

บทคัดย่อ

ในการศึกษาการโคลนยีนที่เกี่ยวข้องกับความต้านทานโรคในพริก พบว่าชนิดของ primers ที่เหมาะสมสำหรับการโคลนยีน chitinase คือ Chi2F1 (5'-CGGATGCTGAGTTTATAGG-3') กับ Chi2P-R2 (5'-CCCCTTATTTACTGTGCATCTCC-3') และ primers ที่เหมาะสมสำหรับการโคลนยีน β -1,3-Glucanase คือ GluP2-F (5'-GCTAGGGAACAACCTGCCACCAGCATCAC-3') กับ GluP2-R (5'-CTATCAGAAAACCCAAGTTGAGTGG-3') โดยขนาดนิวคลีโอไทด์ของ chitinase และ glucanase ที่โคลนได้มีความยาวเท่ากับ 980 bp และ 665 bp ตามลำดับ และมีเปอร์เซ็นต์ homology สูงถึง 94.887% และ 99.184% กับยีน chitinase (accession no. AY775335) และ β -1,3-Glucanase gene (accession no. AF227953) ตามลำดับ นอกจากนี้พบว่า ชนิดของ primers ที่เหมาะสมในการศึกษาการแสดงออกของยีน chitinase และ glucanase ในปฏิกิริยา Real-time PCR คือ ชุด primers CHI-F (5'-CACCAGCAGATAGGTCAGCA-3') และ CHI-R (5'-TCCAGTGGGAACATTCAACA-3') ซึ่งสามารถเพิ่มปริมาณยีน chitinase จากใบพริกได้ โดยมีขนาด PCR product เท่ากับ 157 bp และ ชุด primers GLU-F1 (5'-TTTCTTCTTCCTGCCATGAG-3') และ GLU-R1 (5'-GGTGGAAAAGAGTTCCCAAT-3') สามารถเพิ่มปริมาณยีน glucanase จากใบพริกได้ โดยมีขนาด PCR product เท่ากับ 116 bp

จากการศึกษาการกระตุ้นความต้านทานโรคในต้นพริกพันธุ์ CA1131 โดยการฉีดพ่นใบพริกด้วยน้ำ (ชุดควบคุม) Benzothiadiazole (BTH) ความเข้มข้น 40 μ g/ml และเส้นใยของเชื้อรา *Colletotrichum capsici* ความเข้มข้น 7% และตรวจสอบการแสดงออกของยีน Chitinase และ β -1,3-glucanase โดย real time PCR (polymerase chain reaction) พบว่าการฉีดพ่นใบพริกด้วยเส้นใยเชื้อราอบแห้งและ BTH สามารถกระตุ้นหรือชักนำการแสดงออกของยีน Chitinase ได้ โดยเฉพาะการใช้เส้นใยเชื้อราอบแห้ง สามารถกระตุ้นการแสดงออกของยีน Chitinase ได้ดีกว่าการใช้ BTH ในทางตรงกันข้ามการฉีดพ่นใบพริกด้วยเส้นใยเชื้อราอบแห้งและ BTH ไม่มีผลกระตุ้นการแสดงออกของยีน β -1,3-glucanase แต่กลับมีผลไปยับยั้งการแสดงออกของยีน β -1,3-glucanase

การศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับความต้านต่อโรคแอนแทรคโนสในพริกได้แก่ เอนไซม์ Peroxidase (POD), Phenylalanine ammonia lyase (PAL), β -1,3-glucanase (GLU) และ Chitinase (CHI) ของผลพริกพันธุ์จินดา (พันธุ์ต้านทานต่อโรค) และพันธุ์บางช้าง (พันธุ์อ่อนแอต่อโรค) ภายหลังจากการปลูกเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* สาเหตุของโรคแอนแทรคโนส นาน 6 ชั่วโมง พบว่าพริกพันธุ์จินดาที่ปลูกเชื้อรามีกิจกรรมของ GLU และ CHI เพิ่มขึ้น ($p \leq 0.01$ และ $p \leq 0.05$) แต่ไม่พบการเพิ่มขึ้นของกิจกรรมของเอนไซม์ POD และ PAL ส่วนพริกพันธุ์บางช้างที่ปลูกเชื้อพบ การเพิ่มขึ้นของกิจกรรมของเอนไซม์ POD เท่านั้น ดังนั้นกิจกรรมของเอนไซม์ GLU และ

CHI อาจใช้เป็นตัวบ่งชี้ถึงพันธุ์พริกที่ต้านทานต่อโรคแอนแทรคโนสได้หลังการปลูกเชื้อ การศึกษาผลของการใช้สารละลาย ไคโตแซนต่อการควบคุมโรคแอนแทรคโนส และลักษณะทางสรีระวิทยาของพริกพันธุ์จินดา โดยการทำการทดลองก่อนการปลูกเชื้อรา *C. gloeosporioides* และเคลือบผิวด้วยสารละลายไคโตแซนความเข้มข้น 1.2 และ 1.6 เปอร์เซ็นต์ พบว่าสารละลายไคโตแซนที่ความเข้มข้น 1.6 เปอร์เซ็นต์ สามารถช่วยชะลอการเกิดโรค และรักษาความแน่นเนื้อของผลพริกได้ดีกว่าสารละลายไคโตแซนความเข้มข้น 1.2 เปอร์เซ็นต์ แต่การใช้สารละลายไคโตแซนที่ความเข้มข้นสูงทำให้เกิดการเน่าของขั้วผลมากกว่าสารละลายไคโตแซนที่ความเข้มข้นต่ำกว่า และการเคลือบผลพริกด้วยสารละลายไคโตแซนความเข้มข้น 1.6 เปอร์เซ็นต์ มีผลทำให้เกิดกลิ่นหมัก การเคลือบผลพริกด้วยไคโตแซนที่ความเข้มข้น 1.2 เปอร์เซ็นต์ สามารถช่วยลดอัตราการหายใจและการผลิตเอทิลีนได้ แต่ไม่มีผลช่วยชะลอการสูญเสียน้ำหนักสด การเปลี่ยนแปลงค่าความสว่าง (L) ค่าสีแดง (a) ของผลพริก และค่าความสว่าง (L) ค่าสีเหลือง (b) ของขั้วผลพริก จากการศึกษาผลของการใช้สารละลายไคโตแซนที่ความเข้มข้น 1.2 เปอร์เซ็นต์ ต่อการชักนำกิจกรรมของเอนไซม์ POD, PAL, GLU และ CHI ของผลพริกพันธุ์จินดาที่ทำแผลและปลูกเชื้อรา *C. gloeosporioides* นาน 6, 12, 18, 24, 36 และ 48 ชั่วโมง พบว่าไคโตแซนไม่มีผลชักนำกิจกรรมของ POD, PAL, GLU และ CHI ในขณะที่ POD, GLU และ CHI ถูกชักนำให้เพิ่มขึ้นได้โดยบาดแผลและการปลูกเชื้อรา

คำสำคัญ : ไคตินเนส / เบต้า-1, 3-กลูคานเนส / เปอร์ออกซิเดส / เฟนิลอลานีน แอมโมเนียมไลเอส / สารละลายไคโตแซน / *Colletotrichum gloeosporioides*

Abstract

Cloning of plant defense genes from chili leaves was studied. It was found that the suitable primers for cloning of chitinase gene were Chi2F1 (5'-CGGATGCTGAGTTTTAGG-3') and Chi2P-R2 (5'-CCCCTTATTACTGTCATCTCC-3'), while the suitable primers for cloning of β -1,3-glucanase gene were GluP2-F (5'-GCTAGGGAACAACCTTGCCACCAGCATCAC-3') and GluP2-R (5'-CTATCAGAAAACCCAAGTTGAGTGG-3'). Nucleotide sizes of chitinase and glucanase were 980 and 665 bp respectively and they had a high homology with chitinase gene (accession no. AY775335) and β -1,3-glucanase gene (accession no. AF227953) by 94.887% and 99.184% respectively. Moreover, the suitable primers for studying gene expression in real time PCR were CHI-F (5'-CACCAGCAGATAGGTCAGCA-3') and CHI-R (5'-TCCAGTGGGAACATTCAACA-3') for chitinase gene with 157 bp of the product size, and GLU-F1 (5'-TTTCTTCTTCTGCCATGAG-3') and GLU-R1 (5'-GGTGGAAAAGAGTTCCCAAT-3') for glucanase gene with 116 bp of the product size.

Induction of plant disease defense of chili cv. CA1131 by elicitors was investigated. The chili plants were sprayed with water (control), 40 μ g/ml of Benzothiadiazole (BTH) and 7% of dry mycelium of *Colletotrichum capsici*, and the expression of chitinase and β -1,3-glucanase genes were then detected by real time PCR (polymerase chain reaction). The result revealed that the expression of chitinase gene was increased in the chili leaves treated with BTH and dry mycelium, particularly the expression in the plant treated with dry mycelium was higher than the plant treated with BTH. In the other hand, either BTH or dry mycelium treatments did not induce the expression of β -1,3-glucanase gene but they suppressed the expression of β -1,3-glucanase.

Enzyme activity involved in anthracnose disease resistance, Peroxidase (POD), Phenylalanine ammonia lyase (PAL), β -1,3-glucanase (GLU) and Chitinase (CHI) was investigated in chili fruit var. Jinda (resistance) and var. Bangchang (susceptible) after artificial inoculated with *Colletotrichum gloeosporioide*, causal anthracnose disease for 6 hour. The results showed that GLU and CHI activity significantly increased in var. Jinda after infection but no increased in POD and PAL activity. Pathogen inoculation of Bangchang chili found the increase of POD activity only. This implies that GLU and CHI activity may indicate the resistant variety of chili on anthracnose disease after artificial inoculation. The effect of chitosan solution on controlling of anthracnose disease and

physiology of Jinda chili was conducted by wound-inoculation with *C. gloeosporioides* and followed coating with chitosan solution at concentrations of 1.2% and 1.6%. It was revealed that 1.6% chitosan coating gave the better result to delay the disease incidence and maintain the fruit firmness than 1.2% chitosan coating. However 1.6% chitosan coating caused fruit fermentation. Chitosan coating at 1.2% retarded the respiration rate and ethylene production but could not delay weight loss, L and a value of fruit, and L and b value of stem-end. The effect of chitosan solution at the concentration of 1.2% on the induction of POD, PAL, GLU and CHI activity was obtained in chili fruit var. Jinda after wound-inoculation with *C. gloeosporioides* for 6, 12, 18, 24, 36 and 48 hrs. Chitosan coating had no effect to stimulate the activities of POD, PAL, GLU and CHI. However the activity of POD, GLU and CHI was induced by wound and inoculation.

Keywords : Chitosan Solution / Chitinase / *Colletotrichum gloeosporioides* / β -1, 3-glucanase / Peroxidase / Phenylalanine ammonia lyase /