

## โรคเชื้อราของยูคาลิปตัสในลานเพาะชำต้นกล้าและการบ่งชี้เชื้อสาเหตุโรค

### Fungal diseases of eucalyptus in seedling orchard and identification of the causal agents

ศิริพร ศรีทา<sup>1</sup>, สุวิตา แสไพศาล<sup>1,2,3,4</sup>, วีระศักดิ์ ตักดีศิริรัตน์<sup>2,3,4\*</sup> และ สุภัชญา นามพิลา<sup>5</sup>

Siripon Srita<sup>1</sup>, Suwita Saepaisan<sup>1,2,3,4</sup>, Weerasak Saksirat<sup>2,3,4\*</sup> and Supatchaya Nampila<sup>5</sup>

<sup>1</sup> สาขาวิชากีฏวิทยาและโรคพืชวิทยา คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จังหวัดขอนแก่น 40002

<sup>1</sup> Department of Entomology and Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002

<sup>2</sup> ศูนย์วิจัยเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตรเพื่อเศรษฐกิจที่ยั่งยืน มหาวิทยาลัยขอนแก่น จังหวัดขอนแก่น 40002

<sup>2</sup> Agricultural Biotechnology Research Center for Sustainable Economy (ABRCSE), Khon Kaen University, Khon Kaen 40002

<sup>3</sup> ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม 73140

<sup>3</sup> Center of Agricultural Biotechnology, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom, 73140

<sup>4</sup> ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวงอุดมศึกษา วิทยาศาสตร์ และนวัตกรรม กรุงเทพฯ

<sup>4</sup> Center of Excellence on Agricultural Biotechnology (AG-BIO/MHES), Bangkok

<sup>5</sup> สาขาวิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จังหวัดขอนแก่น 40002

<sup>5</sup> Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002

**บทคัดย่อ:** การศึกษาโรคที่เกิดจากเชื้อราของยูคาลิปตัสจำนวน 9 โคลน ในลานเพาะชำต้นกล้าของบริษัท สยามฟอเรสทรี จำกัด อำเภอ น้ำพอง จังหวัดขอนแก่น ระหว่าง เดือนเมษายน-ธันวาคม พ.ศ. 2561 พบอาการโรคใบจุด ใบไหม้ และไหม้จากยอด ได้แยกเชื้อราสาเหตุโรคจากอาการดังกล่าวแล้วนำไปทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรคและนำไปบ่งชี้ในระดับสกุลจากลักษณะทางสัณฐานวิทยา โดยเชื้อราสาเหตุโรค *Coniella hibisci* มีความรุนแรงในการทำให้เกิดโรคใบจุดมากที่สุด *Cylindrocladium quinquesseptatum* และ *Coniella fusiformis* มีความรุนแรงในการทำให้เกิดโรคใบไหม้มากที่สุด ส่วนอาการไหม้จากยอดนั้นเชื้อ *Cylindrocladium quinquesseptatum* ทำให้เกิดโรคได้รุนแรงมากที่สุด และทำให้ต้นกล้ายูคาลิปตัสตายได้ใน 11 วันหลังการปลูกเชื้อ ซึ่งเชื้อราดังกล่าวมีความสามารถทำให้เกิดความเสียหายต่อการผลิตต้นกล้ายูคาลิปตัส จากการคัดเลือกไอโซเลตของเชื้อราแล้วนำไปบ่งชี้ชนิด (species) ของเชื้อราสาเหตุโรคด้วยวิธีการทางชีวโมเลกุลโดยเปรียบเทียบลำดับเบสของ DNA ในส่วน ITS1-5.8S-ITS2 ของ rDNA ร่วมกับ TEF-1 $\alpha$  gene นั้น พบว่าเชื้อราสาเหตุโรคมีความเหมือน (identity) กับเชื้อรา *Cylindrocladium quinquesseptatum*, *Pseudopezalotiopsis curvatispora*, *Neopezalotiopsis clavispora*, *Coniella fusiformis*, *Coniella hibisci*, *Curvularia eragrostidis*, *Exserohilum rostratum* และ *Macrophomina phaseolina* การศึกษานี้ชี้ให้เห็นถึงชนิดของเชื้อราที่เป็นสาเหตุโรคของยูคาลิปตัสในลานเพาะชำต้นกล้าและการรายงานครั้งแรกในประเทศไทยของเชื้อรา *E. rostratum* และ *M. phaseolina* ที่สามารถทำให้เกิดโรคใบจุดและใบไหม้ได้ในต้นกล้ายูคาลิปตัส

**คำสำคัญ:** เชื้อสาเหตุ; โรคยูคาลิปตัส; การบ่งชี้; คุณภาพ; ต้นกล้า

**ABSTRACT:** The survey and disease collection of 9 clones of eucalyptus seedlings in the orchard of Siam forestry company Limited, Nampong District, Khon Kaen province during April– December, 2018 were conducted. The symptoms included leaf spot, leaf blight and dieback were found. The pathogens of those symptoms were isolated and evaluated on the pathogenicity including the identification of genera by using morphological characteristics and microscopy. The result showed that the pathogens, *Coniella hibisci* were the most virulent causing leaf spot, *Cylindrocladium quinquesseptatum* and *Coniella fusiformis* were the most virulent causing leaf blight. For dieback, *Cylindrocladium quinquesseptatum* was the most virulent. It caused dead seedlings 11 days after inoculation. The

\* Corresponding author: [weerasak@kku.ac.th](mailto:weerasak@kku.ac.th)

Received: date; September 13, 2022 Accepted: date; October 21, 2022 Published: date;

pathogens were able to reduce the quality of eucalyptus seedling production. The representative isolates of those fungi were identified as species, based on molecular technique by using DNA base comparison based on ITS1-5.8S-ITS2 combined with TEF-1 $\alpha$  gene. The result revealed that they were similar to *Cylindrocladium quinquesepatum*, *Pseudopezalotiopsis curvatispora*, *Neopezalotiopsis clavispora*, *Coniella fusiformis*, *Coniella hibisci*, *Curvularia eragrostidis*, *Exserohilum rostratum* and *Macrophomina phaseolina*. This study indicates the fungal species causing diseases of eucalyptus in the seedling orchard and the first occurrence of *E. rostratum* and *M. phaseolina* which are capable to infect the leaf spot and leaf blight of eucalyptus seedlings in Thailand.

**Keywords:** causal agent; diseases of eucalyptus; identification; quality; seedling

## บทนำ

ยูคาลิปตัส (*Eucalyptus* spp.) เป็นพืชที่มีถิ่นกำเนิดในทวีปออสเตรเลีย มีชื่อสามัญ red river gum เป็นพืชที่เจริญเติบโตดี ระยะเวลา 4-5 ปีก็สามารถใช้ประโยชน์ได้ ทนต่อสภาพแวดล้อมที่มีความอุดมสมบูรณ์ต่ำ ยูคาลิปตัสมีความสำคัญทางเศรษฐกิจและสังคม มีการนำมาใช้ประโยชน์อย่างหลากหลาย เช่น การผลิตเส้นใยเรยอนเพื่อใช้ในอุตสาหกรรมสิ่งทอ ใช้ในการก่อสร้าง ปลังงาน เชื้อเพลิงชีวมวล เฟอร์นิเจอร์ อุตสาหกรรมกระดาษ ส่วนใบของยูคาลิปตัสนำมาสกัดเป็นน้ำมันหอมระเหยที่ใช้ในทางการแพทย์ เป็นต้น ซึ่งอุตสาหกรรมกระดาษของประเทศไทยมีการส่งออกคิดเป็นมูลค่า 469.06 ล้านบาทหรือร้อยละ 1.5 ของมูลค่าการส่งออกสินค้า (สำนักงานเศรษฐกิจอุตสาหกรรม, 2559) ทำให้ความต้องการใช้ไม้ยูคาลิปตัสมีเพิ่มสูงขึ้น ประเทศไทยมีพื้นที่ปลูกยูคาลิปตัสส่วนใหญ่อยู่ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ได้แก่ จังหวัดอุดรธานี สกลนคร สุรินทร์ เป็นต้น (กรมส่งเสริมการเกษตร, 2560) ในพื้นที่จังหวัดขอนแก่น บริษัท สยามฟอเรสทรี จำกัด มีการผลิตต้นกล้ายูคาลิปตัสเชิงพาณิชย์ เพื่อส่งเสริมให้เกษตรกรปลูกในระบบสวนป่า บริษัทฯ มีระบบการผลิตที่สำคัญโดยใช้เทคนิคการปักชำต้นกล้าในเรือนเพาะชำ ซึ่งสามารถผลิตต้นกล้ายูคาลิปตัสได้ตามความต้องการ เทคนิคนี้มีการให้น้ำแบบพ่นฝอยในเรือนเพาะชำทำให้ความชื้นสูง ชักน้ำให้เกิดการสร้างรากและยอด จากนั้นจึงย้ายต้นกล้ายูคาลิปตัสไปอนุบาลในลานเพาะชำ (seedling orchard) เมื่อต้นกล้ายูคาลิปตัสสมบูรณ์แข็งแรงแล้วจะนำไปจำหน่ายให้กับเกษตรกร การผลิตต้นกล้ายูคาลิปตัสมักประสบปัญหาโรคในระยะต้นกล้าทำให้เกิดความเสียหาย 40-60% และส่งผลต่อคุณภาพต้นกล้ายูคาลิปตัสอีกด้วย โรคที่สำคัญในระยะต้นกล้ามีหลายชนิด มีรายงานพบเชื้อราสาเหตุโรคมากกว่า 25 ชนิด อาการที่พบมากในระยะต้นกล้าคือ อาการใบจุด ใบไหม้ และไหม้จากยอดหรืออาการยืนต้นตายที่เกิดจากการเข้าทำลายของเชื้อ *Pestalotiopsis* sp., *Cylindrocladium* sp., *Cryptosporotiopsis* sp., *Coniella* sp. และ *Botryosphaeria* sp. เป็นต้น (กฤษณา และคณะ, 2553)

นอกจากนี้ยังมีรายงานการศึกษาถึงโรคในระยะต้นกล้าของยูคาลิปตัส เช่น วีระศักดิ์ และคณะ (2556), กฤษณา (2557) อัฐภรณ์ (2559) และ ชรินทร์ และคณะ (2564) เป็นต้น ซึ่งเป็นรายงานโรคของต้นกล้ายูคาลิปตัสในเรือนเพาะชำ (nursery) แต่ยังไม่มีการรายงานของโรคยูคาลิปตัสในลานเพาะชำต้นกล้า เนื่องจากลานเพาะชำเป็นพื้นที่อนุบาลต้นกล้าที่สำคัญ ทั้งทางด้านปริมาณและคุณภาพของต้นกล้ายูคาลิปตัสก่อนการกระจายส่งให้แก่เกษตรกร อีกทั้งยังมีสภาพแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงตามสภาพอากาศและฤดูกาล ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อสำรวจโรคเชื้อราของต้นกล้ายูคาลิปตัสในลานเพาะชำฤดูกาลผลิตในปี 2561 (เดือนเมษายน-ธันวาคม) และบ่งชี้ถึงชนิด (species) ของเชื้อสาเหตุเพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานในการวิจัยเพื่อการจัดการควบคุมโรคของต้นกล้ายูคาลิปตัสในลานเพาะชำ

## วิธีการศึกษา

### การสำรวจโรคเชื้อราของต้นกล้ายูคาลิปตัสในลานเพาะชำ

สำรวจและรวบรวมตัวอย่างโรคในสภาพลานเพาะชำต้นกล้ายูคาลิปตัสของบริษัท สยามฟอเรสทรี จำกัด ในพื้นที่ อ. น้ำพอง จ. ขอนแก่น สุ่มสำรวจโรคและเก็บตัวอย่างในระหว่างเดือนเมษายน-ธันวาคม พ.ศ. 2561 จำนวน 9 โคลน (clone) ซึ่งเป็นโคลนทางการค้าตามแผนการผลิตต้นกล้าของบริษัทฯ นำตัวอย่างโรคที่เก็บรวบรวมไปศึกษาต่อในห้องปฏิบัติการ

## การแยกเชื้อบริสุทธิ์และการทดสอบความสามารถในการเกิดโรค

### การแยกเชื้อราสาเหตุโรค

นำตัวอย่างโรคยูคาลิปตัสมาแยกเชื้อราสาเหตุโรคให้บริสุทธิ์ ด้วยเทคนิค tissue transplanting ตามวิธีการที่รายงานโดย ชรินทร์ และคณะ (2564)

### การทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรคในสภาพห้องปฏิบัติการ

นำใบยูคาลิปตัสโคลน H4 มาทำความสะอาดด้วยน้ำกลั่นที่นิ่งฆ่าเชื้อและที่ขั้วใบหุ้มด้วยสำลีชุบน้ำกลั่นที่นิ่งฆ่าเชื้อเพื่อให้ความชื้น แล้ววางบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ เลี้ยงเชื้อราสาเหตุโรคจากเชื้อราสาเหตุโรคที่แยกได้ข้างต้น จำนวน 79 ไอโซเลต นำมาทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรคโดยประยุกต์ตามวิธีการของ ชรินทร์ และคณะ (2564) โดยเฉพาะเลี้ยงเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ potato dextrose agar (PDA) เป็นเวลา 7 วัน ที่อุณหภูมิ  $28 \pm 2$  °C ใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 มม. เจาะชิ้นวุ้นที่มีเชื้อรา นำไปวางบนใบจำนวน 1 ใบต่อ 1 ชิ้นวุ้นต่อไอโซเลต บ่มไว้ในกล่องขึ้นที่รองด้วยกระดาษเพาะเมล็ดที่ทำให้ชุ่มน้ำกลั่นที่นิ่งฆ่าเชื้อ บ่มเชื้อราที่อุณหภูมิ  $28 \pm 2$  °C ใช้แผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (completely randomized design, CRD) โดยใช้ไอโซเลตของเชื้อเป็นกรรมวิธี ทดสอบจำนวน 4 ซ้ำ บันทึกข้อมูลขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของแผลที่เกิดขึ้นทุกวัน เป็นเวลา 7 วัน นำค่าเฉลี่ยเส้นผ่าศูนย์กลางของแผลวิเคราะห์ความแปรปรวน (analysis of variance, ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วย Duncan's multiple range test (DMRT) โดยคัดเลือกเชื้อราสาเหตุการจากกลุ่มอาการใหม่จากยอดนำไปทดสอบในสภาพเรือนทดลอง

### การทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรคกับต้นกล้ายูคาลิปตัสในสภาพเรือนทดลอง

ทดสอบความสามารถของเชื้อราจำนวน 13 ไอโซเลตในการทำให้เกิดโรคโดยใช้เชื้อราที่แยกได้จากกลุ่มอาการใหม่จากยอดนำไปเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่อุณหภูมิ  $28 \pm 2$  °C เป็นเวลา 7 วัน ใช้ต้นกล้ายูคาลิปตัสโคลน H4 ที่อายุ 3 สัปดาห์เป็นพืชอาศัย วางแผนการทดลองแบบ CRD ทำการทดลอง 4 ซ้ำ ซ้ำละ 4 ต้นมีทั้งหมด 14 กรรมวิธีใช้กรรมวิธีเป็นเชื้อไอโซเลตต่าง ๆ จำนวน 13 ไอโซเลต และ 1 กรรมวิธีควบคุม (control) ซึ่งปลูกเชื้อโดยใช้ชิ้นวุ้นเชื้อราสาเหตุโรคด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ วิธีการทดสอบการเกิดโรคใหม่จากยอดของยูคาลิปตัส โดยทำแผลที่ลำต้นด้วยเข็มเย็บปลายแหลมที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วปักลำต้นให้ลึกประมาณ 1 มม. สูงจากพื้นดิน 2.5 เซนติเมตร (ซม.) ใช้ cork borer เส้นผ่าศูนย์กลาง 5 มม. ตัดชิ้นวุ้นเชื้อราที่เตรียมไว้ นำมาวางบนแผลที่ทำไว้แล้วพันปิดแผลด้วยแผ่นพาราฟิล์มเพื่อป้องกันการปนเปื้อนและควบคุมความชื้น บันทึกอาการและข้อมูลขนาดของแผลหลังการปลูกเชื้อ 14 วัน (ดัดแปลงจาก Zupan et al., 2017) วิเคราะห์ค่าความแปรปรวน (ANOVA) ของข้อมูลขนาดของแผล และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วย DMRT

## การบ่งชี้ชนิดเชื้อราสาเหตุโรคยูคาลิปตัส

### การใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

คัดเลือกเชื้อราที่มีความสามารถในการทำให้เกิดโรคจากการทดสอบในห้องปฏิบัติการและในเรือนทดลอง มาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา โดยนำเชื้อราบริสุทธิ์เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA บ่มเชื้อราที่อุณหภูมิ  $28 \pm 2$  °C เป็นเวลา 7 วัน ศึกษาลักษณะโคโลนิบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เส้นใย ก้านชูสปอร์และสปอร์ และโครงสร้างการขยายพันธุ์แบบไม่ใช้เพศ (fruiting body) โดยใช้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอและแบบ compound บันทึกลักษณะ ขนาดจากการวัดทั้งหมด 50 สปอร์ รูปร่าง สี ของสปอร์ ก้านชูสปอร์และเส้นใยที่เจริญบนอาหาร นำข้อมูลที่ได้ไปเปรียบเทียบกับข้อมูลรายงานและเอกสารทางวิชาการที่มีรายละเอียดของเชื้อราสาเหตุโรคของยูคาลิปตัส

### การใช้เทคนิคชีวโมเลกุล

เลี้ยงเชื้อราสาเหตุโรคยูคาลิปตัส บนอาหาร PDA โดยวางบนกระดาษเซลโลเฟนที่ปลอดเชื้อบนอาหาร PDA บ่มเชื้อราที่อุณหภูมิ  $28 \pm 2$  °C เป็นเวลา 7 วัน หลังจากนั้นขูดเส้นใยใส่หลอดไมโครทิวบ์ ขนาดปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร (มล.) เก็บไว้ที่อุณหภูมิ  $-20$  °C จนกว่าจะนำมาสกัด DNA ด้วยการใช้น้ำ Cetyltrimethylammonium bromide (CTAB method) ตามวิธีการของ สุวิตา (2549)

นำสารละลาย DNA ปริมาตร 2  $\mu$ l ผสมกับ loading dye ปริมาตร 2  $\mu$ l นำมาแยกขนาดบน agarose gel 0.8-1 % ที่ผสม tracking dye สำเร็จรูป (Red Safe™) ปริมาตร 4  $\mu$ l โดยใช้บัฟเฟอร์ 0.1X TBE ใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำ agarose gel ที่ได้ไปตรวจสอบ DNA ด้วยเครื่อง gel documentation (Gene Genius Bio Imaging System)

นำ DNA ที่ได้มาเพิ่มปริมาณ DNA ในส่วนของ ITS1-5.8S-ITS2 ตามรายงานของ อัฐกรณ์ (2559) และชรินทร์ และคณะ (2564) ด้วยเทคนิคการใส่ปฏิกิริยา polymerase chain reaction (PCR) โดยใช้ไพรเมอร์ ITS1 (5'- TCCGTAGGTGAACCTGCGG - 3') และ ITS4 (5'- TCCTCCGCTTATTGATA TGC - 3') ในส่วนของ TEF-1 $\alpha$  gene ดำเนินการตามรายงานของ ชรินทร์ และคณะ (2564) โดยใช้ไพรเมอร์ TEF1 (5' - GCCATCCTTGGAGATACCAGC - 3') และไพรเมอร์ TEF728 (5' -CATCGAGAAGTTCGAGAAGG-3')

ตรวจวิเคราะห์การเพิ่มปริมาณ DNA ในส่วนของ ITS1-5.8S-ITS2 ของ rDNA และส่วน TEF-1 $\alpha$  gene ด้วย agarose gel electrophoresis นำผลิตภัณฑ์ PCR (PCR product) ที่อยู่ในหลอดปฏิกิริยา PCR ไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้บริการของบริษัท Ward Medic นำลำดับนิวคลีโอไทด์ไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GenBank เพื่อเปรียบเทียบความเหมือน (identity) และบ่งชี้หาชนิดของเชื้อราสาเหตุโรค โดยใช้โปรแกรม Nucleotide BLAST ผ่านเว็บไซต์ <http://www.ncbi.nih.gov/Blast.cgi>

## ผลการศึกษาและวิจารณ์

### การสำรวจโรคเชื้อราของต้นกล้วยคาลิปต์สในลานเพาะชำ

ผลการสำรวจอาการโรคต้นกล้วยคาลิปต์สในลานเพาะชำ พบอาการโรคใบจุด (leaf spot) ใบไหม้ (leaf blight) และไหม้จากยอด (dieback) ของกล้วยคาลิปต์สทั้ง 9 โคลนในฤดูการผลิตปี พ.ศ. 2561 สามารถจัดกลุ่มลักษณะของอาการได้ 3 กลุ่ม คือ ใบจุด (leaf spot) ใบไหม้ (leaf blight) และไหม้จากยอด (dieback) อาการที่พบคล้ายกับอาการโรคของต้นกล้วยคาลิปต์สที่พบในเรือนเพาะชำต้นกล้าที่ผลิตในปีเดียวกัน (ชรินทร์ และคณะ, 2564) ซึ่งเชื้อราสาเหตุโรคบางชนิดอาจมีการปนเปื้อนมากับต้นกล้าที่ย้ายออกมาจากเรือนเพาะชำเพื่ออนุบาลให้แข็งแรงในลานเพาะชำ แต่เนื่องจากมีสภาพแวดล้อมของลานเพาะชำนั้นแตกต่างไปจากในเรือนเพาะชำ ทำให้พบเชื้อสาเหตุโรคที่แตกต่างกัน เช่น มีรายงานว่าพบโรคใบจุดเหลี่ยมของต้นกล้วยคาลิปต์สที่เกิดจากแบคทีเรีย *Xanthomonas* spp. ในลานเพาะชำ (เทคโน และคณะ, 2556) แต่ไม่พบในเรือนเพาะชำ เป็นต้น ทั้งนี้มีความเป็นไปได้จากความชื้นสูงมากในเรือนเพาะชำ ปากใบปิดทำให้แบคทีเรียไม่สามารถเข้าทำลายได้ แต่ที่ลานเพาะชำมีความชื้นต่ำกว่าประกอบกับต้นกล้าได้รับแสงแดดเต็มที่ ปากใบเปิดทำให้แบคทีเรียสามารถเข้าทำลายทางปากใบได้

### การแยกเชื้อบริสุทธิ์และการทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรค

การแยกเชื้อราสาเหตุโรคจากตัวอย่างที่เก็บรวบรวมและแสดงอาการของโรคแตกต่างกันได้เชื้อ 3 กลุ่ม ได้แก่ เชื้อที่ได้จากอาการโรคใบจุด 26 ไอโซเลต โรคใบไหม้ 40 ไอโซเลต และโรคไหม้จากยอด 13 ไอโซเลต รวมทั้งหมดจำนวน 79 ไอโซเลต โดยใช้รหัสของเชื้อดังนี้ โคลน (ได้แก่ H4, H22, H26, H28, H32, H34, H36, H38 และ P6) อาการ (S = ใบจุด, B = ใบไหม้ และ DB = ไหม้จากยอด) และลำดับของการแยกเชื้อได้จากกลุ่มอาการนั้น เชื้อทั้งหมดนำไปทดสอบความสามารถทำให้เกิดโรคในสภาพห้องปฏิบัติการ โดยใช้การทดสอบกับวิธีเด็ดใบ (detached leaf method) พบว่าเชื้อราที่แยกได้จากอาการโรคใบจุดไอโซเลต H34S14 มีความสามารถทำให้เกิดโรคสูงสุดทำให้เกิดแผลจุดมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 4.59 ซม. ซึ่งมีความแตกต่างกันทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) กับทุกไอโซเลต รองลงมาคือไอโซเลต H34S10 ทำให้เกิดแผลเส้นผ่าศูนย์กลาง 3.86 ซม. และมีความแตกต่างกันทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) กับไอโซเลตอื่น ๆ ที่เหลือรวมทั้งกรรมวิธีควบคุม (Table 1) ส่วนการทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรคของเชื้อราที่แยกได้จากอาการโรคใบไหม้จำนวน 40 ไอโซเลตนั้น ไอโซเลต H26B21 สามารถทำให้เกิดโรคซึ่งประเมินจากขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของแผลไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติกับไอโซเลต H22B13 ซึ่งทำให้เกิดจุดแผลมีขนาด 5.15 และ 5.13 ซม. ตามลำดับ ซึ่งมีความแตกต่างกันทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) กับไอโซเลต H22B14, H22B15 และ H22B20 โดยเป็น 3 ไอโซเลตที่ทำให้เกิดโรครองลงมาทำให้เกิดแผลขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 4.17, 3.89 และ 3.82 ซม. ตามลำดับ ซึ่งมีความแตกต่างกันทางสถิติกับไอโซเลตอื่น ๆ รวมทั้งกรรมวิธีควบคุม (Table 2)

**Table 1** Pathogenicity test of leaf spot causal agents in eucalyptus by detached leaf method, 7 days after inoculation

Isolates	Lesion diameter (cm)	Isolates	Lesion diameter (cm)	Isolates	Lesion diameter (cm)
H4S1	0.76g	H34S10	3.86b	H4S19	2.51cd
P6S2	0.90fg	H28S11	0.50g <sup>2/</sup>	H4S20	0.88g
H4S3	0.73g	H4S12	0.64g	H4S21	0.98fg
P6S4	0.64g	H22S13	0.50g <sup>2/</sup>	H4S22	1.68e
H4S5	0.71g	H34S14	<b>4.59a</b>	H4S23	0.66g
H34S6	1.16efg	H22S15	2.28d	H4S24	0.50g <sup>2/</sup>
H4S7	0.79g	H26S16	3.25c	H4S25	1.54ef
H4S8	0.64d	H34S17	0.50g <sup>2/</sup>	H34S26	0.63g
H4S9	0.86g	H34S18	2.78cd	control	0.50g <sup>2/</sup>
C.V. (%)			31.92		
F-test			**		

<sup>1/</sup>Means followed by the same letter are not significantly different ( $P > 0.05$ , DMRT).

<sup>2/</sup>non pathogenic (0.50 cm diameter of agar)

**Table 2** Pathogenicity test of leaf blight causal agents in eucalyptus by detached leaf method, 7 days after inoculation

Isolate	Lesion diameter (cm)	Isolate	Lesion diameter (cm)	Isolate	Lesion diameter (cm)
H26B1	0.95efghi	H22B15	3.89b	H22B30	0.50j <sup>2/</sup>
H4B2	0.61ij	H22B16	0.50j <sup>2/</sup>	H22B31	1.05efgh
H4B3	0.81fghij	H22B17	0.50j <sup>2/</sup>	H22B32	0.50j <sup>2/</sup>
H4B4	0.50j <sup>2/</sup>	H22B18	0.50j <sup>2/</sup>	H22B33	1.27de
H4B5	0.69de	H34B19	0.50j <sup>2/</sup>	H22B33	0.50j <sup>2/</sup>
H26B6	1.15ef	H22B20	3.82b	H22B34	0.50j <sup>2/</sup>
H26B7	0.77fghij	H26B21	<b>5.15a</b>	P6B35	0.75ghij
H4B8	0.62ij	H22B23	0.50e <sup>2/</sup>	P6B36	0.69ij
H4B9	0.50j <sup>2/</sup>	H22B24	2.12c	P6B37	0.50j <sup>2/</sup>
H34B10	0.50j <sup>2/</sup>	H4B25	0.50j <sup>2/</sup>	H22B38	0.50j <sup>2/</sup>
H28B11	0.56ij	H22B26	0.50j <sup>2/</sup>	H34B39	1.24de
H34B12	1.12efg	H22B27	0.50j <sup>2/</sup>	H34B40	1.52d
H22B13	<b>5.13a</b>	H22B28	0.50j <sup>2/</sup>	control	0.50j <sup>2/</sup>
H22B14	4.17b	H26B29	0.50j <sup>2/</sup>		
C.V. (%)			21.20		
F-test			**		

<sup>1/</sup>Means followed by the same letter are not significantly different ( $P > 0.05$ , DMRT).

<sup>2/</sup>non pathogenic (0.50 cm diameter of agar)

ผลการทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรคของเชื้อราที่แยกได้จากอาการโรคไหม้จากยอดบนต้นกล้ายูคาลิปตัสโคลน H4 ในสภาพเรือนทดลองนั้น ทำให้ได้ผลการทดลองทั้งความสามารถในการทำให้เกิดโรคและความรุนแรงที่ทำให้ต้นกล้าเสียหายจนถึงต้นตายได้ พบว่าเชื้อราไอโซเลต H4DB3 ทำให้เกิดแผลมีความยาวของแผลมากที่สุด 8.00 ซม. แต่ไม่มีความแตกต่าง

กันทางสถิติกับไอโซเลต H4DB4 ที่ทำให้เกิดแผลความยาว 7.82 ซม. และมีความแตกต่างกันทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) กับไอโซเลตอื่น รวมทั้งกรรมวิธีควบคุม โดยไอโซเลต H4DB3, H4DB4 และ H22DB9 ทำให้ต้นกล้ายูคาลิปตัสเริ่มแสดงอาการเหี่ยว 3 วันหลังการปลูกเชื้อ และไอโซเลต H4DB13 ทำให้ต้นกล้าเริ่มแสดงอาการเหี่ยวที่ 7 วันหลังการปลูกเชื้อ และทั้ง 4 ไอโซเลตนี้ทำให้ต้นกล้ายูคาลิปตัสเป็นโรคไหม้จากยอดและตายที่ 11 วันหลังจากการปลูกเชื้อ (Table 3)

**Table 3** Pathogenicity test of dieback disease causal agents in eucalyptus seedlings under greenhouse condition, 11 days after inoculation

Isolate	Lesion diameter (cm)	Isolate	Lesion diameter (cm)
H22DB1	0.50e <sup>2/</sup>	H4DB8	0.50e <sup>2/</sup>
H4DB2	1.28d	H22DB9	5.43b
H4DB3	<b>8.00a</b>	H26DB10	0.50e <sup>2/</sup>
H4DB4	<b>7.82a</b>	H4DB11	0.50e <sup>2/</sup>
H22DB5	0.50e <sup>2/</sup>	H26DB12	1.00e
H26DB6	1.18d	H4DB13	3.60c
H4DB7	1.23d	Control	0.50e <sup>2/</sup>
C.V. (%)		15.94	
F-test		**	

<sup>1/</sup>Means followed by the same letter are not significantly different ( $P > 0.05$ , DMRT).

<sup>2/</sup>non pathogenic (0.50 cm diameter of agar)

### การบ่งชี้ชนิดของเชื้อราสาเหตุโรค

ผลการบ่งชี้เชื้อราสาเหตุโรคใบจุด ใบไหม้และไหม้จากยอดในระดับสกุล (genus) โดยใช้ลักษณะสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอและกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง พบว่ามีเชื้อสาเหตุโรค 5 สกุล ได้แก่

1) *Cylindrocladium* sp. ราสกุลนี้เมื่อเจริญบนอาหาร PDA เส้นใยมีสีขาว เมื่อแก่จะเปลี่ยนเป็นสีส้มถึงน้ำตาล (Figure 1A) สร้างก้านชูโคนินเดี่ยวบนแผลทั้งที่ใบและลำต้น รูปร่างแบบทรงกระบอกตรงส่วนปลายมีการแตกกิ่งคล้ายแปรง และมีการสร้างโครงสร้างคล้ายถุง (vesicle) มีการสร้างโคนินเดี่ยวที่ส่วนปลาย รูปร่างท่อนตรง หัวมน ท้ายมน ไม่มีสี มีผนังกัน 1-2 อัน (Figure 1B) มีขนาด 40.48-27.45 x 3.79-2.88  $\mu\text{m}$  เฉลี่ย 35.78 x 3.22  $\mu\text{m}$  (n = 50) เส้นใยของเชื้อราเมื่อแก่มีการพัฒนาเป็นคลาไมโดสปอร์ (chlamydospore) (Figure 1C) ซึ่งเชื้อมีลักษณะและโครงสร้างการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศเมื่อเปรียบเทียบกับเอกสารทางวิชาการ (Crous et al., 2006 และ Rodas et al., 2005) แล้วพบว่าจำแนกเป็นเชื้อรา *Cylindrocladium* sp. เป็นเชื้อราสาเหตุโรคซึ่งทำให้เกิดโรคได้ทั้ง 3 อาการ ได้แก่ ไอโซเลตที่แยกได้จากอาการใบจุด ไอโซเลต H34S10 เชื้อที่แยกได้จากโรคใบไหม้ได้แก่ H22B13, H22B14, H22B15, H22B27 ส่วนไอโซเลตที่แยกได้จากอาการไหม้จากยอดได้แก่ H4DB3, H4DB4, H22DB9 และ H4DB13

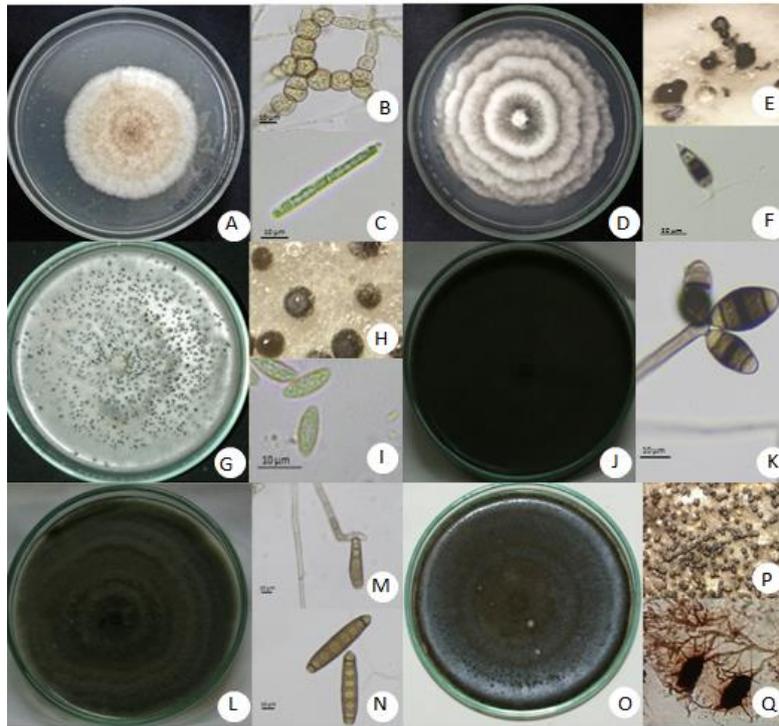
2) *Pestalotiopsis* sp. การเจริญบนอาหาร PDA โคลินีมีลักษณะสีขาวเส้นใยฟูเป็นวงแหวนซ้อนกัน (Figure 1D) กลางของโคลินีเป็นส่วนที่จะสร้าง acervulus ก่อนบริเวณอื่น (Figure 1E) โคนินเดี่ยวมีรูปร่างคล้ายกระสวย มีผนังกัน 4 อัน มีขนาด 27.69-16.68 x 7.87-5.44  $\mu\text{m}$  เฉลี่ย 23.90 x 7.21  $\mu\text{m}$  แบ่งเป็น 5 เซลล์ เซลล์กลางจะมีสีเข้ม ส่วนหัวท้ายไม่มีสี ปลายโคนินเดี่ยวมีรยางค์ทั้ง 2 ด้าน ปลายด้านหนึ่ง มี 2-5 เส้น ไม่มีสี ส่วนเซลล์ฐานมีรยางค์สั้นไม่มีสี 1 เส้นยื่นออกมา (Figure 1F) เมื่อเปรียบเทียบกับเอกสารทางวิชาการ (วิจิตร, 2546; Upadhyay and Dwivedi, 1980) พบว่าเชื้อนี้มีลักษณะคล้ายเชื้อราในสกุล *Pestalotiopsis* sp. เชื้อราที่แยกได้จากอาการใบจุดเป็นที่สกุล *Pestalotiopsis* sp. ได้แก่ ไอโซเลต H4S1, P6S2, H4S3, P6S4, H4S5, H34S6, H4S7, H4S8 และ H4S9 ส่วนไอโซเลตที่แยกได้จากอาการใบไหม้ได้แก่ H26B1, H4B2, H4B3, H4B4, H26B5, H26B6, H26B7, H4B8 และ H34B9 สำหรับในกลุ่มอาการไหม้จากยอดนั้น ไม่พบว่าเป็นเชื้อราสกุล *Pestalotiopsis* sp.

3) เชื้อราสกุล *Pilidiella* sp. เชื้อนี้สร้าง pycnidium สีนํ้าตาลอ่อนต่อมาเปลี่ยนเป็นสีดำกระจายบนแผลทั้งที่ใบและลำต้น เมื่อนํามาเลี้ยงบนอาหาร PDA เส้นใยไม่ฟูเมื่อแก่สร้าง pycnidia กระจายบนผิวอาหาร PDA (Figure 1G and H) โคนิเดียมีรูปร่างรีหรือคล้ายกระสวย สีซีดจนถึงเทา เซลล์เดี่ยว ขนาด 11.41-8.95 x 4.73-2.99  $\mu\text{m}$  เฉลี่ย 10.04 x 3.06  $\mu\text{m}$  (Figure 1I) สร้างจาก conidiogenous cell ที่บรรจุใน pycnidium เชื้อราเมื่อเปรียบเทียบกับรายงานของ Niekerl et al. (2004) แล้วพบว่าเชื้อราที่แยกได้จากอาการโรคใบจุดเกิดจากเชื้อราสกุล *Pilidiella* sp. นี้ ได้แก่ ไอโซเลต H22S13, H34S14, H26S16, H4S19, H4S20, H4S21, H4S22, H34S23 และ H4S25 ไอโซเลตที่แยกได้จากอาการใบไหม้ได้แก่ H22B21, P6B35, P6B37, P36B39 และ H34B40 และไอโซเลตที่แยกได้จากอาการไหม้จากยอดได้แก่ H4DB2 และ H4DB7

4) *Curvularia* sp. เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA สร้างเส้นใยมีสีเทา คล้ายกำมะหยี่ โคนิเดียสีดำ เมื่อเส้นใยแก่สร้างเม็ดสีน้ำตาลถึงสีดำ (Figure 1J) โคนิเดียสร้างบนก้านชูโคนิเดีย รูปไข่หรือโค้งงอ สีนํ้าตาลเข้มถึงดำ มีผนังกัน 3 อัน เซลล์กลางมีสีเข้มกว่าเซลล์หัวท้าย โคนิเดียมีขนาด 23.82-14.18 x 13.45-9.52  $\mu\text{m}$  เฉลี่ย 19.27 x 10.36  $\mu\text{m}$  (Figure 1K) เชื้อราที่แยกได้เมื่อนํามาเปรียบเทียบกับรายงานของ Mehrabi-Koushki et al. (2018) แล้วจัดจำแนกเป็นสกุล *Curvularia* sp. และพบเชื้อในกลุ่มอาการไหม้จากยอด ได้แก่ ไอโซเลต H26DB6 และ H22DB10

5) *Exserohilum* sp. เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA สร้างโคโลนี มีสีน้ำตาลเข้มถึงดำ เส้นใยเจริญเป็นวงซ้อน เส้นใยนูนฟู (Figure 1L) โคนิเดียรูปทรงกระบอกหรือโค้งงอเล็กน้อย มีผนังหนากัน 4-8 อัน มี hilum ที่ปลายส่วนฐานตัด และมีสีเข้ม (Figure 1M and N) ขนาด 71.31-38.65 x 29.32-9.32  $\mu\text{m}$  เฉลี่ย 59.34 x 15.60  $\mu\text{m}$  เมื่อนํามาเชื้อราสาเหตุโรคที่แยกได้เปรียบเทียบกับรายงานของ Sharma et al. (2014) สามารถจัดจำแนกเป็นสกุล *Exserohilum* sp. พบเชื้อราสาเหตุโรคที่แยกได้นี้จากกลุ่มอาการใบจุด ได้แก่ ไอโซเลต H34S17 และ H4S22 อาการใบไหม้ ได้แก่ ไอโซเลต H28B11, H22B29 และ H22B30 และอาการไหม้จากยอด ได้แก่ ไอโซเลต H26DB12

6) *Macrophomina* sp. เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA สร้างโคโลนีสีขาว ขนาดเล็ก ฟูเล็กน้อย ต่อมาเส้นใยเจริญเรียบบนผิวอาหารและเมื่อเชื้อแก่จะเปลี่ยนสีเป็นสีส้ม นํ้าตาลเข้มจนถึงดำ (Figure 1 O) เส้นใยรวมกันเป็นกระจุกสร้างโครงสร้างที่เรียกว่า microsclerotium รูปร่างกลม รีหรือรูปร่างไม่แน่นอน สีนํ้าตาลอ่อนถึงดำ เมื่อนํามาศึกษาไม่พบการสร้างโคนิเดีย (Figure 1P and Q) เชื้อราสาเหตุโรคมี่ที่แยกได้เมื่อเปรียบเทียบกับรายงานของ Marquaz et al. (2021) จัดจำแนกเป็นเชื้อราสกุล *Macrophomina* sp. พบเชื้อราสาเหตุโรคที่แยกได้นี้จากกลุ่มอาการใบจุด ได้แก่ ไอโซเลต H4S21 อาการใบไหม้ ได้แก่ ไอโซเลต H34B40



**Figure 1** Colony characteristics and conidia of pathogenic fungi of eucalyptus diseases

- |   |   |
|---|---|
| A Colony on PDA by <i>Cylindrocladium</i> sp.                 | B Chlamydospore of <i>Cylindrocladium</i> sp. (bar = 10 µm) |
| C Conidia of <i>Cylindrocladium</i> sp. (bar = 10 µm)         | D Colony on PDA of <i>Pestalotiopsis</i> sp.                |
| E Acervulus on PDA of <i>Pestalotiopsis</i> sp. (bar = 20 µm) | F Conidia of <i>Pestalotiopsis</i> sp.                      |
| G Colony on PDA of <i>Pilidiella</i> sp.                      | H Pycnidia on PDA of <i>Pilidiella</i> sp. (bar = 10 µm)    |
| I Conidia of <i>Pilidiella</i> sp.                            | J Colony on PDA of <i>Curvularia</i> sp.                    |
| K Conidia of <i>Curvularia</i> sp. (bar = 10 µm)              | L Colony on PDA of <i>Exserohillum</i> sp.                  |
| M Conidiophores of <i>Exserohillum</i> sp. (bar = 10 µm)      | N Conidia of <i>Exserohillum</i> sp. (bar = 10 µm)          |
| O Colony on PDA of <i>Macrophomina</i> sp.                    | P Microsclerotia on PDA of <i>Macrophomina</i> sp.          |
| Q Microsclerotia of <i>Macrophomina</i> sp.                   |   |

การเปรียบเทียบขนาดของโคนิเดียของเชื้อราทั้ง 5 สกุลในการศึกษานี้ ได้แก่ สกุล *Cylindrocladium* sp., *Pestalotiopsis* sp., *Curvularia* sp., *Exserohillum* sp. และ *Pilidiella* sp. เปรียบเทียบกับแหล่งข้อมูลอ้างอิงของเชื้อสกุลดังกล่าว นั้น (Kang et al., 2001; Sharma et al., 2014; Alvarez et al., 2016; Marin et al., 2017; Kee et al., 2020; Norphanphoun et al., 2019; Daengsuwan et al., 2021) ซึ่งพบว่า ขนาดของโคนิเดียของเชื้อที่ได้นำมาศึกษานั้น ขนาดของโคนิเดียมีความใกล้เคียงกับเชื้อราสาเหตุโรคของยูคาลิปตัสที่มีรายงานมาก่อนหน้านี้ ยกเว้นในสกุล *Cylindrocladium* sp. ซึ่งมีขนาดของโคนิเดียเฉลี่ย 35.78 x 3.22 µm ซึ่งเล็กกว่าเชื้อ *Cylindrocladium quinqueseptatum* ซึ่งมีขนาดเฉลี่ย 55 x 5 µm และเชื้อ *C. reteaudii* ซึ่งมีขนาดเฉลี่ย 75 x 6 µm เมื่อเปรียบเทียบกับรายงานของ Kang et al. (2001)

สำหรับการบ่งชี้เชื้อราในระดับชนิด (species) นั้น จากการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วน DNA ของเชื้อรา ในส่วน ITS-5.8S-ITS2 ของ rDNA โดยใช้ไพรเมอร์ ITS1 และ ITS4 ได้ผลิตผลิตภัณฑ์ PCR ขนาดประมาณ 600 คู่เบส ทุกไอโซเลต เมื่อนำผลิตภัณฑ์ PCR นั้นไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และเปรียบเทียบข้อมูลที่ได้ออกกับข้อมูลนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank แล้ว พบว่าเชื้อราสาเหตุโรคของต้นยูคาลิปตัส ไอโซเลต H4DB3, H4DB13, H4S14, H4DB4, H22DB13 และ H22DB9 มีความเหมือนกับเชื้อรา *C. quinqueseptatum*

ไอโซเลต H4S9 และ H26B6 มีความเหมือนกับเชื้อรา *Pestalotiopsis* sp. ไอโซเลต H4DB2 และ H26DB6 มีความเหมือนกับเชื้อรา *C. eragrostidis* ไอโซเลต H26B21 มีความเหมือนกับเชื้อรา *Coniella fusiformis* และไอโซเลต H34S14 มีความเหมือนกับ *C. hibisci* ซึ่งผลการวิจัยนี้ตรงกับรายงานของชรินทร์ (2564) ที่พบเชื้อราสาเหตุโรคในเรื้อนเพาะชำยูคาลิปตัสในพื้นที่จังหวัดขอนแก่น แต่ผลการวิจัยนี้ ได้ผลที่น่าสนใจกล่าวคือ ได้พบเชื้อราที่แตกต่างออกไป ได้แก่ ไอโซเลต H26DB12 และ H28DB11 ที่มีความเหมือนกับเชื้อรา *Exserohilum rostratum* ส่วนไอโซเลต H34B40 และ H4S21 มีความเหมือนกับเชื้อรา *Macrophomina phaseolina* (Table 4) โดย Keane et Al. (2000) รายงานว่าพบเชื้อทั้ง 2 ชนิดนี้สามารถเข้าทำลายได้ในประเทศอินเดีย ทั้งนี้ผลการศึกษาที่น่าเสนอนี้เป็นการรายงานครั้งแรกในประเทศไทยถึงเชื้อรา 2 ชนิดนี้ทำให้เกิดโรคกับต้นกล้ายูคาลิปตัสได้

นอกจากการใช้ข้อมูลลำดับเบสในส่วน ITS1-5.8S-ITS2 ของ rDNA แล้วได้มีการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วน DNA ในส่วน TEF-1 $\alpha$  ของเชื้อรา 2 สกุล ได้แก่ *Pestalotiopsis* sp. และ *Pilidiella* sp. ซึ่งเชื้อรา 4 ไอโซเลต (H4S9, H26B6, H26B21 และ H34S14) เมื่อนำมาเพิ่มปริมาณชิ้นส่วน DNA ในส่วน TEF-1 $\alpha$  นั้นได้ผลิตภัณฑ์ PCR ขนาดประมาณ 600 คู่เบส เมื่อนำลำดับ นิวคลีโอไทด์ไปเปรียบเทียบกับข้อมูลในฐานข้อมูล GenBank พบว่าไอโซเลต H4S9 มีความเหมือนกับเชื้อรา *Pseudopestalotiopsis curvatispora* ไอโซเลต H26B6 มีความเหมือนกับเชื้อรา *Neopestalotiopsis clavispora* มีรายงานว่าการใช้ข้อมูลลำดับเบสในส่วน ITS1-5.8S-ITS2 ของ rDNA ยังมีความคลุมเครือในระดับชนิดของเชื้อ *Pestalotiopsis* sp. จึงมีการใช้ ชิ้นส่วน DNA ในส่วน TEF-1 $\alpha$  ในการระบุระดับชนิดของเชื้อ (Gerardo-Lugo et al., 2020) ไอโซเลต H26B21 มีความเหมือนกับเชื้อรา *Coniella fusiformis* และไอโซเลต H34S14 มีความเหมือนกับเชื้อรา *Coniella hibisci* (Table 5)

**Table 4** Base comparison of fungal seedling disease pathogens using ITS1-5.8S-ITS2 region of rDNA against GenBank database

Morphology	Isolate	ITS1-5.8S-ITS2		
		Molecular	Accession number	Identity (%)
<i>Cylindrocladium</i> sp.	H4DB3	<i>Cylindrocladium quinqueseptatum</i>	KU377485	100
<i>Cylindrocladium</i> sp.	H4DB4	<i>Cylindrocladium quinqueseptatum</i>	FJ601695	100
<i>Cylindrocladium</i> sp.	H4DB13	<i>Cylindrocladium quinqueseptatum</i>	KU377485	100
<i>Cylindrocladium</i> sp.	H4S14	<i>Cylindrocladium quinqueseptatum</i>	KU377485	100
<i>Cylindrocladium</i> sp.	H22B13	<i>Cylindrocladium quinqueseptatum</i>	FJ601695	99
<i>Cylindrocladium</i> sp.	H22DB9	<i>Cylindrocladium quinqueseptatum</i>	FJ601695	99
<i>Pestalotiopsis</i> sp.	H4S9	<i>Pestalotiopsis</i> sp.	JF304634	100
<i>Pestalotiopsis</i> sp.	H26B6	<i>Pestalotiopsis</i> sp.	MT102584	100
<i>Curvularia</i> sp.	H4DB2	<i>Curvularia eragrostidis</i>	MK886805	99
<i>Curvularia</i> sp.	H26DB6	<i>Curvularia eragrostidis</i>	KT933662	100
<i>Exserohilum</i> sp.	H26DB12	<i>Exserohilum rostratum</i>	MN599590	100
<i>Exserohilum</i> sp.	H28DB11	<i>Exserohilum rostratum</i>	MN599588	99
<i>Pilidiella</i> sp.	H26B21	<i>Coniella fusiformis</i>	KX833674	87
<i>Pilidiella</i> sp.	H34S14	<i>Coniella hibisci</i>	MK587742	99
<i>Macrophomina</i> sp.	H34B40	<i>Macrophomina phaseolina</i>	MZ768542	98
<i>Macrophomina</i> sp.	H4S21	<i>Macrophomina phaseolina</i>	MN166021	100

**Table 5** DNA base comparison of fungal seedling pathogens by using translation elongation factor 1-alpha (TEF-1 $\alpha$ ) against GenBank data base

Morphology	Isolation	ITF-1 $\alpha$		
		Molecular	Accession umber	Identity (%)
<i>Pestalotiopsis</i> sp.	H4S9	<i>Pseudopestalotiopsis curvatispora</i>	MK764334	99
<i>Pestalotiopsis</i> sp.	H26B6	<i>Neopestalotiopsis clavispora</i>	MK512478	98
<i>Pilidiella</i> sp.	H26B21	<i>Coniella fusiformis</i>	KX833674	100
<i>Pilidiella</i> sp.	H34S14	<i>Coniella hibisci</i>	MK587742	99

จากผลการศึกษาโรคเชื้อราของยูคาลิปตัสครั้งนี้สามารถระบุเชื้อราที่สำคัญในลานเพาะชำต้นกล้า ได้แก่ *C. quinqueseptatum*, *P. curvatispora*, *N. clavispora*, *C. eragrostidis*, *C. fusiformis*, *C. hibisci*, *E. rostratum* และ *M. phaseolina* ซึ่งเชื้อราดังกล่าวมีรายงานการเข้าทำลายยูคาลิปตัสทั้งในประเทศและต่างประเทศ เชื้อ *C. quinqueseptatum*, *N. clavispora*, *C. eragrostidis* พบการเกิดโรคในระยะต้นกล้ายูคาลิปตัสในเรือนเพาะชำในจังหวัดขอนแก่น ทำให้เกิดอาการใบจุด ใบไหม้และไหม้จากยอด ในเรือนเพาะชำมีความชื้นสัมพัทธ์สูงกว่าในลานเพาะชำ (ชรินทร์ และคณะ, 2564) โดยในการศึกษาค้นพบเชื้อรา *N. clavispora* ซึ่งเชื้อราในกลุ่มนี้มีรายงานการเข้าทำลายในต้นยูคาลิปตัสที่โตแล้วในภาคเหนือของประเทศไทยซึ่งระบุว่าเป็นเชื้อ *P. virgatula* (Suwannarach et al., 2012) ส่วนรายงานในต่างประเทศนั้นเชื้อรา *C. fusiformis*, *C. hibisci* เป็นสาเหตุโรคใบจุด ใบไหม้ และโรคแคงเกอร์ (Alvarez et al., 2016; Pain et al., 2019) และเชื้อรา *M. phaseolina* รายงานว่าเป็นสาเหตุโรคที่สำคัญของยูคาลิปตัส (Salvatore et al., 2020) ผลการบ่งชี้เชื้อราสาเหตุโรคของต้นกล้ายูคาลิปตัสในครั้งนี้มีความใกล้เคียงกับที่ชรินทร์ และคณะ (2564) ที่ได้รายงานไว้โดยใช้วิธีทางชีวโมเลกุลเช่นเดียวกัน แต่ในลานเพาะชำตามงานวิจัยที่นำเสนอพบเชื้อ *Pseudopestalotiopsis curvatispora* และ *Exserohilum rostratum* ซึ่งไม่พบการเข้าทำลายต้นกล้ายูคาลิปตัสในเรือนเพาะชำ

**สรุป**

จากการศึกษาโรคเชื้อราของต้นกล้ายูคาลิปตัส 3 โรค ได้แก่ โรคใบจุด ใบไหม้ และไหม้จากยอด นำมาแยกเชื้อราและทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรค หลังจากนั้นคัดเลือกไอโซเลตที่มีความสามารถในการทำให้เกิดโรคม่างซึ่งเชื้อด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาแล้ว พบมีเชื้อราสาเหตุโรค 6 สกุล ได้แก่ *Cylindrocladium* sp., *Pestalotiopsis* sp., *Pilidiella* sp., *Curvularia* sp., *Exserohilum* sp., และ *Macrophomina* sp. โดยทำให้เกิดโรคได้ภายใต้การทดสอบในสภาพเต็ดใบในห้องปฏิบัติการและบนต้นกล้ายูคาลิปตัสโคลน H4 ในเรือนทดลอง เชื้อรา *Cylindrocladium* sp. ทำให้เกิดโรคได้รุนแรงที่สุดในสภาพเรือนทดลอง ทำให้ต้นกล้ายูคาลิปตัสตายหลังจากปลูกเชื้อ 11 วัน สำหรับการบ่งชี้เชื้อราสาเหตุโรคของยูคาลิปตัสในระดับชนิดนั้น ใช้วิธีชีวโมเลกุลด้วยการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วน ITS-5.8S-ITS2 ของ rDNA และ TEF1-1 $\alpha$  gene กับฐานข้อมูล GenBank พบว่า ตรงกับเชื้อ *Cylindrocladium quinqueseptatum*, *Pseudopestalotiopsis curvatispora*, *Neopestalotiopsis clavispora*, *Coniella fusiformis*, *Coniella hibisci*, *Exserohilum rostratum* และ *Macrophomina phaseolina* ซึ่งเชื้อ 2 ชนิดหลังนี้เป็นรายงานครั้งแรกในการทำให้เกิดโรคกับต้นกล้ายูคาลิปตัสในประเทศไทย

**คำขอบคุณ**

ขอขอบคุณ ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร (AG-BIO/MHESI) สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวงอุดมศึกษาวิจัยและนวัตกรรม ที่ให้ทุนสนับสนุนงานวิจัย

ขอขอบคุณศูนย์วิจัยเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตรเพื่อเศรษฐกิจที่ยั่งยืน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น และบริษัทสยามฟอเรสทรีจำกัด อำเภอโนนสะอาด จังหวัด ขอนแก่น ที่เอื้อเฟื้อสถานที่และอุปกรณ์ในการดำเนินการวิจัย

## เอกสารอ้างอิง

- กรมส่งเสริมการเกษตร. 2560. ระบบสารสนเทศการผลิตทางด้านเกษตร Online. กรมส่งเสริมการเกษตร. แหล่งข้อมูล: <http://webcache.googleusercontent.com>. ค้นเมื่อ 2 มกราคม 2563.
- กฤษฎา โพธิ์เรืองเดช. 2557. โรคของยูคาลิปตัสภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนบนของประเทศไทยและการป้องกันกำจัดโรคที่สำคัญ. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาโรคพืชวิทยา บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น. ขอนแก่น.
- กฤษณา พงษ์พานิช, จันจิรา อารยะวงศ์, วินันทิดา หิมะมาณ, กิตติมา ด้วงแค และบารมี สกลรัตน์. 2553. โรคของยูคาลิปตัสในประเทศไทย. กลุ่มงานกีฏวิทยาป่าไม้ กรมอุทยานแห่งชาติสัตว์ป่าและพันธุ์พืช กระทรวงทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม. ชุมชุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย. กรุงเทพฯ.
- ชรินทร์ ศรีจันทร์ก่า. 2564. การควบคุมโรคที่สำคัญของยูคาลิปตัสโดยวิธีผสมผสานในระบบการผลิตต้นกล้า. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาโรคพืชวิทยา บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น. ขอนแก่น.
- ชรินทร์ ศรีจันทร์ก่า, วีระศักดิ์ ศักดิ์ศิริรัตน์, ศิวีย์ สิริมงคลรัตน์ และดวงรัตน์ ธงภักดิ์. 2564. การสำรวจและประเมินความรุนแรงโรคที่สำคัญของยูคาลิปตัส (*Eucalyptus* spp.) ในระบบการผลิตต้นกล้า. แก่นเกษตร. 49(6): 1487-1501.
- เทคโนโลยี โพธิ์ลักษณ์, จารุวัฒน์ เถาธรรมพิทักษ์, สุพจน์ กาเข็ม และสุฤติ ประเทืองวงศ์. 2556. การจำแนกชนิดและความรุนแรงของแบคทีเรียสาเหตุโรคใบจุดเหลี่ยมของกล้าไม้ยูคาลิปตัส. น. 137-146. ใน: การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 51 5-7 กุมภาพันธ์ 2556. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- วิจัย รักวิทยาศาสตร์. 2546. ราวิทยาเบื้องต้น. ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. จามจุรีโปรดักท์. กรุงเทพฯ.
- วีระศักดิ์ ศักดิ์ศิริรัตน์, พัฒนา ชมพูวิเศษ, รื่นเริง สีนน้ำพอง, มนัสวี สุริยวานกุล, ปุณณิศา ชารีรักษ์, กฤษฎา โพธิ์เรืองเดช และอารยา ชารีรักษ์. 2556. การทดสอบสารเคมีในการควบคุมเชื้อรา *Cylindrocladium* sp. สาเหตุโรคใบจุดของยูคาลิปตัส. แก่นเกษตร. 41(1): 543-548.
- สำนักงานเศรษฐกิจอุตสาหกรรม. 2559. สรุปภาวะเศรษฐกิจอุตสาหกรรมไตรมาสที่ 3 ปี 2559 (กรกฎาคม-กันยายน 2559) (อุตสาหกรรมเยื่อกระดาษ กระดาษ และสิ่งพิมพ์). แหล่งข้อมูล: <https://www.ryt9.com>. ค้นเมื่อ 2 มกราคม 2563.
- สุวิตา แสไพศาล. 2549. เอนไซม์ย่อยสลาย ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วน ITS1-5.8S-ITS2 ของ rDNA และการโคลนยีนโคดีเนสของเชื้อรา *Trichoderma* spp. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาโรคพืชวิทยา บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น. ขอนแก่น.
- อัฐภรณ์ พันยา. 2559. โรคของยูคาลิปตัสในระบบการผลิตต้นกล้าและการป้องกันกำจัด. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาโรคพืชวิทยา บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น. ขอนแก่น.
- Alvarez, L.V., J.Z. Groenewald, and P.W. Crous. 2016. Revising the Schizopermeaceae: *Coniella* and its synonyms *Pilidiella* and *Schizoperme*. *Studies in Mycology*. 85: 1-34.
- Crous, P.W., J.Z. Groenewald, J.M. Riede, P. Simoneau, and K.D. Hyde. 2006. *Calonectria* species and their *Cylindrocladium* anamorphs: species with clavate vesicles. *Studies in Mycology*. 55: 213-216.
- Daengsuwan, W., P. Wonglom, S. Arikait, and A. Sunpapao. 2021. Morphological and molecular identification of *Neopestalotiopsis clavispora* causing flower blight on *Anthurium andraeanum* in Thailand. *Horticultural Plant Journal*. 7(6): 573-578.

- Gerardo-Lugo S.S, J.M. Tovar-Pedraza, S.S.N. Maharachchikumbura, M.A. Apodaca-Sánchez, K.C. Correia, C.P. Saucedo-Acosta, M. Camacho-Tapia, K.D. Hyde, N. Marraiki, A.M. Elgorban, H. Beltrán-Peña. 2020. Characterization of *Neopestalotiopsis* Species Associated with Mango Grey Leaf Spot Disease in Sinaloa, Mexico. *Pathogens*. 9(10):788.
- Kang, J.C., P.W. Crous, K.M. Old, and M.J. Dudzinski. 2001. Non-conspecificity of *Cylindrocladium quinqueseptatum* and *Calonectria quinqueseptatum* based on  $\beta$ -tubulin gene phylogeny and morphology. *Canadian Journal of Botany*. 79(10): 1241-1247.
- Keane, P.J., G.A. Kile, and F.D. Podger. 2000. Diseases and pathogens of eucalypts. Systematic review of the published literature: <https://books.google.co.th>. Accessed 2 May. 2021.
- Kee, Y.J., L. Zakaria, and M.H. Mohd. 2020. *Curvularia asianensis* and *Curvularia eragrostidis* associated with leaf spot of *Sansevieria trifasciata* in Malaysia. *Journal of Phytopathology*. 168(5): 290-296.
- Marin, F.Y., J.Z. Groenewald, L. Cai, Q. Chen, S. Marincowitz, I. Barnes, K. Bensch, U. Braun, E. Camporesi, U. Damm, Z.W. de Beer, A. Dissanayake, J. Edwards, A. Giraldo, M. Hernández-Restrepo, K.D. Hyde, R.S. Jayawardena, L. Lombard, J. Luangsa-ard, A.R. McTaggart, A.Y. Rossman, M. Sandoval-Denis, M. Shen, R.G. Shivas, Y.P. Tan, E. J. van der Linde, M.J. Wingfield, A.R. Wood, J.Q. Zhang, Y. Zhang, and P.W. Crous. 2017. Genera of phytopathogenic fungi: GOPHY1. *Studies in Mycology*. 86: 99–216.
- Marquez, N., M.L. Giachero, S. Declerck, and D.A. Ducasse. 2021. *Macrophomina phaseolina*: General characteristics of pathogenicity and methods of control. *Frontiers in Plant Science*. 12: 1-16.
- Mehrabi-Koushki, M., P. Pooladi, P. Eisvand, and G. Babaahmadi. 2018. *Curvularia ahvazensis* and *C. rouhaniae* spp. nov. from Iran. *Mycosphere*. 9(6): 1173-1186.
- Niekerk, J.M., J.Z. Groenewald, J.M. Verkley, P.H. Fourle, M.J. Wingfield, and P.W. Crous. 2004. Systemic reappraisal of *Coniella* and *Pilidiella* with specific reference to species occurring on *Eucalyptus* and *Vitis* in South Africa. *Mycological Research*. 108(3): 283-303.
- Norphanphoun, C., R.S. Jayawardena, Y. Chen, W. Meepol, and K.D. Hyde. 2019. Morphological and phylogenetic characterization of novel pestalotioid species associated with mangroves in Thailand. *Mycosphere*. 10(1): 531-578.
- Pain, N. A., B.S. Weir, L.W. Burgess, S. Phanthavong, V. Balmas, and M. Schneider. 2019. First report of *Coniella hibisci* causing leaf and stem canker in the Lao P.D.R. *Australasian Plant Disease Notes*. 14: 17-19.
- Pavlic-Zupanc, D., H.M. Maleme, B. Piskur, B.D. Wingfield, M.J. Wingfield, and B. Slippers. 2017. Diversity, phylogeny and pathogenicity of Botryosphaeriaceae on non-native *Eucalyptus* grown in an urban environment: A case study. *Urban Forestry & Greening*. 26: 139-148.
- Rodas, C.A., L. Lombard, M. Gryzenhout, B. Slippers, and M.J. Wingfield. 2005. *Cylindrocladium* blight of *Eucalyptus grandis* in Colombia. *Australasian Plant Pathology*. 34: 143-149.
- Salvatore, M.M., C. Félix, F. Lima, V. Ferreira, D. Naviglio, F. Salvatore, A.S. Duarte, A. Alves, A. Andolfi, and A.C. Esteves. 2020. Secondary metabolites produced by *Macrophomina phaseolina* Isolated from *Eucalyptus globules*. Load: Systematic review of the published literature: <https://doi.org/10.3390/agriculture10030072>. Accessed 3 May. 2021.

- Sharma, K., E.M. Goss, E.R. Dickstein., M.E. Smith, J.A. Johnson, F.S. Southwick, and A.H.C. van Bruggen. 2014. *Exserohilum rostratum*: Characterization of a cross-kingdom pathogen of plants and humans. PLOS ONE. 9(10):1-10.
- Suwannarach, N., J. Kumla, B. Bussaban, and S. Lumyong. 2012. New report of leaf blight disease on eucalyptus (*Eucalyptus camaldulensis*) caused by *Pestalotiopsis virgatula* in Thailand. Canadian Journal of Plant Pathology. 34(2): 306–309.
- Upadhyay, R.K., and R.S. Dwivedi. 1980. Cultural and taxonomical studies on *Pestalotiopsis funerea* causing leaf spot of *Eucalyptus globulus*. Proceedings of the Indian National Science Academy. 46(3): 397-404.