Agricultural Sci. J. 48 : 3 (Suppl.) : 129-132 (2017) ว. วิทย. กษ. 48 : 3 (พิเศษ) : 129-132 (2560)

ตรวจสอบความต้านทานต่อสารเคมี Azoxystrobin ของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Sacc สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของมะม่วง

Investigation of Azoxystrobin Resistance in *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Sacc Causing Anthracnose Disease of Mango

สัณฐิติ บินคาเดอร์[1,2] รัติยา พงศ์พิสุทธา[1,2] และชัยณรงค์ รัตนกรีฑากุล[1,2]
Santiti Bincader[1, 2], Ratiya Pongpisutta[1, 2] and Chainarong Rattanakreetakul[1, 2]

Abstract

Anthracnose disease is the most serious for mango production. Nowadays, many methods of anthracnose controlling have been studied for a very long time. Disease control with widely used is fungicidal chemical. However, overdoses and regularly used of chemical including environment affect to fungal resistance. The objective of this study was to investigate fungicide resistance in 5 isolates of *Colletotrichum gloeosporioides*, a causal pathogen of mango anthracnose disease on potato dextrose agar (PDA) mixed with azoxystrobin at the concentrations of 0.1, 1, 10 and 100 µg/ml. The result showed that all isolates of *C. gloeosporioides* could grow on the poisoned food medium at all concentrations. DNA extraction and polymerase chain reaction (PCR) were investigated to support fungal resistance using molecular technique. Data analysis will be lead for fungicidal chemical use for mango anthracnose control in both preharvest and postharvest effectively.

Keywords: Anthracnose disease, *Colletotrichum gloeosporioides*, fungicide resistance

บทคัดย่อ

โรคแอนแทรคโนสจัดเป็นโรคที่มีความสำคัญต่อการผลิตมะม่วงเป็นอย่างมาก มีการศึกษาการควบคุมโรคดังกล่าวหลากหลายวิธีมาเป็นระยะยาวนาน ซึ่งวิธีที่นิยมใช้มากที่สุดคือ การใช้สารเคมีกำจัดเชื้อรา อย่างไรก็ตามด้วยปริมาณการใช้ที่สูง และการใช้สารเคมีชนิดเดิมบ่อยครั้ง รวมไปถึงสภาพแวดล้อม อาจส่งผลให้เชื้อราเกิดการต้านทานต่อสารเคมีได้ งานวิจัยในครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อทำการตรวจสอบความต้านทานต่อสารเคมีของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของมะม่วง จำนวน 5 ไอโซเลท บนอาหารเลี้ยงเชื้อ potato dextrose agar (PDA) ที่มีส่วนผสมของสารกำจัดเชื้อรา azoxystrobin ความเข้มข้น 0.1, 1, 10 และ 100 µg/ml จากผลการทดลองพบว่า เชื้อรา *C. gloeosporioides* ทุกไอโซเลท สามารถเจริญเติบโตบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เป็น poisoned food medium ได้ทุกระดับความเข้มข้น การสกัดและเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อราด้วยเทคนิค polymerase chain reaction (PCR) เพื่อทำการยืนยันถึงการเปลี่ยนแปลงความต้านทานของเชื้อราด้วยเทคนิคอณูชีวโมเลกุล ข้อมูลที่ได้ นำไปสู่การเลือกใช้สารเคมีกำจัดเชื้อราเพื่อควบคุมโรคแอนแทรคโนสของมะม่วงทั้งก่อน และหลังการเก็บเกี่ยวได้อย่างมีประสิทธิภาพ

คำสำคัญ: โรคแอนแทรคโนส *Colletotrichum gloeosporioides* ความต้านทานต่อสารเคมีของเชื้อรา

คำนำ

โรคแอนแทรคโนสของมะม่วงที่เกิดจากเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz) Sacc จัดเป็นโรคที่มีความสำคัญ และส่งผลกระทบต่อระบบการผลิตมะม่วงทั้งในเชิงปริมาณ และคุณภาพ การป้องกัน หรือควบคุมโรคในปัจจุบันมักนิยมใช้สารเคมีกำจัดเชื้อรา เนื่องจากเห็นผลรวดเร็ว ใช้ในปริมาณน้อย ปัจจุบันได้มีการผลิตสารเคมีออกมาในรูปแบบที่สามารถนำไปใช้ได้ง่ายขึ้น แต่ส่วนใหญ่เกษตรกรใช้ในปริมาณค่อนข้างสูง และใช้สารเคมีชนิดเดียวโดยไม่มีการจัดการโรคด้วยวิธีอื่นๆ อีกทั้งสภาพแวดล้อมที่เปลี่ยนไป อาจจะส่งผลให้เชื้อราเกิดการกลายพันธุ์ และต้านทานต่อสารเคมีที่ใช้ในที่สุด

[1] ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกาแพงแสน นครปฐม 73140
[1] Department of Plant pathology, Faculty of Agriculture at Kamphaeng Saen, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom 73140
[2] ศูนย์นวัตกรรมเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว สำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษา กรุงเทพฯ 10400
[2] Postharvest Technology Innovation Center, Commission on Higher Education Commission, Bangkok 10400

มีการตรวจสอบความต้านทานต่อสารเคมีในกลุ่ม Benzimidazole ของเชื้อรา *C. gloeosporioides* จำนวน 31 ไอโซเลท ที่แยกได้จากมะม่วง และสตรอเบอรี่ในประเทศไต้หวัน โดยการเลี้ยงเชื้อราบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีส่วนผสมของสาร benomyl, thiabendazole และ carbendazim ตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของเชื้อราโดยเทคนิค Polymerase Chain Reaction – Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP) จากการทดลองพบว่าเชื้อรา 14 ไอโซเลท จาก 31 ไอโซเลท สามารถเจริญเติบโตได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีส่วนผสมของสารเคมีได้ จึงได้ทำการศึกษาการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอตรงบริเวณส่วน beta tubulin โดยใช้ specific primer และตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ พบว่าเชื้อราที่แสดงความต้านทานต่อสารเคมีนั้นมีการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนในลำดับที่ 198 โดยเปลี่ยนกรดอะมิโนจาก GAG เป็น GCG ทำให้ได้แถบดีเอ็นเอจำนวน 2 แถบ มีขนาดอยู่ที่ 240 และ 260 bp โดยแตกต่างจากเชื้อรา ที่ไม่แสดงความต้านทาน ซึ่งมีขนาดของแถบดีเอ็นเอเท่ากับ 500 bp จากการทดลองแสดงให้เห็นถึงการเปลี่ยนแปลงของเชื้อรา และมีการใช้ศักยภาพของเทคนิค PCR-RFLP ในการตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของเชื้อราได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Chung *et al*., 2010)

งานวิจัยของ Xu *et al.* (2014) ได้ทำการทดสอบความต้านทานของเชื้อรา *C. gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของสตอรเบอรี่ และองุ่น ต่อสาร prochloraz และ tebuconazole พบว่าเชื้อรา *C. gloeosporioides* จำนวน 216 ไอโซเลท ที่เก็บจากพื้นที่ 6 แหล่ง มีค่าเฉลี่ยความอ่อนไหวต่อสารเคมี (baseline sensitivity) อยู่ที่ 0.053±0.01 mg/L และ 0.62±0.11 mg/L จากการทดลองนี้ ทำให้ทราบว่า ในบางพื้นที่นั้นมีการใช้สารเคมีปริมาณที่มากเกินความจำเป็น ทำให้เชื้อรายังสามารถก่อโรคกับพืชได้ จึงมีความจำเป็นที่จะต้องใช้สารเคมีในปริมาณที่มากขึ้น และด้วยเหตุนี้ อาจจะส่งผลให้เชื้อราเกิดความต้านทานต่อสารเคมีได้ต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

1. ประสิทธิภาพของสารเคมี Azoxystrobin ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา

ทำการเลี้ยงเชื้อรา *C. gloeosporioides* ที่แยกได้จากผลมะม่วงที่แสดงอาการของโรคแอนแทรคโนส จำนวน 5 ไอโซเลท ได้แก่ PHN01, PH025, PH026, PH059 และ PH065 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ potato dextrose agar (PDA) บ่มใต้แสง near UV สลับมืด 12 ชั่วโมง อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 7 วัน จากนั้นทำการทดสอบประสิทธิภาพของสารเคมี Azoxystrobin ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราด้วยเทคนิค poisoned food โดยผสมสารเคมี Azoxystrobin (25% WP) กับอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายของสารออกฤทธิ์เท่ากับ 0.1, 1, 10 และ 100 µg/ml จากนั้นใช้ cork borer ขนาด 0.8 มิลลิเมตร เจาะเส้นใยบริเวณขอบโคโลนีเชื้อรา ย้ายลงอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมสารเคมี โดยให้เชื้อราสัมผัสผิวหน้าอาหาร บ่มใต้แสง near UV สลับมืด 12 ชั่วโมง อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 7 วัน

เก็บข้อมูลโดยการวัดผลการเจริญเติบโตทุกวัน จนครบ 7 วัน วางแผนการทดลองแบบ completely randomized design (CRD) แต่ละกรรมวิธีมี 5 ซ้ำ วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ ด้วยโปรแกรม R-stat X64 3.4.0

2. การตรวจสอบความเปลี่ยนแปลงของเชื้อราในระดับอณูชีวโมเลกุล

สกัดดีเอ็นเอของเชื้อรา *C. gloeosporioides* โดยดัดแปลงจากวิธีการของ วรานันท์ (2554) ซึ่งใช้ Sodium dodecyl sulfate (SDS) และ phenol chloroform isolamyl alcohol (25:24:1) ในการตกตะกอนโปรตีน จากนั้นทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อราโดยเทคนิค PCR ในบริเวณ Internal transcribed spacer (ITS region) อาศัยคุณสมบัติการจับกันอย่างจำเพาะระหว่างไพรเมอร์ ITS4 (5’ TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC ‘3) และ ITS5 (5’GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G ‘3) จากนั้นนำ PCR product ที่ได้ไปศึกษาต่อด้วยเทคนิค ITS-RFLP โดยทำการย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (Restriction enzyme) *Bsu*RI (*Hae*III) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 12 ชั่วโมง ตรวจสอบ digested product โดย 2% agarose gel electrophoresis ใน 1X TBE buffer และบันทึกการเกิดแถบดีเอ็นเอด้วยเครื่อง Gel document (GeneFlash syngene bio imaging)

ผล

1. ประสิทธิภาพของสารเคมี Azoxystrobin ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา

จากการทดสอบประสิทธิภาพของสารเคมี Azoxystrobin ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา ผลการทดลองพบว่า เชื้อรา *C. gloeosporioides* ทั้ง 5 ไอโซเลท สามารถเจริญเติบโตได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีส่วนผสมของสารเคมีดังกล่าวในทุกความเข้มข้น โดยที่ความเข้มข้น 100 µg/ml พบว่ามีอัตราการเจริญของเส้นใยน้อยที่สุดในทุก ไอโซเลท รองลงมาคือ

อาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมสาร Azoxystrobin ที่ความเข้มข้น 10, 1 และ 0.1 µg/ml ตามลำดับ โดยมีนัยสำคัญทางสถิติ เชื้อรา *C. gloeosporioides* ไอโซเลท PH025 และ PH059 มีค่าความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง เมื่อเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมสารเคมี Azoxystrobin ความเข้มข้น 100 µg/ml (อัตราการเจริญของเส้นใยของวันที่ 5 เท่ากับ 0.1917 และ 0.1833 เซนติเมตร ตามลำดับ) เปรียบเทียบกับความเข้มข้น 10 µg/ml (อัตราการเจริญของเส้นใยของวันที่ 5 เท่ากับ 0.2917 และ 0.2500 เซนติเมตร ตามลำดับ) ส่วนไอโซเลท PH026, PH065 และ PHN01 พบว่าอัตราการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ความเข้มข้น 100 และ 10 µg/ml ไม่มีค่าความแตกต่างทางสถิติ ส่วนลักษณะของโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อพบว่ามีความใกล้เคียงกัน คือสร้างเส้นใยสีขาว เจริญฟูจากผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ ตรงกลางโคโลนีมีสีเข้ม พบการสร้างกลุ่มสปอร์ (spore mass) เล็กน้อย (Table 1; Figure 1)

Table 1 Growth rates of *Colletotrichum gloeosporioides* 5 isolates on poisoned food incubated under near UV with alternative darkness 12 hr, 25 °C, at day 5

Concentration (	Growth rate of colony (cm/day)[1/]				
µg/ml)	PH025	PH026	PH059	PH065	PHN01
Control	0.4417 b	0.5750 a	0.6250 a	0.7000 a	0.6167 a
0.1	0.5667 a	0.3333 b	0.3167 b	0.3750 b	0.3583 b
1	0.4333 b	0.2917 b	0.3000 b	0.2750 bc	0.3583 b
10	0.2917 c	0.2333 c	0.2500 c	0.2250 c	0.2250 c
100	0.1917 d	0.1917 c	0.1833 d	0.2250 c	0.1583 c
CV	13.5177	8.6574	7.9446	10.6005	8.5167
LSD	0.0947	0.0511	0.0485	0.1349	0.1156

[1/] Column values followed by the same letter are not significantly different (P=0.05)

2. การตรวจสอบความเปลี่ยนแปลงของเชื้อราในระดับอณูชีวโมเลกุล

ทำการตรวจสอบปริมาณ และคุณภาพดีเอ็นเอของเชื้อรา *C. gloeosporioides* ทั้ง 5 ไอโซเลท บน 1.2 % agarose gel ใน 1xTBE buffer ที่ 80 โวลต์ เป็นระยะเวลา 45 นาที พบว่าได้แถบดีเอ็นเอ มีความเข้มข้นประมาณ 100 µg เมื่อเทียบจาก 100 bp ladder DNA marker และเมื่อทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยเทคนิค PCR ด้วยไพรเมอร์ ITS4/ITS5 พบว่าเชื้อราทั้ง 5 ไอโซเลท มีขนาดของดีเอ็นเออยู่ที่ประมาณ 600 bp (Figure 2)

เมื่อนำ PCR product ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณ ไปศึกษาต่อโดยใช้เทคนิค PCR-RFLP โดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bsu*RI (*Hae*III) และตรวจสอบ digested product โดย 2% agarose gel electrophoresis ใน 1X TBE buffer พบว่าเชื้อรา *C. gloeosporioides* ที่เลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมสารเคมี Azoxystrobin ความเข้มข้น 0.1 - 10 µg/ ml ให้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่สอดคล้องกันกับเชื้อราที่เลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA (ชุดทดลองควบคุม) โดยมีขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอประมาณ 200 และ 400 bp ส่วนเชื้อรา *C. gloeosporioides* ที่เลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมสารเคมี Azoxystrobin ความเข้มข้น 100 µg/ml นั้น พบว่าไอโซเลท PH026 และ PH065 ให้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอเท่ากับ 600 bp เมื่อทำการตรวจสอบ พบว่าแถบดีเอ็นเอดังกล่าวมีขนาดใกล้เคียงกับ PCR product ในขณะที่ไอโซเลท PHN01, PH025 และ PH059 มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอ 2 แถบ คือ 200 และ 400 bp ซึ่งมีขนาดเท่ากับชุดทดลองควบคุม (Figure 3)

วิจารณ์ผล

การเปลี่ยนแปลงของเชื้อราในระดับอณูชีวโมเลกุลนั้น แสดงให้เห็นว่าเชื้อรามีการพัฒนาการตอบสนองและแสดงความต้านทานต่อสารเคมี Azoxystrobin ในระดับความเข้มข้นสูง โดยเมื่อตรวจสอบด้วยเทคนิค PCR-RFLP สามารถพบการเปลี่ยนแปลงที่ชัดเจน สอดคล้องกับรายงานของ Wen-Hsin Chung *et al*. (2010) ที่พบว่าสารเคมีในกลุ่ม Benzimidazole ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของเชื้อราในระดับโมเลกุล คือมีการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนในลำดับที่ 198 โดยเปลี่ยนกรดอะมิโนจาก GAG เป็น GCG ทำให้เมื่อทำการตรวจสอบด้วยเทคนิค PCR-RFLP โดยใช้เอนไซม์ *Bsh* 1236I ซึ่งมี cutting size ระหว่าง G และ C ทำให้สามารถตัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอดังกล่าวได้ ดังนั้นการศึกษาในครั้งนี้จะนำไปสู่การศึกษาการตอบสนองของเชื้อรา และการต้านทานต่อสารเคมี เพื่อใช้เป็นประโยชน์ในการควบคุมโรคแอนแทรคโนสของมะม่วงในระดับต่อไป

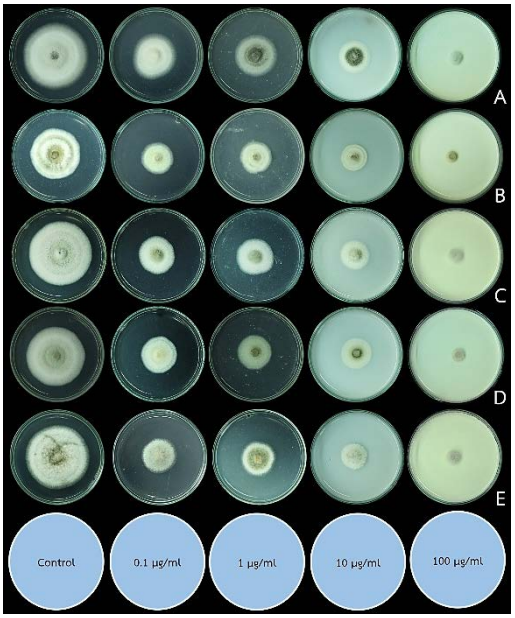

Figure 1 Growth rates of *C. gloeosporioides* causing anthracnose disease of mango on PDA medium mixed with Azoxystrobin at concentrations 0.1, 1, 10 และ 100 µg/ml incubated under near UV with alternate darkness 12 hr at 25°C. (A) Isolate PHN01, (B) Isolate PH025, (C) Isolate PH026, (D) Isolate PH059 and (E) Isolate PH065

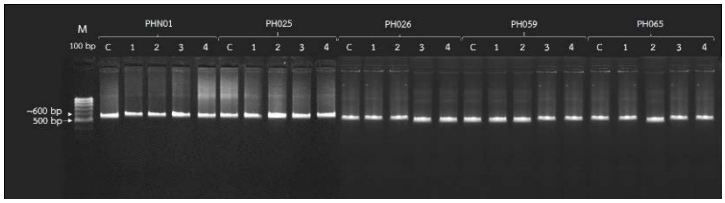

Figure 2 Results of PCR amplification of genomic DNA from *C. gloeosporioides* 5 isolates using the universal primer pair of ITS4 and ITS5.

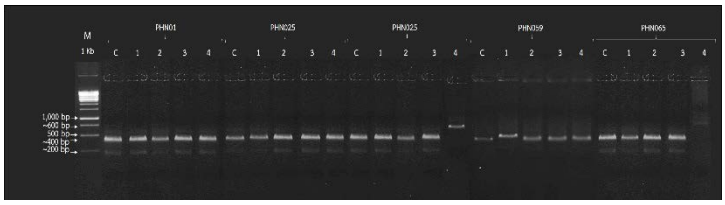

Figure 3 PCR-RFLP of ITS region of *C. gloeosporioides* 5 isolates obtained with restriction enzyme *Bsu*RI (*Hae*III).

สรุป

จากผลการทดลองตรวจสอบความต้านทานต่อสารเคมี Azoxystrobin ของเชื้อรา*C. gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของมะม่วง พบว่าเชื้อราตัวอย่างทั้ง 5 ไอโซเลท สามารถเจริญเติบโตได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีส่วนผสมของสาร Azoxystrobin ได้ทุกความเข้มข้น โดยเชื้อราทั้ง 5 ไอโซเลท เมื่อเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการผสมสารเคมีความเข้มข้น 100 µg/ml พบว่ามีการเจริญเติบโตน้อยที่สุด เมื่อทำการตรวจสอบทางอณูชีวโมเลกุล โดยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ universal primers (ITS4/ITS5) และย่อยชิ้นส่วน PCR product ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bsu*RI (*Hae*III) พบว่า ไอโซเลท PH026 และ PH065 ที่เจริญเติบโตบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมสารเคมี Azoxystrobin ความเข้มข้น 100 µg/ml ให้แถบดีเอ็นเอเท่ากับ 600 bp ซึ่งแตกต่างจากเชื้อราในไอโซเลทอื่นๆ และที่ความเข้มข้นที่ต่ำกว่า จึงคาดการณ์ว่าในระดับอณูชีวโมเลกุลของเชื้อรา *C. gloeosporioides* มีการเปลี่ยนแปลงในส่วนของ recognition site และ cutting site จึงทำให้เอนไซม์ดังกล่าวไม่สามารถตัดชิ้นส่วน PCR product ได้

คำขอบคุณ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากศูนย์นวัตกรรมเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว สำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษา กทม. และขอขอบคุณห้องปฏิบัติการราวิทยา ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน สำหรับการเอื้อเฟื้อสถานที่ และอุปกรณ์ในการทำวิจัย

เอกสารอ้างอิง

วรานันท์ วิญญูรัตน์. 2554. การจำแนกชนิดและศึกษาความรุนแรงของเชื้อรา *Colletotrichum* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสพริก. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 136 หน้า.

Chung, W.H., W.C. Chung, M.T. Peng, H.R. Yang and J.W. Huang. 2010. Specific detection of benzimidazole resistance in *Colletotrichum gloeosporioides* from fruit crops by PCR-RFLP. New Biotechnology 27: 17-24.

Xu, X.F., T. Lin, S.K. Yuan, D.J. Dai, H.J. Shi, C.Q. Zhang and H.D. Wang. 2014. Characterization of baseline sensitivity and resistance risk of *Colletotrichum gloeosporioides* complex isolates from strawberry and grape to two demethylation-inhibitor fungicides, prochloraz and tebuconazole. Australian Plant Pathology 43: 605-613.