กลายพันธุ์ (Peres *et al.*, 2004; Chung *et al.*, 2006; Maymon *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2007) ด้วยเหตุนี้ การศึกษาในครั้งนี้จึงมุ่งเน้นศึกษาถึงจุดกลายพันธุ์บนยีนเบต้าทูบูลิน (*TUB2*) ของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของมะม่วงที่ต้านทานสารป้องกันกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิม เพื่อให้เกิดความรู้ความเข้าใจถึงการกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นในระดับชีวโมเลกุล ที่มีผลทำให้เกิดความต้านทานต่อสารคาร์เบนดาซิมของเชื้อรา อันจะนำไปสู่การหาวิธีที่เหมาะสมในการควบคุมป้องกันได้อย่างถูกวิธี ดังนั้น การศึกษาเพื่อควบคุมเชื้อราที่ทนทานต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อราโดยชีววิธีในครั้งนี้ ได้เลือกใช้น้ำส้มควัน เนื่องจากน้ำส้มควันไม้เป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเผาถ่านธรรมชาติไม่มีการนำมาใช้ประโยชน์ต่อได้ มีฤทธิ์เป็นกรดอ่อน มีคุณสมบัติในการกำจัดเชื้อราและแมลงได้หลายชนิด และยังช่วยให้พืชผักมีความสด กรอบ รสชาติดีขึ้น (สมาคมเทคโนโลยีที่เหมาะสม, 2549)

การตรวจเอกสาร

1. ความสำคัญของมะม่วง

มะม่วง (*Mangifera indica* L.) เป็นพืชในวงศ์ Anacardiaceae ที่เจริญเติบโตได้ดีในเขตร้อน (tropics) และเขตกึ่งร้อน (subtropics) (Litz, 2009) เป็นผลไม้ที่สำคัญทางเศรษฐกิจอีกชนิดหนึ่งของประเทศไทย เพราะนอกจากจะใช้บริโภคภายในประเทศ ทั้งรูปแบบผลดิบ ผลสุก ใช้ประกอบอาหาร และผลิตภัณฑ์แปรรูป ยังสามารถจัดจำหน่ายเป็นสินค้าส่งออกต่างประเทศ เช่น ญี่ปุ่น ฮองกง สิงคโปร์ จีน และสหภาพยุโรป เป็นต้น (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2551) นอกจากนี้สำนักงานเศรษฐกิจเกษตร (2551) รายงานว่าประเทศไทยมีพื้นที่เพาะปลูกมะม่วงเฉลี่ย 1.9 ล้านไร่ ผลผลิตรวมประมาณ 1-1.9 ล้านตันต่อปี ส่วนใหญ่ทำการเพาะปลูกในแถบจังหวัดเชียงใหม่ ฉะเชิงเทรา นครราชสีมา ชัยภูมิ และราชบุรี เป็นต้น และรายงานว่า ปี 2547-2549 ประเทศไทยส่งออกมะม่วงสดและผลิตภัณฑ์ ปริมาณ 13,353 ตัน มูลค่า 548.33 ล้านบาท ชนิดของมะม่วงที่ส่งออก ได้แก่ เขียวเสวย หนังกลางวัน โชคอนันต์ น้ำดอกไม้ แรด และอกร่อง สามารถสร้างรายได้ให้แก่เกษตรกรได้เป็นอย่างดี ประกอบกับมะม่วงมีคุณค่าทางโภชนาการสูง เช่น มีไฟเบอร์ช่วยในระบบย่อยอาหาร, มะม่วงสุกอุดมไปด้วยวิตามินเอ ซี อี โปแตสเซียม และทองแดง ช่วยให้ร่างกายทำงานเป็นปกติ ปรับสมดุลภายในร่างกาย, สารฟลาโวนอยด์กำจัดไขมันในเลือด, สารไตรเทอปีนต้านสารอนุมูลอิสระ, กรดอะมิโนทริปโตแฟน ช่วยให้ร่างกายหลั่งฮอร์โมนโนเซโรโทนิน ทำให้ผ่อนคลาย (วิจิตร, 2529; Prakash, 2004; Litz, 2009)

2. โรคแอนแทรคโนสของมะม่วง

โรคแอนแทรคโนสของมะม่วงเป็นปัญหาสำคัญที่เกิดขึ้น ตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบัน มีรายงานการพบครั้งแรกเมื่อ ค.ศ. 1903 (พ.ศ. 2446) โดย Puerto Rico กล่าวว่าโรคนี้ก่อให้เกิดความเสียหายอย่างมากต่อการผลิตมะม่วงเชิงการค้าทั้งในระยะก่อนเก็บเกี่ยวและหลังเก็บเกี่ยว โดยเฉพาะในเขตพื้นที่ที่มีความชื้นสูง จะสร้างความเสียหายรุนแรง ทำให้ผลผลิตมีคุณภาพต่ำไม่เป็นที่ต้องการของตลาดทั้งภายในและต่างประเทศ (Prakash, 2004)

2.1 เชื้อสาเหตุ

เกิดจากเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. In Penz. เป็น imperfect stage (anamorph) ของ *Glomerella cingulata* (Stoneman) Spauld. & H. Schrenk (teleomorph) จัดอยู่ใน

Kingdom Fungi
Subdivision Deuteromycotina
From-class Coelomycetes
Form-order Melanconiales
Form-family Melanconiaceae

ลักษณะทั่วไปของเชื้อราจะสร้างเส้นใยฝังอยู่ในผิวพืช เส้นใยไม่มีสี หรือมีสีน้ำตาลอ่อนถึงน้ำตาลแก่ แตกกิ่งก้านมีผนังกั้น โคนิเดีย (conidia) เซลล์เดียว สีใส รูปร่างแบบทรงกระบอกหัวท้ายมน (cylindrical) ขนาดประมาณ 9-24 x 3-4.5 µm เกิดอยู่บนก้านชูโคนิเดีย (conidiophores) เป็นก้านตรงเซลล์เดียว สีใส ซึ่งกำเนิดมาจาก stromatic cell ของโครงสร้างสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศที่เรียกว่า อเซอวูลัส (acervulus) ลักษณะโค้งเว้าฝังตัวลงในเนื้อเยื่อผลมะม่วงชั้น epidermis และ sub-epidermis เป็นรูปถ้วย (disc-shaped หรือ chushion shaped) ของพืช เมื่อแก่จะดันผิวพืชให้แตกออกโคนิเดียจะถูกปล่อยออกมาเป็นกลุ่มในลักษณะแห้ง หรือเป็นของเหลวข้น สีส้มอมชมพู หรือสีเหลืองอ่อน อาจพบหรือไม่พบการสร้าง sterile hypha สีน้ำตาลผนังหนาเรียบ ปลายแหลมคล้ายหนาม เรียกว่า setae เกิดบริเวณอเซอวูลัส หรือปะปนอยู่กับก้านชูโคนิเดีย บางครั้งพบการสร้างเม็ด sclerotia เชื้อราชนิดนี้สร้าง appressoria รูปทรงกระบอก (clavate) หรือ แตกต่างไปเล็กน้อย มีขนาดประมาณ 6-20 x 4-12 µm (วิจัย, 2546; Sutton, 1980; Bailey and Jeger, 1992)

2.2 การเข้าทำลาย และลักษณะอาการของโรค

เชื้อสาเหตุสามารถเข้าทำลายมะม่วงได้ทุกระยะการเจริญเติบโตของต้นมะม่วง ตั้งแต่ระยะออกดอก แตกยอด ทำให้ช่อดอก และยอดเน่าดำ ติดผลน้อยลง และสามารถเข้าทำลายเนื้อเยื่อพืชได้หลายส่วนที่อยู่เหนือดิน เช่น เนื้อเยื่อใบ ดอกและผล เชื้ออาจจะเข้าทำลายผลผลิตตั้งแต่อยู่ในแปลง และผลติดเชื้อจนกระทั่งเกิดอาการหลังการเก็บเกี่ยว เชื้อราสามารถเข้าทำลายมะม่วงได้ ดังนี้ (Figure 1) (Arauz, 2000)

- subcuticular intramural pathogen โดยสปอร์งอกสร้าง appressoria และเกิดการสะสม melanin จากนั้นจึงแทงเส้นใยและกระจายอยู่ภายใต้ cuticle และระหว่างนั้นเส้นใยก็แทงเข้าภายใน epidermal และ mesophyll cell ทำให้เซลล์พืชตาย

- hemibiotroph โดยสปอร์ที่งอกสร้าง appressoria และเกิดการสะสม melanin จนกระทั่งเกิดการแทงผ่านเข้าไปทำลายเซลล์ epidermis และเกิดเป็น infection vesicles และ primary hyphae ขึ้นและจะดูดกิน matrix ที่อยู่โดยรอบ เป็น biotrophic stage ในเซลล์ epidermis และ mesophyll ถัดไปหลังจากที่สามารถเข้าทำลายพืชอาศัยได้ประมาณ 48 ชั่วโมง จึงจะสร้าง secondary necrotrophic hyphae ขึ้นและทำให้เซลล์พืชอาศัยตายจากการสร้าง enzyme ต่างๆ ในการเข้าทำลาย

- quiescent or latent infection เชื้อเข้าตามช่องเปิดตามธรรมชาติ เช่น เลนติเซล (lenticel) จากนั้นเชื้อสาเหตุจะสร้าง infection hyphae ออกมาจาก appressoria แล้ว hypha เจริญลงไปช่องว่างระหว่างเซลล์ลึกลงประมาณ 2-3 ชั้นของเซลล์ผิวผล จะแสดงอาการจนกระทั่งผลมะม่วงเริ่มสุก หรือหลังจากเชื้อเข้าทำลายช่อดอกแล้ว เชื้ออาจพักตัวอยู่ในผลดิบโดยไม่ขยายบริเวณทำลายหรือไม่ก่อให้เกิดแผล หรือจะเริ่มแสดงอาการเมื่อผลมะม่วงเริ่มสุกเพราะก๊าซเอทิลีนที่เกิดขึ้นขณะผลสุกมีผลในการชักนำให้เกิดการเข้าทำลายเซลล์พืช

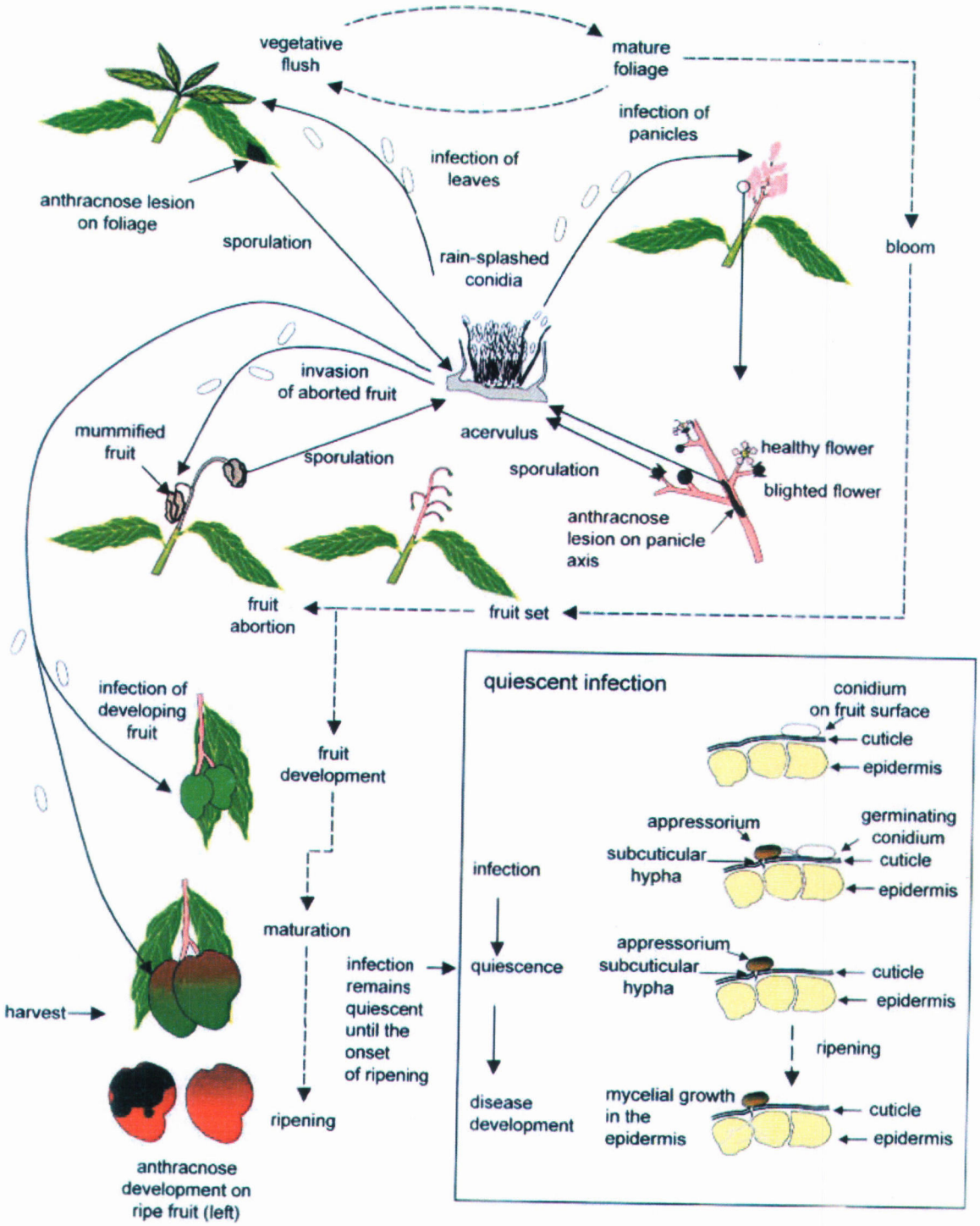

Figure 1 วงจรการเกิดโรคแอนแทรคโนสบนมะม่วง (ลูกศรเส้นทึบแทนวงจรโรค, ลูกศรเส้นปะแทนระยะการเจริญของมะม่วง) (ที่มา: Arauz, 2000)

2.3 ลักษณะอาการ (วิจิตร, 2529; สุชาติ, 2541; นิพนธ์, 2542)

ระยะกล้า

พบอาการของโรคทั้งที่ใบและลำต้นของต้นกล้า จะทำความเสียหายแก่การผลิตกิ่งทาบเพื่อการค้าอย่างมากอาการบนใบ เริ่มแรกจะเป็นจุดเล็ก ๆ บนใบอ่อน มองดูใสกว่าเนื้อใบรอบ ๆ จุดนี้จะขยายออกเป็นวงขนาดต่าง ๆ ขึ้นอยู่กับความชื้นและความแก่อ่อนของใบ โดยจะเห็นขอบแผลชัดเจนเป็นสีน้ำตาลเข้ม ในสภาพความชื้นสูง แผลที่เกิดบนใบอ่อนมาก ๆ จะมีขนาดใหญ่ ขยายออกได้รวดเร็ว และมีจำนวนแผลมากติดต่อกันทั้งผืนใบ ทำให้ใบแห้งทั้งใบหรือใบบิดเบี้ยว เมื่อแก่ขึ้นเพราะเนื้อที่ในบางส่วนถูกทำลายด้วยโรค ถ้าในสภาพที่อุณหภูมิความชื้นไม่เหมาะสม แผลบนใบจะมีลักษณะเป็นจุดขนาดเล็ก กระจัดกระจายทั่วไปบริเวณกลางแผล ซึ่งมีสีน้ำตาลอ่อนกว่าขอบแผล และมีลักษณะบางกว่าเนื้อใบ อาจจะฉีกขาดและหลุดออกเมื่อถูกน้ำ ทำให้แผลมีลักษณะเป็นรูคล้ายถูกยิงด้วยกระสุนปืน

ลำต้นอ่อน

ลักษณะแผลค่อนข้างดำเป็นรูปไข่ยาวไปตามความยาวของลำต้นอ่อน ถ้าอาการของโรครุนแรง แผลจะขยายอย่างรวดเร็ว จนกระทั่งรอบลำต้น ทำให้ต้นแห้งตาย แต่ถ้าต้นอ่อนเป็นโรคเมื่อเนื้อเยื่อเริ่มแก่แล้ว แผลที่อาจจะลุกลามไปได้ไม่มากนักจะเป็นจุดแผลมีลักษณะเป็นวงรีสีดำยุบตัวลงไปเล็กน้อย บริเวณกลางแผลจะเห็นเม็ดสีดำๆ หรือสีส้มปนบ้างเรียงเป็นวงอยู่ภายในแผล ถ้าโรคนี้เกิดกับยอดอ่อนก็จะทำให้ยอดแห้งเป็นสีน้ำตาลดำและอาจตายทั้งต้นได้เช่นเดียวกัน

ช่อดอก

ลักษณะอาการเป็นจุดสีน้ำตาลดำประปรายบนก้านช่อดอก และก้านดอก ซึ่งทำให้ดอกเหี่ยวและหลุดร่วง ถ้าไม่รุนแรงนักจะทำให้การติดผลน้อย แต่ถ้าเป็นมากๆ ก็จะไม่ได้ผลผลิตเลย ในบางครั้งจะพบอาการของโรคที่ก้านช่อดอกไหม้ดำ ซึ่งจะแห้งไปในที่สุด ผลอ่อนๆ อาจจะถูกเชื้อโรคทำลายทำให้เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลดำ และร่วงหล่น ผลที่มีขนาดโตขึ้นแต่ยังไม่แก่ก็เป็นโรคได้เช่นเดียวกัน หากสภาพแวดล้อมเหมาะสม กล่าวคือมีความชื้นสูงและอุณหภูมิพอเหมาะ (24-32 °C)

ผล

เป็นจุดแผลสีดำ รูปร่างกลม หรือรูขนาดตั้งแต่เล็กเท่าหัวเข็ม หมุด จนถึงขนาดใหญ่เส้นผ่าศูนย์กลาง 2 - 4 cm แล้วแต่ความรุนแรง บริเวณแผลจะพบรอยแตกและมีเม็ดเล็กๆ สีดำเรียงรายเป็นวงภายในแผล เมื่อมะม่วงเริ่มแก่ในระหว่างการบ่มหรือขนส่งจุดแผลเหล่านี้จะขยายใหญ่ขึ้นและลุกลามออกไป ทำให้ผลเน่าทั้งผลได้ บริเวณกลางแผลอาจจะพบลักษณะเมือกสีส้ม อาการจุดเน่าดำบนผลนี้พบทำความเสียหายกับมะม่วงเกือบทุกพันธุ์ เชื้อราโรคแอนแทรคโนส ยังสามารถติดอยู่กับผลโดยไม่แสดงอาการใดๆ แต่เมื่อ

สภาพแวดล้อมภายหลังเหมาะสม เช่น ผลสุก หรือมีความชื้นสูง ในระหว่างการเก็บรักษาหรือบรรจุหีบห่อเพื่อการขนส่ง ก็จะแสดงอาการได้ ซึ่งก็ทำความเสียหายเป็นอย่างมาก

ใบ ใบอ่อนหรือยอดไหม้ หากอาการรุนแรงจะทำให้ใบบิดเบี้ยวและยอดแห้ง อาการบนใบจะปรากฏชัดเห็นเป็นจุดแผลสีน้ำตาลเข้มเล็กๆ ลักษณะกลมหรือเหลี่ยม กระจายทั่วทั้งใบ ขนาดแผลไม่แน่นอน แผลแห้งตายกลายเป็นสีน้ำตาลดำและยุบตัวลง เมื่ออาการของโรคพัฒนาเต็มที่เนื้อเยื่อบริเวณตรงกลางจะขาดหลุดเป็นรูกลางแผล

2.4 การแพร่ระบาด

เชื้อราสามารถแพร่ระบาดโดยทางลมและฝนในสวนมะม่วง โดยเฉพาะในสภาพอากาศที่มีความชื้นสัมพัทธ์สูงประมาณ 90-100 % สลับกับอุณหภูมิสูง หรือความชื้นมากกว่า 95% ติดต่อกันเป็นเวลา 12 ชั่วโมง เชื้อราสาเหตุสามารถพัฒนาการเกิดโรคได้ดีและเชื้อสาเหตุสามารถเจริญได้ดีในช่วงอุณหภูมิประมาณ 25^{o}C (Prakash, 2004) โดยเฉพาะเขตร้อนชื้นและกึ่งร้อน แปลงที่แน่นทึบมีความชื้นสูงทำให้เกิดโรคได้ง่ายกับระยะแตกยอดอ่อน แทงช่อดอกและติดผลอ่อน สปอร์ของเชื้อราจากใบที่เป็นโรคจะไหลไปตามหยดน้ำลงสู่ขั้วผล หรือกระจายไปทั่วผล

2.5 การจัดการโรคแอนแทรคโนสของมะม่วง

การควบคุมและป้องกันโรคแอนแทรคโนสเพื่อการผลิตมะม่วงเชิงการค้าที่นับว่าได้ผลดี เกิดจากการฉีดพ่นสารเคมีประเภท benzimidazole fungicides เช่น benomyl, carbendazim, thiophanate-methyl และ thiabendazole ซึ่งสารกลุ่มนี้เป็นสารชนิดดูดซึม (systemic fungicide) ซึ่งเป็นวิธีการที่จะลดความเสียหายจากโรคนี้ได้อย่างรวดเร็วและทันเหตุการณ์ ซึ่งการใช้ต้องใช้ให้ถูกกับจังหวะการเข้าทำลายของเชื้อโรค ทั้งนี้เพื่อลดความสิ้นเปลือง และช่วยให้สารเคมีมีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น (สราญจิต และคณะ, 2540; Arauz, 2000; Prakash, 2004) จึงเป็นที่นิยมใช้ของเกษตรกรสำหรับการป้องกันกำจัดโรคนี้

นิพนธ์ (2542) แนะนำการป้องกันกำจัดโรคแอนแทรคโนส โดยจัดการระบายอากาศในแปลงเพาะกล้า ตัดแต่งกิ่งระยะต้นโตให้โปร่ง และทุกระยะการเจริญเติบโตที่มีฉีดพ่นป้องกันกำจัดเชื้อราด้วย benomyl หรือ carbendazim และควรผสมหรือสลับกับ mancozeb ฉีดพ่นทุกๆ 7-10 วัน เน้นการฉีดพ่นระยะการแทงช่อดอกระยะดอกบานและติดผลอ่อน เพื่อป้องกันการพักตัว (latent infection) เว้นระยะห่างเมื่อผลมะม่วงโต แต่ถ้าสภาพดินฟ้าอากาศเปลี่ยนแปลงบ่อยๆ ฝนตกสลับกับสภาพอากาศร้อน ก็มีความจำเป็นที่ต้องฉีกพ่น การป้องกันการพักตัวของเชื้อราซึ่งจะทำให้ผลมะม่วงเน่าระยะผลสุก ควรเพิ่มวิธีการจุ่มผลมะม่วงที่เก็บเกี่ยวในน้ำร้อน 50^{o}C ผสม benomyl 500 ppm หรือ prochloraz

200 ppm เป็นเวลา 5 นาที หรือการรมผลมะม่วงด้วยก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เข้มข้น 20 % โดยระบบปิดนาน 48 ชั่วโมง ช่วยลดโรคระยะหลังเก็บเกี่ยว

กรมวิชาการเกษตร (2551) แนะนำการควบคุมโรคแอนแทรคโนสของมะม่วงที่ผลิตเพื่อการส่งออก จะต้องกระทำอย่างสม่ำเสมอ โดยในช่วงที่มะม่วงผลิตใบอ่อน ช่วงการออกดอก และติดผล ซึ่งเป็นช่วงที่มะม่วงมีความอ่อนแอต่อการเข้าทำลายของเชื้อ การฉีดพ่นสารเคมีในแหล่งที่มีโรคแอนแทรคโนส ระบาดเป็นประจำ เพื่อลดความเสียหายจากการเกิดโรคที่ใบ อันจะมีผลต่อความอุดมสมบูรณ์ของใบ และจะมีผลต่อการออกดอกติดผลที่สมบูรณ์ต่อไป การตัดแต่งกิ่งเป็นโรค และกิ่งอ่อนที่เกิดตามโคนกิ่งใหญ่ ในทรงพุ่ม ซึ่งเป็นแหล่งสะสมเชื้อโรค แล้วเผาทิ้ง เป็นการลดปริมาณเชื้อโรคได้อีกวิธีหนึ่ง สารป้องกันกำจัดโรคพืชหลายชนิด เช่น benomyl, mancozeb, captan, copper oxychloride เป็นต้น สามารถใช้ป้องกันกำจัดโรคแอนแทรคโนสได้อย่างมีประสิทธิภาพ ซึ่งการเลือกใช้สารชนิดใดนั้นขึ้นอยู่กับความรุนแรงของโรคที่เกิดในแต่ละสภาพแวดล้อมที่แตกต่างกัน ก่อนที่มะม่วงจะเริ่มแทงช่อดอก ควรทำการฉีดพ่นสารเคมีป้องกันโรคพืชครั้งหนึ่ง เพื่อลดปริมาณแมลงและโรคที่จะรบกวนช่อดอกใหม่ที่เริ่มผลิ หลังจากนั้นฉีดพ่นเป็นระยะ ๆ ทุก 10 - 15 วัน จนมะม่วงติดผลอ่อน สารเคมีประเภทดูดซึม เช่น benomyl อาจจะใช้ได้ดีกว่าในการฉีดพ่นไปในช่วงฝนชุกหรือในช่วงผลใกล้เก็บเกี่ยว เพราะจะมีผลต่อคุณภาพของผลผลิตหลังเก็บเกี่ยวด้วย ช่วยลดความเสียหายจากการเกิดผลเน่าได้เป็นอย่างดี สำหรับในช่วงออกดอกติดผลมะม่วงนั้นควรใช้สารเคมีชนิดอื่นพ่นสลับกันบ้างตามความเหมาะสม เช่น ระยะดอกอาจจะใช้ mancozeb ระยะติดผลอ่อนใช้ captan หรือ copper fungicide ระยะผลโตใช้ benomyl เป็นต้น ผลมะม่วงที่เก็บเกี่ยวแล้ว ควรจุ่มในสารละลายไธอาเบนดาโซล (พรอนโต 40) ผสมน้ำที่ 50 °C นาน 5 - 10 นาที แล้วผึ่งให้แห้งเพื่อกำจัดเชื้อที่แฝงอยู่

3. บทบาทของสารกำจัดเชื้อราชนิดดูดซึมต่อเชื้อรา

บทบาทของสารกำจัดเชื้อราชนิดดูดซึมต่อเชื้อรา การใช้นั้นเป็นไปอย่างกว้างขวางและคาดคะเนไม่ได้บางครั้งทำให้เกิดปัญหาในการป้องกันกำจัดโรคพืชแทนที่จะกำจัดโรคให้ได้ผล เช่นสารกำจัดเชื้อราชนิดดูดซึมบางชนิดไปกระตุ้นให้เกิดการดื้อยา (resistance หรือ tolerance) ไม่เพียงแต่เท่านั้นยังพบว่ามีการดื้อยาร่วม (cross resistance) เกิดขึ้นอีกด้วย โดยเฉพาะสารเคมีที่มีฤทธิ์จำเพาะเจาะจงต่อส่วนประกอบเซลล์ (cell organel) และมีฤทธิ์มีท๊อกซิก โบอิตี้ (toxic moiety) อย่างเดียวกัน เช่นการดื้อต่อสารเอ็มบีซี (MBC) ก็ย่อมจะดื้อต่อสารไธโอฟาเนตเมทธิล (thiophanatemethyl) หรือสารเบนโนมิล (benomyl) ได้ด้วย ดังนั้นบทบาทของสารกำจัดราชนิดดูดซึมต่อเชื้อราขึ้นอยู่กับการทำงานของมันในลักษณะที่เข้าไปยับยั้งหรือรบกวนขบวนการต่างๆ ภายในเชื้อรา Kaars Sijpesteijin (1977; อ้างโดย

ธรรมศักดิ์, 2543) ได้สรุปว่าสารกำจัดราชนิดดูดซึมจะมีหน้าที่หรือทำอะไรกับเชื้อรา ดังต่อไปนี้

3.1 ยับยั้งขบวนการสร้างพลังงาน (inhibition of energy production)

อาจกล่าวได้ว่าเป็นขบวนการยับยั้งการสร้างเอทีพี (ATP) ซึ่งเกี่ยวข้องกับปฏิกิริยาในขบวนการต่างๆ ได้แก่ การหายใจ การไม่ทำปฏิกิริยาอ๊อกซิเดทีฟฟอสฟอไรเลชั่น (uncoupling of oxidative phosphorylation) ขบวนการผลิตงานนี้ส่วนมากอยู่ในไซโตพลาสซึม กับไมโตคอนเดรีย ดังนั้นสารป้องกันกำจัดเชื้อราที่เข้าไปในเซลล์ ก็มีผลรบกวนขบวนการเหล่านี้ แล้วจึงส่งผลกระทบกระเทือนต่อเชื้อรา

3.2 รบกวนการสังเคราะห์ทางชีววิทยา (interferance with biosynthesis)

ขั้นตอนนี้เป็นขั้นตอนของการสังเคราะห์ส่วนประกอบใหม่ๆ ของเซลล์ เพื่อรักษาการเจริญเติบโตและทำให้เซลล์ดำรงชีวิตอยู่ได้ตามปกติ การสังเคราะห์ทางชีววิทยาเหล่านี้ได้แก่ การสังเคราะห์กรดอะมิโน (amino acid) สารพิวรีน (purine) สารไพริมิดีน (pyrimidine) และวิตามิน (vitamin) ในไซโตพลาสซึม ส่วนการสร้างโปรตีนเกิดในไรโบโซมและนิวเคลียส การยับยั้งหรือรบกวนขบวนการสังเคราะห์ทางชีววิทยา บางทีมีผลเพียงแค่ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา fungistatic effect)

3.3 รบกวนโครงสร้างของเซลล์ (interferance with cell structure)

การรบกวนลักษณะนี้อาจจะเกี่ยวเนื่องกับการทำให้ความสามารถในการซึมผ่านเซลล์ (cell permeability) เสียไป ทำให้เซลล์สูญเสียไซโตพลาสซึมและสารเคมีที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโต อิทธิพลของขบวนการนี้ส่งผลทำให้เซลล์ของเชื้อราตาย (fungicidal effect)

โดยสรุปแล้วอาจกล่าวได้ว่า อิทธิพลต่อสารเคมีเหล่านี้ต่อเชื้อราอาจแบ่งเป็นผลกระทบขั้นต้น (primary effect) กับผลกระทบขั้นปลาย (secondary effect) เมื่อมีสารเคมีชนิดใหม่ๆ ถูกสังเคราะห์ออกมาหรือนำมาใช้ทดสอบในงานต่างๆ เมื่อมีการศึกษาเกี่ยวกับเชื้อราในห้องทดลอง การศึกษาอีกระดับหนึ่งก็คือการตรวจสอบการยับยั้งการหายใจ การยับยั้งเร่งสารเติบโต หรือยับยั้งการสังเคราะห์สารประกอบสำคัญอื่นๆ ภายในเซลล์เช่น กรดอะมิโน (amino acid) สารประกอบเอสเอช (-SH. compound) ซึ่งการศึกษาในระดับนี้ยุ่งยากขึ้นเมื่อรวมการศึกษาด้านการยับยั้งการสร้างสปอร์ การงอกและยืดยาวของเส้นใยบางครั้งก็ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาประกอบ พร้อมทั้งการเปลี่ยนแปลงภายในเซลล์ด้วย ที่กล่าวมาทั้งหมดอาจจะไม่ละเอียดในแง่ของงานทดลองแบบ bioassay ดังนั้นนักวิทยาศาสตร์บางคนจึงศึกษารายละเอียดถึงโครงสร้างของโมเลกุลระหว่างสารพิษกับส่วนประกอบเซลล์ที่จะถูกทำปฏิกิริยา (target system) ซึ่งงานนี้ค่อนข้างจะได้รับความสนใจ หลังจากพบว่าสารคาร์เบนดาซิม (carbendazim) เป็นตัวอย่างหนึ่งที่น่าสนใจ

4. ผลหรืออิทธิพลของสารกำจัดราชนิดดูดซึมต่อขบวนการต่าง ๆ ภายในเซลล์ของเชื้อรา มีดังนี้ (ธรรมศักดิ์, 2543)

1. รบกวนขบวนการหายใจ
2. รบกวนขบวนการสังเคราะห์โปรตีน
3. การขัดขวางการสังเคราะห์กรดนิวคลีอิกและการแบ่งเซลล์
4. การรบกวนขบวนการสังเคราะห์กรดนิวคลีอิกและการแบ่งเซลล์

สารประกอบเบนซิมิดาโซล (benzimidazole) และไธโอฟาเนต (thiophanate) ในกลุ่มนี้ประกอบด้วยสารเบนโนมิล คาร์เบนดาซิม ไธอเบนดาโซล ฟูเบอริดาโซล และไธโอฟาเนตเมทธิล เป็นต้น สารประกอบเบนซิมิดาโซลอยู่ในความสนใจของนักวิทยาศาสตร์หลังจากพบว่ามีบทบาทในการกำจัดเชื้อราชั้น Ascomycetes แต่สารกลุ่มนี้ไม่สามารถใช้ได้ผลกับโรคที่เกิดจากเชื้อราชั้นต่ำ (ชั้น Phycomycetes) และโรคราน้ำค้าง ได้ Clemon and Sisler (1969; อ้างโดย ธรรมศักดิ์, 2543) ได้ประสบความสำเร็จอย่างงดงามเมื่อพบว่าสารจะสลายตัวอย่างรวดเร็วไปเป็นเมทธิล เบนซิมิดาโซล-2-อิล-คาร์บาเมท (methyl benzimidazole-2-yl-carbamate) หรือคาร์เบนดาซิม หรือ MBC เมื่อละลายน้ำ ซึ่งท่านทั้งสองสรุปว่าสารเบนโนมิล ที่ใช้อยู่นั้นไม่ได้มีบทบาทอย่างแท้จริง แต่อาศัยการสลายไปเป็นคาร์เบนดาซิม ดังนั้นพิษของ MBC นั่นเองที่ควบคุมโรค นอกจากนี้ยังมีผู้สงสัยว่าไธอเบนดาโซลและฟูเบอริดาโซลมีบทบาทการกำจัดราเช่นเดียวกับสารเบนโนมิลหรือไม่ เพราะมีผู้ค้นพบว่าการดื้อยาในกลุ่มนี้เป็นไปในลักษณะเดียวกัน คือมีการดื้อยาร่วมกัน (cross resistance) จึงแสดงว่าสารทุกตัวในกลุ่มนี้ต่างก็ผ่านขบวนการทางด้านชีววิทยาอย่างน้อยก็เป็นคาร์เบนดาซิม ดังนั้นจึงสรุปว่าคาร์เบนดาซิมและ EBC หรือเอทธิลเบนซิมิดาโซล-2-อิล-คาร์บาเมท (methyl benzimidazole-2-ty-carbamate) ไม่สารใดก็สารหนึ่งหรือทั้งสองสารเป็นตัวกำหนดเป็นตัวการในการทำปฏิกิริยาด้านการป้องกันกำจัดเชื้อราของเบนซิมิดาโซลและไธโอฟาเนต (แต่ BEC มีพิษต่ำกว่า MBC เล็กน้อย)

นอกจากนี้ยังพบว่าสารประกอบเบนซิมิดาโซลและไธโอฟาเนตที่ pH 7 จะสลายตัวให้ MBC ในขณะเดียวกัน host metabolite ก็สามารถเปลี่ยนเบนซิมิดาโซลหรือไธโอฟาเนตไปเป็น MBC หรือ EBC ได้เช่นกัน ส่วน metabolite จากพืชที่ผ่านหม้อนึ่งความดัน (autoclave) ไม่สามารถทำปฏิกิริยาเหล่านี้ เพราะมีรายงานยืนยันว่าพิษของเบนซิมิดาโซลจะมากขึ้นเมื่อไปสัมผัสกับเนื้อเยื่อพืช แสดงว่า metabolite จากพืชที่มีชีวิตไปส่งเสริมการผลิต MBC นั่นเอง (Bollen and Scholten,1971; อ้างโดย ธรรมศักดิ์, 2543)

5. บทบาทการทำลายของเชื้อราของสารเบนซิมิดาโซลและไธโอฟาเนต

สารคาร์เบนดาซิม (carbendazim) สารนี้มีผู้พบว่าที่ความเข้มข้น 1 ppm ไม่มีผลต่อการงอกของเชื้อ *Neurospora crassa* แต่หยุดการเจริญของ germ tube ไว้ และยังพบ

อีกว่าน้ำหนักแห้งของสปอร์จะเพิ่มขึ้นในช่วง 6 ชั่วโมง ระหว่างกำลังงอกเท่านั้น หลังจากนั้นจะลดลง ทำให้ได้เซลล์ที่ผิดปกติ ที่เป็นดังนี้เพราะว่าคาร์เบนดาซิมไปมีอิทธิพลต่อการสังเคราะห์ DNA แต่โปรตีนและ RNA ไม่ถูกกระทบกระเทือนซึ่งขบวนการนี้พบในยีสต์และราเขม่าดำ ซึ่งต่อมาได้พิสูจน์ให้เห็นว่าพิษของคาร์เบนดาซิมนั้น เกิดกับการแบ่งเซลล์แบบ mitosis เพราะทำให้เกิดเซลล์ใหม่ที่มี 1 นิวเคลียสและมีขนาดใหญ่แต่ไม่มีการแบ่งเซลล์ (ตาจากการพิสูจน์ต่อมาสันนิษฐานว่าพิษคาร์เบนดาซิมนั้นคล้ายกับสารโคลซิซีน (colchicines) คือไปยับยั้งหน่วยย่อยไมโตคอนเดรียที่จะสร้างเป็น spindle fiber ดังนั้นทำให้ chromatid ไม่สามารถแยกจากกันไปเป็นนิวเคลียสใหม่ได้ ด้วยเหตุนี้จึงมีข้อมูลพอที่จะสันนิษฐานได้ว่าการดื้อยานั้นเกิดขึ้นได้ง่าย (ธรรมศักดิ์, 2543)

การใช้สารเคมีเพื่อป้องกันกำจัดโรคพืช มักจะประสบปัญหาในด้านการดื้อต่อยาหรือความต้านทานต่อสารนั้น (resistance to fungicide) หรือเชื้อจะมีการปรับตัวเองเกิดเป็นเชื้อกลายพันธุ์หรือ mutant ใหม่ ซึ่งลักษณะเหล่านี้สามารถถ่ายทอดไปยังลูกหลานได้ เชื้อกลายพันธุ์จะเกิดขึ้นหลังจากมีการใช้สารเคมีชนิดนั้นติดต่อกันเป็นเวลานานและต่อเนื่อง ในครั้งแรกมีการพบลักษณะเชื้อที่กลายพันธุ์เกิดในห้องปฏิบัติการ จึงเริ่มมีผู้ศึกษาถึงลักษณะการดื้อยาของเชื้อในเวลาต่อมา Sevag (1955; อ้างโดย ธรรมศักดิ์, 2543) ได้ให้คำนิยามว่า "การทนทานต่อการดื้อยาและการดื้อยา" (tolerance และ resistance to a drug) ทั้ง 2 คำนี้ถ้าใช้กล่าวในกรณีว่าเป็นพันธุ์ต้านทานของพืชที่มีต่อเชื้อ จะพบว่า 2 คำนี้มีความหมายต่างกันในแง่ระดับความรุนแรงของโรค คือ จะใช้คำว่าพืชมีการทนทาน (tolerance) เมื่อหมายถึงพืชที่เป็นโรคแสดงอาการ แต่ไม่มีความเสียหายในระดับเศรษฐกิจ ส่วน ความต้านทาน (resistance) หมายถึงพันธุ์พืชนั้นมีความต้านทานต่อโรคนั้นๆ เป็นกี่เปอร์เซ็นต์ โดยทั่วไปการทนทานต่อสารและการดื้อยาต่อสารกำจัดเชื้อราใช้เป็นความหมายเดียวกัน คือเป็นความต้านทานของเชื้อที่มีต่อสารเคมี ซึ่งลักษณะเหล่านี้ต้องคงที่ (stable) และสามารถถ่ายทอดไปยังลูกหลานได้ และลักษณะนี้ต้องเกิดในประชากรที่ได้รับสารต่อเนื่องเป็นระยะเวลา 4 – 10 ปี "คำว่าเชื้อกลายพันธุ์ หรือ mutant" ในที่นี้หมายถึง สายพันธุ์ (strain) ของเชื้อที่ดื้อต่อสารเคมีป้องกันกำจัดโรคพืช ส่วนคำว่า การดื้อยาร่วม (cross resistance) หมายถึงกรณีที่เชื้อสามารถดื้อต่อสารพิษในกลุ่มเดียวกันได้มากกว่า 1 ชนิดขึ้นไปคือ เช่นเมื่อใช้สารกำจัดเชื้อราชนิดที่ 1 พบว่าเกิดเชื้อกลายพันธุ์ (mutant) ดื้อต่อสารกำจัดราชนิดนั้นขึ้นมา พอใช้สารกำจัดราชนิดที่ 2 ที่อยู่ในกลุ่มเดียวกัน ก็เกิดเชื้อกลายพันธุ์ดื้อยาขึ้นมาอีก ก็ถือว่าเชื้อนั้นมี การดื้อยาร่วม (cross resistance) ข้อจำกัดของการเกิดการดื้อยาร่วม (cross resistance) คือจะต้องมีปัจจัยทางพันธุกรรม (genetic factor) เดียวกันและสารพิษ (toxicant) หรือสารกำจัดราเหล่านั้นอยู่ในกลุ่มเดียวกัน มีความสัมพันธ์กัน และอาจมีกลไกในการทำงาน (mechanism

of action) เหมือนกัน จึงเกิดการดื้อยาร่วมขึ้นได้ Bryson (1952; อ้างโดย ธรรมศักดิ์, 2543) ให้คำจำกัดความของ "คอลแลทเทอรัลเซนซิทีฟวิตี้" (collateral sensitivity) ว่ากรณีที่เชื้อกลายพันธุ์ (mutant) หนึ่งอาจเพิ่มการดื้อต่อสารพิษหนึ่งและขณะเดียวกันก็จะอ่อนแอ (sensitive) ต่ออีกสารหนึ่ง (การดื้อต่อสารหนึ่งแต่ไม่ดื้อต่อสารอื่นในกลุ่มเดียวกัน) สรุปก็คือว่า เชื้อกลายพันธุ์มักจะเฉพาะเจาะจงต่อสารพิษใดสารพิษหนึ่งเท่านั้น หรือถ้าจะดื้อต่อสารพิษหลายชนิดก็ได้ ถ้าสารพิษหลายชนิดมีความสัมพันธ์กันและมีกลไกการทำงานที่คล้ายกัน (ธรรมศักดิ์, 2543)

6. พันธุศาสตร์ของการดื้อสารป้องกันกำจัดเชื้อรา (Genetics of fungicide resistance)

พันธุศาสตร์ของการดื้อสารป้องกันกำจัดเชื้อรานั้นขึ้นอยู่กับการเปลี่ยนแปลง ณ ส่วนต่างๆ ดังนี้

1. ควบคุมโดยส่วนนอกโครโมโซม (extrachromosomal control)
2. ควบคุมโดยโครโมโซม (chromosomal control)
3. การทำปฏิกิริยาระหว่างยีน (gene interaction)
4. การกระตุ้นด้วยพิษของสารกำจัดรา (the mutagenicity of fungicides and the possibility of fungicide – induce resistance)

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

ส่วนมากพันธุกรรมของเชื้อที่ดื้อต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อรา (fungicide resistance) ถูกควบคุมโดยส่วนนอกโครโมโซม เช่น พลาสมิด เป็นต้น และส่วนควบคุมโดยโครโมโซม มียีนทำหน้าที่อยู่ สารเคมีป้องกันและกำจัดโรคพืชบางชนิดไม่อาจฆ่าเชื้อราได้ แต่สารเหล่านี้ทำงานโดยยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราในลักษณะใดลักษณะหนึ่งเพียงชั่วคราว ต่อเมื่อฤทธิ์ของสารนั้นจางหายไปหรือลดลงเชื้อราก็จะเจริญเติบโตได้ตามปกติ (ธรรมศักดิ์, 2543)

วันที่ 12 ม.ค. 2555
เลขทะเบียน 245561

7. การต้านทานสารป้องกันกำจัดเชื้อราของเชื้อราสาเหตุโรคพืช

จากการใช้สารเคมีประเภท benzimidazole fungicides ติดต่อกันมาตั้งแต่ในอดีตจนถึงปัจจุบัน ส่งผลเสีย คือ ประสิทธิภาพในการป้องกันโรคของสารเคมีชนิดนี้จะลดลงทุกๆ ปี เนื่องจากเชื้อราจะเกิดความต้านทานต่อสารเคมีประเภทนี้ (Farungsang and Farungsang, 1992) ซึ่ง Damicone and Smith (2009) และ Brent and Hollomon (1998) รายงานว่าสารป้องกันกำจัดเชื้อราประเภทนี้ ได้ถูกจัดระดับความเสี่ยงต่อความสามารถที่จะสร้างความต้านทานของเชื้อราอยู่ในระดับสูง เนื่องจากการใช้สารเคมีประเภทนี้ เป็นสารแบบดูดซึม (systemic fungicide) สารจะเข้าไปกับระบบไหลเวียนของพืชเคลื่อนย้ายไปยังส่วนต่างๆ ภายในพืช มีพิษเจาะจงเฉพาะเชื้อรา มีกลไกทางชีวเคมีที่จำเพาะต่อการรบกวน

การแบ่งเซลล์ (interference with cell deviation) โดยสารเคมีกลุ่มนี้จะรวมตัวกับโปรตีนของ tubulin ในโครงสร้างของ microtubules ซึ่งเป็นอวัยวะคล้ายเส้นด้ายสำหรับดึง chromosome ให้แยกคู่ในระยะ metaphase จึงมีผลต่อการแบ่งตัวของเซลล์ โดยสารเคมีกลุ่มนี้เข้าไปขัดขวางการทำงานของ microtubules ทำให้เกิดความผิดปกติในระยะ metaphase มีผลต่อพันธุกรรมในเซลล์ใหม่ที่เกิดขึ้น ประกอบกับการมีฤทธิ์จำเพาะแบบนี้ จึงเป็นลักษณะที่เชื้ออาจเกิดการกลายพันธุ์ได้ง่ายในระดับดีเอ็นเอ (DNA mutation) เมื่อเชื้อที่ต้านทานอยู่รอดได้ ลักษณะการต้านทานดังกล่าวจึงเกิดการพัฒนา และสามารถถ่ายทอดสู่รุ่นลูกหลานได้ เกิดการเพิ่มจำนวนประชากรของเชื้อราที่ต้านทานสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อราเกิดขึ้นเรื่อยๆ (Figure 2) และแพร่ระบาดอยู่ภายในแปลงปลูกของเกษตรกร (ธรรมศักดิ์, 2543; Davidse, 1986; Deising *et al.* 2008) ทำให้เกษตรกรประสบปัญหาไม่สามารถควบคุมการเกิดและแพร่ระบาดของโรคนี้ได้ รวมทั้งส่งผลให้เกษตรกรต้องสิ้นเปลืองเงินทุนและเวลาในการป้องกันกำจัดโรค เพราะฉะนั้นประโยชน์ที่จะได้รับจากการศึกษาในครั้งนี้ เพื่อชี้ให้เห็นถึงอันตรายที่อาจกำลังเกิดขึ้น หรือจะเกิดขึ้นในอนาคตได้อย่างชัดเจนว่าสารเคมีประเภทที่ใช้กันอยู่ในปัจจุบัน ป้องกันกำจัดโรคไม่ได้ผลดีเท่ากับในอดีตที่ผ่านมา

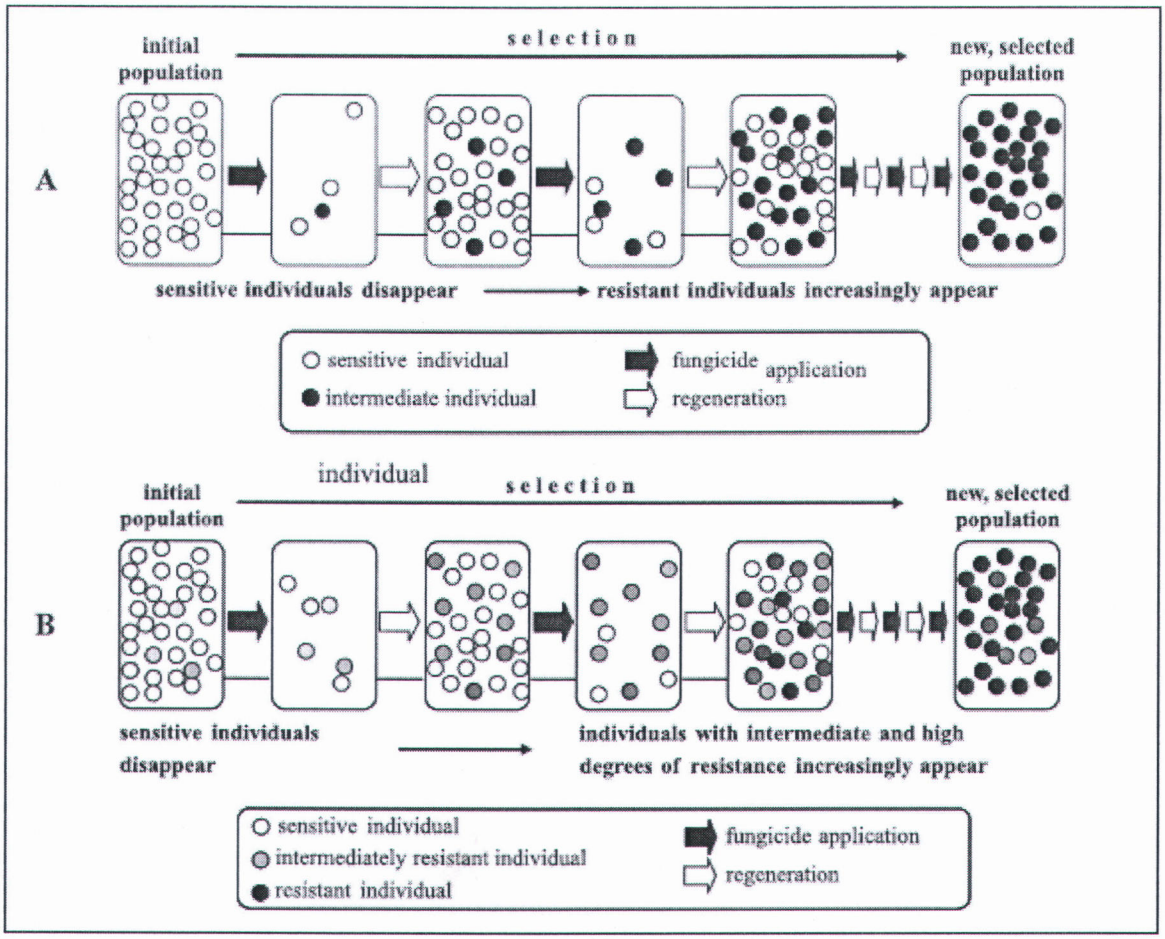

Figure 2 แบบจำลองการพัฒนาความต้านทานของประชากรเชื้อราต่อสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อรา; (A) แบบจำลองความต้านทานเชิงคุณภาพ (B) แบบจำลองความต้านทานเชิงปริมาณ (ที่มา: Deising *et al.*, 2008)

8. งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการศึกษาลักษณะการต้านทานต่อสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อราชนิดดูดซึมประเภท benzimidazole

มีรายงานเกี่ยวกับความทนทานของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. ต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อราเบนโนมิล ในประเทศต่างๆ ทั่วโลก เช่น สหรัฐอเมริกา, ญี่ปุ่น, เคนยา และอินเดีย (Ramos and Kamidi, 1982) ในประเทศไทยมีการใช้สารป้องกันกำจัดเชื้อราในกลุ่มเบนซิมิดาโซล (benzimidazole) อย่างแพร่หลายมาตั้งแต่ปี พ.ศ. 2510 โดยเฉพาะอย่างยิ่งในปัจจุบันมีการใช้สารป้องกันกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิมอย่างกว้างขวาง โดยมีปริมาณการนำเข้าในปี พ.ศ. 2546 สูงถึง 1,494,349 กิโลกรัม หรือมีมูลค่าการนำเข้า 149,304,745

บาท (กรมวิชาการเกษตร, 2549) ซึ่งมีผลให้เชื้อรา *Colletotrichum* spp. มีวิวัฒนาการ เพื่อทนทานต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อรา ในกลุ่มข้างต้นนี้ (Farungsang and Farungsang,1992)

สำหรับประเทศไทยได้มีการศึกษาเกี่ยวกับการต้านทานต่อสารเคมีกลุ่มนี้ ในระดับสัณฐานวิทยา เช่น กรองจิต และวิชัย (2531) ศึกษาลักษณะของเชื้อรา *C. capsici* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของพริก และเชื้อรา *C. gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของมะละกอ ที่ถูกชักนำให้ต้านทานต่อสารเคมีประเภทดูดซึม benzimidazole เมื่อถ่ายเชื้อลงบนอาหาร PDA ที่ไม่ผสมสารเคมีกลุ่มดังกล่าว พบว่าเชื้อราดังกล่าวไม่สูญเสียความต้านทานต่อสารเคมีดังกล่าว และพบว่าเชื้อราที่มีความต้านทาน มีโคโลนีและเส้นใยผิดปกติ คือ โคโลนีมีสีน้ำตาลเข้มถึงดำ ขอบโคโลนีไม่เรียบ ผิวหน้าขรุขระ เส้นใยมีลักษณะโป่งกลมเหี่ยวย่น เรียงต่อกันเป็นสายและอัดตัวกันแน่น และ Farungsang *et al.* (1994) ได้ทำการศึกษาการต้านทานต่อเบนโนมิลของ *Colletotrichum* spp. ที่แยกเชื้อราสาเหตุจากผลมะม่วงและเงาะในประเทศไทย พบว่าประชากรของเชื้อราดังกล่าวมีความต้านทานอยู่ในระดับสูง

Hoeschst and Dupont (1973) รายงานว่า คาร์เบนดาซิมเป็นสารกำจัดเชื้อราชนิดดูดซึมในกลุ่มเบนซิมิดาโซล มีบทบาทสำคัญในการควบคุมโรคพืช ใช้ในการควบคุมโรคที่เกิดกับธัญพืช ผลไม้ พืชผักและไม้ดอกไม้ประดับ นอกจากนี้ยังใช้ในการควบคุมโรคหลังการเก็บเกี่ยว สารคาร์เบนดาซิมจะทำงานโดยไปยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา โดยจะเข้าไปรบกวนการสร้าง spindle fiber ที่กระบวนการแบ่งเซลล์แบบ mitosis การใช้สารคาร์เบนดาซิมเป็นประจำนั้น พบว่าจะทำให้เกิดการดื้อยา (resistance) ของเชื้อราสาเหตุโรคพืช สอดคล้องกับ Davidse and Flach (1974) รายงานว่า สารป้องกันกำจัดเชื้อราในกลุ่ม benzimidazole มีอิทธิพลต่อการสร้างทูเบอลิน (tubulin) ภายในนิวเคลียสของเชื้อรา ซึ่งเมื่อเกิดการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรม ในตำแหน่งของยีน β-tubulin จะมีผลให้ลำดับเบสของกรดอะมิโนเปลี่ยนแปลงไป เชื้อจึงเกิดการทนทานต่อสารกำจัดเชื้อรา

Sariah (1989) ได้ทดลองแยกเชื้อรา *Colletotrichum capsici* จำนวน 340 ไอโซเลท จากตัวอย่างพริกที่เป็นโรคแอนแทรคโนส มาเลี้ยงบนอาหาร potato dextrose agar ที่ผสมสารป้องกันกำจัดเชื้อราเบนโนมิล ความเข้มข้น 0, 2.5, 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500 และ 1000 µg/ml พบว่า เชื้อรา *Colletotrichum capsici* ที่แยกได้จำนวน 73 ไอโซเลท สามารถเจริญเติบโตได้บนอาหาร PDA ที่ผสมสารป้องกันกำจัดเชื้อราเบนโนมิล ความเข้มข้น 1000 µg/ml และเมื่อนำเชื้อราที่ทนทานต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อราเบนโนมิล ไปเลี้ยงบนอาหาร PDA ที่ผสมสารป้องกันกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิม ที่ความเข้มข้น 1.2, 5, 10, 25, 50 และ 100 µg/ml พบว่าเชื้อราดังกล่าวสามารถทนทานต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิมได้เช่นเดียวกัน ซึ่งผลของความทนทานดังกล่าวคาดว่าเกิดจากการ

กลายพันธุ์ (mutation) ของเชื้อรา โดยเกิดจากการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมในตำแหน่งของยีน β-tubulin

Koenraadt *et al.* (1992) และ Yarden and Katan (1993) ทำการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน β-tubulin เชื้อราที่ทนทานต่อสารเบนโนมิล พบว่าเกิดการเปลี่ยนแปลงที่ single nucleotide ในเบสลำดับที่ 198 และ 200 ทำให้ทราบว่าการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสของกรดอะมิโนใน 2 ตำแหน่งนี้ มีผลทำให้เชื้อราทนทานต่อสารเบโนมิล และมีลักษณะที่แสดงออกแตกต่างกัน เช่นในเชื้อรา *Venturia inaequalis* เกิดการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโน glutamic acid เป็น lysine, glycine หรือ alanine ในลำดับเบสตำแหน่งที่ 198 ซึ่งมีผลทำให้ระดับการทนทานต่อสารเบโนมิลอยู่ในระดับสูง (highly resistant) ส่วนการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสของ phenylalanine เป็น tyrosine ตรงตำแหน่ง codon ที่ 200 มีผลทำให้เชื้อดังกล่าวทนทานต่อสารเบโนมิลในระดับปานกลาง (moderately resistant)

Sanders *et al.* (2000) สำรวจความต้านทานต่อสารเคมีกำจัดเชื้อราของ *C. gloeosporioides* จากมะม่วงและอะโวกาโด ในพื้นที่ต่างๆ ในประเทศแอฟริกาใต้ พบประชากรของเชื้อราดังกล่าวสร้างความต้านทานต่อสารเคมีในกลุ่มนี้

Timmer (2003) กล่าวว่า การควบคุมโรคแอนแทรคโนสหลังการเก็บเกี่ยวของส้มยังไม่มีวิธีการควบคุมที่แน่นอน แม้ว่าเชื้อราหลายชนิดจะมีการพัฒนาเพื่อทนทานต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อราเบนโนมิล แต่ก็ยังมีการใช้สารดังกล่าวในการควบคุมโรคอย่างแพร่หลาย ซึ่งในปัจจุบันได้แนะนำให้ใช้สารป้องกันกำจัดเชื้อราเบนโนมิล ร่วมกับสารกำจัดเชื้อราพวกสัมผัสตาย (contact fungicide) หรือชนิดไม่ดูดซึม (non-systemic fungicide) เช่น ferbam, folpet และ mancozep เป็นต้น เพื่อหลีกเลี่ยงหรือชะลอการดื้อยาของเชื้อรา

Yuan and Zhou (2003) รายงานว่าเชื้อรา *Gibberella zeae* ที่เจริญบนอาหาร PSA ที่ความเข้มข้นของสารคาร์เบนดาซิม (MBC) ในความเข้มข้นต่างๆ สามารถแบ่งการเจริญของเชื้อราได้ 3 ระดับ โดยกำหนดให้ (S: sensitive) คือไอโซเลทที่อ่อนแอต่อสารเคมี ซึ่งเชื้อราสามารถเจริญได้ที่ 0.5 μg/ml แต่ไม่สามารถเจริญได้ที่ 1.4 μg/ml สำหรับไอโซเลทที่ต้านทานได้ปานกลาง (MR: moderate resistant) คือเชื้อราสามารถเจริญได้ที่ 1.4 μg/ml และเจริญได้บ้างที่ 50 μg/ml แต่ไม่สามารถเจริญได้ที่ 100 μg/ml และ (HR: high resistant) คือ ไอโซเลทที่ต้านทานได้สูง ซึ่งเชื้อราสามารถเจริญได้ที่ 50 μg/ml และสามารถเจริญได้ที่ 100 μg/ml ดังนั้นสามารถสรุปได้ว่าที่ 2 ระดับ ของการต้านทานต่อสารคาร์เบนดาซิม (MBC) ใน *Gibberella zeae* และได้วิเคราะห์โดยพบการกลายพันธุ์ที่ 2 locus หรือ 1 locus ที่ความแตกต่างของ allelic และการต้านทานนี้ไม่ได้มีผลมาจากการ modifying gene หรือ cytoplasmic components

Sholberg *et al.* (2004) ใช้สารป้องกันกำจัดเชื้อราในกลุ่มเบนซิมิดาโซล (benzimidazole) และไดฟีนิลเอมีน (diphenylamine) ในการควบคุมโรคราสีน้ำเงิน ซึ่งเกิดจากเชื้อรา *Penicillium* sp. ในแอปเปิ้ล โดยนำเชื้อราที่แยกได้จากผลที่เป็นโรคหลังเก็บเกี่ยว มาเลี้ยงบนอาหาร PDA ที่ผสมสารป้องกันกำจัดเชื้อราในกลุ่มเบนซิมิดาโซล คือ เบนโนมิลและไทเบนดาโซล และสารป้องกันกำจัดเชื้อราไดฟีนิลเอมีนที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ พบว่าตัวอย่างเชื้อรา *Penicillium* sp. ทั้งหมด 150 ไอโซเลท มีเชื้อดังกล่าวจำนวน 25 ไอโซเลท ที่สามารถทนทานต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อราทั้ง 2 กลุ่มดังกล่าวได้ และเมื่อนำมาวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของการเรียงตัวของเบสในกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 198 พบว่าลำดับเบสของเชื้อรา *Penicillium expasum* จากเดิมที่มีลำดับเบส GAG เมื่อถูกแทนที่ด้วย GCG หรือ GTG ในตำแหน่งกรดอะมิโนที่ 198 มีผลให้เชื้อราดังกล่าวสามารถทนทานต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อราเบนโนมิลและไทเบนดาโซล ได้ในระดับสูง (highly resistant) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Yarden and Katan (1993) ที่ทำการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน β-tubulin ของเชื้อราที่ทนทานต่อสารเบนโนมิล พบว่าเกิดการเปลี่ยนแปลงที่ single nucleotide ในเบสลำดับที่ 198 และ 200 ทำให้ทราบว่าการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสของกรดอะมิโนใน 2 ตำแหน่งนี้ มีผลทำให้เชื้อราทนทานต่อสารเบนโนมิล และมีลักษณะที่แสดงออกแตกต่างกัน เช่นในเชื้อรา *Venturia inaequalis* เกิดการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโน glutamic acid เป็น lysine, glycine หรือ alanine ในลำดับเบสตำแหน่งที่ 198 ซึ่งมีผลทำให้ระดับการทนทานต่อสารเบนโนมิลอยู่ในระดับสูง (highly resistant) ส่วนการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสของ phenylalanine เป็น tyrosine ตรงตำแหน่งที่ 200 มีผลทำให้เชื้อดังกล่าวทนทานต่อสารเบนโนมิลในระดับปานกลาง (moderately resistant) (Koenraadt *et al.*, 1992)

Peres *et al.* (2004) ได้เก็บตัวอย่างเชื้อรา *Colletotrichum* spp. สาเหตุโรค postbloom fruit drop (PFD) โดยเก็บตัวอย่างส้ม จากสวนส้มของเกษตรกรที่ใช้สารกำจัดเชื้อราเบโนมิลในการควบคุมโรคในส้มในประเทศบราซิล และ ฟลอริด้า จากนั้นนำมาแยกเชื้อราสาเหตุ พบเชื้อรา *C. acutatum* จำนวน 20 ไอโซเลท จากสวนส้ม 17 แห่ง และ *C. gloeosporioides* จำนวน 20 ไอโซเลท จากสวนส้ม 7 แห่ง จากนั้นนำเชื้อราที่แยกได้มาทดสอบความต้านทานต่อสารกำจัดเชื้อราเบนโนมิล โดยนำเชื้อราที่แยกได้มาเลี้ยงบนอาหาร PDA ที่ผสมสารกำจัดเชื้อราเบโนมิล ที่ระดับความเข้มข้น 0, 0.1, 1, 10, 100 และ 1,000 µg/ml พบเชื้อรา *C. gloeosporioides* จำนวน 3 ไอโซเลท อ่อนแอต่อสารกำจัดเชื้อราเบนโนมิล โดยสามารถเจริญได้ $<$ 1 µg/ml ในขณะที่เชื้อราที่ต้านทานต่อสารกำจัดเชื้อราเบนโนมิลจะสามารถเจริญได้ $\geq$ 10 µg/ml ส่วนเชื้อรา *C. acutatum* สามารถเจริญบนอาหารที่ผสมสารกำจัดเชื้อราเบนโนมิลได้ที่ $<$ 0.1 µg/ml และ $<$ 1 µg/ml เมื่อนำเชื้อราทั้งสองมาวิเคราะห์หาระดับความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมในบางส่วนของยีน beta-tubulin

พบเชื้อรา *C. gloeosporioides* จำนวน 3 ไอโซเลท ที่ต้านทานต่อสารกำจัดเชื้อราเบนโนมิล โดยมีการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนที่ codon 198 โดยเปลี่ยนจาก GAG (glutamic acid) เป็น GCG (alanine) แต่ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนที่ codon 198 และ 200 ในเชื้อรา *C. acutatum* นอกจากนี้ยังพบเชื้อรา *C. gloeosporioides* บางไอโซเลท ที่ต้านทานต่อสารกำจัดเชื้อราเบโนมิล แต่ไม่มีการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนที่ codon 198 และ 200

Canas-Gutierrez *et al.* (2006) ได้ศึกษาเชื้อรา *Mycospohaerella fijiensis* สาเหตุโรควิกาโทกาสีดำ (black sigatoka) ในกล้วย โดยเก็บตัวอย่างใบกล้วยที่แสดงอาการของโรค จากนั้นนำมาแยกเชื้อในห้องปฏิบัติการ พบเชื้อราสาเหตุจำนวน 44 ไอโซเลท และเมื่อนำเชื้อราที่แยกได้มาทดสอบความต้านทานต่อสารกำจัดเชื้อราในกลุ่มเบนซิมิดาโซล โดยนำมาเลี้ยงบนอาหาร PDA ที่ผสมสารกำจัดเชื้อราเบโนมิล ที่ระดับความเข้มข้น 0, 1, 5, 10 และ 50 µg/ml พบเชื้อราที่ต้านทานต่อสารกำจัดเชื้อราเบโนมิล (resistant) จำนวน 5 ไอโซเลท ($\geq$ 50 µg/ml) ต้านทานระดับปานกลาง (moderately resistant) จำนวน 3 ไอโซเลท ($\leq$ 10 µg/ml) และอ่อนแอต่อสารกำจัดเชื้อราเบนโนมิล (sensitive) จำนวน 36 ไอโซเลท (< 1 µg/ml) และเมื่อนำเชื้อราที่ต้านทาน และต้านทานระดับปานกลางต่อสารกำจัดเชื้อราเบนโนมิล จำนวน 4 ไอโซเลท มาวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมในบางส่วนของยีน beta-tubulin พบเชื้อรา *M. fijiensis* ทั้ง 4 ไอโซเลท มีการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนที่ codon 198 โดยเปลี่ยนจาก GAG (glutamic acid) เป็น GCG (alanine) แต่ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนที่ codon 200

Kumar *et al.* (2007) ประเมินความต้านทานของเชื้อรา *C. gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของมะม่วงในเขตพื้นที่ผลิตเพื่อการส่งออกของประเทศอินเดีย พบเชื้อราชนิดนี้ต้านทานต่อสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อราหลายชนิด เช่นกัน

นอกจากนี้ยังพบว่าในเวลาต่อมา ประเทศไทยได้เริ่มศึกษาการต้านทานของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. ต่อสารเคมีกลุ่มนี้ ในระดับโมเลกุลเพื่อสร้างความถูกต้องแม่นยำและรวดเร็วในการตรวจสอบการต้านทานของเชื้อราดังกล่าว เช่น ลัดดาวัลย์ (2550) ได้แยกเชื้อรา *Colletotrichum* spp. สาเหตุโรคแอนแทรคโนสในกุหลาบ จำนวน 93 ไอโซเลท จากนั้นนำมาทดสอบบนอาหาร PDA ที่ระดับความเข้มข้น 1, 10, 100 และ 500 µg/ml พบเชื้อราที่ต้านทานต่อสารกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิมจำนวน 3 ไอโซเลท และเมื่อวิเคราะห์ลำดับพันธุกรรมของเชื้อราในตำแหน่งบางส่วนของยีน beta-tubulin โดยใช้ไพรเมอร์ CTBF และ CTBR พบการเปลี่ยนแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน beta-tubulin (*TUB2*) ที่ตำแหน่ง 1,286 เปลี่ยนจาก adenine (A) เป็น cytosine (C) เมื่อเปรียบเทียบกับไอโซเลทที่ไม่ต้านทาน ซึ่งเป็นผลทำให้การกลายพันธุ์ปรากฏที่ตำแหน่งของกรดอะมิโนที่ codon 198 คือ glutamic acid (GAG) ถูกแทนที่ด้วย alanine (GCG) นอกจากนี้ยังพบว่านิวคลีโอไทด์

ที่ตำแหน่ง 1,278 ของไอโซเลท SC-020 และ SC-021 มีการเปลี่ยนจาก cytosine (C) เป็น thymine (T) ซึ่งการเปลี่ยนแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่งนี้ไม่มีผลต่อการแปลรหัสไปเป็นกรดอะมิโนตัวอื่น เช่นเดียวกับ สุธาสินี (2550); สุธาสินี และสรัญยา (2550) นำเชื้อรา *Colletotrichum* spp. สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของมะม่วง มะละกอ ฝรั่ง แอปเปิ้ล และส้ม ทดสอบความต้านทานต่อสารกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิม โดยเลี้ยงบนอาหาร PDA ที่ผสมสารป้องกันกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิมที่ระดับความเข้มข้น 0.1, 1, 10, 100, 500 และ 1,000 µg/ml พบเชื้อราที่ต้านทานต่อสารกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิม จำนวน 70 ไอโซเลท ($\geq$ 500 µg/ml) และเมื่อวิเคราะห์ลำดับพันธุกรรมของเชื้อราในตำแหน่งบางส่วนของยีน beta-tubulin พบเชื้อราที่ต้านทานต่อสารกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิมมีการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนที่ codon 198 โดยเปลี่ยนจาก GAG (glutamic acid) เป็น GCG (alanine) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของนักวิจัยต่างประเทศอีกหลายท่าน เช่น Peres *et al.* (2004) ที่ได้ศึกษาความต้านทานต่อสารเบนโนมิล ของเชื้อรา *Colletotrichum acutatum* และ *C. gloeosporioides* จากส้ม พบว่าเชื้อรา *C. gloeosporioides* มีกรดอะมิโนเปลี่ยนแปลงที่ codon 198 บนยีน β-tubulin แต่เชื้อรา *C. acutatum* ที่ต้านทานต่อเบนโนมิล ไม่เปลี่ยนแปลงในตำแน่งดังกล่าว สอดคล้องกับการศึกษาของ Kim *et al.* (2007) ที่วิเคราะห์ความต้านทานของเชื้อราทั้งสอง species สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของพริกและสตอเบอรี่ในประเทศเกาหลี และ Ru-lin and Jun-Sheng (2007) ทำการ โคลนยีนที่ทนทานสารคาร์เบนดาซิม จากเชื้อรา *C. gloeosporioides* ของมะม่วงในประเทศจีนตอนใต้ พบตำแหน่งกลายพันธุ์ที่สอดคล้องกับลักษณะที่แสดงออก คือ ตำแหน่งของกรดอะมิโนที่ codon 198 เช่นกัน นอกจากการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนตรงตำแหน่งที่กล่าวมาแล้ว Chung *et al.* (2006) ได้พบการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนตรงตำแหน่งที่ codon 200 บนยีน β-tubulin ของเชื้อรา *C. gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของผลไม้ ในประเทศญี่ปุ่น แต่ลักษณะที่แสดงออกของความต้านทานจัดอยู่ในระดับปานกลาง

4. วัตถุประสงค์ของการศึกษา :

เพื่อศึกษาเปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยาและลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของมะม่วงระหว่างสายพันธุ์ปกติกับสายพันธุ์ที่ทนทานต่อสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิม โดยศึกษาถึงจุดกลายพันธุ์บนยีนเบต้าทูบูลิน (*TUB2*) ของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของมะม่วงที่ต้านทานสารป้องกันกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิม เพื่อให้เกิดความรู้ความเข้าใจถึงการกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นในระดับชีวโมเลกุล อันจะนำไปสู่การหาวิธีที่เหมาะสมในการควบคุมป้องกัน และกำจัดเชื้อราดังกล่าวได้อย่างถูกวิธี