อ้อยทิพย์ พูลสวัสดิ์ : ความหลากหลายของเชื้อ ความต้านทาน และการพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลสำหรับยีนต้านทานเชื้อ *Sphaceloma ampelinum* สาเหตุโรคสแคบ (แอนแทรคโนส) ในองุ่น (PATHOGEN DIVERSITY, RESISTANCE AND DEVELOPMENT OF MOLECULAR MARKERS FOR RESISTANCE GENES TO *Sphaceloma ampelinum*, THE CAUSAL AGENT OF GRAPE SCAB (ANTHRACNOSE)) อาจารย์ที่ปรึกษา : รองศาสตราจารย์ ดร.ปิยะดา ตันตสวัสดิ์, 174 หน้า.

โรคสแคบหรือแอนแทรคโนสที่เกิดจากเชื้อ *Sphaceloma ampelinum* เป็นโรคที่มีความสำคัญกับองุ่นทั่วโลก รวมทั้งประเทศไทย ความหลากหลายของเชื้อ และลักษณะการถ่ายทอดทางพันธุกรรมของยีนต้านทานโรคสแคบ สามารถใช้เป็นข้อมูลในการปรับปรุงพันธุ์องุ่นให้ต้านทานโรคสแคบได้อย่างมีประสิทธิภาพ งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อ 1) ศึกษาความหลากหลายทางสัณฐานวิทยา ระดับความรุนแรงในการก่อโรค และใช้เครื่องหมาย random amplified polymorphic DNA (RAPD) ตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อ 2) ประเมินและเปรียบเทียบระดับความต้านทานโรคสแคบในองุ่นลูกผสมชั่วที่ 1 (F_1) โดยวิธีการทดสอบความต้านทานโรคในสภาพห้องปฏิบัติการและสภาพไร่ 3) ศึกษาสมรรถนะการรวมตัวของยีนต้านทานโรคสแคบในองุ่น 4) ประเมินความหลากหลาย (polymorphism) ของเครื่องหมาย RAPD ที่มีรายงานว่าสัมพันธ์กับยีนต้านทนโรคสแคบในองุ่น และ 5) ประเมินความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมาย single strand conformation poly-morphism (SSCP) ที่พัฒนาจาก resistance gene analogs (RGAs) กับลักษณะต้านทานโรคสแคบในองุ่น การศึกษาครั้งนี้ได้แบ่งการทดลองออกเป็น 3 ส่วน ได้แก่ การศึกษาความหลากหลายของเชื้อความต้านทานและการแสดงออกของยีนต้านทาน และการพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลสำหรับยีนต้านทานโรคสแคบในองุ่น

จากการศึกษาความหลากหลายของเชื้อ จำนวน 19 ไอโซเลต พบว่าเชื้อสามารถเจริญเติบโตได้ดีที่สุดบนอาหาร cereal agar (CA) และ corn cereal agar (CCA) แต่เริ่มหยุดการเจริญเติบโตเมื่อเชื้ออายุ 8 สัปดาห์ ส่วนลักษณะทางสัณฐานวิทยา ได้แก่ สีและรูปร่างของโคโลนี การมี/ไม่มี aerial mycelium และขนาดโคนิเดีย พบว่าอาหารทั้ง 4 ชนิด (CA, CCA, potato dextrose agar (PDA) และ Job's tear corn cereal agar (JCCA)) ทำให้เชื้อแต่ละไอโซเลตมีลักษณะดังกล่าวแตกต่างกัน ยกเว้นขนาดโคนิเดีย มีค่าใกล้เคียงกันอยู่ระหว่าง 4.20-5.51 x 1.58-2.07 ไมครอน การวิเคราะห์ RAPD แสดงว่าเชื้อ 19 ไอโซเลตมีความเหมือนกันทางพันธุกรรม 0.78-0.94 และสามารถแบ่งเชื้อออกได้เป็น 4 กลุ่มตามภาค อย่างไรก็ตาม เชื้อแต่ละไอโซเลตมีระดับความรุนแรงในการก่อโรคแตกต่างกัน โดยไอโซเลต Nk4-1 และ Cr1-1 มีระดับความรุนแรงในการก่อโรคสูงที่สุด 3.08 และ 2.96 คะแนน ตามลำดับ ส่วนไอโซเลต Nk5-1 มีระดับความรุนแรงในการก่อโรคน้อยที่สุด (1.74 คะแนน) (ช่วง

คะแนน 1 = 0-6 แผล และ 5 = >100 แผล) ผลการทดลองนี้บ่งชี้ว่าเชื้อ *S. ampelinum* จากต่างแหล่งกันมีการเจริญเติบโต ลักษณะทางสัณฐานวิทยา พันธุกรรม และระดับความรุนแรงในการก่อโรคต่างกัน และยีนต้านทานเดี่ยวอาจไม่มีประสิทธิภาพในทุกพื้นที่

การศึกษาความต้านทานและการแสดงออกของยีนต้านทานต่อเชื้อ *S. ampelinum* ในสภาพห้องปฏิบัติการโดยวิธี detached leaf ในองุ่น 10 พันธุ์/สายพันธุ์ พบว่าองุ่นสายพันธุ์ Wilcox 321, NY 65.0550.04 และ Illinois 547-1 มีระดับความต้านทานสูงที่สุด (1.03, 1.09 และ 1.09 คะแนน ตามลำดับ) ส่วนองุ่นพันธุ์ Black Queen อ่อนแอมากที่สุด (4.61 คะแนน) และพบว่าพันธุ์/สายพันธุ์องุ่นมีปฏิสัมพันธ์กับไอโซเลตของเชื้อ ดังนั้น ในการปรับปรุงพันธุ์องุ่นให้ต้านทานโรคสแคบ จำเป็นต้องทดสอบความต้านทานโรคในสภาพไร่ หลายสถานที่ และอาจจำเป็นต้องรวมยีนต้านทานหลายยีนไว้ในพันธุ์เดียวกัน เมื่อพิจารณาลูกผสม F_1 จำนวนทั้งหมด 133 ลูกผสม จาก 12 คู่ผสม พบว่ามี 14 ลูกผสม ที่ต้านทานหรือต้านทานมากต่อไอโซเลต Nk4-1 และ Rc2-1 คิดเป็น 10.5 เปอร์เซ็นต์ของลูกผสมทั้งหมด ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับการทดลองในสภาพไร่ โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์สเปียร์แมน เท่ากับ 0.54; $P \leq 0.01$ และ 0.41; $P \leq 0.05$ ตามลำดับ และพบลูกผสม F_1 ที่น่าสนใจมากที่สุด คือ SUT0404.40 เนื่องจากต้านทานเชื้อทั้งสองไอโซเลตในสภาพห้องปฏิบัติการและมีความต้านทานระดับสูงในสภาพไร่ เมื่อทดสอบสมรรถนะการรวมตัวทั่วไป (general combining ability; gca) และสมรรถนะการรวมตัวจำเพาะ (specific combining ability; sca) ในองุ่น 6 คู่ผสม โดยใช้แผนการผสมพันธุ์แบบ North Carolina mating design II (NC II) ผลการวิเคราะห์พบว่ายีนที่ควบคุมลักษณะต้านทานโรคสแคบในองุ่นเป็นยีนแบบบวก (additive gene action) ซึ่งสายพันธุ์องุ่นที่เหมาะในการถ่ายทอดยีนต้านทานโรคสแคบมากที่สุด คือ NY65.0550.04 อัตราพันธุกรรมอย่างแคบมีค่า 79.2 เปอร์เซ็นต์ แสดงว่ายีนที่ควบคุมลักษณะต้านทานโรคสแคบสามารถถ่ายทอดทางพันธุกรรมได้สูง ส่วนการพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลสำหรับยีนต้านทานโรคสแคบในองุ่น พบว่าเครื่องหมาย RAPD และ SSCP ที่ใช้ในการทดลองไม่เหมาะสมที่จะนำไปใช้คัดเลือกพันธุ์องุ่นในประชากรนี้ ยกเว้นเครื่องหมาย SSCP NY28_1 สัมพันธ์กับลักษณะต้านทานในคู่ผสมระหว่าง Italia × NY 65.0550.04 ($R^2 = 0.96$; $P < 0.01$) แต่จำเป็นต้องยืนยันผลการทดลองด้วยการใช้จำนวนประชากรที่มีขนาดใหญ่ขึ้น

สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช ลายมือชื่อนักศึกษา_____

ปีการศึกษา 2553 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา_____

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม_____

OYTHIP POOLSAWAT : PATHOGEN DIVERSITY, RESISTANCE AND DEVELOPMENT OF MOLECULAR MARKERS FOR RESISTANCE GENES TO *Sphaceloma ampelinum*, THE CAUSAL AGENT OF GRAPE SCAB (ANTHRACNOSE). THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. PIYADA TANTASAWAT, Ph.D. 174 PP.

GRAPE/ANTHRACNOSE/SCAB/*Sphaceloma ampelinum*/DISEASE RESISTANCE/ GCA/SCA/NC II/HERITABILITY/RAPD/SSCP

Scab or anthracnose caused by *Sphaceloma ampelinum*, is one of the most important grape diseases worldwide including Thailand. Knowledge of pathogen diversity and inheritance of scab resistance genes could be used to achieve efficient grape breeding for scab resistance. The objectives of this study were 1) to study morphological diversity, virulencity using random amplified polymorphic DNA (RAPD) to evaluate genetic diversity of scab pathogen, 2) to assess and compare the scab resistance levels of F_1 hybrids under laboratory and field conditions, 3) to study the combining ability of scab resistance genes, 4) to evaluate polymorphisms of RAPD markers reported to be linked to scab resistance gene(s), and 5) to evaluate correlation between single strand conformation polymorphism (SSCP) markers developed from resistance gene analogs (RGAs) and scab resistance in grapes. This study was divided into three parts : diversity of pathogen, resistance and expression of resistance gene(s) in grapes, and development of molecular markers for scab resistance gene(s).

In the first part, it was found that all 19 isolates were best grown on cereal agar (CA) and corn cereal agar (CCA) but began to stop growing at week 8. Morphological characterization according to color and shape of colonies, presence/absence of aerial

mycelium and conidial size showed that each isolate had different characters on four media (CA, CCA, potato dextrose agar (PDA) and Job's tear corn cereal agar (JCCA)) except conidial size, which fell on the similar range of 4.20-5.51 × 1.58-2.07 μm. The RAPD analysis of 19 isolates showed the genetic similarity of 0.78-0.94, and these isolates could be divided into 4 groups, mainly by geographical regions. However, the virulence of each isolate was different. Isolates Nk4-1 and Cr1-1 were the most virulent (score 3.08 and 2.96, respectively), and Nk5-1 was the least virulent (score 1.74) (score range 1= 0-6 lesions and 5 = >100 lesions). These results indicated that *S. ampelinum* from different geographical regions had differential growth, morphology, genetics and virulence, and that a single resistance gene might not be effective across all regions.

The analysis of resistance and expression of resistance gene(s) to *S. ampelinum* under laboratory condition using detached leaf assay of ten grape cultivars/lines showed that Wilcox 321, NY65.0550.04 and Illinois 547-1 were the most resistant lines (score 1.03, 1.09 and 1.09, respectively) and Black Queen was the most susceptible cultivar (score 4.61). In addition, significant interactions were found between grape cultivars/ lines and isolates of the pathogen. Therefore, breeding of grape for scab resistance required several years and locations of field testing, and pyramiding might be achieved by combining multiple resistance genes into one cultivar. Fourteen F_1 hybrids from 133 hybrids of 12 crosses were resistant or highly resistant to isolates Nk4-1 and Rc2-1 (10.5% of total hybrids). These results were in agreement with evaluation under field condition with the Spearman's rank correlation of 0.54, $P \leq 0.01$ and 0.41, $P \leq 0.05$, respectively. The most interesting F_1 hybrid was SUT0404.40 owing to its resistance to both isolates under laboratory condition and its high resistance level under field condition. When general combining ability (gca) and specific combining ability (sca) were analyzed using North Carolina mating design II (NC II) in 6 crosses of grapes, it

was found that scab resistance in grapes was controlled by additive gene action. Moreover, it showed that NY65.0550.04 was the most suitable parent for the transfer of scab resistance. The estimated heritability of scab resistance was 79.2%, suggesting that scab resistance gene(s) was (were) highly heritable. Finally, the development of molecular markers for scab resistance gene(s) in grape indicated that the RAPDs and SSCPs used in this experiment were not suitable for selection of scab resistance in this population, except NY28_1 marker which was significantly correlated with scab resistance in the Italia × NY65.0550.04 cross ($R^2 = 0.96$; $P < 0.01$). However, the results need to be verified with larger population.

School of Crop Production Technology Student's Signature_____

Academic Year 2010 Advisor's Signature_____

Co-advisor's Signature_____