

ชื่อวิทยานิพนธ์	ความสัมพันธ์ทางสายพันธุ์ของราทะเลแอตโคโมโคตา
ผู้เขียน	นางสาวจริยา สากยโรจน์
สาขาวิชา	จุลชีววิทยา
ปีการศึกษา	2547

บทคัดย่อ

วิทยานิพนธ์นี้มุ่งศึกษาสายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของราทะเลแอตโคโมโคตา 2 กลุ่ม ได้แก่ 1) ราสกุลที่ลักษณะพื้นฐานวิทยาจัดอยู่ในอันดับ Halosphaeriales และ 2) ราสกุลที่ไม่สามารถจัดจำแนกในอันดับที่เหมาะสมได้ โดยศึกษาวิเคราะห์ลำดับเบสสายไรโบโซมอลดีเอ็นเอของราอันดับ Halosphaeriales 12 ชนิด จาก 7 สกุล (ได้แก่ *Bathyascus*, *Haligena*, *Marinospora*, *Naufrogella*, *Nautosphaeria*, *Ocostaspora* และ *Remispora*) และรากลุ่มที่ไม่สามารถจัดในอันดับที่เหมาะสมได้อีก 9 ชนิด จาก 4 สกุล (ได้แก่ *Marinosphaera*, *Pedumispora*, *Swampomyces* และ *Torpedospora*)

ผลจากการวิเคราะห์ลำดับเบสสายดีเอ็นเอพบว่าราอันดับ Halosphaeriales ทุกชนิดที่ศึกษาเหมาะสมที่จะจัดจำแนกอยู่ในอันดับนี้ และมีลักษณะพื้นฐานวิทยาร่วมกันคือ โครงสร้างของ ascomata แบบ perithecia, มีหรือไม่มี periphyses, มีเนื้อเยื่อชนิด pseudoparenchyma ใน ascomata, มีหรือไม่มี catenophyses, ถุงบรรจุแอตโคสปอร์แบบ unitunicate ที่ผนังบางและสลายตัวก่อนเจริญเต็มที่ อีกทั้งมีแอตโคสปอร์ที่มีรูปร่างหลายรูปแบบ อย่างไรก็ตามแอตโคสปอร์ที่มีรูปร่างเหล่านี้ค่อนข้างหลากหลายและไม่อาจทราบแน่ชัดว่ารูปร่างเหล่านี้มีวิวัฒนาการมาอย่างไร เนื่องจากไม่มีรูปแบบพัฒนาการที่แน่นอนและไม่สามารถใช้เป็นลักษณะบ่งชี้สายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของรา

ในอันดับ Halosphaerales ได้ ผลจาก phylogenetic tree ที่ได้ทราบเพียงว่ารยางค์ที่มีผนังสปอร์, รูปแบบพัฒนาการและรูปร่างรยางค์ที่แตกต่างกันของอันดับ Halosphaerales มีวิวัฒนาการเกิดขึ้นหลายครั้ง

ราสกุล *Haligena* (*H. elaterophora*, *H. salina*) มีแอสโคสปอร์ที่มีรยางค์ที่ออกทั้งสองข้าง แต่ไม่สามารถใช้ลักษณะนี้เป็นเกณฑ์ในการจัดจำแนกสกุลได้ เนื่องจากรยางค์ของราทั้งสองชนิดมีลักษณะแตกต่างกันอีกทั้งผลการวิเคราะห์ในระดับโมเลกุลบ่งบอกว่าราทั้งสองชนิดไม่มีสายสัมพันธ์ใกล้ชิดแต่อย่างใด ดังนั้นเราจึงตั้งชื่อราสกุลใหม่ *Morakotiella* โดย *M. salina* แทนที่ *H. salina* โดยใช้รูปร่างและขนาดของรยางค์เป็นเกณฑ์บ่งชี้ นอกจากนี้รา 6 ชนิดในสกุล *Remispora* ไม่มีสายสัมพันธ์ร่วมกันด้วยเช่นกัน เนื่องจากรยางค์มีหลายรูปแบบอีกทั้งไม่สามารถใช้เป็นเกณฑ์ในการบ่งชี้สายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการได้ ขณะนี้กำลังอยู่ในระหว่างพิจารณาตั้งชื่อสกุลใหม่ให้กับ *R. crista* และ *R. galerita* โดยใช้รูปร่างโดยรวมและการจัดเรียงตัวของเส้นใยภายในรยางค์เป็นเกณฑ์

ผลการศึกษาครั้งนี้พบว่าราบางสกุลในอันดับ Halosphaerales มีรยางค์ที่มีรูปแบบพัฒนาการค่อนข้างชัดเจนและคงที่ ใช้เป็นเกณฑ์ในการบ่งชี้สายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการได้ ได้แก่ *Corollospora* ซึ่งมีรยางค์ที่เกิดจากการงอกและหลุดลอกของผนังแอสโคสปอร์ชั้นนอก และ *Marinospora*, *Ceriosporopsis* ซึ่งรยางค์เกิดจากการงอกและแผ่ออกของผนังแอสโคสปอร์ชั้นนอก

นอกจากนี้พบว่าตำแหน่งทางอนุกรมวิธานของรา monotypic genera ส่วนใหญ่ คาดว่าจะเพิ่งมีวิวัฒนาการแยกจากบรรพบุรุษมาเมื่อไม่นาน แต่ก็ยังมีรา monotypic บางสกุลที่อาจมีวิวัฒนาการแยกจากบรรพบุรุษมานานแล้ว และอาจเป็นกลุ่มที่วิวัฒนาการก่อกำเนิดราสกุลอื่นๆ ต่อมา อย่างไรก็ตามเราไม่สามารถใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาลักษณะใดลักษณะหนึ่งเพียงอย่างเดียว

ในการจัดจำแนกหรือบ่งชี้สายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของราอันดับ Halosphaeriales จำเป็นต้องใช้ร่วมกับลักษณะทางสัณฐานวิทยาอื่นๆ ถึงแม้ว่าลักษณะอื่นๆ อาจจะมีการแปรผันค่อนข้างมาก เช่น neck ที่มี periphyses, การมีหรือไม่มี catenophyses, สีและผนังกั้นของแอสโคสปอร์ ดังนั้นในเวลาที่เราไม่สามารถแบ่งวงศ์ใหม่ภายในอันดับ Halosphaeriales ได้ เนื่องจากความผันแปรและหลากหลายของลักษณะทางสัณฐานวิทยามากเกินไป จึงยังคงวงศ์ Halosphaeriaceae ไว้ในอันดับนี้เพียงวงศ์เดียว

ราสองชนิดในสกุล *Torpedospora* (*T. radiata*, *T. ambispinosa*) มีสายสัมพันธ์ร่วมกันแบบ monophyletic และไม่มีสายสัมพันธ์เกี่ยวข้องกับอันดับ Halosphaeriales แต่อย่างใด และราสกุล *Swampomyces* ไม่มีสายสัมพันธ์เกี่ยวข้องกับอันดับ Phyllachorales ที่เคยถูกจัดอยู่เช่นกัน โดย *S. armeniacus*, *S. clavatus* และ *S. aegyptiacus* มีสายสัมพันธ์ร่วมกันแบบ monophyletic ยกเว้น *S. triseptatus* ที่จับกลุ่มแยกออกไป นอกจากนี้ *Torpedospora* และ *Swampomyces* มีสายสัมพันธ์ร่วมกันใน Subclass Hypocreomycetidae, Class Sordariomycetes ประกอบด้วยสมาชิกในอันดับ Halosphaeriales, Microascales, Hypocreales และ Phyllachorales สายสัมพันธ์ดังกล่าวนี้อาจบ่งบอกสายวิวัฒนาการของราทะเลแอสโคไมโคตาที่วิวัฒนาการและปรับตัวลงสู่ทะเลโดยมีราบนบกเป็นบรรพบุรุษร่วม

ราสกุล *Marinosphaera mangrovei* ไม่มีสายสัมพันธ์ร่วมกันกับอันดับ Phyllachorales หรือ *Torpedospora*/*Swampomyces* ตำแหน่งทางอนุกรมวิธานบน phylogenetic tree อยู่บริเวณระหว่างอันดับ Halosphaeriales และ Microascales อย่างไรก็ตามลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ *M. mangrovei* ค่อนข้างแตกต่างจากทั้งสองอันดับนี้อย่างชัดเจน เห็นได้จากการที่มี paraphyses, ผนังของแอสโคสปอร์แบบ persistent และมี subapical plate สายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของราสกุลนี้

อาจจะยังไม่ชัดเจน ซึ่งจำเป็นต้องศึกษาเพิ่มเติมโดยเปรียบเทียบกับราสายพันธุ์อื่นๆ ต่อไป ส่วนตำแหน่งทางอนุกรมวิธานของ *Bathyasus* sp. และ *Pedumispora rhizophorae* ยังไม่ชัดเจน โดย *Bathyasus* sp. มีสายสัมพันธ์ร่วมกับราน้ำจืดวงศ์ Magnaporthaceae และ *P. rhizophorae* มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับอันดับ Xylariales ซึ่งจำเป็นต้องศึกษาเพิ่มเติมต่อไป จะเห็นได้ว่าทั้งสองสกุลนี้มีรูปร่างแอสโคสปอร์แบบ filiform ซึ่งถือเป็นการปรับตัวอย่างหนึ่งเพื่อให้ดำรงชีวิตอยู่ในแหล่งน้ำได้

งานวิจัยชิ้นนี้ทำให้เราทราบถึงการปรับตัวเพื่อแพร่พันธุ์และอยู่รอดของราทะเลแอสโคไมโคตาในทะเลโดยมีรูปร่างทางสัณฐานวิทยาหลากหลายแบบ อีกทั้งวิวัฒนาการลงสู่ทะเลหลายครั้ง โดยมีต้นกำเนิดมาจากบรรพบุรุษร่วมบนบก อย่างไรก็ตามเรายังไม่ทราบแน่ชัดว่าราเหล่านี้วิวัฒนาการลงสู่ทะเลได้อย่างไร อาจจะลงไปในรูปแบบของ pathogen หรือ endophyte หรือ saprophyte ดังนั้นจึงควรมีการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป ทั้งการเก็บตัวอย่าง แยกเชื้อบริสุทธิ์ และศึกษาระดับโมเลกุล สาเหตุที่สายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของราทะเลหลายสกุลยังไม่สมบูรณ์ อาจเป็นเพราะไม่มีสายพันธุ์ที่จะนำมาเทียบเคียง หรือราเหล่านั้นได้สูญพันธุ์ไปแล้ว หรืออาจจะเปลี่ยนสภาพไปเป็นระยะ anamorph แล้ว

Thesis Title Phylogenetic Relationships of Marine Ascomycota
Author Miss Jariya Sakayaroj
Major Program Microbiology
Academic Year 2004

Abstract

This thesis sets out to study the molecular phylogeny of two selected groups of marine Ascomycota: 1) genera assigned to the Halosphaeriales on morphological characteristics; but not verified at the molecular level, and 2) genera not currently assigned to existing orders, or those only tentatively assigned to an order. Twelve species from seven genera of the Halosphaeriales (*Bathyascus*, *Haligena*, *Marinospora*, *Naufregella*, *Nautosphaeria*, *Ocostaspora* and *Remispora*), and nine species from four genera of Ascomycota *incertae sedis* (*Marinosphaera*, *Pedumispora*, *Swampomyces* and *Torpedospora*) were sequenced for ribosomal DNA as the major gene.

All selected genera in the Halosphaeriales are well placed and correctly assigned to the order. Morphological features that support their placement in the order include perithecial ascomata, necks usually with periphyses, central pseudoparenchymatous tissue, presence or absence of catenophyses, unitunicate asci, thin-walled asci that deliquescing early and appendaged ascospores. However, ascospore appendages of the Halosphaeriales are diverse and no clear trend could be inferred in their phylogenetic relationships. The evolution of ascospore appendages

remains unresolved. What emerges is that ascospore appendages, with different wall layers and pattern of development, arose many times within the Halosphaeriales.

The long polar unfurling appendages of *Haligena* (*H. elaterophora*, *H. salina*) are not homologous and cannot be used in delineation of this genus. Although appendage development arises in the same way, they are not congeneric. Therefore, a new genus, *Morakotiella*, is proposed for *H. salina* based on the difference in nature and dimension of appendages, and the support from the molecular evidence.

Remispora is polyphyletic in origin, as the pleomorphic polar appendages are heterogenous, therefore, this appendage type may not be a good indicator of phylogeny for this genus. The differences in nature of the appendages and the arrangement of appendage fibers may be major criteria for the erection of new genera for *R. crista* and *R. galerita*.

The only group that shows stability in ascospore appendage development is those with polar appendages that arise as an outgrowth, and with secondary appendages formed by fragmentation of spore wall (*Corollospora*), and those with appendages that arise as an outgrowth of the spore wall and with elaboration of the exosporium (*Marinospora*, *Ceriosporopsis*).

Many genera in the Halosphaeriales are monotypic, our results confirm their placement and reveal that they appear to be more recently evolved. However, other monotypic genera are also located in the basal clade of the order, and they may have evolved earlier or have given rise to other halosphaerialean taxa.

Additionally, morphological characters in the Halosphaeriales cannot be used singly in the delineation of genera. Some features are considered to be less important (e.g. periphysate necks, presence or absence of catenophyses, ascospore color or septation), but used in association with other characters may give better taxonomic resolution. Nevertheless, division into families within the Halosphaeriales cannot be advanced at this time, as many characters are not stable. Thus only one family, the Halosphaeriaceae, remains in the order.

The genus *Torpedospora* (*T. radiata*, *T. ambispinosa*) is monophyletic and is distantly related, morphologically and phylogenetically, to the Halosphaeriales. *Swampomyces* shows no affinities with the Phyllachorales despite earlier assignment to that order. *Swampomyces armeniacus*, the type species, groups strongly within the subclade with *S. clavatispora* and *S. aegyptiacus*, while *S. triseptatus* is located within the clade but with weak support. *Torpedospora* and *Swampomyces* form a monophyletic clade and group within the subclass Hypocreomycetidae, Sordariomycetes with the Halosphaeriales, Hypocreales, Microascales and Phyllachorales as sister orders. Our findings demonstrate a new lineage of marine ascomycetes invaded the sea from terrestrial counterparts.

The molecular results confirm that *Marinosphaera mangrovei* does not have affinities with the Phyllachorales, or the *Swampomyces/Torpedospora* clade. Phylogenetically *M. mangrovei* is located between the Halosphaeriales and Microascales but without any closely related taxa. However, *M. mangrovei* is clearly distinguished from the Halosphaeriales and Microascales by the presence of paraphyses, persistent cylindrical asci that possess a subapical plate. The true

affinities of this fungus may not be resolved at this time due to lack of ascomycete taxa for comparison.

The resolution of *Bathyascus* sp. and *Pedumispora rhizophorae* phylogenies cannot be advanced at this time. *Bathyascus* sp. and *P. rhizophorae* share the same clade with the Magnaporthaceae (freshwater) and Xylariales (terrestrial), respectively. These two genera possess long filiform ascospores, which may enhance entanglement with substrata in aquatic habitats.

This study has revealed that marine ascomycetes have adapted morphological features for the dispersal, attachment and survival in marine habitats, and may have evolved several times from terrestrial counterparts. How they invaded marine habitats, whether as pathogens, endophytes or saprophytes of wetland aquatic plants, remains unresolved.

In conclusion, this thesis has expanded our knowledge of the phylogeny of marine fungi. However, further studies are required to resolve outstanding taxonomical and phylogenetical relationships of some genera. This cannot be resolved at this time as taxa are not available for comparison, while many require their collection, isolation and study. It may be that some of the taxa required for greater resolution may be already extinct, or exist only as anamorphs.