การสำรวจโรคและจัดทำดีเอ็นเอบาร์โค้ดของรา Cercosporoid fungi สาเหตุโรคพืช

Disease Survey and DNA Barcoding of Plant Pathogenic Cercosporoid Fungi

ชนินทร ดวงสอาด[1/] พรพิมล อธิปัญญาคม[2/] สุณีรัตน์ สีมะเดื่อ[1/]
อมรรัชฎ์ คิดใจเดียว[1/] มะโนรัตน์ สุดสงวน[1/] สุทธิณี ลิขิตตระกูลรุ่ง[3/]
[1/]กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
[2/]ผู้เชี่ยวชาญ สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
[3/]กลุ่มพัฒนาการตรวจสอบพืชและปัจจัยการผลิต สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 1

รายงานความก้าวหน้า

เก็บตัวอย่างของพืชที่แสดงอาการใบจุดที่เกิดจากรา cercosporoid ระหว่างเดือนตุลาคม 2559 – เดือนกันยายน 2560 จากจังหวัด กระบี่ พังงา นครศรีธรรมราช สุราษฎร์ธานี ยโสธร ชัยภูมิ เชียงใหม่ กรุงเทพ เพชรบูรณ์ และเพชรบุรี จำนวน 29 ตัวอย่าง ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา สกัดและเพิ่มปริมาณของ DNA ตำแหน่ง ITS และ tef1 ของรา cercosporoid จำนวน 2 ไอโซเลท ที่แยกได้จากตัวอย่างใบมะละกอ และใบถั่วลิสง ซึ่งแสดงอาการใบจุด ทำการวิเคราะห์ และตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่าคือ *Corynespora cassiicola* และ *Passalora arachidicola*

คำหลัก : ใบจุด leaf spot Cercosporoid barcoding

รหัสการทดลอง 03-30-60-01-03-00-03-60

คำนำ

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

รา cercosporoid เป็นรากลุ่มใหญ่ในกลุ่ม Hyphomycetes (Crous and Braun, 2003) มีการจำแนกโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาตามวิธีที่มีการปฏิบัติกันมา โดยแต่เดิมรากลุ่ม cercosporoid ประกอบไปด้วยสองระยะของวงจรชีวิต คือระยะ telemorph และ anamorph ซึ่งระยะ teleomorph ของรา cercosporid มักอยู่ใน genus *Mycosphaerella* Johanson และราชนิดนี้ยังเป็นระยะ telemorph ของราอื่นๆอีกหลายสกุลของ Coelpmycetes และ Hyphomycetes (Crous *et al.*, 2007) ความซ้ำซ้อนและซับซ้อนของทั้งสองระยะการเจริญนี้ ทำให้เกิดความยุ่งยากและสับสนในการจัดจำแนกชนิดของรากลุ่ม cercosporoid ปัจจุบันได้มีการนำเทคนิคและข้อมูลทางชีวโมเลกุลมาช่วยบ่งชี้ หรือแสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์และวิวัฒนาการ (phylogeny) ของราในหลายสกุลหรือสปีชีส์ ที่มีความใกล้เคียงกัน บนพืชอาศัยต่างๆกัน หรือพืชอาศัยที่มีความใกล้เคียงกัน โดยนำข้อมูลจากหลายๆด้าน เช่น ข้อมูลชีวโมเลกุลจากหลายตำแหน่ง ลักษณะทางสัณฐานวิทยา พืชอาศัย ลักษณะทางภูมิศาสตร์ที่เก็บตัวอย่าง มาวิเคราะห์รวมกันอย่างเป็นระบบ (systematics study) ทำให้พบว่า ราที่จัดว่าเป็น *Mycosphaerella* ที่แท้จริงนั้น มีเพียงเชื้อรา *Ramularia* (Braun, 1998) เพียงชนิดเดียว อีกทั้งการศึกษาที่ใช้ลักษณะของข้อมูลทางพันธุกรรมมาเกี่ยวข้อง แสดงให้เห็นว่าราcercosporoid อื่นๆ ก็มีความจำเพาะในระดับ genus นั้นๆ โดยไม่มีความเกี่ยวข้องใดๆกับ genusอื่นๆ 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 ยังคงมีลักษณะอื่นๆที่ใช้ในการจำแนกรา *Cercospora* ออกจากรากลุ่มอื่นที่มีความใกล้เคียงกัน เช่น Braun (1995) จำแนกรา *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. mississipiensis P. madhauliensis* (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 แต่ลักษณะความแตกต่างดังกล่าวไม่เพียงพอในการจำแนกราไอโซเลทนั้นๆ 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 ในดรรชนีโรคพืชของประเทศไทย รายงานพบเชื้อรา *Cercospora* จำนวน 47 สปีชีส์ และไม่สามารถวินิจฉัยในระดับสปีชีส์ได้อีก 13 ขนิด และอีก 49 สปีชีส์ รายงานโดย Petcharat และ Kanjanamaneesathian (1989) Phengsintham *et al.* (2012) รายงานพบการเข้าทำลายของรา cercosporoid ในเขตภาคเหนือของประเทศไทย จำนวน 14 ชนิด ได้แก่ *Cercospora Passalora Pseodocercospora* และ *Zasmidium* โดยเป็นการพบเป็นครั้งแรกจำนวน 2 ชนิดในประเทศไทยคือ *Cercospora verniciferae* และ *Zasmidium cassiicola*

ปัจจุบันได้มีการนำข้อมูลของรหัสพันธุกรรมหรือ DNA มาใช้ประกอบการจำแนกชนิดของจุลินทรีย์ โดยมีการถอดรหัสพันธุกรรมจากแต่ละตำแหน่งบน DNA ซึ่งจะมีความจำเพาะต่อชนิดของสิ่งมีชีวิต โดยแต่ละตำแหน่งก็จะมีความแปรผันในระดับที่แตกต่างกัน โดยรหัสพันธุกรรมที่ถอดรหัสได้จากแต่ละตำแหน่งสามารถใช้เป็นข้อมูลเพื่อการจำแนกชนิดของจุลินทรีย์หรือสิ่งมีชีวิตชนิดนั้นๆ (DNA barcoding) (Cräutlein *et al.*, 2011) โดยการนำไปเปรียบเทียบกับรหัสพัธุกรรมอ้างอิง (reference

libraries) ที่ทราบชนิดแล้ว ตำแหน่งของรหัสพันธุกรรม (locus) ของราที่นิยมนำมาถอดรหัส โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อการจำแนก ศึกษาวิวัฒนาการ และประชากรของสิ่งมีชีวิตนั้นมีหลายตำแหน่ง หรือแม้กระทั่งมีการถอดรหัสทั้งจีโนมซึ่งจะบรรจุข้อมูลทางพันธุกรรมทั้งหมดของสิ่งมีชีวิตนั้นๆ (Next Generation Sequencing) เช่น Internal Transcribed Spacer (ITS) ซึ่งเป็นตำแหน่งที่นิยมใช้ (Seifert, 2009) ซึ่งตำแหน่งนี้มีสามารถบอกความแตกต่างได้ในระดับสปีชีส์ (White *et al.*, 1990) เนื่องจากการถอดรหัสข้อมูลจากตำแหน่ง ITS บางครั้งไม่เพียงพอในการจัดจำแนก จึงต้องอาศัยข้อมูลของดีเอ็นเอจากยีนตำแหน่งอื่นมากกว่าหนึ่งตำแหน่งร่วมในการวิเคราะห์ (Liu *et al.*, 2012) เพื่อจำแนกความแตกต่างในระดับสปีชีส์ 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 ถึงแม้พบว่ามีบางรายงานได้มีการนำข้อมูลทางด้านชีวโมเลกุลมาประกอบการศึกษาของรากลุ่ม cercosporoid เช่น การศึกษาโดย To-Anun *et al.* (2011) Nakashia *et al.* (2007) และ Phensintham *et al.* (2013) แต่ข้อมูลที่มีก็ยังไม่มีความหลายหลาก อีกทั้งรากลุ่ม cercosporoid สามารถเข้าทำลายพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ โดยเฉพาะสินค้าทางเกษตรเกษตรที่มีการส่งออก เช่น พืชผัก ไม้ดอก ดังนั้น ดังนั้นหากข้อมูลของบัญชีรายชื่อศัตรูพืชมีความครอบคลุมและมีรายละเอียดข้อมูลในเชิงลึกมาสนับสนุน จะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งในการนำเข้าและส่งออกสินค้า

เนื่องจากปัจจุบันความก้าวหน้าของเทคโนโลยีทางด้านชีวโมเลกุล เข้ามามีบทบาทในงานด้านอนุกรมวิธานมากขึ้น โดยมีการนำเทคนิคและข้อมูลทางชีวโมเลกุลมาช่วยเปรียบเทียบในบ่งการชี้หรือจำแนกชนิดของจุลินทรีย์ (genealogical concordance) ควบคู่กับการวินิจฉัยด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา และข้อมูลทางชีวโมเลกุลที่ได้นั้น สามารถใช้เป็นข้อมูลเฉพาะเพื่อการวินิจฉัยราชนิดนั้นๆ (DNA barcoding) ทำให้ทำให้สามารถชี้ชัดในการจำแนก ในกรณีที่การวินิจฉัยเชื้อสาเหตุไม่สามารถชี้ขาดได้ด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ดังนั้นการทดลองนี้มีวัตถุประสงค์ เพื่อศึกษาและจำแนกชนิดของรา cercosporoid สาเหตุโรคพืชในระดับสปีชีส์ โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา และข้อมูลด้านชีวโมเลกุล และ ได้ DNA barcode ของรา cercosporoid เพื่อใช้เป็นหลักฐานอ้างอิงในการจัดทำบัญชีรายชื่อศัตรูพืช เพื่อประโยชน์ในการนำเข้าและส่งออกสินค้า

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

- อุปกรณ์เก็บตัวอย่าง ได้แก่ ถุงพลาสติก ถุงกระดาษ กรรไกรตัดแต่งกิ่ง ไม้ทับตัวอย่าง กระดาษหนังสือพิมพ์ ซองกระดาษสำหรับเก็บและรักษาตัวอย่าง
- อุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการ ได้แก่ เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง (centrifuge) เครื่อง Polymerase chain reaction (PCR machine) เครื่องเขย่า (vortex) เครื่อง tissue lyser gel tank เครื่องกำเนิดกระแสไฟ gel plate comb เครื่องถ่ายภาพเจล microwave micropipette ขนาด 10 100 200 และ 1000 ไมโครลิตร กล้องจุลทรรศน์แบบ compound กล้องจุลทรรศน์แบบ stereo พร้อมอุปกรณ์ถ่ายภาพ water bath และ heat block
- วัสดุในห้องปฏิบัติการ สไลด์และแผ่นแก้วปิดสไลด์ tips ขนาด 10 100 200 และ 1000 ไมโครลิตร PCR tube ใบมีดผ่าตัด เข็มเขี่ยปลายแหลม ปากคีบ
- อุปกรณ์เครื่องแก้ว ได้แก่ บิกเกอร์ ขวดดูแรน กระบอกตวง ตะเกียงแอลกอฮอล์ plate
- สารเคมี ได้แก่ เอนไซม์สำหรับทำปฏิกิริยา Taq DNA Polymerase Phusion High-Fidelity DNA Polymerase Proteinase K enzyme Lithium Borate buffer (LB) ชุดสำหรับการสกัดดีเอ็นเอ ได้แก่ Microbial DNA Isolation Kit Power Plant Isolation Kit ชุดสำหรับการสกัดเจล ชุดสำหรับทำความสะอาดดีเอ็นเอ Stain G loading dye agarose gel (PCR grade) PCR water DNA ladder อาหารเลี้ยงเชื้อ เช่น potato dextrose agar (PDA) และ ไพร์เมอร์ ได้แก่
  - the Internal Transcribed Spacer (ITS) ITS1/ITS4 (White *et al.*, 1990)
  - the Large Subunit (LSU) LROR (Rehner and Samuels, 1994)/LR5 (Vilgalys and Hester, 1990) และ LSU1Fd (Crous *et al.*, 2009)/LR7 (Vilgalys and Hester, 1990)
  - 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)
  - the Actin (ACT) ACT-512F/ACT-783R (Carbone and Kohn, 1999)
  - Sequence assemble programs ได้แก่ Genious version 8.1.9 และ Bioedit

วิธีการ

1. สืบค้นข้อมูลของรากลุ่ม cercosporoid

สืบค้นข้อมูลสถานะของอนุกรมวิธานให้เป็นปัจจุบัน ได้แก่ ชื่อวิทยาศาสตร์ ชื่อพ้อง การจัดจำแนกชนิดของรา cercosporoid โดยใช้ข้อมูลทางด้านชีวโมเลกุล

2. เก็บ และรวบรวมตัวอย่างโรคพืชที่เกิดจากรากลุ่ม cercosporoid

เก็บตัวอย่างโรคพืชที่เกิดจากรากลุ่ม cercosporoid จากแหล่งปลูกพืชในประเทศไทย ได้แก่ ภาคเหนือ จ.เชียงใหม่ จ.เชียงราย จ.พะเยา จ.ลำพูน จ.อุตรดิตถ์ ภาคกลาง จ.สุโขทัย จ.พิษณุโลก จ. สุพรรณบุรี จ.นครสวรรค์ จ.นครปฐม ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ จ.นครราชสีมา จ.ขอนแก่น จ.สุรินทร์ จ.ศรีษะเกษ จ.อุดรธานี 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 ตึกอิงคศรีกสิการ กลุ่มวิจัยโรคพืช กรมวิชาการเกษตร ทั้งนี้ตัวอย่างโรคที่ใช้ในการศึกษา จะรวมถึงตัวอย่างแห้งของโรคพืชที่เกิดจากรากลุ่ม cercosporoid ที่เก็บรักษาในพิพิธภัณฑ์โรคพืช

3. ศึกษา และจำแนกชนิดของรากลุ่ม cercosporoid สาเหตุโรคพืชโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ศึกษาลักษณะอาการของโรค และเชื้อสาเหตุโรคโดยตรงจากพืช

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

แยกรา และเก็บเชื้อบริสุทธิ์

- แยกราโดยวิธี Tissue transplant โดยนำส่วนของพืชที่เป็นโรคมาตัดเป็นชิ้นสี่เหลี่ยมขนาด 0.5x0.5 มิลลิเมตร ให้คาบต่อส่วนที่เป็นโรคและไม่เป็นโรค แช่ในสารละลายโซเดียมไฮเปอร์คลอไรท์ 10 % เป็นเวลา 3-5 นาที ล้างในน้ำนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 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 ที่หยดน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อประมาณ 1 มิลลิลิตร ปิดฝาจานเลี้ยงเชื้อ เอียงจานเลี้ยงเชื้อโดยวนเป็นลักษณะวงกลมนานประมาณ 1-3 นาที จากนั้นเทของเหลวที่อยู่ในจานเลี้ยงเชื้อ ลงบน PDA จานใหม่ หากผิวหน้าอาหาร PDA เริ่มแห้ง ให้เติมน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อประมาณอีกประมาณ 0.5-1 มิลลิลิตร ปิดฝาจานเลี้ยงเชื้อ จากนั้นทำซ้ำแบบเดิมอีก จนได้

จานเลี้ยงเชื้ออย่างน้อย 3 จาน บ่มที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส นาน 10 วัน หากพบราเจริญขึ้นก่อนเวลา 10 วัน ให้ทำการคัดทิ้ง เนื่องจากราในกลุ่ม cercosporoid เจริญช้า ซึ่งจะใช้ระยะเวลานานกว่า 10 วัน จึงจะพบ colony

ศึกษาลักษณะของรา

นำราที่แยกได้มาเลี้ยงบนอาหาร PDA และบันทึกลักษณะต่าง ๆ ได้แก่ อัตราการเจริญของราบนอาหารเลี้ยงเชื้อ สีของโคโลนีด้านบนและด้านล่างจานอาหารเลี้ยงเชื้อ รวมทั้งการสร้างเม็ดสี (pigment) ศึกษา และบันทึกลักษณะทางสัณฐานวิทยาของราได้แก่ รูปร่าง ขนาด สี ของเส้นใย conidia conidiophore และโครงสร้างอื่นๆ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ stereo microscope และ compound microscope และถ่ายภาพ จากนั้นหาค่าเฉลี่ยของขนาดโครงสร้างต่างๆของราที่วัดขนาดไว้

จำแนกชนิดรา cercosporoid สาเหตุโรคพืช

โดยเปรียบเทียบลักษณะของรา cercosporoid ที่ศึกษากับคู่มือของ Deighton (1967, 1974, 1976 และ 1979) Ellis (1971) Braun (1995) และ Crous and Braun (2003)

4. จำแนกชนิดของรากลุ่ม cercosporoid สาเหตุโรคพืชโดยใช้ข้อมูลพันธุกรรม

สกัดดีเอ็นเอ

ตัก และย้ายเส้นใย conidia ของรา cercosporoid ที่เลี้ยงบนอาหาร PDA ประมาณ 0.2-0.5 กรัม ลงในหลอดสำหรับสกัดดีเอ็นเอ ทำการสกัดตามวิธีของ Doungsa-ard, *et al.* (2015) เก็บรักษาดีเอ็นเอไว้ที่อุณหภูมิ -20 หรือ -40 องศาเซลเซียส เพื่อรักษาสภาพและคุณภาพของดีเอ็นเอ

เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมาย

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้จากแต่ละตัวอย่าง มาทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายตำแหน่ง the Large Subunit (LSU) the Internal Transcribed Spacer (ITS) the translation elongation factor 1-alpha (EF-1α) และ the Actin (ACT) ด้วยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR) โดยใช้ Taq DNA Polymerase ใช้ cycling และ condition ของปฏิกิริยาตามที่ผู้ผลิตแนะนำ กำหนดใช้ค่า annealing temperature ของแต่ละตำแหน่ง ITS LSU EF1-α และ ACT ที่ 60 62 53 และ 58 องศาเซลเซียส ตามลำดับ

การตรวจสอบผลิตภัณฑ์ PCR

ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำ PCR โดยตรวจสอบขนาดของชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่ต้องการ ด้วยวิธี อิเล็กโทรโฟรีซิส (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

การวิเคราะห์ และตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์

นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ (sequence) มาทำการวิเคราะห์ โดยนำ forward sequence และ reverse sequence ที่ได้มาเปรียบเทียบเทียบกัน โดยใช้โปรแกรม Geneious version 8.1.9 (http://www.geneious.com, Kearse *et al.*, 2012) จะบันทึกข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ในรูปแบบไฟล์ fasta ทำการตรวจสอบความถูกต้องของชนิดของจุลินทรีย์ที่ทำการศึกษากับฐานข้อมูลทางพันธุกรรม เช่น Mycobank GenBank โดยเลือกวิธีเปรียบเทียบกับ type sequence

- **การบันทึกข้อมูล**

1. บันทึกข้อมูล เก็บรักษาสายพันธุ์เชื้อราและเก็บรักษาดีเอ็นเอต้นแบบ

ข้อมูลของรหัสดีเอ็นเอ (DNA barcode) จะถูกเก็บบันทึก และใช้เป็นข้อมูลอ้างอิงสำหรับการตรวจสอบชนิดของศัตรูพืช ใช้เป็นข้อมูลอ้างอิงสำหรับการจัดทำบัญชีรายชื่อโรคพืชรวมถึงสามารถใช้เป็นข้อมูลประกอบในการศึกษาด้านวิวัฒนาการต่อไป ดีเอ็นเอต้นแบบที่สกัดได้จะจัดเก็บไว้ที่อุณหภูมิ –40 องศาเซลเซียส ณ พิพิธภัณฑ์โรคพืช กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

2. วิเคราะห์ผล สรุปและเขียนรายงานความก้าวหน้า

เวลาและสถานที่

เริ่มต้น ตุลาคม 2559 – กันยายน 2560

กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

แปลงปลูกพืชในประเทศไทย

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

เก็บตัวอย่างของพืชที่แสดงอาการใบจุด (Figure 1) จาก กระบี่ พังงา สุราษฎร์ธานี นครศรีธรรมราช ยโสธร ชัยภูมิ เชียงใหม่ กรุงเทพ เพชรบูรณ์ และเพชรบุรี จำนวน 29 ตัวอย่าง (Table 1) นำตัวอย่างมาทำการศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ ทำสกัดและเพิ่มปริมาณของ DNA เป้าหมาย ตำแหน่ง ITS และ tef1 ของรา cercosporoid จำนวน 2 ไอโซเลท ที่แยกได้จากตัวอย่างใบมะละกอ และใบถั่วลิสง ซึ่งแสดงอาการใบจุดที่เกิดจากรา cercosporoid ทำการวิเคราะห์ และตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่าคือ *Corynespora cassiicola* และ *Passalora arachidicola* ซึ่งเชื้อราที่เป็นสาเหตุของโรคใบจุดมะละกอและเชื้อราสาเหตุของใบจุดถั่วลิสง ตามลำดับ โดยมีรายละเอียด ดังนี้

ใบจุดมะละกอ

เชื้อราสาเหตุ

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

Synonymy:

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

=*Helminthosporium cassiicola* 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-rui (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	*Corynespora*
Species	*cassiicola*

พืชและส่วนที่พบ ใบมะละกอ (*Carica papaya*)

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

ลักษณะของเชื้อ เชื้อราเจริญได้ดีบนอาหาร PDA เส้นใยสีเขียวเข้ม ก้านชูสปอร์เป็นกลุ่มสีน้ำตาลอ่อนมีผนังกั้นไม่แตกก้าน ขนาดประมาณ 100-800 x 4-11 µm พบทั้งลักษณะตรงและโค้ง มีลักษณะโป่งพองตรงผนังกั้น สปอร์หรือโคนีเดียยาวต่อกันเป็นเส้น ลักษณะเป็นแท่งยาวหรือคล้ายกระบอง มีสีจางแต่จะมีสีน้ำตาลเข้มข้นเมื่อสปอร์เริ่มแก่ ผนังเซลล์ตรงฐานหนา ผนังเรียบ สปอร์มีผนังกั้นพบได้ระหว่าง 4-20 ช่อง ขนาดประมาณ 40-500 x 9-22 µm

พืชอาศัย ราชนิดนี้มีพืชอาศัยที่กว้างทั้ง พืชไร่ พืชสวน ไม้ดอกไม้ประดับ รวมถึงวัชพืช เช่น ยางพารา มันสำปะหลัง มะเขือ มะละกอ พริก ถั่วเหลือง แตงกวา อย่างไรก็ตาม Dixon *et al.* (2009) รายงานว่าเมื่อทำการเปรียบเทียบเชื้อรา *C. cassiicola* ที่แยกได้จากพืชอาศัยชนิดต่างๆ พบว่าเชื้อราดังกล่าว

มีความหลากหลายทางชีวภาพและเป็น complex species และพบว่าเชื้อรา *C. cassiicola* มีความจำเพาะเจาะจงต่อพืชอาศัย เช่น *C. cassiicola* ที่แยกได้จากมะละกอ

Consensus sequences

Internal Transcribed Spacer (ITS) region

GTAGGGGCCTCGCCCCCTTCGAGATAGCACCCTTTGTTTATGAGCACCTCTCGTTTCCTCGGCAGGCTCGCCTG
CCAACGGGGACCCACCACAAACCCATTGTAGTACAAGAAGTACACGTCTGAACAAAACAAAACAAACTATTTAC
AACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAGTGTGAATTG
CAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGTATTCCTTAGGGCATGCCTGTTCGA
GCGTCATTTCAACCCTCAAGCCTAGCTTGGTGTTGGGCGTCTGTCCCGCCTCCGCGCGCCTGGACTCGCCTCA
AAAGCATTGGCGGCCGGTTCCCAGCAGGCCACGAGCGCAGCAGAGCAAGCGCTGAAGTGGCTGCGGGTCGGC
GCACCATGAGCCCCCCCACACCAGAATTTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAG

Translation Elongation Factor 1 (tef1)

CACCAACAGCGACGGTTTGACGCATGTCACGGACAGCGAAACGACCGAGAGGAGGGTAGTCAGTGAAAGCCTC
AACGCACATGGGCTTGGAGGGAACCATCTTGACGATGGCGGCGTCACCGGACTTGATGAACTTGGGAGAGTTC
TCAACAGACTTTCCGGTACGGCGGTCAATCTTCTCGAGGAGCTCAGAGAACTTGCAAGCAATGTGGGCGGTGT
GGCAGTCGAGGACTGGGGCGTAACCAGCACCGACCTGACCAGGGTGGTTGAGGACGATGACCTGGGCGTTGAA
GGACTCGGCACCCTTGGGGGGGTCGTTCTTGGAGTCACCGGCAACGTTACCACGACGGATCTCCTTGACGGAG
ACGTTCTTGACGTTGAAGCCGACGTTGTCACCGGGGACACCCTCGGTGAGCTGCTCGTGGTGCATCTCGACGG
ACTTGACTTCAGTGGTGACACAGCGGGGGCGAAAGTGACGACCATACCGGCCTTGATGATACCGGTCTCGACA
CGACCGACGGGCACCGTGCCAATACCACCAATCTTGTAAACATCCTGGAAGGGGAAAACGGAAGGGCTTGTCC
GTGGGACGGCTGGGAGGGTCGATGGCGTCGATGGCCTCGAGGAGGGTCTTACCAGTGGCCTTGGCCTTGGTCT
CCTTCTCCCAACCCTTGTACCAGGGGCAGTTGGATGAGGCCTCAATCATGTTGTCACCGTTGAAACCGGAGATG
GGGACGAAGGGAACGTGCTTGGGGTTGTAGCCGACCTTCTTGATGAAGTTGGAGGTCTCCTTGATGATCTCCT
GGTAACGCTCCTCGGACCACTTGGTGGTGTCCATTTTGTTGATGGCAACGATGAGCTGCTTGACACCGAGGGT
GTAAGCGAGGAGAGCGTGCTCACGAGTCTGGCCATCCTTGGAGATACCAGCCTCGAACTCACCAGTACCGGCG
GCAATGATGAGAATAGCGCAGTCGGCCTGGGAGGTACCAGTGATCATGTTCTTGATAAAATCACCATGACCAG
G

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	*Passalora*
Species	*arachidicola*

พืชและส่วนที่พบ ใบถั่วลิสง (*Arachis hypogaea* L.)

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

ลักษณะของเชื้อ ก้านชูสปอร์เป็นกลุ่มสีน้ำตาลอ่อน มีผนังกั้น 0-2 septate ไม่แตกก้าน มักจะพบลักษณะคล้ายข้อต่อ (Figure 3) ขนาดประมาณ 3-5x15-45 µm สปอร์หรือโคนีเดียสีน้ำตาลอ่อนหรือสีจาง ลักษณะคล้ายกระบอง เป็นเส้นยาว บางครั้งพบลักษณะโค้ง สปอร์มีผนังกั้นพบได้ระหว่าง 3-12 septate ขนาดประมาณ 3-5x35-110 µm ฐานของสปอร์ลักษณะกว้างกว่าส่วนปลาย ยอดมีลักษณะมนเล็กน้อย

พืชอาศัย ถั่วลิสง (*A. hypogaea*)

Consensus sequence

Internal Transcribed Spacer (ITS) region

GTAGGTGAACCTGCGGAGGGATCATTACTGAGTGAGGGCGCGAGCCCGACCTCCAACCCTTTGTGCACCAACT
CTGTTGCTTCGGGGGCGACCCCGCCGTCTGGGCGACGGCGCCCCCGGAGGTCGTCAAAACACTGCATCTCTGC
GTCGGAGTCGTCAAGTAAATTGAAACAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGC
AGCGAAATGCGATAAGTAATGCGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCG
TGGTATTCCGCGGGGCATGCCTGTTCGAGCGTCATTTCACCACTCAAGCCTAGCTTGGTATTGGGCGTGCGGTT
CCGCGCGCCTTAAAGTCTCCGGCTGAGCAGTCCGTCTCTAAGCGTTGTGGCACATATTTCGCTGCAGAGTCCG
GGCGGCTTTCGGCCGTTAAATCTTTCTCAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGG

เก็บตัวอย่างโรคพืชที่เกิดจากรากลุ่ม cercosporoid ที่เก็บรักษาในพิพิธภัณฑ์โรคพืช กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร มาทำการศึกษา ตรวจสภาพของตัวอย่างเพื่อทำการแยกเชื้อจากตัวอย่างแห้งต่อไป

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

เก็บตัวอย่างของพืชที่แสดงอาการใบจุดที่เกิดจากรา cercosporoid ระหว่างเดือนตุลาคม 2559 – เดือนกันยายน 2560 จากจังหวัด กระบี่ พังงา นครศรีธรรมราช สุราษฎร์ธานี ยโสธร ชัยภูมิ เชียงใหม่ กรุงเทพ เพชรบูรณ์ และเพชรบุรี จำนวน 29 ตัวอย่าง สกัดและเพิ่มปริมาณของ DNA ตำแหน่ง ITS และ tef1 ของรา cercosporoid จำนวน 2 ไอโซเลท ที่แยกได้จากตัวอย่างใบมะละกอและใบถั่วลิสง ซึ่งแสดงอาการใบจุด ทำการวิเคราะห์ และตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่าคือ *Corynespora cassiicola* และ *Passalora arachidicola* อย่างไรควรเพิ่มตำแหน่งของยีนหรือดีเอ็นเอเป้าหมายของราทั้งสองไอโซเลท เพื่อข้อมูลที่แม่นยำ รวมถึงตัวอย่างอื่น ๆ ที่ทำการเก็บตัวอย่างต่อไป

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณพี่ๆ และน้องๆ กลุ่มงานวิทยาไมโค กลุ่มวิจัยโรคพืช ที่ให้ความร่วมมือและความช่วยเหลือในการเก็บตัวอย่าง การดำเนินการทดลอง และการเก็บข้อมูล รวมถึงกำลังใจที่มีให้กันเสมอมา

เอกสารอ้างอิง

พัฒนา สนธิรัตน์ ประไพศรี พิทักษ์ไพรวัน ธนวัฒน์ กำแหงฤทธิรงค์ วิรัช ชูบำรุง และ อุบล คือประโคน. 2523. *Cercospora สาเหตุโรคพืชในประเทศไทย*. กลุ่มงานวิทยาไมโค กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร

พัฒนา สนธิรัตน์ ประไพศรี พิทักษ์ไพรวัน ธนวัฒน์ กำแหงฤทธิรงค์ วิรัช ชูบำรุง และ อุบล คือประโคน. 2537. *ดรรชนีโรคพืชในประเทศไทย*. กลุ่มงานวิทยาไมโค กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร. 285 หน้า

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

Aime, M.C. 2006. Toward resolving family-level relationships in rust fungi (Uredinales). *Mycoscience* 47: 112-22.

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

Beenken, L., Zoller, S. and R. Berndt. 2012. Rust fungi on Annonaceae II: the genus Dasyspora Berk. & M.A. Curtis. *Mycologia* 104: 659-81.

Bennett, C., Aime, M.C. 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 *Cercosporella*, *Ramularia* and allied genera (phytopathogenic hyphomycetes). Vol. 1. IHW-Verlag, Eching, Germany.

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., Korpelainen, H., Pietiläinen, M. 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

Crous, P.W., Braun, U. and J.Z. Groenewald. 2007. *Mycosphaerella* is polyphyletic. *Studies in mycology* 58: 1-32.

Crous, P.W., Schoch, C.L., Hyde, K.D., Wood, A.R., Gueidan, C., de Hoog, G.S. 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: 80 pp.

Deighton, F.C. 1974. Studies on *Cercospora* and allied genera. V. *Mycovellosiella* Rangel, and a new species of *Ramulariopsis*.75 pp.

Deighton, F.C. 1976. Studies on *Cercospora* and allied genera. VI. *Pseudocercospora* Speg., *Pantospora* Cif. and *Cercoseptoria* Petr.168 pp.

Deighton, F.C. 1979. Studies on *Cercospora* and allied genera VII. New species and redispositions. 56 pp.

Dixon, L.J., Castlebury, L.A., Aime, C.A., Glynn, N.C. and J.C. Comstock. 2010. Phylogenetic relationships of sugarcane rust fungi. *Mycological Progress* 9: 459-468.

Doungsa-ard, C., McTaggart, A.R., Geering, A.D.W., Dalisay, T.U., Ray, J. 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., Dunkle, L.D. 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., Nakashima, C., Nishikawa, J., Shin, H. D., Park, J. H., Jama, A. N., Groenewald, M., Braun, U. 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., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S., Buxton, S., Cooper, A., Markowitz, S., Duran, C., Thierer, T., Ashton, B., Mentjies, P. 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., Porras-Alfaro, A., Kuske, C.R., Eichorst, S.A. and G. Xie. 2012. Accurate, rapid taxonomic classification of fungal large-subunit rRNA genes. *Appl Environ Microbiol* 78: 1523-1533.

Minnis, A.M., McTaggart, A.R., Rossman, A.Y. and M.C. Aime. 2012. Taxonomy of mayapple rust: the genus *Allodus* resurrected. *Mycologia* 104: 942-950.

Nakashima, C,. Meeboon, J., Motohashi, K. and C. To-anun. 2007. Studies on *Cercospora* and allied genera in northern Thailand. *Fungal Diversity* 26: 257-270.

Nicoli, A., Zambolim, L., Nasu, E. G. C., Pinho, D. B., Pereira, O. L., Cabral, P. G. C. 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., Hawksworth, D. L., Petersen, R. H. and S. A. Redhead. 2010. Fungal nomenclature. *Mycotaxon* 113: 503-514.

O'Donnell, K., Kistler, H.C., Cigelnik, E. 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., Braum, U., McKenzie, E.H.C., Chukeatirote, E., Cai, L. and K.D. Hyde. 2013. Monograph of Cercosporoid fungi from Thailand. *Plant Pathology & Quarantine Online* 3: 67-138.

Phengsintham, P., Chukeatirote, E., McKenzie, E. H. C., Moslem, M. A., Hyde, K. D. 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*. pp 1-212. Berlin: J. Cramer

Rehner, S.A. and G.J. Samuels. 1994. Taxonomy and phylogeny of *Gliocladium* analysed from nuclear large subunit ribosomal DNA sequences. *Mycological Research* 98: 625–634.

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., Hidayat, I. and J. Meeboon. 2011. Genus *Cercospora* in Thailand: Taxonomy and Phylogeny (with a dichotomous key to species). *Plant Pathology & Quarantine* 1: 11-87.

Vilgalys, R. and M. Hester. 1990. Rapid genetic identification and mapping of enzymatically amplified ribosomal DNA from several Cryptococcus species. *Journal of Bacteriology* 172: 4238–4246.

White, T.J., Bruns, T., Lee, S. 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:315-22: Academic Press. Number of 315-22 pp.

Yun, Y.H., Minnis, A.M., Kim, Y.H., Castlebury, L.A. and M.C. Aime. 2011. The rust genus *Frommee¨lla* revisited: a later synonym of *Phragmidium* after all. *Mycologia* 103: 1451-163.

Table 1 Leaf spot specimens caused by cercosporoid fungi collected from this study (2016-2017)

Host	Locations
ตระกูลว่าน	อ.เมือง จ.ขอนแก่น
บัว	ต.หนองหาร อ.สันทราย จ.เชียงใหม่
ว่านสี่ทิศ	ต. อุ่มเม้า อ.ธวัชบุรี จ.ร้อยเอ็ด
ถั่วฝักยาว	บ้านสายหนึ่ง ต.ท่าคอย อ.ท่ายาง จ.เพชรบุรี
บานชื่น	อ.ทุ่งสง จ.นครศรีธรรมราช บ้านบางปอ ต.คลองน้อย ต.ปากพนัง จ.นครศรีธรรมราช
มันสำปะหลัง	ต.ฟ้าห่วน อ.ค้อวัง จ.ยโสธร
หอมแดง	ต.ฟ้าห่วน อ.ค้อวัง จ.ยโสธร
ข่อย	บ้านโพนเมือง ต.ฟ้าห่วน อ.ค้อวัง จ.ยโสธร
หญ้า 1	ต. ลุ่มลำชี อ.บ้านเขว้า จ.ชัยภูมิ
พริก	บ้านห้วยหวาย ต. ลุ่มลำชี อ.บ้านเขว้า จ.ชัยภูมิ
ใบปรัง	บ้านทุ่ง ต.เขาคาม อ.เมือง จ.กระบี่
หญ้า 2	บ้านทุ่ง ต.เขาคาม อ.เมือง จ.กระบี่
หญ้าขจรจบ	ต.กระบี่น้อย อ.เมือง จ.กระบี่
ข่อย	อ.ห้วยยอด จ.กระบี่
ถั่วลิสง	ต.ห้วยทรายเหนือ อ.ชะอำ จ.เพชรบุรี
บานไม่รู้โรย	อ.ทุ่งสง จ.นครศรีธรรมราช
มะเขือ	บ้านบางปอ ต.คลองน้อย ต.ปากพนัง จ.นครศรีธรรมราช
มะละกอ	บ้านบางปอ ต.คลองน้อย ต.ปากพนัง บ้านบางเนียน ต.คลองน้อย ต.ปากพนัง จ.นครศรีธรรมราช
มะรุม	บ้านบางปอ ต.คลองน้อย ต.ปากพนัง จ.นครศรีธรรมราช
หงอนไก่	บ้านบางปอ ต.คลองน้อย ต.ปากพนัง จ.นครศรีธรรมราช
หญ้ายาง	บ้านบางเนียน ต.คลองน้อย ต.ปากพนัง จ.นครศรีธรรมราช
เอื้องเขา	ต.คลองน้อย ต.ปากพนัง จ.นครศรีธรรมราช
กระเจี๊ยบเขียว	อ.เมือง จ.สุราษฎร์ธานี
อะโวกาโด	ศูนย์วิจัยยาง จ.สุราษฎร์ธานี
ตำลึง	ศูนย์วิจัยยาง จ.สุราษฎร์ธานี

Figure 1 Leaf spot specimens caused by cercosporoid fungi collected from this study (2016-2017)

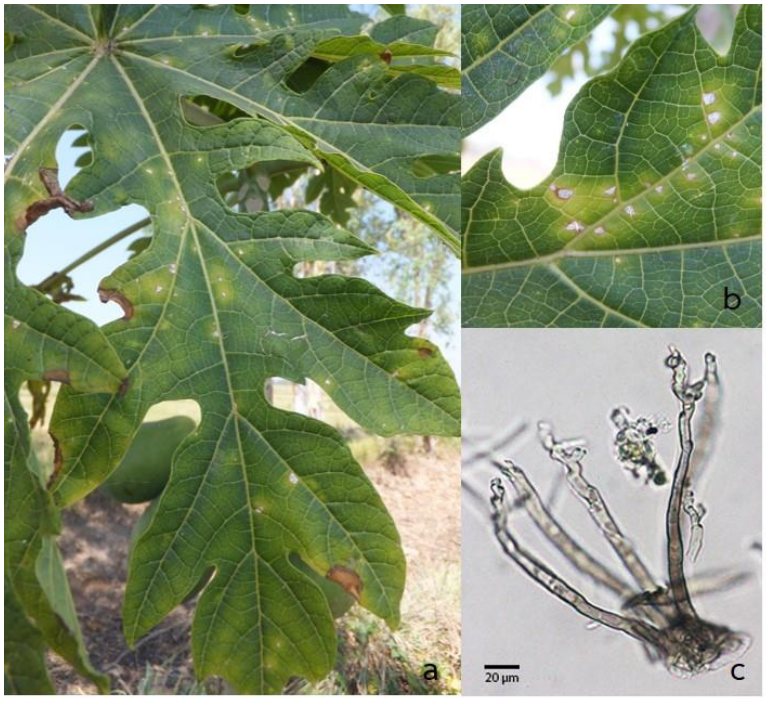

Figure 2 Leaf spot symptom on *Carica papaya* (a-b), conidiophores of *C. cassiicola* (c)

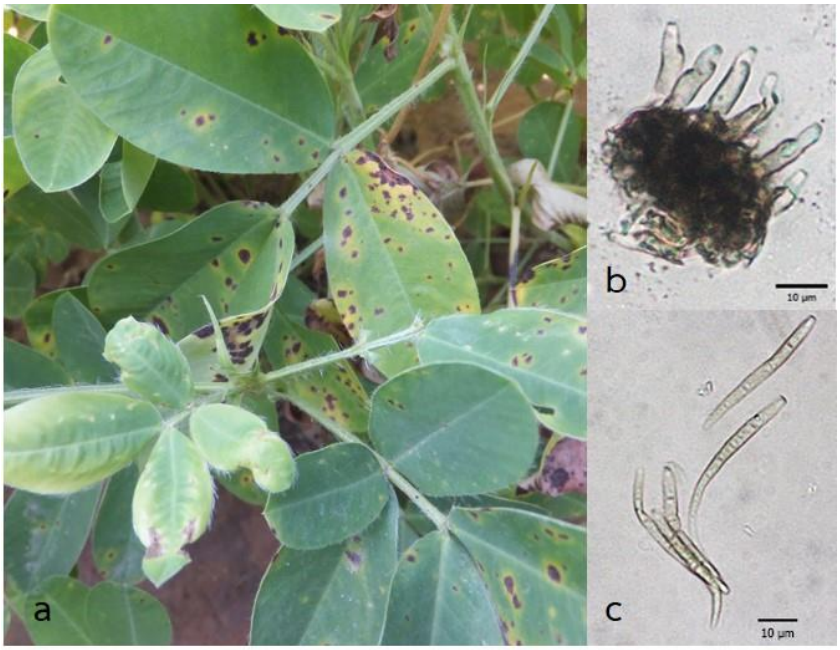

Figure 3 Leaf spot symptom on *Arachis hypogaea* (a) conidiophores (b) and conidia (c) of *P. arachidicola*