Agricultural Sci. J. 38 : 5 (Suppl.) : 205-208 (2007) ว. วิทย. กษ. 38 : 5 (พิเศษ) : 205-208 (2550)

การตรวจสอบความทนทานต่อสารกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิมของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. สาเหตุโรคแอนแทรคโนสในมะม่วง

Detection of fungicide carbendazim resistance in *Colletotrichum* spp. causing anthracnose disease from mango fruits.

สุธาสินี ชัยชนะ[1] **และ สรัญยา ณ ลำปาง**[2]
Sutasinee Chaichana[1] and Sarunya Nalumpang[2]

Abstract

The fungicide carbendazim was recommended for control anthracnose disease both in the field and post harvest. However, recently little or no control of this disease was observed in some major mango growing areas in Chiang Mai. Conidial isolates of *Colletotrichum* spp. were obtained from mango fruits which collected from Chiang Mai. The carbendazim tolerance of these isolates was determined by examining their mycelial growth on potato dextrose agar (PDA) amended with carbendazim (Bavistin® FL 50% W/V F.) at 6 concentrations: 0, 0.1, 1, 10, 100, 500, and 1000 ppm and divided into 4 levels: highly resistant (HR), moderately resistant (MR), weakly resistant (WR) and sensitive (S; wild type). Forty isolates of *Colletotrichum* spp. from mango fruits were observed in this fungicide 26 isolates were showed highly resistant (HR) and 14 isolates were presented fungicide sensitivity (S). None showed moderately resistant (MR) and weakly resistant (WR) in this experiment. In contrast, the effect of carbendazim on conidial germination and germ tube growth using onion surface method was determined for sensitive isolate (S) and highly resistant isolate (HR). The addition of carbendazim to conidia of *Colletotrichum* spp. did not prevent conidial germination even at the highest concentration tested (500 ppm).

Keywords: *Colletotrichum* spp., mango, carbendazim

บทคัดย่อ

เก็บรวบรวมตัวอย่างและแยกเชื้อรา *Colletotrichum* spp. จากผลมะม่วงที่เป็นโรคแอนแทรคโนส ภายในจังหวัดเชียงใหม่ ศึกษาความทนทานต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิม (Bavistin® FL 50% W/V F.) โดยเลี้ยงเส้นใยเชื้อราบนอาหาร potato dextrose agar (PDA) ที่ผสมสารคาร์เบนดาซิม 6 ระดับความเข้มข้น: 0.1, 1, 10, 100, 500, และ 1000 ppm โดยเปรียบเทียบการเจริญกับชุดควบคุม และประเมินระดับความทนทานของเชื้อราต่อสารคาร์เบนดาซิมเป็น 4 ระดับคือ ทนทานมาก (HR), ทนทานปานกลาง (MR), ทนทานน้อย (WR), และไม่ทนทาน (S; สายพันธุ์ปกติ) จากการทดสอบเชื้อรา *Colletotrichum* spp.จำนวน 40 ไอโซเลท พบเชื้อราที่ทนทานต่อสารคาร์เบนดาซิมในระดับสูง (HR) จำนวน 26 ไอโซเลท และเชื้อราที่ไม่ทนทานต่อสารคาร์เบนดาซิม (S) จำนวน 14 ไอโซเลท โดยในการทดสอบครั้งนี้ไม่พบเชื้อราที่มีความทนทานปานกลาง (MR) และเชื้อราที่มีความทนทานน้อย (WR) เมื่อทดสอบสารคาร์เบนดาซิมต่อการงอกและการเจริญของสปอร์เชื้อรา *Colletotrichum* spp.บนเยื่อหอม พบว่าสารคาร์เบนดาซิมความเข้มข้น 500 ppm ไม่ยับยั้งการงอกและการเจริญของสปอร์เชื้อราทั้งสายพันธุ์ปกติ (S) และสายพันธุ์ที่ทนทานต่อสารคาร์เบนดาซิมในระดับสูง (HR)

คำสำคัญ: *Colletotrichum* spp. มะม่วง คาร์เบนดาซิม

คำนำ

เชื้อรา *Colletotrichum* spp. เป็นสาเหตุของการเกิดโรคแอนแทรคโนสในมะม่วง การป้องกันกำจัดโรคดังกล่าว นิยมใช้สารป้องกันกำจัดเชื้อราในกลุ่มเบนซิมิดาโซล (benzimidazole) คือเบนโนมิล (benomyl), ไทอะเบนดาโซล (thaibendazole) หรือคาร์เบนดาซิม (carbendazim) ซึ่งเป็นสารเคมีชนิดดูดซึม (systemic fungicide) เพราะสามารถควบคุมโรคที่มีสาเหตุจากเชื้อราชั้นสูงได้ดี (Sariah, 1989) แต่การใช้สารเคมีดังกล่าวติดต่อกันเป็นเวลานาน มักประสบปัญหาการ

[1] สถานวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยว มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จังหวัดเชียงใหม่ 50200
[1] Postharvest Technology Institute, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200
[2] ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จังหวัดเชียงใหม่ 50200
[2] Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200

ทนทานต่อสาร (resistance to fungicide) หรือเชื้อรามีการปรับตัวเกิดเป็นเชื้อกลายพันธุ์ (mutant) ซึ่งลักษณะดังกล่าวสามารถถ่ายทอดไปสู่ลูกหลานได้ งานวิจัยชิ้นนี้เป็นการศึกษาความผันแปรทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. ในมะม่วงที่ทนทานต่อสารคาร์เบนดาซิม ในเขตจังหวัดเชียงใหม่ เพื่อให้เกิดความรู้และความเข้าใจถึงความผันแปรทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา อันจะนำไปสู่การหาวิธีที่เหมาะสมในการควบคุมและกำจัดเชื้อราได้อย่างถูกต้อง และมีประสิทธิภาพสูงสุดต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การแยกเชื้อราบริสุทธิ์ และเก็บรวบรวมเชื้อรา *Colletotrichum* spp.

เก็บรวบรวมตัวอย่างผลมะม่วงที่คาดว่าจะเป็นโรคที่เกิดจากเชื้อ *Colletotrichum* spp. จากตลาดใน จ.เชียงใหม่ มาทำ free hand section ส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ หากพบว่าเชื้อสาเหตุเป็นเชื้อรา *Colletotrichum* spp. จึงทำการแยกเชื้อมาเลี้ยงบนอาหาร potato dextrose agar (PDA) จนเชื้อราเจริญเกือบเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อ เขี่ยเส้นใยของเชื้อราไปทดสอบการเป็นสาเหตุของโรคโดยการปลูกเชื้อลงบนผลมะม่วง เก็บตัวอย่างเชื้อราที่เป็นสาเหตุของโรคใน PDA slant เพื่อใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

2. การทดสอบความทนทานของเชื้อราต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิม ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ

ใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร ตัดปลายเส้นใยของเชื้อราแต่ละไอโซเลทมาเลี้ยงบนอาหาร PDA ที่ผสมสารป้องกันกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิม (Bavistin® FL 50% W/V F.) (PDA+C) ความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้คือ 0, 0.1, 1, 10, 100, 500 และ 1000 ppm (อัตราแนะนำ 500 ppm) ทำการทดลองความเข้มข้นละ 4 ซ้ำ ถ่ายภาพลักษณะโคโลนีของเชื้อรา และบันทึกการเจริญของเชื้อรา โดยการวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี เพื่อหาเปอร์เซ็นต์การเจริญของเชื้อราบนอาหาร PDA+C ความเข้มข้นต่างๆ เปรียบเทียบกับชุดควบคุม (0 ppm) จากสมการ

$$\text{เปอร์เซ็นต์การเจริญของเชื้อรา} = \frac{\text{ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลาง ชุดทดสอบ}}{\text{ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลาง ชุดควบคุม}} \times 100$$

และจัดระดับความทนทานต่อสารคาร์เบนดาซิม 4 ระดับ ดังนี้คือ sensitive (S) = เชื้อราที่เจริญบน PDA+C ความเข้มข้น 0-1 ppm, weakly resistance (WR) = เชื้อราที่เจริญบน PDA+C ความเข้มข้น 0-10 ppm, moderately resistance (MR) = เชื้อราที่เจริญบน PDA+C ความเข้มข้น 0-100 ppm และ highly resistance (HR) = เชื้อราที่เจริญบน PDA+C ความเข้มข้นมากกว่า 100 ppm (Koenraadt *et al.,* 1992)

3. การศึกษาอัตราการงอกของโคนิเดีย

หาเปอร์เซ็นต์การงอกของโคนิเดียบนเยื่อหอม (Hirata,1942) ในคาร์เบนดาซิม ความเข้มข้น 500 ppm นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง (28 องศาเซลเซียส ± 2) จากนั้นนำเยื่อหอมที่หยด spore suspension ความเข้มข้น 105 สปอร์/มิลลิลิตร ปริมาตร 10 ไมโครลิตร มาวางบนแผ่นสไลด์ แล้วหยด lactophenol cotton blue ลงไป เพื่อหยุดการงอก และการเจริญของโคนิเดีย นำไปตรวจนับเปอร์เซ็นต์การงอกของโคนิเดียโดยสุ่มวัด 100 conidia ต่อซ้ำ และสุ่มวัดขนาดของสปอร์, ความยาว germ tube 20 conidia ต่อซ้ำ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบเลนส์ประกอบ ที่เวลา 6,9,12 และ 24, ชั่วโมง โดยโคนิเดียที่นับว่างอกต้องเป็นโคนิเดียที่งอก germ tube ออกมามากกว่าความกว้างของสปอร์

ผล

จากการทดสอบความทนทานของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. มะม่วงต่อสารคาร์เบนดาซิมทั้งหมด 40 ไอโซเลท พบเชื้อที่ไม่ทนทานต่อสาร (S) 14 ไอโซเลท และเชื้อที่ทนทานต่อสารระดับสูง (HR) 26 ไอโซเลท (รูป 1) และไม่พบเชื้อที่มีความทนทานต่อสารแบบ WR และ MR ในการทดลองครั้งนี้ ส่วนการศึกษาการงอกของโคนิเดียบนเยื่อหอมที่ลอยอยู่บน คาร์เบนดาซิม ความเข้มข้น 500 ppm พบว่าสารไม่ยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อราทั้งสายพันธุ์ปกติ (S) และสายพันธุ์ที่ทนทานต่อสารคาร์เบนดาซิมในระดับสูง (HR) (รูป 2)

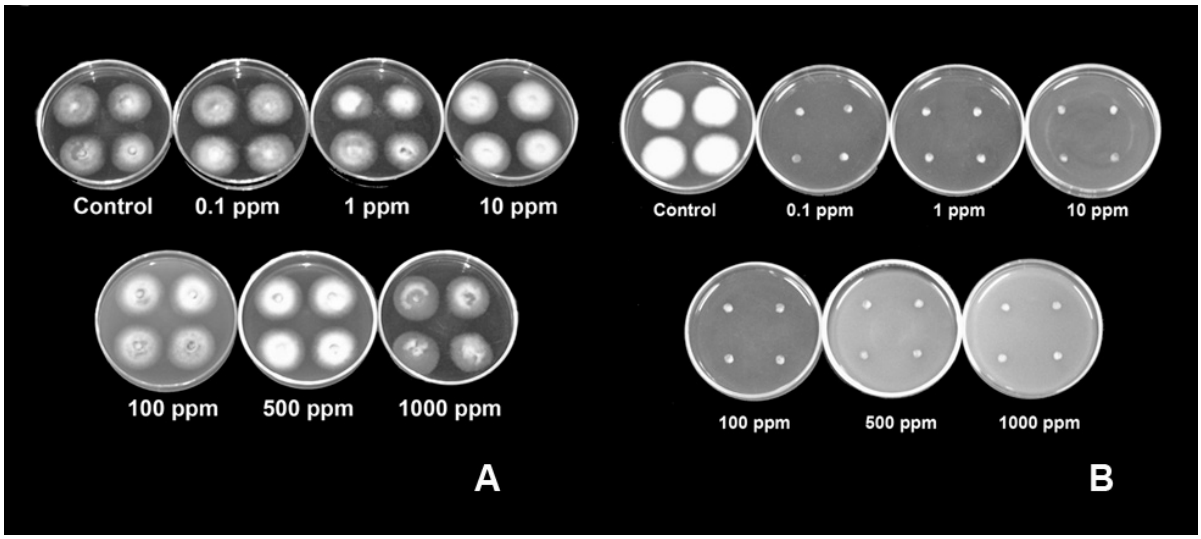

Figure 1 Carbendazim sensitivity assay of *Colletotrichum* spp. from mango fruit A: Highly resistance B: Sensitive

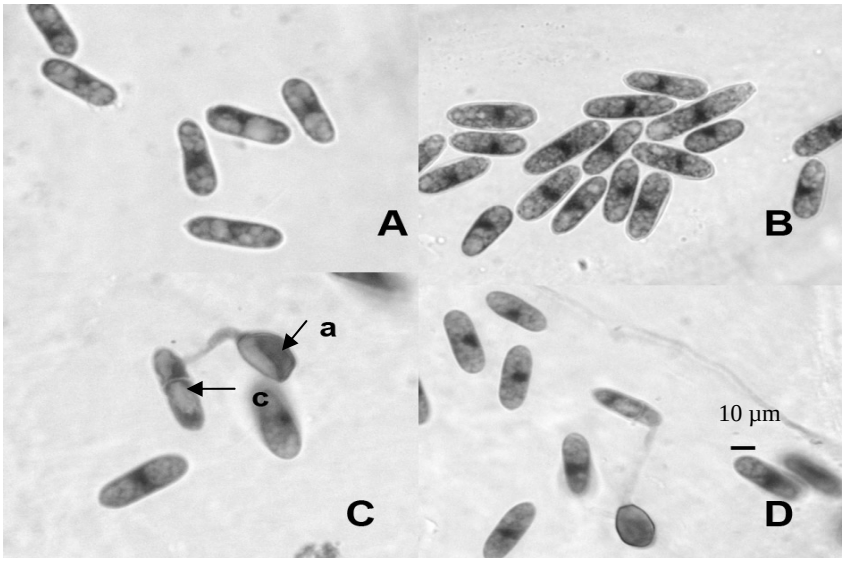

Figure 2 Conidial of *Colletotrichum* spp. on onion surface. A & C: sensitive isolation B & D: highly resistance. a : appressorium, c: conidia

วิจารณ์ผล

การควบคุมโรคแอนแทรคโนสในประเทศไทยส่วนใหญ่จะใช้สารป้องกันกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิม ซึ่งเมื่อใช้ติดต่อกันเป็นเวลานานจะทำให้เชื้อราปรับตัวทนทานต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อราดังกล่าว (Farungsang *et al.*,1992) จากรายงาน Sariah (1989) แยกเชื้อรา *Colletotrichum capsici* จำนวน 340 ไอโซเลทจากพริกที่เป็นโรคแอนแทรคโนส และเลี้ยงบนอาหาร PDA ที่ผสมสารคาร์เบนดาซิม ความเข้มข้น 1,2, 5, 10, 25, 50 และ 100 µg/ml พบเชื้อรา 73 ไอโซเลท สามารถทนทานต่อสารคาร์เบนดาซิมที่ระดับ 100 µg/ml ได้ ซึ่งผลของความทนทานดังกล่าว คาดว่าเกิดจากการกลายพันธุ์ของเชื้อราในตำแหน่ง β -tubulin gene และจากการทดลองหาความทนทานของ *Colletotrichum* spp. มะม่วงในครั้งนี้ พบว่าคาร์เบนดาซิมไม่มีผลในการยับยั้งการงอกของ โคนิเดีย ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Peres *et al.* (2002) ที่รายงานว่าสารเบโนมิลความเข้มข้น 1.0 ppm ยับยั้งการเจริญของเส้นใย แต่สารเคมีดังกล่าวความเข้มข้น 100 ppm ไม่สามารถยับยั้งการงอกของโคนิเดีย

สรุป

การศึกษาครั้งนี้พบเชื้อรา *Colletotrichum* spp. ที่แยกจากผลมะม่วง จำนวน 26 ไอโซเลท ทนทานต่อสารคาร์เบนดาซิม และสารดังกล่าวที่ความเข้มข้น 500 ppm ไม่ยับยั้งการงอกสปอร์ของเชื้อราทั้งสายพันธุ์ปกติ (S) และสายพันธุ์ที่ทนทานในระดับสูง (HR) นอกจากนี้มีแนวโน้มที่จะทนทานต่อสารเคมีกลุ่มเบนซิมิดาโซลเพิ่มมากขึ้น ข้อมูลที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้สามารถนำไปใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการศึกษากลไกการทนทานต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อราต่อไป

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณโครงการพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่ให้ทุนสนับสนุนวิจัยครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

Farungsang, U., N. Farungsang and S. Sangchote. 1992. Benomyl resistance of *Colletotrichum* spp.*Acta Horticulturae* 321: 891-897.

Hirata, K. 1942. On the shape of the germ tubes of *Erysipgaceae*. Bull. Chibu Coll. *J. Hort*. 5: 34-49.

Koenraadt, H., S.C. Somerville and A.L. Jones. 1992. Characterization of mutations in the beta-tubulin gene of benomyl-resistance field strains of *Venturia inaequalis* and other plant pathogenic fungi. *Phytopathology* 82: 1348-1354.

Peres, N. A. R., N. L. Souza, S. E. Zitko, and L. W. Timmer. 2002. Activity of benomyl for control of postbloom fruit drop of citrus caused by *Colletotrichum acutatum*. *J. Plant Dis*. 86: 620-624.

Sariah, M. 1989. Detection of benomyl resistance in the anthracnose pathogen, *Colletotrichum capsici*. *Islamic Academy of Sciences* 2(3): 168-171.