ราเอนโดไฟท์ของใบสัก *Tectona grandis* L.และใบจามจุรี *Samanea saman* Merr. ในบริเวณจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

นางสาวสุกัญญานี แซประเสริฐ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2544

ISBN 974-17-0308-2

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ENDOPHYTIC FUNGI OF TEAK LEAVES *Tectona grandis* L. AND RAIN TREE LEAVES *Samanea saman* MERR. IN CHULALONGKORN UNIVERSITY CAMPUS

MISS SUKUNYANEE CHAREPRASERT

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science in Industrial Microbiology

Department of Microbiology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2001

ISBN 974-17-0308-2

Thesis Title	Endophytic fungi of teak leaves *Tectona grandis* L. and rain tree leaves *Samanea saman* Merr. in Chulalongkorn University campus
By	Miss Sukunyanee Chareprasert
Department	Microbiology
Thesis Advisor	Associate Professor Prakitsin Sihanonth, Ph.D.
Thesis Co-advisor	Surang Thienhirun, Ph.D.

Accepted by the Faculty of Science, Chulalongkorn University in Partial Fulfillment of the Requirements for the Master 's Degree

Pipat Karntiang .....Deputy Dean for Administrative Affairs

(Associate Professor Pipat Karntiang, Ph.D.) Acting Dean, Faculty of Science

THESIS COMMITTEE

S. Kulpreecha ..... Chairman

(Associate Professor Songsri Kulpreecha, Ph.D.)

Prakitsin Sihanonth ..... Thesis Advisor

(Associate Professor Prakitsin Sihanonth, Ph.D.)

S. Thienhirun ..... Thesis Co-advisor

(Surang Thienhirun, Ph.D.)

Leka Manoch ..... Member

(Associate Professor Leka Manoch, Ph.D.)

Mukda Kuhirun ..... Member

(Associate Professor Mukda Kuhirun, M.S.)

สุกัญญานี แซ่ประเสริฐ : ราเอนโดไฟท์ของใบสัก *Tectona grandis* L. และใบจามจุรี *Samanea saman* Merr. ในบริเวณจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. (ENDOPHYTIC FUNGI OF TEAK LEAVES *Tectona grandis* L. AND RAIN TREE LEAVES *Samanea saman* Merr. IN CHULALONGKORN UNIVERSITY CAMPUS) อ. ที่ปรึกษา : รศ.ดร. ประกิตติ์สิน สีหนนทน์, อ.ที่ปรึกษาร่วม : ดร. สุรางค์ เธียรหิรัญ จำนวนหน้า 107 หน้า. ISBN 974-17-0308-2.

งานวิจัยนี้เป็นงานวิจัยครั้งแรกที่ได้มีการศึกษาราเอนโดไฟท์ของใบสัก (*Tectona grandis* L.) และใบจามจุรี (*Samanea saman* Merr.) ที่ปลูกในบริเวณจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาชนิดและปริมาณของราเอนโดไฟท์จากใบอ่อนเปรียบเทียบกับใบแก่ ตลอดจนศึกษาผลของฤดูกาลและทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียและราจากสารทุติยภูมิที่ได้จากราเอนโดไฟท์ของใบสักและใบจามจุรี การศึกษานี้ได้ทำการเก็บตัวอย่างใบทุกๆ 2 เดือนตั้งแต่เดือนมกราคมถึงเดือนธันวาคม 2543 โดยตัดชิ้นส่วนของใบขนาด 5×5 ตารางมิลลิเมตร ทำการฆ่าเชื้อที่ผิวใบ(surface sterilization) ด้วยเอทิล แอลกอฮอล์ความเข้มข้น 95 เปอร์เซ็นต์และสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรต์ (5 เปอร์เซ็นต์คลอรีน) จากนั้นวางชิ้นส่วนของใบลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ malt extract agar ผลการศึกษาพบว่าจำนวนสกุลและชนิดรวมทั้งความถี่ของราที่แยกได้จากใบแก่ของใบสักและใบจามจุรีมีมากกว่าที่แยกได้จากใบอ่อน และพบว่าจำนวนและชนิดของราเอนโดไฟท์ของทั้งใบสักและใบจามจุรีมีปริมาณเพิ่มขึ้นระหว่างเดือนพฤษภาคมถึงเดือนธันวาคมซึ่งอยู่ในช่วงฤดูฝนแต่จะมีปริมาณลดลงในระหว่างเดือนมีนาคมถึงเดือนเมษายนซึ่งอยู่ในช่วงฤดูร้อน ราเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากใบอ่อนและใบแก่ของต้นสักมี 4 สกุลคือ *Alternaria*, *Colletotrichum*, *Nigrospora* และ *Phomopsis* นอกจากนี้ยังพบราเส้นใย mycelia sterilia และราที่ไม่สามารถจัดจำแนกได้จำนวน 5 ตัวอย่าง ราสกุลเด่นที่พบคือ *Phomopsis* ผลการศึกษายังพบอีกว่า ราสกุล *Fusarium* , *Penicillium* ,*Schizophyllum* และราในวงศ์ Xylariaceae พบในใบแก่เท่านั้น ส่วนราเอนโดไฟท์ที่พบทั้งในใบอ่อนและใบแก่ของต้นจามจุรีคือ *Phomopsis* และราเส้นใย mycelia sterilia ส่วนราสกุล *Colletotrichum* และ *Penicillium* พบในใบแก่และราสกุล *Nigrospora* พบในใบอ่อนเท่านั้น ราสกุลเด่นที่พบทั้งในใบสักและใบจามจุรีคือ *Phomopsis* จากการเลี้ยงเชื้อราเอนโดไฟท์วงศ์ Xylariaceae ลงในไม้เพื่อกระตุ้นให้เกิดการสืบพันธุ์แบบใช้เพศ ซึ่งเป็นส่วนที่ใช้ในการจำแนกเชื้อรา พบว่า *Daldinia eschscholzii* เป็นราชนิดเดียวที่มีการพัฒนาโครงสร้างในการสืบพันธุ์แบบใช้เพศ(stromata)จนถึงระยะสร้างสปอร์ ส่วนราสกุล *Xylaria* สามารถพัฒนาโครงสร้างในการสืบพันธุ์แบบใช้เพศได้แต่ไม่ถึงระยะการสร้างสปอร์ สำหรับการทดสอบหาความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียและราจากสารทุติยภูมิที่ได้จากราเอนโดไฟท์ของใบสักและใบจามจุรีจำนวน 37 สายพันธุ์ ผลการศึกษาพบว่า ราเอนโดไฟท์ 19 สายพันธุ์ สามารถสร้างสารยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *Bacillus subtilis, Staphylococcus aureus* และ *Escherichia coli* และราเอนโดไฟท์ 3 สายพันธุ์ สามารถสร้างสารยับยั้งการเจริญของรา *Candida albicans*

ภาควิชา จุลชีววิทยา ลายมือชื่อนิสิต.....

สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

ปีการศึกษา 2544 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

2490923 : MAJOR INDUSTRIAL MICROBIOLOGY
KEY WORD: ENDOPHYTE / *Samanea saman* Merr. / *Tectona grandis* L.

SUKUNYANEE CHAREPRASERT : THESIS TITLE. (ENDOPHYTIC FUNGI OF TEAK LEAVES *Tectona grandis* L. AND RAIN TREE LEAVES *Samanea saman* Merr. IN CHULALONGKORN UNIVERSITY CAMPUS) THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. PRAKITSIN SIHANONTH, Ph. D. , THESIS COADVISOR : SURANG THIENHIRUN, Ph. D., 107 pp. ISBN 974-17-0308-2.

The research represented the first survey of foliar endophytes from teak (*Tectona grandis* L.) and rain tree (*Samanea saman* Merr.) growing in the campus of Chulalongkorn University. Healthy leaves were collected at two month intervals during January to December 1999. The objectives of this investigation were isolation and identification of the endophytic fungi found within the healthy leaves, comparison of the endophyte assemblages of young and mature leaves and the investigation on seasonal effects. The leaf sections (5 × 5 mm^2) were surface sterilized by 95% ethyl alcohol and sodium hypochlorite (5% available chlorine) and then plated on malt extract agar. The number of genera and species, together with their isolation frequency in mature teak and rain tree leaves was greater than those on the young leaves. The number of fungal isolates from teak and rain tree leaves increased during May to December (rainy season) but decreased during March to April (dry season). The fungal genera found in both young and mature teak leaves were *Alternaria*, *Colletotrichum*, *Nigrospora*, *Phomopsis*, mycelia sterilia and 5 unknown. *Phomopsis* was the dominant genus in both young and mature leaves. *Fusarium*, *Penicillium*, *Schizophyllum* and member of the Xylariaceae were found only in mature leaves. For the rain tree leaves, species of *Phomopsis* and mycelia sterilia were found in both young and mature leaves. *Colletotrichum* and *Penicillium* were found only in mature leaves, whereas *Nigrospora* was found only in young leaves. In this study, *Phomopsis* was the dominant genus in both of teak and rain tree leaves. Inoculation of selective culture of Xylariaceae on suitable woody substrata were used to induce teleomorph formation. The results shown that *Daldinia eschscholzii* could be developed to mature stromata on woody substrate but a number of isolates could be recognised as *Xylaria* species on the basis of their immature formation. A total of 37 strains of endophytic fungi isolated from teak and rain tree leaves were tested for the production of antimicrobial activities. Out of these, 19 strains could produce inhibitory substances which inhibited growth of *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* and 3 strains inhibited growth of *Candida albicans* in vitro.

Department Microbiology
Field of study Industrial Microbiology
Academic year 2001

Student's signature.....
Advisor's signature.....
Co-advisor's signature.....

ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to express my greatest appreciation to my thesis advisor, Associate Dr. Professor Prakitsin Sihanonth, and my thesis coadvisor , Dr. Surang Thienhirun, at Royal Forest Department, for their valuable advice, guidance, and encouragement throughout this study.

I am particularly grateful to chairman of thesis committee, Associate Professor Dr. Songsri Kulpreecha, Associate Professor Dr. Leka Manoch, Kasetsart University, Associate Professor Mukda Kuhirun, as committee and for their editorial assistance and comments.

I would like to express my sincere gratitude and thanks to Professor A.J.S. Whalley at Liverpool John Moores University, United Kingdom, for his constant help, support and advice for my research. I am also thank Miss Lianne Nugent for her advice and helpfulness.

I am also very grateful to Mr. Ek Sangvichien at Ramkhamhaeng University and Dr. Sureewan Mekkamol, at the Royal Project Foundation, Chiangmai, for their help, advice and support in many aspects of the works.

I also thank all my friends and all members in Department of Microbiology for their friendship, help and encouragement.

Finally. I would like to thank my family for encouragement and moral support.

CONTENTS

Page

Abstract in Thai.....iv

Abstract in English.....v

Acknowledgement.....vi

Contents.....vii

List of Tables.....ix

List of Figures.....xi

List of Abbreviations.....xv

Chapter 1 Introduction.....1

Chapter 2 Literature review.....4

2.1 Grass endophytes.....5

2.1.1 Fungal taxonomy and biology.....5

2.1.2 Effects of endophytes infection.....8

2.2 Non-grass endophytes.....10

2.2.1 Distribution.....10

2.2.2 Fungal diversity.....13

2.2.3 Effects of endophyte infection and secondary metabolites were produced by endophytic fungi.....17

2.3 Isolation technique of endophytic fungi.....20

2.4 Antibiotics.....21

2.4.1 Definition of antibiotics.....22

2.4.2 Desirable properties of a clinically useful antibiotic.....22

2.4.3 Type of antibiotics.....22

2.4.4 Sources of antimicrobials.....23

Chapter 3 Materials and Methods.....25

3.1 Sampling.....25

3.2 Media.....25

3.3 Fungal isolation and culture methods.....25

3.4 Identification and nomenclature of organisms.....26

Page

3.4.1 Microscopic features....26

3.4.2 Macroscopic features....27

3.5 Technique for induction of teleomorph....27

3.6 Isolation of cultures and production of anamorphs....28

3.7 Fungal cultivation for production of antimicrobial substances.... 28

3.8 Evaluation of the antimicrobial activity....29

3.8.1 Test microorganisms....29

3.8.2 Procedures....29

Chapter 4 Results....31

4.1 Endophytes of mature teak leaves....31

4.2 Endophytes of young teak leaves....41

4.3 Endophytes of mature rain tree leaves....49

4.4 Endophytes of young rain treee leaves....58

4.5 Taxonomy of endophytic species 63

4.6 Induction of teleomorph formation....75

4.7 Antimicrobial testing....79

Chapter 5 Discussion....83

References....94

Appendices....103

Appendix a....104

Appendix b....105

Appendix c 106

Biography....107

LIST OF TABLES

Table Page

2.1 Fungi isolated as endophytes from different host plants.....14

4.1 Endophytic fungi from the mature leaves of teak during January-December 1999.....33

4.2 Endophytic fungi from mature teak leaves during January-February 1999.....35

4.3 Endophytic fungi from mature teak leaves during March-April 1999.....36

4.4 Endophytic fungi from mature teak leaves during May-June 1999.....37

4.5 Endophytic fungi from mature teak leaves during July-August 1999.....38

4.6 Endophytic fungi from mature teak leaves during September-October 1999.....39

4.7 Endophytic fungi from mature teak leaves during November-December 1999.....40

4.8 Endophytic fungi from young teak leaves during January-December 1999.....43

4.9 Endophytic fungi from young teak leaves during May-June 1999.....44

4.10 Endophytic fungi from young teak leaves during July-August 1999.....45

4.11 Endophytic fungi from young teak leaves during September-October 1999.....46

4.12 Endophytic fungi from young teak leaves during November-December 1999.....47

4.13 Endophytic fungi from mature rain tree leaves during January-December 1999.....51

Page

4.14 Endophytic fungi from mature rain tree leaves during January-February 1999....52
4.15 Endophytic fungi from mature rain tree leaves during March-April 1999....53
4.16 Endophytic fungi from mature rain tree leaves during May-June 1999....54
4.17 Endophytic fungi from mature rain tree leaves during July-August 1999....55
4.18 Endophytic fungi from mature rain tree leaves during September-October 1999....56
4.19 Endophytic fungi from mature rain tree leaves during November-December 1999....57
4.20 Endophytic fungi from young rain tree leaves during January-December 1999....59
4.21 Endophytic fungi from young rain tree leaves during May-June 1999....60
4.22 Endophytic fungi from young rain tree leaves during September-October 1999....61
4.23 Antimicrobial activities of fungal isolates from plants....80
5.1 Comparison of endophytic fungi isolated from mature teak leaves from Chiangmai and Bangkok....87
5.2 Comparison of endophytic fungi isolated from teak leaves and rain tree leaves....90

LIST OF FIGURE

Figure Page

2.1 (a) Life cycle of *Acremonium coenophialum*, an endophytic fungus of grasses. The fungus only produces hyphae that grow between plant cells. (b) Endophytic hyphae in aleurone layer of perennial ryegrass seed.....7

4.1 Endophytic fungi from mature teak leaves during January-December 1999.....34

4.2 Endophytic fungi from mature teak leaves during January-February 1999.....35

4.3 Endophytic fungi from mature teak leaves during March-April 1999.....36

4.4 Endophytic fungi from mature teak leaves during May-June 1999.....37

4.5 Endophytic fungi from mature teak leaves during July-August 1999.....38

4.6 Endophytic fungi from mature teak leaves during September-October 1999.....39

4.7 Endophytic fungi from mature teak leaves during November-December 1999.....40

4.8 Endophytic fungi from young teak leaves during January-December 1999.....43

4.9 Endophytic fungi from young teak leaves during May-June 1999.....44

4.10 Endophytic fungi from young teak leaves during July-August 1999.....45

4.11 Endophytic fungi from young teak leaves during September-October 1999.....46

4.12 Endophytic fungi from young teak leaves during November-December 1999.....47

Figure Page

4.13 Comparison of total isolation frequency of endophytic fungi in mature and young teak leaves....48
4.14 Endophytic fungi from mature rain tree leaves during January-December 1999....51
4.15 Endophytic fungi from mature rain tree leaves during January-February 1999....52
4.16 Endophytic fungi from mature rain tree leaves during March-April 1999....53
4.17 Endophytic fungi from mature rain tree leaves during May-June 1999....54
4.18 Endophytic fungi from mature rain tree leaves during July-August 1999....55
4.19 Endophytic fungi from mature rain tree leaves during September-October 1999....56
4.20 Endophytic fungi from mature rain tree leaves during November-December 1999....57
4.21 Endophytic fungi from young rain tree leaves during January-December 1999....59
4.22 Endophytic fungi from young rain tree leaves during May-June 1999....60
4.23 Endophytic fungi from young rain tree leaves during September-October 1999....61
4.24 Comparison of total isolation frequency of endophytic fungi in mature and young rain tree leaves....62
4.25 *Alternaria* sp. (a) culture on PDA (7-10 days) (b) conidia....68
4.26 *Fusarium* sp. (a) culture on PDA (7-10 days) (b) conidia....68
4.27 Culture of *Colletotrichum* sp. (a) of teak leaves on PDA (5-7 days) (b) of rain tree leaves on PDA (5-7 days)....69

Figure Page

4.28 *Nigrospora* sp. (a) culture on PDA (7-10 days) (b) conidia.....70

4.29 *Colletotrichum* sp. (a-b) conidiophore and conidia
(c) appressoria (d) setae.....70

4.30 Culture on PDA of *Phomopsis* spp. from teak leaves (10-20 days)
(a) *Phomopsis* sp. T1 (b) *Phomopsis* sp. T2 (c) *Phomopsis* sp. T3
(d) *Phomopsis* sp. T4 (e) *Phomopsis* sp. T5 (f) *Phomopsis* sp. T6
(g) *Phomopsis* sp. T7 (h) *Phomopsis* sp. T8.....71

4.31 Conidia of *Phomopsis* spp. from teak leaves
(a) α and β conidia of *Phomopsis* sp. T1 (b) α conidia of
Phomopsis sp. T2 (c) α and β conidia of *Phomopsis* sp. T3
(d) α conidia of *Phomopsis* sp. T4.....72

4.32 Culture on PDA of *Phomopsis* spp. from rain tree leaves
(10-20 days) (a) *Phomopsis* sp. S1 (b) *Phomopsis* sp. S2
(a) *Phomopsis* sp. S3 (d) *Phomopsis* sp. S4 (e) *Phomopsis* sp. S5
(b) *Phomopsis* sp. S6 (g) *Phomopsis* sp. S7.....73

4.33 Conidia head and conidia of *Penicillium* sp. 74

4.34 Conidia of *Phomopsis* spp. from rain tree leaves (a) α conidia
of *Phomopsis* sp. S3 (b) α and β conidia of *Phomopsis* sp. S5.....74

4.35 *Xylaria* sp.1 (a) culture on PDA(10 days) (b) developing stromata on
agar surface (c) immature teleomorphic stromata on twig.....75

4.36 *Daldinia eschscholzii* (a) culture on PDA (10 days)
(b) mature teleomorphic stromata on twig.....76

4.37 *Xylaria* sp. 4 (a) culture on PDA (10 days)
(b) anamorphic stromata on twig.....76

4.38 *Xylaria* sp. 8 (a) culture on PDA (10 days)
(b) anamorphic stromata on twig.....77

4.39 *Xylaria* sp.11 (a) culture on PDA (10 days)
(b) anamorphic stromata on twig.....77

Figure Page

4.40 Culture on PDA of Xylariaceae (10-15 days) (a) *Xylaria* sp. 1
(b) *Xylaria* sp. 2 (c) *Daldinia eschscholzii* (d) *Xylaria* sp. 3
(e) *Xylaria* sp. 4 (f) *Xylaria* sp. 5 (g) *Xylaria* sp. 6 (h) *Xylaria* sp. 7
(i) *Xylaria* sp. 8 (j) *Xylaria* sp. 9 (k) *Xylaria* sp. 10 (l) *Xylaria* sp. 11.....78

List of Abbreviations

B.C.	=	before the birth of Chirst
°C	=	degree celcius
cm	=	centrimetre
diam	=	diametre
e.g.	=	for example
et al.	=	et alii (and others)
hr	=	hour
m	=	metre
ml	=	mililitre
mm	=	milimetre
µm	=	micrometre