บทที่ 2

ตรวจเอกสาร

กุหลาบมีชื่อวิทยาศาสตร์คือ *Rosa* spp. ชื่อสามัญคือ กุหลาบ หรือ rose อยู่ในวงศ์ Rosaceae มีถิ่นกำเนิดในทวีปเอเชีย มีจำนวนโครโมโซมพื้นฐาน n = 7 (อดิศร, 2540) เป็นดอกไม้ที่ได้รับฉายาว่าเป็นราชินีแห่งไม้ดอก เนื่องจากเป็นไม้ดอกที่มีสีสวยงามหลากหลายมากมาย และมีกลิ่นหอม นอกจากนี้กุหลาบยังเป็นไม้ดอกที่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้หลายอย่าง เช่น เป็นไม้ตัดดอก ปลูกเป็นไม้กระถาง ใช้ปลูกประดับแปลงเพื่อตกแต่งสถานที่ ใช้ทำดอกไม้แห้ง และเป็นวัตถุดิบในการผลิตน้ำมันหอมระเหย จึงเป็นไม้ดอกเศรษฐกิจชนิดหนึ่งที่นิยมปลูกกันแพร่หลายทั้งในและต่างประเทศ (มุกดา, 2547)

ประเทศไทยมีศักยภาพในการผลิตกุหลาบคุณภาพสูงอย่างต่อเนื่อง หากแต่จะต้องผลิตในพื้นที่ที่เหมาะสม คือพื้นที่สูงมากกว่า 800 เมตรเหนือระดับน้ำทะเล หากปลูกในที่ราบจะได้คุณภาพดีในช่วงฤดูหนาวเท่านั้น ดังนั้นการผลิตกุหลาบจึงมีแนวโน้มเพิ่มพื้นที่การผลิตบนที่สูงมากขึ้น ในประเทศไทยปลูกกุหลาบและใช้ในลักษณะเป็นไม้ตัดดอก รองลงมาเป็นไม้กระถาง โดยมีแนวโน้มขยายตัวเพิ่มขึ้นทุกปี ส่วนใหญ่เป็นการปลูกกลางแจ้ง การปลูกในโรงเรือนมีน้อยมาก ตลาดมีความต้องการกุหลาบที่มีพันธุ์แปลกใหม่และคุณภาพดีมากขึ้น โดยต้นทุนการผลิตต่อไร่ในปี พ.ศ. 2540 จะมีต้นทุนคงที่ประมาณ 20,800 – 31,200 บาท/ปี และต้นทุนผันแปร ประมาณ 62,400 – 93,600 บาท/ปี และราคาที่เกษตรกรขายได้จะราคาประมาณ 1-2 บาท/ดอก ยกเว้นคุณภาพดีเป็นพิเศษ ราคาจะประมาณ 8-15 บาท/ดอก (การเก็บเกี่ยวไม้ตัดดอก, 2548)

การปลูกกุหลาบมักจะพบปัญหาเรื่องโรคอยู่เสมอ เพราะกุหลาบเป็นพืชที่มีโรคมารบกวนง่าย ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อมของแหล่งที่ปลูก การดูแลรักษา และพันธุ์ที่ใช้ปลูก ตลอดจนการดูแลเอาใจใส่ของผู้ปลูก สาเหตุที่ทำให้กุหลาบแสดงอาการผิดปกติหรือเป็นโรค แบ่งได้เป็น 2 พวกใหญ่ๆ คือสาเหตุที่เกิดจากสิ่งไม่มีชีวิตหรือสภาพแวดล้อมและสาเหตุที่เกิดจากสิ่งมีชีวิต โดยสาเหตุที่เกิดจากสิ่งไม่มีชีวิตหรือสภาพแวดล้อม เป็นความผิดปกติอันเนื่องมาจากสภาพแวดล้อมที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตของกุหลาบไม่เหมาะสม เช่น สภาพดินไม่เหมาะสม ปริมาณธาตุอาหารในดินไม่สมดุล การปฏิบัติทางเขตกรรมไม่ถูกต้องหรือขาดความระมัดระวัง พิษของสารเคมีที่ใช้ในการปราบศัตรูพืช สภาพอากาศ อุณหภูมิ ความชื้นในบรรยากาศ แสงที่ไม่เหมาะสม และการขาดหรือได้รับธาตุอาหารมากเกินไป อาการที่เกิดจากสาเหตุเหล่านี้จะเกิดขึ้นเฉพาะบริเวณ ไม่สามารถถ่ายทอดโรค หรือแพร่ระบาดสู่ต้นอื่นหรือบริเวณอื่นได้ และสาเหตุที่เกิดจากสิ่งมีชีวิต ได้แก่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

โรคและแมลง เช่น โรคใบจุดสีดำ โรคแอนแทรคโนส โรคราน้ำค้าง โรคราแป้ง โรคใบจุดสีน้ำตาล โรคราสีเทา โรคใบเหลืองและกิ่งแห้งตาย โรคราสนิม โรคไวรัส หนอนและเพลี้ยต่างๆ รวมถึงไรแดง ซึ่งโรคและแมลงต่างๆ เหล่านี้จะทำลายมากน้อยเพียงใด อาจขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อมของแหล่งปลูก พันธุ์ที่ใช้ปลูก การดูแลเอาใจใส่ตลอดจนความรู้และประสบการณ์ของผู้ปลูกเอง (อังสนา, 2547)

1. โรคแอนแทรคโนส (anthracnose) ของกุหลาบ

โรคแอนแทรคโนส (anthracnose) มีเชื้อสาเหตุคือ *Colletotrichum gloeosporioides* ธารทิพย (2547) และ รัฐกร (2549) โรคแอนแทรคโนสหรือบางทีเรียกว่า “โรคตากบ” ที่เรียกเช่นนี้เนื่องจากลักษณะของจุดแผลที่ใบ ตรงกลางจะมีรูโหว่ดูเหมือนตากบ การเกิดโรคมักเกิดในฤดูฝนที่อากาศเปียกชื้นตั้งแต่เดือนพฤษภาคมไปจนสิ้นเดือนตุลาคม แผลเป็นจุดกลมไม่ใหญ่มากนัก ขนาดประมาณ 0.6 เซนติเมตร ระยะแรกแผลจะเป็นสีน้ำตาลแก่และเปลี่ยนเป็นสีดำ ระยะต่อไปเนื้อเยื่อตรงกลางจุดจะตาย และบริเวณจุดจะเปลี่ยนเป็นสีขาวหรือสีขี้เถ้า แผลจะหลุดทำให้ตรงกลางเป็นรู ใบที่เป็นโรคบางครั้งอาจบิดเบี้ยว รอบจุดอาจเป็นสีเหลืองหรือสีขาว และใบจะร่วง อาการที่กิ่งจะพบจุดกลมขนาดเล็กกว่าที่เกิดบนใบ และยังพบการเกิดแผลที่หนามและที่กลีบเลี้ยงอีกด้วย เชื้อสาเหตุจะอยู่ข้ามฤดูได้ โดยอาศัยอยู่บนแผลที่กิ่งแก่ เมื่ออากาศเหมาะสมคือเปียกชื้นก็จะเกิดสปอร์ที่แผลและกระจายไปสู่ใบและกิ่ง สปอร์จะงอกและติดเชื้อภายใน 24 ชั่วโมง โดยโรคจะเกิดได้ทั้งบนใบและใต้ใบ เกิดกับใบอ่อนได้ดีกว่าใบแก่ สปอร์แพร่กระจายโดยอาศัยการกระเซ็นของละอองน้ำ พจนา (2543) ดารา (2535) และ Reid (2005)

Mastalerz and Langhans (1969) และ Horst (1986) รายงานว่าโรคแอนแทรคโนสมีลักษณะอาการคล้ายโรคใบจุดสีดำบางครั้งอาจเกิดปะปนกับโรคใบจุดสีดำ แผลเป็นจุดค่อนข้างกลมสีเข้ม ประมาณ 0.75 เซนติเมตร เริ่มแรกใบจะมีจุดสีเขียวเข้ม จากนั้นเปลี่ยนเป็นสีม่วงและสีน้ำตาล จนกระทั่งถึงสีดำเป็นส่วนใหญ่ เมื่อแผลมีอายุมากบริเวณกลางแผลจะเปลี่ยนเป็นสีขาว ขอบแผลสีแดงเข้ม สร้าง fruiting bodies จุดสีดำเล็กๆ กระจายทั่วบริเวณกลางแผลที่เป็นสีขาว ใบอาจบิดเบี้ยวและขาดวิ่นบริเวณขอบใบ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2. การเกิดความต้านทาน

สารป้องกันกำจัดเชื้อราเป็นสิ่งที่จำเป็นสำหรับการจัดการโรคพืชในเชื้อราหลายชนิด สามารถที่จะใช้กับพืชที่ยังไม่เกิดอาการของโรคก่อนได้โดยใช้ในการป้องกันก่อนการระบาด และเพื่อให้เกิดประสิทธิภาพของสารป้องกันกำจัดเชื้อรามากยิ่งขึ้นควรมีการใช้สารเคมีก่อนที่จะมีการระบาดของโรคในอัตราที่เพียงพอและครอบคลุมพื้นที่ทั้งหมด โดยสาเหตุที่ทำให้การควบคุมโรคไม่ได้ผล ทั้งนี้เนื่องมาจากการใช้สารเคมีในอัตราที่ไม่เพียงพอ สารเคมีไม่มีประสิทธิภาพ ช่วงเวลาและวิธีการใช้ไม่เหมาะสม ทั้งนี้การเกิดความต้านทานก็เป็นเหตุผลหนึ่งที่ทำให้สารเคมีไม่สามารถกำจัดเชื้อราได้ ซึ่งการต้านทานสารเคมีเป็นขบวนการที่ซับซ้อนและยากที่จะบ่งชี้ถึงการเกิดการต้านทาน ซึ่งเป็นเรื่องที่จะต้องมีการศึกษาและหาวิธีการป้องกันกำจัดเพื่อให้เกิดการควบคุมโรคพืชแบบยั่งยืน Damicone (http://www.osufacts.okstate.edu)

การใช้สารเคมีเพื่อป้องกันกำจัดโรคพืช มักจะประสบปัญหาในด้านการดื้อต่อยาหรือเกิดความต้านทานต่อสารนั้น (resistance to fungicide) หรือเชื้อจะมีการปรับตัวเองเกิดเป็นเชื้อกลายพันธุ์หรือได้ mutant ใหม่ ซึ่งลักษณะเหล่านี้สามารถถ่ายทอดไปยังลูกหลานได้ เชื้อกลายพันธุ์จะเกิดขึ้นหลังจากมีการใช้สารเคมีชนิดนั้นติดต่อกันเป็นเวลานานและต่อเนื่อง ในครั้งแรกมีการพบลักษณะเชื้อที่กลายพันธุ์เกิดในห้องปฏิบัติการ จึงเริ่มมีผู้ศึกษาถึงลักษณะการดื้อยาของเชื้อในเวลาต่อมา เชื้อสาเหตุที่กลายพันธุ์มักจะเฉพาะเจาะจงต่อสารเคมีใดสารเคมีชนิดหนึ่งเท่านั้น หรือถ้าจะดื้อต่อสารเคมีหลายชนิดก็ได้ ถ้าสารเคมีหลายชนิดมีความสัมพันธ์กันและมีกลไกการทำงานที่คล้ายกัน ซึ่งความต้านทานต่อสารเคมีที่เกิดขึ้นโดยเชื้อสาเหตุศัตรูพืชจะสามารถแบ่งได้เป็น 3 ประเภท คือ 1) ความต้านทานเดี่ยว (single resistance) คือการที่ศัตรูพืชสามารถสร้างความต้านทานต่อสารเคมีชนิดใดชนิดหนึ่งเพียงชนิดเดียว 2) ความต้านทานข้าม (cross resistance) คือการที่ศัตรูพืชสร้างความต้านทานต่อสารเคมีชนิดใดชนิดหนึ่งแล้วยังสามารถสร้างความต้านทานต่อสารเคมีชนิดอื่นที่อยู่ในกลุ่มเดียวกัน หรือคนละกลุ่มกันแต่มีกลไกการออกฤทธิ์เข้าทำลายศัตรูพืชเหมือนกันหรือคล้ายกัน และ 3) ความต้านทานรวม (multiple resistance) คือการที่ศัตรูพืชมีกลไกในการสร้างความต้านทานต่อสารเคมีมากกว่า 1 กลไก หรือเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า dual resistance หมายถึงการสร้างความต้านทานต่อสารเคมีในการกำจัดศัตรูพืชได้มากกว่า 1 กลุ่มของเชื้อสาเหตุชนิดหนึ่ง (ธรรมศักดิ์, 2543)

ปัญหาที่เกิดขึ้นเกี่ยวกับความต้านทานต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อราเริ่มเกิดขึ้นเมื่อมีการจดทะเบียนการใช้สารป้องกันกำจัดเชื้อราชนิดดูดซึม (systemic fungicides) และพบว่ามีการใช้กันอย่างกว้างขวางมากขึ้นในช่วงต้นปี 1970 ซึ่งก่อนที่จะมีการใช้สารบีโนมิล (benomyl) ซึ่งเป็นสารชนิดดูดซึม เกษตรกรได้มีการใช้สารพวกมาเน็บ (maneb) และแมนโคเซ็บ (mancozeb) ซึ่งเป็นสารพวกไดไทโอคาร์บาเมต (dithiocarbamate) รวมทั้งสารพวกกำมะถัน โดยจะไม่พบปัญหาเกี่ยวกับ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การต้านทานของสารที่กล่าวมานี้ แต่ต่อมาเมื่อมีการใช้สารบีโนมิล ซึ่งเป็นสารที่มีการออกฤทธิ์ยับยั้งแบบเฉพาะจุด (site specific mode of action) ภายในสองถึงสามปีก็พบการเกิดการต้านทานกับเชื้อราหลายชนิด นอกจากนี้ก็ยังมีสารเคมีที่มีการออกฤทธิ์แบบยับยั้งเฉพาะจุดอีกหลายชนิดที่พบว่ามีความเสี่ยงต่อการเกิดความต้านทานของโรคพืชอีกด้วย Brent (1995) และ Damicone (http://www.osufacts.okstate.edu)

การเกิดการต้านทานต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อรา คือการที่เชื้อราสามารถปรับเปลี่ยนพันธุกรรมเพื่อให้คงทนต่อสารเคมี ซึ่งเป็นผลทำให้เชื้อราเกิดการกลายพันธุ์ โดยเกิดการต้านทานอาจเกิดจากการกลายของยีนเดี่ยวๆ หรือการกลายของยีนหลายๆ ยีน (single gene/multiple gene mutation) ซึ่งการเกิดการกลายพันธุ์ของยีนเดี่ยวจะเกิดกับตำแหน่งจำเพาะเพียงตำแหน่งเดียว และจะมีโอกาสเกิดขึ้นได้มากกว่าการเกิดการเปลี่ยนแปลงของยีนหลายๆ ตำแหน่ง (multi site inhibiting fungicide) ซึ่งก็มีปัจจัยหลายอย่างที่มีผลต่อการพัฒนาความต้านทานของเชื้อราที่เกิดขึ้นในแปลงปลูก ได้แก่ คุณสมบัติของสารป้องกันกำจัดเชื้อรา ชีววิทยาของเชื้อรา และระบบการผลิตพืชในแปลงที่มีการใช้สารเคมี (Baraldi *et al*., 2003) และได้ทำการแบ่งกลุ่มของสารป้องกันกำจัดเชื้อราโดยพิจารณาจากกลไกการออกฤทธิ์และโครงสร้างทางเคมี (ตาราง 1) โดยสารป้องกันกำจัดเชื้อราที่ออกฤทธิ์ยับยั้งเฉพาะจุด (site specific mode of action) จะมีผลยับยั้งเฉพาะตำแหน่ง โดยมีหน้าที่ไปยับยั้งการแบ่งเซลล์ การสังเคราะห์ sterol หรือการสังเคราะห์กรดนิวคลีอิก ซึ่งอาจถูกยับยั้งจากการเกิดการกลายแบบ single gene หรือ multiple gene ก็ได้ สำหรับสารป้องกันกำจัดเชื้อราที่มีการออกฤทธิ์แบบยับยั้งหลายตำแหน่ง (multi site mode of action) จะมีการทำงานที่ซับซ้อนกว่าและมักจะใช้ในรูปแบบของการป้องกันก่อนการระบาดของโรคและมีความเสี่ยงต่อการต้านทานต่ำหรือไม่มีการต้านทานกับสารกลุ่มนี้ Damicone (http://www.osufacts.okstate.edu)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 1 ความเสี่ยงต่อการต้านทานและการพัฒนาการเกิดการต้านทานของสารป้องกันกำจัดเชื้อรา แต่ละกลุ่ม (Damicone, http://www.osufacts.okstate.edu)

Group	Common name	Trade name	Action[1]	Uses[2]	Resistance Risk[3]	Cross resistance[4]
Aromatic hydrocarbons	chloroneb	Chloroneb	P	S, ST	Low	yes
	dicloran	Botran	P	S, ST, PH	moderate	yes
	etridiazole	Terrazole, Koban	P	S	Low	yes
	PCNB	Terraclor	P	S, ST	Low	yes
Benzimidazoles	benomyl	Benlate	S	F, S, PH	high	yes
	thiabendazole	Arbortect, Mertect	S	F, S	high	yes
	thiophanate methyl	Topsin M, Fungo 50	S	F, S, ST	high	yes
Carboximides	carboxin	Vitavax	S	ST	low	no
	flutolanil	Moncut, Prostar	S	S	low	no
Dicarboximides	iprodione	Rovral, Chipco 26019	P	F,S	moderate	yes
	vinclozalin	Ronilan, Vorlan	P	F,S	moderate	yes
Dithiocarbamates	maneb	Maneb	P	F	none	no
	mancozeb	Dithane, Fore	P	F,ST	none	no
	metiram	Polyram	P	F	none	no

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 1 (ต่อ) ความเสี่ยงต่อการต้านทานและการพัฒนาการเกิดการต้านทานของสารป้องกันกำจัดเชื้อราแต่ละกลุ่ม

Group	Common name	Trade name	Action[1]	Uses[2]	Resistance Risk[3]	Cross resistance[4]
Inorganics	copper hydroxide	Kocide	P	F	none	no
	copper sulfate	Basicop	P	F	none	no
	sulfur	Sulfur	P	F	none	no
Phenylamides	metalaxyl	Ridomil	S	F,S,ST	high	yes
	oxadixyl	Recoil	S	ST	low	yes
Sterol inhibitors	cyproconazole	Alto, Sentinel	S	F,S	moderate	yes
	difenconazole	Divedend	S	ST	low	yes
	fenarimol	Rubigan	S	F,S	moderate	yes
	fenbuconazole	Enable, Indar	S	F	moderate	yes
	imazalil	Nuzone	S	ST	low	yes
	myclobutanil	Eagle, Nova, Rally	S	F	moderate	yes
	propiconazole	Banner, Tilt	S	F,S	moderate	yes
	tebuconazole	Folicur, Lynx	S	F,S	moderate	yes
	triadimefon	Bayleton	S	F	moderate	yes
	triadimenol	Baytan	S	ST	low	yes
	triforine	Funginex	S	F	moderate	yes

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 1 (ต่อ) ความเสี่ยงต่อการต้านทานและการพัฒนาการเกิดการต้านทานของสารป้องกันกำจัดเชื้อราแต่ละกลุ่ม

Group	Common name	Trade name	Action[1]	Uses[2]	Resistance risk[3]	Cross resistance[4]
Others	captan	Captan	P	F,ST	none	-
	chlorothalonil	Bravo, Daconil	P	F,S	none	-
	dodine	Syllit	P	F	moderate	-
	fentin hydroxide	Super Tin	P	F	low	-
	fosetyl-AL	Aliette	S	F,S	low	-
	propamocarb	Banol, Prevex	S	S,F,ST	low	-

[1] P = protectant, S = systemic.

[2] S = soilborne diseases, F = foliar diseases, ST = seed treatment, PH = post harvest treatment

[3] The resistance risk.

[4] Cross resistance is resistance to one or more of the fungicides within the same group.

ปัจจุบันมีรายงานการต้านทานสารป้องกันกำจัดเชื้อราสูงมากในเชื้อสาเหตุโรคพืชหลายชนิดโดยเฉพาะการเกิดต้านทานต่อสารกลุ่มเบนซิมิดาโซล จะส่งผลให้เกิดการกลายพันธุ์ที่ยีน beta-tubulin นอกจากนี้ยังพบว่าการเกิดการต้านทานต่อ sterol demethylation inhibitors มีผลทำให้เกิดการ overexpression ของกระบวนการ ATP (ATP-binding cassette) เป็นผลให้เกิดการกลายพันธุ์ใน 14α demethylase (*CYP51*) gene และเกิดการ overexpression ของ *CYP51* gene เกิดการต้านทานต่อ Qo inhibitors fungicides (QoIs) จะทำให้เกิดการกลายพันธุ์ใน mitochondrial cytochrome *bc1* gene และเกิด alternative oxidase activity การเกิดการกลายพันธุ์ใน dicarboximide fungicides (DCFs) จะทำให้เกิดการกลายพันธุ์ใน two-component histidine kinase gene และเกิดการกลายพันธุ์ใน *ubc1* เป็นต้น (ตาราง 2) (Ma and Michailides, 2005)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 2 กลไกการเกิดความต้านทานต่อสารป้องกันกำจัดโรคพืช benzimidazoles, sterol demethylation inhibitors, Qo inhibitors และ dicarboximide fungicides (Ma and Michailides, 2005)

Fungicide class	Mechanism of resistance
Benzimidazoles	Mutations in the beta-tubulin gene
	Unknown mechanisms
Sterol demethylation inhibitors	Overexpression of the ATP-binding cassette transporters
	Mutations in the 14α -demethylase (*CYP51*) gene
	Overexpression of the *CYP51* gene
Qo inhibitors	Mutations in the mitochondrial cytochrome b (*cyt* b) gene
	Alternative oxidase activation
Dicarboximide fungicides	Mutations in the two-component histidine kinase gene
	Mutations in the *ubc1* gene, which encodes the regulatory subunit of a cAMP-dependent protein kinase
	Unknown mechanisms

การต้านทานต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อราในกลุ่มเบนซิมิดาโซล (benzimidazole) จะพบได้ในเชื้อราโรคพืชหลายชนิด โดยส่วนมากการเกิดความต้านทานจะเกี่ยวข้องกับการกลายพันธุ์ของยีนเบตา-ทูบูลิน (beta-tubulin gene; TUB2) ซึ่งจะมีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของลำดับกรดอะมิโน ที่ตำแหน่งจับของเบนซิมิดาโซล (benzimidazole binding site) (Ma and Michailides, 2005) การที่สารเบนซิมิดาโซลไปจับกับ beta-tubulin ของเชื้อราอย่างเฉพาะเจาะจง จะส่งผลรบกวนการทำงานของ microtubule ซึ่งมีความจำเป็นในขบวนการ mitosis และการเกิดโครงสร้างของเซลล์ (Ishii, 2004) สารเบนซิมิดาโซลจะไปยับยั้งการสร้าง microtubule โดยจะไปจับกับ heterodimeric subunit ของ tubulin molecule ซึ่งพบว่าการต้านทานสารเบนซิมิดาโซลจะมีผลทำให้สารเบนซิมิดาโซลไม่สามารถจับกับ heterodimeric subunit ของ molecule tubulin ได้ (Davidse, 1986) ซึ่งมีรายงานของ Ma and Michailides (2005) พบการเกิดการต้านทานกับสารป้องกันกำจัดเชื้อราชนิดดูดซึมในกลุ่มของเบนซิมิดาโซลในเชื้อราโรคพืชหลายชนิด โดยส่วนมากการเกิดความต้านทานจะเกี่ยวข้องกับการกลายพันธุ์ของยีน beta-tubulin ซึ่งจะมีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของลำดับ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

กรดอะมิโนที่ codon 6, 50, 167, 198, 200 และ 240 ทั้งนี้ Buhr and Dickman (1994) รายงานพบการต้านทานของเชื้อรา *C. gloeosporioides* f. sp. *aeschynimene* ต่อสารบีโนมิล และเมื่อทำการวิเคราะห์หาลำดับเบสของยีน beta-tubulin พบว่าเชื้อราที่มีการต้านทานจะเกิดการเปลี่ยนแปลงที่ตำแหน่งกรดอะมิโน 198 โดย glutamic acid (GAG) จะถูกแทนที่ด้วย lysine (AAG) จากการศึกษาของ Albertini และคณะในปี 1999 ได้ทำการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของยีน beta- tubulin ที่เกี่ยวข้องกับการแสดงออกของลักษณะการต้านทานที่แตกต่างกันของเชื้อ *Tapesia* spp. โดยศึกษาเปรียบเทียบระหว่างการกลายพันธุ์ของเชื้อราจากแปลงและที่ชักนำให้เกิดการต้านทานในห้องปฏิบัติการ โดยได้ทำทดสอบการต้านทานต่อสารเคมีกลุ่ม benzimidazole ได้แก่ carbendazim และ thiabendazole กับเชื้อรา *Tapesia yallundae* และ *T. acuformis* พบเชื้อราแสดงการต้านทานจำนวน 7 ไอโซเลทที่แยกได้จากแปลงและเชื้อราที่แสดงการต้านทานจำนวน 6 ไอโซเลท ที่ชักนำให้เกิดการต้านทานในห้องปฏิบัติการ โดยจะพบการเปลี่ยนแปลงที่กรดอะมิโน codon 198, 200 หรือ 240 ของยีน beta-tubulin ทั้งนี้ Peres และคณะในปี 2004 ได้รายงานพบการต้านทานสารบีโนมิลของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* โดยเมื่อวิเคราะห์หาลำดับเบสของยีน beta-tubulin พบว่าเชื้อราที่แสดงการต้านทานสารบีโนมิล จะเกิดการเปลี่ยนแปลงที่ตำแหน่งกรดอะมิโน codon 198 โดย glutamic acid (GAG) จะเปลี่ยนเป็น alanine (GCG) ซึ่งเป็นผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง 1,331 ซึ่ง A เปลี่ยนเป็น C นอกจากนี้มีรายงานของ Maymon (2006) และ Zhan and Huang (2007) พบการต้านทานของเชื้อรา *C. gloeosporioides* ต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อราในกลุ่มเบนซิมิดาโซล และเมื่อวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน beta-tubulin พบว่าเชื้อราจะมีการเปลี่ยนแปลงที่กรดอะมิโน codon 198 โดย glutamic acid (GAG) จะเปลี่ยนเป็น alanine (GCG)

การเกิดความต้านทานต่อสารเบนซิมิดาโซลจะส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงที่ลำดับของกรดอะมิโนในยีน beta-tubulin ในตำแหน่งที่แตกต่างกันไป การเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นนี้จะส่งผลให้เชื้อราเกิดการกลายพันธุ์ และได้มีรายงานที่รวบรวมการเกิดการกลายพันธุ์ที่ยีน beta-tubulin ในตำแหน่งต่างๆ ของเชื้อราสาเหตุโรคพืชแต่ละชนิด (Ma and Michailides, 2005) ดังนี้ (ตาราง 3)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 3 การกลายพันธุ์ที่ยีน beta-tubulin ของเชื้อราสาเหตุโรคพืชแต่ละชนิด

Amino acid of the β-tubulin gene		Organism	Reference
Codon	Substitution		
6	His to Tyr	*Monilinia fructicola*	Ma *et al*., 2003
		Trichoderma viride	Goldman *et al*., 1993
50	Tyr to Cys	*Cladobotryum dendroides*	McKay *et al*., 1998
167	Phe to Tyr	*Cochliobolus heterostrophus*	Gafur *et al*., 1998
		Penicillium expansum	Baraldi *et al*., 2003
198	Glu to Ala	*Botrytis cinerea*	Park *et al*., 1997
		Helminthosporium solani	McKay and Cooke (1997) Cunha and Rizzo (2003)
		M. fructicola	Ma *et al*., 2003
		Penicillium aurantiogriseum	Koenraadt *et al*., 1992
		Penicillium expansum	Baraldi *et al*., 2003 Koenraadt *et al*., 1992
		Tapesia yallundae *Tapesia acuformis*	Albertini *et al*., 1999
		Venturia inaequalis *Venturia pirina*	Koenraadt *et al*., 1992
		Cercospora beticola	Davidson *et al*., 2006
		Cercospora kikuchii	Imazaki *et al*., 2006
		Colletotrichum gloeosporioides	Peres *et al*., 2004 Maymon *et al*., 2006 Zhan and Huang (2007)
198	Glu to Gln	*T. acuformis* *T. yallundae*	Albertini *et al*., 1999
		H. solani	McKay and Cooke (1997)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 3 (ต่อ) การกลายพันธุ์ที่ยีน beta-tubulin ของเชื้อราสาเหตุโรคพืชแต่ละชนิด

Amino acid of the β-tubulin gene		Organism	Reference
Codon	Substitution		
198	Glu to Gly	*T. acuformis* *T. yallundae*	Albertini *et al*., 1999
		V. inaequalis	Koenraadt *et al*., 1992
		Neurospora crassa	Fujimura *et al*., 1994
		M. fructicola *P. aurantiogriseum* *P. digitatum*	Koenraadt *et al*., 1992
		V. inaequalis	Albertini *et al*., 1999
		P. expansum	Baraldi *et al*., 2003
		Beauveria bassiana	Burtter *et al*., 2003
198	Glu to Lys	*C.gloeosporioides* f.sp. *aeschynomene*	Buhr and Dickman (1994)
198	Glu to Val	*P. expansum*	Albertini *et al*., 1999
200	Phe to Tyr	*P. aurantiogriseum* *P. italicum* *V. inaequalis* *V. pirina*	Koenraadt *et al*., 1992
		T. yallundae	Albertini *et al*., 1999
240	Leu to Phe	*Monilinia laxa*	Ma *et al*., 2005
		T. yallundae	Albertini *et al*., 1999

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3. การตรวจหาการต้านทานของเชื้อราต่อสารเบนซิมิดาโซล

ปัจจุบันวิทยาการด้านอณูวิทยาได้เข้ามามีบทบาทในการศึกษาและวินิจฉัยโรคพืชอย่างกว้างขวาง สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในงานต่างๆ ได้มากขึ้น เช่นประยุกต์ใช้ในการตรวจวินิจฉัยโรคและจำแนกชนิดของเชื้อสาเหตุโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพ รวดเร็ว และแม่นยำมากขึ้น ศึกษาความหลากหลายและความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมตลอดจนพันธุศาสตร์ประชากรของเชื้อสาเหตุโรคพืชได้อย่างมีประสิทธิภาพ และมีประโยชน์อย่างยิ่งต่อการวางแผนและการควบคุมโรคที่เหมาะสม รวมทั้งการกักกันโรคอย่างมีประสิทธิภาพ พัชรา (2541) อ้างโดย เอมอร (2544)

วิธีการตรวจสอบการต้านทานสารป้องกันกำจัดเชื้อราโรคพืชที่ใช้ทั่วไปปกติจะตรวจสอบโดยการแยกเชื้อบริสุทธิ์ของเชื้อราที่ต้องการศึกษาและนำมาทดสอบในจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีอาหารที่ผสมสารป้องกันกำจัดเชื้อราชนิดนั้นๆ หรืออาจจะต้องทำการปลูกเชื้อกับพืชที่มีการฉีดพ่นสารป้องกันกำจัดเชื้อรา ซึ่งเป็นวิธีที่ต้องใช้เวลา แรงงาน และปริมาณเชื้อสาเหตุเป็นจำนวนมาก จึงได้มีการนำวิธีการทางชีวโมเลกุลมาศึกษากลไกการเกิดการต้านทาน ซึ่งเป็นวิธีที่ได้ผลรวดเร็วและสามารถชี้วัดได้ถึงในระดับโมเลกุล (Ma and Michailides, 2005)

Buhr และ Dickman (1994) ตรวจสอบการต้านทานของเชื้อราด้วยเทคนิค PCR โดยตรวจวิเคราะห์ชิ้นส่วนของยีน beta-tubulin จากเชื้อรา *C. gloeosporioides* f. sp. *aeschynomene* ที่ต้านทานต่อสารบีโนมิล และนำส่วนของ genomic DNA ไปทำ PCR โดยเลือกใช้ primers TB201 (5'-CTCCATCTCGTCATACC-3') และ TB203 (5'-TTATCCGCCTTGCCCCT-3') นอกจากนี้ยังมีการศึกษาของ Peres และคณะในปี 2004 ที่ได้ตรวจสอบการต้านทานของเชื้อราด้วยเทคนิค PCR เช่นกัน โดยตรวจวิเคราะห์ชิ้นส่วนของยีน beta-tubulin จากเชื้อรา *C. acutatum* และ *C. gloeosporioides* ที่ต้านทานและอ่อนแอต่อสารบีโนมิลโดยใช้ primers TB2L (5'-GYTTCC AGATYACCCACTCC-3') และ TB2R (5'-TGAGCTCAGGAACRCTGACG-3') จากโปรแกรม Primer 3 ซึ่ง TB2L จะ prime ที่ตำแหน่ง nucleotide 1,133 ถึง 1,152 และ TB2R จะ prime ที่ตำแหน่ง nucleotide 1,606 ถึง 1,625 ซึ่งเป็นตำแหน่งที่สัมพันธ์กับลำดับยีน beta-tubulin ของเชื้อรา *C. gloeosporioides* f. sp. *aeschynomene* (GenBank accession U14138) และวิเคราะห์หาลำดับเบส

Davidson และคณะในปี 2006 ได้ทำการตรวจสอบการต้านทานของเชื้อราด้วยเทคนิค PCR โดยตรวจวิเคราะห์ชิ้นส่วนของยีน beta-tubulin จากเชื้อรา *Cercospora beticola* ที่เกิดการทนทานและอ่อนแอต่อสารเบนซิมิดาโซลโดยใช้ primers Bt2a และ Bt2b และโคลน (cloned) ยีน โดยใช้ plasmid vector TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen Life Technologies) และทำ PCR เพื่อวิเคราะห์ recombinant plasmids ที่ได้โดยใช้ไพร์เมอร์ M13F และ M13R จากนั้นวิเคราะห์หาลำดับเบสด้วยเครื่อง automated sequencer (LI-COR Biotechnology, Lincoln, NE, USA) นอกจากนี้ Zhan and

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Huang (2007) ได้ตรวจสอบการต้านทานของเชื้อราด้วยเทคนิค PCR โดยตรวจวิเคราะห์ชิ้นส่วนของยีน beta-tubulin จากเชื้อรา *C. gloeosporioides* ของมะม่วงในประเทศจีน ด้วย primer P_{3-1} (5'-CCTATCCTCGGTCAAGCCCA-3') และ primer P_{3-2} (GAAGCCCATGTTCTGGCAAA-3') เพิ่มปริมาณในส่วนของยีน beta-tubulin และทำการโคลน (cloned) ยีนด้วย pMD18-T Vector ได้ recombinant plasmids แล้วจึงทำการวิเคราะห์หาลำดับเบสในขั้นตอนต่อไป

4. Polymerase chain reaction (PCR)

Polymerase chain reaction (PCR) หรือที่เรียกอีกอย่างหนึ่งว่า *In vitro* enzymatic gene amplification ค้นพบครั้งแรกโดย Kary Mullis และคณะในปี 1985 เป็นเทคนิคการเพิ่มปริมาณยีนหรือชิ้นส่วนของดีเอ็นเอเฉพาะบริเวณที่ต้องการศึกษาให้มีจำนวนมากขึ้นกว่าเดิมหลายล้านเท่าในหลอดทดลองโดยใช้ระยะเวลาอันสั้น ซึ่งกระบวนการต่างๆ เลียนแบบจากการจำลองตัวเองของสายดีเอ็นเอในสภาพธรรมชาติ (*In vitro* DNA replication) ซึ่งการทำปฏิกิริยา PCR ที่ต่อเนื่องซ้ำๆ กันในขั้นตอนที่ 1-3 หลายๆ รอบ จะพบว่ามีสายดีเอ็นเอเพิ่มขึ้น โดยเริ่มจากสายดีเอ็นเอต้นแบบ 1 คู่ เมื่อสิ้นสุดรอบที่ 1 จะได้สายดีเอ็นเอเป็น 2 คู่ ดังนั้นเมื่อทำเช่นนั้นหลายๆ รอบของ PCR ดีเอ็นเอก็จะเพิ่มขึ้นเป็น 2 เท่า ของทุกๆ รอบ ถ้าทำ PCR 20 รอบ ก็จะได้สายดีเอ็นเอเพิ่มเป็น 2^{21} สาย ถ้าทำปฏิกิริยา n รอบ ก็จะได้สายดีเอ็นเอเท่ากับ 2^{n+1} เมื่อประสิทธิภาพการผลิต 100 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งโดยทั่วไปมักจะทำ PCR ประมาณ 30-40 รอบ ก็จะได้ชิ้นส่วนของดีเอ็นเอเป็นจำนวนมากถึงพันล้านเท่าของจำนวนดีเอ็นเอตั้งต้น (อังสนา, 2546)

5. DNA Sequencing

การหาลำดับเบสของดีเอ็นเอ (DNA sequencing) เป็นการหาการเรียงลำดับของนิวคลีโอไทด์ (nucleotide) ของชิ้นดีเอ็นเอที่สนใจ มี 2 วิธี คือ วิธีทางเคมีและวิธีการใช้เอนไซม์ ซึ่งมีหลักการทำให้เกิดชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดต่างกันเพียง 1 เบส โดยใช้ปฏิกิริยาที่ทำให้ได้ชิ้นดีเอ็นเอที่ถูกตัดที่ตำแหน่งที่มีเบสจำเพาะ หรือสังเคราะห์ดีเอ็นเอให้ได้ชิ้นดีเอ็นเอที่มีปลายเป็นเบสจำเพาะทั้ง 4 ชนิด แล้วจึงแยกชิ้นดีเอ็นเอดังกล่าวโดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซีสต่อไป (สุรินทร์, 2545) โดยการหาลำดับเบสของดีเอ็นเอ การถอดรหัสทางพันธุกรรม หรือการวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ (nucleotide sequence) ของสิ่งมีชีวิตต่างๆ ปัจจุบันนิยมใช้ปฏิกิริยาเคมีที่ถูกค้นพบโดย Sanger *et al.* (1997) อ้างโดย ศุภมิตร (2550) ที่เรียกว่า Sanger method หรือ dideoxy or chain-terminating method และใช้เครื่อง automated DNA sequence เป็นตัวช่วยอ่านรหัสพันธุกรรม ซึ่งเป็นวิธีที่สามารถทำได้ในเวลาอันรวดเร็ว

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ซึ่งการหาลำดับเบสโดยใช้เครื่องอัตโนมัตินี้ จะใช้ primer และ ddNTPs ที่ติดฉลากด้วยสารเรืองแสง (fluorescent dye) และอ่านผลโดยใช้แสงเลเซอร์ ซึ่งมีข้อดีคือสามารถอ่านผลได้อย่างรวดเร็วและยังแสดงผลการอ่านทางคอมพิวเตอร์ ทั้งนี้เพื่อเป็นการหลีกเลี่ยงความผิดพลาดที่เกิดขึ้นจากการอ่านผลด้วยวิธี manual อีกด้วย Dale and Schantz (2002) อ้างโดย อรอุมา (2548)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved