

# สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	i
สารบัญตาราง	iii
สารบัญภาพ	v
บทนำ	1
1. ความสำคัญและที่มา	1
2. วัตถุประสงค์ของการวิจัย	3
3. ขอบเขตงานวิจัย	4
4. ทฤษฎี สมมุติฐานและกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย	4
5. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	5
สำรวจเอกสาร	6
ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของพริก	6
พันธุ์พริก	7
โรคแอนแทรกคโนสในพริก	9
การควบคุมโรคแอนแทรกคโนส	10
การควบคุมโรคโดยใช้ไคโตแซน	10
พันธุ์พริกที่ต้านทานและอ่อนแอต่อโรคแอนแทรกคโนส	14
การชักนำความต้านทานโรคพืช	14
กิจกรรมของเอนไซม์ที่มีผลต่อความต้านทานโรค	17
วิธีการดำเนินงานวิจัย	22
A. การเตรียมต้นพริก ผลพริก และเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรกคโนส	22
B. การเตรียม Biotic elicitor และ Abiotic elicitors	23
C. การโคลนยีน CHI และ GLU จากพริกด้วยเทคนิค Reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR)	24

## สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
D. ศึกษาการแสดงออกของยีน CHI และ GLU ที่เกิดจากการชักนำโดย Biotic elicitors และ Abiotic elicitors ในพริกพันธุ์ต้านทานและพริกพันธุ์อ่อนแอต่อโรคแอนแทรกโนส	29
E. การศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับความต้านทานโรคในผลพริก	31
F. การศึกษาผลของสารละลายไคโตแซนต่อการควบคุมโรคแอนแทรกโนสและการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพและสรีระวิทยาของผลพริก	31
G. ศึกษาผลของสารละลายไคโตแซนต่อการชักนำกิจกรรมของเอนไซม์ Peroxidase, Phenylalanine ammonia lyase, $\beta$ -1,3 glucanase และ Chitinase ในผลพริกพันธุ์จินดา	34
<b>ผลการทดลอง</b>	<b>36</b>
A. การโคลนยีน CHI และ GLU จาก cDNA และการทำ DNA sequence	36
B. การศึกษาการแสดงออกของยีน CHI และ GLU ของพริก	36
C. การศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับความต้านทานโรคในผลพริก	44
D. ศึกษาผลของสารละลายไคโตแซนต่อการควบคุมโรคแอนแทรกโนสและการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพและสรีระวิทยาของผลพริกพันธุ์จินดา	47
กิจกรรมของเอนไซม์ Peroxidase, Phenylalanine ammonia lyase, $\beta$ -1,3- glucanase และ Chitinase ของผลพริกพันธุ์จินดา	55
<b>วิจารณ์ผลการทดลอง</b>	<b>58</b>
<b>สรุปผลการทดลอง</b>	<b>65</b>
<b>เอกสารอ้างอิง</b>	<b>67</b>
<b>ภาคผนวก ก</b>	<b>82</b>
<b>ภาคผนวก ข</b>	<b>92</b>

## สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
3.1	ยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ Chitinase และ $\beta$ 1,3-glucanase ใน พริก	25
3.2	แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของ primers ที่ออกแบบมาเพื่อใช้ในการเพิ่ม ปริมาณยีน Glucanase (GLU) และ Chitinase (CHI) ในปฏิกิริยา PCR	26
3.3	ตารางที่ 3.3 Primers สำหรับใช้ในปฏิกิริยา Real-time PCR	29
4.1	การแสดงออกของยีน Chitinase ในใบพริกพันธุ์ CA1131 หลังจาก ได้รับ น้ำ (control), BTH (Benzothiadiazole) ความเข้มข้น 40 $\mu$ g/ml และเส้นใยของเชื้อรา <i>Colletotrichum capsici</i> ความเข้มข้น 7% เป็นเวลา 0, 3 และ 7 วัน	42
4.2	การแสดงออกของยีน $\beta$ -1,3-glucanase ในใบพริกพันธุ์ CA1131 หลังจากได้รับ น้ำ (control), BTH (Benzothiadiazole) ความเข้มข้น 40 $\mu$ g/ml และเส้นใยของเชื้อรา <i>Colletotrichum capsici</i> ความ เข้มข้น 7% เป็นเวลา 0, 3 และ 7 วัน	43
ข. 1	ปริมาณกิจกรรมของเอนไซม์ Peroxidase, Phenylalanine ammonia lyase, Chitinase และ $\beta$ -1,3 glucanase ของผลพริกพันธุ์บางช่วง และจินดาที่ไม่ปลูกและปลูกเชื้อ <i>C. gloeosporioides</i> นาน 6 ชั่วโมง	93
ข. 2	การเกิดโรคของผลพริกพันธุ์จินดาที่เก็บรักษาที่ 13 องศาเซลเซียส นาน 21 วันการเกิดโรคที่ผล (ร้อยละ)	94
ข. 3	อัตราการหายใจของผลพริกพันธุ์จินดาที่เก็บรักษาที่ 13 องศาเซลเซียส นาน 21 วัน อัตราการหายใจ (ml.CO <sub>2</sub> /kg.h)	95
ข. 4	การเปลี่ยนแปลงปริมาณเอทิลีนของผลพริกพันธุ์จินดาที่เก็บรักษาที่ 13 องศาเซลเซียส นาน 21 วัน	96
ข. 5	การเปลี่ยนแปลงค่าความสว่าง (L) ของผลพริกพันธุ์จินดาที่เก็บรักษาที่ 13 องศาเซลเซียส นาน 21 วัน	97
ข. 6	การเปลี่ยนแปลงค่าสีแดง-เขียว (a) ของผลพริกพันธุ์จินดาที่เก็บรักษา ที่ 13 องศาเซลเซียส นาน 21 วัน	98

## สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
ข. 7	การเปลี่ยนแปลงความแน่นเนื้อของผลพริกพันธุ์จินดาที่เก็บรักษาที่ 13 องศาเซลเซียส นาน 21 วัน	99
ข. 8	การเปลี่ยนแปลงน้ำหนักสดของผลพริกพันธุ์จินดาที่เก็บรักษาที่ 13 องศาเซลเซียส นาน 21 วัน	100
ข. 9	การเน่าของข้าวผลของผลพริกพันธุ์จินดาที่เก็บรักษาที่ 13 องศาเซลเซียส นาน 21 วัน การเน่าของข้าวผล (ร้อยละ)	101
ข. 10	การเปลี่ยนแปลงค่าความสว่าง (L) ของสีข้าวผลพริกพันธุ์จินดาที่เก็บรักษาที่ 13 องศาเซลเซียส นาน 21 วัน	102
ข. 11	การเปลี่ยนแปลงค่าสีเหลือง-น้ำเงิน (b) ของสีข้าวผลพริกพันธุ์จินดาที่เก็บรักษาที่ 13 องศาเซลเซียส นาน 21 วัน	103
ข. 12	ของเอนไซม์ Peroxidase บนผลพริกพันธุ์จินดาที่เก็บรักษาที่ 13 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง	104
ข. 13	กิจกรรมของเอนไซม์ Phenylalanine ammonia lyase บนผลพริกพันธุ์จินดาที่เก็บรักษาที่ 13 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง	105
ข. 14	กิจกรรมของเอนไซม์ $\beta$ -1,3 glucanase บนผลพริกพันธุ์จินดาที่เก็บรักษาที่ 13 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง	106
ข. 15	กิจกรรมของเอนไซม์ Chitinase บนผลพริกพันธุ์จินดาที่เก็บรักษาที่ 13 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง	107

## สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
2.1	โครงสร้างไคตินและไคโตแซน	11
3.1	แสดง pCR2.1-TOPO® vector	28
3.2	Standard curve ของปริมาณ cDNA ของยีน Chitinase ที่สกัดได้จากใบพริก โดยการนำ cDNA มาเจือจางให้ได้ความเข้มข้น $1 \times 10^{-1}$ ถึง $1 \times 10^{-4}$ $\mu\text{g/ml}$ และนำไปวิเคราะห์การแสดงออกของยีน โดย Real time PCR	30
3.3	Standard curve ของปริมาณ cDNA ของยีน $\beta$ -1,3-glucanase ที่สกัดได้จากใบพริก โดยการนำ cDNA มาเจือจางให้ได้ความเข้มข้น $1 \times 10^{-1}$ ถึง $1 \times 10^{-4}$ $\mu\text{g/ml}$ และนำไปวิเคราะห์การแสดงออกของยีน โดย Real time PCR	30
4.1	แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน Chitinase ในพริก ในพริกพันธุ์ CA1131	37
4.2	แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน $\beta$ -1,3-glucanase ในพริกพันธุ์ CA1131	38
4.3	DNA Alignment ระหว่าง Chitinase gene (Chi-Th) จากพริกพันธุ์ CA1131 กับ Chitinase gene (accession no. AY775335) จาก DNA data base	39
4.4	DNA Alignment ระหว่าง $\beta$ -1,3-glucanase (Chi-Th) จากพริกพันธุ์ CA1131 กับ $\beta$ -1,3-glucanase gene (accession no. AY775335) จาก DNA data base	40
4.5	การทดสอบประสิทธิภาพของ primers (CHI-F และ CHI-R) ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณ chitinase gene ในขั้นตอนการทำ Real-time PCR จากพริกพันธุ์ CA1131 บน 2% agarose gel	41
4.6	การทดสอบประสิทธิภาพของ primers (GLU-F1 และ GLU-R1, GLU-F2 และ GLU-R2) ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณ $\beta$ -1,3-glucanase gene ในขั้นตอนการทำ Real-time PCR จากพริกพันธุ์ CA1131 บน 2% agarose gel	41

## สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้าที่
4.7	การแสดงออกของยีน Chitinase ในใบพริกพันธุ์ CA1131 หลังจากได้รับ น้ำ (control), BTH (Benzothiadiazole) ความเข้มข้น 40 $\mu\text{g/ml}$ และเส้นใยของเชื้อรา <i>Colletotrichum capsici</i> ความเข้มข้น 7% เป็นเวลา 0 (A), 3 (C) และ 7 (E) วัน	43
4.8	การแสดงออกของยีน $\beta$ -1,3-glucanase ในใบพริกพันธุ์ CA1131 หลังจากได้รับ น้ำ (control), BTH (Benzothiadiazole) ความเข้มข้น 40 $\mu\text{g/ml}$ และเส้นใยของเชื้อรา <i>Colletotrichum capsici</i> ความเข้มข้น 7% เป็นเวลา 0 (A), 3 (C) และ 7 (E) วัน	44
4.9	กิจกรรมเอนไซม์ Peroxidase ในพริกพันธุ์บางช่วงและพันธุ์จินดาที่ไม่ปลูกเชื้อรา และปลูกเชื้อรา <i>C. gloeosporioides</i> นาน 6 ชั่วโมง	45
4.10	กิจกรรมเอนไซม์ Phenylalanine ammonia lyase ในพริกพันธุ์บางช่วงและพันธุ์จินดาที่ไม่ปลูกเชื้อรา และปลูกเชื้อรา <i>C. gloeosporioides</i> นาน 6 ชั่วโมง	46
4.11	กิจกรรมเอนไซม์ $\beta$ -1,3-glucanase ในพริกพันธุ์บางช่วงและพันธุ์จินดาที่ไม่ปลูกเชื้อรา และปลูกเชื้อรา <i>C. gloeosporioides</i> นาน 6 ชั่วโมง	46
4.12	กิจกรรมเอนไซม์ Chitinase ในพริกพันธุ์บางช่วงและพันธุ์จินดาที่ไม่ปลูกเชื้อรา และปลูกเชื้อรา <i>C. gloeosporioides</i> นาน 6 ชั่วโมง	46
4.13	การเกิดโรคบนผลพริกพันธุ์จินดาที่เก็บรักษาที่ 13 องศาเซลเซียส นาน 21 วัน	50
4.14	อัตราการหายใจของผลพริกพันธุ์จินดาที่เก็บรักษาที่ 13 องศาเซลเซียส นาน 21 วัน	50
4.15	การผลิตเอทิลีนของผลพริกพันธุ์จินดาที่เก็บรักษาที่ 13 องศาเซลเซียส นาน 21 วัน	51
4.16	การเปลี่ยนแปลงของค่าความสว่าง (L) บนผลพริกพันธุ์จินดาที่เก็บรักษาที่ 13 องศาเซลเซียส นาน 21 วัน	51

## สารบัญญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
4.17	การเปลี่ยนแปลงของค่าสีแดง (a) บนผลพริกพันธุ์จินดาที่เก็บรักษาที่ 13 องศาเซลเซียส นาน 21 วัน	52
4.18	การเปลี่ยนแปลงความแน่นเนื้อของผลพริกพันธุ์จินดาที่เก็บรักษาที่ 13 องศาเซลเซียส นาน 21 วัน	52
4.19	การสูญเสียน้ำหนักของผลพริกพันธุ์จินดาที่เก็บรักษาที่ 13 องศาเซลเซียส นาน 21 วัน	53
4.20	การเน่าของขั้วผลพริกพันธุ์จินดาที่เก็บรักษาที่ 13 องศาเซลเซียส นาน 21 วัน	53
4.21	การเปลี่ยนแปลงค่าความสว่าง (L) ของขั้วผลพริกพันธุ์จินดาที่เก็บรักษาที่ 13 องศาเซลเซียส นาน 21 วัน	54
4.22	การเปลี่ยนแปลงค่าสีเหลือง (b) ของขั้วผลพริกพันธุ์จินดาที่เก็บรักษาที่ 13 องศาเซลเซียส นาน 21 วัน	54
4.23	การเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์ Peroxidase ในพริกพันธุ์จินดาที่เก็บรักษาที่ 13 องศาเซลเซียส นาน 21 วัน	56
4.24	การเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์ Phenylalanine ammonia lyase ในพริกพันธุ์จินดาที่เก็บรักษาที่ 13 องศาเซลเซียส นาน 21 วัน	56
4.25	การเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์ $\beta$ -1,3-glucanase ในพริกพันธุ์จินดาที่เก็บรักษาที่ 13 องศาเซลเซียส นาน 21 วัน	57
4.26	การเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์ Chitinase ในพริกพันธุ์จินดาที่เก็บรักษาที่ 13 องศาเซลเซียส นาน 21 วัน	57
ก. 1	กราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของ BSA กับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร	84
ก. 2	กราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของน้ำตาล D-glucose กับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร	87
ก. 3	กราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของ N-acetylglucosamine กับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร	89

