247398

ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
247398

รายงานการวิจัย

โครงการวิจัยเรื่อง

การศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการก่อโรคกุ้งแห้งในพริก จากเชื้อรา *Colletotrichum capsici*

Assays of enzyme activity involved in anthracnose during chilli-*Colletotrichum capsici* pathogenesis

โดย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ปวีณา พงษ์ดนตรี

ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

อาจารย์ ดร.ปุญชรัสมิ์ สิริพุทไธวรรณ

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนจาก

ทุนอุดหนุนทั่วไป มหาวิทยาลัยขอนแก่น ประจำปีงบประมาณ 2552

รหัสโครงการวิจัย 521004

b00252187
247398
ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
247398

รายงานการวิจัย

โครงการวิจัยเรื่อง

การศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการก่อโรคกุ้งแห้งในพริกจากเชื้อรา *Colletotrichum capsici*

Assays of enzyme activity involved in anthracnose during chilli-*Colletotrichum capsici* pathogenesis

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

โดย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ปวีณา พงษ์ดนตรี

ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

อาจารย์ ดร.ปุญชรัสมิ์ สิริพุทไธวรรณ

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนจาก

ทุนอุดหนุนทั่วไป มหาวิทยาลัยขอนแก่น ประจำปีงบประมาณ 2552

รหัสโครงการวิจัย 521004

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยเรื่อง การศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการก่อโรคกุ้งแห้งในพริก จากเชื้อรา *Colletotrichum capsici* ดำเนินไปได้ด้วยความอนุเคราะห์จากกาสนับสนุนทุนวิจัย ประเภทอุดหนุนทั่วไป มหาวิทยาลัยขอนแก่น ประจำปีงบประมาณ 2552 โครงการหมายเลข 521004

คณะผู้ทำงานวิจัยจึงใคร่ขอขอบพระคุณ ผศ.ดร.สุพร นุชดำรงค์ ที่ได้ให้คำแนะนำการวิเคราะห์เอนไซม์ คุณจรรยา บุญพึ่ง ในการเพาะต้นกล้าพริก คุณอภิชาติ ขอดคำ ในการซ่อมเครื่องมือที่สำคัญในการวิจัยนี้

นางสาวสิวลี ศรีจันทร์ นางสาวณัฐกฤตา พรมวิโย และนางสาวจุไรรัตน์ ภารสงัด ในการช่วยทำงานวิจัย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ปวีณา พงษ์ดนตรี

สิงหาคม 2553

ชื่อโครงการ: การศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการก่อโรคกุ้งแห้งในพริก จากเชื้อรา *Colletotrichum capsici*

ผู้วิจัย : ผศ. ดร. ปวีณา พงษ์ดนตรี
อ. ดร. ปุญชรัสมิ์ สิริพุทไธวรรณ

ได้รับทุนอุดหนุนจากมหาวิทยาลัยขอนแก่นรหัสโครงการวิจัย 521004 ประจำปี 2552

บทคัดย่อ

247398

การวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษากิจกรรมของเอนไซม์กลุ่มที่ใช้ในการกำจัดสารจำพวก reactive oxygen species ที่คาดว่าเกี่ยวข้องกับการก่อโรคกุ้งแห้งในพริก ได้แก่ เอนไซม์คะตะเลส เปอร์ออกซิเดส และซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทส พบเนื้อเยื่อที่เหมาะสมต่อการสกัดโปรตีนเพื่อนำมาใช้ในการวิเคราะห์เอนไซม์ดังกล่าวได้แก่ใบพริก โดยมีน้ำหนักระหว่าง 0.1 – 0.25 กรัม และสกัดโดยใช้ 1% โพลีไวนิลไพโรริโดน ใน 50 มิลลิโมลาร์ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.0 ได้ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการวิเคราะห์คะตะเลสประกอบด้วย 50 มิลลิโมลาร์ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 2 ไมโครกรัมโปรตีน ในเวลา 2 นาที การวิเคราะห์เปอร์ออกซิเดสใช้โปรตีน 2 ไมโครกรัมโปรตีน ติดตามอัตราเร็วของปฏิกิริยาที่มี 30 มิลลิโมลาร์กวาอิอาคอล (guaiacol) และ 20 มิลลิโมลาร์ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และศึกษาจำนวนไอโซเอนไซม์ของเปอร์ออกซิเดสและซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทสได้ด้วยการย้อมโปรตีนที่แยกด้วยโพลีอะคริลาไมด์เจล การทดสอบลักษณะใบพริกเพื่อให้สามารถนำไปใช้ในการวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์หลังการก่อโรคนั้นโดยทดสอบกับเชื้อรา *Colletotrichum capsici* จำนวน 5 สายพันธุ์ พบว่าการใช้ใบจากต้นกล้าที่มีอายุเท่ากันมีความเหมาะสมกว่าใบจากต้นสมบูรณ์และใบรูปวงกลมขนาด 0.95 ตารางเซนติเมตร และสายพันธุ์ F8-5B เป็นสายพันธุ์ที่มีความรุนแรงมากกว่าสายพันธุ์ SKP16, CC.1.6, CC. 1.9 และ CC.1.12 การเปรียบเทียบกิจกรรมเอนไซม์ในต้นกล้าหลังจากเหนี่ยวนำให้เกิดโรค 7 และ 8 วัน พบว่าไม่มีความแตกต่างของกิจกรรมคะตะเลสกับต้นกล้าที่ใช้เป็นตัวควบคุม แต่เห็นความแตกต่างของเปอร์ออกซิเดสในวันที่ 7 แต่ไม่พบในวันที่ 8 เห็นการเพิ่มจำนวนไอโซเอนไซม์ของซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทสในต้นกล้าในวันที่ 8 มากกว่าวันที่ 7 แต่อย่างไรก็ตามไม่พบความแตกต่างระหว่างต้นกล้าที่ใช้เป็นตัวควบคุมกับต้นกล้าที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดโรคอย่างชัดเจน

Project Title : Assays of enzyme activity involved in anthracnose during chilli-*Colletotrichum capsici* pathogenesis

Project Researcher : Assistant professor Paweena Pongdontri, Ph. D.

Dr. Pooncharassami Siriputthaiwan

Supported by Khon Kaen University Grant No. 521004 Fiscal year 2009

247398

Abstract

This work was aimed to study a group of reactive oxygen scavenging enzymes that was postulated to be involved with anthracnose in chilli. Those enzymes were catalase, peroxidase and superoxide dismutase. Leaf of 0.1 – 0.25 g was appropriate for protein extraction using 1% polyvinylpyroridone in 50 mM phosphate buffer pH 7.0. Optimal assay condition for catalase composed of 50 mM hydrogen peroxide, 2 µg protein within 2 min. Peroxidase was assayed by following the rate of reaction in the presence of 2 µg protein, 30 mM guaiacol and 20 mM hydrogen peroxide. Isoenzymes of peroxidase and superoxide dismutase were observed by electrophoresed proteins in polyacrylamide gel. Adequate leaf tissue for enzyme assays and gel staining after the disease induction using 5 strains of *Colletotrichum capsici* suggested that seedling was better than mature leaf and 0.95-cm^2-leaf disc. F8-5B was the most virulent strain than SKP16, CC.1.6, CC. 1.9 and CC.1.12. Comparison of enzyme activities in seedlings at 7 and 8 days after the F85B treatment showed that there was no difference in catalase activity between the treated and controlled seedlings both at day 7 and day 8. Nevertheless, the treated seedlings at day 7 showed different peroxidase activity from that of day 8. More isoenzymes of superoxide dismutase in seedlings at 7 days after the treatment were detected. However, there was no difference of the superoxide dismutase isoenzymes among the treated and controlled seedlings.

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อ (ภาษาไทย)	ข
Abstract	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	จ
สารบัญรูป	ฉ
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	3
บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัย	16
บทที่ 4 ผลการวิจัยและอภิปราย	21
บรรณานุกรม	33

สารบัญตาราง

		หน้า
ตารางที่ 4.1	การเกิดโรคด้วยเชื้อราสายพันธุ์ F8-5B โดยการสเปรย์บนใบพริก	29
ตารางที่ 4.2	การเกิดโรคด้วยเชื้อราสายพันธุ์ F8-5B และ SKP16 โดยการสเปรย์บนใบพริก	31
ตารางที่ 4.3	การเหนี่ยวนำต้นอ่อนพริกให้เกิดโรคด้วยเชื้อราสายพันธุ์ F8-5B	32
ตารางที่ 4.4	การเปรียบเทียบกิจกรรมเอนไซม์คะตะเลส เปอร์ออกซิเดส	32

สารบัญรูป

		หน้า
รูปที่ 2.1	โครงสร้างโมเลกุลของแคปไซซิน	5
รูปที่ 4.1	สเปคตรัมของสารสกัดจากผลและใบพริก	21
รูปที่ 4.2	ผลของ PVP และน้ำหนักใบพริกที่มีต่อปริมาณโปรตีนต่อปริมาตรที่สกัดได้	22
รูปที่ 4.3	การละลายของโปรตีนต่อน้ำหนักสด 1 กรัม	22
รูปที่ 4.4	การติดตามกิจกรรมเอนไซม์คะตะเลสจากใบพริกตามวิธีของ Chance and Maehly (1995)	23
รูปที่ 4.5	การทำปฏิกิริยาของ 32.4 mM ammonium molybdate กับ H_2O_2 ความเข้มข้นช่วง 0 – 100 mM ปริมาตรในการทำปฏิกิริยา 1 ml	24
รูปที่ 4.6	การการทำปฏิกิริยาของ 32.4 mM ammonium molybdate กับ H_2O_2 ความเข้มข้นช่วง 0 – 100 mM ปริมาตรในการทำปฏิกิริยา 200 µl	24
รูปที่ 4.7	การติดตามกิจกรรมคะตะเลสตามวิธีของ GÓth (1991) ปริมาตรในการทำปฏิกิริยา 1 ml	25
รูปที่ 4.8	ผลของปริมาณโปรตีนต่อกิจกรรมคะตะเลสปริมาตรในการทำปฏิกิริยา 200 µl	25
รูปที่ 4.9	ผลของปริมาณสับสเตรตต่อกิจกรรมคะตะเลสปริมาตรในการทำปฏิกิริยา 200 µl	26
รูปที่ 4.10	การติดตามกิจกรรมคะตะเลสตามวิธีของ GÓth (1991) ปริมาตรในการทำปฏิกิริยา 200 µl	26
รูปที่ 4.11	กิจกรรมคะตะเลสของใบพริก 5 สายพันธุ์ที่มีอายุต่างกัน	27
รูปที่ 4.12	กิจกรรมเปอร์ออกซิเดสของใบพริกและต้นกล้า	28
รูปที่ 4.13	Peroxidase isoenzyme ของใบพริกและต้นกล้า	28
รูปที่ 4.14	Superoxide dismutase isoenzyme ของใบพริกและต้นกล้า	29
รูปที่ 4.15	การก่อโรคบนหลังใบโดยเชื้อราสายพันธุ์ F8-5B	30
รูปที่ 4.16	การก่อโรคบนใบพริกของเชื้อราสายพันธุ์ CC. 1.9	30
รูปที่ 4.17	การก่อโรคบนใบพริกจากเชื้อราสายพันธุ์ F8-5B ด้วยวิธีสเปรย์	31
รูปที่ 4.18	การย้อมแอคติวิตี้ของเปอร์ออกซิเดสและซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทสของต้นกล้าพริก	32