ลักษณะของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. ที่ทนทานต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิมในผลไม้

สุธาสินี ชัยชนะ*

บทคัดย่อ

งานวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาลักษณะของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. สาเหตุโรค แอนแทรคโนสที่ทนทานต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อรา carbendazim โดยศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *Colletotrichum* spp., ระดับความทนทานของเชื้อราต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อรา carbendazim โดยการเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato dextrose agar (PDA) ที่ผสมสารป้องกันกำจัดเชื้อรา carbendazim ความเข้มข้นต่างๆ, ลักษณะการงอกของ conidium เชื้อราบนเยื่อหอม, ประสิทธิภาพของสารป้องกันกำจัดโรคพืช และสมุนไพรในการควบคุมการเจริญของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. และศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. สายพันธุ์ที่ทนทานต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อรา carbendazim

จากการเก็บตัวอย่างเชื้อรา *Colletotrichum* spp. ในจังหวัดเชียงใหม่ จำนวน 147 ไอโซเลท ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. จำนวน 21 ไอโซเลท ที่แยกจากพืช 6 ชนิด (แอปเปิ้ล 1 ไอโซเลท, กล้วย 4 ไอโซเลท, ฝรั่ง 4 ไอโซเลท, มะม่วง 4 ไอโซเลท, มะละกอ 4 ไอโซเลท และส้ม 4 ไอโซเลท) โดยศึกษาลักษณะโคโลนี ขนาดและรูปร่างของ conidium และ appressorium และการสร้าง/ไม่สร้าง seta และ sclerotium สามารถแบ่งกลุ่มเชื้อราได้ 3 กลุ่มโดย กลุ่มที่ 1 มีโคโลนีสีขาว สีเขียวและสีเทา สร้าง conidium รูปร่างคล้ายแคปซูล (cylindrical) สร้าง appressorium แบบกระบอง (clavate) บางไอโซเลทสร้าง seta และ sclerotium กลุ่มที่ 2 มีโคโลนีสีเทาอมส้ม สร้าง conidium รูปร่างคล้ายแคปซูล (cylindrical) สร้าง appressorium แบบไม่สม่ำเสมอ (irregular) ไม่สร้าง seta แต่สร้าง sclerotium และกลุ่มที่ 3 มี โคโลนีสีเทาอมส้ม สร้าง conidium รูปร่างคล้ายลูกรักบี้ (fusiform) สร้าง appressorium แบบกระบอง (clavate) ไม่สร้าง seta และ sclerotium เมื่อจัดจำแนกสปีชีส์โดยใช้หลักเกณฑ์ของ Sutton (1992) พบว่าสามารถจำแนกได้เป็น 3 สปีชีส์ ได้แก่ กลุ่มที่ 1 คือเชื้อรา *C. gloeosporioides* กลุ่มที่ 2 คือเชื้อรา *C. musae* และกลุ่มที่ 3 คือเชื้อรา *C. acutatum*

จากการนำเชื้อราที่แยกได้ทั้งหมดมาทดสอบความทนทานต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อรา carbendazim โดยการเลี้ยงบนอาหาร PDA ผสมสารป้องกันกำจัดเชื้อรา carbendazim ความเข้มข้น 0.1, 1, 10, 100, 500 และ 1,000 ppm และประเมินระดับความทนทานของเชื้อราต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อรา carbendazim 4 ระดับคือ ทนทานมาก (highly resistance; HR), ทนทานปานกลาง (moderately resistance; MR), ทนทานน้อย (weakly resistance; WR), และไม่ทนทาน (sensitive; S; สายพันธุ์ปกติ) พบว่ามีเชื้อรา *Colletotrichum* spp. จำนวน 70 ไอโซเลท ซึ่งแยกได้จากแอปเปิ้ล 1 ไอโซเลท กล้วย 1 ไอโซเลท ฝรั่ง 5 ไอโซเลท มะม่วง 26 ไอโซเลท มะละกอ 4 ไอโซเลท และส้ม 32 ไอโซเลท สามารถทนทานต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อราในระดับสูง (HR) ได้ โดยในการทดสอบครั้งนี้ไม่พบเชื้อราที่มีความทนทานปานกลาง (MR) และเชื้อราที่มีความทนทานน้อย (WR)

---

* วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วิทยาการหลังการเก็บเกี่ยว) สถานวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยว มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. 225 หน้า.

จากการตรวจสอบลักษณะโคโลนีของเชื้อราสายพันธุ์ที่ทนทานต่อป้องกันกำจัดเชื้อรา carbendazim ที่เจริญบนอาหาร PDA ผสมสารป้องกันกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิม ความเข้มข้น 500 ppm พบว่าเชื้อราสายพันธุ์ที่ทนทานต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อรา carbendazim จะสร้างโคโลนี มีลักษณะการเจริญไม่แตกต่างจากการเจริญในชุดควบคุม (0 ppm) แต่พบว่ามีเชื้อราบางไอโซเลท ที่โคโลนีมีลักษณะผิดปกติ เช่น มีการสร้าง pigment สีน้ำตาลแดง ออกมาก่อนที่เส้นใยจะเจริญลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ หรือบางไอโซเลทโคโลนีเจริญช้ากว่าปกติ ขอบโคโลนีหยัก เส้นใยสานตัวกันแน่นเป็นกระจุก และเมื่อตรวจสอบลักษณะเส้นใยเชื้อราทั้งสองสายพันธุ์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบเลนส์ประกอบ พบว่าลักษณะของเส้นใยเชื้อราสายพันธุ์ปกติ (S) และสายพันธุ์ที่ทนทานต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อรา carbendazim (HR) ไม่แตกต่างกัน และเมื่อทดสอบประสิทธิภาพของ สารป้องกันกำจัดเชื้อรา carbendazim ต่อการงอก germ tube ของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. บน เยื่อหอม พบว่าสาร carbendazim ความเข้มข้น 500 ppm ไม่ยับยั้งการงอก germ tube ของเชื้อราทั้งสายพันธุ์ปกติ (S) และสายพันธุ์ที่ทนทานต่อสาร carbendazim ในระดับสูง (HR) ได้

เมื่อทดสอบประสิทธิภาพของสารป้องกันกำจัดเชื้อรา 5 ชนิด คือ captan, carboxin, copper oxychloride, mancozeb และ benomyl ในอัตราแนะนำต่อการเจริญของเส้นใยเชื้อรา พบว่า mancozeb มีประสิทธิภาพในการควบคุมการเจริญของเส้นใยได้ดีที่สุด (100%) ส่วนสารป้องกันกำจัดเชื้อรา carboxin, captan และ benomyl เป็นสารที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมการเจริญของเส้นใยรองลงมา แต่ในเชื้อราสายพันธุ์ที่ทนทานต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อรา carbendazim (HR) นั้น benomyl มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคได้เพียงเล็กน้อย ส่วนสารป้องกันกำจัดเชื้อรา copper oxychloride เป็นสารที่ไม่มีประสิทธิภาพในการควบคุมการเจริญของเส้นใย แต่มีผลทำให้โคโลนีเชื้อราทั้งสองสายพันธุ์ผิดปกติ โดยเส้นใยของเชื้อราจะเจริญบางติดกับผิวอาหาร และสีของโคโลนีเปลี่ยนไปเป็นสีน้ำตาลเข้มจนถึงดำ

จากการทดสอบประสิทธิภาพของสารป้องกันกำจัดเชื้อราทั้ง 5 ชนิดต่อการงอกของ conidium บนเยื่อหอม พบว่า mancozeb สามารถยับยั้งการงอกของ conidium ได้ 100% ส่วนสารที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมการเจริญของเส้นใยรองลงมาคือ carboxin และ captan ส่วน benomyl ยับยั้งการงอก germ tube ได้น้อย แต่ยับยั้งการเจริญของเส้นใยได้ดี และพบว่า copper oxychloride ไม่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการงอกของ conidium แต่ทำให้ conidium งอกผิดปกติโดย germ tube จะมีลักษณะลีบยาว สร้าง appressorium ได้น้อยเมื่อเทียบกับชุดควบคุม

จากการทดสอบประสิทธิภาพของสมุนไพร 3 ชนิด คือ กระชาย, ข่า และขิง ความเข้มข้น 0.1, 0.3, 0.5, 1, 3 และ 5% (w/v) ต่อการเจริญของเส้นใยเชื้อราพบว่ากระชายความเข้มข้น 5% (w/v) มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา ที่แยกได้จากฝรั่ง, มะม่วง และมะละกอ สายพันธุ์ปกติ (S) ได้ดีที่สุด ส่วนข่า ความเข้มข้น 5% (w/v) ยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา สายพันธุ์ปกติ (S) ที่แยกจากส้ม และ เชื้อราสายพันธุ์ที่ทนทานต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อรา carbendazim (HR) ที่แยกได้จากแอปเปิ้ล, ฝรั่ง และมะละกอได้ดีที่สุด และขิงความเข้มข้น 5% (w/v) สามารถควบคุมการเจริญของเส้นใยเชื้อราสายพันธุ์ที่ทนทานต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อรา carbendazim (HR) ที่แยกได้จาก มะม่วง, มะละกอ และกล้วยทั้งสองสายพันธุ์ได้ดีที่สุด

เมื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อราสายพันธุ์ที่ทนทานสารป้องกันกำจัดเชื้อรา carbendazim (HR) จำนวน 16 ไอโซเลท ในตำแหน่งบางส่วนของยีน beta-tubulin ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ ไพร์เมอร์ TB2R และ TB2L สามารถสังเคราะห์ดีเอ็นเอ ขนาด 474 คู่เบส เมื่อวิเคราะห์ลำดับการจัดเรียงตัวของนิวคลีโอไทด์ ในตำแหน่งบางส่วนของยีน beta-tubulin พบการเปลี่ยนแปลงของเบสที่จำเพาะของกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 198 จาก glutamic acid (GAG) เป็น alanine (GCG)

Characterization of *Colletotrichum* spp. Resistant to a Fungicide Carbendazim in Fruit

Sutasinee Chaichana*

Abstract

This study is aimed to characterize *Colletotrichum* spp., the causal agents of anthracnose diseases on fruits, by analyzing the resistance of this fungus to carbendazim fungicide. Characterization of the pathogens was carried out by examining morphology characteristics, testing by the fungal growth on potato dextrose agar (PDA) amended with fungicides and plant extracts, and analyzing a partial sequence of beta-tubulin gene related to carbendazim resistance. One hundred and forty-seven *Colletotrichum* spp. were successfully isolated from 6 different plants which collected in Chiang Mai. Twenty-one isolates (one isolate from *Malus sylvestrys* Mill., 4 isolates from *Musa sapientum* L., 4 isolates from *Psidium guajava* L., 4 isolates from *Mangifera indica* L., 4 isolates from *Carica papaya* L., and 4 isolates from *Citrus* spp.) were examined morphologically using several characteristics such as characters of colony, characteristics of conidium and appressorium, presence/absence of seta and sclerotium. Based on the morphological characteristic observation, the isolates of *Colletotrichum* spp. were classified into three groups. Group 1, the colony was white, with green and grey aerial mycelium, conidium cylindrical, with clavate appressorium, and sometimes produced seta and sclerotium. Group 2, colony was grey with orange exudates, cylindrical conidium, appressorium irregular, seta absent but produced sclerotium. Group 3, colony was grey with orange exudates, conidium fusiform, with clavate appressorium, seta and sclerotium absent. The fungi were identified as *Colletotrichum gloeosporioides*, *C. musae*, and *C. acutatum*, respectively.

The carbendazim tolerance of the isolates was determined by examining their mycelium growth on PDA amended with carbendazim at various concentrations: 0.1, 1, 10, 100, 500, and 1,000 ppm (v/v). The fungal tolerance was categorized into 4 levels: highly resistance (HR), moderately resistance (MR), weakly resistance (WR) and sensitive (S; wild type). Seventy isolates of *Colletotrichum* spp., viz 1 isolate from *M. sylvestrys*, 1 isolate from *M. sapientum*, 5 isolates from *P. guajava*, 26 isolates from *M. indica*, 4 isolates from *C.* papaya, and 32 isolates from *Citrus* spp. were showed highly resistance to the fungicide. None showed moderately resistance (MR) and weakly resistance (WR) in this experiment.

Colonial characteristics of carbendazim resistance isolates growth on PDA amended with carbendazim at 500 ppm is similar with the colony that growth on PDA without carbendazim. However, several resistant isolates showed slightly abnormal colony formation with reduction of growth rate, presence of rugged colonies, and produced red-brown pigment before the colony growing. Microscopic observation of mycelium and conidium formation of both

---

* Master of Science (Postharvest Technology), Postharvest Technology Institute, Chiang Mai University. 225 pages.

sensitive and highly resistance isolates showed similar characteristics. The addition of carbendazim even with the concentration of 500 ppm did not prevent conidial germination for the resistance isolates.

Another five fungicides (captan, carboxin, copper oxychloride, mancozeb and benomyl) with a final concentration of its standard field application rate were assessed for their ability to control *Colletotrichum* spp. The mycelium growth of all isolates was completely inhibited by mancozeb. Carboxin, captan and benomyl, also showed some inhibition, respectively. Copper oxychloride caused abnormality on colony formation to all isolates tested. The abnormality to copper oxychloride was presented as a loss of white-rough-cottony mycelium formation in the colony. Among the tested fungicides, mancozeb completely inhibited conidium germination of *Colletotrichum* spp. by using the inner surface cell layer of onion scales method in this experiment. Carboxin and captan showed strong inhibition to the spore germination amongst all tested isolates. There were no significant differences (P>0.05) observed between the inhibitory effect of these fungicides to the conidium germination. Carbendazim showed a weak effect to suppress conidium germination but a potential to inhibit mycelium growth. Copper oxychloride did not prohibit conidium germination, but was able to suppress conidium germination and appressorium formation. In several cases of conidium germination, abnormalities showed by the formation of branching germ tube.

Extracts of three plants (*Boesenbergia pandurat* Holtt., *Alpinia galangal* Swartz., and *Zingiber officinale* Rose.) were also tested for their ability to inhibit the growth of *Colletotrichum* spp. The experiment was carried out on PDA amended with 6 concentrations of plant extracts as follows: 0.1, 0.3, 0.5, 1, 3 and 5% (w/v). Extracts from *Boesenbergia pandurat* at 5% (w/v) concentration showed strong inhibition to the mycelium growth rate of wild type isolates of *Colletotrichum* spp. isolated from *P. guajava*, *M. indica,* and *C. papaya*. Extracts from *Alpinia galanga* at 5% (w/v) concentration was able to control wild type isolates of *Colletotrichum* spp. from *Citrus* spp. as well as isolates from *M. sylvestrys*, *P.* guajava, and *C. papaya* which showed highly resistance to carbendazim. Extracts of *Zingiber officinale* at 5% (w/v) concentration reduced the radial growth of *Colletotrichum* spp. isolated from *M. indica* and *C. papaya* which were highly resistance to carbendazime, and also suppressed the growth of both wild type and carbendazim high resistance *Colletotrichum* spp. isolated from *M. sapientum*.

Sixteen isolates of *Colletotrichum* spp. which were highly resistant to carbendazim were extracted, amplified, and sequenced at portion of the beta-tubulin gene using TB2R and TB2L primers. All sequences generated from analysis produced amplicons of 474 bp length. Sixteen phenotypes were identified among highly resistant strains of *Colletotrichum* spp. which were correlated with a single mutation of amino acid, a substitution of glutamic acid (GAG) by alanine (GCG) at codon 198.