

ความไวของเชื้อรา *Exserohilum turcicum* ต่อสารคาร์เบนดาซิมและประสิทธิภาพของ  
สารกำจัดเชื้อราในการควบคุมโรคใบไหม้แผลใหญ่ข้าวโพดในประเทศไทย  
Sensitivity of *Exserohilum turcicum* to Carbendazim and the Fungicide's Efficacy  
in Controlling Northern Corn Leaf Blight in Thailand

ธนดา นาคเงิน<sup>1/</sup> กิตติธัช ทรายชู<sup>2/</sup> ศุภฤกษ์ ลีมดลธรรม<sup>1/</sup> วีระณีย์ ทองศรี<sup>1/</sup> ธิดา เดชฮวบ<sup>1/</sup> ปัฐวิภา สงกุมาร<sup>1/\*</sup>  
Thanada Nakngoen<sup>1/</sup> Kittithud Trachu<sup>2/</sup> Supharoek Limdoltham<sup>1/</sup> Veeranee Tongsrri<sup>1/</sup>  
Tida Dethoup<sup>1/</sup> Pattavipha Songkumarn<sup>1/\*</sup>

Received 27 May 2025/Revised 1 Aug. 2025/Accepted 26 Aug. 2025

### ABSTRACT

Northern corn leaf blight is caused by *Exserohilum turcicum*. The use of carbendazim in combination with demethylation inhibitor fungicides is included in the recommendations for controlling this disease in Thailand. However, the efficacy of carbendazim against *E. turcicum* remains unclear. This research assessed the sensitivity of *E. turcicum* isolates (n = 36), collected during 2021–2022, to carbendazim along with sequence analysis of the  $\beta$ 2-tubulin (*Tub2*) gene at codons 167, 198, and 200 of the *E. turcicum* isolates with the highest and lowest sensitivity to carbendazim (n = 2/group). Field efficacy of carbendazim and other fungicides for controlling *E. turcicum* in sweet corn was also determined. The results revealed that approximately half of the *E. turcicum* isolates exhibited EC<sub>50</sub> values exceeding the established baseline sensitivity (1.23–8.70  $\mu$ g/mL). The frequency distribution of EC<sub>50</sub> values showed a unimodal distribution with positive skewness, indicating a shift towards reduced sensitivity in the population. Sequence analysis of the *Tub2* gene revealed no differences between the isolates with the highest and lowest sensitivity to carbendazim. Field trials with natural infection revealed that carbendazim (50%SC) was less effective at disease suppression compared to tebuconazole+trifloxystrobin (50+25%WG) and azoxystrobin+difenoconazole (20+12.5%SC), applied at recommended rates. These findings suggest a decline in sensitivity to carbendazim within the *E. turcicum* population in Thailand. The control efficacy of carbendazim on *E. turcicum* was relatively low compared to the other recommended chemical mixtures.

**Keywords:** northern corn leaf blight; *Exserohilum turcicum*; carbendazim; fungicide sensitivity

<sup>1/</sup> ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ จตุจักร กรุงเทพฯ 10900

<sup>1/</sup> Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Kasetsart University, Chatuchak, Bangkok 10900, Thailand

<sup>2/</sup> สถานีวิจัยลพบุรี มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ อ.โคกเจริญ จ.ลพบุรี 15250

<sup>2/</sup> Lop Buri Research Station, Kasetsart University, Kok Charoen, Lop Buri 15250, Thailand

\* Corresponding author: fagrpps@ku.ac.th

## บทคัดย่อ

โรคใบไหม้แผลใหญ่ของข้าวโพดจากเชื้อรา *Exserohilum turcicum* มีคำแนะนำการใช้สารคาร์เบนดาซิมร่วมกับสารกลุ่ม demethylation inhibitors เพื่อควบคุมโรคนี้ แต่ประสิทธิภาพของสารคาร์เบนดาซิมต่อเชื้อ *E. turcicum* ยังไม่ชัดเจน งานวิจัยนี้จึงประเมินความไวต่อคาร์เบนดาซิมของประชากรเชื้อรา *E. turcicum* (n=36) ซึ่งรวบรวมระหว่างปี พ.ศ. 2564–2565 ตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน  $\beta_2$ -tubulin (*Tub2*) ที่ตำแหน่งโคดอน 167 198 และ 200 ในไอโซเลทเชื้อ *E. turcicum* ซึ่งไวต่อสารคาร์เบนดาซิมต่ำสุดและสูงสุดสองลำดับแรกในประชากรเชื้อราทดสอบ และประเมินศักยภาพของคาร์เบนดาซิมในแปลงปลูกข้าวโพด ผลการทดลองความไวต่อคาร์เบนดาซิมโดยพิจารณาค่าความเข้มข้นที่ยับยั้งการเจริญเส้นใยเชื้อรา 50% ( $EC_{50}$ ) พบว่า เชื้อราในประชากรมากกว่าครึ่งมีค่า  $EC_{50}$  สูงกว่า baseline sensitivity (1.23–8.70  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) และกราฟแจกแจงความถี่ค่า  $EC_{50}$  บ่งชี้แนวโน้มความไวต่อสารคาร์เบนดาซิมลดลง การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *Tub2* ไม่พบความแตกต่างในไอโซเลทเชื้อราที่ไวต่อสารคาร์เบนดาซิมสูงและต่ำสุดในสองลำดับแรก การทดสอบสารเคมีในแปลงปลูกซึ่งเกิดโรคตามธรรมชาติ พบว่า การพ่นคาร์เบนดาซิม (50% SC) มีประสิทธิภาพในการลดความรุนแรงของโรคได้น้อยกว่าการใช้สารผสมระหว่าง tebuconazole+trifloxystrobin (50+25% WG) และ azoxystrobin+ difenoconazole (20+12.5% SC) ตามอัตราแนะนำ สรุปได้ว่าประชากรเชื้อ *E. turcicum* ของประเทศไทยมีความไวต่อคาร์เบนดาซิมลดลง และการพ่นสารคาร์เบนดาซิมเพียงชนิดเดียวโดยไม่ได้ผสมสารอื่นมีประสิทธิภาพค่อนข้างต่ำ

**คำสำคัญ:** ใบไหม้แผลใหญ่ข้าวโพด; *Exserohilum turcicum*; คาร์เบนดาซิม; ความไวต่อสารกำจัดเชื้อรา

## บทนำ

โรคใบไหม้แผลใหญ่มักพบมีการระบาดในข้าวโพดหวาน (องอาจ, 2567) มีสาเหตุจากเชื้อรา *Exserohilum turcicum* หรือในระยะเวลาการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศเรียกว่า *Setosphaeria turcica* จัดเป็นโรคทางใบของข้าวโพดที่สำคัญส่งผลกระทบต่อเศรษฐกิจ (Ahangar et al., 2022) เกิดความสูญเสียผลผลิต 24-91% ขึ้นอยู่กับระยะเวลาการเจริญเติบโตของพืช ความรุนแรงของการระบาดโรค ระดับความต้านของพันธุ์และความรุนแรงของเชื้อก่อโรค (Nwanosike and Mabagala, 2017) การจัดการโรคใบไหม้แผลใหญ่ข้าวโพดในประเทศไทยเกษตรกรใช้สารกำจัดเชื้อราเป็นหลัก สารเคมีกลุ่ม demethylation inhibitors (DMI) และquinone outside inhibitors (QoI) จัดเป็นกลุ่มสารเคมีที่มีประสิทธิภาพสูงในการใช้งานแบบเดี่ยวหรือแบบผสมซึ่งมีรายงานในสหรัฐอเมริกาและจีน (Weems, 2016; Weems and Bradley, 2017; Dai et al., 2018) ส่วนประเทศไทย วิไลวรรณและคณะ (2552) รายงานว่าสารเคมีกลุ่ม DMI เช่น สารโพรพิโคนาโซลแบบเดี่ยว หรือสารเคมีผสมระหว่างโพรพิโคนาโซลและสารอะซอกซีสโตรบิน (กลุ่ม QoI) มีประสิทธิภาพสูงในการป้องกันกำจัดโรคใบไหม้แผลใหญ่ในข้าวโพดหวานโดยไม่มีสารตกค้างในผลผลิต และให้ผลผลิตข้าวโพดหวานฝักสดทั้งเปลือกสูงกว่าการไม่ใช้สารควบคุมโรค รวมถึงวราภรณ์และคณะ (2558) พบว่าความรุนแรงของโรคใบไหม้แผลใหญ่ลดลง 45.89–55.45% เมื่อนิยมน้ำด้วยสารเคมีแบบเดี่ยวหรือแบบผสมระหว่างกลุ่ม DMI และ QoI เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่นิยมน้ำด้วยน้ำเปล่า ทั้งนี้การนิยมน้ำสารเคมีจากกลุ่ม DMI เพียงเดี่ยว และสารเคมีผสมระหว่าง DMI และ QoI มักปรากฏในคำแนะนำเพื่อใช้ควบคุมโรคใบไหม้แผลใหญ่ในประเทศไทย นอกจากนี้ สารคาร์เบนดาซิม (carbendazim) ซึ่งอยู่ในกลุ่ม methyl benzimidazole

carbamates (MBC) เป็นสารเคมีอีกหนึ่งชนิดที่มีการแนะนำให้ใช้ร่วมกับสารอีพอกซีโคนาโซล (กลุ่ม DMI) ในการควบคุมโรคด่างขาว (วิไลวรรณและคณะ, 2552) ทั้งนี้ De Rossi et al. (2015) ศึกษาในระดับความไวของ *E. turcicum* ในการตอบสนองต่อสารเคมีหลายชนิด โดยรวบรวมไอโซเลทเชื้อราจากแปลงปลูกข้าวโพดในประเทศบราซิลและอาร์เจนตินา และบ่งชี้ระดับความเข้มข้นสารเคมีที่สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราที่ระดับ 50% (half maximal inhibitory concentration, IC<sub>50</sub>) พบว่า *E. turcicum* มีความไวในการตอบสนองต่อสารคาร์เบนดาซิมต่ำกว่าสารเคมีชนิดอื่น ๆ โดยพบว่าระดับค่า IC<sub>50</sub> มีค่าสูงกว่า 50 µg/mL ในขณะที่เชื้อราด่างขาวมีความไวต่อสารไอโพรโดโคนสูงที่สุด มีค่า IC<sub>50</sub> เท่ากับ 0.01 µg/mL จึงจัดสารคาร์เบนดาซิมอยู่ในกลุ่มสารที่ไม่เป็นพิษต่อเชื้อรา *E. turcicum* รวมถึง Yelgurty et al. (2019) พบว่าสารคาร์เบนดาซิมยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *E. turcicum* ได้น้อยที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับสารเคมีจากกลุ่มเดียวกัน ได้แก่ ไทโอฟาเนต-เมทิล รวมถึงสารเคมีจากกลุ่ม DMI ได้แก่ โพรพิโคนาโซล ไดฟีโนโคนาโซล เฮกซะโคนาโซล ไตรอะโดเมฟอน และทีบูโคนาโซล เมื่อพิจารณาเทียบเคียงในระดับความเข้มข้นของสารออกฤทธิ์ที่เท่ากันหรือใกล้เคียงกัน

คาร์เบนดาซิมเป็นสารที่จัดอยู่ในกลุ่มที่มีความเสี่ยงสูงต่อการต้านทานสารเคมีของเชื้อโรค โดยออกฤทธิ์เฉพาะกับตำแหน่งโปรตีน  $\beta$ -tubulin ในเชื้อราทำให้ยับยั้งการรวมตัวของไมโครทิวบูล (microtubule) ระหว่างการแบ่งนิวเคลียส ส่งผลให้การเจริญเติบโตของเส้นใยและการยึดตัวของ germ-tube หยุดชะงัก เชื้อราจึงไม่สามารถเจริญเติบโตได้อย่างปกติ (Wang et al., 2022) การใช้คาร์เบนดาซิมในปริมาณมากและบ่อยครั้งในช่วงที่มีการระบาดของโรคพืชเป็นแรงกดดันที่ทำให้เกิดการคัดเลือกสายพันธุ์

เชื้อราต้านทานต่อสารคาร์เบนดาซิม ส่งผลให้โครงสร้างประชากรเชื้อราเปลี่ยนแปลงไปจากเดิม โดยเชื้อราสายพันธุ์ต้านทานสารเคมีเพิ่มจำนวนจนกลายเป็นสมาชิกหลักของประชากรแทนเชื้อราสายพันธุ์เดิมที่ไวต่อสารเคมี (Liu et al., 2019) ส่งผลให้ประสิทธิภาพของสารคาร์เบนดาซิมในการควบคุมโรคใบไหม้แผลใหญ่ลดลง มีรายงานเชื้อราก่อโรคพืชหลายชนิดต้านทานต่อสารคาร์เบนดาซิม เช่น *Botrytis cinerea* (Liu et al., 2016; He et al., 2020) *Botryosphaeria dothidea* (Wang et al., 2022) *Colletotrichum* spp. (Kongtragoul et al., 2011) *Colletotrichum gloeosporioides* (Kongtragoul et al., 2011) *Fusarium graminearum* (Liu et al., 2019) และ *Sclerotinia sclerotiorum* (Zhu et al., 2016) โดยกลไกในการต้านทานต่อสารคาร์เบนดาซิมเกี่ยวข้องกับการกลายพันธุ์ระดับยีนแบบเฉพาะจุด (point mutation) ที่ตำแหน่งยีนเบต้าทูบูลิน 2 ( $\beta_2$ -tubulin, *Tub2*) โดยรูปแบบการกลายพันธุ์บนบริเวณยีนดังกล่าวที่ปรากฏในรายงานวิจัย ได้แก่ โคดอน 167 (F167Y) เปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนจากฟีนิลอะลานีน (F) เป็นไทโรซีน (Y) โคดอน 198 (E198A E198V E198G E198L E198K E198Q) เปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนจากกรดกลูตามิก (E) เป็นเอลานีน (A) วาลีน (V) ไกลซีน (G) ลิวซีน (L) ไลซีน (K) และกลูตามีน (Q) ตามลำดับ และโคดอน 200 (F200Y) เปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนฟีนิลอะลานีนเป็นไทโรซีน

อนึ่ง ข้อมูลความไวต่อคาร์เบนดาซิมของประชากรเชื้อราก่อโรคใบไหม้แผลใหญ่ข้าวโพดที่รวบรวมจากแหล่งปลูกในประเทศไทย รวมถึงข้อมูลประสิทธิภาพของสารคาร์เบนดาซิมในแปลงปลูกข้าวโพดที่มีการเข้าทำลายของโรคด่างขาวยังไม่ชัดเจน และความไวต่อคาร์เบนดาซิมของประชากรเชื้อรา *E. turcicum* ในประเทศไทยเกี่ยวข้องอย่างไร

กับการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งยีน *Tub2* ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินความไวต่อสารคาร์เบนดาซิมของประชากรเชื้อราก่อโรคใบไหม้แผลใหญ่ ซึ่งรวบรวมจากแหล่งปลูกข้าวโพด ในปี พ.ศ. 2564–2565 ตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน *Tub2* ที่ตำแหน่งโคดอน 167 198 และ 200 ในไอโซเลทเชื้อรา *E. turcicum* ซึ่งไวต่อสารคาร์เบนดาซิมต่ำสุดและสูงสุดสองลำดับแรกในประชากรเชื้อราทดสอบ และประเมินศักยภาพของสารคาร์เบนดาซิมในแปลงปลูกข้าวโพดที่มีการเข้าทำลายของเชื้อก่อโรคใบไหม้แผลใหญ่ข้าวโพด เพื่อได้ข้อมูลด้านศักยภาพของสารคาร์เบนดาซิมในการควบคุมโรคใบไหม้แผลใหญ่ของข้าวโพดที่สอดคล้องกับประชากรเชื้อราก่อโรคในปัจจุบัน

## อุปกรณ์และวิธีการ

### 1. เชื้อรา *E. turcicum* ที่ใช้ในงานวิจัย

เชื้อรา *E. turcicum* 36 ไอโซเลท ได้รับความอนุเคราะห์จากห้องปฏิบัติการโรคพืชที่เกิดจากเชื้อรา ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ โดยเป็นเชื้อราสายพันธุ์บริสุทธิ์ซึ่งผ่านการแยกเชื้อจากใบข้าวโพดแสดงอาการใบไหม้แผลใหญ่จากแหล่งปลูกข้าวโพดหวาน 35 แปลง 10 จังหวัด ในปี พ.ศ. 2564–2565 (Table 1) อนึ่งเชื้อราทุกไอโซเลทผ่านการบ่งชี้ชนิดเชื้อโดยการตรวจสอบลักษณะสัณฐานวิทยาและระบุชนิดด้วยวิธีการทางชีววิทยาโมเลกุลอาศัยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณไรโบโซมอลดีเอ็นเอ (บริเวณ ITS1-ITS2 และยีนกำหนดการสร้าง 5.8 rRNA) รวมถึงผ่านการพิสูจน์โรคตามหลักการของ Koch's postulates

$$\% \text{ การยับยั้งการเจริญเส้นใย} = [(a-b)/a] \times 100$$

โดย a คือ เส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อราที่เจริญเติบโตในชุดควบคุม

b คือ เส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อราที่เจริญเติบโตในอาหารพืชแต่ละความเข้มข้น

### 2. การประเมินระดับความไวของคาร์เบนดาซิมในการยับยั้งเส้นใยเชื้อรา

ประเมินระดับความไวของเชื้อราในการตอบสนองต่อสารคาร์เบนดาซิม โดยอาศัยการอ้างอิงค่าความเข้มข้นของสารเคมีที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราแต่ละไอโซเลทที่ 50% (half maximal effective concentration, EC<sub>50</sub>) ทั้งนี้พิจารณาแนวโน้มการเปลี่ยนแปลงระดับความไวโดยอาศัยการกำหนดค่า baseline sensitivity หากพบไอโซเลทเชื้อราแสดงค่า EC<sub>50</sub> สูงกว่า baseline sensitivity แสดงให้เห็นถึงประชากรเชื้อราชุดทดสอบดังกล่าวปรากฏไอโซเลทของเชื้อราที่แสดงแนวโน้มการตอบสนองลดลง มีดังนี้

2.1 ประเมินความไวของเชื้อราแต่ละไอโซเลทโดยการวิเคราะห์หาค่า EC<sub>50</sub> ด้วยวิธีอาหารพิษ (poison food method) วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ อย่างน้อย 2 ซ้ำที่แตกต่างกันอย่างอิสระ ซ้ำละ 3 งาน ทั้งนี้ก่อนการทดสอบด้วยวิธีอาหารพิษเลี้ยงเชื้อราแต่ละไอโซเลทในอาหาร potato dextrose agar (PDA) โดยบ่มเลี้ยงเชื้อราที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน เตรียมอาหารพิษโดยผสมสารคาร์เบนดาซิมในอาหาร PDA เข้มข้น 7 ระดับ (0 0.1 1 10 100 1,000 และ 10,000 µg/mL) รวมชุดควบคุมซึ่งไม่มีสารเคมี ทดสอบการเจริญเติบโตของเชื้อราบนอาหารพิษโดยเจาะขึ้นวันอาหาร PDA ที่มีเส้นใยเชื้อราอายุ 7 วัน ด้วย cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 ซม. ย้ายขึ้นวันไปยังจานอาหารพิษที่มีสารคาร์เบนดาซิม บ่มเลี้ยงเชื้อ 7 วัน บันทึกเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อราที่โตบนอาหารพิษ คำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา โดยใช้สูตร

**Table 1** Identity, location and GenBank accession numbers of *E. turcicum* obtained from this study during 2021–2022

Location	Isolate code (GenBank accession number <sup>1/</sup> )
Nakhon Ratchasima	ET-NMA-9-1-1 (PV436745), ET-NMA-10-1-1 (PV436746), ET-NMA-15-1-1 (PV436747)
Ratchaburi	ET-RBR-1-2-2 (PV436748), ET-RBR-6-2-1 (PV436749)
Kamphaeng Phet	ET-KPT-1-1-1 (PV436750)
Tak	ET-TAK-1-2-1 (PV436751), ET-TAK-8-1-1 (OQ733355), ET-TAK-10-1-1 (PV436753), ET-TAK-11-2-1 (PV436754), ET-TAK-12-1-1 (PV436755)
Mae Hong Son	ET-MSN-1-1-1 (PV436756), ET-MSN-6-1-1 (PV436757), ET-MSN-7-2-1 (PV436758), ET-MSN-8-1-1 (OQ733356), ET-MSN-10-2-1 (PV436759), ET-MSN-12-1-1 (PV436760), ET-MSN-14-1-1 (PV436761), ET-MSN-16-1-1 (PV436762)
Chiang Mai	ET-CMI-2-1-1 (PV436763), ET-CMI-12-2-1 (PV436764), ET-CMI-19-1-1 (PV436765), ET-CMI-21-1-1 (PV476778)
Chiang Rai	ET-CRI-1-1-1 (PV436766), ET-CRI-3-1-1 (PV436767), ET-CRI-4-2-1 (PV436768), ET-CRI-6-1-1 (PV436769), ET-CRI-7-1-1 (PV436770)
Lop Buri	ET-LRI-1-1-1 (PV436771)
Kanchanaburi*	ET-KRI-1-1-1 (PV436772), ET-KRI-4-1-1 (PV436773), ET-KRI-6-1-1 (PV436774), ET-KRI-7-1-1 (PV436775), ET-KRI-9-1-1 (PV436776)
Nakhon Pathom*	ET-NPT-1-2-1 (PV436777)

<sup>1/</sup> Accession numbers of specimens deposited in GenBank (NCBI), \* Samples were obtained in 2022

2.2 วิเคราะห์หาค่า  $EC_{50}$  ของสารคาร์เบนดาซิม ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใย *E. turcicum* ในแต่ละไอโซเลทด้วยวิธีโพรบิต (probit analysis) โดยจัดทำกราฟเส้นตรงและสมการเส้นตรง กำหนดให้แกน x คือ ลอการิทึมของความเข้มข้นสารเคมี และแกน y คือ ตัวเลขโพรบิตซึ่งเทียบเคียงค่าจากเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญเติบโต คำนวณหาค่า  $EC_{50}$  โดยอาศัยการแทนค่าตัวแปร  $y = 5$  (ค่าโพรบิตที่เทียบเท่า 50%) ในสมการเส้นตรงข้างต้น จากนั้นคำนวณหาค่าแอนติลอการิทึมของค่า x หนึ่งการทดลองซ้ำอิสระ 1 ซ้ำ แยกคำนวณค่า  $EC_{50}$  จากชุดทดลองซ้ำแต่ละชุด ซึ่งได้ค่า  $EC_{50}$  3 ชุด/ไอโซเลท ทดสอบความแปรปรวนทางสถิติค่า  $EC_{50}$  จากชุดการทดลองซ้ำอิสระ 2 ซ้ำ ( $n=3$  each) โดยใช้สถิติทดสอบของเลวิน ทั้งนี้ จะนำชุดข้อมูลของซ้ำอิสระที่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p>0.05$ ) มาหาค่าเฉลี่ยเพื่อรายงานค่าระดับความไวของเชื้อราแต่ละไอโซเลทต่อ

สารคาร์เบนดาซิม กำหนดค่า baseline sensitivity ของประชากรเชื้อราทดสอบต่อสารคาร์เบนดาซิมโดยอ้างอิงวิธีการของ Fang et al. (2023) ซึ่งอาศัยวิธีการแจกแจงความถี่และทดสอบความแตกต่างระหว่างความถี่ของชุดข้อมูล และทดสอบความแตกต่างระหว่างความถี่ของชุดข้อมูลโดยอาศัยสถิติทดสอบ Shapiro-Wilk ตรวจสอบค่าเฉลี่ย  $EC_{50}$  ของเชื้อราเพื่อหาช่วงการแจกแจงแบบปกติของชุดข้อมูลในการรายงานค่า baseline sensitivity ของประชากรเชื้อราทดสอบต่อสารคาร์เบนดาซิม

### 3. การตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีนเบต้าทูบูลิน 2 ในไอโซเลทที่แสดงค่า $EC_{50}$ ต่ำและสูงสุด

การปรากฏไอโซเลทเชื้อราที่มีระดับความไวต่อสารเคมีลดลงในประชากรเชื้อรา รวมถึงการตรวจพบระดับความไวต่อสารเคมีที่มีความแตกต่างกันอย่างมากระหว่างไอโซเลทเชื้อราในประชากรทดสอบอาจบ่งชี้ถึงการพัฒนาของสายพันธุ์เชื้อราต้านทานต่อ

สารเคมี (Chen et al., 2020) ทั้งนี้การกลายพันธุ์บริเวณยีน *Tub2* ถือเป็นกลไกหลักนำไปสู่การต้านทานสารเคมีกลุ่ม MBC (Ma and Michailides, 2005) โดยการเปลี่ยนแปลงของนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน *Tub2* ที่ตำแหน่งโคดอน 167 198 และ 200 มีความสัมพันธ์กับการต้านทานสารคาร์เบนดาซิมในเชื้อราก่อโรคพืชหลายชนิด งานวิจัยนี้ตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน *Tub2* ที่ตำแหน่งโคดอน 167 198 และ 200 ในไอโซเลทเชื้อรา *E. turcicum* ที่แสดงค่า EC<sub>50</sub> ต่อสารคาร์เบนดาซิมต่ำสุดและสูงสุดสองลำดับแรก (n=4) โดยเลี้ยงเชื้อราแต่ละไอโซเลทในอาหารเหลว PDB (potato dextrose broth) 5 มล. เป็นเวลา 48 ชม. และเก็บเกี่ยวเส้นใยเชื้อราเพื่อนำมาสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี CTAB (Doyle and Doyle, 1987) ดำเนินการตามขั้นตอนที่ปรากฏในงานวิจัยของ Boonkorn et al. (2024) ทำปฏิกิริยาพีซีอาร์เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณยีน *Tub2* โดยออกแบบไพรเมอร์จากบริเวณยีน *Tub2* ของเชื้อรา *E. turcicum* อาศัยข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีนที่คาดว่ากำหนดการสร้างโปรตีนเบต้าทูบูลิน 2 ของเชื้อรา *E. turcicum* สายพันธุ์ Et28A (accession number = XM\_008032318) ซึ่งปรากฏในฐานข้อมูล GenBank ซึ่งชุดไพรเมอร์ที่ออกแบบได้แก่ Tub2F (5'-CCCCGACAACCTTCGTCTTTGG-3') และ Tub2R (5'-AGAGGAGCGAATCCAACCAT-3') สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณยีน *Tub2* ที่ครอบคลุมตำแหน่งโคดอน 167 198 และ 200

เตรียมส่วนผสมสำหรับทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ 50 ไมโครลิตร โดยใช้เอนไซม์ FIREPol® DNA polymerase (Solis BioDyne, Estonia) ตามคำแนะนำที่ระบุไว้ในคู่มือผลิตภัณฑ์ ทำปฏิกิริยาในเครื่องพีซีอาร์โดยตั้งโปรแกรมดังต่อไปนี้ ขั้นตอน initial denaturation ที่อุณหภูมิ 94°C. เป็นเวลา 2 นาที ตามด้วย 25 รอบ

ของขั้นตอนดังต่อไปนี้ denaturation 94°C. เป็นเวลา 20 วินาที ขั้นตอน annealing 58°C. เป็นเวลา 30 วินาที และขั้นตอน extension 72°C. เป็นเวลา 1 นาที เมื่อครบ 25 รอบของขั้นตอนดังกล่าวแล้วตามด้วยขั้นตอนสุดท้ายคือ 72°C. เป็นเวลา 5 นาที วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 561 คู่เบสด้วยวิธี Sanger ภายใต้การดำเนินการของบริษัทยูทูไปโอ (ประเทศไทย) จำกัด นำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *Tub2* ของแต่ละไอโซเลท รวมถึง *E. turcicum* สายพันธุ์ Et28A (accession number = XM\_008032318) *E. turcicum* isolate ET001 (accession number = KU670340) และ *E. turcicum* isolate Et-09 (accession number = PV778075) มาเปลี่ยนให้เป็นลำดับกรดอะมิโนด้วยโปรแกรม Protein translation tool จากนั้นเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนในเชื้อราทั้ง 7 ไอโซเลท ด้วยโปรแกรม Clustal Omega เพื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนที่ตำแหน่งโคดอน 167 198 และ 200 ในไอโซเลทเชื้อราที่แสดงค่า EC<sub>50</sub> ต่อสารคาร์เบนดาซิมต่ำและสูงสุดสองลำดับแรกร่วมกับ *E. turcicum* ไอโซเลทอื่น ๆ ซึ่งปรากฏในฐานข้อมูล GenBank

#### 4. ประสิทธิภาพของสารเคมีในการควบคุมโรคในแปลงปลูก

ทดสอบประสิทธิภาพของสารเคมีในการควบคุมโรคใบไหม้แผลใหญ่ของข้าวโพดหวานในสภาพแปลงปลูกที่มีการติดเชื้อโดยธรรมชาติ 2 การทดลอง ใน ต.ห้วยป่าหวาย อ.พระพุทธรบาท จ. สระบุรี ซึ่งปลูกข้าวโพดหวานพันธุ์ไฮบริด 3 ทดสอบระหว่างวันที่ 1 ส.ค.-30 ต.ค. 2564 และ ต. โคกมะม่วง อ. ปะคำ จ. บุรีรัมย์ ซึ่งปลูกข้าวโพดหวานพันธุ์ไฮบริด 59 ทดสอบระหว่างวันที่ 1 ส.ค.-30 ส.ค. 2565 วางแผนการทดลองแบบสุ่มในบล็อกสมบูรณ์ 2 ซ้ำ 4 กรรมวิธี ได้แก่ (1) พันด้วยสารคาร์เบนดาซิม

(2) พันด้วยสารอะซอกซิสโตรบิน+ไดฟิโนโคนาโซล  
 (3) พันด้วยสารทีบูโคนาโซล+ไตรฟลอกซีโตรบิน  
 ในอัตราแนะนำที่ระบุไว้ในฉลากผลิตภัณฑ์ (Table 2)  
 และ (4) พันด้วยน้ำเปล่า (วิธีควบคุม) ทั้งนี้สารเคมี  
 ผสมที่เลือกใช้จัดเป็นกลุ่มสารเคมีที่มีประสิทธิภาพสูง  
 ในการควบคุมโรคใบไหม้แผลใหญ่ (วิไลวรรณและ  
 คณะ, 2552; วราภรณ์และคณะ, 2558) และมีการใช้  
 ในพื้นที่ปลูกข้าวโพดหวานที่ดำเนินการเก็บรวบรวม  
 ไอโซเลทเชื้อรา ปลูกแบบแถวคู่ ร่องกว้าง 120 ซม. ปลูก  
 กลางสันร่องทั้งสองข้าง ระหว่างต้น 30 ซม. หลุมละ  
 2 เมล็ด ถอนให้เหลือ 1 ต้น/หลุม เมื่ออายุ 15 วัน ใส่ปุ๋ย  
 2 ครั้ง ครั้งที่ 1 เมื่อข้าวโพดอายุ 25-30 วัน ใส่ปุ๋ย  
 15-15-15 อัตรา 30 กก./ไร่ ครั้งที่ 2 เมื่อข้าวโพดอายุ  
 40-45 วัน ใส่ปุ๋ย 46-0-0 อัตรา 30 กก./ไร่ ฉีดพ่น  
 สารเคมีตามกรรมวิธี 2 ครั้ง ในระยะออกดอกหรือ  
 ที่อายุ 45 วัน และ 60 วัน เมื่อข้าวโพดมีอายุ 65 วัน  
 สุ่มเก็บใบในแต่ละกรรมวิธี 50 ต้น นับจำนวนแผล/ต้น  
 คำนวณเปอร์เซ็นต์แผลเฉลี่ย/ต้น เปรียบเทียบกับชุด  
 ควบคุมเพื่อคำนวณเปอร์เซ็นต์การลดปริมาณโรค  
 วิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูลด้วยวิธี ANOVA  
 และความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's  
 multiple range test

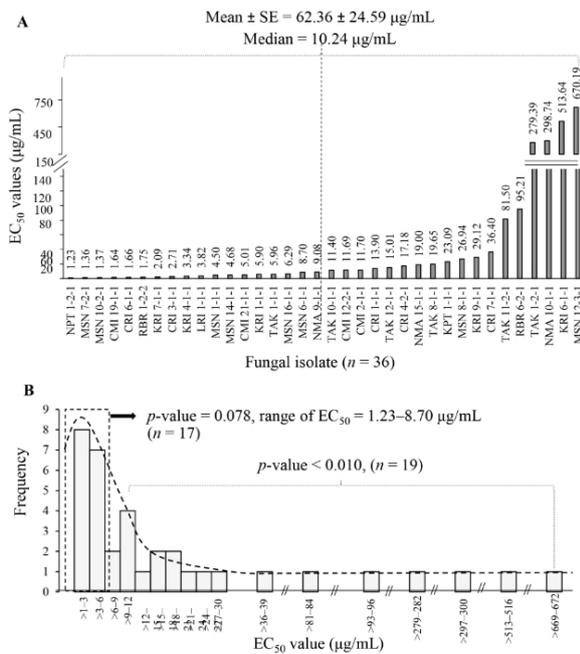
## ผลการทดลองและวิจารณ์

### 1. การประเมินระดับความไวของคาร์เบนดาซิมใน การยับยั้งเส้นใยเชื้อรา

ค่า  $EC_{50}$  ของสารคาร์เบนดาซิมในการยับยั้ง  
 เส้นใยเชื้อรา *E. turcicum* อยู่ในช่วง 1.23–670.19  
 $\mu\text{g/mL}$  โดยมีค่ามัธยฐาน 10.24  $\mu\text{g/mL}$  และค่าเฉลี่ย±  
 ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (SE)  $62.36\pm 24.59$   
 $\mu\text{g/mL}$  (Figure 1A) ทั้งนี้ค่า  $EC_{50}$  ในการยับยั้งเชื้อรา  
 ไอโซเลทที่ไวต่อสารเคมีต่ำสุดแตกต่างกัน 544.8 เท่า  
 เมื่อเทียบกับไอโซเลทที่ไวต่อสารเคมีสูงสุด แสดงให้

เห็นว่าประชากรเชื้อราก่อโรคใบไหม้แผลใหญ่  
 ทั้ง 36 ไอโซเลท มีความแปรผันด้านความไวต่อสาร  
 คาร์เบนดาซิมอย่างมาก ซึ่งสอดคล้องกับกราฟแจก  
 แจงความถี่จำนวนไอโซเลทเชื้อราทดสอบในแต่ละ  
 ช่วงของค่า  $EC_{50}$  ที่แสดงลักษณะการกระจายตัวใน  
 รูปแบบการแจกแจงฐานนิยมเดี่ยวเบ้ขวา (Figure 1B)  
 ซึ่งให้เห็นถึงความไวต่อสารคาร์เบนดาซิมของเชื้อรา  
 ทดสอบในงานวิจัยนี้ลดระดับลง (ค่า  $EC_{50}$  สูงขึ้น)  
 ทั้งนี้การทดสอบความแตกต่างระหว่างความถี่ของ  
 ชุดข้อมูลในแต่ละช่วงระดับค่า  $EC_{50}$  พบว่าเชื้อรา 17  
 ไอโซเลท หรือ 47.22% ซึ่งมีค่า  $EC_{50}$  ในช่วง 1.23–  
 8.70  $\mu\text{g/mL}$  ให้ค่า p-value 0.078 ซึ่งสูงกว่าระดับ  
 นัยสำคัญ ( $p>0.05$ ) ดังนั้นค่า  $EC_{50}$  ในช่วงดังกล่าว  
 ไม่แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ  
 หรือกล่าวได้ว่าเป็นช่วงข้อมูลค่า  $EC_{50}$  ที่มีการแจก  
 แจงแบบปกติ ดังนั้นค่า  $EC_{50}$  ในช่วง 1.23–8.70  
 $\mu\text{g/mL}$  อาจพิจารณาใช้เป็นค่า baseline sensitivity  
 ของประชากรเชื้อรา *E. turcicum* ซึ่งรวบรวมในปี  
 พ.ศ. 2564–2565 (Figure 1B) ทั้งนี้พบว่า ไอโซเลท  
 เชื้อราทดสอบในงานวิจัยนี้กว่า 52.78% แสดงค่า  
 ความไวต่อสารคาร์เบนดาซิมสูงกว่าค่า baseline  
 sensitivity ซึ่งให้เห็นว่าไอโซเลทส่วนใหญ่มีการ  
 ปรับตัวโดยมีระดับความไวต่อสารคาร์เบนดาซิมลดลง  
 ซึ่งอาจเป็นข้อบ่งชี้ว่ามีการพัฒนาของสายพันธุ์เชื้อรา  
 ที่ต้านทานต่อสารคาร์เบนดาซิมในประชากรเชื้อรา  
 ก่อโรคใบไหม้แผลใหญ่ของข้าวโพดในประเทศไทย  
 หนึ่ง He et al. (2020) ได้จัดกลุ่มความไวต่อสาร  
 คาร์เบนดาซิมของ *S. sclerotiorum* และ *B. cinerea*  
 โดยเชื้อที่แสดงค่า  $EC_{50}$  น้อยกว่า 1  $\mu\text{g/mL}$  จัดอยู่ใน  
 กลุ่มเชื้อที่ไวต่อสารเคมี (sensitivity) เชื้อที่แสดงค่า  
 $EC_{50}$  มากกว่า 1  $\mu\text{g/mL}$  แต่น้อยกว่า 10  $\mu\text{g/mL}$  จัดอยู่  
 ในกลุ่มต้านทานต่อสารเคมีในระดับต่ำ (low resistance)  
 เชื้อที่แสดงค่า  $EC_{50}$  มากกว่า 10  $\mu\text{g/mL}$  แต่น้อยกว่า

100 µg/mL จัดอยู่ในกลุ่มต้านทานต่อสารเคมีในระดับปานกลาง (moderate resistance) และเชื้อที่แสดงค่า EC<sub>50</sub> มากกว่า 100 µg/mL จัดอยู่ในกลุ่มต้านทานต่อสารเคมีสูง (high resistance) ทั้งนี้ งานวิจัยนี้พบว่า ความไวต่อสารคาร์เบนดาซิมในทุกไอโซเลทของเชื้อราทดสอบแสดงค่า EC<sub>50</sub> มากกว่า 1 µg/mL ดังนั้นอาจเป็นไปได้ว่า *E. turcicum* ทุกไอโซเลทที่รวบรวมได้ในงานวิจัยนี้จัดอยู่ในกลุ่มต้านทานต่อสารคาร์เบนดาซิม โดยเชื้อรา 50% ที่รวบรวมในงานวิจัยนี้ต้านทานต่อสารคาร์เบนดาซิมในระดับปานกลางถึงสูง ดังนั้น การใช้สารคาร์เบนดาซิมอาจมี



**Figure 1** Sensitivity of *E. turcicum* (n=36 isolates) to carbendazim. (A) Carbendazim sensitivity of each isolate represented as EC<sub>50</sub> value (µg/mL) with mean±SE and median. (B) Frequency distribution of carbendazim sensitivity in *E. turcicum* population (n=36). The Shapiro–Wilk test was performed for a test of normality, and p>0.05 indicates normal distribution of the data. The range of EC<sub>50</sub> values within the normally distributed data represents the baseline sensitivity

ประสิทธิภาพต่ำในการควบคุมเชื้อรากอโรคใบไหม้แผลใหญ่ในบางพื้นที่ของประเทศไทย อนึ่งผลการวิจัยฉบับนี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ De Rossi et al. (2015) ซึ่งพบว่าเชื้อรากอโรคใบไหม้แผลใหญ่ข้าวโพดทุกไอโซเลทที่รวบรวมได้จากประเทศอาเจนตินาและบราซิลจัดอยู่ในกลุ่มไม่ไวต่อสารคาร์เบนดาซิม (carbendazim insensitivity) และระบุว่าสารเคมีดังกล่าวไม่เป็นพิษต่อ *E. turcicum*

## 2. การตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีนเบต้าทูปูลิน2 ในไอโซเลทที่แสดงค่า EC<sub>50</sub> ต่ำและสูงสุด

ไอโซเลทเชื้อราที่มีความไวต่อสารคาร์เบนดาซิมสูงสุดแสดงค่า EC<sub>50</sub> ต่างจากไอโซเลทเชื้อราที่มีความไวต่อสารคาร์เบนดาซิมต่ำสุดถึง 544.8 เท่า จึงตรวจสอบสมมติฐานที่วางไว้ว่า ระดับความไวต่อสารคาร์เบนดาซิมที่แตกต่างกันอย่างมากระหว่างตัวแทนไอโซเลทเชื้อราที่ไวต่อสารเคมีต่ำสุดและสูงสุดในสองลำดับแรกนั้น อาจมีสาเหตุเกิดจากการกลายพันธุ์บริเวณยีน *Tub2* ที่ตำแหน่งโคดอน 167 198 และ 200 จากการอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ บริเวณยีน *Tub2* ของเชื้อรา *E. turcicum* ไอโซเลท MSN12-3-1 และ KRI6-1-1 ซึ่งแสดงความไวต่อสารคาร์เบนดาซิมต่ำสุดและไอโซเลท NPT1-2-1 และ MSN7-2-1 ซึ่งแสดงความไวต่อสารเคมีสูงสุด รวมถึงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนดังกล่าวจากเชื้อรา *E. turcicum* สายพันธุ์ Et28A (accession number = XM\_008032318) *E. turcicum* isolate ET001 (accession number = KU670340) และ *E. turcicum* isolate Et-09 (accession number = PV778075) พบว่า เชื้อราทั้ง 7 ไอโซเลท แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณโคดอน 167 198 และ 200 เหมือนกัน (Figure 2) โดยตำแหน่งโคดอน167 พบการแปลรหัสกรดอะมิโนชนิดไทโรซีน ทั้งนี้ Liu et al. (2019) รายงานถึงรูปแบบการกลายพันธุ์บริเวณยีนเบต้าทูปูลินที่ตำแหน่งโคดอน167

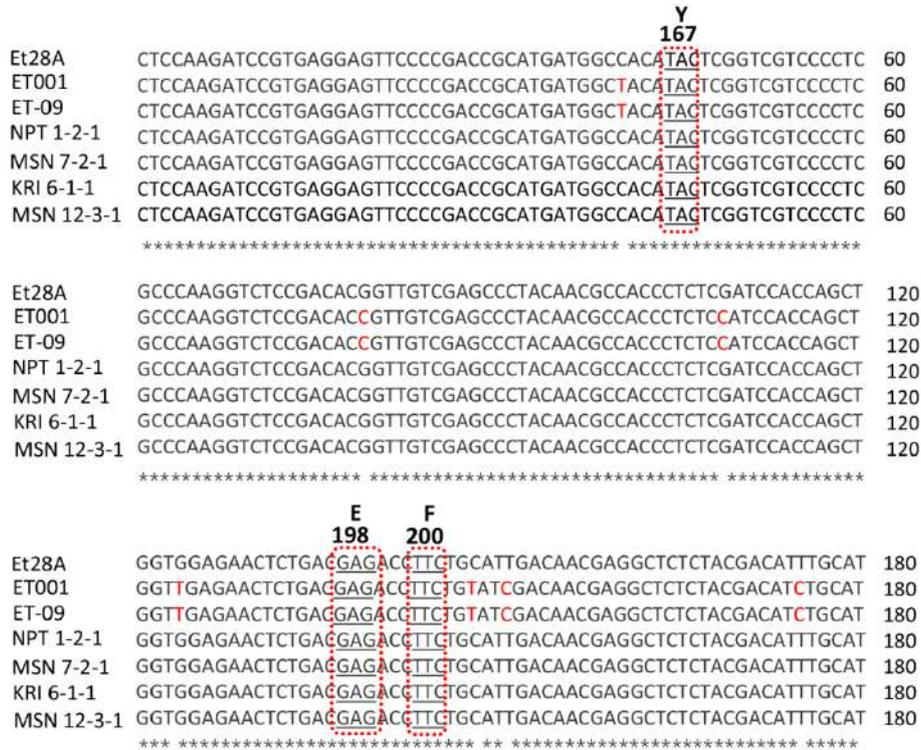
จากฟีนิลอะลานีน (F) เปลี่ยนเป็นไทโรซีน มีความสัมพันธ์กับความต้านทานสารคาร์เบนดาซิม ระดับปานกลาง และพบในสัดส่วนสูงสุดเมื่อเปรียบเทียบกับรูปแบบการกลายพันธุ์อื่น ๆ ในประชากรเชื้อรา *F. graminearum* ก่อโรค Fusarium head blight ของข้าวสาลีในมณฑลเหอหนานของประเทศจีน อนึ่ง งานวิจัยนี้พบกรดอะมิโนชนิดไทโรซีน ที่ตำแหน่งโคดอน 167 ในตัวแทนไอโซเลทเชื้อรา *E. turcicum* ทั้ง 4 ไอโซเลท รวมถึงหากพิจารณาการจัดกลุ่มระดับความต้านทานคาร์เบนดาซิมโดยอ้างอิงงานของ He et al. (2020) ตัวแทนไอโซเลทเชื้อราดังกล่าวอาจจัดอยู่ในกลุ่มต้านทานต่อคาร์เบนดาซิม อย่างไรก็ตาม งานวิจัยนี้ยังไม่สามารถสรุปได้อย่างชัดเจนว่าไทโรซีนที่ปรากฏในตำแหน่งดังกล่าวมีความเกี่ยวข้องกับการต้านทานสารคาร์เบนดาซิม เนื่องจากข้อมูลที่จำกัด เช่น ขาดข้อมูลสายพันธุ์เชื้อรา *E. turcicum* ที่พบฟีนิลอะลานีนที่ตำแหน่งโคดอน 167 เพื่อใช้ในการเทียบเคียง รวมถึงขาดข้อมูลความไวในการตอบสนองต่อคาร์เบนดาซิมของ *E. turcicum* สายพันธุ์ Et28A ไอโซเลท ET001 และ Et-09 เป็นต้น ทั้งนี้เป็นไปได้ว่าไทโรซีนเป็นกรดอะมิโนตามธรรมชาติ (wild-type) ที่ตำแหน่งโคดอน 167 ของเชื้อรา *E. turcicum* เนื่องจากการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่งดังกล่าวใน *E. turcicum* สายพันธุ์ Et28A ไอโซเลท ET001 และ Et-09 (Figure 2) รวมถึงไอโซเลทอื่น ๆ ทั้งหมดที่ปรากฏในฐานข้อมูล GenBank (n = 15) (ไม่ได้แสดงข้อมูล) พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณโคดอนดังกล่าวแปลรหัสกรดอะมิโนชนิดไทโรซีนในทุกไอโซเลท สำหรับการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณตำแหน่งโคดอนที่ 198 และ 200 ในเชื้อราทั้ง 7 ไอโซเลท พบกรดกลูตามิกและฟีนิลอะลานีนตามลำดับ ซึ่งยังคงเป็นรูปแบบโคดอนที่สัมพันธ์กับ

ลักษณะของเชื้อราที่มีความไวสูงในการตอบสนองต่อสารคาร์เบนดาซิม

กลุ่มตัวแทนเชื้อราทดสอบซึ่งมีทั้งไอโซเลทที่ไวต่อสารเคมีสูงสุดและต่ำสุดสองลำดับแรก พบการแปลรหัสโคดอนในตำแหน่ง 167 198 และ 200 เป็นกรดอะมิโนชนิดเดียวกัน คือ Y E และ F ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าตำแหน่งโคดอนดังกล่าวไม่มีความสัมพันธ์กับระดับความไวต่อสารคาร์เบนดาซิมที่แตกต่างกันอย่างยิ่งในกลุ่มเชื้อทดสอบ ทั้งนี้ การตอบสนองต่อสารคาร์เบนดาซิมที่แตกต่างกันนั้นอาจเกี่ยวข้องกับตำแหน่งโคดอนอื่น ๆ เช่น โคดอนที่ 6 รูปแบบ H6N ซึ่งพบใน *F. graminearum* ไอโซเลทที่ต้านทานปานกลางต่อสารกลุ่มเบนซิมิดาโซลโดยพบการเปลี่ยนแปลงจากฮีสทีดีน (H) ไปเป็นแอสพาราจिन (N) (Sevastos et al., 2016) หรือโคดอนที่ 134 รูปแบบ Q134L (กลูตามีนเป็นลิวซีน) และโคดอนที่ 351 รูปแบบ T351I (ทรีโอนีนเป็นไอโซลิวซีน) ซึ่งค้นพบโดยวิธีการชักนำ *Fusarium proliferatum* ให้เกิดการกลายพันธุ์ต่อสารคาร์เบนดาซิมในหลอดทดลอง (*in vitro*) (Xu et al., 2019) นอกจากนี้อาจเป็นไปได้ว่าไอโซเลท *E. turcicum* ที่มีความไวต่อสารคาร์เบนดาซิมในระดับต่ำซึ่งรายงานในงานวิจัยนี้ อาศัยกลไกอื่น ๆ ในการต้านทานต่อสารคาร์เบนดาซิม ดังปรากฏในงานวิจัยของ Song et al. (2012) ที่พบว่าการต้านทานสารเคมีคาร์เบนดาซิมของ *Isaria fumosorosea* เชื้อราในแมลงนั้นไม่ได้อาศัยกลไกการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งยีนเบต้าทูปูลิน แต่อาศัยกลไกการเพิ่มการแสดงออกของยีน *ifT1* โดยยีนดังกล่าวเกี่ยวข้องกับการสร้างโปรตีนในการทำหน้าที่ขนส่งโมเลกุลผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ หรือที่เรียกว่า ABC transporters เพื่อลดระดับสารเคมีหรือลดความเป็นพิษของสารเคมีในเซลล์ ดังนั้น การศึกษาถึงกลไกการต้านทานสารคาร์เบนดาซิมในเชื้อรา *E. turcicum* ควรมีการตรวจสอบลำดับอะมิโน

ที่ตำแหน่งโคดอนอื่น ๆ ของ *Tub2* ร่วมด้วย รวมถึงขยายการศึกษาให้ครอบคลุมถึงกลไกการต้านทานสารคาร์เบนดาซิมในรูปแบบอื่น อาทิ ติดตามการแสดงออก

ของยีนที่กำหนดการสร้างโปรตีนในกลุ่ม ABC transporters เพื่อทำความเข้าใจถึงกลไกของเชื้อรา *E. turcicum* ในการปรับตัวเพื่อลดระดับความไวต่อสารคาร์เบนดาซิม



**Figure 2** Comparison of nucleotide and amino acid sequences at codons 167, 198, and 200 in the partial nucleotide sequences of the *E. turcicum*  $\beta_2$ -tubulin (*Tub2*) region among the most highly sensitive isolates (NPT 1-2-1 and MSN 7-2-1) and less sensitive isolates (KRI 6-1-1 and MSN 12-3-1) to carbendazim, alongside the reference strain *E. turcicum* Et28A (GenBank accession no. XM\_008032318), *E. turcicum* isolate ET001 (accession number = KU670340) and *E. turcicum* isolate Et-09 (accession number = PV778075). Mutations at codons F167Y, E198A/V/G/L/K/Q, and F200Y in the *Tub2* gene are commonly associated with resistance to carbendazim. Asterisks indicate positions with identical nucleotides across sequences, while red letters represent nucleotide polymorphisms observed in certain isolates

### 3. ประสิทธิภาพของสารเคมีในการควบคุมโรคในแปลงปลูก

ประสิทธิภาพการควบคุมโรคใบไหม้แผลใหญ่ของข้าวโพดที่เกิดจากเชื้อรา *E. turcicum* ในข้าวโพดหวานพันธุ์ไฮบริดส์ 3 และไฮบริดส์ 59 มีความสอดคล้องกัน (Table 2) การฉีดพ่นสารคาร์เบนดาซิมมีประสิทธิภาพในการลดการเกิดโรคได้น้อยกว่าการฉีดพ่นสารเคมีผสมระหว่างอะซอกซีสโตรบิน+ไดฟีโนโคนาโซล และทีบูโคนาโซล+ไตรฟลอกซีสโตรบิน

ตามอัตราแนะนำซึ่งระบุที่ฉลาก โดยเฉพาะอย่างยิ่งในแปลงปลูกข้าวโพดหวานพันธุ์ไฮบริดส์ 3 ซึ่งจัดเป็นพันธุ์อ่อนแอ (วรารักษ์และคณะ, 2558) พบว่าประสิทธิภาพในการลดโรคของสารคาร์เบนดาซิมน้อยกว่าการฉีดพ่นสารเคมีผสมทั้ง 2 กรรมวิธี 2.82 และ 1.74 เท่า ตามลำดับ สำหรับการทดสอบในแปลงข้าวโพดหวานพันธุ์ไฮบริดส์ 59 พบว่า การฉีดพ่นสารคาร์เบนดาซิมแสดงประสิทธิภาพในการลดโรคน้อยกว่าการฉีดพ่นสารเคมีผสมทั้ง 2 กรรมวิธี 1.43 และ

1.35 เท่า ตามลำดับ ทั้งนี้สารเคมีผสมอะซอกซิสโตรบิน+ ไดฟิโนโคนาโซล และทีบูโคนาโซล+ไตรฟลอกซิสโตรบิน เป็นสารเคมีผสมระหว่างกลุ่มสารเคมีต่างกลุ่มกลไก การออกฤทธิ์ ซึ่งประกอบด้วยสารเคมีจากกลุ่ม DMI และ QoI โดยสารเคมีผสมจากกลุ่มดังกล่าวมีประสิทธิภาพสูงในการควบคุมโรคใบไหม้แผลใหญ่ข้าวโพดในแปลงปลูกของสหรัฐอเมริกา (Weems, 2016) ทั้งนี้สารเคมีซึ่งแนะนำเพื่อการจัดการโรคใบไหม้แผลใหญ่ในประเทศไทยนั้นมีความเกี่ยวข้องกับกลุ่มกลไกการออกฤทธิ์ 3 กลุ่มด้วยกัน ได้แก่กลุ่ม MBC ได้แก่

คาร์เบนดาซิม กลุ่ม DMI ได้แก่ ไดฟิโนโคนาโซล โพรพิโคนาโซล ทีบูโคนาโซล และอีพอกซีโคนาโซล และจากกลุ่ม QoI ได้แก่ อะซอกซิสโตรบิน และไตรฟลอกซิสโตรบิน ทั้งนี้ วิไลวรรณและคณะ (2552) รายงานว่า การฉีดพ่นสารคาร์เบนดาซิมผสมกับสารอีพอกซีโคนาโซล สารอะซอกซิสโตรบินผสมกับสารไดฟิโนโคนาโซลและสารโพรพิโคนาโซลเชิงเดี่ยวเมื่อเริ่มพบอาการของโรค แสดงประสิทธิภาพในการป้องกันกำจัดโรคใบไหม้แผลใหญ่ของข้าวโพดได้ดี

**Table 2** Efficacy of fungicides in controlling Northern corn leaf blight caused by *Exserohilum turcicum* in sweet corn cultivars, Hy-brix3 and Hy-brix59

Treatment	Application rate/ 1 L of water	Average leaf lesions/plant <sup>1/</sup> (%)		Disease reduction <sup>2/</sup> (%)	
		Hy-brix3	Hy-brix59	Hy-brix3	Hy-brix59
Carbendazim (50%SC)	1.5 mL	31.11±2.11 c	22.12±1.67 c	18.65	39.79
Azoxystrobin + difenoconazole (20%+12.5% SC)	0.5 mL	18.16±1.05 a	15.88±1.02 a	52.51 (2.82-fold) <sup>3/</sup>	56.78 (1.43-fold)
Tebuconazole + trifloxystrobin (50%+25% WG)	0.6 g	25.82±1.68 b	16.98±0.65 b	32.48 (1.74-fold)	53.78 (1.35-fold)
Water		38.24±2.83 d	36.74±2.30 d		

<sup>1/</sup> Means±SD in the same column followed by the same letter are not significantly different at the 5% level, according to DMRT

<sup>2/</sup> Disease reduction (%) = [(Disease in control – Disease in treatment) / Disease in control] × 100

<sup>3/</sup> Values in parentheses represent the fold decrease in disease control efficacy of carbendazim relative to fungicide mixtures, calculated as: disease reduction (%) of fungicide mixture ÷ disease reduction (%) of carbendazim

อนึ่ง การใช้สารคาร์เบนดาซิมเพื่อการควบคุมโรคใบไหม้แผลใหญ่ปรากฏในงานวิจัยและคำแนะนำที่มีอยู่แต่เดิมนั้น แนะนำให้ใช้สารคาร์เบนดาซิมในลักษณะร่วมกับสารเคมีจากกลุ่ม DMI ได้แก่ อีพอกซีโคนาโซล ดังนั้น การศึกษาประสิทธิภาพของสารคาร์เบนดาซิมครั้งต่อไปควรพิจารณาเพิ่มกรรมวิธีการฉีดพ่นในรูปแบบผสมกับสารกลุ่ม DMI เพื่อประเมิน

ประสิทธิภาพของสารเคมีผสมดังกล่าวว่ายังคงสอดคล้องกับคำแนะนำที่มีอยู่เดิมหรือไม่ ข้อมูลดังกล่าวจะเป็นประโยชน์ในการปรับปรุงแนวทางการใช้สารกำจัดเชื้อราเพื่อควบคุมโรคใบไหม้แผลใหญ่ข้าวโพดในประเทศไทยได้อย่างเหมาะสม และสอดคล้องกับสถานการณ์ที่ความไวต่อสารคาร์เบนดาซิมของประชากรเชื้อรา *E. turcicum* มีแนวโน้มลดลง

## สรุปผลการทดลอง

การทดสอบความไวต่อสารคาร์เบนดาซิมของเชื้อราก่อโรคใบไหม้แผลใหญ่ข้าวโพด 36 ไอโซเลทพบว่า ค่า EC<sub>50</sub> ของสารคาร์เบนดาซิมในการยับยั้งเส้นใยเชื้อรา *E. turcicum* อยู่ในช่วง 1.23–670.19 µg/mL กราฟแจกแจงความถี่จำนวนไอโซเลทเชื้อราทดสอบในแต่ละช่วงของค่า EC<sub>50</sub> แสดงลักษณะการกระจายตัวในรูปแบบการแจกแจงฐานนิยมเดี่ยวเบ้ขวา รวมถึงไอโซเลทเชื้อรา 52.78% แสดงค่าความไวต่อสารคาร์เบนดาซิมสูงกว่าค่า baseline sensitivity (1.23–8.70 µg/mL) ซึ่งให้เห็นว่า ไอโซเลทส่วนใหญ่มีการปรับตัวโดยมีระดับความไวต่อสารคาร์เบนดาซิมลดลง การตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่บริเวณยีน *Tub2* ที่ตำแหน่งโคดอน 167 198 และ 200 ในไอโซเลทเชื้อราที่ไวต่อสารคาร์เบนดาซิมต่ำสุดและสูงสุดสองลำดับแรก ไม่พบความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์บ่งชี้ว่าโคดอนทั้ง 3 ตำแหน่งไม่มีความสัมพันธ์กับระดับความไวต่อสารคาร์เบนดาซิมที่แตกต่างกันอย่างยิ่งในกลุ่มตัวอย่างเชื้อราทดสอบ นอกจากนี้การพ่นสารคาร์เบนดาซิม 30 มล./น้ำ 20 ลิตร ในแปลงปลูกข้าวโพดหวานพบว่า มีประสิทธิภาพต่ำในการลดโรคใบไหม้แผลใหญ่เมื่อเปรียบเทียบกับกรณีฉีดสารเคมีผสมระหว่างกลุ่ม DMI และ QoI ดังนั้น การปรับปรุงคำแนะนำการใช้สารคาร์เบนดาซิมร่วมกับสารเคมีกลุ่มอื่นจะช่วยให้การควบคุมโรคใบไหม้แผลใหญ่ข้าวโพดในประเทศไทยมีประสิทธิภาพมากขึ้น

## คำขอบคุณ

งานวิจัยนี้ได้รับงบประมาณสนับสนุนจากทุนอุดหนุนการพัฒนาการวิจัยการเกษตร จากสำนักงานพัฒนาการวิจัยการเกษตร (องค์การมหาชน) ปีงบประมาณ 2564 รหัสโครงการวิจัย PRP6405031980

## เอกสารอ้างอิง

- วิไลวรรณ พรหมคำ เขาวนาถ พุทธิเทพ พิระวรรณ พัฒนวิภาส ศิวไล ลาภบรรจพ พิมพร โชติธรรมาวงษ์ ปัญญา พุกสุ่น และเครือวัลย์ บุญเงิน. 2552. การควบคุมโรคใบไหม้แผลใหญ่ในข้าวโพดหวานโดยใช้สารป้องกันกำจัดโรค. แหล่งข้อมูล: <http://lib.doa.go.th/multim/e-book/EB00538.pdf>. สืบค้น: 8 พฤษภาคม 2568.
- องอาจ กิตติคุณชัย. 2567. สถานการณ์ปัจจุบันของอุตสาหกรรมข้าวโพดหวานไทย. แหล่งข้อมูล: <https://thaifood.org/main/revealed-the-currentsituation-of-thai-sweetcorn/>. สืบค้น: 8 พฤษภาคม 2568.
- วารภรณ์ บุญเกิด พัทธวิภา ใจจักรคำ สุพจน์ กาเข้ม จีรนนท์ แหม่มสูงเนิน และสุดฤดี ประเทืองวงศ์. 2558. การจัดการโรคใบไหม้แผลใหญ่ข้าวโพดด้วยการใช้พันธุ์ต้านทานโรค สารเคมี และจุลินทรีย์ปฏิปักษ์. หน้า 319-330. ใน: เรื่องเติมการประชุมวิชาการข้าวโพดและข้าวฟ่างแห่งชาติ ครั้งที่ 35. วันที่ 5-7 ส.ค. 2558. โรงแรมเดอะกรีนเนอรี รีสอร์ทเขาใหญ่, นครราชสีมา.
- Ahangar, MA., S.H. Wani, Z.A. Dar, J. Roohi, F. Mohiddin, M. Bansal, M. Choudhary, S.K. Aggarwal, S.A. Waza, K.A. Dar, A.E. Sabagh, C. Barutcular, O. Konuşkan and M.A. Hossain. 2022. Distribution, etiology, molecular genetics and management perspectives of northern corn leaf blight of maize (*Zea mays* L.). *Phyton*. 91(10): 2111–2133.
- Boonkorn, Y., V. Tongsrri, O. Piasai and P. Songkumarn. 2024. Characterization, pathogenicity, and fungicide response of *Exserohilum rostratum* causing leaf spot on rice in Thailand. *European Journal of Plant Pathology*. 170(3): 549–566.
- Chen, F., S.S. Tsuji, Y. Li, M. Hu, M.A. Bandeira, M.P.S. Câmara, S.J. Michereff and G. Schnabel. 2020. Reduced sensitivity of azoxystrobin and thiophanate-methyl resistance in *Lasiodiplodia theobromae* from papaya. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 162: 60–68.
- Dai, Y., L. Gan, H. Ruan, N. Shi, Y. Du, L. Liao, Z. Wei, Z. Teng, F. Chen and X. Yang. 2018. Sensitivity of *Cochliobolus heterostrophus* to three demethylation inhibitor fungicides, propiconazole, diniconazole and prochloraz, and their efficacy against southern

- corn leaf blight in Fujian Province, China. *European Journal of Plant Pathology*. 152(2): 447–459.
- De Rossi, R.L., E.M. Reis and R. Brustolin. 2015. Fungicide baseline for mycelial sensitivity of *Exserohilum turcicum*, causal agent of northern corn leaf blight. *Summa Phytopathologica*. 41(1): 25–30.
- Doyle, J.J. and J.L. Doyle. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*. 19(1): 11–15.
- Fang, A., R. Zhang, W. Qiao, T. Peng, Y. Qin, J. Wang, B. Tian, Y. Yu, W. Sun, Y. Yang and C. Bi. 2023. Sensitivity baselines, resistance monitoring, and molecular mechanisms of the rice false smut pathogen *Ustilagoidea vires* to prochloraz and azoxystrobin in four regions of Southern China. *Journal of Fungi*. 9(8): 832.
- He, L., K. Cui, T. Li, Y. Song, N. Liu, W. Mu and F. Liu. 2020. Evolution of the resistance of *Botrytis cinerea* to carbendazim and the current efficacy of carbendazim against gray mold after long-term discontinuation. *Plant Disease*. 104(6): 1647–1653.
- Kongtragoul, P., S. Nalumpang, Y. Miyamoto, Y. Izumi and K. Akimitsu. 2011. Mutation at codon 198 of *Tub2* gene for carbendazim resistance in *Colletotrichum gloeosporioides* causing mango anthracnose in Thailand. *Journal of Plant Protection Research*. 51(4): 377–384.
- Liu, S., Z. Che and G. Chen. 2016. Multiple-fungicide resistance to carbendazim, diethofencarb, procymidone, and pyrimethanil in field isolates of *Botrytis cinerea* from tomato in Henan Province, China. *Crop Protection*. 84: 56–61.
- Liu, S., L. Fu, S. Wang, J. Chen, J. Jiang, Z. Che, Y. Tian and G. Chen. 2019. Carbendazim resistance of *Fusarium graminearum* from Henan wheat. *Plant Disease*. 103(10): 2536–2540.
- 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(10): 853–863.
- Nwanosike, M.R.O. and R.B. Mabagala. 2017. Influence of metrological parameters on the development of *Exserohilum turcicum* (Pass.) Leonard and Suggs on maize in Tanzania. *International Journal of Advanced Scientific Research*. 2(2): 58–68.
- Sevastos, A., A. Markoglou, N.E. Labrou, F. Flouri and A. Malandrakis. 2016. Molecular characterization, fitness and mycotoxin production of *Fusarium graminearum* laboratory strains resistant to benzimidazoles. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 128: 1–9.
- Song, T.T., S.H. Ying and M.G. Feng. 2012. High resistance of *Isaria fumosorosea* to carbendazim arises from the overexpression of an ABC transporter (*ift1*) rather than tubulin mutation. *Journal of Applied Microbiology*. 112(1): 175–184.
- Wang, L., H. Tu, H. Hou, Z. Zhou, H. Yuan, C. Luo and Q. Gu. 2022. Occurrence and detection of carbendazim resistance in *Botryosphaeria dothidea* from apple orchards in China. *Plant Disease*. 106(1): 207–214.
- Weems, J.D. 2016. Evaluation of Race Population Distribution, Fungicide Sensitivity, and Fungicide Control of *Exserohilum turcicum*, the Causal Agent of Northern Leaf Blight of Corn. Doctor of Philosophy Dissertation. University of Illinois at Urbana-Champaign, Illinois, USA. 136 p.
- Weems, J.D. and C.A. Bradley. 2017. Sensitivity of *Exserohilum turcicum* to demethylation inhibitor fungicides. *Crop Protection*. 99: 85–92.
- Xu, S., J. Wang, H. Wang, Y. Bao, Y. Li, M. Govindaraju, W. Yao, B. Chen and M. Zhang. 2019. Molecular characterization of carbendazim resistance of *Fusarium* species complex that causes sugarcane pokkah boeng disease. *BMC Genomics*. 20(1): 115.
- Yelgurty, R., S.K. Jayalkshmi, B.Z. Ahamed, S.S. Chavan and G. Girish. 2019. Screening of promising sorghum genotypes against turcicum leaf blight (*Exserohilum turcicum* (Pass.) Leonard and Suggs) under glasshouse conditions. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. 8(5): 655–658.
- Zhu, Z.Q., F. Zhou, J.L. Li, F.X. Zhu and H.J. Ma. 2016. Carbendazim resistance in field isolates of *Sclerotinia sclerotiorum* in China and its management. *Crop Protection*. 81: 115–121.