



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการความสัมพันธ์ระดับพันธุกรรมและความสามารถในการผลิตสารต้านเชื้อจุลินทรีย์
ของเชื้อราเอนโดไฟติกและซาโพรบิกในพืชวงศ์ขิง

**Phylogenetic relationship of endophytic and saprobic fungi in Zingiberaceae and
their antifungal/antibiotic producing potential**

โดย

สายสมร ล้ายอง และ บุญสม บุษบรณ

พฤษภาคม 2548

สัญญาเลขที่ BGJ4680011

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการความสัมพันธ์ระดับพันธุกรรมและความสามารถในการผลิตสารต้านเชื้อจุลินทรีย์
ของเชื้อราเอนโดไฟติกและซาโพรบิกในพืชวงศ์ขิง

Phylogenetic relationship of endophytic and saprobic fungi in Zingiberaceae and
their antifungal/antibiotic producing potential

โดย

สายสมร ถ่ายอง ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
บุญสม บุษบรรณ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนงานวิจัย (สกว.) ภายใต้โครงการ ทุนวิจัยองค์ความรู้ใหม่ในการสร้างนักวิจัยระดับปริญญาเอกประจำปี 2546 สัญญาเลขที่ BGJ4680011 ผู้วิจัยขอขอบคุณเป็นอย่างสูง และขอขอบคุณ Prof. Dr. Kevin D. Hyde, Department of Biodiversity and Ecology, The University of Hong Kong, Hong Kong, Dr. Eric H.C. McKenzie, Landcare Research, Auckland, New Zealand และ Prof. Dr. Kozo Asano, Laboratory of Applied Microbiology, Graduate School of Agriculture, Hokkaido University, Sapporo, Japan ที่ช่วยเหลือให้คำปรึกษากับนักศึกษาที่อยู่ในโครงการวิจัยนี้ ขอขอบคุณภาควิชาโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัย เชียงใหม่ ที่เอื้อเฟื้อสถานที่สำหรับงานทดลอง Dr. Amy Y. Rossman ที่เอื้อเฟื้อ sequences ของราบางชนิด Duchel Park สำหรับคำแนะนำด้านเทคนิคทางชีวโมเลกุล Prof. Dr. Fusao Tomita, Dr. Teruo Sone และ Tatsuya Miyazawa สำหรับคำแนะนำและความช่วยเหลือตลอดระยะเวลาที่นักศึกษาในโครงการทำวิจัยเกี่ยวกับการแยกสารออกฤทธิ์ชีวภาพและการทำให้สารบริสุทธิ์

รหัสโครงการ: BGJ4680011
 ชื่อโครงการ: โครงการความสัมพันธ์ระดับพันธุกรรมและความสามารถในการผลิต
 สารต้านเชื้อจุลินทรีย์ของเชื้อราเอนโดไฟติกและซาโพรบิกในพืชวงศ์จิง
 ชื่อนักวิจัย: สายสมร ถ้ายอง และ บุญสม บุญบรรณ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
 มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
 E-mail Address: scboi009@chiangmai.ac.th, bussaban@hotmail.com
 ระยะเวลาโครงการ: 2 ปี

บทคัดย่อ

การบ่งบอกชนิดราสกุล *Pyricularia* และ *Myrothecium* โดยใช้ลักษณะทางสัณฐาน และชีวโมเลกุล โดยทำการเพิ่มปริมาณ rDNA ในส่วนของ internal transcribed spacers (ITS1 และ ITS2) และ 5.8 S โดยใช้ universal primer จากนั้นทำการหาลำดับเบสและวิเคราะห์ หาความสัมพันธ์ระดับพันธุกรรม พบว่า *Pyricularia* ทุกชนิดที่มี obpyriform conidia มีความสัมพันธ์ ใกล้ชิดกัน โดยอยู่ในกลุ่มเดียวกับ Magnaporthaceae สำหรับ *P. variabilis* ซึ่งมี conidia หลากรูปร่าง และมีจำนวนผนังกันผนังแปรผันนั้นมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ *Dactylaria Tumularia* หรือ *Ochroconis* มากกว่า Magnaporthaceae ผลจากการใช้ลักษณะทางสัณฐานและชีวโมเลกุลอื่นได้แก่สัณฐานของ conidia และ ลำดับเบสของ ITS rDNA สามารถใช้รูปร่าง conidia เป็นลักษณะสำคัญอันดับแรก ในการจำแนก *Pyricularia* จากเชื้อราสกุลอื่นที่มีความสัมพันธ์กัน สำหรับความสัมพันธ์ระดับ พันธุกรรมของ *Myrothecium* พบว่า *M. cinctum* ที่แยกได้จากพืชชนิดต่างๆ รวมทั้ง *Solheimia costaspora* และ *S. kamatii* ซึ่งเรากล่าวว่ามี conidia ที่มีลวดลายและขนาด conidia ใกล้เคียงกัน มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกัน ผลจากความคล้ายคลึงกันของลักษณะทางสัณฐานและชีวโมเลกุล (ลำดับเบสของ ITS rDNA) อาจกล่าวได้ว่า *Solheimia* ทั้งสองสปีชีส์ ควรเป็นชื่อพ้องของ *Myrothecium cinctum*

นำราเอนโดไฟท์ 57 ไอโซเลท และราซาโพรบ 36 ไอโซเลท ที่แยกได้จากพืชวงศ์จิง มาทดสอบความสามารถในการเป็นปรสิตต่อเชื้อราสาเหตุโรคจิง พบว่าราทุกไอโซเลทสามารถ ควบคุมการเจริญของราสาเหตุโรคใบจุด (*Phomopsis* sp.) และโรคใบไหม้ (*Pyricularia costina*) ในการทดสอบการเป็นปรสิตโดยวิธี dual culture โดยราเอนโดไฟท์ Sterile mycelium (CMUZE0013) และ *Gelasinosporium* sp. 1 (CMUZE0008) สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา

Phomopsis sp. สูงสุด คือ 72.4% และ 70.3% ตามลำดับ ในขณะที่ราเอนโดไฟท์ *Fusarium* sp. (CMUZE0396) และ *Papulasporium* sp. (CMUZE0116) สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *P. costina* สูงสุด คือ 74.4% และ 72.9% ตามลำดับ นอกจากนี้ยังนำราเอนโดไฟท์จำนวน 78 ไอโซเลท และราซาโพรบ 52 ไอโซเลท มาคัดเลือกเชื้อราที่มีความสามารถในการสร้างสารออกฤทธิ์ชีวภาพด้านการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์โดยทำการหมักในอาหารเหลว 2 ชนิด และทดสอบโดยวิธี paper disk agar diffusion จากการทดสอบพบว่า *Chaetomium globosum* (CMUZ0132), *Papulaspora* sp. (CMUZE0118), *Talaromyces flavus* (CMUZE0200), unidentified fungus (CMUZ0126), *Colletotrichum gloeosporioides* (CMUZE0552) และ *Phyllosticta capitalensis* (CMUZE0172) มีความสามารถมากที่สุดในการผลิตสารด้านการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ *Penicillium avellaneum*, *Candida albicans*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* และ *Staphylococcus aureus* ตามลำดับ นำเชื้อรา *Chaetomium globosum* (CMUZ0132) มาทดสอบสภาพที่เหมาะสมในการสร้างสารด้านการเจริญของเชื้อ *P. avellaneum* รวมทั้งทำการแยกสารและทำให้สารบริสุทธิ์โดยใช้ resin HP20 และ silica gel column chromatography พบว่าสารที่ได้มีฤทธิ์กว้างสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราหลายชนิดได้แก่ *C. albicans*, *P. avellaneum*, *Pyricularia oryzae* และ *Phytophthora* sp. และเมื่อวิเคราะห์สารนั้นด้วย mass spectrophotometry พบว่าสารประกอบที่ได้คือ $C_{20}H_{29}O_6$ และ $C_{25}H_{44}O_{15}N_6$

คำสำคัญ: พีชวงศ์จิง, เอนโดไฟท์, ซาโพรบ, ITS rDNA, สารออกฤทธิ์ชีวภาพ

Project Code: BGI4680011

Project Title: Phylogenetic relationship of endophytic and saprobic fungi in Zingiberaceae and their antifungal/antibiotic producing potential

Investigator: Saisamorn Lumyong and Boonsom bussaban Department of Biology, Faculty of Science, Chiang Mai University

E-mail Address: scboi009@chiangmai.ac.th, bussaban@hotmail.com

Project Period: 2 years

Abstract

Fungal isolates of genera *Pyricularia* and *Myrothecium* were identified and characterized by morphological and molecular methods. *Pyricularia* species were commonly isolated from the zingiberaceous plants. The phylogenetic relationships of *Pyricularia* species, and species from related genera, were established from sequences of the internal transcribed spacer ribosomal RNA gene. Phylogenetic analysis disclosed a consistent correlation with spore morphology. *Pyricularia* species studied that have obpyriform conidia fell within the Magnaporthaceae cluster with high bootstrap support. *Pyricularia variabilis* was more closely related to *Dactylaria*, *Tumularia* or *Ochroconis* species than to the Magnaporthaceae. The phylogenetic relationships of *Myrothecium* species, and species from related genera, were also established from sequences of the internal transcribed spacer ribosomal RNA gene. *Myrothecium cinctum* with striate conidia, isolated from various hosts including the Zingiberaceae, and two species previously described as *Solheimia* (*S. costaspora* and *S. kamatii*) that also have striate conidia and similar conidial size, fell within the same clade with high bootstrap support. Based on the molecular data (ITS ribosomal DNA sequences) *Solheimia* species should be synonyms of *Myrothecium cinctum*.

Zingiberaceous fungi were tested for their antagonistic ability against a selected pathogens, *Phomopsis* sp. and *Pyricularia costina*, by dual culture test. All selected isolates (57 endophytes and 36 saprobes) inhibited the growth of both pathogens. *Fusarium* sp. (CMUZE0396) and *Papulaspora* sp. (CMUZE0116) were the most effective fungi in reducing the radial mycelium growth of the pathogen when paired in cultured, with a percentage inhibition of 74.4% and 72.9%, respectively.

Sterile mycelium (CMUZE0013) and *Gelasinosporium* sp. 1 (CMUZE0008) were the most effective fungi in reducing the radial mycelium growth of the *Phomopsis* sp. when paired in cultured, with a percentage inhibition of 72.4% and 70.3%, respectively. *Fusarium* sp. (CMUZE0396) and *Papulasporium* sp. (CMUZE0116) were the most effective fungi in reducing the radial mycelium growth of the *P. costina* when paired in cultured, with a percentage inhibition of 74.4% and 72.9%, respectively. In screening for antimicrobial production, 78 isolates of endophytic fungi and 52 saprobic fungi were grown in two fermentation media. A paper disk agar diffusion assay method was used to check the activity of resulting supernatants. Growth of *Penicillium avellaneum* was most strongly inhibited by *Chaetomium globosum* (CMUZE0132), while growth of the yeast, *Candida albicans*, was most strongly inhibited by *Papulaspora* sp. (CMUZE0118). The four bacteria, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*, were most inhibited by *Talaromyces flavus* (CMUZE0200), an unidentified fungus (CMUZE0126), *Colletotrichum gloeosporioides* (CMUZE0552) and *Phyllosticta capitalensis* (CMUZE0172), respectively. Production of the bioactive compounds from *Chaetomium globosum* (CMUZE0132) was further optimized. Compounds with broad spectrum activity against *Penicillium avellaneum*, *Pyricularia oryzae* and *Phytophthora* sp. were isolated and purified by resin HP20 and silica gel column chromatography. The composition of two bioactive chemicals, studied by mass spectrophotometry, are $C_{20}H_{29}O_6$ and $C_{25}H_{44}O_{15}N_6$.

Keywords: zingiberaceous plants, endophytes, saprobes, ITS rDNA, bioactive compounds

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อ (ไทย)	ข
บทคัดย่อ (อังกฤษ)	ง
บทนำ	1
บทที่ 1 การศึกษาความสัมพันธ์ระดับพันธุกรรมของเชื้อรา <i>Pyricularia</i> และ <i>Myrothecium</i> โดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและชีวโมเลกุล	3
บทที่ 2 การศึกษาความสามารถเป็นเชื้อปรสิตต่อราสาเหตุโรคพืช และความสามารถในการ ผลิตสารต้านเชื้อจุลินทรีย์ของ ราเอนโดไฟท์และราชาโพรบที่แยกได้จากพืชวงศ์ขิง	26
Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว.	56
ภาคผนวก	57

บทนำ

ราเอนโดไฟท์ (endophytic fungi) คือ เชื้อราที่ช่วงหนึ่งหรือตลอดทั้งช่วงชีวิตอาศัยอยู่ในพืช โดยไม่ทำให้พืชแสดงอาการเป็นโรค (Fisher and Petrini, 1990; Petrini, 1991; Hirsch and Braun, 1992; Wilson, 2002) ความสัมพันธ์ที่เชื้อราเจริญอยู่กับพืช มีทั้งการอาศัยอยู่ร่วมกันแบบ symbiosis จนถึงการเป็นเชื้อราก่อโรคเมื่อสภาวะแวดล้อมเหมาะสม นอกจากนี้ยังพัฒนาเป็นราชาโพรบ ย่อยสลายพืชที่แห้งเหี่ยว หรือ ตายแล้ว (Latch, 1993; Brown *et al.*, 1998; Photita *et al.*, 2004) ราเอนโดไฟท์สามารถพบได้ในพืชอาศัยทุกชนิดทั้งพืชน้ำและพืชบก เช่น สาหร่ายทะเลขนาดใหญ่ มอส เฟิร์น gymnosperms พืชใบเลี้ยงเดี่ยว พืชใบเลี้ยงคู่ (Carroll, 1988; Clay, 1991; Petrini, 1991; Bettuci and Saravay, 1993; Fisher *et al.*, 1995; Lodge *et al.*, 1996; Blodgett *et al.*, 2000; Fröhlich *et al.*, 2000; Swart *et al.*, 2000; Okane *et al.*, 2001; Photita *et al.*, 2001; Hata *et al.*, 2002; Suryanarayanan and Thennarasan, 2004)

มีรายงานจำนวนมากที่ศึกษาราเอนโดไฟท์และพบว่ารากลุ่มนี้มีประโยชน์กับพืชอาศัย โดยช่วยให้พืชนั้นต้านทานต่อการเข้าทำลายของเชื้อโรค ช่วยการเจริญโดยส่งเสริมการดูดซับแร่ธาตุในดิน รวมถึงชักนำให้พืชทนต่อสภาวะแห้งแล้ง (Webber, 1981; Funk *et al.*, 1983; Carroll, 1986, 1988; Thomson *et al.*, 1986; Clay, 1989; Breen, 1993, 1994; Stone *et al.*, 2000; Arnold *et al.*, 2003; Newman *et al.*, 2003; Barrow, 2004) นอกจากนี้มีงานวิจัยที่แสดงให้เห็นว่าราเอนโดไฟท์ที่อาศัยร่วมกับพืชสมุนไพรบางชนิด สามารถผลิตสารออกฤทธิ์ชนิดใหม่หลายชนิด (Fisher *et al.*, 1984; Bill and Polishook, 1992; Bruner and Petrini, 1992) และพบว่าเชื้อรา ที่แยกได้จากต้นสมุนไพรนั้น ผลิตสารออกฤทธิ์ชนิดเดียวกันกับพืช ตัวอย่างเช่น เชื้อราที่เจริญอยู่ในต้น Yew ซึ่งผลิตสาร Taxol เช่นเดียวกับพืช (Stierle *et al.*, 1993; Pulici *et al.*, 1997) จากคุณสมบัตินี้อาจนำไปสู่การใช้ราเอนโดไฟท์ให้เป็นประโยชน์ โดยเฉพาะการผลิตสารทุติยภูมิชนิดใหม่ (novel secondary metabolites) ให้มีความหลากหลาย ซึ่งจะนำไปใช้ทางด้านการแพทย์ อุตสาหกรรม และเกษตรกรรม ตัวอย่างของสารออกฤทธิ์ เช่น สารต่อต้านมะเร็ง สารต่อต้านเชื้อรา สารต่อต้านแบคทีเรีย สารฆ่าแมลง และ สารยับยั้งภูมิคุ้มกัน (Strobel, 2002; Strobel *et al.*, 2004)

เนื่องจากพืชวงศ์จิงเป็นพืชสมุนไพรและมีหลากหลายชนิด โดยในประเทศไทยพบ 21 สกุล ประมาณ 200 สปีชีส์ พืชวงศ์จิงจึงเป็นแหล่งน่าสนใจที่อาจพบราเอนโดไฟท์หรือราชาโพรบชนิดใหม่ๆ และราเหล่านี้จะสามารถนำมาใช้ประโยชน์ในการผลิตสารต่อต้านเชื้อจุลินทรีย์ได้ การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อ 1.) ศึกษาหาความสัมพันธ์ของเชื้อราที่แยกได้จากพืชวงศ์จิงโดยวิธีทางอณูวิทยา (วิเคราะห์การจัดเรียงลำดับเบสของ rDNA บริเวณ ITS) ร่วมกับลักษณะทางสัณฐาน 2.) สืบค้นคุณสมบัติของราเอนโดไฟท์ และราชาโพรบ ในการเป็นปรปักษ์ต่อราสาเหตุโรคใบจุด

(*Phomopsis* sp.) โรคใบไหม้ของขิง (*Pyricularia costina*) และ 3.) สำนวจคุณสมบัติของราเอนโดไฟท์ และราชาโพรบในการสร้างสารออกฤทธิ์ที่ต้านแบคทีเรีย (*Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*) รา (*Candida albicans*) สาเหตุโรคในมนุษย์ และต้านการเจริญของรา *Penicillium avellaneum*

บทที่ 1

การศึกษาความสัมพันธ์ระดับพันธุกรรมของเชื้อรา *Pyricularia* และ *Myrothecium*

โดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและชีวโมเลกุล

เชื้อราในสกุล *Pyricularia* เป็นเชื้อราสาเหตุโรคในพืชที่สำคัญทางเศรษฐกิจหลายชนิด เช่น ข้าว ธัญพืชต่างๆ เชื้อสาเหตุสามารถแพร่กระจายได้ทั่วบริเวณเพาะปลูก และเชื้อรายังสามารถอาศัยในพืชทางเลือกอื่นโดยเฉพาะหญ้าวัชพืช (Bailey and Eijnatten, 1961; Asuyama, 1965; Hashioka, 1971, 1973; Ou, 1987) เชื้อรา *Pyricularia oryzae* เป็นสาเหตุของโรคใบไหม้ข้าวซึ่งเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย โดยเชื้อราสามารถเข้าทำลายพืชได้หลายระยะการเจริญเติบโตทั้งในระยะกล้า ระยะเจริญทางใบ ระยะข้าวตั้งท้อง และเชื้อรายังเป็นสาเหตุของโรคสำคัญหลังการเก็บเกี่ยวใน กล้วย เนื่องจากลักษณะการเข้าทำลายแฝง (latent infection) ซึ่งจะแสดงอาการของโรคเมื่อผลผลิตอ่อนแอ หรือสุกแล้วเท่านั้น จึงก่อให้เกิดการสูญเสียรายได้เป็นจำนวนมากในแต่ละปี (Meredith, 1963; Munaut et al., 1998) เชื้อรา *Pyricularia costina*, *P. curcuma*, *P. distorta* และ *P. zingiberis* เป็นสาเหตุของโรคใบจุด หรือใบไหม้ในพืชวงศ์จิง (Hashioka, 1971, 1973; Rathaiiah, 1980; Sarbajna, 1990) ในการศึกษาครั้งนี้พบราสกุล *Pyricularia* ในพืชวงศ์จิงด้วยความถี่ค่อนข้างสูง และพบหลายสปีชีส์ โดยแยกได้ทั้งจากการศึกษาราดำไฟฟ้า ราชาโพรบ และราสาเหตุโรค

การศึกษาเชื้อราในพืชวงศ์จิงครั้งนี้ยังพบราสกุล *Myrothecium* ในความถี่ค่อนข้างสูงอีกด้วย ราสกุลนี้มีความผันแปรสูงของลักษณะสัณฐาน อีกทั้งยังมีลักษณะสัณฐานใกล้เคียงมากกับราสกุล *Solheimia* จึงยากต่อการบ่งบอกชนิดในระดับสกุล และสปีชีส์ โดยใช้เพียงลักษณะสัณฐาน นอกจากนี้ราดังกล่าวยังมีแหล่งอาศัยที่หลากหลาย โดยพบในดิน เป็นสาเหตุโรค ปนเปื้อนในอากาศ หรือเจริญบนพืชที่ตายแล้ว (Tulloch, 1972; Varghese and Rao, 1977; Bills et al., 1994; Seifert et al., 2003; Watanabe et al., 2003)

การจำแนกเชื้อราโดยทั่วไปมักพิจารณาจากลักษณะทางสัณฐานวิทยา (morphology) สำหรับราในสกุล *Pyricularia* อาจจำแนกโดยใช้ความจำเพาะเจาะจงต่อพืชอาศัย (host specificity) และความสามารถทำให้เกิดโรคในพืชทดสอบ (differential cultivar) (Ellis 1971, 1976; Siwasin and Giatgong, 1991; Kato et al., 2000) แต่หลักเกณฑ์ดังกล่าวยังไม่สามารถใช้จำแนกเชื้อราในระดับสปีชีส์ได้ดีพอ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในเชื้อราบางสปีชีส์ เช่น *Pyricularia grisea* และ *P. oryzae* ซึ่งเป็นเชื้อราที่มีความผันแปรสูง (Asuyama, 1965; Borromeo et al., 1993; Shull and Hamer, 1994; Kato et al., 2000) นอกจากนี้วิธีการดังกล่าวยังเป็นวิธีการที่ยุ่งยาก ใช้เวลานาน ต้องอาศัยประสบการณ์ และวิจารณ์ของผู้ทดลอง อีกทั้งลักษณะต่างๆ ที่ใช้ในการจำแนกนี้ยังผันแปร และขึ้นอยู่กับอิทธิพล

จากสิ่งแวดล้อม ซึ่งอาจก่อให้เกิดความสับสนในการจำแนกและการศึกษาได้ (Freeman *et al.*, 1993; Kato *et al.*, 2000) ในการทดลองครั้งนี้จึงศึกษาลักษณะพื้นฐานร่วมกับการจัดเรียงลำดับเบสของ ITS (รวมทั้ง 5.8 S) rDNA เพื่อหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของราสปีชีส์ต่างๆ ในสกุล *Pyricularia* และ *Myrothecium* ตามลำดับ

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

1. เชื้อราที่ใช้ในการสกัด DNA และการบ่งบอกชนิดเชื้อราโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

เชื้อราและรายละเอียดของเชื้อราที่นำเส้นใยบริสุทธิ์และสปอร์ (กรณีการสร้าง) มาใช้ในการสกัด DNA แสดงใน Table 1.1 เชื้อราเหล่านี้แยกได้จากพืชวงศ์จิงระหว่างการศึกษาารานโดไฟท์ ราชาโพรบ และราสาเหตุโรค (Bussaban *et al.*, 2001b, 2004) หรือได้รับมาจากศูนย์เก็บรวบรวมเชื้อจุลินทรีย์ต่างๆ (International Collection of Microorganisms from Plants, Landcare Research, Auckland, New Zealand: ICMP; Mycothèque de l'Université Catholique de Louvain, Louvain-la-Neuve, Belgium: MUCL; National Institute of Technology and Evaluation Biological Resource Center, Osaka, Japan: NBRC) การแยกเชื้อราเอนโดไฟท์ทำโดย นำตัวอย่างพืชมาล้างน้ำไหลจากนั้นฆ่าเชื้อที่ผิวด้วยวิธี triple surface sterilization โดยจุ่มใน 95% ethanol เป็นเวลา 15 วินาที จากนั้นจุ่มใน 1% sodiumhypochlorite นาน 5 นาที แล้วย้ายไปจุ่มใน 95% ethanol 15 วินาที ซับด้วยกระดาษทิชชูที่ฆ่าเชื้อแล้ว วางตัวอย่างที่ฆ่าเชื้อแล้วลงในอาหาร 2% malt extract agar ที่ผสม 0.03% Rose Bengal และ 0.1% streptomycin sulfate บ่มที่อุณหภูมิห้อง 1–2 สัปดาห์ เมื่อเส้นใยเจริญออกมา ทำการถ่ายเชื้อจากปลายเส้นใยลงในอาหาร corn meal agar slant และบ่มไว้เพื่อดูการสร้างสปอร์ สำหรับราชาโพรบนำตัวอย่างพืชมาบ่มในถุงพลาสติกที่มีสำลีชุบน้ำเพื่อเพิ่มความชื้นเมื่อเชื้อราเจริญจึง ทำการแยกเชื้อโดย single spore methods ตามวิธีของ Choi *et al.* (1999) และเลี้ยงเชื้อราที่ได้ ในอาหาร potato dextrose agar (PDA) การแยกเชื้อราสาเหตุโรคสามารถทำเช่นเดียวกับ การแยกราชาโพรบ ในกรณีที่เชื้อราสาเหตุสร้างสปอร์ หากเชื้อราไม่สร้างสปอร์ ทำการแยกโดยตัดชิ้นพืชบริเวณที่ แสดงอาการขนาดประมาณ 3 ตร.มม. ฆ่าเชื้อที่ผิวโดยจุ่มใน 3% Clorox เป็นเวลา 3 นาที และล้าง 2 ครั้ง ด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นวางตัวอย่างที่ฆ่าเชื้อ แล้วลงบนจานอาหาร PDA บ่มที่อุณหภูมิห้อง เมื่อเส้นใยเจริญออกมาทำการถ่ายเชื้อ จากปลายเส้นใยลงในอาหาร PDA slant

ทำการบ่งบอกชนิดเชื้อราในระดับสกุลและ/หรือสปีชีส์ โดยดูจากลักษณะสัณฐานสปอร์ อันได้แก่ขนาดและรูปร่างของสปอร์ ลักษณะโคโลนี และลักษณะอื่นๆ พิจารณาเทียบเคียงร่วมกับ หนังสือและงานตีพิมพ์ที่มีมาตรฐาน (เช่น Ellis, 1971, 1976; Carmichael *et al.*, 1980; Sutton, 1980; von Arx, 1981; Hyde *et al.*, 2000)

Table 1.1 The sources of *Pyricularia*, *Myrothecium* isolates and allied genera used for ITS1-5.8S-ITS2 rDNA sequence analysis.

Genus and species	Strain No. ^a	Original substrate	Habitat	Geographic origin
<i>Dactylaria ampulliformis</i> (Tubaki) G.C. Bhatt & W.B. Kendr.	ICMP3660	<i>Cocos nucifera</i>	leaf streak	Japan
<i>D. appendiculata</i> Cazau, Aramb. & Cabello	ICMP14617	<i>Uncinia</i> sp.	dead culm	New Zealand
<i>D. purpurella</i> (Sacc.) Sacc.	NBRC9336	<i>Castanopsis cuspidata</i> var. <i>sieboldii</i>	submerged wood	Japan
<i>Dactylaria</i> sp.	P24	<i>Cortaderia</i> sp.	dead leaf	New Zealand
<i>Dactylaria</i> sp.	ICMP14618	<i>Uncinia</i> sp.	dead culm	New Zealand
<i>Gaeumannomyces amomi</i> Bussaban	ICMP14650	<i>Alpinia malaccensis</i>	healthy pseudostem	Thailand
<i>G. amomi</i>	ICMP14648	<i>Amomum siamense</i>	healthy leaf	Thailand
<i>Nakataea fusispora</i> (Matsush.) Matsush.	MUCL39228	<i>Myricus</i> sp.	-	Cuba
<i>N. fusispora</i>	MUCL40987	-	decaying leaf	Venezuela
<i>Ochroconis humicola</i> (G.L. Barron & L.V. Busch) de Hoog & Arx	ICMP14434	<i>Cryptocarya mackionianna</i>	decaying leaf	Australia
<i>Pyricularia angulata</i> Hashioka	NBRC9625	<i>Musa sapientum</i>	rotten leaf	Japan
<i>P. costina</i> Sarbajna	ICMP14436	<i>Amomum siamense</i>	healthy leaf	Thailand
<i>P. costina</i>	ICMP14437	<i>Alpinia malaccensis</i>	healthy leaf	Thailand
<i>P. costina</i>	ICMP14609	<i>Alpinia malaccensis</i>	leaf spot	Thailand
<i>P. higginsii</i> Luttr.	ICMP14707	<i>Microleana avenacea</i>	leaf spot	New Zealand
<i>P. higginsii</i>	ICMP14620	<i>M. avenacea</i>	dead leaf	New Zealand
<i>P. juncicola</i> MacGravie	ICMP14625	<i>Carex</i> sp.	dead leaf	New Zealand
<i>P. juncicola</i>	P17	<i>Uncinia</i> sp.	dead panicle	New Zealand
<i>P. longispora</i> Bussaban	ICMP14608	<i>Amomum siamense</i>	healthy leaf	Thailand
<i>P. variabilis</i> Bussaban	ICMP14487	<i>Amomum siamense</i>	healthy leaf	Thailand

Table 1.1 (Continued).

<i>Genus and species</i>	Strain No.a	<i>Original substrate</i>	Habitat	Geographic origin
<i>P. zingiberis</i> Nishik.	NBRC9624	<i>Zingiber mioga</i>	-	Japan
<i>P. zingiberis</i>	MUCL9449	<i>Z. officinale</i>	-	Japan
<i>Pyricularia</i> sp.	ICMP14468	<i>Stenotaphrum secundatum</i>	leaf spot	New Zealand
<i>Pyricularia</i> sp.	ICMP14469	<i>Digitaria sanguinalis</i>	leaf spot	New Zealand
<i>Pyriculariopsis parasitica</i> (Sacc. & Berl.) M.B. Ellis	MUCL9450	<i>Phyllachora graminis</i>	-	USA
<i>Tumularia aquatica</i> (Ingold) Marvanová & Descals	MUCL28096	<i>Quercus</i> sp.	-	UK
<i>Myrothecium cinctum</i> (Corda) Sacc.	ATCC18947	-	Forest soil	Canada
<i>M. cinctum</i>	ATCC32918	<i>Saccharum officinarum</i>	leaf spot	Taiwan
<i>M. cinctum</i>	BCC8249	<i>Amomum siamense</i>	dead pseudostems	Thailand
<i>M. pandanicola</i> Thongkantha	BCC9829	<i>Pandanus penetrans</i>	dead leaves	Thailand
<i>Solheimia costaspora</i> E.F. Morris	AR2737	-	litter	Costa Rica
<i>S. costaspora</i>	BCC11170	<i>Licuala longicalycata</i>	dead petioles	Thailand
<i>S. kamatii</i> Varghese & V.G. Rao	BCC9775	<i>Musa acuminata</i>	dead petioles	Thailand
<i>Virgatospora echinofibrosa</i> Finley	AR2824	-	litter	Mexico

^aBCC: BIOTEC Culture Collection, Bangkok, Thailand, ICMP: International Collection of Microorganisms from Plants, Landcare Research, Auckland, New Zealand; NBRC: National Institute of Technology and Evaluation Biological Resource Center, Osaka, Japan; MUCL: Mycothèque de l'Université Catholique de Louvain, Belgium

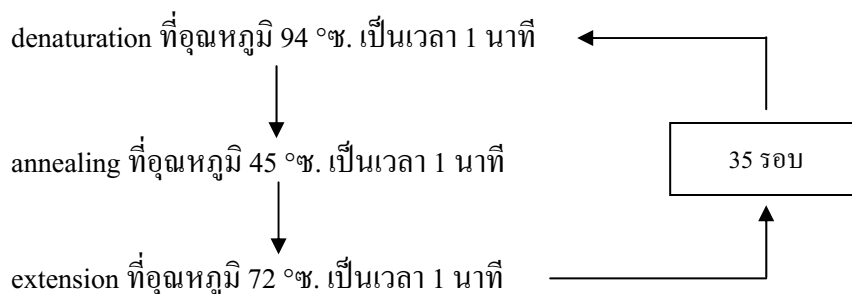
2. การสกัด DNA

ทำการสกัด DNA ด้วยวิธี SDS-CTAB (sodium dodecyl sulfate-cetyltrimethylammonium) (Kim *et al.*, 1990) โดยนำเส้นใยบริสุทธิ์และสปอร์ (กรณีสร้าง) ที่เลี้ยงในอาหารเหลว 1.2% malt extract ที่อุณหภูมิ 22 °ซ. เป็นเวลา 10 วัน มาทำให้แห้ง (freeze-dried) แช่ในไนโตรเจนเหลว และนำมาบดในโกร่งที่เย็นจัดจนเส้นใยละเอียดเป็นผง ได้น้ำหนักประมาณ 15 มก. จากนั้นเติม lysis buffer ที่เย็นจัด (ภาคผนวก) 1 มล. และคนให้เข้ากัน ใช้ไปเปิดหลอดของเหลวถ่ายใส่ลงใน Eppendorf tube ขนาด 1.5 มล. และเก็บที่อุณหภูมิ 4 °ซ. จากนั้นเติม SDS ให้สารละลายมีความเข้มข้นสุดท้าย เป็น 2% เขย่าให้เข้ากัน และ บ่มที่ 65 °ซ. เป็นเวลา 30 นาที แล้วจึงนำมาปั่นให้ตกตะกอนที่ 14,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 15 นาที ใช้ไปเปิดหลอดส่วนใสชั้นบน (supernatant) ใส่ในหลอดใหม่ เติม NaCl โดยปรับให้สารละลายมีความเข้มข้นเป็น 1.4 M และเติม 10% CTAB buffer (ภาคผนวก) ในปริมาณ 1/10 ของปริมาตรของสารละลายในหลอด เขย่าให้เข้ากัน แล้วนำไปปั่นที่ 65 °ซ. เป็นเวลา 10 นาที นำมาทำให้เย็นลงที่ 15 °ซ. เป็นเวลา 2 นาที แล้วจึงเติม chloroform isoamyl alcohol 24:1 (ปริมาตร/ปริมาตร) ในปริมาณที่เท่ากับสารละลายที่มีอยู่เดิมในหลอด ผสมให้เข้ากัน แล้วจึงนำมาปั่นให้ตกตะกอนที่ 14,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 15 นาที ทำการสกัด supernatant ซ้ำด้วย chloroform isoamyl alcohol จนกระทั่งชั้นที่กั้นกลางใส จากนั้นใช้ไปเปิดหลอด supernatant ใส่ในหลอดใหม่เพื่อทำการตกตะกอน DNA โดยเติม 100% ethanol (เก็บที่ -20 °ซ.) ปริมาตร 2 เท่า นำมาปั่นให้ตกตะกอนที่ 14,000 รอบ/นาที ที่ 4°ซ. เป็นเวลา 15 นาที ใช้ไปเปิดหลอดส่วน supernatant ที่ทิ้ง และทำการล้าง pellet ด้วย 70% ethanol โดยการเขย่า แล้วนำไปปั่นที่ 14,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วน supernatant ที่ทิ้ง แล้วล้างด้วย 70% ethanol อีกครั้งหนึ่ง ทำเช่นเดิมเหมือนการล้างครั้งแรก หลังจากดูด supernatant ที่ทิ้งแล้ว ส่วนที่เหลือในหลอดก็คือ DNA โดย DNA จะถูกทำให้แห้งที่อุณหภูมิห้องก่อนนำไปละลายในสารละลายปริมาตร 100 ไมโครลิตร ของ 0.002% RNase (5 ไมโครกรัม/มล.) ใน TE buffer แล้วนำไปปั่นที่ 37 °ซ. เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เพื่อทำลาย RNA (Liou and Tzean, 1997) ก่อนนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 °ซ. ตรวจสอบคุณภาพและปริมาณของ DNA โดยใช้ Lamda DNA marker เปรียบเทียบปริมาณ DNA ดูค่าดูดกลืนแสงที่ 260 นาโนเมตร

3. การเพิ่มปริมาณ DNA และการวิเคราะห์ลำดับ nucleotides (sequencing)

เพิ่มปริมาณ DNA เป้าหมายด้วยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR) ในส่วน internal transcribed spacer (ITS) region 1 และ 2 รวมทั้ง 5.8S ของเชื้อราที่แสดงใน Table 1.1 โดยใช้ primer ITS1 and ITS4 (White *et al.*, 1990) โดยใช้เครื่อง GeneAmp 9700 thermo cycler (Applied Biosystems) PCR ที่ใช้ปริมาตร 25 ไมโครลิตร ประกอบด้วย DNA เจือจาง 1:20 เท่า ปริมาตร 1 ไมโครลิตร, 0.2 มิลลิโมลาร์ dNTP's, FastTaq 0.2 ไมโครลิตร (Applied Biosystems), 0.2 ไมโครโมลาร์ ITS1 และ 0.2

ไมโครโมลาร์ ITS4, 10X PCR buffer ที่ผสม $MgCl_2$ แล้ว 2.5 ไมโครลิตร และ ddH₂O เพื่อปรับปริมาตรให้เป็น 25 ไมโครลิตร และ ปฏิกิริยาที่ใช้สำหรับเริ่มการสังเคราะห์ DNA คือ denaturation ที่ 95 °ซ. เป็นเวลา 4 นาที และ ทำปฏิกิริยาจำนวน 35 รอบ โดยกำหนดเวลาและอุณหภูมิแต่ละขั้นตอนดังนี้



เมื่อปฏิกิริยาครบ 35 รอบแล้วปล่อยให้ extension ที่อุณหภูมิ 72 °ซ. เป็นเวลา 7 นาที จากนั้นนำผลผลิต PCR ที่ได้ไปทำอิเล็กโทรโฟรีซิสที่ 90 โวลต์ บน 1 % agarose gel ใน TAE buffer (Sambrook *et al.*, 1989) แล้วย้อมแถบ DNA ด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ และตรวจดูภายใต้ UV transilluminator จากนั้นนำผลผลิต PCR ที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์ด้วย High Pure PCR Product Kit (Roche Molecular Biochemicals) ตามวิธีการในคู่มือก่อนนำผลผลิต PCR ที่ได้ไปใช้สำหรับ sequencing

วิเคราะห์ลำดับ nucleotides โดยเตรียม sequencing reaction สำหรับ foreverse primer (ITS1) ตามวิธีการในคู่มือ BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems) และอ่านผลโดยใช้เครื่อง ABI PRISM 310 หรือ ABI PRISM 377 automated DNA sequencer เตรียม sequencing reaction อีกหนึ่งชุดสำหรับ reverse primer (ITS4) เพื่อยืนยันผล sequence จากการวิเคราะห์ complementary ของ DNA ทั้ง 2 สายด้วย program Sequencer version 3.1.1 for macintosh (Applied Biosystems)

4. DNA sequence alignment and phylogenetic analysis

ค้นหา sequences ของเชื้อราที่สนใจนำมาใช้ร่วมในการวิเคราะห์ความสัมพันธ์จาก GenBank และ BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) เพื่อทำ multiple alignment ของ sequences ที่ได้จากเชื้อราสายพันธุ์ต่างๆ ด้วย program CLUSTAL W version 1.82 (Thompson *et al.*, 1994) โดยการฝากส่งไปที่ <http://bioweb.pasteur.fr/seqanal/clustalw> และปรับแต่ง alignment โดยใช้ program GeneDoc version 2.6.002 (Nicholas and Nicholas, 1997) จากนั้นวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของเชื้อราสกุล *Pyricularia* และ *Myrothecium* ตามลำดับ ร่วมกับ sequences จาก GenBank (Table 1.2) โดยใช้โปรแกรม PAUP* 4.0b10 (Swofford, 2002) วิเคราะห์โดยวิธี maximum

parsimony (heuristic search options: tree-bisection-reconnection-branch swapping, random stepwise sequences addition) และวิธี distance (neighbor-joining: Kimura two-parameter distance measurement) สำหรับ DNA sequence alignments และ trees ส่งไปเก็บที่ TreeBASE (<http://www.treebase.org/treebase/index.html>)

Table 1.2 *Pyricularia*, *Myrothecium* and allied fungal isolates used in the phylogenetic analyses with the GenBank accession numbers.

Genus and species	GenBank accession number
<i>Arthrobotrys amerospora</i>	AF106533
<i>A. musiformis</i>	U51948
<i>Dactylaria ampulliformis</i> ^a	AY265336
<i>D. appendiculata</i> ICMP14617 ^a	AY265339
<i>D. dimorphospora</i>	U51980
<i>D. lanosa</i>	U51979
<i>D. purpurella</i> NBRC9336 ^a	AY265335
<i>Dactylaria</i> sp. P24 ^a	AY265332
<i>Dactylaria</i> sp. ICMP14618 ^a	AY265338
<i>Dactylella cylindrospora</i>	AF106538
<i>D. cylindrospora</i>	U51953
<i>Gaeumannomyces amomi</i> ^a	AY265318
<i>G. amomi</i> ICMP14650 ^a	AY265317
<i>G. caricis</i>	AJ010030
<i>G. cylindrosporus</i>	AJ010029
<i>G. cylindrosporus</i>	U17211
<i>G. graminis</i>	AJ010034
<i>G. graminis</i> var. <i>tritici</i>	AF087684
<i>Magnaporthe grisea</i>	U17329
<i>M. grisea</i>	U17328
<i>Nakataea fusispora</i> MUCL39228 ^a	AY265330
<i>N. fusispora</i> MUCL40987 ^a	AY265331
<i>Ochroconis humicola</i> ICMP14434 ^a	AY265334
<i>Hapophora graminicola</i>	U17218
<i>Pyricularia angulata</i> NBRC9625 ^a	AY265322

Table 1.2 (Continued).

Genus and species	GenBank accession number
<i>P. costina</i> ICMP14436 ^a	AY265327
<i>P. costina</i> ICMP14437 ^a	AY265328
<i>P. costina</i> ICMP14609 ^a	AY265329
<i>P. higginsii</i> ICMP14707 ^a	AY265326
<i>P. higginsii</i> ICMP14620 ^a	AY265325
<i>P. juncicola</i> ICMP14625 ^a	AY265320
<i>P. juncicola</i> P17 ^a	AY265321
<i>P. longispora</i> ICMP14608 ^a	AY265319
<i>P. variabilis</i> ICMP14487 ^a	AY265333
<i>P. zingiberis</i> MUCL9449 ^a	AY265315
<i>P. zingiberis</i> NBRC9624 ^a	AY265316
<i>Pyricularia</i> sp. ICMP14468 ^a	AY265323
<i>Pyricularia</i> sp. ICMP14469 ^a	AY265324
<i>Pyriculariopsis parasitica</i> ^a	AY265340
<i>Tumularia aquatica</i> MUCL28096 ^a	AY265337
<i>T. aquatica</i>	AY148101
<i>Clonostachys rosea</i>	AF358234
<i>Giocladium penicillioides</i>	AF048733
<i>Graphium erubescens</i>	AF198247
<i>Koorchaloma spartinicola</i>	AF422963
<i>Myrothecium atroviride</i> (Wb256)	AJ302002
<i>M. atroviride</i> CBS224.78	AF455507
<i>M. cinctum</i> (BBA65670)	AJ301996
<i>M. cinctum</i> (BBA69182)	AJ301997
<i>M. cinctum</i> ATCC18947 ^b	DQ135997
<i>M. cinctum</i> ATCC32918 ^b	DQ135998
<i>M. cinctum</i> CBS479.85 (BBA71018)	AJ302004
<i>M. cinctum</i> BCC8249 ^a	DQ135995
<i>M. inundatum</i>	AJ302005
<i>M. leucotrichum</i> CBS131.64	AJ302000
<i>M. pandanicola</i> BCC9829 ^a	DQ135992

Table 1.2 (Continued).

Genus and species	GenBank accession number
<i>M. roridum</i> (BBA62764)	AJ301993
<i>M. roridum</i> (BBA63372)	AJ301994
<i>M. roridum</i> (BBA67679)	AJ301995
<i>M. roridum</i> CBS212.92 (BBA71015)	AJ302001
<i>M. verrucaria</i> (BBA70749)	AJ302003
<i>M. verrucaria</i> CBS328.52	AJ301999
<i>Pesotum cupulatum</i>	AF198230
<i>Pesotum fragrans</i>	AF198248
<i>Peziza echinospora</i>	AF491573
<i>Peziza vesiculosa</i>	AF491623
<i>Solheimia costaspora</i> AR2737 ^b	DQ135996
<i>S. costaspora</i> BCC11170 ^a	DQ135994
<i>S. kamatii</i> BCC9775 ^a	DQ135993
<i>Stilbella byssiseda</i>	AF335453
<i>Tubercularia</i> sp.	AF422980
<i>Verticillium dahliae</i>	AF363998
<i>V. dahliae</i>	AF364005
<i>Virgatospora echinofibrosa</i> AR2824 ^b	DQ135999
<i>Volutella ciliata</i>	AJ301967

^aIsolate with complete ITS region sequenced in present study, ^bIsolate with complete ITS region sequenced from A.Y. Rossman. Other sequences retrieved from GenBank.

ผลการทดลอง

Pyricularia

1. การบ่งบอกชนิดเชื้อราโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ทำการเปรียบเทียบและบ่งบอกรา *Pyricularia* ที่แยกได้จากพืชวงศ์จิง และพืชชนิดอื่น โดยแยกราสกุล *Pyricularia* จากราสกุลอื่นๆ ที่มีลักษณะสัณฐานใกล้เคียงกัน เช่น *Dactylaria* และ *Nakataea* ได้โดยราสกุล *Pyricularia* จะมีลักษณะสัณฐานของสปอร์ที่มีรูปร่างคล้ายลูกแพร์ เกิดจาก ก้านชูสปอร์ (conidiophore) ตรงบริเวณ conidiogenous cell ในลักษณะกลับหัว สำหรับการจำแนก ระดับสปีชีส์ พิจารณาจากรูปร่างและขนาดของสปอร์ จำนวนผนังกั้นสปอร์ (septation) เป็นสำคัญ ดังแสดงรายละเอียดโดยย่อใน Table 1.3 นอกจากนี้ยังพิจารณาร่วมกับลักษณะอื่นๆ ด้วย ได้แก่ การสร้าง appressoria ลักษณะของ hilum ที่บริเวณฐานสปอร์ และลักษณะของเซลล์ที่บริเวณปลายสปอร์

การแยกราสกุล *Pyricularia* จากราสกุล *Dactylaria* มักจะพิจารณาจากรูปแบบการหลุดของสปอร์ (conidial secession) เป็นสำคัญด้วย โดยราสกุล *Pyricularia* มีรูปแบบการหลุดของสปอร์เป็น rhexolytic secession ราสกุล *Dactylaria* มีรูปแบบการหลุดของสปอร์เป็น schizolytic secession แต่ในการศึกษาครั้งนี้ พบว่าราทั้งสองสกุล มีรูปแบบการหลุดของสปอร์ทั้งสองแบบร่วมกัน คือ rhexolytic secession และ schizolytic secession (Figure 1.1)

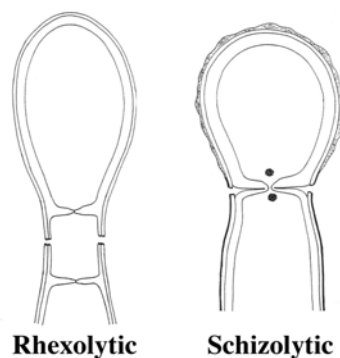


Figure 1.1 Conidial secession: rhexolytic (involving the circumscissile splitting of the periclinal wall of the cell below the basal conidial septum rather than the septum itself) and schizolytic (involving a splitting of delimiting septum).

Table 1.3 Summary of species of *Pyricularia* and allied genera.

Fungi	Conidia				Conidial secession
	length*	width*	septation	hilum	shape
<i>Dactylaria ampulliformis</i> (Tubaki) G.C. Bhatt & W.B. Kendr.	18-32	2-2.3	2-3	–	ampulliform
<i>D. appendiculata</i> Cazau, Aramb. & Cabello	35-45	4-5.6	2-3	–	fusiform
<i>D. purpurella</i> (Sacc.) Sacc.	18-25	3-4	1-4 (mostly 3)	–	cylindrical to subclavate
<i>P. angulata</i> Hashioka	18.2-28	4.9-9.1	2	distinct hilum	obpyriform
<i>P. costina</i> Sarbajna	23-39.5	6.5-10	1-3	distinct hilum	obpyriform
<i>Nakataea fusispora</i> (Matsush.) Matsush.	25-35.5	4.8-5.6	3	–	fusiform
<i>P. grisea</i> (Cooke) Sacc.	17-28	6-9	2	small hilum	obpyriform
<i>P. higginsii</i> Luttr.	19-32	8-13	2	–	obpyriform
<i>P. juncicola</i> MacGarvie	15-24	3.2-5.4	1	small hilum	obpyriform
<i>P. longispora</i> Bussaban	47.1-71.4	5.6-7.6	4-5 (mostly 4)	–	obpyriform
<i>P. variabilis</i> Bussaban	15.7-28.6	6.4-9.3	1-2	distinct hilum	various
<i>P. oryzae</i> Cavares	17-23	8-11	2	small hilum	obpyriform
<i>Pyriculariopsis parasitica</i> (Sacc. & Berl.) M.B. Ellis	30-55	9-12	3	–	obclavate
<i>P. zingiberis</i> Nishik.	18-24	6-7.5	2	–	obpyriform
<i>Tumularia aquatica</i> (Ingold) Marvanová & Descals	24-42	8-12	2	–	cylindrical

*Measurements in μm

2. Molecular phylogeny

ลำดับเบสของ ITS1 และ ITS2 regions รวมทั้ง 5.8S rDNA ของราสกุล *Pyricularia* และสกุลอื่นที่ใช้ในการวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ ทั้งหมดมีขนาดผันแปรตั้งแต่ 402–623 bp อย่างไรก็ตาม ในราสกุลเดียวกันหรือสปีชีส์เดียวกันขนาดลำดับเบสใกล้เคียงกันมาก และมีความผันแปรน้อย สำหรับขนาดลำดับเบสบริเวณ 5.8S rDNA ของราเหล่านี้มีความคงที่โดยมีขนาด 157 bp

จากการศึกษาหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อรากลุ่มนี้โดยการวิเคราะห์แบบ maximum parsimony (MP) และ distance (neighbor-joining) พบว่า tree topology ที่ได้จากการวิเคราะห์ทั้งสองไม่ต่างกัน โดยเชื้อราสกุล *Pyricularia* ทั้งหมด (ยกเว้น *P. variabilis*) รวมกันอยู่ใน clade ของ family Magnaporthaceae ซึ่งมีค่า bootstrap รองรับสูงถึง 99% (Figure 1.2) ใน MP tree พบว่า *Nakateae fusispora* มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงโดยเป็น sister taxon กับ Magnaporthaceae clade โดยมีค่า bootstrap รองรับ 82% (Figure 1.2) ภายใน Magnaporthaceae clade ยังสามารถแบ่งเป็น 2 กลุ่ม ตามสกุลของ teleomorph อันได้แก่ *Magnaporthe* และ *Gaeumannomyces* โดยทั้งสองเป็น sister taxa ซึ่งกันและกัน ใน *Magnaporthe* clade ประกอบด้วย *M. grisea* และ anamorphic species ได้แก่ *P. angulata*, *P. costina*, *P. higginsii*, *P. juncicola* และ *Pyricularia* sp. (ICMP14468, ICMP14469) สำหรับ *Gaeumannomyces* clade ประกอบด้วย *Gaeumannomyces* 4 สปีชีส์ *Harpophora graminicola*, *Pyricularia zingiberis* และ *P. longispora* โดยมีค่า bootstrap รองรับ 90% นอกจากนี้ *Gaeumannomyces amomi* (teleomorph) และ *Pyricularia zingiberis* (anamorph) ซึ่งเป็นราที่แยกได้จากพืชวงศ์จิงพบว่ามีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันมาก (bootstrap support 100%) ในทำนองเดียวกัน ราที่เป็น teleomorph-anamorph คือ *G. cylindrosporus* และ *Phialophora graminicola* ซึ่งเป็นราที่แยกได้จากพืชพวกหญ้า พบว่ามีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันมาก (bootstrap support 100%) เช่นเดียวกัน

สำหรับราชนิดอื่นๆ พบว่ามีความสัมพันธ์ห่าง ออกจาก Magnaporthaceae clade โดยรา *Pyriculariopsis parasitica*, *Dactylaria appendiculata* และ *Dactylaria* sp. ICMP14618 มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันมาก (bootstrap support 100%) ในขณะที่ *Tumularia aquatica* และ *D. ampulliformis* มีความสัมพันธ์กันและรวมอยู่ใน cluster เดียวกัน แต่มีค่า bootstrap รองรับน้อย (64%) สำหรับรา *Ochroconis humicola* และ *D. purpurella* มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันมาก (bootstrap support 100%) นอกจากนี้ราทั้งคู่มียังมีความสัมพันธ์โดยเป็น sister กับสอง clusters ของราที่กล่าวถึงก่อนหน้านี้ (bootstrap support 75%)

กรณีรา *Pyricularia variabilis* ดูเหมือนว่าจะมีความสัมพันธ์ห่างไกลกับรา *Pyricularia* สปีชีส์อื่นๆ ที่นำมาวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ในครั้งนี้ โดยราสปีชีส์นี้มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ *Dactylaria* sp. P24 มากกว่า นอกจากนี้ cluster ของ *P. variabilis* ยังมีความสัมพันธ์เป็น sister group กับกลุ่มของราที่ประกอบด้วยสมาชิกสกุล *Dactylaria*

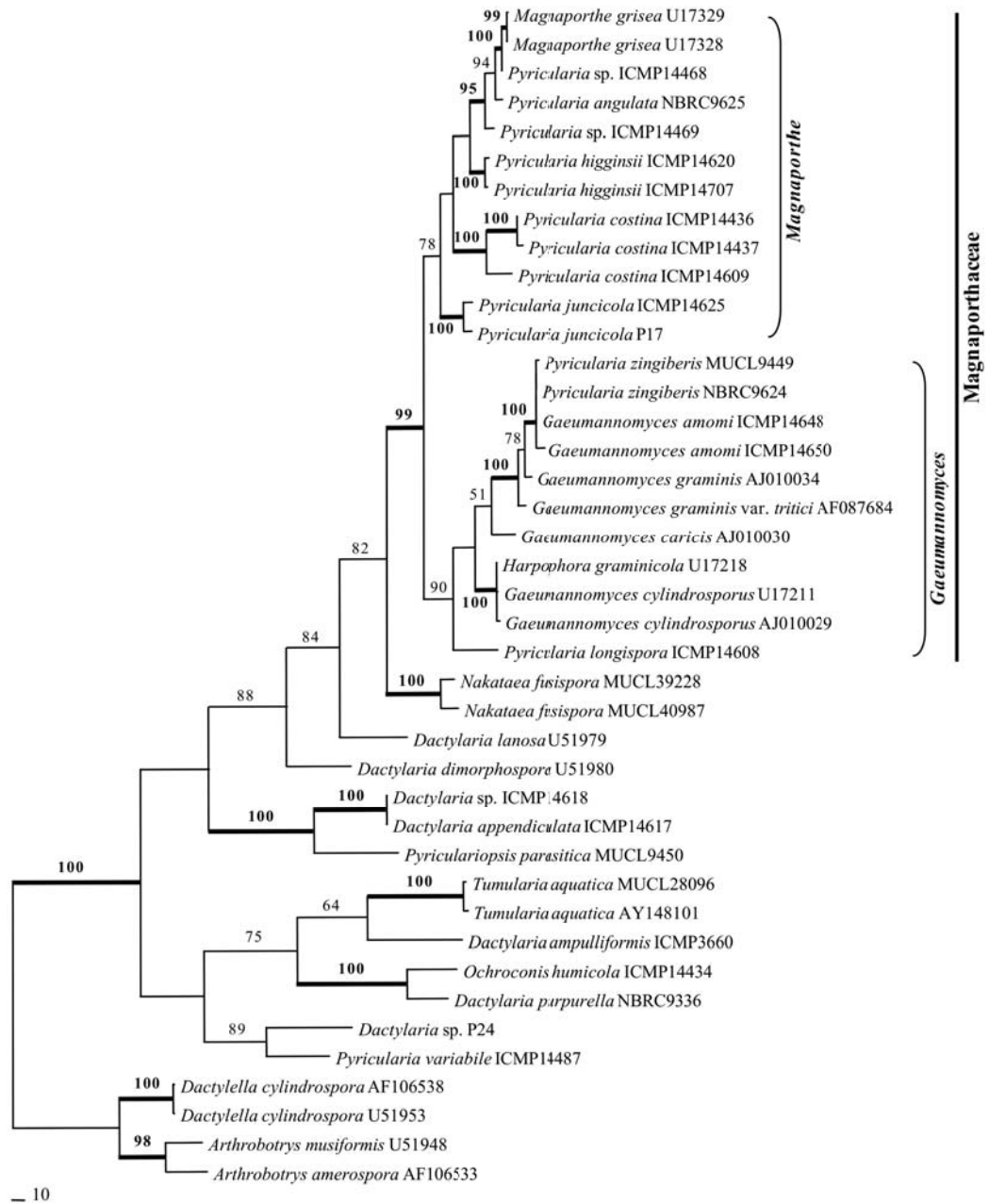


Figure 1.2 One of 90 equally most parsimonious trees inferred from a heuristic search of the ITS1-5.8S-ITS2 rDNA sequence alignment of 41 isolates of *Pyricularia* and related genera. *Dactylella* and *Arthrobotrys* were used to root the tree. The size of the branches is indicated with a scale bar. The bootstrap values representing 1000 bootstrap replications are given (when more than 50%) above or below the branches. Branches $\geq 95\%$ are strongly supported (Felsenstein, 1985) and are shown in bold.

Myrothecium

1. การบ่งบอกชนิดเชื้อราโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

เปรียบเทียบและบ่งบอกชนิดรา *Myrothecium cinctum* ที่แยกได้จากพืชวงศ์จิง และพืชชนิดอื่น โดยพิจารณาจากลักษณะสัณฐานของเชื้อราบน natural substrate และ ลักษณะการเจริญของโคโลนี บนอาหาร PDA และ CMA เปรียบเทียบกับราสกุล *Solheimia* ซึ่งมีลักษณะสัณฐานใกล้เคียงกันด้วย ดังแสดงรายละเอียดโดยย่อใน Table 1.4 โดยพบว่า *M. cinctum* มีความแตกต่างจาก *Myrothecium* สปีชีส์อื่นตรงที่สร้างสปอร์ที่มีลวดลาย ราวนี้มีความคล้ายคลึงกับ *M. pandanicola* โดยราทั้งสองสร้างสปอร์ที่มีลวดลายและเกิดตรงปลายก้านชูสปอร์ซึ่งอัดกันแน่น (synnemata) แต่สปอร์ของ *M. cinctum* มีขนาดเล็กกว่า *M. pandanicola* มาก โดยค่าเฉลี่ยสัดส่วนความยาวกับความกว้างของสปอร์ของ *M. cinctum* เป็น 3:1 ในขณะที่ *M. pandanicola* เป็น 6:1 นอกจากนี้สปอร์ของ *M. cinctum* มีจำนวน longitudinal ridges มากกว่าด้วย (Figure 1.3)

ลักษณะสัณฐานของราไอโซเลท BCC11170 (เจริญบน *Licuala longecalycata*) และ BCC9775 (เจริญบน *Musa acuminata*) นั้นตรงกับ *Solheimia costaspora* และ *S. kamatii* ตามลำดับ ซึ่งราทั้งสองสปีชีส์นี้มีลักษณะรูปร่างและขนาดของสปอร์ใกล้เคียงกับ *Myrothecium cinctum* มาก (Table 1.4) นอกจากนี้ conidiomata การจัดเรียงของสปอร์ และขนาด รวมถึง รูปร่างสปอร์ของราเหล่านี้ที่เจริญบนอาหารที่มีชิ้นใบกล้วยที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วมีลักษณะเหมือนกัน ซึ่งข้อมูลทางชีวโมเลกุล (ITS ribosomal DNA sequences) ที่จะกล่าวในหัวข้อต่อไปนั้น สนับสนุนว่ารา *Solheimia* ที่สปอร์มีขนาด และลวดลายเหมือน *M. cinctum* นั้นควรจัดให้อยู่ในสกุล *Myrothecium*

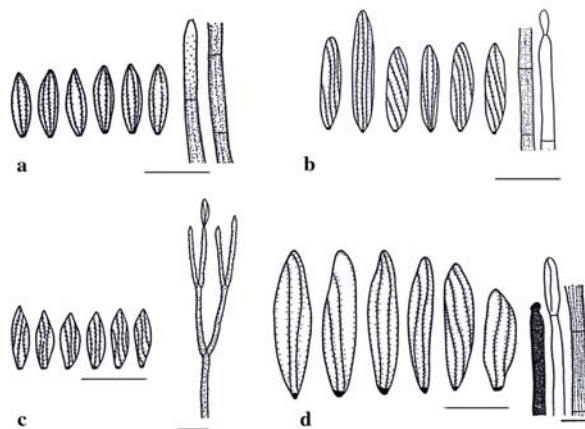


Figure 1.3 Diagrammatic representation of conidiophores, conidiogenous cells and conidia of *Myrothecium cinctum* isolated from Zingiberaceae (a), *Licuala longicalycata* (b), *Musa acuminata* (c) and *M. pandanicola* from *Pandanus penetrans* (d). Scale bars = 10 μm.

Table 1.4 Comparison of morphological characters of *Myrothecium cinctum* and *M.pandanicola* isolated from monocotyledonous plants in Thailand.

Characters	<i>Anomum siamense</i>	<i>Licuala longicalycata</i>	<i>Musa acuminata</i>	<i>Pandanus penetrans</i>
• On natural substrate				
Stipes	up to 350 µm high, 23 µm diam	stipes up to 1500 µm high, 30 µm diam	up to 460 µm high, 15 µm diam	up to 850 µm high, 75 µm diam
Conidiophores	unbranched or double dichotomously branched	mostly unbranched	double dichotomously branched	mostly unbranched
Conidial size	9–12 × 3–3.7 µm	15–19 × 3.7–5 µm	7–11 × 2–3 µm	13.9–27.8 × 2.3–4.6 µm
Striation	8 mostly straight longitudinal ridges	7–9 straight, curved or spiral ridges	6–8 spiral ridges	6–7 straight or mostly curved ridges
• Colony diam on PDA after 14 days	6 cm	5 cm	7 cm	7.5 cm
• Colony diam on CMA after 14 days	5 cm	4 cm	4.5 cm	6 cm

2. Molecular phylogeny

การศึกษาหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของรา *Myrothecium* โดยใช้ ITS sequence ด้วยการวิเคราะห์แบบ maximum parsimony (MP) พบว่ารา *Myrothecium* ทั้งหมดรวมกันอยู่ใน cluster ใหญ่ (Figure 1.4) โดยแบ่งเป็น clade I และ clade II ซึ่งทั้งสอง clade มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดเป็น sister ซึ่งกันและกัน (75% bootstrap support) clade I ประกอบด้วย *M. inundatum* (type species), *M. atroviride*, *M. verrucaria*, *M. roridum*, *M. leucotrichum*, *M. pandanicola* และ *Vergatospora echinofibrosa* (69% bootstrap support) ใน clade นี้ *M. atroviride* และ *M. verrucaria* มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันมากโดยมี bootstrap support 99% สำหรับ clade II ประกอบด้วย *M. cinctum* ซึ่งแยกได้ จากพืชชนิดต่างๆ และ *Solheimia* ทั้งสองบสปีชีส์ด้วย bootstrap support สูงถึง 100% นอกจากนี้เชื้อราที่ รวมกันอยู่ใน *Myrothecium* cluster มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับราซึ่งประกอบไปด้วยราที่สร้าง conidial mass สีอ่อน และอยู่ใน order Hypocreales หรือ Sordariales Incertae Sedis (*Tubercularia* sp., *Koorchaloma spartinicola*, *Gliocladium penicillioides*, *Clonostachys rosea*, *Stilbella byssiseda*, *Volutella ciliata* and *Verticillium dahliae*) มากกว่าราที่สร้าง conidial mass สีเข้ม และอยู่ใน order Ophiostomatales (*Pesotum cupulatum*, *P. fragrans*, *Graphium erubescens*) (Figure 1.4)

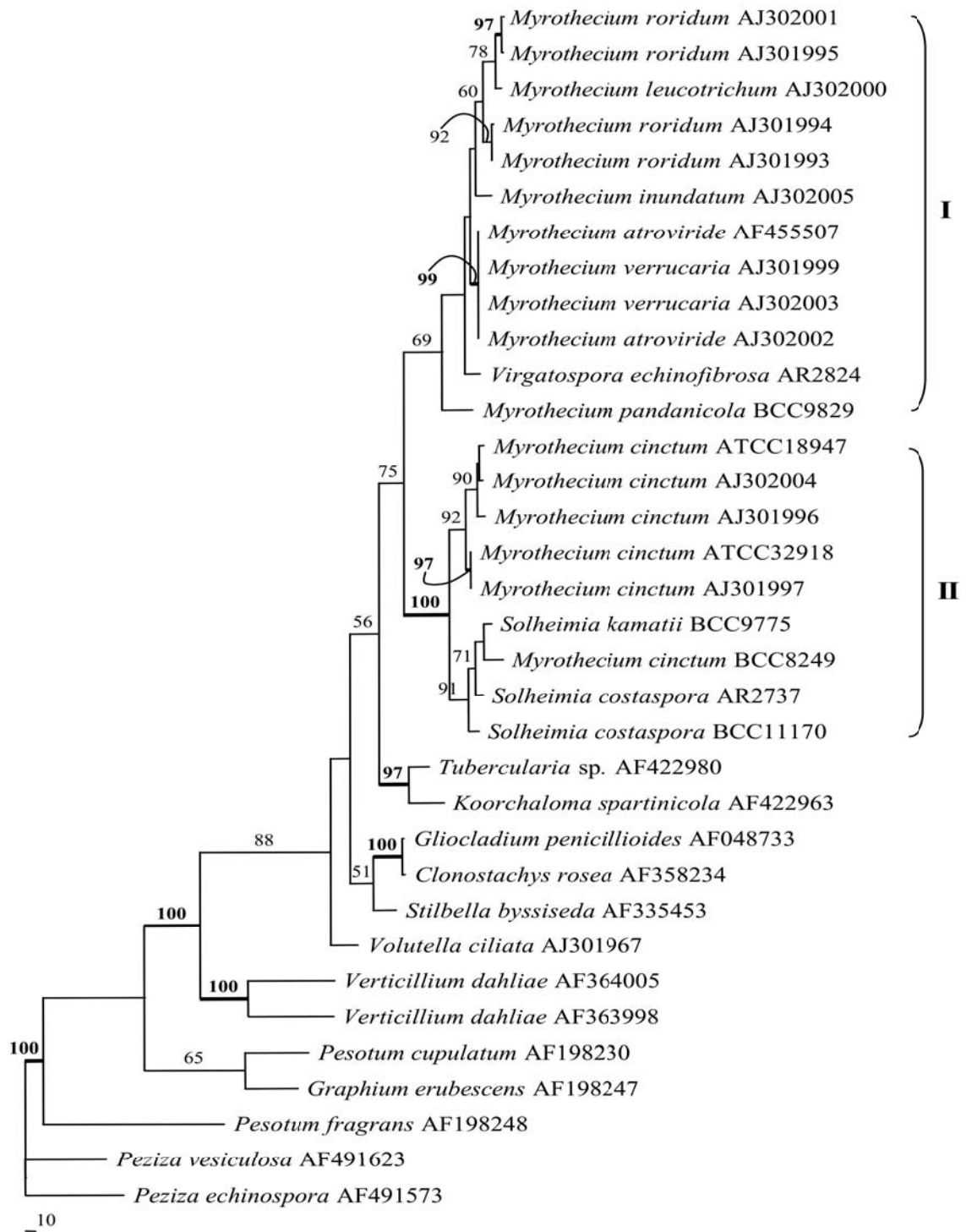


Figure 1.4 One of 6 most parsimonious trees inferred from a heuristic search of the ITS1-5.8S-ITS2 rDNA sequence alignment of 34 isolates of *Myrothecium* and related genera. *Peziza echinospora* and *P. vesiculosa* were used to root the tree. The size of the branches is indicated with a scale bar. Branches with strong support ($\geq 95\%$) are in bold, with bootstrap values $\geq 50\%$ indicated above the branches.

สรุปและวิจารณ์

การจำแนกเชื้อราโดยทั่วไปมักพิจารณาจากลักษณะทางสัณฐานวิทยา อันได้แก่ 1) รูปแบบการเกิดของสปอร์ (conidial ontogeny) 2) ขนาดและรูปร่างสปอร์ และ 3) รูปแบบการหลุดของสปอร์ (conidial secession) เป็นสำคัญ (Kirk *et al.*, 2001) รวมถึงพิจารณาลักษณะ conidiomata การจัดเรียงของสปอร์ จำนวนและชนิดผนังกันสปอร์ (septation) การสร้างโครงสร้างเฉพาะ เช่น appressoria appendages เป็นต้น (Ellis, 1971, 1976; Carmichael *et al.*, 1980; Sutton, 1980; von Arx, 1981; Hyde *et al.*, 2000; Bussaban *et al.*, 2001a, c, 2003a, b) ซึ่งลักษณะบางอย่างมีความผันแปรตามสภาพแวดล้อม ลักษณะบางอย่างใกล้เคียงกันมาก หรือลักษณะบางอย่างอาจตรวจพบได้ยาก ซึ่งต้องอาศัยอุปกรณ์ในการตรวจที่มีประสิทธิภาพ รวมถึงประสบการณ์ และวิจารณญาณของผู้ทดลอง

การแยกราสกุล *Pyricularia* จากราสกุล *Dactylaria* มักจะพิจารณาจากรูปแบบการหลุดของสปอร์ (conidial secession) เป็นสำคัญ (Ellis, 1971, 1976) โดยราสกุล *Pyricularia* มีรูปแบบการหลุดของสปอร์เป็น rhexolytic secession ราสกุล *Dactylaria* มีรูปแบบการหลุดของสปอร์เป็น schizolytic secession ตัวอย่างของราที่ได้รับการบ่งบอกรหัสและให้รายละเอียดว่าเป็นราสกุล *Pyricularia* ได้แก่ *P. higginsii* และ *P. juncicola* ทั้งสองสปีชีส์มีรูปแบบการหลุดของสปอร์แบบ schizolytic ได้ถูกเปลี่ยนชื่อไปเป็นราสกุล *Dactylaria* (Ellis, 1976) ในทำนองเดียวกัน *Nakataea fusispora* ถูกเปลี่ยนชื่อไปเป็น *Pyricularia fusispora* เนื่องจากมีรูปแบบการหลุดของสปอร์แบบ rhexolytic อย่างไรก็ตามในการศึกษาครั้งนี้พบว่าราทั้งสองสกุลมีรูปแบบการหลุดของสปอร์ทั้งสองแบบร่วมกัน คือ rhexolytic secession และ schizolytic secession (Figure 1.1) ซึ่งหลักเกณฑ์การใช้รูปแบบการหลุดของสปอร์ ไม่สามารถนำมาใช้เป็นหลักสำคัญในการแยกราสกุล *Pyricularia* จากราสกุล *Dactylaria* หรือ *Nakataea* ได้ และจากการศึกษาครั้งนี้โดยใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุล (วิเคราะห์ลำดับเบสของ ITS rDNA) ซึ่งให้เห็นว่าการแยกราสกุล *Pyricularia* จากราสกุล *Dactylaria* สอดคล้องกับการใช้รูปร่างของสปอร์ โดยราสกุล *Pyricularia* ซึ่งมีลักษณะสัณฐานของสปอร์ที่มีรูปร่างคล้ายลูกแพร์นั้นถูกจัดให้อยู่รวมกันภายใน Magnaporthaceae clade ด้วยค่า bootstrap support สูง สำหรับ *Nakataea fusispora* ซึ่งสร้างสปอร์ที่มีลักษณะเด่นชัดโดยสปอร์มีรูปร่างคล้ายกระสวยและขรุขระ (Matsushima, 1975) ถูกจัดเป็น sister group ของ Magnaporthaceae และควรจัดอยู่ในสกุล *Nakataea* ตามเดิม สำหรับราสกุล *Dactylaria* ซึ่งมีลักษณะสัณฐานของสปอร์ที่มีรูปร่างเป็นอย่างอื่น ซึ่งยังไม่มีความแน่ชัดว่ามีรูปร่างสปอร์แบบใดบ้าง รวมถึงหลักเกณฑ์ในการจัดจำแนกยังไม่แน่นอน (de Hoog, 1985; Goh and Hyed, 1997) ถูกจัดกระจายอยู่ด้านนอกของ Magnaporthaceae clade กรณี *Pyricularia variabilis* ดูเหมือนว่าจะมีความสัมพันธ์ห่างไกลกับรา *Pyricularia* สปีชีส์อื่นๆ ที่นำมาวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ในครั้งนี้ โดยราสปีชีส์นี้มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ *Dactylaria* sp. P24 มากกว่า นอกจากนี้ cluster ของ

P. variabilis ยังมีความสัมพันธ์เป็น sister group กับกลุ่มของราที่ประกอบด้วยสมาชิกสกุล *Dactylaria* อาจอธิบายได้ว่า ราสปิชีส์นี้มี ลักษณะของสปอร์ที่หลากหลาย บางสปอร์มี appendage รวมถึงมีลักษณะโป่งบวมที่บริเวณปลาย และ ระหว่างข้อของก้านชูสปอร์ การจัดสกุลที่เหมาะสมสำหรับราสปิชีส์นี้ควรได้รับการศึกษาในโอกาสต่อไป

ลักษณะทางสัณฐานวิทยามีหลักเกณฑ์หลายข้อ แต่หลักเกณฑ์ดังกล่าวยังไม่สามารถใช้จำแนกเชื้อราระดับสปิชีส์ หรือแม้กระทั่งระดับสกุลได้ดีพอ เช่นเดียวกับกรณีของราสกุล *Myrothecium* และ *Solheimia* ซึ่งบางสปิชีส์มีลักษณะสัณฐานใกล้เคียงกันมาก ราในสกุล *Myrothecium* ประกอบด้วย 69 สปิชีส์ สำหรับราในสกุล *Solheimia* มีเพียง 2 สปิชีส์ ตามที่มีรายงานใน Index Fungorum (<http://www.indexfungorum.org/Names/Names.asp>) การจัดจำแนกและบ่งบอกชนิดราในกลุ่มนี้ โดยเฉพาะ *Myrothecium* ก่อนข้างทำได้ยากเนื่องจากมีราอีกหลายกลุ่มที่มีลักษณะเป็น synnematus conidiomata (Morris, 1967; Tulloch, 1972; Seifert, 1985) Nag Raj (1995) เลือกใช้สีของ conidial mass เป็นลักษณะสำคัญในการจัดจำแนกและบ่งบอกชนิดราในกลุ่มนี้ ซึ่งยังไม่ชัดเจนนักในการแยก ราสกุล *Solheimia* จากราสกุลอื่นๆ โดยพบว่าราสกุล *Solheimia*, *M. cinctum* และ *Didymostilbe echinofibrosa* (synonym *Virgatospora echinofibrosa*) มีลักษณะสัณฐานต่างๆ คล้ายกันมาก โดยเฉพาะขนาดและรูปร่างสปอร์ รวมถึงลวดลายบนสปอร์ ยกเว้นเพียง *D. echinofibrosa* มีผนังก้านสปอร์ (Bills et al., 1994; Chang, 1998) และยังมีความสับสนของลักษณะที่ใช้แยกว่าเป็นราสกุล *Solheimia* คือ การมีก้านชูสปอร์ตรง ไม่แตกกิ่งก้าน (unbranched conidiophores) (Morris, 1967; Seifert, 1985) แต่ในกรณีของ *Solheimia kamatii* ซึ่งบ่งบอกว่า เป็นอีกสปิชีส์โดยราสปิชีส์นี้มีการแตกแขนงของก้านชูสปอร์แบบ dichotomously 2 ครั้ง (Varghese and Rao, 1977) นอกจากนี้ Bills et al. (1994) ได้ทดลองนำรา *M. cinctum* และ *S. costapora* มาเพาะเลี้ยงบนอาหารและบนใบกล้วยที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว และพิสูจน์ให้เห็นว่าราทั้งสองสปิชีส์นี้ มีลักษณะสัณฐานเหมือนกัน ในการศึกษาครั้งนี้โดยข้อมูลทางชีวโมเลกุลวิเคราะห์จากลำดับเบสของ ITS และ 5.8S rDNA พบว่า *Solheimia costapora*, *S. kamatii* และ *Myrothecium cinctum* มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันมาก ซึ่งสอดคล้องกับการที่ราดังกล่าวมีลักษณะสัณฐานที่ได้รับการยืนยันแล้วว่าคล้ายกันมาก อันอาจกล่าวได้ว่ารา *S. costapora* และ *S. kamatii* ควรเป็นชื่อพ้องของรา *M. cinctum*

การศึกษาครั้งนี้สามารถสรุปได้ว่าข้อมูลทางชีวโมเลกุล (การหาลำดับเบสของ ITS rDNA) สามารถนำมาใช้ในการแยกราบางสกุลที่มีความคล้ายคลึงกัน หรือใช้บ่งบอกความแตกต่างระดับสปิชีส์ในเชื้อราได้ โดยพบว่ารา *Pyricularia* ที่มีลักษณะสัณฐาน (ขนาดและรูปร่างสปอร์ และจำนวน septate) เหมือนกันทั้งที่แยกได้จากพืชชนิดเดียวกันหรือพืชต่างชนิดเป็นราชชนิดเดียวกัน ในทำนองเดียวกัน ผลทางสัณฐานและการหาลำดับเบสของ ITS rDNA ของรา *Myrothecium* มีความสัมพันธ์กัน โดย *M. cinctum* และ *Solheimia* ทั้งสองสปิชีส์ (*S. costapora* และ *S. kamatii*) ซึ่งมีลวดลายบนสปอร์เหมือนกัน

และมีขนาดสปอร์ใกล้เคียงกัน แต่แยกได้จากพืชต่างชนิด เป็นราชนิดเดียวกัน จากผลการเปรียบเทียบระหว่างความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและลักษณะทางสัณฐานของเชื้อราทั้งสองสกุลอาจกล่าวได้ว่าการใช้ลำดับเบสของ ITS rDNA สามารถนำมาใช้บ่งบอกความแตกต่างระดับสปีชีส์ในเชื้อราได้ และทำให้สามารถจำแนกชนิดของเชื้อราดังกล่าวได้อย่างน่าเชื่อถืออีกด้วย

บรรณานุกรม

- Asuyama, H. (1965). Morphology, taxonomy, host range, and life cycle of *Piricularia oryzae*. In R.F.Jr. Chandler (ed.), *The Rice Blast Disease*, pp. 9–22. The Johns Hopkins Press, USA.
- Bailey, A.G. and van Eijnatten, C. (1961). Corn gray spot caused by *Piricularia grisea*. *Phytopathology* 51: 197–198.
- Bills, G.F., Rossman, A.Y. and Polishook, J.D. (1994). Rediscovery of *Albosynnema elegans* and *Solheimia costaspora*. *Sydowia* 46: 1–11.
- Borromeo, E.S., Nelson, R.J., Bonman, J.M. and Leung, H. (1993). Genetic differentiation among isolates of *Piricularia* infecting rice and weed hosts. *Phytopathology* 83: 393–399.
- Bussaban, B., Lumyong, P., McKenzie, E.H.C., Hyde, K.D. and Lumyong, S. (2003a). *Xenosporium amomi* sp. nov. from Zingiberaceae in Thailand. *Fungal Diversity* 14: 61–66.
- Bussaban, B., Lumyong, P., McKenzie, E.H.C., Hyde, K.D. and Lumyong, S. (2004). Fungi on Zingiberaceae (ginger). In E.B.G. Jones, M. Tantichareon and K.D. Hyde (eds.), *Thai Fungal Diversity*, pp. 189–195. BIOTEC, Bangkok, Thailand.
- Bussaban, B., Lumyong, S., Lumyong, P., Hyde, K.D. and McKenzie, E.H.C. (2001a). Two new species of endophytes (ascomycetes) from Zingiberaceae sporulating in culture. *Nova Hedwigia* 73: 487–493.
- Bussaban, B., Lumyong, S., Lumyong, P., Hyde, K.D. and McKenzie, E.H.C. (2003b). Three new species of *Piricularia* isolated as zingiberaceous endophytes from Thailand. *Mycologia* 95: 519–524.
- Bussaban, B., Lumyong, S., Lumyong, P., McKenzie, E.H.C. and Hyde, K.D. (2001b). Endophytic fungi from *Amomum siamense*. *Canadian Journal of Microbiology* 47: 943–948.
- Bussaban, B., Lumyong, S., Lumyong, P., McKenzie, E.H.C. and Hyde, K.D. (2001c). A synopsis of the genus *Berkleasmium* with two new species and new records of *Canalisporium caribense* from Zingiberaceae in Thailand. *Fungal Diversity* 8: 73–85.

- Carmichael, J.W., Kendrick, W.B., Connors, I.L. and Sigler, L. (1980). *Genera of Hyphomycetes*. The University of Alberta Press, Alberta, Canada.
- Chang, H.S. (1998). Three dematiaceous hyphomycetes from Taiwan. *Botanical Bulletin of Academia Sinica* 40: 247–250.
- Choi, Y.W., Hyde, K.D. and Ho, W.H. (1999). Single spore isolation of fungi. *Fungal Diversity* 3: 29–38.
- de Hoog, G.S. (1985). Taxonomy of the *Dactylaria* complex, IV. *Dactylaria*, *Neta*, *Subulispora* and *Scolecobasidium*. *Studies in Mycology* 26: 1–60.
- Ellis, M.B. (1971). *Dematiaceous Hyphomycetes*. Commonwealth Mycological Institute, Kew, UK.
- Ellis, M.B. (1976). *More Dematiaceous Hyphomycetes*. Commonwealth Mycological Institute, Kew, UK.
- Felsenstein, J. (1985). Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 783–791.
- Freeman, S. and Rodriguez, R.J. (1993). Genetic conversion of a fungal plant pathogen to a non-pathogenic, endophytic mutualism. *Science* 260: 75–78.
- Goh, T.K. and Hyde, K.D. (1997). A revision of *Dactylaria*, with description of *D. tunicata* sp. nov. from submerged wood in Australia. *Mycological Research* 101: 1265–1272.
- Hashioka, Y. (1971). Notes on *Pyricularia* I. Three species parasitic to Musaceae, Cannaceae and Zingiberaceae. *Transactions of the Mycological Society of Japan* 12: 126–135.
- Hashioka, Y. (1973). Notes on *Pyricularia* II. Four species and one variety parasitic to Cyperaceae, Gramineae and Commelinaceae. *Transactions of the Mycological Society of Japan* 14: 256–265.
- Hyde, K.D., Taylor, J.E. and Fröhlich, J. (2000). *Genera of Ascomycetes from Palm*, *Fungal Diversity Research Series 2*. Fungal Diversity Press, Hong Kong.
- Kato, H., Yamamoto, M., Yamaguchi-Ozaki, T., Kadouchi, H., Iwamoto, Y., Nakayashiki, H., Tosa, Y., Mayama, S. and Mori, N. (2000). Pathogenicity, mating ability and DNA restriction fragment length polymorphisms of *Pyricularia* populations isolated from Gramineae, Bambusideae and Zingiberaceae plants. *Journal of General Plant Pathology* 66: 30–47.
- Kim, W.K., Mauthe, W., Hausner, G. and Klassen, G.R. (1990). Isolation of high molecular weight DNA and double-stranded RNAs from fungi. *Canadian Journal of Botany* 68: 1898–1902.

- Kirk, P.M., Cannon, P.F., David, J.C. and Stalpers, J.A. (2001). *Dictionary of the Fungi*, 9th Edition. CAB International, Surrey, UK.
- Liou, G.Y. and Tzean, S.S. (1997). Phylogeny of the genus *Arthrobotrys* and allied nematode-trapping fungi based on rDNA sequences. *Mycologia* 89: 876–884.
- Matsushima, T. (1975). *Icones Microfungorum a Matsushima Lectorum*. Matsushima, Kob, Japan.
- Meredith, D.S. (1963). *Pyricularia grisea* (Cooke) Sacc. causing pitting disease of bananas in central America. I. Preliminary studies on pathogenicity. *Annals of Applied Biology* 52: 453–463.
- Morris, E.F. (1967). Studies on the synnematus fungi imperfecti II. *Mycopathologica et Mycologia Applicata* 33: 179–185.
- Munaut, F., Hamaide, N.R. and Maraite, H. (2001). Molecular and Morphological characterization of *Colletotrichum gloeosporioides* from native Mexican *Stylosanthes* species. *Plant pathology* 50: 1–15.
- Nag Raj, T.R. (1995). What is *Myrothecium presonii*? *Mycotaxon* 53: 295–310.
- Nicholas, K.B. and Nicholas, H.B.Jr. (1997). *GeneDoc: a Tool for Editing and Annotating Multiple Sequence Alignments*. <http://www.psc.edu/biomed/genedoc> [2002, August 5].
- Ou, S.H. (1987). *Rice Diseases*, 2nd Edition. CAB International, Kew, UK.
- Rathaiah, Y. (1980). Leaf spot of turmeric. *Plant Disease* 64: 104–105.
- Sarbajna, K.K. (1990). New species of *Mycovellosiella* and *Pyricularia* from West Bengal. *Journal of Mycopathological Research* 28: 159–164.
- Seifert, K.A. (1985). A monograph of *Stilbella* and some allied genera. *Studies in Mycology* 27: 1–235.
- Seifert, K.A., Louis-Seize, G. and Sampson, G. (2003). *Myrothecium acadiense*, a new hyphomycete isolated from the weed *Tussilago farfara*. *Mycotaxon* 87: 317–327.
- Shull, V. and Hamer, J.E. (1994). Genomic structure and variability in *Pyricularia grisea*. In R. Zeigler, S.A. Leong and P.S. Teng (eds.), *Rice Blast Disease*, pp. 65–86. CAB International, Wallingford, UK.
- Siwasin, C. and Giatgong, P. (1991). Cytological study and cross inoculation of *Pyricularia* spp. *Newsletter Institute Rice Commissions* 20: 13–19.
- Sutton, B.C. (1980). *The Coelomycetes*. Commonwealth Mycological Institute, Kew, UK.
- Swofford, D.L. (2002). *PAUP*: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (* and Other Methods)*, Beta Version 4.0b10. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.

- Thompson, J.D., Higgins, D.G. and Gibson, T.J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22: 4673–4680.
- Tulloch, M. (1972). The genus *Myrothecium* Tode ex Fr. *Mycological Papers* 130: 1–42.
- Varghese, K.I.M. and Rao, V.G. (1977). *Solheimia kamatii* sp. nov. (hyphomycete) a new generic record to India. *Current Science* 46: 23–24.
- von Arx, J.A. (1981). *The Genera of Fungi Sporulating in Pure Culture*. A.R. Gantner, Germany.
- Watanabe, T., Watanabe, Y. and Nakamura, K. (2003). *Myrothecium dimorphum*, sp. nov., a soil fungus from beach sand in the Bonin (Ogasawara) Islands, Japan. *Mycoscience* 44: 283–286.
- White, T.J., Bruns, T.D., Lee, S. and Taylor, J.W. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In M.A. Innis, D.H. Gelfand, J.J. Sninsky and T.J. White (eds.), *PCR Protocols: a Guide to Methods and Applications*, pp. 315–322. Academic Press, San Diego, USA.

บทที่ 2

การศึกษาความสามารถเป็นเชื้อปรักษ์ต่อราสาเหตุโรคพืชและความสามารถในการผลิตสาร ต้านเชื้อจุลินทรีย์ของราเอนโดไฟท์และราซาโพรบที่แยกได้จากพืชวงศ์จิง

โรคใบจุดและใบไหม้ในจิงมีสาเหตุจากรา *Pyricularia costina* ลักษณะการเกิดโรคจะเป็นจุดสีน้ำตาลแดงขนาดเล็กเกิดขึ้นมาก่อน โดยใบรอบจุดจะมีสีเหลือง (yellow halo) เห็นได้ชัดเจน จากนั้นรอยแผลนี้จะขยายใหญ่ขึ้นกลางแผลเป็นสีเทาจนถึงสีน้ำตาลเข้มตรงบริเวณด้านนอก และมี yellow halo ล้อมรอบแผล ถ้ามีการทำลายของโรคอย่างรุนแรงอาจเห็นสปอร์ของเชื้อราก่อโรคเจริญอยู่ และรอยแผลอาจลุกลามจนกันจนมีลักษณะคล้ายใบไหม้ สำหรับโรคใบจุดที่มีสาเหตุจากรา *Phomopsis* sp. ลักษณะการเกิดโรคจะเป็นจุดสีน้ำตาลขนาดเล็กเกิดแบบกระจายขึ้นมาก่อน จากนั้นรอยแผลจะขยายใหญ่ขึ้นเนื้อเยื่อตาย ขอบแผลเป็นสีน้ำตาลแดง และตรงบริเวณด้านนอกมี yellow halo ล้อมรอบแผล โรคทั้งสองนี้ไม่เพียงแสดงอาการบนใบเท่านั้น ยังสามารถแสดงอาการบนดอกได้ด้วย จึงมีความสำคัญสำหรับพืชวงศ์จิงโดยเฉพาะจึงชนิดที่ถูกเป็นไม้ประดับหรือไม้ตัดดอก โดยโรคนี้จะก่อให้เกิดความเสียหายทำให้ผลผลิตไม่สวยงาม และ ราคาดก หรือ ไม่สามารถนำไปจำหน่ายได้เลย โดยเฉพาะกรณีเป็นสินค้าส่งออก

การใช้สารเคมีในการควบคุมโรคแม้ว่าจะให้ผลดี แต่ก็มีพิษตกค้างจนก่อให้เกิดมลพิษต่อสิ่งแวดล้อม ซึ่งอาจเกิดจากการใช้สารเคมีในปริมาณที่มากเกินไป หรือใช้ผิดวิธี สารเคมีอาจไปทำลายจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์แก่พืชในดิน หรือแมลงศัตรูธรรมชาติ ปัจจุบันการควบคุมโดยชีววิธีจึงมีบทบาทมากขึ้น และมีประสิทธิภาพในการป้องกันโรค เช่น การใช้จุลินทรีย์กลุ่มต่างๆ มาควบคุมโรคพืช รวมทั้งการหายาด้านเชื้อราชนิดใหม่ๆ จากจุลินทรีย์กลุ่มต่างๆ ซึ่งเชื้อราเอนโดไฟท์ก็จัดเป็นจุลินทรีย์อีกกลุ่มหนึ่ง ที่มีศักยภาพในการได้มาซึ่งสารต้านเชื้อราในกลุ่มใหม่ๆ ซึ่งน่าจะเป็นอีกหนทางหนึ่งในการที่จะสามารถควบคุมโรคพืชได้ (Thomson *et al.*, 1986; Breen, 1993, 1994; Latch, 1993; Stone *et al.*, 2000; Dingle and McGee, 2003; Rubini *et al.*, 2005)

นอกจากนี้ราเอนโดไฟท์หรือราซาโพรบที่แยกได้จากพืชวงศ์จิงยังน่าสนใจอาจจะสามารถนำมาใช้ในการผลิตสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ต่อต้านเชื้อจุลินทรีย์ได้ ดังมีงานวิจัยที่แสดงให้เห็นว่าราเอนโดไฟท์ที่อาศัยร่วมกับพืชสมุนไพรบางชนิด สามารถผลิตสารออกฤทธิ์ชนิดใหม่หลายชนิด (Fisher *et al.*, 1984; Bill and Polishook, 1992; Bruner and Petrini, 1992) และพบว่าเชื้อราที่แยกได้จากต้นสมุนไพรนั้นผลิตสารออกฤทธิ์ชนิดเดียวกันกับพืช ตัวอย่างเช่น เชื้อราที่เจริญอยู่ในต้น Yew ซึ่งผลิตสาร Taxol เช่นเดียวกับพืช (Stierle *et al.*, 1993; Pulici *et al.*, 1997) สารที่ผลิตอาจเป็น

สารทุติยภูมิชนิดใหม่ (novel secondary metabolites) ช่วยเพิ่มความหลากหลายในการนำไปใช้ประโยชน์ทางการแพทย์ อุตสาหกรรม และเกษตรกรรม (Strobel, 2002; Strobel *et al.*, 2004)

การศึกษาค้นคว้าครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อสำรวจคุณสมบัติของราเอนโดไฟท์ และราซาโพรบในการเป็นปรสิตต่อราสาเหตุโรคใบจุด (*Phomopsis* sp.) โรคใบไหม้ (*Pyricularia costina*) ของจิง และสำรวจคุณสมบัติในการสร้างสารออกฤทธิ์ที่ต้านแบคทีเรีย (*Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*) รา (*Candida albicans*) สาเหตุโรคในมนุษย์ และด้านการเจริญของรา *Penicillium avellaneum*

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

1. การทดสอบความสามารถในการเป็นเชื้อปรสิตของราเอนโดไฟท์และราซาโพรบต่อเชื้อราสาเหตุโรคจิง

1.1 การเตรียมเชื้อราเอนโดไฟท์ ราซาโพรบ และราก่อโรค

การแยกราเอนโดไฟท์

เก็บตัวอย่างพืชวงศ์จิง (*Alpinia malaccensis* และ *Amomum siamense*) จากบริเวณอุทยานแห่งชาติดอยสุเทพ-ปุย โดยเก็บต้นที่สมบูรณ์ดีจาก 2 บริเวณๆ ละ 10 ต้น ทำการแยกราเอนโดไฟท์จาก ใบอ่อน ใบแก่ (vein, intervein) ลำต้นเหนือดิน (pseudostem) และลำต้นใต้ดิน (rhizome) โดยนำตัวอย่างพืชมาล้างน้ำไหลจากนั้นฆ่าเชื้อที่ผิวด้วยวิธี triple surface sterilization โดยจุ่มใน 95% ethanol เป็นเวลา 15 วินาที จากนั้นจุ่มใน 1% sodiumhypochlorite นาน 5 นาที แล้วย้ายไปจุ่มใน 95% ethanol 15 วินาที แล้วซับด้วยกระดาษทิชชูที่ฆ่าเชื้อแล้ว วางตัวอย่างที่ฆ่าเชื้อแล้วลงในอาหาร 2% malt extract agar ที่ผสม 0.03% Rose Bengal และ 0.1% streptomycin sulfate บ่มที่อุณหภูมิห้อง 1–2 สัปดาห์ เมื่อเส้นใยเจริญออกมา ทำการถ่ายเชื้อจากปลายเส้นใยลงในอาหาร corn meal agar slant และบ่มไว้เพื่อดูการสร้างสปอร์ จากนั้นบ่งบอกชนิดเชื้อราในระดับสกุลและ/หรือสปีชีส์ตามวิธีที่กล่าวไว้ในบทที่ 1

การแยกราซาโพรบ

เก็บตัวอย่างพืชวงศ์จิงที่ตายแล้วเก็บชนิดและบริเวณเดิม โดยเก็บ 10 ใบ 10 ลำต้นเหนือดิน ต่อชนิดและบริเวณที่เก็บ นำตัวอย่างพืชมาบ่มในถุงพลาสติกที่มีสำลีชุบน้ำ เพื่อเพิ่มความชื้น เมื่อเชื้อราเจริญจึงทำการบ่งบอกชนิดเชื้อราในระดับสกุลและ/หรือสปีชีส์ เช่นเดียวกับราเอนโดไฟท์ จากนั้นแยกเชื้อโดย single spore methods ตามวิธีของ Choi *et al.* (1999) และเลี้ยงเชื้อราที่ได้ ในอาหาร potato dextrose agar (PDA)

การแยกราก่อโรค

เก็บรวบรวมพืชที่แสดงอาการโรคใบจุดโดยมีเชื้อรา *Phomopsis* sp. เป็นเชื้อสาเหตุ โรคใบไหม้ซึ่งมีเชื้อรา *Pyricularia costina* เป็นสาเหตุ (Figure 2.1) การแยกเชื้อราสาเหตุโรคสามารถทำเช่นเดียวกับการแยกราซาโพรบ ในกรณีที่เชื้อราสาเหตุสร้างสปอร์ หากเชื้อราไม่สร้างสปอร์ทำการแยกโดยตัดชิ้นพืชบริเวณที่แสดงอาการขนาดประมาณ 3 ตร.มม. นำเชื้อที่ผิวโดยจุ่มใน 3% Clorox เป็นเวลา 3 นาที และล้าง 2 ครั้ง ด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นวางตัวอย่างที่ฆ่าเชื้อแล้วลงบนจานอาหาร PDA บ่มที่อุณหภูมิห้อง เมื่อเส้นใยเจริญออกมา ทำการถ่ายเชื้อจากปลายเส้นใยลงในอาหาร PDA slant จากนั้นบ่งบอกชนิดเชื้อราในระดับสกุล และ/หรือสปีชีส์เช่นเดียวกับเอนโดไฟต์และซาโพรบ



Figure 2.1 Disease symptoms: a. *Alpinia malaccensis*, Leaf blast caused by *Pyricularia costina*, b, c. *Amomum siamense*, b. Leaf blast caused by *Pyricularia costina*, c. Leaf spot caused by *Phomopsis* sp.

1.2 การทดสอบความสามารถในการเป็นเชื้อปรสิตของราเอนโดไฟต์และราซาโพรบ ต่อเชื้อราสาเหตุโรคพืชด้วยวิธี dual culture

ราเอนโดไฟต์และราซาโพรบที่ใช้ในการทดลองทั้งหมด 57 และ 36 ไอโซเลต ตามลำดับ ทดลอง 4 ซ้ำในแต่ละชนิดของเชื้อราเอนโดไฟต์และราซาโพรบ โดยนำชิ้นวุ้นที่มีเส้นใย (mycelial plug) ของเชื้อราดังกล่าว และ pathogen คือ *Phomopsis* sp. หรือ *Pyricularia costina* ที่มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 ซม. มาเลี้ยงคู่กันบนจานอาหาร PDA โดยวาง mycelial plug ของเชื้อราทั้งสอง ห่างจากขอบจานอาหารเลี้ยงเชื้อข้างละ 2 ซม. สำหรับงานควบคุมวางชิ้นวุ้นเปล่า และ pathogen (Figure 2.2) จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิห้อง ทำการตรวจผลการเกิด antagonist หลังจากบ่มเชื้อ 13 วัน โดยวัดค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรค

$$\% \text{ การยับยั้ง} = \frac{\text{รัศมีโคโลนีของราก่อโรคในงานควบคุม} - \text{รัศมีโคโลนีของราก่อโรคในงานทดลอง}}{\text{รัศมีโคโลนีของเชื้อโรคพืชในงานควบคุม}} \times 100$$

รัศมีโคโลนีของเชื้อโรคพืชในงานควบคุม

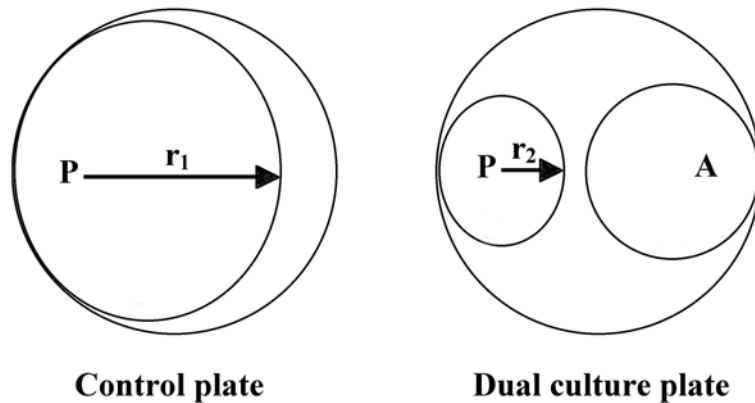


Figure 2.2 Percentage inhibition in dual culture test: P = pathogen, A = endophytic or saprobic fungi, r_1 = radius of pathogen in control plate, r_2 = radius of pathogen in dual culture plate.

2. ความสามารถในการผลิตสารต้านเชื้อจุลินทรีย์ของราเอนโดไฟท์และราซาโพรบที่แยกได้จากพืชวงศ์ขิง

2.1 การเตรียมเชื้อทดสอบ

Bacterial strains

นำเชื้อแบคทีเรียทดสอบ 4 ชนิด (*Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* และ *Staphylococcus aureus*) ที่ได้จากภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ มาเลี้ยงในอาหาร nutrient agar (NA) บ่มที่อุณหภูมิห้อง (27–30 °ซ.)

Fungal strains

นำเชื้อราทดสอบ *Candida albicans* (ATCC90028) ที่ได้จาก American Type Culture Collection, America และเชื้อราทดสอบ *Penicillium avellaneum* ที่ได้จาก Kunming Botanical Garden, Kunming, China มาเลี้ยงในอาหาร malt peptone agar (MPA) และ yeast glucose agar (YGA) ตามลำดับ บ่มที่อุณหภูมิห้อง (27–30 °ซ.)

การเตรียม assay plates

นำเชื้อทดสอบแต่ละชนิดมาเตรียมเพื่อใช้ใน agar well หรือ paper disk diffusion assays โดยเตรียม suspension ของเชื้อทดสอบดังนี้ เชื้อแบคทีเรียชนิดละ 1 loop แยกใส่ลงในหลอดทดลองที่มีอาหารเหลว nutrient 5 มล. และเชื้อ *C. albicans* 1 loop ใส่ลงในหลอดทดลองที่มีอาหารเหลว malt peptone 5 มล. นำหลอดที่มีเชื้อทดสอบดังกล่าวไปบ่มในสภาวะเขย่าด้วยเครื่องเขย่าแบบซ้าย-ขวา ที่อัตราเร็ว 130 รอบ/นาที นาน 16 ชม. สำหรับ *P. avellaneum* เติม Tween 80 ในปริมาตร 1% ลงในหลอดทดลองที่มีอาหารเหลว yeast glucose 5 มล. เขย่าให้เข้ากันก่อน แล้วจึงเชื้อ *P. avellaneum* 1 loop ใส่ลงไป จากนั้นผสมให้เข้ากันโดยใช้ vortex และนำไปเตรียม assay plates ได้ทันที การเตรียม assay plates ทำโดยแยกเติม suspension ของเชื้อทดสอบแต่ละชนิด 1 มล. ลงในอาหารแข็งแต่ละชนิดที่เหมาะสมกับเชื้อ 200 มล. ในขณะที่อาหารมีอุณหภูมิประมาณ 55 °ซ. ผสมให้เข้ากันแล้วจึงเทใส่จานอาหารประมาณ 20 มล. ต่อจาน ทิ้งไว้ให้อาหารที่มีเชื้อทดสอบเหล่านั้นแข็งตัว

2.2 การคัดกรองการสร้างสารออกฤทธิ์ชีวภาพ

เลี้ยงราบนโดไฟฟ้าและราชาโพรบจำนวน 78 และ 52 ไอโซเลต ตามลำดับ บนอาหาร PDA บ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 7 วัน จากนั้นนำไปเลี้ยงในอาหารหมัก 2 ชนิด คือ F1 และ F2 (Cheepthum *et al.*, 1999) โดยใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 ซม. เจาะบริเวณปลายเส้นใยนำไปใส่ในอาหารหมัก 5 มล. ที่บรรจุในหลอดทดลอง ขนาด 18 × 180 มม. บ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 7 วัน บนเครื่องเขย่าที่อัตราเร็ว 130 รอบ/นาที

2.3 Extraction and concentration

หลังจากการหมักเชื้อราแล้วทำการกรองเอาน้ำเลี้ยงเชื้อที่ได้ แล้วนำไปสกัด 2 ครั้งด้วย ethyl acetate (EtOAc) โดยใช้ปริมาตรเดียวกับน้ำเลี้ยงเชื้อที่ได้ จากนั้นนำส่วนที่สกัดได้มาทำให้เข้มข้นด้วยวิธี evaporation ภายใต้ความดัน และอุณหภูมิ 45 °ซ. จนแห้ง แล้วละลายด้วย dimethyl sulfoxide (DMSO) 1 มล. ก่อนนำไปเก็บที่ 4 °ซ. เพื่อรอทำ bioassay ต่อไป

2.4 Bioassay

Agar well diffusion assay

วิธีนี้ใช้สำหรับขั้นตอนการคัดกรองการสร้างสารออกฤทธิ์ชีวภาพ โดยหยดสารสกัดที่ได้ (ละลายใน DMSO) 35 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลุม (well) ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 มม. ซึ่งจะเตรียมไว้บน assay plate

Paper disk diffusion assay

วิธีนี้ใช้สำหรับขั้นตอนการทดสอบสารออกฤทธิ์ชีวภาพที่ผ่าน column chromatography ซึ่งจะกล่าวต่อไป โดยนำ sterile disk (8 mm diameter, BioTech) มาจุ่มใน fraction ที่ได้จาก column chromatography แล้วนำมาตากให้แห้งบนกระจกแก้ว นำ disk ที่แห้งแล้วมาวางบน assay plate ที่เตรียมไว้

งานอาหารทดสอบแบคทีเรียและยีสต์ทั้งหมดนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °ซ. ในที่มีด นาน 1 วัน สำหรับ *P. avellaneum* นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 40 °ซ. นาน 2–3 วัน สังเกตความสามารถในการยับยั้งเชื้อทดสอบ โดยดูการเกิดวงใสรอบ well หรือ disk ซึ่งผลการยับยั้งจะมีอยู่ 5 รูปแบบ โดยวัดจากเส้นผ่าศูนย์กลางของ inhibition zone ดังนี้ +++ , > 20 มม.; ++, 11–20 มม.; +, 8–10 มม.; ±, 6–7 มม.; -, X = 5 มม.

2.5 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการสร้างสารออกฤทธิ์ชีวภาพ

คัดเลือกทำให้ผลการยับยั้งเชื้อทดสอบ *P. avellaneum* มากที่สุด คือ *Chaetomium globosum* (CMUZE0132) มาศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการสร้างสารออกฤทธิ์ชีวภาพ โดยศึกษาผลของแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน ระดับ pH อุณหภูมิ ระยะเวลาในการหมัก โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ และวิเคราะห์ข้อมูลด้วย SPSS v.10 package สำหรับ one-way analysis of variance (ANOVA)

ชนิดของแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน

ศึกษาผลของแหล่งคาร์บอน และไนโตรเจนที่มีผลต่อการผลิตสารออกฤทธิ์ชีวภาพของเชื้อรา โดยเตรียมอาหารหมัก F1 ซึ่งเป็นอาหารหมักที่เหมาะสมในการผลิตสารต้านเชื้อรา จากข้อ 2.2 และแทนที่ด้วยส่วนผสมของแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนที่ต่างกัน แหล่งคาร์บอน คือ D-psicose, fructose, glucose, lactose, maltose, mannitol, pullulan, sucrose และ xylitol แหล่งไนโตรเจน คือ malt extract, peptone, polypeptone, soybean meal และ yeast extract อาหารปริมาตร 50 มล. ใส่ใน 250 มล. Erlenmeyer flasks จากนั้นใส่ชิ้นวุ้นที่มีเชื้อรา *C. globosum* (CMUZE0132) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 มม. จำนวน 3 ชิ้น นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 7 วัน โดยเขย่าที่ 130 รอบ/นาที จากนั้นวัดความสามารถในการยับยั้งเชื้อราทดสอบ *P. avellaneum* ด้วยวิธี agar well diffusion assay

ระดับ pH อุณหภูมิ และระยะเวลาในการหมักที่เหมาะสม

เตรียมอาหาร F1 ที่มีส่วนผสมของคาร์บอนและไนโตรเจนซึ่งได้ผลดีมาปรับระดับ pH เป็น 3.0, 4.0, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0 และ 9.0 โดยการเติม HCl หรือ NaOH ในอาหารปริมาตร 50 มล. ใส่ใน 250 มล. Erlenmeyer flasks จากนั้นใส่ชิ้นวุ้นที่มีเชื้อรา *C. globosum* (CMUZE0132) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 มม. จำนวน 3 ชิ้น นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 7 วัน โดยเขย่าที่ 130 รอบ/นาที สำหรับการศึกษผลของอุณหภูมิทำโดยเตรียมอาหาร F1 ที่มีระดับ pH ที่เหมาะสม มาทำการบ่มที่อุณหภูมิต่างกัน (25, 30, 37, 40 และ 45 °ซ.) นาน 7 วัน โดยเขย่าที่ 130 รอบ/นาที จากนั้นวัดความสามารถในการยับยั้งเชื้อราทดสอบ *P. avellaneum* ด้วยวิธี agar well diffusion assay

การศึกษาระยะเวลาในการหมักที่เหมาะสมทำโดยเตรียมอาหาร F1 ที่มีระดับ pH ที่เหมาะสม ใส่ชิ้นวุ้นที่มีเชื้อรา *C. globosum* (CMUZE0132) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 มม. จำนวน 3 ชิ้น แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิที่เหมาะสม โดยเขย่าที่ 130 รอบ/นาที ทำการเก็บน้ำเลี้ยงทุกวัน เป็นเวลา 14 วันและทำการวัดความสามารถในการยับยั้งเชื้อราทดสอบ *P. avellaneum* ด้วยวิธี agar well diffusion assay

2.6 การศึกษาคุณสมบัติสารออกฤทธิ์ชีวภาพที่สร้างโดย *Chaetomium globosum* (CMUZE0132)

Culture conditions

เตรียมอาหาร F1 ที่มีส่วนผสมของ glucose และ soybean meal ปริมาตร 1000 มล. โดยใช้ชิ้นวุ้นที่มีเชื้อรา *C. globosum* (CMUZE0132) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 มม. จำนวน 45 ชิ้น นำไปบ่มในสภาพที่เหมาะสมตามการทดลองในข้อ 2.5 คือ อุณหภูมิ 30 °ซ. นาน 5 วัน โดยเขย่าที่ 130 รอบ/นาที จากนั้นกรองแยกเอาน้ำเลี้ยงเชื้อ 100 มล. ไปเก็บที่ 4 °ซ. เพื่อรอทำการแยกสารให้บริสุทธิ์ต่อไป สำหรับน้ำเลี้ยงเชื้ออีก 900 มล. นำไปสกัดด้วย EtOAc และ ชั่งน้ำหนักสารสกัดที่เหลือที่ได้

Isolation and purification of bioactive compounds

เตรียม HP20 resin column (เส้นผ่าศูนย์กลาง 1 ซม., สูง 30 ซม.) โดยบรรจุ adsorbent resins 20 ก. ที่ผ่านการแช่ค้างคืนเพื่อขจัดสิ่งสกปรกที่อาจติดมาใน acetone และล้างด้วย ddH₂O โดยเทผ่าน column จากนั้นนำน้ำเลี้ยงเชื้อ 100 มล. (ที่เก็บที่ 4 °ซ.) เทผ่าน column จากนั้นชะ column ด้วย ddH₂O 40 มล., 25% methanol 40 มล., 50% methanol 40 มล., 100% methanol 40 มล. และ acetone: methanol (3:7) 40 มล. ในระหว่างที่เทน้ำเลี้ยงเชื้อและ ddH₂O ให้แยกเก็บแต่ละ fraction ใส่ในหลอดทดลอง ครั้งละ 10 มล. ในระหว่างที่เทตัวทำละลายอื่นให้แยกเก็บแต่ละ fraction ครั้งละ 5 มล. สำหรับ silica gel

column เตรียมโดยบรรจุ silica gel 60 ก. ลงใน column ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2 ซม. สูง 45 ซม. แล้วเทสารสกัดสีเหลืองที่สกัดได้จาก EtOAc (420 มก.) ลงใน column จากนั้นชะด้วย chloroform 300 มล. และ chloroform: methanol (9:1) 180 มล. ในระหว่างที่เทตัวทำละลายให้แยกเก็บแต่ละ fraction ใส่ในหลอดทดลองครั้งละ 5 มล. นำแต่ละ fraction ที่ได้มาทดสอบ (bioassay) ด้วยวิธี paper disk diffusion assay เชื้อทดสอบที่ใช้คือ *Candida albicans*, *Penicillium avellaneum*, *Pyricularia oryzae* (จาก Faculty of Agriculture, Hokkaido University) และ *Phytophthora* sp. (จาก ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่)

ทำการวิเคราะห์ fraction ที่ให้ผลในการยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบทั้งสี่ชนิด ด้วยวิธี thin layer chromatography (TLC) โดยตัดแผ่น TLC Silica gel 60 F₂₅₄ (20 × 20 cm, 0.2 mm thick, Merck) ให้มีขนาดกว้าง 1 ซม. นำแผ่น silica gel ที่ได้มากำหนดจุดระยะเริ่มต้นให้ห่างจากขอบ 2 ซม. และระยะสิ้นสุดของสารละลาย mobile phase ให้ห่างจากระยะเริ่มต้น 15 ซม. หยดสารจาก fraction ลงบนแผ่น silica gel ที่เส้นระยะเริ่มต้น ปริมาตร 10 ไมโครลิตร แล้วทิ้งไว้ให้แห้งก่อน นำแผ่น silica gel แต่ละอันใส่ลงในแท่งที่อ้อมตัวไปด้วยสารละลาย mobile phase (95:5, CHCl₃:MeOH) ปิดฝา และทิ้งไว้จนกระทั่งตัวทำละลายซึมขึ้นจนถึงเส้นระยะสิ้นสุด จากนั้นนำแผ่น silica gel ออกตากให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง และนำแผ่น TLC ไปตรวจสอบหาตำแหน่งของสารออกฤทธิ์ชีวภาพ โดยวางบนอาหารทดสอบที่เหมาะสมกับเชื้อทดสอบแต่ละชนิดนาน 1.5 ชั่วโมง แล้วนำออกจากอาหาร ทดสอบ และนำไปบ่มที่อุณหภูมิที่เหมาะสมกับเชื้อทดสอบแต่ละชนิด นาน 24 ชั่วโมง สังเกตวงใส ที่เกิดขึ้น พร้อมทั้งวัดระยะแล้วบันทึกเป็นค่า R_f เปรียบเทียบกับแผ่น TLC แผ่นที่สองที่นำไปตรวจสอบการเคลื่อนที่ของสารด้วยการส่องดูภายใต้แสง UV โดยจะสังเกตเห็นเป็นจุดเรืองแสง (Figure 2.3).

$$R_f = \frac{\text{ระยะจากจุดเริ่มต้นถึงสิ้นสุดของสารออกฤทธิ์ชีวภาพ}}{\text{ระยะจากจุดเริ่มต้นถึงสิ้นสุดของ mobile phase}}$$

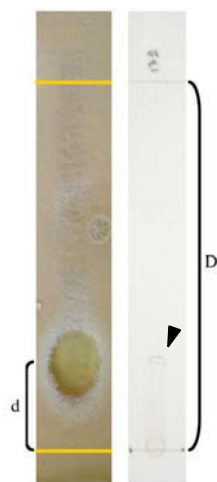


Figure 2.3 Measuring of R_f values of bioactive compounds in bioautograph (left) and band (arrowed) appearing under UV light (right) on TLC plate. d. distance from origins of active compounds, D. distance of solvent.

Mass spectra and NMR

เลือก fraction ที่แยกและทำให้บริสุทธิ์บางส่วนจาก HP20 resin หรือ silica gel columns มาวิเคราะห์ด้วย mass spectrophotometry [JMS-SX102A] และ ^1H NMR spectrophotometry โดยทำการวิเคราะห์ที่ Department of Chemistry, Faculty of Agriculture, Hokkaido University

ผลการทดลอง

1. การทดสอบความสามารถในการเป็นเชื้อปรสิตของราเอนโดไฟท์และราชาโพรบต่อเชื้อราสาเหตุโรคพืช

จากการคัดเลือกราเอนโดไฟท์ และราชาโพรบ มาทดสอบคุณสมบัติการเป็นเชื้อราปรสิต โดยวิธี dual culture กับเชื้อราทดสอบ (test organisms) คือ เชื้อราสาเหตุโรคใบจุด (*Phomopsis* sp.) และใบไหม้ (*Pyricularia costina*) ของพืชวงศ์จิง พบว่าราทุกไอโซเลทที่คัดเลือกมาสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราทดสอบทั้งสองชนิด (Table 2.1) ราจำนวน 13 ไอโซเลทเป็นปรสิตต่อ *Phomopsis* sp. ในระดับสูงโดยยับยั้งการเจริญของราทดสอบ *Phomopsis* sp. ได้สูงกว่า 60% ในขณะที่รา 27 ไอโซเลท ยับยั้งการเจริญของราทดสอบ *P. costina* ได้สูงกว่า 60%

ราเอนโดไฟท์ *Sterile mycelium* (CMUZE0013) และ *Gelasinosporium* sp. 1 (CMUZE0008) สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Phomopsis* sp. สูงสุด คือ 72.4% และ 70.3% ตามลำดับ ในขณะที่ราเอนโดไฟท์ *Fusarium* sp. (CMUZE0396) และ *Papulasporium* sp. (CMUZE0116) สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *P. costina* สูงสุด คือ 74.4% และ 72.9% ตามลำดับ (Table 2.1, Figure 2.4) โดยราเอนโดไฟท์และราชาโพรบมีผลในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราทดสอบ ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อทดสอบ พบการเปลี่ยนสีโคโลนีของราทดสอบใน dual culture และโคโลนีมีขนาดเล็กมาก หรือมีการเจริญที่ปลายเส้นใยของเชื้อทดสอบช้ามากเมื่อเทียบกับชุดควบคุม

Table 2.1 Percentage inhibition of radial growth of *Phomopsis* sp. and *Pyricularia costina* by endophytic and saprobic fungi after dual growth on PDA for 13 days.

Isolate number (CMU)	Taxa	Percentage inhibition	
		<i>Phomopsis</i> sp. ZP0011	<i>Pyricularia costina</i> ZP0006
Endophytes			
ZE0132	<i>Chaetomium globosum</i>	62.6	65.4
ZE0127	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	67.5	65.0
ZE0148	<i>Cylindrocarpon</i> sp.	65.1	18.0
ZE0149	<i>Cylindrocladium</i> sp.	27.7	66.7
ZE0150	<i>Cylindrocladium</i> sp.	54.4	69.9
ZE0151	<i>Eupenicillium crustaceum</i>	69.8	53.4
ZE0152	<i>Eupenicillium crustaceum</i>	51.4	24.0
ZE0155	<i>Eupenicillium crustaceum</i>	48.7	36.1
ZE0156	<i>Eupenicillium crustaceum</i>	67.0	15.0
ZE0161	<i>Eupenicillium crustaceum</i>	52.3	48.9
ZE0389	<i>Fusarium</i> sp.	53.8	70.7

Table 2.1 (Continued).

Isolate number (CMU)	Taxa	Percentage inhibition	
		<i>Phomopsis</i> sp. ZP0011	<i>Pyricularia costina</i> ZP0006
Endophytes			
ZE0393	<i>Fusarium</i> sp.	61.8	43.0
ZE0394	<i>Fusarium</i> sp.	50.7	70.6
ZE0396	<i>Fusarium</i> sp.	19.5	74.4
ZE0400	<i>Fusarium</i> sp.	45.3	19.0
ZE0401	<i>Fusarium</i> sp.	67.0	54.1
ZE0402	<i>Fusarium</i> sp.	24.6	16.0
ZE0403	<i>Fusarium</i> sp.	54.2	62.4
ZE0405	<i>Fusarium</i> sp.	57.4	48.9
ZE0407	<i>Fusarium</i> sp.	59.0	21.0
ZE0408	<i>Fusarium</i> sp.	51.9	17.0
ZE0117	<i>Fusicoccum</i> sp.	48.2	66.1
ZE0002	<i>Gaeumannomyces amomi</i>	63.6	60.0
ZE0100	<i>Gaeumannomyces amomi</i>	53.3	70.7
ZE0101	<i>Gaeumannomyces amomi</i>	44.2	59.0
ZE0008	<i>Geniculosporium</i> sp. 1	70.3	70.7
ZE0009	<i>Geniculosporium</i> sp. 2	13.8	66.0
ZE0065	<i>Glomerella</i> sp.	58.5	59.4
ZE0066	<i>Glomerella</i> sp.	65.6	50.0
ZE0011	<i>Humicola fuscoatra</i>	54.7	22.0
ZE0228	<i>Humicola fuscoatra</i>	41.5	59.0
ZE0102	<i>Leiosphaerella amomi</i>	51.4	60.2
ZE0116	<i>Papulaspora</i> sp.	23.6	72.9
ZE0162	<i>Penicillium</i> sp.	38.2	71.0
ZE0238	<i>Penicillium</i> sp.	56.4	64.0
ZE0133	<i>Phoma</i> sp.	40.5	62.0
ZE0134	<i>Phoma</i> sp.	43.1	70.0
ZE0141	<i>Phomopsis</i> sp.	46.9	69.9
ZE0232	<i>Phomopsis</i> sp.	27.7	38.0
ZE0012	Sterile mycelium	23.1	62.0
ZE0013	Sterile mycelium	72.4	72.0
ZE0120	Sterile mycelium	48.2	23.0
ZE0122	Sterile mycelium	65.1	56.4
ZE0123	Sterile mycelium	23.6	72.3
ZE0124	Sterile mycelium	56.6	33.0
ZE0126	Sterile mycelium	46.7	63.2

Table 2.1 (Continued).

Isolate number (CMU)	Taxa	Percentage inhibition	
		<i>Phomopsis</i> sp. ZP0011	<i>Pyricularia costina</i> ZP0006
Endophytes			
ZE0131	Sterile mycelium	57.5	67.7
ZE0145	Sterile mycelium	61.8	59.0
ZE0146	Sterile mycelium	23.1	51.0
ZE0252	Sterile mycelium	53.3	22.0
ZE0179	<i>Talaromyces flavus</i>	28.2	39.0
ZE0195	<i>Talaromyces flavus</i>	47.6	34.0
ZE0199	<i>Talaromyces flavus</i>	45.8	57.9
ZE0200	<i>Talaromyces flavus</i>	55.3	8.0
ZE0201	<i>Talaromyces flavus</i>	26.2	8.0
ZE0416	<i>Xylaria</i> sp.	16.4	12.0
ZE0418	<i>Xylaria</i> sp.	51.9	64.7
Saprobies			
ZS150	<i>Agaricus</i> sp.	25.5	25.6
ZS112-1	<i>Bahusandhika sundarum</i>	34.6	31.0
ZS149	Basidiomycete 1	39.5	19.0
ZS153	Basidiomycete 2	26.3	67.7
ZS160	Basidiomycete 4	17.1	23.0
ZS167	Basidiomycete 6	10.1	27.8
ZS043-1	<i>Berkleasmium suthheppuiense</i>	30.0	6.5 ^{ns}
ZS129-1	<i>Chloridium</i> sp.	25.1	10.1
ZS129-2	<i>Chloridium</i> sp.	16.0	14.3
ZS139	<i>Crepidotus</i> sp. 1	3.3 ^{ns}	25.6
ZS145	<i>Crepidotus</i> sp. 2	30.0	70.7
ZS148-1	<i>Cyathus</i> sp.	46.1	49.4
ZS147	Discomycete	10.1	39.1
ZS104-2	<i>Helicomyces</i> sp.	30.0	6.0 ^{ns}
ZS126-1	Hyphomycete 5	43.8	49.4
ZS130-1	Hyphomycete 6	34.9	26.2
ZS130-2	Hyphomycete 6	18.0	28.0
ZS154-1	<i>Hypocrea</i> sp.	19.4	44.0
ZS154-2	<i>Hypocrea</i> sp.	33.2	45.2
ZS144	<i>Marasmius</i> sp. 2	19.4	41.7
ZS143	<i>Marasmius</i> sp. 3	20.7	29.2
ZS162	<i>Marasmius</i> sp. 4	37.3	47.0
ZS121-1	<i>Memnoniella</i> sp.	22.6	28.0

Table 2.1 (Continued).

Isolate number (CMU)	Taxa	Percentage inhibition	
		<i>Phomopsis</i> sp. ZP0011	<i>Pyricularia costina</i> ZP0006
Saprobies			
ZS121-2	<i>Memnoniella</i> sp.	30.9	19.0
ZS133-1	<i>Memnoniella subsimplex</i>	38.2	25.0
ZS133-2	<i>Memnoniella subsimplex</i>	41.2	30.4
ZS048	<i>Myrothecium cinctum</i>	27.4	23.3
ZS050-1	<i>Pyricularia longispora</i>	49.8	42.3
ZS117-2	<i>Pyricularia longispora</i>	29.1	41.1
ZS026-1	<i>Solosympodiella</i> sp.	14.3	17.9
ZS026-2	<i>Solosympodiella</i> sp.	55.0	12.5
ZS136-1	<i>Synematosus</i> sp.	27.4	15.5
ZS004-1	<i>Torula</i> sp. 2	30.0	21.1
ZS023-1	<i>Verticillium</i> sp. 1	1.5 ^{ns}	35.1
ZS023-3	<i>Verticillium</i> sp. 1	36.9	31.0
ZS074	<i>Xenosporium intermedium</i>	15.1	11.3
Control		0.0	0.0

^{ns} no significant difference between the percentage inhibition of treatment and control

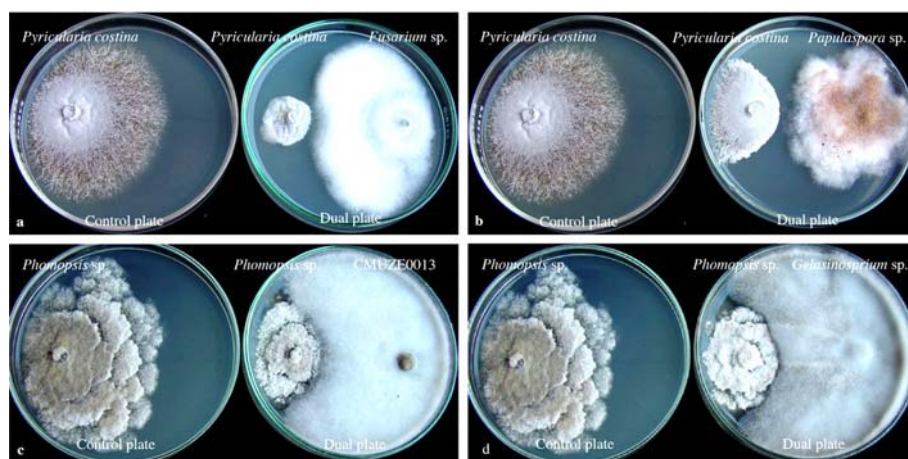


Figure 2.4 *Fusarium* sp. (CMUZE0396) (a) and *Papulaspora* sp. (CMUZE0116) (b) showing inhibition in growth of *Pyricularia costina* on PDA. Sterile mycelium (CMUZE0013) (c) and *Geniculosporium* sp. 1 (CMUZE0008) (d) showing inhibition growth of *Phomopsis* sp. on PDA.

2. ความสามารถในการผลิตสารต้านเชื้อจุลินทรีย์ของราเอนโดไฟท์และราชาโพรบที่แยกได้จากพืชวงศ์จิง

2.1 การคัดกรองการสร้างสารออกฤทธิ์ชีวภาพ

ราเอนโดไฟท์และราชาโพรบที่เลี้ยงในอาหารหมัก F1 หรือ F2 เมื่อนำมาทดสอบความสามารถในการสร้างสารออกฤทธิ์ชีวภาพพบว่าทุกไอโซเลทสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบได้อย่างน้อยหนึ่งชนิด และยังพบว่าอาหารหมัก F1 ให้ผลในการยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบได้ดีกว่าอาหารหมัก F2 สังเกตได้จากมีจำนวนเชื้อราที่เลี้ยงในอาหาร F1 มากกว่า F2 ที่สามารถสร้างสารออกฤทธิ์ชีวภาพมายับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบ โดยทำให้เกิดวงใสขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางใหญ่กว่า 10 มม. (Table 2.2) *Chaetomium globosum* (CMUZE0132) ยับยั้งการเจริญของเชื้อราทดสอบ *Penicillium avellaneum* ได้ดีที่สุด ในขณะที่ *Papulaspora* sp. (CMUZE0118) ยับยั้งการเจริญของเชื้อยีสต์ทดสอบ *Candida albicans* ได้ดีที่สุด สำหรับ *Talaromyces flavus* (CMUZE0200), unidentified fungus (CMUZE0126), *Colletotrichum gloeosporioides* (CMUZE0552) และ *Phyllosticta capitalensis* (CMUZE0172) ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียทดสอบ 4 ชนิดได้แก่ *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* และ *Staphylococcus aureus* ได้ดีที่สุดในลำดับ (Table 2.3)

Chaetomium globosum strain CMUZE0132 เป็นราในกลุ่ม ascomycetes ซึ่ง ascomata มีจำนวนมากทั้งด้านบนและด้านล่าง สร้างสปอร์ใสขนาด $11-12.5 \times 8.5-10$ ไมโครเมตร เมื่อเจริญเต็มที่สปอร์กลายเป็นสีน้ำตาลอาจมีรูปร่างกลม หรือ lemon-shaped (Figure 2.5) ตรงตามที่ Chivers (1915) ได้ให้คำอธิบายไว้ ราไอโซเลทนี้ได้จากการแยกราเอนโดไฟท์จากพืชวงศ์จิง เป็นราที่สร้างสารออกฤทธิ์ชีวภาพยับยั้งการเจริญของเชื้อราทดสอบ *P. avellaneum* ได้ดีที่สุด (วงใสขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 34.3 มม.) และถูกเลือกเพื่อศึกษาในขั้นต่อไป

Table 2.2 Qualitative antimicrobial activity of zingiberaceous fungi cultured in fermentation media F1 and F2.

Potential antimicrobial activity ^a	Number of isolates (and percentage) of zingiberaceous fungi inhibiting growth of test organisms											
	F1						F2					
	<i>B. sub</i>	<i>E. col</i>	<i>S. aur</i>	<i>P. aer</i>	<i>C. alb</i>	<i>P. ave</i>	<i>B. sub</i>	<i>E. col</i>	<i>S. aur</i>	<i>P. aer</i>	<i>C. alb</i>	<i>P. ave</i>
+++	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (0.8%)	1 (0.8%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
++	3 (2.3%)	2 (1.5%)	1 (0.8%)	1 (0.8%)	6 (4.6%)	10 (7.7%)	3 (2.3%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	5 (3.8%)	2 (1.5%)
+	9 (7.0%)	7 (5.4%)	2 (1.5%)	32 (24.6%)	8 (6.1%)	16 (12.3%)	15 (11.5%)	4 (3.1%)	1 (0.8%)	10 (7.7%)	13 (10%)	9 (7%)
±	28 (21.5%)	114 (87.7%)	24 (18.5%)	2 (1.5%)	1 (0.8%)	13 (10%)	23 (17.7%)	102 (78.4%)	2 (1.5%)	5 (3.8%)	0 (0%)	2 (1.5%)
-	90 (69.2%)	7 (5.4%)	103 (70.2%)	95 (73.1%)	114 (87.7%)	90 (69.2%)	89 (68.5%)	24 (18.5%)	127 (97.7%)	115 (88.5%)	112 (86.2%)	117 (90%)

^a +++: inhibition zone diameter (X) > 20 mm++: 20 mm $\geq$ X > 10 mm+: 10 mm $\geq$ X > 7 mm±: 7 mm $\geq$ X > 5 mm

-: X = 5 mm

B. sub = *Bacillus subtilis*, *E. col* = *Escherichia coli*, *S. aur* = *Staphylococcus aureus*, *P. aer* = *Pseudomonas aeruginosa*, *C. alb* = *Candida albicans*, *P. ave* = *Penicillium**avellaneum*

Table 2.3 The inhibition zone (> 7 mm diameter) against test organisms of zingiberaceous fungi cultured in fermentation media F1 and F2.

Isolate number (CMU) ^a	Taxa	Inhibition zone (mm) ^b										
		F1					F2					
		<i>B. sub</i>	<i>E. col</i>	<i>S. aur</i>	<i>P. aer</i>	<i>C. alb</i>	<i>P. ave</i>	<i>B. sub</i>	<i>E. col</i>	<i>S. aur</i>	<i>P. aer</i>	<i>P. ave</i>
ZE0114	<i>Alternaria alternata</i>				8.0		14.7				8.0	
ZE0180	<i>Aspergillus</i> sp.											8.0
ZS149	Basidiomycete 1		9.3									
ZS153	Basidiomycete 2	12.3	8.0	7.3		12.3	11.5					
ZS160	Basidiomycete 4	7.3							8.0			
ZS118-1	<i>Cercospora amomi</i>				7.3							
ZE0132	<i>Chaetomium globosum</i>					9.0	34.3					
ZE0028	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>				8.0		19.7				8.0	10.0
ZE0127	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>		16.0					9.0				
ZE0551	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>				8.0	15.7	17.7		7.2		9.0	8.0
ZE0552	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>				11.0		19.7				9.0	
ZS145	<i>Crepidotus</i> sp. 2	9.0			8.0	9.0	9.0	13.0			13.7	
ZS148-1	<i>Cyathus</i> sp.											9.0
ZS148-2	<i>Cyathus</i> sp.	11.0	9.0		8.0		8.0	8.0				
ZE0148	<i>Cylindrocarpon</i> sp.							7.7				
ZE0149	<i>Cylindrocladium</i> sp.						17.7					
ZS170	<i>Cylindrocladium</i> sp.				8.0		8.0					
ZS040	<i>Dactylaria</i> sp. 1				8.0							
ZS147	Discomycete											8.0

Table 2.3 (Continued).

Isolate number (CMU) ^a	Taxa	Inhibition zone (mm) ^b													
		F1						F2							
		<i>B. sub</i>	<i>E. col</i>	<i>S. aur</i>	<i>P. aer</i>	<i>C. alb</i>	<i>P. ave</i>	<i>B. sub</i>	<i>E. col</i>	<i>S. aur</i>	<i>P. aer</i>	<i>C. alb</i>	<i>P. ave</i>		
ZE0151	<i>Eupenicillium crustaceum</i>				8.0		8.5								
ZE0152	<i>Eupenicillium crustaceum</i>	7.7				15.7	7.7								
ZE0155	<i>Eupenicillium crustaceum</i>						8.5								
ZE0156	<i>Eupenicillium crustaceum</i>							8.3							
ZE0161	<i>Eupenicillium crustaceum</i>						9.0								
ZE0384	<i>Fusarium</i> sp.				10.0		8.0				8.0	7.5			
ZE0393	<i>Fusarium</i> sp.					9.0	8.0					10.7	9.0		
ZE0396	<i>Fusarium</i> sp.					9.0									
ZE0401	<i>Fusarium</i> sp.				10.0							7.2			
ZE0403	<i>Fusarium</i> sp.				9.0							8.0			
ZE0405	<i>Fusarium</i> sp.				9.0							8.0			
ZE0117	<i>Fusicoccum</i> sp.				8.3		8.0				8.0				
ZE0002	<i>Gaeumannomyces amomi</i>				7.7										
ZE0101	<i>Gaeumannomyces amomi</i>	7.2													
ZE0091	<i>Glomerella</i> sp.				8.0		8.0				9.0				
ZE0550	<i>Glomerella</i> sp.				9.0		15.0		7.2			8.0			
ZS106-2	<i>Helicosporium</i> sp.		7.2												
ZE0228	<i>Humicola fuscoatra</i>	8.2													
ZS130-1	Hyphomycete 6				9.0						9.0	7.5	8.0		

Table 2.3 (Continued).

Isolate number (CMU) ^a	Taxa	Inhibition zone (mm) ^b													
		F1						F2							
		<i>B. sub</i>	<i>E. col</i>	<i>S. aur</i>	<i>P. aer</i>	<i>C. alb</i>	<i>P. ave</i>	<i>B. sub</i>	<i>E. col</i>	<i>S. aur</i>	<i>P. aer</i>	<i>C. alb</i>	<i>P. ave</i>		
ZS130-2	Hyphomycete 6				9.0							8.0			
ZE0102	<i>Letiosphaerella amomi</i>				8.0		8.3								
ZS121-2	<i>Memnoniella</i> sp.				8.0										
ZS172	<i>Memnoniella subsimplex</i>														7.3H
ZS048	<i>Myrothecium cinctum</i>							9.0							
ZE0116	<i>Papulaspora</i> sp.						13.7H							8.7	
ZE0118	<i>Papulaspora</i> sp.	7.5	7.2		8.2	28.0	14.3							20.0	
ZE0238	<i>Penicillium</i> sp.							8.5							
ZS169	<i>Pestalotiopsis</i> sp.				9.0										
ZE0133	<i>Phoma</i> sp.							8.3							
ZE0134	<i>Phoma</i> sp.					8.7		10.0							
ZE0071	<i>Phomopsis</i> sp.						8.0				8.0				
ZE0137	<i>Phomopsis</i> sp.		8.3		8.0						10.7				
ZE0141	<i>Phomopsis</i> sp.				8.0										
ZE0172	<i>Phyllosticta capitalensis</i>			14.7		12.7	12.7							10.0	12.7
ZS050-1	<i>Pyricularia longispora</i>		7.7		8.0										
ZE0012	Sterile mycelium	9.3				7.7								8.2	
ZE0120	Sterile mycelium							7.7						19.3	
ZE0122	Sterile mycelium												10.0		

Table 2.3 (Continued).

Isolate number (CMU) ^a	Taxa	Inhibition zone (mm) ^b											
		F1						F2					
		<i>B. sub</i>	<i>E. col</i>	<i>S. aur</i>	<i>P. aer</i>	<i>C. alb</i>	<i>P. ave</i>	<i>B. sub</i>	<i>E. col</i>	<i>S. aur</i>	<i>P. aer</i>	<i>C. alb</i>	<i>P. ave</i>
ZE0123	Sterile mycelium				8.0	15.0H	9.0	9.3		8.0		16.0H	11.0
ZE0124	Sterile mycelium							7.7					
ZE0126	Sterile mycelium		17.0					8.0					
ZE0131	Sterile mycelium				9.0								
ZE0145	Sterile mycelium	8.7			8.7	7.8H		8.7	7.3				
ZE0192	<i>Talaromyces flavus</i>				8.0		8.0						9.0
ZE0199	<i>Talaromyces flavus</i>											9.0	
ZE0200	<i>Talaromyces flavus</i>	13.0		8.0		7.7H		7.7					
ZE0201	<i>Talaromyces flavus</i>	8.8						8.3					
ZE0207	<i>Talaromyces flavus</i>				8.0								
ZS039-2	<i>Trichoderma</i> sp.					19.7							
ZS074	<i>Xenosporium intermedium</i>				9.7								
ZE0416	<i>Xylaria</i> sp.						7.2	7.2					
ZE0418	<i>Xylaria</i> sp.												8.0

^aZE = endophytes, ZS = saprobes

^bMeans of inhibition clear zones surrounding each application point, three replicates, H=inhibition zone hazy

B. sub = *Bacillus subtilis*, *E. col* = *Escherichia coli*, *S. aur* = *Staphylococcus aureus*, *P. aer* = *Pseudomonas aeruginosa*, *C. alb* = *Candida albicans*, *P. ave* = *Penicillium avellaneum*

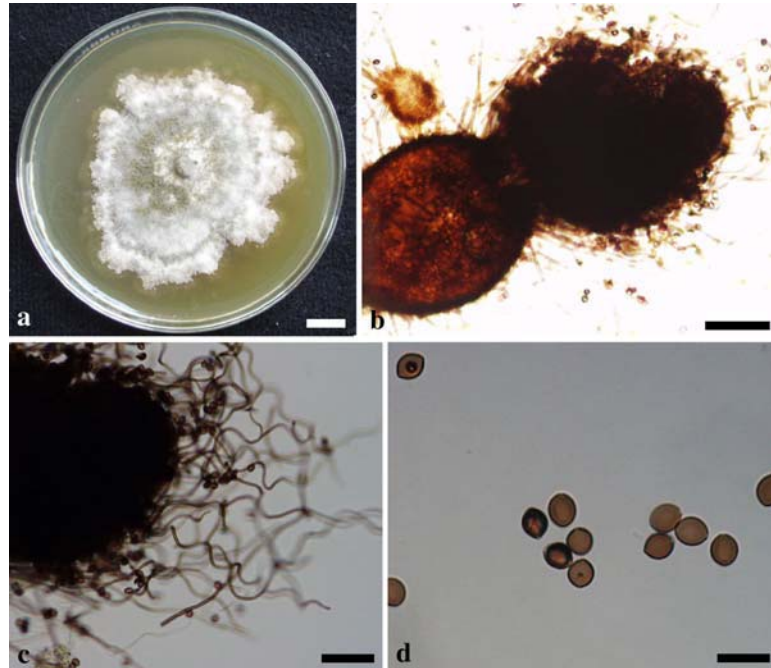


Figure 2.5 *Chaetomium globosum* strain CMUZE0132: a, colony on PDA, b, ascomata with dense lateral and terminal hairs, c, spiral terminal hairs, d, lemon-shaped ascospores. Bars: a. = 1 cm, b. = 100 μm , c. = 100 μm , d. = 20 μm .

2.2 การศึกษาสถานะที่เหมาะสมต่อการสร้างสารออกฤทธิ์ชีวภาพ

ชนิดของแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน

จากการทดสอบแหล่งคาร์บอน และไนโตรเจน ที่มีผลต่อการผลิตสารออกฤทธิ์ชีวภาพ ด้านราทดสอบ *P. avellaneum* ของราเอนโดไฟท์ *Chaetomium globosum* (CMUZE0132) พบว่าอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ ซึ่งผสมกับแหล่งไนโตรเจนชนิด soybean meal ทำให้เชื้อผลิตสาร และเกิดวงใสมากกว่าใช้แหล่งไนโตรเจนชนิดอื่น (Figure 2.6) เมื่อใช้แหล่งคาร์บอนชนิด pullulan ร่วมกับแหล่งไนโตรเจนชนิด soybean meal พบว่าทำให้เชื้อผลิตสาร และเกิดวงใสมากที่สุด (Figure 2.7) อย่างไรก็ตามพบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของวงใส เมื่อใช้แหล่งคาร์บอนเป็น glucose, lactose, mannitol, xylitol หรือ pullulan ผสมกับการใช้แหล่งไนโตรเจนชนิด soybean meal (Figure 2.6) เนื่องจาก glucose และ soybean meal มีราคาถูก และหาซื้อได้สะดวก จึงเหมาะกับการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตสารออกฤทธิ์ชีวภาพในปริมาณที่มากขึ้น สำหรับการทดลองต่อไป จึงเลือกใช้ glucose และ soybean meal เป็นแหล่งคาร์บอน และแหล่งไนโตรเจน

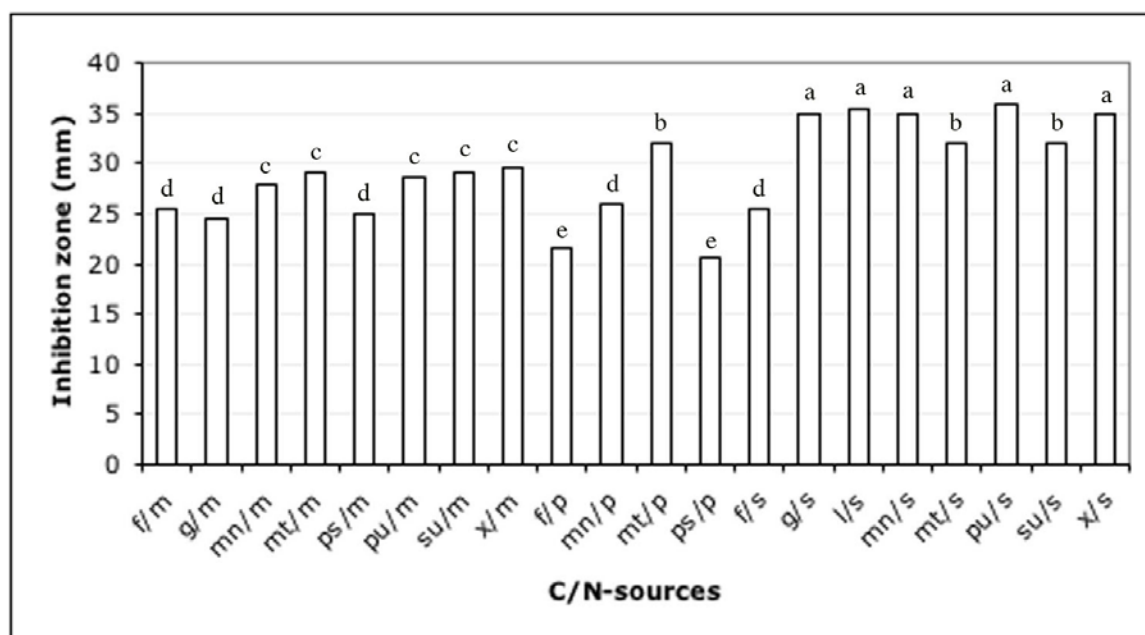


Figure 2.6 Effect of C/N-sources on antimicrobial production by *Chaetomium globosum* (CMUZE0132) against *Penicillium avellaneum*. C-sources: f. fructose, g. glucose, l. lactose, mn. mannitol, mt. maltose, ps. D-psicose, pu. pullulan, su. sucrose, x. xylitol. N-sources: m. malt extract, p. peptone, s. soybean meal. ^{a-d} values above the bars with no common superscripts are significantly different ($P < 0.05$).



Figure 2.7 The inhibition zones of antimicrobial agent produced by *Chaetomium globosum* (CMUZE0132) cultured in F1 medium containing different C/N-sources (A. pullulan/polypeptone, B. pullulan/yeast extract, C. pullulan/malt extract, D. pullulan/soybean meal, E. control) against *Penicillium avellaneum*.

ระดับ pH อุณหภูมิ และระยะเวลาในการหมักที่เหมาะสม

จากการทดลองหาสภาวะที่เหมาะสม ต่อการสร้างสารต้านเชื้อรา ของราเอนโดไฟท์ *Chaetomium globosum* (CMUZE0132) พบว่าการบ่มเชื้อราในอาหารที่มี pH 6.0 บ่มที่อุณหภูมิ 30 °ซ. (Figure 2.8) และระยะเวลานาน 5 วัน (Figure 2.9) ทำให้เชื้อผลิตสารและเกิดวงใสมากที่สุด อย่างไรก็ตาม พบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของวงใสในการบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 25 °ซ. และ 30 °ซ. ถึงแม้ว่าการบ่มที่อุณหภูมิ 30 °ซ. เกิดวงใสขนาดกว้างกว่า ที่อุณหภูมิ 25 °ซ. และเมื่อบ่มเขื่อนานกว่า 5 วัน ทำให้เชื้อผลิตสารและเกิดวงใสลดลง

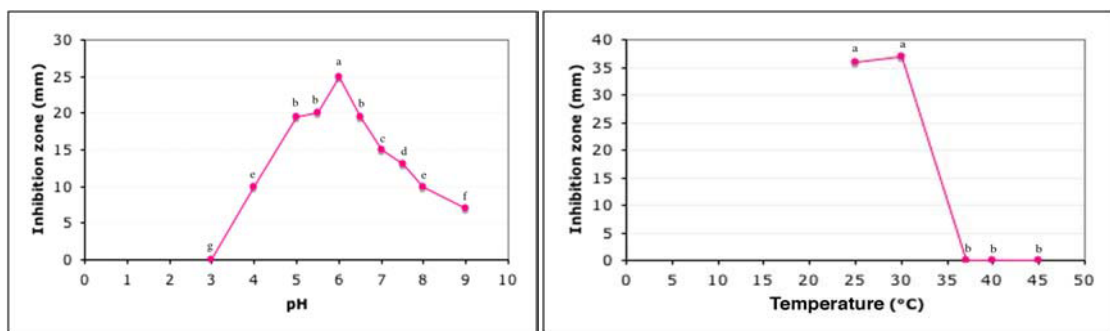


Figure 2.8 Antimicrobial production by *Chaetomium globosum* (CMUZE0132) at different pH levels (left) and temperatures (right), against *Penicillium avellaneum*. ^{a-g} values above the plots with no common superscripts are significantly different ($P < 0.05$).

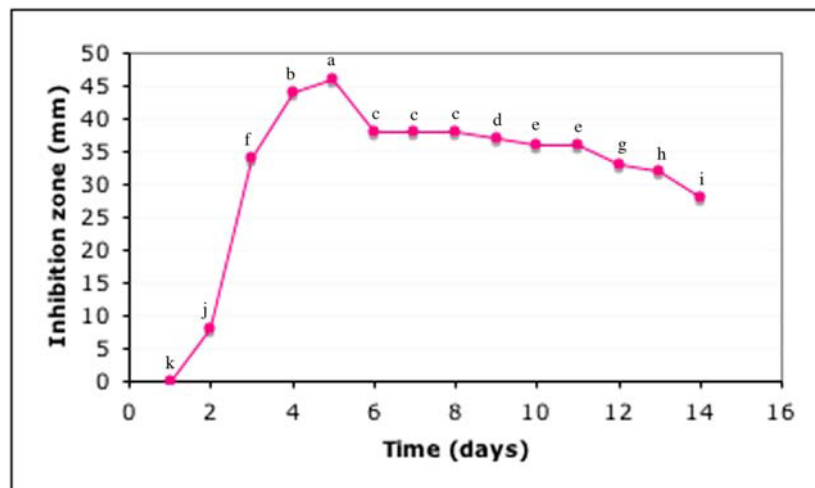


Figure 2.9 Antimicrobial production by *Chaetomium globosum* (CMUZE0132) over time, against *Penicillium avellaneum*. ^{a-k} values above the plots with no common superscripts are significantly different ($P < 0.05$).

2.3 คุณสมบัติสารออกฤทธิ์ชีวภาพที่สร้างโดย *Chaetomium globosum* (CMUZE0132)

จากการทดลองแยกเก็บสารได้ 46 fractions จาก HP20 resin column และ 61 fractions จาก silica gel column เมื่อนำไปทดสอบกับเชื้อทดสอบชนิดต่างๆ พบว่า fractions 22–25 ที่ชะจาก HP20 resin column ด้วย 50% methanol และ fractions 30–36 ที่ชะด้วย 100% methanol ให้ผลในการยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบโดยสร้างวงใส เช่นเดียวกับ fractions 15–18 และ 61 ที่ชะจาก silica gel column (Table 2.4) มีเพียง fractions 22–25 (HP20 resin) และ fraction 61 (silica gel) ยับยั้งการเจริญของเชื้อยีสต์ทดสอบ *Candida albicans* ในขณะที่ fraction 32 (HP20 resin) สร้างวงใสขนาดใหญ่ที่สุดในการยับยั้ง *Penicillium avellaneum*, *Pyricularia oryzae* และ *Phytophthora* sp. นอกจากนี้มีเพียง fraction 61 (silica gel) ที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบทั้งสี่ชนิด สำหรับค่า R_f ของสารออกฤทธิ์ชีวภาพ fractions ต่างๆ ทั้งจากการทดสอบกับเชื้อทดสอบ และจากการตรวจดูได้แสง UV แสดงใน Table 2.5 จากนั้นนำ fractions 23 และ 32 ที่ชะจาก HP20 resin column และ fractions 17 และ 61 ที่ชะจาก silica gel column ไปวิเคราะห์หัดด้วย mass spectrophotometry พบว่าองค์ประกอบทางเคมีของ fraction 32 (HP20 resin) และ fraction 17 (silica gel) คือ $C_{20}H_{29}O_6$ และ $C_{25}H_{44}O_{15}N_{17}$ ตามลำดับ

Table 2.4 Inhibition zones of active fractions eluted from HP20 resin and silica gel columns.

Active fraction number and eluent	Inhibition zone diameter (mm)			
	<i>Candida albicans</i>	<i>Penicillium avellaneum</i>	<i>Pyricularia oryzae</i>	<i>Phytophthora</i> sp.
HP20 resin column (eluent)				
22 (50% MeOH)	13			
23 (50% MeOH)	21			20
24 (50% MeOH)	19			15
25 (50% MeOH)	13			
30 (MeOH)		25	18	
31 (MeOH)		53	38	30
32 (MeOH)		54	42	30
33 (MeOH)		53	42	26
34 (MeOH)		40	32	24
35 (MeOH)		28	18	16
36 (MeOH)		20	15	
Silica gel column (eluent)				
15 (CHCl ₃)		13	9	
16 (CHCl ₃)		26	18	
17 (CHCl ₃)		27	11	
18 (CHCl ₃)		13		
61 (9:1 CHCl ₃ :MeOH)	11	8	20	13

Table 2.5 R_f values on TLC chromatograms of the active compounds eluted from HP20 resin and silica gel columns.

Active fractions	Solvent in TLC analysis	Test organisms	R_f
HP20 resin column			
23	95:5 CHCl_3 :MeOH	<i>Candida albicans</i>	0.22
32	95:5 CHCl_3 :MeOH	<i>Penicillium avellaneum</i>	0.38
Silica gel column			
17	95:5 CHCl_3 :MeOH	<i>Penicillium avellaneum</i>	0.43
61	95:5 CHCl_3 :MeOH	<i>Penicillium avellaneum</i>	0.65

สรุปและวิจารณ์

1. ความสามารถในการเป็นเชื้อปราบศัตรูของราเอนโดไฟท์และราชาโพรบต่อเชื้อราสาเหตุโรคพืช

ราเอนโดไฟท์มีความสามารถในการควบคุมและยับยั้งการเจริญของเชื้อราโรคพืชได้ โดยจะแข่งเจริญกับเชื้อราโรคพืช อาจสร้างสารยับยั้งการเจริญของเชื้อราโรคพืช หรือกระตุ้นให้พืชอาศัยสร้างกลไกป้องกันตัวเอง (Clay, 1992; Wilson, 1993; Brown *et al.*, 2003; Singh *et al.*, 2003) จากกลไกดังกล่าวราเอนโดไฟท์อาจจะสามารถนำมาใช้ควบคุมโรคพืชโดยชีววิธีได้ โดยเฉพาะโรคพืชที่มีการเข้าทำลายแบบแฝง (Petrini, 1993; Photita, 2003; Rubini *et al.*, 2005) มีการทดลองจำนวนมากที่พบว่าราเอนโดไฟท์สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคพืชได้ เช่น การทดสอบพบความสามารถของราเอนโดไฟท์หลายชนิด ในการเป็นปรปักษ์กับเชื้อราโรคพืช โดยทดสอบในต้นพืช (*in vitro*) (Brown *et al.*, 2003) ราเอนโดไฟท์ *Phialocephala fortinii* ที่แยกได้จากรากของมะเขือและกะหล่ำปลี สามารถยับยั้งอาการเหลือง (Verticillium yellows) ที่เกิดจากเชื้อรา *Verticillium dahliae* and *V. longisporum* ในต้นกะหล่ำปลีได้ (Narisawa *et al.*, 2003). ราเอนโดไฟท์ *Gliocladium catenulatum* ที่แยกได้จากกิ่งของต้นโกโก้ (*Theobroma cacao*) สามารถลดความรุนแรงของโรคพุ่มไม้กวาด (witches' broom disease) ในต้นกล้าโกโก้ได้เป็นอย่างดี (Rubini *et al.*, 2005) ซึ่งผลจากการศึกษาเหล่านี้แสดงให้เห็นถึงความเป็นไปได้ที่จะนำราเอนโดไฟท์ มาใช้ในการควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี นอกจากประโยชน์ทางการเกษตรแล้ว ยังพบว่าเชื้อราหลายชนิด เช่น *Acremonium*, *Aspergillus*, *Fusarium* และ *Penicillium* ผลิตสาร secondary metabolites ได้มากกว่า 4000 ชนิด ซึ่งสามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้ทั้งทางการแพทย์และการเกษตร โดยช่วยรักษาปัญหาด้านสุขภาพของมนุษย์และสัตว์ได้ (Bills and Polishook, 1992; Dreyfuss and Chapela, 1999; Strobel and Daisy, 2003; Strobel *et al.*, 2004)

จากการคัดเลือกราเอนโดไฟท์ และราชาโพรบ มาทดสอบคุณสมบัติการเป็นเชื้อราปรปักษ์ โดยวิธี dual culture กับเชื้อราทดสอบ ในการศึกษาครั้งนี้ พบว่าเชื้อราเอนโดไฟท์ Sterile mycelium (CMUZE0013) สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Phomopsis* sp. สูงสุด สำหรับ *Fusarium* sp. (CMUZE0396) สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *P. costina* สูงสุด โดยสามารถยับยั้งการเจริญของ ราสาเหตุโรคได้สูงกว่า 60% และราชนิดอื่นๆ ที่นำมาทดสอบก็สามารถยับยั้งการเจริญของ เชื้อทดสอบทั้งสองชนิด และทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาของเชื้อทดสอบเช่นกัน ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาที่ผ่านมาว่าราเอนโดไฟท์ และราชาโพรบ สามารถต้านการเจริญของราสาเหตุ โรคพืชได้ (Jackson *et al.*, 1997; Benhamou and Brodeur, 2000; Park *et al.*, 2002; Tian *et al.*, 2004; Rubini *et al.*, 2005) อย่างไรก็ตาม หากจะนำราเหล่านี้ไปใช้ควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคใบไหม้ (*P. costina*) และ ใบจุด (*Phomopsis* sp.) ในพืชวงศ์ขิง ควรมีการวางแผนทดลองในต้นพืชด้วย ทั้งนี้ ผลที่ได้ในแปลงปลูกอาจให้ผลต่างจากผลที่ได้ในระดับห้องปฏิบัติการ เนื่องจากมีหลายปัจจัยเกี่ยวข้อง เช่น สภาพแวดล้อม และ ความสมดุลย์ของ pathogens และ biocontrol agents ในแปลงปลูกอาจมีจุลินทรีย์หลายชนิด ซึ่งอาจมีผลในทางสนับสนุน หรือต่อต้าน ราเอนโดไฟท์ หรือราสาเหตุโรคได้ (Schulz *et al.*, 1999; Rodrigues *et al.*, 2000)

2. ความสามารถในการผลิตสารต้านเชื้อจุลินทรีย์ของราเอนโดไฟท์และราชาโพรบที่แยกได้จากพืชวงศ์ขิง

จากการทดลองครั้งนี้จะเห็นว่าราเอนโดไฟท์ และราชาโพรบที่แยกได้จากพืชวงศ์ขิง ทุกไอโซเลทที่คัดเลือก มีความสามารถในการสร้างสารออกฤทธิ์ชีวภาพ โดยสารสกัดที่ได้จากการเลี้ยงราดังกล่าวในอาหารหมักทั้ง 2 ชนิดคือ F1 และ F2 มีผลยับยั้งการเจริญของ test organisms ซึ่งได้แก่ เชื้อรา *Penicillium avellaneum*, ยีสต์ *Candida albicans* และแบคทีเรีย *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* และ *Staphylococcus aureus* สำหรับการศึกษาสมบัติของสารออกฤทธิ์ชีวภาพที่ผลิตจากรา *Chaetomium globosum* CMUZE0132 พบว่าสร้างสารออกฤทธิ์ชีวภาพที่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของราทดสอบได้หลายชนิด คือ *C. albicans*, *P. avellaneum*, *Phytophthora* sp. และ *Pyricularia oryzae* เช่นเดียวกับ Strobel *et al.* (1999) ที่พบว่าสาร cryptocandin ที่ผลิตโดย *Cryptosporiopsis quercina* ซึ่งเป็นราเอนโดไฟท์จาก *Tripterigenum wilfordii* สามารถต้านการเจริญได้ทั้งราที่เป็นสาเหตุโรคในมนุษย์ *C. albicans* และ *Trichophyton* spp. และราสาเหตุโรคพืช *Sclerotinia sclerotiorum* และ *Botrytis cinerea* นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า *Cryptosporiopsis quercina* สามารถสร้างสาร cryptocin ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของราสาเหตุโรคใบไหม้ของข้าว *Pyricularia oryzae* และราสาเหตุโรคพืชอื่นๆ (Li *et al.*, 2000) โดยปกติสาร cryptocin จะไม่มีผลต่อเชื้อรา

ที่เป็นสาเหตุโรคในมนุษย์ และยังใช้ในปริมาณน้อยเพียง 0.39 ไมโครกรัม/มล. สามารถยับยั้งเชื้อรา *P. oryzae* ได้ จึงเป็นสารที่อาจจะนำมาใช้ในการควบคุมเชื้อราดังกล่าวได้ และใช้เป็นต้นแบบในการพัฒนาสารออกฤทธิ์ชีวภาพอื่นๆ (Strobel *et al.*, 2004)

รา *Chaetomium* หลายสปีชีส์สามารถสร้าง metabolites (Guarro *et al.*, 1995; Pujol *et al.*, 1996; Soyong *et al.*, 2001; Reissinger *et al.*, 2003; Aggarwal *et al.*, 2004; Kobayashi *et al.*, 2005) ส่วนใหญ่รากลุ่มนี้จะเป็นผู้ย่อยสลาย cellulose ที่ดี สำหรับ *C. globosum* มีรายงานว่าเป็นราปรักขัที่ตีในการควบคุมราสาเหตุโรคพืชที่อยู่ในดินหรือที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์ (Vannacci and Harman, 1987; Walther and Gindrat, 1988; Soyong *et al.*, 2001) นอกจากนี้ *C. globosum* ที่แยกได้จาก coprophilous, dolichos seed และ ใบข้าวสาลี พบว่าสร้างสารต้านเชื้อรา *Cochliobolus sativus* ซึ่งเป็นสาเหตุโรค spot blotch ของข้าวสาลี ทั้งในห้องปฏิบัติการ และในพืช (Aggarwal *et al.*, 2004) ในการศึกษาความสามารถในการเป็นปรักขัของราที่แยกได้จากพืชวงศ์จิงครั้งนี้ *C. globosum* (CMUZE0132) ที่แยกได้จากลำต้นเหนือดินของข่าป่า (*Alpinia malaccensis*) สามารถยับยั้งราสาเหตุโรคใบไหม้ (*Pyricularia costina*) ได้สูงเช่นเดียวกัน

Chaetomium globosum (CMUZE0132) สร้างสารออกฤทธิ์ชีวภาพหลายชนิด อันสังเกตได้จากสารที่ได้มีค่า R_f แตกต่างกัน เมื่อศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของสารออกฤทธิ์ชีวภาพที่สร้างโดย *C. globosum* (CMUZE0132) คือ $C_{20}H_{29}O_6$ และ $C_{25}H_{44}O_{15}N_{17}$ เมื่อวิเคราะห์ด้วย mass spectrophotometry เชื้อนี้สร้างสารเคมีชนิดอื่นด้วยเช่นในรายงานของ Kobayashi *et al.* (2005) พบว่ารา *Chaetomium* sp. ที่แยกได้จากดินสร้าง triterpene glucoside (FR207944) ซึ่งสามารถต้านการเจริญของรา *Aspergillus fumigatus* และ *C. albicans* เป็นต้น

ในการศึกษาครั้งนี้ราที่แยกได้จากพืชวงศ์จิง โดยเฉพาะราเอนโดไฟท์ มีหลายไอโซเลทที่แสดงประสิทธิภาพในการสร้างสารออกฤทธิ์ชีวภาพด้านการเจริญของจุลินทรีย์ต่างๆ เช่น *Papulaspora* sp., *Phyllosticta capitalensis* และราสปีชีส์ใหม่ๆ ที่แยกได้จากพืชวงศ์จิง เช่น *Gaeumannomyces amomi*, *Leiosphaerella amomi* และ *Pyricularia longispora* ราเหล่านี้ควรมีการศึกษาต่อไป เพราะอาจสร้างสารออกฤทธิ์ชีวภาพชนิดใหม่ๆ ที่อาจเป็นประโยชน์ ในทางการแพทย์และการเกษตร นอกจากนี้ในการคัดกรองการสร้างสารออกฤทธิ์ชีวภาพควรคำนึงถึงปัจจัยหลายอย่างที่มีอิทธิพลต่อการสร้างสารออกฤทธิ์ชีวภาพของเชื้อรา เช่น อาหารที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อรา pH ของอาหาร อุณหภูมิ ที่บ่มเชื้อ ตลอดจนระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อด้วย

บรรณานุกรม

- Aggarwal R., Tewari, A.K., Srivastava, K.D. and Singh, D.V. (2004). Role of antibiosis in the biological control of spot blotch (*Cochliobolus sativus*) of wheat by *Chaetomium globosum*. *Mycopathologia* 157: 369–377.
- Benhamou, N. and Brodeur, J. (2000). Evidence for antibiosis and induced host defense reactions in the interaction between *Verticillium lecanii* and *Penicillium digitatum*, the causal agent of green mold. *Phytopathology* 68: 4044–4060.
- Bills, G.F. and Polishook, J.D. (1992). Recovery of endophytic fungi from *Chamaecyparis thyroides*. *Sydowia* 44: 1–12.
- Breen, J.P. (1993). Enhanced resistance to three species of aphids (Homoptera: Aphididae) in *Acremonium* endophyte-infected turf grasses. *Journal of Economic Entomology* 86: 1279–1286.
- Breen, J.P. (1994). *Acremonium* endophyte interactions with enhanced plant resistance to insects. *Annual Reviews of Entomology* 39: 401–423.
- Brown, K.B., Johnson, G.I. and Guest, D.I. (2003). Interactions between the endophytic fungi of durian (*Durio zibethinus*) and *Phytophthora palmivora*. *Proceedings of the 8th International Congress of Plant Pathology*, p. 41. Christchurch, New Zealand.
- Brunner, F. and Petrini, O. (1992). Taxonomic studies of *Xylaria* species and xylariaceous endophytes by isozyme electrophoresis. *Mycological Research* 96: 723–733.
- Chivers, A.H. (1915). A monograph of the genera *Chaetomium* and *Ascotricha*. *Memoirs of the Torrey Botanical Club* 14: 1–240.
- Choi, Y.W., Hyde, K.D. and Ho, W.H. (1999). Single spore isolation of fungi. *Fungal Diversity* 3: 29–38.
- Clay, K. (1992) Fungal endophytes of plants: biological and chemical diversity. *Natural Toxins* 1: 147–149.
- Dingle, J. and McGee, P.A. (2003). Some endophytic fungi reduce the density of pustules of *Puccinia recondita* f. sp. *tritici* in wheat. *Mycological Research* 107: 301–316.
- Dreyfuss, M.M. and Chapela, I.H. (1999). Potential of fungi in the discovery of novel, low-molecular weight pharmaceuticals. In V.C. Gullo (ed.), *The Discovery of Natural Products with Therapeutic Potential*, pp. 49–80. Butterworth-Heinemann, UK.

- Fisher, P.J., Anson, A.E. and Petrini, O. (1984). Novel antibiotic activity of an endophyte *Cryptosporiopsis* sp. isolated from *Vaccinium myrtillus*. *Transactions of the British Mycological Society* 83: 145–148.
- Guarro, J., Soler, L. and Rinaldi, M.G. (1995). Pathogenicity and antifungal susceptibility of *Chaetomium* species. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* 14: 613–618.
- Jackson, A.J., Walters, D.R. and Marshall, G. (1997). Antagonistic interactions between the foliar pathogen *Botrytis fabae* and isolates of *Penicillium brevicompactum* and *Cladosporium cladosporioides* on faba beans. *Biological Control* 8: 97–106.
- Kobayashi, M., Kanasaki, R., Sato, I., Abe, F., Nitta, K., Ezaki, M., Sakamoto, K., Hashimoto, M., Fujie, A., Hino, M. and Hori, Y. (2005). FR207944, an antifungal antibiotic from *Chaetomium* sp. No. 217 I. Taxonomy, fermentation and biological properties. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 69: 515–521.
- Latch, G.C.M. (1993). Physiological interactions of endophytic fungi and their hosts. Biotic stress tolerance imparted to grasses by endophytes. *Agriculture, Ecology and Environment* 44: 143–156.
- Li, J.Y., Strobel, G.A., Harper, J.K., Lobkovsky, E. and Clardy, J. (2000). Cryptocin, a potent tetramic acid antimycotic from the endophytic fungus *Cryptosporiopsis* cf. *quercina*. *Organic Letters* 2: 767–770.
- Narisawa, K., Currah, R.S. and Hashiba, T. (2003). The root endophytic fungus *Phialocephala fortinii* suppresses *Verticillium* yellow in Chinese cabbage. *Proceedings of the 8th International Congress of Plant Pathology*, p. 39. Christchurch, New Zealand.
- Park, J.Y., Okada, G. and Takahashi, M. (2002). Screening of fungi antagonists against yellows of cabbage caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans*. *Mycoscience* 43: 447–451.
- Petrini, O. (1993). Endophytes of *Pteridium* spp.: some considerations for biological control. *Sydowia* 45: 330–338.
- Photita, W. (2003). *Survey and Isolation of Endophytic and Saprobiic Fungi of Wild Banana in Doi Suthep-Pui National Park*. Ph.D. Thesis, Chiang Mai University, Thailand.
- Pujol, I., Guarro, J., Llop, C., Soler, L. and Fernandez-Ballart, J. (1996). Comparison study of broth macrodilution and microdilution antifungal susceptibility tests for the filamentous fungi. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 40: 2106–2110.

- Pulici, M., Sugawara, F., Koshino, H., Okada, G., Esumi, Y., Uzawa, J. and Yoshida, S. (1997). Metabolites of *Pestalotiopsis* spp., endophytic fungi of *Taxus brevifolia*. *Phytochemistry* 46: 313–319.
- Reissinger, A., Winter, S., Steckelbroeck, S., Hartung, W. and Sikora, R.A. (2003). Infection of barley roots by *Chaetomium globosum*: evidence for a protective role of the exodermis. *Mycological Research* 107: 1094–1102.
- Rodrigues, K.F., Hesse, M. and Werner, C. (2000). Antimicrobial activities of secondary metabolites produced by endophytic fungi from *Spondias mombin*. *Journal of Basic Microbiology* 40: 261–267.
- Rubini, M.R., Silva-Ribeiro, R.T., Pomella, A.W.V., Maki, C.S., Araújo, W.L., dos Santos, D.R. and Azevedo, J.L. (2005). Diversity of endophytic fungal community of cacao (*Theobroma cacao* L.) and biological control of *Crinipellis pernicios*, causal agent of witches' broom disease. *International Journal of Biological Science* 1: 24–33.
- Schulz, B., Römmert, A., Dammann, U., Aust, H. and Strack, D. (1999). The endophyte-host interaction: a balanced antagonism? *Mycological Research* 103: 1275–1283.
- Singh, D.V., Aggarwal, R. and Srivastava, K.D. (2003). The antagonism by *Chaetomium globosum* against spot blotch of wheat caused by *Drechslera sorokiniana*. *Proceedings of the 8th International Congress of Plant Pathology*, p. 32. Christchurch, New Zealand.
- Soytong, K., Kanokmedhakul, S., Kukongviriyapa, V. and Isobe, M. (2001). Application of *Chaetomium* species (Ketomium[®]) as a new broad spectrum biological fungicide for plant disease control: a review article. *Fungal Diversity* 7: 1–15.
- Stierle, A., Strobel, G. and Stierle, D. (1993). Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of Pacific yew. *Science* 260: 214–216.
- Stone, J.K., Bacon, C.W. and White, J.F.Jr. (2000). An overview of endophytic microbes: endophytism defined. In C.W. Bacon and J.F.Jr. White (eds.), *Microbial Endophytes*, pp. 1–29. Marcel Dekker, New York, USA.
- Strobel, G. and Daisy, B. (2003). Bioprospecting for Microbial Endophytes and Their Natural Products. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 67: 491–502.
- Strobel, G., Daisy, B., Castillo, U. and Harper, J. (2004). Natural products from endophytic microorganisms. *Journal of Natural Products* 67: 257–268.
- Strobel, G.A. (2002). Gifts from the rainforest. *Canadian Journal of Phytopathology* 24: 14–20.

- Strobel, G.A., Miller, R.V., Miller, C., Condron, M., Teplow, D.B. and Hess, W.M. (1999). Cryptocandin, a potent antimycotic from the endophytic fungus *Cryptosporiopsis* cf. *quercina*. *Microbiology* 145: 1919–1926.
- Thomson, B.D., Robson, A.D. and Abbott, L.K. (1986). Effects of phosphorus and the formation of mycorrhizas by *Gigaspora calospora* and *Glomus fasciculatum* in relation to root carbohydrates. *New Phytologist* 103: 751–765.
- Tian, X.L., Cao, L.X., Tan, H.M., Zeng, Q.G., Jia, Y.Y., Han, W.Q. and Zhou, S.N. (2004). Study on the communities of endophytic fungi and endophytic actinomycetes from rice and their antipathogenic activities *in vitro*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 20: 303–309.
- Vannacci, G. and Harman, G.E. (1987). Biocontrol of seed borne *Alternaria raphani* and *A. brassicola*. *Canadian Journal of Microbiology* 34: 850–856.
- Walther, D. and Gindrat, D. (1988). Biological control of damping-off of sugar-beet and cotton with *Chaetomium globosum* and a fluorescent *Pseudomonas* sp. *Canadian Journal of Microbiology* 34: 631–637.
- Wilson, D. (1993). Fungal endophytes: out of sight but should not be out of mind. *Oikos* 68: 379–384.

Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว.

Submitted papers

- 1 . Bussaban, B., Thongkantha, S., Photita, W., Lumyong, P., McKenzie, E.H.C., Hyde, K.D. and Lumyong, S. (2005). Taxonomy and phylogeny of *Myrothecium* and *Solheimia* analysed from ITS ribosomal DNA sequences. *Mycological Research* (Submitted).
- 2 . Bussaban, B., Lumyong, S., Lumyong, P., Seelanan, T., Park, D.C., McKenzie, E.H.C. and Hyde., K.D. (2005). Molecular and morphological characterization of *Pyricularia* and allied genera. *Mycologia* (In Press).
- 3 . Lumyong, S., Bussaban, B., Lumyong, P., Hyde, K.D., McKenzie, E.H.C., Asano, K. and Tomita, F. (2005). Evaluation of endophytic fungi from Zingiberaceae for antibiotic production. *Biotechnology for Sustainable Utilization of Biological Resources in the Tropics* 19 (In Press).

การเสนอผลงานในที่ประชุม

1. Bussaban, B., Lumyong, S., Lumyong, P., Seelanan, T., Park, D.C., McKenzie, E.H.C. and Hyde., K.D. Molecular and morphological characterization of the genus *Pyricularia* and allied genera. 3rd Asia-Pacific Mycological Conference on Biodiversity and Biotechnology (AMC2002), 4–8 November 2002, Yunnan University, Kunming, China.
2. Lumyong, S., Bussaban, B., McKenzie, E.H.C., Lumyong, P. and Asano, K. Characterisation of Bioactive Compounds Produced by the Zingiberaceous Endophytic *Chaetomium globosum* CMUZE0132. BMS Annual Scientific Meeting 2005, 5–8 September 2005, The University of Manchester, Manchester, England.

ภาคผนวก

Media:**Corn meal agar (CMA)**

Corn meal	60 g
Agar	15 g, pH 5.6

Malt peptone agar (MPA)

Malt extract	30 g
Peptone	3 g
Agar	15 g, pH 5.6

Nutrient agar (NA)

Beef extract	3 g
Peptone	5 g
Agar	15 g, pH 7

Potato dextrose agar (PDA)

Potatoes	200 g
Glucose	20 g
Agar	15 g, pH 5.6

Yeast glucose agar (YGA)

KH_2PO_4	0.5 g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ or $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	3.5 g or 7.8 g
Yeast extract	5 g
Glucose	10 g
Agar	15 g, pH 7.1

F1

Fructose	3%
Soybean meal	0.5%
CaCl_2	0.01%
KH_2PO_4	0.1%
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.05%, pH 6.0

F2

yeast extract	0.2%
Glucose	0.5%
KH_2PO_4	0.5%
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.05%, pH 6.0

Buffers:**Lysis buffer**

150 mM NaCl	
50 mM EDTA	
10 mM Tris-HCl	
30 $\mu\text{g/ml}$ proteinase K	pH 7.4

CTAB buffer

10% CTAB	
500 mM Tris-HCl	
100 mM EDTA	pH 8.0

TAE buffer

20 mM Tris-Acetate	
1 mM EDTA	pH 8.0

A running title: Taxonomy and phylogeny of *Myrothecium* and *Solheimia*

Taxonomy and phylogeny of *Myrothecium* and *Solheimia* analysed from ITS ribosomal DNA sequences

Boonsom BUSSABAN¹, Sutheera THONGKANTHA¹, Pipob LUMYONG², Eric H.C. McKENZIE³, Kevin D. HYDE⁴ and Saisamorn LUMYONG¹

¹*Department of Biology, Faculty of Science, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand*

²*Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand*

³*Landcare Research, Private Bag 92170, Auckland, New Zealand*

⁴*Centre for Research in Fungal Diversity, Department of Ecology & Biodiversity, The University of Hong Kong, Pokfulam Road, Hong Kong, Sar China*

**Corresponding author: Saisamorn LUMYONG: scboi009@chiangmai.ac.th, bussaban@hotmail.com*

Two saprobic fungi, which are fit to the broad generic limits of *Myrothecium* are described and illustrated. They were found on the monocotyledonous plants *Amomum siamense*, *Licuala longecalycata*, *Musa acuminata* and *Pandanus penetrans* in Thailand. The new species are compared with currently accepted species of *Myrothecium* and other related genera. The phylogenetic relationships of *Myrothecium* species and species from related genera were established from sequences of the internal transcribed spacer ribosomal RNA gene. *Myrothecium cinctum* with striate conidia, isolated from various hosts, and two species previously described as *Solheimia* that also have striate conidia, fell within the same clade with high bootstrap support. The morphological separation (conidial length) of *M. pandanicola* and *M. cinctum* was strongly supported by the molecular data (ITS ribosomal DNA sequences). *Myrothecium pandanicola* was also more related to type species, *M. inundatum* than to *M. cinctum*.

Key Words: *Myrothecium*, *Solheimia*, ITS rDNA, phylogeny

The genus *Myrothecium* was described by Tode (1790), with *M. inundatum* Tode as the type species. Thirty-six available type materials were examined and compared with morphologically similar genera by Tulloch (1972). She also provides a key to species of 13 accepted *Myrothecium* species. The fruiting body consists of a sporodochium with differentiated marginal hyphae. Conidia are produced from phialides and accumulate in a hyaline, olivaceous or black slimy head. The appearance of the fructifications is varied since sporodochia display different degrees of complexity. Hyaline or dark setae are sometimes present, arising from the basal stroma. *Myrothecium dimorphum* Ts. Watanabe, which has straight hyaline setae and two kinds of conidia, was recently described and differentiated from other *Myrothecium* species with setose or hyphal sporodochia (Watanabe, Watanabe & Nakamura 2003). *Myrothecium acadiense* Seifert & G. Sampson, which produces sporodochial conidiomata but apparently proliferates percurrently was also recently described based on studies of morphology and

phylogenetic analysis of partial sequences of large subunit ribosomal DNA (Seifert, Louis-Seize & Sampson 2003).

The genus *Solheimia* described by Morris (1967) is characterized by synnemata and phialides, which produce single unicellular conidia with longitudinal ridges (Morris 1967, Varghese & Rao 1977, Bills, Rossman & Polishook 1994, Matsushima 1995). The differentiation between *Solheimia* and other synnematosous fungi, including *Myrothecium*, is based only on its unbranched conidiophores (Morris 1967, Seifert 1985). However, *Solheimia kamatii* Varghese & V.G. Rao has double dichotomously branched conidiophores (Varghese & Rao 1977). Bills *et al.* (1994) examined the conidiomata and spore ornamentation and shape of *Myrothecium cinctum* (Corda) Sacc. and *S. costaspora* E.F. Morris growing on agar media and on autoclaved banana leaves, and found that all characters of these two fungi were very similar. *Myrothecium cinctum* is morphologically similar to *Virgatospora echinofibrosa* Finley (syn. *Didymostilbe echinofibrosa* (Finley) Rossman), which having 3-septate striate conidia (Bills *et al.* 1994, Chang 1998). Species of *Myrothecium* and *V. echinofibrosa* also have a close relationship belonging to the Hypocreales based on DNA sequences from four nuclear and one mitochondrial gene (Castlebury *et al.* 2004).

During investigations of saprobic fungi occurring on dead tissues of *Amomum siamense* Craib. and *Pandanus penetrans* St. John. in Thailand, we found fungi with morphological characters, both on natural substrates and on agar media, which fit the genus *Myrothecium*. In this paper we report on molecular analysis of the ribosomal DNA of these fungi. In addition, isolates of *Solheimia costaspora* and *S. kamatii* from *Licuala longicalycata* Furtado and *Musa acuminata* Colla, respectively, were also examined. These *Solheimia* isolates and *Myrothecium cinctum* were clumped based on traditional morphological characters and ITS rDNA sequence information.

MATERIALS AND METHODS

Collection and morphology

Dead tissues of the monocotyledonous plants, *Amomum siamense* and *Pandanus penetrans*, were collected from the investigation sites in Doi Suthep-Pui National Park, Chiang Mai, Thailand. Sample were returned to the laboratory and cut into lengths small enough to fit into snap-lock plastic bags (30 × 30 cm) containing wet tissue. These were incubated at room temperature (25–30 °C) and examined within two weeks. Single spore isolates were obtained following the method of Choi, Hyd & Ho (1999). Hyphal tips were transferred to potato dextrose agar (PDA, Difco). For morphological study, mounts were prepared in lactophenol, examined using either differential interference phase contrast or bright-field phase contrast microscopy, and measurements were made at either ×400 or ×1000 magnification. The number of ridges on the conidia was observed by viewing the conidia from the end and refers to the total number surrounding each conidium. Radial growth was determined from isolates grown on cornmeal agar (CMA, Difco) and PDA at 25 °C. Each isolate was also subcultured on CMA and PDA, containing autoclaved strips of host leaf tissue. The description of colony morphology was made from the same cultures.

DNA extraction, PCR amplification and sequencing

Fungal DNA was extracted from freeze-dried mycelium using the SDS-CTAB (sodium dodecyl sulfate-cetyltrimethylammonium bromide) method (Kim *et al.* 1990). All isolates were grown in Nobles broth (1.2% malt extract) at 22 °C for 10 days. Mycelia were harvested, freeze-dried, frozen in liquid nitrogen, and ground into fine powder with

mortar and pestle. About 15 mg of powdered mycelia were suspended in 1 ml of ice-cold lysis buffer (150 mM NaCl, 50 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 30 $\mu\text{g ml}^{-1}$ proteinase K), transferred into a 1.5 ml eppendorf tube, and kept at 4 °C to prevent endonuclease activity during rehydration of the sample. SDS was added to a final concentration of 2%, vortexed, and incubated at 65 °C for 30 min. After centrifugation for 15 min at 14,000 rpm, the supernatant was transferred to a new sterile 1.5 ml eppendorf tube. The volume of supernatant was measured and the NaCl concentration was then adjusted to 1.4 M and 1/10 volume of 10% CTAB buffer (10% CTAB, 500 mM Tris-HCl, 100 mM EDTA, pH 8.0) was added. The solution was then thoroughly mixed and incubated at 65 °C for 10 min. After cooling at 15 °C for 2 min, an equal volume of chloroform isoamyl alcohol (24:1 v/v) was added, thoroughly mixed, and the tube was centrifuged at 14,000 rpm for 15 min. The extraction was repeated until the interface was clear. The supernatant was removed to a new eppendorf tube containing 2 volumes of cold 100% ethanol. After DNA precipitation, the pellet was centrifuged for 15 min at 14,000 rpm at 4 °C. The pellet was washed with 70% ethanol and dried at room temperature. It was resuspended in 100 μl of 0.002% RNase (5 $\mu\text{g ml}^{-1}$) in TE buffer and incubated at 37 °C for 1 h (Liou & Tzean 1997). The rDNA ITS region containing ITS1 and ITS2 and the intervening 5.8S rRNA gene, were amplified in 25 μl reaction on a GeneAmp 9700 thermal cycler (Applied Biosystems) under the following reaction conditions: 1 μl of template DNA at a 1:20 dilution of the DNA extraction, 0.2 mM each dNTP, 0.2 μl of FastTaq (Applied Biosystems), 0.2 μM each of primers ITS1 and ITS4, 2.5 μl of the supplied 10 $\times$ PCR buffer with MgCl_2 , and sterile water to bring volume to 25 μl . Thermal cycling was initiated by denaturation at 95 °C for 4 min. This was followed by 35 cycles of denaturation at 94 °C for 1 min, annealing at 45 °C for 1 min, and extension at 72 °C for 1 min, with a final extension at 72 °C for 7 min. PCR products were analyzed by electrophoresis on 1% agarose gels on TAE buffer [20 mM Tris-Acetate, 1 mM EDTA, pH 8.0] (Sambrook, Fritsch & Maniatis 1989) and visualized by staining with ethidium bromide. Residual nucleotides and primers were removed using High Pure PCR Product Kit (Roche Molecular Biochemicals) according to the manufacturer's instructions. The amplified products were sequenced with BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems) on an ABI PRISM 310 automated DNA sequencer. Sequences were determined on both strands using sequencing primers, ITS1 forward and ITS4 reverse (White *et al.* 1990). The raw data were used to assemble the sequences of the regions using Sequencher 3.1.1 for Macintosh (Applied Biosystems).

Nucleotide sequence alignment and analysis

The sequences were submitted to <http://bioweb.pasteur.fr/seqanal/clustalw>, for multiple alignment using CLUSTAL W 1.82 (Thompson, Higgins & Gibson 1994), and manually adjusted using GeneDoc 2.6.002 (Nicholas & Nicholas 1997). The GenBank accession numbers of the sequences are in Table 1. Phylogenetic trees were inferred using PAUP*4.0b10 (Swofford 2002). Due to the large size of the data set, parsimony trees were constructed using heuristic methods. Heuristic searches were performed using the random addition sequence option and the tree bisection reconnection branch-swapping algorithm. The parsimony tree scores including tree length, consistency index, retention index, rescaled consistency index, and homoplasy index (TL, CI, RI, RC and HI) were also calculated. All molecular characters were unordered and given equal weight during analysis. The robustness of internal branches was estimated with 1000 bootstrap replications (Felsenstein 1985) using the same heuristic search options described above. Anamorphic Pezizaceae, *Peziza vesiculosa* Sacc. and *P. echinospora* P. Karst. were used

to root for phylogenetic tree. DNA sequence alignment and trees were deposited in TreeBASE, accession number SN1790.

RESULTS

Taxonomy

Myrothecium cinctum (Corda) Sacc., Syll. Fung. **4**: 751, 1886 (Figs. 1–9, 15a–c)
 =*Solheimia costaspora* E.F. Morris, *Mycopath. Mycol. Appl.* **33**: 181 (1967)
 =*Solheimia kamatii* Varghese & V.G. Rao, *Curr. Sci.* **46**: 23 (1977)

Colonies on natural substratum in the form of synnemata, scattered, determinate, composed of dark-olivaceous stipes, becoming pale olivaceous towards the black slimy head; stipes up to 350 µm high, 23 µm diam, cylindrical; conidiophores unbranched or branched dichotomously two times, synnematus hyphae 2–2.3 µm wide, parallel, flexuous, septate, verruculose, dark olivaceous. Conidiogenous cells monophialidic, smooth, hyaline to pale olivaceous. Conidia 9–12 × 3–3.7 µm ($\bar{x}$ = 10.2 × 3.1 µm, n = 30), unicellular, fusiform, apex acute, truncate at the base, olivaceous to dark olivaceous, with 8 mostly straight longitudinal ridges.

Colonies on PDA reaching 6 cm diam after 14 days, velvety, yellowish white, edge regular, not staining agar, producing synnemata and spores in the center within 2 months; on CMA reaching 5 cm diam after 14 days, velvety, yellowish-white, edge regular, producing synnemata and spores, only when sterile plant tissue included.

Specimens examined: **Thailand**, Chiang Mai, Doi Suthep-Pui National Park, on dead pseudostem of *Amomum siamense*, 15 Oct. 2000, B. Bussaban (PDD74128, living culture in BCC8249, ICMP14537); Mae Hong Son, Huay Ticha Village, on decaying petioles of *Musa acuminata*, 23 Nov. 2000, W. Pothita (PDD74447, living culture in BCC9775, ICMP14539); Narathiwat, Sirindhorn Peat Swamp Forest, on dead petioles of *Licuala longecalycata*, May 2001, U. Pinruan (PDD74446, living culture in BCC11170, ICMP14538).

Known distribution: Costa Rica, Ecuador, India, Panama, Peru, Thailand.

Notes: Initially, we considered that the morphological characters of the two specimens (PDD74446 and PDD74447) matched those of the original descriptions of *Solheimia costaspora* and *S. kamatii*, respectively. However, the spore shape and size of *Myrothecium cinctum* (from *A. siamense*), *S. costaspora* (from *L. longicalycata*), *S. kamatii* (from *M. acuminata*) and of previously described *Myrothecium cinctum* (Morris 1967, Tulloch 1972, Varghese & Rao 1977, Bills *et al.* 1994, Matsushima 1995) overlap (Table 2). The conidiomata and spore ornamentation and shape of *M. cinctum* and *S. costaspora* growing on agar media and on autoclaved banana leaves, was previously demonstrated to be identical (Bills *et al.* 1994). In our study, the molecular data (ITS ribosomal DNA sequences) were also supported this conjecture. Because of these findings we consider it better to retain one generic and specific epithet for these *Myrothecium* fungi with striate spores.

Myrothecium pandanicola Thongkantha & Bussaban, **sp. nov.** (Figs. 10–14, 15d)

Synnemata solitaria vel gregaria, determinatae, atra stipitis compositi, deinde olivaceo-nigra ad capitula atra, stipites usque ad 850 μm longa, 75 μm crassa, cylindrici, non ramosa; hyphae stipitis 4 μm crassa, parallelibus, septata, verruculosae, olivaceo-nigra. Conidia 13.9–27.8 $\times$ 2.3–4.6 μm , continua, fusiformata, ad apice acuta, ad basim truncata, olivaceo-nigra, cum 6–7 costis longitudinalibus.

Etymology: referring to the occurrence on *Pandanus*.

Colonies on natural substratum in the form of synnemata, scattered or in groups of 2–3, determinate, composed of black stipes, becoming dark olivaceous towards the black slimy head; stipes up to 850 μm high, 75 μm diam, cylindrical. Conidiophores unbranched, synnematus hyphae ca. 4 μm wide, parallel, straight, septate, verruculose, dark olivaceous. Conidiogenous cells monophialidic, smooth, hyaline or dark olivaceous. Conidia 14–28 $\times$ 2–4.5 μm ($\bar{x}$ = 22 $\times$ 3.7 μm , n = 50), unicellular, fusiform, apex acute, narrowly truncate at the base, dark olivaceous, with 6–7 straight or mostly curved ridges.

Colonies on PDA reaching 4 cm diam after 14 days, a cottony tuft in the center velvety at the outside, white to pale yellow from below, edge regular, not staining agar, not sporulating within 2 months; on CMA reaching 6 cm diam after 14 days, velvety, yellowish white, edge regular, produce synnemata and spores only when sterile plant tissue included.

Specimens examined: **Thailand**, Chiang Mai, Doi Suthep-Pui National Park, on dead leaves of *Pandanus penetrans*, 21 July 2001, *S. Thongkantha* (PDD 74134 – holotype, living culture in BCC 9829, ICMP14540); *ibid.*, 6 July 2001, *S. Thongkantha* (PDD 74133 – paratype).

Known distribution: Thailand.

Notes: *Myrothecium pandanicola* is similar to *M. cinctum* in having striate spores. *Myrothecium pandanicola*, however, has distinctly longer conidia than those of *M. cinctum* (14–28 $\times$ 2–4.5 μm vs. 9–12 $\times$ 3–3.7 μm). The mean length to width ratio for the conidia of *M. pandanicola* is 6: 1, compared to 3: 1 for *M. cinctum*. *Myrothecium pandanicola* also has fewer longitudinal ridges (6–7 vs. 7–9 for *M. cinctum*). The morphological separation of *M. pandanicola* and *M. cinctum* was strongly supported by the molecular data (ITS ribosomal DNA sequences)(see below).

Molecular phylogeny

The alignment generated 757 characters, 384 of which were potentially phylogenetically informative. Parsimony analysis of the ITS sequence using the options of a heuristic search generated 6 equally parsimonious trees with a total length of 1458 steps (CI = 0.6598, RI = 0.7082, RC = 0.4673 and HI = 0.3402) (Fig. 16). All of *Myrothecium* taxa were sorted into a large cluster, forming two sister groups, clade I and clade II (75% bootstrap support). Clade I included the type of the genus, *M. inundatum* and *M. atroviride*, *M. verrucaria*, *M. roridum*, *M. leucotrichum*, *M. pandanicola* and *Virgatospora echinofibrosa* (69% bootstrap support). In this clade, *M. atroviride* and *M. verrucaria* were closely related with 99% bootstrap support. *Myrothecium cinctum* with striate conidia, isolated from various hosts, and two species previously described as *Solheimia* that also have striate conidia, fell within the same clade (II, 100% bootstrap support). Members in *Myrothecium* cluster with related to the taxa that have a pale-coloured or green conidial mass and belong to Hypocreales or Sordariales Incertae Sedis (*Tubercularia* sp., *Koorchaloma spartinicola*, *Gliocladium penicillioides*, *Clonostachys rosea*, *Stilbella byssiseda*, *Volutella ciliata* and *Verticillium dahliae*) than to the

remaining taxa that have a dark-coloured conidial mass and belong to Ophiostomatales (*Pesotum cupulatum*, *P. fragrans*, *Graphium erubescens*) (Fig. 16).

DISCUSSION

There are 69 names for *Myrothecium* and two names for *Solheimia* species recorded in IndexFungorum (<http://www.indexfungorum.org/Names/Names.asp>) but only a few comprehensive generic diagnoses have been provided. Tulloch (1972) recognised the difficulty in delimiting *Myrothecium* from other genera. The decision to select the colour of the conidial mass as the main characteristic was criticised by Nag Raj (1995). The differentiation between *Solheimia* and other synnematosous fungi including *Myrothecium*, is based only on the unbranched conidiophores of *Solheimia* (Morris 1967, Seifert 1985). *Solheimia kamatii* Varghese & V.G. Rao, however, was described under this genus with two times dichotomously branched conidiophores (Varghese and Rao 1977). In addition, *Virgatospora natarajensis* with striate conidia resembling those of *Myrothecium* or *Solheimia* species, was described for synnematosous fungi producing slimy, non-septate, phialidic conidia with distinct striation (D'Souza, Singh & Bhat 2002). It is, therefore, difficult to delimit *Myrothecium* from other genera such as *Solheimia*, *Virgatospora*.

Tulloch (1972) revised *Myrothecium* Tode and accepted 13 species. The broad generic limits include cupulate, sporodochial and synnematal forms. Cupulate conidiomata are most typical of *M. gramineum* Lib., *M. leucotrichum* (Peck) Tulloch and *M. atroviride* (Berk. & Br.) Tulloch. In all conidiomata, however, differential marginal hyphae are present. Hyaline or dark setae are also sometimes formed. The marginal hyphae surround the central mass of slimy green to black conidia, which become hard when dried. Conidia may or may not be pigmented but are formed holoblastically from phialides (sensu Sutton, 1980) which sometimes percurrently proliferate.

The genus *Solheimia* is synnematosous hyphomycetes with large, slimy, dark green, striate conidia borne on phialides. This fungi are morphologically similar to *Myrothecium cinctum* and *Virgatospora echinofibrosa*, but the latter having 3-septate striate conidia (Bills *et al.* 1994, Chang 1998). Species of *Myrothecium* and *V. echinofibrosa* were previously thought to be allied with the Bionectriaceae based on large subunit rDNA sequences analysis (Rossman *et al.* 2001). These fungi also formed a monophyletic lineage within the Hypocreales based on DNA sequences from four nuclear and one mitochondrial gene (Castlebury *et al.* 2004). Bills *et al.* (1994) have demonstrated the conidiomata and spore ornamentation and shape of *M. cinctum* and *S. costaspora* growing on agar media and on autoclaved banana leaves, and indicated that all characters of these two fungi were identical. In our study, *Solheimia costaspora*, *S. kamatii* and *Myrothecium cinctum* with striate conidia also appear to have a similar morphological characters on media and they are well supported as monophyletic genera based on ITS including 5.8S rDNA sequence analysis. Because of these findings we consider it better to retain one generic and specific epithet for these *Myrothecium* fungi with striate spores.

Analysis of ribosomal DNA has frequently been used in mycological investigations (Bruns, White & Taylor 1991, Hibbett 1992, Lee & Taylor 1992, Li 1997, Sahr *et al.* 1999, Tomita 2003), and it can be potentially used to classify fungi. Including traditional morphological data, chemotaxonomic data or with sequence information can greatly increase the resolving power of the tree, delineating or clumping species in individual data-set analyses. The results of this research show that species of *Solheimia costaspora*, *S. kamatii* and *Myrothecium cinctum* are closely related and share morphological and molecular characteristics. They formed a strong clade (II) and sister to clade comprising other *Myrothecium* species (clade I). *Myrothecium cinctum* also produced distinct cell

wall polysaccharides from other *Myrothecium* species as demonstrated by Ahrazem *et al.* (2000). The results of the ¹H-NMR spectra of the polysaccharides of the FISS fraction isolated from *M. cinctum* were completely different from those species investigated while the ¹H-NMR spectra of the polysaccharides of the FISS fraction from *M. atroviride* and four strains of *M. verrucaria* were very similar, and similar to those of *M. inundatum*, *M. setiramosum*, *M. prestonii*, *M. tongaense* and *M. roridum*.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank U. Pinruan and W. Photita for the photographs, culture and description of *Solheimia costaspora* and *S. kamatii*, A.Y. Rossman for kindly providing some sequences of *Solheimia* and *Myrothecium*, T. Seelanan for advisory of phylogenetic analysis, and J.F. Maxwell for identification the species of *Pandanus*. B. Bussaban thanks The Royal Golden Jubilee Ph.D. Program Funds (4B4M/43/D1, BGJ 4680011) for financial support. S. Thongkantha thanks Chiang Mai University Graduate School for financial support. J.M. Young, M. Fletcher and R. Kodsueb are thanked for supply of cultures. Landcare Research, Auckland provided facilities and resources for B. Bussaban to carry out much of this work.

REFERENCES

- Ahrazem, O., Gómez-Miranda, B., Prieto, A., Bernabé, M. & Leal, J. A. (2000) Heterogeneity of the genus *Myrothecium* as revealed by cell wall polysaccharides. *Archives of Microbiology* **173**: 296–302.
- Bills, G. F., Rossman, A. Y. & Polishook, J. D. (1994) Rediscovery of *Albosynnema elegans* and *Solheimia costaspora*. *Sydowia* **46**: 1–11.
- Bruns, T. D., White, T. J. & Taylor, J. W. (1991) Fungal molecular systematics. *Annual Reviews of Ecology and Systematics* **22**: 525–564.
- Castlebury, L. A., Rossman, A. Y., Sung, G. -H., Hyten, A. S. & Spatafora, J. W. (2004) Multigene phylogeny reveals new lineage for *Stachybotrys chartarum*, the indoor air fungus. *Mycological Research* **108**: 864–872.
- Chang, H. S. (1998) Three dematiaceous hyphomycetes from Taiwan. *Botanical Bulletin of Academic Sinica* **40**: 247–250.
- Choi, Y. W., Hyde, K. D. & Ho, W. H. (1999) Single spore isolation of fungi. *Fungal Diversity* **3**: 29–38.
- D'Souza, M., Singh, S. K. & Bhat, D. J. (2002) New conidial fungi from Andaman Islands, India. *Mycotaxon* **82**: 133–143.
- Felsenstein, J. (1985) Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* **39**: 783–791.
- Hibbett, D. S. (1992) Ribosomal RNA and fungal systematics. *Transactions of the Mycological Society of Japan* **33**: 533–556.
- Kim, W. K., Mauthe, W., Hausner, G. & Klassen, G. R. (1990) Isolation of high molecular weight DNA and double-stranded RNAs from fungi. *Canadian Journal of Botany* **68**: 1898–1902.
- Lee, S. B. & Taylor, J. W. (1992) Phylogeny of five fungus-like protist species, inferred from the internal transcribed spacers of ribosomal DNA. *Molecular Biology and Evolution* **9**: 636–653.
- Li, W. H. (1997) Rates and patterns of nucleotide substitution. In *Molecular Evolution* (W. H. Li, ed): 177–213. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts, USA.
- Liou, G. Y. & Tzean, S. S. (1997) Phylogeny of the genus *Arthrobotrys* and allied nematode-trapping fungi based on rDNA sequences. *Mycologia* **89**: 876–884.

- Matsushima, T. (1995) *Matsushima Mycological Memoirs* 8. Matsushima, Kobe, Japan.
- Morris, E. F. (1967) Studies on the synnematosus fungi imperfecti II. *Mycopathologica et Mycologia Applicata* **33**: 179–185.
- Nag Raj, T. R. (1995) What is *Myrothecium presonii*? *Mycotaxon* **53**: 295–310.
- Nicholas, K. B. & Nicholas, H. B. Jr. (1997) *GeneDoc: a tool for editing and annotating multiple sequence alignments*. <http://www.psc.edu/biomed/genedoc>.
- Rossmann, A. Y., McKemy, J. M., Pardo-Schultheiss, R. A. & Schroers, H. -J. (2001) Molecular studies of the *Bionectriaceae* using large subunit rDNA sequences. *Mycologia* **93**: 100–110.
- Saccardo, P. A. (1886) *Sylloge Fungorum* **4**: 751.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd edition. Cold Spring Harbor Press, New York, USA.
- Sahr, T., Ammer, H., Besl, H. & Fischer, M. (1999) Infrageneric classification of the boleticolous genus *Sepedonium*: species delimitation and phylogenetic relationships. *Mycologia* **91**: 935–943.
- Seifert, K. A. (1985) A monograph of *Stilbella* and some allied genera. *Studies in Mycology* **27**: 1–235.
- Seifert, K. A., Louis-Seize, G. & Sampson, G. (2003) *Myrothecium acadiense*, a new hyphomycete isolated from the weed *Tussilago farfara*. *Mycotaxon* **87**: 317–327.
- Sutton, B. C. (1980) *The Coelomycetes*. Commonwealth Mycological Institute, Kew, UK.
- Swofford, D. L. (2002) *PAUP*: Phylogenetic analysis using parsimony (* and other methods)*, beta version 4.0b10. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts, USA.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G. & Gibson, T. J. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* **22**: 4673–4680.
- Tode, H. F. (1790) *Fungi Mecklenbergensis selecti* **1**: 25–28. Luneberg.
- Tomita, F. (2003) Endophytes in Southeast Asia and Japan: their taxonomic diversity and potential applications. *Fungal Diversity* **14**: 187–204.
- Tulloch, M. (1972) The genus *Myrothecium* Tode ex Fr. *Mycological Papers* **130**: 1–42.
- Varghese, K. I. M. & Rao, V. G. (1977) *Solheimia kamatii* sp. nov. (hyphomycete) a new generic record to India. *Current Science* **46**: 23–24.
- Watanabe, T., Watanabe Y. & Nakamura K. (2003) *Myrothecium dimorphum*, sp. nov., a soil fungus from beach sand in the Bonin (Ogasawara) Islands, Japan. *Mycoscience* **44**: 283–286.
- White, T. J., Bruns, T. D., Lee, S. & Taylor, J. W. (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In *PCR protocols: a guide to methods and applications* (M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky & T. J. White, eds): 315–322. Academic Press, San Diego, USA.

Table 1. Isolates used in the phylogenetic analyses or morphological studies.

Isolate	Strain number	GenBank accession number	Original substrate	Geographic origin
<i>Clonostachys rosea</i>		AF358234		
<i>Didymostilbe echinofibrosa</i> ^b	AR2824	DQ135999	Litter	Mexico
<i>Giocladium penicillioides</i>		AF048733		
<i>Graphium erubescens</i>		AF198247		
<i>Koorchaloma spartinicola</i>		AF422963		
<i>Myrothecium atroviride</i>	(Wb256)	AJ302002		
<i>M. atroviride</i>	CBS224.78 (BBA71016)	AF455507	Stem of <i>Picea</i> sp.	Germany
<i>M. cinctum</i>	(BBA65670)	AJ301996		
<i>M. cinctum</i>	(BBA69182)	AJ301997		
<i>M. cinctum</i> ^b	ATCC18947	DQ135997	Forest soil	Canada
<i>M. cinctum</i> ^b	ATCC32918	DQ135998	Pathogen of <i>Saccharum officinarum</i>	Taiwan
<i>M. cinctum</i>	CBS479.85 (BBA71018)	AJ302004	Leaf of palm	Japan
<i>M. cinctum</i> ^a	BCC8249	DQ135995	Dead pseudostems of <i>Amomum siamense</i>	Thailand
<i>M. inundatum</i>		AJ302005		
<i>M. leucotrichum</i>	CBS131.64 (BBA71014)	AJ302000	Uncultivated soil	India
<i>M. pandanicola</i> ^a	BCC9829	DQ135992	Dead leaves of <i>Pandanus penetrans</i>	Thailand
<i>M. roridum</i>	(BBA62764)	AJ301993		
<i>M. roridum</i>	(BBA63372)	AJ301994		
<i>M. roridum</i>	(BBA67679)	AJ301995		
<i>M. roridum</i>	CBS212.92 (BBA71015)	AJ302001	Water from nursery	Netherlands
<i>M. verrucaria</i>	(BBA70749)	AJ302003		
<i>M. verrucaria</i>	CBS328.52 (BBA71017)	AJ301999	Deteriorated baled cotton	USA
<i>Pesotum cupulatum</i>		AF198230		
<i>Pesotum fragrans</i>		AF198248		
<i>Peziza echinospora</i>		AF491573		
<i>Peziza vesiculosa</i>		AF491623		
<i>Solheimia costaspora</i> ^b	AR2737	DQ135996	Litter	Costa Rica
<i>S. costaspora</i> ^a	BCC11170	DQ135994	Dead petioles of <i>Licuala longicalycata</i>	Thailand
<i>S. kamatii</i> ^a	BCC9775	DQ135993	Decaying petioles of <i>Musa acuminata</i>	Thailand
<i>Stilbella byssiseda</i>		AF335453		
<i>Tubercularia</i> sp.		AF422980		
<i>Verticillium dahliae</i>		AF363998		
<i>V. dahliae</i>		AF364005		
<i>Volutella ciliata</i>		AJ301967		

^aIsolate with complete ITS region sequenced by the authors, ^bisolate with complete ITS region sequenced from A.Y. Rossman. Others sequences retrieved from GenBank.

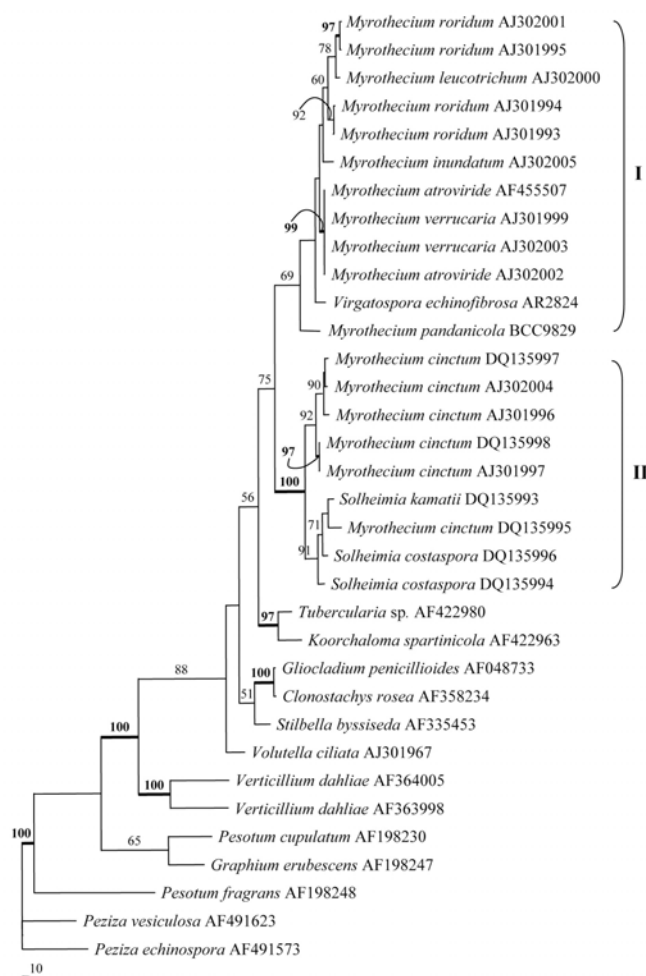
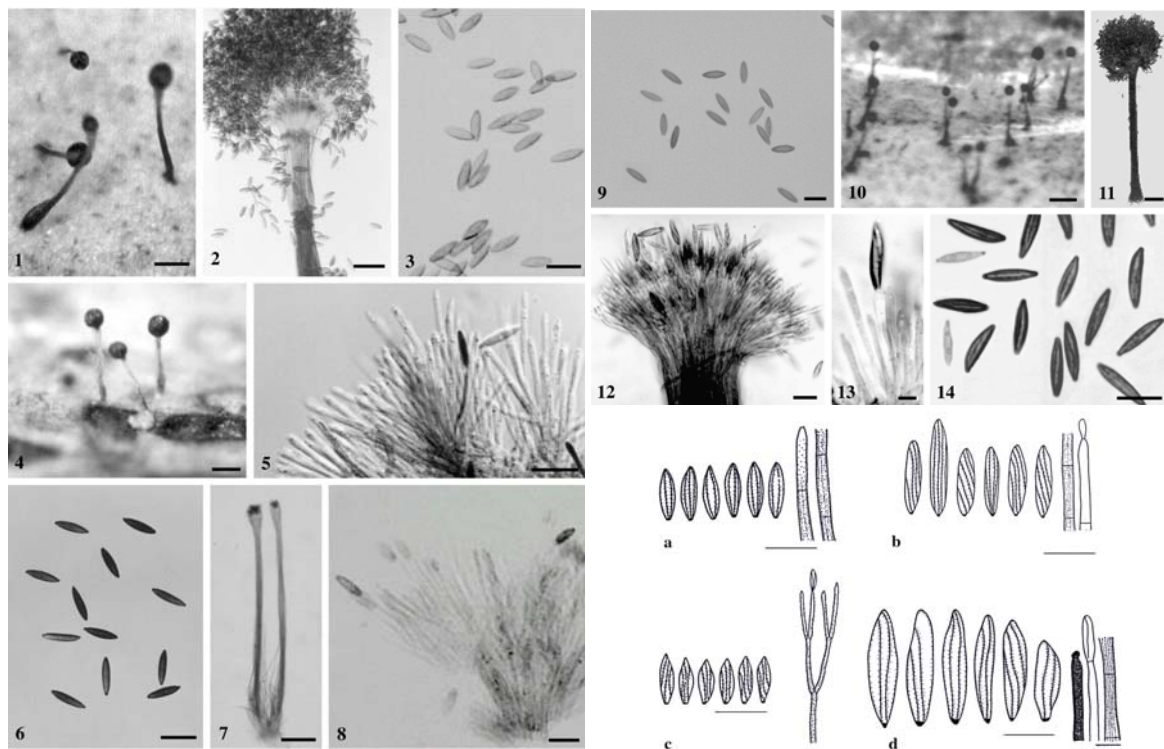
Table 2. Comparison of morphological characters of *Myrothecium* isolated from monocotyledonous plants in Thailand.

Characters	<i>Amomum siamense</i>	<i>Licuala longicalycata</i>	<i>Musa acuminata</i>	<i>Pandanus penetrans</i>
• On natural substrate				
Stipes	up to 350 µm high, 23 µm diam	stipes up to 1500 µm high, 30 µm diam	up to 460 µm high, 15 µm diam	up to 850 µm high, 75 µm diam
Conidiophores	unbranched or double dichotomously branched	mostly unbranched	double dichotomously branched	mostly unbranched
Conidial size	9–12 × 3–3.7 µm	15–19 × 3.7–5 µm	7–11 × 2–3 µm	14–28 × 2–4.5 µm
Striation	8 mostly straight longitudinal ridges	7–9 straight, curved or spiral ridges	6–8 spiral ridges	6–7 straight or mostly curved ridges
• Colony diam on PDA after 14 days	6 cm	5 cm	7 cm	7.5 cm
• Colony diam on CMA after 14 days	5 cm	4 cm	4.5 cm	6 cm

Figs. 1–12. *Myrothecium cinctum* and *M. pandanicola* (from holotype). 1–3. *M. cinctum* (from *Amomum siamense*). 1. Synnema on host surface. 2. Squash mount of synnema. 3. Conidia. 4–6. *M. cinctum* (from *Licuala longicalycata*). 4. Synnemata on host surface. 5. Conidiogenous cells and conidiophore with developing conidia. 6. Conidia. 7–9. *M. cinctum* (from *Musa acuminata*). 7. Squash mount of synnemata. 8. Conidiogenous cells with developing conidia. 9. Conidia. 10–14. *M. pandanicola*. 10. Synnemata on host surface. 11. Squash mount of synnema. 12, 13. Conidiogenous cells with developing conidia. 14. Conidia with ridges clearly visible. Scale bars: 1, 4, 11 = 100 µm, 2, 12, 14 = 20 µm, 3, 5, 6, 8, 9 = 10 µm, 7 = 50 µm, 10 = 500 µm, 13 = 5 µm.

Fig. 15. Diagrammatic representation of conidiophores, conidiogenous cells and conidia of *Myrothecium cinctum* isolated from Zingiberaceae (a), *Licuala longicalycata* (b), *Musa acuminata* (c) and *M. pandanicola* from *Pandanus penetrans* (d). Scale bars = 10 µm.

Fig. 16. One of 6 most parsimonious trees inferred from a heuristic search of the ITS1-5.8S-ITS2 rDNA sequence alignment of 34 isolates of *Myrothecium* and related genera. *Peziza echinospora* and *P. vesiculosa* were used to root the tree. The size of the branches is indicated with a scale bar. Branches with strong support ($\geq 95\%$) are in bold, with bootstrap values $\geq 50\%$ indicated above the branches.



Short title: *Pyricularia*, Molecular and morphology

Molecular and morphological characterization of *Pyricularia* and allied genera

B. Bussaban

S. Lumyong¹

Department of Biology, Faculty of Science, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand

P. Lumyong

Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand 50200

T. Seelanan

Department of Botany, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand

D.C. Park

E.H.C. McKenzie

Landcare Research, Private Bag 92170, Auckland, New Zealand

K.D. Hyde

Centre for Research in Fungal Diversity, Department of Ecology & Biodiversity, The University of Hong Kong, Pokfulam Road, Hong Kong SAR, China

Abstract: The phylogenetic relationships of *Pyricularia* species and species from related genera were established from sequences of the internal transcribed spacer ribosomal RNA gene. Phylogenetic analysis disclosed a consistent correlation with spore morphology. Most *Pyricularia* species studied, and two species of *Dactylaria* that have obpyriform conidia, fell within the Magnaporthaceae cluster with high bootstrap support. *Pyricularia variabilis* was more related to *Dactylaria*, *Tumularia* or *Ochroconis* species than to the Magnaporthaceae. *Dactylaria* and species of *Nakataea*, *Ochroconis*, *Pyriculariopsis* and *Tumularia* were distinct from the Magnaporthaceae, and the genus *Dactylaria* is polyphyletic. The combination of morphological and molecular characters, such as spore morphology and ITS ribosomal DNA sequences data, suggested that conidial shape could be a primary character to distinguish *Pyricularia* from related genera.

Key Words: *Dactylaria*, ITS rDNA, phylogeny, systematics, 5.8S rDNA

INTRODUCTION

The genus *Pyricularia* (Cooke) Sacc. (anamorphic Magnaporthaceae) was established by Saccardo (1880) with the type species, *P. grisea* (Cooke) Sacc., which was originally described from crabgrass (*Digitaria sanguinalis* L.). The name “*Pyricularia*” refers to the pyriform shape of the conidia. Subsequently, Cavara (1892) described *P. oryzae* Cav. from rice (*Oryza sativa* L.), a taxon with very similar morphology to *P. grisea*. Despite the lack of obvious morphological differences, these two taxa have been maintained as separate species. Rossman et al (1990) argued that *P. oryzae* should be synonymised with *P. grisea* and grouped these two anamorphs under the teleomorph *Magnaportha grisea* (Hebert) Barr. Recent molecular genetic analyses have, however, indicated that *Pyricularia* species isolated from different hosts are genetically distinct (Borromeo et al 1993, Shull and Hamer 1994, Kato et al 2000). Based on RFLP and DNA sequence analysis, Borromeo et al (1993) and Kato et al (2000) suggested that the *Pyricularia* isolates from *Digitaria* sp. and rice represent distinct species. Using a molecular approach based on three genes (actin, beta-tubulin, and calmodulin), Couch and Kohn (2002)

described the teleomorph *Magnaporthe oryzae* B. Couch (associated with *Oryza sativa* and other cultivated grasses) as a species distinct from *M. grisea* (associated with the grass genus *Digitaria* Haller).

Pyricularia has been well-circumscribed (Ellis 1971, 1976), although the distinction between it and some *Dactylaria* species is not always clear (Goh and Hyde 1997). The conidiogenous cells of *Dactylaria* and *Pyricularia* are polyblastic, integrated on the conidiophores and sympodial, cylindrical, geniculate, and denticulate. The conidia are solitary, dry, acropleurogenous, simple, variously shaped, and hyaline to pale brown (Ellis 1971, 1976). In *Pyricularia*, however, denticles are usually cut off by a septum to form a separating cell (rhexolytic secession) and the conidia are mostly obpyriform. In *Dactylaria* there is no separating cell in the denticles (schizolytic secession) and the conidia are of various shapes, usually fusiform, naviculate, or more or less cylindrical (Ellis 1976). The presence of a separating cell and cylindrical denticles in *Pyricularia* were characteristics used by Ellis (1976) to delineate *Pyricularia* from *Dactylaria*. Furthermore, *Pyricularia* species are important pathogens, while *Dactylaria* species are usually saprobes (Cai et al 2002, Ho et al 2002, Bussaban et al 2003, Paulus et al 2003, Luo et al 2004).

Analysis of ribosomal DNA has frequently been used in mycological investigations (Bruns et al 1991). In this study, the phylogenetic relationships among 41 isolates of *Pyricularia* and related genera were determined by analyzing complete sequences of the ITS regions (including 5.8S rRNA gene). The aims were to determine whether the morphological characters used to distinguish between *Dactylaria* and *Pyricularia* are supported by molecular data, and also establish relationships with *Nakataea*, *Pyriculariopsis* and *Tumularia*, whose species were originally described in or transferred to *Pyricularia*. The potential of rDNA sequences in the analysis of anamorph-teleomorph relationships at the generic level or using sequence analysis of rDNA combined with PCR-fingerprinting to prove the connection between an anamorph species and an ascomycete has been demonstrated by various authors (Guadet et al 1989, Rehner and Samuels 1994, 1995, Kuhls et al 1997). A further aim of this study, therefore, was to establish whether molecular techniques can determine anamorph-teleomorph relationships of species of *Dactylaria* or *Pyricularia*.

MATERIALS AND METHODS

Fungal isolates and morphology.—Fungal isolates used in this study are listed in TABLE I. They were obtained from culture collections (International Collection of Microorganisms from Plants, Landcare Research, Auckland, New Zealand: ICMP; Mycotheque de l' Université Catholique de Louvain, Louvain-la-Neuve, Belgium: MUCL; National Institute of Technology and Evaluation Biological Resource Center, Osaka, Japan: NBRC) or from recently published case studies (Bussaban et al 2001a, 2001b, 2001c, 2003). These isolates were recovered from healthy plants, dead or decaying plant tissues, or those exhibiting symptoms of leaf blast, leaf spot, or leaf streak. For morphological study, mounts were prepared in lactophenol, examined using both differential interference phase contrast and bright-field phase contrast microscopy.

Extraction of genomic DNA.—Genomic DNA was extracted by an SDS-CTAB (sodium dodecyl sulfate-cetyltrimethylammonium bromide) method (Kim et al 1990). All isolates were grown in Nobles broth (1.2% malt extract) at 22 C for 10 days. Mycelia including conidia were harvested, freeze-dried, frozen in liquid nitrogen, and ground into a fine powder with a mortar and pestle.

About 15 mg of powdered mycelia including conidia were suspended in 1 mL of ice-cold lysis buffer (150 mM NaCl, 50 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 30 µg/mL proteinase K), transferred into 1.5 mL eppendorf tube, and kept at 4 C to prevent endonuclease activity during rehydration of the sample. SDS was added to a final concentration of 2%, vortexed, and incubated at 65 C for 30 min. After centrifugation for 15 min at 14 000 rpm, the supernatant was transferred to a new sterile 1.5 mL eppendorf tube. The volume of supernatant was measured and the NaCl concentration was then adjusted to 1.4 M and 1/10 volume of 10% CTAB buffer (10% CTAB, 500 mM Tris-HCl, 100 mM EDTA, pH 8.0) was added. The solution was then thoroughly mixed and incubated at 65 C for 10 min. After cooling at 15 C for 2 min, an equal volume of chloroform isoamyl alcohol (24:1 v/v) was added, thoroughly mixed, and the tube was centrifuged at 14,000 rpm for 15 min. The extraction was repeated until the interface was clear. The supernatant was removed to a new eppendorf tube, containing 2 volumes of cold 100% ethanol. After DNA precipitation, the pellet was centrifuged for 15 min at 14 000 rpm, 4 C. Then the pellet was washed with 70% ethanol and dried at room temperature. It was resuspended in 100 µL of 0.002% RNase (5 µg/mL) in TE buffer and incubated at 37 C for 1 h (Liou and Tzean 1997). The suspension was stored at -20 C pending use for PCR amplification.

PCR amplification and sequencing.—The internal transcribed spacer (ITS) regions 1 and 2, including 5.8S rDNA, were amplified in a 25 µL reaction on a GeneAmp 9700 thermal cycler (Applied Biosystems) under the following reaction conditions: 1 µL of template DNA at a 1:20 dilution of the DNA extraction, 0.2 mM each dNTP, 0.2 µL of FastTaq (Applied Biosystems), 0.2 µM each of primers ITS1 and ITS4, 2.5 µL of the supplied 10× PCR buffer with MgCl₂, and sterile water to bring volume to 25 µL. Thermal cycling was initiated by denaturation at 95 C for 4 min. This was followed by 35 cycles of denaturation at 94 C for 1 min, annealing at 45 C for 1 min, and extension at 72 C for 1 min, with a final extension at 72 C for 7 min. PCR products were analyzed by electrophoresis on 1% agarose gels in TAE buffer [20 mM Tris-Acetate, 1 mM EDTA, pH 8.0] (Sambrook et al 1989) and visualized by staining with ethidium bromide. Residual nucleotides and primers were removed using High Pure PCR Product Kit (Roche Molecular Biochemicals) according to the manufacturer's instructions. The amplified products were sequenced with BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems) on an ABI PRISM 310 or ABI PRISM 377 automated DNA sequencer. Sequences were determined on both strands using sequencing primers, ITS1 forward and ITS4 reverse (White et al 1990).

DNA sequence alignment and phylogenetic analysis.—Sequences were assembled using Sequencher 3.1.1 for Macintosh (Applied Biosystems). Sequences were submitted to <http://bioweb.pasteur.fr/seqanal/clustalw>, for multiple alignment using CLUSTAL W 1.82 (Thompson et al 1994), and manually adjusted using GeneDoc 2.6.002 (Nicholas and Nicholas 1997). Calculation of base pair (bp) differences was carried out by pairwise comparison of strains from the alignment. Twenty-six new sequences were deposited in GenBank with accession numbers AY265315–AY265340. Fifteen previously published sequences were obtained from GenBank for inclusion in analyses (TABLE II). Phylogenetic trees were inferred using PAUP*4.0b10 (Swofford 2002). Heuristic searches were performed using the criterion of maximum parsimony (MP) with tree-bisection-reconnection-branch swapping algorithm. Starting trees were obtained via stepwise addition with 100 random sequence input orders. The

1 parsimony tree scores including tree length, consistency index, retention index, rescaled
 2 consistency index, and homoplasy index (TL, CI, RI, RC and HI) were also calculated. The
 3 neighbor-joining (NJ) method based on a Kimura two-parameter distance measurement also was
 4 used to infer a phylogenetic tree. All molecular characters were unordered and given equal
 5 weight during analysis. Relative branch support was estimated with 1000 bootstrap replications
 6 (Felsenstein 1985) for NJ and MP analyses. Anamorphic Orbiliaceae, *Arthrobotrys amerospora*
 7 S. Schenck, W.B. Kendr. & Pramer, *A. musiformis* Drechsler and *Dactylella cylindrospora* (R.C.
 8 Cooke) A. Rubner were used to root for phylogenetic tree. DNA sequence alignment and trees
 9 were deposited in TreeBASE, accession number SN1368.

11 RESULTS

12 *DNA extraction, sequencing and alignment.*—The ITS region (covering ITS1 region, 5.8S gene
 13 and ITS2 region) were amplified from all *Pyricularia* and related species, and the sizes of these
 14 regions are listed in TABLE II. Boundaries of the ITS1 and ITS2 regions were determined by
 15 comparison with published sequences of the ITS region. ITS regions varied in length from 402 to
 16 623 bp. The length of the 5.8S gene was very consistent: 157 (± 1) bp for strains investigated. No
 17 sequence variation is detectable within species, and low among species within both the genera
 18 *Pyricularia* and *Gaeumannomyces*.

19 *Molecular phylogeny.*—Of 680 total characters in the aligned sequence data, maximum
 20 parsimony analysis was conducted for 442 potentially phylogenetically informative characters.
 21 Forty sites ambiguously aligned were excluded from the analysis to avoid fragmentary
 22 ambiguities. A total of 90 equally most parsimonious trees (TL=1967, CI=0.519, RI=0.698,
 23 RC=0.370 and HI=0.481) were obtained and compared for the best topology using the Kishino-
 24 Hasegawa test (FIG. 1). Those parsimony-informative characters in the alignment were also
 25 analyzed by means of the NJ method using the Kimura two-parameter distance measurement,
 26 assuming equal base frequencies of entire sequences across taxa, and unequal transition to
 27 transversion ratio. Supports for grouping in NJ trees were evaluated with 1000 bootstrap
 28 replications, which produced a similar tree topology, giving high bootstrap values for the
 29 relevant clades.

30 In the parsimony and distance analyses, most taxa were sorted into a large cluster,
 31 belonging to the family Magnaporthaceae with high bootstrap support (MP=99%, FIG. 1), while
 32 the remaining taxa were basal to this group. With the exception of *P. variabilis* Bussaban, all
 33 *Pyricularia* species studied fell within the Magnaporthaceae. In the MP tree *Nakataea fusispora*
 34 (Matsush.) Matsush. formed a sister taxon to the Magnaporthaceae with 82% bootstrap support
 35 (FIG. 1). The Magnaporthaceae is comprised of two sister taxa corresponding to the teleomorph
 36 genera *Magnaporthe* and *Gaeumannomyces*. The *Magnaporthe* clade included the type of the
 37 genus, *M. grisea* and the anamorphic species, *P. angulata* Hashioka, *P. costina* Sarbajna,
 38 *Pyricularia higginsii* Luttr., *P. juncicola* MacGarvie and *Pyricularia* sp. (ICMP14468,
 39 ICMP14469). The *Gaeumannomyces* clade was comprised of four *Gaeumannomyces* species,
 40 *Phialophora graminicola* (Deacon) J. Walker, *Pyricularia zingiberis* Nishik., and *P. longispora*
 41 Bussaban with 90% bootstrap support. Also in this clade, *Gaeumannomyces amomi* Bussaban
 42 and *Pyricularia zingiberis* isolates from Zingiberaceae plants were closely related with 100%
 43 bootstrap support. The *Gaeumannomyces* isolates from grass were also closely related to the
 44 Zingiberaceae isolates. *Gaeumannomyces cylindrosporus* D. Hornby, Slope, Gutter. & Sivan.

and *Phialophora graminicola* clustered with 100% bootstrap support, and *Pyricularia longispora* occurred separately.

The remaining taxa were distantly related to the Magnaporthaceae. In the MP analysis *Pyriculariopsis parasitica* (Sacc. & Berl.) M.B. Ellis formed a closely related cluster (100% bootstrap support) with *Dactylaria appendiculata* Cazau, Aramb. & Cabello and *Dactylaria* sp. ICMP14618. *Tumularia aquatica* (Ingold) Marvanová & Descals and *D. ampulliformis* (Tubaki) G.C. Bhatt & W.B. Kendr. are clustered but with low bootstrap support (64%). *Ochroconis humicola* (G.L. Barron & L.V. Busch) de Hoog & Arx and *D. purpurella* (Sacc.) Sacc. are clustered with 100% bootstrap support and formed a sister cluster to this former cluster with 75% bootstrap support. *Pyricularia variabilis* seems to be a completely different taxon to the other *Pyricularia* species studied. This species clustered with *Dactylaria* sp. isolate P24 (89% bootstrap support). They showed 24.4% of sequence variation and formed a sister group to members including the type species of *Dactylaria*, *D. purpurella*. However, this branch lacked bootstrap support. Similar clusters resulted in the NJ tree but with differing bootstrap support.

DISCUSSION

Molecular phylogeny and relationships of Pyricularia and related genera.—Species of the anamorphic fungus *Pyricularia* are typically plant pathogens, e.g., *P. oryzae* is a serious rice blast pathogen (Ou 1987). *Pyricularia grisea* is the cause of gray leaf spot of St Augustine grass (Malca and Owen 1957). Other *Pyricularia* species cause diseases on members of Cannaceae, Commelinaceae, Marantaceae, Musaceae and Zingiberaceae (Meredith 1963, Asuyama 1965, Hashioka 1971, 1973, Kotani and Kurata 1992, Pappas and Paplomatas 1998). Morphologically similar pathogens, *Pyricularia penniseti* Prasada & Goyal and *P. setariae* Nishik. have been reported on cereals and grasses (Nishikado 1917, Sprague 1950, Malca and Owen 1957, Bailey and van Eijnatten 1961, Asuyama 1965, Wells et al 1969, Prasada and Goyal 1970). *Pyricularia zingiberis*, *P. costina*, *P. curcumae* Rathaiah and *P. distorta* Hashioka are pathogenic on Zingiberaceae (Nishikado 1917, Hashioka 1971, Rathaiah 1980, Sarbajna 1990). Bussaban et al (2001a, 2001b, 2003) reported several *Pyricularia* species, including *P. costina*, living as endophytes in healthy wild gingers.

The criterion used by Ellis (1976) for separating *Pyricularia* from *Dactylaria* is that the conidia of *Pyricularia* secede in a rhexolytic manner, with the denticle acting as a separating cell, and with a protruding hilum on the conidia, whereas those of *Dactylaria* secede in a schizolytic manner. However, subsequent revisions of *Dactylaria* (de Hoog 1985, Goh and Hyde 1997) are not consistent with this method of conidiogenesis in *Dactylaria*. Two species originally described in *Pyricularia* (*P. higginsii* Luttr. and *P. juncicola* MacGarvie) that secede in a schizolytic manner, were transferred to *Dactylaria* (Ellis 1976). The name *Dactylaria juncicola* was already occupied, by a different fungus, *D. juncicola* (MacGarvie) G.C. Bhatt & W.B. Kendr., thus Ellis (1976) proposed the new name, *D. junci*. *Nakataea fusispora* was also transferred to *Pyricularia fusispora* because of its rhexolytic conidial secession (Zucconi et al 1984). However, the phylograms inferred from ITS sequence data presented here did not disclose any consistent correlation with the type of conidial secession. Nonetheless, it did reveal an interesting correlation between this clade and conidial morphology. With the exception of *P. variabilis*, all *Pyricularia* species studied including two species of *Pyricularia* (*P. higginsii* and *P. juncicola*, previously renamed *Dactylaria*) that have obpyriform conidia were grouped within the family Magnaporthaceae with high bootstrap support. This suggested the clade might

1 represent a monophyletic lineage of species with obpyriform conidia. Following this conidial
 2 morphology criterion, the originally named *Pyricularia higginsii* and *P. juncicola* should
 3 therefore be maintained in *Pyricularia*. Likewise, *Nakataea fusispora* should also be maintained
 4 in *Nakataea*, since this species has distinctive, verrucose, fusiform conidia and it formed a sister
 5 cluster to members in Magnaporthaceae.

6 *Pyricularia variabilis* was the only species of *Pyricularia* studied that did not group in
 7 the Magnaporthaceae. This taxon has swollen, terminal and intercalary nodes on the
 8 conidiophores, and variously shaped conidia. Analyses of ITS sequence data showed that *P.*
 9 *variabilis* was phylogenetically unrelated to the other *Pyricularia* species studied, but more
 10 related to *Dactylaria*, *Tumularia* or *Ochroconis* species. Further work is needed to establish the
 11 appropriate placement of this taxon and determine its relationships.

12 Our results indicated that the rest of *Dactylaria* and species of *Pyriculariopsis*, *Tumularia*
 13 and *Ochroconis* were distinct from the Magnaporthaceae, and that the genus *Dactylaria* is
 14 polyphyletic. *Dactylaria* is a form genus and includes species with many conidia born at the
 15 apical region of conidiophores on cylindrical or tapering denticles. Conidia are, however,
 16 variously shaped and therefore taxa may be unrelated. Furthermore, this type of conidiogenesis
 17 may have evolved more than once. Our results support this conjecture.

18 *Dactylaria purpurella* is the type species of *Dactylaria* and has short conidiophores with
 19 cylindrical or tapering denticles bearing navicular conidia. In the ITS sequence analysis it was
 20 clustered with *Ochroconis humicola* with 100% BS. *Ochroconis humicola* was described
 21 originally as a species of *Scolecobasidium* and subsequently included in *Ochroconis* (de Hoog
 22 and von Arx 1973). *Ochroconis* and *Scolecobasidium* are members of the *Dactylaria* complex
 23 characterized by rhexolytic conidium secession and pale brown conidia. Most species of
 24 *Ochroconis* have ellipsoidal, clavate or fusiform conidia, while *Scolecobasidium* species have
 25 trilobate conidia (de Hoog and von Arx 1973, de Hoog 1985). The other species of *Dactylaria*
 26 appear to be unrelated to *D. purpurella* and further work is needed to understand this genus
 27 complex.

28 *Tumularia aquatica* and *Pyriculariopsis parasitica* were originally described in
 29 *Pyricularia* and later accommodated in newly introduced genera (Ingold 1943, Hughes 1958,
 30 Ellis 1971, Marvanová and Descals 1987). *Tumularia aquatica* differs from *Pyricularia* in
 31 lacking denticles and having lemon-shaped conidia. *Pyriculariopsis parasitica* differs in having
 32 straight or curved, obclavate, rostrate conidia. The exclusion of these taxa from *Pyricularia* is,
 33 therefore, justified and supported by morphological and molecular data.

34
 35 *Anamorph-teleomorph connections.*— Anamorphic fungi that have not been linked to any
 36 teleomorphs make up a large proportion of known fungi. The inability to identify such links lies
 37 in inherent difficulties in experimentally proving anamorph-teleomorph connections and the fact
 38 that many fungi will not sporulate in culture. The present classification system for anamorphic
 39 genera therefore uses three categories of information to identify taxa (Kirk et al 2001):
 40 conidiomatal types, Saccardo's spore groups, and conidiogenous events. Relationships suggested
 41 by such information, however, do not necessarily reflect evolutionary relationships (Hawksworth
 42 et al 1995), and the need for identifying relationships of anamorphs with their teleomorphs using
 43 molecular techniques has been advocated by Rossman et al (2001). *Dactylaria* and *Pyricularia*
 44 have similar types of conidiogenesis and spore types, and are hyphomycetes (Ellis 1976).
 45 Species of *Pyricularia* have been characterized by morphological, physiological or molecular

information (Ellis 1971, 1976, Matsuyama et al 1977, Kato et al 2000, Couch and Kohn 2002), and have been linked to *Magnaporthe* teleomorphs (Hebert 1971, Kato et al 1976). Species of *Dactylaria* differ from *Pyricularia* in the absence of a separating cell in the denticles and the conidia also are of various shapes, usually fusiform, naviculate, or more or less cylindrical (Ellis 1976). Teleomorphs of *Dactylaria* species have not been commonly reported. Carmichael et al (1980) mentioned the occurrence of an anamorph for *Acrospermum compressum* Tode. This anamorph bears some similarity to *Subulispora minima* P.M. Kirk and to *Dactylaria graminicola* Årsvoll. Sivichai et al (2002) reported a teleomorph-anamorph connection between an unidentified teleomorph and *Dactylaria*.

Carbone and Kohn (1993) demonstrated the confirmations of anamorph-teleomorph connection by comparative sequence analysis of amplified products of *Sclerotinia* and *Sclerotium*, which showed 98% sequence homology in the ITS region of rDNA. Kuhls et al (1997) established the connection between *Trichoderma* anamorphs and *Hypocrea* teleomorphs where five *Trichoderma-Hypocrea* connections were supported by 100% identity in ITS1 and ITS2 sequences. Egger and Sigler (1993) investigated the ex type strains of the anamorph *Scytalidium vaccinii* Dalpé, Litten & Sigler and the ascomycete *Hymenoscyphus ericae* (D.J. Read) Korf & Kernan. They found 1.2–3.5% divergence in the ITS1 and ITS2 regions, and concluded from these data and morphological observations that *S. vaccinii* and *H. ericae* are anamorph and teleomorph of a single taxon. In our study, phylogenies showed *Pyricularia zingiberis* and *Gaeumannomyces amomi* isolated from Zingiberaceae plants were strongly grouped and closely related to other *Gaeumannomyces* species from grasses. Our isolates from Zingiberaceae contained up to 6 nucleotide differences in the entire ITS sequences, while nucleotide sequences of *P. zingiberis* isolate NBRC9624 and *G. amomi* isolate ICMP14648 were identical. Geographical separation or host specialisation (TABLE I) could be an explanation for the nucleotide sequence differences present in *P. zingiberis* from Japan, isolates MUCL9449 (*Zingiber officinale* Rosc.) and NBRC9624 (*Zingiber mioga* Rosc.), in comparison with *G. amomi* isolates ICMP14650 (*Alpinia malaccensis* (Burm.) Rosc.) and ICMP14648 (*Amomum siamense* Craib.) from Thailand. However, information from a larger number of isolates is required to confirm this. According to ITS sequences, and a distinct morphological character of sickle-shaped conidia, *Harpophora* W. Gams, a genus comprising phialidic anamorphs of the Magnaporthaceae was introduced with *H. radiculicola* (Cain) W. Gams (= *Phialophora radiculicola* Cain) as type (Ward and Bateman 1999, Gams 2000). A connection between *H. graminicola* (Deacon) W. Gams (= *P. graminicola* (Deacon) J. Walker) and *Gaeumannomyces cylindrosporus* was also supported by ITS sequences similarity (Walker 1980, Bryan et al 1995). Likewise, Couch and Kohn (2000) extracted DNA directly from freeze-dried perithecia of *Magnaporthe* and mycelial of anamorphic *Pyricularia* isolates and the result, based on three genes (actin, beta-tubulin and calmodulin), supported the anamorph-teleomorph connection demonstrated by Hebert (1971) and Yaegashi (1977). Our results are consistent with the possibility that heterogenous *P. zingiberis* may be the anamorph state of *Gaeumannomyces amomi*.

Molecular studies have suggested that *Pyricularia* spp. isolated from different hosts are genetically distinct (Borromeo et al 1993, Shull and Hamer 1994, Kato et al 2000, Couch and Kohn 2002, Goodwin et al 2003) or provided information on the genetic diversity among different population of rice blast fungi, *Pyricularia grisea* or *P. oryzae* (Lebrun et al 1991, Levy et al 1991, Zhu et al 1992, Chen et al 1995, George et al 1998). In our study, the combination of morphological characters (e.g. spore morphology) and molecular characters (ITS ribosomal

DNA sequences data) may confidently allow us to distinguish *Pyricularia* from *Dactylaria* species, especially if sexual structures are not readily produced in culture. We conclude that conidial shape can be used as a primary character to distinguish *Pyricularia* species from related genera such as *Dactylaria*.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by The Thailand Research Fund (Royal Golden Jubilee Ph. D. Program 4B4M/43/D1, BGJ 4680011) and The Biodiversity and Training Program (BRT 142006). International Collection of Microorganisms from Plants (ICMP), National Institute of Technology and Evaluation Biological Resource Center (NBRC), and Mycotheque de l'Universite Catholique de Louvain-la-Neuve (MUCL), and B. Paulus provided some isolates of *Pyricularia* and related genera. J.M. Young, M. Fletcher and R. Kodsueb are thanked for culture arrangement. Landcare Research, Auckland provided facilities and resources for B. Bussaban to carry out much of this work.

LITERATURE CITED

- Asuyama H. 1965. Morphology, taxonomy, host range, and life cycle of *Pyricularia oryzae*. In: Chandler RF Jr. ed. The rice blast disease. USA: The Johns Hopkins Press. p 9–22.
- Bailey AG, van Eijnatten C. 1961. Corn gray spot caused by *Pyricularia grisea*. Phytopathology 51:197–198.
- Borromeo ES, Nelson RJ, Bonman JM, Leung H. 1993. Genetic differentiation among isolates of *Pyricularia* infecting rice and weed hosts. Phytopathology 83:393–399.
- Bruns TD, White TJ, Taylor JW. 1991. Fungal molecular systematics. Ann Rev Ecol Syst 22:525–564.
- Bryan GT, Daniels MJ, Osbourn AE. 1995. Comparison of fungi within the *Gaeumannomyces-Phialophora* complex by analysis of ribosomal DNA sequences. Appl Environm Microb 61:681–689.
- Bussaban B, Lumyong S, Lumyong P, McKenzie EHC, Hyde KD. 2001a. Endophytic fungi from *Amomum siamense*. Canad J Microbiol 47:943–948.
- Bussaban B, Lumyong S, Lumyong P, McKenzie EHC, Hyde KD. 2001b. Endophytic fungi from Zingiberaceae: *Alpinia malaccensis*. Phytopathology 91:S104. Publication no. P-2001-0023-MSA.
- Bussaban B, Lumyong S, Lumyong P, Hyde KD, McKenzie EHC. 2001c. Two new species of endophytes (ascomycetes) from Zingiberaceae sporulating in culture. Nova Hedw 73:487–493.
- Bussaban B, Lumyong S, Lumyong P, Hyde KD, McKenzie EHC. 2003. Three new species of *Pyricularia* are isolated as Zingiberaceous endophytes from Thailand. Mycologia 95:521–526.

- 1 Cai L, Tsui CKM, Zhang K, Hyde KD. 2002. Aquatic fungi from Lake Fuxian, Yunnan, China.
2 Fungal Diversity 9:57–70.
- 3
- 4 Carbone I, Kohn LM. 1993. Ribosomal DNA sequence divergence within internal transcribed
5 spacers 1 of the Sclerotiniaceae. Mycologia 85:415–427.
- 6
- 7 Carmichael JW, Kendrick WB, Connors IL, Sigler L. 1980. Genera of Hyphomycetes. Alberta,
8 Canada: The University of Alberta Press. 386 p.
- 9
- 10 Cavara F. 1892. Contribuzione alla micologia lombarda. Atti Ist Bot Univer Lab Crittogam
11 Pavia Ser 2, 2:207–292.
- 12
- 13 Chen D, Zeigler RS, Leung H, Nelson RJ. 1995. Population structure of *Pyricularia grisea* at
14 two screening sites in the Philippines. Phytopathology 85:1011–1020.
- 15
- 16 Couch BC, Kohn LM. 2002. A multilocus gene genealogy concordant with host preference
17 indicates segregation of a new species, *Magnaporthe oryzae*, from *M. grisea*. Mycologia 94:683–
18 693.
- 19
- 20 de Hoog GS. 1985. Taxonomy of the *Dactylaria* complex, IV. *Dactylaria*, *Neta*, *Subulispora* and
21 *Scolecobasidium*. Stud Mycol 26:1–60.
- 22
- 23 de Hoog GS, von Arx JA. 1973. Revision of *Scolecobasidium* and *Pleurophragmium*. Kavaka
24 1:55–60.
- 25
- 26 Egger KN, Sigler L. 1993. Relatedness of the ericoid endophytes *Scytalidium vaccinii* and
27 *Hymenoscyphus ericae* inferred from analysis of ribosomal DNA. Mycologia 85:219–230.
- 28
- 29 Ellis MB. 1971. Dematiaceous hyphomycetes. Kew, England: Commonwealth
30 Mycological Institute. 680 p.
- 31
- 32 Ellis MB. 1976. More dematiaceous hyphomycetes. Kew, England: Commonwealth
33 Mycological Institute. 507 p.
- 34
- 35 Felsenstein J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap.
36 Evolution 39:783–791.
- 37
- 38 Gams W. 2000. *Phialophora* and some similar morphologically little-differentiated anamorphs
39 of divergent ascomycetes. Stud Mycol 45:187–199.
- 40
- 41 George MLC, Nelson RJ, Zeigler RS, Leung H. 1998. Rapid Population analysis of
42 *Magnaporthe grisea* by using rep-PCR and endogenous repetitive DNA sequences.
43 Phytopathology 88:223–229.
- 44

- 1 Goh TK, Hyde KD. 1997. A revision of *Dactylaria*, with description of *D. tunicata* sp.
2 nov. from submerged wood in Australia. Mycol Res 101:1265–1272.
- 3
- 4 Goodwin SB, Levy M, Cavaletto JR, Tian Y. 2003. Phylogenetic analyses place
5 *Magnaporthe grisea* in the order Diaporthales and suggest rapid speciation. 8th
6 International Congress of Plant Pathology. Christchurch, New Zealand. Abstracts, vol. 2.
7 p. 349.
- 8
- 9 Guadet J, Julien J, Lafay JF, Brygoo Y. 1989. Phylogeny of some *Fusarium* species as
10 determined by large-subunit rRNA sequence comparison. Mol Biol Evol 6:227–242.
- 11
- 12 Hashioka Y. 1971. Notes on *Pyricularia* I. Three species parasitic to Musaceae,
13 Cannaceae and Zingiberaceae. Trans Mycol Soc Japan 12:126–135.
- 14
- 15 Hashioka Y. 1973. Notes on *Pyricularia* II. Four species and one variety parasitic to
16 Cyperaceae, Gramineae and Commelinaceae. Trans Mycol Soc Japan 14:256–265.
- 17
- 18 Hawksworth DL, Kirk MP, Sutton BC, Pegler DN. 1995. Dictionary of the fungi. 8th ed.
19 Surrey, England: CAB International. 616 p.
- 20
- 21 Hebert TT. 1971. The perfect stage of *Pyricularia grisea*. Phytopathology 61:83–87.
- 22
- 23 Ho WH, Yanna, Hyde KD, Hodgkiss IJ. 2002. Seasonality and sequential occurrence of fungi on
24 wood submerged in Tai Po Kau Forest Stream, Hong Kong. Fungal Diversity 10:21–43.
- 25
- 26 Hughes SJ. 1958. Revisiones hyphomycetum aliquot cum appendice de nominibus
27 rejiciendis. Canad J Bot 36:727–836.
- 28
- 29 Ingold CT. 1943. Further observations on aquatic hyphomycetes of decaying leaves. Trans
30 Brit Mycol Soc 26:105–115.
- 31
- 32 Kato H, Yamaguchi T, Nishihara N. 1976. The perfect stage of *Pyricularia oryzae* Cav. in
33 culture. Ann Phytopath Soc Japan 42:507–510.
- 34
- 35 Kato H, Yamamoto M, Yamaguchi-Ozaki T, Kadouchi H, Iwamoto Y, Nakayashiki H, Tosa Y,
36 Mayama S, Mori N. 2000. Pathogenicity, mating ability and DNA restriction fragment length
37 polymorphisms of *Pyricularia* populations isolated from Gramineae, Bambusideae and
38 Zingiberaceae plants. J Gen Plant Pathol 66:30–47.
- 39
- 40 Kim WK, Mauthe W, Hausner G, Klassen GR. 1990. Isolation of high molecular weight DNA
41 and double-stranded RNAs from fungi. Canad J Bot 68:1898–1902.
- 42
- 43 Kirk PM, Cannon PF, David JC, Stalpers JA. 2001. Dictionary of the fungi. 9th ed. Surrey,
44 England: CAB International. 655 p.
- 45

- 1 Kotani S, Kurata M. 1992. Black blotch of rhizome by *Pyricularia zingiberi* Nishikado. Ann
2 Phytopath Soc Japan 58:469–472.
- 3
- 4 Kuhls K, Lieckfeldt E, Samuels GJ, Meyer W, Kubicek CP, Börner T. 1997. Revision of
5 *Trichoderma* sect. *Longibrachiatum* including related teleomorphs based on analysis of
6 ribosomal DNA internal transcribed spacer sequences. Mycologia 89:442–460.
- 7
- 8 Lebrun MH, Capy MP, Garcia N, Dutertre M, Brygoo Y, Notteghem JL, Vales M. 1991.
9 Biology and genetics of *Pyricularia oryzae* and *P. grisea* populations: current situation
10 and development of RFLP markers. In: Rice genetics 2. Proceedings of the Second
11 International Rice Genetics Symposium. IRRI. Los Banos, Laguna, The Philippines. p
12 487–497.
- 13
- 14 Levy M, Ramao J, Marchetti MA, Hamer JE. 1991. DNA fingerprinting with a dispersed
15 repeated sequence resolves pathotype diversity in the rice blast fungus. Plant Cell 3:95–102.
- 16
- 17 Liou GY, Tzean SS. 1997. Phylogeny of the genus *Arthrobotrys* and allied nematode-trapping
18 fungi based on rDNA sequences. Mycologia 89:876–884.
- 19
- 20 Luo J, Yin JF, Cai L, Zhang KQ, Hyde KD. 2004. Freshwater fungi in Lake Dianchi, a heavily
21 polluted lake in Yunnan, China. Fungal Diversity 16 (In Press)
- 22
- 23 Malca MI, Owen JH. 1957. The gray leaf spot disease of St. Augustine grass. Plant Dis Rep
24 41:874–875.
- 25
- 26 Marvanová L, Descals E. 1987. New taxa and new combinations of ‘aquatic hyphomycetes’.
27 Trans Brit Mycol Soc 89:499–507.
- 28
- 29 Matsuyama N, Kato H, Yamaguchi T. 1977. Comparison of the isozyme patterns of extracellular
30 enzymes in *Pyricularia* strains from gramineous and zingiberaceous plants. Ann Phytopath Soc
31 Japan 43:419–425.
- 32
- 33 Meredith DS. 1963. *Pyricularia grisea* (Cooke) Sacc. causing pitting disease of bananas in
34 central America. I. Preliminary studies on pathogenicity. Ann Appl Biol 52:453–463.
- 35
- 36 Nicholas KB, Nicholas HB Jr. 1997. GeneDoc: a tool for editing and annotating multiple
37 sequence alignments. <http://www.psc.edu/biomed/genedoc>
- 38
- 39 Nishikado Y. 1917. Studies on the rice blast fungus. I. Ber Ohara Inst Landwirtsch Forsch
40 1:171–217.
- 41
- 42 Ou SH. 1987. Rice diseases. 2nd ed. Kew, England: CAB International. 380 p.
- 43
- 44 Pappas AC, Paplomatas EJ. 1998. *Pyricularia* leaf spot: a new disease of ornamental plants of
45 the family Marantaceae. Plant Dis 82:465–469.

- 1
- 2 Paulus B, Gadek P, Hyde KD. 2003. Two new species of *Dactylaria* (anamorphic fungi) and an
- 3 update of species in *Dactylaria* sensu lato. Fungal Diversity 14:157–170.
- 4
- 5 Prasada R, Goyal JP. 1970. A new species of *Pyricularia* on Bajra. Curr Sci 39:287–288.
- 6
- 7 Rathaiah Y. 1980. Leaf blast of turmeric. Plant Dis 64:104–105.
- 8
- 9 Rehner SR, Samuels GJ. 1994. Taxonomy and phylogeny of *Gliocladium* analyzed by large
- 10 subunit rDNA sequences. Mycol Res 98:625–634.
- 11
- 12 Rehner SR, Samuels GJ. 1995. Molecular systematics of the Hypocreales: a teleomorph gene
- 13 phylogeny and the status of their anamorphs. Canad J Bot 73:S816–S823.
- 14
- 15 Rossman AY, Howard RJ, Valent B. 1990. *Pyricularia grisea*, the correct name for the rice blast
- 16 disease fungus. Mycologia 82:509–512.
- 17
- 18 Rossman AY, Farr DF, Castlebury LA. 2001. Phylogenetic relationships among obscure
- 19 microfungi: Why does it matter? Phytopathology 91:S164. Publication no. P-2001-0119-MSA.
- 20
- 21 Saccardo PA. 1880. Fungorum extra-europaeorum Pugillus. Michelia 2:136–149.
- 22
- 23 Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd ed. New
- 24 York, USA: Cold Spring Harbor Press. 1592 p.
- 25
- 26 Sarbajna KK. 1990. New species of *Mycovellosiella* and *Pyricularia* from West Bengal. J
- 27 Mycopath Res 28:159–164.
- 28
- 29 Shull V, Hamer JE. 1994. Genomic structure and variability in *Pyricularia grisea*. In: Zeigler R,
- 30 Leong SA, Teng PS. eds. Rice blast disease. Wallingford, England: CAB International. p 65–86.
- 31
- 32 Sivichai S, Jones EBG, Jones NLH. 2002. Lignicolous freshwater higher fungi with reference to
- 33 their teleomorph and anamorph stages. In: Watling R, Frankland JC, Ainsworth AM, Isaac S,
- 34 Robinson CH. eds. Tropical mycology. Wallingford, England: CAB International. p 41–49.
- 35
- 36 Sprague R. 1950. Disease of cereals and grasses in North America. New York, USA: Ronald
- 37 Press. 538 p.
- 38
- 39 Swofford DL, 2002. PAUP*: Phylogenetic analysis using parsimony (* and other methods), beta
- 40 version 4.0b10. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates.
- 41
- 42 Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of
- 43 progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap
- 44 penalties and weight matrix choice. Nuc Acids Res 22:4673–4680.
- 45

- 1 Walker J. 1980. *Gaeumannomyces*, *Linocarpon*, *Ophiobolus* and several other genera of
2 scolecospored ascomycetes and phialophora conidial states, with a note on hyphopodia.
3 Mycotaxon 11:1–129.
4
- 5 Ward E, Bateman GL. 1999. Comparison of *Gaeumannomyces*- and *Phialophora*-like fungal
6 pathogens from maize and other plants using DNA methods. New Phytol 141:323–331.
7
- 8 Wells HD, Burton GW, Powell JB. 1969. *Piricularia* leaf spot of pearl millet. Phytopathology
9 59:1057.
10
- 11 White TJ, Bruns TD, Lee S, Taylor JW. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal
12 ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ. eds.
13 PCR protocols: a guide to methods and applications. San Diego: Academic Press. p 315–322.
14
- 15 Yaegashi H. 1977. On the sexuality of blast fungi, *Pyricularia* spp. Ann Phytopath Soc Japan
16 43:432–439.
17
- 18 Zhu H, Jiang W, Wang J, Lei C, Ling Z, Zhu L. 1992. DNA fingerprint and pathotype
19 characterization of *Pyricularia oryzae* isolates. Mycosystema 5:89–98.
20
- 21 Zucconi L, Onofri S, Persiani AM. 1984. Rare or interesting hyphomycetes from tropical forest
22 litter. II. *Pyricularia fusispora* comb. nov., a new species combination for the species *Nakataea*
23 *fusispora*. Mic Ital 2:7–10.
24

TABLE I. The sources of *Pyricularia* isolates and allied genera used for ITS1-5.8S-ITS2 rDNA sequence analysis

Genus and species	Strain No. ^a	Original substrate	Habitat	Geographic origin
<i>Dactylaria ampulliformis</i> (Tubaki) G.C. Bhatt & W.B. Kendr.	ICMP3660	<i>Cocos nucifera</i>	leaf streak	Japan
<i>D. appendiculata</i> Cazau, Aramb. & Cabello	ICMP14617	<i>Uncinia</i> sp.	dead culm	New Zealand
<i>D. purpurella</i> (Sacc.) Sacc.	NBRC9336	<i>Castanopsis cuspidata</i> var. <i>sieboldii</i>	submerged balsa wood	Japan
<i>Dactylaria</i> sp.	P24	<i>Cortaderia</i> sp.	dead leaf	New Zealand
<i>Dactylaria</i> sp.	ICMP14618	<i>Uncinia</i> sp.	dead culm	New Zealand
<i>Gaeumannomyces amomi</i> Bussaban	ICMP14650	<i>Alpinia malaccensis</i>	healthy pseudostem	Thailand
<i>G. amomi</i>	ICMP14648	<i>Amomum siamense</i>	healthy leaf	Thailand
<i>Nakataea fusispora</i> (Matsush.) Matsush.	MUCL39228	<i>Myricus</i> sp.	-	Cuba
<i>N. fusispora</i>	MUCL40987	-	decaying leaf	Venezuela
<i>Ochroconis humicola</i> (G.L. Barron & L.V. Busch) de Hoog & Arx	ICMP14434	<i>Cryptocarya mackionianna</i>	decaying leaves	Australia
<i>Pyricularia angulata</i> Hashioka	NBRC9625	<i>Musa sapientum</i>	rotten leaf	Japan
<i>P. costina</i> Sarbajna	ICMP14436	<i>Am. siamense</i>	healthy leaf	Thailand
<i>P. costina</i>	ICMP14437	<i>Al. malaccensis</i>	healthy leaf	Thailand
<i>P. costina</i>	ICMP14609	<i>Al. malaccensis</i>	leaf spot	Thailand
<i>P. higginsii</i> Luttr.	ICMP14707	<i>Microleana avenacea</i>	leaf spot	New Zealand
<i>P. higginsii</i>	ICMP14620	<i>M. avenacea</i>	dead leaf	New Zealand
<i>P. juncicola</i> MacGravie	ICMP14625	<i>Carex</i> sp.	dead leaf	New Zealand
<i>P. juncicola</i>	P17	<i>Uncinia</i> sp.	dead panicle	New Zealand
<i>P. longispora</i> Bussaban	ICMP14608	<i>Am. siamense</i>	healthy leaf	Thailand
<i>P. variabilis</i> Bussaban	ICMP14487	<i>Am. siamense</i>	healthy leaf	Thailand
<i>P. zingiberis</i> Nishik.	NBRC9624	<i>Zingiber mioga</i>	-	Japan
<i>P. zingiberis</i>	MUCL9449	<i>Z. officinale</i>	-	Japan
<i>Pyricularia</i> sp.	ICMP14468	<i>Stenotaphrum secundatum</i>	leaf spot	New Zealand
<i>Pyricularia</i> sp.	ICMP14469	<i>Digitaria sanguinalis</i>	leaf spot	New Zealand
<i>Pyriculariopsis parasitica</i> (Sacc. & Berl.) M.B. Ellis	MUCL9450	<i>Phyllachora graminis</i>	-	USA
<i>Tumularia aquatica</i> (Ingold) Marvanová & Descals	MUCL28096	<i>Quercus</i> sp.	-	UK

^a ICMP: International Collection of Microorganisms from Plants, Landcare Research, Auckland, New Zealand; NBRC: National Institute of Technology and Evaluation Biological Resource Center, Osaka, Japan; MUCL: Mycotheque de l' Université Catholique de Louvain, Belgium.

TABLE II. The PCR product size (bp) and GenBank sequence accession numbers of ITS1-5.8S-ITS2 of *Pyricularia* and allied fungi

Genus and species	ITS1	5.8S	ITS2	Total	GenBank accession no.
<i>Arthrobotrys amerospora</i>	214	156	193	563	AF106533
<i>A. musiformis</i>	203	157	167	527	U51948
<i>Dactylaria ampulliformis</i> ICMP3660	151	157	209	517	AY265336
<i>D. appendiculata</i> ICMP14617	220	158	230	608	AY265339
<i>D. dimorphospora</i>	159	157	147	463	U51980
<i>D. lanosa</i>	155	157	162	474	U51979
<i>D. purpurella</i> NBRC9336	242	156	225	623	AY265335
<i>Dactylaria</i> sp. P24	201	157	199	557	AY265332
<i>Dactylaria</i> sp. ICMP14618	220	158	230	608	AY265338
<i>Dactylella cylindrospora</i>	185	156	207	548	AF106538
<i>D. cylindrospora</i>	185	156	183	524	U51953
<i>Gaeumannomyces amomi</i> ICMP14648	142	157	185	484	AY265318
<i>G. amomi</i> ICMP14650	140	157	187	484	AY265317
<i>G. caricis</i>	164	157	174	495	AJ010030
<i>G. cylindrosporus</i>	174	157	174	505	AJ010029
<i>G. cylindrosporus</i>	175	157	174	506	U17211
<i>G. graminis</i>	137	157	172	466	AJ010034
<i>G. graminis</i> var. <i>tritici</i>	156	157	171	484	AF087684
<i>Magnaporthe grisea</i>	124	157	174	455	U17329
<i>M. grisea</i>	124	157	174	455	U17328
<i>Nakataea fusispora</i> MUCL39228	64	157	184	405	AY265330
<i>N. fusispora</i> MUCL40987	64	157	181	402	AY265331
<i>Ochroconis humicola</i> ICMP14434	248	156	214	618	AY265334
<i>Phialophora graminicola</i>	175	157	174	506	U17218
<i>Pyricularia angulata</i> NBRC9625	113	157	231	501	AY265322
<i>P. costina</i> ICMP14436	128	157	191	476	AY265327
<i>P. costina</i> ICMP14437	125	157	192	474	AY265328
<i>P. costina</i> ICMP14609	159	157	228	544	AY265329
<i>P. higginsii</i> ICMP14707	153	157	225	535	AY265326
<i>P. higginsii</i> ICMP14620	149	157	219	525	AY265325
<i>P. juncicola</i> ICMP14625	151	157	225	533	AY265320
<i>P. juncicola</i> P17	152	157	225	534	AY265321
<i>P. longispora</i> ICMP14608	195	157	186	538	AY265319
<i>P. variabilis</i> ICMP14487	180	157	182	519	AY265333
<i>P. zingiberis</i> MUCL9449	133	157	193	483	AY265315
<i>P. zingiberis</i> NBRC9624	129	157	186	472	AY265316
<i>Pyricularia</i> sp. ICMP14468	154	157	232	543	AY265323
<i>Pyricularia</i> sp. ICMP14469	157	157	236	550	AY265324
<i>Pyriculariopsis parasitica</i> MUCL9450	228	158	194	580	AY265340
<i>Tumularia aquatica</i> MUCL28096	165	157	208	530	AY265337
<i>T. aquatica</i>	134	157	149	440	AY148101

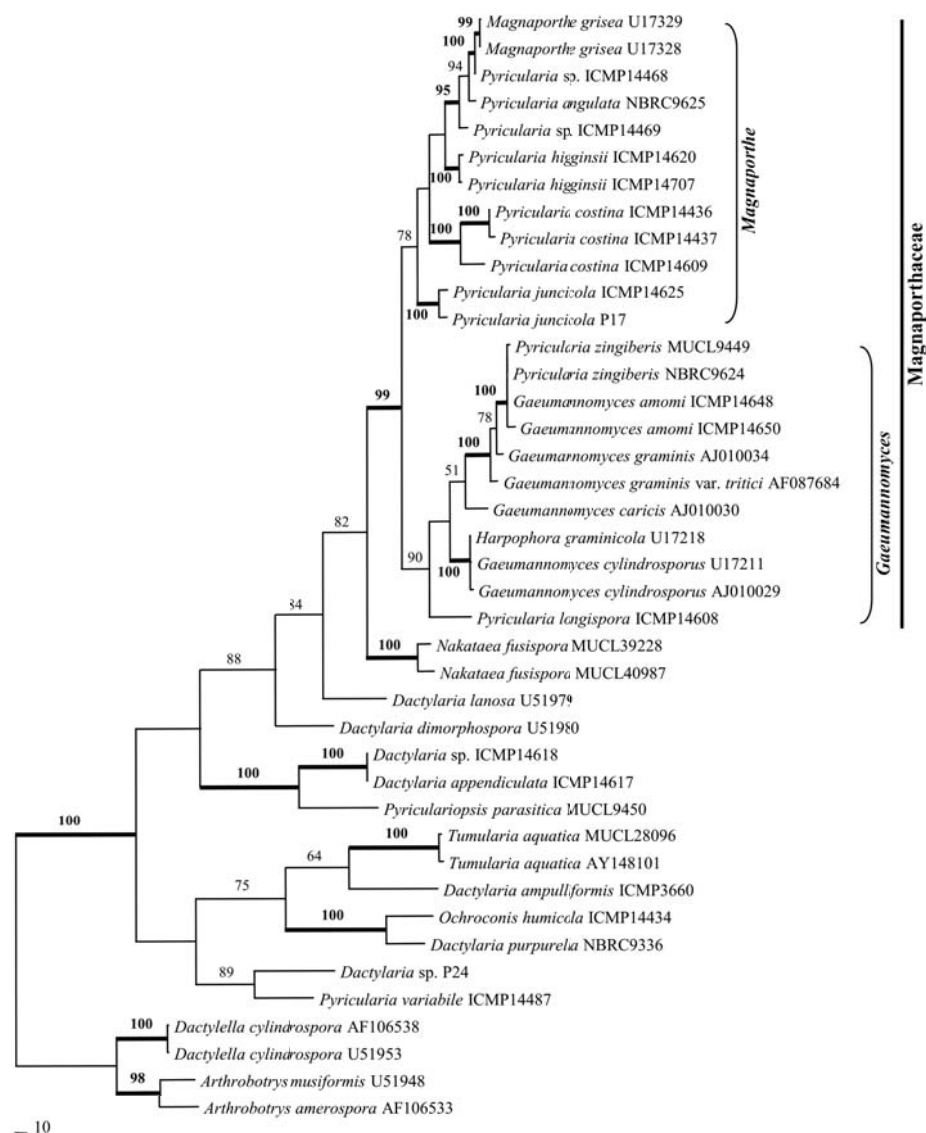


FIG. 1. One of 90 equally most parsimonious trees inferred from a heuristic search of the ITS1-5.8S-ITS2 rDNA sequence alignment of 41 isolates of *Pyricularia* and related genera. *Dactylella* and *Arthrobotrys* were used to root the tree. The size of the branches is indicated with a scale bar. The bootstrap values representing 1000 bootstrap replications are given (when more than 50%) above or below the branches. Branches $\geq 95\%$ are strongly supported (Felsenstein 1985) and are shown in bold.

¹Corresponding author, Email: scboi009@chiangmai.ac.th

Evaluation of endophytic fungi from Zingiberaceae for antibiotic production

SAISAMORN LUMYONG¹, BOONSOM BUSSABAN¹, PIPOB LUMYONG², KEVIN D. HYDE³, ERIC H.C. MCKENZIE⁴, KOZO ASANO⁵, FUSAO TOMITA⁵

¹Department of Biology, Faculty of Science, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand, ²Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand, ³Center for Research in Fungal Diversity, Department of Ecology & Biodiversity, The University of Hong Kong, Pokfulam Road, Hong Kong SAR, China ⁴Landcare Research, Private Bag 92170, Auckland, New Zealand, ⁵Laboratory of Applied Microbiology, Graduate School of Agriculture, Hokkaido University, Sapporo 060, Japan

Endophytic fungi were isolated from two wild ginger species *Alpinia malaccensis* and *Amomum siamense*. The efficiency of 78 representative strains, including five new species of endophytic fungi, in inhibiting the *in vitro* growth of *Candida albicans* and *Penicillium avellaneum* was investigated using F1 and F2 medium. Inhibition of *C. albicans* and *P. avellaneum*, was observed with 12 and 28 isolates respectively, from the two host species. Eight isolates were active against both test organisms. *Papulaspora* sp. CMUZE0118 was the most active against *C. albicans* while the unidentified mycelia sterilia, strain CMUZE0132, produced the largest inhibition zone against *P. avellaneum*. One new species, *Gaeumannomyces amomi*, grown on PDB medium, showed inhibition of *C. albicans*. Isolation of the bioactive component from the culture broth was carried out on a resin HP20 and silica gel column chromatography and a hydrophobic compound was recovered in acidic condition and the hydrophobicity will decrease in alkaline condition. The chemical composition study by mass spectrophotometry is C₂₀H₂₉O₆.

Key words: *Gaeumannomyces amomi*, anticancer, Zingiberaceae, endophyte, anti-yeast

Introduction

Antibiotic resistance is a major problem of this century. Consequently, pharmaceutical companies have faced repeated crises when new forms of antibiotic resistance emerged in a previously susceptible pathogen. Other problems that need attention include the new epidemics of old strains of pathogens, which have restored virulence again such as HIV and Avian flu. Therefore, resistance remains an important driving force for new drug discovery. It is an evident that the resistance is an ongoing problems even as new drug are discovered and sold in the market [1].

There is an urgent need and good reasons, scientific, medical and commercial, for the continued search for new antimicrobial antibiotics. Many intelligent screening methods have been applied in the search for novel molecules. One approach has involved the investigation of the microbes associated with medicinal plants. From such an approach, the antitumor drug, taxol, was discovered as a produced by *Taxomyces andreana*, an endophytic fungus isolated from pacific yew (*Taxus brevifolia*) [2]. Over the last 20 years, filamentous fungi have been a consistent source of biochemical innovations in natural product screening program [3]. The search of novel metabolites did not appear to be link to a particular morphological group of organisms [4], hence the biodiversity of fungi seems to be promising for discovery of novel compounds. Endophytic fungi have been shown to be a significant source of novel compounds which have proved effective against diseases such as cancer and infectious diseases including malaria, viruses e.g., herpes simplex virus type 1 [5].

Zingiberaceae such as ginger is the most popular plants in Thailand and as important as both a food ingredient worldwide and as a medicine for local people. The wild species are of interest as a source of endophytic fungi with their potential as a

resource for novel bioactive compound production. This paper describes the isolation of fungi from these plants, and a preliminary screening of crude preparations (i.e., culture broth) of their metabolites for antifungal activity.

Materials and Methods

Isolation and Identification: Ten plants of each host, *Alpinia malaccensis* and *Amomum siamense*, were randomly collected from each of two local habitats at different sea level in the mountainous Doi Suthep-Pui National Park, Chiang Mai, Thailand. One pseudostem, two leaves (one young and one old) and one rhizome from each plant were randomly removed and taken back to the laboratory.

Tissue samples were surface sterilized and then placed on 2% malt extract agar medium. The plates were incubated at room temperature (27–30°C) for 1–2 weeks. Fungal mycelium which grew out from the tissues was transfer to slants of corn meal agar. Pure cultures were kept on malt extract agar for further investigation. Stock cultures were maintained under mineral oil and kept at room temperature and in a cold room at the Department of Biology, Faculty of Science, Chiang Mai University, Chiang Mai and at the BIOTEC Culture Collection, Pathumthani 12120, Bangkok, Thailand. Identification was based on morphological and molecular characteristics.

Screening for bioactive compounds: The endophytic isolates were grown on potato dextrose agar plate at room temperature for 7–14 days depending on growth rate. One piece (0.5 mm diameter) from the growing edge of colony was cut and inoculated into test tubes (18 × 180 mm) containing 5 ml F1 or F2 broth media. After incubation, with shaking at 130 rpm, at 27°C for 7 days, the cultures were harvested by filtration. The culture broths were then extracted twice with 5 ml ethyl acetate. The extracts were pooled and dried by rotary evaporation at 45°C. The extract residue was dissolved in DMSO and 35µl of the organic phase was added to wells (0.5 mm diameter) cut into the agar medium which had been seeded with cells of *C. albicans* or spores of *P. avellaneum*. The plates were incubated at room temperature for 1 day for *C. albicans* and 2–3 days for *P. avellaneum*. The clear zones around the extracts from active strains were evaluated and selected.

Optimization of antibiotic production: Different carbon (fructose, glucose, D-psicose, lactose, sucrose, manitol, xylitol and pullulan) and nitrogen source (peptone, polypeptone, yeast extract, malt extract and soybean meal) combinations were tested in the F1 medium. Three mycelial discs of mycelia sterilia stain CMUZE0132 grown in PDA for 3 days were inoculated in all types of medium and incubated for 5 days. Optimum temperature, pH and time course of production were determined. The antifungal activity in the culture filtrates was assayed against *C. albicans* and *P. avellaneum* using a paper disc method [6].

Characterized of bioactive compound from a selected strain: One liter of F1 medium was inoculated with mycelium from a 3 days old culture of mycelia sterilia strain CMUZE0132. The cultures were incubated with reciprocal shaking at 30°C for 5 days. One hundred ml of the filtered broth was passed through a HP20 resin column. Fractions were collected and each fraction was bioassayed. The column was rinsed with 40 ml water and fractionated with 40 ml of methanol (25%, 50% v/v with water and 100%) as eluent with a final elution 40 ml acetone methanol (3:7) mixture. The fractions were analysed by TLC (silica gel 60F254, Merck) and the separated samples were bioassayed. The UV absorption spectrum of the selected fraction was determined.

Results and Discussion

Endophytic fungi from wild ginger plants: The endophytic fungi were relatively common with an isolate prevalence of 70–84% at the different sites sampled in the wet and dry season [7]. Thirty-four taxa comprised of 8 ascomycetes and 26 anamorphic fungi were reported (Table 1). *Colletotrichum* and *Phomopsis* spp. were found in high frequency similar to the endophytes found in other plants such as wild banana [8] and palms [9] surveyed in the same area. Dominant species in these host plants were xylariaceous and mycelia sterilia. Five new species, *Gaeumanomyces amomi*, *Leiosphaerella amomi*, *Pyricularia kookkicola*, *P. longispora* and *P. variabile* were isolated [10,11].

Table 1. Isolate prevalence, total number of isolates and taxa isolated from *Alpinia malaccensis* and *Amomum siamense*.

Characterization	<i>Alpinia malaccensis</i>				<i>Amomum siamense</i>			
	Wet		Dry		Wet		Dry	
	HKM	PDP	HKM	PDP	HKM	MPG	HKM	MPG
No. of samples	300	300	300	300	300	300	300	300
No. of isolates	266	306	352	271	296	362	289	295
No. of prevalence [%]	70.7	75.0	83.7	73.7	70.3	83.3	70.0	78.7
Total taxa	20	17	18	13	19	18	23	20
Taxa/plant ^{ns} [mean±SD]	7±1	8±2	7±1	6±1	8±2	8±1	8±2	7±2
Taxa/plant ^{ns} [range]	3–8	4–10	5–10	5–8	4–12	6–11	5–11	6–11

Screenings for antibiotic production: Seventy-eight of the endophytic fungi were screened for their antibiotic production in two different media. F1 medium was better than F2 medium in promoting antibiotic production (Table 2–3). Thus F1 medium was selected for further studies. Two strains, *Papulaspora* sp. CMUZE0118 and mycelia sterilia CMUZE0123 gave largest zones of inhibition. One new species, *G. amomI* showed inhibitory ability only against *C. albicans* when grown in PDB but the clear zone is smaller than produced by broth extracts from *Papulaspora* sp. (28 mm in F1 medium) and mycelia sterilia CMUZE0132 (34 mm against *P. avellaneum* in F1 medium). Mycelia sterilia was selected as a producer for further experiment.

Table 2. No. of isolates inhibited growth of test organism.

F1			F2		
<i>C. albicans</i>	<i>P. avellaneum</i>	Both	<i>C. albicans</i>	<i>P. avellaneum</i>	Both
12	22	7	14	7	3

Table 3. Screening of antibiotic production from endophytic fungi grew in different media

Fungi	Inhibition zone					
	F1		F2		F3	
	<i>C. alb</i>	<i>P. ave</i>	<i>C. alb</i>	<i>P. ave</i>	<i>C. alb</i>	<i>P. ave</i>
<i>Alternaria</i> sp.	0	15	0	0	-	-
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	0	20	0	10	-	-
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	0	18	9	8	-	-
<i>Cylindrocladium</i> sp.	0	18	0	0	13	0
<i>Eupenicillium crustaceum</i>	17	8	0	0	-	-
<i>Fusarium</i> sp.	9	8	11	9	-	0
<i>Gaeumannomyces amomi</i>	0	0	0	0	19	-
<i>Papulaspora</i> sp.	28	14	20	0	-	-
<i>Phoma</i> sp.	10	0	0	0	-	-
MSCMUZE0123	20	9	0	11	-	-
MSCMUZE0132	9	34	0	0	-	-

Optimum condition for antibiotic production: The suitable mixture C and N sources in F1 medium for antibiotic production by MS CMUZE0132, against both test organisms, was glucose mixed with soybean meal. Glucose and soybean meal are unlimited, cheap and readily available nutrients and so would be suitable for large scale production. Optimum temperature and pH was 30°C and 6.0, respectively. The highest production was observed after 5 days incubation.

Characterization of bioactive compound: Extracts from HP20 and silica gel chromatography were bioassayed and further characterized. Fractions 30–36 eluted with 100% methanol from the resin column showed activity, with the highest in Fraction 32, against *P. avellaneum*. The R_f value for this fraction on TLC chromatograms was 0.38. The UV absorption maximum at 230 nm and 260 nm was 3.94 and 3.32 respectively. This compound is very hydrophobic. Fractions 17 and 61 from silica gel chromatography showed activity against *P. avellaneum*. These compounds had R_f values of 0.43 and 0.65 respectively. Fraction 32 from the HP20 resin column was analysed by mass spectrophotometry [JMS-SX102A]. The spectrum showed the highest peak at 585.1 m/z. The compound is very hydrophobic in acidic condition and the hydrophobicity decreased in alkalide condition. The chemical composition of this compound is C₂₀H₂₉O₆ and the structure now under study by NMR.

We can conclude at this time some of the endophytic fungi from *Zingiberaceae* have a high potential for bioactive compound production. The compound that has been investigated has a broad spectrum of activity against several fungi including *C. albicans*, *P. avellaneum*, *Phytophthora* sp., and *Pyricularia oryzae* (the latter two results not showed in this manuscript).

Acknowledgements

We acknowledge the support of the Thailand Research Fund (Golden Jubilee Ph.D Program), BRT 142006 and JSPS-Biotechnology Collaboration Program for funding this research. We also thank. Prof. John Peberdy, Nottingham University, UK for his kind revision of manuscript.

References

1. Bush, K. (2004). Why it is important to continue antibacterial drug discovery. *ASM News* **70**: 282–287.
2. Stierle, A., Strobel, G., Stierle, D., Grothaus, P. and Bignami, G. (1993). The search for a taxol-producing microorganism among the endophytic fungi of the pacific yew, *Taxus brevifolia*. *J Natural Products* **58**: 1315–1324.
3. Monaghan, R. L. and Tkacz, J.S. (1990). Bioactive microbial products: focus on mechanism of action. *Annu. Rev. Microbiol.* **44**: 271–301.
4. Monaghan, R.L., Polishook, J.D., Pecore, V.J. Bill, G.F., Nallin-Omstead, M. and Streicher, S.L. (1995). Discovery of novel secondary metabolites from fungi-is it really a random walk through a random forest? *Can. J. Bot.* **73** (Suppl. 1): S925–S931.
5. Wiyakrutta, S., Sriubolmas, N., Panphut, W., Thongon, N., Danwisetkanjana, K., Ruangrunsi, N. and Meevootisom, V. (2003). Endophytic fungi with anti-microbial, anti-cancer and anti-malarial activities isolated from Thai medicinal plants. *World J. Microbiol. Biotech.* **20**: 265–272.
6. Rothrock, C. B. and Gottlieb, D. (1984). Role of antibiosis in antagonism of *Streptomyces hygroscopicus* var. *geldanus* to *Rhizoctonia solani* in soil. *Can. J. Microbiol.*, **30**: 1440–1447.
7. Bussabun B., Lumyong, S., Lumyong, P., McKenzie, E.H.C. and Hyde, K.D. (2001). A synopsis of the genus *Berkleasium* with two new species and new records of *Canalisporium caribense* from *Zingiberaceae* in Thailand. *Fungal Diversity* **8**: 73–85.
8. Photita, W., Lumyong, S., Lumyong, P. and K.D. Hyde. (2001). Endophytic fungi of wild banana (*Musa acuminata*) at Doi Suthep-Pui National Park, Thailand. *Mycological Research* **105**: 1508–1513.
9. Techa, W. (2001). *Isolation and Collection of Endophytic and Saprobiic Fungi from Two Species of Palms in Doi Suthep-Pui National Park*. M.Sc Thesis, Chiang Mai University, Thailand.
10. Bussabun B., Lumyong, S., Lumyong, P., McKenzie, E.H.C. and Hyde, K.D. (2001). Endophytic fungi from *Amomum siamense*. *Can. J. Microbiol.* **47**: 943–948.
11. Bussabun B., Lumyong, S., Lumyong, P., Hyde, K.D. and McKenzie, E.H.C. (2003). Three new species of *Pyricularia* isolated as endophytes from Thailand. *Mycologia* **95**: 519–524.