

Thesis Title	Biodiversity of Saprobic Fungi on Woody Litter	
Author	Miss Rampai Kodsueb	
Degree	Doctor of Philosophy (Biodiversity and Ethnobiology)	
Thesis Advisory Committee	Prof. Dr. Saisamorn Lumyong	Chairperson
	Prof. Dr. Kevin D. Hyde	Member
	Dr. Eric H.C. McKenzie	Member

ABSTRACT

This thesis investigates aspects of the ecology and biodiversity of saprobic fungi found on dead wood of three magnoliaceous plants, *Magnolia liliifera*, *Manglietia garrettii* and *Michelia baillonii*. In addition, the molecular systematic of selected fungal groups growing on dead wood was studied. The project was initiated in Doi Suthep-Pui National Park, Chiang Mai Province, northern Thailand.

Chapter 1 provides a general introduction to fungal biodiversity and an outline for subsequent chapters. The second chapter reviews recent advances in fungal biology, fungal ecology, fungal taxonomy and molecular systematics.

In Chapter 3, the biodiversity of fungi found on woody litter of three genera of plants in the family Magnoliaceae is reported and the communities are compared. Saprobic fungi were investigated from 150 samples of decaying woody litter of *Mag. liliifera*, *Man. garrettii* and *Mic. baillonii*. Two-hundred and thirty-nine fungi were identified comprising 92 ascomycetes, 4 basidiomycetes and 143 anamorphic fungi.

Corynespora cassiicola (60% frequency of occurrence) was the most common taxon found on *Mag. liliifera* samples. *Ellisembia opaca* and *Phaeoisaria clematidis* with 27.5% frequency of occurrence were the dominant species from *Man. garrettii*, while *Annellophora phoenicis* and *Ellisembia adscendens* (18%) were the most commonly encountered species from *Mic. baillonii*. Distinct fungal communities were found on samples of the three tree species. In terms of the numbers of taxa recovered, fungi were more diverse on *Mic. baillonii* than on the other two genera, although the common genera of fungi obtained from woody litter of each host were similar. Seasonal effect on the fungal communities was investigated. Dry season samples supported a significantly more diverse fungal community than samples from the wet season. Relatively a few species of woody fungi recorded in this study had been previously recorded from wood samples by other researchers.

The new and interesting fungi obtained from this study are reported in Chapter 4. Six new taxa are identified in this study; *Acrodictyis micheliae* sp. nov., *Aquaticheirospora lignicola* gen. et sp. nov., *Catenosynnema micheliae* gen. et sp. nov., *Dictyosporium manglietiae* sp. nov., *Oedemium micheliae* sp. nov. and *Tubeufia claspisphaeria* sp. nov., and are formally described and illustrated in Chapter 4. Chapter 4 also includes descriptions and illustrations of another nine interesting fungi, most of them are ascomycetes. They are compared with similar taxa.

The fifth chapter reports studies on the changes of fungal communities found during the decay of woody litter of *Mag. liliifera*, over a 29-month period. Both naturally occurring wood samples from the forest floor and bait samples, placed on the ground, were studied. Pioneer, mature and impoverished successional stages comprising distinct fungal communities were observed. A total of 163 sporulating

taxa were recorded (114 anamorphic taxa, 46 ascomycetes and 3 basidiomycetes). The observed fungal diversity was high when compared to other studies. Number of fungi per wood on naturally occurring samples was higher than on bait samples and overlap of species was low. The number of fungal species was highest during the mature stage of the fungal succession. Anamorphic fungi were the dominant group on wood baits throughout the experiment. *Lasiodiplodia theobromae* and *Nectria coccinea* were regular inhabitants on the wood and were found up to 10 sampling times. *Canalisporium pallidum*, *Dactylaria hyalina*, *L. theobromae*, *N. coccinea* and *Xylaria carpophila* dominated the fungal communities during the various stages of the decomposition process. *Chloridium botryoideum*, *D. hyalina*, *N. coccinea*, *Volutella ramkumarii* and *X. carpophila* were common overlapping species identified at all three stages of succession.

Chapter 6 reports investigations of the fungal communities on *Magnolia liliifera* wood from freshwater and adjacent riparian habitats. Thirty-seven species of saprobic fungi were discovered from 50 bait samples of wood submerged in the stream, comprising 13 (35%) ascomycetes and 24 (65%) anamorphic fungi. Fungi obtained from submerged baits were compared with those found on wood of *Mag. liliifera* in terrestrial habitats (both naturally terrestrial and terrestrial bait). Results from 3D-correspondence and cluster analyses show that the fungal communities on wood in freshwater are distinct from those in terrestrial habitats. Seventeen species of fungi overlapped between freshwater and terrestrial habitats, but only 5 out of 234 species overlapped between all habitats (freshwater, natural terrestrial and terrestrial bait). *Corynespora cassiicola* (60% frequency of occurrence) was the most common taxon found on natural terrestrial samples, while *Lasiodiplodia theobromae* (42.9%

frequency of occurrence) was the dominant species from terrestrial bait. *Candelabrum brocciatum* (20%) was the most common species from submerged baits. The common genera of fungi obtained from submerged baits similar to those reported on other submerged wood.

Evolutionary relationships within the fungal family Pleosporaceae were investigated by DNA sequence analyses from LSU rDNA gene under Maximum Parsimony, Likelihood and Bayesian criteria (Chapter 7). Pleosporaceous species are commonly found on leaves and stems. Phylogenies revealed that *Cochliobolus* can be broadly segregated into two groups as previously proposed, and *Pleospora* is polyphyletic in its current sense. Taxa with *Stemphylium* anamorphs are closely related to *Cochliobolus* and fit within the Pleosporaceae, although the affinities of *Pleospora herbarum* and *P. ambigua* are obscure. The genus *Pyrenophora* constitutes a monophyletic group within the Pleosporaceae, whereas *Leptosphaerulina* and *Macroventuria* appear to share phylogenetic affinities to the Leptosphaeriaceae and Phaeosphaeriaceae. Phylogenies indicate that *Wettsteinina* should be excluded from the Pleosporaceae. Similar findings are reported for *Kirschsteiniothelia*, which is probably polyphyletic. Anamorphic characters appear to be significant (especially in *Cochliobolus*) while ascospore morphologies, such as shape and color, and substrate occurrence, are poor predictors of phylogenetic relationships among these loculoascomycetes.

In Chapter 8, nucleotide sequences from 28S rDNA from different taxa of the Tubeufiaceae and allied families were analysed under different optimality criteria (Maximum Parsimony, Likelihood and Bayesian) to assess phylogenetic relationships. Tubeufia species are commonly found on rotten wood. Phylogenies obtained using

different tree construction methods yielded essentially similar topologies. Results from the molecular data do not correspond to established morphological schemes. Characters such as color of ascomata, shape of ascospores, and anamorphic taxa, do not appear to be significant in delineating several genera within the Tubeufiaceae. At the familial level, Tubeufiaceae does not appear to be restricted to those bitunicate fungi characterised by superficial, white or pallid to bright ascomata and filiform ascospores. In addition, phylogenies also indicate that Tubeufiaceae is more closely related to the Venturiaceae, and therefore its current taxonomic placement within the order Pleosporales is justified. Results also indicate that *Acanthostigma*, *Boerlagiomyces* and *Letendraea* are phylogenetically unrelated to other members of the Tubeufiaceae and should be excluded from Tubeufiaceae. In this study, the family Tubeufiaceae is redefined based on existing morphological information and phylogenies.

The final chapter (Chapter 9) summarizes the implications of the findings and gives suggestions concerning useful avenues for future study.

Key words: Lignicolous fungi, *Magnoliaceae*, *Magnolia liliifera*, *Manglietia garrettii*, *Michelia baillonii*, saprobes

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์	ความหลากหลายทางชีวภาพของราแซฟโพรบในซากไม้เนื้อแข็ง	
ผู้เขียน	นางสาวรำไพ โกฏลีบ	
ปริญญา	วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต (ความหลากหลายทางชีวภาพและชีววิทยาชาติพันธุ์)	
คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	ศ.ดร. สายสมร ถ้ายอง Prof. Dr. Kevin D. Hyde Dr. Eric H.C. McKenzie	ประธานกรรมการ กรรมการ กรรมการ

บทคัดย่อ

วิทยานิพนธ์เล่มนี้มีจุดมุ่งหมายเพื่อสำรวจนิเวศวิทยาและความหลากหลายทางชีวภาพของราแซฟโพรบที่เจริญบนซากไม้เนื้อแข็งของพืชวงศ์จำปี (Magnoliaceae) สามชนิด คือ มณฑาขาว (*Magnolia liliifera*) มณฑาแดง (*Manglietia garrettii*) และจำปีป่า (*Michelia baillonii*) ในอุทยานแห่งชาติดอยสุเทพ-ปุย จังหวัดเชียงใหม่ ภาคเหนือ ประเทศไทย นอกจากนี้ยังได้ศึกษาระบบการจัดจำแนกเชื้อราบางชนิดที่เจริญบนซากไม้เนื้อแข็ง โดยใช้เทคนิคทางอนุชีววิทยา

บทที่หนึ่งแสดงข้อมูลโดยทั่วไปเกี่ยวกับความหลากหลายทางชีวภาพของเชื้อราและร่างเค้าโครงของวิทยานิพนธ์ บทที่สองเป็นการทบทวนเอกสารเกี่ยวกับข้อมูลด้านชีววิทยาของเชื้อรา นิเวศวิทยาของเชื้อรา การจัดแบ่งกลุ่มของเชื้อราและระบบการจัดจำแนกระดับโมเลกุล

บทที่สามเป็นการศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพและเปรียบเทียบกลุ่มของราแซฟโพรบจากซากกิ่งไม้ ในพืชวงศ์จำปีทั้ง 3 ชนิด จากไม้ทั้งหมด 150 ตัวอย่าง สามารถบ่งบอกชนิดเชื้อราได้ 239 สปีชีส์ ประกอบด้วย ascomycetes 92 ชนิด basidiomycetes 4 ชนิด และกลุ่มที่สืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ 143 ชนิด โดย *Corynespora cassiicola* เป็นราแซฟโพรบชนิดที่พบมากที่สุด在不มณฑาขาว (60%) ส่วน *Ellisembia opaca* และ *Phaeoisaria clematidis* (27.5%) พบมากที่สุด在不มณฑาแดง ในขณะที่ *Annellophora phoenicis* และ *Ellisembia adscendens* เป็นราแซฟโพรบที่พบมากที่สุด (18%) ในจำปีป่า นอกจากนี้พบว่าลักษณะกลุ่มสังคมของราแซฟโพรบมีความแตกต่างกันบน

บทที่สี่เป็นการรายงานราแซพ โพรบชนิดใหม่และราแซพ โพรบชนิดที่น่าสนใจที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ พบราแซพ โพรบชนิดใหม่ทั้งหมดจำนวน 6 ชนิดคือ *Acrodictys micheliae* sp. nov., *Aquaticheirospora lignicola* gen. et sp. nov., *Catenosynnema micheliae* gen. et sp. nov., *Dictyosporium manglietiae*, *Oedemium micheliae* sp. nov. และ *Tubeufia claspisphaeria* sp. nov. ในบทนี้ยังได้รวบรวมราแซพ โพรบที่น่าสนใจอีกเก้าชนิด โดยส่วนใหญ่เป็นราในกลุ่ม ascomycetes ซึ่งได้บรรยายลักษณะและแสดงรูปภาพประกอบรวมทั้งบรรยายเปรียบเทียบกับเชื้อชนิดอื่นที่มีลักษณะใกล้เคียงกัน

บทที่ห้าเป็นการศึกษาการเปลี่ยนแปลงแทนที่ของเชื้อราแซพ โพรบที่เจริญบนกิ่งมณฑาขาว ทั้งจากกิ่งที่ร่วงหล่นตามธรรมชาติและ bait ที่เก็บมาจากบริเวณอุทยานแห่งชาติดอยสุเทพ-ปุย โดยทำการตรวจหาเชื้อราเป็นช่วงๆ ตามระยะเวลาที่กำหนด ตลอดช่วงระยะเวลาการย่อยสลายของกิ่งไม้เป็นเวลา 29 เดือน พบว่ากลุ่มเชื้อราที่เจริญได้ในแต่ละช่วงของการย่อยสลายมีความแตกต่างกัน แบ่งออกได้เป็นสามกลุ่มคือ กลุ่มผู้บุกเบิก (pioneer) กลุ่มเจริญวัย (mature) และกลุ่มที่ลดน้อยลง (impoverished) ราแซพ โพรบที่พบในการศึกษานี้มีทั้งหมด 163 ชนิด ประกอบด้วย 3 กลุ่ม คือกลุ่ม ascomycetes 46 ชนิด กลุ่ม basidiomycetes 3 ชนิด และกลุ่มที่สืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ 114 ชนิด การศึกษานี้มีความหลากหลายของเชื้อราสูงเมื่อเทียบกับการศึกษาอื่นที่คล้ายกัน โดยพบจำนวนชนิดของเชื้อรามากที่สุดในระยะ mature stage ราในกลุ่มที่สืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศเป็นกลุ่มที่พบมากที่สุดในทุกระยะของการย่อยสลาย ราที่พบว่ามีเชื้อราเจริญเกือบทุกระยะของการย่อยสลายคือ *Lasiodiplodia theobromae* และ *Nectria coccinea* สำหรับเชื้อราในกลุ่มที่พบบนตัวอย่างมากที่สุดระหว่างการย่อยสลายได้แก่ *Canalisporium pallidum*, *Dactylaria hyalina*, *L. theobromae*, *N. coccinea* และ *Xylaria carpophila* ในขณะที่ *Chloridium botryoideum*, *D. hyalina*, *N. coccinea*, *Volutella ramkumarii* และ *X. carpophila* เป็นเชื้อราที่พบทั้งสามระยะของการย่อยสลาย การเปรียบเทียบความหลากหลายของเชื้อราที่พบบนไม้ตัวอย่างที่ทำการศึกษการย่อยสลายกับไม้ใน

ในบทที่หก ทำการศึกษาเปรียบเทียบเชื้อราบนไม้มณฑาขาวที่แช่ในน้ำ (submerged bait) และที่อยู่บนบก (ไม้ที่พบในธรรมชาติและไม้ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาการเปลี่ยนแปลงแทนที่) ผลการศึกษาพบเชื้อราจำนวน 37 ชนิด จากตัวอย่างไม้ที่แช่ในน้ำ 50 ตัวอย่าง ประกอบด้วย ascomycetes 13 ชนิด (35%) และรากลุ่มที่สืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ 24 ชนิด (65%) เมื่อเปรียบเทียบเชื้อราที่ได้จากไม้แช่ในน้ำกับไม้บนบก โดยใช้การวิเคราะห์ 3D-correspondence และ cluster พบว่าระบบสังคมของเชื้อราจากไม้ทั้งสองแหล่งมีความแตกต่างกัน มีเชื้อราจำนวน 17 สปีชีส์ ที่พบบนไม้ทั้งบนบกและแช่ในน้ำ และมีเพียง 5 สปีชีส์ ที่ตรวจพบบนไม้ทั้งสามประเภท *Corynespora cassicola* (60%) เป็นเชื้อที่พบมากที่สุด ในไม้ที่พบในธรรมชาติ *Lasiodiplodia theobromae* (42.9%) พบมากที่สุดบนไม้ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาการเปลี่ยนแปลงแทนที่ ขณะที่ *Candelabrum brocciatum* (20%) เป็นเชื้อที่พบมากที่สุด ในไม้มณฑาขาวที่แช่ในน้ำ นอกจากนี้พบว่าเชื้อราจากไม้มณฑาขาวที่แช่ในน้ำมีความคล้ายคลึงกับเชื้อราจากที่พบบนไม้ชนิดอื่น ๆ ที่แช่ในน้ำ

บทที่เจ็ดเป็นการศึกษาวิเคราะห์เพื่อเปรียบเทียบความสัมพันธ์ระดับพันธุกรรมของเชื้อราสปีชีส์ต่างๆ ในวงศ์ Pleosporaceae จากลำดับเบสบางส่วนของ LSU แล้ววิเคราะห์หาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการด้วยวิธี bayesian, likelihood และ parsimony พบว่าเชื้อราในสกุล *Cochliobolus* สามารถแยกออกได้เป็นสองกลุ่มกว้าง ๆ สอดคล้องกับที่เคยมีรายงานมาก่อน ขณะที่เชื้อสกุล *Pleospora* นั้นมีความเป็น polyphyletic เชื้อราที่มีระยะสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศเป็น *Stemphylium* พบว่ามีความใกล้เคียงทางพันธุกรรมกับ *Cochliobolus* และควรจัดอยู่ในวงศ์ Pleosporaceae ความสัมพันธ์ระดับพันธุกรรมของ *Pleospora herbarum* กับ *Pleospora ambigua* ยังคงไม่สามารถระบุได้แน่ชัดจากการวิเคราะห์นี้ สำหรับ *Pyrenophora* มีความเป็น monophyletic และสามารถจัดกลุ่มให้อยู่ในวงศ์ Pleosporaceae ในขณะที่ *Leptosphaerulina* และ *Macroventuria* กลับพบมีความใกล้เคียงกับเชื้อราวงศ์ Leptosphaeriaceae และ Phaeosphaeriaceae นอกจากนี้การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระดับพันธุกรรมชี้ชัดว่าเชื้อราสกุล *Wettsteinina* ซึ่งเคยจัดให้อยู่ในวงศ์ Pleosporaceae มาก่อน มีความแตกต่างทางพันธุกรรมกับเชื้ออื่น ๆ ในวงศ์เดียวกัน จึงควรจัดเชื้อราสกุล *Wettsteinina* ให้อยู่นอกวงศ์ Pleosporaceae สำหรับเชื้อสกุล *Kirschsteiniethelia* ความแตกต่างที่ได้จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระดับพันธุกรรมน่าจะเกิดจากความเป็น polyphyletic ของตัวเชื้อเอง จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าความสัมพันธ์ระหว่างเชื้อที่มีการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศและแบบไม่อาศัยเพศเป็นลักษณะที่มีความสำคัญในการจัดกลุ่มเชื้อ (โดยเฉพาะเชื้อในสกุล *Cochliobolus*)

บทที่แปดศึกษาวิเคราะห์เพื่อเปรียบเทียบความสัมพันธ์ระดับพันธุกรรมของเชื้อราสปีชีส์ต่างๆ ในวงศ์ Tubeufiaceae จากลำดับเบสบางส่วนของ 28S rDNA โดยใช้วิธีต่าง ๆ คือ Bayesian, Likelihood และ Parsimony พบว่าผลการวิเคราะห์โดยใช้หลักการสร้าง phylogeny tree ที่แตกต่างกัน แสดงผล phylogeny tree ที่มีลักษณะคล้ายกัน โดยพบว่าลักษณะความสัมพันธ์ระดับพันธุกรรมไม่สอดคล้องกับลักษณะทางสัณฐานที่ใช้ในการจัดจำแนกเชื้อมาก่อน ลักษณะบางอย่างเช่นสีของแอสโคมาตา รูปร่างของแอสโคสปอร์ ตลอดจนเชื้อราในระหว่างการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ พบว่าไม่มีผลในการจำแนกเชื้อระดับสกุลของเชื้อในวงศ์ Tubeufiaceae การพิจารณาลักษณะของเชื้อในระดับวงศ์พบว่าเชื้อราในวงศ์นี้ไม่ถูกจำกัดความตามลักษณะของเชื้อ bitunicate ที่มีแอสโคมาตาแบบ superficial ซึ่งมีสีขาวจนถึงสีอ่อนกระทั่งสีสว่างเข้ม และแอสโคสปอร์แบบ filiform ผลการศึกษาพบว่าความสัมพันธ์ระดับพันธุกรรมของเชื้อในวงศ์นี้มีความคล้ายคลึงกับเชื้อในวงศ์ Venturiaceae ซึ่งผลดังกล่าวสามารถยืนยันและสรุปการจัดจำแนกของเชื้อในวงศ์ Tubeufiaceae ว่าอยู่ในอันดับ Pleosporales จริง นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อราสกุล *Acanthostigma*, *Boerlagiomyces* และ *Letendreaa* ไม่มีความใกล้เคียงระดับพันธุกรรมกับเชื้ออื่น ๆ ในวงศ์ Tubeufiaceae และควรจัดให้อยู่ภายนอกวงศ์นี้

ในบทที่เก้า เป็นการสรุปความเกี่ยวข้องสัมพันธ์กันของผลที่ได้จากการศึกษาทั้งหมด และให้ข้อเสนอแนะเกี่ยวกับข้อมูลที่น่าจะเป็นประโยชน์ต่อการศึกษารองอื่น ๆ ในอนาคต

คำสำคัญ: ราที่ย่อยสลายลิกนิน, พืชวงศ์จำปี, มณฑาขาว, มณฑาแดง, จำปีป่า, ราแซฟโพรบ