วารสารเกษตรพระจอมเกล้า 2560 : 35 (2) : 84 - 94

การจำแนกชนิดของเชื้อรา *Corynespora torulosa* (Sydow) Cros ไอโซเลท SJ1 สาเหตุโรคใบจุดของกล้วยไข่และการเข้าทำลายของเชื้อราสาเหตุโรค

Identification of *Corynespora torulosa* (Sydow) Cros Isolate SJ1, the Causal Agent of Leaf Spot Disease on Banana cv. Kluai Khai and Infection of the Pathogen

วีระณีย์ ทองศรี[1*] สุมาพร แสงเงิน[1] อทิตยา ปาลคะเชนทร์[1]
สมศิริ แสงโชติ[1] จักรพงษ์ หรั่งเจริญ[2] พัชรวิภา ใจจักรคำ[1] และปัฐวิภา สงกุมาร
Veeranee Tongsri,[1*] Sumaporn Sangngern,[1] Atittaya Palakachain,[1] Somsiri Sangchote,[1]
Chakrapong Rangjaroen,[2] Patcharavipa Chaijuckam,[1] and Pattavipha Songkumarn[1]

บทคัดย่อ

โรคใบจุดของกล้วย เป็นโรคที่มีความสำคัญต่อการผลิตกล้วยไข่เพื่อการส่งออกในแหล่งปลูกภาคตะวันออกของประเทศไทย โดยทำให้ผลผลิตไม่ได้ขนาดและสูญเสียน้ำหนัก ตลอดจนเกิดอันตรายต่อสุขภาพของผู้ผลิตเนื่องจากมีการใช้สารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อราอย่างต่อเนื่องในแหล่งปลูก ซึ่งโรคดังกล่าวยังไม่มีการศึกษาให้เป็นปัจจุบันมากนักในประเทศไทย ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นศึกษาการเข้าทำลาย การงอกของสปอร์ และการจำแนกชนิดของเชื้อราสาเหตุโรคโดยวิธีชีวโมเลกุล โดยทำการแยกเชื้อราจากกล้วยไข่ที่แสดงอาการใบจุดจาก 3 แหล่งปลูก คือ จังหวัดจันทบุรี ตราด และระยอง พบสกุลของเชื้อราก่อโรค คือ *Corynespora* sp. ไอโซเลท SJ1 โดยเชื้อราดังกล่าวทำให้เนื้อเยื่อพืชเกิดการติดเชื้อและปรากฏอาการจุดสีน้ำตาลขนาดเล็กที่ 3 วันหลังจากปลูกเชื้อ ต่อมาแผลขยายใหญ่มีวงแหวนสีเหลืองล้อมรอบ และทำให้เนื้อเยื่อพืชตายที่ 7 วันหลังจากปลูกเชื้อ สปอร์ของเชื้อราสามารถงอกบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ได้ภายใน 1 ชั่วโมง โดยที่ความหนาแน่นต่ำสุดของสปอร์ที่ 2,400 สปอร์ต่อตารางเซนติเมตรทำให้เกิดการติดเชื้อของเนื้อเยื่อพืชมากที่สุด และเชื้อราสามารถเข้าทำลายใบกล้วยที่บริเวณท้องใบได้ดีกว่าหลังใบ และเมื่อจำแนกชนิดของเชื้อราด้วยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ rDNA ITS1 และ ITS4 พบว่าได้ผลผลิตปฏิกิริยา PCR ขนาด 590 คู่เบส ซึ่งมีความคล้ายคลึงกับเชื้อรา *Corynespora torulosa* strain CPC15989 (Accession no. KF777154.1) และ *Corynespora cassiicola* (Accession no. GQ407100.1) ที่ระดับ identity 99% และเมื่อจัดกลุ่มความสัมพันธ์ของเชื้อราร่วมกับการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยา พบว่าเชื้อรา *Corynespora* sp. ไอโซเลท SJ1 จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับเชื้อรา *Corynespora torulosa* ซึ่งข้อมูลที่ได้จากงานวิจัยนี้จะเป็นประโยชน์ต่อการศึกษาโรคใบจุดของกล้วยในระดับที่สูงขึ้นต่อไป

คำสำคัญ : ใบจุดกล้วย การงอกของสปอร์ การจำแนกเชื้อรา ไฟโลจีเนติกทรี

Abstract

Banana leaf spot is an important disease on the production of banana cv. Kluai Khai for export in eastern region of Thailand. It causes a significant reduction in either standard-fruit size for export or weight loss. Furthermore, it also affects health of the growers due to the continue use a lot of fungicide for controlling the disease for long periods of time. Unfortunately, to recent times, there has been far too little study on this disease in Thailand. This research aims to study on infection of the causal fungus and its conidial germination. It also focuses on identification of the pathogen by molecular technique. The causal agent was isolated from diseased leaves harvested from 3 banana growing areas: Chanthaburi, Trat and Rayong

[1] ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ 10900
[2] สาขาวิชาเทคโนโลยีการจัดการการเกษตร คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏพระนคร กรุงเทพฯ 10220
*Corresponding author

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

provinces. The result revealed that the plant pathogenic fungus, *Corynespora* sp. isolate SJ1 was obtained. This pathogen infected the leaf tissues and expressed the tiny spot symptoms within 3 days after inoculation. The lesions later expanded and exhibited yellow haloes surrounding the spots, subsequently the necrotic areas were exposed after 7 days after inoculation. Additionally, conidial germination of the pathogen was assayed. The results showed that conidia could germinate within a 1-hour period on PDA. The best infection on banana leaf by the pathogen was observed at the minimum conidial density of 2,400 conidia/cm^2. The infection of pathogen on plant tissue was prevalent at the abaxial surface of the leaf. Moreover, identification of the pathogen by nucleotide sequencing analysis of rDNA-ITS region was determined. It was shown that the PCR product of *Corynespora* sp. isolate SJ1 was 590 base pairs, and it was similar to *Corynespora torulosa* strain CPC15989 (Accession no. KF777154.1) and *Corynespora cassiicola* (Accession no. GQ407100.1) with 99% identity. Phylogenetic tree analysis and morphological study of this pathogen were also investigated. The result showed that *Corynespora* sp. isolate SJ1 was identified as *Corynespora torulosa*. The knowledge obtained from this study will be useful for investigation of leaf spot disease of banana for future research.

Keywords: banana leaf spot, spore germination, fungal identification, phylogenetic tree

คำนำ

กล้วยไข่ (*Musa* AA Group) เป็นไม้ผลเศรษฐกิจที่ถูกส่งเสริมให้มีการขยายพื้นที่ปลูกให้มากขึ้นในแต่ละปีเป็นลำดับ เพื่อสนองต่อความต้องการของตลาดต่างประเทศที่มีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นทุกๆ ปี โดยในปี 2557 มีพื้นที่ให้ผลผลิต 34,194 ไร่ ได้น้ำหนักของผลผลิต 96,154 ตัน ซึ่งเพิ่มขึ้นจากปี 2556 1.3 เปอร์เซ็นต์ ผลผลิตที่ได้นำมาใช้ในประเทศ 69,919 ตัน และส่งออกในรูปกล้วยไข่สด 26,232 ตัน คิดเป็นมูลค่า 317.08 ล้านบาท ซึ่งมากกว่าปี 2556 ถึง 111.8 เปอร์เซ็นต์ พื้นที่ปลูกที่สำคัญได้แก่จังหวัดจันทบุรี นครสวรรค์ เพชรบุรี ตาก และชุมพร มีประเทศคู่ค้าที่สำคัญ คือ จีน ฮ่องกง และเวียตนาม (ศูนย์สารสนเทศการเกษตร, 2557) ด้วยเหตุที่เกษตรกรมีการขยายพื้นที่สำหรับปลูกกล้วยไข่เป็นพืชเชิงเดี่ยวมากขึ้นทุกๆ ปี เพื่อรองรับการขยายตลาดต่างประเทศให้มากขึ้น โดยเฉพาะในแถบภาคตะวันออกของประเทศไทย ทั้งในเขตพื้นที่จังหวัดจันทบุรี ตราด และระยอง จึงส่งผลให้เกิดปัญหาการระบาดของโรคใบจุดเป็นไปอย่างกว้างขวางในปัจจุบัน (จากการประเมินด้วยสายตาและสัมภาษณ์เกษตรกร) โดยลักษณะอาการของโรคเริ่มแรกจะพบเป็นจุดสีน้ำตาลขนาดเล็กที่ใบล่าง ต่อมาแผลจะขยายเป็นขีดยาวสีน้ำตาลเข้มตามเส้นใบและมีขนาดกว้างขึ้น มีวงแหวน (halo) สีเหลืองล้อมรอบแผล เมื่ออายุแผลมากขึ้นเนื้อเยื่อพืชจะเปลี่ยนเป็นสีเทาและพบการสร้างสปอร์ของเชื้อราอยู่กลางแผล เมื่อแต่ละแผลขยายขนาดมาเชื่อมต่อกันจะทำให้ปรากฏอาการใบไหม้สีดำเป็นผืนใหญ่ ส่งผลให้ใบกล้วยแห้งตายอย่างรวดเร็ว ในประเทศไทยมีรายงานของ จริยา (2553) ที่ได้ศึกษาเกี่ยวกับโรคใบจุดซิกาโตกาสีเหลืองของกล้วยไข่ ซึ่งมีสาเหตุจากเชื้อรา *Pseudocercospora musae* ในแถบจังหวัดแพร่ นครสวรรค์ และชุมพร โดยพบว่าในแปลงที่เป็นโรครุนแรงจะทำให้น้ำหนักเฉลี่ยต่อเครือลดลงมากกว่า 5 กิโลกรัมเมื่อเปรียบเทียบกับแปลงที่ไม่เป็นโรค ซึ่งเชื้อรา *P. musae* ดังกล่าวมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดในระดับพันธุกรรมกับเชื้อรา *P. fijiensis* สาเหตุโรคใบจุดซิกาโตกาสีดำของกล้วยในต่างประเทศ (Carlier, 2000) ซึ่งยังไม่มีรายงานการปรากฏโรคนี้ในประเทศไทยแต่อย่างใด อย่างไรก็ตาม นอกจากเชื้อรา *P.musae* จะเป็นสาเหตุโรคใบจุดของกล้วยแล้ว ยังมีรายงานเชื้อราในสกุลอื่นๆ ที่ก่อให้เกิดโรคใบจุดในกล้วยได้ทั้งในและต่างประเทศ ได้แก่เชื้อราในสกุล *Corynespora* spp. *Curvularia* spp. *Alternaria* spp. *Nigrospora* spp. *Septoria* spp. และ *Phyllosticta* spp.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(สุมาพร และคณะ, 2558; อทิตยา และคณะ, 2558; Meredith, 1963; Jacome *et al.,* 2002; Udugama, 2002; Kamhawy, 2006; Wulandari *et al.,* 2010; Wong *et al.,*2012; Amani and Avagyan, 2014) แต่ในประเทศไทยยังไม่มีรายงานถึงลักษณะการเข้าทำลายของเชื้อราสาเหตุโรคบนใบกล้วย และยังมีเชื้อราก่อโรคหลายสกุล (genus) ที่ยังไม่ได้จำแนกในระดับชนิด (species) เพื่อให้เป็นปัจจุบัน ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นศึกษาการเข้าทำลายของเชื้อราสาเหตุโรคบนใบกล้วยไข่ การงอกของสปอร์ และการจำแนกชนิดของเชื้อราก่อโรค เพื่อให้เป็นข้อมูลพื้นฐานและเกิดประโยชน์ต่อการศึกษาโรคใบจุดของกล้วยในระดับที่สูงขึ้น อันจะก่อให้เกิดการจัดการโรคที่มีประสิทธิภาพต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

1. เก็บตัวอย่างและแยกเชื้อราสาเหตุโรค

สุ่มเก็บตัวอย่างโรคใบจุดจากแหล่งปลูกกล้วยไข่ในภาคตะวันออก ได้แก่ อำเภอท่าใหม่ จังหวัดจันทบุรี อำเภอบ่อไร่ จังหวัดตราด และอำเภอแกลง จังหวัดระยอง โดยสุ่มเก็บพื้นที่ละ 3 แปลงๆ ละ 20 ต้น แล้วนำมาแยกเชื้อโดยวิธี tissue transplanting technique เพื่อให้ได้เป็นเชื้อบริสุทธิ์ โดยตัดเนื้อเยื่อใบบริเวณรอยต่อระหว่างแผลและเนื้อเยื่อปกติ ขนาด 3x3 มิลลิเมตร ฆ่าเชื้อบริเวณผิวรอบนอกด้วยคลอร็อกซ์ 10 เปอร์เซ็นต์ (v/v) เป็นเวลา 5 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 2 ครั้ง นำมาผึ่งแห้งในตู้ปลอดเชื้อ จากนั้นย้ายชิ้นส่วนพืชลงวางบนจานอาหาร potato dextrose agar (PDA) บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ตัดส่วนรอบนอกโคโลนีของเชื้อราที่เจริญออกมาจากเนื้อเยื่อพืชมาเลี้ยงเป็นเชื้อบริสุทธิ์ และเก็บในอาหารเอียงเพื่อไว้ศึกษาในขั้นตอนต่อไป

2. ทดสอบความสามารถในการก่อโรค

นำเชื้อราที่แยกได้จากข้อ 1 มาทดสอบความสามารถในการก่อโรคบนใบกล้วยไข่ โดยวิธี detached leaf technique ซึ่งตัดใบกล้วยให้มีขนาด 10 x 15 เซนติเมตร ปลูกเชื้อโดยใช้ชิ้นวุ้นของเชื้อราขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตรลงบนท้องใบ (abaxial surface) วางแผนการทดลองแบบ CRD จำนวน 3 ซ้ำ ซ้ำละ 3 ใบ บ่มใบกล้วยในกล่องพลาสติกชื้นที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 85 เปอร์เซ็นต์ ภายใต้แสงสว่างสลับมืด 12/12 ชั่วโมง เป็นเวลา 7 วัน บันทึกเส้นผ่าศูนย์กลางและลักษณะแผลที่ปรากฏ

3. ศึกษาการเข้าทำลายของเชื้อราสาเหตุโรค

เตรียมสปอร์แขวนลอยของเชื้อราสาเหตุโรคที่เลี้ยงบนอาหาร PDA เป็นเวลา 7 วัน โดยใส่น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อปริมาตร 20 มิลลิลิตรลงไป ใช้แท่งแก้วสามเหลี่ยมขูดผิวหน้าโคโลนีของเชื้อราเพื่อให้สปอร์หลุดออกมา กรองด้วยผ้าขาวบาง 3 ชั้นเพื่อเก็บสปอร์แขวนลอย จากนั้นพ่นสปอร์แขวนลอยของเชื้อราที่ความหนาแน่นต่างกัน ได้แก่ 600 1,200 2,400 และ 3,600 สปอร์ต่อตารางเซนติเมตร ลงบนท้องใบ (abaxial surface) ของกล้วยไข่ที่ตัดให้มีขนาด 10 x 15 เซนติเมตร โดยแยกจากกันในแต่ละความหนาแน่น (ดัดแปลงจากวิธีการของ Balint-Kurti *et al*., 2001) วางแผนการทดลองแบบ CRD จำนวน 3 ซ้ำ ซ้ำละ 3 ใบ บ่มใบกล้วยไว้ในกล่องพลาสติกชื้นที่ความชื้นสัมพัทธ์ 85 เปอร์เซ็นต์ ที่ 25 องศาเซลเซียส ภายใต้แสงสว่างสลับมืด 12/12 ชั่วโมง เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อ และนำสปอร์แขวนลอยที่ระดับความหนาแน่นที่ก่อให้เกิดการติดเชื้อมากที่สุด มาพ่นลงบนหลังและท้องใบของกล้วยไข่ โดยแยกจากกัน เพื่อเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อภายใน 24 ชั่วโมง

4. ศึกษาการงอกของสปอร์ของเชื้อราสาเหตุโรค

เตรียมสปอร์แขวนลอยของเชื้อราสาเหตุโรคที่ความเข้มข้น 500 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ดูดสปอร์แขวนลอย 100 ไมโครลิตรลงบนอาหาร water agar (WA) ใช้แท่งแก้วสามเหลี่ยมเกลี่ยให้ทั่วผิวหน้าอาหาร บ่มจานเลี้ยงเชื้อที่ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0 1 3 5 และ 7 ชั่วโมง วางแผนการทดลองแบบ CRD จำนวน 3 ซ้ำ ซ้ำละ 3 จาน เมื่อครบกำหนดในแต่ละช่วงเวลา บันทึกจำนวนการงอกของสปอร์ และขนาดความยาวของ germ tube ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ที่กำลังขยาย 400 เท่า โดยสุ่มนับจากแต่ละซ้ำ ซ้ำละ 300 สปอร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5. จำแนกชนิดของเชื้อราด้วยวิธีชีวโมเลกุล

การสกัด DNA ของเชื้อรา

นำเชื้อราไอโซเลทที่ก่อให้เกิดโรคมาจำแนกชนิดด้วยเทคนิคชีวโมเลกุล โดยทำการสกัด DNA ของเชื้อราซึ่งประยุกต์จากวิธีการของ Alexander *et al*. (2007) โดยเลี้ยงเชื้อราในอาหาร Malt Broth ในสภาพเขย่าเป็นเวลา 2-3 วัน จากนั้นใส่เส้นใยเชื้อรา 100 มิลลิกรัม ลงในหลอดปั่นเหวี่ยงขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติมสารละลายที่ 1 (Solution 1) ประกอบด้วย 0.1M NaCl 0.2M sucrose 0.01M EDTA และ 0.03M Tris-HCl ปริมาตร 200 ไมโครลิตร บดเส้นใยด้วยที่บดพลาสติก (polypropylene pestle) จากนั้นเติมสารละลายที่ 2 (Solution 2) ซึ่งประกอบด้วย 50mM Tris-HCl 50mM EDTA และ 2.5% SDS ปริมาตร 200 ไมโครลิตร จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เติมสารละลายที่ 3 (Solution 3) ประกอบด้วย potassium acetate และ acetic acid ปริมาตร 192 ไมโครลิตร และสาร chloroform:isoamyl alcohol (24:1) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร พลิกหลอดกลับไปมา และนำหลอดปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที จากนั้นดูดเฉพาะส่วนใสปริมาตร 450 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดใหม่ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติมสารละลาย isopropanol ที่เย็นจัด ปริมาตร 450 มิลลิลิตร พลิกหลอดกลับไปมาเพื่อให้ส่วนผสมเข้ากัน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที จากนั้นเทสารละลายในหลอดทิ้งไป ล้างตะกอน DNA ที่ก้นหลอดด้วย 70% ethyl alcohol ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงอีกครั้งที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เทสารละลาย ethyl alcohol ทิ้ง และทิ้งให้ตะกอน DNA ในหลอดปั่นเหวี่ยงแห้งที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นละลายตะกอน DNA ด้วย 1XTE buffer ปริมาตร 30 ไมโครลิตร และเก็บรักษา DNA ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

การทำ PCR (Polymerase Chain Reaction)

สำหรับการจำแนกเชื้อราสาเหตุโรคโดยการวิเคราะห์ลำดับเบสบริเวณ ITS rDNA ด้วยไพรเมอร์ ITS1 (5’ TCCGTAGGTGAACCTGCGG 3’) และ ITS4 (5’ TCCTCCGCTTATTGATATGC 3’) (White *et al*, 1990) ด้วยปฏิกิริยา PCR โดยใช้ปริมาตรรวมของปฏิกิริยา 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย 10xPCR buffer 2 ไมโครลิตร dNTP (2.5 mM each) 1.6 ไมโครลิตร Primer ITS1 (10 µM) และ ITS4 (10 µM) อย่างละ 0.4 ไมโครลิตร dH_2O (PCR grade) 14.5 ไมโครลิตร Taq DNA polymerase 0.1 ไมโครลิตร DNA template (1-100 ng) 1 ไมโครลิตร จากนั้นนำใส่ในเครื่อง Thermal Cycler รุ่น MiniCycler PTC-150 โดยจำนวนรอบในการทำ PCR คือ 35 รอบ ใช้เวลาและอุณหภูมิในการสังเคราะห์สายดีเอ็นเอ ดังนี้ Initial denaturation อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที denaturation อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที annealing อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที extension อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที และ final extension อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นตรวจสอบผลผลิตปฏิกิริยา PCR (PCR product) ที่ได้โดยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (agarose gel electrophoresis) โดยนำผลผลิตปฏิกิริยา PCR ผสมกับ Fluorescence dye (Novel juice) แล้วนำไปโหลดในอะกาโรสเจล 1% ใน 1xTBE buffer เวลา 30 นาที กระแสไฟ 100 โวลต์ ตรวจผลด้วยเครื่อง Gel Documentation

การวิเคราะห์ลำดับเบส (Sequencing analysis)

วิเคราะห์ลำดับเบสของดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยา PCR โดยส่งผลผลิตปฏิกิริยา PCR ไปวิเคราะห์ที่ห้องปฏิบัติการภายนอก ของบริษัท Macrogen ประเทศเกาหลี

การเปรียบเทียบลำดับเบส

นำลำดับเบสที่ได้มาเปรียบเทียบ (BLAST) กับฐานข้อมูลใน GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) และสร้างแผนภาพ Phylogenetic tree เพื่อเปรียบเทียบความสัมพันธ์ของเชื้อราในระดับสกุล (genus) และชนิด (species) กับฐานข้อมูลลำดับเบสสิ่งมีชีวิตที่มีอยู่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. เก็บตัวอย่างและแยกเชื้อราสาเหตุโรค

จากการแยกเชื้อราจากใบกล้วยไข่ที่แสดงอาการโรคใบจุดจากแหล่งปลูกต่างๆ ในภาคตะวันออก พบว่าสามารถแยกได้เชื้อราในสกุล *Corynespora* sp. ไอโซเลท SJ1 โดยเชื้อรามีลักษณะการเจริญของเส้นใยบนอาหาร potato dextrose agar (PDA) เป็นสีน้ำตาลอมเทา เส้นใยฟูเล็กน้อย (Figure 1A) สปอร์มีรูปร่างคล้ายกระบอง และมีขนาดของสปอร์เท่ากับ 18.8±2.6 x 56.41±5.7 ไมครอน โดยเซลล์ที่ฐานจะมีขนาดใหญ่กว่าด้านบน และตำแหน่งที่ฐานจะสังเกตเห็นโครงสร้าง protruding hilum ได้อย่างชัดเจน ผิวรอบนอกเรียบ สีเข้ม มีผนังกั้นแบบ pseudoseptum (Figure 1B) ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อราในสกุลดังกล่าวของพงษ์เทพ และกาญจณสินธุ์ (2530) และสุมาพร และคณะ (2558)

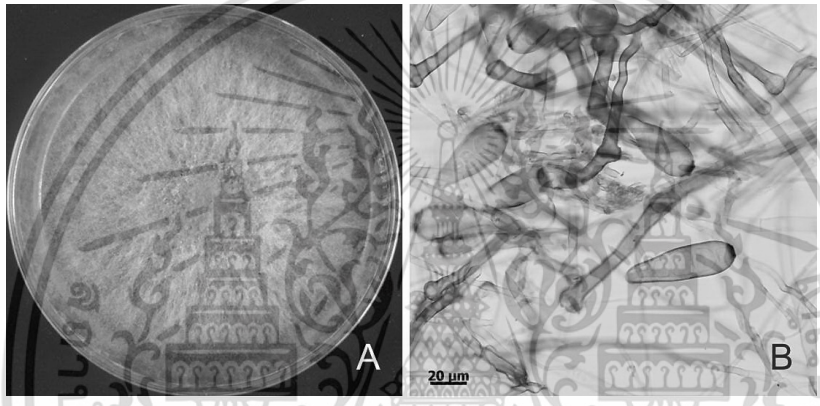

Figure 1 Morphological characteristics of *Corynespora* sp. isolate SJ1, causing agent of leaf spot disease on banana cv. Kluai Khai. (A) Colony morphology on PDA at 25ºC for 7 days. (B) Characteristics of conidia.

2. ทดสอบความสามารถในการก่อโรค

จากการนำเชื้อรา *Corynespora* sp. ไอโซเลท SJ1 ที่แยกได้จากข้อ 1 มาทดสอบความสามารถในการก่อโรคบนเนื้อเยื่อใบกล้วยไข่โดยวิธี detached leaf ซึ่งผ่านการปลูกเชื้อโดยวิธีวางชิ้นวุ้นของเชื้อราลงบนเนื้อเยื่อพืช เป็นเวลา 7 วัน พบว่าเชื้อรา *Corynespora* sp. ไอโซเลท SJ1 สามารถก่อให้เกิดโรคได้ โดยเนื้อเยื่อพืชที่เกิดการติดเชื้อจะปรากฏสีน้ำตาลที่ 3 วันหลังจากปลูกเชื้อ โดยมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางแผลประมาณ 2 มิลลิเมตร ต่อมาที่ 5 วันหลังจากปลูกเชื้อ แผลจะขยายขนาด และเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเข้ม พร้อมทั้งมีวงแหวนสีเหลือง (yellow halo) ล้อมรอบแผล และมีเส้นผ่าศูนย์กลางแผลประมาณ 17.5 มิลลิเมตร จนกระทั่งที่ 7 วันหลังจากปลูกเชื้อ แผลขยายลามเป็นจุดตายและปรากฏวงแหวนสีเหลืองอย่างชัดเจน โดยมีเส้นผ่าศูนย์กลางแผลประมาณ 23.7 มิลลิเมตร (Figure 2) และมีการเจริญของเส้นใยพร้อมทั้งผลิตสปอร์เป็นจำนวนมากอยู่บนแผล นอกจากนี้ได้ทำการปลูกเชื้อโดยวิธีพ่นสปอร์แขวนลอย (เข้มข้น 1,000 สปอร์ต่อมิลลิลิตร) ลงบนท้องใบ (abaxial surface) ก็ยังพบว่าเชื้อราสามารถก่อให้เกิดโรคได้ และพบการพัฒนาของแผลเช่นเดียวกับข้างต้น แต่ปรากฏแผลจุดสีน้ำตาลที่มีขนาดเล็กกว่า (data not shown) อย่างไรก็ตาม เชื้อราในสกุล *Corynespora* spp. เป็นเชื้อราที่สามารถเข้าทำลายพืชอื่นอีกได้หลายชนิด ได้แก่ ยางพารา โหระพา ถั่วเหลือง แตงกวา มะละกอ มะเขือเทศ และมันเทศ โดยพบว่ามักเป็นเชื้อรา *C.cassiicola* และเชื้อราดังกล่าวสามารถผลิตสารพิษชื่อ cassiicolin ซึ่งทำให้พืชแสดงอาการใบจุดและใบไหม้ และต่อมาจะทำให้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ใบร่วง (Barthe *et al.,* 2006; Dixon *et al.* 2009; Déon *et al.,* 2014)

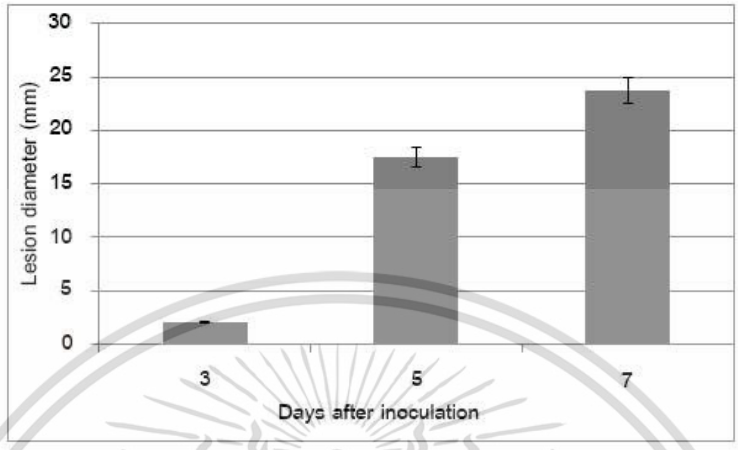

Figure 2 Lesion diameter on detached leaf of banana cv. Kluai Khai by agar disc inoculation of *Corynespora* sp. isolate SJ1, incubated at room temperature (25-32ºC) for different periods of time. Bars represent standard deviations of the mean.

3. ศึกษาการเข้าทำลายของเชื้อราสาเหตุโรค

จากการพ่นสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *Corynespora* sp. ไอโซเลท SJ1 ที่ความหนาแน่น 600 1,200 2,400 และ 3,600 สปอร์ต่อตารางเซนติเมตรลงบนท้องใบของกล้วยไข่ และบ่มเป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบว่า เชื้อราทำให้เกิดการติดเชื้อมากที่สุด ที่ความหนาแน่นต่ำสุดที่ 2,400 สปอร์ต่อตารางเซนติเมตร ซึ่งก่อให้เกิดการติดเชื้อถึง 81 เปอร์เซ็นต์ (Figure 3) ดังนั้น จึงใช้สปอร์ของเชื้อราที่ระดับความหนาแน่นดังกล่าวสำหรับปลูกเชื้อบนกล้วยไข่ทั้งที่หลังใบ (adaxial surface) และท้องใบ (abaxial surface) เพื่อศึกษาความสามารถในการเข้าทำลายของเชื้อราที่ 24 ชั่วโมง ซึ่งพบว่า บริเวณท้องใบพบการเข้าทำลายของเชื้อรามากกว่าบริเวณหลังใบ โดยพบการติดเชื้อบริเวณท้องใบ 35.7 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่พบการติดเชื้อบริเวณหลังใบเพียง 11.4 เปอร์เซ็นต์ (Figure 4) นั่นแสดงถึงเชื้อรามีการเข้าทำลายเนื้อเยื่อพืชที่บริเวณท้องใบได้ง่ายกว่า อาจจะมีสาเหตุเนื่องจากบริเวณท้องใบมีจำนวนปากใบมากกว่าบริเวณหลังใบ จึงเปิดโอกาสให้เชื้อราเจริญรุกรานเข้าไปได้ง่ายกว่า ประกอบกับที่บริเวณหลังใบมีชั้น wax ค่อนข้างหนากว่า จึงทำให้เกิดการติดเชื้อได้น้อยกว่าในช่วงที่มีการเริ่มติดเชื้อใหม่ๆ (O'Gara *et al.,* 2004)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

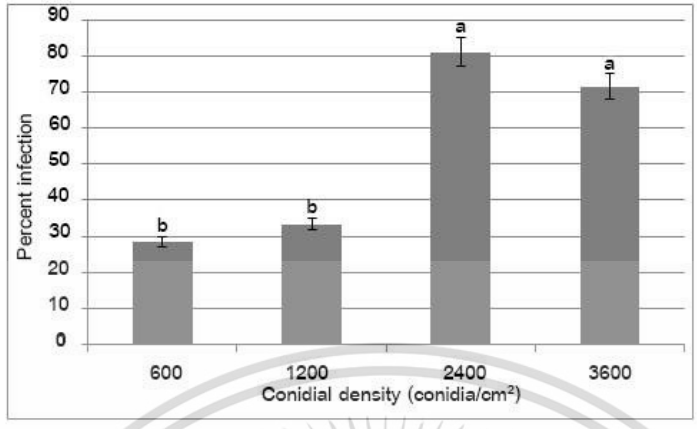

Figure 3 The average percentage of *Corynespora* sp. isolate SJ1 infection on detached leaf of banana cv. Kluai Khai after inoculation with various conidial densities, incubated at room temperature (25-32ºC) and 85% RH for 72 hours. The different letters on columns are significant difference at P = 0.05, according to DMRT. Bars represent standard deviations of the mean.

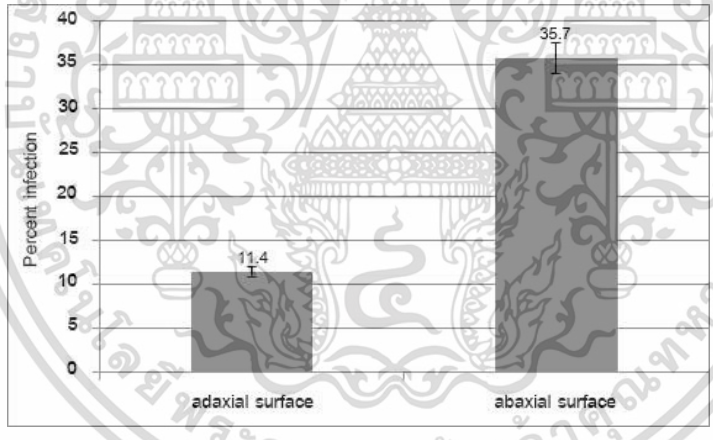

Figure 4 The average percentage of *Corynespora* sp. isolate SJ1 infection on detached leaf of banana cv Kluai Khai after inoculation with conidial density at 2,400 conidia/cm^2 on adaxial or abaxial surface of leaf, incubated at room temperature (25-32ºC) and 85% RH for 24 hours. Bars represent standard deviations of the mean.

4. ศึกษาการงอกของสปอร์ของเชื้อราสาเหตุโรค

จากการศึกษาการงอกของสปอร์ของเชื้อรา *Corynespora* sp. ไอโซเลท SJ1 บนอาหาร PDA ที่เวลา 0 1 3 5 และ 7 ชั่วโมง พบว่าสปอร์ของเชื้อราเริ่มงอกที่เวลา 1 ชั่วโมง มีเปอร์เซ็นต์การงอก 32.5 เปอร์เซ็นต์ และที่เวลา 3 ชั่วโมงพบการงอกเพิ่มสูงขึ้นเป็น 87% โดยในช่วงเวลาดังกล่าวเปอร์เซ็นต์การงอกของสปอร์ไม่แตกต่างจากช่วงเวลาที่ 5 และ 7 ชั่วโมง (Figure 5A) ในขณะที่การยืดยาวของ germ tube ของสปอร์เชื้อรา ในช่วงเวลาที่มากขึ้น germ tube จะมีความยาวมากขึ้นเป็นลำดับ ซึ่งในชั่วโมงที่ 7 นั้น germ tube ได้เริ่มพัฒนาเจริญไปเป็นเส้นใยแล้ว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(Figure 5B) การงอกของสปอร์ของเชื้อรา *Corynespora* sp. ไอโซเลท SJ1 นี้สามารถพบการงอกทั้งส่วนหัวและท้าย รวมถึงด้านข้างของเซลล์ (Figure 6) ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Fernando *et al.* (2012) ที่พบว่าสปอร์ของเชื้อรา *C. cassiicola* สามารถงอกได้ทั้งส่วนหัวและท้ายของสปอร์ โดยสามารถงอกได้ตั้งแต่ที่อุณหภูมิ 5-40 องศาเซลเซียส แต่อุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดอยู่ในช่วง 15-35 องศาเซลเซียส นอกจากนี้ Ogbebor and Adekunle (2005) รายงานว่าสปอร์ของเชื้อรา *C. cassiicola* ที่อยู่บนพื้นผิวของอาหารแข็งจะงอกได้ดีกว่าในอาหารเหลว และจากการที่สปอร์ของเชื้อรามีระยะเวลาในการงอกสั้น และ germ tube สามารถงอกได้จากหลายเซลล์ของสปอร์ จะทำให้เป็นการเพิ่มโอกาสในการเข้าทำลายพืชได้มากและเร็วขึ้น ซึ่ง Madhavi and Murthy (2001) กล่าวว่าขนาดความยาวของ germ tube ของเชื้อรา *C. casiicola* บนผิวพืชจะมีความผกผันกับความต้านทานของพืช โดยถ้า germ tube สั้น แสดงถึงพืชมีความต้านทาน ถ้าหาก germ tube ยาวแสดงถึงพืชมีความอ่อนแอต่อเชื้อราชนิดนี้

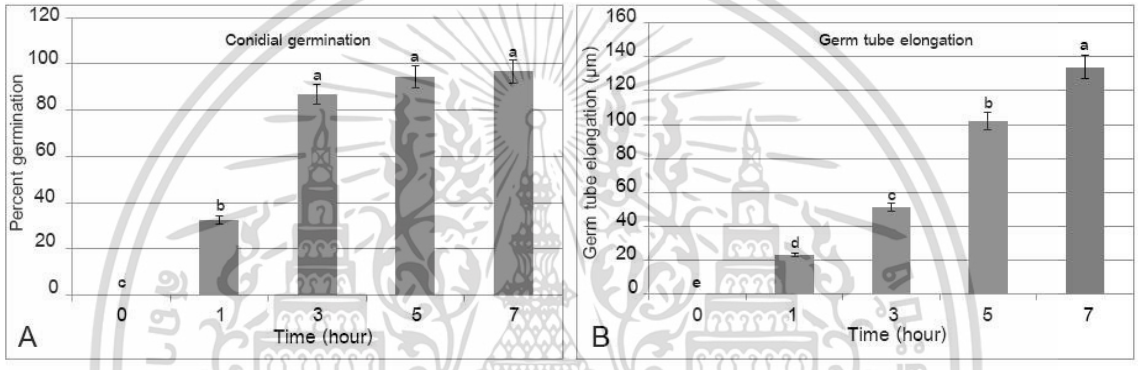

Figure 5 The average percentage of conidial germination (A) and germ tube elongation (B) of *Corynespora* sp. isolate SJ1 on PDA at different periods of time, incubated at room temperature (25-32ºC). Bars represent standard deviations of the mean.

Figure 6 Conidial germination of *Corynespora* sp. isolate SJ1 on PDA, incubated at room temperature (25-32ºC) for 3 hours. Germ tubes grow from the cell end of conidium (continuous arrows) and proliferate from the cell inside (dash arrow).

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5. จำแนกชนิดของเชื้อราด้วยวิธีชีวโมเลกุล

จากการทำปฏิกิริยาด้วย universal primer ITS1 และ ITS4 เพื่อเพิ่มปริมาณ DNA ที่บริเวณ internal transcribed spacer rRNA gene (ITS1-5.8s-ITS2) พบว่าได้ผลผลิตปฏิกิริยา PCR ของเชื้อรา *Corynespora* sp. ไอโซเลท SJ1 มีขนาด 590 คู่เบส โดยผลการระบุชนิดของเชื้อราจากลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ rDNA-ITS ดังกล่าว พบว่ามีความคล้ายคลึงกับเชื้อรา *Corynespora torulosa* strain CPC15989 (Accession no. KF777154.1) ซึ่งแยกได้จากกล้วยป่า (*Musa acuminata*) และเชื้อรา *Corynespora cassiicola* (Accession no. GQ407100.1) ที่ระดับ identity 99% (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) และได้แสดงแผนภาพความสัมพันธ์ (Phylogenetic tree) ด้วยวิธี Neighbor-joining พบว่าเชื้อรา *Corynespora* sp. ไอโซเลท SJ1 จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับเชื้อรา *Corynespora torulosa* โดยสามารถแยกกลุ่มกับเชื้อรา *Corynespora cassiicola* ที่ bootstrap 100% (Figure 7) และเมื่อเปรียบเทียบรูปร่างและขนาดของสปอร์ของเชื้อรา *Corynespora* sp. ไอโซเลท SJ1 กับเชื้อรา *Corynespora cassiicola* และ *Corynespora torulosa* ในฐานข้อมูล Mycobank (http://www.mycobank.org/quicksearch.aspx) พบว่ามีความใกล้เคียงกับสปอร์ของเชื้อรา *Corynespora torulosa* มากกว่า โดยไอโซเลท SJ1 มีขนาดของสปอร์ 18.8±2.6 x 56.41±5.7 ไมครอน ซึ่งมีความกว้างและสั้นกว่าสปอร์ของเชื้อรา *Corynespora cassiicola* (มีขนาดประมาณ 10 x 70 ไมครอน) (http://www.mycobank.org/quicksearch.aspx) ดังนั้น จึงสามารถจำแนกชนิดของเชื้อรา *Corynespora* sp. ไอโซเลท SJ1 เป็นเชื้อรา *Corynespora torulosa* ซึ่งจากผลการทดลองครั้งนี้มีความสอดคล้องกับการรายงานของ Crous และคณะ (2013) ที่พบว่าเชื้อรา *Corynespora torulosa* เป็นสาเหตุของโรคปลายใบไหม้สีดำของกล้วย ในขณะที่ Shanhai และคณะ (2011) พบว่าเชื้อรา *Corynespora cassiicola* สามารถก่อโรคใบจุดในกล้วยได้เช่นเดียวกัน อย่างไรก็ตาม ถึงแม้ในงานวิจัยนี้ จะพบการเข้าทำลายของเชื้อรา *Corynespora torulosa* ในกล้วยไข่เป็นครั้งแรกของประเทศไทย แต่เชื้อราชนิดดังกล่าวไม่ได้ถูกจัดให้เป็นศัตรูพืชต้องห้ามตามพระราชบัญญัติกักพืช พ.ศ. 2507 (ฉบับที่ 6 และ 7) พ.ศ. 2550 แต่อย่างใด

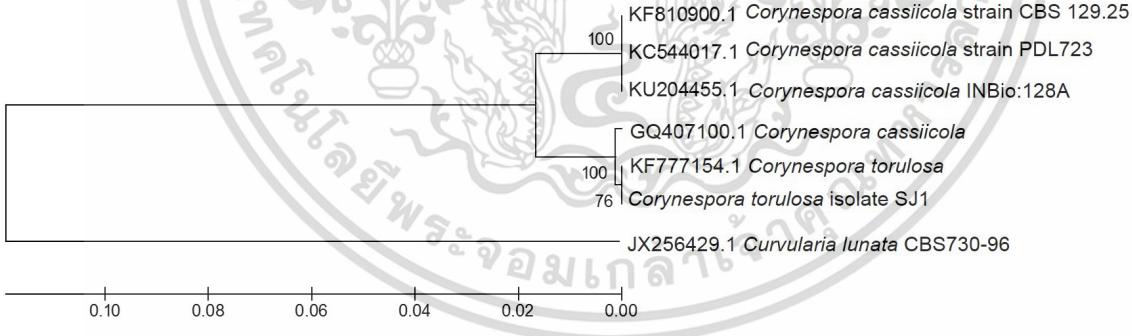

Figure 7 The neighbour-joining tree based on rDNA-ITS nucleotide sequence of *Corynespora torulosa* isolate SJ1, leaf spot causing agent of banana cv. Kluai Khai, comparing with those of *Corynespora* spp. and *Curvularia lunata* from EMBL and NCBI databases via MEGA Program 5.0 (bootstrap 1000 replicates).

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สรุป

จากการแยกเชื้อราสาเหตุโรคใบจุดของกล้วยไข่ในแหล่งปลูกภาคตะวันออกของประเทศไทย ได้แก่ จังหวัดจันทบุรี ตราด และระยอง พบเชื้อราก่อโรค คือ *Corynespora* sp. ไอโซเลท SJ1 โดยเชื้อราดังกล่าวทำให้เนื้อเยื่อพืชเกิดการติดเชื้อและปรากฏลักษณะอาการเป็นจุดสีน้ำตาลขนาดเล็กภายใน 3 วันหลังจากปลูกเชื้อ และที่ 7 วันหลังจากปลูกเชื้อเนื้อเยื่อพืชจะตายเป็นสีน้ำตาล และปรากฏวงแหวนสีเหลืองล้อมรอบ สปอร์ของเชื้อราสามารถงอกบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ได้ภายในเวลา 1 ชั่วโมง และเชื้อราสามารถเข้าทำลายใบกล้วยที่บริเวณท้องใบได้ดีกว่าหลังใบ และเมื่อจำแนกชนิดของเชื้อราด้วยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ rDNA-ITS1 และ ITS4 ร่วมกับการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยา พบว่าเชื้อรา *Corynespora* sp. ไอโซเลท SJ1 มีลำดับนิวคลีโอไทด์คล้ายคลึงกับเชื้อรา *Corynespora torulosa* strain CPC15989 (Accession no. KF777154.1) และเชื้อรา *Corynespora cassiicola* (Accession no. GQ407100.1) ที่ระดับ identity 99% แต่ลักษณะรูปร่างและขนาดของสปอร์มีความใกล้เคียงกับเชื้อรา *Corynespora torulosa* ดังนั้น จึงบ่งชี้ได้ว่าเชื้อรา *Corynespora* sp. ไอโซเลท SJ1 คือเชื้อรา *Corynespora torulosa* ไอโซเลท SJ1

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณสถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่สนับสนุนทุนวิจัยในครั้งนี้ และขอขอบคุณเกษตรกรผู้ปลูกกล้วยไข่ภาคตะวันออกที่อนุเคราะห์ให้ใช้พื้นที่ในการศึกษาวิจัย

เอกสารอ้างอิง

จริยา วิสิทธิ์พานิช. 2553. รายงานวิจัยโครงการการพัฒนาและถ่ายทอดเทคโนโลยีการผลิตกล้วยไข่คุณภาพเพื่อการส่งออก. แหล่งที่มา: http://elibrary.trf.or.th/project_content.asp?PJID=RDG5020048, 20 มิถุนายน 2559.

พงษ์เทพ ขจรไชยกุล และ กาญจณสินธุ์ มีศุข. 2530. โรคใบจุดก้างปลาของยางพารา. วารสารยางพารา. 8(2): 92-98.

ศูนย์สารสนเทศการเกษตร. 2557. สารสนเทศเศรษฐกิจการเกษตรรายสินค้า ปี 2557. สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 122 หน้า.

สุมาพร แสงเงิน สมศิริ แสงโชติ และวีระณีย์ ทองศรี. 2558. การพัฒนาการของโรคและระดับความต้านทานต่อสารเคมีคาร์เบนดาซิมของเชื้อราสาเหตุโรคใบจุดของกล้วยไข่เพื่อการส่งออกในภาคตะวันออกของประเทศไทย. วารสารเกษตรพระจอมเกล้า 33 (ฉบับพิเศษ 1): 830-836.

อทิตยา ปาลคะเชนทร์ สมศิริ แสงโชติ และวีระณีย์ ทองศรี. 2558. การสำรวจโรคใบจุดในแปลงกล้วยหอมทองอินทรีย์เพื่อการส่งออกความสามารถในการเกิดโรค และการควบคุมเชื้อสาเหตุโดยชีววิธี. วารสารเกษตรพระจอมเกล้า 33 (ฉบับพิเศษ 1): 727-734.

Alexander, P. J., G. Rajanikanth, C. D. Bacon and C. D. Bailey. 2007. Recovery of plant DNA using a reciprocating and silica-based columns. Mol. Ecol. Notes 7: 5-9.

Amani, M. and G. Avagyan. 2014. First report of banana Septoria leaf spot disease caused by *Septoria eumusae* in Iran. Intl J Farm & Alli Sci. 3(11): 1140-1144.

Balint-Kurti, P.J., G.D. May and A.C.L. Churchill. 2001. Development of a transformation system for *Mycosphaerella* pathogens of banana: a tool for the study of host/pathogen interactions. FEMS Microbiol. Lett. 195: 9-15.

Barthe, P., V. Pujade-Renaud, F. Breton, D. Gargani, R. Thai, C. Roumestand and F. de Lamotte. 2006. Structural analysis of Cassiicolin, a host-selective protein toxin from *Corynespora cassiicola*. J. Mol. Biol. 367: 89-101.

Carlier, J. 2000. Sigatoka leaf spots, Diseases of Banana, Abaca and Enset, (Jones, D.R., Ed.), CABI Publishing, New York. 37-92.

Crous, P.W., M.J. Wingfield, J. Guarro, R. Cheewangkoon and M. van der Bank. 2013. Fungal planet description sheets: 154–213. Persoonia 31(3): 188–296.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Déon, M., B. Fumanal, S. Gimenez, D. Bieysse, R.R. Oliveira, S.S. Shuib, F. Breton, S. Elumalai, J.B. Vida, M. Seguin, T. Leroy, P. Roekel-Drevet and V. Pujade-Renaud. 2014. Diversity of the cassiicolin gene in *Corynespora cassiicola* and relation with the pathogenicity in *Hevea brasiliensis*. Fungal Biol. 118(1): 32-47.

Dixon, L.J, R.L. Schlub, K. Pernezny and L.E. Datnoff. 2009. Host specialization and phylogenetic diversity of *Corynespora cassiicola*. Phytopathology 99(9): 1015-1027.

Fernando, T.H.P.S. ,C.K. Jayasinghe, R.L.C. Wijesundera and D. Siriwardane. 2012. Some factors affecting *in vitro* production, germination and viability of conidia of *Corynespora cassiicola* from *Hevea brasiliensis*. J. Natn. Sci. Foundation Sri Lanka (3): 241-249.

Jacome, L., P. Lepoivre, D. Marin, R. Ortiz, R. Romero and J.V. Escalant. 2002. Mycosphaerella leaf spot of bananas: present status and outlook. Proceedings of the 2nd International workshop on Mycosphaerella leaf spot diseases held in San Josê, Costa Rica, 20-23 May 2002.

Kamhawy, M.A.M. 2006. Host range and control of *Phyllosticta* sp. the cause of banana leaf spot and blight. Egypt. J. Phytopathol. 34(2): 1-15.

Madhavi, G.B. and K.V.M.K. Murthy. 2001. Growth of germ tube of *Corynespora casiicola* (Berk. & Curt) Wei. on leaves of different Blackgram varieties at different ages (15, 40 and 65 days) Indian J. Agric. Res., 3(1): 69-70.

Meredith D.S., 1963. Some graminicolous fungi associated with spotting of banana leaves in Jamaica. Ann. Appl. Biol. 51: 371-378.

O'gara, E., S. Sangchote, L. Fitzgerald, D. Wood, A.C. Seng and D.I. Guest. 2004. Infection biology of *Phytophthora palmivora* Butl. in *Durio zibethinus* L. (Durian) and responses induced by phosphonate, pp 42-52. In: A. Drenth and D.I. Guest, eds. Diversity and Management of *Phytophthora* in Southeast Asia. Australian Centre for International Agricultural Research, Canberra. 102p.

Ogbebor, N. and A.T. Adekunle. 2005. Inhibition of conidial germination and mycelial growth of *Corynespora cassiicola* (Berk and Curt) of rubber (*Hevea brasiliensis* muell. Arg.) using extracts of some plants. Afr. J. Biotechnol. 4(9): 996-1000.

Shanhai, L., H. Siliang, Z. He, Q. Yanxiang, Q. Liping, X. Ling and F. Gang. 2011. Isolation and identification of *Corynespora cassiicola* causing banana leaf spot disease. Chinese Journal of Tropical Crops 1: 152-157.

Udugama, S. 2002. Septoria leaf spot disease of banana, *Mycosphaerella eumusae*, a new record for Sri Lanka. Annals of Sri Lanka Department of Agriculture 4: 337-343.

White, T.J., T. Bruns, S. Lee and J. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. P315-322. In: M.A. Innis (ed.), PCR Protocol: A Guide to Methods and Amplifications. Academic Press, San Diego, CA, USA.

Wong, M.H., P.W. Crous, J. Henderson, J.Z. Groenewald and A. Drenth. 2012. *Phyllosticta* species associated with freckle disease of banana. Fungal Diversity 173-187.

Wulandari F.N., C. To-anun, L. Cai, A.B.D. Elsalam, K.A. and K.D. Hyde. 2010. *Guignardia/Phyllosticta* species on banana. Cryptogamie Mycol. 31(4): 403-418.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้