

<b>Thesis Title</b>	Taxonomy and Phylogeny of Fungi on <i>Eucalyptus</i>	
<b>Author</b>	Miss Ratchadawan Cheewangkoon	
<b>Degree</b>	Doctor of Philosophy (Plant Pathology)	
<b>Thesis Advisory Committee</b>	Assoc. Prof. Dr. Chaiwat To-anun	Chairperson
	Prof. Dr. Kevin D. Hyde	Member
	Assoc. Prof. Dr. Nuchnart Jongleakha	Member
	Dr. Sarunya Valyasevi	Member

### ABSTRACT

The plant genus *Eucalyptus* has been widely grown as exotic plantations for timber and paper production in both tropical and temperate regions. *Eucalyptus* trees are rich substrates and thus favourable hosts for a highly diverse fungal community including numerous saprobic and plant pathogenic fungi which are potential plant-disease-causing agents that can inhibit plant growth and substantially limit plantation yields. Yet, the biology and ecology of a majority of these fungi has not been studied and documented systematically. The presence of morphs or sexual/asexual states in their life cycle has further confused and complicated taxonomic classification and species identification, particularly when taxonomy was solely based on morphological characters. The current research aimed to investigate the biodiversity of fungi on *Eucalyptus*, their distribution and degrees of host-specificity, and to resolve ambiguous phylogenetic relationships and clarify their taxonomic status with the concurrent application of morphological and molecular approaches.

*Eucalyptus* leaves with disease symptoms and fungal complexes were collected in plantations and natural forests in five provinces in Thailand during June - October 2007. Observations of morphological and cultural characteristics showed species of *Mycosphaerella* its related anamorphs to be particularly common on *Eucalyptus* leaves. However, due to similarities in their characteristics, the data were insufficient to confirm the fungal species identities. DNA sequences of the internal transcribed spacers (ITS1, 5.8S nrDNA, ITS2), 28S nrDNA (LSU) regions,

actin gene (ACT),  $\beta$ -tubulin gene (TUB), and translation elongation factor 1- $\alpha$  gene (EF-1 $\alpha$ ) of the fungal complexes were thus compared. By integrating the morphological and molecular datasets, the identities of *Mycosphaerella* and *Pseudocercospora* species were successfully clarified and five new taxa were distinguished: *Mycosphaerella irregulari*, *M. pseudomarksii*, *M. quasiparkii*, *Penidiella eucalypti*, and *Pseudocercospora Chiangmaiensis*; and *Mycosphaerella vietnamensis* was a new record in Thailand.

Application of molecular techniques also allowed the revision of the taxonomic status of the fungal group that causes Chocolate Spot leaf disease of *Eucalyptus*. Classification of these fungi was problematic as they resemble the sooty-mold genus *Heteroconium* s.str. in morphology, despite they are plant pathogens and differ from *Heteroconium* s.str. in ecology. Results of molecular analyses inferred from DNA sequences of LSU and ITS regions delineated four *Heteroconium*-like species on *Eucalyptus*: *H. eucalypti*, *H. kleinziense*, *Alysidiella parasitica*, and one isolate resembling a novel species in a clade separated from the holotype of *Heteroconium*, *H. citharexyli*. Together with morphological observations, the *Heteroconium*-like species associated with Chocolate Spot disease were reclassified into the genus *Alysidiella* which has mycelium immersed in and superficially on the host tissue, and has either inconspicuous or percurrently proliferating conidiogenous cells. Also, the conidiogenous cells can either occur solitary on hyphae, or be sporodochial and arranged on a weakly developed stroma. Morphologically these characteristics distinguish *Alysidiella* from *Heteroconium*.

Molecular techniques were more effective than morphological or culture observations in revealing anamorph-teleomorph (i.e. asexual and sexual states of the same fungi) connections such as in the case of *Cryptosporiopsis eucalypti* which is a common pathogen on *Eucalyptus*. Previous classification of *Cryptosporiopsis eucalypti* was ambiguous because of the absent of its teleomorphs, and also due to the fact that it is phylogenetically unrelated to the type species of *Cryptosporiopsis* (*Cryptosporiopsis nigra* = *C. scutellata*, Helotiales). To solve this classification problem, 32 *Eucalyptus* leaf samples with symptoms typical of *C. eucalypti* infection were collected from seven tropical and three temperate countries across four

continents. Cultures were established from single conidia and from ascospores of a previously unreported teleomorph state. DNA sequences of LSU, ITS, and TUB regions were employed to determine generic and species-level relationships. The results suggested that conidial and ascospore isolates of *C. eucalypti* showed only little intraspecific variation, but two collections from Australia and one from Uruguay were found to belong to two novel taxa. Based on the newly collected teleomorph stage, as well as the phylogenetic data, the two taxa were shown to belong to a new genus related to *Plagiostoma* (Gnomoniaceae, Diaporthales), for which the names *Pseudoplagiostoma* gen. nov. and *Pseudoplagiostomaceae* fam. nov. (Diaporthales) were therefore introduced. Two new species of *Cryptosporiopsis* (Dermateaceae, Helotiales) on *Eucalyptus* from Australia and California (USA) were also described and documented. Findings from the study of *Cryptosporiopsis eucalypti* anamorphs and teleomorph further showed the advantages of molecular techniques in uncovering and resolving complicated phylogenetic relationships.

In this research, I also described the newly found and previously unstudied fungal species on *Eucalyptus* using the combined morphological and molecular approach. The reported taxa included three new genera (i.e. *Bagadiella*, *Foliocryphia* and *Pseudoramichloridium*), 20 new species and one new combination. An updated and complete checklist of the fungal species occurring on *Eucalyptus* was compiled. Morphological and molecular investigations were complimentary in studying plant pathogenic fungi, with the former provided the foundation for studying fungal biology and ecology, while the latter offered insights into phylogenetic relationships and species identification. In particular, cladistic analysis of molecular characteristics allowed consistency in the delineation of species and thus better understanding of fungal species evolution. The combined approach was effective and therefore recommended for other similar studies of plant pathogens.

**Key words:** DNA phylogeny, exotic plant, *Eucalyptus*, microfungi, pathogens, saprobes, taxonomy

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์	อนุกรมวิธานและความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อราบน ยูคาลิปตัส	
ผู้เขียน	นางสาวรัชดาวรรณ ชีวังกูร	
ปริญญา	วิทยาศาสตร์ดุสิตบัณฑิต (โรคพืช)	
คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	รศ. ดร. ชัยวัฒน์ โตอมนันต์	ประธานกรรมการ
	Prof. Dr. Kevin D. Hyde	กรรมการ
	รศ. ดร. นุชนารถ จงเลขา	กรรมการ
	ดร. สรัญญา วัลยะเสวี	กรรมการ

### บทคัดย่อ

พืชในสกุลยูคาลิปตัสเป็นพืชที่ปลูกกันอย่างแพร่หลายทั้งในเขตร้อน และเขตอบอุ่น เพื่อใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตไม้และเยื่อกระดาษ ยูคาลิปตัสเป็นพืชที่มีสารอาหารอุดมสมบูรณ์จึงเป็นที่อาศัยของเชื้อราหลากหลายสายพันธุ์ทั้งเชื้อราที่ดำรงชีวิตแบบ saprobe และแบบพาราสิตที่เป็นสาเหตุโรคพืชที่สร้างความเสียหายทำให้พืชชะงักการเจริญและผลผลิตลดลง โดยที่เชื้อราเหล่านี้ส่วนใหญ่ยังไม่มีผู้ใดศึกษาถึงสภาพทางชีววิทยา และนิเวศวิทยาอย่างจริงจัง ลักษณะการสืบพันธุ์ทั้งแบบอาศัยเพศ และแบบไม่อาศัยเพศของเชื้อราเหล่านี้ได้สร้างความสับสนในการจัดอนุกรมวิธาน และการจำแนกชนิด (สปีชีส์) โดยเฉพาะเมื่อการจำแนกนั้นใช้เพียงลักษณะทางสัณฐานวิทยาเพียงอย่างเดียว ดังนั้นการศึกษาในครั้งนี้จึงมุ่งศึกษาถึงความหลากหลายของสายพันธุ์ของเชื้อราบนยูคาลิปตัส การแพร่กระจายของเชื้อรา และความจำเพาะเจาะจงของเชื้อราที่มีต่อพืชอาศัย โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา ร่วมกับเทคนิคด้านอณูวิทยาในการวิเคราะห์เพื่อหาความสัมพันธ์ของเชื้อรา และการจัดอนุกรมวิธานของเชื้อราเหล่านี้ให้ชัดเจนยิ่งขึ้น

จากการเก็บตัวอย่างใบของยูคาลิปตัสที่เป็นโรค และที่มีเชื้อราอาศัยร่วมอยู่จากแปลงปลูก และจากป่าในสภาพธรรมชาติในพื้นที่ต่างๆ ของไทยตั้งแต่เดือนกรกฎาคม พ.ศ. 2550 เป็นต้นมา พบว่า เชื้อราหลายชนิดในระยะการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศที่มีความเกี่ยวข้องกับเชื้อราใน genus *Mycosphaerella* ซึ่งเป็นเชื้อราที่พบได้ทั่วไปในใบของยูคาลิปตัส อย่างไรก็ตามเนื่องจากเชื้อราเหล่านี้มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่คล้ายกันมาก จึงไม่สามารถจำแนกในระดับสปีชีส์ได้ ด้วยเหตุนี้การใช้ลำดับเบสตรงตำแหน่งยีนส์ internal transcribed spacers (ITS1, 5.8S nrDNA, ITS2), 28S

nrDNA (LSU) regions, actin gene (ACT),  $\beta$ -tubulin gene (TUB) และ translation elongation factor 1- $\alpha$  gene (EF-1 $\alpha$ ) มาร่วมในการพิจารณาจำแนกชนิด ซึ่งผลจากการวิเคราะห์ทำให้พบเชื้อราชนิดใหม่จำนวนห้าชนิดคือ *Mycosphaerella irregulari*, *M. pseudomarksii*, *M. quasiparkii*, *Penidiella eucalypti* และ *Pseudocercospora chiangmaiensi* นอกจากนี้ยังพบเชื้อรา *Mycosphaerella vietnamensis* เป็นครั้งแรกในประเทศไทยอีกด้วย

ผลจากการใช้เทคนิคด้านอณูชีววิทยาร่วมกับลักษณะทางสัณฐานวิทยา ยังสามารถช่วยในการจัดจำแนกชนิดของเชื้อราที่เป็นสาเหตุโรค Chocolate spot ในยูคาลิปตัสอีกด้วย ซึ่งแต่เดิมการจัดจำแนกชนิดของเชื้อราในกลุ่มนี้มีปัญหา เนื่องจากเชื้อราเหล่านี้มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่คล้ายกับเชื้อราดำ (sooty-mold) ใน genus *Heteroconium* แต่แตกต่างกันทางนิเวศวิทยา โดยผลจากการเปรียบเทียบลำดับเบสในตำแหน่ง ITS และ LSU แสดงให้เห็นว่าเชื้อราที่มีลักษณะคล้ายเชื้อรา *Heteroconium* ที่พบบนใบยูคาลิปตัสนั้น สามารถจำแนกออกเป็นเชื้อรา 4 ชนิดคือ *Heteroconium eucalypti*, *H. kleinzense*, *Alysiidiella parasitica* และ *H. citharexyli* โดยที่เชื้อรา *H. citharexyli* นี้เป็นเชื้อราที่แยกออกจาก holotype ของเชื้อรา *Heteroconium* อย่างชัดเจน โดยผลจากการศึกษาทางสัณฐานวิทยา ร่วมกับเทคนิคด้านอณูชีววิทยา ได้ช่วยให้การจัดจำแนกชนิดของเชื้อราที่เป็นสาเหตุของโรค Chocolate spot ในใบ ยูคาลิปตัสที่มีลักษณะคล้ายกับเชื้อรา *Heteroconium* ถูกจำแนกใหม่เป็น genus *Alysiidiella* โดยเชื้อรากลุ่มนี้สร้างเส้นใยทั้งในเนื้อเยื่อพืช และบนผิวใบพืช มีลักษณะของ conidiogenous cells ที่สร้างบนเส้นใยแบบ solitary หรือ sporodochium ที่รวมกันและพัฒนาเป็น stroma ขนาดเล็ก และ conidiogenous cells ยังเป็นแบบ percurrently proliferating ที่ไม่ชัดเจน ลักษณะเหล่านี้สามารถใช้ในการแยกเชื้อรา *Alysiidiella* ออกจากเชื้อรา *Heteroconium*

เทคนิคด้านอณูชีววิทยานี้ ยังมีประสิทธิภาพในการหาความสัมพันธ์ของเชื้อราในระยการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ และแบบไม่อาศัยเพศได้ดีกว่าการเปรียบเทียบลักษณะสัณฐานวิทยา หรือลักษณะของเชื้อที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้ออีกด้วย ดังตัวอย่างของเชื้อรา *Cryptosporiopsis eucalypti* ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคใบจุดบนยูคาลิปตัส ที่มีความสับสนในการจัดจำแนกเนื่องจากไม่พบระยะการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ และยังพบว่าเชื้อรานี้มีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมที่แตกต่างจาก type species ของ *Cryptosporiopsis* คือ *C. nigra* = *C. scutella* (Helotiales) และเพื่อเป็นการแก้ปัญหาในการจัดจำแนกดังกล่าวจึงได้รวบรวมเชื้อรา *Cryptosporiopsis* จำนวน 32 ไอโซเลท ที่แยกได้จากใบของยูคาลิปตัสจากประเทศในเขตร้อนเจ็ดแห่ง และประเทศในเขตอบอุ่นสามแห่ง รวมถึงทวีป มาทำการสกัดดีเอ็นเอ และเปรียบเทียบลำดับเบสของยีนส์ตรงตำแหน่ง LSU, ITS และ TUB เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม และจำแนกชนิดในระดับจีโนมและสปีชีส์ พบว่าเชื้อรา *C. eucalypti* ในระยะการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ (โดยการสร้าง ascospore) และระยะการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัย



เทศ (โดยการสร้าง conidia) มีลำดับเบสที่แตกต่างกันเพียงเล็กน้อย แต่กลับพบว่าเชื้อที่แยกได้จาก ประเทศออสเตรเลียและประเทศอูรุกวัย จัดเป็นเชื้อราชนิดใหม่ที่แตกต่างจากเชื้อรา *C. eucalypti* โดยเชื้อราทั้งสองมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับเชื้อรา *Plagiostoma* (Gnomoniaceae, Diaporthales) และถูกจำแนกใหม่เป็น *Pseudoplagiostoma* gen. nov. และ *Pseudoplagiostomaceae* fam. nov. (Diaporthales) นอกจากนี้ยังพบเชื้อราในจีนัส *Cryptosporiopsis* ใหม่สองชนิดจากประเทศ ออสเตรเลีย และสหรัฐอเมริกา (แคลิฟอร์เนีย) โดยการค้นพบที่ได้จากการศึกษาเชื้อรา *Cryptosporiopsis eucalypti* ในระยะการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศและไม่อาศัยเพศในครั้งนี้ ได้ช่วยให้ เห็นถึงประโยชน์ของการใช้เทคนิคด้านอนุวิทยาในการตรวจหาความสัมพันธ์ที่ซับซ้อนของเชื้อรา ได้

จากงานวิจัยที่ใช้เทคนิคทางอนุวิทยาร่วมกับลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราที่ พบบนพืชยูคาลิปตัสในครั้งนี้ ได้ค้นพบเชื้อราชนิดใหม่รวมสามจีนัส (*Bagadiella*, *Foliocryphia* และ *Pseudoramichloridium*) ยีสต์สปิซี่ส์ และหนึ่ง combination อีกทั้งยังได้รวบรวมรายชื่อของเชื้อ ราที่พบบนยูคาลิปตัสใหม่ จากที่กล่าวมาจะเห็นได้ว่าการใช้เทคนิคด้านอนุวิทยาร่วมกับลักษณะ ทางสัณฐานวิทยามีความเหมาะสมในการศึกษาถึงเชื้อราสาเหตุโรคพืชได้ดี เนื่องจากสามารถ อธิบายถึงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม และการจำแนกชนิดของเชื้อราได้อย่างแม่นยำ แน่นอน อีกทั้งยังช่วยให้เข้าใจถึงการเกิด สปิซี่ส์ในเชื้อรามากขึ้น จึงควรมีการใช้เทคนิคดังกล่าวในการศึกษา เชื้อสาเหตุโรคพืชชนิดอื่นๆ ให้มากขึ้น ซึ่งแต่เดิมในอดีตการศึกษาเชื้อราต่างๆ เป็นการอธิบายบน พื้นฐานทางชีววิทยา และนิเวศวิทยาเท่านั้น