

9. เอกสารอ้างอิง

- กรรองจิต แซ่หงอ และ วิชัย ก่อประดิษฐ์สกุล. 2531. ลักษณะของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. ที่ต้านทานต่อสารเคมีประเภทดิวดีซิม benzimidazole. หน้า 167-177. ใน: การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 26 รายงานผลการวิจัยสาขาพืช. 3-5 กุมภาพันธ์ 2531. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- กรมวิชาการเกษตร. 2549. ข้อมูลนำเข้าวัตถุอันตรายทางการเกษตรปี 2546. [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา : <http://www.doa.go.th/toxic-46.pdf> (20 พฤษภาคม 2549).
- กรมวิชาการเกษตร. 2551. การป้องกันกำจัดโรคแอนแทรกคโนสของมะม่วง. (ระบบออนไลน์). แหล่งข้อมูล : <http://www.doa.go.th> (20 พฤษภาคม 2551).
- ธรรมศักดิ์ สมมาตย์. 2543. สารเคมีป้องกันกำจัดโรคพืช. สำนักพิมพ์รั้วเขียว, กรุงเทพฯ. 371 หน้า
- นิพนธ์ วิสารทนนท์. 2531. เอกสารเผยแพร่ทางวิชาการหลักสูตร “หมอพืช-ไม้ผล” ฉบับที่ 6 โรคมะม่วง. ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 172 หน้า.
- นิพนธ์ วิสารทนนท์. 2542. โรคไม้ผลเขตร้อนและการป้องกันกำจัด. ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 172 หน้า.
- วิจัย รักรักษาศาสตร์. 2546. ราวิทยาเบื้องต้น. ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตรกำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, นครปฐม. 351 หน้า.
- วิจิตร วังไ. 2529. มะม่วง. ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร คณะเกษตรศาสตร์. บริษัท ศรีสมบัติการพิมพ์ จำกัด, กรุงเทพฯ. 301 หน้า.
- ลัดดาวัลย์ ผดุงโอษฐ์. 2550. การตรวจสอบความต้านทานต่อสารเบนซิมิดาโซลของเชื้อราสาเหตุ โรคแอนแทรกคโนสกุหลาบโดยการวิเคราะห์หาลำดับเบสเบตาทูบูลินยีน. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (สาขาวิชาโรคพืช). มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่. 109 หน้า.
- สมาคมเทคโนโลยีที่เหมาะสม. 2549. การศึกษาการใช้น้ำส้มควันไม้ในระบบเกษตรกรรมอินทรีย์ Study using of Wood Vinegar in Organic Agriculture. 145 หน้า. ใน: รายงานการประชุมวิชาการโครงการส่งเสริมการผลิตการเผาถ่านและการจัดทรัพยากรป่าไม้อย่างมีประสิทธิภาพ.

- สราญจิต ไกรฤกษ์ วิทย์ นามเรืองศรี อรุณี วงษ์กอบรัชฎ์ และสุชาติ วิจิตรานนท์. 2540. การป้องกันกำจัดศัตรูมะม่วง (สด) โดยวิธีผสมผสาน. หน้า 386-396. ใน: รายงานผลการค้นคว้าทดลอง กองโรคพืชจุลชีววิทยา, กรมวิชาการเกษตร.
- สุชาติ วิจิตรานนท์. 2541. สมุดภาพ โรคมะม่วง และการป้องกันกำจัดโดยวิธีผสมผสาน. บริษัท เซนเนก้า เกษตร เอเชียติก จำกัด, กรุงเทพฯ. 30 หน้า.
- สุธาสิณี ชัยชนะ. 2550. ลักษณะของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. ที่ทนทานต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิมในผลไม้. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (สาขาวิชาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยว). มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่. 225 หน้า.
- สุธาสิณี ชัยชนะ และ สรัญญา ณ ลำปาง. 2550. การตรวจสอบความทนทานต่อสารกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิมของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. สาเหตุโรคแอนแทรคโนสในมะม่วง. วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร 38 (5) (พิเศษ): 205-208.
- สำนักงานเศรษฐกิจเกษตร กรมวิชาการเกษตร. 2551. ข้อมูลการส่งออกสินค้ามะม่วง. (ระบบออนไลน์). แหล่งข้อมูล: <http://www.oae.go.th/oae> (18 พฤษภาคม 2551).
- อรุณี พวงมี. 2533. การควบคุมโรคผลเน่าของมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้ระยะก่อนและหลังเก็บเกี่ยว. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. ภาควิชาโรคพืช มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- Akem, C. N. 2006. Mango anthracnose disease: present status and future research priorities. *Plant Pathol. J.* 5: 266-273.
- Anon. 1989. Fruits in Thailand. Department of Agricultural Extension, Ministry of Agriculture and Cooperatives, Bangkok.
- Arauz, F. L. 2000. Mango anthracnose: Economic impact and current options for integrated management. *Plant Disease.* 84(6): 600-611.
- Brent, J. K. and D. W. Hollomon. 1998. Fungicide resistance: The assessment of risk. Aimprint, UK. 49 pp.
- Buhr, T. L., and Dickman, M. B. 1994. Isolation, characterization, and expression of a second β -tubulin-encoding gene from *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *aeschynomene*. *Appl. and Environ. Microbiol.* 60: 4155-4159.

- Canas-Gutierrez, G. P., Patino, L. F., Rodriguez-Arango, E. and Arango, R. 2006. Molecular characterization of benomyl-resistant isolates of *Mycosphaerella fijiensis* collected in Colombia. *Journal of Phytopathology*. 154: 403-409.
- Chung, W-H., H. Ishii, K. Nishimura, M. Fukaya, K. Yano, and Y. Kajitani. 2006. Fungicide sensitivity and phylogenetic relationship of anthracnose fungi isolated from various fruit crops in Japan. *Plant Disease*. 90(4): 506-512.
- Damicone, J. and D. Smith. 2009. Fungicide Resistance Management. (Online). Oklahoma cooperative extension. Available: <http://osufacts.okstate.edu> (June 30, 2009).
- Davidse, C. L. and W. Flach. 1974. Integration of thaibendazole with fungal tubulin. *Biophysica Acta*. 543: 82-90.
- Davides, C. L. 1986. Benzimidazole fungicides: mechanism of action and biological impact. *Annual Review Phytopathology*. 24: 43-65.
- Deising, B. H., S. R. Reimann, S. F. Pascholati. 2008. Mechanisms and significance of fungicide resistance. *Brazilian Journal of Microbiology*. 39: 286-295.
- Dirou, J., and Stovold, G. 2005. Fungicide management program to control mango anthracnose. Primefacts 19, Profitable & Sustainable Primary Industries. Online.
- Farungsang, U., and N. Farungsang. 1992. Benomyl resistance of *Colletotrichum* spp. associated with rambutan and mango fruit rot in Thailand. *Acta Horticulturae* 321: 891-897.
- Farungsang, U., N. Farungsang, and S. Sangchote. 1994. Benomyl resistance of *Colletotrichum* species associated with mango and rambutan fruit rots in Thailand. pp. 45-50. In: I. G. Johnson, and E. Highley, (eds.), Development of Postharvest handling technology for tropical tree fruits: a workshop held in Bangkok, Thailand. July 16-18, 1992. Watson Ferguson and Co., Brisbane, Australia.

- Fitzell, R.D., and C.M. Peak. 1984. The epidemiology of anthracnose disease of mango : inoculum sources spore production and dispersal. *Annals of Applied Biology* 104: 53-59. CAB Abstracts. Accession no. 841397228.
- Hoeschst and Dupont (1973). *Pesticides News*. Carbendazim. [Online].
<http://www.pau-uk.org/pestnews/Actives/Carbenda.htm>. (20 January 2005).
- Kim, Y-S., J. Y. Min, B. K. Kang, N. V. Bach, W. B. Choi, E. W. Park, and H. T. Kim. 2007. Analyses of the less benzimidazole-sensitivity of the isolates of *Colletotrichum* spp. causing the anthracnose in pepper and strawberry. *The Plant Pathology Journal*. 23(3): 187-192.
- 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.
- Kumar, A. S., N. P. E. Reddy, K. H. Reddy, and M. C. Devi. 2007. Evaluation of fungicidal resistance among *Colletotrichum gloeosporioides* isolates causing mango anthracnose in Agri Export Zone of Andhra Pradesh, India. *Plant Pathology Bulletin*. 16: 157-160.
- Litz, E. R., (ed.). 2009. *The mango: botany, production and uses*. Oxfordshire, UK. 680 pp.
- Ma, Z., and Michailides, T. J. 2005. Advances in understanding molecular mechanisms of fungicide resistance and molecular detection of resistant genotypes in phytopathogenic fungi. *Crop Protection*. 24: 853-863.
- Maymon, M., Zveibil, A., Pivonia, S., Minz, D. and Freeman, S. 2006. Identification and characterization of benomyl-resistant and -sensitive populations of *Colletotrichum gloeosporioides* from *Statice* (*Limonium* spp.). *Phytopathology* 96: 542-548.
- Peres, N. A. R., N. L. Souza, T. L. Peever, and L. W. Timmer. 2004. Benomyl sensitivity of Isolates of *Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides* from citrus. *Plant Disease*. 88(2): 125-130.

- Ploetz, R. C. 2003. Diseases of mango. Pages 327-363 in: Diseases of Tropical Fruit Crops. R. C. Ploetz, ed. CABI Publishing, Oxford, UK.
- Prabakar, K., Raguchander, T., Saravanakumar, D., Muthulakshmi, P., Parthiban, V. K., and Prakasam, V. 2008. Management of postharvest disease of mango anthracnose incited by *Colletotrichum gloeosporioides*. Arch. Phytopathology Plant Protect. 41: 333-339
- Prakash, O., 2004. Diseases and disorders of mango and their management. pp. 511-619. In: S. A. M. H. Naqvi (ed.). Diseases of fruits and vegetables, Volume I. Kluwer Academic Publishers, Netherlands.
- Prior, C., Elango, F., and Whitwell, A. 1992. Chemical control of *Colletotrichum* infection in Mangoes. Pages 326-336 in: *Collectotrichum: Biology, Pathology and Control*. J. A. Bailey, and M. J. Jeger, eds. CAB International, Oxon, UK.
- Ramos, A.H. and E.E. Kamidi. 1982. Determination and significance of mutation rate of *Colletotrichum coffeanum* from benomyl sensitivity to benomyl tolerance. *Phytopathology* 72: 181-185.
- Ru-Lin, Z., and H. Jun-Sheng. 2007. Cloning of a carbendazim-resistant gene from *Colletotrichum gloeosporioides* of mango in South China. *African Journal of Biotechnology*. 6(2): 143-147.
- Sanders, M. G., L. Korsten and F. C. Wehner. 2000. Survey of fungicide sensitivity in *Colletotrichum gloeosporioides* from different avocado and mango production areas in South Africa. *European Journal of Plant Pathology*. 106: 745-752.
- Sariah, M. 1989. Detection of benomyl resistance in the anthracnose pathogen, *Colletotrichum capsici*. *Journal of Islamic Academy of Sciences*. 2(3): 168-171.
- Sholberg, P.L., C. Harlton, P. Haag, C.A. Lévesque, D.O'Gorman and K. Seifert. 2004. Benzimidazole and diphenylamine sensitivity and identity of *Penicillium* spp. that cause postharvest blue mold of apples using β -tubulin gene sequences. *Postharvest Biology and Technology* 36: 41-49.

- Singh, S. B., Mukherjee, I., Maisnam, J., Kumar, P., Gopal, M., and Kulshrestha, G. 2008. Determination of pesticide residues in IPM and non-IPM sample of mango (*Mangifera indica*). *J. Environ. Sci. Health Part B*. 43: 300-306.
- Staub, T. 1991. Fungicide resistance: practical experience with antiresistance strategies and the role of integrated use. *Annu. Rev. Phytopathol.* 29: 421-442.
- Steffens, J. J., Pell, E. J., and Tien, M. 1996. Mechanisms of fungicide resistance in phytopathogenic fungi. *Curr. Opin. Biotechnol.* 7: 348-355.
- Sutton, B. C. 1980. *The coelomycetes: fungi imperfect with pycnidia acervuli and stromata*. CMI. Kew Surrey, England, 696 pp.
- Sutton, B. C. 1992. The genus *Glomerella* and its Anamorph *Colletotrichum*. Pages 1 - 27. in: *Colletotrichum: Biology, Pathology and Control*. J. A. Bailey, and M. J. Jeger, eds. CAB International, Wallingford, UK.
- Timmer, L.W. 2003. *Florida Citrus Pest Management Guide*. Coop. Ext. Serv. Publ., Gainesville.
- Yarden, O. and T. Katan. 1993. Mutations leading to substitutions at amino acids 198 and 200 of beta-tubulin that correlate with benomyl-resistance phenotypes of field strains of *Botrytis cinerea*. *Phytopathology* 83: 1478-1483.
- Yuan S.K., and Zhou M.G. 2003. Genetics of resistance to cabendazim in *Gibberella zea*. *Yi Chuan Xue Bao.* 30(5): 474-8. [Online]. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=12924164&dopt=Abstract (20 January 2005).

ผลที่ได้รับจากโครงการฯ

สำหรับผลงานวิจัยที่ได้รับการตีพิมพ์ในครั้งนี พอสรุบได้ดังนี้

I ผลงานที่ตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ

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

2.

II ผลงานที่ตีพิมพ์ในวารสารวิชาการในประเทศ และการเสนอผลงานในที่ประชุมวิชาการ

1. Kongtrakoul, P., S. Chaichana and **S. Nalumpang**. 2009. Effect of ginger and some fungicide on carbendazim-resistant *Colletotrichum* spp. causing mango anthracnose. Proceedings of the third botanical conference of Thailand. Faculty of Science, Mahidol University, Thailand, 25-27 March 2009. p.159-164.
2. Nuandee, N. and **S. Nalumpang**. 2009. Sensitivity of Cercosporoid fungi to benzimidazole (carbendazim) from various plants in Chiang Mai. Proceedings of the third botanical conference of Thailand. Faculty of Science, Mahidol University, Thailand, 25-27 March 2009. 165-170.
3. Kongtrakoul, P., Y. Miyamoto, C. Miyake, Y. Izumi, K. Akimitsu and **S. Nalumpang**. 2009. Detection of carbendazim-resistant *Colletotrichum gloeosporioides* causing mango anthracnose disease. Proceedings of the second international meeting for development of international network for reduction of agrochemical use: food safety technologies in Southeast Asia. The Imperial Mae Ping Hotel, Chiang Mai, Thailand. 22-23 September 2009. 9-15.
4. Nuandee, N., P. Kongtrakoul, W. Boonying, I. Hidayat, Y. Miyamoto, C. Miyake, Y. Izumi, K. Akimitsu and **S. Nalumpang**. 2009. Genetic analysis of beta-tubulin gene fragment from carbendazim-resistant *Cercospora lactucae-sativae* on lettuce. Proceedings of the second international meeting for development of

international network for reduction of agrochemical use: food safety technologies in Southeast Asia. The Imperial Mae Ping Hotel, Chiang Mai, Thailand. 22-23 September 2009. 80-84.

5. Boonying, W., Y. Miyamoto, C. Miyake, Y. Izumi, K. Akimitsu and **S. Nalumpang**. 2009. Detection beta-tubulin gene of carbendazim-resistant *Colletotrichum* spp. causing chilli anthracnose. Proceedings of the second international meeting for development of international network for reduction of agrochemical use: food safety technologies in Southeast Asia. The Imperial Mae Ping Hotel, Chiang Mai, Thailand. 22-23 September 2009. 85-89.
6. Suwan, N., N. Nuandee, W. Boonying and **S. Nalumpang**. 2010. Efficiency of soil actinomycete for controlling some plant pathogen. Proceedings of the annual meeting of Thai Phytopathological Society (TPS) and conference on Plant Pathology in Thailand. Kasetsart University, Bangkok, Thailand. 15 May 2010. p.6.
7. Kongtrakoul, P., Y. Miyamoto, C. Miyake, Y. Izumi, K. Akimitsu and **S. Nalumpang**. 2010. Point mutation of carbendazim-resistant *Colletotrichum gloeosporioides* causing mango anthracnose. Proceedings of the annual meeting of Thai Phytopathological Society (TPS) and conference on Plant Pathology in Thailand. Kasetsart University, Bangkok, Thailand. 15 May 2010. p.22.
8. Hongsanan, S., **S. Nalumpang** and K. Soyong. 2010. Fungal metabolites of *Emericella rugulosa* for controlling *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* causing tomato wilt. Proceedings of the annual meeting of Thai Phytopathological Society (TPS) and conference on Plant Pathology in Thailand. Kasetsart University, Bangkok, Thailand. 15 May 2010. p.50.
9. Thotree, P., C. Knongnuch and **S. Nalumpang**. 2010. Efficiency of actinomyces culture medium for controlling *Colletotrichum* spp. causing chilli anthracnose disease. Proceedings of the eighth national postharvest technology conference in Thailand, Chiang Mai, Thailand. 1-3 September 2010. p.148.

10. Sangnak, V. and **S. Nalumpang**. 2010. Efficiency of vinegar extracts from eucalyptus and neem trees for controlling *Colletotrichum gloeosporioides* of mango cv.'Nam Dok Mai' causing anthracnose. Proceedings of the eighth national postharvest technology conference in Thailand, Chiang Mai, Thailand. 1-3 September 2010. p.149.

11. Kongtrakoul, P. and **S. Nalumpang**. 2010. Characterization of carbendazim-resistant *Colletotrichum gloeosporioides* causing 'mango anthracnose disease on fruits from fresh markets. Proceedings of the eighth national postharvest technology conference in Thailand, Chiang Mai, Thailand. 1-3 September 2010. p.189.

Agricultural Technology

an international journal

Volume 6, Number 2, April 2010



Rajamangala University of Technology Tawan-OK (RMUTTO)
43 Moo 6 Bangpra, Siracha, Cholburi, 20110 Thailand
www.ijat-rmutto.com e-mail: ijat.rmutto@gmail.com

Point mutations in the beta-tubulin gene conferred carbendazim-resistant phenotypes of *Colletotrichum gloeosporioides* causing 'Nam Dok Mai' mango anthracnose

Nalumpang, S.^{1,2*}, Miyamoto, Y.³, Miyake, C.³, Izumi, Y.³, Akitmitsu, K.³ and Kongtragoul, P.^{1,2}

¹Department of Entomology and Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Chiang Mai University, Chiang Mai, Thailand.

²Center for Agriculture Biotechnology (AG-BIO/PERDO-CHE), Thailand.

³Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Kagawa University, Japan.

Nalumpang, S., Miyamoto, Y., Miyake, C., Izumi, Y., Akitmitsu, K., and Kongtragoul, P. (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.

Fifty-nine naturally-infected isolates of *Colletotrichum gloeosporioides* causing 'Nam Dok Mai' mango anthracnose disease were collected from markets and orchards in Thailand; consisting of 6 isolates (10.17%) from leaves and 53 isolates (89.83%) from fruits. In preliminary studies conducted *in vitro* with potato dextrose agar amended with carbendazim at various concentrations: 0.1, 1, 10, 100, 500 and 1,000 mg/l. The phenotype-resistant levels evaluation was grouping into four representative phenotypes of reactions as highly resistance (HR; ≥ 500 mg/l), moderately resistance (MR; ≤ 100 mg/l), weakly resistance (WR; ≤ 10 mg/l) and sensitive (S; ≤ 1 mg/l). The result showed 49 isolates (83.05%) were HR phenotypes; consisting of 2 isolates (3.39%) from leaves and 47 isolates (79.66%) from fruits, and 10 isolates (16.95%) were S phenotypes; consisting of 4 isolates (6.78%) from leaves and 6 isolates (10.22%) from fruits. The differences in the carbendazim-resistant phenotypes were conspicuous in sequence analysis of the second beta-tubulin (*TUB2*) gene compared with *C. gloeosporioides* f. sp. *aeschnomene* (accession No. U14138). HR phenotypes were revealed a single nucleotide mutation; an adenine (A) to cytosine (C) transversion, resulting in a substitution of codon 198, which encodes glutamic acid (GAG) in S phenotypes, was converted to a codon for alanine (GCG) which is closely associated with conferring carbendazim-resistant phenotype. This indicates that careful management of carbendazim fungicides applications is necessary to achieve effective control.

Key words: anthracnose, beta-tubulin gene, carbendazim resistance, *Colletotrichum gloeosporioides*, mango (*Mangifera indica*)

Introduction

Mango fruit cv. 'Nam Dok Mai' (*Mangifera indica* L.) is one of the important economic fruit crops in Thailand because of its good smell,

*
Corresponding author: Sarunya Nalumpang; e-mail: sarunya@chiangmai.ac.th

delicious taste, excellent flavor, and attractive fragrance (Singh *et al.* 2008). And Thailand is one of the major producers and exporters of this mango cultivar (Office of Agricultural Economics, Department of Agriculture, 2008). However, one of the constraints of markets is disease, especially anthracnose disease caused by fungus *Colletotrichum gloeosporioides*. It causes a problem after harvest due to disease expression starting at the ripening stage. These cultivar mangos are highly susceptible to this disease and can be infected as latent infection in high levels compared with other cultivar (Sangchote, 1987). In order to control this disease, in over time, benzimidazole fungicides such as carbendazim, benomyl and thiabendazole have been widely used to manage the mango anthracnose, because farmers believed that the chemical fungicides are able to control plant diseases better than other methods. In fact, the chemical fungicides effectively suppressed and controlled a wide variety of plant diseases at beginning; however, a consequence of a long term utilization of chemical fungicides, particularly systemic fungicides, reduced the significant of fungicide effects to the disease pathogens. Because the pathogens often become resistance to chemical fungicides, and the increase in number of these fungicide resistant isolates give the main problems for the farmers (Farungsang and Farungsang, 1992; Farungsang *et al.*, 1994; Steffen *et al.*, 1996; Yoon *et al.*, 2008). The appearance of fungicide resistance has become an important factor in limiting the efficacy and useful lifetime of important disease control strategies, and therefore the cost spending for the fungicides also increase because the farmers are forced to increase the dosage of the chemical fungicide. Therefore, this resistance may also be an important aid to our understanding, at a molecular level, of the fungicidal mechanism of action.

To effectively control this disease, it is necessary to determine the resistibility of isolates of *C. gloeosporioides* causing anthracnose disease to fungicides. The objectives of this study were to examine resistance of *C. gloeosporioides* isolates obtained from 'Nam Dok Mai' mango to the carbendazim fungicide using phenotypic response and to sequence the partial second beta-tubulin (*TUB2*) gene which has been reported to be responsible for benzimidazole resistance (Orbach *et al.* 1986; Koenraadt *et al.*, 1992; Yarden and Katan, 1993; Buhr and Dickman, 1994; Ma and Michailides, 2005).

Materials and methods

Isolation of Colletotrichum gloeosporioides from 'Nam Dok Mai' mango anthracnose

Naturally-infected fruits and leaves of 'Nam Dok Mai' mango were collected from markets and orchards in Thailand. Isolations were made by

cutting small sections about 5x5 mm from lesions and asymptomatic tissues, wetting the sections briefly for 1 min in 70% ethanol, surface disinfecting in 1% sodium hypochlorite for 2-3 min, and rinsing in sterile distilled water. Sections tissues were placed on potato dextrose agar (PDA) media plates and incubated at room temperature. Those plates were observed daily until the mycelium grows and subculture to the new PDA media plates. Cultures were prepared by plating each strain on PDA media plate at room temperature for 5 days productions of mycelial plugs.

Carbendazim resistibility assays

Screening resistibility of all *C. gloeosporioides* isolates to carbendazim were tested using mycelial growth assays. Each isolate was cultured on PDA media plates at room temperature. Mycelial plugs, 5 mm diameter, was cut from the margins of colonies and transferred onto carbendazim supplemented with PDA media at the concentration of 0, 0.1, 1, 10, 100, 500 and 1,000 mg/l. Carbendazim was added to PDA after autoclaving. After inoculation at room temperature, the diameter of each colony was measured and the percentages of growth were calculated and data expressed as percentage of the control. Values obtained were categorized as phenotypes carbendazim resistibility was evaluated into 4 levels shown in Table 1.

Table 1. Phenotype-resistant levels of *Colletotrichum gloeosporioides* to carbendazim at various concentrations: 0.1, 1, 10, 100, 500 and 1,000 mg/l amended with potato dextrose agar (Modified from Farungsang and Farungsang (1992); Farungsang *et al.* (1994); Koenraad *et al.* (1992) and Peres *et al.* (2004)).

Phenotype-resistant levels	Carbendazim concentration (mg/l)					
	0.1	1	10	100	500*	1,000
Sensitive (S)	✓	X	X	X	X	X
Weakly resistance (WR)	✓	✓	X	X	X	X
Moderately resistance (MR)	✓	✓	✓	✓	X	X
Highly resistance (HR)	✓	✓	✓	✓	✓	X
	✓	✓	✓	✓	✓	✓

* = the field recommendation rate

✓ = the percentage of growth \geq 10% compared with the control

X = the percentage of growth $<$ 10% compared with the control

Partial sequencing of the second beta-tubulin (TUB2) gene

DNA extraction and PCR amplification

Some isolates of field carbendazim-resistant *C. gloeosporioides* were selected to represent different phenotypes. Genomic DNA was extracted and

purified followed NuclSpin® Plant Kit (MACHREY-NAGEY) was used as the protocol described by the company. Primers TB2L (5'-GTT TCC AGA TCA CCC ACT CC-3') and TB2R (5'-TGA GCT CAG GAA CAC TGA CG-3') (Peres *et al.*, 2004) were used to amplify a portion of the partial *TUB2* where carbendazim resistance mutations occurred. Amplification of partial *TUB2* sequences were carried out in a total reaction volume of 50 μ l. Polymerase chain reaction (PCR) reaction mixtures contained 1 μ l of purified genomic DNA, 5 μ l of 10X PCR buffer (iNtRON Biotechnology, Inc.), 25 mM MgCl₂ (iNtRON Biotechnology, Inc.), 10 mM dNTPs (iNtRON Biotechnology, Inc.), 50 pmoles each primer, and 1 unit of *Taq* polymerase (Fermentas). All PCR reactions were carried out in PTC-100™ programmable thermal controller (MJ Research, INC.) with a hold of 5 min at 95 °C, followed by 30 cycles of 1 min at 95 °C, 1 min at 35 °C, and 1 min at 72 °C, and a final extension for 5 at 72 °C. PCR products were separated by electrophoresis on 1% agarose gels (Research Organics, INC) with 100-bp sharp DNA maker (RBC Bioscience, Corp.) as a size standard.

DNA sequencing and alignment

Purified PCR products were direct-sequenced on both strands using cycle sequencing with TUB2L and TUB2R primers. Sequence of PCR products were obtained from both strands by the dideoxy chain termination method (Sanger *et al.* 1977) using an ABI PRISM Dye Termination Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems, Foster City, USA) and an automated fluorescent DNA sequencer (Model 310, Applied Biosystems) following the manufacturer's instructions. DNA sequences were aligned with the BioEdit version 5.0.6 software was used to assemble, edit, and generate high-quality sequences. Using Blast, we searched GenBank, NCBI database for sequences that were similar to those isolates in our study. Alignment of sequences was performed with the implemented ClustalX software automated alignment tool, and alignments were refined manually.

Results

Isolation of Colletotrichum gloeosporioides from 'Nam Dok Mai' mango anthracnose

Colletotrichum spp. was isolated from naturally-infected leaves and fruits of 'Nam Dok Mai' mango collected from markets and orchards in Thailand (Fig. 1). Isolation was made by tissue transplanting technique. The mycelium grows and then subculture to the new PDA plate. Cultures were prepared by plating each strain onto PDA media plate at room temperature for 7-10 days. Fifty-nine *Colletotrichum* spp. isolates were successfully isolated, consisting of 6 isolates (10.17%) from leaves and 53 isolates

(89.83%) from fruits. Studies on morphology characteristic were carried out by examinations of their characteristics of colonies and conidia. The results showed that aerial mycelium of the colonies of all isolates are white and grey. They form cylindrical conidia (4.2-5.1 x 15.4-20.6 μm) and also some isolates produced slimy spore mass and/or sclerotium (Fig. 2). These morphology characteristics were identical with that of *C. gloeosporioides* referred by Sutton (1980).

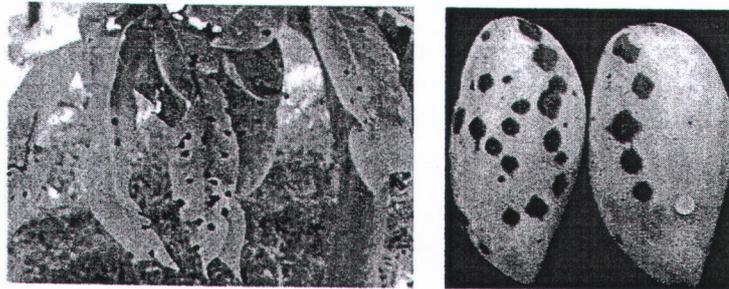


Fig. 1. Naturally-infected leaves or fruits of 'Nam Dok Mai' mango.

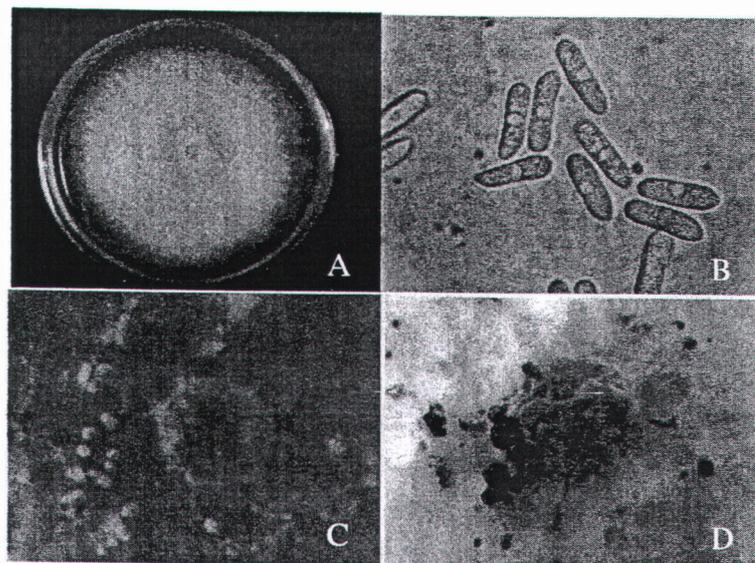


Fig. 2. Characterizations of *Colletotrichum gloeosporioides* causing 'Nam Dok Mai' mango anthracnose; (A) Colony on PDA 10 days, (B) Conidia (X100), (C) Slimy spore mass, (D) Sclerotia.

Carbendazim resistibility assays

Starter cultures were prepared by incubating each *C. gloeosporioides* isolates on PDA plates for 3-4 days. Mycelial plugs, (5 mm diameter) were cut from starter plate. The carbendazim-resistant test was conducted to each strain on PDA amended with carbendazim at various concentrations: 0.1, 1, 10, 100, 500 and 1,000 mg/l, unamended PDA served as control. The result

showed that 49 isolates were highly resistant (HR) phenotypes; consisting 2 isolates from leaves and 47 isolates from fruits. Four isolates were sensitive (S) phenotypes; consisting 2 isolates from leaf and 2 isolates from fruits. None showed weakly resistance (WR) and moderately resistance (MR) phenotypes in this examination (Table 2, Fig. 3).

Table 2. The phenotypes of carbendazim-resistant *Colletotrichum gloeosporioides* causing 'Nam Dok Mai' mango anthracnose base on Table 1.

Mango parts	No. of isolates of carbendazim-resistant phenotypes				Total
	Sensitive (S)	Weakly resistance (WR)	Moderately resistance (MR)	Highly resistance (HR)	
Leaves	4 (6.78%)	0	0	2 (3.39%)	6 (10.17%)
Fruits	6 (10.22%)	0	0	47 (79.66%)	53 (89.83%)
Total	10 (18.60%)	0	0	49 (83.05%)	59 (100%)

Partial sequencing of the second beta-tubulin (*TUB2*) gene

Partial *TUB2* gene sequences from representative of HR and S phenotypes of *C. gloeosporioides* from 'Nam Dok Mai' mango anthracnose were 430 bp in length. The nucleotides at 878-1,308 and amino acid at codon 147-289 sequences of *TUB2* gene from the thirteen HR phenotypes and four S phenotypes were compared with wild type *C. gloeosporioides* f. sp. *aeschynomene* (accession No. U14138) (Buhr and Dickman, 1994). In this study, there were both silent and missense mutation. In missense mutation, the single nucleotide point mutation which resulted in deduced amino acid altered was observed at some codons in *TUB2* fragment, but the single nucleotide point mutation occurred at 1,032; an adenine (A) to cytosine (C) transversion, resulting in a substitution of amino acid at codon 198; glutamic acid (GAG) in all S phenotypes, was converted to a codon for alanine (GCG) in all HR phenotypes which is closely associated with conferring carbendazim-resistant phenotype (Fig. 4).

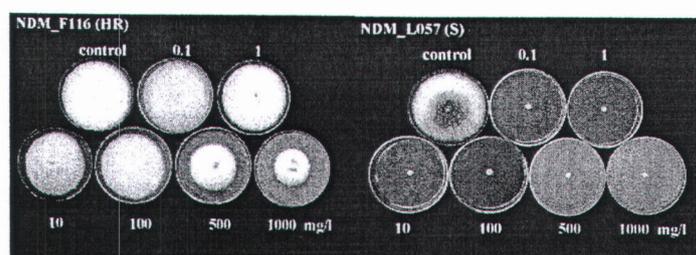


Fig. 3. The carbendazim-resistant phenotypes of highly resistance ($HR \geq 500$ mg/l) and sensitive ($S \leq 1$ mg/l) *Colletotrichum gloeosporioides* isolates on PDA amended with carbendazim at control, 0.1, 1, 10, 100, 500 and 1000 mg/l.

U14138 ⁽¹⁾	Phenotypes	Sequence
	wild type	TTCTCCGTCGTTCCCTCCCCCAAGGTCCTCCGACACCGTTGTCGAGCCCTACAACGCCACT
NDM_F006	S	F S V V P S F K V S D T V V E P Y N A T
NDM_F057	S	TTCTCCGTCGTTCCCTCCCCCAAGGTCCTCCGACACCGTTGTCGAGCCCTACAACGCCACT
NDM_F118	S	F S V V P S F K V S D T V V E P Y N A T
NDM_L068	S	TTCTCCGTCGTTCCCTCCCCCAAGGTCCTCCGACACCGTTGTCGAGCCCTACAACGCCACT
NDM_F002	HR	F S V V P S F K V S D T V V E P Y N A T
NDM_F012	HR	TTCTCCGTCGTTCCCTCCCCCAAGGTCCTCCGACACCGTTGTCGAGCCCTACAACGCCACT
NDM_F014	HR	F S V V P S F K V S D T V V E P Y N A T
NDM_F018	HR	TTCTCCGTCGTTCCCTCCCCCAAGGTCCTCCGACACCGTTGTCGAGCCCTACAACGCCACT
NDM_F026	HR	F S V V P S F K V S D T V V E P Y N A T
NDM_F027	HR	TTCTCCGTCGTTCCCTCCCCCAAGGTCCTCCGACACCGTTGTCGAGCCCTACAACGCCACT
NDM_F038	HR	F S V V P S F K V S D T V V E P Y N A T
NDM_F061	HR	TTCTCCGTCGTTCCCTCCCCCAAGGTCCTCCGACACCGTTGTCGAGCCCTACAACGCCACT
NDM_F106	HR	F S V V P S F K V S D T V V E P Y N A T
NDM_F110	HR	TTCTCCGTCGTTCCCTCCCCCAAGGTCCTCCGACACCGTTGTCGAGCCCTACAACGCCACT
NDM_F116	HR	F S V V P S F K V S D T V V E P Y N A T
NDM_F130	HR	TTCTCCGTCGTTCCCTCCCCCAAGGTCCTCCGACACCGTTGTCGAGCCCTACAACGCCACT
NDM_L078	HR	F S V V P S F K V S D T V V E P Y N A T
	Nucleotides	-----*
	Amino acids	-----

60
20

U14138 ⁽¹⁾	Phenotype	Target site for benzimidazole ⁽²⁾ 198
	wild type	CTCTCCGTCGCCACAGCTGGTCGAGAAGCTCCGACGAGACCTTCTGCATTGACAACGAGGCT
NDM_F006	S	L S V H Q L V E N S D E T F C I D N E A
NDM_F057	S	CTCTCCGTCGCCACAGCTGGTCGAGAAGCTCCGACGAGACCTTCTGCATTGACAACGAGGCT
NDM_F118	S	L S V H Q L V E N S D E T F C I D N E A
NDM_L068	S	CTCTCCGTCGCCACAGCTGGTCGAGAAGCTCCGACGAGACCTTCTGCATTGACAACGAGGCT
NDM_F002	HR	L S V H Q L V E N S D E T F C I D N E A
NDM_F012	HR	CTCTCCGTCGCCACAGCTGGTCGAGAAGCTCCGACGAGACCTTCTGCATTGACAACGAGGCT
NDM_F014	HR	L S V H Q L V E N S D A T F C I D N E A
NDM_F018	HR	CTCTCCGTCGCCACAGCTGGTCGAGAAGCTCCGACGAGACCTTCTGCATTGACAACGAGGCT
NDM_F026	HR	L S V H Q L V E N S D A T F C I D N E A
NDM_F027	HR	CTCTCCGTCGCCACAGCTGGTCGAGAAGCTCCGACGAGACCTTCTGCATTGACAACGAGGCT
NDM_F038	HR	L S V H Q L V E N S D A T F C I D N E A
NDM_F061	HR	CTCTCCGTCGCCACAGCTGGTCGAGAAGCTCCGACGAGACCTTCTGCATTGACAACGAGGCT
NDM_F106	HR	L S V H Q L V E N S D A T F C I D N E A
NDM_F110	HR	CTCTCCGTCGCCACAGCTGGTCGAGAAGCTCCGACGAGACCTTCTGCATTGACAACGAGGCT
NDM_F116	HR	L S V H Q L V E N S D A T F C I D N E A
NDM_F130	HR	CTCTCCGTCGCCACAGCTGGTCGAGAAGCTCCGACGAGACCTTCTGCATTGACAACGAGGCT
NDM_L078	HR	L S V H Q L V E N S D A T F C I D N E A
	Nucleotides	-----*
	Amino acids	-----

120
40

Fig. 4. Comparison of deduced nucleotide sequences and amino acids in *TUB2* gene of *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *aeschynomene*⁽¹⁾ between carbendazim-resistant *C. gloeosporioides* isolates causing 'Nam Dok Mai' mango anthracnose. ⁽¹⁾Buhr and Dickman (1994), ⁽²⁾Peres *et al.* (2004).

U14138 ⁽¹⁾	Phenotype	CTCTACGACATTTGCATGCGTACCCTCAAGCTGTCCAACCCCTCTTACGGCGACCTGAAC
NDM_F006	S	L Y D I C M R T L K L S N P S Y G D L N
NDM_F057	S	CTCTACGACATTTGCATGCGTACCCTCAAGCTGTCCAACCCCTCTTACGGCGACCTGAAC
NDM_F118	S	L Y D I C M R T L K L S N P S Y G D L N
NDM_L068	S	CTCTACGACATTTGCATGCGTACCCTCAAGCTGTCCAACCCCTCTTACGGCGACCTGAAC
NDM_F002	HR	L Y D I C M R T L K L S N P S Y G D L N
NDM_F012	HR	CTCTACGACATTTGCATGCGTACCCTCAAGCTGTCCAACCCCTCTTACGGCGACCTGAAC
NDM_F014	HR	L Y D I C M R T L K L S N P S Y G D L N
NDM_F018	HR	CTCTACGACATTTGCATGCGTACCCTCAAGCTGTCCAACCCCTCTTACGGCGACCTGAAC
NDM_F026	HR	L Y D I C M R T L K L S N P S Y G D L N
NDM_F027	HR	CTCTACGACATTTGCATGCGTACCCTCAAGCTGTCCAACCCCTCTTACGGCGACCTGAAC
NDM_F038	HR	L Y D I C M R T L K L S N P S Y G D L N
NDM_F061	HR	CTCTACGACATTTGCATGCGTACCCTCAAGCTGTCCAACCCCTCTTACGGCGACCTGAAC
NDM_F106	HR	L Y D I C M R T L K L S N P S Y G D L N
NDM_F110	HR	CTCTACGACATTTGCATGCGTACCCTCAAGCTGTCCAACCCCTCTTACGGCGACCTGAAC
NDM_F116	HR	L Y D I C M R T L K L S N P S Y G D L N
NDM_F130	HR	CTCTACGACATTTGCATGCGTACCCTCAAGCTGTCCAACCCCTCTTACGGCGACCTGAAC
NDM_L078	HR	L Y D I C M R T L K L S N P S Y G D L N
Nucleotides		-----*
Amino acids		-----
		180
		60
U14138 ⁽¹⁾	Phenotype	CACCTGGTCTCTGCTGTTATGTCGGGTGTCACCTACCTGCCTGCGTTTCCCGGGTCAAGCTG
NDM_F006	S	H L V S A V M S G V T T C L R F P P G Q L
NDM_F057	S	CACCTGGTCTCTGCTGTTATGTCGGGTGTCACCTACCTGCCTGCGTTTCCCGGGTCAAGCTG
NDM_F118	S	H L V S A V M S G V T T C L R F P P G Q L
NDM_L068	S	CACCTGGTCTCTGCTGTTATGTCGGGTGTCACCTACCTGCCTGCGTTTCCCGGGTCAAGCTG
NDM_F002	HR	H L V S A V M S G V T T C L R F P P G Q L
NDM_F012	HR	CACCTGGTCTCTGCTGTTATGTCGGGTGTCACCTACCTGCCTGCGTTTCCCGGGTCAAGCTG
NDM_F014	HR	H L V S A V M S G V T T C L R F P P G Q L
NDM_F018	HR	CACCTGGTCTCTGCTGTTATGTCGGGTGTCACCTACCTGCCTGCGTTTCCCGGGTCAAGCTG
NDM_F026	HR	H L V S A V M S G V T T C L R F P P G Q L
NDM_F027	HR	CACCTGGTCTCTGCTGTTATGTCGGGTGTCACCTACCTGCCTGCGTTTCCCGGGTCAAGCTG
NDM_F038	HR	H L V S A V M S G V T T C L R F P P G Q L
NDM_F061	HR	CACCTGGTCTCTGCTGTTATGTCGGGTGTCACCTACCTGCCTGCGTTTCCCGGGTCAAGCTG
NDM_F106	HR	H L V S A V M S G V T T C L R F P P G Q L
NDM_F110	HR	CACCTGGTCTCTGCTGTTATGTCGGGTGTCACCTACCTGCCTGCGTTTCCCGGGTCAAGCTG
NDM_F116	HR	H L V S A V M S G V T T C L R F P P G Q L
NDM_F130	HR	CACCTGGTCTCTGCTGTTATGTCGGGTGTCACCTACCTGCCTGCGTTTCCCGGGTCAAGCTG
NDM_L078	HR	H L V S A V M S G V T T C L R F P P G Q L
Nucleotides		-----*
Amino acids		-----
		240
		80

Fig. 4. (continued) Comparison of deduced nucleotide sequences and amino acids in *TUB2* gene of *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *aeschynomene*⁽¹⁾ between carbendazim-resistant *C. gloeosporioides* isolates causing 'Nam Dok Mai' mango anthracnose. ⁽¹⁾Buhr and Dickman (1994), ⁽²⁾Peres et al. (2004).

U14138 ⁽¹⁾	Phenotype		AACTCTGACCTGCGCAAGCTGGCTGTCAACATGGTTCCTTTCCCCCGTCTCCACTTCTTC	
	wild type		N S D L R K L A V N M V P F P R L H F F	
NDM_F006	S		AACTCTGACCTGCGCAAGCTGGCTGTCAACATGGTTCCTTTCCCCCGTCTCCACTTCTTC	
			N S D L R K L A V N M V P F P R L H F F	
NDM_F057	S		AACTCTGACCTGCGCAAGCTGGCTGTCAACATGGTTCCTTTCCCCCGTCTCCACTTCTTC	
			N S D L R K L A V N M V P F P R L H F F	
NDM_F118	S		AACTCTGACCTGCGCAAGCTGGCTGTCAACATGGTTCCTTTCCCCCGTCTCCACTTCTTC	
			N S D L R K L A V N M V P F P R L H F F	
NDM_L068	S		AACTCTGACCTGCGCAAGCTGGCTGTCAACATGGTTCCTTTCCCCCGTCTCCACTTCTTC	
			N S D L R K L A V N M V P F P R L H F F	
NDM_F002	HR		AACTCTGACCTGCGCAAGCTGGCTGTCAACATGGTTCCTTTCCCCCGTCTCCACTTCTTC	
			N S D L R K L A V N M V P F P R L H F F	
NDM_F012	HR		AACTCTGACCTGCGCAAGCTGGCTGTCAACATGGTTCCTTTCCCCCGTCTCCACTTCTTC	
			N S D L R K L A V N M V P F P R L H F F	
NDM_F014	HR		AACTCTGACCTGCGCAAGCTGGCTGTCAACATGGTTCCTTTCCCCCGTCTCCACTTCTTC	
			N S D L R K L A V N M V P F P R L H F F	
NDM_F018	HR		AACTCTGACCTGCGCAAGCTGGCTGTCAACATGGTTCCTTTCCCCCGTCTCCACTTCTTC	
			N S D L R K L A V N M V P F P R L H F F	
NDM_F026	HR		AACTCTGACCTGCGCAAGCTGGCTGTCAACATGGTTCCTTTCCCCCGTCTCCACTTCTTC	
			N S D L R K L A V N M V P F P R L H F F	
NDM_F027	HR		AACTCTGACCTGCGCAAGCTGGCTGTCAACATGGTTCCTTTCCCCCGTCTCCACTTCTTC	
			N S D L R K L A V N M V P F P R L H F F	
NDM_F038	HR		AACTCTGACCTGCGCAAGCTGGCTGTCAACATGGTTCCTTTCCCCCGTCTCCACTTCTTC	
			N S D L R K L A V N M V P F P R L H F F	
NDM_F061	HR		AACTCTGACCTGCGCAAGCTGGCTGTCAACATGGTTCCTTTCCCCCGTCTCCACTTCTTC	
			N S D L R K L A V N M V P F P R L H F F	
NDM_F106	HR		AACTCTGACCTGCGCAAGCTGGCTGTCAACATGGTTCCTTTCCCCCGTCTCCACTTCTTC	
			N S D L R K L A V N M V P F P R L H F F	
NDM_F110	HR		AACTCTGACCTGCGCAAGCTGGCTGTCAACATGGTTCCTTTCCCCCGTCTCCACTTCTTC	
			N S D L R K L A V N M V P F P R L H F F	
NDM_F116	HR		AACTCTGACCTGCGCAAGCTGGCTGTCAACATGGTTCCTTTCCCCCGTCTCCACTTCTTC	
			N S D L R K L A V N M V P F P R L H F F	
NDM_F130	HR		AACTCTGACCTGCGCAAGCTGGCTGTCAACATGGTTCCTTTCCCCCGTCTCCACTTCTTC	
			N S D L R K L A V N M V P F P R L H F F	
NDM_L078	HR		AACTCTGACCTGCGCAAGCTGGCTGTCAACATGGTTCCTTTCCCCCGTCTCCACTTCTTC	
			N S D L R K L A V N M V P F P R L H F F	
	Nucleotides		-----*	300
	Amino acids		-----	100
U14138 ⁽¹⁾	Phenotype		ATGGTCGGCTTCGCTCCCCTGACCAGCCGTGGCGCCCACTTTCCCGCGCCGTCAAGTGT	
	wild type		M V G F A P L T S R G A H S F R A V S V	
NDM_F006	S		ATGGTCGGCTTCGCTCCCCTGACCAGCCGTGGCGCCCACTTTCCCGCGCCGTCAAGTGT	
			M V G F A P L T S R G A H S F R A V S V	
NDM_F057	S		ATGGTCGGCTTCGCTCCCCTGACCAGCCGTGGCGCCCACTTTCCCGCGCCGTCAAGTGT	
			M V G F A P L T S R G A H S F R A V S V	
NDM_F118	S		ATGGTCGGCTTCGCTCCCCTGACCAGCCGTGGCGCCCACTTTCCCGCGCCGTCAAGTGT	
			M V G F A P L T S R G A H S F R A V S V	
NDM_L068	S		ATGGTCGGCTTCGCTCCCCTGACCAGCCGTGGCGCCCACTTTCCCGCGCCGTCAAGTGT	
			M V G F A P L T S R G A H S F R A V S V	
NDM_F002	HR		ATGGTCGGCTTCGCTCCCCTGACCAGCCGTGGCGCCCACTTTCCCGCGCCGTCAAGTGT	
			M V G F A P L T S R G A H S F R A V S V	
NDM_F012	HR		ATGGTCGGCTTCGCTCCCCTGACCAGCCGTGGCGCCCACTTTCCCGCGCCGTCAAGTGT	
			M V G F A P L T S R G A H S F R A V S V	
NDM_F014	HR		ATGGTCGGCTTCGCTCCCCTGACCAGCCGTGGCGCCCACTTTCCCGCGCCGTCAAGTGT	
			M V G F A P L T S R G A H S F R A V S V	
NDM_F018	HR		ATGGTCGGCTTCGCTCCCCTGACCAGCCGTGGCGCCCACTTTCCCGCGCCGTCAAGTGT	
			M V G F A P L T S R G A H S F R A V S V	
NDM_F026	HR		ATGGTCGGCTTCGCTCCCCTGACCAGCCGTGGCGCCCACTTTCCCGCGCCGTCAAGTGT	
			M V G F A P L T S R G A H S F R A V S V	
NDM_F027	HR		ATGGTCGGCTTCGCTCCCCTGACCAGCCGTGGCGCCCACTTTCCCGCGCCGTCAAGTGT	
			M V G F A P L T S R G A H S F R A V S V	
NDM_F038	HR		ATGGTCGGCTTCGCTCCCCTGACCAGCCGTGGCGCCCACTTTCCCGCGCCGTCAAGTGT	
			M V G F A P L T S R G A H S F R A V S V	
NDM_F061	HR		ATGGTCGGCTTCGCTCCCCTGACCAGCCGTGGCGCCCACTTTCCCGCGCCGTCAAGTGT	
			M V G F A P L T S R G A H S F R A V S V	
NDM_F106	HR		ATGGTCGGCTTCGCTCCCCTGACCAGCCGTGGCGCCCACTTTCCCGCGCCGTCAAGTGT	
			M V G F A P L T S R G A H S F R A V S V	
NDM_F110	HR		ATGGTCGGCTTCGCTCCCCTGACCAGCCGTGGCGCCCACTTTCCCGCGCCGTCAAGTGT	
			M V G F A P L T S R G A H S F R A V S V	
NDM_F130	HR		ATGGTCGGCTTCGCTCCCCTGACCAGCCGTGGCGCCCACTTTCCCGCGCCGTCAAGTGT	
			M V G F A P L T S R G A H S F R A V S V	
NDM_L078	HR		ATGGTCGGCTTCGCTCCCCTGACCAGCCGTGGCGCCCACTTTCCCGCGCCGTCAAGTGT	
			M V G F A P L T S R G A H S F R A V S V	
	Nucleotides		-----*	360
	Amino acids		-----	120

Fig. 4. (continued) Comparison of deduced nucleotide sequences and amino acids in *TUB2* gene of *C. gloeosporioides* f. sp. *aeschyromene*⁽¹⁾ between carbendazim-resistant *C. gloeosporioides* isolates causing 'Nam Dok Mai' mango anthracnose. ⁽¹⁾Buhr and Dickman (1994), ⁽²⁾Peres *et al.* (2004).

	Phenotype		
U14138 ⁽¹⁾	wild type	CCTGAGCTCA	
		P E L	
NDM_F006	S	CCTGAGCTCA	
		P E L	
NDM_F057	S	CCTGAGCTCA	
		P E L	
NDM_F118	S	CCTGAGCTCA	
		P E L	
NDM_L068	S	CCTGAGCTCA	
		P E L	
NDM_F002	HR	CCTGAGCTCA	
		P E L	
NDM_F038	HR	CCTGAGCTCA	
		P E L	
NDM_F061	HR	CCTGAGCTCA	
		P E L	
NDM_F106	HR	CCTGAGCTCA	
		P E L	
NDM_F110	HR	CCTGAGCTCA	
		P E L	
NDM_F116	HR	CCTGAGCTCA	
		P E L	
NDM_F130	HR	CCTGAGCTCA	
		P E L	
NDM_L078	HR	CCTGAGCTCA	
		P E L	
Nucleotides		-----	430
Amino acids		- - -	143

Fig. 4. (continued) Comparison of deduced nucleotide sequences and amino acids in *TUB2* gene of *C. gloeosporioides* f. sp. *aeschnomene*⁽¹⁾ between carbendazim-resistant *C. gloeosporioides* isolates causing 'Nam Dok Mai' mango anthracnose. ⁽¹⁾Buhr and Dickman (1994), ⁽²⁾Peres *et al.* (2004).

Discussion

C. gloeosporioides causing 'Nam Dok Mai' mango anthracnose, according to their differential carbendazim-resistant phenotypes. HR phenotypes of *C. gloeosporioides* were developed naturally under conditions of continuously applied fungicide that resistance in field. It showed that continuous application enhanced fungal pathogen development against chemical fungicides as reported by many researchers (Sariah, *et al.*, 1989; Farungsang and Farungsang, 1992; Farungsang *et al.*, 1994; Steffen *et al.*, 1996; Sander *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 2007 and Kumar *et al.*, 2007). The appearance of fungicide resistance is a key factor in limiting the efficacy and lifetime of important disease control strategies. This is the worldwide problem of farmer. Therefore, resistance may also be an important aid to our understanding, at a molecular level, of the fungicidal mechanism of action.

Carbendazim fungicide act by inhibition of tubulin biosynthesis (Davidse, 1973 and Ma and Michailides, 2005). Several researchers have reported that fungicide-resistant mutations of almost all fungi are closely associated with the single nucleotide mutation, and results in the mutation of amino acid as well as the structure of fungicide binding point in the *TUB2* (Fujimura *et al.*, 1992 and Gafur *et al.*, 1998). These mutations that confer fungicide resistance have been identified in the *TUB2* homologs from several fungi. This region of the gene was amplified because every identified mutation which confers fungicide resistance in the phytopathogenic fungi (Table 4). In this study, we were analysis of partial sequences of the *TUB2* gene in *C. gloeosporioides* from 'Nam Dok Mai' mango in Thailand that is responsible for carbendazim resistance showed that the typical single

nucleotide mutation converting codon 198 caused HR phenotypes. Only the amino acid mutation at residue 198 was closely correlated with all HR phenotypes. The amino acid mutation of codon 198 in the *TUB2* gene has been identified in fungicide-resistant fungi such as *Botrytis cinerea* causing gray mold disease of a number of crops in Israel (Yarden and Katan, 1993), *C. gloeosporioides* causing postbloom fruit drop disease of citrus in Sao Paulo, Brazil and Florida, United States (Peres *et al.*, 2004) or causing anthracnose diseases of fruit crops in Japan (Chung *et al.*, 2006) or causing anthracnose disease of *Limonium* spp. in Israel (Maymon *et al.*, 2006) or causing anthracnose disease of mango in south China (Ru-lin and Jun-sheng, 2007), *C. gloeosporioides* f. sp. *aeschynomene* from northern jointvetch (Buhr and Dickman, 1994), *Monilinia fructicola* causing brown rot of stone fruits in California (Ma *et al.*, 2003), *Penicillium expansum* causing blue mold disease of stored apples in north America (Sholberg *et al.*, 2005), *Venturia inaequalis* causing scab disease of apple in Michigan and other plant pathogenic fungi (Koenraadt *et al.*, 1992). Besides, different mutation points such as codon 50 in *Fusarium moniliforme* (Yan and Dickman, 1996) or 200 in *C. gloeosporioides* (Chung *et al.*, 2006), *P. aurantiogriseum* *Venturia inaequalis* *V. pirina* (Koenraadt *et al.*, 1992). There were the different codons in the *TUB* gene may result in different resistance levels to chemical fungicide (Koenraadt *et al.*, 1992; Albertini *et al.*, 1999 and Chung *et al.*, 2006). In the present study, *C. gloeosporioides* highly resistant phenotypes to carbendazim also had the amino acid substitution of glutamic (GAG) with alanine (GCG) at codon 198. Therefore, we conclude that mutations in codon 198 of the *TUB2* gene confer phenotype of carbendazim resistance in *C. gloeosporioides*. However, the fungicide resistance may result from single or multiple gene mutation. Resistant phenotypes typically arise from a very low natural rate of genetic mutation, and these isolates are less affected or not inhibited at all by a labeled application rate of this fungicide (Ma and Michailides, 2005). This indicates that careful management of chemical fungicides applications is necessary to achieve effective control.

Acknowledgments

This research is partially supported by the Center for Agricultural Biotechnology, Postgraduate Education and Research Development Office, Commission on Higher Education, Ministry of Education, Thailand. And we would like to thank are also due to Plant Pathology Laboratory, Faculty of Agriculture, Chiang Mai University, Thailand and Kagawa University, Japan.

Table 4. Point mutations of some phytopathogenic fungi at the second beta-tubulin (*TUB2*) gene causing the resistance to fungicide.

Phytopathogenic fungi	Amino acid		Growth on concentration of kind fungicides (phenotype)	Reference
	Substitution	Position		
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	Glu (GAG)-to-Ala (GCG)	198	10 µg of benomyl/ml (resistant) > 100 mg of thiophanate-methyl/l (highly resistant)	Peres <i>et al.</i> , 2004 Chung <i>et al.</i> , 2006
	Phe (TTC)-to-Tyr (TAC)	200	1,000 µg of carbendazim/ml (high resistant) 10-100 mg of thiophanate-methyl/l (intermediately resistant)	Ru-lin and Jun-sheng, 2007 Chung <i>et al.</i> , 2006
<i>C. gloeosporioides</i> f. sp. <i>aeschyromene</i>	Glu (GAG)-to-Ala (GCG)	198	1 µg of benomyl / ml (resistant)	Buhr and Dickman, 1994
<i>Fusarium moniliforme</i>	Tyr(ATC)-to-Asn (AAC)	50	1.5 µg of benomyl / ml (resistant)	Yan and Dickman, 1996
<i>Monilinia fructicola</i>	Glu (GAA)-to-Lys (AAA)	198	slow growth on 50 mg of benomyl/l (highly resistant)	Koenraad <i>et al.</i> , 1992
<i>Penicillium aurantiogriseum</i>	Glu (GAG)-to-Ala (GCG)	198	rapid growth on 50 mg of benomyl/l (very high resistance)	
	Glu (GAG)-to-Lys (AAG)	198	slow growth on 50 mg of benomyl/l (highly resistant)	
	Phe (TTC)-to-Tyr (TAC)	200	5 mg of benomyl /l (medium resistance)	
<i>P. digitatum</i>	Glu (GAG)-to-Lys (AAG)	198	slow growth on 50 mg of benomyl/l (highly resistant)	
	Glu (GAG)-to-Val (GTG)	198	slow growth on 50 mg of benomyl/l (highly resistant)	
<i>P. expansum</i>	Glu (GAG)-to-Ala (GCG)	198	rapid growth on 50 mg of benomyl/l (very high resistance)	
	Glu (GAG)-to-Ala or Val (GCG or GTG)	198	1,000 of benomyl or thiabendazole/ml (highly resistant)	Sholberg <i>et al.</i> , 2005
<i>P. puberulum</i>	Glu (GAG)-to-Ala (GCG)	198	rapid growth on 50 mg of benomyl/l (very high resistance)	Koenraad <i>et al.</i> , 1992
	Glu (GAG)-to-Lys (AAG)	198	slow growth on 50 mg of benomyl/l (highly resistant)	
<i>P. solitum</i>	Glu (GAG)-to-Lys (AAG)	198	1,000 of benomyl or thiabendazole/ml (highly resistant)	Sholberg <i>et al.</i> , 2005
<i>P. viridicatum</i>	Glu (GAG)-to-Lys (AAG)	198	slow growth on 50 mg of benomyl/l (highly resistant)	Koenraad <i>et al.</i> , 1992
<i>Sclerotinia homoeocarpa</i>	Glu (GAG)-to-Lys (AAG)	198	slow growth on 50 mg of benomyl/l (highly resistant)	
<i>Venturia inaequalis</i>	Glu (GAG)-to-Ala (GCG)	198	rapid growth on 50 mg of benomyl/l (very high resistance)	
	Glu (GAG)-to-Lys (AAG)	198	slow growth on 50 mg of benomyl/l (highly resistant)	
	Phe (TTC)-to-Tyr (TAC)	200	5 mg of benomyl /l (medium resistance)	
<i>V. pirina</i>	Glu (GAG)-to-Ala (GCG)	198	rapid growth on 50 mg of benomyl/l (very high resistance)	
	Phe (TTC)-to-Tyr (TAC)	200	5 mg of benomyl /l (medium resistance)	

References

- Albertini, C., Gredt, M. and Leroux, P. (1999). Mutations of the *beta*-tubulin gene associated with different phenotypes of benzimidazole resistance in the cereal eyespot fungi *Tapesia yallundae* and *Tapesia acuformis*. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 64: 17-31.
- Buhr, L.T. and Dickman, M.B. (1994). Isolation, characterization, and expression of a second *beta*-tubulin-encoding gene from *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *aeschyromene*. *Applied and Environmental Microbiology* 60(11): 4155-4159.
- Chung, W-H., Ishii, H., Nishimura, K., Fukaya, M., Yano, K. and Kajitani, Y. (2006). Fungicide sensitivity and phylogenetic relationship of anthracnose fungi isolated from various fruit crops in Japan. *Plant Disease* 90(4): 506-512.
- Davides, C.L. (1986). Benzimidazole fungicides: mechanism of action and biological impact. *Annual Review Phytopathology* 24: 43-65.
- Farungsang, U. and Farungsang, N. (1992). Benomyl resistance of *Colletotrichum* spp. associated with rambutan and mango fruit rot in Thailand. *Acta Horticulturae* 321: 891-897.
- Farungsang, U., Farungsang, N. and Sangchote, S. (1994). Benomyl resistance of *Colletotrichum* species associated with mango and rambutan fruit rots in Thailand. pp. 45-50. In: Johnson, I.G. and Highley, E. (ed.), *Development of Postharvest handling technology for tropical tree fruits: a workshop held in Bangkok, Thailand. July 16-18, 1992*. Watson Ferguson and Co., Brisbane, Australia.
- Fujimura, M., Oeda, K., Inoue, H. and Kato, T. (1992). A single amino-acid substitution in the *beta*-tubulin gene of *Neurospora* confers both carbendazim resistance and diethofencarb sensitivity. *Current Genetics* 21: 399-404.
- Gafur, A., Tanaka, C., Shimizu, K., Ouchi, S. and Tsuda, M. (1998). Molecular analysis and characterization of the *Cochliobolus heterostrophus beta*-tubulin gene and its possible role in conferring resistance to benomyl. *Journal of General and Applied Microbiology* 44: 217-223.
- Kim, Y-S., Min, J.Y., Kang, B.K., Bach, N.V, Choi, W.B., Park, E.W. and Kim, H.T. (2007). Analyses of the less benzimidazole-sensitivity of the isolates of *Colletotrichum* spp. causing the anthracnose in pepper and strawberry. *The Plant Pathology Journal* 23(3): 187-192.
- Koenraadt, H., Somerville, S.C. and Jones, A.L. (1992). Characterization of mutations in the *beta*-tubulin gene of benomyl-resistant field isolates of *Venturia inaequalis* and other plant pathogenic fungi. *Phytopathology* 82(11): 1348-1354.
- Kumar, A.S., Reddy, N.P.E., Reddy, K.H. and Devi, M.C. (2007). Evaluation of fungicidal resistance among *Colletotrichum gloeosporioides* isolates causing mango anthracnose in Agri Export Zone of Andhra Pradesh, India. *Plant Pathology Bulletin* 16: 157-160.
- Ma, Z., and Michailides, T.J. (2005). Advances in understanding molecular mechanisms of fungicide resistance and molecular detection of resistant genotypes in phytopathogenic fungi. *Crop Protection* 24: 853-863.
- Ma, Z., Yoshimura, A.M. and Michailides, T.J. (2003). Identification and characterization of benzimidazole resistance in *Monilinia fructicola* from stone fruit orchards in California. *Applied and Environmental Microbiology* 69(12): 7145-7152.
- Maymon, M., Zveibil, A., Pivonia, S., Minz, D. and Freeman, S. (2006). Identification and characterization of benomyl-resistant and -sensitive populations of *Colletotrichum gloeosporioides* from *Statice* (*Limonium* spp.). *Phytopathology* 96(5): 542-548.
- Office of agricultural economics, Department of agriculture, Thailand. 2008. News/ an article. (Online). Available: http://www.oae.go.th/oae_website (May 18, 2008).

รายงานการประชุมวิชาการพฤกษศาสตร์แห่งประเทศไทย ครั้งที่ 3
Proceeding of the Third Botanical Conference of Thailand

จัดโดย

ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

ร่วมกับ

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช กระทรวงเกษตรและสหกรณ์

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา

และ

สมาคมพฤกษศาสตร์

วันที่ 25-27 มีนาคม พ.ศ. 2552

เนื่องในวาระครบรอบ 50 ปีแห่งการสถาปนา

คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

ณ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

ถนนพระรามที่ 6 เขตราชเทวี กทม. 10400

ISBN 978-974-11-1215-9

ผลของผงจากพืชตระกูลขิงและสารป้องกันกำจัดเชื้อราบางชนิด ต่อเชื้อรา *Colletotrichum* spp. สาเหตุโรคแอนแทรกโนสของมะม่วง ที่ต้านทานสารป้องกันกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิม

Effect of Ginger Powder and Some Fungicide on Carbendazim-Resistant

Colletotrichum spp. Causing Mango Anthracnose

พรประพา คงตระกูล^{1,2}, สุธาสิณี ชัยชนะ³ และ สรัญญา ณ ลำปาง^{1,2,*}

¹ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จ. เชียงใหม่ 50200

²ศูนย์ด้านเทคโนโลยีชีวภาพ, สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี, สำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษา

³สถาบันวิจัยเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จ. เชียงใหม่ 50200

* Corresponding author: sarunya@chaingmai.ac.th

บทคัดย่อ

เชื้อรา *Colletotrichum* spp. สาเหตุโรคแอนแทรกโนสของมะม่วงจำนวน 150 ไอโซเลท แยกโดยวิธี tissue transplanting technique นำมาทดสอบความต้านทานต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิม 6 ระดับความเข้มข้น ดังนี้ 0.1, 1, 10, 100, 500 และ 1000 มิลลิกรัมต่อลิตร พบเชื้อราสายพันธุ์ต้านทาน (Car^R) จำนวน 115 ไอโซเลท (76.6%) และเชื้อราสายพันธุ์อ่อนแอ (Car^S) จำนวน 35 ไอโซเลท (23.4%) นำมาทดสอบประสิทธิภาพของสารป้องกันกำจัดเชื้อรา 6 ชนิด (benomyl, captan, carboxin, carbendazim, copper oxychloride, และ mancozeb) ตามอัตราแนะนำ พบว่า captan, carboxin และ mancozeb ควบคุมเชื้อราสายพันธุ์ Car^R และ Car^S ได้ประสิทธิภาพสูงสุด 100% นอกจากนี้ สาร benomyl และ carbendazim ควบคุมเชื้อราสายพันธุ์ Car^S ได้ 100% เช่นกัน ส่วนสารป้องกันกำจัดเชื้อรา copper oxychloride ไม่มีประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อราทั้ง 2 สายพันธุ์ แต่โคโลนีที่ปรากฏแตกต่างจากชุดควบคุม เมื่อทดสอบประสิทธิภาพจากผงกระชาย ข่า และ ขิง ที่ 6 ระดับความเข้มข้น ได้แก่ 0.1, 0.3, 0.5, 1, 3 และ 5% พบว่าขิงและข่าที่ความเข้มข้น 5% มีประสิทธิภาพยับยั้งเชื้อราสายพันธุ์ Car^R เท่ากับ 56.34% และ 54.83% ตามลำดับ ส่วนกระชายที่ความเข้มข้น 5% ยับยั้งเฉพาะเชื้อราสายพันธุ์ Car^S เท่ากับ 61.91%

คำสำคัญ: เชื้อราต้านทานสารเคมี, สารสกัดจากพืช, เชื้อราสาเหตุโรคพืช, *Colletotrichum*

Abstract

One hundred and fifty isolates of *Colletotrichum* spp. were isolated from mango anthracnose disease by tissue transplanting technique. The carbendazim resistance test was conducted to all isolates at various concentrations: 0.1, 1, 10, 100, 500 and 1,000 mg/l. The result showed that 115 isolates (76.6%) were carbendazim highly resistance (Car^R) and 35 isolates (23.4%) were carbendazim sensitive (Car^S). Six fungicides (benomyl, captan, carboxin, carbendazim, copper oxychloride and mancozeb) with a final concentration of its standard field recommendation rate were assessed for their effectiveness to control Car^R and Car^S strains. The results indicated that captan, carboxin and mancozeb showed 100% effectiveness to control both Car^R and Car^S strains, but benomyl and carbendazim were only able to control Car^S strain (100%). Copper oxychloride was not effective to control both strains, but the colony appearance distinct from control. The efficacy of *Alpinia galanga* (galangal), *Boesenbergia pandurata* (fingerroot) and *Zingiber officinale* (ginger) at various concentrations: 0.1, 0.3, 0.5, 1, 3 and 5% (w/v) was also tested against Car^R and Car^S strains. The results showed that crude extract from ginger and galangal at 5% concentration were the most effective to control Car^R strain with 56.34 and 54.83% inhibition activities, respectively. However, fingerroot at 5% concentration showed the highest activity in controlling only Car^S strains with 61.91% inhibition activity.

Key words: fungicides resistance, phytopathogen, plant extract, *Colletotrichum*



บทนำ

มะม่วง (*Mangifera indica* L.) อยู่ในตระกูล Anacardiaceae เป็นไม้ผลที่สำคัญทางเศรษฐกิจชนิดหนึ่งของประเทศไทย สามารถสร้างรายได้ให้แก่เกษตรกรเป็นอย่างดี เนื่องจากมีการซื้อขายภายในประเทศและส่งออกไปยังต่างประเทศ ทั้งในรูปผลสดและแปรรูป (สำนักงานเศรษฐกิจเกษตรกรรม วิชาการเกษตร, 2551) ประกอบกับอุดมด้วยคุณค่าทางโภชนาการสูง โดยเฉพาะวิตามินเอ และ บี (Singh *et al.*, 2008) แต่ปัญหาสำคัญในการผลิตมะม่วงเพื่อการค้าคือ การเข้าทำลายของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* สาเหตุของโรคแอนแทรกโนส (anthracnose) (นิพนธ์, 2542) โดยเข้าทำลายมะม่วงได้ทั้งส่วนใบและผล ทำความเสียหายแก่มะม่วงทั้งก่อนและหลังการเก็บเกี่ยว (อรุณี, 2533) ซึ่งอาการบนใบเริ่มจากเกิดจุดแผลเล็กๆ สีเหลืองอ่อนและขยายใหญ่เห็นเป็นจุดแผลสีน้ำตาลรูปร่างไม่แน่นอน หากเกิดบนใบที่อ่อนมากๆ ผลจะขยายตัวอย่างรวดเร็ว ทำให้ใบแห้งหรือบิดเบี้ยว ส่วนอาการบนผลเริ่มจากจุดสีน้ำตาลเข้มถึงสีดำรูปร่างกลมขนาดไม่แน่นอน แล้วขยายเป็นแผลใหญ่ค่อนข้างกลมสีน้ำตาลเข้มถึงสีดำ เนื้อเยื่อบริเวณแผลยุบเล็กน้อย (นิพนธ์, 2531; 2542) สำหรับการป้องกันกำจัดโรคนี้นี้ได้ผลดีและรวดเร็วคือ การใช้สารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อรา โดยเฉพาะสารกลุ่มเบนซิมิดาโซล (benzi- midazole) เช่น คาร์เบนดาซิม (carbendazim), เบนโนมิล (benomyl) หรือ ไธเบนดาโซล (thiabendazol) เป็นต้น สารเคมีกลุ่มนี้เป็นสารประเภทดูดซึม (systemic fungicide) สามารถควบคุมเชื้อราชนิดนี้ได้เป็นอย่างดีมีประสิทธิภาพ (นิพนธ์, 2531; อรุณี, 2533) เกษตรกรส่วนใหญ่จึงนิยมใช้อย่างกว้างขวาง ขวางเพื่อป้องกันกำจัดโรคดังกล่าว ด้วยเหตุที่การใช้สารเคมีประเภทนี้ติดต่อกันเป็นเวลานาน หรือใช้เกินอัตราแนะนำ จะส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมให้เกิดการพัฒนา หรือปรับตัวเองเพื่อความอยู่รอด จนเกิดการกลายพันธุ์เป็นสายพันธุ์ที่ต้านทานสารป้องกันกำจัดเชื้อรา (fungicide resistance) ขึ้นได้ (ธรรมาศักดิ์, 2543) ซึ่งลักษณะความต้านทานของเชื้อราที่สามารถถ่ายทอดสู่รุ่นลูกหลาน จนกระทั่งเพิ่มปริมาณมากขึ้นในธรรมชาติ ทำให้ประสบปัญหาการแพร่ระบาดของโรคภายในแปลงปลูก จึงทำให้การใช้สารเคมีในการป้องกันกำจัดโรคดังกล่าวไม่ได้ผล ดังนั้น การควบคุมโรคพืชโดยการใช้น้ำส้มชั่งฉีด (contact fungicide) หมุนเวียนในแปลงปลูกสลับกับสารป้องกันกำจัดเชื้อราชนิดดูดซึม (systemic fungicide) ตลอดจนการใช้สารจากธรรมชาติ เช่น จากพืช จึงเป็นทางเลือกหนึ่งที่จะช่วยลดปัญหาการต้านทานต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อรา โดยในการศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อหาวิธีที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อรา *Colletotrichum* spp. สาเหตุโรคแอนแทรกโนสของมะม่วงสายพันธุ์ที่ต้านทานสารป้องกันกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิม อันจะนำไปสู่การหาวิธีที่เหมาะสมในการควบคุมโรคแอนแทรกโนสของมะม่วงได้อย่างถูกต้องและมีประสิทธิภาพ โดยศึกษาประสิทธิภาพของสารป้องกันกำจัดเชื้อราชนิดต่างๆ ตามที่กรมวิชาการเกษตรแนะนำ เพื่อนำสารเคมีที่มีประสิทธิภาพชนิด contact fungicide มาใช้ทดแทนสารในกลุ่มเบนซิมิดาโซล และการนำสารจากพืชตระกูลขิงมาใช้ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา เนื่องจากมีรายงานว่าพืชตระกูลขิงมีฤทธิ์ ภาพในการควบคุมเชื้อราโรคพืชได้หลายชนิด ซึ่งสามารถควบคุมการเจริญเส้นใยของเชื้อรา *C. capsici*, *C. gloeosporioides*, *Dothiorella* sp., *Pestalotiopsis* sp., *Lasioidiplodia theobromae*, *Pestalotiopsis* sp. และ *P. aphanidermatum* ได้ (สุภัทรา, 2548) พืชตระกูลขิงเป็นพืชที่หาได้ง่ายทั่วไปสามารถขยายตัวได้ง่ายและมีความเป็นพืชต่ำต่อสัตว์เลื้อยคลานด้วยนม อีกทั้งการใช้สารสกัดจากพืชในการควบคุมโรคนั้น เป็นการช่วยลดปัญหาสารเคมีตกค้างในพืชและในดิน ส่งผลไม่ให้เกิดมลพิษต่อสภาพแวดล้อม และปลอดภัยต่อผู้บริโภค

อุปกรณ์และวิธีการ

การทดลองที่ 1 การแยกและเก็บรวบรวมเชื้อรา *Colletotrichum* spp. สาเหตุโรคแอนแทรกโนสของมะม่วง

เก็บรวบรวมตัวอย่างจากใบและผลมะม่วงที่แสดงอาการโรคแอนแทรกโนสจากตลาดและสวน ตรวจดูเชื้อจากผลภายใต้กล้อง stereo จากนั้นแยกเชื้อ

ราโดยวิธี tissue transplanting technique ตัดชิ้นพืชบริเวณแผลกับเนื้อเยื่อปกติให้มีขนาดประมาณ 0.5x0.5 เซนติเมตร นำเชื้อที่ผิวโดยแช่ใน sodium hypochlorite (Clorox 10%) ระยะเวลา 2 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่น นึ่งฆ่าเชื้อ 5 นาที ขั้วชิ้นพืชให้แห้งด้วยกระดาษกรองที่ผ่านการฆ่าเชื้อ นำชิ้นพืชวางบนอาหาร potato dextrose agar (PDA) บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 3-4 วัน เมื่อสังเกตเห็นเส้นใยเชื้อราเจริญออกจากชิ้นส่วนพืช จึงแยกบริเวณปลายเส้นใยมาวางบนอาหาร PDA บ่มเชื้อเป็นเวลา 10 วัน ที่อุณหภูมิห้อง เพื่อศึกษาลักษณะโคโลนีและสปอร์ โดยแยกเก็บเชื้อส่วนหนึ่งไว้ใน PDA slant สำหรับใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

การทดลองที่ 2 การตรวจสอบความต้านทานสารป้องกันกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิมของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. สาเหตุโรคแอนแทรกโนสของมะม่วง

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ผสมสารป้องกันกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิมที่ระดับความเข้มข้น 0.1, 1, 10, 100, 500 และ 1,000 mg/l ใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3 มิลลิเมตร ตัดบริเวณขอบโคโลนีของเชื้อราที่เลี้ยงบนอาหาร PDA อายุ 7 วัน วางบนอาหาร PDA ที่ผสมสารป้องกันกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิมที่ระดับความเข้มข้นดังกล่าว บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง บันทึกขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อรา เปรียบเทียบกับชุดควบคุม (อาหาร PDA ที่ไม่ผสมสารป้องกันกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิม) ทดลองความเข้มข้น 5 ซ้ำ โดยประเมินระดับความต้านทานตามหลักเกณฑ์ใน ข้อ A และ B ซึ่งดัดแปลงจาก Koenraad *et al.* (1992) และ Peres *et al.* (2004) ดังนี้

การทดลองที่ 3 ทดสอบประสิทธิภาพของสารป้องกันกำจัดเชื้อรา ในการควบคุมการเจริญของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. สาเหตุโรคแอนแทรกโนสของมะม่วง

ทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใย ด้วยวิธี poisoned food technique โดยใช้สารเคมีป้องกันกำจัดโรคพืชกลุ่มดูดซึม (systemic fungicide) และกลุ่มสัมผัส (contact fungicide) ตามที่เกษตรกรส่วนใหญ่ใช้ จำนวน 6 ชนิด ได้แก่ benomyl, captan, carbendazim, carboxin, copper oxychloride และ mancozeb ที่ได้รับการขึ้นทะเบียนจากกรมวิชาการเกษตร (2549) โดยใช้สารป้องกันกำจัดตามอัตราแนะนำ ดังตารางที่ 2 ผสมในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เทใส่จานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร ประมาณ 15 มิลลิเมตร จากนั้นใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร ตัดบริเวณขอบโคโลนีเชื้อรา *Colletotrichum* spp. สายพันธุ์ Car^r และสายพันธุ์ Car^s ที่เลี้ยงบนอาหาร PDA อายุ 7 วัน วางบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมสารป้องกันกำจัดโรคพืชดังกล่าว โดยทดสอบจำนวน 4 ซ้ำ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง บันทึกลักษณะโคโลนี และวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี เพื่อคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใย เปรียบเทียบลักษณะโคโลนีกับชุดควบคุมทั้งสองสายพันธุ์

การทดลองที่ 4 ทดสอบประสิทธิภาพของผงกระชาย ข่า และขิง ในการควบคุมการเจริญของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. สาเหตุโรคแอนแทรกโนสของมะม่วง

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้ออาหารดังกล่าวที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นผสมผงกระชาย ข่า และขิง ที่ 6 ระดับความเข้มข้นดังนี้ 0.1, 0.3, 0.5, 1, 3 และ 5% แล้วใส่จานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร ประมาณ 15 มิลลิเมตร จากนั้นทดสอบการยับยั้งการเจริญของเส้นใย โดยวิธี culture disc technique โดยใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร ตัดบริเวณขอบโคโลนีเชื้อรา *Colletotrichum* spp. สายพันธุ์ Car^r และสายพันธุ์ Car^s ที่เลี้ยงบนอาหาร PDA อายุ 7 วัน วางลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ การทดลองละ 4 ซ้ำ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องจนเส้นใยเชื้อราในชุดควบคุมเจริญเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อ บันทึกขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีเพื่อคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง

A. วัดการเจริญได้ของเชื้อราบนอาหาร PDA ที่ผสมสารป้องกันกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิม

$$\text{เปอร์เซ็นต์การเจริญของเชื้อรา} = \frac{\text{ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีชุดทดสอบ}}{\text{ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีชุดควบคุม}} \times 100$$

(เทียบกับชุดควบคุม)

จากนั้นนำเปอร์เซ็นต์การเจริญของเชื้อราที่ได้ เปรียบเทียบกับชุดควบคุม ดังนี้

- = เชื้อราที่เจริญได้ < 10 % เมื่อเทียบกับชุดควบคุม
- + = เชื้อราที่เจริญได้ตั้งแต่ 10% แต่ไม่ถึง 35% เมื่อเทียบกับชุดควบคุม
- ++ = เชื้อราที่เจริญได้ตั้งแต่ 35% แต่ไม่ถึง 65% เมื่อเทียบกับชุดควบคุม
- +++ = เชื้อราที่เจริญได้ตั้งแต่ 65% แต่ไม่ถึง 90% เมื่อเทียบกับชุดควบคุม
- ++++ = เชื้อราที่เจริญได้ตั้งแต่ 90% ขึ้นไปเมื่อเทียบกับชุดควบคุม

B. จัดระดับความต้านทานต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิมเป็น 4 ระดับ (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 หลักเกณฑ์การจัดระดับความต้านทานสารป้องกันกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิม (Koenraad et al., 1992; Peres et al., 2004)

Strains	Resistant levels	Carbendazim concentration (mg/l)					
		0.1	1	10	100	500	1,000
Car ^S	Sensitive (S)	/	X	X	X	X	X
	Weakly resistance (WR)	/	/	X	X	X	X
	Moderately resistance (MR)	/	/	/	/	X	X
Car ^R	Highly resistance (HR)	/	/	/	/	/	X
		/	/	/	/	/	/

- Car^S = เชื้อราสายพันธุ์อ่อนแอต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิม
- Car^R = เชื้อราสายพันธุ์ต้านทานสารป้องกันกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิม
- X = เชื้อราที่เจริญไม่ได้ หรือเจริญได้น้อยกว่า 10 % เมื่อเทียบกับชุดควบคุม
- / = เชื้อราที่เจริญได้ตั้งแต่ 10% ขึ้นไป เมื่อเทียบกับชุดควบคุม

ผลการวิจัย

การทดลองที่ 1 การแยกและเก็บรวบรวมเชื้อรา *Colletotrichum* spp. สาเหตุโรคแอนแทรกโนสของมะม่วง

เก็บตัวอย่างใบและผลของมะม่วง ที่แสดงอาการโรคแอนแทรกโนส พบอาการบนใบเป็นจุดผลสีน้ำตาลรูปร่างไม่แน่นอน เนื้อเยื่อตรงกลางผลฉีกขาด ใบที่อ่อนมากๆ ผลจะขยายตัวอย่างรวดเร็ว ทำให้ใบแห้งหรือบิดเบี้ยวเสียรูปทรง (ภาพที่ 1ก) ส่วนอาการบนผลที่แก่จัดหรือผลสุก เริ่มจากจุดสีน้ำตาลเข้มถึงสีดำรูปร่างกลมขนาดไม่แน่นอน จากนั้นขยายเป็นแผลใหญ่ค่อนข้างกลมสีน้ำตาลเข้มถึงสีดำ (ภาพที่ 1ข) เนื้อเยื่อบริเวณแผลยุบตัวกว่าระดับเดิม เล็กน้อย ตรงกลางแผลอาจพบเม็ดแข็งเล็กๆ สีดำเรียงเป็นวงซ้อนกันเป็นชั้น หรืออาจมีกลุ่มสปอร์ลักษณะเป็นของเหลวข้นสีส้มอยู่บริเวณกลางแผลบนผลมะม่วง (ภาพที่ 1ค)

จากการแยกเชื้อราโดยวิธี tissue transplanting technique ได้จำนวน 150 ไอโซเลท และศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราที่แยกได้ พบว่าเชื้อราทั้งหมดมีลักษณะโคโลนีบนอาหาร PDA ดังนี้ เมื่ออ่อนเส้นใยมีสีขาว สีขาวปนเทา สีเทาอ่อน และสีเทาเข้มเจริญเต็มจานเลี้ยงเชื้อประมาณ 7-10 วัน (ภาพที่ 2ก) บางไอโซเลทสร้างกลุ่มสปอร์สีส้ม และพบเม็ด sclerotium สีดำ (ภาพที่ 2ข) ฝังตัวอย่างในอาหาร PDA ลักษณะสปอร์รูปทรงกระบอกหัวท้ายมน (cylindrical) เซลล์เดี่ยว ไซ ขนาด 4.2-5.1 x 15.4-20.6 μm (ภาพที่ 2ค) จากลักษณะดังกล่าวจัดจำแนกเชื้อราสาเหตุได้เป็น *Colletotrichum gloeosporioides* ตามหลักเกณฑ์ของ Sutton (1980)

การทดลองที่ 2 การตรวจสอบความต้านทานสารป้องกันกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิมของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. สาเหตุโรคแอนแทรกโนสของมะม่วง

นำเชื้อราบริสุทธิ์ที่แยกได้ มาตรวจสอบความต้านทานสารป้องกันกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิมบนอาหาร PDA ที่ผสมสารป้องกันกำจัดเชื้อราคาร์

เบนดาซิมที่ 6 ระดับความเข้มข้นดังนี้ 0.1, 1, 10, 100, 500 และ 1000 mg/l (ภาพที่ 3) พบเชื้อราที่ต้านทานสารป้องกันกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิมในระดับสูง (highly resistant: HR), ระดับปานกลาง (moderately resistant: MR) และเชื้อราที่อ่อนแอต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิม (sen -sitive: S) จำนวน 113 ไอโซเลท (75.3%), 2 ไอโซเลท (1.4%) และ 35 ไอโซเลท (23.3%) ตามลำดับ (ตารางที่ 3)

การทดลองที่ 3 ทดสอบประสิทธิภาพของสารป้องกันกำจัดเชื้อรา ในการควบคุมการเจริญของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. สาเหตุโรคแอนแทรกโนสของมะม่วง

จากการทดสอบประสิทธิภาพของสารป้องกันกำจัดเชื้อรา 6 ชนิด ได้แก่ benomyl, captan, carboxin, carbendazim, copper oxychloride และ mancozeb ที่ความเข้มข้นตามอัตราแนะนำในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อรา พบว่า สารป้องกันกำจัดเชื้อราที่มีประสิทธิภาพยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อราสายพันธุ์ Car^R และ Car^S ได้ 100% คือ captan, carboxin และ mancozeb นอกจากนี้ สาร benomyl และ carbendazim ยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อราสายพันธุ์ Car^S 100% เช่นกัน ส่วนสารป้องกันกำจัดเชื้อรา copper oxychloride ยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อราสายพันธุ์ Car^R และ Car^S ได้เพียง 41.12 และ 40.14% ตามลำดับ (ตารางที่ 4) นอกจากนี้ สาร copper oxychloride ยังมีส่วนทำให้เส้นใยมีลักษณะเปลี่ยนแปลงไป โดยเส้นใยสีส้มแบนเจริญติดผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ และโคโลนีเปลี่ยนจากสีขาวเป็นสีเหลืองอ่อนหรือสีน้ำตาลเข้ม (ภาพที่ 4)

การทดลองที่ 4 ทดสอบประสิทธิภาพของผงกระชาย ข่า และขิง ในการควบคุมการเจริญของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. สาเหตุโรคแอนแทรกโนสของมะม่วง

จากการทดสอบประสิทธิภาพของผงกระชาย ข่า และขิง ที่ 6 ระดับความเข้มข้นดังนี้ 0.1, 0.3, 0.5, 1, 3 และ 5% ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใย



ตารางที่ 2 สารป้องกันกำจัดโรคพืชที่ใช้ในการทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. สาเหตุโรคแอนแทรกโนส

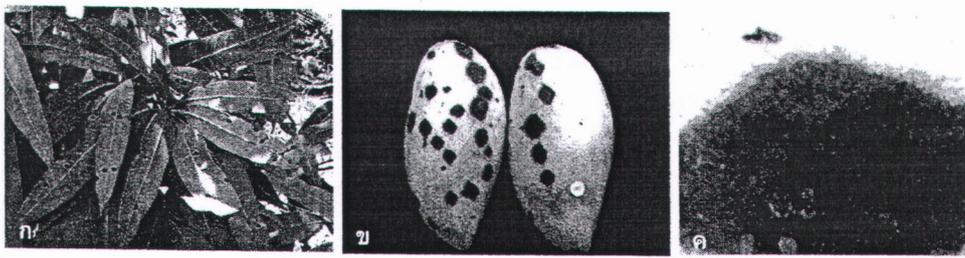
Fungicide common name	Recommended conctn. (mg/l)
1. benomyl	500
2. carbendazim	500
3. carboxin	525
4. captan	1,250
5. copper oxychloride	2,150
6. mancozeb	200

ของเชื้อรา พบว่าขิงและข่าที่ความเข้มข้น 5% มีประสิทธิภาพยับยั้งเชื้อราสายพันธุ์ที่ต้านทานต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อราคาเบนดาซิม (Car^R) ได้เท่ากับ 56.34 และ 54.83% ตามลำดับ ซึ่งสมุนไพรทั้ง 2 ชนิดนี้มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อราได้ไม่แตกต่างกันที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ส่วนกระชายที่ความเข้มข้น 3 และ 5% ยับยั้งเชื้อราสายพันธุ์อ่อนแอต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อราคาเบนดาซิม (Car^S) ได้เท่ากับ 52.20 และ 61.91% ตามลำดับ (ตารางที่ 5, ภาพที่ 5)

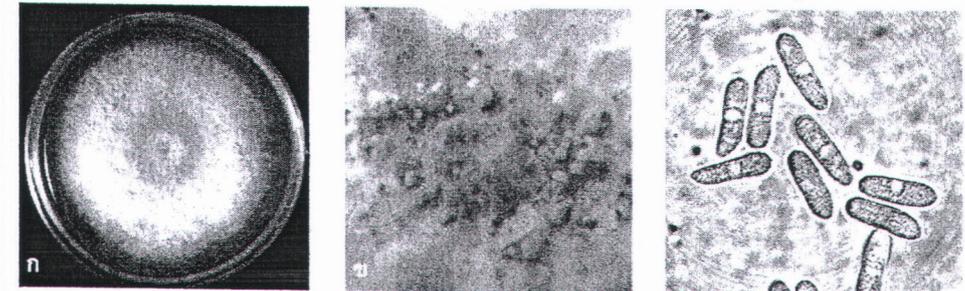
วิจารณ์ผล

จากการประเมินความต้านทานสารป้องกันกำจัดเชื้อรา คาร์เบนดาซิมของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. สาเหตุโรคแอนแทรกโนสของมะม่วง จำนวน 150 ไอโซเลท พบเชื้อราสายพันธุ์ Car^R สูงถึง 76.7% เนื่องจากการผลิตมะม่วงในประเทศไทย เกษตรกรส่วนใหญ่นิยมใช้สารป้องกันกำจัดเชื้อราชนิดนี้อย่างกว้างขวางและต่อเนื่องเป็นเวลานาน จึงทำให้เกิดการกลายพันธุ์ของเชื้อราเพราะต้องปรับตัวให้อยู่รอดได้ในธรรมชาติ ซึ่งสอดคล้องกับที่ Spalding (1982) และ Jeffries *et al.* (1990) รายงานว่าสารป้องกันกำจัดเชื้อราชนิดดูดซึม (systemic fungicide) ทั้ง benomyl และ carbendazim ชักนำให้เชื้อต้านทานต่อสารเคมีกลุ่มนี้ได้ ส่งผลให้ประสิทธิภาพในการควบคุมโรคนี้น้อยลง หรือแทบจะควบคุมไม่ได้ ซึ่งธรรมศักดิ์ (2543) กล่าวว่า การกลายพันธุ์ของเชื้อราเพื่อให้ต้านทานต่อสารเคมีเกิดขึ้นหลังจากที่มีการใช้สารเคมีนั้นๆ ติดต่อกันเป็นเวลานานและต่อเนื่อง และความต้านทานต่อสารป้องกันกำจัดโรคพืชชนิดดูดซึม (systemic fungicide) จะเกิดขึ้นได้เร็วกว่าสารป้องกันกำจัดโรคพืชชนิดสัมผัส (contact fungicide) โดยความต้านทานต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อราชนิดดูดซึมจะ

เกิดขึ้นภายหลังจากที่มีการใช้ติดต่อกันนาน 2-3 ปีเท่านั้น และการกลายพันธุ์ดังกล่าวสามารถถ่ายทอดทางพันธุกรรมสู่รุ่นลูกหลานได้ เกิดเชื้อสายพันธุ์ต้านทานต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อราสาเหตุโรคพืชเพิ่มปริมาณมากขึ้นในธรรมชาติ ส่งผลกระทบต่อเกษตรกรผู้ปลูกพืช เมื่อใช้สารป้องกันกำจัดโรคดังกล่าวแล้ว ไม่สามารถควบคุมเชื้อสาเหตุของโรคพืชได้ นอกจากนั้นต้องสิ้นเปลืองเงินทุนการผลิต และสูญเสียเวลาโดยไม่จำเป็น สำหรับการทดสอบประสิทธิภาพของสารป้องกันกำจัดเชื้อรา ตามอัตราแนะนำ 6 ชนิด ได้แก่ benomyl, carbendazim, captan, carboxin, copper oxychloride และ mancozeb เพื่อควบคุมเชื้อรา *Colletotrichum* spp. พบว่าสารป้องกันกำจัดเชื้อราที่มีประสิทธิภาพควบคุมได้สูงถึง 100% คือ captan, carboxin และ mancozeb ซึ่งสารเคมีดังกล่าวเป็นสารป้องกันกำจัดโรคพืช ที่กรมวิชาการเกษตร (2549) แนะนำให้ใช้หมุนเวียนในแปลงปลูกสลับกับสารป้องกันกำจัดเชื้อรา carbendazim เพื่อป้องกันการกลายพันธุ์ของเชื้อรา ส่วนการนำสาร benomyl ซึ่งเป็นสารเคมีกลุ่มเดียวกับสาร carbendazim (กลุ่ม benzimidazole) มาใช้ในการทดลอง เนื่องจากต้องการศึกษาด้านต้านทานข้าม (cross resistance) ซึ่งพบว่าสารป้องกันกำจัดเชื้อรา benomyl มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคได้เพียงเล็กน้อย และจากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าการใช้สารเคมีในกลุ่มเดียวกันนี้น่าจะก่อให้เกิดความต้านทานข้าม ซึ่งหมายถึงเชื้อราดังกล่าวสามารถต้านทานต่อสารเคมีในกลุ่มเดียวกัน ได้มากกว่า 1 ชนิด สอดคล้องกับรายงานการเกิดความต้านทานข้ามต่อสารเคมีในกลุ่ม benzimidazole ในเชื้อราหลายชนิดเช่น *Colletotrichum capsici* (Sariah, 1989) *C. gloeosporioides* (Wen-Hsin *et al.*, 2006) *Penicillium* spp. (Sholberg *et al.*, 2004) *Venturia inaequalis* (Koenraadt *et al.*, 1992) เป็นต้น และจากการทดสอบประสิทธิภาพของกระชาย ข่า และขิง เพื่อควบคุมเชื้อรา *Colletotrichum* spp. พบว่ากระชายที่ความเข้มข้น 5% มีประสิทธิภาพดีที่สุด โดยยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อรา Car^S ได้เท่ากับ 61.91% นอกจากนี้ ขิงและข่าที่ความเข้มข้น 5% มีประสิทธิภาพยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อรา Car^R ได้ เท่ากับ 56.34 และ 54.83% ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ สุภัทรา (2548) ที่ศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดน้ำมันระเหยที่ได้จากสมุนไพรขิง 3 ชนิด คือ กระชาย ข่า และขิง ในการควบคุมการเจริญของเส้นใยของเชื้อราสาเหตุโรคพืช พบว่า น้ำมันระเหยจากกระชายผสมในอาหาร PDA ความเข้มข้น 1,000 μ g/l มีผลทำให้เชื้อรา *C. capsici*, *Dothiorella* sp. และ *Pytium aphanidermatum* เจริญไม่ได้บนอาหาร และเชื้อรา *Pestalotiopsis* sp. เจริญลดลง 88% สำหรับน้ำมันระเหยจากขิงความเข้มข้น 1,000 μ g/l มีผลทำให้การเจริญของเชื้อรา *C. gloeosporioides*, *Lasiodiplodia theobromae*, *Pestalotiopsis* sp. และ *P. aphanidermatum* ลดลงเช่นกัน



ภาพที่ 1 ลักษณะอาการโรคแอนแทรกโนสบนใบและผลมะม่วง; (ก) อากาบบนใบ, (ข) อากาบบนผล และ (ค) กลุ่มสปอร์สีส้มบนแผ่นของผลมะม่วง



ภาพที่ 2 ลักษณะทางฐานวิทยาของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรกโนสของมะม่วง; (ก) โคลนีนบนอาหาร potato dextrose agar อายุ 10 วัน, (ข) กลุ่มสปอร์สีส้ม และเม็ด sclerotium สีดำ และ (ค) โคนินเดี่ยว (100X)

สรุป

จากการแยกเชื้อรา *Colletotrichum* spp. สาเหตุโรคแอนแทรกโนสของมะม่วงจำนวน 150 ไอโซเลท และตรวจสอบความต้านทานต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิม พบเชื้อรากลุ่มสายพันธุ์ Car^R จำนวน 115 ไอโซเลท และเชื้อราสายพันธุ์ Car^S จำนวน 35 ไอโซเลท เมื่อนำมาทดสอบประสิทธิภาพของสารป้องกันกำจัดเชื้อราตามอัตราแนะนำ พบว่า captan, carbosin และ mancozeb ควบคุมเชื้อราสายพันธุ์ Car^R และสายพันธุ์ Car^S ได้ประสิทธิภาพสูงสุด 100% ส่วนสารป้องกันกำจัดเชื้อรา copper oxychloride ไม่มีประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อราทั้ง 2 สายพันธุ์ และประสิทธิภาพของผงกระชาย ชิง และฆ่า ฟ่าง ชิงและฆ่าที่ความเข้มข้น 5% ยับยั้งการเจริญของเชื้อราสายพันธุ์ Car^R ได้ดีที่สุด เท่ากับ 56.34 และ 54.83% ตามลำดับ ส่วนกระชายที่ความเข้มข้น 5% ยับยั้งเฉพาะเชื้อราสายพันธุ์ Car^S ได้เท่ากับ 61.91%

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยจากศูนย์ด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร, สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี, สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา

เอกสารอ้างอิง

กรมวิชาการเกษตร. 2549. ข้อมูลนำเข้าวัตถุอันตรายทางการเกษตรปี 2546. (ระบบออนไลน์). แหล่งข้อมูล : <http://www.doa.go.th/toxic-46.pdf> (20 พฤษภาคม 2549).

ธรรมศักดิ์ สมมาตรย์. 2543. สารเคมีป้องกันกำจัดโรคพืช. สำนักพิมพ์วิบูลย์, กรุงเทพฯ. 371 หน้า

นิพนธ์ วิสารทนนท์. 2531. โรคไม้ผล. ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 286 หน้า.

นิพนธ์ วิสารทนนท์. 2542. โรคไม้ผลเขตร้อนและการป้องกันกำจัด. ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 172 หน้า.

สุภัทรา จามกระโทก, ชัยณรงค์ รัตนกริชากุล, ชลิตา เล็กสมบูรณ์, นवलวรรณ ฟารุ่งสา และ อุดม ฟารุ่งสา. 2548. ผลของสารสกัดหยาบจากพืชสมุนไพรบางชนิดในการต่อต้านราสาเหตุโรคพืชหลังการเก็บเกี่ยว. หน้า 142. เอกสารประกอบการสัมมนาทางวิชาการวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยว ครั้งที่ 3. 10-11 ตุลาคม 2548. โรงแรมกิฬีวิมานรีสอร์ท จ. เพชรบุรี

สำนักงานเศรษฐกิจเกษตร กรมวิชาการเกษตร. 2551. ข้อมูลการส่งออกสินค้ามะม่วง. (ระบบออนไลน์). แหล่งข้อมูล: <http://www.oae.go.th/oae> (18 พฤษภาคม 2551).

อรุณี พวงมี. 2533. การควบคุมโรคผลเน่าของมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้ระยะก่อนและหลังเก็บเกี่ยว. วิทยานิพนธ์ปริญญา- ฑูโท. ภาควิชาโรคพืช มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

Jeffries, P., J. C. Dodd., M. J. Jeger. and R. A. Plumbley. 1990. The biology and control of *Colletotrichum* species on tropical fruit crops. *Plant Pathology* 39: 343-366.

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

Peres, A.R.N., N.L. Souza, T.L. Peever, and L.W. Timmer. 2004. Benomyl sensitivity of Isolates of *Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides* from citrus. *Plant Disease* 88 (2): 125-130.

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

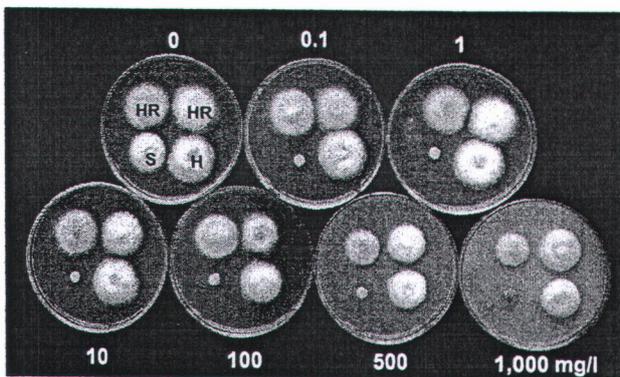
Singh, B. S., I. Mukherjee, J. Maisnam, P. Kumar, M. Gopal and G. Kulshrestha. 2008. Determination of pesticide residues in IPM and non-IPM sample of mango (*Mangifera indica*). *Journal of Environment Science and Health*. 43: 300-306.

Sholberg, P.L., C. Harlton, P. Haag, C.A. Lévesque, D.O'Gorman and K. Seifert. 2004. Benzimidazole and diphenylamine sensitivity and identity of *Penicillium* spp. that cause post harvest blue mold of apples using β -tubulin gene sequences. *Postharvest Biology and Technology* 36: 41-49.

Spalding, D. H. 1982. Resistance of mango pathogens to fungicides used to control postharvest diseases. *Plant Disease* 66: 1185-1186.

Sutton, C.B. 1980. The coelomycetes: fungi imperfect with pycnidia acervuli and stromata. CMI. Kew Surrey, England. 696 p.

Wen-Hsin, C., I. Hideo. and N. Kumiko. 2006. Fungicide sensitivity and phylogenetic relationship of anthracnose fungi isolated from various fruit crop in Japan. *Plant Disease* 90: 506-512.



ภาพที่ 3 การตรวจสอบความต้านทานของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. สาเหตุโรคแอนแทรกโนสของมะม่วงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ potato dextrose agar ที่ผสมสารป้องกันกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิม ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 วัน

ตารางที่ 3 เชื้อรา *Colletotrichum* spp. สาเหตุโรคแอนแทรกโนสของมะม่วง ที่ระดับความต้านทานสารป้องกันกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิมต่าง ๆ

Parts of plant	No. of isolates (%) of Carbendazim-resistance levels*				Total
	Sensitive (S)	Weakly resistant (WR)	Moderately resistant (MR)	Highly resistant (HR)	
Leaves	24 (16.0%)	0 (0%)	1 (0.7%)	21 (14.0%)	46 (30.7%)
Fruits	11 (7.3%)	0 (0%)	1 (0.7%)	92 (61.3%)	104 (69.3%)
Total	35 (23.3%)	0 (0%)	2 (1.4%)	113 (75.3%)	150 (100%)

*เชื้อราที่เจริญได้ $\geq 10\%$ เมื่อเทียบกับชุดควบคุมบนอาหาร PDA ผสมคาร์เบนดาซิมที่ช่วงระดับความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้ ; S = 0.1 – 1 mg/l, WR = 0.1 – 10 mg/l, MR = 0.1 – 100 mg/l, HR = 0.1 – 500 หรือ 1,000 mg/l

ตารางที่ 4 ประสิทธิภาพของสารป้องกันกำจัดเชื้อราชนิดต่างๆ (ตามอัตราแนะนำ) ในการควบคุมเชื้อรา *Colletotrichum* spp. สาเหตุโรคแอนแทรกคโนสมะม่วง บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ potato dextrose agar

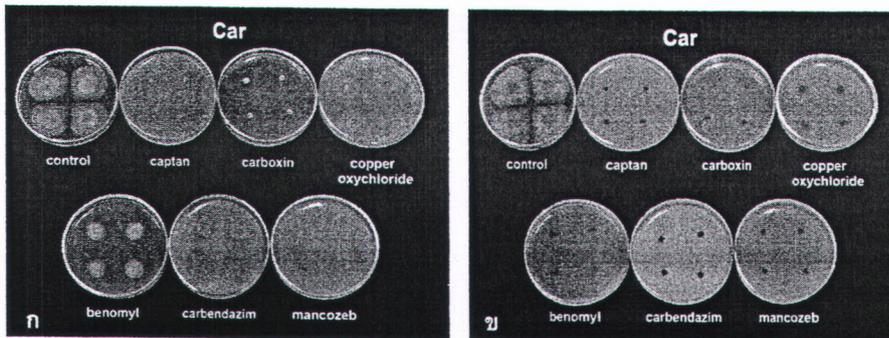
Fungicide common name	Percent inhibition*	
	Car ^R	Car ^S
benomyl	61.15 ^{b**}	100.00 ^a
carbendazim	19.86 ^d	100.00 ^a
captan	100.00 ^a	100.00 ^a
carboxin	100.00 ^a	100.00 ^a
copper oxychloride	41.12 ^c	40.14 ^b
mancozeb	100.00 ^a	100.00 ^a

*ค่าเฉลี่ยจาก 4 ซ้ำ

** อักษรต่างกันแสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% เปรียบเทียบโดยวิธี LSD

Car^S = เชื้อราสายพันธุ์อ่อนแอต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิม

Car^R = เชื้อราสายพันธุ์ต้านทานสารป้องกันกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิม



ภาพที่ 4 การทดสอบประสิทธิภาพของสารกำจัดเชื้อราชนิดต่างๆ (ตามอัตราแนะนำ) ในการควบคุม *Colletotrichum* spp. สาเหตุโรคแอนแทรกคโนสมะม่วง บน potato dextrose agar ที่อุณหภูมิห้อง 3 วัน; (ก) สายพันธุ์ต้านทานต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิม (highly resistance) และ (ข) สายพันธุ์อ่อนแอต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิม (sensitive)

ตารางที่ 5 ประสิทธิภาพของกระชาย ข่า และขิง ในการควบคุม *Colletotrichum* spp. สาเหตุโรคแอนแทรกคโนสมะม่วงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ potato dextrose agar

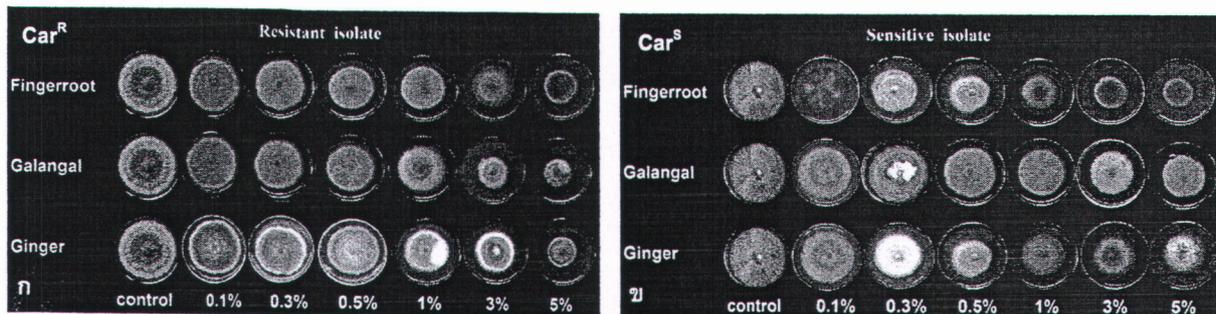
Concentration (%)	Percentage inhibition *					
	Car ^R			Car ^S		
	Galangal	Fingerroot	Ginger	Galangal	Fingerroot	Ginger
0.1	32.69 ^{ba**}	15.27 ^l	19.72 ^l	26.34 ^h	4.91 ^l	11.02 ^k
0.3	40.93 ^a	20.43 ^l	28.82 ^o	31.51 ^g	12.65 ^k	18.78 ^l
0.5	44.68 ^{cd}	20.27 ^l	33.58 ^f	38.03 ^f	15.10 ^l	24.06 ^h
1	46.78 ^{bc}	25.33 ^h	42.69 ^{de}	40.88 ^{de}	20.16 ^l	29.70 ^g
3	48.63 ^b	47.79 ^b	48.47 ^b	52.20 ^b	30.45 ^g	40.50 ^a
5	49.36 ^b	54.83 ^a	56.34 ^a	61.91 ^a	43.05 ^{cd}	45.42 ^c

* ค่าเฉลี่ยจาก 4 ซ้ำ

** อักษรต่างกันแสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% เปรียบเทียบโดยวิธี LSD

Car^S = เชื้อราสายพันธุ์อ่อนแอต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิม

Car^R = เชื้อราสายพันธุ์ต้านทานสารป้องกันกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิม



ภาพที่ 5 ประสิทธิภาพของกระชาย ข่า และขิง ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ในการควบคุมเชื้อรา *Colletotrichum* spp. สาเหตุโรคแอนแทรกคโนสมะม่วงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ potato dextrose agar ที่อุณหภูมิห้อง ระยะเวลา 7 วัน; (ก) สายพันธุ์ต้านทานต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิม (highly resistance) และ (ข) สายพันธุ์อ่อนแอต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิม (sensitive)

ปฏิภริยาของเชื้อราในกลุ่ม *Cercospora* ต่อสารเคมีเบนซิมิดาโซล (คาร์เบนดาซิม) จากพืชต่าง ๆ ในจังหวัดเชียงใหม่

Sensitivity of *Cercosporoid* Fungi to Benzimidazole (carbendazim) from Various Plants in Chiang Mai

ณัฐพงษ์ นวลดี และ สรัญญา ณ ลำปาง *

ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จ. เชียงใหม่ 50200

* Corresponding author: sarunya@chiangmai.ac.th

บทคัดย่อ

จากการแยกและเก็บรวบรวมเชื้อราในกลุ่ม *Cercospora* จากพืช 21 ตัวอย่าง ในจังหวัดเชียงใหม่ ได้ทั้งหมด 21 ไอโซเลท ซึ่งจัดจำแนกโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาเป็น 3 จีนัส ได้แก่ *Cercospora*, *Pseudocercospora* และ *Passalora* จำนวน 12, 5 และ 4 ไอโซเลท ตามลำดับ เมื่อทดสอบความต้านทานของเชื้อราต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิมที่ผสมบนอาหาร potato dextrose agar (PDA) ความเข้มข้น 6 ระดับ 1, 5, 10, 50, 100 และ 500 $\mu\text{g/ml}$ พบว่าเชื้อรา *Cercospora* sp. ที่แยกได้จากผักสลัด (*Lactuca sativa*) ต้านทานต่อสารคาร์เบนดาซิมระดับสูง (highly resistance; 500 $\mu\text{g/ml}$) จำนวน 1 ไอโซเลท ขณะที่เชื้อรา *Cercospora* sp. ที่แยกจากผักกาดหอม (*Lantana camara*) และเชื้อรา *Passalora* sp. แยกจากเสลดพังพอน (*Barleria lupulina*) ต้านทานต่อสารคาร์เบนดาซิมระดับต่ำ (weakly resistance; 5-10 $\mu\text{g/ml}$) ส่วนเชื้อราที่ไม่ต้านทานสารคาร์เบนดาซิม (sensitive; 1 $\mu\text{g/ml}$) มีจำนวน 18 ไอโซเลท จากการศึกษาครั้งนี้ยังสามารถนำข้อมูลไปใช้วิเคราะห์หาความสัมพันธ์ความต้านทานของเชื้อราต่อสารคาร์เบนดาซิม ณ ตำแหน่ง β -tubulin gene ต่อไป

คำสำคัญ: โรคใบจุด, เชื้อราในกลุ่ม *Cercospora*, เชื้อราต้านทานสารคาร์เบนดาซิม

Abstract

Cercospora, the cause of leaf spot disease, was isolated from 21 different plants in Chiang Mai. Twenty one isolates of *Cercosporoid* fungi were identified as belonging to three genera; *Cercospora* (12 isolates), *Pseudocercospora* (5 isolates), and *Passalora* (4 isolates) based on morphological characteristics. Carbendazim-sensitivity assays were conducted by growing all isolates on potato dextrose agar (PDA) medium amended with carbendazim at 1, 5, 10, 50, 100, 500 $\mu\text{g/ml}$. The results indicated that one isolate of *Cercospora* sp. on lettuce (*Lactuca sativa*) was highly resistant to the carbendazim fungicide (500 $\mu\text{g/ml}$). Two isolates, *Cercospora* sp. and *Passalora* sp. were weakly resistant (5-10 $\mu\text{g/ml}$), and other 18 isolates were sensitive (1 $\mu\text{g/ml}$). Further analysis of the β -tubulin gene region related to the fungicide resistance is needed in order to clarify this preliminary result.

Key words: leaf spots, *Cercosporoid* fungi, carbendazim resistance

บทนำ

เชื้อราใน genus *Cercospora* ถูกค้นพบในปี 1863 โดย Fresenius จัดอยู่ใน Class Hyphomycetes (Braun, 1995) เป็นเชื้อราสาเหตุโรคใบจุด ทำความเสียหายกับพืชเศรษฐกิจหลายชนิดอย่างกว้างขวางทั่วโลก (Agrios, 2005) ส่งผลกระทบต่อผลผลิตของเกษตรกรมากมาย พบในทุกภูมิภาคบนพืชอาศัยจำนวนมาก (Crous and Braun, 2003) การแพร่กระจายของเชื้อราในกลุ่มนี้เพิ่มขึ้นทุกปี ใน

world monograph ของ Chupp (1954) ได้รายงานว่ามีเชื้อราใน genus *Cercospora* มีจำนวนถึง 1,800 species เมื่อเกิดการระบาดของเกษตรกรมักจะป้องกันกำจัดโรคโดยการฉีดพ่นสารเคมี (Franc *et al.*, 2001) กันอย่างแพร่หลาย โดยนิยมใช้สารในกลุ่มเบนซิมิดาโซล (benzimidazole) เช่น เบนโนมิล (benomyl) คาร์เบนดาซิม (carbendazim) หรือ ไธอบินดาโซล (thiabendazol) เป็นต้น ซึ่งเป็นสารเคมีประเภทดูดซึม สามารถป้องกันกำจัดและควบคุมโรคได้รวดเร็ว และได้ผลดี



แต่ผลกระทบที่ตามมาคือ ทำให้เชื้อเกิดการต้านทาน หรือ เกิดปัญหาการติดต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อราในกลุ่มนี้ และ กลายเป็นปัญหาใหญ่ในพื้นที่เพาะปลูก (Briere *et al.*, 2001) เพราะเกษตรกรเพิ่มปริมาณการใช้สารเคมีมากขึ้น ทำให้ ส่งผลเสียต่อสภาพแวดล้อม ความหลากหลายทางชีวภาพ และคุณภาพของดินลดลง อีกทั้งยังส่งผลกระทบต่อเกษตรกร ผู้ใช้เอง และสุขภาพของผู้บริโภค การศึกษาในครั้งนี้จึงได้ ตรวจสอบความต้านทานของเชื้อราในกลุ่ม *Cercospora* ต่อ สารคาร์เบนดาซิมเพื่อนำไปใช้เป็นข้อมูลพื้นฐาน ว่าประชากร เชื้อราในกลุ่ม *Cercospora* ประกอบไปด้วยกลุ่มที่อ่อนแอ และต้านทานต่อสารเคมีเบนซิมิดาโซลที่ใช้กันอยู่ในปัจจุบัน

อุปกรณ์และวิธีการ

การทดลองที่ 1 การแยกและเก็บรวบรวมเชื้อราบริสุทธิ์
 เก็บรวบรวมตัวอย่างใบพืชหลายชนิดที่เกิดอาการ ใบจุด *Cercospora* จากแปลงปลูก โดยใช้ hand lens ตรวจดู fruiting bodies แล้วนำมาแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ตามวิธีของ Choi *et al.* (1999) จัดจำแนกเชื้อบริสุทธิ์ตามวิธีของ Braun (1995) ซึ่งอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาได้แก่ ลักษณะรูปร่างของ stromata, conidiophores, conidial scar, conidia และ hilum ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

การทดลองที่ 2 การตรวจความต้านทานต่อสารป้องกัน กำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิม

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ potato dextrose agar (PDA) ผสมกับสารป้องกันกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิม ที่ความ เข้มข้น 6 ระดับ ดังนี้ 1, 5, 10, 50, 100 และ 500 µg/ml (อัตราแนะนำการใช้) ใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร ตัดบริเวณขอบโคโลนีของเชื้อราอายุ 14 วันที่เลี้ยง บนอาหาร PDA จากนั้นนำมาวางบนอาหาร PDA ที่ผสมสาร คาร์เบนดาซิมที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ทดลองความเข้มข้น ละ 3 ซ้ำ บันทึกการเจริญของเชื้อรา โดยวัดขนาด เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อรา ประเมินเปอร์เซ็นต์การ เจริญเติบโต และระดับความต้านทาน ตามหลักการใน ข้อ A และ B ดังนี้

A. ประเมินหาค่าการเจริญเติบโตของเชื้อราบน อาหาร PDA ที่ผสมสารคาร์เบนดาซิม

วัดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อราบนอาหาร PDA ที่ผสมสารป้องกันกำจัดเชื้อราแต่ละความเข้มข้น นำ ค่าเฉลี่ยการเจริญของเชื้อราที่ได้มาคำนวณเปอร์เซ็นต์การ เจริญของเชื้อราเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (0 µg/ml)

$$\text{เปอร์เซ็นต์การเจริญของเชื้อรา} = \frac{\text{ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีชุดทดสอบ} \times 100}{\text{ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี ชุดควบคุม}}$$

(เทียบกับชุดควบคุม)

จากนั้นนำเปอร์เซ็นต์การเจริญของเชื้อราที่ได้ เปรียบเทียบกับชุดควบคุม ดังนี้

-	=	เชื้อราที่เจริญได้ < 10 % เมื่อเทียบกับชุดควบคุม
+	=	เชื้อราที่เจริญได้ตั้งแต่ 10% แต่ไม่ถึง 35% เมื่อเทียบกับชุดควบคุม
++	=	เชื้อราที่เจริญได้ตั้งแต่ 35% แต่ไม่ถึง 65% เมื่อเทียบกับชุดควบคุม
+++	=	เชื้อราที่เจริญได้ตั้งแต่ 65% แต่ไม่ถึง 90% เมื่อเทียบกับชุดควบคุม
++++	=	เชื้อราที่เจริญได้ตั้งแต่ 90% ขึ้นไปเมื่อเทียบกับชุดควบคุม

B. จัดระดับความต้านทานต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิมเป็น 4 ระดับ

ซึ่งดัดแปลงจาก Koenraadt *et al.* (1992) และ Peres *et al.* (2004) (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 หลักเกณฑ์ในการจัดระดับความต้านทานสารป้องกันกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิม

Resistant levels	Carbendazim concentrations (µg/ml)					
	1	5	10	50	100	500*
Sensitive (S)	x	x	x	x	x	x
	/	x	x	x	x	x
Weakly resistant (WR)	/	/	x	x	x	x
	/	/	/	x	x	x
Moderately resistant (MR)	/	/	/	/	x	x
	/	/	/	/	/	x
Highly resistany (HR)	/	/	/	/	/	/

หมายเหตุ

- * = อัตราแนะนำการใช้
- x = เชื้อราที่เจริญไม่ได้ หรือเจริญ <10 % เมื่อเทียบกับชุดควบคุม
- / = เชื้อราที่เจริญได้ตั้งแต่ 10% ขึ้นไป เมื่อเทียบกับชุดควบคุม

ผลการวิจัย

การทดลองที่ 1 การเก็บรวบรวม และแยกเชื้อราเชื้อราในกลุ่ม *Cercospora*

จากการเก็บรวบรวมตัวอย่างใบพืช 21 ตัวอย่าง ที่แสดงอาการใบจุดที่เกิดจากเชื้อราในกลุ่ม *Cercospora* พบลักษณะอาการโรคใบจุด คือ อาการตายของเซลล์เฉพาะบริเวณใดบริเวณหนึ่ง จุดมักจะไม่ใหญ่นัก มีรูปร่างต่างๆ กัน มีสีน้ำตาลปนขาวและลักษณะคล้ายผงฝุ่นเกาะบริเวณตรงกลางและรอบๆ แผล ซึ่งล้อมรอบด้วยขอบสีน้ำตาลปนดำ ระยะเวลาต่อมาอาจจะกลายเป็นอาการไหม้ (blight) ได้ ทั้งนี้ลักษณะอาการขึ้นอยู่กับชนิดของพืชอาศัยด้วย พบได้ทั้งด้านบนใบและใต้ใบ และจากการแยกเชื้อรากลุ่มนี้ทั้งหมด 21 ไอโซเลท (ตารางที่ 2) และนำมาจัดจำแนกโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาตามวิธีของ Braun (1995) สามารถแบ่งเป็น 3 จีนัส ได้แก่ *Cercospora*, *Pseudocercospora* และ *Passalora* จีนัส *Cercospora* พบลักษณะ conidiophores อยู่กันเป็นกลุ่ม (fasciculate) และแบบเดี่ยว (solitary) มีสีน้ำตาลอ่อนและหรือสีเข้ม มีผนังกัน (septate), conidium สีไม่มีสี (hyaline) และ hilum มีสีดำและหนา สังเกตเห็นได้ชัดเจน (ภาพที่ 1), จีนัส *Pseudocercospora* พบลักษณะ conidiophore มีการจัดเรียงตัวกันอย่างหนาแน่นเป็นมัด (synnematosus) มีสีน้ำตาลเข้ม มีผนังกัน (septate), conidium สีไม่มีสี (hyaline) และ hilum สังเกตเห็นได้ไม่ชัดเจน (ภาพที่ 2), จีนัส *Passalora* พบลักษณะ conidiophores มีการจัดเรียงตัวกันอย่างหนาแน่นเป็นมัด (synnematosus) มีสีน้ำตาลเข้ม มีผนังกัน (septate), co-

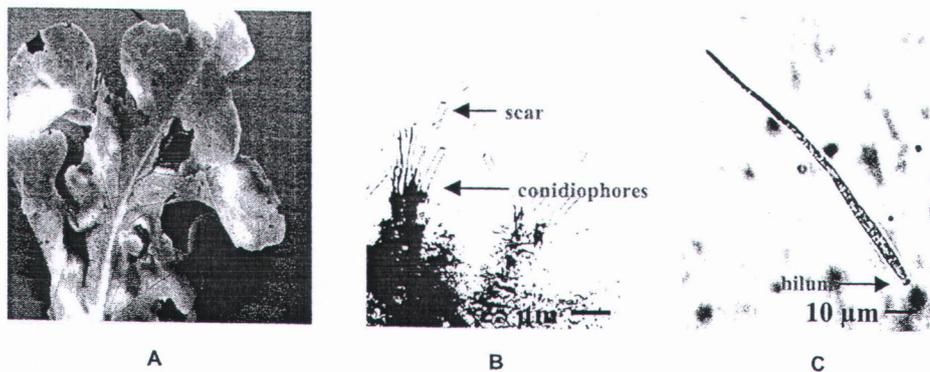
nidium มีสีน้ำตาล และ hilum มีสีดำและหนา สังเกตเห็นได้ชัดเจน (ภาพที่ 3)

การทดลองที่ 2 การตรวจความต้านทานต่อสารคาร์เบนดาซิม

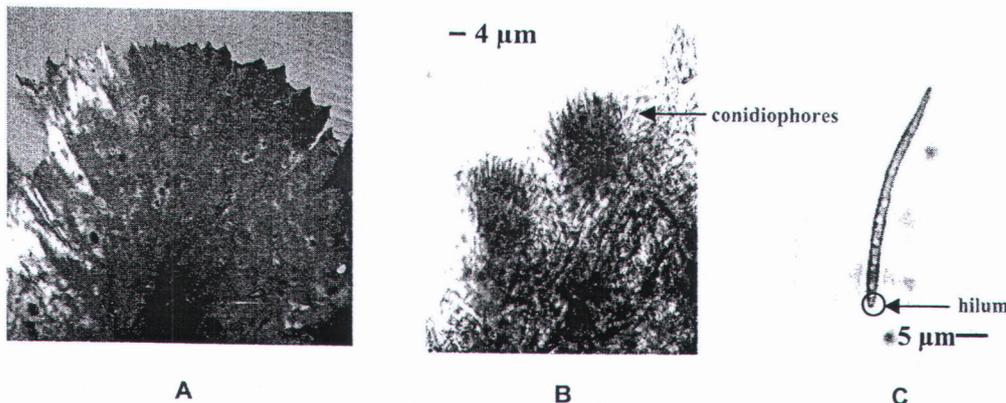
จากการทดสอบความต้านทานของเชื้อราในกลุ่ม *Cercospora* ทั้ง 21 ไอโซเลท ต่อสารคาร์เบนดาซิมบนอาหาร PDA ที่ 6 ระดับความเข้มข้น พบเชื้อราต้านทานสารป้องกันกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิมระดับสูง (highly resistant; 500 µg/ml) จำนวน 1 ไอโซเลท เป็นเชื้อรา *Cercospora* sp. ที่แยกได้จากผักสลัด (*Lactuca sativa*), เชื้อราต้านทานสารป้องกันกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิมระดับต่ำ (weakly resistant; 5-10 µg/ml) จำนวน 2 ไอโซเลท เป็นเชื้อรา *Cercospora* sp. แยกจากผักกาดหอม (*Lantana camara*) และเชื้อรา *Passalora* sp. แยกจากเสลดพังพอน (*Barleria lupulina*) ส่วนเชื้อราที่ไม่ต้านทานสารป้องกันกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิม (sensitive; 1 µg/ml) มีจำนวน 18 ไอโซเลท (ภาพที่ 4, ตารางที่ 2)

สรุปและวิจารณ์

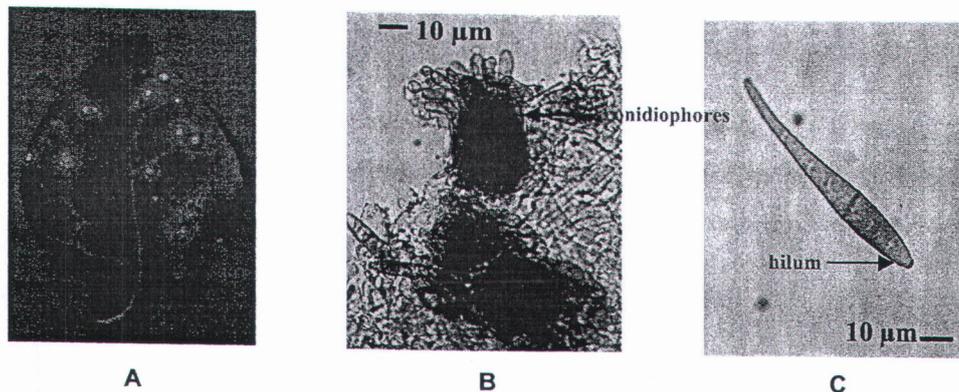
จากการแยกเชื้อราสาเหตุโรคใบจุด ในจังหวัดเชียงใหม่จากใบพืชต่างๆ สามารถแยกเชื้อราในกลุ่ม ได้ทั้งหมด 21 ไอโซเลท แบ่งออกเป็น 3 จีนัส คือ *Cercospora*, *Pseudocercospora* และ *Passalora* จำนวน 12, 5 และ 4 ไอโซเลท ตามลำดับ เมื่อนำมาทดสอบความต้านทานของเชื้อรา ต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิม พบเชื้อราต้านทานสารป้องกันกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิมระดับสูง (highly resistant)



ภาพที่ 1 ลักษณะอาการโรคใบจุดของผักสลัด (*Lactuca sativa*) ที่เกิดจากเชื้อรา *Cercospora* sp.; A: อาการบนใบ, B: ลักษณะ conidiophores ของเชื้อรา *Cercospora* sp. (40X) และ C: ลักษณะ conidium ของเชื้อรา *Cercospora* sp. (40X)



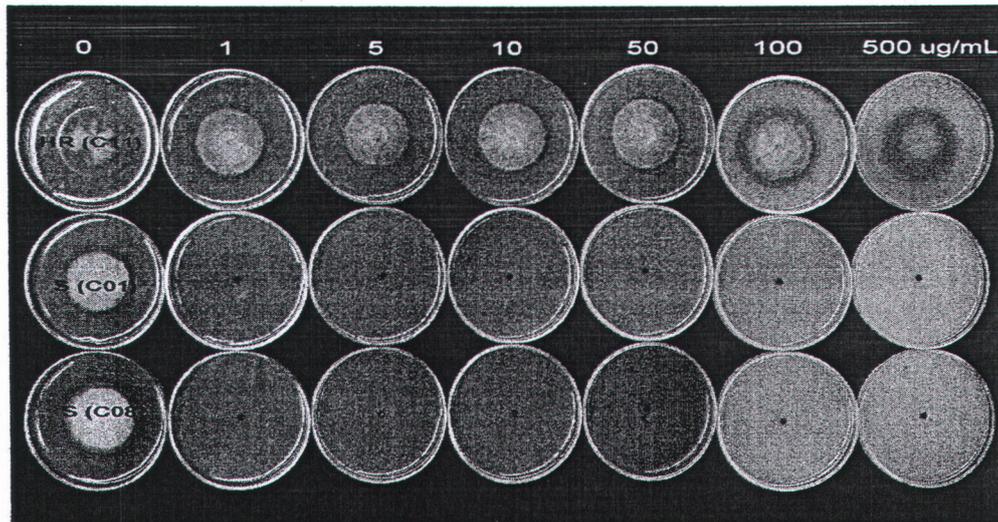
ภาพที่ 2 ลักษณะอาการโรคใบจุดของบัวหลวง (*Nelumbo nucifera*) ที่เกิดจากเชื้อรา *Pseudocercospora* sp.; A: อาการบนใบ, B: ลักษณะ conidiophores ของเชื้อรา *Pseudocercospora* sp. (40X) และ C: ลักษณะ conidium ของเชื้อรา *Pseudocercospora* sp. (40X)



ภาพที่ 3 ลักษณะอาการโรคใบจุดของเฟื่องฟ้า (*Bougainvillea hybrida*) ที่เกิดจากเชื้อรา *Passalora* sp.; A: อาการบนใบ, B: ลักษณะ conidiophores ของเชื้อรา *Passalora* sp. (40X) และ C: ลักษณะ conidium ของเชื้อรา *Passalora* sp. (40X)

จำนวน 1 ไอโซเลท เป็นเชื้อรา *Cercospora* sp. ที่แยกได้จากผักสลัด (*Lactuca sativa*) และเชื้อราต้านทานสารป้องกันกำจัด เชื้อราคาร์เบนดาซิมที่ระดับต่ำ (weakly resistant) จำนวน 2 ไอโซเลท เป็นเชื้อรา *Cercospora* sp. ที่แยกจากผกากรอง (*Lantana camara*) และเชื้อรา *Passalora* sp.

แยกจากเสลดพังพอน (*Barleria lupulina*) ซึ่งสอดคล้องกับ รายงานของ Imazaki *et al.* (2006) ที่ทดสอบเชื้อรา *Cercospora kikuchii* จำนวน 247 ไอโซเลท พบเชื้อราที่ต้านทานสารเคมีในกลุ่ม Benzimidazole ที่ระดับ 1600 µg/ml จำนวน 154 ไอโซเลท จากการศึกษาครั้งนี้สามารถนำ



ภาพที่ 4 การทดสอบความต้านทานของเชื้อรา *Cercospora* spp. บนอาหารเลี้ยงเชื้อ potato dextrose agar ที่ผสมสารคาร์เบนดาซิมที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 14 วัน; HR = highly resistant, S = sensitive

ตารางที่ 2 ระดับความต้านทานสารคาร์เบนดาซิมของเชื้อราในกลุ่ม *Cercospora* สาเหตุโรคใบจุดในพืชต่างๆ

No	Isolates	Pathogens	Hosts			Resistance levels*
			Scientific name	Common name	Thai name	
1	C01	<i>Cercospora</i>	<i>Lactuca sativa</i> var. <i>longifolia</i>	cos lettuce	ผักสลัด	S
2	C02	<i>Cercospora</i>	<i>Coffea arabica</i>	coffee	กาแฟ	S
3	C03	<i>Cercospora</i>	<i>Eupatorium adenophorum</i>	catweed	สาบหมา	S
4	C04	<i>Cercospora</i>	<i>Vigna unguiculata</i>	cow pea	ถั่วฝักยาว	S
5	C05	<i>Cercospora</i>	<i>Zinnia elegans</i>	zinnia	บานชื่น	S
6	C06	<i>Cercospora</i>	<i>Areca catechu</i>	betel nut	หมาก	S
7	C07	<i>Cercospora</i>	<i>Coccinia grandis</i>	ivy gourd	ตำลึง	S
8	C08	<i>Cercospora</i>	<i>Capsicum annum</i>	chilli peper	พริกชี้ฟ้า	S
9	C09	<i>Cercospora</i>	<i>Jatropha curcas</i>	physic nut	สบู่ดำ	S
10	C10	<i>Cercospora</i>	<i>Lantana camara</i>	lantana	ผกากรอง	WR
11	C11	<i>Cercospora</i>	<i>Lactuca sativa</i> var. <i>crispata</i>	green oak leaf	ผักสลัด	HR
12	C12	<i>Cercospora</i>	<i>Hydrangea macrophylla</i>	hydrangea	ไฮเดรนเยีย	S
13	C13	<i>Pseudocercospora</i>	<i>Datura alba</i>	jimson Weed	ลำโพงขาว	S
14	C14	<i>Pseudocercospora</i>	<i>Nelumbo nucifera</i>	lotus	บัวหลวง	S
15	C15	<i>Pseudocercospora</i>	<i>Nephrolepis cordifolia</i>	tuber sword fern	เฟิร์น	S
16	C16	<i>Pseudocercospora</i>	<i>Nymphaea stellata</i>	water lily	บัวผัน	S
17	C17	<i>Pseudocercospora</i>	<i>Eucalyptus</i> sp.	eucalyptus	ยูคาลิปตัส	S
18	C18	<i>Passalora</i>	<i>Bougainvillea hybrida</i>	paper flower	เฟื่องฟ้า	S
19	C19	<i>Passalora</i>	<i>Cassia agnes</i>	golden shower	ราชพฤกษ์	S
20	C20	<i>Passalora</i>	<i>Barleria lupulina</i>	philippine violet	เสลดพังพอน	WR
21	C21	<i>Passalora</i>	<i>Arachis hypogaea</i>	gruondnut	ถั่วลิสง	S

* HR = highly resistance, WR = weakly resistance, S = sensitive



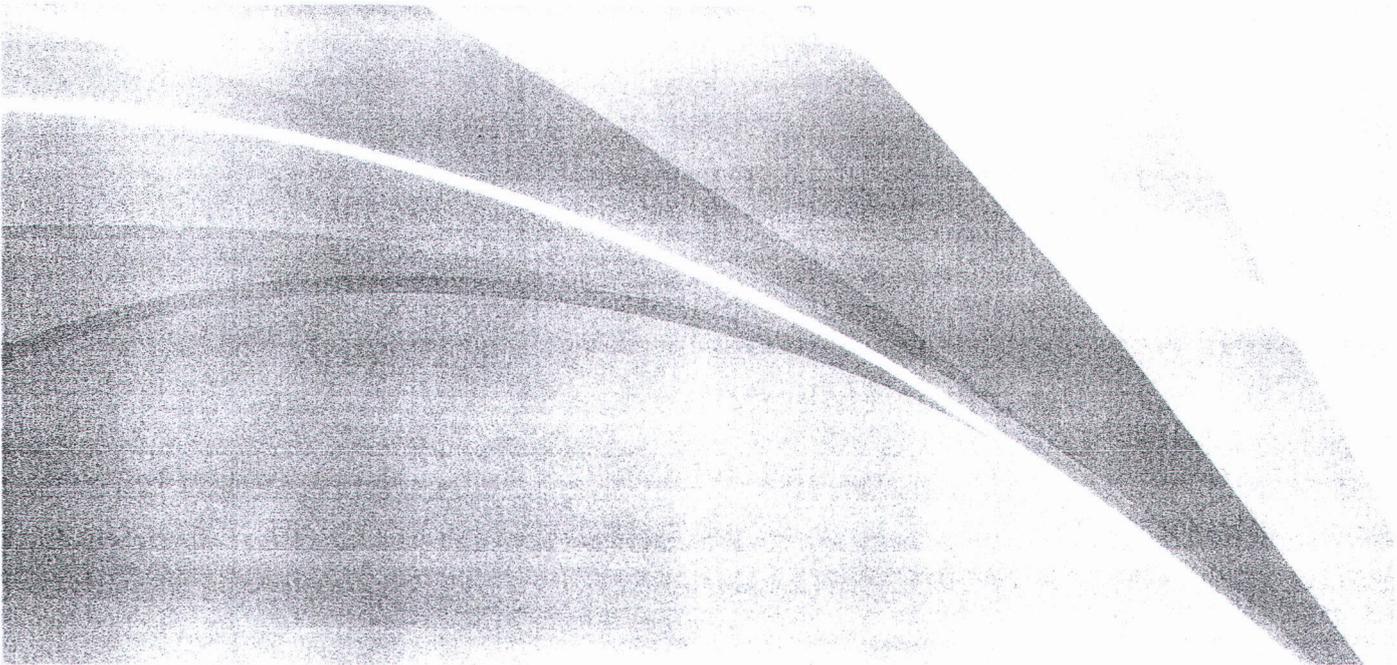
ข้อมูลไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณตำแหน่งยีน β -tubulin เพื่อวิเคราะห์หาจุดกลายพันธุ์ (point mutation) ต่อไป และนำไปสู่การแก้ปัญหาความต้านทานต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อราอย่างถูกต้อง

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัย จากศูนย์ด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร, สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี, สำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษา

เอกสารอ้างอิง

- Agrios, G.N. 2005. Plant Pathology. Fifth edition. Elsevier Academic Press, London. UK.
- Braun, U. 1995. A Monograph of *Cercospora*, *Ramularia* and Allied Genera (Phytopathogenic Hyphomycetes) Vol.1. IHW- Verlag, Germany.
- Choi, Y. W., K. D. Hyde and W. H. Ho. 1999. Single spore isolation of fungi. *Fungal Diversity*. 3: 29 - 38.
- Chupp, C. 1954. *A Monograph of the Fungus Genus Cercospora*. Ithaca, New York.
- Crous, P. W. and U. Braun. 2003. *Mycosphaerella and its anamorphs: 1. names published in Cercospora and Passalora*. CBS Biodiversity Series 1. Netherlands.
- Franc, G.D., R.M. Harveson, E.D. Kerr, and B.J. Jacobsen. 2001. Disease management. In: Wilson, R.G., Smith, J.A., and S.D. Miller (eds), *Sugarbeet Production Guide*. Lincoln, Nebraska, USA, University of Nebraska Institute of Agriculture and Natural Resources.
- Imazaki, I., K. Ishidawa, N. Yasuda, a. Miyasaka, S. Kawasaki and S. Koizumi. 2006. Incidence of thiophanate-methyl resistance in *Cercospora kikuchii* within a single lineage based on amplified fragment length polymorphisms in Japan. *J Gen Plant Pathol*. 72: 77-84.
- Kirk, P.M., Cannon, P.F., David, J.C., and J.A. Stalpers. 2001. *Ainsworth and Bisby's Dictionary of the fungi*. 9th ed. CABI Publishing, Wallingford.
- Koenraadt, H., S. C. Somerville and A. L. Jones. 1992. Characterization of mutations in the beta-tubulin gene of benomyl-resistance field strain of *Venturia inaequalis* and other plant pathogenic fungi. *Phytopathology* 82: 1348-1354.
- Peres, A.R.N., N.L. Souza, T.L. Peever, and L.W. Timmer. 2004. Benomyl sensitivity of Isolates of *Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides* from citrus. *Plant Disease* 88(2): 125-130.
- Shin, H.D. and J.D. Kim. 2001. *Cercospora* and Allied Genera from Korea. National Institute of Agricultural Science and Technology Suwon, Korea.



CMU-KU SYMPOSIUM 2009

The Second International Meeting for Development of
International Network for
Reduction of Agrochemical Use:

Food Safety Technologies in Southeast Asia

September 22-23, 2009

The Imperial Mae Ping Hotel, Chiang Mai, Thailand

DETECTION OF CARBENDAZIM-RESISTANT *COLLETOTRICHUM GLOEOSPORIOIDES* CAUSING MANGO ANTHRACNOSE DISEASE

Pornprapa Kongtragoul^{1,2}, Yoko Miyamoto³, Chikako Miyake³, Yuriko Izumi³,
Kazuya Akimitsu³ and Sarunya Nalumpang^{1,2,*}

¹Department of Entomology and Plant Pathology, Faculty of Agriculture,
Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand

²Center for Agriculture Biotechnology (AG-BIO/PERDO-CHE), Thailand.

³Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Kagawa University,
Miki, Kagawa 761-0795 Japan

* Corresponding author: sarunya@chiangmai.ac.th

ABSTRACT

Naturally-infected mango anthracnose disease caused by *Colletotrichum gloeosporioides* were collected in Thailand. One hundred and fifty isolates were successfully isolated from 17 mango cultivars; consisting of 46 isolates (30.67%) from leaves and 104 isolates (69.33%) from fruits. In preliminary studies conducted *in vitro* with potato dextrose agar amended with carbendazim fungicide at various concentrations: 0.1, 1, 10, 100, 500 and 1,000 mg/l, the result showed that 113 isolates (75.33%) were HR; consisting 18 isolate (12%) from leaves and 95 isolates (63.33%) from fruits. Thirty-seven isolates (24.67%) were S; consisting 28 isolates (18.67%) from leaves and 9 isolates (6%) from fruits. The differences in the carbendazim-resistant phenotypes were conspicuous in sequence analysis of the partial second beta-tubulin (*TUB2*) gene. HR phenotype were revealed a single nucleotide mutation, an adenine (A) to cytosine (C) transversion, resulting in a substitution of codon 198, which encodes glutamic acid (GAG) in S phenotype, was converted to a codon for alanine (GCG). This indicates that careful management of carbendazim fungicides applications is necessary to achieve effective control.

Keywords: β -tubulin gene, *Colletotrichum gloeosporioides*, Fungicide resistance, Mango anthracnose

INTRODUCTION

Mango (*Mangifera indica* L.) is one of economic fruit in the domestic and export market of Thailand. The major export markets for fresh and processed mangoes are Hong Kong, Malaysia, Singapore, Japan, Canada and USA etc. [1]. Many diseases can reduce the quality and cause severe losses. Anthracnose caused by *Colletotrichum gloeosporioides* Penz.

is the most devastating disease and major constraint in production and exportation [2]. In order to control this disease, benzimidazole fungicides such as carbendazim, benomyl and thiabendazole have been widely used to manage this disease because farmers believed that the chemical fungicides are able to control plant diseases better than other methods [3]. In fact, the chemical fungicides effectively suppressed and controlled a wide variety of plant diseases at beginning; however, a consequence of a long term utilization of chemical fungicides, particularly systemic fungicides, reduced the significant of fungicide effects to the disease pathogens. Because the pathogens often become resistance to chemical fungicides and the increase in number of these fungicide resistant isolates give the main problems for the farmers [4-6]. The appearance of fungicide resistance has become an important factor in limiting the efficacy and useful lifetime of important disease control strategies and therefore the cost spending for the fungicides also increase because the farmers are forced to increase the dosage of the chemical fungicide. The objectives of this study were to examine resistance of *C. gloeosporioides* obtained from mango to the carbendazim fungicide using phenotypic response and to sequence the partial second β -tubulin (*TUB2*) gene which has been reported to be responsible for benzimidazole resistance [7-11].

MATERIALS AND METHODS

1. Isolation of *Colletotrichum gloeosporioides* causing mango anthracnose

Naturally-infected fruits and leaves of mango were collected from markets and orchards in Thailand. Isolations were made by tissue transplanting technique. Sections tissues were placed on potato dextrose agar (PDA) plates and incubated at room temperature. Those plates were observed daily until the mycelium grows and subculture to the new PDA plates for identification. Cultures were prepared by plating each isolate on PDA plate at room temperature for 5-7 days productions of mycelial plugs.

2. Detection of carbendazim resistance by culture test

Screening resistibility of all *C. gloeosporioides* isolates to carbendazim fungicide were tested using mycelial growth assays. Each isolates was cultured on PDA plates at room temperature. Mycelial plugs, 5 mm diameter, was cut from the margins of colonies and transferred onto carbendazim fungicide supplemented with PDA at the concentration of 0, 0.1, 1, 10, 100, 500 and 1,000 mg/l. Carbendazim was added to PDA after autoclaving. After inoculation at room temperature, the diameter of each colony was measured and the percentages of growth were calculated and data expressed as percentage of the control. The phenotype-resistant levels evaluation was grouping into four representative phenotypes of reactions as highly resistance (HR; ≥ 500 mg/l), moderately resistance (MR; ≤ 100 mg/l), weakly resistance (WR; ≤ 10 mg/l) and sensitive (S; ≤ 1 mg/l).

3. Detection of carbendazim resistance by molecular technique

Some isolates were extracted genomic DNA followed NucleoSpin[®] Plant Kit (MACHEREY-NAGEL) was used as the protocol described by the company. Amplification reactions in nested polymerase chain reaction (PCR); primary PCR using primer TB2L (5'-GTT TCC AGA TCA CCC ACT CC-3') and TB2R (5'-TGA GCT CAG GAA CAC TGA CG-3'), the 2nd PCR using primer CTB2F1 (5'-TCC AAG ATC CGT GAG G-3') and CTB2R1 (5'-AAG AAG TGG ACG GG-3'). The sequence was determined using an automated fluorescent DNA sequencer. The sequenced DNA fragments were aligned with CLUSTA W.

RESULTS

1. Isolation of *Colletotrichum gloeosporioides* causing mango anthracnose

One hundred and fifty isolates were successfully isolated, consisting of 46 isolates (30.67%) from leaves and 104 (69.33%) isolates from fruits. The myceliums of colonies of most isolates are white and grey. They form cylindrical conidia (4.2-5.1 x 15.4-20.6 μ m). These morphology characteristics were identical with that of *C. gloeosporioides* referred by Sutton [12].

2. Detection of carbendazim resistance by culture test

The carbendazim sensitivity assays was conducted to each isolates on PDA amended with carbendazim at various concentrations: 0.1, 1, 10, 100, 500 and 1,000 mg/l. The result showed that 113 isolates (75.33%) were HR; consisting 18 isolate (12%) from leaves and 95 isolates (63.33%) from fruits. Thirty-seven isolates (24.67%) were S; consisting 28 isolates (18.67%) from leaves and 9 isolates (6%) from fruits. None showed weakly resistance (WR) and moderately resistance (MR) in this examination.

3. Detection of carbendazim resistance by molecular technique

All the nucleotides and amino acid sequences of the *TUB2* gene fragment from each isolates were compared with wild type *C. gloeosporioides* f. sp. *aeschynomene* (accession No. U14138) [10]. Alignment of the sequences revealed several nucleotides substitutions were observed in the DNA sequences. In this study, there were both silent and missense mutation. In missense mutation, the single nucleotide point mutation which resulted in deduced amino acid altered was observed one point at target site of benzimidazole in *TUB2* gene fragment, with deduced amino acid at codon 198 of all HR phenotypes, an adenine (A) to cytosine (C) transversion, resulting in a substitution of glutamic acid by alanine which is closely associated with conferring carbendazim-resistant phenotype (Figure 1).

	Phenotype	Target site for benzimidazole ^[20]	198
U14138	wild type	CTCTCCGTCACCAGCTGGTCGAGA	ACTCCGACGACCTTCTGCATTGACAACGAGGCT
CAN_F125	S	CTCTCCGTCACCAGCTGGTCGAGA	ACTCCGACGACCTTCTGCATTGACAACGAGGCT
CAN_L080	S	CTCTCCGTCACCAGCTGGTCGAGA	ACTCCGACGACCTTCTGCATTGACAACGAGGCT
CAN_L105	S	CTCTCCGTCACCAGCTGGTCGAGA	ACTCCGACGACCTTCTGCATTGACAACGAGGCT
FL_F003	S	CTCTCCGTCACCAGCTGGTCGAGA	ACTCCGACGACCTTCTGCATTGACAACGAGGCT
FL_L079	S	CTCTCCGTCACCAGCTGGTCGAGA	ACTCCGACGACCTTCTGCATTGACAACGAGGCT
K_L120	S	CTCTCCGTCACCAGCTGGTCGAGA	ACTCCGACGACCTTCTGCATTGACAACGAGGCT
KMK_L088	S	CTCTCCGTCACCAGCTGGTCGAGA	ACTCCGACGACCTTCTGCATTGACAACGAGGCT
KSW_L062	S	CTCTCCGTCACCAGCTGGTCGAGA	ACTCCGACGACCTTCTGCATTGACAACGAGGCT
MCN_L059	S	CTCTCCGTCACCAGCTGGTCGAGA	ACTCCGACGACCTTCTGCATTGACAACGAGGCT
MCN_L070	S	CTCTCCGTCACCAGCTGGTCGAGA	ACTCCGACGACCTTCTGCATTGACAACGAGGCT
NDM_F006	S	CTCTCCGTCACCAGCTGGTCGAGA	ACTCCGACGACCTTCTGCATTGACAACGAGGCT
NDM_L057	S	CTCTCCGTCACCAGCTGGTCGAGA	ACTCCGACGACCTTCTGCATTGACAACGAGGCT
NDM_F118	S	CTCTCCGTCACCAGCTGGTCGAGA	ACTCCGACGACCTTCTGCATTGACAACGAGGCT
NDM_L068	S	CTCTCCGTCACCAGCTGGTCGAGA	ACTCCGACGACCTTCTGCATTGACAACGAGGCT
NLR_L048	S	CTCTCCGTCACCAGCTGGTCGAGA	ACTCCGACGACCTTCTGCATTGACAACGAGGCT
OR_L040	S	CTCTCCGTCACCAGCTGGTCGAGA	ACTCCGACGACCTTCTGCATTGACAACGAGGCT
PBL_F102	S	CTCTCCGTCACCAGCTGGTCGAGA	ACTCCGACGACCTTCTGCATTGACAACGAGGCT
R_L087	S	CTCTCCGTCACCAGCTGGTCGAGA	ACTCCGACGACCTTCTGCATTGACAACGAGGCT
SLY_L017	S	CTCTCCGTCACCAGCTGGTCGAGA	ACTCCGACGACCTTCTGCATTGACAACGAGGCT
TLN_L060	S	CTCTCCGTCACCAGCTGGTCGAGA	ACTCCGACGACCTTCTGCATTGACAACGAGGCT
CAN_F095	HR	CTCTCCGTCACCAGCTGGTCGAGA	ACTCCGACGACCTTCTGCATTGACAACGAGGCT
CAN_F146	HR	CTCTCCGTCACCAGCTGGTCGAGA	ACTCCGACGACCTTCTGCATTGACAACGAGGCT
CKT_L044	HR	CTCTCCGTCACCAGCTGGTCGAGA	ACTCCGACGACCTTCTGCATTGACAACGAGGCT
FL_F066	HR	CTCTCCGTCACCAGCTGGTCGAGA	ACTCCGACGACCTTCTGCATTGACAACGAGGCT
K_F103	HR	CTCTCCGTCACCAGCTGGTCGAGA	ACTCCGACGACCTTCTGCATTGACAACGAGGCT
KMK_F135	HR	CTCTCCGTCACCAGCTGGTCGAGA	ACTCCGACGACCTTCTGCATTGACAACGAGGCT
KMK_L058	HR	CTCTCCGTCACCAGCTGGTCGAGA	ACTCCGACGACCTTCTGCATTGACAACGAGGCT
MCN_L056	HR	CTCTCCGTCACCAGCTGGTCGAGA	ACTCCGACGACCTTCTGCATTGACAACGAGGCT
NDM_F002	HR	CTCTCCGTCACCAGCTGGTCGAGA	ACTCCGACGACCTTCTGCATTGACAACGAGGCT
NDM_F012	HR	CTCTCCGTCACCAGCTGGTCGAGA	ACTCCGACGACCTTCTGCATTGACAACGAGGCT
NDM_F014	HR	CTCTCCGTCACCAGCTGGTCGAGA	ACTCCGACGACCTTCTGCATTGACAACGAGGCT
NDM_F018	HR	CTCTCCGTCACCAGCTGGTCGAGA	ACTCCGACGACCTTCTGCATTGACAACGAGGCT
NDM_F026	HR	CTCTCCGTCACCAGCTGGTCGAGA	ACTCCGACGACCTTCTGCATTGACAACGAGGCT
NDM_F027	HR	CTCTCCGTCACCAGCTGGTCGAGA	ACTCCGACGACCTTCTGCATTGACAACGAGGCT
NDM_F038	HR	CTCTCCGTCACCAGCTGGTCGAGA	ACTCCGACGACCTTCTGCATTGACAACGAGGCT
NDM_F061	HR	CTCTCCGTCACCAGCTGGTCGAGA	ACTCCGACGACCTTCTGCATTGACAACGAGGCT
NDM_F106	HR	CTCTCCGTCACCAGCTGGTCGAGA	ACTCCGACGACCTTCTGCATTGACAACGAGGCT
NDM_F110	HR	CTCTCCGTCACCAGCTGGTCGAGA	ACTCCGACGACCTTCTGCATTGACAACGAGGCT
NDM_F116	HR	CTCTCCGTCACCAGCTGGTCGAGA	ACTCCGACGACCTTCTGCATTGACAACGAGGCT
NDM_F130	HR	CTCTCCGTCACCAGCTGGTCGAGA	ACTCCGACGACCTTCTGCATTGACAACGAGGCT
NDM_L078	HR	CTCTCCGTCACCAGCTGGTCGAGA	ACTCCGACGACCTTCTGCATTGACAACGAGGCT
NRL_L047	HR	CTCTCCGTCACCAGCTGGTCGAGA	ACTCCGACGACCTTCTGCATTGACAACGAGGCT
OR_F126	HR	CTCTCCGTCACCAGCTGGTCGAGA	ACTCCGACGACCTTCTGCATTGACAACGAGGCT
PBL_F033	HR	CTCTCCGTCACCAGCTGGTCGAGA	ACTCCGACGACCTTCTGCATTGACAACGAGGCT
PBL_F076	HR	CTCTCCGTCACCAGCTGGTCGAGA	ACTCCGACGACCTTCTGCATTGACAACGAGGCT
PBL_F131	HR	CTCTCCGTCACCAGCTGGTCGAGA	ACTCCGACGACCTTCTGCATTGACAACGAGGCT
PS_F114	HR	CTCTCCGTCACCAGCTGGTCGAGA	ACTCCGACGACCTTCTGCATTGACAACGAGGCT
TLN_L065	HR	CTCTCCGTCACCAGCTGGTCGAGA	ACTCCGACGACCTTCTGCATTGACAACGAGGCT
	Nucleotides	L S V H O L V E N S D A T F C I D N E A	
	Amino acids	-----*-----*	

Figure 1 Comparison of deduced nucleotide sequences and amino acids of *C. gloeosporioides* f. sp. *aeschynomene* a second beta-tubulin (*TUB2*) gene [10] at the target sites of benzimidazole [20] between carbendazim-resistant *C. gloeosporioides* causing mango anthracnose; S = sensitive and HR = highly resistance.

DISCUSSION

The carbendazim-resistant *C. gloeosporioides* from mango anthracnose disease were developed naturally under conditions of continuously applied fungicide that resistance in field. It showed that continuous application enhanced fungal pathogen development against chemical fungicides as reported by many researchers [4, 5, 13-16].

Carbendazim fungicide act by inhibition of tubulin biosynthesis [11, 17]. Several researchers have reported that fungicide-resistant mutations of almost all fungi are closely associated with the single nucleotide mutation, and results in the mutation of amino acid as well as the structure of fungicide binding point in the *TUB2* genes [5, 18, 19]. In this study, we were analysis of partial sequences of the *TUB2* genes in all isolates that is responsible for carbendazim resistance showed that the typical single nucleotide mutation converting codon 198 caused HR phenotypes. Only the amino acid mutation at residue 198 was closely correlated with all HR phenotypes. The amino acid mutation of codon 198 in the *TUB2* genes has been identified in fungicide-resistant fungi such as *Botrytis cinerea* causing gray mold disease of a number of crops in Israel [9] *C. gloeosporioides* causing postbloom fruit drop disease of citrus in Sao Paulo, Brazil and Florida, United States [20] or causing anthracnose disease of mango in south China [21], *C. gloeosporioides* f. sp. *aeschynomene* from northern jointvetch [10], *Venturia inaequalis* causing scab disease of apple in Michigan and other plant pathogenic fungi [8]. Besides, different mutation points such as codon 200 in *C. gloeosporioides* [22], *P. aurantiogriseum*, *Venturia inaequalis*, *V. pirina* [8]. There were the different codons in the *TUB2* gene may result in different phenotype to chemical fungicide [8, 22, 23]. Therefore, we conclude that mutations in codon 198 of the *TUB2* gene confer resistance to carbendazim in *C. gloeosporioides*. However, the fungicide resistance may result from single or multiple gene mutation. The appearance of fungicide resistance is a key factor in limiting the efficacy and lifetime of important disease control strategies. This indicates that careful management of chemical fungicides applications is necessary to achieve effective control.

ACKNOWLEDGMENTS

This research is partially supported by the Center for Agricultural Biotechnology, Postgraduate Education and Research Development Office, Commission on Higher Education, Ministry of Education, Thailand. And we would like to thank you are also due to Plant Pathology Laboratory, Faculty of Agriculture, Chiang Mai University, Thailand and Kagawa University, Japan.

REFERENCES

- [1] Santipracha, W. 2009. Thai mango export. (Online). Available: <http://share.psu.ac.th/blog/agr/13192> (September 4, 2009).
- [2] Sangchote, S. 1987. Postharvest disease of mango fruit and their losses. *Kasetsart Journal (Natural Science)* 21: 81-85.
- [3] Singh, B. S. *et al.* 2008. Determination of pesticide residues in IPM and non-IPM sample of mango (*Mangifera indica*). *Journal of Environment Science and Health Part B.* 43: 300- 306.
- [4] Farungsang, U., Farungsang, N. and Sangchote, S. 1994. Benomyl resistance of *Colletotrichum* species associated with mango and rambutan fruit rots in Thailand. *In: Development of Postharvest Handling Technology for Tropical Tree Fruits* (Johnson, I.G. and Highley, E., eds.), ACIAR Proceedings No. 58, 45-50.
- [5] Steffens, J. J., Pell, E. J. and Tien, M. 1996. Mechanisms of fungicide resistance in phytopathogenic fungi. *Environmental Biotechnology* 7: 348-355.
- [6] Yoon, S.C. *et al.* 2008. Survey of fungicide resistance for chemical control of *Botrytis cinerea* on Paprika. *The Plant Pathology Journal* 24(4): 447-452.
- [7] Orbach, J. M., Porro, E. B. and Yanofsky, C. 1986. Cloning and characterization of the gene for β -tubulin form a benomyl-resistant mutant of *Neurospora crassa* and its use as a dominant selectable marker. *Molecular and Cellular Biology* 6(7): 2452-2461.
- [8] Koenraadt, H., Somerville, S.C. and Jones, A.L. 1992. Characterization of mutations in the beta-tubulin gene of benomyl-resistant field strains of *Venturia inaequalis* and other plant pathogenic fungi. *Phytopathology* 82: 1348-1354.
- [9] Yarden, O. and Katan, T. 1993. Mutations leading to substitutions at amino acids 198 and 200 of β -tubulin that correlates with benomyl-resistance phenotypes of field strains of *Botrytis cinerea*. *Phytopathology* 83: 1478-1483.
- [10] Buhr, L. T. and Dickman, M. B. 1994. Isolation, characterization, and expression of a second β -tubulin-encoding gene from *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *aeschyromene*. *Applied and Environmental Microbiology* 60(11): 4155-4159.

- [11] Ma, Z. and Michailides, T. J. 2005. Advances in understanding molecular mechanisms of fungicide resistance and molecular detection of resistant genotypes in phytopathogenic fungi. *Crop Protection* 24: 853-863.
- [12] Sutton, B. C. 1980. The Coelomycetes: Fungi imperfect with pycnidia, acervuli and stromata. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey. 696 pp.
- [13] Sariah, M. 1989. Detection of benomyl resistance in the anthracnose pathogen, *Colletotrichum capsici*. *Journal of Islamic Academy of Sciences* 2(3): 168-171.
- [14] Sanders, M. G., Korsten, L. and Wehner, F. C. 2000. Survey of fungicide sensitivity in *Colletotrichum gloeosporioides* from different avocado and mango production areas in South Africa. *European Journal of Plant Pathology* 106: 745-752.
- [15] Kim, Y.-S. *et al.* 2007. Analyses of the less benzimidazole-sensitivity of the isolates of *Colletotrichum* spp. causing the anthracnose in pepper and strawberry. *The Plant Pathology Journal*. 23(3): 187-192.
- [16] Kumar, A. S. *et al.* 2007. Evaluation of fungicidal resistance among *Colletotrichum gloeosporioides* isolates causing mango anthracnose in Agri Export Zone of Andhra Pradesh, India. *Plant Pathology Bulletin* 16: 157-160.
- [17] Davides, L.C. 1986. Benzimidazole fungicides: mechanism of action and biological impact. *Annual Review Phytopathology* 24: 43-65.
- [18] Fujimura, M. *et al.* 1992. A single amino-acid substitution in the beta-tubulin gene of *Neurospora* confers both carbendazim resistance and diethofencarb sensitivity. *Current Genetics* 21: 399-404.
- [19] Gafur, A. *et al.* 1998. Molecular analysis and characterization of the *Cochliobolus heterostrophus* β -tubulin gene and its possible role in conferring resistance to benomyl. *Journal of General and Applied Microbiology* 44: 217-223.
- [20] Peres, N. A. R. *et al.* 2004. Benomyl sensitivity of isolates of *Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides* from citrus. *Plant Disease* 88(2): 125-130.
- [21] Zhan, R.-L. and Huang, J.-S. 2007. Cloning of a carbendazim-resistant gene from *Colletotrichum gloeosporioides* of mango in South China. *African Journal of Biotechnology* 6(2): 143-147.
- [22] Chung, W.-H. *et al.* 2006. Fungicide sensitivity and phylogenetic relationship of anthracnose fungi isolated from various fruit crops in Japan. *Plant Disease* 90(4): 506-512.
- [23] Albertini, C., Gredt, M. and Leroux, P. 1999. Mutations of the β -tubulin gene associated with different phenotypes of benzimidazole resistance in the cereal eyespot fungi *Tapesia yallundae* and *Tapesia acuformis*. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 64: 17-31.

**GENETIC ANALYSIS OF β -TUBULIN GENE FRAGMENTS FROM
CARBENDAZIM-RESISTANT *CERCOSPORA LACTUCAE-SATIVAE*
ON LETTUCE**

Nattapong Nuandee^{1,2}, Pornprapa Kongtragoul^{1,2}, Wassamon Boonying^{1,2},
Iman Hidayat¹, Yoko Miyamoto³, Chikako Miyake³, Yuriko Izumi³,
Kazuya Akimitsu³ and Sarunya Nalumpang^{1,2,*}

¹ Department of Entomology and Plant Pathology, Faculty of Agriculture,
Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand

² Center for Agriculture Biotechnology (AG-BIO/PERDO-CHE), Thailand

³ Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Kagawa University,
Miki, Kagawa 761-0795 Japan

*Corresponding author: sarunya@chiangmai.ac.th

ABSTRACT

A total 48 isolates of *Cercospora lactucae-sativae* from lettuce (*Lactuca sativa* L.) in Chiang Mai Thailand were collected and analyzed for their sensitivity to carbendazim fungicide. This study also aimed at analyzing possible mutation within β -tubulin gene (*TUB1*) sequence in relation to the level of fungicide sensitivity. The Carbendazim sensitivity assays were conducted by growing all isolates on potato dextrose agar (PDA) medium amended with the Carbendazim at 1, 10, 50, 100, 500 and 1,000 $\mu\text{g/ml}$ concentrations. The β -tubulin gene (*TUB1*) sequences of 12 representative isolates were amplified by means of polymerase chain reaction (PCR) using specific primers TUB2L and CER2R. The result showed that all isolates were highly resistance ($\geq 500 \mu\text{g/ml}$) to the Carbendazim fungicide. A single mutation at codon 198 was detected within all representative isolates of *C. lactucae-sativae*. The amino acid glutamic acid (GAG) that usually present in sensitive isolates, had been replaced by alanine (GCG) of highly resistant isolates. This report is the first finding of the carbendazim-resistant in *C. lactucae-sativae* worldwide.

Keywords: β -tubulin gene, Fungicide resistance, *Cercospora* leaf spot, Lettuce

INTRODUCTION

Lettuce (*Lactuca sativa* L.) is the world's most popular leafy salad vegetable [14]. It is an important leafy vegetable mainly consumed fresh in salads and a good dietary source of natural antioxidants [1]. *Cercospora* leaf spot of lettuce is caused by *Cercospora lactucae-sativae*. This pathogen is found in many parts of the world. First reported in 1929, it is most

common in the tropics and subtropics [17]. The disease has been reported as being economically significant in the Ivory Coast [15]. The disease is managed by a combination of crop rotation, good drainage and the destruction of wild lettuce and other closely related hosts near the lettuce crop. In certain areas, foliar fungicides may be justified for disease control [8]. Carbendazim is a member of the benzimidazole group of fungicides. These fungicides have been used extensively in disease management, but resistance to these fungicides has become a major problem in many growing areas [3, 4, 9, 12, 16]. Resistance to benzimidazole is due to a reduction of the binding affinity of the fungicide to β -tubulin [6]. The genetic characterization of benzimidazole resistance in *C. lactucae-sativae* has not, in our knowledge, been studied. The objectives of this study were to examine resistance of *C. lactucae-sativae* isolates to the carbendazim fungicide using phenotypic response and to sequence the partial β -tubulin gene (*TUB1*) which has been reported to be responsible for benzimidazole.

MATERIALS AND METHODS

1. Isolation of *Cercospora lactucae-sativae*

C. lactucae-sativae was collected and isolated from leaves lettuce (*Lactuca sativa* L.) in Chiang Mai Thailand by single spore isolation technique [5]. Fungal isolates were maintained at 4 °C in potato dextrose agar (PDA) and stored at Department of Entomology and Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200 Thailand.

2. Carbendazim sensitivity assays

The carbendazim-sensitivity assays of all *C. lactucae-sativae* isolates were conducted by growing all isolates on PDA medium amended with the carbendazim at 1, 10, 50, 100, 500 and 1,000 $\mu\text{g/ml}$ concentrations, three replicates of each fungicide concentration for each isolate. After 14 days of incubation at room temperature, the diameter of each colony was measured and the percentages of growth were calculated and data expressed as percentage of the control. Phenotype carbendazim resistibility was evaluated into four representative phenotypes of reactions as highly resistant ($\geq 500 \mu\text{g/ml}$), moderately resistant ($\leq 100 \mu\text{g/ml}$), weakly resistant ($\leq 10 \mu\text{g/ml}$) and sensitive ($\leq 1 \mu\text{g/ml}$).

3. DNA extraction and PCR amplification of β -tubulin gene fragments

Twelve representative isolates of Carbendazim-resistant *Cercospora lactucae-sativae* were extracted genomic DNA followed NucleoSpin® Plant Kit (MACHEREY-NAGEL). DNA Amplification was performed by polymerase chain reaction (PCR); primary PCR using primer TUB2L (5'-GTT TCC AGA TCA CCC ACT CC-3') and CER2R (5'-TGA GCT CTG GAA CGG TGA CAG CAC-3'), the 2nd PCR using primer CTB2F1 (5'-TCC AAG ATC CGT GAG G-3') and CTB2R (5'-AAG AAG TGG ACG GG-3'). PCR products were separated by electrophoresis on 1% agarose gels. The BigDye® Terminator DNA Sequencing Kit was used

for determining sequence of the 2nd PCR fragment. The sequence was determined using an automated fluorescent DNA sequencer. The sequenced DNA fragments were aligned with CLUSTA W.

RESULTS

1. Isolation of *Cercospora lactucae-sativae*

Forty-nine isolates of *C. lactucae-sativae* were successfully isolated from leaves lettuce by single spore isolation technique.

2. Carbendazim sensitivity assays

The carbendazim sensitivity test was conducted to each isolate on PDA amended with carbendazim at various concentrations at 1, 10, 50, 100, 500 and 1,000 µg/ml. The result showed that all isolates were highly resistance (≥ 500 µg/ml) to the carbendazim fungicide.

3. Sequence analysis of β -tubulin gene fragments containing potential amino acid substitution

The β -tubulin gene (*TUB1*) sequences of 12 representative isolates were amplified by means of PCR using specific primers TUB2L and CER2R. In order to analyse the region predicted condon 198. A single mutation at codon 198 was detected within all representative isolates of highly resistant *C. lactucae-sativae*. The amino acid glutamic acid (GAG) that usually present in sensitive isolates, had been replaced by alanine (GCG) of highly resistant isolates compared with sequence of sensitive isolate (C-3, GenBank accession number AY856373 [7]). Furthermore codon 196 and 199 was nucleotied from cytocine (C) to thymine (T) but the change dose not affect the amino acid synthesis (Figure 1).

	Phenotype	Target site for benzimidazole [13]	
		198	X
AY856373 ^[7]	S	TCCGACGAGACCTTCTGT	Glu
AY856374 ^[7]	HR	TCCGACGCGACCTTCTGT	Ala
CCR10	HR	TCCGACGCGACTTTCTGT	Ala
CCR20	HR	TCTGACGCGACCTTCTGT	Ala
CL02	HR	TCCGACGCGACTTTCTGT	Ala
CL07	HR	TCCGACGCGACTTTCTGT	Ala
CL10	HR	TCCGACGCGACTTTCTGT	Ala
CL15	HR	TCCGACGCGACTTTCTGT	Ala
CL16	HR	TCCGACGCGACTTTCTGT	Ala
CL18	HR	TCCGACGCGACTTTCTGT	Ala
CL22	HR	TCCGACGCGACTTTCTGT	Ala
CL24	HR	TCCGACGCGACTTTCTGT	Ala
CL28	HR	TCCGACGCGACTTTCTGT	Ala
CL32	HR	TCTGACGCGACCTTCTGT	Ala
Predicted Amino acid		SerAsp X ThrPheCys	

Figure 1 Sequence alignment of *Cercospora lactucae-sativae* β -tubulin at predicted codon 196-201 compared with sequence of *C. beticola*. S = sensitive and HR = highly resistant. All carbendazim-resistant isolates examined had the same single base pair change [7, 13].

DISCUSSION

Only a single mutation in the β -tubulin gene was consistently found in all carbendazim-resistant isolates compared with sensitive isolate. This mutation was observed at predicted codon 198. Mutations at codon 198 in the β -tubulin gene of ascomycetes have been demonstrated to confer resistance to benzimidazole group of fungicides [7]. This is one of the codon most frequently reported to alter in field isolates of ascomycetes with benzimidazole resistance [2, 10, 11]. Several different amino acid substitutions, including glycine, lysine, alanine and valine have been reported at codon 198 in field isolates of various fungi [2, 11]. This finding allowed us to standardize a rapid and precise molecular diagnostic assay capable of differentiating resistant from susceptible isolates of this pathogen and this indicates that careful management of chemical fungicides applications is necessary to achieve effective control.

ACKNOWLEDGMENTS

This research is partially supported by the Center for Agricultural Biotechnology, Postgraduate Education and Research Development Office, Commission on Higher Education, Ministry of Education, Thailand. And we would like to the Plant Pathology Laboratory, Faculty of Agriculture, Chiang Mai University, Thailand and Kagawa University, Japan.

REFERENCES

- [1] Altunkaya, A. 2009. Antioxidant activity of lettuce extract (*Lactuca sativa*) and synergism with added phenolic antioxidants. *Food Chemistry* 115: 163-168.
- [2] Butters, J.A. and D.W. Holloman, D.W. 1999. Resistance to benzimidazole can be caused by changes β_1 -tubulin isoforms. *Pestic. Sci.* 55: 501-503.
- [3] Briere, S.C., Franc, G.D. and Kerr, E.D. 2001. Fungicide sensitivity characteristics of *Cercospora beticola* isolates recovered from the high plains of Colorado, Montana, Nebraska and Wyoming: 1. Benzimidazole and triphenyltin hydroxide. *J. Sugar Beet Res.* 38: 111-120.
- [4] Campbell, L.G. *et al.* 1998. *Cercospora beticola* tolerant to triphenyltin hydroxide and resistant to thiophanate methyl in North Dakota and Minnesota. *J. Sugar Beet Res.* 35: 29-41.
- [5] Choi, Y.W., Hyde, K.D. and Ho, W.H. 1999. Single spore isolation of fungi. *Fungal Diversity* 3: 29-38.
- [6] Davidse, L.C. 1986. Benzimidazole fungicides: mechanism of action and biological impact. *Annu. Rev. Phytopathol.* 24: 43-65.
- [7] Davidson, R.M. *et al.* 2006. Analysis of β -tubulin gene fragments from benzimidazole-sensitive and-tolerant *Cercospora beticola*. *J. Phytopathology* 154: 321-328.
- [8] Davis, R.M. *et al.* 1997. *Compendium of Lettuce Disease*. APS Press, The American Phytopathological Society. 79 pp.
- [9] Georgopoulos, S.G. and Dovas, C. 1973. Occurrence of *Cercospora beticola* strains resistant to benzimidazole fungicides in northern Greece. *Plant Dis. Rep.* 57: 321-324.
- [10] Koenraadt, H. and Jones, A.J. 1993. Resistance to benomyl conferred by mutations in codon 198 or 200 of the beta-tubulin gene of *Neurospora crassa* and sensitivity to diethofencarb conferred by condon 198. *Phytopathology* 83: 850-854.
- [11] Koenraadt, H., Somerville, S. C. and Jones, A. L. 1992. Characterization of mutations in the beta-tubulin gene of benomyl-resistant field strains of *Venturia inaequalis* and other plant pathogenic fungi. *Phytopathology* 82: 1348-1354.
- [12] Percich, J.A., Nickelson, L.J. and Huot, C.M. 1987. Characterization of two divergent β - tubulin genes from *Colletotrichum graminicola*. *Gene* 86: 163-170.
- [13] Peres, N. A. *et al.* 2004. Benomyl sensitivity of isolates of *Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides* from citrus. *Plant Disease* 88(2): 125-130.
- [14] Raid, R.N. 2004. Lettuce diseases and their management. *In: Diseases of Fruits and Vegetables, Vol. II* (Naqvi, S.A.M.H. ed.). Kluwer Academic Publishers, 121-147.
- [15] Savery, S. 1983. Epidemiology of *Cercospora* leaf spot of lettuce in Republic of the Ivory Coast. *Agron. Sci. Prod. Veg. Environ.* 3: 903-909.
- [16] Weiland, J.J. and Halloin, J.M. 2001. Benzimidazole resistance in *Cercospora beticola* sampled from sugarbeet fields in Michigan, USA. *Can. J. Plant Pathol.* 23: 78-82.
- [17] Toro, R.A. 1929. Plant-disease notes from the Central Andes II. *Phytopathology* 19: 969-974.

DETECTION β -TUBULIN GENE OF CARBENDAZIM-RESISTANT *COLLETOTRICHUM* SPP. CAUSING CHILLI ANTHRACNOSE

Wassamon Boonying^{1,2}, Yoko Miyamoto³, Chikako Miyake³, Yuriko Izumi³,
Kazuya Akimitsu³ and Sarunya Nalumpang^{1,2,*}

¹ Department of Plant Pathology and Entomology, Faculty of Agriculture,
Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand

² Center for Agriculture Biotechnology (AG-BIO/PERDO-CHE), Thailand

³ Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Kagawa University,
Miki, Kagawa 761-0795 Japan

* Corresponding author: sarunya@chiangmai.ac.th

ABSTRACT

Collection of chilli cultivars (*Capsicum* spp.) infected by *Colletotrichum* spp.. One hundred isolates of *Colletotrichum* spp. were successfully obtained, consisting 73 isolates of *Colletotrichum gloeosporioides* and 27 isolates of *C. capsici*. The carbendazim sensitivity assays showed that 43 isolates were highly resistance (HR; ≥ 500 mg/l) phenotype consist of 27 isolates of *C. gloeosporioides* and 16 isolates of *C. capsici*, 57 isolates were sensitive (S; ≤ 1 mg/l) phenotype. Seven isolates HR phenotype were amplified by PCR technique at partial β -tubulin (*TUB2*) gene and sequences nucleotide. The result showed that the PCR amplification β -tubulin gene produced a fragment of 474 bp and homology β -tubulin (*TUB2*) of *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *aeschynomene* (accession No. U14138) about 93-98%. All HR phenotype showed a mutation point with substitution of glutamic acid (GAG) to alanine (GCG) at codon 198 but no mutation point of amino acid was found in the S phenotype.

Keywords: β -tubulin, *Colletotrichum* spp., Fungicide resistance, Chilli anthracnose

INTRODUCTION

Anthracnose is one of the most important tropical diseases of chilli (*Capsicum* spp.) worldwide, caused by *Colletotrichum* species. Anthracnose is also a main problem on mature fruits which causing severe losses due to both pre- and post-harvest fruit decay. Two significant causal pathogens found in Thailand are *Colletotrichum capsici* (Syd.) E.J. Butler & Bisby and *C. gloeosporioides* Penz. & Sacc [5]. In an attempt to control the action of this pathogenic fungi, farmers in Thailand usually use synthetic fungicides, mostly benzimidazole, during the growth season. Benzimidazole fungicide has been used in agriculture for approximately 30 years and showed great efficacy in controlling plant pathogenic fungi.

However, numerous resistance cases of *Colletotrichum* species have been arised and reported as consequences of the fungicides long term application by the farmers [4], including Thailand.

MATERIALS AND METHODS

1. Collection and isolation of *Colletotrichum* spp. causing chilli anthracnose

Anthracnose were collected from chilli's plantation and market in Chiang Mai, Thailand. The sample were isolated by single-spore isolation from infected fruits with sporulation, spore masses were touched with sterilized loop and streaked on surface of potato dextrose agar (PDA) plates and incubated overnight at room temperature. Spore germinated was picked up with sterilized needle and transferred onto PDA.

2. Carbendazim sensitivity assay

Colletotrichum spp. were test on PDA amended with carbendazim concentration 0, 0.1, 1, 10, 100, 500 and 1,000 mg/l. Three replicate plates per treatment were incubated for 7 days at room temperature, the diameter of each colony was measured and the percentages of growth were calculated and data expressed as percentage of the control. Phenotype carbendazim resistibility was evaluated into 4 levels of reactions as highly resistance (HR; \geq 500 mg/l), moderately resistance (MR; \leq 100 mg/l), weakly resistance (WR; \leq 10 mg/l) and sensitive (S; \leq 1 mg/l).

3. Detection of β -tubulin gene by molecular technique

Some isolates of *Colletotrichum* spp. were extract genomic DNA followed protocol described by NucleoSpin®Plant Kit (MACHEREY-NAGEL). DNA amplification was performed by PCR; primers PCR were TUB2L (5'-GTT TCC AGA TCA CCC ACT CC-3') and TUB2R (5'-TGA GCT CAG GAA CAC TGA CG-3'), the 2nd PCR primer were CTB2F1 (5'-TCC AAG ATC CGT GAG G-3') and CTB2R (5'-AAG AAG TGG ACG GG-3') [6]. The sequence was determined using an automated fluorescent DNA sequencer. The sequenced DNA fragments were aligned with CLUSTA W.

RESULTS

1. Collection and isolation of *Colletotrichum* spp. causing chilli anthracnose

One hundred isolates of *Colletotrichum* spp. were successfully isolated, consisting of 73 isolates from cylindrical conidia (9-24 X 3-4.5 μ m) and 27 isolates from falcate conidia (9-14 X 6.5-11.5 μ m). These morphology characteristics were identical with that of *C. gloeosporioides* and *C. capsici* referred by Sutton [7].

2. Carbendazim sensitivity assay

The preliminary test on the potato dextrose agar (PDA) medium amended with carbendazim at 0.1, 10, 50, 100, 500 and 1,000 mg/l concentrations showed that 43 isolates were highly resistance (≥ 500 mg/l), consisting of 27 isolates of *C. gloeosporioides* and 16 isolates of *C. capsici*. Fifty-seven isolates were sensitive (≤ 1 mg/l).

3. Detection of β -tubulin gene by molecular technique

β -tubulin (*TUB2*) gene fragment of nine isolates of *Colletotrichum* spp. were amplified by PCR technique. The result showed that the PCR amplification β -tubulin gene produced a fragment of 474 bp and homology β -tubulin (*TUB2*) of *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *aeschynomene* (accession No. U14138) about 93-98%. All HR phenotype showed a mutation point with substitution of glutamic acid (GAG) to alanine (GCG) at codon 198 but no mutation point of amino acid was found in the S phenotype (Figure 1)

		Target site for benzimidazole [6] 198						
						↓		
TBU2	1	MMATFSVVPS	PKVSDTVVEP	YNATLSVHQL	VENS DATFCI	DNEALYDICM	RTLKLSNPSY	60
CF30 S	1	MMATFSVVPS	PKVSDTVVEP	YNATLSVHQL	VENS DATFCI	DNEALYDICM	RTLKLSNPSY	60
CF5 HR	1	MMATFSVVPS	PKVSDTVVEP	YNATLSVHQL	VENS DATFCI	DNEALYDICM	RTLKLSNPSY	60
CF14 HR	1	MMATFSVVPS	PKVSDTVVEP	YNATLSVHQL	VENS DATFCI	DNEALYDICM	RTLKLSNPSY	60
CF23 HR	1	MMATFSVVPS	PKVSDTVVEP	YNATLSVHQL	VENS DATFCI	DNEALYDICM	RTLKLSNPSY	60
CF43 HR	1	MMATFSVVPS	PKVSDTVVEP	YNATLSVHQL	VENS DATFCI	DNEALYDICM	RTLKLSNPSY	60
CF60 HR	1	MMATFSVVPS	PKVSDTVVEP	YNATLSVHQL	VENS DATFCI	DNEALYDICM	RTLKLSNPSY	60
CF73 HR	1	MMATFSVVPS	PKVSDTVVEP	YNATLSVHQL	VENS DATFCI	DNEALYDICM	RTLKLSNPSY	60
CF86 HR	1	MMATFSVVPS	PKVSDTVVEP	YNATLSVHQL	VENS DATFCI	DNEALYDICM	RTLKLSNPSY	60
TBU2	61	GDLNHL	VSAV	MSGVTTCLRF	PGQLNSDLRK	LAVNMVPFPR	LHF	103
CF30 S	61	GDLNHL	VSAV	MSGVTTCLRF	PGQLNSDLRK	LAVNMVPFPR	LHF	103
CF5 HR	61	GDLNHL	VSAV	MSGVTTCLRF	PGQLNSDLRK	LAVNMVPFPR	LHF	103
CF14 HR	61	GDLNHL	VSAV	MSGVTTCLRF	PGQLNSDLRK	LAVNMVPFPR	LHF	103
CF23 HR	61	GDLNHL	VSAV	MSGVTTCLRF	PGQLNSDLRK	LAVNMVPFPR	LHF	103
CF27 HR	61	GDLNHL	VSAV	MSGVTTCLRF	PGQLNSDLRK	LAVNMVPFPR	LHF	103
CF43 HR	61	GDLNHL	VSAV	MSGVTTCLRF	PGQLNSDLRK	LAVNMVPFPR	LHF	103
CF60 HR	61	GDLNHL	VSAV	MSGVTTCLRF	PGQLNSDLRK	LAVNMVPFPR	LHF	103
CF73 HR	61	GDLNHL	VSAV	MSGVTTCLRF	PGQLNSDLRK	LAVNMVPFPR	LHF	103
CF86 HR	61	GDLNHL	VSAV	MSGVTTCLRF	PGQLNSDLRK	LAVNMVPFPR	LHF	103

Figure 1 Comparison of deduced nucleotide sequences and amino acids of *C. gloeosporioides* f. sp. *aeschynomene* a second beta-tubulin gene [1] at the target sites of benzimidazole [6] between carbendazim-resistant *Colletotrichum* spp. causing chilli anthracnose. (S; sensitive and HR; highly resistance)

DISCUSSION

One hundred isolates of *Colletotrichum* spp. were detected from chilli anthracnose disease, forty-three are classified as highly resistance (HR) isolates, and fifty-seven are sensitive (S) isolates of carbendazim-resistant phenotype. HR phenotypes of *Colletotrichum* spp. developed fungicide resistance because farmers continuously use systemic fungicides to control the action of pathogenic fungi, as reported by many researchers [4]. In this study, we analyzed partial sequences of the second β -tubulin genes in *Colletotrichum* spp. from chilli in Thailand that is responsible for carbendazim resistance. All HR phenotype showed a mutation point with substitution of glutamic acid (GAG) to alanine (GCG) at codon 198 but no mutation point of amino acid was found in the S phenotype. The amino acid mutation of codon 198 in the β -tubulin genes has been identified in fungicide-resistant fungi such as *Colletotrichum* spp. causing anthracnose from various fruit crops in Japan [8], *C. cereale* causing turfgrass anthracnose in California [9], *Venturia inaequalis* causing scab disease of apple in Michigan and other plant pathogenic fungi [3]. Therefore, we conclude that mutations in codon 198 of the β -tubulin gene confer resistance to carbendazim in *Colletotrichum* spp. The presence of fungicide resistance may result from single or multiple gene mutation. This indicates that careful management of chemical fungicides in control and to focus on alternative management tactics for this disease in chilli.

ACKNOWLEDGMENTS

This research is partially supported by the Center for Agricultural Biotechnology, Postgraduate Education and Research Development Office, Commission on Higher Education, Ministry of Education, Thailand. And I would like to thank are also due to Plant Pathology Laboratory, Faculty of Agriculture, Kagawa University, Japan.

REFERENCES

- [1] Buhr, T. L. and Dickman, M.B. 1994. Isolation, characterization, and expression of a second β -tubulin encoding gene from *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *aeschynomene*. *Applied and Environmental Microbiology* 60: 4155-4159.
- [2] Farungsang, U., Farungsang, N. and Sangchote, S. 1992. Benomyl resistance of *Colletotrichum* spp. *Acta Horticulture* 321: 891-897.
- [3] Koenraadt, H., Somerville, S.C. and Jones, A.L. 1992. Characterization of mutations in the beta-tubulin gene of benomyl-resistance field strain of *Venturia inaequalis* and other plant pathogenic fungi. *Phytopathology* 82: 1348-1354.
- [4] Nakaune, R. and Nakano, M. 2007. Benomyl resistance of *Colletotrichum acutatum* is caused by enhanced expression of beta-tubulin 1 gene regulated by putative leucine zipper protein CaBEN1. *Fungal Genetics and Biology* 44: 1324-1335.

- [5] Pakdeevaporn, P. *et al.* 2005. Inheritance of resistance to anthracnose caused by *Colletotrichum capsici* in *Capsicum*. *Plant Breeding* 124: 206-208.
- [6] Peres, N. A. R. *et al.* 2004. Activity of benomyl for control of postbloom fruit drop of citrus caused by *Colletotrichum acutatum*. *Plant Disease* 86: 620-624.
- [7] Sutton, C.B. 1980. *The Coelomycetes: Fungi imperfect with pycnidia, acervuli and stromata*. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey. 696 pp.
- [8] Chung, W.-S. *et al.* 2006. Fungicide sensitivity and phylogenetic relationship of anthracnose fungi isolated from various fruit crop in Japan. *Plant Disease* 90: 506-512.
- [9] Wong, F.P. *et al.* 2008. Detection and characterization of benzimidazole resistance in California populations of *Colletotrichum cereale*. *Plant Disease* 92: 239-246.



การประชุมใหญ่สามัญประจำปีสมาคมโรคพืชแห่งประเทศไทย
และการประชุมวิชาการโรคพืชแห่งประเทศไทย
THE ANNUAL MEETING OF THAI PHYTOPATHOLOGICAL SOCIETY (TPS)
AND
CONFERENCE ON PLANT PATHOLOGY IN THAILAND

วันเสาร์ที่ 15 พฤษภาคม 2553
Saturday 15 May 2010

ณ

ศูนย์ประชุมมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ชั้น 8 ห้อง 804

อาคารวิทยบริการ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน กรุงเทพฯ

AT

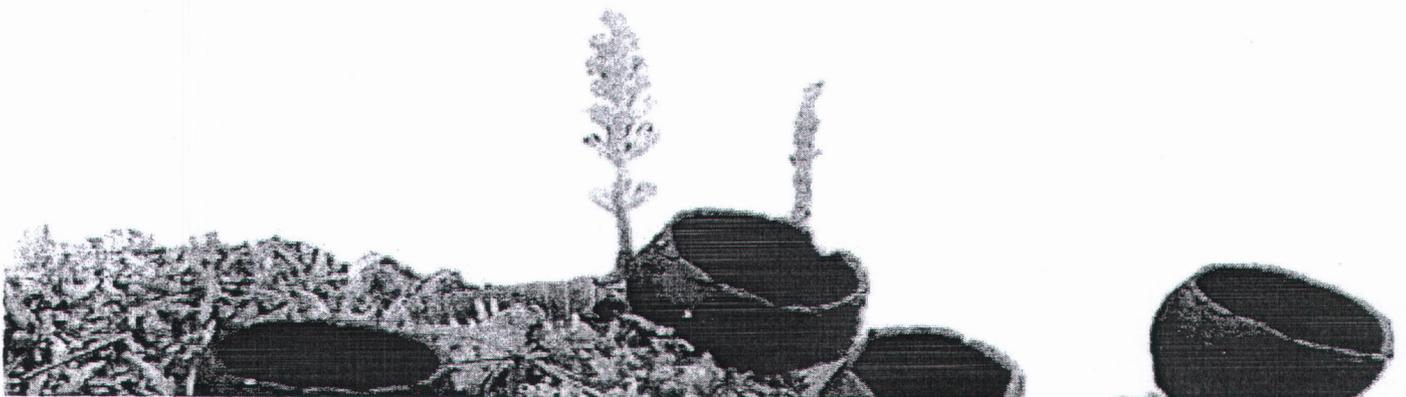
KU Convention Center 8th Floor, Room No. 804
Office of Academic Services, Kasetsart University, Bangkok, Thailand

วิทยาการโรคพืชเพื่อการเกษตรที่ปลอดภัย
Plant Pathology for Safe Agriculture

ดำเนินการประชุมโดย สมาคมโรคพืชแห่งประเทศไทย ตึกอิงศรีกสิการ

กลุ่มวิจัยโรคพืช กรมวิชาการเกษตร เขตจตุจักร กรุงเทพฯ 10900

Organized by Thai Phytopathological Society (TPS) Inkasrikasikarn Building,
Plant Pathology Research Group, Department of Agriculture, Chatuchak,
Bangkok 10900, Thailand



ประสิทธิภาพการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคพืชบางชนิดของเชื้อแอกติโนมัยซีสที่แยกจากดิน

นิศากร สุวรรณ^{1,2} ณัฐพงษ์ นวลดี^{1,2} วรรมน บุญยิ่ง^{1,2} อรพรรณ วิโสภา¹ ชัยวัฒน์ โตอนันต์¹ และสรัญญา ณ ลำปาง^{1,2*}

¹ภาควิชากีฏวิทยาและโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จ.เชียงใหม่ 50200

²ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพการเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษา

บทคัดย่อ: การแยกเชื้อแอกติโนมัยซีสจากดินบริเวณอุทยานแห่งชาติดอยสุเทพ-ปุย และจากแปลงปลูกพริกใน อ. สันทราย พบว่าแยกเชื้อแอกติโนมัยซีสได้ 191 ไอโซเลท เมื่อนำเชื้อแอกติโนมัยซีสที่แยกได้มาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคพืชต่างๆ โดยวิธี dual culture พบว่าเชื้อแอกติโนมัยซีส 6 ไอโซเลท ได้แก่ OMA60-01, OMA60-07, SEA60-34, SEA120-04, SEA120-28 และ SEA120-38 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Cercospora* spp. สาเหตุโรคใบจุดผักสลัด, *Colletotrichum* spp. สาเหตุโรคแอนแทรคโนสมะม่วงและพริก และ *Fusarium oxysporum* f. sp. *callistephi* สาเหตุโรคเหี่ยวเหลืองควาวเรืองได้มากกว่า 70% ขึ้นไป โดยพบว่าเชื้อแอกติโนมัยซีสดังกล่าวสามารถผลิตเอนไซม์ chitinase และ cellulase ได้ เมื่อทดสอบประสิทธิภาพของน้ำเลี้ยงเชื้อแอกติโนมัยซีสที่ไม่ผ่านการกรอง (non-filtrate; NF) ในการยับยั้งเชื้อราดังกล่าว พบว่าน้ำเลี้ยงเชื้อแอกติโนมัยซีสไอโซเลท OMA60-07 และ OMA60-01 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. และ *Fusarium oxysporum* f. sp. *callistephi* ได้สูงกว่าไอโซเลทอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อแอกติโนมัยซีสทั้ง 6 ไอโซเลท ที่เจริญบนอาหาร GYM และ IMA-2 พบว่าเชื้อแอกติโนมัยซีสไอโซเลท OMA60-01, OMA60-07, SEA60-34, SEA120-04 และ SEA120-28 มีลักษณะโคโลนีสีขาว นูน(convex) ผิวโคโลนีนูน ขรุขระ แต่แอกติโนมัยซีสไอโซเลท SEA120-38 มีลักษณะโคโลนีสีขาว ผิวแบนราบ (flat) เชื้อแอกติโนมัยซีสทั้ง 6 ไอโซเลท มีการสร้างสปอร์ลักษณะขดม้วน ต่อกันเป็นวงคล้ายขดลวดสปริง (coil) ไม่พบการสร้างรงควัตถุ (pigment) มีองค์ประกอบของผนังเซลล์เป็นชนิด LL และจากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคทางอณูชีววิทยาของยีนบนตำแหน่ง 16S rDNA พบว่าเชื้อแอกติโนมัยซีสทั้ง 6 ไอโซเลทจัดอยู่ใน genus *Streptomyces*

คำสำคัญ: แอกติโนมัยซีส, การควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี, 16S rDNA

*Corresponding author: สรัญญา ณ ลำปาง; e-mail: sarunya@chiangmai.ac.th

จุดกลายพันธุ์บนยีนเบต้าทูปูลินของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของมะม่วงที่ต้านทานสารควบคุมเชื้อราคาร์เบนดาซิม

พรประพา คงตระกูล^{1, 2}, Yoko Miyamoto³, Chikako Miyake³, Yuriko Izumi³, Kazuya Akimitsu³ และ สรัญญา ณ ลำปาง^{1, 2*}

¹ภาควิชากีฏวิทยาและโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

²ศูนย์ด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษา

³คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยคากาวา ประเทศญี่ปุ่น

บทคัดย่อ: การแยกเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของมะม่วง 11 สายพันธุ์ที่เก็บรวบรวมจากตลาดและสวนจำนวน 150 ไอโซเลทแล้วประเมินความสามารถในการต้านทานสารควบคุมเชื้อราคาร์เบนดาซิม โดยทดสอบบนอาหาร potato dextrose agar ผสมสารควบคุมเชื้อราคาร์เบนดาซิมที่ระดับความเข้มข้น 0.1, 1, 10, 100, 500 และ 1,000 mg/l ตามลำดับ ด้วยเกณฑ์ประเมินระดับความต้านทานดังนี้ ต้านทานระดับสูง (HR; ≥ 500 mg/l), ต้านทานระดับปานกลาง (MR; ≤ 100 mg/l), ต้านทานระดับต่ำ (WR; ≤ 10 mg/l) และระดับอ่อนแอ (S; ≤ 1 mg/l) ผลการทดลองพบเชื้อรากลุ่ม HR จำนวน 113 ไอโซเลท และกลุ่ม S จำนวน 37 ไอโซเลท เมื่อวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนจากตัวอย่างเชื้อราแต่ละระดับความต้านทานตรงตำแหน่งบางส่วนของยีนเบต้าทูปูลิน (*TUB2*) เมื่อเปรียบเทียบกับ *C. gloeosporioides* f. sp. *aeschynomene* สายพันธุ์ wild type (accession no. U14138) พบการเปลี่ยนแปลงของลำดับนิวคลีโอไทด์จาก adenine (A) เป็น cytosine (C) ของเชื้อรากลุ่ม HR เป็นผลให้ที่ตำแหน่งของกรดอะมิโน codon 198 เกิดการกลายพันธุ์ จาก glutamic acid (GAG) ของเชื้อรากลุ่ม S เป็น alanine (GCG) ซึ่งสัมพันธ์กับลักษณะกลายพันธุ์ที่แสดงออกตามธรรมชาติต่อสารคาร์เบนดาซิม

คำสำคัญ: การต้านทานสารควบคุมเชื้อรา, โรคแอนแทรคโนสของมะม่วง, *Colletotrichum gloeosporioides*

*Corresponding author: สรัญญา ณ ลำปาง; e-mail: sarunya@chiangmai.ac.th

**เชื้อรา *Emericella rugulosa* และสารออกฤทธิ์ที่มีผลต่อการยับยั้งการเจริญเติบโต
ของเชื้อรา *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* สาเหตุโรคเหี่ยวของมะเขือเทศ**

สินาง หงสนันทน¹ สรัญญา วัลยะเสวี¹ และเกษม สร้อยทอง^{2*}

¹ภาควิชากีฏวิทยาและโรคพืช สาขาวิชาโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ อ.เมือง
จ. เชียงใหม่ 50200

²คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง เขตลาดกระบัง
กรุงเทพฯ 10520

บทคัดย่อ: การทดสอบในห้องปฏิบัติการพบว่าเชื้อรา *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* isolate NKSC02 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่รุนแรงต่อการทำให้เกิดโรคเหี่ยวมะเขือเทศพันธุ์เซอร์รี กับการใช้เชื้อราที่มีคุณสมบัติเป็นจุลินทรีย์ต่อต้าน(antagonist) เช่น *Emericella rugulosa* เพื่อยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราสาเหตุโรคดังกล่าวด้วยวิธีการเลี้ยงเชื้อร่วมในอาหาร(biculture) พบว่าเชื้อรา *E. rugulosa* มีคุณสมบัติยับยั้งการเจริญเติบโตของราสาเหตุโรคเหี่ยวมะเขือเทศได้ 34.74% ยับยั้งการสร้าง macro-conidia ได้ 88.69% และยับยั้งการสร้าง microconidia ได้ 77.71% ส่วนการใช้สารสกัด SKPP007 ซึ่งเป็นสารบริสุทธิ์จากเชื้อรา *Emericella rugulosa* พบว่า SKPP007 สามารถยับยั้ง macroconidia ของเชื้อสาเหตุโรคได้ดี มีค่า ED₅₀ เท่ากับ 167 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และพบว่า conidia ของเชื้อราสาเหตุโรคเหี่ยวมีรูปร่างผิดปกติไปจากเดิม

คำสำคัญ: *Emericella rugulosa*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* isolate NKSC02, tomato wilt

*Corresponding author: Kasem Soyong; e-mail: kskasem@kmitl.ac.th



บทคัดย่อ

การสัมมนาทางวิชาการ

วิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวแห่งชาติ ครั้งที่ 8

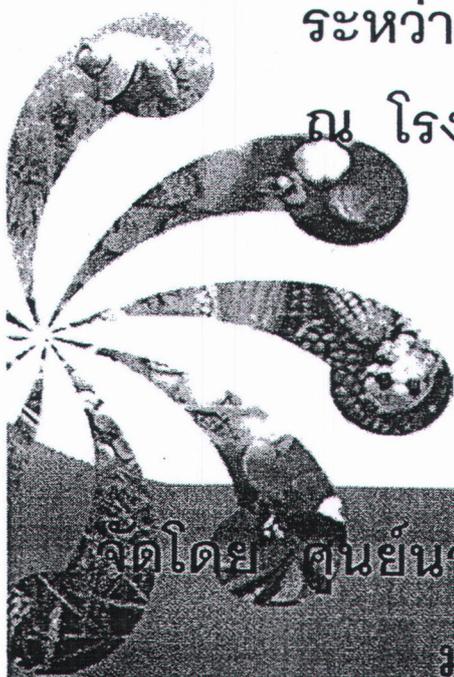
8th National Postharvest Technology

Conference 2010

ABSTRACT

ระหว่างวันที่ 1-3 กันยายน 2553

ณ โรงแรม ดิเอ็มเพรส เชียงใหม่



จัดโดย ศูนย์นวัตกรรมเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ประสิทธิภาพของน้ำเลี้ยงเชื้อแอกติโนมัยซีสในการควบคุมเชื้อรา *Colletotrichum* sp.
สาเหตุโรคแอนแทรกโนสของพริก
Efficiency of actinomycetes culture medium for controlling *Colletotrichum* sp. causing
chilli anthracnose disease

พรนภา โทตรี¹ ชาติชาย ไชนงนุช² และสรัญญา ณ ลำปาง³
Pomnapa Thotree,¹ Chatchai Knongnuch² and Sarunya Nalumpang³

บทคัดย่อ

การศึกษาค้นคว้าเพื่อหาประสิทธิภาพของน้ำเลี้ยงเชื้อแอกติโนมัยซีสในการยับยั้งการเจริญเส้นใยและการงอกของสปอร์เชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรกโนสของพริก พบว่า เมื่อนำเชื้อแอกติโนมัยซีสที่แยกได้จากดินบนดอยสุเทพ-ปุยจำนวน 6 ไอโซเลท ได้แก่ SEA120-04, SEA120-28, SEA120-38, SEA60-34, OMA60-01 และ OMA60-07 มาเลี้ยงในอาหาร enzyme production medium (EPM) ที่ 28°C เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นทดสอบการยับยั้งการเจริญเส้นใยและการงอกของสปอร์เชื้อราด้วยวิธี agar well method โดยแบ่งน้ำเลี้ยงเชื้อแอกติโนมัยซีสเป็น 2 ส่วน ได้แก่ ส่วนที่ไม่ได้กรองเอาสปอร์ของเชื้อแอกติโนมัยซีสออก (non-culture filtrate, NF) และส่วนที่ผ่านการกรองเอาสปอร์ออก (culture filtrate, F) เปรียบเทียบกับชุดควบคุม คืออาหาร EPM พบว่า NF ของทุกไอโซเลทให้ผลการยับยั้งสูงกว่า F อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยน้ำเลี้ยงเชื้อแอกติโนมัยซีสไอโซเลท OMA60-01 ทั้ง NF และ F มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญเส้นใยเชื้อราเท่ากับ 56.39% และ 51.87% ตามลำดับ อีกทั้งสามารถยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อราได้อีกด้วย เมื่อนำ NF และ F ของ OMA60-01 มาทดสอบความสามารถในการยับยั้งโรคบนผลพริกพบว่า การแช่ผลพริกใน NF และ F เป็นเวลา 1 และ 3 นาที ก่อนปลูกเชื้อสาเหตุสามารถยับยั้งการเกิดโรคได้สูงถึง 80% ซึ่งไม่แตกต่างจากการใช้เชื้อ *B. subtilis* ที่ใช้ในเชิงการค้า จากการศึกษาคุณสมบัติบางประการของน้ำกรองเลี้ยงเชื้อแอกติโนมัยซีส (F) พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ไคตินเนสในน้ำกรองเลี้ยงเชื้อ OMA60-01 มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงที่สุดเท่ากับ 0.15 U/ml และเมื่อนำมาทำให้เข้มข้นขึ้นด้วยการกรองผ่าน ultrafiltration membrane พบว่าส่วนที่ไม่ผ่านการกรองซึ่งส่วนใหญ่เป็นเอนไซม์ไคตินเนสยังให้ผลการยับยั้งการเจริญและการงอกของสปอร์เชื้อราเช่นเดียวกับน้ำกรองเลี้ยงเชื้อ (F) ปกติ
คำสำคัญ: น้ำเลี้ยงเชื้อแอกติโนมัยซีส, แอนแทรกโนส, พริก

Abstract

This study for evaluate the efficiency of culture medium from soil actinomycetes against *Colletotrichum gloeosporioides* causing chilli anthracnose disease. Six actinomycetes isolated from Doi Suthep-Pui soil; SEA120-04, SEA120-28, SEA120-38, SEA60-34, OMA60-01 and OMA60-07, were cultivated on enzyme production medium (EMP) 28 °C for 7 days. After that culture medium of each isolate was separated in 2 parts; non-culture filtrate (NF) and culture filtrate (F), were tested against of *C. gloeosporioides* by using agar well method and EMP as a control. The results showed a significant difference on inhibition activity between NF and F of all actinomycetes. Both NF and F of isolate OMA60-01 were found to inhibited mycelial growth at 56.39% and 51.87%, respectively. Moreover, they could suppress spore germination of fungi. The NF and F of isolate OMA60-01 were tested for prevention of anthracnose disease on chilli. The chillis were treated in NF and F for 1 and 3 min before inoculation with spore suspensions of *C. gloeosporioides* showed biocontrol efficacy up to 80% as well as using commercial *Bacillus subtilis*. The chitinase activity of culture filtrate was observed. The isolate OMA60-01 showed the highest chitinase activity (0.15 U/ml) and then the chitinase was concentrated by using ultrafiltration membrane. It found that the inhibition activity of concentrated chitinase was not difference from culture filtrate (F).

Keywords: culture medium, anthracnose, chilli

¹ สถาบันวิจัยเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว/ ศูนย์นวัตกรรมเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ 50200

² Postharvest technology research institute / Postharvest Technology Innovation Center, Chiangmai University 50200

³ ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพทางอุตสาหกรรมเกษตร คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ 50200

² Department of Agro-Biotechnology, Faculty of Agro-Industry, Chiangmai University, Chiangmai 50200

³ ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ 50200

³ Department of Plant pathology, Faculty of Agriculture, Chiangmai University, Chiangmai 50200

ประสิทธิภาพของน้ำส้มควันไม้จากต้นยูคาลิปตัสและสะเดาในการควบคุมเชื้อรา
Colletotrichum gloeosporioides สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้
 Efficiency of vinegar extracts from eucalyptus and neem trees for controlling
Colletotrichum gloeosporioides of mango cv. 'Nam Dok Mai' causing anthracnose

วิลาลินี แสงนาค¹ และ สรัญญา ณ ลำปาง¹
 Vilasinee Sangnak¹ and Sarunya Nalumpang¹

บทคัดย่อ

จากการศึกษาประสิทธิภาพของน้ำส้มควันไม้จากต้นยูคาลิปตัสและสะเดา ในการควบคุมเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสในมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้ โดยการรวบรวมเชื้อราทั้งหมด 150 ไอโซเลท แล้วทดสอบความทนทานต่อสารกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิม พบเชื้อราที่ต้านทานสารป้องกันกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิมระดับสูง (HR) จำนวน 94 ไอโซเลท (62.67%), ต้านทานระดับปานกลาง (MR) 1 ไอโซเลท (0.67%) และระดับอ่อนแอ (S) 37 ไอโซเลท (24.67%) จากนั้นทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *C. gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสในมะม่วงสายพันธุ์ละ 1 ไอโซเลท โดยใช้น้ำส้มควันไม้ทั้ง 2 ชนิด ผสมอาหารเลี้ยงเชื้อ potato dextrose agar (PDA) พบว่าน้ำส้มควันไม้ที่มีความเข้มข้นตั้งแต่ 2% ขึ้นไป ยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราได้ 100% เมื่อทดสอบการงอกของโคนินเดียเป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าน้ำส้มควันไม้ที่มีความเข้มข้นตั้งแต่ 1% (v/v) ขึ้นไป สามารถยับยั้งการงอกของสปอร์ได้ 100% ซึ่งประสิทธิภาพของน้ำส้มควันไม้ยูคาลิปตัสที่ระดับความเข้มข้นน้อยสามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใย และการงอกของสปอร์เชื้อราได้ดีกว่าน้ำส้มควันไม้สะเดา สำหรับการทดสอบประสิทธิภาพของน้ำส้มควันไม้ยูคาลิปตัสในการควบคุมโรคบนผลมะม่วง โดยแช่มะม่วงในน้ำส้มควันไม้ที่มีความเข้มข้น 1, 2 และ 3% (v/v) เป็นเวลา 1, 3 และ 5 นาที แล้วปลูกเชื้อ พบว่าการแช่มะม่วงในน้ำส้มควันไม้ 1% (v/v) เป็นเวลา 1 นาที มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเกิดโรคสูงสุด ซึ่งเมื่อตรวจสอบคุณภาพของมะม่วงภายหลังจากการแช่น้ำส้มควันไม้เป็นเวลา 16 วัน พบว่ากลิ่นจะหายไปในวันแรกหลังจากการแช่น้ำส้มควันไม้ และไม่พบอาการของโรคที่ผล ในขณะที่ชุดควบคุมนั้น บนผลมะม่วงแสดงอาการของโรคทั่วทั้งผล ส่วนสีผิว และรสชาติของมะม่วงไม่ต่างจากมะม่วงก่อนนำมาแช่น้ำส้มควันไม้

คำสำคัญ : น้ำส้มควันไม้, *Colletotrichum gloeosporioides*, มะม่วง

Abstract

Assays on the efficiency of vinegar extracts of eucalyptus and neem trees in controlling *Colletotrichum gloeosporioides* were carried out. The methods used in this study included isolation of the *C. gloeosporioides* from mango cv. 'Nam Dok Mai', sensitivity assays of the *C. gloeosporioides* to the carbendazim fungicide and inhibition activity assays of vinegar extracts of eucalyptus and neem trees to the *C. gloeosporioides*. The results showed that from a total of 150 *C. gloeosporioides* isolated from mango cv. 'Nam Dok Mai', 94 isolates (62.67%) were highly resistant (HR), 1 isolate (0.67%) was moderately resistance (MR) and 37 isolates (24.67%) were sensitive (S) to the carbendazim fungicide. Three isolates, one isolate from each phenotype, were selected in the inhibition activity assays of the vinegar extracts of eucalyptus and neem trees to the *C. gloeosporioides*. Both vinegar extracts were screened for their inhibition activity against *C. gloeosporioides* on agar plates by mixing the extracts with potato dextrose agar (PDA). In this experiment, both vinegar extracts could completely inhibit the hyphal growth of *C. gloeosporioides* (100% efficiency) at 2% (v/v) concentration, and showed inhibition activity to the conidial germination of *C. gloeosporioides* (100% efficiency) after 24 hour at 1% (v/v) concentration. The lower eucalyptus vinegar extract concentration could inhibit the hyphal growth and conidial germination better than neem vinegar extract. The inhibition activity assays was also carried out by soaking mango fruits into eucalyptus vinegar extract at 1, 2 and 3% (v/v) concentration for 1, 3 and 5 min. The soaking mango fruits in 1% eucalyptus vinegar extract for 1 min produced the highest inhibition activity on the anthracnose disease incident of the mango fruits. The vinegar extract smell was faded away within a day. Using this combination, the mango fruits did not show any anthracnose symptom up to 16 days incubation period while the control has shown the symptom over the mango. As for the skin and taste were not differences from the mango before soaking. In conclusion, vinegar extract of eucalyptus wood has a potential as an alternative agent for controlling anthracnose disease of mango fruits.

Keyword: vinegar extract, *Colletotrichum gloeosporioides*, mango

¹ภาควิชากีฏวิทยาและโรคพืช สาขาโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เชียงใหม่ 50200

¹ Department of Entomology and Plant Pathology, Major Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Chiang Mai University

ลักษณะของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* ที่ต้านทานสารคาร์เบนดาซิม สาเหตุโรคแอนแทรกโนสบนผลมะม่วงจากตลาดสด

Characterization of carbendazim-resistant *Colletotrichum gloeosporioides* causing mango anthracnose disease on fruits from fresh markets

พรประพา คงตระกูล^{1,2} และ สรัญญา ณ ลำปาง^{1,2}
Pomprapa Kongtragoul^{1,2} and Sarunya Nalumpang^{1,2}

บทคัดย่อ

เก็บรวบรวมเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรกโนสบนผลมะม่วง จากตลาดสด ในจังหวัดเชียงใหม่ จำนวน 100 ไอโซเลท จากนั้นทดสอบความสามารถในการต้านทานสารป้องกันกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิมบนอาหาร potato dextrose agar ผสมสารกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิมที่ระดับความเข้มข้น 0.1, 1, 10, 100, 500 และ 1,000 mg/l ตามลำดับ โดยประเมินระดับความต้านทานดังนี้ ต้านทานระดับสูง (HR; ≥ 500 mg/l), ต้านทานระดับปานกลาง (MR; ≤ 100 mg/l), ต้านทานระดับต่ำ (WR; ≤ 10 mg/l) และระดับอ่อนแอ (S; ≤ 1 mg/l) ผลการทดลองพบเชื้อรากลุ่ม HR จำนวน 95 ไอโซเลท และกลุ่ม S จำนวน 5 ไอโซเลท เมื่อวิเคราะห์หาคodon ในจากตัวอย่างเชื้อราแต่ละระดับความต้านทาน ที่ตำแหน่งบางส่วนของยีนเบต้าทูบูลิน (*TUB2*) เปรียบเทียบกับ *C. gloeosporioides* f. sp. *aeschyromene* (accession no. U14138) พบการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนตรงตำแหน่ง codon 198 ของเชื้อรากลุ่ม HR จาก glutamic acid (E) ของเชื้อรากลุ่ม S เป็น alanine (A) ซึ่งสัมพันธ์กับลักษณะกลายพันธุ์ที่แสดงออกต่อสารคาร์เบนดาซิมจากแปลงปลูก

คำสำคัญ: ความต้านทานสารกำจัดเชื้อรา, โรคแอนแทรกโนสของมะม่วง, *Colletotrichum gloeosporioides*

Abstract

Isolates of *Colletotrichum gloeosporioides* causing anthracnose disease were obtained from infected mango fruits collected from fresh market in Chiang Mai. One hundred isolates were successfully isolated. The carbendazim-resistant assay was conducted on potato dextrose agar amended with carbendazim at various concentrations: 0.1, 1, 10, 100, 500 and 1,000 mg/l, respectively. These isolates were classified into four representative phenotypes of reactions as highly resistant (HR; ≥ 500 mg/l), moderately resistant (MR; ≤ 100 mg/l), weakly resistant (WR; ≤ 10 mg/l) and sensitive (S; ≤ 1 mg/l). The results showed that 95 isolates were HR, and 5 isolates were S phenotype. The differences in the carbendazim-resistant phenotypes were conspicuous in sequence analysis of the partial second beta-tubulin (*TUB2*) gene. Amino acid sequence analysis in comparison with wild type *C. gloeosporioides* f. sp. *aeschyromene* (accession no. U14138) was carried out HR phenotype revealed a substitution of codon 198, which encoded glutamic acid (E) in S phenotype, was converted to a codon for alanine (A) which was closely associated with conferring carbendazim resistance of phenotypic mutation from field.

Keywords: fungicide resistance, mango anthracnose disease, *Colletotrichum gloeosporioides*



¹ สาขาวิชาโรคพืช ภาควิชากีฏวิทยาและโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

¹ Plant Pathology Program, Department of Entomology and Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Chiang Mai University

² ศูนย์ด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษา

² Center for Agriculture Biotechnology (AG-BIO/PERDO-CHE) Thailand.

