การศึกษาสถานภาพของรา *Fusarium oxysporum* f.sp. *elaeidis* (Foe) ในประเทศไทย

Study on Status of *Fusarium oxysporum* f.sp. *elaeidis* (Foe) in Thailand

ชนินทร ดวงสอาด[1/] พรพิมล อธิปัญญาคม[2/]
อภิรัชต์ สมฤทธิ์[1/] สุณีรัตน์ สีมะเดื่อ[1/] อมรรัชฎ์ คิดใจเดียว[1/]
[1/]กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
[2/]ผู้เชี่ยวชาญ สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

รายงานความก้าวหน้า

การสำรวจสถานภาพของรา *Fusarium oxysporum* f.sp. *elaeidis* ในประเทศไทย ระหว่างเดือนตุลาคม 2558 – เดือนกันยายน 2560 ในแปลงปลูกปาล์มน้ำมัน ในพื้นที่จังหวัดเพชรบุรี กระบี่ ชุมพร นครศรีธรรมราช พังงา ประจวบคีรีขันธ์ ตรัง สุราษฎร์ธานี และเชียงใหม่ จำนวน 70 แปลง ไม่พบต้นที่แสดงอาการเหี่ยวที่มีลักษณะการเข้าทำลายของรา *F. oxysporum* f.sp. *elaeidis* เมื่อสุ่มตัวอย่างราก และดินบริเวณรอบราก จำนวน 142 ตัวอย่าง แยกราจากตัวอย่างรากด้วยวิธี tissue transplanting และแยกราจากดินด้วยวิธี dilution plate ได้ราที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาพ้องกับรา *Fusarium* spp. จำนวน 79 ไอโซเลท และจัดจำแนกด้วยการเปรียบเทียบข้อมูลพันธุกรรมของรา *Fusarium* spp. จำนวน 5 ไอโซเลท โดยการเปรียบเทียบเบื้องต้นด้วยตำแหน่ง 28S และ ITS ไม่พบราสาเหตุของโรคเหี่ยวของปาล์มน้ำมัน ดังนั้นรา *F. oxysporum* f.sp. *elaeidis* ไม่ปรากฏในพื้นที่ปลูกปาล์มน้ำมันของประเทศไทย

คำหลัก : ปาล์มน้ำมัน โรคเหี่ยว ศัตรูพืชกักกัน *Fusarium oxysporum* f.sp. *elaeidis*

รหัสการทดลอง 03-04-59-04-01-00-01-59

คำนำ

เนื่องจากในปัจจุบันการส่งออกและนำเข้าสินค้าเกษตรจะต้องมีความตกลงทั่วไปว่าด้วยภาษีศุลกากรและการค้า (General Agreement on Tariff and Trade: GATT) ซึ่งต่อมาได้เปลี่ยนเป็นองค์การการค้าโลก (World Trade Organization: WTO) ได้กำหนดกฎเกณฑ์และระเบียบเพื่อให้เกิดการค้าเสรีและเป็นธรรม โดยทุกประเทศสมาชิกของ WTO จะต้องปรับลดอัตราอากรขาเข้าลงมาเป็นอันดับแรกสุดของการเปิดการค้าเสรี ในปัจจุบันมาตรการกีดกันด้านภาษีศุลกากรมีแนวโน้มที่จะลดลงเนื่องจากการเปิดเสรีทางการค้าภายใต้เขตการค้าเสรีต่างๆ มีเพิ่มขึ้น แต่ในขณะเดียวกันมาตรการกีดกันทางการค้าที่มิใช่ภาษีศุลกากร (non-tariff barrier, NTB) จะเริ่มมีบทบาทและมีรูปแบบใหม่ๆ เพิ่มขึ้น ซึ่ง มาตรการที่สำคัญในด้านการเกษตรได้แก่ มาตรการด้านสุขอนามัยและสุขอนามัยพืช (Sanitary and Phytosanitary Measures : SPS) มาตรการด้านสุขอนามัยและสุขอนามัยพืช มีวัตถุประสงค์เพื่อปกป้องชีวิต และสุขภาพมนุษย์ สัตว์ และพืช เพื่อสร้างความมั่นใจต่อความปลอดภัยด้านอาหาร แต่ต้องไม่ใช้สิทธินั้นในทางที่เป็นการสร้างข้อจำกัดทางการค้า หรือเลือกปฏิบัติระหว่างประเทศสมาชิกตามอำเภอใจ ซึ่งการนำมาตรการ SPS มาใช้ควรสอดคล้องกับมาตรฐานตามที่องค์กรมาตรฐานระหว่างประเทศกำหนดขึ้น และต้องมีเหตุผล และหลักฐานทางวิทยาศาสตร์ที่เพียงพอมีการประเมินความเสี่ยง (Risk Assessment) ที่เชื่อถือได้ ซึ่งประเทศคู่ค้ามักนำมาตรการ SPS มาใช้เป็นเครื่องมือในการกีดกันทางการค้ากับสินค้าอาหารประเภทปศุสัตว์ ประมง และพืชผักผลไม้ โดยอ้างการตรวจพบเชื้อโรค โรคแมลง และอื่นๆ ซึ่งส่งผลกระทบต่อภาพลักษณ์ทางการค้าของประเทศ และเป็นการเพิ่มต้นทุนการผลิต

ประเทศเกือบทุกประเทศที่เป็นสมาชิกขององค์การการค้าโลก (WTO) ได้นำมาตรการสุขอนามัยพืชมาใช้เป็นข้อต่อรองในการส่งออกและนำเข้า โดยที่ประเทศผู้ส่งออกต้องส่งบัญชีรายชื่อศัตรูพืชของพืชส่งออก และข้อมูลของศัตรูพืชแต่ละชนิดตามความต้องการของประเทศผู้นำเข้า เพื่อทำการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช ก่อนที่จะอนุญาตให้สินค้าเกษตรนั้นๆเข้าประเทศ ขณะเดียวกันประเทศผู้นำเข้าจำเป็นต้องมีข้อมูลบัญชีรายชื่อศัตรูของพืชที่นำเข้าด้วย การจัดทำบัญชีรายชื่อศัตรูโดยการศึกษาและการสำรวจแบบติดตามข้อมูลศัตรูพืชในแหล่งปลูกเพื่อเป็นการเฝ้าระวัง (Surveillance) เป็นกระบวนการรวบรวมข้อมูลศัตรูพืชชนิดใดชนิดหนึ่งในพื้นที่ ซึ่งการรวบรวมข้อมูลนั้นสามารถทำได้ 2 แบบ ได้แก่การเฝ้าระวังโดยทั่วไป (general surveillance) โดยการค้นคว้าข้อมูลจากแหล่งข้อมูลได้แก่ ข้อมูลข่าวสารศัตรูพืชที่มีรายงานในประเทศเช่น จากหน่วยงานภาครัฐ มหาวิทยาลัย ภาคเอกชน ตลอดจนข่าวสารจากแหล่งข้อมูลขององค์กรระหว่างประเทศ เช่น องค์การอาหารและเกษตรแห่งชาติ (Food and Agriculture Organization, FAO) องค์การอารักขาพืชระดับภูมิภาค (Regional Plant Protection Organization, RPPOs) และอื่นๆ การเฝ้าระวังโดยการสำรวจแบบเฉพาะเจาะจง (specific surveys) สามารถดำเนินการโดยการสำรวจแบบตรวจหา (detection surveys) และการสำรวจแบบมีขอบเขต (delimiting surveys) (McMaugh, 2005) ประโยชน์ของการสำรวจแบบเฉพาะเจาะจงทั้ง 2 วิธีนี้นอกจากจะสามารถบอกถึงสถานการณ์ของศัตรูพืชในพื้นที่

แล้วยังสามารถใช้ข้อมูลที่ได้เป็นการรับรองพื้นที่ปลอดศัตรูพืชในกรณีที่ไม่พบศัตรูพืชในพื้นที่นั้นๆ เมื่อมีการรับรองพื้นที่ปลอดศัตรูพืชแล้ว การที่จะคงสภาพพื้นที่ปลอดศัตรูพืชจะต้องมีการสำรวจแบบตรวจหาอย่างเป็นระบบ ข้อมูลต่างๆ ที่ได้จากการสำรวจติดตามศัตรูพืชเพื่อการเฝ้าระวังนี้จะส่งให้องค์การอารักขาพืชแห่งชาติ (National Plant Protection Organization, NPPO) นำไปใช้ประโยชน์ ซึ่งข้อมูลที่ได้จากการเฝ้าระวังนี้สามารถนำไปใช้ในด้านต่างๆ เช่น ใช้ในการสนับสนุนการออกประกาศเรื่องการปลอดศัตรูพืช ตลอดจนที่ดำเนินการโดย NPPO เป็นกระบวนการช่วยตรวจหาศัตรูพืชชนิดใหม่ได้ทันเวลา การให้การรับรองพื้นที่ปลอดศัตรูพืช เป็นต้น การสำรวจ ติดตามและตรวจสอบศัตรูพืชเป็นงานพื้นฐานที่มีความจำเป็นสำหรับใช้ในการดำเนินการด้านอื่นๆ อีก เช่น Pest Risk Analysis, Establishment for pest free area, Pest list, Pest report เป็นต้น ซึ่งแนวทางการดำเนินงานจะสอดคล้องกับ ISPMs (International Standard for Phytosanitary Measures) ฉบับที่ 6 (Guidelines for Surveillance)

ปาล์มน้ำมัน (Oil palm; *Elaeis guineensis* Jacq) เป็นพืชน้ำมันที่มีศักยภาพในการแข่งขันสูงในตลาดโลก เนื่องจากเป็นพืชที่มีผลผลิตต่อหน่ายพื้นที่ปลูกสูงสุดในพืชน้ำมันด้วยกัน อีกทั้งต้นทุนการปลูกและการสกัดน้ำมันและการสกัดน้ำมันเพื่อผลิตน้ำมันปาล์มโดยรวมค่อนข้างต่ำ ในปัจจุบันการผลิตน้ำมันปาล์มในประเทศไทยเพียงพอสำหรับการบริโภคภายในประเทศเท่านั้น ส่วนการผลิตเพื่อการส่งออกต้องมีการพัฒนาระบบภายในประเทศให้ดีกว่าที่เป็นอยู่ เนื่องจากผลผลิตต่อไร่ที่ได้รับค่อนข้างต่ำเมื่อเทียบกับประเทศมาเลเซีย

ในปี 2557 พื้นที่ปลูกปาล์มน้ำมันทั้งหมด 4,023,819 ไร่ ได้ผลผลิตจำนวน 12,472,505 ตัน ในปี 2558 มีพื้นที่ปลูกปาล์มน้ำมันทั้งหมด 4,276,240 ไร่ ได้ผลผลิตจำนวน 11,015,872 ตัน และในปี 2559 มีพื้นที่ปลูกปาล์มน้ำมันทั้งหมด 4,515,679 ไร่ และได้ผลผลิตจำนวน 10,944,884 ตัน จะเห็นได้ว่ามีพื้นที่ปลูกเพิ่มมากขึ้นในทุกปี ซึ่งในภาคใต้จะมีพื้นที่ปลูกปาล์มน้ำมันมากที่สุด (ศูนย์สารสนเทศการเกษตร, 2560) ในปี 2559 มีการนำเข้าเมล็ดปาล์มน้ำมันและเนื้อในเมล็ดปาล์มจำนวน 2,721,402 กิโลกรัม มีมูลค่า 58,661,853 บาท (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2560) จากการที่ประเทศไทยมีการนำเข้าเมล็ดปาล์มน้ำมันในปริมาณมาก ทำให้มีการเสี่ยงในการติดมาของศัตรูพืชกักกันที่สำคัญที่อาจติดมากับเมล็ดพันธุ์ได้ โดยเฉพาะโรคเหี่ยวของปาล์มน้ำมันสาเหตุเกิดจากรา *Fusarium oxysporum* f.sp. *elaeidis* ซึ่งราชนิดนี้เป็น seed borne สามารถถ่ายทอดโรคทางเมล็ดพันธุ์และติดมากับละอองเกสรได้ โรคนี้มีถิ่นกำเนิดมาจากในส่วนตอนกลางและทางตะวันตกของประเทศแอฟริกา ได้แก่ประเทศไนจีเรีย กานา คาแมรูน และคองโก ต่อมามีการแพร่ระบาดเข้ามาในประเทศบราซิล และเอกวาดอร์ (Oritsejafor, 1989) ประเทศไทยมีการนำเข้าเมล็ดปาล์มน้ำมันมาจากเบนิน ปาปัวนิวกินี คองโก ไอเวอรี่โคสท์ คอสตาริกา และอินโดนีเซีย เช่น คอสตาริกา ปาปัวนิวกินี คองโก เบนิน ไอโวรีโคต บราซิล และอินเดีย เป็นต้น ทำให้มีความเสี่ยงที่รา *F. oxysporum* f.sp. *elaeidis* จะติดมากับเมล็ดพันธุ์ได้ จึงมีความจำเป็นที่จะต้องทำการสำรวจสถานภาพของรา *F. oxysporum* f.sp. *elaeidis* ในพื้นที่ปลูกปาล์มน้ำมันของประเทศไทยอย่างเป็นระบบ เพื่อให้ได้

ข้อมูลในการการสนับสนุนการออกประกาศเรื่องการปลอดศัตรูพืช ตลอดจนที่ดำเนินการโดย NPPO เป็นกระบวนการช่วยตรวจหาศัตรูพืชชนิดใหม่ได้ทันเวลา การให้การรับรองพื้นที่ปลอดศัตรูพืช เป็นต้น การสำรวจ ติดตามและตรวจสอบศัตรูพืชเป็นงานพื้นฐานที่มีความจำเป็นสำหรับใช้ในการดำเนินการด้านอื่นๆ อีก เช่น การวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช การกำหนดพื้นที่ปลอดศัตรูพืช การจัดทำบัญชีรายชื่อศัตรูพืชและการรายงานศัตรูพืช เป็นต้น ซึ่งแนวทางการดำเนินงานจะสอดคล้องกับ ISPMs (International Standard for Phytosanitary Measures) ฉบับที่ 6 (Guidelines for Surveillance)

ดังนั้นการทดลองนี้มีวัตถุประสงค์ เพื่อศึกษาการปรากฏ/ไม่ปรากฏ และได้ข้อมูลสถานภาพของรา *F. oxysporum* f.sp. *elaeidis* ในแหล่งปลูกปาล์มน้ำมันในพื้นที่ภาคใต้ของประเทศไทย เพื่อใช้สนับสนุนการออกประกาศการปลอดศัตรูพืช โดยหน่วยงานองค์กรอารักขาพืชแห่งชาติ (NPPO)

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. อุปกรณ์เก็บตัวอย่าง ได้แก่ ถุงพลาสติก ถุงกระดาษ กรรไกรตัดแต่งกิ่ง ไม้ทับตัวอย่าง กระดาษหนังสือพิมพ์ ซองกระดาษสำหรับเก็บและรักษาตัวอย่าง

2. อุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการ ได้แก่ เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง (centrifuge) เครื่อง Polymerase chain reaction (PCR machine) เครื่องเขย่า (vortex) เครื่อง tissue lyser gel tank เครื่องกำเนิดกระแสไฟ gel plate comb เครื่องถ่ายภาพเจล microwave micropipette ขนาด 10 100 200 และ 1000 ไมโครลิตร กล้องจุลทรรศน์แบบ compound กล้องจุลทรรศน์แบบ stereo พร้อมอุปกรณ์ถ่ายภาพ water bath และ heat block

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

4. อุปกรณ์เครื่องแก้ว ได้แก่ บิกเกอร์ ขวดดูแรน กระบอกตวง ตะเกียงแอลกอฮอล์ plate

5. สารเคมี ได้แก่ เอนไซม์สำหรับทำปฏิกิริยา Taq DNA Polymerase Phusion High-Fidelity DNA Polymerase Proteinase K enzyme Lithium Borate buffer (LB) ชุดสำหรับการสกัดดีเอ็นเอ ได้แก่ Microbial DNA Isolation Kit Power Plant Isolation Kit ชุดสำหรับการสกัดเจล ชุดสำหรับทำความสะอาดดีเอ็นเอ Stain G loading dye agarose gel (PCR grade) PCR water DNA ladder อาหารเลี้ยงเชื้อ เช่น potato dextrose agar (PDA) และ ไพร์เมอร์ LROR/LR5 (Vilgalys and Hester, 1990)

6. Sequence assemble programs ได้แก่ Geneious

วิธีการ

1. การเก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างจากแปลงปลูกปาล์มน้ำมันในเขตพื้นที่ภาคใต้ของประเทศไทยเพิ่มเติม โดยพิจารณาข้อมูลที่ได้จากการสำรวจในปี 2559 และ 2560 โดยดำเนินการเก็บตัวอย่างตามมาตรฐานระหว่างประเทศว่าด้วยมาตรการสุขอนามัยพืชฉบับที่ 6 (Guidelines for surveillance: ISPM No. 6) วางแผนการสำรวจอย่างน้อย 10 แปลง ต่อพื้นที่ แต่ละแปลงทำการสุ่มตัวอย่างแบบเป็นระบบ โดยเดินตามเส้นทแยงมุม สังเกตลักษณะอาการ และหากพบต้นปาล์มน้ำมันที่แสดงอาการเหี่ยว ให้ทำการเปรียบเทียบลักษณะของต้นปาล์มน้ำมันที่พบ ภาพในคู่มือสำหรับการสำรวจโรคเหี่ยวปาล์มน้ำมันที่เกิดจากรา *F. oxysporum* f.sp. *elaeidis* บันทึกลักษณะอาการที่พบ ถ่ายรูป เก็บตัวอย่างโรคทุกต้นที่สุ่มที่พบต้นปาล์มน้ำมันแสดงอาการคล้ายกับโรคเหี่ยวตามคู่มือการสำรวจ และสำหรับต้นปกติ สุ่มเก็บตัวอย่างราก และดินบริเวณรอบราก โดยสุ่มเก็บจากต้นปาล์ม 20 ต้น/แปลง หรือ 10 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่แปลง เก็บดินใส่ถุงพลาสติก และห่อรากด้วยกระดาษหนังสือพิมพ์ เขียนรายละเอียดกำกับเพื่อนำมาตรวจแยกเชื้อในห้องปฏิบัติการ

2. การแยกราสาเหตุโรคพืช

ศึกษาลักษณะอาการของโรค และแยกราโดยตรงจากเนื้อเยื่อพืช

นำตัวอย่างที่แสดงอาการต้องสงสัย มาศึกษาลักษณะอาการของโรค และแยกราโดยตรงจากชิ้นส่วนพืช และตัดขวางรากพืชเพื่อดูการเข้าทำลายของเชื้อที่ราก ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ stereo หรือ ทำ moist chamber บ่มที่อุณหภูมิห้องปฏิบัติการ นาน 5-10 วัน เมื่อพบราสร้างเส้นใยหรือ conidium ตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และใช้เข็มเขี่ยส่วนของเชื้อรามาวางบนสไลด์ หรือใช้ใบมีดตัดขวางชิ้นส่วนพืชให้บาง ๆ และตรวจดูลักษณะต่าง ๆ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ compound ถ่ายรูปลักษณะเชื้อและบันทึกลักษณะต่าง ๆ ของเชื้อ

แยกราโดยวิธี Tissue transplanting

นำส่วนของพืชที่แสดงอาการต้องสงสัย รวมถึงพืชปกติที่ทำการสุ่มเก็บตัวอย่าง มาตัดเป็นชิ้นสี่เหลี่ยมขนาดประมาณ 0.5x0.5 มิลลิเมตร ให้คาบต่อส่วนที่เป็นโรคและไม่เป็นโรค แช่ในสารละลายโซเดียมไฮโปรคลอไรท์ 10 % เป็นเวลา 3-5 นาที ล้างในน้ำนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง นำไปซับบนกระดาษที่ผ่านการฆ่าเชื้อให้แห้ง แล้วนำไปเลี้ยงบนอาหาร RBA บ่มที่อุณหภูมิ ห้องปฏิบัติการ นาน 7-21 วัน แยกราให้บริสุทธิ์ และเลี้ยงบนอาหาร PDA

3. ศึกษา และจำแนกชนิดของราโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ศึกษารูปร่างลักษณะของราภายใต้กล้องจุลทรรศน์ stereo และ compound microscope โดยตรวจดูลักษณะเส้นใย conidiophore conidia และโครงสร้างอื่น ๆ ของรา โดยอ้างอิงข้อมูลของ Booth (1971) และ Brayford (1992) โดยการ mount slide ด้วยน้ำหรือ shear's solution

ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของราได้แก่ ลักษณะของเส้นใย ขนาด สี ลักษณะของ conidia conidiophore สี ขนาด ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ stereo และ compound microscope บันทึกขนาด รูปร่าง และบันทึกภาพด้วยกล้องถ่ายภาพ

4. จำแนกชนิดของราโดยใช้ข้อมูลพันธุกรรม

สกัดดีเอ็นเอ

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

เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมาย

เพิ่มปริมาณ ribosomal DNA ตำแหน่ง the Large Subunit (LSU) และ translation elongation factor (EF1) ด้วยวิธีการ Polymerase Chain Reaction (PCR) โดยใช้ high fidelity Phusion DNA Polymerase ของบริษัท New England Biolabs ใช้ cycling และ condition ของปฏิกิริยาตามที่ผู้ผลิตแนะนำใช้ primer LROR/LR5 (Vilgalys and Hester, 1990) Ef1/Ef2 (Geiser *et al.,* 2004) ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมาย กำหนดใช้ค่า annealing temperature ที่ 60 และ 58 องศาเซลเซียส ตามลำดับ

การตรวจสอบผลิตภัณฑ์ PCR

ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำ PCR โดยตรวจสอบขนาดของชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่ต้องการ ด้วยวิธี อิเล็กโทรโฟรีซิส (Electrophoresis) ทำการผสมผลิตภัณฑ์ PCR ด้วย loading dye และ stain ในปริมาตร 4 1 และ 1 ไมโครลิตร ตามลำดับ ผสมให้เข้ากันจากนั้นหยอดลงใน agarose gel ที่ความเข้มข้น 1% ให้ผลิตภัณฑ์ PCR เคลื่อนที่ผ่านสารละลาย Lithium Borate buffer (LB buffer) ส่งผลิตภัณฑ์ PCR ไปยัง บริษัท Macrogen Korea เพื่อทำให้ผลิตภัณฑ์ PCR บริสุทธิ์ และหาลำดับนิวคลีโอไทด์

การวิเคราะห์ และตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์

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

การจัดเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์

นำ contig ของลำดับนิวคลีโอไทด์ (consencus sequence ที่บันทึกไว้ในรูปแบบ fasta ไฟล์) มาจัดเรียง (align) ด้วยโปรแกรม MAFFT 6.611 (Katoh and Toh, 2008) จากนั้นตรวจสอบการจัดเรียง (alignment) โดยวิธี MUSCLE ในโปรแกรม the MEGA (Kumar et al., 2008) จากนั้นใช้โปรแกรม Gblocks (Talavera and Castresana, 2007) ทำการรวมชุดข้อมูลของดีเอ็นเอตำแหน่ง

LSU และ EF1 เป็น combined dataset บันทึกชุด alignment ในรูปแบบไฟล์ .nexus หรือ .nex โดยใช้โปรแกรม Mesquite

วิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการเพื่อการจัดจำแนก

ประมวลผลและวิเคราะห์ข้อมูล ใช้สองเกณฑ์มาตรฐานคือ Maximum Likelihood และ Bayesian Inference เตรียมชุดของข้อมูลที่จะใช้ในการวิเคราะห์ในแต่ละวิธี ดังนี้

Maximum Likelihood (ML) เตรียมไฟล์ .phy ใช้โปรแกรม RAxML v8.1.15(Stamatakis, 2014) ในการวิเคราะห์ กำหนดค่า model of evolution แบบ GTRGAMMA วิเคราะห์ด้วย rapid bootstrap (command –f a) เริ่มวิเคราะห์จาก random starting tree และ กำหนดค่า 1000 ซ้ำสำหรับ maximum likelihood bootstrap

Bayesian inference (BI) เตรียมไฟล์ .nexus ใช้โปรแกรม MrBayes (Ronquist and Huelsenbeck, 2003) โดยใช้วิธี Markov Chain Monte Carlo (MCMC) ค่าตั้งต้นที่ใช้ในการวิเคราะห์ดังนี้

Mcmc startingtree=user ngen=10 000 000 temp=0.25 nruns=4samplefreq=1000 pintfreq=1000 nchains=4 savebrlens=yes stoprules=yes stopval=0.01; ปรับค่า generation temperature substitution model parameters จำนวน generation และ burnin เพื่อให้ได้ concensus topology ตรวจสอบความเชื่อมั่นของผลวิเคราะห์ด้วย cumulative and compare functions ด้วย AWTY (Nylander *et al.*, 2008)

การบันทึกข้อมูล

1. บันทึกข้อมูลสถานการณ์รา *F. oxysporum* f.sp. *elaeidis* ในพื้นที่ปลูกปาล์มน้ำมันของประเทศไทย ปีที่ 2
2. บันทึกข้อมูล เก็บรักษาสายพันธุ์เชื้อรา และเก็บรักษาดีเอ็นเอต้นแบบที่ได้จากการศึกษาเชื้อราที่แยกได้เก็บรักษาไว้ใน Culture Collection ของกลุ่มวิจัยโรคพืชโดยเลี้ยงบนอาหาร PDA Slant ในหลอดแก้ว เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส ข้อมูลของรหัสดีเอ็นเอ (DNA barcode) จะถูกเก็บบันทึก และรายงานเพื่อใช้เป็นข้อมูลอ้างอิงสำหรับการจัดทำบัญชีรายชื่อโรคพืช รวมถึงสามารถใช้เป็นข้อมูลประกอบในการศึกษาด้านวิวัฒนาการต่อไป และดีเอ็นเอต้นแบบที่สกัดได้ จะจัดเก็บไว้ที่อุณหภูมิ –40 องศาเซลเซียส ณ พิพิธภัณฑ์โรคพืช กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
3. วิเคราะห์ผล สรุปและเขียนรายงาน

เวลาและสถานที่

ตุลาคม 2558 – กันยายน 2560

กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

แปลงปาล์มน้ำมันในประเทศ

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. การเก็บตัวอย่าง

ดำเนินการสำรวจ รวบรวมและเก็บตัวอย่างเพื่อแยกเชื้อรา *Fusarium* spp. จากตัวอย่าง ดิน จากพื้นที่ปลูกปาล์มน้ำมัน รากปาล์มน้ำมัน และพืชอาศัยในพื้นที่ปลูกปาล์มจากพื้นที่จังหวัดเพชรบุรี กระบี่ ชุมพร นครศรีธรรมราช พังงา ประจวบคีรีขันธ์ ตรัง สุราษฎร์ธานี และเชียงใหม่ ระหว่างเดือน ตุลาคม 2558 – กันยายน 2560 จำนวน 70 แปลง 142 ตัวอย่าง (Table 1) ทำการจัดจำแนกชนิด และจัดกลุ่มของรา *Fusarium* spp. และเลือกเอาไอโซเลทตัวแทนมาทำการสกัดดีเอ็นเอ

2. การแยกราสาเหตุโรคพืช

นำราก และดินบริเวณรอบรากนำมาแยกเชื้อราจากรากปาล์มน้ำมัน และพืชอาศัยด้วยวิธี tissue transplanting และแยกจากดินด้วยวิธี dilution plate บนอาหาร rose bengal agar ได้รา *Fusarium* spp. จำนวน 79 ไอโซเลท

3. ศึกษา และจำแนกชนิดของราโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

เมื่อตรวจสอบราที่แยกได้ทั้ง 79 ไอโซเลท ในห้องปฏิบัติการโดยศึกษาลักษณะสปอร์ด้วยกล้องจุลทรรศน์ stereo และ compound ยังไม่พบรา *Fusarium* ที่มีลักษณะคล้าย *F. oxysporum* f.sp. *elaeidis* ทำการจัดจำแนกชนิดและจัดกลุ่มของรา *Fusarium* spp. และเลือกเอาไอโซเลทตัวแทนมาทำการสกัดดีเอ็นเอ

4. จำแนกชนิดของราโดยใช้ข้อมูลพันธุกรรม

ทำการสกัด DNA จากตัวอย่างรา *Fusarium* spp. จำนวน 5 ไอโซเลท ทำการเพิ่มปริมาณ DNA ตำแหน่ง 28S และ ITS ด้วยวิธี PCR นำข้อมูลดีเอ็นเอ (consensus sequence) ที่ได้มาทำการเปรียบเทียบโดยวิธี BLASTN พบว่ารา *Fusarium* ไอโซเลทที่ทำการทดสอบ คือ *F. solani*

รวบรวมข้อมูลทางพันธุกรรมของรา *F. oxysporum* complex เพื่อใช้ในการวิเคราะห์เปรียบเทียบเปรียบเทียบข้อมูลการจำแนกด้วยข้อมูลพันธุกรรมกับรา *F. oxysporum* f.sp. *elaeidis* ได้จำนวน 100 ชนิด จาก 256 ชนิด จาก GenBank Fusarium MLST และ Fusarium ID (Table 2)

พบข้อมูลเพิ่มเติมว่ากระบวนการงอกของเมล็ดสามารถกำจัดรา *F. oxysporum* f.sp. *elaeidis* ที่อาศัยในเมล็ดปาล์มได้เนื่องจากในกระบวนการมีการแช่ด้วยสารเคมีป้องกันกำจัดโรคพืชในระยะเวลาหนึ่ง ทั้งนี้ และผลจากการตรวจเมล็ดพันธุ์ปาล์มน้ำมันที่มีการนำเข้ามาจากต่างประเทศได้แก่ เบนิน คอสตาริก้า และมาเลเซีย ตั้งแต่เดือน มกราคม – กันยายน 2560 ไม่พบรา *F. oxysporum* f.sp. *elaeidis* (Table 3) (ข้อมูลจากกลุ่มวิจัยการกักกันพืช สอพ.) ณ ขณะที่ทำการศึกษา ยังไม่พบการปรากฏของรา *F. oxysporum* f.sp. *elaeidis* ในประเทศไทย

การจำแนกโดยการเปรียบเทียบข้อมูลพันธุกรรมจะนำมาใช้ในการจำแนกรา *Fusarium* spp. ที่แยกได้ต่อไป เก็บรา *Fusarium* spp. ที่แยกได้ บนอาหาร PDA slant ในหลอดแก้ว เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียสใน Culture Collection ของกลุ่มวิจัยโรคพืช เก็บบันทึกข้อมูลของรหัสดี

เอ็นเอที่ได้ เพื่อใช้เป็นข้อมูลสำหรับการศึกษาและทดลองต่อไป และจัดเก็บไว้ที่อุณหภูมิ –40 องศาเซลเซียส ณ พิพิธภัณฑ์โรคพืช กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

จากผลการสำรวจสถานภาพของรา *F. oxysporum* f.sp. *elaeidis* ในช่วงเดือนตุลาคม 2558 – เดือนกันยายน 2560 ในแหล่งปลูกปาล์มน้ำมัน ในพื้นที่จังหวัดเพชรบุรี กระบี่ ชุมพร นครศรีธรรมราช พังงา ประจวบคีรีขันธ์ ตรัง สุราษฎร์ธานี และเชียงใหม่ ไม่พบต้นที่แสดงอาการเหี่ยวที่มีลักษณะการเข้าทำลายของรา *F. oxysporum* f.sp. *elaeidis* เมื่อทดลองตัดทางใบเพื่อดูลักษณะท่อน้ำของทางใบที่มีลักษณะแห้งและทิ้งทางใบ ไม่พบลักษณะที่บ่งชี้ว่ามีการเข้าทำลายของราสาเหตุ เก็บรากและดินบริเวณรอบรากปาล์ม จำนวน 142 ตัวอย่าง จากแปลงปลูกปาล์มน้ำมันจำนวน 70 แปลง และนำมาแยกได้รา *Fusarium* spp. จำนวน 79 ไอโซเลท ตรวจสอบราที่แยกได้ทั้ง 79 ไอโซเลท ในห้องปฏิบัติการโดยศึกษาลักษณะสปอร์ด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิด stereo และ compound ไม่พบราที่มีลักษณะคล้าย *F. oxysporum* f.sp. *elaeidis* จัดทำกลุ่มของรา *Fusarium* spp. และจำแนกด้วยการเปรียบเทียบข้อมูลพันธุกรรมของรา *Fusarium* spp. จำนวน 5 ไอโซเลท โดยการเปรียบเทียบเบื้องต้นด้วยตำแหน่ง 28S และ ITS ไม่พบราสาเหตุของโรคเหี่ยวของปาล์มน้ำมัน ดังนั้น รา *F. oxysporum* f.sp. *elaeidis* ไม่ปรากฏในพื้นที่ปลูกปาล์มน้ำมันของประเทศไทย อย่างไรตาม รา *Fusarium* spp. ที่ทำการแยกได้ควรทำการจัดจำแนกด้วยข้อมูลพันธุกรรมต่อไป รวมถึงการเพิ่มตำแหน่งของยีนหรือดีเอ็นเอเป้าหมาย เพื่อเพิ่มความเชื่อมั่นของข้อมูลสถานะภาพของการไม่ปรากฏของรา *F. oxysporum* f.sp. *elaeidis* ในประเทศไทย

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณ นางสาวศรีสุรางค์ ลิขิตเอกราช อดีตผู้เชี่ยวชาญด้านโรคพืช กรมวิชาการเกษตร สำหรับคำปรึกษา คำแนะนำ และแนวทางที่เป็นประโยชน์ต่อการปฏิบัติงาน ขอขอบคุณพี่ๆ และน้องๆ กลุ่มงานวิทยาไมโค กลุ่มวิจัยโรคพืช ที่ให้ความร่วมมือและความช่วยเหลือในการเก็บตัวอย่าง การดำเนินการทดลอง และการเก็บข้อมูล รวมถึงกำลังใจที่มีให้กันเสมอมา

เอกสารอ้างอิง

ศูนย์สารสนเทศการเกษตร สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2560. *ปาล์มน้ำมัน: เนื้อที่ให้ผล ผลผลิตและผลผลิตต่อไร่ ปี 2557 – 2559*. (ระบบออนไลน์). แหล่งข้อมูล : http://www.oae.go.th/download/prcai/farmcrop/palm.pdf (25 กุมภาพันธ์ 2560).

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2560. *สถิติการนำเข้า (Import) เมล็ดปาล์มและเนื้อในเมล็ดปาล์ม: ปริมาณและมูลค่าการนำเข้ารายเดือน*. (ระบบออนไลน์). แหล่งข้อมูล : http://www.oae.go.th/oae_report/export_import/import_result.php (25 กุมภาพันธ์ 2560).

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

Brayford, D. 1992. *Fusarium oxysporum* f.sp. *elaeidis*. IMI Descriptions of Fungi and Bacteria. Set 112, No 1116. *Mycopathologia*. 118: 49-50.

Cooper, R.M. 2011. *Fusarium* Wilt of oil palm: a continuing threat to South East Asian plantations. *The Planter Kuala Lumpur*. 87 (1023): 409-418.

Cooper, R.M. 2011. *Fusarium oxysporum* wilt of oil palm: seed contamination, intercontinental spread and the development of eradication and rapid detection for seed quarantine. pp. 29-46. *In:* Pfenning, L.H., Mitzubuti, E.S.G. and M.L.G. Resende, (eds.) *Annals of 11th Symposium of Management of Plant Diseases*. Brazil: Brazilian Society of Plant Pathology.

Corley, R.H.V. and P.B.H. Tinker. 2003. *The Oil Palm*. Blackwell Scientific Press, Oxford. 592 p.

Franqueville, H. and S. Diabaté. 1995. Oil palm vascular wilt in West Africa. Plantations, Recherche. *Développement*. 2(4): 5-13.

Geiser, D.M., Jiminez-Gasco, M., Kang, S., Makalowski, I., Veeraraghavan, N., Ward, T.J, Zhang, N., Kuldau, G.A. and K. O'Donnell. 2004. *Fuarium*-ID v.10; a DNA sequence data vase for identifying *Fusarium*. *European Journal of Plant Pathology*. 119: 473-479.

Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S., Buxton, S., Cooper, A., Markowitz, S., Duran, C., Thierer, T., Ashton, B., Mentjies, P. and A. Drummond. 2012. Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*. 28 (12): 1647-1649.

McMaugh, T. 2005. *Guidelines for Surveillance for Plant Pests in Asia and the Pacific*. ACIAR Monograph No. 119. 192 p.

Mepsted, R. 1992. *Studies on Fusarium wilt of oil palm*. PhD Thesis. Bath, UK: University of Bath.

Mepsted, R., Flood, J. and R.M. Cooper RM. 1995. *Fusarium* wilt of oil palm II. Stunting as a mechanism to reduce water stress. *Physiological and Molecular Plant Pathology.* 46 (5): 373-387.

Oritsejafor, J.J. 1989. Status of the oil palm vascular wilt disease in Nigeria. In NIFOR, eds. *International Conference on Oil Palm and Palm Products*. Benin City, Nigeria: NIFOR.

Prendergast, A.G. 1957. Observations on the epidemiology of vascular wilt disease of the oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). *Journal of the West African Institute for Oil Palm Research*. 2: 148-175.

Rees, R.W., Flood, J., Hasan, Y. and R.M. Cooper. 2007. Effect of inoculum potential, shading and soil temperature on root infection of oil palm seedlings by the basal stem rot pathogen *Ganoderma boninense*. *Plant Pathology.* 56: 862-870.

Renard, J.L. and H. Franqueville. 1989. Oil palm vascular wilt. *Oléagineux (Paris).* 44 (7): 341-349.

Renard, J. L., Noiret, J.M. and J. Meunier. 1980. Sources and ranges of resistance to *Fusarium* wilt in the oil palms *Elaeis guineensis* and *Elaeis melanococca*. *Oleagineux.* 35: 387-393.

UK CAB International. 1996. *Fusarium oxysporum* f.sp. *elaeidis*. *Distribution Maps of Plant Diseases*, December (Edition 3): Map 471.

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

Wardlaw, C.W. 1946. *Fusarium oxysporum* on the oil palm. *Nature*. 158: 712.

Wardlaw, C.W. 1950. Vascular wilt disease of the oil palm caused by *Fusarium oxysporum* Schl. *Tropical Agriculture.* 27: 42-47.

Table 1 Soil and root samples used in this study (2015 – 2017)

Sample No.		Province	District	Sub-district	Village	Latitude	Longitude
OPS01	OPR01	Surat Thani	Mueang	Khlong Noi		9° 08' 44"N	99° 15' 57"E
OPS02	OPR02	Surat Thani	Phunphin	Si Wichai		9° 09' 58"N	99° 14' 01"E
OPS03	OPR03	Surat Thani	Phunphin	Si Wichai		9° 09' 58"N	99° 13' 59"E
OPS04	OPR04	Surat Thani	Phrasaeng	Bang Sawan		8° 38' 29"N	98° 58' 18"E
OPS05	OPR05	Surat Thani	Phrasaeng	Bang Sawan		8° 38' 33"N	98° 58' 04"E
OPS06	OPR06	Surat Thani	Khian Sa	Ban Khian Sa	Plai Lik	8° 50' 24"N	99° 10' 55"E
OPS07	OPR07	Surat Thani	Khian Sa	Khian Sa	Ban Sadet	8° 47' 40"N	99° 09' 46"E
OPS08	OPR08	Surat Thani	Khian Sa	Khian Sa	Ban Huay Nam Tao	8° 45' 37"N	99° 09' 46"E
OPS09	OPR09	Surat Thani	Khian Sa	Khian Sa	Ban Huay Nam Tao	8° 45' 37"N	99° 09' 48"E
OPS10	OPR10	Surat Thani	Khian Sa	Ban Khian Sa	Phuang Phromkhon	8° 40' 32"N	99° 07' 29"E
OPS11	OPR11	Surat Thani	Phrasaeng	Bang Sawan	Ban Bang Sawan	8° 35' 10"N	98° 55' 08"E
OPS12	OPR12	Krabi	Plai Phraya	Plai Phraya	Ban Klongpuan	8° 36' 57"N	98° 53' 05"E
OPS13	OPR13	Krabi	Plai Phraya	Plai Phraya	Ban Klongpuan	8° 36' 51"N	98° 53' 08"E
OPS14	OPR14	Krabi	Plai Phraya	Plai Phraya	Ban Klongpuan	8° 36' 51"N	98° 53' 08"E
OPS15	OPR15	Krabi	Plai Phraya	Plai Phraya	Ban Nha Suan	8° 36' 02"N	98° 54' 10"E
OPS16	OPR16	Phang-nga	Khura Buri	Khura Buri	Mae Ya Nang Kao	9° 9' 13.35"N	98° 25' 29"E
OPS17	OPR17	Chumphon	Mueang	Thung Kha	Ban Thung Kha	10° 22' 50"N	99° 07' 13"E
OPS18	OPR18	Chumphon	Mueang	Thung Kha	Ban Thung Kha	10° 23' 14"N	99° 06' 47"E
OPS19	OPR19	Surat Thani	Phrasaeng	Bang Sawan	Ban Bang Sawan	8° 35' 46"N	98° 56' 54"E
OPS20	OPR20	Surat Thani	Phrasaeng	Bang Sawan	Ban Bang Sawan	8° 36' 24"N	98° 57' 27"E
OPS21	OPR21	Surat Thani	Phrasaeng	Bang Sawan	Ban Bang Sawan	8° 38' 29"N	99° 01' 52"E
OPS22	OPR22	Surat Thani	Phrasaeng	Bang Sawan	Ban Bang Sawan	8° 38' 28"N	99° 04' 07"E
OPS23	OPR23	Surat Thani	Phrasaeng	Bang Sawan	Ban Bang Sawan	8° 55' 45"N	99° 15' 31"E
OPS24	OPR24	Surat Thani	Phrasaeng	Bang Sawan	Ban Bang Sawan	8° 59' 12"N	99° 12' 23"E
OPS25	OPR25	Surat Thani	Mueang	Khlong Noi		9° 08' 44"N	99° 15' 57"E
OPS26	OPR26	Surat Thani	Mueang	Khlong Noi		9° 08' 45"N	99° 15' 57"E
OPS27	OPR27	Surat Thani	Mueang	Khlong Noi		9° 08' 45"N	99° 15' 56"E
OPS28	OPR28	Surat Thani	Mueang	Khlong Noi		9° 08' 46"N	99° 15' 57"E
OPS29	OPR29	Surat Thani	Mueang	Khlong Noi		9° 08' 50"N	99° 15' 57"E
OPS30	OPR30	Surat Thani	Mueang	Khlong Noi		9° 08' 50"N	99° 15' 57"E
OPS31	OPR31	Surat Thani	Mueang	Khlong Noi		9° 08' 50"N	99° 15' 57"E
OPS32	OPR32	Surat Thani	Mueang	Khlong Noi		9° 08' 50"N	99° 15' 57"E
OPS33	OPR33	Surat Thani	Mueang	Khlong Noi		9° 08' 48"N	99° 15' 56"E
OPS34	OPR34	Surat Thani	Mueang	Khlong Noi		9° 08' 43"N	99° 16' 06"E
OPS35	OPR35	Surat Thani	Mueang	Bang Bai Mai		9° 08' 08"N	99° 16' 44"E
OPS36	OPR36	Surat Thani	Mueang	Bang Bai Mai		9° 07' 56"N	99° 17' 01"E
OPS37	OPR37	Nakhon Si Thammarat	Sichon	Sichon	Kao Fai	9° 02' 10"N	99° 51' 20"E
OPS38	OPR38	Nakhon Si Thammarat	Sichon	Sichon	Kao Fai	9° 01' 56"N	99° 52' 07"E
OPS39	OPR39	Nakhon Si Thammarat	Sichon	Sichon	Kao Fai	9° 01' 56"N	99° 52' 07"E
OPS40	OPR40	Nakhon Si Thammarat	Sichon	Sichon	Klong Tha Ruea	9° 01' 27"N	99° 52' 33"E

Table 1 Soil and root samples used in this study (2015 – 2017) (Continued)

Sample No.		Province	District	Sub-district	Village	Latitude	Longitude
OPS41	OPR41	Nakhon Si Thammarat	Sichon	Sichon		9° 01' 13"N	99° 52' 25"E
OPS42	OPR42	Nakhon Si Thammarat	Sichon	Sichon		8° 19' 17"N	99° 57' 49"E
OPS43	OPR43	Nakhon Si Thammarat	Chaloem Phra Kiat	Suan Luang		8° 10' 34"N	100° 02' 30"E
OPS44	OPR44	Nakhon Si Thammarat	Chaloem Phra Kiat	Thang Phun		8° 10' 51"N	100° 02' 10"E
OPS45	OPR45	Nakhon Si Thammarat	Chaloem Phra Kiat	Thang Phun		8° 10' 52"N	100° 02' 11"E
OPS46	OPR46	Nakhon Si Thammarat	Phra Phrom	Na Phur		8° 19' 30"N	99° 56' 06"E
OPS47	OPR47	Prachuap Khiri Khan	Mueang	Bo Nok		11° 58' 13"N	99° 48' 28"E
OPS48	OPR48	Trang	Wang Wiset			7° 44' 30"N	99° 21' 37"E
OPS49	OPR49	Trang	Huai Yot			7° 45' 25"N	99° 26' 54"E
OPS50	OPR50	Nakhon Si Thammarat	Thungsong	Khlong Noi	Ban Bang Poh	8° 07' 19"N	99° 39' 58"E
OPS51	OPR51	Nakhon Si Thammarat	Pak Phanang	Khlong Noi	Ban Bang Nian	8° 21' 50"N	100° 05' 18"E
OPS52	OPR52	Chiangmai	San Khampang	Ban Mor		18° 49' 32"N	99° 13' 04"E
OPS53	OPR53	Chiangmai	San Khampang	Ban Mor		18° 49' 31"N	99° 13' 07"E
OPS54	OPR54	Chiangmai	San Khampang			18° 49' 31"N	99° 13' 20"E
OPS55	OPR55	Chiangmai	San Khampang			18° 49' 35"N	99° 13' 09"E

Table 2 *Fusarium oxysporum* species complex

Group	Source	ID as	f.sp.	Name FD_xx	Alternative ID	MLST type	EF-1a	GenBank EF1	IGS	GenBank LSU	GenBank ITS
1	Human	F. oxysporum		00049	1943 (NRRL)	1	TCGTCGTCATCGGCCACG TCGACTCTGGCAAGTCGA	>FJ985264 Fusarium oxysporum NRRL 1943	TTGTTACGATCTGCTGAG GGTAAGCCGTCCTTCGCC	>FJ985445 Fusarium oxysporum NRRL 1943	
1	Human eye	F. oxysporum		00120	26360 (NRRL) FRC O-0755		TCGTCGTCATCGGCCACG TCGACTCTGGCAAGTCGA		TTGTTACGATCTGCTGAG GGTAAGCCGTCCTTCGCC		
2	Birds Foot Trefoil (Lotus corniculatus)	F. oxysporum		00595	38316 (NRRL) FRC O-1778		GACAAGACTCACCTTAA CGTCGTCGTCATCGGCCA		TTGTTACGATCTGCTGAG GGTAAGCCGTCCTTCGCC		>U34577 Fusarium inflexum NRRL 20433
2	Bean (Vicia faba)	F. inflexum		01216	20433 (NRRL)	2	TCGTCGTCATCGGCCACG TCGACTCTGGCAAGTCGA	>AF008479 Fusarium inflexum NRRL 20433	TGCCAGAACGCGGTGAT ACCACCCGCACGTATAG	>FJ985446 Fusarium oxysporum fsp fabae	>U34577 Fusarium inflexum NRRL 20433
2	Flax (Linum usitatissimum)	F. oxysporum		01217	29094 (NRRL)		TCGTCGTCATCGGCCACG TCGACTCTGGCAAGTCGA				
3	Melon (Cucumis melo var.	F. oxysporum	f.sp. melonis	00051	22518 (NRRL) ATCC 32669	3	GTCGACTCTGGCAAGTCG ACCACTGTGAGTACTCTC	>FJ985265 Fusarium oxysporum fsp melonis	TTGTTACGATCTGCTGAG GGTAAGCCGTCCTTCGCC	>FJ985447 Fusarium oxysporum fsp melonis	
3	Cucumber (Cucumis sativus)	F. oxysporum	f.sp. melonis	00481	36385 (NRRL) CBS 254.52		GACAAGACTCACCTTAA CGTCGTCGTCATCGGCCA		TTGTTACGATCTGCTGAG GGTAAGCCGTCCTTCGCC		
3	Cucurbita sp.	F. oxysporum	f.sp. melonis	00712	38516 (NRRL) ICMP 8357		GACAAGACTCACCTTAA CGTCGTCGTCATCGGCCA		TTGTTACGATCTGCTGAG GGTAAGCCGTCCTTCGCC		
4	Melon (Cucumis melo var.	F. oxysporum	f.sp. melonis	00052	22519 (NRRL) ATCC 22519	4	GACAAGACTCACCTTAA CGTCGTCGTCATCGGCCA	>FJ985266 Fusarium oxysporum fsp melonis	TTGTTACGATCTGCTGAG GGTAAGCCGTCCTTCGCC	>FJ985448 Fusarium oxysporum fsp melonis	
5	Aechmea fasciata Type strain; causing wilt	F. oxysporum	f.sp. aechmeae	00055	22533 (NRRL) CBS 244.61	5	GACAAGACTCACCTTAA CGTCGTCGTCATCGGCCA	>AY527622 Fusarium oxysporum fsp	TTGTTACGATCTGCTGAG GGTAAGCCGTCCTTCGCC	>FJ985449 Fusarium oxysporum fsp	
6	Apium sp.	F. oxysporum	f.sp. apii	00056	22534 (NRRL) CBS 175.35	6	GACAAGACTCACCTTAA CGTCGTCGTCATCGGCCA	>FJ985267 Fusarium oxysporum fsp apii	TTGTTACGATCTGCTGAG GGTAAGCCGTCCTTCGCC	>FJ985450 Fusarium oxysporum fsp apii	
7	Sweet potato (Ipomoea batatas)	F. oxysporum	f.sp. batatas	00057	22535 (NRRL) CBS 172.30	7	GACAAGACTCACCTTAA CGTCGTCGTCATCGGCCA		TTGTTACGATCTGCTGAG GGTAAGCCGTCCTTCGCC	>FJ985451 Fusarium oxysporum fsp batatas	
7	Gladiolus sp.	F. oxysporum		00480	36382 (NRRL) CBS 253.52		GACAAGACTCACCTTAA CGTCGTCGTCATCGGCCA		TTGTTACGATCTGCTGAG GGTAAGCCGTCCTTCGCC		
8	Aster (Callistephus sinensis)	F. oxysporum	f.sp. callistephi	00058	22536 (NRRL) CBS 182.35	8	GACAAGACTCACCTTAA CGTCGTCGTCATCGGCCA		TTGTTACGATCTGCTGAG GGTAAGCCGTCCTTCGCC	>FJ985452 Fusarium oxysporum fsp	
8	Narcissus sp. bulb rot	F. oxysporum		00066	22547 (NRRL) CBS 196.65	8	GACAAGACTCACCTTAA CGTCGTCGTCATCGGCCA		TTGTTACGATCTGCTGAG GGTAAGCCGTCCTTCGCC		
9	Orchid (Phalaenopsis sp.)	F. oxysporum	f.sp. cattleyae	00059	22537 (NRRL) CBS 742.79	9	GACAAGACTCACCTTAA CGTCGTCGTCATCGGCCA	>FJ985268 Fusarium oxysporum fsp	TTGTTACGATCTGCTGAG GGTAAGCCGTCCTTCGCC	>AY490760 Mycosphaerella	>AY490760 Mycosphaerella
10	Chrysanthemum sp.	F. oxysporum	f.sp. chrysanthe	00061	22539 (NRRL) CBS 129.81	10	ACAAGACTCACCTTAAC GTCGTCGTCATCGGCCAC	>FJ985269 Fusarium oxysporum fsp	TTGTTACGATCTGCTGAG GGTAAGCCGTCCTTCGCC	>FJ985454 Fusarium oxysporum fsp	
11	Oil palm (Elaeis guineensis),	F. oxysporum	f.sp. elaeidis	00062	22543 (NRRL) CBS 783.83	11	GACAAGACTCACCTTAA CGTCGTCGTCATCGGCCA	>FJ985270 Fusarium oxysporum fsp elaeidis	TTGTTACGATCTGCTGAG GGTAAGCCGTCCTTCGCC	>FJ985455 Fusarium oxysporum fsp elaeidis	
11	Oil palm (Elaeis guineensis) trunk,	F. oxysporum		00592	38313 (NRRL) FRC O-1379		GACAAGACTCACCTTAA CGTCGTCGTCATCGGCCA		TTGTTACGATCTGCTGAG GGTAAGCCGTCCTTCGCC		
11	Oil palm (Elaeis guineensis) seed,	F. oxysporum		00593	38314 (NRRL) FRC O-1743		GACAAGACTCACCTTAA CGTCGTCGTCATCGGCCA		TTGTTACGATCTGCTGAG GGTAAGCCGTCCTTCGCC		
12	Tomato (Solanum esculentum)	F. oxysporum	f.sp. lycopersici	00063	22544 (NRRL) CBS 167.30	12	GACAAGACTCACCTTAA CGTCGTCGTCATCGGCCA	>FJ985271 Fusarium oxysporum fsp	TTGTTACGATCTGCTGAG GGTAAGCCGTCCTTCGCC	>FJ985456 Fusarium oxysporum fsp	
12	Onion (Allium cepa)	F. oxysporum		00694	38495 (NRRL) ICMP 5188		GACAAGACTCACCTTAA CGTCGTCGTCATCGGCCA		TTGTTACGATCTGCTGAG GGTAAGCCGTCCTTCGCC		
13	Stock (Matthiola incana) vascular bundle of wilting	F. oxysporum	f. sp. matthiolae		22545 (NRRL) CBS 247.61	13				>FJ985457 Fusarium oxysporum f. sp.	
14	Tea (Thea sinensis)	F. oxysporum	f. sp. medicaginis		22546 (NRRL) CBS 221.49	14				>FJ985458 Fusarium oxysporum fsp	
15	Cactus (Zygocactus truncatus)	F. oxysporum	f. sp. opuntiarum		22548 (NRRL) CBS 743.79	15				>FJ985459 Fusarium oxysporum fsp	
16	Passion fruit (Passiflora edulis),	F. oxysporum	f.sp. passiflorae		22549 (NRRL) CBS 744.79	16	>AF008505 Fusarium oxysporum f.sp.	>AF008505 Fusarium oxysporum f.sp.		>FJ985460 Fusarium oxysporum f.sp.	
17	Mimosa (Albizia julibrissin)	F. oxysporum	f.sp. perniciosum		22550 (NRRL) CBS 794.70	17		>AF008506 Fusarium oxysporum f.sp.		>FJ985461 Fusarium oxysporum f.sp.	
18	Pine (Pinus sp.)	F. oxysporum	f.sp. pini		22551 (NRRL) CBS 171.31	18		>FJ985272 Fusarium oxysporum f.sp. pini		>FJ985462 Fusarium oxysporum f.sp. pini	>U28161 Fusarium oxysporum NRRL 22551
19	Radish (Raphanus sativus)	F. oxysporum	f. sp. raphani		22553 (NRRL) CBS 488.76	19		>FJ985273 Fusarium oxysporum f. sp.		>FJ985463 Fusarium oxysporum f. sp.	
20	Chrysanthemum sp.	F. oxysporum	f. sp. tracheiphilum		22554 (NRRL) CBS 130.81	20		>FJ985274 Fusarium oxysporum f. sp.		>FJ985464 Fusarium oxysporum f. sp.	
21	Potato (Solanum tuberosum)	F. oxysporum	f. sp. tuberosi		22555 (NRRL) CBS 797.70	21		>AF008511 Fusarium oxysporum f. sp.		>FJ985465 Fusarium oxysporum f.	
22	Tulipa sp.	F. oxysporum	f. sp. tulipae		22556 (NRRL) CBS 242.59	22		>FJ985275 Fusarium oxysporum f. sp.		>FJ985466 Fusarium oxysporum f. sp.	
23	Cotton (Gossypium sp.)	F. oxysporum	f. sp. vasinfectum		NRRL 22557 CBS 173.28	23		>FJ985276 Fusarium oxysporum f. sp.		>FJ985467 Fusarium oxysporum f. sp.	
24	Soil nonpathogenic	F. oxysporum	-		NRRL 25357 Alabouvette	24		>AF008481 Fusarium oxysporum NRRL 25357		>FJ985468 Fusarium oxysporum NRRL 25357	
25	Terminalia ivorensis seed	F. oxysporum	-		NRRL 25369 IMI 312016	25		>AF008482 Fusarium oxysporum NRRL 25369			

Table 3 The results of quarantine pest inspection on imported oil palm seeds between January – September 2017

No	Country of the origin	No of imported seeds	Results
1	BENIN	90,000	No pest detected
2	COSTA RICA	47,000	No pest detected
3	COSTA RICA	16,000	No pest detected
4	COSTA RICA	47,167	No pest detected
5	COSTA RICA	66,000	No pest detected
6	COSTA RICA	18,000	No pest detected
7	COSTA RICA	75	No pest detected
8	MALAYSIA	4,200	No pest detected
9	MALAYSIA	31,500	No pest detected
10	MALAYSIA	10,500	No pest detected
11	MALAYSIA	3,300	No pest detected
12	MALAYSIA	10,500	No pest detected
	Total	344,242	-