Agricultural Sci. J. 50 : 3 (Suppl.) : 175-178 (2019) ว. วิทย. กษ. 50 : 3 (พิเศษ) : 175-178 (2562)

การตอบสนองต่อสารเคมีของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* และ *Colletotrichum siamense* สาเหตุโรคหลังการเก็บเกี่ยวของมะม่วง

Responsiveness to Fungicide Chemicals of *Colletotrichum gloeosporioides* and *Colletotrichum siamense* Associated with Postharvest Disease of Mango

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

Abstract

Colletotrichum gloeosporioides and *C. siamense* were reported to cause anthracnose and post-harvest diseases of mangoes worldwide. Morphological studies and molecular technique by using nucleotide sequences of the internal transcribed spacer (ITS) were used to compare both species. The result showed highly similarity with *C. gloeosporioides and C. siamense.* Apart from this, responsiveness of 4 fungicides were studied and finding indicated that prochloraz at the concentration of 10 ppm and difenoconazole at 100 ppm upward could completely inhibit the fungal mycelium in case of azoxystrobin found that those fungi could grow at all concentrations but carbendazim differ respond that *C. gloeosporioides* could inhibit mycelium at the 100 ppm upward and *C. siamense* grew up at all concentrations. Therefore, fungal pathogen species identification will solve for decision support to use fungicide chemicals to control and protect effectively

Keywords: Anthracnose, Fungicide chemical, *Colletotrichum* spp.

บทคัดย่อ

เชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* และ *C. siamense* พบว่ามีรายงานการก่อให้เกิดโรคแอนแทรคโนส และโรคหลังการเก็บเกี่ยวของมะม่วงทั่วโลก จากการศึกษาทางสัณฐานวิทยา และอณูชีวโมเลกุลโดยการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ Internal transcribed spacer (ITS) ในครั้งนี้ พบว่าเชื้อราทั้ง 2 สปีชีส์มีความคล้ายคลึงกันทางชีวภาพค่อนข้างสูง และเมื่อทำการตรวจสอบการตอบสนองต่อสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อรา 4 ชนิด ที่ 6 ระดับความเข้มข้น ผลการทดลองพบว่าสารเคมี prochloraz ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 10 ppm และ difenoconazole ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 100 ppm สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราทั้ง 2 สปีชีส์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยไม่พบการเจริญของเส้นใยเชื้อรา สำหรับสารเคมี azoxystrobin พบว่าเชื้อราทั้ง 2 สปีชีส์ สามารถเจริญได้ในทุกความเข้มข้น แต่ในสารเคมี carbendazim เชื้อรามีการตอบสนองที่แตกต่างกัน คือ เชื้อรา *C. gloeosporioides* ไม่สามารถเจริญได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมสารเคมี carbendazim ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 100 ppm เป็นต้นไป ในขณะที่เชื้อรา *C. siamense* สามารถเจริญได้บนอาหารดังกล่าวในทุกความเข้มข้น ดังนั้นการระบุสปีชีส์เชื้อราสาเหตุโรคที่แน่ชัด จะเป็นตัวช่วยในการตัดสินใจใช้สารเคมีควบคุม และป้องกันเชื้อราได้อย่างมีประสิทธิภาพต่อไป

คำสำคัญ: โรคแอนแทรคโนส สารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อรา *Colletotrichum* spp.

คำนำ

จากรายงานของ Cannon *et al*. (2012) พบว่าเชื้อราในสกุล *Colletotrichum* มีความหลากหลายทางชีวภาพ ที่ค่อนข้างสูง และความแตกต่างของเชื้อราในระดับสปีชีส์ค่อนข้างน้อย อีกทั้งเชื้อดังกล่าวยังสามารถก่อให้เกิดโรคได้กับพืชหลายชนิดทั่วโลก โดยเฉพาะอย่างยิ่งมะม่วง พบว่าเชื้อนี้เข้าทำลายทั้งในระยะแปลงปลูก รวมไปถึงก่อให้เกิดโรคหลังการเก็บเกี่ยวอีกด้วย ในปัจจุบันได้มีการจำแนกเชื้อรา โดยใช้สัณฐานวิทยา ร่วมกับอณูชีวโมเลกุล และพบว่าเชื้อราที่เข้าทำลายมะม่วงนั้น มีหลายสปีชีส์ อาทิ *C. acutatum* และ *C. asianum, C. gloeosporioides, C. siamense* เป็นต้น แต่จากข้อมูลหลายฉบับพบว่าเชื้อรา *C. gloeosporioides* และ *C. siamense* เป็นสปีชีส์หลักที่ก่อให้เกิดโรคกับมะม่วง (Mo *et al*., 2018)

สำหรับการควบคุมเชื้อรา การใช้สารเคมีจัดเป็นวิธีการหนึ่งที่นิยมใช้มากที่สุดในการจัดการโรค เนื่องจากใช้ในปริมาณน้อย เห็นผลรวดเร็ว และจากรายงานของ Tredway and Wong (2012) พบว่ามีสารเคมีที่สามารถควบคุมโรคแอนแทรคโนสได้

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

มากถึง 9 กลุ่มสาร โดยเฉพาะสารในกลุ่ม demethylation Inhibitors, benzimidazole และ QoI (strobilurin) เช่น azoxystrobin, carbendazim, difenoconazole และ prochloraz เป็นที่นิยมมาก เนื่องจากมีประสิทธิภาพในการควบคุมทั้งในระยะแปลงปลูกและหลังการเก็บเกี่ยว งานวิจัยนี้นอกเหนือจากการตรวจสอบการตอบสนองของเชื้อรา *C. gloeosporioides* และ *C. siamense* แล้วนั้น ยังได้ทำการเปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยา และอณูชีวโมเลกุลโดยการวิเคราะห์ลำดับ นิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS-region ของเชื้อราทั้ง 2 สปีชีส์ เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการศึกษา และควบคุมโรคแอนแทรคโนสได้อย่างมีประสิทธิภาพต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

1. เชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนส และลักษณะทางสัณฐานวิทยา

เชื้อรา *C. gloeosporioides* และ *C. siamense* ได้รับความอนุเคราะห์จากห้องปฏิบัติการราวิทยา ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ นำมาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ potato dextrose agar (PDA) บ่มใต้แสง near UV สลับมืด 12 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส วัดการเจริญของเส้นใยเชื้อราทุกวันจนครบ 5 วัน วางแผนการทดลองแบบ completely randomized design (CRD) แต่ละกรรมวิธีมี 5 ซ้ำ บันทึกลักษณะของเชื้อราภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 40X

2. การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์

สกัดดีเอ็นเอ และเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมเชื้อราบริเวณ ITS-region ด้วยไพรเมอร์ ITS4/ITS5 (ดัดแปลงวิธีการจาก Pongpisutta *et al*., 2013) จากนั้นส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่บริษัท First Base Laboratories ประเทศมาเลเซีย นำข้อมูลที่ได้จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์มาเปรียบเทียบในฐานข้อมูลของ GenBank ด้วยโปรแกรม Blast n

3. การตอบสนองต่อสารเคมีป้องกันกำจัดโรคพืช

การศึกษาการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราด้วยเทคนิค poisoned food โดยเพิ่มปริมาณเชื้อรา *C. gloeosporioides* และ *C. siamense* เลี้ยงเชื้อราบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA บ่มใต้แสง near UV สลับมืด 12 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 5 วัน จากนั้นใช้ cork borer ขนาด 0.6 มิลลิเมตร เจาะบริเวณขอบโคโลนีเชื้อรา ย้ายลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่ผสมสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อรา 4 ชนิด ได้แก่ azoxystrobin (25% SC), carbendazim (50% SC), difenoconazole (25% EC) และ prochloraz (45% EW) ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายของสารออกฤทธิ์เท่ากับ 0.1, 1, 10, 100, 200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (ppm) และอัตราแนะนำ (Recommended rate:RR) บ่มภายใต้แสง near UV สลับมืด 12 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส บันทึกข้อมูลโดยการวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี จนครบ 5 วัน วางแผนการทดลองแบบ completely randomized design (CRD) แต่ละกรรมวิธีมี 5 ซ้ำ วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ ด้วยโปรแกรม R-stat X64 3.4.0

ผล

1. เชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนส และลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ลักษณะของเชื้อรา *C. gloeosporioides* ไอโซเลท CS001 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA พบว่าเส้นใยมีการเจริญค่อนข้างเร็ว สร้างเส้นใยสีเทา ถึงเขียวมะกอก ฟูจากผิวหน้าอาหารเล็กน้อย ขอบโคโลนีเรียบ สร้างสปอร์ค่อนข้างน้อย ศึกษาลักษณะสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 40X พบมีลักษณะ ใส ไม่มีสี (hyaline) 1 เซลล์ รูปร่างทรงกระบอก (cylindrical) ปลายตัด ขนาดประมาณ 2.88 – 5.71 x 9.45 – 16.59 ไมโครเมตร ไม่พบการสร้าง setae ส่วนของ appressorium มีรูปร่างทรงกระบอง (clavate) ถึง รูปร่างไม่แน่นอน (irregular) สีน้ำตาลอ่อน ถึงน้ำตาล ขนาดประมาณ 3.27 - 9.26 x 7.57 - 16.15 ไมโครเมตร ในขณะที่ *C. siamense* ไอโซเลท RB003 มีการสร้างโคโลนีสีขาว เจริญฟูจากผิวหน้าอาหาร พบการสร้างกลุ่มสปอร์ (spore mass) สีส้ม สปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ มีลักษณะใส ไม่มีสี 1 เซลล์ รูปร่างทรงกระบอก ปลายฐานตัด ขนาดประมาณ 4.22 – 7.05 x 10.68 – 15.05 ไมโครเมตร ไม่พบการสร้าง setae ส่วนของ appressorium มีลักษณะเป็น lobe ถึง irregular สีน้ำตาลอ่อน ถึงน้ำตาล ขนาดประมาณ 4.66- 7.14 x 6.02 – 11.00 ไมโครเมตร (Figure 1)

2. การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์

ผลการเทียบเคียงลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS จากการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยไพรเมอร์ ITS4/ITS5 ในฐานข้อมูล GenBank เพื่อยืนยันการจำแนกสปีชีส์โดยอาศัยลักษณะสัณฐานวิทยา พบว่ามีความเหมือน 99 – 100 และ 100 เปอร์เซ็นต์ กับเชื้อรา *C. gloeosporioides* และ *C. siamense* ตามลำดับ (Table 1) นอกจากนี้ยังช่วยสนับสนุนว่าลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS สามารถบ่งบอกความแตกต่างของชนิดเชื้อรา *Colletotrichum* จำนวน 2 สปีชีส์ ดังกล่าว ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่ม *Colletotrichum gloeosporioides* species complex ได้อย่างชัดเจน

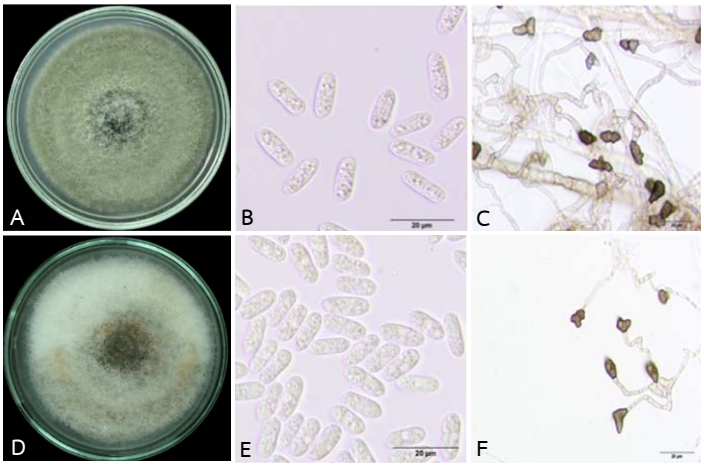

Figure 1 Characteristics between *Colletotrichum gloeosporioides* (A-C) and *C. siamense* (D-F) after 5d incubation on PDA under near UV with alternative darkness for 12 hr at 25 °C. (A, D) colony types, (B, E) conidial shape and (C, F) appressoria

Table 1 Sequence similarity of *Colletotrichum* 2 species compared to Genbank database using NCBI BLAST

C. gloeosporioides isolate RB002			*C. siamense* isolate RB003		
Description	% similarity	Accession	Description	% similarity	Accession
C. gloeosporioides, strain BBA 70072	100%	AJ301909.1	*C. siamense* isolate: R020	100%	LC052320.1
C. gloeosporioides strain TDMG002	99%	AY791888.1	*C. siamense* strain MEF82A	100%	MF380921.1
C. gloeosporioides strain F210042	99%	KX197386.1	*C. siamense* isolate: R007	100%	LC052317.1
C. gloeosporioides strain Bpf-2	99%	KX960784.1	*C. siamense* isolate: R003	100%	LC052316.1
C. gloeosporioides strain F210004	99%	KX197385.1	*C. siamense* isolate: BP033	100%	LC052313.1

3. การตอบสนองต่อสารเคมีป้องกันกำจัดโรคพืช

จากการทดลองการตอบสนองต่อสารเคมี พบว่าเชื้อรา *C. gloeosporioides* ไอโซเลท CS001 ไม่สามารถเจริญได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมสารเคมี prochloraz ความเข้มข้น 10 – 200 ppm และอัตราแนะนำ ส่วนสารเคมี carbendazim และ difenoconazole ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 100 ppm และอัตราแนะนำ สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราสปีชีส์ดังกล่าวได้เช่นกัน สำหรับสารเคมี azoxystrobin นั้น พบว่าในทุกความเข้มข้น มีการควบคุมการเจริญของเส้นใยเชื้อรามีประสิทธิภาพน้อยกว่าสารเคมีชนิดอื่น โดยความเข้มข้นสูงสุด (200 ppm) วัดการเจริญของเส้นใยได้เท่ากับ 2.9333 เซนติเมตร สำหรับเชื้อรา *C. siamense* ไอโซเลท RB003 พบว่าสารเคมี prochloraz ที่ความเข้มข้น 1 – 200 ppm และอัตราแนะนำ และสารเคมี difenoconazole ที่ความเข้มข้น 200 ppm สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยไม่พบการเจริญของเส้นใยเชื้อรา รองลงมาคือ สารเคมี prochloraz ความเข้มข้น 0.1 ppm และสารเคมี difenoconazole ที่ความเข้มข้น 10 และ 1 ppm ซึ่งวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีได้ 2.4167, 2.2333 และ 2.6833 เซนติเมตร ตามลำดับ (Table 2) สำหรับสารเคมี azoxystrobin และ carbendazim ทุกความเข้มข้น พบว่าเชื้อรามีการเจริญเติบโตได้ดี เมื่อเปรียบเทียบกับชุดทดลองควบคุม (3.9500 เซนติเมตร; LSD= 01720)

วิจารณ์ผล

เชื้อรา *C. gloeosporioides* และ *C. siamense* มีความคล้ายคลึง ทั้งทางสัณฐานวิทยา และ ลักษณะทางพันธุกรรม สอดคล้องกับรายงานของ Weir *et al*. (2012) ที่ทำการศึกษาเชื้อรา *C. gloeosporioides* species complex พบว่าเชื้อราทั้ง 2 สปีชีส์ มีความเหมือนทางพันธุกรรมสูง โดยลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS-region ไม่สามารถแยกความแตกต่างได้ อีกทั้งเชื้อราทั้ง 2 สปีชีส์ยังสามารถเข้าทำลายและก่อให้เกิดโรคกับพืชอาศัยได้หลายชนิดเช่นเดียวกัน สำหรับการตอบสนองต่อสารเคมี พบว่า *C. gloeosporioides* และ *C. siamense* มี sensitivity ต่อ difenoconazole และ prochloraz ได้รวดเร็วกว่า ตามลำดับ อย่างไรก็ตามสารเคมี 2 ชนิดดังกล่าวมีประสิทธิภาพดีที่สุดในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราทั้ง 2 สปีชีส์ (สัณฐิติ และคณะ, 2561; Lin *et al*., 2016) ส่วนสารเคมี azoxystrobin รวมไปถึง carbendazim ไม่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราทั้ง *C. gloeosporioides* และ *C. siamense* ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Hu *et al*. (2015) และ Nalumpang *et al*. (2010) ที่พบว่าเชื้อในสกุล *Colletotrichum* แสดงความต้านทานต่อสารเคมี โดยเฉพาะสาร azoxystrobin และ carbendazim งานวิจัยนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาการควบคุมโรคแอนแทรคโนสของมะม่วงให้มีประสิทธิภาพ ทั้งนี้เพื่อลดต้นทุนการผลิตด้วยเช่นกัน

Table 2 Colony diameter of *Colletotrichum gloeosporioides* and *C. siamense* on poisoned food medium incubated at 25°C under near UV with alternative darkness 12 hr for 5 days

Treatment	Conc. (ppm)	Colony diameter at d5		Treatment	Conc. (ppm)	Colony diameter at d5	
		C. gloeosporioides	*C. siamense*			*C. gloeosporioides*	*C. siamense*
Control	-	3.8833b	3.9500d				
Azoxystrobin	0.1	3.7667b	4.5950ab	Difenoconazole	0.1	4.2667a	4.3000d
	1	3.6500bc	4.5833ab		1	3.3167d	2.6833f
	10	3.3833cd	4.5833ab		10	1.5500g	2.2333h
	100	3.3833cd	4.5167abc		100	0.0000i	0.9167i
	200	2.9333e	4.3667cd		200	0.0000i	0.0000j
	RR (125)	3.1000de	4.4333bcd		RR (125)	0.0000i	0.8000j
Carbendazim	0.1	3.2500d	4.6667a	Prochloraz	0.1	2.6167f	2.4167g
	1	0.7167h	4.6000ab		1	1.7833g	0.0000j
	10	0.7167h	4.5500ab		10	0.0000i	0.0000j
	100	0.0000i	4.5500ab		100	0.0000i	0.0000j
	200	0.0000i	4.4833bc		200	0.0000i	0.0000j
	RR (500)	0.0000i	4.4833bc		RR (450)	0.0000i	0.0000j
				F-value		****	***
				CV		1.1142	0.3654
				LSD		0.3112	0.1720

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

สรุป

เชื้อรา *C. gloeosporioides* และ *C. siamense* ถูกจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน คือ *C. gloeosporioides* species complex อย่างไรก็ตามพบการตอบสนองต่อสารเคมีป้องกันกำจัดโรคพืชที่แตกต่างกัน โดยพบว่าสารเคมีที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อราทั้ง 2 สปีชีส์ ได้ดีที่สุด คือสารเคมี prochloraz และ difenoconazole

คำขอบคุณ

งานวิจัยนี้ ได้รับการสนับสนุนจากศูนย์นวัตกรรมเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา และขอขอบคุณห้องปฏิบัติการราวิทยา ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน สำหรับการเอื้อเฟื้อสถานที่ และอุปกรณ์ในการทำวิจัย

เอกสารอ้างอิง

สัณฐิติ บินคาเดอร์, รัติยา พงศ์พิสุทธา และชัยณรงค์ รัตนกรีฑากุล. 2561. การตอบสนองของ *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Sacc สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้สีทองต่อสารเคมีกำจัดเชื้อรา. วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร 49 (4 พิเศษ): 167-170.

Cannon, P.E., U. Damm, P.R. Johnston and B.S. Weir. 2012. *Colletotrichum* – current status and future directions. Studies in Mycology 73: 181–213.

Hu, M.J., A. Grabke, M.E. Dowling, H.J. Holstein and G. Schnabel. 2015. Resistance in *Colletotrichum siamense* from peach and blueberry to thiophanate-methyl and azoxystrobin. Plant Disease 99 (6): 806-814.

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.

Mo, J., G. Zao, Q. Li, G.S. Solangi, L. Tang, T. Guo, S. Huang and T. Hsiang. 2018. Identification and characterization of *Colletotrichum* species associated with mango anthracnose in Guangxi, China. Plant Disease 102: 1283-1289.

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 Horticulturae 973: 181-186.

Tredway, L. and F. Wong. 2012. Managing anthracnose with fungicides. Research GCM. [Online]. Available Source: https://www.gcsaa.org/uploadedfiles/course/pests-and-diseases/diseases/anthracnose /managing-anthracnose-with-fungicides.pdf. (May 17, 2019).

Weir, B.S., P.R. Johnston and U. Damm. 2012. The *Colletotrichum gloeosporioides* species complex. Studies in Mycology 73: 115-180.