

การพัฒนาวิธีการตรวจสอบการเข้าทำลายของเชื้อ *Sphaceloma ampelinum*
de Bary สาเหตุโรคสแคบในองุ่นและความหลากหลายของสายพันธุ์เชื้อ

นางสาวขนิษฐา มากรุง

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ปีการศึกษา 2548

ISBN 974-533-466-9

**DEVELOPMENT OF TECHNIQUES FOR DETECTING
INFECTION OF *SPHACELOMA AMPELINUM* DE BARY
CAUSING SCAB IN GRAPE AND THE PATHOGEN
DIVERSITY**

Miss Khanistha Makrung

**A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the
Degree of Master of Science in Crop Production Technology**

Suranaree University of Technology

Academic Year 2005

ISBN 974-533-466-9

การพัฒนาวิธีการตรวจสอบการเข้าทำลายของเชื้อ *Sphaceloma ampelinum*
de Bary สาเหตุโรคสแฟบในองุ่นและความหลากหลายของสายพันธุ์เชื้อ

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัยเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....
(รองศาสตราจารย์ ดร. จุฑารัตน์ อรรถจารุสิทธิ์)
ประธานกรรมการ

.....
(อาจารย์ ดร. โสภณ วงศ์แก้ว)
กรรมการ(อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์)

.....
(ศาสตราจารย์ ดร. นันทกร บุญเกิด)
กรรมการ

.....
(รองศาสตราจารย์ ดร.เสาวณีย์ รัตนพานิช)
รองอธิการบดีฝ่ายวิชาการ

.....
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุเวทย์ นิงสานนท์)
คณบดีสำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

ขนิษฐา มากรุ่ง : 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

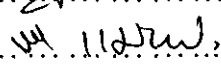
การพัฒนาวิธีตรวจสอบการเข้าทำลายของเชื้อ *Sphaceloma ampelinum* โดยเทคนิคทางเซรุ่มวิทยากระทำโดยใช้สารสกัดเส้นใยและโคนิเดียของเชื้อที่แยกได้จากองุ่นในพื้นที่ปลูกอำเภอบางบาล (ไอโซเลต Sa_TK1) ซึ่งมีปริมาณโปรตีน 0.75 ไมโครกรัมต่อการฉีด 1 ครั้ง ฉีดเข้ากระต่ายในลักษณะฉีดเข้ากล้ามเนื้อโดยผสม Freund's incomplete 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 1×10^6 โคนิเดีย/มิลลิลิตร โดยวิธี direct antigen coating indirect ELISA แอนติเซรุ่มที่ได้ทำปฏิกิริยาเฉพาะเจาะจงกับเชื้อ *S. ampelinum* และ *Collectotrichum* spp. ที่แยกได้จากองุ่นแต่ไม่ทำปฏิกิริยากับเชื้อราและแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชชนิดอื่นๆ เมื่อตรวจสอบโดยวิธี immunofluorescence พบว่า โคนิเดียของเชื้อที่ใช้ทดสอบจำนวน 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 , ขนาดของโคนิเดีย, 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 ส่วนขนาดของโคนิเดียแต่ละไอโซเลตมีขนาดใกล้เคียงกัน เฉลี่ยระหว่าง 2.17-3.35 x 5.24-6.83 ไมครอน เมื่อศึกษาด้วยวิธี ELISA พบว่า เชื้อในแต่ละไอโซเลตมีค่าดูดกลืนแสง A₄₀₅ แตกต่างกันแบ่งเป็น 4 กลุ่ม คล้ายกับปฏิกิริยาที่พบใน immunofluorescence คือ ค่าดูดกลืนแสงไม่ต่างจาก negative control, ค่าดูดกลืนแสงต่ำ, ค่าดูดกลืนแสงปานกลาง และค่าดูดกลืนแสงสูง โดยค่าดูดกลืนแสงมีความสัมพันธ์ไปในทางเดียวกันกับระดับการเรืองแสง และจากการนำเชื้อ *S. ampelinum* จำนวน 12 ไอโซเลตมาปลูกลงบนองุ่น 6 สายพันธุ์ คือ Black queen, Marroo seedless, Crimson seedless, Centenail, Delight และ Shiraz วางแผนการทดลองแบบ completely randomized

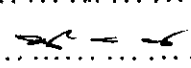
design (CRD) จำนวน 10 ซ้ำ พบว่า 2 ไอโซเลต ทำให้องุ่นทั้ง 6 สายพันธุ์เป็นโรค, 4 ไอโซเลตทำให้องุ่น 5 สายพันธุ์เป็นโรค, 4 ไอโซเลต ทำให้องุ่น 4 สายพันธุ์เป็นโรค และ 2 ไอโซเลตทำให้องุ่น 2 สายพันธุ์เป็นโรค เมื่อศึกษาขนาดของแผลที่เกิดบนใบองุ่น พบว่า เชื้อไอโซเลต Sa_24, Sa_12, Sa_1, Sa_3, Sa_9 และ Sa_5 สามารถทำให้เกิดแผลขนาดใหญ่ที่สุดในองุ่นพันธุ์ 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 เซรุ่มวิทยาและปฏิกิริยาต่อสายพันธุ์องุ่น

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
Academic Year 2005

Student's Signature Khanistha Makrungs
Advisor's Signature Sopon Wongkarn
Co-advisor's Signature Manthan Buncha

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์นี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ บุคคล และกลุ่มบุคคลต่าง ๆ ที่ได้กรุณาให้คำปรึกษา แนะนำ ช่วยเหลือ อย่างดียิ่ง ทั้งในด้านวิชาการ และ ด้านการดำเนินงานวิจัย

ขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ ดร. โสภณ วงศ์แก้ว อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ให้ความเมตตากรุณา ให้การสนับสนุนการศึกษาต่อในระดับบัณฑิตศึกษา นอกจากนั้นยังคอยให้คำปรึกษา และคอยชี้แนะแนวทางทั้งในด้านงานวิจัย พร้อมทั้งอบรมสั่งสอนเพื่อให้ศิษย์ประพฤติตนเป็นคนดีของสังคม

ขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ประจำสาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืชทุกท่าน ที่ให้ความเมตตาและคอย อบรมสั่งสอนประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้

ขอขอบพระคุณ คุณไพเราะ ทองนุช และคุณกิตติมา กฤษณาสุวรรณ เจ้าหน้าที่บริหารงานทั่วไปที่ให้ความช่วยเหลือด้านการประสานงานและการเตรียมเอกสารต่าง ๆ

ขอขอบพระคุณ คุณเอกวัฒน์ ธาราพฤษพงษ์ , คุณอรทัย นาซิน, คุณนวลปรานค์ อุทัยดา เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการกีฏวิทยาและโรคพืช ที่ให้ความอนุเคราะห์อุปกรณ์วิทยาศาสตร์ นอกจากนั้นยังให้ความช่วยเหลือ ดูแลห่วงใยและคอยอำนวยความสะดวกในทุก ๆ ด้าน

ขอขอบพระคุณ คุณรุ่งฤดี รัชมณี และคุณจรินทร์พร เปลื้องทุกข์ ที่ให้ความช่วยเหลือให้กำลังใจ ให้คำปรึกษา อบรมสั่งสอนและดูแลอย่างใกล้ชิดตลอดระยะเวลาที่ได้ศึกษาเล่าเรียน

ขอขอบคุณ คุณณัฐริญา เบือนสันเทียะ และเพื่อน ๆ ร่วมเรียนในระดับบัณฑิตศึกษา ที่คอยช่วยเหลือ ให้กำลังใจ และให้คำปรึกษามาโดยตลอด

สุดท้ายนี้ ขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา ที่ให้การเลี้ยงดูอบรมสั่งสอนและส่งเสริมการศึกษา เป็นอย่างดียิ่งตลอดมา ซึ่งเป็นกำลังใจที่สำคัญที่สุดในการที่ทำให้การทำวิทยานิพนธ์ครั้งนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

ขนิษฐา มากรุ่ง

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อ (ภาษาไทย).....	ก
บทคัดย่อ (ภาษาอังกฤษ)	ค
กิตติกรรมประกาศ.....	จ
สารบัญ.....	ฉ
สารบัญตาราง.....	ณ
สารบัญรูป.....	ญ
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	ฎ
บทที่	
1 บทนำ	1
1.1 ความสำคัญของปัญหา.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	2
1.3 สมมติฐานการวิจัย.....	2
1.4 ขอบเขตของการวิจัย.....	3
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	3
2 ปรัชญาวรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
2.1 ความสำคัญขององุ่น.....	4
2.2 การปลูกองุ่นในประเทศไทย.....	5
2.3 โรคสแคบขององุ่น	5
2.3.1 เชื้อรา <i>Sphaceloma ampelinum</i>	5
2.3.2 อาการของโรคสแคบ	7
2.3.3 การแพร่ระบาดและวงจรการเกิดโรค	7
2.3.4 การควบคุมโรค	8
2.3.5 ความเสียหายที่เกิดจากการเข้าทำลายของเชื้อ	10
2.3.6 การแยกเชื้อสาเหตุโรคพืช	10
2.4 การใช้เทคนิคทางด้านเซรุ่มวิทยาในการตรวจการเข้าทำลายของเชื้อโรคพืช.....	11

สารบัญ(ต่อ)

หน้า

2.4.1 การทดสอบที่ใช้ปฏิกิริยาการตกตะกอน (Precipitation)	12
2.4.2 การตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์เรืองแสง (Immunofluorescence microscopy).13	
2.4.3 การตรวจโดยวิธี ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay)	14
3 วิธีดำเนินการวิจัย	16
3.1 การแยกเชื้อ <i>Sphaceloma ampelinum</i> จากชิ้นส่วนองุ่นที่เป็นโรค.....	16
3.2 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ <i>S. ampelinum</i>	16
3.3 การผลิตแอนติเซรัม.....	19
3.3.1 การเตรียมแอนติเจน.....	19
3.3.2 การเก็บ normal serum.....	19
3.3.3 การฉีดแอนติเจน.....	19
3.3.4 การเก็บแอนติเซรัม.....	20
3.3.5 การตรวจสอบความเจือจางต่ำสุดที่ยังทำปฏิกิริยากับแอนติเจนได้ (titer).....	20
3.3.6 การทดสอบความจำเพาะเจาะจงของแอนติเซรัม.....	21
3.4 การพัฒนาวิธีการตรวจสอบ Latent infection โดยวิธีทางเซรัมวิทยา.....	21
3.4.1 วิธี ELISA.....	21
3.4.2 วิธี Immunofluorescence microscopy.....	22
3.5 การศึกษาความหลากหลายของสายพันธุ์เชื้อ <i>S. ampelinum</i> โดยเทคนิคทางเซรัมวิทยา.....	22
3.5.1 วิธี ELISA.....	22
3.5.2 วิธี Gel- double diffusion.....	22
3.6 การศึกษาความหลากหลายของสายพันธุ์เชื้อ <i>S. ampelinum</i> จากปฏิกิริยาบนพื้นธู่งุ่น.....	23
3.6.1 การเตรียมพืช.....	23
3.6.2 การเตรียมเชื้อ.....	24
3.6.3 การปลูกเชื้อ.....	24
3.6.4 การบันทึกผลการทดลอง.....	24
4 ผลการทดลอง	25
4.1 การแยกเชื้อ <i>Sphaceloma ampelinum</i> จากชิ้นส่วนองุ่นที่เป็นโรค.....	25
4.2 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ <i>S. ampelinum</i>	27
4.3 การผลิตแอนติเซรัมของเชื้อ <i>S. ampelinum</i>	33

สารบัญ(ต่อ)

หน้า

4.3.1 การตรวจสอบความเจือจางต่ำสุดที่ยังทำปฏิกิริยากับแอนติเจนได้ (titer).....	33
4.3.2 การทดสอบความจำเพาะเจาะจงของแอนติเซรัม.....	33
4.4 การพัฒนาวิธีการตรวจสอบ Latent infection โดยวิธีทางเซรัมวิทยา.....	37
4.4.1 วิธี ELISA.....	37
4.4.2 วิธี Immunofluorescence microscopy.....	37
4.5 การศึกษาความหลากหลายของสายพันธุ์เชื้อ <i>S. ampelinum</i> โดยเทคนิคทางเซรัมวิทยา.....	45
4.5.1 วิธี ELISA.....	45
4.5.2 วิธี Gel- double diffusion.....	45
4.6 การศึกษาความหลากหลายของสายพันธุ์เชื้อ <i>S. ampelinum</i> จากปฏิกิริยาบนพื้นธู่งุ่น.....	49
5 สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง	54
รายการอ้างอิง.....	58
ภาคผนวก	65
ประวัติผู้เขียน.....	77

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
3.1 แสดงไอโซเลตของเชื้อที่เก็บจากงุ่นพันธุ์ต่าง ๆ จากแหล่งปลูกงุ่นที่สำคัญเพื่อใช้ในการศึกษา.....	17
4.1 แสดงขนาดของโคนีเดียของเชื้อ <i>S. ampelinum</i> จำนวน 38 ไอโซเลต ที่เก็บจากแหล่งปลูกงุ่น.....	31
4.2 การตรวจสอบความเจือจางต่ำสุดที่ยังทำปฏิกิริยากับแอนติเจนได้ (titer).....	34
4.3 ผลการทดสอบความเฉพาะเจาะจงของแอนติเซรัมที่ผลิตได้ต่อเชื้อ <i>S. ampelinum</i> ไอโซเลต Sa_TK1 กับเชื้อ <i>S. ampelinum</i> บางไอโซเลตและจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ	36
4.4 แสดงค่าดูดกลืนแสงที่ 405 นาโนเมตร เมื่อตรวจสอบโดยใช้ชิ้นส่วนของใบที่แสดงอาการแทน solid surface ของ plastic plate surface.....	38
4.5 ปฏิกิริยาของเชื้อ <i>S. ampelinum</i> ต่อ polyclonal antibody (PABs) ในการทดสอบด้วยวิธี immunofluorescence test.....	43
4.6 แสดงค่าดูดกลืนแสงของเชื้อ <i>S. ampelinum</i> ความเข้มข้น 10^6 โคนีเดีย/มิลลิลิตร โดยวิธี indirect- ELISA ที่ 405 นาโนเมตร.....	46
4.7 แสดงความสามารถในการทำให้เกิดโรคของเชื้อ <i>S. ampelinum</i> แต่ละไอโซเลตบนพันธุ์งุ่น	50
4.8 แสดงขนาดของแผลที่เกิดจากเชื้อ <i>S. ampelinum</i> หลังจากปลูกเชื้อ 10 วันบนงุ่นพันธุ์ต่างๆ	51
4.9 แสดงวันแรกที่เชื้อในแต่ละไอโซเลตปรากฏแผลบนงุ่นพันธุ์ต่างๆ.....	52

สารบัญรูป

รูปที่

หน้า

2.1 แสดงปฏิกิริยา (1) Identity (2) Non-identity และ (3) Partial identity ในการตรวจสอบปฏิกิริยาเซรุ่มวิทยาด้วยวิธี gel diffusion	12
3.1 ภาพกิ่งชำขององุ่นที่แตกใบอ่อนหลังปักชำ 10 วัน	23
4.1 ลักษณะขององุ่นที่แสดงอาการโรคสแคบ	26
4.2 แสดงการเจริญของเชื้อ <i>S. ampelinum</i> บนอาหาร WA ที่เจริญออกมาจากชิ้นส่วนขององุ่นที่เป็นโรคทำการแยกเชื้อโดยวิธี tissue transplanting	37
4.3 ลักษณะการเจริญของเชื้อ <i>S. ampelinum</i> ที่เจริญบนอาหาร PDA เป็นเวลา 10 วันหลังจากที่ย้ายจากอาหาร WA เป็นการเจริญแบบพอกพูน	28
4.4 ลักษณะโคนิเดียของเชื้อ <i>S. ampelinum</i> ที่ศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์	29
4.5 ลักษณะพื้นผิวภายนอกขององุ่นที่แสดงอาการต่าง ๆ ของโรคสแคบขององุ่นในประเทศไทยถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด	29
4.6 แสดงลักษณะการเจริญของเชื้อ <i>S. ampelinum</i> อายุ 15 วัน บนอาหาร PDA	30
4.7 ลักษณะปรากฏของอาการเริ่มแรกของโรคสแคบหลังจากปลูกเชื้อ 4 วัน ที่กำลังขยาย 40 x	39
4.8 ลักษณะปรากฏของอาการเริ่มแรกของโรคสแคบหลังจากปลูกเชื้อ 4 วัน ที่กำลังขยาย 100 x	40
4.9 แสดงการเรืองแสงของเชื้อ <i>S. ampelinum</i> ที่ทำการทดสอบโดยวิธี immunofluorescence tests	41
4.10 แสดงการเรืองแสงสีเขียวของโคนิเดียของเชื้อ <i>S. ampelinum</i> จากการทดสอบโดยวิธี immunofluorescence	42
4.11 แสดงลักษณะ precipitin band ที่เกิดขึ้นระหว่างแอนติเซรุ่มกับแอนติเจนของเชื้อ <i>S. ampelinum</i>	48
4.12 ลักษณะอาการของโรคสแคบที่เกิดบนองุ่นกิ่งชำหลังจากทำการปลูกเชื้อในพันธุ์ต่างๆ	53

คำอธิบายสัญลักษณ์ และคำย่อ

Ab	=	antibody
Ag	=	antigen
As	=	antiserum
ELISA	=	enzyme-linked immunosorbent assay
PDA	=	potato dextrose agar
PDB	=	potato dextrose broth
WA	=	water agar
PBS	=	phosphate buffer saline
PBS-T	=	phosphate buffer saline tween
FITC	=	fluorescein isothiocyanate

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญของปัญหา

องุ่น (*Vitis vinifera* Linn.) เป็นไม้ผลเศรษฐกิจของไทยชนิดหนึ่ง ซึ่งเป็นที่นิยมของผู้บริโภค ในช่วงก่อนปี พ.ศ. 2503 องุ่นรับประทานผลสดในประเทศไทยนำเข้าจากประเทศสหรัฐอเมริกา และออสเตรเลียทำให้องุ่นมีราคาสูง หลังจากนั้นจึงได้มีการนำพันธุ์องุ่นมาทดลองปลูกในประเทศไทยและประสบความสำเร็จในปี พ.ศ.2503 การผลิตองุ่นเป็นการค้าจึงเริ่มขึ้น โดยมีแหล่งกำเนิดในเขตภาคกลาง จังหวัดนครปฐม ราชบุรี สมุทรสาคร และสมุทรสงคราม ปัจจุบันการปลูกองุ่นขยายไปสู่ภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคตะวันตก สถานการณ์การผลิตองุ่นในประเทศไทยในปี 2541 ประเทศไทยมีพื้นที่ปลูกองุ่นประมาณ 16,981 ไร่ ผลผลิตทั้งหมดประมาณ 31,677 ตัน/ปี ผลผลิตเฉลี่ย 2.4 ตัน/ไร่ ข้อมูลในการผลิตองุ่นรับประทานผลสดพันธุ์ที่นิยมปลูกได้แก่ พันธุ์ไวท์มะละกาและพันธุ์คาร์ดินัล มีผลผลิตทั้งประเทศประมาณ 27,556 ตัน องุ่นพันธุ์อื่นๆ ที่นิยมปลูกเพื่อรับประทานผลสด ได้แก่ Kyoho, Beuty Seedless, Early Muscat และ Carolina Blackrose และองุ่นทำไวน์ที่นิยมปลูกได้แก่องุ่นพันธุ์ Chenin blanc และ Shiraz มีผลผลิตทั้งประเทศประมาณ 4,043 ตัน นอกจากนี้ยังรับประทานผลสดและทำไวน์แล้วองุ่นยังสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ในหลายลักษณะ เช่น ทำน้ำผลไม้ แยม ลูกเกด และบรันดี เป็นต้น ดังนั้นการปลูกองุ่นจึงมีการขยายพื้นที่ปลูกออกไปอย่างกว้างขวาง ซึ่งเมื่อมีการขยายพื้นที่ปลูกมากขึ้นก็ย่อมมีปัญหาเกิดขึ้น ปัญหาที่สำคัญที่สุดของการผลิตองุ่นคือการแพร่ระบาดของโรค องุ่นเป็นพืชชนิดหนึ่งที่มีโรคจำนวนมากเข้าทำลาย ในประเทศไทยมีโรคที่พบระบาดประจำได้แก่ โรคราน้ำค้างที่เกิดจากเชื้อ *Plasmopara viticola* โรคแอนแทรคโนส (เตาเผา) เกิดจากเชื้อ *Collectrotichum ampelinum* โรคราสนิมเกิดจากเชื้อ *Physopella ampelopsidis* โรคกิ่งแห้งหรือเน่าขมเกิดจากเชื้อ *Greeneria uvicola* นอกจากนั้นยังพบ โรคสแคบ (อินบูบ) หรือแอนแทรคโนสที่เกิดจากเชื้อ *Sphaceloma ampelinum* (กรรมการ เพี้ยนพัคตร และคณะ, 2533) ซึ่งเป็นโรคที่มีผู้ศึกษาน้อยในประเทศไทย เนื่องจากสับสนกับโรคแอนแทรคโนส (เตาเผา) ที่เกิดจาก เชื้อ *C. ampelinum* (กรรมการ เพี้ยนพัคตร และคณะ, 2537)

โรคสแคบ ณ ปัจจุบันได้กลายเป็นโรคพืชที่สำคัญอีกชนิดหนึ่งในประเทศไทย เพราะนอกจากองุ่นแล้ว ยังมีรายงานว่าพบบนพืชอีกหลายชนิด เช่น กะวาน กุหลาบ ชา ถั่วลิสง น้อยหน่า ฝรั่ง มะละกอ มะม่วง มะม่วงหิมพานต์ ขางพารา ละหุ่ง หน้วว ส้ม สัก และอะโวคาโด โดยโรคนี้เริ่มก่อ

ให้เกิดความเสียหายมากขึ้นกับ มะม่วง แก้วมังกร และกระเจี๊ยบเขียว (กรณีการ เพี้ยนพันธุ์และ คณะ, 2545) การแก้ไขปัญหานี้ในองุ่นส่วนใหญ่มักกระทำหลังจากที่มีการระบาดของโรคอย่างรุนแรงแล้วซึ่งมักจะไม่ได้ผลเนื่องจากเป็นช่วงฤดูฝนทำให้ฉีดพ่นสารเคมีลำบากหรือเกิดการฉีดยาของเชื้อ ดังนั้นจึงจำเป็นต้องทำอย่างอื่นที่ควรพัฒนาวิธีการตรวจสอบโรคสแคบ เพื่อการป้องกันก่อนการแพร่ระบาด โดยเน้นการศึกษาปฏิกิริยาทางเซรุ่มวิทยาเพื่อสามารถนำมาพัฒนาเป็นวิธีตรวจหาเชื้อสาเหตุของโรคสแคบก่อนที่โรคจะแพร่ระบาดหรือนำมาใช้ในการตรวจสอบโรคที่อาจติดมากับท่อนพันธุ์ที่นำเข้ามาจากต่างประเทศหรือจากแหล่งปลูกที่มีการแพร่ระบาดของเชื้อ เพื่อเป็นการป้องกันการแพร่ระบาดของเชื้อเมื่อนำไปปลูกในพื้นที่ใหม่

ปี 2536 กรณีการ เพี้ยนพันธุ์และคณะ ได้ทดสอบเปรียบเทียบความสามารถของเชื้อ *S. ampelimum* จำนวน 6 ไอโซเลต จากพื้นที่ปลูกต่างๆ ในการทำให้เกิดโรคโดยทดสอบบนองุ่นพันธุ์ไวท์มะละกา พบว่าเชื้อทุกไอโซเลต สามารถทำให้เกิดโรคได้ 100 เปอร์เซ็นต์ แต่ผลการทดลอง ดังกล่าวยังไม่ชัดเจนในเรื่องความหลากหลายของเชื้อ เนื่องจากองุ่นพันธุ์ไวท์มะละกาอาจเป็นพันธุ์ที่อ่อนแอ ดังนั้นการทดลองนี้จึงทำการทดสอบ เชื้อ *S. ampelimum* บนพันธุ์องุ่นหลายสายพันธุ์ เพื่อศึกษาเปรียบเทียบความสามารถในการทำให้เกิดโรคของเชื้อแต่ละไอโซเลต และศึกษาถึงความหลากหลายของเชื้อ เพื่อทราบข้อมูลว่าเชื้อที่ระบาดอยู่ในแต่ละพื้นที่มีความแตกต่างกันหรือไม่ ข้อมูลดังกล่าวเป็นข้อมูลพื้นฐานที่สำคัญในการพัฒนาพันธุ์ต้านทานซึ่งน่าจะเป็นวิธีที่เหมาะสมที่สุดในการใช้จัดการกับโรคสแคบ

1.2 วัตถุประสงค์การวิจัย

- 1.2.1 เพื่อพัฒนาวิธีการตรวจสอบการเข้าทำลายของเชื้อ *S. ampelimum* ในองุ่นก่อนที่เชื้อจะแพร่ระบาด
- 1.2.2 เพื่อศึกษาถึงความหลากหลายของสายพันธุ์ของเชื้อ *S. ampelimum* สาเหตุโรคสแคบในประเทศไทยโดยวิธีทางเซรุ่มวิทยาและปฏิกิริยาบนพันธุ์องุ่น

1.3 สมมติฐานการวิจัย

- 1.3.1 การตรวจการเข้าทำลายของ *S. ampelimum* สามารถทำได้ก่อนที่จะปรากฏอาการของโรคหากใช้วิธีการตรวจสอบที่เหมาะสม
- 1.3.2 เชื้อ *S. ampelimum* มีความหลากหลายทางสายพันธุ์ เนื่องจากการปลูกองุ่นแพร่กระจายอยู่ในหลายภาคของประเทศ ความแตกต่างดังกล่าวสามารถตรวจสอบได้โดยใช้เทคนิคทางเซรุ่มวิทยาและปฏิกิริยาบนองุ่น

1.4 ขอบเขตการวิจัย

การวิจัยครั้งนี้มุ่งเน้นศึกษาถึงการพัฒนาวิธีการตรวจสอบการเริ่มเข้าทำลายของเชื้อสาเหตุโรคสแคบในองุ่น โดยวิธีการทางเซรุ่มวิทยา และตรวจสอบความแตกต่างทางเซรุ่มวิทยาของเชื้อ *S. ampelinum* ที่เก็บจากองุ่นในแหล่งปลูกที่สำคัญของประเทศ

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ทราบถึงข้อมูลความหลากหลายของสายพันธุ์ของเชื้อสาเหตุโรคสแคบ และสามารถนำความรู้ที่ได้มาใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานที่จะใช้ในการพัฒนาพันธุ์ต้านทาน สำหรับวิธีการตรวจสอบหากพัฒนาขึ้นได้จะสามารถนำมาใช้ช่วยการตัดสินใจ พิจารณาใช้สารเคมีทำให้ใช้ได้อย่างถูกเวลา ซึ่งน่าจะช่วยลดปัญหาการใช้สารเคมีอย่างพร่ำเพรื่อ

บทที่ 2

ปรัทัศนัวรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ความสำคัญขององุ่น

องุ่นมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Vitis vinifera* Linn. เป็นผลไม้ต่างประเทศในเขตอบอุ่น (temperate) แต่มีรายงานการปลูกในประเทศต่างๆ เกือบทั่วโลก (วันณรงค์ เหล่าประดิษฐ์, 2542) จัดอยู่ในวงศ์ Vitacea มีชื่อสกุลว่า Vitis สกุลนี้แบ่งเป็น 2 สกุลย่อย (subgenera) คือ Euvitis และ Muscadinia (นันทกร บุญเกิด, 2545) องุ่นเป็นผลไม้ที่ปลูกกันมานานเก่าแก่ที่สุดอย่างหนึ่งของโลก ถิ่นกำเนิดดั้งเดิมอยู่บริเวณเอเชียไมเนอร์ ตรงบริเวณระหว่างทะเลดำและทะเลเมดิเตอร์เรเนียน และจากแหล่งนี้องุ่นได้แพร่ขยายออกไปทั้งทางตะวันออกและตะวันตก ไปสู่ทวีปยุโรป อเมริกา และแหล่งอื่นๆ ของโลก (กลุ่มเกษตรสัญจร, ม.ม.ป.) องุ่นสามารถเจริญเติบโตได้ดีทั้งในเขตหนาว เขตอบอุ่น และเขตร้อน โดยในเขตอากาศหนาวและเขตอบอุ่น องุ่นจะมีลักษณะเป็นพืชผลัดใบ จะผลัดใบในฤดูใบไม้ร่วง พักตัวในฤดูหนาวแตกตาใบในฤดูใบไม้ผลิ และเจริญเติบโตไปจนผลแก่ในฤดูร้อน ส่วนองุ่นที่นำมาปลูกในเขตร้อนจะมีใบสีเขียวตลอดปี ไม่มีการพักตัวตามธรรมชาติ โดยทั่วไปคุณภาพขององุ่นในเขตร้อนมักจะสู้องุ่นในเขตอากาศหนาวไม่ได้ (ยงยุทธ ชำรงนิมิต, 2547) ในเขตหนาวในช่วงฤดูร้อนองุ่นจะสุกแก่พอดี ความชื้นในอากาศต่ำทำให้ต้นเติบโตได้ดี โรคแมลงไม่ค่อยรบกวน การสุกของผลเป็นไปอย่างช้าๆ การสร้างรสชาติและลักษณะเฉพาะตัวของผลเป็นไปได้อย่างเต็มที่ สัดส่วนของส่วนประกอบต่างๆ ในผลพอเหมาะทำให้คุณภาพรสชาติของผลดี ส่วนในเขตร้อนความชื้นในอากาศสูงตลอดปี ส่งผลให้ต้นองุ่นเติบโตได้รวดเร็วแต่โรคและแมลงศัตรูก็ระบาดได้รวดเร็วเช่นกัน นอกจากนี้ฝนที่ตกชุกก็ทำความเสียหายอย่างมากแก่ช่อดอก อาจทำให้ดอกร่วง ผลแตก คุณภาพและรสชาติไม่ดี พันธุ์องุ่นทั้งหมดของโลกมีไม่น้อยกว่า 8,000 ชนิด ซึ่งมีชื่อและลักษณะพันธุ์ต่างๆ กันออกไป แต่มีเพียง 20% เท่านั้นที่ปลูกกันเป็นสวนองุ่นการค้า ปัจจุบันทั่วโลกมีการปลูกองุ่นทั้งสิ้น 48,750,000 ไร่ ยุโรปมีพื้นที่ปลูกเท่ากับ 32,500,000 ไร่ ประเทศที่มีการปลูกมากได้แก่ สเปน, อิตาลี, ฝรั่งเศส ในแถบเอเชียมีพื้นที่ปลูกทั้งสิ้น 8,125,000 ไร่ ในทวีปอเมริกาผลิตได้ 4,900,000 ไร่ พื้นที่หลักที่ใช้ในการผลิตคือสหรัฐอเมริกา อาร์เจนตินาและชิลี ในทวีปแอฟริกาผลิตได้ 2,801,250 ไร่ พื้นที่ที่ปลูกมากได้แก่ประเทศแถบเมดิเตอร์เรเนียน และแอฟริกาใต้ มีผลผลิตขององุ่นรับประทานผลสดทั้งสิ้น 7.7 ล้านตัน พื้นที่หลักที่ผลิตองุ่นรับประทานผลสด ได้แก่ ประเทศอิตาลี ผลผลิต 1.5 ล้านตัน รองลงมา คือประเทศสเปน กรีซ สหรัฐอเมริกา และชิลี ตามลำดับ (CAB, 2000)

2.2 การปลูกองุ่นในประเทศไทย

สำหรับประเทศไทยไม่ปรากฏหลักฐานแน่ชัดว่านำเข้ามาในสมัยใด แต่พอจะเชื่อได้ว่าในสมัยรัชกาลที่ 5 พระองค์ท่านได้นำพันธุ์ไม้แปลกๆ จากต่างประเทศที่ได้เสด็จประพาสมาปลูกในประเทศไทย และเชื่อว่าในจำนวนพันธุ์ไม้แปลกๆ เหล่านั้นน่าจะมีพันธุ์องุ่นรวมอยู่ด้วย ต่อมาในสมัยรัชกาลที่ 7 มีหลักฐานยืนยันว่าเริ่มมีการปลูกองุ่นกันบ้างแต่ผลองุ่นที่ได้มีรสเปรี้ยว การปลูกองุ่นจึงชบเซาไป ต่อมาในปี 2493 ได้เริ่มมีการปลูกองุ่นอย่างจริงจัง โดย หลวงสมานวนกิจ ได้นำพันธุ์มาจากแคลิฟอร์เนีย และปี 2506 อาจารย์ ปวิณ ปุณณศรี และคณะ ได้นำพันธุ์มาจากยุโรป หลายสายพันธุ์ ได้แก่ พันธุ์คาร์ดินาล พันธุ์มัสแคทอัมเบิร์ก พันธุ์โกลเดนมัสแคท พันธุ์เอ็มเปอเรอ ซึ่งปลูกได้ผลเป็นที่น่าพอใจ (นันทกร บุญเกิด, 2544) นับแต่นั้นมาการปลูกองุ่นในประเทศไทยจึงแพร่หลายมากขึ้น ปัจจุบันในประเทศไทยมีการปลูกองุ่นในแถบภาคตะวันตก เช่น อำเภอดำเนินสะดวก จังหวัดราชบุรี อำเภอสามพราน อำเภอนครชัยศรี จังหวัดนครปฐม อำเภอบ้านแพ้ว จังหวัดสมุทรสาคร ซึ่งสามารถให้ผลผลิตได้ดี แต่เกษตรกรบางรายได้เปลี่ยนจากองุ่นเป็นพืชอื่น เนื่องจากมีโรคแมลงระบาดมาก และแมลงคือยาไม่สามารถกำจัดได้ ทำให้พื้นที่ปลูกองุ่นในแถบนี้ลดลง พื้นที่ปลูกองุ่นได้ขยายไปในแถบภาคกลาง ภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ถึงแม้ว่าราคาจะเป็นแรงจูงใจ แต่ปัญหาเรื่องโรคแมลงระบาดมากทำให้พื้นที่ปลูกองุ่นไม่ค่อยขยายเท่าที่ควร

2.3 โรคสแคบขององุ่น

โรคขององุ่นซึ่งเกิดจากเชื้อ *Sphaceloma ampelinum* เดิมทีถูกเรียกว่า charbon ในประเทศฝรั่งเศสซึ่งเป็นคำที่ใช้เรียก smut ของธัญพืชด้วย ทำให้เกิดความสับสน ปี ค.ศ. 1853 Fabre และ Dunal จึงเสนอให้เรียกชื่อโรคว่าโรคแอนแทรคโนส (Jenkins, 1933 อ้างถึงใน กานต์ คำทรัพย์, 2546) แต่เนื่องจากโรคแอนแทรคโนสนิยมใช้เรียกชื่อโรคที่เกิดจากเชื้อ *Collectotrichum* ขณะที่สแคบนิยมใช้กับโรคที่เกิดจากเชื้อ *Sphaceloma* กรรณิการ์ เพ็ญพักตร์และคณะ จึงเสนอให้เรียกชื่อโรคที่เกิดในประเทศไทยว่าโรคสแคบ

2.3.1 เชื้อรา *Sphaceloma ampelinum*

เชื้อ *S. ampelinum* สามารถจัดจำแนกตามอนุกรมวิธาน ได้ดังนี้ (ไพโรจน์ จ้วงพานิช, 2525)

Division Eumycota

Class Deuteromycetes

Order Melanconiales

Family Melanconiaceae

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ พบว่า ขยายพันธุ์แบบไม่ใช้เพศ เรียกว่า conidia ซึ่งเกิดบนก้านที่เรียกว่า conidiophore เกิดใน acervulus สามารถสร้าง conidia ได้อย่างรวดเร็วและมีจำนวนมากโดยเฉพาะอย่างยิ่งถ้าสภาพแวดล้อมต่าง ๆ เหมาะสม เช่น อุณหภูมิ ความชื้น แสงอาหารและความเป็นกรดเป็นด่าง (pH) ของอาหาร (ประสาทพร สมิตะมาน, 2534) มี perfect state ในชื่อ *Elsinoe ampelina* จัดอยู่ใน Class Ascomycetes Order Myriangiales สร้างสปอร์ขยายพันธุ์แบบใช้เพศ เรียกว่า ascospore จำนวน 8 สปอร์ แต่ละสปอร์มี 4 เซลล์ มีขนาดตั้งแต่ 29-35 x 4.5-7 ไมโครเมตร เกิดใน ถุงหุ้ม(ascus) ascospore สามารถงอกได้ที่อุณหภูมิ 2-32 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นจะเข้าทำลายเนื้อเยื่อและพัฒนาเป็นแผลบนใบองุ่น ในปี 1874 De Bary ได้ศึกษารายละเอียดและรายงานถึงเชื้อนี้ครั้งแรกโดยใช้ชื่อ *S. ampelinum* ได้สร้างความเสียหายแก่องุ่นอย่างรุนแรงในประเทศสหรัฐอเมริกาตะวันออกและยุโรป ต่อมาจึงมีผู้สนใจศึกษาเกี่ยวกับโรคนี้เป็นจำนวนมากและรายงานชื่อเชื้อสาเหตุไว้หลายชื่อ ได้แก่ *Torula meyeri*, *Ramularia meyeri*, *Ramularia ampelophaga* ในปี ค.ศ.1900 Raciborski รายงานว่าเชื้อ *E. viticola* เป็นสาเหตุของโรคชนิดหนึ่งในองุ่นซึ่งมีสปอร์คล้าย *E. ampelina* ต่อมา Jenkins (1925) และ Horsfall (1929) รายงานว่า เชื้อ *E. viticola* เป็น synonym ของเชื้อ *E. ampelinum*

เชื้อ *S. ampelinum* ตรวจพบครั้งแรกในประเทศไทย ในปี พ.ศ. 2506 ที่ อำเภอบางช่อง จังหวัดนครราชสีมา (กรรณิการ์ เพ็ญพัตร์และคณะ, 2545) ในประเทศไทย พบเชื้อ *S. ampelinum* ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคสร้างเฉพาะ conidial state อย่างเดียว ในขณะที่ต่างประเทศ ได้มีรายงานการพบ perfect state บนองุ่น (กรรณิการ์ เพ็ญพัตร์และคณะ, 2536)

Viala และ Pacottet (1904) อ้างถึงใน กานต์ คำทรัพย์ (2546) รายงานว่า *S. ampelinum* มีการแสดง reproductive stage ได้มากกว่า 1 ระยะ (polymorphic) คือมี conidial stages 2-3 ระยะ โดยมีระยะที่เรียกว่า yeast form ซึ่งในระยะนี้จะมี giant cell resting spore และระยะที่เรียกว่า monosporous และ polysporous cysts เป็นระยะที่สร้าง conidioma และ spermatogonia สามารถเปลี่ยนไปเป็น ascospore stage ได้

Jenkins และ Giltner (1935) อ้างถึงใน กานต์ คำทรัพย์ (2546) ได้กล่าวถึงการเลี้ยงเชื้อ *E. ampelina* ในอาหาร PDA และ beef agar พบว่า เชื้อจะไม่สร้าง conidia บนอาหารเลี้ยงเชื้อจะมีแต่การเจริญทางเส้นใยแต่เมื่อย้ายเชื้อไปเลี้ยงในสภาพบรรยากาศที่มีความชื้นพบว่าเชื้อมีการสร้าง conidium เกิดขึ้น ในรายงานยังได้กล่าวถึงอาหารที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อ *E. ampelina* คือ PDA, glycerin และ Sabouraud's maltose agar และยังรายงานว่าการเลี้ยงเชื้อ *E. ampelina* มีอัตราการเจริญช้ามากบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

2.3.2 อาการของโรคสแคบ

เชื้อสามารถเข้าทำลายของงุ่นที่อยู่เหนือพื้นดินได้ทุกส่วน โดยเฉพาะส่วนที่เป็นเนื้อเยื่อเจริญ (meristematic tissue) เช่น ใบ, ก้านใบ, มือจับ, ยอดอ่อน, และผลอ่อน อาการบนใบหรือส่วนยอดมักจะเห็นเป็นจุดน้ำ สีนํ้าตาลอ่อน หรือเทา มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1-5 มิลลิเมตร ลักษณะกลม ต่อมาจุดเหล่านั้นจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล จุดแผลดังกล่าวเมื่อใบขยายใหญ่ขึ้นจะขาดเป็นรูพรุน (shot-hole) ถ้าสภาพแวดล้อมเหมาะสมแผลจะขยายโตขึ้น และรวมกันจนเนื้อเยื่อใบขาดตัวใบม้วนงอลงด้านล่างหรือบิดงอ การทำลายบนผลมักจะเกิดในช่วงผลอ่อนอายุผลไม้ไม่เกิน 60-70 วัน จะเห็นเป็นแผลสีน้ำตาลค่อนข้างกลมแผลจะมองดูแห้งแข็งและยุบตัวลงไปเล็กน้อยและมักไม่ขยายขนาดมากนัก (เตือนใจ กาหลงและคณะ, 2545) แผลมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางเฉลี่ย 1/4 นิ้ว บริเวณกลางแผลมีสีขาวเทา ส่วนบริเวณรอบ ๆ แผลจะมีสีน้ำตาลแดงหรือดำ เมื่อแผลพัฒนาเต็มที่เชื้อจะสร้าง acervulus บนแผล และเมื่อมีสภาพอากาศที่เหมาะสมโคนิเดียของเชื้อจะถูกปล่อยจาก acervulus และเข้าทำลายส่วนอื่น ๆ ต่อไป

อาการบนกิ่ง เถาหรือมือจับ เริ่มจากเชื้อเข้าทำลายบริเวณยอดอ่อนลงมา บริเวณที่ถูกทำลายจะเกิดอาการบิดงอและมีแผลตะปุ่มตะป่ำ การทำลายที่ยอดและเถาทำให้เกิดเป็นสะเก็ดสีดำ และพบจุดแผลสีน้ำตาลดำที่มีลักษณะยุบตัวลงไปและแผลมีขอบนูน ใบมักจะหงิกงอและบิดเบี้ยวไป การเข้าทำลายที่ก้านช่อดอกจะทำให้ช่อดอกบิดเบี้ยว และแกระแกร็น ช่อดอกจะอ่อนแอต่อเชื้อในช่วงก่อนดอกบาน

เมื่อเปรียบเทียบกับอาการของแอนแทรคโนส พบว่า โรคแอนแทรคโนสชอบเข้าทำลายผลระยะใกล้แก่ที่ผลเริ่มนิ่มโดยเกิดเป็นจุดช้ำน้ำสีน้ำตาลอ่อนต่อมาขยายขึ้นเป็นแผลขนาดใหญ่มี 2 ลักษณะคือ เป็นจุดสีน้ำตาลอ่อนรูปร่างกลมหรือรี ไม่มีขอบแผลที่ชัดเจน ตรงบริเวณกลางแผลจะพบเม็ดสีดำเรียงรายอยู่ภายในบริเวณแผลนํ้า อีกลักษณะหนึ่งเป็นแผลสีน้ำตาลดำยุบตัวลงตรงกลาง แผลมีลักษณะเป็นวงซ้อนกัน และพบเม็ดเล็ก ๆ สีดำขึ้นเรียงรายโดยบางครั้งจะพบลักษณะคล้ายผงหรือเมือกสีส้มซึ่งเป็นส่วนขยายพันธุ์ของเชื้อราอยู่ในบริเวณแผลนั้น (เตือนใจ กาหลง และคณะ, 2545)

2.3.3 การแพร่ระบาดและวงจรการเกิดโรค

เชื้อจะอยู่ข้ามฤดูในเศษซากของงุ่นที่เคยเป็นโรค เมื่อสภาพแวดล้อมเหมาะสม เชื้อจะสร้าง inoculum ขึ้นใหม่ในรูปของโคนิเดีย ซึ่งเป็น primary inoculum โคนิเดียจะแพร่กระจายโดยลมและละอองน้ำฝน เมื่อมีความชื้นสูงเชื้อจะงอก germ tube เข้าทำลายพืชไปเจริญอยู่ในเซลล์ เข้าทำลายส่วนต่าง ๆ ของงุ่น โคนิเดียจะงอกเมื่อได้รับความชื้นเป็นเวลานาน 4-7 ชั่วโมง และมีความชื้นสัมพัทธ์ 100 เปอร์เซ็นต์ ปัจจัยที่มีอิทธิพลอย่างมากต่อการงอกของโคนิเดียคือระยะเวลาที่ใบพืชเปียก อาการของโรคจะเริ่มปรากฏภายใน 3-8 วัน หลังจากปลูกเชื้อลง

บนพืชแล้วนำไปเก็บไว้ในที่ชื้นอุณหภูมิ 12 ± 1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และเก็บในที่แห้งที่อุณหภูมิ 12 ± 1 องศาเซลเซียส นาน 17 วัน โคนิเดียจะปรากฏบนใบใหม่ภายใน 12-14 วัน หลังจากการเข้าทำลาย (Brook, 1973) สปอร์จะงอกบนผิวใบอ่อนหลังจากบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง และจะงอกสูงสุดหลังจากปลูกเชื้อ 24 ชั่วโมง การงอกของสปอร์ พบว่าสปอร์มากกว่า 95 เปอร์เซ็นต์ จะงอกที่บริเวณท้องใบเนื่องจากมีปากใบมาก ส่วนโครงสร้างที่เป็น appressoria จะเกิดขึ้นเมื่อ germ tube แทงเข้าไปในปากใบ (Naik, Sastry, and Lingaraju, 1987)

ประเทศที่พบว่าการแพร่ระบาดของโรค คือ ประเทศจีน, สหรัฐอเมริกา, ฟิลิปปินส์, อินเดีย, นิวซีแลนด์, ออสเตรเลีย และแอฟริกาใต้ เชื้อ *S. ampelinum* ในอาหารเลี้ยงเชื้อสามารถเจริญเติบโตได้สูงสุดที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส และหยุดการเจริญที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ช่วงเวลาใบเปื่อยที่เหมาะสมที่เชื้อสามารถเข้าทำลายได้ คือ 7-10 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 12 องศาเซลเซียส หรือ 3 - 4 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 21 องศาเซลเซียส (Mortensen, 1981) เชื้อจะผลิตโคนิเดียภายใน 14 วันหลังจากปลูกเชื้อ ที่อุณหภูมิ 12 องศาเซลเซียส หรือ 5 วัน หลังปลูกเชื้อที่อุณหภูมิ 21 องศาเซลเซียส สปอร์สามารถปลิวไปตามลมและฝนได้ไกลถึง 7 เมตรจากแหล่งกำเนิด (Brook, 1973) ในอินเดียพบว่า อุณหภูมิต่ำสุดที่เชื้อยังสามารถเจริญได้ คือ ที่อุณหภูมิ 5-18 องศาเซลเซียส เชื้อสามารถเจริญและสร้าง สปอร์สูงสุดที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส (Mathur and Gupta, 1975)

ในประเทศนิวซีแลนด์ ฝรั่งจะเริ่มแตกตาในเดือนกันยายน และจะเริ่มเกิดช่อดอกในช่วงปลายเดือนพฤศจิกายนถึงต้นเดือนธันวาคม ฝรั่งสามารถเก็บเกี่ยวได้ในเดือนมีนาคมในปีถัดไป primary infection ที่เกิดจากโคนิเดียบนฝรั่งจะเกิดในช่วงปลายเดือนกันยายนถึงต้นเดือนตุลาคมประมาณ 4 สัปดาห์หลังจากแตกตาคือช่วงที่กิ่งฝรั่งมีใบประมาณ 5 ใบ เชื้อจะพักตัวอยู่ในชั้น epidermis เมื่อถึงช่วงฤดูฝนก็จะเกิดการแพร่ระบาดทันที (Brook, 1992)

ในประเทศอินเดีย ฝรั่งเริ่มแตกตาในช่วงปลายเดือนกุมภาพันธ์ ช่อดอกเกิดช่วงปลายเดือนมีนาคมถึงเมษายน ฝรั่งสามารถเก็บเกี่ยวได้ประมาณสัปดาห์แรกของเดือนกรกฎาคม โรคจะเริ่มระบาดโดยเริ่มปรากฏอาการของโรคในเดือนมีนาคมและจะระบาดจนถึงเดือนเมษายน และจะลดการระบาดลงในเดือนพฤษภาคมถึงมิถุนายน แต่โรคจะกลับมาระบาดรุนแรงอีกครั้งในเดือนกรกฎาคมถึงสิงหาคมเนื่องจากเป็นช่วงของมรสุมและจะระบาดจนถึงเดือนกันยายน โรคจะระบาดรุนแรงที่สุดในเดือนกันยายน ระบาดน้อยที่สุดในเดือนพฤษภาคม ช่วงที่โรคระบาดรุนแรงจะมีการระบาดรุนแรงสองช่วง คือ ตั้งแต่เดือนมีนาคมถึงเดือนเมษายน และเดือนสิงหาคมถึงเดือนกันยายน การระบาดของโรคจะมีความสัมพันธ์กับปริมาณน้ำฝนและอุณหภูมิ (อุณหภูมิสูงสุด 28-30 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิต่ำสุด 15-25 องศาเซลเซียส) (Thind et al., 1992 อ้างถึงใน CAB, 2000)

2.3.4 การควบคุมโรค

2.3.4.1 การควบคุมโรคโดยวิธีเขตกรรม

ในแหล่งปลูกที่มีการระบาดของโรคหลักเนื่องจากการตัดแต่งกิ่งในให้ออกดอกติดผลในช่วงที่มีฝนตกชุก ส่วนของพืชที่เป็นโรค เมื่อตัดออกต้องนำไปทำลายนอกแปลงปลูก หรือใช้ nitrate of soda , ปูนขาว หรือปุ๋ยโพแทสเซียม ใส่ให้ดินอุ่นหลังจากถอนแตกตาได้ ประมาณ 3 สัปดาห์เพื่อกระตุ้นให้กิ่งอ่อนเจริญเติบโตได้ดี (Ravaz, 1927) นอกจากนั้นสามารถควบคุมโรคได้ โดยการเก็บเกี่ยวผลผลิตให้เร็วขึ้นเพื่อหลีกเลี่ยงช่วงที่โรคระบาดรุนแรง (Lyon and Walters, 1941)

Suhag และ Daulata (1981) รายงานว่า การทำค้ำแบบ head-trained จะพบว่าโรคเข้าทำลายในกิ่งพันธุ์ Delight, Khalili และ Anab-e-Shahi ได้น้อย และค้ำในระบบ Arbour จะมีการเข้าทำลายของเชื้อน้อยที่สุด

Todorava (1980) พบว่า การคัดเลือกกิ่งพันธุ์อ่อนที่ดีจากโรงเรือนหรือในพื้นที่ที่ปลอดโรคจะช่วยลดโอกาสการเกิดโรคในพื้นที่ใหม่

2.3.4.2 การใช้พันธุ์ต้านทาน

การใช้พันธุ์ต้านทานมีประสิทธิภาพมากในการควบคุมโรคสแคบ แต่พันธุ์ต้านทานจะกลายเป็นพันธุ์อ่อนแอภายใน 2-3 ปี ขึ้นกับความรุนแรงของสายพันธุ์เชื้อ และยีนต้านทานของพืช พันธุ์ต้านทานที่ใช้ปลูก เช่น Himrod, Schuyler-white, Beauty seedless, Naibal, Muscat, Isabella และ Golden Muscat (Prasad and Nirvan, 1965) ในพันธุ์องุ่นไร้เมล็ดจะมีความอ่อนแอต่อโรคมากกว่าพันธุ์ที่มีเมล็ด (Suhag, Grover, and Kaushik, 1982)

Bedi, Jhooty, and Cheema (1986) พบว่าในการคัดเลือกพันธุ์ต้านทานทั้งหมด 35 พันธุ์ พบว่า องุ่นพันธุ์ Himrod มีความต้านทานสูงที่สุด

2.3.4.3 การควบคุมโรคโดยชีววิธี

การควบคุมโดยวิธีชีววิธี การใช้เชื้อจุลินทรีย์ปรปักษ์ Chen and Shao (1991) รายงานว่า เชื้อ *Brevibacterium* strain M สามารถยับยั้ง เชื้อ *E. ampelina* ได้

2.3.4.4 การควบคุมโรคโดยใช้สารเคมีและสารสกัดจากพืช

การป้องกันกำจัดโดยใช้สารเคมีในสภาพที่มีการระบาดของโรครุนแรง สารเคมีที่ใช้ในการป้องกันกำจัดโรคที่อาจจะนำมาพิจารณาในการเลือกใช้ตามความเหมาะสมก็คือ ประเภทไม่ดูดซึม เช่น โพรพิเนบ แมนโคเซบ ประเภทดูดซึม เช่น อะซ็อกซิสโตรบิน เบโนมิล คาร์เบนดาซิม โพรคลอราซ สารกลุ่มไตรอะโซล เช่น ไดฟิโนโคนาโซล เป็นต้น (ยงยุทธ ขำรงนิมิต, 2547)

กานต์ คำทรัพย์ (2546) ได้ศึกษาประสิทธิภาพของสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อราจำนวน 8 ชนิดในห้องปฏิบัติการ พบว่า คาร์เบนดาซิมและแคพแทนเป็นสารที่มีประสิทธิภาพดีที่สุดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ และสารคอปเปอร์เป็นสารที่มีประสิทธิภาพดีที่สุดในการยับยั้งการเจริญของโคโคนีของเชื้อ

กานต์ คำทรัพย์ (2546) ได้ศึกษาผลของสารสกัดจากพืชสมุนไพรในการยับยั้งการเจริญของเชื้อพบว่า สารสกัดจากผลมะตูมและสารสกัดผลแก่จากยอบ้านที่มีประสิทธิภาพดีที่สุดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ

2.3.4.5 การใช้ระบบพยากรณ์ล่วงหน้า

การใช้ระบบพยากรณ์ล่วงหน้า ในปี 1997 Thind, Monga, Kaur, Arora, and Kumar ได้มีการคิดค้นสมการ Multiple linear regression model เพื่อใช้ในการทำนายการแพร่ระบาดล่วงหน้า โดยต้องสอดคล้องกับข้อมูลทางอุตุนิยวิทยา ซึ่งมีสมการดังนี้

$$Y = -225.10 + 2.62 (\text{temp.}) + 3.35 (\text{RH}) - 0.9(\text{rainfall}) R^2 = 0.94$$

สมการนี้ต้องใช้ค่าเฉลี่ยของอุณหภูมิในแต่ละวัน ความชื้นสัมพัทธ์และปริมาณน้ำฝนประจำเดือน ถ้าค่าที่คำนวณได้มีค่ามากกว่า 94% แสดงว่ามีโอกาสที่โรคจะระบาดต้องทำการป้องกันกำจัดทันที

การป้องกันกำจัดโรคที่เกิดจากเชื้อ *E. ampelina* นั้นเพื่อให้การป้องกันกำจัดได้ผลและมีประสิทธิภาพควรใช้วิธีการป้องกันกำจัดแบบผสมผสานโดยใช้สารเคมีป้องกันกำจัดชนิดดูดซึมและชนิดป้องกันกำจัด ร่วมกับการเขตกรรมและใช้พันธุ์ต้านทาน

2.3.5 ความเสียหายที่เกิดจากการเข้าทำลายของเชื้อ

โรคนี้สร้างความเสียหายให้กับผู้ปลูกองุ่นเป็นอย่างมาก เนื่องจากทำให้คุณภาพขององุ่นลดลงโดยผลองุ่นที่ถูกทำลายจะหดรัดและหลุดร่วงจากกิ่ง (Brook, 1992) ในองุ่นพันธุ์ Perlette พบว่า น้ำหนักผลลดลง 69.96% ขนาดของผลและความยาวของผลลดลงคิดเป็น 34.55% ความกว้างของผลลดลง 41.8% เปอร์เซ็นต์ของน้ำองุ่นลดลง 28.99% TSS ลดลง 48.10% และปริมาณน้ำตาลในผลลดลง 54.24% ในขณะที่ความเป็นกรดในผลเพิ่มขึ้น 120.96% และเปอร์เซ็นต์เนื้อองุ่นเพิ่มขึ้น 29.74% เมื่อเปรียบเทียบกับองุ่นปกติ (Thind, Monga, and Kaur, 1998) การผลิตองุ่นในประเทศอินเดีย พบว่า ผลผลิตองุ่นทั้งประเทศลดลง 10-50% (Bedi, Singh, and Suryanaryana, 1969) ในประเทศออสเตรเลีย พบว่าเชื้อทำให้ผลผลิตลดลง 5 ส่วนต่อเอเคอร์ หลังการเก็บเกี่ยวผลผลิต (Lyon and Walters, 1941)

2.3.6 การแยกเชื้อสาเหตุโรค

การเก็บตัวอย่างพืชเป็นโรคสดแบบ (กรณีการ เพาะพันธุ์ และคณะ, 2544) ควร

คำนึงถึงขั้นตอนต่อไปนี้ แหล่งที่เก็บตัวอย่างควรปลอดสารป้องกันกำจัดเชื้อราอย่างน้อย 3-5 วัน เลือกรับเฉพาะส่วนของพืชที่แสดงอาการของโรคชัดเจน ปราศจากอาการร่วมอื่น ๆ ห่อตัวอย่างโรคด้วยกระดาษที่สามารถซับความชื้นได้แล้วใส่ถุงกระดาษ พับปากถุงควรเปลี่ยนกระดาษห่อใหม่ เมื่อถึงที่พักแล้วและควรเก็บในที่เย็นแห้งเมื่อยังไม่ได้แยกเชื้อทันที ตัวอย่างที่ดีสำหรับการแยกให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ ควรอยู่ในสภาพสด และเก็บไม่เกิน 2 วัน ปราศจากเชื้อปนเปื้อนอื่นๆ จดบันทึกสถานที่ วัน เดือน ปี ที่เก็บตัวอย่าง และลักษณะอาการของพืชที่เป็นโรค

การแยกเชื้อราสาเหตุโดยเทคนิคการชักนำให้เชื้อราปล่อยสปอร์ออกจาก acervulus ในน้ำกลั่นมีวิธีการตามลำดับขั้นตอน ดังนี้

2.3.6.1 แยกเชื้อจากส่วนของพืชที่เป็นโรคส่วนใดส่วนหนึ่งโดยเฉพาะไม่ปนกัน เริ่มจากการทำความสะอาดผิวด้วยน้ำกลั่นหนึ่งมาเชื้อ จากนั้นใช้ใบมีดผ่าตัดเฉือนบริเวณที่เป็นโรคเป็นชิ้นเล็กๆ ขนาดประมาณ 2 x 2 มิลลิเมตร ล้างด้วยน้ำกลั่นที่หนึ่งมาเชื้อ จากนั้นวางบนกระดาษกรองที่เตรียมไว้ใน plate เพื่อซับน้ำส่วนเกินจากชิ้นส่วนของพืช

2.3.6.2 วางแผ่นสไลด์บนวงแหวนหรือแท่งแก้ว V-shape ใน plate ที่อบฆ่าเชื้อแล้ว ใช้ pasteur pipette ดูดน้ำกลั่นที่หนึ่งมาเชื้อหยดบนแผ่นสไลด์ 2 จุด ห่างกันพอสมควร จุดละ 2-3 หยด และใส่น้ำกลั่นหนึ่งมาเชื้อใน plate เล็กน้อย นำชิ้นพืชที่เตรียมไว้ในข้อ 1 ใส่ในหยดน้ำบนสไลด์ 3-4 ชิ้น ปิดฝา plate เก็บไว้ในที่อุณหภูมิห้อง ตรวจสอบสปอร์ได้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายสูง ทุก 2-3 ชั่วโมง เมื่อปรากฏกลุ่มของสปอร์จึงใช้ปากคีบ (forcep) หยิบชิ้นพืชออก

2.3.6.3 จากการตรวจดูได้กล้องในข้อ 2.3.6.2 สามารถบอกได้ว่าเชื้อราที่ได้เป็นเชื้อราสาเหตุและไม่มีเชื้ออื่นปนเปื้อน จึงแยกเชื้อให้บริสุทธิ์โดยใช้ loop และหยดน้ำกลั่นที่มีสปอร์บนแผ่น สไลด์ใส่ใน vial บรรจุน้ำกลั่นหนึ่งมาเชื้อ 0.5 มิลลิลิตร ใช้ loop และน้ำจากหลอดที่หนึ่งถ่ายไปหลอดที่ 2 และต่อ ๆ ไป (serial dilution method) และตรวจปริมาณสปอร์ไปด้วยทุกระยะ จนแน่ใจว่าได้จำนวนสปอร์ที่มีความหนาแน่นที่จะแยกสปอร์เดี่ยว (single spore isolation) ได้เหมาะสม จึงเพิ่มจำนวนหลอดที่บรรจุ spore suspension ที่ความหนาแน่นของสปอร์ ณ จุดนั้น ค่อย ๆ เท spore suspension จากแต่ละหลอดลงบนอาหาร WA (water agar) ที่เตรียมไว้ ปิดฝาเอียง plate ไปมาเพื่อให้ spore suspension กระจายบนผิวอาหารบาง ๆ อย่างสม่ำเสมอ บ่ม plate อาหาร WA ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส ตรวจดูความเปลี่ยนแปลงได้กล้องจุลทรรศน์เมื่อสปอร์งอกจึงย้ายลงอาหาร PDA (potato dextrose agar) ในหลอดแก้ว เก็บในตู้ 28 องศาเซลเซียส และเก็บเป็น culture collection ต่อไป

2.4 การใช้เทคนิคทางด้านเซรุ่มวิทยาในการตรวจการเข้าทำลายของเชื้อโรคพืช

เทคนิคทางเซรุ่มวิทยาเป็นวิธีการทดสอบที่อาศัยการทำปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจน (antigen, Ag) และแอนติบอดี (antibody, Ab) โดยการตรวจหาแอนติเจนจะต้องใส่แอนติบอดีที่ทราบชนิด

ลงไปในห้องทดสอบและในการตรวจหาแอนติบอดีจะต้องใส่แอนติเจนที่ทราบลงไป ผลที่เกิดขึ้นบางกรณีสามารถมองเห็นได้ เช่น มีตะกอนหรือมีการเกาะกลุ่มของแอนติเจนที่เป็นเซลล์ แต่บางกรณีต้องติดฉลากแอนติเจนหรือแอนติบอดีด้วยสารบางชนิดเสียก่อน จึงจะทราบได้ว่ามีปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีเกิดขึ้น ดังนั้นจึงสามารถแบ่งการทดสอบสำหรับการตรวจหาแอนติเจนและแอนติบอดีออกตามลักษณะของปฏิกิริยาที่ใช้ในการทดสอบ ได้แก่

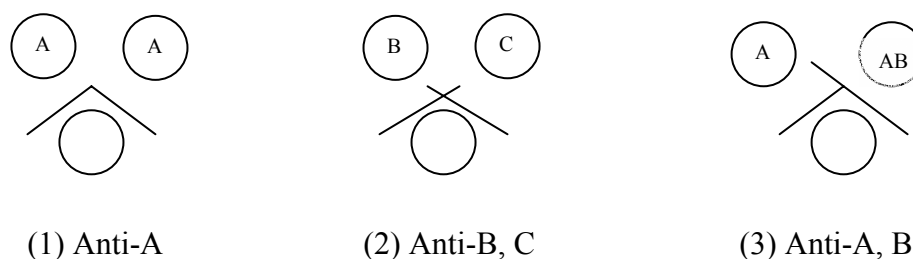
2.4.1 การทดสอบที่ใช้ปฏิกิริยาการตกตะกอน (Precipitation)

แอนติเจนที่เป็นโปรตีนละลายน้ำได้ (soluble protein) เมื่อทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีจำเพาะในอัตราส่วนที่พอเหมาะระหว่างปริมาณของแอนติเจนและแอนติบอดีจะเกิดเป็น Ag-Ab complex เกาะเกี่ยวกันเป็นตะกอนขุ่นขาว (precipitate) ซึ่งมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า การตรวจทางห้องปฏิบัติการนิยมใช้แอนติเจนและแอนติบอดีทำปฏิกิริยาในเนื้อวุ้นเนื่องจากตะกอนจะอยู่ได้คงทนกว่าทำให้อ่านผลได้ง่าย ปฏิกิริยาการตกตะกอนได้ถูกนำมาใช้ในห้องปฏิบัติการอย่างกว้างขวางโดยวิธีการทำที่แตกต่างกัน (สุรวิทย์ รอดทอง และคณะ, 2539)

ปฏิกิริยาการตกตะกอนในตัวกลางที่เป็นของเหลว (precipitation in liquid media) การทดสอบนี้แอนติเจนในสารละลายจะทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีใน capillary tube โดยแอนติเจนและแอนติบอดีจะซึมเข้าหากันถึงจุดที่มีสัดส่วนพอเหมาะก็เกิดการรวมตัวตกตะกอน (สุรนนท์ ตีระวัฒนพงษ์ และอรทัย กังวาลศิริธาดา, 2539)

ปฏิกิริยาการตกตะกอนในตัวกลางที่เป็นวุ้น (gel diffusion หรือ precipitation in semisolid media) หลักการคือ ให้แอนติเจนและแอนติบอดีซึมผ่านตัวกลางที่เป็นวุ้นเข้าหากันจนถึงบริเวณที่มีสัดส่วนพอเหมาะต่อกัน แอนติเจนและแอนติบอดีจะทำปฏิกิริยารวมตัวกันเห็นเป็นเส้นตะกอนสีขาวขุ่น เส้นตะกอนแต่ละเส้นแสดงถึงปฏิกิริยาจำเพาะระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีแต่ละคู่ วิธีนี้สามารถใช้ในการตรวจหาชนิดของแอนติเจนและแอนติบอดีต่าง ๆ ได้

หลักการของ gel diffusion ได้ถูกประยุกต์มาใช้ในรูปแบบต่าง ๆ ที่สำคัญได้แก่ Ouchterlony's double diffusion วิธีนี้วุ้นจะอยู่บนแผ่นกระจก เจาะหลุมบนเนื้อวุ้นให้ห่างกันพอสมควร ใส่แอนติเจนและแอนติบอดีลงในหลุมที่เจาะไว้ แอนติเจนและแอนติบอดีจะกระจายออกรอบ ๆ หลุมในทุกทิศทาง ส่วนของแอนติเจนและแอนติบอดีที่ซึมมาพบกัน จะทำปฏิกิริยารวมตัวกันเห็นเป็นเส้นตะกอนสีขาว ณ จุดที่แอนติเจนและแอนติบอดีมีสัดส่วนที่พอเหมาะกัน วิธีของ Ouchterlony นี้มีประโยชน์มากในการศึกษาเปรียบเทียบความเหมือนหรือต่างกันของสาร โดยอาศัยการพิจารณาจากลักษณะของเส้นตะกอนที่เกิดขึ้น ตามแสดงในรูปที่ 2.1



รูปที่ 2.1 แสดงปฏิกิริยา (1) Identity, (2) Non-identity และ (3) Partial identity ในการตรวจสอบปฏิกิริยาเซรุ่มวิทยาด้วยวิธี gel diffusion

Reaction of identity ถ้าแอนติเจนในหลุมที่อยู่ติดกันเป็นแอนติเจนชนิดเดียวกัน เส้นตะกอนที่เกิดขึ้นระหว่างแอนติบอดีและแอนติเจนในหลุมทั้งสองจะโค้งมาพบกันและต่อกันเรียบสนิทเป็นเส้นโค้งเดียวกัน รูป (1) ในรูปที่ 2.1

Reaction of non-identity ถ้าแอนติเจนในหลุมที่อยู่ติดกันเป็นแอนติเจนต่างชนิดกัน เส้นตะกอนที่เกิดขึ้นระหว่างแอนติบอดีและแอนติเจนในแต่ละหลุมจะไม่มีความสัมพันธ์กัน เห็นเป็นเส้นตะกอนตัดกัน รูป (2) ในรูปที่ 2.1

Reaction of partial identity ถ้าแอนติเจนในหลุมที่อยู่ติดกันมีบางส่วนที่เหมือนกัน เส้นตะกอนที่เกิดขึ้นจะมีบางส่วนโค้งเข้าหากัน รูป (3) ในรูปที่ 2.1 ซึ่งแสดงถึงส่วนที่เหมือนกันของแอนติเจนทั้งสอง และมีส่วนหนึ่งยาวออกไปจากรอยโค้ง ส่วนที่ยื่นยาวออกไปนี้เรียกว่า spur เป็นเส้นตะกอนที่เกิดจากปฏิกิริยาระหว่าง Anti-B และสาร B

วิธีนี้เป็นวิธีที่นำมาทดสอบกับงานด้านโรคพืชมากที่สุด นอกจากจะใช้ศึกษาเชื้อไวรัส (Smith and Stewart, 1978) และแบคทีเรียสาเหตุโรคพืช (Schaad, 1979) ยังสามารถนำมาใช้ในการศึกษาหาความสัมพันธ์ของเชื้อราหลายชนิด เช่น การจำแนกเชื้อ *Fusarium* spp. เพื่อศึกษาเปรียบเทียบความสัมพันธ์ของเชื้อในระดับชนิด (species) และระดับย่อยลงกว่าชนิด (formae speciales) (เฉลิมศักดิ์ อังตระกูล, 2534)

2.4.2 การตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์เรืองแสง (Immunofluorescence microscopy)

การตรวจเชื้อโดยวิธีนี้เป็นการประยุกต์ใช้หลักการทางเซรุ่มวิทยาเข้ามาร่วมกับวิธีการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์เรืองแสง เพื่อให้สามารถสังเกตการปรากฏของเชื้อในตัวอย่างเนื้อเยื่อชัดเจนขึ้น และในขณะเดียวกันก็สามารถบ่งชี้ถึงชนิดหรือประเภทของเชื้อได้ตามระดับความเฉพาะเจาะจงของชนิดแอนติบอดีที่นำมาใช้ เพราะถึงแม้วิธีการย้อมสีเนื้อเยื่อเชื้อด้วยสารเรืองแสงแล้วตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์เรืองแสง จะเป็นวิธีที่สะดวกและรวดเร็ว แต่ก็เป็น การตรวจทั่วไปเพื่อการเห็นสภาพการมีเชื้อสาเหตุของโรคในเนื้อเยื่อพืชเท่านั้น สำหรับการตรวจเชื้อโดยวิธี immunofluorescence microscopy ให้สามารถแสดงผลการปรากฏของเชื้อในเนื้อเยื่อตลอดจน

ความเฉพาะเจาะจงและความเชื่อมั่นในระดับที่ต้องการนั้น ขึ้นอยู่กับวิธีการเตรียมตัวอย่างเนื้อเยื่อที่นำมาตรวจสอบ รวมทั้งชนิดแอนติบอดี สารเคมีคุณภาพของอุปกรณ์หรือเครื่องมือ ตลอดจนความรอบคอบในการแปลผล รวมทั้งประสบการณ์และความชำนาญของผู้ตรวจสอบที่ต้องมีความรู้อย่างเพียงพอต่อการแยกแยะความเหมือนหรือความแตกต่างของสิ่งต่าง ๆ ที่ปรากฏในภาพสะท้อนจากกล้องจุลทรรศน์ ตัวอย่างในการใช้เทคนิค immunofluorescence คือการตรวจสอบการปนเปื้อนของเชื้อ *Xanthomonas campestris* ในเมล็ดถั่ว (Schaad, 1978) พบว่า สามารถตรวจสอบได้ถึงระดับ 0.01% คือมีเมล็ดปนเปื้อน 1 เมล็ดใน 9,999 เมล็ดดี ในปี 1979 MacDonald และ Duniwa ศึกษาการอยู่รอดของ zoospore ของเชื้อ *Phytophthora megaspema* และ *P. cinnamomi* ในดินโดยตรวจดูการงอกของ zoospore cyst บนอาหารจำเพาะโดยใช้ fluorescent antibody ในปี 1994 Jesus และ Schots ทำการตรวจสอบโคนิเดียของเชื้อ *Botrytis cinerea* ในไม้ตัดดอก เช่น เยอบีร่าและกุหลาบ โดยใช้ monoclonal antibody และทดสอบด้วย immunofluorescence test พบว่า โคนิเดียของ *B. cinerea* มีระดับการเรืองแสงตั้งแต่ 50-100% ส่วน *Botrytis* สปีชีส์อื่น ๆ จะมีรูปแบบของการเรืองแสงแตกต่างจาก *Botrytis cinerea* นอกจากนั้นยังมีการใช้เทคนิค immunofluorescence ในการตรวจเชื้อ *Poria placenta* ที่เป็นสาเหตุของการผุพังของไม้ โดยใช้ polyclonal antibody (Goodell, Jellison, and Hosli, 1988)

2.4.3 การตรวจโดยวิธี Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

การตรวจเชื้อโดยปฏิกิริยาทางเซรุ่มวิทยาด้วยแอนติบอดีทั้งชนิด polyclonal และ monoclonal antibodies เป็นวิธีที่ใช้กันอย่างแพร่หลาย (พรทิพย์ วงศ์แก้ว, 2544) ในระยะเวลากว่า 20 ปีที่ผ่านมา ได้มีผู้ค้นคิดปรับปรุงการทดสอบซึ่งอาศัยหลักการของการทำปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีให้มีความไว (sensitivity) ความจำเพาะ (specificity) สูงขึ้นโดยการนำแอนติเจนหรือแอนติบอดีที่ติดฉลาก (label) ไว้ด้วยสารต่าง ๆ เช่น สารเรืองแสง (fluorescent compound) สารกัมมันตภาพรังสี (radio-isotope) มาใช้ในการทดสอบเหล่านั้น ถึงแม้การทดสอบดังกล่าวจะมีความไวสูง แต่ยังมีข้อจำกัดบางประการในการใช้ เช่น วิธี immunofluorescence ซึ่งใช้สารเรืองแสงเป็นสารติดฉลาก มีข้อเสียคือ ต้องใช้เครื่องมือราคาแพงในการทดสอบ คือ กล้องจุลทรรศน์เรืองแสง (fluorescence microscope) ส่วนวิธี radioimmunoassay ซึ่งใช้สารกัมมันตภาพรังสีเป็นสารติดฉลากก็มีข้อเสียในเรื่องของความจำเป็นที่จะต้องใช้เครื่องมือซึ่งมีราคาแพงเช่นกัน และนอกนั้นยังต้องมีระบบการควบคุมการใช้สารกัมมันตภาพรังสีที่ดีด้วย ดังนั้น ห้องปฏิบัติการเล็ก ๆ ส่วนมากไม่สามารถนำวิธี radioimmunoassay มาใช้ได้ ด้วยสาเหตุนี้จึงมีผู้พยายามคิดค้นสารอื่นซึ่งสามารถจะนำมาใช้เป็นสารติดฉลากได้ และมีข้อดีกว่าสารเรืองแสงและสารกัมมันตภาพรังสีที่ใช้อยู่ สารอย่างหนึ่งที่พบว่าสามารถนำมาใช้ได้เป็นอย่างดี คือ เอนไซม์ เนื่องจากเอนไซม์หนึ่งโมเลกุลสามารถทำให้เกิดการ

เปลี่ยนแปลงของ substrate ได้หลายโมเลกุล ดังนั้น การใช้เอนไซม์เป็นสารติดฉลากจึงช่วยขยายความสามารถในการตรวจสอบปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีที่เกิดขึ้นในการทดสอบนั้น นอกจากนี้เอนไซม์ที่นำมาใช้ในการทดสอบยังมีความคงทนสามารถเก็บไว้ได้นานในสถานะต่าง ๆ เอนไซม์ที่นำมาใช้ได้มีหลายชนิด ปฏิกิริยาของเอนไซม์กับ substrate ทำให้เกิดผลิตภัณฑ์ที่มีสีซึ่งสามารถมองเห็นได้ชัดเจนโดยไม่จำเป็นต้องใช้เครื่องมือพิเศษและเมื่อต้องการบันทึกผลการทดสอบโดยละเอียดก็สามารถทำได้โดยใช้เครื่องมือสำหรับวัดความเข้มของสี ซึ่งอาจจะใช้เพียงเครื่องมือธรรมดา ๆ หรืออาจใช้เครื่องมืออัตโนมัติเพื่อความสะดวกรวดเร็วในการทำงานก็ได้ สำหรับเวลาที่ต้องใช้ในการทดสอบนี้มีรายงานกล่าวว่าสามารถลดเวลาที่ใช้เหลือเพียงภายใน 30 นาที โดยที่การทดสอบนั้นยังมีความไวพอเพียงที่จะใช้ประโยชน์ในแง่ของการวินิจฉัยโรคได้ วิธีการที่ใช้ตรวจแอนติเจนหรือแอนติบอดีที่กล่าวมานั้นมีความแตกต่างกันในด้านต่าง ๆ เช่น ความไว (Sensitivity), ความจำเพาะ (specificity), ความสิ้นเปลือง, ความสะดวกในการทำ วิธีการทดสอบทางเซรุ่มวิทยา โดยวิธี enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) เป็นวิธีที่นิยมใช้ค่อนข้างมาก เนื่องจากสามารถใช้ตรวจเชื้อได้ตั้งแต่ช่วงเริ่มเข้าทำลาย เช่น การใช้ ELISA ในการตรวจเชื้อ *Spongospora subterranea* ในมันฝรั่ง (Harrison, Rees, Barker, and Lowe, 1993), การตรวจสอบ *Phytophthora fragariae* ในสตรอเบอรี่ (Mohan, 1988), การตรวจสอบเชื้อรา *Verticillium* spp. ในมันฝรั่ง (Sundaram, Plasencia, and Banttari, 1991) การวัดปริมาณของเส้นใย เชื้อ *Phytophthora infestans* ในเนื้อเห็ด (Harrison, Barker, Lowe, and Rees, 1990) และการตรวจสอบ Odontoglossum ringspot virus ในกล้วยไม้ (โชคพิศิษฐ์ชาญนันท์พิพัฒน์ และคณะ, 2538) นอกจากนั้นยังมีการใช้เทคนิค ELISA ในการตรวจสอบการปนเปื้อนจุลินทรีย์ในอาหาร (Yong and Cousin, 1995) การตรวจสอบเชื้อ *Fusarium* ใน corn meal (Iyer and Cousin, 2003) เป็นต้น

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 การแยกเชื้อ *Sphaceloma ampelinum* จากชิ้นส่วนองุ่นที่เป็นโรค

นำตัวอย่างองุ่นที่แสดงอาการของโรคสแคบ จากพื้นที่ปลูกอำเภอปรางค์กู่ อำเภอวังน้ำเขียว อำเภอปากช่อง จังหวัดนครราชสีมา สระบุรี ระยอง ราชบุรี พิจิตร เพชรบูรณ์ สมุทรสาครและ จังหวัดเลย ตามที่แสดงในตารางที่ 3.1 มาทำการแยกเชื้อบนอาหาร Water Agar (WA) ด้วยวิธี tissue transplanting โดยนำไปที่ต้องการแยกเชื้อมาล้างทำความสะอาดบริเวณพื้นผิวโดยการล้างด้วยน้ำสะอาด ตัดชิ้นขององุ่นบริเวณที่แสดงอาการของโรคบริเวณคาบต่อระหว่างเนื้อเยื่อที่เป็นโรกับเนื้อเยื่อดี หลังจากนั้นฟอกฆ่าเชื้อด้วย clorox 10% เป็นเวลาประมาณ 1 นาที ใช้ปากคีบคีบย้ายชิ้นองุ่นมาล้างในน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อเป็นเวลาประมาณ 1 นาที ซับชิ้นส่วนด้วยกระดาษกรองหนึ่งฆ่าเชื้อ จากนั้นใช้เข็มเย็บเย็บชิ้นองุ่นวางบนอาหาร WA บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ประมาณ 3 วัน หลังจากนั้นย้ายเส้นใยที่เจริญออกมารอบๆ เนื้อเยื่อพืช ไปเลี้ยงบนอาหาร Potato Dextrose Agar (PDA) หลังจากที่ได้เชื้อเจริญ ทำการเก็บเชื้อโดยย้ายเชื้อที่ได้จากการ clone จากแผลเดี่ยวลงใน PDA slant เพื่อใช้ศึกษาในลำดับอื่น ๆ ต่อไป

3.2 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ *S. ampelinum*

ศึกษาลักษณะโคโลนีของเชื้อบนอาหาร PDA ทำการบันทึกผลดังนี้ ลักษณะของโคโลนี สังเกตลักษณะ เปรียบเทียบรูปร่าง และสีของโคโลนี บันทึกภาพ และวัดขนาดโคโลนีเดี่ยวด้วยโปรแกรมวัดขนาดโดยสุ่มวัดโคโลนีเดี่ยวจำนวน 100 โคโลนีเดี่ยว/ไอโซเลต

ตารางที่ 3.1 แสดงไอโซเลตของเชื้อที่เก็บจากองุ่นพันธุ์ต่าง ๆ จากแหล่งปลูกองุ่นที่สำคัญเพื่อใช้ในการศึกษา

ไอโซเลต	พันธุ์องุ่น	สถานที่เก็บ
Sa_1	Black opal (Marroo seedless)	ไร่ชั้นขพร อ.ปากช่อง
Sa_2	White malaga	ไร่วันดี อ.ปากช่อง
Sa_3	Marroo seedless	ไร่ BS8 อ. ปากช่อง
Sa_4	Loose perlette	ไร่ BS8 อ.ปากช่อง
Sa_5	Loose perlette	ไร่ Grandmonte อ.ปากช่อง
Sa_6	Beuty seedless	ไร่ Grandmonte อ.ปากช่อง
Sa_7	Muscat humburg	ไร่ Grandmonte อ.ปากช่อง
Sa_8	Black opal (Marroo seedless)	ไร่ Grandmonte อ.ปากช่อง
Sa_9	Grandmonte seedless	ไร่ Grandmonte อ.ปากช่อง
Sa_10	Black night	ไร่สุพัตรา อ.ปากช่อง
Sa_11	Crimson seedless	ฟาร์ม มทส.
Sa_12	Flame seedless	ฟาร์ม มทส.
Sa_13	Black queen	ฟาร์ม มทส.
Sa_14	Italia	ฟาร์ม มทส.
Sa_15	Marroo seedless	ฟาร์ม มทส.
Sa_16	Mei gui chieng	ฟาร์ม มทส.
Sa_17	Carolina blackrose	ฟาร์ม มทส.
Sa_18	Ruby seedless	ฟาร์ม มทส.
Sa_19	Down seedless	ฟาร์ม มทส.
Sa_20	Emerol	ฟาร์ม มทส.
Sa_21	Tom muscat	ฟาร์ม มทส.
Sa_22	Loose pertette	ฟาร์ม มทส.
Sa_23	Centenail	ฟาร์ม มทส.
Sa_24	Fantasy seedless	ฟาร์ม มทส.
Sa_25	Early muscat	ฟาร์ม มทส.
Sa_26	Flame seedless	ไร่ Silverlake จ.ระยอง

ตารางที่ 3.1 แสดงไอโซเลตของเชื้อที่เก็บจากองุ่นพันธุ์ต่าง ๆ จากแหล่งปลูกองุ่นที่สำคัญเพื่อใช้ในการศึกษาสอบ (ต่อ)

ไอโซเลต	พันธุ์องุ่น	สถานที่เก็บ
Sa_27	Marroo seedless	อ.เทพสถิต จ.ชัยภูมิ
Sa_28	Loose perlette	อ.เทพสถิต จ.ชัยภูมิ
Sa_29	White malaga	อ.บ้านแพ้ว จ.สมุทรสาคร
Sa_30	เหมยหลินจือ	อ.คงเจริญ จ.พิจิตร
Sa_31	Red grove	จ.เพชรบูรณ์
Sa_32	Loose perlette	จ.เพชรบูรณ์
Sa_33	Sultana	จ.เพชรบูรณ์
Sa_34	Beuty seedless	อ.ภูเรือ จ.เลย
Sa_35	Flame seedless	อ.ภูเรือ จ.เลย
Sa_36	Loose perlette	อ.คงเจริญ จ.พิจิตร
Sa_37	Thompson seedless	อ.ภูเรือ จ.เลย
Sa_38	White malaga	อ.บ้านแพ้ว จ.สมุทรสาคร
Sa_39	White malaga	อ.บางแพ จ.ราชบุรี
RSa_2	Black opal (Marroo seedless)	ไร่ชั้นขพร อ.ปากช่อง
RSa_3	Beuty seedless	ไร่ Grandmonte อ.ปากช่อง
RSa_4	Flame seedless	อ.บางละมุง จ.ระยอง
RSa_5	Muscat humburg	ไร่ Grandmonte อ.ปากช่อง
RSa_6	Black opal (Marroo seedless)	ไร่ชั้นขพร อ.ปากช่อง
RSa_7	Grandmonte seedless	ไร่ Grandmonte อ.ปากช่อง
RSa_8	Flame seedless 1	อ.บางละมุง จ.ระยอง
RSa_9	Muscat humburg	ไร่ Grandmonte อ.ปากช่อง
RSa_10	Loose perlette	ไร่BS8 อ.ปากช่อง
RSa_11	Beuty seedless	ไร่ Grandmonte อ.ปากช่อง
RSa_12	Marroo seedless	ไร่ BS8 อ.ปากช่อง
Sa_TK1	Black queen	ไร่ตะวันแก้ว อ. ปากช่อง

3.3 การเตรียมแอนติเซรัม (antiserum)

3.3.1 การเตรียมแอนติเจน

เตรียมแอนติเจนโดยใช้ soluble mycelial proteins ดัดแปลงจากวิธีการของ Sundaram et al., (1991) นำเชื้อ *S. ampelinum* ที่ได้จากการ clone จากแผลเดียวจากไอโซเลต Sa_TK 1 ที่แยกได้จาก อำเภอปากช่อง จังหวัดนครราชสีมา เลี้ยงในอาหาร potato dextrose broth (PDB) บน shaker เป็นเวลา 15 วัน หลังจากนั้นนำเชื้อที่อยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อกรองโดยใช้กระดาษกรองหนึ่งผืน เชื้อล้างเส้นใยที่ค้างอยู่บนกระดาษกรองด้วยน้ำกลั่นหนึ่งผืน เชื้อ 3 ครั้ง จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยง ด้วย เครื่องเหวี่ยง (ยี่ห้อ Biofuge pico, Germany) โดยใช้ความเร็ว 16,000 g นาน 15 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นหนึ่งผืน ทำการหมุนเหวี่ยงอีกครั้ง หลังจากนั้นนำตะกอนที่ได้บดในทรายละเอียดที่ผ่านการล้างเรียบร้อยแล้ว โดยบดใน 0.85% NaCl ในสถานะแช่อยู่ในน้ำแข็งตลอดเวลาเพื่อรักษาสภาพโปรตีนที่ออกมาจากเซลล์ที่แตกสลาย หลังจากบดแล้วปล่อยให้สารละลายตกตะกอนในหลอดทดลอง เป็นเวลา 15 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงโดยใช้ความเร็ว 12,000 รอบ/นาที นาน 30 นาที เก็บเฉพาะน้ำใส หลังจากนั้นนำไปตรวจเช็คความเข้มข้นของโปรตีนโดยวิธี Bradford (1976) และใช้ bovine serum albumin (BSA) เป็นโปรตีนเปรียบเทียบ

3.3.2 การเก็บ normal serum

ใช้กระต่ายพันธุ์ New Zealand White เพศเมีย สีขาว ตาแดง จำนวน 1 ตัว ที่ไม่เคยได้รับการฉีดสารที่มีคุณสมบัติเป็นแอนติเจนมาก่อน ก่อนทำการฉีดแอนติเจน จะเก็บเลือดบริเวณเส้นเลือดขอบใบหู ด้วยเข็มฉีดยา ประมาณ 3-5 มิลลิลิตรต่อน้ำหนักตัวกระต่าย 1 กิโลกรัม เพื่อนำมาใช้เป็น normal serum สำหรับทดสอบเปรียบเทียบกับแอนติเซรัมที่ต้องการผลิต โดยใช้เข็มฉีดยาเบอร์ 20G แทงเข้าเส้นเลือดบริเวณใบหูของกระต่าย ปล่อยให้เลือดไหลผ่านเข็มลงในหลอดแก้วที่อบฆ่าเชื้อ นำหลอดแก้วที่บรรจุเลือดดังกล่าววางไว้ในอุณหภูมิห้อง เพื่อให้เลือดแข็งตัว ใช้ส่วนปลายเข็มที่ปราศจากเชื้อกรีดตรงบริเวณรอยต่อระหว่างผิวหนังของเมดเลือดที่แข็งตัวกับผนังหลอดแก้วเพื่อให้ส่วนที่แข็งตัวของเลือดจมลงก้นหลอด นำหลอดแก้วที่บรรจุเลือดนี้เก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นดูดส่วนที่เป็นน้ำเหลืองใสไว้ในหลอด 1.5 มิลลิลิตร เติม 0.02% Sodium azide (NaN_3) เพื่อป้องกันการเจริญของจุลินทรีย์อื่นๆ ที่อาจเกิดขึ้นได้เมื่อเก็บ normal serum ไว้เป็นเวลานาน

3.3.3 การฉีดแอนติเจน

ฉีดแอนติเจนมีทั้งหมด 4 ครั้ง แต่ละครั้งห่างกัน 7-10 วัน นำแอนติเจนที่เตรียมจากข้อ 1 ฉีดเข้าในกระต่ายโดยครั้งที่ 1 และ 2 ฉีดเข้ากล้ามเนื้อ (intramuscular) บริเวณสะโพกโดยผสมสารแขวนลอยแอนติเจนกับ Freund's incomplete adjuvant (Difco

Laboratories, USA) ในอัตราส่วน 1 : 1 (v/v) ผสมให้เข้ากันจนมีลักษณะเป็นครีมขาวขึ้น ปริมาตรสารแขวนลอยแอนติเจนที่ใช้ฉีดแต่ละครั้งเท่ากับ 0.5 มิลลิลิตร โดยมีความเข้มข้นของ โปรตีนเท่ากับ 0.75 µg/ml ส่วนครั้งที่ 3 และครั้งที่ 4 ฉีดเข้าเส้นเลือด (intravascular) บริเวณใบหู ใช้สารแขวนลอยแอนติเจนครั้งละ 1 มิลลิลิตร โดยที่ไม่ผสม กับ Freund's incomplete adjuvant

3.3.4 การเก็บแอนติเซรัม

เก็บแอนติเซรัมลักษณะเดียวกับการเก็บ normal serum เก็บครั้งแรกแอนติเซรัม หลังจากฉีดครั้งที่ 4 ครบ 7 วัน จำนวน 5 มิลลิลิตร หลังจากนั้นนำแอนติเซรัมทดสอบ titer และเก็บ แอนติเซรัมครั้งที่ 2 โดยเก็บห่างจากครั้งแรก 7 วัน จำนวน 5 มิลลิลิตร

3.3.5 การตรวจสอบความเจือจางต่ำสุดที่ยังทำปฏิกิริยากับแอนติเจนได้ (titer)

ใช้เทคนิค DAC indirect ELISA ตามวิธีการของ โสภณ วงศ์แก้ว (2536) โดยนำ แอนติเซรัมที่ได้มาประเมินหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของแอนติเซรัมที่สามารถทำปฏิกิริยากับ แอนติเจนได้ พร้อมกับทดสอบความไวในการตรวจหาเชื้อ *S. ampelinum* ที่ปริมาณต่างๆ โดยนำ โคโคนิดีของเชื้อ *S. ampelinum* ที่เลี้ยงไว้ในอาหารไอโซเลตต่างๆ และ soluble mycelial proteins ที่ใช้ผลิตแอนติเซรัม มาละลายใน carbonate coating buffer แล้วเจือจางให้มีความเจือ จางลดลงเป็น 10 เท่า (ten-fold serial dilution) โดยใช้ carbonate coating buffer เป็นตัวทำ ละลายแทนน้ำ เตรียมสารแขวนลอยของเชื้อ ให้มีความเจือจางที่ระดับตั้งแต่ 10^{-1} ถึง 10^{-6} และใช้ normal serum เป็น negative control ใช้ไมโครปิเปตดูดเอาสารแขวนลอยของเชื้อที่มีความเจือ จางที่ระดับตั้งแต่ 10^{-1} ถึง 10^{-6} และ soluble mycelial proteins ตัวอย่างละ 100 µl ใส่ลงในแต่ละ หลุมของจานทดสอบ (microtiter plate) จำนวน 2 ซ้ำ (หลุม) ต่อตัวอย่าง บ่มจานทดสอบในกล่อง ขึ้น (กล่องพลาสติกใสกระดาษขึ้น) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง หรือเก็บใส่ตู้เย็น ค้างไว้ 1 คืน เทส่วนประกอบที่บ่มไว้ทิ้ง แล้ว หยอด blocking solution ใน carbonate coating buffer (1% skimmed milk) หลุมละ 100 µl บ่มไว้ในกล่องขึ้นนาน 30-60 นาที ที่ 37 องศา เซลเซียส ล้างด้วย PBS-T (phosphate buffer saline-tween) 3 ครั้ง แช่ไว้ 2-3 นาที ต่อครั้ง (รวม 5-10 นาที) หยอด antiserum (1 °As) ที่เจือจางใน conjugated buffer ในอัตราส่วนของ แอนติเซรัมและ normal serum ต่อ conjugated buffer ที่ 1 : 16, 1:32, 1:64, 1: 128, 1: 256, 1:512, 1: 1,024 และ 1:2,048 บ่มไว้ในกล่องขึ้น 1 ชั่วโมงที่ 37 องศาเซลเซียส ล้างด้วย PBS-T 3 ครั้ง แช่ไว้ 2-3 นาที ต่อครั้ง (รวม 5-10 นาที) ทำการเตรียม anti- rabbit IgG alkaline phosphatase conjugate (Sigma, Cat. No. A3687) อัตรา 1:30,000 (v/v) นำไปหยอดลงใน หลุมที่ล้างแล้วหลุมละ 100 µl บ่มในกล่องขึ้นนาน 1 ชั่วโมงที่ 37 องศาเซลเซียส ล้างด้วย PBS-T 3 ครั้ง แช่ไว้ 2-3 นาที ต่อครั้ง (รวม 5-10 นาที) หลังจากนั้นเตรียม 0.05% p-nitrophenyl

phosphate (Gibco BRL, Cat. No. 15978-098) ใน substrate นำมาหยอดลงในหลุมที่ล้างแล้วหลุมละ 100 μ l จากนั้นนำไปบ่มไว้ในกล่องขึ้นในที่มืดที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นานประมาณ 45-60 นาที นำออกมาตรวจปฏิกิริยา เมื่อมีสีเหลืองปรากฏขึ้นบนหลุม positive control จนเห็นชัดด้วยตาเปล่า หยุดปฏิกิริยาด้วย 3 M potassium hydroxide (KOH) อัตรา 25/100 μ l จากนั้นนำจาน ELISA ไปวัดการดูดซับแสงด้วย ELISA reader (SpectraCount™ Microplate Photometer, ยี่ห้อ Packard รุ่น AS10001) ที่ความยาวช่วงคลื่น 405 nm

3.3.6 การทดสอบความเฉพาะเจาะจงของแอนติเซรัม

นำเชื้อ *S. ampelinum* จำนวน 5 ไอโซเลต ที่เก็บจากแหล่งปลูกองุ่นต่างๆ รวมทั้งเชื้อ *Collectotrichum* sp. ที่แยกจากองุ่น ส้ม พริก และกล้วย จำนวน 6 ไอโซเลต เชื้อราโรคพืชอื่น ๆ ได้แก่ เชื้อ *Fusarium* spp., *Curvularia* spp. และ *Helminthosporium* spp. โดยนำเชื้อมาเลี้ยงในอาหาร PDA และเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชจำนวน 4 ชนิด หลังจากนั้นนำเชื้อมาทำให้เจือจางด้วยหลักการ serial dilution ละลายด้วย carbonate coating buffer นำสารแขวนลอยของเชื้อแต่ละไอโซเลตมาหยอดลงในหลุม ๆ ละ 100 μ l ของ microtiter plate บ่มข้ามคืน จากนั้นทำตามขั้นตอนของวิธี DAC indirect – ELISA วิธีการเดียวกับข้อ 3.3.5 วิธีการทดสอบความจำเพาะเจาะจงจะใช้แอนติเซรัมที่ระดับความเจือจาง 1:1,000 จากนั้นทำการตรวจปฏิกิริยาในแต่ละไอโซเลตของเชื้อ

3.4 การพัฒนาวิธีการตรวจสอบ latent infection โดยวิธีทาง serology

3.4.1 วิธี ELISA

นำเชื้อ *S. ampelinum* ที่เก็บจากแหล่งปลูกต่าง ๆ ปลูกเชื้อบนองุ่นโดยใช้ความเข้มข้นของ spore suspension เท่ากับ 10^6 โคนิเดีย/มิลลิลิตร ใช้วิธีหยอด spore suspension 20 ไมโครลิตร บนใบองุ่นจำนวน 5 จุด ต่อใบ จำนวน 2 ซ้ำ ทำเครื่องหมายบนจุดที่ปลูกเชื้อทั้ง 5 จุด หลังจากนั้น ทำการตรวจปฏิกิริยาทุก ๆ 2 วัน หลังปลูกเชื้อ จนกระทั่งองุ่นปรากฏอาการของโรค โดยมีขั้นตอนดังนี้ ใช้มีดตัดบริเวณที่ปลูกเชื้อเป็นชิ้นให้มีขนาดครอบคลุมบริเวณที่ปลูกเชื้อ นำชิ้นองุ่นมาบ่มร่วมกับ primary antiserum ที่ระดับความเข้มข้น 1:1,000 ใน conjugated buffer บ่มร่วมกันใน microfuge tube อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างชิ้นองุ่นใน PBS-T 3 ครั้ง นำชิ้นองุ่นบ่มร่วมกับ anti - rabbit IgG alkaline phosphatase conjugate (Sigma, Cat. No. A3687) ใน conjugate buffer บ่มร่วมกันใน microfuge tube อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างชิ้นองุ่นใน PBS-T 3 ครั้ง ครั้งละ 1-2 นาที จากนั้นย้ายชิ้นองุ่นใส่ใน microtiter plate หลังจากนั้นเตรียม 0.05% p - nitrophenyl phosphate (Gibco BRL, Cat. No. 15978-098) ใน substrate buffer นำมาหยอดลงในหลุม ๆ ละ 100 μ l

จากนั้นนำไปบ่มไว้ในกล่องขึ้นในที่มืดที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นานประมาณ 15-20 นาที ใช้ปากคีบคีบชิ้นส่วนอ่อนออก นำออกมาตรวจปฏิกิริยา สังเกตจากสีที่ปรากฏด้วยสายตาและนำจาน ELISA ไปวัดที่ความเข้มของสีที่เกิดขึ้นด้วย ELISA reader ที่ความยาวช่วงคลื่น 405 nm เปรียบเทียบสีที่เกิดขึ้นและค่าที่วัดได้ บันทึกจำนวนวันที่เกิดปฏิกิริยาเป็นบวกในแต่ละไอโซเลต ใช้ชิ้นอ่อนที่ไม่ได้รับการปลูกเชื้อเป็น negative control

3.4.2 วิธี immunofluorescence

ใช้วิธีเกี่ยวกับการตรวจโดยวิธี ELISA แตกต่างกันที่เทคนิค immunofluorescence บ่มชิ้นอ่อนร่วมกับ primary antiserum ที่ระดับความเจือจาง 1:1,000 ใน conjugated buffer บ่มร่วมกันใน microfuge tube อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้ว หลังจากนั้นบ่มชิ้นอ่อนกับ anti-rabbit IgG -FITC conjugate (Sigma, Cat. No. F0382) ที่เจือจาง 1:1,000 ใน conjugate buffer บ่มร่วมกันใน microfuge tube อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างชิ้นอ่อนใน PBS-T 3 ครั้ง ซับชิ้นอ่อนให้แห้งด้วยกระดาษกรอง หยอด glycerin ที่ละลายใน PBS ปิดด้วย cover glass นำชิ้นอ่อนไปส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์แสงเรือง (ยี่ห้อ Olympus Fluorescence Microscopes and Accessories รุ่น BX 50 -32E01) ในการทดลองที่แสดงผลเป็นบวกจะเห็นการเรืองแสงของ FITC เป็นสีเหลืองอมเขียว ทำการถ่ายรูปเพื่อบันทึกข้อมูล บันทึกจำนวนวันที่เกิดปฏิกิริยาเป็นบวกในแต่ละไอโซเลต ใช้ชิ้นอ่อนที่ไม่ได้รับการปลูกเชื้อเป็น negative control

3.5 การศึกษาความหลากหลายของสายพันธุ์เชื้อ *S. ampelinum* โดยเทคนิค serology

3.5.1 วิธี ELISA

นำเชื้อ *S. ampelinum* ที่เก็บจากแหล่งปลูกต่าง ๆ ที่เลี้ยงบนอาหาร PDA อายุ 1 เดือน มาตรวจสอบปฏิกิริยาทางเซรุ่มวิทยาโดยใช้วิธี ELISA เปรียบเทียบค่าที่วัดได้จากเครื่อง spectrophotometer โดยเชื้อที่ใช้มีความเข้มข้นของสปอร์ในแต่ละไอโซเลตเท่ากัน ความเข้มข้นของสปอร์ที่ใช้เท่ากับ 10^6 โคนิเดีย/มิลลิลิตร ตรวจสอบไอโซเลตละ 4 ซ้ำ

3.5.2 วิธี Gel-double diffusion

เพื่อตรวจสอบความแตกต่างและความสัมพันธ์ของเชื้อ species ต่าง ๆ ของเชื้อ *S. ampelinum*, เชื้อ *Colletotrichum* spp. ไอโซเลตต่าง ๆ และเชื้อชนิดอื่น ๆ วิธีนี้เป็นการตกตะกอนทางเซรุ่มวิทยาที่เกิดในตัวกลางที่เป็นวุ้น โดยทำให้แอนติเจนและแอนติบอดีเคลื่อนเข้าหากันในตัวกลางที่เป็นวุ้น ตามวิธีการของ Gooding (1966)

เทวุ้นที่มี Ionagar 0.8% ผสมกับ NaN_3 1% ปริมาตร 12-15 มิลลิลิตรลงบนจาน

เลี้ยงเชื้อพลาสติกขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร ปล่อยให้แห้งตัวที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นใช้ cork borer เบอร์ 2 ที่มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร เจาะที่ตรงกลางจาน 1 หลุมและโดยรอบ 6 หลุม ให้ขอบห่างกัน 4-5 มิลลิเมตร แล้วจึงใช้ vacuum pump ดูดเอาวุ้นออก เติมแอนติเซรุ่มที่ หลุมกลาง 20 ไมโครลิตร และ หลุมรอบนอกเติม spore suspension หรือ สารสกัดจากสปอร์ของ เชื้อ *S. ampelinum* ไอโซเลตต่าง ๆ ที่สกัดโดยวิธีเดียวกับการเตรียมแอนติเซรุ่ม และเชื้อ *Colletotrichum* spp. ในปริมาณที่เท่ากัน นำจานเลี้ยงเชื้อเข้าบ่มในกล่องขึ้นที่อุณหภูมิห้องนาน 24-48 ชั่วโมงจึงตรวจผลการทดลองโดยดูจาก precipitin band ที่เกิดขึ้น

3.6 การศึกษาความหลากหลายของสายพันธุ์เชื้อ *S. ampelinum* จากปฏิกิริยาบ่นพันธุ์ องุ่น

3.6.1 การเตรียมพืช

ใช้กิ่งองุ่นที่ตัดจากต้นองุ่นจำนวน 6 พันธุ์ คือ Black queen, Crimson seedless, Marroo seedless, Delight, Centenail และ Shiraz แต่ละกิ่งมีตาประมาณ 3-5 ตา นำมาชำลงในขวดสีชาที่บรรจุน้ำเต็มขวด หลังจากชำประมาณ 5 วัน องุ่นจะเริ่มผลิดา และแตกใบอ่อนในวันที่ 10 หลังจากชำกิ่ง ดังรูปที่ 3.1



รูปที่ 3.1 ภาพกิ่งชำขององุ่นที่แตกใบอ่อนหลังปักชำ 10 วัน

3.6.2 การเตรียมเชื้อ

นำเชื้อ *S. ampelinum* จำนวน 12 ไอโซเลต ที่แยกได้จากใบองุ่นที่เป็นโรค เฝี้ยงเชื้อ *S. ampelinum* บนอาหาร PDA ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 เดือน จากนั้นเตรียมสารแขวนลอยของเชื้อ โดยใช้ดูปปลายกลมจี้โคโคนิเดียบนอาหารเลี้ยงเชื้อมาละลายในน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ ตรวจสอบจำนวน โคโคนิเดีย โดยใช้ heamacytometer ให้มีความเข้มข้น 10^6 โคโคนิเดีย/มิลลิลิตร เพื่อใช้ในการปลูกเชื้อต่อไป

3.6.3 การปลูกเชื้อ

ปลูกเชื้อ *S. ampelinum* บนใบองุ่น โดยใช้ cotton bud จุ่มลงในหลอดที่มีสารแขวนลอยเชื้อ หลังจากนั้นใช้ cotton bud ทาลงบนด้านหลังใบและท้องใบขององุ่นที่ใช้ทดสอบ ใช้น้ำกลั่นทาบนใบองุ่นต้น control ทำการทดสอบจำนวน 2 ใบต่อต้น ภายได้โรงเรือนอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

3.6.4 การบันทึกผลการทดลอง

หลังปลูกเชื้อ 3 วัน สังเกตอาการบนต้นองุ่น โดยทำการบันทึกข้อมูลดังนี้

3.6.4.1 พันธุ์ที่แสดงอาการ

3.6.4.2 วันแรกที่อาการปรากฏบนต้นองุ่น

3.6.4.3 วัดขนาดของแผล ทุกวันหลังจากปรากฏอาการติดต่อกัน 7 วัน

3.6.4.4 วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยใช้การวิเคราะห์แบบ CR

บทที่ 4

ผลการทดลองและอภิปรายผล

4.1 การแยกเชื้อ *Sphaceloma ampelinum* จากตัวอย่างองุ่นที่เป็นโรค

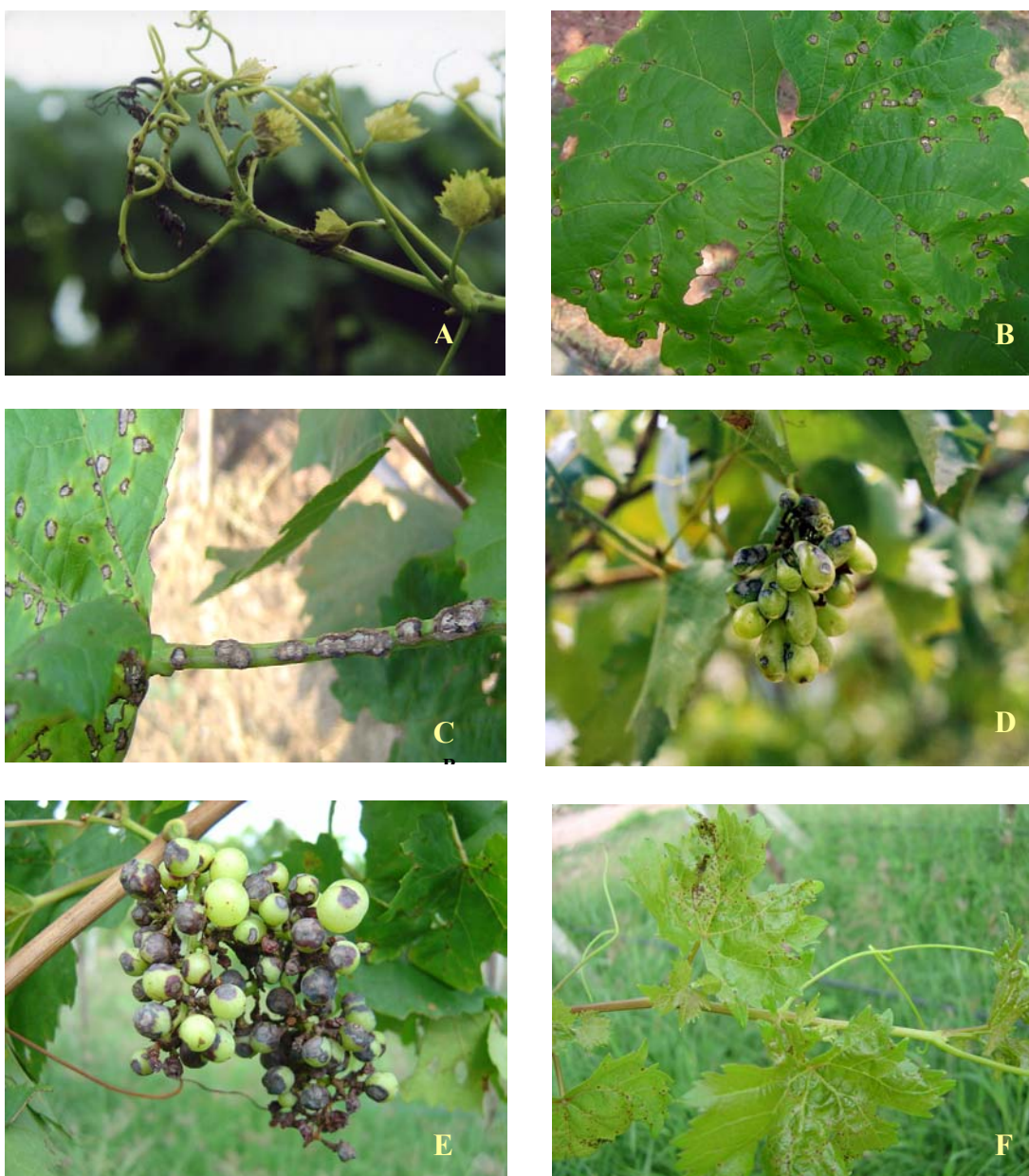
จากการเก็บตัวอย่างองุ่นที่แสดงอาการของโรคสแคบ ในพื้นที่ปลูกอำเภอปรางค์กู่ อำเภอวังน้ำเขียว อำเภอปากช่อง จังหวัดนครราชสีมา สระบุรี ระยอง ราชบุรี พิจิตร เพชรบูรณ์ สมุทรสาคร และจังหวัดเลย (รูปที่ 4.1 A-F) สามารถแยกเชื้อได้สำเร็จประมาณ 80 เปอร์เซ็นต์ สาเหตุที่ทำให้ไม่สามารถแยกเชื้อได้ 100 เปอร์เซ็นต์จากตัวอย่างทั้งหมด เนื่องจากเกิดการปนเปื้อนจากเชื้อราอื่นๆ บนแผลเดียวกันเพราะยังไม่ได้ทำการแยกเชื้อทันทีหลังจากเก็บตัวอย่าง การแยกเชื้อให้มีประสิทธิภาพต้องแยกเชื้อทันทีหลังจากเก็บตัวอย่างและผลที่ใช้แยกต้องเป็นผลที่แสดงอาการเริ่มแรก หลังจากย้ายเนื้อเยื่อไปองุ่นลงวางบน WA 3 วัน เชื้อจะสร้างเส้นใยสั้น ๆ เจริญออกมาโดยรอบเนื้อเยื่อ (รูปที่ 4.2) ทำการย้ายชิ้นส่วนของเชื้อลงบน PDA ลักษณะโคโลนีของเชื้อบนอาหาร PDA และ PDB แสดงในรูปที่ 4.3

4.2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

4.2.1 ลักษณะของโคนีเดีย ผลของการวัดขนาดโคนีเดียของเชื้อ ที่แยกได้จากตัวอย่างที่เป็นโรคจากแหล่งปลูกต่างๆ จำนวน 38 ไอโซเลต พบว่า เชื้อแต่ละไอโซเลตมีขนาดของโคนีเดียเฉลี่ยอยู่ในช่วง 2.17-3.35 x 5.24-6.83 ไมครอน ดังแสดงในตารางที่ 4.1 โคนีเดียมีขนาดเล็ก กลมรี หัวท้ายมน คล้ายรูปไข่ ไม่มีสี มีลักษณะใส เซลล์เดี่ยว มี vacuole กลมใสภายใน ดังรูปที่ 4.4

4.2.2 ลักษณะของโคโลนีบนใบองุ่น การศึกษาลักษณะภายนอกของใบองุ่นที่เป็นโรคด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (scanning electron microscope: SEM) พบว่าเชื้อสาเหตุของโรคสแคบบนใบองุ่นมีลักษณะโคนีเดียอยู่รวมกันเป็นกลุ่ม กระจุกตัวหนาแน่นบริเวณเส้นใบ โดยที่โคนีเดียของเชื้อเกิดที่บริเวณส่วนปลายของโคนดิโอฟอร์ (รูปที่ 4.5)

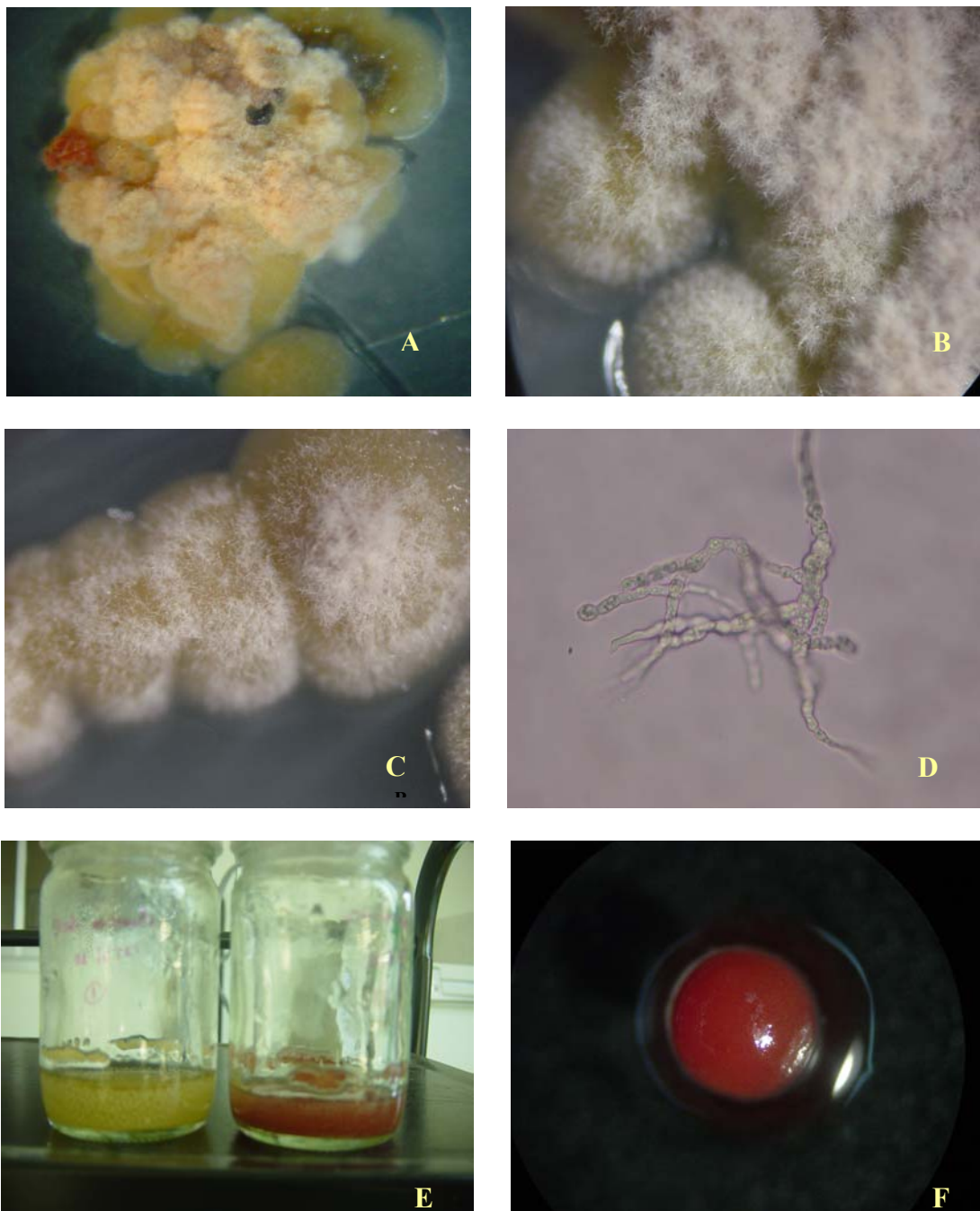
4.2.3 ลักษณะการเจริญของโคโลนีบนอาหารของเชื้อ จากการสังเกตการเจริญเติบโตของเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA พบว่า เชื้อในแต่ละไอโซเลตมีลักษณะโคโลนีที่แตกต่างกัน ขยายขนาดของโคโลนีค่อนข้างช้า คือ มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเพียง 0.5-2 เซนติเมตร หลังจาก 10 วัน และขยายขนาดขึ้นเป็น 2.5 เซนติเมตร เมื่อเชื้อมีอายุ 1-2 เดือน ซึ่งเป็นช่วงที่เชื้อหยุดการขยายขนาด โคโลนี สำหรับสีของโคโลนี พบว่าแบ่งได้เป็น 3 กลุ่ม คือ สีเหลืองอ่อน สีเหลืองเข้มถึงส้ม และสีแดง ลักษณะโคโลนีของเชื้อบนอาหาร PDA แสดงในรูปที่ 4.6



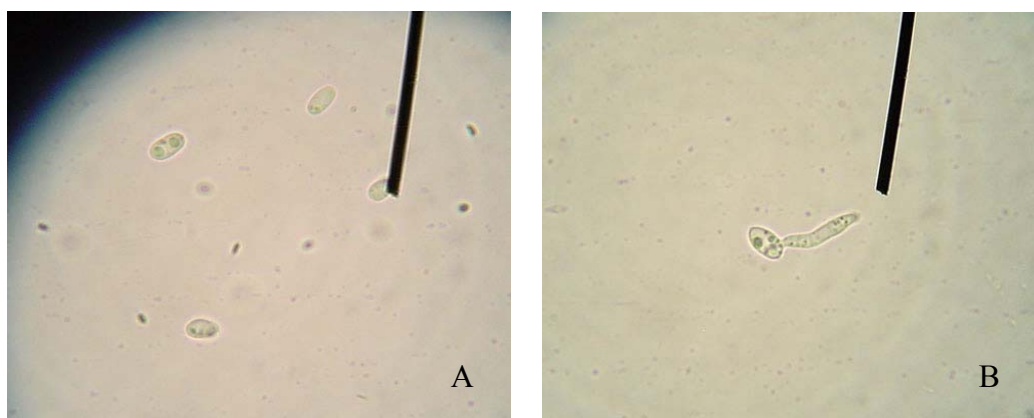
รูปที่ 4.1 ลักษณะขององุ่นที่แสดงอาการโรคสแคบ (A) อาการบนยอดอ่อน (B) อาการบนใบ (C) อาการบนก้านใบขององุ่น (D) อาการบนผลองุ่นพันธุ์ไวท์มะละกา (E) อาการบนผลองุ่นพันธุ์ loose perlett (F) อาการเริ่มแรกบนใบอ่อนขององุ่น



รูปที่ 4.2 แสดงลักษณะการเจริญของเชื้อ *S. ampelinum* บนอาหาร WA ที่เจริญออกมาจาก
ชิ้นส่วนขององุ่นที่เป็นโรคที่แยกเชื้อโดยวิธี tissue transplanting



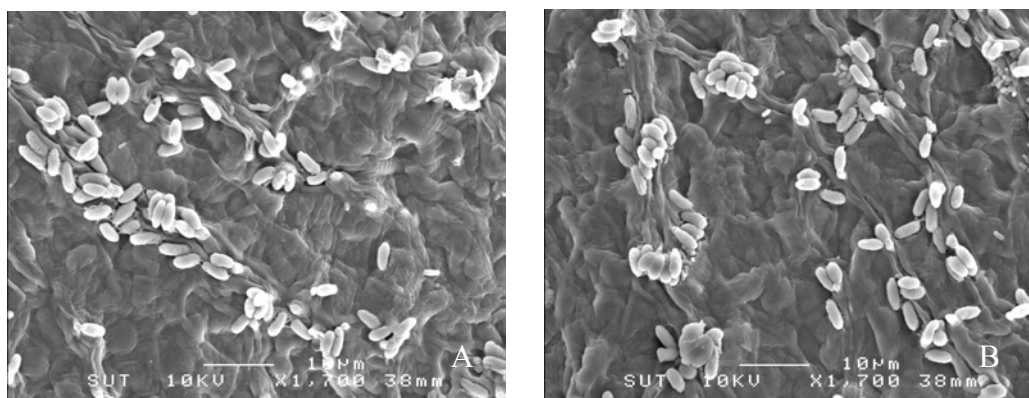
รูปที่ 4.3 (A) ลักษณะการเจริญของเชื้อ *S. ampelinum* ที่เจริญบนอาหาร PDA เป็นเวลา 10 วัน หลังจากที่ย้ายจากอาหาร WA เป็นการเจริญแบบพอกพูน (B-C) ลักษณะการสร้างเส้นใยของเชื้อบนอาหารแข็ง (D) ลักษณะเส้นใยของเชื้อที่มีผนังกัน (septum) บริเวณที่ต่อกันจะมีลักษณะคอด (E) ลักษณะของเชื้อที่เลี้ยงในอาหาร PDB ซึ่งจะมีลักษณะการเจริญที่แตกต่างกันในแต่ละไอโซเลต (F) ลักษณะเชื้อที่เจริญในอาหาร PDB บริเวณรอบ ๆ โคลนจะมีเมือกใสหุ้ม



รูปที่ 4.4 ลักษณะโคนิเดียของเชื้อ *S. ampelinum* ที่ศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์

(A) ลักษณะของโคนิเดียของเชื้อ *S. ampelinum* มีลักษณะและขนาดแตกต่างกัน โคนิเดียที่อายุน้อยจะสังเกตเห็นว่ามีจุด oil drop อยู่ภายในและจะหายไปเมื่ออายุมากขึ้น (กำลังขยาย 1000 เท่า)

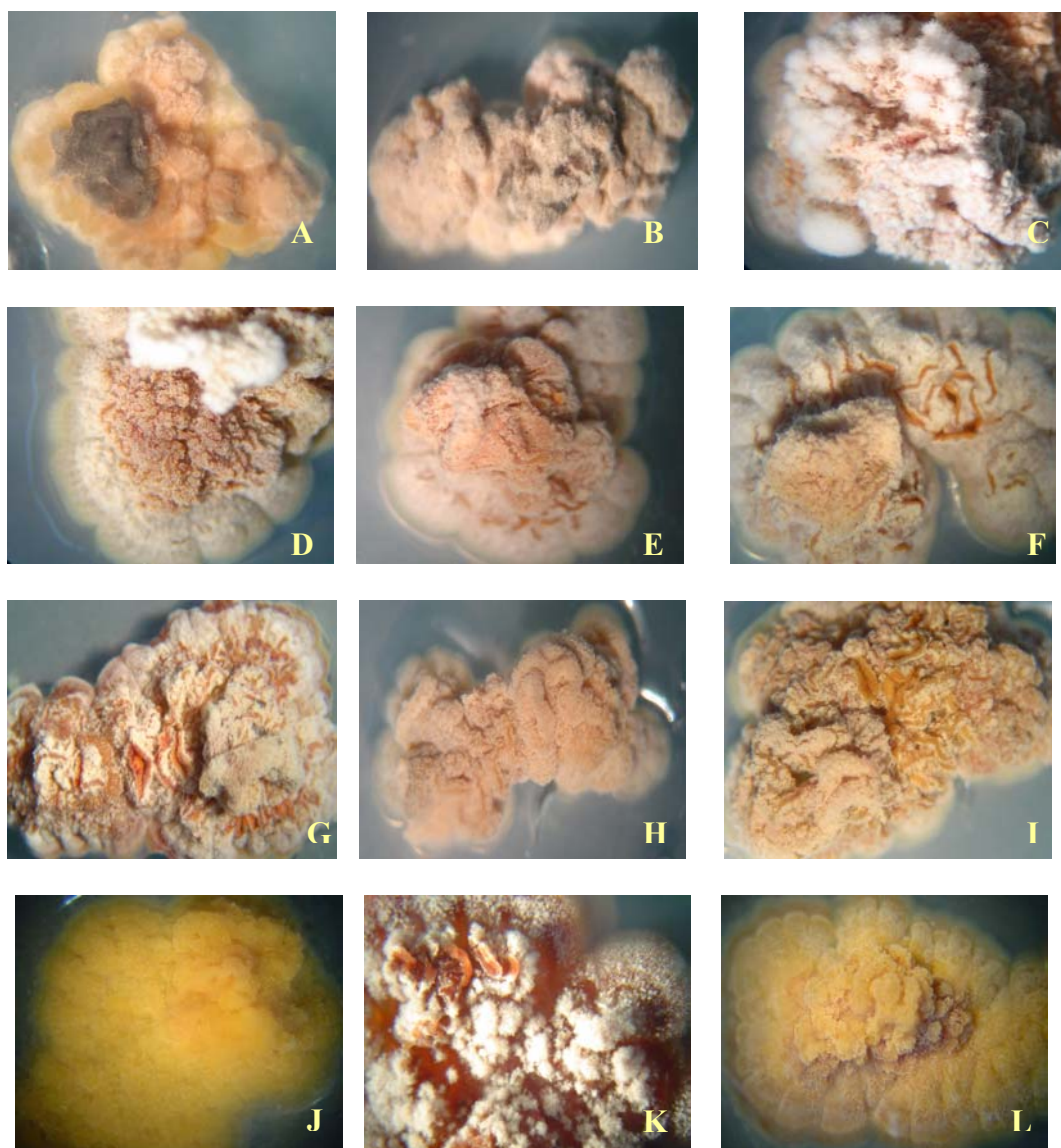
(B) ลักษณะของโคนิเดียของเชื้อ *S. ampelinum* ที่กำลังงอก (กำลังขยาย 1000 เท่า)



รูปที่ 4.5 ลักษณะพื้นผิวภายนอกบริเวณของงุ่นที่เป็นโรคสแคบ ถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด

(A) เนื้อเยื่อบริเวณเส้นใบของงุ่นพันธุ์ Marroo seedless แสดงอาการสแคบ (กำลังขยาย 1700 เท่า)

(B) เนื้อเยื่อบริเวณผิวใบของงุ่นพันธุ์ Flame seedless แสดงอาการโรคสแคบที่ (กำลังขยาย 1700 เท่า)



รูปที่ 4.6 แสดงลักษณะการเจริญของเชื้อ *S. ampelinum* อายุ 15 วัน บนอาหาร PDA เชื้อในแต่ละไอโซเลตจะมีลักษณะการเจริญบนอาหารที่แตกต่างกันทั้งในด้านขนาดและสีของโคโลนี

- | | |
|-------------------|-------------------|
| (A) ไอโซเลต Sa_1 | (B) ไอโซเลต Sa_2 |
| (C) ไอโซเลต Sa_3 | (D) ไอโซเลต Sa_4 |
| (E) ไอโซเลต Sa_5 | (F) ไอโซเลต Sa_6 |
| (G) ไอโซเลต Sa_7 | (H) ไอโซเลต Sa_8 |
| (I) ไอโซเลต Sa_9 | (J) ไอโซเลต Sa_10 |
| (K) ไอโซเลต Sa_11 | (L) ไอโซเลต Sa_12 |

ตารางที่ 4.1 แสดงขนาดของโคนีเดียของเชื้อ *S. ampelinum* ที่เลี้ยงบนอาหาร PDA จำนวน 38 ไอโซเลตที่เก็บจากแหล่งปลูกองุ่น

ไอโซเลต	ขนาดโคนีเดีย(ไมครอน)*	
	ความยาวเฉลี่ย	ความกว้างเฉลี่ย
Sa_1	6.20±0.66	3.35±0.36
Sa_2	5.74±0.69	2.41±0.58
Sa_3	5.89±0.52	2.61±0.30
Sa_4	6.14±0.60	2.55±0.36
Sa_5	5.93±0.70	2.61±0.48
Sa_6	6.35±0.64	2.67±0.30
Sa_7	5.91±0.77	2.47±0.36
Sa_8	6.23±0.69	2.58±0.30
Sa_9	6.21±0.64	2.26±0.35
Sa_10	6.16±0.67	2.34±0.35
Sa_11	6.25±0.67	2.50±0.33
Sa_12	5.24±0.63	2.17±0.33
Sa_13	5.47±0.77	2.36±0.31
Sa_14	5.80±0.65	2.60±0.31
Sa_15	5.68±0.65	2.54±0.32
Sa_16	5.93±0.76	2.59±0.44
Sa_17	5.43±0.77	2.32±0.27
Sa_18	5.29±0.57	2.49±0.32
Sa_19	6.29±0.69	2.59±0.43
Sa_20	5.78±0.69	2.48±0.27

* ค่าเฉลี่ยจาก 100 โคนีเดียต่อไอโซเลต

ตารางที่ 4.1 แสดงขนาดของโคนี้เดียของเชื้อ *S. ampelinum* ที่เลี้ยงบนอาหาร PDA จำนวน 38 ไอโซเลตที่เก็บจากแหล่งปลูกองุ่น (ต่อ)

ไอโซเลต	ขนาดโคนี้เดีย(ไมครอน)*	
	ความยาวเฉลี่ย	ความกว้างเฉลี่ย
Sa_21	5.80±0.79	2.55±0.25
Sa_22	5.98±0.44	2.46±0.25
Sa_23	6.04±0.71	2.66±0.32
Sa_24	6.08±0.71	2.66±0.46
Sa_25	6.48±0.65	3.10±0.42
Sa_26	6.81±0.83	3.17±0.35
Sa_27	6.69±0.60	3.17±0.41
Sa_28	6.26±0.62	2.74±0.31
Sa_29	5.91±0.72	2.56±0.33
Sa_30	6.83±0.80	3.08±0.47
Sa_31	6.80±0.65	2.99±0.39
Sa_32	5.72±0.60	2.81±0.34
Sa_33	6.69±0.64	3.26±0.46
Sa_34	6.68±0.60	3.02±0.35
Sa_35	6.36±0.50	3.03±0.32
Sa_36	6.52±0.38	3.19±0.50
Sa_37	6.39±0.61	2.91±0.45

* ค่าเฉลี่ยจาก 100 โคนี้เดียต่อไอโซเลต

4.3 การผลิตแอนติเซรุ่มของเชื้อ *S. ampelinum*

การผลิตแอนติเซรุ่มโดยใช้โคนีเดียของเชื้อที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นแอนติเจนฉีดเข้ากระต่ายโดยตรงไม่สามารถกระตุ้นให้กระต่ายสร้างแอนติบอดีที่จำเพาะเจาะจงได้ แต่การใช้ของเหลวที่ได้จากการบดเส้นใยและโคนีเดียซึ่งมีปริมาณโปรตีน 0.75 ไมโครกรัม ต่อการฉีด 1 ครั้ง ฉีดเข้ากระต่ายในลักษณะฉีดเข้ากล้ามเนื้อโดยผสม Freund's incomplete adjuvant 2 ครั้ง ร่วมกับการฉีดเข้าเส้นเลือดโดยมีปริมาณโปรตีน 1.5 ไมโครกรัม โดยไม่ผสม Freund's adjuvant 2 ครั้ง พบว่า สามารถกระตุ้นให้กระต่ายสร้างแอนติบอดีที่จำเพาะเจาะจงกับเชื้อ *S. ampelinum* ได้

4.3.1 การตรวจสอบความเจือจางต่ำสุดที่ยังทำปฏิกิริยากับแอนติเจนได้ (titer)

จากผลการทดสอบประสิทธิภาพของแอนติเซรุ่มที่ผลิตได้ โดยนำมาประเมินหาค่าระดับความเข้มข้นต่ำสุดของแอนติเซรุ่มที่สามารถทำปฏิกิริยากับแอนติเจนเป้าหมาย และศึกษาความไว ของแอนติเซรุ่มที่ระดับต่าง ๆ ด้วยวิธี DAC indirect – ELISA พบว่าแอนติเซรุ่มที่ทุก ระดับความเข้มข้นที่ใช้ในการทดสอบสามารถทำปฏิกิริยากับแอนติเจนได้ โดยผลการตรวจระดับความเข้มข้นที่ใช้ทดสอบตั้งแต่ 1:16 ถึง 1:2,048 (v/v) พบว่า ที่ความเข้มข้นของแอนติเจน 10^6 โคนีเดีย/มิลลิลิตร แอนติเซรุ่มยังให้ปฏิกิริยาบวกที่ความเข้มข้น 1: 1,024 และที่ความเข้มข้น 1:512 ยังให้ปฏิกิริยาบวกเมื่อแอนติเจนมีความเข้มข้นเพียง 10 โคนีเดีย/มิลลิลิตร (ตารางที่ 4.2)

4.3.2 การทดสอบความจำเพาะเจาะจง (specificity) ของแอนติเซรุ่ม

จากผลการทดสอบความจำเพาะเจาะจงของแอนติเซรุ่ม พบว่า normal serum ที่นำมาใช้ในการทดสอบเปรียบเทียบกับแอนติเซรุ่มไม่ทำปฏิกิริยากับเชื้อ *S. ampelinum* และแบคทีเรียที่นำมาทดสอบ ส่วนแอนติเซรุ่มที่ผลิตได้ให้ค่า A405 สูงเมื่อทำปฏิกิริยากับ *S. ampelinum* และ *Colletotrichum* จากกองุ่น ให้ค่าปานกลางเมื่อทำปฏิกิริยากับเชื้อ *Fusarium spp.*, *Curvularia lunata*, *Helminthosporium spp.*, *Collectotrichum gloeosporioides* และเชื้อไอโซเลต Sa_5 แต่ให้ค่าต่ำมากกับเชื้อแบคทีเรีย *Enterobacter aerogenes*, *Azotobacter sp.*, *Bacillus cereus*, *Xanthomonas campestris* ดังผลการทดลองที่แสดงในตารางที่ 4.3 แสดงว่าสามารถทำปฏิกิริยาก่อนข้างจำเพาะเจาะจงกับ *S. ampelinum* มี cross reaction กับ *Colletotrichum* จากกองุ่น มีปฏิกิริยาบ้างกับ *Fusarium spp.*, *Curvularia lunata*, *Helminthosporium spp.*, *Collectotrichum gloeosporioides* ซึ่งน่าจะหมดไปหากทำแอนติเซรุ่มให้เจือจางลง

ตารางที่ 4.2 การตรวจสอบความเจือจางต่ำสุดที่ยังทำปฏิกิริยากับแอนติเจนได้ (titer)

ระดับความเจือจาง ของ แอนติเซรุ่ม	ค่าดูดกลืนแสงที่ 405 นาโนเมตร ^{1/}		
	ความเข้มข้นของโคนีเดีย (โคนีเดีย/มิลลิลิตร)		
	10 ¹	10 ²	10 ³
1: 16	0.328 ± 0.007	0.309 ± 0.012	0.296 ± 0.009
1: 32	0.252 ± 0.004	0.212 ± 0.005	0.199 ± 0.004
1: 64	0.202 ± 0.002	0.158 ± 0.005	0.161 ± 0.004
1: 128	0.156 ± 0.001	0.124 ± 0.001	0.119 ± 0.003
1: 256	0.122 ± 0.006	0.099 ± 0.002	0.105 ± 0.000
1: 512	0.105 ± 0.001	0.090 ± 0.001	0.091 ± 0.004
1: 1,024	0.088 ± 0.001	0.081 ± 0.003	0.088 ± 0.001
1: 2,048	0.082 ± 0.001	0.082 ± 0.001	0.069 ± 0.008
Normal serum			
1: 256	0.099 ± 0.003	0.101 ± 0.018	0.113 ± 0.011
1: 512	0.086 ± 0.001	0.085 ± 0.001	0.104 ± 0.006
1: 1,024	0.084 ± 0.002	0.089 ± 0.003	0.098 ± 0.014
1: 2,048	0.076 ± 0.006	0.082 ± 0.006	0.095 ± 0.006

^{1/} ค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงที่วัดได้จากเครื่อง ELISA reader ที่ความยาวคลื่น 405 nm ในการทดสอบด้วยวิธี Indirect – ELISA ผลการอ่านค่าจาก 4 ซ้ำ (หุลุม) ต่อตัวอย่าง

ตารางที่ 4.2 การตรวจสอบความเจือจางต่ำสุดที่ยังทำปฏิกิริยากับแอนติเจนได้ (titer) (ต่อ)

ระดับความเจือจาง ของ แอนติเซรุ่ม	ค่าดูดกลืนแสงที่ 405 นาโนเมตร ^{1/} ความเข้มข้นของโคนีเดีย (โคนีเดีย/มิลลิลิตร)		
	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁶
1: 16	0.401 ± 0.023	0.538 ± 0.006	0.554 ± 0.015
1: 32	0.306 ± 0.007	0.468 ± 0.001	0.509 ± 0.030
1: 64	0.259 ± 0.018	0.409 ± 0.005	0.438 ± 0.016
1: 128	0.198 ± 0.001	0.328 ± 0.011	0.337 ± 0.005
1: 256	0.159 ± 0.016	0.267 ± 0.003	0.296 ± 0.003
1: 512	0.116 ± 0.009	0.199 ± 0.000	0.235 ± 0.005
1: 1,024	0.096 ± 0.003	0.133 ± 0.039	0.176 ± 0.008
1: 2,048	0.087 ± 0.008	0.121 ± 0.001	0.126 ± 0.008
Normal serum			
1: 256	0.101 ± 0.002	0.123 ± 0.001	0.122 ± 0.004
1: 512	0.086 ± 0.001	0.105 ± 0.006	0.101 ± 0.001
1: 1,024	0.086 ± 0.002	0.087 ± 0.011	0.087 ± 0.003
1: 2,048	0.085 ± 0.002	0.087 ± 0.001	0.086 ± 0.004

^{1/} ค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงที่วัดได้จากเครื่อง ELISA reader ที่ความยาวคลื่น 405 nm ในการทดสอบด้วยวิธี Indirect – ELISA ผลการอ่านค่าจาก 4 ซ้ำ (หลุม) ต่อตัวอย่าง

ตารางที่ 4.3 ผลการทดสอบความเฉพาะเจาะจงของแอนติเซรุ่มที่ผลิตจากเชื้อ *S. ampelinum* ไอโซเลต Sa_TK1 กับเชื้อ *S. ampelinum* บางไอโซเลตและจุลินทรีย์ชนิดอื่น ๆ

ชนิดของเชื้อ	ความเข้มข้น (โคเน็คติว- เซลล์/มิลลิลิตร)	ค่าดูดกลืนแสง A405
<i>Sphaceloma ampelinum</i>		
Sa_1	2.6×10^6	$0.316 \pm 0.020(+)$
Sa_2	2.4×10^6	$0.225 \pm 0.010(+)$
Sa_3	3.2×10^6	$0.265 \pm 0.030(+)$
Sa_4	2.2×10^6	$0.249 \pm 0.022(+)$
Sa_5	2.0×10^6	$0.195 \pm 0.017(+)$
Sa_6	3.5×10^6	$0.283 \pm 0.024(+)$
<i>Collectotrichum musarum</i>	2.6×10^6	$0.167 \pm 0.008(-)$
<i>Collectotrichum ampelophagum</i> 1	2.2×10^6	$0.228 \pm 0.018(+)$
<i>Collectotrichum ampelophagum</i> 2	4.0×10^6	$0.267 \pm 0.006(+)$
<i>Collectotrichum gloeosporioides</i>	4.3×10^6	$0.109 \pm 0.014(-)$
<i>Collectotrichum ampelophagum</i> 3	2.0×10^6	$0.265 \pm 0.005(+)$
<i>Collectotrichum piperatum</i>	5.0×10^6	$0.089 \pm 0.004(-)$
<i>Curvularia lunata</i>	2.3×10^6	$0.126 \pm 0.003(-)$
<i>Fusarium</i> spp.	5.0×10^6	$0.103 \pm 0.001(-)$
<i>Helminthosporium</i> spp.	2.0×10^6	$0.133 \pm 0.005(-)$
<i>Enterobacter aerogenes</i>	1.0×10^9	$0.094 \pm 0.002(-)$
<i>Azotobacter</i> sp.	1.0×10^9	$0.079 \pm 0.002(-)$
<i>Bacillus cereus</i>	1.0×10^9	$0.080 \pm 0.001(-)$
<i>Xanthomonas campestris</i>	1.0×10^9	$0.077 \pm 0.002(-)$
Blank (carbonate buffer)	-	$0.060 \pm 0.001(-)$

หมายเหตุ * = ค่าเฉลี่ยการอ่านค่าจาก 4 ซ้ำ (หลุม)/ตัวอย่าง
 + = ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้จากเครื่อง ELISA reader ที่ความยาวคลื่น 405 nm มีค่าสูงกว่า negative control 2 เท่า ในการทดสอบด้วยวิธี Indirect – ELISA
 - = ค่าที่อ่านได้จากปฏิกิริยามีค่าไม่แตกต่างจากค่า Blank

4.4 การพัฒนาวิธีการตรวจสอบ Latent infection โดยวิธีทาง serology

4.4.1 วิธี ELISA

การดัดแปลงรูปแบบของวิธี ELISA โดยใช้ชิ้นส่วนของใบบริเวณที่แสดงอาการของโรคสแคเป็น solid surface แทนพื้นที่ผิวของหลุมพลาสติก (plastic plate surface) เมื่อนำชิ้นส่วนของใบมาทดสอบด้วยวิธี ELISA ทุก 2 วัน พบว่า ค่าดูดกลืนแสงของทุกตัวอย่างไม่แตกต่างจาก control ทั้งนี้ที่สุ่มตรวจหลังจากปลูกเชื้อ (0 วัน) แต่ทุกไอโซเลตให้ผลบวก (ค่า A 405 สูงกว่า control เกิน 2 เท่า) หลังจากปลูกเชื้อ 2 วัน ยกเว้นไอโซเลต Sa_1, Sa_2 และ Sa_3 (ตารางที่ 4.4) อย่างไรก็ตามค่าความแตกต่างของ A 405 ระหว่างตัวอย่างที่ได้รับการปลูกเชื้อกับ control มีน้อยลงหลังจากเริ่มปรากฏอาการของโรคในวันที่ 4 (รูปที่ 4.7 และ 4.8) แต่ยังคงสูงกว่า control ในทุกตัวอย่าง

4.4.2 วิธี immunofluorescence microscopy

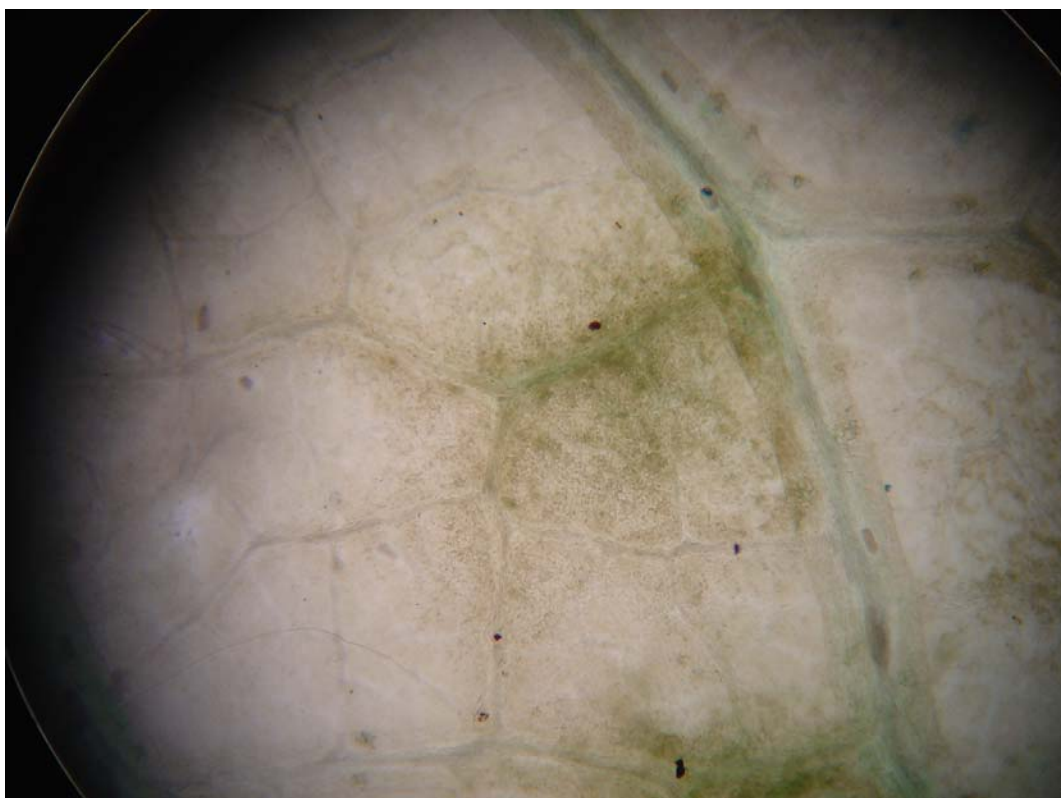
จากการใช้ชิ้นส่วนของใบที่ปลูกเชื้อ *S. ampelinum* นำมาทำปฏิกิริยากับ primary antiserum และ secondary antiserum ที่ติดฉลากกับสาร fluorescein isothiocyanate (FITC) แล้วนำไปตรวจดูการเรืองแสงด้วยกล้องจุลทรรศน์แสงเรือง พบว่า โคนิเดียของเชื้อในแต่ละไอโซเลตมีลักษณะการเรืองแสงที่ต่างกันแบ่งออกเป็นได้ 4 ระดับ ดังแสดงในรูปที่ 4.9 และ 4.10 ซึ่งผลจากการอ่านค่าการเรืองแสงของเชื้อในแต่ละไอโซเลตเปรียบเทียบกับรูปที่ 4.9 และ 4.10 สามารถบันทึกผลในแต่ละไอโซเลต ดังแสดงในตารางที่ 4.5 ลักษณะการเรืองแสงของโคนิเดียในทุกไอโซเลตจะมีการเรืองแสงเข้มที่บริเวณผิวรอบ ๆ โคนิเดีย

ตารางที่ 4.4 แสดงค่าดูดกลืนแสงที่ 405 นาโนเมตร ของเชื้อ *S. ampelinum* จำนวน 27 ไอโซเลต โดยวิธี DAC ELISA กับแอนติเซรุ่ม โดยการใช้ชิ้นส่วนของใบที่แสดงอาการแทน solid surface ของ plastic plate surface

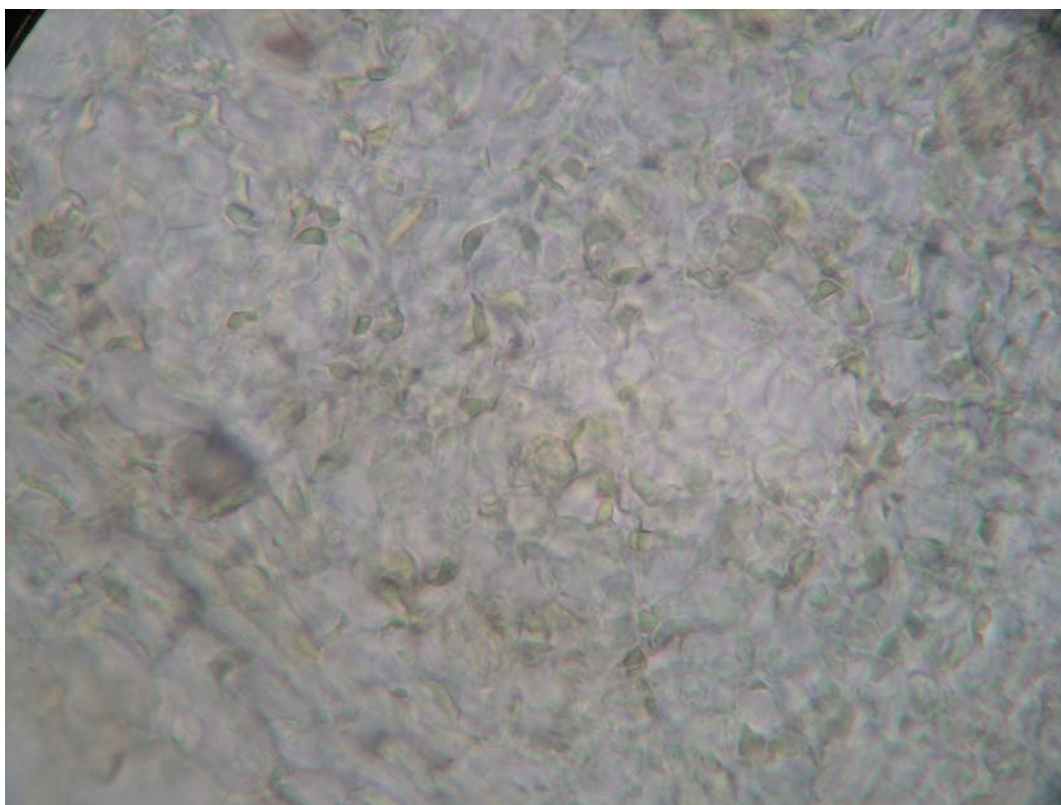
ค่าดูดกลืนแสงที่ 405 นาโนเมตร*			
ไอโซเลต	จำนวนวันหลังปลูกเชื้อ (วัน)		
	0	2	4
Sa_1	0.160±0.001	0.092±0.001	0.210±0.031
Sa_2	0.153±0.001	0.092±0.001	0.269±0.043
Sa_3	0.173±0.007	0.090±0.002	0.311±0.074
Sa_4	0.153±0.005	0.190±0.002	0.228±0.019
Sa_5	0.154±0.014	0.199±0.011	0.246±0.050
Sa_6	0.148±0.007	0.216±0.007	0.241±0.006
Sa_7	0.152±0.001	0.222±0.009	0.237±0.036
Sa_8	0.164±0.009	0.223±0.003	0.229±0.116
Sa_9	0.159±0.001	0.152±0.082	0.201±0.027
Sa_10	0.161±0.009	0.147±0.067	0.262±0.053
Sa_11	0.165±0.003	0.142±0.072	0.337±0.038
Sa_12	0.159±0.010	0.189±0.003	0.239±0.003
Sa_13	0.149±0.007	0.186±0.012	0.246±0.058
Sa_14	0.150±0.009	0.202±0.009	0.254±0.024
Sa_15	0.148±0.004	0.221±0.001	0.218±0.009
Sa_16	0.157±0.019	0.204±0.008	0.279±0.046
Sa_17	0.159±0.002	0.199±0.007	0.229±0.010
Sa_18	0.160±0.011	0.189±0.001	0.231±0.009
Sa_19	0.171±0.010	0.192±0.002	0.284±0.036
Sa_20	0.163±0.008	0.189±0.001	0.226±0.015
Sa_21	0.160±0.007	0.185±0.003	0.210±0.000
Sa_22	0.155±0.002	0.198±0.005	0.259±0.018
Sa_23	0.149±0.005	0.223±0.008	0.243±0.026
Sa_24	0.150±0.009	0.194±0.002	0.231±0.000
Control	0.159±0.019	0.091±0.000	0.196±0.070

หมายเหตุ

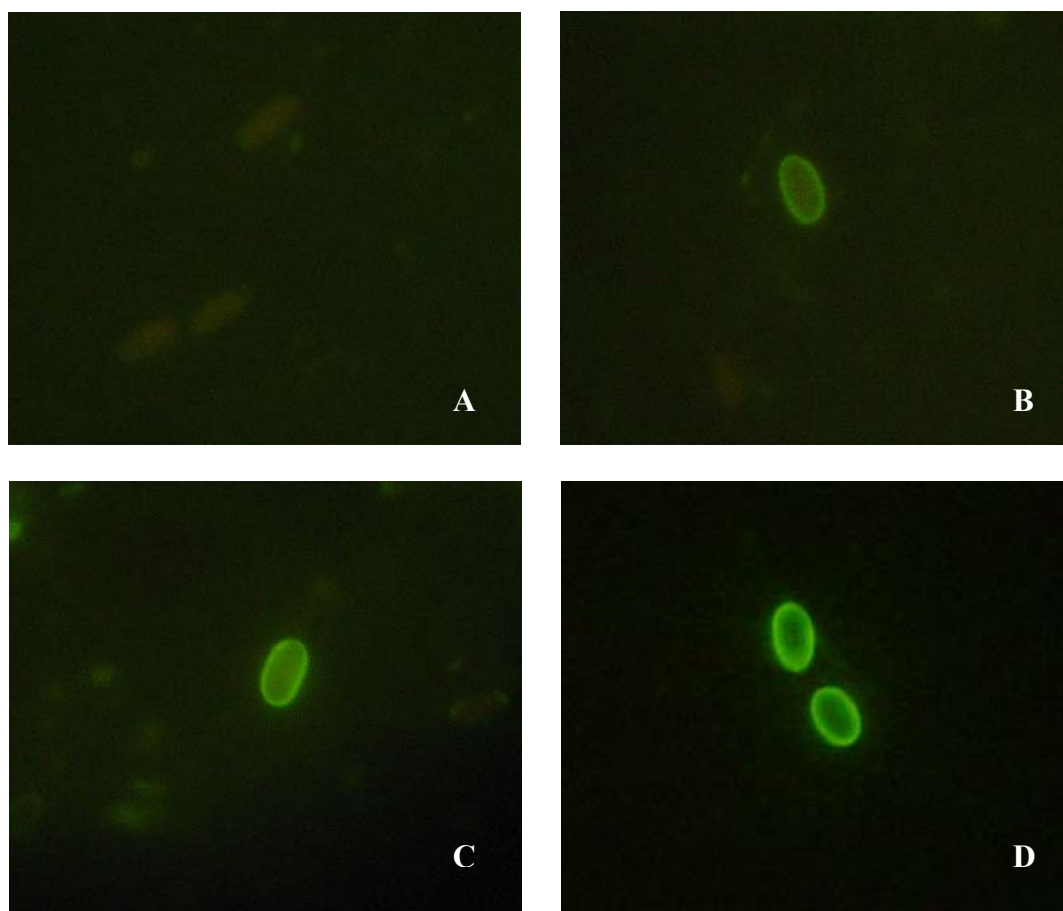
* = ค่าเฉลี่ยการอ่านค่าจาก 2 ซ้ำ/ ตัวอย่าง



รูปที่ 4.7 ลักษณะปรากฏของอาการเริ่มแรกของโรคสแคบหลังจากปลูกเชื้อ 4 วัน(กำลังขยาย 40 x)

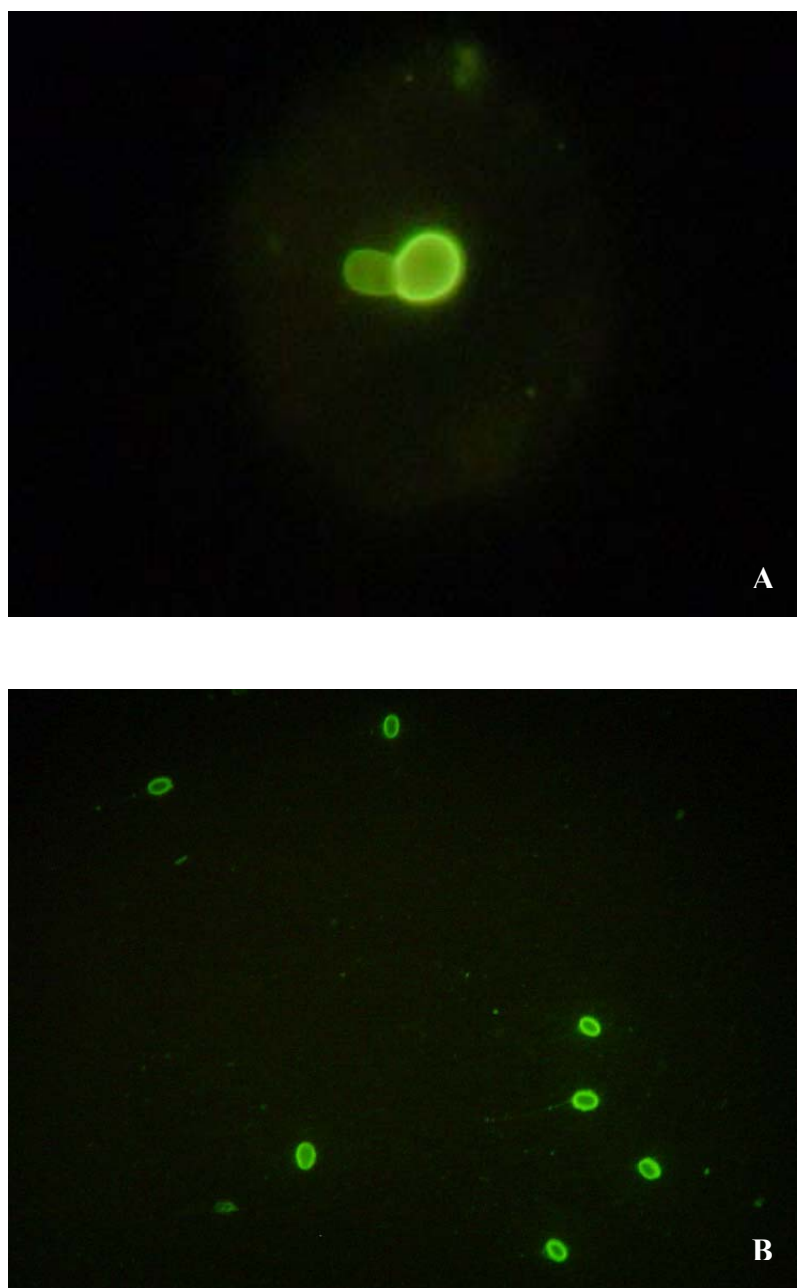


รูปที่ 4.8 ลักษณะปรากฏของอาการเริ่มแรกของโรคสแคบหลังจากปลูกเชื้อ 4 วัน(กำลังขยาย 100x)



รูปที่ 4.9 แสดงการเรืองแสงของเชื้อ *S. ampelinum* ที่ทำการทดสอบโดยวิธี immunofluorescence tests

- (A) โคนีเดียของเชื้อที่ไม่เรืองแสงเมื่อทดสอบด้วย normal serum (-)
- (B) โคนีเดียของเชื้อที่แสดงการเรืองแสงได้น้อย (+)
- (C) โคนีเดียของเชื้อที่แสดงการเรืองแสงได้ปานกลาง (++)
- (D) โคนีเดียของเชื้อที่แสดงการเรืองแสงมากที่สุด (+++)



รูปที่ 4.10 แสดงการเรืองแสงสีเขียวของโคนิเดียของเชื้อ *S. ampelinum* จากการทดสอบโดยวิธี immunofluorescence

(A) การเรืองแสงของโคนิเดียที่กำลังงอก กำลังขยาย 100X

(B) การเรืองแสงของโคนิเดียที่กำลังขยาย 40X

ตารางที่ 4.5 ปฏิกิริยาของเชื้อ *S. ampelinum* ต่อ polyclonal antibody (PAbs) ในการทดสอบด้วย วิธี immunofluorescence tests

ไอโซเลต	ปฏิกิริยาการเรืองแสงสีเขียวแกมเหลืองของ FITC*	
	แอนติเซรุ่ม	Normal serum
Sa_1	++	-
Sa_2	++	-
Sa_3	++	-
Sa_4	++	-
Sa_5	++	-
Sa_6	++	-
Sa_7	+++	-
Sa_8	+	-
Sa_9	+	-
Sa_10	+	-
Sa_11	+	-
Sa_12	+	-
Sa_13	++	-
Sa_14	+	-
Sa_15	+	-
Sa_16	+	-
Sa_17	+	-
Sa_18	+	-
Sa_19	+	-
Sa_20	+	-
Sa_21	+	-
Sa_22	+	-
Sa_23	+	-
Sa_24	+	-
Sa_25	+	-

* คำนีการเรืองแสง: - = ไม่มีการเรืองแสง, + = เรืองแสงได้น้อย, ++ = เรืองแสงได้ปานกลาง, +++ = เรืองแสงมากที่สุด

ตารางที่ 4.5 ปฏิกริยาของเชื้อ *S. ampelinum* ต่อ polyclonal antibody (PAbs) ในการทดสอบด้วย วิธี immunofluorescence tests (ต่อ)

ไอโซเลต	ปฏิกริยาการเรืองแสงสีเขียวแกมเหลืองของ FITC*	
	แอนติเซรัม	Normal serum
Sa_26	++	-
Sa_27	+	-
Sa_28	++	-
Sa_29	++	-
Sa_30	++	-
Sa_31	++	-
Sa_32	++	-
Sa_33	+	-
Sa_34	++	-
Sa_35	++	-
Sa_36	++	-
Sa_37	+	-
Sa_38	+	-
Sa_39	+	-
RSa_2	+	-
RSa_3	+	-
RSa_4	+	-
RSa_5	+	-
RSa_6	++	-
RSa_7	+++	-
RSa_8	+	-
RSa_9	+	-
RSa_10	+	-
RSa_11	++	-
RSa_12	+	-

* ดัชนีการเรืองแสง: - = ไม่มีการเรืองแสง, + = เรืองแสงได้น้อย, ++ = เรืองแสงได้ปานกลาง, +++ = เรืองแสงมากที่สุด

4.5 การศึกษาความหลากหลายของสายพันธุ์เชื้อ *S. ampelinum* โดยเทคนิค serology

4.5.1 วิธี ELISA

เมื่อนำเชื้อ *S. ampelinum* ที่เก็บจากแหล่งปลูกต่าง ๆ ตรวจสอบ ปฏิกริยาทางเซรุ่มวิทยาโดยใช้วิธี ELISA เปรียบเทียบค่าที่วัดได้จากเครื่อง spectrophotometer โดยเชื้อที่ใช้มีความเข้มข้นของสปอร์ในแต่ละไอโซเลตเท่ากัน พบว่า เชื้อในแต่ละไอโซเลตมีค่าดูดกลืนแสงใกล้เคียงกัน มีเฉพาะไอโซเลต Sa_7, Sa_14, Sa_23, Sa_26, Sa_27, Sa_29, Sa_35, Sa_36 และ Sa_37 เท่านั้นที่มีค่าดูดกลืนแสงสูงกว่าไอโซเลตอื่น ๆ ดังแสดงในตารางที่ 4.6

4.5.2 วิธี Gel-double diffusion

การทดสอบแอนติเซรุ่มของเชื้อ *S. ampelinum* พบว่า precipitin band ที่เกิดขึ้นระหว่างเชื้อ *S. ampelinum* ไอโซเลตต่าง ๆ กับแอนติเซรุ่มที่ผลิตได้ ผลที่เกิดขึ้น แสดงว่าแอนติเจนในหลุมที่ 1-5 เป็นแอนติเจนชนิดเดียวกันชนิดเดียวกัน เนื่องจากเส้นตะกอนที่เกิดขึ้นระหว่างแอนติเซรุ่มและแอนติเจนในหลุมทั้งสองจะโค้งมาพบกันและต่อกันเรียบสนิทเป็นเส้นโค้งเดียวกัน ลักษณะเหมือนกันในทุกไอโซเลต (identity) ส่วนการทดสอบแอนติเซรุ่มกับแอนติเจนของเชื้อ *Collectotrichum ampelophagum* นั้น พบว่า แอนติเจนที่มีความสัมพันธ์ทางเซรุ่มวิทยากับเชื้อ แสดงดังรูปที่ 4.11

ตารางที่ 4.6 แสดงค่าดูดกลืนแสงของเชื้อ *S. ampelinum* ความเข้มข้น 10^6 โคณิเดีย/มิลลิลิตรโดยวิธี indirect- ELISA ที่ 405 นาโนเมตร

ไอโซเลต	ค่าดูดกลืนแสงที่ 405 นาโนเมตร*
Sa_1	0.209±0.009
Sa_2	0.236±0.009
Sa_3	0.228±0.012
Sa_4	0.216±0.009
Sa_5	0.209±0.002
Sa_6	0.196±0.009
Sa_7	0.450±0.023
Sa_8	0.200±0.008
Sa_9	0.205±0.005
Sa_10	0.222±0.007
Sa_11	0.239±0.007
Sa_12	0.206±0.004
Sa_13	0.199±0.004
Sa_14	0.401±0.013
Sa_15	0.199±0.003
Sa_16	0.183±0.009
Sa_17	0.188±0.001
Sa_18	0.209±0.011
Sa_19	0.216±0.015
Sa_20	0.255±0.013
Sa_21	0.207±0.010
Sa_22	0.205±0.004
Sa_23	0.314±0.034
Sa_24	0.190±0.008
Sa_25	0.209±0.004
Sa_26	0.476±0.002

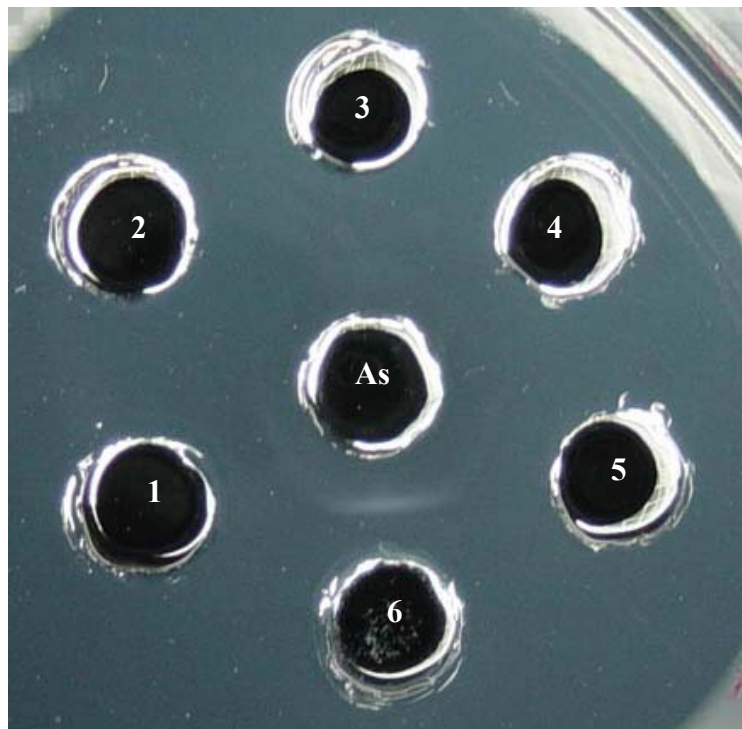
หมายเหตุ

* ค่าเฉลี่ยผลการอ่านค่าจาก 4 ซ้ำต่อตัวอย่าง

ตารางที่ 4.6 แสดงค่าดูดกลืนแสงของเชื้อ *S. ampelinum* ความเข้มข้น 10^6 โคณีย์เดีย/มิลลิลิตร
โดยวิธี indirect- ELISA ที่ 405 นาโนเมตร (ต่อ)

ไอโซเลต	ค่าดูดกลืนแสงที่ 405 นาโนเมตร*
Sa_27	0.334±0.011
Sa_28	0.217±0.004
Sa_29	0.431±0.003
Sa_30	0.265±0.010
Sa_31	0.295±0.007
Sa_32	0.274±0.004
Sa_33	0.312±0.012
Sa_34	0.234±0.020
Sa_35	0.410±0.008
Sa_36	0.313±0.003
Sa_37	0.301±0.006
RSa_2	0.269±0.005
RSa_3	0.221±0.008
RSa_4	0.223±0.005
RSa_5	0.211±0.018
RSa_6	0.246±0.013
RSa_7	0.296±0.016
RSa_8	0.278±0.004
RSa_9	0.274±0.016
RSa_10	0.270±0.004
RSa_11	0.275±0.008
RSa_12	0.246±0.007

หมายเหตุ * ค่าเฉลี่ยผลการอ่านค่าจาก 4 ซ้ำต่อตัวอย่าง



รูปที่ 4.11 แสดงลักษณะ precipitin band ที่เกิดขึ้นระหว่างแอนติเซรุ่มกับแอนติเจนของเชื้อ *S. ampelinum* (1) ไอโซเลต Sa_1 (2) ไอโซเลต Sa_7 (3) ไอโซเลต Sa_8 (4) ไอโซเลต Sa_10 (5) ไอโซเลต Sa_1 (6) เชื้อ *Collectotrichum ampelophagum* ที่แยกได้จากองุ่น

4.6 การศึกษาความหลากหลายของสายพันธุ์เชื้อ *S. ampelinum* จากปฏิกริยาบนพันธุ์องุ่น

จากการปลูกเชื้อ *S. ampelinum* จำนวน 12 ไอโซเลต ลงบนใบองุ่นในพันธุ์ต่าง ๆ 6 พันธุ์ พบว่า สามารถจัดกลุ่มตามลักษณะของการเกิดโรคได้ 6 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 เชื้อสามารถทำให้เกิดโรคในองุ่นได้ทั้งหมด ทุกสายพันธุ์ กลุ่มที่ 2 เชื้อสามารถทำให้เกิดโรคได้ในทุกพันธุ์ยกเว้นพันธุ์ Shiraz กลุ่มที่ 3 เชื้อสามารถทำให้เกิดโรคได้ในทุกพันธุ์ยกเว้นพันธุ์ Centenail และ Delight กลุ่มที่ 4 เชื้อสามารถทำให้เกิดโรคได้ในทุกพันธุ์ยกเว้นพันธุ์ Crimson seedless และ Centenail กลุ่มที่ 5 เชื้อสามารถทำให้เกิดโรคได้ในทุกพันธุ์ยกเว้นพันธุ์ Marroo seedless และ Delight กลุ่มที่ 6 เชื้อสามารถทำให้เกิดโรคได้เฉพาะในพันธุ์ Black queen และ Crimson seedless เท่านั้น ดังแสดงในตารางที่ 4.7

พันธุ์องุ่นที่เกิดโรคน้อยที่สุดได้แก่ พันธุ์ Delight, Centenail, Shiraz, Marroo seedless, Crimson seedless และ Black queen เป็นพันธุ์ที่มีจำนวนไอโซเลตที่ทำให้เกิดโรคได้ คือ 6/12, 7/12, 8/12, 9/12, 10/12 และ 12/12 ไอโซเลต ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4.7 นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อไอโซเลต Sa_8, Sa_1 และ Sa_6 สามารถทำให้องุ่นพันธุ์ Black queen และ Crimson seedless เกิดโรคได้ภายใน 4 วัน ส่วนในไอโซเลตอื่น ๆ จะเกิดโรคกับองุ่นหลังวันที่ 5 ของการปลูกเชื้อ ส่วนเชื้อไอโซเลต Sa_4 และ Sa_7 ทำให้องุ่นพันธุ์ Shiraz และ Delight เกิดโรคหลังจากปลูกเชื้อ 8 วันดังแสดงในตารางที่ 4.9

จากการวัดขนาดของแผล หลังจากการปลูกเชื้อ 7 วัน พบว่า เชื้อไอโซเลต Sa_24 สามารถทำให้เกิดแผลขนาดใหญ่ที่สุดในองุ่นพันธุ์ Black queen ขนาดเท่ากับ 2.282 มิลลิเมตร ไอโซเลต Sa_12 สามารถทำให้เกิดแผลขนาดใหญ่ที่สุดในองุ่นพันธุ์ Crimson seedless ขนาดเท่ากับ 2.336 ไอโซเลต Sa_1 สามารถทำให้เกิดแผลขนาดใหญ่ที่สุดในองุ่นพันธุ์ Marroo seedless ขนาดเท่ากับ 2.180 มิลลิเมตร ไอโซเลต Sa_3 สามารถทำให้เกิดแผลขนาดใหญ่ที่สุดในองุ่นพันธุ์ Centenail ขนาดเท่ากับ 1.836 มิลลิเมตร ไอโซเลต Sa_9 สามารถทำให้เกิดแผลขนาดใหญ่ที่สุดในองุ่นพันธุ์ Delight ขนาดเท่ากับ 1.900 มิลลิเมตร และไอโซเลต Sa_5 สามารถทำให้เกิดแผลขนาดใหญ่ที่สุดในองุ่นพันธุ์ Shiraz ขนาดเท่ากับ 1.680 มิลลิเมตร ดังแสดงในตารางที่ 4.8

ตารางที่ 4.7 แสดงความสามารถในการทำให้เกิดโรคของเชื้อ *S. ampelinum* แต่ละไอโซเลต บนใบองุ่น 6 สายพันธุ์

Isolate	ความสามารถในการทำให้เกิดโรค*					
	BQ	CS	MS	C	D	SR
Sa_3	+	+	+	+	+	+
Sa_5	+	+	+	+	+	+
Sa_6	+	+	+	+	+	-
Sa_9	+	+	+	+	+	-
Sa_2	+	+	+	-	-	+
Sa_24	+	+	+	-	-	+
Sa_7	+	-	+	-	+	+
Sa_11	+	-	+	-	-	-
Sa_1	+	+	+	+	-	+
Sa_12	+	+	-	+	-	+
Sa_4	+	+	-	+	+	+
Sa_8	+	+	-	-	-	-

*หมายเหตุ + = เชื้อทำให้อองุ่นเกิดโรค
 - = เชื้อไม่ทำให้อองุ่นเกิดโรค
 BQ = Black queen
 CS = Crimson seedless
 MS = Marroo seedless
 C = Centenail
 D = Delight
 SR = Shiraz

ตารางที่ 4.8 แสดงขนาดของแผลที่เกิดจากเชื้อ *S. ampelinum* หลังจากปลูกเชื้อ 10 วัน บนใบองุ่น 6 สายพันธุ์

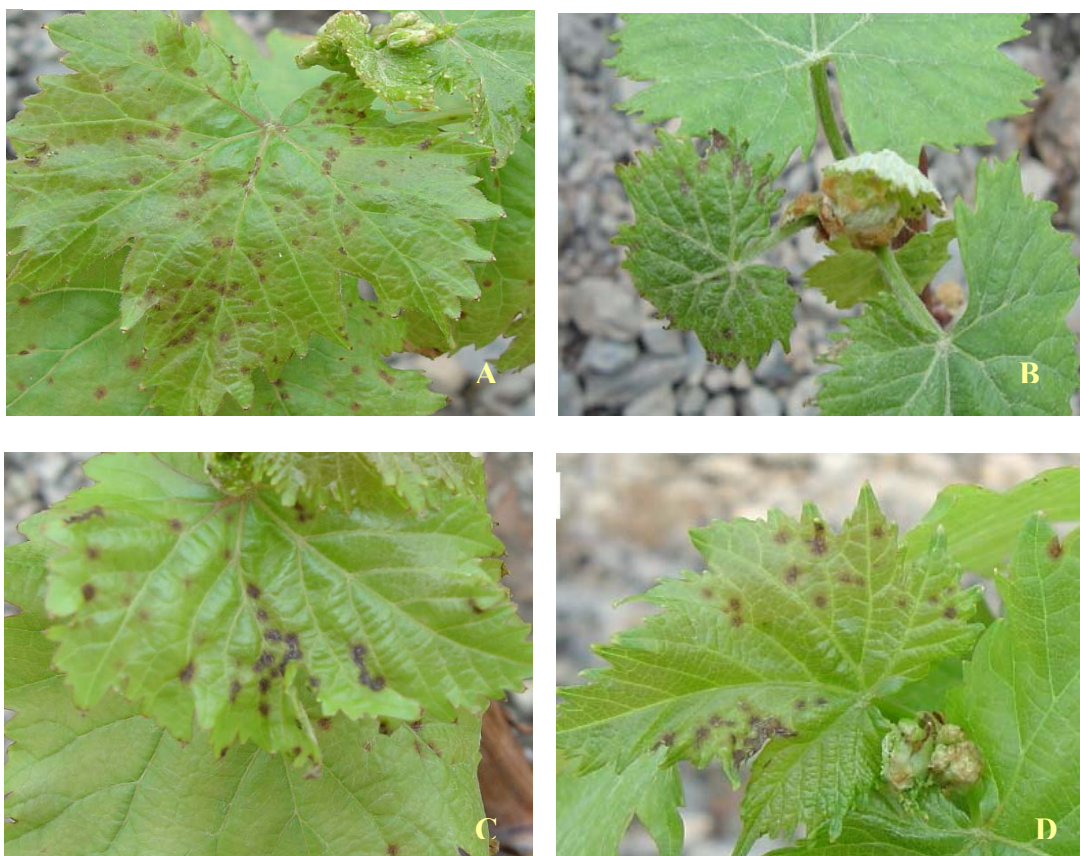
Isolate	ขนาดของแผล (มิลลิเมตร)					
	BQ	CS	MS	C	D	SR
Sa_1	1.820c	1.092f	2.180a	1.440c	0.000f	1.190c
Sa_2	1.480d	1.300e	2.100ab	0.000e	0.000f	0.680e
Sa_3	0.860g	1.680d	2.100ab	1.836a	0.650e	0.900d
Sa_4	1.700c	1.956c	0.000e	1.300d	1.280c	1.400b
Sa_5	1.466d	1.790d	1.816c	1.680b	1.680b	1.680a
Sa_6	2.104b	2.020c	1.760c	1.026d	0.960d	0.000f
Sa_7	2.100b	0.000g	1.100d	0.000e	1.660b	1.400b
Sa_8	2.000b	2.160b	0.000e	0.000e	0.000f	0.000f
Sa_9	1.025f	1.040f	0.956d	1.500c	1.900a	0.000f
Sa_11	1.320e	0.000g	1.200d	0.000e	0.000f	0.000f
Sa_12	2.070b	2.336a	0.000e	1.800ab	0.000f	1.150c
Sa_24	2.282a	2.192b	2.000b	0.000e	0.000f	1.148c

ค่าเฉลี่ยในแนวตั้งที่ตามด้วยอักษรที่ต่างกันมีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับ 0.01 จากการเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT)

ตารางที่ 4.9 แสดงวันแรกที่เชื้อในแต่ละไอโซเลตปรากฏผลบนอุณหภูมิที่ต่าง ๆ

Isolate	BQ	CS	MS	C	D	SR
Sa_1	4	5	5	6	-	6
Sa_2	5	5	5	-	-	6
Sa_3	5	6	5	5	7	7
Sa_4	5	5	-	7	7	8
Sa_5	5	5	5	6	8	6
Sa_6	4	5	6	5	7	-
Sa_7	5	-	6	-	8	6
Sa_8	6	4	-	-	-	-
Sa_9	6	6	7	7	5	-
Sa_11	5	-	5	-	-	-
Sa_12	5	5	-	7	-	6
Sa_24	4	6	5	-	-	6

- = เชื้อไม่ทำให้เกิดอาการผิดปกติ



รูปที่ 4.12 ลักษณะที่เกิดจากเชื้อไอโซเลต Sa_12 บนใบองุ่นพันธุ์ต่าง ๆ

- (A) พันธุ์ Blackqueen
- (B) พันธุ์ Shiraz
- (C) พันธุ์ Crimson seedless
- (D) พันธุ์ Marroo seedless

บทที่ 5

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากการศึกษา วิธีการตรวจสอบการเข้าทำลายของเชื้อ *Sphaceloma ampelinum* สาเหตุโรค สแคบในองุ่นและความหลากหลายของสายพันธุ์เชื้อ พบว่า

1. วิธีการที่สามารถใช้ในการแยกเชื้อจากตัวอย่างขององุ่นที่แสดงอาการของโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพ คือ การแยกเชื้อด้วยวิธี tissue transplanting โดยทำการชักนำให้เชื้อเจริญออกมาจากเนื้อเยื่อที่เป็นโรคโดยนำเนื้อเยื่อที่เป็นโรควางในอาหาร water agar ก่อนในระยะแรกหลังจากนั้น 3 วันจึงทำการเขี่ยย้ายเส้นใยของเชื้อที่เจริญออกมาเลี้ยงในอาหาร potato dextrose agar วิธีการนี้จะสามารถทำให้เชื้อสามารถที่จะเจริญแข่งกับเชื้ออื่น ๆ ที่ปนเปื้อนมากับเนื้อเยื่อพืชได้ดี เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหาร PDA นาน 15 วัน สามารถนำเชื้อมาใช้ในการทดสอบต่าง ๆ ได้ ในการเขี่ยเชื้อเพื่อนำมาทดสอบต้องทำด้วยความระมัดระวังเนื่องจากเชื้อเจริญช้ำมากและเกิดการปนเปื้อนได้ง่าย และเนื้อเยื่อที่นำมาแยกเชื้อควรเป็นเนื้อเยื่อที่แสดงอาการเริ่มแรกของโรค วิธีการที่พัฒนาขึ้นมีประสิทธิภาพดีเท่ากับวิธีที่ กรรณิการ์ เพียนพัคตร์ และคณะ (2545) แนะนำ

2. ลักษณะการเจริญของโคโคนิบนอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่า เชื้อแต่ละไอโซเลตมีลักษณะการเจริญ และสีของโคโคนิ ที่แตกต่างกัน ลักษณะการเจริญของเชื้อเป็นแบบพอกพูนขึ้นด้านบน (gummy growth) (กรรณิการ์ เพียนพัคตร์และคณะ, 2536) ในระยะแรกของการเจริญโคโคนิจะเป็นจุดเล็ก ๆ มีสีครีมปรากฏขึ้น ต่อมาจุดเหล่านั้นจะขยายขนาดใหญ่ขึ้นมีลักษณะเยิ้มมีตั้งแต่สีเหลืองอ่อนจนถึงสีแดงเข้ม ผลการศึกษาขนาดของโคโคนิเดีย พบว่า โคโคนิเดียของเชื้อที่แยกได้จากแหล่งต่าง ๆ มีลักษณะและขนาดใกล้เคียงกัน สปอร์มีลักษณะใส เซลล์เดี่ยว ทรงกระบอก เมื่อโคโคนิเดียแก่เต็มที่จะเห็นวงกลมใสอยู่หัวท้ายเซลล์ (guttule at each end) ผนังของโคโคนิเดียจะมีเมือกหุ้มอีกชั้นหนึ่ง โคโคนิเดียของเชื้อสร้างใน fruiting body เรียกว่า acervulus หรือสามารถเกิดจากการแตกหน่อได้คล้ายยีสต์ การศึกษาลักษณะภายนอกของใบองุ่นที่เป็นโรคด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (scanning electron microscope: SEM) พบว่า โคโคนิเดียของเชื้อมีการรวมตัวหนาแน่นบริเวณเส้นใบ โคโคนิเดียส่วนใหญ่เกิดขึ้นที่บริเวณปลายของ conidiophore ขนาดโคโคนิเดียในการทดลองครั้งนี้มีขนาดอยู่ในช่วง 2.17-3.35 x 5.24-6.83 ไมครอน ซึ่งมีขนาดเล็กกว่าที่รายงานโดยไว้กรรณิการ์ เพียนพัคตร์ และคณะ (2537) ซึ่งมีขนาดอยู่ในช่วง 2.61-4.77 x 6.37-8.75 ไมครอน ซึ่งทั้งลักษณะของโคโคนิและโคโคนิเดียจากการทดลองครั้งนี้สามารถใช้แยกความแตกต่างของเชื้อในแต่ละไอโซเลตได้เนื่องจากเชื้อมีความหลากหลายใน

รูปแบบของการเจริญบนอาหาร และรูปร่างของโคนิเดีย ซึ่งเป็นความแตกต่างทางสัณฐานวิทยา

3. การพัฒนาวิธีการตรวจสอบเชื้อโดยเทคนิคทางเซรุ่มวิทยา พบว่า สามารถกระตุ้นให้กระต่ายสร้างแอนติบอดีที่จำเพาะเจาะจงได้ โดยใช้แอนติเจนที่เตรียมด้วยวิธีการบดเส้นใยและโคนิเดียที่เลี้ยงในอาหาร PDB ซึ่งวิธีการเตรียมแอนติเจนดัดแปลงจากวิธีการของ Sundaram et al., (1991) ที่ใช้โปรตีน บริสุทธิ์ในการผลิตแอนติเซรุ่ม แต่จากการเตรียมแอนติเจนตามที่ได้พัฒนาขึ้นเป็นการใช้โปรตีนรวมที่สกัดโดยการบดเส้นใย พบว่า สามารถกระตุ้นให้กระต่ายสร้างแอนติเซรุ่มได้และแอนติเซรุ่มมีความจำเพาะเจาะจงกับเชื้อ *S. ampelium* ทุกไอโซเลต แต่แอนติเซรุ่มมี cross reaction กับ *Collectotrichum* spp. แต่สามารถแก้ไขได้โดยเจือจางแอนติเซรุ่มก็จะสามารถแก้ไขปัญหานี้ได้ หลังจากนั้น ใช้แอนติเจนที่เตรียมได้ฉีดเข้ากระต่าย ในลักษณะฉีดเข้ากล้ามเนื้อโดยผสม Freund' incomplete adjuvant 2 ครั้ง ร่วมกับการฉีดเข้าเส้นเลือดโดยไม่ผสม Freund's adjuvant 2 ครั้ง พบว่าสามารถกระตุ้นให้กระต่ายสร้างแอนติบอดีที่จำเพาะเจาะจงกับเชื้อ *S. ampelinum* ได้ และมี titer ของแอนติเซรุ่ม 1:1,024 เมื่อทดสอบกับแอนติเจนเข้มข้น 1×10^6 โคนิเดีย/มิลลิลิตร โดยวิธี direct antigen coating indirect ELISA แอนติเซรุ่มที่ได้ทำปฏิกิริยาเฉพาะเจาะจงเฉพาะกับเชื้อ *S. ampelinum* และเชื้อ *Colletotrichum* sp. ที่แยกได้จากองุ่นแต่ไม่ทำปฏิกิริยากับเชื้อ *Colletotrichum* sp. ที่แยกได้จากส้ม พริก กล้วย และมะม่วง เชื้อราสาเหตุโรคพืชชนิดอื่นๆ เช่น เชื้อ *Curvularia lunata*, *Fusarium* spp. และ *Helminthosporium* spp. เชื้อแบคทีเรีย *Enterobacter aerogenes*, *Azotobacter* sp., *Bacillus cereus* และ *Xanthomonas campestris* เมื่อทดสอบโดยวิธี immunofluorescence และ ELISA เพื่อศึกษา Latent infection การดัดแปลงรูปแบบของวิธี ELISA โดยใช้ชิ้นส่วนของใบบริเวณที่แสดงอาการเป็น solid surface แทนพื้นผิวของหลุมพลาสติก (plastic plate surface) สำหรับการพัฒนาการตรวจหาแอนติเจนตั้งแต่ที่ยังไม่ปรากฏอาการหลังจากปลูกเชื้อ 0, 2 และ 4 วัน และเมื่อปรากฏอาการแล้ว พบว่า หลังจากปลูกเชื้อลงบนใบองุ่นแล้วนำมาทดสอบด้วยวิธี ELISA ที่ 0, 2 และ 4 วัน พบว่า สามารถตรวจพบการเข้าทำลายของเชื้อได้หลังจากปลูกเชื้อ 2 วัน โดยที่ยังไม่ปรากฏอาการ ขณะที่ชิ้นส่วนของใบองุ่นปกติให้ผลลบ การใช้รูปแบบนี้ในการทดสอบทำให้ไม่จำเป็นต้องบดละเอียดตัวอย่างเพื่อปลดปล่อยแอนติเจน และน่าจะปรับใช้ตรวจเชื้อในระยะแรกเข้าทำลายซึ่งอาจอยู่ในรูปโคนิเดีย เส้นใยเริ่มงอกหรือ appressorium ที่เกาะติดผิวพืชได้ จากผลการทดลองดังกล่าวทำให้สามารถทำการตรวจการเข้าทำลายของเชื้อได้โดยเมื่อสังเกตว่าสภาพแวดล้อมเอื้ออำนวยและเหมาะสมต่อการเกิดโรค ควรสุ่มใบองุ่นมาตรวจด้วยวิธีดังกล่าวข้างต้นเป็นระยะ เพื่อตรวจหาการเข้าทำลาย ถ้าผลของการตรวจเป็นบวกจะทำให้สามารถทำนายได้ว่าเชื้อเริ่มระบาดในแปลงปลูกแล้ว สามารถทำการป้องกันกำจัดได้ก่อนที่จะเห็นอาการปรากฏ นอกจากนี้ยังทำให้ลดต้นทุนในการผลิตได้ โดยสามารถใช้สารเคมีได้ถูกเวลา ลดการใช้สารเคมี

อย่างแพร่หลายในการฉีดพ่นสารเคมีเป็นโปรแกรม และจากการตรวจสอบการเรืองแสงของ โคนิเดียในแต่ละไอโซเลต พบว่า โคนิเดียของเชื้อทุกไอโซเลตสามารถเรืองแสงได้ และสามารถ แบ่งลักษณะการเรืองแสงได้ 4 ลักษณะ คือ ไม่เรืองแสง, เรืองแสงได้น้อย, เรืองแสงได้ปานกลาง และเรืองแสงมาก วิธีนี้สามารถใช้เพื่อให้สามารถสังเกตการปรากฏของเชื้อในตัวอย่างเนื้อเยื่อ ชัดเจนขึ้น และในขณะเดียวกันก็สามารถบ่งชี้ถึงชนิดหรือประเภทของเชื้อได้ตามระดับความ เฉพาะเจาะจงของชนิดแอนติบอดีที่นำมาใช้ เพราะถึงแม้วิธีการย้อมสีเนื้อเยื่อเชื้อด้วยสารเรืองแสง แล้วตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์เรืองแสง จะเป็นวิธีที่สะดวกและรวดเร็ว แต่ก็เป็นการตรวจทั่วไป เพื่อการเห็นสภาพการมีเชื้อสาเหตุของโรคในเนื้อเยื่อพืชเท่านั้น สำหรับการตรวจเชื้อโดยวิธี immunofluorescence microscopy ให้สามารถแสดงผลการปรากฏของเชื้อในเนื้อเยื่อตลอดจน ความเฉพาะเจาะจงและความเชื่อมั่นในระดับที่ต้องการนั้น ขึ้นอยู่กับวิธีการเตรียมตัวอย่างเนื้อเยื่อที่ นำมาตรวจสอบ รวมทั้งชนิดแอนติบอดี สารเคมีคุณภาพของอุปกรณ์หรือเครื่องมือตลอดจนความ รอบคอบในการแปลผล รวมทั้งประสบการณ์และความชำนาญของผู้ตรวจสอบที่ต้องมีความรู้อย่าง เพียงพอต่อการแยกแยะความเหมือนหรือความแตกต่างของสิ่งต่าง ๆ ที่ปรากฏในภาพสะท้อนจาก กล้องจุลทรรศน์ ดังนั้นในการเลือกใช้วิธีที่จะตรวจสอบการเข้าทำลายของเชื้อ *Sphaceloma ampelinum* สาเหตุโรคสแคบ ในองุ่นควรเลือกใช้วิธี indirect-ELISA เนื่องจาก ง่าย สะดวก รวดเร็ว ถูกต้อง แม่นยำ และตรวจเชื้อในปริมาณน้อยพร้อมทั้งตรวจตัวอย่างได้จำนวนมาก

4. การศึกษาด้วยวิธี ELISA พบว่า เชื้อในแต่ละไอโซเลตมีค่าดูดกลืนแสง A 405 แตกต่างกันแบ่งเป็น 4 กลุ่ม คล้ายกับที่สังเกตจากการเรืองแสง คือ ค่าดูดกลืนแสงไม่ต่างจาก negative control, ค่าดูดกลืนแสงต่ำ, ค่าดูดกลืนแสงปานกลาง และค่าดูดกลืนแสงสูง โดยค่า ดูดกลืนมีความสัมพันธ์ไปในทางเดียวกันกับระดับการเรืองแสง คือ ไอโซเลตที่มีค่าดูดกลืนแสงสูง จะมีการเรืองแสงมาก เมื่อนำไปตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์แสงเรือง ส่วนการทดสอบด้วยวิธี gel double diffusion ใช้ไม่ได้ผล เนื่องจากความเข้มข้นโปรตีนของเชื้อไม่เพียงพอที่จะทำปฏิกิริยากับ แอนติเซรุ่ม นอกจากนั้นเชื้อ *S. ampelinum* มีลักษณะพิเศษ คือ เชื้อมีเมือกใสหุ้มทำให้ การซึมผ่าน วัสดุซึ่งเป็นตัวกลางเป็นไปได้ยาก การเตรียมแอนติเจนโดยใช้สารสกัดจากเชื้อเกิดความหนืดมาก ทำให้ไม่สามารถซึมผ่านได้และไม่สามารถใช้โคนิเดียทั้งโคนิเดียได้เพราะมีขนาดใหญ่ไม่สามารถ ผ่านตัวกลางได้เช่นกัน

5. การศึกษาความหลากหลายของสายพันธุ์เชื้อ *S. ampelinum* จากปฏิกิริยาบนสายพันธุ์ องุ่น พบว่า เมื่อพิจารณาจากความสามารถในการทำให้เกิดโรคทำให้แบ่งเชื้อได้ทั้งหมด 6 กลุ่ม กลุ่มที่ 1 สามารถทำให้เกิดโรคในองุ่นได้ทั้งหมดทุกสายพันธุ์ กลุ่มที่ 2 สามารถทำให้เกิดโรคได้ใน ทุกพันธุ์ยกเว้นพันธุ์ Shiraz กลุ่มที่ 3 สามารถทำให้เกิดโรคได้ในทุกพันธุ์ยกเว้นพันธุ์ Centenail และ Delight กลุ่มที่ 4 สามารถทำให้เกิดโรคได้ในทุกพันธุ์ยกเว้นพันธุ์ Crimson seedless และ Centenail กลุ่มที่ 5 เชื้อสามารถทำให้เกิดโรคได้ในทุกพันธุ์ยกเว้นพันธุ์ Marroo seedless และ

Delight กลุ่มที่ 6 เชื่อสามารถทำให้เกิดโรคได้เฉพาะในพันธุ์ Black queen และ Crimson seedlees เท่านั้น จากผลการทดลองดังกล่าวสามารถให้คำแนะนำกับเกษตรกร ในการเลือกพันธุ์ องุ่นมาปลูกเพื่อแก้ปัญหาโรคสแคบได้และพันธุ์ที่มีจำนวนไอโซเลตที่ทำให้เกิดโรคได้น้อยที่สุดที่ควรแนะนำให้เกษตรกรปลูก คือ พันธุ์ Delight, Centenail และ Shiraz ตามลำดับ และสายพันธุ์ของเชื้อที่เหมาะสมกับการใช้คัดเลือกองุ่นพันธุ์ต้านทานได้แก่ ไอโซเลต Sa_3 และ Sa_5 เนื่องจากสามารถทำให้องุ่นเกิดโรคได้ทั้ง 6 สายพันธุ์ที่ใช้ทดสอบ การทดสอบความหลากหลายในลักษณะนี้เคยมีการทดสอบแล้วโดยใช้องุ่นพันธุ์ White malaga ในการทดสอบเพียงพันธุ์เดียว แต่ผลการทดลอง ดังกล่าวยังไม่ชัดเจนในเรื่องความหลากหลายของเชื้อ เนื่องจากองุ่นพันธุ์ไวท์มะละกาเป็นพันธุ์ที่อ่อนแอ และไม่สามารถใช้เป็นข้อมูลเชิงเปรียบเทียบได้ เพราะเชื้อทุกไอโซเลตทำให้เกิดโรคกับ White malaga อาจเป็นเหตุผลให้การปลูก White malaga ล้มเหลวเพราะเชื้อที่มีทุกไอโซเลตสามารถเข้าทำลายได้ การศึกษาระยะฟักตัวของเชื้อแต่ละไอโซเลตบนองุ่นแต่ละพันธุ์ พบว่า มีความแตกต่างกันขึ้นอยู่กับไอโซเลตและพันธุ์ขององุ่น เชื้อเกือบทุกไอโซเลตจะแสดงอาการค่อนข้างเร็วบนพันธุ์ Black queen (4-6 วัน) แต่จะแสดงอาการช้าในพันธุ์ Shiraz (6-8 วัน) ผลการศึกษา ดังกล่าวแสดงให้เห็นว่า เชื้อ *S. ampelinum* ในประเทศไทยมีความแตกต่างกันทั้งทางสัณฐานวิทยา และปฏิกิริยาต่อสายพันธุ์องุ่น

รายการอ้างอิง

- กานต์ คำทรัพย์. (2546). ชีววิทยา ความสามารถในการก่อให้เกิดโรค และการควบคุมโดยใช้สารเคมี ของเชื้อรา *Sphaceloma ampelinum* de Bary สาเหตุโรคสแคบขององุ่น. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาโรคพืชวิทยา. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 134 หน้า
- กรรณิการ์ เพียนพัคตร์, วิรัช ชูบำรุง และ อุบล คีอประโคน. (2533). โรคเชื้อราขององุ่นที่พบใหม่. **หนังสือพิมพ์กสิกร** 63(5): 444-447.
- กรรณิการ์ เพียนพัคตร์, วิรัช ชูบำรุง และ อุบล คีอประโคน. (2536). โรคสแคบขององุ่น. **วารสารวิชาการเกษตร** 11(2): 66-72.
- กรรณิการ์ เพียนพัคตร์, วิรัช ชูบำรุง และ อุบล คีอประโคน. (2537). อินุบไม่ใช่เตาเผา. **หนังสือพิมพ์กสิกร** 67(2): 124-126.
- กรรณิการ์ เพียนพัคตร์, วิรัช ชูบำรุง และ อภิรักษ์ สมฤทธิ์. (2544). การศึกษาเชื้อราสาเหตุโรคสแคบของฝรั่งในประเทศไทย. **ข่าวสารโรคพืชและจุลชีววิทยา** 11(3): 2-13.
- กรรณิการ์ เพียนพัคตร์, อภิรักษ์ สมฤทธิ์ และ ธนิตย์ ปล่องบรรจง. (2545). การแยกเชื้อราสาเหตุโรคสแคบของพืชต่างๆ ในประเทศไทย. **ข่าวสารโรคพืชและจุลชีววิทยา** 12(1): 14-20.
- กลุ่มเกษตรสัญจร, (ม.ม.ป.). **การปลูกองุ่น(grape)**. สำนักพิมพ์ฐานเกษตรกรรม, ปรานีเจริญปลูกและการพิมพ์. บางซื่อ กรุงเทพมหานคร. หน้า 5-70.
- เฉลิมศักดิ์ อึ้งตระกูล. (2534). การจำแนกเชื้อรา *Fusarium* spp. โดยวิธีทางเคมีวิทยาและอิมมูโนโทรโฟริซิส. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาโรคพืชวิทยา. มหาวิทยาลัยขอนแก่น. 96 หน้า.
- โชคพิศิษฐ์ ชานูนันทพิพัฒน์, ดวงใจ เอี่ยมพนากิจ, เรณู เวชรัตน์พิมล และ พิทยา หลิวเสรี. (2538). การผลิตแอนติเซรัมเพื่อการตรวจสอบ Odontoglossum Ringspot virus โดยวิธีอีไลซา. **วารสารวิทยาศาสตร์ มศว** 11(1): 2-14.
- อุทัย สกุลแรมรุ่ง. (2539). **วิทยาภูมิคุ้มกัน**. ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย: 92-96.
- ณัฐพร อุทัยมงคล และณัฐจิมา โหมยิตเจริญกุล. (2546). การผลิตแอนติเซรัมใช้ในการตรวจสอบเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบจุดมะเขือเทศ. **วารสารโรคพืช** 17(1-2): 33-39.
- เดือนใจ กาหลง, สุชาติ วิจิตรานนท์และแสงมณี ชิงดวง. (2545). โรคไม้ผล. สมาคมนักโรคพืชแห่งประเทศไทย. 60-71.

- นันทกร บุญเกิด. (2545). **คู่มือการสร้างสวนองุ่น**. สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี. หน้า 1-36.
- ประสาทร สมิตะมาน. (2537). **โรคพืชวิทยา**. ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- ไพโรจน์ จ้างพานิช. (2525). **หลักวิชาโรคพืช**. บริษัทสารมวลชน จำกัด. กรุงเทพฯ.
- พรทิพย์ วงศ์แก้ว. (2544). **มอลลิกิวต์สาเหตุโรคพืช**. พิมพ์ครั้งที่ 1. ขอนแก่นพิมพ์พัฒนา. ขอนแก่น. 482 น.
- โสภณ วงศ์แก้ว. (2536). **โรคไวรัสลั่วลิสงในประเทศไทย**. กลุ่มพืชน้ำมัน กองส่งเสริมไร่นา กรมส่งเสริมการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.
- ขงยุทธ ชำรงนิมิตร. (2547). **โรคไม้ผล**. อักษรสยามการพิมพ์. ภาษีเจริญ กรุงเทพมหานคร. 43-53.
- วันณรงค์ เหล่าประดิษฐ์. (2542). **องุ่น(Grapes)**. วารสารส่งเสริมการเกษตร. 16-18.
- สุนันท์ ตีระวัฒนพงษ์ และอรทัย กังวาลชิรธาดา. (2539). ปฏิกริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดี; **วิทยานิพนธ์การศึกษาระดับปริญญาโท**. หน่วยภูมิคุ้มกันวิทยา ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ.
- สุรลักษณ์ รอดทอง. (2536). **คู่มือปฏิบัติการจุลชีววิทยา**. สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี นครราชสีมา.
- Bedi, P.S., Singh, G. and Suryanaryana, D. (1969). Field evaluation of Aureofungin and other chemicals to control anthracnose disease of grapes in Punjab. **Hindustan Antibiotic Bulletin**, 11:251-253.
- Bedi, J.S., Jhooty, J.S. and Cheema, S.S. (1986). Field reaction of different grapevine cultivars to anthracnose caused by *Sphaceloma ampelinum*. **Punjab Horticultural Journal**, 26(1/4): 74-77
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem** 72: 248-254.
- Brook, P. J. (1973). Epidemiology of grapevine anthracnose, caused by *Elsinoe ampelina*. **New Zealand Journal of Agricultural Research**, 16(3):333-342.

- Brook, P. J. (1992). Epidemiology of grapevine anthracnose and downy mildew in an Auckland, New Zealand vineyard. **New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science**, 20(1):37-49.
- CAB international. (1999). Crop protection compendium [CD]. Walingford : CA visual object.
- Cheema, S. S., Kapur, S. P., Chohan, J. S. and Jeyarajan, R. (1978). Studies on the cultural and pathogenic variations of *Sphaceloma ampelinum*, the causal organism of the anthracnose disease of grape. **Indian Phytopath.** 31(2):163-166.
- Chen, X.P. and Shao, B.F. (1991). A preliminary report on the experimental effect of a new antagonist *Brevibacterium* strain M in crops. **Acta Agriculturae Universitatis Zhejiangensis**, 17(4): 427-430.
- Fenell, J. L. (1948). Inheritance studies with the tropical grape. **Journal Heredity**, 34 : 54-64.
- Goodell, B. S., Jellison, J., and Hosli, J.P. (1988). Serological detection of wood decay fungi. **Forest. Prod. J.** 38: 59-62.
- Gooding, G. V. (1966). Preparation of macromolecular antigens from *Fomes annosus*. **Phytopathology** 56: 1310-1311.
- Harrison, J. G., Barker, H., Lowe, R. and Rees, E. A. (1990). Estimation of amounts of *Phytophthora infestans* mycelium in leaf tissue by enzyme-linked immunosorbent assay. **Plant Pathology** 39: 274-277.
- Harrison, J.G., Rees, E.A., Barker, H. and Lowe, R. (1993). Detection of spore balls of *Spongospora subterranean* on potato tubers by enzyme-linked immunosorbent assay. **Plant Pathology** 42: 181-186.

- Hopkins, D. I. and Harris, J. W. (2000). A greenhouse method for screening grapevine seedling for resistance to anthracnose. **Hort. Science** 35(1): 89-91.
- Iyer, M. S. and Cousin, M. A. (2003). Immunological detection of *Fusarium* species in cornmeal. **Journal of food protection** 66(3): 451-456.
- Jayasankar, S., Li, Z. and Gray, J. D. (1999). In-vitro selection of *Vitis vinifera* ‘Chardonnay’ with *Elsinoe ampelina* culture filtrate is accompanied by fungal resistance and enhanced secretion of chitinase. **Planta** : 200-208
- Jayasankar, S., Li, Z. and Gray, J. D. (2003). Constitutive expression of *Vitis vinifera* thaumatin-like protein after in vitro selection and its role in anthracnose resistance. **Functional Plant Biology** 30: 1105-1115.
- Jenkins, A.E. (1925). The citrus scab fungus. **Phytopathology** 15: 99-103
- Kansal, V. K. and Lal, B. M. (1976). Changes in lipids during growth in *Gloeosporium ampelophagum*. **Indian Journal of Experimental Biology**, 14(4):463-465.
- Kumar, S., Thind, T. S. and Chander, M. (1995). Morphogenic and pathogenic variation in *Gloeosporium ampelophagum*. **Indian Phytopath.** 48(3):331-334.
- Lyon, A.V. and Walters, D.W. (1941). Production of dried grapes in murray Valley irrigation settlement. **Bulletin Country Science Industrial Research Australia**, 143:48.
- MacDonald, J. D. and Duniway, J. M. (1979). Use of fluorescent antibodies to study the survival of *Phytophthora megasperma* and *P. cinnamomi* zoospores in soil. **Phytopathology** 69:436-441.

- Mohan, S. B. (1988). Evaluation of antisera raised against *Phytophthora fragariae* for detecting the red core disease of strawberries by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Plant Pathology** 37: 206-216.
- Mohan, S. B. (1989). Cross-reactivity of antiserum raised against *Phytophthora fragariae* with other *Phytophthora* species and its evaluation as a genus-detecting antiserum. **Plant Pathology** 38: 352-363.
- Mohanraj, D., Vidhyasekaran, P., Kandaswamy, T. K. and Govindaswamy, C. V. (1971). Organic acids in grapevine leaves in relation to anthracnose disease resistance. **Indian Phytopath.** 24:339-342.
- Mortensen, J. A. (1981). Sources and inheritance of resistance to anthracnose in *Vitis*. **Journal of Heredity**, 72(6): 423-426.
- Naik, S. T., Sastry, M. N. L., Lingaraju, S. (1987). Host-parasite interaction of *Sphaceloma ampelinum*. **Indian Phytopath.** 40(4): 547-548.
- Nilnond, S. (2001). Grape production in Thailand. **Food and Agriculture Organization of The United Nations Regional Office for Asia and The Pacific Bangkok**, Thailand, July 2001.
- Quimio, T. H. and Quimio, A. J. (1975). Notes of Philippine grape and guava anthracnose. **Plant Dis. Rep.** 59(3): 221-224.
- Prasad, A., Nirvan, R.S. (1965). Grape anthracnose and its control. **Punjab Fruit Journal**, 5:185-190.
- Quimio, T. H. and Quimio, A. J. (1975). Notes of Philippine grape and guava anthracnose. **Plant Dis. Rep.** 59(3): 221-224.
- Rao, K.C. and Satyanarayana, A. (1989). Epidemiology of anthracnose of grape (*Vitis vinifera*) caused by *Elsinoe ampelina* around Hyderabad. **Indian Journal of Agricultural Sciences**, 59(10): 655-657.

- Ravaz, L. (1927). Anthracnose. **Progressive Agriculture and Viticulture**, 87: 3-7.
- Salinas, J. and Schots, A. (1994). Monoclonal antibodies-based immunofluorescence test for detection of conidia of *Botrytis cinerea* on cut flower. **Phytopathology** 84 (4) : 351-356.
- Schaad, N. W. (1978). Use of direct and indirect immunofluorescence tests for identification of *Xanthomonas campestris*. **Phytopathology** 68: 249-252.
- Shear, C. L. (1929). The life history of *Sphaceloma ampelina* de-Bary and *Gloeosporium ampelophagum* Sac. **Phytopathology**, 19(7): 673-679.
- Smith, P.C. and Stewart, W.C. (1978). Agar-gel immunodiffusion assay for Pseudorabies virus antibody. **Journal of Clinical Microbiology** 7(5):423-425.
- Suhag, L.S. and Daulta, B.S. (1981). A note on the incidence and distribution of grape-vine anthracnose under different systems of training. **Indian Journal of Mycology and Plant Pathology**, 11(1):108-109.
- Suhag, L. S., Kaushik, J. C. and Duhan, J. C. (1980). Incidence of four fungal diseases on the foliage of grapevine varieties grown in Haryana. **Indian Phytopath.** 33(3): 472-474.
- Suhag, L. S., Grover, R. K. and Kaushik, J.C. (1982). Variability in *Sphaceloma ampelinum* and the performance of grapevine cultivars against the pathogen. **Indian Phytopath.** 35(3): 526-528.
- Sundaram, S., Plasencia, J. and Banttari, E. E. (1991). Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of *Verticillium* spp. using antisera produced to *V. dahliae* from potato. **Phytopathology** 81:1485-1489.

- Thind, S.K., Monga, P.K., Kaur, N., Arora, P.K. and Kumar, H. (1997). Evaluation of promising grape varieties against anthracnose and its fungicidal control. **Plant Disease Research**, 12(1): 99-100.
- Thind, S.K., Monga, P.K. and Kaur, N. (1998). Studies on the control of grape anthracnose. **Annual Report, Punjab Agricultural University**, Regional Fruit Research Station, Abohar, India: 118-122.
- Todorova, M. (1980). Anthracnose of grapevine and the means for its control. **Rastitelna Zashchita**, 28(7):25-26.
- Taylor, R.H. (1954). Black spot of the vine, new recommendations for control. **Journal Department of Agriculture, Victoria**, 52(2): 370-374.
- Velicheti, R. K., Lamison, C., Brill, L.M., and Sinclair, J.B. (1993). Immunodetection of *Phomopsis* species in asymptomatic soybean plants. **Plant Dis.** 77: 70-73.
- Vidhyasekaran, P., Sivaprakasam, K. and Padmanabhan, D. (1972). Role of ascorbic acid in the grapevine anthracnose disease incidence. **Labdev Journal of Science and Technology**, B, 10(3/4): 120-122.
- Wang, Y., Liu, Y. and He, P. (1998). Resistance of Chinese *Vitis* species to *Elsinoe ampelina* (de Bary) Shear. **Hort. Science** 33(1): 123-126.
- Yong, R. K., and Cousin, M. A. (1995). Nonspecific enzyme-linked immunosorbent assay for molds in foods. **Journal of Food Science** 60(6): 1357-1363.

ภาคผนวก

1. สารเคมีที่ใช้ในวิธี **Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)**

1.1 0.05 M Carbonate coating buffer, pH 9.6

Na ₂ CO ₃	1.59	กรัม
NaHCO ₃	2.93	กรัม
NaN ₃	0.20	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร
ปรับ pH ให้เป็น 9.6		

1.2 0.02 M Phosphate Buffer Saline Tween (PBS) pH 7.4

NaCl	8.0	กรัม
KH ₂ PO ₄	0.2	กรัม
Na ₂ HPO ₄	2.9	กรัม
KCl	0.2	กรัม
NaN ₃	0.2	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

1.3 Phosphate Buffer Saline Tween (PBS-T)

0.02 M, pH 7.4	1.0	ลิตร
tween-20	0.5	มิลลิลิตร

1.4 Conjugate Buffer

polyvinyl pyrrolidone 40T (PVP)	2.0	กรัม
ovalbumin (egg albumin)	2.0	กรัม
PBS-T	1.0	ลิตร

1.5 Substrate Buffer pH 9.8

Diethanolamine	100	มิลลิลิตร
NaN ₃	0.2	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร
ปรับ pH ให้เป็น 9.8		

1.6 3M KOH

KOH	168.327	กรัม
น้ำกลั่นปริมาตร	1000	มิลลิลิตร

****** สารเคมีที่เตรียมเสร็จแล้วจะต้องเก็บรักษาไว้ในตู้เย็นจนกว่าจะใช้และไม่ควรเก็บไว้นานเกิน 1 เดือน

2. อาหารเลี้ยงเชื้อรา

2.1 Potato dextrose agar (PDA)

มันฝรั่ง	200	กรัม
Dextrose หรือ glucose	20	กรัม
วุ้นผง (Agar)	18	กรัม
น้ำกรองหรือน้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

หั่นมันฝรั่งที่ปอกเปลือกแล้วเป็นชิ้นขนาดประมาณ 1 ลบ.ซม. ต้มกับน้ำ 500 มิลลิลิตร จนนิ่ม กรองเอาเฉพาะน้ำสกัด ผสม dextrose ทั้งหมดลงในน้ำสกัด นำไปผสมกับวุ้นผงที่ต้มจนละลายแล้ว ด้วยน้ำส่วนที่เหลือ คนให้เข้ากัน เติมน้ำให้ครบ 1 ลิตร แบ่งใส่ภาชนะเพื่อนำเข้านึ่งภายใต้ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว หรืออุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15-20 นาที

2.2 Potato dextrose broth (PDB)

มันฝรั่ง	200	กรัม
Dextrose หรือ glucose	20	กรัม
น้ำกรองหรือน้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

2.3 Water agar (WA)

วุ้น	15-18	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

วิธีเตรียมคล้ายกันกับ PDA แต่ไม่ต้องต้มน้ำสกัด ใช้แยกเชื้อรา

ตารางที่ 1 แสดงขนาดของแผลที่เกิดจากการปลูกเชื้อจำนวน 12 ไอโซเลตบนอรุ่นพันธุ์ **Black queen**

พันธุ์	ไอโซเลต	ขนาดของแผลหลังปลูกเชื้อ (มิลลิเมตร) ^{1/}					
		วันที่ 5	วันที่ 6	วันที่ 7	วันที่ 8	วันที่ 9	วันที่ 10
Black queen	Sa_8	0.7071 e	1.2538 a	1.2962 a	1.4422 a	1.4832 bc	1.5811 b
	Sa_1	1.0000 d	1.0260 f	1.1165 b	1.3525 cd	1.4534 c	1.5227 c
	Sa_6	1.1124 bc	1.2586 a	1.2540 a	1.4355 a	1.5222 ab	1.6109 b
	Sa_24	1.1439 ab	1.1722 bc	1.2798 a	1.4251 ab	1.5166 ab	1.6666 a
	Sa_7	1.0000 d	1.0488 ef	1.1402 b	1.4394 a	1.5100 ab	1.6124 b
	Sa_5	1.0280 d	1.0059 f	1.1716 b	1.2909 e	1.4013 d	1.4013 d
	Sa_9	0.7071 e	1.1004 de	1.0209 c	1.2220 f	1.2220 f	1.2315 f
	Sa_12	1.1798 a	1.2247 ab	1.2604 a	1.3711 c	1.5457 a	1.6029 b
	Sa_2	1.0785 c	1.0573 ef	1.2351 a	1.3249 de	1.4067 d	1.4067 d
	Sa_4	1.1124 bc	1.1019 de	1.2979 a	1.3875 bc	1.4832 bc	1.4832 c
	Sa_11	1.0000 d	1.1325 cd	1.2832 a	1.3476 cd	1.3476 e	1.3476 e
	Sa_3	1.0000 d	1.0000 f	1.1655 b	1.1655 g	1.1655 g	1.1655 g

^{1/} ค่าเฉลี่ยจากจำนวน 10 แผล

ค่าเฉลี่ยในแนวดิ่งที่ตามด้วยอักษรที่ต่างกันมีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับ 0.01 จากการเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT)

ตารางที่ 2 แสดงขนาดของแผลที่เกิดจากการปลูกเชื้อจำนวน 12 ไอโซเลตบนองุ่นพันธุ์ Crimson seedless

พันธุ์	ไอโซเลต	ขนาดของแผลหลังปลูกเชื้อ (มิลลิเมตร) ^{1/}					
		วันที่ 5	วันที่ 6	วันที่ 7	วันที่ 8	วันที่ 9	วันที่ 10
Crimson seedless	Sa_8	0.8944 c	1.1402 a	1.4422 a	1.3416 cd	1.5166 a	1.6310 b
	Sa_1	0.9743 b	1.0932 abc	1.0669 d	1.2584 f	1.2584 c	1.2584 f
	Sa_6	0.8822 c	0.9932 d	1.2140 c	1.3809 bc	1.4892 a	1.5833 c
	Sa_24	0.7071 e	1.0657 bc	1.1952 c	1.2675 ef	1.4817 a	1.6389 b
	Sa_7	0.7071 e	0.7071 e	0.7071 f	0.7071 h	0.7071 d	0.7071 g
	Sa_5	1.0449 a	1.1092 ab	1.3069 b	1.4032 b	1.5100 a	1.5133 d
	Sa_9	0.7071 e	1.0000 d	1.0000 e	1.1832 g	1.2372 c	1.2372 f
	Sa_12	1.0428 a	1.0993 abc	1.3565 b	1.4649 a	1.4955 a	1.6828 a
	Sa_2	0.8367 d	1.0670 bc	1.2106 c	1.2913 ef	1.3416 b	1.3416 e
	Sa_4	1.0000 ab	1.0477 cd	1.1199 d	1.3754 bc	1.4784 a	1.5661 c
	Sa_11	0.7071 e	0.7071 e	0.7071 f	0.7071 h	0.7071 d	0.7071 g
	Sa_3	0.7071 e	1.0000 d	1.1124 d	1.3038 de	1.4765 a	1.4765 d

^{1/} ค่าเฉลี่ยจากจำนวน 10 แผล

ค่าเฉลี่ยในแนวดิ่งที่ตามด้วยอักษรที่ต่างกันมีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับ 0.01 จากการเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT)

ตารางที่ 3 แสดงขนาดของแผลที่เกิดจากการปลูกเชื้อจำนวน 12 ไอโซเลตบนองุ่นพันธุ์ Marroo seedless

พันธุ์	ไอโซเลต	ขนาดของแผลหลังปลูกเชื้อ (มิลลิเมตร) ^{1/}					
		วันที่ 5	วันที่ 6	วันที่ 7	วันที่ 8	วันที่ 9	วันที่ 10
Marroo seedless	Sa_8	0.7071 e	0.7071 e	0.7071 f	0.7071 f	0.7071 g	0.7071 f
	Sa_1	1.0076 b	1.0503 b	1.2030 b	1.3326 bc	1.4606 b	1.6371 a
	Sa_6	0.7071 e	1.0477 b	1.1571 bc	1.2390 d	1.3975 d	1.5020 c
	Sa_24	1.0000 b	1.0146 bc	1.1565 bc	1.2962 c	1.4491 bc	1.5811 b
	Sa_7	0.7071 e	1.0000 bc	1.0000 d	1.1402 e	1.2626 f	1.2626 d
	Sa_5	1.1611 a	1.1759 a	1.3069 a	1.3848 a	1.5199 a	1.5199 c
	Sa_9	0.7071 e	0.7071 e	1.0181 d	1.1428 e	1.2416 f	1.1974 e
	Sa_12	0.7071 e	0.7071 e	0.7071 f	0.7071 f	0.7071 g	0.7071 f
	Sa_2	0.8367 c	0.9717 c	1.1150 c	1.3416 b	1.4832 ab	1.6124 ab
	Sa_4	0.7071 e	0.7071 e	0.7071 f	0.7071 f	0.7071 g	0.7071 f
	Sa_11	0.7746 d	0.7746 d	0.8757 e	1.3038 bc	1.3038 e	1.3038 d
	Sa_3	0.8367 c	1.0382 b	1.1904 b	1.4103 a	1.4102 cd	1.6124 ab

^{1/} ค่าเฉลี่ยจากจำนวน 10 แผล

ค่าเฉลี่ยในแนวนอนที่ตามด้วยอักษรที่ต่างกันมีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับ 0.01 จากการเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT)

ตารางที่ 4 แสดงขนาดของแผลที่เกิดจากการปลูกเชื้อจำนวน 12 ไอโซเลตบนอรุ่นพันธุ์ Centenail

พันธุ์	ไอโซเลต	ขนาดของแผลหลังปลูกเชื้อ (มิลลิเมตร) ^{1/}					
		วันที่ 5	วันที่ 6	วันที่ 7	วันที่ 8	วันที่ 9	วันที่ 10
Centenail	Sa_8	0.7071 c	0.7071 d	0.7071 e	0.7071 d	0.7071 f	0.7071 e
	Sa_1	0.7071 c	0.9207 b	1.0335 cd	1.2554 c	1.2823 d	1.3920 c
	Sa_6	1.1057 a	1.1554 a	1.2653 a	1.3881 a	1.4352 b	1.5575 a
	Sa_24	0.7071 c	0.7071 d	0.7071 e	0.7071 d	0.7071 f	0.7071 e
	Sa_7	0.7071 c	0.7071 d	0.7071 e	0.7071 d	0.7071 f	0.7071 e
	Sa_5	0.7071 c	1.1402 a	1.2247 a	1.2962 c	1.4765 a	1.4765 b
	Sa_9	0.7071 c	0.7071 d	1.1137 b	1.2649 c	1.4116 b	1.4116 c
	Sa_12	0.7071 c	0.7071 d	0.9871 d	1.2556 c	1.3486 c	1.5166 ab
	Sa_2	0.7071 c	0.7071 d	0.7071e	0.7071 d	0.7071 f	0.7071 e
	Sa_4	0.7071 c	0.7071 d	1.1124 b	1.3416 b	1.3416 c	1.3416 d
	Sa_11	0.7071 c	0.7071 d	0.7071 e	0.7071 d	0.7071 f	0.7071 e
	Sa_3	0.7746 b	0.8367 c	1.0724 bc	1.2755 c	1.2394 e	1.5282 a

^{1/} ค่าเฉลี่ยจากจำนวน 10 แผล

ค่าเฉลี่ยในแนวตั้งที่ตามด้วยอักษรที่ต่างกันมีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับ 0.01 จากการเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT)

ตารางที่ 5 แสดงขนาดของแผลที่เกิดจากการปลูกเชื้อจำนวน 12 ไอโซเลตบนอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส พันธุ์ Delight

พันธุ์	ไอโซเลต	ขนาดของแผลหลังปลูกเชื้อ (มิลลิเมตร) ^{1/}					
		วันที่ 5	วันที่ 6	วันที่ 7	วันที่ 8	วันที่ 9	วันที่ 10
Delight	Sa_8	0.7071 b	0.7071 c	0.7071 d	0.7071 e	0.7071 f	0.7071 f
	Sa_1	0.7071 b	0.7071 c	0.7071 d	0.7071 e	0.7071 f	0.7071 f
	Sa_6	0.7071 b	0.7071 c	0.7071 d	1.1846 c	1.1846 d	1.2041 d
	Sa_24	0.7071 b	0.7071 c	0.7071 d	0.7071 e	0.7071 f	0.7071 f
	Sa_7	0.7071 b	0.7866 b	1.0000 b	1.2184 c	1.4559 b	1.4685 b
	Sa_5	0.7071 b	0.7071 c	1.1825 a	1.3342 a	1.4765 b	1.4765 b
	Sa_9	1.0000 a	1.0955 a	1.1558 a	1.2867 b	1.5489 a	1.5489 a
	Sa_12	0.7071 b	0.7071 c	0.7071 d	0.7071 e	0.7071 f	0.7071 f
	Sa_2	0.7071 b	0.7071 c	0.7071 d	0.7071 e	0.7071 f	0.7071 f
	Sa_4	0.7071 b	0.7071 c	0.7071 d	1.2649 b	1.3342 c	1.3342 c
	Sa_11	0.7071 b	0.7071 c	0.7071 d	0.7071 e	0.7071 f	0.7071 f
	Sa_3	0.7071 b	0.7071 c	0.8944 c	1.0561 d	1.0701 e	1.0701 e

^{1/} ค่าเฉลี่ยจากจำนวน 10 แผล

ค่าเฉลี่ยในแนวตั้งที่ตามด้วยอักษรที่ต่างกันมีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับ 0.01 จากการเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT)

ตารางที่ 6 แสดงขนาดของแผลที่เกิดจากการปลูกเชื้อจำนวน 12 ไอโซเลตบนองุ่นพันธุ์ Shiraz

พันธุ์	ไอโซเลต	ขนาดของแผลหลังปลูกเชื้อ (มิลลิเมตร) ^{1/}					
		วันที่ 5	วันที่ 6	วันที่ 7	วันที่ 8	วันที่ 9	วันที่ 10
Shiraz	Sa_8	0.7071a	0.7071e	0.7071f	0.7071e	0.7071f	0.7071f
	Sa_1	0.7071 a	1.0699 ab	1.2319 a	1.2993 b	1.2993 c	1.2993 c
	Sa_6	0.7071 a	0.7071 e	0.7071 f	0.7071 e	0.7071 f	0.7071 f
	Sa_24	0.7071 a	1.0000 c	1.0981 c	1.2830 b	1.2830 c	1.2830 c
	Sa_7	0.7071 a	1.0382 abc	1.0000 d	1.1546 c	1.3784 b	1.3784 b
	Sa_5	0.7071 a	1.0795 a	1.1618 b	1.3590 a	1.4742 a	1.4742 a
	Sa_9	0.7071 a	0.7071 e	0.7071 f	0.7071 e	0.7071 f	0.7071 f
	Sa_12	0.7071 a	1.0150 bc	1.1121 bc	1.2832 b	1.2832 c	1.2832 c
	Sa_2	0.7071 a	0.7746 d	0.8944 e	1.0488 d	1.0863 e	1.0863 e
	Sa_4	0.7071 a	0.7071 e	0.7071 f	1.3784 a	1.3784 b	1.3784 b
	Sa_11	0.7071 a	0.7071 e	0.7071 f	0.7071 e	0.7071 f	0.7071 f
	Sa_3	0.7071 a	0.7071 e	0.8944 e	1.1825 c	1.1825d	1.1825 d

^{1/} ค่าเฉลี่ยจากจำนวน 10 แผล

ค่าเฉลี่ยในแนวดิ่งที่ตามด้วยอักษรที่ต่างกันมีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับ 0.01 จากการเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT)

ตารางที่ 7 แสดงขนาดของแผลที่เกิดจากการปลูกเชื้อจำนวน 12 ไอโซเลตบนองุ่นจำนวน 6 พันธุ์

พันธุ์	ไอโซเลต	ขนาดของแผลหลังปลูกเชื้อ (มิลลิเมตร)						
		วันที่ 4	วันที่ 5	วันที่ 6	วันที่ 7	วันที่ 8	วันที่ 9	วันที่ 10
Black queen	SA_8	0.000	0.000	1.072	1.180	1.580	1.700	2.000
	SA_1	0.300	0.500	0.568	0.768	1.334	1.620	1.820
	SA_6	0.300	0.750	1.100	1.076	1.562	1.820	2.104
	SA_24	0.300	0.820	0.882	1.140	1.536	1.800	2.282
	SA_7	0.000	0.500	0.600	0.800	1.572	1.780	2.100
	SA_5	0.000	0.560	0.520	0.886	1.170	1.466	1.466
	SA_9	0.000	0.000	0.711	0.550	1.000	1.000	1.025
	SA_12	0.000	0.900	1.000	1.090	1.380	1.890	2.070
	SA_2	0.000	0.670	0.620	1.028	1.258	1.480	1.480
	SA_4	0.000	0.750	0.720	1.190	1.432	1.700	1.700
	SA_11	0.000	0.500	0.800	1.150	1.320	1.300	1.320
	SA_3	0.000	0.500	0.500	0.860	0.860	0.860	0.860
Crimson seedless	SA_8	0.100	0.300	0.800	1.580	1.300	1.800	2.160
	SA_1	0.000	0.450	0.706	0.650	1.092	1.092	1.092
	SA_6	0.000	0.290	0.496	0.978	1.408	1.720	2.020
	SA_24	0.000	0.000	0.640	0.950	1.110	1.700	2.192
	SA_7	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
	SA_5	0.000	0.600	0.740	1.214	1.470	1.780	1.790
	SA_9	0.000	0.000	0.500	0.500	0.900	1.040	1.040
	SA_12	0.000	0.360	0.710	1.342	1.650	1.740	2.336
	SA_2	0.000	0.200	0.670	0.979	1.170	1.300	1.300
	SA_4	0.000	0.500	0.600	0.770	1.400	1.692	1.956
	SA_11	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
	SA_3	0.000	0.000	0.500	0.750	1.200	1.680	1.680

ตารางที่ 8 แสดงขนาดของแผลที่เกิดจากการปลูกเชื้อจำนวน 12 ไอโซเลตบนอรุ่นจำนวน 6 พันธุ์

พันธุ์	ไอโซเลต	ขนาดของแผลหลังปลูกเชื้อ (มิลลิเมตร)						
		วันที่ 4	วันที่ 5	วันที่ 6	วันที่ 7	วันที่ 8	วันที่ 9	วันที่ 10
Marroo seedless	SA_8	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
	SA_1	0.000	0.540	0.630	0.974	1.284	1.636	2.180
	SA_6	0.000	0.000	0.600	0.840	1.036	1.454	1.760
	SA_24	0.000	0.500	0.540	0.840	1.180	1.600	2.000
	SA_7	0.000	0.000	0.500	0.500	0.800	1.100	1.100
	SA_5	0.000	0.860	0.890	1.214	0.142	1.816	1.816
	SA_9	0.000	0.000	0.000	0.560	0.820	1.044	0.956
	SA_12	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
	SA_2	0.000	0.200	0.450	0.750	1.300	1.700	2.100
	SA_4	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
	SA_11	0.000	0.100	0.100	0.270	1.200	1.200	1.200
	SA_3	0.000	0.200	0.580	0.920	1.490	1.500	2.100
Centenail	SA_8	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
	SA_1	0.000	0.000	0.355	0.570	0.000	1.150	1.440
	SA_6	0.000	0.740	0.840	1.101	0.910	1.560	1.926
	SA_24	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
	SA_7	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
	SA_5	0.000	0.000	0.800	1.000	1.280	0.000	1.680
	SA_9	0.000	0.000	0.000	0.748	1.160	1.500	1.500
	SA_12	0.000	0.000	0.000	0.480	0.000	1.320	1.800
	SA_2	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
	SA_4	0.000	0.000	0.000	0.750	1.300	1.300	1.300
	SA_11	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
	SA_3	0.000	0.100	0.200	0.650	1.128	1.038	1.836

ตารางที่ 9 แสดงขนาดของแผลที่เกิดจากการปลูกเชื้อจำนวน 12 ไอโซเลตบนรุ้นจำนวน 6 พันธุ์

พันธุ์	ไอโซเลต	ขนาดของแผลหลังปลูกเชื้อ (มิลลิเมตร)							
		วันที่ 4	วันที่ 5	วันที่ 6	วันที่ 7	วันที่ 8	วันที่ 9	วันที่ 10	
Delight	SA_8	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	
	SA_1	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	
	SA_6	0.000	0.000	0.000	0.000	0.910	0.910	0.960	
	SA_24	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	
	SA_7	0.000	0.000	0.120	0.500	0.990	1.620	1.660	
	SA_5	0.000	0.000	0.000	0.900	1.280	1.680	1.680	
	SA_9	0.000	0.500	0.700	0.838	1.160	1.900	1.900	
	SA_12	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	
	SA_2	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	
	SA_4	0.000	0.000	0.000	0.000	1.100	1.280	1.280	
	SA_11	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	
	SA_3	0.000	0.000	0.000	0.300	0.620	0.650	0.650	
Shiraz	SA_8	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	
	SA_1	0.000	0.000	0.648	1.018	1.190	1.190	1.190	
	SA_6	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	
	SA_24	0.000	0.000	0.500	0.710	1.140	1.148	1.148	
	SA_7	0.000	0.000	0.580	0.500	0.840	1.400	1.400	
	SA_5	0.000	0.000	0.670	0.860	1.350	1.680	1.680	
	SA_9	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	
	SA_12	0.000	0.000	0.540	0.740	1.150	1.150	1.150	
	SA_2	0.000	0.000	0.100	0.300	0.600	0.680	0.680	
	SA_4	0.000	0.000	0.000	0.000	1.400	1.400	1.400	
	SA_11	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	
	SA_3	0.000	0.000	0.000	0.300	0.900	0.900	0.900	

ประวัติผู้เขียน

นางสาวชนิษฐา มากรุง เกิดวันที่ 1 สิงหาคม พ.ศ. 2522 ที่ อำเภอดงหลวง จังหวัดสุพรรณบุรี สำเร็จการศึกษาในระดับปริญญาตรีในสาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จังหวัดนครราชสีมา ในปีการศึกษา 2544 เข้าศึกษาต่อในระดับบัณฑิตศึกษา สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ในปีการศึกษา 2546 สถานที่ติดต่อได้สะดวก บ้านเลขที่ 11/1 หมู่ 4 ตำบลเขาพระ อำเภอดงหลวง จังหวัดสุพรรณบุรี 72120