



## รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

ควบคุมเชื้อรา *Phytophthora* spp. สาเหตุโรคผลเน่าทุเรียน ที่ดื้อต่อสารป้องกันกำจัด  
เชื้อราหลายชนิดโดยไคโตซานบางชนิด

Control of Multiple Fungicide-Resistant *Phytophthora* spp. Causing  
Durian Fruit Rot by Some Chitosan

ดร. พรประพา คงตระกูล

ดร. พรรณีภา ย้วยล

นางสาวศิริขวัญ สุตวัตแก้ว

ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจากเงินรายได้ ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2558

วิทยาเขตชุมพรเขตรอุดมศักดิ์ จังหวัดชุมพร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง



## รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

ควบคุมเชื้อรา *Phytophthora* spp. สาเหตุโรคผลเน่าทุเรียน ที่ดื้อต่อสารป้องกันกำจัด  
เชื้อราหลายชนิดโดยไคโตซานบางชนิด

Control of Multiple Fungicide-Resistant *Phytophthora* spp. Causing  
Durian Fruit Rot by Some Chitosan

ดร. พรประพา คงตระกูล

ดร. พรรณีภา ย้วยล

นางสาวศิริขวัญ สุตวัตแก้ว

ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจากเงินรายได้ ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2558

วิทยาเขตชุมพรเขตรอุดมศักดิ์ จังหวัดชุมพร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

**ชื่อโครงการ** ควบคุมเชื้อรา *Phytophthora* spp. สาเหตุโรคผลเน่าทุเรียน ที่ดื้อต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อราหลายชนิดโดยไคโตซานบางชนิด

**แหล่งเงิน** เงินรายได้

**ประจำปีงบประมาณ** 2558 **จำนวนเงินที่ได้รับการสนับสนุน** 70,000 บาท

**ระยะเวลาดำเนินการ** 1 ปี ตั้งแต่ ตุลาคม 2557 ถึง กันยายน 2558

**หัวหน้าโครงการ** ดร. พรประพา คงตระกูล หน่วยงานต้นสังกัด ภาควิชาเทคโนโลยีการเกษตร

**ผู้ร่วมโครงการวิจัย** ดร. พรธัญญา ยั่วยล หน่วยงานต้นสังกัด ภาควิชาเทคโนโลยีการเกษตร  
นางสาวศิริขวัญ สุตวัตแก้ว หน่วยงานต้นสังกัด งานบริการห้องปฏิบัติการ

### บทคัดย่อ

เก็บรวบรวมเชื้อรา *Phytophthora* spp. สาเหตุโรคทุเรียน สามารถแยกเชื้อบริสุทธิ์ได้จำนวน 79 ไอโซเลท สุ่มจำนวน 24 ไอโซเลท เพื่อทดสอบความต้านทานต่อสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อราหลายชนิด คือ dimethomorph, fosetyl-Al, metalaxyl และ mancozeb บนอาหาร V8 agar ด้วยวิธี poison food technique ผสมสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อราที่ความเข้มข้น ครึ่งของอัตราแนะนำ, อัตราแนะนำ และสองเท่าของอัตราแนะนำ ประเมินระดับความต้านทาน ดังนี้ ต้านทานต่อสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อรา [resistance ( $Fg^R$ )  $\geq$  อัตราแนะนำ] และ อ่อนแอต่อสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อรา [sensitive ( $Fg^S$ )  $<$  อัตราแนะนำ] พบเชื้อราจำนวน 7 ไอโซเลท ต้านทานต่อสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อรา metalaxyl และเชื้อราจำนวน 5 ไอโซเลท ต้านทานต่อสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อรา dimethomorph โดยพบว่าจำนวน 3 ไอโซเลท จากโรคผลเน่าของทุเรียน ต้านทานต่อสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อราได้ 2 ชนิด คือ dimethomorph และ metalaxyl จึงจัดอยู่ในกลุ่มต้านทานต่อสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อราหลายชนิด ( $MuFg^R$ ) นอกจากนี้ศึกษาผลของไคโตซาน น้ำหนักโมเลกุลต่ำ ปานกลาง และสูง ที่ระดับความเข้มข้น 0 (ชุดควบคุม), 500, 1,000 และ 2,000 ppm ต่อการเจริญเติบโตทางเส้นใยของเชื้อรา *Phytophthora* spp. สาเหตุโรคทุเรียน โดยวิธี poisoned food technique และต่อการสร้าง sporangium และการปลดปล่อย zoospores โดยวิธี culture disc technique ผลการทดลอง พบว่า น้ำหนักโมเลกุลของไคโตซานทั้งสามชนิด ที่ระดับความเข้มข้น 2,000 ppm มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตทางเส้นใย และยับยั้งการสร้าง sporangium ได้ดีที่สุด แต่อย่างไรก็ตาม ไคโตซานทุกกรรมวิธีไม่มีผลแตกต่างทางสถิติต่อการปลดปล่อย zoospores

**คำสำคัญ:** *Phytophthora* spp., ทุเรียน, ไคโตซาน, ดื้อต่อสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อราหลายชนิด

**Research Title:** Control of Multiple Fungicide-Resistant *Phytophthora* spp. Causing Durian Fruit Rot by Some Chitosan

**Researcher:** Dr. Pornprapa Kongtragoul

**Faculty:** Prince of Chumphon campus

**Department:** Agricultural Technology, Horticultural Program

## ABSTRACT

*Phytophthora* spp. causing disease were obtained from infected para-rubber and durian collected from orchard in Chumphon province. Seventy nine isolates were successfully isolated. Twenty four isolates were randomly selected to be representative of multiple fungicide-resistant test. The resistibility of each isolate to dimethomorph, fosetyl-Al, metalaxyl and mancozeb was detected from the growth of colony by poisoned food technique on V8 agar amended with fungicides at concentrations of 1/2X, 1X, and 2X of field-use recommended rate. The level of resistance to each fungicide was evaluated and grouped into 2 representative phenotype reactions which fungicide resistance ( $Fg^R$ ) and able to grow on each fungicide at  $\geq$  field-use recommended rate and sensitive ( $Fg^S$ ) for the isolate that could grow on at  $<$  field-use recommended rate. The 7 isolates were classified as the  $Fg^R$  to metalaxyl and 5 isolates were  $Fg^R$  to dimethomorph. The 3 isolates from fruit rot of durian were multiple fungicide resistance ( $MuFg^R$ ) to dimethomorph and metalaxyl. Moreover, study the effect of low, medium and high molecular weight chitosan at 0 (control), 500, 1,000 and 2,000 ppm were to evaluate the *in vitro* on mycelial growth of *Phytophthora* spp. causing para-rubber and durian diseases by poisoned food technique and on sporangium production and zoospores release by culture disc technique. The results show that low, medium and high molecular weight chitosan at 2,000 ppm. were the most effective treatment for mycelial and sporangium inhibition percentage. However, all chitosan treatments were no significant on zoospores release.

**Keywords:** *Phytophthora* spp., durian, chitosan, multiple fungicide resistance

## กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ เกษตรกรชาวสวนทุเรียน ที่ให้ความอนุเคราะห์ อำนวยความสะดวก และสนับสนุน ครั้งนี้

ขอขอบพระคุณ เจ้าหน้าที่ประจำห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา ที่อำนวยความสะดวก เครื่องมือและอุปกรณ์ห้องปฏิบัติการ

ขอขอบคุณนักศึกษาหลักสูตรพืชสวนทุกท่าน ที่เป็นส่วนสำคัญในการดำเนินงานวิจัยครั้งนี้

สุดท้ายนี้ ขอขอบพระคุณคณะกรรมการวิจัย ที่ให้โอกาสการทำวิจัยครั้งนี้ รวมทั้งเจ้าหน้าที่ฝ่ายวิจัย ฝ่ายพัสดุ และฝ่ายการเงิน สจล. วิทยาเขตชุมพรเขตรอุดมศักดิ์ จังหวัดชุมพร ที่อำนวยความสะดวกแก่การดำเนินงานวิจัยครั้งนี้

“การวิจัยครั้งนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง วิทยาเขตชุมพรเขตรอุดมศักดิ์ จังหวัดชุมพร จากแหล่งทุนเงินรายได้ ประจำปีงบประมาณ 2558”

พรประพา คงตระกูล

พรรณิภา ย้วยล

ศิริขวัญ สุวัตแก้ว

## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	II
กิตติกรรมประกาศ	III
สารบัญ	IV
สารบัญตาราง	VI
สารบัญภาพ	VII
<b>บทที่ 1 บทนำ</b>	<b>1</b>
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย	1
1.3 ขอบเขตของการวิจัย	2
1.4 คำสำคัญของการวิจัย	2
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
<b>บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง</b>	<b>3</b>
2.1 แนวทางการใช้โคโตซานในการควบคุมโรคพืช	3
2.2 เชื้อรา <i>Phytophthora</i> spp.	3
2.3 การดื้อหรือต้านทานต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อรา <i>Phytophthora</i> spp.	4
<b>บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย</b>	<b>7</b>
3.1 เก็บรวบรวมและศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาเชื้อรา <i>Phytophthora</i> spp. สาเหตุโรคพืช	7
3.2 ตรวจสอบเชื้อรา <i>Phytophthora</i> spp. ที่ดื้อต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อราชนิดต่างๆ ด้วยวิธี Poisoned food technique	7
3.3 ทดสอบประสิทธิภาพของโคโตซานบางชนิดต่อการเจริญของเชื้อรา <i>Phytophthora</i> spp. ที่ดื้อต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อรา	8
<b>บทที่ 4 ผลและวิจารณ์ผลการวิจัย</b>	<b>10</b>
4.1 แยกและรวบรวมเชื้อรา <i>Phytophthora</i> spp. สาเหตุโรคทุเรียน	10
4.2 ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราสาเหตุ	10
4.3 ประเมินระดับความต้านทานต่อสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อราหลายชนิด	15
4.4 ทดสอบประสิทธิภาพของโคโตซานบางชนิดต่อการเจริญของเชื้อรา <i>Phytophthora</i> spp. ที่ดื้อต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อรา	23
<b>บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ</b>	<b>28</b>
5.1 สรุปผลการวิจัย	28
5.2 ข้อเสนอแนะ	28

## สารบัญ

	หน้า
บทที่ 6 สรุปผลผลิตงานวิจัย	29
6.1 ผลผลิตงานวิจัยที่ผลิตได้	29
บรรณานุกรม	30
ภาคผนวก	
ภาคผนวก ก เอกสารประกอบผลผลิตงานวิจัยที่ผลิตได้	32
ภาคผนวก ข สรุปค่าใช้จ่ายการดำเนินโครงการวิจัย	36
ประวัตินักวิจัย	38

## สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	Fungicides for controlling <i>Phytophthora</i> spp.	6
3.1	Phenotype-resistant levels of <i>Phytophthora</i> spp. to fungicide	8
4.1	Sample numbers of durian disease collected from orchards	10
4.2	Morphology characterization of <i>Phytophthora</i> spp. isolate causing fruit rot disease of durian	11
4.3	Morphology characterization of <i>Phytophthora</i> spp. isolate causing stem rot disease of durian.	13
4.4	Multiple fungicide resistant assay of <i>Phytophthora</i> spp. causing fruit rot disease of durian on V8 agar amended with fungicide.	16
4.5	Multiple fungicide resistant assay of <i>Phytophthora</i> spp. causing stem rot disease of durian on V8 agar amended with fungicide	20
4.6	The effect of low, medium, and high molecular weight of chitosan on the mycelial growth of <i>Phytophthora</i> spp. causing durian disease.	24
4.7	The effect of low, medium, and high molecular weight of chitosan on the sporangia of <i>Phytophthora</i> spp. causing durian disease at 48 hr. after incubation.	26
4.8	The effect of low, medium, and high molecular weight of chitosan on the empty sporiagia of <i>Phytophthora</i> spp. causing durian disease at 48 hr. after incubation.	27



## สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
2.1	Chemical structure of chitosan	3
4.1	Symptoms of fruit rot disease (a) and stem rot disease (b) in durian	10
4.2	Morphology characterization of <i>Phytophthora</i> spp. isolate causing fruit rot disease of durian; colony color on V8 agar (column a), hypha (column b), sporangium (column c), and chlamyospore (column d).	12
4.3	Morphology characterization of <i>Phytophthora</i> spp. isolate causing stem rot disease of durian; colony color on V8 agar (column a), hypha (column b), sporangium (column c), and chlamyospore (column d).	14
4.4	Multiple fungicide-resistant assay of <i>Phytophthora</i> spp. causing fruit rot disease of durian on V8 agar amended with fungicide.	18
4.5	Multiple fungicide-resistant assay of <i>Phytophthora</i> spp. causing stem rot disease of durian on V8 agar amended with fungicide	22

# บทที่ 1

## บทนำ

### 1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ปัญหาการเกิดโรคพืชอุบัติซ้ำจากจากการเข้าทำลายของเชื้อรา *Phytophthora* spp. ซึ่งเป็นสาเหตุโรคต่างๆ ของพืชหลายชนิดในประเทศไทย เช่น ยางพารา ทูเรียน มันฝรั่ง เป็นสาเหตุให้เกิดโรคต่างๆ เช่น โรคใบร่วง (leaf fall), โรคเส้นดำ (black stripe) และโรคลำต้นเน่าของยางชำถุง (twig rot of polybag rubber) เป็นสาเหตุให้ศักยภาพการผลิตลดลง (กลุ่มวิจัยและพัฒนาการอนุรักษ์ดินและน้ำพื้นที่พืชไร่, 2548; สำนักงานกองทุนสงเคราะห์การทำสวนยาง, 2555) เนื่องด้วยภูมิประเทศของไทยตั้งอยู่ในเขตสภาพภูมิอากาศแบบร้อนชื้นมีฝนตกชุกเกือบตลอดทั้งปี ประกอบกับลักษณะเด่นของเชื้อราชนิดนี้อาศัยได้ทั้งในน้ำและดิน สร้างสปอร์ได้ทั้งแบบอาศัยและไม่อาศัยเพศ โดยสปอร์ที่ไม่อาศัยเพศมีหางทำหน้าที่โบกให้เคลื่อนที่ไปข้างหน้าและถอยหลังได้อย่างรวดเร็ว ส่งผลให้เกิดการแพร่ระบาดได้รวดเร็ว ปัจจุบันเกษตรกรแก้ปัญหาดังกล่าวข้างต้นโดยการใช้สารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อราชนิดต่างๆ เช่น cymoxanil, dimethomorph, etridiazole, fosetyl-Al, metalaxyl phosphorous acid และ oxadixyl เพื่อควบคุมเชื้อรา *Phytophthora* spp. เพราะสะดวกและได้ผลรวดเร็ว โดยสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อราชนิดต่างๆ ข้างต้น ออกฤทธิ์แบบจำเพาะเจาะจงตามลักษณะกลไกทางชีวเคมีที่แตกต่างกัน (ธรรมศักดิ์, 2543; Davidse, 1988) ด้วยลักษณะการออกฤทธิ์แบบจำเพาะนี้ประกอบกับการใช้สารเคมีอย่างต่อเนื่อง ส่งผลชักนำให้เชื้อราเกิดการพัฒนาหรือปรับตัวเพื่อความอยู่รอด จนเกิดการกลายพันธุ์เป็นสายพันธุ์ที่ต่อต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อราขึ้น เมื่อเกษตรกรยังคงใช้สารเคมีชนิดต่างๆ ดังกล่าว เชื้อราสายพันธุ์ที่กลายพันธุ์ต่อต่อสารเคมียังคงอยู่รอด โดยลักษณะการกลายพันธุ์ที่กล่าวนี้สามารถถ่ายทอดสู่รุ่นลูกหลานได้ ส่งผลให้เกิดการเพิ่มปริมาณภายในแปลงปลูกของเกษตรกรได้โดยไม่รู้ตัว (acquired fungicide resistance) (Brent and Hollimon, 1998; Deising *et al.*, 2008; Damicone and Smith, 2009) ประกอบกับหากเชื้อสาเหตุหนึ่งชนิดต่อต่อสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อราหลายชนิด (multiple fungicide resistance) ส่งผลให้เกษตรกรต้องประสบปัญหาไม่สามารถควบคุมการเกิดและแพร่ระบาดของเชื้อสาเหตุนั้นๆ ได้ จึงเกิดโรคอุบัติซ้ำจาก รวมทั้งต้องสิ้นเปลืองเงินทุนและเวลาในการป้องกันกำจัด จากเหตุผลดังกล่าวจึงทำให้เกิดความล้มเหลวในการป้องกันกำจัดโรคเกิดขึ้น ทางเลือกหนึ่งในการลดปัญหาดังกล่าวคือ การใช้สารที่ได้จากธรรมชาติที่มีคุณสมบัติในการป้องกันเชื้อสาเหตุของโรคพืช จากรายงานของ Bautista-Banos *et al.* (2005) พบว่า ไคโตซานสามารถควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคพืชได้ สำหรับงานวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาเชื้อรา *Phytophthora* spp. ที่ต่อต่อสารเคมีป้องกันกำจัดหลายชนิด พร้อมศึกษาผลของไคโตซานต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรากลุ่มดังกล่าว เพื่อมุ่งเน้นลดการใช้สารเคมี อันจะนำไปสู่การหาวิธีที่เหมาะสมในการควบคุมโรคอย่างถูกต้องและมีประสิทธิภาพ อีกทั้งช่วยลดปัญหาสารเคมีตกค้างในธรรมชาติ ส่งผลไม่ให้เกิดมลพิษต่อสภาพแวดล้อม และปลอดภัยต่อเกษตรกร

### 1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

ศึกษาประสิทธิภาพของไคโตซานบางชนิดเพื่อควบคุมเชื้อรา *Phytophthora* spp. สาเหตุโรคผลเน่าของทุเรียนที่ต่อต่อสารเคมีป้องกันกำจัดหลายชนิด

### 1.3 ขอบเขตของการวิจัย

ตลอดเวลาที่ผ่านมาประเทศไทย ประสบปัญหาสำคัญ คือ การเข้าทำลายของเชื้อรา *Phytophthora* spp. สารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อราชนิดต่างๆ จะเป็นสิ่งที่ถูกเลือกในระดับต้นๆ เพื่อแก้ปัญหาดังกล่าว เพราะได้ผลดี และรวดเร็ว แต่กลับพบว่าการใช้สารเคมีอย่างต่อเนื่อง ก็ยังมีการระบาดของเชื้อรา *Phytophthora* spp. โดยมีสมมุติฐานว่าน่าจะเกิดการดื้อต่อสารเคมีต่างๆ เกิดขึ้นในธรรมชาติอย่างไม่รู้ตัว เพราะสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อราชนิดต่างๆ ออกฤทธิ์แบบเฉพาะเจาะจงจำเพาะจุดตามกลไกทางชีวเคมีที่แตกต่างกัน ประกอบกับการใช้อย่างต่อเนื่อง ส่งผลชักนำให้เชื้อราเกิดการพัฒนา หรือปรับตัวเองเพื่อความอยู่รอด จนเกิดการกลายพันธุ์เป็นสายพันธุ์ที่ดื้อต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อราขึ้น เมื่อเกษตรกรยังคงใช้สารเคมีดังกล่าวเชื้อราสายพันธุ์ที่กลายพันธุ์ยังคงอยู่รอดได้ ซึ่งลักษณะการกลายพันธุ์ที่กล่าวมานี้ยังสามารถถ่ายทอดสู่รุ่นลูกหลานได้อีกด้วย และส่งผลให้เกิดการเพิ่มปริมาณภายในแปลงปลูกของเกษตรกรได้โดยไม่รู้ตัว ทำให้เกษตรกรประสบปัญหาไม่สามารถควบคุมการเกิดและแพร่ระบาดของโรคนี้ได้ รวมทั้งต้องสิ้นเปลืองเงินทุนและเวลาในการป้องกันกำจัดโรค จากเหตุผลดังกล่าวจึงทำให้เกิดความล้มเหลวในการป้องกันกำจัดโรคที่เกิดขึ้น

จากการตรวจสอบหากพบว่าเกิดเชื้อรา *Phytophthora* spp. ที่ดื้อต่อสารป้องกันกำจัดหลายชนิดเกิดขึ้นแล้วในธรรมชาติ สมมุติฐานต่อมาคือ ต้องลดปริมาณเชื้อกลุ่มนี้ลงโดยการใช้ไคโตซานบางชนิด เพราะเป็นสารที่ได้จากธรรมชาติมีคุณสมบัติในการป้องกันเชื้อสาเหตุโรคพืช ทดแทนสารเคมีกลุ่มดังกล่าว การใช้ไคโตซานเป็นแนวทางเลือก เพื่อพร้อมที่จะปรับลดการใช้สารเคมีในแปลงปลูก โดยคาดหวังว่าจะสามารถลดปริมาณเชื้อราที่ดื้อต่อสารเคมีป้องกันกำจัดหลายชนิดได้

### 1.4 คำสำคัญของการวิจัย

- 1.4.1 ทูเรียน (Durian)
- 1.4.2 ไคโตซาน (Chitosan)
- 1.4.3 ดื้อต่อสารเคมีป้องกันกำจัด (fungicide resistance)

### 1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

เพื่อทราบถึงประสิทธิภาพของไคโตซานบางชนิดเพื่อควบคุมเชื้อรา *Phytophthora* spp. สาเหตุโรคผลเน่าของทุเรียน ที่ดื้อต่อสารเคมีป้องกันกำจัดหลายชนิด

ผลงาน	ระบุนรายละเอียดให้ชัดเจน	จำนวน	ปีสำเร็จ
<b>1. การเผยแพร่ผลงานทางวิชาการ(Publications)</b>			
<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ การประชุม / สัมมนา ระดับชาติ (National Conference)</li> </ul>	The 13 <sup>th</sup> international symposium on biocontrol and biotechnology, Shen Zhen, China November 6-8, 2015	1	2558
<b>2. การผลิตบัณฑิต</b>			
<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ ป.ตรี/โท/เอก</li> </ul>	นักศึกษาระดับปริญญาตรี นายปณต วิริยะเอกกุล นางสาวพนิดา มีคลองแบ่ง	1	ปีการศึกษา 2557

## บทที่ 2

### ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

#### 2.1 แนวทางการใช้ไคโตซานในการควบคุมโรคพืช

ไคโตซานเป็นโพลีเมอร์ธรรมชาติที่สกัดจากไคติน ซึ่งมีองค์ประกอบสำคัญในรูปของ D - glucosamine (Figure 2.1) พบได้ในธรรมชาติ โดยเป็นองค์ประกอบอยู่ในเปลือกนอกของสัตว์พวก กุ้ง ปู แมลง และเชื้อรา เป็นสารธรรมชาติที่มีลักษณะโดดเด่นเฉพาะตัว คือ ที่เป็นวัสดุชีวภาพ (Biomaterials) ย่อยสลายตามธรรมชาติ มีความปลอดภัยในการนำมาใช้กับมนุษย์ ไม่เกิดผลเสียและปลอดภัยต่อสิ่งแวดล้อม ไม่เกิดการแพ้ ไม่ไวไฟและไม่เป็นพิษ (non - phytotoxic) ต่อพืช นอกจากนี้ยังส่งเสริมการเพิ่มปริมาณของสิ่งมีชีวิต เป็นองค์ประกอบต่อเป็นสายยาวขนาดต่าง ๆ ฉะนั้นเมื่อสลายตัวจะช่วยเพิ่มธาตุอาหารให้เกิดขึ้นนอกจากนี้ยังมีความสามารถจับกับไอออนต่าง ๆ เช่น โปตัสเซียม แคลเซียม แมกนีเซียม เหล็ก ฟอสเฟต ที่เป็นประโยชน์ต่อพืชแล้วค่อย ๆ ปลดปล่อยสารเหล่านี้แก่พืช ทั้งนี้เพราะไคโตซาน เป็นโพลีเมอร์ที่มีประจุ ฉะนั้นจึงช่วยลดการชะล้างและช่วยให้การใช้ปุ๋ยมีประสิทธิภาพมากขึ้น (รัฐ, 2543) มีรายงานเกี่ยวกับการใช้ไคโตซานซึ่งเป็นสารที่ได้จากธรรมชาติมีคุณสมบัติในการป้องกันเชื้อสาเหตุของโรคพืช (Bautista-Banos *et al.*, 2005) การเคลือบเมล็ดพันธุ์ข้าวสาลีด้วยไคโตซานสามารถกระตุ้นการต้านทานการเข้าทำลายของเชื้อรา *Fusarium graminearum* ที่ติดต่อผ่านทางเมล็ดพันธุ์ โดยทำให้เปอร์เซ็นต์ความงอก และความแข็งแรงของเมล็ดพันธุ์ดีกว่าเมล็ดที่ไม่เคลือบด้วยไคโตซาน (Reddy *et al.*, 1999) ทั้งนี้ประสิทธิภาพของไคโตซานขึ้นอยู่กับชนิด และระยะเวลาเจริญเติบโตของเชื้อรา การงอกของสปอร์ และการเจริญเติบโตของเส้นใย (El Ghaouth, A. *et al.*, 1997; Benhamou, N. *et al.*, 1994)

การยับยั้งเชื้อสาเหตุของโรคพืช ได้แก่ เชื้อไวรัส แบคทีเรีย และเชื้อราบางชนิด โดยไคโตซานจะซึมผ่านเข้าทางผิวใบ ลำต้นพืช ช่วยยับยั้งการเกิดโรคพืชในกรณีที่เกิดเชื้อโรคพืชแล้ว (รักษาโรคพืช) และสร้างความต้านทานโรคให้กับพืชที่ไม่ติดเชื้อ โดยไคโตซานมีคุณสมบัติที่สามารถออกฤทธิ์เป็นตัวกระตุ้น (elicitor) ต่อพืชได้ จะกระตุ้นระบบป้องกันตัวเองของพืช ทำให้พืชผลิตเอนไซม์และสารเคมีเพื่อป้องกันตนเองหลายชนิด พืชจึงลดโอกาสที่จะถูกคุกคามโดยเชื้อสาเหตุโรคพืชได้ ไคโตซานจะกระตุ้นให้มีการผลิตสารลิกนินและแทนนินของพืชมากขึ้น พืชสามารถป้องกันตัวเอง ไคโตซานสามารถส่งเสริมการเพิ่มปริมาณจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ในดิน เช่น เชื้อ *Actinomycetes sp.* *Trichoderma spp.* ทำให้เกิดการลดปริมาณของจุลินทรีย์ที่เป็นเชื้อโรคพืช เช่น เชื้อรา *Furarium* *Phythophthora spp.* ฯลฯ (ภาวดี 2544; รัฐ 2543; สุวลี 2543)

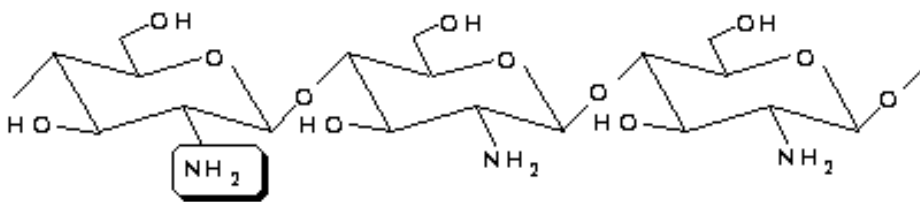


Figure 2.1 Chemical structure of chitosan

## 2.2 เชื้อรา *Phytophthora* spp.

เชื้อรา *Phytophthora* spp. เป็นเชื้อสาเหตุโรคพืช ทำให้เกิดอาการเน่าที่รุนแรง เมื่อปี พ.ศ. 2419 หรือเมื่อ 135 ปี Anton de Bary เป็นผู้ตั้งชื่อราชนิดนี้ว่า *Phytophthora* (Greek : Phyton and Phtherio = Plant destroyer) มีความหมายว่า “ผู้ทำลาย” เนื่องจากในครั้งนั้นเกิดโรคใบไหม้ของมันฝรั่งระบาดรุนแรง ทำให้การปลูกมันฝรั่งล้มเหลว จนไม่สามารถผลิตหัวมันฝรั่งได้พอเพียงกับชาวไอริช ซึ่งบริโภคเป็นอาหารหลัก เป็นเหตุให้ชาวไอริชต้องอดอยากล้มตายเป็นจำนวนมาก ที่มีชีวิตอยู่รอดก็พยายามดิ้นรนอพยพหาแหล่งที่ทำกินและที่อยู่อาศัยใหม่เพื่อให้รอดพ้น อพยพสู่สหรัฐอเมริกา (Zentmyer, 1983)

เชื้อรา *Phytophthora* spp. จัดอยู่ใน (Hawksworth et al. 1995)

Kingdom	Stramenopiles
Class	Oomycetes
Order	Peronosporales
Family	Pythiaceae
Genus	<i>Phytophthora</i>

เชื้อรา *Phytophthora* มีขนาดและรูปร่างผันแปรมาก ในปี พ.ศ. 2506 Waterhouse (1973) ได้ทำ key การจำแนก species ของรา *Phytophthora* จำนวน 48 species ปัจจุบันมีการจำแนก *Phytophthora* ไปแล้ว 80 species ทั่วโลก เป็นเชื้อที่ระบาดได้รุนแรงโดยมีพืชที่เป็นพืชอาศัยกว่าหนึ่งพันชนิด มีลักษณะเด่นคือ สามารถสร้างสปอร์ได้ทั้งแบบอาศัยและไม่อาศัยเพศ สำหรับการไม่ผสมเพศเรียกว่า zoospore เกิดใน sporangium เมื่อแก่เต็มที่จะพร้อมที่จะแตกออกมาทาง papilla ลักษณะของ zoospore มีหาง (flagella) 2 หาง มีความยาวไม่เท่ากัน หางหนึ่งเป็นลักษณะแบบเส้นที่มีขนอ่อนโดยรอบคล้ายแปรงล้างขวด (tinsel flagellum) ทำหน้าที่ช่วยโบกให้ไปข้างหน้า อีกหางหนึ่งมีลักษณะคล้ายแส้ (whiplash flagellum) ทำหน้าที่ช่วยโบกให้ถอยหลังในการเคลื่อนย้าย หรือการว่ายน้ำ ลักษณะ sporangium รูปมะนาวฝรั่ง (lemoniform) รูปไข่ปลายตัด (obpyriform) หรือรูปไข่ (ovoid) ผนังของ oogonium มีทั้งแบบเรียบ ชรุขระ หรือเป็นตะปุ่มตะป่ำ (แต่ไม่มีหนาม) ผนัง oogonium อาจจะหนาขึ้น และมีสีน้ำตาล ส่วน antheridium เป็นแบบ amphigynous (มีน้อย species ที่เป็นแบบ paragynous) (Waterhouse, 1973)

สำหรับในประเทศไทยเชื้อรา *Phytophthora* ที่พบได้แก่ *P. palmivora*, *P. parasitica*, *P. cinnamomi* และ *P. botryosa*, *P. infestans* เชื้อรา *Phytophthora* spp. เป็นสาเหตุโรคของพืชเศรษฐกิจที่สำคัญหลายชนิด เช่น โรคเส้นดำของยางพารา โรครากเน่า โคนเน่า และผลเน่า ของทุเรียน ทั้งระยะกล้าและระยะต้นไม้ใหญ่ ในประเทศไทยกำลังมีปัญหาเกี่ยวกับเชื้อราชนิดนี้ค่อนข้างมาก (นิพนธ์ และ จักรพงษ์, 2541; นิพนธ์ 2542a; 2542b; เตือนใจ และคณะ, 2545; กลุ่มวิจัยและพัฒนาการอนุรักษ์ดินและน้ำ พื้นที่พืชไร่, 2548; สถาบันวิจัยยางพารา, 2553)

### 2.3 การดื้อหรือต้านทานต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อรา *Phytophthora* spp.

จากการเกิดโรคของยางพาราที่มีการแพร่ระบาด และอุบัติซ้ำซากทุกปี เหตุผลสำคัญประการหนึ่ง น่าจะเกิดจากการที่เชื้อสาเหตุ เริ่มมีพัฒนาการ “การดื้อยา” หรือที่เรียกในทางวิชาการว่า Fungicide resistance อันเป็นผลสืบเนื่องมาจากการใช้สารเคมีแต่ละชนิดต่อเนื่องมายาวนาน จากปัญหาการดื้อต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อรา เป็นเรื่องสำคัญในงานการป้องกันกำจัดศัตรูพืช เป็นปัจจัยที่จะส่งผลว่าการป้องกันกำจัดศัตรูพืชด้วยสารเคมี จะสัมฤทธิ์ผล หรือล้มเหลว ขึ้นอยู่กับข้อมูล การดื้อยา และวิธีการจัดการต้านการดื้อยา ดังนั้น เพื่อต่อต้านหรือชะลอการพัฒนา การดื้อยาของเชื้อสาเหตุโรคพืชออกไปให้นานที่สุด จึงต้องมีการกำหนดยุทธศาสตร์การใช้สารเคมี สมาพันธ์กลุ่มอุตสาหกรรมเคมีเกษตร (Crop Life International) มีการจัดตั้ง คณะทำงานด้านนี้โดยเฉพาะ เรียกว่า คณะทำงานด้านบริหารจัดการการดื้อยา ซึ่งขึ้นอยู่กับประเภทของสารเคมี เช่น สารกำจัดเชื้อรา ก็จะเรียกว่า คณะทำงานบริหารจัดการต่อต้านการดื้อยาของสารกำจัดเชื้อรา (Fungicide Resistance Action Committee : FRAC) คณะทำงานนี้ประกอบด้วย นักวิทยาศาสตร์จากบริษัทต่างๆ ทางด้านเคมีเกษตรทั่วโลก มาร่วมกันทำงานร่วมกัน และขยายความร่วมมือทำงานร่วมกับนักวิทยาศาสตร์จากสถาบันวิจัย หรือสถาบันการศึกษาของรัฐ เพื่อติดตามการพัฒนาการดื้อต่อกลุ่มสารเคมีต่างๆ ให้คำแนะนำที่ทันสมัยอยู่ตลอดเวลาในการใช้สารเคมีให้เหมาะสม เพื่อยืดอายุการใช้งานสารเคมีให้มีประสิทธิภาพอยู่ได้นานที่สุดหรือ กล่าวอีกนัยหนึ่ง ก็คือ ต่อต้านการดื้อยา ด้วยวิธีการทางวิทยาศาสตร์ งานลักษณะนี้มีหรือไม่ในประเทศไทย คำตอบ ก็คงจะมีว่า การทดสอบ การดื้อยา พอมีอยู่บ้าง แต่ไม่ต่อเนื่อง อาจเป็นเพียงความสนใจเฉพาะบุคคลของนักวิจัย เมื่อวิจัยแล้ว ก็ไม่ได้นำข้อมูลที่ได้มาใช้ประโยชน์อย่างจริงจัง ข้อมูลยังไม่เป็นระบบ และยังไม่มีความหมายใด ทั้งภาครัฐและเอกชนให้ความสำคัญ ในเรื่องนี้ ทั้งๆที่ การดื้อยา ถ้าเกิดขึ้นแล้ว เป็นความสูญเสียทางเศรษฐกิจของชาติ เป็นความสูญเสียต้นทุนการผลิตของเกษตรกร และนำไปสู่ผลิตภาพต่ำ (low productivity) ของเกษตรกร เรียกว่า สูญเสียเงินทุน และ สูญเสียกำไร ที่ควรจะได้จากการผลิต ซึ่งเรื่องนี้ จะต้องมีข้อมูลวิชาการและคำแนะนำจากนักวิชาการ และเพื่อให้เกิดผลในทางปฏิบัติอย่างจริงจัง ต้องมีความร่วมมือระหว่าง ภาครัฐ ภาคเอกชน และเกษตรกร จึงจะสามารถบริหารจัดการ การใช้สารเคมีให้มีประโยชน์สูงสุด

จาก Table 2.1 แสดงชนิดของสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อรา *Phytophthora* spp. ชนิดต่างๆ จากการดัดแปลงจาก จาก Fishel (2009) และ Fungicide resistance action committee (2011) พบว่า เชื้อรา *Phytophthora* spp. มีโอกาสเสี่ยงต่อการดื้อสารเคมีในกลุ่ม Phenylamides สูง ส่วนในสารเคมีในกลุ่ม Aromatic hydrocarbons & heteroaromatics และ Cyanoacetam-ideoxime เชื้อรา *Phytophthora* spp. มีโอกาสดื้อในระดับปานกลาง – ต่ำ ส่วนกลุ่มอื่นอยู่ในระดับความเสี่ยงต่อการดื้อระดับต่ำ แต่อย่างไรก็ตามสรุปได้ว่า เชื้อรา *Phytophthora* spp. มีความเสี่ยงต่อการดื้อต่อสารเคมีทุกกลุ่ม แตกต่างกันขึ้นกับชนิดของสารเคมี จึงทำให้ต้องทำการศึกษาต่อไป

**Table 2.1** Fungicides for controlling *Phytophthora* spp.

Group name	Chemical group	Common name	Mode of action	Target site and code	Resistance risk and comments
Dithiocarbamates and relatives	Dithiocarbamates and relatives	Mancozeb	Group M: Multi-site contact activity	multi-site contact activity	<b>LOW RISK</b> Generally considered as a low risk group without any signs of resistance developing to the fungicides
Phenylamides	Acylalanines	Metalaxyl	Group A: Nucleic acid synthesis	A1: RNA polymerase I	<b>HIGH RISK</b> Resistance and cross resistance well known in various Oomycetes but mechanism unknown.
	Oxazolidinones	Oxadixyl			
Aromatic hydrocarbons & heteroaromatics	Thiadiazoles	Etridiazole	Group F: Lipid and Membrane synthesis	F3: lipid peroxidation	<b>LOW TO MEDIUM RISK</b> Resistance known to some fungi. Cross resistance patterns complex due to different activity spectra.
Carboxylic Acid Amides	Cinnamic acid amides	Dimethomorph	Group H: Cell wall biosynthesis	H5: cellulose synthesis	
Cyanoacetamideoxime	Cyanoacetamideoxime	Cymoxanil	Unknown mode of action (not appearing in the list derive from reclassified fungicides)	Unknown	<b>LOW TO MEDIUM RISK</b> Resistance claims described. Resistance management required.
Phosphonates	Ethyl phosphonates	Fosetyl-Al	reclassified fungicides)	Unknown	<b>LOW RISK</b> Few resistance cases reported in few pathogens.
	Phosphorous acid and salts	phosphorous acid		Unknown	

**Sources:** Fishel (2009); Fungicide resistance action committee (2011)

### บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย

#### 3.1 เก็บรวบรวมและศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาเชื้อรา *Phytophthora* spp. สาเหตุโรคพืช

เก็บรวบรวมตัวอย่างทุเรียนที่แสดงอาการผลเน่าที่เกิดจากเชื้อราสาเหตุ *Phytophthora* spp. พร้อมบันทึกชนิดและอัตราการใช้สารป้องกันกำจัดเชื้อราชนิดนั้นๆ ทำการแยกเชื้อราโดยตัดชิ้นพืชบริเวณแผลกับเนื้อเยื่อปกติให้มีขนาดประมาณ 0.5 x 0.5 เซนติเมตร ฆ่าเชื้อที่ผิวโดยแช่ใน Clorox 1-2% ประมาณ 1-2 นาที และตัด selective media เป็นชิ้นขนาดประมาณ 0.5 x 0.5 เซนติเมตร ใส่รวมกันในน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จึงย้ายขึ้น selective media วางบนอาหาร selective media อีกครั้ง บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 2-3 วัน เมื่อสังเกตเห็นเส้นใยเชื้อราเจริญออกจากชิ้นส่วนพืช จึงแยกบริเวณปลายเส้นใยมาวางบนอาหาร V8 agar บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้อง และทำการแยกเชื้อราบริสุทธิ์เก็บเชื้อส่วนหนึ่งไว้ใน PDA slant สำหรับใช้ในการทดลองขั้นต่อไป นำเชื้อที่แยกได้ศึกษาลักษณะการเจริญเติบโต เส้นใยของเชื้อรา โคลนี และ sporangium

#### 3.2 ตรวจสอบเชื้อรา *Phytophthora* spp. ที่ติดต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อราชนิดต่างๆ ด้วยวิธี Poisoned food technique

ตรวจสอบเชื้อรา *Phytophthora* spp. ที่ติดต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อราชนิดต่างๆ โดยใช้สารเคมีป้องกันกำจัดโรคพืชตามที่เกษตรกรส่วนใหญ่ใช้ จำนวน 6 ชนิด ได้แก่ cymoxanil, dimethomorph, etridiazole, fosetyl-Al, metalaxyl phosphorous acid และ oxadixyl ที่ได้รับการขึ้นทะเบียนจากกรมวิชาการเกษตร (2549) โดยใช้สารป้องกันกำจัดต่างๆ ที่ระดับความเข้มข้น 3 ระดับในอาหารเลี้ยงเชื้อ V8 agar ดังนี้ น้อยกว่าสองเท่าของอัตราแนะนำ, อัตราแนะนำ และมากกว่าสองเท่าของอัตราแนะนำ จากนั้นใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร ตัดบริเวณขอบโคโลนีเชื้อราที่เลี้ยงบนอาหาร V8 agar อายุ 5 วัน วางบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร ประมาณ 15 มิลลิลิตร ที่ผสมสารป้องกันกำจัดโรคพืชแต่ละชนิด โดยทดสอบจำนวน 5 ซ้ำ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง บันทึกขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี เพื่อคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใย เปรียบเทียบลักษณะโคโลนีกับชุดควบคุมที่ไม่มีการผสมสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อรา โดยประเมินระดับความต้านทานตามหลักเกณฑ์ในข้อ A และ B ซึ่งดัดแปลงจาก Koenraad *et al.* (1992) และ Peres *et al.* (2004) ดังนี้

นำเชื้อราไอโซเลทที่จัดระดับเป็นเชื้อราสายพันธุ์ต้านทาน ( $Fg^R$ ) ต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อรามากกว่า 2 ชนิด ให้จัดเป็นสายพันธุ์ multiple fungicide resistance ( $MuFg^R$ ) เพื่อนำไปทดสอบต่อไปในการทดลองที่ 3.3



### 3.3 ทดสอบประสิทธิภาพของไคโตซานบางชนิดต่อการเจริญของเชื้อรา *Phytophthora* spp. ที่ดื้อต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อรา

แผนการทดลองแบบ 3\*4 Factorials in Completely Randomized Design (CRD)

ปัจจัยที่ 1 ชนิดของไคโตซานแบ่งตามน้ำหนักโมเลกุล คือ

- chitosan low molecular weight
- chitosan medium molecular weight
- chitosan high molecular weight

ปัจจัยที่ 2 ระดับความเข้มข้น คือ

- control
- 500 ppm
- 1,000 ppm
- 2,000 ppm

จัดระดับความต้านทานต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อรา 2 ระดับ (Table 3.1)

**Table 3.1** Phenotype-resistant levels of *Phytophthora* spp. to fungicide modified from Koenraad *et al.*, 1992; Peres *et al.*, 2004.

Strains	Resistant levels	Fungicide concentrations		
		Less than 2 time of field-use recommended concentration	Field-use recommended concentration	More than 2 time of field-use recommended concentration
Fg <sup>S</sup>	Sensitive (S)	X ✓	X X	X X
Fg <sup>R</sup>	Resistance (R)	✓ ✓	✓ ✓	X ✓

Fg<sup>S</sup> = Fungicide sensitivity strains

Fg<sup>R</sup> = Fungicide resistance strains

X = Percentage of growth < 10% compared with the control

✓ = Percentage of growth ≥ 10% compared with the control

#### 3.3.1 ศึกษาผลของไคโตซานต่อการเจริญทางเส้นใย

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ V8 agar ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อจากนั้นผสมผลิตภัณฑ์ไคโตซานชนิดต่างๆ ที่ระดับความเข้มข้น 500, 1,000 และ 2,000 ppm เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ผสมผลิตภัณฑ์ไคโตซาน เทใส่จานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร ประมาณ 15 มิลลิลิตร จากนั้นทดสอบการยับยั้งการเจริญของเส้นใย โดยใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร ตัดบริเวณขอบโคโลนีเชื้อราสายพันธุ์ MuFg<sup>R</sup> ที่เลี้ยงบนอาหาร V8 agar อายุ 7 วัน วางลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ จำนวน 5 ซ้ำ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องจนเส้นใยเชื้อราในชุดควบคุมเจริญเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อ บันทึกขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีเพื่อคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง

### 3.3.2 ศึกษาผลของไคโตซานต่อการสร้าง sporangium และการปลดปล่อย zoospores

โดยวิธี culture disc technique ใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3 มิลลิเมตร ตัดบริเวณขอบโคลนเชื้อรา สายพันธุ์ MuFg<sup>R</sup> ที่เลี้ยงบนอาหาร V8 agar อายุ 7 วัน ใส่จานอาหารเลี้ยงเชื้อ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 เซนติเมตร หลังจากนั้นนำสารละลายไคโตซานชนิดต่างๆ ที่ระดับความเข้มข้น 500, 1,000 และ 2,000 ppm อย่างละเท่าๆ กัน ใส่จนท่วม culture disc จำนวน 5 ซ้ำ บ่มเชื้อที่ อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 12 ชั่วโมง หลังจากนั้น บันทึกจำนวน sporangium และ empty sporangium ทุก 6 ชั่วโมง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง

## บทที่ 4

### ผลและวิจารณ์ผลการวิจัย

#### 4.1 แยกและรวบรวมเชื้อรา *Phytophthora* spp. สาเหตุโรคทุเรียน

จากการเก็บตัวอย่างตัวอย่างทุเรียน ที่มีอาการผลเน่าในระยะก่อนการเก็บเกี่ยว มีลักษณะเป็นแผลสีน้ำตาลบริเวณเปลือก และลูกกลมเข้าไปภายในผล (Figure 4.1a) ส่วนอาการของต้นเน่าจะมีลักษณะเป็นแผลเน่าและมีน้ำไหลเยิ้ม ลักษณะเนื้อเยื่อเปลือกและเนื้อไม้เป็นสีน้ำตาลเข้ม อาการจะลุกลามทำให้ต้นทุเรียนยืนต้นตายในเวลาต่อมา (Figure 4.1b) นำตัวอย่างที่ได้มาทำการแยกเชื้อด้วยวิธี baiting technique และ tissue transplanting technique โดยใช้อาหาร PAR(PH)-V8 selective media แยกจากโรคผลทุเรียน 91 ตัวอย่าง แยกเชื้อได้ 67 ไอโซเลท และโรคต้นทุเรียน 28 ตัวอย่าง แยกเชื้อได้ 12 ไอโซเลท รวมแยกเชื้อได้ทั้งหมด 79 ไอโซเลท (Table 4.1)



Figure 4.1 Symptoms of fruit rot disease (a) and stem rot disease (b) in durian.

Table 4.1 Sample numbers of durian disease collected from orchards.

Durian Tissue	No. of samples	Isolate no. of pure culture
Stem	28	12
Fruit	91	67
<b>Total</b>	<b>119</b>	<b>79</b>

#### 4.2 ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราสาเหตุ

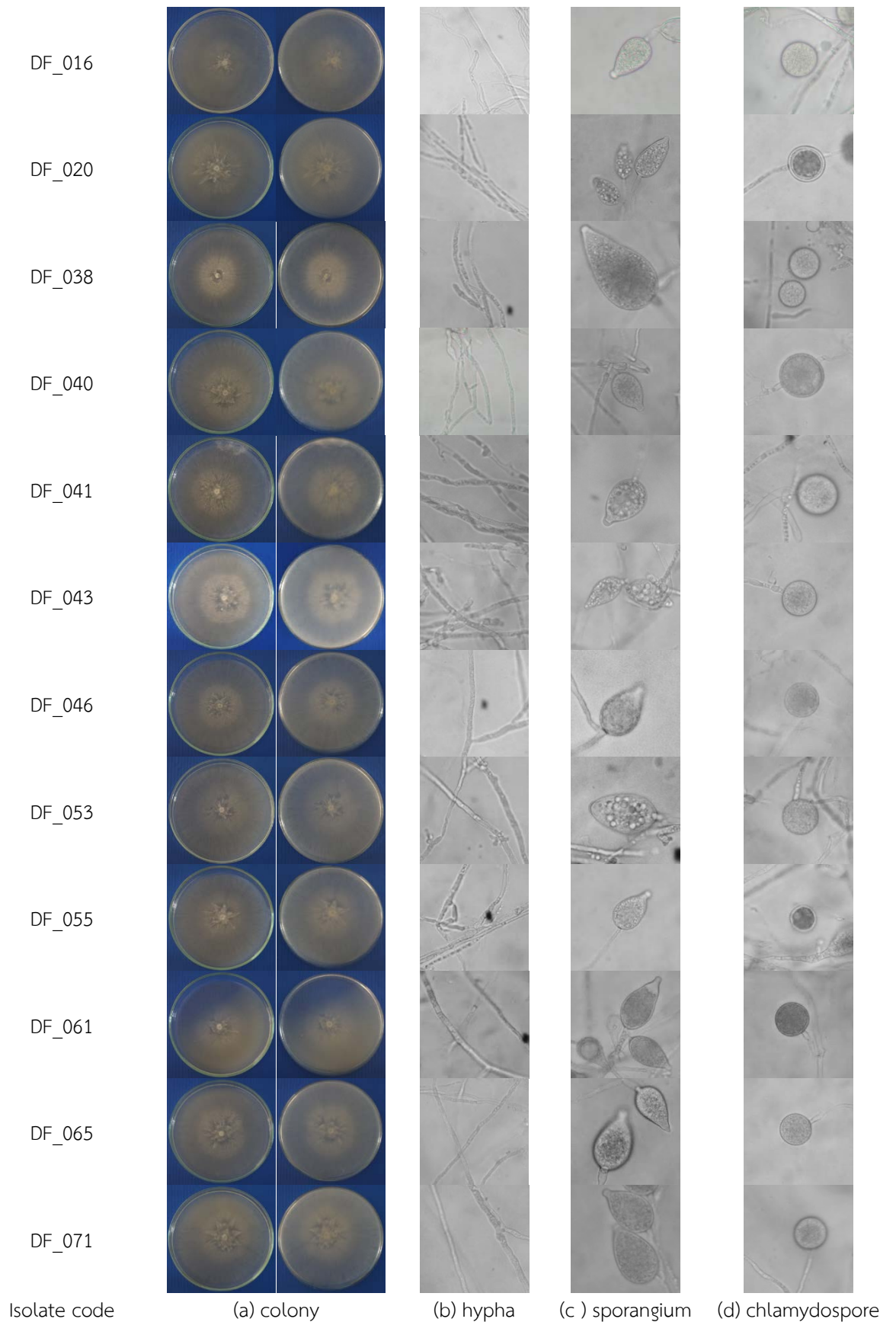
- สาเหตุโรคผลเน่าทุเรียน

ทำการสุ่มตัวอย่างจำนวน 12 ไอโซเลทจากเชื้อที่แยกได้จากผลทุเรียนที่แสดงอาการผลเน่า พบว่าเชื้อราทั้งหมดมีลักษณะโคโลนิบนอาหาร V8 agar ดังนี้ โคโลนิไม่มีสีขาว เป็นเส้นใยสีขาวบางๆ ซ้อนเป็นชั้นๆ อัตราการเจริญบนอาหาร V8 agar เฉลี่ยต่อวัน  $11.25 \pm 0.12 - 15.30 \pm 0.64$  mm. (Figure 4.2a) เจริญเต็มจานเพาะเชื้อประมาณ 5-7 วัน จากนั้นตัดชิ้นส่วนของเชื้อที่เลี้ยงไว้เป็นชิ้นเล็กๆ นำมาใส่จานเพาะเชื้อที่ฆ่าเชื้อแล้ว เติมน้ำกลั่นฆ่าเชื้อให้ท่วมชิ้นวุ้น เก็บไว้ในตู้อุณหภูมิห้อง 1 วัน ตรวจลักษณะเส้นใยและ sporangium ภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบว่า ลักษณะเส้นใยเป็นแบบ non-septate (Figure 4.2b) ซึ่งเป็นลักษณะที่พบได้ในเชื้อราชั้นต่ำ สร้าง sporangium แบบ ovoid และ obpyriform ขนาด sporangium มี

ความยาวเฉลี่ย 35-70  $\mu\text{m}$  และความกว้างเฉลี่ย 23-40  $\mu\text{m}$  อัตราของความยาวต่อความกว้างเฉลี่ย 1.5-2 (Figure 4.2c) นอกจากนี้ยังพบ chlamyospore ทุกไอโซเลท (Figure 4.2d) จากลักษณะดังกล่าวสามารถจำแนกได้เป็นเชื้อรา *Phytophthora* spp. (Table 4.2)

**Table 4.2** Morphology characterization of *Phytophthora* spp. isolate causing fruit rot disease of durian.

Isolate	Plant		Origins (Location)	Radial Growth (mm/day)	Sporangia characteristic and dimension			Chlamyospore	
	Host	Tissue			Shape	Length ( $\mu\text{m}$ )	Beadth ( $\mu\text{m}$ )		L/B ratio
DF_016	Durian	fruit	Sawi	15.25 $\pm$ 1.58	ovoid	35	23	1.52	✓
DF_020	Durian	fruit	Sawi	11.25 $\pm$ 0.12	ovoid	50	30	1.67	✓
DF_038	Durian	fruit	Chumphon Campus	14.85 $\pm$ 0.75	ovoid	70	40	1.75	✓
DF_040	Durian	fruit	Chumphon Campus	13.05 $\pm$ 1.22	ovoid	48	30	1.6	✓
DF_041	Durian	fruit	Chumphon Campus	13.13 $\pm$ 0.15	ovoid	40	25	1.6	✓
DF_043	Durian	fruit	Chumphon Campus	15.30 $\pm$ 0.64	ovoid	50	25	2	✓
DF_046	Durian	fruit	Chumphon Campus	12.71 $\pm$ 0.57	ovoid	45	30	1.5	✓
DF_053	Durian	fruit	Chumphon Campus	12.86 $\pm$ 0.41	obpyriform	50	30	1.67	✓
DF_055	Durian	fruit	Chumphon Campus	11.93 $\pm$ 0.94	ovoid	50	30	1.67	✓
DF_061	Durian	fruit	Chumphon Campus	13.46 $\pm$ 0.99	ovoid	55	30	1.83	✓
DF_065	Durian	fruit	Chumphon Campus	12.00 $\pm$ 0.92	ovoid	45	30	1.5	✓
DF_071	Durian	fruit	Chumphon Campus	12.11 $\pm$ 0.23	ovoid	50	30	1.67	✓



**Figure 4.2** Morphology characterization of *Phytophthora* spp. isolate causing fruit rot disease of durian; colony color on V8 agar (column a), hypha (column b), sporangium (column c), and chlamydospore (column d).

● สาเหตุโรคลำต้นเน่าทุเรียน

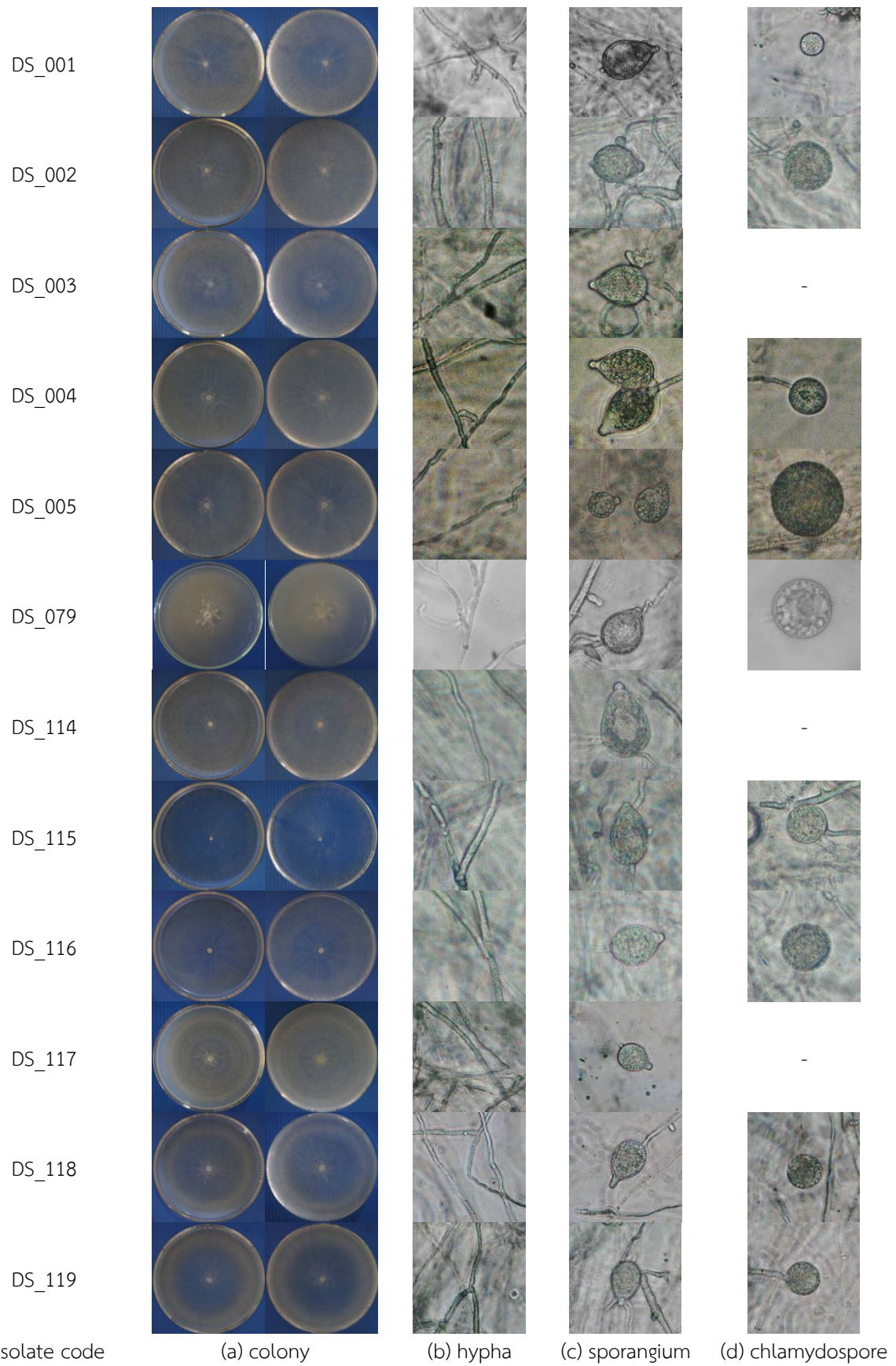
จากตัวอย่าง 12 ไอโซเลท พบว่าเชื้อราทั้งหมดมีลักษณะโคโลนีบนอาหาร V8 agar ดังนี้ โคโลนีมีสีขาว เป็นเส้นใยสีขาวบางๆ ซ้อนเป็นชั้นๆ อัตราการเจริญบนอาหาร V8 agar เฉลี่ยต่อวัน  $13.50 \pm 1.00 - 17.69 \pm 0.69$  mm. (Figure 4.3a) เจริญเต็มจานเพาะเชื้อประมาณ 5-7 วัน จากนั้นตัดชิ้นส่วนของเชื้อที่เลี้ยงไว้เป็นชิ้นเล็กๆ นำมาใส่จานเพาะเชื้อที่ฆ่าเชื้อแล้ว เติมน้ำกลั่นฆ่าเชื้อให้ท่วมชิ้นวุ้น เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1 วัน ตรวจสอบลักษณะเส้นใยและ sporangium ภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบว่า ลักษณะเส้นใยเป็นแบบ non-septate (Figure 4.3b) ซึ่งเป็นลักษณะที่พบได้ในเชื้อราชั้นต่ำสร้าง sporangium แบบ ovoid ขนาด sporangium มีความยาวเฉลี่ย 25-80  $\mu$ m และความกว้าง 20-60  $\mu$ m อัตราของความยาวต่อความกว้างเฉลี่ย 1.2-1.6 (Figure 4.3c) นอกจากนี้ยังพบ chlamyospore ในไอโซเลท DS\_001, DS\_002, DS\_004, DS\_005, DS\_079, DS\_115, DS\_116, DS\_118, DS\_119, (Figure 4.3d) จากลักษณะดังกล่าวสามารถจำแนกได้เป็นเชื้อรา *Phytophthora* spp. (Table 4.3)

เชื้อรา *Phytophthora* spp. มีลักษณะกลุ่มเส้นใยสีขาวบางๆ เจริญบนอาหาร V8 agar ได้เต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อราประมาณ 5-7 วัน ตรวจสอบลักษณะเส้นใยและการสร้างสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบว่า เส้นใยแตกกิ่งก้าน ลักษณะเส้นใยใสไม่มีสี (hyaline) ไม่มีผนังกั้น (non-septa) สร้าง sporangium แบบ ovoid ตรงปลาย sporangium พบ papilla ชัดเจน จากลักษณะดังกล่าวสามารถจำแนกได้ว่าเป็นเชื้อรา *Phytophthora* spp. ตรงตามรายงานของ Hawksworth *et al.* (1995); Drent and Sendall (2001); Sangchote *et al.* (2004); Sumbali (2005)

**Table 4.3** Morphology characterization of *Phytophthora* spp. isolate causing stem rot disease of durian.

Isolate	Plant		Origins (Location)	Radial Growth (mm/day)	Sporangia characteristic and dimension			Chlamyospore	
	Host	Tissue			Shape	Length ( $\mu$ m)	Beadth ( $\mu$ m)		L/B ratio
DS_001	Durian	Stem	Chumphon Campus	$17.25 \pm 0.25$	ovoid	40	30	1.33	✓
DS_002	Durian	Stem	Chumphon Campus	$17.25 \pm 0.63$	ovoid	80	50	1.6	✓
DS_003	Durian	Stem	Chumphon Campus	$17.43 \pm 0.53$	ovoid	80	60	1.33	-
DS_004	Durian	Stem	Chumphon Campus	$17.69 \pm 0.69$	ovoid	45	30	1.5	✓
DS_005	Durian	Stem	Chumphon Campus	$15.63 \pm 1.19$	ovoid	30	25	1.2	✓
DS_079	Durian	Stem	Suratthani	$14.56 \pm 0.53$	ovoid	35	30	1.17	✓
DS_114	Durian	Stem	Hua Hin	$17.06 \pm 0.47$	ovoid	50	35	1.43	-
DS_115	Durian	Stem	Hua Hin	$17.63 \pm 0.19$	ovoid	45	30	1.5	✓
DS_116	Durian	Stem	Hua Hin	$13.50 \pm 1.00$	ovoid	40	28	1.43	✓
DS_117	Durian	Stem	Hua Hin	$17.50 \pm 0.38$	ovoid	25	20	1.25	-
DS_118	Durian	Stem	Hua Hin	$15.56 \pm 0.94$	ovoid	38	25	1.52	✓
DS_119	Durian	Stem	Hua Hin	$17.06 \pm 0.53$	ovoid	30	20	1.5	✓





**Figure 4.3** Morphology characterization of *Phytophthora* spp. isolate causing stem rot disease of durian; colony color on V8 agar (column a), hypha (column b), sporangium (column c), and chlamydospore (column d).

#### 4.3 ประเมินระดับความต้านทานต่อสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อราหลายชนิด

จากการสุ่มเชื้อรา *Phytophthora* spp. สาเหตุโรคทุเรียน ทดสอบความต้านทานต่อสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อรา 4 ชนิด ได้แก่ dimethomorph, fosetyl-AL, metalaxyl และ mancozeb พบว่ามีจำนวน 3 ไอโซเลท คือ DF\_016, DF\_020 และ DF\_038 ที่ต้านทานต่อสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อรา metalaxyl และ จำนวน 5 ไอโซเลท คือ DF\_016, DF\_020, DF\_038, DF\_040 และ DF\_065 ต้านทานต่อสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อรา dimethomorph โดยพบว่า จำนวน 3 ไอโซเลท คือ DF\_016, DF\_020 และ DF\_038 ที่ต้านทานต่อสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อราได้ 2 ชนิด คือ dimethomorph และ metalaxyl จึงจัดอยู่ในกลุ่ม MuFg<sup>R</sup> และพบว่าทุกไอโซเลทอ่อนแอต่อสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อรา fosetyl-AL และ mancozeb (Table 4.4 และ Figure 4.4) และ จากตัวอย่างเชื้อรา *Phytophthora* spp. สาเหตุโรคลำต้นเน่าทุเรียน จำนวน 12 ไอโซเลท พบว่ามีจำนวน 4 ไอโซเลท คือ DS\_001, DS\_002, DS\_003 และ DS\_004 ที่ต้านทานต่อสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อรา metalaxyl และพบว่าทุกไอโซเลทอ่อนแอต่อสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อรา dimethomorph, fosetyl-AL และ mancozeb (Table 4.5 และ Figure 4.5)

จากการประเมินระดับความต้านทานต่อสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อรา dimethomorph, fosetyl-AL, metalaxyl และ mancozeb ของเชื้อรา *Phytophthora* spp. พบว่าเชื้อรา โดยสุ่มเชื้อรา *Phytophthora* spp. ที่แยกได้จากตัวอย่างที่แสดงอาการ โรคใบร่วงและโรคเส้นดำของยางพารา โรคผลเน่าและลำต้นเน่าของทุเรียน จำนวน 48 ไอโซเลท พบเชื้อราจำนวน 27 ไอโซเลท ต้านทานต่อสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อรา metalaxyl และเชื้อราจำนวน 5 ไอโซเลท จากโรคผลเน่าของทุเรียน ต้านทานต่อสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อรา dimethomorph และพบว่าจำนวน 3 ไอโซเลท จากโรคผลเน่าของทุเรียน ที่ต้านทานต่อสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อราได้ 2 ชนิด คือ dimethomorph และ metalaxyl จัดอยู่ในกลุ่ม MuFg<sup>R</sup> และพบว่าทุกไอโซเลทอ่อนแอต่อสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อรา fosetyl-AL และ mancozeb จากผลการทดลองพบเชื้อรา *Phytophthora* spp. ส่วนใหญ่ต้านทานต่อสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อรา metalaxyl ซึ่งมีผลสอดคล้องกับ Sujkovski *et al.* (1995) ได้ทำการประเมินระดับความต้านทานของเชื้อรา *P. infestans* โดยใช้สารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อรา metalaxyl, cymoxanil และ chlorothalonil โดยผลการทดลองพบว่า เชื้อรา *P. infestans* ส่วนใหญ่ต้านทานต่อสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อรา metalaxyl เช่นกัน และยังสอดคล้องกับ พิภพร และคณะ (2554), Mukalazi *et al.* (2000) และ Fontem *et al.* (2005) ที่พบว่า เชื้อรา *Phytophthora* spp. ส่วนใหญ่ต้านทานต่อสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อรา metalaxyl นอกจากนี้จากผลการทดลองครั้งนี้พบเชื้อรา *Phytophthora* spp. ทุกไอโซเลทอ่อนแอต่อสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อรา fosetyl-AL และ mancozeb ซึ่งสอดคล้องกับ Sujkovski *et al.* (1995) ที่มีรายงานว่าพบเชื้อรา *P. infestans* อ่อนแอต่อสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อรา cymoxanil และ chlorothalonil ซึ่งจัดอยู่ในสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อรากลุ่มเดียวกับ fosetyl-AL และ mancozeb ตามลำดับ แต่สำหรับผลการทดลองเชื้อรา *Phytophthora* spp. ที่ต้านทานต่อสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อรา dimethomorph ยังไม่พบรายงานการวิจัยว่าเชื้อรา *Phytophthora* spp. สามารถต้านทานต่อสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อราดังกล่าวได้ นอกจากนี้ยังพบรายงานการวิจัยเชื้อราชนิดอื่นที่ต้านทานต่อสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อรา เช่น พรประพา และคณะ (2553) รายงานว่า พบเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรกโนสบนผลมะม่วง สามารถต้านทานสารป้องกันกำจัดเชื้อรา carbendazim และ Bardes *et al.* (2010) รายงานว่า เชื้อรา *Botrytis cinerea* สามารถต้านทานต่อสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อรา boscalid และ pyraclostrobin ได้



**Table 4.4** Multiple fungicide resistant assay of *Phytophthora* spp. causing fruit rot disease of durian on V8 agar amended with fungicide.

Isolate code	Fungicide type	Concentration			Resistant	Multiple resistant
		0.5X	1X	2X		
DF_016	<b>Systemic fungicides</b>					
	dimethomorph	12.73% (✓)	12.27% (✓)	11.42% (✓)	Fg <sup>R</sup>	MuFg <sup>R</sup>
	fosetyl-Al	0% (✗)	0% (✗)	0% (✗)	Fg <sup>S</sup>	
	metalaxyl	14.41% (✓)	13.58% (✓)	11.68% (✓)	Fg <sup>R</sup>	
	<b>Contact fungicide</b>					
mancozeb	0% (✗)	0% (✗)	0% (✗)	Fg <sup>S</sup>		
DF_020	<b>Systemic fungicides</b>					
	dimethomorph	12.60% (✓)	12.15% (✓)	11.33% (✓)	Fg <sup>R</sup>	MuFg <sup>R</sup>
	fosetyl-Al	0% (✗)	0% (✗)	0% (✗)	Fg <sup>S</sup>	
	metalaxyl	22.82% (✓)	18.89% (✓)	17.01% (✓)	Fg <sup>R</sup>	
	<b>Contact fungicide</b>					
mancozeb	0% (✗)	0% (✗)	0% (✗)	Fg <sup>S</sup>		
DF_038	<b>Systemic fungicides</b>					
	dimethomorph	12.93% (✓)	12.64% (✓)	12.53% (✓)	Fg <sup>R</sup>	MuFg <sup>R</sup>
	fosetyl-Al	0% (✗)	0% (✗)	0% (✗)	Fg <sup>S</sup>	
	metalaxyl	14.27% (✓)	13.89% (✓)	12.14% (✓)	Fg <sup>R</sup>	
	<b>Contact fungicide</b>					
mancozeb	0% (✗)	0% (✗)	0% (✗)	Fg <sup>S</sup>		
DF_040	<b>Systemic fungicides</b>					
	dimethomorph	12.61% (✓)	12.23% (✓)	11.25% (✓)	Fg <sup>R</sup>	non
	fosetyl-Al	5.74% (✗)	0% (✗)	0% (✗)	Fg <sup>S</sup>	
	metalaxyl	0% (✗)	0% (✗)	0% (✗)	Fg <sup>S</sup>	
	<b>Contact fungicide</b>					
mancozeb	0% (✗)	0% (✗)	0% (✗)	Fg <sup>S</sup>		
DF_041	<b>Systemic fungicides</b>					
	dimethomorph	0% (✗)	0% (✗)	0% (✗)	Fg <sup>S</sup>	non
	fosetyl-Al	0% (✗)	0% (✗)	0% (✗)	Fg <sup>S</sup>	
	metalaxyl	0% (✗)	0% (✗)	0% (✗)	Fg <sup>S</sup>	
	<b>Contact fungicide</b>					
mancozeb	0% (✗)	0% (✗)	0% (✗)	Fg <sup>S</sup>		
DF_043	<b>Systemic fungicides</b>					
	dimethomorph	0% (✗)	0% (✗)	0% (✗)	Fg <sup>S</sup>	non
	fosetyl-Al	0% (✗)	0% (✗)	0% (✗)	Fg <sup>S</sup>	
	metalaxyl	0% (✗)	0% (✗)	0% (✗)	Fg <sup>R</sup>	
	<b>Contact fungicide</b>					
mancozeb	0% (✗)	0% (✗)	0% (✗)	Fg <sup>S</sup>		
DF_046	<b>Systemic fungicides</b>					
	dimethomorph	0% (✗)	0% (✗)	0% (✗)	Fg <sup>S</sup>	non
	fosetyl-Al	0% (✗)	0% (✗)	0% (✗)	Fg <sup>S</sup>	
	metalaxyl	0% (✗)	0% (✗)	0% (✗)	Fg <sup>R</sup>	
	<b>Contact fungicide</b>					
mancozeb	0% (✗)	0% (✗)	0% (✗)	Fg <sup>S</sup>		

X = Field-use recommendation rate

Fg<sup>S</sup> = Fungicide-sensitive, Fg<sup>R</sup> = Fungicide-resistant and MuFg<sup>R</sup> = Multiple fungicide-resistant

✗ = Percentage of growth &lt;10% compare with the control ; ✓ = Percentage of growth ≥10% compare with the control

Table 4.4 Continues.

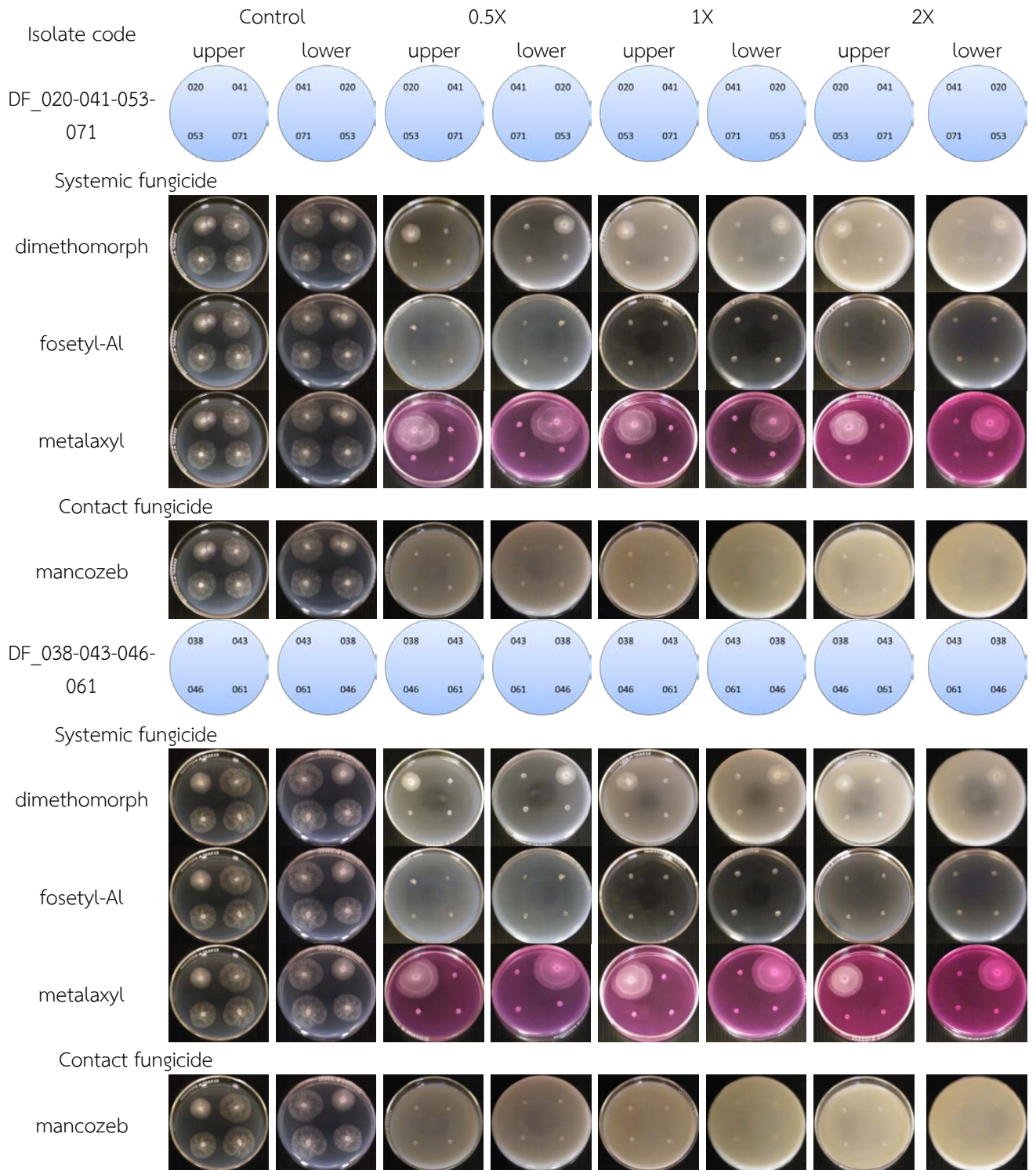
Isolate code	Fungicide type	Concentration			Resistant	Multiple resistant
		0.5X	1X	2X		
DF_053	<b>Systemic fungicides</b>					
	dimethomorph	0% (✘)	0% (✘)	0% (✘)	Fg <sup>S</sup>	non
	fosetyl-Al	0% (✘)	0% (✘)	0% (✘)	Fg <sup>S</sup>	
	metalaxyl	0% (✘)	0% (✘)	0% (✘)	Fg <sup>S</sup>	
	<b>Contact fungicide</b>					
mancozeb	0% (✘)	0% (✘)	0% (✘)	Fg <sup>S</sup>		
DF_055	<b>Systemic fungicides</b>					
	dimethomorph	0% (✘)	0% (✘)	0% (✘)	Fg <sup>S</sup>	non
	fosetyl-Al	5.43% (✘)	0% (✘)	0% (✘)	Fg <sup>S</sup>	
	metalaxyl	0% (✘)	0% (✘)	0% (✘)	Fg <sup>S</sup>	
	<b>Contact fungicide</b>					
mancozeb	0% (✘)	0% (✘)	0% (✘)	Fg <sup>S</sup>		
DF_061	<b>Systemic fungicides</b>					
	dimethomorph	0% (✘)	0% (✘)	0% (✘)	Fg <sup>S</sup>	non
	fosetyl-Al	0% (✘)	0% (✘)	0% (✘)	Fg <sup>S</sup>	
	metalaxyl	0% (✘)	0% (✘)	0% (✘)	Fg <sup>R</sup>	
	<b>Contact fungicide</b>					
mancozeb	0% (✘)	0% (✘)	0% (✘)	Fg <sup>S</sup>		
DF_065	<b>Systemic fungicides</b>					
	dimethomorph	14.24% (✓)	13.50% (✓)	12.26% (✓)	Fg <sup>S</sup>	non
	fosetyl-Al	5.84% (✘)	0% (✘)	0% (✘)	Fg <sup>S</sup>	
	metalaxyl	0% (✘)	0% (✘)	0% (✘)	Fg <sup>R</sup>	
	<b>Contact fungicide</b>					
mancozeb	0% (✘)	0% (✘)	0% (✘)	Fg <sup>S</sup>		
DF_071	<b>Systemic fungicides</b>					
	dimethomorph	0% (✘)	0% (✘)	0% (✘)	Fg <sup>S</sup>	non
	fosetyl-Al	0% (✘)	0% (✘)	0% (✘)	Fg <sup>S</sup>	
	metalaxyl	0% (✘)	0% (✘)	0% (✘)	Fg <sup>S</sup>	
	<b>Contact fungicide</b>					
mancozeb	0% (✘)	0% (✘)	0% (✘)	Fg <sup>S</sup>		

X = Field-use recommendation rate

Fg<sup>S</sup> = Fungicide-sensitive, Fg<sup>R</sup> = Fungicide-resistant and MuFg<sup>R</sup> = Multiple fungicide-resistant

✘ = Percentage of growth <10% compare with the control

✓ = Percentage of growth ≥10% compare with the control



**Figure 4.4** Multiple fungicide-resistant assay of *Phytophthora* spp. causing fruit rot disease of durian on V8 agar amended with fungicide.

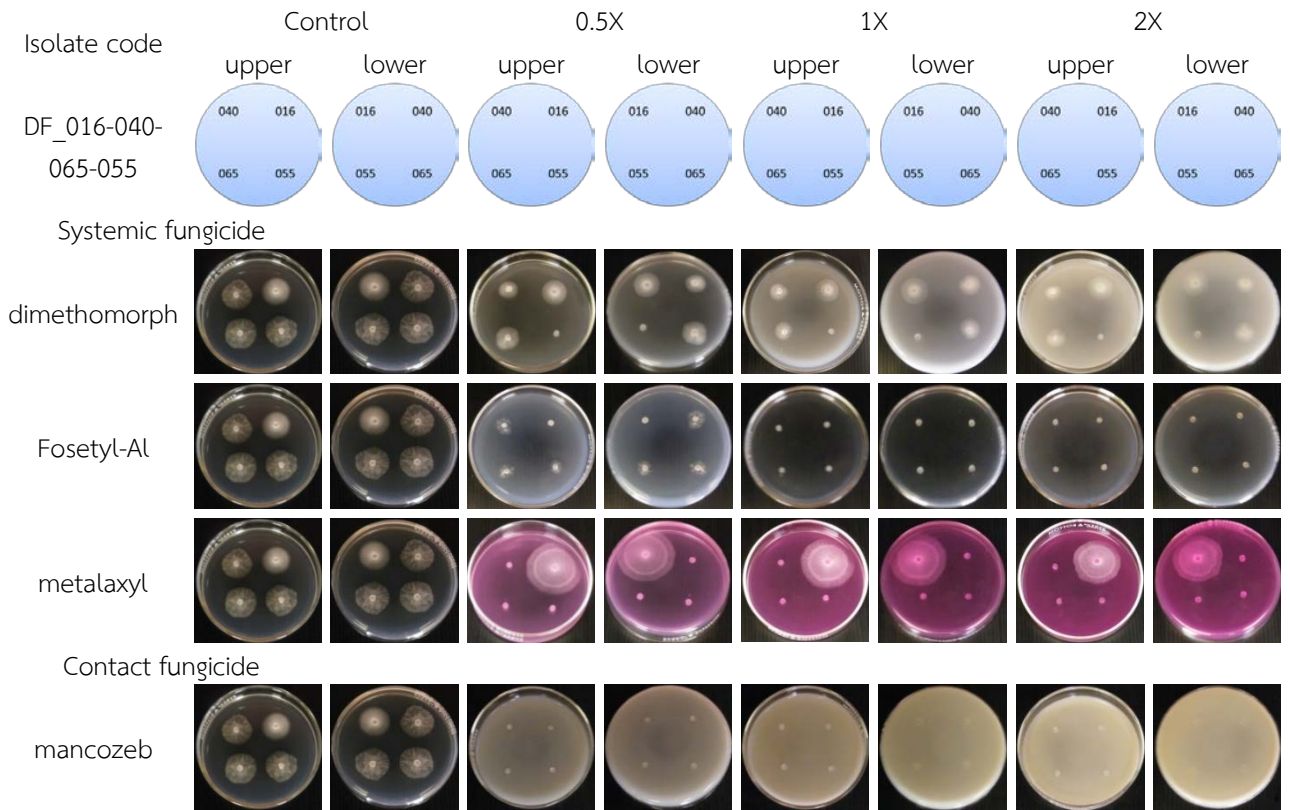


Figure 4.4 Continues.

**Table 4.5** Multiple fungicide resistant assay of *Phytophthora* spp. causing stem rot disease of durian on V8 agar amended with fungicide.

Isolate code	Fungicide type	Concentration			Resistant	Multiple resistant
		0.5X	1X	2X		
DS_001	<b>Systemic fungicides</b>					
	dimethomorph	0% (✘)	0% (✘)	0% (✘)	Fg <sup>S</sup>	non
	fosetyl-Al	0% (✘)	0% (✘)	0% (✘)	Fg <sup>S</sup>	
	metalaxyl	11.08% (✓)	10.86% (✓)	9.42% (✘)	Fg <sup>R</sup>	
	<b>Contact fungicide</b>					
mancozeb	0% (✘)	0% (✘)	0% (✘)	Fg <sup>S</sup>		
DS_002	<b>Systemic fungicides</b>					
	dimethomorph	0% (✘)	0% (✘)	0% (✘)	Fg <sup>S</sup>	non
	fosetyl-Al	0% (✘)	0% (✘)	0% (✘)	Fg <sup>S</sup>	
	metalaxyl	11.60% (✓)	9.44% (✓)	0% (✘)	Fg <sup>R</sup>	
	<b>Contact fungicide</b>					
mancozeb	0% (✘)	0% (✘)	0% (✘)	Fg <sup>S</sup>		
DS_003	<b>Systemic fungicides</b>					
	dimethomorph	0% (✘)	0% (✘)	0% (✘)	Fg <sup>S</sup>	non
	fosetyl-Al	0% (✘)	0% (✘)	0% (✘)	Fg <sup>S</sup>	
	metalaxyl	11.47% (✓)	10.57% (✓)	9.34% (✘)	Fg <sup>R</sup>	
	<b>Contact fungicide</b>					
mancozeb	0% (✘)	0% (✘)	0% (✘)	Fg <sup>S</sup>		
DS_004	<b>Systemic fungicides</b>					
	dimethomorph	0% (✘)	0% (✘)	0% (✘)	Fg <sup>S</sup>	non
	fosetyl-Al	0% (✘)	0% (✘)	0% (✘)	Fg <sup>S</sup>	
	metalaxyl	10.77% (✓)	10.27% (✓)	0% (✘)	Fg <sup>R</sup>	
	<b>Contact fungicide</b>					
mancozeb	0% (✘)	0% (✘)	0% (✘)	Fg <sup>S</sup>		
DS_005	<b>Systemic fungicides</b>					
	dimethomorph	0% (✘)	0% (✘)	0% (✘)	Fg <sup>S</sup>	non
	fosetyl-Al	0% (✘)	0% (✘)	0% (✘)	Fg <sup>S</sup>	
	metalaxyl	0% (✘)	0% (✘)	0% (✘)	Fg <sup>S</sup>	
	<b>Contact fungicide</b>					
mancozeb	0% (✘)	0% (✘)	0% (✘)	Fg <sup>S</sup>		
DS_079	<b>Systemic fungicides</b>					
	dimethomorph	0% (✘)	0% (✘)	0% (✘)	Fg <sup>S</sup>	non
	fosetyl-Al	0% (✘)	0% (✘)	0% (✘)	Fg <sup>S</sup>	
	metalaxyl	0% (✘)	0% (✘)	0% (✘)	Fg <sup>S</sup>	
	<b>Contact fungicide</b>					
mancozeb	0% (✘)	0% (✘)	0% (✘)	Fg <sup>S</sup>		
DS_114	<b>Systemic fungicides</b>					
	dimethomorph	0% (✘)	0% (✘)	0% (✘)	Fg <sup>S</sup>	non
	fosetyl-Al	0% (✘)	0% (✘)	0% (✘)	Fg <sup>S</sup>	
	metalaxyl	11.73% (✓)	9.34% (✘)	0% (✘)	Fg <sup>S</sup>	
	<b>Contact fungicide</b>					
mancozeb	0% (✘)	0% (✘)	0% (✘)	Fg <sup>S</sup>		

X = Field-use recommendation rate

Fg<sup>S</sup> = Fungicide-sensitive, Fg<sup>R</sup> = Fungicide-resistant and MuFg<sup>R</sup> = Multiple fungicide-resistant

✘ = Percentage of growth <10% compare with the control; ✓ = Percentage of growth ≥10% compare with the control

Table 4.5 Continues.

Isolate code	Fungicide type	Concentration			Resistant	Multiple resistant
		0.5X	1X	2X		
DS_115	<b>Systemic fungicides</b>					
	dimethomorph	0% (✘)	0% (✘)	0% (✘)	Fg <sup>S</sup>	non
	fosetyl-Al	0% (✘)	0% (✘)	0% (✘)	Fg <sup>S</sup>	
	metalaxyl	9.57% (✘)	9.05% (✘)	0% (✘)	Fg <sup>S</sup>	
	<b>Contact fungicide</b>					
mancozeb	0% (✘)	0% (✘)	0% (✘)	Fg <sup>S</sup>		
DS_116	<b>Systemic fungicides</b>					
	dimethomorph	0% (✘)	0% (✘)	0% (✘)	Fg <sup>S</sup>	non
	fosetyl-Al	0% (✘)	0% (✘)	0% (✘)	Fg <sup>S</sup>	
	metalaxyl	0% (✘)	0% (✘)	0% (✘)	Fg <sup>S</sup>	
	<b>Contact fungicide</b>					
mancozeb	0% (✘)	0% (✘)	0% (✘)	Fg <sup>S</sup>		
DS_117	<b>Systemic fungicides</b>					
	dimethomorph	0% (✘)	0% (✘)	0% (✘)	Fg <sup>S</sup>	non
	fosetyl-Al	0% (✘)	0% (✘)	0% (✘)	Fg <sup>S</sup>	
	metalaxyl	9.49% (✘)	9.11% (✘)	0% (✘)	Fg <sup>S</sup>	
	<b>Contact fungicide</b>					
mancozeb	0% (✘)	0% (✘)	0% (✘)	Fg <sup>S</sup>		
DS_118	<b>Systemic fungicides</b>					
	dimethomorph	0% (✘)	0% (✘)	0% (✘)	Fg <sup>S</sup>	non
	fosetyl-Al	0% (✘)	0% (✘)	0% (✘)	Fg <sup>S</sup>	
	metalaxyl	0% (✘)	0% (✘)	0% (✘)	Fg <sup>S</sup>	
	<b>Contact fungicide</b>					
mancozeb	0% (✘)	0% (✘)	0% (✘)	Fg <sup>S</sup>		
DS_119	<b>Systemic fungicides</b>					
	dimethomorph	0% (✘)	0% (✘)	0% (✘)	Fg <sup>S</sup>	non
	fosetyl-Al	0% (✘)	0% (✘)	0% (✘)	Fg <sup>S</sup>	
	metalaxyl	10.11% (✓)	8.98% (✘)	0% (✘)	Fg <sup>S</sup>	
	<b>Contact fungicide</b>					
mancozeb	0% (✘)	0% (✘)	0% (✘)	Fg <sup>S</sup>		

X = Field-use recommendation rate

Fg<sup>S</sup> = Fungicide-sensitive, Fg<sup>R</sup> = Fungicide-resistant and MuFg<sup>R</sup> = Multiple fungicide-resistant

✘ = Percentage of growth <10% compare with the control

✓ = Percentage of growth ≥10% compare with the control



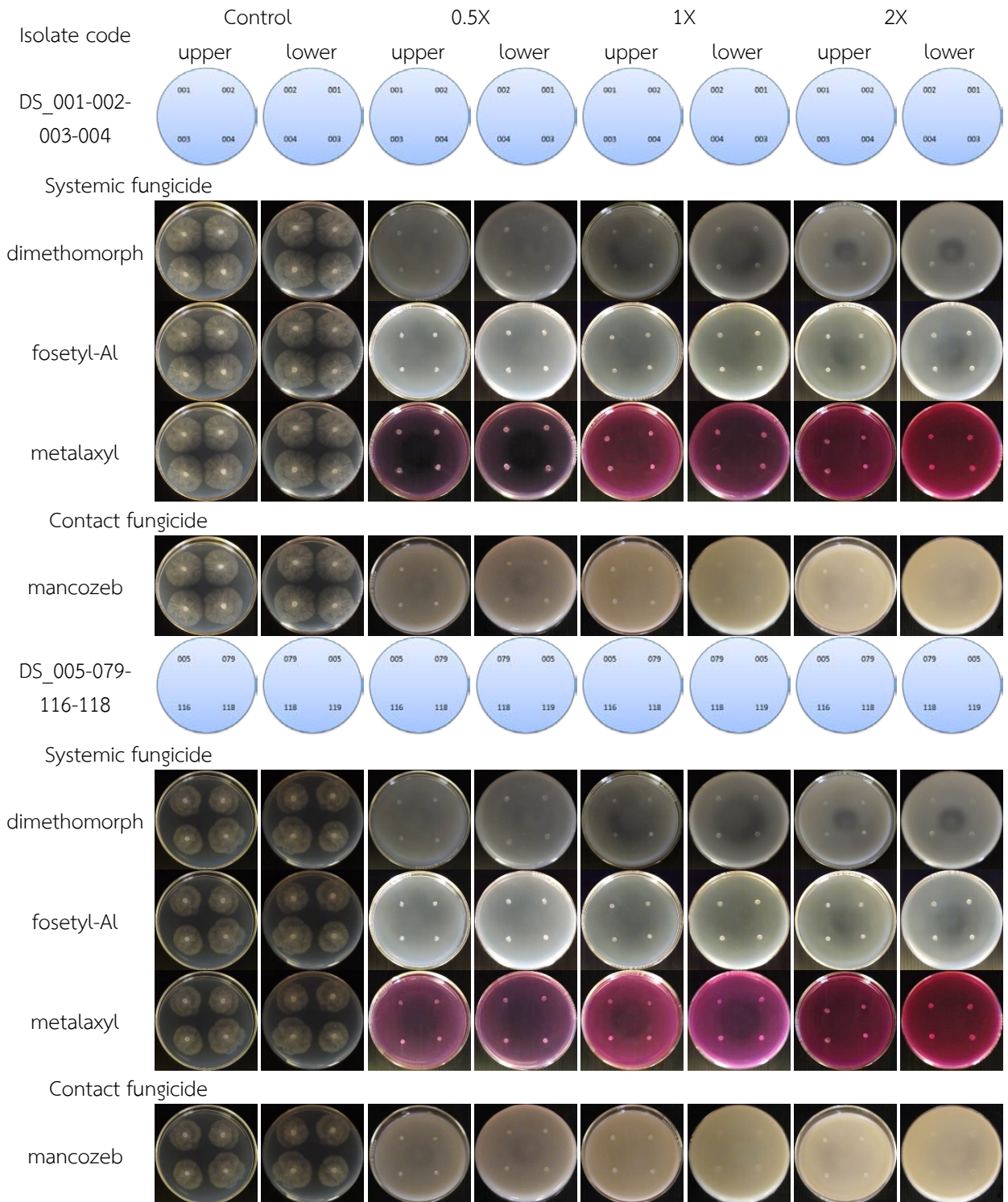


Figure 4.5 Multiple fungicide-resistant assay of *Phytophthora* spp. causing stem rot disease of durian on V8 agar amended with fungicide.

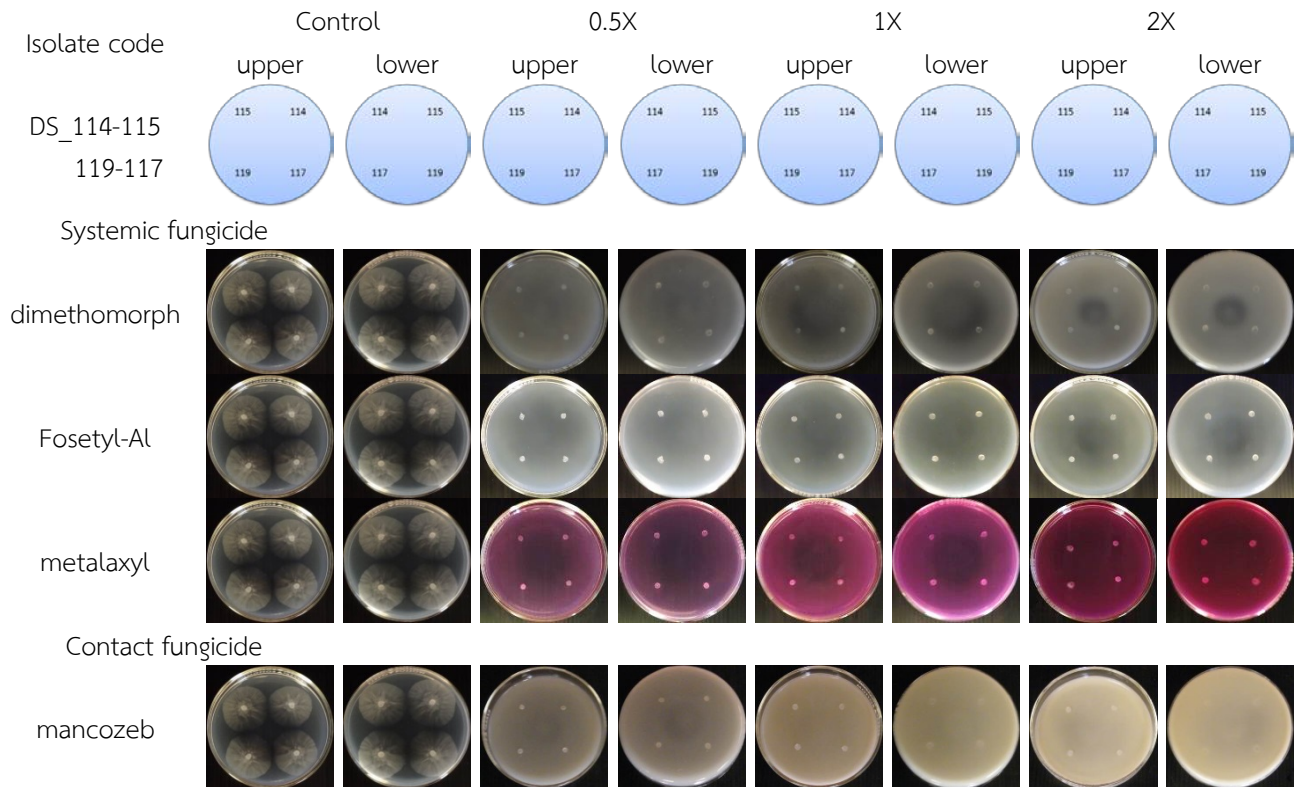


Figure 4.5 Continues.

#### 4.4 ทดสอบประสิทธิภาพของไคโตซานบางชนิดต่อการเจริญของเชื้อรา *Phytophthora* spp. ที่ดีต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อรา

##### 4.4.1 ศึกษาผลของไคโตซานต่อการเจริญทางเส้นใย

จากการทดลองผลของน้ำหนักรวมของไคโตซาน แบบ low, medium และ high molecular weight ที่ระดับความเข้มข้น 0 (ชุดควบคุม), 500, 1,000 และ 2,000 ppm ต่อการเจริญเติบโตทางเส้นใยของเชื้อรา *Phytophthora* spp. จำนวน 4 ไอโซเลท (DF\_020, DF\_065, DS\_079, DS\_117) พบว่าน้ำหนักรวมของไคโตซานมีผลแตกต่างทางสถิติต่อเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเจริญเติบโตทางเส้นใยของไอโซเลท DF\_020 และ DS\_079 และระดับความเข้มข้นมีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่งต่อทั้ง 4 ไอโซเลท โดยน้ำหนักรวมของไคโตซานมีปฏิสัมพันธ์ต่อระดับความเข้มข้นต่อเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเจริญเติบโตทางเส้นใยของไอโซเลท DF\_020 และ DS\_079 จากการทดลองพบว่าน้ำหนักรวมของไคโตซาน แบบ low, medium และ high ที่ระดับความเข้มข้น 2,000 ppm สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตทางเส้นใยได้ 100 เปอร์เซ็นต์ (Table 4.6)



**Table 4.6** The effect of low, medium, and high molecular weight of chitosan on the mycelial growth of *Phytophthora* spp. causing durian disease.

Molecular weight of chitosan	Concentration (ppm)	Percentage of mycelial inhibition			
		DF_020	DF_065	DS_079	DS_117
low	0	0.00d	0.00c	0.00f	0.00d
	500	22.76c	80.29b	78.33d	88.67bc
	1,000	30.99c	100.00a	91.46c	100.00a
	2,000	100.00a	100.00a	100.00a	100.00a
medium	0	0.00d	0.00c	0.00f	0.00d
	500	27.55c	88.57ab	72.01e	79.38c
	1,000	43.33bc	100.00a	91.97bc	93.75ab
	2,000	100.00a	100.00a	100.00a	100.00a
high	0	0.00d	0.00c	0.00f	0.00d
	500	98.12a	88.24ab	99.29a	96.35ab
	1,000	96.47a	94.12ab	95.53b	95.65ab
	2,000	100.00a	100.00a	100.00a	100.00a
	Chitosan type (A)	**	ns	**	ns
	Concentration (B)	**	**	**	**
	A*B	**	ns	**	ns
	CV (%)	36.04	15.59	4.19	11.42

\* = F-test significant at  $P < 0.05$ ; \*\* = F-test significant at  $P < 0.05$ ; ns = F-test not significant at  $P > 0.05$  values in the same column followed by different are significantly different by  $LSD_{0.05}$

จากการทดสอบประสิทธิภาพของน้ำหนักโมเลกุลของไคโตซาน แบบ low, medium และ high ต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตทางเส้นใยของเชื้อรา *Phytophthora* spp. จำนวน 4 ไอโซเลท ที่ระดับความเข้มข้น 0 (ชุดควบคุม), 500, 1,000 และ 2,000 ppm พบว่าไคโตซานทั้ง 3 ชนิดที่ระดับความเข้มข้น 2,000 ppm สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตทางเส้นใยของเชื้อรา *Phytophthora* spp. ได้ดีที่สุดในผล สอดคล้องกับ จินตนา และคณะ (2549) ศึกษาผลของไคโตซานต่อการเจริญเติบโตของเส้นใยของเชื้อรา สาเหตุโรคพืช 4 ชนิด ในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA pH 5.6 พบว่า ไคโตซานสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตทาง เส้นใย ของเชื้อรา *Fusarium solani* และ *Macrophomena phaseolina* ที่เลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี ไคโตซานในทุกความเข้มข้นมีการเจริญเติบโตช้ากว่าชุดควบคุมและชุดที่มีกรดอะซิติก อย่างมีนัยสำคัญ แต่ การเจริญเติบโตของเส้นใยของเชื้อรา *Pythium aphanidermatum* เป็นผลจากปฏิกิริยาร่วมของกรดอะซิติกและไคโตซานในขณะที่เชื้อรา *Sclerotium rolfsii* การเจริญเติบโตถูกยับยั้งเมื่ออาหารเลี้ยงเชื้อมี กรดอะซิติกร่วมด้วย และสอดคล้องกับ ชนิตรา และคณะ (2556) ได้ทำการศึกษาประสิทธิภาพนาโน แพลทินัม (Nano-Pt) และ chitosan-derivatives (Chi-der) ในการยับยั้งเชื้อรา *Aspergillus parasiticus* และ *Aspergillus niger* ที่แยกได้จากเมล็ดอัลฟาลฟาและผักกาดหัว ซึ่งพบว่า Nano-Pt ระดับ ความเข้มข้น 1.2 ppm และ Chi-der ที่ระดับความเข้มข้น 1,000 ppm มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการ เจริญเติบโตเส้นใยได้ แสดงผลสอดคล้องกับ ชาลิณี และคณะ (2556) ที่ศึกษาผลของไคโตซานต่อการ

ควบคุมเชื้อรา *F. oxysporum* สาเหตุโรคเหี่ยวเหลืองในเมล็ดมะเขือเทศ พบว่าไคโตซานที่ระดับความเข้มข้น 0.2, 0.4, 0.6, และ 0.8% (pH 5.6) สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเส้นใยเชื้อรา *F. oxysporum* ได้อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม และสอดคล้องกับ สุภาพรณ และคณะ (2557) ทำการทดสอบประสิทธิภาพของไคโตซานที่ผลิตจากเปลือกกุ้งในการควบคุมเชื้อรา *Rigidoporus lignosus* สาเหตุโรครากขาวของยางพาราได้จากการเก็บตัวอย่างรากผิวดินรอบโคนต้นยางพาราและดอกเห็ด โดยเลี้ยงเชื้อในอาหาร PDA ผสมไคโตซานที่ระดับความเข้มข้น 10, 100, 500 และ 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าไคโตซานที่ความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตรสามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อรา *R. Lignosus* ได้ดีที่สุด และสอดคล้องกับ Hernández-Lauzardo et al. (2008) ได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับเชื้อรา *Rhizopus stolonifer* สาเหตุโรคเน่าในผักและผลไม้ พบว่า ไคโตซานชนิด low molecular weight มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเส้นใย และสอดคล้องกับ Liu et al. (2007) ผลของไคโตซานต่อการควบคุมโรคราสีเทาและราสีน้ำเงินเกิดจากเชื้อราสาเหตุ *Botrytis cinerea* และ *Penicillium expansum* หลังการเก็บเกี่ยวผลมะเขือเทศพบว่า ไคโตซานมีประสิทธิภาพสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตทางเส้นใยของเชื้อรา *B. cinerea* และ *P. expansum* ได้ดีที่สุด และยังสอดคล้องกับ Sunpapao et al. (2013) ได้ทำการศึกษาไคโตซานต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Phytophthora botryosa* สาเหตุโรคใบร่วงในยางพารา พบว่าเชื้อรา *P. botryose* ที่เลี้ยงบนอาหาร PDA ที่ผสมไคโตซานที่ระดับความเข้มข้น 0.5 mg/mL-1 สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเส้นใยได้ดีที่สุด

#### 4.4.2 ศึกษาผลของไคโตซานต่อการสร้าง sporangium และการปลดปล่อย zoospores

พบว่า เมื่อเวลา 48 ชั่วโมง น้ำหนักโมเลกุลของไคโตซานมีผลแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่งต่อเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการสร้าง sporangium และระดับความเข้มข้นมีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ต่อทั้ง 4 ไอโซเลท โดยน้ำหนักโมเลกุลของไคโตซานมีปฏิสัมพันธ์ต่อระดับความเข้มข้นต่อของ ไอโซเลท DF\_065 และ DS\_079 โดยพบว่า น้ำหนักโมเลกุลของไคโตซาน แบบ low, medium และ high ที่ระดับความเข้มข้น 2,000 ppm มีแนวโน้มสามารถยับยั้งการสร้าง sporangium ได้ดีที่สุด (Table 4.7)

นอกจากนี้ พบว่า ชนิดของไคโตซานมีความแตกต่างทางสถิติต่อการปลดปล่อย zoospores เพียง ไอโซเลทเดียว คือ DS\_079 และ ระดับความเข้มข้นไม่มีความแตกต่างทางสถิติต่อการปลดปล่อย zoospores ยกเว้น ไอโซเลท DF\_020 และพบว่าชนิดของไคโตซานกับระดับความเข้มข้นไม่มีปฏิสัมพันธ์ทางสถิติต่อการปลดปล่อย zoospores (Table 4.8)

จากการทดสอบประสิทธิภาพของน้ำหนักโมเลกุลไคโตซานชนิด low และ medium molecular weight ต่อการสร้าง sporangium พบว่าไคโตซานทั้ง 3 ชนิดที่ระดับความเข้มข้น 2,000 ppm สามารถยับยั้งการสร้าง sporangium ของเชื้อรา *Phytophthora* spp. ได้ดีที่สุด ซึ่งมีผลสอดคล้องกับ จินตนา และคณะ (2549) ศึกษาผลของไคโตซานต่อการสร้างสปอร์ของเชื้อราสาเหตุโรคพืช 4 ชนิด พบว่าไคโตซานสามารถชะลอการสร้างสปอร์ของเชื้อรา *F. solani*, *S. rolfsi*, *P. aphanidermatum* และ *M. phaseolina* ได้อย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม และสอดคล้องกับ ชนิตตรา และคณะ (2556) ได้ทำการศึกษาประสิทธิภาพ Nano-Pt และ Chi-der ในการยับยั้งเชื้อรา *A. parasiticus* และ *A. niger* ที่แยกได้จากเมล็ดอัลฟาลฟาและผักกาดหัว ซึ่งพบว่า Nano-Pt ระดับความเข้มข้น 1.2 ppm และ Chi-der ที่ระดับความเข้มข้น 1,000 ppm มีประสิทธิภาพในการชะลอการสร้างสปอร์ได้ และสอดคล้องกับ ชาลณี และคณะ (2556) ศึกษาผลของไคโตซานต่อการควบคุมเชื้อรา *F. oxysporum* สาเหตุโรคเหี่ยว

เหลืองในเมล็ดมะเขือเทศ พบว่าไคโตซานที่ระดับความเข้มข้น 0.2, 0.4, 0.6, และ 0.8% (pH 5.6) สามารถชะลอการสร้างสปอร์ของเชื้อรา *F. oxysporum* ได้อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม และสอดคล้องกับ Hernández-Lauzardo et al. (2008) ได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับเชื้อรา *R. stolonifer* สาเหตุโรคน้ำในผักและผลไม้ พบว่า ไคโตซานชนิด high molecular weight ส่งผลให้รูปร่างของสปอร์ การสร้างสปอร์และการงอกของสปอร์เปลี่ยนแปลง และสอดคล้องกับ Liu et al. (2007) ผลของไคโตซาน ต่อการควบคุมโรคราสีเทาและราสีน้ำเงินเกิดจากเชื้อราสาเหตุ *B. cinerea* และ *P. expansum* หลังการเก็บเกี่ยวผลมะเขือเทศและเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 25 และ 2 องศาเซลเซียส พบว่า ไคโตซานสามารถยับยั้ง การงอกของสปอร์ ความยาวของ germ tube และพร้อมทำลายผนังเซลล์ของสปอร์ของเชื้อรา *B. cinerea* และ *P. expansum* แต่อย่างไรก็ตามพบว่า ไคโตซานทั้ง 3 ชนิดไม่มีผลต่อการปลดปล่อย zoospores

**Table 4.7** The effect of low, medium, and high molecular weight of chitosan on the sporangia of *Phytophthora* spp. causing durian disease at 48 hr. after incubation.

Molecular weight of chitosan	Concentration (ppm)	Percentage of sporangia inhibition			
		DF_020	DF_065	DS_079	DS_117
low	0	0.00c	0.00e	0.00e	0.00e
	500	35.29b	38.06cd	36.41cd	82.69a
	1,000	43.51b	24.39d	52.16bc	61.92cd
	2,000	37.52b	55.38bc	35.90cd	63.22bcd
medium	0	0.00c	0.00e	0.00e	0.00e
	500	22.50bc	49.26bc	25.66d	49.62d
	1,000	31.60b	44.29bcd	44.80bcd	80.83ab
	2,000	26.23b	61.74b	47.77bcd	75.54abc
high	0	0.00c	0.00e	0.00e	0.00e
	500	37.45b	53.62bc	67.97ab	89.78a
	1,000	73.55a	57.00bc	77.30a	91.79a
	2,000	84.55a	84.88a	84.11a	88.59a
Chitosan type (A)		**	**	**	**
Concentration (B)		**	**	**	**
A*B		*	ns	ns	**
CV (%)		46.99	34.62	35.65	19.18

\* = F-test significant at  $P < 0.05$ ; \*\* = F-test significant at  $P < 0.05$ ; ns = F-test not significant at  $P > 0.05$  values in the same column followed by different are significantly different by  $LSD_{0.05}$

**Table 4.8** The effect of low, medium, and high molecular weight of chitosan on the empty sporiagia of *Phytophthora* spp. causing durian disease at 48 hr. after incubation.

Molecular weight of chitosan	Concentration (ppm)	Percentage of empty sporiagia			
		DF_020	DF_065	DS_079	DS_117
low	0	3.83ab	9.74	10.70ab	8.31
	500	2.78ab	5.10	6.31bcd	9.03
	1,000	1.67b	2.86	7.34abc	3.75
	2,000	5.83ab	3.47	13.93a	0.76
medium	0	3.83ab	9.74	10.70ab	8.31
	500	1.39b	10.00	6.59bcd	0.93
	1,000	4.17ab	5.90	7.72abc	3.33
	2,000	8.63a	10.00	2.84cd	1.19
high	0	0.58b	3.28	2.91cd	4.47
	500	0.67b	1.85	3.28cd	4.58
	1,000	0.00b	1.48	0.00d	2.38
	2,000	8.33a	4.17	5.83bcd	2.80
Chitosan type (A)		ns	ns	**	ns
Concentration (B)		*	ns	ns	ns
A*B		ns	ns	ns	ns
CV (%)		113.60	92.24	62.17	153.93

\*= F-test significant at  $P < 0.05$ ; \*\* = F-test significant at  $P < 0.05$ ; ns = F-test not significant at  $P > 0.05$   
 values in the same column followed by different are significantly different by  $LSD_{0.05}$

## บทที่ 5

### สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

#### 5.1 สรุปผลการวิจัย

1. เก็บรวบรวมเชื้อรา *Phytophthora* spp. สาเหตุโรคทุเรียน ได้จำนวน 79 ไอโซเลท
2. เชื้อรา *Phytophthora* spp. จำนวน 7 ไอโซเลท ต้านทานต่อสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อรา metalaxyl และจำนวน 5 ไอโซเลท ต้านทานต่อสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อรา dimethomorph
3. เชื้อรา *Phytophthora* spp. จำนวน 3 ไอโซเลท ต้านทานต่อสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อราหลายชนิด (MuFg<sup>R</sup>)
4. โคโคซาน้ำหนักโมเลกุลต่ำ ปานกลาง และสูงที่ระดับความเข้มข้น 2,000 ppm มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตทางเส้นใย และยับยั้งการสร้าง sporangium ดีที่สุด

#### 5.2 ข้อเสนอแนะ

1. ควรทดลองกับเชื้อราสาเหตุโรคพืชชนิดอื่นต่อไป

## บทที่ 6

### สรุปผลผลิตงานวิจัย

#### 6.1 สรุปรายชื่อและรายละเอียดผลผลิตงานวิจัยที่ผลิตได้

Mikhlongbaeng, P. and P. Kongtragoul. 2015. Low molecular weight chitosan inhibits sporangia production of *Phytophthora* spp. causing durian disease in Chumphon province, Thailand. In The 13<sup>th</sup> international symposium on biocontrol and biotechnology, November 6-8, Shen Zhen, China.

## บรรณานุกรม

- กลุ่มวิจัยและพัฒนาการอนุรักษ์ดินและน้ำพื้นที่พีชไร่. 2548. ยางพารา. สำนักวิจัยและพัฒนาการจัดการที่ดิน กรมพัฒนาที่ดิน. สืบค้นจาก : <http://www.ldd.go.th/Lddwebsite/P/Technical06020.pdf>. (1 มีนาคม 2555)
- ธรรมศักดิ์ สมมาตย์. 2543. สารเคมีป้องกันกำจัดโรคพืช. สำนักพิมพ์วีวีเอเซีย: กรุงเทพฯ.
- เตือนใจ บุญ-หลง, สุชาติ วิจิตรานนท์ และ แสงมณี ชิงดวง. 2545. โรคไม้ผล. สมาคมนักโรคพืชแห่งประเทศไทย, กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพมหานคร. 120 หน้า.
- นิพนธ์ วิสารทานนท์. 2542a. โรคไม้ผลเขตร้อนและการป้องกันกำจัด. บริษัท เจ फिल्म โปรเซส จำกัด, กรุงเทพมหานคร. 172 หน้า.
- นิพนธ์ วิสารทานนท์. 2542b. โรคทุเรียน. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน คณะเกษตรภาควิชาโรคพืช. กรุงเทพฯ. 29 หน้า.
- นิพนธ์ วิสารทานนท์ และ จักรพงษ์ เจริญศิริ. 2541. โรคไม้ผล. กรมวิชาการเกษตร สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 6 ฝ่ายวิเคราะห์และบริการ. จันทบุรี. 74 หน้า.
- ภาวดี เมธะदानนท์, 2544. ความรู้เกี่ยวกับไคติน – ไคโตซาน. ศูนย์เทคโนโลยีโลหะวัสดุแห่งชาติ. 10 หน้า.
- รัฐ พิษณุวงกูร. 2543. คุณสมบัติและกลไกการทำงานของสารไคติน-ไคโตซานที่สามารถช่วยเพิ่มผลผลิตทางการเกษตร. ใน การประชุมเรื่อง “เกษตรยุคใหม่กับไคติน-ไคโตซาน” วันที่ 18 กุมภาพันธ์ ห้องสุธรรมอารีกุล อาคาร 50 ปี มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ.
- สุวลี จันทร์กระจ่าง, 2543. การใช้ไคติน – ไคโตซานในประเทศไทยสถาบันเทคโนโลยีแห่งเอเชีย. ปทุมธานี. 5 หน้า.
- สำนักงานกองทุนสงเคราะห์การทำสวนยาง, 2555. สืบค้นจาก: <http://km.rubber.co.th>. (1 มีนาคม 2555)
- สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2554. สืบค้นจาก: <http://www.oae.go.th>. (1 มีนาคม 2555)
- สถาบันวิจัยยาง. 2553. ข้อมูลวิชาการยางพารา. กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. สืบค้นจาก: <http://www.rubberthai.com/about/pdf/all.pdf>
- Bautista-Banos, S., Hernandez-Lauzardo, A.N., Velazquez-del Valle, M.G., Hernandez-Lopez, M., Ait Barka,E., Bosquez-Molina, E., Wilson, C.L., 2005, Chitosan as a potential natural compound to control pre and postharvest diseases of horticultural commodities, Crop Protection. Inpress.
- Benhamou, N., Lafontaine, P.J., Nicole, M., 1994. Induction on systemic resistance to Fusarium crown and root rot in tomato plants by seed treatment with chitosan. Phytopathology 84,1432–1444.
- Brent, J. K., and Hollomon, D. W. 1998. Fungicide resistance: the assessment of risk. Aimplint in the United Kingdom. 48 pp.
- Damicone, J., and Smith, D. 2009. Fungicide resistance management. Oklahoma Cooperative Extension Fact Sheets. Available: <http://osufacts.okstate.edu>. (2010 September 8)
- Davidse, C. L. 1988. Phenylamide fungicides: mehanism of action and resistance. In: DelpCJ. (ed) *Fungicide Resistance in North America*. St Paul, MN, USA, APS Press, pp 63–65.
- Deising, B. H., Reimann S., and Pascholati, S. F. 2008. Mechanisms and significance of fungicide resistance. Brazil. J. Microbiol. 39: 286-295.
- El Ghaouth, A., Arul, J., Wilson, C., Benhamou, N., 1997, Biochemical and cytochemical aspects of the interactions of chitosan and *Botrytis cinerea* in bell pepper fruit. Postharv. Biol.Technol. 12, 183–194.

- Fungicide resistance action committee. 2011. FRAC Code List©\*: Fungicides sorted by mode of action (including FRAC Code numbering). Available: [www.frac.info](http://www.frac.info). (2012 September 8)
- Fishel, F. M. 2009. Fungicide Resistance Action Committee's (FRAC) Classification Scheme of Fungicides According to Mode of Action. Available: <http://Fishel-miami-dade.ifas.ufl.edu>. (2012 September 8)
- Hawksworth, D. L., Kirk, P. M., Sutton, B. C., and Pegler, D. N. 1995. Ainsworth and Bisby's Dictionary of the Fungi, 8th ed. CAB International, Wallingford, Oxon, UK.
- Reddy M.V.B., Joseph, A. Angers P., Couture, L., 1999, Chitosan treatment of wheat seeds induces resistance to *Fusarium graminearum* and improves seed quality, J. Agric. Food Chem. 47, 1208-1216.
- Waterhouse, G.M. 1973. Peronosporales, Pages 165-185. In The Fungi Vol. IVB. G.C. Ainsworth, Frederick K. Sparrow and Alfred S. Sussman. (eds.). Academic Press, New York and London.
- Zentmyer, G.A. 1983. The world of Phytophthora. In: Phytophthora, its biology, taxonomy, ecology and pathology (Ed. by Erwin, D.C.; Bartnicki-Garcia, S.; Tsao, P.H.), pp. 1-8. American Phytopathological Society, St. Paul, USA.



ภาคผนวก

ภาคผนวก ก  
รายละเอียดผลผลิตงานวิจัยที่ผลิตได้



哈尔滨工业大学  
HARBIN INSTITUTE OF TECHNOLOGY



黑龙江省微生物学会  
Heilongjiang Society for Microbiology



黑龙江省生物工程学会  
Heilongjiang Society for Biotechnology

黑龙江省仿生与生物制造学会  
Heilongjiang Society for Bionic and Bio-manufacturing

黑龙江省科学与艺术协会  
Heilongjiang Society for Science and Art

THE 13<sup>th</sup> INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON  
BIOCONTROL AND BIOTECHNOLOGY

ABSTRACTS AND PROGRAM

13<sup>th</sup>  
IS B

NOVEMBER 6–8, 2015  
Shen Zhen, China

Organized by  
Harbin Institute of Technology

P.K.

**Contents**

<b>Organizing Committee .....</b>	<b>I</b>
<b>Program Schedule.....</b>	<b>III</b>
<b>Keynote Session.....</b>	<b>1</b>
<b>Oral Presentation.....</b>	<b>9</b>
<b>Poster Session .....</b>	<b>35</b>
<b>Author Index .....</b>	<b>61</b>

**Low Molecular Weight Chitosan Inhibits Sporangia Production of *Phytophthora* spp. Causing Durian Disease in Chumphon Province, Thailand**

Phanida MIKHLONGBAENG<sup>1</sup>, Pornprapa KONGTRAGOUL<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>*Program in Horticulture, Department of Agricultural Technology, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Prince of Chumphon Campus, Chumphon, Thailand*

**Abstract**

The effect of low molecular weight chitosan (LMWC) was evaluated on sporangia production of four isolates of *Phytophthora* spp. causing fruit and stem rot of durian. The culture disc of all tested isolates were soaked in LMWC solution at 500, 1,000, 2,000 ppm, and sterilized distilled water (control). The sporangia production was observed under the compound light microscope after incubated for 24, 36, and 48 hours. The result showed that LMWC had potential to inhibit the sporangia production of *Phytophthora* spp. from the early stage of incubation (24 hours). At the end of incubation (48 hours), it revealed that LMWC at 500 ppm were inhibited the sporangia production of all tested isolates in the range of 35.29-82.69 percent. Moreover, the LMWC at 1,000 and 2,000 ppm in all tested isolates gave the percent inhibition in the range of 24.40-61.93 and 35.91-63.22 percent, respectively. However, their antifungal activities were significantly different in each isolates.

**Keywords:** chitosan, *phytophthora* spp., durian disease

---

\* Corresponding author: E-mail address: kkpornpr@kmitl.ac.th

ภาคผนวก ข  
สรุปค่าใช้จ่ายการดำเนินโครงการวิจัย



## สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

แหล่งงบประมาณแผ่นดิน (แบบปกติ)  แหล่งเงินรายได้

(ภาษาไทย) .ควบคุมเชื้อรา *Phytophthora* spp. สาเหตุโรครดเน่าทุเรียน ที่ติดต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อราหลายชนิด โดยไคโตซานบางชนิด

(ภาษาอังกฤษ) .Control of Multiple Fungicide-Resistant *Phytophthora* spp. causing Durian Fruit Rot by Some Chitosan.

ชื่อ-สกุลหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน/ผู้วิจัย (อ./ดร./ผศ./รศ./ศ.) .....ดร. พรประพา คงตระกูล.....

รายงานในช่วงตั้งแต่วันที่ ..... 1 ตุลาคม 2557 ..... ถึงวันที่ ..... 30 กันยายน 2558 .....

ระยะเวลาดำเนินการ ..... 1 ..... ปี ..... เดือน ตั้งแต่วันที่ ..... 1 ตุลาคม 2557 ..... ถึงวันที่ ..... 30 กันยายน 2558

ข้อมูลการรายงานค่าใช้จ่ายงบประมาณโครงการวิจัย

1. การเบิกจ่ายงบประมาณ (กรณีการจ่ายเงินถ้าจ่ายงวดเดียวให้ลบข้อที่ไม่เกี่ยวข้องออก)

งวดที่ 1 70,000 บาท ..... 100 ..... % วันที่ได้รับอนุมัติให้เบิกจ่ายเงิน (ป/ด/ว) .....

2. สรุปงบประมาณค่าใช้จ่ายที่ใช้นับตั้งแต่เริ่มทำการวิจัยถึงปัจจุบัน (จำแนกตามหมวดค่าใช้จ่าย)

หมวดค่าใช้จ่าย	งบประมาณรวมทั้งโครงการ	ค่าใช้จ่าย (บาท)	คงเหลือ (หรือเกิน)
งบบุคลากร :ค่าจ้างชั่วคราว	-	-	-
งบดำเนินงาน			
ค่าวัสดุสำนักงาน	1,000	1,000	0
ค่าวัสดุวิทยาศาสตร์	45,000	45,000	0
ค่าวัสดุเกษตร	14,000	14,000	0
ค่าจ้างเหมา	10,000	10,000	0
งบลงทุน: ค่าครุภัณฑ์	-	-	-
<b>รวม</b>	<b>70,000</b>	<b>70,000</b>	<b>0</b>

.....  
(.....)

ลงนามหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน

...../...../.....

.....  
(.....)

ลงนามเจ้าหน้าที่การเงิน/เจ้าหน้าที่ที่เกี่ยวข้อง

...../...../.....

หมายเหตุ : นักวิจัยหรือเจ้าหน้าที่การเงินสามารถปรับหรือเปลี่ยนแปลงเพิ่มเติมข้อความได้ตามความเหมาะสมและสอดคล้องกับการดำเนินงาน อาทิเช่น นักวิจัยอยู่ระหว่างการดำเนินการเคลียร์ด้านเอกสารทางการเงิน หรือข้อความอื่นๆ

## ข้อมูลประวัติคณะผู้วิจัย

### นักวิจัยคนที่ 1 (หัวหน้าโครงการวิจัย)

- ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย) นางสาวพรประพา คงตระกูล  
ชื่อ - นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Miss Pornprapa Kongtragoul
- เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน 3-8601-00744-50-5
- หน่วยงานและสถานที่ติดต่อได้สะดวก หมายเลขโทรศัพท์ โทรสาร และไปรษณีย์อิเล็กทรอนิกส์ (e-mail)  
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง วิทยาเขตชุมพร  
17/1 ต.ชุมโค อ.ปะทิว จ.ชุมพร 86160  
โทรศัพท์ 0-7750-6431 โทรสาร 0-7750-6433  
E-mail: [kkpornpr@kmitl.ac.th](mailto:kkpornpr@kmitl.ac.th)

### 3. ประวัติการศึกษา

ปีสำเร็จการศึกษา	ระดับปริญญา	สาขาวิชา	สถานศึกษา	ประเทศ
2554	ปริญญาเอก	โรคพืช	มหาวิทยาลัยเชียงใหม่	ไทย
2546	ปริญญาโท	เทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืช	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง	ไทย
2541	ปริญญาตรี	เกษตรศาสตร์ (พืชสวน)	มหาวิทยาลัยเชียงใหม่	ไทย

- ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ โดยระบุสถานภาพในการทำ  
วิจัยว่าเป็นผู้อำนวยการแผนงานวิจัย หัวหน้าโครงการวิจัย หรือผู้ร่วมวิจัยในแต่ละผลงานวิจัย

#### 5.1 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว:

- หัวหน้าโครงการวิจัย

- เรื่อง การใช้ปุ๋ยอินทรีย์น้ำในระบบปลูกพืชโดยไม่ใช้ดิน (Using Organic Solution Fertilizer in Hydroponics) ทุน วช. ปี 2549

#### 5.2 งานวิจัยที่กำลังทำ:

- หัวหน้าโครงการวิจัย

- เรื่อง สำรวจและประเมินระดับความรุนแรงของโรครยางพารา (Survey and Disease Severity Evaluation of Para rubber)

งบประมาณ 100,000 บาท แหล่งเงินรายได้

ระยะเวลาทำการวิจัย 1 ปี เริ่มทำการวิจัยเมื่อ ตุลาคม 2555 ถึง กันยายน 2556

สถานภาพในการทำวิจัยว่าได้ทำการวิจัยคล่องแล้วประมาณร้อยละ 80

- เรื่อง ความแปรปรวนในการดื้อต่อสารเคมีเมทาเล็กซิลของประชากรเชื้อรา *Phytophthora* spp. จากสวนยางพาราและทุเรียน (Variability on Metalaxyl-resistant *Phytophthora* spp. Population from Para-rubber and Durian Orchards)

งบประมาณ 295,000 บาท กองทุนวิจัย สจล. ประจำปี 2556

ระยะเวลาโครงการ 1 ปี ตั้งแต่ เมษายน 2556 ถึง เมษายน 2557

### นักวิจัยคนที่ 2 (ผู้ร่วมวิจัย)

- ชื่อ - นามสกุล นางสาวพรรณนิภา ยั่วยล  
ชื่อ - นามสกุล Miss Pannipa Youryon
- เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน 5850490003790
- หน่วยงานและสถานที่ติดต่อ  
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง วิทยาเขตชุมพร อ.ปะทิว จ.ชุมพร 86160



หมายเลขโทรศัพท์ 0-77506431 โทรสาร 0-77506433  
 ไปรษณีย์อิเล็กทรอนิกส์(e-mail) kypannip@kmitl.ac  
 4.ประวัติการศึกษา

ปีที่จบการศึกษา	ระดับปริญญา	อักษรย่อปริญญา	สาขาวิชา	ชื่อสถาบันการศึกษา	ประเทศ
2555	เอก	ปร.ด	เทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว	มจร.	ไทย
2543	โท	วท.ม.	พืชสวน	สจล.	ไทย
2539	ตรี	วท.บ.	พืชสวน	สจล.	ไทย

5.ประสบการณ์งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง และ/หรือที่ผ่านมา ทั้งภายในและภายนอกประเทศ โดยระบุสถานภาพในการทำวิจัยว่าเป็นผู้อำนวยการแผนงานวิจัย หัวหน้าโครงการวิจัย หรือผู้ร่วมวิจัยในแต่ละข้อเสนองานวิจัย

5.1 หัวหน้าโครงการวิจัย : ชื่อโครงการวิจัย

- การผลิตผักเหียงเชิงเกษตรอินทรีย์เพื่อการค้า ปีงบประมาณ 2545
- การผลิตผักเหียงเชิงพาณิชย์ ปีงบประมาณ 2546-2548
- การใช้แคลเซียมต่อการลดการเกิดไส้สีน้ำตาลในสับปะรด ปีงบประมาณ 2556-2557
- การวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระในกล้วยเล็บมือนาง ปีงบประมาณ 2557

5.2 ผู้ร่วมวิจัย : ชื่อโครงการวิจัย

- การลดการเกิดสีน้ำตาลระหว่างการเก็บรักษาของสับปะรดกลุ่ม Queen โดยการใช้สารแคลเซียมคลอไรด์ ปีงบประมาณ 2555
- ประสิทธิภาพของเมทิลจัสโมเนตและเอทิลีนต่อการเปลี่ยนแปลงสีของเปลือกและคุณภาพของส้มโชกุน ปีงบประมาณ 2556

5.3 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว : ชื่อผลงานวิจัย ปีที่พิมพ์ การเผยแพร่

Youryon, P., Wongs-Aree, C., McGlasson, W.B., Glahan, S., Kanlayanarat, S., 2008. Internal browning occurrences of 'Queen' pineapple under various low temperatures. Acta Hort 804, 555-560.

Youryon P, Wongs-Aree C, McGlasson WB, Glahan S., Kanlayanarat S (2011) Response of internal browning in pineapple fruit vacuum infiltrated with solutions of calcium chloride or strontium chloride. Acta Hort 943:

Youryon, P., Wongs-Aree, C., McGlasson, W.B., Glahan, S., Kanlayanarat, S., 2011. Development of internal browning during low temperature storage of pineapple fruit cv. Trad-Srithong harvested at different time of the day. J of applied horticulture 13(2):122-126.

Youryon, P., Wongs-Aree, C., McGlasson, W.B., Glahan, S., Kanlayanarat, S., 2013. Alleviation of internal browning in pineapple fruit by peduncle infiltration with solutions of calcium chloride or strontium chloride under mild chilling storage. International Food Research Journal 20(1): 239-246.

พรรณนิภา ย้วยล กนกพร บุญญะอดิชาติ และนัตยา มนต์รี . 2554. ระยะเก็บเกี่ยวเหมาะสมและบรรจุภัณฑ์ต่อการเก็บรักษาผักเหียง. การประชุมวิชาการวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวครั้งที่ 9. หน้า 93.

**นักวิจัยคนที่ 3 (ผู้ร่วมวิจัย)**

1. ชื่อ (ภาษาไทย) นางสาวศิริขวัญ สูดวัตแก้ว  
(ภาษาอังกฤษ) Miss. Sirikwan Sudwatkaew
2. บัตรประจำตัวประชาชน 3 8607 00239 801
3. หน่วยงานและสถานที่ทำงาน ที่อยู่ติดต่อสะดวก

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง วิทยาเขตชุมพร

หมู่ที่ 6 ตำบลชุมโค อำเภอปะทิว จังหวัดชุมพร 86160

โทรศัพท์ 0-7750-6411 โทรสาร 0-7759-1445, 0-7759-446, 0-7750-6411

E-mail : [kschinda@kmitl.ac.th](mailto:kschinda@kmitl.ac.th)

#### 4. ประวัติการศึกษา

ปีสำเร็จการศึกษา	ระดับปริญญา	สาขาวิชา	สถานศึกษา	ประเทศ
2544	ตรี	พืชสวน	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหาร ลาดกระบัง	ไทย

#### 5 . ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ

##### 5.1 ประสบการณ์งานวิจัย

เรื่อง การขยายพันธุ์เปราะป่าเชิงการค้า สถานภาพ : หัวหน้าโครงการ

##### 5.2 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว

จินดา สุตวัตแก้ว กนกพร บุญญอดิชาติ และนาตยา มนตรี. 2545. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้สิงโตนกยูงทอง. ในเอกสารประกอบการประชุมวิชาการ ครั้งที่ 41 สาขาพืช, วันที่ 4-11 กุมภาพันธ์ 2545 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ

##### 5.3 งานวิจัยที่กำลังทำ

-