การจำแนกสายวิวัฒนาการของเชื้อรา *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* Complex สาเหตุโรคตายพรายกล้วยในประเทศไทย

Phylogenetic Characterization of *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* Complex Causing Banana Wilt Disease in Thailand

ชนินทร ดวงสอาด[1/*] วันวิสาข์ เพ็ชรอำไพ[1/] สุณีรัตน์ สีมะเดื่อ[1/] มะโนรัตน์ สุดสงวน[1/] อมรรัชฎ์ คิดใจเดียว[1/] พรศิริ บุญพุ่ม[1/] ธารทิพย์ ภาสบุตร[1/] สุทธินี ลิขิตตระกูลรุ่ง[2/] พรพิมล อธิปัญญาคม[3/] ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล[1/]

Chanintorn Doungsa-ard[1/*] Wanwisa Pet-amphai[1/] Suneerat Seemadua [1/] Manorat Sudsanguan[1/] Amonrat Kitjaideaw[1/] Pornsiri Bunphum[1/] Tarntip Passabut[1/] Suttinee Likhittrakulrung[2/] Pornpimon Athipunyakom[3/] Nuttima Kositcharoenkul[1/]

Received 22 Jul. 2025/Revised 9 Dec. 2025/Accepted 9 Dec. 2025

ABSTRACT

Fusarium wilt in bananas, caused by the soil-borne fungus *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Foc), colonizes the vascular system, leading to severe wilting and plant death. This disease poses a critical threat to global banana production. In Thailand, Foc race 1 has long been present, whereas Foc tropical race 4 (TR4)—a devastating emerging pathogen affecting Cavendish bananas—has been detected through surveillance activities. Due to reports of Fusarium-like wilt symptoms of uncertain etiology, accurate identification is essential for establishing effective disease control measures. This research aimed to identify the species of *Fusarium* collected from symptomatic bananas across major cultivation areas in Thailand and also the *Fusarium* isolates collected from a pest control area, where eradication measures were implemented and which are currently no longer present in Thailand. The isolates of *Fusarium* have been preserved at the Department of Agriculture, which serves as the National Plant Protection Organization (NPPO) of Thailand under the International Plant Protection Convention (IPPC). The methodology involved fungal isolation, DNA extraction, PCR amplification, and nucleotide sequencing of the *tef1* and *rpb2* gene regions. The phylogenetic analyses were conducted for species identification. The results revealed significant genetic diversity among Foc race 1 isolates in Thailand, identifying them as *F. tardichlamydosporum*, *F. duoseptatum*, and *F. grosmichelii*.

[1/] สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช 50 ถ.พหลโยธิน จตุจักร กรุงเทพฯ 10900

[1/] Plant Protection Research and Development Office, 50 Phahonyothin Rd., Chatuchak, Bangkok 10900, Thailand

[2/] สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 1 ต.แม่เหียะ อ.เมือง จ.เชียงใหม่ 50100

[2/] Office of Agricultural Research and Development Region 1, Mae Hia, Mueang, Chiang Mai 50100, Thailand

[3/] ข้าราชการเกษียณอายุ กรมวิชาการเกษตร 50 ถ.พหลโยธิน จตุจักร กรุงเทพฯ 10900

[3/] Retired government officer, Department of Agriculture, 50 Phahonyothin Rd., Chatuchak, Bangkok 10900, Thailand

***Corresponding author: chanintorn.dd@gmail.com**

Additionally, *F. kalimantanense* was identified within the non-race group. Notably, the isolates from Cavendish bananas were identified as *F. odoratissimum* (syn. TR4), a pathogen currently classified as "not present" in Thailand. This study concludes that these species are phylogenetically closely related. Accurate identification within these species complexes requires molecular diagnostics to ensure precise differentiation and biosecurity management.

Keywords: species complex; *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*; taxonomy

บทคัดย่อ

โรคตายพรายในกล้วยเกิดจากเชื้อรา *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Foc) ซึ่งทำลายท่อลำเลียง ทำให้ต้นกล้วยเหี่ยวและตาย เป็นภัยร้ายแรงต่อการปลูกกล้วยทั่วโลก ในประเทศไทยเชื้อรา Foc race 1 มีระบาดนานแล้ว ในขณะที่เชื้อรา Foc tropical race 4 (TR4) ซึ่งเป็นศัตรูพืชร้ายแรงอุบัติใหม่ในกล้วยคาเวนดิชและตรวจพบจากการเฝ้าระวังเชื้ออาการเหี่ยวจากเชื้อรา *Fusarium* ที่ยังไม่ทราบชนิดที่แน่ชัด จำเป็นต้องจำแนกชนิดให้ถูกต้อง เพื่อกำหนดมาตรการที่เหมาะสมในการควบคุมโรค งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ เพื่อจำแนกชนิดของเชื้อรา Foc ที่พบในกล้วยซึ่งแสดงอาการเหี่ยวจากแหล่งปลูกที่สำคัญของจังหวัดต่าง ๆ โดยใช้ข้อมูลและวิธีการทางชีวโมเลกุล รวมทั้งตรวจสอบชนิดของเชื้อรา *Fusarium* ที่เคยพบในกล้วยคาเวนดิชจากเขตควบคุมศัตรูพืชซึ่งได้ดำเนินควบคุมกำจัดศัตรูพืชและปัจจุบันไม่ปรากฏในประเทศไทย โดยได้นำเชื้อรามาเก็บรักษาไว้ที่กรมวิชาการเกษตรซึ่งทำหน้าที่องค์กรอารักขาพืชแห่งชาติ (NPPO) ของประเทศไทยภายใต้อนุสัญญาอารักขาพืชระหว่างประเทศ (IPPC) นำมาแยกเชื้อ สกัด และเพิ่มปริมาณ DNA ตำแหน่ง *tef1* และ *rpb2* ด้วยเทคนิค PCR วิเคราะห์ลำดับนิวคลิโอไทด์ และความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการเพื่อจำแนกชนิด พบว่า Foc race 1 ในประเทศไทยมีความหลากหลายทางพันธุกรรม สามารถจำแนกได้เป็น *F. tardichlamydosporum F. duoseptatum* และ *F. grosmichelii* นอกจากนี้ยังพบในกลุ่ม non-race คือ *F. kalimantanense* โดยเชื้อราจากกล้วยคาเวนดิช คือ *F. odoratissimum* (syn. TR4) ซึ่งปัจจุบันเชื้อราชนิดนี้มีสถานะไม่ปรากฏในประเทศไทย เชื้อราทุกชนิดมีความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการที่ใกล้ชิดกันมาก การระบุชนิดจำแนกชนิดในกลุ่มที่เป็น species complex ต้องใช้การวินิจฉัยระดับห้องปฏิบัติการด้วยข้อมูลชีวโมเลกุลมาช่วยในการศึกษา

คำสำคัญ: ชนิดที่ซับซ้อน; *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*; อนุกรมวิธาน

บทนำ

กล้วยเป็นหนึ่งในผลไม้ที่สำคัญของโลก (Ploetz, 2015) ที่นิยมปลูกกว่า 148 ประเทศ โดยเฉพาะในเขตร้อนชื้น มีปริมาณผลผลิตออกสู่ตลาดโลกในปี พ.ศ. 2565 กว่า 19.2 ล้านตัน และมีมูลค่ากว่าพันล้านบาท (FAO, 2022a) ปัญหาสำคัญที่กระทบต่อการผลิตกล้วยทั่วโลก คือ การระบาดของโรคตายพราย (Fusarium wilt หรือ Panama disease) สาเหตุจากเชื้อรา *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* W.C. Snyder & H.N. Hansen (Foc) เชื้อราดังกล่าวอยู่ในกลุ่มของ *F. oxysporum* species complex (Michielse and Rep, 2009; O'Donnell et al., 2009) มีพืชอาศัยแคบ สามารถเข้าทำลายและก่อให้เกิดความเสียหายต่อพืชวงศ์กล้วย (*Musa*) (Stover and Buddenhagen, 1986; Stover and

Simmonds, 1987; Ploetz et al., 2015) การเข้าทำลายของเชื้อรา Foc ก่อให้เกิดความเสียหายต่อระบบท่อลำเลียงของพืช ส่วนใหญ่เชื้อรามักจะเข้าทำลายทางราก เจริญขึ้นไปตามท่อน้ำ (xylem) เริ่มจากบริเวณกาบใบด้านนอกของส่วนลำต้น เชื้อรา Foc เป็น soil borne สามารถคงอยู่ได้ในดิน เศษซากพืช หรือบริเวณรากของพืชอาศัยในรูปแบบของ chlamydospore ได้นานกว่า 30 ปี (Stover, 1962)

เชื้อรา Foc แต่ละชนิดมีความสามารถในการก่อโรคที่แตกต่างกันในกล้วยแต่ละพันธุ์ จากความแตกต่างนี้ทำให้เชื้อรา Foc จัดเป็น 4 สายพันธุ์ (race) ได้แก่ race 1 เข้าทำลายกล้วย เช่น พันธุ์ Gros Michel (กล้วยหอมทอง genome type AAA) Pisang Awak (กล้วยน้ำว้า genome type ABB) เป็นต้น race 2 เข้าทำลายกล้วย เช่น พันธุ์ Bluggoe (กล้วยหักมุก genome type ABB) เป็นต้น race 3 เข้าทำลายพืชในสกุล *Heliconia* ซึ่งต่อมาได้จำแนกเป็นเชื้อชนิดใหม่และไม่จัดอยู่ในกลุ่มของเชื้อรา Foc (Ploetz, 2005) และ race 4 เข้าทำลายกล้วยพันธุ์คาเวนดิช (กล้วยหอมเขียว genome type AAA) โดย race 4 นี้แยกออกเป็น 2 strains คือ subtropical race 4 (Foc SR4) พบการระบาดเฉพาะในเขต subtropics และ tropical race 4 (Foc TR4) พบในเขต tropics ซึ่งทั้ง 2 strains จัดเป็นศัตรูพืชชนิดร้ายแรงที่มีความสำคัญทางด้านกักกันพืช โดยเฉพาะ Foc TR4 ทำความเสียหายและแพร่ระบาดในพื้นที่ปลูกกล้วยคาเวนดิชในเขตเอเชียตะวันออกเฉียงใต้และอุตสาหกรรมการผลิตกล้วยทั่วโลก (FAO, 2014) การทราบ race ของเชื้อรา Foc จึงมีความสำคัญต่อการจัดการโรค

การจำแนก race ของเชื้อรา Foc ไม่สามารถใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาได้ เนื่องจากมีความแตกต่างไม่เพียงพอ จึงมีความพยายามในการจำแนกโดยใช้ลักษณะการแสดงออกของเชื้อรา (phenotyping) การทำปฏิกิริยาระหว่างสายพันธุ์ โดยใช้วิธีการ vegetative compatibility groups (VCGs) ที่ออกแบบโดย Cove (1976) และปรับปรุงวิธีการโดย Puhalla (1985) และ Correll et al. (1987) อย่างไรก็ตาม วิธีการนี้ค่อนข้างยุ่งยากและมีข้อจำกัด เช่น ต้องมี Foc จากแต่ละกลุ่ม VCGs เพื่อใช้ในการทดสอบ ซึ่งห้องปฏิบัติการที่พร้อมมีจำกัด อีกทั้งการจัดจำแนกด้วย VCGs ใช้เวลาในการตรวจสอบค่อนข้างนาน จึงหันมาจำแนกทางชีวโมเลกุลโดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลิโอไทด์ ซึ่งมีความรวดเร็วกว่าการจำแนกชนิดด้วย VCGs (Dita et al., 2010; Dita et al., 2011; Fraser-Smith et al., 2014) และยังสามารถระบุถึงชนิด species ด้วยวิธีการทางชีวโมเลกุลโดยใช้ข้อมูลของ systematics และ genealogical concordance โดยใช้ข้อมูลของยีนตำแหน่ง *rpb1 rpb2* และ *tef1* ซึ่งพบว่า เชื้อรา Foc นั้นมีความหลากหลายทางพันธุกรรมและเชื้อรา Foc แต่ละ race สามารถจำแนกชนิดได้ดังนี้ race 1 ประกอบไปด้วย 6 species ได้แก่ *F. duoseptatum, F. gromichellii, F. hexaseptatum, F. phialophorum, F. purpurascens* และ *F. tardichlamydosporum* สำหรับ race 2 ได้แก่ *F. cugenangense* และ tropical race 4 ได้แก่ *F. odoratissimum* ทั้งนี้ไม่พบ subtropical race 4 ในประเทศไทย นอกจากนี้ยังพบกลุ่ม none-race หรือเชื้อรา Foc ที่ไม่เคยมีการระบุ race มาก่อน 3 species คือ *F. kalimantanense*, *F. sangayamense* และ *F. tardicrescens* (Maryani et al., 2019)

เชื้อรา Foc tropical race 4 (TR4) จัดเป็นศัตรูพืชร้ายแรงอุบัติใหม่ที่กำหนดโดย FAO (TCP/RAS/3619) จึงได้มีการเฝ้าระวังการระบาด และพบอาการเหี่ยวในต้นกล้วยคาเวนดิชใน อ.พญาเม็งราย จ.เชียงราย ซึ่งเกิดอาการเหี่ยวจากเชื้อรา *Fusarium* ที่ยังไม่ทราบว่าเป็นชนิดใด อนึ่ง เชื้อรานี้อยู่ในกลุ่ม

ของ *F. oxysporum* species complex (FOSC) เป็นกลุ่มของเชื้อราที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่คล้ายคลึงกันจนไม่สามารถแยกความแตกต่างได้ แต่มีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง กล่าวคือมีลักษณะสัณฐานวิทยาเหมือนกันแต่เป็นคนละชนิดในเชิงสายวิวัฒนาการ การจำแนกชนิดที่แม่นยำต้องวิเคราะห์ด้วยลำดับนิวคลิโอไทด์ของยีน เช่น *tef1* และ *rpb2* เพื่อระบุชนิดที่แท้จริง (O'Donnell et al., 2009; O'Donnell et al., 2010) รวมถึงเชื้อรา Foc ที่พบในกล้วยสายพันธุ์ต่าง ๆ ที่แสดงอาการเหี่ยวของประเทศไทยยังไม่ทราบชนิดที่แน่ชัดเนื่องจากอยู่ในกลุ่มของ FOSC นี้เช่นกัน ดังนั้น งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อจำแนกชนิดและสายวิวัฒนาการของเชื้อรา Foc ที่พบในกล้วยซึ่งแสดงอาการเหี่ยว จากแหล่งปลูกที่สำคัญของจังหวัดต่าง ๆ ในประเทศไทย โดยใช้ข้อมูลและวิธีการทางชีวโมเลกุล รวมถึงตรวจสอบชนิดของเชื้อรา *Fusarium* ที่พบในกล้วยคาเวนดิชจากการเฝ้าระวังเชื้อ ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่องานด้านอนุกรมวิธานของเชื้อสาเหตุโรคตายพรายกล้วย การป้องกันกำจัด การปรับปรุงพันธุ์ และการส่งออกไปต่างประเทศ

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อกล้วย

เก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อสีน้ำตาลบริเวณโคนต้นที่แสดงอาการของโรคตายพราย 225 ตัวอย่าง จากแหล่งปลูกกล้วยที่สำคัญ 36 จังหวัด ได้แก่ กาญจนบุรี กำแพงเพชร ขอนแก่น จันทบุรี ชลบุรี เชียงราย เชียงใหม่ นครปฐม กรุงเทพมหานคร นครพนม นครราชสีมา น่าน ประจวบคีรีขันธ์ พะเยา พิษณุโลก เพชรบูรณ์ แพร่ ภูเก็ต แม่ฮ่องสอน ลำพูน เลย ศรีสะเกษ สกลนคร สงขลา สมุทรสงคราม สมุทรสาคร สระบุรี สุโขทัย สุพรรณบุรี สุรินทร์ หนองคาย หนองบัวลำภู อุดรธานี อุตรดิตถ์ อุทัยธานี และอุบลราชธานี แต่ละตัวอย่างห่อด้วยกระดาษหนังสือพิมพ์ บันทึกข้อมูลพิกัดทางภูมิศาสตร์ วันที่เก็บตัวอย่าง ผู้เก็บตัวอย่าง พันธุ์ของกล้วยที่เก็บตัวอย่าง และเขียนรายละเอียดกำกับให้ชัดเจน ก่อนนำมาตรวจสอบและแยกเชื้อในห้องปฏิบัติการ รวมทั้งตัวอย่างจากพื้นที่โครงการ " Capacity development on diagnostic and surveillance system of banana *Fusarium* wilt disease (TCP/RAS/3619)" ซึ่งกรมวิชาการเกษตรได้ประกาศเป็นเขตควบคุมศัตรูพืชและดำเนินควบคุมกำจัดศัตรูพืช ตามแผนปฏิบัติการฉุกเฉินสำหรับ FOC TR 4 และพระราชบัญญัติกักพืช พ.ศ. 2507 มาตรา 17 ฉบับแก้ไขเพิ่มเติมแล้ว ซึ่งตามหลักเกณฑ์การกำหนดสถานภาพศัตรูพืช (pest status) ของ ISPM 8 (FAO, 2021) เชื้อราชนิดนี้มีสถานะไม่ปรากฏในประเทศไทย (FAO, 2022b) แต่เพื่อประโยชน์ต่องานด้านอารักขาพืชจึงได้นำเชื้อรา *Fusarium* มาเก็บรักษาไว้ที่กรมวิชาการเกษตร ซึ่งทำหน้าที่องค์กรอารักขาพืชแห่งชาติ (NPPO) ของประเทศไทย ภายใต้อนุสัญญาอารักขาพืชระหว่างประเทศ (IPPC) และได้นำมาวิจัยจำนวน 24 ตัวอย่าง รวมทั้งหมด 249 ตัวอย่าง

2. การแยกเชื้อรา Fusarium และการตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยา

แยกเชื้อราโดยวิธี tissue transplanting นำตัวอย่างส่วนของท่อน้ำท่ออาหารของต้นกล้วยที่มีสีน้ำตาลแช่ในสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ที่มี active ingredient ของ NaOCl 1% เป็นเวลา 3-5 นาที ล้างในน้ำที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง นำไปซับให้แห้งบนกระดาษที่ผ่านการฆ่าเชื้อ ตัดเป็นเส้นเล็ก ๆ ขนาดความยาว 0.5-1 ซม. โดยประมาณ แล้วนำไปเลี้ยงบนอาหาร potato dextrose agar (PDA) บ่มที่อุณหภูมิห้องปฏิบัติการ นาน 7-21 วัน แยกราให้บริสุทธิ์โดยการถ่ายเชื้อบริเวณปลายเส้นใย และเลี้ยงบนอาหาร PDA จานใหม่ ตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ และ

กล้องจุลทรรศน์เชิงซ้อน โดยตรวจดูลักษณะเส้นใย conidiophore สปอร์ และโครงสร้างอื่น ๆ ของเชื้อรา โดยการ mount slide ด้วยน้ำหรือ shear's solution จากนั้นเปรียบเทียบกับข้อมูลของเชื้อรา *Fusarium* โดยอ้างอิงรายงานของ Booth (1971) และ Brayford (1992)

3. การสกัดดีเอ็นเอ การเพิ่มปริมาณ และการวิเคราะห์ลำดับนิวคลิโอไทด์

แยกเชื้อราให้บริสุทธิ์ โดยวิธี single spore isolation ย้ายสปอร์เดี่ยวของเชื้อรา เลี้ยงลงบนอาหาร PDA บ่มที่อุณหภูมิห้องปฏิบัติการ นาน 7-14 วัน หากไม่มีการปนเปื้อน จึงดำเนินการสกัดดีเอ็นเอ โดยตักและย้ายเส้นใยของเชื้อรา *Fusarium* ที่เลี้ยงบนอาหาร PDA ประมาณ 0.2-0.5 ก. ลงในหลอดสำหรับสกัดดีเอ็นเอ และทำการสกัดตามวิธีของ Doungsa-ard et al. (2015) เก็บรักษาดีเอ็นเอที่สกัดได้จากแต่ละตัวอย่าง ไว้ที่อุณหภูมิ -20 หรือ -40°ซ. เพื่อรักษาสภาพและคุณภาพของดีเอ็นเอ นำดีเอ็นเอที่สกัดได้จากแต่ละตัวอย่าง มาทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายของ *Fusarium* spp. ตำแหน่ง the RNA polymerase second largest subunit gene (*rpb2*) ด้วยไพร์เมอร์ RPB2-5f2/RPB2-7cr (O'Donnell et al., 2010) และ the translation elongation factor1-alpha gene (*tef1*) (O'Donnell et al., 1998) กำหนด annealing temperature ของแต่ละตำแหน่งที่ 56°ซ. ด้วยวิธี polymerase chain reaction (PCR) โดยใช้ Taq DNA polymerase ใช้ cycling และ condition ของปฏิกิริยาตามที่ผู้ผลิตแนะนำ ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำ PCR โดยตรวจสอบขนาดของชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่ต้องการด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส (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 บริสุทธิ์ด้วยวิธี enzymatic purification (ExoSap-IT/ExoStar) และหาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยวิธี Sanger sequencing

เชื้อรา *Fusarium* ที่ได้เก็บรักษาสายพันธุ์เชื้อราใน culture collection ดีเอ็นเอต้นแบบ (DNA templates) ข้อมูลรหัสดีเอ็นเอ (DNA barcodes หรือ consensus sequences) ได้รับการเก็บบันทึกและใช้เป็นข้อมูลอ้างอิง รวมถึงสามารถใช้เป็นข้อมูลประกอบในการศึกษาด้านวิวัฒนาการต่อไป จัดเก็บดีเอ็นเอต้นแบบไว้ที่อุณหภูมิ –40°ซ. ณ พิพิธภัณฑ์โรคพืช กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

4. การวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ

นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์มาทำการวิเคราะห์โดยนำ forward sequence และ reverse sequence ที่ได้มาเปรียบเทียบกัน โดยใช้โปรแกรม Geneious Prime 2024 (Kearse et al., 2012) บันทึกข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ในรูปแบบไฟล์ชนิด fasta ทำการตรวจสอบความถูกต้องของชนิดของจุลินทรีย์ที่ทำการศึกษากับฐานข้อมูลทางพันธุกรรม เช่น GenBank และ Mycobank นำ contig ของลำดับนิวคลีโอไทด์ (consensus sequence ที่บันทึกไว้ในรูปแบบ fasta ไฟล์) มาจัดเรียง (align) ด้วยโปรแกรม MAFFT 6.611 (Katoh and Toh, 2008) จากนั้นตรวจสอบการจัดเรียงโดยวิธี MUSCLE ในโปรแกรม the MEGA (Kumar et al., 2016) จากนั้นใช้โปรแกรม Gblocks (Talavera and Castresana, 2007) ทำการรวมชุดข้อมูลของดีเอ็นเอตำแหน่ง *rpb2* และ *tef1* เป็น combined dataset รวมกับ type sequence ของเชื้อรา Foc race ต่าง ๆ (Table 1) ซึ่งข้อมูลของดีเอ็นเอตำแหน่ง *rpb2* และ *tef1* เพียงพอต่อการระบุชนิดของตัวอย่างเชื้อรา Foc ที่ใช้ในการศึกษานี้

บันทึกชุด alignment ในรูปแบบไฟล์ nexus หรือ nex โดยใช้โปรแกรม Mesquite วิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการเพื่อการจัดจำแนกโดยประมวลผลและวิเคราะห์ข้อมูล ใช้เกณฑ์มาตรฐาน คือ maximum likelihood ใช้โปรแกรม RAxML 8.1.15 (Stamatakis, 2014)

Table 1 List of taxa for *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* identification at race level and specimens included in this study

Fusarium	Accession number	Location	Host, genotype	GenBank number	
				tef1	*rpb2*
F. duoseptatum	INACC F835	Indonesia	Cavendish	LS479764	LS479315
(race 1)	**INACC F916***	Indonesia	Musa ABB	**LS479688**	**LS479239**
	INACC F921	Indonesia	Musa ABB	LS479694	LS479245
	INACC F979	Indonesia	Musa AAB	LS479749	LS479300
	M0288	Phetchabun	Musa ABB	PX512734	na
	M0334	Chanthaburi	Musa ABB	PX512735	na
	M0342	Saraburi	Musa ABB	PX512738	na
	M0436	Chiang Rai	Musa ABB	PX512741	na
	M0442	Chiang Mai	Musa ABB	PX512742	na
	M0449	Uttaradit	Musa ABB	PX512745	na
	M0452	Uttaradit	Musa ABB	PX512724	na
	M0880	Nakhon Pathom	Musa ABB	PX512750	na
	M0881	Nakhon Pathom	Musa ABB	PX512751	na
	M0882	Nakhon Pathom	Musa ABB	PX512752	na
	M0996	Phitsanulok	Musa ABB	PX512753	na
	M0997	Phitsanulok	Musa ABB	PX512754	na
	M1182	Khon Kaen	Musa ABB	PX512757	na
	M1183	Khon Kaen	Musa ABB	PX512758	na
	M1258	Uthai Thani	Musa ABB	PX512768	na
	M1260	Phitsanulok	Musa ABB	PX512769	na
F grosmichelii	**INACC F833**	Indonesia	Musa ABB	**LS479744**	**LS479295**
(race 1)	InaCC F855	Indonesia	Musa AAA	LS479794	LS479346
	InaCC F854	Indonesia	Musa AAA	LS479793	LS479345
	InaCC F884	Indonesia	Musa AAA	LS479824	LS479382
	M0337	Loei	Musa ABB	PX512737	na
	M0345	Nong Khai	Musa ABB	PX512739	na
	M0421	Sakon Nakhon	Musa ABB	PX512740	na
	M0447	Nong Bua Lamphu	Musa ABB	PX512743	na
	M0456	Chiang Rai	Musa ABB	PX512746	na
	M0462	Phayao	Musa ABB	PX512747	na
	M1238	Sukhothai	Musa ABB	PX512725	na
F. tardichlamydosporum	**INACC F958**	Indonesia	Musa AAB	**LS479729**	**LS479280**
(race 1)	M0336	Phitsanulok	Musa	PX512736	PX512727
	M0448	Chiang Mai	Musa ABB	PX512744	PX512728
	M0463	Lamphun	Musa	PX512748	PX512729
	M1256	Uthai Thani	Musa ABB	PX512766	PX512731
F. tardicrescens	**NRRL 36113**	Malawi	Musa	**LS479665**	**LS479217**
(race 1)	NRRL 54005	-	*Raphanus*	LS479674	LS479226
	NRRL 54008	-	*Raphanus*	LS479673	LS479225

Table 1 Cont.

Fusarium	Accession number	Location	Host, genotype	GenBank number	
				tef1	*rpb2*
F. cugenangense	**INACC F984**	Indonesia	Musa ABB	**LS479757**	**LS479308**
(race 2)	INACC F983	Indonesia	Musa ABB	LS479756	LS479307
	NRRL 25433	-	*Gossypium*	LS479648	LS479202
F. oxysporum f.sp. *cubense*	CAV1788	South Africa	*Heliconia*	FJ664919	na
(race 3)	Foc807	Brazil	Musa AAB	KY436227	na
	Race 3	China	Musa ABB	KC889021	na
F. odoratissimum	**INACC F822**	Indonesia	AAB, AAA, ABB	**LS479828**	**LS479386**
(tropical race 4)	VCG 01213	Indonesia	-	MG211817	na
	NRRL 36102	China	Cavendish	LS479655	LS479209
	INACC F927	Indonesia	AAB, AAA, ABB	LS479701	LS479252
	INACC F936	Indonesia	Musa AAA	LS479711	LS479262
	INACC F931	Indonesia	Musa AAB	LS479705	LS479256
	M0116	Chiang Rai**	Cavendish	PX512733	PX512726
	M0215	Chiang Rai**	Cavendish	PX512723	na
	M0501	Chiang Rai**	Cavendish	PX512749	PX512730
F. kalimantanense	**INACC F917**	Indonesia	Musa AAB	**LS479690**	**LS479241**
(non-race)	INACC F918	Indonesia	Musa AAB	LS479691	LS479242
	INACC F922	Indonesia	Musa AAB	LS479695	LS479246
	M1146	Nakhon Phanom	Musa ABB	PX512755	na
	M1147	Nakhon Phanom	Musa ABB	PX512756	na
F. sangayamense (non-race)	**INACC F960**	Indonesia	Musa ABB	**LS479732**	**LS479283**
F. oxysporum f. sp. *batatas*	NRRL 26360	-	-	AY527522	na
F. fujikuroi	CBS 221.76	-	-	MN534010	KU604255
F. sacchari	LC13681	-	-	MW580548	MW474494

na= not available; * The numbers in "**bold**" are type sequences

** The Department of Agriculture declared the TR4-affected area a pest-controlled zone in 2019, implementing control and eradication measures

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การจำแนกเชื้อรา *Fusarium*

เมื่อพิจารณาลักษณะของเยื้อเยื่อของลำต้นกล้วยที่เชื้อเข้าทำลายพบว่า มีความแตกต่าง โดยมีทั้งลักษณะของเนื้อเยื่อที่ถูกทำลายเป็นสีน้ำตาลจนถึงน้ำตาลแดงอย่างชัดเจน รวมถึงที่มีลักษณะสีน้ำตาลอ่อนจาง หรือพบเล็กน้อยในลำต้น อย่างไรก็ตาม เมื่อนำตัวอย่างเนื้อเยื่อมาแยกเชื้อโดยวิธี tissue transplanting พบว่า แม้ลักษณะของเนื้อเยื่อจะมีความแตกต่างของลักษณะเนื้อเยื่อสีน้ำตาลที่พบยังสามารถแยกได้เชื้อรา *Fusarium* (Figure 1) 158 ไอโซเลท แยกเป็น 135 ไอโซเลทจากตัวอย่างเนื้อเยื่อกล้วย 225 ตัวอย่าง และ 23 ไอโซเลทจากเนื้อเยื่อกล้วยคาเวนดิช 24 ตัวอย่าง เมื่อจำแนกชนิดเบื้องต้นด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราภายใต้กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ และกล้องจุลทรรศน์เชิงซ้อน และจำแนกชนิดเบื้องต้นด้วยวิธี phylogenetic reconstruction ด้วยข้อมูลลำดับนิวคลิโอไทด์ของยีน *tef1* พบว่า เป็นเชื้อรา *F. oxysporum* จำนวน 108 ไอโซเลท และเป็น *Fusarium* spp. อื่น ๆ อีก 50 ไอโซเลท เช่น *F. solani*, *F. incarnatum*, *F. equiseti* และ *F. fujikuroi* (Figure 1A) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการจำแนกชนิดเชื้อรา *Fusarium* ด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาถึงแม้จะสามารถระบุ species ได้ แต่ก็ยังเป็นการจำแนกได้ในระดับกลุ่มใหญ่ สอดคล้องกับการรายงานของ O'Donnell et al. (2009)

ที่รายงานว่าเชื้อรา *Fusarium* แต่ละชนิดมีความซับซ้อนโดยมีมากกว่า 1 ชนิด ภายใต้ชื่อเดียวกัน (complex species) โดยเฉพาะ *F. oxysporum* complex ดังนั้น การวินิจฉัยระดับห้องปฏิบัติการด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา สามารถระบุได้เพียงว่าอยู่ในกลุ่ม complex ของ *F. oxysporum* ซึ่งยังไม่สามารถแยกความแตกต่างของชนิดได้ในระดับลึก

2. ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของเชื้อรา *F. oxysporum* f.sp. *cubense*

นำเชื้อรา *F. oxysporum* ที่มีความใกล้ชิดกับ Foc จากการวิเคราะห์เบื้องต้นด้วยข้อมูลลำดับนิวคลิโอไทด์ของยีน *tef1* (Figure 1A) 40 ไอโซเลท มาวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการโดยใช้ชุดข้อมูลลำดับนิวคลิโอไทด์จาก *tef1-rpb2* loci ของเชื้อรา Foc ที่ศึกษาวิเคราะห์รวมกับ type sequence ของเชื้อรา Foc race ต่าง ๆ (Table 1) พบว่า ไอโซเลทของ Foc race 1 สามารถจำแนกได้เป็น 3 ชนิด ได้แก่ *F. tardichlamydosporum* 5 ไอโซเลท *F. duoseptatum* 16 ไอโซเลท และ *F. grosmichelii* 14 ไอโซเลท กลุ่ม non-race พบ 1 ชนิด คือ *F. kalimantanense* 2 ไอโซเลท และ Foc TR4 คือ *F. odoratissimum* 3 ไอโซเลท (Figure 2) ซึ่งผลการศึกษาพบว่า เชื้อรา Foc race 1 ในประเทศไทยมีความหลากหลาย โดยในกลุ่มนี้ประกอบไปด้วยเชื้อรา *Fusarium* อย่างน้อย 3 ชนิด ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานพบความหลากหลายของ Foc race 1 โดย Maryani et al. (2019)

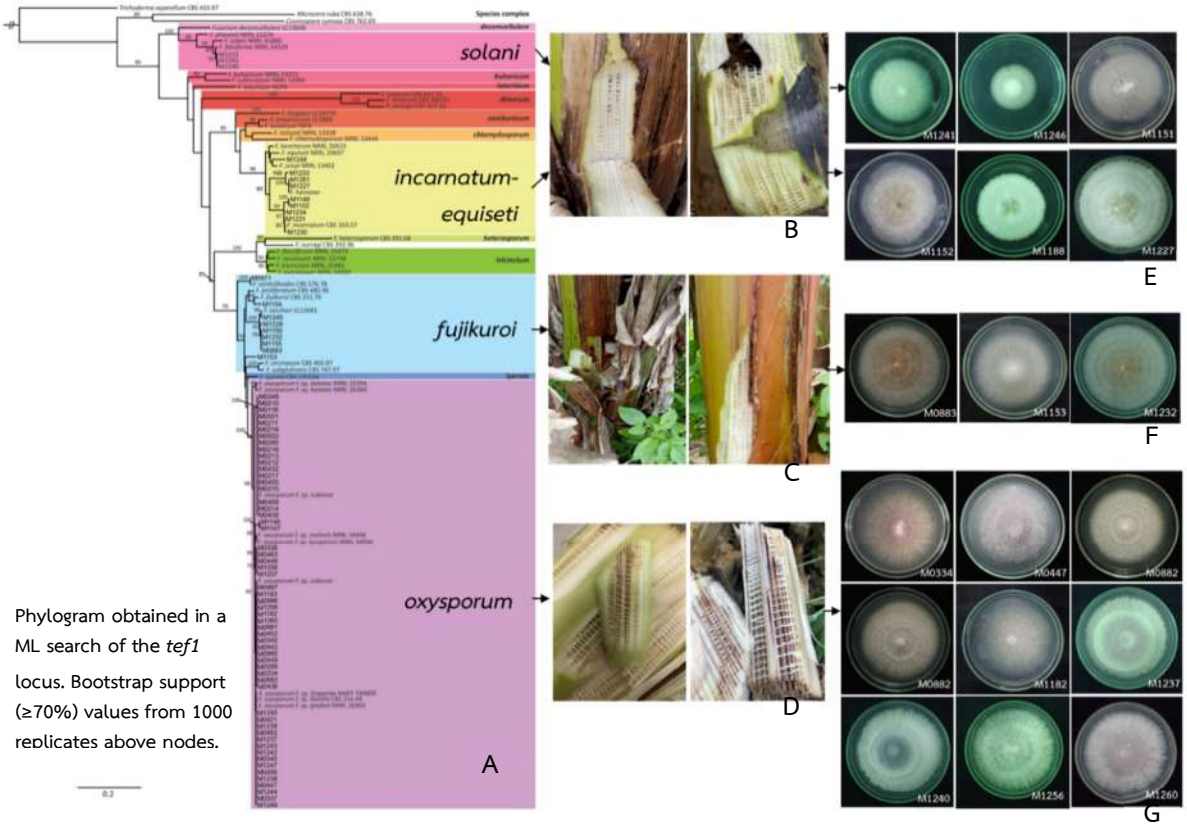


Figure 1 *Fusarium* spp. were recovered from pseudostem tissues exhibiting diverse pigmentation. (A) the phylogram obtained in an ML search of the *tef1* dataset represents the preliminary identification of the *Fusarium* isolates obtained from pseudostem tissues; (B,C,D) the various coloration observed on the banana pseudostem; (E,F,G) the *Fusarium* isolates obtained from the pigmented pseudostem tissues

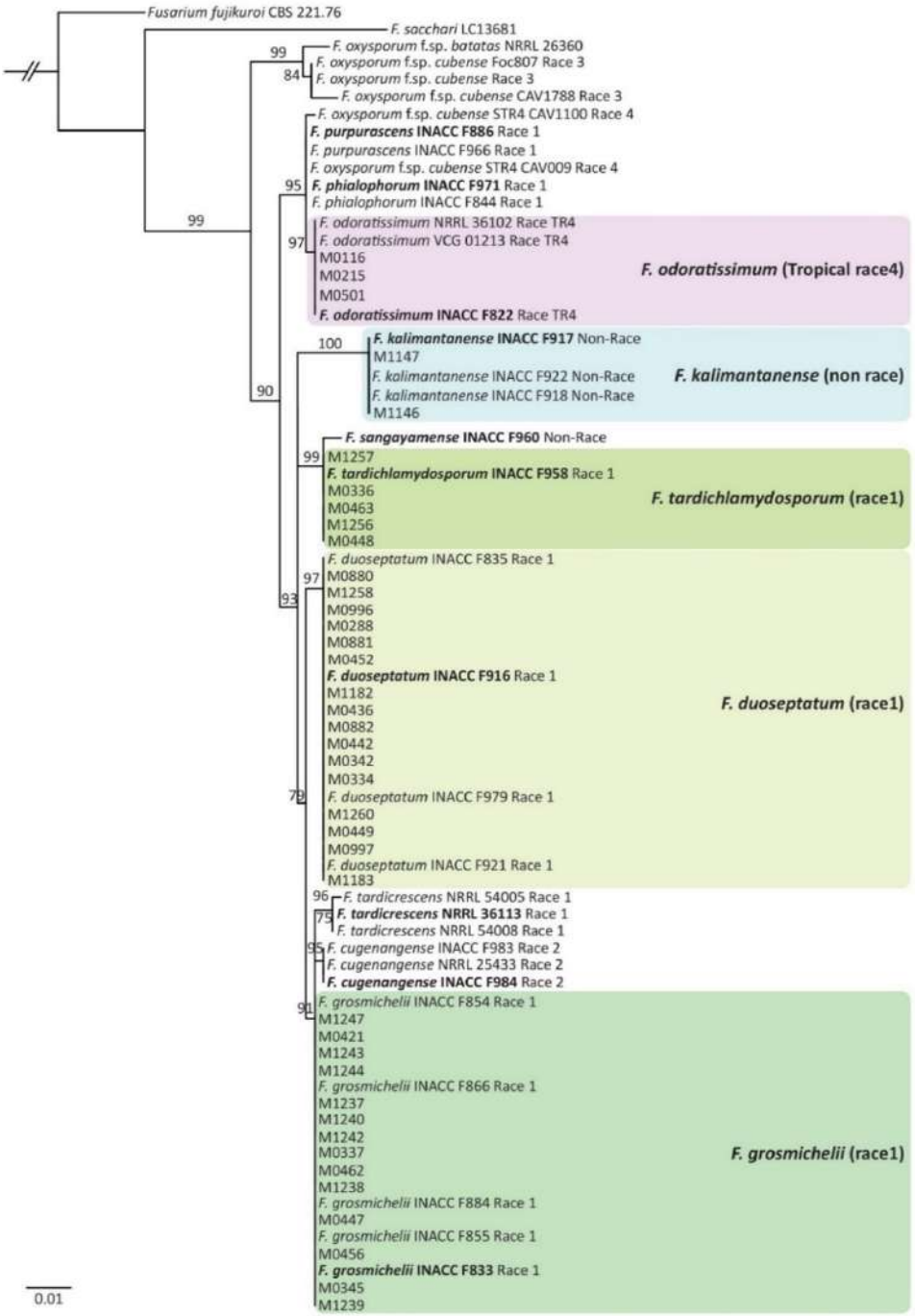


Figure 2 Phylogram obtained from a ML search of the concatenated dataset of the *tef1-rpb2* loci. Bootstrap support (≥70%) values from 1000 replicates above nodes; the samples with M followed by number collected from this study

จากตัวอย่างที่เก็บจากแหล่งปลูกกล้วยพบว่าลักษณะของเนื้อเยื่อลำต้นกล้วยมีความแตกต่าง โดยมีตั้งแต่ลักษณะเนื้อเยื่อสีน้ำตาลจางเป็นเส้นเล็ก ๆ จนถึงเป็นสีน้ำตาลเข้มทั่วทั้งลำต้น เมื่อเปรียบเทียบกับชนิดของเชื้อรา *Fusarium* ที่จำแนกได้ด้วยวิธีการทางชีวโมเลกุลพบว่า ตัวอย่างเนื้อเยื่อที่มีสีอ่อนเส้นน้ำตาลจาง ๆ ไม่ได้ทำให้เกิดอาการที่รุนแรงจนทำให้เนื้อเยื่อกลายเป็นสีน้ำตาลแดง หรือน้ำตาลเข้ม

และภายนอกไม่พบลักษณะอาการเหี่ยว แต่พบเพียงลักษณะของใบเหลืองเพียงเล็กน้อยพบว่า เกิดจากเชื้อรากลุ่ม *F. solani* complex, *F. incarnatum-equiseti* complex, *F. fujikuroi* complex รวมถึงกลุ่ม non-race เช่น *F. kalimantanense* และตัวอย่างเนื้อเยื่อที่ได้จากต้นกล้วยที่แสดงอาการเหี่ยวอย่างชัดเจน ซึ่งเนื้อเยื่อลำต้นกลายเป็นสีน้ำตาลเข้มพบว่าเกิดจากเชื้อรา *F. duoseptatum* และ *F. grosmichelii* ซึ่งอยู่ในกลุ่มของ race 1 และ *F. odoratissimum* (TR4)

ผลจากการศึกษาสามารถแบ่งระดับการวินิจฉัยโรคเหี่ยวของกล้วยได้ว่า การวินิจฉัยระดับแปลงปลูก เมื่อพิจารณาจากลักษณะอาการ การเข้าทำลายท่อลำเลียงสามารถยืนยันได้เพียงอาการของโรคว่าเป็นโรคเหี่ยวหรือตายพราย การวินิจฉัยระดับห้องปฏิบัติการด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาสามารถระบุได้เพียงว่าอยู่ในกลุ่มของ *F. oxysporum, F. fujikuroi, F. incarnatum-equiseti* หรือ *F. solani* ซึ่งเป็นกลุ่ม *Fusarium* species complex รวมถึง Foc (O'Donnell et al., 2013) (Figure 1) ซึ่งยังไม่สามารถแยกความแตกต่างของชนิดได้ในระดับลึกกว่าระดับของกลุ่ม complex ดังนั้น การจำแนกชนิดในกลุ่มที่เป็น species complex เพื่อให้สามารถระบุชนิดที่ชัดเจนต้องวินิจฉัยระดับห้องปฏิบัติการด้วยข้อมูลชีวโมเลกุลเท่านั้น ซึ่งจะเห็นได้ว่าเชื้อรา Foc race 1 ไอโซเลทต่างๆ ได้จากการศึกษาครั้งนี้ไม่ใช่ชนิดเดียวกันและมีความแตกต่างในระดับ species (Figure 2)

ผลการทดลองข้างต้นแสดงให้เห็นว่าเชื้อรา *Fusarium* ในกลุ่มของ race 1 นั้นมีความหลากหลายของสายพันธุ์ มีทั้งที่เป็นสาเหตุโรคพืชโดยที่ทำให้เกิดอาการรุนแรง และไม่ได้ทำให้เกิดอาการรุนแรง รวมถึงสายพันธุ์ที่อยู่ในกลุ่มที่อาศัยอยู่ในพืชโดยไม่แสดงอาการ การจำแนกชนิดที่แม่นยำโดยใช้ข้อมูลของยีน *tef1* และ *rpb2* ในการวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการช่วยให้สามารถจำแนกชนิดของเชื้อรา Foc ได้อย่างละเอียด โดยสามารถระบุ species ของเชื้อราได้อย่างชัดเจน ซึ่งมีความแม่นยำและวินิจฉัยได้ในระดับลึกกว่าลักษณะทางสัณฐานวิทยา ที่สามารถระบุได้ที่ระดับกลุ่ม complex เท่านั้น ทั้งนี้จากการจำแนกชนิดและพบ *F. grosmichelii, F. duoseptatum, F. tardichlamydosporum* และ *F. kalimantanense* รวมถึงศัตรูพืชกักกันอย่าง *F. odoratissimum* ที่ได้รับการควบคุมและกำจัดตามแผนปฏิบัติการฉุกเฉินสำหรับ FOC TR 4 และพระราชบัญญัติกักพืช พ.ศ. 2507 มาตรา 17 ฉบับแก้ไขเพิ่มเติมแล้ว และมีสถานะไม่ปรากฏในประเทศไทย (FAO, 2022b)

การค้นพบนี้เป็นข้อมูลที่มีความสำคัญต่อการบริหารจัดการโรค การพิจารณากำหนดแนวทางการป้องกันกำจัดเมื่อทราบชนิดที่ถูกต้อง จะช่วยเสริมสร้างความแข็งแกร่งในการรับมือกับโรคเหี่ยวในกล้วยได้อย่างมีประสิทธิภาพ และเป็นประโยชน์ต่อการปรับปรุงพันธุ์กล้วยให้ต้านทานต่อเชื้อราสายพันธุ์ต่าง ๆ ที่พบในประเทศไทย ข้อมูลที่ได้ทำให้เข้าใจอนุกรมวิธานของเชื้อรา Foc มากขึ้น สามารถนำไปกำหนดมาตรการควบคุมและป้องกันกำจัดที่เหมาะสม อีกทั้งยังสนับสนุนการกักกันพืชที่มีประสิทธิภาพและการเจรจาการค้าสินค้าเกษตรภายใต้มาตรการสุขอนามัยพืช

สรุปผลการทดลอง

การจำแนกชนิดและวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของเชื้อรา Foc ที่พบในกล้วยที่แสดงอาการของโรคตายพรายจากแหล่งปลูกที่สำคัญของของประเทศไทย และตรวจสอบชนิดของเชื้อรา *Fusarium* ในกล้วยคาเวนดิชด้วยวิธีทางชีวโมเลกุล พบว่า เชื้อรา Foc กลุ่ม race 1 ที่พบในประเทศไทยมีความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยสามารถจำแนก

ชนิดได้ 3 species ได้คือ *F. tardichlamydosporum, F. duoseptatum* และ *F. grosmichelii* และพบในกลุ่ม non-race คือ *F. kalimantanense* ส่วนเชื้อรา *Fusarium* ที่แยกได้จากตัวอย่างต้นกล้วยคาเวนดิช คือ *F. odoratissimum* (syn. *F. oxysporum* f. sp. *cubense* Tropical race 4) ซึ่งเชื้อราทั้ง 5 ชนิด มีความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการที่ใกล้ชิดกันมาก การจำแนกชนิดด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและข้อมูลพืชอาศัยไม่สามารถบ่งชี้ความแตกต่างระหว่างชนิดได้ จึงจัดกลุ่มให้อยู่ใน *F. oxysporum* f. sp. *cubense* ทั้งหมด แต่การจำแนกชนิดด้วยข้อมูลความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการสามารถแยกความแตกต่างได้ ซึ่งความแตกต่างที่พบนี้จะเป็นประโยชน์ต่อการบริหารเพื่อจัดการโรค การปรับปรุงพันธุ์ รวมถึงการกักกันพืชของประเทศต่อไป

คำขอบคุณ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ Professor Dr. Roger Shivas และ Dr. Yu Pei Tan จาก University of Southern Queensland, Australia ที่ให้คำปรึกษาในการเก็บตัวอย่างและแยกเชื้อจากเนื้อเยื่อต้นกล้วย รวมถึงคำแนะนำการวิเคราะห์ผล และขอขอบคุณสำนักงานคณะกรรมการส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม (สกสว.) ที่สนับสนุนด้านงบประมาณสำหรับการวิจัย

เอกสารอ้างอิง

Booth, C. 1971. The Genus *Fusarium*. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, 237p.

Brayford, D. 1992. IMI Descriptions of Fungi and Bacteria No. 1112. *Fusarium oxysporum* f. sp. *Batatas*. Mycopathologia. 118(1): 41-42.

Correll, J.C., C.J.R. Klittich and J.F. Leslie. 1987. Nitrate non-utilizing mutants of *Fusarium oxysporum* and their use in vegetative compatibility tests. Phytopathology. 77(12): 1640-1646.

Cove, D.J. 1976. Chlorate toxicity in *Aspergillus nidulans*: the selection and characterisation of chlorate resistant mutants. Heredity. 36(2): 191-203.

Dita, M.A., C. Waalwijk, I.W. Buddenhagen, M.T. Jr Souza and G.H.J. Kema. 2010. A molecular diagnostic for tropical race 4 of the banana fusarium wilt pathogen. Plant Pathology. 59(2): 348–357.

Dita, M.A., C. Waalwijk, I.W. Buddenhagen, M.T. Jr Souza and G.H.J. Kema. 2011. Corrigendum. Plant Pathology. 60: 384.

Doungsa-ard, C., A.R. McTaggart, A.D. Geering, T.U. Dalisay, J. Ray and R.G. Shivas. 2015. *Uromycladium falcatarium* sp. nov., the cause of gall rust on *Paraserianthes falcataria* in south-east Asia. Australasian Plant Pathology. 44(1): 25-30.

Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). 2014. Prevention and diagnostic of fusarium wilt (Panama disease) of banana caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* Tropical Race 4 (TR4). Available at: https://openknowledge.fao.org/handle/20.500.14283/br126e. Accessed: December 20, 2023.

FAO. 2021. ISPM 8: Determination of pest status in an area. Available at: https://openknowledge.fao.org/handle/20.500.14283/x2968e. Accessed: December 20, 2023.

FAO. 2022a. FAOSTAT Database. Rome, Italy: FAO. Available at: http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC. Accessed: January 8, 2024.

FAO. 2022b. Detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* tropical race 4 in Thailand. Available at: https://www.ippc.int/en/countries/thailand/pestreports/2019/11/detection-of-fusarium-oxysporum-f-sp-cubense-tropical-race-4-in-thailand/. Accessed: December 20, 2023.

Fraser-Smith, S., E. Czislowski, R.A. Meldrum, M. Zander, W. O'neill, G.R. Balali and E.A.B. Aitken. 2014. Sequence variation in the putative effector gene SIX8 facilitates molecular differentiation of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. Plant Pathology. 63(5): 1044 –1052.

Katoh, K. and H. Toh. 2008. Recent developments in the MAFFT multiple sequence alignment program. Briefings in Bioinformatics. 9(4): 286-298.

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(7): 1870-1874.

Michielse, C.B. and M. Rep. 2009. Pathogen profile update: *Fusarium oxysporum*. Molecular Plant Pathology. 10(3): 311-324.

Maryani, N., L. Lombard, Y.S. Poerba, S. Subandiyah, P.W. Crous and G.H.J. Kema. 2019. Phylogeny and genetic diversity of the banana Fusarium wilt pathogen *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* in the Indonesian centre of origin. Studies in Mycology. 92(1): 155–194.

O'Donnell, K., C. Gueidan, S. Sink, P.R. Johnston, P.W. Crous, A. Glenn, R. Riley, N.C. Zitomer, P. Colyer, C. Waalwijk, Tv. Lee, A. Moretti, S. Kang, H.S. Kim, D.M. Geiser, J.H. Juba, R.P. Baayen, M.G. Cromey, S. Bithell, D.A. Sutton, K. Skovgaard, R. Ploetz, K.H. Corby, M. Elliott, M. Davis and B.A. Sarver. 2009. A two-locus DNA sequence database for typing plant and human pathogens within the *Fusarium oxysporum* species complex. Fungal Genetics and Biology. 46(12): 936-948.

O'Donnell, K., D.A. Sutton, M.G. Rinaldi, B.A Sarver, S.A. Balajee, H.J. Schroers, R.C. Summerbell, V.A. Robert, P.W. Crous, N. Zhang, T. Aoki, K. Jung, J. Park, Y.H. Lee, S. Kang, B. Park and D.M. Geiser. 2010. Internet-accessible DNA sequence database for identifying fusaria from human and animal infections. Journal of Clinical Microbiology. 48(10): 3708-3718.

O'Donnell, K., H.C. Kistler, E. Cigelnik and R.C. Ploetz. 1998. Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 95(5): 2044–2049.

Ploetz, R.C. 2005. Panama disease: An old nemesis rears its ugly head Part 2. The Cavendish era and beyond. Online APS Publications. The American Phytopathological Society (APS). Minnesota, USA. Available at: https://apsjournals.apsnet.org/doi/10.1094/PHP-2006-0308-01-RV. Accessed: January 8, 2022.

Ploetz, R.C. 2015. Fusarium wilt of banana. Phytopathology. 105(12): 1512–1521.

Ploetz, R.C., G.H. Kema and L.J. Ma. 2015. Impact of diseases on export and smallholder production of banana. Annual Review of Phytopathology. 53(1): 269-288.

Puhalla, J.E. 1985. Classification of strains of *Fusarium oxysporum* on the basis of vegetative compatibility. Canadian Journal of Botany. 63(2): 179–183.

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

Stover, R. H. 1962. Fusarial wilt (Panama Disease) of bananas and other Musa species. Commonwealth Mycological Institute. Phytopathological Paper No. 4. Kew, Surrey, England. 117 p.

Stover, R.H. and I.W. Buddenhagen. 1986. Banana breeding: Polyploidy, disease resistance and productivity. Fruits. 41(3): 175-191.

Stover, R.H. and N.W. Simmonds. 1987. Bananas, 3rd ed. Longman, London, UK. 468p.

Talavera, G. and J. Castresana. 2007. Improvement of phylogenies after removing divergent and ambiguously aligned blocks from protein sequence alignments. Systematic Biology. 56(4): 564-5