

Thesis Title	Biodiversity of Fungi on Some Grasses and Their Production of Bioactive Compounds	
Author	Mr. Weraphol Bhilabutra	
Degree	Doctor of Philosophy (Biology)	
Thesis Advisory Committee	Prof. Dr. Saisamorn Lumyong	Chairperson
	Prof. Dr. Kevin D. Hyde	Member
	Dr. Eric H.C. McKenzie	Member
	Prof. Dr. John F. Peberdy	Member

ABSTRACT

Fungi generally play an important ecological role within living plant tissues and on dead plant material. Fungi associated with plants are highly diverse with endophytes, saprobes, and pathogens occurring in all plant species examined. New fungal species continues to be discovered regularly, thus increasing the known fungal diversity. Ongoing studies help estimating global fungal numbers, conserving current levels of biodiversity and making use of natural products and novel bioactive compounds from fungi. Therefore, the diversity and ecology of endophytes and saprobes from some grasses, *Thysanolaena latifolia*, *Saccharum spontaneum* and *Vetiveria zizanioides* from northern Thailand (Chiang Mai province) were investigated.

Endophytic fungi associated with the leaves, midribs, nodes, internodes and roots of *T. latifolia* (woody grass) and leaves, midribs and roots of *V. zizanioides*

(herbaceous grass) were investigated at six sites. Fifty-one fungal taxa were isolated from *T. latifolia* (4 sampling sites) and 44 taxa were isolated from *V. zizazioides* (at 2 sampling sites). The mostly frequently isolated taxa were xylariaceous, *Colletotrichum* spp., *Phomopsis* spp. and various sterile morphocharacters. The overlap of fungal species between wet and dry seasons was 68.8 % and 54.3 % for *T. latifolia* and *V. zizazioides*, respectively. The overall colonization rate (CR) for the 4 sampling sites of *T. latifolia* did not differ greatly in both wet and dry seasons. For the 2 sites of *V. zizazioides* overall colonization rate was 51.1 % and 51.4 % in the wet season and 44.7 % and 43.8% in the dry season. Endophytic fungal communities, site effect, age effect, effect of tissue type and biodiversity of endophytic fungi in the grasses were discussed. Two fungi isolated from *T. latifolia* are novel species; *Dactylaria endograminicola* sp. nov. (CMUGE1125) and *Periconia siamensis* sp. nov. (CMUGE015).

Fungi associated with dead leaves and stems of *T. latifolia* and *S. spontaneum*, were collected and identified at each of the two sampling sites. On *T. latifolia*, 67 fungi were identified, comprising 24 ascomycetes, 33 hyphomycetes, 9 coelomycetes and 1 myxomycete. The most common genera were *Leptosphaeria*, *Niptera*, *Periconia*, *Septoria*, *Stachybotrys*, *Tetraploa*, and *Verticillium*. For *S. spontaneum*, 79 taxa were identified, comprising 32 ascomycetes, 37 hyphomycetes, and 10 coelomycetes. The most common genera were *Cladosporium*, *Halosphaeria*, *Massarina*, *Periconia*, and *Tetraploa*. The highest species diversity index was recorded on *S. spontaneum* ($H = 6.5$), while *T. latifolia* was lower ($H = 5.5$). The mycota at the two sampling sites differed significantly in species composition. For *T. latifolia*, percentage similarity between the two sampling sites was 50.5% while for *S.*

spontaneum it was 52.34%. A comparison of the fungi occurring on grasses with those on other monocotyledonous host from tropical region is presented. *Drumopama moonseti*, *Pycnothyriopsis* sp.1 were reported as rare species in this study. During investigation, one fungus was considered as new to science, *Dendrographium thysanolaenae* sp. nov.

The genus *Dactylaria* and their allied genera are an important group of hyphomycetes. There has been disagreement regarding the classification and systematic placement of these genera. In addition, their teleomorphic affinities to known sexual ascomycetes are mostly unknown. In this study, phylogenetic relationships among members of the genera were investigated using partial sequences of the large and small subunit of ribosomal DNA. Phylogenies generated through molecular analyses reveal that *Dactylaria* is polyphyletic in nature. Some species were found to be phylogenetically related to fungi in the orders Dothideomycetes, Orbiliomycetes and Sordariomycetes, while the phylogenetical affinities of other species was still obscure, although they were appeared to be belong to the Sordariomycetes. On the other hand, results indicated that conidial secession is important in differentiating *Dactylaria* and closely related genera, especially *Scolecobasidium*.

One hundred and twenty three fungal isolates were examined for their potential antimicrobial activities against pathogenic microorganisms. Strains showing high potential antimicrobial activities were *P. siamensis* (CMUGE015) and *D. endograminicola* (CMUGE1125). These two strains were selected for optimization studies of the production of their bioactive compounds.

Periconia siamensis (CMUGE015) was antagonistic against various human pathogens. Metabolites in both culture filtrates and crude extracts of the filtrates were inhibitory against various microorganism tests. The major active ingredients were purified and identified by infrared spectroscopy (IR), nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR) and mass spectral (MS) data as Modiolide A, 5,8-dihydroxy-10-methyl-5,8,9,10-tetrahydro-2H-oxecin-2-one and 4-Chromanone, 6-hydroxy-2-methyl- (5CI). Bioassays showed that both compounds had antibacterial activity against all the tested bacteria. This is the first report of the production of these two antibacterial metabolites from a terrestrial endophytic fungus.

Bioactive compounds such as lovastatin, anticholesterol agent and the natural carcinogen, aflatoxin are well known and synthesized by polyketide synthase from fungal as polyketide type I. Other type I PKS products are known as melanin and plant pathogen compounds. In this study, a phylogenetic approach was used to investigate and screen the diversity of fungal genes encoding partial PKSs that are predicted to synthesis polyketide products (PKs). The resulting genealogy, constructed by using the highly conserved Keto Synthase (KS) domain, indicated that selected species within Ascomycota (Pezizomycotina) have large number of PKS genes: 6 in *Cladosporium* sp. (CMUGE2210), 5 in *D. endogrammicola* (CMUGE1125), 7 in *P. siamensis* (CMUGE015), 4 in *Xylaria hypoxylon* CMUGE1005 and 8 in *Thermoascus aurantiacus* (SL16W). However, one of the *T. auratiacus* sequences is the likely result of horizontal gene transfer as the sublineage of fungi. By using KSDI primers in this study, PKS genes were divided into two subclades, reducing and non-reducing PKSs. Most of the fungal amino acid sequences in this study were grouped to reducing PKS rather than non-reducing PKS. The

species from different classes of Pezzizomycotina shared the same PKS gene and supported different fungal genomes shared few putative orthologous *PKS* genes, even between closely related genomes in the same class or genus. The discontinuous distributions of orthologous *PKS*s among fungal species can be explained by gene duplication, divergence, and gene loss; horizontal gene transfer among fungi does not need to be invoked.

Key Words: diversity, graminicolous fungi, *Thysanolaena latifolia*, *Saccharum spontaneum*, secondary metabolites, *Vetiveria zizanioides*

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์	ความหลากหลายทางชีวภาพของเชื้อราบนหญ้าบางชนิด และการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ	
ผู้เขียน	นายวีระพล พิลาบุตร	
ปริญญา	วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต (ชีววิทยา)	
คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	ศ.ดร. สายสมร ถ้ายอง	ประธานกรรมการ
	Prof. Dr. Kevin D. Hyde	กรรมการ
	Dr. Eric H.C. McKenzie	กรรมการ
	Prof. Dr. John F. Peberdy	กรรมการ

บทคัดย่อ

เชื้อรามีบทบาทที่มีความสำคัญต่อระบบนิเวศวิทยาโดยที่มีความสัมพันธ์กับพืชอาศัยซึ่งมีความหลากหลายทั้งการเป็นกลุ่มเอนโดไฟต์ แซบโพรบ และเชื้อราก่อโรค ซึ่งพบได้กับพืชทุกชนิดที่ทำการศึกษา การค้นพบเชื้อราชนิดใหม่สามารถพบได้เสมอในระหว่างการศึกษา ซึ่งนำไปสู่การเพิ่มความหลากหลายของจำนวนของเชื้อราที่ทราบชนิด การศึกษาอย่างต่อเนื่องช่วยนำไปใช้ในการประมาณจำนวนเชื้อราที่มีอยู่ในโลก ช่วยอนุรักษ์จำนวนของระดับความหลากหลายทางชีวภาพและยังนำไปสู่การค้นพบผลิตภัณฑ์ทางธรรมชาติและสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดใหม่ ในการศึกษาในครั้งนี้ได้ทำการศึกษาระบบนิเวศและความหลากหลายทางชีวภาพของเชื้อราในกลุ่มเอนโดไฟท์และแซบโพรบจากหญ้าบางชนิด คือ หญ้าไม้กวาด (*Thysanolaena latifolia*), กกลาว (*Saccharum spontaneum*) และหญ้าแฝก (*Vetiveria zizanioides*)

ในการศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพของเชื้อราเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากเนื้อเยื่อของใบ เส้นกลางใบ ข้อ เนื้อเยื่อระหว่างข้อ และราก ของหญ้าไม้กวาด (หญ้าเนื้อแข็ง) และ หญ้าแฝก (หญ้าเนื้ออ่อน) ที่แยกได้จากหญ้าทั้ง 6 แห่ง พบว่าสามารถแยกเชื้อราที่มีความแตกต่างกันได้ 51 ชนิดในหญ้าไม้กวาด จากแหล่งศึกษาทั้ง 4 แห่ง และแยกเชื้อราที่มีความแตกต่างกันได้ 44 ชนิดในหญ้าแฝก จากแหล่งศึกษาทั้ง 2 แห่ง โดยพบว่าเชื้อราในกลุ่ม *Colletotrichum* spp., *Phomopsis* spp.

และ *Mycelia sterilia* เป็นกลุ่มที่พบได้บ่อยตามลำดับในระหว่างทำการศึกษา โดยที่มีความคาบเกี่ยวกันในระหว่างชนิดของเชื้อราในหญ้าไม้กวาดระหว่างฤดูร้อนและฤดูฝนถึง 68.8 % ใน และพบว่ามีความคาบเกี่ยวกันระหว่างชนิดของเชื้อราในหญ้าแฝกหอมเพียง 54.3 % พบว่าในการศึกษาหญ้าไม้กวาด ของทั้ง 4 แห่ง

พบค่า colonization rate (CR) ในฤดูฝนและฤดูร้อนไม่มีความแตกต่างกัน สำหรับการศึกษารวมทั้ง หญ้าแฝก ของทั้ง 2 แห่ง พบค่า colonization rate (CR) เป็น 51.1 % และ 51.4 % ในฤดูฝน และ 44.7% และ 43.8% ในฤดูร้อน ในการศึกษาในครั้งนี้ยังได้ทำการศึกษถึงความสัมพันธ์ของเชื้อราเอนโดไฟต์ ผลของแหล่งที่เก็บตัวอย่าง อายุของเนื้อเยื่อ และชนิดของเนื้อเยื่อจากส่วนต่างๆของกัน โดยพบเชื้อราชนิดใหม่ในกลุ่ม hyphomycetes 2 ชนิดคือ *Dactylaria endograminicola* sp. nov. (CMUGE1125) และ *Periconia siamensis* sp. nov. (CMUGE015) จากหญ้าไม้กวาด

ในการศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพของเชื้อราในกลุ่มแซบโพรบที่แยกได้หญ้าไม้กวาดและกกลาว พบเชื้อราจำนวน 67 ชนิด จากหญ้าไม้กวาด ประกอบด้วย ascomycetes 25 ชนิด hyphomycetes 32 ชนิด coelomycetes 9 ชนิด และ Myxomycetes 1 ชนิด โดยพบเชื้อราในกลุ่มของ *Niptera exselsior* (29.2%), *Periconia* spp. (51.7%), *Stachybotrys* spp. (24.2%) และ *Tetraploa aristata* (20.0%) บ่อยที่สุด ในส่วนของกกลาว พบว่ามีความหลากหลายของชนิดของเชื้อรามากกว่าโดยพบ เชื้อราแซบโพรบทั้งหมด 71 ชนิด โดยแบ่งเป็น ascomycetes 33 ชนิด hyphomycetes 35 ชนิดและ coelomycetes 10 ชนิดโดยพบเชื้อรา ของ *Massarina* spp. (6.6%), *Periconia* spp. (occurring on 19.6 % of samples) และ *Tetraploa aristata* (9.6 %) มากที่สุดในระหว่างขั้นตอนการศึกษาในส่วนของการศึกษาผลของแหล่งของหญ้าไม้กวาดพบว่ามีความคาบเกี่ยวของชนิดของเชื้อจากแหล่งทำการศึกษาลงถึง 23 ชนิด และมีความคาบเกี่ยวของชนิดของเชื้อถึง 50.5 % และมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนของชนิดของเชื้อที่แยกได้จากใบและลำต้น 59.6 % โดยพบว่า *Acremonium* sp., *Niptera exselsior*, *Periconia cookie* และ *Verticillium* sp. เป็นกลุ่มเชื้อที่พบได้บ่อยในเนื้อเยื่อทั้งสอง และจากแหล่งการศึกษา ผลของแหล่งที่เก็บตัวอย่างของหญ้า พบว่าเชื้อราแซบโพรบ *Periconia* spp., *Spegazzinia deightonii* และ *Sporidesmium cookie* มีความจำเพาะต่อหญ้าที่เก็บได้จากบริเวณสวนสัตว์เชียงใหม่(สูงจากระดับน้ำทะเล 300 เมตร) ในขณะที่ *Massarina chamaecyparissi*, *Lophaeostoma macrostomum* และ *Dactylaria* spp. สามารถพบได้จำเพาะต่อหญ้าที่เก็บได้ บริเวณพระตำหนักภูพิงคราชนิเวศน์ (สูงจากระดับน้ำทะเล 1600 เมตร) ในระหว่างการศึกษาพบกลุ่มเชื้อที่มีหายากและมีความจำเพาะต่อหญ้าคือ *Drumopama moonseti* และ *Pycnothyriopsis*

sp.1 นอกจากนี้ยังพบเชื้อที่เป็นชนิดใหม่คือ *Dendrographium thysanolaenae* จากหญ้าไม้กวาด

จากการศึกษาในส่วนของความหลากหลายทางชีวภาพ พบเชื้อราที่น่าสนใจในกลุ่ม *Dactylaria* และกลุ่มเชื้อที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาใกล้เคียงกันซึ่งพบว่ามีปัญหาในการจัดจำแนกเข้าสู่ระดับชนิดของเชื้อราที่ยังคงมีความสับสนตั้งแต่มิการค้นพบเชื้อราในกลุ่มนี้และเชื้อราในกลุ่มดังกล่าวยังพบว่ามีรายงานว่ามีสารยับยั้งแบบใช้เพศทำให้ไม่สามารถจัดจำแนกกลุ่มเพื่อเข้าสู่ระบบการจัดจำแนกของเชื้อราได้ จึงได้สนใจทำการศึกษาวิจัยโดยอาศัยข้อมูลทางด้านพันธุกรรม โดยอาศัยยีนในกลุ่มของ ribosomal DNA และเครื่องมือทางด้านชีวโมเลกุลจากการศึกษาพบว่าเชื้อราดังกล่าวเป็นเชื้อราที่ถูกจัดให้เป็น polyphyletic group โดยธรรมชาติซึ่งพบการกระจายของเชื้อราในกลุ่มดังกล่าวไปมีความใกล้ชิดสัมพันธ์กับเชื้อราในกลุ่มของ Dothideomycetes, Orbiliomycetes และ Sordariomycetes ในขณะที่การจำกัดความสัมพันธ์ทางด้านอนุวิธานยังคงไม่ชัดเจน แต่อย่างไรก็ตามพบว่า *Dactylaria* ส่วนใหญ่จะไปมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับเชื้อราในกลุ่ม Sordariomycetes นอกจากนี้ยังพบความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการจากการศึกษาความสัมพันธ์ของเชื้อราโดยใช้ความรู้ทางอนุวิธานว่า เชื้อรา *Dactylaria* มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับเชื้อราในกลุ่ม *Scolecobasidium*

เชื้อราจำนวน 123 ไอโซเลท ที่ได้จากการศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพของเชื้อราของหญ้าข้างต้นถูกนำมาศึกษาและตรวจสอบหาความสามารถในการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ พบเชื้อราที่คาดว่าจะมีความสามารถในการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพต่อต้านการเจริญของเชื้อก่อโรคในกลุ่มแบคทีเรีย คือ *P. siamensis* (CMUGE1015) และ พบเชื้อราที่คาดว่าจะมีความสามารถในการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพต่อต้านการเจริญของเชื้อก่อโรคในกลุ่มราโรคพืช คือ *D. endograminicola* (CMUGE1225)

เชื้อรา *P. siamensis* (strain CMUGE015) ถูกนำมาศึกษาต่อเพื่อทำการแยกสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพและหาโครงสร้างทางเคมี พบสารประกอบ 2 ชนิด คือ Modiolide A, 5,8-dihydroxy-10-methyl-5,8,9,10-tetrahydro-2H-oxecin-2-one และ 4-Chromanone, 6-hydroxy-2-methyl- (5CI) โดยใช้ความรู้ทางสเปกโตรสโคปี นอกจากนี้ยังพบผลึกของสาร 5,8-dihydroxy-10-methyl-5,8,9,10-tetrahydro-2H-oxecin-2-one ซึ่งไม่เคยมีรายงานโครงสร้างของผลึกมาก่อน สารออกฤทธิ์ดังกล่าวได้ทำการศึกษาถึงคุณสมบัติในการต่อต้านการเจริญของเชื้อแบคทีเรียต่อโรคผลการศึกษาและการทดสอบประสิทธิภาพ (MIC test) ได้ถูกรายงานไว้ในการศึกษาวิจัยนี้

นอกจากทำการศึกษาในการหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพแล้วในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ได้ทำการศึกษาในระดับของยีนของสารพันธุกรรมของเชื้อราเพื่อที่จะค้นหาเชื้อราที่มีความสามารถในการผลิตสารในกลุ่มของโพลีคีไทด์ ซึ่งเป็นกลุ่มสารที่กำลังได้รับความสนใจและมีประโยชน์ทั้งทางด้านการแพทย์และเภสัชกรรม เช่น สารต่อต้านคอเรสเตอรอล และต่อต้านสารก่อมะเร็ง (lovastatin) และสารกลุ่มอื่นใน PKS type I ซึ่งรู้จักในสารกลุ่มเมลานินและสารที่ก่อให้เกิดโรคในพืช ในการศึกษาในครั้งนี้ได้ใช้ความรู้ทางด้านชีวโมเลกุลเข้าไปค้นหาความหลากหลายของยีนในกลุ่ม PKSs ในเชื้อราที่ทำการคัดเลือกที่คาดว่าจะมีความสามารถในการผลิตสารในกลุ่ม PKS I ได้ โดยมีจุดมุ่งหมายในการศึกษาในส่วนของ KS domain ของ PKS ซึ่งพบเชื้อราที่ทำการคัดเลือกมาทำการศึกษามีจำนวนของยีนที่คาดว่าจะมีความสามารถในการผลิตสารในกลุ่ม PKSs จำนวนมาก โดยพบยีนที่มีความแตกต่างของ PKSs ใน *Cladosporium* sp. CMUGE2210 จำนวน 6 ยีน และ 5 ยีนใน *D. endograminicola* (CMUGE 012), 7 ยีนใน *P. siamensis* (CMUGE015), 4 ยีนใน *Xylaria hypoxylon* CMUGE1005, 8 ยีนใน *Thermoascus aurantiacus* ซึ่งในการศึกษาในครั้งนี้ได้พบยีน PKSs แบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ คือ reducing และ non-reducing PKSs ซึ่งมีความหลากหลายในการผลิตสารออกฤทธิ์ในกลุ่มโพลีคีไทด์ต่างกัน นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อราในกลุ่ม Pezzizomycotina ที่ทำการศึกษานี้ยังมีบริเวณของยีนหลายๆ บริเวณที่มีความใกล้เคียงกัน ความสัมพันธ์ของยีนในกลุ่มดังกล่าวในการผลิตสารในกลุ่ม PKSs การศึกษานี้เป็นการศึกษาในขั้นต้นเพื่อที่จะทำนายถึงการชักนำให้มีการแสดงออกของยีน (expression) และการผลิตโปรตีนในกลุ่มดังกล่าวในการศึกษาขั้นต่อไป นอกจากนี้ในด้านความสัมพันธ์ทางด้านวิวัฒนาการของยีนและของเชื้อในกลุ่มดังกล่าวได้ถูกอธิบายไว้ในการศึกษา

คำสำคัญ: กกลาว, ความหลากหลาย, สารปฏิชีวนะ, เหง้า, เหง้าแฝก, เหง้าไม้กวาด