วิธีการดำเนินการวิจัย

A. การเตรียมต้นพริก ผลพริก และเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรกโนส

1) การเตรียมต้นพริกที่ใช้ทดสอบ

นำเมล็ดพริกพันธุ์พริก CA1131 (พันธุ์ต้านทาน) และพันธุ์ CA365 (พันธุ์อ่อนแอ) มาฟอกฆ่าเชื้อด้วย 0.6% โซเดียมไฮโปคลอไรท์ จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว จำนวน 3 ครั้ง นำเมล็ดพริกที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วไปเลี้ยงบนอาหาร MS medium ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 วัน ก่อนนำไปใช้ในการทดลองต่างๆ

2) การเตรียมผลพริกที่ใช้ทดสอบ

ผลพริกที่ใช้ในการทดสอบผลของไคโตแซนต่อการชักนำความต้านทานโรคแอนแทรกโนส คือ สายพันธุ์จินดา (พันธุ์ต้านทาน) และสายพันธุ์บางช้าง (พันธุ์อ่อนแอ) ที่ได้จากพื้นที่ปลูกพริก อำเภอพระแท่นดงรัง จังหวัดกาญจนบุรี ทำการคัดเลือกผลที่สมบูรณ์ไม่มีโรค ปลอดจากแมลง และมีคุณภาพดีโดยมีความยาวของผลประมาณ 5-6 เซนติเมตร กว้างประมาณ 1 เซนติเมตร สีแดงตลอดผล นำมาทำการทดลอง ณ ห้องปฏิบัติการสายวิชาเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว คณะทรัพยากรชีวภาพและเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี โดยนำพริกมาล้างทำความสะอาด ผึ่งให้แห้งก่อนนำไปใช้ในการทดลองต่างๆ

๒) การแยกเชื้อราสาเหตุโรคผลเน่าในพริกและการพิสูจน์โรคตามวิธีของ Koch's postulation

นำผลพริกที่แสดงอาการผลเน่ามาแยกเชื้อราสาเหตุโรคโดยวิธี Tissue transplanting method โดยการตัดเนื้อเยื่อผลพริกจากบริเวณส่วนที่เป็นรอยต่อระหว่างเนื้อเยื่อที่ปกติและเนื้อเยื่อที่เกิดโรคเป็นชิ้นขนาด 5x5 มิลลิเมตร ฆ่าเชื้อที่ผิวด้วยสารละลาย Sodium hypochlorite (Clorox®) ที่ความเข้มข้นร้อยละ 10 แช่เป็นเวลา 3 นาที จากนั้นล้างออกด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง ซับน้ำส่วนเกินออกด้วยกระดาษทิชชูที่ผ่านการฆ่าเชื้อ วางชิ้นส่วนเนื้อเยื่อพริกลงบนอาหาร Water Agar (WA) และบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 วัน จากนั้นใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร ตัดส่วนปลายเส้นใยเชื้อราที่เจริญออกจากเนื้อเยื่อพริกและย้ายลงบนอาหาร Potato Dextrose Agar (PDA) และเก็บเชื้อราบริสุทธิ์ที่ได้ไว้ใช้ในการศึกษาต่อไปนำเชื้อราที่แยกได้ไปพิสูจน์โรคโดยวิธี Koch (Koch's postulation) เพื่อทดสอบว่าเชื้อราที่แยกได้เป็นเชื้อสาเหตุของโรคที่แท้จริงของพริกหรือไม่ โดยใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร ตัดชิ้นส่วนเชื้อราบริเวณปลายเส้นใยของโคโลนีเชื้อราที่แยกได้ นำชิ้นวุ้น (mycelial disc)ไปปลูกบนผลพริกปกติหรือไม่เป็นโรค จากนั้นบ่มผลพริกไว้ในกล่องพลาสติกที่มีความชื้นสูง ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน ตรวจผล

การเกิดโรคเปรียบเทียบกับอาการโรคผลเน่าที่แยกได้จากผลพริกในครั้งแรก จากนั้นเก็บโคโลนีของเชื้อบริสุทธิ์ที่แยกได้ใน PDA slant บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2-5 วัน ก่อนนำมาเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป

๓) การเตรียม spore suspension และวิธีการปลูกเชื้อรา *C. gloeosporioides* หรือ *C. capsici*

นำเชื้อรา *C. gloeosporioides* หรือ *C. capsici* ที่แยกได้มาเลี้ยงบนอาหาร PDA บ่มไว้ที่ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7-10 วัน จากนั้นนำเชื้อที่เลี้ยงไว้มาล้างเอาสปอร์ที่ผิวหน้าโคโลนีด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ โดยใช้แท่งแก้วขูดผิวหน้าโคโลนีเบาๆ จากนั้นนำมากรองด้วยผ้าขาวบางที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว นำส่วนของ spore suspension ที่ได้มาปรับให้ได้ความเข้มข้น $1x10^7$ สปอร์/มิลลิลิตร และนำไปฉีดพ่นลงบนผลพริกบริเวณที่ทำแผลด้วยเข็มเขี่ยเชื้อกดลงบริเวณกึ่งกลางผลโดยให้มีความลึกประมาณ 2 มิลลิเมตร

B. การเตรียม Biotic elicitor และ Abiotic elicitors

1) Biotic elicitor -ทำการแยกเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรกโนสที่แยกได้จากข้อ 3) มาเลี้ยงในอาหารเหลว PDB (Potato Dextrose Broth) ปริมาตร 200 มิลลิลิตร และวางบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องนาน 7-10 วัน จากนั้นนำเส้นใยที่ได้มากรองผ่านกระดาษกรอง และอบเส้นใยให้แห้งตามวิธีการของ Chen และคณะ (2006) โดยอบในตู้ที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส นาน 4 ชั่วโมง จากนั้นนำเส้นใยแห้งที่ได้มาบดให้ละเอียดจำนวน 100 กรัม มาละลายในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อปริมาตร 1 ลิตร โดยวางบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 100 รอบต่อนาทีนาน 2 ชั่วโมง จากนั้นเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 24 ชั่วโมง เพื่อให้เกิดการตกตะกอน และนำไปกรองผ่านกระดาษกรอง Whatman No.1 นำส่วนที่กรองได้ (filtrate) ซึ่งมีความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ไว้เป็น stock สำหรับการศึกษาไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส ได้นาน 2 สัปดาห์ ส่วน Soluble chitosan ใช้ของบริษัท Sigma โดยเตรียมที่ความเข้มข้น 10, 20 และ 40 ppm

2) Abiotic elicitors - ที่ใช้ในการทดลองได้แก่ Benzolthiadiazole (BTH, 50% wettable granule fomulation) (Novarits) ความเข้มข้น 20 $\mu g\ L^{-1}$ (Hong และคณะ, 2000), 30 และ 40 μgL^{-1}

C. การโคลนยีน CHI และ GLU จากพริกด้วยเทคนิค Reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR)

1) การสกัด total RNA จากใบพริก

นำใบพริกพันธุ์ CA1131 (พันธุ์ต้านทาน) และพันธุ์ CA365 (พันธุ์อ่อนแอ) มาทำการสกัด total RNA ด้วยชุด InviTrap® Spin Universal RNA Mini Kit (Stratec molecular)โดยนำใบพริกประมาณ 100 mg มาบดให้เป็นผงละเอียดด้วยไนโตรเจนเหลว นำไปใส่ใน 2 ml Receiver tube จากนั้นเติม DTT-containing Lysis Solution TR ปริมาตร 600 ไมโครลิตร แล้ว vortex ให้ Lysis Solution TR สัมผัสกับตัวอย่างพืชอย่างทั่วถึงประมาณ 10 นาที หมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 xg เป็นเวลา 2 นาที ดูดส่วนใสใส่ใน 2.0 ml Receiver tube ปริมาตร 500 ไมโครลิตร เติม 100% Ethanol ผสมให้เข้ากันโดยใช้ปิเปต แล้วดูดสารละลายที่ได้ลงใน RTA Spin Filter Set บ่มเป็นเวลา 1 นาที แล้วหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 Xg เป็นเวลา 1 นาที ทิ้งส่วนใสที่ผ่าน column ลงมาแล้วล้าง RTA Spin Filter ด้วย Wash Buffer R1 ปริมาตร 600 ไมโครลิตร หมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 xg เป็นเวลา 1 นาที ทิ้งส่วนใสที่ผ่าน column ลงมา จากนั้นย้าย RTA Spin Filter ลงใน RTA Reciever Tube หลอดใหม่ แล้วล้างด้วย Wash Buffer R2 ปริมาตร 700 ไมโครลิตร หมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 Xg เป็นเวลา 1 นาที (ทำการล้าง column 2 รอบ) ทิ้งส่วนใสที่ผ่าน column ลงมา หมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 Xg เป็นเวลา 5 นาที เพื่อกำจัดเอทธานอลที่เหลือ จากนั้นย้าย RTA Spin Filter ลงใน RNase free Elution Tube และชะ RNA ด้วย Elution Buffer R ปริมาตร 30 ไมโครลิตร บ่ม 2 นาทีก่อนนำหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 Xg เป็นเวลา 1 นาที ทิ้ง RTA Spintb Filter จากนั้นนำสารละลายที่ได้ไปวัดค่าการดูดแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร RNA ที่มีความบริสุทธิ์จะมีอัตราส่วนค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตรต่อค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร (A260nm/A280nm) ระหว่าง 1.8-2.1 และวิเคราะห์คุณภาพของ RNA ด้วยเทคนิค Formaldehyde-Agarose gel electrophoresis จากนั้นเก็บ RNA ที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป

2) การกำจัด DNA ออกจากตัวอย่าง total RNAโดยเติม RNase-free DNaseI

นำ total RNA ที่ได้เติม 100 µL DEPC-treated water, 20 µL 10X DNaseI buffer, (100 mM Tris-HCl, pH 8.4, 500 mM KCl, 15 mM MgCl, 0.01% gelatin) และ 4 µL DNaseI นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที จากนั้นทำการสกัดแยกเอาเอนไซม์และเกลือต่างๆ ออกด้วยการเติม phenol:$CHCH_3$ (3:1) ปริมาตร 1 เท่าของสารละลายที่มีอยู่ในปฏิกิริยา เขย่าและนำไป centrifuge ที่ 4 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 14,000 Xg นาน 10 นาที นำส่วนใสด้านบนมากตกตะกอนด้วย 20 µL 3 M NaOAc, pH 5.5 และ 600 µL 100% ethanol จากนั้นทิ้งไว้ในตู้เย็น -20 องศาเซลเซียส ข้ามคืนจึงนำ

ตัวอย่างมา centrifuge ที่ 4 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 14,000 Xg นาน 10 นาที นำตะกอนที่ได้มาล้างใน 80% ethanol และปล่อยทิ้งไว้ให้แห้งใน heat block ที่ 50 องศาเซลเซียสนาน 3-5 นาที จากนั้นละลาตะกอนใน 50 µL DEPC-treated water และทำการตรวจสอบความเข้มข้นและคุณภาพของ total RNA ที่ได้ด้วยวิธี Electrophoresis และ Spectrophotometer ที่ Absorbance 260/280 (Bailey และคณะ , 2005)

3) การออกแบบ primers ที่ใช้ในการโคลนยีน CHI และ GLU

นำการออก primers ที่ใช้ในการโคลนยีน CHI และ GLU จะแบ่งทำได้ 2 ส่วน คือ ส่วนที่ 1 คือโดยการนำเอาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน CHI และ GLU ที่เคยมีรายงานในพริกกลุ่ม *Capsicum annuum*(ตารางที่ 1) ตามที่ปรากฏในฐานข้อมูลของ GenBank เช่น DDBJ (DNA Data Bank of Japan, Mishima, Shizuoka, Japan, http://www.ddbj.nig.ac.jp), NBCI (Bethesda, MD, USA, http://www.ncbi.nlm.nih.gov)และ EMBL (Cambridge, UK, http://www.embl-heidelberg.de) มาเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วนที่เหมือนกัน (conserver regions หรือบริเวณอนุรักษ์) ด้วยโปรแกรม Genetyx MAC Version 10.1 จากนั้นจึงออกแบบ primer จากบริเวณดังกล่าวส่วนที่ 2 คือการนำเอา primers ของยีนCHI และ GLU จากที่เคยมีการรายงานไว้ก่อนหน้านี้แล้วในผลงานตีพิมพ์ เช่น Primer ของ pepper chitinase gene จากจีโนมของพริกกลุ่ม *Capsicum annuum* ได้แก่ CLASS2N 5′-AACAACCC(A/T)GATTTAGT(A/G)GC-3′ (forward primer) และ CLASS2C (5′-GTTCCTTT(A/G)GTTGTTACGT-3′ (reverse primer) (Hong และคณะ, 2000) เป็นต้น

ตารางที่ 3.1 ยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ Chitinase และ β1,3-glucanase ในพริก

Gene/cDNA	Species of capsicum	Presumptive function	GeneBank accession number / References
Chi2	*Capsicum annuum*	chitinase	AY775335
CLF17	*Capsicum annuum*	endochitinase	AA840648
I9	*Capsicum annuum*	chitinase class I	AF082713
CAChi2	*Capsicumannuum*	chitinase class II	AF091235/Hong และคณะ (2000)
GLU	*Capsicum annuum*	β-1,3-glucanase-like protein	AF294849/Pflieger และคณะ (2000)
BGLU	*Capsicum annuum*(cv. Hanbyul)	basic-β1,3-glucanase	AF227953/Jung และ Hwang (2000)

ตารางที่ 3.2 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของ primers ที่ออกแบบมาเพื่อใช้ในการเพิ่มปริมาณยีน Glucanase (GLU) และ Chitinase (CHI) ในปฏิกิริยา PCR

ชื่อ Primers	ลำดับเบส	ยีน	Accession no.
GluP-F1	5'-CGAGAATTACTATTCCTCAAATGGGC-3'	GLU	AF227953
GluP-R1	5'-GGGCTGCTTGTTGGGGGAAAAACCTCC-3'	GLU	
GluP-F2	5'-GCAGGGGGTCAATCAATAGG-3'	GLU	AF227953
GluP-R2	5'-GCGGTTTCCAAAACAAACAGG-3'	GLU	
BGAL3-F1	5'-CTGGGATGGAACACGCGAG-3'	GLU	AF294849
BGAL3-R1	5'-CAGAATCCAACATAGCATC-3'	GLU	
BGAL-F1	5'-GAGGCTCCAACATTGAAG-3'	GLU	AF227953
BGAL-R1	5'-TCGGATCAATGGACGACC-3'	GLU	
GluP2-F*	5'-GCTAGGGAACAACTTGCCACCAGCATCAC-3'	GLU	AF227953
GluP2-R*	5'-CTATCAGAAAACCCAAGTTGAGTGG-3'	GLU	
Chi2P-F1	5'-ATGGAGTTCTCTGTATCACCAGTGGC-3'	CHI	AF091235
Chi2P-R1	5'-GCCTAACCCTGGGCAAAGTTC-3'	CHI	
Chi2P-F2	5'-CCAGGGACTTGTTTGAACGGATG-3'	CHI	AF091235
Chi2P-R2*	5'-CCCCTTATTTATTACTGTCATCTCC-3'	CHI	
Chi1F1	5'-TGCTTAAGCATCGCAACG-3'	CHI	AF082713
Chi1R1	5'-TGATGACACCGAATCCAG-3'	CHI	
Chi2F1*	5'-CGGATGCTGAGTTTTAGG-3'	CHI	AF091235
Chi2R1	5'-ATGCCCCTTCCTGCGCGCT-3'	CHI	

* คือ primers ที่สามารถใช้เพิ่มปริมาณ DNA จาก cDNA ของ Glucanase (GLU) และ Chitinase (CHI) ในปฏิกิริยา PCR ได้

4) การเตรียม cDNA จาก RNA ของใบพริก ด้วยชุด Thermo Scienctific Verso™ (Thermo Scientific)

เตรียม Reaction Mix ดังนี้ ผสม 5X cDNA synthesis buffer ปริมาตร 4 ไมโครลิตร, 5 mM dNTP Mix ปริมาตร 2 ไมโครลิตร, 500 ng/µl Anchored Oligo-dT ปริมาตร 1 ไมโครลิตร, RT Enhancer ปริมาตร 1 ไมโครลิตร, Verso Enzyme Mix ปริมาตร 1 ไมโครลิตร, น้ำ (PCR grade) ปริมาตร 10 ไมโครลิตร และเติม RNA ที่สกัดได้จากข้อ 1 จำนวน 1 ไมโครกรัม ผสมให้เข้ากันโดย

ใช้ปิเปต นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที และหยุดปฏิกิริยาด้วยการบ่มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที

5) การเพิ่มปริมาณ taget DNA จาก cDNA ด้วยวิธี PCR

นำ cDNA ที่ได้จากข้อ xx มาเพิ่มปริมาณยีนด้วยวิธี PCR โดยใช้ primers ที่ออกแบบได้จากตารางที่ 3.2 ในปฏิกิริยาจะมี PCR reaction mix ประกอบด้วย 10X PCR buffer ปริมาตร 2.5 ไมโครลิตร, 2.5 mMdNTPs ปริมาตร 2.0 ไมโครลิตร, เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase (5U/µl) ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร, 10 µM Forward primer และ10 µM Reverse primer ปริมาตรอย่างละ 0.5 ไมโครลิตร และใส่ cDNA (1 µg) ปริมาตร 1 ไมโครลิตร แล้วปรับปริมาตรให้ได้ปริมาตรสุทธิเท่ากับ 25 ไมโครลิตร โดยใช้น้ำ DEP-C water หลังจากนั้นนำเข้าเครื่อง Thermal cycler: MJ Research PTC-200 Peltier Thermal Cycler โดยใช้โปรแกรม PCR ดังนี้

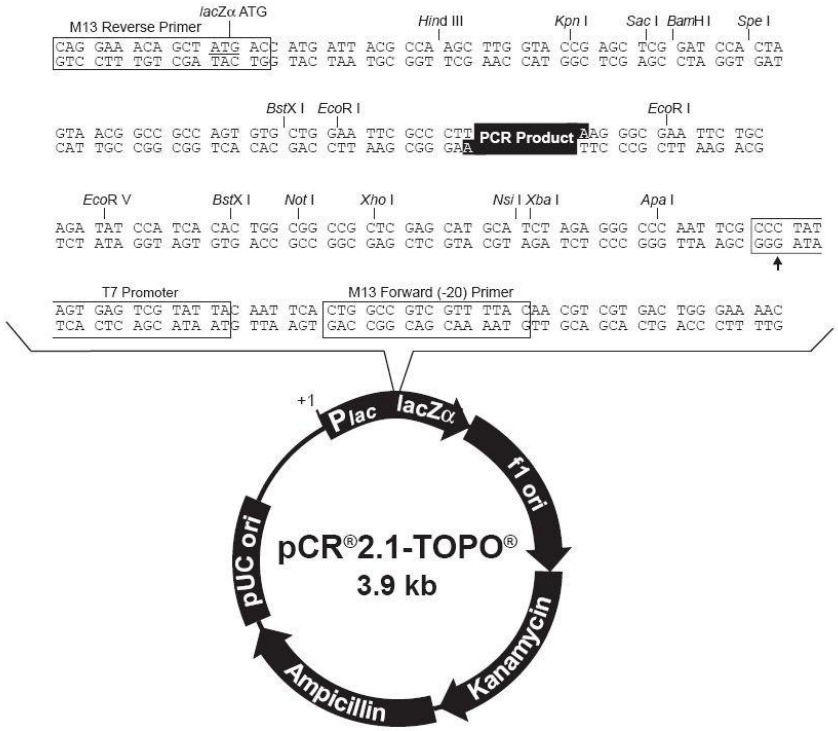
โปรแกรมที่ 1 Initial denaturation	ที่ 94°C เป็นเวลา 3 นาที	จำนวน 1 รอบ
โปรแกรมที่ 2 Denaturation	ที่ 94°C เป็นเวลา 30 วินาที	จำนวน 30 รอบ
Annealing	ที่ 55°C เป็นเวลา 30 วินาที	
Extension	ที่ 72°C เป็นเวลา 45 วินาที	
โปรแกรมที่ 3 Extension	ที่ 72°C เป็นเวลา 10 นาที	จำนวน 1 รอบ
	ที่ 4°C เป็นเวลา ∞	

นำ PCR product ที่ได้ไปตรวจสอบด้วยวิธี gel electrophoresis บน 0.7% agarose gel และเปรียบเทียบขนาดของ DNA ที่ได้กับ 100 bp DNA ladder (Fermentas)

6) การโคลนยีน CHI และ GLU

นำ PCR product บริสุทธิ์ที่สกัดจาก agarose gel ได้มาเชื่อมต่อกับ pCR2.1 vector (รูปที่ 3.1) โดยใช้เอนไซม์ T4 DNA ligase (Sambrook และคณะ, 1987) จากนั้นนำพลาสมิดลูกผสมที่ได้ถ่ายเข้าสู่ *E.coli* DH5α ด้วยวิธี $CaCl_2$ หลังการถ่ายพลาสมิดลูกผสมเข้าสู่ *E.coli* DH5α จากนั้นนำเอา *E.coli* DH5α ที่มีพลาสมิดนี้ไปเลี้ยงในอาหาร LB (Lurient Broth) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร บนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที นาน 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จากนั้นดูดเซลแขวนลอยที่ได้มาคัดเลือกเซลที่มีพลาสมิด ลูกผสมของยีน CHI หรือ GLU อยู่โดยการนำไปเลี้ยงในอาหาร LB agar ที่มีส่วนผสมของแอมพิซิลินความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร และเกลี่ยหน้าอาหารด้วย40 ไมโครลิตรของสารละลายผสมของ สารx-gal ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ IPTG ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (Sambrook และคณะ, 1987) ทำการคัดเลือกโคโลนีที่มีสีขาวมา

เลี้ยงใน LB ที่มีส่วนผสมของแอมพิซิลินความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร จากนั้นนำเซลที่ได้มาสกัดพลาสมิดออกโดยวิธี Alkaline lysis (Sambrook และคณะ, 1987) ทำการตรวจสอบโคลนที่ได้โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดเฉพาะ และนำไปแยกโดยวิธี Electrophoresis บน 1.0% agarose gelและทำการตรวจสอบขนาดของDNA ที่ได้โดยเทียบกับ λ DNA ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Sty* I หรือ *Hind*III เป็น DNA makerเพื่อพิจารณาขนาดดีเอ็นเอที่ได้ว่ามีขนาดใกล้เคียงกับยีน CHI และ GLU จากที่เคยมีการรายงานไว้หรือไม่ จากนั้นนำพลาสมิดสายผสมที่คัดเลือกได้ส่งไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่โคลนได้ที่ 1st BASE Pte Ltd (สิงคโปร์)



รูปที่ 3.1 แสดง pCR2.1-TOPOⓇ vector

7) การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และอะมิโนแอซิดของยีน CHI และ GLU

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน CHI และ GLU ที่ได้จาก 1st BASE Pte Ltdมาวิเคราะห์หาส่วนที่เป็น start codon, stop codon, ORF (open reading frame), restriction site และแปลรหัสโปรตีนที่ได้โดยโปรแกรม Genetyx MAC Version 10.1 จากนั้นนำเอาลำดับนิวคลีโอไทด์และอะมิโนแอซิดของยีน CHI และ GLU ที่ได้โคลนได้จากพริกกลุ่ม *Capsicum chinense* ไปเปรียบเทียบเป็นเปอร์เซ็นต์ความเหมือน (Similarity และ Identity) กับ CHI และ GLU ของพริก *Capsicum annuum* และสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นๆ โดยการทำ Multiple sequence alignment ด้วยโปรแกรม Genetyx MAC Version 10.1

D. ศึกษาการแสดงออกของยีน CHI และ GLU ที่เกิดจากการชักนำโดย Biotic elicitors และ Abiotic elicitors ในพริกพันธุ์ต้านทานและพริกพันธุ์อ่อนแอต่อโรคแอนแทรกโนส

1) การฉีดพ่น Biotic elicitors และ Abiotic elicitors

นำต้นกล้าพริกที่เพาะไว้ใน MS media อายุ 60 วัน มาทำการฉีดพ่นด้วย Biotic elicitors คือ stock ของเส้นใยแห้งของเชื้อที่เตรียมได้ในข้อ 13.2 ความเข้มข้น 3, 5 และ 7 เปอร์เซ็นต์ หรือฉีดพ่นด้วย Abiotic elicitors ได้แก่ Benzolthiadiazole (BTH) ความเข้มข้น 20, 30 และ 40 μgmL^{-1} ส่วนต้นพริกในชุดควบคุมคือพ่นด้วยน้ำกลั่น โดยปริมาตรของสารละลายที่ฉีดพ่นต่อต้นคือ 1 มิลลิลิตรต่อต้น จากนั้นทำการเก็บตัวอย่างใบพริกในวันที่ 0 1 3 5 และ 7 มาสกัด total RNA ตามวิธีการข้างต้น

2) การออกแบบ primers สำหรับใช้ใน Real-time PCR

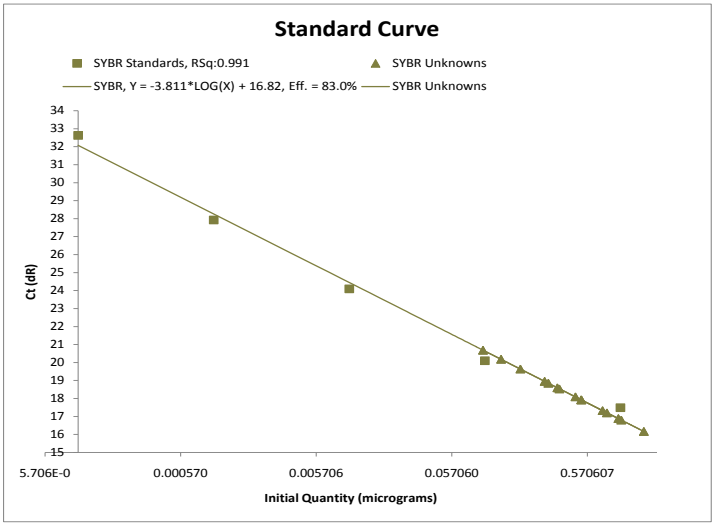
ทำการออกแบบ Primers สำหรับใช้ในปฏิกิริยา Real-time PCR (ตารางที่ 3.3) ทำโดยวิเคราะห์จากนิวคลีโอไทด์ของยีน CHI และ GLU ที่ได้จากการทำ DNA sequence ที่ข้อ C (7)

ตารางที่ 3.3 Primers สำหรับใช้ในปฏิกิริยา Real-time PCR

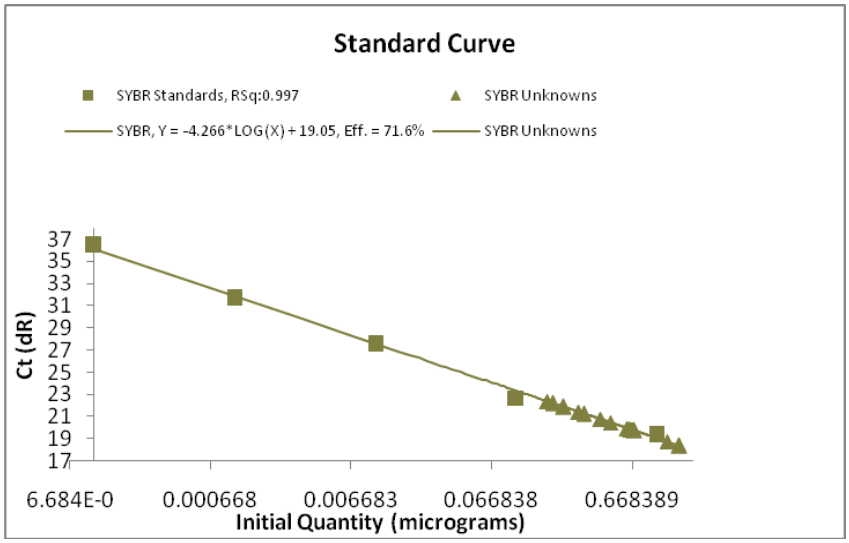
Primer Name	Oligonucleotide sequence	Product Size (bp)
CHI-F	5'-CACCAGCAGATAGGTCAGCA-3'	157
CHI-R	5'-TCCAGTGGGAACATTCAACA-3'	
GLU-F1	5'-TTTCTTCTTCCTGCCATGAG-3'	116
GLU-R1	5'-GGTGGAAAAGAGTTCCCAAT-3'	

3) การตรวจการแสดงออกของยีน CHI และ GLU โดยวิธี Real time RT- PCR

ทำ Real-time PCR ด้วย KAPA SYBR® FAST qPCR Kit Master Mix (2X) Universal (kapabiosystems, USA) โดยใช้ cDNA ที่ได้จากการสังเคราะห์ 2 µg / total reaction 20 µl เป็นแม่แบบและใช้ forward primer และ reverse primer ดังตารางที่ 3.3 โดยเตรียม reaction mix ดังนี้ ผสม 2X KAPAKAPA SYBR® FAST qPCR Master Mix (2X)* ABI Prism 10 µl, forward primer (10 µM) 0.4 µl, reverse primer (10 µM) 0.4 µl, ROX 0.4 µl ในการสังเคราะห์ยีนนั้นๆ โดยมีขั้นตอนการสังเคราะห์ดังนี้ เริ่มจากแยกสาย DNA ออกจากกันที่ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นทำปฏิกิริยา PCR จำนวน 40 รอบ โดย denature ที่ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที, annealing ที่ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที และ extension ที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นนำค่า Ct ที่ได้จากการอ่านค่าของเครื่อง Real-time PCR มาวิเคราะห์ข้อมูล



รูปที่ 3.2 Standard curve ของปริมาณ cDNA ของยีน Chitinase ที่สกัดได้จากใบพริก โดยการนำ cDNA มาเจือจางให้ได้ความเข้มข้น $1x10^{-1}$ ถึง $1x10^{-4}$ µg/ml และนำไปวิเคราะห์การแสดงออกของยีนโดย Real time PCR



รูปที่ 3.3 Standard curve ของปริมาณ cDNA ของยีน β-1,3-glucanase ที่สกัดได้จากใบพริก โดยการนำ cDNA มาเจือจางให้ได้ความเข้มข้น $1x10^{-1}$ ถึง $1x10^{-4}$ µg/ml และนำไปวิเคราะห์การแสดงออกของยีนโดย Real time PCR

E. การศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับความต้านทานโรคในผลพริก

นำพริกที่เป็นพันธุ์การค้าจำนวน 2 พันธุ์ คือ พันธุ์จินดาและพันธุ์บางช้างมาล้างทำความสะอาดด้วยน้ำกลั่น จากนั้นทำบาดแผลโดยการใช้เข็มเขี่ยเชื้อกดลงบริเวณกึ่งกลางผลโดยให้มีความลึกประมาณ 2 มิลลิเมตร จากนั้นจัดสิ่งทดลองดังต่อไปนี้

ทรีตเมนท์ที่ 1 พริกพันธุ์บางช้างไม่ทำแผล ไม่ปลูกเชื้อรา

ทรีตเมนท์ที่ 2 พริกพันธุ์บางช้างทำแผล ปลูกเชื้อโดยใช้สปอร์ของเชื้อรา *C. gloeosporioides* นาน 6 ชั่วโมง

ทรีตเมนท์ที่ 3 พริกพันธุ์จินดาไม่ทำแผล ไม่ปลูกเชื้อ

ทรีตเมนท์ที่ 4 พริกพันธุ์จินดาทำแผล ปลูกเชื้อโดยใช้สปอร์ของเชื้อรา *C. gloeosporioides* นาน 6 ชั่วโมง

จากนั้นนำผลพริกมาหั่นเป็นชิ้นเล็กๆ แล้วทำการสุ่มตัวอย่างละ 5 กรัม และเก็บแช่เย็นไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส (นานไม่เกิน 1 สัปดาห์) จากนั้นนำตัวอย่างที่แช่แข็งมาบดให้ละเอียดในโกร่งบดยาด้วยไนโตเจนเหลวและทรายละเอียด และทำการตรวจวัดกิจกรรมของเอนไซม์ดังนี้

- Peroxidase โดยวิธีของ Wang (1982) (ภาคผนวก ก.1)
- Phenylalanine ammonia lyase โดยวิธีของ Camm และ Tower (1973) (ภาคผนวก ก.2)
- β-1,3 glucanase โดยวิธีของ Salles และคณะ (2002) (ภาคผนวก ก.3)
- Chitinase โดยวิธีของ Gupta และคณะ (1983) (ภาคผนวก ก.4)

F. การศึกษาผลของสารละลายไคโตแซนต่อการควบคุมโรคแอนแทรคโนสและการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพและสรีระวิทยาของผลพริก

นำผลพริกพันธุ์จินดาซึ่งเป็นพันธุ์ที่ต้านทานต่อโรคที่ได้จากผลการทดลองที่ 1 และจากการตรวจเอกสารพบว่าเป็นพันธุ์ที่มีความต้านทานต่อโรคแอนแทรคโนส (บุญญวดี จิรวุฒิ, 2540) จึงนำมาใช้ในการศึกษาถึงผลของไคโตแซนต่อการควบคุมโรคแอนแทรคโนส และการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพและสรีระของผลพริก โดยนำผลพริกที่เก็บเกี่ยวมาจากสวน มาล้างทำความสะอาดด้วยน้ำกลั่น จากนั้นทำบาดแผลโดยการใช้เข็มเขี่ยเชื้อกดลงบริเวณกึ่งกลางผล โดยให้มีความลึกประมาณ 2 มิลลิเมตร ส่วนสารละลายไคโตแซนนั้นนำมาจากบริษัท T.A.B. Innovation จำกัด ซึ่งมีความเข้มข้นของไคโตแซนร้อยละ 2 จากนั้นจัดสิ่งทดลองดังต่อไปนี้

ทรีตเมนท์ที่ 1 ไม่ทำแผล ไม่ปลูกเชื้อรา จุ่มในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ (ชุดควบคุมที่ 1)

ทรีตเมนท์ที่ 2 ทำแผล ไม่ปลูกเชื้อรา จุ่มในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ (ชุดควบคุมที่ 2)

ทรีตเมนท์ที่ 3 ทำแผล ปลูกเชื้อโดยใช้สปอร์ของเชื้อรา *C. gloeosporioides* นาน 6 ชั่วโมง จุ่มในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ (ชุดควบคุมที่ 3)

ทรีตเมนท์ที่ 4 ทำแผล ปลูกเชื้อโดยใช้สปอร์ของเชื้อรา *C. gloeosporioides* นาน 6 ชั่วโมง จุ่มในสารละลายไคโตแซนร้อยละ 1.2

ทรีตเมนท์ที่ 5 ทำแผล ปลูกเชื้อโดยใช้สปอร์ของเชื้อรา *C. gloeosporioides* นาน 6 ชั่วโมง จุ่มในสารละลายไคโตแซนร้อยละ 1.6

โดยแต่ละทรีตเมนท์มี 5 ซ้ำ ๆ ละ 50 ผล จากนั้นบรรจุลงในถาดโฟม และหุ้มด้วยฟิล์มยืดห่อหุ้มอาหารชนิด PVC ชนิด ทำการเก็บพริกที่อุณหภูมิ 13 องศาเซลเซียส และทำการบันทึกผลการทดลองทุก 3 วัน จนกระทั่งหมดอายุการเก็บรักษา โดยบันทึกการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางกายภาพและสรีระ

วิทยาของพริกดังต่อไปนี้

- อัตราการหายใจและการผลิตเอทิลีน

นำพริกที่ทราบน้ำหนัก มาบรรจุลงในขวดแก้วขนาด 50 มิลลิลิตร ปิดขวดให้สนิท เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง แล้วทำการเก็บตัวอย่างก๊าซภายในขวดแก้วด้วยหลอดฉีดยาที่เป็นสุญญากาศปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำไปตรวจวัดคาร์บอนไดออกไซด์และเอทีลีน โดยทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง gas chromotography (ภาคผนวก ก. 5)

- การเปลี่ยนแปลงสีของผลพริก

ทำการวัดสีผิวผลพริกด้วยเครื่องวัดสี (Colorimeter) Minolta DP-301 ในการวัดจะพยายามให้ probe สัมผัสกับผิวผลมากที่สุด โดยใช้ผลพริกประมาณ 5 ผล วางเรียงชิดกัน จากนั้นวาง probe ให้ตั้งฉากกับผลพริกแล้วจึงทำการวัด ตัวอย่างที่ใช้ในการวัดค่าสีแต่ละทรีตเมนท์มีทำ 5 ซ้ำ และรายงานเป็นค่า Hunter' scale ซึ่งประกอบด้วยค่าต่างๆ ดังนี้

- ค่า L เป็นค่าที่รายงานถึงความสว่างของสี มีค่าตั้งแต่ 0 ถึง 100 ถ้าค่า L สูง หมายถึง มีความสว่างมาก แต่ถ้าค่า L ต่ำ หมายถึง มีสีเข้มหรือสว่างน้อย

- ค่า a เป็นค่าที่รายงานถึงการเปลี่ยนแปลงของสีเขียว-แดง ค่า a เป็นค่าลบแสดงว่ามีช่วงสีเป็นสีเขียว แต่ถ้าค่า a เป็นบวกแสดงว่าอยู่ในช่วงสีแดง

- ค่า b เป็นค่าที่รายงานถึงการเปลี่ยนแปลงของสีในช่วงสีน้ำเงิน-เหลือง กรณีที่ค่า b มีค่าเป็นลบแสดงว่าอยู่ในช่วงสีน้ำเงิน แต่ค่า b เป็นบวกแสดงว่าอยู่ในช่วงสีเหลือง

- การเปลี่ยนแปลงความแน่นเนื้อ (Firmness)

วัดความแน่นเนื้อโดยใช้เครื่อง Texture analyzer TA-XT2 หัววัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3 มิลลิเมตร โดยวางหัววัดให้ตั้งฉากกับผลพริก กดลึก 2 มิลลิเมตร บันทึกความแน่นเนื้อ ณ จุดสูงสุดของกราฟ แต่ละทรีตเมนท์ทำการวัดค่าความแน่นเนื้อจำนวน 5 ซ้ำ และรายงานผลในหน่วยนิวตัน (N)

- การสูญเสียน้ำหนักของพริก

ตรวจสอบการสูญเสียน้ำหนักสดได้โดยทำการชั่งน้ำหนักเริ่มต้นก่อนเก็บรักษา หลังจากนั้นทำการชั่งน้ำหนักทุกๆ วัน โดยแต่ละทรีตเมนท์มีตัวอย่างจำนวน 5 ซ้ำ นำค่าที่บันทึกได้มาคำนวณหาค่าร้อยละของการสูญเสียน้ำหนักสดดังนี้

$$\text{ร้อยละ การสูญเสียน้ำหนักสด} = \frac{\text{น้ำหนักเริ่มต้น-น้ำหนักหลังการเก็บรักษา} \times 100}{\text{น้ำหนักเริ่มต้น}}$$

- เปอร์เซ็นต์การเกิดโรคบนผลพริก

ตรวจสอบการเกิดโรคเฉพาะบนผลพริกโดยให้คะแนนดังนี้ (Zhang และ Quantick, 1997)

0 = ไม่มีการเกิดโรค

1 = มีอาการเกิดโรคเป็นจุดเล็กๆ

2 = มีอาการเกิดโรคน้อยกว่าร้อยละ 25 ของพื้นที่ผิว

3 = มีอาการเกิดโรคร้อยละ 25-50 ของพื้นที่ผิว

4 = มีอาการเกิดโรคมากกว่าร้อยละ 50 ของพื้นที่ผิว

- การเปลี่ยนแปลงสีของขั้วผล

ทำการวัดสีขั้วพริกด้วยเครื่องวัดสี (Colorimeter) Minolta DP-301 ในการวัดจะพยายามให้ probe สัมผัสกับขั้วผลพริกมากที่สุด โดยเรียงขั้วผลประมาณ 10-15 ผล วางเรียงชิดกัน จากนั้นวาง probe ให้ตั้งฉากกับขั้วพริกแล้วทำการวัด จำนวน 5 ซ้ำ และรายงานเป็นค่า Hunter'scale ซึ่งประกอบด้วยค่าต่างๆ ดังนี้ ค่าความสว่าง (L) ค่าสีแดง (a) ค่าสีเหลือง (b)

- เปอร์เซ็นต์การเน่าของขั้วผล

ตรวจสอบความรุนแรงของการเน่าของขั้วพริกโดยให้คะแนนดังนี้ (Zhang และ Quantick, 1997)

0 = ไม่มีการเกิดโรค

1 = มีอาการเกิดโรคเป็นจุดเล็ก ๆ ของขั้วผลพริก

2 = มีอาการเกิดโรคน้อยกว่าร้อยละ 25 ของพื้นที่ผิวของขั้วผลพริก

3 = มีอาการเกิดโรคร้อยละ 25 – 50 ของพื้นที่ผิวของขั้วผลพริก

4 = มีอาการเกิดโรคมากกว่าร้อยละ 50 ของพื้นที่ผิวของขั้วผลพริก

G. ศึกษาผลของสารละลายไคโตแซนต่อการชักนำกิจกรรมของเอนไซม์ Peroxidase, Phenylalanine ammonia lyase, β-1,3 glucanase และ Chitinase ในผลพริกพันธุ์จินดา

นำผลพริกพันธุ์จินดามาล้างทำความสะอาดด้วยน้ำกลั่น จากนั้นทำบาดแผลโดยการใช้เข็มเขี่ยเชื้อกดลงบริเวณกึ่งกลางผลโดยให้มีความลึกประมาณ 2 มิลลิเมตร จากนั้นจัดสิ่งทดลองดังต่อไปนี้

ทรีตเมนท์ที่ 1 ไม่ทำแผล ไม่ปลูกเชื้อรา จุ่มในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ (ชุดควบคุมที่ 1)

ทรีตเมนท์ที่ 2 ทำแผล ไม่ปลูกเชื้อรา จุ่มในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ (ชุดควบคุมที่ 2)

ทรีตเมนท์ที่ 3 ทำแผล ปลูกเชื้อโดยใช้สปอร์ของเชื้อรา *C. gloeosporioides* นาน 6 ชั่วโมง จุ่มในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ (ชุดควบคุมที่ 3)

ทรีตเมนท์ที่ 4 ทำแผล ปลูกเชื้อโดยใช้สปอร์ของเชื้อรา *C. gloeosporioides* นาน 6 ชั่วโมง จุ่มในสารละลายไคโตแซนที่ระดับความเข้มข้นที่สามารถช่วยชะลอการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพและสรีระวิทยาของพริกพันธุ์จินดาที่ได้จากการทดลองที่ F

แต่ละทรีตเมนท์มี 5 ซ้ำ และทำการตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของกิจกรรมของเอนไซม์ 4 ชนิด คือ Peroxidase, Phenylalanine ammonia lyase, β-1,3 glucanase และ Chitinase โดยพิจารณาจากการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์ ดังกล่าวข้างต้น ทุกๆ 0, 6, 12, 18, 24 และ 48 ชั่วโมง จากนั้นนำมาหั่นเป็นชิ้นเล็กๆ ตัวอย่างละ 5 กรัม และเก็บแช่ไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส ก่อนนำมาบดให้ละเอียดในโกร่งบดยาด้วยไนโตรเจนเหลวและทรายละเอียด และทำการตรวจวัดกิจกรรมของเอนไซม์ ดังนี้

- Peroxidase โดยวิธีของ Wang (1982) (ภาคผนวก ก.1)
- Phenylalanine ammonia lyase โดยวิธีของ Camm และ Tower (1973) (ภาคผนวก ก.2)
- β-1,3 glucanase โดยวิธีของ Salles และคณะ (2002) (ภาคผนวก ก.3)
- Chitinase โดยวิธีของ Gupta และคณะ (1983) (ภาคผนวก ก.4)

สถานที่ทำการทดลอง/เก็บข้อมูล

ห้องปฏิบัติการของสายวิชาเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว
คณะทรัพยากรชีวภาพและเทคโนโลยี
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี (ศูนย์บริการทางการศึกษาบางขุนเทียน)