บทนำ

1. ความสำคัญ และที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

พริกเป็นพืชที่เศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทยนิยมนำมาปรุงรสในอาหารไทยและต่างประเทศหลากหลายชนิด เพื่อชูรสอาหารให้เผ็ดร้อนและเข้มข้นขึ้น ผลผลิตพริกส่วนใหญ่ใช้บริโภคในประเทศและส่งออกไปจำหน่ายยังต่างในประเทศ เช่น มาเลเซีย สิงคโปร์ จีน ฮ่องกง เป็นต้น (กรมวิชาการเกษตร, 2547) โรคพริกที่พบโดยทั่วไปในประเทศไทย ได้แก่ โรคต้นเน่า โรคเหี่ยว โรคใบจุด โรคราแป้ง โรคกุ้งแห้ง โรคยอดและกิ่งแห้ง โรคผลเน่า โรคตากบ โรคใบหงิก อย่างไรก็ตามโรคที่ทำความเสียหายกับผลผลิตมากที่สุดและเป็นปัญหาต่อการเพาะปลูกและการเก็บรักษาพริกภายหลังการเก็บเกี่ยวคือ โรคกุ้งแห้งหรือแอนแทรคโนส ซึ่งเกิดจากการเข้าทำลายของเชื้อรา *Collectotrichum* spp. ที่พบระบาดโดยทั่วไป และสามารถเข้าทำลายพริกทุกสายพันธุ์ มีผลทำให้ปริมาณและคุณภาพของผลผลิตลดลง เชื้อราที่เป็นสาเหตุของโรคสามารถเข้าทำลายผลพริกในทุกระยะการเจริญ และพบว่าเชื้อนี้สามารถถ่ายทอดทางเมล็ดได้ การป้องกันกำจัดก่อนเกิดโรคระบาดควรแช่เมล็ดในสารเคมีฆ่าเชื้อราก่อนปลูก และหลังปลูกควรพ่นสารเคมีฆ่าเชื้อราทุกๆ 7-15 วันต่อครั้ง (เฉลิมเกียรติ โภคาวัฒนา, 2540; ศศิธร วุฒิวณิชย์, 2545)

ในปัจจุบันนี้พันธุ์พริกในประเทศไทยมีจำนวนมากมาย และมีการศึกษาถึงพันธุ์พริกที่ต้านทานต่อโรคเป็นจำนวนมากด้วยวิธีการปลูกเชื้อรา โดยเฉพาะโรคแอนแทรคโนสของผลพริก ทำให้ทราบถึงพันธุ์ที่ต้านทานและอ่อนแอต่อการเกิดโรค อย่างไรก็ตามยังไม่มีการศึกษาถึงกิจกรรมของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับความต้านทานโรคในผลพริกพันธุ์ต่างๆ ซึ่งการศึกษาข้อมูลเกี่ยวกับกิจกรรมของเอนไซม์ที่ต้านทานต่อโรคจะเป็นกุญแจสำคัญสำหรับการคัดเลือกพันธุ์พริกที่ต้านทานต่อโรคได้ดีอีกวิธีการหนึ่ง นอกจากนี้หากมีการศึกษาหาวิธีการกระตุ้นให้พริกสร้างภูมิต้านทานต่อโรคด้วย ก็ยิ่งจะเป็นการช่วยชะลอการเกิดโรคแอนแทรกโนสก่อนการเก็บเกี่ยวและป้องกันการเน่าเสียได้เป็นอย่างมาก

โรคแอนแทรกโนสเป็นโรคที่พบในพริกทุกสายพันธุ์ ต้นพริกที่ถูกเชื้อเข้าทำลายก็จะให้ผลผลิตลดลง รวมทั้งผลพริกที่ได้ก็มีคุณภาพแย่ลง ผลพริกที่ถูกเชื้อรานี้เข้าทำลายจะทำให้ไม่สามารถนำไปจำหน่ายได้ ในการควบคุมโรคโดยทั่วไปนิยมใช้พันธุ์พริกที่ต้านทานต่อโรคร่วมกับการทำเขตกรรมและใช้สารเคมีเพื่อป้องกันกำจัดโรค อย่างไรก็ตามการใช้สารเคมีทำให้เกิดอันตรายต่อเกษตรกรผู้ใช้ ผู้บริโภคและสิ่งแวดล้อม นอกจากนี้การใช้สารเคมีบ่อยๆ ก็ทำให้เชื้อหลายชนิดเกิดความต้านทานต่อ

สารเคมี ทำให้การป้องกันกำจัดโรคนั้นไม่ได้ผล (Wilson และคณะ, 1994) และหากใช้ในปริมาณที่สูง โดยเฉพาะช่วงใกล้เก็บเกี่ยว ก็ทำให้ผลผลิตที่จะส่งออกมีปริมาณสารพิษตกค้างอยู่มากกว่าเกณฑ์ที่ประเทศปลายทางกำหนด จากการเปิดตลาดเสรีภายใต้ WTO ให้ยกเว้นภาษีสินค้าเกษตร ทำให้ประเทศผู้ส่งออกต้องทำตามมาตรการและระเบียบปฏิบัติของประเทศผู้นำเข้าโดยเฉพาะมาตรการด้านสุขอนามัย ทำให้พริกจากประเทศไทยถูกปฏิเสธจากประเทศนำเข้าพริก ได้แก่ สิงคโปร์ สเปน นอร์เวย์ และออสเตรีย เนื่องจากพบสารพิษตกค้างอยู่มาก โดยพริกจากไทยจึงถูกปฏิเสธการนำเข้าปีละไม่ต่ำกว่า 40-50 ครั้ง (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2547) ดังนั้นจึงเป็นปัญหาที่สำคัญที่สมควรจะได้รับการแก้ปัญหาอย่างรีบด่วน โดยการลดการใช้สารเคมีในระดับไร่นาเพื่อให้สอดคล้องกับความต้องการของผู้บริโภคและประเทศคู่ค้า ในขณะเดียวกันเกษตรกรผู้ผลิตก็มีรายได้เพิ่มขึ้นจากการส่งออกพริกได้มากขึ้นและดำรงชีพได้อย่างยั่งยืนในระบบการผลิตผักของตน

ดังนั้นจึงมีการศึกษาเพื่อหาแนวทางอื่นๆ ในการควบคุมโรคในพริกจึงเป็นสิ่งที่สำคัญยิ่ง โดยเฉพาะการควบคุมโรคโดยไม่ใช้สารเคมีจึงเป็นวิธีที่ได้รับความสนใจมากขึ้น เช่น การควบคุมโรคโดยชีววิธี (Biological control) ก็เป็นอีกวิธีหนึ่งที่กำลังได้รับความสนใจมาก โดยการใช้สิ่งที่มีชีวิตกำจัดเชื้อโรคพืชด้วยกัน เช่น การใช้ไส้เดือนฝอยกำจัดเชื้อรา การใช้เชื้อรากำจัดเชื้อรา การใช้เชื้อแบคทีเรียกำจัดแบคทีเรีย และอีกวิธีหนึ่งคือ ใช้สารกระตุ้น (elicitors) ความต้านทานโรค เช่น การใช้ไคโตแซน มีรายงานว่าไคโตแซนสามารถกระตุ้นให้พืชสร้างความภูมิคุ้มกัน โดยพืชจะมีการผลิตเอนไซม์และสารเคมีป้องกันตนเอง เช่น สร้างเอนไซม์ Chitinase และสารประกอบพวก Lignin และ Tannin สารเหล่านี้จะมีผลลดอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อราสาเหตุของโรคพืช และสร้างภูมิต้านทานโรคให้กับพืช (รัฐ พิชญางกูร, 2543) การควบคุมโรคโดยการใช้พันธุ์ต้านทานเป็นอีกวิธีหนึ่งที่สามารถช่วยลดการเกิดโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพ ทั้งยังช่วยลดปริมาณการใช้สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืช ทำให้ปลอดภัยต่อสภาพแวดล้อม เกษตรกร ผู้บริโภค และยังช่วยลดต้นทุนการผลิต (รัตตา เอนกธนโชติ, 2542)

ในปัจจุบันการควบคุมการเข้าทำลายของเชื้อสาเหตุโรคแบบใหม่ที่กำลังมีการศึกษากันอย่างมาก คือ ความพยายามที่จะกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันหรือกลไกความต้านทานโรคของพืชให้มีอยู่ตลอดเวลา (Van Loon, 1997) ทำให้พืชสามารถป้องกันตัวเองจากการเข้าทำลายของเชื้อโรคได้โดยไม่ต้องใช้สารเคมีกำจัดโรคพืช โดยเฉพาะการกระตุ้นความต้านทานโรคทั้งระบบของพืช หรือ Systemic Acquired Resistance (SAR) ซึ่งเป็นกลไกความต้านทานโรคพืชที่เกิดจากการชักนำ (Inducible defense mechanism) และไม่จำเพาะต่อชนิดของเชื้อที่เข้าทำลาย และพบว่าการชักนำ SAR ในพืชนั้นส่วนใหญ่

เกี่ยวข้องกับการสะสม Salicylic acid (Yang และคณะ, 1997), Hypersensitive response (HR), Pathogenesis-related (PR) proteins (Christ และ Mosinger, 1989; Van Loon และคณะ, 1994) เป็นต้น ปกติแล้วการศึกษาความต้านทานแบบ SAR มักพิจารณาจากการแสดงออกของ PR protein genes เพื่อใช้เป็นเครื่องบ่งชี้ถึงการเกิด SAR ในพืช จึงถือว่า PR protein จัดเป็น SAR marker genes อย่างหนึ่ง (Ward และคณะ, 1991) SAR สามารถถูกชักนำได้โดยตัวกระตุ้น (elicitors) ทั้งแบบ 1) Biotic elicitors เช่น เส้นใยของเชื้อรา *Penicillium chrysogenum* (Chen และคณะ, 2006) ไวรัส TMV (Christ และ Mosinger, 1989; Van Loon และคณะ, 1994) และ 2) Abiotic elicitors เช่น Chitosan (Benhamou, 1996), Probenzole (PBZ) (Watanabe, 1997), Benzothiadiazole (BTH) (Garlach และคณะ, 1996), Acibenzolar-*S*-Methyl (Perez และคณะ, 2003; Cole, 1999), 2,6-Dichloroisonicotinic acid (INA)(Wilson และคณะ, 1994)

จากรายงานข้างต้นและรายงานการวิจัยอีกหลายผลงานทำให้คณะผู้วิจัยเล็งเห็นว่า Biotic และ Abiotic elicitors หลายๆ ชนิดนั้นสามารถใช้กระตุ้นความต้านทานโรคให้กับพืชได้ ซึ่งหากเราสามารถกระตุ้นให้พริกมีความต้านทานโรคอยู่ตลอดเวลาก็จะทำให้การใช้สารเคมีป้องกันกำจัดโรคน้อยลงได้ ดังนั้นการศึกษาในครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์ 2 ประการคือ เพื่อศึกษาผลของการใช้ Biotic และ Abiotic elicitors ในการชักนำ Systemic Acquired Resistance (SAR) โดยพิจาณาจากการแสดงออกของยีน Pathogenesis-Related (PR) Proteins ในต้นพริก และเพื่อศึกษาผลของไคโตแซนในการชักนำเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับความต้านทานโรคของพืช ได้แก่ Peroxidase, Phenylalanine ammonia lyase, β-1,3 glucanase และ Chitinase ในผลพริกพันธุ์ต้านทานและอ่อนแอต่อโรคแอนแทรกโนส

2. วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

2.1 เพื่อโคลนยีนที่เกี่ยวข้องกับ Pathogenesis-Related (PR) Proteins ของพริก (Chitinase และ β-1,3 Glucanase)

2.2 เพื่อศึกษาการแสดงออกของยีน Chitinase และ β-1,3 Glucanase ที่เกิดจากการชักนำโดย abiotic elicitors และ biotic elicitors ในพริกพันธุ์ต้านทานและพริกพันธุ์อ่อนแอต่อโรคแอนแทรกโนส

2.3 ศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับความต้านทานโรคในผลพริกพันธุ์จินดา (พันธุ์ต้านทานต่อโรค) และพันธุ์บางช้าง (พันธุ์อ่อนแอต่อโรค)

2.4 ศึกษาผลของการใช้สารละลายไคโตแซนต่อการควบคุมโรคแอนแทรคโนส และลักษณะทางกายภาพ/สรีระวิทยาของพริกพันธุ์จินดา

2.5 ศึกษาผลของการใช้สารละลายไคโตแซนต่อการชักนำกิจกรรมของเอนไซม์ Peroxidase, Phenylalanine ammonia lyase, β-1,3-glucanase และ Chitinase ของผลพริกพันธุ์จินดา

3. ขอบเขตของโครงการวิจัย

3.1 ทำการโคลนยีนที่เกี่ยวข้องกับ Plant pathogenic related proteins และความต้านทานโรคแบบ Systemic Acquired Resistance ของพริก 2 ชนิด คือ Chitinase และ β-1,3 glucanase

3.2 ศึกษาการแสดงออกของยีน Chitinase และ β-1,3 glucanase ที่ใบและผลพริกพันธุ์ต้านทาน (พันธุ์ CA1131)และพริกพันธุ์อ่อนแอ (พันธุ์ CA365) ที่เกิดจากการชักนำโดย Biotic elicitors ได้แก่ เส้นใยแห้งของเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรกโนส และ Chitosan และ Abiotic elicitors ได้แก่ Benzothiadiazole

3.3 ผลพริกที่ใช้ในการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับความต้านทานโรคของพืช คือ ผลพริกผลจินดา (พันธุ์ต้านทาน) และบางช้าง (พันธุ์อ่อนแอ)

3.4 เมล็ดพันธุ์พริกที่ใช้ในการทดลองเพื่อการตรวจสอบการแสดงออกของยีนคือ *Capsicum chinense* ได้แก่ พันธุ์พริก CA1131 (พันธุ์ต้านทาน) และพันธุ์ CA365 (พันธุ์อ่อนแอ)

3.5กิจกรรมของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับความต้านทานโรคที่จะทำการวิเคราะห์ในผลพริกผลจินดา (พันธุ์ต้านทาน) ได้แก่ Peroxidase, Phenylalanine ammonia lyase, β-1,3-glucanase และ Chitinase

4. ทฤษฎี สมมุติฐาน (ถ้ามี) และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

การกระตุ้นความต้านทานโรคที่มีอยู่ตามธรรมชาติของพริกให้มีอยู่ตลอดเวลาโดยการใช้ตัวกระตุ้น (elicitors) จะช่วยป้องกันการเข้าทำลายของเชื้อสาเหตุโรคได้ ทำให้พืชไม่เป็นโรคหรือเป็นโรคน้อยลง โดยเฉพาะอย่างยิ่งความต้านทานโรคแบบ Systemic Acquired Resistance (SAR) ซึ่งเป็นความต้านทานโรคแบบไม่เฉพาะเจาะจงต่อเชื้อและเกิดได้ทั่วทั้งต้นพืช โดยในการศึกษา SAR ครั้งนี้จะพิจารณาจากการแสดงออกของยีน Chitinase และ β-1,3 Glucanase เนื่องจากเป็นยีนที่มีการแสดงออกอย่างชัดเจนจากการศึกษาในพืชหลายๆ ชนิดที่ผ่านมา และการชักนำให้พืชมีความต้านทานโรคอยู่ตลอดเวลา จะมีผลช่วยลดการใช้สารเคมีป้องกันกำจัดโรคพืชได้อีกทางหนึ่ง และก่อให้เกิดความปลอดภัยต่อเกษตรกรผู้ปลูก ผู้บริโภค และสภาพแวดล้อม นอกจากนี้ การไคโตแซนเคลือบผิวผลพริกภายหลังการเก็บเกี่ยวสามารถ

ชะลอการเกิดโรคแอนแทรกโนส โดยมีผลไปชักนำกิจกรรมของเอนไซม์ Peroxidase, Phenylalanine ammonia lyase, β-1,3-glucanase และ Chitinase บนผลพริกให้สูงขึ้นได้ ตลอดจนมีผลชะลอการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพและสรีระวิทยาบนผลพริกภายหลังการเก็บเกี่ยวได้

5. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1) ด้านการวิจัย

- เผยแพร่ผลงานวิจัยในงานประชุมวิชาการระดับชาติ 2 เรื่อง (1 ปี/เรื่อง)
- เผยแพร่ผลงานวิจัยในวารสารระดับนานาชาติ 1 เรื่อง ซึ่งคาดว่าผลงานวิจัยนี้จะส่งตีพิมพ์ในวารสาร Physiological Molecular Plant Pathology หรือ Plant Disease

2) ด้านการเรียนการสอน

– สามารถผลิตนักศึกษาปริญญาโทได้ 1 คน (ภายในเวลา 2 ปี)

- ช่วยกระตุ้นให้นักศึกษาในสายวิชาเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยวสนใจและเกิดการเรียนรู้งานวิจัยด้าน Molecular Plant Pathology มากขึ้น

3) ด้านสาธารณสุขและสิ่งแวดล้อม

- การกระตุ้นให้พืชสร้างความต้านทานต่อโรคอยู่ตลอดเวลาได้ ทำให้เราสามารถลดการใช้สารเคมีป้องกันกำจัดโรคพืช ทำให้เกษตรกรผู้ปลูก ผู้บริโภค และสิ่งแวดล้อมปลอดภัยจากสารพิษ ไม่ต้องเสียเงินทองในการรักษาพยาบาล และธรรมชาติไม่เสียสมดุลย์