Thesis Title Detection and Control of Carbendazim-resistant *Colletotrichum* spp. Causing Mango Anthracnose

Author Miss Pornprapa Kongtragoul

Degree Doctor of Philosophy (Plant Pathology)

Thesis Advisory Committee

Lect. Dr. Sarunya Valyasevi	Advisor
Prof. Dr. Kazuya Akimitsu	Co-advisor
Assoc. Prof. Dr. Chaiwat To-anun	Co-advisor
Asst. Prof. Dr. Angsana Akarapisan	Co-advisor
Asst. Prof. Dr. Ekachai Chukeatirote	Co-advisor

Abstract

Fruit and leaf samples of various mango cultivars showed typical anthracnose symptoms which were collected from markets and orchards. A tissue transplanting technique was yielded one hundred and fifty pathogenic isolates. Different types of colonies, including white, greyish white and dark grey cottony mycelia were observed on potato dextrose agar (PDA) for ten days. The growth rate average of the colonies was 9.97±0.81 mm/day. The colonies from cultures showed hyaline branching septate hyphae, and formed one-celled hyaline, straight, cylindrical conidia with an average 16.46-18.65 x 3.94-4.47 µm., and developed dark brown clavate appressoria. These morphological characteristics were identified as *Colletotrichum gloeosporioides*.

The carbendazim-resistant assay was conducted on PDA amended with carbendazim at various concentrations of 0.1, 1, 10, 100, 500 and 1,000 mg/l. The

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

phenotype evaluation was grouped into four levels of resistance to carbendazim; highly resistant (Car^{HR}; ≥ 500 mg/l), moderately resistant (Car^{MR}; ≤ 100 mg/l), weakly resistant (Car^{WR}; ≤ 10 mg/l) and sensitive (Car^{S}; ≤ 1 mg/l). The levels of resistances were showed 74.7% of Car^{HR}, 0.6% of Car^{MR} and 24.7% of Car^{S}. Pathogenicity tests confirmed that the Car^{HR}, Car^{MR} and Car^{S} isolates from various mangoes which were pathogenic to the mango "Namdokmai" cultivar, thus producing typical anthracnose symptoms on both fruits and leaves.

Approximately 450 base pairs were shown from molecular technique analysis of random samples of Car^{HR}, Car^{MR} and Car^{S} isolates on a partial genomic region of ITS rDNA, using polymerase chain reaction (PCR) with the species-specific primer of CgInt and ITS4. Similar sequences to *C. gloeosporioides* from all isolates were shown by comparisons of nucleotide sequences with the respective PCR products, using BLAST analyses with GenBank and NCBI databases.

Results from the analysis of nucleotide and amino acid sequences of the partial second *β*-tubulin (*TUB2*) gene from the samples in each level were compared with *C. gloeosporioides* f. sp. *aeschynomene* wild type (accession no. U14138). The comparison showed a single nucleotide mutation, which was a transversion of an adenine (A) being converted into cytosine (C) in the Car^{HR} phenotype. This resulted in the substitution of codon 198, which encodes glutamic acid (G<u>A</u>G) in the Car^{S} phenotype, converting to a codon for alanine (G<u>C</u>G). Furthermore, Car^{MR} phenotype was found a single nucleotide that was a transversion of a thymine (T) to adenine (A) transversion. This resulted in the substitution of codon 200, which encodes phenylalanine (T<u>T</u>C), converting to a codon for tyrosine (T<u>A</u>C).

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

The tested chitosan showed clearly delay in conidial germination of the tested 7 isolates of carbendazim resistant *C. gloeosporioides* for 24 hr in slide culture when treated separately with three chitosan groups were tested as follows:-, commercial chitosan solution group: CC1 and CC2 applied at 1 cc/l, polymer chitosan group: PC1 [poly-(1,4-β-D-glucopyranosamine] and PC2 [poly (D-glucosamine] applied at 0.5%, 1.0% and 1.5%, and oligomer chitosan group: OC1 (oligomer chitosan solution) applied at 1 cc/l and OC2 (chitosan oligosaccharide lactate) applied at 0.5%, 1.0% and 1.5%.

The chitosan CC1 and CC2 at 1 cc/l, and PC1 and PC2 at 0.5%, 1.0% and 1.5% were separately spread over potato dextrose agar and placed culture dish onto the middle Petri dish. Result showed that the tested chitosan were delayed the mycelial growth of tested 7 isolates of the carbendazim resistant *C. gloeosporioides*.

Dropping CC2 at 1 cc/l and PC2 at 1.5% on wounded mango fruits before inoculation with isolate of CAN_F095 decreased disease incidence of 68.81 and 66.09%, respectively, followed by dropping PC1 and PC2 at 1.5% before inoculated with isolate of NDM_F116 decreased disease incidence of 62.58 and 61.40%, respectively. The carbendazim at 500 mg/l were treated before and after inoculation with isolates of CAN_F095 and NDM_F116 that was not decreased disease incidence on mango fruits.

Chitosan was sprayed to un-wounded mango fruits at 15 min before inoculation with carbendazim resistant isolates at $1x10^6$ spore/ml. It showed that chitosan 1.5 % PC1 and PC2 could against the inoculated isolates of CAN_F095 and NDM_F116 as disease reduction of 75 %. It revealed the disease reduction of 75 % when sprayed with 1.0 % PC1 against the inoculated isolate of CAN_F095 and

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

sprayed 1.0 % PC2 against the inoculated isolate of NDM_F116. Spraying 1.0 % PC1 inhibited the isolate of NDM_F116 for delaying infection on mango fruits and the spraying 1.0 % PC2 inhibited the isolate of CAN_F095 to infect on mango fruits as disease reduction of 66.75%.

After inoculation of carbendazim resistant isolates at $1x10^6$ spore/ml for 24 hr and sprayed chitosan to un-wounded mango fruits were studied and resulted that spraying 1.5 % PC1 and PC2 could inhibit the isolates of CAN_F095 and NDM_F116 to infect mango fruits as the disease reduction of 75 %. The disease reduction was also shown when spraying 1.0 % PC1 and 1 cc/l CC2 against inoculated isolates of CAN_F095 and spraying 1.0 % PC2 against the inoculated isolates of NDM_F116 as 75 %.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ การตรวจสอบและการควบคุมเชื้อรา *Colletotrichum* spp. สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของมะม่วงที่ดื้อต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิม

ผู้เขียน นางสาวพรประพา คงตระกูล

ปริญญา วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต (โรคพืช)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

อาจารย์ ดร. สรัญยา วัลยะเสวี	อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
ศาสตราจารย์ ดร. คาซูยะ อะคิมิซึ	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
รองศาสตราจารย์ ดร. ชัยวัฒน์ โตอนันต์	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อังสนา อัครพิศาล	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เอกชัย ชูเกียรติโรจน์	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

บทคัดย่อ

จากการเก็บตัวอย่างผลและใบของมะม่วงสายพันธุ์ต่างๆ ที่แสดงอาการโรคแอนแทรคโนสจากตลาดและสวน ทำการแยกเชื้อราสาเหตุโรคโดยวิธี tissue transplanting technique ได้จำนวน 150 ไอโซเลท เชื้อราสาเหตุโรคดังกล่าวที่เจริญบนอาหาร potato dextrose agar (PDA) เมื่อเวลา 10 วัน แสดงลักษณะโคโลนี สีขาว สีขาวปนสีเทา และสีเทาเข้ม อัตราการเจริญเติบโตของโคโลนีเฉลี่ย 9.97±0.81 มิลลิเมตรต่อวัน พบเส้นใยมีผนังกั้น แตกแขนง และสีใส สร้างสปอร์เซลล์เดียว สีใส รูปทรงกระบอกตรง มีขนาดเฉลี่ย 16.46-18.65 x 3.94-4.47 ไมครอน สร้าง appressoria สีน้ำตาลแบบกระบอง ลักษณะทางสัณฐานวิทยาดังกล่าวจัดจำแนกเป็นเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides*

ทดสอบความต้านทานต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิมบนอาหาร PDA ที่ผสมสารป้องกันกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิมที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ได้แก่ 0.1, 1, 10, 100, 500 และ 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ประเมินระดับความต้านทานที่แสดงออกเป็น 4 กลุ่ม ดังนี้ ต้านทานระดับสูง (Car^{HR}; $\geq$ 500 มิลลิกรัมต่อลิตร), ต้านทานระดับปานกลาง (Car^{MR}; $\leq$ 100 มิลลิกรัมต่อ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ลิตร), ต้านทานระดับต่ำ (Car^{WR}; $\leq$ 10 มิลลิกรัมต่อลิตร) และ อ่อนแอ (Car^{S}; $\leq$ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร) พบลักษณะต้านทานระดับสูง จำนวน 74.7 เปอร์เซ็นต์ ต้านทานระดับปานกลางจำนวน 0.6 เปอร์เซ็นต์ และอ่อนแอจำนวน 24.7 เปอร์เซ็นต์ และทำการทดสอบความสามารถในการก่อโรคของไอโซเลท Car^{HR}, Car^{MR} และ Car^{S} ที่แยกได้จากมะม่วงสายพันธุ์ต่างๆ กับมะม่วงสายพันธุ์น้ำดอกไม้ พบว่าทุกไอโซเลทสามารถก่อให้เกิดโรคแอนแทรคโนส ทั้งบนใบและผลของมะม่วงสายพันธุ์ดังกล่าว

จำแนกเชื้อราไอโซเลท Car^{HR}, Car^{MR} และ Car^{S} ที่สุ่มจากมะม่วงสายพันธุ์ต่างๆ โดยเทคนิคอณูชีวโมเลกุล บนส่วนของ ITS rDNA โดยวิธี polymerase chain reaction (PCR) โดยใช้ไพรเมอร์ CgInt และ ITS4 ที่มีความเฉพาะเจาะจง แสดงขนาดประมาณ 450 คู่เบส และทำการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยใช้โปรแกรม BLAST กับฐานข้อมูล GenBank NCBI databases พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของทุกไอโซเลท เหมือนกับ *C. gloeosporioides* มากที่สุด

วิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ และกรดอะมิโนจากตัวอย่างเชื้อราแต่ละระดับความต้านทาน ตรงตำแหน่งบางส่วนของยีนเบต้าทูบูลินที่สอง (*TUB2*) เพื่อเปรียบเทียบกับ *C. gloeosporioides* f. sp. *aeschynomene* สายพันธุ์ wild type (accession no. U14138) พบเชื้อรากลุ่ม Car^{HR} มีการเปลี่ยนแปลงของลำดับนิวคลีโอไทด์จาก adenine (A) เป็น cytosine (C) ซึ่งทำให้เกิดการกลายพันธุ์ปรากฏที่ตำแหน่งของกรดอะมิโน codon 198 จาก glutamic acid (G<u>A</u>G) ของเชื้อรากลุ่ม Car^{S} เป็น alanine (G<u>C</u>G) นอกจากนี้ พบการเปลี่ยนแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อรา Car^{MR} จาก thymine (T) เป็น adenine (A) เป็นผลให้เกิดการกลายพันธุ์ปรากฏที่ตำแหน่งของกรดอะมิโน codon 200 จาก phenylalanine (T<u>T</u>C) เป็น tyrosine (T<u>A</u>C)

ไคโตซานชะลอการงอกของสปอร์เชื้อรา *C. gloeosporioides* ที่ต้านทานต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิม 7 ไอโซเลท เป็นเวลา 24 ชั่วโมง บน slide culture ไคโตซานที่ใช้ทดสอบแบ่งเป็น 3 กลุ่ม ประกอบด้วย กลุ่มสารละลายไคโตซานเชิงพาณิชย์ ได้แก่ สารละลายไคโตซาน CC1 และ CC2 ความเข้มข้น 1 ลูกบาศก์เซนติเมตรต่อลิตร, กลุ่มโพลิเมอร์ไคโตซาน ได้แก่ PC1 [poly-(1,4-β-D-glucopyranosamine)] และ PC2 [poly (D-glucosamine)] ความเข้มข้น 0.5, 1.0 และ 1.5 เปอร์เซ็นต์ และกลุ่มโอลิโกเมอร์ไคโตซาน ได้แก่ OC1 (oligomer chitosan solution) ความ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เข้มข้น 1 ลูกบาศก์เซนติเมตรต่อลิตร และ OC2 chitosan oligosaccharide lactate (OC2) ความเข้มข้น 0.5, 1.0 และ 1.5 เปอร์เซ็นต์

ไคโตซาน CC1 และ CC2 ความเข้มข้น 1 ลูกบาศก์เซนติเมตรต่อลิตร PC1 และ PC2 ความเข้มข้น 0.5, 1.0 และ 1.5 เปอร์เซ็นต์ เคลือบบนอาหาร potato dextrose agar และวางชิ้นส่วนเชื้อราบนกลางจานอาหารเลี้ยงเชื้อดังกล่าว ปรากฏว่าชะลอการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *C. gloeosporioides* ที่ต้านทานต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิม 7 ไอโซเลท

ไคโตซาน CC1 ความเข้มข้น 1 ลูกบาศก์เซนติเมตรต่อลิตร และ PC2 ความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ หยดบริเวณที่ทำแผลบนผลมะม่วง ก่อนการปลูกเชื้อราไอโซเลท CAN_F095 พบลดการเกิดโรค 68.81 และ 66.09 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ รองลงมา ได้แก่ ไคโตซาน PC1 และ PC2 ความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ ก่อนการปลูกเชื้อราไอโซเลท NDM_F116 ลดการเกิดโรค 62.58 และ 61.40 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ขณะที่สารป้องกันกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิมความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร ทั้งก่อนและหลังการปลูกเชื้อราไอโซเลท CAN_F095 และ NDM_F116 ไม่สามารถลดการเกิดโรคบนผลมะม่วง

ไคโตซานพ่นบนผลมะม่วงที่ไม่ทำแผล 15 นาที ก่อนการปลูกเชื้อรา *C. gloeosporioides* ที่ต้านทานต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิม ความเข้มข้น $1x10^6$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร ปรากฏว่าไคโตซาน PC1 และ PC2 ความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ ต้านทานต่อเชื้อราไอโซเลท CAN_F095 และ NDM_F116 ลดการเกิดโรค 75 เปอร์เซ็นต์ และพบว่าเมื่อพ่น PC1 ความเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ ลดการเกิดโรคจากเชื้อราไอโซเลท CAN_F095 และ PC2 ความเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ ต้านทานต่อเชื้อราไอโซเลท NDM_F116 เท่ากับ 75 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ PC1 ความเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ ยับยั้งเชื้อราไอโซเลท NDM_F116 โดยชะลอการติดเชื้อบนผลมะม่วง และ การพ่น PC2 ความเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ ยับยั้งเชื้อราไอโซเลท CAN_F095 โดยชะลอการติดเชื้อบนผลมะม่วง ที่ 66.75 เปอร์เซ็นต์

หลังการปลูกเชื้อไอโซเลทที่ต้านทานต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิม ความเข้มข้น $1x10^6$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และพ่นไคโตซานบนผลมะม่วงที่ไม่ทำแผล ปรากฏว่า PC1 และ PC2 ความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ ยับยั้งการติดเชื้อราไอโซเลท CAN_F095 บนผลมะม่วง โดยลดการเกิดโรค 75 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้พบว่าเมื่อพ่น PC1 ความเข้มข้น 1.0

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เปอร์เซ็นต์ และ CC2 ความเข้มข้น 1 ลูกบาศก์เซนติเมตรต่อลิตร ต้านทานต่อเชื้อราไอโซเลท CAN_F095 และ PC2 ความเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ ต้านทานต่อเชื้อราไอโซเลท NDM_F116 เท่ากับ 75 เปอร์เซ็นต์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved