

# การระบุชนิดเชื้อราสาเหตุโรคผลเน่าของมะม่วงเขียวเสวยในพื้นที่การผลิต จังหวัดเลยเพื่อการส่งออก

## Identification of the fungal fruit rot causal agents of Khiew Sawoey mango of production area in Loei province for export

สุวิตา แสนไพศาล<sup>1,2\*</sup>, สุภัสสิริ เชนงเผ่าพันธุ์ และ ชนรินทร์ ฟ้าแลบ<sup>1</sup>

Suwita Saepaisan<sup>1,2\*</sup>, Suphasiri Chawengphaophan and Shanerin Falab<sup>1</sup>

**บทคัดย่อ:** การระบุชนิดเชื้อราสาเหตุโรคผลเน่าของมะม่วงเขียวเสวยเพื่อการส่งออกจากพื้นที่การผลิตในจังหวัดเลย โดยแยกเชื้อราสาเหตุโรคผลเน่าได้จำนวน 7 ไอโซเลต เมื่อนำมาทดสอบความสามารถในการก่อโรค พบว่าทุกไอโซเลตทำให้เกิดอาการผลเน่าบนมะม่วงเขียวเสวย เมื่อระบุสกุล (genus) โดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา พบว่า ไอโซเลต KWS1 มีลักษณะคล้ายกับ *Colletotrichum* sp. ไอโซเลต KWS4, KWS5, KWS6 และ KWS12 คล้ายกับ *Lasiodiplodia* sp. ส่วน KWS7 และ KWS9 คล้ายกับ *Fusicoccum* sp. หลังจากการระบุชนิด (species) ด้วยเทคนิคชีวโมเลกุลโดยเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วน internal transcribe spacer ของ rDNA (ITS1-5.8S-ITS2) และบริเวณ translation elongation factor 1-alpha (EF1- $\alpha$ ) gene ด้วยเทคนิค PCR พบว่า ได้ PCR product ขนาด 500 และ 550 คู่เบส ตามลำดับ เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GenBank พบว่า ไอโซเลต KWS1 มีความเหมือนกับ *Colletotrichum gloeosporioides* ไอโซเลต KWS4 และ KWS6 มีความเหมือนกับ *Lasiodiplodia pseudotheobromae* ไอโซเลต KWS5 และ KWS12 มีความเหมือนกับ *Lasiodiplodia theobromae* ไอโซเลต KWS7 และ KWS9 มีความเหมือนกับ *Fusicoccum fabicercianum* และ *Neofusicoccum parvum* ตามลำดับ

**คำสำคัญ:** โรคผลเน่า, มะม่วง, Botryosphaeriaceae species, เทคนิคชีวโมเลกุล, พื้นที่การผลิต

**ABSTRACT:** Identification of fungal pathogen causing fruit rot of Khiew Sawoey mango for export in production area of Loei province was conducted, the fruit rot pathogens were isolated, which derived seven isolates of fungi. Pathogenicity tests indicated that all of these fungal isolates were pathogenic on mango fruits. The 7 isolates of fungal pathogens causal agents were identified to general based on morphological characteristics. The result revealed that the isolate KWS1 related to *Colletotrichum* sp., and isolates KWS4, KWS5, KWS6, KWS12 similar to *Lasiodiplodia* sp., and KWS7, KWS9 similar to *Fusicoccum* sp. Molecular identification of those pathogens was performed.

Received June 23, 2020

Accepted October 12, 2020

<sup>1</sup> สาขากีฏวิทยาและโรคพืชวิทยา คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จังหวัดขอนแก่น 40002

<sup>1</sup> Department of Entomology and Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand

<sup>2</sup> ศูนย์วิจัยเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตรเพื่อเศรษฐกิจที่ยั่งยืน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จังหวัดขอนแก่น 40002

<sup>2</sup> Agricultural Biotechnology Research Center for sustainable Economy, Faculty of Agriculture, Khon Kaen University, Khon Kaen, 40002 Thailand

\*Corresponding author: Suwitsa@kku.ac.th

The DNA fragment of internal transcribe spacer of rDNA (ITS1-5.8S-ITS2) and translation elongation factor 1-alpha (EF1- $\alpha$ ) gene were amplified by PCR technique. The PCR products of 500 and 550 bp were obtained, respectively. Results of nucleotide sequences comparison with GenBank database indicated that the KWS1 was identical to *Colletotrichum gloeosporioides*, KWS4 and KWS6 to *Lasiodiplodia pseudotheobromae*; KWS5 and KWS12 to *Lasiodiplodia theobromae*; KWS7 and KWS9 to *Fusicoccum fabicerianum* and *Neofusicoccum parvum*, respectively.

**Keywords:** fruit rot disease, mango, Botryosphaeriaceae species, molecular technique, production area

## บทนำ

มะม่วง (*Mangifera indica* Linn.) เป็นผลไม้เศรษฐกิจที่มีความสำคัญมากชนิดหนึ่งของประเทศไทย มีเนื้อที่การผลิตไม้ผลมากที่สุดในประเทศ โดยในปี 2559 มี 2,145,211 ไร่ จำนวนผลผลิตออกสู่ตลาดเป็นจำนวน 3,243,559 ตัน ซึ่งตลาดต่างประเทศมีความต้องการมะม่วงเพิ่มมากขึ้นเรื่อยๆ มะม่วงเขียวเสวยเป็นมะม่วงที่ได้รับความนิยมบริโภคและปลูกเพื่อการส่งออกติดอันดับหนึ่งในสี่ของมะม่วงส่งออก ในปี พ.ศ. 2558 ประเทศไทยผลิตมะม่วงได้ปริมาณ 3,131,237 ตัน คิดเป็นมูลค่า 218,372.47 ล้านบาท ในจำนวนนี้เป็นมะม่วงนำดอกไม้มูลค่าประมาณ 59,556 ล้านบาท มะม่วงเขียวเสวย 88,300 ล้านบาท และมะม่วงคละชนิดประมาณ 70,515 ล้านบาท แหล่งผลิตมะม่วงเขียวเสวยเพื่อการส่งออกในภาคตะวันออกเฉียงเหนือมีหลายพื้นที่ อาทิเช่น จังหวัดอุดรธานี ขอนแก่น และเลย แต่แหล่งผลิตใหญ่เพื่อการส่งออกและเป็นตลาดกลางในการรับซื้อมะม่วงเขียวเสวยที่ใหญ่ที่สุดในภาคตะวันออกเฉียงเหนือคือ หมู่บ้านบุสม ตำบลบุสม อำเภอเชียงคน จังหวัดเลย ปัจจุบันมีพื้นที่ปลูกมะม่วง 22,000 ไร่ เป็นมะม่วงเขียวเสวยร้อยละ 39.21 ของพื้นที่ปลูกทั้งหมด ผลผลิตมะม่วงเขียวเสวยที่ได้นำมาบริโภคภายในประเทศและส่งออกไปยังตลาดต่างประเทศ ได้แก่ ประเทศเวียดนาม จีน และมาเลเซีย โดยเฉพาะการส่งออกไปประเทศเวียดนามมีปริมาณประมาณ 1,000 - 2,000 ตันต่อปี สามารถสร้างรายได้ให้กับเกษตรกรปีละประมาณ 200 ล้านบาท (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2559) ซึ่งนับเป็นพื้นที่สำคัญของการผลิตมะม่วงเขียวเสวย

สำหรับปัญหาสำคัญในการผลิตมะม่วงของประเทศไทย คือ โรคหลังการเก็บเกี่ยว เช่น โรคแอนแทรคโนส (Boonsiri and Siriphanich, 2007)

โรคผลเน่า และโรคขั้วผลเน่า (Sardsud et al., 2003) ส่งผลให้มะม่วงเน่าในระหว่างการเก็บรักษาและการขนส่ง คุณภาพของผลผลิตไม่ได้มาตรฐาน และไม่ตรงตามความต้องการของประเทศคู่ค้า ในประเทศไทยมีรายงานอาการผลเน่าเกิดจากเชื้อสาเหตุโรคพืชได้หลายชนิด ได้แก่ เชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides*, *Botryosphaeria dothidea*, *Lasiodiplodia theobromae* (กรมวิชาการเกษตร, 2557) และในต่างประเทศมีรายงานเกิดจากเชื้อ *C. gloeosporioides*, *Lasiodiplodia pseudotheobromae*, *L. theobromae*, *Phomopsis mangiferae* (Lim et al., 2019), *Neofusicoccum parvum* และ *Fusicoccum aesculi* ทำให้มีลักษณะอาการของโรคผลเน่าที่หลากหลาย และมีความคล้ายคลึงกันมาก แต่เกิดจากเชื้อราสาเหตุโรคต่างชนิดกัน การวินิจฉัยเชื้อสาเหตุโรคโดยพิจารณาถึงลักษณะอาการโรคและลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้ออาจก่อให้เกิดความคลาดเคลื่อนในการระบุชนิดของเชื้อสาเหตุโรคได้ ทั้งนี้การระบุชนิด (species) ของเชื้อสาเหตุโรคผลเน่าในพื้นที่ปลูกของจังหวัดเลยนั้นยังไม่มีรายงานมาก่อน การระบุชนิดของเชื้อสาเหตุจึงมีความสำคัญเพื่อนำไปสู่การควบคุมโรคอย่างมีประสิทธิภาพ

การระบุชนิดของเชื้อราในกลุ่ม *Botryosphaeria* ที่ก่อให้เกิดอาการโรคผลเน่า ต้องอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาร่วมกับลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อสาเหตุโรค เพื่อให้การระบุชนิดมีความถูกต้อง และแม่นยำมากยิ่งขึ้น เช่นการศึกษาของ Alves et al. (2008) ได้ระบุชนิดเชื้อ *Lasiodiplodia* sp. สาเหตุโรคผลเน่าของมะม่วงโดยใช้ลักษณะสัณฐานวิทยาและเทคนิคชีวโมเลกุล ได้ 3 ชนิด ได้แก่ เชื้อ *L. theobromae*, *L. pseudotheobromae* และ *Lasiodiplodia parva* อีกทั้ง Abdollahzadeh et al. (2010) ได้ศึกษาชนิดเชื้อ *Lasiodiplodia* sp. สาเหตุโรคผลเน่าของมะม่วงในประเทศอิหร่านจากการใช้ไพรเมอร์ ITS1 - ITS4

และ EF1688F - EF1251R และระบุชนิดเชื้อราได้ 5 ชนิด คือ *L. pseudotheobromae*, *L. theobromae*, *Lasiodiplodia hormozganensis*, *Lasiodiplodia gilanensis* และ *Lasiodiplodia iraniensis* ซึ่งเป็นรายงานชนิดใหม่

ในการผลิตมะม่วงเขียวเสวยเพื่อการส่งออกของเกษตรกรในพื้นที่การผลิตบ้านบูนม ต.บูนม อ.เชียงคน จ.เลย ได้ประสบปัญหาโรคผลเน่า ทำให้ไม่สามารถส่งออกผลผลิตมะม่วงได้ และยังไม่มีการศึกษาถึงการระบุชนิดเชื้อราสาเหตุโรคผลเน่าของมะม่วงเขียวเสวยในเขตพื้นที่ดังกล่าวมาก่อน ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อระบุชนิดของเชื้อราสาเหตุโรคผลเน่าของมะม่วงเขียวเสวย เพื่อหาแนวทางในการควบคุมและป้องกันกำจัดโรคอย่างมีประสิทธิภาพ รวมถึงการเฝ้าระวังการเกิดโรค เพื่อลดการสูญเสียผลผลิตมะม่วงเขียวเสวยทั้งทางด้านคุณภาพและปริมาณ

## วิธีการศึกษา

1. การแยกเชื้อสาเหตุโรคผลเน่าของมะม่วงเขียวเสวย  
แยกเชื้อสาเหตุโรคจากตัวอย่างมะม่วงเขียวเสวยที่ปลูกในพื้นที่ บ้านบูนม ต.บูนม อ.เชียงคน จ.เลย ซึ่งแสดงอาการผลเน่า (ได้รับความอนุเคราะห์จากสำนักงานเกษตรจังหวัดเลย กรมส่งเสริมการเกษตร) ด้วยวิธี tissue transplanting โดยตัดชิ้นส่วนผลมะม่วงที่เป็นโรค ขนาดประมาณ 0.5 X 0.5 เซนติเมตร (cm) แช่ใน sodium hypochlorite 0.6 เปอร์เซ็นต์ (%) เป็นเวลา 3 - 5 นาที ล้างชิ้นส่วนมะม่วงด้วยน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง ซับชิ้นส่วนมะม่วงให้แห้งด้วยกระดาษกรองหนึ่งฆ่าเชื้อ นำชิ้นส่วนมะม่วงวางบนอาหาร Water agar (WA) บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 - 2 วัน เมื่อสังเกตพบเส้นใยเชื้อราเจริญออกมาจากชิ้นส่วนมะม่วงจึงย้ายเส้นใยเชื้อราลงบนอาหาร Potato dextrose agar (PDA) เพื่อให้ได้เชื้อบริสุทธิ์  
นำเชื้อราบริสุทธิ์ที่แยกได้มาทดสอบการทำให้เกิดโรคด้วยวิธี detached fruit โดยเลี้ยงเชื้อราบนอาหาร PDA บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ  $28 \pm 2$  องศาเซลเซียส ( $^{\circ}\text{C}$ ) เป็นเวลา 7 วัน เตรียมมะม่วงเขียวเสวยสำหรับทดสอบ ฆ่าเชื้อที่ผิวด้วย ethyl alcohol 70 % ทำแผลบนผลด้วยใบมีดโกนฆ่าเชื้อ ขนาดแผล 1 cm จำนวน

2 แผลต่อผล ปลูกเชื้อโดยเจาะขึ้นรู้นบริเวณปลายเส้นใยเชื้อราด้วย cork borer ขนาด 0.5 cm ย้ายชิ้นส่วนที่มีเชื้อราวางบนผลมะม่วงเขียวเสวยปกติบริเวณที่ทำแผล สำหรับกรรมวิธีควบคุมปลูกเชื้อโดยใช้ชิ้นส่วนอาหาร PDA ปลอดเชื้อสาเหตุโรค บ่มผลมะม่วงในกล่องขึ้นที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 - 72 ชั่วโมง สังเกตอาการของโรคบนผลมะม่วง

2. การระบุชนิดเชื้อราสาเหตุโรคโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา

นำเชื้อราสาเหตุโรคที่แยกได้มาเลี้ยงบนอาหาร PDA บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ  $28 \pm 2$   $^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา 7 วัน สำหรับเชื้อราสาเหตุโรคที่ไม่พบการสร้างสปอร์นั้น ชักนำให้เชื้อราสร้างสปอร์โดยเลี้ยงเชื้อราบนอาหาร 2% WA ที่วางใบสนสามใบ (*Pinus radiate*) หนึ่งฆ่าเชื้อบนผิวหน้าอาหาร บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ  $25$   $^{\circ}\text{C}$  ภายใต้แสง near UV สลับกับไม่ให้แสง (12/12 ชั่วโมง) เป็นเวลา 14 - 30 วัน (Trakunyingcharoen et al., 2014) จากนั้นศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราสาเหตุโรค ได้แก่ ลักษณะโคโลนี รูปร่าง ขนาด และสีของสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ จากตัวอย่างสปอร์จำนวน 50 สปอร์ต่อไอโซเลต ด้วยโปรแกรม Axios vision SE64 (Carl Zeiss, Germany) เพื่อระบุชนิดของเชื้อราสาเหตุโรคในระดับสกุล (genus)

3. การระบุชนิดเชื้อราสาเหตุโรคด้วยเทคนิคชีวโมเลกุล  
สกัดดีเอ็นเอของเชื้อราสาเหตุโรคจากเส้นใยเชื้อราด้วยวิธี CTAB method (สุวิดา, 2554) นำดีเอ็นเอที่ได้มาเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค PCR ในส่วน internal transcribe spacer ของ rDNA (ITS1-5.8S-ITS2) โดยใช้ไพรเมอร์ ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') - ITS4 (5'-TCCTCCGCTATTGATATGC-3') (White et al., 1990) และบริเวณ translation elongation factor 1-alpha (EF1- $\alpha$ ) gene โดยใช้ไพรเมอร์ EF1688F (5'-CGGTCACTTGATCTACAAGTGC-3') - EF1251R (5'-CCTC-GAACTCACCAGTACCG-3') (Alves et al., 2008) ปฏิกริยา PCR ประกอบด้วยดีเอ็นเอความเข้มข้น 100 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ( $\mu\text{M}$ ) 10X Immobuffer ปริมาตร 2.5  $\mu\text{L}$  50mM  $\text{MgCl}_2$  ปริมาตร 0.75  $\mu\text{L}$  25mM dNTPs ปริมาตร 2.5  $\mu\text{L}$  ไพรเมอร์ความเข้มข้น 5 ไมโครโมลาร์ อย่างละ 1.25  $\mu\text{L}$  เอนไซม์ Taq DNA polymerase

(ImmolaseTM, Bionline) ความเข้มข้น 5 หน่วยต่อไมโครลิตร ปริมาตร 0.15  $\mu$ l และปรับปริมาตรสุดท้ายด้วย water nuclease free ให้ได้ 25  $\mu$ l และนำเข้าเครื่องควบคุมอุณหภูมิอัตโนมัติ thermal cycler โดยมีขั้นตอนดังนี้ initial denaturation ที่อุณหภูมิ 95 °C เป็นเวลา 7 นาที denaturation ที่อุณหภูมิ 95 °C เป็นเวลา 1 นาที annealing ของไพรเมอร์ ITS1-ITS4 ที่อุณหภูมิ 50 °C และไพรเมอร์ EF1688F-EF1251R ที่ อุณหภูมิ 52 °C เป็นเวลา 1.30 นาที extension ที่อุณหภูมิ 72 °C เป็นเวลา 2 นาที (จำนวน 30 รอบ) และ final extension ที่อุณหภูมิ 72 °C เป็นเวลา 10 นาที

ตรวจวิเคราะห์การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วย electrophoresis และนำ PCR products ไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้บริการบริษัท WardMedic (Ward Medic Ltd., Part.) ทำการเปรียบเทียบข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank โดยใช้โปรแกรม BlastN ผ่านเว็บไซต์ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> นำลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อราสาเหตุโรคและลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีความใกล้เคียงกันจากการเปรียบเทียบในฐานข้อมูล GenBank มาจัดเรียงแนวความสัมพันธ์ (multiple sequence alignment) โดยโปรแกรม Clustal W (Thompson et al., 1994) วิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมจากค่าความแตกต่างทางพันธุกรรม (genetic distance) โดยใช้วิธี Kimura 2-parameter (Kimura, 1980) นำค่าความแตกต่างที่ได้มาสร้าง phylogenetic tree โดยวิธี Neighbor-joining (Tamura et al., 2013)

## ผลการศึกษาและวิจารณ์

1. การแยกเชื้อสาเหตุโรคผลเน่าของมะม่วงเขียวเสวย แยกเชื้อราสาเหตุโรคจากผลมะม่วงเขียวเสวยที่แสดงอาการผลเน่าได้เชื้อราทั้งหมด 7 ไอโซเลต คือ ไอโซเลต KWS1 แยกได้จากผลที่แสดงอาการแผลเนื้อเยื่อตายยุบตัวลงเป็นแอ่ง และไอโซเลต KWS4, KWS5, KWS6, KWS7, KWS9 และ KWS12 แยกได้จากผลที่เกิดอาการผลเน่าดำบริเวณขั้วผล ปลายผล เนื้อเยื่อแผลไม่ยุบตัว และมีของเหลวสีน้ำตาลไหล

ออกมาจากบริเวณแผล เมื่อนำเชื้อราทั้ง 7 ไอโซเลตไปทดสอบความสามารถในการก่อให้เกิดโรค พบว่า หลังจากปลูกเชื้อราไอโซเลต KWS 1 เป็นเวลา 48 - 72 ชั่วโมง ผลมะม่วงเกิดแผลเป็นจุดสีน้ำตาลดำ ค่อนข้างกลม เนื้อเยื่อแผลยุบตัวเล็กน้อย คล้ายกับอาการโรคแอนแทรคโนส (Figure 1B) ซึ่งผลการทดสอบมีความสอดคล้องกับ Swamy (2012) และกรมวิชาการเกษตร (2557) ที่ได้รายงานว่าอาการโรคแอนแทรคโนสบนผลมะม่วงจะพบจุดสีน้ำตาลเข้มจนถึงน้ำตาลดำขนาดเล็ก ต่อมาขยายขนาดขึ้น จุดแผลที่อยู่ใกล้กันเชื่อมต่อกันเป็นแผลขนาดใหญ่ เนื้อเยื่อยุบตัวไปในผิวผล หากมีความชื้นในอากาศสูงจะพบกลุ่มสปอร์สีส้มอมชมพูบริเวณแผล สำหรับโรคแอนแทรคโนสนับว่าเป็นปัญหาสำคัญทั้งก่อนและหลังการเก็บเกี่ยวของมะม่วง Dinh et al. (2003) ได้รายงานว่าพบการสูญเสียผลผลิตจากโรคแอนแทรคโนสในมะม่วงน้ำดอกไม้สีทองที่ตลาดไท ประเทศไทย 27 - 46% ซึ่งความสูญเสียอาจมีมากถึง 60% หรือสูงกว่าในช่วงฝนตกหนัก

เชื้อไอโซเลต KWS4, KWS5, KWS6, KWS7, KWS9 และ KWS12 ทำให้ผลมะม่วงแสดงอาการแผลจุดสีน้ำตาลดำ หลังจากการปลูกเชื้อ 24 - 48 ชั่วโมง ผลมะม่วงแสดงอาการโรคได้เร็วกว่าการปลูกเชื้อไอโซเลต KWS1 โดยทำให้เกิดแผลขนาดใหญ่ สีน้ำตาลเข้มจนถึงดำ ขยายวงกว้างอย่างรวดเร็ว พบเส้นใยเชื้อราและของเหลวสีน้ำตาลไหลออกมาจากบริเวณแผล (Figure 1C-H) คล้ายกับอาการโรคผลเน่า ในขณะที่กรรมวิธีควบคุมไม่พบอาการผลเน่า (Figure 1A) ผลการแยกเชื้อและทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรคให้ผลที่สอดคล้องกับรายงานของ อูราภรณ์ และคณะ (2548) ที่ได้พบว่า โรคผลเน่าของมะม่วง จะพบแผลสีน้ำตาลถึงดำขอบแผลไม่เรียบ มีลักษณะตุ่ม แผลจะลุกลามทั่วทั้งผลทำให้ผลนิ่ม ผลเป็นสีน้ำตาลเข้มถึงดำภายในเวลา 5 - 10 วัน และสามารถพบอาการเน่าเป็นแผลสีน้ำตาลลุกลากจากรอยตัดขั้วผลไปยังกันผล ทำให้ผลเน่าผิวนุ่มอย่างรวดเร็ว และผลการทดลองที่ได้คล้ายคลึงกับงานวิจัยที่มีการปลูกเชื้อราในวงศ์ Botryosphaeriaceae ลงบนผลมะม่วง ซึ่งพบแผลสีน้ำตาล หรือสีน้ำตาลดำบนผลมะม่วง หลังจากปลูกเชื้อเป็นเวลา 3 - 7 วัน แผลขยายอย่างรวดเร็วทำให้

ผลมะม่วงเน่าทั้งผล และฉ่ำน้ำ ขนาดของแผลมีความแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อราสาเหตุโรค อาการผลเน่าที่เกิดจากเชื้อรา *L. theobromae* มักมีแผลขนาดใหญ่กว่าแผลที่เกิดจากเชื้อราอื่น ๆ

โรคผลเน่าสร้างความเสียหายเป็นอย่างมากในหลาย ๆ ประเทศ เช่น ใต้หวัน ออสเตรเลีย อินเดีย ปากีสถาน และบราซิล เป็นต้น (Ni et al., 2012)

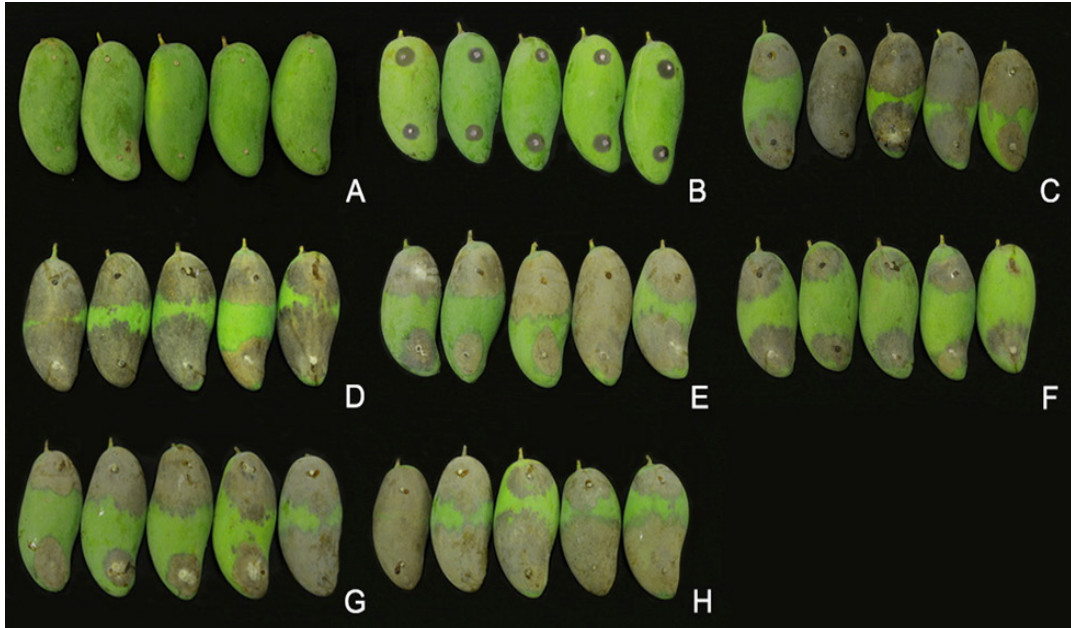


Figure 1 Pathogenicity test on fruit rot of Khiew Sawoey mango, 24-72 hours after inoculation; A: control, B-H: fruit rot symptoms after inoculation with isolates KWS1, KWS4, KWS5, KWS6, KWS7, KWS9 and KWS12, respectively.

## 2. การระบุชนิดเชื้อราสาเหตุโรคโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและเทคนิคชีวโมเลกุล

การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราสาเหตุโรคผลเน่าของมะม่วงเขียวเสวยทั้ง 7 ไอโซเลตพบว่า ไอโซเลต KWS1 มีการเจริญของเส้นใยขึ้นบนอาหาร PDA โคโลนีเจริญเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อโดยเฉลี่ยประมาณ 7 วัน ลักษณะโคโลนีมีสีขาวอมเทา เส้นใยละเอียดฟูเล็กน้อย สร้างกลุ่มสปอร์สีส้มเป็นวงซ้อนกัน (Figure 2A) เส้นใยมีผนังกัน สร้าง fruiting body แบบ acervulus (Figure 2B) พบ conidiophore รูปทรงกระบอก (cylindrical) ใส ผนังเรียบ (Figure 2C) conidia มีเซลล์เดียว ใส รูปทรงกระบอก หัวท้ายมน ขนาดประมาณ 15 - 20 x 2.5 - 5 ไมโครเมตร ( $\mu\text{m}$ ) (Figure 2D) คล้ายกับเชื้อรา

*Colletotrichum* sp. เมื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ ITS1 - ITS4 และ EF1688F - EF1251R พบ PCR products ขนาดประมาณ 550 คู่เบส ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อราไอโซเลต KWS1 มีความเหมือนกับเชื้อรา *C. gloeosporioides* (accession NO. KC010540) ในฐานข้อมูล GenBank 99 % (Table 1) สอดคล้องกับ López et al. (2015) ได้รายงานว่าลักษณะโคโลนีของเชื้อรา *Colletotrichum* บนอาหาร PDA เริ่มแรกมีสีขาวต่อมาเปลี่ยนเป็นสีขาวอมเทา พบกลุ่มสปอร์สีชมพูหรือสีส้มเรียงรอบโคโลนีลักษณะคล้ายวงแหวน (concentric ring) conidia เซลล์เดียว มีลักษณะเป็นรูปทรงกระบอก หัวท้ายมน หรือเรียวยาวแหลม ใส มีขนาดเฉลี่ยเท่ากับ 12 - 17 x 3.5 - 6  $\mu\text{m}$  สร้างบน conidiophore ใน

fruiting body คล้ายจวนกันต้น (acervulus) ปากเปิดกว้าง ไม่พบ setae (พงศธร และปริญญา, 2554) และสอดคล้องกับรายงานของ Kamle et al. (2013) ที่ได้ระบุชนิดของเชื้อรา *C. gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรกโนส ซึ่งแยกได้จากพื้นที่ปลูกมะม่วงต่าง ๆ ในประเทศอินเดีย จำนวน 11 ไอโซเลต ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ ITS1 - ITS4 พบ PCR product ขนาดประมาณ 560 คู่เบส

สำหรับลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา ไอโซเลต KWS4, KWS5, KWS6 และ KWS 12 พบว่าเส้นใยเจริญอย่างรวดเร็วบนอาหาร PDA โคโลนีเจริญเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อภายในเวลา 3 วัน ลักษณะโคโลนีมีสีขาวอมเทา สีเทาจนถึงสีเทาดำ เส้นใยละเอียดและฟู (Figure 3A, 4A, 5A, 6A) เส้นใยมีผนังกัน ไม่สร้างสปอร์บนอาหาร PDA เมื่อกระตุ้นให้เชื้อราสร้างสปอร์ พบการสร้าง fruiting body แบบ pycnidia บนใบสน (Figure 3B, 4B, 5B, 6B) ภายในมีเส้นใย paraphyses ใส ไม่มีสี รูปทรงกระบอก conidiogenous cells ใส ผนังบาง มีลักษณะแบบ holoblastic ขนาดประมาณ 5 - 10 x 2.5 - 5  $\mu\text{m}$  (Figure 3C, 4C, 5C, 6C) สปอร์อ่อน (immature conidia) มีเซลล์เดียว ใส รูปร่างกลมรีจนถึงค่อนข้างรี (subovoid-ellipsoid) ผนังหนา ขนาดเฉลี่ยประมาณ 16 - 26 x 12 - 18  $\mu\text{m}$  (Figure 3D, 4D, 5D, 6D) สปอร์แก่ (mature conidia) มีผนังกันตามขวาง 1 อัน มี 2 เซลล์ สีน้ำตาลจนถึงสีน้ำตาลเข้ม และผิวด้านในของผนังสปอร์มีริ้วลาย (strate) ตามยาว (Figure 3E, 4E, 5E, 6E) เชื้อราทั้ง 4 ไอโซเลตนี้มีลักษณะคล้ายกับเชื้อรา *Lasiodiplodia* sp. สอดคล้องกับ Alves et al. (2008) ที่ได้รายงานเชื้อรา *Lasiodiplodia* sp. เจริญได้ดีบนอาหาร PDA เส้นใยมีผนังกัน เส้นใยมีสีขาวละเอียดและค่อนข้างฟู เมื่อแก่เส้นใยจะเปลี่ยนเป็นสีเทาดำ การสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศสร้าง pycnidia ค่อนข้างกลมปากเปิดแคบ มีช่องเปิด (ostiole) ยื่นออกมาจากใน pycnidia ภายในประกอบด้วยเส้นใย paraphyses ใสไม่มีสี รูปร่างทรงกระบอก มีผนังกัน มี conidiogenous cells ใส ไม่มีสี สร้าง conidia อยู่บนปลาย conidiophores conidia เมื่ออ่อนมีเซลล์เดียว ใสไม่มีสี รูปร่างค่อนข้างรีจนถึงค่อนข้างกลม (sub-ovoid to ellipsoid-ovoid) ปลายด้านหนึ่งกลมมน อีกด้านสอบลงคล้ายกรวย ไม่มีผนังกัน เมื่อ conidia แก่จะสร้างผนังกันตรงกลาง 1 อัน ทำให้แบ่งออกเป็น

2 เซลล์ มีรูปร่างคล้ายไข่ ผนังด้านนอกหนา 2 ชั้น และมีการสร้างเม็ดสีเมลานินสีน้ำตาลเข้มบนผิวเซลล์ด้านใน เรียงตัวเห็นเป็นริ้วในแนวยาว เชื้อรา *L. theobromae* มีขนาดสปอร์เฉลี่ย 26.2 - 27 x 14 - 14.4  $\mu\text{m}$  และเชื้อรา *L. pseudotheobromae* มีขนาดสปอร์เฉลี่ย 23.5 - 32 x 14 - 18  $\mu\text{m}$  เชื้อรา *L. theobromae* และ *L. pseudotheobromae* มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่คล้ายคลึงกันมาก โดยมีความแตกต่างกันที่ conidia ของ *L. pseudotheobromae* มีขนาดใหญ่ รูปร่างเป็นวงรีมากกว่าและไม่เรียวยาวไปที่ฐานมากเหมือนกับเชื้อรา *L. theobromae* (Phillips et al., 2005) เมื่อระบุชนิดด้วยเทคนิคชีวโมเลกุลโดยเทคนิค PCR จากการใช้ไพรเมอร์ ITS1 - ITS4 และ EF1688F - EF1251R ได้ PCR product ขนาดประมาณ 500 และ 550 คู่เบส ตามลำดับ เชื้อไอโซเลต KWS4 และ KWS6 มีความเหมือนกับเชื้อรา *L. pseudotheobromae* (accession NO. MK426803 และ MN818616) 99-100 % ไอโซเลต KWS5 และ KWS12 มีความเหมือนกับเชื้อรา *L. theobromae* (accession NO. MK587446 และ MK530044) 99-100 % (Table 1) ซึ่งคล้ายกับ Ni et al. (2012) ได้ระบุชนิดเชื้อราสาเหตุโรคผลเน่าของมะม่วงที่ประเทศไต้หวัน โดยใช้ไพรเมอร์ ITS1 - ITS4 และ EF1728F - EF1986R พบ PCR product ขนาด 540 และ 320 คู่เบส ตามลำดับ มีความคล้ายกับเชื้อรา *L. theobromae* (GQ502453 และ GQ979999)

เชื้อไอโซเลต KWS 7 และ KWS 9 มีการเจริญค่อนข้างเร็วบนอาหาร PDA เจริญเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อภายในเวลา 3 - 5 วัน ลักษณะโคโลนีมีสีเทาเข้มจนถึงสีเทาดำ เส้นใยละเอียดและฟูเล็กน้อย (Figure 7A, 8A) เส้นใยมีผนังกัน ไม่สร้างสปอร์บนอาหาร PDA พบการสร้าง pycnidia บนใบสน (Figure 7B, 8B) ภายในมีเส้นใย paraphyses ใส ไม่มีสี รูปทรงกระบอก conidiogenous cells ใส ผนังบาง ผิวเรียบ ขนาดประมาณ 10 - 15 x 1.5 - 2.5  $\mu\text{m}$  (Figure 7C, 8C) และ conidia มีเซลล์เดียว ใส รูปทรงกระสวย (fusiform) ผิวเรียบ ผนังบาง ขนาดประมาณ 20 - 27 x 3.5 - 5.5  $\mu\text{m}$  (Figure 7D, 8D) ลักษณะคล้ายกับเชื้อรา *Fusicoccum* sp. (Table 1) ลักษณะของเชื้อดังกล่าวคล้ายกับที่ Slippers et al. (2005) ได้รายงานไว้ ลักษณะโคโลนีเริ่มแรกมีสีขาวต่อมาเปลี่ยนเป็นสีเทาดำ conidia ใส เซลล์เดียว ผนังบาง

รูปร่างคล้ายกระสวย - ยาวรี (spindle-shaped) และไม่มีผนังกัน มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ  $23 - 25 \times 4 - 5 \mu\text{m}$  จากการระบุชนิดด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ ITS1-ITS4 และไพรเมอร์ EF1688F - EF1251R ได้ PCR product ขนาดประมาณ 500 และ 550 คู่เบสตามลำดับ ซึ่งเชื้อไอโซเลต KWS7 มีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกับเชื้อ *B. dothidia* (accession NO. KF516938) 99 % และมีความเหมือนกับเชื้อรา *Fusicoccum fabicercianum* (accession NO. JX513621) 99 % ซึ่งเป็นระยะการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ (anamorphic stage) ของเชื้อรา *B. dothidia* ตามลำดับ ขณะที่เชื้อราไอโซเลต KWS9 มีความเหมือนกับเชื้อรา *N. parvum* (accession NO. GU066688 และ MH265978) 100 % สอดคล้องกับการศึกษาของ Marques et al. (2013) ได้ระบุชนิดของเชื้อราวงศ์ Botryosphaeriaceae สาเหตุโรคผลเน่า และขั้วผลเน่าของมะม่วงในประเทศไทยโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานร่วมกับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วน ITS1-5.8S-ITS2 และ EF1- $\alpha$  สามารถระบุชนิดเชื้อราได้หลายชนิด ได้แก่ เชื้อรา *B. dothidea* ซึ่งมีจำนวนมากถึง 37 เปอร์เซ็นต์, *Botryosphaeria mamane*, *F. fabicercianum*, *N. parvum*, *Neofusicoccum brasiliense* sp. nov, *Neoscytalidium dimidiatum* และ *Pseudofusicoccum stromaticum*

เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS และ EF1- $\alpha$  ของเชื้อราสาเหตุโรคทั้ง 7 ไอโซเลต มาวิเคราะห์สายสัมพันธ์วิวัฒนาการและสร้าง phylogenetic tree พบว่าเชื้อรา *C. gleosporioides* (KWS1), *L. pseudotheobromae* (KWS4 และ KWS6), *L. theobromae* (KWS5 และ

KWS12), *F. fabicercianum* (KWS7) และ *N. parvum* (KWS9) จัดอยู่ใน clade ของเชื้อราในสกุล (genus) และชนิด (species) เดียวกันซึ่งนำมาจากฐานข้อมูล GenBank การระบุชนิดเชื้อราสาเหตุโรคผลเน่าของมะม่วงเขียนเสวยนั้นมีความถูกต้อง แม่นยำ และมีความสอดคล้องกับลักษณะทางสัณฐานวิทยา เช่นเดียวกับการศึกษาของ Pavlic et al. (2004) ที่ได้นำลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อราวงศ์ Botryosphaeriaceae บริเวณ ITS และ EF1- $\alpha$  มาสร้าง phylogenetic tree พบว่าระบุชนิดของเชื้อราได้ 5 กลุ่มสอดคล้องกับลักษณะทางสัณฐานวิทยา และระบุชนิดเชื้อราได้เพิ่ม 7 ชนิด ได้แก่ เชื้อรา *Dothiorella longicollis*, *Fusicoccum ramosum*, *Lasiodiplodia margaritacea*, *Neofusicoccum novaehollandiae*, *Pseudofusicoccum adhsoniae*, *Pseudofusicoccum ardesiacum* และ *Pseudofusicoccum kimberleyense* นอกจากนี้ Trakunyingcharom et al. (2015) ได้ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา ร่วมกับการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS และ EF1- $\alpha$  ของเชื้อราในวงศ์ Botryosphaeriaceae และวิเคราะห์สายสัมพันธ์วิวัฒนาการ สามารถระบุและจำแนกชนิดเชื้อราได้สอดคล้องกับลักษณะทางสัณฐานวิทยา และระบุชนิดเชื้อราได้เพิ่มหนึ่งชนิด ได้แก่ เชื้อรา *Lasiodiplodia thailandica*

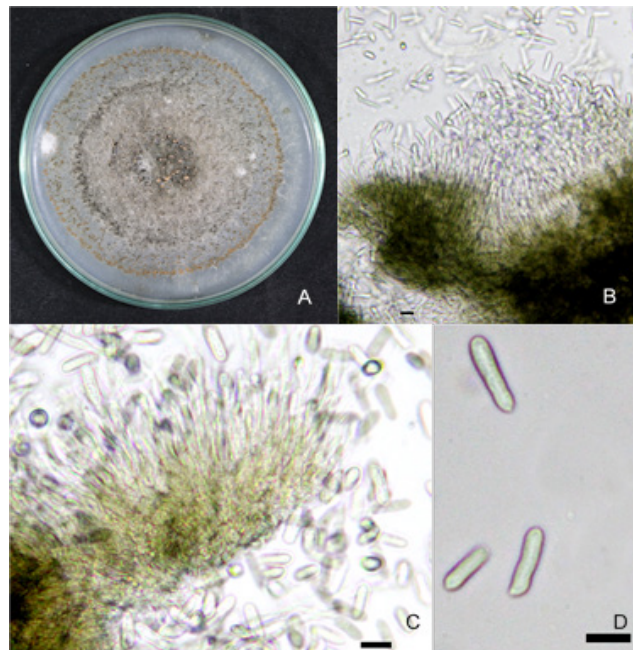


Figure 2 Morphological characteristics of *Colletotrichum gloeosporioides* (KWS1), A: colony of isolate KWS1 on PDA, 7 days after incubation, B: acervulus, C: conidia, conidiophore and D: conidia of isolate KWS1. (Bars = 10  $\mu$ m)

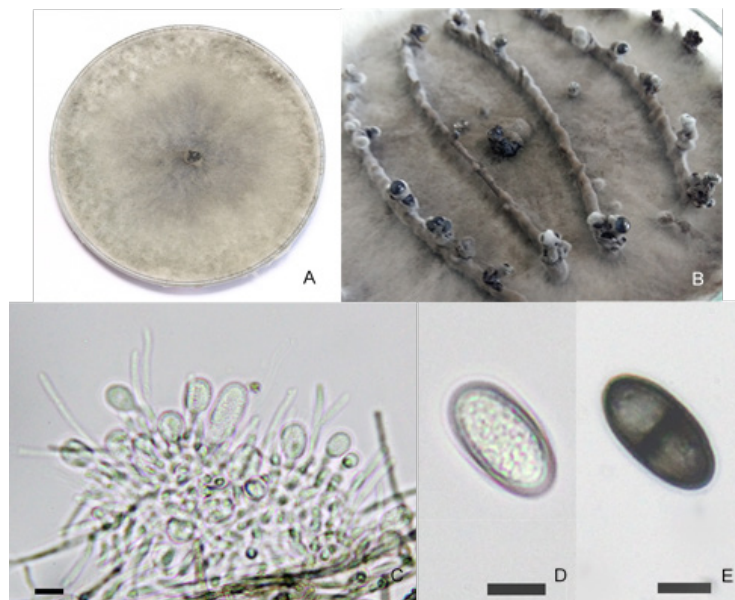


Figure 3 Morphological characteristics of *Lasiodiplodia pseudotheobromae* (KWS4), A: colony of isolate KWS4 on PDA, 7 days after incubation, B: pycnidia forming on pine leaves, C: conidigenous cells and paraphyses, D: immature conidium, and E: mature conidium. (Bars = 10  $\mu$ m)



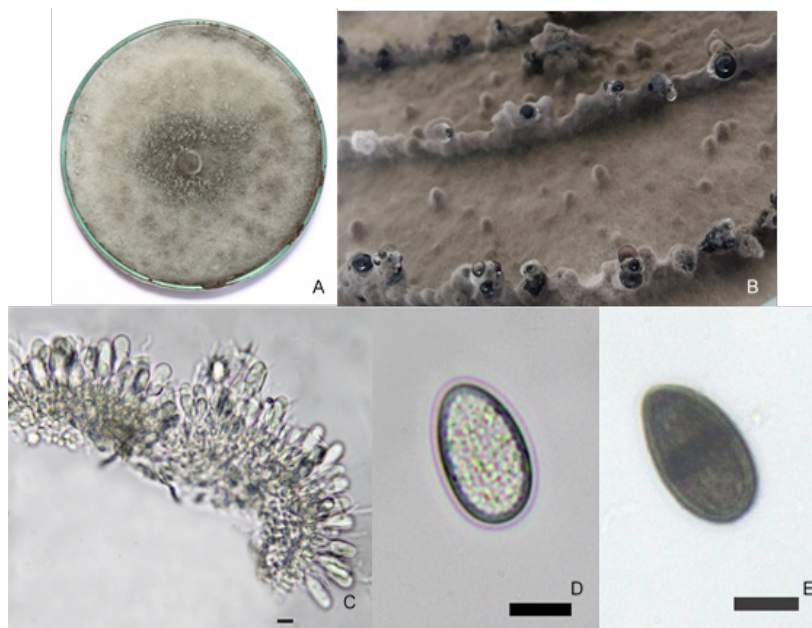


Figure 4 Morphological characteristics of *Lasiodiplodia theobromae* (KWS5), A: colony of isolate KWS5 on PDA, 7 days after incubation, B: pycnidia forming on pine leaves, C: conidiogenous cells and paraphyses, D: immature conidium, and E: mature conidium. (Bars = 10  $\mu$ m)

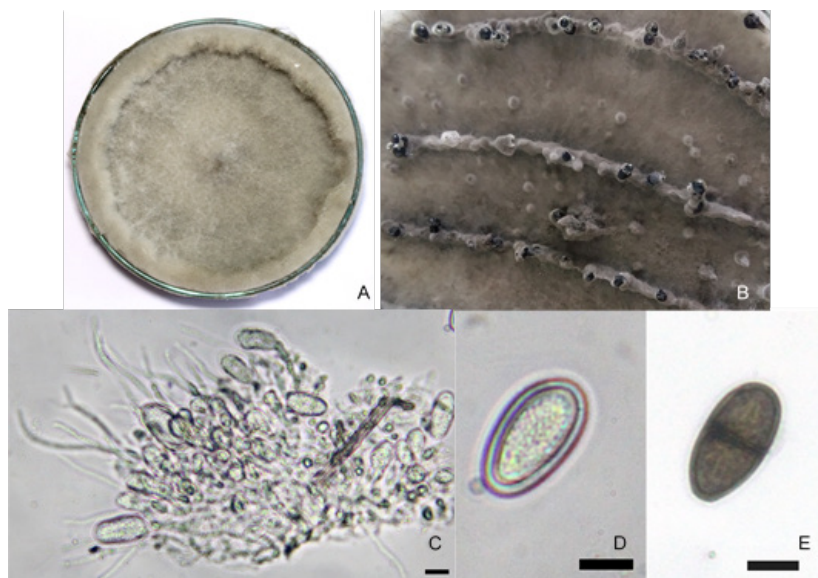
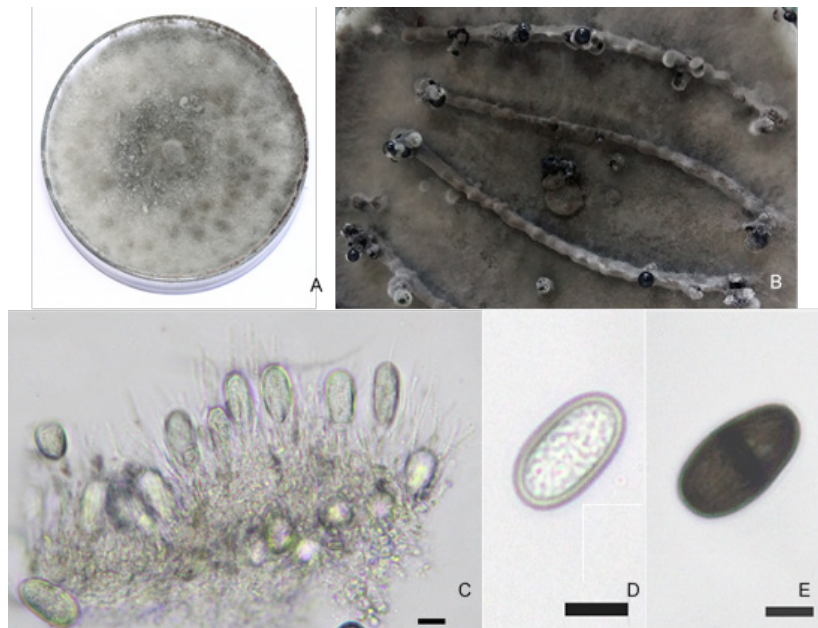
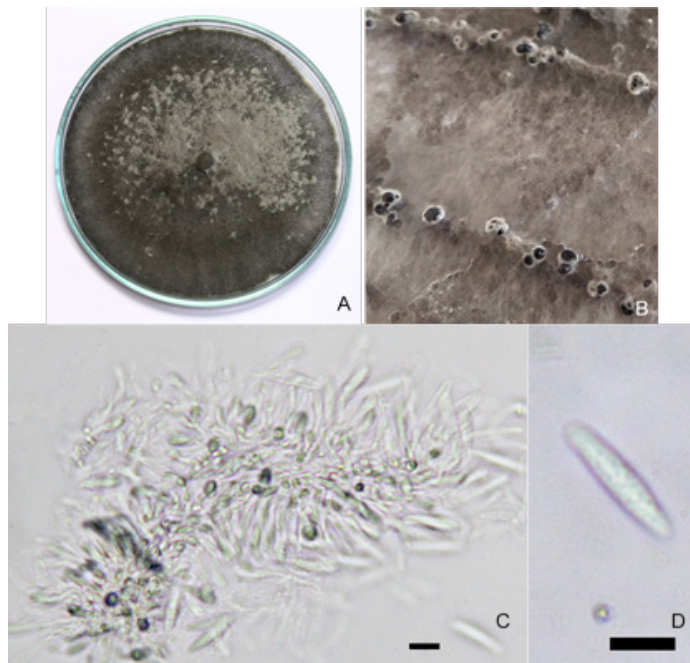


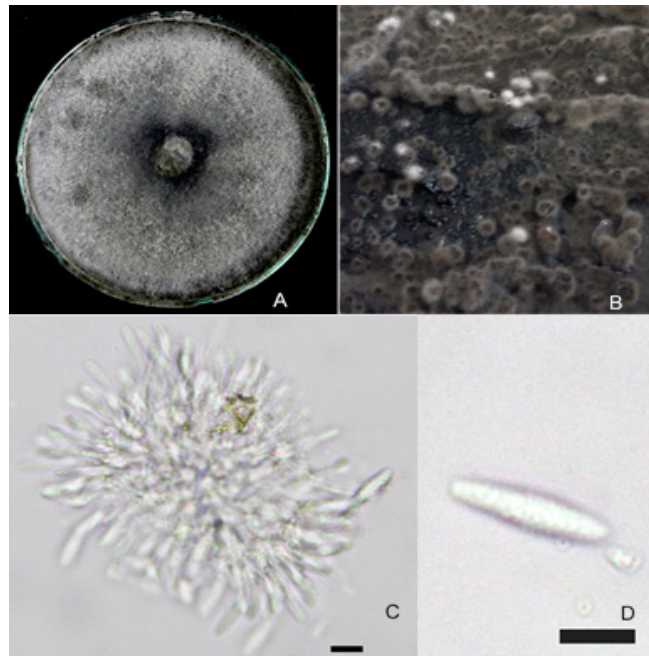
Figure 5 Morphological characteristics of *Lasiodiplodia pseudotheobromae* (KWS6), A: colony of isolate KWS6 on PDA, 7 days after incubation, B: pycnidia forming on pine leaves, C: conidiogenous cells and paraphyses, D: immature conidium, and E: mature conidium. (Bars = 10  $\mu$ m)



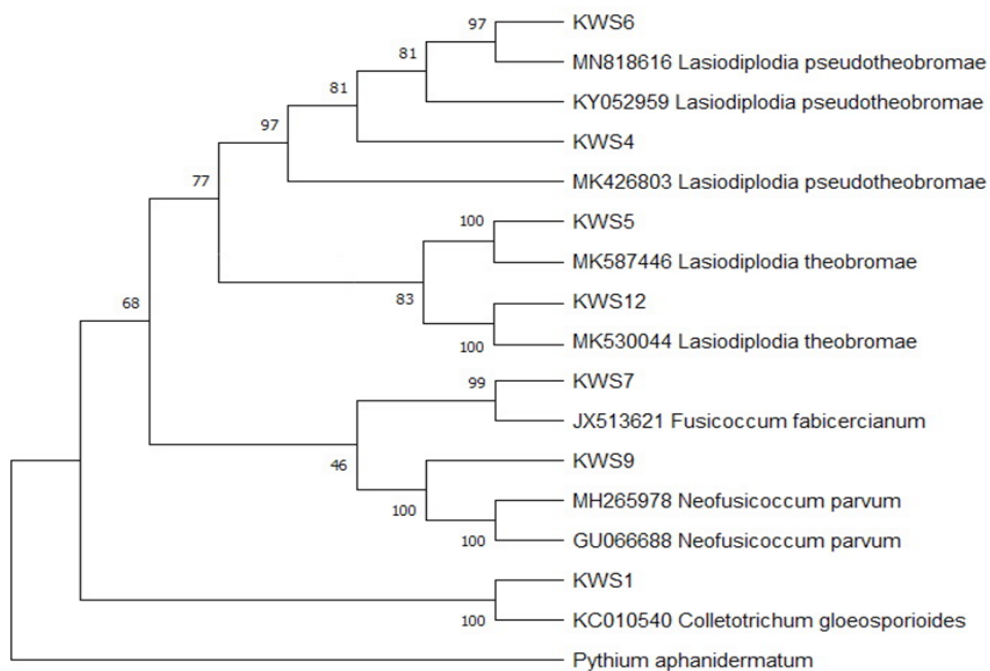
**Figure 6** Morphological characteristics of *Lasiodiplodia theobromae* (KWS12), A: colony of isolate KWS12 on PDA, 7 days after incubation, B: pycnidia forming on pine leaves, C: conidiogenous cells and paraphyses, D: immature conidium, and E: mature conidium. (Bars = 10  $\mu$ m)



**Figure 7** Morphological characteristics of *Fusicoccum fabicercianum* (KWS7), A: colony of isolate KWS7 on PDA, 7 days after incubation, B: pycnidia forming on pine leaves, C: conidiogenous cells and paraphyses, and D: conidium. (Bars = 10  $\mu$ m)



**Figure 8** Morphological characteristics of *Neofusicoccum parvum* (KWS9), A: colony of isolate KWS9 on PDA, ; B: pycnidia on pine leaves, C: conidiogenous cells and paraphyses, and D: conidium. (Bars = 10  $\mu$ m)



**Figure 9** Phylogenetic tree constructed by using ClustalW algorithm and Mega 6.0 version with ITS and EF1 -  $\alpha$  region sequences retrieved randomly from the GenBank along with the present studied isolates; KWS1, KWS4, KWS5, KWS6, KWS7, KWS9 and KWS12.

**Table 1** Morphological characteristics and molecular information of the fungal isolates causing fruit rot disease of Khiew Sawoey mango from Loei province.

Isolates	Morphological characteristics				Molecular information			
	colony on PDA	fruiting body	conidial shape	conidial size (µm)	PCR product (base pair)		designed species	Identity (%) to accession No.
					ITS1-5.8S-ITS2	(EF1-α) gene		
KWS1	white grayish with a orange conidial mass	acervulus	cylindrical	15-20 X 2.5-5	550	550	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	99 (KC010540)
KWS4	whitish - grey, fluffy	pycnidia	subovoid-ellipsoid	21-23 X 13-16	500	550	<i>Lasiodiplodia pseudotheobromae</i>	99 (MK426803)
KWS5	whitish - grey, fluffy	pycnidia	subovoid-ellipsoid	19-21 X 12-14	500	550	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	100 (MK587446)
KWS6	whitish - grey, cottony to fluffy	pycnidia	subovoid-ellipsoid	24-26 X 16-18	500	550	<i>Lasiodiplodia pseudotheobromae</i>	100 (MN818616)
KWS7	grey to black, fluffy	pycnidia	fusiform	24-27 X 4-5.5	500	550	<i>Fusicoccum fabicercianum</i>	99 (JX513621)
KWS9	grey to dark grey, fluffy	pycnidia	fusiform	20-22.5 X 3.5-5	500	550	<i>Neofusicoccum parvum</i>	100 (GU066688)
KWS12	whitish - grey, fluffy	pycnidia	subovoid-ellipsoid	16-19 X 14-16	500	550	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	99 (MK530044)

### สรุป

การระบุชนิดเชื้อราสาเหตุโรคผลเน่าของมะม่วงเขียวเสวยจำนวน 7 ไอโซเลต โดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาร่วมกับเทคนิคซีวโมเลกุล พบว่า โรคผลเน่าของมะม่วงเขียวเสวยที่ปลูกในพื้นที่หมู่บ้านบุษมต.บุษม อ.เชียงคาน จ.เลย ซึ่งเป็นแหล่งผลิตมะม่วงเขียวเสวยเพื่อการส่งออก เกิดจากการเข้าทำลายของเชื้อรา *C. gloeosporioides* (KWS1) ก่อให้เกิดอาการโรคแอนแทรคโนส และเชื้อราในวงศ์ Botryosphaeriaceae ได้แก่ *L. pseudotheobromae* (KWS4, KWS6),

*L. theobromae* (KWS5, KWS12), *F. fabicercianum* (KWS7) และ *N. parvum* (KWS9) ซึ่งทำให้เกิดอาการโรคผลเน่า และช้ำผลเน่า ทั้งนี้การระบุชนิดของเชื้อราสาเหตุโรคที่ได้จะนำไปสู่การหาแนวทางในการควบคุมโรคให้ตรงกับชนิดของเชื้อสาเหตุโรคในระดับแปลงปลูกเพื่อลดแหล่งของเชื้อสาเหตุโรคที่จะเข้าทำลายผลมะม่วง และเฝ้าระวังการเกิดโรคในระยะหลังการเก็บเกี่ยวเพื่อลดการสูญเสียผลผลิตมะม่วงในระหว่างการขนส่งได้

## เอกสารอ้างอิง

- กรมวิชาการเกษตร. 2557. โรคไม้ผลหลังการเก็บเกี่ยว. บริษัท จามจุรีโปรดักส์ จำกัด บางขุนเทียน กรุงเทพฯ. 130 หน้า.
- พงศธร ธรรมถนอม และปริญญา จันทศรี. 2554. การจำแนกชนิดในระดับโมเลกุลของเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรกโนสจากตัวอย่างในสวนมะม่วงน้ำดอกไม้สีทอง อำเภอพัวาว จังหวัดเชียงใหม่. วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร 42 (พิเศษ): 31-34.
- สุวิดา แสไพศาล. 2554. การกระตุ้นความต้านทานโรคทางใบด้วยเชื้อราปฏิภักษ์ *Trichoderma* spp. และการส่งถ่ายยีนไคตินเนสจากเชื้อรา *Trichoderma* spp. เพื่อปรับปรุงพันธุ์มะเขือเทศให้มีความต้านทานต่อโรคเชื้อรา. วิทยานิพนธ์ปริญญาปรัชญาดุษฎีบัณฑิต สาขาวิชาโรคพืชวิทยา บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น.
- สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 2559. สถิตินำเข้าส่งออก. แหล่งข้อมูล [http://www.oae.go.th/oae\\_report/export\\_import/export\\_result.php](http://www.oae.go.th/oae_report/export_import/export_result.php). ค้นเมื่อ 22 กรกฎาคม 2562.
- อุราภรณ์ สะอาดสุด วิชชา สะอาดสุด และโสภณ สิงห์แก้ว. 2548. การประเมินความเสียหายในมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้หลังการเก็บเกี่ยว. Postharvest Newsletter 4: 1-4.
- 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.
- 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.
- Boonsiri, A. and J. Siriphanich. 2007. How to export mangoes. Kasetsart University. Press. Bangkok. 37p.
- Dinh, S.Q., J. Chongwungse, P. Pongam, and S. Sangchote. 2003. Fruit infection by *Colletotrichum gloeosporioides* and anthracnose resistance of some mango cultivars in Thailand. Australasian Plant Pathology 32: 533–538.
- Kamle, M., B.K. Pandey, P. Kumar, and M.M. Kumar. 2013. A species-specific PCR based assay for rapid detection of mango anthracnose pathogen *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. and Sacc. Journal of Plant Pathology and Microbiology 4: 1-5.
- 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.
- 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 of Plant Pathology 155: 687-696.
- López, B.A., J.A. Ragazzo-Sánchez, R. Allende-Molar, G.D. Avila-Quezada, and M. Calderon-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. Huang. 2012. New Botryosphaeriaceae fruit rot of mango in Taiwan: identifica-

- tion and pathogenicity. *Botanical Studies* 53: 467-478.
- Pavlic, D., B. Slippers, T.A. Coutinho, M. Gryzenhout, and M.J. Wingfield. 2004. *Lasiodiplodia gonubiensis* sp. nov., a new *Botryosphaeria* anamorph from native *Syzygium cordatum* in South Africa. *Studies in Mycology* 50: 313-322.
- 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.
- Sardsud, U., V. Sardsud, and S. Singkaew. 2003. Postharvest loss assessment of mango cv. Nam Doc Mai. Postharvest Technology Research Institute, Chiang Mai University. 62p.
- 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: 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.