รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด

---

1. **แผนงานวิจัย** : การจัดทำฐานข้อมูลศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติเพื่อการวิจัยพัฒนาด้านการอารักขาพืชในประเทศไทย (The Establishment of Pests and Natural Enemies Database for Plant Protection Research and Development in Thailand)

2. **โครงการวิจัย** : อนุกรมวิธาน ชีววิทยา และการจำแนกชนิดโดยดีเอ็นเอบาร์โค้ดของศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติเพื่อการวิจัยด้านอารักขาพืชในประเทศไทย (Taxonomy, Biology and Species Identification by DNA Barcoding of Pests and Natural Enemies for The Plant Protection Research in Thailand)

   กิจกรรม : สำรวจชนิด และอนุกรมวิธานของศัตรูพืชและ ศัตรูธรรมชาติ

   กิจกรรมย่อย (ถ้ามี) : สำรวจชนิด และอนุกรมวิธานของจุลินทรีย์สาเหตุโรคพืชและจุลินทรีย์ควบคุมโรคพืช

3. **ชื่อการทดลอง (ภาษาไทย)** : ศึกษาราสกุล *Phytophthora* ในเผือก

   ชื่อการทดลอง (ภาษาอังกฤษ) : Study on *Phytophthora* species of Taro

4. **คณะผู้ดำเนินงาน**

   หัวหน้าการทดลอง : อมรรัชฎ์ คิดใจเดียว สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

   ผู้ร่วมงาน : สุณีรัตน์ สีมะเดื่อ ชนินทร ดวงสอาด มะโนรัตน์ สุดสงวน พรพิมล อธิปัญญาคม สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

5. **บทคัดย่อ**

การศึกษาราสกุล *Phytophthora* ในเผือก ได้รวบรวมและเก็บตัวอย่างเผือกที่แสดงอาการโรคใบจุดตาเสือ 110 ตัวอย่าง 117 ไอโซเลท ในจังหวัดเพชรบุรี ประจวบคีรีขันธ์ กาญจนบุรี สุพรรณบุรี นครปฐม เพชรบูรณ์ สระบุรี นครราชสีมา สุโขทัย และจังหวัดเชียงใหม่ ศึกษาและจำแนกด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและข้อมูลชีวโมเลกุลของยีนตำแหน่ง ß-tubulin และ translation elongation factor พบว่าคือ *P. colocasiae* ราเจริญได้ดีบนอาหาร V8, CA OMA และ PDA สร้างสปอร์ได้ดีบนอาหาร CA และ PDA

สามารถเก็บรักษาไว้ในหลอดอาหารเอียง PDA ได้อย่างน้อย 10 เดือน ทั้งในตู้เก็บเชื้อ (อุณหภูมิ 17°C) และ ที่อุณหภูมิห้อง (อุณหภูมิ 27°C) แต่ที่อุณหภูมิห้อง (อุณหภูมิ 27°C) การมีชีวิตรอดลดลงและมีการปนเปื้อนมากกว่าการเก็บในตู้เก็บเชื้อ (อุณหภูมิ 17°C) รานี้เจริญได้ดีที่ pH 5, 6 และ pH 7 อุณหภูมิ 25°C และอุณหภูมิ 30°C ราสร้างสปอร์ได้ดีที่ pH 5, 6 และ pH 7 อุณหภูมิ 25°C

Taro leaf blight samples were collected from plantation located in Phetchaburi, Prachuap Khiri Khan, Kanchanaburi, Suphan Buri, Nakhon Pathom, Phetchabun, Saraburi, Nakhon Ratchasima, Sukhothai and Chiang Mai provinces, 110 specimens 117 isolates. Ten specimens had been observed and identified using morphological and molecular data of β-tubulin and translation elongation factor 1-alpha gene regions. It was found that *P. colocasiae*. This fungi grow well on V8, CA OMA and PDA and sporulation on CA and PDA. It can be stored in slant PDA tube at least 10 months both in incubator (17°C) and at room temperature (27°C) but at room temperature (27°C), survival decreases and is more contaminated than storing in an incubator (temperature 17°C). *In vitro* growth and sporulation of *P. colocasiae*, pH 5, 6, 7 and temperature of 25°C and 30°C were the optimum conditions for growth while those of sporulation were pH 5, 6, and 25°C.

6. คำนำ :

เผือก (*Colocasia esculenta* (L.) Schott.) ประชากรของประเทศในเขตร้อนเกือบทั่วโลกรู้จักเผือกเป็นอย่างดี บางประเทศรับประทานเผือกเป็นอาหารหลัก บางประเทศรับประทานเผือกเป็นอาหารรอง ประเทศเหล่านั้นจึงปลูกเผือกเป็นพืชเศรษฐกิจพืชหนึ่งของประเทศ (สารานุกรมไทยสำหรับเยาวชน, ม.ป.ท.) สำหรับประเทศไทย เผือกถือเป็นพืชเศรษฐกิจระดับท้องถิ่นที่สำคัญอีกพืชหนึ่ง คนไทยนิยมบริโภคเผือกเพราะมีกลิ่นหอมและรสชาติดี เป็นพืชหัวที่เป็นพืชอาหารที่สำคัญอีกชนิดหนึ่ง (มาลินี และคณะ, ม.ป.ท.) การปลูกเผือกมีทุกภาคของประเทศ ปี 2559/60 มีพื้นที่ปลูกประมาณ 16,148 ไร่ ผลผลิตประมาณ 26,830 ตัน ผลผลิตเฉลี่ยประมาณ 2,836 กิโลกรัมต่อไร่ จังหวัดที่เป็นแหล่งปลูกที่สำคัญ ได้แก่ จังหวัดสระบุรี นครปฐม เพชรบุรี และจังหวัดสุพรรณบุรี (ศูนย์เทคโนโลยีสารสนเทศและการสื่อสาร, 2560)

โรคใบไหม้ (โรคใบจุดตาเสือ; Taro leaf blight) สาเหตุเกิดจากรา *Phythopthera colocasiae* Rac. อาการเริ่มแรกบนใบ เป็นจุดขี้แมลงวันเล็กๆ สีน้ำตาลเข้ม หรือจุดสีน้ำตาลอ่อน ปรากฏเห็นชัดบนผิวใบ (Brooks, F.E. 2005) แผลขยายใหญ่ขึ้นเป็นวงๆ ต่อกัน ลักษณะพิเศษ คือ บริเวณขอบแผลมีหยดสีเหลืองข้น ซึ่งต่อมาแห้งเป็นเม็ดๆ เกาะอยู่เป็นวงๆ เมื่อบีบจะแตกเป็นผงละเอียด สีสนิม ในระยะที่รุนแรงแผลขยายติดต่อกัน และทำให้ใบ

ม้วนพับเข้าและแห้งเหี่ยว หรืออาจเน่าเละถ้าอากาศชื้นมีฝนพรำ อาการบนก้านใบ จะเกิดแผลฉ่ำน้ำยาวรี สีน้ำตาลอ่อน แผลขยายใหญ่ขึ้นเป็นวงๆ เช่นกัน ต่อมาจะเน่า แห้ง เป็นสีน้ำตาล มีหยดสีเหลืองข้นด้วย ทำให้ก้านต้านทานน้ำหนักใบไม่ได้จึงหักพับ มีผลทำให้ใบแห้ง พบมากในระยะโรครุนแรง และมีลมพัด อาการเป็นระยะนี้ทำให้ผลผลิตลดลง และเชื้อนี้อาจเข้าทำลายหัวเผือกด้วยทำให้หัวเผือกเน่าเสียหายได้ โรคนี้เป็นโรคที่รุนแรงที่สุดของเผือกที่พบในประเทศไทยและในต่างประเทศ โรคนี้เริ่มระบาดเมื่อมีฝนตกและอากาศชุ่มชื้น ถ้ามีฝนตกหนักและติดต่อกันหลายๆ วัน โรคจะระบาดอย่างรวดเร็ว ในแปลงที่เป็นรุนแรง เผือกจะมีใบเหลืองประมาณต้นละ 3-4 ใบเท่านั้น เผือกที่เป็นโรคนี้ถ้ายังไม่เริ่มลงหัว หรือลงหัวไม่โตนักจะเสียหายหมด หัวที่ลงจะไม่ขยายเพิ่มขนาดขึ้นในช่วงที่หมอกลงจัดเผือกจะเป็นโรคนี้ได้ง่ายเช่นเดียวกัน (อมรรัตน์, 2552; กลุ่มวิจัยโรคพืช, 2555)

P. colocasiae จัดอยู่ใน class Oomycetes family Pythiaceae ลักษณะของรานี้ เป็นรานำ้ เส้นใยสีขาว ไม่มีผนังกั้น แตกกิ่งก้าน สร้างสปอร์ 4 ชนิด ได้แก่ sporangia เกิดบนก้าน sporangiophores มีการขยายพันธุ์ทั้งแบบไม่ใช้เพศให้กำเนิด zoospores ภายใน sporangium ส่วนการขยายพันธุ์แบบใช้เพศให้กำเนิด oospores ซึ่งเกิดจากการผสมระหว่างเพศผู้ (antheridium) และเพศเมีย (oogonium) และ chlamydospores เชื้ออยู่ข้ามฤดูในรูปของ oospore และเส้นใยในพืชที่เป็นโรค เมื่อความชื้นเหมาะสมจะเกิด sporangia ให้กำเนิด zoospore ที่มีหางว่ายน้ำได้ เข้าทำลายพืชต่อไป (Erwin and Ribeiro, 1996)

โรคแพร่กระจายอย่างรวดเร็วในสภาพที่มีเมฆมากและฝนตกไม่สม่ำเสมอ อุณหภูมิประมาณ 28 องศาเซลเซียส และจะเกิดการระบาด เมื่อเวลากลางคืนมีอุณหภูมิต่ำต่อเนื่องกัน ประมาณ 20 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 90-100 เปอร์เซนต์ (Nath, *et al*., 2013)

P. colocasiae มีพืชอาศัยส่วนมากเป็นพืชพวก aroids (Araceae) รวมทั้ง พืชตระกูลเผือก [*Colocasia esculenta* (taro, kalo, dasheen) และ *Alocasia macrorrhiza* (giant taro)] (Brooks, F.E. 2005) มีรายงานในประเทศอินเดีย ว่า *P. colocasiae* ทำให้เกิดโรคใบไหม้และหัวเน่าที่ร้ายแรงที่สุดของเผือก (Raj *et al*., 2011) พบได้ทุกพื้นที่ที่มีการปลูกเผือกในฮาวายและยังพบได้ในพื้นที่อื่นอีก ได้แก่ ปาปัวนิวกินี, เกาะโซโลมอน, ฟิลิปปินส์, เกาะกวม,ซามัวตะวันตก, อินเดีย, ไต้หวัน และทรินิแดด เป็นต้น (Anonymous, n.p.) ทำให้ผลผลิตลดลง 25-50% (Gollifer and Brown, 1974; Jackson *et al*., 1980)

อมรรัตน์ (2552; 2556) รายงานว่ารา *P. colocasiae* ทำให้เกิดโรคใบแห้ง ใบไหม้ ใบจุดตาเสือกับเผือก บอนน้ำ บอนเขียว และคูณ

ในโปรแกรมการปรับปรุงพันธุ์เผือกให้ต้านทานโรคใบจุดตาเสือของบางประเทศ มีการนำวิธีการ Isozyme analysis and DNA markers (RAPD) มาระบุความแตกต่างทางพันธุกรรมของ *P. colocasiae* ไอโซเลทต่างๆ ทั้งภายในและนอกประเทศ ซึ่งเผือกจากการปรับปรุงพันธุ์ควรมีการทดสอบการต่อต้านเชื้อนี้ ก่อนที่จะออกเป็นพันธุ์ใหม่ต่อไป (Brooks, F.E. 2005)

Mei-ju Lin and Wen-Hsiung Ko (2008) ทำการสำรวจและเก็บใบเผือกที่แสดงอาการโรคมาแยกเชื้อได้ 7 ไอโซเลท จากนั้นนำมาวินิจฉัยว่าเป็น *P. colocasiae* โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา ลำดับของ ITS (Internal Transcribed Spacer) และความสามารถในการทำให้เกิดโรคบนเผือก

ในประเทศไทย มีรายงานเกี่ยวกับรา *Phythopthora* หลายสปีชี ที่ทำให้เกิดโรคกับพืชต่างๆ หลายชนิด จึงควรมีการศึกษาข้อมูลต่างๆ ของรา *Phythopthora* สาเหตุโรคใบจุดตาเสือของเผือก เพื่อให้ได้ทราบชนิด และลักษณะประจำพันธุ์ ซึ่งเป็นข้อมูลพื้นฐานในการหาวิธีการป้องกันกำจัดโรค เพื่อเตรียมพร้อมสำหรับนำมาใช้กำหนดแผนการป้องกำจัดได้รวดเร็วทันเหตุการณ์ และยังเป็นข้อมูลอ้างอิงในการจัดทำบัญชีรายชื่อศัตรูพืช เพื่อประโยชน์ในการนำเข้าและส่งออกสินค้า และเพื่อเก็บในศูนย์รวบรวมราสาเหตุโรคพืช กลุ่มวิจัยโรคพืช และตัวอย่างแห้งโรคพืชเก็บไว้ในพิพิธภัณฑ์โรคพืช

7. วิธีดำเนินการ :

- อุปกรณ์

1. อุปกรณ์เก็บตัวอย่างและอุปกรณ์จัดเก็บตัวอย่างแห้ง ได้แก่ ปากกาเคมี, ดินสอ, กระดาษหนังสือพิมพ์, ถุงพลาสติก, กรรไกรตัดแต่งกิ่ง, ไม้ทับตัวอย่าง, ซองกระดาษสำหรับเก็บและรักษาตัวอย่าง และ GPS ฯลฯ

2. อุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการ ได้แก่ สไลด์และแผ่นแก้วปิดสไลด์, ปากคีบ, เข็มเขี่ยปลายแหลม, ใบมีดโกน, ใบมีดผ่าตัด, ตะเกียงแอลกอฮอล์, ยาทาเล็บ (แบบใส), cork borer, เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง (centrifuge), เครื่อง Polymerase chain reaction (PCR machine), เครื่องเขย่า (vortex), เครื่อง tissue lyser, gel tank, เครื่องกำเนิดกระแสไฟ, gel plate, comb, PCR tube, เครื่องอ่านผล PCR (gel doc), microwave, micropipette ขนาด 10, 100, 200 และ 1000 ไมโครลิตร, tips ขนาด 10, 100, 200 และ 1000 ไมโครลิตร, กล้องจุลทรรศน์แบบ compound และ stereo, water bath หรือ incubation chamber ฯลฯ

3. อุปกรณ์เครื่องแก้ว ได้แก่ บิกเกอร์, ขวดดูแรน, กระบอกตวง, จานอาหารเลี้ยงเชื้อ ฯลฯ

4. สารเคมี ได้แก่ lactophenol, lactic acid, oil immersion, sodium hypochlorite, ethyl alcohol ฯลฯ

5. อาหารเลี้ยงเชื้อ เช่น potato dextrose agar (PDA), Potato Carrot Agar (PCA), V-8 juice agar, และ Carrot Agar (CA) ฯลฯ

6. ตำราสำหรับใช้ในการจัดจำแนกรา *Phytophthora* (Phytophthora Diseases Worldwide, Identifying Species by Morphology and DNA Fingerprints)

- วิธีการ

1. การเก็บและรวบรวมตัวอย่างโรคพืชที่เกิดจากรา *Phytophthora*

เก็บและรวบรวม และเก็บตัวอย่างโรคใบจุดตาเสือของเผือก จากแหล่งปลูก ได้แก่ จังหวัดเชียงใหม่ นครสวรรค์ พิษณุโลก สิงห์บุรี นครราชสีมา สุรินทร์ สระบุรี ปราจีนบุรี อยุธยา นครปฐม ราชบุรี สุพรรณบุรี ประจวบคีรีขันธ์ ชุมพร และสุราษฎร์ธานี โดยเลือกเก็บส่วนที่แสดงอาการของโรค ห่อตัวอย่างด้วยกระดาษ โดยรักษาสภาพของตัวอย่างในสภาพที่แห้ง เพื่อให้ส่วนของแผลอยู่ในสภาพที่สมบูรณ์และหลีกเลี่ยงที่เชื้อราชนิดอื่นจะขึ้นปกคลุม เนื่องจากความชื้น บันทึกข้อมูลรายละเอียด วันที่ พิกัด สถานที่ที่เก็บตัวอย่าง ผู้เก็บ พืชอาศัย และลักษณะอาการของโรค จากนั้นนำมาจำแนกชนิดและทำการสกัดดีเอ็นเอ ในห้องปฏิบัติการ ตัวอย่างแห้งจะจัดเก็บในพิพิธภัณฑ์โรคพืช ตึกอิงคศรีกสิการ กลุ่มวิจัยโรคพืช กรมวิชาการเกษตร

2. การจำแนกชนิดของราโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

- การแยกรา และเก็บเชื้อบริสุทธิ์

แยกราโดยวิธี Tissue transplanting โดยตัดบริเวณรอยต่อเนื้อเยื่อที่เป็นโรคกับเนื้อเยื่อปกติเป็นชิ้นสี่เหลี่ยมขนาด 2x2 มิลลิเมตร แช่ในสารละลายโซเดียมไฮเปอร์คลอไรท์ 10 % เป็นเวลา 3-5 นาที ล้างในน้ำนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง ซับให้แห้งด้วยกระดาษที่ผ่านการฆ่าเชื้อ แล้วนำไปวางบนอาหาร Potato Dextrose Agar ผสม BRNAP (PDA+BRNAP) (Masago *et al*., 1972) บ่มที่อุณหภูมิห้อง (25+2 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 24-36 ชั่วโมง ตัดขอบโคโลนีของเส้นใยราที่เจริญจากชิ้นตัวอย่างพืช มาเลี้ยงบนอาหาร PDA+BRNAP อีกครั้ง บ่มที่อุณหภูมิห้อง (25+2 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 24-36 ชั่วโมง ตัดขอบโคโลนีของเส้นใยราที่เจริญจากชิ้นวุ้น มาเลี้ยงบนอาหารวุ้นแครอท (อมรรัตน์ และคณะ, 2556) แล้วทำให้เป็นราบริสุทธิ์จากสปอร์เดี่ยว โดยนำราที่เจริญบนอาหารวุ้นแครอท ไปเก็บไว้ในที่มืด 72 ชั่วโมง แล้วนำออกไปไว้ใต้แสงนีออน ที่อุณหภูมิห้อง นาน 24-48 ชั่วโมง ใช้เข็มเขี่ยที่ฆ่าเชื้อแล้ว จุ่มในน้ำกลั่นบริสุทธิ์ มาแตะกลุ่มสปอร์ แล้วนำไปเขี่ยให้สปอร์กระจายบนอาหารวุ้น (water agar: WA) แล้วตรวจดูใต้กล้องจุลทรรศน์ เพื่อแยกสปอร์เดี่ยว นำไปวางบนอาหาร PDA ทิ้งไว้ 72 ชั่วโมง ให้สปอร์เจริญสร้างกลุ่มสปอร์ แล้วตัดขอบโคโลนี ไปเลี้ยงในหลอดอาหาร PDA (อมรรัตน์, 2556) ในหลอดแก้ว เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ศึกษาต่อไป

- การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา (คู่มือการจำแนกชนิด *Phytophthora* ของ Stamps *et al.* (1990) และ เอกสารของ Erwin and Ribeiro (1996))

- ศึกษาลักษณะการเจริญของเส้นใย (ลักษณะโคโลนี) ของเชื้อ

เลี้ยงรา *Phytophthora* บนอาหารวุ้นมันฝรั่ง หรืออาหารวุ้นแครอท เพื่อศึกษาลักษณะการเจริญของเส้นใย ใช้เครื่องเจาะรู (Cork borer) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร ตัดเส้นใยบริเวณขอบโคโลนีของเชื้อซึ่งเลี้ยงบนอาหาร นาน 5 วัน วางให้ด้านที่มีเส้นใยของเชื้อคว่ำลงบนอาหารบริเวณกลางจานเลี้ยงเชื้อ นำไปบ่มในตู้

บ่มมืดอุณหภูมิห้อง จนเชื้อเจริญเติบโตเต็มจานเลี้ยงเชื้อ บันทึกลักษณะการเจริญที่ผิวหน้าอาหารและความหนาแน่นของเส้นใย

- ศึกษาลักษณะรูปร่างและขนาดสปอร์ของรา

นำรา *Phytophthora* ในจานเลี้ยงเชื้อ ที่มีอาหารวุ้นแครอท จานวน 15 มิลลิเมตร ที่บ่มในตู้บ่มมืดนาน 72 ชั่วโมง นำไปไว้ใต้แสงนีออน (White cool) 40 วัตต์ 2 หลอดระยะ 30 เซนติเมตรที่ให้แสง 200 แรงเทียน (Foot candle ftc) ที่อุณหภูมิห้อง ปล่อยไว้ใต้แสงนาน 48 ชั่วโมง เพื่อให้เชื้อสร้าง สปอร์แรงเจีย (Sporangia) ศึกษาและบันทึกลักษณะการแตกแขนงของก้านสปอร์ (Sporangiophores) วัดความยาว (Length) และความกว้าง (Breadth) ของ สปอร์แรงเจีย เพื่อหาอัตราส่วนความยาวต่อความกว้าง วัดความยาวของก้านสปอร์ (Pedicel หรือ Stalk) ความยาวของ ปาปิลา (Papilla) และวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของ คลาไมโดสปอร์ (Chlamydospore)

- จัดทำตัวอย่างแห้งโรคพืช

ตัวอย่างโรคพืชที่เก็บมาได้ ส่วนหนึ่งนำมาจัดทำตัวอย่างแห้ง โดยตัดส่วนของพืชบริเวณที่แสดงอาการโรค วางบนกระดาษฟาง พร้อมแนบกระดาษบันทึกข้อมูลพืช แล้วปิดทับด้วยกระดาษหนังสือพิมพ์ อัดทับด้วยแผงไม้อัดตัวอย่างโรคพืช นำไปวางผึ่งลม ไม่ให้ถูกแดด เปลี่ยนกระดาษทุกวัน จนกระทั่งตัวอย่างพืชแห้ง จึงนำมาเก็บในถุงกระดาษสำหรับเก็บตัวอย่างแห้ง พร้อมลงรายละเอียดข้อมูลตัวอย่างตามระบบสากล ได้แก่ ชื่อพืช ลักษณะอาการโรค สถานที่เก็บ ชนิดของราสาเหตุโรคพืช วันที่เก็บ ชื่อผู้เก็บ และชื่อผู้จัดจำแนกชนิดรา เป็นต้น แล้วส่งเก็บในพิพิธภัณฑ์ตัวอย่างแห้งโรคพืช กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

3. การจำแนกชนิดของรา *Phytophthora* โดยใช้ลักษณะทางพันธุกรรม

สกัดดีเอ็น

โดยเลี้ยงรา *Phytophthora* ที่ต้องการศึกษาในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่อุณหภูมิห้อง (25-27 องศาเซลเซียส) ให้มีอายุประมาณ 7 วัน จากนั้นเขี่ยเส้นใยของราย้ายลงในหลอดสำหรับสกัดดีเอ็นเอ สกัดดีเอ็นเอโดยใช้ชุดสกัดสำเร็จรูป ปฏิบัติตามขั้นตอนของบริษัทผู้ผลิต โดยก่อนสกัด จะเติมเอ็นไซม์ Proteinase K เพื่อช่วยในการย่อยผนังเซลล์ ใช้ที่ความเข้มข้น 0.8 มิลลิกรัมต่อไมโครลิตร หลังจากสกัดได้ดีเอ็นเอต้นแบบ (DNA template) หากยังไม่ทำ PCR ทันที จะเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 หรือ -40 องศาเซลเซียส เพื่อรักษาสภาพและคุณภาพของดีเอ็นเอ

เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมาย

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้จากแต่ละตัวอย่าง มาทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยวิธีการ Polymerase Chain Reaction (PCR) โดยตำแหน่งของดีเอ็นเอเป้าหมาย คือ translation elongation factor 1-alpha (Tef1) ด้วยคู่ไพร์เมอร์ ELONGF1/ELONGR1 (Kroon *et al*., 2004) β-tubulin ด้วยคู่ไพร์เมอร์ TUBuF2/TUBuR1 (Kroon *et al*., 2004) และ Internal Transcribed Spacer (ITS) DC6 (Cooke *et al*.,

2000)/ITS4 (White *et al*., 1990) เอนไซม์ที่ใช้สำหรับทำปฏิกิริยาสำหรับการวิจัยนี้ คือ Taq DNA Polymerase และกำหนดค่า annealing temperature คือ 56 องศาเซลเซียส สำหรับไพร์เมอร์ของยีนทั้ง 3 ตำแหน่ง

การตรวจสอบผลิตภัณฑ์ PCR

ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำ PCR โดยตรวจสอบขนาดของชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่ต้องการ ด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส (Electrophoresis) ทำการผสมผลิตภัณฑ์ PCR ด้วย loading dye และ stain ในปริมาตร 4 1 และ 1 ไมโครลิตร ตามลำดับ ผสมให้เข้ากันจากนั้นหยอดลงใน agarose gel ที่ความเข้มข้น 1% ให้ผลิตภัณฑ์ PCR เคลื่อนที่ผ่านสารละลาย Lithium Borate buffer (LB buffer) ส่งผลิตภัณฑ์ PCR ไปยัง บริษัท Macrogen Korea เพื่อทำให้ผลิตภัณฑ์ PCR บริสุทธิ์ และหาลำดับนิวคลีโอไทด์

การวิเคราะห์และตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์

นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ดีเอ็นเอของรา *Phytophthora* มาทำการวิเคราะห์ โดยนำเส้นดีเอ็นเอสองเส้นที่ได้จาก forward และ reverse primer มาเทียบกัน โดยใช้โปรแกรมที่ Genious version 8.1.9 (http://www.geneious.com, Kearse *et al*., 2012) จะบันทึกข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ในรูปแบบไฟล์ fasta ทำการตรวจสอบความถูกต้องของชนิดของจุลินทรีย์ที่ทำการศึกษากับฐานข้อมูลทางพันธุกรรม เช่น Mycobank GenBank โดยเลือกวิธีเปรียบเทียบกับ type sequence

บันทึกข้อมูลดีเอ็นเอ และรายงานเพื่อใช้เป็นข้อมูลอ้างอิงสำหรับการจัดทำบัญชีรายชื่อโรคพืช รวมถึงสามารถใช้เป็นข้อมูลประกอบในการศึกษาด้านวิวัฒนาการต่อไป และดีเอ็นเอต้นแบบที่สกัดได้ จะจัดเก็บไว้ที่อุณหภูมิ –40 องศาเซลเซียส ณ พิพิธภัณฑ์โรคพืช กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

วิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการเพื่อการจัดจำแนก

จำแนกชนิดของ *Phytophthora* โดยวิเคราะห์เบื้องต้นจากตำแหน่ง ITS (883 bases/taxa) และทำการวิเคราะห์ concatenated dataset ของยีนตำแหน่ง β-tubulin และ translation elongation factor 1-alpha (1,863 bases/taxa; Tub2 = 944, TEF1 = 919) ด้วย phylogenetic criteria คือ Maximum Likelihood (ML) มีรายละเอียดการวิเคราะห์ ดังนี้ เตรียมไฟล์ phy วิเคราะห์โดยโปรแกรม RAxML v8.1.15 (Stamatakis, 2014) กำหนด model of evolution แบบ GTRGAMMA ซึ่งจำเพาะต่อการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ วิเคราะห์ด้วย rapid bootstrap (command –f a) เริ่มจาก random starting tree และ กำหนด maximum likelihood bootstrap จำนวน 1000 ครั้ง

4. ศึกษาชนิดอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญและสร้างสปอร์ของรา *P. colocasiae*

วางแผนการทดลองแบบ CRD 5 กรรมวิธี 10 ซ้ำ โดยให้อาหารแต่ละชนิดเป็นกรรมวิธี คือ

กรรมวิธีที่ 1 Potato dextrose agar (PDA)

กรรมวิธีที่ 2 V8 juice agar (V8 A)

กรรมวิธีที่ 3 Oat meal agar (OMA)

กรรมวิธีที่ 4 Carrot agar (CA)

กรรมวิธีที่ 5 Corn meal agar (CMA)

วิธีการทดลอง

นำรา *P. colocasiae* บริสุทธิ์ที่แยกได้ มาเลี้ยงบนอาหารทดสอบชนิดต่างๆ ในจานเลี้ยงเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส

การบันทึกข้อมูล

วัดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีของเส้นใยราบนอาหารแต่ละชนิด เมื่อเส้นใยที่เจริญบนอาหารชนิดใดชนิดหนึ่งเจริญเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ลักษณะสีของเส้นใย และการสร้างสปอร์ เพื่อเปรียบเทียบการเจริญของราบนอาหารสูตรต่างๆ

5. ศึกษาการเก็บรักษารา *P. colocasiae*

นำรา *P. colocasiae* บริสุทธิ์ที่แยกได้ มาเลี้ยงบนอาหาร Potato dextrose agar (PDA) ในหลอดทดลอง จนกระทั่งเชื้อราเจริญเต็มนำไปเก็บในตู้เก็บเชื้อ (อุณหภูมิ 17 ^{O}C) และ ที่อุณหภูมิห้อง (อุณหภูมิ 27 ^{O}C) เมื่อได้ระยะเวลาตามแผนนำหลอดเชื้อมาแยกเชื้อเพื่อดูการมีชีวิตของเชื้อ

การบันทึกข้อมูล

การเจริญและการสร้างสปอร์ หลังการเก็บรักษา 2 4 6 8 และ10 เดือน

6. ศึกษาผลของความเป็นกรดเป็นด่าง (pH) และอุณหภูมิ (T) ของอาหารต่อการเจริญและสร้างสปอร์ของรา *P. colocasiae*

วางแผนการทดลองแบบ 3 x 4 Factorial in RCB จำนวน 20 ซ้ำ โดยปัจจัยแรก เป็น ระดับอุณหภูมิ 3 ระดับ ได้แก่ 25°C 30 ^{o}C และ 35 ^{o}C และปัจจัยที่สอง เป็น ระดับความเป็นกรดเป็นด่าง (pH) ของอาหารเลี้ยงเชื้อ 5 ระดับ ได้แก่ pH 6 7 8 9 และ 10

วิธีการทดลอง

นำรา *P. colocasiae* บริสุทธิ์ที่แยกได้ มาเลี้ยงบนอาหาร CA ที่ปรับความเป็นกรดเป็นด่าง (ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ หรือ ไฮโดรคลอริคแอซิค) ในจานเลี้ยงเชื้อ จนกระทั่งเชื้อราเจริญเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อ

การบันทึกข้อมูล

วัดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีของเส้นใยรา ลักษณะสีของเส้นใย และการสร้างสปอร์

- เวลาและสถานที่ - ตุลาคม 2559 – กันยายน 2562

- ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานวิทยาไมโค กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช และแปลงเผือกของเกษตรกร

8. ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การเก็บและรวบรวมตัวอย่างโรคพืชที่เกิดจากรา *Phytophthora*

เก็บตัวอย่างเผือกที่เป็นโรคใบจุดตาเสือจากแหล่งปลูกเผือก (Table 1) รวม 110 ตัวอย่าง แยกราสาเหตุโรคจากส่วนก้านใบและใบเผือกที่แสดงอาการ (Figure 1 and 2) เก็บเป็นราบริสุทธิ์ เพื่อใช้ศึกษา 117 ไอโซเลท

2. การจำแนกชนิดของรา *Phytophthora* โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

- ศึกษาลักษณะการเจริญของเส้นใย (ลักษณะโคโลนี) ของเชื้อ

การเจริญเติบโตของรา *Phytophthora* ในระยะการสืบพันธุ์แบบไม่ใช้เพศ บนอาหารแข็ง 2 ชนิด คือ อาหารวุ้นมันฝรั่ง (PDA) และอาหารวุ้นแครอท (CA) บ่มไว้ที่มืดอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส (Figure 3) พบว่า การสร้างเส้นใยบนอาหารแข็ง มีลักษณะการเจริญเป็นเส้นตรง แตกกิ่งก้านออกไปสม่ำเสมอ เส้นใยใสไม่มีสี ไม่มีผนังกั้นเส้นใย ผิวผนังเส้นใยเรียบ (Smoot) ไม่มีการโป่งพอง การเจริญบนอาหารวุ้นมันฝรั่ง เต็มจานเลี้ยงเชื้อใช้เวลา 9 วัน แต่บนอาหารวุ้นแครอท เชื้อเจริญเติบโตช้ากว่า เต็มจานเลี้ยงเชื้อใช้เวลา 11 วัน นอกจากนี้ บนอาหารวุ้นมันฝรั่ง ราสร้างเส้นใยหนาแน่นกว่า แต่บนอาหารวุ้นแครอทสร้างสปอร์แรนเจีย (Sporangia) มากกว่าบนอาหารวุ้นมันฝรั่ง

- ศึกษาลักษณะรูปร่างและขนาดสปอร์ของรา (Figure 4 and 5)

รา *Phytophthora* สร้างสปอร์แรนเจียจำนวนมาก มีรูปร่างหลายแบบตั้งแต่ รูปไข่ หรือรูปค่อนข้างยาว หรือรูปไข่ ขนาดสปอร์แรนเจีย 98.71-179.40 x 87.78-144.40 μm อัตราส่วนความยาวต่อความกว้าง เท่ากับ 1.40:1 ด้านบนของสปอร์แรนเจียมีส่วนเปิดเป็นทางออกของสปอร์ที่มีหางและว่ายน้ำได้ เด่นชัด

3. การจำแนกชนิดของรา *Phytophthora* โดยใช้ลักษณะทางพันธุกรรม

การจำแนกชนิดของรา *Phytophthora* ที่แยกได้จากตัวอย่างเผือกที่แสดงอาการโรคใบจุดตาเสือ จากแหล่งปลูกเผือก 110 ตัวอย่าง 117 ไอโซเลท จากข้อมูลของลักษณะทางสัณฐานวิทยา พบว่าเป็น *P. colocasiae* ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันในแต่ละแหล่งปลูก เมื่อพิจารณาจากพิกัดภูมิศาสตร์และวิธีการปลูก สามารถแบ่งได้ 5 กลุ่ม เลือกมากลุ่มละ 2 ไอโซเลท รวม 10 ไอโซเลท (Figure 6) เพื่อเปรียบเทียบและจำแนกเบื้องต้นด้วยข้อมูลพันธุกรรมของยีนตำแหน่ง ITS พบว่า รา *P. colocasiae* และรา *Phytophthora* ทั้ง 10 ไอโซเลท มีความใกล้เคียงกับ *P. meadii* มาก จึงวิเคราะห์เพิ่มเติมด้วย concatenated dataset ของยีนตำแหน่ง β-tubulin และ translation elongation factor 1-alpha โดยเปรีบบเทียบกับราใน genus *Phytophthora* จำนวน 69 taxa โดยมี *Pythium aphanidermatum* เป็น outgroup (Table 2) เมื่อวิเคราะห์ phylogenetic reconstruction พบว่ารา *Phytophthora* ทั้ง 10 ไอโซเลท สามารถจำแนกได้เป็น *P. colocasiae* (Figure 7) อย่างไรก็ตาม เมื่อพิจารณาใน clade ของ *P. colocasiae* จะพบว่าราที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ทั้ง 10 ไอโซเลท มีความหลากหลาย โดยความหลากหลายนี้อาจมีความสอดคล้องตามชนิดของพืชอาศัยที่แตกต่าง เช่น ไอโซเลท M0193

ที่แยกได้จากใบบอนพบว่ามีความแตกต่างอย่างชัดเจนกับไอโซเลทอื่น ๆ ใน clade เดียวกัน (Figure 7) รวมถึงความหลากหลายที่อาจเกิดจากความแตกต่างของพื้นที่เก็บตัวอย่าง ซึ่งเมื่อพิจารณาภายใน clade ของรา *P. colocasiae* จะพบว่ามีแนวโน้มของความหลากหลายอย่างน้อย 5 กลุ่ม

4. ศึกษาชนิดอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญและสร้างสปอร์ของรา *P. colocasiae*

*ชนิดอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญ*ของรา *P. colocasiae* ที่ 7 วัน พบว่า รา *P. colocasiae* เจริญบนอาหาร CMA ได้เร็วที่สุดโดยมีเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีเส้นใย 78.0 มม. รองมา ได้แก่ V8, CA, OMA และ PDA มีเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีเส้นใย 69.30, 64.30, 58.70 และ 52.20 มม. ตามลำดับ (Table 3, Figure 8)

ที่ 14 วัน พบว่า บนอาหาร PDA รา *P. colocasiae* มีเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีเส้นใย 85.10 มม. ส่วนบนอาหารชนิดอื่น รา *P. colocasiae* เจริญเต็มจานอาหารแล้ว โดย บนอาหาร CMA เจริญเต็มจานอาหารที่ 8 วัน แต่ให้เส้นใยที่น้อยและบางติดอาหาร ส่วนอาหาร V8, CA และ OMA เจริญเต็มจานอาหารที่ 10 วัน แต่ถึงแม้การเจริญของ รา *P. colocasiae* บนอาหาร PDA จะเจริญได้ช้ากว่า แต่เส้นใยหนาแน่นกว่าอาหารชนิดอื่น ส่วนบนอาหาร OMA ถึงจะมีการเจริญของเส้นใยดีและราสามารถสร้างสปอร์แรงเจียมได้ แต่ยากต่อการสังเกตุเนื่องจากสีของอาหารมีสีขาวขุ่น

ลักษณะเส้นใยบนอาหารต่างๆ ดังนี้

- PDA เส้นใยสีขาว แน่น ค่อนข้างหยิก เจริญเป็นวงถี่ๆ เห็นชัดเจน เส้นใยชูขึ้นบนผิวอาหารเล็กน้อย
- CA เส้นใยสีขาว หยิก เจริญเป็นวง เส้นใยชูขึ้นบนผิวอาหาร
- V8 เส้นใยสีขาว หยิก เจริญเป็นวงเห็นชัดเจน เส้นใยชูขึ้นบนผิวอาหารมาก
- OMA เส้นใยสีขาว หยาบ หยิกเล็กน้อย เจริญแบนราบติดผิวอาหาร แต่เห็นการเจริญยาก เนื่องจากอาหารมีสีขาวขุ่น สีเดียวกับเส้นใย
- CMA เส้นใยสีขาว บางมาก ค่อนข้างตรง เจริญแบนราบติดผิวอาหาร

*ชนิดอาหารที่เหมาะสมการสร้างสปอร์*ของรา *P. colocasiae* พบว่า รา *P. colocasiae* ไม่สร้างสปอร์แรงเจียมบนอาหาร CMA ส่วนบนอาหารอื่นๆ สามารถสร้างสปอร์ได้เรียงลำดับ ดังนี้ CA, PDA, OMA และ V8A (Table 4, Figure 9) ซึ่งสอดคล้องกับ Jeffers (2006) ที่ใช้อาหาร CA และ V8A ในการศึกษาการระบุชนิดของรา *Phytophthora*

5. ศึกษาการเก็บรักษารา *P. colocasiae*

หลังการเก็บรักษา 2 เดือน พบว่า การเก็บในตู้เก็บเชื้อ (อุณหภูมิ 17°C) และ ที่อุณหภูมิห้อง (อุณหภูมิ 27°C) การเจริญของราปกติ ส่วนการสร้างสปอร์ค่อนข้างน้อย

หลังการเก็บรักษา 4 เดือน พบว่า การเก็บในตู้เก็บเชื้อ (อุณหภูมิ 17°C) และ ที่อุณหภูมิห้อง (อุณหภูมิ 27°C) การเจริญของราเริ่มลดลง ส่วนการสร้างสปอร์ค่อนข้างน้อย

หลังการเก็บรักษา 6 เดือน พบว่า การเก็บในตู้เก็บเชื้อ (อุณหภูมิ 17°C) การเจริญของราไม่แตกต่างจากการเก็บที่ 4 เดือน ส่วนที่อุณหภูมิห้อง (อุณหภูมิ 27°C) การเจริญของลดลง ส่วนการสร้างสปอร์ค่อนข้างน้อย และเริ่มพบการปนเปื้อน

หลังการเก็บรักษา 8 เดือน พบว่า การเก็บในตู้เก็บเชื้อ (อุณหภูมิ 17 ^{O}C) และที่อุณหภูมิห้อง (อุณหภูมิ 27 ^{O}C) มีการเจริญของลดลง ส่วนการสร้างสปอร์ค่อนข้างน้อย และมีการปนเปื้อน

หลังการเก็บรักษา 10 เดือน พบว่า การเก็บในตู้เก็บเชื้อ (อุณหภูมิ 17 OC) และที่อุณหภูมิห้อง (อุณหภูมิ 27 OC) มีการเจริญของลดลง ส่วนการสร้างสปอร์ค่อนข้างน้อย และมีการปนเปื้อนเพิ่มขึ้น

6. ศึกษาผลของความเป็นกรดเป็นด่าง (pH) และอุณหภูมิ (T) ของอาหารต่อการเจริญและสร้างสปอร์ของรา *P. colocasiae*

ผลของความเป็นกรดเป็นด่าง (pH) และอุณหภูมิ (T) ต่อการเจริญของรา P. colocasiae ที่ pH 10 ไม่มีการเจริญของรา ที่อุณหภูมิ 35°C ส่วนที่อุณหภูมิ 30°C และอุณหภูมิ 25 °C มีการเจริญเป็นปกติ pH 5, 6, 7, 8 และ 9 มีการเจริญช้า ที่อุณหภูมิ 35°C ส่วนที่อุณหภูมิ 30°C และอุณหภูมิ 25 °C มีการเจริญเป็นปกติ ซึ่งสอดคล้องกับ Tsopmbeng *et al*. (2014) ที่รายงานว่า ที่ pH 10 การเจริญของรา *P. colocasiae* ต่ำกว่าที่ pH อื่นๆ ในทุกอุณหภูมิ และเจริญสูงสุดที่อุณหภูมิ 27 °C, 30 °C, 24 °C, 21 °C และ 18 °C ตามลำดับ และ ที่ pH 6.5 เหมาะสมที่สุดสำหรับการเจริญของรา *P. colocasiae* (Sahu *et al*., 2000)

ผลของความเป็นกรดเป็นด่าง (pH) และอุณหภูมิ (T) ต่อการสร้างสปอร์ของรา P. colocasiae ที่ pH 9 ไม่มีการสร้างสปอร์ ที่อุณหภูมิ 35°C และอุณหภูมิ 30°C ที่อุณหภูมิ 25 °C สร้างสปอร์ได้ปกติ สำหรับ pH 5, 6, 7 และ 8 มีการสร้างสปอร์ที่อุณหภูมิ 30°C ได้ แต่น้อยกว่า ที่อุณหภูมิ 25°C ซึ่งสามารถสร้างสปอร์ได้ดีเป็นปกติ

9. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

ผลการรวบรวมและเก็บตัวอย่างเผือกที่แสดงอาการโรคใบจุดตาเสือ 110 ตัวอย่าง ในจังหวัดเพชรบุรี ประจวบคีรีขันธ์ กาญจนบุรี สุพรรณบุรี นครปฐม เพชรบูรณ์ สระบุรี นครราชสีมา สุโขทัย และจังหวัดเชียงใหม่ แยกได้ 117 ไอโซเลท เมื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและลักษณะทางพันธุกรรม พบว่าเป็น *P. colocasiae* ราเจริญได้ดีบนอาหาร V8, CA OMA และ PDA สร้างสปอร์ได้ดีบนอาหาร CA และ PDA สามารถเก็บรักษาไว้ในหลอดอาหารเอียง PDA ได้อย่างน้อย 10 เดือน ทั้งในตู้เก็บเชื้อ (อุณหภูมิ 17°C) และ ที่อุณหภูมิห้อง (อุณหภูมิ 27°C) แต่ที่อุณหภูมิห้อง (อุณหภูมิ 27°C) การมีชีวิตรอดลดลงและมีการปนเปื้อนมากกว่าการเก็บในตู้เก็บเชื้อ (อุณหภูมิ 17°C) รานี้เจริญได้ดีที่ pH 5, 6 และ pH 7 อุณหภูมิ 25°C และอุณหภูมิ 30°C ราสร้างสปอร์ได้ดีที่

pH 5, 6 และ pH 7 อุณหภูมิ 25°C สำหรับที่ pH 10 การเจริญและการสร้างสปอร์ ลดลงเมื่อมีอุณหภูมิสูงขึ้น ทำการจัดเก็บตัวอย่างแห้งโรคพืชไว้ในพิพิธภัณฑ์ตัวอย่างแห้งโรคพืช ตึกอิงคศรีกสิการ กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร และเก็บรักษาสายพันธุ์บริสุทธิ์ของเชื้อไว้ใน culture collection

10. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์ :

- ได้อาหารที่เหมาะสมในการเจริญของเส้นใยและการสปอร์ของเชื้อสาเหตุโรค และการเก็บรักษาราสาเหตุโรค เพื่อใช้ในการศึกษาในระยะยาว
- ได้ข้อมูลเบื้องต้นของปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญและสร้างสปอร์ของราสาเหตุโรคใบจุดตาเสือของเผือก เพื่อการคาดการณ์การเพิ่มหรือลดของเชื้อสาเหตุ หรือการเลือกพื้นที่ปลูก
- เผยแพร่แก่ นักวิจัย จากหน่วยงานต่างๆ ทั้งภาครัฐและเอกชนเพื่อไปพัฒนางานต่อไป

11. คำขอบคุณ

ขอขอบคุณพี่ ๆ และน้อง ๆ กลุ่มงานวิทยาไมโค กลุ่มวิจัยโรคพืช ที่ให้ความช่วยเหลือ และความร่วมมือในการดำเนินการทดลองทุกขั้นตอน รวมถึงกำลังใจที่มีให้กันเสมอมา

12. เอกสารอ้างอิง

กลุ่มวิจัยโรคพืช. 2555. *คู่มือโรคผัก*. โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย. กรุงเทพฯ. 153 หน้า.

มาลินี พิทักษ์ สมศรี บุญเรือง และรังสิมันตุ์ สัมฤทธิ์. ม.ป.ท. *การปลูกเผือก*. (ระบบออนไลน์). แหล่งข้อมูล : http://eto.ku.ac.th/neweto/e-book/plant/herb_gar/pukperk.pdf (7 มีนาคม 2562).

ศูนย์เทคโนโลยีสารสนเทศและการสื่อสาร. 2560. *ข้อมูลภาวะการผลิตพืช ปี 2559/60*. (ระบบออนไลน์). แหล่งข้อมูล : http://www.agriinfo.doae.go.th/year60/plant/rortor/ page1.pdf (7 มีนาคม 2562).

สารานุกรมไทยสำหรับเยาวชน. ม.ป.ท. *พืชหัว/เผือก*. (ระบบออนไลน์). แหล่งข้อมูล : http:// kanchanapisek.or.th/kp6 / sub/book/book.php?book=5 &chap=5 &page=t5 -5 - infodetail04.html (7 มีนาคม 2562).

อมรรัตน์ ภู่ไพบูลย์. 2552. *รา Phytophthora สาเหตุโรคพืชในประเทศไทย*. เอกสารวิชาการ สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช. กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 74 หน้า.

อมรรัตน์ ภู่ไพบูลย์. 2556. *พืชที่เป็นโรคไฟทอปธอรา*. เอกสารวิชาการ สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช. กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 189 หน้า.

อมรรัตน์ ภู่ไพบูลย์ ยุทธศักดิ์ เจียมไชยศรี และพีระวรรณ พัฒนาวิภาส. 2556. การศึกษาชีววิทยาและนิเวศวิทยาของรา *Phytophthora capsici*. หน้า 2281-2292. *ใน : ผลงานวิจัย ประจำปี 2555*. สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร.

Anonymous. n.p. *Phytophthora colocasiae*. (Online). Available : http://www.extento.hawaii.edu/ kbase/crop/type/p_coloc.htm. (June 22, 2014)

Brooks, F.E. 2005. *Taro leaf blight*. (Online). Available : https://www.apsnet.org/edcenter/ intropp/lession/fungi/Oomycetes/Pages/TaroLeafBlight.aspx. (June 22, 2014)

Cooke, D. E. L., A. Drenth, J. M. Duncan, G. Wagels, and C. M. Brasier. 2000. A Molecular Phylogeny of *Phytophthora* and Related Oomycetes. *Fungal Genetics and Biology*. 30: 17–32.

Erwin, D.C and O.K.Ribeiro. 1996. *Phytophthora Diseases Worldwide*. APS Press, St.Paul., MN., USA. 562 p.

Gollifer, D.E. and J.F. Brown. 1974. Phytophthora leaf blight of *Colocasia esculenta* in the British Solomon Islands. *Papua New Guinea Agricultural Journal*. 25: 6-11.

Jackson, G.V.H., D.E. Gollifer and F.J. Newhook. 1980. Studies on the taro leaf blight fungus *Phytophthora colocasiae* in Solomon Islands: Control by fungicides and spacing. *Annals of Applied Biology*. 96 (1): 1-10.

Jeffers, S.N. 2006. *Identifying species of Phytophthora*. (Online). Available: https://fhm.fs.fed.us/sp/sod/misc/culturing_species_phytophthora.pdf. (November 20, 2017)

Kearse, M., R. Moir, A. Wilson, S. Stones-Havas, M. Cheung, S. Sturrock, S. Buxton, A. Cooper, S. Markowitz, C. Duran, T. Thierer, B. Ashton, P. Mentjies and A. Drummond. 2012. Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics* 28(12): 1647-1649.

Kroon L., Bakker FT, Bosch GBM van den, Bonants PJM and Flier WG. 2004. Phylogenetic analysis of *Phytophthora* species based on mitochondrial and nuclear DNA sequences. *Fungal Genetics and Biology*. 41: 766 – 782.

Masago, H., M. Yoshikawa, M. Fukada and N. Nakanishi. 1972. Selection inhibition of *Pythium* spp. on a medium for direct isolation of *Phytophthora* spp. from soils and plants. *Phytophthology* 67 : 425 – 428.

Mei-ju Lin and Wen-Hsiung Ko. 2008. Occurrence of isolates of *Phytophthora colocasiae* in Taiwan with homothaiiic behavior and its significance. *Mycologia*. 100(5) : 727-734.

Nath, V.S., M. Senthil, V.M. Hegde, M.L. Jeeva, R.S. Misra, S.S. Veena and M. Raj. 2013. Genetic diversity of Phytophthora colocasiae isolates in India based on AFLP analysis. *Biotech*. 3: 297–305.

Raj, S.M., A.K. Mishraa, K.S., M.L.Jeevaa and V. Hegdea. 2011. Characterisation of *Phytophthora colocasiae* isolates associated with leaf blight of taro in India. *Phytopathology and Plant Protection*. 44(6) : 581-591.

Stamatakis, A. 2014. RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *BIOINFORMATICS*. 30(9) : 1312–1313.

Stamps, D.J., G. M. Waterhouse, F. J. Newhook and G. S. Hall. 1990. *Revised Tabular Key to the Species of Phytopthora*. Mycological Papers No. 162. CB. International Mycological Institute. 28 p.

Sahu, A.K., S.K. Maheshwari, S. Sriram and R.S. Misra. 2000. Effects of temperature and pH on the growth of *Phytophthora colocasiae*. *Annals of Plant Protection Sciences*. 8(1) : 112-114.

Tsopmbeng N.G.R., J.A. Lienou, C.P. Megatche and D. A. Fontem. 2014. Effect of different pH and temperature levels on in vitro growth and sporulation of *Phytophthora colocasiae*, taro leaf blight pathogen. *International Journal of Agronomy and Agricultural Research*. 4(4) : 202-206.

White, T.J., Bruns, T., Lee, S. and J. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. pp. 315-322. *In*: M. Innis, D. Gelfand, J. Shinsky and T. White, eds. *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. Academic Press.

Table 1 Sampling location of Taro leaf blight.

No.	Sampling location			
1	สายหนึ่ง	ท่าคอย	ท่ายาง	เพชรบุรี
2			ท่ายาง	เพชรบุรี
3	ม.7 บ้านประชาสุขสาร	ทุ่งสมอ	เขาค้อ	เพชรบูรณ์
4	ม.7 บ้านประชาสุขสาร	ทุ่งสมอ	เขาค้อ	เพชรบูรณ์
5		วังโบสถ์	หนองไผ่	เพชรบูรณ์
6		วังโบสถ์	หนองไผ่	เพชรบูรณ์
7	ม.1 บ้านวังรี	นาเฉลียง	หนองไผ่	เพชรบูรณ์
8	ม.1 บ้านวังรี	นาเฉลียง	หนองไผ่	เพชรบูรณ์
9	ม.1 บ้านวังรี	นาเฉลียง	หนองไผ่	เพชรบูรณ์
10	ม.1 บ้านวังรี	นาเฉลียง	หนองไผ่	เพชรบูรณ์
11	ม.1 บ้านวังรี	นาเฉลียง	หนองไผ่	เพชรบูรณ์
12	ม.1 บ้านวังรี	นาเฉลียง	หนองไผ่	เพชรบูรณ์
13	ม.1 บ้านวังรี	นาเฉลียง	หนองไผ่	เพชรบูรณ์
14	ม.1 บ้านวังรี	นาเฉลียง	หนองไผ่	เพชรบูรณ์
15	ม.1 บ้านวังรี	นาเฉลียง	หนองไผ่	เพชรบูรณ์
16	ม.1 บ้านวังรี	นาเฉลียง	หนองไผ่	เพชรบูรณ์
17	ม.1 บ้านวังรี	นาเฉลียง	หนองไผ่	เพชรบูรณ์
18	ม.1 บ้านวังรี	นาเฉลียง	หนองไผ่	เพชรบูรณ์
19	ม.1 บ้านวังรี	นาเฉลียง	หนองไผ่	เพชรบูรณ์
20	ม.9 (บ้านหลังสถานี)	บ้านหมอ	บ้านหมอ	สระบุรี
21	ม.9 (บ้านหลังสถานี)	บ้านหมอ	บ้านหมอ	สระบุรี
22	ม.9 (บ้านหลังสถานี)	บ้านหมอ	บ้านหมอ	สระบุรี
23	ม.9 (บ้านหลังสถานี)	บ้านหมอ	บ้านหมอ	สระบุรี
24	ม.5 (บ้านวังกะโห้)	โคกใหญ่	บ้านหมอ	สระบุรี
25	ม.5 (บ้านวังกะโห้)	โคกใหญ่	บ้านหมอ	สระบุรี
26	ม.5 (บ้านวังกะโห้)	โคกใหญ่	บ้านหมอ	สระบุรี
27	ม.5 (บ้านวังกะโห้)	โคกใหญ่	บ้านหมอ	สระบุรี
28	ม.1 บ้านท่ายาง	ท่ายาง	ท่ายาง	เพชรบุรี
29	ม.7 บ้านหนองบ้วย	ท่ายาง	ท่ายาง	เพชรบุรี
30	ม.7 บ้านหนองบ้วย	ท่ายาง	ท่ายาง	เพชรบุรี
31	ม.9 บ้านหนองแจง	ท่ายาง	ท่ายาง	เพชรบุรี

32	ม.9 บ้านหนองแจง	ท่ายาง	ท่ายาง	เพชรบุรี
33	ม.9 สาย 2 บ้านหนองแจง	ท่ายาง	ท่ายาง	เพชรบุรี
34	ม.9 สาย 2 บ้านหนองแจง	ท่ายาง	ท่ายาง	เพชรบุรี
35	ม.4 บ้านไสค้าน	ท่ายาง	ท่ายาง	เพชรบุรี
36	หนองขานาง	ท่าคอย	ท่ายาง	เพชรบุรี

Table 1 Sampling location of Taro leaf blight. (cont.)

No.	Sampling location			
37	หนองขานาง	ท่าคอย	ท่ายาง	เพชรบุรี
38	หนองขานาง	ท่าคอย	ท่ายาง	เพชรบุรี
39	ม.8 บ้านหนองแขม	ท่ายาง	ท่ายาง	เพชรบุรี
40	ม.8 บ้านหนองแขม	ท่ายาง	ท่ายาง	เพชรบุรี
41	ม.8 บ้านหนองแขม	ท่ายาง	ท่ายาง	เพชรบุรี
42	ม.8 บ้านหนองแขม	ท่ายาง	ท่ายาง	เพชรบุรี
43	ม.8 บ้านหนองแขม	ท่ายาง	ท่ายาง	เพชรบุรี
44	บ้านหัวทุ่ง	ท่ายาง	ท่ายาง	เพชรบุรี
45	บ้านหัวทุ่ง	ท่ายาง	ท่ายาง	เพชรบุรี
46	ม.2 บ้านทุ่งแฝก	หาดขาม	กุยบุรี	ประจวบคีรีขันธ์
47		หาดขาม	กุยบุรี	ประจวบคีรีขันธ์
48	ม.4 บ้านโป่งกะสัง	หาดขาม	กุยบุรี	ประจวบคีรีขันธ์
49	ม.11 บ้านเขาตกน้ำ	หาดขาม	กุยบุรี	ประจวบคีรีขันธ์
50	ม.11 บ้านเขาตกน้ำ	หาดขาม	กุยบุรี	ประจวบคีรีขันธ์
51	ซ. พัชรี ม.4 บ้านโป่งกะสัง	หาดขาม	กุยบุรี	ประจวบคีรีขันธ์
52	ม.3 บ้านหาดขาม	หาดขาม	กุยบุรี	ประจวบคีรีขันธ์
53	ม.7	ท่าเรือ	ท่ามะกา	กาญจนบุรี
54	ม.7	ท่าเรือ	ท่ามะกา	กาญจนบุรี
55	วัดเทวธรรม ม.3 บ้านศาลตึก	ท่าล้อ	ท่าม่วง	กาญจนบุรี
56	ม.6 บ้านหนองสองตอน	ท่าล้อ	ท่าม่วง	กาญจนบุรี
57	ม.2 บ้านห้วยนาคราช	ทุ่งทอง	ท่าม่วง	กาญจนบุรี
58	ม.2 บ้านห้วยนาคราช	ทุ่งทอง	ท่าม่วง	กาญจนบุรี
59	ม.2 บ้านห้วยนาคราช	ทุ่งทอง	ท่าม่วง	กาญจนบุรี
60	ม.1 ซ.12 บ้านกร่างทอง	ทุ่งทอง	ท่าม่วง	กาญจนบุรี
61	ม.1 ซ.13 บ้านกร่างทอง	ทุ่งทอง	ท่าม่วง	กาญจนบุรี
62	วัดสันติคีรีศรีบรมธาตุ ม.5	ท่าล้อ	ท่าม่วง	กาญจนบุรี
63	ม.2 บ้านสำนักคร้อ	ตะคร้ำเอน	ท่ามะกา	กาญจนบุรี
64	ม.1 บ้านท่ากระบือ	เกาะสำโรง	เมือง	กาญจนบุรี
65	ม.7 หนองยายทรัพย์	สระยายโสม	อู่ทอง	สุพรรณบุรี
66	ม.4 บ้านโซ่ง	สระยายโสม	อู่ทอง	สุพรรณบุรี
67	บ้านทองลุ่ม	บ้านกร่าง	ศรีประจันต์	สุพรรณบุรี

68	บ้านทองลุ่ม	บ้านกร่าง	ศรีประจันต์	สุพรรณบุรี
69	บ้านทองลุ่ม	บ้านกร่าง	ศรีประจันต์	สุพรรณบุรี
70	ม.3 บ้านดอนบุปผา	บ้านกร่าง	ศรีประจันต์	สุพรรณบุรี
71	ม.3 บ้านดอนบุปผา	บ้านกร่าง	ศรีประจันต์	สุพรรณบุรี
72	ม.5 บ้านกล้วย	บ้านกร่าง	ศรีประจันต์	สุพรรณบุรี

Table 1 Sampling location of Taro leaf blight. (cont.)

No.	Sampling location			
73	วัดโพธิ์ศรีเจริญ ม.6 บ้านดงตาป้อม	บ้านกร่าง	ศรีประจันต์	สุพรรณบุรี
74	วัดโพธิ์ศรีเจริญ ม.6 บ้านดงตาป้อม	บ้านกร่าง	ศรีประจันต์	สุพรรณบุรี
75	ม. 4 บ้านปู่เจ้า	บ้านกร่าง	ศรีประจันต์	สุพรรณบุรี
76	ม. 4 บ้านปู่เจ้า	บ้านกร่าง	ศรีประจันต์	สุพรรณบุรี
77	วัดดงขี้เหล็ก ม.4 บ้านดงขี้เหล็ก	วังหว้า	ศรีประจันต์	สุพรรณบุรี
78	ม.7 บ้านคลองชะโด	วังหว้า	ศรีประจันต์	สุพรรณบุรี
79	ม.7 บ้านคลองชะโด	วังหว้า	ศรีประจันต์	สุพรรณบุรี
80	ม.7 บ้านคลองชะโด	วังหว้า	ศรีประจันต์	สุพรรณบุรี
81	ม.9	หนองหาร	สันทราย	เชียงใหม่
82	ม.9	หนองหาร	สันทราย	เชียงใหม่
83	ม.9	หนองหาร	สันทราย	เชียงใหม่
84	ม.9	หนองหาร	สันทราย	เชียงใหม่
85	ม.9	หนองหาร	สันทราย	เชียงใหม่
86	ม.6	หนองหาร	สันทราย	เชียงใหม่
87	117/1 ม.11	หนองงูเหลือม	เมือง	นครปฐม
88	ม.8	ห้วยหมอนทอง	กำแพงแสน	นครปฐม
89	ม.9 บ้านหนองขี้แรด	ตะคร้ำเอน	ท่ามะกา	กาญจนบุรี
90		วังขนาย	ท่าม่วง	กาญจนบุรี
91	ม.6	วังขนาย	ท่าม่วง	กาญจนบุรี
92	ม.6	วังขนาย	ท่าม่วง	กาญจนบุรี
93	ม.1 บ้านป่ากระพุ่ม	หนองบัว	ศรีนคร	สุโขทัย
94	ม.1 บ้านป่ากระพุ่ม	หนองบัว	ศรีนคร	สุโขทัย
95	ม.5 บ้านหนองโรง	หนองบัว	ศรีนคร	สุโขทัย
96	ม.2 บ้านหนองเหมือง	หนองบัว	ศรีนคร	สุโขทัย
97	ม.2 บ้านหนองเหมือง	หนองบัว	ศรีนคร	สุโขทัย
98	ม.1 บ้านตาลพร้า	ศรีนคร	ศรีนคร	สุโขทัย
99	ม.6 บ้านบึงงาม	นครเดิฐ	ศรีนคร	สุโขทัย
100	ม.6 บ้านบึงงาม	นครเดิฐ	ศรีนคร	สุโขทัย
101	ม.6 บ้านหนองโสน	ศรีนคร	ศรีนคร	สุโขทัย
102	ม.6 บ้านหนองโสน	ศรีนคร	ศรีนคร	สุโขทัย
103	ม.6 บ้านหนองโสน	ศรีนคร	ศรีนคร	สุโขทัย

104	ม.6 บ้านหนองโสน	ศรีนคร	ศรีนคร	สุโขทัย
105	ม.5 บ้านหนองสนวน	กุดโบสต์	เสิงสาง	นครราชสีมา
106	ม.7 บ้านหนองแดง	กุดโบสต์	เสิงสาง	นครราชสีมา
107	ม.7 บ้านหนองแดง	กุดโบสต์	เสิงสาง	นครราชสีมา
108	ม.7 บ้านหนองตูม	สุขไพบูลย์	เสิงสาง	นครราชสีมา

Table 1 Sampling location of Taro leaf blight. (cont.)

No.	Sampling location			
109	ม.6 บ้านหนองเข้	สุขไพบูลย์	เสิงสาง	นครราชสีมา
110	ม.6 บ้านหนองเข้	สุขไพบูลย์	เสิงสาง	นครราชสีมา

Figure 1 Symptoms of taro leaf blight on leaf and petiole.

Figure 2 Symptoms of taro leaf blight on the upper leaf surface (dark brown flecks or light brown spots, circular, zonate, some with yellow halos) (left) and on the lower leaf surface, spots have a water-soaked, or dry gray appearance. (right)

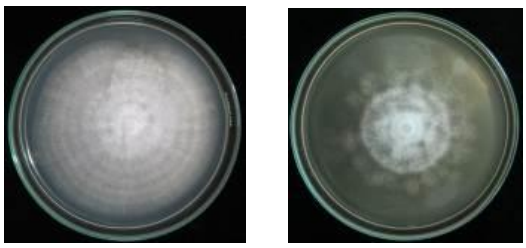


Figure 3 Colony types of *Phytophthora* isolated from taro on Potato dextrose agar (PDA) after 9 days incubation (left) and on Carrot agar (CA) after 11 days incubation. (right)

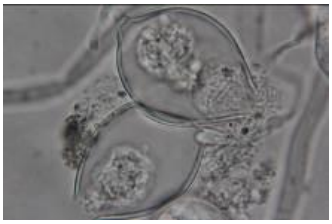


Figure 4 Microscopic view of mycelium and sporangium of *Phytophthora* on Potato dextrose agar (PDA)

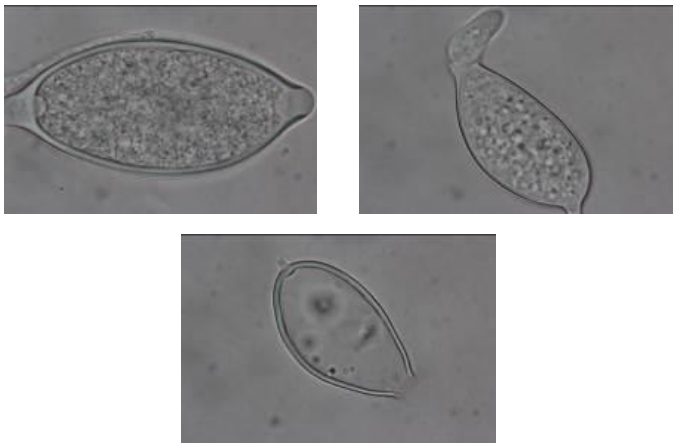


Figure 5 Microscopic view of sporangium of *Phytophthora* on Carrot agar (CA)

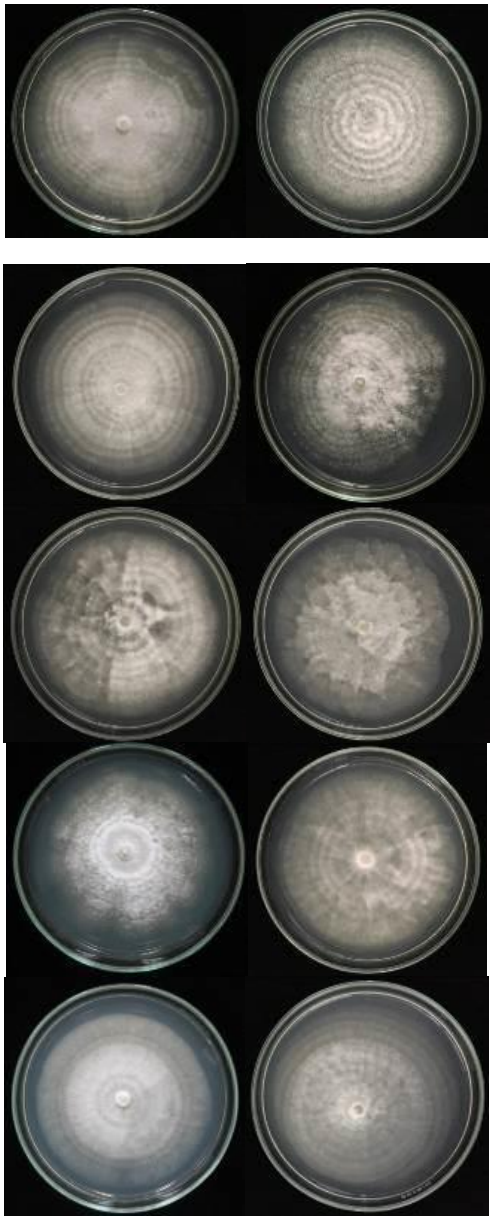


Figure 6 *Phytophthora colocasiae* isolates used for genetic characteristics.

Table 2 The list of taxa used in the phylogenetic identification.

Taxa	Acession No.	Host	Locations	GenBank No.[a]	
				β-tubulin	EF-1α
Phytophthora andina	EC3421	*Solanum muricatum*	Ecuador	AY564045	AY564102
P. arecae	CBS148.88	*Chamaedorea seifrizzi* x *erumpens*	USA	AY564049	AY564105
P. boehmeriae	CBS291.29	*Boehmeria nivea*	Japan	AY564050	AY564106
P. botryosa	CBS533.92	*Hevea brasiliensis*	Thailand	AY564051	AY564107
P. brassicae	CBS179.87	*Brassica oleracea*	The Netherlands	AY564083	AY564139
P. cactorum	P6183	*Rubus idaeus*	USA	AY564052	AY564108
P. cinnamomi	10A6	*Persea americana*	-	AY564054	AY564110
P. citricola	P1817	*Medicago sativa*	South Africa	AY564055	AY564111
P. citrophthora	PD94/353	*Citrus limonium*	Cyprus	AY564056	AY564112
P. clandestina	R193	*Trifolium subterranea*	Australia	AY564057	AY564113
P. colocasiae	IMI368918	*Colocasia esculenta*	Malaysia	AY564058	AY564114
P. colocasiae	M0186	*C. esculenta*	Moo 5, Ban Nong Sa-nguan, Kut Bot Sub-district, Soeng Sang District, Nakhon Ratchasima Province, Thailand	this study	this study
P. colocasiae	M0187	*C. esculenta*	Huai Mon Thong Subdistrict, Kamphaeng Saen District, Nakhon Pathom Province, Thailand	this study	this study

Table 2 The list of taxa used in the phylogenetic identification. (cont.)

Taxa	Acession No.	Host	Locations	GenBank No.	
				ß-tubulin	EF-1α
Phytophthora colocasiae	M0188	*C. esculenta*	Moo 6, Ban Nong Khe, Suk Phaibun Sub-district, Soeng Sang District, Nakhon Ratchasima Province, Thailand	this study	this study
P. colocasiae	M0189	*C. esculenta*	Moo 5, Khok Mai Sub-district, Ban Mo District, Saraburi Province, Thailand	this study	this study
P. colocasiae	M0190	*C. esculenta*	Moo 9, Nong Han Sub-district, San Sai District, Chiang Mai Province, Thailand	this study	this study
P. colocasiae	M0192	*C. esculenta*	Baan Sai Nueng, Tha Khoi Subdistrict, Tha Yang District, Phetchaburi Province, Thailand	this study	this study
P. colocasiae	M0193	*C. esculenta* var. *aquatilis*	Moo 7, Prachasuksan Village, Thung Samo Sub-district, Khao Kho District, Phetchabun Province, Thailand	this study	this study
P. colocasiae	M0194	*C. esculenta*	Moo 7, Prachasuksan Village, Thung Samo Sub-district, Khao Kho District, Phetchabun Province, Thailand	this study	this study
P. colocasiae	M0195	*C. esculenta*	Ban Nong Yai Sub Sra Yai Som Sub-district, U Thong District, Suphan Buri Province, Thailand	this study	this study
P. colocasiae	M0196	*C. esculenta*	Ban Nong Suk, Ban Krang Si Prachan District Suphan Buri Province,	this study	this study

			Thailand		
P. cryptogea	HR1/ss/pp/99	*S. lycopersicum*	UK	AY564059	AY564115
P. drechsleri	CBS292.35	*Beta vulgaris var. altissima*	USA	AY564060	AY564116

Table 2 The list of taxa used in the phylogenetic identification. (cont.)

Taxa	Acession No.	Host	Locations	GenBank No.	
				ß-tubulin	EF-1α
Phytophthora erythroseptica	CBS951.87	*S. tuberosum*	Australia	AY564061	AY564117
P. fragariae var. *fragariae* I	A2	*Fragaria x ananassa*	-	AY564062	AY564118
P. fragariae var. *fragariae* II	NS4	*Fragaria x ananassa*	-	AY564063	AY564119
P. fragariae var. *rubi* I	FVR67	*Rubus idaeus*	-	AY564064	AY564120
P. fragariae var. *rubi* II	FVR30	*R. idaeus*	Scotland	AY564065	AY564121
P. gonapodyides	P245	*Salix matsudana*	UK	AY564066	AY564122
P. heveae	CBS296.29	*Hevea brasiliensis*	Malaysia	AY564067	AY564123
P. hibernalis	CBS522.77	*Aquilegia vulgaris*	New Zealand	AY564068	AY564124
P. humicola	IMI302303	citrus orchard soil via citrus bait	Taiwan	AY564069	AY564125
P. hybrid-Dutch variant	PD92/1471	*Alnus cordata*	The Netherlands	AY564053	AY564109
P. idaei	R66	-	UK	AY564070	AY564126
P. ilicis	PD91/595	*Ilex aquifolium*	The Netherlands	AY564071	AY564127
P. infestans haplotype Ia	Pic99186	*S. stoliniferum*	Mexico	AY564035	AY564093
P. infestans haplotype IIa	Dr98004	*S. tuberosum*	-	AY564036	AY564094
P. infestans haplotype IIb	Can4	-	The Netherlands	AY564037	-
P. inflata	IMI342898	*Syringa*	UK	AY564072	AY564128
P. insolita	IMI288805	soil	Taiwan	AY564073	AY564129
P. ipomoeae	Pic99165	*Ipomoea longipedunculata*	Mexico	AY564043	AY564100
P. iranica	CBS374.72	*S. melongena*	Iran	AY564074	AY564130

Table 2 The list of taxa used in the phylogenetic identification. (cont.)

Taxa	Acession No.	Host	Locations	GenBank No.	
				ß-tubulin	EF-1α
Phytophthora katsurae	CBS587.05	soil	Taiwan	AY564075	AY564131
P. lateralis	CBS168.42	*Chamaecyparis lawsoniana*	USA	AY564076	AY564132
P. meadii	CBS219.88	*H. brasiliensis*	India	AY564077	AY564133
P. megakarya	IMI337098	*Theobroma cacao*	Equatorial Guinea	AY564078	AY564134
P. megasperma	MEG23	*Malus sylvestris*	Australia	AY564079	AY564135
P. mirabilis type I	Pic99129	*Mirabilis jalapa*	Mexico	AY564038	AY564095
P. mirabilis type II	P3001	*M. jalapa*	Mexico	AY564039	AY564096
P. mirabilis type III	Pic99145	*M. jalapa*	Mexico	AY564040	AY564097
P. mirabilis type IV	G4-4	*M. jalapa*	Mexico	AY564041	AY564098
P. mirabilis type V	G15-4	*M. jalapa*	Mexico	AY564042	AY564099
P. multivesiculata	PD95/8679	*Cymbidium*	The Netherlands	AY564080	AY564136
P. nicotianae	P582	*Nicotiana tabacum*	USA	AY564081	AY564137
P. palmivora	CBS236.30	*Cocos nucifera*	India	AY564082	AY564138
P. phaseoli	CBS556.88	*Phaseolus lunatus*	-	AY564044	AY564101
P. pseudotsugae	PSE1	*Pseudotsuga menziesii*	USA	AY564084	AY564140
P. quininea	CBS407.48	*Cinchona officinalis*	Peru	AY564085	AY564141
P. ramorum European-type	USA 0.13	*Quercus agrifolia*	USA	AY564092	AY564149
P. ramorum US-type	-	-	-	-	AY564148

P. richardiae	CBS240.30	*Zantedeschia aethiopica*	USA	AY564086	AY564142

Table 2 The list of taxa used in the phylogenetic identification. (cont.)

Taxa	Acession No.	Host	Locations	GenBank No.	
				ß-tubulin	EF-1α
Phytophthora sinensis	P1475	-	-	AY564087	AY564143
P. sojae	P6497	*Glycine max*	-	AY564047	AY564104
P. sp. Spathiphyllum	-	*Spathiphyllum* spp.	-	AY564091	AY564147
P. syringae	CBS364.52	*Prunus armeniaca*	New Zealand	AY564088	AY564144
P. tentaculata	CBS552.96	*Chrysanthemum leucanthemum*	Germany	AY564089	AY564145
P. tropicalis	PD97/11132	*Rosa* spp.	The Netherlands	AY564046	AY564103
P. vignae	CBS241.73	*Vigna sinensis*	Australia	AY564090	AY564146
Pythium aphanidermatum	PD93/51	*Rhododendron catawbiense*	The Netherlands	AY564048	-

[a] Dataset referred to Kroon (2010), except the taxa obtained from this study.

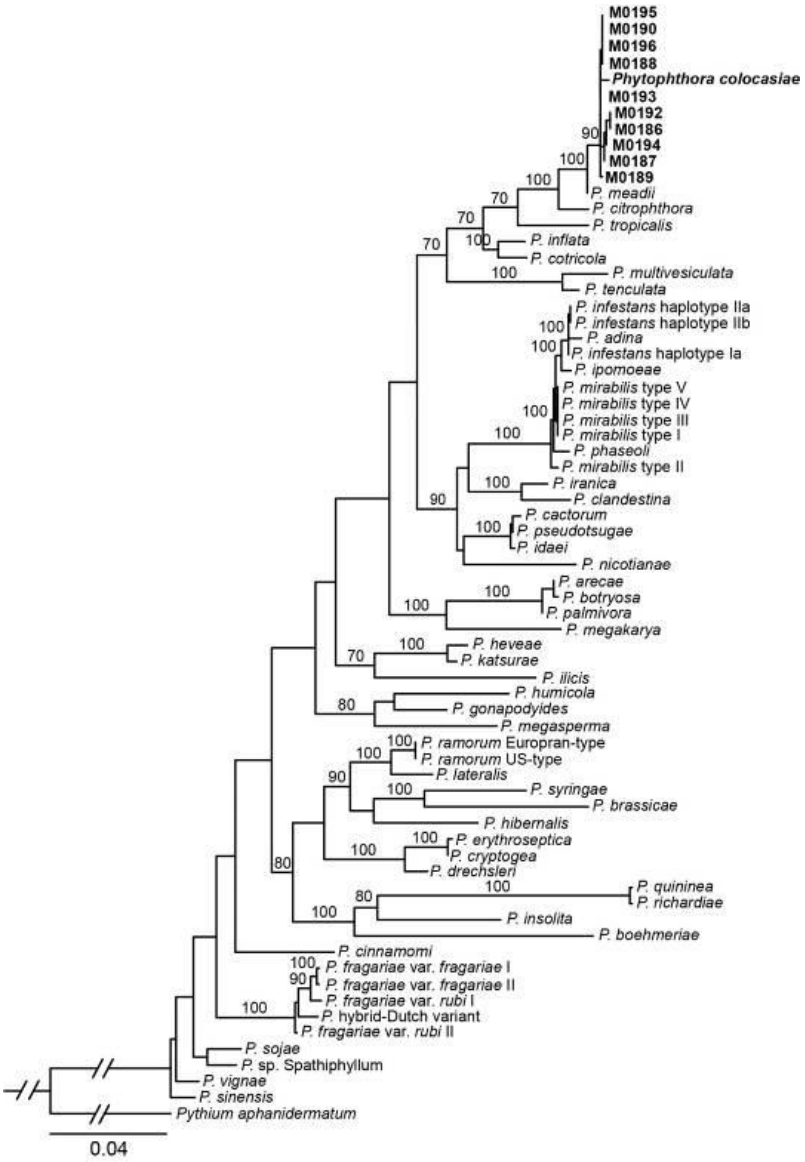


Figure 7 Phylogram obtained in a maximum likelihood search in RAxML of concatenated β-tubulin2 and TEF1 gene regions. Bootstrap support values (≥70%) from 1,000 replicates above nodes.

Table 3 Effect of different media on radial growths of *Phytophthora colocasiae* at 7 and 14 day.

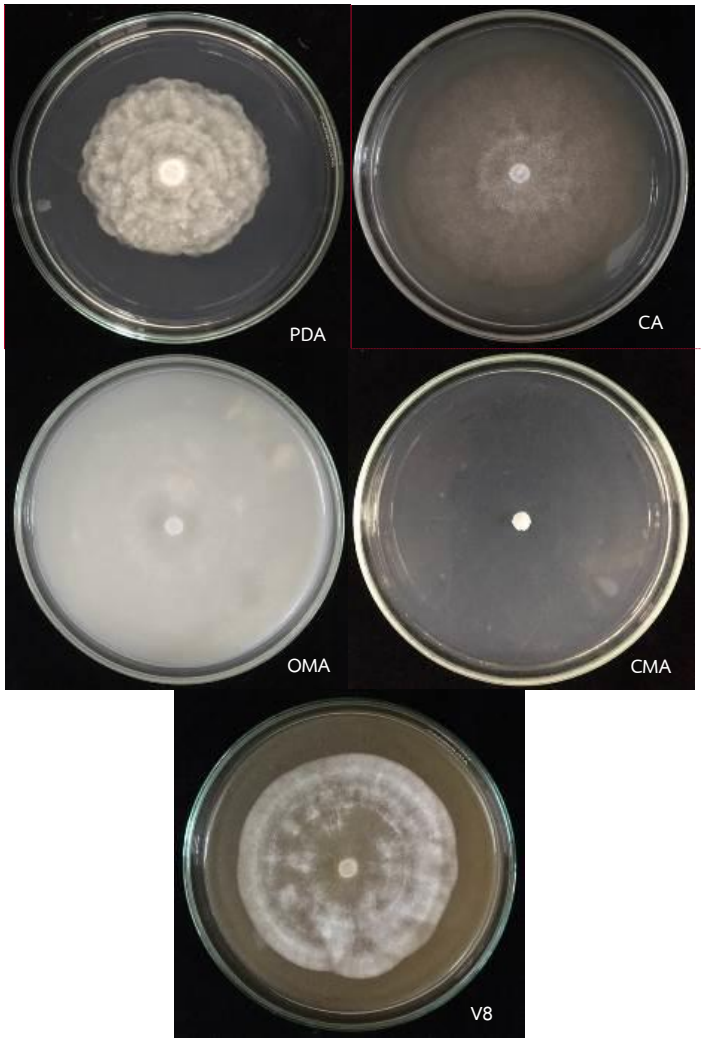
Media	Day 7 (mm.)	Day 14 (mm.)
PDA	52.2 e[1/]	85.1 b
CA	64.3 c	90.0 a
OMA	58.7 d	90.0 a
CMA	78.0 a	90.0 a
V8	69.3 b	90.0 a
CV	15	4

[1/] Mean followed by different letter in the same column are significantly different at the 5% level.

Table 4 Effect of different media on sporangium production of *Phytophthora colocasiae* at 7 day.

Media	Day 7
PDA	5.01 b
CA	7.48 a
OMA	2.54 c
CMA	0.00 d
V8	1.69 c
CV	84

[1/] Mean followed by different letter in the same column are significantly different at the 5% level.



Commented [L1]:

Figure 8 Colony growths of *Phytophthora colocasiae* on 5 selective media at 7 day.

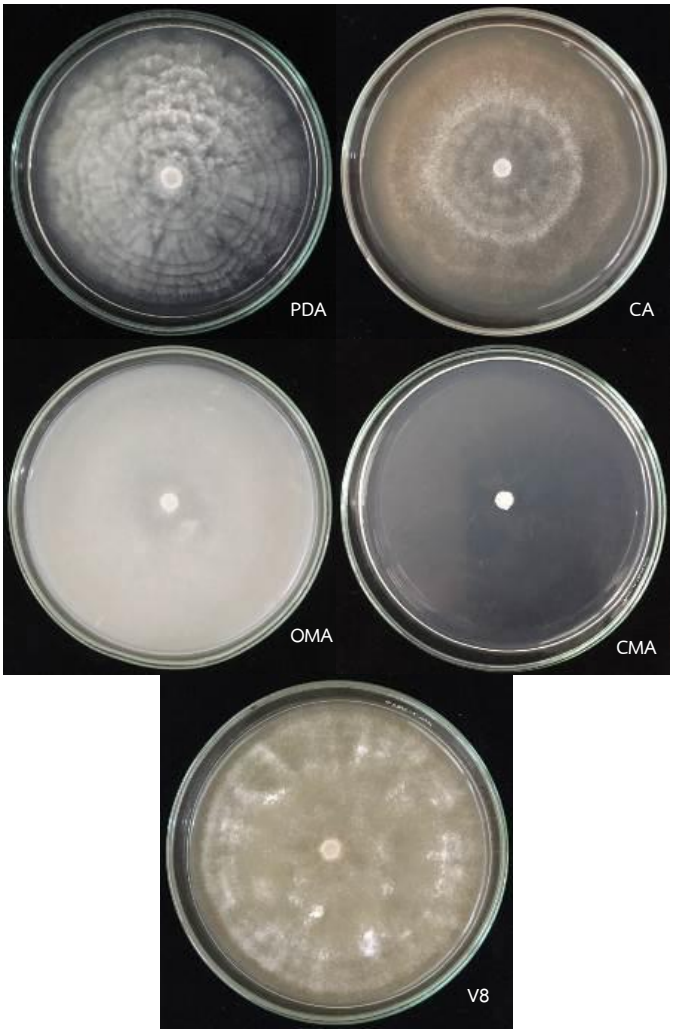


Figure 9 Colony growths of *Phytophthora colocasiae* on 5 selective media at 14 day.