

ความต้านทานสารเคมีแมนโคเซบของเชื้อ *Phytophthora palmivora* สาเหตุโรค ลำต้นเน่าและใบไหม้ของทุเรียนในแหล่งปลูกภาคตะวันออกของประเทศไทย

Mancozeb Resistance of *Phytophthora palmivora*, a Causal Agent of Stem Rot and Leaf Blight of Durian in Eastern Thailand

พัชรินทร์ เนียรวิชัย¹ วีระณีย์ ทองศรี^{1*} ณัฐสุดา ธาราบุตร¹ วริษา ศรีโสภา¹
กมลวรรณ สีฉาย¹ นภลภัส บุชบงก¹ ปฐวิภา สงกุมาร¹ และมณีนรัตน์ คูหาพิทักษ์ธรรม²
Patcharin Nianwichai¹, Veeranee Tongsri^{1*}, Nutsuda Tarabut¹, Warisa Srisopha¹,
Kamonwan Sichai¹, Noplapat Bussabong¹, Pattavipha Songkumarn¹ and Maneerat Koohapitagtam²

บทคัดย่อ

ภาคตะวันออกเป็นแหล่งปลูกทุเรียนที่สำคัญของประเทศไทย ในแหล่งปลูกมักพบการแพร่ระบาดของโรคโรครากเน่า ลำต้นเน่า และใบไหม้ที่มีสาเหตุจากเชื้อ *Phytophthora palmivora* อยู่เสมอ จึงทำให้เกิดการสูญเสียผลผลิตเป็นจำนวนมาก เป็นเหตุให้เกษตรกรมีการใช้สารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อสาเหตุชนิดเดิมต่อเนื่องเป็นเวลานาน ซึ่งอาจทำให้เชื้อสาเหตุโรคพัฒนาเกิดความต้านทานขึ้น งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบความสามารถในการก่อโรคของเชื้อสาเหตุโรคในทุเรียน จำแนกชนิดของเชื้อด้วยวิธีชีวโมเลกุล และศึกษาการตอบสนองของเชื้อ *P. palmivora* ต่อสารเคมีแมนโคเซบ โดยแยกเชื้อจากทุเรียนที่เป็นโรคราก 3 จังหวัด ได้แก่ จันทบุรี ระยอง และตราด พบเชื้อ *Phytophthora* spp. 40 ไอโซเลท โดยทุกไอโซเลทสามารถก่อโรคที่มีลักษณะใบไหม้คล้ายอาการชา น้ำ มีขนาดแผลตั้งแต่ 1 เซนติเมตรขึ้นไป เชื้อทุกไอโซเลทได้รับการยืนยันในระดับสปีชีส์โดยศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ว่าเป็น *P. palmivora* จากการทดสอบความต้านทานของเชื้อดังกล่าวต่อสารเคมีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่า 3 ไอโซเลทจาก 40 ไอโซเลท ได้แก่ CTT3, CTT4 และ RKT2 เกิดความต้านทานต่อสารเคมีแมนโคเซบ โดยมีค่า EC_{50} 103.4 – 109.86 ppm ซึ่งเป็นเชื้อที่ได้จากจังหวัดจันทบุรี และระยอง ในทำนองเดียวกันเมื่อทดสอบความต้านทานบนเนื้อเยื่อใบทุเรียน พบว่าตัวแทนไอโซเลทที่อ่อนแอต่อสารเคมีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ มีค่า EC_{50} 13.29 – 15.64 ppm ส่วนตัวแทนไอโซเลทที่ต้านทานต่อสารเคมีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ มีค่า EC_{50} >1000 ppm ซึ่งถูกจัดอยู่ในกลุ่มอ่อนแอและต้านทานต่อแมนโคเซบ ตามลำดับ เช่นเดียวกับบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ดังนั้นข้อมูลที่ได้จากงานวิจัยนี้จะเป็นประโยชน์ในการเลือกใช้สารเคมีกลุ่มอื่น เพื่อทดแทนสารเคมีในกลุ่ม Dithiocarbamate ในการควบคุมโรคของทุเรียนที่มีสาเหตุจากเชื้อ *P. palmivora* ในแหล่งปลูกภาคตะวันออกของประเทศไทยต่อไป

คำสำคัญ: ไฟทอปธอรา ทุเรียน ไตรโอคาร์บาเมต การตอบสนอง

Abstract

The eastern region is a vital cultivation area for durian production in Thailand. In planting areas, the outbreaks of root rot, stem rot and leaf blight caused by *Phytophthora palmivora* are persistent, and they cause a large number of yield losses. Since the growers have continued to use the same fungicides for a long period of time, the pathogens have

¹ ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ 10900

² บริษัท เรนคอตตอน จำกัด แขวงสามเสนนอก เขตห้วยขวาง กรุงเทพฯ 10310

¹ Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Kasetsart University, Bangkok 10900

² RAINCOTTON company limited, Huaykwang, Samsen Nok, Bangkok 10310

* Corresponding author, Email: fagrvtnt@ku.ac.th

developed fungicide resistance. This research aims to study the fungal pathogenicity, identify the pathogens using molecular techniques and investigate the pathogens resistant to mancozeb. The pathogens were isolated from diseased durian parts obtained from 3 provinces, Chanthaburi, Rayong and Trat. The results revealed that 40 isolates of *Phytophthora* spp. caused leaf blight-like water-soaked symptoms with more than 1 cm in size. All isolates of pathogens were confirmed based on nucleotide sequence in the ITS region as *P. palmivora*. The evaluation of fungicide resistance of the pathogens on culture media was found in 3 out of 40 isolates, including CTT3, CTT4 and RKT2 isolates that were resistant to mancozeb with the EC₅₀ values of 103.4 – 109.86 ppm. The resistant isolates were predominated in Chanthaburi and Rayong provinces. Additionally, in the resistance assay on durian leaf tissues, the mancozeb-sensitive and mancozeb-resistant isolates had the EC₅₀ values of 13.29 – 15.64 ppm and >1000 ppm, respectively. This phenomena were classified as the sensitivity type in the culture medium assay. Thus, the information from this study will be beneficial to choosing alternative fungicides for dithiocarbamate fungicide replacement in controlling *P. palmivora* diseases of durian in eastern Thailand.

Keywords: *Phytophthora*, durian, dithiocarbamate, sensitivity

คำนำ

แมนโคเซบ (Mancozeb) เป็นสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อราสาเหตุโรคพืชชนิดสัมผัส (contact fungicides) มีกลไกออกฤทธิ์แบบจุดจับจำเพาะหลายจุด (multi-site actions) จัดอยู่ในกลุ่มสารเคมี Dithiocarbamate โดยมีชนิดของสารเคมีที่อยู่ในกลุ่มเดียวกัน ได้แก่ มาเนบ (Maneb) ซิเนบ (Zineb) โพรพิเนบ (Propineb) และไธแรม (Thiram) เป็นต้น ซึ่งเป็นกลุ่มสารเคมีที่มีความเสี่ยงต่ำที่จะทำให้เชื้อราเกิดความต้านทาน อย่างไรก็ตาม Sijpesteijn (1984) รายงานว่า สารเคมีแมนโคเซบมีความเกี่ยวข้องกับการยับยั้งหมู่ sulphydryl ของกรดอะมิโนและเอนไซม์ภายในเซลล์ของเชื้อรา ซึ่งส่งผลกระทบต่อกระบวนการเมตาบอลิซึมของไขมันและการหายใจของเซลล์ โดยทั่วไปแล้ว สารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อราสาเหตุโรคในกลุ่ม Oomycetes มักเป็นสารเคมีเมทาแลกซิล (Metalaxyl) เนื่องจากเป็นสารเคมีที่มีกลไกยับยั้งการสังเคราะห์และการทำงานของเอนไซม์ RNA polymerase I ซึ่งออกฤทธิ์จำเพาะต่อเชื้อในกลุ่ม Oomycetes ได้ตรงจุดกว่าสารเคมีแมนโคเซบ แต่ด้วยเหตุที่สารเคมีเมทาแลกซิลเป็นสารที่มีความเสี่ยงสูงที่ทำให้เชื้อในกลุ่มดังกล่าวเกิดความต้านทานได้ง่าย (Wu et al., 2011; Kongtragoul et al., 2021; Chacón et al., 2022) สารเคมีแมนโคเซบจึงถูกนำมาใช้สลับกับสารเคมีเมทาแลกซิลเพื่อควบคุมโรคดังกล่าวอย่างต่อเนื่อง ซึ่งพบว่าสารเคมีแมนโคเซบมีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคที่เกิดจากเชื้อในกลุ่ม Oomycetes ได้ดีมาอย่างยาวนาน อาทิ โรคลำต้นเน่าของทุเรียน ส้ม อะโวคาโด ที่เกิดจากเชื้อ *Phytophthora palmivora* และ *P. cinnamomi* โรคใบไหม้ของมันฝรั่งและมะเขือเทศ ที่เกิดจากเชื้อ *P. infestans* (Ramírez-Gil et al., 2017; Chi et al., 2020; Ivanov et al., 2021) โรคคราบน้ำค้างของหอม ที่เกิดจากเชื้อ *Peronospora destructor* (Araújo et al., 2020) และโรคคราบน้ำค้างขององุ่น ที่เกิดจากเชื้อ *Plasmopara viticola* (Wong & Wilcox, 2001) ถึงแม้ว่าสารเคมีแมนโคเซบจะมีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคได้หลากหลาย แต่ก็พบว่ามีความไวต่อสารเคมีลดลง (Gullino et al., 2010) ดังเช่น เชื้อรา *Alternaria alternata* ที่เป็น

สาเหตุโรคใบไหม้ของมะเขือเทศ และยังทำให้เกิดความต้านทานข้าม (cross resistance) ต่อสารเคมีไซโปรไดนิล (Cyprodinil) และเทบูโคนาโซล (Tebuconazole) (Malandrakis et al., 2015) เช่นเดียวกับ Yang et al. (2019) รายงานว่า เชื้อรา *A. alternata* บางไอโซเลท เกิดความต้านทานต่อสารเคมีแมนโคเซบ และสามารถเกิดความต้านทานต่อสารเคมีไดฟีโนโคนาโซล (Difenoconazole) ซึ่งความต้านทานข้ามนี้จะส่งผลกระทบต่อการใช้สารเคมีอีกชนิดหนึ่งเป็นอย่างมาก เนื่องจากจะเป็นการส่งเสริมให้เชื้อราสาเหตุโรครีโอกาสด้านทานต่อสารเคมีชนิดอื่น ๆ ที่ใช้ร่วมหรือใช้สลับกับแมนโคเซบได้ จึงทำให้ไม่สามารถควบคุมการระบาดของโรคได้ นอกจากนี้ยังพบการรายงานว่าการระบาดของเชื้อรา *Colletotrichum acutatum* สาเหตุโรคผลเน่าของแอปเปิ้ลเกิดความต้านทานสูงต่อสารเคมีแมนโคเซบร้อยละ 25 และมีความต้านทานปานกลางร้อยละ 50 ของไอโซเลทที่นำมาทดสอบทั้งหมด (Moreira et al., 2019) และเนื่องจากแมนโคเซบเป็นสารเคมีที่ทำให้เชื้อราพัฒนาความต้านทานได้ต่ำ จึงทำให้ในงานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาความต้านทานสารเคมีแมนโคเซบของเชื้อ *P. palmivora* สาเหตุโรคลำต้นเน่าและใบไหม้ของทุเรียนในแหล่งปลูกทั้ง 3 จังหวัดของภาคตะวันออกของประเทศไทย ได้แก่ จังหวัดจันทบุรี ระยอง และตราด ซึ่งเป็นแหล่งปลูกที่มีการใช้สารเคมีแมนโคเซบอย่างต่อเนื่อง และยังไม่มีรายงานถึงความต้านทานของเชื้อชนิดนี้ต่อสารเคมีดังกล่าว เพื่อประเมินประสิทธิภาพของสารเคมีแมนโคเซบในการควบคุมโรค และเป็นแนวทางในการเลือกใช้สารเคมีที่เหมาะสมและมีประสิทธิภาพต่อการจัดการโรคของทุเรียนที่เกิดจากเชื้อ *P. palmivora* ที่เป็นปัจจุบันต่อไป

วิธีการศึกษา

1. เก็บตัวอย่างทุเรียนที่เป็นโรค แยกเชื้อบริสุทธิ์และพิสูจน์การก่อโรค

เก็บตัวอย่างทุเรียนที่เป็นโรคจากแหล่งปลูกภาคตะวันออก 3 จังหวัด ได้แก่ จันทบุรี ระยอง และตราด โดยสุ่มเก็บตัวอย่างโรคที่เกิดจากเชื้อ *P. palmivora* เช่น อาการลำต้นและกิ่งเน่า ยอดเน่าและใบไหม้ จังหวัดละ 2-3 แปลง (Table 1) นำตัวอย่างพืชที่เป็นโรคมานำแยกเชื้อด้วยวิธี tissue transplanting โดยตัดเนื้อเยื่อบริเวณรอยต่อระหว่างผลและเนื้อเยื่อปกติให้ได้ขนาดประมาณ 0.5×0.5 เซนติเมตร ฆ่าเชื้อบริเวณพื้นผิวรอบนอกด้วย 10% Clorox® เป็นเวลา 5-7 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 2 ครั้ง ผึ่งให้แห้งในสภาพปลอดเชื้อ นำชิ้นส่วนพืชวางบนอาหารจำเพาะ carrot agar (แครอท 200 กรัมและวุ้น 15 กรัมต่อลิตร) ซึ่งประกอบด้วย pentachloronitrobenzene 100 ppm, pimarin 10 ppm, ampicillin 200 ppm, vancomycin 100 ppm, nystatin 25 ppm และ hymexazol 40 ppm (ดัดแปลงจาก Jeffers & Martin, 1986) บ่มที่อุณหภูมิห้อง (25-30 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 2-4 วัน ใช้เข็มเย็บตัดปลายเส้นใยของเชื้อย้ายไปวางบนอาหาร half potato dextrose agar (half PDA) และแยกเชื้อให้บริสุทธิ์โดยใช้เทคนิค hyphal tip เก็บเชื้อไว้ในหลอดอาหารเอียง (slant agar) เพื่อนำไปทดสอบการก่อโรคด้วยวิธี detached leaf โดยตัดใบทุเรียนในระยะเพสลาดและนำมาล้างให้สะอาด ผึ่งให้แห้ง และปลูกเชื้อที่แยกได้ในแต่ละไอโซเลท โดยตัดบริเวณขอบโคโลนีของเชื้อโดยใช้ cork borer ให้ชิ้นวุ้นมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.6 เซนติเมตร ย้ายชิ้นวุ้นปลูกบนใบทุเรียนที่ทำแผลใบละ 3 จุด วางแผนการทดลองแบบ CRD จำนวน 5 ซ้ำ บ่มใบทุเรียนที่ปลูกเชื้อแล้วในกล่องพลาสติกชั้นที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 วัน บันทึกขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางและลักษณะอาการของแผลที่ปรากฏ ประเมินระดับความรุนแรงของโรค โดยให้คะแนน 4 ระดับ ได้แก่ - = ไม่เกิดแผล, + = แผลมีเส้นผ่านศูนย์กลาง <1 เซนติเมตร, ++ = แผลมีเส้นผ่านศูนย์กลาง 1-2 เซนติเมตร และ +++ = แผลมีเส้นผ่านศูนย์กลาง >2 เซนติเมตร จากนั้นคัดเลือกไอโซเลทที่ก่อโรคไว้ศึกษาในขั้นตอนต่อไป

Table 1 Diseased parts of ‘Mon Thong’ durians collected from growing areas of eastern Thailand, Chanthaburi, Rayong and Trat provinces

Fungal isolates	Diseased parts	Location
CKKB1, CKKB2	Branches	Khao Khitchakut District, Chanthaburi Province
CKKL1, CKKL2, CKKL3, CKKL4, CKKL5, CKKL6	Leaves	Khao Khitchakut District, Chanthaburi Province
CKLB1, CKLL1, CKLT1	Leaves	Khlung District, Chanthaburi Province
CTT1, CTT2, CTT2-1, CTT3, CTT4	Trunks	Tha Mai District, Chanthaburi Province
RKT1, RKT2	Trunks	Klaeng District, Rayong Province
RWL1, RWL2	Leaves	Wang Chan District, Rayong Province
RWT1, RWT2, RWT3	Trunks	Wang Chan District, Rayong Province
TBA1, TBA2	Shoots	Bo Rai District, Trat Province
TBL1, TBL2, TBL3	Leaves	Bo Rai District, Trat Province
TBT1	Trunk	Bo Rai District, Trat Province
TKT1, TKT2, TKT3	Trunks	Khao Saming District, Trat Province
TKL1, TKL2, TKL3	Leaves	Khao Saming District, Trat Province
TMB1	Branch	Mueang District, Trat Province
TML1, TML2, TML3, TML4	Leaves	Mueang District, Trat Province

2. สกัด DNA และตรวจสอบสปีชีส์ของเชื้อสาเหตุโรค

นำเชื้อที่แยกได้แต่ละไอโซเลทมาเลี้ยงบนอาหาร half PDA เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นนำไปเลี้ยงในอาหารเหลวของ half potato dextrose broth (half PDB) เป็นเวลา 3 วันบนเครื่องเขย่า 240 รอบต่อนาที นำเส้นใยมาสกัด DNA ด้วยวิธี CTAB (ดัดแปลงจาก Doyle & Doyle., 1987) โดยนำเส้นใยของเชื้อจำนวน 100 มิลลิกรัมใส่ในหลอดขนาด 2 มิลลิลิตร ใส่ลูกเหล็กขนาด 4 มิลลิเมตร จำนวน 3 ลูกต่อหลอด แล้วจึงเติม CTAB buffer [2% CTAB, 1.4M NaCl, 100mM Tris (pH 8.0), 20mM EDTA, 2% PVP polyvinylpyrrolidone, 0.2% Beta mercaptoethanol] 600 ไมโครลิตร บดเส้นใยให้ละเอียดด้วยเครื่องตีเส้นใยเป็นเวลา 3 นาที นำไปปั่นที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 30 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10000 rpm เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนใส 500 ไมโครลิตรใส่ในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม Chloroform : Isoamyl alcohol (24:1) 500 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10000 rpm เป็นเวลา 2 นาที ดูดส่วนใส 350 ไมโครลิตรใส่ในหลอดใหม่ เติม Chloroform : Isoamyl alcohol (24:1) 240 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปปั่นเหวี่ยงเป็นเวลา 2 นาที ดูดส่วนใส 200 ไมโครลิตรใส่ในหลอดใหม่ เติม isopropanol 200 ไมโครลิตร และ (1:10) 3M Sodium Acetate (pH 5.2) 20 ไมโครลิตร นำไปปั่นที่ -20°C เป็นเวลา 15 นาที นำไปปั่นเหวี่ยง 10 นาที เทส่วนใสทิ้ง เติม 70% ethanol 200 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12000 rpm 10 นาที เทส่วนใสทิ้ง ตากตะกอน DNA ให้แห้งเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ละลายตะกอน DNA ด้วย Nuclease-free water (Omega Bio-tek, Norcross, Georgia) จากนั้นนำ DNA ที่ได้ไปวัดปริมาณและคุณภาพด้วยเครื่อง BioDrop (Biodrop Ltd.,

Cambridge, United Kingdom) และเก็บสารละลาย DNA ที่ -20°C จากนั้นทำการเพิ่มปริมาณ DNA เพื่อตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS (Internal transcribed spacer region) โดยใช้เทคนิค Polymerase chain reaction (PCR) ในปฏิกิริยาประกอบด้วย 375 ng/ μL DNA template, 1X FIREPol[®] Master Mix (Solis BioDyne, Tartu, Estonia), forward และ reverse primer ได้แก่ 0.1 μM forward primer ITS5 (5'-GGAAGTAAAGTCGTAACAAGG-3') และ 0.1 μM reverse primer ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') จากนั้นนำเข้าเครื่อง PCR โดยตั้งค่าดังนี้ initial denaturation 94°C 5 นาที, ตามด้วย 30 รอบ ของ denaturation 94°C 1 นาที, annealing 48°C 1 นาที, extension 72°C 1 นาที และ final extension 72°C 5 นาที เมื่อสิ้นสุดปฏิกิริยานำผลผลิตพีซีอาร์มาวิเคราะห์โดยวิธี Agarose gel electrophoresis ใน 1% Agarose gel ใน 0.5X TBE buffer ผสม RedSafe[™] (iNtRON Bio, Korea) โดยใช้ความต่างศักย์ 120 โวลต์ 30 นาที ตรวจสอบชิ้น DNA ภายใต้แสง UV ซึ่งจะปรากฏแถบ DNA ขนาดประมาณ 754-834 คู่เบส นำผลผลิตพีซีอาร์ส่งบริษัท U2Bio (Thailand) Co., Ltd (Bangkok, Thailand) เพื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยวิธี BT sequencing และนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลใน GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) โดยใช้ Nucleotide BLAST ในฐานข้อมูล NCBI เพื่อยืนยันเชื่อในระดับสปีชีส์

3. ทดสอบความต้านทานของเชื้อสาเหตุโรคต่อสารเคมีแมนโคเซบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

ทดสอบความต้านทานของเชื้อต่อสารเคมีด้วยวิธี poisoned food โดยเลี้ยงเชื้อสาเหตุโรคบนอาหาร half PDA ที่มีส่วนผสมของสารเคมีแมนโคเซที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน (0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 และ 90 ppm) ตัดขอบโคโลนีของเชื้อด้วย cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.6 เซนติเมตร วางชิ้นส่วนของเชื้อที่กึ่งกลางจานโดยคว่ำด้านที่มีเส้นใยลงบนผิวหน้าอาหาร บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 6 วัน บันทึกเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อทดสอบ และคำนวณเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเจริญของเชื้อในแต่ละความเข้มข้นเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (ใช้น้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อแทนสารเคมี) โดยใช้สูตร เปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบ = (เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อทดสอบในชุดควบคุม - เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อทดสอบบนอาหารผสมสารเคมี / เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อทดสอบในชุดควบคุม) $\times$ 100 จากนั้นคำนวณความเข้มข้นของสารเคมีแต่ละชนิดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ 50% (half maximal effective concentration; EC_{50}) โดยใช้สมการลอการิทึมของความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารเคมีและเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเจริญของเชื้อ ($y = a \times \ln(x) + b$) เพื่อประเมินความต้านทานของเชื้อทดสอบต่อสารเคมี (Lu et al., 2010) โดยแบ่งกลุ่มการตอบสนองของเชื้อต่อสารเคมีเป็น 2 กลุ่ม คือ อ่อนแอ (sensitive, S) = $\text{EC}_{50} \leq 100$ ppm และต้านทาน (resistant, R) = $\text{EC}_{50} > 100$ ppm (ดัดแปลงจาก Malandrakis et al., 2015)

4. ทดสอบความต้านทานของเชื้อสาเหตุโรคต่อสารเคมีแมนโคเซบนเนื้อเยื่อพืช

ตัดใบทุเรียนพันธุ์หมอนทองในระยะเฟสลาดจากต้นกล้าที่อายุ 10 เดือน จุ่มใบในสารละลาย 10% Clorox[®] เป็นเวลา 5 นาทีเพื่อฆ่าเชื้อบริเวณผิวรอบนอก ล้างด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง ผึ่งให้แห้ง ตัดใบทุเรียนให้ได้พื้นที่ 2 ตารางเซนติเมตร ทำแผลโดยใช้เข็มเจาะ 1 แผลบริเวณกลางชิ้นใบ วางชิ้นใบทุเรียนให้ลอยบนสารเคมีแมนโคเซที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน (0, 0.1, 1, 10, 100, 500, 1000 และ 3000 ppm) ที่บรรจุอยู่ในจานทดลองปริมาตร 25 มิลลิลิตรต่อจาน (ดัดแปลงจากวิธีการของ Zhao et al., 2013) หยดสารแขวนลอย sporangium ของตัวแทนไอโซเลทกลุ่มละ 2 ไอโซเลทที่คัดเลือกจากเชื้อที่อ่อนแอ (ไอโซเลท CKKL1 และ TML2) และต้านทาน (ไอโซเลท CTT3 และ CTT4) ต่อสารเคมีแมนโคเซในข้อ 3. ที่ความเข้มข้น 1×10^5 sporangia / มิลลิลิตร ปริมาตร 20 ไมโครลิตรลงบนแผล บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4 วัน บันทึกความรุนแรงของโรค โดยประเมินเปอร์เซ็นต์พื้นที่ที่แสดงอาการของโรค (อาการช้ำสีน้ำตาล) และคำนวณเปอร์เซ็นต์ยับยั้ง

ความรุนแรงของโรคเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (ใช้น้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อแทนสารเคมี) โดยใช้สูตร เปอร์เซ็นต์ยับยั้งความรุนแรงของโรค = $(\text{เปอร์เซ็นต์ความรุนแรงของโรคในชุดควบคุม} - \text{เปอร์เซ็นต์ความรุนแรงของโรคบนสารเคมี} / \text{เปอร์เซ็นต์ความรุนแรงของโรคในชุดควบคุม}) \times 100$ คำนวณค่า EC_{50} โดยใช้สมการลอการิทึมของความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารเคมีและเปอร์เซ็นต์ยับยั้งความรุนแรงของโรค ($y = a \times \ln(x) + b$)

ผลการศึกษาและวิจารณ์

1. เก็บตัวอย่างทุเรียนที่เป็นโรค แยกเชื้อบริสุทธิ์และพิสูจน์การก่อโรค

จากการแยกเชื้อจากตัวอย่างทุเรียนที่เป็นโรคที่เก็บมาจากแหล่งปลูกภาคตะวันออกทั้ง 3 จังหวัด ได้แก่ จันทบุรี ระยอง และตราด พบว่า เชื้อทั้ง 40 ไอโซเลทที่แยกได้จากส่วนต่าง ๆ ของทุเรียนที่เป็นโรค (Table 1) มีลักษณะโคโลนีเป็นสีขาว เส้นใยฟูเล็กน้อยและมีการเจริญเป็นชั้นบนอาหาร half PDA ส่วน sporangia มีรูปร่างคล้ายผลแพร์ (pear shape) โดยบริเวณส่วนปลาย มี papilla และบริเวณฐานมน ภายใน sporangia บรรจุด้วย zoospore ซึ่งเป็นสปอร์ในระยะสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ (Figure 1) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Prommate et al. (2019) และ Suzui et al. (1979) ที่รายงานว่าลักษณะสัณฐานของเชื้อดังกล่าวถูกระบุเป็นเชื้อ *Phytophthora* spp.

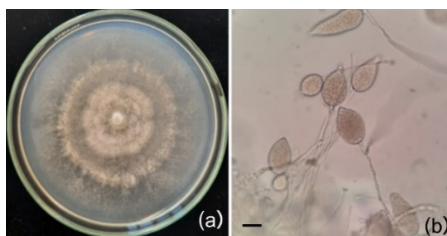


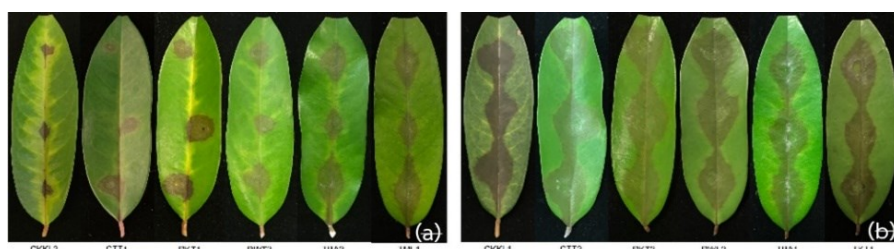
Figure 1 Colony characteristics of a representative isolate of *Phytophthora* sp. obtained from a diseased durian part on half PDA incubated at 25°C for 10 days (a) and sporangium shapes (b), scale bar = 20 μm .

จากการนำเชื้อ *Phytophthora* spp. ทั้ง 40 ไอโซเลทที่แยกได้ มาทดสอบความสามารถในการก่อโรคบนใบทุเรียนพันธุ์หมอนทองด้วยวิธี detached leaf พบว่าทุกไอโซเลทสามารถก่อโรคได้ โดยเริ่มปรากฏอาการช้ำน้ำที่ 2 วันหลังการปลูกเชื้อ ซึ่งต่อมาขยายลามเป็นแผลสีน้ำตาลขนาดใหญ่ ไอโซเลทส่วนใหญ่จำนวน 32 ไอโซเลทจาก 40 ไอโซเลทก่อให้เกิดแผลมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางมากกว่า 2 เซนติเมตร (Table 2, Figure 2) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Koochapitagtam (2018) ที่กล่าวว่าเชื้อ *Phytophthora* spp. ที่แยกได้จากทุเรียนในแหล่งปลูกภาคตะวันออกจำนวน 15 ไอโซเลท สามารถก่อให้เกิดโรคบนใบทุเรียนพันธุ์หมอนทองได้เช่นเดียวกัน

Table 2 Isolates of *Phytophthora* spp. causing blight symptoms on ‘Mon Thong’ durian leaves obtained from artificial inoculation after 5 days of incubation.

Isolates of <i>Phytophthora</i> spp.	Disease severity ^{1/}
CKKL2, CKKL5, CTT1, RKT1, RWT1, RWT3, TBA2, TML1	++
CKKB1, CKKB2, CKKL1, CKKL3, CKKL4, CKKL6, CKLB1, CKLL1, CKLT1, CTT2, CTT2-1, CTT3, CTT4, RKT2, RWL1, RWL2, RWT2, TBA1, TBL1, TBL2, TBL3, TBT1, TKL1, TKL2, TKL3, TKT1, TKT2, TKT3, TMB1, TML2, TML3, TML4	+++

^{1/} + = lesion size <1 cm, ++ = lesion size 1–2 cm, +++ = lesion size >2 cm.

**Figure 2** Pathogenicity tests of *Phytophthora* spp. causing blight symptoms on ‘Mon Thong’ durian leaves obtained from artificial inoculation after 5 days of incubation, lesion size 1–2 cm (a) and lesion size >2 cm (b).

2. การระบุชนิดของเชื้อสาเหตุด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS

จากการตรวจสอบชนิด (species) ของเชื้อทั้ง 40 ไอโซเลทที่แยกได้จากต้นทุเรียนที่เป็นโรคโดยเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS กับฐานข้อมูลใน GenBank พบว่า ทุกไอโซเลทแสดงค่าความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์เท่ากับ 100% กับเชื้อ *P. palmivora* isolate Pp43-Wera-leaf (GenBank accession number KP183963) ที่เป็นสาเหตุโรคที่แยกได้จากทุเรียนในประเทศอินโดนีเซีย ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Kongtragoul et al. (2021) ที่เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS และ 5.8S rDNA พบว่าเชื้อที่เป็นสาเหตุโรคลำต้นเน่าและผลเน่าของทุเรียนในภาคใต้ของประเทศไทยจำนวน 17 ไอโซเลทจากทั้งหมด 20 ไอโซเลทถูกระบุชนิดเป็น *P. palmivora* เช่นเดียวกัน

3. ทดสอบความต้านทานของเชื้อต่อสารเคมีแมนโคเซบบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

จากการทดสอบความต้านทานของเชื้อ *P. palmivora* ทั้ง 40 ไอโซเลทต่อสารเคมีแมนโคเซบบนอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่ามีค่า EC_{50} ตั้งแต่ <10 – 109.86 ppm ซึ่งสามารถแบ่งเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มอ่อนแอ (S; $EC_{50} \leq 100$ ppm) มี 37 ไอโซเลท โดยมีค่า EC_{50} <10 – 93.21 ppm และกลุ่มต้านทาน (R; $EC_{50} > 100$ ppm) มี 3 ไอโซเลท คือ CTT3, CTT4 และ RKT2 โดยมีค่า EC_{50} 103.4, 106.53 และ 109.86 ppm ตามลำดับ ซึ่งเป็นเชื้อที่แยกได้จากแหล่งปลูกในอำเภอแกลง จังหวัดระยอง และอำเภอท่าใหม่ จังหวัดจันทบุรี (Figure 3) แมนโคเซบเป็นสารเคมีที่มีกลไกการออกฤทธิ์แบบจุดจับจำเพาะหลายจุด จึงส่งผลให้เชื้อราและสิ่งมีชีวิตคล้าย

ราที่เป็นสาเหตุโรครมีความเสี่ยงต่อการเกิดความต้านทานต่อสารเคมี (FRAC, 2022) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Rekanović et al. (2012) ที่พบว่าเชื้อ *P. infestans* จำนวน 12 ไอโซเลทมีความไว (sensitive) ต่อสารเคมีแมนโคเซบ โดยมีค่า EC_{50} 3.9 – 5 ppm เช่นเดียวกับการรายงานของ Puig et al. (2021) ที่พบว่าเชื้อ *P. palmivora* จากโกโก้ จำนวน 7 ไอโซเลท มีความไวต่อสารเคมีแมนโคเซบ โดยมีค่า EC_{50} 29.5 – 41.5 ppm แต่จากการศึกษาของ Malandrakis et al. (2015) พบว่า เชื้อรา *Alternaria alternata* จำนวน 42 ไอโซเลทมีทั้งอ่อนแอและต้านทานต่อสารเคมีแมนโคเซบ โดยมีค่า EC_{50} 2.34 – >100 ppm รวมทั้งยังพบว่าเชื้อรา *A. alternata* ที่เกิดความต้านทานต่อสารเคมีดังกล่าวยังเกิดความต้านทานข้ามต่อสารเคมี 2 ชนิด คือ Cyprodinil และ Tebuconazole

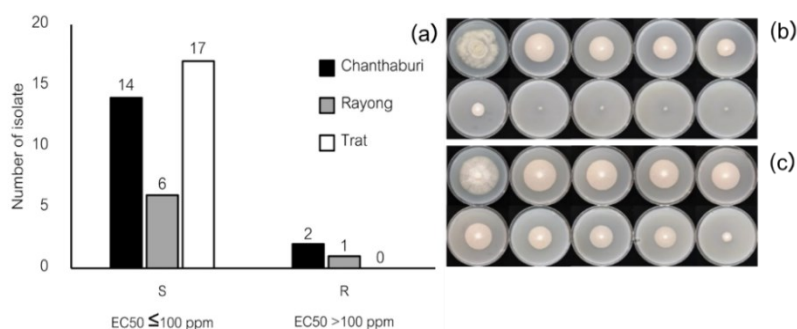


Figure 3 Sensitivity types of *P. palmivora* to mancozeb obtained from durian growing areas in eastern Thailand (a), CKKL1, a representative isolate sensitive (S) to mancozeb (b) and RKT2, a representative isolate resistant (R) to mancozeb (c). The pathogens were grown on culture medium amended with different concentrations of mancozeb at 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 and 90 ppm, starting from the left plates of the upper rows, respectively.

4. ทดสอบความต้านทานของเชื้อสาเหตุโรคต่อสารเคมีแมนโคเซบบนเนื้อเยื่อพืช

จากการทดสอบความต้านทานของตัวแทนไอโซเลทเชื้อ *P. palmivora* ที่อ่อนแอและต้านทานต่อสารเคมีแมนโคเซบบนเนื้อเยื่อใบทุเรียน พบว่า ไอโซเลท CKKL1^{MS} และ TML2^{MS} มีค่า EC_{50} 13.29 – 15.64 ppm ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่มอ่อนแอต่อแมนโคเซบ ส่วนไอโซเลท CTT3^{MR} และ CTT4^{MR} มีค่า EC_{50} >1000 ppm ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่มต้านทานต่อแมนโคเซบ (Table 3, Figure 4) โดยไอโซเลทของเชื้อทั้ง 2 กลุ่มนี้มีการตอบสนองต่อสารเคมีเช่นเดียวกับที่ทดสอบบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ดังนั้นในการทดสอบความต้านทานของเชื้อ *P. palmivora* ต่อสารเคมีแมนโคเซบ จึงสามารถใช้วิธีการทดสอบได้ทั้ง 2 วิธี อย่างไรก็ตาม จากการที่ค่า EC_{50} ของไอโซเลท CTT3^{MR} และ CTT4^{MR} ที่ทดสอบบนเนื้อเยื่อใบพืชมีค่า EC_{50} สูงกว่าที่ทดสอบบนอาหารเลี้ยงเชื้อเกินกว่า 10 เท่า นั้น อาจมีสาเหตุมาจากสารเคมีแมนโคเซบไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรคได้ จึงทำให้เชื้อดังกล่าวสามารถเจริญและก่อโรคบนเนื้อเยื่อพืชได้ หรืออาจเกิดจากแมนโคเซบเป็นสารเคมีประเภทสัมผัส ซึ่งไม่สามารถเคลื่อนย้ายเข้าสู่เนื้อเยื่อภายในของพืชได้ (FRAC, 2022) จึงส่งผลให้ไม่สามารถควบคุมโรคได้เท่าที่ควร หากต้องการหลีกเลี่ยงการเกิดความต้านทานของประชากรเชื้อ *P. palmivora* ของทุเรียนต่อสารเคมีแมนโคเซบในอนาคต ควรใช้สารเคมีตามอัตราแนะนำอย่างเคร่งครัด หรือสลับไปใช้สารเคมีประเภทสัมผัสในกลุ่มอื่น เช่น แคปเทน (Captan) หรือ คลอโรทาลอนิล (Chlorothalonil) เป็นต้น

Table 3 Sensitivity type of *P. palmivora* isolates to mancozeb on durian leaf tissues.

Isolates of <i>P. palmivora</i> ^{1/}	Logarithmic regression	R ²	EC ₅₀	Sensitivity type on durian leaf tissues ^{2/}
CKKL1 ^{MS}	$y = 9.65\ln(x) + 23.46$	0.89	15.64	Sensitive
TML2 ^{MS}	$y = 3.54\ln(x) + 40.83$	0.84	13.29	Sensitive
CTT3 ^{MR}	$y = 4.55\ln(x) + 16.21$	0.98	>1000	Resistant
CTT4 ^{MR}	$y = 29.12\ln(x) - 151.99$	0.94	>1000	Resistant

^{1/} MS = mancozeb-sensitive isolates, ^{MR} = mancozeb-resistant isolates obtained from culture medium technique

^{2/} Sensitive = EC₅₀ ≤ 100 ppm, Resistant = EC₅₀ > 100 ppm

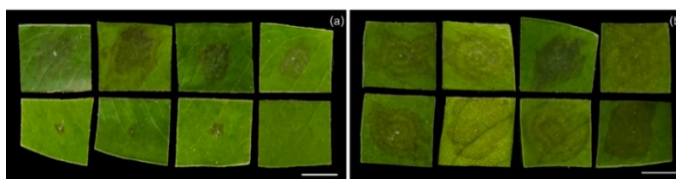


Figure 4 Water-soaked symptoms on durian leaf tissues obtained from artificial inoculation using sporangium suspension dropping technique of CKKL1, mancozeb-sensitive (a) and CTT3, mancozeb-resistant isolates (b). The durian leaf tissues were floated in mancozeb solutions at different concentrations of 0, 0.1, 1, 10, 100, 500, 1000 and 3000 ppm, starting from the left side of the upper rows, respectively, scale bar = 10 mm.

สรุปผลการศึกษา

จากการแยกเชื้อสาเหตุโรคลำต้นเน่าและใบไหม้ของทุเรียนในแหล่งปลูกภาคตะวันออก 3 จังหวัด ได้แก่ จันทบุรี ระยอง และตราด ได้เชื้อ *Phytophthora* spp. จำนวน 40 ไอโซเลท โดยทุ ไอโซเลทสามารถก่อโรคบนใบทุเรียน และทุ ไอโซเลทได้รับการยืนยันโดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ บริเวณ ITS ว่าเป็น *P. palmivora* เมื่อทดสอบความต้านทานของเชื้อทุ ไอโซเลทต่อสารเคมี แมนโคเซบบนอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่า ไอโซเลท CTT3 และ CTT4 ที่แยกได้จากจังหวัดจันทบุรี และไอโซเลท RKT2 ที่แยกได้จากจังหวัดระยองเกิดความต้านทานต่อสารเคมีแมนโคเซบ ซึ่งเป็นไปในทำนองเดียวกันกับการทดสอบความต้านทานของเชื้อบนเนื้อเยื่อใบทุเรียน ที่พบว่าตัวแทนไอโซเลทที่อ่อนแอต่อสารเคมีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ก็อ่อนแอต่อสารเคมีบนเนื้อเยื่อพืชด้วย และตัวแทนไอโซเลทที่ต้านทานบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ก็ต้านทานต่อสารเคมีบนเนื้อเยื่อพืชเช่นเดียวกัน จากการวิจัยครั้งนี้บ่งชี้ได้ว่าเชื้อ *P. palmivora* ที่แยกได้จากแหล่งปลูกทุเรียนในภาคตะวันออกของประเทศไทย มีบางไอโซเลทของเชื้อเริ่มพัฒนาความต้านทานต่อสารเคมี แมนโคเซบแล้ว แต่ประชากรของเชื้อส่วนใหญ่ยังอ่อนแอต่อสารเคมีอยู่ ดังนั้นเกษตรกรยังสามารถใช้สารเคมี แมนโคเซบต่อไปได้ในแหล่งปลูกที่เชื้อยังไม่เกิดความต้านทาน แต่ควรใช้เท่าที่จำเป็น และใช้ตามอัตราแนะนำอย่างเคร่งครัด รวมทั้งควรตรวจสอบความต้านทานของเชื้อเป็นระยะ ๆ เพื่อป้องกันการพัฒนาความต้านทานของประชากรเชื้อ *P. palmivora* ต่อสารเคมีแมนโคเซบในจำนวนที่มากขึ้น

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณสถาบันพัฒนาการวิจัยการเกษตร (สวก.) ที่สนับสนุนทุนวิจัยในครั้งนี้ และขอขอบคุณเกษตรกรผู้ปลูกทุเรียนทางภาคตะวันออกที่อนุเคราะห์ให้ใช้พื้นที่ในการศึกษาวิจัย

เอกสารอ้างอิง

- Koohapitagtam, M. (2018). *Kānsuksā Laksana Thāng Santhānvitthaya læ Kānkoetrok khōng Chuāra Phytophthora palmivora Sāhet Rōkrāknāo læ Khōnnāo khōng Thuriān Nai Prathedthai* [Characterization of morphology and pathogenicity of *Phytophthora palmivora* a causal agent of root rot and stem rot of durian in Thailand]. Research. Burapha University.
- Prommate, A., Valyasevi, S., Arunothayanan, H., McGovern, R. J., Cheewankoon, R., & To-anun, C. (2019). Prasitthipap khōng Rā Patipak *Chaetomium* spp. Tō**Phytophthora palmivora* (P-ha) Sāhet Rōkrāklækhōnnāo Thuriān. *Khon Kaen Agriculture Journal*. 47(6), 1251-1264
- Araújo, E. R., Resende, R. S., Alves, D. P., & Higashikawa, F. S. (2020). Field efficacy of fungicides to control downy mildew of onion. *European Journal of Plant Pathology*. 156(1), 305-309
- Chacón, M. G., Caicedo, E., & Ordóñez, M. E. (2022). Sensitivity to metalaxyl, mefenoxam, and cymoxanil in *Phytophthora andina* isolates collected from tree tomato (*Solanum betaceum*) in Ecuador. *Tropical Plant Pathology*. doi:10.1007/s40858-022-00512-1
- Chi, N. M., Thu, P. Q., Nam, H. B., Quang, D. Q., Phong, L. V., Van, N. D., Trang, T. T., Kien, T. T., Tam, T. T. T., & Dell, B. (2020). Management of *Phytophthora palmivora* disease in *Citrus reticulata* with chemical fungicides. *Journal of General Plant Pathology*. 86(6), 494-502
- Doyle, J. J., & Doyle, J. L. (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*. 19(1): 11-15.
- FRAC. (2022). FRAC Code List ©2022: Fungal control agents sorted by cross-resistance pattern and mode of action (including coding for FRAC Groups on product labels). Retrieved from: <https://www.frac.info/fungicide-resistance-management>
- Gullino, M. L., Tinivella, F., Garibaldi, A., Kemmitt, G. M., Bacci, L., & Sheppard, B. (2010). Mancozeb: past, present, and future. *Plant Disease*. 94: 1076-87.
- Ivanov, A. A., Ukladov, E. O., & Golubeva, T. S. (2021). *Phytophthora infestans*: An overview of methods and attempts to combat late blight. *Journal of Fungi*. 7(12), 1071
- Jeffers, S. N., & Martin, S. B. (1986). Comparison of two media selective for *Phytophthora* and *Pythium* species. *Plant Disease*. 70(11), 1038-1043
- Sijpesteijn, A. K. (1984). Mode of action of some traditional fungicides. In: Trinci, A. P. J., & Ryley, J. F., *Mode of Action of Antifungal Agents: Symposium series-British Mycological Society* (pp. 135-153). Cambridge: Cambridge University Press.
- Kongtragoul, P., Ishikawa, K., & Ishii, H. (2021). Metalaxyl resistance of *Phytophthora palmivora* causing durian diseases in Thailand. *Horticulturae*. 7(10), 375
- Lu, X. H., Zhu, S. S., Bi, Y., Liu, X. L., & Hao, J. J. (2010). Baseline sensitivity and resistance-risk assessment of *Phytophthora capsici* to iprovalicarb. *Phytopathology*. 100(11), 1162-1168.
- Malandrakis, A. A., Apostolidou, Z. A., Markoglou, A., & Flouri, F. (2015). Fitness and cross-resistance of *Alternaria alternata* field isolates with specific or multiple resistance to single site inhibitors and mancozeb. *European Journal of Plant Pathology*. 142(3), 489-499
- Moreira, R. R., Hamada, N. A., Peres, N. A., & De Mio, L. L. M. (2019). Sensitivity of the *Colletotrichum acutatum* Species Complex from Apple Trees in Brazil to Dithiocarbamates, Methyl Benzimidazole Carbamates, and Quinone Outside Inhibitor Fungicides. *Plant Disease*. 103(10), 2569-2576

- Puig, A. S., Quintanilla, W., Matsumoto, T., Keith, L., Gutierrez, O. A., & Marelli, J. P. (2021). *Phytophthora palmivora* Causing Disease on Theobroma cacao in Hawaii. **Agriculture**. 11(5), 396
- Ramirez-Gil, J. G., Castañeda-Sánchez, D. A., & Morales-Osorio, J. G. (2017). Production of avocado trees infected with *Phytophthora cinnamomi* under different management regimes. **Plant Pathology**. 66(4), 623-632
- Rekanović, E., Potočnik, I., Milijašević-Marčić, S., Stepanović, M., Todorović, B., & Mihajlović, M. (2012). Toxicity of metalaxyl, azoxystrobin, dimethomorph, cymoxanil, zoxamide and mancozeb to *Phytophthora infestans* isolates from Serbia. **Journal of Environmental Science and Health**. 47(5), 403-409
- Suzui, T., Kueprakone, U., & Kamphangridthrong, T. (1979). *Phytophthora* spp. isolated from some economic plants in Thailand. **Technical Bulletins**. 12, 32-41
- Wong, F. P., & Wilcox, W. F. (2001). Comparative physical modes of action of azoxystrobin, mancozeb, and metalaxyl against *Plasmopara viticola* (grapevine downy mildew). **Plant Disease**. 85(6), 649-656
- Wu, Y., Lu, S., Huang, S., Fu, G., Chen, L., Xie, D., Li, Q., & Cen, Z. (2011). Field resistance of *Phytophthora melonis* to metalaxyl in South China. **Wei Sheng Wu Xue Bao**. 51(8), 1078-1086.
- Yang, L. N., He, M. H., Ouyang, H. B., Zhu, W., Pan, Z. C., Sui, Q. J., Shang, L. P., & Zhan, J. (2019). Cross-resistance of the pathogenic fungus *Alternaria alternata* to fungicides with different modes of action. **BMC Microbiology**. 19(1), 1-10
- Zhao, X., Ren, L., Yin, H., Zhou, J., Han, J., & Luo, Y. (2013). Sensitivity of *Pseudoperonospora cubensis* to dimethomorph, metalaxyl and fosetyl-aluminium in Shanxi of China. **Crop Protection**. 43, 38-44

วันรับบทความ (Received date) : 21 มิ.ย. 65

วันแก้ไขบทความ (Revised date) : 30 ก.ย. 65

วันตอบรับบทความ (Accepted date) : 3 ต.ค. 65