ณัฐธิญา เบือนสันเทียะ : การระบุชนิดเชื้อสาเหตุ การพัฒนาวิธีการตรวจสอบและการสำรวจการแพร่ระบาดของโรคใบจุดเส้นใบไหม้จากแบคทีเรียขององุ่นในประเทศไทย (IDENTIFICATION, DEVELOPMENT OF DETECTION METHOD AND SURVEY OF BACTERIAL NECROSIS DISEASE OF GRAPEVINE IN THAILAND) อาจารย์ที่ปรึกษา : อาจารย์ ดร.โสภณ วงศ์แก้ว, 80 หน้า.
ISBN 974-533-414-6

งานวิจัยมีวัตถุประสงค์เพื่อระบุชนิดของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุของโรค พัฒนาวิธีการตรวจสอบการเข้าทำลายของเชื้อในสภาพไร่ และสำรวจการแพร่ระบาดของของโรคใบจุดเส้นใบไหม้จากแบคทีเรียขององุ่นในประเทศไทย ทำการศึกษาโดยนำตัวอย่างใบองุ่นที่แสดงอาการใบจุดและเส้นใบไหม้มาแยกเชื้อบนอาหาร NA ศึกษาคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา คุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อ ผลของการศึกษาพบว่าเชื้อที่ทำให้เกิดอาการใบจุดเส้นใบไหม้ (ไอโซเลต $VN_3$) เป็นแบคทีเรียแกรมลบ โคโลนีลักษณะกลม ขอบเรียบ สีเหลืองอ่อน ขนาด 0.4 – 0.8 mm บนอาหาร NA สามารถสร้างเอนไซม์คะตะเลส ย่อยแป้ง เจลาติน ไขมัน และใช้สารซิเตรต แคลเซียมแลคเตต น้ำตาล galactose, glucose, arabinose, maltose, sucrose, cellobiose, mannose และ fructose ได้ แต่ไม่รีดิวซ์ไนเตรต ไม่ย่อยยูเรีย สามารถเจริญได้ในอาหารผสมเกลือ (NaCl) สูงถึง 5% ไม่หยุดการเจริญที่อุณหภูมิ 33 ˚C และยังคงเจริญได้ที่อุณหภูมิสูงถึง 37 ˚C แต่มีอัตราการเจริญที่ช้ามาก ลักษณะและตำแหน่งของแฟลกเจลลาเป็นแบบ monotrichous flagella มีเส้นเดียวบริเวณปลายของเซลล์แบคทีเรีย และเมื่อเลี้ยงในอาหาร galactose yeast extract agar $CaCO_3$ (GYAC) พบว่าเชื้อสามารถสร้างเมือกและเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว การใช้ primer ที่ออกแบบสำหรับเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่เฉพาะเจาะจงสำหรับเชื้อ *Xylophilus ampelinus* ซึ่งได้รับรายงานว่าเป็นสาเหตุของโรคใบจุดเส้นใบไหม้ขององุ่นในอเมริกาและยุโรป คือชุด primer S3, S4 ซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์ คือ 5’-GGT GTT AGG CCG AGT AGT GAG-3’ และ 5’-GGT CTT TCA CCT GAC GCG TTA-3’ และตรวจสอบการเพิ่มปริมาณของชิ้นดีเอ็นเอโดยเทคนิค PCR พบว่าไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเมื่อใช้ดีเอ็นเอจากเชื้อที่ทำให้เกิดโรคในประเทศไทยเป็นดีเอ็นเอเป้าหมาย และการใช้แอนติซีรั่มที่ผลิตได้จากเชื้อดังกล่าว ในการทำปฏิกิริยากับตัวอย่างเชื้อ *Xy. ampelinus* ของชุดตรวจสอบ *Xylophilus ampelinus* ELISA kit ของบริษัท LOEWE Biochemical GmbH, Germany ให้ผลปฏิกิริยาเป็นลบ ขณะที่แอนติซีรั่มที่ผลิตได้จากเชื้อในประเทศไทยให้ปฏิกิริยาบวกกับตัวอย่างโรคที่เก็บรวบรวมจากจังหวัดนครราชสีมา สระบุรี ระยอง สุรินทร์และพิจิตร ทุกตัวอย่างที่ตรวจสอบ และ anti *Xy. ampelinus* ของบริษัทให้ผลลบกับทุกตัวอย่างในประเทศไทย แสดงว่าเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบจุดเส้นใบไหม้ขององุ่นในประเทศไทยไม่ใช่เชื้อ *Xy. ampelinus* แต่เป็นเชื้อ *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* สำหรับการศึกษา

ทางด้านเซรุ่มวิทยา พบว่าระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมของแอนติซีรั่มสำหรับใช้ตรวจสอบการติดเชื้อโดยวิธี direct antigen coating indirect ELISA คือ 1 : 1,000 โดยแอนติซีรั่มสามารถตรวจพบเชื้อที่ระดับความเข้มข้นต่ำสุด 8 x $10^2$ cfu/ml โดยเกิดปฏิกิริยา cross reaction กับเชื้อ *X. axonopodis* pv *citri* ที่แยกได้จากพืชตระกูลส้ม แต่ไม่เกิดปฏิกิริยากับแบคทีเรียชนิดอื่น ๆ สำหรับการพัฒนาวิธีการตรวจสอบการติดเชื้อในเนื้อเยื่อพืช พบว่าการตัดเนื้อเยื่อเป็นชิ้นฝอยแล้วนำไปปรับสภาพแอนติเจนด้วยการต้มหรือนึ่งภายใต้ความดันไอก่อนนำมาตรวจสอบด้วยวิธี DAC Indirect – ELISA ให้ประสิทธิภาพการตรวจสอบสูงสุด และวิธีดังกล่าวสามารถตรวจพบเชื้อหลังจากปลูกเชื้อ 5 วัน การสำรวจการแพร่ระบาดของของโรคใบจุดเส้นใบไหม้ในพื้นที่ปลูก 5 จังหวัด คือ จังหวัดนครราชสีมา สระบุรี ระยอง สุรินทร์และพิจิตร ด้วยวิธี DAC Indirect – ELISA และ Immunofluorescence microscopy โดยใช้แอนติซีรั่มที่เตรียมได้จากเชื้อไอโซเลต $VN_3$ พบว่าทั้ง 68 ตัวอย่างที่ตรวจสอบติดเชื้อ *X. campestris* pv. *viticola*

สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช
ปีการศึกษา 2547

ลายมือชื่อนักศึกษา _____
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา _____
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม _____

NATTHIYA BUENSANTEAI : IDENTIFICATION, DEVELOPMENT OF DETECTION METHOD AND SURVEY OF BACTERIAL NECROSIS DISEASE OF GRAPEVINE IN THAILAND. THESIS ADVISOR : SOPONE WONGKAEW, Ph.D. 80 PP. ISBN 974-533-414-6

VEIN NECROSIS/GRAPEVINE/*Xanthomonas campestris* pv. *viticola*/IDENTIFY/ SEROLOGICAL DETECTION METHODS

The objectives of this study were to identify the causal agent of bacterial necrosis on grapevine, to develop the detection method and survey of the disease on grapevine in Thailand. A bacterium was isolated from leaf spot and vein necrosis samples collected from Nakhon Ratchasima and Saraburi provinces on nutrient agar (NA). After culturing on NA for 72 hours at 26 $^{0}$C, the bacterium ($VN_3$ isolate) formed round, white, semitranslucent, slightly raised, glistening colonies with 0.4-0.8 mm in diameter. It produced similar symptoms on detached grape leaf as observed in the field 5 days after inoculation. The bacterium was rod shape and gram - negative. It was able to utilize galactose, glucose, arabinose, maltose, sucrose, cellobiose, mannose and fructose as carbon sources and was catalase positive. The bacterium could lyse Tween 80, hydrolyze starch and gelatin and utilize citrate and calcium lactate. But it was urease-negative and could not denitrify nitrate. It could tolerate NaCl concentration up to 5%. It was able to grow well at 33 $^{\circ}$C and still grew at 37 $^{\circ}$C but at a very low growth rate. The bacterium grew very fast on galactose yeast extract agar $CaCO_3$ (GYAC) and produced large amount of gum. With silver staining and transmission electron microscopy, the bacterium appeared to have a monotrichous

flagellum. By using specific primers S3 and S4 designed specifically for detection of *Xylophilus ampelinus* on grapevine in America and Europe, the primers failed to amplify the target DNA extracted from $VN_3$ isolate after completion of the PCR cycle. Result of a direct antigen coating indirect ELISA test using *Xylophilus ampelinus* antiserum of LOEWE Biochemical GmbH company, Germany also was negative with $VN_3$ isolate and all other diseased samples collected in Thailand. In contrast the antiserum prepared against the $VN_3$ isolate gave positive ELISA results with all samples tested. From the results it was concluded that the causal agent of bacterial leaf spot and vein necrosis of grape in Thailand was *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* and not *Xy. ampelinus* as earlier anticipated. For serological study, the suitable dilution of the $VN_3$ antiserum for the detection of grape infection was 1 : 1,000 in which as low as $8 \times 10^2$ cfu/ ml of the bacterium could be detected. The antiserum could cross react with *X. axonopodis* pv *citri* but not with other bacteria species. The detection efficacy could be improved when the diseased samples were cut into small pieces and the oozing bacteria were boiled or autoclaved prior to the ELISA test. With this technique the bacteria could be detected as early as 5 days after inoculation. All 68 diseased samples collected from Nakhon Ratchasima, Saraburi, Rayong, Surin and Pichit gave positive results with the DAC Indirect – ELISA and Immunofluorescence microscopy using anti - $VN_3$, indicating the widespread of this disease in Thailand.

School of Crop Production Technology

Academic Year 2004

Student's Signature _____

Advisor's Signature _____

Co-advisor's Signature _____