Thesis Title	Diversity and Ecology of Myxomycetes in Some Provinces of Thailand and Lao People's Democratic Republic
Author	Miss Thida Win Ko Ko
Degree	Doctor of Philosophy (Biodiversity and Ethnobiology)
Thesis Advisory Committee	Prof. Dr. Saisamorn Lumyong — Chairperson
	Prof. Dr. Steven L. Stephenson — Member
	Prof. Dr. Kevin D. Hyde — Member

ABSTRACT

Patterns of biodiversity and the ecological distribution of myxomycetes with respect to seasons, microhabitats and different geographical locations were investigated in some provinces of Thailand and the Lao People's Democratic Republic from July 2006 to February 2008. Since the sporocarps of myxomycetes can form only under certain conditions such as after the precipitation in rainy weather in natural ecosystems, samples of the substrates being examined were collected and used to prepare moist chamber cultures in the laboratory to complement the field collections. In addition, direct environmental sampling with the use of the denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) fingerprint technique was used to reveal the presence of hidden taxa in their primary microhabitats.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

The geographical distribution of myxomycetes was studied across northern Thailand (Chiang Mai Province, Chiang Rai Province, Lampang Province and Pha Yao Province), northeastern Thailand (Loei Province) and the Lao People's Democratic Republic (Bolikhamxay Province and Vientiane Capital). Totals of 64 species and 24 species were collected from Thailand and Lao PDR, respectively. The community of myxomycetes associated with each locality displayed different patterns of distribution, with coefficient of communities values lower than 0.5 (range of 0.12 to 0.47). The assemblages of myxomycetes in Mae Sae National Park, Chiang Mai Province, northern Thailand and Phu Kradung National Park, North East Thailand (Shannon's diversity index=3.1) were more diverse than for the other geographical localities. The lowest biodiversity value was recorded for study sites in Pha Yao Province, northern Thailand and Bolikhamxay Province, Lao PDR (Shannon's diversity index=2.4).

Field collecting was carried out to investigate the effect of seasonality on the species composition and the assemblages of myxomycetes associated with forests at seven different localities— Chiang Dao National Park, Doi Inthanon National Park, Doi Suthep-Pui National Park, Mae Sae National Park, Mogfa Waterfall, Pong Duet Hot Spring, and the Mushroom Research Centre—in Chiang Mai Province, northern Thailand. The warm-wet season (July- October) was most productive, being represented by 69% of all specimens (representing 59 species), while only 31% of all specimens (representing 35 species) were obtained during the cool-dry season (November-February). The diversity of myxomycetes with respect to Shannon's diversity index was higher in warm-wet season (3.77) than in the cool-dry season (3.37). The Sorensen's coefficient of community value calculated from a comparison

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

of the assemblages of myxomycetes in the two seasons was 0.36. Such genera as *Stemonitis*, *Stemonitopsis* and *Symphytocarpus* were encountered only during the warm-wet season. However, some species (*Diachea splendens*, *Physarum cinereum*, *Phy. compressum* and *Phy. retisporum*) would seem to tolerate the dry conditions of the cool-dry season.

A comparative study of the assemblages of species between two selected microhabitats—lianas and leaf litter—was also carried out by using the combination of field sampling and preparation of moist chamber cultures. Samples of these selected microhabitats were obtained from five collecting sites located in Doi Inthanon National Park, Doi Suthep-Pui National Park, Mae Sae National Park, Pong Duet Hot Spring and the Mushroom Research Centre (Pha Dang Village) in Chiang Mai Province, northern Thailand. Totals of 27 and 51 species were recorded on lianas and litter, respectively. Both leaf litter (Shannon's diversity index=3.43) and lianas (Shannon's diversity index=3.08) have the potential to be among the microhabitats accounting for an appreciable part of the high biodiversity of myxomycetes in tropical forest ecosystems. Species composition differs for a particular microhabitat. All collections in the genera *Craterium* and *Diachea* were consistently recorded on litter, but all of the records of *Clasdoderma* and *Cribraria* were invariably restricted to lianas.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Patterns of occurrence of myxomycetes on different types of lianas were assessed at the Mushroom Research Centre in Chiang Mai Province. All collections of myxomycetes were obtained from a series of moist chamber cultures prepared with samples of living and dead lianas. The highest value of species diversity was recorded for dead aerial lianas (Shannon's diversity index=2.61), followed by dead ground

lianas (Shannon's diversity index=2.17), living ground lianas (Shannon's diversity index = 2.14) and living aerial lianas (Shannon's diversity index=2.05). Taxonomic diversities of myxomycetes on all types of lianas were relatively high, with values ranging between 1.67 on living aerial lianas and 1.82 on dead aerial lianas. The larger diameter lianas (Shannon's diversity index=2.92) were more productive than the smaller diameter (Shannon's diversity index=2.69). Species richness of myxomycetes was highest on smooth bark lianas (Shannon's diversity index=2.72), intermediate texture bark and rough texture bark lianas yielded Shannon's diversity index of 2.61 and 2.34, respectively. The general patterns were that such biodiversity parameters of myxomycete communities as species richness, species diversity, taxonomic diversity and species composition vary on lianas as a result of the differences that exist for height above the ground, bark texture and liana diameter.

Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) fingerprinting was used to assess the molecular diversity of myxomycetes from 24 environmental samples (decaying wood and forest floor litter) collected at the Mushroom Research Centre. Total genomic DNA was extracted directly from environmental samples on which myxomycetes were not apparent. Part of the small subunit ribosomal RNA gene (SSU rDNA) was amplified and DNA sequences analyzed. DGGE gels revealed up to 17 operational taxonomic units (OTUs) from decaying wood and 10 OTUs from forest floor litter samples, but only seven (wood) and six (litter) OTUs could be re-amplified and/or sequenced. Based on results obtained with the BLAST analysis program, the species involved appeared to correspond most closely to *Diderma saundersii*, *Didymium iridis*, *Stemonitis flavogenita* and *Hyperamoeba* sp. strain W2i. on decaying wood and to *Diderma saundersii* and *Physarum didermoides* on forest floor

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

litter. These results suggest that PCR-DGGE technique, which has not been attempted before to study myxomycetes diversity, can be used to obtain data on the presence of myxomycetes in their primary microhabitats without the need of observing the sporocarps of these organisms.

Overall, a total of 103 species were collected from Thailand, and 21 of these are new records for the country. The present study was the very first effort to study the diversity of myxomycetes in Lao PDR, and all of 24 species obtained are the first records. In addition, some globally rare and/or uncommon species (for example, *Leocarpus fragilis*, *Licea eleanorae* and *Cornuvia serpula*) were identified from Thailand. As such, all three of the methods used in the present study proved to be capable of successfully revealing the assemblages of myxomycetes present at a given locality. The use of combination of these techniques (Natural field collecting, Moist chamber culture, and Environmental sampling) would seem to have considerable potential for contributing to a more complete understanding of myxomycete diversity and ecology in terrestrial ecosystems.

Keywords: myxomycetes, biodiversity, ecology

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ ความหลากหลายและนิเวศวิทยาของมิกโซไมซีสในบางจังหวัดของประเทศไทยและสาธารณรัฐประชาธิปไตยประชาชนลาว

ผู้เขียน นางสาว ธิดา วิน โคโค

ปริญญา วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต
(ความหลากหลายทางชีวภาพ และชีววิทยาชาติพันธุ์)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

ศ.ดร.สายสมร ลำยอง	ประธานกรรมการ
Prof. Dr. Steven L. Stephenson	กรรมการ
Prof. Dr. Kevin D. Hyde	กรรมการ

บทคัดย่อ

การศึกษารูปแบบของความหลากหลายทางชีวภาพและการกระจายทางนิเวศวิทยาของมิกโซไมซีสในบางจังหวัดของประเทศไทยและสาธารณรัฐประชาธิปไตยประชาชนลาว ระหว่างเดือนกรกฎาคม ปี 2006 ถึง เดือนกันยายน ปี 2008 โดยทำการศึกษาในฤดูต่าง ๆ ศึกษาทั้งในที่อยู่เฉพาะและในบริเวณที่ต่างกันทางภูมิศาสตร์ เนื่องจากมิกโซไมซีสจะสร้างสปอร์โรคาร์พได้เฉพาะภายใต้บางสภาวะในระบบนิเวศตามธรรมชาติ เช่น หลังฝนตก เก็บตัวอย่างเพื่อที่นำมาตรวจสอบโดยบ่มเพาะในกล่องที่มีความชื้นในห้องปฏิบัติการ นอกจากนี้ยังมีการนำสารพันธุกรรมที่สกัดได้จากตัวอย่างโดยตรงทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Denaturing gradient gel eletrophoresis (DGGE) เพื่อตรวจสอบความหลากหลายของชนิด และสายพันธุ์ที่ซึ่งตรวจสอบไม่พบโดยใช้วิธีพื้นฐาน

จากการศึกษาการกระจายของมิกโซไมซีสตามสภาพภูมิศาสตร์บริเวณภาคเหนือของประเทศไทย (จ .เชียงใหม่, จ .เชียงราย, จ.พะเยา และ จ .ลำปาง) ภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย (จ.เลย) และสาธารณรัฐประชาธิปไตยประชาชนลาว (จ.โบลิคำไส และจ. เวียงจันทร์) พบมิกโซไมซีสทั้งหมด 64 ชนิด และ 24 ชนิด จากการเก็บตัวอย่างในประเทศไทยและลาวตามลำดับ ประชาคมของมิกโซไมซีสที่อยู่ในแต่ละสถานที่จะมีการกระจายแตกต่างกัน โดยมีค่าสัมประสิทธิ์ของสังคม ต่ำกว่า 0.5 (ช่วง 0.12-0.47) มิกโซไมซีสที่พบในอุทยานแห่งชาติน้ำตก แม่สา ภาคเหนือของประเทศไทย และอุทยานแห่งชาติภูกระดึง ภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย (ทั้งสองแห่งมีค่า Shannon's diversity index=3.1) มีความหลากหลายมากกว่าพื้นที่ทาง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ภูมิศาสตร์อื่นๆ ส่วนใน จ.พะเยา ภาคเหนือของประเทศไทย และ จ.โบลิคำไส สาธารณรัฐประชาธิปไตยประชาชนลาว มีค่าความหลากหลายต่ำที่สุด (Shannon's diversity index=2.4)

ทำการเก็บตัวอย่างเพื่อศึกษาผลของฤดูกาลต่อจำนวนชนิดและการรวมกลุ่มของมิกโซไมซีสในป่าใน 7 แหล่งได้แก่ ศูนย์วิจัยเห็ด (หมู่บ้านป่าแดง จังหวัดเชียงใหม่) อุทยานแห่งชาติดอยสุเทพ-ปุย อุทยานแห่งชาติเชียงดาว อุทยานแห่งชาติดอยอินทนนท์ อุทยานแห่งชาติแม่สา น้ำตกหมอกฟ้า และน้ำพุร้อนโป่งเดือด พบว่าในฤดูฝนมีสปอร์โรคาร์พของมิกโซไมซีสมากที่สุด 69 % (59 สปีชี่ส์) ส่วนในฤดูแล้งพบ 31 % ของตัวอย่างทั้งหมด (35 สปีชี่ส์) โดยใช้ค่า Shannon's diversity index (H') ประเมินความหลากหลายของมิกโซไมซีส พบว่าในฤดูฝน (Shannon's diversity index=3.77) มีความหลากหลายสูงกว่าในฤดูแล้ง (Shannon's diversity index=3.37) และเมื่อเปรียบเทียบการรวมกลุ่มของมิกโซมัยซีทในทั้งสองฤดูได้ค่า Sorensen' s coefficient เป็น 0.36 ในฤดูฝนพบเฉพาะจีนัส *Stemonitis, Stemonitopsis* และ *Symphytocarpus* ส่วนในฤดูแล้งพบมิกโซไมซีสบางชนิด (*Diachea sphlendens*, *Physarum cinereum*, *Phy. compressum* และ *Phy. retisporum*) ที่ค่อนข้างทนต่อสภาพแวดล้อมที่แห้งในฤดูแล้งที่เย็นได้

ทำการศึกษาเปรียบเทียบชนิดของมิกโซไมซีสที่พบในถิ่นเฉพาะคือ เถาวัลย์ และซากใบไม้ โดยใช้ผลรวมของตัวอย่างที่ พบสปอร์โรคาร์พในภาคสนามและในตัวอย่างที่บ่มเพาะในกล่องความชื้น ตัวอย่างที่ศึกษาเก็บจาก 5 บริเวณในอุทยานแห่งชาติดอยสุเทพ-ปุย อุทยานแห่งชาติดอยอินทนนท์ อุทยานแห่งชาติแม่สา น้ำพุร้อนโป่งเดือด และศูนย์วิจัยเห็ด (หมู่บ้านป่าแดง จ.เชียงใหม่) ภาคเหนือของประเทศไทย พบมิกโซไมซีสบนเถาวัลย์ทั้งหมด 27 สปีชี่ส์ และบนซากใบไม้ 51 สปีชี่ส์ ทั้งซากใบไม้ (Shannon's diversity index=3.43) และเถาวัลย์ (Shannon's diversity index=3.08) เป็นถิ่นเฉพาะที่มีความหลากหลายของมิกโซไมซีสสูงและชนิดที่ต่างกัน ในระบบนิเวศป่าเขตร้อน โดยมิกโซไมซีสทุกชนิดในจีนัส *Craterium* และ *Diachea* จะพบบนซากใบไม้เสมอ แต่ทุกชนิดในจีนัส *Clasdoderma* และ *Cribraria* จะพบบนเถาวัลย์

ในการศึกษารูปแบบของการเกิดของมิกโซไมซีสบนเถาวัลย์ต่างชนิดกัน ที่ศูนย์วิจัยเห็ด จ.เชียงใหม่ โดยนำตัวอย่างมิกโซไมซีสที่เก็บได้จากตัวอย่างเถาวัลย์ที่มีชีวิตและที่ตายแล้วมาบ่มในกล่องความชื้น พบว่าเถาวัลย์ที่ตายบนต้นมีความหลากหลายของมิกโซไมซีทสูงสุด (Shannon's diversity index=2.61) ตามด้วยเถาวัลย์ที่ตายแล้วบนพื้นดิน (Shannon's diversity index=2.17) เถาวัลย์ที่มีชีวิตบนดิน (Shannon's diversity index=2.14) และเถาวัลย์ที่มีชีวิตที่เลื้อยในอากาศ (Shannon's diversity index=2.05) ซึ่งความหลากหลายของมิกโซไมซีสบนเถาวัลย์ทุกชนิดค่อนข้างสูง นอกจากนี้พบว่าเถาวัลย์ที่มีเส้นผ่าศูนย์กลางขนาดใหญ่ (24 สปีชี่ส์) มีมิกโซไมซีส มากกว่าเถาวัลย์ที่มีเส้นผ่าศูนย์กลางเล็กกว่า (14 สปีชี่ส์) และพบจำนวนชนิดของมิกโซไมซีสสูงสุดบน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เถาวัลย์ที่มีผิวเรียบ (19 สปีชี่ส์) บนเถาวัลย์ผิวค่อนข้างหยาบและผิวหยาบ พบว่ามี 17 สปีชี่ส์ และ 11 สปีชี่ส์ ตามลำดับ โดยทั่วไปพารามิเตอร์ที่มีผลต่อความหลากหลายทางชีวภาพของประชากรมิกโซไมซีส คือ ความสูงเหนือพื้นดิน และลักษณะของเปลือกและเส้นผ่าศูนย์กลางเถาวัลย์

การตรวจสอบความหลากหลายระดับชีวโมเลกุลของมิกโซไมซีส 24 ตัวอย่างที่ได้จากการเก็บตัวอย่างในธรรมชาติ (ขอนไม้ผุ และซากใบไม้ผุพังบนพื้นป่า) บริเวณศูนย์วิจัยเห็ด ใช้เทคนิค DGGE โดยทำการสกัดจีโนมิก และดีเอ็นเอทั้งหมด จากตัวอย่างที่ได้จากสิ่งแวดล้อม ซึ่งไม่พบสปอร์โรคาร์พของมิกโซไมซีส นำส่วนหนึ่งของยีนไรโบโซมอล อาร์เอ็นเอ หน่วยย่อยเล็ก (SSU rDNA) มาเพิ่มปริมาณและวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ผลลัพธ์ที่ได้จากเจลทดสอบ DGGE พบว่าท่อนไม้ผุและซากใบไม้ผุพังมี Operational Taxonomic Unit (OTUs) เท่ากับ 17 และ 10 ตามลำดับ แต่พบว่าไม้ผุ และซากใบไม้ร่วง มี OTUs เท่ากับ 7 และ 6 ตามลำดับ จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากท่อนไม้ผุและซากใบไม้ร่วงโดยใช้โปรแกรม BLAST พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากตัวอย่างท่อนไม้ผุมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับเชื้อ *Didymium iridis*, *Stemonitis flavogenita* และ *Hyperamoeba* sp. สายพันธุ์ W2i และผลวิเคราะห์จากซากใบไม้ร่วง มีความคล้ายคลึงกับเชื้อ *Diderma saundersii* และ *Physarum didermoides* ซึ่งผลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าวิธี PCR-DGGE ซึ่งเป็นวิธีหนึ่งที่ยังไม่เคยมีการนำมาใช้ในการศึกษาความหลากหลายของเชื้อในกลุ่มมิกโซไมซีสมาก่อน สามารถใช้ในการนี้ศึกษาข้อมูลจากแหล่งอาศัยปฐมภูมิของเชื้อในกลุ่มนี้ได้โดยไม่จำเป็นต้องรอให้เกิดโครงสร้างสปอร์โรคาร์พเสียก่อน

ในการศึกษาครั้งนี้พบมิกโซไมซีสในประเทศไทย 103 สปีชี่ส์ ซึ่งเป็นการพบครั้งแรกในประเทศไทยจำนวน 21 สปีชี่ส์ สำหรับการศึกษาความหลากหลายมิกโซไมซีสในสาธารณรัฐประชาธิปไตยประชาชนลาวซึ่งเป็นการรายงานครั้งแรก พบ 24 สปีชี่ส์ นอกจากนี้มีพบมิกโซไมซีสชนิดที่หายาก เช่น *Leocarpus fragilis, Licea eleanorae* และ *Cornuvia serpula* ในประเทศไทย ทั้งสามวิธี (Natural field collecting, Moist chamber culture และ Environmental sampling) ที่ได้กล่าวมาแล้ว แสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพที่จะนำมาสู่ความสำเร็จในการรวบรวมเชื้อมิกโซไมซีสที่มีอยู่ในท้องถิ่น การใช้วิธีการศึกษาร่วมกัน น่าจะช่วยเพิ่มความเข้าใจเกี่ยวกับความหลากหลายของเชื้อมิกโซไมซีสและระบบนิเวศวิทยาบนบก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

คำสำคัญ: มิกโซไมซีส ความหลากหลายทางชีวภาพ นิเวศวิทยา