Agricultural Sci. J. 49 : 4 (Suppl.) : 167-170 (2018) ว. วิทย. กษ. 49 : 4 (พิเศษ) : 167-170 (2561)

การตอบสนองของ *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Sacc สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้สีทองต่อสารเคมีกำจัดเชื้อรา

Responsiveness of *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Sacc Causing Anthracnose Disease of Mango cv. Nam Dork Mai See Tong to Fungicides

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

Abstract

Losses of mango post-production are highly caused by anthracnose disease, which infected by *Colletotrichum gloeosporioides*. Currently, pre and post-harvest disease control in mango is achieved through fungicides due to that method is an uncomplicated option. However, the fungus may easily be mutated if farmer frequently used the fungicides for very long time. So, the aim of this research was to investigate responsiveness of *C. gloeosporioides* isolated from mango cv. Nam Dork Mai See Tong, from Chachoengsao province. Fungal identification based on morphological characteristics and PCR-RFLP method with restriction enzymes. Apart from this, fungal responsiveness to 6 fungicides using poisoned food technique on potato dextrose agar (PDA) was studied. The result showed that prochloraz at the concentration of 10 ppm upward could completely inhibit the fungal mycelium differing from carbendazim and difenoconazole representing totally restrain at the concentration of 100 ppm upward. So, this study will lead to fungicidal chemical use for mango anthracnose control in both pre and postharvest effectively.

Keywords: Anthracnose, mango, fungicide responsiveness

บทคัดย่อ

ความเสียหายของผลผลิตมะม่วงหลังการเก็บเกี่ยวนั้น มีสาเหตุจากโรคแอนแทรคโนส ในปริมาณ ค่อนข้างสูง ซึ่งเกิดจากการเข้าทำลายของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* ในปัจจุบันการควบคุมก่อน และหลังการเก็บเกี่ยว นิยมใช้สารเคมีกำจัดเชื้อรา เนื่องจากเป็นวิธีการที่ไม่ซับซ้อน แต่อาจทำให้เชื้อรากลายพันธุ์ได้ง่าย หากใช้ติดต่อกันยาวนาน วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้ เพื่อศึกษาการตอบสนองต่อสารเคมีกำจัดเชื้อรา ของเชื้อรา *C. gloeosporioides* ที่แยกได้จากมะม่วงน้ำดอกไม้สีทองในจังหวัดฉะเชิงเทรา ทำการจำแนกเชื้อราโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา และเทคนิค PCR-RFLP จากนั้นทดสอบการตอบสนองของเชื้อราต่อสารเคมีกำจัดเชื้อราจำนวน 6 ชนิด โดยใช้เทคนิค poisoned food บนอาหาร PDA พบว่าสาร prochloraz ความเข้มข้นตั้งแต่ 10 ppm สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราได้อย่างสมบูรณ์ ซึ่งแตกต่างไปจาก carbendazim และ difenoconazole ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยได้ตั้งแต่ความเข้มข้น 100 ppm ขึ้นไป โดยผลจากการทดลองนี้ จะนำไปสู่การใช้สารเคมี ในการควบคุมโรคแอนแทรคโนสของมะม่วง ทั้งก่อนและหลังการเก็บเกี่ยวได้อย่างมีประสิทธิภาพ

คำสำคัญ: โรคแอนแทรคโนส, มะม่วง, การตอบสนองต่อสารเคมีกำจัดเชื้อรา

คำนำ

ประเทศไทยเริ่มมีการส่งออกมะม่วงไปยังต่างประเทศตั้งแต่ปี พ.ศ. 2536 โดยมีปริมาณการส่งออก มากกว่า 1,000,000 ตัน และเพิ่มมากขึ้นในทุกๆปี จนถึงปี พ.ศ. 2559 ผลผลิตมะม่วงไทยที่ส่งไปยังต่างประเทศมีเพิ่มมากถึง 3,432,129 ตัน (FAOSTAT, 2017) โดยมะม่วงที่ได้รับความนิยมมากที่สุดเป็นมะม่วงสายพันธุ์น้ำดอกไม้สีทอง ซึ่งมีกลิ่นหอม เนื้อนุ่ม และรสชาติอร่อย (Nalumpang *et al*., 2010) สถานการณ์มะม่วงในปัจจุบัน พบว่าผลผลิตมะม่วงมีปริมาณลดต่ำลง เนื่องจากการปลูกพืชชนิดอื่นทดแทน สภาพแวดล้อมที่เปลี่ยนไป และที่สำคัญคือ ศัตรูพืช โดยเฉพาะโรคแอนแทรคโนสที่เกิดจากเชื้อรา

[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

Colletotrichum gloeosporioides (Penz.) Sacc ซึ่งในสายพันธุ์มะม่วงน้ำดอกไม้สีทองนั้น เป็นสายพันธุ์ที่มีความอ่อนแอต่อเชื้อราดังกล่าวค่อนข้างมาก (Sangchote, 1987) การควบคุมโรคในปัจจุบันนอกเหนือจากการใช้สารชีวภัณฑ์ และการควบคุมทางกายภาพ เช่น การใช้น้ำร้อน การกระตุ้นด้วยรังสี หรือการควบคุมอุณหภูมิแล้วนั้น สารเคมีกำจัดเชื้อรา ยังเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่เกษตรกรนิยมนำมาใช้ในการควบคุมโรค เนื่องจากเห็นผลรวดเร็ว ใช้ในปริมาณน้อย อีกทั้งในปัจจุบันยังมีการผลิตสารเคมีออกมาในหลากหลายรูปแบบ ซึ่งสามารถนำไปใช้ได้ง่าย และมีประสิทธิภาพในการควบคุมมากขึ้น

จากรายงานของ Tredway and Wong (2012) พบว่าสารเคมีที่สามารถใช้ในการควบคุมโรคแอนแทรคโนสได้นั้นมีมากถึง 9 กลุ่มสาร (chemical classes) โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกลุ่ม demethylation Inhibitors, benzimidazole และ QoI (strobilurin) ซึ่งเป็นที่นิยมใช้กันมาก แต่พบว่าสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อราในกลุ่มดังกล่าว เช่น azoxystrobin, carbendazim และ prochloraz เป็นต้น มีผลกระทบทำให้เชื้อราเกิดความต้านทาน และส่งผลให้การควบคุมโรคดังกล่าว ไม่ดีเท่าที่ควร (Nalumpang *et al*., 2010; Xu *et al*., 2014; Lin *et al*., 2016) งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อทำการตรวจสอบความไวต่อสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อราจำนวน 6 ชนิด ที่ใช้ในการควบคุมโรคแอนแทรคโนสของมะม่วง เพื่อเป็นข้อมูลในการนำไปใช้ และจัดการโรคได้อย่างถูกต้อง และมีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น

อุปกรณ์และวิธีการ

การแยกเชื้อราสาเหตุโรค

เก็บตัวอย่างมะม่วงสายพันธุ์น้ำดอกไม้สีทอง ที่แสดงอาการของโรคแอนแทรคโนส นำมาแยกเชื้อด้วยวิธีการ tissue transplanting บนอาหารเลี้ยงเชื้อ potato dextrose agar (PDA) บ่มใต้แสง near UV สลับมืด 12 ชั่วโมงเป็นเวลา 7 วัน ทำให้เชื้อราบริสุทธิ์โดยวิธีการ single spore isolation บนอาหาร water agar (WA) เมื่อเชื้อราเจริญเติบโต ทำการย้ายลงหลอดอาหารเอียง potato carrot agar (PCA) เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป

การจำแนกเชื้อราสาเหตุโรค

เลี้ยงเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนสของมะม่วงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA บ่มใต้แสง near UV สลับมืด 12 ชั่วโมงเป็นระยะเวลา 5 วัน ศึกษาลักษณะโคโลนี และสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ compound microscope จากนั้นทำการสกัดดีเอ็นเอโดยดัดแปลงวิธีการจาก Pongpisutta *et al*. (2013) เพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมโดยเทคนิค polymerase chain reaction (PCR) ด้วย universal primers ITS4/ITS5 และจำแนกเชื้อราโดยใช้เทคนิค PCR-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) โดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) *Rsa*I ตรวจสอบ digested product ด้วย 2.0% agarose gel electrophoresis ใน 1X TBE buffer บันทึกการเกิดแถบดีเอ็นเอด้วยเครื่อง Gel documentation

การตอบสนองต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อรา 6 ชนิด ในการยับยั้งการจริญของเส้นใยเชื้อรา

ทำการเลี้ยงเชื้อราสาเหตุโรคที่แยกได้จากผลมะม่วงที่แสดงอาการแอนแทรคโนส บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA บ่มใต้แสง near UV สลับมืด 12 ชั่วโมง อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 5 วัน จากนั้นทำการทดสอบประสิทธิภาพของสารกำจัดเชื้อรา 6 ชนิด ได้แก่ azoxystrobin (25% SC), azoxystrobin ผสม difenoconazole (32.5% SC), cabendazim (50% SC), difenoconazole (25% EC), prochloraz (45% EW) และ propineb (70% WP) ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราด้วยเทคนิค poisoned food โดยผสมสารกำจัดเชื้อรากับอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายของสารออกฤทธิ์เท่ากับ 0.1, 1, 10, 100, 200 µg/ml และอัตราแนะนำของแต่ละสาร จากนั้นใช้ cork borer ขนาด 6 มิลลิเมตร เจาะเส้นใยบริเวณขอบโคโลนีเชื้อรา ย้ายลงอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมสารเคมี โดยให้เชื้อราสัมผัสผิวหน้าอาหาร บ่มใต้แสง near UV สลับมืด 12 ชั่วโมง อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 5 วัน

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

ผล

การแยกเชื้อราสาเหตุโรค

แยกเชื้อราสาเหตุโรคจากมะม่วงสายพันธุ์น้ำดอกไม้สีทองที่แสดงอาการโรคแอนแทรคโนส (Figure 1A) ด้วยเทคนิค tissue transplanting และทำให้เชื้อราบริสุทธิ์โดยวิธี single spore isolation ผลการทดลอง พบว่าเชื้อราที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ให้ลักษณะโคโลนีฟูจากผิวหน้าอาหาร สร้างเส้นใยสีขาวปนเทา ถึงเขียวมะกอก ขอบโคโลนีมีสีขาว พบการสร้างกลุ่มสปอร์สีส้ม กระจายทั่วโคโลนี (Figure 1B)

การจำแนกเชื้อราสาเหตุโรค

จำแนกเชื้อราสาเหตุโรคโดยใช้เทคนิคทางสัณฐานวิทยาอ้างอิงตามหนังสือ The coelomycetes: fungi imperfecti with pycnidium, acervulus and stromata พบว่าเชื้อรามีการสร้างสปอร์ (conidia) ใสไม่มีสี (hyaline) 1 เซลล์ ขนาด

ประมาณ 3.75-6.25 X 12.50-22.50 µm รูปร่างทรงกระบอก ฐานตัด (truncate) (Figure 1C) ไม่พบการสร้าง setae เจริญอยู่บนก้านชูสปอร์ (conidiophore) ภายใน asexual fruiting body ที่เรียกว่า acervulus จากนั้นทำการสกัดดีเอ็นเอ และเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วย universal primers ITS4/ITS5 ได้แถบดีเอ็นเอขนาด 600 bp (Figure 1D) นำ PCR product มาย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Rsa*I พบว่าได้แถบผลิตภัณฑ์ขนาด 200 และ 400 bp ตามลำดับ เปรียบเทียบกับ 0'GeneRuler Express DNA Ladder และ *C. gloeosporioides* ไอโซเลท PH065 (รัติยา และคณะ, 2560) (Figure 1E)

การตอบสนองต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อรา 6 ชนิด ในการยับยั้งการจริญของเส้นใยเชื้อรา

ทดสอบการตอบสนองต่อสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อรา 6 ชนิด ผลการทดลอง พบว่าสารเคมี prochloraz ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 10 ถึง 200 ppm สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราได้ดีที่สุดโดยมีนัยสำคัญทางสถิติ รองลงมา คือสารเคมี carbendazim และ difenoconazole ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 100 ถึง 200 ppm ซึ่งไม่พบการเจริญของเส้นใยเชื้อราบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมสารเคมีที่ความเข้มข้นดังกล่าว สำหรับสารเคมีอีก 3 ชนิด ได้แก่ azoxystrobin, azoxystrobin ผสม difenoconazole และ propineb พบว่าที่ความเข้มข้นสูงสุด คือ 200 ppm ยังพบการเจริญของเส้นใยเชื้อราบนอาหารดังกล่าว โดยมีเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อราที่อายุ 5 วัน เท่ากับ 2.93, 1.00 และ 3.18 เซนติเมตร ตามลำดับ (LSD=0.2771) เมื่อเทียบกับชุดทดลองควบคุม (4.85 เซนติเมตร)

สำหรับอัตราแนะนำของสารเคมีกำจัดเชื้อรา พบว่าสารเคมีทั้ง 6 ชนิด มีความเข้มข้นของอัตราแนะนำที่แตกต่างกันดังนี้ azoxystrobin (RC= 125 ppm), azoxystrobin ผสม difenoconazole (RC= 325 ppm), carbendazim (RC= 500 ppm), difenoconazole (RC= 125 ppm), prochloraz (RC= 450 ppm) และ propineb (RC= 1,750 ppm) จากข้อมูลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าสารเคมี azoxystrobin ที่อัตราแนะนำยังพบการเจริญของเส้นใยเชื้อรา (3.10 เซนติเมตร) และที่ความเข้มข้นสูงสุด คือ 200 ppm เชื้อรายังสามารถเจริญได้บนอาหารที่ผสมสารเคมีดังกล่าว เช่นเดียวกับสารเคมี azoxystrobin ผสม difenoconazole และ propineb (0.70 และ 2.93 เซนติเมตร ตามลำดับ) ดังแสดงใน Table 1

Table 1 Colony diameter of *Colletotrichum gloeosporioides* on poisoned food incubated under near UV with alternative darkness 12 hr, 25 °C, at d5

Chemicals / Concentrations (ppm)	Diameter of colony (cm)[1]					
	0.1	1	10	100	200	RC*
Azoxystrobin	3.65def	3.77de	3.38fgh	3.38fgh	2.93j	3.10ij
Azoxystrobin mixed with Difenoconazole	3.85d	2.52k	1.58lm	1.35m	1.00n	0.70o
Carbendazim	3.25hi	0.72o	0.72o	0.00p	0.00p	0.00p
Difenoconazole	4.27c	3.32ghi	1.55lm	0.00p	0.00p	0.00p
Prochloraz	2.62k	1.78l	0.00p	0.00p	0.00p	0.00p
Propineb	4.62ab	4.48bc	4.28c	3.53efg	3.18hij	2.93j
Control	4.85a					
CV	8.1475					
LSD	0.2771					

[1] Column values followed by the same letter are not significantly different (P=0.05) *RC= recommended rate

วิจารณ์ผล

จำแนกเชื้อราโดยใช้สัณฐานวิทยา ร่วมกับอณูชีวโมเลกุลด้วยเทคนิค PCR-RFLP พบว่าการใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Rsa*I สามารถจำแนกเชื้อรา *C. gloeosporioides* ได้ สอดคล้องกับรายงานของ Pongpisutta *et al*. (2013) ที่ใช้เทคนิค PCR-RFLP ในการจำแนกเชื้อรา *C. acutatum*, *C. capsici* และ *C. gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของพริกในประเทศไทย สำหรับการตอบสนองต่อสารกำจัดเชื้อรา พบว่าเชื้อราสาเหตุโรค สามารถเจริญได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีส่วนผสมของสารเคมี azoxystrobin, azoxystrobin ผสม difenoconazole และ propineb ซึ่งสารเคมีดังกล่าว มีรายงานว่าเชื้อราในสกุล *Colletotrichum* แสดงความต้านทาน (Nalumpang *et al*., 2010; Xu *et al*., 2014; Lin *et al*., 2016) การศึกษานี้จะนำไปสู่การปรับเปลี่ยนวิธีการใช้สารเคมี เพื่อให้สามารถควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคดังกล่าวได้อย่างมีประสิทธิภาพ และเหมาะสมต่อไป

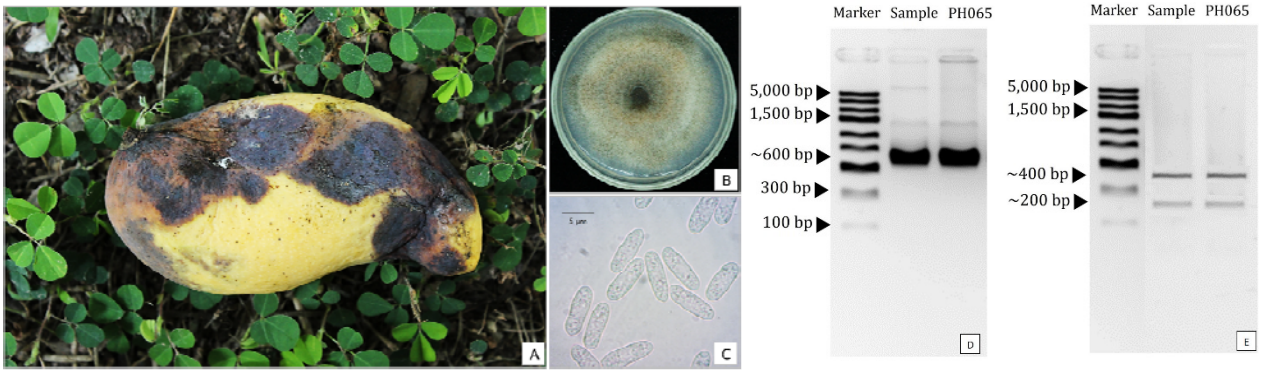

Figure 1 (A) Naturally infection of mango fruit cultivar Nam Dork Mai See Tong, (B) fungal colony on PDA incubated under near UV with alternative darkness 12 hr, 25 °C, (C) conidia under compound microscope at 400X of *Colletotrichum gloeosporioides* (D) molecular technique using PCR amplified fragment of ITS region was approximately 600 bp on 1.2% agarose gel and (E) PCR-RFLP by *Rsa*I enzyme could cut the PCR fragment of sample and generating bands of 200 and 400 bp.

สรุป

จากการแยกเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนสจากมะม่วงสายพันธุ์น้ำดอกไม้สีทอง ในจังหวัดฉะเชิงเทรา ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา ร่วมกับเทคนิค PCR-RFLP จำแนกเชื้อราได้เป็น *C. gloeosporioides* จากนั้นตรวจสอบการตอบสนองของเชื้อราต่อสารเคมีกำจัดเชื้อรา จำนวน 6 ชนิด ผลการทดลอง พบว่าสารเคมี prochloraz ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 10 ppm สารเคมี carbendazim และ difenoconazole ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 100 รวมถึงความเข้มข้นตามอัตราแนะนำของสารแต่ละชนิด สามารถควบคุมการเจริญของเส้นใยเชื้อรา โดยไม่พบการเจริญของเส้นใยเชื้อราบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมสารเคมีดังกล่าว

คำขอบคุณ

งานวิจัยนี้ ได้รับการสนับสนุนจากศูนย์นวัตกรรมเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว สำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษา กทม. และขอขอบคุณห้องปฏิบัติการราวิทยา ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัย เกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน สำหรับการเอื้อเฟื้อสถานที่ และอุปกรณ์ในการทำวิจัย

เอกสารอ้างอิง

รัติยา พงศ์พิสุทธา, ชัยณรงค์ รัตนกรีฑากุล และสัณฐิติ บินคาเดอร์. 2560. การจำแนกเชื้อรา *Colletotrichum* species สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของกาแฟ. วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร 48 (3 พิเศษ): 133-136.

Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2017. FAOSTAT. (Online). Retrieved from: http://www.fao.org/faostat/en/#home. (May 8, 2018).

Lin, T., X.F. Xu, D.J. Dai, H.J. Shi, H.D. Wang and C.Q. Zhang. 2016. Differentiation in development of benzimidazole resistance in *Colletotrichum gloeosporioides* complex populations from strawberry and grape hosts. Australasian Plant Pathology 45: 241–249.

Nalumpang, S., Y. Miyamoto, C. Miyake, Y. Izumi K. Akimitsu and P. Kongtragoul. 2010. Point mutations in the beta-tubulin gene conferred carbendazim-resistant phenotypes of *Colletotrichum gloeosporioides* causing 'Nam Dok Mai' mango anthracnose. Journal of agricultural technology 6(2): 365-378.

Pongpisutta, R., W. Winyarat and C. Rattanakreetakul. 2013. RFLP identification of *Colletotrichum* species isolated from chilli in Thailand. Acta Hortriculturae 973: 181-186.

Sangchote, S. 1987. Postharvest disease of mango fruit and their losses. Kasetsart Journal (Natural Science) 21: 81-85.

Tredway, L. and F. Wong. 2012. Managing anthracnose with fungicides. Research GCM. Retrieved from https://www.gcsaa.org/uploadedfiles/course/pests-and-diseases/diseases/anthracnose /managing-anthracnose-with-fungicides.pdf. (May 18, 2018).

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. Australasian Plant Pathology 43: 605–613.