Thesis Title	Biodiversity and Secondary Metabolites of Endophytic Fungi Isolated from Some Medicinal Plants in Northern Thailand	
Author	Mr. Nakarin Suwannarach	
Degree	Doctor of Philosophy (Biology)	
Thesis Advisory Committee	Prof. Dr. Saisamorn Lumyong	Advisor
	Assoc. Prof. Dr. Kevin D. Hyde	Co-advisor
	Prof. Dr. Kenji Matsui	Co-advisor
	Dr. Jamal Ouazzani	Co-advisor

ABSTRACT

This study investigated the diversity of endophytic fungi in four medicinal plants; *Cinnamomum bejolghota* (Buch. – Ham.), *C. zylanicum* (Nees.), *Gnetum montanum* (Markgr.) and *Lagerstroemia loudoni* (Teijsm. & Binn) in northern Thailand, and evaluated the potential of selected fungal strains to promote plant growth and control microbial disease. A total of 5,925 endophytic isolates were recovered from 5,625 sample tissues of healthy leaves (vein and inter vein) and stems of selected plants. Fungal colonization rates ranged from 34.67% to 67.20%. Fungal endophytes were most frequently isolated from trees during the wet season. All isolated endophytes were classified into 56 taxa comprising 14 ascomycetes, 1 basidiomycete and 41 anamorphic taxa (13 coelomycetes and 28 hyphomycetes). Fungal colonization rates of inter vein

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

regions of both *C. zylanicum* and *L. loudoni* were lower than veins and stems, except for *C. bejolghota* and *G. montanum*. *Colletrotrichum gloeosporioide*s, *Phomopsis* spp., xylariaceous fungi, *Glomerella* spp. and *Guignardia magiferae* were consistently dominant.

Moreover, volatile-producing endophytic fungus genus *Muscodor* was isolated from some medicinal plants in northern Thailand. Based on its morphology, antimicrobial activity, volatile chemical composition and phylogeny, five new species, *M. cinnamomi, M. equiseti*, *M. musae*, *M. oryzae* and *M. suthepensis* recovered from *C. bejolghota* (Buch. – Ham.), *Equisetum debile* (Roxb.), *Musa acuminate* (Colla.) and *Oryza rufipogon* (Griff.), respectively were described. Four new fungal species produced 2-methylpropanoic acid as a main volatile organic compound (VOC), where as *M. oryzae* produced 3-methylbutan-1-ol as the major VOC. *Muscodor cinnamomi* and *M. suthepensis* showed 100% inhibition and killed all tested bacteria, plant pathogenic fungi and yeast.

Muscodor cinnamomi was selected and investigated for its *in vitro* ability to produce siderophore, phenazine, indole-3-acetic acid (IAA), to solubilize different toxic metal (Ca, Co, Cd, Cu, Pb, Zn)-containing insoluble minerals and metal tolerance. The results indicated that this fungus is able to produce hydroxamate-type siderophore (11.62±0.35 μg ml^{-1}), phenazine (187.60±10.43 μg ml^{-1}) and IAA (45.36±2.40 g ml^{-1}). Moreover, fungal IAA could stimulate coleoptile elongation, and increase seed germination and root length of tested plants. Fungal phenazine showed growth inhibition of *Rhizoctonia solani* AG-2. The metal tolerance and solubilizing ability depended on the

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

type of insoluble minerals. *Muscodor cinnommi* showed the highest growth tolerance on Ca-containing media at 150 mM, followed by Zn-containing medium at 100 mM and Cd-containing media at 10 mM. In addition, *M. cinnamomi* was evaluated as a potential biological agent to control damping off disease caused by *R. solani* AG-2. The results indicated that rye grain was the best grain for fungal inoculum production and 30 g rye grain culture of *M. cinnamomi* was a minimum dose to completely control *R. solani* AG-2 damping off of bird pepper, bush bean, garden pea and tomato seedlings.

Two volatile-producing endophytic fungi, *M. suthepensis* and *Nodulisporium* sp. CMU-UPE34 were selected and evaluated for potential to control postharvest disease by mycofumigation. 3-methylbutan-1-ol and eucalyptol were the most abundant VOC's from *M. suthepensis* and *Nodulisporium* sp. CMU-UPE34, respectively, which showed antifungal activity. Rye grain and jasmine rice grain were the best grains for *M. suthepensis* and *Nodulisporium* sp. CMU-UPE34 inocula production, respectively. Treatment of 30 g rye grain culture of *M. suthepensis* was the minimum dose that completely controlled *Citrus tangerine* (Tanaka.) fruit rot caused by green mold (*Penicillium digitatum*). Treatment with 60 g jasmine rice grain cultures of CMU-UPE34 was the minimum dose for control of blue mold (*P. expansum*) decay on *C. aurantifolia* (Swing.) and *C. reticulate* (Blanco.) In addition, 50 g jasmine rice grain cultures of CMU-UPE34 completely controlled green mold decay on *C. limon* (L. Burm. f.).

A total 127 endophytic fungal strains were primary tested for antimicrobial production. Among three different culture media, potato dextrose broth was the best media for antimicrobial production. The highest antimicrobial activity was found on

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

strain CMU-Cib179, followed by strain CMU-Cib1018, which both fungi were isolated from *C. bejolghota*. The morphology and molecular identification indicated that fungal strains CMU-Cib179 and CMU-Cib1018 were *Mycoleptodiscus terrestris* and *Nodulisporium* sp., respectively. Therefore, these strains were selected to further study the secondary metabolites that they produced. After purification and structure elucidation, four compounds, *p*-hydroxybenzoic acid methyl ester (**1**), puupehenol (**2**), 4-hydroxybenzoic acid (**3**) and 2,4′-dihydroxyacetophenone (**4**) were obtained from *M. terrestris* culture. Moreover, five compounds, 8-methoxynaphthalen-1-ol (**5**), 5-hydroxy-2-methyl-4-chromanone (**6**), 5-hydroxy-2-methyl-*4H*-chromen-4-one (**7**), 1-(2,6-dihydroxyphenyl)propan-1-one (**8**) and 1-(2,6-dihydroxyphenyl)ethanone (**9**) was isolated from *Nodulisporium* sp. CMU-Cib1018 culture. All compounds were most inhibited *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *S. aureus*, except compound **6**. Only, compound **8** was affective against the growth of *Escherichia coli* and compound **9** exhibited activity against the growth of *Aspergillus flavus*, *P. digitatum* and *P. expansum*.

Keywords: Endophytic fungi, medicinal plant, secondary metabolite, biological control, volatile organic compound

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ ความหลากหลายทางชีวภาพและสารทุติยภูมิเมแทโบไลต์ของราเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากพืชสมุนไพรบางชนิดในภาคเหนือของประเทศไทย

ผู้เขียน นายนครินทร์ สุวรรณราช

ปริญญา วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต (ชีววิทยา)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

ศ. ดร. สายสมร ลำยอง	อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
Assoc. Prof. Dr. Kevin D. Hyde	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
Prof. Dr. Kenji Matsui	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
Dr. Jamal Ouazzani	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

บทคัดย่อ

การศึกษานี้เพื่อตรวจสอบความหลากหลายของราเอนโดไฟท์ในพืชสมุนไพรจำนวน 4 ชนิด คือ อบเชยไทย (*Cinnamomum bejolghota*) อบเชยเทศ (*Cinnamomum zylanicum*) เครือมะเมื่อย (*Gnetum montanum*) และเสลา (*Lagerstroemia loudoni*) ในภาคเหนือของประเทศไทย และประเมินศักยภาพของสายพันธุ์ราที่คัดเลือกเพื่อส่งเสริมการเจริญของพืชและควบคุมจุลินทรีย์ก่อโรค ราเอนโดไฟท์จำนวนทั้งหมด 5,925 ไอโซเลท ได้มาจากเนื้อเยื่อตัวอย่างจำนวน 5,625 ของใบ (เส้นกลางใบ และเนื้อใบ) และกิ่งของพืชที่เลือกศึกษา colonization rate ของราเอนโดไฟท์อยู่ในช่วง 34.67 ถึง 67.20 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งราเอนโดไฟท์ที่แยกได้พบมากในพืชในช่วงฤดูฝน ราเอนโดไฟท์ที่แยกได้จำแนกออกเป็น 56 taxa ประกอบด้วย 14 ascomycetes, 1 basidiomycete และ 41 anamorphic taxa (13 coelomycetes และ 28 hyphomycetes) colonization rate ของราที่พบในเนื้อใบของพืชทั้ง 2 ชนิด คือ *C. zylanicum* และ *L. loudoni* มีค่าที่ต่ำกว่าเส้นกลางใบและกิ่ง ยกเว้น *C. bejolghota* และ *G. montanum*

โดยมี *Colletrotrichum gloeosporioides*, *Phomopsis* spp., xylariaceous fungi, *Glomerella* spp. และ *Guignardia magiferae* เป็นราเอนโดไฟท์ชนิดเด่น

นอกจากนี้พบราเอนโดไฟท์ที่ผลิตสารระเหยในจีนัส *Muscodor* 5 สายพันธุ์ที่แยกได้จากพืชสมุนไพรบางชนิดในภาคเหนือของประเทศไทย เมื่อพิจารณาลักษณะทางสัณฐานวิทยา ฤทธิ์การต้านจุลินทรีย์ องค์ประกอบทางเคมีของสารระเหยและความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ ราชนิดใหม่ คือ *Muscodor cinnamomi*, *M. equiseti*, *M. musae*, *M. oryzae* และ *M. suthepensis* ได้มาจาก อบเชยไทย (*C. bejolghota*) หญ้าถอดปล้อง (*Equisetum debile*) กล้วยป่า *(Musa acuminate)* และข้าวป่า (*Oryza rufipogon*) ตามลำดับ เชื้อราชนิดใหม่ 4 ชนิด ที่ผลิต 2-methylpropanoic acid ที่เป็นสารประกอบอินทรีย์ระเหยหลัก ยกเว้น *M. oryzae* ผลิต 3-methylbutan-1-ol เป็นสารประกอบอินทรีย์ระเหยหลัก *M. cinnamomi* และ *M. suthepensis* แสดงความสามารถในการยับยั้งและฆ่าแบคทีเรีย ราโรคพืช และยีสต์ที่ทดสอบทั้งหมดได้ 100 เปอร์เซ็นต์

Muscodor cinnamomi ได้รับการคัดเลือกและตรวจสอบความสามารถในการผลิตsiderophore, phenazine, indole-3-acetic acid (IAA), การละลายโลหะที่เป็นพิษที่แตกต่างกัน (แคลเซียม (Ca)โคบอล (Co) แคดเมียม (Cd) ทองแดง (Cu) ตะกั่ว (Pb) และ สังกะสี (Zn))ซึ่งอยู่ในรูปแร่ธาตุที่ไม่ละลายและความทนทานต่อโลหะในห้องปฏิบัติการ ผลการทดลองพบว่าราชนิดนี้สามารถผลิต siderophore ชนิด hydroxamate (11.62±0.35 μg ml^{-1}), phenazine (187.60±10.43 μg ml^{-1}) และ IAA (45.36±2.40 μg ml^{-1}) นอกจากนี้ IAA ของราสามารถกระตุ้นการยืดตัวของ coleoptile และเพิ่มการงอกของเมล็ดและความยาวรากของพืชทดสอบ phenazine ของราแสดงผลการยับยั้งการเจริญของ *Rhizoctonia solani* AG-2 ความทนทานและความสามารถในการละลายโลหะขึ้นอยู่กับชนิดของแร่ธาตุที่ไม่ละลายน้ำโดยแสดงความทนทานสูงสุดในการเจริญเติบโตในอาหารผสมแคลเซียม 150 mM ตามด้วยอาหารผสมสังกะสี 100 mM และอาหารผสมแคดเมียม 10 mM นอกจากนี้ *M. cinnamomi* ได้รับการประเมินศักยภาพในการเป็นตัวแทนทางชีวภาพเพื่อควบคุมโรคเน่าระดับดินที่เกิดจากรา *R. solani* AG-2 จากผลการทดลองพบว่าเมล็ดข้าวไรน์ดีที่สุดสำหรับผลิตหัวเชื้อและ 30 กรัมของ *M. cinnamomi*ในเมล็ดข้าวไรน์เป็น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ปริมาณขั้นต่ำในการควบคุมโรคเน่าระดับดินของ *R. solani* AG-2 ได้อย่างสมบูรณ์ในต้นกล้าของพริก ขี้หนู ถั่วแขก ถั่วลันเตา และมะเขือเทศ

ราเอนโดไฟท์ที่ผลิตสารระเหย 2 ชนิด ได้แก่ *M. suthepensis* และ *Nodulisporium* sp. CMU-UPE34 ได้รับการคัดเลือกและประเมินศักยภาพในควบคุมโรคหลังการเก็บเกี่ยวโดยใช้วิธีการรม 3-methylbutan-1-ol และ eucalyptol เป็นสารอินทรีย์ระเหยที่พบมากที่สุดใน *M. suthepensis* และ *Nodulisporium* sp. CMU-UPE34 ตามลำดับ ซึ่งแสดงกิจกรรมในการต้านรา เมล็ดข้าวไรน์และข้าวหอมมะลิดีที่สุดในการผลิตหัวเชื้อของ *M. suthepensis* และ *Nodulisporium* sp. CMU-UPE34 ตามลำดับ กรรมวิธีของ 30 กรัมของ *M. suthepensis* ในเมล็ดข้าวไรน์เป็นปริมาณขั้นต่ำที่ควบคุมโรคผลเน่าของส้มสายน้ำผึ้ง (*Citrus tangerine*) ที่เกิดจากราเขียว (*Penicillium digitatum*)ได้อย่างสมบูรณ์ กรรมวิธีของ 60 กรัมของ CMU-UPE34 ในเมล็ดข้าวหอมมะลิเป็นปริมาณขั้นต่ำที่ควบคุมราน้ำเงิน (*P. expansum*) ของมะนาว (*C. aurantifolia*) และส้มแมนดาลิน (*C. reticulata*) นอกจากนี้ 50 กรัม CMU-UPE34 ในเมล็ดข้าวหอมมะลิเป็นปริมาณขั้นต่ำที่ควบคุมผลเน่าจากราเขียวของเลมอน (*C. limon*) ได้อย่างสมบูรณ์

จากการทดสอบราเอนโดไฟท์ทั้งหมด 127 สายพันธุ์ในการผลิตสารยับยั้งจุลินทรีย์ขั้นต้นโดยเลี้ยงในอาหาร 3 ชนิด ที่พบว่า potato dextrose broth เป็นอาหารที่ดีที่สุดในการผลิตสารยับยั้งจุลินทรีย์ และพบว่าราสายพันธุ์ CMU-Cib179 และ CMU-Cib1018 มีกิจกรรมต้านจุลินทรีย์เป็นสองลำดับแรก โดยราทั้งสองแยกได้จากอบเชยไทยเมื่อพิจารณาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการจำแนกโดยเทคนิคอณูชีวโมเลกุลพบว่าสายพันธุ์ CMU-Cib179 และ CMU-Cib1018 คือ *Mycoleptodiscus terrestris* และ *Nodulisporium* sp. ตามลำดับ ดังนั้นจึงคัดเลือกราทั้งสองชนิดเพื่อศึกษาการผลิตสารเมแทโบไลต์ทุติยภูมิ หลังจากการทำให้บริสุทธิ์และบ่งบอกโครงสร้าง พบสารประกอบจำนวน 4 ชนิด ได้แก่ *p*-hydroxybenzoic acid methyl ester (**1**), puupehenol (**2**), 4-hydroxybenzoic acid (**3**) และ 2,4′-dihydroxyacetophenone (**4**) ได้จาก *M. terrestris* และสารประกอบอีกจำนวน 5 ชนิด ได้แก่ 8-methoxynaphthalen-1-ol (**5**), 5-hydroxy-2-methyl-4-chromanone (**6**), 5-hydroxy-2-methyl-*4H*-chromen-4-one (**7**), 1-(2,6-dihydroxyphenyl)propan-1-one (**8**) และ 1-(2,6-dihydroxyphenyl) ethanone (**9**) ได้จาก *Nodulisporium* sp. โดยสารประกอบทั้งหมดยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* และ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

methicillin-resistant *S. aureus* ยกเว้นสารประกอบที่ (**6**) นอกจากนี้สารประกอบที่ (**8**) เท่านั้นที่ยับยั้งการเจริญของ *Escherichia coli* และสารประกอบที่ (**9**) ยับยั้งการเจริญของรา *Aspergillus flavus*, *P. digitatum* และ *P. expansum* ได้

คำสำคัญ: ราเอนโดไฟท์, พืชสมุนไพร, เมแทโบไลต์ทุติยภูมิ, การควบคุมโดยชีววิธี, สารอินทรีย์ระเหย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved