Abstract (บทคัดย่อ)

Project Code : MRG6080089

Project Title : Taxonomy and phylogeny of foliar fungi from Mangrove

Investigator : Putarak Chomnunti, Mae Fah Luang University

E-mail Address : putarak.cho@mfu.ac.th

Project Period : 2 years (2 April 2017 – 3 April 2019)

In our investigation on mangrove fungi from southern Thailand, we collected over 200 specimens from various mangrove habitats yielded 40 different saporobic fungal species. There are 10 new species, 15 new host and geographical records and 15 existing species. Two novel marine genera *Halobyssothecium* and *Halocrptovalsa* were established along with phylogenetic analyses. Further, molecular data are yielded for number of existing taxa that are lack of molecular data in GenBank and new types were designated where necessary. The results confirmed their phylogenetic placements within the natural classification system. This study further aimed to investigate relationships of parasitic, saprobic and endophytic fungi of mangroves. Several fungal isolates were screen and selected for bioactive compound study. Two selected fungal species *Paraconiothyrium mangrovei* and *parabambusicola marina* associated with an unidentified mangrove species and *Bruguiera cylindrica* were isolated and the potential antibiotic and antioxidant properties of compounds were investigated. The results of antimicrobial assay revealed that crude extract of *Paraconiothyrium mangrovei*. has antibacterial activity against *Escherichia coli* (TISTR 780) and *Salmonella typhimurium* (TISTR 292) with MICs value at 80 µg/ml and 320 µg/ml respectively. Rest of the mangrove fungi isolates generated during this study would also subject to evaluate for the antibiotic and antioxidant activities and identify their chemical constituents for further investigation as potential source for commercially bioactive compounds.

Key words: bioactive compounds, marine, taxonomy, phylogeny

บทคัดย่อ

จากการศึกษาเชื้อราจากพืชโกงกางในเขตภาคใต้ของประเทศไทย ผู้วิจัยได้รวบรวมเชื้อราไว้มากกว่า 200 ตัวอย่างจากแหล่งที่อยู่อาศัยป่าชายเลนต่างๆ พบเชื้อราจำนวน 40 ชนิดที่อยู่ในกลุ่มผู้ย่อยสลาย โดยพบเชื้อราชนิดใหม่จำนวน 10 ชนิด รายงานแหล่งที่อยู่อาศัยใหม่ของเชื้อราจำนวน 15 ชนิด ซึ่งไม่เคยมีรายงานว่าสามารถเจริญได้ในพืชโกงกางมาก่อน และพบเชื้อราที่มีรายงานมาแล้วจำนวน 15 ชนิด เชื้อราชนิดใหม่ในสกุล Halobyssothecium และ *Halocrptovalsa* จัดจำแนกโดยวิธีการวิเคราะห์ทางด้านวงศ์วานวิวัฒนาการ ซึ่งให้ข้อมูลทางด้านโมเลกุล และโมเลกุลต้นแบบที่เป็นประโยชน์ต่อการวิเคราะห์และจัดจำแนกเชื้อราอื่นๆ ที่อยู่ใน GenBank การศึกษาโครงการวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อหาความสัมพันธ์ของเชื้อราก่อโรค เชื้อราย่อยสลายและเชื้อราที่อาศัยอยู่ในพืชโกงกาง และการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของเชื้อราดังกล่าว เชื้อรา *Paraconiothyrium mangrovei* และ *Parabambusicola marina* จากพืชโกงกางเป็นตัวแทนในการศึกษาหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพเพื่อผลิตยาปฏิชีวนะและสารต้านอนุมูลอิสระ ผลการศึกษาคุณสมบัติการต้านเชื้อแบคทีเรียของเชื้อรา *Paraconiothyrium mangrovei* พบว่า สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Escherichia coli* (TISTR 780) และเชื้อ *Salmonella typhimurium* (TISTR 292) ที่ความเข้มข้นของยาในระดับต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย (MICs value) ที่ 80 µg/ml และ 320 µg/ml ตามลำดับ เชื้อราชนิดใหม่ดังกล่าวมีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียได้แม้ใช้ในประมาณที่ต่ำ แสดงว่าเชื้อรานั้นมีประสิทธิภาพในการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ นอกจากนี้ทางผู้วิจัยสนใจที่จะนำเชื้อราที่เก็บรวบรวมได้มาหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพและระบุองค์ประกอบทางเคมี เพื่อประโยชน์ในเชิงพาณิชย์ต่อไป

คำสำคัญ สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ทะเล อนุกรมวิธาน วงศ์วานวิวัฒนาการ

Executive Summary

Mangroves are tropical and subtropical swampy plants that grow in estuaries, bogs, deltas and lagoons, and harbour marine fungi in trunks and roots that are permanently or intermittently submerged in water (Kohlmeyer and Kohlmeyer 1979; Hyde and Jones 1988; Hyde and Lee 1995). Mangrove forests have vast ecological, economic and traditional importance (Kathiresan and Bingham 2001). They are considered as the second largest habitat of the earth's marine fungi species (Jones 2011a). Mangroves are the biodiversity hotspots for marine fungi and they play a vital role in nutrient recycling by secreting extracellular degradative enzymes. Marine fungi are the ecological group of microorganisms that are classified as obligate marine fungi and facultative marine fungi. Kohlmeyer and Kohlmeyer (1979) defined obligate marine fungi as "those fungi that grow and sporulate exclusively in a

marine or estuarine habitat" and facultative marine fungi as "those from a freshwater or terrestrial milieu, able to grow and possibly also sporulate in the marine environment". However, the above definition was considered as too narrow (Jones et al. 2015). Pang et al. (2016) broadened the concept of marine fungi in a revised definition that is inclusive of to include all those that occur in marine environment. In a recent compilation the total number of marine fungal species were shown to be 1112 belonging to 472 genera, with most of them beloinging to phylum Ascomycota (805 species in 352 genera), followed by phylum Basidiomycota (21 species in 17 genera) and phylum Chytridiomycota (26 species in 13 genera), respectively. These species belong to 65 orders and 129 families. At present the number of known marine fungi has increased to 1206 from 1112 but there is still an undescribed diversity of marine fungi in mangroves (Pang and Jones 2017). The number of new marine fungi has increased significantly as different habitats and substrates are examined for marine fungi (Hyde et al. 2017, 2018). Few marine fungi are also being recollected and enriched with molecular data to resolve their taxonomic placements (Hyde et al. 2017). Several marine species have been discovered, and others transferred to other taxa as a result of a wider use of sequencing data (see www.marinefungi.org, 2017). The current number of accepted marine fungi in the world is 1,257 species in 538 genera, 168 families, and 74 orders (Jones et al. 2019). Yet, there are many mangroves in Thailand remaining unexplored and probably several marine fungi are to be discovered from a rich mangrove diversity.

In this study we collected specimens from Krabi, Ranong and Phetchaburi provinces in southern Thailand and we could obtain higher percentage of new taxa from Ranong. New species investigated during this study are *Cryptosphaeria halophila*, *Diatrype mangrovei*, *Halocryptovalsa salicorniae*, *Jattaea bruguierae*, *Neocamarosporium artemisiae*, *Paraconiothyrium mangrovei*, *parabambusicola marina, Pleurotrema phetchaburiensis*, *P. thailandica* and *Rhytidhysteron bruguierae*. Our study indicated that species diversity in Ranong province is higher than other two provinces. We do believe that species diversity of southern Thailand is still unexplored. Therefore, we recommend further studies on saprobic micro fungi in mangrove habitats. Species found in mangrove habitats should overcome extreme environmental situations such as high temperature, high tidal actions, high salinity level etc. therefore, there is a huge potential of producing important bioactive compounds to survive under these conditions. It is worth to conduct further researches on bio exploitation of saprobic mangrove species. We are conducting further research on 20 more isolated fungal species for bioactive metabolites.

Content and Detail of work

Sample collection of marine and fresh water fungi was conducted from south Korea as described by Dayarathne et al. (2019a). Incubation and specimen examination were conducted at the laboratory and fungal cultures were obtained from various substrates collected by single spore isolation method following Chomnunti et al. (2014) and Dayarathne et al (2019a). Morphological characters of fungi were examined under a compound microscope and photographed by a Canon EOS 550D digital camera fitted to the microscope. Measurements such as diameter of ascomata, length and width of asci and ascospores and width of parapyses were made with the Tarosoft (R. Image Frame Work program and images use for figures were processed with Adobe Photoshop CS3 Extended version 10.0 software (Adobe Systems Inc., US). Herbarium specimens and cultures were deposited at Mae Fah Luang culture collection. DNA extractions were conducted using the fungal cultures as well as fresh fruiting structures when necessary in Kunming Institute of Botany, China. Polymerase chain reactions (PCR) and DNA sequencing will be conducted using appropriated primer combinations (Table 1). Phylogenetic analysis of multi genes were consisted of Maximum Parsimony (MP), Maximum Likelihood (ML) and Bayesian analysis. MP analysis will be performed using PAUP* 4.0b10 (Swofford 2002). Specific fungal species were subjected to explore the bioactive secondary metabolites.