รณชีพ ลี้ประเสริฐ : การประเมินแหล่งเชื้อเริ่มต้นของ *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. ที่ทำให้เกิดโรคกุ้งแห้งในพริก (INITIAL INOCULUM ASSESEMENT OF *Colletotrichum gloeosporioides* Penz., THE CAUSAL AGENT OF ANTHRACNOSE IN CHILLI PEPPER) อาจารย์ที่ปรึกษา : อาจารย์ ดร. โสภณ วงศ์แก้ว, 47 หน้า.

การใช้สารเคมีเพื่อป้องกันกำจัดโรคแอนแทรกโนสของพริกมักไม่ได้ผล เนื่องจากการเข้าทำลายแบบแฝงของเชื้อ *Colletotrichum gloeosporioides* งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาหาวิธีการตรวจประเมินปริมาณแหล่งเชื้อเริ่มต้นของเชื้อ *C. gloeosporioides* ที่อยู่ในสภาพแฝงในพริก เพื่อประกอบการตัดสินใจในการป้องกันกำจัด โดยการกระตุ้นให้พริกแสดงอาการด้วยการใช้สารพาราควอต เอทีฟอน และการขาดน้ำ และใช้วิธีการทางเซรุ่มวิทยาตรวจหาการเข้าทำลายในสภาพแฝง การทดลองใช้เชื้อไอโซเลตที่แยกได้จากสวนเกษตรอินทรีย์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ซึ่งเป็นเชื้อที่สามารถทำให้เกิดโรคดีที่สุด ก่อนการทดลองเตรียมพริกพันธุ์ซุปเปอร์ฮ๊อตอายุ 2 เดือน ให้อยู่ในสภาพที่มีเชื้อเข้าทำลายแบบแฝงโดยปลูกเชื้อ *C. gloeosporioides* ด้วยวิธี horizontal spraying บนใบในรูปของ spore suspension ความเข้มข้น 1×10^6 สปอร์/มิลลิลิตร เก็บพืชที่ปลูกเชื้อไว้ 48 ชั่วโมงในโรงเรือนที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 90% วางแผนการทดลองแบบ Randomized Complete Block Design 4 ซ้ำ ใช้ พริก 1 ต้น/ซ้ำ การทดลองใช้สารพาราควอตประกอบด้วย 14 ตำรับทดลอง ๆ ที่ 1-7 ฉีดพ่นพริกที่เตรียมไว้ด้วยสารพาราควอตความเข้มข้น 0, 6.92, 13.84, 20.75, 27.67, 41.51 และ 55.34 mg/l ของสารออกฤทธิ์ ตามลำดับ ตำรับทดลองที่ 8-14 ฉีดพ่นสารที่ความเข้มข้นเดียวกันโดยไม่ปลูกเชื้อ การทดลองใช้สารเอทีฟอนประกอบด้วย 18 ตำรับทดลอง ๆ ที่ 1-9 ฉีดพ่นสารเอทีฟอนความเข้มข้น 0, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84 และ 96 mg/l ของสารออกฤทธิ์ตามลำดับ ตำรับทดลองที่ 10-18 ฉีดพ่นสารที่ความเข้มข้นเดียวกันโดยไม่ปลูกเชื้อ และการทดลองควบคุมการให้น้ำประกอบด้วย 8 ตำรับ ทดลอง ๆ ที่ 1-4 ให้น้ำกับพริกที่เตรียมไว้ที่ระดับ 300, 150, 75 และ 38 มิลลิลิตร/กระถาง ซึ่งมีค่าเท่ากับ 1, 1/2, 1/4 และ1/8 WHC ตำรับทดลองที่ 5-8 ให้น้ำที่ระดับเดียวกันโดยไม่ปลูกเชื้อ ทิ้งไว้ 48 ชั่วโมงโดยไม่ให้น้ำและความชื้น หลังจากการกระตุ้นนำพริกไปเก็บไว้ในโรงเรือนที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 90% เพื่อสร้างสภาพที่เหมาะต่อการเกิดโรค ทำการตรวจผลโดยนับจำนวนแผลและจำนวนใบร่วงที่เกิดขึ้นจนจำนวนแผลและใบร่วงไม่เปลี่ยนแปลง ผลการทดลองพบว่า ตำรับทดลองที่ฉีดพ่นสารพาราควอตเพียงอย่างเดียวไม่เกิดแผล แต่ตำรับทดลองที่ปลูกเชื้อร่วมกับการฉีดพ่นสารพาราควอตเกิดแผลเฉลี่ย 4, 4.50, 3.25, 5.75, 10, 9 และ 9 แผลต่อต้นเมื่อได้รับสารที่ความเข้มข้น 0, 6.92, 13.84, 20.75, 27.67, 41.51 และ 55.34 mg/l ของสารออกฤทธิ์ ตามลำดับ การร่วงของใบพบว่าตำรับที่ฉีดพ่นสารพาราควอตเพียงอย่างเดียวทำให้เกิดใบร่วงเฉลี่ย 0.5, 3 และ 7.25 ใบต่อต้นเมื่อได้รับสารความ

เข้มข้น 27.67, 41.51 และ 55.34 mg/l ของสารออกฤทธิ์ ตามลำดับ ขณะที่การปลูกเชื้อร่วมกับการฉีดพ่นสารความเข้มข้น 20.75, 27.67, 41.51 และ 55.34 mg/l ของสารออกฤทธิ์ทำให้เกิดใบร่วงเฉลี่ย 1.75, 4.25, 5.75 และ 12 ใบ การทดลองโดยใช้เอทีฟอนพบว่า ตำรับทดลองที่ฉีดพ่นสารเอทีฟอนเพียงอย่างเดียวไม่เกิดแผล แต่ตำรับทดลองที่ปลูกเชื้อร่วมกับการฉีดพ่นสารเอทีฟอนเกิดแผลเฉลี่ย 2.75, 4.25, 3.25, 6.35, 7.25, 2.5, 2.5, 3.5 และ 3 แผลต่อต้นเมื่อได้รับสารที่ความเข้มข้น 0, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84 และ 96 mg/l ของสารออกฤทธิ์ ตามลำดับ การร่วงของใบพบว่า ตำรับที่ฉีดพ่นสารเอทีฟอนเพียงอย่างเดียวทำให้เกิดใบร่วงเฉลี่ย 3.25, 3.25 และ 6.25 ใบต่อต้นเมื่อได้รับสารเอทีฟอนความเข้มข้น 72, 84 และ 96 mg/l ของสารออกฤทธิ์ ตามลำดับ ขณะที่การปลูกเชื้อร่วมกับการฉีดพ่นสารเอทีฟอนความเข้มข้น 36, 48, 60, 72, 84 และ 96 mg/l ของสารออกฤทธิ์ ทำให้เกิดใบร่วงเฉลี่ย 1.75, 2.25, 3.25, 5.25, 6.25 และ 8.25 ใบ และตำรับทดลองที่ปลูกเชื้อร่วมกับควบคุมการให้น้ำทำให้เกิดแผลเฉลี่ย 4.5, 8.25, 10, 18.5 แผลต่อต้นเมื่อได้รับน้ำปริมาณ 1, 1/2, 1/4 และ 1/8 WHC ตามลำดับ การทดสอบทางสถิติพบว่า จำนวนแผลและใบร่วงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติระหว่างตำรับทดลอง ดังนั้นการใช้สารพาราควอตที่ความเข้มข้น 27.67 mg/l ของสารออกฤทธิ์ การใช้สารเอทีฟอนความเข้มข้น 36 mg/l ของสารออกฤทธิ์ และการควบคุมการให้น้ำที่ 1/8 WHC สามารถใช้ประเมินการเข้าทำลายแบบแฝงของเชื้อ *C. gloeosporioides* ได้ การพัฒนาวิธีการตรวจสอบการเข้าทำลายแบบแฝงโดยใช้เทคนิคทางเซรุ่มวิทยา กระทำโดยใช้สารสกัดเส้นใยและโคนีเดียของเชื้อ *C. gloeosporioides* กระตุ้นให้กระต่ายสร้างแอนติบอดีที่จำเพาะเจาะจงกับเชื้อ *C. gloeosporioides* ผลการทดลองพบว่า เมื่อทดสอบแอนติเจนที่ระดับความเข้มข้น 1×10^6 โคนีเดีย/มิลลิลิตร โดยวิธี direct antigen coating indirect enzyme-linked immunosorbent assay (DAC-indirect ELISA) แอนติเซรุ่มที่ได้ทำปฏิกิริยาเฉพาะเจาะจงกับเชื้อ *C. gloeosporioides* มีปฏิกิริยาข้าม (cross reaction) กับ *C. capsici* และ *Sphaceloma sp.* เล็กน้อย แต่ไม่ทำปฏิกิริยากับเชื้อรา *Phytophthora* spp. การทดสอบการเข้าทำลายแบบแฝงบนใบด้วยวิธี ทาง ELISA โดยใช้ชิ้นส่วนของใบเป็น solid surface แทนพื้นผิวของหลุมพลาสติก เพื่อตรวจสอบหาแอนติเจนตั้งแต่ที่ยังไม่ปรากฏอาการ พบว่า การต้มใบพริกเป็นเวลา 5 นาทีก่อนนำไปตรวจสามารถใช้ตรวจสอบการเข้าทำลายแบบแฝงของเชื้อ *C. gloeosporioides*

สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช ลายมือชื่อนักศึกษา_____

ปีการศึกษา 2552 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา_____

RONNACHIP LEEPRASERT : INITIAL INOCULUM ASSESSMENT OF *Colletotrichum gloeosporioides* Penz., THE CAUSAL AGENT OF ANTHRACNOSE IN CHILLI PEPPER. THESIS ADVISOR : SOPONE WONGKAEW, Ph.D. 47 PP.

INITIAL INOCULUM ASSESSMENT/*Colletotrichum gloeosporioides*/CHILLI PEPPER ANTHRACNOSE

Applying chemicals to control chilli anthracnose caused by *Colletotrichum gloeosporioides* is rather difficult because the quiescent infection cannot be estimated. Stimulating chilli peppers to show symptoms of the quiescent infection may enable the fungicide application to be done more effectively. This study aimed to use paraquat, ethephon, and water deficit to stimulate symptom expression and serological technique to detect the quiescent infection. The experiments utilized *C. gloeosporioides* isolated from Suranaree University of Technology's organic farm which was the most virulent isolate and Super Hot chilli pepper (*Capsicum annuum* L.) as tested variety. Prior to the experiments, spore suspension of *C. gloeosporioides* ($1x10^6$spores/ milliliter) was sprayed horizontally on to the leaves of 2 months old plants and kept for 48 hours in greenhouse at 27ºC and 90% RH. The experiment was conducted in a randomized complete block design (RCBD) with 4 replications, 1 plant/replication. Fourteen treatments were conducted in the paraquat experiment. In treatments 1–7, paraquat was sprayed at the concentration of 0, 6.92, 13.84, 20.75, 27.67, 41.51 and 55.34 mg/l respectively. In treatments 8–14, the same concentrations of paraquat as that of treatments 1–7 were also sprayed on to the plants but without inoculation. The ethephon experiment was conducted in 18 treatments. In treatments

1–9, the pre inoculated peppers were sprayed with ethephon at the concentration of 0, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84 and 96 mg/l respectively. In treatments 10–18, the same concentrations of ethephon as that of treatments 1–9 were also sprayed on to the plants but without inoculation. For water deficit, the experiment was conducted in 8 treatments. In treatments 1-4, the pre inoculated peppers were watered at 300, 150, 75 and 38 ml/pot equivalent to 1, 1/2, 1/4 and 1/8 water holding capacity (WHC). In treatments 5-8 the same amount of water were given but without inoculation. The plants were kept in a greenhouse at 27ºC and 90% RH after the treatment to stimulate symptom expression. The treatment effects were evaluated by counting the lesions and falling leaf number. For paraquat application, no lesions were observed on the uninoculated treatments (8–14) while in the inoculated treatments, the plants showed 4, 4.5, 3.25, 5.75, 10, 9 and 9 average lesions per plant when received paraquat at the concentration of 0, 6.92, 13.84, 20.75, 27.67, 41.51 and 55.34 mg/l respectively. The uninoculated plants received paraquat at 27.67, 41.51 and 55.34 mg/l had 0.5, 3 and 7.25 of average falling leaves/plant, while the inoculated plants sprayed with 20.75, 27.67, 41.51 and 55.34 mg/l had 1.75, 4.25, 5.75 and 12 of average falling leaves per plant respectively. For ethephon application, no lesions were observed on the uninoculated treatments (10–18) while the inoculated treatments, the plants showed 2.75, 4.25, 3.25, 6.35, 7.25, 2.5, 2.5, 3.5 and 3 average lesions per plant when received ethephon at the concentration of 0, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84 and 96 mg/l respectively. The uninoculated plants received ethephon at 72, 84 and 96 mg/l had 3.25, 3.25 and 6.25 of average falling leaves/plant, while the inoculated plants sprayed with 36, 48, 60, 72, 84 and 96 mg/l had 1.75, 2.25, 3.25, 5.25, 6.25 and 8.25 of average falling leaves per plant respectively. For water application, the plants showed 4.5, 8.25, 10.0, 18.5 average lesions per plant when water was given at the 1, 1/2, 1/4 and 1/8 WHC

respectively. The number of lesions and leaf fallings were statistically different among the treatments. Therefore spraying paraquat at the concentration of 27.67 mg/l, spraying ethephon at the concentration of 36 mg/l or giving water deficit at 1/8 WHC could be used to estimate the degree of quiescent infection by *C. gloeosporioides* in chilli pepper. A polyclonal antiserum was produced in rabbit by injections with mycelia and conidial extracts of *C. gloeosporioides*. When tested with $1x10^6$ conidia/ml spore suspension of selected fungi using DAC-indirect ELISA protocol, it reacted specifically with *C. gloeosporioides* and weakly cross reacted with *C. capsici* and *Sphaceloma sp.*but not with *Phytophthora* spp. By using infected pepper leaf as solid surface instead of the plastic plate surface to detect quiescent infection by ELISA, it was found that 5 minute-boiled infected leaf could be used for the detection of *C. gloeosporioides*.

School of Crop Production Technology Student's Signature_____

Academic Year 2009 Advisor's Signature_____