ลักษณะของเชื้อรา *Cercospora* ที่ต้านทานสารคาร์เบนดาซิม สาเหตุโรคใบจุดของผักกาดหอมในจังหวัดเชียงใหม่

Characterization of Carbendazim-resistant *Cercospora* Causal Agent of Lettuce Leaf Spots in Chiang Mai Province

ณัฐพงษ์ นวลดี (Nattapong Nuandee)[1,2], *พรประพา คงตระกูล (Pornprapa Kongtragoul)*[1,2], *วรรยมน บุญยิ่ง (Wassamon Boonying)*[1,2], *Iman Hidayat*[1], *Yoko Miyamoto*[3], *Yuriko Izumi*[3], *Kazuya Akimitsu*[3] *และ สรัญยา ณ ลำปาง (Sarunya Nalumpang)**[1,2]

บทคัดย่อ

เชื้อรา *Cercospora* spp. สาเหตุโรคใบจุด ที่แยกได้จากผักกาดหอม 5 ชนิด ในจังหวัดเชียงใหม่ จำนวน 49 ไอโซเลต เมื่อประเมินความไวต่อสารคาร์เบนดาซิมโดยการเลี้ยงเชื้อทุกไอโซเลตบนอาหาร potato dextrose agar ที่มีสารระดับความเข้มข้น 1, 10, 50, 100, 500 (อัตราแนะนำ) และ 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยจัดระดับความต้านทานของเชื้อดังนี้ ความต้านทานระดับสูง (HR; ≥ 500 มิลลิกรัมต่อลิตร), ต้านทานระดับปานกลาง (MR; ≤ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร), ต้านทานระดับต่ำ (WR; ≤ 10 มิลลิกรัมต่อลิตร) และระดับอ่อนแอ (S; ≤ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร) ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าเชื้อราในกลุ่ม HR มีจำนวน 48 ไอโซเลต เมื่อทำการวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโน ตรงบริเวณบางส่วนของยีน beta-tubulin (*TUB1*) เพื่อเปรียบเทียบกับเชื้อราระดับอ่อนแอ (Accession No. AY856373) พบการแทนที่ของลำดับนิวคลีโอไทด์จาก adenine (A) เป็น cytosine (C) ของเชื้อรากลุ่ม HR เป็นผลให้กรดอะมิโนของโปรตีนที่ตำแหน่งของ codon 198 เกิดการเปลี่ยนแปลงจาก glutamic acid (GAG) ของเชื้อรากลุ่ม S เป็น alanine (GCG)

Abstract

Total 49 *Cercospora* isolates causing leaf spot disease were isolated from five lettuces in Chiang Mai. The carbendazim-sensitivity assays were conducted by growing all isolates on potato dextrose agar contained the carbendazim at 1, 10, 50, 100, 500 (recommended concentration) and 1,000 mg/l concentration. 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 result showed that 48 isolates were highly resistant to the carbendazim. The partial beta-tubulin (*TUB1*) gene sequences of *Cercospora* isolates. Nucleotide and amino acid sequence analysis compare with S phenotype (Accession no. AY856373). The results showed a single nucleotide transversion of adenine to cytosine, resulting in a substitution at codon 198, which encodes glutamic acid (GAG) in S phenotype and converts it to alanine (GCG) in HR phenotype.

คำสำคัญ: การต้านทานสารป้องกันกำจัดเชื้อรา, เบนซิมิดาโซล, ยีน beta-tubulin

Keywords: benzimidazole, beta-tubulin gene, fungicide resistance

[1] *ภาควิชากีฏวิทยาและโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่*

[2] *ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษา*

[3] *คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยคากาว่า ประเทศญี่ปุ่น*

* *Corresponding author, e-mail: sarunya@chiangmai.ac.th*

บทนำ

เชื้อรา *Cercospora* เป็นสาเหตุโรคใบจุดที่ทำความเสียหายกับพืชผักทั่วโลก โดยเฉพาะกลุ่มผักกาดหอม (lettuce) (Shin and Kim, 2001; Agrios, 2005) การควบคุมป้องกันกำจัดโรคใบจุด *Cercospora* สามารถทำได้หลายวิธี เช่น การเขตกรรม การใช้พืชพันธุ์ต้านทาน และการฉีดพ่นสารเคมี (France et al., 2001) อย่างไรก็ตามการทำเกษตรในปัจจุบัน นิยมใช้สารเคมีชนิดดูดซึม (systemic fungicide) ในการควบคุมป้องกันกำจัดโรค เพราะควบคุมโรคได้ผลดีและรวดเร็ว (De Waard et al., 1993)

สารเคมีกลุ่มเบนซิมิดาโซล (benzimidazole) โดยเฉพาะสารคาร์เบนดาซิม (carbendazim) เป็นที่นิยมใช้ควบคุมเชื้อรา *Cercospora* spp. สาเหตุโรคใบจุด (Chandra et al., 1998) สารเคมีชนิดนี้ออกฤทธิ์แบบเฉพาะจุด กล่าวคือจะเข้าไปจับกับโปรตีนทูบูลิน (tubulin) โดยเข้าไปจับอย่างจำเพาะเจาะจงกับโปรตีน beta-tubulin subunit ซึ่งเป็นองค์ประกอบหนึ่งของโครงสร้าง microtubules โครงสร้างนี้มีลักษณะคล้ายเส้นด้าย สำหรับดึงโครโมโซมให้แยกคู่ (Ma and Michailides, 2005) เนื่องด้วยลักษณะของการออกฤทธิ์แบบจำเพาะจุดนี้ ประกอบกับการใช้สารเคมีอย่างต่อเนื่อง จะส่งผลทำให้เชื้อราสาเหตุโรคพืชเกิดการปรับตัวเอง หรือกลายพันธุ์ให้ต้านทานต่อสารเคมีเพื่อความอยู่รอด ผลจากการฉีดพ่นสารเคมีดังกล่าวเป็นเวลานานจึงมีรายงานพบเชื้อรา *Cercospora* spp. ต้านทานต่อสารเบนซิมิดาโซลในหลายประเทศ (Imazaki et al., 2006) การต้านทานสารในกลุ่มนี้ เกิดจากการเปลี่ยนแปลงของลำดับกรดอะมิโนของยีน beta-tubulin (*TUB*) ณ ตำแหน่งจับของสารเบนซิมิดาโซล (benzimidazole binding site) (Ma and Michailides, 2005) ลักษณะการกลายพันธุ์นี้สามารถถ่ายทอดไปสู่ลูกหลานได้ (Sisler, 1998) เมื่อเชื้อราเกิดการต้านทานต่อสารเคมีขึ้น เกษตรกรจึงเพิ่มอัตราการใช้สารเคมีสูงขึ้น ทำให้ส่งผลเสียต่อสภาพแวดล้อม ความหลากหลายทางชีวภาพ และคุณภาพของดิน อีกทั้งยังส่งผลกระทบต่อเกษตรกรผู้ใช้และสุขภาพของผู้บริโภค จนกลายเป็นปัญหาใหญ่ในพื้นที่เพาะปลูก (Briere et al., 2001) ส่วนการศึกษาความต้านทานต่อสารในกลุ่มนี้ ส่วนใหญ่จะศึกษาเกี่ยวข้องกับจุดกลายพันธุ์ บนยีน *TUB* ซึ่งเกิดจากการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนตรงตำแหน่งจับของสารกลุ่มเบนซิมิดาโซล พบการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง codon 198 มีรายงานมากที่สุด กล่าวคือกรดอะมิโน glycine, lysine, alanine หรือ valine จะเข้าไปแทนที่ glutamic acid ในตำแหน่ง codon นี้ (Ma and Michailides, 2005) ทั้งนี้พบว่ามีรายงานการศึกษาความต้านทานของเชื้อรา *Cercospora* spp. ต่อสารในกลุ่มเบนซิมิดาโซล บริเวณยีน *TUB1* เนื่องจากเป็นบริเวณที่คาดว่ามีตำแหน่งที่เกิดจุดกลายพันธุ์ (Davidson et al., 2006)

สำหรับประเทศไทย เชื้อรา Cercospora spp. ยังไม่มีรายงานการตรวจสอบความต้านทานต่อสารในกลุ่มเบนซิมิดาโซลจนถึงปัจจุบัน ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินระดับความต้านทานสารคาร์เบนดาซิมที่ระดับ phenotype และ genetic mutation เพื่อให้เกิดความเข้าใจในกระบวนการต้านทานสารเคมีของเชื้อราสาเหตุ และนำข้อมูลที่ได้ไปปรับใช้เป็นกลยุทธ์ในการวางแผนควบคุมป้องกันกำจัดเชื้อรา *Cercospora* spp. สาเหตุโรคใบจุดต่อไป รวมถึงวิธีการใช้สารเคมีที่ถูกต้อง และเกิดประสิทธิภาพสูงสุด

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การแยกเชื้อรา *Cercospora* spp. บริสุทธิ์

เก็บรวบรวมตัวอย่างพืชกลุ่มผักกาดหอมที่เป็นโรคใบจุด ซึ่งเกิดจากการตายของเซลล์เนื้อเยื่อ (necrosis) ในเขตพื้นที่ปลูกผักของจังหวัดเชียงใหม่ มาตรวจสอบโครงสร้างของเชื้อราสาเหตุโรคภายใต้กล้องจุลทรรศน์ จากนั้นแยกเชื้อราบริสุทธิ์โดยวิธีการแยกสปอร์เดี่ยว (single spore isolation) ดัดแปลงจาก Choi et al. (1999) โดยเลี้ยงเชื้อบนอาหาร potato dextrose agar (PDA) บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง ศึกษาลักษณะโคโลนีของเชื้อ แยกเก็บเชื้อส่วนหนึ่งไว้ในอาหารผิวหน้าเอียง (PDA slant) เพื่อเป็น stock culture เก็บไว้ศึกษาต่อไป

2. การประเมินระดับความต้านทานต่อสารคาร์เบนดาซิม

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ผสมกับสารคาร์เบนดาซิม ที่ความเข้มข้นระดับต่างๆ ดังนี้คือ 1, 10, 50, 100, 500 (อัตราแนะนำ) และ 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร ตัดบริเวณขอบโคโลนีของเชื้อราที่เลี้ยงบนอาหาร PDA เป็นระยะเวลา 14 วัน ย้ายเลี้ยงบนอาหาร PDA ที่ผสมสารคาร์เบนดาซิมที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ เปรียบเทียบการเจริญของโคโลนีเชื้อรากับชุดควบคุมที่ไม่ผสมสารคาร์เบนดาซิมในอาหาร PDA บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 14 วัน บันทึกการเจริญของเส้นใยเชื้อรา โดยวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อราและประเมินระดับความต้านทานต่อสารคาร์เบนดาซิมตามหลักเกณฑ์ซึ่งดัดแปลงจาก Koenraadt et al. (1992); Peres et al. (2004) และ Imazaki et al. (2006) แสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1. หลักเกณฑ์ในการจัดระดับความต้านทานสารคาร์เบนดาซิม 4 ระดับ

Phenotype resistant level	Carbendazim concentration (mg/l)					
	1	10	50	100	500[1/]	1,000
Sensitive (S)	×[2/]	×	×	×	×	×
	✓	×	×	×	×	×
Weakly resistant (WR)	✓	✓	×	×	×	×
Moderately resistant (MR)	✓	✓	✓	×	×	×
	✓	✓	✓	✓	×	×
Highly resistant (HR)	✓	✓	✓	✓	✓	×
	✓	✓	✓	✓	✓	✓

[1/]อัตราแนะนำ

[2/]× = เชื้อราที่เจริญไม่ได้ หรือเจริญ <10 % เมื่อเทียบกับชุดควบคุม

✓ = เชื้อราที่เจริญได้ >10% ขึ้นไปเมื่อเทียบกับชุดควบคุม

3. การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ และวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ตรงตำแหน่งบางส่วนของยีน *TUB1*

สกัดดีเอ็นเอจากเส้นใยของเชื้อราด้วยชุดสกัด DNA NucleoSpin® Plant II (Macherey-Nagel, Düren, Germany) ตามวิธีที่ระบุไว้ในคู่มือ นำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาทำปฏิกิริยา PCR ประกอบด้วย ดีเอ็นเอต้นแบบ 10-100 ng, 10 mM dNTPs, 10X PCR buffer, 25 mM $MgCl_2$, 0.5 pmol primers (TUB2L: GTT TCC AGA TCA CCC ACT CC และ CER2R: TGA GCT CTG GAA CGG TGA CAG CAC) และ 1 unit *Taq* DNA polymerase (Finnzymes) ในปริมาตรรวม 50 ไมโครลิตร ปฏิกิริยาสังเคราะห์ดีเอ็นเอ ทำที่ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที denaturing 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที annealing 55 องศาเซลเซียส 1 นาที และ extension 72 องศาเซลเซียส 1 นาที จำนวน 30 รอบ และตามด้วยอุณหภูมิที่ 72 องศาเซลเซียสนาน 5 นาที โดยใช้เครื่อง DNA thermal cycle (MJ. Research, Model PTC–100) ผลผลิตดีเอ็นเอจากปฏิกิริยาที่ได้นำมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค gel electrophoresis บน 1% agarose gel ใน 0.5X TBE buffer และย้อมในเอธิเดียมโบรไมด์ (ethidium bromide) ตรวจดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเลท จากนั้นนำชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยา PCR ข้างต้นโคลนเข้าสู่พลาสมิดพาหะ pGEM®-T easy (Promega) ตามวิธีที่ระบุไว้ในคู่มือ และนำไปวิเคราะห์หาลำดับ

นิวคลีโอไทด์โดยใช้ชุดปฏิกิริยา QIAprep Spin Miniprep kit (QIAGEN) และ BigDye® Terminator V 1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) วิเคราะห์ด้วยเครื่อง automated fluorescent DNA sequencer นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้เปรียบเทียบความเหมือนกับข้อมูลของยีน *TUB* ที่มีรายงานไว้ในฐานข้อมูล GenBank ของ National Center for Biotechnology Information (NCBI) ด้วยโปรแกรม BLAST โดยเข้าไปที่ http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ พร้อมกับการเปรียบเทียบกรดอะมิโนที่แปลรหัสเพื่อวิเคราะห์หาจุดกลายพันธุ์ โดยใช้คอมพิวเตอร์โปรแกรม BioEdit version 7.0.9.0 for Windows ควบคู่กันนอกจากนี้นำข้อมูลทั้งสองเปรียบเทียบกับเชื้อรา *Cercospora beticola* (C-3; Accession No. AY856373) สายพันธุ์ไม่ต้านทานสารเบนซิมิดาโซนตามรายงานของ Davidson et al. (2006)

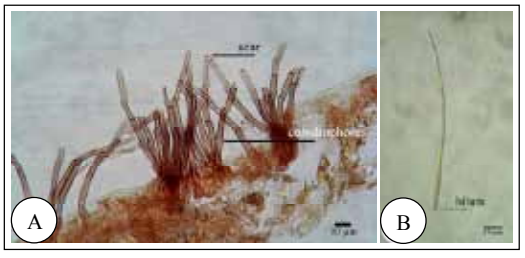
ผลการทดลองและวิจารณ์

1. ลักษณะเชื้อรา *Cercospora* spp. บริสุทธิ์ที่แยกได้

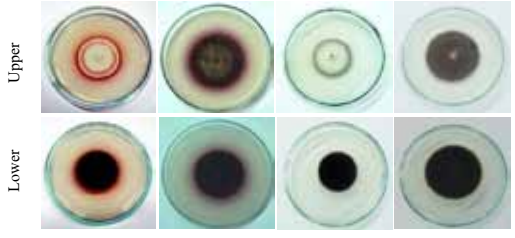
เก็บรวบรวมเชื้อรา *Cercospora* spp. จากตัวอย่างพืชกลุ่มผักกาดหอมชนิดต่างๆ เช่น cos lettuce, green oak leaf, head lettuce, butter head lettuce, และ red salad ที่แสดงอาการเป็นโรคใบจุด และแยกเชื้อราบริสุทธิ์โดยวิธีการแยกสปอร์เดี่ยวบนอาหาร PDA ได้ทั้งสิ้น 49 ไอโซเลต ดังแสดงในตารางที่ 2 ตรวจสอบโครงสร้างของเชื้อราภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบลักษณะ conidiophore เกิดเป็นกลุ่มเกาะกัน (fasciculate) และแบบเดี่ยว (solitary) รูปร่างเรียวยาว สีซีดจางไปจนถึงสีน้ำตาล มีผนังกั้น conidial scar สังเกตเห็นได้ชัดเจน ซึ่งเป็นที่ให้กำเนิด conidium เป็นสาเหตุทำให้ conidiophore เกิดการหักงอ conidium ใสไม่มีสี (hyaline) รูปร่างคล้ายเข็ม (acicular) เส้นด้าย (filiform) หรือ กระบองคว่ำ (obclavate) hilum หนา (รูปที่ 1) ซึ่งตรงกับข้อมูลที่มีผู้รายงานไว้ (Shin and Kim, 2001; Crous and Bruan, 2003) พบลักษณะโคโลนีค่อนข้างกลม เส้นใยมีการเจริญขึ้นหนาแน่นฝังลงไปบนอาหารเลี้ยงเชื้อ และพบรอยบุ๋มหรือรอยยุบตัวของอาหารเลี้ยงเชื้อบริเวณขอบโคโลนีและไม่พบการสร้างสปอร์ สอดคล้องกับงานวิจัยของ Beckman and Payne (1983) ที่ไม่พบการสร้างสปอร์ ของเชื้อรา *Cercospora zeaemaydis* สาเหตุโรค gray leaf spot บนอาหาร PDA และนอกจากนั้นยังพบว่าเชื้อรา *Cercospora* spp. บางไอโซเลตมีการสร้างรงควัตถุสีม่วงจนถึงแดงบนอาหาร PDA (รูปที่ 2) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Jenns et al. (1989) และ Almeida et al. (2005) ทำการเลี้ยงเชื้อรา *Cercospora* spp. บนอาหาร PDA พบการสร้างรงควัตถุสีแดงรอบๆ โคโลนี เกิดจากเชื้อราสร้างสารพิษ cercosporin ในสายพันธุ์ที่มีความรุนแรงในการก่อโรค

ตารางที่ 2. จำนวนเชื้อรา *Cercospora* spp. สาเหตุโรคใบจุดของพืชกลุ่มผักกาดหอม (lettuce; *Lactuca sativa*) ในพื้นที่ปลูกผักของจังหวัดเชียงใหม่

Host		No. of isolate
Scientific name	Common name	
Lactuca sativa var. *longifolia*	cos lettuce (romain lettuce)	12
L. sativa var. *crispa*	green oak leaf	6
L. sativa var. *capitata*	head lettuce	20
L. sativa L.	butter head lettuce	9
L. sativa L.	red salad	2
	Total	49



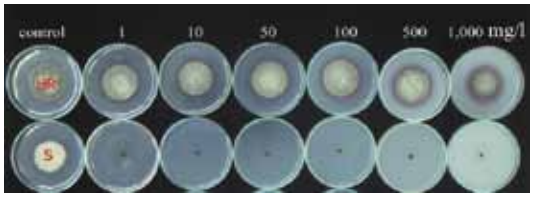
รูปที่ 1. ลักษณะของเชื้อรา *Cercospora* spp. สาเหตุโรคใบจุดของผักกาดหอม (*Lactuca sativa*) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์; A: conidiophore และ B: conidium



รูปที่ 2. ลักษณะโคโลนีเชื้อรา *Cercospora* spp. สาเหตุโรคใบจุดของพืชกลุ่มผักกาดหอมเจริญบนอาหาร potato dextrose agar ที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 14 วัน

2. ระดับความต้านทานของเชื้อราต่อสารคาร์เบนดาซิม

จากการทดสอบความต้านทานของเชื้อรา *Cercospora* spp. ต่อสารคาร์เบนดาซิมบนอาหาร PDA ที่ความเข้มข้น 6 ระดับได้แก่ 1, 10, 500, 100, 500 (อัตราแนะนำ) และ 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ พบเชื้อราที่ต้านทานสารคาร์เบนดาซิมระดับสูง (highly resistant; HR ≥ 500 มิลลิกรัมต่อลิตร) จำนวน 48 ไอโซเลต และเชื้อราที่ไม่ต้านทานสารคาร์เบนดาซิม (sensitive; S ≤ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร) จำนวน 1 ไอโซเลต (รูปที่ 3) ซึ่งอาจเกิดจากการใช้สารเคมีในกลุ่มนี้ติดต่อกันเป็นเวลานาน ส่งผลให้เชื้อราเกิดการปรับตัวเองเพื่อความอยู่รอด และเกิดการต้านทานต่อสารเคมีขึ้น (Briere et al., 2001; Weiland and Halloin, 2001) เช่นเดียวกับรายงานของ Imazaki et al. (2006) ที่ตรวจสอบเชื้อรา *Cercospora kikuchii* จำนวน 247 ไอโซเลต พบเชื้อราที่ต้านทานสารคาร์เบนดาร์ซิมที่ระดับความเข้มข้น 1,600 มิลลิกรัมต่อลิตร จำนวน 154 ไอโซเลต และสอดคล้องกับรายงานของ Weiland and Halloin (2001) ที่ทำการประเมินตรวจสอบความต้านทานสารเบนซิมิดาโซลของเชื้อรา *Cercospora beticola* สาเหตุโรคใบจุดของ sugar beet ในพื้นที่ที่มีการฉีดพ่นสารเบนซิมิดาโซล ระหว่างปี ค.ศ. 1998-1999 พบเชื้อราต้านทานต่อสารเคมีนี้เพิ่มสูงขึ้น



รูปที่ 3. การทดสอบความต้านทานเชื้อรา *Cercospora* spp. ต่อสารคาร์เบนดาซิมที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ บนอาหาร potato dextrose agar เมื่อบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 14 วัน; S = sensitive, HR = highly resistant

3. การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ตรงตำแหน่งบางส่วนของยีน *TUB1*

จากการสกัดดีเอ็นเอโดยคัดเลือกตัวแทนเชื้อรา *Cercospora* spp. จำนวน 20 ไอโซเลต ซึ่งเป็นเชื้อราที่ต้านทาน (HR) และไม่ต้านทาน (S) ต่อสารคาร์เบนดาซิมจำนวน 19 และ 1 ไอโซเลต ตามลำดับ ด้วยเทคนิค PCR เมื่อตรวจสอบโดยใช้ gel electrophoresis บน 1% agarose gel พบแถบ DNA ขนาด 474 bp เมื่อนำไปทำการวิเคราะห์เพื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ และกรดอะมิโน พบการเปลี่ยนแปลงเฉพาะจุดของลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณบางส่วนของยีน *TUB1* ปรากฏที่ตำแหน่ง 860 เปลี่ยนแปลงแทนที่จาก adenine (A) เป็น cytosine (C) ส่งผลให้กรดอะมิโนตรงตำแหน่ง codon 198 ของเชื้อราในกลุ่ม HR ทุกไอโซเลตมีการเปลี่ยนแปลงแทนที่ของกรดอะมิโนจาก glutamic acid (GAG) เป็น alanine (GCG) ในขณะที่บางตำแหน่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์เปลี่ยนแต่กรดอะมิโนไม่เปลี่ยนแปลง (รูปที่ 4) ซึ่งการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นนี้สอดคล้องกับ

รายงานการต้านทานสารเบนซิมิดาโซลของเชื้อราสาเหตุโรคพืชหลายชนิด เช่น *Botrytis cinerea* (Zhang et al., 2010), *Cercospora kikuchii* (Imazaki et al., 2006), *Colletotrichum gloeosporioides* (Maymon et al., 2006), *Helminthosporium solani* (Cunha and Rizzo, 2003), *Monilinia fructicola* (Ma et al., 2003), *Penicillium aurantiogriseum* (Koenraadt et al., 1992) และ *P. expansum* (Baraldi et al.,2003) ส่วนใหญ่จะเกิดการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนของยีน *TUB* ตรงตำแหน่ง codon 198 สำหรับการเปลี่ยนแปลงลำดับกรดอะมิโนที่ตำแหน่งอื่นยังไม่ปรากฏความสัมพันธ์กับความต้านทานสารในกลุ่มเบนซิมิดาโซลอย่างชัดเจน

	Phenotype[2/]	198
AY856373(GenBank)[1/]	S	TCCGACGAGACCTTCTGT
CCR01	S	TCCGACGAGACTTTCTGT
CCR10	HR	TCCGACGCGACTTTCTGT
CCR18	HR	TCCGACGCGACTTTCTGT
CCR19	HR	TCCGACGCGACCTTCTGT
CL02	HR	TCCGACGCGACTTTCTGT
CL05	HR	TCCGACGCGACTTTCTGT
CL06	HR	TCCGACGCGACTTTCTGT
CL07	HR	TCCGACGCGACTTTCTGT
CL08	HR	TCCGACGCGACTTTCTGT
CL10	HR	TCCGACGCGACTTTCTGT
CL15	HR	TCCGACGCGACTTTCTGT
CL16	HR	TCCGACGCGACTTTCTGT
CL18	HR	TCCGACGCGACTTTCTGT
CL19	HR	TCCGACGCGACTTTCTGT
CL23	HR	TCCGACGCGACTTTCTGT
CL24	HR	TCCGACGCGACTTTCTGT
CL28	HR	TCCGACGCGACTTTCTGT
CL32	HR	TCTGACGCGACCTTCTGT
CL40	HR	TCCGACGCGACTTTCTGT
CL43	HR	TCCGACGCGACTTTCTGT
		--*----*---*------

รูปที่ 4. ความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะที่แสดงออก (phenotype) กับจุดกลายพันธุ์ (mutation point) บนตำแหน่งยีน beta-tubulin (*TUB1*) ของเชื้อรา *Cercospora* spp.; [1/]Accession No. AY856373; [2/]S = sensitive, HR = highly resistant

สรุปผลการทดลอง

เชื้อรา *Cercospora* spp. สาเหตุโรคใบจุด ของพืชกลุ่มผักกาดหอม 5 ชนิด ทั้งหมด 49 ไอโซเลต เมื่อประเมินตรวจสอบความต้านทาน พบเชื้อราที่ต้านทานสารคาร์เบนดาซิมระดับสูง (HR ≥ 500 มิลลิกรัมต่อลิตร) จำนวน 48 ไอโซเลต และเชื้อราที่ไม่ต้านทานสารคาร์เบนดาซิม (S ≤ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร) จำนวน 1 ไอโซเลต เมื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอตรงตำแหน่งบริเวณบางส่วนของยีน *TUB1* ด้วยเทคนิค PCR พบว่า PCR product มีแถบดีเอ็นเอขนาด 474 bp และลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อราในกลุ่มต้านทานสารคาร์เบนดาซิมทุกไอโซเลตมีการเปลี่ยนแปลงของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ส่งผลให้เกิดจุดกลายพันธุ์ของกรดอะมิโนตรงตำแหน่ง codon 198 จาก glutamic acid (G<u>A</u>G) แทนที่เป็น alanine (G<u>C</u>G)

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ (AG-BIO/PERDO-CHE) และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.)

เอกสารอ้างอิง

Agrios, G.N. 2005. Plant Pathology. 5th ed. Elsevier Academic Press. London.

Almeida, Á.M.R., F.F. Piuga, S.R.R. Marin, E. Binneck, F. Sartori, L.M. Costamilan, M.R.O. Teixeira and M. Lopes. 2005. Pathogenicity, molecular characterization, and cercosporin content of Brazilian isolates of **Cercospora kikuchii. Fitopatologia Brasileira.** 30: 594-602.

Baraldi, E., M. Mari, E. Chierici, M. Pondrelli, P. Bertolini and G.C. Pratella. 2003. Studies on thiabendazole resistance of *Penicillium expansum* of pears: pathogenic fitness and genetic characterization. **Plant Pathology.** 52: 326-370.

Beckman, P.M. and G.A. Payne. 1983. Cultural techniques and conditions influencing growth and sporulation of *Cercospora zeae-maydis* and lesion development in corn. **Phytopathology.** 73: 286-289.

Briere, S.C., G.D. Franc and E.D. Derr. 2001. Fungicide sensitivity characteristics of *Cercosproa beticola* isolates recoverd from the high plains of Colorado, Montana, Nebraska and Wyoming: 1. Benzimidazole and triphenyltin hydroxide. **Journal of Sugarbeet Rresearch.** 38: 111-120.

Choi, Y.W., K.D. Hyde and W.H. Ho. 1999. Single spore isolation of fungi. **Fungal Diversity.** 3: 29-38.

Chandra, S., S. Kumar and A.K. Singh. 1998. Management of *Cercospora* leaf spot of groundnut (*Arachis hypogaea* L.) with a single fungicidal spray. **International Journal of Pest Management.** 44: 135-137.

Crous, P.W. and U. Braun. 2003. *Mycosphaerella* and its anamorphs: 1.Names published in *Cercospora* and *Passalora.* CBS Biodiversity Series 1. Centraalbureau voor Schimmel cultures, Utrecht.

Cunha, G.M. and M.D. Rizzo. 2003. Development of fungicide cross resistance in *Helminthosporium solani* population from California. **Plant Disease.** 87: 798-803.

Davidson, R.M., L.E. Hanson, G.D. Franc and L. Panella. 2006. Analysis of β-tubulin gene fragments from benzimidazole-sensitive and –tolerant *Cercospora beticola.* **Journal of Phytopathology.** 154: 321-328.

De Waard, M.A., S.G. Georgopoulos, D.W. Hollomon, H. Ishii, P. Leroux, N.N. Ragsdale and F.J. Schwinn. 1993. Chemical control of plant diseases: problems and prospects. **Annual Review of Phytopathology.** 31: 403-421.

France, G.D., R.M. Harveson, E.D. Kerr and B.J. Jacobsen. 2001. Disease management. pp. 131-160. *In:*Wilson, R.G., J.A. Smith and S.D. Miller, (eds.), Proceedings of Sugarbeet Production Guide. University of Nebraska Institute of Agriculture and Natural Resources, Lincoln, Nebraska.

Imazaki, I., K. Ishidawa, N. Yasuda, A. Miyasaka, S. Kawasakiand and S. Koizumi. 2006. Incidence of thiophanate-methyl resistance in

Cercospora kikuchii within a single lineage based on amplified fragment length polymorphisms in Japan. **Journal of General Plant Pathology.** 72: 77-84.

Jenns, A.E., M.E. Daub and R.G. Upchurch. 1989. Regulation of cercosporin accumulation in culture by medium and temperature manipulation. **Phytopathology.** 79: 213-219.

Koenraadt, H., S.C. Somerville and A.L. Jones.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.

Ma, Z. and T.J. Michailides. 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., M.A. Yoshimura and T.J. Michailides. 2003. Identification and characterization of benzimidazole resistance in *Monilinia fructicola* from stone fruit orchards in California. **Applied and Environmental Microbiology.** 69: 7145-7152.

Maymon, M., A. Zveibil, S. Pivonia, D. Minz and S. Freeman. 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: 125-130.

Shin, H.D. and J.D. Kim. 2001. *Cercospora* and allied genera from Korea. **Plant Pathogen from Korea.** 7: 1-302.

Sisler, H.D. 1988. Fungicidal action and fungal resistance mechanisms. pp. 6-8. *In*:Delp, C.J. (ed.), Proceedings of Fungicide Resistance in North America. APSPress. Minnesota.

Weiland, J.J. and J.M. Halloin. 2001. Benzimidazole resistance in *Cercospora beticola* sampled from sugar beet fields in Michigan, USA. **The Canadian Journal of Plant Pathology.** 23: 78-82.

Zhang, C.Q., Y.H. Liu and G.N. Zhu. 2010. Detection and characterization of benzimidazole resistance of *Botrytis cinerea* in greenhouse vegetables. **European Journal of Plant Pathology.**126: 509-515.