การใช้ชีววิธีในการยับยั้งเชื้อราก่อโรคใบไหม้ของยูคาลิปตัส

Biological Control for Inhibiting Fungi Caused Leaf Blight Disease of Eucalyptus

ธารรัตน์ แก้วกระจ่าง[1,*] พรพิมล หมั่นจิตร[1] และ นพมาศ โตสมบูรณ์[1]

Tharnrat Kaewgrajang[1,*], Ponpimol Manjit[1] and Noppamas Tosomboon[1]

[1] ภาควิชาชีววิทยาป่าไม้ คณะวนศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ 10900

[1] Department of Forest Biology, Faculty of Forestry, Kasetsart University, 10900, Thailand

รับเรื่อง: พฤศจิกายน 2561 Received: November 2018

รับตีพิมพ์: ธันวาคม 2561 Accepted: December 2018

* Corresponding author: ffortrk@ku.ac.th

ABSTRACT: The aim of this study was to investigate the inhibition of leaf blight disease of eucalyptus caused by *C. reteaudii* and *Pestalotiopsis* sp. using two biological control methods including antagonistic fungi and wood vinegar. Two species of antagonistic fungi, *Trichoderma asperellum* and *T. harzianum*, were tested for their ability to inhibit leaf blight disease of eucalyptus by *in vitro* experiment. Both antagonistic fungi had not significantly different to inhibit the mycelial growth of pathogenic fungi of eucalyptus ($P > 0.05$). Additionally, *T. asperellum* was tested for the inhibition of *C. reteaudii* by directly spraying of the pathogen on the seedlings. It was found that spraying *T. asperellum* into the soil around the basal stem of seedlings could reduce the percentage of disease incidence comparing with control treatments. Moreover, the spraying *T. asperellum* every 3 days had the disease incidence lesser than spraying *T. asperellum* only one time. For using wood vinegar as biological control, it was found that *C. reteaudii* (IC_{50} = 13,679.71 ppm) was inhibited better than *Pestalotiopsis* sp. (IC_{50} = 18,218.51). Moreover, the mycelial growth of both pathogens were completely inhibited at the concentration 40,000 ppm. Therefore, both biological control methods might be apply for control eucalyptus leaf blight disease caused by *C. reteaudii* and *Pestalotiopsis* sp.

Keywords: Antagonistic fungi, wood vinegar, leaf blight disease, eucalyptus

บทคัดย่อ

ในการศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบการยับยั้งเชื้อก่อโรคใบไหม้ของยูคาลิปตัส 2 ชนิด (*Cylindrocladium reteaudii* และ *Pestalotiopsis* sp.) โดยใช้การควบคุมด้วยชีววิธี 2 วิธี คือ การใช้ราปฏิปักษ์ และการใช้น้ำส้มควันไม้ ซึ่งผลจากการทดสอบประสิทธิภาพของราปฏิปักษ์ 2 ชนิด ได้แก่ *Trichoderma asperellum* และ *T. harzianum* ในการยับยั้งราก่อโรคใบไหม้ยูคาลิปตัสในสภาพจานเลี้ยงเชื้อ พบว่า ราปฏิปักษ์ทั้ง 2 ชนิด สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อก่อโรคได้แตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) นอกจากนี้เมื่อนำ *T. asperellum* ไปทดสอบการยับยั้งเชื้อ *C. reteaudii* โดยการฉีดพ่นเชื้อก่อโรคโดยตรงที่กล้าไม้ พบว่า การฉีดพ่น *T. asperellum* ลงในดินบริเวณรอบโคนต้นกล้าสามารถช่วยลดเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคได้เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม นอกจากนี้ยังพบว่า การฉีดพ่น *T. asperellum* ทุก ๆ 3 วัน สามารถช่วยลดการเกิดโรคได้ดีกว่าฉีดพ่นเพียงครั้งเดียว สำหรับการใช้น้ำส้มควันไม้ในการควบคุมโรคแบบชีววิธีนั้น พบว่า น้ำส้มควันไม้สามารถยับยั้งรา *C. reteaudii* (IC_{50} = 13,679.70 ppm) ได้ดีกว่า *Pestalotiopsis* sp. (IC_{50} = 18,218.50) และพบว่าที่ระดับความเข้มข้น 40,000 ppm สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราก่อโรคทั้ง 2 ชนิดนี้ได้ 100 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นจึงควรนำชีววิธีทั้ง 2 ประเภทนี้ไปประยุกต์ใช้ในการควบคุมโรคใบไหม้ยูคาลิปตัสที่เกิดจาก *C. reteaudii* และ *Pestalotiopsis* sp. ในเรือนเพาะชำกล้าไม้ต่อไป

คำสำคัญ: ราปฏิปักษ์, น้ำส้มควันไม้, โรคใบไหม้, ยูคาลิปตัส

บทนำ

ยูคาลิปตัสเป็นไม้ที่จัดอยู่ในวงศ์ Myrtaceae สกุล Eucalyptus มีรายงานพบทั่วโลกมากกว่า 600–700 ชนิด สำหรับในประเทศไทยยูคาลิปตัสจัดเป็นไม้ต่างถิ่นที่สามารถเติบโตได้ในแทบทุกสภาพพื้นที่และมีอัตราการรอดตายสูง อีกทั้งยังถูกนำไปใช้ประโยชน์ในหลายด้าน ได้แก่ ใช้เป็นวัตถุดิบหลักของโรงงานประดิษฐ์และอุตสาหกรรมต่าง ๆ ไม้อัด แผ่นใยไม้ซีเมนต์ เยื่อกระดาษ ใช้ทำไม้ฟืนและถ่าน (Laemsak, 2008) ด้วยประโยชน์ที่หลากหลายและมูลค่าทางเศรษฐกิจที่สูงจึงทำให้ยูคาลิปตัสได้รับความนิยมปลูกอย่างแพร่หลายส่งผลให้มีความต้องการกล้ายูคาลิปตัสเป็นจำนวนมากเพื่อนำไปปลูกสร้างสวนป่า แต่ปัญหาที่มักเกิดขึ้นและสร้างความเสียหายต่อกระบวนการผลิต คือการเกิดโรคของกล้าไม้ในเรือนเพาะชำ โดยมีรายงานว่าพบเชื้อราสาเหตุโรคมากกว่า 30 ชนิด สามารถเข้าทำลายยูคาลิปตัสได้ตั้งแต่ระยะเมล็ด กิ่งชำ กล้าไม้ และต้นไม้ในแปลงปลูก โดยเฉพาะอย่างยิ่งในระยะปักชำกิ่งของยูคาลิปตัส ผู้ผลิตกล้าปักชำจำเป็นต้องเตรียมและต้องดูแลกิ่งปักชำในเรือนเพาะชำที่มีความชื้นสูงและอุณหภูมิที่เหมาะสมเป็นเวลา 20–25 วัน ด้วยสภาพแวดล้อมดังกล่าวนี้ ส่งผลให้กล้าปักชำมักอ่อนแอและเกิดโรคง่าย ซึ่งมีสาเหตุเกิดจากเชื้อก่อโรคหลายชนิด ได้แก่ *Botrytis cinerea*, *Cylindrocladium* spp., *Rhizoctonia solani*, *Pestalotiopsis* sp. และ *Hainesia* sp. (Maciel *et al*., 2012) ในจำนวนเชื้อก่อโรคเหล่านี้พบว่า *Cylindrocladium* ก่อให้เกิดโรคกับกล้าปักชำยูคาลิปตัสรุนแรงที่สุด โดยทำให้เกิดอาการใบจุด ใบไหม้ และหากเชื้อมีความรุนแรงใบจะร่วงและตายในที่สุด (Devi, 2011; Filho *et al*., 2018)

การควบคุมโรคด้วยชีววิธี (Biological control) คือการใช้สิ่งมีชีวิตหนึ่งหรือสารสกัดจากพืชมาควบคุม ลดจำนวนหรือยับยั้งการเข้าทำลายของสิ่งมีชีวิตอีกชนิดหนึ่ง ซึ่งอาจเป็นจุลินทรีย์ก่อโรค

สัตว์ หรือวัชพืชก็ได้ หากสิ่งมีชีวิตที่นำมาใช้ควบคุมโรคนั้นเป็นจุลินทรีย์ จะเรียกจุลินทรีย์เหล่านี้ว่า จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ (Vincent *et al*., 2007) *Trichoderma* เป็นราปฏิปักษ์ชนิดหนึ่งที่นิยมนำมาใช้ในการเพิ่มการเติบโตของต้นไม้และควบคุมโรคพืช เนื่องจากสามารถเพิ่มปริมาณสปอร์ได้ง่าย โตเร็ว ต้นทุนการผลิตหัวเชื้อต่ำ อีกทั้งมีหลายชนิดที่มีศักยภาพนำไปใช้ในพื้นที่เกษตรกรรมขนาดใหญ่ได้และผลิตเป็นผลิตภัณฑ์ทางการค้าได้ (Saba *et al*., 2012) ซึ่งงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่า *Trichoderma* นั้นสามารถนำมาควบคุมเชื้อก่อโรคของยูคาลิปตัสได้ด้วย เช่น *Cylindrocladium* spp. ที่ก่อให้เกิดใบ และกิ่งไหม้ (Devi, 2011; Maciel *et al*., 2012; Filho *et al*., 2018) *Botrytis cinerea* ที่ก่อให้เกิดโรคราสีเทา (grey mold disease) (Zaldúa and Sanfuentes, 2010) เป็นต้น

น้ำส้มควันไม้ (Wood vinegar หรือ Pyroligneous acid) ได้มาจากการควบแน่นของควันที่เกิดจากการเผาไม้ให้กลายเป็นถ่านในสภาวะที่มีออกซิเจนจำกัด (Anonim, 2001) ซึ่งมีองค์ประกอบหลัก ได้แก่ hydroxy aldehydes, hydroxy ketones, sugars, carboxylic acid และ phenolic acid (Guillen and Manzanos, 2002) น้ำส้มควันไม้เป็นผลิตภัณฑ์ธรรมชาติประเภทหนึ่งที่นำมาใช้ในการยับยั้งการเติบโตของเชื้อก่อโรคพืชหลายชนิด ได้แก่ *Pythium aphanidermatum*, *P. myriotylum*, *Fusarium* sp., *Alternaria brassicicola*, *Gloeophyllum trabeum*, *Coriolus versicolor*, *Bostryodiplodia theobromea, Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum* (Yodthong *et al*., 2008; Oramahi and Yoshimura, 2013; Saberi *et al*., 2013) ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของราปฏิปักษ์ (*Trichoderma asperellum* และ *T. harzianum*) และน้ำส้มควันไม้ในการควบคุมเชื้อก่อโรคใบไหม้ยูคาลิปตัส 2 ชนิด คือ *Cylindrocladium reteaudii* และ *Pestalotiopsis* sp. ทั้งนี้เพื่อเป็นทางเลือกหนึ่งให้เกษตรกรหรือผู้ผลิตกล้ายูคาลิปตัสเลือกใช้ทดแทนการใช้สารเคมีในการควบคุมโรคพืช

อุปกรณ์และวิธีการ

ในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการทดสอบการยับยั้งเชื้อก่อโรคใบไหม้ของยูคาลิปตัสโดยใช้ชีววิธี 2 วิธีหลัก คือ การใช้ราปฏิปักษ์ และการใช้น้ำส้มควันไม้ ซึ่งมีขั้นตอนการทดสอบดังนี้

การแยกเชื้อและพิสูจน์การก่อให้เกิดโรค

เชื้อก่อโรคใบไหม้ของยูคาลิปตัสที่นำมาศึกษาในครั้งนี้มี 2 ชนิด คือ *C. reteaudii* และ *Pestalotiopsis* sp. ซึ่งได้แยกเชื้อบริสุทธิ์จากใบยูคาลิปตัสที่เป็นโรคใบไหม้ที่เก็บตัวอย่างจากเรือนเพาะชำของบริษัทสยามฟอเรสทรี จำกัด จังหวัดกาญจนบุรี ทำโดยนำใบตัวอย่างมาแยกเชื้อด้วยวิธี tissue transplanting technique (Agrios, 2005) เมื่อได้เชื้อบริสุทธิ์แล้วจึงนำมาพิสูจน์ความสามารถในการก่อให้เกิดโรคด้วยวิธี Koch's Postulation โดยการฉีดพ่นสารแขวนลอยสปอร์เชื้อราความเข้มข้น $5x10^5$ สปอร์/มิลลิลิตร ลงบนกล้ายูคาลิปตัส ภายหลังจากนั้น 1 สัปดาห์ จึงบันทึกลักษณะอาการของโรคบนกล้าไม้ นอกจากนี้ได้ทำการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เพื่อจัดจำแนกชนิดของเชื้อราก่อโรคด้วย

การทดสอบการยับยั้งเชื้อราก่อโรคด้วยราปฏิปักษ์

การเตรียมราปฏิปักษ์

ราปฏิปักษ์ที่ใช้ในการทดสอบครั้งนี้ มี 2 ชนิด คือ *T. asperellum* ซึ่งได้รับการอนุเคราะห์จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.) จังหวัดปทุมธานี และ *T. harzianum* ซึ่งเป็นสายพันธุ์ทางการค้าและได้รับความอนุเคราะห์จากคณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นำเชื้อราทั้ง 2 ชนิด มาเลี้ยงบนจานเลี้ยงเชื้อที่บรรจุอาหาร Potato dextrose agar (PDA)

ปริมาณ 20 มิลลิลิตร ทำการบ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 4 วัน หรือจนกระทั่งเชื้อเจริญเต็มจานเลี้ยงเชื้อ

การทดสอบประสิทธิภาพของราปฏิปักษ์ในการยับยั้งเชื้อราก่อโรค

ในการทดสอบครั้งนี้ได้ทำการทดสอบประสิทธิภาพของราปฏิปักษ์ทั้งในสภาพจานเลี้ยงเชื้อและในกล้าไม้ยูคาลิปตัส โดยมีวิธีการทดสอบดังนี้

การทดสอบในจานเลี้ยงเชื้อ

ใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร เจาะขอบโคโลนีของเชื้อราที่เตรียมไว้ นำชิ้นวุ้นที่เจาะได้วางบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA 20 มิลลิลิตร จากนั้นใช้ cork borer ขนาดเท่ากันเจาะขอบโคโลนีของเชื้อก่อโรคแต่ละชนิดที่เตรียมได้จากข้อ 1 แล้วนำชิ้นวุ้นที่ได้มาวางบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA โดยให้ระยะห่างของชิ้นวุ้นรา *Trichoderma* และราก่อโรคห่างจากขอบจานเลี้ยงเชื้อ 2 เซนติเมตร บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 วัน สำหรับชุดทดลองควบคุม (Control) ทำโดยนำเชื้อราก่อโรคแต่ละชนิดวางบริเวณกึ่งกลางจานเลี้ยงเชื้อที่บรรจุ PDA (ไม่วางชิ้นวุ้นของ *Trichoderma*) แต่ละชุดการทดลองมี 5 ซ้ำ

สำหรับการวัดการเติบโตและวิเคราะห์ข้อมูล ได้ทำการวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเชื้อราในทุกชุดการทดลองทุกวันเป็นเวลา 3 วัน แล้วนำขนาดค่าที่ได้ไปคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งของราปฏิปักษ์จากสมการที่ (1)

$$[(A-B)/A] \times 100 \qquad (1)$$

เมื่อ A คือ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อราก่อโรคในจานเลี้ยงเชื้อชุด control และ B คือ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อราก่อโรคในจานเลี้ยงเชื้อที่เลี้ยงร่วมกับราปฏิปักษ์

จากนั้นนำข้อมูลเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อราไปวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนทางสถิติ Two way ANOVA และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วย Least Significant Difference (LSD) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้โปรแกรมอาร์ (R program)

การทดสอบในกล้ายูคาลิปตัส

ได้ทำการทดสอบประสิทธิภาพของ *T. asperellum* ในการยับยั้งรา *C. reteaudii* ในกล้ายูคาลิปตัสสายต้น H4 อายุ 2 เดือน ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์กล้าไม้จาก บริษัท สยามฟอเรสทรี จำกัด จังหวัดกาญจนบุรี โดยทำการทดสอบโดยการฉีดพ่นเชื้อก่อโรคโดยตรงกับกล้าไม้ (intact seedling) ตามวิธีการของ Dudzinski *et al.* (2000) ซึ่งแบ่งชุดการทดลองเป็น 5 ชุด ได้แก่ ชุดที่ 1 (T1) ทำการฉีดสารแขวนลอยสปอร์รา *T. asperellum* ความเข้มข้น $1x10^7$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงบริเวณโคนต้นของกล้ายูคาลิปตัส เป็นเวลา 9 วัน หลังจากนั้นทำการฉีดพ่นสารแขวนลอยสปอร์ *C. reteaudii* ความเข้มข้น $1x10^5$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 10 มิลลิลิตร บนใบและลำต้นของกล้ายูคาลิปตัส ชุดที่ 2 (T2) ทำการฉีดสารแขวนลอยสปอร์รา *T. asperellum* ความเข้มข้น $1x10^7$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ซ้ำทุก ๆ 3 วัน (ตลอดระยะเวลาในการทำการศึกษา) จากนั้นทำการฉีดพ่นเชื้อรา *C. reteaudii* ความเข้มข้น $1x10^5$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 10 มิลลิลิตร บนใบและลำต้นของกล้ายูคาลิปตัส ชุดที่ 3 (T3) ทำการฉีดสารเคมี Captan ความเข้มข้น 1000 ppm บนใบและลำต้นของกล้ายูคาลิปตัส หลังจากนั้นทำการฉีดพ่นเชื้อรา *C. reteaudii* ความเข้มข้น $1x10^5$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงบนใบและลำต้นของกล้ายูคาลิปตัส ชุดที่ 4 (T4) ทำการฉีดพ่นสารแขวนลอยสปอร์รา *C. reteaudii* ความเข้มข้น $1x10^5$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 10 มิลลิลิตร บนใบและลำต้นของกล้ายูคาลิปตัส และชุดที่ 5 (T5) ทำการรดน้ำต้นกล้ายูคาลิปตัสเพียงอย่างเดียว โดยไม่ฉีดพ่นสารแขวนลอยสปอร์ของรา *C. reteaudii*

หลังจากทำการทดลองเป็นเวลา 21 วัน ได้ทำการประเมินความรุนแรงการเกิดโรคในกล้า

ยูคาลิปตัสโดยให้คะแนนจาก 0 ถึง 4 ตามระดับคะแนนอาการการเกิดโรคที่พบ ซึ่งมีหลักเกณฑ์ในการให้คะแนนดังต่อไปนี้

0 = ไม่แสดงอาการของโรค
1 = พบลักษณะอาการของโรคใบไหม้เป็นจุดสีน้ำตาลจากบริเวณส่วนล่างของเรือนยอด
2 = พบลักษณะอาการของโรคใบไหม้เป็นจุดกระจายทั่วบริเวณทั่วเรือนยอด
3 = พบลักษณะอาการของโรคใบไหม้โดยขอบใบเริ่มไหม้
4 = พบลักษณะอาการของโรคใบไหม้โดยใบมีอาการไหม้และร่วง

จากนั้นทำการคำนวณหาค่าดัชนีความเป็นโรค (disease index) ตามสมการที่ (2) ของ Hadi and Nuhamara (1997) ดังนี้

$$\text{Disease index} = [(na\times0+nb\times1+nc\times2+nd\times3+ne\times4)\times100] / N\times4 \quad (2)$$

เมื่อ na = จำนวนต้นกล้าที่เกิดโรคระดับคะแนนอาการเกิดโรคเท่ากับ 0
nb = จำนวนต้นกล้าที่เกิดโรคระดับคะแนนอาการเกิดโรคเท่ากับ 1
nc = จำนวนต้นกล้าที่เกิดโรคระดับคะแนนอาการเกิดโรคเท่ากับ 2
nd = จำนวนต้นกล้าที่เกิดโรคระดับคะแนนอาการเกิดโรคเท่ากับ 3
ne = จำนวนต้นกล้าที่เกิดโรคระดับคะแนนอาการเกิดโรคเท่ากับ 4

เมื่อทำการคำนวณการประเมินความรุนแรงของดัชนีการเป็นโรคแล้วได้ทำการแบ่งระดับความรุนแรงของโรคออกเป็น 5 ระดับ ดังนี้

ระดับ 1 ไม่พบอาการของโรค ค่าดัชนีของการเป็นโรคเท่ากับ 0 เปอร์เซ็นต์

ระดับ 2 ความรุนแรงของการเกิดโรคอยู่ในระดับต่ำ (low) ค่าดัชนีของการเป็นโรคเท่ากับ 1–25 เปอร์เซ็นต์

ระดับ 3 ความรุนแรงของการเกิดโรคอยู่ในระดับปานกลาง (medium) ค่าดัชนีของการเป็นโรคเท่ากับ 26–50 เปอร์เซ็นต์

ระดับ 4 ความรุนแรงของการเกิดโรคอยู่ในระดับรุนแรง (severe) ค่าดัชนีของการเป็นโรคเท่ากับ 51–75 เปอร์เซ็นต์

ระดับ 5 ความรุนแรงของการเกิดโรคอยู่ในระดับรุนแรงมาก (extreme) ค่าดัชนีของการเป็นโรคเท่ากับ 76–100 เปอร์เซ็นต์

การทดสอบการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคด้วยน้ำส้มควันไม้เงาะ

ทดสอบการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราได้ ใช้เทคนิค Poisoned medium technique หลังจากนำน้ำส้มควันไม้มากรองเศษบนกระดาษกรอง (Whatman No.1) ทำการผสมน้ำส้มควันไม้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ให้มีความเข้มข้น 6 ระดับ ได้แก่ 5,000, 10,000, 15,000, 20,000, 30,000 และ 40,000 ppm จากนั้นนำ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร ที่ผ่านการลนไฟฆ่าเชื้อแล้วไปเจาะบริเวณขอบโคโลนีของเชื้อรา *C. reteaudii* และ *Pestalotiopsis* sp. แล้วใช้เข็มเขี่ยที่ผ่านการลนไฟฆ่าเชื้อย้ายชิ้นวุ้นไปวางตรงกลางจานเลี้ยงเชื้อที่ผสมน้ำส้มควันไม้ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ระดับความเข้มข้นละ 5 ซ้ำ ทำการบ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน

หลังจากนั้นทำการบันทึกขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีทุกวัน แล้วนำมาหาค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเติบโตของเชื้อราตามสูตรที่ (1) จากนั้นนำค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อราในแต่ละ

ระดับความเข้มข้นไปหาค่าแปรปรวนทางสถิติด้วย One Way ANOVA และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วย Least Significant Difference (LSD) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์โดยใช้โปรแกรมอาร์ นอกจากนี้ได้นำค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งไปหาความสัมพันธ์กับระดับความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งเชื้อราได้ แล้วหาค่าความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราได้ร้อยละ 50 (Inhibitory Concentration; IC_{50})

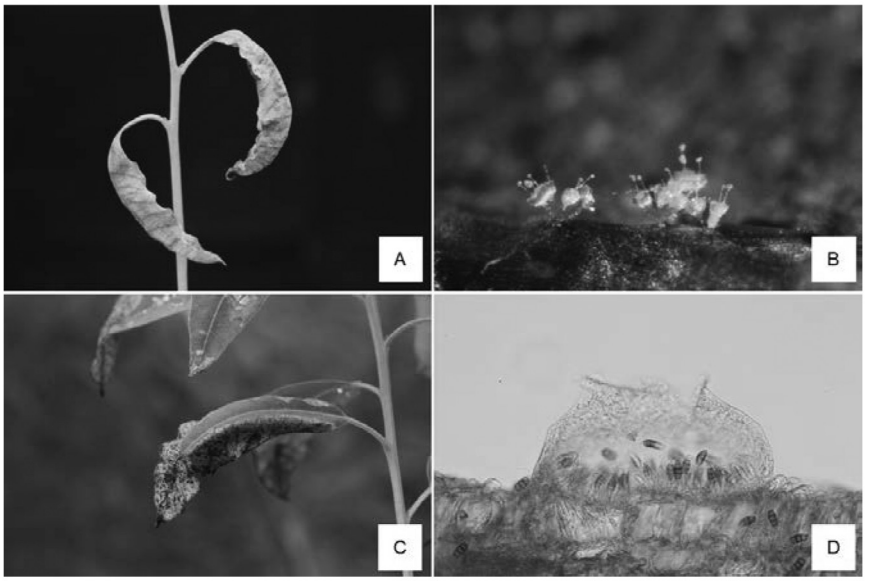

Figure 1 Leaf blight of Eucalyptus caused by *C. reteaudii* (A), macroconidia on conidiophores of *C. reteaudii* (B), leaf blight of Eucalyptus caused by *Pestalotiopsis* sp. (C) and acervulus and conidia of *Pestalotiopsis* sp. (D)

ผลการทดลองและวิจารณ์

การแยกเชื้อและพิสูจน์การก่อให้เกิดโรค

หลังจากพิสูจน์การก่อให้เกิดใบไหม้ยูคาลิปตัส ซึ่งสาเหตุเกิดจาก *C. reatudii* พบว่า อาการใบไหม้จะเริ่มเกิดจากขอบใบแล้วกระจายถึงกึ่งกลางใบ จากนั้นอาการของโรคจะลามทำให้เกิดอาการกิ่งและยอดไหม้รวมถึงใบร่วงในที่สุดได้ (Figure 1A, 1B) เชื้อราสร้าง conidiophore สีขาว เกิดเป็นกลุ่ม ๆ กลุ่มละ 2–8 อัน และมี macroconidia สีขาว รูปทรงกระบอก มี 6 เซลล์ ขนาด 67.22–84.00 x 4.35–6.30 ไมโครเมตร vesicle สีขาว ทรงเรียวยาว (clavate) ขนาด 135.09–200.53 x 3.20–7.00 ไมโครเมตร มี microconidia สีขาว มี 2 เซลล์ ขนาด 30.50–39.50 x 1.83–5.5 ไมโครเมตร Crous (2002) ได้รายงานว่า มี *Cylindrocladium* จำนวน 24 ชนิด ที่เป็นเชื้อก่อโรคของยูคาลิปตัส และในจำนวนนี้มี 15 ชนิดที่เป็นเชื้อก่อโรคที่พบในประเทศแถบเอเชียใต้ และตะวันออก ซึ่ง *C. reatudii* เป็นเชื้อก่อโรคใบและกิ่งไหม้ที่พบได้ทั่วไปและมีความรุนแรงสร้างความเสียหายให้กล้ายูคาลิปตัสมากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับ *Cylindrocladium* ชนิดอื่น (Bolland *et al*., 1985)

ส่วนเชื้อ *Pestalotiopsis* sp. ทำให้เกิดใบไหม้ โดยใบเริ่มเกิดอาการแห้ง และม้วนงอที่ขอบใบ จากนั้นจะเกิดอาการใบไหม้ตามมา หากอาการรุนแรงจะทำให้ใบหลุดร่วง เชื้อราจะสร้างเส้นใยสีขาว และ acervulus จุดนูนสีดำเยิ้ม (Figure 1C, 1D) acervulus มีขนาด 141.00–256.10 ไมโครเมตร ซึ่งภายในบรรจุ conidia ขนาด 15.20–24 x 8–9 ไมโครเมตร รูปร่างคล้ายกระสวย มี 4 septate ผนังเรียบ เซลล์หัวท้ายใสไม่มีสี เซลล์บริเวณตรงกลางมีสีเข้ม มี apical appendage จำนวน 3 เส้น ยาว 15.8–28.3 ไมโครเมตร รูปร่างคล้ายเส้นด้าย ใสไม่มีสี และมี basal appendage จำนวน 1 เส้น ยาว 4.0–5.5 ไมโครเมตร

Table 1 Two ways factorial analysis for inhibition (%) of two leaf blight disease against by two species of *Trichoderma*

Source	DF	Sum Square	Mean Square	F value	Pr < F
Trichoderma species (Ts)	1	78.5	78.5	2.145	0.162
Disease species (Ds)	1	611.8	611.8	16.724	<0.001***
Ts x Ds	1	35.3	35.3	0.966	0.340

Note: *** The significance of mean different at the level of P < 0.05

การทดสอบการยับยั้งเชื้อก่อโรคด้วยราปฏิปักษ์

การทดสอบในจานเลี้ยงเชื้อ

เมื่อนำค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งราสาเหตุโรคไปวิเคราะห์ Two way ANOVA (Table 1) พบว่า ชนิดของรา *Trichoderma* (*T. asperellum* และ *T. harzianum*) และชนิดของราสาเหตุโรค (*C. reteaudii* และ *Pestalotiopsis* sp.) ไม่มีปฏิสัมพันธ์ต่อกัน (P = 0.340) แต่พบว่า ชนิดเชื้อราก่อโรคที่แตกต่างกันสองชนิดมีเปอร์เซ็นต์การถูกยับยั้งต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P < 0.001) โดยพบว่า *Trichoderma* สามารถยับยั้งเชื้อ *C. reteaudii* ได้ดีกว่า *Pestalotiopsis* sp. ซึ่งมีค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเท่ากับ 49.82 และ 38.75 ตามลำดับ (Figure 2) อย่างไรก็ตาม เชื้อรา *Trichoderma* ทั้งสองชนิดมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราก่อโรคได้แตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ (P = 0.162) ซึ่งแตกต่างจากการศึกษาของ Filho *et al*. (2018) ที่พบว่า *Trichoderma* ต่างชนิด และต่างสายพันธุ์ (strain) มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *C. scoparium* ต่างกัน แต่หากเปรียบเทียบเฉพาะ *T. asperellum* และ *T. harzianum* นั้นพบว่า *T. harzianum* มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อก่อโรคมากกว่า นอกจากนี้ Chaudhary (2014) ยังรายงานว่า *T. koningii* สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใย *C. quinqueseptatum* ได้ดีกว่า *Trichoderma* ชนิดอื่น การคัดเลือกสายพันธุ์ของ *Trichoderma* เป็นเรื่องที่จำเป็น เนื่องจากราบางสายพันธุ์มีประสิทธิภาพดีในห้องปฏิบัติการ แต่กลับมีประสิทธิภาพน้อยเมื่อนำไปใช้ในเรือนเพาะชำหรือในแปลงปลูก (Kaewchai *et al*., 2009)

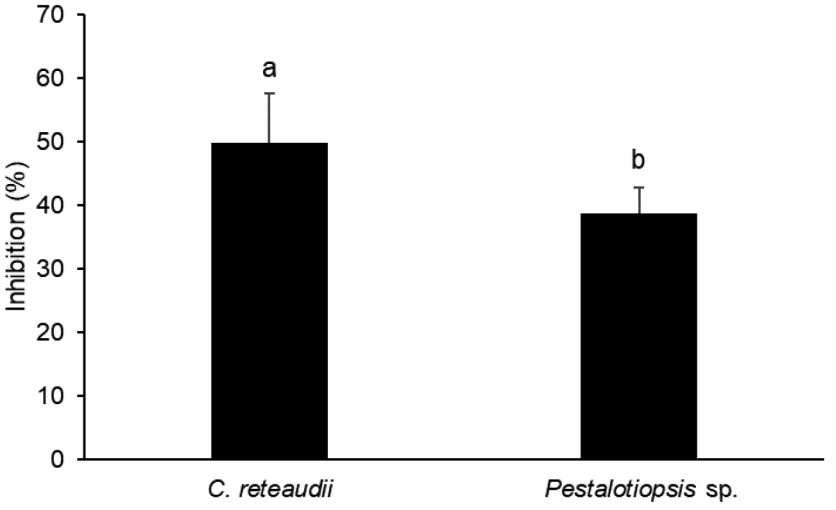

Figure 2 Percentage of inhibition of *C. reteaudii* and *Pestalotiopsis* sp. by *Trichoderma*

การทดสอบในกล้ายูคาลิปตัส

ในการทดสอบประสิทธิภาพของราปฏิปักษ์ในการยับยั้งเชื้อราก่อโรคใบไหม้ของยูคาลิปตัสได้เลือกรา *T. asperellum* ซึ่งมีค่าการยับยั้งการเจริญของเส้นใยในจานเลี้ยงเชื้อค่อนข้างดีกว่า *T. harzianum* และเลือกเชื้อสาเหตุโรค *C. reteaudii* มาทดสอบการยับยั้ง เนื่องจากมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งสูงกว่า *Pestalotiopsis* sp. อีกทั้งยังเป็นเชื้อราก่อโรคที่กำลังแพร่ระบาดในเรือนเพาะชำกล้าไม้ในปัจจุบัน

Table 2 Evaluation of disease index in different treatments

Treatment	Disease index (%)	Severity
T1	62.50	Extreme
T2	58.33	Extreme
T3	33.33	Medium
T4 (negative control)	70.83	Extreme
T5 (positive control)	0	No disease

ผลการประเมินดัชนีการเกิดโรคใบไหม้ของยูคาลิปตัสซึ่งสาเหตุเกิดจาก *C. reteaudii* แสดงใน Table 2 พบว่า ชุดการทดลอง T3 ที่ฉีดพ่นกล้าไม้ด้วยสารเคมี captan นั้นมีค่าดัชนีการเกิดโรคเท่ากับ 33.33 ซึ่งมีระดับการเกิดโรคปานกลาง การใช้สารเคมี captan นั้นมีประสิทธิภาพในการยับยั้งราก่อโรคได้ดีกว่าการใช้การฉีดพ่นด้วย *T. asperellum* ทั้ง 2 วิธี (T1 และ T2) แต่การฉีดพ่น *T. asperellum* ทั้ง 2 วิธีนั้นส่งผลให้กล้าไม้มีดัชนีของการเกิดโรคต่ำกว่าการชุดควบคุมแบบลบ (T4) นอกจากนี้ การฉีดพ่น *T. asperellum* เพียงครั้งเดียว (T1 = 62.50 เปอร์เซ็นต์) ส่งผลให้กล้าไม้มีดัชนีการเกิดโรคสูงกว่าการฉีดพ่น *T. asperellum* ทุก ๆ 3 วัน (T2 = 58.33 เปอร์เซ็นต์) สอดคล้องกับการศึกษาของ Maciel *et al*. (2012) ซึ่งรายงานว่า *Trichoderma* หลาย strain สามารถลดเปอร์เซ็นต์การเข้าทำลายของเชื้อ *C. candelabrum* ที่ก่อให้เกิดโรคใบจุดในยูคาลิปตัสได้ นอกจากนี้ Poruangdate *et al*. (2015) ยังพบว่าเชื้อ *Trichoderma* ทั้ง 3 สายพันธุ์ คือ *T. brevicopactum* *T. harzianum* และ *T. asperellum* สามารถกระตุ้นความต้านทานโรคของยูคาลิปตัสสาเหตุเกิดจาก *Cryptosporiopsis eucalypti* และ *C. reteaudii* โดยสามารถลดพื้นที่ใบที่เกิดโรค อีกทั้งยังช่วยทำให้กล้าไม้มีการเติบโตเพิ่มขึ้นด้วย

การทดสอบการยับยั้งเชื้อราก่อโรคด้วยน้ำส้มควันไม้

น้ำส้มควันไม้สามารถยับยั้งราก่อโรคใบไหม้ของยูคาลิปตัสได้ทั้งสองชนิด และที่ระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกันจะสามารถยับยั้งการเติบโตของราได้แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.001$) ดังแสดงใน Table 3 เมื่อเปรียบเทียบความสามารถในการยับยั้งเชื้อราแต่ละชนิดโดยพิจารณาจากค่า IC_{50} พบว่า น้ำส้มควันไม้สามารถยับยั้งรา *C. reteaudii* (IC_{50} = 13,679.70 ppm) ได้ดีกว่า *Pestalotiopsis* sp. (IC_{50} = 18,218.50) โดยพบว่า ที่ระดับความเข้มข้น 40,000 ppm นั้นสามารถยับยั้งการเติบโตของเส้นใยราทั้งสองชนิดนี้ได้ 100 เปอร์เซ็นต์ (Figure 3 และ Figure 4) น้ำส้มควันไม้ถูกนำมาใช้ในการยับยั้งเชื้อก่อโรคอีกหลายชนิด Chalermsan and Peerapan (2009) ได้รายงานว่า น้ำส้มควันไม้ 20,000 ppm สามารถยับยั้งเชื้อ *Rhizoctonia solani, Sclerotium oryzae* และ *Pythium* sp. ได้ 100 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ 30,000 ppm จึงจะสามารถยับยั้งเชื้อ *Helminthosporium maydis, Choanephora cucurbitaram* และ *Collectotrichum gloeosporioides* ได้ 100 เปอร์เซ็นต์ และในรายงานการศึกษาของ Saberi *et al*. (2013) พบว่า ต้องใช้น้ำส้มควัน 5,000 ppm จึงจะสามารถยับยั้งเชื้อ *Sclerotinia sclerotium* และ *Rhizoctonia solani* ได้ 100 เปอร์เซ็นต์ จะเห็นได้ว่าโดยส่วนใหญ่การใช้น้ำส้มควันไม้ในการควบคุมโรคพืชให้ได้ประสิทธิภาพดีจำเป็นต้องใช้ที่ระดับความเข้มข้นค่อนข้างสูง ทั้งนี้อาจขึ้นอยู่กับความรุนแรงของเชื้อแต่ละชนิด

Table 3 Effect of wood vinegar on mycelial growth inhibition of *C. reteaudii* and *Pestalotiopsis* sp.

Concentration (ppm)	*C. reteaudii* (%)	*Pestalotiopsis* sp. (%)
5,000	11.04 ± 2.09[f]	7.19 ± 3.69[d]
10,000	39.16 ± 2.08[e]	14.84 ± 5.02[d]
15,000	49.29 ± 4.65[d]	39.77 ± 1.48[c]
20,000	64.36 ± 1.61[c]	47.05 ± 4.38[c]
30,000	77.17 ± 1.45[b]	61.48 ± 7.58[b]
40,000	100 ± 0.00[a]	100 ± 0.00[a]
IC_{50} (ppm)	13,679.70	18,218.50

Note: Value are mean ± standard deviation of the mean for bioassay conducted in 5 replications. Means in a column with the same letter are not significantly different (LSD, $P < 0.05$)

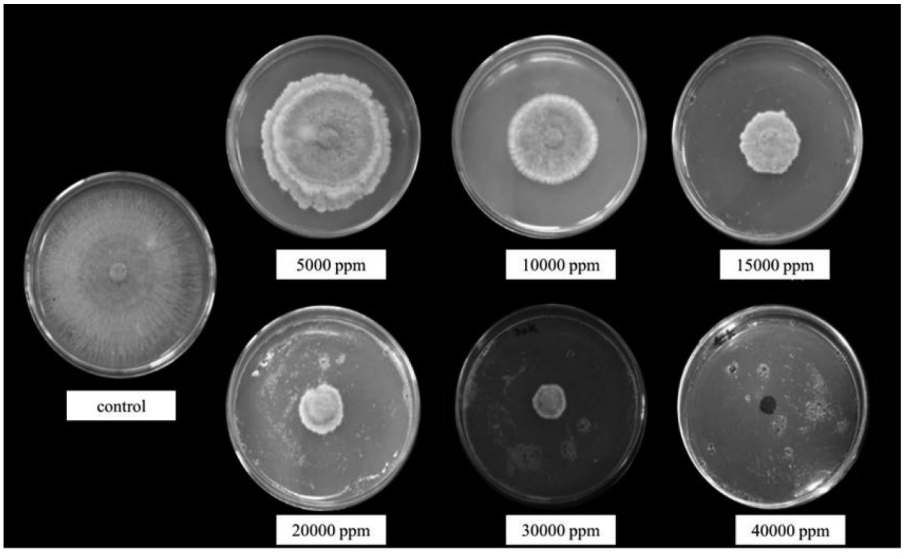

Figure 3 Mycelia growth inhibition of *Cylindrocladium reteaudii* by wood vinegar

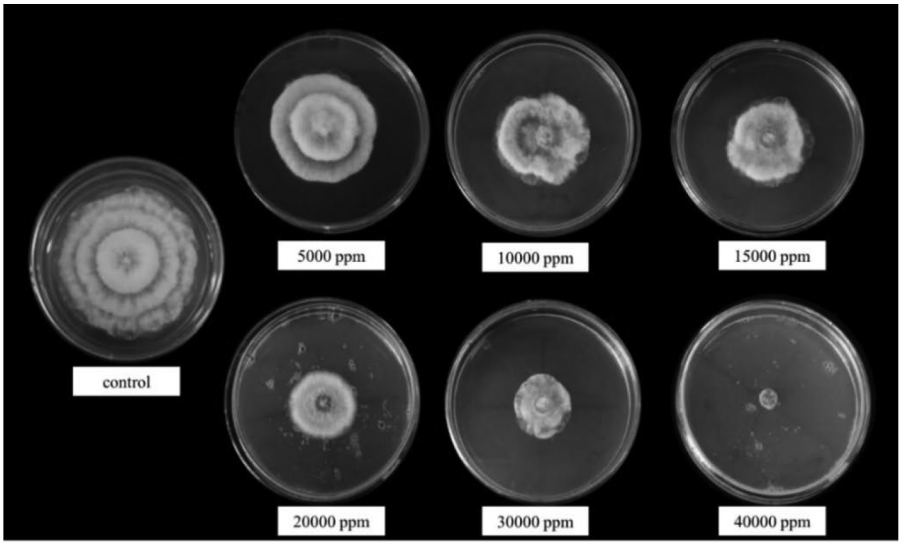

Figure 4 Mycelia growth inhibition of *Pestalotiopsis* sp. by wood vinegar

สรุป

จากการทดสอบประสิทธิภาพของราปฏิปักษ์ (*T. asperellum* และ *T. harzianum*) ในการยับยั้งราก่อโรคใบไหม้ยูคาลิปตัส 2 ชนิด ได้แก่ *C. reteaudii* และ *Pestalotiopsis* sp. ในระดับห้องปฏิบัติการ พบว่า ราปฏิปักษ์ทั้ง 2 ชนิดสามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อก่อโรคได้ดีไม่แตกต่างกัน เมื่อนำ *T. asperellum* ไปยับยั้งเชื้อ *C. reteaudii* ที่ก่อให้เกิดโรคใบไหม้ของกล้ายูคาลิปตัส พบว่า การฉีดพ่น *T. asperellum* สามารถช่วยลดเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคได้ ซึ่งการฉีดพ่น *T. asperellum* ทุก ๆ 3 วัน ช่วยลดการเกิดโรคได้ดีกว่าฉีดพ่นเพียงครั้งเดียว สำหรับการใช้น้ำส้มควันไม้นั้น พบว่า สามารถยับยั้งรา *C. reteaudii* ได้ดีกว่า *Pestalotiopsis* sp. โดยพบว่า ที่ระดับความเข้มข้น 40,000 ppm สามารถยับยั้งการเติบโตของเส้นใยราทั้งสองชนิดนี้ได้ 100 เปอร์เซ็นต์

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ บริษัท สยามฟอเรสทรี จำกัด ที่ให้ความอนุเคราะห์กล้าไม้ที่ใช้ในการทดสอบ และขอขอบคุณ คุณพนิน สินธวารักษ์ ที่ให้ความช่วยเหลือในการดำเนินงานวิจัยในห้องปฏิบัติการ

เอกสารอ้างอิง

Agrios, G.N. 2005. Plant Pathology. 5th Edition, Elsevier Academic Press, New York, U.S.A. 952 pp.

Anonim. 2001. Wood Vinegar. Forest Energy Forum No. 9, FAO of United Nations. 34 pp.

Bolland, L., J.W. Tierney and B.J. Tierney. 1985. Studies on leaf spot and shoot blight of Eucalyptus caused by *Cylindrocladium quinqueseptatum*. Eur. J. Forest Pathol. 15: 385–397.

Chalermsan, Y. and S. Peerapan. 2009. Wood vinegar a by-product from rural charcoal kilns and its role in plant protection. As. J. Food Ag-Ind. Special Issue: S189–S195.

Chaudhary, N. 2014. *Cylindrocladium quinqueseptatum* leaf and twig blight of *Eucalyptus* species. IOSR J. Pharm. Biol. Sci. 9(3): 15–18.

Crous, P.W. 2002. Taxonomy and Pathology of *Cylindrocladium* (*Calonectria*) and Allied Genera. APS Press, St. Paul. 278 pp.

Devi, S. 2011. *Cylindrocladium quinqueseptatum* leaf and twig blight disease of *Eucalyptus* species. Int. Ref. Res. J. 2(18): 49–51.

Dudzinski, M.J., K.M. Old, R.J. Gibbs and N.T. Nguyen. 2000. Selecting *Eucalyptus camaldulensis* resistant to foliar disease at Chon Thanh, Vietnam. ACIAR 9441-Final Rep. 558 pp.

Filho, M.R.C., I. Martins, G.H.S. Peixoto, P.H.P.C. Muniz, D.D.C. Carvalho and S.C.M. Mello. 2018. Biological control of leaf spot and growth promotion of Eucalyptus plants by *Trichoderma* spp. J. Agric. Sci. (Belihuloya) 10(9): 459–467.

Guillen, M.D. and M.J. Manzanos. 2002. Study of the volatile composition of an aqueous oak smoke preparation. Food Chem. 79: 283–292.

Hadi, S. and S.T. Nuhamara. 1997. Disease of species and provenances of Acacia in west and south Kalimantan, Indonesia. *In*: Proceedings of an International Workshop Held at Subanjeriji (South Sumatra) 28 April–3 May 1996. Center for International Forestry Research (CIFOR), Indonesia. p.23–47.

Kaewchai, S., K. Soytong and K.D. Hyde. 2009. Mycofungicides and fungal biofertilizers. Fungal Divers. 38: 25–50.

Laemsak, N. 2008. The wood-based industries in Thailand. J. For. Manag. 2(3): 115–129. (in Thai)

Vincent, C., M.S. Goettel and G. Lazarovits. 2007. Biological Control: A Global Perspective. CABI, Wallingford, UK. 432 pp.

Maciel, C.G., M. Lazarotto, R. Mezzomo, I. Poletto, M.F.B. Muniz and D.B. Lippert. 2012. *Trichoderma* spp. no biocontrole de *Cylindrocladium candelabrum* em mudas de Eucalyptus saligna. Revista Árvore 36(5): 825–832.

Oramahi, A.H. and T. Yoshimura. 2013. Antifungal and antitermitic activities of wood vinegar from *Vitex pubescens* Vahl. J. WOOD Sci. 59: 344–350.

Poruangdate, K., W. Saksirirat, S. Sirimungkararat, S. Saepaisan and P. Chompoowiset. 2015. Use of *Trichoderma* spp. to induce disease resistance against leaf spot diseases caused by *Cylindrocladium reteaudii* and *Cryptosporiopsis eucalypti* of eucalyptus seedling. Khon Kaen Agr. J. 43(1): 176–181. (in Thai)

Saba, H., D. Vibhash, M. Manisha, K.S. Prashant, H. Farhan and A. Tauseef. 2012. *Trichoderma* – a promising plant growth stimulator and biocontrol agent. Mycosphere 3(4): 524–531.

Saberi, M., A. Sarpeleh, H. Askary and F. Rafiei. 2013. The effectiveness of wood vinegar in controlling *Rhizoctonia solani* and *Sclerotinia sclerotiorum* in green house-cucumber. AASCIT. 1(4): 39–43.

Zaldúa, S. and E. Sanfuentes. 2010. Control of *Botrytis cinerea* in *Eucalyptus globulus* mini-cuttings using *Clonostachys* and *Trichoderma* strains. ChileanJAR. 70(4): 576–582.