

ลักษณะของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* ที่ต้านทานสารคาร์เบนดาซิม

Characterization of *Colletotrichum gloeosporioides* Resistant to Carbendazim

พรประพา คงตระกูล^{1/, 2/} และ สรัญญา ณ ลำปาง^{1/, 2/}
Pornprapa Kongtragoul^{1/, 2/} and Sarunya Nalumpang^{1/, 2/}

Abstract: Isolates of *Colletotrichum gloeosporioides* causing anthracnose disease were obtained from infected mango fruits collected from fresh market in Chiang Mai. One hundred isolates were successfully isolated. The carbendazim-resistant assay was conducted on potato dextrose agar amended with carbendazim at various concentrations: 0.1, 1, 10, 100, 500 and 1,000 mg/l, respectively. These isolates were classified into four representative phenotypes of reactions as highly resistant (HR; ≥ 500 mg/l), moderately resistant (MR; ≤ 100 mg/l), weakly resistant (WR; ≤ 10 mg/l) and sensitive (S; ≤ 1 mg/l). The results showed that 95 isolates were HR, and 5 isolates were S phenotype. The differences in the carbendazim-resistant phenotypes were conspicuous in sequence analysis of the partial second beta-tubulin (*TUB2*) gene. Amino acid sequence analysis in comparison with wild type *C. gloeosporioides* f. sp. *aeschynomene* (accession no. U14138) was carried out. HR phenotype revealed a substitution of codon 198, which encoded glutamic acid (E) in S phenotype, was converted to a codon for alanine (A) which was closely associated with conferring carbendazim resistance of phenotypic mutation from the field.

Keywords: Fungicide resistance, mango anthracnose disease, *Colletotrichum gloeosporioides*

^{1/}ภาควิชากีฏวิทยาและโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

^{1/}Department of Entomology and Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Chiang Mai University

^{2/}ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา

^{2/}Center of Excellence on Agricultural Biotechnology: (AG-BIO/PERDO-CHE), Bangkok, Thailand

บทคัดย่อ: เก็บรวบรวมเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสบนผลมะม่วงจากตลาดสด ในจังหวัดเชียงใหม่ จำนวน 100 ไอโซเลท จากนั้นทดสอบความสามารถในการต้านทานสารป้องกันกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิมบนอาหาร potato dextrose agar ผสมสารกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิมที่ระดับความเข้มข้น 0.1, 1, 10, 100, 500 และ 1,000 mg/l ตามลำดับ โดยประเมินระดับความต้านทานดังนี้ ด้านทานระดับสูง (HR; ≥ 500 mg/l), ด้านทานระดับปานกลาง (MR; ≤ 100 mg/l), ด้านทานระดับต่ำ (WR; ≤ 10 mg/l) และระดับอ่อนแอ (S; ≤ 1 mg/l) ผลการทดลองพบเชื้อรากลุ่ม HR จำนวน 95 ไอโซเลท และกลุ่ม S จำนวน 5 ไอโซเลท เมื่อวิเคราะห์หาคอร์ดอะมิโนจากตัวอย่างเชื้อราแต่ละระดับความต้านทาน ที่ตำแหน่งบางส่วนของยีนเบต้าทูบูลิน (*TUB2*) เปรียบเทียบกับ *C. gloeosporioides* f. sp. *aeschynomene* (accession no. U14138) พบการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนตรงตำแหน่ง codon 198 ของเชื้อรากลุ่ม HR จาก glutamic acid (E) ของเชื้อรากลุ่ม S เป็น alanine (A) ซึ่งสัมพันธ์กับลักษณะกลายพันธุ์ที่แสดงออกต่อสารคาร์เบนดาซิมจากแปลงปลูก

คำสำคัญ: ความต้านทานสารกำจัดเชื้อรา โรคแอนแทรคโนสของมะม่วง *Colletotrichum gloeosporioides*

คำนำ

มะม่วงเป็นผลไม้ที่สำคัญทางเศรษฐกิจอีกชนิดหนึ่งของประเทศไทย เพราะในแต่ละปีมีผลผลิตมะม่วงออกสู่ตลาดทั้งภายในประเทศ และส่งออกต่างประเทศจำนวนมาก (เกียรติเกษตร, 2547) แต่ในขณะเดียวกันก็พบว่าผลผลิตหลังการเก็บเกี่ยวจำนวนมากได้รับความเสียหาย จากการเข้าทำลายของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* สาเหตุของโรคแอนแทรคโนส (anthracnose) โดยทำให้เกิดลักษณะจุดสีดำ รูปร่างกลม ในระหว่างการบ่มหรือขนส่งจุดแผลเหล่านี้จะขยายใหญ่ขึ้น และลุกลาม ทำให้เน่าทั้งผลได้ อาการจุดเน่าดำบนผลนี้พบทำความเสียหายกับมะม่วงเกือบทุกสายพันธุ์ นอกจากนี้เชื้อราชนิดนี้ยังสามารถแฝงอยู่กับผลตั้งแต่อยู่ในแปลงปลูกโดยไม่แสดงอาการใด ๆ แต่เมื่อสภาพแวดล้อมเหมาะสม เช่น ผลสุก หรือมีความชื้นสูง ในระหว่างการเก็บรักษา หรือบรรจุหีบห่อเพื่อการขนส่ง จะแสดงอาการได้ ซึ่งก็ทำความเสียหายเป็นอย่างมาก (Akem, 2006) สำหรับการจัดการป้องกันกำจัดโรคนี้ในแปลงปลูก เกษตรกรนิยมใช้สารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อรา โดยเฉพาะสารกลุ่มเบนซิมิดาโซล (benzimidazole) เนื่องจากควบคุมโรคได้ดีและรวดเร็ว เช่น คาร์เบนดาซิม (carbendazim), เบนอิมิด (benomyl) หรือ

ไธอะเบนดาโซล (thiabendazol) เป็นต้น (Akem, 2006) สารเคมีกลุ่มนี้เป็นสารชนิดดูดซึม (systemic fungicides) ที่ออกฤทธิ์แบบเฉพาะจุด (site specific mode of action) กล่าวคือจะเข้าไปจับกับโปรตีนทูบูลิน (tubulin) โดยเข้าไปจับอย่างจำเพาะเจาะจงกับโปรตีน beta-tubulin subunit (Ma and Michailides, 2005) เนื่องจากลักษณะของการออกฤทธิ์แบบจำเพาะจุดนี้ ประกอบกับการใช้สารเคมีอย่างต่อเนื่อง จะส่งผลชักนำให้เชื้อราเกิดการพัฒนา หรือปรับตัวเองเพื่อความอยู่รอด จนเกิดการกลายพันธุ์เป็นสายพันธุ์ที่ต้านทานสารป้องกันกำจัดเชื้อราขึ้น เมื่อเกษตรกรยังคงใช้สารเคมีดังกล่าวเชื้อราสายพันธุ์ที่กลายพันธุ์ยังคงอยู่รอดได้ ซึ่งลักษณะการกลายพันธุ์นี้สามารถถ่ายทอดสู่รุ่นลูกหลานได้ จึงส่งผลให้เพิ่มปริมาณภายในแปลงปลูกของเกษตรกรได้โดยไม่รู้ตัว (acquired fungicide resistance) (Deising et al., 2008; Damicone and Smith, 2009) ทำให้เกษตรกรประสบปัญหาไม่สามารถควบคุมการเกิดและแพร่ระบาดของโรคนี้ได้ รวมทั้งต้องสิ้นเปลืองเงินทุนและเวลาในการป้องกันกำจัดโรค ซึ่งจากรายงานของ Damicone and Smith (2009) ได้จัดระดับความเสี่ยงต่อการพัฒนาความต้านทานต่อสารกลุ่มเบนซิมิดาโซลอยู่ในระดับความเสี่ยงสูง ประกอบกับ Deising et al. (2008) รายงานว่าเชื้อรา *Venturia inaequalis* และ *Botrytis cinerea* สามารถสร้างความ

ต้านทานต่อสารกลุ่มนี้ในเวลาเพียงสองปี จากเหตุผลดังกล่าวจึงทำให้เกิดความล้มเหลวในการป้องกันกำจัดโรคที่เกิดขึ้น

ปัจจุบันมีนักวิจัยหลายท่านที่ได้ศึกษาความต้านทานต่อสารในกลุ่มเบนซิมิดาโซลของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. ที่ระดับ phenotype และ genetic mutation พบว่าเชื้อราดังกล่าวเกิดความต้านทานต่อสารในกลุ่มนี้ขึ้นแล้วในหลายประเทศ (Kumar *et al.*, 2007; Ru-Lin and Jun-Sheng, 2007) โดยศึกษาบนยีนเบต้าทูบูลิน (beta-tubulin gene; *TUB*) ซึ่งเกิดจากการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนตรงตำแหน่งจับของสารกลุ่มเบนซิมิดาโซล (benzimidazole binding site) พบว่าเกี่ยวข้องกับจุดกลายพันธุ์ (point mutation) ที่ตำแหน่ง codon 198 มีรายงานมากที่สุด กล่าวคือกรดอะมิโน glycine, lysine, alanine หรือ valine จะเข้าไปแทนที่ glutamic acid ในตำแหน่ง codon นี้ (Ma and Michailides, 2005) ทั้งนี้พบว่ามีรายงานการศึกษาความต้านทานของเชื้อรา *C. gloeosporioides* ต่อสารในกลุ่มเบนซิมิดาโซล บริเวณยีน *TUB2* เนื่องจากเป็นบริเวณที่คาดว่ามีความสำคัญที่เกิดจุดกลายพันธุ์ (Peres *et al.*, 2004; Chung *et al.*, 2006; Maymon *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2007) ดังนั้นจึงจำเป็นต้องศึกษาถึงจุดกลายพันธุ์บนยีนเบต้าทูบูลิน (*TUB2*) ของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของมะม่วงที่ต้านทานสารป้องกันกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิม เพื่อให้เกิดความรู้ความเข้าใจถึงการกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นในระดับชีวโมเลกุล อันจะนำไปสู่การหาวิธีที่เหมาะสมในการควบคุมป้องกันได้อย่างถูกต้อง

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

1. แยกและเก็บรวบรวมเชื้อรา *C. gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสบนผลมะม่วง เก็บผลมะม่วงที่แสดงอาการโรคแอนแทรคโนสจากตลาดสด ตรวจเชื้อจากแผลภายใต้กล้องสเตอริโอ จากนั้นแยก เชื้อราโดยวิธี tissue transplanting technique ตัดชิ้นพืชบริเวณแผลกับเนื้อเยื่อปกติให้มีขนาดประมาณ 0.5 x 0.5 เซนติเมตร ฆ่าเชื้อที่ผิวโดยแช่ใน

สารละลาย sodium hypochlorite (10% Clorox) ประมาณ 1-2 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อประมาณ 2-3 นาที ซับชิ้นพืชให้แห้งด้วยกระดาษกรองที่ผ่านการฆ่าเชื้อ นำชิ้นพืชวางบนอาหาร potato dextrose agar (PDA) บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง (30°C) ประมาณ 3-4 วัน เมื่อสังเกตเห็นเส้นใยเชื้อราเจริญออกจากชิ้นส่วนพืช จึงแยกบริเวณปลายเส้นใยมาวางบนอาหาร PDA บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง (30°C) เป็นเวลา 10 วัน เพื่อศึกษาลักษณะโคโลนีและสปอร์ จากนั้นแยกเก็บเชื้อส่วนหนึ่งไว้ในอาหาร PDA ในหลอดเอียง สำหรับการใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

2. ประเมินระดับความต้านทานของเชื้อรา *C. gloeosporioides* ต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิม เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ผสมกับสารป้องกันกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิม ที่ความเข้มข้นระดับต่าง ๆ ได้แก่ 0.1, 1, 10, 100, 500 (อัตราแนะนำ) และ 1,000 mg/l ใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร ตัดบริเวณขอบโคโลนีของเชื้อราแต่ละไอโซเลตเลี้ยงบนอาหาร PDA ที่ผสมสารป้องกันกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิมที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ เปรียบเทียบการเจริญของโคโลนีเชื้อรากับชุดควบคุมคือ อาหาร PDA ที่ไม่ผสมสารป้องกันกำจัดเชื้อรา ทำการทดลองความเข้มข้นละ 5 ซ้ำ บันทึกการเจริญของเชื้อรา โดยวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อรา และประเมินระดับความต้านทานต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิมเป็น 4 ระดับ ตามหลักเกณฑ์ ซึ่งดัดแปลงจาก Koenraadt *et al.* (1992) และ Peres *et al.* (2004) แสดงใน ตารางที่ 1 และตรวจสอบลักษณะเส้นใยของเชื้อราแต่ละระดับความต้านทานที่เลี้ยงบนอาหาร PDA และ PDA ผสมคาร์เบนดาซิมที่ 500 mg/l ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ขยาย 400 เท่า โดยวิธี slide culture

3. เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ และวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ตรงตำแหน่งยีนเบต้าทูบูลิน สกัดดีเอ็นเอจากเส้นใยของเชื้อราที่คัดเลือกแต่ละระดับความต้านทานด้วยชุด NucleoSpin® kit และเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอตรงตำแหน่งบางส่วนของยีน *TUB2* โดยทำปฏิกิริยา PCR ใช้ไพรเมอร์ TUB2L (5' GTT TCC AGA TCA CCC ACT CC 3') และไพรเมอร์ TUB2R (5' TGA GCT CAG GAA CAC TGA CG 3') ตรวจสอบผลผลิต

จากปฏิกิริยาที่ได้โดยวิธี gel electrophoresis บน 1% agarose gel ใน 0.5X TBE buffer และย้อมเจลดด้วย 0.5 µg/ml เอธิเดียมโบรไมด์ ตรวจดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต และนำไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ด้วยเครื่อง automated fluorescent DNA sequencer นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้แปลรหัสเป็นกรดอะมิโนด้วยโปรแกรม BioEdit version 5.0.6. เปรียบเทียบความเหมือนกับข้อมูลของยีนเบต้าทูบูลินที่มีรายงานไว้ในฐานข้อมูล GenBank ของ National Center for Biotechnology Information (NCBI) ด้วยโปรแกรม BLAST โดยเข้าไปที่ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> นอกจากนี้ นำข้อมูลทั้งสองเปรียบเทียบกับเชื้อรา *C. gloeosporioides* f. sp. *aeschynomene* (accession no. U14138) ตามรายงานของ Buhr and Dickman (1994) ด้วยโปรแกรม ClustalX, version 2.0.10 เพื่อตรวจสอบหาจุดคล้ายพันธุ์

1. แยก และ เก็บ บ ร ว บ ร ร ม เชื้อ ร า
Colletotrichum gloeosporioides สาเหตุโรคแอนแทรกในสมะม่วง จากการแยกและเก็บตัวอย่างโรคแอนแทรกในสมะม่วงจากตลาดสดได้ 100 ไอโซเลท

ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราที่แยกได้ โดยเลี้ยงเชื้อบนอาหาร PDA พบว่าเชื้อราทั้งหมดมีลักษณะโคโลนีบนอาหาร PDA ดังนี้ เมื่ออ่อนเส้นใยมีสีขาวต่อมาจะค่อย ๆ เปลี่ยนเป็นสีเทาและเจริญเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อประมาณ 10 วัน บางไอโซเลทสร้างกลุ่มสปอร์สีส้ม (spore mass) และพบเม็ด sclerotium สีดำฝังตัวอยู่ในอาหาร PDA มีลักษณะสปอร์รูปทรงกระบอกหัวท้ายมน (cylindrical) เซลล์เดี่ยวใส (ไม่มีสี) ขนาด 4.2-5.1 x 15.4-20.6 µm (ภาพที่ 1) ซึ่งจากลักษณะดังกล่าวสามารถจัดจำแนกเชื้อราสาเหตุดังกล่าวเป็นเชื้อรา *C. gloeosporioides* ตามหลักเกณฑ์ของ Sutton (1992)

2. ประเมินระดับความต้านทานต่อสาร
ป้องกันกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิม จากการศึกษาความต้านทานต่อสารคาร์เบนดาซิมที่ระดับ phenotypic mutation โดยประเมินระดับความต้านทานของเชื้อรา *C. gloeosporioides* ต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิมบนอาหาร PDA ที่ผสมสารคาร์เบนดาซิม 6 ระดับความเข้มข้น ได้แก่ 0.1, 1.0, 10, 100, 500 และ 1000 mg/l ตามหลักเกณฑ์ที่แสดงใน ตาราง 1 พบเชื้อราที่ต้านทานต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิมในระดับสูง (HR) ซึ่งเจริญได้บนอาหารผสม

Table 1 Phenotype-resistant levels of *Colletotrichum gloeosporioides* to carbendazim at various concentrations: 0.1, 1, 10, 100, 500 and 1,000 mg/l supplemented with potato dextrose agar (Modified from Koenraadt *et al.*, 1992; Peres *et al.*, 2004).

Phenotype-resistant levels	Carbendazim concentration (mg/l)					
	0.1	1	10	100	500*	1,000
Sensitive (S)	✓	X	X	X	X	X
	✓	✓	X	X	X	X
Weakly resistant (WR)	✓	✓	✓	X	X	X
Moderately resistant (MR)	✓	✓	✓	✓	X	X
Highly resistant (HR)	✓	✓	✓	✓	✓	X
	✓	✓	✓	✓	✓	✓

* = the field recommendation rate

✓ = the percentage of growth $\geq$ 10% compared with the control

X = the percentage of growth < 10% compared with the control

คาร์เบนดาซิมได้ ≥ 500 mg/l จำนวน 95 ไอโซเลท และระดับอ่อนแอ (S) ซึ่งเจริญได้บนอาหารผสมคาร์เบนดาซิมได้ ≤ 1 mg/l จำนวน 5 ไอโซเลท (ภาพที่ 2) ในการทดลองครั้งนี้ไม่พบเชื้อราที่ต้านทานระดับปานกลาง (MR) และระดับต่ำ (WR) และเมื่อตรวจสอบเส้นใยเชื้อราสายพันธุ์ S และ HR ที่เลี้ยงบนอาหาร PDA และ

PDA ผสมคาร์เบนดาซิมที่ 500 mg/l ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ขยาย 400 เท่า โดยวิธี slide culture พบลักษณะเส้นใยของเชื้อราทั้งสองสายพันธุ์ที่เลี้ยงบนอาหาร PDA และ เชื้อราสายพันธุ์ HR ที่เลี้ยงบนอาหาร PDA ผสม คาร์เบนดาซิมที่ 500 mg/l มีลักษณะเส้นใยไม่แตกต่างกัน ส่วนเชื้อราสายพันธุ์ S ที่เลี้ยง

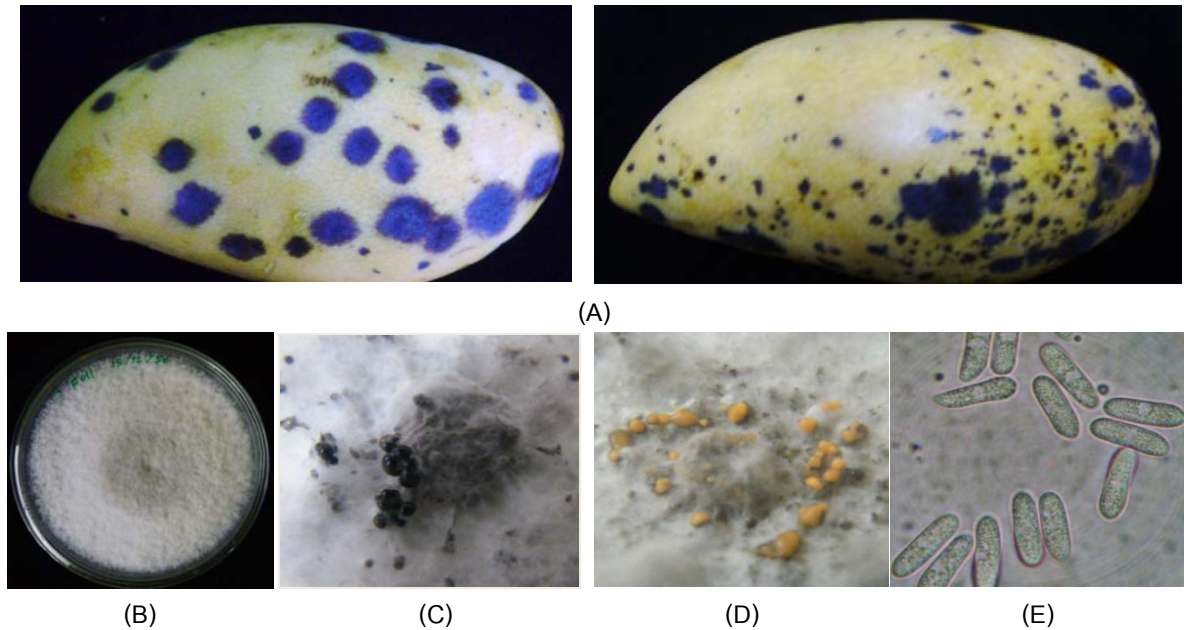


Figure 1 Morphological characteristics of *Colletotrichum gloeosporioides* isolates causing mango anthracnose disease; (A) anthracnose symptom on fruits, (B) Colony growth on potato dextrose agar for 10 days, (C) sclerotia, (D) slimy spore mass, (E) conidia (X100).

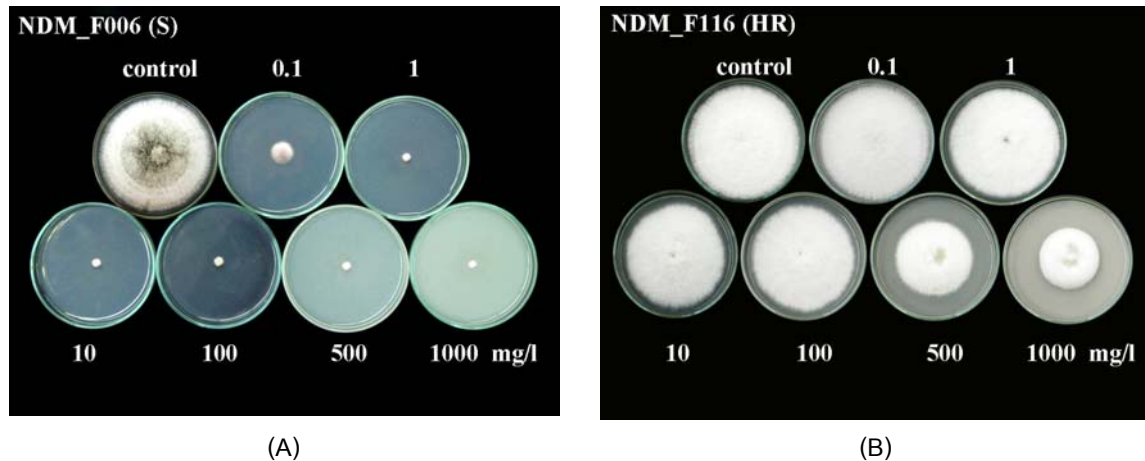


Figure 2 Carbendazim-resistance assays of *Colletotrichum gloeosporioides* causing mango anthracnose on potato dextrose agar supplemented with carbendazim at control (0), 0.1, 1, 10, 100, 500, and 1,000 mg/l; (A) Sensitive (S) phenotype. (B) Highly-resistant (HR) phenotype.

บนอาหาร PDA ผสมคาร์เบนดาซิมที่ 500 mg/l ไม่พบการสร้างเส้นใย (ภาพที่ 3)

3.เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอและวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ตรงตำแหน่งยีนเบต้าทูบูลิน จากการศึกษาความต้านทานต่อสารคาร์เบนดาซิมที่ระดับพันธุกรรม (genetic mutation) โดยเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอตรงตำแหน่งบางส่วนของยีน *TUB2* ของเชื้อรา *C. gloeosporioides* ด้วยเทคนิค PCR โดยสุ่มตัวอย่างเชื้อรากลุ่ม HR จำนวน 20 ไอโซเลท และเชื้อรากลุ่ม S จำนวน 5 ไอโซเลท เมื่อตรวจสอบผลปฏิกิริยาโดยวิธี gel electrophoresis พบแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 474 คู่เบส เมื่อนำไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ และแปลรหัสเป็นกรดกรดอะมิโน เพื่อหาการเปลี่ยนแปลงเฉพาะจุดพบการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนตรงตำแหน่ง 139, 149, 151, 156, 176, 194 และ 198 โดยเฉพาะการเปลี่ยนแปลงตรงตำแหน่ง codon 198 ของเชื้อรากลุ่มต้านทานระดับสูง (HR) มีความสัมพันธ์กับตัวอย่างเชื้อรากลุ่ม HR ทุก ไอโซเลท ในขณะที่ตรงตำแหน่งนี้ของเชื้อรากลุ่ม S ไม่เปลี่ยนแปลง กล่าวคือเกิดการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนจาก glutamic acid (E; GAG) ถูกแทนที่ด้วย alanine (A; GCG) บน codon ดังกล่าว (ภาพที่ 4)

วิจารณ์ผล

จากการประเมินระดับความต้านทานของเชื้อรา *C. gloeosporioides* ต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิม พบเชื้อราที่ต้านทานต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิมในระดับสูง (HR) จำนวน 95 % จากผลการทดลองนี้ซึ่งแสดงการกลายพันธุ์ในระดับ phenotypic mutation บ่งชี้ว่ามีเชื้อราเกิดการปรับตัวเองเพื่อความอยู่รอดและเกิดการต้านทานต่อสารเคมีดังกล่าวแฝงอยู่ในธรรมชาติขึ้นแล้ว เพราะพบเชื้อรากลุ่ม HR ที่สามารถเจริญได้ดีบนอาหาร PDA ที่ผสมสารคาร์เบนดาซิมที่ระดับความเข้มข้น ≥ 500 mg/l ซึ่งเป็นระดับความเข้มข้นในอัตราแนะนำ และมากกว่าอัตราแนะนำ โดยอาจเป็นผลมาจากการใช้สารเคมีป้องกันกำจัดโรคนี้มากเกินไปเกินอัตราแนะนำและใช้ติดต่อกันเป็นเวลานาน มีผลสอดคล้องกับรายงานของ Kumar *et al.* (2007) ที่ตรวจสอบความต้านทานต่อสารเคมีในกลุ่มเบนซิมิดาโซลของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. ในระดับ phenotype mutation พบเชื้อราดังกล่าวต้านทานต่อสารเคมีในกลุ่มเบนซิมิดาโซลอยู่ในระดับสูง

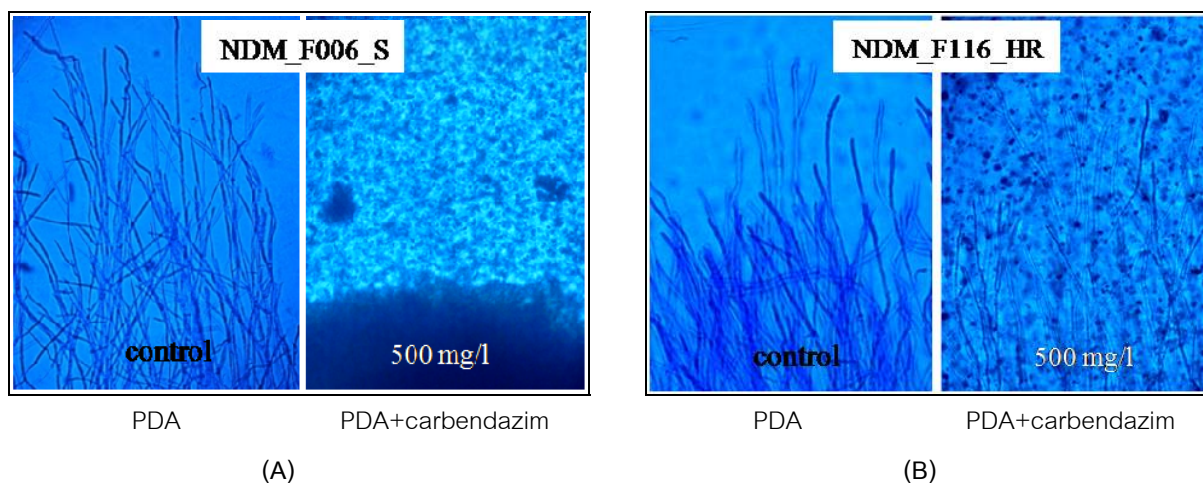


Figure 3 The mycelia (X40) of *Colletotrichum gloeosporioides* causing mango anthracnose on fruits between A) Sensitive (S) phenotype, (B) Highly-resistant (HR) phenotype on potato dextrose agar (PDA) and on PDA with carbendazim 500 mg/l.

จากการศึกษาความต้านทานต่อสารคาร์เบนดาซิมที่ระดับ genetic mutation โดยเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอตรงตำแหน่งบางส่วนของยีน *TUB2* ของเชื้อรา *C. gloeosporioides* ด้วยเทคนิค PCR โดยสุ่มตัวอย่างเชื้อรากลุ่ม HR และเชื้อรากลุ่ม S เมื่อนำไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ และแปลรหัสเป็นกรดกรดอะมิโน เพื่อหาการเปลี่ยนแปลงเฉพาะจุด พบจุดกลายพันธุ์ (point mutation) ของกรดอะมิโนตรงตำแหน่ง codon 198 ของเชื้อรากลุ่ม HR กล่าวคือเกิดการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนจาก glutamic acid (E; GAG) ถูกแทนที่ด้วย alanine (A; GCG) บน codon ดังกล่าว ซึ่งอาจเป็นตัวบ่งชี้ว่าเชื้อรา *C. gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของมะม่วงเกิดการกลายพันธุ์ต้านทานต่อสารคาร์เบนดาซิม ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาความต้านทานต่อสารในกลุ่มเบนซิมิดาโซลของเชื้อรา *C. gloeosporioides* ที่เกิดจุดกลายพันธุ์ ตรงตำแหน่ง codon ที่ 198 โดยศึกษาจากต้น northern jointvetch ในประเทศสหรัฐอเมริกา (Buhr and Dickman, 1994) โรค postbloom fruit drop ของส้ม ในรัฐฟลอริดา ประเทศสหรัฐ และ เมืองเซาเปาโล ประเทศบราซิล (Peres et al., 2004) โรคแอนแทรคโนสจากไม้ผลต่าง ๆ ในประเทศญี่ปุ่น (Chung et al., 2006), โรคแอนแทรคโนสของต้นสแตติส ในประเทศอิสราเอล (Maymon et al., 2006) โรคแอนแทรคโนสของพริก และ สตรอเบอรี่ ในประเทศเกาหลี (Kim et al., 2007) และโรคแอนแทรคโนสของมะม่วงในประเทศจีนตอนใต้ (Ru-Lin and Jun-Sheng, 2007) ซึ่งจากการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นในระดับพันธุกรรมนี้ เป็นตัวบ่งชี้ที่แสดงให้เห็นชัดเจนขึ้นว่าความต้านทานต่อสารเคมีดังกล่าวของเชื้อราสามารถถ่ายทอดสู่ลูกหลาน และเชื้อรากลุ่มที่กลายพันธุ์ต้านทานต่อสารเคมีที่กล่าวนี้ได้ปรากฏขึ้นแล้วในธรรมชาติ หรือแปลงปลูกของเกษตรกร และกำลังเพิ่มปริมาณขึ้นเรื่อย ๆ เพราะฉะนั้นจำเป็นต้องแนะนำเกษตรกรให้ตระหนักถึงการใช้อย่างระมัดระวังเพื่อป้องกันเชื้อราเกิดความต้านทานต่อสารเคมีที่กำลังเกิดขึ้นแสดงให้เห็นว่าจำเป็นต้องมีการจัดการอย่างระมัดระวังเพื่อให้เกิดการควบคุม และป้องกันกำจัดเชื้อโรคเป้าหมาย

ให้มีประสิทธิภาพสูงสุด สำหรับการกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นนี้ ยังมีรายงานจาก Damicone and Smith (2009) ว่าสามารถสร้างความต้านทานข้าม (cross resistance) ได้ด้วย กล่าวคือ การที่เชื้อราสาเหตุโรคพืชสร้างความต้านทานต่อสารเคมีชนิดใดชนิดหนึ่งแล้ว ยังสามารถสร้างความต้านทานต่อสารเคมีชนิดอื่นที่อยู่ในกลุ่มเดียวกันหรือคนละกลุ่มกันแต่มีกลไกการออกฤทธิ์เข้าทำลายเหมือนกันหรือคล้ายกัน ดังนั้นการศึกษารั้วนี้ที่แสดงให้เห็นว่าเกิดเชื้อราสายพันธุ์ต้านทานต่อสารคาร์เบนดาซิม นั้น อาจจะต้านทานต่อสารชนิดอื่นในกลุ่มเบนซิมิดาโซลด้วย จึงจำเป็นต้องแนะนำเกษตรกรให้ลดความเสี่ยงนี้โดยการใช้สารเคมีต่างกลุ่มสลับกัน หรือ ใช้หลักการจัดการศัตรูพืชแบบผสมผสานมาใช้ในแปลงปลูก (integrated pest management) (Prabakar et al., 2008; Singh et al., 2008; Damicone and Smith, 2009) อย่างไรก็ตามการกลายพันธุ์เพื่อต้านทานต่อสารเคมีนั้น อาจเกิดจากยีนเดี่ยว ๆ หรือหลายยีน ซึ่งการกลายพันธุ์ของยีนอาจเกิดขึ้นจำเพาะตำแหน่งเดียว หรือเกิดขึ้นหลายตำแหน่ง จึงต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป

สรุป

จากการแยกเชื้อรา *C. gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของผลมะม่วง และการประเมินระดับความต้านทานต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิมพบว่าเชื้อราที่มีความต้านทานระดับสูง (HR) ซึ่งเจริญได้บนอาหารผสม คาร์เบนดาซิมได้ ≥ 500 mg/l จำนวน 95 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างเชื้อราเพื่อเพิ่มปริมาณตรงตำแหน่งบางส่วนของยีนเบต้าทูบูลิน (*TUB2*) ด้วยเทคนิค PCR ได้แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 474 คู่เบส และเมื่อวิเคราะห์หาลำดับกรดอะมิโนเปรียบเทียบกับ *C. gloeosporioides* f. sp. *aeschynomene* (accession no. U14138) พบการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนตรงตำแหน่ง codon 198 ของเชื้อรากลุ่ม HR จาก glutamic acid (E) ของเชื้อรากลุ่ม S เป็น alanine (A)

code	Phenotype	Target site codon 198 ⁽²⁾	
U14138 ⁽¹⁾	wild type	MGTLISKIREEFDRMMATFSVVPSPKVS DTVVEPYNATLSVHQLVENSDETFCIDNEA	↓
1 F003	S	MGTLISKIREEFDRMMATFSVVPSPKVS DTVVEPYNATLSVHQLVENSDETFCIDNEA	
2 F006	S	MGTLISKIREEFDRMMATFSVVPSPKVYD TVVEPYNATLSVHQLVENSDETFCIDNEA	
3 F102	S	MGTLISKIREEFDRMMATFSVVPSPKVYD TVVEPYNATLSVHQLVENSDETFCIDNEA	
4 F118	S	MGTLISKIREEFDRMMATFSVVPSPKVYD TVVEPYNATLSVHQLVENSDETFCIDNEA	
5 F125	S	MGTLISKIREEFDRMMATFSVVPSPKVS DTVVEPYNATLSVHQLVENSDETFCIDNEA	
6 F002	HR	MGTLISKIREEFDRMMATFSVVPSPKVS DTVVEPYNATLSVHQLVENSDETFCIDNEA	
7 F012	HR	MGTLISKIREEFDRMMATFSVVPSPKVYD TVVEPYNATLSVHQLVENSDETFCIDNEA	
8 F014	HR	MGTLISKIREEFDRMMATFSVVPSPKVS DTVVEPYNATLSVHQLVENSDETFCIDNEA	
9 F018	HR	MGPLLSKIREEFDRMMATFSVVPSPKVS DTVVEPYNATLSVHQLVENSDETFCIDNEA	
10 F026	HR	MGTLISKIREEFDRMMATFSVVPSPKVS DTVVEPYNATLSVHQLVENSDETFCIDNEA	
11 F027	HR	MGPLLSKIREEFDRMMATFSVVPSPKVYD TVVEPYNATLSVHQLVENSDETFCIDNEA	
12 F033	HR	MGTLISKIREEFDRMMATFSVVPSPKVS DTVVEPYNATLSVHQLVENSDETFCIDNEA	
13 F061	HR	MGTLISKIREEFDRMMATFSVVPSPKVS DTVVEPYNATLSVHQLVENSDETFCIDNEA	
14 F066	HR	MGTLISKIREEFDRMMATFSVVPSPKVS DTVVEPYNATLSVHQLVENSDETFCIDNEA	
15 F076	HR	MGPLLSKIREEFDRMMATFSVVPSPKVS DTVVEPYNATLSVHQLVENSDETFCIDNEA	
16 F095	HR	MGPLLSKIREEFDRMMATFSVVPSPKVS DTVVEPYNATLSVHQLVENSDETFCIDNEA	
17 F103	HR	MGPLLSKIREEFDRMMATFSVVPSPKVS DTVVEPYNATLSVHQLVENSDETFCIDNEA	
18 F106	HR	MGTLISKIREEFDRMMATFSVVPSPKVS DTVVEPYNATLSVHQLVENSDETFCIDNEA	
19 F110	HR	MGTLISKIREEFDRMMATFSVVPSPKVS DTVVEPYNATLSVHQLVENSDETFCIDNEA	
20 F114	HR	MGPLLSKIREEFDRMMATFSVVPSPKVS DTVVEPYNATLSVHQLVENSDETFCIDNEA	
21 F116	HR	MGTLISKIREEFDRMMATFSVVPSPKVS DTVVEPYNATLSVHQLVENSDETFCIDNEA	
22 F130	HR	MGPLLSKIREEFDRMMATFSVVPSPKVS DTVVEPYNATLSVHQLVENSDETFCIDNEA	
23 F131	HR	MGPLLSKIREEFDRMMATFSVVPSPKVS DTVVEPYNATLSVHQLVENSDETFCIDNEA	
24 F135	HR	MGPLLSKIREEFDRMMATFSVVPSPKVYD TVVEPYNATLSVHQLVENSDETFCIDNEA	
25 F146	HR	MGTLISKIREEFDRMMATFSVVPSPKVS DTVVEPYNATLSVHQLVENSDETFCIDNEA	
		-----*-----*-----*-----*-----*-----*-----	60
code	Phenotype		
U14138 ⁽¹⁾	wild type	LYDICMRTLKLSNPSYGLNHLVSAVMSGVTTCLRFPGQLNSDLRKLAVNMVFPRLHFF	
1 F003	S	LYDICMRTLKLSNPSYGLNHLVSAVMSGVTTCLRFPGQLNSDLRKLAVNMVFPRLHFF	
2 F006	S	LYDICMRTLKLSNPSYGLNHLVSAVMSGVTTCLRFPGQLNSDLRKLAVNMVFPRLHFF	
3 F102	S	LYDICMRTLKLSNPSYGLNHLVSAVMSGVTTCLRFPGQLNSDLRKLAVNMVFPRLHFF	
4 F118	S	LYDICMRTLKLSNPSYGLNHLVSAVMSGVTTCLRFPGQLNSDLRKLAVNMVFPRLHFF	
5 F125	S	LYDICMRTLKLSNPSYGLNHLVSAVMSGVTTCLRFPGQLNSDLRKLAVNMVFPRLHFF	
6 F002	HR	LYDICMRTLKLSNPSYGLNHLVSAVMSGVTTCLRFPGQLNSDLRKLAVNMVFPRLHFF	
7 F012	HR	LYDICMRTLKLSNPSYGLNHLVSAVMSGVTTCLRFPGQLNSDLRKLAVNMVFPRLHFF	
8 F014	HR	LYDICMRTLKLSNPSYGLNHLVSAVMSGVTTCLRFPGQLNSDLRKLAVNMVFPRLHFF	
9 F018	HR	LYDICMRTLKLSNPSYGLNHLVSAVMSGVTTCLRFPGQLNSDLRKLAVNMVFPRLHFF	
10 F026	HR	LYDICMRTLKLSNPSYGLNHLVSAVMSGVTTCLRFPGQLNSDLRKLAVNMVFPRLHFF	
11 F027	HR	LYDICMRTLKLSNPSYGLNHLVSAVMSGVTTCLRFPGQLNSDLRKLAVNMVFPRLHFF	
12 F033	HR	LYDICMRTLKLSNPSYGLNHLVSAVMSGVTTCLRFPGQLNSDLRKLAVNMVFPRLHFF	
13 F061	HR	LYDICMRTLKLSNPSYGLNHLVSAVMSGVTTCLRFPGQLNSDLRKLAVNMVFPRLHFF	
14 F066	HR	LYDICMRTLKLSNPSYGLNHLVSAVMSGVTTCLRFPGQLNSDLRKLAVNMVFPRLHFF	
15 F076	HR	LYDICMRTLKLSNPSYGLNHLVSAVMSGVTTCLRFPGQLNSDLRKLAVNMVFPRLHFF	
16 F095	HR	LYDICMRTLKLSNPSYGLNHLVSAVMSGVTTCLRFPGQLNSDLRKLAVNMVFPRLHFF	
17 F103	HR	LYDICMRTLKLSNPSYGLNHLVSAVMSGVTTCLRFPGQLNSDLRKLAVNMVFPRLHFF	
20 F106	HR	LYDICMRTLKLSNPSYGLNHLVSAVMSGVTTCLRFPGQLNSDLRKLAVNMVFPRLHFF	
18 F110	HR	LYDICMRTLKLSNPSYGLNHLVSAVMSGVTTCLRFPGQLNSDLRKLAVNMVFPRLHFF	
19 F114	HR	LYDICMRTLKLSNPSYGLNHLVSAVMSGVTTCLRFPGQLNSDLRKLAVNMVFPRLHFF	
21 F116	HR	LYDICMRTLKLSNPSYGLNHLVSAVMSGVTTCLRFPGQLNSDLRKLAVNMVFPRLHFF	
22 F130	HR	LYDICMRTLKLSNPSYGLNHLVSAVMSGVTTCLRFPGQLNSDLRKLAVNMVFPRLHFF	
23 F131	HR	LYDICMRTLKLSNPSYGLNHLVSAVMSGVTTCLRFPGQLNSDLRKLAVNMVFPRLHFF	
24 F135	HR	LYDICMRTLKLSNPSYGLNHLVSAVMSGVTTCLRFPGQLNSDLRKLAVNMVFPRLHFF	
25 F146	HR	LYDICMRTLKLSNPSYGLNHLVSAVMSGVTTCLRFPGQLNSDLRKLAVNMVFPRLHFF	
		-----*-----*-----*-----*-----*-----*-----	120

Figure 4 Comparison of amino acids of *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *aeschynomene* a second beta-tubulin gene (⁽¹⁾accession no. U14138) at the target sites of benzimidazole between carbendazim-resistant *C. gloeosporioides* causing anthracnose on mango fruits (⁽²⁾Buhr and Dickman, 1994; Peres, *et al.*, 2004).

คำขอบคุณ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนส่วนหนึ่ง จากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว) และศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ (AG-BIO/PERDO-CHE) และขอขอบพระคุณ Prof. Dr. Kazuya Akimitsu แห่งมหาวิทยาลัยคาทอลิก ประเทศญี่ปุ่น ที่ให้อุปกรณ์และสนับสนุนการวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ในการศึกษาครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

- เกียรติเกษตร กาญจนพิสุทธิ. 2547. คู่มือมะม่วง. เพ็ท-แพล้น พับลิชชิง, กรุงเทพฯ. 272 หน้า.
- Akem, C. N. 2006. Mango anthracnose disease: present status and future research priorities. *Plant Pathol. J.* 5: 266-273.
- Buhr, T. L., and M. B., Dickman. 1994. Isolation, characterization, and expression of a second β -tubulin-encoding gene from *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *aeschynomene*. *Appl. and Environ. Microbiol.* 60: 4155-4159.
- Chung, W. H., H. Ishii, K. Nishimura, M. Fukaya, K. Yano, and Y. Kajitani. 2006. Fungicide sensitivity and phylogenetic relationship of anthracnose fungi isolated from various fruit crops in Japan. *Plant Dis.* 90: 506-512.
- Damicone, J., and D. Smith. 2009. Fungicide resistance management. (On-line). Oklahoma Cooperative Extension Fact Sheets. Available: <http://pods.dasnr.okstate.edu/docushare/dsweb/Get/Document-2317/F-7663web.pdf> (July 1, 2010).
- Deising, H. B., S. Reimann, and S. F. Pascholati. 2008. Mechanisms and significance of fungicide resistance. *Brazil. J. Microbiol.* 39: 286-295.
- Kim, Y. S., J. Y. Min, B. K. Kang, N. V. Bach, W. B. Choi, E. W. Park, and H. T. Kim. 2007. Analyses of the less benzimidazole-sensitivity of the isolates of *Colletotrichum* spp. causing the anthracnose in pepper and strawberry. *Plant Pathol. J.* 23: 187-192.
- Koenraad, H., S. C. Somerville, and A. L. Jones. 1992. Characterization of mutations in the beta-tubulin gene of benomyl-resistant field isolates of *Venturia inaequalis* and other plant pathogenic fungi. *Phytopathology* 82: 1348-1354.
- Kumar, A. S., N. P. E. Reddy, K. H. Reddy, and M. C. Devi. 2007. Evaluation of fungicidal resistance among *Colletotrichum gloeosporioides* isolates causing mango anthracnose in Agri Export Zone of Andhra Pradesh, India. *Plant Pathol. Bull.* 16: 157-160.
- Ma, Z., and T. J. Michailides. 2005. Advances in understanding molecular mechanisms of fungicide resistance and molecular detection of resistant genotypes in phytopathogenic fungi. *Crop Protection* 24: 853-863.
- Maymon, M., A. Zveibil, S. Pivonia, D. Minz, and S. Freeman. 2006. Identification and characterization of benomyl-resistant and sensitive populations of *Colletotrichum gloeosporioides* from statice (*Limonium* spp.). *Phytopathology* 96: 542-548.

- Peres, N. A. R., N. L. Souza, T. L. Peever, and L. W. Timmer. 2004. Benomyl sensitivity of isolates of *Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides* from citrus. Plant Dis. 88: 125-130.
- Prabakar, K., T. Raguchander, D. Saravanakumar, P. Muthulakshmi, V. K. Parthiban, and V. Prakasam. 2008. Management of postharvest disease of mango anthracnose incited by *Colletotrichum gloeosporioides*. Arch. Phytopathology Plant Protect. 41: 333-339
- Ru-Lin, Z., and H. Jun-Sheng. 2007. Cloning of a carbendazim-resistant gene from *Colletotrichum gloeosporioides* of mango in South China. Afr. J. Biotechnol. 6: 143-147.
- Singh, S. B., I. Mukherjee, J. Maisnam, P. Kumar, M. Gopal, and G. Kulshrestha. 2008. Determination of pesticide residues in IPM and non-IPM sample of mango (*Mangifera indica*). J. Environ. Sci. Health Part B. 43: 300-306.
- Sutton, B. C. 1992. The genus *Glomerella* and its anamorph *Colletotrichum*. Pp. 1 – 27. In: *Colletotrichum: Biology, Pathology and Control*. J. A. Bailey, and M. J. Jeger, eds. CAB International, Wallingford, UK
-