

การระบุชนิดของเชื้อราสาเหตุโรคผลเน่าของมะม่วงน้ำดอกไม้สีทองเพื่อการส่งออก

Identification into species of the fungal fruit rot disease on Nam Dok Mai Si Tong mango for export

ชญาพร แก้วโนนเห้า^{1,2}, สุวิตา แสไพศาล^{1,2*} และ อนันต์ วงเจริญ^{1,2}

Chadaporn Kaenonhah^{1,2}, Suwita Saepaisan^{1,2*} and Anan Wongcharone^{1,2}

¹ สาขาวิชาวิทยาและโรคพืชวิทยา คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จังหวัดขอนแก่น 40002

¹ Department of Entomology and Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand

² ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักงานปลัดกระทรวง กระทรวงการอุดมศึกษา วิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม กรุงเทพฯ 10900

² Center of Excellence on Agricultural Biotechnology: (AG-BIO/MHESI), Bangkok 10900, Thailand

บทคัดย่อ: มะม่วงน้ำดอกไม้สีทองเป็นผลไม้เศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย ปัญหาหลักในการผลิตมะม่วงเพื่อการส่งออกเกิดจากโรคผลเน่าหลังการเก็บเกี่ยว จึงได้ทำการเก็บตัวอย่างโรคผลเน่าของมะม่วงน้ำดอกไม้สีทองเพื่อการส่งออกจากอำเภอบ้านแฮด จังหวัดขอนแก่น นำตัวอย่างโรคจำนวน 30 ตัวอย่าง มาแยกเชื้อโดยวิธี tissue transplanting แยกได้เชื้อราจำนวน 20 ไอโซเลต เมื่อทำการทดสอบความสามารถในการเกิดโรคพบว่า ทุกไอโซเลตทำให้เกิดโรคบนผลมะม่วงน้ำดอกไม้สีทอง และไอโซเลต NDM8 มีความรุนแรงในการก่อโรคสูงที่สุด มีขนาดแผลบนผลมะม่วงเท่ากับ 100.73 มม. คัดเลือกเชื้อราสาเหตุโรคจำนวน 11 ไอโซเลต เพื่อระบุชนิด (species) โดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและเทคนิคชีวโมเลกุล ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วน internal transcribe spacer ของ rDNA (ITS1-5.8S-ITS2) และบริเวณ translation elongation factor 1-alpha (EF1- α) gene ด้วยเทคนิค PCR ทำการระบุชนิดของเชื้อราสาเหตุโรคผลเน่าได้ 5 ชนิด ได้แก่ *Lasiodiplodia theobromae* (NDM5, NDM7, NDM8, NDM17, NDM19, NDM20), *Lasiodiplodia pseudotheobromae* (NDM16, NDM18), *Botryosphaeria dothidea* (NDM10), *Colletotrichum gloeosporioides* (NDM12) และ *Diaporthe pascoei* (NDM13) ผลการศึกษาที่ได้ในครั้งนี้ สามารถนำไปประยุกต์ใช้เป็นแนวทางในการควบคุมโรคผลเน่าของมะม่วงน้ำดอกไม้สีทองให้มีประสิทธิภาพในระดับแปลงปลูกได้

คำสำคัญ: Botryosphaeriaceae; โรคผลเน่า; มะม่วง

ABSTRACT: Nam Dok Mai Si Tong mango is an important economic fruit in Thailand. The major problem in mango production for export caused by postharvest fruit rot disease. We performed collected mango fruit rot disease of Nam Dok Mai Si Thong from Banhad district Khon Kaen province. Thirty disease samples were isolated using tissue transplanting method. The result showed that twenty isolates of fungi were obtained. Pathogenicity tests indicated that all of these fungal isolates were pathogenic on mango fruits and isolate NDM 8 was the most aggressive pathogen with the lesion size on mango fruit of 100.73 mm. Eleven isolates of fungal pathogen were selected for identifying into species based on morphological characterization and molecular technique. The DNA fragment of internal transcribe spacer of rDNA (ITS1-5.8S-ITS2) and translation elongation factor 1-alpha (EF1- α) gene were amplified by PCR technique. Identification of fruit rot pathogenic fungi were belong to five species as *Lasiodiplodia theobromae* (NDM5, NDM7, NDM8, NDM17, NDM19, NDM20), *Lasiodiplodia pseudotheobromae* (NDM16, NDM18), *Botryosphaeria dothidea* (NDM10), *Colletotrichum gloeosporioides* (NDM12) and *Diaporthe pascoei* (NDM13). The result of this study suggests can be applied as a strategy to improve the efficiency of fruit rot diseases control for Nam Dok Mai Si Tong mango in the field.

Keywords: Botryosphaeriaceae; fruit rot disease; mango

* Corresponding author: Suwitsa@kku.ac.th

Received: date; October 14, 2021 Accepted: date; January 4, 2022 Published: date; April 5, 2022

บทนำ

มะม่วง (*Mangifera indica* Linn.) เป็นผลไม้เมืองร้อนที่สำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศไทย ในปีพ.ศ. 2560 มีปริมาณการส่งออกผลมะม่วงสดจำนวน 33,346.99 ตัน มูลค่าประมาณ 118 ล้านบาท (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2563) ซึ่งมะม่วงน้ำดอกไม้สีทองเป็น 1 ใน 4 สายพันธุ์ที่ปลูกเพื่อการส่งออกไปยังประเทศญี่ปุ่น เกาหลี จีน ลาว มาเลเซีย เวียดนาม พม่า กัมพูชา และสหรัฐอเมริกา การผลิตมะม่วงน้ำดอกไม้สีทองเพื่อส่งออกนั้นมักประสบกับโรคหลังการเก็บเกี่ยวทำให้เกิดการเน่าเสียของมะม่วงในระหว่างการเก็บรักษาและการขนส่ง คุณภาพของผลผลิตมะม่วงไม่ได้มาตรฐานและไม่ตรงตามความต้องการของประเทศคู่ค้า เป็นปัญหาอย่างมากในการส่งออกมะม่วงไปยังต่างประเทศ โรคหลังการเก็บเกี่ยวที่พบ ได้แก่ โรคแอนแทรคโนส โรคข้าวผลเน่า และโรคผลเน่า ที่เกิดจากเชื้อราหลายชนิด ได้แก่ เชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides*, *Lasiodiplodia theobromae*, *Lasiodiplodia pseudotheobromae*, *Botryosphaeria dothidea*, *Fusicoccum aesculi*, *Phomopsis mangiferae*, *Neofusicoccum parvum* และ *Neofusicoccum mangiferae* ซึ่งเป็นเชื้อราสาเหตุโรคที่สำคัญของมะม่วง พบการเข้าทำลายและแพร่กระจายไปทั่วโลก สร้างความเสียหายเป็นอย่างมากในหลาย ๆ ประเทศ เช่น ไต้หวัน ออสเตรเลีย อินเดีย บราซิล จีน ปากีสถาน เกาหลี และไทย (Ni et al., 2012) โรคผลเน่าของมะม่วงเป็นโรคหลังการเก็บเกี่ยวมีลักษณะอาการที่หลากหลาย คือ ผลมะม่วงเกิดแผลจุด มีรอยขีดน้ำตาลเข้มไปจนถึงสีดำ เห็นขอบรอยขีดชัดเจน บริเวณแผลอ่อนนุ่มและฉ่ำน้ำ แผลบนผลมะม่วงจะขยายอย่างรวดเร็วทำให้ผลมะม่วงเน่า บริเวณที่เน่าเกิดเป็นรอยร้าวสีดำ อาการของโรคอาจเริ่มจากข้าวผล หรืออาจเกิดบนส่วนอื่นๆ ของผลได้เช่นกัน และบางลักษณะอาการมีความคล้ายคลึงกันแต่เกิดจากเชื้อสาเหตุโรคต่างชนิดกัน ซึ่งการวินิจฉัยโรคจากลักษณะอาการเพียงอย่างเดียวอาจก่อให้เกิดความผิดพลาดได้ในการระบุเชื้อสาเหตุโรคที่แท้จริง ดังนั้นการระบุชนิดเชื้อสาเหตุโรคนอกจากจะวินิจฉัยลักษณะอาการและลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อสาเหตุโรค จำเป็นต้องอาศัยลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อสาเหตุโรคร่วมด้วย จากการเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ universal primer และ specific primer จะทำให้ระบุชนิดเชื้อราสาเหตุโรคผลเน่าในกลุ่ม *Botryosphaeria* เช่น เชื้อรา *L. theobromae*, *L. pseudotheobromae* และ *Lasiodiplodia parva* ที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาคล้ายคลึงกันได้อย่างถูกต้อง และแม่นยำมากยิ่งขึ้น (Alves et al., 2008) ในประเทศไทย ชัยณรงค์ และพิมพ์ธรรมา (2557) ได้จำแนกชนิดของเชื้อราที่แยกได้จากโรคข้าวผลเน่าของมะม่วง โดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาร่วมกับเทคนิคทางด้านชีวโมเลกุลเพื่อยืนยันชนิดของเชื้อราสาเหตุโรค เนื่องจากอาการโรคที่เหมือนกันอาจเกิดจากเชื้อราต่างชนิดได้ พบว่า เชื้อราที่แยกได้จากอาการโรคข้าวผลเน่าของมะม่วงในจังหวัดเชียงใหม่มีความคล้ายคลึงกับเชื้อรา *B. dothidea* ที่แยกได้จากมะม่วงในจังหวัดศรีสะเกษ และเชื้อราที่แยกได้จากมะม่วงในจังหวัดสุพรรณบุรีมีความคล้ายคลึงกับเชื้อรา *N. parvum*

ในพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือมีแหล่งปลูกและรวบรวมมะม่วงน้ำดอกไม้สีทองเพื่อการส่งออกที่สำคัญอยู่ที่อำเภอบ้านแฮด จังหวัดขอนแก่น ในปี 2559 ได้เกิดปัญหาโรคผลเน่าขึ้นในระหว่างการขนส่งมะม่วงไปยังประเทศปลายทาง สร้างความเสียหายให้แก่ผลผลิตมากถึง 50 เปอร์เซ็นต์ ทำให้เกษตรกรสูญเสียรายได้เป็นจำนวนมาก และยังไม่มีการศึกษาข้อมูลชนิดของเชื้อราสาเหตุโรคผลเน่าในมะม่วงน้ำดอกไม้สีทองมาก่อน การระบุชนิดของเชื้อสาเหตุโรคจึงมีความสำคัญมาก หากระบุชนิดของเชื้อราสาเหตุโรคได้อย่างถูกต้องตามลักษณะอาการ จะทำให้เกษตรกรควบคุมโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพ เช่น การจัดการในการผลิตเพื่อลดแหล่งสะสมโรค การนำเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์มาใช้ควบคุมโรค รวมไปถึงการเลือกใช้สารเคมีในการป้องกันกำจัดโรคในแปลงปลูกและในระหว่างการขนส่งได้อย่างถูกต้องตรงกับชนิดของเชื้อสาเหตุโรค ลดต้นทุนค่าใช้จ่ายในการซื้อสารเคมี ดังนั้นการศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อระบุชนิดเชื้อราสาเหตุโรคผลเน่าของมะม่วงน้ำดอกไม้สีทองเพื่อการส่งออก โดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาร่วมกับการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ เพื่อนำไปสู่การควบคุมโรคอย่างมีประสิทธิภาพ

วิธีการศึกษา

1. การแยกเชื้อราสาเหตุโรคผลเน่าของมะม่วงน้ำดอกไม้สีทอง และการทดสอบความสามารถในการเกิดโรค

เก็บตัวอย่างมะม่วงน้ำดอกไม้สีทองที่แสดงอาการโรคผลเน่า ที่ไร่มะม่วงสวนอุดม เลขที่ 134 หมู่ที่ 4 บ้านสว่างพัฒนา ตำบลหนองแขง อำเภอบ้านแฮด จังหวัดขอนแก่น นำตัวอย่างมาศึกษาลักษณะอาการโรคและแยกเชื้อสาเหตุโรคด้วยวิธี tissue

transplanting ตัดชิ้นส่วนผลมะม่วงที่เป็นโรค ขนาดประมาณ 0.5 X 0.5 เซนติเมตร (cm) แช่ใน sodiumhypochlorite 0.6 เปอร์เซ็นต์ (%) เป็นเวลา 3 - 5 นาที ล้างชิ้นส่วนมะม่วงด้วยน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง ซับชิ้นส่วนมะม่วงให้แห้งด้วยกระดาษกรองหนึ่งฆ่าเชื้อ นำชิ้นส่วนมะม่วงวางบนอาหาร Water agar (WA) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 - 48 ชั่วโมง เมื่อสังเกตพบเส้นใยเชื้อราเจริญออกมาจากชิ้นส่วนมะม่วงจึงย้ายเส้นใยเชื้อราเลี้ยงลงบนอาหาร Potato dextrose agar (PDA) บ่มที่อุณหภูมิ 28 ± 2 องศาเซลเซียส ($^{\circ}\text{C}$) เป็นระยะเวลา 7 วัน เพื่อให้ได้เชื้อบริสุทธิ์

ทดสอบการเกิดโรคด้วยวิธี detached fruit โดยนำผลมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้สีทองปกติอายุ 110 - 115 วัน มาฆ่าเชื้อที่ผิวมะม่วงด้วย ethyl alcohol 70 % ทำแผลบนผลห่างจากขั้วผล 2 cm ด้วยใบมีดโกนฆ่าเชื้อ 1 แผลต่อผล ขนาดแผล 1 cm ปลุกเชื้อโดยเลี้ยงเชื้อราบนอาหาร PDA บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 28 ± 2 $^{\circ}\text{C}$ เป็นเวลา 7 วัน เจาะชิ้นวัณบริเวณปลายเส้นใยเชื้อราด้วย cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 cm ย้ายชิ้นวัณวางบนผลมะม่วง สำหรับกรรมวิธีควบคุมปลุกเชื้อโดยใช้ชิ้นวัณอาหาร PDA ปลอดเชื้อสาเหตุโรค บ่มผลมะม่วงในกล่องขึ้นที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 วัน บันทึกลักษณะอาการของโรค และวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของแผล (มิลลิเมตร, mm) บนผลมะม่วงทุกวัน ประเมินค่าระดับความรุนแรงของโรคโดยให้ค่าคะแนน 0 - 4 คะแนน โดย 0 = ไม่แสดงอาการผลเน่า, 1 = แสดงอาการผลเน่า 1 - 20 % ของผลมะม่วง, 2 = แสดงอาการผลเน่า 21 - 40 % ของผลมะม่วง, 3 = แสดงอาการผลเน่า 41 - 60 % ของผลมะม่วง และ 4 = แสดงอาการผลเน่ามากกว่า 61 % ของผลมะม่วง (ดัดแปลงจาก Alivindia and Miriam, 2015) และคำนวณเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคจากสูตร ((จำนวนตัวอย่างที่เกิดโรค X 100)/จำนวนตัวอย่างทั้งหมด)

วางแผนการทดลองแบบ CRD กรรมวิธีละ 5 ซ้ำ นำข้อมูลที่ได้ไปวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ โดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ (Statistical Analysis System, SAS, version 9.1) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของแต่ละกรรมวิธีด้วยวิธี Duncan' Multiple Rang Test (DMRT)

2. การระบุชนิดเชื้อราสาเหตุโรคผลเน่าของมะม่วงน้ำดอกไม้สีทองจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาและวิธีทางชีวโมเลกุล

นำเชื้อราสาเหตุโรคที่แยกได้ทั้งหมดมาเลี้ยงบนอาหาร PDA บ่มที่อุณหภูมิ 28 ± 2 $^{\circ}\text{C}$ เป็นเวลา 7 วัน ส่วนเชื้อราที่ไม่สร้างสปอร์จะชักนำให้เชื้อสาเหตุโรคสร้างสปอร์ โดยเลี้ยงเชื้อราบนอาหาร 2% WA ที่วางใบสนสามใบ (*Pinus radiata*) หนึ่งฆ่าเชื้อบนผิวหน้าอาหาร บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 25 $^{\circ}\text{C}$ ภายใต้แสง near UV สลับกับไม่ให้แสง (12/12 ชั่วโมง) เป็นเวลา 14 - 30 วัน (Trakunyingcharoen et al., 2014) และเชื้อราบางไอโซเลตชักนำให้สร้างสปอร์โดยปลุกเชื้อลงบนพีชอาศัย จากนั้นศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา ได้แก่ ลักษณะโคโลนี รูปร่าง ขนาด สีของสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และวัดขนาดสปอร์ จำนวน 50 สปอร์ต่อไอโซเลต ด้วยโปรแกรม Axios vision SE64 (Carl Zeiss, Germany) เพื่อระบุชนิดของเชื้อราสาเหตุโรคในระดับสกุล (genus)

คัดเลือกเชื้อรา จำนวน 11 ไอโซเลต คือ NDM5, NDM7, NDM8, NDM10, NDM16, NDM17, NDM18, NDM19 และ NDM20 แยกจากอาการโรคแบบที่ 1 มีค่าระดับความรุนแรงในการเกิดโรคตั้งแต่ 3 คะแนนขึ้นไป ไอโซเลต NDM12 และ NDM13 แยกจากอาการโรคแบบที่ 2 และ 3 ตามลำดับ มีค่าระดับความรุนแรงเท่ากับ 2 คะแนน นำมาสกัด genomic DNA ด้วยวิธี CTAB method และเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยเทคนิค PCR ในส่วน internal transcribe spacer ของ rDNA (ITS1-5.8S-ITS2) โดยใช้ไพรเมอร์ ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCG-3') - ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATTGC-3') (White et al., 1990) และบริเวณ translation elongation factor 1-alpha (EF1- α) gene โดยใช้ไพรเมอร์ EF1251F (5'-CGGTCACTTGATCTACAAGTGC-3') - EF1251R (5'-CCTCGACTCACCAGTACCG-3') (Alves et al., 2008) และใช้ specific primer คือ ไพรเมอร์ LT347F (5'-AACGTACCTCTGTTGCTTTGGC-3') - LT347R (5'-AACGTACCTCTGTTGCTTTGGC-3') สำหรับเพิ่มปริมาณ DNA ของเชื้อรา *Lasiodiplodia* sp. และไพรเมอร์ CgInt (5'-GGCCTCCGCTCCGGGCGG-3') - ITS4 (Martinez et al., 2009) สำหรับเพิ่มปริมาณ DNA ของเชื้อรา *C. gloeosporioides* ปฏิบัติ PCR มีขั้นตอนดังนี้ initial denaturation ที่ 95 $^{\circ}\text{C}$ เป็นเวลา 7 นาที denaturation ที่อุณหภูมิ 95 $^{\circ}\text{C}$ เป็นเวลา 1 นาที annealing เป็นเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิ 50 $^{\circ}\text{C}$ สำหรับไพรเมอร์ ITS1-ITS4 ส่วนไพรเมอร์ EF1251F - EF1251R และ CgInt - ITS4 ที่อุณหภูมิ 52 $^{\circ}\text{C}$ และ ที่อุณหภูมิ 56 $^{\circ}\text{C}$ สำหรับไพรเมอร์ LT347F - LT347R extension ที่อุณหภูมิ 72 $^{\circ}\text{C}$ เป็นเวลา 2 นาที (จำนวน 30 รอบ) final extension ใช้เวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 72 $^{\circ}\text{C}$ ตรวจวิเคราะห์การเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยเทคนิค gel electrophoresis และนำ PCR product ไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้บริการบริษัท Ward medic เปรียบเทียบข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank โดยใช้โปรแกรม BlastN ผ่านเว็บไซต์ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> นำลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อราสาเหตุโรคและลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีความเหมือน (% identities) สูงสุดจากการเปรียบเทียบในฐานข้อมูล

GenBank มาจัดเรียงแนวความสัมพันธ์ (multiple sequence alignment) โดยโปรแกรม Clustal W (Thompson et al., 1994) วิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมจากค่าความแตกต่างทางพันธุกรรม (genetic distance) โดยใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วน ITS ร่วมกับ (EF1- α) ด้วยวิธี Kimura 2-parameter (Kimura, 1980) นำค่าความแตกต่างที่ได้มาสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (phylogenetic tree) เลือกวิธี Neighbor-joining (Tamura et al., 2013) โดยใช้โปรแกรม MEGA version 6 และใช้สูตรในการคำนวณแผนภูมิทางสถิติของ maximum composite likelihood ตั้งค่าจำนวนรอบในการสร้างแผนภูมิที่เป็นไปได้มากที่สุดเท่ากับ 1,000 รอบ (bootstrap method)

ผลการศึกษาและวิจารณ์

1. การแยกเชื้อราสาเหตุโรคผลเน่าของมะม่วงน้ำดอกไม้สีทอง และการทดสอบความสามารถในการเกิดโรค

จากการศึกษาลักษณะอาการโรคผลเน่าของมะม่วงน้ำดอกไม้สีทอง จำนวน 30 ตัวอย่าง พบ 3 ลักษณะอาการ คือ แบบที่ 1 อาการผลเน่าเริ่มจากหัวผลหรือปลายผล ผลยังคงรูปร่าง ผิวผลมีสีดำ มีของเหลวสีน้ำตาลไหลออกมา และพบเส้นใยเชื้อราสีขาวอมเทา (Figure 1A) แยกได้เชื้อราจำนวน 16 ไอโซเลต แบบที่ 2 อาการแผลสีดำ เนื้อเยื่อผลยุบตัวลง สร้างกลุ่มสปอร์สีส้มบริเวณกลางแผล (Figure 1B) คล้ายกับอาการโรคแอนแทรกโนส แยกได้เชื้อราจำนวน 1 ไอโซเลต และแบบที่ 3 อาการจุดแผลสีดำ ขอบแผลหยัก (Figure 1C) แยกได้เชื้อราจำนวน 3 ไอโซเลต สอดคล้องกับ Marques et al. (2013) ที่ได้รายงานลักษณะอาการโรคหัวผลเน่า และโรคผลเน่าของมะม่วง จะมีแผลสีน้ำตาลถึงดำที่ก้านและหัวผล แผลลุกลามจากหัวผลไปยังผล ทำให้ผลเน่าทั่วทั้งผลเป็นสีน้ำตาล เนื้อเยื่อผลอ่อนนุ่มและปล่อยกลิ่นเหม็น ส่วนอาการโรคแอนแทรกโนสจะพบจุดแผลขนาดเล็ก สีน้ำตาลเข้มถึงดำ ต่อมาแผลขยายขนาดใหญ่ขึ้น เนื้อเยื่อผลยุบตัว พบกลุ่มสปอร์สีส้มอมชมพูบริเวณแผลเมื่อมีความชื้นในอากาศสูง (Swamy, 2012) งานวิจัยนี้มุ่งเน้นศึกษาเชื้อราจึงนำเชื้อราที่แยกได้ทั้งหมดจำนวน 20 ไอโซเลต คือ ไอโซเลต NDM1 – NDM20 มาทดสอบความสามารถในการเกิดโรค เชื้อราทุกไอโซเลตก่อให้เกิดอาการผลเน่าเมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุมซึ่งไม่พบอาการโรคบนผลมะม่วง พบว่าหลังจากปลูกเชื้อเป็นเวลา 48 - 72 ชั่วโมง ผลมะม่วงที่ปลูกด้วยเชื้อราไอโซเลต NDM1, NDM2, NDM3, NDM4, NDM5, NDM6, NDM7, NDM8, NDM9, NDM10, NDM11, NDM16, NDM17, NDM18, NDM 19 และ NDM 20 มีแผลสีน้ำตาลถึงดำ ต่อมาแผลขยายขนาดใหญ่ลุกลามอย่างรวดเร็ว ทำให้ผลเน่าเป็นสีน้ำตาลเข้มจนถึงดำ มีเส้นใยเชื้อราและของเหลวสีน้ำตาลไหลออกมาจากบริเวณแผล มีขนาดแผลอยู่ระหว่าง 37.22 - 100.73 mm ค่าระดับความรุนแรงเท่ากับ 0.60 - 4.00 คะแนน มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค 60 - 100 % โดยที่เชื้อราไอโซเลต NDM8 มีความรุนแรงในการก่อโรคสูงที่สุด มีขนาดแผลเท่ากับ 100.73 mm ค่าระดับความรุนแรงเท่ากับ 4.00 คะแนน มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคเท่ากับ 100 % รองลงมาคือ ไอโซเลต NDM17, NDM10, NDM7, NDM19, NDM20 และ NDM 5 มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค 100 % ขนาดแผลบนผลมะม่วงเท่ากับ 95.07, 93.12, 88.58, 85.40, 85.12 และ 84.85 mm ตามลำดับ ค่าระดับความรุนแรงเท่ากับ 4.00, 4.00, 4.00, 3.20, 4.00 และ 3.40 คะแนน ตามลำดับ ขณะที่ไอโซเลต NDM1 มีความรุนแรงในการก่อโรคน้อยที่สุด มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค 60 % ขนาดแผลเท่ากับ 37.22 mm ค่าระดับความรุนแรงเท่ากับ 0.60 คะแนน และพบอาการแผลจุดสีน้ำตาลดำ ค่อนข้างกลม เนื้อเยื่อผลยุบตัวเล็กน้อยจากการปลูกเชื้อราไอโซเลต NDM12 มีขนาดแผลเท่ากับ 12.50 mm ค่าระดับความรุนแรงเท่ากับ 2.00 และมีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค 100 % สำหรับเชื้อราไอโซเลต NDM13, NDM14, NDM15 พบแผลมีสีดำ มีลักษณะต้น ขอบแผลไม่เรียบ มีขนาดแผลบนผลมะม่วงอยู่ระหว่าง 27.87 - 49.60 mm มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค 80 - 100 % และมีค่าระดับความรุนแรง 1.60 - 2.00 (Table1, Figure 2)

2. การระบุชนิดเชื้อราสาเหตุโรคผลเน่าของมะม่วงน้ำดอกไม้สีทองจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาและวิธีทางชีวโมเลกุล

การระบุชนิดของเชื้อราสาเหตุโรคโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาพบว่า เชื้อราที่แยกได้จากลักษณะอาการโรคผลเน่าแบบที่ 1 มีลักษณะโคโลนี 2 แบบ แบบที่ 1 ลักษณะโคโลนีเริ่มแรกมีสีขาวต่อมาเปลี่ยนเป็นสีเทาดำ เจริญเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อภายใน 48 ชั่วโมง (Figure 3 A1-E1) เส้นใยละเอียดค่อนข้างฟู ไม่สร้างสปอร์บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เมื่อกระตุ้นให้เชื้อราสร้างสปอร์ พบพิดินเดีย (pycnidia) สีดำค่อนข้างกลม ปากเปิดแคบ บนใบสน (Figure 3 A2-E2) ภายในมีเส้นใย paraphyses ยาว ใส ทรงกระบอก และ conidiogenous cells ใส ผนังบาง มีลักษณะแบบ holoblastic (Figure 3 A3-E3) พบสปอร์ 2 แบบ คือ immature conidia มีเซลล์เดียว ใส รูปร่างค่อนข้างรีจนถึงค่อนข้างกลม (sub-ovoid, ellipsoid-ovoid) ไม่มีผนังกัน (Figure 3 A4-E4) ปลายด้านหนึ่งกลมมน อีกด้านสอบลงคล้ายกรวย และ mature conidia มีสองเซลล์ มีผนังกัน 1 ชั้นตรงกลาง สีน้ำตาลเข้ม รูปร่างรีคล้ายไข่ ผนังด้านนอก

หนา 2 ชั้น สร้างเม็ดสีเมลานินบนผิวด้านในเรียงตัวเห็นเป็นริ้วในแนวยาว (Figure 3 A5-E5) ซึ่งลักษณะคล้ายเชื้อรา *Lasiodiplodia* sp. (Alves et al., 2008) ได้แก่ ไอโซเลต NDM2, NDM5, NDM7, NDM8, NDM16, NDM17, NDM18, NDM19 และ NDM20 แบบที่ 2 ลักษณะโคโลนีเริ่มแรกมีสีขาวและเปลี่ยนเป็นสีเทาถึงสีเทาดำ ขอบโคโลนีเรียบหรือขอบโคโลนีหยัก เส้นใยไม่ฟูหรือฟูเล็กน้อย เจริญเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อภายใน 3 - 4 วัน ซึ่งมีการเจริญช้ากว่าแบบที่ 1 (Figure 3 F1-G1) พบการสร้าง pycnidia บนใบสน (Figure 3 F2-G2) ภายในมีเส้นใย paraphyses ใส รูปทรงกระบอก conidiogenous cells ใส พนังบาง ผิวเรียบ (Figure 3 F3-G3) ลักษณะ conidia ใส เซลล์เดียว พนังบาง ผิวเรียบ รูปร่างคล้ายกระสวยถึงยาวรี (fusiform) (Figure 3 F4-G4) ลักษณะคล้ายเชื้อรา *Fusicocum* sp. (Slippers et al., 2005) ได้แก่ ไอโซเลต NDM1, NDM3, NDM4, NDM6, NDM9, NDM10 และ NDM11 ลักษณะอาการโรคผลเน่าแบบที่ 2 แยกเชื้อราได้ 1 ไอโซเลต คือ NDM12 มีลักษณะโคโลนีสีขาวอมเทา ขอบเรียบ เจริญเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อโดยเฉลี่ย 7 วัน เส้นใยฟูเล็กน้อย (Figure 4A) พบโครงสร้าง acervulus ไม่มี setae มี conidiophore รูปทรงกระบอกอยู่ภายใน พนังเรียบ ใส สร้างกลุ่มสปอร์ (spore mass) สีส้มบริเวณกลางโคโลนี (Figure 4 B-D) conidia มีเซลล์เดียว ใส รูปร่างทรงกระบอกหัวมนท้ายมน ลักษณะคล้ายเชื้อรา *Colletotrichum* sp. (López et al., 2015) (Figure 4E) เชื้อราไอโซเลต NDM13, NDM14 และ NDM15 แยกได้จากลักษณะอาการโรคผลเน่าแบบที่ 3 ลักษณะโคโลนีมีสีขาวจนถึงน้ำตาลอ่อน เส้นใยค่อนข้างหยาบและเจริญเรียบกับผิวอาหาร เจริญเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อภายใน 6-7 วัน (Figure 4F,K) เชื้อราสร้าง pycnidia สีดำ กระจายทั่วโคโลนี (Figure 4G, L) บนอาหารเลี้ยงเชื้อพบสปอร์แบบ beta conidia เซลล์เดียว ใส รูปร่างเป็นเส้นยาว ส่วนปลายโค้งงอคล้ายตะขอ (filiform) (Figure 4H, I) บนเนื้อเยื่อใบมะม่วง พบ pycnidia (Figure 4I, N) และ alpha conidia มีเซลล์เดียว ใส รูปร่างคล้ายกระสวยถึงรูปไข่ (Figure 4J, O) ลักษณะคล้ายกับเชื้อรา *Phomopsis* sp. (Tan et al., 2013) ซึ่งขนาดสปอร์ของเชื้อราทั้ง 20 ไอโซเลตนั้นแสดงใน Table 2

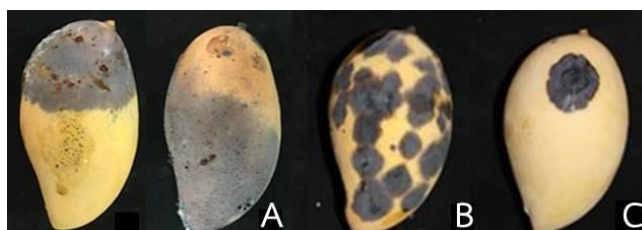


Figure 1 Symptoms of Nam Dok Mi Si Tong mango fruit rot disease; A: stem-end rot, black rot throughout fruit and remained shape, B: sunken dark brown to black lesion and orange-colored masses of spores, and C: black lesion and wavy edges on fruit.



Figure 2 Pathogenicity test of fruit rot disease on Nam Dok Mi Si Tong mango for 5 days after inoculation; A-T: fruit rot symptoms after inoculation with isolate NDM1, NDM2, NDM3, NDM4, NDM5, NDM6, NDM7, NDM8; NDM9, NDM10, NDM11, NDM12, NDM13, NDM14, NDM15, NDM16, NDM17, NDM18, NDM19, NDM20, and U: control, respectively.

Table 1 Pathogenicity test of fungi associated with fruit rot disease of mango Nam DoK Mai Si Thong for 5 days after inoculation

Isolates	Lesion length (mm) ^{1/}	Disease severity	Disease incidence (%)
control	00.00±0.00 o	0.00	0.00
NDM1	37.22±3.41 l	0.60	60.00
NDM2	65.70±0.83 h	2.00	100.00
NDM3	82.97±1.54 e	2.00	100.00
NDM4	75.08±0.93 fg	2.00	100.00
NDM5	84.85±2.50 de	3.40	100.00
NDM6	56.65±2.03 i	1.00	100.00
NDM7	88.58±1.79 cd	4.00	100.00
NDM8	100.73±3.80 a	4.00	100.00
NDM9	72.77±1.97 g	1.60	100.00
NDM10	93.12±3.71 bc	4.00	100.00
NDM11	76.42±1.50 fg	2.00	100.00
NDM12	12.50±2.27 n	2.00	100.00
NDM13	49.60±2.25 j	2.00	100.00
NDM14	42.83±1.26 k	1.60	80.00
NDM15	27.87±4.45 m	2.00	100.00
NDM16	80.18±0.95 ef	3.20	100.00
NDM17	95.07±0.95 b	4.00	100.00
NDM18	77.75±0.53 fg	3.80	100.00
NDM19	85.40±3.32 de	3.20	100.00
NDM20	85.12±0.55 de	4.00	100.00
F-test	**		
C.V. (%)	4.38		

^{1/} Mean ± standard error

** Significant difference at P <0.01 by DMRT

Means followed by the same letter (s) in a column are not significantly different (P <0.01 by DMRT).

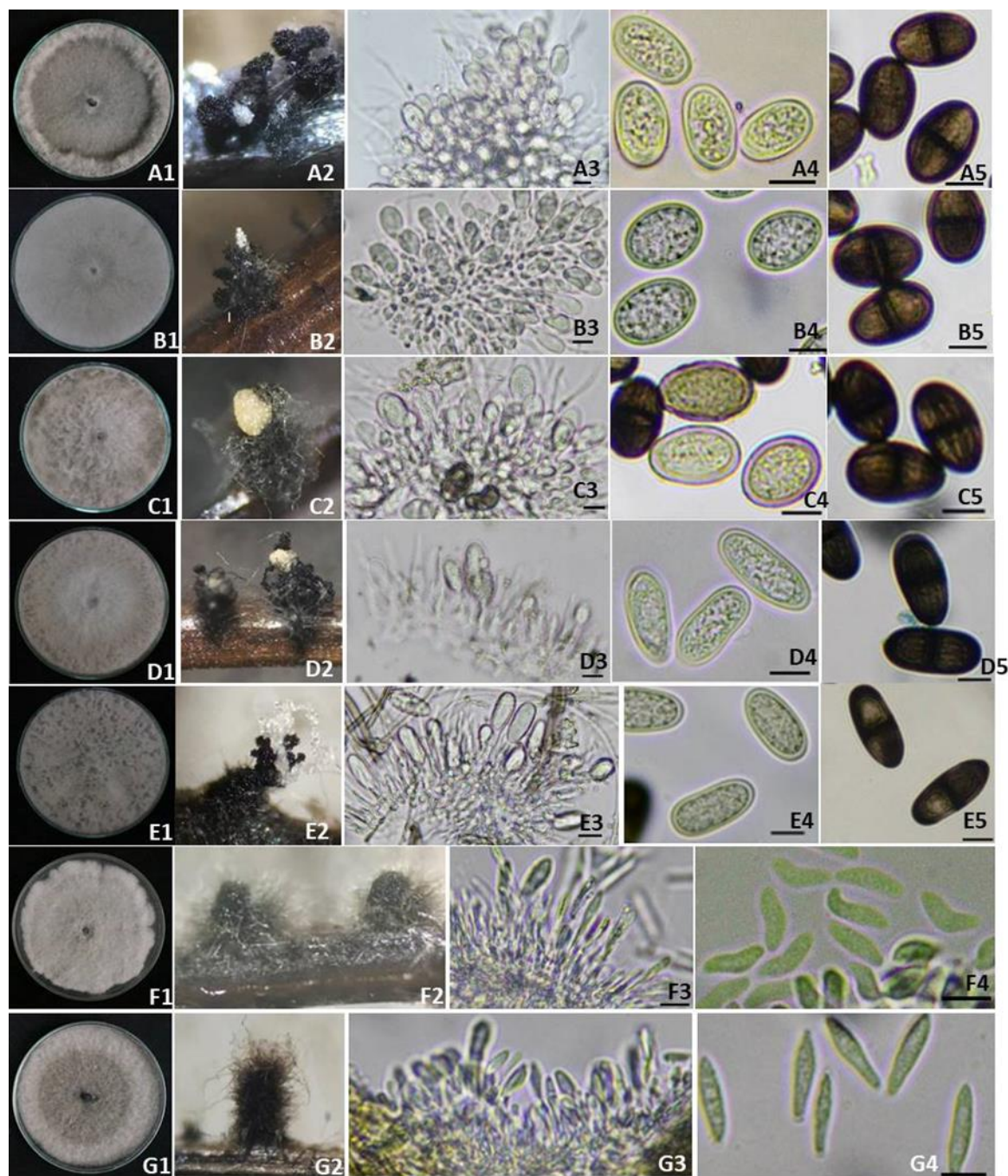


Figure 3 Morphological characteristics of fungal isolates; A: NDM7, B: NDM8, C: NDM17, D: NDM16, E: NDM18, F: NDM6, and G: NDM10; 1: colony on PDA, 7 days after incubation, 2: pycnidia on pine leaves, 3 = conidiogenous cell and paraphyses, 4: immature conidia and conidia spindle-shaped, and 5: mature conidia. (Bars=10μm)

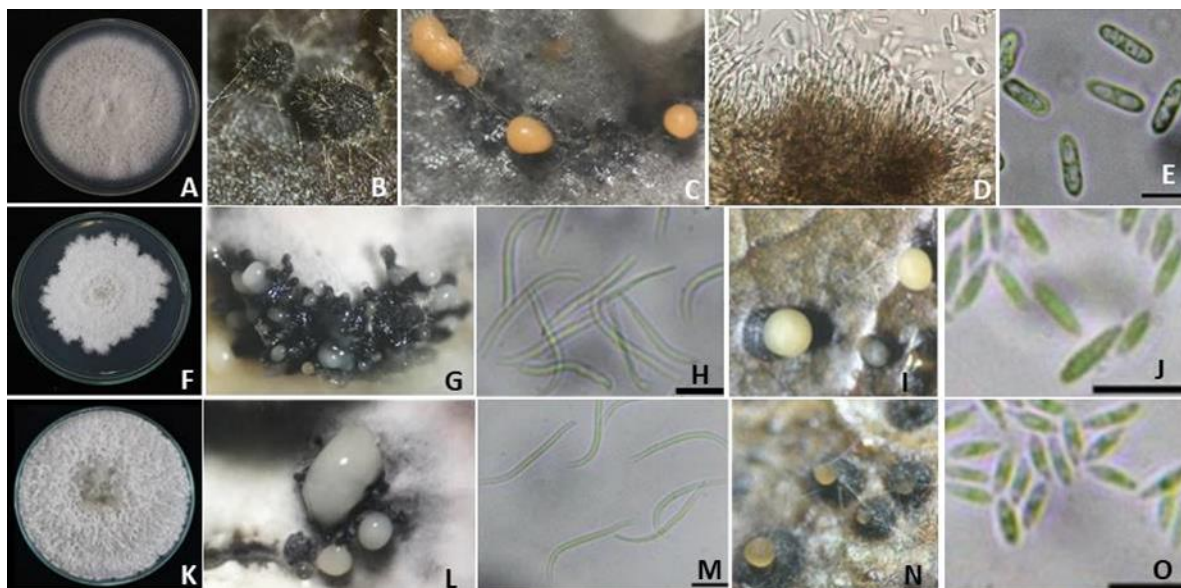


Figure 4 Morphological characteristics of fungal isolates; A: NDM12 on PDA, 7 days after incubation, B: acervulus, C: orange coloured spore masses produced in culture, D: conidiophore, E: conidia, F: NDM13, K: NDM15; colony on PDA, 7 days after incubation, G, L: pycnidia and conidiomata on PDA, H, I = beta-conidia, I, N: pycnidia on mango leave and J, O: alpha-conidia. (Bars=10µm)

เมื่อบ่งชี้ชนิดของเชื้อรา 11 ไอโซเลต ด้วยวิธีทางชีวโมเลกุลโดยใช้ไพรเมอร์ ITS1 - ITS4 และไพรเมอร์ EF1251F - EF1251R เพิ่มปริมาณ DNA บริเวณ ITS1-5.8S-ITS2 และ Translation elongation factor 1-alpha gene ได้ PCR product ขนาดประมาณ 500 และ 550 คู่เบส ตามลำดับ ในทุกไอโซเลต เมื่อเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์กับฐานข้อมูล GenBank พบว่า ไอโซเลต NDM5, NDM7, NDM8, NDM17, NDM19 และ NDM20 มีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกับเชื้อรา *L. theobromae* มีความเหมือนอยู่ระหว่าง 95 - 100 % ไอโซเลต NDM16 และ NDM 18 มีความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อรา *L. pseudotheobromae* 100 % ไอโซเลต NDM10 มีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกับเชื้อรา *B. dothidea* 99 - 100 % ซึ่งไอโซเลตดังกล่าวแยกจากอาการโรคแบบที่ 1 และมีค่าระดับความรุนแรงในการเกิดโรคตั้งแต่ 3 คะแนนขึ้นไป เชื้อราไอโซเลต NDM12 แยกจากอาการโรคผลเน่าแบบที่ 2 มีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกับเชื้อรา *C. gloeosporioides* 99 % และเชื้อราไอโซเลต NDM13 แยกจากอาการโรคผลเน่าแบบที่ 3 มีความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อรา *D. pascoei* 99 % (Table 3) และได้ยืนยันการบ่งชี้ชนิดของเชื้อราในกลุ่ม Botryosphaeria อีกครั้งโดยใช้ specific primer LT347F - LT347R ที่เพิ่มปริมาณ DNA ได้เฉพาะเชื้อรา *Lasiodiplodia* sp. พบ PCR product ขนาดประมาณ 350 คู่เบส ในเชื้อรา 8 ไอโซเลต คือ ไอโซเลต NDM5, NDM7, NDM8, NDM17, NDM19 และ NDM20 ซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกับเชื้อรา *L. theobromae* มีความเหมือน 99 - 100 % ไอโซเลต NDM 16 และ NDM 18 มีความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อรา *L. pseudotheobromae* 99 % ทั้งนี้ไม่พบ PCR product ของเชื้อราไอโซเลต NDM 10 และ NDM 13 สำหรับไอโซเลต NDM12 ยืนยันการบ่งชี้ชนิดโดยใช้ไพรเมอร์ CgInt - ITS4 พบ PCR product ขนาดประมาณ 500 คู่เบส มีความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อรา *C. gloeosporioides* 99 % (Table 3) การวิเคราะห์ phylogenetic tree ของเชื้อราสาเหตุโรคทั้ง 11 ไอโซเลต จากลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ร่วมกับ EF1- α ขนาดประมาณ 500 - 550 คู่เบส ด้วยโปรแกรม MEGA 6 โดยมีลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อรา *Phytophthora infestans* (DQ365743) เป็น outgroup พบว่าที่ระยะทางทางพันธุกรรมเท่ากับ 0.10 เชื้อราต่างสกุลกันแยกออกจากกันอย่างชัดเจน และลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อราสาเหตุโรคถูกจัดอยู่ใน clade ของเชื้อราในสกุล (genus) และชนิด (species) เดียวกันกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่นำมาจากฐานข้อมูล GenBank เชื้อรา *B. dothidea* (NDM10), *C. gloeosporioides* (NDM12) และ *D. pascoei* (NDM13) แยกออกจากกลุ่มของเชื้อรา *Lasiodiplodia* อย่างชัดเจน และจัดอยู่ใน clade เดียวกันกับเชื้อรา *B. dothidea* (MG198191), *C. gloeosporioides* (HQ718505) และ *D. pascoei* (JX862538) จากฐานข้อมูล GenBank มีค่า bootstrap เท่ากับ 100, 99 และ 100 ตามลำดับ เชื้อรา

L. theobromae ไอโซเลต NDM5, NDM7, NDM8, NDM17, NDM19 และ NDM20 จัดอยู่ใน clade เดียวกับเชื้อรา *L. theobromae* (MH447074 และ MF580814) มีค่า bootstrap เท่ากับ 82 - 96 และเชื้อรา *L. pseudotheobromae* ไอโซเลต NDM16 และ NDM18 จัดอยู่ใน clade เดียวกับเชื้อรา *L. pseudotheobromae* (LC270869 และ KY404090) มีค่า bootstrap เท่ากับ 63 - 93 (Figure 5) จะเห็นได้ว่าการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ร่วมกับ EF1- α นั้น มีประสิทธิภาพในการระบุชนิดของเชื้อราในกลุ่ม Botryosphaeria ได้เป็นอย่างดี ผลการศึกษานี้มีความสอดคล้องกับ Alves et al. (2008) ที่ได้ระบุชนิดเชื้อราสาเหตุโรคผลเน่าของมะม่วงจากลักษณะสัณฐานวิทยา ร่วมกับเทคนิคชีวโมเลกุล ได้เชื้อรา *Lasiodiplodia* 3 ชนิด (species) คือ *L. theobromae*, *L. pseudotheobromae* และ *L. parva* และการระบุชนิดเชื้อราสาเหตุโรคผลเน่าของมะม่วงในประเทศอิหร่านโดยใช้ไพรเมอร์ ITS1 - ITS4 และ EF1-688F - EF1-1251R ทำให้ระบุเชื้อราได้ 5 ชนิด คือ *L. pseudotheobromae*, *L. theobromae*, *Lasiodiplodia hormozganensis*, *Lasiodiplodia gilanensis* และ *Lasiodiplodia iraniensis* ซึ่งเป็นรายงานชนิดใหม่ (Abdollahzadeh et al., 2010) Pavlic et al. (2004) ได้วิเคราะห์ phylogenetic tree จากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS และ EF1- α ของเชื้อราวงศ์ Botryosphaeriaceae พบว่าจำแนกเชื้อราได้เป็น 5 กลุ่ม ซึ่งมีความสอดคล้องกับลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา และระบุชนิดเชื้อราได้เพิ่ม 7 ชนิด ได้แก่ *Dothiorella longicollis*, *Fusicoccum ramosum*, *Lasiodiplodia margaritacea*, *Neofusicoccum novaehollandiae*, *Pseudofusicoccum adnsoniae*, *Pseudofusicoccum ardesiacum* และ *Pseudofusicoccum kimberleyense* เช่นเดียวกับ Trakunyingcharom et al. (2015) ที่ได้รายงานว่าการระบุและจำแนกชนิดเชื้อราวงศ์ Botryosphaeriaceae จากการวิเคราะห์ phylogenetic tree ของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS และ EF1- α ร่วมกับลักษณะทางสัณฐานวิทยานั้นมีความสอดคล้องกัน อีกทั้งระบุชนิดเชื้อราได้เพิ่มหนึ่งชนิด คือ เชื้อรา *Lasiodiplodia thailandica*

เชื้อราที่ก่อให้เกิดอาการโรคข้าวผลเน่าและผลเน่า ได้แก่ เชื้อรา *L. theobromae* (NDM5, NDM7, NDM8, NDM17, NDM19 และ NDM20), *L. pseudotheobromae* (NDM16 และ NDM 18), *B. dothidea* (NDM10) (ระยะการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศคือ เชื้อรา *Fusicoccum* sp.) และ *D. pascoei* (NDM13) (ระยะการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศคือ เชื้อรา *Phomopsis* sp.) ส่วนเชื้อรา *C. gleosporioides* (NDM12) เป็นสาเหตุโรคแอนแทรคโนส สอดคล้องกับ สุวิดา และคณะ (2563) ที่ได้ระบุชนิดเชื้อราสาเหตุโรคผลเน่าของมะม่วงเขียวเสวยเพื่อการส่งออกจากพื้นที่การผลิตในจังหวัดเลย พบโรคแอนแทรคโนส เกิดจากเชื้อรา *C. gleosporioides* อาการแผลเนื่อเยื่อตายยุบตัวลงเป็นแอ่ง โรคข้าวผลเน่า และโรคผลเน่าบริเวณปลายผล เนื่อเยื่อแผลไม่ยุบตัว มีของเหลวสีน้ำตาลไหลออกมาจากบริเวณแผล เกิดจากการเข้าทำลายของเชื้อรา *L. pseudotheobromae*, *L. theobromae*, *Fusicoccum fabicercianum* และ *N. parvum* อีกทั้งในประเทศจีนและออสเตรเลียได้มีรายงานการเกิดโรคผลเน่าของมะม่วงจากเชื้อรา *C. gleosporioides*, *Colletotrichum asianum* (Li et al., 2018) และ *Phomopsis fukushii* (Choi In-yong et al., 2017) นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อรา *L. theobromae* มีความรุนแรงในการก่อโรคผลบนผลมะม่วงมากกว่าเชื้อรา *N. parvum*, *N. mangiferae*, *F. aesculi* (Oliveira et al., 2010), *Neoscytalidium* sp. และ *Pseudofusicoccum* sp. อาการผลเน่าที่เกิดจากเชื้อรา *L. theobromae* จึงมีแผลขนาดใหญ่กว่าแผลที่เกิดจากเชื้อราอื่น ๆ และเป็นเชื้อราที่มีลักษณะรูปร่างหลายแบบ (pleomorphism) มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่คล้ายคลึงกันกับเชื้อรา *L. pseudotheobromae* มาก ทำให้ยากต่อการระบุชนิด ถึงแม้ว่า conidia ของเชื้อรา *L. pseudotheobromae* มีขนาดใหญ่ รูปร่างรีมากกว่า และไม่เรียวยาวไปที่ฐานมากเหมือนกับเชื้อรา *L. theobromae* ก็ตาม (Phillips et al., 2005) การระบุชนิดเชื้อราสาเหตุโรคโดยอาศัยลักษณะอาการโรคและลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา ร่วมกับเทคนิคทางด้านชีวโมเลกุลจากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ Internal Transcribed Spacer (ITS) ของ ribosomal DNA (rDNA) เป็นบริเวณที่ถูกอนุรักษ์ (conserved region) ไว้ในสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด และมีความผันแปรทางพันธุกรรมสูงกว่า DNA ในบริเวณอื่น ๆ ของ rDNA ทำให้แยกความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์หรือภายในสายพันธุ์เดียวกันได้ อีกทั้งบริเวณ ITS มีจำนวนซ้ำ (copy number) ของชุด rDNA สูง จึงง่ายต่อการวิเคราะห์โดยการเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยเทคนิค PCR รวมถึงการวิเคราะห์ phylogenetic trees โดยใช้ข้อมูลบริเวณ ITS ร่วมกับบริเวณ elongation factor 1-alpha gene (EF1- α) ซึ่งทำหน้าที่ควบคุมการผลิตโปรตีน EF1- α ที่มีลำดับอนุรักษ์สูง (highly conserved) และมีลักษณะเป็นยีนเดี่ยว (single copy gene) พบกระจายอยู่ทั่วไปใน

กระบวนการแปลรหัส (translation) ของยูแคริโอต (eukaryotes) จะทำให้การระบุชนิดเชื้อราสาเหตุโรคมีความชัดเจน ถูกต้อง และแม่นยำมากยิ่งขึ้น

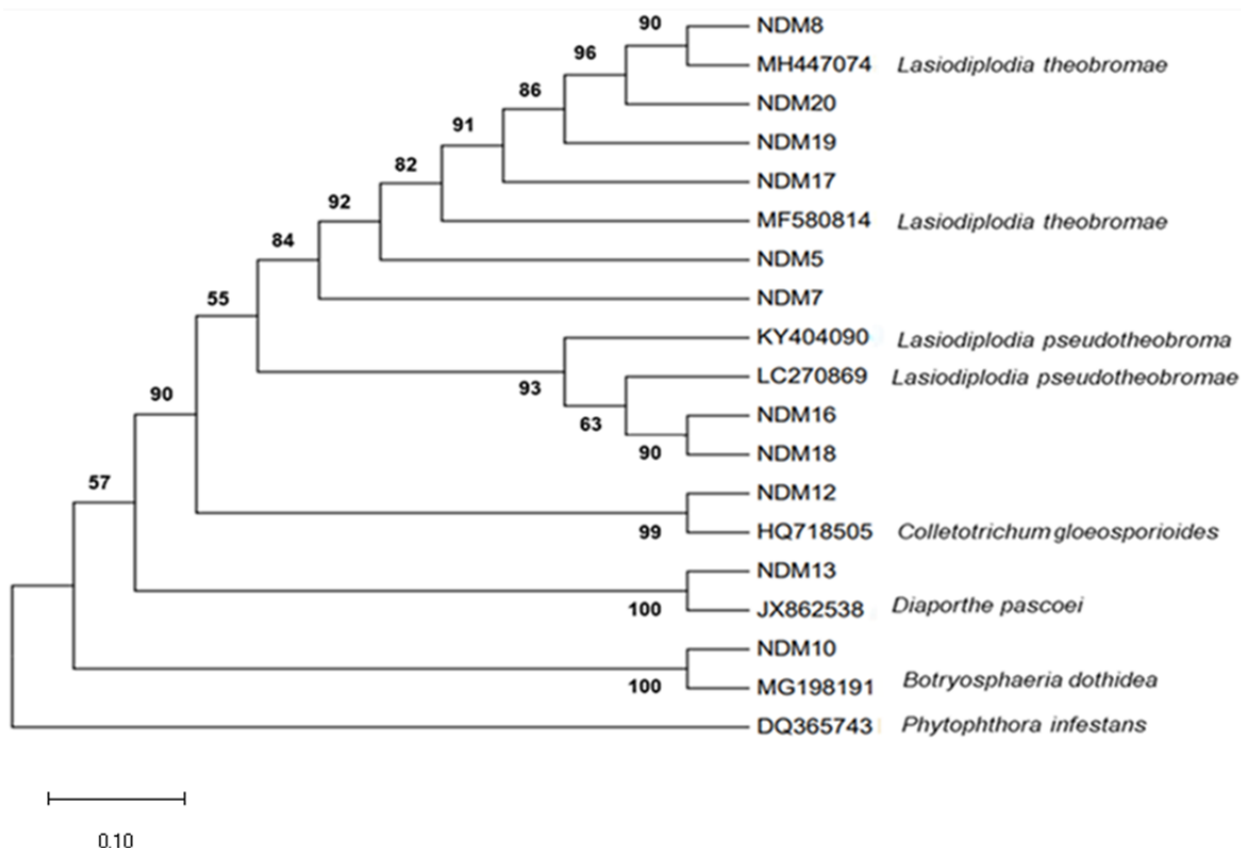


Figure 5 Phylogenetic tree constructed by using neighbor joining method with 1000 bootstrap replicates. The maximum likelihood tree is obtained from combined ITS and EF1- α sequence data retrieved randomly from the GenBank along with the present studied isolate. The scale bar on the rooted tree indicates a 0.10 substitution per nucleotide position.

สรุป

การระบุชนิดเชื้อราสาเหตุโรคผลเน่าของมะม่วงน้ำดอกไม้สีทองที่ปลูกในอำเภอบ้านแฮด จังหวัดขอนแก่น ซึ่งเป็นแหล่งผลิตและรวบรวมมะม่วงน้ำดอกไม้สีทองสำหรับส่งออกไปต่างประเทศ โดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา ร่วมกับเทคนิคชีวโมเลกุล พบว่าโรคเน่าเน่า โรคผลเน่า เกิดจากการเข้าทำลายของเชื้อราในวงศ์ Botryosphaeriaceae ได้แก่ *L. theobromae*, *L. pseudotheobromae*, *B. dothidea* และ *D. pascoei* และโรคแอนแทรคโนสเกิดจากเชื้อรา *C. gloeosporioides* เชื้อราที่มีความรุนแรงในการก่อโรคผลเน่ามากที่สุดคือ เชื้อรา *L. theobromae* (NDM8) ทั้งนี้ข้อมูลที่ได้จากการระบุชนิดเชื้อราสาเหตุโรคผลเน่าจะนำไปสู่การเฝ้าระวังการเกิดโรค การหาแนวทางป้องกันกำจัดและควบคุมโรคในระดับแปลงปลูกโดยใช้เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่มีศักยภาพในการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรค การใช้สารเคมีที่ตรงกับชนิดของเชื้อราสาเหตุโรค หรือการควบคุมโรคแบบผสมผสาน เพื่อลดการสะสมของเชื้อสาเหตุโรคในแปลงปลูกที่จะเข้าทำลายช่อดอก กิ่ง ก้าน บริเวณข้อผล และผลมะม่วงในระยะก่อนการเก็บเกี่ยว ซึ่งทำให้ผลมะม่วงแสดงอาการของโรคหลังเก็บเกี่ยว รวมถึงการควบคุมโรคในระยะหลังการเก็บเกี่ยว เช่น การจุ่มผลมะม่วงในน้ำอุ่นผสมสารเคมีที่มีประสิทธิภาพสูงในการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคผลเน่าได้หลายชนิด เพื่อลดการสูญเสียผลผลิตมะม่วงน้ำดอกไม้สีทองทั้งทางด้านคุณภาพและปริมาณในการเก็บรักษาและการขนส่ง

Table 2 Conidia size of the fungal isolates causal agents of fruit rot disease from Nam DoK Mai Si Thong mango

Species	Isolates	Conidia size (μm)(L x W)	Mean ± SD (μm)(L x W)	(L x W)	Source of data
<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	Type	(19-)21-31(-32.5) x (12-)13-15.5(-18.5)	26.2±2.6x14.2±1.2	1.9	Alves et al. (2008)
<i>Lasiodiplodia thailandica</i>	Type	(20-)22-25(-26) x (12-)13-15(-16)	Not report	Not report	Trakunyingcharoen et al. (2015)
<i>Lasiodiplodia</i> sp.	Type	(19-)21-31(-32.5) x (12-)13-15.5(-18.5)	26.2±2.6 x 14.2±1.2	1.9	Alves et al.(2008)
<i>Lasiodiplodia</i> sp.	NDM2	(17.1-)20.6-22.1(-23.6) x (11.8-)13.5-14.8(-16.2)	22.2±3.8 x 14.7±1.3	1.5	This study
<i>Lasiodiplodia</i> sp.	NDM5	(20.1-)22.6-23.3(-27.5) x (11.0-)14.1-15.1(-16.9)	23.0±1.4 x 14.6±0.9	1.5	This study
<i>Lasiodiplodia</i> sp.	NDM7	(15.9-)20.8-21.0(-24.9) x (11.1-)12.1-12.2(-13.1)	20.9±1.9 x 12.1±0.5	1.7	This study
<i>Lasiodiplodia</i> sp.	NDM8	(13.3-)19.1-21.2(-26.1) x (12.6-)15.1-17.4(20.6)	16.2±1.6 x 20.4±2.1	1.2	This study
<i>Lasiodiplodia</i> sp.	NDM17	(15.3-)20.8-22.0(-25.4) x (10.4-)13.3-14.5(-15.6)	21.3±2.2 x 14.1±1.3	1.5	This study
<i>Lasiodiplodia</i> sp.	NDM19	(20-)22.9--23.4(-26.6) x (12.1-)13.3-14(-15.3)	23.2±1.4 x 13.7±0.8	1.6	This study
<i>Lasiodiplodia</i> sp.	NDM20	(19.1-)22.7-23(-26.7) x (12.3-)14.0-14.1(-15.5)	22.2±1.6 x 14.0±0.8	1.5	This study
<i>Lasiodiplodia pseudotheobromae</i>	Type	(22.5-)23.5-32(-33) x (13.5-)14-18(-20)	28±2.5 x 16±1.2	1.7	Alves et al. (2008)
<i>Lasiodiplodia</i> sp.	NDM16	(21.1-)27.3-28.2(-30.6) x (12.5-)14.2-14.3(-15.9)	27.8±1.7 x 14.2±0.6	1.9	This study
<i>Lasiodiplodia</i> sp.	NDM18	(25.1-)28.9-29.7(33.42) x (12.1-)13.8-13.8(-16.2)	29.6±1.7 x 13.8±0.7	2.1	This study
<i>Fusicocum</i> sp.	Type	18.6-37.2 x 4.6-7	22.4 x 5	4.5	Slippers et al. (2005)
<i>Botryosphaeria dothidea</i>	Type	(20-)23-27(-30) x 4-5(6)	24.7 x 4.9	5.0	Alves et al. (2008)
<i>Fusicocum aesculi</i>	Type	(18.8) 23 (30.4) x (4.5) 5.1 (7)	Not report	4.5	Slippers et al. (2005)
<i>Fusicocum</i> sp.	NDM1	(24.7-)29.6-30.2(-33.8) x (5.2-)6.8-6.9(-8)	30.0±2.5 x 6.9±0.5	4.3	This study
<i>Fusicocum</i> sp.	NDM3	(10.0-)13.4-13.9(-16.4) x (3.0-)4.0-4.3(-5.6)	13.6±1.2 x 4.1±0.5	3.3	This study
<i>Fusicocum</i> sp.	NDM4	(12.5-)14.9-15.6(-18.4) x (3.1-)3.7-3.9(-4.6)	15.3±1.6 x 3.8±0.3	4.0	This study
<i>Fusicocum</i> sp.	NDM6	(10.6-)13.6-13.9(-16.5) x (3.5-)4.2-4.3(-5.9)	13.7±1.2 x 4.2±0.4	3.2	This study
<i>Fusicocum</i> sp.	NDM9	(15.8-)18.3-19.3(-21.7) x (3.5-)4.2-4.4(-5.5)	18.8±2.5 x 4.3±0.4	4.3	This study
<i>Fusicocum</i> sp.	NDM10	(15.8-)18.3-20.2(-24.2) x (2.8-)3.9-3.4(-4.9)	19.6±1.9 x 4.1±0.4	4.7	This study
<i>Fusicocum</i> sp.	NDM11	(15.8-)20.0-20.3(-25.5) x (3.3-)4.4-4.5(-5.6)	20.1±1.9 x 4.4±0.4	4.5	This study
<i>Colletotrichum siamense</i>	Type	15.0 - 18.5 x 5.0 - 5.5	-	-	Li et al. (2018)
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	Type	12-17 x 3.5 -6	-	-	Ragazzo-sanchez et al. 2015
<i>Colletotrichum acutatum</i>	Type	8.5-16.5 x 2.5- 4	-	-	Ragazzo-sanchez et al. 2015
<i>Colletotrichum</i> sp.	NDM12	(11.7-)12.8-13.3(-14.8) x (3.3-)3.9-4(-4.7)	-	-	This study
		β -conidia size (μm)(L x W)	α -conidia size (μm)(L x W)		
<i>Diaporthe pascoei</i>	Type	(15-) 19-31 (-39) x 1.0-1.5	(3.5-) 4-5 x 1-2	-	Tan et al. (2013)
<i>Phomopsis fukushii</i>	Type	22-30 x 1.0-1.5	6-10 x 2-4	-	Choi et al. (2017)
<i>Phomopsis</i> sp.	NDM13	(15.0-)20.9-21.6(-26.4) x (0.95-)1.5-1.6(-2.2)	(5.3-)6.6-6.7(-7.7) x (1.3-) 1.7-1.8(-2.3)	-	This study
<i>Phomopsis</i> sp.	NDM14	(16.5-)21.7-22.8(-26.8) x (1-)1.4-1.5(-1.7)	(5-)5.2-6.0 (-7.5) x (1.0-) 1.1-1.6(-1.9)	-	This study
<i>Phomopsis</i> sp.	NDM15	(18.5-)22.7-24.8(-27.8) x (1-)1.3-1.4(-1.9)	(4.7-)5.8-6.1(-6.8) x (0.9-) 1.5-1.6(-2.0)	-	This study

Table 3 Identification of the fungal causal agents of Nam Dok Mi Sri Thong fruit rot disease based on morphological characteristics and molecular techniques

Isolates	Morphological characteristic	Identified name	Primer ITS1 - ITS4		Identified name	Primer EF1251F - EF1251R		Identified name	Primer Lt347F - Lt347R	
			Identity (%)	Accession (No.)		Identity (%)	Accession (No.)		Identity (%)	Accession (No.)
NDM5	<i>Lasiodiplodia</i> sp.	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	99	AB873040	<i>L. theobromae</i>	100	MF580814	<i>L. theobromae</i>	100	MH820123
NDM7	<i>Lasiodiplodia</i> sp.	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	99	KU377516	<i>L. theobromae</i>	100	MH820123	<i>L. theobromae</i>	99	LC496371
NDM8	<i>Lasiodiplodia</i> sp.	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	95	LC074359	<i>L. theobromae</i>	100	MH447074	<i>L. theobromae</i>	100	MH820123
NDM10	<i>Botryosphaeria</i> sp.	<i>Botryosphaeria dothidea</i>	100	MG198191	<i>B. dothidea</i>	99	JX513624	-	-	-
NDM13	<i>Phomopsis</i> sp.	<i>Diaporthe pascoei</i>	99	KY011895	<i>D. pascoei</i>	99	JX862538	-	-	-
NDM16	<i>Lasiodiplodia</i> sp.	<i>Lasiodiplodia pseudotheobromae</i>	99	KP872340	<i>L. pseudotheobromae</i>	100	KT277529	<i>L. pseudotheobromae</i>	100	KX650830
NDM17	<i>Lasiodiplodia</i> sp.	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	100	HM466959	<i>L. theobromae</i>	99	KU507431	<i>L. theobromae</i>	100	KX401428
NDM18	<i>Lasiodiplodia</i> sp.	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	99	KX022498	<i>L. pseudotheobromae</i>	100	KT277529	<i>L. pseudotheobromae</i>	100	KX650830
NDM19	<i>Lasiodiplodia</i> sp.	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	100	HM466960	<i>L. theobromae</i>	99	JX464041	<i>L. theobromae</i>	100	KX401428
NDM20	<i>Lasiodiplodia</i> sp.	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	100	EF904843	<i>L. theobromae</i>	99	GQ469898	<i>L. theobromae</i>	100	KX650842
Primer CgInt - ITS4										
NDM12	<i>Colletotrichum</i> sp.	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	99	JX258803	<i>C. gloeosporioides</i>	99	AB971003	<i>C. gloeosporioides</i>	99	AJ301909

คำขอบคุณ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักงานปลัดกระทรวง กระทรวงการอุดมศึกษา วิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม และศูนย์วิจัยเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตรเพื่อเศรษฐกิจที่ยั่งยืน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่เอื้อเฟื้อสถานที่และอุปกรณ์ในการทำวิจัยครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

- ชัยณรงค์ รัตนกริฑากุล และพิมพ์รณภา เปี่ยมสกุล. 2557. ความหลากหลายในการใช้ข้อมูลดีเอ็นเอของเชื้อรา *Lasiodiplodia* sp. เพื่อการจำแนกเชื้อ. วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร. 45(พิเศษ 3/1): 157-160.
- สุวิดา แสไพศาล, ศุภศิริ เชวงเผ่าพันธุ์ และชนเรินทร์ ฟ้าแลบ. 2563. การระบุชนิดเชื้อราสาเหตุโรคผลเน่าของมะม่วงเขียวเสวยในพื้นที่การผลิตจังหวัดเลยเพื่อการส่งออก. วารสารแก่นเกษตร. 48(6): 1360-1373.
- สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 2563. สถิตินำเข้าส่งออก. แหล่งข้อมูล: http://www.oae.go.th/oae_report/export_import/export_result.php. ค้นเมื่อ 22 กรกฎาคม 2563.
- Abdollahzadeh, J., A. Javadi, E.M. Goltapeh, R. Zare, and A.J.L. Phillips. 2010. Phylogeny and morphology of four new species of *Lasiodiplodia* from Iran. *Persoonia*. 25: 1-10.
- Alves, A., P.W. Crous, A. Correia, and A.J.L. Phillips. 2008. Morphological and molecular data reveal cryptic speciation in *Lasiodiplodia theobromae*. *Fungal Diversity*. 28: 1-13.
- Alivindia, D.G., and A.A. Miriam. 2015. Crop Protection 67 96e101 Contents. *Crop Protection*. 67: 96-101.
- Choi, I.Y., J.H. Joa, S.W. Cho, W.H. Lee, V. Galea, and H.D. Shin. 2017. Occurrence of stem and shoot cankers caused by *Phomopsis fukushii* on mango. *Australasian Plant Disease Notes*. 12(1): 1-4.
- de Oliveira Costa, V.S., S.J. Michereff, R.B. Martins, C.A.T. Gava, E.S.G. Mizubuti, and M.P.S. Câmara. 2010. Species of *Botryosphaeriaceae* associated on mango in Brazil. *European Journal of Plant Pathology*. 127(4): 509-519.
- Kimura, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*. 16: 111-120.
- Li Q., S.G.S. Solangi, L. Tang, T. Guo, and S. Huang. 2018. Identification and characterization of *Colletotrichum* species associated with mango anthracnose in Guangxi, China. *Plant Disease*. 102(7): 480-489.
- Lim, L., M.H. Mohd, and L. Zakaria. 2019. Identification and pathogenicity of *Diaporthe* species associated with stem-end rot of mango (*Mangifera indica* L.). *European Journal Plant Pathology*. 155(2): 687-696.
- López, B.A., J.A. Ragazzo-Sánchez, R. Allende- Molar, G.D. Avila-Quezada, and M. Cal-deron-Santoyo. 2015. *Colletotrichum gloeosporioides* from mango Ataulfo: morphological, physiological, genetic and pathogenic aspects. *Journal of Research in Biology*. 5: 1641-1647.
- Marques, M.W., N.B. Lima, M.A. de Moraes Jr, S.J. Michereff, A.J.L. Phillips, and M.P.S. Câmara. 2013. *Botryosphaeria*, *Neofusicoccum*, *Neoscytalidium* and *Pseudofusicoccum* species associated with mango in Brazil. *Fungal Diversity*. 61: 195-208.
- Ni, H.F., H.R. Yang, R.S. Chen, R.F. Liou, and T.H. Hung. 2012. New *Botryosphaeriaceae* fruit rot of mango in Taiwan: identification and pathogenicity. *Botanical Studies*. 53(4): 467-478.
- Phillips, A.J.L., A. Alves, A. Correia, and J. Luque. 2005. Two new species of *Botryosphaeria* with brown, 1-septate ascospores and *Dothiorella* anamorphs. *Mycologia*. 97: 513-529.

- Ragazzo-Sánchez, J. A., T. Coria, J.A. Ramírez de León, R.I. Ortiz-Basurto, H. Cabanillas-Beltrán, and M. Calderon-Santoyo. 2015. Control of anthracnose in mango (*Mangifera indica* L.) var. ataulfo by high hydrostatic pressure combined with moderated temperature and the biocontrol agent *Candida famata*. *Sylwan*. 159: 448-460.
- Slippers, B., G.I. Johnson, P.W. Crous, T.A. Coutinho, B.D. Wingfield, and M.J. Wingfield. 2005. Phylogenetic and morphological re-evaluation of the *Botryosphaeria* species causing diseases of *Mangifera indica*. *Mycologia*. 97(1): 99–110.
- Swamy, J.S. 2012. Anthracnose- A devastating pre and post-harvest disease in mango. *Internat. Journal of Plant Protection Research*. 5: 429-437.
- Tan, Y.P., J. Edwards, K.R.E. Grice, and R.G. Shivas. 2013. Molecular phylogenetic analysis reveals six new species of *Diaporthe* from Australia. *Fungal Diversity*. 61(1): 251-260.
- Tamura, K., G. Stecher, D. Peterson, A. Filipski, and S. Kumar. 2013. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0 *Molecular Biology and Evolution*. 30: 2725-2729.
- Trakunyingcharoen, T., R. Cheewangkoon, C. To-anun, P.W. Crous, J.M. van Niekerk, and L. Lombard. 2014. *Botryosphaeriaceae* associated with diseases of mango (*Mangifera indica*). *Australasian Plant Pathology*. 43: 425-438.
- Trakunyingcharoen, T., L. Lombard, J.Z. Groenewald, R. Cheewangkoon, C. To-anun, and P.W. Crous. 2015. Caulicolous *Botryosphaeriales* from Thailand. *Persoonia*. 34: 87-99.
- Thompson, J.D., D.G. Higgins, and T.J. Gibson. 1994. Clustal W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*. 22: 4673-4680.
- White, T.J., T. Bruns, S. Lee, and J. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal DNA for phylogenetics, p. 315-322. In M.A. Innes, D.H. Gelfand, J.J. Sninsky, and T.J. White (ed.) *PCR protocols: a guide to methods and applications*. Academic Press, Inc., San Diego, Calif.