

รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด

1. แผนงานวิจัย : การจัดทำฐานข้อมูลศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติเพื่อการวิจัยพัฒนาด้านการอารักขาพืชในประเทศไทย
2. โครงการวิจัย : อนุกรมวิธาน ชีววิทยา และการจำแนกชนิดโดยดีเอ็นเอบาร์โค้ดของศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติเพื่อการวิจัยด้านอารักขาพืชในประเทศไทย
- กิจกรรมที่ 3 : การจำแนกชนิดศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติโดยดีเอ็นเอบาร์โค้ด
3. ชื่อการทดลอง (ภาษาไทย) : การสำรวจโรคและจัดทำดีเอ็นเอบาร์โค้ดของรา Cercosporoid fungi สาเหตุโรคพืช
- ชื่อการทดลอง (ภาษาอังกฤษ) : Disease survey and DNA barcoding of plant pathogenic Cercosporoid fungi
4. คณะผู้ดำเนินงาน
- หัวหน้าการทดลอง : นางสาวชนินทร ดวงสอาด สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
- ผู้ร่วมงาน : นางสาวพรพิมล อธิปัญญาคม สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
- นางสาวสุณีรัตน์ สิมะเตือ สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
- นางสาวมะโนรัตน์ สุดสงวน สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
- นางสาวอมรรักษ์ คัดใจเดียว สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
- นางสาวสุทธิณี ลิขิตตระกูลรุ่ง สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตร เขตที่ 1

5. บทคัดย่อ

เพื่อจัดทำดีเอ็นเอบาร์โค้ดของรา cercosporoid fungi สาเหตุโรคพืช เก็บตัวอย่างพืชที่แสดงอาการใบจุดที่เกิดจากรา cercosporoid ระหว่างเดือนตุลาคม 2559 – เดือนกันยายน 2562 จากจังหวัด กระบี่ พังงา นครศรีธรรมราช สุราษฎร์ธานี ยโสธร ชัยภูมิ เชียงราย เชียงใหม่ ลำปาง กรุงเทพฯ เพชรบูรณ์ ราชบุรี และเพชรบุรี จำนวน 69 ตัวอย่าง ศึกษาและจำแนกด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและข้อมูลซีวโมเลกุลของยีนตำแหน่ง Internal Transcribed Spacer (ITS) และ translation elongation factor 1-alpha (EF1- α) ของรา cercosporoid จำนวน 6 ไอโซเลท ที่แยกได้จากตัวอย่างใบจุดมะละกอ ใบจุดถั่วลิสง ปั้นเหลียงกล้วยไม้ ใบจุดกระเจี๊ยบเขียว ใบจุดถั่วฝักยาว และใบจุดบานไม่รู้โรย พบว่าเชื้อราดังกล่าวคือ *Corynespora cassicola*, *Passalora arachidicola*, *Pseudocercospora dendrobii*, *Pseu. abelmoschi* *Pseu. cruenta* และ *Cercospora zinnia* ตามลำดับ

Plant disease samples caused by cercosporoid fungi had been collected during October 2016 – September 2019. Plant disease samples were collected from plantation located in Krabi, Phangnga, Nakhon Si Thammarat, Surat Thani, Yasothon, Chaiyaphum, Chiangrai, Chiangmai,

Lampang, Bangkok, Phetchabun, Ratchaburi and Phetchaburi provinces. Sixty-nine specimens had been observed and identified using morphological and molecular data of Internal Transcribed Spacer (ITS) and translation elongation factor 1-alpha (EF1- α) gene regions. It was found that the causal agent could be identified as *Corynespora cassicola*, *Passalora arachidicola*, *Pseudocercospora dendrobii*, *Pseu. abelmoschi* *Pseu. cruenta* and *Cercospora zinnia*, which isolated from *Carica papaya*, *Arachis hypogaea*, *Orchid* sp., *Abelmoschus* sp., *Vigna unguiculata* (L.) Walp. subsp. *Unguiculata* and *Zinnia* sp., respectively.

6. คำนำ

Cercosporoid เป็นกลุ่มของราที่จัดอยู่ใน order Capnodiales family Mycosphaerellaceae ราในกลุ่ม cercosporoid เป็นสาเหตุของโรคพืชและทำความเสียหายให้แก่พืชหลายชนิด ทั้งในกลุ่มของพืชใบเลี้ยงเดี่ยวและใบเลี้ยงคู่ รวมถึงพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ (Pollack, 1987) ราในกลุ่มนี้ประกอบด้วยกว่า 40 genera (Groenewald, 2013) โดยราส่วนใหญ่อยู่ใน genus *Pseudocercospora* *Cercospora* *Passalora* ราในกลุ่ม cercosporoid ส่วนใหญ่ลักษณะการเข้าทำลายที่พบได้โดยทั่วไปคือจะพบอาการใบจุด (leaf spot) และสามารถพบว่าทำให้เกิดแผล (necrotic lesion) บนดอกไม้ ผล และส่วนอื่นๆของพืช (Agrios, 2005) รวมถึงก่อให้เกิดความเสียหายแก่พืชหลังการเก็บเกี่ยว เช่น ผลเน่า (Silva and Pereira, 2008)

รา cercosporoid เป็นรากลุ่มใหญ่ในกลุ่ม Hyphomycetes (Crous and Braun, 2003) มีการจำแนกโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาตามวิธีที่มีการปฏิบัติกันมา โดยแต่เดิมนิยามกลุ่ม cercosporoid ประกอบไปด้วยสองระยะของวงจรชีวิต คือระยะ teleomorph และ anamorph ซึ่งระยะ teleomorph ของรา cercosporid มักอยู่ใน genus *Mycosphaerella* Johanson และราชนิดนี้ยังเป็นระยะ teleomorph ของราอื่นๆอีกหลายสกุลของ Coelmycetes และ Hyphomycetes (Crous et al., 2007) ความซ้ำซ้อนและซับซ้อนของทั้งสองระยะการเจริญนี้ ทำให้เกิดความยุ่งยากและสับสนในการจัดจำแนกชนิดของรากลุ่ม cercosporoid ปัจจุบันได้มีการนำเทคนิคและข้อมูลทางชีวโมเลกุลมาช่วยบ่งชี้ หรือแสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์และวิวัฒนาการ (phylogeny) ของราในหลายสกุลหรือสปีชีส์ ที่มีความใกล้เคียงกัน บนพืชอาศัยต่างๆกัน หรือพืชอาศัยที่มีความใกล้เคียงกัน โดยนำข้อมูลจากหลายๆด้านเช่น ข้อมูลชีวโมเลกุลจากหลายตำแหน่ง ลักษณะทางสัณฐานวิทยา พืชอาศัย ลักษณะทางภูมิศาสตร์ที่เก็บตัวอย่าง มาวิเคราะห์รวมกันอย่างเป็นระบบ (systematics study) ทำให้พบว่า ราที่จัดว่าเป็น *Mycosphaerella* ที่แท้จริงนั้น มีเพียงเชื้อรา *Ramularia* (Braun, 1998) เพียงชนิดเดียว อีกทั้งการศึกษาที่ใช้ลักษณะของข้อมูลทางพันธุกรรมมาเกี่ยวข้อง แสดงให้เห็นว่ารา cercosporoid อื่นๆ ก็มีความจำเพาะในระดับ genus นั้นๆ โดยไม่มีความเกี่ยวข้องใดๆกับ genus อื่นๆ ในแง่ของลักษณะการสืบพันธุ์ของวงจรชีวิต ดังนั้นในการจำแนกชนิดของรา โดยราแต่ละชนิดจะมีเพียง 1 ชื่อ ทั้งสองระยะของการสืบพันธุ์ โดยลักษณะของ teleomorph และ anamorph จะเป็นลักษณะทางสัณฐานวิทยาเพื่อการจำแนกชนิดของราชนิดนั้นๆ ตามข้อกำหนดของการกำหนดชื่อตามหลักสากล (Article 59 of the International Code for Nomenclature of algae, fungi and plants (ICN) (Hawksworth, 2011; Norvell, 2011)

การจำแนกชนิดของรา cercosporoid โดยลักษณะทางสัณฐานวิทยา สามารถจำแนกได้จากลักษณะของ conidia เช่น การจำแนกชนิดของรา *Cercospora* โดยหนึ่งในลักษณะที่ใช้บ่งชี้คือความหนา (thickening) ของ conidial scars (Deighton, 1987) ซึ่งลักษณะความหนาของส่วนนี้มีความคล้ายคลึงกับราหลายชนิดที่มีลักษณะที่มีความใกล้เคียงกับรา *Cercospora* เช่น *Camptomeris* *Cercosporella* *Cercosporidium* *Fusicladium* *Mycovellosiella* *Passalora* *Phaeoisariopsis* *Phaeoramularia* *Sirosporium* *Cercoseptoria* *Mycocentrospora* *Pseudocercospora* และ *Stigmina* (Deighton, 1967, 1974, 1976, 1979) นอกจากลักษณะของ conidia แล้ว ยังมีลักษณะอื่นๆที่ใช้ในการจำแนกรรา *Cercospora* ออกจากรากลุ่มอื่นที่มีความใกล้เคียงกัน เช่น Braun (1995) จำแนกรรา *Cercospora* ออกจากเชื้อรา *Passalora* และ *Phaeoisariopsis* โดยอาศัยลักษณะของ stroma

ด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่ค่อนข้างใกล้เคียงกันทำให้การจำแนกชนิดค่อนข้างมีความสับสน ทำให้พบว่ามีมักมีการจัดกลุ่มของรา *Cercospora* ขึ้นมาใหม่ หลังจากการจำแนกด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่ซับซ้อนมากขึ้น เช่น Crous และ Braun (2003) จัดกลุ่มของรา cercosporoid ใหม่หลังจากที่ศึกษาตัวอย่างโรคพืชที่เกิดจากราใน สกุล *Cercospora* และ *Passalora* กว่า 3,500 ตัวอย่าง โดยอาศัยลักษณะของ conidial scar hila และลักษณะความเข้มของ conidia และ conidiophore มีราหลายชนิดที่ถูกจำแนกให้เป็น *Pseudocercospora* แม้จะมีลักษณะของ scar ที่หนา ทั้งนี้เพราะลักษณะทางสัณฐานวิทยาอื่นๆ ค่อนข้างที่จะเข้าลักษณะของรา *Pseudocercospora* มากกว่าที่จะเป็นรา *Cercospora* เช่น *P. mississippiensis* *P. madhuliensis* (Ruiz and Braun, 1989) และยังพบอีกว่าลักษณะ scar ของ *Pseudocercospora* มีความคล้ายคลึง (synapomorphy) กับรา *Parapithomyces clitoriae* (Alcorn, 1992) นอกจากนี้ยังพบการวินิจฉัยรา *Cercospora* ในบางสปีชีส์ ถูกจัดเป็นกลุ่มสปีชีส์ เนื่องจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่พบไม่เพียงพอต่อการจัดจำแนก ทำให้ราในกลุ่มนี้จัดเป็น complex species เช่นกัน เช่น *Cercospora apii* ประกอบไปด้วยมากกว่า 280 ไอโซเลท ที่จำแนกเป็น *C. apii* โดยทุกไอโซเลทมีความแตกต่างของลักษณะทางสัณฐานวิทยา แต่ลักษณะความแตกต่างดังกล่าวไม่เพียงพอในการจำแนกรราไอโซเลทนั้นๆ ออกจาก *C. apii* (Ellis, 1971; Crous and Braun, 2003; Nicoli *et al.*, 2011)

ในประเทศไทยมีการศึกษาโรคพืชที่เกิดจากราในกลุ่ม cercosporoid แล้วในระดับหนึ่ง แต่ในการจำแนกราชนิดนี้ส่วนใหญ่ยังคงใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา เช่น สนธิรัตน์ และคณะ (2523) รายงานพบรา *Cercospora* จำนวน 21 สปีชีส์ นอกจากนี้ ในดรชรณีโรคพืชของประเทศไทย รายงานพบเชื้อรา *Cercospora* จำนวน 47 สปีชีส์ และไม่สามารถวินิจฉัยในระดับสปีชีส์ได้อีก 13 ชนิด และอีก 49 สปีชีส์ รายงานโดย Petcharat และ Kanjanamaneesathian (1989) Phengsintham *et al.* (2012) รายงานพบการเข้าทำลายของรา cercosporoid ในเขตภาคเหนือของประเทศไทย จำนวน 14 ชนิด ได้แก่ *Cercospora* *Passalora* *Pseudocercospora* และ *Zasmidium* โดยเป็นการพบเป็นครั้งแรกจำนวน 2 ชนิดในประเทศไทยคือ *Cercospora verniciferae* และ *Zasmidium cassicola*

ปัจจุบันได้มีการนำข้อมูลของรหัสพันธุกรรมหรือ DNA มาใช้ประกอบการจำแนกชนิดของจุลินทรีย์ โดยมีการถอดรหัสพันธุกรรมจากแต่ละตำแหน่งบน DNA ซึ่งจะมีความจำเพาะต่อชนิดของสิ่งมีชีวิต โดยแต่ละตำแหน่งก็ จะมีความแปรผันในระดับที่แตกต่างกัน โดยรหัสพันธุกรรมที่ถอดรหัสได้จากแต่ละตำแหน่งสามารถใช้เป็นข้อมูล เพื่อการจำแนกชนิดของจุลินทรีย์หรือสิ่งมีชีวิตชนิดนั้นๆ (DNA barcoding) (Cräutlein *et al.*, 2011) โดยการ นำไปเปรียบเทียบกับรหัสพันธุกรรมอ้างอิง (reference libraries) ที่ทราบชนิดแล้ว ตำแหน่งของรหัสพันธุกรรม (locus) ของราที่นิยมนำมาถอดรหัส โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อการจำแนก ศึกษาวิวัฒนาการ และประชากรของ สิ่งมีชีวิตนั้นมีหลายตำแหน่ง หรือแม้กระทั่งมีการถอดรหัสทั้งจีโนมซึ่งจะบรรจุข้อมูลทางพันธุกรรมทั้งหมดของ สิ่งมีชีวิตนั้นๆ (Next Generation Sequencing) เช่น Internal Transcribed Spacer (ITS) ซึ่งเป็นตำแหน่งที่ นิยมใช้ (Seifert, 2009) ซึ่งตำแหน่งนี้มีความสามารถบอกความแตกต่างได้ในระดับสปีชีส์ (White *et al.*, 1990) เนื่องจากการถอดรหัสข้อมูลจากตำแหน่ง ITS บางครั้งไม่เพียงพอในการจัดจำแนก จึงต้องอาศัยข้อมูลของดีเอ็นเอ จากยีนตำแหน่งอื่นมากกว่าหนึ่งตำแหน่งร่วมในการวิเคราะห์ (Liu *et al.*, 2012) เพื่อจำแนกความแตกต่างใน ระดับสปีชีส์ เช่น Small Subunit (SSU) Large Subunit (LSU) Intergenic Spacer (IGS) Mitochondria cytochrome oxidase subunit 3 (CO3) และอื่นๆ (Aime, 2006; Beenken *et al.*, 2012; Bennett *et al.*, 2011; Dixon *et al.*, 2010; Minnis *et al.*, 2012; Goodwin *et al.* 2001; Yun *et al.*, 2011)

ในประเทศไทย ถึงแม้พบว่ามียางรายงานได้มีการนำข้อมูลทางด้านชีวโมเลกุลมาประกอบการศึกษาของรา กลุ่ม cercosporoid เช่น การศึกษาโดย To-Anun *et al.* (2011) Nakashia *et al.* (2007) และ Phensintham *et al.* (2013) แต่ข้อมูลที่มีก็ยังไม่มีความหลากหลาย อีกทั้งรากลุ่ม cercosporoid สามารถเข้าทำลายพืชที่มี ความสำคัญทางเศรษฐกิจ โดยเฉพาะสินค้าทางเกษตรเกษตรที่มีการส่งออก เช่น พืชผัก ไม้ดอก ดังนั้น ดังนั้นหาก ข้อมูลของบัญชีรายชื่อศัตรูพืชมีความครอบคลุมและมีรายละเอียดข้อมูลในเชิงลึกมาสนับสนุน จะเป็นประโยชน์ อย่างยิ่งในการนำเข้าและส่งออกสินค้า

เนื่องจากปัจจุบันความก้าวหน้าของเทคโนโลยีทางด้านชีวโมเลกุล เข้ามามีบทบาทในงานด้าน อนุกรมวิธานมากขึ้น โดยมีการนำเทคนิคและข้อมูลทางชีวโมเลกุลมาช่วยเปรียบเทียบในบ่งการชี้หรือ จำแนกชนิดของจุลินทรีย์ (genealogical concordance) ควบคู่กับการวินิจฉัยด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา และข้อมูลทางชีวโมเลกุลที่ได้นั้น สามารถใช้เป็นข้อมูลเฉพาะเพื่อการวินิจฉัยชนิดนั้นๆ (DNA barcoding) ทำให้ ทำให้สามารถชี้ชัดในการจำแนก ในกรณีที่การวินิจฉัยเชื้อสาเหตุไม่สามารถชี้ขาดได้ด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ดังนั้นการทดลองนี้มีวัตถุประสงค์ เพื่อศึกษาและจำแนกชนิดของรา cercosporoid สาเหตุโรคพืชใน ระดับสปีชีส์ โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา และข้อมูลด้านชีวโมเลกุล และได้ DNA barcode ของรา cercosporoid เพื่อใช้เป็นหลักฐานอ้างอิงในการจัดทำบัญชีรายชื่อศัตรูพืช เพื่อประโยชน์ในการนำเข้าและส่งออก สินค้า

7. วิธีดำเนินการ

- อุปกรณ์

1. อุปกรณ์เก็บตัวอย่าง ได้แก่ ถุงพลาสติก ถุงกระดาษ กรรไกรตัดแต่งกิ่ง ไม้ทาบตัวอย่าง กระดาษหนังสือพิมพ์ ของกระดาษสำหรับเก็บและรักษาตัวอย่าง

2. อุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการ ได้แก่

- Microcentrifuge
- Thermal cyclers
- Vortex
- Tissue Lyser
- Gel electrophoresis
- เครื่องถ่ายภาพเจล
- microwave
- micropipette ขนาด 10 100 200 และ 1000 ไมโครลิตร
- กล้องจุลทรรศน์แบบ compound
- กล้องจุลทรรศน์แบบ stereo
- Dry heat block

3. วัสดุในห้องปฏิบัติการ สไลด์และแผ่นแก้วปิดสไลด์ tips ขนาด 10 100 200 และ 1000 ไมโครลิตร PCR tube ไขมีดผ่าตัด เข็มเขี่ยปลายแหลม ปากคีบ

4. อุปกรณ์เครื่องแก้ว ได้แก่ บีกเกอร์ ขวดดูแรน กระบอกตวง ตะเกียงแอลกอฮอล์ plate

5. สารเคมี ได้แก่

- Green Hot Start PCR Master Mix (biotechrabbit™)
- High fidelity Phusion® DNA Polymerase (New England Biolabs)
- Lysing Enzymes from *Trichoderma harzianum* (Glucanex®)
- Lithium Borate buffer (LB)
- PureDireX Genomic DNA Isolation Kit
- QIAquick Gel Extraction Kit
- SERVA HiSens Stain G
- Nuclease-Free Water
- ไพรเมอร์ ได้แก่ the Internal Transcribed Spacer (ITS) ITS1/ITS4 (White *et al.*, 1990)

ITS1/ITS4 (White *et al.*, 1990) และ the translation elongation factor 1-alpha (EF1- α) EF1-728F/EF1-986R (Carbone and Kohn, 1999) และ EF1-728F (Carbone and Kohn, 1999)/EF-2 (O'Donnell *et al.*, 1998)

- อาหารเลี้ยงเชื้อ potato dextrose agar (PDA) และ rose bengal agar (RBA)

6. Sequence assemble programs ได้แก่ Geneious Prime 2020 (<http://www.geneious.com>, Kearse *et al.*, 2012)

- วิธีการ

1. เก็บ และรวบรวมตัวอย่างโรคพืชที่เกิดจากรากลุ่ม cercosporoid

เก็บตัวอย่างโรคพืชที่เกิดจากรากลุ่ม cercosporoid จากแหล่งปลูกพืชในประเทศไทย ได้แก่ ภาคเหนือ จ. เชียงใหม่ จ. เชียงราย จ. พะเยา จ. ลำพูน จ. อุดรดิตถ์ ภาคกลาง จ. สุโขทัย จ. พิษณุโลก จ. สุพรรณบุรี จ. นครสวรรค์ จ. นครปฐม ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ จ. นครราชสีมา จ. ขอนแก่น จ. สุรินทร์ จ. ศรีสะเกษ จ. อุตรธานี ภาคตะวันตก จ. ตาก จ. กาญจนบุรี จ. เพชรบุรี จ. ประจวบคีรีขันธ์ จ. ราชบุรี ภาคใต้ จ. ชุมพร จ. สุราษฎร์ธานี จ. ตรัง จ. กระบี่ โดยเลือกเก็บส่วนที่แสดงอาการของโรค ห่อตัวอย่างด้วยกระดาษ โดยรักษาสภาพของตัวอย่างในสภาพที่แห้ง เพื่อให้ส่วนของแผลอยู่ในสภาพที่สมบูรณ์และหลีกเลี่ยงที่เชื้อราชนิดอื่นจะขึ้นปกคลุม เนื่องจากความชื้น บันทึกข้อมูลรายละเอียดของการเก็บตัวอย่าง วันที่ พิกัด สถานที่ ผู้เก็บ พืชอาศัย และลักษณะอาการของโรค จากนั้นนำแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ ในห้องปฏิบัติการ ตัวอย่างแห้งจะจัดเก็บในพิพิธภัณฑ์โรคพืช ตึกอภิศรีการ กลุ่มวิจัยโรคพืช กรมวิชาการเกษตร ทั้งนี้ตัวอย่างโรคที่ใช้ในการศึกษา จะรวมถึงตัวอย่างแห้งของโรคพืชที่เกิดจากรากลุ่ม cercosporoid ที่เก็บรักษาในพิพิธภัณฑ์โรคพืช

2. ศึกษา และจำแนกชนิดของรากลุ่ม cercosporoid สาเหตุโรคพืชโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ศึกษาลักษณะอาการของโรค และแยกราโดยตรงจากเนื้อเยื่อพืช

ศึกษาลักษณะอาการของโรค และจำแนกชนิดของเชื้อสาเหตุโรคโดยตรงจากพืชภายใต้กล้องจุลทรรศน์ stereo microscope หรือ ทำ moist chamber บ่มที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส นาน 3-5 วัน เมื่อพบราสร้างเส้นใยหรือ conidia นำมาตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยใช้เข็มเขี่ยส่วนของเชื้อราวางบนสไลด์ หรือใช้ใบมีดตัดขวางชิ้นส่วนพืช (cross section) ให้บาง ๆ และนำมาตรวจดูลักษณะต่าง ๆ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ compound microscope ถ่ายรูปและบันทึกลักษณะต่าง ๆ ของเชื้อ

แยกราโดยวิธี Tissue transplanting และเก็บเชื้อบริสุทธิ์

- แยกราโดยวิธี Tissue transplant โดยนำส่วนของพืชที่เป็นโรคมามาตัดเป็นชิ้นสี่เหลี่ยมขนาด 0.5x0.5 มิลลิเมตร ให้คาบต่อส่วนที่เป็นโรคและไม่เป็นโรค แขนในสารละลายโซเดียมไฮเปอร์คลอไรท์ 10 % เป็นเวลา 3-5 นาที ล้างในน้ำนิ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง ซับให้แห้งด้วยกระดาษที่ผ่านการฆ่าเชื้อ แล้วนำไปวางบนอาหาร Potato Dextrose Agar (PDA) ในจานเลี้ยงเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส นาน 3-5 วัน แยกเชื้อราให้บริสุทธิ์ จากนั้นนำเชื้อบริสุทธิ์ที่ได้ เลี้ยงบนอาหาร PDA Slant ในหลอดแก้ว เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ศึกษาต่อไป

- แยกราโดยวิธี dilution plate technique โดยใช้ปลายมีดผ่าตัดเบอร์ 11 ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ตักเอาส่วนขยายพันธุ์ (fruiting body) ของราที่เจริญอยู่กลางแผล ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ stereo microscope จากนั้นนำมาวางบนอาหาร PDA ที่หยดน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อประมาณ 1 มิลลิลิตร ปิดฝาจานเลี้ยงเชื้อ เอียงจานเลี้ยงเชื้อโดยวนเป็นลักษณะวงกลมนานประมาณ 1-3 นาที จากนั้นเทของเหลวที่อยู่ในจานเลี้ยงเชื้อ ลงบน PDA จานใหม่ หากผิวหน้าอาหาร PDA เริ่มแห้ง ให้เติมน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อประมาณอีกประมาณ 0.5-1 มิลลิลิตร ปิดฝาจานเลี้ยงเชื้อ จากนั้นทำซ้ำแบบเดิมอีก จนได้จานเลี้ยงเชื้ออย่างน้อย 3 จาน บ่มที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส นาน 10 วัน หาก

พบราเจริญขึ้นก่อนเวลา 10 วัน ให้ทำการคัดทิ้ง เนื่องจากราในกลุ่ม cercosporoid เจริญช้า ซึ่งจะใช้เวลา นานกว่า 10 วัน จึงจะพบ colony

3. ศึกษา และจำแนกชนิดของราโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ศึกษารูปร่างลักษณะทางสัณฐานวิทยาของราภายใต้กล้องจุลทรรศน์ stereo และ compound microscope โดยตรวจดูลักษณะเส้นใย conidiophore conidia ขนาด สี และโครงสร้างอื่น ๆ ของรา โดยเปรียบเทียบลักษณะของรา cercosporoid ที่ศึกษากับคู่มือของ Deighton (1967, 1974, 1976 และ 1979) Ellis (1971) Braun (1995) และ Crous and Braun (2003)

4. จำแนกชนิดของรากลุ่ม cercosporoid สาเหตุโรคพืชโดยใช้ข้อมูลพันธุกรรม

สกัดดีเอ็นเอ

ตัดและย้ายเส้นใยของรา cercosporoid ที่เลี้ยงบนอาหาร PDA ประมาณ 0.2-0.5 กรัม ลงในหลอดสำหรับสกัดดีเอ็นเอ และทำการสกัดตามวิธีของ Doungsa-ard, *et al.* (2015) เก็บรักษาดีเอ็นเอที่สกัดได้จากแต่ละตัวอย่าง ไว้ที่อุณหภูมิ -20 หรือ -40 องศาเซลเซียส เพื่อรักษาสภาพและคุณภาพของดีเอ็นเอ

เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมาย

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้จากแต่ละตัวอย่าง มาทำ Polymerase Chain Reaction (PCR) ของตำแหน่ง the Internal Transcribed Spacer (ITS) ITS1/ITS4 (White *et al.*, 1990) ITS1/ITS4 (White *et al.*, 1990) และ the translation elongation factor 1-alpha (EF1- α) EF1-728F/EF1-986R (Carbone and Kohn, 1999) และ EF1-728F (Carbone and Kohn, 1999)/EF-2 (O'Donnell *et al.*, 1998) ด้วย Green Hot Start PCR Master Mix (biotechrabbit™) ใช้ cycling และ condition ของปฏิกิริยาตามที่คุณผลิตแนะนำ กำหนด annealing temperature ที่ 56 องศาเซลเซียส

การตรวจสอบผลิตภัณฑ์ PCR

ตรวจสอบ PCR product ด้วยวิธี อิเล็กโทรโฟรีซิส (Electrophoresis) เตรียม gel 1% และผสม SERVA HiSens Stain G ในอัตราส่วน 1:50,000 ผสม pcr product 5 ไมโครลิตร ด้วย loading dye 1 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันจากนั้นหยอดลงใน agarose gel ที่ความเข้มข้น 1% ให้ผลิตภัณฑ์ PCR เคลื่อนที่ผ่านสารละลาย Lithium Borate buffer (LB buffer) ส่งผลิตภัณฑ์ pcr product ไปยัง บริษัท MacroGen Korea เพื่อทำ purification และหาลำดับนิวคลีโอไทด์

การวิเคราะห์ และตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์

นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ (sequence) มาทำการวิเคราะห์ โดยนำ forward sequence และ reverse sequence ที่ได้มาเปรียบเทียบเทียบกัน โดยใช้โปรแกรม Geneious Prime 2020 (<http://www.geneious.com>; Kearse *et al.*, 2012) จะบันทึกข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ในรูปแบบไฟล์ fasta ทำการตรวจสอบความถูกต้องของชนิดของจุลินทรีย์ที่ทำการศึกษากับฐานข้อมูลทางพันธุกรรม เช่น Mycobank GenBank โดยเลือกวิธีเปรียบเทียบกับ type sequence

การจัดเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์

นำ contig ของลำดับนิวคลีโอไทด์ (consensus sequence ที่บันทึกไว้ในรูปแบบ fasta ไฟล์) แต่ละตำแหน่งมาจัดเรียง (align) เป็นชุดข้อมูล (dataset) ด้วยโปรแกรม MAFFT 6.611 (Kato and Toh, 2008) ตรวจสอบการจัดเรียงของชุดข้อมูล (alignment) ด้วยวิธี MUSCLE ในโปรแกรม MEGA7 (Kumar *et al.*, 2016) ใช้โปรแกรม Gblocks (Talavera and Castresana, 2007) เพื่อกรองส่วนที่เป็น ambiguous sequence

ทำ dataset ของแต่ละตำแหน่ง และ partitioned (combined) dataset ของตำแหน่ง TEF1 และ ITS บันทึก dataset และ partitioned dataset ในรูปแบบไฟล์ .nexus โดยใช้โปรแกรม Mesquite

วิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการเพื่อการจัดจำแนก

จำแนกชนิดของรา cercosporoid โดยวิเคราะห์จากตำแหน่ง ITS และ TEF1 วิเคราะห์ combined dataset ของ TEF1 และ ITS (1,239 bases/taxa; TEF1 = 679, ITS = 560) ด้วย phylogenetic criteria คือ Maximum Likelihood (ML) โดยเตรียมไฟล์ phy และวิเคราะห์โดยโปรแกรม 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

การบันทึกข้อมูล

บันทึกข้อมูล เก็บรักษาสายพันธุ์เชื้อรา และเก็บรักษาดีเอ็นเอต้นแบบที่ได้จากการศึกษา เชื้อราที่แยกได้เก็บรักษาไว้ใน Culture Collection ของกลุ่มวิจัยโรคพืชโดยเลี้ยงบนอาหาร PDA Slant ในหลอดแก้ว เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส ดีเอ็นเอต้นแบบ (DNA templates) จะจัดเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -40 องศาเซลเซียส ณ พิพิธภัณฑสถานโรคพืช กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช และข้อมูลรหัสดีเอ็นเอ (DNA barcodes หรือ consensus sequences) จะถูกเก็บบันทึก และรายงานเพื่อใช้เป็นข้อมูลอ้างอิงสำหรับการจัดทำบัญชีรายชื่อโรคพืช รวมถึงสามารถใช้เป็นข้อมูลประกอบในการศึกษาด้านวิวัฒนาการต่อไป

- เวลาและสถานที่

เริ่มต้น ตุลาคม 2559 – กันยายน 2562

กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

แปลงปาล์มน้ำมันในประเทศ

8. ผลการทดลองและวิจารณ์

เก็บตัวอย่างของพืชที่แสดงอาการใบจุด (Figure 1) จากจังหวัด กระบี่ พังงา นครศรีธรรมราช สุราษฎร์ธานี ยโสธร ชัยภูมิ เชียงราย เชียงใหม่ ลำปาง กรุงเทพมหานคร เพชรบูรณ์ ราชบุรี และเพชรบุรี จำนวน 69 ตัวอย่าง (Table 1)



Figure 1 Leaf spot specimens caused by cercosporoid fungi collected from this study (2016-2019)

นำตัวอย่างมาทำการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา สกัดและเพิ่มปริมาณของ DNA ตำแหน่ง Internal Transcribed Spacer (ITS) และ translation elongation factor (EF1- α) ของรา cercosporoid จำนวน 6 ไอโซเลท ที่แยกได้จากตัวอย่างใบจุดมะละกอ ใบจุดถั่วลิสง ปิ่นเหลืองกล้วยไม้ ใบจุดกระเจี๊ยบเขียว และใบจุดบานไม่รู้โรย ทำการวิเคราะห์ ตรวจสอบความถูกต้องของ consensus sequence และวิเคราะห์ชนิดพบว่าเชื้อราดังกล่าวคือ *Corynespora cassiicola*, *Passalora arachidicola*, *Pseudocercospora dendrobii*, *Pseu. abelmoschi* และ *Cercospora zinnia* ตามลำดับ โดยมีรายละเอียด ดังนี้

Table 1 Leaf spot specimens caused by cercosporoid fungi collected from this study (2016-2019)

Host	Locations
<i>Lilium</i>	Mueang district, Khon Kaen province
<i>Nelumbo nucifera</i>	Nongharn sub-district, Mueang district, Chiangmai province
<i>Amaryllis</i>	Um Mao sub-district, Thawat Buri district, Roi Et province
<i>Vigna sinensis</i>	Ban Sai Nung, Tha Koi sub-district, Tha Yang district, Phetchaburi province
<i>Zinnia</i> sp.	Thung Song district, Nakhon Si Thammarat province
<i>Manihot esculenta</i>	Fhahoun sub-district, Ko Wang district, Yasothon province
<i>Allium ascalonicum</i>	Fhahoun sub-district, Ko Wang district, Yasothon province
<i>Streblus aspera</i>	Fhahoun sub-district, Ko Wang district, Yasothon province
Weed	Lum Lam Chee sub-district, Ban Khwao district, Chaiyaphum province
Weed	Ban Thung, Kao Kham sub-district, Mueang district, Krabi province
<i>Pennisetum polystachyon</i>	Krabi Noi sub-district, Mueang district, Krabi province
<i>Streblus aspera</i>	Huay Yod district, Krabi province
<i>Arachis hypogaea</i>	Huay Sai Nuea sub-district, Cha-am district, Phetchaburi
<i>Gomphrena globosa</i>	Thung Song district, Nakhon Si Thammarat province
<i>Lycopersicon esculentum</i>	Ban Bang Por, Klong Noi district, Nakhon Si Thammarat province
<i>Carica papaya</i>	Ban Bang Por, Klong Noi district, Nakhon Si Thammarat
<i>Moringa oleifera</i>	Ban Bang Por, Klong Noi district, Nakhon Si Thammarat
<i>Aeschynanthus hildebrandii</i>	Ban Bang Por, Klong Noi district, Nakhon Si Thammarat province
<i>Euphorbia heterophylla</i>	Ban Bang Nien, Klong Noi district, Nakhon Si Thammarat province
<i>Rhynchosyilis coelestis</i>	Klong Noi sub-district, Pak Panang district, Nakhon Si Thammarat province

<i>Abelmoschus</i> sp.	Mueang district, Surat Thani province
<i>Persea americana</i>	Tha Chana district, Surat Thani province
<i>Coccinia grandis</i>	Tha Chana district, Surat Thani province
<i>Helianthus annuus</i>	KG farm, Nhong Kwai sub-district, Hang Dong district, Chiangmai province
<i>Dendrobium</i> sp.	Nabirom sub-district, Bang lan district, Nakhon Pathom province

ใบจุดมะละกอ

เชื้อราสาเหตุ

Corynespora cassicola (Berk. & M.A. Curtis) C.T. Wei, Mycological Papers 34: 5 (1950)

Synonymy:

=*Helminthosporium cassiaeicola* Berk. & M.A. Curtis (1868)

=*Helminthosporium cassicola* Berk. & M.A. Curtis, Journal of the Linnean Society. Botany 10: 361 (1869)

=*Cercospora melonis* Cooke, Gardeners' Chronicle: 271 (1896)

=*Corynespora mazei* Güssow, Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz 16: 13 (1906)

=*Helminthosporium warpuriae* Wakef., Bulletin of Miscellaneous Informations of the Royal Botanical Gardens Kew 1918: 233 (1918)

=*Helminthosporium papayae* Syd., Annales Mycologici 21 (1-2): 105 (1923)

=*Cercospora vignicola* E. Kawam., Kin-rii (Fungi) 1 (2): 20 (1931)

=*Helminthosporium vignae* L.S. Olive, Phytoprotection 35: 830 (1945)

Classification

Kingdom	Fungi
Phylum	Ascomycota
Subphylum	Pezizomycotina
Class	Dothideomycetes
Subclass	Pleosporomycetidae
Order	Pleosporales
Family	Corynesporascaceae
Genus	<i>Corynespora</i>

Species *cassiicola*

พืชและส่วนที่พบ ใบมะละกอ (*Carica papaya*)

ลักษณะอาการของโรค พบอาการบนใบโดยพบลักษณะแผลจุดน้ำตาลอ่อนตรงกลางสีเขียวและมีสีเหลืองล้อมรอบ ขนาดแผลมีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 2-3 มิลลิเมตร แผลมีทั้งลักษณะเป็นวงกลมหรือแบบเหลี่ยม (Figure 2) มักพบการแสดงอาการในใบล่างๆหรือใบแก่ หากมีอาการหรือการเข้าทำลายที่รุนแรงใบจะหลุดร่วง เชื้อราสาเหตุสามารถแพร่กระจายได้โดยลมและฝน

ลักษณะของเชื้อ เชื้อราเจริญได้ดีบนอาหาร PDA เส้นใยสีเขียวเข้ม ก้านชูสปอร์เป็นกลุ่มสีน้ำตาลอ่อน มีผนังกันไม่แตกก้าน ขนาดประมาณ 100-800 x 4-11 μm พบทั้งลักษณะตรงและโค้ง มีลักษณะโป่งพองตรงผนังกันสปอร์หรือโคนเดี่ยวยาวต่อกันเป็นเส้น ลักษณะเป็นแท่งยาวหรือคล้ายกระบอง มีสีจางแต่จะมีสีน้ำตาลเข้มขึ้นเมื่อสปอร์เริ่มแก่ ผนังเซลล์ตรงฐานหนา ผนังเรียบ สปอร์มีผนังกันพบได้ระหว่าง 4-20 ช่อง ขนาดประมาณ 40-500 x 9-22 μm

พืชอาศัย ราชชนิดนี้มีพืชอาศัยที่กว้างทั้ง พืชไร่ พืชสวน ไม้ดอกไม้ประดับ รวมถึงวัชพืช เช่น ยางพารา มันสำปะหลัง มะเขือ มะละกอ พริก ถั่วเหลือง แตงกวา อย่างไรก็ตาม Dixon *et al.* (2009) รายงานว่าเมื่อทำการเปรียบเทียบเชื้อรา *C. cassiicola* ที่แยกได้จากพืชอาศัยชนิดต่างๆ พบว่าเชื้อราดังกล่าวมีความหลากหลายทางชีวภาพและเป็น complex species และพบว่าเชื้อรา *C. cassiicola* มีความจำเพาะเจาะจงต่อพืชอาศัย เช่น *C. cassiicola* ที่แยกได้จากมะละกอ

Consensus sequences

Internal Transcribed Spacer (ITS) region

```
GTAGGGGCCTCGCCCCCTTCGAGATAGCACCCCTTTGTTTATGAGCACCTCTCGTTTCCTCGGCAGGCTCGCCTGCCAACGGG  
GACCCACCACAAACCCATTGTAGTACAAGAAGTACACGTCTGAACAAAAACAAACTATTTACAACCTTTCAACAACGGAT  
CTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAGTGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTT  
TGAACGCACATTGCGCCCTTTGGTATTCCTTAGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCTCAAGCCTAGCTTGGTGTG  
GGCGTCTGTCCCGCTCCGCGCGCTGGACTCGCCTCAAAGCATTGGCGGCCGTTCCAGCAGGCCACGAGCGCAGCAG  
AGCAAGCGCTGAAGTGGCTGCGGGTCGGCGCACCATGAGCCCCCACACCAGAATTTTACCTCGGATCAGGTAGGGATAC  
CCGCTGAACTTAAG
```

Translation Elongation Factor 1 (EF1- α)

```
CACCAACAGCGACGGTTTGACGCATGTCACGGACAGCGAAACGACCGAGAGGGTAGTCAGTGAAAGCCTCAACGCACAT  
GGGCTTGGAGGGAACCATCTTGACGATGGCGGCGTCACCGGACTTGATGAACTTGGGAGAGTTCTCAACAGACTTTCCGGTA  
CGGCGGTCAATCTTCTCGAGGAGCTCAGAGAACTTGCAAGCAATGTGGGCGGTGTGGCAGTCGAGGACTGGGGCGTAACCAG  
CACCGACCTGACCAGGGTGGTTGAGGACGATGACCTGGGCGTTGAAGGACTCGGCACCCTTGGGGGGTCTGTTCTTGGAGTC  
ACCGGCAACGTTACCACGACGGATCTCCTTGACGGAGACGTTCTTGACGTTGAAGCCGACGTTGTCACCGGGGACACCCTCG  
GTGAGCTGCTCGTGGTGCATCTCGACGGACTTGACTTCAGTGGTGACACAGCGGGGGCGAAAGTGACGACCATACCGGCCTT  
GATGATACCGGTCTCGACACGACCGACGGGCACCGTGCCAATACCACCAATCTTGTAAACATCCTGGAAGGGGAAAACGGAA
```

GGGCTTGTCCGTGGGACGGCTGGGAGGGTCGATGGCGTCGATGGCCTCGAGGAGGGTCTTACCAGTGGCCTTGGCCTTGGT
CTCCTTCTCCCAACCCTTGTACCAGGGGCAGTTGGATGAGGCCTCAATCATGTTGTCACCGTTGAAACCGGAGATGGGGACG
AAGGGAACGTGCTTGGGGTTGTAGCCGACCTTCTTGATGAAGTTGGAGGTCTCCTTGATGATCTCCTGGTAACGCTCCTCGG
ACCACTTGGTGGTGTCCATTTTGTGATGGCAACGATGAGCTGCTTGACACCGAGGGTGTAAGCGAGGAGAGCGTGCTCACG
AGTCTGGCCATCCTTGGAGATACCAGCCTCGAACTCACCAGTACCGGCGGCAATGATGAGAATAGCGCAGTCGGCCTGGGAG
GTACCAGTGATCATGTTCTTGATAAAATCACCATGACCAG

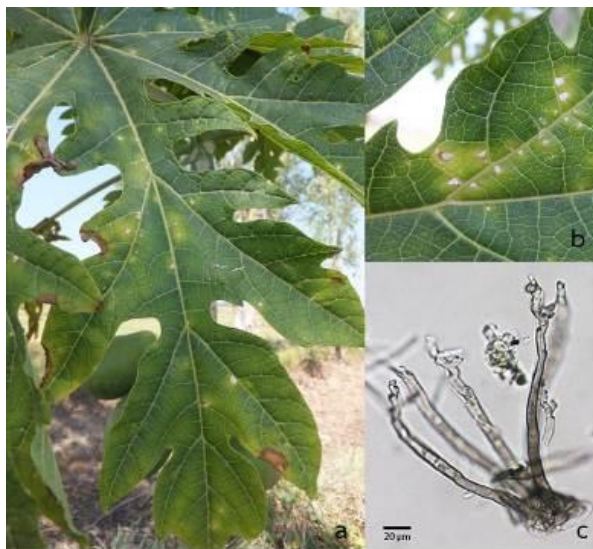


Figure 2 Leaf spot symptom on *Carica papaya* (a-b), conidiophores of *C. cassiicola* (c)

ใบจุดถั่วลิสง

เชื้อราสาเหตุ

Passalora arachidicola (Hori) U. Braun, New Zealand Journal of Botany 37 (2): 303 (1999)

Synonymy:

=*Cercospora arachidicola* Hori, Rep. (Annual) Nishigahara Agric. Exp. Sta. Tokyo: 26 (1917)

=*Cercospora arachidis* var. *macrospora* Maffei, Riv. Patol. Veg.: 7 (1922)

Classification

Kingdom	Fungi
Phylum	Ascomycota
Subphylum	Pezizomycotina
Class	Dothideomycetes
Subclass	Dothideomycetidae
Order	Capnodiales
Family	Mycosphaerellaceae
Genus	<i>Passalora</i>
Species	<i>arachidicola</i>

พืชและส่วนที่พบ ใบถั่วลิสง

ลักษณะอาการของโรค พบอาการบนใบโดยพบลักษณะแผลจุดกลมสีน้ำตาลเข้มและมีสีเหลืองล้อมรอบ ขนาดแผลมีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 1-10 มิลลิเมตร (Figure 3) การเข้าทำลายของเชื้อรานชนิดนี้มักพบในระยะแรกของการปลูกหรือต้นอ่อน จึงเรียกโรคใบจุดที่พบในระยะนี้ว่า early leaf spot หากในระยะต้นแก่อาจพบการเข้าทำลายของเชื้อรา *Cercosporidium personatum* (late leaf spot)

ลักษณะของเชื้อ ก้านชูสปอร์เป็นกลุ่มสีน้ำตาลอ่อน มีผนังกัน 0-2 septate ไม่แตกก้าน มักจะพบลักษณะคล้ายข้อต่อ (Figure 3) ขนาดประมาณ 3-5 x 15-45 µm สปอร์หรือโคนิเดียสีน้ำตาลอ่อนหรือสีจาง ลักษณะคล้ายกระบอง เป็นเส้นยาว บางครั้งพบลักษณะโค้ง สปอร์มีผนังกันพบได้ระหว่าง 3-12 septate ขนาดประมาณ 3-5 x 35-110 µm ฐานของสปอร์ลักษณะกว้างกว่าส่วนปลาย ยอดมีลักษณะมนเล็กน้อย

พืชอาศัย ถั่วลิสง (*Arachis hypogaea* L.)

Consensus sequence

Internal Transcribed Spacer (ITS) region

```
GTAGGTGAACCTGCGGAGGGATCATTACTGAGTGAGGGCGCGAGCCCGACCTCCAACCCTTTGTGCACCAACTCTGTTGCTT  
CGGGGGCGACCCCGCCGTCCTGGGCGACGGCGCCCCGGAGGTCGTCAAACACTGCATCTCTGCGTCGGAGTCGTCAAGTA  
AATTGAAACAAAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGCGAAT  
TGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCGTGGTATTCCGCGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCA  
TTTACCACCTCAAGCCTAGCTTGGTATTGGGCGTGCGGTTCCGCGCGCCTTAAAGTCTCCGGCTGAGCAGTCCGTCTCTAAG  
CGTTGTGGCACATATTTGCTGCAGAGTCCGGGCGGCTTTGCGCCGTTAAATCTTTCTCAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAG  
GG
```

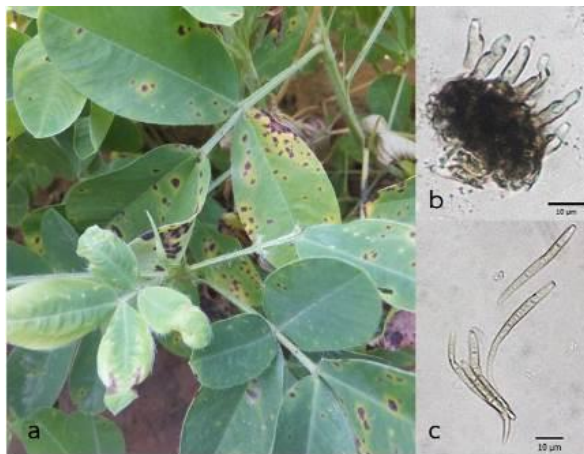


Figure 3 Leaf spot symptom on *Arachis hypogaea* (a) conidiophores (b) and conidia (c) of *P. arachidicola*

ใบปิ่นเหลือง

เชื้อราสาเหตุ

Pseudocercospora dendrobii (H.C. Burnett) U. Braun & Crous, *Mycosphaerella* and its anamorphs: 1. Names published in *Cercospora* and *Passalora*: 156 (2003)

Synonymy:

≡ *Cercospora dendrobii* H.C. Burnett, Proc. Florida State Hort. Soc.: 465-466 (1965)

=*Pseudocercospora dendrobii* Goh & W.H. Hsieh, *Cercospora* and similar fungi
from Taiwan: 255 (1990)

Classification

Kingdom	Fungi
Phylum	Ascomycota
Subphylum	Pezizomycotina
Class	Dothideomycetes
Subclass	Dothideomycetidae
Order	Capnodiales
Family	Mycosphaerellaceae
Genus	<i>Pseudocercospora</i>
Species	<i>dendrobii</i>

พืชและส่วนที่พบ ใบกล้วยไม้

ลักษณะอาการของโรค พบอาการบนใบโดยพบลักษณะเป็นปื้น ไม่มีขอบแผลชัดเจน อาการเริ่มแรกพบลักษณะสีเหลืองซีดบนผิวใบหรือหน้าใบ ขนาดแผลประมาณ 3-10 mm เมื่อแผลขยายหรือเริ่มแก่จะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลหรือเทาดำ (Figure 4) หากมีอาการหรือการเข้าทำลายที่รุนแรงใบจะหลุดร่วง เชื้อราสาเหตุสามารถแพร่กระจายได้โดยลมและฝน

ลักษณะของเชื้อ พบการสร้าง fruiting body สีเขียวมะกอกบนกระจายผิวใบ อาจพบการเกาะกลุ่มเป็นจุดเล็ก ๆ สีเข้ม ไม่พบการสร้าง secondary mycelium stromata มีขนาดเล็กขนาดความกว้างประมาณ 90 µm ลักษณะกลม สีเขียวมะกอกบนน้ำตาล conidiophores พบเป็นช่อหลวม (loosely fasciculate) หรืออัดกันแน่น (densely fasciculate) โผล่ออกมาจาก stromata และแตกกิ่งก้านอย่างชัดเจน conidiophores มีสีเขียวมะกอก หรือ สีเขียวมะกอกบนน้ำตาล สีอ่อนตรงปลาย ลักษณะตรงหรือโค้งเล็กน้อย มีผนังที่ชัดเจน 1-5 septate ขนาด 40-80 x 3-4.5 µm conidial scars ลักษณะบาง conidia มีลักษณะ acicular หรือ aciculo-obclavate สีเขียวมะกอกอ่อน หรือเข้มเล็กน้อย ลักษณะตรงหรือโค้งเล็กน้อย conidia มี 5-9 septate ลักษณะกลมมนตรงปลาย และส่วนฐานค่อนข้างป้าน ขนาด 40-80 x 3-3.5 µm hilum ไม่หนาและไม่ติดกัน (inconspicuous)

พืชอาศัย กล้วยไม้ (*Orchid* sp.)

Consensus sequences

Internal Transcribed Spacer (ITS) region

AACCTGCGGAGGGATCATTACTGAGTGAGGGCTCACGCCGACCTCCAACCCTTTGTGAACACATCTTGTTGCTTCGGGGGC
GACCCTGCCGGCACTACTTAGCCGGGCGCCCCGAAGGTCTCCAAACACTGCATCTTTGCGTCGGAGTTTCAACAAATTTAAA
CAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAAT
TCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGTATTCCGAAGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTACCAC
TCAAGCCTGGCTTGGTATTGGGCGTCGCGGGCTCCGCGCGCCTTAAAGTCTCCGGCTGAGCCATTGCTCTCTAAGCGTTGTGG
ATTTTCTAATTCGCTTCGGAGTGCGGGTGGCCGCGGCCGTTAAATCTTTACTTAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGG

Translation Elongation Factor 1 (EF1- α)

CGAGAAGGTAAGCTACCACCATCACCACATCGCCGCGTCACACGACTGCAACACCACTTTTTTCGCTCTTATCATCGTTGCG
CTGGCGACGAGGGGCAAATTTGGTGGGGTGCAGAAATTTGGCGCTTCGGCTCCACAGCCAATGACCTCACCCCATATCCAC
TTCACATTCTCCGCTCATTTTCAGCGACGACGGCGACGGCGATGTGCTTCACACTTGAACAGCTCGCTAACGACATGCCTCAC
AGGAAGCTGCCGAACCTTGGTAAGGGTTCCTTCAAGTA



Figure 4 Leaf spot symptom on *Orchid* sp. and conidia of *Pseudocercospora dendrobii*

ใบจุดกระเจี๊ยบเขียว

เชื้อราสาเหตุ

Pseudocercospora abelmoschi (Ellis & Everh.) Deighton, Mycological Papers 140: 138 (1976)

Synonymy:

=*Cercospora abelmoschi* Ellis & Everh., J. Inst. Jamaica: 347 (1893)

=*Cercospora hibisci* Tracy & Earle, Bulletin of the Torrey Botanical Club 22: 179 (1895)

=*Cercospora hibisci-manihotis* Henn., Hedwigia 43: 146 (1904)

Classification

Kingdom	Fungi
Phylum	Ascomycota
Subphylum	Pezizomycotina
Class	Dothideomycetes
Subclass	Dothideomycetidae
Order	Capnodiales
Family	Mycosphaerellaceae
Genus	<i>Pseudocercospora</i>
Species	<i>abelmoschi</i>

พืชและส่วนที่พบ ใบกระเจียบเขียว

ลักษณะอาการของโรค พบอาการที่ชัดเจนบริเวณใต้ใบโดยพบลักษณะของเชื้ออยู่เป็นกลุ่มป็นสีน้ำตาลเข้มถึงเทา ดำ บนผิวใบหรือหน้าใบจะพบลักษณะสีซีดไม่ชัดเจน หากมีอาการหรือการเข้าทำลายที่รุนแรงใบจะหลุดร่วง เชื้อราสาเหตุสามารถแพร่กระจายได้โดยลมและฝน (Figure 5)

ลักษณะของเชื้อ พบการสร้าง fruiting body สีน้ำตาลเข้มหรือเทาดำใต้ผิวใบ stomata มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 20-30 μm conidiophores อัดกันแน่น (densely fasciculate) โผล่ออกมาจาก stomata และแตกกิ่งก้านอย่างชัดเจน conidiophores มีสีน้ำตาลอ่อน ลักษณะตรงหรือโค้งเล็กน้อย มีผนังที่ชัดเจน 1-5 septate ขนาด 60-150 x 3.5-4.5 μm conidial scars ลักษณะหนา conidia มีลักษณะ solitary หรือ acropleurogenous สีน้ำตาลอ่อน ลักษณะตรงหรือโค้งเล็กน้อย conidia มี 3-6 septate ขนาด 33-58 x 4.5-8.5 μm (Figure 5)

พืชอาศัย กระเจียบเขียว (*Abelmoschus* sp.)

Consensus sequences

Internal Transcribed Spacer (ITS) region

```
ACCTGCGGAGGGATCATTACTGAGTGAGGGCTCACGCCCCGACCTCCAACCCTTTGTGAACCAAACCTTGTTGCTTCGGGGGCG
ACCCTGCCGACGACTTCGTCGCCGGGCGCCCCGGAGGTCTTCTAAACACTGCATCTTTGCGTCGGAGTTTAAACAAATTAA
ACAAAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAA
TTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGTATTCCGAAGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTACCA
CTCAAGCCTGGCTTGGTATTGGGCGTCGCGGTGTTTCCGCGCGCCTTAAAGTCTTCCGGCTGAGCTGTCCGTCTTAAGCGT
TGTGGATTTTTCAATTCGCTTCGGAGTGCGGATGGCCGCGCCGTTAAATCTTTATTCAAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGG
GAT
```

Translation Elongation Factor 1 (EF1- α)

AAGGTAAGCCATCGCCATCACTTTTTTCGCGGCCGCCGCTCGACTACAACACCATTTTTTCGCTCTTATCATCGTTGCGCTGGC
GACGAGGGGCAAATTTTGGTGGGGTGCAGAAATTCGACTCGGCTCCACAGCCAATGACTTCATCTCAAGCCCAGTGCCCAT
CCCTCTCCATCACTTCTGGCATCGACAGCGATGTTCAATTCGTGAACAACGGCATCGACGATCGCCTCTTCTCTATCTGAA
CAGCTCACTAACGATGTCCCTCACAGGAAGCCGCCGAACCTTGCAAGGGTTCCT



Figure 5 Leaf spot symptom on *Abelmoschus* sp. and characters of conidiophore and conidia

ใบจุดบนขึ้น

เชื้อราสาเหตุ

Cercospora zinniae Ellis & G. Martin, Journal of Mycology 1 (1): 20 (1885)

Synonymy:

=*Cercospora atrocincta* Heald & F.A. Wolf (1911)

=*Cercospora atricincta* Heald & F.A. Wolf, Mycologia 3 (1): 14 (1911)

=*Cercosporina zinniae* Takah. & Yosh., Pl. Protect. Tokyo: 17 (1953)

Classification

Kingdom	Fungi
Phylum	Ascomycota
Subphylum	Pezizomycotina
Class	Dothideomycetes

Subclass	Dothideomycetidae
Order	Capnodiales
Family	Mycosphaerellaceae
Genus	<i>Cercospora</i>
Species	<i>zinniae</i>

พืชและส่วนที่พบ ใบและกลีบดอกบานชื่น

ลักษณะอาการของโรค พบอาการที่ชัดเจนทั้งบนผิวใบ หากอาการรุนแรงจะพบอาการบนกลีบดอก เริ่มแรกแผลมีขนาดเล็กประมาณ 0.5 mm. และเมื่อแผลขยายอาจมีขนาดใหญ่ถึง 8 mm. แผลมีลักษณะกลมจนถึงรูปร่างไม่แน่นอน ตรงกลางแผลมีสีขาวจนถึงเทา ขอบแผลสีน้ำตาล น้ำตาลแดง หรือน้ำตาลเข้ม เชื้อราสาเหตุสามารถแพร่กระจายได้โดยลมและฝน (Figure 6)

ลักษณะของเชื้อ พบการสร้าง fruiting body ทั้งผิวใบและใต้ใบ แต่พบมากกว่าบนผิวใบ พบ stromata น้อย สีน้ำตาลเข้ม conidiophores อัดกันแน่นเป็นกลุ่ม (densely fasciculate) กลุ่มละประมาณ 2-20 และแตกกิ่งก้านอย่างชัดเจน conidiophores มีสีน้ำตาลอ่อนจนถึงเขียวมะกอกปนน้ำตาลอ่อน ลักษณะตรงหรือโค้งเล็กน้อย ลักษณะเรียวยาว มักพบ 2-3 spore scars ตรงบริเวณส่วนยอดหรือปลายของ conidiophore ขนาด 4-6 x 10-120 μm conidial ใสไม่มีสี จำนวน septate ไม่แน่นอน conidia มีลักษณะ acicular หรือ obclavate ปลายมนเล็กน้อย ขนาด 2-4 x 20-140 μm

พืชอาศัย บานชื่น (*Zinnia* sp.)



Figure 6 Leaf spot symptoms on leaves and petals of *Zinnia* sp.

ใบจุดถั่วฝักยาว

เชื้อราสาเหตุ

Pseudocercospora cruenta (Sacc.) Deighton, Mycological Papers 140: 142 (1976)

Synonymy:

- =*Cercospora cruenta* Sacc., *Michelia* 2 (6): 149 (1880)
- =*Cercospora phaseolorum* Cooke, *Grevillea* 12 (61): 30 (1883)
- =*Cercospora vignae* Ellis & Everh., *Journal of Mycology* 3 (2): 19 (1887)
- =*Cercospora viguae* Ellis & Everh., *Journal of Mycology* 3 (2): 19 (1887)
- =*Cercospora dolichi* Ellis & Everh., *Journal of Mycology* 5 (2): 71 (1889)
- =*Cercospora vignae* Racib., *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz* 8: 66 (1898)
- =*Cercospora raciborskii* Matsumoto & Nagaoka, *J. Plant Protect.*: 714 (1931)
- =*Cercospora vignae-sinensis* F.L. Tai & C.T. Wei, *Sinensia* 4: 126 (1933)
- =*Cercospora neovignae* W. Yamam., *Trans. Sapporo Nat. Hist. Soc.*: 142 (1934)
- =*Cercospora vignae-sinensis* Sawada, *Report of the Department of Agriculture Government Research Institute of Formosa* 85: 125 (1943)

Classification

Kingdom	Fungi
Phylum	Ascomycota
Subphylum	Pezizomycotina
Class	Dothideomycetes
Subclass	Dothideomycetidae
Order	Capnodiales
Family	Mycosphaerellaceae
Genus	<i>Pseudocercospora</i>
Species	<i>cruenta</i>

พืชและส่วนที่พบ ใบกล้วยฝักยาว

ลักษณะอาการของโรค พบอาการที่ชัดเจนบริเวณใต้ใบโดยพบลักษณะของเชื้ออยู่เป็นกลุ่มปื้นสีน้ำตาลเข้มถึงเทา ดำ บนผิวใบหรือหน้าใบจะพบลักษณะสีซีดไม่ชัดเจน หากมีอาการหรือการเข้าทำลายที่รุนแรงใบจะหลุดร่วง เชื้อราสาเหตุสามารถแพร่กระจายได้โดยลมและฝน

ลักษณะของเชื้อ พบการสร้าง fruiting body สีน้ำตาลเข้มหรือเทาดำใต้ผิวใบ stomata มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 20-30 μm conidiophores อัดกันแน่น (densely fasciculate) โผล่ออกมาจาก stomata และแตกกิ่งก้านอย่างชัดเจน conidiophores มีสีน้ำตาลอ่อน ลักษณะตรงหรือโค้งเล็กน้อย มีผนังที่ชัดเจน 0-3 septate ลักษณะยอดแบบ conic ขนาด 10-75 x 3-5 μm conidia มีลักษณะ cylindric หรือ cylindro-obclavate หรือลักษณะตรงหรือโค้งเล็กน้อย มีสีน้ำตาลอ่อนจนถึงใส conidia มี 3-14 septate ขนาด 25-120 x 2-5 μm

พืชอาศัย ถั่วฝักยาว (*Vigna unguiculata* (L.) Walp. subsp. *unguiculata*)

Consensus sequences

Internal Transcribed Spacer (ITS) region

```
AACCTGCGGAGGGATCATTACTGAGTGAGGGCTCACGCCGACCTCCAACCCTTTGTGAACCAAACCTTGTTGCTTCGGGGGC
GACCCTGCCGACGACTTCGTCGCCGGGCGCCCCGGAGGTCTTCTAAACACTGCATCTTTGCGTCGGAGTTAAACAAATTA
AACAAAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGA
ATTAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGTATTCCGAAGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTACC
ACTCAAGCCTGGCTTGGTATTGGGCGTCGCGGTGTCCGCGCGCCTTAAAGTCTTCCGGCTGAGCTGTCCGTCTTAAGCGT
TGTGGATTTTTCAATTGCTTCGGAGTGCGGATGGCCGCGGCCGTTAAATCTTTATTCAAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGG
GATA
```

Translation Elongation Factor 1 (EF1- α)

```
TCGAGAAGGTAAGCCATCGCCATCACCTTTTCACGACCGCCGCTCGACTACAATACCATTTTTTTCGCTCTTATCATCGTTGC
GCTGGCGACGAGGGGCAAAATTTGGTGGGGTGCAGAAATTTCTACTCGGCTCCACAGCCAAATGACTTCATCTCAAGCCACT
ACCCATTCCGTCTCCGTACCTCTGGCATCGACAGCGATGTTATCTGTGAACAATGGCATCGACGAGCGCTTGTGTCACTAT
CTGAACAGTCCACTAACGACATGCCTCACAGGAAGCCGCCGAACCTCGGTAAGGGTTCCTTCAAGTA
```

9. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

เก็บตัวอย่างของพืชที่แสดงอาการใบจุดที่เกิดจากรา cercosporoid จำนวน 69 ตัวอย่าง ระหว่างเดือน ตุลาคม 2559 – เดือนกันยายน 2562 จากจังหวัด กระบี่ พังงา นครศรีธรรมราช สุราษฎร์ธานี ยโสธร ชัยภูมิ เชียงราย เชียงใหม่ ลำปาง กรุงเทพฯ เพชรบูรณ์ ราชบุรี และเพชรบุรี สกัดและเพิ่มปริมาณของ DNA ตำแหน่ง Internal Transcribed Spacer (ITS) และ translation elongation factor 1-alpha (EF1- α) ของรา cercosporoid จำนวน 6 ไอโซเลท ที่แยกได้จากตัวอย่างใบจุดมะละกอ ใบจุดถั่วลิสง ปั้นเหลียงกล้วยไม้ ใบจุด กระเจี๊ยบเขียว ใบจุดถั่วฝักยาว และใบจุดบานไม่รู้โรย ทำการวิเคราะห์ ตรวจสอบความถูกต้องของ consensus sequence วิเคราะห์ชนิดเบื้องต้นพบว่าเชื้อราดังกล่าวคือ คือ *Corynespora cassicola*, *Passalora arachidicola*, *Pseudocercospora dendrobii*, *Pseu. abelmoschi* *Pseu. cruenta* และ *Cercospora*

zinnia ตามลำดับ ข้อมูลที่ได้สามารถใช้เป็นข้อมูลอ้างอิงสำหรับการจัดทำบัญชีรายชื่อโรคพืช รวมถึงสามารถใช้เป็นข้อมูลประกอบในการศึกษาด้านวิวัฒนาการต่อไป

10. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

10.1 ใช้เป็นข้อมูลอ้างอิงสำหรับการจัดทำบัญชีรายชื่อโรคพืช รวมถึงสามารถใช้เป็นข้อมูลประกอบในการศึกษาด้านวิวัฒนาการต่อไป

10.2 สามารถเผยแพร่ผลงานวิจัยในรายงานประจำปีของสำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร รวมถึงงานประชุมวิชาการระดับชาติ หรือนานาชาติ

11. คำขอบคุณ

ขอขอบคุณสมาชิก กลุ่มงานวิทยาไมโค กลุ่มวิจัยโรคพืช ที่ให้ความร่วมมือและความช่วยเหลือในการเก็บตัวอย่าง การดำเนินการทดลอง และการเก็บข้อมูล รวมถึงกำลังใจที่เมตตาให้กันเสมอมา

12. เอกสารอ้างอิง

พัฒนา สนธิรัตน์ ประไพศรี พิทักษ์ไพรวรรณ ธนวัฒน์ วิรัช ชูบำรุง และ อุบล คือประ โคน. 2523. *รา Cercospora สาเหตุโรคพืชในประเทศไทย*. กลุ่มงานวิทยาไมโค กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร. 51 หน้า.

พัฒนา สนธิรัตน์ ประไพศรี พิทักษ์ไพรวรรณ ธนวัฒน์ กำแหงฤทธิรงค์ วิรัช ชูบำรุง และ อุบล คือประ โคน. 2537. *ดรรรชนีโรคพืชในประเทศไทย*. กลุ่มงานวิทยาไมโค กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร. 285 หน้า

Agrios, G.N. 2005. *Plant pathology*. New York: Elsevier Academic Press. 922 p.

Aime, M.C. 2006. Toward resolving family-level relationships in rust fungi (Uredinales). *Mycoscience* 47: 112-122.

Alcorn, J. 1992. *Parapithomyces clitoriae* sp. nov. (Fungi: Hyphomycetes) and its *Pseudocercospora* synanamorph. *Australian Systematic Botany* 5: 711-715.

Beenken, L., S. Zoller and R. Berndt. 2012. Rust fungi on Annonaceae II: the genus *Dasyscypha* Berk. & M.A. Curtis. *Mycologia* 104: 659-681.

Bennett, C., M.C. Aime and G. Newcombe. 2011. Molecular and pathogenic variation within *Melampsora* on *Salix* in western North America reveals numerous cryptic species. *Mycologia* 103: 1004-1018.

Braun, U. 1995. *A monograph of Cercospora, Ramularia and allied genera (phytopathogenic hyphomycetes)*. Vol. 1. IHW-Verlag, Eching, Germany. 333 p.

- Carbone, I. and L.M. Kohn. 1999. A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. *Mycologia* 91: 553–556.
- Cräutlein, M., H. Korpelainen, M. Pietiläinen and J. Rikkinen. 2011. DNA barcoding: a tool for improved taxon identification and detection of species diversity. *Biodivers Conserv* 20: 373-389.
- Crous, P.W. and U. Braun. 2003. *Mycosphaerella and its Anamorphs: 1. Names published in Cercospora and Passalora*. In *CBS Biodiversity Series 1*. Utrecht, Netherland. 571 p.
- Crous, P.W., U. Braun and J.Z. Groenewald. 2007. *Mycosphaerella* is polyphyletic. *Studies in mycology* 58: 1-32.
- Crous, P.W., C.L. Schoch, K.D. Hyde, A.R. Wood, C. Gueidan, G.S. de Hoog and J.Z. Groenewald. 2009. Phylogenetic lineages in the Capnodiales. *Studies in Mycology* 64: 17–47.
- Deighton, F.C. 1967. Studies on *Cercospora* and allied genera. II. *Passalora*, *Cercosporidium*, and some species of *Fusicladium* on *Euphorbia*. *Mycological Papers*. 112: 1-80.
- Deighton, F.C. 1974. Studies on *Cercospora* and allied genera. V. *Mycovellosiella* Rangel, and a new species of *Ramulariopsis*. *Mycological Paper*.137: 1-76.
- Deighton, F.C. 1976. Studies on *Cercospora* and allied genera. VI. *Pseudocercospora* Speg., *Pantospora* Cif. and *Cercoseptoria* Petr. *Mycological Paper*.140: 1-168.
- Deighton, F.C. 1979. Studies on *Cercospora* and allied genera VII. New species and redispositions. *Mycological Paper*.137: 1-56.
- Dixon, L.J., L.A. Castlebury, C.A. Aime, N.C. Glynn and J.C. Comstock. 2010. Phylogenetic relationships of sugarcane rust fungi. *Mycological Progress* 9: 459-468.
- Doungsa-ard, C., A.R. McTaggart, A.D.W. Geering, T.U. Dalisay, J. Ray and R.G. Shivas. 2015. *Uromycladium falcatarium* sp. nov., the cause of gall rust on *Paraserianthes falcataria* in south-east Asia. *Australasian Plant Pathology* 44:25-30.
- Goodwin, S.B., L.D. Dunkle and V.L. Zismann. 2001. Phylogenetic Analysis of *Cercospora* and *Mycosphaerella* Based on the Internal Transcribed Spacer Region of Ribosomal DNA. *Phytopathology* 91: 648-658.

- Groenewald, J. Z., C. Nakashima, J. Nishikawa, H.D. Shin, J.H. Park, A.N. Jama, M. Groenewald, U. Braun and P. W., Crous. 2013. Species concepts in *Cercospora*: spotting the weeds among the roses. *Studies in Mycology* 75: 115-170.
- Hawksworth, D. L. 2011. A new dawn for the naming of fungi: impacts of decisions made in Melbourne in July 2011 on the future publication and regulation of fungal names. *IMA Fungus* 2: 155-162.
- 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.
- Liu, K.L., A. Porras-Alfaro, C.R. Kuske, S.A. Eichorst and G. Xie. 2012. Accurate, rapid taxonomic classification of fungal large-subunit rRNA genes. *Apply Environmental Microbiology* 78: 1523-1533.
- Minnis, A.M., A.R. McTaggart, A.Y. Rossman and M.C. Aime. 2012. Taxonomy of mayapple rust: the genus *Allodus* resurrected. *Mycologia* 104: 942-950.
- Nakashima, C., J. Meeboon, K. Motohashi and C. To-anun. 2007. Studies on *Cercospora* and allied genera in northern Thailand. *Fungal Diversity* 26: 257-270.
- Nicoli, A., L. Zambolim, E.G.C. Nasu, D.B. Pinho, O.L. Pereira, P.G.C. Cabral and E.M. Zambolim. 2011. First Report of *Cercospora apii* Leaf Spot on *Capsicum chinense* in Brazil. *Plant Disease* 95: 1194-1194.
- Norvell, L.L., D.L. Hawksworth, R.H. Petersen and S.A. Redhead. 2010. Fungal nomenclature. *Mycotaxon* 113: 503-514.
- O'Donnell, K., H.C. Kistler, E. Cigelnik and R.C. Ploetz. 1998. Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95: 2044-2049.
- Petcharat, V. and M. Kanjanamaneesathian. 1989. Species of plant pathogen *Cercospora* in Southern Thailand. *Thai Phytopathology* 9: 23-27.

- Phengsintham, P., U. Braun, E.H.C. McKenzie, E. Chukeatirote, L. Cai and K.D. Hyde. 2013. Monograph of Cercosporoid fungi from Thailand. *Plant Pathology & Quarantine Online* 3: 67-138.
- Phengsintham, P., E. Chukeatirote, E.H.C. McKenzie, M.A. Moslem, K.D. Hyde and U. Braun. 2012. Fourteen new records of cercosporoids from Thailand. *Maejo International Journal of Science and Technology* 6: 47-61.
- Pollack, F.G. 1987. *An annotated compilation of Cercospora names*. Berlin: J. Cramer. 212 p.
- Ruiz, R. C. and U. Braun. 1989. *Cercospora* and allied genera of Cuba (1). *Cryptogamic Botany* 1: 42-55.
- Seifert, K.A. 2009. Progress towards DNA barcoding of fungi. *Molecular Ecology Resources* 9 Suppl s1: 83.
- Silva, M. and O.L. Pereira. 2008. Postharvest *Cercospora apii* fruit rot disease on *Cucurbita maxima* (Cucurbitaceae). *Australasian Plant Disease Notes* 3: 21-23.
- Taylor, J.W. 2011. One Fungus = One Name: DNA and fungal nomenclature twenty years after PCR. *IMA Fungus* 2: 113-120.
- To-anun, C., I. Hidayat and J. Meeboon. 2011. Genus *Cercospora* in Thailand: Taxonomy and Phylogeny (with a dichotomous key to species). *Plant Pathology & Quarantine* 1: 11-87.
- White, T.J., T. Bruns, S. Lee and J. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, ed. M Innis, D Gelfand, J Shinsky, T White: Academic Press. Number of 315-322 pp.
- Yun, Y.H., A.M. Minnis, Y.H. Kim, L.A. Castlebury and M.C. Aime. 2011. The rust genus *Frommeella* revisited: a later synonym of *Phragmidium* after all. *Mycologia* 103: 1451-163.