Thesis Title Fungal Diversity on Leaf Litter of Five Selected Tree Species in Chiang Mai Province, Thailand

Author Mr. Duong Minh Lam

Degree Doctor of Philosophy (Biodiversity and Ethnobiology)

Thesis Advisory Committee Assoc. Prof. Dr. Saisamorn Lumyong Chairperson

Assoc. Prof. Dr. Somboon Anuntalabhochai Member

Assoc. Prof. Dr. Kevin D. Hyde Member

ABSTRACT

The fungal diversity on leaf litter of five tree species in Doi Suthep-Pui National Park, Chiang Mai, Thailand was carried out between October 2003 and October 2005. These hosts were chosen based on their occurrence at Doi Suthep-Pui National Park and their hierarchical phylogenetic relationships - *Castanopsis acuminatissima*, *C. diversifolia* (same genus) and *Lithocarpus polystachyus* (same Family – Fagaceae); *Schima wallichii* and *Syzygium albiflorum* belong to Theaceae and Myrtaceae, respectively. Direct observation was used to survey fungal diversity of litter of all tree species. A total of 106 fungal taxa were encountered comprising 28 ascomycetes, 3 basidiomycetes, 1 myxomycete and 74 anamorphic fungi (11 coelomycetes and 63 hyphomycetes). Thirty-six species were found on *Castanopsis acuminatissima*; 64 on *C. diversifolia*; 30 on *Lithocarpus polystachyus*; 21 on *Schima wallichii* and 18 on *Syzygium albiflorum*. The different host species supported different fungal communities. The common species on *Castanopsis acuminatissima*

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

are *Beltrania rhombica* (10.5%), *Idriella* sp. (10.5%), *Kionochaeta spissa* (11%), *Ophioceras commune* (12.5%) and *Subulispora procurvata* (18.5%), while *Beltrania rhombica* (15.5%), *B. odinae* (12%), *Chalara pteridina* (11.5%), *Dictyochaeta simplex* (11.5%), *Gnomonia amoena* (15.5%), *Idriella* sp. (15%), *Ophioceras commune* (13.5%) and *Subulisporium procurvata* (35.5%) are common on *Castanopsis diversifolia* leaf litter. The most common species found on *Lithocarpus polystachyus* are *Beltrania rhombica* (20.5%), *Dictyochaeta* sp. (13%) and *Menisporopsis nova-zealandae* (21%). *Gnomonia gnomon* (12%) and *Linocarpon* sp. (35%) are common on *Schima wallichii* and *Syzygium albiflorum*, respectively. Fungal communities from different hosts are statistically compared. The overlapping fungi are low among the studied hosts. However, it is very low with 5 overlapping species among three host families.

Leaf litter of *Castanopsis diversifolia* harboured the most fungi and therefore fungal succession on senescent leaves of this host was investigated. Senescent leaves (190) from the host were divided into 4 subsets and used as baits with different treatments to establish fungal succession. Sixty leaves were sterilised and hung 4 metres above the ground under the *Castanopsis diversifolia* canopy. Other 60 leaves were sterilised and laid on the forest floor. Other 60 unsterile leaves were placed on the forest floor. The other 10 leaves were sterilized and incubated with sterile tissue paper in plastic containers to act as a control. The study yielded 112 taxa including 19 ascomycetes, 4 basidiomycetes, 1 myxomycete and 88 anamorphic taxa during the 4-month decay period. The sterile hanging leaves harboured the highest diversity with 65 taxa, while unsterile leaves on the forest floor yielded 55 taxa and sterile leaves on the forest floor yielded 53 taxa. The period of highest fungal diversity for sterile

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

hanging leaves was on day 7 and on day 51 for both sterile and unsterile leaves on the ground. Fungal distributions, origins and functional roles in leaf decomposition are discussed.

Fungal communities occurring on leaves of *Castanopsis diversifolia* were studied using a molecular technique. In this study, denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) technique coupled with sequence analysis of 18S rDNA fragments were used to assess fungal diversity. Total genomic DNA was extracted using hot phenol chloroform protocol and partial SSU rDNA was amplified using a universal primer (NS1 – forward primer) and a fungal specific primer (GCFung – reward primer) to obtain fungal sequences. PCR-DGGE analysis recovered 24 phylotypes from different parts of the studied leaves. Phylogenetically, 17 phylotypes belonged to the ascomycetes and the other 7 phylotypes were basidiomycetes. Of the 17 ascomycete phylotypes, 10 were bitunicate and 7 were unitunicate ascomycetes. Fungal communities from different leaf parts (petioles and midribs, leaf blade lower and upper parts) differed. The findings are compared with previous studies on the same host using direct observation (Chapter 3, 4).

Guignardia and its anamorph *Phyllosticta* are well-known plant pathogens. They have been found on many different hosts, in different areas. The phylogeny of *Guignardia* species was studied using multiple gene sequence analysis. Five different primer pairs were used to amplify partial sequences of actin, β-tubulin, elongation factor (EF1-α) genes, large subunit ribosomal DNA (LSU rDNA), and complete sequence of internal transcribed spacers (ITS). In total, 107 sequences of partial large subunit ribosomal DNA and complete ITS1-5.8S-ITS2 sequences, 80 sequences of partial elongation factor gene, 84 sequences of actin gene, and 56 sequences of partial

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

β-tubulin gene were produced. Phylogenetic analyses of individual gene dataset and LSU-ITS combined sequence dataset were performed. Phylogenetic analysis of different gene sequences in this study resulted similar topologies. The phylogenetic analysis showed that *Guignardia* and its anamorph *Phyllosticta* are monophyletic.

Key words: *Castanopsis acuminatissima*, *C. diversifolia*, *Lithocarpus polystachyus*, *Schima wallichii*, *Syzygium albiflorum*, *Guignardia*, *Phyllosticta*, DGGE, Doi Suthep-Pui, fungal diversity, fungal succession, fungal taxonomy, leaf litter fungi, microfungi, molecular phylogenetic.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์	ความหลากหลายของเชื้อราบนใบไม้ร่วงจากต้นไม้ที่เลือกสรรห้าชนิดในจังหวัดเชียงใหม่ ประเทศไทย
ผู้เขียน	Mr. Duong Minh Lam
ปริญญา	วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต (ความหลากหลายทางชีวภาพและชีววิทยาชาติพันธุ์)
คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	รศ.ดร. สายสมร ลำยอง ประธานกรรมการ
	รศ.ดร. สมบูรณ์ อนันตลาโภชัย กรรมการ
	Assoc. Prof. Dr. Kevin D. Hyde กรรมการ

บทคัดย่อ

การศึกษาเชื้อราบนใบไม้ร่วงจากต้นไม้ 5 ชนิด ในบริเวณอุทยานแห่งชาติดอยสุเทพ-ปุย มีจุดมุ่งหมายเพื่อศึกษาความหลากหลายของเชื้อราที่เจริญบนใบของต้นก่อเดือย, ก่อแป้น, ก่อแงะ (วงศ์ไม้ก่อ), ทะโล้ (วงศ์ชาหรือเมี่ยง) และ มะห้า (วงศ์ชมพู่หรือหว้า)

จากการสำรวจเชื้อราโดยตรงบนใบพืชทั้ง 5 ชนิด พบว่ามีหลากหลาย โดยพบเชื้อรา 106 ชนิด แบ่งเป็นเชื้อราในกลุ่ม ascomycetes 28 ชนิด กลุ่ม basidiomycetes 3 ชนิด กลุ่ม myxomycete 1 ชนิด และกลุ่มที่สืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ 74 ชนิด (11 ceelomycetes และ 63 hyphomycetes) เมื่อพิจารณาแยกตามชนิดพืชพบเชื้อราบนใบก่อเดือย 36 ชนิด ก่อแป้น 64 ชนิด ก่อแงะ 30 ชนิด ทะโล้ 21 ชนิด และมะห้า 18 ชนิด ตามลำดับ นอกจากนี้ใบพืชที่ต่างชนิดกัน พบว่ามีจำนวนและชนิดของเชื้อราแตกต่างกัน โดยเชื้อราที่พบมากบนใบก่อเดือยคือ *Beltrania rhombica* (10.5%), *Idriella* sp. (10.5%), *Kionochaeta spissa* (11%), *Ophioceras commune* (12.5%) และ *Subulispora procurvata* (18.5%) เชื้อราที่พบมากบนใบก่อแป้นได้แก่ *Beltrania rhombica* (15.5%), *B. odinae* (12%), *Chalara pteridina* (11.5%), *Dictyochaeta simlex* (11.5%), *Gnomonia amoena* (15.5%), *Idriella* sp. (15), *Ophioceras commune* (13.5%) และ *Subulisporium procurvata* (35.5%) เชื้อราที่พบมากบนใบก่อแงะได้แก่ *Beltrania rhombica* (20.5%), *Dictyochaeta* sp. (13.%) และ *Menisporopsis nova-zealandae* (21%) สำหรับเชื้อราที่พบมากบนใบทะโล้และมะห้าคือ *Gnomonia gnomon* (12%) และ *Linocarpon* sp. (35%) ตามลำดับ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

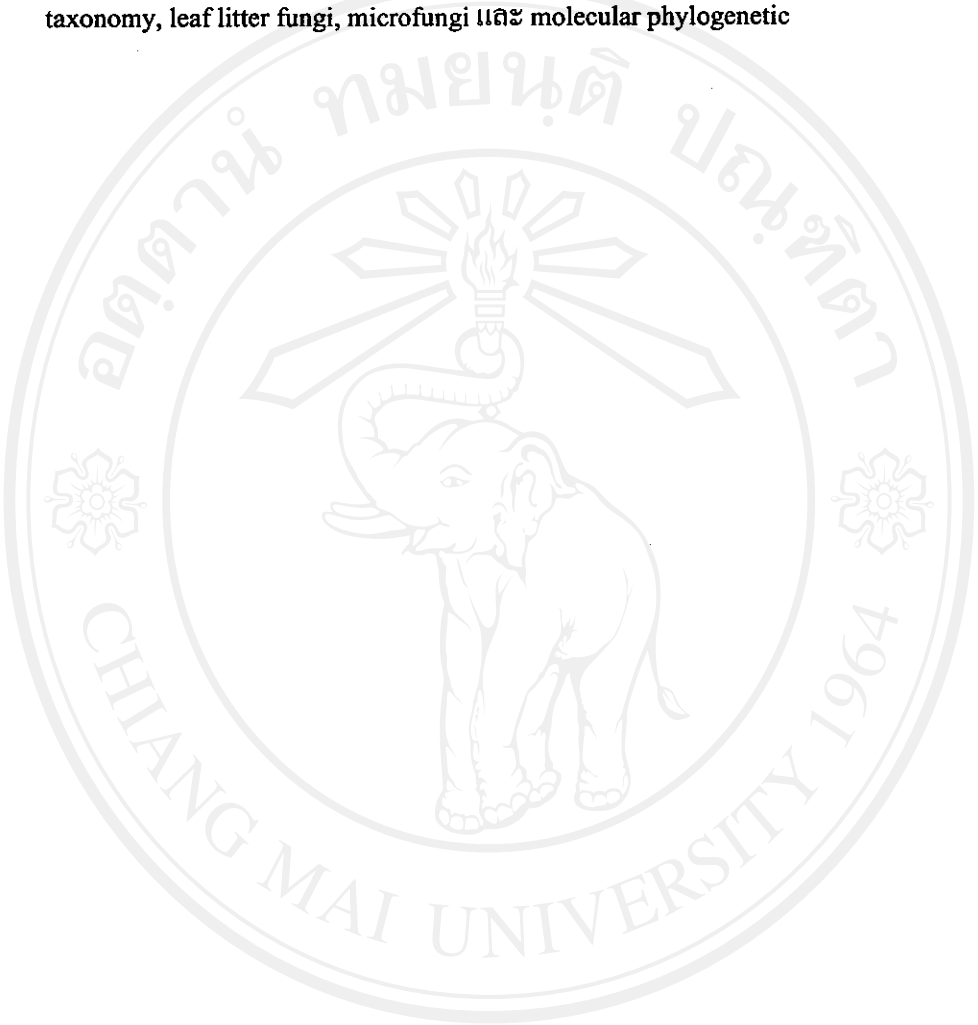
ทำการศึกษาการเปลี่ยนแปลงลำดับของเชื้อราบนใบก่อแป้นจำนวน 190 ใบ โดยแบ่งออกเป็น 4 กลุ่มย่อย เพื่อใช้เป็นเหยื่อล่อในกรรมวิธีต่างๆ ดังนี้ ใบที่ฆ่าเชื้อแล้ว 60 ใบ นำไปแขวนใต้ต้นก่อแป้นให้สูงเหนือพื้น 4 เมตร ใบที่ฆ่าเชื้อแล้ว 60 ใบ และไม่ฆ่าเชื้อ 60 ใบ นำไปวางบนพื้นในป่า และใบที่ฆ่าเชื้อแล้ว 10 ใบนำมาบ่มในกล่องพลาสติกที่บรรจุกระดาษทิชชู ที่ฆ่าเชื้อแล้ว (ชุดควบคุม) หลังจากศึกษาเป็นเวลา 4 เดือน พบเชื้อราทั้งหมด 112 taxa แบ่งเป็นเชื้อรา ในกลุ่ม ascomyetes 19 ชนิด กลุ่ม basidiomycetes 4 ชนิด กลุ่ม myxomycete 1 ชนิด และกลุ่มสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ 88 ชนิด ในกรรมวิธีแขวนใบที่ฆ่าเชื้อแล้วใต้ต้นก่อแป้น พบเชื้อรามากที่สุด 65 taxa สำหรับกรรมวิธีวางใบที่ฆ่าเชื้อและไม่ฆ่าเชื้อบนพื้นในป่าพบเชื้อรา 55 taxa และ 53 taxa ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่าช่วงเวลาที่พบเชื้อราชนิดต่าง ๆ มากที่สุดนั้นมีความแตกต่างกันในแต่ละกรรมวิธี

นอกจากการศึกษาสังคมของเชื้อราบนใบก่อแป้นโดยตรงแล้วยังได้นำเทคนิคทางชีวโมเลกุลมาใช้ศึกษาร่วมด้วยโดยใช้วิธี PCR-based และ denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) ร่วมกับการหาลำดับเบสในบริเวณยีน 18S rDNA เพื่อประเมินความหลากหลายของเชื้อรา ทำการสกัด DNA โดยใช้ hot phenol chloroform และทำการเพิ่มปริมาณ small subunit ribosomal DNA โดยใช้ specific primers (NS1 GCFung) และหาลำดับเบสจากการวิเคราะห์ด้วย PCR-DGGE พบ 24 operational taxonomic units (OTU), จากส่วนต่าง ๆ ของใบก่อแป้น และเมื่อวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระดับพันธุกรรม พบว่าเชื้อราอยู่ในกลุ่ม ascomycetes 17 OUTs (bitunicate 10 และ unitunicate 7) และกลุ่ม basidilomycetes 17 OUTs ในการทดลองนี้พบว่าชนิดของเชื้อราในส่วนต่าง ๆ ของใบ (ก้านใบ, เส้นกลางใบ, เนื้อผิวใบ และ เนื้อท้องใบ) มีความแตกต่างกันเช่นเดียวกับในการศึกษาแบบโดยตรง

ในการศึกษาครั้งนี้พบเชื้อรา *Guignadia* sp. บนใบก่อแป้น ราชนิดนี้และ *Phyllosticta* ซึ่งเป็นระยะสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศของ *Guignadia* เป็นเชื้อราสาเหตุโรคพืชที่สำคัญ พบในพืชหลายชนิด จึงนำมาศึกษาโดยใช้วิธีชีวโมเลกุล โดยทำการเพิ่มปริมาณและหาลำดับเบส rDNA large subunit ribosomal DNA (primers LROR และ LR5) internal transcribed spacers (primers V9G และ ITS4) ยีน actin (primers Acty512 และ Act783) บางส่วนของ beta tubulin (primers T_1 และ Bt2b) และยีน elongation factor (primers EF1-728 และ EF1-986) เมื่อวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระดับพันธุกรรม พบว่าเชื้อรา *Guignadia* จัดเป็นกลุ่มที่มีบรรพบุรุษเดียวกัน (monophyletic group) เมื่อพิจารณาจากลักษณะสันฐานและชีวโมเลกุล อาจกล่าวได้ว่า *G. foeniculata* (CBS 218.58), *G. miribelii* (CBS 161.75), *G. traversoana* (CBS 450.64), *P. congesta* (CBS 139.22) และ *P. blevolandica* (CBS 998.72) ควรจัดอยู่ในสกุลอื่น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

คำสำคัญ: ก่อ, ก่อแงะ, ทะโล้, มะห้า, *Guignadia*, *Phyllosticta*, DGGE, fungal succession, fungal taxonomy, leaf litter fungi, microfungi และ molecular phylogenetic



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved