



การพัฒนาเทคนิค loop-mediated isothermal amplification (LAMP) เพื่อตรวจหาเชื้อ
Colletotrichum asianum ที่ก่อโรคแอนแทรกโนส



กณิษฐา จันทร์ศรี

วิทยานิพนธ์เสนอบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยนเรศวร
เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
ปีการศึกษา 2566
ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยนเรศวร

การพัฒนาเทคนิค loop-mediated isothermal amplification (LAMP) เพื่อตรวจหาเชื้อ
Colletotrichum asianum ที่ก่อโรคแอนแทรคโนส



วิทยานิพนธ์เสนอบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยพระนคร
เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
ปีการศึกษา 2566
ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยพระนคร

วิทยานิพนธ์ เรื่อง "การพัฒนาเทคนิค loop-mediated isothermal amplification (LAMP) เพื่อ
ตรวจหาเชื้อ *Colletotrichum asianum* ที่ก่อโรคแอนแทรคโนส"
ของ กณิษฐา จันทร์ศรี
ได้รับการพิจารณาให้นับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นันทวัน หัตถมาศ)

..... ประธานที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.มลิวรรณ นาคขุนทด)

..... กรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์
(รองศาสตราจารย์ ดร.อนุพันธ์ กงบังเกิด)

..... กรรมการผู้ทรงคุณวุฒิภายใน
(รองศาสตราจารย์ ดร.กิตติศักดิ์ พุทธชาติ)

อนุมัติ

.....
(รองศาสตราจารย์ ดร.กรองกาญจน์ ชูทิพย์)
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ชื่อเรื่อง	การพัฒนาเทคนิค loop-mediated isothermal amplification (LAMP) เพื่อตรวจหาเชื้อ <i>Colletotrichum asianum</i> ที่ก่อโรคแอนแทรกโนส
ผู้วิจัย	กณิษฐา จันทศรี
ประธานที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.มลิวรรณ นาคขุนทด
กรรมการที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ ดร.อนุพันธ์ กงบังเกิด
ประเภทสารนิพนธ์	วิทยานิพนธ์ วท.ม. เทคโนโลยีชีวภาพ, มหาวิทยาลัยนเรศวร, 2566
คำสำคัญ	แอนแทรกโนส, เทคนิคแลมป์, เชื้อรา, ผลไม้

บทคัดย่อ

โรคแอนแทรกโนสเป็นโรคพืชที่ก่อให้เกิดความเสียหายหลังการเก็บเกี่ยวผลผลิตทางการเกษตรเป็นอย่างมาก สาเหตุหลักมาจากเชื้อราสกุล *Colletotrichum* โดยจะเข้าทำลายพืชได้ทุกระยะการเติบโต โดยเฉพาะการเข้าทำลายแบบแฝง ซึ่งไม่แสดงอาการของโรคให้เห็นในช่วงผลอ่อนแต่จะแสดงอาการรุนแรงออกมาในช่วงผลสุก ทำให้ผลผลิตเน่าเสียไม่เป็นที่ต้องการของผู้บริโภค อายุการเก็บรักษาสั้น และไม่สามารถขนส่งระยะไกลได้ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์พัฒนาเทคนิค Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) ในการตรวจหาเชื้อรา *C. asianum* ที่ก่อโรคแอนแทรกโนส โดยเก็บตัวอย่างผลไม้ที่พบรอยโรคจากตลาดสดรอบมหาวิทยาลัยนเรศวรมา 4 ชนิดคือ มะม่วงน้ำดอกไม้ ฝรั่ง แก้วมังกร และกล้วยหอม จากนั้นแยกเชื้อราให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี tissue transplant ผลการศึกษา พบว่าสามารถแยกเชื้อราที่พบทั้งหมด 11 ไอโซเลต ซึ่งแบ่งออกได้ 3 กลุ่มจากสี่ของเส้นใยและลักษณะของโคนิเดีย และจากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS สามารถจำแนกเชื้อราได้ทั้งหมด 5 ชนิด โดยเป็นเชื้อราในสกุล *Colletotrichum* จำนวน 3 ชนิด ได้แก่ *C. musae*, *C. fructicola* และ *C. asianum* และเชื้อราสกุลอื่นอีก 2 ชนิด คือ *Fusarium incarnatum* และ *Pestalotiopsis sydownina* และเมื่อนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS มาวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม พบว่าเชื้อรา *C. asianum* และ *C. fructicola* มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมกันมากที่สุด ผลการพัฒนาเทคนิคแลมป์สำหรับตรวจหาเชื้อราก่อโรคแอนแทรกโนส พบว่าสามารถตรวจพบเชื้อรา *C. asianum* และ *C. musae* ได้ที่อุณหภูมิคงที่ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 นาที ซึ่งประสิทธิภาพความไวในการตรวจหาเชื้อรา *C. asianum* สามารถตรวจพบได้ที่ความเข้มข้นต่ำสุดของดีเอ็นเอที่ 1 นาโนกรัม/ไมโครลิตร ในขณะที่ประสิทธิภาพความไวในการตรวจหาเชื้อรา *C. musae* สามารถตรวจพบได้ที่ความเข้มข้นต่ำสุดของดีเอ็นเอที่ 25 นาโนกรัม/ไมโครลิตร เมื่อเปรียบเทียบกับเทคนิคพีซีอาร์ พบว่าเทคนิคแลมป์มีประสิทธิภาพความไวในการ

ตรวจจับเชื้อได้ไวกว่าถึง 10 เท่า ดังนั้นเทคนิคแลมป์จึงมีประสิทธิภาพในการตรวจพบเชื้อราก่อโรคแอนแทรกโนสในพืชได้อย่างรวดเร็ว ซึ่งช่วยให้เกิดการควบคุมโรคในผลผลิตได้อย่างมีประสิทธิภาพ ส่งผลให้ลดการสูญเสียผลผลิตในระหว่างเก็บเกี่ยวรวมไปถึงระหว่างการส่งออกอีกด้วย



Title	DEVELOPMENT OF LOOP-MEDIATED ISOTHERMAL AMPLIFICATION (LAMP) ASSAY FOR ANTHRACNOSE DISEASE CAUSED BY <i>COLLETOTRICHUM ASIANUM</i>
Author	Kanittha Chansri
Advisor	Assistant Professor Maliwan Nakkuntod, Ph.D.
Co-Advisor	Associate Professor Dr. Anupan Kongbangkerd, Ph.D.
Academic Paper	M.S. Thesis in Biotechnology, Naresuan University, 2023
Keywords	Anthracnose, LAMP technique, Fungi, Fruits

ABSTRACT

Anthracnose is a plant disease causing severe post-harvest damage to agricultural products. It is mainly caused by fungi of the genus *Colletotrichum*, which can infect plants at any growth stage. In particular, it can infect in a latent stage, where symptoms do not show on immature fruits but become severe when the fruit ripens. This result, makes it undesirable to consumers, shortening its shelf life, and hindering exportation. Therefore, this research aimed to develop technique called a Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) assay for anthracnose disease caused by *C. asianum*. The fruits of mango, guava, dragon fruit and banana showing symptoms from markets around the Naresuan University were collected and cultured using tissue transplant technique. The results showed that 11 fungal isolates were divided into 3 groups according to morphological characteristics such as color of mycelium and the shape of conidia. The ITS sequences identified the fungal samples as five species: three species of *Colletotrichum* (*C. musae*, *C. fructicola*, and *C. asianum*), and two other genera, *Fusarium incarnatum* and *Pestalotiopsis sydowiana*. Phylogenetic analysis indicated that *C. asianum* is most closely related to *C. fructicola*. The development of the LAMP technique for anthracnose disease detection showed that *C. asianum* and *C. musae* could be detected at a constant temperature of 65 degrees Celsius in 45 minutes. The detection sensitivity for *C. asianum* was achieved at a minimum DNA concentration of 1 ng/ μ L, while for *C.*

musae it was 25 ng/ μ L. Compared to the PCR technique, the LAMP technique was found to be up to 10 times faster in detection sensitivity. Therefore, the LAMP technique is efficient for rapidly detecting anthracnose disease, enabling effective disease control and reducing post-harvest losses, including those during exportation.



ประกาศคุณูปการ

ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงในความกรุณาของ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.มลิวรรณ นาคขุนทด ประธานที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ได้สละเวลาอันมีค่ามาเป็นທີ່ปรึกษา พร้อมคำแนะนำตลอดระยะเวลาในการทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ รวมถึงชี้แนะแนวทางในการแก้ไขปัญหาต่างๆ และการตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์นี้ให้มีความสมบูรณ์ และขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.อนุพันธ์ กงบังเกิด กรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ได้กรุณาให้คำแนะนำตลอดจนแก้ไขข้อบกพร่องของวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ จนทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้อย่างสมบูรณ์

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นันทวัน หัตถมาศ ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และรองศาสตราจารย์ ดร.กิตติศักดิ์ พุทธิชาติ กรรมการผู้ทรงคุณวุฒิ ที่ให้เกียรติมาเป็นกรรมการสอบในครั้งนี้ ตลอดจนให้คำแนะนำแก่วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้มีความสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ นางสาวสุณิษา ถ่วงลือ ที่ได้ให้คำแนะนำช่วยเหลือ และขอขอบพระคุณ เจ้าหน้าที่ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ที่ให้ความอนุเคราะห์ด้านเครื่องมืออุปกรณ์ และสถานที่ตลอดการทำวิจัยครั้งนี้ให้สำเร็จไปได้ด้วยดี เหนือสิ่งอื่นใดขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดา ของผู้วิจัยและเพื่อน ๆ ที่ให้กำลังใจและการสนับสนุนในทุก ๆ ด้านอย่างดีที่สุดเสมอมา

ผู้วิจัยหวังเป็นอย่างยิ่งว่า งานวิจัยนี้จะเป็นประโยชน์ต่อการพัฒนาเทคนิคแลมป์สำหรับตรวจหาโรคแอนแทรกโอส และสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการจัดการควบคุมโรคแอนแทรกได้ เพื่อประโยชน์ทางเศรษฐกิจต่อไป

กณิษฐา จันทร์ศรี

สารบัญ

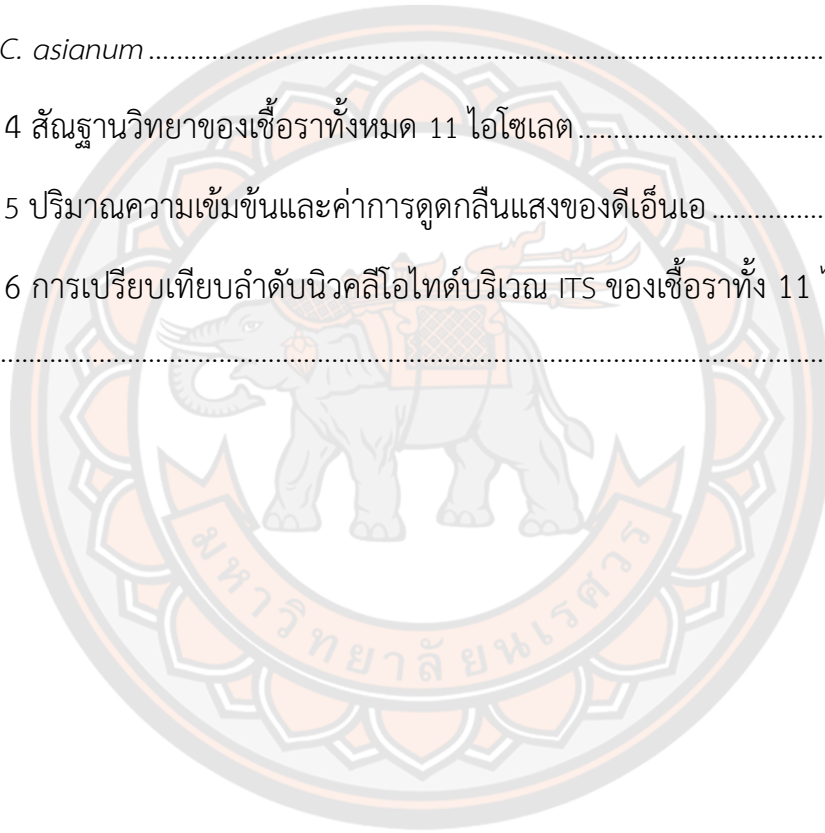
	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ค
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
ประกาศคุณูปการ.....	ช
สารบัญ.....	ซ
สารบัญตาราง.....	ฅ
สารบัญภาพ.....	ฉ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
ความเป็นมาของปัญหา.....	1
จุดมุ่งหมายของการวิจัย.....	2
สมมุติฐานของการวิจัย.....	3
ขอบเขตการวิจัย.....	3
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	4
โรคแอนแทรกโนส (Anthracnose).....	4
การเข้าทำลายและการเกิดโรคแอนแทรกโนส.....	5
อนุกรมวิธานและลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา.....	6
โรคแอนแทรกโนสในกล้วย.....	24
โรคแอนแทรกโนสในแก้วมังกร.....	26
โรคแอนแทรกโนสในฝรั่ง.....	28
โรคแอนแทรกโนสในมะม่วง.....	29

การป้องกันและกำจัดโรคแอนแทรกโนส	31
1. การเขตกรรมหรือการจัดการภายในแปลงปลูก.....	31
2. การใช้สารเคมีกำจัดเชื้อรา.....	31
3. การใช้เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์.....	32
4. การใช้สารเคลือบผิว	32
5. การใช้สารกลุ่ม generally recognized as safe (GRAS)	32
หลักการวินิจฉัยโรคพืชโดยทั่วไป	32
Loop-mediated isothermal amplification (LAMP).....	33
ยีนไคตินซินเทส (chitin synthase gene: CHS)	36
บทที่ 3 วิธีดำเนินงานวิจัย.....	38
การเก็บตัวอย่างโรคพืช.....	38
การแยกเชื้อราสาเหตุโรคพืชโดยวิธี Tissue transplant.....	38
การจำแนกชนิดเชื้อราด้วยลักษณะสัณฐานวิทยา.....	38
การสกัดดีเอ็นเอของเชื้อราด้วยวิธี CTAB ประยุกต์จากวิธีของ Ferdous et al., (2012)..	38
การจำแนกเชื้อราโดยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริวณ ITS ด้วยเทคนิค Polymerase chain reaction (PCR)	39
การเตรียมผลผลิตพีซีอาร์ให้บริสุทธิ์.....	40
การหาลำดับนิวคลีโอไทด์และการวิเคราะห์ข้อมูล	41
การออกแบบไพรเมอร์สำหรับปฏิกิริยาแลมป์.....	41
การหาอุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยาแลมป์	42
การทดสอบประสิทธิภาพความจำเพาะของไพรเมอร์ CHS-1 ด้วยเทคนิคแลมป์.....	43
การทดสอบประสิทธิภาพความไวของไพรเมอร์ CHS-1 ด้วยเทคนิคแลมป์.....	43

บทที่ 4 ผลการวิจัย	44
การจำแนกเชื้อราโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา	44
การสกัดดีเอ็นเอและการตรวจสอบคุณภาพ.....	52
การจำแนกเชื้อราโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ Internal Transcribed space (ITS)...	53
การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อราทั้ง 11 ไอโซเลต โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS	55
การทดสอบประสิทธิภาพความจำเพาะของไพรเมอร์ CHS-1 ด้วยเทคนิคแลมป์	59
การทดสอบประสิทธิภาพความไวของไพรเมอร์ CHS-1 ด้วยเทคนิคแลมป์ เปรียบเทียบกับเทคนิคพีซีอาร์	61
บทที่ 5 อภิปรายผลการวิจัย.....	65
การจำแนกเชื้อราโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา	65
การจำแนกเชื้อราโดยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ ITS ด้วยเทคนิคพีซีอาร์.....	66
การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อราทั้ง 11 ไอโซเลต โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS	66
การพัฒนาเทคนิคแลมป์สำหรับตรวจหาเชื้อ <i>C. asianum</i>	67
บทที่ 6 บทสรุป	69
สรุปผลการวิจัย.....	69
ข้อเสนอแนะ	69
บรรณานุกรม	71
ประวัติผู้วิจัย	88

สารบัญตาราง

	หน้า
ตาราง 1 ความเข้มข้นของสารต่าง ๆ ที่ใช้ในปฏิกิริยาพีซีอาร์.....	40
ตาราง 2 อุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในปฏิกิริยาพีซีอาร์	40
ตาราง 3 ไพรมเมอร์สำหรับเทคนิคแลมพ์ที่ออกแบบจากลำดับดีเอ็นเอบริเวณยีน CHS-1 ของเชื้อรา <i>C. asianum</i>	42
ตาราง 4 สันฐานวิธานของเชื้อราทั้งหมด 11 ไอโซเลต.....	46
ตาราง 5 ปริมาณความเข้มข้นและค่าการดูดกลืนแสงของดีเอ็นเอ	53
ตาราง 6 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ของเชื้อราทั้ง 11 ไอโซเลตใน NCBI	54



สารบัญภาพ

หน้า

ภาพ 1 รอยโรคแอนแทรกโนสบนผลไม้ (A) ฝรั่ง, (B) แก้วมังกร, (C) กล้วย, (D) มะม่วง และ (E) มะละกอ	4
ภาพ 2 วงจรชีวิตของโรคแอนแทรกโนสบนผลไม้เขตร้อน.....	5
ภาพ 3 โครงสร้าง acervulus (conidiomata) ของเชื้อราสกุล <i>Colletotrichum</i>	6
ภาพ 4 สัณฐานวิทยาของเชื้อ <i>C. acutatum</i> (A) โคลนินบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA, (B) โคนินเดี่ยว, และ (C) appressoria.....	7
ภาพ 5 สัณฐานวิทยาของเชื้อ <i>C. capsici</i> (A) โคลนินบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA, (B) seta และ (C) โคนินเดี่ยว.....	8
ภาพ 6 สัณฐานวิทยาของเชื้อ <i>C. caudatum</i> (A) โคลนินบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA, (B และ C) โคนินเดี่ยว, (D) seta และ (E) appressoria	8
ภาพ 7 สัณฐานวิทยาของเชื้อ <i>C. circinans</i> (A) seta, (B) conidia และ (D) conidiophores...	9
ภาพ 8 สัณฐานวิทยาของเชื้อ <i>C. coccodes</i> (A) โคลนินบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA, (B) โคนินเดี่ยว และ (C) appressoria	9
ภาพ 9 สัณฐานวิทยาของเชื้อ <i>C. coffeanum</i> (A) โคลนินบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA, (B) โคนินเดี่ยวและ (C) conidiophores	10
ภาพ 10 สัณฐานวิทยาของเชื้อ <i>C. dematium</i> (A) โคลนินบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA, (B) โคนินเดี่ยว (C) appressoria และ (D) acervuli	11
ภาพ 11 สัณฐานวิทยาของเชื้อ <i>C. destructivum</i> (A) โคลนินบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA, (B) โคนินเดี่ยว และ (C) appressoria.....	11
ภาพ 12 สัณฐานวิทยาของเชื้อ <i>C. falcatum</i> (A) โคลนินบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA, (B) conidia masses, (C) seta, (D) โคนินเดี่ยว และ (E) appressoria.....	12

ภาพ 13 สัณฐานวิทยาของเชื้อ <i>C. fragariae</i> (A) โคลนินบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA, (B) conidia masses, (C) seta, และ (D) โคนินเดี่ยว.....	13
ภาพ 14 สัณฐานวิทยาของเชื้อ <i>C. fuscum</i> (A) sclerotia, (B) โคนินเดี่ยว, (C) seta, และ (D) conidiophores.....	13
ภาพ 15 สัณฐานวิทยาของเชื้อ <i>C. gloeosporioides</i> (A) โคลนินบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA, (B) โคนินเดี่ยว, และ (C) appressoria.....	14
ภาพ 16 สัณฐานวิทยาของเชื้อ <i>C. gloeosporioides</i> var minus (A) โคลนินบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA, (B) โคนินเดี่ยว และ (C) appressoria.....	14
ภาพ 17 สัณฐานวิทยาของเชื้อ <i>C. graminicola</i> (A) โคลนินบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA, (B) โคนินเดี่ยว และ (C) appressoria.....	15
ภาพ 18 สัณฐานวิทยาของเชื้อ <i>C. higginsianum</i> (A) โคลนินบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA, (B) acervuli, (C) seta, (D) conidiophores และ (E) โคนินเดี่ยว.....	15
ภาพ 19 สัณฐานวิทยาของเชื้อ <i>C. lilicearum</i> (A) โคลนินบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA, (B) seta, (C) โคนินเดี่ยว และ (D) appressoria.....	16
ภาพ 20 สัณฐานวิทยาของเชื้อ <i>C. lindemuthianum</i> (A) conidia masses, (B) seta, (C) conidiophores, (D) โคนินเดี่ยว และ (E) appressoria.....	17
ภาพ 21 สัณฐานวิทยาของเชื้อ <i>C. nymphaeae</i> (A) โคลนินบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA, (B) โคนินเดี่ยว และ (C) appressoria.....	17
ภาพ 22 สัณฐานวิทยาของเชื้อ <i>C. malvarum</i> (A) acervuli, (B) seta, (C) appressoria และ (D) โคนินเดี่ยว.....	18
ภาพ 23 สัณฐานวิทยาของเชื้อ <i>C. musae</i> (A) โคลนินบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA, (B) โคนินเดี่ยว และ (C) appressoria.....	18
ภาพ 24 สัณฐานวิทยาของเชื้อ <i>C. nigrum</i> (A) conidia masses, (B) conidiophores, (C) โคนินเดี่ยว, (D) seta และ (E) appressoria.....	19

ภาพ 25 สัณฐานวิทยาของเชื้อ <i>C. orbiculare</i> (A) conidia masses, (B) conidiophores, (C) appressoria และ (D) โคนิเดีย	20
ภาพ 26 สัณฐานวิทยาของเชื้อ <i>C. sublineolum</i> (A) โคลนินบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA, (B) acervuli, (C) appressoria, และ (D) โคนิเดีย	20
ภาพ 27 สัณฐานวิทยาของเชื้อ <i>C. psoraleae</i> (A) โคลนินบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA, (B) conidia masses, (C) conidiophore และ (D) โคนิเดีย	21
ภาพ 28 สัณฐานวิทยาของเชื้อ <i>C. typhae</i> (A) โคลนินบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA, (B) seta, (C) โคนิเดีย และ (D) appressoria	21
ภาพ 29 สัณฐานวิทยาของเชื้อ <i>C. truncatum</i> (A) โคลนินบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA, (B) โคนิเดีย (C) appressoria และ (D) conidiophores	22
ภาพ 30 สัณฐานวิทยาของเชื้อ <i>C. spinaciae</i> (A) acervuli, (B) โคนิเดีย, (C) seta และ (D) conidiophores	22
ภาพ 31 สัณฐานวิทยาของเชื้อ <i>C. trichellum</i> (A) โคลนินบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA, (B) acervuli, (C) โคนิเดีย และ (D) appressoria	23
ภาพ 32 สัณฐานวิทยาของเชื้อ <i>C. trifolii</i> (A) โคลนินบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA, (B) acervuli, (C) conidia, (D) conidiophores และ (E) appressoria	23
ภาพ 33 ลำดับประเทศมีผลผลิตกล้วยมากที่สุดในปี 2563	24
ภาพ 34 พื้นที่ปลูกกล้วยในประเทศไทย	25
ภาพ 35 ลักษณะรอยโรคแอนแทรกโนสในกล้วย (A) ใบกล้วย และ (B) ผลกล้วย	25
ภาพ 36 ลักษณะสัณฐานของผลแก้วมังกร (A) <i>H. undatus</i> , (B) <i>H. costaricensis</i> , (C) <i>H. polyrhizus</i> และ (E) <i>H. megalanthus</i>	27
ภาพ 37 ลักษณะรอยโรคแอนแทรกโนสในแก้วมังกร (A) ลำต้น (กิ่ง) และ (B) ผล	27
ภาพ 38 ลักษณะรอยโรคแอนแทรกโนสในฝรั่ง (A) ใบ และ (B) ผล	29

ภาพ 39 ลักษณะรอยโรคแอนแทรกโนสในมะม่วง (A, B, C) ใบ, (D) acervuli, (E) ช่อดอก และ (F, G, H และ I) ผล	30
ภาพ 40 หลักการทำงานของปฏิกิริยาแลมป์ ขั้นตอน LAMP initial step และ LAMP cycle step.....	34
ภาพ 41 หลักการทำงานของปฏิกิริยาแลมป์ ขั้นตอน Elongation and recycling step.....	35
ภาพ 42 โครงสร้างของโคติน.....	37
ภาพ 43 โครงสร้างและการจำแนกชนิดของกลุ่มโคตินซินเทส	37
ภาพ 44 ตำแหน่งของชุดไพรเมอร์ที่ทำการออกแบบจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน CHS-1 ของเชื้อรา <i>C. asianum</i>	42
ภาพ 45 ลักษณะรอยโรคและลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราจากตัวอย่างกล้วย ซึ่ง (A) CB01, (B) CB02, (C และ D) ลักษณะเส้นใยของเชื้อราบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA และ (E และ F) ลักษณะโคโคนิเดีย.....	50
ภาพ 46 ลักษณะรอยโรคและลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราจากตัวอย่างแก้วมังกร ซึ่ง (A) CD01, (B) CD02, (C) CD03, (D, E และ F) ลักษณะเส้นใยของเชื้อราบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA และ (G, H และ F) ลักษณะโคโคนิเดีย.....	50
ภาพ 47 ลักษณะรอยโรคและลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราจากตัวอย่างฝรั่ง ซึ่ง (A) CG01, (B) CG02, (C) CG03, (D, E และ F) ลักษณะเส้นใยของเชื้อราบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA และ (G, H และ F) ลักษณะโคโคนิเดีย.....	51
ภาพ 48 ลักษณะรอยโรคและลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราจากตัวอย่างมะม่วง ซึ่ง (A) CM01, (B) CM02, (C) CM03, (D, E และ F) ลักษณะเส้นใยของเชื้อราบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA และ (G, H และ F) ลักษณะโคโคนิเดีย.....	51
ภาพ 49 ผลการสกัดดีเอ็นเอของเชื้อราทั้ง 11 ไอโซเลต จากรอยโรคแอนแทรกโนสบนผลไม้ 4 ชนิดโดย (A) กล้วย, (B) แก้วมังกร, (C) ฝรั่ง, (D) มะม่วง และ M คือ 1 kb DNA ladder (Thermo Scientific, USA).....	52

ภาพ 50 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ ITS ของเชื้อราทั้ง 11 ไอโซเลต โดย M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1Kb DNA ladder (Thermo Scientific, USA)	54
ภาพ 51 Phylogenetic tree ที่ได้จากการหาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน ITS โดยใช้วิธี Maximum Likelihood.....	56
ภาพ 52 ผลการเกิดปฏิกิริยาแลมพ์หลังจากบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30-75 นาที (A) ผลก่อนเกิดปฏิกิริยาแลมพ์ (B) ผลหลังเกิดปฏิกิริยาแลมพ์	57
ภาพ 53 ผลการเกิดปฏิกิริยาแลมพ์หลังจากบ่มที่อุณหภูมิ 63 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30-75 นาที (A) ผลก่อนเกิดปฏิกิริยาแลมพ์ (B) ผลหลังเกิดปฏิกิริยาแลมพ์	57
ภาพ 54 ผลการเกิดปฏิกิริยาแลมพ์หลังจากบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30-75 นาที (A) ผลก่อนเกิดปฏิกิริยาแลมพ์ (B) ผลหลังเกิดปฏิกิริยาแลมพ์	57
ภาพ 55 ผลอิเล็กโทรโฟรีซิสแลมพ์ของปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30-75 นาที บนอะกาโรสเจล 2% ซึ่งแถบ M คือดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA ladder (Bio-helix, Taiwan).....	58
ภาพ 56 ผลอิเล็กโทรโฟรีซิสของปฏิกิริยาแลมพ์ที่อุณหภูมิ 63 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30-75 นาที บนอะกาโรสเจล 2% ซึ่งแถบ M คือดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA ladder (Bio-helix, Taiwan).....	58
ภาพ 57 ผลอิเล็กโทรโฟรีซิสแลมพ์ของปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30-75 นาที บนอะกาโรสเจล 2% ซึ่งแถบ M คือดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA ladder (Bio-helix, Taiwan).....	59
ภาพ 58 ผลการทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ CHS-1 ด้วยเทคนิคแลมพ์ในหลอดทดลอง (A) ผลก่อนเกิดปฏิกิริยาแลมพ์ (B) ผลหลังเกิดปฏิกิริยาแลมพ์	60
ภาพ 59 ผลอิเล็กโทรโฟรีซิสของการตรวจสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ CHS-1 ด้วยเทคนิคแลมพ์ บนอะกาโรสเจล 2% ซึ่งแถบ M คือดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA ladder (Bio-helix, Taiwan).....	60

ภาพ 60 ผลการทดสอบความไวของไพรเมอร์ CHS-1 ในการตรวจหาเชื้อรา <i>C. asianum</i> ด้วยเทคนิคแลมป์ในหลอดทดลอง (A) ผลก่อนเกิดปฏิกิริยาแลมป์ (B) ผลหลังเกิดปฏิกิริยาแลมป์.....	61
ภาพ 61 ผลการทดสอบความไวของไพรเมอร์ CHS-1 ในการตรวจหาเชื้อรา <i>C. musae</i> ด้วยเทคนิคแลมป์ในหลอดทดลอง (A) ผลก่อนเกิดปฏิกิริยาแลมป์ (B) ผลหลังเกิดปฏิกิริยาแลมป์.....	62
ภาพ 62 ผลอิเล็กโทรโฟรีซิสของการตรวจสอบความจำไวของไพรเมอร์ CHS-1 ในการตรวจหาเชื้อรา <i>C. asianum</i> ด้วยเทคนิคแลมป์ บนอะกาโรสเจล 2% ซึ่งแถบ M คือดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA ladder (Bio-helix, Taiwan)	62
ภาพ 63 ผลอิเล็กโทรโฟรีซิสของการตรวจสอบความจำไวของไพรเมอร์ CHS-1 ในการตรวจหาเชื้อรา <i>C. musae</i> ด้วยเทคนิคแลมป์ บนอะกาโรสเจล 2% ซึ่งแถบ M คือดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA ladder (Bio-helix, Taiwan)	63
ภาพ 64 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ของเชื้อรา <i>C. asianum</i> ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ ซึ่งแถบ M คือดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA ladder (Bio-helix, Taiwan).....	63
ภาพ 65 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ของเชื้อรา <i>C. musae</i> ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ ซึ่งแถบ M คือดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA ladder (Bio-helix, Taiwan)	64

บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาของปัญหา

โรคแอนแทรกโนส (Anthracnose) เป็นโรคพืชที่ทำให้เกิดความเสียหายหลังการเก็บเกี่ยว ผลผลิตทางการเกษตรเป็นอย่างมาก ซึ่งสาเหตุเกิดจากเชื้อราสกุล *Colletotrichum* จัดเป็นเชื้อราสำคัญอันดับ 8 ในกลุ่มเชื้อราก่อโรคในพืชผลทางการเกษตร (Dean et al., 2012) สามารถเข้าทำลายพืชผักและผลไม้ได้หลายชนิด เช่น พริก มะละกอ กัลย แก้วมังกร มะม่วง ซึ่งถือเป็นพืชทางเศรษฐกิจของไทย โดยเชื้อราสามารถเข้าทำลายพืชได้ทุกระยะการเจริญเติบโต โดยเฉพาะการเข้าทำลายแบบแฝง (Latent Infections) ซึ่งจะไม่แสดงอาการของโรคให้เห็นในช่วงผลอ่อน แต่จะแสดงอาการรุนแรงออกมาในช่วงผลสุก (Freeman et al., 1998) โดยอาการของโรคจะมีลักษณะเป็นจุดแผลวงกลมหรือวงรีซ้อนกันเป็นชั้น ๆ สีน้ำตาลเข้มจนถึงสีดำ จะเห็นชัดเจนเมื่อผลสุกจัด ซึ่งทำให้ผลผลิตเน่าเสีย ไม่เป็นที่ต้องการของผู้บริโภค อายุการเก็บรักษาสั้น ไม่สามารถขนส่งระยะไกลได้ ซึ่งจัดเป็นปัญหาที่สำคัญในการส่งออกไปยังต่างประเทศ ดังนั้นเมื่อมีการตรวจพบการแสดงออกของโรค เกษตรส่วนใหญ่มักใช้วิธีการป้องกันและกำจัดโรค โดยการฉีดพ่นสารเคมีกำจัดเชื้อรา เช่น mancozeb carbendazim และ benomyl ร่วมกับวิธีเขตกรรม เช่น ปลูกพืชหมุนเวียน จัดการระยะปลูกให้เหมาะสม การตัดแต่งกิ่ง และเผาทำลายส่วนที่ติดเชื้อ (Than et al., 2008) ซึ่งการใช้สารเคมีในจำนวนมากและเป็นระยะเวลานาน อาจส่งผลให้เชื้อเกิดการดื้อยา และก่อให้เกิดสารพิษตกค้างในผลผลิต ผู้บริโภครวมถึงตัวเกษตรกรผู้ปลูก ทางเลือกหนึ่งในการหลีกเลี่ยงปัญหาสารเคมีตกค้าง โดยใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ต่อโรค เช่น *Bacillus* spp. และ *Trichoderma* spp. หรือการเลือกใช้พันธุ์ต้านทานต่อโรค (Saxena et al., 2020)

อย่างไรก็ตามวิธีเหล่านี้ยังไม่เพียงพอต่อการป้องกันการเข้าทำลายของโรคแอนแทรกโนส เนื่องจากเป็นวิธีการจัดการกับโรคหลังจากตรวจพบการแสดงออกของโรคที่ชัดเจนแล้ว ดังนั้นการตรวจพบโรคก่อนที่จะเกิดการแสดงออกที่รุนแรงจึงเป็นวิธีที่สำคัญมากในการป้องกันการเข้าทำลายของโรค เพื่อนำไปสู่การดูแลรักษาในลำดับต่อไป ปัจจุบันได้มีการพัฒนาเทคนิคทางโมเลกุลหลายวิธีมาใช้ในการตรวจหาเชื้อก่อโรคแอนแทรกโนส เช่น เทคนิคพีซีอาร์ซึ่งเป็นเทคนิคประสบความสำเร็จในการตรวจพบและระบุเชื้อรา ได้อย่างรวดเร็ว ถูกต้องและแม่นยำ (Ibrahim et al., 2016; Kashiwa et al., 2016; Saini et al., 2017; Yao et al., 2018) เช่น งานวิจัยของ Mo et al. (2018) ได้ทำการระบุชนิดของเชื้อราสกุล *Colletotrichum* สาเหตุโรคแอนแทรกโนสในมะม่วงในเมืองกวางซี ประเทศจีน โดยวิเคราะห์บริเวณยีน Internal transcribed spacer (ITS), Actin (ACT), Tubulin2

(TUB2), Chitin synthase (CHS-1) และ glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ ผลการศึกษาพบว่าสามารถระบุชนิดของเชื้อได้ 3 ชนิดดังนี้ *C. asianum*, *C. fructicola* และ *C. siamense* นอกจากนี้ยังมีการนำเทคนิค real-time PCR มาใช้ในการตรวจหาเชื้อ *C. lagenarium* สาเหตุโรคแอนแทรกโนสในพืชทองแตงโม แตงกวา และแตงไทยจากเนื้อเยื่อที่ติดเชื้อและตัวอย่างดิน ผลการศึกษาพบว่าความไวในการตรวจหาดีเอ็นเอของเชื้อราอยู่ที่ 0.001 นาโนกรัม/ไมโครลิตร (Kuan et al., 2011) อย่างไรก็ตามเทคนิคเหล่านี้ยังมีข้อจำกัดในการใช้เครื่องมือที่มีความจำเพาะสูง ซึ่งต้องอาศัยประสบการณ์และความชำนาญของผู้ปฏิบัติการ ใช้เวลาในการตรวจสอบนาน

ดังนั้นเทคนิค Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) เป็นเทคนิคทางเลือกหนึ่งในการนำมาใช้ตรวจหาเชื้อรา *Colletotrichum* spp. ซึ่งสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่อุณหภูมิเดียวในช่วง 60–65 องศาเซลเซียส เป็นเทคนิคที่มีความแม่นยำและจำเพาะสูงเนื่องจากใช้ไพรเมอร์จำนวน 4 ตำแหน่งอีกทั้งยังสามารถตรวจสอบการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ในขั้นตอนเดียวโดยสังเกตการตกตะกอน หรือการเปลี่ยนสีของปฏิกิริยาหลังการย้อมสีได้ด้วยตาเปล่า (Notomi et al., 2000) ปัจจุบันมีการนำเทคนิคแลมป์มาใช้ในการตรวจหาเชื้อราก่อโรคแอนแทรกโนสในพืชหลายชนิด เช่น Wu et al. (2019) ได้ตรวจหาเชื้อ *C. gloeosporioides* G143A สายพันธุ์ที่ก่อโรคแอนแทรกโนสในสตอเบอร์รี่ โดยศึกษาที่บริเวณยีน Cytochrome b (cyt b) พบว่าสามารถตรวจพบเชื้อได้และมีความไวที่ 0.001 นาโนกรัม/ไมโครลิตร นอกจากนี้ Chen et al. (2020) พัฒนาเทคนิคแลมป์ตรวจหาเชื้อ *C. gloeosporioides* ในมะกอกจีนโดยออกแบบชุดไพรเมอร์จากลำดับนิวคลีโอไทด์ 4 บริเวณบนยีน Transcriptional enhancer factor 1 (TEF-1) จากผลการศึกษาพบว่าไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน TEF-1 ประสบความสำเร็จในการตรวจหาเชื้อ *C. gloeosporioides* และแยกเชื้อจากสายพันธุ์ที่ใกล้เคียงได้อย่างแม่นยำ ดังนั้นเทคนิคแลมป์จึงมีประสิทธิภาพในการตรวจหาโรคได้อย่างรวดเร็ว และแม่นยำ โดยสามารถใช้ในการประเมินความรุนแรงของโรค เพื่อให้เกษตรกรได้มีการวางแผนการป้องกันโรคต่อไป งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์พัฒนาเทคนิคแลมป์ในการตรวจหาเชื้อรา *C. asianum* ที่ก่อโรคแอนแทรกโนสในพืชเศรษฐกิจ

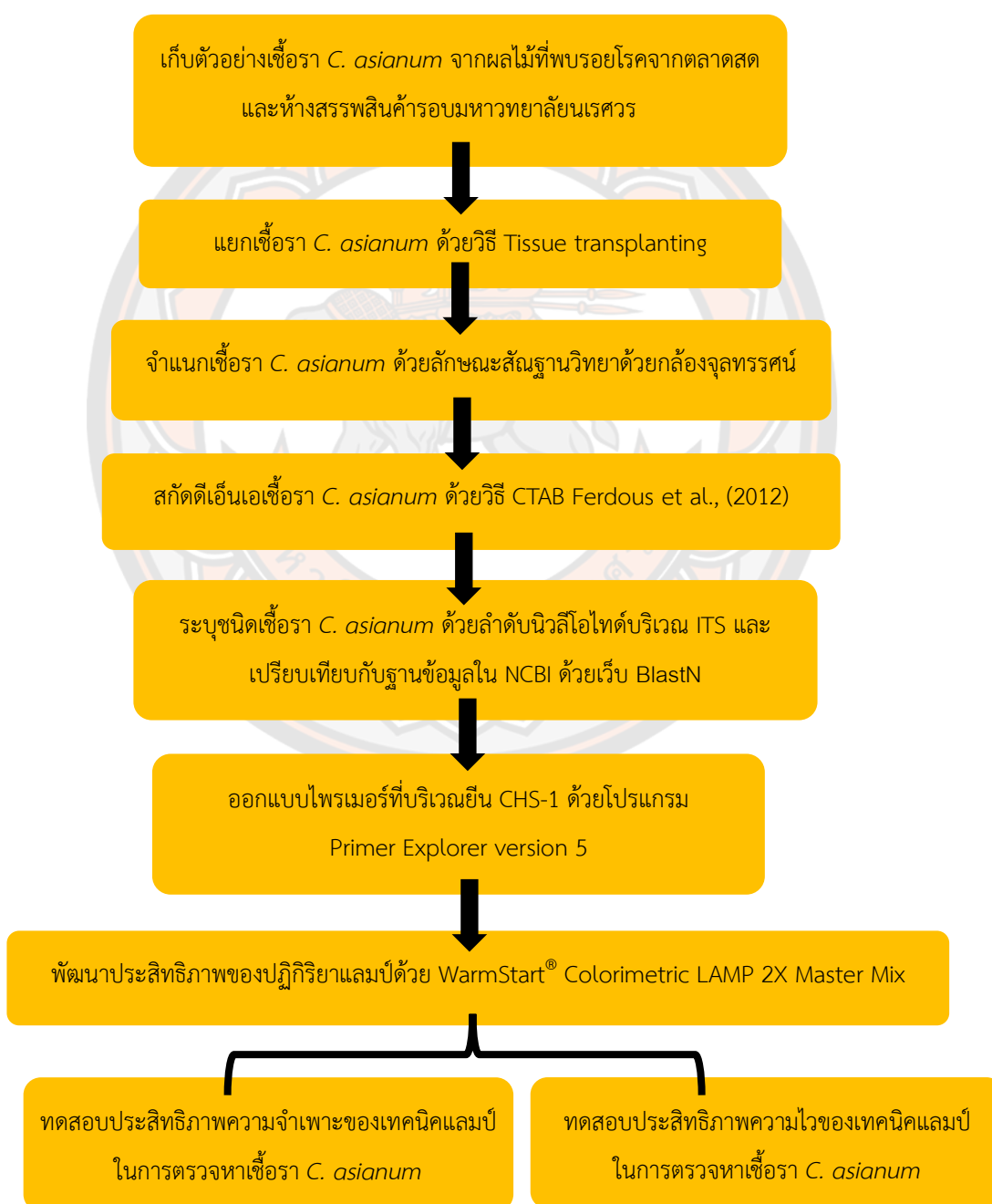
จุดมุ่งหมายของการวิจัย

1. เพื่อพัฒนาเทคนิคแลมป์สำหรับยีน CHS-1 ในการตรวจหาเชื้อรา *C. asianum*
2. เพื่อทดสอบความจำเพาะของเทคนิคแลมป์ในการตรวจหาเชื้อรา *C. asianum*
3. เพื่อทดสอบความไวของเทคนิคแลมป์ในการตรวจหาเชื้อรา *C. asianum*

สมมุติฐานของการวิจัย

1. เทคนิคแลมบ์ที่พัฒนาขึ้นสามารถตรวจหา *C. asianum* ที่ก่อโรคแอนแทรกโอสได้
2. ชุดไพรเมอร์ที่ออกแบบด้วยยีนบริเวณ CHS-1 สามารถตรวจเชื้อราสกุล *C. asianum* ได้
อย่างจำเพาะและแม่นยำ

ขอบเขตการวิจัย



บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

โรคแอนแทรกโนส (Anthracnose)

โรคแอนแทรกโนส เป็นโรคพืชที่ทำให้เกิดความเสียหายหลังการเก็บเกี่ยวต่อผลผลิตทางการเกษตรทั้งปริมาณและคุณภาพ สาเหตุเกิดจากเชื้อรา *Colletotrichum* spp. ทำให้ผลผลิตเน่าเสียอายุการเก็บรักษาสั้น ไม่สามารถขนส่งระยะไกลได้ เชื้อราสามารถเข้าทำลายได้ทุกส่วนของพืชตั้งแต่ลำต้น ใบ ก้าน ดอก ผล และเมล็ด และเข้าทำลายได้ทุกระยะการเจริญเติบโตของพืชตั้งแต่ต้นอ่อนระยะดอก ผลอ่อน โดยยังไม่แสดงอาการของโรค แต่จะแสดงอาการชัดเจนเมื่อผลผลิตแก่หรือเริ่มสุก จัดเป็นการเข้าทำลายแบบแฝง (latent infection) นอกจากนี้ยังพบการเข้าทำลายของเชื้อได้ทั้งแบบหลายชนิดเข้าทำลายพืชชนิดเดียว เช่น *C. capsici* และ *C. gloeosporioides* พบในแก้วมังกร หรือเชื้อชนิดเดียวเข้าทำลายพืชหลายชนิดก็ได้ เช่น *C. gloeosporioides* พบในมะม่วง มะละกอ แก้วมังกร ฝรั่ง องุ่น และพริก เป็นต้น การระบาดของโรคเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วและรุนแรงในสภาวะที่มีอุณหภูมิและความชื้นสูง ซึ่งมีการแพร่กระจายของเชื้อโดยอาศัยลม ฝน หรือแมลงที่บินมาเกาะบริเวณแผลทำให้สปอร์แพร่กระจายไปยังที่ต่าง ๆ เมื่อถูกความชื้นก็สามารถงอกเจริญได้ โดยอาการของโรคเริ่มจากจุดแผลแห้งเล็ก ๆ สีน้ำตาลแล้วค่อย ๆ เข้มขึ้นขยายออกเป็นวงกลมหรือวงรีซ้อนกันเป็นชั้น ๆ (ภาพ 1) จะเห็นชัดเจนในระยะที่ผลเริ่มสุกเมื่อมีความชื้นสูงและพบการสร้างกลุ่มของสปอร์ หรือโคนิเดีย (conidia) สีส้มหรือสีชมพูเป็นหยดเหลวชั้นบริเวณแผล (รัมมีพัน โกศลาพันธ์ และคณะ, 2557)

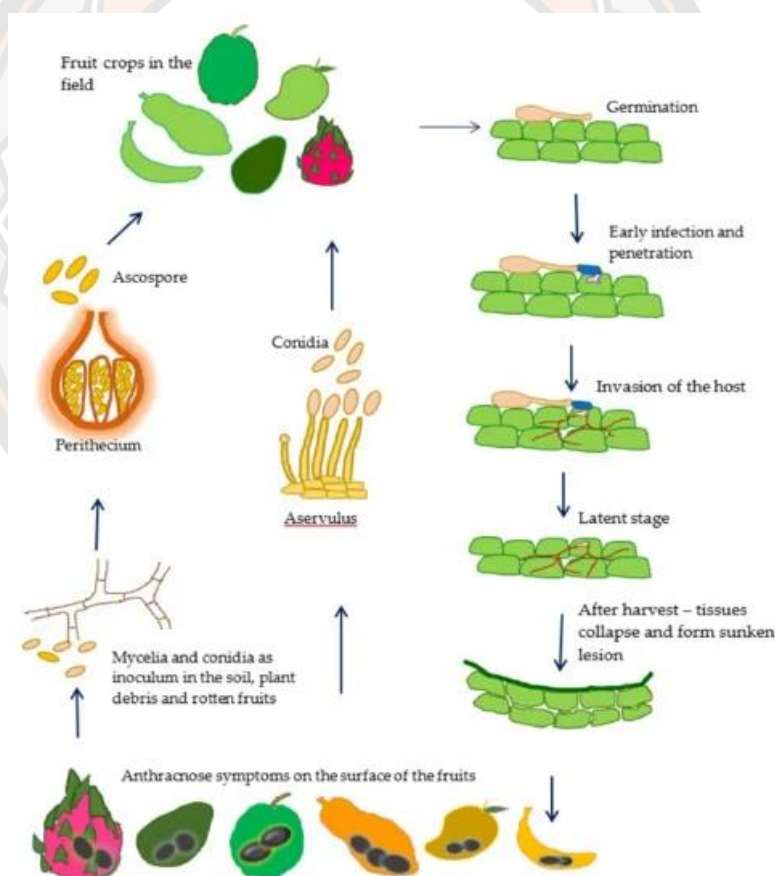


ภาพ 1 รอยโรคแอนแทรกโนสบนผลไม้ (A) ฝรั่ง, (B) แก้วมังกร, (C) กล้วย, (D) มะม่วง และ (E) มะละกอ

(ที่มา : Zakaria, 2021)

การเข้าทำลายและการเกิดโรคแอนแทรกโนส

โรคแอนแทรกโนสจะมีการเข้าทำลายโดยตรง (direct penetration) และเข้าทำลายแบบแฝง (latent inflection) โดยสปอร์ของเชื้อราที่เป็นโรคจะปลิวตามลมไปยังต้นกล้า และส่วนต่าง ๆ ของพืช ซึ่งสปอร์ที่ตกลงผิวพืชจะงอก germ tube แผ่แนบกับผิวพืชจากนั้นก็สร้าง appressorium เป็นโครงสร้างพิเศษใช้สร้าง penetration peg แทะผ่านทะลุชั้น cuticle ไปยังผนังเซลล์แล้วแทงแฝงเข้าไปทางช่องว่างภายในเซลล์ หลังจากนั้นจะอยู่ในช่วงพักตัวเมื่อถึงระยะเก็บเกี่ยวหรือผลไม้เริ่มสุก ต่อมาส่วนปลายของ penetration peg ของเชื้อจะมีการปล่อยเอนไซม์ pectolytic และ cellulolytic ออกมาย่อย pectic และ cellulose ซึ่งเป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ทำให้ผนังเซลล์แยกออกจากกันไม่รวมกันส่งผลให้เนื้อเยื่อยุบตัวและเกิดการเน่า (rotting) ซึ่งเรียกสภาวะการแฝงนี้ว่า latent inflection (ภาพ 2) (Zakaria, 2021)



ภาพ 2 วงจรชีวิตของโรคแอนแทรกโนสบนผลไม้เขตร้อน

(ที่มา : Zakaria, 2021)

อนุกรมวิธานและลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา

Subdivision Deuteromycotina,

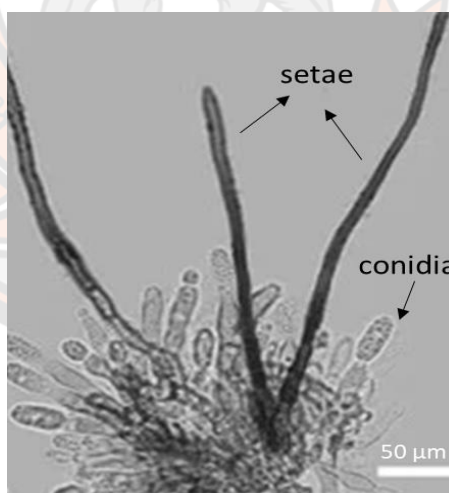
Class Coelomycetes,

Order Melanconiales,

Family Melanconiaceae

Genus *Colletotrichum* spp. (Ainsworth, 1973)

ลักษณะทั่วไปของเชื้อราสกุลนี้คือ เส้นใย (mycelium) มีผนังกัน (septum) มีสีขาวอมเทาจนถึงดำ หรือสีขาวอมส้ม มักพบการสร้าง fruiting body แบบ acervulus ที่มีรูปร่างแบบ cushion-shaped กลมค่อนข้างแบน บริเวณใต้เซลล์ผิวพืช (epidermis) มีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศโดยจะสร้างสปอร์เรียกว่าโคนิเดีย (conidia) เกิดบนก้านชูโคนิเดีย (conidiophore) มีลักษณะเซลล์เดี่ยว ไม่มีสีไม่มีผนังกัน (setae) มีรูปร่างทรงกระบอกยาวรีตรง หรือโค้งงอ เมื่อแก่จะตันโคนิเดียจะถูกปล่อยออกมาเป็นกลุ่มในลักษณะแห้ง หรือของเหลวข้นสีเหลืองอ่อนหรือสีส้มอมชมพู นอกจากนี้ยังสร้าง sterile hyphae สีเข้มขนาดใหญ่คล้ายหนามเรียกว่า seta บริเวณรอบขอบ acervulus หรือปะปนอยู่กับ conidiophore (ภาพ 3) ซึ่งลักษณะของ acervulus แตกต่างกันไปตามสภาพธรรมชาติและพืชอาศัย (host) (วิจัย รักรักษาศาสตร์, 2546)



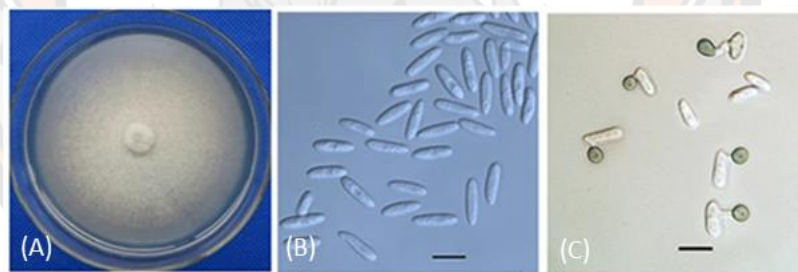
ภาพ 3 โครงสร้าง acervulus (conidiomata) ของเชื้อราสกุล *Colletotrichum*

(ที่มา : Zheng et al., 2022)

เชื้อราในสกุล *Colletotrichum* เป็นเชื้อสาเหตุที่ทำให้เกิดโรคแอนแทรกโนสในพืชมากกว่า 470 สกุล ในพืชตระกูลหญ้า ธัญพืช ถั่ว ผัก ไม้ผล และไม้ประดับ ซึ่งรายงานการจัดจำแนกที่ได้รับ การยอมรับมากที่สุดคือการจัดจำแนกของ Sutton (1992) โดยอาศัยความจำเพาะเจาะจงต่อพืช

อาศัยร่วมกับลักษณะทางสัณฐานวิทยา สามารถจำแนกได้ 39 สปีชีส์ ดังนี้ *C. acutatum*, *C. capsici*, *C. caricae*, *C. caudatum*, *C. circinans*, *C. coccodes*, *C. coffeanum*, *C. corchori*, *C. crassipes*, *C. curvatum*, *C. dematium*, *C. destructivum*, *C. falcatum*, *C. fragariae*, *C. fusarioides*, *C. fuscum*, *C. gloeosporioides*, *C. gloeosporioides var minus*, *C. gnaphalii*, *C. graminicola*, *C. helichrysi*, *C. higginsianum*, *C. lilicearum*, *C. lindemuthianum*, *C. linicola*, *C. malvarum*, *C. musae*, *C. nigrum*, *C. nymphaeae*, *C. orbiculare*, *C. paludosum*, *C. phyllachoroides*, *C. psoraleae*, *C. spinaciae*, *C. sublineolum*, *C. trichellum*, *C. trifolii*, *C. truncatums* และ *C. typhae* (Bailey & Jeger, 1992)

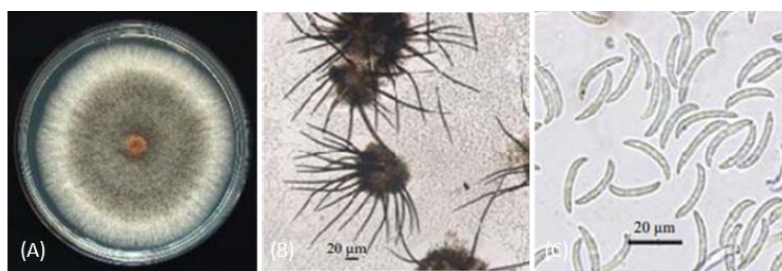
1. *C. acutatum* ลักษณะทางสัณฐานวิทยาเมื่อนำมาเลี้ยงบนอาหาร PDA จะพบเส้นใยเจริญหนาแน่น เมื่อยังอ่อนเส้นใยมีสีเขียว (ภาพ 4A) ต่อมาค่อย ๆ เปลี่ยนเป็นสีเทาอมชมพู ด้านตรงข้ามโคโลนีสีส้มอมชมพู โคนิเดียมีลักษณะเป็นรูปกระบอกเซลล์เดี่ยว ไม่มีสี ขนาดที่วัดได้ประมาณ 8.5-16.5 x 2.5-4 ไมโครเมตร (ภาพ 4B) ไม่สร้าง sclerotia และ setae ซึ่ง appressoria มีลักษณะทรงกระบอกขนาด 9-12 x 8-10.5 ไมโครเมตร (ภาพ 4C) (Zivkovic et al., 2010)



ภาพ 4 สัณฐานวิทยาของเชื้อ *C. acutatum* (A) โคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA, (B) โคนิเดีย, และ (C) appressoria

(ที่มา : Liu et al., 2016)

2. *C. capsici* เป็นราที่มีพืชอาศัยกว้าง สามารถทำให้พืชแสดงอาการได้หลายอย่างเช่น dieback, stem break, anthracnose leaf spot, seed ling blight เป็นต้น ซึ่งลักษณะโคโลนีบนอาหาร PDA พบว่า เส้นใยเหนืออาหารเจริญฟูหนาหนา เมื่อยังอ่อนอยู่เส้นใยสีขาวเทา ต่อมาค่อย ๆ เปลี่ยนเป็นสีเทาและเป็นเทาแกมดำ (ภาพ 5A) พบ seta ลักษณะเป็นเส้นสีน้ำตาลเข้มถึงดำปลายเรียวแหลมเกิดปะปน (ภาพ 5B) ไม่พบการสร้าง sclerotia โคนิเดียเดี่ยว ๆ มีลักษณะโค้งงอคล้ายเคียว ปลายด้านหนึ่งแหลม ส่วนอีกด้านหนึ่งค่อนข้างมน ขนาดที่วัดได้ 18-23 x 3.5-4 ไมโครเมตร (ภาพ 5C) (Widodo & Hidayat, 2018)

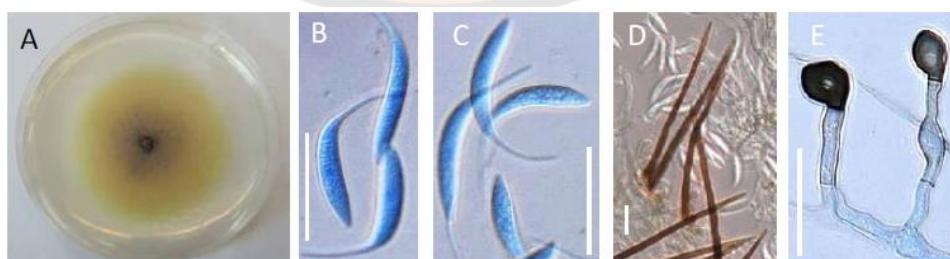


ภาพ 5 ลักษณะวิทยาของเชื้อ *C. capcisi* (A) โคลนินบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA, (B) seta และ (C) โคนิเดียม

(ที่มา : Widodo & Hidayat, 2018)

3. *C. caricae* เป็นสายพันธุ์ที่มีการเจริญเติบโตเร็วบนอาหารเลี้ยงเชื้อ มีการสร้างกลุ่ม acervular conidomata บนพืชอาศัยซึ่งคล้ายกับการแตกแขนงของเส้นใยบนอาหารเลี้ยงเชื้อ พบ seta และ appressoria มีสีเขียวเข้ม มีลักษณะเป็นรูปไข่ค่อนข้างไปทางทรงรูปชมพู กลุ่มโคนิเดียมเป็นหยดน้ำขุ่น ๆ สีชมพู และโคนิเดียมเดี่ยว ๆ มีลักษณะทรงกระบอกมีขนาด 3.5-6 x 9-20 ไมโครเมตร (Bailey & Jeger, 1992; Sutton, 1980)

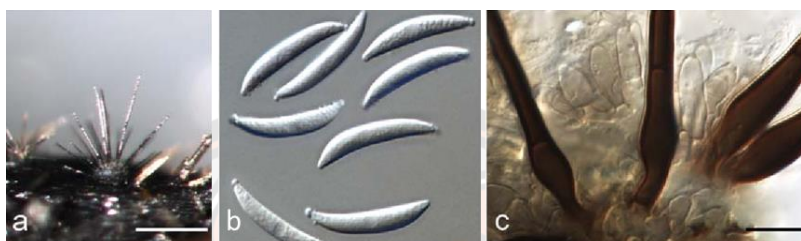
4. *C. caudatum* โคลนินเจริญกันอย่างหนาแน่นมีสีน้ำตาลอ่อน (ภาพ 6A) และเส้นใยที่เจริญบริเวณรอบโกลนินมีสีเทาอ่อน โคนิเดียมมีลักษณะเป็นทรงกระสวยมีขนาด 18.5 x 3.5-4 ไมโครเมตร ซึ่งด้านหนึ่งโค้งมนส่วนปลายอีกด้านโค้งงอยาวยืดออกไป ขนาดประมาณ 10-16 ไมโครเมตร (ภาพ 6B และ 6C) พบ seta จำนวนมากมีลักษณะเป็นเส้นสีน้ำตาลเข้มถึงดำปลายเรียวแหลมเกิดปะปน (ภาพ 6D) appressoria มีลักษณะทรงกระบอก หรือรูปไข่ มีขนาด 10-14 x 9-10 ไมโครเมตร (ภาพ 6E) (Crouch, 2014)



ภาพ 6 ลักษณะวิทยาของเชื้อ *C. caudatum* (A) โคลนินบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA, (B และ C) โคนิเดียม, (D) seta และ (E) appressoria

(ที่มา : Crouch, 2014)

5. *C. circinans* โคลนินี้มีสีน้ำตาลเข้ม เส้นใยที่เจริญรอบๆ มีสีเหลืองอ่อน มีการสร้าง sclerotia มีรูปร่างทรงกลม พบ seta เป็นจำนวนมาก และพบกลุ่มโคนินเดียเป็นหยดน้ำชั้นสีเหลืองใส (ภาพ 7A) โคนินเดียเดี่ยว ๆ เป็นรูปทรงกระสวย ปลายแต่ละด้านค่อยๆ โค้งงอเรียวยาวไปจนสุดปลายซึ่งมีขนาด $3.5 \times 19-21$ ไมโครเมตร conidiophores มีการปะปนของ seta มีลักษณะเป็นเส้นสีน้ำตาลเข้มถึงดำปลายเรียวแหลม (ภาพ 7C) (Damm et al., 2009)



ภาพ 7 สัณฐานวิทยาของเชื้อ *C. circinans* (A) seta, (B) conidia และ (D) conidiophores (ที่มา : Damm et al., 2009)

6. *C. coccodes* โคลนินี้ที่เจริญบริเวณรอบโคลนินี้มีสีขาวเมื่อเส้นใยแก่ตัวจะเปลี่ยนเป็นสีดำ (8A) กลุ่มโคนินเดียเป็นหยดน้ำชั้นสีเหลืองอ่อน สีส้มจนถึงสีส้มเข้ม มีรูปร่างทรงกระบอกตรง หัวท้ายโค้งงอเล็กน้อยมีขนาด $3-4 \times 16-24$ ไมโครเมตร (ภาพ 8B) appressoria มีสีน้ำตาลอ่อนจนถึงเข้ม ลักษณะทรงกระบอกยาวค่อนไปทางทรงรูปไข่ หรือบางครั้งมีรูปร่างไม่แน่นอนซึ่งมีขนาด $4-11.5 \times 8.5-16$ ไมโครเมตร (ภาพ 8C) (Liu et al., 2011)

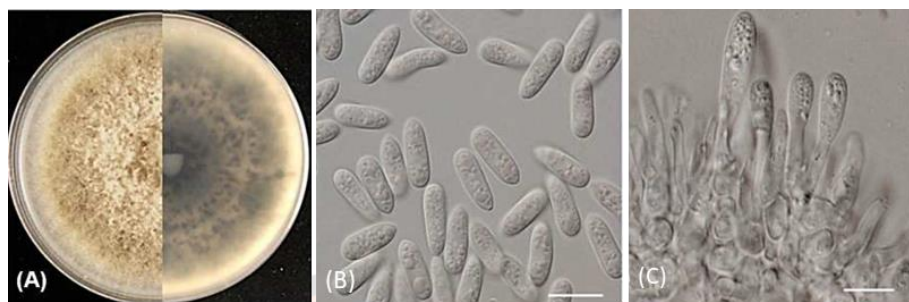


ภาพ 8 สัณฐานวิทยาของเชื้อ *C. coccodes* (A) โคลนินบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA, (B) โคนินเดีย และ (C) appressoria

(ที่มา : Liu et al., 2011)

7. *C. coffeanum* โคลนินี้ค่อนข้างเจริญช้า เส้นใยเจริญรอบ ๆ โคนินี้มีขนาดหนาแน่นมีสีเทาเข้มจนถึงสีเทาอมเขียวมะกอก เมื่อเชื้อราแก่ตัวจะมีสีที่ซีดลง (ภาพ 9A) ไม่พบ setae และ sclerotia ซึ่งโคนินเดียเดี่ยว ๆ มีลักษณะทรงกระบอกตรง หัวท้ายมน ขนาดที่วัดได้ $4 \times 12.5-19$

ไมโครเมตร (ภาพ 9B) โดยโคนิเดียเกิดจาก conidiophores (ภาพ 9C) (Bailey & Jeger, 1992; Furtado, 1970; Hocking, 1972)



ภาพ 9 สัณฐานวิทยาของเชื้อ *C. coffeanum* (A) โคลนินบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA, (B) โคนิเดีย และ (C) conidiophores

(ที่มา : Alhudaib et al., 2023)

8. *C. corchori* สายพันธุ์นี้โคนิเดียค่อนข้างแปรผัน เส้นใยรอบ ๆ โคลนินมีขนาดบางหรือไม่มี เส้นใยมีสีขาวจนถึงสีเทา เมื่อเชื้อราแก่ตัวจะพบ sclerotia ปะปนอยู่บริเวณรอบ ๆ โคลนิน นอกจากนี้ยังพบ setae และ appressoria จำนวนมากกระจายบนอาหารเลี้ยงเชื้อบางครั้งรวมตัวกันเป็นก้อนแน่น ซึ่งมีลักษณะทรงกลมค่อนข้างไปทางรูปไข่ มีขนาด 5.5-8.5 x 6.5-11 ไมโครเมตร กลุ่มโคนิเดียเป็นหยดน้ำข้นสีเหลืองอมน้ำตาลคล้ายสีน้ำผึ้ง โคนิเดียเดี่ยว ๆ มีรูปร่างทรงกระสวย ส่วนหัวท้ายแต่ละด้านค่อย ๆ โค้งงอไปจนสุดปลาย (Ikata & Yoshida, 1940; Islam et al., 2006)

9. *C. crassipes* โคลนินมีความแปรผันมาก โดยเส้นใยมีสีที่หลากหลายขึ้นอยู่กับอาหารเลี้ยงเชื้อ อายุของเชื้อราซึ่งเส้นใยที่เจริญออกไปรอบ ๆ โคลนินมีสีชมพู สีเทา และสีน้ำตาล พบ sclerotia และ setae จำนวนมาก นอกจากนี้ยังพบ appressoria มีสีน้ำตาลอ่อนจนถึงเข้ม มีลักษณะทรงกลมยาวค่อนข้างไปทางรูปไข่ และมีขอบหยักลึกปกติจะรวมตัวกันเป็นก้อนแน่นซึ่งมีขนาด 7-9.5 x 10.5-14 ไมโครเมตร กลุ่มโคนิเดีย รวมกันเป็นน้ำข้นสีน้ำผึ้ง หรือสีครีมส้ม โคนิเดียเดี่ยว ๆ มีรูปร่างทรงกระบอกตรง ด้านหัวมนฐานปลายตัดมีขนาด 5-7 x 14-28 ไมโครเมตร ซึ่งสายพันธุ์นี้เป็นหนึ่งในหลายๆสายพันธุ์ที่ถูกจำแนกออกมาจาก *C. gloeosporioides* เนื่องจากโคนิเดียมีขนาดที่กว้างและยาวกว่าปกติ นอกจากนี้ appressoria มีขอบหยักลึก (Sutton, 1980)

10. *C. curvatum* กลุ่มของโคลนินและเส้นใยที่เจริญอยู่รอบ ๆ มีสีขาวจนถึงสีเทา ไม่พบ sclerotia และ appressoria แต่พบ setae ซึ่งพบกลุ่มของโคนิเดีย รวมกันเป็นหยดน้ำข้นสีขาวอมชมพู และโคนิเดียเดี่ยว ๆ มีลักษณะเป็นทรงกระสวยโค้งงอ โดยปลายแต่ละด้านค่อย ๆ เรียวจนไปถึงแหลมขนาดที่วัดได้ 3.5 x 16-22 ไมโครเมตร (Briant & Martyn, 1930)

11. *C. dematium* สายพันธุ์นี้โคโลนีมีความแปรผันมาก ซึ่งเส้นใยมีสีหลากหลายมีตั้งแต่สีขาว สีเทาอ่อนจนถึงสีเทาเข้ม และมีน้ำตาลเข้ม (ภาพ 10A) ซึ่งโคนินเดียว ๆ มีลักษณะเป็นทรงกระสวยหัวท้ายค้อย ๆ โค้งงอเรียวยาวสุดปลายแต่ละด้านมีขนาด $2-3 \times 18-26$ ไมโครเมตร (ภาพ 10B) appressoria เป็นสีน้ำตาลอ่อน ลักษณะทรงกลมยาวค่อนไปทางรูปไข่ หรือบางครั้งพบรูปร่างที่ไม่แน่นอน ขอบหัวท้ายมีรอยหยักมีขนาด $4-12.5 \times 7.5-18$ ไมโครเมตร (ภาพ 10C) นอกจากนี้ยังพบ acervuli บนเนื้อเยื่อหรือผิวของพืช (ภาพ 10D) (K. D. Hyde et al., 2009; Samarakoon et al., 2018)



ภาพ 10 สัณฐานวิทยาของเชื้อ *C. dematium* (A) โคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA, (B) โคนินเดี่ยว (C) appressoria และ (D) acervuli

(ที่มา : K. D. Hyde et al., 2009)

12. *C. destrunctivum* โคโลนีของเชื้อรามีการเจริญเติบโตกับงานอาหารเลี้ยงเชื้อ ลักษณะค่อนข้างเปียกตรงกลางมีสีเหลืองอ่อนจนถึงสีส้ม (ภาพ 11A) และโคนินเดี่ยว ๆ มีลักษณะทรงกระบอกตรงโค้งเล็กน้อย หัวมนส่วนปลายฐานตัดซึ่งมีขนาด $4-6 \times 10-22$ ไมโครเมตร (ภาพ 11B) พบ appressoria มีจำนวนมาก มีลักษณะทรงกลมค่อนไปทางรูปไข่ มีขนาด $6-10 \times 6-16$ ไมโครเมตร (ภาพ 11C) (K. Hyde et al., 2009)



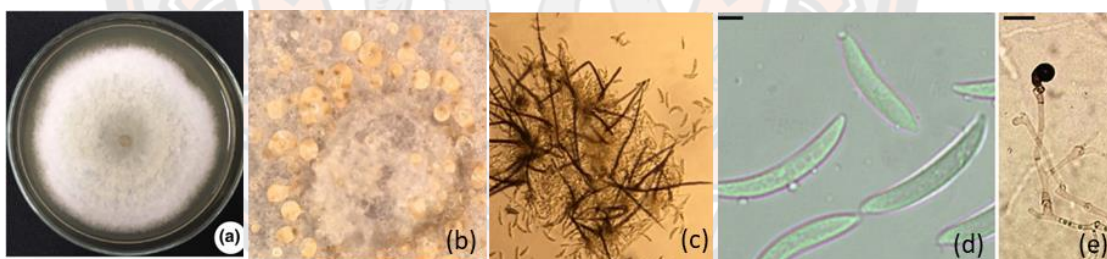
ภาพ 11 สัณฐานวิทยาของเชื้อ *C. destrunctivum* (A) โคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA, (B) โคนินเดี่ยว และ (C) appressoria

(ที่มา : K. D. Hyde et al., 2009)

13. *C. fusarioides* สายพันธุ์นี้พบการสร้าง conidiomata ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 200-450 ไมโครเมตร พบ seta กระจายอยู่บาง ๆ หรือไม่พบเลยขึ้นอยู่กับการเจริญของ conidiomata กลุ่มของโคนิเดีย รวมกันเป็นหยดน้ำชั้นสีส้มเข้ม มีรูปร่างไม่แน่นอน ส่วนใหญ่มีลักษณะทรงกระบอกตรง หัวท้ายโค้งมนซึ่งมีขนาด 4.5-6 x 18-32 ไมโครเมตร (Bailey & Jeger, 1992; Garibaldi et al., 1997)

14. *C. gnaphalii* สายพันธุ์นี้เป็นหนึ่งในสายพันธุ์ที่ถูกจำแนกออกมาจากสายพันธุ์ *C. gloeosporioides* ซึ่งมีลักษณะเด่นคือ โคนิเดียมีขนาดที่เล็กกว่าซึ่งขนาดที่วัดได้คือ 4-6 x 8-15 ไมโครเมตร (Bailey & Jeger, 1992)

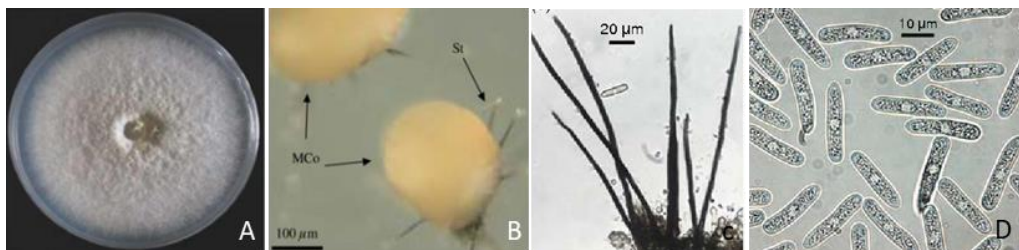
15. *C. falcatum* โคลนินี้มีสีขาวอมเทา และเส้นใยมีการเจริญกระจายแบบบางฟู อยู่รอบ ๆ โคลนินี้บางบริเวณเจริญแบบหนาแน่น (ภาพ 12A) กลุ่มของโคนิเดีย รวมกันเป็นหยดน้ำชั้นสีส้มอมเหลือง (ภาพ 12B) พบ seta เป็นจำนวนมาก มีลักษณะเป็นเส้นสีน้ำตาลเข้มถึงดำปลายเรียวแหลม (ภาพ 12C) โคนิเดียมีลักษณะรูปทรงกระสวย ส่วนหัวท้ายแต่ละข้างค้อย ๆ งอเรียวยาวไปจนสุดปลาย ขนาดที่วัดได้ 4-5 x 15.5-26.5 ไมโครเมตร (ภาพ 12D) appressoria มีสีน้ำตาลอ่อน ลักษณะทรงกลมจนถึงรูปไข่ ซึ่งมีขนาด 9.5-12 x 12.5-14.5 ไมโครเมตร (ภาพ 12E) (Costa et al., 2021; Srijudanu et al., 2023)



ภาพ 12 ลักษณะวิทยาของเชื้อ *C. falcatum* (A) โคลนินบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA, (B) conidia masses, (C) seta, (D) โคนิเดีย และ (E) appressoria

(ที่มา : Costa et al., 2021)

16. *C. fragariae* โคลนินี้ของเชื้อรามีสีขาวอมเทาจนถึงดำ (ภาพ 13A) และกลุ่มของโคนิเดีย รวมกันเป็นหยดน้ำชั้นสีส้ม (ภาพ 13B) พบ seta กระจายตัวกันอย่างหนาแน่น มีลักษณะเป็นเส้นสีน้ำตาลเข้มถึงดำปลายเรียวแหลม (ภาพ 13C) ไม่พบ sclerotia ส่วนโคนิเดียเดี่ยว ๆ เป็นรูปทรงกระบอก ส่วนหัวโค้งมนจนถึงปลายตัดซึ่งมีขนาด 4.5-5 x 12.5-16.5 ไมโครเมตร (ภาพ 13D) (Li et al., 2021; Xie et al., 2010)



ภาพ 13 ลักษณะวิทยาของเชื้อ *C. fragariae* (A) โคลนินบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA, (B) conidia masses, (C) seta, และ (D) โคนิเดีย

(ที่มา : De Chirimoya, 2005)

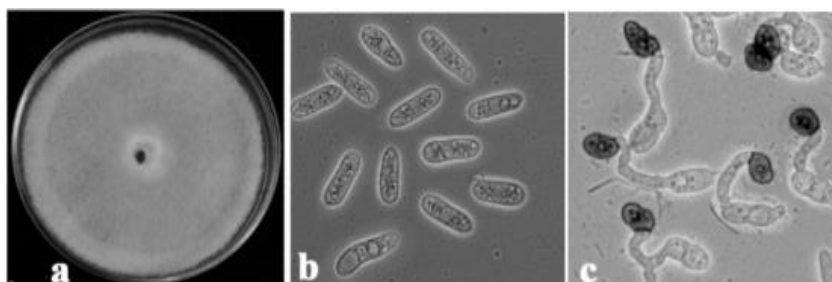
17. *C. fuscum* สายพันธุ์นี้โคโลนีมีการเจริญเติบโตเร็ว เส้นใยมีลักษณะหนาแน่น มีสีขาวอมเทา เมื่อเชื้อราแก่ตัวเส้นใยจะรวมกันเป็นก้อนสีดำกลายเป็น sclerotia (ภาพ 14A) โคนิเดียเดี่ยว ๆ มีลักษณะเป็นทรงกระบอกจนถึงทรงรี หัวท้ายมนปลายตัดซึ่งมีขนาด 3.5-4 x 15-21 ไมโครเมตร (ภาพ 14B) พบ seta เป็นจำนวนมาก (ภาพ 14C) และพบ appressoria มีลักษณะเป็นรูปไข่ เส้นผ่านศูนย์กลาง 4-7 ไมโครเมตร (ภาพ 14D) (Damm et al., 2014)



ภาพ 14 ลักษณะวิทยาของเชื้อ *C. fuscum* (A) sclerotia, (B) โคนิเดีย, (C) seta, และ (D) conidiophores

(ที่มา : Damm et al., 2014)

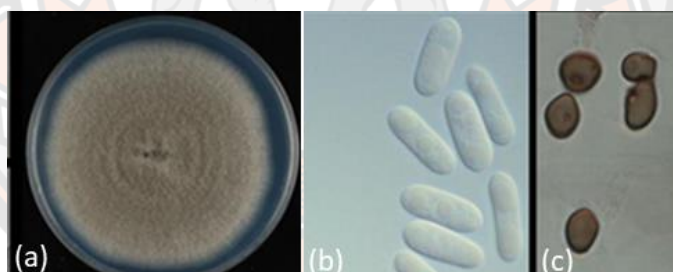
18. *C. gloeosporioides* เส้นใยของเชื้อรา มีลักษณะการเจริญเติบโตกระจายตัวแบบบาง ๆ เรียบติดกับอาหารเลี้ยงเชื้อ มีสีขาวอมเทาถึงสีเทาจนถึงสีเทาเข้ม (ภาพ 15A) ไม่พบ seta และ sclerotia และโคนิเดียเดี่ยว ๆ มีลักษณะรูปร่างทรงกระบอกตรง ปลายมนทั้งสองด้าน ขนาดประมาณ 3.5-6 x 12-17 ไมโครเมตร (ภาพ 15B) ส่วน appressoria มีลักษณะเป็นรูปไข่ บางครั้งขอบหยักสีน้ำตาลอ่อนมีขนาด 6-20 x 4-12 ไมโครเมตร (ภาพ 15C) (Bailey & Jeger, 1992; Chowdappa, 2017)



ภาพ 15 ลักษณะวิทยาของเชื้อ *C. gloeosporioides* (A) โคลนีนบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA, (B) โคนิเดียม, และ (C) appressoria

(ที่มา : Chowdappa, 2017)

19. *C. gloeosporioides* var *minus* โคลนีนมีการเจริญเติบโตเร็ว เมื่อสังเกตด้วยตาเปล่า เส้นใยจะมีลักษณะที่หยากกว่าสายพันธุ์ *C. gloeosporioides* เส้นใยที่เจริญอยู่รอบ ๆ โคลนีนมีสีขาวจนถึงสีเทา และมีลักษณะหนานุ่มฟู (ภาพ 16A) ไม่พบ sclerotia และโคนิเดียมที่มีลักษณะทรงกระบอกตรง หัวท้ายมนปลายตัดขนาดที่วัดได้ 3-5 x 11-17.5 ไมโครเมตร (ภาพ 16B) appressoria มีลักษณะเป็นรูปไข่ หรือมีรูปร่างไม่แน่นอน บางครั้งมีขอบหยักสีน้ำตาลอ่อนมีขนาด 6-6.5 x 8-9 ไมโครเมตร (ภาพ 16C) (Weir et al., 2012)



ภาพ 16 ลักษณะวิทยาของเชื้อ *C. gloeosporioides* var *minus* (A) โคลนีนบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA, (B) โคนิเดียม และ (C) appressoria

(ที่มา : Weir et al., 2012)

20. *C. helichrysi* สายพันธุ์นี้เป็นสาเหตุอาการ leaf hypertrophy หรืออาการใบบิดเบี้ยว ใบหนาและงอ ซึ่งเกิดจากเซลล์มีขนาดการเจริญเติบโตกว่าปกติ หรือเนื้อเยื่อนั้นมีการแบ่งเซลล์เกิดขึ้นมากกว่าปกติ ซึ่ง conidiomata มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 120-250 ไมโครเมตร และโคนิเดียมเดี่ยว ๆ มีลักษณะเป็นทรงกระบอกมีขนาด 4.5-6 x 15-19 ไมโครเมตร (Arx, 1957a; Van der Aa et al., 1990)

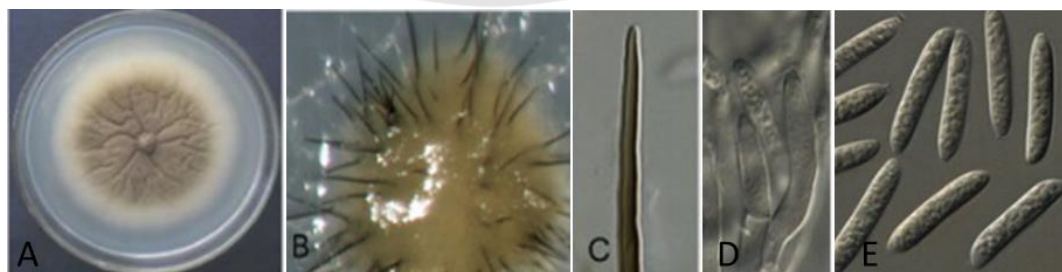
21. *C. graminicola* โคลนินมีสีเทา และเส้นใยที่เจริญเติบโตรอบๆ โคลนินมีการเจริญที่ไม่สม่ำเสมอ ซึ่งเส้นใยมีลักษณะหนาฟู มีสีเทาหรือสีน้ำตาลเข้ม (ภาพ 17A) โคนินเดี่ยวเดี่ยว ๆ มีลักษณะเป็นรูปกระสวย ปลายแต่ละข้างค้อย ๆ โค้งงอจนสุดปลายมีขนาด 3.5-5 x 23.5-29 ไมโครเมตร (ภาพ 17B) และพบ appressoria จำนวนมาก มีสีน้ำตาล ขอบไม่มีเรียบซึ่งมีขนาด 12.5-14 x 17.5-20 ไมโครเมตร (ภาพ 17C) (Shi et al., 2023)



ภาพ 17 ลักษณะวิทยาของเชื้อ *C. graminicola* (A) โคลนินบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA, (B) โคนินเดี่ยว และ (C) appressoria

(ที่มา : Shi et al., 2023)

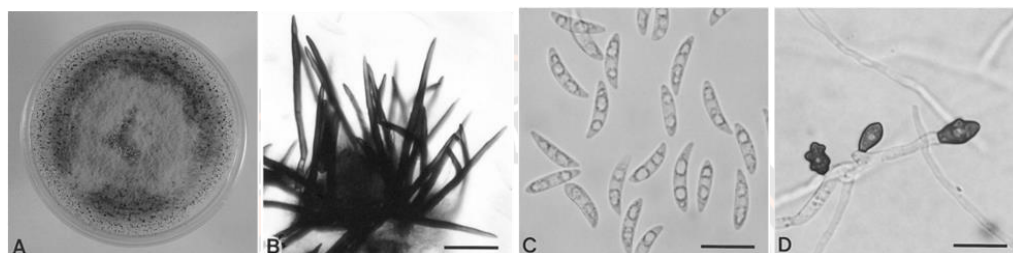
22. *C. higginsianum* สายพันธุ์นี้ก่อโรคในพืชวงศ์ *Curciferae* โคลนินมีลักษณะเปียกเรียบ ติดกับอาหารเลี้ยง มีสีขาวอมเหลืองจนถึงสีน้ำตาล (ภาพ 18A) กลุ่มโคนินเดี่ยว รวมตัวเป็นหยดน้ำขุ่น หรือเมือกสีส้มเข้มอมน้ำตาล (ภาพ 18B) พบ seta เป็นจำนวนมาก มีลักษณะเป็นเส้นสีน้ำตาลเข้มถึงดำปลายเรียวแหลม (ภาพ 18C) โคนินเดี่ยวเกิดจาก conidiophores (ภาพ 18D) และโคนินเดี่ยวเดี่ยว ๆ มีลักษณะกระบอกตรง หัวท้ายโค้งมน มีขนาด 4 x 16.5-19 ไมโครเมตร (ภาพ 18E) (Damm et al., 2014; Liu et al., 2017)



ภาพ 18 ลักษณะวิทยาของเชื้อ *C. higginsianum* (A) โคลนินบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA, (B) acervuli, (C) seta, (D) conidiophores และ (E) โคนินเดี่ยว

(ที่มา : Damm et al., 2014)

23. *C. lilicearum* โคลนนี้เริ่มมีขาวจนถึงสีเทา เมื่อเชื้อราแก่ตัวโคลนนี้มีสีดำ (ภาพ 19A) พบ seta จำนวนมาก (ภาพ 19B) กลุ่มโคนินเดี่ยวเดี่ยว ๆ มีลักษณะทรงกระสวย พระจันทร์เสี้ยว ปลายแต่ละด้านค้อย ๆ เรียวเล็กกลมมีขนาด 3.5-5 x 13-23 ไมโครเมตร (ภาพ 19C) appressoria มีสีน้ำตาลอ่อน มีลักษณะทรงกลมค่อนข้างยาว รูปร่างไม่แน่นอน หรือขอบหยักมนมีขนาด 6.-10.5 x 12-14.5 ไมโครเมตร (ภาพ 19D) (Bailey & Jeger, 1992) ซึ่งสายพันธุ์นี้ก่อโรคสะเก็ดดำ (black scale) ในตาหน่อต้นลิ้น (Boerema & Hamers, 1989; Kim et al., 2002)



ภาพ 19 ลักษณะวิทยาของเชื้อ *C. lilicearum* (A) โคลนบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA, (B) seta, (C) โคนินเดี่ยว และ (D) appressoria

(ที่มา : Kim et al., 2002)

24. *C. linicola* สายพันธุ์นี้โคลนนี้มีการเจริญเติบโตช้ามีสีน้ำตาลเข้มถึงดำ ไม่ค่อยมีการเจริญของเส้นใยขยายออกด้านนอก แต่มีการเจริญของเส้นใยที่รวมตัวกันแน่นซึ่งมีสีดำ ไม่พบ sclerotia แต่พบ seta เป็นจำนวนมาก appressoria มีสีน้ำตาลอ่อน มีลักษณะทรงกลมค่อนข้างยาว รูปร่างไม่แน่นอน หรือขอบหยักมนมีขนาด 6.5-13.5 x 10-13.5 ไมโครเมตร โคนินเดี่ยวเดี่ยว ๆ มีลักษณะตรงโค้งงอเล็กน้อย ปลายแต่ละด้านๆ เรียวไปจนสุดปลาย มีขนาด 3-4.5 x 16-19 ไมโครเมตร (Vasic et al., 2014)

25. *C. lindemuthianum* กลุ่มโคนินเดี่ยว รวมตัวเป็นหยดน้ำชั้นสีส้มอ่อนจนถึงสีน้ำตาล (ภาพ 20A) พบ seta กระจายอยู่อย่างบาง ๆ มีลักษณะเป็นเส้นสีน้ำตาลอ่อนปลายเรียวแหลม (ภาพ 20B) โคนินเดี่ยวเกิดจาก conidiophores (ภาพ 20C) โคนินเดี่ยวเดี่ยว ๆ มีลักษณะทรงกระบอกจนถึงทรงรี ปลายทั้งสองด้านโค้งมนมีขนาด 3.5-4.5 x 9.5-11.5 ไมโครเมตร (ภาพ 20D) พบ appressoria กระจายตัวอยู่มีสีน้ำตาลอ่อน หรือสีน้ำตาลเข้ม มีลักษณะทรงกลมรูปไข่ ขอบเรียบมีขนาด 6-7 x 8 ไมโครเมตร (ภาพ 20E) (Arx, 1957a; Bailey & Jeger, 1992) ซึ่งสายพันธุ์นี้ถูกจำแนกออกจากสายพันธุ์ *C. gloeosporioides* (Damm et al., 2013; Von Arx, 1970)

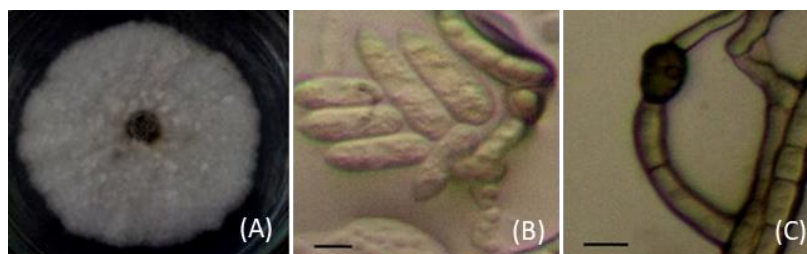


ภาพ 20 สัณฐานวิทยาของเชื้อ *C. lindemuthianum* (A) conidia masses, (B) seta, (C) conidiophores, (D) โคนิเดีย และ (E) appressoria

(ที่มา : Damm et al., 2013)

26. *C. paludosum* สายพันธุ์นี้มีเส้นผ่านศูนย์กลางของ conidiomata ที่ขนาด 150-370 ไมโครเมตร และโคนิเดียเดี่ยว ๆ มีลักษณะเป็นทรงกระบอกจนถึงรูปทรงรี มีขนาด 6-8 x 18-28 ไมโครเมตร (Arx, 1957a, 1957b) ซึ่งจากรายงานของ von Arx (1957a,b) ไม่มีรายงานเกี่ยวกับ สัณฐานวิทยาของเชื้อราที่เลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ จึงทำให้ไม่ทราบรายละเอียดเกี่ยวกับ setae, sclerotia และ appressoria (Arx, 1957a; Bailey & Jeger, 1992)

27. *C. nymphaeae* สายพันธุ์นี้การเจริญเติบโตในอาหารเลี้ยงเชื้อส่วนใหญ่จะเป็นแบบ hyphomycetous มากกว่าแบบ sporodochial และไม่มีการสร้าง acervulus โคลนินี้มีสีขาว และมีลักษณะหนาฟูรวมตัวกันแน่น (ภาพ 21A) ซึ่งโคนิเดียเดี่ยว ๆ มีลักษณะเป็นรูปทรงรี ค่อนข้างไปทรงกระบอก โค้งงอเล็กน้อย ปลายทั้งสองด้านโค้งมนมีขนาด 4-5.5 x 12-23 ไมโครเมตร (ภาพ 21B) พบ appressoria มีสีน้ำตาลซีดหรือสีน้ำตาลเข้ม มีลักษณะทรงกลมรูปไข่ ขอบหยักมีขนาด 9-10.5 x 10-12.5 ไมโครเมตร (ภาพ 20C) ซึ่งเชื้อรานี้เป็นสายพันธุ์เฉพาะที่ก่อโรคจุดดำพืชม่วง (Nymphaea) และยังจัดอยู่ในกลุ่ม *C. acutatum* complex (Damm et al., 2012; Van der Aa, 1978; Van der Aa et al., 1990)



ภาพ 21 สัณฐานวิทยาของเชื้อ *C. nymphaeae* (A) โคลนินบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA, (B) โคนิเดีย และ (C) appressoria

(ที่มา : Hunupolagama et al., 2017)

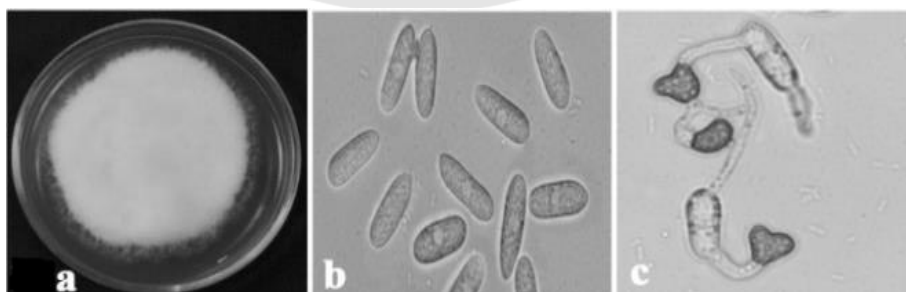
28. *C. malvarum* พบ acervuli เจริญอยู่บนผิวหรือเนื้อเยื่อของพืช (ภาพ 22A) พบการสร้าง setae มีลักษณะเป็นหนามสีน้ำตาลเข้มเป็นจำนวนมาก (ภาพ 22B) และ appressoria มีลักษณะทรงกลมรูปไข่ ขอบเรียบมีขนาด 8-13.5 x 11-14.5 ไมโครเมตร (ภาพ 22C) โคนิเตียเดี่ยว ๆ มีลักษณะทรงกระบอกค่อนข้างยาวรูปทรงรี ส่วนหัวโค้งมนปลายฐานตัด มีขนาด 4-6 x 12-24 ไมโครเมตร (ภาพ 22D) (Arx, 1957b; Bailey & Jeger, 1992) สายพันธุ์นี้มีรายงานว่ามีความใกล้เคียงกับสายพันธุ์ *C. gloeosporioides* และยังเป็นเชื้อราก่อโรคที่จำเพาะกับพืชในวงศ์ชบา (*Malvaceae*) (Cho & Shin, 2004; Kim et al., 2008)



ภาพ 22 สัณฐานวิทยาของเชื้อ *C. malvarum* (A) acervuli, (B) seta, (C) appressoria และ (D) โคนิเตีย

(ที่มา : Damm et al., 2013)

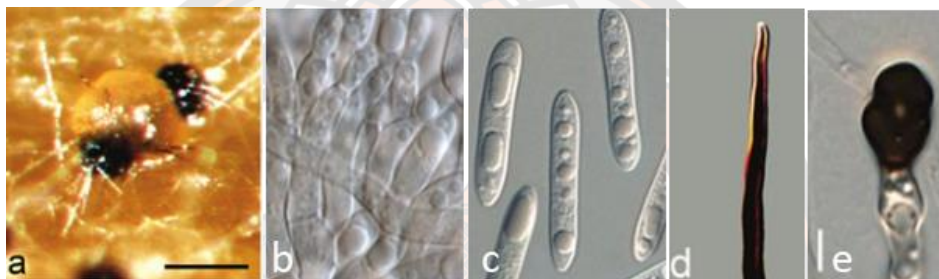
29. *C. musae* โคลนินมีสีขาวเจริญเติบโตอย่างมากมีลักษณะหนาแน่น เส้นใยรอบที่เจริญอยู่รอบๆ โคลนินมีสีเทาเมื่อเชื้อราแก่ตัว (ภาพ 23A) โคนิเตียเดี่ยว ๆ มีลักษณะทรงกระบอก ปลายกว้างฐานตัดมีขนาด 4.5-5.5 x 12-17 ไมโครเมตร (ภาพ 23B) appressoria เป็นจำนวนมากมีสีน้ำตาลอ่อนจนถึงเข้ม มีรูปร่างไม่แน่นอน ขอบมักมีรอยหยักขนาดใหญ่และลึก มีขนาด 9-11.5 x 9-13 ไมโครเมตร (Bailey & Jeger, 1992) (Su et al., 2011; Von Arx, 1970)



ภาพ 23 สัณฐานวิทยาของเชื้อ *C. musae* (A) โคลนินบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA, (B) โคนิเตีย และ (C) appressoria

(ที่มา : Chowdappa, 2017)

30. *C. nigrum* พบกลุ่มโคนิเดีย (conidia masses) เป็นหยดน้ำข้นสีส้ม (ภาพ 24A) ซึ่งโคนิเดียเกิดจากก้านชูสปอร์ หรือเรียกว่า conidiophore (ภาพ 24B) โคนิเดียเดี่ยว ๆ มีลักษณะเป็นทรงกระบอกค่อนไปรูปทรงรี หัวมนปลายฐานตัดซึ่งมีขนาด 3.5-6.5 x 15-21 ไมโครเมตร (ภาพ 24C) พบ setae เป็นจำนวนมาก ซึ่งมีลักษณะทรงกระบอกยาวคล้ายหนาม สีจ้ำตาลเข้ม (ภาพ 24D) พบ appressoria มีลักษณะรูปไข่ค่อนกลมจนถึงมีรูปร่างไม่แน่นอน ขอบหยักมีขนาด 8.5-10 x 13 ไมโครเมตร (ภาพ 24E) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าสายพันธุ์นี้มีความใกล้เคียงกับสายพันธุ์ *C. gloeosporioides* และก่อโรคที่จำเพาะกับพืชสกุล *Capsicum* (Liu et al., 2013; Rivera et al., 2016)



ภาพ 24 สัณฐานวิทยาของเชื้อ *C. nigrum* (A) conidia masses, (B) conidiophores, (C) โคนิเดีย, (D) seta และ (E) appressoria

(ที่มา : Liu et al., 2013)

31. *C. phyllachoroides* สายพันธุ์นี้ conidiomata มีสีดำ และมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางที่ 150-400 ไมโครเมตร นอกจากนี้ยังพบ setae และโคนิเดียเดี่ยว ๆ มีลักษณะเป็นทรงกระบอกหัวท้ายมน หรือโค้งงอเล็กน้อยมีขนาด 4-6.5 x 18-24 ไมโครเมตร (Arx, 1957a, 1957b)ซึ่งไม่มีรายงานเกี่ยวกับสัณฐานวิทยาของเชื้อราที่เลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ จึงทำให้ไม่ทราบรายละเอียดเกี่ยวกับ sclerotia และ appressoria (Arx, 1957a; Sutton, 1980)

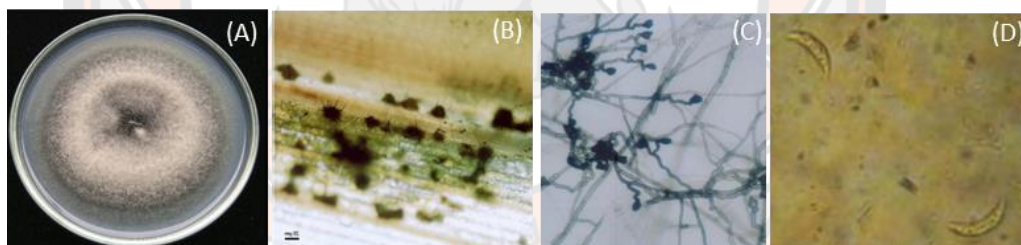
32. *C. orbiculare* พบกลุ่มโคนิเดีย หรือเรียกว่า conidia masses เป็นหยดน้ำใสสีส้มอ่อน และพบการปะปนของ seta ด้วย (ภาพ 25A) ซึ่งโคนิเดียเกิดจากก้านชูสปอร์เรียกว่า conidiophores (ภาพ 25B) ส่วน appressoria มักจับตัวกัน มีลักษณะรูปไข่ค่อนกลม ขอบเรียบมีขนาด 5.5-10 x 16 ไมโครเมตร (ภาพ 25C) โคนิเดียเดี่ยว ๆ มีลักษณะทรงตรง โค้งงอเล็กน้อย หัวท้ายโค้งมนมีขนาด 4.5-6 x 10-15 ไมโครเมตร (ภาพ 25D) (Arx, 1957a, 1957b; Guozhong et al., 2004)



ภาพ 25 สัณฐานวิทยาของเชื้อ *C. orbiculare* (A) conidia masses, (B) conidiophores, (C) appressoria และ (D) โคนิเดียม

(ที่มา : Damm et al., 2013)

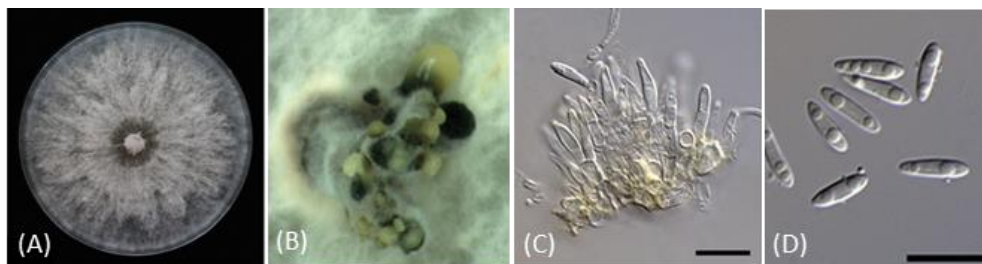
32. *C. sublineolum* โคลนีเจริญหนาฟูเป็นชั้น ๆ เส้นใยรอบโคลนีมีสีเทา มีลักษณะฟูอัดกันแน่น เมื่อเชื้อราแก่ตัวสีของเส้นใยจะเปลี่ยนเป็นสีเทาอมเขียว (ภาพ 26A) พบกลุ่ม acervuli เจริญอยู่บนผิว หรือเนื้อเยื่อของพืช (ภาพ 26B) พบ appressoria มีสีน้ำตาล มีรูปร่างไม่แน่นอน มีขนาด 8.5-9 x 11.5-15 ไมโครเมตร (ภาพ 26C) โคนิเดียมเดี่ยว ๆ มีรูปทรงกระสวยหรือรูปร่างคล้ายพระจันทร์เสี้ยว ปลายทั้งสองด้านค้อย ๆ โค้งงอเรียวกึ่งกลางมีขนาด 3-4.5 x 18.5-27.5 ไมโครเมตร (ภาพ 26D) (Binyam et al., 2016; Holliday, 1989; Sutton, 1980)



ภาพ 26 สัณฐานวิทยาของเชื้อ *C. sublineolum* (A) โคลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA, (B) acervuli, (C) appressoria, และ (D) โคนิเดียม

(ที่มา : Binyam et al., 2016)

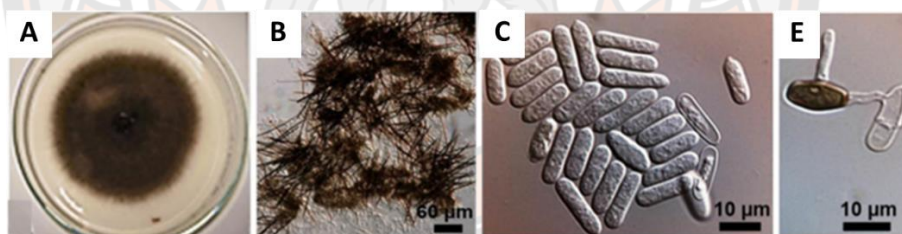
34. *C. psoraleae* เส้นใยที่เจริญอยู่รอบโคลนีมีสีขาวอมเทา (ภาพ 27A) กลุ่มโคนิเดียมเป็นหยดน้ำข้นสีเหลืองอมเขียว (ภาพ 27B) (Arx, 1957a; K. Hyde et al., 2009) โคนิเดียมเกิดจากก้านชูสปอร์ หรือที่เรียกว่า conidiophore (ภาพ 27B) และโคนิเดียมเดี่ยว ๆ มีลักษณะเป็นทรงกระบอกจนถึงรูปทรงรี หัวท้ายมนมีขนาด 3.5-4 x 6-1 ไมโครเมตร (ภาพ 27C) (Arx, 1957a, 1957b)



ภาพ 27 สัณฐานวิทยาของเชื้อ *C. psoraleae* (A) โคลนีนบนอาหารเลี้ยงเชื้อPDA, (B) conidia masses, (C) conidiophore และ (D) โคนิเดียม

(ที่มา: <https://mycokeys.pensoft.net/article/59852/zoom/fig/13/>)

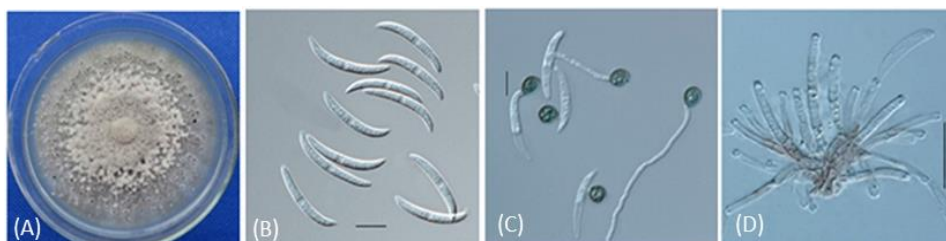
35. *C. typhae* โคลนินี้มีลักษณะบางเรียบติดกับจานอาหารเลี้ยงเชื้อ มีสีขาวอมเทาจนถึงสีน้ำตาลอมเทา (ภาพ 28A) พบ setae จำนวนมาก มีลักษณะคล้ายหนาม สีน้ำตาลเข้มจนถึงสีดำ (ภาพ 28B) โคนิเดียมเดี่ยว ๆ มีลักษณะทรงกระบอกโค้งงอเล็กน้อย บางครั้งช่วงตรงกลางหดตัวเล็กน้อย ปลายแต่ละด้านค่อย ๆ เรียวเล็กลงไปจนสุดปลายมีขนาด 3.5-5 x 11.5-21 ไมโครเมตร (ภาพ 28C) appressoria มีสีน้ำตาลอ่อน และมีลักษณะเป็นรูปไข่ก่อนไปทรงกลมมีขนาด 5-9 x 8-11 ไมโครเมตร (ภาพ 28E) (Bailey & Jeger, 1992; Belmino Maia et al., 2018)



ภาพ 28 สัณฐานวิทยาของเชื้อ *C. typhae* (A) โคลนีนบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA, (B) seta, (C) โคนิเดียม และ (D) appressoria

(ที่มา : Dias et al., 2018)

36. *C. truncatum* โคนิเดียมมีสีเทาอ่อน และลักษณะเป็ยกหนาเรียบติดกับจานอาหารเลี้ยงเชื้อ (ภาพ 29A) ซึ่งโคนิเดียมเดี่ยว ๆ มีลักษณะเป็นทรงกระสวย หรือพระจันทร์เสี้ยว ปลายแต่ละด้านค่อย ๆ เรียวเล็กลงมีขนาด 4-6 x 12-16 ไมโครเมตร (ภาพ 29B) และพบ appressoria เป็นจำนวนมาก มีลักษณะค่อนข้างกลมหรือมีรูปร่างไม่แน่นอนมีขนาด 6-12 x 6-12 ไมโครเมตร (ภาพ 29C) พบการสร้างโคนิเดียมบนก้านชูสปอร์ที่เรียกว่า conidiophore (ภาพ 29D) (Holliday, 1989; Koch & Knox-Davies, 1989; Sutton, 1980)



ภาพ 29 สัณฐานวิทยาของเชื้อ *C. truncatum* (A) โคลนินบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA, (B) โคนินเดี่ยว (C) appressoria และ (D) conidiophores

(ที่มา : Liu et al., 2016)

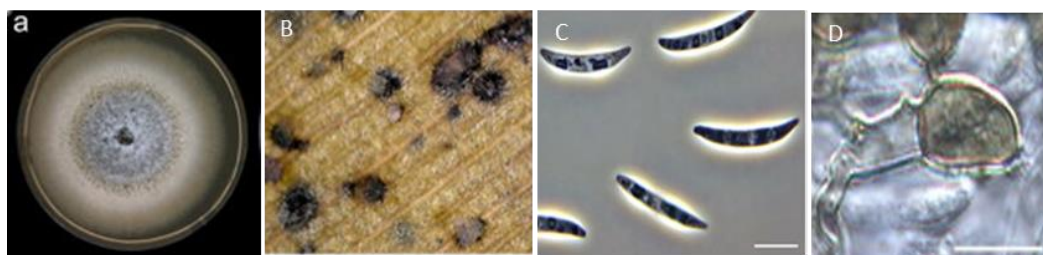
37. *C. spinaciae* พบการสร้าง acervuli บนผิวของพืช ซึ่งจะพบการสร้างกลุ่มโคนินเดี่ยวมีลักษณะเป็นหยดน้ำใสสีเหลืองอ่อน (ภาพ 30A) แต่ไม่พบ sclerotia โคนินเดี่ยว ๆ มีลักษณะเป็นทรงกระสวย หรือรูปพระจันทร์เสี้ยว ทั้งด้านแต่ละด้านค่อย ๆ เรียวเล็กไปจนสุดปลายมีขนาด 3.5-5.5 x 21-28 ไมโครเมตร (ภาพ 30B) พบ seta เป็นจำนวนมากมีลักษณะคล้ายหนาม ปลายเรียวแหลม มีสีน้ำตาลเข้ม (ภาพ 30C) ซึ่งพบการสร้างโคนินเดี่ยวบนก้านชูสปอร์ที่เรียกว่า conidiophore (ภาพ 30D) (Damm et al., 2009)



ภาพ 30 สัณฐานวิทยาของเชื้อ *C. spinaciae* (A) acervuli, (B) โคนินเดี่ยว, (C) seta และ (D) conidiophores

(ที่มา : Damm et al., 2006)

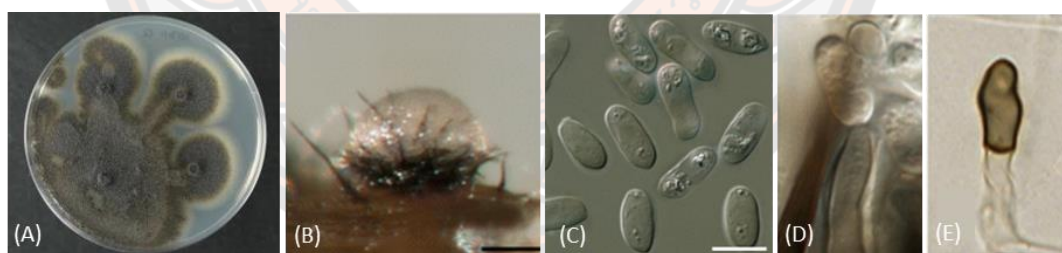
38. *C. trichellum* สายพันธุ์นี้โคลนินค่อนข้างมีความแปรผัน เส้นใยที่เจริญออกไปรอบ ๆ โคลนินมีสีน้ำตาลอ่อนจนถึงสีเขียวมะกอก (ภาพ 31A) พบการเกิด acervuli เจริญบนผิวของพืช (ภาพ 31B) โคนินเดี่ยว ๆ มีลักษณะเป็นรูปทรงกระสวย หรือรูปร่างคล้ายพระจันทร์เสี้ยว ปลายแต่ละด้านค่อย ๆ เรียวยาวออกไปมีขนาด 4-6 x 14-24 ไมโครเมตร (ภาพ 31C) appressoria มีสีน้ำตาลน้ำตาลอ่อน ขอบโค้งมน และมีรอยหยักขนาดที่วัดได้ 8.5-12 x 12-18 ไมโครเมตร (ภาพ 31D) (Kim et al., 2001; Sutton, 1980)



ภาพ 31 ลักษณะวิทยาของเชื้อ *C. trichellum* (A) โคลนีนบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA, (B) acervuli, (C), โคนิเดีย และ (D) appressoria

(ที่มา : Kim et al., 2001)

39. *C. trifolii* โคลนีนเป็นสีเทาหม่นกอก และตรงกลางโคลนีนเป็นสีหม่นกอกอมดำ เส้นใยที่เจริญออกไปด้านขอบรอบ ๆ โคลนีนจะมีสีที่ซีดลง (ภาพ 32A) กลุ่มโคนิเดียเป็นหยดน้ำชั้นสีส้มอมชมพูอมเหลือง และพบ setae เป็นจำนวนมากปะปนอยู่กับโคนิเดียแมส (ภาพ 32B) โคนิเดียเดี่ยว ๆ มีรูปร่างทรงกระบอกหัวมนปลายฐานตัดมีขนาด 4-8 x 6-18 ไมโครเมตร (ภาพ 32C) ซึ่งโคนิเดียเกิดจาก้านชูสปอร์หรือเรียกว่า conidiophores (ภาพ 32D) appressoria มีลักษณะกลมค่อนข้างแป้นรูปทรงรี บางครั้งมีรอยหยักมีรูปร่างไม่แน่นอน มีขนาด 6-8 x 6-12 (ภาพ 32E) (Baxter et al., 1984; Holliday, 1989; Koch & Knox-Davies, 1989)



ภาพ 32 ลักษณะวิทยาของเชื้อ *C. trifolii* (A) โคลนีนบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA, (B) acervuli, (C) conidia, (D) conidiophores และ (E) appressoria

(ที่มา : Damm et al., 2013)

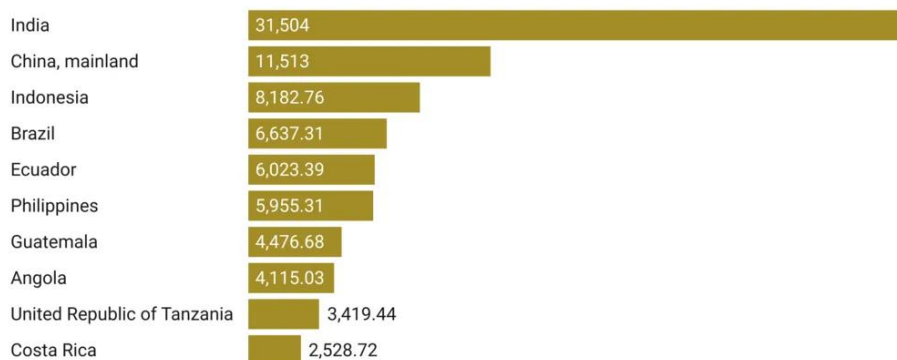
ในประเทศไทยพบเป็นสาเหตุโรคแอนแทรกโนสของพืชที่สำคัญหลายชนิด โดยมีรายงานการศึกษาอนุกรมวิธานเชื้อรา *Colletotrichum* spp. สาเหตุโรคแอนแทรกโนสของพืชต่างๆ โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาในการจัดจำแนกพบว่า *C. higginsianum* *C. truncatum* *C. capsici* *C. fulcatum* และ *C. sublineolum* ทำให้เกิดโรคกับผักกวางตุ้ง ถั่วเขียวเมล็ดดำ มะเขือเทศ อ้อย

ข้าวฟ่าง ตามลำดับ และ *C. gloeosporioides* ทำให้เกิดโรคกับ พริกไทย ถั่วเหลือง กุยช่าย หน่อไม้ฝรั่ง มะม่วงหิมพานต์ และส้มโอ (วิรัช ชูบำรุง และคณะ, 2528) นอกจากนี้ยังมีรายงานการจำแนกชนิดเชื้อรา *Colletotrichum* ที่ก่อโรคแอนแทรกโนสในมันสำปะหลัง โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา ร่วมกับข้อมูลทางโมเลกุล พบว่าสามารถจำแนกชนิดของเชื้อราออกเป็น 5 ชนิดจากตัวอย่าง 38 ไอโซเลตดังนี้ *C. capsici*, *C. lindemuthianum*, *C. aeschynomene*, *C. boninense* และ *C. gloeosporioides* complex (Sangpueak et al., 2018)

โรคแอนแทรกโนสในกล้วย

กล้วย (*Musa* spp.) เป็นหนึ่งในพืชที่มีความสำคัญในด้านเศรษฐกิจชนิดหนึ่ง และยังเป็นผลไม้ที่ได้รับความนิยมในการบริโภคกันอย่างทั่วโลกรวมทั้งในทุกรัฐ ทุก ๆ ปีมีการบริโภคกล้วยมากกว่า 100,000 ล้านลูก (Bananlink, 2020) และมากกว่า 150 ประเทศมีการปลูกกล้วยซึ่งส่วนใหญ่มีการจำหน่ายภายในประเทศ และส่งออกกล้วยไปยังประเทศต่าง ๆ โดยผู้ผลิตกล้วยรายใหญ่ที่สุดของโลกคือ อินเดีย จีน อินโดนีเซีย บราซิล และเอกวาดอร์ เป็นต้น (ภาพ 33) (FAO, 2020) นอกจากนี้ในปี 2563 ประเทศไทยมีพื้นที่ปลูกกล้วย 61 จังหวัด ประมาณ 481,639 ไร่ และมีการส่งออกกล้วยประมาณ 1.5 ล้านตันต่อปีซึ่งเป็นอันดับที่ 2 ของอาเซียน (ภาพ 34) (TNN online, 2023)

Leading producers of bananas worldwide in 2020, by country (in thousand metric tons)



ภาพ 33 ลำดับประเทศมีผลผลิตกล้วยมากที่สุดในปี 2563

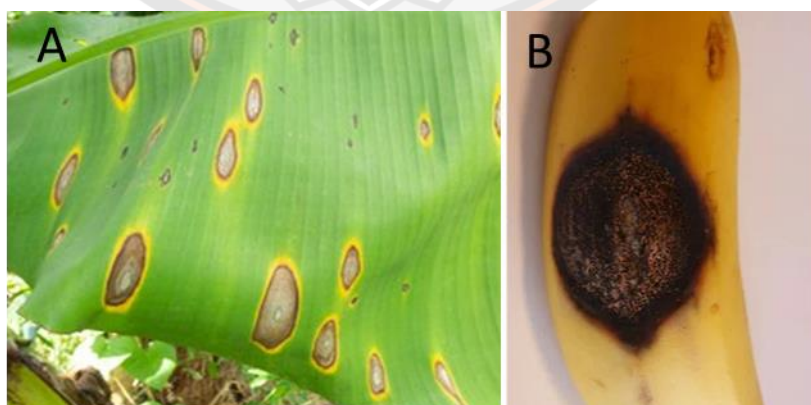
(ที่มา: <https://www.mappr.co/largest-banana-producing-countries/>)



ภาพ 34 พื้นที่ปลูกกล้วยในประเทศไทย

(ที่มา: <https://www.tnnthailand.com/news/infographic/150930/>)

โรคแอนแทรกคโนสในกล้วยเกิดเชื้อรา *C. musae* เป็นโรคพืชสำคัญที่ก่อโรคหลังการเก็บเกี่ยวผลผลิตของกล้วย (Abd-El Salam et al., 2010; Balendres et al., 2020) โดยเชื้อรามีการเข้าทำลายพืชตั้งแต่ระยะการเพาะปลูกในสวน หลังจากนั้นเชื้อราจะทำแฝงตัวในพืชโดยยังไม่แสดงอาการของโรคให้เห็น ซึ่งเรียกอาการนี้ว่า Latent inflection โดยเกษตรกรผู้ปลูกมักจะเก็บเกี่ยวผลผลิตก่อนที่จะสุก ซึ่งในระหว่างการเก็บรักษาหรือการขนส่งผลกล้วยก็จะค่อย ๆ สุกทำให้เชื้อราแสดงอาการของโรคออกมาเป็นรอยแผลจุดสีน้ำตาลเข้มจนถึงสีดำ รอยแผลเหล่านี้จะค่อย ๆ ขยายใหญ่ขึ้นและเป็นรอยบุ๋มลงไป นอกจากนี้ยังมีการสร้างกลุ่มสปอร์หรือกลุ่มโคนิเดียบนใบ (ภาพ 35A) และเปลือกกล้วย (ภาพ 35B) ซึ่งทำให้คุณภาพและมูลค่าของผลผลิตลดลง เนื่องจากยังไม่เป็นที่ต้องการของผู้บริโภค (Jeger et al., 1995)



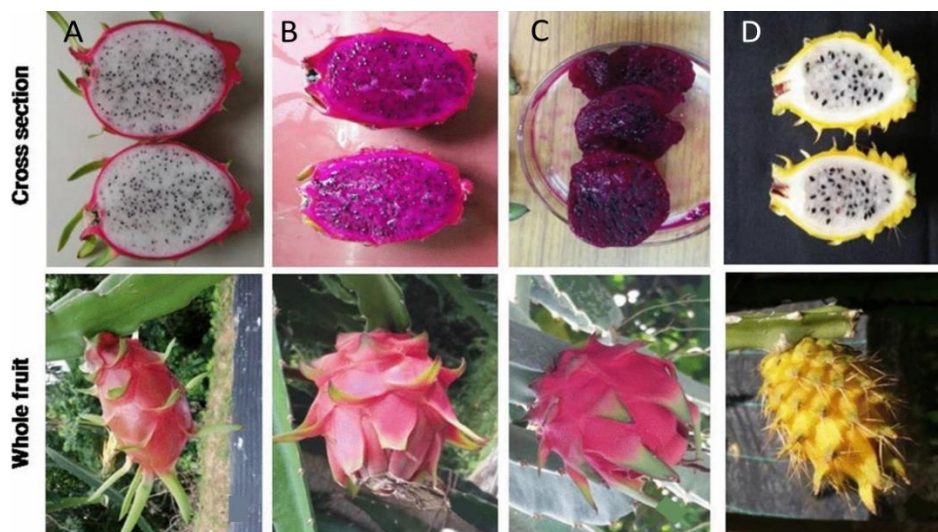
ภาพ 35 ลักษณะรอยโรคแอนแทรกคโนสในกล้วย (A) ใบกล้วย และ (B) ผลกล้วย

(ที่มา: <https://www.mdpi.com/2223-7747/11/14/1856>)

นอกจากก่อโรคแอนแทรกโนสแล้วเชื้อราสายพันธุ์นี้ยังทำให้เกิดโรคเน่า (rot disease) ในปลายยอด ลำต้น และดอกอีกด้วย (Sangeetha et al., 2010) ซึ่ง Vieira et al. (2017) ได้รายงานว่าการที่เชื้อรา *C. musae* มีความจำเพาะเจาะจงกับกล้วยเท่านั้น และมีการจำแนกเชื้อราสายพันธุ์นี้จากเชื้อราอื่น ๆ โดยออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะกับ *C. musae* อย่างไรก็ตามผลการศึกษาเกี่ยวกับโรคแอนแทรกโนสในมะม่วงของ Li et al. (2019) พบว่า *C. musae* เป็นหนึ่งในสายพันธุ์ที่ก่อโรคในมะม่วง ซึ่งเป็นการยืนยันว่าเชื้อราสกุล *Colletotrichum* มีพืชอาศัยที่กว้างไม่จำเพาะกับพืชชนิดใดชนิดหนึ่ง (Li et al., 2019) นอกจากนี้ยังมีรายงานการพบเชื้อราอีก 5 ชนิดจากสกุลนี้ที่ก่อโรคแอนแทรกโนสในกล้วยในประเทศบราซิล ได้แก่ *C. siamense*, *C. tropicale*, *C. chrysophilum* และ *C. theobromicola* (Vieira et al., 2017) และยังพบ *C. scovillei* ในประเทศจีน (Zhou et al., 2017) รวมถึงยังพบเชื้อรา *C. siamense* ในประเทศอินเดีย และประเทศตุรกี (Kumar et al., 2017; Uysal & Kurt, 2020) ซึ่งในประเทศเอกวาดอร์พบเชื้อรา *C. gloeosporioides* (Riera et al., 2019) และประเทศแม็กซิโกพบ *C. chrysophilum* (Fuentes-Aragón et al., 2021) ที่ก่อโรคแอนแทรกโนสในกล้วย

โรคแอนแทรกโนสในแก้วมังกร

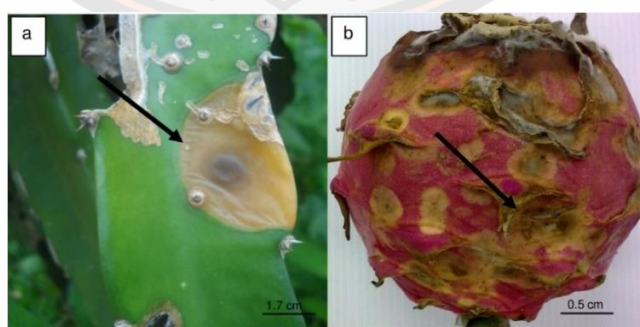
แก้วมังกร (*Hylocereus* sp.) มีต้นกำเนิดในอเมริกากลางและอเมริกาใต้ ซึ่งปัจจุบันในหลาย ๆ ประเทศมีการปลูกแก้วมังกรกันอย่างแพร่หลาย เช่น เวียดนาม จีน แม็กซิโก เอกวาดอร์ ไทย มาเลเซีย อินโดนีเซีย ออสเตรเลีย และสหรัฐอเมริกา (Paull & Chen, 2019) แก้วมังกรมักนิยมรับประทานสด หรือนำไปปรุงรสและแปรรูปต่าง ๆ ซึ่งแก้วมังกรมีคุณค่าทางโภชนาการสูงเนื่องจากมีโซเดียม โพแทสเซียม วิตามินเอ และสารต้านอนุมูลอิสระ (Nerd et al., 1999; Tenore et al., 2012) นอกจากนี้ยังมีสรรพคุณช่วยลดระดับน้ำตาลในเลือด (Poolsup et al., 2017) ซึ่งประเทศจีนได้เริ่มการเพาะปลูกแก้วมังกรขนาดใหญ่บนพื้นที่ 200 ล้านตารางเมตร ในเมืองกวางตุ้งและเมืองกวางสี ปัจจุบันประเทศที่ผลิตและส่งออกแก้วมังกรมากที่สุดคือ เวียดนาม ไทย ไต้หวัน ฟิลิปปินส์ มาเลเซีย ศรีลังกา ออสเตรเลีย และอิสราเอล ตามลำดับ (Mercado-Silva, 2018; Tel-Zur, 2013) สายพันธุ์ของแก้วมังกรที่นิยมปลูกกันมากมี 4 สายพันธุ์ได้แก่ *H. undatus* (เนื้อสีขาว เปลือกสีแดงและเกล็ดสีเขียว) (ภาพ 36A) *H. costaricensis* (เนื้อสีแดง เปลือกและเกล็ดสีแดง) (ภาพ 36B) *H. polyrhizus* (เนื้อสีแดงเข้มอมม่วง เปลือกและเกล็ดสีแดงเข้ม) (ภาพ 36C) และ *H. megalanthus* (เนื้อสีขาว เปลือกสีเหลือง) (ภาพ 36D) (Bauer, 2003; Tel-Zur, 2013)



ภาพ 36 ลักษณะสัณฐานของผลแก้วมังกร (A) *H. undatus*, (B) *H. costaricensis*, (C) *H. polyrhizus* และ (E) *H. megalanthus*

(ที่มา: <https://www.nature.com/articles/s41598-021-81682-x>)

อย่างไรก็ตามเกษตรกรผู้ปลูกแก้วมังกรมักเผชิญกับปัญหาหลายประการที่ส่งผลให้ปริมาณและคุณภาพของผลผลิตลดลง ซึ่งหนึ่งในสาเหตุหลักคือ โรคแอนแทรกโนสมักเกิดจากเชื้อราสกุล *Colletotricum* เป็นสาเหตุโรคกิ่งหรือลำต้นเน่า โดยลักษณะอาการของโรคจะพบวงแผลสีน้ำตาลแดง ขอบรอบ ๆ วงมีสีเหลืองซีดมักเกิดบริเวณริมเถา (ภาพ 37A) ส่วนอาการของโรคเน่าที่เกิดบนผลจะมีลักษณะเป็นรอยแผลสีน้ำตาลยุบตัวลง แล้วค่อย ๆ ขยายเป็นวงซ้อนกันเป็นชั้น ๆ เมื่ออาการของโรครุนแรงขึ้นจะมีการสร้างกลุ่มสปอร์ หรือโคนินเดียเป็นเมือกสีชมพู หรือสีส้มบนแผล (ภาพ 37B) (Abirami et al., 2019)



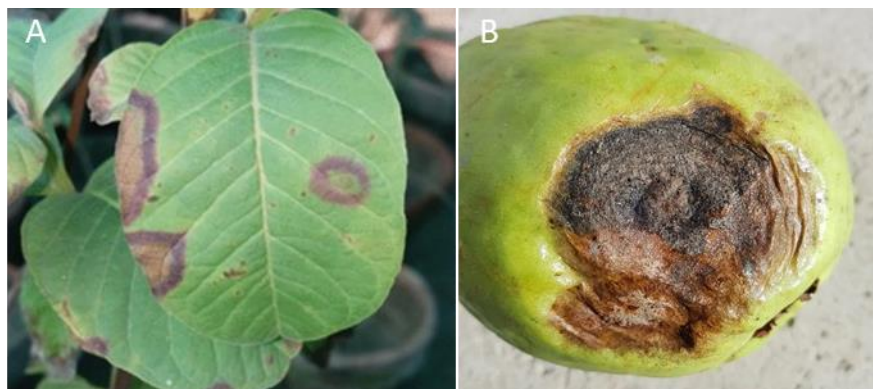
ภาพ 37 ลักษณะรอยโรคแอนแทรกโนสในแก้วมังกร (A) ลำต้น (กิ่ง) และ (B) ผล

(ที่มา: <https://www.semanticscholar.org/Developing-chitosan-based->)

ซึ่งทำให้คุณภาพของผลผลิตลดลง อายุการเก็บรักษาสั้นส่งผลให้ราคาของสินค้าลดลง จากการศึกษา ก่อนหน้านี้มีรายงานว่าเชื้อรา *C. gloeosporioides* ก่อโรคแอนแทรกโนสใน *H. megalanthus* ที่พบมากที่สุดในประเทศบราซิล (Takahashi et al., 2008) และก่อโรคใน *H. undatus* ที่พบมากในประเทศญี่ปุ่นและสหรัฐอเมริกา (Palmateer et al., 2007; Taba et al., 2006) นอกจากนี้ยัง ก่อให้เกิดโรคลำต้นและผลแก้วมังกรเน่าที่เพาะปลูกในประเทศมาเลเซีย (Masyahit, 2009) และ Ma et al. (2014) ได้รายงานว่าพบเชื้อรา *C. gloeosporioides* ก่อโรคแอนแทรกโนสในต้นอ่อนของแก้ว มังกรสายพันธุ์ *H. undatus* ในประเทศจีน (Ma et al., 2014) จากการศึกษาภายหลังพบว่าเชื้อรา *C. siamense*, *C. aenigma*, *C. karstii*, *C. boninense* และ *C. truncatum* สามารถก่อโรคแอน แทรกโนสในแก้วมังกรได้เช่นเดียวกัน (Abirami et al., 2019; Lin et al., 2017; Meetum et al., 2015; Nascimento et al., 2019; Zhao et al., 2018)

โรคแอนแทรกโนสในฝรั่ง

ฝรั่ง (*Psidium guajava* L.) เป็นผลไม้เมืองร้อนที่มีถิ่นกำเนิดในประเทศเม็กซิโก อเมริกา กลาง และอเมริกาใต้ (Morton, 1987) ซึ่งฝรั่งมีคุณค่าทางโภชนาการสูงอุดมไปด้วยสารต้านอนุมูล อิสระ เนื่องจากมีวิตามินซีสูง (ความเข้มข้นวิตามินสูงกว่าส้ม 10 เท่า) นอกจากนี้ยังมีวิตามินเอและบี รวมถึงเกลือแร่ ธาตุเหล็ก แคลเซียม และฟอสฟอรัส (Leite et al., 2006) มักนิยมรับประทานผลสด หรือทำเป็นน้ำผลไม้ดื่ม ด้วยคุณค่าทางโภชนาการนี้ฝรั่งจึงถือว่าเป็นผลไม้ทางเลือกหนึ่งสำหรับกลุ่ม คนที่ชอบดูแลสุขภาพดังนั้นความต้องการของฝรั่งจึงมีมากขึ้นทุกปี จากข้อมูลขององค์การอาหารและ การเกษตรแห่งสหประชาชาติ (FAO) เกี่ยวกับการผลิตและการส่งออกผลฝรั่ง มะม่วง และมังคุดได้ รายงานว่าในปี 2566 ประเทศอินเดียเป็นผู้นำในการผลิตและส่งออกฝรั่งมากที่สุด โดยมีผลผลิต ประมาณ 25 ล้านตัน รองลงมาคือประเทศจีน อินโดนีเซีย ปากีสถาน เม็กซิโก เป็นต้น (World Population Review, 2023) อย่างไรก็ตามเกษตรกรผู้ปลูกฝรั่งมักประสบปัญหาเกี่ยวกับโรคพืชที่ส่งผล กระทบต่อผลผลิตของฝรั่งคือ โรคแอนแทรกโนสหรือโรคผลเน่าเกิดจากเชื้อราสกุล *Colletotrichum* เชื้อราสามารถเข้าทำลายผลฝรั่งได้ทั้งระยะก่อนและหลังการเก็บเกี่ยว โดยเฉพาะในช่วงที่ฝนตกชุก และมีความชื้นสูงดอกและผลฝรั่งที่กำลังพัฒนาอาจมีการติดเชื้อได้เช่นกัน ซึ่งโรคแอนแทรกโนสจะ แสดงอาการของได้ชัดที่สุดในช่วงผลฝรั่งสุก โดยจะมีลักษณะเป็นจุดสีดำบนใบ (ภาพ 37A) และรอย แผลยุบตัวลงเป็นวงกลมสีน้ำตาลเข้มจนถึงสีดำบนผิวของผลฝรั่ง (ภาพ 38B) (Merida & Palmateer, 2006)



ภาพ 38 ลักษณะรอยโรคแอนแทรกโนสในฝรั่ง (A) ใบ และ (B) ผล

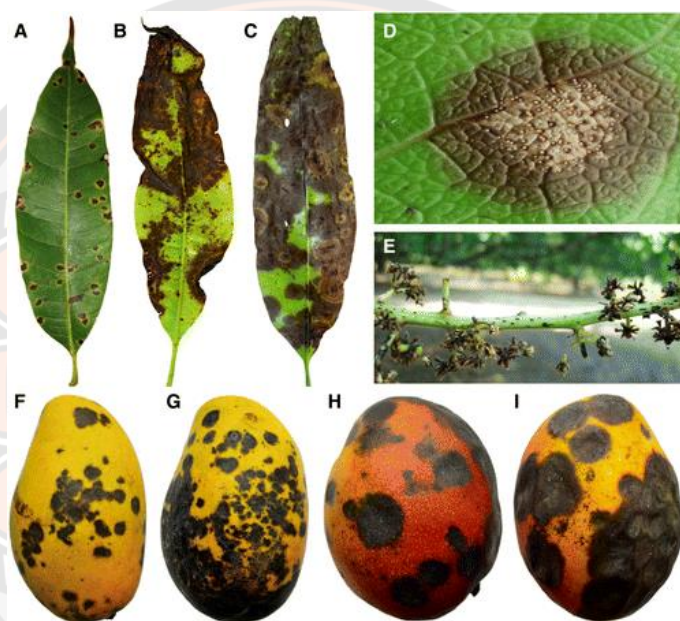
(ที่มา : Waseem Khan Qudri et al., 2022)

ซึ่งมีรายงานว่าเชื้อรา *C. gloeosporioides* sensu lato ก่อโรคแอนแทรกโนสในฝรั่งที่พบได้บ่อยในหลาย ๆ ประเทศที่มีการเพาะปลูก (Abdul Wahid, 2001; Amusa et al., 2005; Merida & Palmateer, 2006; Yao et al., 2018) อย่างไรก็ตามปัจจุบันได้มีการศึกษาพัฒนาหาบริเวณอื่นหลาย ๆ ตำแหน่งเพื่อใช้สำหรับระบุชนิดของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. ซึ่งผลการศึกษาพบว่านอกจากสายพันธุ์ *C. gloeosporioides* sensu lato แล้วยังสามารถจำแนกสายพันธุ์อื่นที่ก่อโรคแอนแทรกโนสในฝรั่งได้ด้วย ซึ่งจำแนกออกจากกลุ่ม *C. gloeosporioides* complexes ได้แก่ *C. psidii* พบในอิตาลี (Zhou et al., 2017) และ *C. siamense* พบในอินเดีย (Sharma et al., 2015) ส่วนในกลุ่มของ *C. acutatum* complexes ได้แก่ *C. simmondsii* พบในบราซิล (Cruz et al., 2015) *C. abscissum* พบในบราซิลและสหรัฐอเมริกา (Bragança et al., 2016; Crous et al., 2015) และ *C. guajavae* พบในอินเดีย (Damm et al., 2012) นอกจากนี้งานวิจัยของ Braganca et al. (2016) ได้ทำการศึกษาชนิดของ *C. acutatum* complexes ที่ก่อโรคแอนแทรกโนสในผลไม้ในบราซิล ซึ่งผลการศึกษาพบว่า *C. nymphaeae* ที่แยกได้จากผลแอปเปิ้ลสามารถก่อโรคในผลฝรั่งอีกด้วย ดังนั้นแสดงให้เห็นว่าเชื้อราสกุลนี้มีพืชอาศัยที่กว้าง (Bragança et al., 2016)

โรคแอนแทรกโนสในมะม่วง

มะม่วง (*Mangifera indica* L.) เป็นผลไม้เศรษฐกิจชนิดหนึ่งที่มีการปลูกมากกว่า 87 ประเทศทั่วโลก ซึ่งประเทศในเอเชียมีพื้นที่ปลูกมะม่วงมากที่สุดซึ่งคิดเป็น 80 เปอร์เซ็นต์ของโลก (กรมส่งเสริมการค้า, 2023) โดยประเทศอินเดียเป็นประเทศที่มีการผลิตมะม่วงมากที่สุดประมาณ 10 ล้านตันต่อปี ซึ่งคิดเป็น 50 เปอร์เซ็นต์ของการผลิตมะม่วงทั่วโลก รองลงมาคือประเทศจีน ไทย ปากีสถาน และอินโดนีเซีย (Patil et al., 2018) อย่างไรก็ตามเกษตรกรผู้ปลูกในหลาย ๆ ประเทศ

เหล่านี้มักประสบพบกับปัญหาโรคแอนแทรกโนสในมะม่วง สาเหตุเกิดจากเชื้อราสกุล *Colletotrichum* ซึ่งส่งผลให้ผลผลิตและคุณภาพลดลง นอกจากนี้ยังทำให้อายุการเก็บรักษาผลมะม่วงสั้น ส่งผลถึงปัญหาเกี่ยวกับการส่งออกไปยังขายประเทศต่าง ๆ ทำให้ไม่เป็นที่ต้องการของผู้บริโภคส่งผลให้ราคาสินค้าลดลงด้วย นอกจากนี้ยังมีโรคแอนแทรกโนสยังสามารถเข้าทำลายทั้งกิ่ง ใบ และดอก โดยอาการของโรคจะพบจุดสีน้ำตาลเข้มจนถึงดำ และค่อย ๆ ขยายรอยแผลใหญ่ขึ้น หรืออาจพบการสร้าง acervuli บนเนื้อเยื่อพืช (ภาพ 39D) ทำให้เนื้อเยื่อบริเวณใบ (ภาพ 39A-C) ช่อดอก (ภาพ 39E) และผล (ภาพ 39F-I) ที่ติดเชื้อแห้งและตายลง (Arauz, 2000; Freeman et al., 1998)



ภาพ 39 ลักษณะรอยโรคแอนแทรกโนสในมะม่วง (A, B, C) ใบ, (D) acervuli, (E) ช่อดอก และ (F, G, H และ I) ผล

(ที่มา: <https://apsjournals.apsnet.org/doi/10.1094/PDIS-01-19-0178-RE>)

ซึ่งรายงานของ Phoulivong et al. (2012) และ Weir et al. (2012) ได้วิเคราะห์สายวิวัฒนาการของเชื้อราสกุล *Colletotrichum* ที่ก่อโรคแอนแทรกโนสในมะม่วง โดยใช้เครื่องหมายทางเอ็นเอหลายชุดพบว่าสายพันธุ์ของเชื้อรา *Colletotrichum* หลายชนิดถูกจัดอยู่ในกลุ่ม *C. gloeosporioides* และ *C. acutatum* complexes (Phoulivong et al., 2012; Weir et al., 2012) นอกจากนี้ในประเทศบราซิลมีรายงานว่าพบเชื้อรา *Colletotrichum* ทั้ง 5 สายพันธุ์ ได้แก่ *C. asianum*, *C. fructicola*, *C. tropicale*, *C. karstii* และ *C. dianesei* ก่อโรคแอนแทรกโนสในมะม่วง (Lima et al., 2013) ต่อมา Lima et al. (2015) ได้ระบุสายพันธุ์เชื้อราดังกล่าวโดยใช้เครื่องหมายทางดีเอ็นเอ ได้แก่ GAPDH, actin, beta-tubulin, calmodulin (CaM), glutamine synthetase (GS) และ ITS

พบว่า มีแค่สายพันธุ์ *C. karstii* ที่ไม่ก่อโรคแอนแทรกโนสในมะม่วง อย่างไรก็ตามการทดสอบการก่อโรคข้ามสายพันธุ์พบว่าเชื้อราเหล่านี้ยังก่อโรคในมะละกอ กล้วย ฝรั่ง และพริกหยวก (Lima et al., 2015) นอกจากนี้ Mo et al. (2018) ระบุชนิดเชื้อราก่อโรคแอนแทรกโนสจากส่วนต่าง ๆ จากตัวอย่างใบ และผลมะม่วงในเมืองกวางซี ประเทศจีนพบ 3 สายพันธุ์ในกลุ่ม *C. gloeosporioides* complex ได้แก่ *C. asianum*, *C. fruticola* และ *C. siamense* และมีรายงานว่า *C. scovillei* ซึ่งเป็นสายพันธุ์ภายในกลุ่ม *C. acutatum* complex เป็นเชื้อก่อโรคแอนแทรกโนสอีกชนิดหนึ่งในใบมะม่วงในเมืองกวางซี ประเทศจีนด้วยเช่นกัน (Qin et al., 2017) ปัจจุบันมะม่วงมีการปลูกมะม่วงเป็นจำนวนมากขึ้นทำให้ตรวจพบสายพันธุ์ของเชื้อราที่แยกได้มากขึ้น ซึ่ง Li et al. (2019) ได้จำแนกเชื้อราที่ก่อโรคแอนแทรกโนสจากตัวอย่างมะม่วงที่ติดเชื้อจาก 6 มณฑลในประเทศจีน ผลการศึกษาพบว่าสามารถจำแนกชนิดเชื้อราสกุลนี้ได้ 13 ชนิดคือ *C. asianum*, *C. cliviicola*, *C. cordylinicola*, *C. endophytica*, *C. fruticola*, *C. gigasporum*, *C. gloeosporioides*, *C. karstii*, *C. liaoningense*, *C. musae*, *C. scovillei*, *C. siamense* และ *C. tropicale* ซึ่งสายพันธุ์ทั้งหมดนี้ก่อโรคแอนแทรกโนสในมะม่วง โดยที่ *C. asianum* และ *C. siamense* เป็นชนิดที่พบมากที่สุด (Li et al., 2019) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Wu et al. (2020) ที่ได้รายงานว่าพบ *C. asianum*, *C. fruticola*, *C. siamense*, *C. tropicale* และ *C. scovillei* ก่อโรคแอนแทรกโนสในมะม่วงที่ปลูกในประเทศไต้หวัน (Wu et al., 2020) เช่นเดียวกับกับรายงานการศึกษาโรคแอนแทรกโนสในมะม่วงที่ประเทศเม็กซิโก โดย Tovar Pedraza et al. (2020) ได้จำแนกชนิดเชื้อราก่อโรคแอนแทรกโนสโดยออกแบบยีน Mat1-20 (ApMat) ซึ่งจำแนกได้ 5 ชนิด คือ *C. alienum*, *C. asianum*, *C. fruticola*, *C. siamense* และ *C. tropicale* ซึ่ง *C. asianum* และ *C. siamense* เป็นสายพันธุ์ที่มีความรุนแรงของเชื้อมากที่สุด (Tovar-Pedraza et al., 2020) ต่อมา มีรายงานว่า *C. alienum* ก่อโรคแอนแทรกโนสในมะม่วงที่ปลูกในกรุงปักกิ่ง ประเทศจีน (Ahmad et al., 2021)

การป้องกันและกำจัดโรคแอนแทรกโนส

การควบคุมและกำจัดและโรคแอนแทรกโนสนั้นสามารถทำได้ตั้งแต่ระยะการเพาะปลูกจนถึงระยะการเก็บเกี่ยว ซึ่งมีหลายวิธีดังนี้

1. การเขตกรรมหรือการจัดการภายในแปลงปลูก โดยการเพาะปลูกต้นกล้าไม่ให้แน่นทึบ ตัดแต่งกิ่งทรงพุ่มต้นให้โปร่ง และมีการระบายอากาศที่ดี หรือการทำความสะอาดให้แปลงปลูกให้สม่ำเสมอ รวมถึงการตัดแต่งที่เป็นโรคออก และการเก็บใบร่วงบนพื้นแปลง จากนั้นนำไปเผาทำลายเพื่อลดการสะสมของเชื้อโรค (Uddin et al., 2018)

2. การใช้สารเคมีกำจัดเชื้อรา ซึ่งประกอบด้วย 2 ประเภทคือ สารเคมีประเภทดูดซึม เช่น mancozeb thiabendazole benomyl สารเคมีประเภทดูดซึม เช่น carbendazim azoxystrobin

และ prochloraz โดยฉีดพ่นสลับกันระหว่างสารชนิดสัมผัสและสารชนิดดูดซึมทุก ๆ 10-15 วัน ตั้งแต่ภายหลังตัดแต่งกิ่ง จนกระทั่งถึงระยะท่อนผลเพื่อเป็นการลดปริมาณของเชื้อที่เจริญแบบแฝง (Brown & Ogle, 1997; Eckert, 1989)

3. การใช้เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ เช่น ยีสต์ (*Candida oleophila*) (Farbo et al., 2018; Spadaro & Droby, 2016) แบคทีเรีย (*Bacillus subtilis*) หรือ (*Pseudomonas syringae*) (Northover & Zhou, 2002) และเชื้อรา (*Trichoderma* spp.) ซึ่งกลไกการทำงานของเชื้อจุลินทรีย์เหล่านี้ ส่งผลเกี่ยวกับการแข่งขันแย่งชิงอาหาร และพื้นที่ครอบครองบนเซลล์พืช (competition) การสร้างสารปฏิชีวนะ (antibiosis) การเป็นปรสิต (parasitism) และการชักนำความต้านทานในเนื้อเยื่อพืช (induced resistance) (Sharma et al., 2009; Wisniewski et al., 2007)

4. การใช้สารเคลือบผิว ซึ่งเป็นสารเคลือบที่สารสามารถรับประทานได้ และมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา เช่น ไคโตซาน มักใช้ร่วมกับสารสกัดจากธรรมชาติหรือน้ำมันหอมระเหย (Ali et al., 2013; De Oliveira et al., 2017; Dos Passos Braga et al., 2019)

5. การใช้สารกลุ่ม generally recognized as safe (GRAS) เป็นสารเคมี หรือวัตถุเจือปนอาหารที่ได้รับการยอมรับโดยทั่วไปว่าปลอดภัย เนื่องจากมีความเป็นพิษต่ำ และส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมน้อยมาก สามารถยับยั้งการงอกและการเจริญของเส้นใยเชื้อราได้ เช่น hydrogen peroxide, acetic acid, sodium carbonates, potassium sorbates, sodium metabisulfite, benzoates และ silicates (Jitareerat et al., 2018; Kalupahana et al., 2018; Palou, 2018)

หลักการวินิจฉัยโรคพืชโดยทั่วไป

การวินิจฉัยโรคพืชเพื่อให้ทราบถึงสาเหตุการผิดปกติของพืชนั้นเป็นสิ่งจำเป็น เนื่องจากการนำไปสู่วิธีการแก้ไข และลดความเสียหายได้อย่างมีประสิทธิภาพเพราะวิธีการควบคุมโรคที่เกิดจากเชื้อแต่ละชนิดนั้นมีความจำเพาะที่แตกต่างกัน ดังนั้นการวินิจฉัยสาเหตุของโรคพืชได้อย่างจำเพาะ แม่นยำ และรวดเร็วจะช่วยให้นักเกษตรกรรมควบคุมโรคพืชได้อย่างถูกต้อง และไม่จำเป็นต้องใช้สารเคมีเกินความจำเป็น ประหยัดเงินและเวลา ซึ่งการวินิจฉัยโรคพืชโดยทั่วไปที่มีประสิทธิภาพนั้น ต้องมีความรู้เกี่ยวกับกลุ่มของเชื้อสาเหตุโรคพืช ลักษณะของเชื้อสาเหตุของโรคพืช ลักษณะอาการผิดปกติ ร่องรอยของเชื้อโรค รวมถึงกลุ่มอาการของโรค ดังนั้นจึงได้มีการจัดจำแนกโรคพืชโดยอาศัยหลักพื้นฐานต่าง ๆ ดังนี้

1. การจำแนกโดยอาศัยอาการของพืชที่เป็นโรค เช่น โรคแอนแทรคโนส โรคแคงเกอร์ โรคเหี่ยว โรคเมาดำ เป็นต้น อย่างไรก็ตามอาการของโรคพืชเหล่านี้มักเกิดจากเชื้อจุลินทรีย์หลากหลายชนิด

2. จำแนกโดยอาศัยส่วนต่าง ๆ ของพืชที่เป็นโรค เช่น เชื้อโรคแต่ละชนิดมักเข้าทำลายส่วนต่าง ๆ ของพืชได้แตกต่างกันบางชนิดมีการเข้าทำลายที่จำเพาะเจาะจงกับส่วนนั้น ๆ ของพืช เช่น โรคที่ราก ใบ ลำต้น ดอก ผล เป็นต้น หรือบางชนิดมีการเข้าทำลายในทุก ๆ ส่วนของพืช

3. การจำแนกโดยอาศัยแบบของพืช ได้แก่ โรคที่มักเกิดในพืชไร่ ผัก ผลไม้ ไม้ดอกไม้ประดับ หรือสนามหญ้า เป็นต้น

4. จำแนกโดยอาศัยความเสียหายและการแพร่ระบาดของโรค ซึ่งเชื้อโรคแต่ละชนิดมีความรุนแรงและการแพร่ระบาดที่แตกต่างกัน บางชนิดมีการก่อให้เกิดความเสียหายเพียงเล็กน้อยและไม่ติดต่อไปยังพืชชนิดอื่น แต่บางชนิดมีพืชอาศัยที่กว้างจึงทำให้เกิดการแพร่ระบาดและก่อให้เกิดความเสียหายเป็นอย่างมาก

5. จำแนกโดยอาศัยสาเหตุของโรคพืช โดยทั่วไปเชื้อสาเหตุที่ทำให้เกิดโรคมักเกิดจากสิ่งมีชีวิต เช่น แบคทีเรีย รา ไส้เดือนฝอย ไวรัสและไวรอยด์ ไฟโตพลาสมา พืชพาราไซต์ ได้แก่ ฝอยกาฝาก สำหรับบางชนิด รวมไปถึงแมลง บางครั้งก็เกิดจากสิ่งไม่มีชีวิต เช่น สิ่งแวดล้อมไม่เหมาะสมต่อการพืชนั้น ๆ การขาดธาตุอาหาร สภาพอากาศ ความชื้น อุณหภูมิ โครงสร้าง และค่า pH ของดิน เป็นต้น

หลังจากที่มีวินิจฉัยโรคโดยอาศัยการจำแนกด้วยหลักการต่าง ๆ แล้วเครื่องมือที่เลือกใช้ในการวินิจฉัยการมีความจำเป็นเช่นเดียวกัน ดังนี้

1. การวินิจฉัยโรคพืชด้วยตาเปล่า โดยใช้แว่นขยายส่องสำรวจต้นพืชหรือแปลงปลูกพืชโดยตรง แล้วทำการบันทึกข้อมูลลักษณะอาการของโรคพืชให้มากที่สุดเท่าที่ทำได้ จากนั้นนำข้อมูลดังกล่าวมาเปรียบเทียบกับเอกสารอ้างอิงของโรคพืช

2. การวินิจฉัยโรคพืชด้วยจุลทรรศน์

3. การวินิจฉัยโรคพืชโดยการแยกเชื้อด้วยอาการเลี้ยงเชื้อ

4. การวินิจฉัยโรคพืชโดยลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ ซึ่งสามารถจำแนกได้ถึงระดับสกุล หรือระดับชนิด

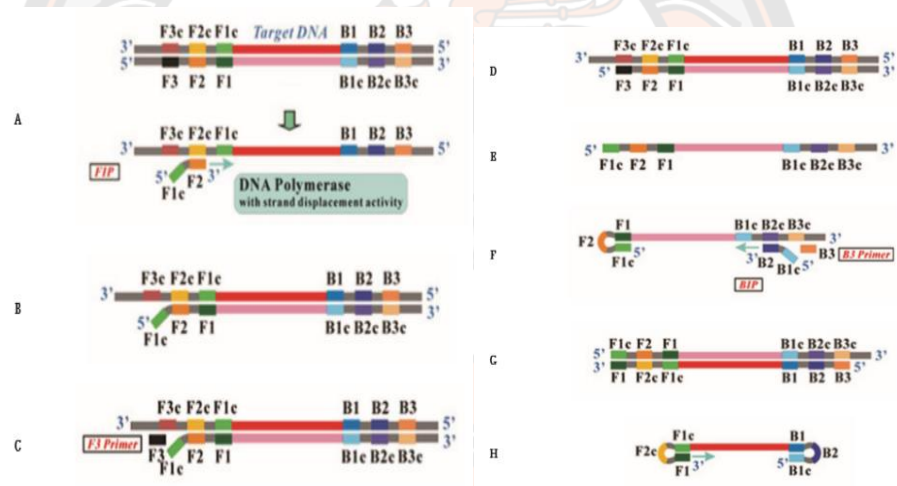
5. การวินิจฉัยโรคพืชด้วยเทคนิคทางโมเลกุล เช่น ELISA, PCR, RT-PCR และ RFLP เป็นต้น

Loop-mediated isothermal amplification (LAMP)

เทคนิค Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) เป็นวิธีการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตได้ถึง 10^9 เท่า ภายใต้อุณหภูมิคงที่เพียงอุณหภูมิเดียว 60-65 องศาเซลเซียส ในระยะเวลาสั้นน้อยกว่า 1 ชั่วโมง การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอต้องใช้ไพรเมอร์ 4 ชุด สามารถตรวจสอบยีนที่มีความจำเพาะถึง 6 ตำแหน่งของยีนเป้าหมายประกอบไปด้วย outer primers (F3 และ B3) และ inner primers (FIP และ BIP) โดยที่ FIP ประกอบด้วย F1c กับ F2 และ BIP ประกอบด้วย B1c กับ B2 (Mori et.al., 2006) ปฏิกิริยาของ LAMP ประกอบด้วยขั้นตอน 3 ขั้นตอนดังนี้ในขั้นตอนแรก

LAMP initial step เอนไซม์ *Bst* DNA polymerase ทำหน้าที่แยกดีเอ็นเอสายคู่ เป็นสายเดี่ยวได้ (strand displacement) ซึ่งทำงานได้ดีที่อุณหภูมิระหว่าง 60-65 องศา กระบวนการสังเคราะห์ เริ่มต้นจาก FIP primer ด้าน F2 จะเข้าจับกับ F2c และทำการสังเคราะห์ที่ปลาย 3' ของ primer F2 จากนั้น F3 primer เข้ามาจับในตำแหน่ง F3c แล้วทำการสังเคราะห์โดย DNA polymerase จะทำการแยกสาย FIP-link complementary strand ซึ่งสายนี้จะเกิดการ form เป็น loop ที่ปลาย 5' โดยเกิดจาก F1c จับกับ F1

ขั้นตอน LAMP cycling step เริ่มจาก BIP ด้าน B2 จะเข้าจับกับ B2c และทำการสังเคราะห์ที่ปลาย 3' ของ B2 primer จากนั้น B3 primer เข้ามาจับในตำแหน่ง B3c แล้วทำการสังเคราะห์โดย DNA polymerase ทำการแยกสาย BIP-link complementary strand ซึ่งสายนี้จะเกิดการ form เป็น loop ที่ปลาย 5' โดยเกิด จาก B1c จับกับ B1 ซึ่งการเกิด loop ของด้าน FIB และ BIP จะเรียกว่า dumb-bell (ภาพ 40)

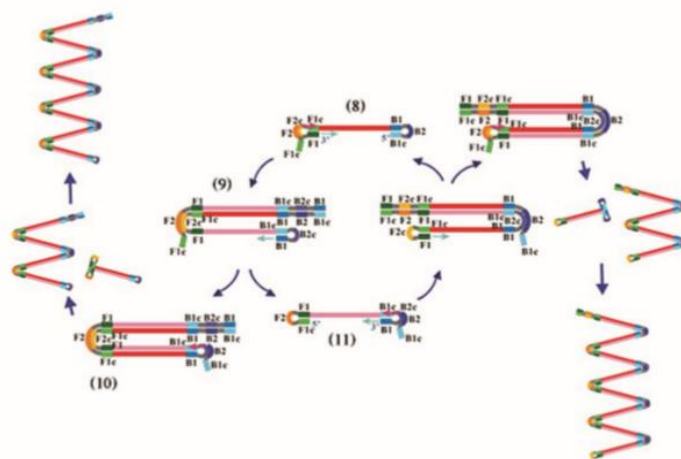


ภาพ 40 หลักการทำงานของปฏิกิริยาแลมป์ ขั้นตอน LAMP initial step และ LAMP cycle step

(ที่มา : อมรรัตน์ ร่มพฤกษ์, 2554)

ขั้นตอน Elongation and recycling step เป็นปฏิกิริยาที่เกิดซ้ำทำให้ได้ dumb-bell ที่ต่อกันหลายข้อ สามารถเกิด cycle amplification step ด้านปลายของ loop forward ก่อน คือสามารถมี self-primed strand displacement DNA synthesis สร้างดีเอ็นเอจาก F1 ต่อไปเรื่อยๆ จนถึง B1c ขณะเดียวกัน FIP primer ก็สามารถ hybridize กับ F2c ที่ loop forward และสร้างดีเอ็นเอสายใหม่ได้จำนวนซ้ำเพิ่มมากขึ้นและมี stem loop แบบ dumb-bell ที่สามารถเกิด cycle amplification ด้าน backward ขึ้นได้ การทำงานจะต่อเนื่องกันตลอดเวลา ทำให้สามารถเพิ่ม

จำนวนได้มาก 10⁹-10¹⁰ ซ้ำภายในเวลา 15-60 นาที ดังนั้นจึงทำให้ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นมีได้หลายขนาดในขั้นตอนเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (ภาพ 41) (Notomi et al., 2000)



ภาพ 41 หลักการทำงานของปฏิกิริยาแลมป์ ขั้นตอน Elongation and recycling step

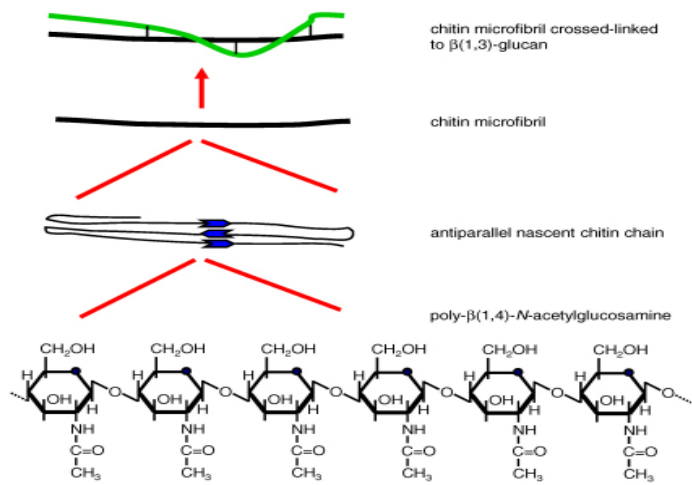
(ที่มา : อมรรัตน์ ร่มพฤษ, 2554)

ซึ่งเทคนิคนี้เป็นเทคนิคที่ง่ายในการทดสอบถ้าสามารถสร้างไพรเมอร์ที่เหมาะสมได้ โดยใช้เครื่องมือพื้นฐานทั่วไป เช่น อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ หรือ heat block และติดตามผลของปฏิกิริยาหลังการเกิดการสังเคราะห์ได้โดยด้วยตาเปล่า เช่น การจับกัน ของ pyrophosphate ion กับ magnesium ได้สารประกอบเชิงซ้อน magnesium pyrophosphate ทำให้เกิดตะกอนสีขาวขุ่นไม่ละลายน้ำ ซึ่ง pyrophosphate เป็นสารที่ปล่อยออกมาระหว่างการสังเคราะห์สารพันธุกรรมตะกอนดังกล่าวสามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า (Mori et al., 2001) การติดตามด้วยสารฟลูออเรสเซนต์ เช่น SYBR Green I เติมหลังจากเกิดปฏิกิริยาแลมป์เวลาที่มีผลิตภัณฑ์เกิดขึ้นจะเปลี่ยนสีตั้งต้น (สีส้ม) ให้กลายเป็นสีเขียวเมื่อดูภายใต้แสงยูวี (302 nm.) หรืออาจดูภายใต้แสงธรรมชาติ (Tomita et al., 2008) ปัจจุบันเทคนิค LAMP ถูกใช้งานในการตรวจหาเชื้อราที่ก่อโรคในพืชหลายชนิด เช่นงานวิจัยการศึกษา Kandan et.al (2016) ได้ทำการศึกษาตรวจหาเชื้อ *C. capsici* สาเหตุโรครุ้งแห้งในพริก ซึ่งศึกษาบริเวณยีน *beta-tubulin* ผลการศึกษาพบว่ามีความไวในการตรวจพบเชื้อที่ 0.00001 นาโนกรัม/ไมโครลิตร ซึ่งตรวจพบไวกว่าเทคนิค PCR ในขณะที่เทคนิค PCR มีความไวที่ 1 นาโนกรัม/ไมโครลิตร (Kandan et al., 2016) ต่อมา Tian et.al (2017) ได้ตรวจหาเชื้อ *C. truncatum* ก่อโรคแอนแทรกโนสในถั่วเหลือง ซึ่งศึกษาบริเวณยีน *Rpb1* และตรวจสอบผลด้วย SYBR Green I พบว่าสามารถตรวจจับเชื้อได้อย่างจำเพาะ ซึ่งความไวในการตรวจเชื้อที่ 0.01 นาโนกรัม/ไมโครลิตร (Tian et al., 2017)

นอกจากนี้ Wu et al. (2019) ได้ตรวจหาเชื้อ *C. gloeosporioides* G143A สายพันธุ์กลายที่ก่อโรคแอนแทรกโนสในสตอเบอร์รี่ โดยศึกษาที่บริเวณยีน *cyt b* พบว่าสามารถตรวจพบเชื้อได้และมีความไวที่ 0.01 นาโนกรัม/ไมโครลิตร (Wu et al., 2019) เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Chen et al. (2020) ได้ตรวจหาเชื้อรา *C. gloeosporioides* ในมะกอกจีนโดยศึกษาบริเวณยีน *TEF-1* พบว่าสามารถตรวจพบเชื้อได้อย่างจำเพาะและมีความไวในการตรวจพบที่ 4×10^{-7} นาโนกรัม/ไมโครลิตร (Chen et al., 2020)

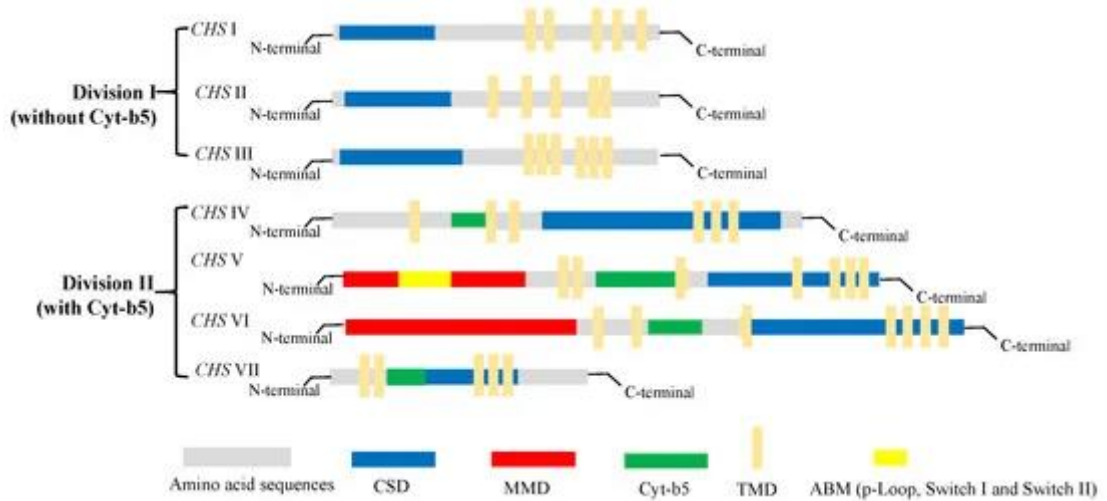
ยีนไคตินซินเทส (chitin synthase gene: CHS)

ยีนไคตินซินเทส เป็นยีนที่ทำหน้าที่ในการสังเคราะห์ไคตินซึ่งเป็นประกอบหลักของผนังเซลล์ของเชื้อรา (Lenardon et al., 2010) โดยโครงสร้างของไคตินจะเป็นโพลิเมอร์เชิงเส้นตรงของ N-acetylglucosamine ที่เชื่อมด้วย β 1,4 โดยต่อเป็นสายพอลิแซ็กคาไรด์พับกลับเข้าหากันไปมา และมีการสร้างสายโซ่มาเชื่อมสายพอลิแซ็กคาไรด์ด้านขนานด้วยพันธะไฮโดรเจนที่มีความแข็งแรงจนกลายเป็นเส้นใยไคติน หลังจากนั้นเส้นใยไคตินจะเชื่อมกับสาย β (1,3)-glucan แบบ cross-link ด้วยพันธะโคเวเลนต์ซึ่งก่อตัวเป็นโครงสร้างภายในของผนังเซลล์ของเชื้อรา (ภาพ 42) (Klis et al., 2006; Kollár et al., 1997) นอกจากนี้เอนไซม์ไคตินซินเทสถูกแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 (CHS1, CHS2, CHS3) และกลุ่มที่ 2 (CHS4, CHS5, CHS6, CHS7) ซึ่งกลุ่มเอนไซม์เหล่านี้ถูกควบคุมการแสดงออกด้วยยีนไคตินซินเทสประมาณ 6-10 ยีน (ภาพ 43) (Roncero, 2002) โดยมีรายงานการจำแนกลักษณะการทำงานของยีนไคตินซินเทสในเชื้อราพบที่สามารถจำแนกได้ 7 ยีน โดยแต่ละยีนมีหน้าที่แตกต่างกัน (Kong et al., 2012) โดยเฉพาะบริเวณยีน CHS1 พบมากสุดในเชื้อราเนื่องจากเป็นยีนที่มีบทบาทสำคัญในการสร้างโครงสร้างเส้นใยของผนังเซลล์ และโคโคเนียเชื้อรา รวมไปถึงการเจริญเติบโตของเส้นใย การเข้าทำลาย (inflection) และความรุนแรงในการก่อโรคในพืช (Werner et al., 2007; Yarden & Yanofsky, 1991)



ภาพ 42 โครงสร้างของไคติน

(ที่มา : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2923753/>)



ภาพ 43 โครงสร้างและการจำแนกชนิดของกลุ่มไคตินซินเทส

(ที่มา : <https://www.mdpi.com/2309-608X/9/2/205>)

บทที่ 3

วิธีดำเนินงานวิจัย

การเก็บตัวอย่างโรคพืช

เก็บตัวอย่างผลไม้ที่แสดงอาการของโรคเป็นแผลจุดสีน้ำตาลดำจากตลาดและห้างสรรพสินค้า รอบมหาวิทยาลัยนเรศวร จำนวน 4 ชนิด คือ มะม่วงน้ำดอกไม้ แก้วมังกร ฝรั่ง และกล้วยน้ำหว่า โดยบันทึกรอยโรคด้วยกล้องถ่ายภาพ พร้อมระบุวัน/เดือน/ปี

การแยกเชื้อราสาเหตุโรคพืชโดยวิธี Tissue transplant

นำผลมะม่วงน้ำดอกไม้ แก้วมังกร ฝรั่ง และกล้วยน้ำหว่า ที่พบรอยโรคมาล้างทำความสะอาดด้วยน้ำกลั่น จากนั้นตัดเอาเฉพาะบริเวณที่มีรอยของโรคเป็นชิ้นสี่เหลี่ยมขนาด 5x5 มิลลิเมตร โดยให้มีคาบต่อส่วนที่เป็นโรคและไม่เป็นโรค จากนั้นแช่ในสารละลายคลอโรกซ์ (Clorox) 10% เป็นเวลา 3-5 นาที แล้วนำไปล้างในน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้งแล้วนำชิ้นส่วนพืชที่มีรอยโรคไปซบบนกระดาษทิชชูที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้วให้แห้ง แล้วนำไปวางบนอาหารสูตร Potato Dextrose Agar (PDA) บ่มที่อุณหภูมิ 37±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-7 วัน จนเชื้อราสร้างเส้นใย จากนั้นทำการเขี่ยปลายเส้นใยของเชื้อราที่เจริญออกมาจากชิ้นส่วนของพืชไป วางบนอาหารสูตร PDA บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อใหม่ เพื่อแยกเชื้อให้บริสุทธิ์สำหรับการทดลองต่อไป

การจำแนกชนิดเชื้อราด้วยลักษณะสัณฐานวิทยา

ศึกษาลักษณะรูปร่าง สี การเจริญเติบโตของเส้นใยบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ด้วยตาเปล่า แล้วตรวจดูลักษณะโคนิเดีย (conidia) และโครงสร้างอื่น ๆ ของเชื้อราด้วยเทคนิค wet mount ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้เลนส์ประกอบ พร้อมบันทึกภาพที่กำลังขยาย 400 เท่า

การสกัดดีเอ็นเอของเชื้อราด้วยวิธี CTAB ประยุกต์จากวิธีของ Ferdous et al., (2012)

1. เตรียม 2X CTAB buffer (100 mM Tris-HCl; pH 8.0, 20 mM EDTA; pH 8.0, 1.4 mM NaCl, 2% CTAB, 1% PVPP) จากนั้นทำการนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที และทิ้งไว้หนึ่งคืนก่อนใช้งาน

2. ขูดเส้นใยเชื้อราบนอาหารเลี้ยงเชื้อมาบดในโกร่งด้วยไนโตรเจนเหลวให้ละเอียดเป็นผง แล้วถ่ายใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวส์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่เติม 2X CTAB buffer 1 มิลลิลิตร

3. จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที จากนั้นปั่นเหวี่ยง 13,000 รอบ/นาที่ เป็นเวลา 10 นาที เพื่อแยกตะกอนออก
4. ดูดสารละลายส่วนใสด้านบนใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวส์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดใหม่
5. เติม Chloroform: Isoamyl alcohol (24:1) ปริมาตร 1 เท่าของสารละลายส่วนใสที่ดูดมา จากนั้นปั่นเหวี่ยง 13,000 รอบ/นาที่ เป็นเวลา 10 นาที และดูดสารละลายส่วนใสด้านบนใส่หลอดใหม่อีกครั้ง
6. ตกตะกอนดีเอ็นเอด้วยการเติม Chilled absolute ethanol ปริมาตร 2 เท่าของสารละลายส่วนใสที่ดูดมา แล้วบ่มดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลาอย่างน้อย 45 นาที
7. ทำการปั่นเหวี่ยง 13,000 รอบ/นาที่ เป็นเวลา 10 นาที และล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70% ethanol 2 ครั้ง และตากตะกอนดีเอ็นเอทิ้งไว้ให้แห้ง
8. ละลายดีเอ็นเอด้วยการเติม TE buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA; pH 8.0) ปริมาตร 30 ไมโครลิตร (ขึ้นอยู่กับปริมาณตะกอนดีเอ็นเอ)
9. ตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่อง Nanodrop spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร และตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอด้วยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส บนอะกาโรสเจล 1% ที่เติม Safe View™ FireRed (abm, Cannada) ใน 1X TAE buffer ภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต
10. เก็บสารละลายดีเอ็นเอไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะใช้งาน

การจำแนกเชื้อราโดยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ ITS ด้วยเทคนิค Polymerase chain reaction (PCR)

นำดีเอ็นเอของเชื้อราที่สกัดได้มาทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ ITS1-5.8S rDNA-ITS2 ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยใช้คู่ไพรเมอร์ ITS1 (5'-TTTCCGTAGGTGAACCTGC-3') และ ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (White et al., 1990) และใช้ความเข้มข้นของสารในการทำปฏิกิริยาดังตาราง 1 โดยอุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสมดังตาราง 2 หลังจากนั้นนำผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้มาตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่อง Nanodrop spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร และตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอด้วยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส บนอะกาโรสเจล 1% ที่เติม Safe View™ FireRed (abm, Cannada) ใน 1X TAE buffer ภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต โดยใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลาประมาณ 30-40 นาที และเปรียบเทียบขนาดของดีเอ็นเอที่ได้กับดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb DNA Ladder (Thermo Scientific, USA)

ตาราง 1 ความเข้มข้นของสารต่าง ๆ ที่ใช้ในปฏิกิริยาพีซีอาร์

สารเคมี	ความเข้มข้นเริ่มต้น	ความเข้มข้นสุดท้าย
PCR buffer (GeneDirex, Taiwan)	10X	1X
dNTPs	2 mM	0.2 mM
ITS1	10 μ M	0.2 mM
ITS4	10 μ M	0.2 mM
Taq Polymerase (GeneDirex, Taiwan)	5U/ μ l	1U
DI water	-	Up to 50 μ l
DNA template	-	50 ng

ตาราง 2 อุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในปฏิกิริยาพีซีอาร์

ขั้นตอน	อุณหภูมิ/เวลา	
1. Initial denaturation	94 °C 5 นาที	
2. Denaturation	94 °C 1 นาที	} 30 รอบ
Annealing	60 °C 45 วินาที	
Extension	72 °C 1 นาที	
3. Final extension	72 °C 5 นาที	

การเตรียมผลผลิตพีซีอาร์ให้บริสุทธิ์

ทำการเตรียมตัวอย่างผลผลิต PCR ให้บริสุทธิ์ด้วยชุด QIAquick® PCR Purification kit (Qiagen, Netherlands) ตามขั้นตอนดังนี้

- เติม PB Buffer 5 เท่าของปริมาตรผลผลิตพีซีอาร์ แล้วกลับหลอดไปมาให้สารเข้ากัน
- นำคอลัมน์ใส่ลงใน collection tube จากนั้นดูดสารละลายทั้งหมดใส่ลงในคอลัมน์ แล้วปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 1 นาที
- เทสารใน collection tube ทิ้งแล้วนำคอลัมน์กลับมาใส่ใน collection tube
- ล้างคอลัมน์ด้วย PE buffer 750 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ 2 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 1 นาที

5. เทสารใน collection tube ที่แล้วนำคอลัมน์กลับมาใส่ใน collection tube จากนั้นทำการปั่นเหวี่ยงหลอดเปล่าอีกครั้งที่ความเร็ว 10,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 2 นาที เพื่อแยก PE buffer ออกจากคอลัมน์ให้หมด

6. ทำการย้ายคอลัมน์ใส่ลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวส์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร

7. ทำการชะผลผลิตพีซีอาร์ออกจากคอลัมน์ โดยเติม EB buffer 25 ไมโครลิตร ลงตรงกลางของคอลัมน์แล้วทิ้งไว้ 5 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 1 นาที

8. นำผลผลิตพีซีอาร์มาตรวจสอบขนาดด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสในอะกาโรสเจล 1% ที่เติม Safe View™ FireRed (abm, Cannada) ใน 1X TAE buffer ภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต โดยใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลาประมาณ 30-40 นาที และเปรียบเทียบขนาดของดีเอ็นเอที่ได้กับดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb DNA Ladder (Thermo Scientific, USA)

การหาลำดับนิวคลีโอไทด์และการวิเคราะห์ข้อมูล

นำผลผลิตพีซีอาร์บริสุทธิ์ส่งหาลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยบริษัท Macrogen ประเทศเกาหลีใต้ จากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาทำการจัดเรียง (alignment) โดยใช้โปรแกรม GeneDoc version 2.7.00 (Nicholas & Nicholas, 1997) จากนั้นเปรียบเทียบข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับฐานข้อมูล National Center for Biotechnology Information (NCBI) โดยใช้ Nucleotide blast (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) และทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรม MEGA11 (Tamura et al., 2021) โดยใช้ Kimura 2-parameter model สร้าง Phylogenetic tree โดยใช้เชื้อรา *Alternaria brassicae* เป็น Outgroup

การออกแบบไพรเมอร์สำหรับปฏิกิริยาแลมป์

ทำการออกแบบไพรเมอร์จากลำดับดีเอ็นเอบริเวณยีน CHS-1 ของเชื้อรา *C. asianum* (JX009818.1) จากฐานข้อมูล NCBI โดยใช้โปรแกรม Primer Explorer software version 5 (<https://primerexplorer.jp/lampv5e/index.html>) แล้วสังเคราะห์ไพรเมอร์โดยบริษัท Macrogen (Macrogen, South Korea) ดังตาราง 3 ซึ่งไพรเมอร์ถูกออกแบบเป็น 2 คู่ โดยคู่แรกคือ outer primer (F3 และ B3) และคู่ที่ 2 คือ inner primer (FIP และ BIP) (ภาพ 44)



ภาพ 44 ตำแหน่งของชุดไพรเมอร์ที่ทำการออกแบบจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน CHS-1 ของเชื้อรา *C. asianum*

ตาราง 3 ไพรเมอร์สำหรับเทคนิคแลมป์ที่ออกแบบจากลำดับดีเอ็นเอบริเวณยีน CHS-1 ของเชื้อรา *C. asianum*

ชื่อไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5'-3')
CHS1-F3	CCGCGAACAAGAGCACTG
CHS1-B3	GCAGAACAGCATCTGAACGG
CHS1-FIP (F1c-F2)	GCGGTGACATCCTTGCTGTTGA-CCGGTATGGGTGTGTACCA
CHS1-BIP (B1c-B2)	ACGAATACACGACCCAGGTCGG-GCTGCTGCTTAGGAACCAAG

การหาอุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยาแลมป์

เตรียมส่วนผสมของปฏิกิริยาแลมป์ดังนี้ 1X WarmStart® Colorimetric LAMP Master Mix with UDG (New England Biolabs, America), 0.8 ไมโครโมลาร์ (FIP และ BIP Primer), 0.1 ไมโครโมลาร์ (F3 และ B3 Primer), ดีเอ็นเอต้นแบบ (50 นาโนกรัม/ไมโครลิตร) และ Molecular grade water ปริมาตรทั้งหมด 15 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง Vortex และดูดสารลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวส์ขนาด 0.2 มิลลิลิตร จากนั้นนำมาบ่มที่อุณหภูมิ 60, 63 และ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30-75 นาที ด้วยเครื่อง Thermal cycle แล้วนำหลอดออกจากการบ่มและตรวจผลด้วยตาเปล่า ซึ่งปฏิกิริยาเชิงบวกสารละลายในหลอดทดลองมีการเกิดการเปลี่ยนสีจากสีชมพู

เป็นสีเหลือง และไม่เกิดการเปลี่ยนสีในปฏิกิริยาเชิงลบ จากนั้นบันทึกภาพผลการทดสอบด้วยกล้องถ่ายภาพ และยืนยันผลปฏิกิริยาด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสบนอะกาโรสเจล 2%

การทดสอบประสิทธิภาพความจำเพาะของไพรเมอร์ CHS-1 ด้วยเทคนิคแลมป์

เตรียมส่วนผสมของปฏิกิริยาแลมป์ดังนี้ 1X WarmStart® Colorimetric LAMP Master Mix with UDG (New England Biolabs, America), 0.8 ไมโครโมลาร์ (FIP และ BIP Primer), 0.1 ไมโครโมลาร์ (F3 และ B3 Primer), ดีเอ็นเอต้นแบบดีเอ็นเอ (50 นาโนกรัม/ไมโครลิตร) และ Molecular grade water ปริมาตรทั้งหมด 15 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวส์ขนาด 0.2 มิลลิลิตร โดยใช้ดีเอ็นเอต้นแบบดังนี้ *C. asianum*, *C. musae*, *C. siamense*, *F. incarnatum* และ *P. sydowina* จากนั้นผสมให้เข้าด้วยกันด้วยเครื่อง Vortex แล้วนำมาบ่มที่อุณหภูมิ และเวลาที่เหมาะสมจากการทดสอบก่อนหน้านี้ด้วยเครื่อง Thermal cycle จากนั้นนำหลอดออกจากการบ่ม และตรวจผลด้วยตาเปล่า ซึ่งปฏิกิริยาเชิงบวกจะละลายในหลอดทดลองมีการเกิดการเปลี่ยนสีจากสีชมพูเป็นสีเหลือง และไม่เกิดการเปลี่ยนสีในปฏิกิริยาเชิงลบ แล้วทำการบันทึกภาพผลการทดสอบด้วยกล้องถ่ายภาพ และยืนยันผลปฏิกิริยาด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสบนอะกาโรสเจล 2%

การทดสอบประสิทธิภาพความไวของไพรเมอร์ CHS-1 ด้วยเทคนิคแลมป์

เตรียมส่วนผสมของปฏิกิริยาแลมป์ดังนี้ 1X WarmStart® Colorimetric LAMP Master Mix with UDG (New England Biolabs, America), 0.8 ไมโครโมลาร์ (FIP และ BIP Primer), 0.1 ไมโครโมลาร์ (F3 และ B3 Primer), ดีเอ็นเอต้นแบบ และ Molecular grade water ปริมาตรทั้งหมด 15 ไมโครลิตร โดยดีเอ็นเอต้นแบบของ *C. asianum* ถูกเจือจางด้วยน้ำ Molecular grade ได้ทั้งหมด 7 ความเข้มข้นคือ 25, 10, 1, 0.1, 0.01, 0.001 และ 0.0001 นาโนกรัม/ไมโครลิตร จากนั้นผสมให้เข้ากันแล้วดูดสารลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวส์ขนาด 0.2 มิลลิลิตร แล้วนำมาบ่มที่อุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสมจากการทดสอบแรกด้วยเครื่อง Thermal cycle แล้วนำหลอดออกจากการบ่มและตรวจผลด้วยตาเปล่า ซึ่งปฏิกิริยาเชิงบวกจะละลายในหลอดทดลองมีการเกิดการเปลี่ยนสีจากสีชมพูเป็นสีเหลือง และไม่เกิดการเปลี่ยนสีในปฏิกิริยาเชิงลบ จากนั้นบันทึกภาพผลการทดสอบด้วยกล้องถ่ายภาพ และยืนยันผลปฏิกิริยาด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสบนอะกาโรสเจล 2%

บทที่ 4

ผลการวิจัย

การจำแนกเชื้อราโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

จากการศึกษาเชื้อราทั้ง 11 ไอโซเลตจากผลไม้ 4 ชนิด โดยแยกมาจากรอยโรคบนผลต่างกัน และรอยแผลต่างกันพบเชื้อราบนผลของกล้วย 2 ไอโซเลต คือ CB01 และ CB02 พบว่าเส้นใยของเชื้อรา มีสีส้ม เส้นใยบางเรียบติดกับจานอาหารเลี้ยงเชื้อ และลักษณะโคนิเดียเดี่ยว ๆ เป็นรูปทรงกระบอกหัวท้ายโค้งมน และไม่มีผนังกัน ซึ่งโคนิเดียมีขนาดประมาณ $3.5-6.5 \times 15-21$ ไมโครเมตร ในขณะที่แก้วมังกรพบเชื้อราที่แยกเชื้อรามากจากบนผลเดียวกันแต่รอยแผลต่างกันได้ 3 ไอโซเลต คือ CD01 พบว่าเส้นใยของเชื้อรา มีลักษณะเส้นใยหนาฟู สีขาวและเมื่ออายุของเชื้อรามากขึ้นสีของเส้นใยจะค่อย ๆ เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล และลักษณะโคนิเดียเดี่ยว ๆ เป็นรูปทรงกระบอกหัวท้ายโค้งมน และไม่มีผนังกัน ซึ่งโคนิเดียมีขนาดประมาณ $3.2-4.5 \times 11.0-16$ ไมโครเมตร ในขณะที่อีก 2 ไอโซเลต ที่แยกได้จากแก้วมังกรคือ CD02 และ CD03 พบว่าเส้นใยของเชื้อรา มีลักษณะเส้นใยหนาฟู มีสีขาว และเมื่ออายุของเชื้อรามากขึ้นสีของเส้นใยจะค่อย ๆ เปลี่ยนเป็นสีส้มอ่อน และลักษณะโคนิเดียเดี่ยว ๆ เป็นรูปพระจันทร์เสี้ยว มีผนังกัน มีขนาดโคนิเดียประมาณ $3.0-5.5 \times 16.0-35.5$ ไมโครเมตร และเชื้อราที่แยกจากรอยโรคบนผลเดียวกันแต่รอยแผลต่างกันบนผลฝรั่ง สามารถแยกได้ 3 ไอโซเลต คือ CG01, CG02 และ CG03 พบว่าเส้นใยของเชื้อรา มีลักษณะเส้นใยหนาเรียบขึ้นซ้อนกันเป็นชั้น ๆ มีสีขาว และเมื่ออายุของเชื้อรามากขึ้นสีของเส้นใยจะค่อย ๆ เปลี่ยนเป็นสีเทา และลักษณะโคนิเดียเดี่ยว ๆ เป็นรูปทรงกลมค่อนข้างทรงแท่งรี มีผนังกัน ซึ่งโคนิเดียมีขนาดประมาณ $6.5-8.0 \times 18.3-43.5$ และ 3.4×9.5 ไมโครเมตร และเชื้อราที่แยกจากรอยโรคบนผลเดียวกันรอยแผลเดียวกันบนผลมะม่วง สามารถแยกได้ 3 ไอโซเลต คือ CM01, CM02 และ CM03 พบว่าเส้นใยของเชื้อรา มีลักษณะเส้นใยหนาฟู มีสีขาว และเมื่ออายุของเชื้อรามากขึ้นสีของเส้นใยจะค่อย ๆ เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล-ดำ และลักษณะโคนิเดียเดี่ยว ๆ เป็นรูปทรงกระบอกปลายเรียวเล็กหัวท้ายโค้งมน และไม่มีผนังกัน ซึ่งโคนิเดียมีขนาดประมาณ $3.6-7.5 \times 10.3-19.5$ ไมโครเมตร (ตาราง 4) (ภาพ 45-48)

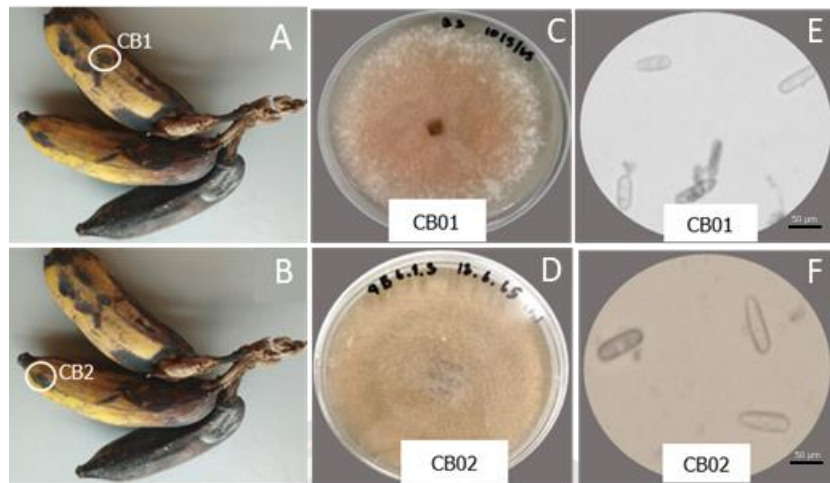
ดังนั้นจากผลการศึกษาลักษณะของเส้นใย สีและโคนิเดียสามารถบอกได้คร่าว ๆ คือ กลุ่มที่มีเส้นใยสีส้ม สีขาวอมน้ำตาล สีขาวอมเทา-ดำ และโคนิเดียมีลักษณะเป็นรูปทรงกระบอกหัวท้ายโค้งมน และโคนิเดียไม่มีผนังกันน่าจะเป็นเชื้อราในสกุล *Colletotrichum* ในขณะที่กลุ่มที่มีเส้นใยสีขาวอมส้ม และลักษณะโคนิเดียเป็นรูปพระจันทร์เสี้ยว และโคนิเดียมีผนังกัน อาจจะเป็นเชื้อราในสกุล *Fusarium* ส่วนกลุ่มที่มีเส้นใยสีขาวอมเทา และโคนิเดียมีรูปร่างที่ไม่แน่นอน บางส่วนเป็นทรงกลม บางส่วนเป็นทรงแท่งรี และโคนิเดียมีผนังกัน ซึ่งทำให้ไม่สามารถระบุสกุลได้

ตาราง 4 สัมมนาวิทยาของเชื้อราทั้งหมด 11 ไอโซเลต

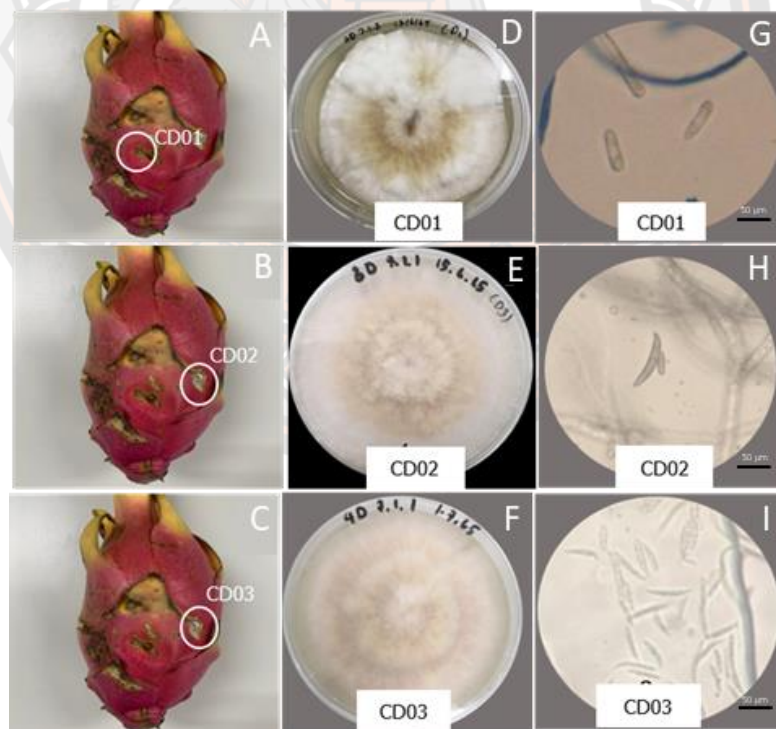
ตัวอย่าง	ไอโซเลต	อายุของเชื้อรา	ลักษณะของเส้นใย	สีของเส้นใย	ลักษณะของนิติเตย	ขนาดของโคนิเตย (ไมโครเมตร)
กล้วย	CB01	10 วัน	เส้นใยบางเรียบ ติดกับ	สีส้ม	รูปทรงกระบอก หัวท้ายมน	3.5-6.5 x 15-21
	CB02	14 วัน	จานอาหารเลี้ยงเชื้อ		ไม่มีผนังกัน	
แก้วมังกร	CD01	14 วัน	เส้นใยหนาฟู	สีขาวอมน้ำตาล	รูปทรงกระบอก หัวท้ายโค้งมน	3.2-4.5 x 11.0-16.0
	CD02	16 วัน	เส้นใยหนาฟู	สีขาวอมส้ม	รูปทรงจันทรีเสี้ยว มีผนังกัน	3.5-5.5 x 16.0-30.5
	CD03	18 วัน	เส้นใยหนาฟู	สีขาวอมส้ม	รูปทรงจันทรีเสี้ยว มีผนังกัน	3.0-4.5 x 17.0-35.5
ฝรั่ง	CG01	7 วัน	เส้นใยหนาเรียบ	สีขาวอมเทา	ทรงกลม-รี มีผนังกัน	6.5-8.0 x 18.3-43.5
	CG02	10 วัน	เส้นใยหนาเรียบ	สีขาวอมเทา	ทรงกลม-รี มีผนังกัน	
	CG03	7 วัน	เส้นใยหนาเรียบ ขึ้นซ้อนกันเป็นชั้น ๆ	สีขาวอมเทา	ทรงกลม ค่อนข้างยาว ทรงรี มีผนังกัน	3.4 x 9.5

ตาราง 4 สัมภาษณ์ของเข็วราทั้งหมด 11 ไอโซเลต (ต่อ)

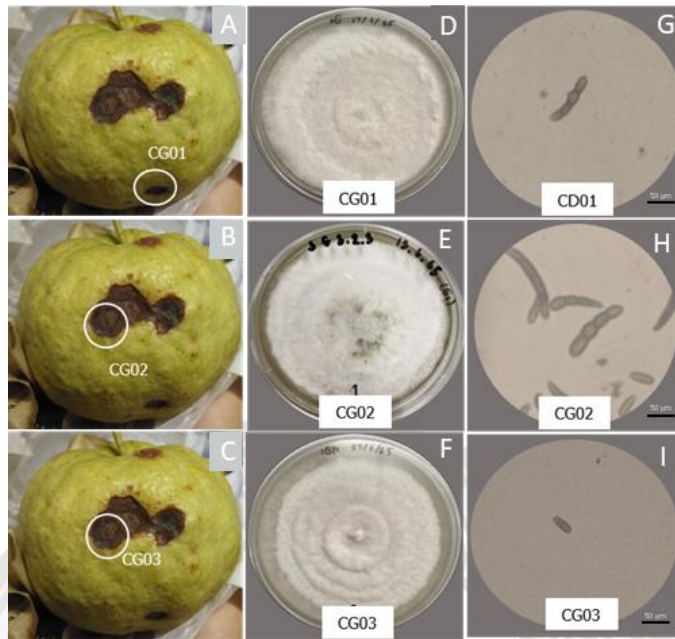
ตัวอย่าง	ไอโซเลต	อายุของเข็วรา	ลักษณะของเส้นใย	สีของเส้นใย	ลักษณะของนิติเตีย	ขนาดของโคโคนิเตีย (ไมโครเมตร)
มะม่วง	CM01	10 วัน	เส้นใยบางฟู	สีขาวอมเทา	รูปทรงกระบอกปลายเรียวเล็ก หัวท้ายโค้งมน ไม่มีผนังกัน	3.6-7.5 x 10.3-19.5
	CM02	7 วัน	เส้นใยฟูและหนา	สีขาว	รูปทรงกระบอกปลายเรียวเล็ก หัวท้ายโค้งมน ไม่มีผนังกัน	
	CM03	14 วัน	เส้นใยฟูและหนา	สีดำ	รูปทรงกระบอกปลายเรียวเล็ก หัวท้ายโค้งมน ไม่มีผนังกัน	



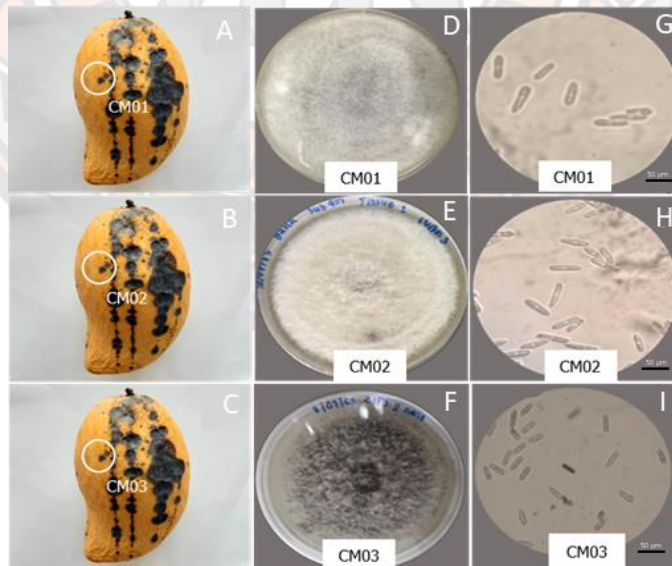
ภาพ 45 ลักษณะรอยโรคและลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราจากตัวอย่างกล้วย ซึ่ง (A) CB01, (B) CB02, (C และ D) ลักษณะเส้นใยของเชื้อราบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA และ (E และ F) ลักษณะโคนินเดีย



ภาพ 46 ลักษณะรอยโรคและลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราจากตัวอย่างแก้วมังกร ซึ่ง (A) CD01, (B) CD02, (C) CD03, (D, E และ F) ลักษณะเส้นใยของเชื้อราบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA และ (G, H และ I) ลักษณะโคนินเดีย



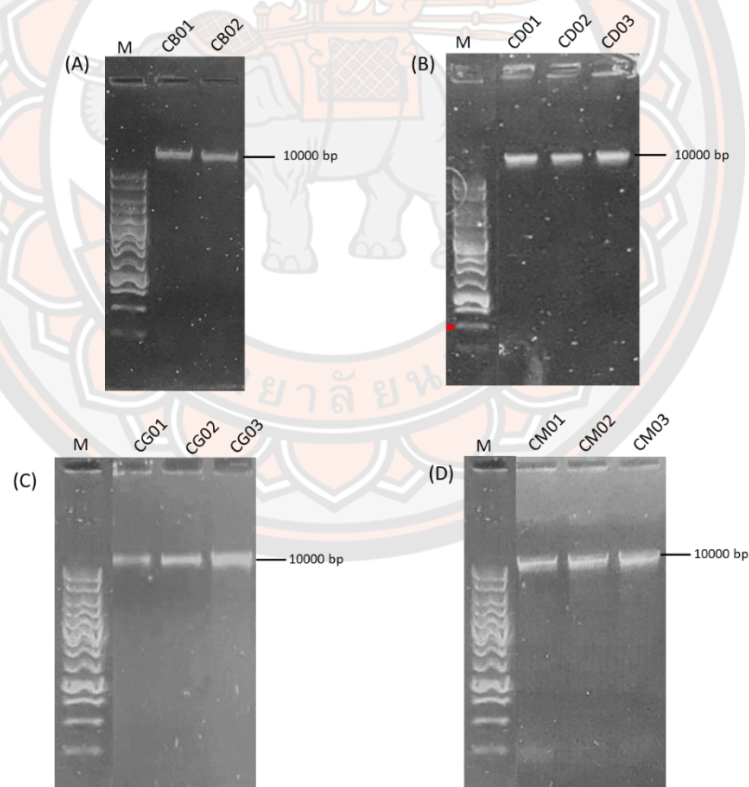
ภาพ 47 ลักษณะรอยโรคและลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราจากตัวอย่างฝรั่ง ซึ่ง (A) CG01, (B) CG02, (C) CG03, (D, E และ F) ลักษณะเส้นใยของเชื้อราบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA และ (G, H และ F) ลักษณะโคนิเดีย



ภาพ 48 ลักษณะรอยโรคและลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราจากตัวอย่างมะม่วง ซึ่ง (A) CM01, (B) CM02, (C) CM03, (D, E และ F) ลักษณะเส้นใยของเชื้อราบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA และ (G, H และ F) ลักษณะโคนิเดีย

การสกัดดีเอ็นเอและการตรวจสอบคุณภาพ

เมื่อนำเชื้อราทั้ง 11 ไอโซเลต ที่แยกได้จากรอยโรคแอนแทรกโนสบนผลไม้ 4 ชนิด มาสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี CTAB ที่ดัดแปลงมาจากวิธีสกัดดีเอ็นเอเชื้อราของ Ferdous et al. (2012) จากนั้นนำดีเอ็นเอไปตรวจสอบด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส บนอะกาโรสเจลที่ความเข้มข้น 1% พบว่าในทุกไอโซเลตปรากฏแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดมากกว่า 10,000 bp (ภาพ 49) จากนั้นทำการตรวจสอบคุณภาพและปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้ด้วยเครื่อง Nanodrop spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร พบว่าตัวอย่างดีเอ็นเอของไอโซเลต CM03 (*C. asianum*) มีความเข้มข้นของดีเอ็นเอสูงสุดที่ประมาณ 865.60 นาโนกรัม/ไมโครลิตร และตัวอย่างไอโซเลต CB01 (*C. musae*) ซึ่งความเข้มข้นดีเอ็นเอต่ำสุดอยู่ที่ประมาณ 6.80 นาโนกรัม/ไมโครลิตร นอกจากนี้ค่าอัตราส่วนการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 มีค่าประมาณ 1.78-2.03 (ตาราง 5)



ภาพ 49 ผลการสกัดดีเอ็นเอของเชื้อราทั้ง 11 ไอโซเลต จากรอยโรคแอนแทรกโนสบนผลไม้ 4 ชนิด โดย (A) กล้าย, (B) แก้วมังกร, (C) ฝรั่ง, (D) มะม่วง และ M คือ 1 kb DNA ladder (Thermo Scientific, USA)

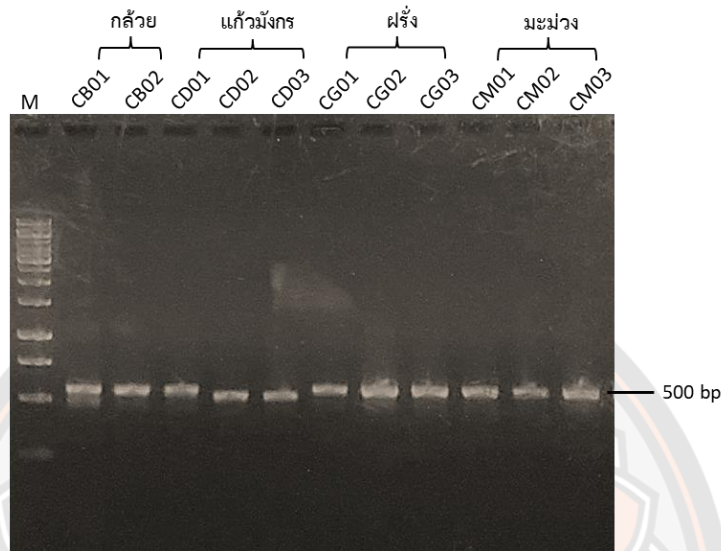
ตาราง 5 ปริมาณความเข้มข้นและค่าการดูดกลืนแสงของดีเอ็นเอ

ตัวอย่าง	ไอโซเลต	260	280	260/280	ความเข้มข้น (ng/μl)
กล้วย	CB01	1.38	0.72	1.90	6.80
	CB02	2.06	1.10	1.87	103.22
มะม่วง	CD01	7.76	4.02	1.93	388.10
	CD02	10.54	5.58	1.89	527.10
	CD03	12.60	6.96	1.81	634.10
แก้วมังกร	CG01	1.37	0.73	1.88	568.25
	CG02	6.05	3.29	1.84	302.30
	CG03	4.65	2.61	1.78	232.30
ฝรั่ง	CM01	13.08	6.51	2.01	653.80
	CM02	14.78	7.43	1.99	739.18
	CM03	17.31	8.53	2.03	865.60

การจำแนกเชื้อราโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ Internal Transcribed space (ITS)

จากการศึกษาเชื้อราทั้ง 11 ไอโซเลต โดยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ ITS1-5.8S rDNA-ITS2 พบว่าชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้มีขนาดประมาณ 500 คู่เบส (ภาพ 50) และเมื่อนำไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์เปรียบเทียบกับฐานข้อมูลใน NCBI พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อราจากตัวอย่างผลกล้วย (CB01 และ CB02) มีเส้นใยสีขาวอมส้ม และโคนิเดียเป็นรูปทรงกระบอกหัวท้ายมน ไม่มีผนังกันนั้น มีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกับลำดับเบสของ *C. musae* และลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อราจากตัวอย่างผลแก้วมังกร (CD01) ที่มีเส้นใยสีขาวอมน้ำตาล และโคนิเดียเป็นรูปทรงกระบอกหัวท้ายมน ไม่มีตรงผนังกัน ตรงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *C. fructicola* ขณะที่ตัวอย่าง (CD02 และ CD03) มีเส้นใยสีขาวอมส้ม และโคนิเดียเป็นรูปพระจันทร์เสี้ยว มีผนังกัน ตรงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *F. incarnatum* และลำดับเบสของเชื้อราจากตัวอย่างผลฝรั่ง (CG01, CG02 และ CG03) ที่มีเส้นใยสีขาวอมดำ และโคนิเดียเป็นรูปทรงรีมีผนังกันเป็นชั้นๆ ตรงกับลำดับเบสของ *P. sydowina* และลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อราจากตัวอย่างผลมะม่วง (CM01 และ CM02) ที่มีเส้นใยสีขาวอมเทา และเส้นใยสีดำในตัวอย่างผลมะม่วง (CM03) ซึ่งมีโคนิเดียเป็นรูปทรงกระบอกหัวท้ายมน ไม่มีผนังกัน

ตรงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *C. asianum* โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อราทั้งหมดมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนที่ 100% ในทุกตัวอย่าง (ตาราง 6)



ภาพ 50 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ ITS ของเชื้อราทั้ง 11 ไอโซเลต โดย M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1Kb DNA ladder (Thermo Scientific, USA)

ตาราง 6 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ของเชื้อราทั้ง 11 ไอโซเลตใน NCBI

ตัวอย่าง	ไอโซเลต	ชนิดของเชื้อราใน NCBI	Similar Identity	Accession no.
กล้วย	CB01	<i>Colletotrichum masae</i>	100%	JN943077.1
	CB02	<i>Colletotrichum masae</i>	100%	MH863549.1
แก้วมังกร	CD01	<i>Colletotrichum fructicola</i>	100%	MT470539.1
	CD02	<i>Fusarium incarnatum</i>	100%	MT563420.1
	CD03	<i>Fusarium incarnatum</i>	100%	MT560219.1

ตาราง 6 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ของเชื้อราทั้ง 11 ไอโซเลตใน NCBI (ต่อ)

ตัวอย่าง	ไอโซเลต	ชนิดของเชื้อราใน NCBI	Similar Identity	Accession no.
ฝรั่ง	CG01	<i>Pestalotiopsis sydowina</i>	100%	MN856236.1
	CG02	<i>Pestalotiopsis sydowina</i>	100%	MW411584.1
	CG03	<i>Pestalotiopsis sydowina</i>	100%	MW411584.1
มะม่วง	CM01	<i>Colletotrichum asianum</i>	100%	MN272368.1
	CM02	<i>Colletotrichum asianum</i>	100%	KC820803.1
	CM03	<i>Colletotrichum asianum</i>	100%	MT012107.1

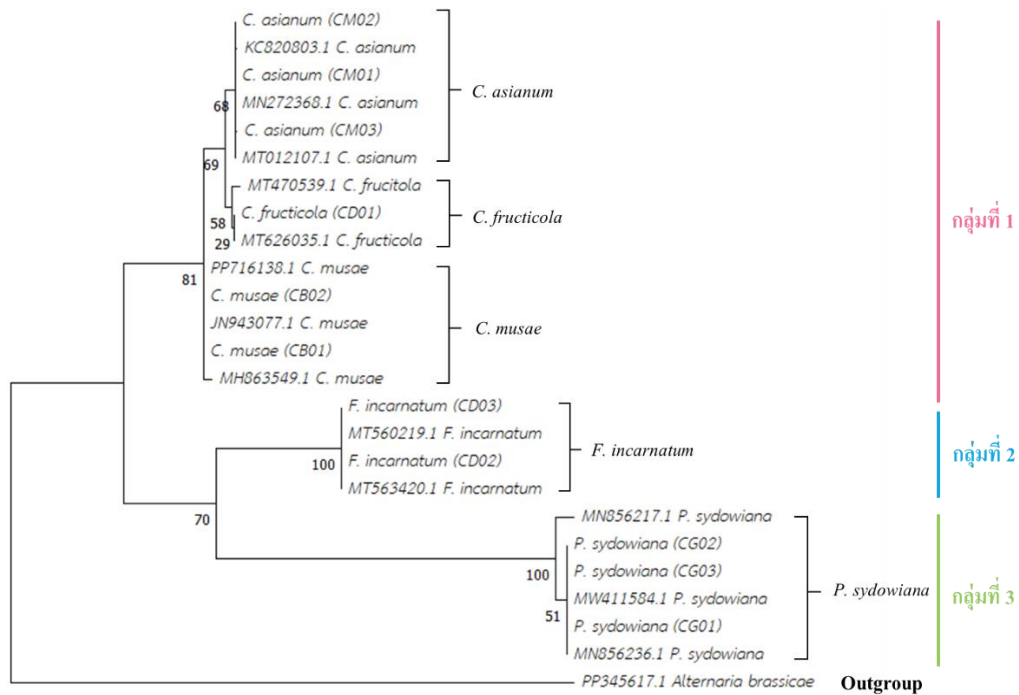
การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อราทั้ง 11 ไอโซเลต โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS

จากการวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อราทั้ง 11 ไอโซเลตที่แยกได้จากผลกล้วย แก้วมังกร ฝรั่ง และมะม่วง โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ด้วยวิธี Maximum

กลุ่มที่ 1 สามารถแบ่งออกเป็น 3 กลุ่มย่อย ประกอบด้วยกลุ่มย่อยที่ 1.1 คือ *C. asianum* ซึ่งเชื้อราที่แยกได้จากผลมะม่วง 3 ไอโซเลต ได้แก่ CM01, CM02 และ CM03 ถูกจัดอยู่ในกลุ่ม *C. asianum* ซึ่งมีค่า Bootstrap ที่ 68% ในขณะกลุ่มย่อยที่ 1.2 คือ *C. fructicola* โดยเชื้อราที่แยกได้จากผลแก้วมังกร 1 ไอโซเลต จากทั้งหมด 3 ไอโซเลต คือ CD01 ถูกจัดอยู่ในกลุ่ม *C. fructicola* โดยมีค่า Bootstrap ที่ 58% และกลุ่มย่อยที่ 1.3 คือ *C. musae* ซึ่งเชื้อราที่แยกได้จากผลกล้วย 2 ไอโซเลต ได้แก่ CM01 และ CB02 ถูกจัดอยู่ในกลุ่ม *C. musae* ซึ่งมีค่า Bootstrap ที่ 81%

กลุ่มที่ 2 คือ *F. incarnatum* ซึ่งเชื้อราที่แยกได้จากผลแก้วมังกรอีก 2 ไอโซเลต ได้แก่ CD02 และ CD03 ถูกจัดอยู่ในกลุ่ม *F. incarnatum* ซึ่งมีค่า Bootstrap ที่ 100%

กลุ่มที่ 3 คือ *P. sydowiana* ซึ่งเชื้อราที่แยกได้จากผลฝรั่ง 3 ไอโซเลต ได้แก่ CG01, CG02 และ CG03 ถูกจัดอยู่ในกลุ่ม *P. sydowiana* โดยมีค่า Bootstrap ที่ 51% (ภาพ 51)

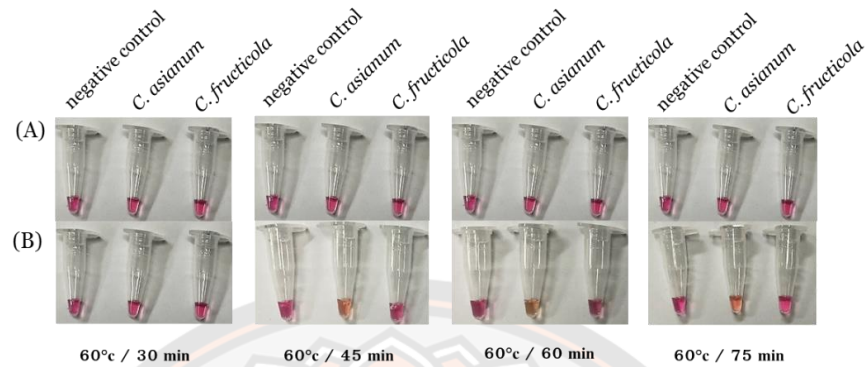


ภาพ 51 Phylogenetic tree ที่ได้จากการหาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน ITS โดยใช้วิธี Maximum Likelihood

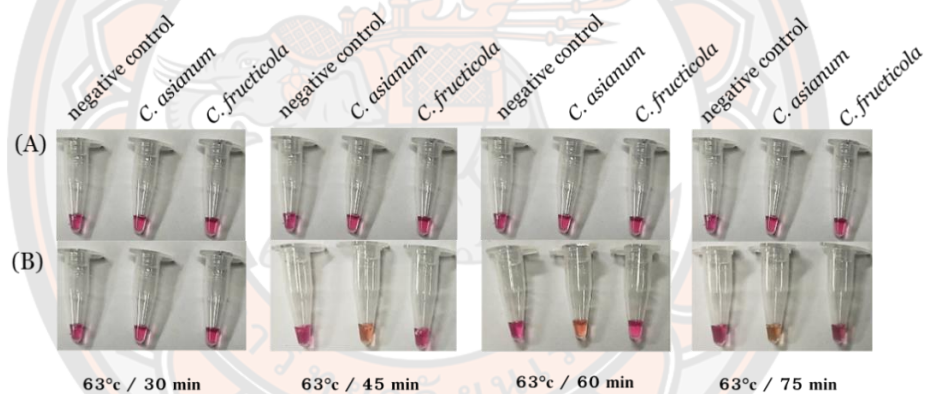
การหาอุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยาแลมบ์

จากการกำหนดหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยาแลมบ์ของยีน CHS-1 โดยใช้เชื้อรา *C. asianum*, *C. fructicola* และน้ำ molecular grade ซึ่งเป็นตัวควบคุมเชิงลบมาใช้ในการทดสอบ โดยทำการบ่มด้วยเครื่อง Thermal Cycle ที่อุณหภูมิ 60, 63 และ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30, 45, 60 และ 75 นาที แล้วสังเกตดูการเปลี่ยนสีของสารละลายในหลอดทดลอง พบว่าสีของสารละลายในหลอดทดลองเกิดการเปลี่ยนแปลงจากสีชมพูเปลี่ยนเป็นสีส้มในตัวอย่างของเชื้อรา *C. asianum* หลังจากทำการบ่มที่อุณหภูมิ 60, 63, และ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45, 60 และ 75 นาที แต่ไม่พบการเปลี่ยนสีของสารละลายในหลอดทดลองหลังจากทำการบ่มในเวลา 30 นาที ของทุกอุณหภูมิ นอกจากนี้ยังไม่พบการเปลี่ยนสีของสารละลายในหลอดทดลองที่มีตัวอย่างของเชื้อรา *C. fructicola* และตัวควบคุมเชิงลบ (ภาพ 52-54) จากนั้นทำการยืนยันผลการเกิดปฏิกิริยาแลมบ์ด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส พบการเกิดแถบแบนดีเอ็นเอหลายขนาดบนอะกาโรสเจล 2% ในหลอดตัวอย่างของเชื้อรา *C. asianum* หลังจากบ่มที่อุณหภูมิ 60, 63 และ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45, 60 และ 75 นาที แต่ไม่พบการเกิดแถบแบนดีเอ็นเอที่บ่มเป็นเวลา 30 นาที นอกจากนี้ยังไม่พบแถบแบนดีเอ็นเอของตัวอย่างเชื้อรา *C. fructicola* และตัวควบคุมเชิงลบ (ภาพ 55-57) เนื่องจากแถบแบนดีเอ็นเอของปฏิกิริยาแลมบ์ที่บ่มด้วยอุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส มีความคมชัดมากที่สุดเมื่อ

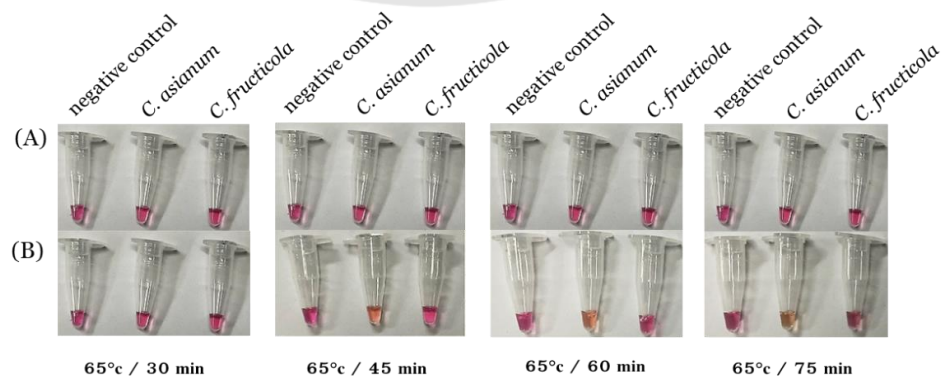
เทียบกับแถบแบนดีเอ็นเออูณหภูมิอื่น ๆ (ภาพ 57) ดังนั้นจึงเลือกให้เป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับใช้ในการทดสอบประสิทธิภาพความจำเพาะ และความไวของไพรเมอร์ CSH-1 ในลำดับต่อไป



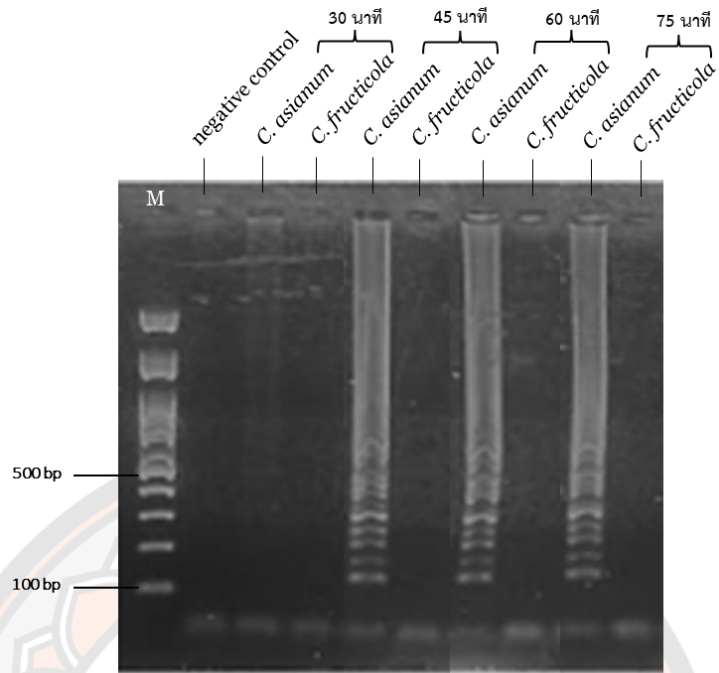
ภาพ 52 ผลการเกิดปฏิกิริยาแลมป์หลังจากบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30-75 นาที (A) ผลก่อนเกิดปฏิกิริยาแลมป์ (B) ผลหลังเกิดปฏิกิริยาแลมป์



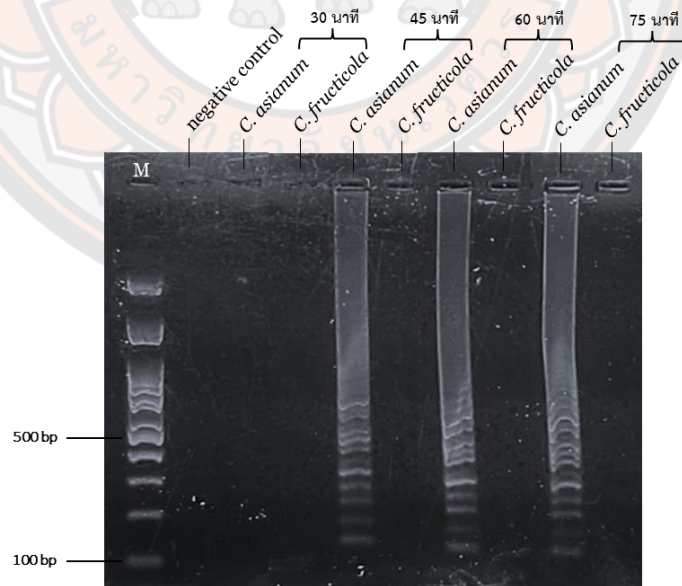
ภาพ 53 ผลการเกิดปฏิกิริยาแลมป์หลังจากบ่มที่อุณหภูมิ 63 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30-75 นาที (A) ผลก่อนเกิดปฏิกิริยาแลมป์ (B) ผลหลังเกิดปฏิกิริยาแลมป์



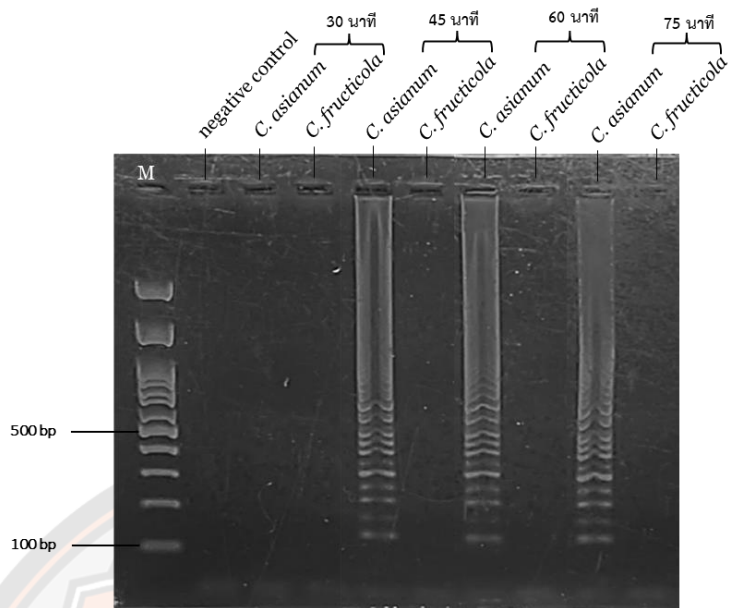
ภาพ 54 ผลการเกิดปฏิกิริยาแลมป์หลังจากบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30-75 นาที (A) ผลก่อนเกิดปฏิกิริยาแลมป์ (B) ผลหลังเกิดปฏิกิริยาแลมป์



ภาพ 55 ผลอิเล็กทรอนิกส์แลมพ์ของปฏิบัติการที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30-75 นาที บนอะกาโรสเจล 2% ซึ่งแถบ M คือดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA ladder (Bio-helix, Taiwan)



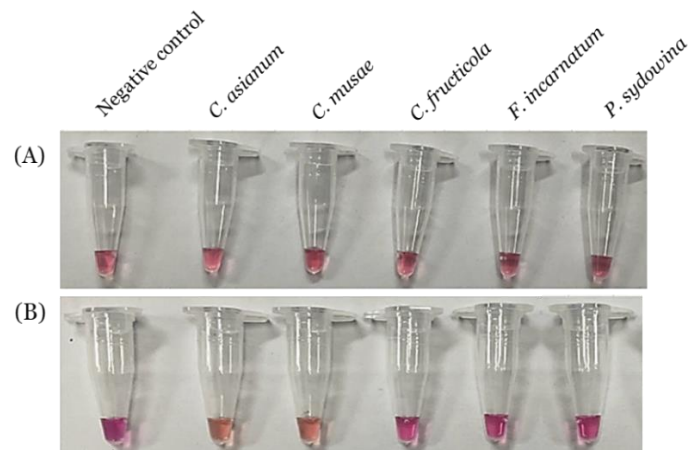
ภาพ 56 ผลอิเล็กทรอนิกส์ของปฏิบัติการแลมพ์ที่อุณหภูมิ 63 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30-75 นาที บนอะกาโรสเจล 2% ซึ่งแถบ M คือดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA ladder (Bio-helix, Taiwan)



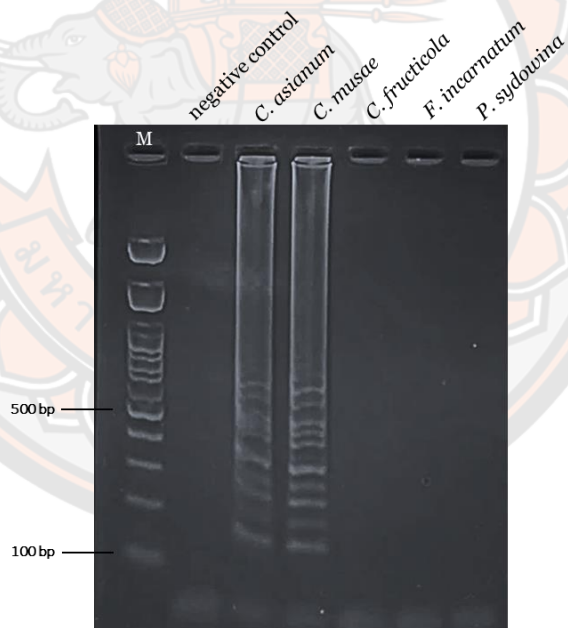
ภาพ 57 ผลอิเล็กทรอนิกส์แลมป์ของปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30-75 นาที บนอะกาโรสเจล 2% ซึ่งแถบ M คือดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA ladder (Bio-helix, Taiwan)

การทดสอบประสิทธิภาพความจำเพาะของไพรเมอร์ CHS-1 ด้วยเทคนิคแลมป์

จากการทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ CHS-1 ในการตรวจหาเชื้อรา *C. asiaticum* ด้วยเทคนิคแลมป์ โดยทำการบ่มด้วยเครื่อง Thermal Cycle ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 นาที แล้วสังเกตดูการเปลี่ยนสีของสารละลายในหลอดทดลอง พบว่ามีการเปลี่ยนสีของสารละลายจากสีชมพูเปลี่ยนเป็นสีส้มในหลอดทดลองที่มีตัวอย่างของเชื้อรา *C. asiaticum* และ *C. musae* ซึ่งให้ผลเป็นปฏิกิริยาเชิงบวก แต่ไม่พบการเปลี่ยนสีของสารละลายในหลอดทดลองที่มีตัวอย่างของเชื้อรา *C. fructicola* และตัวอย่างของเชื้อราสกุลอื่นอีก 2 ชนิดได้แก่ *F. incarnatum* และ *P. sydowiana* และตัวควบคุมเชิงลบ (ภาพ 58) จากนั้นทำการยืนยันผลการเกิดปฏิกิริยาแลมป์ด้วยวิธีอิเล็กทรอนิกส์ ซึ่งพบการเกิดแถบแบนดีเอ็นเอหลายขนาดบนอะกาโรสเจล 2% ในตัวอย่างของเชื้อรา *C. asiaticum* และ *C. musae* แต่ไม่พบการเกิดแถบแบนดีเอ็นเอของตัวอย่างของเชื้อรา *C. fructicola*, *F. incarnatum* และ *P. sydowiana* รวมถึงตัวควบคุมเชิงลบ (ภาพ 59)



ภาพ 58 ผลการทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ CHS-1 ด้วยเทคนิคแลมป์ในหลอดทดลอง
 (A) ผลก่อนเกิดปฏิกิริยาแลมป์ (B) ผลหลังเกิดปฏิกิริยาแลมป์



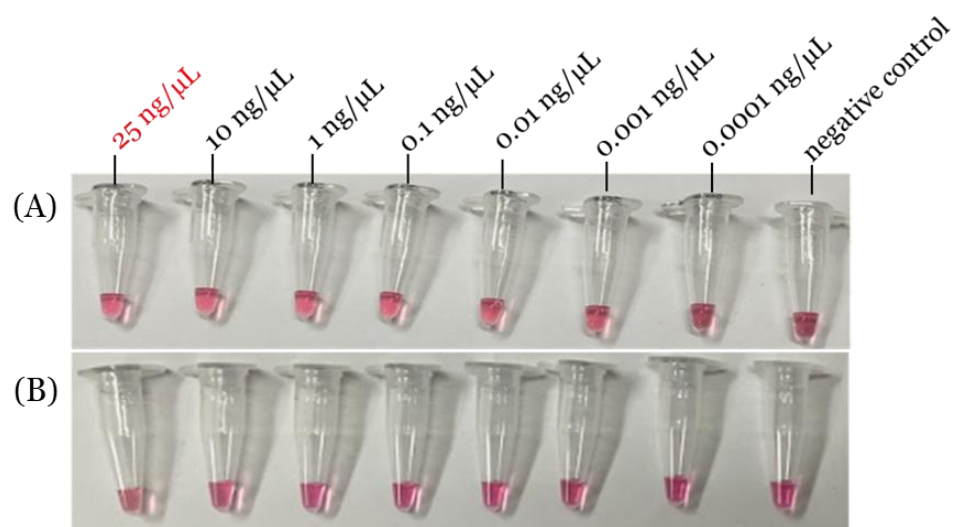
ภาพ 59 ผลอิเล็กทรอนิกส์ของการตรวจสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ CHS-1 ด้วยเทคนิคแลมป์ บนอะกาโรสเจล 2% ซึ่งแถบ M คือดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA ladder (Bio-helix, Taiwan)

การทดสอบประสิทธิภาพความไวของไพรเมอร์ CHS-1 ด้วยเทคนิคแลมป์ เปรียบเทียบกับเทคนิคพีซีอาร์

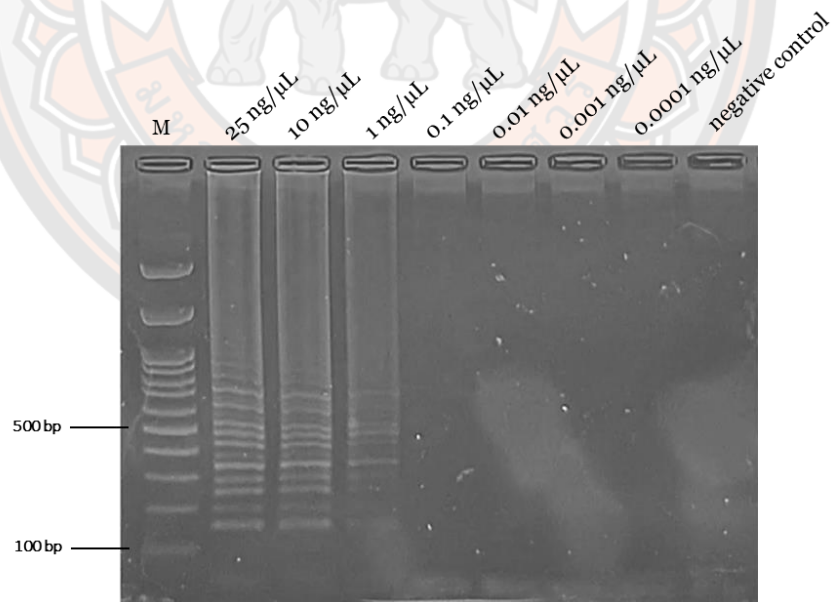
จากการทดสอบความไวของไพรเมอร์ CHS-1 ด้วยเทคนิคแลมป์ เพื่อหาความเข้มข้นต่ำสุดในการตรวจหาเชื้อรา *C. asianum* และ *C. musae* โดยทำการเจือจางความเข้มข้นดีเอ็นเอของเชื้อราทั้งหมด 7 ความเข้มข้นดังนี้ 25, 10, 1, 0.1, 0.01, 0.001 และ 0.0001 นาโนกรัม/ไมโครลิตร แล้วบ่มด้วยเครื่อง Thermal Cycle ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 นาที จากนั้นสังเกตผลการเปลี่ยนสีของสารละลายในหลอดทดลอง พบว่าหลอดทดลองที่มีตัวอย่างของเชื้อรา *C. asianum* ที่ความเข้มข้นดีเอ็นเอ 25, 10 และ 1 นาโนกรัม/ไมโครลิตร เกิดการเปลี่ยนสีของสารละลายจากสีชมพูเปลี่ยนเป็นสีส้ม (ภาพ 60) ในขณะที่หลอดทดลองที่มีตัวอย่างของเชื้อรา *C. musae* พบการเปลี่ยนสีของสารละลายที่ความเข้มข้นดีเอ็นเอ 25 นาโนกรัม/ไมโครลิตร (ภาพ 61) จากนั้นทำการยืนยันผลของปฏิกิริยาแลมป์ด้วยอิเล็กโทรโฟรีซิส ซึ่งพบการเกิดแถบแบนหลายขนาดบนอะกาโรสเจล 2% ในตัวอย่างของเชื้อรา *C. asianum* ที่ความเข้มข้นดีเอ็นเอ 25, 10 และ 1 นาโนกรัม/ไมโครลิตร (ภาพ 62) ในขณะที่ตัวอย่างเชื้อรา *C. musae* พบการเกิดแถบแบนดีเอ็นเอหลายขนาดที่ความเข้มข้นดีเอ็นเอ 25 นาโนกรัม/ไมโครลิตร (ภาพ 63) ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าการทดสอบความไวของไพรเมอร์ CHS-1 ด้วยเทคนิคแลมป์สามารถตรวจพบเชื้อรา *C. asianum* ได้ที่ความเข้มข้นดีเอ็นเอต่ำสุด 1 นาโนกรัม/ไมโครลิตร ในขณะที่เชื้อรา *C. musae* สามารถตรวจพบได้ที่ความเข้มข้นดีเอ็นเอต่ำสุด 25 นาโนกรัม/ไมโครลิตร และเมื่อทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อราด้วยเทคนิคพีซีอาร์ พบว่าเทคนิคพีซีอาร์สามารถตรวจพบเชื้อรา *C. asianum* และ *C. musae* ได้ความเข้มข้นดีเอ็นเอต่ำสุดที่ 10 นาโนกรัม/ไมโครลิตร (ภาพ 64-65)



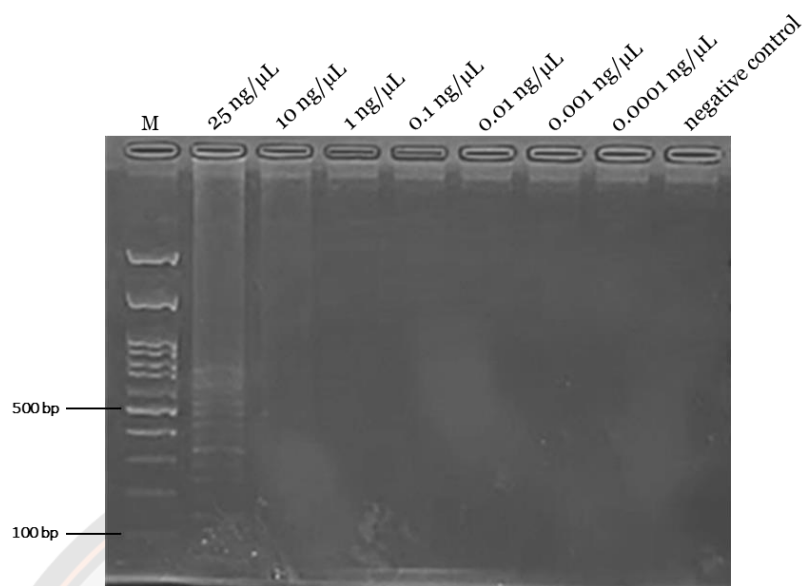
ภาพ 60 ผลการทดสอบความไวของไพรเมอร์ CHS-1 ในการตรวจหาเชื้อรา *C. asianum* ด้วยเทคนิคแลมป์ในหลอดทดลอง (A) ผลก่อนเกิดปฏิกิริยาแลมป์ (B) ผลหลังเกิดปฏิกิริยาแลมป์



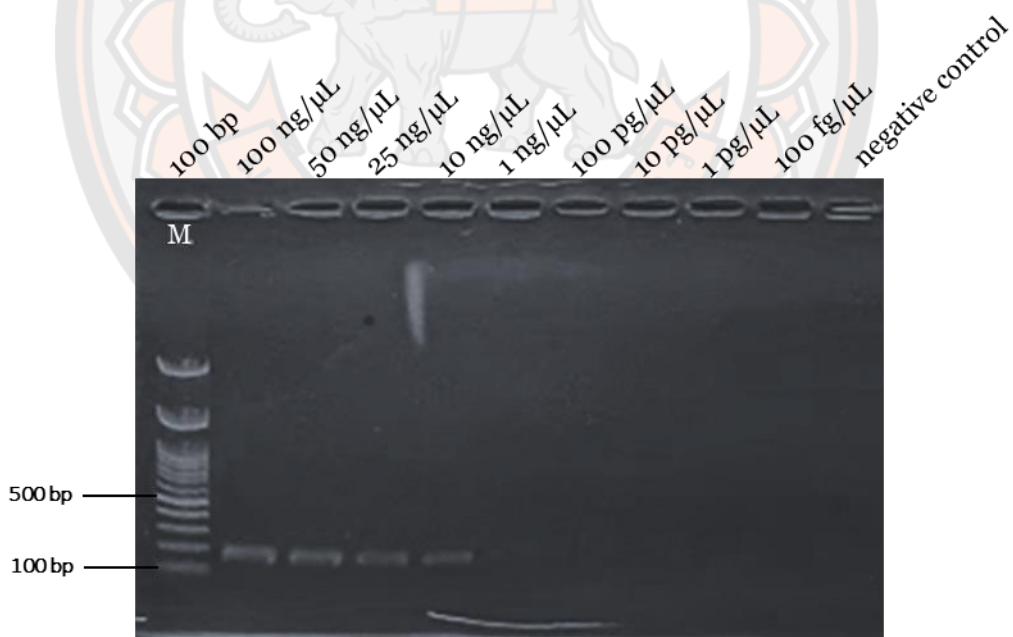
ภาพ 61 ผลการทดสอบความไวของไพร์เมอร์ CHS-1 ในการตรวจหาเชื้อรา *C. musae* ด้วยเทคนิคแลมป์ในหลอดทดลอง (A) ผลก่อนเกิดปฏิกิริยาแลมป์ (B) ผลหลังเกิดปฏิกิริยาแลมป์



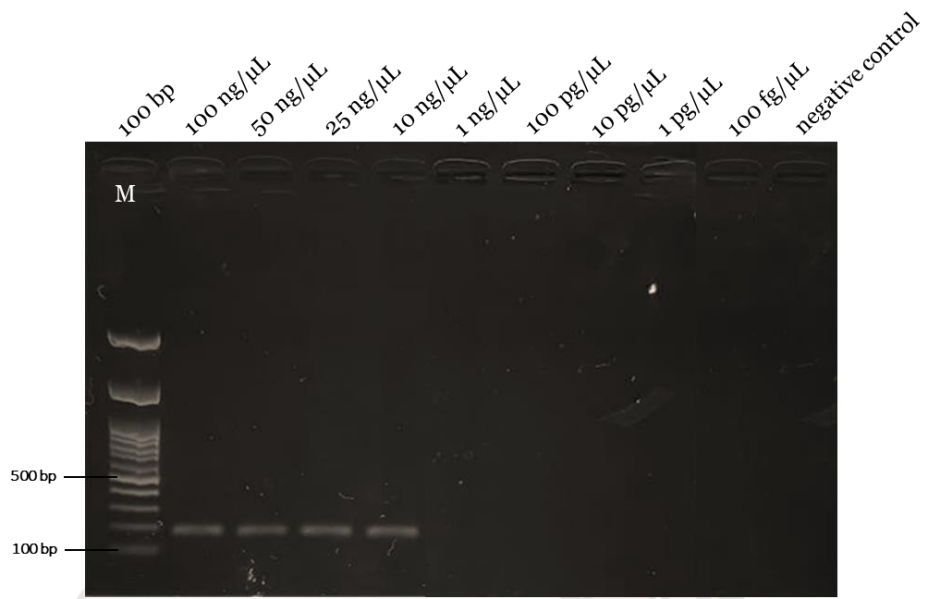
ภาพ 62 ผลอิเล็กทรอนิกส์ของการตรวจสอบความจำไวของไพร์เมอร์ CHS-1 ในการตรวจหาเชื้อรา *C. asianum* ด้วยเทคนิคแลมป์ บนอะกาโรสเจล 2% ซึ่งแถบ M คือดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA ladder (Bio-helix, Taiwan)



ภาพ 63 ผลอิเล็กทรอนิกส์ของการตรวจสอบความจำไวของไพรเมอร์ CHS-1 ในการตรวจหาเชื้อรา *C. musae* ด้วยเทคนิคแลมป์ บนอะกาโรสเจล 2% ซึ่งแถบ M คือดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA ladder (Bio-helix, Taiwan)



ภาพ 64 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ของเชื้อรา *C. asianum* ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ ซึ่งแถบ M คือดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA ladder (Bio-helix, Taiwan)



ภาพ 65 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ของเชื้อรา *C. musae* ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ ซึ่งแถบ M คือดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA ladder (Bio-helix, Taiwan)

บทที่ 5

อภิปรายผลการวิจัย

การจำแนกเชื้อราโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

จากการศึกษาจำแนกชนิดของเชื้อรา 11 ไอโซเลต จากผลไม้ 4 ชนิดได้แก่ กล้วย (CB01 และ C02) แก้วมังกร (CD01, CD02 และ CD03) ฝรั่ง (CG01, CG02 และ CG03) และมะม่วง (CM01, CM03 และ CM03) พบว่าสามารถใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเส้นใย สีของเส้นใย และลักษณะรูปร่างของโคนิเดียจัดจำแนกเชื้อราเหล่านี้ได้อย่างคร่าว ๆ โดยเชื้อราในสกุล *Colletotrichum* จะมีลักษณะเส้นใยหนาฟู และมีสีขาวยในช่วงแรก เมื่ออายุของเชื้อรามากขึ้น หลังจากนั้นจะค่อย ๆ เปลี่ยนเป็นสีที่เข้มขึ้นจนถึงสีดำ ซึ่งสีของเส้นใยของเชื้อราในสกุลนี้จะแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อ (วิจัย รักรักษาศาสตร์, 2546) และโคนิเดียมีรูปร่างเป็นทรงกระบอกหัวท้ายมน และโคนิเดียไม่มีผนังกัน (Than et al., 2008) ส่วนเชื้อราในสกุล *Fusarium* จะมีลักษณะเส้นใยหนาฟู และมีสีขาวยในระยะแรก หลังจากนั้นจะค่อย ๆ เปลี่ยนเป็นสีส้มอ่อนเมื่ออายุของเชื้อรามากขึ้น ซึ่งคล้ายกับเชื้อราในสกุล *Colletotrichum* แต่อัตราการเจริญเติบโตเชื้อราไวกว่า (Sanna et al., 2023; Zakaria, 2021) และมีรูปร่างโคนิเดียที่แตกต่างกันคือ เป็นรูปพระจันทร์เสี้ยว และโคนิเดียมีผนังกัน (Zemankao & Lebeda, 2001) ส่วนกลุ่มเชื้อราที่มีเส้นใยสีขาว และลักษณะเส้นใยหยาบเรียบ เมื่ออายุของเชื้อรามากขึ้นจะค่อย ๆ เปลี่ยนเป็นสีเทา-ดำ และด้วยรูปร่างของโคนิเดียไม่แน่นอนจึงยังไม่สามารถระบุชนิดได้

ดังนั้นจากข้อมูลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าการใช้ลักษณะของเส้นใย สีของเส้นใย และรูปร่างของโคนิเดียนั้นยังไม่เพียงพอสำหรับในการจำแนกชนิดของเชื้อราได้ ซึ่งรายงานของ Sutton, (1980) ได้ทำการจัดจำแนกเชื้อราสกุล *Colletotrichum* ออกเป็น 39 ชนิด ได้โดยใช้ลักษณะรูปร่างของ acervulus, conidiophore, conidia, appressorium และการสร้าง sterile hypha (Sutton, 1980) เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Zemankoa & Leneda, (2001) ได้จัดจำแนกเชื้อราสกุล *Fusarium* โดยอาศัยลักษณะสัณฐานวิทยาร่วมกับสูตรอาหารที่ต่างกันจึงสามารถจำแนกถึงระดับชนิดได้ จากผลการศึกษางานวิจัยก่อนหน้านี้แสดงให้เห็นว่าในการจัดจำแนกชนิดของเชื้อราได้นั้น นอกจากการใช้ข้อมูลลักษณะสัณฐานวิทยาแล้ว จำเป็นต้องอาศัยข้อมูลด้านอื่น ๆ เข้ามาช่วยด้วยเช่น อาหารเลี้ยงเชื้อและความจำเพาะของพืชอาศัย (Ujat et al., 2021; Zemankao & Lebeda, 2001) จึงจะสามารถจัดจำแนกและระบุถึงระดับชนิดของเชื้อราได้

การจำแนกเชื้อราโดยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ ITS ด้วยเทคนิคพีซีอาร์

จากการนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS มาใช้ในการระบุชนิดของเชื้อราทั้ง 11 ไอโซเลต พบว่าสามารถจำแนกเชื้อราสกุล *Colletotrichum* ออกได้ 3 ชนิดคือ *C. musae* (CB01 และ CB02) *C. fructicola* (CD01) และ *C. asianum* (CM01, CM02 และ CM03) และเชื้อราอีก 2 สกุลคือ *F. incarnatum* (CD02 และ CD03) และ *P. sydowiana* (CG01, CG02 และ G03) ซึ่งลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ถือว่าเป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีผู้นิยมศึกษากันมากในเชื้อรา เนื่องจากดีเอ็นเอในนิวเคลียส และเป็นบริเวณที่ไม่ใช่ยีน ทำให้มีความผันแปรที่ค่อนข้างมาก จึงสามารถนำมาใช้ในการจำแนกระหว่างสายพันธุ์หรือภายในสายพันธุ์เดียวกันได้ (Sharma et al., 2017) และงานวิจัยของ Zakaria et al., (2015) ได้ทำการจำแนกเชื้อรา *Colletotrichum* บนผลมะม่วงได้ทั้งหมด 35 ไอโซเลต จากนั้นระบุชนิดด้วยลำดับเบสบริเวณ ITS พบว่าสามารถจำแนกเชื้อราสกุลนี้ได้ 2 ชนิดคือ *C. gloeosporioides* และ *C. asianum* นอกจากนี้งานวิจัยของ Khodadadi et al., (2020) ได้การจำแนกชนิดของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. ที่ก่อโรคผลเน่าในแอปเปิ้ลด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS พบว่าสามารถจำแนกเชื้อรา *C. fioriniae* และ *C. chrysophilum* ออกจากกลุ่มสายพันธุ์ที่ซับซ้อนของเชื้อรา *C. acutatum* complex และ *C. gloeosporioides* complex จากตัวอย่างเชื้อราทั้งหมด 400 ไอโซเลต และจากการศึกษาการจำแนกและระบุชนิดของเชื้อรา *Colletotrichum* ด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS แสดงให้เห็นว่าเชื้อราในสกุลนี้มีมากกว่า 1 ชนิดสามารถก่อโรคแอนแทรคโนสในผลไม้ได้หลายชนิด (Zakaria, 2021) เช่น เชื้อรา *C. aianum* นอกจากจะก่อโรคแอนแทรคโนสในมะม่วงแล้ว ยังมีรายงานว่าก่อโรคในมะละกอ ชมพู (Li et al., 2019) ในขณะที่เชื้อรา *C. muse* จากเดิมเป็นเชื้อราที่จำเพาะกับกล้วย ซึ่งปัจจุบันมีรายงานพบการก่อโรคในมะม่วง (Phoulivong et al., 2012) และเชื้อ *C. fructicola* ยังพบก่อโรคในมะละกอ และอะโวคาโดอีกด้วย (Sharma et al., 2017)

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อราทั้ง 11 ไอโซเลต โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS

จากการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อราทั้ง 11 ไอโซเลต โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS พบว่าสามารถแบ่งเชื้อราออกเป็น 3 กลุ่มดังนี้ กลุ่มที่ 1 เป็นเชื้อราในสกุล *Colletotrichum* ซึ่งสามารถแยกได้ 3 กลุ่มย่อยดังนี้ กลุ่มย่อยที่ 1.1 คือ *C. asianum* ซึ่งตัวอย่างของเชื้อราที่แยกได้จากผลมะม่วง 3 ไอโซเลต คือ CM01, CM02 และ CM03 ถูกจัดอยู่ในกลุ่มนี้จึงระบุได้ว่าเป็นเชื้อรา *C. asianum* (Phoulivong et al., 2012; Weir et al., 2012) ในขณะที่กลุ่มย่อยที่ 1.2 คือ *C. fructicola* โดยตัวอย่างเชื้อราแยกได้จากผลแก้วมังกร 1 ไอโซเลต จากทั้งหมด 3 ไอโซเลต คือ CD01 ถูกจัดอยู่ในกลุ่มนี้จึงระบุได้ว่าเป็นเชื้อรา *C. fructicola* (Guo et al., 2014) และกลุ่ม

ย่อยที่ 1.3 คือ *C. musae* ซึ่งตัวอย่างเชื้อราที่แยกได้จากผลกล้วย 2 ไอโซเลต คือ CM01 และ CB02 ถูกจัดอยู่ในกลุ่มนี้จึงระบุได้ว่าเป็นเชื้อรา *C. musae* (Balendres et al., 2020; Kuppusamy et al., 2011)

จากศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อราในสกุล *Colletotrichum* จะเห็นได้ว่าเชื้อราทั้ง 3 ชนิดในสกุลนี้นั้นมีความใกล้ชิดกันทางพันธุกรรม ซึ่งเชื้อรา *C. asianum* มีความใกล้ชิดกับ *C. fructicola* มากที่สุด ในขณะที่งานวิจัยของ Su et al., (2011) และ Fuentes et al., (2018) ได้ศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อรา *Collectotrichum* โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS, ACT, CHS, GAPDH, และ ApMat พบว่าเชื้อรา *C. sianum* มีความใกล้ชิดกับ *C. musae* มากที่สุด เนื่องจากงานวิจัยในครั้งนี้ใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS เพียงอย่างเดียวในการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อราในสกุล *Collectotrichum* ในขณะที่การวิจัยก่อนหน้านี้ใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณหลายตำแหน่ง ดังนั้นการใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS เพียงอย่างเดียวยังไม่พอสำหรับวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อรานี้ ซึ่งควรที่จะใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์หลาย ๆ ตำแหน่งเข้าร่วมในการวิเคราะห์ด้วย ซึ่งจะทำให้ผลการศึกษามีความแม่นยำมากขึ้น (Raja et al., 2017) กลุ่มที่ 2 คือ *F. incarnatum* ซึ่งตัวอย่างเชื้อราที่แยกได้จากผลแก้วมังกรอีก 2 ไอโซเลต คือ CD02 และ CD03 ถูกจัดอยู่ในกลุ่มนี้จึงระบุได้ว่าเป็นเชื้อรา *F. incarnatum* ซึ่งถูกรายงานว่าเป็นเชื้อราสาเหตุโรคผลเน่า และลำต้นเน่าในแก้วมังกร (Zhao & Huang, 2023) กลุ่มที่ 3 คือ *P. sydowiana* ซึ่งตัวอย่างเชื้อราที่แยกได้จากผลฝรั่ง 3 ไอโซเลต ได้แก่ CG01, CG02 และ CG03 ถูกจัดอยู่ในกลุ่มนี้จึงระบุได้ว่าเป็นเชื้อรา *P. sydowiana* ซึ่งมีรายงานว่าเป็นเชื้อราสกุลนี้ถือเป็นเชื้อก่อโรคแอนแทรคโนสในฝรั่ง (Keith et al., 2006)

การพัฒนาเทคนิคแลมป์สำหรับตรวจหาเชื้อ *C. asianum*

จากการพัฒนาประสิทธิภาพของปฏิกิริยาแลมป์ในการตรวจหาเชื้อรา *C. asianum* ผลการศึกษาพบว่าสามารถตรวจจับเชื้อราได้โดยใช้อุณหภูมิคงที่ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 นาที ซึ่งผลการศึกษาในครั้งนี้ใช้เวลาในการตรวจหาเชื้อที่เร็วกว่างานวิจัยก่อนหน้านี้ Li, (2017) ได้พัฒนาเทคนิคแลมป์ในการตรวจหาเชื้อ *C. gloeosporioides* ใน *Anoectochilus* โดยช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมในการตรวจหาเชื้อได้ที่ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที และงานวิจัยของ Wu et al., (2019) ทำการตรวจหาเชื้อ *C. gloeosporioides* ที่ก่อโรคผลเน่าในสตอร์เบอร์รี่ โดยช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมในการตรวจหาเชื้อได้ที่ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 50 นาที และผลการทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ CHS-1 พบว่ามีความจำเพาะกับเชื้อรา *C. asianum* และ *C. musae* แต่ไม่พบการตรวจจับเชื้อรา *C. fructicola* และเชื้อราทดสอบสกุลอื่น เนื่องจากมีรายงานการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อราในสกุล *Colletotrichum* พบว่าเชื้อรา *C. asianum* และ

C. musae มีความใกล้เคียงทางพันธุกรรมกันมากจึงทำให้ยากต่อการแยกเชื้อทั้งชนิดนี้ได้ (Fuentes-Aragón et al., 2018; Su et al., 2011) และผลการจำลองจับของไพรเมอร์สำหรับปฏิกิริยาแลมป์ที่ออกแบบบริเวณยีน CHS-1 บนลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อรา *C. fructicola* พบว่ามีบริเวณที่ไม่เกิดการจับกันของไพรเมอร์อยู่ถึง 2 ตำแหน่ง คือ ตำแหน่ง Forward out primer (F3) และ Backward internal primer (B1c) ซึ่งตำแหน่งดังกล่าวนี้เป็นตำแหน่งที่สำคัญในกระบวนการสังเคราะห์สายดีเอ็นเอในปฏิกิริยาแลมป์ (Notomi et al., 2000)

จากผลการทดสอบหาประสิทธิภาพความไวในการตรวจหาเชื้อรา *C. asianum* ด้วยไพรเมอร์ CHS-1 พบว่า สามารถตรวจจับได้ถึงความเข้มข้นของดีเอ็นเอต่ำสุดที่ 1 นาโนกรัม/ไมโครลิตร ในขณะที่เชื้อรา *C. musae* สามารถตรวจจับได้ถึงความเข้มข้นของดีเอ็นเอต่ำสุดที่ 25 นาโนกรัม/ไมโครลิตร ซึ่งงานวิจัยก่อนหน้านี้ Wu et al., (2019) ได้ทำการตรวจหาเชื้อ *C. gloeosporioides* G143A สายพันธุ์กลายที่ก่อโรคแอนแทรกโนสในสตอเบอร์รี่ โดยศึกษาที่บริเวณยีน Cyt b พบว่าสามารถตรวจพบเชื้อได้และความไวที่ 0.001 นาโนกรัม/ไมโครลิตร ซึ่งผลการทดสอบความไวในการตรวจจับเชื้อราที่ก่อโรคแอนแทรกโนสในการศึกษาครั้งนี้ พบว่ามีประสิทธิภาพความไวในการตรวจจับน้อยกว่างานวิจัยที่ผ่านมา เนื่องจากวิจัยก่อนหน้านี้ทำการตรวจจับเชื้อราโดยใช้บริเวณยีน Cyt b ซึ่งเป็นยีนที่อยู่ในไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอ โดยเป็นส่วนสำคัญในการขนส่งอิเล็กตรอนที่เป็นองค์ประกอบในการผลิตพลังงานแก่เซลล์ ดังนั้นจึงมักพบยีนนี้เป็นจำนวนมากในเซลล์ ทำให้มีจำนวนซ้ำดีเอ็นเอ (copy number) มาก ดังนั้นจึงสามารถตรวจจับดีเอ็นเอของเชื้อราได้ในความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่น้อย (Hebert et al., 2004; Hebert et al., 2003)

อย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพความไวกับเทคนิคพีซีอาร์พบว่าเทคนิคแลมป์สามารถตรวจจับเชื้อรา *C. asianum* ได้ไวกว่าเทคนิคพีซีอาร์ โดยที่เทคนิคพีซีอาร์สามารถตรวจจับความเข้มข้นของดีเอ็นเอต่ำสุดได้ที่ 10 นาโนกรัม/ไมโครลิตร ซึ่งจะเห็นได้ว่าเทคนิคแลมป์มีประสิทธิภาพในการตรวจจับเชื้อราได้ดีกว่าเทคนิคพีซีอาร์ถึง 10 เท่า ซึ่งสอดคล้องรายงานวิจัยของ Chandra et al. (2015) โดยเปรียบเทียบความไวในการตรวจหาเชื้อรา *C. falcatum* ที่ก่อโรคแอนแทรกโนสในอ้อย พบว่าเทคนิคแลมป์สามารถตรวจจับเชื้อราได้ที่ 0.01 นาโนกรัม/ไมโครลิตร ซึ่งมีประสิทธิภาพในการตรวจจับเชื้อราได้ดีกว่าเทคนิคพีซีอาร์ถึง 100 เท่า ดังนั้นเทคนิคแลมป์จึงมีประสิทธิภาพในการตรวจพบเชื้อราที่ก่อโรคแอนแทรกโนสในพืชได้อย่างรวดเร็ว ซึ่งช่วยให้เกิดการควบคุมโรคในผลผลิตได้อย่างมีประสิทธิภาพส่งผลให้ลดการสูญเสียผลผลิตในระหว่างเก็บเกี่ยวรวมไปถึงระหว่างการส่งออกอีกด้วย

บทที่ 6

บทสรุป

สรุปผลการวิจัย

การจำแนกเชื้อราที่ก่อให้เกิดโรคแอนแทรกโนสโดยใช้ลักษณะของเส้นใย สีของเส้นใย และรูปร่างของโคนิเดีย สามารถจำแนกเชื้อราทั้งหมดได้ 11 ไอโซเลต โดยแบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม ในขณะที่ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS สามารถจำแนกเชื้อราออกเป็น 5 ชนิด โดยกลุ่มเชื้อราที่มีลักษณะเส้นใยบางเรียบ และมีสีส้ม และลักษณะเส้นใยหนาฟู มีสีขาวอมน้ำตาล สีขาวอมเทาและสีดำ โคนิเดียเป็นรูปทรงกระบอกหัวท้ายมน และไม่มีผนังกัน คือ *C. musae*, *C. fructicola* และ *C. asianum* ในขณะที่กลุ่มเชื้อราที่มีเส้นใยสีขาวอมส้ม โคนิเดียเป็นรูปพระจันทร์เสี้ยว และมีผนังกัน คือ *F. incarnatum* และกลุ่มเชื้อราที่มีลักษณะเส้นใยหนาฟูซ้อนกันเป็นชั้นๆ เส้นใยสีขาวอมเทา โคนิเดียเป็นรูปทรงกลม-ทรงรี และผนังกันหลาย ๆ เซลล์ คือ *P. sydowina* และเมื่อนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS วิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม พบว่าเชื้อรา *C. fructicola* และ *C. asianum* มีความใกล้เคียงกันทางพันธุกรรมมากที่สุด

การพัฒนาเทคนิคแลมป์เพื่อตรวจหาเชื้อรา *C. asianum* สาเหตุโรคแอนแทรกโนส พบว่าสามารถตรวจพบเชื้อราได้ที่อุณหภูมิคงที่ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 นาที และการทดสอบประสิทธิภาพความจำเพาะของไพรเมอร์ CHS-1 พบว่าสามารถตรวจจับเชื้อรา *C. asianum* และ *C. musae* แต่ไม่ตรวจจับเชื้อรา *C. fructicola* และเชื้อราอื่นอีก 2 ชนิด ได้แก่ *F. incarnatum* และ *P. sydowina* และการทดสอบประสิทธิภาพความไวในการตรวจหาเชื้อรา พบว่าสามารถตรวจพบเชื้อรา *C. asianum* ได้ที่ความเข้มข้นต่ำสุดของดีเอ็นเอที่ 1 นาโนกรัม/ไมโครลิตร และตรวจพบเชื้อรา *C. musae* ที่ได้ที่ความเข้มข้นต่ำสุดของดีเอ็นเอที่ 25 นาโนกรัม/ไมโครลิตร เมื่อเปรียบเทียบกับเทคนิคพีซีอาร์ พบว่าเทคนิคแลมป์มีประสิทธิภาพความไวในการตรวจจับเชื้อได้ดีกว่าถึง 10 ดังนั้นเทคนิคแลมป์จึงมีประสิทธิภาพในการตรวจพบเชื้อราก่อโรคแอนแทรกโนสในพืชได้อย่างรวดเร็ว ซึ่งช่วยให้เกิดการควบคุมโรคในผลผลิตได้อย่างมีประสิทธิภาพส่งผลให้ลดการสูญเสียผลผลิตในระหว่างเก็บเกี่ยวรวมไปถึงระวางการส่งออกอีกด้วย

ข้อเสนอแนะ

1. ควรมีการศึกษาข้อมูลพื้นฐานวิทยาของเชื้อเพิ่มเติม การจำแนกเชื้อราก่อโรคแอนแทรกโนสได้อย่างชัดเจนและแม่นยำขึ้น

2. ไพรเมอร์ที่ใช้สำหรับทดสอบความจำเพาะกับเชื้อรากลุ่มโรค พบว่ายังไม่จำเพาะกับเชื้อชนิดใดชนิดหนึ่ง นั้นควรออกแบบไพรเมอร์ใหม่เพื่อให้จำเพาะกับเชื้อราเพียงชนิดเดียว

3. ควรเลือกบริเวณยีนที่มีจำนวนซ้ำดีเอ็นเอที่มากมาออกแบบไพรเมอร์ เพื่อให้ประสิทธิภาพความไวในการตรวจจับเชื้อราที่ดี



บรรณานุกรม

- Abd-Elsalam, K. A., Roshdy, S., Amin, O., & Rabani, M. (2010). First morphogenetic identification of the fungal pathogen *Colletotrichum musae* (Phyllachoraceae) from imported bananas in Saudi Arabia. *Genetics and Molecular Research*, 9(4), 2335-2342.
- Abdul Wahid, O. A. (2001). Occurrence of *Colletotrichum anthracnose* disease of guava fruit in Egypt. *International journal of pest management*, 47(2), 147-152.
- Abirami, K., Sakthivel, K., Sheoran, N., Baskaran, V., Gautam, R., Jerard, B., & Kumar, A. (2019). Occurrence of anthracnose disease caused by *Colletotrichum siamense* on dragon fruit (*Hylocereus undatus*) in Andaman Islands, India. *Plant Disease*, 103(4), 768-768.
- Ahmad, T., Wang, J., Zheng, Y., Mugizi, A. E., Moosa, A., Nie, C., & Liu, Y. (2021). First record of *Colletotrichum alienum* causing postharvest anthracnose disease of mango fruit in China. *Plant Disease*, 105(6), 1852.
- Alhudaib, K., Ismail, A. M., & Magistà, D. (2023). Multi-Locus Phylogenetic Analysis Revealed the Association of Six *Colletotrichum* Species with Anthracnose Disease of Coffee (*Coffea arabica* L.) in Saudi Arabia. *Journal of Fungi*, 9(7), 705.
- Ali, A., Zahid, N., Manickam, S., Siddiqui, Y., Alderson, P. G., & Maqbool, M. (2013). Effectiveness of submicron chitosan dispersions in controlling anthracnose and maintaining quality of dragon fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 86, 147-153.
- Amusa, N., Ashaye, O., Oladapo, M., & Oni, M. (2005). Guava fruit anthracnose and the effects on its nutritional and market values in Ibadan, Nigeria. *World Journal of Agricultural Sciences*, 1(2), 169-172.
- Arauz, L. F. (2000). Mango anthracnose: Economic impact and current options for integrated management. *Plant Disease*, 84(6), 600-611.
- Arx, J. v. (1957a). Die Arten der Gattung *Colletotrichum*. *Phytopathol. z.*, 29, 413-468.
- Arx, J. v. (1957b). Revision der zu *Gloeosporium* gestellten Pilze. *Verhandlignen des Koninklijke Nederlandse Akadademie van Wetenschappen, Afd. Natuurkunde*, 2.

- Bananalink. (2020). Banana link review of 2021-2022. Retrieved from <https://www.bananalink.org.uk/wp-content/uploads/2023/07/Banana-Link-Review-of-2021-22>. March 8, 2024.
- Bailey, J. A., & Jeger, M. J. (1992). *Colletotrichum*: biology, pathology and control.
- Balendres, M. A., Mendoza, J., & Dela Cueva, F. (2020). Characteristics of *Colletotrichum musae* PHBN0002 and the susceptibility of popular banana cultivars to postharvest anthracnose. *Indian Phytopathology*, 73, 57-64.
- Bauer, R. (2003). *A synopsis of the tribe Hylocereeae F. Buxb.* Hunt.
- Baxter, A. P., Van der Westhuizen, G., & Eicker, A. (1984). A synoptic key to South African isolates of *Colletotrichum*. *South African Journal of Botany*, 3(4), 265-266.
- Belmino Maia, C., Rodrigues de Melo, P. A. F., Weingart Barreto, R., Maffia, L. A., Silva Pinto, K. M., Costa Rodrigues, A. A., Ribeiro de Souza Serra, I. M., Ribeiro Mesquita, M. L., Mondego, J. M., & Gomes da Silva, A. P. (2018). Biological Potential of *Colletotrichum typhae* HC Greene mycoherbicide for *Typha domingensis* Pers. *bioRxiv*, 502-526.
- Binyam, T., Girma, A., & Fikre, L. (2016). Distribution and importance of sorghum anthracnose (*Colletotrichum sublineolum*) in Southwestern and Western Ethiopia. *Plant Pathology Journal (Faisalabad)*, 15(3), 75-85.
- Boerema, G. H., & Hamers, M. E. (1989). Check-list for scientific names of common parasitic fungi. Series 3b: Fungi on bulbs: *Amaryllidaceae* and *Iridaceae*. *Netherlands Journal of Plant Pathology*, 95, 1-29.
- Bragança, C. A., Damm, U., Baroncelli, R., Júnior, N. S. M., & Crous, P. W. (2016). Species of the *Colletotrichum acutatum* complex associated with anthracnose diseases of fruit in Brazil. *Fungal biology*, 120(4), 547-561.
- Briant, A., & Martyn, F. (1930). Diseases of cover crops. 25-260.
- Brown, J. F., & Ogle, H. (1997). *Plant pathogens and plant diseases*. Published by Rockvale Publications for the Division of Botany, University of New England.
- Chen, J., Lan, C., Hu, H., Lai, R., & Wu, R. (2020). The development and application of a LAMP assay for visualized detection of Chinese olive anthracnose. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 127, 553-560.
- Cho, W.-D., & Shin, H.-D. (2004). *List of plant diseases in Korea*. Korean Society of Plant

Pathology. 779.

- Chowdappa, P. (2017). Revisiting the taxonomy of *Colletotrichum* using multi-locus gene phylogeny. *Indian Phytopathology*, 70(2), 141-150.
- Costa, M. M., Silva, B. A., Moreira, G. M., & Pfenning, L. H. (2021). *Colletotrichum falcatum* and *Fusarium* species induce symptoms of red rot in sugarcane in Brazil. *Plant Pathology*, 70(8), 1807-1818.
- Crouch, J. A. (2014). *Colletotrichum caudatum* is a species complex. *IMA Fungus*, 5, 17-30.
- Crous, P. W., Wingfield, M., Guarro, J., Hernández-Restrepo, M., Sutton, D., Acharya, K., Barber, P., Boekhout, T., Dimitrov, R., & Dueñas, M. (2015). Fungal Planet description sheets: 320–370. *Persoonia-Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, 34(1), 167-266.
- Cruz, A. F., Medeiros, N. L., Benedet, G. L., Araújo, M. B., Uesugi, C. H., da Silva Velloso Ferreira, M. A., Peixoto, J. R., & Blum, L. E. B. (2015). Control of post-harvest anthracnose infection in guava (*Psidium guajava*) fruits with phosphites, calcium chloride, acetyl salicylic acid, hot water, and 1-MCP. *Horticulture, Environment, and Biotechnology*, 56, 330-340.
- Damm, U., Cannon, P., Woudenberg, J., & Crous, P. (2012). The *Colletotrichum acutatum* species complex. *Studies in mycology*, 73, 37-113.
- Damm, U., Cannon, P. F., Liu, F., Barreto, R. W., Guatimosim, E., & Crous, P. W. (2013). The *Colletotrichum orbiculare* species complex: Important pathogens of field crops and weeds. *Fungal Diversity*, 61, 29-59.
- Damm, U., O'Connell, R., Groenewald, J. Z., & Crous, P. W. (2014). The *Colletotrichum destructivum* species complex-hemibiotrophic pathogens of forage and field crops. *Studies in mycology*, 79(1), 49-84.
- Damm, U., Woudenberg, J., Cannon, P., & Crous, P. (2009). *Colletotrichum* species with curved conidia from herbaceous hosts. *Fungal Diversity*, 39, 45.
- De Chirimoya, e. F. (2005). Characterizations and Identification of *Colletotrichum fragariae*. *Agrociencia*, 39(1), 93-106
- De Oliveira, K. Á. R., Berger, L. R. R., de Araújo, S. A., Câmara, M. P. S., & de Souza, E. L. (2017). Synergistic mixtures of chitosan and *Mentha piperita* L. essential oil to

- inhibit *Colletotrichum* species and anthracnose development in mango cultivar Tommy Atkins. *Food Microbiology*, 66, 96-103.
- Dean, R., Van Kan, J. A., Pretorius, Z. A., Hammond-Kosack, K. E., Di Pietro, A., Spanu, P. D., Rudd, J. J., Dickman, M., Kahmann, R., & Ellis, J. (2012). The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Molecular plant pathology*, 13(4), 414-430.
- Dias, M. D., Fonseca, M. E. N., Dias-Neto, J. J., Santos, M. D., Pandolfo, G. M., Boiteux, L. S., & Café-Filho, A. C. (2018). Biology, pathogenicity, and haplotype analyses of *Colletotrichum cliviae*: a novel soybean anthracnose agent in warm tropical areas. *Tropical plant pathology*, 43, 439-451.
- Dos Passos Braga, S., Lundgren, G. A., Macedo, S. A., Tavares, J. F., Dos Santos Vieira, W. A., Camara, M. P. S., & De Souza, E. L. (2019). Application of coatings formed by chitosan and Mentha essential oils to control anthracnose caused by *Colletotrichum gloesporioides* and *C. brevisporum* in papaya (*Carica papaya* L.) fruit. *International journal of biological macromolecules*, 139, 631-639.
- Eckert, J. (1989). Recent developments in the chemical control of postharvest diseases. *Symposium on Tropical Fruit in International Trade* 269, 477-494.
- Farbo, M. G., Urgeghe, P. P., Fiori, S., Marcello, A., Oggiano, S., Balmas, V., Hassan, Z. U., Jaoua, S., & Migheli, Q. (2018). Effect of yeast volatile organic compounds on ochratoxin A-producing *Aspergillus carbonarius* and *A. ochraceus*. *International Journal of Food Microbiology*, 284, 1-10.
- Ferdous, J., Hanafi, M., Rafii, M., & Muhammad, K. (2012). A quick DNA extraction protocol: Without liquid nitrogen in ambient temperature. *African Journal of Biotechnology*, 11(27), 6956-6964.
- Freeman, S., Katan, T., & Shabi, E. (1998). Characterization of *Colletotrichum* species responsible for anthracnose diseases of various fruits. *Plant Disease*, 82(6), 596-605.
- Food and Agriculture Organization. (2020). Market Review 2020. Retrieved from <https://www.fao.org/3/cb6639en/cb6639en.pdf>. March 8, 2024.
- Fuentes-Aragón, D., Juárez-Vázquez, S. B., Vargas-Hernández, M., & Silva-Rojas, H. V.

- (2018). *Colletotrichum fructicola*, a member of *Colletotrichum gloeosporioides* sensu lato, is the causal agent of anthracnose and soft rot in avocado fruits cv. "Hass". *Mycobiology*, 46(2), 92-100.
- Fuentes-Aragón, D., Rebollar-Alviter, A., Osnaya-Gonzalez, M., Enciso-Maldonado, G. A., Gonzalez-Reyes, H., & Silva-Rojas, H. V. (2021). Multilocus phylogenetic analyses suggest the presence of *Colletotrichum chrysophilum* causing banana anthracnose in Mexico. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 128(2), 589-595.
- Furtado, I. (1970). Effect of copper fungicides on the occurrence of the pathogenic form of *Colletotrichum coffeanum*. 325-328.
- Garibaldi, A., Gullino, M. L., & Minuto, G. (1997). Diseases of basil and their management. *Plant Disease*, 81(2), 124-132.
- Guo, L. W., Wu, Y. X., Ho, H. H., Su, Y. Y., Mao, Z. C., He, P. F., & He, Y. Q. (2014). First report of dragon fruit (*Hylocereus undatus*) anthracnose caused by *Colletotrichum truncatum* in China. *Journal of Phytopathology*, 162(4), 272-275.
- Guozhong, L., Cannon, P. F., Alex, R., & Simmons, C. M. (2004). Diversity and molecular relationships of endophytic *Colletotrichum* isolates from the Iwokrama Forest Reserve, Guyana. *Mycological research*, 108(1), 53-63.
- Hebert, P. D., Penton, E. H., Burns, J. M., Janzen, D. H., & Hallwachs, W. (2004). Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(41), 14812-14817.
- Hebert, P. D., Ratnasingham, S., & De Waard, J. R. (2003). Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 270(1), 96-99.
- Hocking, D. (1972). Alternative hosts for two races of *Colletotrichum coffeanum* from Cotee. 234-235.
- Holliday, P. (1989). *A dictionary of plant pathology*. Cambridge University Press.
- Hunupolagama, D., Chandrasekharan, N., Wijesundera, W., Kathriarachchi, H., Fernando, T., & Wijesundera, R. (2017). Unveiling members of *Colletotrichum acutatum*

- species complex causing Colletotrichum leaf disease of *Hevea brasiliensis* in Sri Lanka. *Current microbiology*, *74*, 747-756.
- Hyde, K., Cai, L., Cannon, P., Crouch, J., Crous, P., Damm, U., Goodwin, P., Chen, H., Johnston, P., & Jones, E. (2009). *Colletotrichum*—names in current use. *Fungal Diversity*, *39*(1), 147-182.
- Hyde, K. D., Cai, L., McKenzie, E., Yang, Y., Zhang, J., & Prihastuti, H. (2009). *Colletotrichum*: a catalogue of confusion. *Fungal Diversity*, *39*(1), 1-17.
- Ibrahim, H. H., Abba, Y., Ahmed, I. M., Jesse, F. F. A., Chung, E. L. T., Marza, A. D., Zamri-Saad, M., Omar, A. R., Bakar, M. Z. A., & Saharee, A. A. (2016). Molecular detection and pathology of *Pasteurella multocida* B: 2 in the reproductive system of pre-pubertal buffalo calves (*Bubalus bubalis*). *Comparative Clinical Pathology*, *25*, 319-326.
- Ikata, S., & Yoshida, M. (1940). A new anthracnose of jute-plant. *Japanese Journal of Phytopathology*, *10*(2-3), 141-149.
- Islam, M., Sultana, K., Hussain, M., Mostafa, M., Islam, M., Rahman, M., & Kashem, M. (2006). Inoculation times with strains of *Macrophomina phaseolina* and *Colletotrichum corchori* on the seed yield contributing characters of late jute seeds.
- Jeger, M., Eden-Green, S., Thresh, J., Johanson, A., Waller, J., & Brown, A. (1995). Banana diseases. In *Bananas and plantains* (pp. 317-381). Springer.
- Jitareerat, P., Sripong, K., Masaya, K., Aiamla-or, S., & Uthairatanakij, A. (2018). Combined effects of food additives and heat treatment on fruit rot disease and quality of harvested dragon fruit. *Agriculture and Natural Resources*, *52*(6), 543-549.
- Kalupahana, K., Kuruppu, M., & Dissanayake, P. (2018). Effect of essential oils and GRAS compounds on postharvest disease control in mango (*Mangifera indica* L. cv Tom EJC). *Journal of Agricultural Sciences (Sri Lanka)*, *15*(2).
- Kandan, A., Akhtar, J., Singh, B., Pal, D., Chand, D., Agarwal, P. C., & Dubey, S. C. (2016). Application of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for rapid and sensitive detection of fungal pathogen, *Colletotrichum capsici* in *Capsicum annum*. *Journal of Environmental Biology*, *37*(6), 1355.
- Kashiwa, T., Inami, K., Teraoka, T., Komatsu, K., & Arie, T. (2016). Detection of cabbage

- yellow's fungus *Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans* in soil by PCR and real-time PCR. *Journal of General Plant Pathology*, 82, 240-247.
- Keith, L. M., Velasquez, M. E., & Zee, F. T. (2006). Identification and characterization of *Pestalotiopsis* spp. causing scab disease of guava, *Psidium guajava*, in Hawaii. *Plant Disease*, 90(1), 16-23.
- Kim, W. G., Hong, S. K., & Cho, W. D. (2001). Occurrence of anthracnose on English Ivy caused by *Colletotrichum trichellum* in Korea. *Mycobiology*, 29(2), 107-109.
- Kim, W. G., Hong, S. K., & Cho, W. D. (2002). Anthracnose of may lily caused by *Colletotrichum lilifolium*. *Mycobiology*, 30(1), 57-59.
- Kim, W. G., Hong, S. K., & Kim, J. H. (2008). Occurrence of anthracnose on Chinese mallow caused by *Colletotrichum malvarum*. *Mycobiology*, 36(2), 139-141.
- Klis, F. M., Boorsma, A., & De Groot, P. W. (2006). Cell wall construction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 23(3), 185-202.
- Koch, S., Baxter, AP, & Knox-Davies, P. (1989). Identity and pathogenicity of *Colletotrichum* species from *Medicago sativa* in South Africa. *Phytophylactica*, 21(1), 65-78.
- Kollár, R., Reinhold, B. B., Petráková, E., Yeh, H. J., Ashwell, G., Drgonová, J., Kapteyn, J. C., Klis, F. M., & Cabib, E. (1997). Architecture of the yeast cell wall: (1, 6) beta-glucan interconnects mannoprotein, (1, 3) beta-glucan, and chitin. *Journal of Biological Chemistry*, 272(28), 17762-17775.
- Kong, L. A., Yang, J., Li, G. T., Qi, L. L., Zhang, Y. J., Wang, C. F., Zhao, W. S., Xu, J. R., & Peng, Y. L. (2012). Different chitin synthase genes are required for various developmental and plant infection processes in the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *PLoS Pathog*, 8(2), 1002526.
- Kuan, C. P., Wu, M. T., Huang, H. C., & Chang, H. (2011). Rapid detection of *Colletotrichum lagenarium*, causal agent of anthracnose of cucurbitaceous crops, by PCR and real-time PCR. *Journal of Phytopathology*, 159(4), 276-282.
- Kumar, V., Nair, B., Nair, P., Annamalai, A., Jaishanker, R., Umamaheswaran, K., Sooraj, N., & Peethambaran, C. (2017). First report of *Colletotrichum siamense* causing anthracnose of cliff banana in India. *Plant Disease*, 101(2), 390-390.

- Kuppusamy, P., Peeran, M. F., Gandhi, K., & Raguchander, T. (2011). Morphological and Physiological Characterization of *Colletotrichum musae* the Causal Organism of Banana Anthracnose. *World Journal of Agricultural Sciences* 7, 6, 743-754.
- Leite, K. M. d. S. C., Tadiotti, A. C., Baldochi, D., & Oliveira, O. M. M. F. (2006). Partial purification, heat stability and kinetic characterization of the pectinmethylesterase from Brazilian guava, Paluma cultivars. *Food Chemistry*, 94(4), 565-572.
- Lenardon, M. D., Munro, C. A., & Gow, N. A. (2010). Chitin synthesis and fungal pathogenesis. *Curr Opin Microbiol*, 13(4), 416-423.
- Li, B. (2017). Rapid and visual detection of *Colletotrichum gloeosporioides* on *Anoectochilus* using loop-mediated isothermal amplification assay. *International Journal of Phytopathology*, 5(3), 99-106.
- Li, Q., Bu, J., Shu, J., Yu, Z., Tang, L., Huang, S., Guo, T., Mo, J., Luo, S., & Solangi, G. S. (2019). *Colletotrichum* species associated with mango in southern China. *Scientific Reports*, 9(1), 18891.
- Li, X., Zhang, M., Qi, D., Zhou, D., Qi, C., Li, C., Liu, S., Xiang, D., Zhang, L., & Xie, J. (2021). Biocontrol ability and mechanism of a broad-spectrum antifungal strain *Bacillus safensis* sp. QN1NO-4 against strawberry anthracnose caused by *Colletotrichum fragariae*. *Frontiers in Microbiology*, 12, 735732.
- Lima, N. B., de A. Batista, M. V., De Moraes, M. A., Barbosa, M. A., Michereff, S. J., Hyde, K. D., & Câmara, M. P. (2013). Five *Colletotrichum* species are responsible for mango anthracnose in northeastern Brazil. *Fungal Diversity*, 61, 75-88.
- Lima, N. B., Lima, W. G., Tovar-Pedraza, J. M., Michereff, S. J., & Câmara, M. P. (2015). Comparative epidemiology of *Colletotrichum* species from mango in northeastern Brazil. *European Journal of Plant Pathology*, 141, 679-688.
- Lin, C.-P., Ann, P.-J., Huang, H.-C., Chang, J.-T., & Tsai, J.-N. (2017). Anthracnose of pitaya (*Hylocereus* spp.) caused by *Colletotrichum* spp., a new postharvest disease in Taiwan. *Journal of Taiwan Agricultural Research*, 66(3), 178-183.
- Liu, F., Cai, L., Crous, P. W., & Damm, U. (2013). Circumscription of the anthracnose pathogens *Colletotrichum lindemuthianum* and *C. nigrum*. *Mycologia*, 105(4), 844-860.

- Liu, F., Hyde, K. D., & Cai, L. (2011). Neotypification of *Colletotrichum coccodes*, the causal agent of potato black dot disease and tomato anthracnose. *Mycology*, 2(4), 248-254.
- Liu, F., Tang, G., Zheng, X., Li, Y., Sun, X., Qi, X., Zhou, Y., Xu, J., Chen, H., Chang, X., Zhang, S., & Gong, G. (2016). Molecular and phenotypic characterization of *Colletotrichum* species associated with anthracnose disease in peppers from Sichuan Province, China. *Scientific Reports*, 6(1), 32761.
- Liu, L., Yan, Y., Huang, J., Hsiang, T., Wei, Y., Li, Y., Gao, J., & Zheng, L. (2017). A novel MFS transporter gene ChMfs1 is important for hyphal morphology, conidiation, and pathogenicity in *Colletotrichum higginsianum*. *Frontiers in Microbiology*, 8, 1953.
- Ma, W., Yang, X., Wang, X., Zeng, Y., Liao, M., Chen, C., Sun, S., & Jia, D. (2014). First report of anthracnose disease on young stems of Bawanghua (*Hylocereus undatus*) caused by *Colletotrichum gloeosporioides* in China. *Plant Disease*, 98(7), 991-991.
- Masyahit, M. (2009). The first report of the occurrence of anthracnose disease caused by *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. on dragon fruit (*Hylocereus* spp.) in Peninsular Malaysia. *American Journal of Applied Sciences*, 6, 902-912.
- Meetum, P., Leksomboon, C., & Kanjanamaneesathian, M. (2015). First report of *Colletotrichum aenigma* and *C. siamense*, the causal agents of anthracnose disease of dragon fruit in Thailand. *Journal of Plant Pathology*, 97(2).
- Mercado-Silva, E. (2018). Pitaya—*Hylocereus Undatus* (haw). *Exotic Fruits* (2018). 339-349.
- Merida, M., & Palmateer, A. J. (2006). 2006 Florida Plant Disease Management Guide: Guava (*Psidium guajava*). Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida, 2006(13), 232-2540.
- Morton, J. F. (1987). Fruits of warm climates. *Proceedings of the 6th National Symposium on Creating Markets for Economic Development of New Crops and New Uses*. Miami, 29-46.
- Nascimento, M., Bellé, C., Azambuja, R., Maich, S., Neves, C., Souza-Junior, I., Jacobsen,

- C., & Barros, D. (2019). First report of *Colletotrichum karstii* causing anthracnose spot on pitaya (*Hylocereus undatus*) in Brazil. *Plant Disease*, 103(8), 2137.
- Nerd, A., Gutman, F., & Mizrahi, Y. (1999). Ripening and postharvest behaviour of fruits of two *Hylocereus* species (Cactaceae). *Postharvest Biology and Technology*, 17(1), 39-45.
- Nicholas, K. B., & Nicholas, J. B. (1997). Genedoc: a Tool for Editing and Annotating Multiple Alignments. *version 2.5*.
- Northover, J., & Zhou, T. (2002). Control of rhizopus rot of peaches with postharvest treatments of tebuconazole, fludioxonil, and *Pseudomonas syringae*. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 24(2), 144-153.
- Notomi, T., Okayama, H., Masubuchi, H., Yonekawa, T., Watanabe, K., Amino, N., & Hase, T. (2000). Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic acids research*, 28(12), 63-63.
- Palmateer, A., Ploetz, R., Van Santen, E., & Correll, J. (2007). First occurrence of anthracnose caused by *Colletotrichum gloeosporioides* on pitahaya. *Plant Disease*, 91(5), 631-631.
- Palou, L. (2018). Postharvest treatments with GRAS salts to control fresh fruit decay. *Horticulturae*, 4(4), 46.
- Patil, R., Deshmukh, R., Bhaskar, K., & Jahagirdar, S. (2018). Growth and export performance of mango in India. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 6, 2667-2267.
- Paull, R. E., & Chen, N. J. (2019). Overall dragon fruit production and global marketing. *FFTC*.
- Phoulivong, S., McKenzie, E., & Hyde, K. (2012). Cross infection of *Colletotrichum* species; a case study with tropical fruits. *Current Research in Environmental & Applied Mycology*, 2(2), 99-111.
- Poolsup, N., Suksomboon, N., & Paw, N. J. (2017). Effect of dragon fruit on glycemic control in prediabetes and type 2 diabetes: A systematic review and meta-analysis. *PloS one*, 12(9), 184577.
- Qin, L., Huang, S., Lin, S., & Lin, C. (2017). First report of anthracnose of *Mangifera indica* caused by *Colletotrichum siamense* in Sanya city in China. *Plant Disease*, 101(6),

1038-1038.

- Raja, H. A., Miller, A. N., Pearce, C. J., & Oberlies, N. H. (2017). Fungal identification using molecular tools: a primer for the natural products research community. *Journal of natural products*, *80*(3), 756-770.
- Riera, N., Ramirez-Villacis, D., Barriga-Medina, N., Alvarez-Santana, J., Herrera, K., Ruales, C., & Leon-Reyes, A. (2019). First report of banana anthracnose caused by *Colletotrichum gloeosporioides* in Ecuador. *Plant Disease*, *103*(4), 763-763.
- Rivera, Y., Stommel, J., Dumm, J., Ismaiel, A., Wyenandt, C., & Crouch, J. (2016). First report of *Colletotrichum nigrum* causing anthracnose disease on tomato fruit in New Jersey. *Plant Disease*, *100*(10), 2162-2162.
- Roncero, C. (2002). The genetic complexity of chitin synthesis in fungi. *Current Genetics*, *41*(6), 367-378.
- Saini, T., Gupta, S., & Anandalakshmi, R. (2017). Detection of tomato anthracnose caused by *Colletotrichum truncatum* in India. *Australasian plant disease notes*, *12*, 1-3.
- Samarakoon, M., Peršoh, D., Hyde, K., Bulgakov, T., Manawasinghe, I., Jayawardena, R., & Promputtha, I. (2018). *Colletotrichum acidiae* sp. nov. from northern Thailand and a new record of *C. dematium* on Iris sp. *Mycosphere*, *9*(3), 583-597.
- Sangeetha, G., Usharani, S., & Muthukumar, A. (2010). Significance of *Lasiodiplodia theobromae* and *Colletotrichum musae* in causing crown rot in banana and their reaction on some commercial banana cultivars. *Indian Journal of Horticulture*, *67*(1), 21-25.
- Sangpueak, R., Phansak, P., & Buensanteai, N. (2018). Morphological and molecular identification of *Colletotrichum* species associated with cassava anthracnose in Thailand. *Journal of Phytopathology*, *166*(2), 129-142.
- Sanna, M., Martino, I., Guarnaccia, V., & Mezzalama, M. (2023). Diversity and Pathogenicity of *Fusarium* Species Associated with Stalk and Crown Rot in Maize in Northern Italy. *Plants*, *12*(22), 3857.
- Saxena, A., Mishra, S., Ray, S., Raghuwanshi, R., & Singh, H. B. (2020). Differential reprogramming of defense network in *Capsicum annum* L. plants against *Colletotrichum truncatum* infection by phyllospheric and rhizospheric

- Trichoderma* strains. *Journal of plant growth regulation*, 39, 751-763.
- Sharma, G., Maymon, M., & Freeman, S. (2017). Epidemiology, pathology and identification of *Colletotrichum* including a novel species associated with avocado (*Persea americana*) anthracnose in Israel. *Scientific Reports*, 7(1), 15839.
- Sharma, G., Pinnaka, A. K., & Shenoy, B. D. (2015). Resolving the *Colletotrichum siamense* species complex using ApMat marker. *Fungal Diversity*, 71, 247-264.
- Sharma, R., Singh, D., & Singh, R. (2009). Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables by microbial antagonists: A review. *Biological control*, 50(3), 205-221.
- Shi, X., Xia, X., Mei, J., Gong, Z., Zhang, J., Xiao, Y., Duan, C., & Liu, W. (2023). Genome Sequence Resource of a *Colletotrichum graminicola* Field Strain from China. *Molecular Plant-Microbe Interactions*.
- Spadaro, D., & Droby, S. (2016). Development of biocontrol products for postharvest diseases of fruit: The importance of elucidating the mechanisms of action of yeast antagonists. *Trends in Food Science & Technology*, 47, 39-49.
- Srijudanu, A., Piasai, O., Leesutthiphonchai, W., Wanitch, M., Chaisiri, C., & Khewkhom, N. (2023). Biocontrol of *Colletotrichum falcatum* Causing Red Rot Disease of Sugarcane Using Non-toxigenic *Aspergillus* sp. *Chiang Mai Journal of Science*, 50(3).
- Su, Y.-Y., Noireung, P., Liu, F., Hyde, K. D., Moslem, M. A., Bahkali, A. H., Abd-Elsalam, K. A., & Cai, L. (2011). Epitypification of *Colletotrichum musae*, the causative agent of banana anthracnose. *Mycoscience*, 52(6), 376-382.
- Sutton, B. C. (1980). *The Coelomycetes. Fungi imperfecti with pycnidia, acervuli and stromata*. Commonwealth Mycological Institute.
- Taba, S., Mikami, D., Takaesu, K., Ooshiro, A., Moromizato, Z., Nakasone, S., & Kawano, S. (2006). Anthracnose of pitaya (*Hylocereus undatus*) by *Colletotrichum gloeosporioides*. *Japanese Journal of Phytopathology (Japan)*.
- Takahashi, L., Rosa, D., Basseto, M., De Souza, H., & Furtado, E. (2008). First report of *Colletotrichum gloeosporioides* on *Hylocereus megalanthus* in Brazil. *Australasian Plant Disease Notes*, 3, 96-97.

- Tamura, K., Stecher, G., & Kumar, S. (2021). MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Molecular Biology and Evolution*, *38*(7), 3022-3027.
- Tel-Zur, N. (2013). Research and development of pitahayas-dragonfruit-vine cacti: limitations and challenges and the current global market. *VIII International Congress on Cactus Pear and Cochineal*. *1067*, 365-370.
- Tenore, G. C., Novellino, E., & Basile, A. (2012). Nutraceutical potential and antioxidant benefits of red pitaya (*Hylocereus polyrhizus*) extracts. *Journal of functional foods*, *4*(1), 129-136.
- Than, P., Jeewon, R., Hyde, K., Pongsupasamit, S., Mongkolporn, O., & Taylor, P. (2008). Characterization and pathogenicity of *Colletotrichum* species associated with anthracnose on chilli (*Capsicum* spp.) in Thailand. *Plant Pathology*, *57*(3), 562-572.
- Tian, Q., Lu, C., Wang, S., Xiong, Q., Zhang, H., Wang, Y., & Zheng, X. (2017). Rapid diagnosis of soybean anthracnose caused by *Colletotrichum truncatum* using a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay. *European Journal of Plant Pathology*, *148*, 785-793.
- Tovar-Pedraza, J. M., Mora-Aguilera, J. A., Nava-Díaz, C., Lima, N., Michereff, S. J., Sandoval-Islas, J., Camara, M. P. S., Téliz-Ortiz, D., & Leyva-Mir, S. G. (2020). Distribution and pathogenicity of *Colletotrichum* species associated with mango anthracnose in Mexico. *Plant Disease*, *104*(1), 137-146.
- Uddin, M., Shefat, S., Afroz, M., & Moon, N. (2018). Management of anthracnose disease of mango caused by *Colletotrichum gloeosporioides*: A review. *Acta Scientific Agriculture*, *2*(10), 169-177.
- Ujat, A. H., Vadamalai, G., Hattori, Y., Nakashima, C., Wong, C. K. F., & Zulperi, D. (2021). Current Classification and Diversity of *Fusarium* Species Complex, the Causal Pathogen of Fusarium Wilt Disease of Banana in Malaysia. *Agronomy*, *11*(10), 1955.
- Uysal, A., & Kurt, Ş. (2020). First report of fruit and leaf anthracnose caused by *Colletotrichum karstii* on avocado in Turkey. *Crop protection*, *133*, 105145.
- Van der Aa, H. (1978). A leaf spot disease of *Nymphaea alba* in the Netherlands. *Netherlands Journal of Plant Pathology*, *84*, 109-115.

- Van der Aa, H., Noordeloos, M., & Gruyter, J. d. (1990). Species concepts in some larger genera of the *Coelomycetes*. *Studies in mycology*, (32), 3-19.
- Vasic, T., Bulajic, A., Krnjaja, V., Jevremovic, D., Zivkovic, S., & Andjelkovic, B. (2014). First report of anthracnose on alfalfa caused by *Colletotrichum linicola* in Serbia. *Plant Disease*, 98(9), 1276-1276.
- Vieira, W. A., Lima, W. G., Nascimento, E. S., Michereff, S. J., Câmara, M. P., & Doyle, V. P. (2017). The impact of phenotypic and molecular data on the inference of *Colletotrichum* diversity associated with *Musa*. *Mycologia*, 109(6), 912-934.
- Von Arx, J. A. (1970). The genera of fungi sporulating in pure culture. *The genera of fungi sporulating in pure culture*.
- Waseem Khan Qadri, R., Amrao, L., & Ijaz, S. (2022). Effect of environmental conditions (temperature and precipitation) on severity of guava die-back caused by *Colletotrichum* spp. under climatic conditions of Pakistan. *Journal of Plant Pathology*, 104(1).
- Weir, B., Johnston, P., & Damm, U. (2012). The *Colletotrichum gloeosporioides* species complex. *Studies in mycology*, 73, 115-180.
- Werner, S., Sugui, J. A., Steinberg, G., & Deising, H. B. (2007). A chitin synthase with a myosin-like motor domain is essential for hyphal growth, appressorium differentiation, and pathogenicity of the maize anthracnose fungus *Colletotrichum graminicola*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 20(12), 1555-1567.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S., & Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR protocols: a guide to methods and applications*, 18(1), 315-322.
- Widodo, & Hidayat, S. (2018). Identification of *Colletotrichum* species associated with chili anthracnose in Indonesia by morphological characteristics and species-specific primers. *Asian J Plant Pathol*, 12, 7-15.
- Wisniewski, M., Wilson, C., Droby, S., Chalutz, E., El-Ghaouth, A., & Stevens, C. (2007). Postharvest biocontrol: new concepts and applications. In *Biological control: A global perspective*. (pp. 262-273) CABI Wallingford UK.
- World Population Review. (2023). Guava Production by Country 2023. Retrieved from

<https://worldpopulationreview.com/country-rankings/guava-production-by-country>. March 8, 2024

- Wu, C.-J., Chen, H.-K., & Ni, H.-F. (2020). Identification and characterization of *Colletotrichum* species associated with mango anthracnose in Taiwan. *European Journal of Plant Pathology*, *157*, 1-15.
- Wu, J., Hu, X., & Zhang, C. (2019). Molecular detection of QoI resistance in *Colletotrichum gloeosporioides* causing strawberry anthracnose based on loop-mediated isothermal amplification assay. *Plant Disease*, *103*(6), 1319-1325.
- Xie, L., Zhang, J.-z., Wan, Y., & Hu, D.-w. (2010). Identification of *Colletotrichum* spp. isolated from strawberry in Zhejiang Province and Shanghai City, China. *Journal of Zhejiang University Science*, *11*, 61-70.
- Yao, J., Lan, C., Huang, P., & Yu, D. (2018). PCR detection of *Colletotrichum gloeosporioides* in *Psidium guajava*. *Australasian Plant Pathology*, *47*(1), 95-100.
- Yarden, O., & Yanofsky, C. (1991). Chitin synthase 1 plays a major role in cell wall biogenesis in *Neurospora crassa*. *Genes & development*, *5*(12b), 2420-2430.
- Zakaria, L. (2021). Diversity of *Colletotrichum* species associated with anthracnose disease in tropical fruit crops—A review. *Agriculture*, *11*(4), 297.
- Zemankao, M., & Lebeda, A. (2001). Fusarium Species, their Taxonomy, Variability and Significance. *Plant Protection Science*, *37*(1), 25-42.
- Zhao, H., Chen, S., Chen, Y., Zou, C., Wang, X., Wang, Z., Liu, A., & Ahammed, G. (2018). First report of red dragon fruit (*Hylocereus polyrhizus*) anthracnose caused by *Colletotrichum siamense* in China. *Plant Disease*, *102*(6), 1175-1175.
- Zhao, J., & Huang, M. (2023). Characterization and In Vitro Fungicide Sensitivity of Two *Fusarium* spp. Associated with Stem Rot of Dragon Fruit in Guizhou, China. *Journal of Fungi*, *9*(12), 1178.
- Zheng, H., Yu, Z., Jiang, X., Fang, L., & Qiao, M. (2022). Endophytic *Colletotrichum* Species from Aquatic Plants in Southwest China. *Journal of Fungi*, *8*(1), 87.
- Zhou, Y., Huang, J., Yang, L., Wang, G., & Li, J. (2017). First report of banana anthracnose caused by *Colletotrichum scovillei* in China. *Plant Disease*, *101*(2), 381.
- Zivkovic, S., Stojanovic, S., Ivanovic, Z., Trkulja, N., Dolovac, N., Aleksic, G., & Balaz, J. (2010). Morphological and molecular identification of *Colletotrichum acutatum*

from tomato fruit. *Pesticidi i fitomedicina*, 25(3), 231-239.

กรมส่งเสริมการค้าระหว่างประเทศ. (2023). เกษะติดการนำเข้าและส่งออกมะม่วงของจีน ปี 2023. (ออนไลน์). อ้างอิงจาก: <https://www.ditp.go.th/post/127424>. 8 มีนาคม 2567.

ทีเอ็นเอ็น ออนไลน์. (2566). กล้วยหอมไทย ผลไม้ยืนหนึ่ง ราคาสูง ผลไม้เศรษฐกิจที่สำคัญที่มียอดการส่งออกมากเป็นอันดับต้นๆ. (ออนไลน์). อ้างอิงจาก <https://www.tnnthailand.com/news/infographic/150930/>. 8 มีนาคม 2567.

รัชมังพันธุ์ โกลลานันท์, กรรณิการ์ เพ็งคุ้ม, บุญญวดี จิระวุฒิ, ชวเลิศ ตรีกรุณาสวัสดิ์, รัตดา สุทธยาคม, อารีรัตน์ การุณสถิตยชัย, เนตรา สมบูรณ์แก้ว, อัจฉราพร ศรีจุฑานุ, สุพี วนศิริกุล, ชุติมา วิธูรจิตต์ และ วีรภรณ์ เดชนาปัญญาชัย. (2557). โรคผลไม้หลังการเก็บเกี่ยว. สำนักงานวิจัยและพัฒนาการหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตรกรรมวิชาการเกษตร.

วิจัย รักวิทยาศาสตร์. (2551). ราวิทยาเบื้องต้น. พิมพ์ครั้งที่ 2. ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน. 351 หน้า.