

Thesis Title	Survey and Isolation of Endophytic and Saprobiic Fungi of Wild Banana in Doi Suthep–Pui National Park	
Author	Miss Wipornpan Photita	
Ph.D.	Biology	
Examining Committee	Assoc. Prof. Dr. Saisamorn Lumyong	Chairman
	Assoc. Prof. Dr. Somboon Anuntalabhochai	Member
	Dr. Uraporn Sardsud	Member
	Prof. Dr. E.B. Gareth Jones	Member
	Prof. Dr. Kevin D. Hyde	Member

ABSTRACT

Most studies on banana fungi have focused on taxonomy of saprobes and pathogens. A few work has been studied on endophytic fungi. Fungi from *Musa acuminata* has been studied in Thailand including endophytic, pathogenic and saprobic fungi.

Endophytic fungi were isolated from 7500 samples of wild *Musa acuminata* collected from five sites at Doi Suthep Pui National Park, Thailand during December 1998 to July 2000. Overall colonization rates (CR) from surface sterilized tissues were 56.5 %, 48.9 %, 48 %, 47.9 % and 41.7 % for Medicinal plant garden, Ban Suthep, Queen Sirikit Botanic Garden, San Gu and Montatarn waterfall sites

respectively. Sixty-one different fungal taxa were isolated. *Colletotrichum gloeosporioides*, *C. musae*, *Guignardia cocoicola*, various mycelia sterilia and xylariaceous spp. were common at all sites. The endophyte fungal communities at the five sites were found to differ. Fewer isolates were recovered from younger than older samples. Xylariaceous taxa and *Guignardia cocoicola* were the most frequently isolated endophytes from leaves and were either absent or rare in midrib, petiole and pseudostem. *Colletotrichum* species were most common in the midribs and petioles at all sites, while *Pyriculariopsis parasitica* and *Dactylaria* sp. were most common in the pseudostem.

Saprobic fungi associated with dead tissue of *Musa acuminata* from five sites at Doi Suthep Pui National Park, Thailand were investigated. Nine hundred collections of decaying *Musa* were examined and 80 fungal species were identified, comprising 7 ascomycetes, 2 basidiomycetes and 71 anamorphic fungi (4 coelomycetes and 67 hyphomycetes). The most commonly encountered species were *Periconia digitata*, *Verticillium tenuissimum*, *Memnoniella subsimplex* and *Pseudobotrytis terrestris*, which were represented by 32%, 19%, 15% and 14% of the total collections, respectively. The site of collection did not significantly affect fungal species composition. However, the fungal communities on leaves were markedly different from those on petioles and pseudostems.

Fourteen banana diseases were surveyed and collected from banana plantain and forest in northern Thailand (Chiang Mai, Chiang Rai, Mae Hong Son and Lampang provinces). Banana pathogens were tested for pathogenicity, while fungi isolated as endophytes from wild banana (*Musa acuminata*) were tested in order to ascertain whether the endophytic taxa were capable of causing disease symptoms in

healthy banana leaves. The endophytes *Cladosporium musae*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Cordana musae*, *Deightoniella torulosa*, *Guignardia cocoicola*, *Periconiella musae* and *Pestalotiopsis* sp. were inoculated on banana leaves *in vitro* to test their pathogenicity. Only *Deightoniella torulosa* was able to cause leaf spots on banana leaves *in vitro*. This result confirms earlier reports that many fungal pathogens may be latent in their host long before the outbreak of disease symptoms.

Two hundred and fifty isolates of endophytic fungi isolated from healthy wild banana were screened for antagonistic ability. A dual culture method was used to establish the ability of endophytic fungi to inhibit growth of banana pathogens. *Colletotrichum musae* and *Fusarium oxysporum* were used as test organisms. The endophytic fungus, *Guignardia cocoicola* CMUBE1415 had highest percent inhibition against *C. musae* (44.9%), and *F. oxysporum* (11.5%).

Eight hundred and twenty strains of endophytic fungi isolated from healthy wild banana were screened for the production of antifungal antibiotics. Four media were used for fermentation. A paper disc agar diffusion assay method was used to check the activity of resulting supernatants. Two strains of *Saccharomyces cerevisiae* strain SS 553 (wild type strain) and strain EC 19 (mutant strain that defective in certain genes required for chitin synthesis) were used as test organisms. The endophyte, *Fusarium* sp. CMUBE1681 fermented on F3, F5 media had the highest activity against strain EC 19.

Thirty-eight isolates of *Colletotrichum* sp. were isolated from banana (*Musa acuminata*), ginger (*Zingiberaceae*), *Eupatorium* sp., and some other tropical plants. All fungal isolates were identified and characterized by morphological and molecular methods. Three groups of *Colletotrichum gloeosporioides*, one group of *C. musae* and

one group of *C. truncatum* were grouped by using morphological characters. The internal transcribed spacers (ITS1 and ITS2) including the 5.8S rDNA were amplified from total DNA with universal primers. The amplified fragments were aligned and sequenced. Five morphological types of *Colletotrichum* spp. were observed. The phylogenetic analyses revealed that most species of *Colletotrichum* nested in *C. gloeosporioides* clade and *C. musae* was close to *C. gloeosporioides*, but *C. truncatum* and *C. acutatum* was positioned apart from the main group. The results of phylogeny compared with morphological data for the *Colletotrichum* grouping strongly suggest that using ITS rDNA sequences are potentially useful in taxonomic distinction to species level studies.

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์	การสำรวจและการแยกเชื้อราเอนโดไฟท์และแซฟโทรบของกล้วยป่า ในอุทยานแห่งชาติคอยสุเทพ-ปุย	
ชื่อผู้เขียน	นางสาววิพรพรรณ โปธิดา	
วิทยาศาสตร์ดุษฎีบัณฑิต	สาขาวิชาชีววิทยา	
คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์	รศ.ดร. สายสมร ล้ายอง	ประธานกรรมการ
	รศ.ดร. สมบูรณ์ อนันตลาโภชัย	กรรมการ
	ดร. อุราภรณ์ สอาดสุด	กรรมการ
	Prof. E.B Gareth Jones	กรรมการ
	Prof. Kevin D. Hyde	กรรมการ

บทคัดย่อ

การศึกษาเชื้อราในกล้วยป่าสายพันธุ์ *Musa acuminata* มีจุดมุ่งเน้นเพื่อศึกษาความหลากหลายของเชื้อราแซฟโทรบ และเชื้อราสาเหตุโรคพืช และศึกษาเพิ่มเติมเล็กน้อยในเรื่องเชื้อราเอนโดไฟท์

ทำการแยกเชื้อราเอนโดไฟท์ จากกล้วยป่า *Musa acuminata* ทั้งหมด 7,500 ตัวอย่าง ซึ่งเก็บตัวอย่างจาก 5 พื้นที่ในอุทยานแห่งชาติคอยสุเทพ-ปุย จังหวัดเชียงใหม่ ประเทศไทย ระหว่างเดือนธันวาคม 2541 ถึง กรกฎาคม 2543 พบ colonization rate ของสวณสมุนไพโร, บ้านสุเทพ, สวณสิริกิติ์, สันกู่ และ มณฑลธาราร คือ 56.5%, 48.9%, 48%, 47.9% และ 41.7% ตามลำดับ พบจำนวนเอนโดไฟท์ 61 ชนิด โดยจะพบเชื้อในตัวอย่างของพืชที่อ่อนมากกว่าพืชที่แก่ ซึ่งชนิดที่พบทั่วไปคือ *Colletotrichum gloeosporioides*, *C. musae*, *Guignardia cocoicola*, *Xylariaceous* sp. เชื้อราในกลุ่มตัวอย่างของ *Xylariaceous* และ *Guignardia cocoicola* จะพบมากที่สุด, เส้นกลางใบ, กาบลำต้น และก้านใบ ส่วน *Colletotrichum* sp. จะพบที่บริเวณเส้นกลางใบและก้านใบ ในขณะที่จะพบ *Pyriculariopsis parasitica* และ *Dactylaria* sp. บริเวณกาบลำต้นเป็นส่วนมาก

ทำการศึกษาเชื้อราแซฟโทรบ จาก 5 แหล่งบริเวณคอยสุเทพ ของกล้วยป่า *Musa acuminata* ทั้งหมด 900 ตัวอย่าง สามารถบ่งบอกชนิดได้ 80 สปีชีส์ ประกอบด้วย 3 กลุ่ม คือ

กลุ่ม ascomycetes 7 ชนิด กลุ่ม basidiomycetes 2 ชนิด และกลุ่มที่สืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ 71 ชนิด (4 coelomycetes และ 67 hyphomycetes) ซึ่งชนิดที่พบมากที่สุดคือ *Periconia digitata* (32%), *Verticillium tenuissimum* (19%), *Memnoniella subsimplex* (15%) และ *Pseudobotrytis terrestris* (14%) จากการศึกษาพบว่าแหล่งที่เก็บไม่มีผลต่อชนิดของเชื้อรา แต่พบว่าจำนวนเชื้อราบนใบมีความแตกต่างจากเชื้อราบนก้านใบและกาบลำต้น

จากการเก็บและรวบรวมตัวอย่างของโรคกล้วยในแปลงปลูกและในป่าเขตภาคเหนือ (เชียงใหม่, เชียงราย, แม่ฮ่องสอน และลำปาง) พบโรคกล้วย 14 โรค หลังจากนั้นนำเชื้อราก่อโรคและเชื้อราเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากกล้วยป่า (*Musa acuminata*) ที่มีรายงานว่าเป็นสาเหตุของโรคกล้วย (*Cladosporium musae*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Cordana musae*, *Deightoniella torulosa*, *Guignardia cocoicola*, *Periconiella musae* และ *Pestalotiopsis* sp.) มาทดสอบความสามารถในการก่อโรคโดยการเพาะเลี้ยงเชื้อบนใบกล้วย จากการทดลองพบว่าเฉพาะเชื้อรา *Deightoniella torulosa* เท่านั้นที่สามารถทำให้เกิดโรคบนใบกล้วยในชุดการทดลองได้ ซึ่งผลการทดลองนี้สามารถยืนยันได้ว่าเชื้อราสาเหตุโรคพืชอาจจะมีระยะแฝงตัวที่ยาวนานก่อนที่จะมีอาการของโรค

นำเชื้อราจำนวน 250 ไอโซเลท มาทำการคัดเลือกเชื้อราที่สามารถผลิตสารต้านเชื้อรา โดยทำการหมักในอาหารเหลว 4 ชนิด และทดสอบ โดยวิธี paper disc agar diffusion เชื้อราทดสอบที่ใช้คือ *Saccharomyces cerevisiae* สายพันธุ์ SS 553 และ สายพันธุ์ EC 19 (สายพันธุ์ที่ทำให้กลายพันธุ์ซึ่งขาดยีนที่ใช้ในการสังเคราะห์ไคติน) จากการทดสอบพบว่าเชื้อรา *Fusarium* sp. CMUBE1681 ที่หมักในอาหาร F3 และ F5 มีความสามารถในการผลิตสารต้านเชื้อราและยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบเฉพาะสายพันธุ์ EC19

เชื้อรา *Colletotrichum* จำนวน 38 ไอโซเลทที่แยกได้จากกล้วย (*Musa acuminata*) จิง (*Zingiberaceae*) *Eupatorium* sp. และพืชในเขตร้อนอื่นๆ ทำการบ่งชนิดของเชื้อราทั้งหมดโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและชีวโมเลกุล พบ 3 กลุ่มของ *Colletotrichum gloeosporioides* 1 กลุ่มของ *C. musae* และอีก 1 กลุ่มของ *C. truncatum* จากนั้นทำการเพิ่มปริมาณ rDNA ในส่วนของ The internal transcribed spacers (ITS1 และ ITS2) และ 5.8 S โดยใช้ universal primer จากนั้นทำการหาลำดับเบสและวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระดับพันธุกรรม จากผลการทดลองพบว่าเชื้อราในกลุ่มของ *Colletotrichum gloeosporioides* และ *C. musae* มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกัน ส่วนเชื้อราในกลุ่ม *C. truncatum* และ *C. acutatum* จะมีความต่างกันของพันธุกรรมมากกว่า จากผลการเปรียบเทียบระหว่างความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและลักษณะทางสัณฐานวิทยา

สามารถบ่งบอกได้ว่าการใช้ลำดับเบสของ ITS rDNA สามารถนำมาใช้บ่งบอกความแตกต่างระดับสปีชีส์ได้

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University