A MOLECULAR PHYLOGENETIC STUDY OF SELECTED INGOLDIAN SPECIES

NATTAWUT BOONYUEN

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE (BIOTECHNOLOGY)
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
2005

ISBN 974-04-5775-4
COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

การศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการระดับโมเลกุลของราน้ำ ในกลุ่ม อินโกเดียน
(A MOLECULAR PHYLOGENETIC STUDY OF SELECTED INGOLDIAN SPECIES)

นัฐวุฒิ บุญยืน 4536531 SCBT/M

วท.ม.(เทคโนโลยีชีวภาพ)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์: จีรพันธ์ วรพงษ์, Ph.D., สมศักดิ์ ศิวิชัย, Ph.D., ไนเจล ไฮเวล โจนส์, Ph.D., ทิมโมที วิเลี่ยม เฟลเกล, Ph.D.

บทคัดย่อ

การศึกษาอนุกรมวิธานของราน้ำในกลุ่มอินโกเดียนส่วนใหญ่อาศัยสัณฐานวิทยาและรูปร่างของสปอร์ที่เกิดจากการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศและไม่อาศัยเพศ อย่างไรก็ตามราน้ำในกลุ่มอินโกเดียนบางกลุ่มโดยเฉพาะในระดับสกุลและสปีชีส์จำเป็นต้องมีการทบทวนการจำแนกใหม่ ศิวิชัยและคณะ (2546) เสนอว่าราน้ำ *H. varicosporoides* ควรมีชื่อในช่วงการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศเป็นราน้ำสกุล *Tricladium* มากกว่าที่จะเป็นสกุล *Varicosporium* ตามที่ถูกเสนอโดยทาบูกิ (2509) นอกจากนี้ราน้ำสองสปีชีส์คือ *H. varicosporoides* และ *C. indica* มีรูปร่างสัณฐานวิทยาเกือบเหมือนกัน ยกเว้นลักษณะความแตกต่างของการย้อมสีที่ปลายบนถุงสปอร์แอสคัส ดังนั้นการศึกษาวิวัฒนาการระดับโมเลกุลด้วยเทคนิคการวิเคราะห์ดีเอนเอของลำดับเบสในบริเวณ ITS1-2 และ 5.8S rDNA ถูกนำมาใช้เพื่อที่จะตอบปัญหาความสัมพันธ์ในช่วงของการสืบพันธุ์อาศัยเพศและไม่อาศัยเพศของราน้ำสองสายพันธุ์ดังกล่าวที่ใกล้ชิดกันมาก รวมทั้งตัวอย่างราน้ำในกลุ่มอินโกเดียนทั้งหมด 37สายพันธุ์ในแฟมมีลี่ Helotiaceae ผลการศึกษาทางวิวัฒนาการระดับโมเลกุลพบว่าราน้ำในกลุ่มอินโกเดียนทั้ง 37 สายพันธุ์มีวิวัฒนาการมาจากบรรพรุษเดียวกันจากวงศ์ Helotiales ผลจากการศึกษายังบ่งชี้ได้ว่าในช่วงการสืบพันธุ์อาศัยเพศราน้ำสายพันธุ์ *H. varicosporoides* และ *C. indica* และช่วงการสืบพันธุ์อาศัยเพศมีค่าความเชื่อมั่นอย่างมีนัยสำคัญ 82 เปอร์เซ็นต์ในความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการจากบรรพรุษเดียวกัน ดังนั้นลักษณะของการย้อมติดสีและไม่ติดสีที่ปลายบนถุงสปอร์แอสคัสของราน้ำทั้งสอง สปีชีส์ ถือว่าไม่ใช่ลักษณะรูปร่างที่สำคัญที่จะนำมาใช้ในการแยกของราในสองสปีชีส์นี้ ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บน ITS1-5.8S rDNA-ITS2 ใน *C. indica* SS708; *H. varicosporoides* SS76.01; SS336 และ CBS 651.66 พบว่าการเรียงตัวของลำดับนิวคลีโอไทด์ของราดังกล่าวมีความเหมือนกันอย่างมีนัยสำคัญถึง 98-99.5 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเป็นหลักฐานที่กล่าวเป็นนัยได้ว่า *H. varicosporoides* และ *C. indica* มีความใกล้ชิดกันมากหรือเกือบเป็นสายพันธุ์ เดียวกัน ต้นไม้ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการยังแสดงให้เห็นว่าสายพันธุ์ *C. indica* และ *H. varicosporoides* ที่แยกมาจากสหราชอาณาจักร อินเดีย และ ญี่ปุ่นจับกลุ่มแยกจากสายพันธุ์ที่แยกมาจากเขตร้อนชื้นในประเทศไทย ดังนั้นการศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการระดับโมเลกุลของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS1-5.8S-ITS2 ถือว่าเป็นเครื่องมือที่สามารถแก้ปัญหาความความสัมพันธ์ของราน้ำในกลุ่มอินโกเดียนในช่วงการสืบพันธุ์อาศัยเพศและไม่อาศัยเพศที่ได้

92 หน้า ISBN 947-04-5775-4

A MOLECULAR PHYLOGENETIC STUDY OF SELECTED INGOLDIAN SPECIES

NATTAWUT BOONYUEN 4536531 SCBT/M

M.Sc. (BIOTECHNOLOGY)

THESIS ADVISORS: JEERAPUN WORAPONG, Ph.D., SOMSAK SIVICHAI, Ph.D., TIMOTHY WILLIAM FLEGEL, Ph.D., NIGEL HYWEL-JONES, Ph.D.

ABSTRACT

Taxonomic studies of Ingoldian fungi are mainly based on morphological characters and ontogeny of sexual and asexual spore formation. However, some of them need revision and reclassification especially at the genus and species levels because of misleading of teleomorph and anamorph connections. Sivichai *et al*. (2003) proposed that the anamorph of *H. varicosporoides* a species of *Tricladium* rather than *Varicosporium* sp. as originally initiated by Tubaki (1966). In addition, the two species *H. varicosporoides* and *Cudoniella indica* possess almost the same morphological characteristics except for differences in the ascus staining. Thus, we conducted a molecular phylogenetic analysis of the complete ITS1-5.8S-ITS2 DNA sequences of 37 selected Ingoldian taxa in the Helotiaceae to clarify teleomorph-anamorph connections for these two conspecific genera. The phylogenetic analysis suggested that the 37 selected taxa comprised a monophyletic group in Helotiaceae, Helotiales. The results indicated that both type species have an anamorph best assigned to *Tricladium indicum* with a well-supported clade (82%) containing both of the teleomorph genera *H. varicosporoides* and *C. indica,* and their anamorphs. The molecular data suggested that the presence or absence of a staining reaction for the apical ring was not a phylogenetically reliable character. The highly significant identity (98-99.5%) of ITS1-2 and 5.8S regions of *C. indica* (SS 708) and *H. varicosporoides* (SS 336, SS 76.01 and CBS 651.66) is evidence that the two genera are very closely related or synonymous. The inferred phylogenetic trees illustrate that temperate strains isolated from the UK, India and Japan formed the subclade separate from subclade of tropical strains isolated from Thailand. Molecular phylogeny analysis based on ITS1-5.8S-ITS2 DNA sequences is a useful tool for resolving regarding teleomorph-anamorph connections within related Ingoldian taxa.

KEY WORDS: PHYLOGENETIC/ MOLECULAR/ INGOLDIAN FUNGI/ *VARICOSPORIUM* spp./ *HYMENOSCYPHUS VARICOSPOROIDES*/ *CUDONIELLA INDICA*/ *TRICLADIUM VARICOSPOROIDES*

92 p. ISBN 947-04-5775-4