

Thesis Title Taxonomy and Phylogeny of Powdery Mildew Fungi in Tribe Phyllactinieae

Author Miss Sararat Monkhang

Degree Doctor of Philosophy (Plant Pathology)

Thesis Advisory Committee

Assoc. Prof. Dr. Chaiwat To-anun	Advisor
Assoc. Prof. Dr. Nuchnart Jonglaekha	Co-advisor
Lect. Dr. Sarunya Valyasevi	Co-advisor
Lect. Dr. Ratchadawan Cheewangkoon	Co-advisor

ABSTRACT

Erysiphales is an important group of pathogenic fungi, causing powdery mildew diseases of numerous plant species. Collection of powdery mildew samples in northern part of Thailand during years 2009 to 2011 was made and obtained more than 200 samples from more than 130 host plant species. They were studied and identified by using their host plants and morphological characteristics, combined with molecular phylogenetic analysis. It was found that the fungal species could be divided into 5 tribes, the tribe Phyllactinieae is endoparasitic to plants. This tribe was found most; 70 samples in 27 plant species or 30 percent of collected samples and normally found on perennial wild plants. This study has new Phyllactinieae fungi as the first record of Thailand in 20 host plant species, and as the first world record in 4 host plant species. Classification of these fungal samples showed that the fungi found on 13 host species in 5 host plant families e.g. Euphorbiaceae, Malpighiaceae,

Oxalidaceae, Pedaliaceae and Solanaceae are genus *Oidiopsis*. The genus *Ovulariopsis* was found on 14 host species in 10 plant families: Alangiaceae, Boraginaceae, Caesalpiniaceae, Combretaceae, Euphorbiaceae, Lythraceae, Moraceae, Rosaceae, Urticaceae and Verbenaceae. Of these, the sexual state of genus *Phyllactinia* found on 7 host species; *Boehmeria siamensis*, *Cassia fistula*, *Dalbergia cana*, *Dalbergia lanceolaria*, *Gmelina arborea*, *Morus alba* and *Terminalia bellirica*. The key to genera of the Phyllactinieae was also created in this study.

The phylogenetic relationship of powdery mildew fungi in the tribe Phyllactinieae was studied using ITS and 28S rDNA gene sequences of 20 fungal specimens from Thailand and analysed by compared with the sequences of other Phyllactinieae members obtained from DNA Data Bank of Japan (DDBJ). Phylogenetic tree was conducted from data using maximum parsimony with PAUP Mac Rat program. The phylogenetic analysis within tribe Phyllactinieae divided into 6 groups. Group 1 is the fungus that has clavate conidia with straight foot-cells. This group can be divided into 4 subgroups. Subgroup 1, the fungus found on *Gmelina arborea* was identified as *Phyllactinia gmelinae*. Subgroup 2, the fungi found on *Morus alba* and *Broussonetia papyrifera*. The one on *Morus alba* was identified as *Phyllactinia guttata*. However, the fungus found on *Broussonetia papyrifera* in Thailand showed closely related with *Phyllactinia guttata* on *Morus alba* and *Phyllactinia broussonetiae-kaempfer* on *Broussonetia papyrifera* from other countries but differ from them on 6 nucleotide bases. So, this could be identified as a new species. Subgroup 3 is the fungus found on *Pyrus pyrifolia* which can be identified as *Phyllactinia mali*. Subgroup 4 is the fungus from *Ehretia laevis* which was identified as a new species. Group 2 consists of 16 fungal specimens from *Capsicum* spp., *Euphorbia heterophylla*, *Solanum aculeatissimum* and *Solanum torvum*. This group has dimorphic conidia with straight foot-cells and was identified as *Oidiopsis sicula* which is an anamorphic state of *Leveillula taurica*. Group 3, the fungus has clavate conidia and twisted foot-cells which was found on *Terminalia bellirica* and it was identified as *Phyllactinia bellirica*. Group 4 consists of 7 fungal specimens from *Cassia fistula* and *Senna siamea*, its characteristics are similar to genus *Oidium*. This group has single ellipsoidal conidia and short conidiophores. The fungal specimens

from *Cassia fistula* was identified as *Phyllactinia cassiae-fistulae*. The fungal specimens found on *Senna siamea* was identified as a new species. Group 5 consists of 2 fungal specimens from *Dalbergia lanceolaria*. This fungus is represented dimorphic conidia and twisted foot-cells and was identified as *Phyllactinia dalbergiae*. Group 6 consists of 2 fungal specimens from *Lagerstroma macrocarpa* which represented dimorphic conidia and twisted foot-cells and was identified as a new species. Furthermore, the morphological observations of Thai Phyllactinieae under Group 3, 4, 5 and 6 are distinct from other known *Phyllactinia* species that having clavate conidia and twisted foot-cells. In this phylogenetic analysis revealed that *Phyllactinia* in these groups were split from other *Phyllactinia* species at early stage of evolution.

This is the first comprehensive study of powdery mildews in tribe Phyllactinieae that collected in Thailand by using morphological characteristics, photograph and line drawing together with phylogenetic analysis of the ITS and 28S nucleotide sequences to solve the problem on identification and classification of this fungal tribe. Furthermore, molecular phylogenetic analysis is used to link the asexual and sexual states of tribe Phyllactinieae. A comprehensive molecular analysis confirmed the taxonomic status of numerous morphological species that were found in some groups of Phyllactinieae, which having asexual features that differ from all other *Ovulariopsis* species.

Keywords: Taxonomy, Phylogeny, Powdery mildew fungi, Tribe Phyllactinieae

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ อนุกรมวิธานและความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อราแป้งในไทรบ
Phyllactinieae

ผู้เขียน นางสาวสรารัตน์ มนต์ขลัง

ปริญญา วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต (โรคพืช)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

รองศาสตราจารย์ ดร. ชัยวัฒน์ โตอนันต์

อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก

รองศาสตราจารย์ ดร. นุชนาฏ จงเลขา

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

อาจารย์ ดร. สรัญญา วัลยะเสวี

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

อาจารย์ ดร. รัชดาวรรณ ชีวังกูร

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

บทคัดย่อ

Erysiphales เป็นเชื้อราสาเหตุของโรคพืชที่สำคัญกลุ่มหนึ่ง ซึ่งทำให้เกิดโรคราแป้งกับพืชหลายชนิด ได้ทำการเก็บตัวอย่างโรคราแป้งในเขตภาคเหนือของประเทศไทย ระหว่างปี ค.ศ. 2009 ถึง 2011 ได้มากกว่า 200 ตัวอย่างบนพืชอาศัยมากกว่า 130 ชนิด และทำการศึกษาเพื่อจำแนกชนิดของเชื้อราแป้ง โดยดูจากพืชอาศัย สัณฐานวิทยาต่างๆ ร่วมกับเทคนิคทางด้านอนุชีววิทยา เพื่อวิเคราะห์ถึงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อรา พบว่าสามารถแบ่งออกได้เป็น 5 tribes โดยมีไทรบ Phyllactinieae ที่เป็นปรกติภายในพืช ซึ่งพบมากถึง 70 ตัวอย่าง บนพืชอาศัย 27 ชนิด หรือคิดเป็น 30 เปอร์เซ็นต์ของตัวอย่างที่เก็บได้ทั้งหมด โดยพบมากบนพืชยืนต้นในป่า เชื้อราที่ศึกษาครั้งนี้มีเชื้อราที่พบครั้งแรกในประเทศไทยในพืชอาศัย 20 ชนิด และเป็นรายงานการพบครั้งแรกในโลกในพืชอาศัย 4 ชนิด เมื่อทำการจำแนกชนิดเชื้อราในกลุ่มนี้ตามลักษณะของการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ พบว่าเป็นเชื้อราในจันีส *Oidiopsis* บนพืชอาศัย 13 ชนิดใน 5 วงศ์ คือ Euphorbiaceae, Malpighiaceae, Oxalidaceae, Pedaliaceae และ Solanaceae และเป็นเชื้อรา *Ovulariopsis* บนพืชอาศัย 14 ชนิดใน 10 วงศ์คือ Alangiaceae, Boraginaceae, Caesalpiniaceae, Combretaceae, Euphorbiaceae, Lythraceae, Moraceae, Rosaceae, Urticaceae และ Verbenaceae โดยในจำนวนนี้

พบระยะการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ 7 ชนิด ได้แก่ *Boehmeria siamensis*, *Cassia fistula*, *Dalbergia cana*, *Dalbergia lanceolaria*, *Gmelina arborea*, *Morus alba* และ *Terminalia bellirica* ในการศึกษาครั้งนี้ได้มีการจัดทำวิธีการจำแนก (Key) สำหรับราในไฟลัม Phylactiniales ด้วย

การศึกษาค้นคว้าความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อราในไฟลัม Phylactiniales โดยการวิเคราะห์ลำดับเบสตรงตำแหน่ง ITS และ 28 S rDNA จากตัวอย่างเชื้อรา 20 ตัวอย่างเปรียบเทียบกับลำดับเบสที่ได้จากฐานข้อมูลจีโนมของประเทศญี่ปุ่น (DNA Data Bank of JAPAN, DDBJ) จากนั้นทำการสร้างแผนภูมิต้นไม้ของความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (Phylogenetic tree) จากข้อมูลด้วยวิธี maximum parsimony และด้วยโปรแกรม PAUP Mac Rat พบว่าตัวอย่างเชื้อราในไฟลัมนี้ที่พบในประเทศไทย แบ่งออกได้เป็น 6 กลุ่มใหญ่ โดยกลุ่มที่ 1 มีลักษณะสัณฐานวิทยาคือ conidia รูปกระบอง (clavate) และ foot-cells มีลักษณะตรง ซึ่งแบ่งออกเป็น 4 กลุ่มย่อย คือ กลุ่มย่อยที่ 1 ในพืช *Gmelina arborea* ที่จำแนกชนิดได้เป็น *Phyllactinia gmelinae* กลุ่มย่อยที่ 2 เป็นเชื้อราที่พบในพืช *Morus alba* ซึ่งจำแนกได้เป็น *Phyllactinia guttata* และเชื้อราที่พบในพืช *Broussonetia papyrifera* ในประเทศไทยพบว่ามีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับเชื้อรา *Phyllactinia guttata* ที่พบในพืช *Morus alba* และเชื้อรา *Phyllactinia broussonetiae-kaempfer* ที่พบในพืช *Broussonetia papyrifera* ในประเทศอื่น แต่มีลำดับเบสต่างกันถึง 6 เบส จึงถือว่าเป็นเชื้อรา *Phyllactinia* ชนิดใหม่ที่ยังไม่มีรายงานมาก่อน ส่วนเชื้อราที่พบบนพืช *Pyrus pyrifolia* จำแนกได้เป็น *Phyllactinia mali* ซึ่งถูกจัดอยู่ในกลุ่มย่อยที่ 3 และเชื้อราในกลุ่มย่อยที่ 4 ในพืช *Ehretia laevis* ที่จัดเป็นเชื้อรา *Phyllactinia* ที่พบใหม่ สำหรับเชื้อราในกลุ่มที่ 2 มี 16 ตัวอย่างที่พบบนพืชอาศัยดังนี้ *Capsicum* spp., *Euphorbia heterophylla*, *Solanum aculeatissimum* และ *Solanum torvum* เชื้อราในกลุ่มนี้สร้าง conidia ที่มีรูปร่างต่างกัน 2 แบบ และ foot-cells มีลักษณะตรง โดยจำแนกชนิดได้เป็นเชื้อรา *Oidiopsis sicula* ซึ่งเป็นระยะการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศของเชื้อรา *Leveillula taurica* เชื้อราในกลุ่มที่ 3 ได้แก่เชื้อราที่พบพืช *Terminalia bellirica* ที่ conidia รูปกระบอง (clavate) และ foot-cells มีลักษณะบิด จำแนกชนิดได้เป็นเชื้อรา *Phyllactinia bellirica* กลุ่มที่ 4 มีเชื้อรา 7 ตัวอย่างพบบนพืช *Cassia fistula* และ *Senna siamea* โดยเชื้อราในกลุ่มนี้มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาคือคล้ายกับเชื้อรา *Oidium* คือ conidia เป็นรูปทรงรี (ellipsoid) และก้านชูสปอร์สั้น เชื้อราที่พบบนพืช *Cassia fistula* จำแนกได้เป็น *Phyllactinia cassiae-fistulae* ส่วนเชื้อราที่พบบนพืชอาศัย *Senna siamea* จัดเป็นเชื้อรา *Phyllactinia* ชนิดใหม่ กลุ่มที่ 5 ประกอบด้วยเชื้อรา 2 ตัวอย่างที่พบบนพืชอาศัย *Dalbergia lanceolaria* จำแนกชนิดได้เป็น *Phyllactinia dalbergiae* มีการสร้าง conidia ที่ต่างกัน 2 แบบ และมี foot-cells ลักษณะบิด กลุ่มที่ 6 ประกอบด้วยเชื้อรา 2 ตัวอย่างที่พบบนพืชอาศัย *Lagerstroma macrocarpa* ซึ่งสร้าง conidia ที่ต่างกัน 2 แบบ และ foot-cells มีลักษณะบิดเป็นเกลียว ที่จำแนกได้เป็นเชื้อรา *Phyllactinia*

ชนิดใหม่ นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อราเป็งในกลุ่มที่ 3, 4, 5 และ 6 มีลักษณะสำคัญที่ต่างจากเชื้อราเป็งในไทรีบ Phyllactinieae ที่พบในส่วนอื่นๆ ของโลก คือ สร้างสปอร์ที่มีรูปร่างต่างกัน 2 แบบ และส่วนใหญ่ foot-cells มีลักษณะบิดเป็นเกลียว เชื้อราเป็งกลุ่มนี้มีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม โดยจัดกลุ่มที่ตำแหน่งด้านล่างของแผนภูมิต้นไม้ ซึ่งมีการแยกออกจากเชื้อรา *Phyllactinia* ชนิดอื่นๆ ในระยะเริ่มแรกของวิวัฒนาการ

การศึกษาถึงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อราเป็งในไทรีบ Phyllactinieae ที่พบในประเทศไทยครั้งนี้ นับเป็นครั้งแรกที่ได้ศึกษาครอบคลุมถึงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา โดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาต่างๆ โดยใช้ภาพถ่าย และภาพวาดของเชื้อราแต่ละชนิดประกอบ โดยวิเคราะห์ร่วมกับลำดับเบสของยีนตรงตำแหน่ง ITS และ 28S rDNA ซึ่งช่วยแก้ปัญหาการจัดจำแนกชนิดของเชื้อราในกลุ่มนี้ได้ นอกจากนี้เทคนิคด้านอนุชีววิทยายังช่วยให้เชื่อมโยงระหว่างเชื้อราในระยะการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศและไม่อาศัยเพศที่พบในประเทศไทย ซึ่งมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่แตกต่างจากเชื้อรา *Ovulariopsis* ชนิดอื่นๆ กับระยะการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศของเชื้อราในไทรีบ Phyllactinieae ได้

คำสำคัญ: อนุกรมวิธาน, ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม, ราเป็ง, ไทรีบ ไฟแลคทีเนีย