วารสารแก่นเกษตร THAIJO

Content List Available at ThaiJo

Khon Kaen Agriculture Journal

Journal Home Page : https://li01.tci-thaijo.org/index.php/agkasetkaj

การสำรวจและประเมินความรุนแรงโรคราที่สำคัญของยูคาลิปตัส (*Eucalyptus* spp.) ในระบบการผลิตต้นกล้า

Survey and assessment of the major fungal diseases of *Eucalyptus* spp. in seedling production system

ขรินทร ศรีจันทร์ก่ำ[1, 2, 3, 4], วีระศักดิ์ ศักดิ์ศิริรัตน์[2, 3, 4, 5]*, ศิวิลัย สิริมังคารัตน์[2, 5] และ ดวงรัตน์ ธงภักดี[1]

Karintorn Srujankam[1, 2, 3, 4], Weerasak Saksirirat[2, 3, 4, 5]*, Sivilai Sirimungkararat[2, 5] and Duangrat Thongpak[1]

[1] *สาขากีฏวิทยาและโรคพืชวิทยา คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น*
[1] *Department of Entomology and Plant Pathology, Fac. of Agriculture, Khon Kaen University*
[2] *ศูนย์วิจัยเทคโนโลยีชีวภาพการเกษตรเพื่อเศรษฐกิจที่ยั่งยืน มหาวิทยาลัยขอนแก่น*
[2] *Agricultural Biotechnology Research Center for Sustainable Economy, Khon Kaen University*
[3] *ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม 73140*
[3] *Center for Agricultural Biotechnology, Kasetsart University, Kanphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom, 73140*
[4] *ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวงอุดมศึกษาวิจัยและนวัตกรรม*
[4] *Center of Excellence on Agricultural Biotechnology: (AG-BIO/MHESI)*
[5] *กลุ่มวิจัยการเพาะเลี้ยงและพัฒนาผลิตภัณฑ์ไหมป่าและแมลงสำคัญทางเศรษฐกิจเพื่อสร้างมูลค่าเพิ่ม มหาวิทยาลัยขอนแก่น*
[5] *Cultivation and Product Development Research Group of Wild Silkmoths and Economic Insects for Value Added Creation, Khon Kaen University*

บทคัดย่อ: จากการสำรวจและประเมินความรุนแรงโรคราที่สำคัญของต้นกล้ายูคาลิปตัส ในระบบการผลิตภายใต้สภาพเรือนเพาะชำของบริษัทสยามฟอเรสทรี จำกัด อำเภอน้ำพอง จังหวัดขอนแก่น ช่วงเดือนมีนาคม–กันยายน พ.ศ. 2561 จากต้นกล้าจำนวน 7 โคลน (H4, H26, H28, H32, H36, H38 และ P6) ของปีการผลิต ซึ่ง 3 ลักษณะอาการโรคที่พบเสมอ ได้แก่ ใบไหม้ (leaf blight) ใบจุด (leaf spot) และไหม้จากยอด (dieback) เมื่อประเมินความรุนแรงของโรคใบไหม้และใบจุดจากดรรชนีความรุนแรงของโรค (disease severity index, DSI) โรคไหม้จากยอดจากเปอร์เซ็นต์การเป็นโรค (disease incidence, DI) ในทุกเดือนๆละครั้ง พบว่ามี DSI และ DI ต่ำที่สุดในเดือนมีนาคม (9.56, 10.55 และ 1.50% ตามลำดับ) ส่วนอาการใบไหม้และไหม้จากยอดมีค่าเฉลี่ยดังกล่าวมากที่สุดในเดือนกันยายน (20.70 และ 28.39% ตามลำดับ) ขณะที่ DSI ของอาการใบจุดมีค่ามากที่สุดในเดือนสิงหาคม (21.50) สำหรับโคลนที่มีค่าเฉลี่ย DSI และ DI น้อยที่สุดในทุกลักษณะอาการ ได้แก่ โคลน P6 แต่โคลน H32 มีค่าประเมินมากที่สุดในอาการใบไหม้ (18.30) และไหม้จากยอด (22.35%) โดยโคลน H28 อาการใบจุดมีค่ามากที่สุด (19.67) ขณะที่ในการแยกเชื้อราสาเหตุโรคจากตัวอย่างต้นกล้ายูคาลิปตัสนั้น สามารถแยกเชื้อบริสุทธิ์ได้ 61 ไอโซเลต เมื่อนำไปทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรคภายใต้สภาพห้องปฏิบัติการ พบว่ามีจำนวน 58 ไอโซเลตเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดอาการโรคกับใบยูคาลิปตัสที่ทดสอบด้วยวิธีการเด็ดใบ (detached leaf) และได้คัดเลือกไอโซเลตเชื้อราที่แสดงอาการรุนแรง 10 อันดับแรก ไปทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรคกับต้นกล้ายูคาลิปตัสโคลน H4 ในเรือนทดลอง พบว่าเชื้อทุกไอโซเลตก่อให้เกิดโรคบนใบได้ โดยไอโซเลต 39DBH32 ที่ทำให้เกิดแผลที่มีขนาดใหญ่ที่สุด (เส้นผ่าศูนย์กลางเฉลี่ย 3.23 ซม.) ส่วนไอโซเลต 37LBH38 ทำให้เกิดแผลที่มีขนาดเล็กที่สุด (เส้นผ่าศูนย์กลางเฉลี่ย 0.40 ซม.) สำหรับการบ่งชี้ในระดับสกุล (genus) จากลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ 58 ไอโซเลตนี้นั้น สามารถบ่งชี้เชื้อราได้ 4 สกุล ได้แก่ *Coniella* sp., *Pestalotiopsis* sp., *Cylindrocladium* sp. และ *Curvularia* sp.

คำสำคัญ: ยูคาลิปตัส; โรครา; ระบบการผลิตต้นกล้า; การบ่งชี้; การประเมินความรุนแรงโรค

* Corresponding author: weerasak@kku.ac.th

Received: date; May 11, 2021 Accepted: date; May 25, 2021 Published: date; December 5, 2021

ABSTRACT: The survey and assessment of the major eucalyptus fungal diseases under seedling production system of Siam Forestry Company, Nampong District, Khon Kaen Province were carried out during March – September 2018. Seven clones of eucalyptus seedlings (H4, H26, H28, H32, H36, H38 and P6) were produced in the production year. There were 3 disease symptoms always found along the period, i.e., leaf blight, leaf spot and dieback. The disease severity index (DSI) of leaf blight and leaf spot including percent disease incidence (DI) of dieback were evaluated once monthly. In March, average DSI and DI were the lowest (9.56, 10.55 and 1.50%, respectively). The average maximum DSI of leaf blight (20.70) and DI of dieback (28.39%) were detected in September, also DSI of leaf spot (21.50) in August. The eucalyptus clone P6 showed the lowest average DSI and DI of all symptoms. But clone H32 exhibited the highest of leaf blight DSI (18.30) and dieback DI of 22.35%. For leaf spot, the clone H28 was the maximum DSI (19.67). Whereas, 61 isolates of fungal causal agents were obtained from pure culture isolation. These isolates were tested on the pathogenicity using detached leaf technique under laboratory condition. Result indicated that 58 isolates were pathogenic causing symptoms on detached leaves. In addition, top 10 virulent isolates were investigated on their pathogenicity tested on eucalyptus clone H4 seedlings under greenhouse condition. It was clearly that all isolates caused the disease symptoms on leaves. The isolate 39DBH32 caused the biggest average lesion diameter (3.23 cm), however the isolate 37LBH38 led to the smallest average diameter (0.40 cm). All of these 58 isolates were identified into 4 genera using morphological characteristics. The result revealed that there were *Coniella* sp., *Pestalotiopsis* sp., *Cylindrocladium* sp. and *Curvularia* sp.

Keyword: eucalyptus; fungal disease; seedling production system; indication; disease assessment

บทนำ

ยูคาลิปตัสเป็นพืชที่มีถิ่นกำเนิดในประเทศออสเตรเลีย มีจำนวนมากกว่า 700 ชนิด เช่น *Eucalyptus camaldulensis*, *E. globulus, E. cretata, E. macrocarpa* เป็นต้น สำหรับ *E. camaldulensis* มีการเจริญเติบโตเร็ว รูปทรงลำต้นเปลาตรง มีกิ่งก้านน้อย ทนต่อสภาพแห้งแล้ง เจริญได้ทั้งพื้นที่ที่มีดินเสื่อมโทรมมีความอุดมสมบูรณ์ต่ำ ดินเค็ม ดินเปรี้ยว ดินทราย มีความแห้งแล้งติดต่อกันเป็นเวลานาน พื้นที่ดินเลวที่มีปริมาณน้ำฝนน้อยกว่า 650 มิลลิเมตร(มม.)ต่อปี หรือแม้แต่ในสภาพพื้นที่ที่มีน้ำท่วมบ้างในรอบปี หรือพื้นที่ริมน้ำ แต่จะไม่ทนทานต่อดินที่มีหินปูนสูง ในประเทศไทยได้เริ่มนำยูคาลิปตัสชนิดต่างๆมาทดลองปลูกประมาณปี พ.ศ. 2493 (สำนักงานส่งเสริมการปลูกป่า กรมป่าไม้, 2556) สำหรับสถานการณ์การปลูกยูคาลิปตัสปีพ.ศ. 2559 มีรายงานว่า ในประเทศไทยนั้นมีการปลูกยูคาลิปตัสทั้งหมด 51 จังหวัด ในเนื้อที่ถึง 794,064 ไร่ มีผลผลิต 4,738 กิโลกรัม(กก.)ต่อไร่ รวมผลผลิตทั้งหมด 1.13 ล้านตัน ราคา 21.87 บาทต่อกก. และภาคตะวันออกเฉียงเหนือมีเนื้อที่ปลูกมากที่สุดคือ 460,933 ไร่ ใน 19 จังหวัด (ศูนย์เทคโนโลยีสารสนเทศและการสื่อสาร กรมส่งเสริมการเกษตร, 2560) อีกทั้งภาคตะวันออกเฉียงเหนือมีการขยายพื้นที่ปลูกยูคาลิปตัสมากขึ้น เนื่องจากมีการผลิตเยื่อกระดาษจากไม้ยูคาลิปตัส โดยบริษัทผลิตเยื่อกระดาษในเครือ SCG Paper เช่น บริษัทสยามฟอเรสทรี จำกัด (บริษัทฟินิกซ์ พัลพ์ แอนด์ เพเพอร์ มหาชน) ตั้งอยู่ที่อำเภอน้ำพอง จังหวัดขอนแก่น ซึ่งยูคาลิปตัสสามารถนำมาขยายพันธุ์ได้หลายวิธี แต่วิธีที่เหมาะสมมี 3 วิธีคือ การเพาะเมล็ด (seeding), การปักชำ (cutting) และการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (tissue culture) โดยพื้นที่ที่จะทำการขยายพันธุ์ควรต้องอยู่ใกล้แหล่งน้ำ เนื่องจากในการจัดเตรียมกล้าไม้จนกว่าจะนำไปปลูกในพื้นที่ ต้องใช้ปริมาณน้ำมากพอสมควร เพื่อการบำรุงรักษา (สำนักงานส่งเสริมการปลูกป่า กรมป่าไม้, 2556) ในปัจจุบันการผลิตต้นกล้ายูคาลิปตัสนิยมใช้วิธีการปักชำกิ่ง แล้วนำไปเก็บไว้ในโรงเรือนเพาะชำที่มีความชื้นสัมพัทธ์สูง (มากกว่า 90% R.H.) จากการขยายพื้นที่ปลูกมากขึ้น จึงทำให้เกิดโรคกับยูคาลิปตัส ซึ่งเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้ผลผลิตไม้ยูคาลิปตัสลดลง มีรายงานโดยกฤษณา และคณะ (2553) ว่ามีเชื้อรามากกว่า 30 ชนิดที่เข้าทำลายยูคาลิปตัสได้ตั้งแต่ระยะเมล็ด กิ่งชำ ต้นกล้า และแปลงปลูก ซึ่งเชื้อราที่สำคัญ ได้แก่ *Cylindrocladium reteaudii*, *Cryptosporiopsis eucalypti*, *Kirramyces destructans*, *Dothiorella* sp., *Botryosphaeria* sp. และ *Cryphonetria cubensis* เป็นต้น และพบว่าในโรงเรือนผลิตต้นกล้ายูคาลิปตัสของบริษัทฟินิกซ์ พัลพ์ แอนด์ เพเพอร์ มีเชื้อรา *Pestalotiopsis* sp. เข้าทำลายกิ่งปักชำและต้นกล้า (อัฐภรณ์, 2559) รวมทั้งพบเชื้อราอีกหลายชนิดที่เข้าทำลายกิ่งปักชำยูคาลิปตัส เช่น *Cylindrocladium* sp., *Cryptosporiopsis* sp. และ *Coniella* sp. เป็นต้น เชื้อราดังกล่าวทำให้เกิดอาการได้ทั้งในกิ่งปักชำและต้นกล้า โดยทำความเสียหายให้กับการผลิตต้นกล้า 30 – 50 เปอร์เซ็นต์(%) ในการป้องกันกำจัดโรคนั้น มีการทดสอบสารเคมีซึ่งได้ผลดีจากการตรวจสอบในสภาพห้องปฏิบัติการและเรือนทดลอง เช่น carbendazim, prochloraz และ mancozeb เป็นต้น (Old et al., 2003; วีระศักดิ์ และคณะ, 2556; กฤษฎา, 2557)

อย่างไรก็ดีการใช้สารเคมีอาจทำให้เกิดพิษตกค้างต่อสิ่งแวดล้อมและเกิดการสะสมสารเคมีมีพิษในระยะยาว การควบคุมโรคยูคาลิปตัสโดยวิธีผสมผสาน จึงได้มีการนำมาประยุกต์ใช้เพื่อการควบคุมอย่างมีประสิทธิภาพและก่อให้เกิดความยั่งยืนต่อสภาพแวดล้อม เช่น การใช้สารเคมีร่วมกับการใช้ราปฏิปักษ์ *Trichoderma* spp. เป็นต้น ซึ่งนอกจากจะยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคแล้ว ยังสามารถกระตุ้นความต้านในพืชได้อีกด้วย (วีระศักดิ์, 2560)

การควบคุมแหล่งของเชื้อสาเหตุโรคตั้งแต่เริ่มต้น จัดเป็นอีกวิธีหนึ่งที่จะช่วยลดการระบาดของโรคลงได้ ซึ่งหากมีการควบคุมโรคยูคาลิปตัสตั้งแต่แรก เช่น โรครา ก็น่าจะเป็นอีกวิธีหนึ่งที่สามารถช่วยควบคุมโรคพืชได้ อีกทั้งในกระบวนการผลิตต้นกล้ามีการใช้เรือนเพาะชำที่มีความชื้นสูง จึงเป็นปัจจัยหนึ่งของการเกิดโรคและแพร่ระบาดของเชื้อโดยเฉพาะเชื้อรา ซึ่งยังไม่มีการสำรวจและประเมินความรุนแรงของโรคราในระบบการผลิตต้นกล้ายูคาลิปตัสตลอดฤดูการผลิต การวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อสำรวจ รวบรวม และประเมินความรุนแรงของโรคราที่สำคัญในระบบการผลิตต้นกล้ายูคาลิปตัสตลอดฤดูการผลิต รวมทั้งการบ่งชี้เชื้อในระดับสกุล (genus) จากการใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา

วิธีการศึกษา

1. การสำรวจและรวบรวมตัวอย่างโรคราที่สำคัญของต้นกล้ายูคาลิปตัสในระบบการผลิตภายใต้สภาพเรือนเพาะชำ

สำรวจและรวบรวมโรคราที่เกิดกับต้นกล้ายูคาลิปตัสในสภาพเรือนเพาะชำที่บริษัทสยามฟอเรสทรี จำกัด (บริษัทฟินิกซ์ พัลพ์ แอนด์ เพเพอร์ มหาชน) อำเภอน้ำพอง จังหวัดขอนแก่น ในระหว่างเดือนมีนาคม – กันยายน พ.ศ. 2561 โดยสำรวจทุกๆเดือนๆละ 1 ครั้ง รวมทั้งสิ้น 7 เดือน ในยูคาลิปตัสทั้งหมด 7 โคลน (clone) ได้แก่ H4, H26, H28, H32, H36, H38 และ P6 ทั้งนี้ในแต่ละโคลนของแต่ละครั้งที่ทำการสำรวจ จะสุ่มตัวอย่างต้นกล้ายูคาลิปตัสทั้งหมด 10 ต้น (ซ้ำ) จากถาดเพาะต้นกล้า 1 ถาด ซึ่งมีต้นกล้ารวม 112 ต้นต่อถาด และจำนวนถาดที่มีการเก็บข้อมูลนั้นขึ้นอยู่กับกำลังการผลิตของบริษัทในแต่ละเดือน ซึ่งแต่ละถาดที่สุ่มสำรวจมีระยะห่างกัน 2 เมตร เก็บรวบรวมตัวอย่างโรคราที่สำคัญของต้นกล้ายูคาลิปตัสใส่ถุงพลาสติก โดยแยกกันจากแต่ละลักษณะอาการที่ผิดปกติของแต่ละโคลน และจะต้องไม่ให้แต่ละตัวอย่างโรคปะปนกัน จากนั้นนำถุงตัวอย่างใส่กล่องโฟมเก็บความเย็น เพื่อนำมาศึกษาในสภาพห้องปฏิบัติการถึงลักษณะอาการของโรคราและจำแนกหาอาการโรค

2. การประเมินความรุนแรงและการเป็นโรค

ตัวอย่างโรคราของต้นกล้ายูคาลิปตัสที่สำรวจได้ตามข้อ 1. นำมาประเมินความรุนแรงของโรคราที่เกิดกับต้นกล้าในระบบการผลิตภายใต้สภาพเรือนเพาะชำ โดยใช้เกณฑ์คะแนนความรุนแรงตามวิธีการของวีระศักดิ์ และคณะ (2556) และให้คะแนนการเป็นโรคของพื้นที่ใบดังนี้ 1 = ไม่แสดงอาการ 2 = แสดงอาการของพื้นที่ใบ 1 – 25% 3 = แสดงอาการของพื้นที่ใบ 26 – 50% 4 = แสดงอาการของพื้นที่ใบ 51 – 75% 5 = แสดงอาการของพื้นที่ใบ 76 – 100% แล้วนำค่าคะแนนการเป็นโรคของต้นกล้ายูคาลิปตัสของแต่ละโคลนมาหาค่าความรุนแรงของโรค จากดรรชนีความรุนแรงของโรค (disease severity index) เพื่อใช้ประเมินความรุนแรงของโรคใบไหม้และใบจุด ส่วนโรคไหม้จากยอดของต้นกล้าประเมินจากเปอร์เซ็นต์การเป็นโรค (% disease incidence)

$$\text{ดรรชนีความรุนแรงของโรค} = \frac{\sum(n \times v)}{N} \times \frac{100}{M}$$

n = จำนวนต้นที่ประเมินค่าคะแนนการเป็นโรคที่มีค่าคะแนน v

v = ค่าคะแนนการเป็นโรคของต้นที่ถูกประเมินการเป็นโรค (1 – 5)

N = จำนวนต้นทั้งหมดที่สุ่ม

M = ค่าคะแนนการเป็นโรคสูงสุด

$$\text{เปอร์เซ็นต์การเป็นโรค} = \frac{n}{N} \times 100$$

n = จำนวนต้นกล้าที่แสดงอาการโรค

N = จำนวนต้นทั้งหมดที่สุ่ม

3. การแยกเชื้อให้บริสุทธิ์

นำชิ้นส่วนต้นกล้ายูคาลิปตัสที่เป็นโรคที่เกิดจากเชื้อราซึ่งได้จากการสำรวจในข้อ 1. มาศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อราสาเหตุโรค ด้วยการตรวจสอบอาการร่วมกับเชื้อสาเหตุโดยใช้กล้องจุลทรรศน์ชนิด stereo microscope และ compound microscope ส่วนชิ้นส่วนพืชที่ไม่สามารถตรวจพบชิ้นส่วนของเชื้อด้วยกล้องจุลทรรศน์ได้นั้น จะใช้วิธี tissue transplanting และโดยการนำมาวางในกล่องชื้น (moist chamber) แล้วจึงตรวจสอบการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิด stereo microscope ทุกๆวัน เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นแยกเชื้อบริสุทธิ์จากตัวอย่างที่พบเชื้อราที่เจริญจากชิ้นส่วนพืชที่เป็นโรคด้วยวิธี direct isolation แล้วจึงย้ายเชื้อบริสุทธิ์ที่ได้มาเลี้ยงใน potato dextrose agar (PDA) slant บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส (°ซ) เป็นเวลา 3 – 5 วัน เพื่อเก็บเป็น stock สำหรับนำไปใช้ในการศึกษาทดลองต่อไป สำหรับรหัสเชื้อที่แยกได้นั้นประกอบด้วยตัวเลขเพื่อระบุลำดับในการเก็บสต๊อกเชื้อ ตามด้วยอักษรย่อเพื่อบ่งบอกที่มาของอาการโรคของแยกเชื้อไอโซเลตนั้นๆ โดย LB แยกจากใบไหม้, LS แยกจากใบจุด, DB แยกจากไหม้จากยอด และชื่อโคลนของต้นกล้ายูคาลิปตัสที่เชื้อนั้นแยกได้

4. การทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรคภายใต้สภาพห้องปฏิบัติการ

เชื้อราที่แยกได้จากข้อ 3. นำไปทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรค (pathogenicity test) วางแผนการทดลองแบบ completely randomized design (CRD) โดยใช้ไอโซเลตเป็นกรรมวิธีๆละ 4 ซ้ำ ปลูกเชื้อสาเหตุโรคแต่ละไอโซเลต (อายุ 5 – 7 วัน ที่เลี้ยงบนอาหาร PDA) ลงบนใบยูคาลิปตัสโคลน H4 ซึ่งเป็นโคลนที่มีการผลิตมากของบริษัทฯในสภาพเด็ดใบ (detached leaf) โดยฆ่าเชื้อที่ผิวใบด้วยการใช้สำลีชุบแอลกอฮอล์ 70% เช็ดที่ผิวใบแล้วปล่อยไว้จนแอลกอฮอล์ระเหยหมด จากนั้นใช้สำลีชุบน้ำกลั่นนึ่งที่ฆ่าเชื้อแล้วพันที่ก้านใบ จึงใช้เข็มเขี่ยที่ฆ่าเชื้อแล้วทำแผลที่ใบ โดยแทงทะลุใบให้เกิดแผล 1 ครั้ง แล้วใช้ cork borer (เส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 ซม.) เจาะชิ้นวุ้นอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรคยูคาลิปตัสเจริญอยู่ ไปวางบนบริเวณแผลที่ใบยูคาลิปตัส นำใบยูคาลิปตัสที่ผ่านการปลูกเชื้อมาบ่มในกล่องชื้นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว (surface sterilization) บ่มที่อุณหภูมิห้อง 28 ± 2 °ซ สังเกตและบันทึกอาการของโรคและพัฒนาการเกิดโรค และวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของแผลที่เกิดจากเชื้อราที่ปลูกทุกๆวัน ดำเนินการหลังการปลูกเชื้อเป็นเวลา 5 วัน วิเคราะห์ความแปรปรวน (analysis of variance) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของเส้นผ่าศูนย์กลางของแผลที่เกิดจากแต่ละกรรมวิธี และที่เกิดกับกรรมวิธีควบคุม คือไม่มีการปลูกเชื้อสาเหตุโรคแต่มีการวางชิ้นวุ้น PDA ที่ไม่มีเชื้อแทน ด้วย Duncan's multiple range test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยใช้โปรแกรม Statistical Analysis System (SAS) ในการวิเคราะห์สถิติ

5. การบ่งชี้เชื้อราสาเหตุโรค

ในการบ่งชี้เชื้อราสาเหตุโรคในระดับสกุล (genus) จากเชื้อที่บริสุทธิ์แล้ว โดยการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา ซึ่งได้เพาะเลี้ยงเชื้อราสาเหตุโรคบนอาหาร PDA เป็นเวลา 7 วัน เพื่อศึกษาลักษณะการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้นนำมาตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิด compound microscope เพื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเส้นใยและสปอร์ของเชื้อ เปรียบเทียบลักษณะของเชื้อกับเอกสารทางวิชาการที่เกี่ยวข้องกับโรคของยูคาลิปตัส (Old et al., 2003; กฤษณา และคณะ, 2553; วีระศักดิ์ และคณะ, 2556; กฤษฎา, 2557; อัฐภรณ์, 2559)

6. การทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรคภายใต้สภาพเรือนทดลอง

นำเชื้อทุกสกุลมาทดสอบทั้งสิ้น 10 ไอโซเลต ซึ่งแต่ละสกุลมีความรุนแรงอยู่ในระดับสูงมากที่สด-มาก ส่วนจำนวนไอโซเลตต่อสกุลนั้นขึ้นอยู่กับปริมาณที่พบ ซึ่งสามารถทำให้เกิดโรคในสภาพห้องปฏิบัติการ มาทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรคบนต้นกล้ายูคาลิปตัสภายใต้สภาพเรือนทดลอง ใช้แผนการทดลองแบบ CRD โดยใช้ไอโซเลตเป็นกรรมวิธีๆละ 4 ซ้ำ และปลูกเชื้อสาเหตุโรค (อายุ 5 – 7 วัน ที่เลี้ยงบนอาหาร PDA) ลงบนใบยูคาลิปตัสใบที่ 5 – 6 ของต้นกล้ายูคาลิปตัสโคลน H4 อายุ 1 – 2 เดือน สำหรับการปลูกเชื้อนั้นปฏิบัติเช่นเดียวกับข้อ 4 แล้วนำไปเพาะเลี้ยงต่อในเรือนทดลอง สังเกตและบันทึกอาการของโรค และวัดความยาวเส้นผ่าศูนย์กลางของแผลที่เกิดจากเชื้อที่ปลูกทุกๆวัน ดำเนินการหลังการปลูกเชื้อเป็นเวลา 7 วัน วิเคราะห์ความแปรปรวน และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของเส้นผ่าศูนย์กลางของแผลที่เกิดขึ้นจากแต่ละกรรมวิธี และที่เกิดกับกรรมวิธีควบคุม (ไม่มีการปลูกเชื้อราสาเหตุโรค แต่มีการวางชิ้นวุ้น PDA ที่ไม่มีเชื้อ) ด้วย DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ผลการศึกษาและวิจารณ์

1. การสำรวจและรวบรวมตัวอย่างราที่สำคัญของต้นกล้ายูคาลิปตัสในระบบการผลิตภายใต้สภาพเรือนเพาะชำ

จากการสำรวจและรวบรวมตัวอย่างของโรคราของต้นกล้ายูคาลิปตัสภายใต้สภาพเรือนเพาะชำในฤดูการผลิต พ.ศ. 2561 ช่วงเดือนมีนาคม – กันยายน พบมีโรค 3 ลักษณะอาการ ได้แก่ ใบไหม้ (leaf blight), ใบจุด (leaf spot) และไหม้จากยอด (dieback) โดยลักษณะอาการดังกล่าวนั้นพบในต้นกล้าทั้ง 7 โคลนที่ทำการสำรวจ ซึ่งให้ผลใกล้เคียงกับการศึกษาของ อัฐภรณ์ (2559) ที่มีการสำรวจโรคจำนวน 1 ครั้งในเรือนเพาะชำกล้าไม้ ลานเพาะชำกล้าไม้ และแปลงแม่พันธุ์ ซึ่งพบอาการใบไหม้และใบจุดจากการสำรวจทั้ง 3 แหล่ง แต่ไม่พบอาการไหม้จากยอด แสดงให้เห็นว่าอาการของโรคใบไหม้และใบจุดนั้นเป็นโรคที่สำคัญของยูคาลิปตัส ซึ่งในแปลงแม่พันธุ์ที่ผลิตกิ่งพันธุ์เพื่อใช้ในการปักชำนั้นอาจเป็นแหล่งของเชื้อ เมื่อนำกิ่งพันธุ์มาปักชำในเรือนเพาะชำที่มีความชื้นสูง เชื้อสาเหตุโรคจึงมีการเข้าทำลายได้อย่างรุนแรง ทั้งนี้ในเชื้อบางชนิดเมื่อเข้าทำลายยูคาลิปตัสอาจแสดงอาการได้ทั้งใบจุด ใบไหม้ และไหม้จากยอด เช่น เชื้อ *Cylidrocladium* sp. เป็นต้น (Old et al., 2003)

2. การประเมินความรุนแรงและการเป็นโรค

ผลการประเมินความรุนแรงและพัฒนาการของโรคนั้น พบมีอาการใบไหม้ในยูคาลิปตัสทุกโคลน และพบในทุกเดือนของการสำรวจ ซึ่งการเกิดโรคในแต่ละเดือนเมื่อประเมินจากค่าเฉลี่ยดรรชนีความรุนแรงของโรค (DSI) นั้น พบว่ามีค่าสูงสุดในเดือนกันยายนเท่ากับ 20.70 และต่ำสุดในเดือนมีนาคม (9.56) โดยโคลน H32 มีค่าสูงที่สุด (18.30) และ P6 มีค่าต่ำที่สุด (14.77) (**Table 1**) สำหรับอาการใบจุดพบว่าช่วงเวลาและค่า DSI สูงที่สุด – ต่ำที่สุดนั้นใกล้เคียงกับอาการใบไหม้ ซึ่งมีค่า DSI สูงสุดในเดือนสิงหาคม (21.50) และเดือนมีนาคมมีค่าต่ำที่สุด (10.55) แต่ยูคาลิปตัสโคลนที่เป็นโรคใบจุดสูงที่สุดคือ H28 (19.67) และต่ำที่สุดคือโคลนเดียวกันกับที่เป็นโรคใบไหม้ต่ำที่สุด (โคลน P6, 11.68) (**Table 2**) ส่วนอาการไหม้จากยอดนั้น ช่วงเวลาที่ตรวจพบโรคและโคลนที่พบการเป็นโรค (DI) ที่สูงที่สุดและต่ำที่สุดเหมือนกันกับที่เกิดกับอาการใบไหม้ทุกประการ กล่าวคือพบการเป็นโรคเฉลี่ยสูงสุด (28.39%) ในเดือนกันยายน ต่ำสุดในเดือนมีนาคม (1.50%) และในระหว่างยูคาลิปตัสทั้ง 7 โคลน พบค่า DI สูงสุดในโคลน H32 (22.35%) และต่ำสุดในโคลน P6 (2.82%) (**Table 3**) ซึ่งเชื้อราสาเหตุโรคทั้ง 3 ลักษณะอาการดังกล่าวข้างต้นสามารถทำให้เกิดอาการได้ทั้งในกิ่งชำและต้นกล้า โดยทำความเสียหายให้กับการผลิตต้นกล้า 30 – 50% (วีระศักดิ์ และคณะ, 2556) จากค่า DSI และ DI ของต้นกล้ายูคาลิปตัสทั้ง 7 โคลนในสภาพเรือนเพาะชำนั้น เมื่อประเมินโรคทั้งหมดจาก 3 ลักษณะอาการ พบว่าเป็นโรคต่ำที่สุดในเดือนมีนาคม ขณะที่อาการใบไหม้และอาการไหม้จากยอดพบมากที่สุดในเดือนกันยายน ส่วนอาการใบจุดพบมากที่สุดในเดือนสิงหาคม สำหรับโคลนที่เป็นโรคทุกชนิดน้อยที่สุดคือ P6 ขณะที่ H32 เป็นโรคและแสดงอาการรุนแรงมากที่สุดต่ออาการใบไหม้และไหม้จากยอด ส่น H28 เป็นโรคมากที่สุดต่ออาการใบจุด ค่า DSI และ DI นั้นมีค่าต่ำที่สุดในเดือนมีนาคม (**Table 1 – 3**) เนื่องจากเป็นเดือนที่เริ่มต้นการผลิตต้นกล้า ซึ่งอาจมีปริมาณเชื้อปฐมภูมิ (primary inoculum) น้อยมากในการเริ่มต้นฤดูการผลิต หลังจากนั้นมีการสะสมเชื้อสาเหตุโรคระหว่างฤดูการผลิตต้นกล้า จึงทำให้อาการของโรคมีความรุนแรงเพิ่มมากขึ้นในเดือนต่อๆมา ซึ่งมีรายงานโรคยูคาลิปตัสที่มีสาเหตุจากไวรัส ไฟโตพลาสมา แบคทีเรีย และไส้เดือนฝอยนั้นพบมีจำนวนน้อยมาก โดยส่วนมากสาเหตุของโรคไวรัสและไฟโตพลาสมาทำให้ยูคาลิปตัสแสดงความผิดปกติ แต่ยังไม่มีการศึกษาในรายละเอียด มีเฉพาะโรคเหี่ยวที่เกิดจากแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* ในประเทศบราซิลที่เป็นโรคสำคัญ และทราบสาเหตุโรคที่ชัดเจนแล้ว โรคนี้สามารถทำลายต้นกล้ายูคาลิปตัสได้ถึง 17% ภายใน 6 เดือนของการปลูกในบางพื้นที่ สำหรับไส้เดือนฝอยที่อยู่ร่วมกับยูคาลิปตัสซึ่งก่อให้เกิดความเสียหายอย่างรุนแรงนั้นมีน้อยมาก (Wardlaw et al., 2000) อีกทั้งยังมีเชื้อราที่สามารถติดไปกับเมล็ดยูคาลิปตัส ซึ่งเป็นทั้งเชื้อราในแปลงปลูกหรือในโรงเก็บ สำหรับเชื้อราที่พบในเมล็ดยูคาลิปตัสจากแปลงจะเกี่ยวพันกับเชื้อราในดินทั่วไป เช่น *Fusarium* spp., *Macrophomina phaseolina*, *Pythium* spp. และ *Verticillium albo – atrum* โดยอาจติดมากับเมล็ดที่ปนเปื้อนดินระหว่างการเก็บเกี่ยว สำหรับเชื้อราที่พบในแปลงปลูก รวมทั้งเชื้อราที่เป็นสาเหตุโรคทางใบของยูคาลิปตัส เช่น *Botrytis cinerea, Coniella australiensis, Curvularia* spp., *Cylindrocladium scoparium, Dothiorella eucalypti*, *Fairmaniella leprosa, Harknessia* spp. และ *Pestalotiopsis* spp. อีกทั้งเชื้อราที่พบหลังการเก็บเกี่ยวสามารถทำให้เกิดการติดเชื้อในระหว่างการเก็บรักษาเมล็ด โดยเป็นเชื้อราที่สามารถเจริญเติบโตได้ในสภาพความชื้นต่ำ เชื้อราหลังการเก็บเกี่ยวนั้นส่วนใหญ่อยู่ในสกุล *Aspergillus* และ *Penicillium* (Brown, 2000) ทั้งนี้โรคของยูคาลิปตัสในสภาพเรือนเพาะชำส่วนใหญ่เกิดจากเชื้อ

รา ซึ่งพบได้จากอาการและส่วนต่างๆของพืช ได้แก่ การตายของต้นกล้า, โรคทางใบ (foliar diseases), โรคที่ลำต้น (stem diseases) และโรครากเน่า (root rots) สำหรับโรคที่สำคัญคือ โรคเน่าคอดิน (damping – off) ที่เกิดจากเชื้อราที่อยู่ในดิน ราสีเทา (grey mould) *Botrytis cinerea* โดยเฉพาะในเขตหนาวและเขตอบอุ่น รวมทั้งโรคราต่างๆ ได้แก่ ใบจุด ยอดไหม้ (shoot blight), แผลสะเก็ดที่ลำต้น (stem canker), รากเน่า และการตายของต้นกล้าที่เกิดจากเชื้อราหลายชนิด (species) ในสกุล *Cylindrocladium* และ *Cylindrocladiella* ที่พบโดยเฉพาะในเขตร้อน (Brown and Ferreira, 2000)

3. การแยกเชื้อให้บริสุทธิ์

การแยกเชื้อสาเหตุโรคจากตัวอย่างต้นกล้ายูคาลิปตัสตามลักษณะอาการจำนวนทั้งหมด 57 ตัวอย่าง สามารถแยกเชื้อบริสุทธิ์ได้ 61 ไอโซเลตโดยพบว่าราเป็นเชื้อสาเหตุที่ทำให้เกิดโรคที่สำคัญที่พบในช่วง 7 เดือน (มีนาคม – กันยายน 2561) จากต้นกล้า 7 โคลน (H4, H26, H28, H32, H36, H38 และ P6) เชื้อราสาเหตุโรคที่เจริญบนอาหาร PDA ได้นำไปใช้สำหรับการศึกษาต่อไป

4. การทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรคภายใต้สภาพห้องปฏิบัติการ

เชื้อราที่แยกได้จำนวน 61 ไอโซเลต เมื่อนำไปทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรคโดยทดสอบในการสภาพเด็ดใบ พบว่าสามารถทำให้เกิดโรคได้จำนวน 58 ไอโซเลต โดยในวันที่ 1 มี 12 ไอโซเลต ซึ่งมีค่าเฉลี่ยของขนาดแผลอยู่ระหว่าง 0.50 – 0.70 เซนติเมตร (ซม.) วันที่ 2 มีเชื้อ 52 ไอโซเลต ขนาดแผลอยู่ระหว่าง 0.40 – 2.73 ซม. วันที่ 3 และ 4 มีเชื้อที่สามารถทำให้เกิดโรคสะสมได้มากจำนวน 54 ไอโซเลตเท่ากัน โดยมีขนาดแผลอยู่ระหว่าง 0.30 – 4.13 และ 0.43 – 4.35 ซม. ตามลำดับ สำหรับในวันที่ 5 มีจำนวนไอโซเลตที่ทำให้เกิดโรคสะสมได้มากที่สุด จำนวน 58 ไอโซเลต ซึ่งมีขนาดแผลอยู่ระหว่าง 0.10 – 5.08 ซม. โดยไอโซเลตที่ทำให้เกิดแผลขนาดเฉลี่ยใหญ่ที่สุดคือ ไอโซเลต 22LBH32 (5.08 ซม.) ซึ่งมีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่งกับไอโซเลตอื่นๆ ยกเว้นไอโซเลต 6LSH4, 11LBH28, 12LBH36, 13LSH28, 14LBH4, 19LSH36, 20LBH32, 21LBP6, 23LBH38, 24LBH28, 25LSH28, 26LSH38, 29LSH38, 30DBH4, 31DBH28, 35LSH4, 36LSH28, 37LBH38, 38DBH32, 39DBH32,42LBH28, 43LBH28, 44LSH38, 45LSH28, 46LSH36, 47DBH38, 50LSH4, 53LSH28, 54LSH26, 55LBP6, 57LBH4, 58LBH32, 59LSH32 และ 61LBH4 ขณะที่ไอโซเลตที่ไม่ทำให้เกิดโรคคือ ไอโซเลต 5LSP6, 9LSP6 และ 15LSH4 ซึ่งไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($P<0.05$) กับกรรมวิธีควบคุม ซึ่งไม่แสดงอาการของโรคตลอดการทดลอง ส่วนไอโซเลต 17LSH26 ทำให้มีขนาดแผลเฉลี่ยเล็กที่สุดเท่ากับ 0.10 ซม. (**Table 4**) ซึ่งในงานวิจัยที่นำเสนอนี้สามารถแยกเชื้อบริสุทธิ์ได้ 61 ไอโซเลต ในการทดสอบในสภาพการเด็ดใบในห้องปฏิบัติการนั้น เป็นการคัดเลือกเบื้องต้นที่สามารถประเมินความสามรถในการทำให้เกิดโรคได้โดยเปรียบเทียบกับกรรมวิธีที่ไม่มีการปลูกเชื้อ วิธีดังกล่าวมีการทำแผลเพื่อให้เชื้อเข้าทำลายทางบาดแผลได้ง่าย ทำให้การเกิดโรคเร็วขึ้น วิธีการตรวจสอบนี้มีการทำแผล ซึ่งแตกต่างจากที่อัฐภรณ์ (2559) ได้ทดสอบโดยไม่มีการทำแผล แต่ก็ให้ลักษณะอาการโรคของยูคาลิปตัสคล้ายกัน เทคนิคการทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรคนั้นมีในไม้ยืนต้นอื่นๆในประเทศไทยด้วย เช่น ทุเรียน (Suksiri et al., 2018) เป็นต้น ในส่วนการทดสอบกับระดับต้นกล้าในเรือนทดลองนั้นเป็นการทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรคที่มีสภาพใกล้เคียงกับธรรมชาติและยืนยันผลในไอโซเลตของเชื้อที่คัดเลือกจากการทดสอบในสภาพห้องปฏิบัติการ

Table 1 Leaf blight disease severity indexes of different clones of eucalyptus seedlings in nursery evaluated once monthly in 2018

Clone	Month							
	Mar	Apr	May	Jun	Jul	Aug	Sep	Mean
H4	11.11	8.78	26.14	16.16	16.06	17.90	20.73	16.70
H26	np	15.36	13.04	11.65	13.89	18.56	16.39	14.82
H28	np	14.52	12.50	12.00	19.72	22.88	26.77	18.07
H32	np	np	17.33	16.00	16.49	15.24	26.43	**18.30**
H36	np	13.70	16.00	12.11	14.12	20.32	20.69	16.16
H38	np	np	np	11.43	21.97	21.56	16.82	16.74
P6	8.00	14.29	8.57	22.38	14.17	18.97	17.04	14.77
Mean	9.56	13.33	15.60	14.53	16.63	19.35	**20.70**	

np = not producing

Table 2 Leaf spot disease severity indexes of different clones of eucalyptus seedlings in nursery evaluated once monthly in 2018

Clone	Month							
	Mar	Apr	May	Jun	Jul	Aug	Sep	Mean
H4	11.10	8.36	26.72	14.26	20.67	29.42	13.57	17.72
H26	np	14.69	19.58	16.70	11.03	16.39	18.61	16.17
H28	np	11.91	18.28	14.76	22.99	29.41	20.69	**19.67**
H32	np	np	17.33	16.00	12.35	14.69	26.84	17.44
H36	np	13.61	14.10	16.53	13.75	21.81	16.55	16.06
H38	np	np	np	13.91	22.05	24.32	17.93	17.96
P6	10.00	12.38	9.71	12.22	12.00	14.47	11.00	11.68
Mean	10.55	12.19	17.62	14.91	16.41	**21.50**	17.88	

np = not producing

Table 3 Dieback disease incidence percentage of different clones of eucalyptus seedlings in nursery evaluated once monthly in 2018

Clone	Month/Disease incidence (%)							
	Mar	Apr	May	Jun	Jul	Aug	Sep	Mean
H4	3.00	3.64	13.57	20.00	4.00	14.17	18.00	10.91
H26	np	0	10.00	0.71	0	3.75	10.00	4.08
H28	np	6.67	1.82	5.00	6.67	9.00	28.75	9.65
H32	np	np	6.00	12.00	10.00	23.75	60.00	**22.35**
H36	np	0	3.33	0	1.43	29.17	42.00	12.66
H38	np	np	np	0	1.00	28.00	27.50	14.13
P6	0	1.67	2.00	1.54	2.00	0	12.50	2.82
Mean	1.50	2.39	6.12	5.61	3.59	15.41	**28.39**	

np = not producing

5. การบ่งชี้เชื้อราสาเหตุโรค

จากการตรวจลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อจำนวน 58 ไอโซเลต สามารถบ่งชี้เชื้อราสาเหตุโรคของต้นกล้ายูคาลิปตัสในช่วง 7 เดือนดังกล่าวได้ 4 สกุล โดยมีเชื้อรา *Coniella* sp. 30 ไอโซเลต เชื้อรา *Pestalotiopsis* sp. 10 ไอโซเลต เชื้อรา *Cylindrocladium* sp. 11 ไอโซเลต และเชื้อรา *Curvularia* sp. 7 ไอโซเลต (**Table 5**) ได้แก่

1) *Coniella* sp. ทำให้เกิดอาการใบไหม้บนใบยูคาลิปตัส (**Figure 1A**) สร้างเส้นใยสีขาวเมื่อเจริญบนอาหาร PDA และจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลอ่อนเมื่อมีอายุมากขึ้น บนโคโลนีในอาหาร PDA พบเม็ดพิกนีเดีย (pycnidia) มีสีดำกระจายอยู่บนเส้นใยสีขาว (**Figure 1B**) โคนิเดีย (conidia) รูปร่างคล้ายกระสวย มีสีเข้มเซลล์เดียวขนาด 10.21×3.94 ไมโครเมตร (µm) (**Figure 1C**)

2) *Pestalotiopsis* sp. ทำให้เกิดอาการใบไหม้และอาการใบจุดบนใบยูคาลิปตัส (**Figure 1D**) เส้นใยมีสีขาวฟู มีผนังกั้น ต่อมาจะมีเมือกสีดำอยู่บนเส้นใย (**Figure 1E**) ภายในเมือกมี conidia รูปร่างคล้ายกระสวย มี 3 – 5 เซลล์ ส่วนหัวและท้ายมีเซลล์ลักษณะใส ส่วนกลางมีสีเข้ม conidia มีขนาด 14.33×6.39 µm ส่วนปลายมีรยางค์ (appendage) 3 อัน (**Figure 1F**)

3) *Cylindrocladium* sp. ทำให้เกิดอาการใบจุดบนใบยูคาลิปตัส (**Figure 1G**) เส้นใยมีสีขาวฟูในช่วงแรกและเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเข้มในเวลาต่อมา (**Figure 1H**) เส้นใยมีผนังกั้น สร้าง conidia ทรงกระบอกตรงมีขนาด 35.19×2.83 µm มีผนังกั้นหลายอัน ใสไม่มีสี ขนาดใหญ่ (**Figure 1I**)

4) *Curvularia* sp. ทำให้เกิดอาการใบจุดบนใบยูคาลิปตัส (**Figure 1J**) เส้นใยมีสีเทาดำ (**Figure 1K**) conidia มีผนังกั้น มี 4 เซลล์ รูปร่างโค้งเล็กน้อย หัวท้ายมน เซลล์ตรงกลางมีสีเข้มกว่าเซลล์หัวท้าย conidia มีขนาด 19.79×10.83 µm (**Figure 1L**)

จากผลการศึกษานี้พบว่าเชื้อราที่เป็นสาเหตุโรคของต้นกล้ายูคาลิปตัสที่สำคัญ ได้แก่ สกุล *Cylindrocladium* ซึ่งตรงกับ กฤษณา และคณะ (2553) ที่ได้รายงานว่ามีเชื้อรามากกว่า 30 ชนิดที่เข้าทำลายยูคาลิปตัสได้ตั้งแต่ระยะเมล็ด กิ่งชำ กล้าไม้ และแปลงปลูก โดยเชื้อราที่สำคัญ ได้แก่ *Cylindrocladium reteaudii*, *Cryptosporiopsis eucalypti*, *Kirramyces destructans*, *Dothiorella* sp., *Botryosphaeria* sp. และ *Cryphonetria cubensis* เป็นต้น ขณะที่มีรายงานว่าเชื้อ *C. eucalypti* และ *C. reteaudii* เป็นเชื้อราสำคัญของโรคยูคาลิปตัสในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (กฤษฎา, 2557) สำหรับในต่างประเทศมีข้อมูลถึงการตายของต้นกล้าที่เกิดจากเชื้อ *Cylindrocladium* และ *Cylindrocladiella* ซึ่งจะพบมากในเขตร้อน (Brown and Ferreira, 2000)

6. การทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรคภายใต้สภาพเรือนทดลอง

จากการทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรคของเชื้อรา ในสภาพการเด็ดใบและบ่งชี้เชื้อในระดับสกุลได้ 4 สกุล จึงคัดเลือกไอโซเลตตัวแทนของแต่ละสกุลจากความรุนแรงในการทำให้เกิดโรคจากมากที่สุด-มากจากสกุล *Coniella* 3 ไอโซเลต (11LBH28, 14LBH4

และ 22LBH32), *Pestalotiopsis* 2 ไอโซเลต (25LSH28 และ 26LSH38), *Curvularia* 2 ไอโซเลต (35LSH4 และ 36LSH28) และ *Cylindrocladium* 3 ไอโซเลต (37LBH38, 38DBH32 และ 39DBH32) รวม 10 ไอโซเลต ไปทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรคกับต้นกล้ายูคาลิปตัสโคลน H4 ภายใต้สภาพเรือนทดลอง พบว่าต้นกล้ายูคาลิปตัสแสดงอาการจุดแผลครั้งแรกในวันที่ 3 หลังการปลูกเชื้อ โดยวันที่ 3, 4 และ 6 ไอโซเลต 38DBH32 มีขนาดแผลใหญ่ที่สุด (1.40, 2.10 และ 2.82 ซม. ตามลำดับ) มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญกับไอโซเลตอื่นๆยกเว้นไอโซเลต 39DBH32 (1.12, 1.75 และ 2.58 ซม. ตามลำดับ) สำหรับในวันที่ 5 และ 7 นั้น ไอโซเลต 39DBH32 มีขนาดแผลใหญ่ที่สุด (2.52 และ 3.23 ซม. ตามลำดับ) มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P<0.05$) กับไอโซเลตอื่นๆ ยกเว้นไอโซเลต 38DBH32 (2.30 และ 2.92 ซม. ตามลำดับ) ซึ่งไอโซเลตที่เกิดโรคช้าที่สุดคือ ไอโซเลต 14LBH4 ส่วนไอโซเลตที่มีขนาดแผลเล็กที่สุดในวันที่ 7 คือ ไอโซเลต 37LBH38 (0.40 ซม.) (**Table 6, Figure 2**) การทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรคด้วยการปลูกเชื้อบนใบต้นกล้ายูคาลิปตัสในสภาพเรือนทดลองนั้น เชื้อบางไอโซเลต เช่น เชื้อ *Coniella* ไอโซเลต 11LBH28, 14LBH4 และ 22LBH32 ที่ทำให้เกิดแผลขนาดใหญ่ในการทดสอบในสภาพการเด็ดใบ แต่เมื่อนำมาทดสอบบนต้นกล้ากลับทำให้เกิดแผลเล็กนั้น อาจเป็นเพราะสภาพการทดสอบที่มีเงื่อนไขที่แตกต่างกัน ประกอบกับใบพืชที่เด็ดออกจากต้นจะมีปัจจัยของความแก่และความถดถอยของเซลล์พืช (senescence) เข้ามาเกี่ยวข้องด้วย ทำให้ใบพืชอ่อนแอต่อการเข้าทำลายของเชื้อ ซึ่งต่างจากใบที่อยู่กับต้นพืชที่มีความสดและมีกลไกของความต้านทานต่อการเข้าทำลายของเชื้ออยู่ ทำให้แสดงอาการแผลน้อยกว่าในสภาพเด็ดใบ ซึ่งปรากฏการณ์นี้พบในใบ *Arabidopsis thaliana* ซึ่งหากมีการปลูกเชื้อ *Colletotrichum linicola* A1 ให้กับใบพืชดังกล่าวในสภาพเด็ดใบจะพบลักษณะของการเข้าทำลายที่เห็นได้ชัดเจน แต่ไม่พบกับใบที่อยู่บนต้น (Liu et al., 2007)

Table 4 The pathogenicity of fungal disease causal agents on eucalyptus detached leaves under laboratory condition evaluated from lesion diameters (continued)

Isolates[1/]	Lesion diameter[2/] (cm)				
	Day 1	Day 2	Day 3	Day 4	Day 5
control	0d	0r	0q	0s	0p
1LBH4	0d	1.05j-q	1.63i-o	1.65k-r	2.50c-m
2LBP6	0d	0r	0.30pq	0.43rs	0.78mnop
3LBH26	0d	0r	0.38pq	0.63rs	1.28k-p
4LBH26	0d	0.50pqr	1.00m-q	1.28n-s	1.60j-p
5LSP6	0d	0r	0q	0s	0p
6LSH4	0d	1.28f-o	2.23e-m	2.75d-m	3.70a-j
7LSH4	0d	0r	0q	0s	0.13op
8LSH26	0d	0r	0q	0s	0.13op
9LSP6	0d	0r	0q	0s	0p
10LSH4	0d	0.40qr	0.60opq	1.08o-s	1.95g-p
11LBH28	0d	1.90b-g	3.70abc	4.18abc	4.75ab
12LBH36	0d	2.18abcd	3.50abcd	3.85a-e	4.05a-g
13LSH28	0d	1.63b-k	2.73b-i	3.23a-i	4.35abcd
14LBH4	0d	2.73a	4.00a	4.33ab	4.83ab
15LSH4	0d	0r	0q	0s	0p
16LSH36	0.50c	1.75b-i	1.93g-n	2.05i-q	2.13e-o
17LSH26	0d	0r	0q	0s	0.10op
18LSH32	0d	0r	0q	0s	0.20nop
19LSH36	0d	1.68b-j	3.43a-e	3.63a-h	4.08a-g
20LBH32	0d	1.83 b-h	3.13a-h	3.58a-h	4.28a-e
21LBP6	0d	1.45e-m	3.05a-h	3.80a-f	4.18a-f
22LBH32	0d	2.33ab	3.78ab	3.98abcd	5.08a
23LBH38	0d	1.15h-p	2.10f-n	2.65d-n	3.43a-k
24LBH28	0d	1.43e-n	2.18f-m	2.50e-o	3.15a-l
25LSH28	0d	1.78 b-h	2.63b-j	3.23a-i	4.15a-f
26LSH38	0d	1.53d-l	2.50c-k	3.03a-k	3.85a-h
27LBH36	0d	1.28f-o	1.43j-p	1.55k-r	2.05f-p
28LSH32	0d	1.70b-j	1.90h-n	2.08i-q	2.30d-m
29LSH38	0.70a	2.28abc	2.70b-i	2.93b-l	3.33a-k
30DBH4	0.70a	2.20abcd	2.40d-l	2.68d-n	3.13a-l
31DBH28	0d	1.88b-g	2.00g-n	2.28g-q	3.33a-k
32LSH38	0d	1.03j-q	1.33k-p	1.63k-r	2.25d-n

Table 4 The pathogenicity of fungal disease causal agents on eucalyptus detached leaves under laboratory condition evaluated from lesion diameters (continued)

Isolates[1/]	Lesion diameter[2/] (cm)				
	Day 1	Day 2	Day 3	Day 4	Day 5
33LSH28	0.60b	2.05bcde	2.28d-l	2.40f-p	2.53c-m
34DBH36	0.60b	1.83b-h	2.15f-m	2.30g-q	2.83b-m
35LSH4	0.60b	1.90b-g	2.33d-l	2.60d-n	3.25a-l
36LSH28	0.60b	1.93b-f	2.15f-m	2.43e-p	3.18a-l
37LBH38	0d	2.05bcde	3.43a-e	3.70a-g	4.30a-e
38DBH32	0d	2.03bcde	3.15a-h	3.85a-e	4.33abcd
39DBH32	0d	2.23abcd	4.13a	4.35a	4.60abc
40LBH26	0d	0.80m-q	1.00m-q	1.05pqrs	1.83h-p
41LSH26	0d	0.78m-q	0.88nopq	0.93qrs	1.15l-p
42LBH28	0d	0.90l-q	2.05g-n	2.48e-o	3.40a-k
43LBH28	0d	1.08i-q	2.08g-n	2.55d-n	3.60a-j
44LSH38	0d	1.20g-o	2.53c-k	3.10a-j	3.68a-j
45LSH28	0d	1.03j-q	1.98g-n	2.70d-n	3.33a-k
46LSH36	0d	1.08i-q	2.30d-l	2.88c-l	3.73a-j
47DBH38	0d	0.90l-q	1.93g-n	2.50e-o	3.23a-l
48LBH32	0.50c	0.78m-q	1.28k-p	1.53l-r	2.33d-m
49LSH32	0.50c	0.70opq	1.30k-p	1.50l-r	1.68i-p
50LSH4	0.60b	0.93l-q	1.95g-n	2.48e-o	2.93a-l
51LSH38	0.60b	0.73nopq	1.20l-q	1.65k-r	1.83h-p
52LBH38	0.60b	1.15h-p	1.90h-n	2.23h-q	2.70b-m
53LSH28	0d	1.80 b-h	3.15a-h	3.48a-i	4.03a-g
54LSH26	0d	1.60c-l	3.33a-f	3.58a-h	4.30a-e
55LBP6	0d	1.75b-i	3.18a-g	3.43a-i	3.93a-h
56LBH36	0d	0.58opqr	1.18l-q	1.33m-s	2.38d-m
57LBH4	0d	1.03j-q	2.48d-k	3.28a-i	4.05a-g
58LBH32	0d	0.73nopq	1.68i-o	2.05i-q	4.08a-g
59LSH32	0d	0.95k-q	2.40d-l	2.85c-l	3.60a-j
60LSH38	0d	0.70opq	1.63i-o	1.68j-r	2.05f-p
61LBH4	0d	0.90l-q	2.05g-n	2.90c-l	3.83a-i
F-test	**	**	**	**	**
C.V. (%)	0	34.47	36.85	36.51	43.65

[1/]LB = isolated from leaf blight, LS = isolated from leaf spot, DB = isolate from dieback

[2/]Means followed by the same letter(s) in the same column are not significantly different (P≥0.05, DMRT).

Table 5 Identification of fungal disease causal agents of eucalyptus seedlings clone H4 into the genus from 58 isolates

Genus	Isolate[1/]	Numbers
Coniella	1LBH4, 2LBP6, 3LBH26, 4LBH26, 6LSH4, 7LSH4, 8LSH26, 10LSH4, 11LBH28, 12LBH36, 13LSH28, 14LBH4, 16LSH36, 17LSH26, 18LSH32, 19LSH36, 20LBH32, 21LBP6, 22LBH32, 40LBH26, 41LSH26, 53LSH28, 54LSH26, 55LBP6, 56LBH36, 57LBH4, 58LBH32, 59LSH32, 60LSH38, 61LBH4	30
Pestalotiopsis	23LBH38, 24LBH28, 25LSH28, 26LSH38, 42LBH28, 43LBH28, 44LSH38, 45LSH28, 46LSH36, 47DBH38	10
Cylindrocladium	27LBH36, 28LSH32, 29LSH38, 30DBH4, 31DBH28, 32LSH38, 33LSH28, 34DBH36, 37LBH38, 38DBH32, 39DBH32	11
Curvularia	35LSH4, 36LSH28, 48LBH32, 49LSH32, 50LSH4, 51LSH38, 52LBH38	7

[1/]LB = isolated from leaf blight, LS = isolated from leaf spot, DB = isolate from dieback

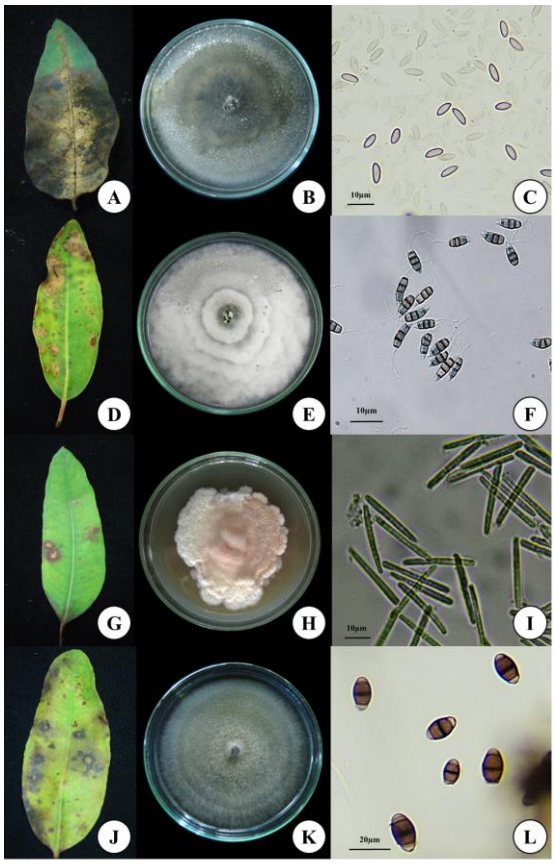

Figure 1 Symptoms, colony characteristics and conidia of pathogenic fungi of major eucalyptus fungal diseases.

A Leaf blight by *Coniella* sp. (isolate 11LBH28)
B Colony of *Coniella* sp. (isolate 11LBH28)
C Conidia of *Coniella* sp. (isolate 11LBH28)
D Leaf blight and leaf spot by *Pestalotiopsis* sp. (isolate 25LSH28)
E Colony of *Pestalotiopsis* sp. (isolate 25LSH28)
F Conidia of *Pestalotiopsis* sp. (isolate 25LSH28)
G Leaf spot by *Cylindrocladium* sp. (isolate 39DBH32)
H Colony of *Cylindrocladium* sp. (isolate 39DBH32)
I Conidia of *Cylindrocladium* sp. (isolate 39DBH32)
J Leaf spot by *Curvularia* sp. (isolate 36LSH28)
K Colony of *Curvularia* sp. (isolate 36LSH28)
L Conidia of *Curvularia* sp. (isolate 36LSH28)

Table 6 Pathogenicity test of different fungal genera on eucalyptus seedlings (clone H4) under greenhouse condition

Isolates[1/]	Genus	Lesion diameter[2/] (cm)						
		Day 1	Day 2	Day 3	Day 4	Day 5	Day 6	Day 7
control		0	0	0d	0d	0e	0d	0d
11LBH28	*Coniella*	0	0	0.48bc	1.00b	1.23b	1.37b	1.60b
14LBH4	*Coniella*	0	0	0d	0d	0e	0.15d	0.45cd
22LBH32	*Coniella*	0	0	0.18cd	0.33cd	0.37cde	0.43cd	0.62cd
25LSH28	*Pestalotiopsis*	0	0	0d	0d	0.62bcde	0.72bcd	0.82bcd
26LSH38	*Pestalotiopsis*	0	0	0d	0d	0.25de	0.27d	0.55cd
35LSH4	*Curvularia*	0	0	0.58b	0.77bc	0.95bcd	1.20bc	1.33bc
36LSH28	*Curvularia*	0	0	0.68b	0.90b	1.05b	1.42b	1.70b
37LBH38	*Cylindrocladium*	0	0	0.17cd	0.22d	0.37cde	0.37cd	0.40cd
38DBH32	*Cylindrocladium*	0	0	**1.40a**	**2.10a**	2.30a	**2.82a**	2.92a
39DBH32	*Cylindrocladium*	0	0	1.12a	1.75a	**2.52a**	2.78a	**3.23a**
F-test		ns	ns	**	**	**	**	**
C.V.%		–	–	46.14	45.98	47.08	43.59	41.47

[1/]LB = isolated from leaf blight, LS = isolated from leaf spot, DB = isolate from dieback

[2/]Means followed by the same letter(s) in the same colum are not significantly different (P≥0.05, DMRT).

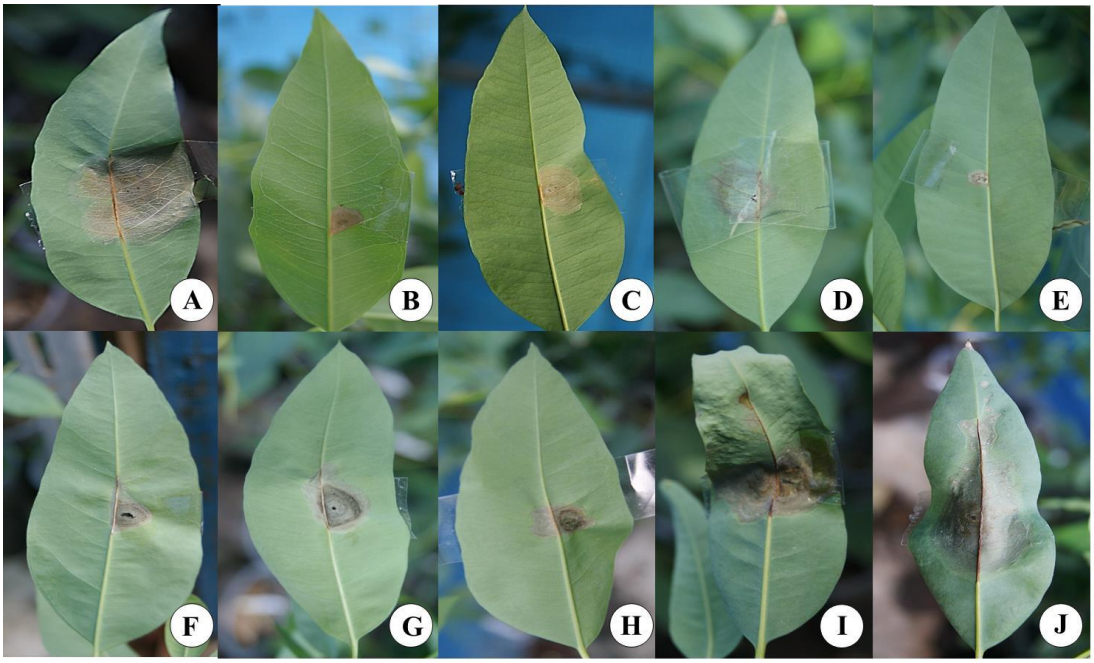

Figure 2 Symtoms of eucalyptus diseases caused by different fungi tested on eucalyptus seedlings in greenhouse, 7 days after inoculation

A Isolate 11LBH28 B Isolate 14LBH4 C Isolate 22LBH32 D Isolate 25LSH28 E Isolate 26LSH38

F Isolate 35LSH4 G Isolate 36LSH28 H Isolate 37LBH38 I Isolate 38DBH32 J Isolate 39DBH32

สรุป

จากการสำรวจและรวบรวมตัวอย่างโรคเชื้อราของต้นกล้ายูคาลิปตัสที่ผลิต 7 โคลนภายใต้สภาพเรือนเพาะชำของบริษัทสยามฟอเรสทรี จำกัด ในฤดูการผลิต 2561 (มีนาคม–กันยายน 2561) นั้น พบมีโรคราที่สำคัญ 3 โรค ได้แก่ โรคใบไหม้ โรคใบจุด และโรคไหม้จากยอด ผลการประเมินค่า DSI ของโรคใบจุดและใบไหม้ และค่า DI ของโรคไหม้จากยอด พบว่าค่าเฉลี่ยของ DSI ของโรคใบจุดและใบไหม้และ DI โรคไหม้จากยอดต่ำที่สุดนั้นพบในเดือนมีนาคม ทั้งนี้โรคใบไหม้และโรคไหม้จากยอดมีค่า DSI และ DI มากที่สุดในเดือนกันยายน ส่วนโรคใบจุดมีค่ามากที่สุดในเดือนสิงหาคม สำหรับโคลนที่เป็นโรคทุกโรคน้อยที่สุดคือ P6 ขณะที่ H32 ซึ่งแสดงอาการโรคใบไหม้และโรคไหม้จากยอดมีค่า DSI และ DI มากที่สุด ส่วน H28 มีค่า DSI ของโรคใบจุดมากที่สุด การแยกเชื้อสาเหตุโรคจากตัวอย่างโรคต้นกล้ายูคาลิปตัสทั้ง 7 โคลน สามารถแยกเชื้อราได้ทั้งหมด 61 ไอโซเลต โดยสามารถทำให้เกิดโรคได้ 58 ไอโซเลต ซึ่งเมื่อนำมาบ่งชี้ได้เชื้อราสาเหตุโรค 4 สกุล ได้แก่ *Coniella* sp., *Pestalotiopsis* sp., *Cylindrocladium* sp. และ *Curvularia* sp. ส่วนอีก 3 ไอโซเลตไม่สามารถทำให้เกิดโรคได้ ในการทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรคภายใต้สภาพเรือนทดลองของเชื้อทั้ง 10 ไอโซเลตที่พบว่ามีความรุนแรงของโรคในสภาพเรือนทดลองในระดับมาก – มากที่สุด เชื้อ *Cylindrocladium* ไอโซเลต 38DBH32 และ *Cylindrocladium* ไอโซเลต 39DBH32 เป็นไอโซเลตที่ทำให้เกิดขนาดแผลเฉลี่ยใหญ่ที่สุด และเชื้อ *Cylindrocladium* ไอโซเลต 37LBH38 เป็นไอโซเลตที่ทำให้เกิดขนาดแผลเฉลี่ยเล็กที่สุด

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณ ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร (AG-BIO/MHESI) สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวงอุดมศึกษาวิจัยและนวัตกรรม ที่ให้ทุนสนับสนุนงานวิจัยในครั้งนี้ ขอขอบคุณศูนย์วิจัยเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตรเพื่อเศรษฐกิจที่ยั่งยืน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น บริษัท สยามฟอเรสทรี จำกัด อำเภอน้ำพอง จังหวัดขอนแก่น รวมทั้งกลุ่มวิจัยการเพาะเลี้ยงและพัฒนาผลิตภัณฑ์ไหมป่าและแมลงสำคัญทางเศรษฐกิจเพื่อสร้างมูลค่าเพิ่ม มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่เอื้อเฟื้อสถานที่และอุปกรณ์ในการทำวิจัยในครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

กฤษฎา โพธิ์เรืองเดช. 2557. โรคของยูคาลิปตัสในเขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนบนของประเทศไทยและการป้องกันกำจัดโรคที่สำคัญ. วิทยานิพนธ์ ปริญญาวิทยาศาสตร มหาบัณฑิต สาขาโรคพืชวิทยา มหาวิทยาลัยขอนแก่น. ขอนแก่น.

กฤษณา พงษ์พานิช จันจิรา อายะวงศ์ วินันทิดา หิมะมาน กิตติมา ด้วงแค และ บารมี สกลรัตน์. 2553. โรคยูคาลิปตัสในประเทศไทย. โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์ฯ, กรุงเทพมหานคร.

วีระศักดิ์ ศักดิ์ศิริรัตน์. 2560. ราปฏิปักษ์สำหรับควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี. หจก. คลังนานาวิทยา, ขอนแก่น.

วีระศักดิ์ ศักดิ์ศิริรัตน์ พัฒนา ชมพูวิเศษ รื่นเริง สินน้ำพอง มนัสวี สุริยวนากุล ปุญญิศา ชารีรักษ์ กฤษฎา โพธิ์เรืองเดช และ อารยา ชารีรักษ์. 2556. การทดสอบสารเคมีในการควบคุมเชื้อรา *Cylindrocladium* sp. สาเหตุโรคใบจุดของยูคาลิปตัส. แก่นเกษตร. 41(ฉบับพิเศษ 1): 543–548.

ศูนย์เทคโนโลยีสารสนเทศและการสื่อสาร กรมส่งเสริมการเกษตร. 2560. ยูคาลิปตัส. แหล่งข้อมูล: http://www.agriinfo.doae.go.th/year60/plant/rortor/perennial/euca.pdf. ค้นเมื่อ 15 พฤษภาคม 2561.

สำนักงานส่งเสริมการปลูกป่า กรมป่าไม้. 2556. ยูคาลิปตัส คามาลดูเลนซิส. แหล่งข้อมูล: http://forestinfo.forest.go.th/pfd/Files/FileEBook/EB5.pdf. ค้นเมื่อ 15 พฤษภาคม 2561.

อัฐภรณ์ พันยา. 2559. โรคของยูคาลิปตัสในระบบการผลิตต้นกล้าและการป้องกันกำจัด. วิทยานิพนธ์ ปริญญาวิทยาศาสตร มหาบัณฑิต สาขาโรคพืชวิทยา มหาวิทยาลัยขอนแก่น. ขอนแก่น.

Brown, B. N. 2000. Diseases and fungi of the reproductive structure of eucalypts, P. 103–118. In: Keane, P. J., G. A. Kile, F. D. Podger, and B. N. Brown (eds.). Diseases and pathogens of eucalypts. CSIRO Publishing: Collingwood.

Brown, B. N., and F. A. Ferreira. 2000. Disease during propagation of eucalypts, P. 119–152. In: Keane, P. J., G. A. Kile, F. D. Podger, and B. N. Brown (eds.), Diseases and pathogens of eucalypts. CSIRO Publishing: Collingwood.

Lui, G., R. Kennedy, D. L. Greenshields, G. Peng, L. Forseille, G. Selvaroj, and Y. Wei. 2007. Detached and attached *Arabidopsis* leaf assays reveal distinctive defense responses against hemibiotrophic *Colletotrichum* spp. Molecular Plant-Microbe Interactions. 20(10): 1308 – 1319.

Old, K., M. J. Wingfield, and Z. Q. Yuan. 2003. A manual of diseases of eucalypts in south–east asia. Center for International Forestry Research. Jakarta.

Suksiri, S., P. Laipasu, K. Soytong, and S. Poeaim. 2018. Isolation and identification of *Phytophthora* sp. and *Pythium* sp. from durian orchard in Chumphon province, Thailand. International Journal of Agricultural Technology. 14(3): 389–402.

Wardlaw, T. J., G. A. Kile, and J. C. Dianese. 2000. Diseases of eucalypts associated with viruses, phytoplasmas, bacteria and nematodes, P. 339–352. In: Keane, P. J., G. A. Kile, F. D. Podger, and B. N. Brown (eds.), Diseases and pathogens of eucalypts. CSIRO Publishing: Collingwood.