

Thesis Title Endophytic and Saprophytic Palm Fungi and Their Ability as Antagonists Against the Oil Palm Pathogen, *Ganoderma boninense*

Author Miss Umpava Pinruan

Degree Doctor of Philosophy (Biotechnology)

Thesis Advisory Committee

Prof. Dr. Saisamorn Lumyong Advisor

Prof. Dr. E.B. Gareth Jones Co-advisor

Prof. Dr. Kevin D. Hyde Co-advisor

Abstract

The primary objective of this study was to document the endophytic and saprobic fungal diversity of two tropical palms, *Elaeis guineensis* (cultivated species), and *Licuala spinosa* (native forest species), to isolate into axenic culture and evaluate the potential antagonistic activity of selected strains (300) against the oil palm pathogen, *Ganoderma boninense*.

The study was carried out at Huey Yod district and Kantrang district, Trang province, southern Thailand. Endophytic fungi were isolated from 1,000 samples of *L. spinosa*, and 800 samples from *E. guineensis*. Leaves intervein and vein, petiole, and rachis of the palms were sampled yielding 2,403 fungal isolates recovered from *L. spinosa*, and 1,809 from *E. guineensis*. The overall colonization rate ranged between 62 to 94% from *L. spinosa*, and ranged 78 to 96% from *E. guineensis*. Of the 4,212

fungal isolates recovered, 34 taxa were identified to genus based on sporulation in culture, comprising 3 ascomycetes, 22 anamorphic fungi (6 coelomycetes and 16 hyphomycetes) and 9 basidiomycetes. The dominant fungal groups were mycelia sterilia (52 strains from *E. guineensis*, 115 from *L. spinosa*, mean of 2 samplings), xylariaceous sterile mycelia (37 strains from *E. guineensis*, 71 from *L. spinosa*, mean of 2 samplings), *Pestalotiopsis*, *Phomopsis*, *Phoma*, and *Phyllosticta* spp. The percentage of none sporulating endophytic fungi in this study was higher (36.6-64.2%) than recorded in previous studies of various endophytes from herbaceous and woody tree host plants. None sporulating isolates were grouped into morphospecies based on their cultural characteristics, with 127 (dry season) and 147 (wet season) from *E. guineensis*, and 169 (wet season) and 156 (dry season) from *L. spinosa*. Xylariaceous endophytes were diverse in the current study with 50% of all isolates from *L. spinosa*, and 20.6% from *E. guineensis*.

Saprobic fungi associated with senescent tissue were investigated from 240 palms samples (120 from *E. guineensis*, 120 from *L. spinosa*), resulting in 213 fungal records. One hundred and seven fungi were identified, including 48 ascomycetes (representing 45% of all taxa), and 59 anamorphic taxa (55%). Saprobian fungi from *E. guineensis* totaled 67 species comprising 29 ascomycetes (43.3%); 38 anamorphic taxa (56.7%) from 122 records. Common fungi were *Delortia palmicola*, *Nawawia fusiformis*, *Trichoderma* sp., *Massarina bipolaris* and *Stilbohypoxyton moelleri*. The percentage of fungi occurring on dry versus damp material were 59% and 41%, respectively, with 56.6% of fungi occurring on rachides, 38.5% on petioles, and 4.9% on leaves.

Sixty fungal species (91 records) were found on *L. spinosa*, comprising 27 ascomycetes (45%) and 33 anamorphic fungi (55%), with *Linocarpon livistonae*, *Oxydothis licualae*, *Linocarpon* sp., *Helicosporium gigasporum*, and *Endocalyx melanoxanthus* listed as common. The percentage of fungi occurring on dry versus damp material were 57.1% and 42.9%, respectively, with 81.3% of fungi occurrence on petioles, and 18.7% on leaves.

Overlap of taxa from the two palms was 15.9% with only 17 species found common to both palms. This has great significance when considering total fungal diversity, and global estimates of fungi.

The major contribution of this study to science is in the documentation of basidiomycetes as endophytes of *E. guineensis*. The basidiomycetes were initially diagnosed by producing clamp connections in isolated cultures. Subsequently these produced basidomes in culture, either poroid or lamellate, with basidia, sterigmata, and basidiospores. Confirmation as basidiomycetes was based on LSU and SSU sequence data, enabling characterization to generic and specific levels. Few endophytic basidiomycetes have been previously reported, and this indicates that greater attention should be paid to non sporulating endophyte cultures. The basidiomycetes identified were predominantly polyporoid including *Pycnoporus sanguineus*, *Fomitopsis meliae*, *Fomitopsis ostreiformis*, *Fomitopsis palustris*, *Fomitopsis pinicola*, *Perenniporia* sp., and *Trametes lactinea*, with only one member of the Agaricales (*Schizophyllum commune*).

Three hundred strains of saprobic and endophytic fungi isolated from palms were screened for their antagonistic activity against the oil palm pathogen, *Ganoderma boninense* by the dual culture procedure. Forty eight isolates tested had a

high antagonistic activity (> 70% inhibition), and of these 17 isolates showed > 80% inhibition. These 17 isolates were further evaluated by fermentation on F1, F2 media and bioactivity evaluated by the paper disk agar diffusion assay method. Of these, EP16a and EP191 (mycelia sterilia endophytes) showed the greatest activity against the oil palm pathogen. One endophyte from this study has been shown to produce new chemical structures: *Xylaria* sp. (EP325) produced the new eremophilane-type sesquiterpenoids and a new furofurandione. This endophyte was isolated from *L. spinosa*. This indicates the potential of palm endophytes as a source of new or novel compounds with antimicrobial activity.

Key words: *Elaeis guineensis*, *Licuala spinosa*, palm, endophytes, saprobes

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ ราเอนโดไฟต์และแซโครโพไรต์จากปาล์ม และความสามารถ ในการ เป็น
ปฏิบัติกับจุลชีพก่อโรคของปาล์มน้ำมัน, *Ganoderma boninense*

ผู้เขียน นางสาวอัมพวา ปิ่นเรือน

ปริญญา วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

ศ. ดร. สายสมร ถ้ายอง อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก

Prof. Dr. E.B. Gareth Jones อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

Prof. Dr. Kevin D. Hyde อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

บทคัดย่อ

วิทยานิพนธ์เล่มนี้มีจุดมุ่งหมายเพื่อศึกษาความหลากหลายของราเอนโดไฟต์และราแซโครโพไรต์ที่เจริญในพืชปาล์ม 2 ชนิด คือ ปาล์มน้ำมัน, *Elaeis guineensis* (ปาล์มปลูก), และปาล์มกระพ้อ *Licuala spinosa* (ปาล์มป่า) ราเอนโดไฟต์และแซโครโพไรต์ที่ คัดแยกและเพาะเลี้ยงจากปาล์มทั้งสองชนิดนี้จะนำไปศึกษาความสามารถในการผลิตสารต้านราก่อโรคพืชปาล์มน้ำมัน *Ganoderma boninense*

ทำการแยกราเอนโดไฟต์จากปาล์มน้ำมันทั้งหมด 800 ตัวอย่าง และปาล์มกระพ้อจำนวน 1,000 ตัวอย่าง ซึ่งเก็บจากสวนปาล์มน้ำมันอำเภอกันตัง และป่าพรุร้อนควนแคง อำเภอห้วยยอด จังหวัดตรัง แยกเชื้อราเอนโดไฟต์จากเนื้อเยื่อใบ ก้านใบ และทางปาล์ม โดยการฆ่าเชื้อที่ผิวด้วยวิธี triple surface sterilization พบราเอนโดไฟต์จากปาล์มน้ำมันจำนวน 1,809 ไอโซเลท และจากปาล์มกระพ้อจำนวน 2,403 ไอโซเลท พบ colonization rate ของเอนโดไฟต์บนปาล์มน้ำมันและปาล์มกระพ้อ จากการเก็บตัวอย่างชนิดละ 2 ครั้ง คือ 78-96% และ 62-94% ตามลำดับ นอกจากนี้พบว่ารา

เอนโดไฟต์ที่แยกได้มีความหลากหลาย โดยจากราทั้งหมด 4,212 ไอโซเลท จัดจำแนกได้เป็น 34 taxa แบ่งเป็นเชื้อราในกลุ่ม ascomycetes 3 ชนิด เชื้อราในกลุ่มที่สืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ 22 ชนิด (6 coelomycetes และ 16 hyphomycetes) และเชื้อราในกลุ่ม basidiomycetes 9 ชนิด ชนิดที่พบทั่วไปคือ เชื้อราในกลุ่มไม่สร้างสปอร์ (mycelia sterilia) เชื้อราในกลุ่ม xylariaceous, *Pestalotiopsis*, *Phomopsis*, *Phoma*, และ *Phyllosticta* spp. โดยเชื้อราในกลุ่มไม่สร้างสปอร์มีมากถึง 36.6-64.2%

ทำการศึกษาราแซโทรไฟต์ จากใบ ทางใบ และก้านใบของปาล์มทั้ง 2 ชนิด และในบริเวณเดียวกับที่เก็บตัวอย่างในการศึกษาราเอนโดไฟต์ ทั้งหมด 240 ตัวอย่าง สามารถบ่งบอกชนิดได้ 107 สปีชีส์ ประกอบด้วย กลุ่ม ascomycetes 48 ชนิด (45%) และกลุ่มที่สืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ 59 ชนิด (55%) ราแซโทรไฟต์ที่แยกได้จากปาล์มน้ำมัน พบ 67 สปีชีส์ ประกอบด้วย กลุ่ม ascomycetes 29 ชนิด (43.3%) และกลุ่มที่สืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ 38 ชนิด (56.7%) ราที่พบทั่วไปบนปาล์มชนิดนี้คือ *Delortia palmicola*, *Nawawia fusiformis*, *Trichoderma* sp., *Massarina bipolaris* และ *Stilbohypoxyton moelleri* จำนวนราที่พบในแต่ละสภาวะนั้นแบ่งออกเป็น ส่วนที่แห้งพบ 59% และส่วนที่มีความชื้นมากพบ 41% ในแต่ละส่วนของปาล์มพบว่าเจอรามากที่สุดในส่วนทางปาล์ม 56.6% ก้านใบ 38.5% และใบ 4.9 %

ในส่วนของราบนปาล์มกระพ้อ พบ 60 สปีชีส์ ประกอบด้วย กลุ่ม ascomycetes 27 ชนิด (45%) และกลุ่มที่สืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ 33 ชนิด (55%) ราที่พบทั่วไปบนปาล์มชนิดนี้คือ *Linocarpon livistonae*, *Oxydothis licualae*, *Linocarpon* sp., *Helicosporium gigasporum*, และ *Endocalyx melanoxanthus* จำนวนราที่พบในแต่ละสภาวะนั้นแบ่งออกเป็น ส่วนที่แห้งพบ 57.1% และส่วนที่มีความชื้นมากพบ 42.9% ในแต่ละส่วนของปาล์มพบว่าเจอราที่สุดในส่วน ก้านใบ 81.3% และใบ 18.7 % จากจำนวนราทั้งหมดที่แยกได้จากปาล์มทั้ง 2 ชนิด พบว่ามีเพียง 17 สปีชีส์ที่พบในปาล์มทั้ง 2 ชนิด คิดเป็น 15.9%

นอกจากนี้ จากการศึกษาพบว่ามีราเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากปาล์มน้ำมัน สามารถบ่งบอก กลุ่ม basidiomycetes ได้จากการสังเกตการสร้าง clamp connection ในอาหารเลี้ยงเชื้อ รวมถึงการสร้างโครงสร้างสืบพันธุ์ basiodome และ poroid ในอาหาร เมื่อตรวจดูใต้กล้องจุลทรรศน์สามารถพบ basidia และ basidiospores เมื่อนำราเอนโดไฟต์กลุ่ม basidiomycetes มาจัดจำแนกโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและชีวโมเลกุล สามารถจัดจำแนกชนิดและสปีชีส์ได้ คือ *Pycnoporus sanguineus*, *Fomitopsis meliae*, *Fomitopsis ostreiformis*, *Fomitopsis palustris*, *Fomitopsis picicola*, *Perenniporia* sp., and *Trametes lactinea* และ *Schizophyllum commune*

เมื่อนำเชื้อราเอนโดไฟต์และแซโทรไฟต์จำนวน 300 ไอโซเลท มาทำการคัดเลือกเชื้อราที่สามารถผลิตสารต้านเชื้อราโรคปาล์มน้ำมัน *G. boninense* โดยวิธี dual culture method พบว่าเชื้อรา

เอนโดไฟต์ ที่คัดแยกจากปาล์ม 48 ไอโซเลท มี ประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใย *G. boninense* โดยมีเปอร์เซ็นต์ในการยับยั้งสูง คือมากกว่า 70 เปอร์เซ็นต์ และมี 17 ไอโซเลทที่ให้ผลการยับยั้งสูงมากกว่า 80% นำเชื้อรา 17 ไอโซเลทนี้มาทดสอบโดยวิธี paper disk agar diffusion assay พบราเอนโดไฟต์ที่ไม่สร้างสปอร์ 2 ไอโซเลท คือ EP16a และ EP191 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใย *G. boninense* ได้สูงสุด นอกจากนั้นราเอนโดไฟต์ *Xylaria* sp. (EP325) สร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดใหม่คือ eremophilane-type sesquiterpenoids และ furofurandione จากการศึกษาครั้งนี้สามารถบ่งบอกได้ว่าราเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากปาล์มมีความสามารถในการสร้างสารต้านเชื้อราและเป็นแหล่งค้นพบสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดใหม่ได้

คำสำคัญ: ปาล์มน้ำมัน, ปาล์มกระพ้อ, ปาล์ม, เอนโดไฟต์, แซโพรไฟต์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved