

Appendix B Nucleotide sequence (341 bp) of *Colletotrichum gloeosporioides* from second beta-tubulin gene by nested polymerase chain reaction with TB2L, TB2R primer and CTB2F1, CTB2R primer.

No.	Isolate code	Nucleotide Sequence
1.	CKT_L044	TCCAAGATTCGTGAGGAGTTCCCCGACCGCATGATGGCCACCTTCTCCGTCGTTCCCTC CCCCAAGGTCTACGACACCGTTGTCGAGCCCTACAACGCCACTCTCTCCGTCCACCAGC TGGTCGAGAACTCCGACGCGACCTTCTGCATTGACAACGAGGCTCTCTACGACATTTGC ATGCGTACCCTCAAGCTGTCCAACCCCTCTTACGGCGACCTGAACCACCTGGTCTCTGC TGTTATGTCCGGTGTCACTACCTGCCTGCGTTTCCCGGGTCAGCTGAACCTCTGACCTGC GCAAGCTGGCTGTCAACATGGTTCCTTTCCCCCGTCTCCACTTCTT
2.	CAN_F095	TCCAAGATTCGTGAGGAGTTCCCCGACCGCATGATGGCCACCTTCTCCGTCGTTCCCTC CCCCAAGGTCTCCGACACTGTTGTCGAGCCCTACAACGCCACTCTCTCCGTCCACCAGC TGGTCGAGAACTCCGACGCGACCTTCTGCATTGACAACGAGGCTCTCTACGACATTTGC ATGCGTACCCTCAAGCTATCCAACCCCTCTTACGGCGACCTGAACCACCTGGTCTCTGC TGTTATGTCCGGTGTCACTACCTGCCTGCGTTTCCCGGGTCAACTGAACCTCTGACCTGC GCAAGCTGGCTGTCAACATGGTTCCTTTCCCCCGTCTCCACTTCTT
3.	CAN_F125	TCCAAGATTCGTGAGGAGTTCCCCGACCGCATGATGGCCACCTTCTCCGTCGTTCCCTC CCCCAAGGTCTCCGACACTGTTGTCGAGCCCTACAACGCCACTCTCTCCGTCCACCAGC TGGTCGAGAACTCCGACGAGACCTTCTGCATTGACAACGAGGCTCTCTACGACATTTGC ATGCGTACCCTCAAGCTATCCAACCCCTCTTACGGCGACCTGAACCACCTGGTCTCTGC TGTTATGTCCGGTGTCACTACCTGCCTGCGTTTCCCGGGTCAACTGAACCTCTGACCTGC GCAAGCTGGCTGTCAACATGGTTCCTTTCCCCCGTCTCCACTTCTT
4.	CAN_F146	TCCAAGATTCGTGAGGAGTTCCCCGACCGCATGATGGCCACCTTCTCCGTCGTTCCCTC CCCCAAGGTCTCCGACACTGTTGTCGAGCCCTACAACGCCACTCTCTCCGTCCACCAGC TGGTCGAGAACTCCGACGCGACCTTCTGCATTGACAACGAGGCTCTCTACGACATTTGC ATGCGTACCCTCAAGCTATCCAACCCCTCTTACGGCGACCTGAACCACCTGGTCTCTGC TGTTATGTCCGGTGTCACTACCTGCCTGCGTTTCCCGGGTCAACTGAACCTCTGACCTGC GCAAGCTGGCTGTCAACATGGTTCCTTTCCCCCGTCTCCACTTCTT
5.	CAN_L080	TCCAAGATTCGTGAGGAGTTCCCCGACCGCATGATGGCCACCTTCTCCGTCGTTCCCTC CCCCAAGGTCTCCGACACCGTTGTCGAGCCCTACAACGCCACTCTCTCCGTCCACCAGC TGGTCGAGAACTCCGACGAGACCTTCTGCATTGACAACGAGGCTCTCTACGACATTTGC ATGCGTACCCTCAAGCTGTCCAACCCCTCTTACGGCGACCTGAACCACCTGGTCTCTGC TGTTATGTCCGGTGTCACTACCTGCCTGCGTTTCCCGGGTCAACTGAACCTCTGACCTGC GCAAGCTGGCTGTCAACATGGTTCCTTTCCCCCGTCTCCACTTCTT
6.	CAN_L105	TCCAAGATTCATGAGGAGTTCCCCGACCGCATGATGGCCACCTTCTCCGTCGTTCCCTC CCCCAAGGTCTACGACACTGTTGTCGAGCCCTACAACGCCACTCTCTCCGTCCACCAGC TGGTCGAGAACTCCGACGAGACCTTCTGCATTGACAACGAGGCTCTCTACGACATTTGC ATGCGTACCCTCAAGCTATCCAACCCCTCTTACGGCGACCTGAACCACCTGGTCTCTGC TGTTATGTCCGGTGTCACTACCTGCCTGCGTTTCCCGGGTCAACTGAACCTCTGACCTGC GCAAGCTGGCTGTCAACATGGTTCCTTTCCCCCGTCTCCACTTCTT
7.	FL_F003	TCCAAGATCCGTGAGGAGTTCCCCGACCGCATGATGGCCACCTTCTCCGTCGTTCCCTC CCCCAAGGTCTCCGACACCGTTGTCGAGCCCTACAACGCCACTCTCTCCGTCCACCAGC TGGTCGAGAACTCCGACGAGACCTTCTGCATTGACAACGAGGCTCTCTACGACATTTGC ATGCGTACCCTCAAGCTGTCCAACCCCTCTTACGGCGACCTGAACCACCTGGTCTCTGC TGTTATGTCCGGTGTCACTACCTGCCTGCGTTTCCCGGGTCAACTGAACCTCTGACCTGC GCAAGCTGGCTGTCAACATGGTTCCTTTCCCCCGTCTCCACTTCTT
8.	FL_F066	TCCAAGATTCGTGAGGAGTTCCCCGACCGCATGATGGCCACCTTCTCCGTCGTTCCCTC CCCCAAGGTCTCCGACACTGTTGTCGAGCCCTACAACGCCACTCTCTCCGTCCACCAGC TGGTCGAGAACTCCGACGCGACCTTCTGCATTGACAACGAGGCTCTCTACGACATTTGC ATGCGTACCCTCAAGCTATCCAACCCCTCTTACGGCGACCTGAACCACCTGGTCTCTGC TGTTATGTCCGGTGTCACTACCTGCCTGCGTTTCCCGGGTCAACTGAACCTCTGACCTGC GCAAGCTGGCTGTCAACATGGTTCCTTTCCCCCGTCTCCACTTCTT
9.	FL_L079	TCCAAGATCCATGAGGAGTTCCCCGACCGCATGATGGCCACCTTCTCCGTCGTTCCCTC CCCCAAGGTCTCCGACACCGTTGTCGAGCCCTACAACGCCACTCTCTCCGTCCACCAGC TGGTCGAGAACTCCGACGAGACCTTCTGCATTGACAACGAGGCTCTCTACGACATTTGC ATGCGTACCCTCAAGCTGTCCAACCCCTCTTACGGCGACCTGAACCACCTGGTCTCTGC TGTTATGTCCGGTGTCACTACCTGCCTGCGTTTCCCGGGTCAACTGAACCTCTGACCTGC GCAAGCTGGCTGTCAACATGGTTCCTTTCCCCCGTCTCCACTTCTT

Appendix B Continued.

No.	Isolate code	Nucleotide Sequence
10.	K_F103	TCCAAGATTCGTGAGGAGTTCCCCGACCGCATGATGGCCACCTTCTCCGTCGTTCCCTC CCCCAAGGTCTCCGACACTGTTGTGCGAGCCCTACAACGCCACTCTCTCCGTCACCAGC TGGTCGAGAACTCCGACGCGACCTTCTGCATTGACAACGAGGCTCTCTACGACATTTGC ATGCGTACCCTCAAGCTATCCAACCCCTCTTACGGCGACCTGAACCACCTGGTCTCTGC TGTTATGTCCGGTGTCACTACCTGCCTGCGTTTCCCGGGTCAACTGAACCTGTACCTGC GCAAGCTGGCTGTCAACATGGTTCCTTTCCCCCGTCTTCACTTCTT
11.	K_L120	TCCAAGATTCGTGAGGAGTTCCCCGACCGCATGATGGCCACCTTCTCCGTCGTTCCCTC CCCCAAGGTCTCCGACACTGTTGTGCGAGCCCTACAACGCCACTCTCTCCGTCACCAGC TGGTCGAGAACTCCGACGAGACCTTCTGCATTGACAACGAGGCTCTCTACGACATTTGC ATGCGTACCCTCAAGCTATCCAACCCCTCTTACGGCGACCTGAACCACCTGGTCTCTGC TGTTATGTCCGGTGTCACTACCTGCCTGCGTTTCCCGGGTCAACTGAACCTGTACCTGC GCAAGCTGGCTGTCAACATGGTTCCTTTCCCCCGTCTTCACTTCTT
12.	KSW_L062	TCCAAGATTCATGAGGAGTTCCCCGACCGCATGATGGCCACCTTCTCCGTCGTTCCCTC CCCCAAGGTCTACGACACCGTGTGCGAGCCCTACAACGCCACTCTCTCCGTCACCAGC TGGTCGAGAATTCGACGAGACCTTCTGCATTGACAACGAGGCTCTCTACGACATTTGC ATGCGTACCCTCAAGCTGTCCAACCCCTCTTACGGCGACCTGAACCACCTGGTCTCTGC TGTTATGTCCGGTGTCACTACCTGCCTGCGTTTCCCGGGTCACTGAACCTGTACCTGC GCAAGCTGGCTGTCAACATGGTTCCTTTCCCCCGTCTTCACTTCTT
13.	KSW_L085	TCCAAGATCCGTGAGGAGTTCCCCGACCGCATGATGGCCACCTTCTCCGTCGTTCCCTC CCCCAAGGTCTCCGACACCGTGTGCGAGCCCTACAACGCCACTCTCTCCGTCACCAGC TGGTCGAGAACTCCGACGCGACCTTCTGCATTGACAACGAGGCTCTCTACGACATTTGC ATGCGTACCCTCAAGCTATCCAACCCCTCTTACGGCGACCTGAACCACCTGGTCTCTGC TGTTATGTCCGGTGTCACTACCTGCCTGCGTTTCCCGGGTCACTGAACCTGTACCTGC GCAAGCTGGCTGTCAACATGGTTCCTTTCCCCCGTCTTCACTTCTT
14.	KMK_F135	TCCAAGATTCATGAGGAGTTCCCCGACCGCATGATGGCCACCTTCTCCGTCGTTCCCTC CCCCAAGGTCTACGACACTGTTGTGCGAGCCCTACAACGCCACTCTCTCCGTCACCAGC TGGTCAAGAACTCCGACGCGACCTTCTGCATTGACAACGAGGCTCTCTACGACATTTGC ATGCGTACCCTCAAGCTATCCAACCCCTCTTACGGCGACCTGAACCACCTGGTCTCTGC TGTTATGTCCGGTGTCACTACCTGCCTGCGTTTCCCGGGTCAACTGAACCTGTACCTGC GCAAGCTGGCTGTCAACATGGTTCCTTTCCCCCGTCTTCACTTCTT
15.	KMK_L058	TCCAAGATTCATGAGGAGTTCCCCGACCGCATGATGGCCACCTTCTCCGTCGTTCCCTC CCCCAAGGTCTACGACACTGTTGTGCGAGCCCTACAACGCCACTCTCTCCGTCACCAGC TGGTCGAGAACTCCGACGCGACCTTCTGCATTGACAACGAGGCTCTCTACGACATTTGC ATGCGTACCCTCAAGCTATCCAACCCCTCTTACGGCGACCTGAACCACCTGGTCTCTGC TGTTATGTCCGGTGTCACTACCTGCCTGCGTTTCCCGGGTCAACTGAACCTGTACCTGC GCAAGCTGGCTGTCAACATGGTTCCTTTCCCCCGTCTTCACTTCTT
16.	KMK_L088	TCCAAGATTCGTGAGGAGTTCCCCGACCGCATGATGGCCACCTTCTCCGTCGTTCCCTC CCCCAAGGTCTACGACACCGTGTGCGAGCCCTACAACGCCACTCTCTCCGTCACCAGC TGGTCGAGAACTCCGACGAGACCTTCTGCATTGACAACGAGGCTCTCTACGACATTTGC ATGCGTACCCTCAAGCTGTCCAACCCCTCTTACGGCGACCTGAACCACCTGGTCTCTGC TGTTATGTCCGGTGTCACTACCTGCCTGCGTTTCCCGGGTCACTGAACCTGTACCTGC GCAAGCTGGCTGTCAACATGGTTCCTTTCCCCCGTCTTCACTTCTT
17.	LNG_L031	TCCAAGATCCGTGAGGAGTTCCCCGACCGCATGATGGCCACCTTCTCCGTCGTTCCCTC CCCCAAGGTCTCCGACACCGTGTGCGAGCCCTACAACGCCACTCTCTCCGTCACCAGC TGGTCGAGAACTCCGACGAGACCTTCTGCATTGACAACGAGGCTCTCTACGACATTTGC ATGCGTACCCTCAAGCTGTCCAACCCCTCTTACGGCGACCTGAACCACCTGGTCTCTGC TGTTATGTCCGGTGTCACTACCTGCCTGCGTTTCCCGGGTCACTGAACCTGTACCTGC GCAAGCTGGCTGTCAACATGGTTCCTTTCCCCCGTCTTCACTTCTT
18.	MCN_L056	TCCAAGATTCGTGAGGAGTTCCCCGACCGCATGATGGCCACCTTCTCCGTCGTTCCCTC CCCCAAGGTCTCCGACACTGTTGTGCGAGCCCTACAACGCCACTCTCTCCGTCACCAGC TGGTCGAGAACTCCGACGCGACCTTCTGCATTGACAACGAGGCTCTCTACGACATTTGC ATGCGTACCCTCAAGCTATCCAACCCCTCTTACGGCGACCTGAACCACCTGGTCTCTGC TGTTATGTCCGGTGTCACTACCTGCCTGCGTTTCCCGGGTCAACTGAACCTGTACCTGC GCAAGCTGGCTGTCAACATGGTTCCTTTCCCCCGTCTTCACTTCTT

Appendix B Continued.

No.	Isolate code	Nucleotide Sequence
19.	MCN_L059	TCCAAGATTCGTGAGGAGTTCCCGACCGCATGATGGCCACCTTCTCCGTCGTTCCCTC CCCCAAGGTCTACGACACTGTTGTCGAGCCCTACAACGCCACTCTCTCCGTCACCAGC TGGTCGAGAACTCCGACGAGACCTTCTGCATTGACAACGAGGCTCTCTACGACATTTGC ATGCGTACCCTCAAGCTATCCAACCCCTCTTACGGCGACCTGAACCACCTGGTCTCTGC TGTTATGTCCGGTGTCACTACCTGCCTGCGTTTCCCGGGTCAACTGAACCTCTGACCTGC GCAAGCTGGCTGTCAACATGGTTCCTTTCCCCCGTCTTCACTTCTT
20.	MCN_L070	TCCAAGATTCGTGAGGAGTTCCCGACCGCATGATGGCCACCTTCTCCGTCGTTCCCTC CCCCAAGGTCTCCGACACCGTGTGTCGAGCCCTACAACGCCACTCTCTCCGTCACCAGC TGGTCGAGAATCCGACGAGACCTTCTGCATTGACAACGAGGCTCTCTACGACATTTGC ATGCGTACCCTCAAGCTGTCCAACCCCTCTTACGGCGACCTGAACCACCTGGTCTCTGC TGTTATGTCCGGTGTCACTACCTGCCTGCGTTTCCCGGGTCACTGAACCTCTGACCTGC GCAAGCTGGCTGTCAACATGGTTCCTTTCCCCCGTCTTCACTTCTT
21.	MCN_L121	TCCAAGATTCGTGAGGAGTTCCCGACCGCATGATGGCCACCTTCTCCGTCGTTCCCTC CCCCAAGGTCTCCGACACCGTGTGTCGAGCCCTACAACGCCACTCTCTCCGTCACCAGC TGGTCGAGAACTCCGACGAGACCTTCTGCATTGACAACGAGGCTCTCTACGACATTTGC ATGCGTACCCTCAAGCTGTCCAACCCCTCTTACGGCGACCTGAACCACCTGGTCTCTGC TGTTATGTCCGGTGTCACTACCTGCCTGCGTTTCCCGGGTCACTGAACCTCTGACCTGC GCAAGCTGGCTGTCAACATGGTTCCTTTCCCCCGTCTTCACTTCTT
22.	MKS_L086	TCCAAGATTCGTGAGGAGTTCCCGACCGCATGATGGCCACCTTCTCCGTCGTTCCCTC CCCCAAGGTCTCCGACACCGTGTGTCGAGCCCTACAACGCCACTCTCTCCGTCACCAGC TGGTCGAGAACTCCGACGAGACCTTCTGCATTGACAACGAGGCTCTCTACGACATTTGC ATGCGTACCCTCAAGCTGTCCAACCCCTCTTACGGCGACCTGAACCACCTGGTCTCTGC TGTTATGTCCGGTGTCACTACCTGCCTGCGTTTCCCGGGTCACTGAACCTCTGACCTGC GCAAGCTGGCTGTCAACATGGTTCCTTTCCCCCGTCTTCACTTCTT
23.	NDM_F002	TCCAAGATTCGTGAGGAGTTCCCGACCGCATGATGGCCACCTTCTCCGTCGTTCCCTC CCCCAAGGTCTCCGACACTGTTGTCGAGCCCTACAACGCCACTCTCTCCGTCACCAGC TGGTCGAGAACTCCGACGCGACCTTCTGCATTGACAACGAGGCTCTCTACGACATTTGC ATGCGTACCCTCAAGCTATCCAACCCCTCTTACGGCGACCTGAACCACCTGGTCTCTGC TGTTATGTCCGGTGTCACTACCTGCCTGCGTTTCCCGGGTCAACTGAACCTCTGACCTGC GCAAGCTGGCTGTCAACATGGTTCCTTTCCCCCGTCTTCACTTCTT
24.	NDM_F006	TCCAAGATTCGTGAGGAGTTCCCGACCGCATGATGGCCACCTTCTCCGTCGTTCCCTC CCCCAAGGTCTACGACACCGTGTGTCGAGCCCTACAACGCCACTCTCTCCGTCACCAGC TGGTCGAGAACTCCGACGAGACCTTCTGCATTGACAACGAGGCTCTCTACGACATTTGC ATGCGTACCCTCAAGCTGTCCAACCCCTCTTACGGCGACCTGAACCACCTGGTCTCTGC TGTTATGTCCGGTGTCACTACCTGCCTGCGTTTCCCGGGTCAACTGAACCTCTGACCTGC GCAAGCTGGCTGTCAACATGGTTCCTTTCCCCCGTCTTCACTTCTT
25.	NDM_F012	TCCAAGATTCGTGAGGAGTTCCCGACCGCATGATGGCCACCTTCTCCGTCGTTCCCTC CCCCAAGGTCTACGACACTGTTGTCGAGCCCTACAACGCCACTCTCTCCGTCACCAGC TGGTCGAGAACTCCGACGCGACCTTCTGCATTGACAACGAGGCTCTCTACGACATTTGC ATGCGTACCCTCAAGCTATCCAACCCCTCTTACGGCGACCTGAACCACCTGGTCTCTGC TGTTATGTCCGGTGTCACTACCTGCCTGCGTTTCCCGGGTCAACTGAACCTCTGACCTGC GCAAGCTGGCTGTCAACATGGTTCCTTTCCCCCGTCTTCACTTCTT
26.	NDM_F014	TCCAAGATTCGTGAGGAGTTCCCGACCGCATGATGGCCACCTTCTCCGTCGTTCCCTC CCCCAAGGTCTCCGACACTGTTGTCGAGCCCTACAACGCCACTCTCTCCGTCACCAGC TGGTCGAGAACTCCGACGCGACCTTCTGCATTGACAACGAGGCTCTCTACGACATTTGC ATGCGTACCCTCAAGCTATCCAACCCCTCTTACGGCGACCTGAACCACCTGGTCTCTGC TGTTATGTCCGGTGTCACTACCTGCCTGCGTTTCCCGGGTCAACTGAACCTCTGACCTGC GCAAGCTGGCTGTCAACATGGTTCCTTTCCCCCGTCTTCACTTCTT
27.	NDM_F018	TCCAAGATTCGTGAGGAGTTCCCGACCGCATGATGGCCACCTTCTCCGTCGTTCCCTC CCCCAAGGTCTCCGACACTGTTGTCGAGCCCTACAACGCCACTCTCTCCGTCACCAGC TGGTCGAGAACTCCGACGCGACCTTCTGCATTGACAACGAGGCTCTCTACGACATTTGC ATGCGTACCCTCAAGCTATCCAACCCCTCTTACGGCGACCTGAACCACCTGGTCTCTGC TGTTATGTCCGGTGTCACTACCTGCCTGCGTTTCCCGGGTCAACTGAACCTCTGACCTGC GCAAGCTGGCTGTCAACATGGTTCCTTTCCCCCGTCTTCACTTCTT

Appendix B Continued.

No.	Isolate code	Nucleotide Sequence
28.	NDM_F026	TCCAAGATTCGTGAGGAGTTCCCCGACCGCATGATGGCCACCTTCTCCGTCGTTCCCTC CCCCAAGGTCTCCGACACTGTTGTGCGAGCCCTACAACGCCACTCTCTCCGTCACCAGC TGGTCGAGAACTCCGACGCGACCTTCTGCATTGACAACGAGGCTCTCTACGACATTTGC ATGCGTACCCTCAAGCTATCCAACCCCTCTTACGGCGACCTGAACCACCTGGTCTCTGC TGTTATGTCCGGTGTCACTACCTGCCTGCGTTTCCCGGGTCAACTGAACCTCTGACCTGC GCAAGCTGGCTGTCAACATGGTTCCTTTCCCCCGTCTTCACTTCTT
29.	NDM_F027	TCCAAGATTCGTGAGGAGTTCCCCGACCGCATGATGGCCACCTTCTCCGTCGTTCCCTC CCCCAAGGTCTACGACACTGTTGTGCGAGCCCTACAACGCCACTCTCTCCGTCACCAGC TGGTCGAGAACTCCGACGCGACCTTCTGCATTGACAACGAGGCTCTCTACGACATTTGC ATGCGTACCCTCAAGCTATCCAACCCCTCTTACGGCGACCTGAACCACCTGGTCTCTGC TGTTATGTCCGGTGTCACTACCTGCCTGCGTTTCCCGGGTCAACTGAACCTCTGACCTGC GCAAGCTGGCTGTCAACATGGTTCCTTTCCCCCGTCTTCACTTCTT
30.	NDM_F038	TCCAAGATTCATGAGGAGTTCCCCGACCGCATGATGGCCACCTTCTCCGTCGTTCCCTC CCCCAAGGTCTACGACACTGTTGTGCGAGCCCTACAACGCCACTCTCTCCGTCACCAGC TGGTCGAGAACTCCGACGCGACCTTCTGCATTGACAACGAGGCTCTCTACGACATTTGC ATGCGTACCCTCAAGCTATCCAACCCCTCTTACGGCGACCTGAACCACCTGGTCTCTGC TGTTATGTCCGGTGTCACTACCTGCCTGCGTTTCCCGGGTCAACTGAACCTCTGACCTGC GCAAGCTGGCTGTCAACATGGTTCCTTTCCCCCGTCTTCACTTCTT
31.	NDM_F061	TCCAAGATTCATGAGGAGTTCCCCGACCGCATGATGGCCACCTTCTCCGTCGTTCCCTC CCCCAAGGTCTCCGACACTGTTGTGCGAGCCCTACAACGCCACTCTCTCCGTCACCAGC TGGTCGAGAACTCCGACGCGACCTTCTGCATTGACAACGAGGCTCTCTACGACATTTGC ATGCGTACCCTCAAGCTATCCAACCCCTCTTACGGCGACCTGAACCACCTGGTCTCTGC TGTTATGTCCGGTGTCACTACCTGCCTGCGTTTCCCGGGTCAACTGAACCTCTGACCTGC GCAAGCTGGCTGTCAACATGGTTCCTTTCCCCCGTCTTCACTTCTT
32.	NDM_F063	TCCAAGATTCGTGAGGAGTTCCCCGACCGCATGATGGCCACCTTCTCCGTCGTTCCCTC CCCCAAGGTCTACGACACTGTTGTGCGAGCCCTACAACGCCACTCTCTCCGTCACCAGC TGGTCAAGAACTCCGACGAGACCTACTGCATTGACAACGAGGCTCTCTACGACATTTGC ATGCGTACCCTCAAGCTATCCAACCCCTCTTACGGCGACCTGAACCACCTGGTCTCTGC TGTTATGTCCGGTGTCACTACCTGCCTGCGTTTCCCGGGTCAACTGAACCTCTGACCTGC GCAAGCTGGCTGTCAACATGGTTCCTTTCCCCCGTCTTCACTTCTT
33.	NDM_F106	TCCAAGATTCGTGAGGAGTTCCCCGACCGCATGATGGCCACCTTCTCCGTCGTTCCCTC CCCCAAGGTCTCCGACACTGTTGTGCGAGCCCTACAACGCCACTCTCTCCGTCACCAGC TGGTCGAGAACTCCGACGCGACCTTCTGCATTGACAACGAGGCTCTCTACGACATTTGC ATGCGTACCCTCAAGCTATCCAACCCCTCTTACGGCGACCTGAACCACCTGGTCTCTGC TGTTATGTCCGGTGTCACTACCTGCCTGCGTTTCCCGGGTCAACTGAACCTCTGACCTGC GCAAGCTGGCTGTCAACATGGTTCCTTTCCCCCGTCTTCACTTCTT
34.	NDM_F110	TCCAAGATTCGTGAGGAGTTCCCCGACCGCATGATGGCCACCTTCTCCGTCGTTCCCTC CCCCAAGGTCTCCGACACTGTTGTGCGAGCCCTACAACGCCACTCTCTCCGTCACCAGC TGGTCGAGAACTCCGACGCGACCTTCTGCATTGACAACGAGGCTCTCTACGACATTTGC ATGCGTACCCTCAAGCTATCCAACCCCTCTTACGGCGACCTGAACCACCTGGTCTCTGC TGTTATGTCCGGTGTCACTACCTGCCTGCGTTTCCCGGGTCAACTGAACCTCTGACCTGC GCAAGCTGGCTGTCAACATGGTTCCTTTCCCCCGTCTTCACTTCTT
35.	NDM_F116	TCCAAGATTCGTGAGGAGTTCCCCGACCGCATGATGGCCACCTTCTCCGTCGTTCCCTC CCCCAAGGTCTCCGACACTGTTGTGCGAGCCCTACAACGCCACTCTCTCCGTCACCAGC TGGTCAAGAACTCCGACGCGACCTTCTGCATTGACAACGAGGCTCTCTACGACATTTGC ATGCGTACCCTCAAGCTATCCAACCCCTCTTACGGCGACCTGAACCACCTGGTCTCTGC TGTTATGTCCGGTGTCACTACCTGCCTGCGTTTCCCGGGTCAACTGAACCTCTGACCTGC GCAAGCTGGCTGTCAACATGGTTCCTTTCCCCCGTCTTCACTTCTT
36.	NDM_F118	TCCAAGATTCGTGAGGAGTTCCCCGACCGCATGATGGCCACCTTCTCCGTCGTTCCCTC CCCCAAGGTCTACGACACTGTTGTGCGAGCCCTACAACGCCACTCTCTCCGTCACCAGC TGGTCGAGAACTCCGACGAGACCTTCTGCATTGACAACGAGGCTCTCTACGACATTTGC ATGCGTACCCTCAAGCTATCCAACCCCTCTTACGGCGACCTGAACCACCTGGTCTCTGC TGTTATGTCCGGTGTCACTACCTGCCTGCGTTTCCCGGGTCAACTGAACCTCTGACCTGC GCAAGCTGGCTGTCAACATGGTTCCTTTCCCCCGTCTTCACTTCTT

Appendix B Continued.

No.	Isolate code	Nucleotide Sequence
37.	NDM_F130	TCCAAGATTCGTGAGGAGTTCCCCGACCGCATGATGGCCACCTTCTCCGTCGTTCCCTC CCCCAAGGTCTCCGACACTGTTGTCGAGCCCTACAACGCCACTCTCTCCGTCACCAGC TGGTCGAGAACTCCGACGCGACCTTCTGCATTGACAACGAGGCTCTCTACGACATTTGC ATGCGTACCCTCAAGCTATCCAACCCCTCTTACGGCGACCTGAACCACCTGGTCTCTGC TGTTATGTCCGGTGTCACTACCTGCCTGCGTTTCCCGGGTCAACTGAACCTCTGACCTGC GCAAGCTGGCTGTCAACATGGTTCCTTTCCCCCGTCTTCACTTCTT
38.	NDM_L057	TCCAAGATCCGTGAGGAGTTCCCCGACCGCATGATGGCCACCTTCTCCGTCGTTCCCTC CCCCAAGGTCTCCGACACCGTGTGTCGAGCCCTACAACGCCACTCTCTCCGTCACCAGC TGGTCGAGAACTCCGACGAGACCTTCTGCATTGACAACGAGGCTCTCTACGACATTTGC ATGCGTACCCTCAAGCTGTCCAACCCCTCTTACGGCGACCTGAACCACCTGGTCTCTGC TGTTATGTCCGGTGTCACTACCTGCCTGCGTTTCCCGGGTCACTGAACCTCTGACCTGC GCAAGCTGGCTGTCAACATGGTTCCTTTCCCCCGTCTTCACTTCTT
39.	NDM_L067	TCCAAGATCCGTGAGGAGTTCCCCGACCGCATGATGGCCACCTTCTCCGTCGTTCCCTC CCCCAAGGTCTCCGACACCGTGTGTCGAGCCCTACAACGCCACTCTCTCCGTCACCAGC TGGTCGAGAACTCCGACGAGACCTTCTGCATTGACAACGAGGCTCTCTACGACATTTGC ATGCGTACCCTCAAGCTGTCCAACCCCTCTTACGGCGACCTGAACCACCTGGTCTCTGC TGTTATGTCCGGTGTCACTACCTGCCTGCGTTTCCCGGGTCACTGAACCTCTGACCTGC GCAAGCTGGCTGTCAACATGGTTCCTTTCCCCCGTCTTCACTTCTT
40.	NDM_L068	TCCAAGATCCGTGAGGAGTTCCCCGACCGCATGATGGCCACCTTCTCCGTCGTTCCCTC CCCCAAGGTCTCCGACACCGTGTGTCGAGCCCTACAACGCCACTCTCTCCGTCACCAGC TGGTCGAGAACTCCGACGAGACCTTCTGCATTGACAACGAGGCTCTCTACGACATTTGC ATGCGTACCCTCAAGCTGTCCAACCCCTCTTACGGCGACCTGAACCACCTGGTCTCTGC TGTTATGTCCGGTGTCACTACCTGCCTGCGTTTCCCGGGTCACTGAACCTCTGACCTGC GCAAGCTGGCTGTCAACATGGTTCCTTTCCCCCGTCTTCACTTCTT
41.	NDM_L071	TCCAAGATCCGTGAGGAGTTCCCCGACCGCATGATGGCCACCTTCTCCGTCGTTCCCTC CCCCAAGGTCTCCGACACCGTGTGTCGAGCCCTACAACGCCACTCTCTCCGTCACCAGC TGGTCGAGAATTCGACGAGACCTTCTGCATTGACAACGAGGCTCTCTACGACATTTGC ATGCGTACCCTCAAGCTGTCCAACCCCTCTTACGGCGACCTGAACCACCTGGTCTCTGC TGTTATGTCCGGTGTCACTACCTGCCTGCGTTTCCCGGGTCACTGAACCTCTGACCTGC GCAAGCTGGCTGTCAACATGGTTCCTTTCCCCCGTCTTCACTTCTT
42.	NDM_L078	TCCAAGATTCATGAGGAGTTCCCCGACCGCATGATGGCCACCTTCTCCGTCGTTCCCTC CCCCAAGGTCTCCGACACCGTGTGTCGAGCCCTACAACGCCACTCTCTCCGTCACCAGC TGGTCGAGAATTCGACGCGACCTTCTGCATTGACAACGAGGCTCTCTACGACATTTGC ATGCGTACCCTCAAGCTGTCCAACCCCTCTTACGGCGACCTGAACCACCTGGTCTCTGC TGTTATGTCCGGTGTCACTACCTGCCTGCGTTTCCCGGGTCACTGAACCTCTGACCTGC GCAAGCTGGCTGTCAACATGGTTCCTTTCCCCCGTCTTCACTTCTT
43.	NDM_L096	TCCAAGATCCGTGAGGAGTTCCCCGACCGCATGATGGCCACCTTCTCCGTCGTTCCCTC CCCCAAGGTCTCCGACACCGTGTGTCGAGCCCTACAACGCCACTCTCTCCGTCACCAGC TGGTCGAGAACTCCGACGAGACCTTCTGCATTGACAACGAGGCTCTCTACGACATTTGC ATGCGTACCCTCAAGCTGTCCAACCCCTCTTACGGCGACCTGAACCACCTGGTCTCTGC TGTTATGTCCGGTGTCACTACCTGCCTGCGTTTCCCGGGTCACTGAACCTCTGACCTGC GCAAGCTGGCTGTCAACATGGTTCCTTTCCCCCGTCTTCACTTCTT
44.	NLR_L047	TCCAAGATTCGTGAGGAGTTCCCCGACCGCATGATGGCCACCTTCTCCGTCGTTCCCTC CCCCAAGGTCTCCGACACCGTGTGTCGAGCCCTACAACGCCACTCTCTCCGTCACCAGC TGGTCGAGAACTCCGACGCGACCTTCTGCATTGACAACGAGGCTCTCTACGACATTTGC ATGCGTACCCTCAAGCTGTCCAACCCCTCTTACGGCGACCTGAACCACCTGGTCTCTGC TGTTATGTCCGGTGTCACTACCTGCCTGCGTTTCCCGGGTCACTGAACCTCTGACCTGC GCAAGCTGGCTGTCAACATGGTTCCTTTCCCCCGTCTTCACTTCTT
45.	NLR_L048	TCCAAGATTCATGAGGAGTTCCCCGACCGCATGATGGCCACCTTCTCCGTCGTTCCCTC CCCCAAGGTCTCCGACACCGTGTGTCGAGCCCTACAACGCCACTCTCTCCGTCACCAGC TGGTCGAGAACTCCGACGAGACCTTCTGCATTGACAACGAGGCTCTCTACGACATTTGC ATGCGTACCCTCAAGCTGTCCAACCCCTCTTACGGCGACCTGAACCACCTGGTCTCTGC TGTTATGTCCGGTGTCACTACCTGCCTGCGTTTCCCGGGTCACTGAACCTCTGACCTGC GCAAGCTGGCTGTCAACATGGTTCCTTTCCCCCGTCTTCACTTCTT

Appendix B Continued.

No.	Isolate code	Nucleotide Sequence
46.	OR_F126	TCCAAGATTCATGAGGAGTTCCCGACCGCATGATGGCCACCTTCTCCGTCGTTCCCTC CCCCAAGGTCTACGACACTGTTGTGCGAGCCCTACAACGCCACTCTCTCCGTCCACCAGC TGGTCAAGAACTCCGACGCGACCTTCTGCATTGACAACGAGGCTCTCTACGACATTTGC ATGCGTACCCTCAAGCTATCCAACCCCTCTTACGGCGACCTGAACCACCTGGTCTCTGC TGTTATGTCCGGTGTCACTACCTGCCTGCGTTTCCCGGGTCAACTGAACCTCTGACCTGC GCAAGCTGGCTGTCAACATGGTTCCTTTCCCCCGTCTTCACTTCTT
47.	OR_L040	TCCAAGATCCGTGAGGAGTTCCCGACCGCATGATGGCCACCTTCTCCGTCGTTCCCTC CCCCAAGGTCTCCGACACTGTTGTGCGAGCCCTACAACGCCACTCTCTCCGTCCACCAGC TGGTCGAGAACTCCGACGAGACCTTCTGCATTGACAACGAGGCTCTCTACGACATTTGC ATGCGTACCCTCAAGCTGTCCAACCCCTCTTACGGCGACCTGAACCACCTGGTCTCTGC TGTTATGTCCGGTGTCACTACCTGCCTGCGTTTCCCGGGTCACTGAACCTCTGACCTGC GCAAGCTGGCTGTCAACATGGTTCCTTTCCCCCGTCTTCACTTCTT
48.	PBL_F033	TCCAAGATTCGTGAGGAGTTCCCGACCGCATGATGGCCACCTTCTCCGTCGTTCCCTC CCCCAAGGTCTCCGACACTGTTGTGCGAGCCCTACAACGCCACTCTCTCCGTCCACCAGC TGGTCGAGAACTCCGACGCGACCTTCTGCATTGACAACGAGGCTCTCTACGACATTTGC ATGCGTACCCTCAAGCTATCCAACCCCTCTTACGGCGACCTGAACCACCTGGTCTCTGC TGTTATGTCCGGTGTCACTACCTGCCTGCGTTTCCCGGGTCAACTGAACCTCTGACCTGC GCAAGCTGGCTGTCAACATGGTTCCTTTCCCCCGTCTTCACTTCTT
49.	PBL_F076	TCCAAGATTCGTGAGGAGTTCCCGACCGCATGATGGCCACCTTCTCCGTCGTTCCCTC CCCCAAGGTCTCCGACACTGTTGTGCGAGCCCTACAACGCCACTCTCTCCGTCCACCAGC TGGTCGAGAACTCCGACGCGACCTTCTGCATTGACAACGAGGCTCTCTACGACATTTGC ATGCGTACCCTCAAGCTATCCAACCCCTCTTACGGCGACCTGAACCACCTGGTCTCTGC TGTTATGTCCGGTGTCACTACCTGCCTGCGTTTCCCGGGTCAACTGAACCTCTGACCTGC GCAAGCTGGCTGTCAACATGGTTCCTTTCCCCCGTCTTCACTTCTT
50.	PBL_F102	TCCAAGATTCATGAGGAGTTCCCGACCGCATGATGGCCACCTTCTCCGTCGTTCCCTC CCCCAAGGTCTACGACACTGTTGTGCGAGCCCTACAACGCCACTCTCTCCGTCCACCAGC TGGTCAAGAACTCCGACGAGACCTTCTGCATTGACAACGAGGCTCTCTACGACATTTGC ATGCGTACCCTCAAGCTATCCAACCCCTCTTACGGCGACCTGAACCACCTGGTCTCTGC TGTTATGTCCGGTGTCACTACCTGCCTGCGTTTCCCGGGTCAACTGAACCTCTGACCTGC GCAAGCTGGCTGTCAACATGGTTCCTTTCCCCCGTCTTCACTTCTT
51.	PBL_F131	TCCAAGATTCGTGAGGAGTTCCCGACCGCATGATGGCCACCTTCTCCGTCGTTCCCTC CCCCAAGGTCTCCGACACTGTTGTGCGAGCCCTACAACGCCACTCTCTCCGTCCACCAGC TGGTCGAGAACTCCGACGCGACCTTCTGCATTGACAACGAGGCTCTCTACGACATTTGC ATGCGTACCCTCAAGCTATCCAACCCCTCTTACGGCGACCTGAACCACCTGGTCTCTGC TGTTATGTCCGGTGTCACTACCTGCCTGCGTTTCCCGGGTCAACTGAACCTCTGACCTGC GCAAGCTGGCTGTCAACATGGTTCCTTTCCCCCGTCTTCACTTCTT
52.	PS_F114	TCCAAGATTCGTGAGGAGTTCCCGACCGCATGATGGCCACCTTCTCCGTCGTTCCCTC CCCCAAGGTCTCCGACACTGTTGTGCGAGCCCTACAACGCCACTCTCTCCGTCCACCAGC TGGTCGAGAACTCCGACGCGACCTTCTGCATTGACAACGAGGCTCTCTACGACATTTGC ATGCGTACCCTCAAGCTATCCAACCCCTCTTACGGCGACCTGAACCACCTGGTCTCTGC TGTTATGTCCGGTGTCACTACCTGCCTGCGTTTCCCGGGTCAACTGAACCTCTGACCTGC GCAAGCTGGCTGTCAACATGGTTCCTTTCCCCCGTCTTCACTTCTT
53.	PS_L032	TCCAAGATCCGTGAGGAGTTCCCGACCGCATGATGGCCACCTTCTCCGTCGTTCCCTC CCCCAAGGTCTCCGACACTGTTGTGCGAGCCCTACAACGCCACTCTCTCCGTCCACCAGC TGGTCGAGAACTCCGACGAGACCTTCTGCATTGACAACGAGGCTCTCTACGACATTTGC ATGCGTACCCTCAAGCTGTCCAACCCCTCTTACGGCGACCTGAACCACCTGGTCTCTGC TGTTATGTCCGGTGTCACTACCTGCCTGCGTTTCCCGGGTCACTGAACCTCTGACCTGC GCAAGCTGGCTGTCAACATGGTTCCTTTCCCCCGTCTTCACTTCTT
54.	PS_L082	TCCAAGATCCGTGAGGAGTTCCCGACCGCATGATGGCCACCTTCTCCGTCGTTCCCTC CCCCAAGGTCTCCGACACTGTTGTGCGAGCCCTACAACGCCACTCTCTCCGTCCACCAGC TGGTCGAGAACTCCGACGCGACCTTCTGCATTGACAACGAGGCTCTCTACGACATTTGC ATGCGTACCCTCAAGCTCTCCAACCCCTCTTACGGCGACCTGAACCACCTGGTCTCTGC TGTTATGTCCGGTGTCACTACCTGCCTGCGTTTCCCGGGTCACTGAACCTCTGACCTGC GCAAGCTGGCTGTCAACATGGTTCCTTTCCCCCGTCTTCACTTCTT

Appendix B Continued.

No.	Isolate code	Nucleotide Sequence
55.	R_L087	TCCAAGATTCGTGAGGAGTTCCCCGACCGCATGATGGCCACCTTCTCCGTCGTTCCCTC CCCCAAGGTCTACGACACCGTTGTGCGAGCCCTACAACGCCACTCTCTCCGTCCACCAGC TGGTCGAGAACTCCGACGAGACCTTCTGCATTGACAACGAGGCTCTCTACGACATTTGC ATGCGTACCCTCAAGCTGTCCAACCCCTCTTACGGCGACCTGAACCACCTGGTCTCTGC TGTTATGTCCGGTGTCACTACCTGCCTGCGTTTCCCGGGTCAGCTGAACCTCTGACCTGC GCAAGCTGGCTGTCAACATGGTTCCTTTCCCCCGTCTCCACTTCTT
56.	SLY_L017	TCCAAGATTCGTGAGGAGTTCCCCGACCGCATGATGGCCACCTTCTCCGTCGTTCCCTC CCCCAAGGTCTACGACACCGTTGTGCGAGCCCTACAACGCCACTCTCTCCGTCCACCAGC TGGTCGAGAACTCCGACGAGACCTTCTGCATTGACAACGAGGCTCTCTACGACATTTGC ATGCGTACCCTCAAGCTATCCAACCCCTCTTACGGCGACCTGAACCACCTGGTCTCTGC TGTTATGTCCGGTGTCACTACCTGCCTGCGTTTCCCGGGTCAACTGAACCTCTGACCTGC GCAAGCTGGCTGTCAACATGGTTCCTTTCCCCCGTCTTCACTTCTT
57.	TLN_L060	TCCAAGATTCGTGAGGAGTTCCCCGACCGCATGATGGCCACCTTCTCCGTCGTTCCCTC CCCCAAGGTCTCCGACACCGTTGTGCGAGCCCTACAACGCCACTCTCTCCGTCCACCAGC TGGTCGAGAACTCCGACGAGACCTTCTGCATTGACAACGAGGCTCTCTACGACATTTGC ATGCGTACCCTCAAGCTGTCCAACCCCTCTTACGGCGACCTGAACCACCTGGTCTCTGC TGTTATGTCCGGTGTCACTACCTGCCTGCGTTTCCCGGGTCAACTGAACCTCTGACCTGC GCAAGCTGGCTGTCAACATGGTTCCTTTCCCCCGTCTTCACTTCTT
58.	TLN_L065	TCCAAGATTCATGAGGAGTTCCCCGACCGCATGATGGCCACCTTCTCCGTCGTTCCCTC CCCCAAGGTCTACGACACTGTTGTGCGAGCCCTACAACGCCACTCTCTCCGTCCACCAGC TGGTCGAGAACTCCGACGCGACCTTCTGCATTGACAACGAGGCTCTCTACGACATTTGC ATGCGTACCCTCAAGCTATCCAACCCCTCTTACGGCGACCTGAACCACCTGGTCTCTGC TGTTATGTCCGGTGTCACTACCTGCCTGCGTTTCCCGGGTCAACTGAACCTCTGACCTGC GCAAGCTGGCTGTCAACATGGTTCCTTTCCCCCGTCTTCACTTCTT

CURRICULUM VITAE

Personal Information

Name: Miss Pornprapa Kongtragoul

Birth Date: March 18, 1975

Education

Primary School:

1981-1987 Wat Pichaiyaram School, Chumphom, Thailand

Secondary School:

1987-1990 Wat Noinai School, Bangkok, Thailand

High School

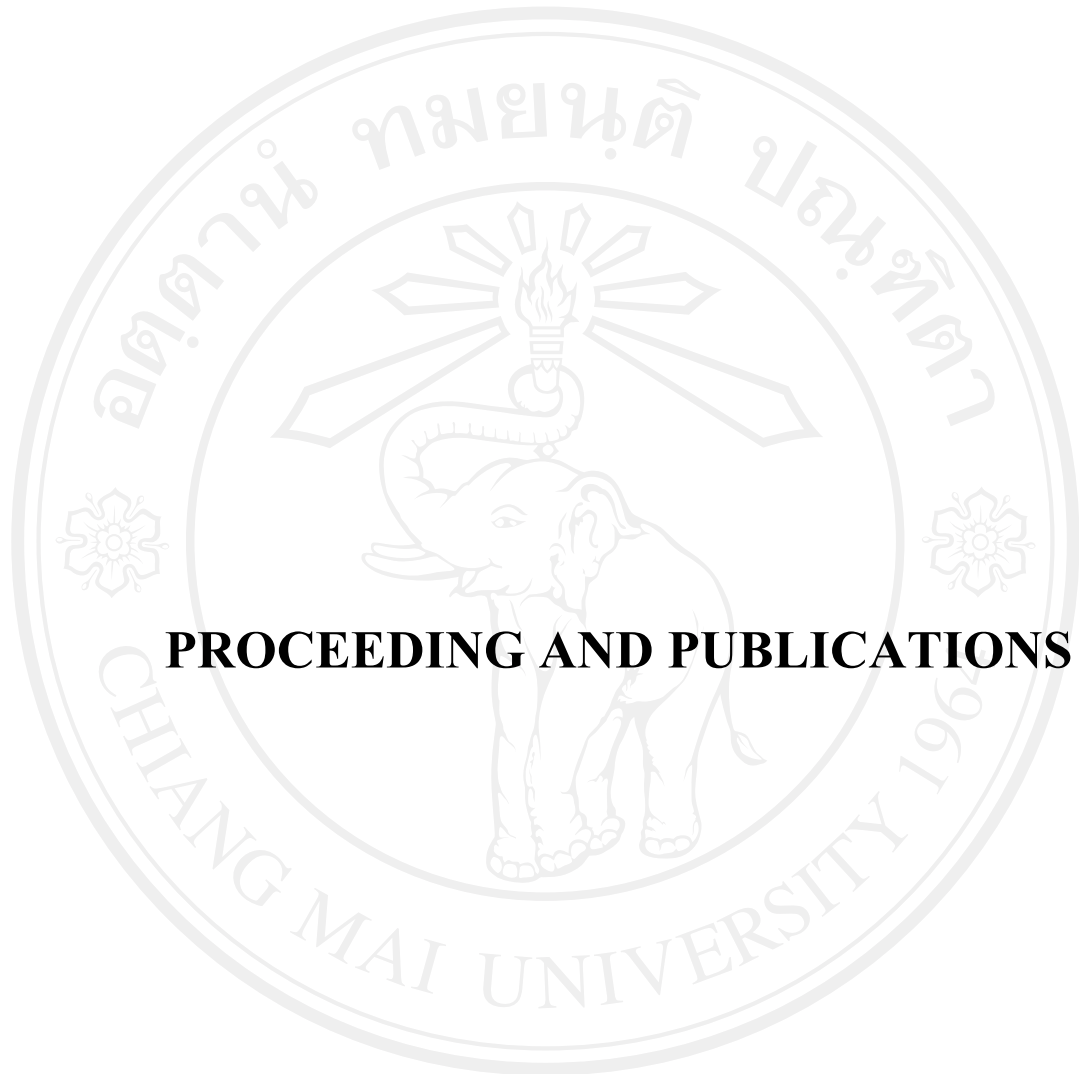
1990-1991 Non-Formal Education, Bangkok, Thailand

Bachelor degree

1994-1998 Horticulture, Faculty of Agriculture, Chiang Mai University,
Chiang Mai, Thailand

Master degree

1998-2003 Plant Pest Management, Faculty of Agriculture Technology,
King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang,
Bangkok, Thailand



PROCEEDING AND PUBLICATIONS

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

Copyright© by Chiang Mai University

All rights reserved

The 3rd Annual Meeting of Thai Mycological Association and
Mycology Conference in Thailand. 11 October 2008, p. 53.

Studies on Fungicide Carbendazim Resistance of *Colletotrichum gloeosporioides* Causing Mango Anthracnose

Pornprapa Kongtragoul, Sutasinee Chaichana and Sarunya Nalumpang*

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

Abstract: This research is aimed at morphology and molecular characterization of carbendazim resistance in *Colletotrichum* spp., the causal agents of mango anthracnose, and development of bio-control method for management of the pathogen with decreasing the use of fungicide. *Colletotrichum* spp. were isolated from infected leaves and fruits of 15 cultivars of mango (Nam Dokmai, Farlun, Kiew Sawoei, Maha Chanok, Salaya, Lin Nguhao, Phimsen, Man Khunsri, Ok-Rong, Kiew Morakod, Kaew, Talub Nark, Chok Anan, Rad and Phetbanlat) collected from market and orchards in Muang district, Chiang Mai. One hundred and thirty-one *Colletotrichum* spp. isolates were successfully isolated, consisting of 46 isolates from leaves (35.12%) and 85 isolates from fruits (64.88%). Studies on morphology characteristic were carried out by examinations of their characteristics of colonies, conidia, and appressoria. The results showed that aerial mycelium of the colonies of most isolates are white and grey. They form cylindrical conidia and clavate appressoria, and also some isolates produced seta and/or sclerotia. These morphology characteristics were identical with that of *Colletotrichum gloeosporioides* referred by Sutton (1992). The carbendazim resistance test was conducted to all isolates on potato dextrose agar (PDA) amended with carbendazim at various concentrations: 0.1, 1, 10, 100, 500 and 1,000 ppm. The result showed that 95 isolates (72.52%) were highly resistance (HR), 2 isolates (1.53%) were moderately resistance (MR), and 34 isolates (25.95%) were sensitive (S). None showed weakly resistance (WR) in this examination. The colony characteristics of some HR isolates growth on PDA amended with carbendazim at 500 ppm gave abnormality colony formation with reduction of growth rate, presence of rugged colony, tight mycelium, and occasionally produced red-brown pigment before the colony growth. Microscopic observations of mycelia of S and HR isolates showed similar characteristics. The effectiveness of carbendazim to germ tube germination on onion tissue was at 500 ppm for S isolates. However, the same concentration of carbendazim has no effect to conidial germination of HR isolates.

Key words: carbendazim resistance, *Colletotrichum gloeosporioides*, mango anthracnose

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

การตรวจสอบความต้านทานสารป้องกันกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิมเบื้องต้นของเชื้อรา
Colletotrichum spp. สาเหตุโรคแอนแทรกโนสในมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้

Preliminary Assay of Carbendazim-resistant Detection of *Colletotrichum* spp. Causing
Anthracnose of Mango cv. Nam Dok Mai

พรประพา คงตระกูล และ สรรยุธา ณ ลำปาง

Pomprapa Kongtragoul and Sarunya Nalumpang

ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Chiang Mai University

Abstract

Isolates of *Colletotrichum* spp. causing anthracnose disease were obtained from infected leaves and fruits of mango cv. Nam Dok Mai collected from market and orchards. Fifty-nine isolates were successfully isolated; consist of 6 isolates (10.2%) from leaves and 53 isolates (89.8%) from fruits. The evaluation of carbendazim resistance was conducted to all isolates on potato dextrose agar (PDA) amended with carbendazim at various concentrations: 0.1, 1, 10, 100, 500 and 1,000 $\mu\text{g/ml}$, respectively. These isolates were classified into four representative phenotypes of reactions as highly resistance (HR; $\geq 500 \mu\text{g/ml}$), moderately resistance (MR; $\leq 100 \mu\text{g/ml}$), weakly resistance (WR; $\leq 10 \mu\text{g/ml}$) and sensitive (S; $\leq 1 \mu\text{g/ml}$). The result showed that 47 isolates (79.7%) were HR, 1 isolate (1.7%) was MR, and 11 isolates (18.6%) were S, respectively. Some samples of all resistant levels were analyzed the β -tubulin (TUB2) gene fragment using polymerase chain reaction (PCR). The PCR products were 474 bp DNA fragments. These fragments will be sequenced and analyzed point mutation in the future.

Keywords: anthracnose, carbendazim, *Colletotrichum* spp., mango

บทคัดย่อ

จากการแยกเชื้อรา *Colletotrichum* spp. สาเหตุโรคแอนแทรกโนสของมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้ ที่เก็บรวบรวมจากตลาดและสวนผลไม้ จำนวน 59 ไอโซเลท โดยแยกได้จากใบจำนวน 6 ไอโซเลท (10.2%) และจากผลจำนวน 53 ไอโซเลท (89.8%) เมื่อนำมาประเมินความสามารถในการต้านทานสารป้องกันกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิม โดยทดสอบบนอาหาร potato dextrose agar (PDA) ที่ผสมสารป้องกันกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิมระดับความเข้มข้นต่างๆ คือ 0.1, 1, 10, 100, 500 และ 1000 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ โดยจัดระดับความต้านทานดังนี้ ต้านทานระดับสูง (HR; $\geq 500 \mu\text{g/ml}$), ต้านทานระดับปานกลาง (MR; $\leq 100 \mu\text{g/ml}$), ต้านทานระดับต่ำ (WR; $\leq 10 \mu\text{g/ml}$) และระดับอ่อนแอ (S; $\leq 1 \mu\text{g/ml}$) ผลการทดลองพบเชื้อรากลุ่ม HR จำนวน 47 ไอโซเลท (79.7%), กลุ่ม MR จำนวน 1 ไอโซเลท (1.7%) และกลุ่ม S จำนวน 11 ไอโซเลท (18.6%) ตามลำดับ จากนั้นนำเชื้อราแต่ละระดับความต้านทานมาตรวจสอบหาการเปลี่ยนแปลงบางส่วนของยีน β -tubulin (TUB2) โดยเพิ่มปริมาณยีนด้วยเทคนิค polymerase chain reaction (PCR) ได้แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 474 คู่เบส ซึ่งจะวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อตรวจสอบ point mutation ต่อไป

คำสำคัญ: โรคแอนแทรกโนส, สารป้องกันกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิม, *Colletotrichum* spp., มะม่วง

บทนำ

มะม่วงเป็นผลไม้ที่สำคัญทางเศรษฐกิจอีกชนิดหนึ่งของประเทศไทย โดยเฉพาะพันธุ์น้ำดอกไม้เพราะมีลักษณะโดดเด่นกล่าวคือ มีกลิ่นหอมและรสหวานอร่อย สามารถทำรายได้ให้แก่เกษตรกร และผู้ขายเป็นอย่างดี มีวางจำหน่ายอย่างแพร่หลายทั้งภายในประเทศ และส่งออกไปยังยุโรป อเมริกา และญี่ปุ่น (สำนักงานเศรษฐกิจเกษตรกรรม 2551) แต่ข้อด้อยของมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้ก็คืออ่อนแอต่อโรคแอนแทรกโนส (anthracnose) ซึ่งเป็นโรคที่เป็นปัญหาสำคัญที่สุดของมะม่วงมีสาเหตุเกิดจากเชื้อรา *Colletotrichum* spp. (นิพนธ์, 2542) สำหรับการป้องกันกำจัดที่ได้ผลดี และรวดเร็วคือการใช้สารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อราโดยเฉพาะสารกลุ่มเบนซิมิดาโซล (benzimidazole) เช่น

คาร์เบนดาซิม (carbendazim), เบนโนมิล (benomyl) หรือ ไธอะเบนดาโซล (thiabendazol) เป็นต้น สารเคมีเหล่านี้เป็นสารชนิดดูดซึมที่สามารถควบคุม เชื้อราชั้นสูงได้เป็นอย่างดี (นิพนธ์, 2531 และ อรุณี, 2533) สำหรับการวิจัยในครั้งนี้ใช้สารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิมเป็นตัวทดสอบ เนื่องจากเกษตรกรนิยมใช้ และการใช้สารเคมีในกลุ่มดังกล่าวติดต่อกันเป็นเวลานาน ทำให้เกิดปัญหาการต้านทานต่อสารเคมีขึ้น (fungicide resistance) ซึ่งเกิดจากการพัฒนา หรือ การปรับตัวของเชื้อราเพื่อความอยู่รอด จึงทำให้เกิดการกลายพันธุ์เป็นสายพันธุ์ที่ต้านทานสารป้องกันกำจัดเชื้อราในกลุ่มนี้ (ธรรมาศักดิ์, 2543) ลักษณะการต้านทานเหล่านี้สามารถถ่ายทอดสู่รุ่นลูกหลานเกิดการเพิ่มจำนวน และแพร่ระบาดภายในแปลงปลูกของเกษตรกร ทำให้เกษตรกรประสบปัญหาไม่สามารถควบคุมการเกิดและแพร่ระบาดของโรคนี้ได้ รวมทั้งส่งผลให้เกษตรกรต้องสิ้นเปลืองเงินทุนและเวลาในการป้องกันกำจัดโรค สำหรับการทดลองในครั้งนี้เป็นการตรวจสอบความต้านทานสารป้องกันกำจัดเชื้อรา คาร์เบนดาซิมของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้ โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อให้เกิดความรู้ความเข้าใจถึงความผันแปรที่เกิดขึ้น และเพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงในระดับชีวโมเลกุลต่อไป อันจะนำไปสู่การหาวิธีที่เหมาะสมในการควบคุม และกำจัดเชื้อราดังกล่าวได้อย่างถูกต้อง

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การแยกและเก็บรวบรวม เชื้อรา *Colletotrichum* spp. สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้

เก็บรวบรวมตัวอย่างจากใบและผลมะม่วง ที่แสดงอาการของโรคแอนแทรคโนสจากตลาด และสวน โดยตัดชิ้นพืชบริเวณแผลกับเนื้อเยื่อปกติให้มีขนาดเล็กประมาณ 0.5 x 0.5 เซนติเมตร ฆ่าเชื้อที่ผิวโดยแช่ใน clorox 10% เป็นเวลา 2 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อประมาณ 5 นาที ซับชิ้นพืชให้แห้งด้วยกระดาษกรองที่ผ่านการฆ่าเชื้อ นำชิ้นพืชวางบนอาหาร potato dextrose agar (PDA) บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 3-4 วัน จะสังเกตเห็นเส้นใยเชื้อราเจริญออกจากชิ้นส่วนพืช จากนั้นจึงแยกบริเวณปลายเส้นใยมาวางบนอาหาร PDA บ่มเชื้อเป็นเวลา 10 วัน ที่อุณหภูมิห้อง เพื่อศึกษาลักษณะโดยแยกเก็บเชื้อส่วนหนึ่งไว้ใน PDA slant เพื่อใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

2. การทดสอบความต้านทานสารป้องกันกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิมของเชื้อรา *Colletotrichum* spp.

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ผสมกับสารป้องกันกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิม ความเข้มข้นระดับต่างๆ ดังนี้คือ 0.1, 1, 10, 100, 500 และ 1,000 µg/ml (อัตราแนะนำ 500 µg/ml) ใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร ตัดบริเวณขอบของโคโลนีของเชื้อราแต่ละไอโซเลท เลี้ยงบนอาหาร PDA ที่ผสมสารป้องกันกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิมที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ เปรียบเทียบการเจริญของโคโลนีเชื้อรากับชุดควบคุมคือ อาหาร PDA ที่ไม่ผสมสารป้องกันกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิม ทำการทดลองความเข้มข้นละ 5 ซ้ำ บันทึกการเจริญของเชื้อรา โดยวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อรา และประเมินระดับความต้านทาน ตามหลักการใน ข้อ A และ B ดังนี้

A. วัดการเจริญได้ของเชื้อราบนอาหาร PDA ที่ผสมสารป้องกันกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิม

ประเมินหาการเจริญเติบโตของเชื้อราบนอาหาร PDA ที่ผสมสารป้องกันกำจัดเชื้อราแต่ละความเข้มข้น โดยนำค่าเฉลี่ยการเจริญของเชื้อราที่ได้จากการทดลองเปรียบเทียบกับชุดควบคุม ซึ่งคำนวณจากสมการ

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

(เทียบกับชุดควบคุม) ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี ชุดควบคุม

จากนั้นนำเปอร์เซ็นต์การเจริญเติบโตของเชื้อราที่ได้มาเปรียบเทียบกับระดับการเจริญเติบโตของเชื้อรา ดังนี้คือ

- = เชื้อราที่เจริญไม่ได้ หรือเจริญได้น้อยกว่า 10 % เมื่อเทียบกับชุดควบคุม

+ = เชื้อราที่เจริญได้ตั้งแต่ 10% ขึ้นไป เมื่อเทียบกับชุดควบคุม

B. จัดระดับความต้านทานต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิมเป็น 4 ระดับ ซึ่งตัดแปลงจาก Koenraad *et al.* (1992) และ Peres *et al.* (2004) (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 ระดับความต้านทานสารป้องกันกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิม 4 ระดับ ตัดแปลงจาก Koenraad *et al.* (1992) และ Peres *et al.* (2004)

Resistant levels	Carbendazim concentration ($\mu\text{g/ml}$)					
	0.1	1	10	100	500*	1,000
Sensitive (S)	+	+	-	-	-	-
Weakly resistance (WR)	+	+	+	-	-	-
Moderately resistance (MR)	+	+	+	+	-	-
Highly resistance (HR)	+	+	+	+	+	-
	+	+	+	+	+	+

* = อัตราแนะนำ

- = เชื้อราที่เจริญไม่ได้ หรือเจริญได้น้อยกว่า 10% เมื่อเทียบกับชุดควบคุม

+ = เชื้อราที่เจริญได้ตั้งแต่ 10% ขึ้นไป เมื่อเทียบกับชุดควบคุม

3. การสกัดและเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอตรงตำแหน่งยีน β -tubulin ของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. ด้วย เทคนิค polymerase chain reaction (PCR)

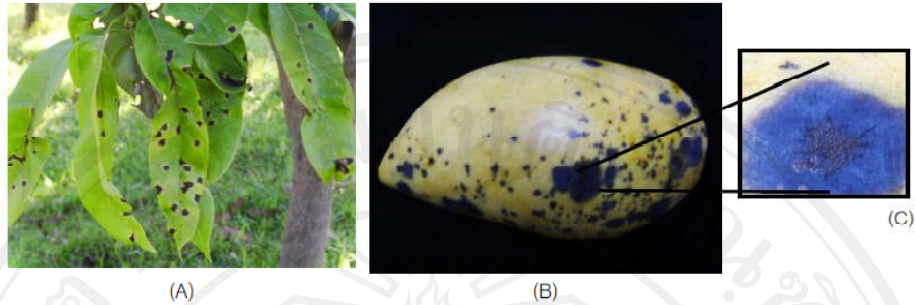
คัดเลือกไอโซเลทแต่ละระดับความต้านทานทำการสกัดดีเอ็นเอจากเส้นใยของเชื้อราด้วยชุด NucleoSpin[®] และนำดีเอ็นเอดังกล่าวมาทำปฏิกิริยา PCR ร่วมกับไพรเมอร์ TUB2L (5'-GTTTCAGATGACCCACTCC-3') และไพรเมอร์ TUB2R (5'-TGAGCTCAGGAACACTGACG-3') ตามวิธีการของ Peres *et al.* (2004) ปฏิกิริยา PCR จะเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบางส่วนตรงตำแหน่งยีน β -tubulin (*TUB2*) นำผลผลิตจากปฏิกิริยา PCR ที่ได้ตรวจสอบโดยวิธีการ gel electrophoresis บน 1% agarose gel ใน 0.5X TBE buffer ย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ (ethidium bromide) ตรวจสอบภายใต้แสงอัลตราไวโอเลท

ผลการทดลอง

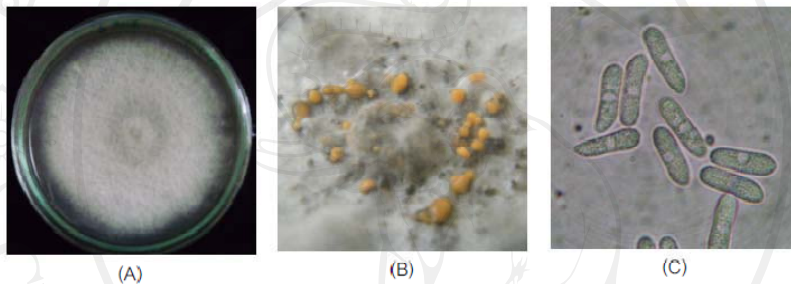
1. การแยกและเก็บรวบรวม เชื้อรา *Colletotrichum* spp. สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้

จากการแยกและเก็บตัวอย่างโรคแอนแทรคโนสจากใบและผลของมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้ พบลักษณะอาการเริ่มแรกบนใบ มีจุดแผลเล็กๆ สีเหลืองอ่อน เมื่อขยายใหญ่จะเห็นเป็นจุดแผลสีน้ำตาลรูปร่างไม่แน่นอน เนื้อเยื่อตรงกลางแผลฉีกขาด ใบที่อ่อนมากๆ แผลจะขยายตัวอย่างรวดเร็ว ทำให้ใบแห้งหรือบิดเบี้ยวเสียรูปทรง (รูปที่ 1A) ส่วนอาการบนผลที่แก่จัดหรือผลสุก เริ่มจากจุดสีน้ำตาลเข้มถึงสีดำรูปร่างกลมขนาดไม่แน่นอน จากนั้นขยายเป็นแผลใหญ่ค่อนข้างกลมสีน้ำตาลเข้มถึงสีดำ (รูปที่ 1B) เนื้อเยื่อบริเวณแผลยุบตัวกว่าระดับเดิมเล็กน้อย ตรงกลางแผลอาจพบเม็ดแข็งเล็กๆ สีดำเรียงเป็นวงซ้อนกันเป็นชั้น หรืออาจมีกลุ่มสปอร์ลักษณะเป็นของเหลวข้นสีส้มอยู่บริเวณกลางบาดแผลบนผล (รูปที่ 1C)

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราที่แยกได้ โดยการเลี้ยงเชื้อบนอาหาร PDA พบว่าเชื้อราทั้งหมดมีลักษณะโคโลนีบนอาหาร PDA ดังนี้ เมื่ออ่อนเส้นใยมีสีขาวต่อมาจะค่อยๆ เปลี่ยนเป็นสีเทาเจริญเต็มจานเลี้ยงเชื้อประมาณ 10 วัน (รูปที่ 2A) บางไอโซเลทสร้างกลุ่มสปอร์ mass สีส้ม และพบเม็ด sclerotia สีดำ (รูปที่ 2B) ผังตัวอยู่ในอาหาร PDA ลักษณะสปอร์รูปทรงกระบอกหัวท้ายมน (cylindrical) เซลล์เดี่ยว ไส้ (ไม่มีสี) ขนาด 4.2-5.1 x 15.4-20.6 (รูปที่ 2C) ซึ่งจากลักษณะดังกล่าวสามารถจัดจำแนกเชื้อราสาเหตุได้เป็น *Colletotrichum gloeosporioides* ตามหลักเกณฑ์ของ Sutton (1980)



รูปที่ 1 อาการโรคแอนแทรกโนสที่เกิดบนมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้; (A) อาการบนใบ, (B) อาการบนผล, (C) กลุ่มสปอร์ mass สีส้มบนผิวผลมะม่วง



รูปที่ 2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. สาเหตุโรคแอนแทรกโนสของมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้; (A) โคลนบนอาหารอาหาร PDA อายุ 10 วัน, (B) กลุ่มสปอร์ mass สีส้ม และ เม็ด sclerotia สีดำ, (C) โคนินเดี่ยว (100X)

2. การทดสอบความต้านทานสารป้องกันกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิม

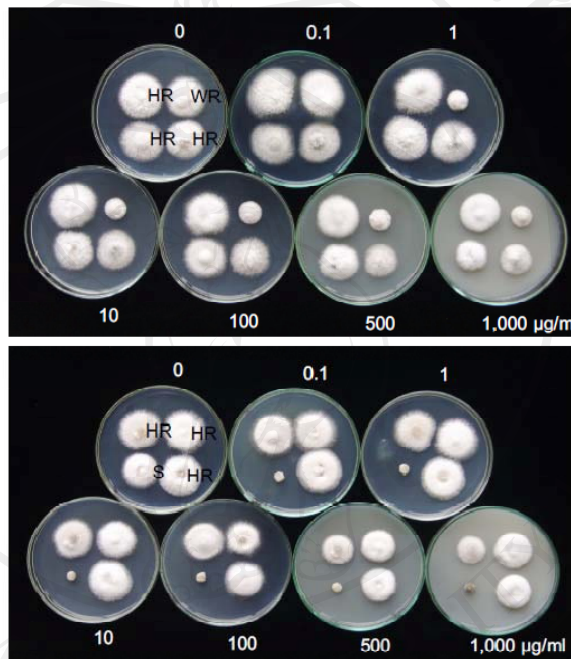
จากการทดสอบความต้านทานของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. ต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิมบนอาหาร PDA ที่มีผสมสารคาร์เบนดาซิม 6 ระดับความเข้มข้น ดังนี้ 0.1, 1.0, 10, 100, 500 และ 1000 ug/ml พบเชื้อราที่ต้านทานต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิมระดับสูง (HR), ต้านทานระดับปานกลาง (MR) และระดับอ่อนแอ (S) จำนวน 47 โยโคเลท (79.7%), 1 โยโคเลท (1.7%) และ 11 โยโคเลท (18.6%) ตามลำดับ ในการทดลองครั้งนี้ไม่พบเชื้อราที่ต้านทานระดับต่ำ (WR) (ตารางที่ 2, รูปที่ 3) เมื่อตรวจสอบเส้นใยเชื้อราสายพันธุ์ S และ HR ที่เลี้ยงบนอาหาร PDA มีลักษณะฟูสีขาวผสมสีเทาอ่อน และเมื่อนำปลายเส้นใยมาตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (40X) พบ ลักษณะเส้นใยยาว เรียวตรง ไม่แตกต่างกัน (รูปที่ 4)

ตารางที่ 2 จำนวนโยโคเลทของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. สาเหตุโรคแอนแทรกโนสของมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้ ที่ระดับความต้านทานสารป้องกันกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิมต่างๆ

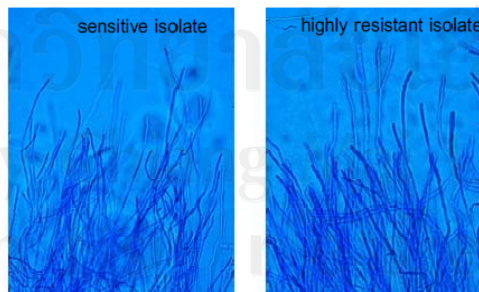
Parts of mango	No. of isolates (%) of Carbendazim-resistant levels				Total
	Sensitive (S)	Weakly resistance (WR)	Moderately resistance (MR)	Highly resistance (HR)	
Leaves	3 (5.1%)	0 (0%)	0 (0%)	3 (5.1%)	6 (10.2%)
Fruits	8 (13.7%)	0 (0%)	1 (1.7%)	44 (74.6%)	53 (89.8%)
Total	11 (18.6%)	0 (0%)	1 (1.7%)	47 (79.7%)	59 (100%)

3. การสกัดและเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอตรงตำแหน่งยีน β -tubulin ของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. ด้วยเทคนิค polymerase chain reaction (PCR)

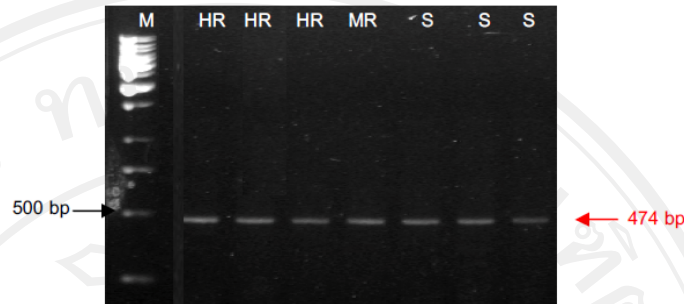
จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบางส่วนตรงตำแหน่ง β -tubulin gene (*TUB2*) ของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. ไอโซเลท HR, MR และ S ด้วยเทคนิค PCR ได้แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 474 คู่เบส (รูปที่ 5) ซึ่งจะนำไปทำการวิเคราะห์หาลำดับ นิวคลีโอไทด์ และเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อหาการเปลี่ยนแปลงเฉพาะจุด (point mutation) ในการทดลองครั้งต่อไป



รูปที่ 3 การทดสอบความต้านทานของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. บนอาหารเลี้ยงเชื้อ potato dextrose agar ที่ผสมสารป้องกันกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิม เบนดาซิม ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 วัน



รูปที่ 4 ลักษณะเส้นใยของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. ไอโซเลท sensitive และ highly resistance ภายใต้อ่างจุลทรรศน์ (40X)



รูปที่ 5 ผลผลิต PCR ขนาดประมาณ 474 คู่เบส ที่เกิดจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบางส่วนตรงตำแหน่งยีน β -tubulin (*TUB2*) ด้วยไพรเมอร์ TUB2L/TUB2R ของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. ภายหลังจากการตรวจสอบบน 1% agarose gel; M = ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb DNA ladder, HR = ไอโซเลทต้านทานระดับสูง, MR = ไอโซเลทต้านทานระดับปานกลาง, S = ไอโซเลทระดับอ่อนแอ

วิจารณ์ผลการทดลอง

จากการประเมินความต้านทานสารป้องกันกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิมของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. สาเหตุโรคแอนแทรกโนสของมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้จำนวน 59 ไอโซเลท พบเชื้อราที่ต้านทานระดับสูง (HR) สูงถึง 79.7% ซึ่งเกิดจากการใช้สารเคมีป้องกันกำจัดโรคนี้ โดยเฉพาะสารเคมีกลุ่มดูดซึมติดต่อกันเป็นเวลานาน ส่งผลให้เชื้อราเกิดการปรับตัวเองเพื่อความอยู่รอดเกิดการต้านทานต่อสารเคมีดังกล่าวขึ้น (Farungsang *et al.*, 1992) ซึ่งมีผลสอดคล้องกับรายงานของ Sariah (1989) ที่ทดสอบเชื้อรา *C. capsici* สาเหตุโรคแอนแทรกโนสของพริกจำนวน 340 ไอโซเลท พบเชื้อราที่ต้านทานสารป้องกันกำจัด เชื้อราคาร์เบนดาซิมที่ระดับ 100 $\mu\text{g/ml}$ จำนวน 73 ไอโซเลท และจากการสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างแต่ละกลุ่มเพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบางส่วนตรงตำแหน่งยีน β -tubulin (*TUB2*) โดยวิธี polymerase chain reaction (PCR) ได้แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 474 คู่เบส เนื่องจากเป็นบริเวณที่มีตำแหน่งที่คาดว่าเกิด point mutation ตามรายงานของ Koenraad *et al.* (1992), Peres *et al.* (2004), Maymon *et al.* (2006), สุธาสิณี และ สรัญญา (2550) ที่ทำการศึกษาความต้านทานสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อราในกลุ่มเบนซิมิดาโซลของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. ตรงตำแหน่ง codon ที่ 198 และ 200 ของยีนนี้ สำหรับการตรวจสอบเพื่อวิเคราะห์หาจุดกลายพันธุ์ (point mutation) ในการทดลองครั้งนี้จะต้องวิเคราะห์หาลำดับ นิวคลีโอไทด์ เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการศึกษาการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวต่อไป

สรุป

จากการแยกและเก็บรวบรวมเชื้อรา *Colletotrichum* spp. สาเหตุโรคแอนแทรกโนสของมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้จำนวน 59 ไอโซเลท เมื่อนำมาประเมินความสามารถในการต้านทานสารป้องกันกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิม พบเชื้อรากลับต้านทานต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิม (R) 81.4% โดยแบ่งเป็นเชื้อกลุ่มต้านทานระดับสูง (HR) 79.7% และกลุ่มต้านทานระดับปานกลาง (MR) 1.7 % เมื่อสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างเพื่อเพิ่มปริมาณตรงตำแหน่งบางส่วนของยีน β -tubulin (*TUB2*) ด้วยเทคนิค PCR ได้แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 474 คู่เบส เพื่อนำไปวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์ต่อไป

เอกสารอ้างอิง

- ธรรมศักดิ์ สมมาตย์. 2543. สารเคมีป้องกันกำจัดโรคพืช. สำนักพิมพ์วิริยชัย, กรุงเทพฯ. 371 หน้า
 นิพนธ์ วิสารทานนท์. 2531. โรคไม้ผล. ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 286 หน้า.
 นิพนธ์ วิสารทานนท์. 2542. โรคไม้ผลเขตร้อนและการป้องกันกำจัด. ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 172 หน้า.

- สุธาสินี ชัยชนะ และ สรัญญา ณ ลำปาง. 2550. การตรวจสอบความทนทานต่อสารกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิมของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. สาเหตุโรคแอนแทรกโนสในมะม่วง. *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.
- Farungsang, U., N., Farungsang and S. Sangchote. 1992. Benomyl resistance of *Colletotrichum* spp. *Acta Horticulture* 321:891-897.
- 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.
- 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(5): 542-548.
- 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.
- Sutton, C.B. 1980. The coelomycetes: fungi imperfect with pycnidia acervuli and stromata. CMI. Kew Surrey, England, 696 p.

คำนิยาม

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุน จากศูนย์ด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร. สำนักพัฒนามันบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี, สำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษา ที่สนับสนุนทุนวิจัยในครั้งนี้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ผลของผงจากพืชตระกูลขิงและสารป้องกันกำจัดเชื้อราบางชนิด ต่อเชื้อรา *Colletotrichum* spp. สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของมะม่วง ที่ต้านทานสารป้องกันกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิม

Effect of Ginger Powder and Some Fungicide on Carbendazim-Resistant *Colletotrichum* spp. Causing Mango Anthracnose

พรประพา คงตระกูล^{1,2}, สุภาสินี 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. สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของมะม่วงจำนวน 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 เป็นไม้ผลที่สำคัญทางเศรษฐกิจอีกชนิดหนึ่งของประเทศไทย สามารถสร้างรายได้ให้แก่เกษตรกรเป็นอย่างดี เนื่องจากการซื้อขายภายในประเทศและส่งออกต่างประเทศ ทั้งในรูปแบบผลสดและแปรรูป (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร กรมวิชาการเกษตร, 2551) ประกอบกับอุตสาหกรรมค้าทางโภชนาการสูง โดยเฉพาะวิตามินเอ และ บี (Singh et al., 2008) แต่ปัญหาสำคัญในการผลิตมะม่วงเพื่อการค้าคือ การเข้าทำลายของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* สาเหตุของโรคแอนแทรคโนส (anthracnose) (นิพนธ์, 2542) โดยเข้าทำลายมะม่วงได้ทั้งส่วนใบและผล ทำความเสียหายแก่มะม่วงทั้งก่อนและหลังการเก็บเกี่ยว (ยูริณี, 2533) ซึ่งอาการบนใบเริ่มจากมีจุดแผลเล็ก ๆ สีเหลืองอ่อนและขยายใหญ่เห็นเป็นจุดแผลสีน้ำตาลรูปร่างไม่แน่นอน หากเกิดบนใบที่อ่อนมาก ผลจะขยายตัวอย่างรวดเร็ว ทำให้ใบแห้งหรือบิดเบี้ยว ส่วนอาการบนผลเริ่มจากจุดสีน้ำตาลเข้มถึงสีดำรูปร่างกลมขนาดเล็กไม่แน่นอน แล้วขยายเป็นแผลใหญ่ค่อนข้างกลมสีน้ำตาลเข้มถึงสีดำ เนื้อเยื่อบริเวณแผลยุบเล็กน้อย (นิพนธ์, 2531; 2542) สำหรับการป้องกันกำจัดโรคนี้นี้ได้ผลดีและรวดเร็วคือ การใช้สารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อรา โดยเฉพาะสารกลุ่มเบนซิมิดาโซล (benzimidazole) เช่น คาร์เบนดาซิม (carbendazim), เบนโนมิล (benomyl) หรือ ไธเบนดาโซล (thiabendazol) เป็นต้น สารเคมีกลุ่มนี้เป็นสารประเภทฟังกิไซด์ (systemic fungicide) สามารถควบคุมเชื้อราชนิดนี้ได้เป็นอย่างดี มีประสิทธิภาพ (นิพนธ์, 2531; อรุณี, 2533) เกษตรกรส่วนใหญ่จึงนิยมใช้อย่างกว้างขวาง เพื่อป้องกันกำจัดโรครดดังกล่าว ด้วยเหตุที่มีการใช้สารเคมีประเภทนี้ติดต่อกันเป็นเวลานาน หรือใช้เกินอัตราแนะนำ จะส่งผลให้น้ำเชื้อราดังกล่าวให้เกิดการพัฒนา หรือปรับตัวเองเพื่อความอยู่รอด จนเกิดการกลายพันธุ์เป็นสายพันธุ์ที่ต้านทานสารป้องกันกำจัดเชื้อรา (fungicide resistance) ขึ้นได้ (ธรรมศักดิ์, 2543) ซึ่งลักษณะความต้านทานของเชื้อรานี้สามารถถ่ายทอดสู่รุ่นลูกหลาน จนกระทั่งเพิ่มปริมาณมากขึ้นในธรรมชาติ ทำให้ประสบปัญหาการแพร่ระบาดของโรคภายในแปลงปลูก จึงทำให้การใช้สารเคมีในการป้องกันกำจัดโรครดดังกล่าวไม่ได้ผล ดังนั้น การควบคุมโรคพืชโดยการใช้น้ำยาชนิดสัมผัส (contact fungicide) หมุนเวียนในแปลงปลูกสลับกับสารป้องกันกำจัดเชื้อราชนิดดูดซึม (systemic fungicide) ตลอดจนการใช้สารจากธรรมชาติ เช่น จากพืช จึงเป็นทางเลือกหนึ่งที่จะช่วยลดปัญหาการต้านทานต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อรา โดยในการศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อหาวิธีที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อรา *Colletotrichum* spp. สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของมะม่วงสายพันธุ์ที่ต้านทานสารป้องกันกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิม อันจะนำไปสู่การหาวิธีที่เหมาะสมในการควบคุมโรคแอนแทรคโนสของมะม่วงได้อย่างถูกต้องและมีประสิทธิภาพ โดยศึกษาประสิทธิภาพของสารป้องกันกำจัดเชื้อราชนิดต่างๆ ตามที่กรมวิชาการเกษตรแนะนำ เพื่อนำสารเคมีที่มีประสิทธิภาพชนิด contact fungicide มาใช้ทดแทนสารในกลุ่มเบนซิมิดาโซล และการนำสารจากพืชตระกูลขิงมาใช้ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา เนื่องจากมีรายงานว่าพืชตระกูลขิงมีฤทธิ์ ภายในการควบคุมเชื้อราโรคพืชได้หลายชนิด ซึ่งสามารถควบคุมการเจริญเติบโตของเชื้อรา *C. capsici*, *C. gloeosporioides*, *Dothiorella* sp., *Pestalotiopsis* sp., *Lasiodiopodia theobromae*, *Pestalotiopsis* sp. และ *P. aphanidermatum* ได้ (สุภัทรา, 2543) พืชตระกูลขิงเป็นพืชที่หาได้ง่ายทั่วไป สามารถสลายตัวได้ง่ายและมีความเป็นพืชต่ำต่อสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม อีกทั้งการใช้สารสกัดจากพืชในการควบคุมโรคนั้น เป็นการช่วยลดปัญหาสารเคมีตกค้างในพืชและในดิน ส่งผลไม่ให้เกิดมลพิษต่อสภาพแวดล้อม และปลอดภัยต่อผู้บริโภค

อุปกรณ์และวิธีการ

การทดลองที่ 1 การแยกและเก็บรวบรวมเชื้อรา *Colletotrichum* spp. สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของมะม่วง

เก็บรวบรวมตัวอย่างจากใบและผลมะม่วงที่แสดงอาการโรคแอนแทรคโนสจากตลาดและสวน ตรวจสอบเชื้อจากผลภายใต้กล้อง stereo จากนั้นแยกเชื้อ

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

การทดลองที่ 2 การตรวจสอบความต้านทานสารป้องกันกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิมของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของมะม่วง

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) ทดลองความเข้มข้นและ 5 ข้ำ โดยประเมินระดับความต้านทานตามหลักเกณฑ์ใน ข้อ A และ B ซึ่งดัดแปลงจาก Koenraad et al. (1992) และ Peres et al. (2004) ดังนี้

การทดลองที่ 3 ทดสอบประสิทธิภาพของสารป้องกันกำจัดเชื้อรา ในการควบคุมการเจริญของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของมะม่วง

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

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

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% แล้วเทใส่จานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร ประมาณ 15 มิลลิลิตร 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 ข้ำ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องจนเส้นใยเชื้อราในชุดควบคุมเจริญเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อ บันทึกขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีเพื่อคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง



A. วัดการเจริญได้ของเชื้อราบนอาหาร PDA ที่ผสมสารป้องกันกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิม

- เปอร์เซ็นต์การเจริญของเชื้อรา = $\frac{\text{ค่าเฉลี่ยเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีชุดทดสอบ}}{\text{ค่าเฉลี่ยเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีชุดควบคุม}} \times 100$
 (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. สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของมะม่วง

เก็บตัวอย่างใบและผลของมะม่วง ที่แสดงอาการโรคแอนแทรคโนส พบอาการบนใบเป็นจุดแผลสีน้ำตาลรูปร่างไม่แน่นอน เนื้อเยื่อตรงกลางแผลวิ้งขาด ใบที่อ่อนมาก ๆ และขยายตัวอย่างรวดเร็ว ทำให้ใบแห้งหรือบิดเบี้ยวเสียรูปทรง (ภาพที่ 1n) ส่วนอาการบนผลที่แก่จัดหรือผลสุก เริ่มจากจุดสีน้ำตาลเข้มถึงสีดำรูปร่างกลมขนาดไม่แน่นอน จากนั้นขยายเป็นแผลใหญ่ต่อเนืองข้างกลีบสีน้ำตาลเข้มถึงสีดำ (ภาพที่ 1ข) เนื้อเยื่อบริเวณแผลยุบตัวกว่าระดับเดิม เล็กน้อย ตรงกลางแผลอาจพบเม็ดแข็งเล็ก ๆ สีดำเรียงเป็นวงซ้อนกันเป็นชั้น หรืออาจมีกลุ่มสปอร์ลักษณะเป็นของเหลวข้นสีส้มอยู่บริเวณกลางแผลบนผลมะม่วง (ภาพที่ 1ค)

จากการแยกเชื้อราโดยวิธี tissue transplanting technique ให้จำนวน 150 โยโซเลท และศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราที่แยกได้ พบว่าเชื้อราทั้งหมดมีลักษณะโคโลนีบนอาหาร PDA ดังนี้ เมื่ออ่อนเส้นใยมีสีขาว สีขาวปนเทา สีเทาอ่อน และสีเทาเข้มเจริญเต็มจานเลี้ยงเชื้อประมาณ 7-10 วัน (ภาพที่ 2ก) บางโยโซเลทสร้างกลุ่มสปอร์สีส้ม และพบเม็ด sclerotium สีดำ (ภาพที่ 2ข) ฝังตัวอยู่ในอาหาร 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. สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของมะม่วง

นำเชื้อราบริสุทธิ์ที่แยกได้ มาตรวจสอบความต้านทานสารป้องกันกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิมบนอาหาร PDA ที่ผสมสารป้องกันกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิมที่ 6 ระดับความเข้มข้นดังนี้ 0.1, 1, 10, 100, 500 และ 1000 mg/l (ภาพที่ 3) พบเชื้อราที่ต้านทานสารป้องกันกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิมในระดับสูง (highly resistant: HR), ระดับปานกลาง (moderately resistant: MR) และเชื้อราที่อ่อนแอต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิม (sensitive: S) จำนวน 113 โยโซเลท (75.3%), 2 โยโซเลท (1.4%) และ 35 โยโซเลท (23.3%) ตามลำดับ (ตารางที่ 3)

การทดลองที่ 3 ทดสอบประสิทธิภาพของสารป้องกันกำจัดเชื้อรา ในการควบคุมการเจริญของเชื้อรา Colletotrichum spp. สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของมะม่วง

จากการทดลองประสิทธิภาพของสารป้องกันกำจัดเชื้อรา 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 ยังยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อราสายพันธุ์ Car^S 100% เช่นกัน ส่วนสารป้องกันกำจัดเชื้อรา copper oxychloride ยังยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อราสายพันธุ์ Car^R และ Car^S ได้เพียง 41.12 และ 40.14% ตามลำดับ (ตารางที่ 4) นอกจากนี้ สาร copper oxychloride ยังส่งผลทำให้เส้นใยมีลักษณะเปลี่ยนแปลงไป โดยเส้นใยสีแบบเจริญติดผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ และโคโลนีเปลี่ยนจากสีขาวเป็นสีเหลืองอ่อนหรือสีน้ำตาลเข้ม (ภาพที่ 4)

การทดลองที่ 4 ทดสอบประสิทธิภาพของผงกระชาย ข่า และขิง ในการควบคุมการเจริญของเชื้อรา Colletotrichum spp. สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของมะม่วง

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



ตารางที่ 2 สารป้องกันกำจัดโรคพืชที่ใช้ในการทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. สาเหตุโรคแอนแทรคโนส

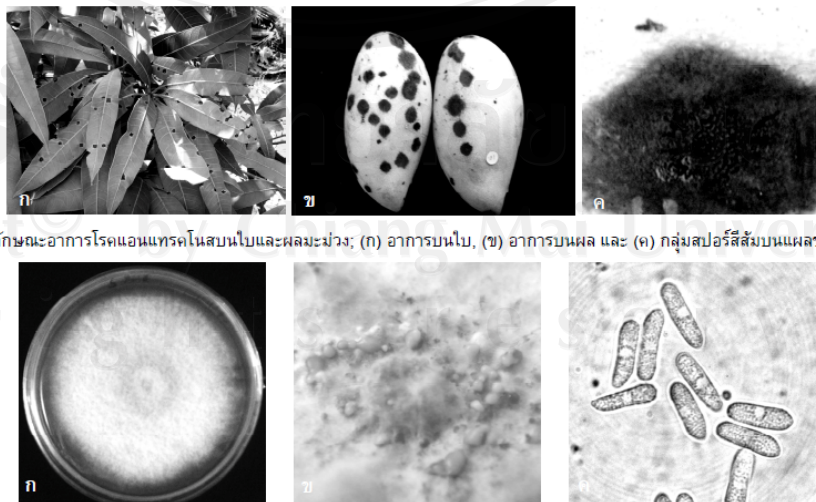
Fungicide common name	Recommended concn. (mg/l)
1. benomyl	500
2. carbendazim	500
3. carboxin	525
4. captan	1,250
5. copper oxychloride	2,150
6. mancozeb	200

ของเชื้อรา พบว่าขิงและข่าที่ความเข้มข้น 5% มีประสิทธิภาพยับยั้งเชื้อราสายพันธุ์ที่ต้านทานต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิม (Carⁱ) ได้เท่ากับ 66.34 และ 64.83% ตามลำดับ ซึ่งสมุนไพรทั้ง 2 ชนิดนี้มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อราได้ไม่แตกต่างกันที่ระดับความเข้มข้น 95% ส่วนกระชายที่ความเข้มข้น 3 และ 5% ยับยั้งเชื้อราสายพันธุ์อ่อนแอต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิม (Carⁱ) ได้เท่ากับ 52.20 และ 61.91% ตามลำดับ (ตารางที่ 5, ภาพที่ 5)

วิจารณ์ผล

จากการประเมินความต้านทานสารป้องกันกำจัดเชื้อรา คาร์เบนดาซิมของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของมะม่วง จำนวน 150 ไอโซเลต พบเชื้อราสายพันธุ์ Carⁱ สูงถึง 76.7% เนื่องจากการผลิตมะม่วงในประเทศไทย เกษตรกรส่วนใหญ่นิยมใช้สารป้องกันกำจัดเชื้อราชนิดนี้อย่างกว้างขวางและต่อเนื่องเป็นเวลานาน จึงทำให้เกิดการกลายพันธุ์ของเชื้อราเพราะต้องปรับตัวให้อยู่รอดได้ในธรรมชาติ ซึ่งสอดคล้องกับที่ Spalding (1982) และ Jeffries *et al.* (1990) รายงานว่าสารป้องกันกำจัดเชื้อราชนิดดูดซึม (systemic fungicide) ทั้ง benomyl และ carbendazim ชักนำให้เชื้อราต้านทานต่อสารเคมีกลุ่มนี้ได้ ส่งผลให้ประสิทธิภาพในการควบคุมโรคนั้นลดลง หรือแทบจะควบคุมไม่ได้ ซึ่งธรรมศักดิ์ (2543) กล่าวว่าหากการกลายพันธุ์ของเชื้อราเพื่อให้อาหารต้านทานต่อสารเคมีจะเกิดขึ้นหลังจากที่มีการใช้สารเคมีนั้นๆ ติดต่อกันเป็นเวลานานและต่อเนื่อง และความต้านทานต่อสารป้องกันกำจัดโรคพืชชนิดดูดซึม (systemic fungicide) จะเกิดขึ้นได้เร็วกว่าสารป้องกันกำจัดโรคพืชชนิดสัมผัสตาย (contact fungicide) โดยความต้านทานต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อราชนิดดูดซึมจะ

เกิดขึ้นภายหลังจากที่มีการใช้ติดต่อกันนาน 2-3 ปีเท่านั้น และการกลายพันธุ์ดังกล่าวสามารถถ่ายทอดทางพันธุกรรมสู่รุ่นลูกหลานได้ เกิดเชื้อสายพันธุ์ต้านทานต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อราสาเหตุโรคพืชเพิ่มปริมาณมากขึ้นในธรรมชาติ ส่งผลกระทบต่อเกษตรกรผู้ปลูกพืช เมื่อใช้สารป้องกันกำจัดโรดดังกล่าวแล้ว 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) แนะนำให้ใช้หมุนเวียนไม่เปลี่ยนปลูกลูกสลับกับสารป้องกันกำจัดเชื้อรา carbendazim เพื่อป้องกันการกลายพันธุ์ของเชื้อรา ส่วนการนำสาร benomyl ซึ่งเป็นสารเคมีกลุ่มเดียวกับสาร carbendazim (กลุ่ม benzimidazole) มาใช้ในการทดลอง เนื่องจากต้องการศึกษาการต้านทานข้าม (cross resistance) ซึ่งพบว่าสารป้องกันกำจัดเชื้อรา benomyl มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคได้เพียงเล็กน้อย และจากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าการใช้สารเคมีในกลุ่มเดียวกันนี้ น่าจะก่อให้เกิดความต้านทานข้าม ซึ่งหมายถึงเชื้อราดังกล่าวสามารถต้านทานต่อสารเคมีในกลุ่มเดียวกัน ได้มาก กว่า 1 ชนิด สอดคล้องกับรายงานการศึกษาความต้านทานข้ามต่อสารเคมีในกลุ่ม 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 และจากการทดสอบประสิทธิภาพของสมุนไพร ข่า และขิง เพื่อควบคุมเชื้อรา *Colletotrichum* spp. พบว่ากระชายที่ความเข้มข้น 5% มีประสิทธิภาพที่ดีที่สุด โดยยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อรา Carⁱ ได้เท่ากับ 61.91% นอกจากนี้ ขิงและข่าที่ความเข้มข้น 5% มีประสิทธิภาพยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อรา Carⁱ ได้เท่ากับ 66.34 และ 64.83% ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ สุภัทรา (2548) ที่ศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดน้ำมันระเหยที่ได้จากสมุนไพรทั้ง 3 ชนิด คือ กระชาย ข่า และขิง ในการควบคุมการเจริญของเส้นใยของเชื้อราสาเหตุโรคพืช พบว่า น้ำมันระเหยจากกระชายผสมในอาหาร PDA ความเข้มข้น 1,000 µg/l มีผลทำให้เชื้อรา *C. capsici*, *Dothiorella* sp. และ *Pythium aphanidermatum* เจริญไม่ได้บนอาหาร และเชื้อรา *Pestalotiopsis* sp. เจริญลดลง 88% สำหรับน้ำมันระเหยจากขิงความเข้มข้น 1,000 µg/l มีผลทำให้การเจริญของเชื้อรา *C. gloeosporioides*, *Lasiodiplodia theobromae*, *Pestalotiopsis* sp. และ *P. aphanidermatum* ลดลงเช่นกัน



ภาพที่ 1 ลักษณะอาการโรคแอนแทรคโนสบนใบและผลมะม่วง; (ก) อาการบนใบ, (ข) อาการบนผล และ (ค) กลุ่มสปอร์สี่เหลี่ยมผลของผลมะม่วง

ภาพที่ 2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของมะม่วง; (ก) โคนินบนอาหาร potato dextrose agar อายุ 10 วัน, (ข) กลุ่มสปอร์สี่เหลี่ยมและเม็ด sclerotium สีดำ และ (ค) โคนินเดี่ยว (100X)



สรุป

จากการแยกเชื้อรา *Colletotrichum* spp. สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของมะม่วงจำนวน 150 ไอโซเลท และตรวจสอบความต้านทานต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิม พบเชื้อรากลุ่มสายพันธุ์ Carⁱ จำนวน 115 ไอโซเลท และเชื้อรากลุ่มสายพันธุ์ Car^s จำนวน 35 ไอโซเลท เมื่อนำมาทดสอบประสิทธิภาพของสารป้องกันกำจัดเชื้อราตามอัตราแนะนำ พบว่า captan, carbosin และ mancozeb ควบคุมเชื้อราสายพันธุ์ Carⁱ และสายพันธุ์ Car^s ได้ประสิทธิภาพสูงสุด 100% ส่วนสารป้องกันกำจัดเชื้อรา copper oxychloride ไม่มีประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อราทั้ง 2 สายพันธุ์ และประสิทธิภาพของผงกระชาย ชิง และข่า พบว่า ชิงและข่าที่ความเข้มข้น 5% ยับยั้งการเจริญของเชื้อราสายพันธุ์ Carⁱ ได้ดีที่สุด เท่ากับ 56.34 และ 54.83% ตามลำดับ ส่วนกระชายที่ความเข้มข้น 5% ยับยั้งเฉพาะเชื้อราสายพันธุ์ Car^s ได้เท่ากับ 61.91%

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยจากศูนย์ด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร, สำนักพัฒนานวัตกรรมและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี, สำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษา

เอกสารอ้างอิง

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

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

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

นิพนธ์ วิสารทานนท์. 2542. โรคไม้ผลเขตร้อนและกึ่งเขตร้อน. ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 172 หน้า.

สุภกร จามระโทก, ชัยณรงค์ รัตนกรพิบูล, ชลิตา เล็กสมบูรณ์, นวสวรรค์ พิรุณสง และ ยุพ พิศุฑสง. 2548. ผลของสารสกัดจากพืชสมุนไพรบางชนิดที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อราสาเหตุโรคพืชหลังการเก็บเกี่ยว. หน้า 142. เอกสารประกอบการสัมมนาทางวิชาการวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยว ครั้งที่ 3. 10-11 ตุลาคม 2548. โรงแรมทิพย์วิมานรีสอร์ท จ. เพชรบุรี

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

อรุณี พวงมี. 2533. การควบคุมโรคผลเน่าของมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้ระยะก่อนและหลังเก็บเกี่ยว. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. ภาควิชาโรคพืช มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

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

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. Pcever, and L.W. Timmer. 2004. Benomyl sensitivity of Isolates of *Colletotrichum acutatum* and *C. aloesporioides* 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.

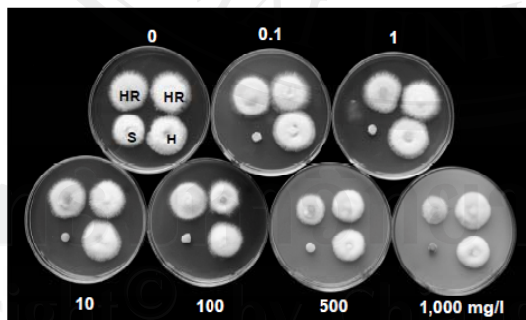
Singh, B. S., I. Mukherjee, J. Maisnam, P. Kumar, M. Gopal and G. Kulshrestha. 2008. Determination of pesticide residues in IPM and non-IPM sample of mango (*Mangifera indica*). *Journal of Environment Science and Health*. 43: 300-306.

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. *Fostharvest 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. Kumko. 2006. Fungicide sensitivity and phylogenetic relationship of anthracnose fungi isolated from various fruit crop in Japan. *Plant Disease* 90: 506-512



ภาพที่ 3 ภาพตรวจสอบความต้านทานของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของมะม่วงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ potato dextrose agar ที่ผสมสารป้องกันกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิม เบนดาซิม ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 วัน

ตารางที่ 3 เชื้อรา *Colletotrichum* spp. สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของมะม่วง ที่ระดับความต้านทานสารป้องกันกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิมต่างๆ

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 ≥ 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. สาเหตุโรคน้ำแฉกในสมมะม่วง บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ potato dextrose agar

Fungicide common name	Percent inhibition ^a	
	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

^aค่าเฉลี่ยจาก 4 ซ้ำ

^{**} อักษรต่างกันแสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% เปรียบเทียบโดยวิธี LSD

Car^S = เชื้อราสายพันธุ์อ่อนแอต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิม

Car^R = เชื้อราสายพันธุ์ต้านทานสารป้องกันกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิม



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

ตารางที่ 5 ประสิทธิภาพของกระชาย ข่า และขิง ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ในการควบคุมเชื้อรา *Colletotrichum* spp. สาเหตุโรคน้ำแฉกในสมมะม่วงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ potato dextrose agar

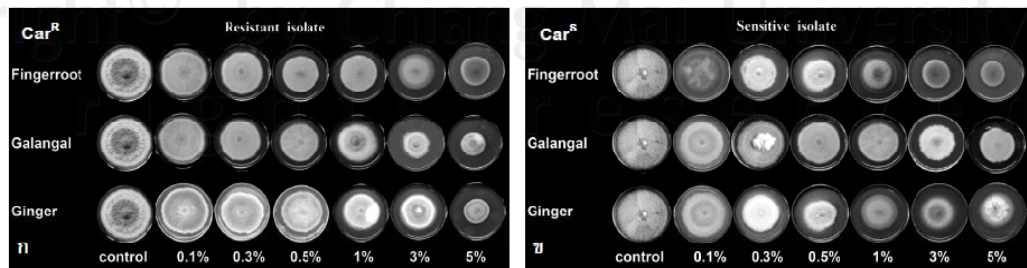
Concentration (%)	Percentage inhibition ^a					
	Car ^R			Car ^S		
	Galangal	Fingerroot	Ginger	Galangal	Fingerroot	Ginger
0.1	32.69 ^{**}	15.27 ^j	19.72 ⁱ	26.34 ^h	4.91 ⁱ	11.02 ^k
0.3	40.93 [*]	20.43 ⁱ	28.82 ^g	31.51 ^g	12.65 ^h	18.78 ⁱ
0.5	44.68 ^{cd}	20.27 ⁱ	33.58 ^f	38.03 ^f	15.10 ^h	24.06 ^h
1	46.78 ^{bc}	25.33 ^h	42.69 ^{de}	40.88 ^{de}	20.16 ^g	29.70 ^g
3	48.63 ^b	47.79 ^b	48.47 ^b	62.20 ^b	30.46 ^g	40.60 ^a
5	49.36 ^b	54.83 ^a	56.34 ^a	61.91 ^a	43.05 ^{cd}	45.42 ^c

^a ค่าเฉลี่ยจาก 4 ซ้ำ

^{**} อักษรต่างกันแสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% เปรียบเทียบโดยวิธี LSD

Car^S = เชื้อราสายพันธุ์อ่อนแอต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิม

Car^R = เชื้อราสายพันธุ์ต้านทานสารป้องกันกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิม



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

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.

10 PROCEEDINGS

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).

12 PROCEEDINGS

Strain	Phenotype	Target site for benzimidazole ^[20]	198
UI14138 ^[10]	wild type	CTCTCCGTCACCAGCTGGTCGAGA	ACTCCGACGAGCCTTCTGCATTGACAACGAGGGCT
CAN_F125	S	CTCTCCGTCACCAGCTGGTCGAGA	ACTCCGACGAGCCTTCTGCATTGACAACGAGGGCT
CAN_L080	S	CTCTCCGTCACCAGCTGGTCGAGA	ACTCCGACGAGCCTTCTGCATTGACAACGAGGGCT
CAN_L105	S	CTCTCCGTCACCAGCTGGTCGAGA	ACTCCGACGAGCCTTCTGCATTGACAACGAGGGCT
FL_F003	S	CTCTCCGTCACCAGCTGGTCGAGA	ACTCCGACGAGCCTTCTGCATTGACAACGAGGGCT
FL_L079	S	CTCTCCGTCACCAGCTGGTCGAGA	ACTCCGACGAGCCTTCTGCATTGACAACGAGGGCT
K_L120	S	CTCTCCGTCACCAGCTGGTCGAGA	ACTCCGACGAGCCTTCTGCATTGACAACGAGGGCT
KMK_L088	S	CTCTCCGTCACCAGCTGGTCGAGA	ACTCCGACGAGCCTTCTGCATTGACAACGAGGGCT
KSW_L062	S	CTCTCCGTCACCAGCTGGTCGAGA	ACTCCGACGAGCCTTCTGCATTGACAACGAGGGCT
MCN_L059	S	CTCTCCGTCACCAGCTGGTCGAGA	ACTCCGACGAGCCTTCTGCATTGACAACGAGGGCT
MCN_L070	S	CTCTCCGTCACCAGCTGGTCGAGA	ACTCCGACGAGCCTTCTGCATTGACAACGAGGGCT
NDM_F006	S	CTCTCCGTCACCAGCTGGTCGAGA	ACTCCGACGAGCCTTCTGCATTGACAACGAGGGCT
NDM_L057	S	CTCTCCGTCACCAGCTGGTCGAGA	ACTCCGACGAGCCTTCTGCATTGACAACGAGGGCT
NDM_F118	S	CTCTCCGTCACCAGCTGGTCGAGA	ACTCCGACGAGCCTTCTGCATTGACAACGAGGGCT
NDM_L068	S	CTCTCCGTCACCAGCTGGTCGAGA	ACTCCGACGAGCCTTCTGCATTGACAACGAGGGCT
NLR_L048	S	CTCTCCGTCACCAGCTGGTCGAGA	ACTCCGACGAGCCTTCTGCATTGACAACGAGGGCT
OR_L040	S	CTCTCCGTCACCAGCTGGTCGAGA	ACTCCGACGAGCCTTCTGCATTGACAACGAGGGCT
PBL_F102	S	CTCTCCGTCACCAGCTGGTCGAGA	ACTCCGACGAGCCTTCTGCATTGACAACGAGGGCT
R_L087	S	CTCTCCGTCACCAGCTGGTCGAGA	ACTCCGACGAGCCTTCTGCATTGACAACGAGGGCT
SLY_L017	S	CTCTCCGTCACCAGCTGGTCGAGA	ACTCCGACGAGCCTTCTGCATTGACAACGAGGGCT
TLN_L060	S	CTCTCCGTCACCAGCTGGTCGAGA	ACTCCGACGAGCCTTCTGCATTGACAACGAGGGCT
CAN_F095	HR	CTCTCCGTCACCAGCTGGTCGAGA	ACTCCGACGAGCCTTCTGCATTGACAACGAGGGCT
CAN_F146	HR	CTCTCCGTCACCAGCTGGTCGAGA	ACTCCGACGAGCCTTCTGCATTGACAACGAGGGCT
CKT_L044	HR	CTCTCCGTCACCAGCTGGTCGAGA	ACTCCGACGAGCCTTCTGCATTGACAACGAGGGCT
FL_F066	HR	CTCTCCGTCACCAGCTGGTCGAGA	ACTCCGACGAGCCTTCTGCATTGACAACGAGGGCT
K_F103	HR	CTCTCCGTCACCAGCTGGTCGAGA	ACTCCGACGAGCCTTCTGCATTGACAACGAGGGCT
KMK_F135	HR	CTCTCCGTCACCAGCTGGTCGAGA	ACTCCGACGAGCCTTCTGCATTGACAACGAGGGCT
KMK_L058	HR	CTCTCCGTCACCAGCTGGTCGAGA	ACTCCGACGAGCCTTCTGCATTGACAACGAGGGCT
MCN_L056	HR	CTCTCCGTCACCAGCTGGTCGAGA	ACTCCGACGAGCCTTCTGCATTGACAACGAGGGCT
NDM_F002	HR	CTCTCCGTCACCAGCTGGTCGAGA	ACTCCGACGAGCCTTCTGCATTGACAACGAGGGCT
NDM_F012	HR	CTCTCCGTCACCAGCTGGTCGAGA	ACTCCGACGAGCCTTCTGCATTGACAACGAGGGCT
NDM_F014	HR	CTCTCCGTCACCAGCTGGTCGAGA	ACTCCGACGAGCCTTCTGCATTGACAACGAGGGCT
NDM_F018	HR	CTCTCCGTCACCAGCTGGTCGAGA	ACTCCGACGAGCCTTCTGCATTGACAACGAGGGCT
NDM_F026	HR	CTCTCCGTCACCAGCTGGTCGAGA	ACTCCGACGAGCCTTCTGCATTGACAACGAGGGCT
NDM_F027	HR	CTCTCCGTCACCAGCTGGTCGAGA	ACTCCGACGAGCCTTCTGCATTGACAACGAGGGCT
NDM_F038	HR	CTCTCCGTCACCAGCTGGTCGAGA	ACTCCGACGAGCCTTCTGCATTGACAACGAGGGCT
NDM_F061	HR	CTCTCCGTCACCAGCTGGTCGAGA	ACTCCGACGAGCCTTCTGCATTGACAACGAGGGCT
NDM_F106	HR	CTCTCCGTCACCAGCTGGTCGAGA	ACTCCGACGAGCCTTCTGCATTGACAACGAGGGCT
NDM_F110	HR	CTCTCCGTCACCAGCTGGTCGAGA	ACTCCGACGAGCCTTCTGCATTGACAACGAGGGCT
NDM_F116	HR	CTCTCCGTCACCAGCTGGTCGAGA	ACTCCGACGAGCCTTCTGCATTGACAACGAGGGCT
NDM_F130	HR	CTCTCCGTCACCAGCTGGTCGAGA	ACTCCGACGAGCCTTCTGCATTGACAACGAGGGCT
NDM_L078	HR	CTCTCCGTCACCAGCTGGTCGAGA	ACTCCGACGAGCCTTCTGCATTGACAACGAGGGCT
NRL_L047	HR	CTCTCCGTCACCAGCTGGTCGAGA	ACTCCGACGAGCCTTCTGCATTGACAACGAGGGCT
OR_F126	HR	CTCTCCGTCACCAGCTGGTCGAGA	ACTCCGACGAGCCTTCTGCATTGACAACGAGGGCT
PBL_F033	HR	CTCTCCGTCACCAGCTGGTCGAGA	ACTCCGACGAGCCTTCTGCATTGACAACGAGGGCT
PBL_F076	HR	CTCTCCGTCACCAGCTGGTCGAGA	ACTCCGACGAGCCTTCTGCATTGACAACGAGGGCT
PBL_F131	HR	CTCTCCGTCACCAGCTGGTCGAGA	ACTCCGACGAGCCTTCTGCATTGACAACGAGGGCT
PS_F114	HR	CTCTCCGTCACCAGCTGGTCGAGA	ACTCCGACGAGCCTTCTGCATTGACAACGAGGGCT
TLN_L065	HR	CTCTCCGTCACCAGCTGGTCGAGA	ACTCCGACGAGCCTTCTGCATTGACAACGAGGGCT
Nucleotides		-----*	-----*
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.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี
Copyright by Chiang Mai University

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] Koenraad, 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. *aeschynomene*. *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 yellundae* and *Tapesia acuformis*. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 64: 17-31.

Determination of beta-tubulin gene point mutation in *Colletotrichum gloeosporioides* causing mango anthracnose

Pornprapa Kongtragoul^{1,2}, Yoko Miyamoto³, Chikako Miyake³, Yuriko Izumi³,
Kazuya Akitmitsu³ 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

Abstract: One hundred-fifty isolates of *Colletotrichum gloeosporioides* causing mango anthracnose disease were successfully isolated from naturally-infected 16 mango cultivars; consisting of 46 isolates (30.67%) from leaves and 104 isolates (69.33%) from fruits. A preliminary study was conducted *in vitro* by growing the isolates on potato dextrose agar amended with carbendazim at various concentrations of 0.1, 1, 10, 100, 500 and 1000 mg/L. These isolates were classified into four representative phenotypes as follows: 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 that 18 isolate (12%) from leaves and 95 isolates (63.33%) from fruits were highly resistant. Twenty-eight isolates (18.67%) from leaves and 9 isolates (6%) from fruits were sensitive to carbendazim. 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. *aeschynomene* (accession No. U14138). HR phenotypes were revealed a single nucleotide mutation of adenine (A) to cytosine (C) resulting in a substitution of codon 198 which encodes glutamic acid (GAG) in S phenotypes 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 and avoid resistency in plant parasitic fungi.

Key words: beta-tubulin gene, carbendazim, *Colletotrichum gloeosporioides*,

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

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

The Annual Meeting of Thai Phytopathological Society and Plant Pathology Conference
Kasetsart University, Bangkok, Thailand, 15 May 2010.

จุดกลายพันธุ์บนยีนเบต้าทูลูลินของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* สาเหตุโรคนแอนแทรกโนสของมะม่วงที่ต้านทานสารควบคุมเชื้อราคาร์เบนดาซิม

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 มหาวิทยาลัยคาทอลิก ประเทศญี่ปุ่น

บทคัดย่อ: การแยกเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* สาเหตุโรคนแอนแทรกโนสของมะม่วง 11 สายพันธุ์ที่เก็บรวบรวมจากตลาดและสวนจำนวน 150 ไร่แล้วประเมินความสามารถในการต้านทานสารควบคุมเชื้อราคาร์เบนดาซิม 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 ไร่ และกลุ่ม S จำนวน 37 ไร่ เมื่อวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนจากตัวอย่างเชื้อราแต่ละระดับความต้านทานตรงตำแหน่งบางส่วนของยีนเบต้าทูลูลิน (*TUB2*) เมื่อเปรียบเทียบกับ *C. gloeosporioides* f. sp. *aeschynomene* สายพันธุ์ wild type (accession no. U14138) พบการเปลี่ยนแปลงของลำดับนิวคลีโอไทด์จาก adenine (A) เป็น cytosine (C) ของเชื้อรากลุ่ม HR เป็นผลให้ตำแหน่งของกรดอะมิโน codon 198 เกิดการกลายพันธุ์ จาก glutamic acid (GAG) ของเชื้อรากลุ่ม S เป็น alanine (GCG) ซึ่งสัมพันธ์กับลักษณะกลายพันธุ์ที่แสดงออกตามธรรมชาติต่อสารคาร์เบนดาซิม

คำสำคัญ: การต้านทานสารควบคุมเชื้อรา, โรคนแอนแทรกโนสของมะม่วง, *Colletotrichum gloeosporioides*

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

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. *aeschyromene* (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; Koenraad *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	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.

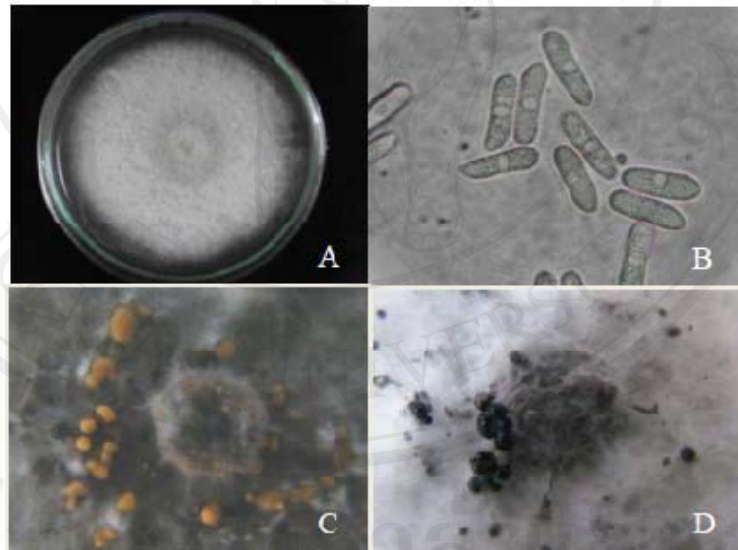


Fig. 2. Characterizations of *Colletotrichum gloeosporioides* causing 'Nam Dok Mai' mango anthracnose; (A) Colony on PDA 10 days, (B) Conidia (X100), (C) Slimy spore mass, (D) Sclerotia.

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. *aeschyromene* (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).

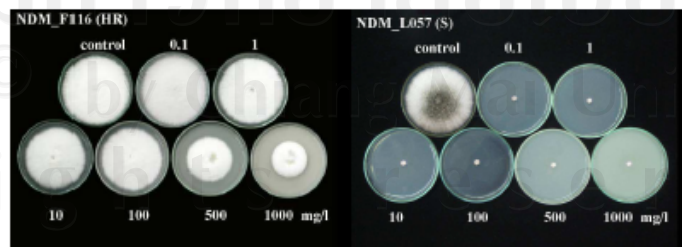


Fig. 3. The carbendazim-resistant phenotypes of highly resistance ($HR \geq 500$ mg/l) and sensitive ($S \leq 1$ mg/l) *Colletotrichum gloeosporioides* isolates on PDA amended with carbendazim at control, 0.1, 1, 10, 100, 500 and 1000 mg/l.

Phenotypes		
U14138 ⁽¹⁾	wild type	TTCTCCGTCGTTCCCTCCCCAAGGTCCTCGACACCGTTGTCGAGCCCTACAACGCCACT
NDM_F006	S	TTCTCCGTCGTTCCCTCCCCAAGGTCCTCGACACCGTTGTCGAGCCCTACAACGCCACT
NDM_F057	S	TTCTCCGTCGTTCCCTCCCCAAGGTCCTCGACACCGTTGTCGAGCCCTACAACGCCACT
NDM_F118	S	TTCTCCGTCGTTCCCTCCCCAAGGTCCTCGACACCGTTGTCGAGCCCTACAACGCCACT
NDM_L068	S	TTCTCCGTCGTTCCCTCCCCAAGGTCCTCGACACCGTTGTCGAGCCCTACAACGCCACT
NDM_F002	HR	TTCTCCGTCGTTCCCTCCCCAAGGTCCTCGACACCGTTGTCGAGCCCTACAACGCCACT
NDM_F012	HR	TTCTCCGTCGTTCCCTCCCCAAGGTCCTCGACACCGTTGTCGAGCCCTACAACGCCACT
NDM_F014	HR	TTCTCCGTCGTTCCCTCCCCAAGGTCCTCGACACCGTTGTCGAGCCCTACAACGCCACT
NDM_F018	HR	TTCTCCGTCGTTCCCTCCCCAAGGTCCTCGACACCGTTGTCGAGCCCTACAACGCCACT
NDM_F026	HR	TTCTCCGTCGTTCCCTCCCCAAGGTCCTCGACACCGTTGTCGAGCCCTACAACGCCACT
NDM_F027	HR	TTCTCCGTCGTTCCCTCCCCAAGGTCCTCGACACCGTTGTCGAGCCCTACAACGCCACT
NDM_F038	HR	TTCTCCGTCGTTCCCTCCCCAAGGTCCTCGACACCGTTGTCGAGCCCTACAACGCCACT
NDM_F061	HR	TTCTCCGTCGTTCCCTCCCCAAGGTCCTCGACACCGTTGTCGAGCCCTACAACGCCACT
NDM_F106	HR	TTCTCCGTCGTTCCCTCCCCAAGGTCCTCGACACCGTTGTCGAGCCCTACAACGCCACT
NDM_F110	HR	TTCTCCGTCGTTCCCTCCCCAAGGTCCTCGACACCGTTGTCGAGCCCTACAACGCCACT
NDM_F116	HR	TTCTCCGTCGTTCCCTCCCCAAGGTCCTCGACACCGTTGTCGAGCCCTACAACGCCACT
NDM_F130	HR	TTCTCCGTCGTTCCCTCCCCAAGGTCCTCGACACCGTTGTCGAGCCCTACAACGCCACT
NDM_L078	HR	TTCTCCGTCGTTCCCTCCCCAAGGTCCTCGACACCGTTGTCGAGCCCTACAACGCCACT
Nucleotides		-----*-----
Amino acids		-----*-----
60		
U14138 ⁽¹⁾	Phenotype wild type	Target site for benzimidazole ⁽²⁾ 198
NDM_F006	S	CTCTCCGTCACCCAGCTGGTCGAGAACTCCGACCGAGACCTTCTGCATTGACAAACGAGGCT
NDM_F057	S	CTCTCCGTCACCCAGCTGGTCGAGAACTCCGACCGAGACCTTCTGCATTGACAAACGAGGCT
NDM_F118	S	CTCTCCGTCACCCAGCTGGTCGAGAACTCCGACCGAGACCTTCTGCATTGACAAACGAGGCT
NDM_L068	S	CTCTCCGTCACCCAGCTGGTCGAGAACTCCGACCGAGACCTTCTGCATTGACAAACGAGGCT
NDM_F002	HR	CTCTCCGTCACCCAGCTGGTCGAGAACTCCGACCGAGACCTTCTGCATTGACAAACGAGGCT
NDM_F012	HR	CTCTCCGTCACCCAGCTGGTCGAGAACTCCGACCGAGACCTTCTGCATTGACAAACGAGGCT
NDM_F014	HR	CTCTCCGTCACCCAGCTGGTCGAGAACTCCGACCGAGACCTTCTGCATTGACAAACGAGGCT
NDM_F018	HR	CTCTCCGTCACCCAGCTGGTCGAGAACTCCGACCGAGACCTTCTGCATTGACAAACGAGGCT
NDM_F026	HR	CTCTCCGTCACCCAGCTGGTCGAGAACTCCGACCGAGACCTTCTGCATTGACAAACGAGGCT
NDM_F027	HR	CTCTCCGTCACCCAGCTGGTCGAGAACTCCGACCGAGACCTTCTGCATTGACAAACGAGGCT
NDM_F038	HR	CTCTCCGTCACCCAGCTGGTCGAGAACTCCGACCGAGACCTTCTGCATTGACAAACGAGGCT
NDM_F061	HR	CTCTCCGTCACCCAGCTGGTCGAGAACTCCGACCGAGACCTTCTGCATTGACAAACGAGGCT
NDM_F106	HR	CTCTCCGTCACCCAGCTGGTCGAGAACTCCGACCGAGACCTTCTGCATTGACAAACGAGGCT
NDM_F110	HR	CTCTCCGTCACCCAGCTGGTCGAGAACTCCGACCGAGACCTTCTGCATTGACAAACGAGGCT
NDM_F116	HR	CTCTCCGTCACCCAGCTGGTCGAGAACTCCGACCGAGACCTTCTGCATTGACAAACGAGGCT
NDM_F130	HR	CTCTCCGTCACCCAGCTGGTCGAGAACTCCGACCGAGACCTTCTGCATTGACAAACGAGGCT
NDM_L078	HR	CTCTCCGTCACCCAGCTGGTCGAGAACTCCGACCGAGACCTTCTGCATTGACAAACGAGGCT
Nucleotides		-----*-----
Amino acids		-----*-----
120		
40		

Fig. 4. Comparison of deduced nucleotide sequences and amino acids in *TUB2* gene of *Colletotrichum 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).

U14138 ⁽¹⁾	Phenotype	CTCTACGACATTGCATGGGTACCCTCAAGCTGTCCAACCCCTCTTACGGGACCTGAAC
	wild type	L Y D I C M R T L K L S N P S Y G D L N
NDM_F006	S	CTCTACGACATTGCATGGGTACCCTCAAGCTGTCCAACCCCTCTTACGGGACCTGAAC
NDM_F057	S	L Y D I C M R T L K L S N P S Y G D L N
NDM_F118	S	CTCTACGACATTGCATGGGTACCCTCAAGCTGTCCAACCCCTCTTACGGGACCTGAAC
NDM_L068	S	L Y D I C M R T L K L S N P S Y G D L N
NDM_F002	HR	CTCTACGACATTGCATGGGTACCCTCAAGCTGTCCAACCCCTCTTACGGGACCTGAAC
NDM_F012	HR	L Y D I C M R T L K L S N P S Y G D L N
NDM_F014	HR	CTCTACGACATTGCATGGGTACCCTCAAGCTGTCCAACCCCTCTTACGGGACCTGAAC
NDM_F018	HR	L Y D I C M R T L K L S N P S Y G D L N
NDM_F026	HR	CTCTACGACATTGCATGGGTACCCTCAAGCTGTCCAACCCCTCTTACGGGACCTGAAC
NDM_F027	HR	L Y D I C M R T L K L S N P S Y G D L N
NDM_F038	HR	CTCTACGACATTGCATGGGTACCCTCAAGCTGTCCAACCCCTCTTACGGGACCTGAAC
NDM_F061	HR	L Y D I C M R T L K L S N P S Y G D L N
NDM_F106	HR	CTCTACGACATTGCATGGGTACCCTCAAGCTGTCCAACCCCTCTTACGGGACCTGAAC
NDM_F110	HR	L Y D I C M R T L K L S N P S Y G D L N
NDM_F116	HR	CTCTACGACATTGCATGGGTACCCTCAAGCTGTCCAACCCCTCTTACGGGACCTGAAC
NDM_F130	HR	L Y D I C M R T L K L S N P S Y G D L N
NDM_L078	HR	CTCTACGACATTGCATGGGTACCCTCAAGCTGTCCAACCCCTCTTACGGGACCTGAAC
		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 ⁽²⁾	Phenotype	CACCTGGTCTGCTGTTATGTCGGGTGTCACCTGCCTGGTTCCTCCGGGTCAAGCTG
	wild type	H L V S A V M S G V T T C L R F P G Q L
NDM_F006	S	CACCTGGTCTGCTGTTATGTCGGGTGTCACCTGCCTGGTTCCTCCGGGTCAAGCTG
NDM_F057	S	H L V S A V M S G V T T C L R F P G Q L
NDM_F118	S	CACCTGGTCTGCTGTTATGTCGGGTGTCACCTGCCTGGTTCCTCCGGGTCAAGCTG
NDM_L068	S	H L V S A V M S G V T T C L R F P G Q L
NDM_F002	HR	CACCTGGTCTGCTGTTATGTCGGGTGTCACCTGCCTGGTTCCTCCGGGTCAAGCTG
NDM_F012	HR	H L V S A V M S G V T T C L R F P G Q L
NDM_F014	HR	CACCTGGTCTGCTGTTATGTCGGGTGTCACCTGCCTGGTTCCTCCGGGTCAAGCTG
NDM_F018	HR	H L V S A V M S G V T T C L R F P G Q L
NDM_F026	HR	CACCTGGTCTGCTGTTATGTCGGGTGTCACCTGCCTGGTTCCTCCGGGTCAAGCTG
NDM_F027	HR	H L V S A V M S G V T T C L R F P G Q L
NDM_F038	HR	CACCTGGTCTGCTGTTATGTCGGGTGTCACCTGCCTGGTTCCTCCGGGTCAAGCTG
NDM_F061	HR	H L V S A V M S G V T T C L R F P G Q L
NDM_F106	HR	CACCTGGTCTGCTGTTATGTCGGGTGTCACCTGCCTGGTTCCTCCGGGTCAAGCTG
NDM_F110	HR	H L V S A V M S G V T T C L R F P G Q L
NDM_F116	HR	CACCTGGTCTGCTGTTATGTCGGGTGTCACCTGCCTGGTTCCTCCGGGTCAAGCTG
NDM_F130	HR	H L V S A V M S G V T T C L R F P G Q L
NDM_L078	HR	CACCTGGTCTGCTGTTATGTCGGGTGTCACCTGCCTGGTTCCTCCGGGTCAAGCTG
		H L V S A V M S G V T T C L R F 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. *aeschnomene*⁽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. *aeschyromene*⁽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) 1,000 µg of carbendazim/ml (high resistant)	Peres <i>et al.</i> , 2004 Chung <i>et al.</i> , 2006 Ru-lin and Jun-sheng, 2007
	Phe (TTC)-to-Tyr (TAC)	200	10-100 mg of thiophanate-methyl/l (intermediately resistant)	Chung <i>et al.</i> , 2006
<i>C. gloeosporioides</i>	Glu (GAG)-to-Ala (GCG)	198	1 µg of benomyl / ml (resistant)	Buhr and Dickman, 1994
<i>f. sp. aesclynomene</i>	Tyr(ATC)-to-Asn (AAC)	50	1.5 µg of benomyl / ml (resistant)	Yan and Dickman, 1996
<i>Fusarium moniliforme</i>				
<i>Monilinia fructicola</i>	Glu (GAA)-to-Lys (AAA)	198	slow growth on 50 mg of benomyl/l (highly resistant)	Koenraadt <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)	
<i>P. digitatum</i>	Phe (TTC)-to-Tyr (TAC)	200	5 mg of benomyl /l (medium resistance)	
	Glu (GAG)-to-Lys (AAG)	198	slow growth on 50 mg of benomyl/l (highly resistant)	
<i>P. expansum</i>	Glu (GAG)-to-Val (GTG)	198	slow growth on 50 mg of benomyl/l (highly resistant)	
	Glu (GAG)-to-Ala (GCG)	198	rapid growth on 50 mg of benomyl/l (very high resistance)	
<i>P. puberulum</i>	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
	Glu (GAG)-to-Ala (GCG)	198	rapid growth on 50 mg of benomyl/l (very high resistance)	Koenraadt <i>et al.</i> , 1992
<i>P. solitum</i>	Glu (GAG)-to-Lys (AAG)	198	slow growth on 50 mg of benomyl/l (highly resistant)	
	Glu (GAG)-to-Lys (AAG)	198	1,000 of benomyl or thiabendazole/ml (highly resistant)	Sholberg <i>et al.</i> , 2005
<i>P. viticolum</i>	Glu (GAG)-to-Lys (AAG)	198	slow growth on 50 mg of benomyl/l (highly resistant)	Koenraadt <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)	
<i>V. pirina</i>	Phe (TTC)-to-Tyr (TAC)	200	5 mg of benomyl /l (medium resistance)	
	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)	

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

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.
- Koenraad, 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).

- Orbach, J.M., Porro, E.B. and Yanofsky, C. (1986). Cloning and characterization of the gene for *beta*-tubulin from a benomyl-resistant mutant of *Neurospora crassa* and its use as a dominant selectable marker. *Molecular and Cellular Biology* 6(7): 2452-2461.
- Peres, N.A.R., Souza, N.L., Peever, T.L. and Timmer, L.W. (2004). Benomyl sensitivity of isolates of *Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides* from citrus. *Plant Disease* 88(2): 125-130.
- Ru-Lin, Z. and Jun-Sheng, H. (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., Korsten, L. and Welner, 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.
- Sangchote, S. (1987). Postharvest disease of mango fruit and their losses. *Kasetsart Journal (Natural Science)* 21: 81-85.
- Sanger, F., Nicklen, S. and Chase, A.R. (1977). DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proceeding of the National Academy Sciences, USA*. 74(12): 5463-5468.
- 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., 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*). *Journal of Environment Science and Health Part B* 43: 300-306.
- Steffens, J.J., Pell, E.J. and Tien, M. (1996). Mechanisms of fungicide resistance in phytopathogenic fungi. *Environmental Biotechnology* 7:348-355.
- Sholberg, L.P., Harlton, C., Haag, P., Levesque, C.A., O'Gorman, D. and Seifert, K. (2005). Benzimidazole and diphenylamine sensitivity and identity of *Penicillium* spp. that cause postharvest blue mold of apples using beta-tubulin gene sequences. *Postharvest Biology and Technology* 36: 41-49.
- Sutton, B.C. (1980). *The coelomycetes: fungi imperfect with pycnidia acervuli and stromata*. CMI. Kew Surrey, England, 696 p.
- Yan, K. and Dickman, M. B. (1996). Isolation of a β -tubulin gene from *Fusarium moniliforme* that confers cold-sensitive benomyl resistance. *Applied and Environmental Microbiology* 62(8): 3053-3056.
- Yarden, O. and Katan, T. (1993). Mutations leading to substitutions at amino acids 198 and 200 of beta-tubulin that correlates with benomyl-resistance phenotypes of field isolates of *Botrytis cinerea*. *Phytopathology* 83: 1478-1483.
- Yoon, S.C., Ju, E-H., Yeoung, Y.R. and Kim, B.S. (2008). Survey of fungicide resistance for chemical control of *Botrytis cinerea* on Paprika. *The Plant Pathology Journal* 24(4): 447-452.

(Received 15 October 2009; accepted 2 February 2010)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

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}
Pornprapa 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 เมื่อวิเคราะห์หาลำดับเบสของยีน *TUB2* เปรียบเทียบกับ *C. gloeosporioides* f. sp. *aeschnomene* (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. *aeschnomene* (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*

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

¹ สาขาวิชาโรคพืช ภาควิชาชีววิทยาและโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

² Plant Pathology Program, Department of Entomology and Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Chiang Mai University

³ ศูนย์ด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษา

⁴ Center for Agriculture Biotechnology (AG-BIO/PERDO-CHE) Thailand.

Single Nucleotide Transversion in the *TUB2* Gene Associated with Carbendazim-resistant *Colletotrichum gloeosporioides* from Mango

Kongtragoul, P.^{1,2} and S. Nalumpang¹

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

² Center of Excellence on Agricultural Biotechnology, Science and Technology Postgraduate Education and Research Development Office, Commission on Higher Education, Ministry of Education. (AG-BIO/PERDO-CHE)

Abstract

The field isolates of *Colletotrichum gloeosporioides* were obtained from mango. The carbendazim-resistant assay was conducted on potato dextrose agar amended with carbendazim at various concentrations: 0.1, 1, 10, 100, 500 (field recommendation rate) and 1,000 mg/l, respectively. Isolates with a highly-resistant (HR) phenotype were able to grow well on carbendazim even at ≥ 500 mg/l. The differences in the carbendazim-resistant phenotypes were conspicuous in sequence analysis of the partial second β -tubulin (*TUB2*) gene. The sequence of *TUB2* in the isolates with an HR phenotype showed a single nucleotide transversion of adenine to cytosine, resulting in a substitution at codon 198, which encodes glutamic acid (GAG) in the wild type and converts it to alanine (GCG) in these isolates which is closely associated with conferring carbendazim resistance of phenotypic mutation on nature.

Keywords: Fungicide resistance, Point mutation

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

Copyright © by Chiang Mai University

All rights reserved

ลักษณะของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides*
ที่ต้านทานสารคาร์เบนดาซิม

Characterization of *Colletotrichum gloeosporioides*
Resistant to Carbendazim

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

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 the field.

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

¹ภาควิชา ภูมิวิทยาและโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

²Department of Entomology and Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Chiang Mai University

³ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนานวัตกรรมการผลิตและการกระจายความรู้เพื่อการพัฒนาคนและท้องถิ่น สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา

⁴Center of Excellence on Agricultural Biotechnology (AG-BIO/PERDO-CHE), Bangkok, Thailand

บทคัดย่อ: เก็บรวบรวมเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสในสมผลมะม่วงจากตลาดสด ในจังหวัดเชียงใหม่ จำนวน 100 ไอโซเลท จากนั้นทดสอบความสามารถในการต้านทานสารป้องกันกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิม บนอาหาร 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) ผลการทดลองพบเชื้อรา กลุ่ม HR จำนวน 95 ไอโซเลท และกลุ่ม S จำนวน 5 ไอโซเลท เมื่อวิเคราะห์หาคอร์อะมีโนจากตัวอย่างเชื้อราแต่ละระดับความต้านทาน ที่ตำแหน่งบางส่วนของยีนเบต้าทูบูลิน (*TUB2*) เปรียบเทียบกับ *C. gloeosporioides* f. sp. *aeschynomene* (accession no. U14138) พบการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนตรงตำแหน่ง codon 198 ของเชื้อรากลุ่ม HR จาก glutamic acid (E) ของเชื้อรากลุ่ม S เป็น alanine (A) ซึ่งสัมพันธ์กับลักษณะกลายพันธุ์ที่แสดงออกต่อสารคาร์เบนดาซิมจากแปลงปลูก

คำสำคัญ: ความต้านทานสารกำจัดเชื้อรา โรคแอนแทรคโนสของมะม่วง *Colletotrichum gloeosporioides*

คำนำ

มะม่วงเป็นผลไม้ที่สำคัญทางเศรษฐกิจชนิดหนึ่งของประเทศไทย เพราะในแต่ละปีมีผลผลิตมะม่วงออกสู่ตลาดทั้งภายในประเทศ และส่งออกต่างประเทศจำนวนมาก (เกียรติเกษตร, 2547) แต่ในขณะที่เดียวกันก็พบจำผลผลิตหลังการเก็บเกี่ยวจำนวนมากได้รับความเสียหาย จากการเข้าทำลายของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* สาเหตุของโรคแอนแทรคโนส (anthracnose) โดยทำให้เกิดลักษณะจุดสีดำ รูปร่างกลมในระหว่างการรมหรือขนส่งจุดเหล่านี้จะขยายใหญ่ขึ้น และลุกลาม ทำให้เน่าทั้งผลได้ อาการจุดเน่าด้านบนผลนี้พบทำความเสียหายกับมะม่วงเกือบทุกสายพันธุ์ นอกจากนี้เชื้อรานี้นี้ยังสามารถแฝงอยู่กับผลตั้งแต่อยู่ในแปลงปลูกโดยไม่แสดงอาการใด ๆ แต่เมื่อสภาพแวดล้อมเหมาะสม เช่น ผลสุก หรือมีความชื้นสูง ในระหว่างการเก็บรักษา หรือบรรจุหีบห่อเพื่อการขนส่ง จะแสดงอาการได้ ซึ่งก็ทำความเสียหายเป็นอย่างมาก (Akem, 2006) สำหรับการจัดการป้องกันกำจัดโรคนี้ในแปลงปลูก เกษตรกรนิยมใช้สารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อรา โดยเฉพาะสารกลุ่มเบนซิมิดาโซล (benzimidazole) เนื่องจากควบคุมโรคได้ผลดีและรวดเร็ว เช่น คาร์เบนดาซิม (carbendazim), เบนโนมิล (benomyl) หรือ

ไออะเบนดาโซล (thiabendazol) เป็นต้น (Akem, 2006) สารเคมีกลุ่มนี้เป็นสารชนิดดูดซึม (systemic fungicides) ที่ออกฤทธิ์แบบเฉพาะจุด (site specific mode of action) กล่าวคือจะเข้าไปจับกับโปรตีนทูบูลิน (tubulin) โดยเข้าไปจับอย่างจำเพาะเจาะจงกับโปรตีน beta-tubulin subunit (Ma and Michailides, 2005) เนื่องจากลักษณะของการออกฤทธิ์แบบจำเพาะจุดนี้ ประกอบกับการใช้สารเคมีอย่างต่อเนื่อง จะส่งผลชักนำให้เชื้อราเกิดการพัฒนาหรือปรับตัวเองเพื่อความอยู่รอด จนเกิดการกลายพันธุ์เป็นสายพันธุ์ที่ต้านทานสารป้องกันกำจัดเชื้อราขึ้น เมื่อเกษตรกรยังคงใช้สารเคมีดังกล่าวเชื้อราสายพันธุ์ที่กลายพันธุ์ยังคงอยู่รอดได้ ซึ่งลักษณะการกลายพันธุ์นี้สามารถถ่ายทอดสู่รุ่นลูกหลานได้ จึงส่งผลให้เพิ่มปริมาณภายในแปลงปลูกของเกษตรกรได้โดยไม่รู้ตัว (acquired fungicide resistance) (Deising et al., 2008; Damicone and Smith, 2009) ทำให้เกษตรกรประสบปัญหาไม่สามารถควบคุมการเกิดและแพร่ระบาดของโรคนี้ได้ รวมทั้งต้องสิ้นเปลืองเงินทุนและเวลาในการป้องกันกำจัดโรค ซึ่งจากรายงานของ Damicone and Smith (2009) ได้จัดระดับความเสี่ยงต่อการพัฒนาความต้านทานต่อสารกลุ่มเบนซิมิดาโซลอยู่ในระดับความเสี่ยงสูง ประกอบกับ Deising et al. (2008) รายงานว่า เชื้อรา *Venturia inaequalis* และ *Botrytis cinerea* สามารถสร้างความ

ด้านทานต่อสารกลุ่มนี้ในเวลาเพียงสองปี จากเหตุผลดังกล่าวจึงทำให้เกิดความล้มเหลวในการป้องกันกำจัดโรคที่เกิดขึ้น

ปัจจุบันมีนักวิจัยหลายท่านที่ได้ศึกษาความต้านทานต่อสารในกลุ่มเบนซิมิดาโซลของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. ที่ระดับ phenotype และ genetic mutation พบว่าเชื้อราดังกล่าวเกิดความต้านทานต่อสารในกลุ่มนี้ขึ้นแล้วในหลายประเทศ (Kumar *et al.*, 2007; Ru-Lin and Jun-Sheng, 2007) โดยศึกษาบนยีนเบต้าทูบูลิน (beta-tubulin gene; *TUB2*) ซึ่งเกิดจากการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนตรงตำแหน่งจับของสารกลุ่มเบนซิมิดาโซล (benzimidazole binding site) พบว่าเกี่ยวข้องกับจุดกลายพันธุ์ (point mutation) ที่ตำแหน่ง codon 198 มีรายงานมากที่สุด กล่าวคือกรดอะมิโน glycine, lysine, alanine หรือ valine จะเข้าไปแทนที่ glutamic acid ในตำแหน่ง codon นี้ (Ma and Michailides, 2005) ทั้งนี้พบว่ามีรายงานการศึกษาค้นคว้าด้านทานของเชื้อรา *C. gloeosporioides* ต่อสารในกลุ่มเบนซิมิดาโซล บริเวณยีน *TUB2* เนื่องจากเป็นบริเวณที่คาดว่ามีความถี่เกิดจุดกลายพันธุ์ (Peres *et al.*, 2004; Chung *et al.*, 2006; Maymon *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2007) ดังนั้นจึงจำเป็นต้องศึกษาถึงจุดกลายพันธุ์บนยีนเบต้าทูบูลิน (*TUB2*) ของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของมะม่วงที่ด้านทานสารป้องกันกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิม เพื่อให้เกิดความรู้ความเข้าใจถึงการกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นในระดับชีวโมเลกุล อันจะนำไปสู่การหาวิธีที่เหมาะสมในการควบคุมป้องกันได้อย่างถูกวิธี

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

1. แยกและเก็บรวบรวมเชื้อรา *C. gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสบนผลมะม่วง เก็บผลมะม่วงที่แสดงอาการโรคแอนแทรคโนสจากตลาดสด ตรวจเชื้อจากผลภายใต้กล้องสเตอริโอ จากนั้นแยก เชื้อราโดยวิธี issue transplanting technique ตัดชิ้นพืชบริเวณแผลกับเนื้อเยื่อปกติให้มีขนาดประมาณ 0.5 x 0.5 เซนติเมตร ฆ่าเชื้อที่ผิวโดยแช่ใน

สารละลาย sodium hypochlorite (10% Clorox) ประมาณ 1-2 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อประมาณ 2-3 นาที ซับชิ้นพืชให้แห้งด้วยกระดาษกรองที่ผ่านการฆ่าเชื้อ นำชิ้นพืชวางบนอาหาร potato dextrose agar (PDA) ปุ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง (30°C) ประมาณ 3-4 วัน เมื่อสังเกตเห็นเส้นใยเชื้อราเจริญออกจากชิ้นส่วนพืช จึงแยกบริเวณปลายเส้นใยมาวางบนอาหาร PDA ปุ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง (30°C) เป็นเวลา 10 วัน เพื่อศึกษาลักษณะโคโลนีและสปอร์ จากนั้นแยกเก็บเชื้อส่วนหนึ่งไว้ในอาหาร PDA ในหลอดเสียง สำหรับใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

2. ประเมินระดับความต้านทานของเชื้อรา *C. gloeosporioides* ต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิม เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ผสมกับสารป้องกันกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิม ที่ความเข้มข้นระดับต่างๆ ได้แก่ 0.1, 1, 10, 100, 500 (อัตราแนะนำ) และ 1,000 mg/l ใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร ตัดบริเวณขอบโคโลนีของเชื้อราแต่ละไอโซเลตเลี้ยงบนอาหาร PDA ที่ผสมสารป้องกันกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิมที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ เปรียบเทียบการเจริญของโคโลนีเชื้อราที่ชุดควบคุมคือ อาหาร PDA ที่ไม่ผสมสารป้องกันกำจัดเชื้อรา ทำการทดลองความเข้มข้นละ 5 ซ้ำ บันทึกการเจริญของเชื้อรา โดยวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อรา และประเมินระดับความต้านทานต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิมเป็น 4 ระดับ ตามหลักเกณฑ์ ซึ่งดัดแปลงจาก Koenraadt *et al.* (1992) และ Peres *et al.* (2004) แสดงใน ตารางที่ 1 และตรวจสอบลักษณะเส้นใยของเชื้อราแต่ละระดับความต้านทานที่เลี้ยงบนอาหาร PDA และ PDA ผสมคาร์เบนดาซิมที่ 500 mg/l ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ขยาย 400 เท่า โดยวิธี slide culture

3. เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ และวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ตรงตำแหน่งยีนเบต้าทูบูลิน สกัดดีเอ็นเอจากเส้นใยของเชื้อราที่คัดเลือกแต่ละระดับความต้านทานด้วยชุด NucleoSpin[®] kit และเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอตรงตำแหน่งบางส่วนของยีน *TUB2* โดยทำปฏิกิริยา PCR ใช้ไพรเมอร์ TUB2L (5' GTT TCC AGA TCA CCC ACT CC 3') และไพรเมอร์ TUB2R (5' TGA GCT CAG GAA CAC TGA CG 3') ตรวจสอบผลผลิต

จากปฏิกิริยาที่ได้โดยวิธี gel electrophoresis บน 1% agarose gel ใน 0.5X TBE buffer และย้อมเจดด้วย 0.5 µg/ml เอธิเดียมโบรไมด์ ตรวจจุดแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต และนำไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ ด้วยเครื่อง automated fluorescent DNA sequencer นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้แปลรหัสเป็นกรดอะมิโนด้วยโปรแกรม BioEdit version 5.0.6. เปรียบเทียบความเหมือนกับข้อมูลของยีนเบต้าทูบูลินที่มีรายงานไว้ในฐานข้อมูล GenBank ของ National Center for Biotechnology Information (NCBI) ด้วยโปรแกรม BLAST โดยเข้าไปที่ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> นอกจากนี้ นำข้อมูลทั้งสองเปรียบเทียบกับเชื้อรา *C. gloeosporioides* f. sp. *aeschynomene* (accession no. U14138) ตามรายงานของ Buhr and Dickman (1994) ด้วยโปรแกรม ClustalX, version 2.0.10 เพื่อตรวจสอบหาจุดคล้ายพันธุ์

1. แยกและเก็บรวบรวมเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรกซ์ในสมม่วง จากการแยกและเก็บตัวอย่างโรคแอนแทรกซ์ในสมมม่วงจากตลาดสดได้ 100 ไอโซเลท

ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราที่แยกได้โดยเลี้ยงเชื้อบนอาหาร PDA พบว่าเชื้อราทั้งหมดมีลักษณะโคโลนีบนอาหาร PDA ดังนี้ เมื่ออ่อนเส้นใยมีสีขาวต่อมาจะค่อยๆ เปลี่ยนเป็นสีเทาและเจริญเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อประมาณ 10 วัน บางไอโซเลทสร้างกลุ่มสปอร์สีส้ม (spore mass) และพบเม็ด sclerotium สีดำฝังตัวอยู่ในอาหาร PDA มีลักษณะสปอร์รูปทรงกระบอกหัวท้ายมน (cylindrical) เกล็ดเดี่ยว ใส (ไม่มีสี) ขนาด 4.2-5.1 x 15.4-20.6 µm (ภาพที่ 1) ซึ่งจากลักษณะดังกล่าวสามารถจัดจำแนกเชื้อราสาเหตุดังกล่าวว่าเป็นเชื้อรา *C. gloeosporioides* ตามหลักเกณฑ์ของ Sutton (1992)

2. ประเมินระดับความต้านทานต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิม จากการศึกษาความต้านทานต่อสารคาร์เบนดาซิมที่ระดับ phenotypic mutation โดยประเมินระดับความต้านทานของเชื้อรา *C. gloeosporioides* ต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิมบนอาหาร PDA ที่ผสมสารคาร์เบนดาซิม 6 ระดับความเข้มข้น ได้แก่ 0.1, 1.0, 10, 100, 500 และ 1000 mg/l ตามหลักเกณฑ์ที่แสดงใน ตาราง 1 พบเชื้อราที่ต้านทานต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิมในระดับสูง (HR) ซึ่งเจริญได้บนอาหารผสม

Table 1 Phenotype resistant levels of *Colletotrichum gloeosporioides* to carbendazim at various concentrations: 0.1, 1, 10, 100, 500 and 1,000 mg/l supplemented with potato dextrose agar (Modified from Koenraadt *et al.*, 1992; 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 resistant (WR)	✓	✓	X	X	X	X
Moderately resistant (MR)	✓	✓	✓	✓	X	X
Highly resistant (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

ลักษณะของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides*
ที่ต้านทานสารคาร์เบนดาซิม

คาร์เบนดาซิมได้ > 500 mg/l จำนวน 95 โยโซเลท และระดับอ่อนแอ (S) ซึ่งเจริญได้บนอาหารผสมคาร์เบนดาซิมได้ ≤ 1 mg/l จำนวน 5 โยโซเลท (ภาพที่ 2) ในการทดลองครั้งนี้ไม่พบเชื้อราที่ต้านทานระดับปานกลาง (MR) และระดับต่ำ (WR) และเมื่อตรวจหาลักษณะเส้นใยเชื้อราสายพันธุ์ S และ HR ที่เลี้ยงบนอาหาร PDA และ

PDA ผสมคาร์เบนดาซิมที่ 500 mg/l ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ขยาย 400 เท่า โดยวิธี slide culture พบลักษณะเส้นใยของเชื้อราทั้งสองสายพันธุ์ที่เลี้ยงบนอาหาร PDA และ เชื้อราสายพันธุ์ HR ที่เลี้ยงบนอาหาร PDA ผสม คาร์เบนดาซิมที่ 500 mg/l มีลักษณะเส้นใยไม่แตกต่างกัน ส่วนเชื้อราสายพันธุ์ S ที่เลี้ยง

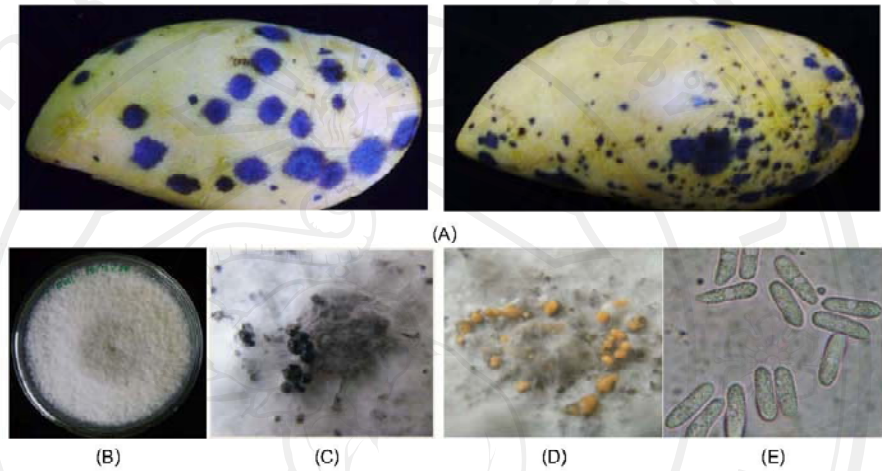


Figure 1 Morphological characteristics of *Colletotrichum gloeosporioides* Isolates causing mango anthracnose disease; (A) anthracnose symptom on fruits, (B) Colony growth on potato dextrose agar for 10 days, (C) sclerotia, (D) slimy spore mass, (E) conidia (X100).

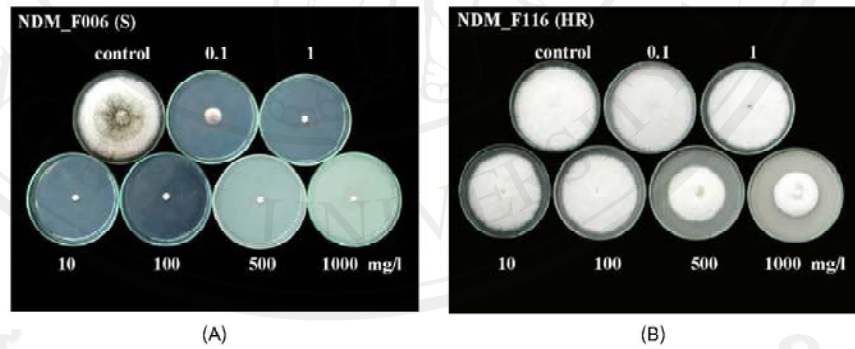


Figure 2 Carbendazim-resistance assays of *Colletotrichum gloeosporioides* causing mango anthracnose on potato dextrose agar supplemented with carbendazim at control (0), 0.1, 1, 10, 100, 500, and 1,000 mg/l; (A) Sensitive (S) phenotype. (B) Highly-resistant (HR) phenotype.

บนอาหาร PDA ผสมคาร์เบนดาซิมที่ 500 mg/l ไม่พบการรุกรานเส้นใย (ภาพที่ 3)

3. เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอและวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ตรงตำแหน่งยีนเบต้าทูบูลิน จากการศึกษาระดับความต้านทานต่อสารคาร์เบนดาซิมที่ระดับพันธุกรรม (genetic mutation) โดยเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอตรงตำแหน่งบางส่วนของยีน *TUB2* ของเชื้อรา *C. gloeosporioides* ด้วยเทคนิค PCR โดยสุ่มตัวอย่างเชื้อรากลุ่ม HR จำนวน 20 ไอโซเลท และเชื้อรากลุ่ม S จำนวน 5 ไอโซเลท เมื่อตรวจสอบผลปฏิกิริยาโดยวิธี gel electrophoresis พบแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 474 คู่เบส เมื่อนำไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ และแปลรหัสเป็นกรดอะมิโน เพื่อหาการเปลี่ยนแปลงเฉพาะจุดพบการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนในตรงตำแหน่ง 139, 149, 151, 156, 176, 194 และ 198 โดยเฉพาะการเปลี่ยนแปลงตรงตำแหน่ง codon 198 ของเชื้อรากลุ่มต้านทานระดับสูง (HR) มีความสัมพันธ์กับตัวอย่างเชื้อรากลุ่ม HR ทุก ไอโซเลท ในขณะที่ตรงตำแหน่งนี้ของเชื้อรากลุ่ม S ไม่เปลี่ยนแปลง กล่าวคือเกิดการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนจาก glutamic acid (E; GAG) ถูกแทนที่ด้วย alanine (A; GCG) บน codon ดังกล่าว (ภาพที่ 4)

วิจารณ์ผล

จากการประเมินระดับความต้านทานของเชื้อรา *C. gloeosporioides* ต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิม พบเชื้อราที่ต้านทานต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิมในระดับสูง (HR) จำนวน 95 % จากผลการทดลองนี้จึงแสดงการกลายพันธุ์ในระดับ phenotypic mutation ปังซึ่งว่ามีเชื้อราเกิดการปรับตัวเองเพื่อความอยู่รอดและเกิดการต้านทานต่อสารเคมีดังกล่าวฝังอยู่ในธรรมชาติขึ้นแล้ว เพราะพบเชื้อรากลุ่ม HR ที่สามารถเจริญได้ดีบนอาหาร PDA ที่ผสมสารคาร์เบนดาซิมที่ระดับความเข้มข้น ≥ 500 mg/l ซึ่งเป็นระดับความเข้มข้นในอัตราแนะนำ และมากกว่าอัตราแนะนำ โดยอาจเป็นผลมาจากการใช้สารเคมีป้องกันกำจัดโรคนี้มากเกินไปจนคัดรณำและใช้ติดต่อกันเป็นเวลานาน มีผลสอดคล้องกับรายงานของ Kumar et al. (2007) ที่ตรวจสอบความต้านทานต่อสารเคมีในกลุ่มเบนซิมิดาโซลของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. ในระดับ phenotype mutation พบเชื้อราดังกล่าวต้านทานต่อสารเคมีในกลุ่มเบนซิมิดาโซลอยู่ในระดับสูง

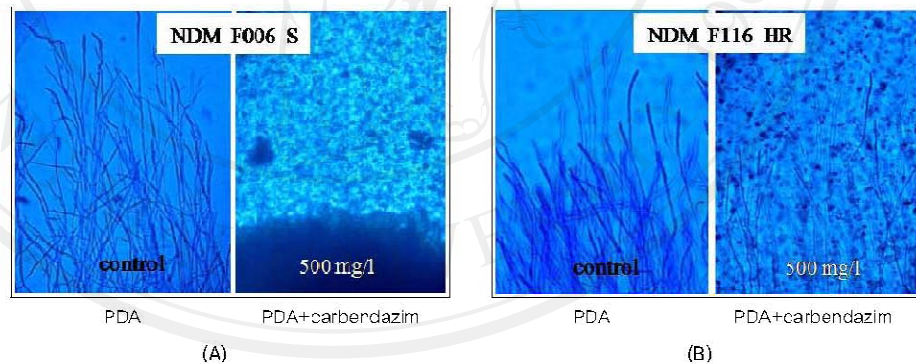


Figure 3 The mycelia (X40) of *Colletotrichum gloeosporioides* causing mango anthracnose on fruits between A) Sensitive (S) phenotype, (B) Highly-resistant (HR) phenotype on potato dextrose agar (PDA) and on PDA with carbendazim 500 mg/l.

จากการศึกษาความต้านทานต่อสารคาร์เบนดาซิมที่ระดับ genetic mutation โดยเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอตรงตำแหน่งบางส่วนของยีน *TUB2* ของเชื้อรา *C. gloeosporioides* ด้วยเทคนิค PCR โดยสุ่มตัวอย่างเชื้อรากลุ่ม HR และเชื้อรากลุ่ม S เมื่อนำไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ และแปลรหัสเป็นกรดอะมิโน เพื่อหาการเปลี่ยนแปลงเฉพาะจุด พบจุดกลายพันธุ์ (point mutation) ของกรดอะมิโนตรงตำแหน่ง codon 93 ของเชื้อรากลุ่ม HR กล่าวคือเกิดการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนจาก glutamic acid (E; GAG) ถูกแทนที่ด้วย alanine (A; GCG) บน codon ดังกล่าว ซึ่งอาจเป็นตัวบ่งชี้ว่าเชื้อรา *C. gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรกซ์ของผลมะม่วงเกิดการกลายพันธุ์ต้านทานต่อสารคาร์เบนดาซิม ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาค้นคว้าความต้านทานในกลุ่มเบนซิมิไดโกลของเชื้อรา *C. gloeosporioides* ที่เกิดจุดกลายพันธุ์ ตรงตำแหน่ง codon ที่ 198 โดยศึกษาจากต้น northern jointvech ในประเทศสหรัฐอเมริกา (B.Jhr and Dickman, 1994) โรค postbloom fruit drop ไร่ขิงส้ม ในรัฐฟลอริดา ประเทศสหรัฐอเมริกา และ เมืองเซา.ปาโต ประเทศบราซิล (Peres et al., 2004) โรคแอนแทรกซ์ในสจากไม้ผลต่างๆ ในประเทศญี่ปุ่น (Chung et al., 2006), โรคแอนแทรกซ์ในสของต้นสแตติส ในประเทศอิสราเอล (Maymon et al., 2006) โรคแอนแทรกซ์ในสของพริก และ สตรอเบอรี่ ในประเทศเกาหลี (Kim et al., 2007) และโรคแอนแทรกซ์ในสของมะม่วงในประเทศจีนตอนใต้ (Ru-Lin and Jun-Sheng, 2007) ซึ่งจากการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นในระดับพันธุกรรมนี้ เป็นตัวบ่งชี้ให้เห็นชัดเจนขึ้นว่าความต้านทานต่อสารเคมีดังกล่าวของเชื้อราสามารถถ่ายทอดสู่ลูกหลาน และเชื้อรากลุ่มที่กลายพันธุ์ต้านทานต่อสารเคมีที่กล่าวนี้ได้ปรากฏขึ้นแล้วในธรรมชาติ หรือแปลงปลูกของเกษตรกร และกำลังเพิ่มปริมาณขึ้นเรื่อยๆ เพราะฉะนั้นจำเป็นต้องแนะนำเกษตรกรให้ตระหนักถึงการใช้อย่างระมัดระวัง การกำจัดโรคพืชอย่างระมัดระวัง เพื่อป้องกันเชื้อราเกิดความต้านทานต่อสารเคมีที่กำลังเกิดขึ้น แสดงให้เห็นว่าจะต้องมีการจัดการอย่างระมัดระวัง เพื่อให้เกิดการควบคุม และป้องกันกำจัดเชื้อโรคเป้าหมาย

ให้มีประสิทธิภาพสูงสุด สำหรับการกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นนี้ ยังมีรายงานจาก Damicone and Smith (2009) ว่าสามารถสร้างความต้านทานข้าม (cross resistance) ได้ด้วย กล่าวคือ การที่เชื้อราสาเหตุโรคพืชสร้างความต้านทานต่อสารเคมีชนิดใดชนิดหนึ่งแล้ว ยังสามารถสร้างความต้านทานต่อสารเคมีชนิดอื่นที่อยู่ในกลุ่มเดียวกัน หรือคนละกลุ่มกันแต่มีกลไกการออกฤทธิ์เข้าทำลายเหมือนกันหรือคล้ายกัน ดังนั้นการศึกษาค้นคว้านี้ แสดงให้เห็นว่าเกิดเชื้อราสายพันธุ์ต้านทานต่อสารคาร์เบนดาซิมนั้น อาจจะเป็นต้นตอของเชื้อราชนิดอื่นในกลุ่มเบนซิมิไดโกลด้วย จึงจำเป็นต้องแนะนำเกษตรกรให้ลดความเสี่ยงนี้โดยใช้สารเคมีต่างกลุ่มสลับกัน หรือ ใช้หลักการจัดการศัตรูพืชแบบผสมผสานมาใช้ในแปลงปลูก (integrated pest management) (Prabakar et al., 2008; Singh et al., 2008; Damicone and Smith, 2009) อย่างไรก็ตาม การกลายพันธุ์ที่ต้านทานต่อสารเคมีนั้น อาจเกิดขึ้นเพียงอย่างเดียว หรือหลายยีน ซึ่งการกลายพันธุ์ของยีนอาจเกิดขึ้นจำเพาะตำแหน่งเดียว หรือเกิดขึ้นหลายตำแหน่ง จึงต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป

สรุป

จากการแยกเชื้อรา *C. gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรกซ์ในสของผลมะม่วง และการประเมินระดับความต้านทานต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิม พบว่าเชื้อรามีความต้านทานระดับสูง (HR) ซึ่งเจริญได้บนอาหารผสม คาร์เบนดาซิมได้ ≥ 500 mg/l จำนวน 95 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างเชื้อราเพื่อเพิ่มปริมาณตรงตำแหน่งบางส่วนของยีนเบต้าทูบูลิน (*TUB2*) ด้วยเทคนิค PCR ได้แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 174 คู่เบส และเมื่อวิเคราะห์หาลำดับกรดอะมิโนเปรียบเทียบกับ *C. gloeosporioides* f. sp. *aeschynomene* (accession no. U11138) พบการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนตรงตำแหน่ง codon 93 ของเชื้อรากลุ่ม HR จาก glutamic acid (E) ของเชื้อรากลุ่ม S เป็น alanine (A)

code	Phenotype	Target site codon 190 ⁽²⁾
U14138 ⁽¹⁾	wild type	NGCLLSKIREEFFDRMMATFSVVESEPKYSDTWVEFYNAQLSVHQLVNSDDETFCEINEA
1 F003	S	NGCLLSKIREEFFDRMMATFSVVESEPKYSDTWVEFYNAQLSVHQLVNSDDETFCEINEA
2 F005	S	NGCLLSKIREEFFDRMMATFSVVESEPKYSDTWVEFYNAQLSVHQLVNSDDETFCEINEA
3 F102	S	NGCLLSKIREEFFDRMMATFSVVESEPKYSDTWVEFYNAQLSVHQLVNSDDETFCEINEA
4 F119	S	NGCLLSKIREEFFDRMMATFSVVESEPKYSDTWVEFYNAQLSVHQLVNSDDETFCEINEA
5 F125	S	NGCLLSKIREEFFDRMMATFSVVESEPKYSDTWVEFYNAQLSVHQLVNSDDETFCEINEA
6 F002	HR	NGCLLSKIREEFFDRMMATFSVVESEPKYSDTWVEFYNAQLSVHQLVNSDDETFCEINEA
7 F012	HR	NGCLLSKIREEFFDRMMATFSVVESEPKYSDTWVEFYNAQLSVHQLVNSDDETFCEINEA
8 F014	HR	NGCLLSKIREEFFDRMMATFSVVESEPKYSDTWVEFYNAQLSVHQLVNSDDETFCEINEA
9 F019	HR	NGCLLSKIREEFFDRMMATFSVVESEPKYSDTWVEFYNAQLSVHQLVNSDDETFCEINEA
10 F025	HR	NGCLLSKIREEFFDRMMATFSVVESEPKYSDTWVEFYNAQLSVHQLVNSDDETFCEINEA
11 F027	HR	NGCLLSKIREEFFDRMMATFSVVESEPKYSDTWVEFYNAQLSVHQLVNSDDETFCEINEA
12 F033	HR	NGCLLSKIREEFFDRMMATFSVVESEPKYSDTWVEFYNAQLSVHQLVNSDDETFCEINEA
13 F061	HR	NGCLLSKIREEFFDRMMATFSVVESEPKYSDTWVEFYNAQLSVHQLVNSDDETFCEINEA
14 F066	HR	NGCLLSKIREEFFDRMMATFSVVESEPKYSDTWVEFYNAQLSVHQLVNSDDETFCEINEA
15 F075	HR	NGCLLSKIREEFFDRMMATFSVVESEPKYSDTWVEFYNAQLSVHQLVNSDDETFCEINEA
16 F095	HR	NGCLLSKIREEFFDRMMATFSVVESEPKYSDTWVEFYNAQLSVHQLVNSDDETFCEINEA
17 F103	HR	NGCLLSKIREEFFDRMMATFSVVESEPKYSDTWVEFYNAQLSVHQLVNSDDETFCEINEA
18 F105	HR	NGCLLSKIREEFFDRMMATFSVVESEPKYSDTWVEFYNAQLSVHQLVNSDDETFCEINEA
19 F110	HR	NGCLLSKIREEFFDRMMATFSVVESEPKYSDTWVEFYNAQLSVHQLVNSDDETFCEINEA
20 F114	HR	NGCLLSKIREEFFDRMMATFSVVESEPKYSDTWVEFYNAQLSVHQLVNSDDETFCEINEA
21 F115	HR	NGCLLSKIREEFFDRMMATFSVVESEPKYSDTWVEFYNAQLSVHQLVNSDDETFCEINEA
22 F130	HR	NGCLLSKIREEFFDRMMATFSVVESEPKYSDTWVEFYNAQLSVHQLVNSDDETFCEINEA
23 F131	HR	NGCLLSKIREEFFDRMMATFSVVESEPKYSDTWVEFYNAQLSVHQLVNSDDETFCEINEA
24 F135	HR	NGCLLSKIREEFFDRMMATFSVVESEPKYSDTWVEFYNAQLSVHQLVNSDDETFCEINEA
25 F146	HR	NGCLLSKIREEFFDRMMATFSVVESEPKYSDTWVEFYNAQLSVHQLVNSDDETFCEINEA

code	Phenotype	Target site codon 190 ⁽²⁾
U:4138 ⁽¹⁾	wild type	LYDCMRTLKLSNPSYGLDNHLVSAVMSGVTTCLRFPGQLNSDLRKLAVNMVFPRLHFF
1 F003	S	LYDCMRTLKLSNPSYGLDNHLVSAVMSGVTTCLRFPGQLNSDLRKLAVNMVFPRLHFF
2 F005	S	LYDCMRTLKLSNPSYGLDNHLVSAVMSGVTTCLRFPGQLNSDLRKLAVNMVFPRLHFF
3 F102	S	LYDCMRTLKLSNPSYGLDNHLVSAVMSGVTTCLRFPGQLNSDLRKLAVNMVFPRLHFF
4 F119	S	LYDCMRTLKLSNPSYGLDNHLVSAVMSGVTTCLRFPGQLNSDLRKLAVNMVFPRLHFF
5 F125	S	LYDCMRTLKLSNPSYGLDNHLVSAVMSGVTTCLRFPGQLNSDLRKLAVNMVFPRLHFF
6 F002	HR	LYDCMRTLKLSNPSYGLDNHLVSAVMSGVTTCLRFPGQLNSDLRKLAVNMVFPRLHFF
7 F012	HR	LYDCMRTLKLSNPSYGLDNHLVSAVMSGVTTCLRFPGQLNSDLRKLAVNMVFPRLHFF
8 F014	HR	LYDCMRTLKLSNPSYGLDNHLVSAVMSGVTTCLRFPGQLNSDLRKLAVNMVFPRLHFF
9 F019	HR	LYDCMRTLKLSNPSYGLDNHLVSAVMSGVTTCLRFPGQLNSDLRKLAVNMVFPRLHFF
10 F025	HR	LYDCMRTLKLSNPSYGLDNHLVSAVMSGVTTCLRFPGQLNSDLRKLAVNMVFPRLHFF
11 F027	HR	LYDCMRTLKLSNPSYGLDNHLVSAVMSGVTTCLRFPGQLNSDLRKLAVNMVFPRLHFF
12 F033	HR	LYDCMRTLKLSNPSYGLDNHLVSAVMSGVTTCLRFPGQLNSDLRKLAVNMVFPRLHFF
13 F061	HR	LYDCMRTLKLSNPSYGLDNHLVSAVMSGVTTCLRFPGQLNSDLRKLAVNMVFPRLHFF
14 F066	HR	LYDCMRTLKLSNPSYGLDNHLVSAVMSGVTTCLRFPGQLNSDLRKLAVNMVFPRLHFF
15 F076	HR	LYDCMRTLKLSNPSYGLDNHLVSAVMSGVTTCLRFPGQLNSDLRKLAVNMVFPRLHFF
16 F095	HR	LYDCMRTLKLSNPSYGLDNHLVSAVMSGVTTCLRFPGQLNSDLRKLAVNMVFPRLHFF
17 F103	HR	LYDCMRTLKLSNPSYGLDNHLVSAVMSGVTTCLRFPGQLNSDLRKLAVNMVFPRLHFF
20 F106	HR	LYDCMRTLKLSNPSYGLDNHLVSAVMSGVTTCLRFPGQLNSDLRKLAVNMVFPRLHFF
18 F110	HR	LYDCMRTLKLSNPSYGLDNHLVSAVMSGVTTCLRFPGQLNSDLRKLAVNMVFPRLHFF
19 F114	HR	LYDCMRTLKLSNPSYGLDNHLVSAVMSGVTTCLRFPGQLNSDLRKLAVNMVFPRLHFF
21 F115	HR	LYDCMRTLKLSNPSYGLDNHLVSAVMSGVTTCLRFPGQLNSDLRKLAVNMVFPRLHFF
22 F130	HR	LYDCMRTLKLSNPSYGLDNHLVSAVMSGVTTCLRFPGQLNSDLRKLAVNMVFPRLHFF
23 F131	HR	LYDCMRTLKLSNPSYGLDNHLVSAVMSGVTTCLRFPGQLNSDLRKLAVNMVFPRLHFF
24 F135	HR	LYDCMRTLKLSNPSYGLDNHLVSAVMSGVTTCLRFPGQLNSDLRKLAVNMVFPRLHFF
25 F146	HR	LYDCMRTLKLSNPSYGLDNHLVSAVMSGVTTCLRFPGQLNSDLRKLAVNMVFPRLHFF

Figure 4 Comparison of amino acids of *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *aeschyromene* a second beta-tubulin gene (⁽¹⁾accession no. U14138) at the target sites of benzimidazole between carbendazim-resistant *C. gloeosporioides* causing anthracnose on mango fruits (⁽²⁾Buhr and Dickman, 1994; Peres, et al., 2004).

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

คำขอบคุณ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนส่วนหนึ่ง จากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) และศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนา บัณฑิตศึกษา และวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ (AG-BIO/PERDÓ-CHE) และขอขอบพระคุณ Prof. Dr. Kazuya Akimitsu แห่งมหาวิทยาลัยคากาว่า ประเทศญี่ปุ่น ที่ให้ความอนุเคราะห์และสนับสนุนการวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ในการศึกษาครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

- เกียรติยศกร กาญจนพิสุทธิ์. 2547. คู่มือมะม่วง. เพ็ชรแพ้น พับลิชชิง, กรุงเทพฯ. 272 หน้า.
- Akem, C. N. 2006. Mango anthracnose disease: present status and future research priorities. *Plant Pathol. J.* 5: 266-273.
- Buhr, T. L., and M. B., Dickman. 1994. Isolation, characterization, and expression of a second β tubulin-encoding gene from *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *aeschynomene*. *Appl. and Environ. Microbiol.* 60: 1155-1159.
- 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 Dis.* 90: 506-512.
- Damicone, J., and D. Smith. 2009. Fungicide resistance management. (On-line). Oklahoma Cooperative Extension Fact Sheets. Available: <http://pods.dasnr.okstate.edu/docushare/dsweb/Get/Document-2317/F-7663web.pdf> (July 1, 2010).
- Deising, H. B., S. Reimann, and S. F. Pascholati. 2008. Mechanisms and significance of fungicide resistance. *Brazil. J. Microbiol.* 39: 286-295.
- 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. *Plant Pathol. J.* 23: 187-192.
- Koenraadt, H., S. C. Somerville, and A. L. Jones. 1992. Characterization of mutations in the beta-tubulin gene of benomyl-resistant field isolates of *Venturia inaequalis* and other plant pathogenic fungi. *Phytopathology* 82: 1318-1351.
- 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 Pathol. Bull.* 16: 157-160.
- 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.
- 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 stative (*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 Dis.* 88: 125-130.
- Prabakar, K., T. Raguchander, D. Saravanakumar, P. Mulhulakshmi, V. K. Parthiban, and V. Prakasam. 2008. Management of postharvest disease of mango anthracnose incited by *Colletotrichum gloeosporioides*. *Arch. Phytopathology Plant Protect.* 41: 333-339
- Ru-Lin, Z., and H. Jun-Sheng. 2007. Cloning of a carbendazim-resistance gene from *Colletotrichum gloeosporioides* of mango in South China. *Afr. J. Biotechnol.* 6: 143-147.
- Singh, S. B., . Mukherjee, J. Maisram, P. Kumar, M. Gopal, and G. Kulshrestha. 2008. Determination of pesticide residues in IPM and non-IPM sample of mango (*Mangifera indica*). *J. Environ. Sci. Health Part B.* 43: 300-305.
- Sutton, B. C. 1992. The genus *Glomerella* and its anamorph *Colletotrichum*. Pp. 1 – 27. In: *Colletotrichum: Biology, Pathology and Control*. J. A. Bailey, and M. J. Jeger, eds. CAB International, Wallingford, UK