Thesis Title	Biodiversity and Secondary Metabolites of Actinomycetes Associated with Eaglewood (*Aquilaria crassna*)
Author	Mr. Pongrawee Nimnoi
Degree	Doctor of Philosophy (Applied Microbiology)
Thesis Advisory Committee	Prof. Dr. Saisamorn Lumyong — Advisor Prof. Dr. Hartmut Laatsch — Co-advisor Dr. Wasu Pathom-aree — Co-advisor

ABSTRACT

The aims of this study were to isolate, identify and investigate on the diversity and community of endophytic as well as rhizospheric actinomycetes associated with *Aquilaria crassna* (Eaglewood). The healthy leaf, shoot and root tissues as well as rhizosphere soils of eaglewood were collected from the plantations in Phetchabun province, Nakhonnayok province, Rayong province and Chiang Mai province of Thailand. A total of 10 endophytic actinomycete isolates were successfully isolated from healthy shoots and roots of this plant. According to morphological and chemotaxonomic characterization as well as molecular identification, these isolates belonged to members of the genera *Actinomadura* (1 isolate), *Kibdelosporangium* (1

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

isolate), *Nocardia* (3 isolates), *Nonomuraea* (2 isolates), *Pseudonocardia* (1 isolate) and *Streptomyces* (2 isolates). Genetic relatedness amongst these isolates was determined based on Random amplified polymorphic DNA (RAPD) and Enterobacterial repetitive intergenic consensus polymerase chain reaction (ERIC PCR). The results of RAPD and ERIC PCR revealed that all of tested isolates generated specific patterns corresponding to particular genotypes and 2 isolates in genus *Nocardia* should be classified as the same strain. In this study 2 strains of endophytic actinomycetes were proposed as the new species. The first strain was *Nonomuraea endophytica* sp. nov. strain S3310 and the second strain was *Kibdelosporangium thailandensis* sp. nov. strain S4312. Moreover, PCR-denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) of 16S rRNA gene was used to determine the diversity and community of endophytic actinomycetes distributed within the roots of eaglewood. Nested-PCR was used to specifically amplify all actinobacterial groups. PCR DGGE analysis confirmed the presence of endophytic actinomycetes in genera *Actinomadura*, *Kibdelosporangium*, *Nocardia*, *Pseudonocardia* and *Streptomyces* within the roots of eaglewood from Phetchabun province. Actinomycetes in genera *Actinomadura*, *Nocardia*, *Nonomuraea* and *Pseudonocardia* inhabited abundantly in the roots of eaglewood from Nakhonnayok province. The UPGMA dendrogram generated from DGGE profiles indicated that different planted locations resulted in different endophytic actinomycetes communities within the roots of plant.

For analysis of actinobacterial community in rhizospheres of eaglewood, total genomic DNA and RNA were extracted. PCR DGGE of 16S rRNA gene was employed. The UPGMA dendrogram generated from DGGE fingerprints showed that the actinobacterial community was separated corresponding to sampling sites,

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

suggesting sampling sites effect. The shift in community and diversity between dry and rainy seasons was detected in all sampling sites. RNA-based analyses showed that several actinobacterial groups appeared to be ubiquitous but different in metabolic activity in different environments. At all sampling sites, species diversity was increased in rainy season. Cloning and sequencing of 16S rRNA gene fragments obtained from DGGE bands revealed that 14 of 40 dominant species of actinobacteria in the rhizospheres of this plant belonged to the uncultured actinobacteria. Besides the uncultured actinobacteria, *Nocardioides* sp., *Streptomyces* sp., *Mycobacterium* sp., *Rhodococcus* sp. and *Actinoplanes* sp. were identified and found more frequently than other genera. Furthermore, plant growth promoters production by these endophytic actinobacteria were evaluated. All actinomycete strains produced the amount of indole-3-acetic acid (IAA) and ammonia ranging between 9.85±0.31 to 15.14±0.22 µg ml^{-1} and 2 to 60 mg ml^{-1}, respectively. Among 9 strains tested, the amount of hydroxamate-type siderophore produced by *Non. rubra* strain S3304 and *Non. endophytica* sp. nov. strain S3310 was undetectable. While the remaining 7 strains produced hydroxamate-type siderophore ranged between 3.21±0.12 to 39.30±0.40 µg ml^{-1}. Also, catechols-type siderophore produced by 8 strains was undetectable. *A. glauciflava* strain S4215 is the only isolate that produced catechols-type (4.12±0.90 µg ml^{-1}). For determination on the potential of the endophytic actinomycetes and *Bradyrhizobium japonicum* strain USDA110 used as co-inoculums to enhance the growth, the nodulation and the improvement on plant nutrient levels of soybean. All co-inoculation treatments increased root and shoot dry weight of soybean. Co-inoculation of USDA110 with *Noc. alba* strain S4301 conferred the maximum yield of root (94.33 ± 19.50 mg $plant^{-1}$) and shoot (493.00 ± 34.22 mg $plant^{-1}$) dry weight,

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

followed by *Non. rubra* strain S3304. Moreover, co-inoculations of USDA 110 with each of *Non. rubra* strain S3304, *S. javensis* strain S4202 and *Noc. alba* strain S4301 increased nodule number of soybean, respectively. Co-inoculations of USDA110 with each of *Non. rubra* strain S3304, *A. glauciflava* strain S4215 and *Noc. alba* strain S4301 increased nitrogen fixation by 1.7 to 2.7-fold as compared with the control inoculated only with USDA110. All of co-inoculation treatments used in this study significantly increased the nutrient levels of N, P, K, Ca, Mg, Fe and Zn in soybean plant.

To study on secondary metabolites production, 9 endophytic actinomycete strains were evaluated for their antifungal activity towards 3 plant pathogenic fungi. *S. javensis* strain S4202 and *A. glauciflava* strain S4215 exhibited the highest activity against the growth of *Exserohilum* sp., followed by *Curvularia* sp. and *Fusarium oxysporum*. Therefore, they were selected to characterize there metabolites in parallel with 2 new species. After purification and structure elucidation of compounds, we obtained 7 compounds from 4 endophytic actinomycetes. Two compounds, indol-3-carboxylic acid and 4-methylorcinol were obtained from *S. javensis* strain S4202. *A. glauciflava* strain S4215 produced indole-3-acetic acid and 5,7-dihydroxy-2-isopropylchromon as some of its metabolites. One of the new species, *K. thailandensis* sp. nov. strain S4312 produced 2,6-dihydroxyacetophenone and indole-3-acetic acid. The metabolite, *p*-hydroxyphenylethyl alcohol was isolated from *Non. endophytica* sp. nov. strain S3310.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Keywords: Endophytic actinomycetes, Rhizosphereic actinomycetes, Secondary metabolites, DGGE, Co-inoculation, *Aquilaria crassna*, Eaglewood

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์	ความหลากหลายทางชีวภาพและเมแทโบไลต์ทุติยภูมิของแอกติโนไมซีสต์ที่เกี่ยวข้องกับกฤษณา	
ผู้เขียน	นายพงศ์ระวี นิ่มน้อย	
ปริญญา	วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต (จุลชีววิทยาประยุกต์)	
คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	ศ. ดร. สายสมร ลำยอง	อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
	Prof. Dr. Hartmut Laatsch	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
	อ. ดร. วสุ ปฐมอารีย์	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

บทคัดย่อ

การวิจัยนี้มีจุดประสงค์หลัก เพื่อศึกษาความหลายหลายทางชีวภาพ และศึกษารูปแบบสังคมของแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ รวมถึงแอกติโนไมซีสต์ที่เจริญอย่างอิสระอยู่ในดินรอบรากกฤษณา ในการทดลองครั้งนี้ได้เก็บตัวอย่างราก กิ่งและใบ ที่ปราศจากอาการของโรคพืช รวมถึงดินรอบราก จากจังหวัดเพชรบูรณ์ นครนายก ระยอง และจังหวัดเชียงใหม่ การทดลองแยกเชื้อจากตัวอย่างชิ้นพืช พบแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟท์ จำนวน 10 ไอโซเลท จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา องค์ประกอบทางเคมีของเซลล์ และยีนส่วน 16S rRNA สามารถจัดจำแนกแอกติโนมัยซีสต์ได้ 6 จีนัส ซึ่งประกอบด้วย จีนัส *Nocardia* 3 ไอโซเลท จีนัส *Nonomuraea* 2 ไอโซเลท จีนัส *Streptomyces* 2 ไอโซเลท นอกจากนี้ในจีนัส *Actinomadura Kibdelosporangium* และ *Pseudonocardia* พบจีนัสละ 1 ไอโซเลท จากการประยุกต์ใช้เทคนิคทางอนูชีววิทยา Random amplified polymorphic DNA (RAPD) และ Enterobacterial repetitive intergenic consensus polymerase chain reaction (ERIC PCR) มาศึกษาอัตลักษณ์รอยพิมพ์ DNA ของแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ พบว่าแต่ละไอโซเลทมีความแตกต่างเฉพาะตัวของอัตลักษณ์รอยพิมพ์ DNA อีกทั้งยังพบว่า 2 ไอโซเลทในจีนัส *Nocardia* มีรอยพิมพ์ DNA ที่เหมือนกัน จึงสามารถจำแนกอยู่ในสายพันธุ์เดียวกันได้ ทั้งนี้ในการทดลองยังพบแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์สายพันธุ์ใหม่ 2 สายพันธุ์ ได้แก่ *Nonomuraea endophytica* sp. nov. S3310 และ *Kibdelosporangium thailandensis* sp. nov. S4312 และจากการใช้เทคนิคทางอนูชีววิทยาขั้นสูง PCR Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) เพื่อยืนยันการมีอยู่ของแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ในรากกฤษณา และเพื่อศึกษารูปแบบสังคมของแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ พบว่า แอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ในจีนัส *Actinomadura*

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Kibdelosporangium Nocardia Pseudonocardia และจีนัส *Streptomyces* อาศัยอยู่ภายในรากของกฤษณาที่เก็บจากจังหวัดเพชรบูรณ์ และพบแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ในจีนัส *Actinomadura Nocardia Nonomuraea* และจีนัส *Pseudonocardia* อาศัยอยู่ภายในรากของกฤษณาที่เก็บจากจังหวัดนครนายก จากการสร้างกราฟแผนภาพความสัมพันธ์ชุดรูปแบบ DNA ของเทคนิค DGGE พบว่าแหล่งปลูกมีผลต่อการกำหนดชนิดและรูปแบบสังคมของแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ในรากกฤษณา

นอกจากนั้นการวิจัยครั้งนี้ยังได้ทำการศึกษาความหลายหลายทางชีวภาพ และรูปแบบสังคมของแอกติโนไมซีสต์ที่เจริญอย่างอิสระอยู่ในดินรอบรากกฤษณาโดยเทคนิค PCR DGGE ดังข้างต้นพบว่า คุณสมบัติของดินปลูกและสภาวะแวดล้อมของแหล่งปลูกเป็นปัจจัยหลักที่กำหนดความหลายหลายทางชีวภาพ และรูปแบบสังคมของแอกติโนไมซีสต์ที่เจริญอย่างอิสระอยู่ในดินรอบรากกฤษณา ทั้งนี้ยังพบความแตกต่างอย่างชัดเจนของจำนวนประชากรและรูปแบบสังคมแอกติโนไมซีสต์ในดินระหว่างฤดูแล้งและฤดูฝน โดยดินในฤดูฝนจะพบกิจกรรมของแอกติโนไมซีสต์สูงกว่าดินในฤดูแล้ง จากการโคลนนิ่งและการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนส่วน 16S rRNA พบว่าแอกติโนไมซีสต์ที่เจริญอิสระอยู่ในดินรอบรากกฤษณาส่วนใหญ่ยังไม่สามารถระบุชนิดได้ ส่วนสายพันธุ์ที่พบมากและระบุชนิดได้ ได้แก่ *Nocardioides* sp. *Streptomyces* sp. *Mycobacterium* sp. *Rhodococcus* sp. และ *Actinoplanes* sp. ตามลำดับ

จากการศึกษาความสามารถของแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ในการสร้างสารที่มีฤทธิ์ต่อการส่งเสริมการเจริญของพืชพบว่า ทุกสายพันธุ์มีความสามารถในการสร้างฮอร์โมน อินโดล-3-อะซิติก แอซิก (IAA) ได้โดยมีค่าระหว่าง 9.85±0.31 ถึง 15.14±0.22 $\mu g\ ml^{-1}$ อีกทั้งยังสามารถสร้างแอมโมเนียได้มีค่าระหว่าง 2 ถึง 60 $mg\ ml^{-1}$ แอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ทุกสายพันธุ์ยกเว้น *Non. rubra* S3304 และ *Non. endophytica* sp. nov. S3310 สร้างสารไซเดอโรฟอร์ชนิด ฮายดอกซ์ซาเมท ได้ มีค่าระหว่าง 3.21±0.12 ถึง 39.30±0.40 $\mu g\ ml^{-1}$ ส่วน *A. glauciflava* S4215 เป็นสายพันธุ์เดียวที่สามารถสร้างสารไซเดอโรฟอร์ชนิดแคททิค่อลได้ มีค่า 4.12±0.90 $\mu g\ ml^{-1}$ และจากการทดลองใช้แอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์เป็นเชื้อปลูกร่วมกับ *Bradyrhizobium japonicum* USDA110 ในการส่งเสริมการเจริญและการเกิดปมของต้นถั่วเหลือง พบว่าในทุกการปลูกเชื้อร่วมสามารถเพิ่มน้ำหนักแห้งต้นและรากของถั่วเหลืองได้ เชื้อปลูกร่วมระหว่าง *Noc. alba* S4301 กับ USDA110 ให้น้ำหนักแห้งต้นและรากสูงที่สุด ตามด้วย *Non. rubra* S3304 นอกจากนั้นการปลูกเชื้อร่วมระหว่าง *Non. rubra* S3304 *S. javensis* S4202 และ *Noc. alba* S4301 กับ USDA110 ยังให้ปริมาณปมมากที่สุดตามลำดับ การปลูกเชื้อร่วมระหว่าง *Non. rubra* S3304 *A. glauciflava* S4215 และ *Noc. alba* S4301 กับ USDA110 สามารถเพิ่มอัตราการตรึงไนโตรเจนในอากาศต่อต้นต่อชั่วโมงได้สูงขึ้น 1.7 ถึง 2.7

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เท่าเมื่อเปรียบเทียบกับการปลูกเชื้อ USDA110 เพียงอย่างเดียว และเมื่อทำการวิเคราะห์ธาตุอาหารในต้นถั่วเหลืองพบว่า ทุกการปลูกเชื้อร่วมสามารถเพิ่มธาตุ ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส โพแทสเซี่ยม แคลเซี่ยม แมงกานีส เหล็ก และสังกะสี ให้กับต้นถั่วเหลืองได้

เมื่อนำแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ทั้งหมดมาทดสอบความสามารถในการสร้างสารปฏิชีวนะต้านการเจริญของเชื้อราก่อโรคพืชบางชนิดโดยวิธี dual-culture พบว่าแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ 2 สายพันธุ์คือ *S. javensis* S4202 และ *A. glauciflava* S4215 มีความสามารถในการสร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งการเจริญของเชื้อราทดสอบ *Exserohilum* sp. *Curvularia* sp. และ *Fusarium oxysporum* ได้ เมื่อนำ culture filtrate ที่ได้จากการเลี้ยงแอกติโนไมซีสต์สายพันธุ์ใหม่ *Non. endophytica* sp. nov. S3310 และ *K. thailandensis* sp. nov. S4312 รวมถึงแอกติโนไมซีสต์สายพันธุ์เดิม *S. javensis* S4202 และ *A. glauciflava* S4215 มาสกัดแยกเมแทโบไลต์ทุติยภูมิ และพิสูจน์โครงสร้างซึ่งวิเคราะห์โดยวิธีสเปกโทรสโคปีพบว่า *S. javensis* S4202 สร้างเมแทโบไลต์ที่แยกบริสุทธิ์ได้คือ indol-3-carboxylic acid และ 4-methylorcinol ในส่วนของ *A. glauciflava* S4215 สร้างเมแทโบไลต์ที่แยกบริสุทธิ์ได้คือ indole-3-acetic acid และ 5,7-dihydroxy-2-isopropylchromon สำหรับแอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์สายพันธุ์ใหม่ *Non. endophytica* sp. nov. S3310 สร้างเมแทโบไลต์ที่แยกบริสุทธิ์ได้คือ *p*-hydroxyphenylethyl alcohol และ *K. thailandensis* sp. nov. S4312 สร้าง 2,6-dihydroxyacetophenone และ indole-3-acetic acid เป็นเมแทโบไลต์ทุติยภูมิ

คำสำคัญ: แอกติโนไมซีสต์เอนโดไฟต์ แอกติโนไมซีสต์ ดินรอบราก เมแทโบไลต์ทุติยภูมิ
เทคนิคทางอนูชีววิทยา DGGE กฤษณา

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved