รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด ปีงบประมาณ 2562

1. แผนงานวิจัย การจัดทำฐานข้อมูลศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติเพื่อการวิจัยพัฒนาด้านการอารักขาพืชในประเทศไทย

2. โครงการวิจัย อนุกรมวิธาน ชีววิทยา และการจำแนกชนิดโดยดีเอ็นเอบาร์โค้ดของศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติเพื่อการวิจัยด้านอารักขาพืชในประเทศไทย

กิจกรรม ที่ 3 การจำแนกชนิดศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติโดยดีเอ็นเอบาร์โค้ด

กิจกรรมย่อย

3. ชื่อการทดลอง (ภาษาไทย) **การจัดทำดีเอ็นเอบาร์โค้ดของรา *Alternaria* สาเหตุโรคพืช**

(ภาษาอังกฤษ) DNA barcoding of plant pathogenic *Alternaria*

4. คณะผู้ดำเนินงาน

หัวหน้าการทดลอง	สุณีรัตน์ สีมะเดื่อ	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
ผู้ร่วมงาน	ชนินทร ดวงสอาด	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
	อมรรัชฎ์ คิดใจเดียว	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
	มะโนรัตน์ สุดสงวน	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
	พรพิมล อธิปัญญาคม	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

5. บทคัดย่อ

เก็บและรวบรวมตัวอย่างโรคพืชที่คาดว่าเกิดจากรา *Alternaria* ระหว่างเดือนพฤศจิกายน 2560 กันยายน 2562 จากแปลงปลูกพืชใน จังหวัด เพชรบูรณ์ สระบุรี ราชบุรี ชลบุรี ฉะเชิงเทรา ประจวบคีรีขันธ์ เพชรบุรี กาญจนบุรี สุพรรณบุรี ชัยภูมิ นครราชสีมา ขอนแก่น เลย เชียงใหม่ ลำพูน ลำปาง น่าน ตาก แพร่ และอุตรดิตถ์ ได้ตัวอย่างโรคพืชที่เกิดจากรา *Alternaria* จำนวน 145 ตัวอย่าง ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา และข้อมูลชีวโมเลกุลของยีนตำแหน่ง ITS, GAPDH และ EF1-**α** จำนวน 37 ไอโซเลท และจัดทำดีเอ็นเอบาร์โค้ด พบว่าเกิดจากรา *Alternaria* 6 species และ 1 complex species คือ *Alternaria brassicicola* สาเหตุโรคใบจุดคะน้า กะหล่ำปลี กะหล่ำปลีรูปหัวใจ ผักกาดขาว หัวไชเท้า บรอกโคลี และกะหล่ำดอก *A. porri* สาเหตุโรคใบจุดสีม่วงของหอมแดง หอมหัวใหญ่ กระเทียม หอมแบ่ง และหอมญี่ปุ่น *A. solani* สาเหตุโรคใบจุดมะเขือเทศ *A. alternata* สาเหตุโรคใบจุดของมันฝรั่ง โรคใบจุดใบไหม้ดาวเรือง และโรคใบจุดใบไหม้ทานตะวันเม็กซิโก *A. dauci* สาเหตุโรคใบไหม้ทานตะวัน และโรคใบไหม้ผักชี *A. tagetica* สาเหตุโรคใบจุดใบไหม้ดาวเรือง และ *A. porri* complex จากอาการโรคใบจุดสีม่วงของหอมแดง หอมหัวใหญ่ และกระเทียม

คำค้น: ดีเอ็นเอบาร์โค้ด, ออลเทอร์นาเรีย

ABSTRACT

Plant disease samples caused by *Alternaria* fungi had been collected during November 2016 – September 2019. One hundred and forty-five plant disease samples were collected from plantation located in Phetchabun, Sarabur,i Ratchaburi, Chonburi, Chachoengsao, Prachuap Khiri Khan, Phetchaburi, Kanchanaburi, Supunburi, Chaiyaphum, Nakhon Ratchasima, Khon Kaen, Loei, Chiangmai, Lumpun, Lampang, Nan, Tak, Phrae and Uttaradit provinces. Thirty-seven specimens had been observed and identified using morphological and molecular data of Internal Transcribed Spacer (ITS), translation elongation factor 1-alpha (EF1-**α**) and Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenasebeta (GAPDH) gene regions. It was found that the causal agent could be identified as *Alternaria brassicicola Alternaria porri Alternaria solani Alternaria alternata Alternaria dauci Alternaria tagetica* and *Alternaria porri* complex.

Keywords: *Alternaria* DNA barcoding

6. คำนำ

ราสกุล *Alternaria* เป็นสาเหตุโรคทำความเสียหายต่อผลผลิตของพืชเศรษฐกิจหลายชนิด ทั้งพืชผัก ไม้ผล ไม้ดอก ไม้ประดับ รวมทั้งวัชพืช รา *Alternaria* ที่เป็นสาเหตุโรคพืช ได้แก่ *Alternaria dauci* สาเหตุโรคใบไหม้ของแครอท *A. radicina* สาเหตุโรคเน่าดำของแครอท *A. brassicae* และ *A. brassicicola* สาเหตุโรคใบจุดของพืชตระกูลกะหล่ำ และโรคเน่า (head rot) ของบรอคโคลี่ *A. solani* สาเหตุโรคไบไหม้ และผลเน่าของมะเขือเทศ *A. tenuis* และ *A. alternata* สาเหตุโรคผลจุดของพริก โรคใบจุดของ geranium หรือ จิบโซฟิลล่า *A. porri* สาเหตุโรคใบจุดสีม่วงหรือใบไหม้กับพืชตระกูลหอมกระเทียม *A. dianthi* และ *A. dianthicola* สาเหตุโรคใบไหม้และกลีบดอกจุดของคาร์เนชั่น และทานตะวัน *A. zinniae* สาเหตุโรคใบจุด และกลีบดอกจุดของบานชื่น *A. tennuissima* สาเหตุโรคใบจุดของแพนซี่ *A. citri* สาเหตุโรคเน่าดำ ซึ่งเป็นโรคหลังการเก็บเกี่ยวของผลส้ม (พัฒนา และคณะ, 2526, 2537 ; Katoh *et al*., 2005 ; Chase, 1998 : Laemmlen, 2009) เป็นต้น *Alternaria* จัดอยู่ใน Phylum Ascomycota Class Dothideomycetes Order Pleosporales Family Plosporaceae Genus *Alternaria* ราสกุลนี้สร้าง conidiophore สีเข้มไม่แตกกิ่งก้าน conidium จัดอยู่ในพวก porospore และ dictyospore มีสีเข้ม รูปร่างรูปไข่จนถึง obclavate หรือทรงกระบอก สปอร์อันแรกเกิดที่

ปลายก้าน conidiophore และสามารถทำหน้าที่เป็น conidiophore โดยสร้างรูที่ปลายของสปอร์ และให้กำเนิดสปอร์อันต่อไปต่อกันเป็นลูกโซ่ยาว สปอร์อาจมีส่วนปลายเรียวเป็น beak (วิจัย, 2551)

ในประเทศไทยการศึกษาด้านการจำแนกชนิดของรา *Alternaria* ส่วนใหญ่ เป็นการจำแนกชนิดโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ ซึ่งปัจจุบันความก้าวหน้าของเทคโนโลยีทางด้านชีวโมเลกุล เข้ามามีบทบาทในงานด้านการจำแนกชนิด และอนุกรมวิธานของเชื้อมากขึ้น โดยมีการนำเทคนิคและข้อมูลทางชีวโมเลกุลมาใช้จำแนกชนิดควบคู่กับการใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา ซึ่งจะทำให้การจำแนกชนิดของรามีความถูกต้องและแม่นยำมากขึ้น การทำดีเอ็นเอบาร์โค้ด (DNA barcoding) เป็นอีกเทคนิคหนึ่งทางชีวโมเลกุล ที่กำลังได้รับความสนใจอย่างมาก เพราะมีประสิทธิภาพ และความแม่นยำ สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการระบุชนิดของสิ่งมีชีวิตได้ในระยะเวลาอันสั้น และสามารถจำแนกชนิดของสิ่งมีชีวิต ในกลุ่มที่มีความซับซ้อนมาก (species complex) เชื้อรา *Alternaria* บางชนิดมีลักษณะทางสัณฐานวิทยา ใกล้เคียงกันมากและยังใกล้เคียงกับ *Nimbya* และ *Stemphylium* ดังนั้น เพื่อให้การจำแนกชนิดของรามีความถูกต้องและแม่นยำมากขึ้น ในงานวิจัยนี้ จึงนำเทคนิคและข้อมูลทางชีวโมเลกุลมาใช้จำแนกชนิดควบคู่กับการใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของรา *Alternaria* โดยการจัดทำดีเอ็นเอบาร์โค้ดของรา *Alternaria* ซึ่งข้อมูลที่ได้นอกจากจะเป็นประโยชน์ในด้านการจำแนกชนิดของราแล้ว ยังเป็นประโยชน์สำหรับการค้นคว้าวิจัยด้านวิวัฒนาการ ความหลากหลายทางชีวภาพ รวมถึงการอนุรักษ์พันธุกรรมของเชื้อรา และยังเป็นข้อมูลอ้างอิงในการจัดทำบัญชีรายชื่อศัตรูพืช เพื่อประโยชน์ในการนำเข้าและส่งออกสินค้าเกษตร

7. วิธีดำเนินการ

- อุปกรณ์

1. ตัวอย่างโรคพืชที่เกิดจากรา *Alternaria* จากแหล่งปลูกพืชของประเทศไทย

2. อุปกรณ์เก็บตัวอย่าง ได้แก่ ถุงพลาสติก ถุงกระดาษ กรรไกรตัดแต่งกิ่ง ไม้ทับตัวอย่าง กระดาษหนังสือพิมพ์ ซองกระดาษสำหรับเก็บและรักษาตัวอย่าง

3. 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

4. วัสดุในห้องปฏิบัติการ สไลด์และแผ่นแก้วปิดสไลด์ tips ขนาด 10 100 200 และ 1000 ไมโครลิตร PCR tube ใบมีดผ่าตัด เข็มเขี่ยปลายแหลม ปากคีบ

5. อุปกรณ์เครื่องแก้ว ได้แก่ บิกเกอร์ ขวดดูแรน กระบอกตวง ตะเกียงแอลกอฮอล์ จานเลี้ยงเชื้อ

6. 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
- ไพร์เมอร์ ได้แก่

the Internal Transcribed Spacer (ITS)

ITS1: CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA (White *et al*., 1990)

ITS4: TCCTCCGCTTATTGATATGC (White *et al*., 1990)

the translation elongation factor 1-alpha (EF1-α)

EF1-728F: CATCGAGAAGTTCGAGAAGG (Carbone and Kohn, 1999)

EF1-986R: TACTTGAAGGAACCCTTACC (Carbone and Kohn, 1999)

Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenasebeta (GAPDH)

gpd1: CAACGGCTTCGGTCGCATTG (Berbee *et al*., 1999)

gpd2: GCCAAGCAGTTGGTTGTGC (Berbee *et al*., 1999)

- อาหารเลี้ยงเชื้อ potato dextrose agar (PDA) และ potato carrot agar (PCA)

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

วิธีการ

1. เก็บและรวบรวมตัวอย่างโรคพืชที่เกิดจากรา *Alternaria*

เก็บตัวอย่างพืชที่แสดงอาการเป็นโรคซึ่งคาดว่าเกิดจากรา *Alternaria* จากแหล่งปลูกพืชในประเทศไทย โดยเลือกเก็บส่วนของพืชที่แสดงอาการของโรค ได้แก่ ใบ ดอก ผล กิ่ง และลำต้น ห่อด้วยกระดาษหนังสือพิมพ์ ใส่ใน

ถุงพลาสติก พร้อมแนบกระดาษบันทึกรายละเอียด ชื่อพืช สถานที่เก็บ วันที่เก็บ และลักษณะอาการของโรค บรรจุห่อตัวอย่างโรคพืชลงในกล่องเก็บความเย็น เพื่อนำมาจำแนกชนิดของเชื้อสาเหตุโรคในห้องปฏิบัติการ

2. ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา และจำแนกชนิดของรา *Alternaria*

ศึกษาลักษณะอาการของโรคและเชื้อสาเหตุโรคโดยตรงจากพืช

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

แยกเชื้อรา และเก็บเชื้อบริสุทธิ์

แยกเชื้อราโดยวิธี 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

พิสูจน์โรคตามวิธีการ Koch's postulate

นำรา *Alternaria* บริสุทธิ์ที่แยกได้ มาเลี้ยงบนอาหาร PDA ในจานเลี้ยงเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส นาน 5 วัน จากนั้นใช้ cork boror ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร ตัดวุ้นอาหารบริเวณส่วนปลายเส้นใยของเชื้อรา นำไปปลูกเชื้อบนพืชชนิดเดิม สำหรับกรรมวิธีเปรียบเทียบปลูกเชื้อด้วยชิ้นวุ้นอาหาร PDA ที่ปราศจากเชื้อสาเหตุโรค เมื่อพืชเป็นโรคนำส่วนที่แสดงอาการเป็นโรคมาแยกเชื้อบริสุทธิ์ตรวจดู เพื่อยืนยันเชื้อสาเหตุโรคอีกครั้ง

ศึกษาลักษณะของรา

นำราที่แยกได้มาเลี้ยงบนอาหาร PDA และบันทึกลักษณะต่าง ๆ ได้แก่ อัตราการเจริญของราบนอาหารเลี้ยงเชื้อ สีของโคโลนี ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราได้แก่ รูปร่าง ขนาด สี ของเส้นใย conidia conidiophore และโครงสร้างอื่น ๆ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ stereo microscope และ compound microscope และถ่ายภาพ จากนั้นหาค่าเฉลี่ยของขนาดโครงสร้างต่างๆของราที่วัดขนาดไว้

จำแนกชนิดรา *Alternaria* สาเหตุโรคพืช

โดยเปรียบเทียบลักษณะของรา *Alternaria* ที่ศึกษากับเอกสารการจัดจำแนกรา *Alternaria* คือ *Alternaria* An Identification Manual (Simmons, 2007)

เก็บรักษาสายพันธุ์รา

เชื้อราที่แยกได้เก็บรักษาไว้ใน Culture Collection ของกลุ่มวิจัยโรคพืชโดยเลี้ยงบนอาหาร PDA slant ในหลอดแก้ว เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส

จัดทำตัวอย่างแห้งโรคพืช

ตัวอย่างโรคพืชที่เก็บมาได้ ส่วนหนึ่งนำมาจัดทำตัวอย่างแห้ง แล้วส่งเก็บในพิพิธภัณฑ์ตัวอย่างแห้งโรคพืช กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

3. จัดทำดีเอ็นเอบาร์โค้ดของรา *Alternaria*

สกัดดีเอ็นเอ (DNA extraction) ของรา *Alternaria*

โดยเลี้ยงรา *Alternaria* 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

เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของรา *Alternaria* โดยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR)

ไพร์เมอร์ที่ใช้ในการศึกษา

the Internal Transcribed Spacer (ITS)

ITS1: CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA (White *et al*., 1990)

ITS4: TCCTCCGCTTATTGATATGC (White *et al*., 1990)

the translation elongation factor 1-alpha (EF1-**α**)

EF1-728F: CATCGAGAAGTTCGAGAAGG (Carbone and Kohn, 1999)

EF1-986R: TACTTGAAGGAACCCTTACC (Carbone and Kohn, 1999)

Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenasebeta (GAPDH)

gpd1: CAACGGCTTCGGTCGCATTG (Berbee *et al*., 1999)

gpd2: GCCAAGCAGTTGGTTGTGC (Berbee *et al*., 1999)

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้จากแต่ละตัวอย่าง มาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) ของตำแหน่ง the Internal Transcribed Spacer (ITS) the translation elongation factor 1-alpha (EF1-**α**) และ Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenasebeta (GAPDH) ด้วย Green Hot Start PCR Master Mix (biotechrabbit™) ใช้ cycling และ condition ของปฏิกิริยาตามที่ผู้ผลิตแนะนำ กำหนด annealing temperature ที่ 56 องศาเซลเซียส

ตรวจสอบผลผลิตดีเอ็นเอจากปฏิกิริยา PCR

ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ PCR ด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส (Electrophoresis) เตรียม 1% agarose gel และผสม SERVA HiSens Stain G ในอัตราส่วน 1:50,000 ผสมผลิตภัณฑ์ PCR 5 ไมโครลิตร ด้วย loading dye 1 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันจากนั้นหยอดลงใน agarose gel ที่ความเข้มข้น 1% ให้ผลิตภัณฑ์ PCR เคลื่อนที่ผ่าน

สารละลาย Lithium Borate buffer (LB buffer) ส่งผลิตภัณฑ์ PCR ไปยัง บริษัท Macrogen Korea เพื่อทำ purification และหาลำดับนิวคลีโอไทด์

วิเคราะห์และตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์

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

การจัดเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์

นำ contig ของลำดับนิวคลีโอไทด์ (consensus sequence ที่บันทึกไว้ในรูปแบบ fasta ไฟล์) แต่ละตำแหน่งมาจัดเรียง (align) เป็นชุดข้อมูล (dataset) ด้วยโปรแกรม MAFFT 6.611 (Katoh and Toh, 2008) ตรวจสอบการจัดเรียงของชุดข้อมูล (alignment) ด้วยวิธี MUSCLE ในโปรแกรม MEGA7 (Kumar *et al*., 2016)

ทำ dataset ของแต่ละตำแหน่ง และ partitioned (combined) dataset ของตำแหน่ง ITS GAPDH และ EF1-**α** บันทึก dataset และ partitioned dataset ในรูปแบบไฟล์ .nexus โดยใช้โปรแกรม Mesquite

วิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการเพื่อการจัดจำแนก

จำแนกชนิดของ *Alternaria* โดยวิเคราะห์ concatenated dataset ของยีนตำแหน่ง ITS-GAPDH-EF1 -**α** (1,780 bases/taxa; ITS = 569, GAPDH = 599 และ EF1-**α** = 611) 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 และกำหนด maximum likelihood bootstrap จำนวน 1000 ครั้ง

จัดเก็บข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ด (DNA barcode) และเก็บรักษาดีเอ็นเอต้นแบบ

บันทึกและจัดเก็บข้อมูลรหัสดีเอ็นเอ หรือ ดีเอ็นเอบาร์โค้ด (DNA barcode) ซึ่งเป็นลักษณะประจำพันธุ์ของราในแต่ละตัวอย่าง และเก็บดีเอ็นเอต้นแบบที่สกัดได้ ไว้ที่อุณภูมิ –40 องศาเซลเซียส ที่กลุ่มงานวิทยาไมโค กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช เพื่อใช้ศึกษาในด้านอื่นๆต่อไป

- **เวลาและสถานที่**

เวลา	**เริ่มต้น** ตุลาคม 2559 **สิ้นสุด** กันยายน 2562
สถานที่	กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพฯ

8. ผลการทดลองและวิจารณ์

เก็บและรวบรวมตัวอย่างโรคพืชที่คาดว่าเกิดจากรา *Alternaria* ระหว่างเดือนพฤศจิกายน 2560 กันยายน 2562 ได้จำนวน 145 ตัวอย่าง จากแปลงปลูกพืชใน จังหวัด เพชรบูรณ์ สระบุรี ราชบุรี ชลบุรี

ฉะเชิงเทรา ประจวบคีรีขันธ์ เพชรบุรี กาญจนบุรี สุพรรณบุรี ชัยภูมิ นครราชสีมา ขอนแก่น เลย เชียงใหม่ ลำพูน ลำปาง น่าน ตาก แพร่ และอุตรดิตถ์

แยกเชื้อในห้องปฏิบัติการ และศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของรา พบว่า ได้ตัวอย่างโรคพืชที่เกิดจากรา *Alternaria* จำนวน 109 ตัวอย่าง จากพืช 18 ชนิด จำแนกได้ Alternaria 6 ชนิด (species) และ 1 complex species ที่มีลักษณะใกล้เคียงระหว่าง *Alternaria porri* และ *A. solani* (ตารางที่1)

จัดทำดีเอ็นเอบาร์โค้ดของรา *Alternaria* สาเหตุโรคพืช ที่รวบรวมได้ โดยเลือกตัวแทนของเชื้อ *Alternaria* แต่ละชนิด (species) จากพืช 16 ชนิด จำนวน 37 ตัวอย่าง (ไอโซเลท) นำมาสกัดดีเอ็นเอ เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายของรา *Alternaria* ด้วยเทคนิค PCR ที่ตำแหน่ง ITS, GAPDH และ EF1-**α** หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลผลิตดีเอ็นเอของรา *Alternaria* วิเคราะห์และตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ และวิเคราะห์ชนิด พบว่า ได้ตัวอย่างโรคพืชที่เกิดจากรา *Alternaria* 6 ชนิด (species) และ 1 complex species สอดคล้องกับการศึกษาจากลักษณะทางสัณฐานวิทยา คือ

Alternaria brassicicola สาเหตุโรคใบจุดคะน้า กะหล่ำปลี กะหล่ำปลีรูปหัวใจ ผักกาดขาว หัวไชเท้า บรอกโคลี และกะหล่ำดอก

Alternaria porri สาเหตุโรคใบจุดสีม่วงของหอมแดง หอมหัวใหญ่ กระเทียม หอมแบ่ง และหอมญี่ปุ่น

Alternaria solani สาเหตุโรคใบจุดมะเขือเทศ

Alternaria alternata สาเหตุโรคใบจุดของมันฝรั่ง โรคใบจุดใบไหม้ดาวเรือง และโรคใบจุดใบไหม้ทานตะวันเม็กซิโก

Alternaria dauci สาเหตุโรคใบไหม้ทานตะวัน และโรคใบไหม้ผักชี

Alternaria tagetica สาเหตุโรคใบจุดใบไหม้ดาวเรือง

Alternaria porri complex จากอาการโรคใบจุดสีม่วงของหอมแดง หอมหัวใหญ่ และกระเทียม (รายละเอียดดังตารางที่ 1และ 2 และภาพที่ 1) ในกรณีของเชื้อที่เป็น complex species ต้องศึกษาเพิ่มเติมในยีนตำแหน่งอื่น เพื่อให้ได้ผลการจำแนกที่ถูกต้องและชัดเจน

จัดเก็บข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ด และเก็บรักษาดีเอ็นเอต้นแบบที่สกัดได้ ไว้ที่อุณภูมิ –40 องศาเซลเซียส ที่กลุ่มงานวิทยาไมโค กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช เพื่อใช้ศึกษาในด้านอื่นๆต่อไป

เก็บเชื้อบริสุทธิ์ของรา *Alternaria* จำนวน 109 ไอโซเลท และจัดทำตัวอย่างแห้งโรคพืชที่เกิดจากรา *Alternaria* จำนวน 109 ตัวอย่าง ส่งเก็บรักษาในพิพิธภัณฑ์ตัวอย่างแห้งโรคพืช กลุ่มวิจัยโรคพืชสำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพฯ

ตารางที่ 1 ตัวอย่างโรคพืชที่เกิดจากรา *Alternaria* จากการเก็บรวบรวม ระหว่างเดือนพฤศจิกายน 2560 ถึงกันยายน 2562

Host	Symptom	No. of Sample	Fungi	Location
คะน้า	ใบจุด	24	*Alternaria brassicicola*	ต.ท่าเรือ อ.ท่ามะกา จ.กาญจนบุรี (3) ต.บ้านขาม อ.จตุรัส จ.ชัยภูมิ (1) ต. แจงงาม อ.หนองหญ้าไทร จ.สุพรรณบุรี (4) ต.ลุ่มน้ำชี อ.บ้านเขว้า จ.ชัยภูมิ (2) ต.ท่าน้าว อ.ภูเพียง จ.น่าน (1) ต.แก้มอ้น อ.จอมบึง จ.ราชบุรี (2) ต.ท่าม่วง อ.ท่าม่วง จ.กาญจนบุรี (3) ต.ท่าเรือ อ.ท่ามะกา จ.กาญจนบุรี (6) ต.ทุ่งทอง อ.ท่าม่วง จ.กาญจนบุรี (2)
กะหล่ำปลี	ใบจุด	10	*A. brassicicola*	ต.วังสวาบ อ.ภูผาม่าน จ.ขอนแก่น (2) ต.ปากช่อง อ.หล่มสัก จ.เพชรบูรณ์ (1) ต.หนองแม่นา อ.เขาค้อ จ.เพชรบูรณ์ (2) ต.เขาค้อ อ.เขาค้อ จ.เพชรบูรณ์ (2) ต.รวมไทยพัฒนา อ.พบพระ จ.ตาก (2) ต.คีรีราษฎร์ อ.พบพระ จ.ตาก (1)
ผักกาดขาว	ใบจุด	2	*A. brassicicola*	ต.ปากช่อง อ.หล่มสัก จ.เพชรบูรณ์ (1) ต.บ้านแม อ.สันป่าตอง จ.เชียงใหม่ (1)
กะหล่ำดอก	ใบจุด	2	*A. brassicicola*	ต.ปากช่อง อ.หล่มสัก จ.เพชรบูรณ์ (1) ต.ม่วงตื๊ด อ.ภูเพียง จ.น่าน (1)
กะหล่ำปลีรูปหัวใจ	ใบจุด	1	*A. brassicicola*	ต.โหล่งขอด อ. พร้าว จ.เชียงใหม่ (1)
บรอคโคลี่	ใบจุด	2	*A. brassicicola*	ต.ม่วงตื๊ด อ.ภูเพียง จ.น่าน (1) ต.คีรีราษฎร์ อ.พบพระ จ.ตาก (1)
หัวไชเท้า	ใบจุด	2	*Alternaria alternata*	ต.รวมไทยพัฒนา อ.พบพระ จ.ตาก (2)
มะเขือเทศ	ใบจุด (อาการที่ใบ กิ่ง ต้นและผล)	11	*Alternaria solani*	ต.โป่งตาลอง อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา (6) ต.มวกเหล็ก อ.มวกเหล็ก จ.สระบุรี (1) ต.รวมไทยพัฒนา อ.พบพระ จ.ตาก (2) ต.เวียงตาล อ.ห้างฉัตร จ.ลำปาง (2)

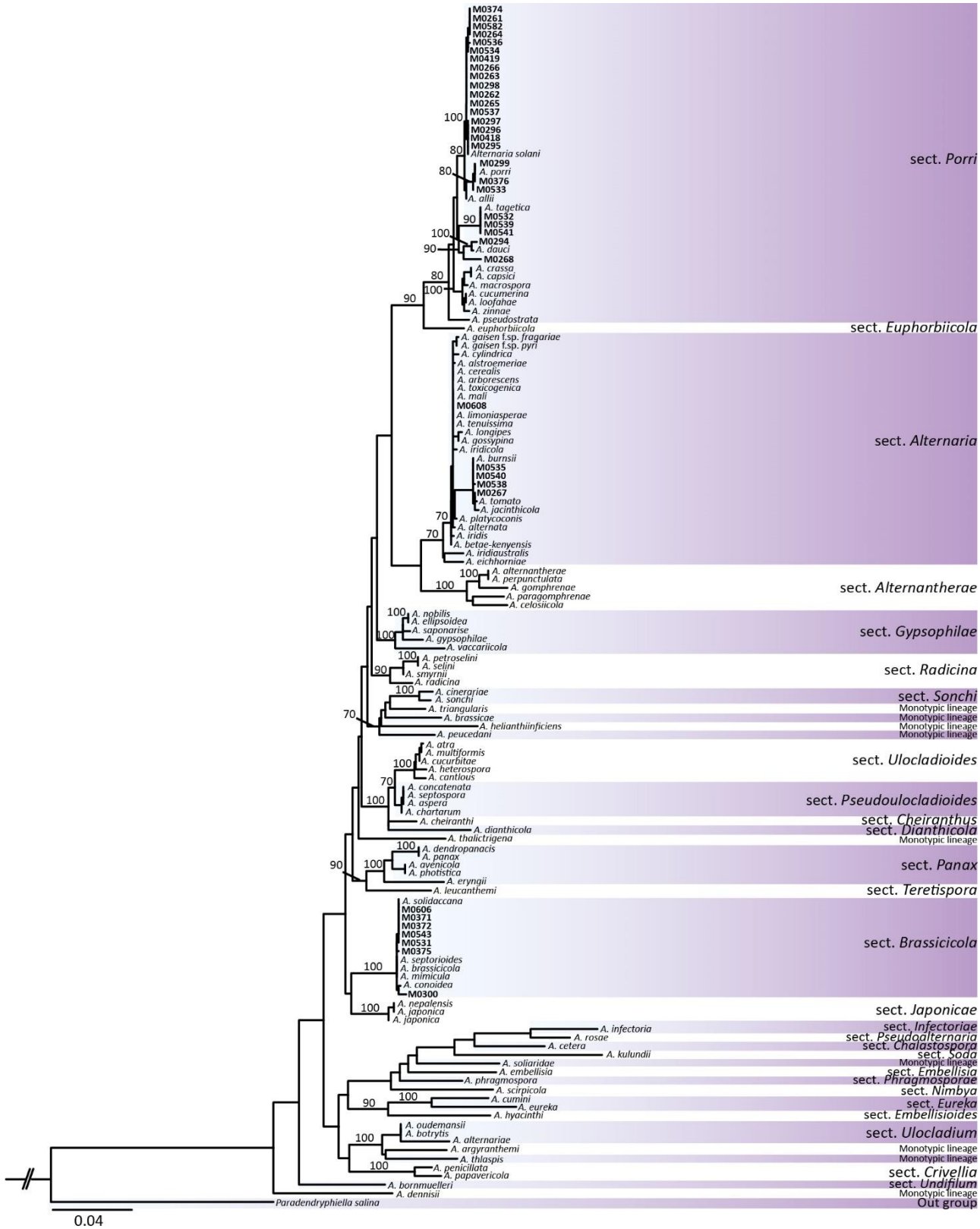
ทานตะวันเม็กซิโก	ใบจุด ใบไหม้		*Alternaria alternata*	ต.ทุ่งทอง อ.ท่าม่วง จ.กาญจนบุรี (1)
ทานตะวัน	ใบไหม้	3	*Alternaria dauci*	ต.หมูสี อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา (1) ต.มวกเหล็ก อ.มวกเหล็ก จ.สระบุรี (1) ต.ลาดบัวขาว อ.สีคิ้ว จ.นครราชสีมา (1)
		1	*Alternaria alternata*	จ.เชียงราย (1)
ดาวเรือง	ใบจุด ใบไหม้	1	*Alternaria alternata*	ต.รวมไทยพัฒนา อ.พบพระ จ.ตาก (1)
		6	*Alternaria tagetica*	ต.รวมไทยพัฒนา อ.พบพระ จ.ตาก (2) ต.พบพระ อ.พบพระ จ.ตาก (1) ต.คีรีราษฎร์ อ.พบพระ จ.ตาก (3)
ผักชี	ใบไหม้	1	*Alternaria dauci*	ต.หินฮาว อ.หล่มเก่า จ.เพชรบูรณ์ (1)
กระเทียม	ใบจุดสีม่วง	3	*Alternaria porri*	ต.โหล่งขอด อ.พร้าว จ.เชียงใหม่ (1) ต.แม่ฮ้อยเงิน อ.ดอยสะเก็ด จ.เชียงใหม่ (2)
		1	*A. porri complex*	ต.บ้านขาม อ.จตุรัส จ.ชัยภูมิ (1)
หอมแดง	ใบจุดสีม่วง	13	*A. porri*	ต.บ้านม่วง อ.น้ำปาด จ.อุตรดิตถ์ (5) ต.ลุ่มน้ำชี อ.บ้านเขว้า จ.ชัยภูมิ (2) ต.หนองหาร อ.สันทราย จ.เชียงใหม่ (1) ต.บ้านหวาย อ.ป่าซาง จ.ลำพูน (3) ต.รวมไทยพัฒนา อ.พบพระ จ.ตาก (2)
		7	*A. porri complex*	ต.บ้านขาม อ.จตุรัส จ.ชัยภูมิ (1) ต.ลานบ่า อ.หล่มสัก จ.เพชรบูรณ์ (1) ต.แม่ฮ้อยเงิน อ.ดอยสะเก็ด จ.เชียงใหม่ (3) ต.ทุ่งสะโตก อ.สันป่าตอง จ.เชียงใหม่ (2)
หอมแบ่ง	ใบจุดสีม่วง	6	*A. porri*	ต.แม่ยางร้อง อ.ร้องกวาง จ.แพร่ (1) อ.ลับแล จ.อุตรดิตถ์ (1) ต.รวมไทยพัฒนา อ.พบพระ จ.ตาก (2) ต.ท่าม่วง อ.ท่าม่วง จ.กาญจนบุรี (2)
หอมญี่ปุ่น	ใบจุดสีม่วง	1	*A. porri*	ต.กกสะท้อน อ.ด่านซ้าย จ.เลย (1)

หอมหัวใหญ่	ใบจุดสีม่วง	10	*A. porri*	ต.บ้านแม อ.สันป่าตอง จ.เชียงใหม่ (4) ต.ม่อนปิ่น อ.ฝาง จ.เชียงใหม่ (1) ต.ทุ่งทอง อ.ท่าม่วง จ.กาญจนบุรี (3)
			A. porri complex	ต.ดอนเปา อ.แม่วาง จ.เชียงใหม่ (2)
มันฝรั่ง	ใบจุด	2	*Alternaria alternata*	ต.รวมไทยพัฒนา อ.พบพระ จ.ตาก (1) ต.ช่องแคบ อ.พบพระ จ.ตาก (1)
รวม		109		

ตารางที่ 2 ตัวอย่างรา *Alternaria* จากการเก็บรวบรวม ระหว่างเดือนพฤศจิกายน 2560 ถึง กันยายน 2562 และจัดทำดีเอ็นเอบาร์โค้ด

DNA code	Genus	species	section	Host	Location
M 0261	*Alternaria*	*solani*	*Porri*	มะเขือเทศ	ต.โป่งตาลอง อ.ปากช่อง จ. นครราชสีมา
M 0262	*Alternaria*	*solani*	*Porri*	มะเขือเทศ	ม. 13 ต.โป่งตาลอง อ.ปากช่อง จ. นครราชสีมา
M 0263	*Alternaria*	*solani*	*Porri*	มะเขือเทศ	ต.โป่งตาลอง อ.ปากช่อง จ. นครราชสีมา
M 0264	*Alternaria*	*solani*	*Porri*	มะเขือเทศ	ม. 13 ต.โป่งตาลอง อ.ปากช่อง จ. นครราชสีมา
M 0265	*Alternaria*	*solani*	*Porri*	มะเขือเทศ	ต.โป่งตาลอง อ.ปากช่อง จ. นครราชสีมา
M 0266	*Alternaria*	*solani*	*Porri*	มะเขือเทศ	ต.โป่งตาลอง อ.ปากช่อง จ. นครราชสีมา
M 0267	*Alternaria*	*alternata*	*Alternaria*	ทานตะวัน เม็กซิโก	ต.ทุ่งทอง อ.ท่าม่วง จ.กาญจนบุรี
M 0268	*Alternaria*	*dauci*	*Porri*	ทานตะวัน	ต.หมูสี อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา
M 0294	*Alternaria*	*dauci*	*Porri*	ผักชี	บ้านหินฮาว ต.หินฮาว อ.หล่มเก่า จ. เพชรบูรณ์
M 0295	*Alternaria*	*porri complex*	*Porri*	หอมแดง	ต.ลานบ่า อ.หล่มสัก จ.เพชรบูรณ์
M 0296	*Alternaria*	*porri complex*	*Porri*	หอมแดง	อ.เมือง จ.เชียงใหม่
M 0297	*Alternaria*	*porri complex*	*Porri*	กระเทียม	ม. 10 ต.บ้านขาม อ.จตุรัส จ.ชัยภูมิ
M 0298	*Alternaria*	*porri complex*	*Porri*	กระเทียม	ต.โหล่งขอด อ.พร้าว จ.เชียงใหม่
M 0299	*Alternaria*	*porri*	*Porri*	หอมญี่ปุ่น	ต.กกสะท้อน อ.ด่านซ้าย จ.เลย
M 0300	*Alternaria*	*brassicicola*	*Brassicicola*	กะหล่ำปลี	ต.วังสวาบ อ.ภูผาม่าน จ.ขอนแก่น

M 0371	*Alternaria*	*brassicicola*	*Brassicicola*	กะหล่ำดอก	ต.ปากช่อง อ.หล่มสัก จ.เพชรบูรณ์
M 0372	*Alternaria*	*brassicicola*	*Brassicicola*	ผักกาดขาว	ต.ปากช่อง อ. หล่มสัก จ.เพชรบูรณ์
M 0374	*Alternaria*	*porri complex*	*Porri*	หอมแดง	ต.บ้านขาม อ.จตุรัส จ.ชัยภูมิ
M 0375	*Alternaria*	*brassicicola*	*Brassicicola*	กะหล่ำปลี	ต.ปากช่อง อ. หลุมสัก จ.เพชรบูรณ์
M 0376	*Alternaria*	*porri*	*Porri*	หอมแบ่ง	ต.แม่ยางร้อง อ.ร้องกวาง จ.แพร่
M 0418	*Alternaria*	*porri complex*	*Porri*	หอมหัวใหญ่	บ.ริมขาน ต.ดอนเปา อ.แม่วาง จ. เชียงใหม่
M 0419	*Alternaria*	*porri complex*	*Porri*	หอมแดง	บ้านป่าอ้อ ต.ทุ่งสโตก อ.สันป่าตอง จ.เชียงใหม่
M 0531	*Alternaria*	*brassicicola*	*Porri*	กะหล่ำปลี	บ.สะเดาะบง ตำบเขาค้อ อ.เขาค้อ จ.เพชรบูรณ์
M 0532	*Alternaria*	*tagetica*	*Porri*	ดาวเรือง	ต.รวมไทยพัฒนา อ.พบพระ จ.ตาก
M 0533	*Alternaria*	*porri*	*Porri*	หอมแดง	ต.รวมไทยพัฒนา อ.พบพระ จ.ตาก
M 0534	*Alternaria*	*solani*	*Porri*	มะเขือเทศ	ต.รวมไทยพัฒนา อ.พบพระ จ.ตาก
M 0535	*Alternaria*	*alternata*	*Alternaria*	หัวไชเท้า	ต.รวมไทยพัฒนา อ.พบพระ จ.ตาก
M 0536	*Alternaria*	*solani*	*Porri*	มะเขือเทศ	ต.รวมไทยพัฒนา อ.พบพระ จ.ตาก
M 0537	*Alternaria*	*solani*	*Porri*	มะเขือเทศ	ต.รวมไทยพัฒนา อ.พบพระ จ.ตาก
M 0538	*Alternaria*	*alternata*	*Alternaria*	มันฝรั่ง	ตำบช่องแคบ อ.พบพระ จ.ตาก
M 0539	*Alternaria*	*tagetica*	*Porri*	ดาวเรือง	ต.รวมไทยพัฒนา อ.พบพระ จ.ตาก
M 0540	*Alternaria*	*alternata*	*Alternaria*	ดาวเรือง	ต.รวมไทยพัฒนา อ.พบพระ จ.ตาก
M 0541	*Alternaria*	*tagetica*	*Porri*	ดาวเรือง	ตำบพบพระ อ.พบพระ จังหวดตาก
M 0543	*Alternaria*	*brassicicola*	*Brassicicola*	กะหล่ำปลี	บ้านรางช้าง ตำบหนองไม้นา อ.เขาค้อ จ.เพชรบูรณ์
M 0582	*Alternaria*	*solani*	*Porri*	มะเขือเทศ	
M 0606	*Alternaria*	*brassicicola*	*Brassicicola*	บล็อกโคลี	ม.1 ตำบคีรีราษฎร์ อ.พบพระ จ.ตาก
M 0608	*Alternaria*	*alternata*	*Alternaria*	ทานตะวัน	จ.เชียงราย



ภาพที่ 1 ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของเชื้อรา *Alternaria* ได้จากการวิเคราะห์ชุดข้อมูลของยีนตำแหน่ง ITS, GAPDH และ EF1-**α** ด้วย phylogenetic criteria คือ Maximum Likelihood โดยโปรแกรม RAxML และมีค่า Bootstrap ≥70% จาก 1,000 ซ้ำเหนือ nodes

9. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

จากการเก็บและรวบรวมตัวอย่างโรคพืชที่คาดว่าเกิดจากรา *Alternaria* ระหว่างเดือนพฤศจิกายน 2560 กันยายน 2562 จากแปลงปลูกพืชใน จังหวัด เพชรบูรณ์ สระบุรี ราชบุรี ชลบุรี ฉะเชิงเทรา ประจวบคีรีขันธ์ เพชรบุรี กาญจนบุรี สุพรรณบุรี ชัยภูมิ นครราชสีมา ขอนแก่น เลย เชียงใหม่ ลำพูน ลำปาง น่าน ตาก แพร่ และอุตรดิตถ์ ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา และจัดทำดีเอ็นเอบาร์โค้ดของรา *Alternaria* สาเหตุโรคพืช ที่รวบรวมได้ โดยเลือกตัวแทนของเชื้อ *Alternaria* แต่ละชนิด (species) จากพืช 16 ชนิด จำนวน 37 ตัวอย่าง (ไอโซเลท) นำมาสกัดดีเอ็นเอ เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายของรา *Alternaria* ด้วยเทคนิค PCR ที่ตำแหน่ง ITS, GAPDH และ EF1-α หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลผลิตดีเอ็นเอของรา *Alternaria* วิเคราะห์และตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ และวิเคราะห์ชนิด พบว่า ได้ตัวอย่างโรคพืชที่เกิดจากรา *Alternaria* 6 ชนิด (species) และ 1 complex species คือ *Alternaria brassicicola* สาเหตุโรคใบจุดคะน้า กะหล่ำปลี กะหล่ำปลีรูปหัวใจ ผักกาดขาว หัวไชเท้า บรอกโคลี และกะหล่ำดอก *Alternaria porri* สาเหตุโรคใบจุดสีม่วงของหอมแดง หอมหัวใหญ่ กระเทียม หอมแบ่ง และหอมญี่ปุ่น *Alternaria solani* สาเหตุโรคใบจุดมะเขือเทศ *Alternaria alternata* สาเหตุโรคใบจุดของมันฝรั่ง โรคใบจุดใบไหม้ดาวเรือง และโรคใบจุดใบไหม้ทานตะวันเม็กซิโก *Alternaria dauci* สาเหตุโรคใบไหม้ทานตะวัน และโรคใบไหม้ผักชี *Alternaria tagetica* สาเหตุโรคใบจุดใบไหม้ดาวเรือง และ *Alternaria porri* complex จากอาการโรคใบจุดสีม่วงของหอมแดง หอมหัวใหญ่ และกระเทียม ในกรณีของเชื้อที่เป็น complex species ต้องศึกษาเพิ่มเติมในยีนตำแหน่งอื่น เพื่อให้ได้ผลการจำแนกที่ถูกต้องและชัดเจน

จัดเก็บข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ด และเก็บรักษาดีเอ็นเอต้นแบบที่สกัดได้ จำนวน 37 ไอโซเลท ไว้ที่กลุ่มงานวิทยาไมโค กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช เพื่อใช้ศึกษาในด้านอื่น ๆ ต่อไป เก็บเชื้อบริสุทธิ์ของรา *Alternaria* จำนวน 109 ไอโซเลท และจัดทำตัวอย่างแห้งโรคพืชที่เกิดจากรา *Alternaria* จำนวน 109 ตัวอย่าง ส่งเก็บรักษาในพิพิธภัณฑ์ตัวอย่างแห้งโรคพืช กลุ่มวิจัยโรคพืชสำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพฯ ข้อมูลที่ได้สามารถใช้เป็นข้อมูลอ้างอิงสำหรับการจัดทำบัญชีรายชื่อโรคพืช รวมถึงสามารถใช้เป็นข้อมูลประกอบในการศึกษาด้านวิวัฒนาการต่อไป

10. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

10.1 ใช้เป็นข้อมูลอ้างอิงสำหรับการจัดทำบัญชีรายชื่อโรคพืช รวมถึงสามารถใช้เป็นข้อมูลประกอบในการศึกษาด้านวิวัฒนาการต่อไป

10.2 สามารถเผยแพร่งานวิจัยในรายงานประจำปีของสำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร รวมถึงงานประชุมวิชาการระดับชาติ หรือนานาชาติ

11. เอกสารอ้างอิง

วิจัย รักวิทยาศาสตร์. 2551. ราวิทยาเบื้องต้น. ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน. 351 หน้า.

พัฒนา สนธิรัตน วิรัช ชูบำรุง ประไพศรี พิทักษ์ไพรวัน และปิยะ เกียรติก้อง. 2526. รา *Alternaria* ที่เป็นสาเหตุโรคใบจุดของพืชผักบางชนิด. *วารสารโรคพืช* ปีที่ 3 เล่มที่ 4. ต.ค.-ธ.ค. 2526. น. 154-167.

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

Berbee, M.L., M. Pirseyedi and S. Hubbard. 1999. *Cochliobolus* phylogenetics and the origin of known, highly virulent pathogens, inferred from ITS and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene sequences. *Mycologia* 91: 964–977.

Cabone, I. and L.M. Kohn. 1999. A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. *Mycologia* 91: 553-556.

Chase, A.R. 1998. Alternaria Diseases of Ornamentals *Western Connection turf & Ornamentals*, A Monthly publication 1(3). Available at http://www.westernfarmservice.com/newsletters/turf/alternaria.pdf. (Access date : August 24, 2009).

Simmons, E.G. 2007. *Alternaria* An Identification Manual. CBS Biodiversity Series No. 6. CBS Fungal Biodiversity Centre, Utrecht, the Netherlands. 775 pp.

Katoh, H, A. Isshiki, A. Masunaka, H. Yamamoto and K. Akimitsu. 2005. Abstracts & Program. The Second Asian Conference on Plant Pathology 2005, 25-28 June 2005, National University of Singapore, Singapore. 113 p.

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.

Kumar, S., G. Stecher and K. Tamura. 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Molecular Biology and Evolution* 33: 1870-1874. doi: 10.1093/molbev/msw054.

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

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*" (M. Innis, D. Gelfand, J. Shinsky and T. White, eds.), Academic Press. 315–322 pp.