Project : Distribution of Endophytic Fungi Among Indigenous Plant Species in Doi Suthep-Pui Area

Thirty nine indiginous dicotyledonous plant seedling species and two mature plants (*Shorea roxburgii* and *Mesua ferrea*) collected from Doi Suthep-Pui National Park area were examined for endophytic fungi. The first set of experiment was done with 32 seedling species by random sampling from plant tissue. Isolation was achieved by a standard triple sterilization technique, using surface sterilized leaves disc , stem or branch segments plated onto water agar or 2% malt extract agar with 30 mg/l of rose bengal and 50 mg/l streptomycin sulfate or chloramphenicol and incubated at 30 °C up to 60 days. Advancing region ,14 days old, of mycelia growing from the tissue were transferred to PDA or corn meal agar slant and incubated at 30° C to promote sporulation.

Four hundred fungal isolates were obtained and these were sorted into strains. An average of 5 endophytic species occurred on each seedling species while 6-14 fungal species were obtained from mature plant species tested. Although as many as 30% of those were mycelia sterilia, many of the fungi isolated belonged to the typical endophytic genera, eg. *Phomopsis* sp., *Colletotrichum* sp., *Phoma* sp., *Fusarium* sp. and *Curvularia* sp. Several of the isolates are sterile Xylariaceous fungi. Less common species included *Nigrospora* sp., *Alternaria* sp., *Pestalotiopsis* sp., *Cladosporium* sp. and *Penicillium* sp. Rare species were *Apiosordaria striatispora* and *Guignardia* sp.which found in many seedling species. Malt extract rose bengal agar is better than water agar for isolation of endophytic fungi.

To evaluate the colonization rate and frequency of endophytic fungal species the second experiment was carried out by isolated endophytes from 7 seedlings and 2 mature plant species. A total of 14 fungal species were recovered from 700 samples of leaves , stems or twigs taken from 5 individual plants. *Shorea roxbougii* showed the highest diversity of endophytes, whereas *Manglietia garrettii* showed the lowest (9 species).The most frequently isolated fungi were *Gloeosporium* sp., *Glomellera* sp., mycelia sterilia, *Colletotrichum* sp., *Phoma* sp., *Cladosporium* sp UK2, *Phomopsis* sp, *Guignardia* sp.MK3 and Xylariaceous fungi . Other species of not more than 30 isolates were *Nigrospora* sp., *Pestalotiopsis* sp., *Didymella* sp. The less frequent isolates were *Sporomella* sp., *Corynespora* sp., UK 3, *Seimatosporium* sp., *Curvularia* sp., *Fusarium* sp., *Selenophoma* sp. Seven rare species were obtained. The higher colonization rate and diversity of taxa were obtained from older segments than younger tissue segments.

Preservation of culture under sterile water at 4°C was the most convenient way to keep for at least one year. Culture kept on slant with silicone stopper or screw cap at room temperature or at 4 °C was another easy way but subculture was need every 6 months.

Xylariaceous fungi could roughly grouped by different culture morphology. Twenty four groups were differentiated by colony characteristic on oat meal agar and corn meal agar. The molecular technique using RAPD-PCR is possible to identify endophytic fungi into intra species level. By using 18S rDNA sequencing teachnique for phylogenic study, *Guignardia* sp and *Selenophoma* sp. was very close to *Botryosphaeria ribis* and *Lasioderma serricorne* repectively. This method has high potential to be used for the identification of the myceria sterilia group and also for xylariaceous fungi.

Key words: biodiversity, fungal diversity, endophytic fungi, Doi Suthep-Pui

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

เรื่อง การสำรวจการกระจายของราที่เจริญในต้นพืชป่าบริเวณดอยสุเทพ-ปุย

ได้ทำการแยกเชื้อราที่อาศัยในต้นพืชจากพืชป่าที่เป็นต้นกล้า 39 ชนิด พืชต้นแก่ 2 ชนิด (พะยอม : *Shorea roxburgii* และบุนนาค: *Mesua ferrea*) การทดลองชุดแรกจะศึกษาจากกล้าพืช 32 ชนิด โดยสุ่มแยกจากเนื้อเยื่อพืช วิธีการแยกจะทำการฆ่าเชื้อที่ผิว 3 ขั้นตอน, จากนั้นนำส่วนของใบ ลำต้น หรือกิ่งที่ตัดเป็นชิ้นๆ ซึ่งฆ่าเชื้อแล้วไปเพาะในอาหาร water agar หรือ 2% malt extract agar ที่ผสม rose bengal (30มก./ลิตร) และ สเตร็ปโตมายซีน ซัลเฟต หรือคลอแรมฟินิคลอ (50 มก./ ลิตร) บ่มที่ 30 °C นาน 60 วัน ทำการย้ายเส้นใยที่เจริญจากเนื้อเยื่ออายุ 14 วัน ไปเลี้ยงในหลอดอาหารวุ้นเอียง PDA หรือ corn meal agar บ่มที่ 30 °C เพื่อให้เกิดการสร้างสปอร์

แยกได้เชื้อรา 400 isolate ซึ่งเมื่อนำไปบ่งบอกชนิดพบว่า โดยเฉลี่ยแล้วจะพบเชื้อรา endophyte 5 species ต่อต้นกล้า 1 ชนิด แต่พบถึง 6-14 species ในพืชต้นแก่พยอม 30% ของเชื้อราที่แยกได้จะเป็นกลุ่ม Mycelia sterilia (ที่ไม่สร้างโครงสร้างสืบพันธุ์) ราหลายชนิดเป็นจีนัสที่พบเสมอว่าเป็น endophytes ได้แก่ *Phomopsis* sp., *Colletotrichum* sp., *Phoma* sp., *Fusarium* sp. และ *Curvularia* sp. หลาย isolates จะเป็นรากลุ่ม Xylaria พบราที่ไม่ค่อยพบว่าเป็น endophyte รวมทั้ง *Nigrospora* sp., *Alternaria* sp., *Pestalotiopsis* sp., *Cladosporium* sp. และ *Penicillium* sp., species ที่พบยาก คือ *Apiosordaria striatispora* และ *Guignardia* sp. ซึ่งพบในกล้าพืชหลายชนิด อาหาร malt extract ผสม rose bengal จะใช้ได้ดีกว่า water agar

การทดลองชุดที่ 2 จะเป็นการหาอัตราการมาอาศัยอยู่ และความถี่ของราชนิดต่าง ๆ ในต้นกล้าพืช 7 ชนิด เปรียบเทียบกับพืชต้นแก่ 2 ชนิด (พะยอม และบุนนาค) พบรา 14 ชนิด จากตัวอย่างเนื้อเยื่อ 700 ตัวอย่างจากใบ, ลำต้น หรือกิ่ง ซึ่งก็ยังคงพบ 5 species ต่อต้นกล้า 1 ชนิด เช่นเดียวกัน พยอมจะพบราหลากหลายที่สุดส่วนในบุนนาคอยจะพบน้อยชนิด (9 species) ราที่พบบ่อยในกล้าที่แยกทั้ง 7 ชนิดคือ *Gloeosporium* sp.,*Glomellera* sp., Mycelia sterilia, *Colletotrichum* sp., *Phoma* sp., *Cladosporium* sp., UK2, *Phomopsis* sp., *Guignardia* sp. MK3 และรากลุ่ม *Xylaria* ราที่พบไม่เกิน 30 isolates คือ *Nigrospora* sp., *Pestalotiopsis* sp., *Didymella* sp. ราที่พบไม่มากคือ *Sporomella* sp., *Corynespora* sp., UK3, *Seinalosporium* sp., *Curvularia* sp., *Fusarium* sp. และ *Selenophoma* sp. พบรา 7 ชนิดที่เป็น rare species เนื้อเยื่อของพืชที่แก่จะพบราหลากหลายมากกว่าเนื้อเยื่อที่อ่อน

การเก็บรักษา culture ของ endophytes ที่แยกได้ วิธีที่สะดวกที่สุดคือ การเก็บในน้ำกลั่นฆ่าเชื้อและเก็บไว้ที่ 4 °C จะเก็บเชื้อได้นานอย่างน้อย 1 ปี ส่วนการเก็บเชื้อในหลอดอาหารที่มีจุกยางหรือจุกเกลียวและเก็บที่อุณหภูมิห้อง หรือ ที่ 4 °C ก็เป็นอีกวิธีที่ดี แต่ต้องถ่ายเชื้อทุก 6 เดือน

รากลุ่ม *Xylaria* นั้นสามารถแยกความแตกต่างคร่าว ๆ โดยดูลักษณะการเจริญในอาหาร จัดกลุ่มจากราที่แยกได้เป็น 24 กลุ่ม เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร oat meal agar และ corn meal agar การใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุล โดยใช้เทคนิค RAPD-PCR ก็สามารถที่จะบ่งบอกชนิดของ endophytes ถึงระดับ species หรือ strain ได้ การใช้เทคนิค 18S rDNA sequencing เพื่อศึกษา phylogenetic นั้นได้ทำการศึกษากับ *Guignardia* sp. และ *Selenophoma* sp. พบว่ามีวิวัฒนาการมาใกล้เคียงกับ *Botryosphaeria ribis* และ *Lasioderma serricorne* ตามลำดับ วิธีการนี้มีแนวโน้มสูงที่จะใช้ได้ดีในการบ่งบอกของรากลุ่ม Mycelia sterilia และ Xylaria

คำหลัก: ความหลากหลายทางชีวภาพ, ความหลากหลายของเชื้อรา, เอนโดไฟต์, ดอยสุเทพ-ปุย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved