ขนิษฐา มากรุง : การพัฒนาวิธีการตรวจสอบการเข้าทำลายของเชื้อ *Sphaceloma ampelinum* de Bary สาเหตุโรคสแคบในองุ่นและความหลากหลายของสายพันธุ์เชื้อ (DEVELOPMENT OF TECHNIQUES FOR DETECTING INFECTION OF *SPHACELOMA AMPELINUM* DE BARY CAUSING SCAB IN GRAPE AND THE PATHOGEN DIVERSITY) อาจารย์ที่ปรึกษา : อาจารย์ ดร.โสภณ วงศ์แก้ว, 77 หน้า. ISBN 974-533-466-9

การพัฒนาวิธีตรวจสอบการเข้าทำลายของเชื้อ *Sphaceloma ampelinum* โดยเทคนิคทางเซรุ่มวิทยากระทำโดย ใช้สารสกัดเส้นใยและโคนีเดียของเชื้อที่แยกได้จากองุ่นในพื้นที่ปลูกอำเภอปากช่อง (ไอโซเลต Sa_TK1) ซึ่งมีปริมาณโปรตีน 0.75 ไมโครกรัมต่อการฉีด 1 ครั้ง ฉีดเข้ากระต่ายในลักษณะฉีดเข้ากล้ามเนื้อโดยผสม Freund's incomplete adjuvant 2 ครั้ง ร่วมกับการฉีดเข้าเส้นเลือดโดยไม่ผสม Freund's incomplete adjuvant 2 ครั้ง ๆ ละ 1.5 ไมโครกรัม พบว่า สามารถกระตุ้นให้กระต่ายสร้างแอนติบอดีที่จำเพาะเจาะจงกับเชื้อ *S. ampelinum* โดยได้ titer ของแอนติเซรุ่มเท่ากับ 1: 1,024 เมื่อทดสอบกับแอนติเจนเข้มข้น $1x10^6$ โคนีเดีย/มิลลิลิตร โดยวิธี direct antigen coating indirect ELISA แอนติเซรุ่มที่ได้ทำปฏิกิริยาเฉพาะเจาะจงกับเชื้อ *S. ampelinum* และ *Collectotrichum* spp.ที่แยกได้จากองุ่นแต่ไม่ทำปฏิกิริยากับเชื้อราและแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชชนิดอื่นๆ เมื่อตรวจสอบโดยวิธี immunofluorescence พบว่า โคนีเดียของเชื้อที่ใช้ทดสอบจำนวน 50 ไอโซเลต มีการเรืองแสง 4 รูปแบบ คือ ไม่เรืองแสง, เรืองแสงได้น้อย, เรืองแสงได้ปานกลาง และเรืองแสงมากที่สุด การดัดแปลงรูปแบบของวิธี ELISA โดยใช้ชิ้นส่วนของใบบริเวณที่แสดงอาการเป็น solid surface แทนพื้นที่ผิวของหลุมพลาสติก (plastic plate surface) พบว่า ชิ้นส่วนของใบให้ปฏิกิริยาบวกในทุกไอโซเลต ยกเว้น Sa_1, Sa_2 และ Sa_3 หลังจากปลูกเชื้อ 2 วัน การศึกษาความหลากหลายของเชื้อ *S. ampelinum* จำนวน 12 ไอโซเลต กระทำโดยเปรียบเทียบลักษณะของโคโลนีบนอาหาร PDA , ขนาดของโคนีเดีย, ปฏิกิริยาทางเซรุ่มวิทยาด้วยวิธี ELISA และ double gel diffusion พบว่า ลักษณะของโคโลนีของเชื้อมีรูปแบบไม่แน่นอน มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางอยู่ระหว่าง 0.5 - 2 เซนติเมตร หลังจากเลี้ยง 10 วัน และจะขยายขนาดขึ้นเป็น 2.5 เซนติเมตร เมื่อเชื้อมีอายุ 1-2 เดือน โคโลนีสามารถแบ่งตามลักษณะสีได้ 3 ลักษณะ คือ สีเหลืองอ่อน, สีเหลืองเข้มถึงสีส้ม และสีแดง ส่วนขนาดของโคนีเดียแต่ละไอโซเลตมีขนาดใกล้เคียงกัน เฉลี่ยระหว่าง 2.17-3.35 x 5.24-6.83 ไมครอน เมื่อศึกษาด้วยวิธี ELISA พบว่า เชื้อในแต่ละไอโซเลตมีค่าดูดกลืนแสง A 405 แตกต่างกันแบ่งเป็น 4 กลุ่ม คล้ายกับปฏิกิริยาที่พบใน immunofluorescence คือ ค่าดูดกลืนแสงไม่ต่างจาก negative control, ค่าดูดกลืนแสงต่ำ, ค่าดูดกลืนแสงปานกลาง และค่าดูดกลืนแสงสูง โดยค่าดูดกลืนมีความสัมพันธ์ไปในทางเดียวกันกับระดับการเรืองแสง และจากการนำเชื้อ *S. ampelinum* จำนวน 12 ไอโซเลตมาปลูกลงบนองุ่น 6 สายพันธุ์ คือ Black queen, Marroo seedless, Crimson seedless, Centenail, Delight และ Shiraz วางแผนการทดลองแบบ completely randomized

design (CRD) จำนวน 10 ซ้ำ พบว่า 2 ไอโซเลต ทำให้องุ่นทั้ง 6 สายพันธุ์เป็นโรค, 4 ไอโซเลตทำให้องุ่น 5 สายพันธุ์เป็นโรค, 4 ไอโซเลต ทำให้องุ่น 4 สายพันธุ์เป็นโรค และ 2 ไอโซเลตทำให้องุ่น 2 สายพันธุ์เป็นโรค เมื่อศึกษาขนาดของแผลที่เกิดบนใบองุ่น พบว่า เชื้อไอโซเลต Sa_24, Sa_12, Sa_1, Sa_3 , Sa_9 และ Sa_5 สามารถทำให้เกิดแผลขนาดใหญ่ที่สุดในองุ่นพันธุ์ Black queen, Crimson seedless, Marroo seedless, Centenail และ Delight ตามลำดับ การศึกษาระยะฟักตัวของเชื้อแต่ละไอโซเลตบนองุ่นแต่ละพันธุ์ พบว่า มีความแตกต่างกันขึ้นอยู่กับไอโซเลตและพันธุ์ขององุ่น เชื้อเกือบทุกไอโซเลตจะแสดงอาการค่อนข้างเร็วบนพันธุ์ Black queen (4-6 วัน) แต่จะแสดงอาการช้าในพันธุ์ Shiraz (6-8 วัน) ผลการศึกษาดังกล่าวแสดงให้เห็นว่า เชื้อ *S. ampelinum* ในประเทศไทยมีความแตกต่างกันทั้งทางสัณฐานวิทยา เชรุ่มวิทยาและปฏิกิริยาต่อสายพันธุ์องุ่น

สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช
ปีการศึกษา 2548

ลายมือชื่อนักศึกษา.....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

KHANISTHA MAKRUNG : DEVELOPMENT OF TECHNIQUES FOR DETECTING INFECTION OF *SPHACELOMA AMPELINUM* DE BARY CAUSING SCAB IN GRAPE AND THE PATHOGEN DIVERSITY. THESIS ADVISOR : SOPONE WONGKAEW, Ph.D. 77 PP.
ISBN 974-533-466-9

SPHACELOMA AMPELINUM/SEROLOGICAL DETECTION/BIODIVERSITY

A serological technique was developed for the detection of *Sphaceloma ampelinum* infection in grape. A polyclonal antiserum was produced in rabbit by injections with mycelia and conidial extracts of Sa_TK1 isolate from Pak Chong District. The first two injections were done intramuscularly with 0.75 μg/ml of the extract emulsified with Freund's incomplete adjuvant followed by two intravenous injections of non-adjuvant 1.5 μg/ml antigen. The antiserum obtained after the last injection had 1 : 1,024 titer when tested with 1×10^6 conidia/ml of *S. ampelinum* with DAC-indirect ELISA protocol. It reacted specifically with *S. ampelinum* and a *Collectotrichum* species isolated from grape but did not react with other plant pathogenic fungi and bacteria tested. With the immunofluorescence assay, 50 *S. ampelinum* isolates could be divided into 4 groups according to the intensity of the fluorescence when reacted with the antiserum that is no fluorescence, low, medium and high intensity. By using the infected grape leaf as a solid surface instead of the ELISA plate, most of the leaf pieces inoculated with different *S. ampelinum* gave a positive result with DAC indirect ELISA 2 days after the inoculation except those inoculated with Sa_1, Sa_2 and Sa_3 isolates. This result indicates that the infection can be detected before the symptoms appear. By comparison of colony morphology,

size of conidia and serological reaction, 12 isolates used in the study showed some differences indicating their biodiversity. Their colony shapes were irregular with the diameter in the range of 0.5-2.0 cm after culturing for ten days on PDA and stopped growing after 1-2 months with 2.5 cm colony diameter. The colony was of 3 colors depending on the isolates which were pale yellow, orange and red. The conidia sizes were in the range of 2.17-3.35 x 5.24-6.83 μm. When tested with ELISA using the Sa_TK1 antiserum, the 50 isolates had different 405 absorbency and could be divided into 4 groups similar to that of the immunofluorescence assay. Twelve isolates chosen for infectivity test on 6 grape cultivars (Black queen, Crimson seedless, Marroo seedless, Delight, Centenail and Shiraz) showed differential reaction. The test was done in Completely Randomized Design (CRD) with 10 replications. After the inoculation, 2 isolates could infect all 6 cultivars, 4 isolates infected 5, 4 isolates infected 4 and 2 isolates could infect only 2 of the 6 cultivars tested. The isolates also showed different reaction on grape in terms of size of the lesions. The Sa_24, Sa_12, Sa_1, Sa_3, Sa_9 and Sa_ 5 gave the biggest lesion size on Black queen, Crimson seedless, Marroo seedless, Delight, Centenail and Shiraz respectively. The incubation period was also different depending on the isolates and cultivars of grape. Most isolates had a short latent period on Black queen (4-6 days) but a longer one on Shiraz (6-8 days). The difference in terms of morphology, serological reaction and host differentiation indicated that *S. ampelinum* in Thailand are considerably diversified.

School of Crop Production Technology — Student's Signature Khanistha Makrung

Academic Year 2005 — Advisor's Signature .....

Co-advisor's Signature .....