

รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด

1. แผนงานวิจัย : การจัดทำฐานข้อมูลศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติเพื่อการวิจัย
พัฒนาด้านการอารักขาพืชในประเทศไทย
2. โครงการวิจัย : อนุกรมวิธาน ชีววิทยาและการจำแนกชนิดโดยดีเอ็นเอบาร์โค้ดของศัตรูพืช
และศัตรูธรรมชาติเพื่อการวิจัยด้านอารักขาพืชในประเทศไทย
- กิจกรรม : สำรวจชนิด และอนุกรมวิธานของศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติ
- กิจกรรมย่อย (ถ้ามี) : สำรวจชนิด และอนุกรมวิธานของจุลินทรีย์สาเหตุโรคพืชและจุลินทรีย์
ควบคุมโรคพืช
3. ชื่อการทดลอง (ภาษาไทย) : การจัดทำดีเอ็นเอบาร์โค้ดของราสกุล *Curvularia* สาเหตุโรคพืช
ชื่อการทดลอง (ภาษาอังกฤษ): DNA Barcoding of Plant Pathogenic *Curvularia*
4. คณะผู้ดำเนินงาน
- | | | |
|-----------------|-----------------------------|------------------------------|
| หัวหน้าการทดลอง | : นางสาวมะโนรัตน์ สุดสงวน | สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช |
| ผู้ร่วมงาน | : นางสาวพรพิมล อธิปัญญาคม | สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช |
| | : นางสาวชนินทร ดวงสอาด | สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช |
| | : นางสาวสุนิรัตน์ สีมะเต็อ | สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช |
| | : นางสาวอมรรักษ์ คัดใจเดียว | สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช |
5. บทคัดย่อ

เก็บตัวอย่างโรคพืชที่มีสาเหตุจากเชื้อรา *Curvularia* ระหว่างเดือนตุลาคม 2561 - กันยายน 2562 จากจังหวัดกาญจนบุรี กระบี่ จันทบุรี ฉะเชิงเทรา ชุมพร เชียงราย เชียงใหม่ ชลบุรี นครนายก นครปฐม นครราชสีมา ประจวบคีรีขันธ์ พิษณุโลก พะเยา เพชรบูรณ์ ราชบุรี ลำปาง สุโขทัย สุรินทร์ สระแก้ว และสุราษฎร์ธานี จำนวน 39 ตัวอย่าง แยกเชื้อราสาเหตุโรคใบจุดและใบไหม้จากตัวอย่างโรคพืชด้วยวิธี tissue transplanting ได้รา *Curvularia* spp. จำนวน 47 ไอโซเลต จำแนกชนิดด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและข้อมูลชีวโมเลกุลของยีนตำแหน่ง Internal Transcribed Spacer (ITS) translation elongation factor 1-alpha (*tef1*) และ glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase gene (*GAPDH*) ของรา *Curvularia* จำนวน 15 ไอโซเลต สามารถจำแนกชนิดได้ ดังนี้ *C. akaiensis* *C. dactyloctenicola* *C. eragrostidis* *C. geniculata* *C. lunata* *C. oryzae* และ *C.*

pseudobrachyspora ตัวอย่างที่ได้จากการศึกษาจัดทำเป็นตัวอย่างแห้งเก็บรักษาในพิพิธภัณฑ์โรคพืช กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

Plant disease samples caused by *Curvularia* had been collected from various located in Kanchanaburi, Krabi, Chanthaburi, Chachoengsao, Chumphon, Chiang Rai, Chiang Mai, Chonburi, Nakhon Nayok, Nakhon Pathom, Nakhon Ratchasima, Prachuap Khiri Khan, Phitsanulok, Phayao, Phetchabun, Ratchaburi, Lampang, Sukhotai, Surin, Sakaeo and Surat Thani provinces during October 2018 to September 2019. The causal agents of leaf spot and blight diseases were isolated from specimens of plants by tissue transplanting technique. The fifty-five isolates, which were obtained from 39 specimens, were identified based on morphological and molecular data of Internal Transcribed Spacer (ITS), translation elongation factor 1-alpha (tef1) and glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) gene regions. The result showed that 47 isolates were identified as *Curvularia* 15 isolates. The taxa in this species is *C. akaiensis* *C. dactyloctenicola* *C. eragrostidis* *C. geniculata* *C. lunata* *C. oryzae* และ *C. pseudobrachyspora*. All specimens from this study have been curated as pest reference in plant disease collection herbarium at Plant Pathology Research Group, Plant Research and Development, Department of Agriculture, Bangkok, Thailand.

6. คำนำ

เชื้อรา *Curvularia* Boedijn (1933) เป็นระยะสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศของเชื้อรา *Cochliobolus* Drechsler (1934) จัดอยู่ใน Kingdom fungi Phylum Ascomycota Class Dothideomycetes Order Pleosporales Family Pleosporaceae (Mycobank, 2019) พบแพร่กระจายทั่วไปและเป็นสาเหตุก่อให้เกิดโรคพืชที่สำคัญของพืชหลายชนิด เช่น ปาล์มน้ำมัน กล้วยไม้ และข้าว เป็นต้น (จิตรา และคณะ, 2557; วรณิภา และคณะ, 2555; เลขา และคณะ, 2544)

Cui and Sun (2012) รายงานพบเชื้อรา *Curvularia lunata* เป็นสาเหตุของโรคใบจุดของข้าวเป็นครั้งแรก ในเมือง Pingxiang ประเทศจีน ซึ่งเป็นสาเหตุทำให้ข้าวแห้งตายถึง 60 เปอร์เซ็นต์และส่งผลกระทบต่อผลผลิตทำให้ผลผลิตลดลงถึง 10-15 เปอร์เซ็นต์ ข้าวที่เกิดโรคจะมีลักษณะเป็นจุดสีม่วงแกมน้ำตาลเกิดบนใบมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5-3 เซนติเมตร ต่อมาบริเวณตรงกลางแผลจะเปลี่ยนเป็นสีเทาถึงขาวและขอบแผลจะเป็นสีน้ำตาลเข้มถึงดำ นอกจากนี้ มีรายงานพบหญ้า Switchgrass (*Panicum virgatum* cv. Alamo) มีลักษณะอาการใบจุดสีน้ำตาลและอาการ necrotic root ซึ่งพบเป็นครั้งแรกใน Knoxville รัฐ Tennessee ประเทศสหรัฐอเมริกา แยกเชื้อราสาเหตุโรคพืชได้จากพืชที่แสดงลักษณะอาการของโรค เชื้อที่แยกได้มีลักษณะ

โคโลนีสีน้ำตาลเข้มถึงดำ สร้าง stromata สีดำ conidiophores มีสีน้ำตาลดำ ไม่แตกกิ่งก้าน มีผนังกัน polytretric sympodial และ geniculate สร้างโคนิเดียที่บริเวณปลาย โคนิเดียมีลักษณะสีน้ำตาลดำ รูปร่าง cymbiform มีผนังกัน 3-4 septate เซลล์บริเวณส่วนกลางของโคนิเดียประมาณ 1-2 เซลล์ มีขนาดใหญ่กว่า บริเวณปลาย ซึ่งมีลักษณะคล้ายคลึงกับรา *Curvularia lunata* var. *aeria* (*Cochliobolus lunatus*) (Fajolu et al., 2012)

ในประเทศไทยมีการศึกษาเกี่ยวกับเชื้อรา *Curvularia* ทั้งในด้านการสำรวจ ความหลากหลายของราชนิดนี้ทั้งในดินและในพืช โดยนิยม (2542) ทำการศึกษาความหลากหลายของราดินและราโรคพืชในดินปลูกพืชไรในจังหวัดสกลนครพบว่าสามารถแยกเชื้อรา *C. eragrostidis* ได้จากดินปลูกมันสำปะหลัง และดินปอแก้ว ในปี 2553 พีระวรรณ และคณะ ทำการสำรวจ รวบรวม และจำแนกเชื้อราสกุล *Curvularia* โดยเก็บตัวอย่างพืชที่มีลักษณะอาการไหม้และใบจุด มาทำการแยกเชื้อสาเหตุโรค พบว่าสามารถแยกได้เชื้อรา *Curvularia* ทั้งหมด 45 ไอโซเลต โดยแยกเชื้อสาเหตุได้จากพืชที่เป็นโรคต่างๆ ดังนี้ โรคใบจุดข้าวโพด โรคเมล็ดต่างข้าว โรคใบจุด โรคใบไหม้เยอบีร่า โรคเมล็ดเน่าข้าวฟ่าง โรคใบไหม้สับดูดำ โรคใบไหม้วัชพืชหญ้าayang โรคใบไหม้ปาล์มน้ำมัน โรคดอกสนิมหรือโรคจุดสนิมบนดอกไม้สกุลหวาย โรคจุดบนกล้วยไม้สกุลออชเดียม โรคใบแกลดดิโอลัส โรคใบไหม้ลิ้นมังกรใบจุดบานชื่น และ ฝักจุดกระเจี๊ยบแดงเช่นเดียวกันกับเลขา และคณะ (2544) ศึกษาเชื้อราโรคพืชและเชื้อราอื่นๆ บนข้าวโพด ข้าว และหญ้าโดยวิธี tissue transplanting พบเชื้อราจำนวน 19 ชนิด ซึ่ง 1 ใน 19 ชนิดนี้พบทั้งเชื้อราสกุล *Curvularia* และ *Bipolaris*

สมศิริ และ ศศิวิมล (2011) รายงานการสำรวจโรคที่สำคัญของดอกกล้วยไม้ตัดดอกสกุลหวายเอื้องสกุลที่ผลิตเป็นการค้า (*Dendrobium* 'Earsakul') พบโรคสำคัญที่ดอก คือ โรคเกสรดำและโรคดอกสนิม โดยพบเชื้อราที่แยกได้จากโรคเกสรดำ ได้แก่ *Alternaria alternata*, *Curvularia lunata*, *Drechslera* sp., *Nigrospora* sp., *Fusarium* sp. และ *Cladosporium* sp. และเชื้อราแยกได้จากโรคดอกสนิม ได้แก่ เชื้อรา *A. alternata*, *Curvularia eragrostidis*, *C. lunata*, *Nigrospora* sp. และ *Drechslera* sp. นำเชื้อราที่แยกได้ไปทดสอบการเกิดโรคกับดอกกล้วยไม้ พบว่า เชื้อสาเหตุของโรคเกสรดำ คือ *C. lunata* และเชื้อราสาเหตุของโรคดอกสนิม คือ *A. alternata* และ *C. eragrostidis*

Kittimorakul et al. (2013) ทำการสำรวจโรคใบไหม้และใบจุดของต้นกล้าปาล์มน้ำมันในภาคใต้ของประเทศไทย โดยทำการเก็บตัวอย่างโรค 277 ตัวอย่าง จาก 11 จังหวัดในภาคใต้ของประเทศไทย ทำการแยกเชื้อสาเหตุโรคได้ 197 ไอโซเลต สามารถจัดจำแนกเป็น *Curvularia* 149 ไอโซเลต และ *Colletotrichum* 48 ไอโซเลต แสดงให้เห็นถึงความสำคัญของปัญหาโรคใบจุดในระยะต้นกล้าของปาล์มน้ำมัน นอกจากนี้ Sunpapoa and Kittimorakul (2014) รายงานเชื้อรา *C. oryzae* สาเหตุโรคใบจุดของต้นกล้าปาล์มน้ำมัน โดยแยกเชื้อรา

สาเหตุของโรคจากต้นกล้าปาล์มที่มีอายุ 3-4 เดือนที่แสดงลักษณะอาการของโรคใบจุด และนำเชื้อราสาเหตุโรคที่แยกได้มาศึกษาลักษณะพื้นฐานของเชื้อราและวิธีทางอนุชีวโมเลกุลร่วมด้วย

วรัญญ และ นิวัฒน์ (2559) ได้รายงานโรคของกล้าไม้พะยุง (*Dalbergia cochinchinensis* Pierre ex Laness) พบว่ามีเชื้อรา *Curvularia* sp. มีความเกี่ยวข้องต่อการเกิดโรคใบจุดของกล้าไม้พะยุง นอกจากพบมีรายงานการก่อโรคในพืชแล้วพบมีรายงานการศึกษาเชื้อรา *Curvularia* ที่แยกได้จากวัชพืชชนิดต่างๆ ได้แก่ หญ้า หัวหมู หญ้าปากควาย หญ้านกสีชมพู หญ้าตีนกา หญ้าตีนนก หญ้าตีนติด หญ้าโขยง หญ้าขจรจบดอกเล็ก น้ำนมราชสีห์ ผักขม ผักเปี้ยหิน และผักยาง (จิตรรา, 2547)

จากงานวิจัยที่กล่าวมาในข้างต้นแสดงให้เห็นว่ารา *Curvularia* เป็นสาเหตุของโรคพืชหลายชนิด และการจัดจำแนกชนิดของราในกลุ่มนี้ส่วนใหญ่ใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา มีบางงานวิจัยที่นำเทคนิคทางด้านชีวโมเลกุลร่วมด้วย การจัดจำแนกรรา *Curvularia* ยังมีความสับสน และมีปัญหาเนื่องจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่ใช้ในการจัดจำแนกนั้นมีความคล้ายคลึงกันกับรา *Bipolaris* และรา 2 ชนิดนี้มีระยะสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศเป็นรา *Cochliobolus* Drechsler (1934) เหมือนกัน Jeon et al., (2015) ได้นำข้อมูลทางสัณฐานวิทยาร่วมกับเทคนิคทางชีวโมเลกุลมาทำการจัดจำแนกชนิดของรา *Curvularia* โดยเลือกใช้ multi loci sequences (rDNA internal transcribed spacer (ITS), large ribosomal subunit (28S) และ glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase gene (GAPDH)) เพื่อจำแนกและจัดกลุ่มของรา *Curvularia spicifera* นอกจากนี้ Sun et al., (2003) ได้ทำการแยกรรา *Curvularia geniculata* group โดยใช้ *Brn1* gene sequences จำแนกชนิดและเพื่อยืนยันความแตกต่างของราในกลุ่มนี้ เชื้อรา *C. geniculata* group ประกอบไปด้วย *Curvularia affinis* *C. fallax* และ *C. senegalensis* ราทั้ง 3 ชนิดนี้มีลักษณะคล้ายคลึงกับรา *C. geniculata* มาก หากใช้ข้อมูลด้านลักษณะทางสัณฐานวิทยาเพียงอย่างเดียวคงไม่เพียงพอต่อการยืนยันผลความแตกต่างจึงจำเป็นต้องมีข้อมูลทางด้านชีวโมเลกุลช่วยยืนยันผลความแตกต่างเพื่อความถูกต้องและแม่นยำยิ่งขึ้น ดังนั้น การศึกษารรา *Curvularia* จึงจำเป็นต้องใช้ทั้งข้อมูลด้านลักษณะทางสัณฐานวิทยาควบคู่กับข้อมูลด้านชีวโมเลกุลเพื่อยืนยันผลการจัดจำแนกที่ถูกต้องและแม่นยำมากขึ้น และข้อมูลทางชีวโมเลกุลที่ได้สามารถนำไปศึกษาต่อทางด้านวิวัฒนาการของราชนิดนี้เพื่อเป็นข้อมูลในการสืบค้นและเป็นแหล่งอ้างอิงในการทำงานวิจัยต่อไป

7. วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. อุปกรณ์เก็บตัวอย่าง ได้แก่ มีด กรรไกร กรรไกรตัดกิ่ง ถุงพลาสติก กระดาษหนังสือพิมพ์ กระดาษบันทึก ปากกาเคมี และเครื่องระบุพิกัด
2. อุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการ ได้แก่

- ตู้แช่เยือกแข็ง
 - หม้อนึ่งความดัน
 - ตู้อบฆ่าเชื้อ
 - Microcentrifuge
 - Thermal cyclers
 - Vortex
 - Tissue Lyser
 - Gel electrophoresis
 - เครื่องถ่ายภาพเจล
 - microwave micropipette ขนาด 10 100 200 และ 1000 ไมโครลิตร และ
 - Dry heat block
 - กล้องจุลทรรศน์แบบ compound และ stereo พร้อมกล้องถ่ายภาพ
3. อุปกรณ์เครื่องแก้ว ได้แก่ จานอาหารเลี้ยงเชื้อ หลอดทดลอง ขวดดูแรน ปีกเกอร์ กระบอกตวง แท่งแก้ว ตะเกียงแอลกอฮอล์ สไลด์ และแผ่นกระจกปิดสไลด์
 4. เข็มเขี่ยปลายแหลม หัวง่ายเชื้อ ปากคืบ ใบมีดผ่าตัด ต้ามมีด
 5. อาหารแยกและเลี้ยงเชื้อ ได้แก่ Water Agar (WA), ½Potato Dextrose Agar (½PDA) และ Potato Dextrose Agar (PDA)
 6. สารเคมีที่ใช้ในการฆ่าเชื้อ ได้แก่ สารละลายโซเดียมไฮเปอร์คลอไรต์ และเอธิลแอลกอฮอล์ 75%
 7. 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)
 - V9G: TTACGTCCCTGCCCTTTGTA (de Hoog and Gerrits van den Ende, 1998)
 - the translation elongation factor 1-alpha (tef1)

EF1-983F: GCYCCYGGHCAYCGTGAYTTYAT (Rehner and Buckley, 2005)

EF1-2218R: ATGACACCRACRGCACRGTGTG (Rehner and Buckley, 2005)

glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase gene (GAPDH)

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

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

8. อุปกรณ์ทำตัวอย่างแห้ง ได้แก่ กระดาษหนังสือพิมพ์ ไม้ทาบตัวอย่าง กระดาษฟาง และซองกระดาษ สำหรับใส่ตัวอย่าง

วิธีการ

1. เก็บและรวบรวมตัวอย่างโรคพืชที่เกิดจากเชื้อรา *Curvularia*

เก็บตัวอย่างโรคพืชที่เกิดจากเชื้อรา *Curvularia* โดยเก็บส่วนที่แสดงอาการของโรค ห่อตัวอย่างด้วยกระดาษ บันทึกรายละเอียดของอาการเก็บตัวอย่าง วันที่ พิกัด สถานที่ ผู้เก็บ พืชอาศัย และลักษณะอาการของโรค จากนั้นนำมาแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ รวมถึงตัวอย่างแห้งที่เก็บไว้ในพิพิธภัณฑ์โรคพืช กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

2. ศึกษาและจำแนกชนิดของราสกุล *Curvularia* สาเหตุโรคพืชโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

- ศึกษาลักษณะอาการของโรคและแยกเชื้อราโดยตรงจากชิ้นส่วนพืชภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ stereo หรือทำ moist chamber โดยบ่มที่อุณหภูมิห้องปฏิบัติการ นาน 3-7 วัน เมื่อพบเชื้อราสร้างเส้นใยหรือโคนิเดียใช้เข็มเขี่ยส่วนของเชื้อรามาวางบนสไลด์หรือใช้ใบมีดตัดขวางชิ้นส่วนพืชให้บางๆ และตรวจดูลักษณะต่างๆ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ compound ถ่ายรูปและบันทึกลักษณะต่างๆ ของเชื้อ

- แยกเชื้อราโดยวิธี tissue transplanting นำส่วนของพืชที่เป็นโรคมามาตัดเป็นชิ้นสี่เหลี่ยมขนาด 0.5x0.5 มิลลิเมตร ให้คาบต่อส่วนที่เป็นโรคและไม่เป็นโรค แช่ในสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ 10 เปอร์เซ็นต์เป็นเวลา 3-5 นาที ล้างในน้ำที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง นำไปซับบนกระดาษที่ผ่านการฆ่าเชื้อให้แห้ง จากนั้นนำไปเลี้ยงบนอาหาร PDA บ่มที่อุณหภูมิ 28-30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-7 วัน หากพบเส้นใยของเชื้อราเจริญออกจากชิ้นส่วนพืชให้ทำการแยกเชื้อราให้บริสุทธิ์ และเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เพื่อศึกษาต่อไป

- ศึกษาลักษณะทางสัณฐานของเชื้อ โดยบันทึกลักษณะต่าง ๆ ได้แก่ อัตราการเจริญของเชื้อราบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ลักษณะและสีของโคโลนี บันทึกลักษณะทางสัณฐาน ได้แก่ รูปร่าง ขนาด สี ของก้านชูสปอร์ (conidiophores) โคนิเดีย (conidia) และโครงสร้างอื่นๆ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ stereo และ compound และถ่ายภาพ จากนั้นนำข้อมูลขนาดโครงสร้างต่างๆ ที่วัดได้มาหาค่าเฉลี่ย และจำแนกชนิดโดยเปรียบเทียบลักษณะของเชื้อราที่ศึกษากับคู่มือของ Ellis (1971, 1976) Manamgoda *et al.* (2014) และ Seifert *et al.* (2011) นอกจากนี้สามารถใช้ข้อมูลบางส่วนจากงานวิจัยที่เกี่ยวข้องซึ่งได้มีการศึกษาและจำแนกชนิดของเชื้อรา *Curvularia* เพื่อประกอบการวิเคราะห์ต่อไป

3. การจำแนกชนิดของราสกุล *Curvularia* สาเหตุโรคพืช โดยใช้ข้อมูลพันธุกรรม

การสกัดดีเอ็นเอ

นำเส้นใยและโคนิเดียของรา *Curvularia* ที่เลี้ยงบนอาหาร PDA ประมาณ 0.2-0.5 กรัม ใส่ลงในหลอดสำหรับสกัดดีเอ็นเอ ทำการสกัดตามวิธีของ Doungsa-ard *et al.* (2015) เก็บรักษาดีเอ็นเอไว้ที่อุณหภูมิ -20 หรือ -40 องศาเซลเซียส เพื่อรักษาสภาพและคุณภาพของดีเอ็นเอ

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมาย

ไพรเมอร์ที่ใช้ในการศึกษา

the Internal Transcribed Spacer (ITS)

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

V9G: TTACGTCCCTGCCCTTTGTA (de Hoog and Gerrits van den Ende, 1998)

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

the translation elongation factor 1-alpha (tef1)

EF1-983F: GCYCCYGGHCAYCGTGAYTTYAT (Rehner and Buckley, 2005)

EF1-2218R: ATGACACCRACRGCACRGTGTG (Rehner and Buckley, 2005)

glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase gene (GAPDH)

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

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

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้จากแต่ละตัวอย่าง มาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) ของตำแหน่ง ITS tef1 และ GAPDH ด้วย Green Hot Start PCR Master Mix (biotechrabbit™) ใช้ cycling และ condition ของปฏิกิริยาตามที่คุณผลิตแนะนำ กำหนด annealing temperature ที่ 56 องศาเซลเซียส

การตรวจสอบผลิตภัณฑ์ PCR

ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำ PCR โดยตรวจสอบขนาดของชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่ต้องการด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส (Electrophoresis) ทำการผสมผลิตภัณฑ์ PCR ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ด้วย loading dye 1 ไมโครลิตร และ SERVA HiSens Stain G ในอัตราส่วน 1:50,000 ผสมให้เข้ากันจากนั้นหยอดลงใน agarose gel ที่ความเข้มข้น 1% ให้ผลิตภัณฑ์ PCR เคลื่อนที่ผ่านสารละลาย Lithium Borate buffer (LB buffer) ส่งผลิตภัณฑ์ PCR ไปยังบริษัท MacroGen Korea เพื่อให้ผลิตภัณฑ์ PCR บริสุทธิ์ และหาลำดับนิวคลีโอไทด์

การวิเคราะห์ และตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์

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

การจัดเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์

นำ contig ของลำดับนิวคลีโอไทด์ (consensus sequence ที่บันทึกไว้ในรูปแบบ fasta ไฟล์) ที่ได้จากการทดลองและจากการรวบรวมข้อมูลมาจัดเรียง (align) เป็นชุดข้อมูล (dataset) ด้วยโปรแกรม MAFFT 6.611 (Kato and Toh, 2008) จากนั้นตรวจสอบการจัดเรียงของชุดข้อมูล (alignment) โดยวิธี MUSCLE ในโปรแกรม MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 (Kumar *et al.*, 2016) จากนั้นใช้โปรแกรม Gblocks (Talavera and Castresana, 2007) ทำ dataset ของแต่ละตำแหน่ง และ partitioned (combined) dataset ของตำแหน่ง ITS TEF1 และ GAPDH บันทึก dataset และ partitioned dataset ในรูปแบบไฟล์ .nexus โดยใช้โปรแกรม Mesquite

การเก็บรักษา

การเก็บรักษาสายพันธุ์เชื้อราโดยเลี้ยงบนอาหาร PDA Slant เก็บรักษาไว้ใน Culture Collection ที่อุณหภูมิตั้งที่ 15 องศาเซลเซียส และเก็บรักษาดีเอ็นเอต้นแบบ (DNA templates) ที่อุณหภูมิตั้งที่ -40 องศาเซลเซียส กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

การบันทึกข้อมูล

บันทึกข้อมูล เก็บรักษาสายพันธุ์เชื้อรา และเก็บรักษาดีเอ็นเอต้นแบบที่ได้จากการศึกษา เชื้อราที่แยกได้เก็บรักษาไว้ใน Culture Collection ของกลุ่มวิจัยโรคพืชโดยเลี้ยงบนอาหาร PDA Slant ในหลอดแก้ว เก็บไว้ที่อุณหภูมิตั้งที่ 15 องศาเซลเซียส ดีเอ็นเอต้นแบบจัดเก็บไว้ที่อุณหภูมิตั้งที่ -40 องศาเซลเซียส กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช และข้อมูลรหัสดีเอ็นเอ (DNA barcodes หรือ consensus sequences) จะถูกเก็บบันทึก และรายงานเพื่อใช้เป็นข้อมูลอ้างอิงสำหรับการจัดทำบัญชีรายชื่อโรคพืช รวมถึงสามารถใช้เป็นข้อมูลประกอบในการศึกษาด้านวิวัฒนาการต่อไป

- เวลาและสถานที่

ตุลาคม 2561 – กันยายน 2563

ห้องปฏิบัติการ กลุ่มงานวิทยาไมโค กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

8. ผลการทดลองและวิจารณ์

เก็บตัวอย่างของพืชที่แสดงอาการใบจุดและใบไหม้ที่เกิดจากเชื้อรา *Curvularia* (ภาพที่ 1) จากจังหวัดกาญจนบุรี กระบี่ จันทบุรี ฉะเชิงเทรา ชุมพร เชียงราย เชียงใหม่ ชลบุรี นครนายก นครปฐม นครราชสีมา ประจวบคีรีขันธ์ พิษณุโลก พะเยา เพชรบูรณ์ ราชบุรี ลำปาง สุโขทัย สุรินทร์ สระแก้ว และสุราษฎร์ธานี จำนวน 39 ตัวอย่าง (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 ตัวอย่างพืชที่แสดงลักษณะอาการใบจุดและใบไหม้ที่เกิดจากรา *Curvularia* ที่ทำการเก็บจากแหล่งปลูกพืชในประเทศไทย

ชื่อพืช	สถานที่
กล้วยไม้สกุลหวาย	ต.หนองลาน อ.ท่ามะกา จ.กาญจนบุรี ต.นราภิรมณ์ อ.บางเลน จ.นครปฐม ต.คลองใหญ่ อ.องครักษ์ จ.นครนายก
แก้วมังกร	อ.นายายอาม จ.จันทบุรี
ข้าว	ต.เขาค้อ อ.เขาค้อ จ.เพชรบูรณ์ ต.เขาแก้วศรีสมบูรณ์ อ.ทุ่งเสริ่ม จ.สุโขทัย ต.บุฤาษี อ.เมือง จ.สุรินทร์
ข้าวโพด	ต.พระแท่น อ.ท่ามะกา จ.กาญจนบุรี ต.วังขนาย อ.ท่าม่วง จ.กาญจนบุรี ต.หนองหาร อ.สันทราย จ.เชียงใหม่ ต.ท่าตอน อ.แม่เอย จ.เชียงใหม่ ต.แม่ข้าวต้ม อ.เมือง จ.เชียงราย อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา ต.กำแพงแสน อ.กำแพงแสน จ.นครปฐม ต.ทุ่งบัว อ.กำแพงแสน จ.นครปฐม ต.ปลักแรด อ.บางระกำ จ.พิษณุโลก ต.มะตอง อ.พรหมพิราม จ.พิษณุโลก ต.ทับพริก อ.อรัญประเทศ จ.สระแก้ว ต.บางสง อ.ปากแคว จ.สุโขทัย
ขนุน	อ.เมือง จ.ประจวบคีรีขันธ์
ปาล์มน้ำมัน	ต.เขาคราม อ.เมือง จ.กระบี่ ต.ปกาสัย อ.เหนือคลอง จ.กระบี่ ต.ท่าชนะ อ.กันตลี จ.สุราษฎร์ธานี ต.คลองน้อย อ.เมือง จ.สุราษฎร์ธานี
หญ้าปากควาย	อ. ท่าม่วง จ.กาญจนบุรี
หญ้าตีนกา	อ.กำแพงแสน จ.นครปฐม อ.แก่งกระจาน จ.เพชรบุรี
หญ้าสนามกอล์ฟ	ต.หอมศีล อ.บางปะกง จ.ฉะเชิงเทรา จ.ชลบุรี
มะพร้าว	อ.สวี จ. ชุมพร ต.วังเย็น อ.บางแพ จ.ราชบุรี ต.กันตลี อ.ท่าชนะ จ.สุราษฎร์ธานี
มะละกอ	อ.ดอกคำใต้ จ.พะเยา



ภาพที่ 1 ตัวอย่างพืชที่แสดงอาการใบจุดและใบไหม้ที่มีสาเหตุจากเชื้อรา *Curvularia*

แยกเชื้อรา *Curvularia* ได้จำนวน 47 ไอโซเลต จากนั้นนำเชื้อรา *Curvularia* ที่แยกได้จากตัวอย่างโรคพืชมาทำการศึกษาลักษณะทางสัณฐาน โดยศึกษาลักษณะของโคโลนี ขนาด และสี ลักษณะของเส้นใย ลักษณะของก้านชูสปอร์ และลักษณะของโคนิเดียเปรียบเทียบกับเอกสารการจำแนกเชื้อรา Dematiaceous hyphomycetes และ more Dematiaceous hyphomycetes ของ Ellis M.B. (1971, 1976) และ The Genera of Hyphomycetes ของ Seifert *et al.* (2011) เลือกเชื้อรา *Curvularia* จำนวน 15 ไอโซเลต มาสกัดดีเอ็นเอของเชื้อรา *Curvularia* โดยทำการแยกเชื้อราให้บริสุทธิ์บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA และสกัดดีเอ็นเอ จากนั้นนำดีเอ็นเอที่ได้ไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอต้นแบบด้วยเทคนิค PCR และทำการวิเคราะห์ phylogenetic

reconstruction ด้วย sequences ของตำแหน่ง ITS tef1 และ GAPDH นำข้อมูลที่ได้ไปดำเนินการวิเคราะห์ผล โดยเทียบกับ type sequences สามารถจำแนกเชื้อรา *Curvularia* ได้ 7 ชนิด ได้แก่ *C. akaiiensis* *C. dactyloctenicola* *C. eragrostidis* *C. geniculata* *C. lunata* *C. oryzae* และ *C. pseudobrachyspora*

การจำแนกราสกุล *Curvularia* โดยมีรายละเอียดต่างๆ ดังต่อไปนี้

Scientific Classification

Kingdom:	Fungi
Phylum:	Ascomycota
Class:	Dothideomycetes
Subclass:	Pleosporomycetidae
Order:	Pleosporales
Family:	Pleosporaceae
Genus:	<i>Curvularia</i>

Curvularia akaiiensis Sivanesan

ชื่อโรค ไบจุด

พืชอาศัยที่พบ ข้าวโพด (*Zea mays*)

พืชอาศัยอื่น หญ้า

แหล่งที่พบ กาญจนบุรี นครปฐม นครราชสีมา พิษณุโลก สุโขทัย สระแก้ว

ลักษณะอาการของโรค จุดขนาดเล็กกระจายทั่วไปข้าวโพด บริเวณกลางแผลจะมีสีน้ำตาลเนื่องจากเนื้อเยื่อถูกเชื้อราสาเหตุโรคเข้าทำลาย

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา โคลนบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 8 เซนติเมตร เมื่ออายุ 7 วัน ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส มีสีเทา ด้านใต้ของอาหารสีน้ำตาลถึงดำ ก้านชูสปอร์มีลักษณะเกิดแบบเดี่ยวๆ หรือเป็นกลุ่ม สีน้ำตาล ผนังเรียบ มีสีน้ำตาล บริเวณส่วนปลายหักแบบ geniculate โคนินเดียวมีรูปร่างตรงหรือโค้งงอเล็กน้อย รูปคล้ายกระบอง ผนังเรียบ มีผนังชั้น 3 ชั้น มี 4 เซลล์ เซลล์ที่สามจากฐานมีขนาดใหญ่กว่าเซลล์อื่นๆ มีสีน้ำตาลเข้ม เซลล์หัวและท้ายมีสีอ่อน มีขนาด 22.00–26.5 × 7.3–14.5 ไมโครเมตร จากการศึกษาครั้งนี้แยกได้จากลักษณะอาการไบจุดของข้าวโพดสอดคล้องกับงานวิจัยของ เลขา และคณะ (2544)

Consensus sequences

the Internal Transcribed Spacer (ITS)

TGTCTTTTGCACACTTGTTGTTTCCTGGGCGGGTTCGCCCCACCAGGACCACATGATAAACCTTTTTTATGCAGTTGCAAT
CAGCGTCAGTACAACAAATGTAAATCATTTACAACCTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCG
AAATGCGATACGTAGTGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGTATTCCAAAG
GGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTGTACCCTCAAGCTTTGCTTGGTGTGGGCGTCTTGTCTTTGCTCCGCCAAAGACTCGCC
TTAAACGATTGGCAGCCGGCCTACTGGTTTTGCAGCGCAGCACATTTTTGC

the translation elongation factor 1-alpha (tef1)

TGAGTTCGAGGCTGGTATCTCCAAGGATGGTCAGACTCGTGAGCACGCCCTGCTTGCCTACACCCTCGGTGTCAAGCAGCTC
ATCGTCGCCATCAACAAGATGGACACCACCAAGTGGTCTGAGGATCGTTACCAGGAAATCATCAAGGAGACCTCCAACCTCA
TCAAGAAGTTCGGCTACAACCCCAAGCACGTTCCCTTCGTCCCCATCTCCGTTTTCAACGGAGACAACATGATTGAGGCCTC
CACCAACTGCCCTGGTACAAGGGTTGGGAGAAGGAGACCAAGACCAAGTCCACTGGTAAGACCCTCCTCGAGGCCATCGAC
GCCATCGACGCTCCCGTCCGTCTACCGACAAGCCTCTCCGCCTTCCCCTCCAGGATGTCTACAAGATTGGTGGTATTGGCA
CGGTTCCCGTCCGGTCTGTCGAGACCGGTATCATCAAGCCCGGTATGGTCGTACCTTCGCCCCCGCTGGTGTCAACTACTGA
GGTCAAGTCCGTTCGAGATGCACCACGAGCAGCTTACTGAGGGTGTCCCCGGTGACAACGTTCGGCTTCAACGTCAAGAACGTC
TCCGTCAAGGAGATCCGTCTGGTAACGTTGCTGGTACTCCAAGAACGACCCCCCAAGGGTTGCGAGTCTTCAACGCC
AGGTCATCGTCTCAACCACCCCGGTTCAGGTCCGGTGCCGGTTACGCACCAAGTCTTACTGACTGCCACACTGCCACATTGCCTG
CAAGTCTCCGAGCTCCTCGAGAAGATCGACCCGCGTACCGGAAAGTCTGTTGAAA

glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase gene (GAPDH)

CCGTATCGTCTCCGCAATGCGTACGTGTTCTGGATCCATTGATCCATTGTGTATCAAGGCTAATCAAGGCGCGCAGCATCG
AGCACAACGACGTTCGAGATTGTCGCCGTCAACGACCCCTTCATCGAGCCCCACTACGCTGTAAGCATCCCCGACACAGATTC
CTACTGTCTGAGCAATGCGTGCTAATATCCACATAGGCATACATGCTCAAGTATGACAGCACACACGGCCAGTTCAAGGGCG
ACATCAAGGTTGACGGCAACAACCTGACCGTCAACGGCAAGACCGTCCGCTTCCACATGGAGAAGGACCCCGCCAACATCCC
ATGGAGCGAGACCGGCGCTTACTACGTCTGTTGAGTCTACCGGTGTCTTACCACCACCGAGAAGGCCAAGGCTCACTTGAAG
GGTGGAGCCAAGAAGGTTGTCATCTCTGCTCCCTCCGCCGATGCCCCATGTTTCGTCATGGGTGTCAACCACGAGACCTACA
AGTCTGACATTGAGGTGCTCTCCAACGCCTCCTG

Curvularia dactyloctenicola Y. Marin, Senwana & Crous, sp. nov.

ชื่อโรค ไบจุด

พืชอาศัยที่พบ หญ้าปากควาย (*Dactyloctenium* sp.)

พืชอาศัยอื่น หญ้า (*Dactyloctenium aegyptium*) (Marin-Felix et al., 2017)

แหล่งที่พบ กาญจนบุรี

ลักษณะอาการของโรค เริ่มแรกมีจุดสีน้ำตาลแดง จากนั้นเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล และมีสีเหลืองรอบๆ

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา โคลนีสบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5-6 เซนติเมตร เมื่ออายุ 7 วัน ที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส ลักษณะฟูคล้ายคอตตอน มีสีเทา ใต้โคลนีสมีสีดำ สร้างก้านชูสปอร์แบบเดี่ยวหรือเป็นกลุ่ม ตั้งตรง หรือ งอ บางครั้งพบบริเวณปลายหักแบบ geniculate บริเวณปลายก้านชูสปอร์มีสีอ่อน โคนีเดียมีรูปร่างโค้งงอ บางครั้งพบรูปร่างรีหรือรูปไข่ ผ่นเรียบ สีน้ำตาลอ่อน มี 3-4 เซลล์ มีขนาด 21.0-27.5 x 7.3-9.0 ไมโครเมตร จากการศึกษาครั้งนี้แยกได้จากหญ้าปากควายที่มีลักษณะอาการใบจุดสอดคล้องกับงานวิจัยของ Marin-Felix *et al.* (2017) รายงานแยกเชื้อราชนิดนี้จากใบจุดหญ้า (*Dactyloctenium aegyptium*)

Consensus sequences

the Internal Transcribed Spacer (ITS)

```
AGGTCTCCGTAGGTGAACCTGCGGAGGGATCATTACACAATACAATATGAAGGCTGTCCGCAGCTGGAGTATTTTATTACCCT  
TGCTTTTTGCGCACTTGTTGTTTCCTGGGCGGGTTCGCTCGCCACCAGGACCACCAAATAAACCTTTTTTATGCAGTTGCAAT  
CAGCGTCAGTACAAACAATGTAAATCATTTACAACCTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGA  
AATGCGATACGTAGTGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGTATTCCAAAGG  
GCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTGTACCCTCAAGCTTTGCTTGGTGTGGGCGTTTTTGTCTTTGGTCGCCCAAAGACTCGCC  
TTAAAGTGATTGGCAGCCGGCCTTTCTGGTTTCGAGCGCAGCACATTTTGCCTTGCCATCAGCAAAACGGCAATCCATCA  
AGCCTCCTTCTCACGTTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACCTTAAG
```

the translation elongation factor 1-alpha (tef1)

```
CATTGCCGCCGGTACTGGTGTGAGTTCGAGGCTGGTATCTCCAAGGATGGTCAGACTCGTGAGCACGCTCTGCTCGCCTACACC  
CTCGGTGTCAAGCAGCTCATCGTCGCCATCAACAAGATGGACACCACCAAGTGGTCTGAGGAGCGTTACCAGGAAATCATCA  
AGGAGACCTCCAACCTTCATCAAGAAGGTCGGCTACAACCCCAAGCACGTTCCCTTCGTCCTCCATCTCCGGTTTCAACGGAGA  
CAACATGATTGAGGCTTCCACCAACTGCCCTGGTACAAGGGTGGGAGAAGGAGACCAAGGCCAAGGCCACTGGTAAGACC  
CTCCTCGAGGCCATCGACGCCATCGACCCCTGTCCGTCTACCGACAAGCCCTCCGCTTCCCTCCAGGATGTCTACA  
AGATTGGTGGTATTGGCACGGTCCCCGTCGGTGTGTCGAGACCGGTATCATCAAGCCCGGTATGGTCGTACCTTCGCCCC  
CGCTGGTGTCAACTGAAGTCAAGTCCGTGAGATGCACCACGAGCAGCTCACCGAGGGTGTCCCGGTGACAACGTGCGC  
TTCAACGTCAAGAAGTCTCCGTCAAGGAGATCCGTGCTGTTAAGTGGTGGTACTCCAAGAACGACCCCCCAAGGGTT  
GCGAGTCTTCAACGCCAGGTCATCGTCTCAACCACCCGGTCAGGTCGGTGCCGGTTACGCACCAGTCTTGACTGCCA  
CACTGCCACATTGCTTGAAGTTCTCCGAGCTCCTCGAGAAGATCGACCGCGTACCGGAAAGTCTGTTGAGAACTCCCC  
AAGTTCATCAAGTCCGGTGACGCTGCCATCGTCAAGATGGTCCCTCCAAGCCATGTGCGTTGAGGCTTTCACTGACTACCC  
TCCTCTCGGTGCTTTC
```

glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase gene (GAPDH)

TGGCCGTATCGTCTTCCGCAATGCGTAGGTGCCCTTGAATCCATTGATTGAGCGTGTATCGAAGCTAATCGAAGCTCGCAGCA
TCGAGCACAAACGACGTCGAGATTGTCGCCGTGAACGACCCCTTCATCGAGCCCCACTACGCTGTAAGCATCCCCAGCACAGA
ATCCTTCCGTGAGAGCGATGCTTTGCATCATTGATTCCATCCTGGCATGATCCATTGGCGGAACAGTACAAGCTAACATGTCC
ATAGGCATACATGCTCAAGTATGACAGCACACACGGCCAGTTCAAGGGCGACATCAAGGTTGACGGCAACAACCTGACTGTC
AACGGCAAGACCGTCCGCTTCCACATGGAGAAGGACCCCGCCAACATCCCATGGAGCGAGACCGGGCGCTTACTACGTGTTG
AGTCCACTGGTGTCTTCACCACCACCGAGAAGGCCAAGGCTCACTTGAAGGGTGGAGCCAAGAAGTTGTCATCTCTGCTCC
CTCCGCCGATGCCCTATGTTCTGCATGGGTGTCAACCACGAGACCTACAAGTCTGACATTGAGGTCTCTCCAACGCCTCCT
GC

Curvularia eragrostidis (P. Henn) J.A. Meyer

ชื่อพ้อง \equiv *Brachysporium eragrostidis* Henn., Annales du Musée du Congo 2(3): 230 (1908)

= *Spondylocladium maculans* C.K. Bancr. (1913)

ชื่อโรค ดอกจุดสนิมกล้วยไม้

พืชอาศัยที่พบ กล้วยไม้สกุลหวาย (*Dendrobium* spp.)

พืชอาศัยอื่น อะกาเว (*Agave*) สับปะรด (*Ananas*) พืชตระกูลถั่ว (*Arachis*) มะพร้าว (*Cocos*) หญ้าปล้อง (*Digitaria*) กลอย (*Dioscorea*) ปาล์มน้ำมัน (*Elaeis*) หญ้า (*Eragrostis*) พืชอวบน้ำ (*Furcraea*) ยางพารา (*Hevea*) ผักบุ้ง (*Ipomoea*) หญ้าลิ้นงู (*Oldenlandia*) คำเตี้ย (*Polygala*) อ้อย (*Saccharum*) งา (*Sesamum*) ข้าวฟ่าง (*Sorghum*) หญ้า (*Sporobolus*) ข้าวโพด (*Zea*) ดิน (Soil) (Ellis, 1971)

แหล่งที่พบ กาญจนบุรี นครปฐม นครนายก

ลักษณะอาการของโรค เริ่มแรกจะเกิดจุดขนาดเล็ก มีสีเหลืองแกมน้ำตาลสีจะคล้ายๆ สนิม ต่อมาจะขยายขนาดใหญ่ขึ้นแผลมีลักษณะค่อนข้างกลม มีขนาดตั้งแต่ 0.1- 0.3 มิลลิเมตร บริเวณกลางแผลจะมีสีน้ำตาลเนื่องจากเนื้อเยื่อถูกเชื้อราสาเหตุโรคเข้าทำลาย มักพบบนกลีบดอกกล้วยไม้

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา โคลนินบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร เมื่ออายุ 7 วัน ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ลักษณะฟูคล้ายกำมะหยี่ มีสีเทาเข้มถึงน้ำตาลดำ ใต้อาหารวันมีสีน้ำตาลเข้มจนถึงดำ สร้างก้านชูสปอร์แบบเดี่ยวหรือเป็นกลุ่ม มีลักษณะตั้งตรงหรือโค้งงอ บริเวณส่วนปลายของก้านชูสปอร์หักแบบ geniculate ผนังเรียบ มีสีน้ำตาลอ่อนถึงน้ำตาลเข้ม บริเวณปลายก้านชูสปอร์มีสีอ่อน โคนิเดียมีรูปร่างคล้ายถังเบียร์ (barrel shaped) ผนังเรียบ มีสีน้ำตาล มีผนังกัน 3 เส้น มี 4 เซลล์ เซลล์ที่อยู่บริเวณตรงกลางโป่งออก มีสีน้ำตาลเข้ม เซลล์บริเวณปลายทั้ง 2 ข้างมีสีอ่อนและผนังกันที่อยู่กึ่งกลางของโคนิเดียมีสี

น้ำตาลข้มจนถึงดำมองเห็นชัดเจนซึ่งเป็นลักษณะเด่นของราชนิดนี้และมักพบโคนินเดียวเกิดเป็นกลุ่มอยู่บริเวณปลาย ก้านชูสปอร์ มีขนาด 18.7-35.5 x 11.0-18.6 ไมครอน จากการศึกษาครั้งนี้แยกได้จากโรคดอกจุดสนิมของ กล้วยไม้สอติดคล้องกับงานวิจัยของพีระวรรณและคณะ (2553) รายงานแยกราชนิดนี้ได้จากโรคดอกจุดสนิมของ กล้วยไม้สกุลหวายและมีรายงานพบเชื้อราชนิดนี้ได้ในดินและพืชหลายชนิด ได้แก่ อ้อย ข้าวโพด ข้าวฟ่าง เป็นต้น (นิยม, 2542; Domsch *et al.*, 1993)

Consensus sequences

the Internal Transcribed Spacer (ITS)

```
AACAAGGTCTCCGTAGGTGAACCTGCGGAGGGATCATTACACAAAAATATGAAGGCTGCAACCGCCAGTTTTGGCGGGGAA
GCTGAATTATTTTTACCCATGTCTTTTGC GCACTTGTGTTTCCTGGGCGGGTTCGCCCGCCACCAGGACCACACCATAAAC
CTTTTTTATGCAGTTGCAATCAGCGTCAGTATAACAAATGTAAATCATTTACAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGTTCTGGC
ATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAGTGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGC
GCCCTTGGTATTCAAAGGGCATGCCTGTTGAGCGTCATTTGTACCCTCAAGCTTGGCTTGGTGTGGGCGTTTTGTCTTT
GGCTTTTGC CCAAAGACTCGCCTTAAAACGATTGGCAGCCGGCCTACTGGTTTCGGAGCGCAGCACATTTTTGCGCTTGCAA
CTAGCTAAAGAGGCCAGCAATCCATCAAGACCTTCTTCTACTTTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACCTTAAG
CATAT
```

the translation elongation factor 1-alpha (tef1)

```
CTGGTACCTCCCAGGCTGACTGCGCCATTCTCATCATTGCCCGCGTACTGGTGAGTTTCGAGGCTGGTATCTCCAAGGATGG
TCAGACTCGTGAGCACGCCCTGCTTGCCTACACCCTCGGTGTCAAGCAGCTCATCGTTGCCATCAACAAGATGGACACCACC
AAGTGGTCTGAGGAGCGTTACCAGGAAATCATCAAGGAGACCTCCAACCTCATCAAGAAGGTCGGCTACAACCCCAAGCACG
TTCCCTTCGTGCCATCTCCGGTTTCAACGGAGACAACATGATTGAGGCTTCCACCAACTGCCCTGGTACAAGGGTTGGGA
GAAGGAGACCAAGGCCAAGGCCACTGGTAAGACCCTCCTCGAGGCCATCGATGCCATCGACCCTCCCGTCCGTCCTACCGAC
AAGCCCCTCCGTCTTCCCTCCAGGATGTTTACAAGATTGGTGGTATTGGCACGGTTCCTCGGTTCGTGTCGAGACCGGTA
TCATCAAGCCCGGTATGGTCGTCACCTTCGCCCCGCTGGTGTCAACACTGAAGTCAAGTCCGTGAGATGCACCACGAGCA
GCTTACTGAGGGTGTCCCCGGTGACAACGTTGGCTTCAACGTCAAGAACGTCTCCGTCAAGGAGATCCGTTCGTGGTAACGTT
GCCGGTACTCCAAGAACGACCCCCCAAGGGTTGCGAGTCTTCAACGCCAGGTCATCGTCCTCAACCACCTGGTCAGG
TCGGTGCCGGTTACGCACCAGTCCTCGACTGCCACACTGCCACATTGCCTGCAAGTTCTCTGAGCTCCTCGAGAAGATCGA
CCGCCGTACCGGAAAGTCTGTTGAGAACTCCCCAAGTTCATCAAGTCCGGTGACGCTGCCATCGTCAAGATGGTTCCCTCC
AAGCCCATGTGCGTTGAGGCTTCACTGACTACCCTCCTCTCGGTTCGTTTCGCCGTCCGTGACATGCGTCAAACGT
```


glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase gene (GAPDH)

```
GTTGTGCCACGAATTTGCCAAGCAGKTGGTTGTGCAGGAGGCGTTGGAGAGCACCTCAATGTCCGACTTGTAGGTCTCGTGG
TTGACGCCCATGACGAACATGGGGGCATCAGCGGAGGGAGCAGAAATGACAACCTTCTTGGCTCCGCCCTTCAAGTGGGCCT
TGGCCTTCTCGGTGGTGGTGAAGACACCGGTGGACTCAACGACGTAGTAAGCGCCGGTCTCGCCCCATGGGATGTTGGCGGG
GTCCTTCTCCATGTGGAAGCGGATGGTCTTGCCATTGACGGTCAGGTTGTTGCCGTCGACCTTGATCTCACCTTGAAGTGGC
CGTGTGTGCTGTCATACTTGAGCATGTATGCCTATGTAGATGTCAGCCTATACTCGTCCTCCAGAGAATGATGCTGGGGCGTC
AAGATGAAGCAAATGGCGCAGGCCATTGCTCTGACTGTACGATTCTATGCTGGGGATGCTTACAGCGTAGTGGGGCTCGATG
AAAGGGTCGTTTACGGCGACGATATCGACATCGTTGTGCTCAATGCTGCGAACTGTTGTTAGTTTTGATCCACATTGGATCAA
TGGGTTGAGGAGCACCTACGCATTGCGGAAGACGATACGGCCAATGCAMCAAAAACCCGTTGGAT
```



ภาพที่ 2 *Curvularia eragrostidis* : ก) ลักษณะอาการดอกจุดสนิมของกล้วยไม้
ข) ก้านชูสปอร์และโคนินเดีย
ค) โคนินเดีย

Curvularia geniculata (Tracy & Earle) Boedijn (ภาพที่ 3)

ชื่อพ้อง *Helminthosporium geniculatum* Tracy & Earle (1896)

Cochliobolus geniculatus R.R. Nelson (1964)

Pseudocochliobolus geniculatus (R.R. Nelson) Tsuda, Ueyama & Nishih (1978)

ชื่อโรค ไบจุด

พืชอาศัยที่พบ หญ้า (Tifdwarf grass)

พืชอาศัยอื่น ข้าวโพด (*Zea*) หญ้าแห้วหมู (*Cyperus rotundus*) หญ้าปากควาย (*Dactyloctenium aegyptium*) หญ้านกสีชมพู (*Echinochloa colana*) (กัญญา, 2545; จิตรา, 2547; Ellis, 1971)

แหล่งที่พบ ชลบุรี

ลักษณะอาการของโรค พบเป็นสาเหตุของโรคใบจุด ใบไหม้ มีลักษณะอาการจุดสีน้ำตาลขนาดเล็กกระจายบนใบข้าวโพดหากอาการรุนแรงแผลจุดจะรวมกันเป็นแผลไหม้มีรายงานพบได้ทั่วไปและเป็นสาเหตุโรคจุดในพืชหลายชนิด เช่น โรคใบจุดใบ และไหม้ข้าวโพด (กัญญา 2545; Ellis, 1971)

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา โคลนึบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5.7 ซม. เมื่ออายุ 7 วัน ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส มีลักษณะฟูเล็กน้อย มีสีน้ำตาลปนเขียวมะกอก ก้านชูสปอร์ มีลักษณะตั้งตรง ผนังเรียบ มีสีน้ำตาลเข้ม บริเวณปลายหักแบบ geniculate โคนีเดีย มีลักษณะคล้ายกระสวย โค้งงอเล็กน้อย ผนังเรียบ มีผนังชั้น 3-4 ชั้น มีขนาด 8.7-12.3 x 19.6-30.5 ไมโครเมตร สอดคล้องกับรายงานของกัญญา (2545) และ จิตรา (2547) รายงานพบในข้าวโพด หญ้าแห้วหมู หญ้าปากควาย หญ้านกสีชมพู จังหวัดนครปฐม และนนทบุรี

Consensus sequences

the Internal Transcribed Spacer (ITS)

```
AGTTCAGCGGGTATCCCTACCTGATCCGAGGTCAAAAGTGATATAGAGTCTTGATGGAGTGCCGTCCTCTTTTGCTGATTGCA
AGCGCAAAAATGTGCTGCGCTGCGAAACCAAGTAGGCCGGCTGCCAATCGTTTTAAGGCGAGTCTTTGGACAAAACCAAAGAC
AAAAAACGCCAACACCAAGCAAAGCTTGAGGGTACAAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCTTTGGAATACCAAAGGGCGCA
ATGTGCGTTCAAAGATTCGATGATTCACCTGAATTCTGCAATTCACACTACGTATCGCATTTGCTGCGTTCATCGATGCC
AGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTGTAATGATTTACATTTGTTGTAAGTACTGACGCTGATTGCAACTGCATAAAAAAGGTT
TATCATGTGGTCTCGAGGGCGGGCGAACCCGCCAGGAAACAACAAGTGCAGAAAAGACAAGGGTAATAAAAATACTCCAGCC
TTGCCGCTGTTGGCGGTGCAGCCTTCATATGTTTATTGTGAATGATCCCTCCGAGGTTACCTACGGAGACCTTGTACG
ACTTTTACTTCTCTAAATGACCGAGTTTGACGAACCTTCCGGCTTGGGGTGGTCTTGCCAACCTCCCCGAGCCAGTCCGAA
CGCCTCACTGAGCCATTCAATCGGTAGTAGCGACGGGCGGTGTGTACAAGGGGGGRRAAAAAAAAAA
```

the translation elongation factor 1-alpha (tef1)

```
TTCTCATCATTGCCGCCGTTACTGGTGAGTTTCGAGGCTGGTATCTCCAAGGATGGTCAGACTCGTGAGCACGCCCTGCTTGC
CTACACCCTCGGTGTCAAGCAGCTCATCGTCGCCATCAACAAGATGGACACCACCAAGTGGTCTGAGGAGCGTTACCAGGAA
ATCATCAAGGAGACCTCCAACCTCATCAAGAAGGTGGCTACAACCCCAAGCACGTTCCCTTCGTCCCCATCTCCGTTTCAA
CGGAGACAACATGATTGAGGCTTCCACCAACTGCCCTGGTACAAGGGTGGGAGAAGGAGACCAAGGCCAAGGCCACTGGT
AAGACCTTCTCGAGGCCATCGATGCCATCGATGCCCCGTCCTGCTACCGACAAGCCCCTCCGTCTCCCTCCAGGATG
TCTACAAGATTGGTGGTATTGGCACGGTCCCCGTCGGTCTGTCGAGACCGGTGTCATCAAGCCCGGTATGGTCGTCACCTT
CGCCCCGCTGGTGTCAACACTGAAGTCAAGTCCGTCGAGATGCACCACGAGCAGTTACCGAGGGTGTCCCCGGTGACAAC
GTCGGCTTCAACGTCAAGAAGTCTCCGTCAAGGAGATCCGTCGTGGTAAAGTTGCCGGTACTCCAAGAACGACCCCCCA
```

AGGGTTGCGAGTCCTTCAACGCCAGGTCATCGTCTCAACCACCCCGGTCAGGTCGGTGCTGGTTACGCCCCAGTCCTTGA
CTGCCACACTGCCACATTGCCTGCAAGTTCTCCGAGCTCCTCGAGAAGATCGACCGCCGTACCGGAAAGTCTGTTGAGAAC
TCCCCAAGTTCATCAAGTCCGGTGACGCTGCCATCGTCAAGATGGTTCCTCCAAGCCCATGTGCGTTGAGGCTTTCCTGA
CTACCCTCCTCTTGGTCGTTTCGCCGTCCGTGACATGCGTC

glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase gene (GAPDH)

GTTGGAGAGAACCTCAATGTCAGACTTGTAGGTCTCGTGGTTGACACCCATGACGAACATGGGGGCATCGGCCGAGGGAGCA
GAGATGACAACCTTCTTGGCTCCACCCTTCAAGTGAGCCTTGGCCTTCTCAGTGGTGGTGAAGACACCGGTGGACTCAACGA
CGTAGTAAGCGCCAGTCTCGCTCCATGGGATGTTGGCGGGTCTTCTCCATGTGGAAGCGGACGGTCTTGCCGTTGACAGT
CAGGTTGTTGCCGTC AACCTTGATGTCGCCCTTGA ACTGGCCGTGTGTGCTGTCATACTTGAGCATGTAGGCCTATGTAGATA
TTAGCACGTGCTGCTCTGCCAATGGATGATTTCAAGTTTCAGGATGATGCGAAGCATTTCCTTGACAGTAGGAATCTGTGTC
GGGGATGCTTACAGCGTAGTGGGGCTCGATGAAGGGTTCGTTACGGCGACAATCTCGACGTCGTTGTGCTCGATGCTGCGA
GCTACGATTAGCTTTAATACGCACTGGATCAATGGATTCGAGAAGACCTACGCATTGCGGAAGACGATACGGCCAATGC



ภาพที่ 3 *Curvularia geniculata* : ก) ลักษณะอาการใบไหม้ของหญ้าสนามกอล์ฟ

ข) ก้านชูสปอร์และโคนใบเดี่ยว

ค) โคนใบเดี่ยว

Curvularia lunata (Wakker) Boedijn (ภาพที่ 4)

ชื่อพ้อง

≡ *Acrethecium lunata* Wakker, De ziekten van her suikerriet op Java, die niet door dieren veroorzaakt worden worden: 196 (1898)

= *Helminyosporium curvulum* Sacc., Atti della Accademia Scientifica Veneto-Trentino-Istria 10: 89 (1916)

=*Helmisporium curvulum* Sacc., (1916)

ชื่อโรค โรคเมล็ดต่างข้าว (*Oryza sativa*)

พืชอาศัยที่พบ เมล็ดข้าว (*Oryza sativa*) ข้าวโพด (*Zea mays*) หญ้าสนามกอล์ฟ (Tifdwarf grass) หญ้า-
นวลน้อย (*Zoysia* sp.) แก้วมังกร (*Hylocereus undatus*) มะพร้าว (*Cocos nucifera*) ขนุน (*Artocarpus*
heterophyllus) มะละกอ (*Carica papaya*)

พืชอาศัยอื่นๆ พบได้ทั่วไปทั้งในพืชและดิน เช่น ข้าวโพด (*Zea mays*) เมล็ดข้าว (*Oryza sativa*) ข้าวฟ่าง
(*Sorghum* sp.) สับดูดำ (*Jatropha curcas*) หน้าวัว (*Anthurium* spp.) เยอบีร่า (*Gerbera* sp.) หญ้ายาง
(*Euphorbia heterophylla*) กล้วยไม้สกุลหวายเอี้ย (*Dendrobium*) ถั่วดำ (*Vigna mungo*) เป็นต้น (นิยม,
2542; สมศิริ และ ศศิวิมล, 2011; Ellis, 1971; Lal et al., 2013)

แหล่งที่พบ กาญจนบุรี จันทบุรี ฉะเชิงเทรา ชุมพร ชลบุรี เชียงราย เชียงใหม่ นครปฐม นครราชสีมา เพะเยา
พิษณุโลก เพชรบูรณ์ เพชรบุรี ราชบุรี ลพบุรี ลำปาง ลำพูน สุโขทัย สุราษฎร์ธานี สุรินทร์

ลักษณะอาการของโรค มักพบในระยะข้าวออกรวงโดยจะพบจุดสีน้ำตาลหรือดำ หรือสีน้ำตาลปนดำ บางครั้ง
อาจพบสีน้ำตาลปนสีชมพูอ่อนๆ บนเมล็ดที่อยู่บนรวงข้าว นอกจากโรค *C. lunata* แล้วพบมีเชื้อราหลายชนิดเข้า
ทำลายและทำให้เกิดโรคนี้อีก ซึ่งทำให้พบอาการที่แตกต่างกันออกไป

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ โคลนินบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร เมื่อ
อายุ 7 วัน ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ลักษณะฟูเล็กน้อยคล้ายกำมะหยี่ มีสีตาลเข้มถึงดำ ใต้อาหารวันมีสี
น้ำตาลเข้มจนถึงดำ ก้านชูสปอร์เกิดแบบเดี่ยว มีลักษณะตั้งตรงหรือหักไปมา ผนังเรียบ มีสีน้ำตาล บริเวณปลาย
ก้านชูสปอร์มีสีน้ำตาลอ่อน โคนินเดียวมีลักษณะโค้งเล็กน้อย รูปร่างคล้ายครีวของค์ ผนังเรียบ มีผนังชั้น 3 ชั้น มี 4
เซลล์ บริเวณกลางเซลล์มีสีน้ำตาล บริเวณปลายเซลล์มีสีน้ำตาลอ่อน มีขนาด 18.0-31.7 x 8.3-15.9 ไมโครเมตร
การศึกษาในครั้งนี้สามารถแยกเชื้อราจากลักษณะอาการใบจุดข้าวโพด เมล็ดต่างข้าว และหญ้าสนามกอล์ฟ
สอดคล้องกับรายงานของพีระวรรณ และคณะ (2553) ที่ทำการศึกษาและแยกราชนิดนี้ได้จากโรคใบจุดข้าวโพด
โรคเมล็ดต่างข้าว โรคเมล็ดเน่าดำข้าวฟ่าง โรคใบไหม้สับดูดำ โรคใบจุดหน้าวัว โรคใบไหม้เยอบีร่า และโรคใบไหม้
หญ้ายาง สมศิริ และ ศศิวิมล (2011) รายงานแยกราชนิดนี้ได้จากโรคเกสรดำในดอกกล้วยไม้สกุลหวายเอี้ยสกุลที่
ผลิตเป็นการค้า นอกจากนี้พบเชื้อราชนิดนี้ในดินปลูกอ้อย ปอ มันสำปะหลัง และพบเป็นราเอนโดไฟท์ในใบ
Globba sp. (นิยม, 2542; Kokaew, 2011)

Consensus sequences

the Internal Transcribed Spacer (ITS)

```
TTCAGCGGGTATCCCTACCTGATCCGAGGTCAAACGTGAGAAGGAGGCTTGATGGATTGCCGTTTTGCTGATGGCAAGCGCA  
AAAATGTGCTGCGCTGCGAAACCAGAAAGGCCGGCTGCCAATCACTTTAAGGCGAGTCTTTGGGCGACCAAAGACAAAAACG  
CCCAACACCAAGCAAAGCTTGAGGGTACAAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCTTTGGAATACCAAAGGGCGCAATGTGCGT  
TCAAAGATTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACACTACGTATCGCATTTGCTGCGTTCTTCATCGATGCCAGAACCAA
```

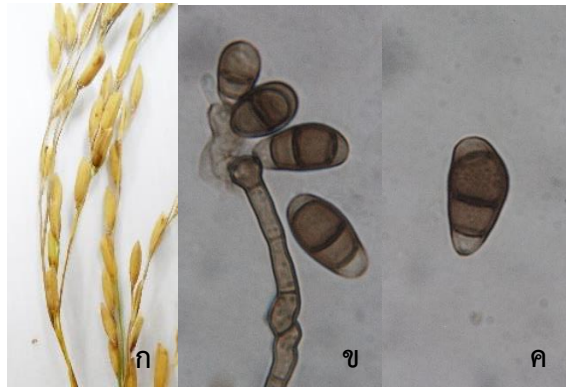
GAGATCCGTTGTTGAAAGTTGAAATGATTTACATTGTTTGTACTGACGCTGATTGCAACTGCATAAAAAAGTTTATTTGGT
GGTCCTGGTGGCGAGCGAACCCGCCAGGAAACAACAAGTGCGCAAAGACAAGGGTAATAAAATACTCCAGCTGCGGACAG
CCTTCATATTGTATTGTGAATGATCCCTCCGAGGTTACCTACGGAGACCTTGTTACGACTTTTACTTCCTCTAAATGACC
GAGTTTGACGAACTTTCCGGCTTGGGGTGGTTCGTTGCCAACCTCCCCGAGCCAGTCCGAACGCCTCACTGAGCCATTCAATC
GGTAGTAGCGACGGGCGGTGTGTACAACGGG

the translation elongation factor 1-alpha (tef1)

TTCTCATCATTGCCGCCGTTACTGGTGAGTTTCGAGGCTGGTATCTCCAAGGATGGTCAGACTCGTGAGCACGCTCTGCTCGC
CTACACCCTCGGTGTCAAGCAGCTCATCGTCGCCATCAACAAGATGGACACCACCAAGTGGTCTGAGGAGCGTTACCAGGAA
ATCATCAAGGAGACCTCCAACCTCATCAAGAAGGTCGGCTACAACCCCAAGCACGTTCCCTTCGTCCCCATCTCCGGTTTCAA
CGGAGACAACATGATTGAGGCTTCCACCAACTGCCCTGGTACAAGGGTTGGGAGAAGGAGACCAAGGCCAAGGCCACTGGT
AAGACCCTCCTTGAGGCCATCGACGCCATCGACCCCCCTGTCCGTCTACCGACAAGCCCCTCCGCCTTCCCCTCCAGGATG
TCTACAAGATTGGTGGTATTGGCACGGTCCCCGTGGTTCGTGTCGAGACCGGTATCATCAAGCCCAGTATGGTTCGTACCTT
CGCCCCGCTGGTGTCAACACTGAAGTCAAGTCCGTGAGATGCACCACGAGCAGCTCACCGAGGGTGTCCCCGGTGACAAC
GTCGGCTTCAACGTCAAGAACGTCTCCGTCAAGGAGATCCGTTCGTGGTAACGTTGCCGGTGACTCCAAGAACGACCCCCCA
AGGGTTGCGAGTCCTTCAACGCCAGGTATCGTCTCAACCACCCCGTCAAGTTCGGTTCGGTTCGGGTTACGCACCAGTCTTGA
CTGCCACACTGCCCACATTGCTTGAAGTTCTCCGAGCTCCTCGAGAAGATCGACCGCCGTACCGGAAAGTCTGTTGAGAAC
TCCCCAAGTTCATCAAGTCCGGTGACGCTGCCATCGTCAAGATGGTTCCTCCAAGCCCATGTGCGTTGAGGCTTTCCTGA
CTACCCTCCTCTCGGTGTTTTGCGCGTCCGTGAC

glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase gene (GAPDH)

GGCGTTGGAGAGGACCTCAATGTCAGACTTGTAGGTCTCGTGGTTGACACCCATGACGAACATAGGGGCATCGGCGGAGGGA
GCAGAGATGACAACTTCTTGGCTCCACCCTTCAAGTGAGCCTTGGCCTTCTCGGTGGTGGTGAAGACACCAGTGGACTCAA
CAACGTAGTAAGCGCCGGTCTCGTCCATGGGATGTTGGCGGGTCTTCTCCATGTGGAAGCGGACGGTCTTGCCGTTGAC
AGTCAGGTTGTTGCCGTAACCTTGATGTCGCCCTTGAAGTGGCCGTGTGTGCTGTCATACTTGAGCATGTATGCCTATGGAC
ATGTTAGCTTGTACTGTTCCGCCAATGGATCATGCCAGGATGGAATCAATGATGCAAAGCATCGCTCTGACGGAAGGATTCTG
TGCTGGGGATGCTTACAGCGTAGTGGGGCTCGATGAAGGGTTCGTTACGGCGACAATCTCGACGTCGTTGTGCTCGATGCT
GCGAGCTTCGATTAGCTTCGATACACGCTGAATCAATGGATTCAAGGGCACCTACGCATTGCGGAAGACGATACGGCCAATG
CGACCGAAAGCCGTTG



ภาพที่ 4 *Curvularia lunata* : ก) ลักษณะอาการเมล็ดต่างข้าว

ข) ก้านชูสปอร์และโคนิเดีย

ค) โอลิโกสปอร์

Curvularia oryzae Bugnicourt (ภาพที่ 5)

ชื่อพ้อง -

ชื่อโรค ใบจุดปาล์มน้ำมัน

พืชอาศัยที่พบ ปาล์มน้ำมัน (*Elaeis*)

พืชอาศัยอื่นๆ กล้วยไม้ดิน (*Curculigo*) ปาล์มน้ำมัน (*Elaeis guineensis*) ข้าว (*Oryza sativa*) หญ้ารัดเขียด (*Fimbristylis miliacea*) อากาศ (air) (Ellis, 1971; de Luna et al., 2002)

แหล่งที่พบ กระจับ สุราษฎร์ธานี

ลักษณะอาการของโรค มักพบอาการบนใบอ่อนและช่วงที่ใบเริ่มคลี่ โดยระยะแรกจะเกิดเป็นจุดเล็กๆ ต่อมาแผลขยายขนาดใหญ่ขึ้นรูปร่างเป็นวงกลมหรือรี มีสีน้ำตาล บริเวณขอบแผลมีสีเหลืองล้อมรอบ หากอาการรุนแรงจะทำให้เกิดใบไหม้ มักพบอาการรุนแรงในปาล์มน้ำมันระยะต้นกล้ามากกว่าต้นที่ให้ผลผลิตแล้ว

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ โคลนินบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 7.8 เซนติเมตร เมื่ออายุ 7 วัน ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ลักษณะฟูคล้ายกำมะหยี่ มีสีตาลเข้มถึงดำ ใต้อาหารร่วนมีสีน้ำตาลเข้มจนถึงดำ ก้านชูสปอร์เกิดแบบเดี่ยว ผนังเรียบ มีสีน้ำตาล โคนิเดียมีลักษณะตั้งตรงหรือโค้งเล็กน้อย รูปร่างคล้ายถังเบียร์ (barrel shaped) ผนังเรียบ มีผนังกัน 3 เส้น และมี 4 เซลล์ มีสีน้ำตาลจนถึงน้ำตาลปนดำ บริเวณกลางเซลล์มีสีน้ำตาลเข้ม บริเวณปลายเซลล์ทั้ง 2 ข้างมีสีน้ำตาลอ่อน มีขนาด 24.0-40.7 × 13.3-22.7 ไมโครเมตร การศึกษาในครั้งนี้แยกได้ลักษณะอาการใบจุดและใบไหม้ของปาล์มน้ำมันสอดคล้องกับการวิจัยของ Sunpapoa and Kittimorakul (2014) ที่ทำการศึกษาโรคใบจุดปาล์มน้ำมันและรายงานรา *C. oryzae* เป็นเชื้อราของสาเหตุโรคนี้ มักพบมากในต้นปาล์มน้ำมันระยะต้นกล้า และพบที่ใบอ่อนมากกว่าใบแก่ นอกจากนี้มีรายงานราชินีนี้เป็น

สาเหตุของโรคเมล็ดพันธุ์ข้าว และแยกได้จากหญ้าไร่เขียด (*Fimbristylis miliacea*) ในประเทศฟิลิปปินส์ (De Luna *et al.*, 2002)

Consensus sequences

the Internal Transcribed Spacer (ITS)

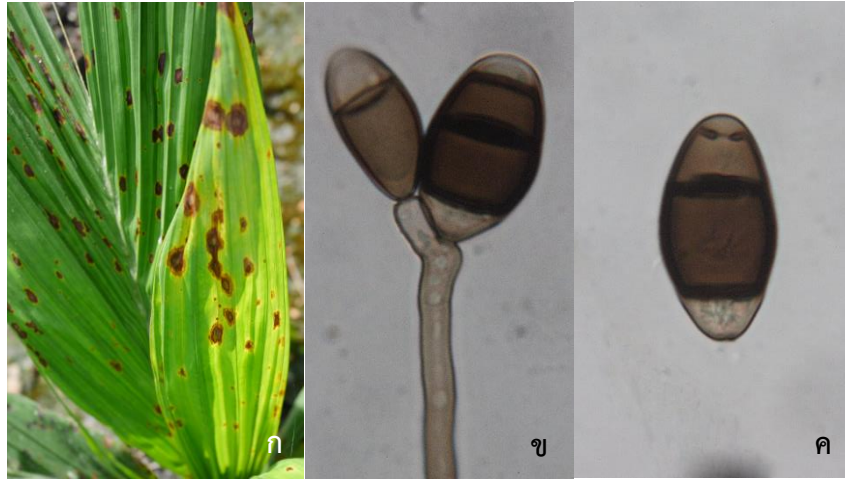
GCGTTCGGACTGGCTCGGGGAGGTTGGCAACGACCACCCCAAGCCGGAAAGTTCGTCAAACCTCGGTCAATTTAGAGGAAGTAA
AAGTCGTAACAAGGTCTCCGTAGGTGAACCTGCGGAGGGATCATTACACAAAAGAATATGAAGGCTGACTGCGGCTGCGCTT
CACGGCCAGTTTGCTGAGGCTGAATTATTTTTTACCCATGTCTTTTGCACACTTGTGTTTCTGGGCGGGTTCGCTCGCCA
CCAGGACCACACCATAAACCTTTTTATCTGTAGTTGCAATCAGCGTCAGTAACAAGTAAATAATCATTTACAACCTTTCAACAA
CGGATCTCTTGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAGTGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCG
AATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGTATTCCAAAGGGCATGCTGTTGAGCGTCATTTGTACCCTCAAGCTTTGCTTG
GTGTTGGGCGTTTTTGTCTTTGGCTACAGCCCAAAGACTCGCCTTAAAACGATTGGCAGCCGGCCTACTGGTTTTGCGAGCGC
AGCACATTTTTGCGCTTGCAACCAGCAAAAGAGGTTGGCAATCCATCAAGTCTTACTTTCTCACTTTTGACCTCGGATCAGGT
AGGGATACCCCG

the translation elongation factor 1-alpha (tef1)

CAGTGAAAGCCTCAACGCACATGGGCTTGGAGGGAACCATCTTGACGATGGCGGCGTCACCAGACTTGATGAACTTGGGGGA
GTTCTCAACAGACTTTCCGGTACGGCGGTGATCTTCTCGAGGAGCTCAGAGAAGTTGCAGGCAATGTGGGCAGTGTGGCAG
TCGAGGACTGGTGCFTAACCGGCACCGACCTGACCAGGGTGGTTGAGGACGATGACCTGGGCGTTGAAAGAGTCGCAGCCCT
TGGGGGGGTGTTCTTGGTGTACCGGCAACGTTACCACGACGGATCTCCTTGACGGAGACGTTCTTGACGTTGAAGCCGAC
GTTGTCACCGGGGACACCCTCGGTGAGCTGCTCGTGGTGCATCTCGACGGACTTGACTTCAGTGGTGACACCAGCGGGGGCG
AAGGTGACGACCATAACCGCCTTGATGACACCAGTCTCGACACGACCGACGGGGACCGTGCCAATACCACCAATCTTGTA
CATCCTGGAGGGGAAGACGGAGAGGCTTGTGCGGTAGGACGGCTGGGGGGTTCGATGGCATCGATGGCCTCGAGGAGGGTCT
TACCAGTGGCCTTGCCCTTGGTCTCCTTCTCCAGCCCTTGTACCAGGGCAGTTGGTGGAGGCCTCAATCATGTTGTCTCC
GTTGAAACCGGAGATGGGGACGAAGGGAACGTGCTTGGGGTTGTAGCCGACCTTCTTGATGAAGTTGGAGGTCTCCTTGATG
ATCTCCTGGTAACGGTCCTCAGACCACTTGGTAGTGTCCATCTTGTGATGGCAACGATGAGCTGCTTGACACCGAGGGTGT
AGGCAAGCAGAGCGTGCTCACGAGTCTGGCCATCCTTGAGATAACGACCTCGAACTCACCAGTACCCG

glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase gene (GAPDH)

CACAACGACGTCGACATTGTGCGCCGTAACGACCCCTTCATCGAGCCCCACTACGCTGTAAGCACTCCCCAAGACACCGCAA
GACCATCACCAGACCAAGGCTTCCCATCATTGCTTCTGATGCCCTGGCATCAACCATTGGCAGAGGAGCAGGGGCTA
ACATGCACATAGGCATACATGCTCAAGTATGACAGCACACACGGCCAGTTCAAGGGTGACATCAAGGTTGACGGCAACA
TGACCGTCAACGGCAAGACCATCCGCTTCCACATGGAGAAGGACCCCGCAACATCCCATGGAGCGAGACCGGCGCCTACTA
CGTCGTTGAGTCCACTGGTGTCTTACCACCACCGAGAAGGCCAAGGCTCACTTGAAGGGCGGAGCTAAGAAGGTGCTCATC
TCTGCTCCCTCCGCTGACGCCCCATGTTGTCATGGGTTCAACCACGAGACCTACAAGTCGGACATTGAGGTGCTC



ภาพที่ 5 *Curvularia oryzae* : ก) ลักษณะอาการใบจุดปาล์มน้ำมัน
 ข) ก้านชูสปอร์และโคนิเดียม
 ค) โคนิเดียม

Curvularia pseudobrachyspora Y. Marín, Cheew. & Crous, sp. nov.

ชื่อพ้อง -
 ชื่อโรค ใบจุด
 พืชอาศัยที่พบ หญ้าตีนกา (*Eleusine indica*)
 พืชอาศัยอื่นๆ -
 แหล่งที่พบ นครปฐม เพชรบุรี

ลักษณะอาการของโรค เริ่มแรกมีจุดรูปร่างหรือรูปไข่สีน้ำตาลแดง จากนั้นเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ โคลนินบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 8.5 เซนติเมตร เมื่ออายุ 7 วัน ที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส บริเวณขอบมีสีเทาอ่อน บริเวณอื่นๆ มีสีเขียวมะกอก ใต้โคลนินมีสีเขียวมะกอกถึงดำ สร้างก้านชูสปอร์แบบเดี่ยวหรือเป็นกลุ่ม ตั้งตรง หรือ งอ บางครั้งพบบริเวณปลายหักแบบ geniculate มีผนังกัน โคนิเดียมมีรูปร่างโค้งงอ บางครั้งพบรูปร่างรีถึงรูปไข่ ผนังเรียบ สีน้ำตาลอ่อนถึงเข้ม มี 2-3 เซลล์ มีขนาด 20.0-27.5 x 8.3-13.7 ไมโครเมตร จากการศึกษาครั้งนี้แยกได้จากหญ้าตีนกาที่มีลักษณะอาการใบจุดสอดคล้องกับงานวิจัยของ Marin-Felix *et al.* (2017) รายงานแยกเชื้อราชนิดนี้จากใบจุดหญ้าตีนกา

Consensus sequences

the Internal Transcribed Spacer (ITS)

CGTAACAAGGTCTCCGTAGGTGAACCTGCGGAGGGATCATTACACAAATTAATATGAAGGCTTCGGCTGGATTATTTTTAT
CACCTTGTCTTTTGCACACTTGTGTTTCTGGGCGGGTTCGCCGCCACCAGGACCACACCATAAACCTTTTTTTATGCAG
TTGCAATCAGCGTCAGTATAACAAATGTAATCATTTACAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAAC
GCAGCGAAATGCGATACGTAGTGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGTATT
CCAAAGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTGTACCCTCAAGCTTTGCTTGGTGTGGGCGTCTTTTGTCTTTGGCCTCGCCCA
AAGACTCGCCTTAAAACGATTGGCAGCCGGCCTACTGGTTTCGAGCGCAGCACATTTTTGCGCTTGAATCAGCAAAAAGG
ACGGCAATCCATCAAGACTACATTTTTACGTTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAGCATATC

the translation elongation factor 1-alpha (tef1)

TCATTGCCGCCGGTACTGGTGAGTTCGAGGCTGGTATCTCCAAGGATGGTCAGACTCGTGAGCACGCCCTGCTTGCCTACAC
CCTCGGTGTCAAGCAGTCATCGTCGCCATCAACAAGATGGACACCACCAAGTGGTCTGAGGAGCGTTACCAGGAAATCATC
AAGGAAACCTCCAACCTTCAAGAAAGTTCGGCTACAACCCCAAGCAGTTCCTTTCGTCCTCCATCTCCGGTTTTCAACGGAG
ACAACATGATTGAGGCTTCCACCAACTGCCCATGGTACAAGGGTTGGGAGAAGGAGACCAAGGCCAAGGCCACTGGTAAGAC
CCTCCTCGAGGCCATCGACGCCATCGACCCCCCTGTCCGTCTACCGACAAGCCCCCTCCGCCTTCTCCTCAGGATGTCTAC
AAGATTGGCGGTATTGGCACGGTTCCTCGTTCGGTGTGCGAGACCGGTATCATCAAGCCCGGTATGGTGTGACCTTCGCCC
CCGCTGGTGTCAACACCGAAGTCAAGTCCGTTCGAGATGCACCACGAGCAGCTTACTGAGGGTGTCCCCGGTGACAACGTCCG
CTTCAACGTCAAGAACGTCTCCGTCAAGGAGATCCGTTCGGTAACTTGGCCGGTGACTCCAAGAGCGACCCTCCCAAGGGC
TGCGAGTCTTTCAACGCCAGGTTCATCGTCTCAACCACCCTGGTCAAGTCCGGTGCCGGTTACGCACCAGTCTTACTGACTGCC
AACTGCCCACATTGCCTGCAAGTTCCTCCGAGCTCCTCGAGAAGATCGACCCCGTACCGGAAAGTCTGTTGAGAACTCCCC
CAAGTTCATCAAGTCCGGCGACGCTGCCATCGTCAAGATGGTTCCTCTAAGCCCATGTGCGTTGAGGCCCTTACTGACTAC
CCTCCTCTCGGTGCTTT

glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase gene (GAPDH)

GCCGTATCGTCTTCCGCAATGCGTAGGTGCCCTTGAATCCATTGATTCCGTGTATATCAATGCTAACGGTAGCCCCGAGCATC
GAGCACAACGACGTTCGAGATCGTCGCCGTAACGACCCTTTCATTGAGCCCCACTACGCTGTAAGCATCCCCAGTACAGAC
TCGTTTCGACGGTCAGAGCAATGGCTTGCATCACTTGTCTTGGCCGACGCCTCGGCATCATTATTGGTAGAGCAGTGCAG
GCTAACATCTACATAGGCATACATGCTCAAGTATGACAGCACACCGCCAGTTCAAGGGCGACATCAAGGTTGACGGCAAC
AACCTGACTGTCAACGGCAAGACTGTCCGCTTCCACATGGAGAAGGACCCCGCCAACATCCCATGGAGCGAGACCGGCGCCT
ACTACGTGCTTGTGAGTCCACCGGTGTCTTACCACCACCGAGAAGGCCAAGGCTCACTTGAAGGGTGGAGCCAAGAAGGTTGT
CATCTCTGCTCCTTCCGCCGATGCCCCATGTTTCGTATGGGTGTCAACCACGAGACCTACAAGTCCGACATTGAGGTGCTCT
CCAACGCCTCTTGC

9. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

เก็บตัวอย่างของพืชที่แสดงอาการใบจุดและใบไหม้ที่เกิดจากเชื้อรา *Curvularia* ระหว่างเดือนกันยายน 2561 - กันยายน 2562 จากจังหวัดกาญจนบุรี กระบี่ จันทบุรี ฉะเชิงเทรา ชุมพร เชียงราย เชียงใหม่ ชลบุรี นครนายก นครปฐม นครราชสีมา ประจวบคีรีขันธ์ พิษณุโลก พะเยา เพชรบูรณ์ ราชบุรี ลำปาง สุโขทัย สุรินทร์ สระแก้ว และสุราษฎร์ธานี จำนวน 39 ตัวอย่าง แยกเชื้อรา *Curvularia* ได้จำนวน 47 ไอโซเลต เลือกรหัส *Curvularia* จำนวน 15 ไอโซเลตมาสกัดและเพิ่มปริมาณของ DNA ตำแหน่ง ITS tef1 และ GAPDH ของ ทำการวิเคราะห์ ตรวจสอบความถูกต้องของ consensus sequence วิเคราะห์และจำแนกชนิดได้จำนวน 7 ชนิด ดังนี้ *C. akaiensis* *C. dactyloctenicola* *C. eragrostidis* *C. geniculata* *C. lunata* *C. oryzae* และ *C. pseudobrachyspora*

10. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

ได้ข้อมูลและรายละเอียดการจัดจำแนกชนิดของรา *Curvularia* สามารถนำไปใช้เป็นข้อมูลสำหรับจัดทำบัญชีรายชื่อโรคพืชและสามารถใช้เป็นข้อมูลประกอบในการศึกษาด้านวิวัฒนาการ นอกจากนี้สามารถใช้เป็นข้อมูลอ้างอิงประกอบการศึกษา งานวิจัย ในสถาบันการศึกษา หน่วยงานรัฐ และหน่วยงานเอกชน

11. คำขอบคุณ (ถ้ามี)

ขอขอบคุณสมาชิกห้องปฏิบัติการวิทยาไมโค กลุ่มวิจัยโรคพืช สำหรับความช่วยเหลือในการเก็บตัวอย่าง การดำเนินการทดลอง และการเก็บข้อมูลในการทำงานวิจัยในครั้งนี้

12. เอกสารอ้างอิง

- กัญญา เจริญไทย. 2545. เชื้อรา *Dematiaceous Hyphomycetes* บนข้าว ข้าวโพด วัชพืชใบแคบและดินบริเวณราก. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 163 หน้า.
- คะเนิงนิจ บุศราคำ. 2545. โรคของกล้วยไม้ดิน ราเอนโดไฟท์บนใบและราก และราดินบริเวณรอบราก. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. สาขาโรคพืช. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 245 หน้า.
- จิตรา เกาะแก้ว. 2547. ความหลากหลายของเชื้อราบนวัชพืชที่เป็นโรคในแปลงผักและแนวทางการนำมาใช้ควบคุมวัชพืชทางชีวภาพ. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. สาขาโรคพืช. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 150 หน้า.
- นิยม สุตเพราะ. 2542. ความหลากหลายของราดินและราโรคพืชในดินปลูกพืชไร่ จังหวัดสกลนคร. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 321 หน้า.
- พีระวรรณ พัฒนวิภาส ทศนาพร ทศคร และ ธารทิพย์ ภาสบุตร. 2553. สสำรวจ รวบรวม และจำแนกเชื้อรา *Curvularia* spp. หน้า 1782-1793. ใน : ผลงานวิจัยและพัฒนา ปี 2553. สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร.

- เลขา มาโนช ภัยญา เจริญไทย คณิงนิจ บุศราคำ พรพิมล อธิปัญญาคม อภิรัชต์ สมฤทธิ์ และ อรุมา เขียมจิตต์. 2544. เชื้อราโรคพืช รา endophyte และราดินในประเทศไทย. หน้า 502-510. ใน : *การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 39*. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ.
- สมศิริ แสงโชติ และศศิวิมล ลักษณะพิสุทธิ์. 2011. โรคที่สำคัญของดอกกล้วยไม้ตัดดอกสกุลหวายเอื้องสกุลที่ผลิตเป็นการค้า. *วารสารวิทยาศาสตร์การเกษตร* 42: 1(พิเศษ): 315-318.
- วรัญญู ชัยรพ และ นิวัฒน์ เสนามืออง. 2559. โรคของกล้วยไม้พะยุง (*Dalbergia cochinchinensis* Pierre ex Lanes) และเชื้อราที่เกี่ยวข้องกับโรคใบจุดกลมสีน้ำตาล. *แก่นเกษตร* 44 ฉบับพิเศษ 1: 977-982.
- วรรณนิภา มธุรส พัฒน ทวีโชค จุฬารณณ์กำเนิดเพชร อุดมศักดิ์เลิศสุชาตวนิช และ รัตน์นุช จันทร์เพ็ญ. 2555. หน้า 1144-1150. ใน : *การประชุมวิชาการแห่งชาติมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์วิทยาเขตกำแพงแสน ครั้งที่ 9*. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กำแพงแสน, นครปฐม.
- 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(6): 964-977.
- Carbone, I. and L.M. Kohn. 1999. A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. *Mycologia* 91: 553-556.
- Cui, R. Q. and X. T. Sun. 2012. First report of *Curvularia lunata* causing leaf spot on lotus in China. *The American Phytopathological Society* 96(7): 1068.
- de Hoog, G.S. and A.H.G. Gerrits van den Ende. 1998. Molecular diagnostics of clinical strains of filamentous basidiomycetes. *Mycosciences* 41: 183-189.
- Domsh, K.H., W. Gams and T.H. Anderson. 1993. *Compendium of soil fungi*. Vol. 2. 2nd ed Academic Press, London. 405 p.
- 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.
- Ellis, M.B. 1971. *Dematiaceous Hyphomycetes*. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, England. 608 p.
- Ellis, M.B. 1976. *More Dematiaceous Hyphomycetes*. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, England. 507 p.
- Fajolu, O. L., A. L. Vu, M. M. Dee, J. Zale, K. D. Gwinn and B. H. Ownley. 2012. First report of leaf spot and necrotic root on switchgrass caused by *Curvularia lunata* var. *aeria* in the United States. *Plant Disease* 96(9): 1372-1373.
- Ferreira, A. P. S., D. B. Pinho, A. R. Machado and O. L. Pereira. 2014. First report of *Curvularia eragrostidis* causing postharvest rot on pineapple in Brazil. *Plant Pathology*. 98(9):1,277.

- Gurung, S., B. N. Mahto, S. Gyawali and T. B. Adhikari. 2013. Phetypic and molecular diversity of *Cochlibolus sativus* populations from wheat. *Plant Disease*. 97: 62-73.
- Jeon, S. J., T. T. T. Nguyen and H. B. Lee. 2015. Phylogenetic Status of an Unrecorded Species of *Curvularia*, *C. spicifera*, Based on Current Classification System of *Curvularia* and *Bipolaris* Group Using Multi Loci. *Mycobiology* 43(3): 210-217.
- Kokaew, J. 2011. *Diversity and bioactivities of endophytic fungi from Thai forests*. Ph.D.Thesis, Kasetsart University. 202 p.
- Kumar, J., P. Schäfer, R. Hückelhoven, G. Langen, H. Baltruschat, E. Stein, S. Nagarajan and KH. Kogel. 2002. *Bipolaris sorokiniana*, a cereal pathogen of global concern: cytological and molecular approaches towards better control double dagger. *Molecular Plant Pathology*. 3(4): 185-195.
- Lal, M., S. Kumar, M. Ali, A Khan, V. Singh and S. Murti. 2013. Host range, susceptibility period of *Curvularia lunata* causing leaf spot of black gram and germplasm screening. *Agriways* 1(2) : 142-146.
- Luna L.Z., A.K. Watson T.C. Paulitz. 2002. Reaction of Rice (*Oryza sativa*) Cultivars to Penetration and Infection by *Curvularia tuberculata* and *C. oryzae*. *Plant disease* 86(5): 470-476
- Manamgoda, D.S., L. Cai, A.H. Bahkali, E. Chukeatirote and K.D. Hyde. 2011. *Cochlibolus*: an overview and current status of species. *Fungal Diversity*. 51(1): 3-42.
- Manamgoda, D. S., L. Cai, E. H. C. McKenzie, E. Chukeatirote and K. D. Hyde. 2012. Two new *Curvularia* species from northern Thailand. *Sydowia* 64: 255-266.
- Manamgoda, D. S., L. Cai, E. H. C. McKenzie, P.W. Crous, H. Madrid, E.i Chukeatirote, R. G. Shivas, Y. P. Tan and K. D. Hyde. 2012. A phylogenetic and taxonomic re-evaluation of the *Bipolaris* - *Cochliobolus* - *Curvularia* Complex. *Fungal Diversity* 56: 131-144.
- Manamgoda D.S., A.H. Madri, A.Y. Rossman, L.A. Castleburyd, E. Chukeatrirote and K.D. Hyde. 2014. The genus *Bipolaris*. *Studies in Mycology* 79: 221-288.
- Manoch, L., O. Jeamjitt, K. Jaroenthai and C. Sringiew. 2002. Plant pathogenic fungi from rice kernel and other host plant. p. 99. *In* Abstracts of the 1th International Conference on Tropical and Subtropical Plant Disease. Chiang Mai, Thailand.
- Marin-Felix, Y., C. Senwannan, R. Cheewangkoon and P.W. Crous. 2017. New species and records of *Bipolaris* and *Curvularia* from Thailand. *Mycosphere* 8(9): 1555-1573.
- Mycobank, 2019. *Curvularia*. (Online). Available. <https://www.mycobank.org> (February 19, 2019)

- Rehner, S.A., E. Buckley. 2005. A *Beauveria* phylogeny inferred from nuclear ITS and EF1- α sequences: evidence for cryptic diversification and links to *Cordyceps* teleomorphs. *Mycologia* 97: 84–89.
- Rehner, S. A. (2001) Primers for Elongation Factor 1-alpha (EF1-alpha). <http://ocid.nacse.org/research/deephyphae/EF1primer.pdf>.
- Seifert, K., G. Morgan-Jones, W. Gams and B. Kendrick. 2011. *The Genera of Hyphomycetes*. CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre, Utrecht, The Netherlands. 997 p.
- Sun, G., S. Oide, E. Tanaka, K. Shimizu, C. Tanaka and M. Tsuda. 2003. Species separation in *Curvularia* “geniculata” group inferred from Brn1 gene sequences. *Mycoscience* 44: 239–244.
- Sunpapoa, A. and J. Kittimorakul. 2014. Disease note: identification of *Curvularia oryzae* as cause of leaf spot disease on oil palm seedling in nurseries of Thailand. *Phytoparasitica*. 42: 529-533.
- Torres, D. P., M. A. Silva and G. Q. Furtado. 2015. Infection process of *Curvularia gladioli* on *Gladiolus* leaves. *Tropical Plant Pathology* 40(6): 382-387.
- Ullstrup A.J. 1972. The impacts of the southern corn leaf blight epidemics of 1970–1971. *Annual Reviews of Phytopathology* 10: 37–50.
- 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. Inc.