เอกสารแนบหมายเลข 2

Project Code: TRG5780008

Project Title: การศึกษาโรคราดำของไม้ผลในเขตภาคเหนือของประเทศไทย

Investigator: ดร. พุทธรักษ์ ชมนันติ มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง

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

Project Period: 2 มิถุนายน 2557- 1 มิถุนายน 2559

Abstract (บทคัดย่อ)

Sooty moulds are plant pathogens that have ecology complex with host and insect, they are produce black mycelium which covers plants and interfere with the photosynthetic capability, causes plant stunting and yield and thereby reduce the marketability of post-harvest products. In view of high diversity, complex ecology of growing, mixing together on the host and lack of proper taxonomic records, the relationships of sooty moulds are poorly known also the sexual-asexual connections. In this study we emphasis on the taxonomy and molecular studies to resolve their life cycle complex, established xerophlic property and bioactive compound. We obtain 80 strains of sooty mould species from difference geographical regions and difference hosts; *Mangifera* sp., *Chrysophyllum cainito*, *Psidium* sp. and *Cofea* sp., from Chiang Rai, Chiang Mai, Payao and Songkla Province. Eighth genera were identified based on morphological characters including of *Phragmocapnias*, *Phaeosaccardinula*, *Capnodium, Leptoxyphium, Polychaeton*, and species in *Trichomeriaceae* and *Chaetothyriaceae* respectively. Six insect types have been found together with sooty moulds habitat included of soft scale insect, whitefilies, mealybugs, acarid, aleyrodid and aphid. Totally 30 morphological characters were prepared in photo plates with descriptions. Three sooty mould fungi; *Leptoxyphium cacuminum* (MFLUCC 14-0276), *Capnodium coffeae* (MFLUCC 14-0182), *Phragmocapnias siamensis* (MFLUCC 14-0277) were selected to present a test for verify sooty moulds are xerophilic and will be analysesed by ANOVA and linear growth rate. Thus, the sooty moulds are Xerophilic fungi and such knowledge will contribute to the future work of secondary metabolism and may have biotechnological potential in enzyme production or bioremediation. The holotypes were deposited at the herbarium of Mae Fah Luang University (MFLU). Fungi isolated by single spore technique were used for molecular work, and deposited in in Mae Fah Luang university Culture collection (MFLUCC) and BRIP culture collection. Genomic DNA was extracted from fungal mycelium using Biospin Fungus Genomic DNA Extraction Kit (BioFlux®) according to the manufacturer's protocol for maximum yield and amplified by using PCR technique. Five primers including ITS, LSU, SSU TEF and RPB2 genes were used in this process. The RAxML phylogenetic tree was contributed and sequences data were deposited in

GenBank. Three poster presentations were presented in IMC 2014 and three SCI papers were published.

Keywords: Biodiversity, *Capnodiaceae* phylogeny, sooty moulds, Taxonomy

โรคราดำเป็นโรคพืชที่พบได้ทั่วไปในเขตร้อนและเขตกึ่งร้อน มีความหลากหลายสูงและสัมพันธ์กับพืชและแมลงหลายชนิด ลักษณะเฉพาะของเชื้อราดำคือ จะสร้างเส้นใยปกคลุมบริเวณผิวใบและผลของพืชอาศัย ลักษณะดังกล่าวส่งผลต่ออัตราการสังเคราะห์แสงของพืชลดลง ปัจจุบันการศึกษาทางด้านอนุกรมวิธานและลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อราดำยังไม่มีความชัดเจน อีกทั้งไม่มีความหลากหลายในด้านวงศ์วานวิวัฒนาการ ดังนั้นวัตถุประสงค์ของการวิจัยนี้คือเพื่อศึกษาถึงอนุกรมวิธานและวงศ์วานวิวัฒนาการโดยใช้ลักษณะสัณฐานวิทยาและชีวโมเลกุลในการจัดจำแนกและการวิเคราะห์ความสามารถของเชื้อราในสภาพที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญหรือขาดน้ำโดยวิธี Xerophilic จากการศึกษาดังกล่าวสามารถรวบรวมเชื้อราดำได้จำนวน 80 ตัวอย่างจากพืชอาศัยที่หลากหลายได้แก่ *Mangifera* sp., *Chrysophyllum cainito*, *Psidium* sp. และ *Cofea* sp ซึ่งพบได้ต่างพื้นที่เช่นใน จังหวัดเชียงราย เชียงใหม่และ สงขลา จากผลการวิจัยพบว่าจากการศึกษาลักษณะทางด้านสันฐานวิทยาร่วมกับการวิเคราะห์ทางด้านชีวโมเลกุลเชื้อราโดยทำการวิเคราะห์หาลำดับเบสของเชื้อราดำ โดยใช้ multi genes analysis ได้แก่การวิเคราะห์ลำดับเบสตำแหน่ง LSU, SSU, TEF, ITS และ RPB2 ตามลำดับ และสร้างแผนภูมิวิวัฒนาการโดยใช้โปรแกรม RAxML เพื่อทำการจัดจำแนกเชื้อราดำดังกล่าวได้อย่างแม่นยำและถูกต้อง ซึ่งสามารถจัดจำแนกตัวอย่างเชื้อราดำจำนวน 80 ตัวอย่าง ออกเป็น 8 สกุลคือ *Phragmocapnias*, *Phaeosaccardinula*, *Capnodium, Leptoxyphium, Polychaeton* และพบว่ามีเชื้อราดำบางชนิดที่ถูกจัดอยู่ในวงศ์ *Chaetothyriaceae* และ *Trichomeriaceae* ทั้งนี้ยังพบแมลงทั้งหมด 6 ชนิด ที่มีความสัมพันธ์กับเชื้อราดำได้แก่ เพลี้ยหอย แมลงหวี่ขาว เพลี้ยแป้ง เพลี้ยอ่อน เป็นต้น จากการศึกษาด้านสัญฐานวิทยา รายงานฉบับนี้ได้จัดทำรูปภาพราดำและคำอธิบายถึงลักษณะเฉพาะของเชื้อราดำไว้อย่างละเอียดเพื่อสามารถนำไปใช้ในการจัดจำแนกเบื้องต้น นอกจากนี้ได้ทำการวิเคราะห์ความสามารถของเชื้อราในสภาพที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญหรือขาดน้ำโดยวิธี Xerophilic ผลการศึกษาเบื้องต้นถึงประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์ พบว่าเชื้อราดำ *Leptoxyphium cacuminum* (MFLUCC 14-0276), *Capnodium coffeae* (MFLUCC 14-0182), *Phragmocapnias siamensis* (MFLUCC 14-0277) สามารถเจริญได้ในสภาวะที่ขาดแคลนน้ำและไม่เหมาะสม ดังนั้นผู้วิจัยจึงเลือกศึกษาประสิทธิภาพในการสร้างเอนไซม์ในเชื้อราดำทั้งสามชนิดในขั้นตอนต่อไป ซึ่งผลดังกล่าวยังสามารถพัฒนาและนำไปใช้ประโยชน์ทางด้านอุตสาหกรรมและการบำบัดทางชีวภาพ จากการวิจัยครั้งนี้ทำให้สามารถจัดจำแนกเชื้อราดำได้อย่างถูกต้องและมีข้อมูลพื้นฐานทางด้านสัณฐานวิทยา ซึ่งสามารถนำไปใช้ประกอบการศึกษาและวินิจฉัยเชื้อราดำได้ อีกทั้งเพิ่มข้อมูลที่ทางด้านลำดับเบสของ DNA ใน GenBank ซึ่งเป็นข้อมูลที่เป็นประโยชน์ต่อการวิจัยทางด้านโรคพืชและอนุกรมวิธานของเชื้อรา นอกจากนี้ผู้วิจัยได้เก็บรักษาสายพันธุ์เชื้อราดังกล่าวใน MFLU culture collection (MFLUCC), Biotech Culture Collection (BCC), และ BRIP culture collection เพื่อให้นักวิจัยและผู้ที่สนใจศึกษานำไปใช้ประโยชน์ต่อไป ผลงานของโครงการวิจัยนี้ได้มีการเผยแพร่ในการประชุมนานาชาติในรูปแบบของโปสเตอร์จำนวน 3 ผลงาน และในรูปแบบของเอกสารตีพิมพ์ในวารสารนานาชาติจำนวน 3 ผลงาน

คำสำคัญ: ความหลากหลายทางชีวภาพ, วงศ์วานวิวัฒนาการ, ราดำ, อนุกรมวิธาน, *Capnodiaceae*