

การแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับเอนไซม์ cutinase และ endopolygalacturonase ของเชื้อรา *Colletotrichum capsici* ในช่วงการเข้าทำลายบนผลพริก

Expression Profiling of Cutinase and Endopolygalacturonic-related Genes in *Colletotrichum capsici* During Chili Fruit Infection

สวิตา สุวรรณรัตน์¹ ปัทวิภา สงกุมาร¹ Siegrid Steinkellner² และ สมศิริ แสงโชติ^{1*}

Sawita Suwannarat¹, Pattavipha Songkumarn¹, Siegrid Steinkellner² and Somsiri Sangchote^{1*}

¹ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ จตุจักร กรุงเทพฯ 10900

¹Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Kasetsart University, Chatuchak, Bangkok 10900, Thailand

²Division of Plant Protection, Department of Crop Sciences, University of Natural Resources and Life Sciences, Vienna,

Austria

*Corresponding author: Email: agrsrs@ku.ac.th

(Received: 26 April 2017; Accepted: 28 July 2017)

Abstract: This study determined the expression level of cutinase (*CUT*) and endopolygalacturonase (endo-PG) genes of *Colletotrichum capsici* after inoculating on green and red chili fruit stages of Bang Chang variety by real-time PCR technique. The inoculated green chili fruits were sampled at 0, 24, 48, 72, 96, 120, 192 and 240 hours after inoculation (HAI) and red chili fruits were sampled at 0, 24, 48, 72, 96, 120 and 144 HAI. It showed that *CUT* was the greatest up-regulated at 72 hours after inoculation (HAI) on red fruit stage and at 240 HAI on green fruit stage. The maximum expression of endo-PG was observed at 144 and 192 HAI on red and green fruits, respectively. Disease symptom started to produce at 144 HAI on red chili fruit and 240 HAI on green fruit.

Keywords: *Colletotrichum capsici*, anthracnose, gene expression, cutinase, endopolygalacturonase, qPCR

บทคัดย่อ: การศึกษาการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีน cutinase (*CUT*) และ endopolygalacturonase (endo-PG) ของเชื้อรา *Colletotrichum capsici* สาเหตุของโรคแอนแทรคโนสในผลพริก บนผลพริกพันธุ์บางช้างในระยะสีเขียวและสีแดง ด้วยเทคนิค real-time PCR โดยเก็บผลพริกระยะสีเขียวที่ 0, 24, 48, 72, 96, 120, 192 และ 240 ชั่วโมงหลังปลูกเชื้อ และเก็บผลพริกระยะสีแดงที่ 0, 24, 48, 72, 96, 120 และ 144 ชั่วโมงหลังปลูกเชื้อ พบว่า การแสดงออกของยีน *CUT* บนผลพริกระยะสีแดงสูงสุดที่ 72 และ บนผลพริกระยะสีเขียวที่ 240 ชั่วโมงหลังปลูกเชื้อ และการแสดงออกของยีน endo-PG สูงสุดในระยะผลสีแดงที่ 144 ชั่วโมงหลังการปลูกเชื้อและบนผลพริกระยะสีเขียวที่ 192 ชั่วโมงหลังปลูกเชื้อ โดยผลพริกเริ่มแสดงอาการของโรคแอนแทรคโนสที่ 144 และ 240 ชั่วโมงหลังการปลูกเชื้อบนผลพริกระยะสีแดงและสีเขียวตามลำดับ

คำสำคัญ: *Colletotrichum capsici* โรคแอนแทรคโนส การแสดงออกของยีน เอนไซม์คิวทีเนส เอนไซม์เอนโดโพลิกลาคทูโรเนส qPCR

คำนำ

พริกเป็นพืชผักที่มีความสำคัญในทางเศรษฐกิจและสังคม เป็นวัตถุดิบที่สำคัญในการอุตสาหกรรมอาหาร ยา สามารถปลูกทั่วไปในทุกภาคของประเทศไทย ในปี พ.ศ. 2556 มีพื้นที่ในการเพาะปลูกพริก 348,453 ไร่ ซึ่งมีพื้นที่การปลูกมากที่สุดเมื่อเทียบกับพืชผักชนิดอื่น ๆ (กรมวิชาการเกษตร, 2560) สำหรับปัญหาที่พบในการผลิตพริกเกิดจากโรคและแมลง ซึ่งก่อให้เกิดความเสียหายต่อผลผลิตและส่งผลกระทบต่อปริมาณผลผลิตที่ไม่สม่ำเสมอ โดยโรคที่มีการระบาดและเกิดปัญหากับการผลิตพริกได้แก่โรคแอนแทรคโนส ซึ่งมีสาเหตุจากเชื้อรา *Colletotrichum* spp. ในประเทศไทยพบเชื้อราสาเหตุนี้ 4 สปีชีส์ ได้แก่ *Colletotrichum gloeosporioides*, *Colletotrichum acutatum*, *Colletotrichum siamense* และ *Colletotrichum capsici* ที่สามารถเข้าทำลายได้ทั้งก่อนและหลังการเก็บเกี่ยวพบทั้งบนพริกผลแดงและผลสีเขียว ลักษณะอาการที่ปรากฏบนผลพริกจะแสดงอาการเป็นจุดแผลสีน้ำตาลดำ เนื้อเยื่อยุบตัวแห้งและอาจพบส่วนโครงสร้างของเชื้อรา (fruiting body) ลักษณะเป็นจุดเรียงซ้อนกันเป็นวง และส่วน conidial mass สีส้ม ปรากฏอยู่บนแผล นอกจากนี้เชื้อยังเข้าทำลายแบบแฝง (latent infection) ในผลพริกโดยไม่มีการแสดงอาการของเชื้อรา (บุญญาวดี, 2540) อาการของโรคจะปรากฏเมื่อผลถึงระยะสุก สำหรับปัจจัยการเข้าทำลายแบบแฝงของโรคหลังการเก็บเกี่ยวมีความเกี่ยวข้องกับ 1) การยับยั้งการพัฒนาของ

เชื้อเนื่องจากปัจจัยทางด้านสรีรวิทยาของพืช 2) สารประกอบในพืชที่มีคุณสมบัติต่อต้านเชื้อรา และ 3) การชักนำสารประกอบต่อต้านที่เป็นพิษต่อเชื้อรา (Prusky, 1996) โดยระหว่างที่เชื้อร่าอยู่ภายในเนื้อพืช เชื้อจะสามารถใช้อาหารจากเซลล์พืช 2 รูปแบบคือ แบบ biotrophy คือเชื้อใช้สารอาหารจากเซลล์ที่มีชีวิต และแบบ necrotrophy ที่ใช้สารอาหารจากเซลล์ที่ไม่มีชีวิตหรือเซลล์ที่ตายแล้ว ซึ่งเชื้อรา *Colletotrichum* spp. มีรูปแบบการใช้สารอาหารจากสิ่งมีชีวิตทั้งสองรูปแบบที่เรียกว่า hemibiotrophy (Perfect et al., 1999; Münch et al., 2008)

ในการศึกษาการเข้าทำลายของเชื้อราพบว่าเชื้อรามีการแสดงออกของยีนต่าง ๆ ในแต่ละช่วงของการเข้าทำลายพืชอาศัย เช่น ยีน *CUTA* ที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ cutinase ของเชื้อรา *Botrytis cinerea* (van Kan et al., 1997) ยีน *CLPG2* ควบคุมการสร้างเอนไซม์ endopolygalacturonase ในเชื้อรา *Colletotrichum lindemuthianum* (Dumas et al., 1999) ยีน *PG1* และ *PL1* (Di Pietro and Roncero, 1998; Huertas-Maceira et al., 1999) ของเชื้อรา *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* ที่ควบคุมการสังเคราะห์เอนไซม์ endopolygalacturonase และ pectate lyase ตามลำดับ

จากความสามารถในการเข้าทำลายแบบแฝงของเชื้อรา *Colletotrichum* โดยเฉพาะ *C. capsici* สามารถสร้างความเสียหายในระยะผลพริกสุกได้มาก (Nayaka et al., 2009) ดังนั้นในการศึกษาค้นคว้านี้ มี

วัตถุประสงค์เพื่อศึกษาระดับการแสดงออกของยีน *CUT* และ *endo-PG* ของเชื้อรา *C. capsici* ที่แสดงในระยะเวลาต่าง ๆ ด้วยวิธี real-time polymerase chain reaction (real-time PCR) หรือที่เรียกว่า quantitative PCR (qPCR) เพื่อเป็นพื้นฐานในการศึกษากลไกการเข้าทำลายของเชื้อรานี้ ตลอดจนการปรับปรุงพันธุ์พริกที่ต้านทานต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การแยกเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนสพริก

แยกเชื้อราจากผลพริกที่แสดงอาการโรคแอนแทรคโนสด้วยวิธี tissue transplanting โดยตัดชิ้นพืชจากบริเวณรอยต่อเนื้อเยื่อปกติและเนื้อเยื่อแสดงอาการโรคขนาดประมาณ 0.5×0.5 เซนติเมตร ใส่เชื้อที่ผิวภายนอกด้วย 1% sodium hypochlorite เวลา 5 นาที ผึ่งให้แห้งบนกระดาษที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อ และนำเนื้อเยื่อเลี้ยงบนอาหาร potato dextrose agar (PDA) ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5-7 วัน เมื่อเชื้อราเริ่มปรากฏ conidial mass จึงแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี single spore isolation โดยเลี้ยงบนอาหาร PDA (Difco, France) ภายใต้แสง near ultra violet เวลา 12 ชั่วโมงสลับมืด 12 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นตรวจสอบลักษณะโคไคโนของเชื้อรา ลักษณะของโคไคโนเดี่ยวของเชื้อราสาเหตุเพื่อจำแนกชนิดของเชื้อราสาเหตุ และทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรคในผลพริก โดยเตรียม spore suspension ความเข้มข้น 2×10^6 สปอร์/มิลลิลิตร เพื่อพ่นลงบนผลพริกพันธุ์บางช้างระยะผลสีแดงบนต้นพริกด้วย airbrush sprayer และคลุมผลพริกที่ปลูกเชื้อด้วยถุงพลาสติกขึ้นที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำถุงพลาสติกออก และสังเกตการเกิดโรค เชื้อราที่บริสุทธิ์และเมล็ดจากผลพริกที่แสดงอาการของโรคจะถูกเก็บรักษาเพื่อใช้เป็น stock culture ในการทดลองลำดับต่อไป

2. การเตรียมตัวอย่างและการเก็บตัวอย่างสำหรับตรวจสอบ

2.1 การเตรียมเชื้อรา

เตรียม spore suspension ให้มีความเข้มข้น 2×10^6 สปอร์/มิลลิลิตร จากเชื้อรา *C. capsici* ไอโซเลท CC9.4 ที่ถูกเก็บรักษาบนเมล็ดพริก ที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส เชื้อไอโซเลทดังกล่าวแยกจากผลพริกที่แสดงอาการโรคแอนแทรคโนสซึ่งปลูก ณ โรงเรือนปลูกพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน โดยนำเมล็ดมาฆ่าเชื้อที่ผิวด้วย 1% sodium hypochlorite เวลา 5 นาที หลังจากนั้นทำเช่นเดียวกับวิธีการแยกเชื้อราจากพืช เลี้ยงเชื้อราเป็นเวลา 7 วัน

2.2 การปลูกเชื้อทดสอบ

เตรียมผลพริกพันธุ์บางช้าง ระยะผลสีเขียว (30-35 วันหลังติดผล) และระยะผลสีแดง (50-55 วันหลังติดผล) (ภาพที่ 1) จากนั้นปลูกเชื้อราในข้อ 2.1 ลงบนผลโดยวิธีหยด spore suspension (drop-inoculation) ความเข้มข้น 2×10^6 สปอร์/มิลลิลิตร ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงบนผิวผล ปิดทับด้วยกระดาษกรองเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร ที่อบฆ่าเชื้อแล้ว เพื่อป้องกันไม่ให้ spore suspension ไหลจากผิวผล จากนั้นคลุมผลพริกแต่ละผลด้วยถุงพลาสติกขึ้น บ่มเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส แล้วจึงนำถุงพลาสติกออก นำต้นพริกไปไว้ในตู้ growth chamber (Tomy, Japan) ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส โดยให้แสงสว่าง 12 ชั่วโมงสลับมืด 12 ชั่วโมง

2.3 การเก็บตัวอย่าง

การเก็บตัวอย่างพริกแบ่งออกเป็น 2 ช่วง ได้แก่ ช่วงก่อนแสดงอาการของโรค และช่วงที่ผลพริกเริ่มแสดงอาการของโรค สำหรับผลพริกระยะสีแดงเก็บผลที่ 0, 24, 48, 72, 96, 120 ชั่วโมงหลังปลูกเชื้อ และที่เวลา 144 ชั่วโมง (6 วัน) หลังปลูกเชื้อเมื่อผลพริกเริ่มแสดงอาการของโรคแอนแทรคโนส สำหรับพริกระยะสีเขียวเก็บตัวอย่างที่เวลา 0, 24, 48, 72, 96, 120, 194 และ 240 ชั่วโมง (10 วัน) หลังจากปลูกเชื้อ เมื่อผลพริกเริ่มแสดงอาการของโรค ใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร ตัดตัวอย่างพืชที่ตำแหน่งปลูกเชื้อ นำตัวอย่างพืช (tissue disc) บรรจุลงในหลอด micro tube จากนั้น

จุ่มลงในไนโตรเจนเหลว เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปสกัด RNA

3. การสกัด RNA และ การสังเคราะห์ cDNA

นำตัวอย่างพืชน้ำหนัก 0.1 กรัม บรรจุภายในหลอด micro tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร บดตัวอย่างด้วยเครื่องบดชิ้นส่วนพืช (Retsch, Germany) โดยนำลูกเหล็กจำนวน 2 ลูกใส่ลงในหลอด micro tube บดตัวอย่างจนละเอียด จากนั้นสกัด RNA จากตัวอย่างด้วยชุดสกัดสำเร็จรูป RNeasy Plant mini kit (QIAGEN Sciences, Hilden, Germany) ตามขั้นตอนในเอกสารคู่มือจากบริษัท ตรวจสอบคุณภาพและปริมาณของ total RNA ที่ได้ด้วยเครื่อง Nano Drop-1000 spectrophotometer (Thermoscientific, USA) นำ RNA ที่สกัดจากตัวอย่างเปลี่ยนจาก mRNA เป็น cDNA ด้วยชุดสำเร็จรูป RevertAid First Strand cDNA synthesis kit M-MuLV (Thermo Scientific, USA)

4. การออกแบบไพรเมอร์

การออกแบบไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อ cutinase gene (*CUT*) endopolygalacturonase gene (endo-*PG*) และ actin gene (*ACT*) ได้รวบรวมลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่ต้องการตรวจสอบจากเชื้อรา *Colletotrichum* สปีชีส์ต่าง ๆ ซึ่งปรากฏในฐานข้อมูล GENBANK (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) ดังนั้น cutinase gene ได้แก่ accession HQ406775.1 และ M180331, polygalacturonase gene ได้แก่ accession EF094978.1 และ EXF76753_1, actin gene ได้แก่

accession LC170499, LC170500, LC170501, LC170505, LC170511, LC170518 และ LC170537 จากนั้นวิเคราะห์ความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้โดยใช้โปรแกรม CLUSTAL W (Thomson *et al.*, 1994) ออกแบบไพรเมอร์ โดยใช้โปรแกรม Primer3 Input program (Untergasser *et al.*, 2007) โดยไพรเมอร์ที่ออกแบบ (ตารางที่ 1) จะให้ผลผลิตบางส่วนของยีน *CUT*, *PG* และ *ACT* ที่มีขนาด 200, 160 และ 96 คู่เบสตามลำดับ ตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากผลิตภัณฑ์ PCR (PCR product) โดยส่งไปวิเคราะห์ที่บริษัท MacroGen (Korea) และเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่รายงานในฐานข้อมูล GENBANK (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)

5. การวิเคราะห์การแสดงออกของยีน

วิเคราะห์ระดับการแสดงออกของยีนด้วยวิธี qPCR โดยทำงานด้วยเครื่อง Eco PCR max 48 machine (PCR Max, UK) ในหลอดปฏิกิริยามีปริมาตรรวม 10 ไมโครลิตร ประกอบด้วย HOT FIREPol EvaGreen qPCR Mix Plus no ROX (Solis BioDyne, Slovenia) 2 ไมโครลิตร primer (10 มิลลิโมลาร์) 0.15 ไมโครลิตร cDNA 2 ไมโครลิตร และ PCR-water 5.7 ไมโครลิตร กำหนดโปรแกรมในปฏิกิริยา PCR ในการตรวจสอบการแสดงออกของแต่ละยีนดังนี้ มีอุณหภูมิในขั้นตอน pre-denaturation คือ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ตามด้วย 40 รอบของขั้นตอน denaturation 95 องศาเซลเซียส 15 วินาที ขั้นตอน annealing อุณหภูมิ (ตารางที่ 1) 20 วินาที และขั้นตอน extension อุณหภูมิ



Figure 1. *Capsicum annuum* Bang Chang variety (A), chili green fruit stage (B), chili red fruit stage (C)

Table 1. PCR primers and annealing temperature used in the study

Gene	Primer name	Sequences	Annealing temp (°C)
Cutinase (<i>CUT</i>)	CUT200F	5'-GACCTGGCCTCCAACTTC-3'	62
	CUT200R	5'-ACGACGCCCTTGATCTGGTT-3'	
Endopolygalacturonase (<i>endo-PG</i>)	PG1F	5'-ACCTTCGGCTACAAGGAGTGG-3'	63
	PG1R	5'-CGTAGAAGAACTTGGGCTTGG-3'	
Actin (<i>ACT</i>)	ACTFA	5'-TCTACCACCCACACACAGAC-3'	62
	ACTFA1	5'-GCGAGATGGTTAGCATTGA-3'	

72 องศาเซลเซียส 20 วินาที และ final-extension อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 5 นาที ซึ่งในการวิเคราะห์ใช้ ยีน ACT เป็นยีนอ้างอิง (reference gene) และวิเคราะห์ ผลการแสดงออกของยีนจากค่า CT value ด้วยวิธีการ คำนวณแบบ $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak and Schmittgen, 2001) เพื่อให้ได้ค่า Relative quantification และการวิเคราะห์ melting curve เพื่อยืนยันว่า PCR product ที่ได้จาก ปฏิกริยา real-time PCR เป็นผลิตภัณฑ์ที่ต้องการ ซึ่ง ผลิตภัณฑ์ที่ถูกต้องมักจะแสดง peak เดียวที่อุณหภูมิสูง

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การแยกเชื้อราแอนแทรคโนสพริก

จากการแยกเชื้อราจากผลพริกที่แสดงอาการโรค แอนแทรคโนส (ภาพที่ 2A) ด้วยวิธี tissue transplanting พบว่าเชื้อราสามารถเจริญบนอาหาร PDA โคโลนีมีสีเทา ปนน้ำตาล พบการสร้าง conidial mass สีส้ม (ภาพที่ 2B) เมื่อตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบลักษณะของโคนี เดียมีรูปร่างแบบเสี้ยวพระจันทร์ (falcate shape) ไม่มีผนังกันภายใน ไม่มีสี (ภาพที่ 2C) ซึ่งเชื้อราที่แยกได้มี ลักษณะตรงกับเชื้อรา *C. capsici* (Sutton, 1992) และ เมื่อทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรคบนผลพริก พันธุ์บางช้าง โดยการพ่น spore suspension ลงบนผิวผล พริกระยะผลสีแดงที่ยังบนต้น (intact fruits) พบว่าผลพริก แสดงอาการของโรคหลังจากปลูกเชื้อ 6 วัน ผลมี ลักษณะยุบตัว สีเข้ม และสังเกตเห็นกลุ่มของ fruiting body เป็นวงซ้อนสีดำเมื่อผลมีอายุมากขึ้น (ภาพที่ 2D)

2. การเตรียมตัวอย่างและการเก็บตัวอย่างสำหรับ ตรวจสอบ

จากการปลูกเชื้อรา *C. capsici* ลงบนผลพริก สีเขียวและสีแดง และเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อในแต่ละ ช่วงเวลาหลังการปลูกเชื้อรา ในผลพริกระยะสีแดง หลังจากปลูกเชื้อที่เวลา 0, 24, 48, 72, 96, 120 และ 144 ชั่วโมง และพบว่าผลพริกระยะสีแดงเริ่มแสดง อาการของโรคแอนแทรคโนสที่ 144 ชั่วโมงหลังจากปลูก เชื้อ (ภาพที่ 3A) สำหรับผลพริกระยะสีเขียวได้เก็บ ตัวอย่างหลังจากปลูกเชื้อที่เวลา 0, 24, 48, 72, 96, 120, 192 และ 240 ชั่วโมง โดยพบว่าผลพริกเริ่มแสดง อาการของโรคที่ 240 ชั่วโมง (10 วัน) ภายหลังจากปลูก เชื้อ ซึ่งระยะของผลพริกที่เริ่มแสดงอาการของโรคนั้นผล เข้าสู่ระยะการเปลี่ยนสีผล (turning stage) (ภาพที่ 3B)

3. ผลการออกแบบไพรเมอร์

จากการออกแบบคู่ไพรเมอร์ ได้แก่ CUT200F/CUT200R PG1F/PG1R และ ACTFA/ACTFA1 เพื่อใช้เพิ่มปริมาณตำแหน่งยีน *CUT*, *endo-PG* และ *ACT* ตามลำดับ พบว่าไพรเมอร์ที่ ออกแบบนั้นสามารถเพิ่มปริมาณ DNAเป้าหมายได้ โดยมี ขนาด PCR product เท่ากับ 200, 160 และ 96 คู่เบส ตามลำดับ และเมื่อนำ PCR product ของแต่ละคู่ไพร เมอร์ไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และเทียบใน ฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม Blastn (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) พบว่าลำดับ นิวคลีโอไทด์ที่ได้จากคู่ไพรเมอร์ CUT200F/CUT200R

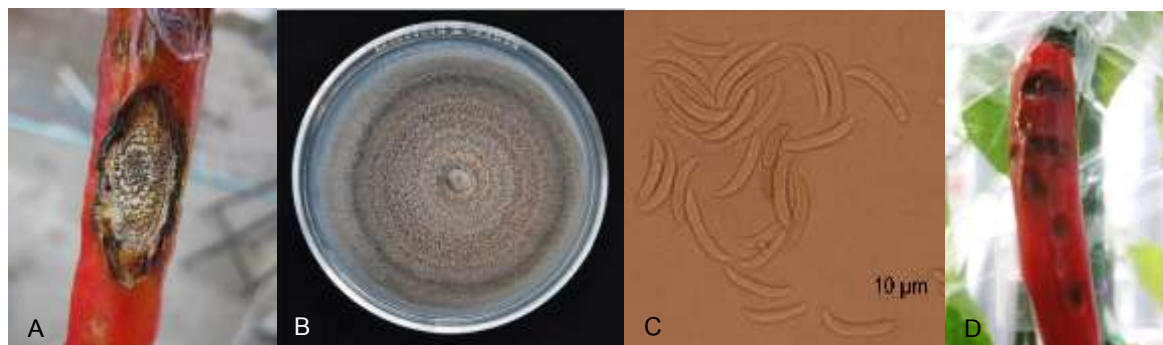


Figure 2. Anthracnose disease on chili fruit (A), *Colletotrichum capsici* colony on PDA at 7 days (B), conidial shape of *C. capsici* (C), pathogenicity test of *C. capsici* on red fruits (D)



Figure 3. Disease symptoms on red chili fruit 144 hours after inoculation (A), 240 hours after inoculation on green chili fruit and disease expressed the symptom at turning color stage (B)

มีความเหมือนกับบางส่วนของยีน cutinase ของเชื้อรา *Colletotrichum truncatum* (accession HQ406775.1) เท่ากับ 99% และ ยีน cutinase ของเชื้อรา *C. capsici* (accession M180331) เท่ากับ 98% สำหรับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากคู่ไพรเมอร์ PG1F/PG1R มีความเหมือนกับบางส่วนของยีน endopolygalacturonase ของเชื้อรา *Colletotrichum fioriniae* (accession XM_007599435.1) *C. gloeosporioides* Nara gc5 (accession XM_007286512) ที่แยกจากสตรอว์เบอร์รี่ และ *Glomella magna* (accession AF114157.1) เท่ากับ 87%, 86% และ 79% ตามลำดับ และ ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากคู่ไพรเมอร์ ACTFA/ACTFA1 มีความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน actin ของเชื้อรา *C. truncatum* (accession KX702275.1) และ

C. capsici (accession JX870645) เท่ากับ 100 และ 99% ตามลำดับ

4. การวิเคราะห์การแสดงออกของยีน

จากการวิเคราะห์ระดับการแสดงออกของยีน *CUT* และ *PG* ของเชื้อราภายหลังจากปลูกเชื้อลงบนผลพริกระยะสีเขียวและสีแดงในระยะเวลาต่าง ๆ ด้วยวิธีการ quantitative PCR พบการแสดงออกของยีนทั้งสองชนิดภายหลังจากการปลูกเชื้อบนพริก โดยระดับการแสดงออกของยีน *CUT* ของเชื้อราบนผลพริกสีเขียวที่ 24-120 ชั่วโมง มีการแสดงออกของยีนในระดับต่ำ การแสดงออกเริ่มสูงขึ้นที่ 192 ชั่วโมง และสูงสุดที่เวลา 240 ชั่วโมง ซึ่งในระยะเวลาที่มีการแสดงออกของยีนสูงสุดนี้ จะเริ่มปรากฏอาการของโรคบนผิวผล สำหรับการแสดงออกของ

ยีน *CUT* ของเชื้อราบนพริกระยะสีแดงพบว่ายีนมีการแสดงออกตลอดเวลาภายหลังจากการปลูกเชื้อ โดยที่ 72 ชั่วโมงมีการแสดงออกของยีนสูงกว่าในช่วงเวลาอื่น ๆ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาในเชื้อรา *Zymoseptoria tritici* (*Mycosphaerella graminicola*) บนข้าวสาลีที่พบว่ายีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์เอนไซม์ cutinase สามารถแสดงออกได้ในช่วงที่พืชยังไม่แสดงอาการของโรค (Rudd *et al.*, 2015) โดยการศึกษาการแสดงออกของยีน *CUTA* และ *CUTB* ของเชื้อรา *Botrytis cinerea* พบตั้งแต่สปอร์ของเชื้อรางอกบนผิวของผลแอปเปิ้ลและจะถูกยับยั้งการทำงานเมื่อความเข้มข้นของกลูโคสและ cutin monomer สูงขึ้น (Leroch *et al.*, 2013)

ระดับการแสดงออกของยีน *PG* พบว่าที่ 24-120 ชั่วโมงเชื้อมีการแสดงออกของยีนในระดับต่ำ การแสดงออกของยีนสูงสุดที่ 192 ชั่วโมงหลังจากการปลูกเชื้อ และลดลงเมื่อเริ่มปรากฏอาการของโรคบนผิวผลที่ปลูก

เชื้อในระยะผลสีเขียว ในการแสดงออกของยีน *PG* บนระยะสีแดงพบว่า ที่ 72 และ 120 ชั่วโมง ยีนมีการแสดงออกที่สูงขึ้นและมีระดับสูงสุดที่ 144 ชั่วโมงหลังเชื้อถูกปลูกบนผลจากการศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์เอนไซม์ polygalacturonase ของเชื้อรา *Fusarium graminearum* พบว่า ยีน *FgPg1* ที่ 24 ชั่วโมง และ *FgPg2* 12 ชั่วโมงหลังการปลูกเชื้อ *F. graminearum* มีระดับการแสดงออกของยีนสูงสุด (Tomassini *et al.*, 2009) และจากการศึกษาของ Herbert *et al.* (2004) พบว่า ในเชื้อรา *Colletotrichum lindemuthianum* มีการแสดงออกของยีน *CLPG2* ที่ควบคุมการสังเคราะห์เอนไซม์ endopolygalacturonase ในช่วงแรกของขั้นตอน penetration เพื่อผ่านชั้นเซลล์ epidermis ของพืชอาศัย ซึ่งแตกต่างกับการแสดงออกของยีน *CLPG1* ที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ endopolygalacturonase ซึ่งแสดงออกในช่วงที่พืชเริ่มแสดงอาการของโรคหรือระยะ necrotrophic stage

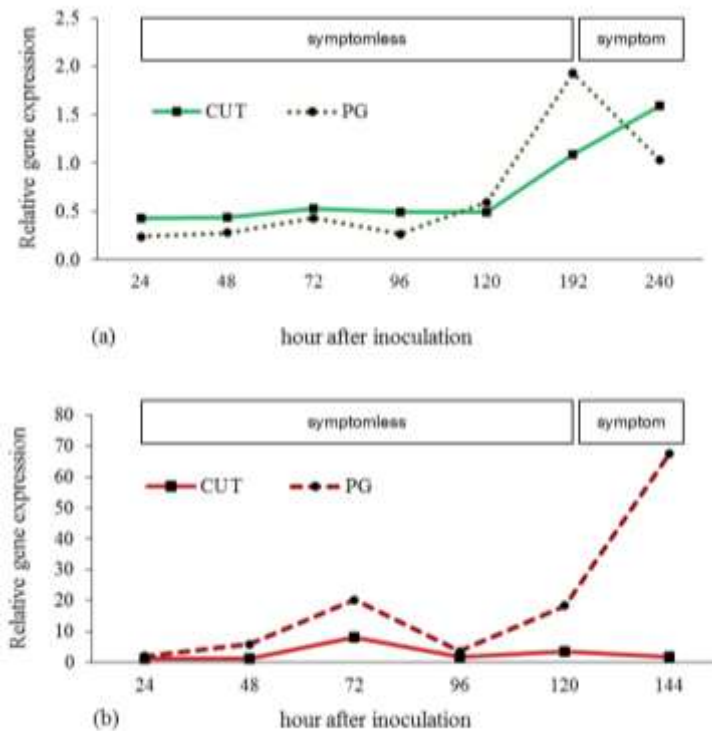


Figure 4. *CUT* and *PG* gene expression profiles of *Colletotrichum capsici* on green fruit (a) and red fruit (b). After inoculation chili plants were incubated at 25°C. The gene expression was determined using real-time PCR technique. There were three replications on each treatment and the data from a representative replication is shown

ในกระบวนการก่อให้เกิดโรคของเชื้อรา *Colletotrichum capsici* บน cowpea (*Vigna unguiculata*) พบว่า ภายหลังจากสปอร์ของเชื้อรางอกและสร้าง appressoria บนผิวพืช เชื้อราจะแทงผ่านชั้น cuticle ที่ 24 ชั่วโมงหลังการปลูกเชื้อ โดยพบการสลายของ cuticle และเอนไซม์ที่ใช้ในการสลาย (Pring *et al.*, 1995) หลังจากนั้นเส้นใยของเชื้อราจะขยายไปตามชั้นผนังเซลล์พืชซึ่งในช่วงนี้พืชยังไม่แสดงอาการของโรค และในช่วงท้ายของการเข้าทำลาย เส้นใยของเชื้อราจะแทงผ่านเข้าไปยังส่วน epidermal cell และ mesophyll cell ส่งผลให้เกิดเซลล์ตายและเชื้อแสดงอาการของโรคบนพืชนั้น (Perfect *et al.*, 1999) โดยจากการศึกษาของ Ettinger *et al.* (1987) ตรวจพบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ cutinase gene จาก mRNA ที่สกัดได้จากเส้นใยของเชื้อราที่เลี้ยงในอาหารผสม cutin hydrolysate

สรุป

จากการศึกษาระดับการแสดงออกของยีน *CUT* และ *endo-PG* ที่ระยะเวลาต่าง ๆ โดยการปลูกเชื้อบนผลพริกสองระยะ สังเกตอาการของโรคที่แสดงออก และตรวจสอบการแสดงออกของยีนทั้งสองชนิดด้วยวิธีการ real-time PCR พบว่าที่ 240 ชั่วโมงหลังการปลูกเชื้อ ผลพริกระยะสีเขียวแสดงอาการของโรค และที่ 144 ชั่วโมงหลังการปลูกเชื้อ ผลพริกระยะสีแดงแสดงอาการของโรค โดยพบว่ามี การแสดงออกของยีน *CUT* และ *endo-PG* ในทุกช่วงเวลา แต่ระดับและรูปแบบการแสดงออกของยีนทั้งสองชนิดระหว่างผลพริกสีเขียวและสีแดงมีความแตกต่างกัน โดยพบว่าการแสดงออกของยีน *CUT* บนผลพริกเขียวแสดงออกได้สูงขึ้นสอดคล้องกับช่วงเวลาหลังการปลูกเชื้อ ขณะที่การแสดงออกของยีน *CUT* บนผลพริกสีแดงสูงสุดในช่วงก่อนแสดงอาการของโรคบนผลที่ 72 ชั่วโมงหลังการปลูกเชื้อ สำหรับการแสดงออกของยีน *endo-PG* บนผลพริกสีเขียวถูกกระตุ้นสูงสุดที่ 192 ชั่วโมงหลังปลูกเชื้อโดยอยู่ในระยะก่อนแสดงอาการของโรค และการแสดงออกของยีน *endo-PG* บนผลพริกสีแดงสูงสุดเมื่อผลพริกเริ่มแสดงอาการของโรคหรือ 144 ชั่วโมงหลังการปลูกเชื้อ ทั้งนี้จากผลการศึกษาการแสดงออกของยีน

ทั้งสองชนิดเป็นข้อมูลขั้นต้นในการศึกษาถึงยีนที่เกี่ยวข้องต่อการแสดงอาการของโรคบนผลพริกแต่ละระยะ แต่ยังไม่อาจสามารถสรุปว่ายีนชนิดใดเป็นปัจจัยหลักที่สำคัญในการทำให้เกิดโรคในผลพริกได้

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากสำนักงานสนับสนุนการวิจัย (สกว.) โครงการปริญญาเอกกาญจนาภิเษก (คปก.) รหัสโครงการ (PHD/0158/2551)

เอกสารอ้างอิง

- กรมวิชาการเกษตร. 2560. ยุทธศาสตร์การพัฒนางานวิจัยพริก พ.ศ. 2556-2562. (ระบบออนไลน์). แหล่งข้อมูล : www.doa.go.th/hortold/images/stories/strategyplanhort/strategychili.doc (25 พฤษภาคม 2560).
- บุญญาวดี จิระวุฒิ. 2540. การทำให้เกิดโรคของเชื้อรา *Colletotrichum capsici* บนผลพริกและการถ่ายทอดเชื้อจากผลที่เป็นโรคสู่เมล็ดและต้นกล้า. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 66 หน้า.
- Di Pietro, A. and M.I. Roncero. 1998. Cloning, expression, and role in pathogenicity of pg1 encoding the major extracellular endopolygalacturonase of the vascular wilt pathogen *Fusarium oxysporum*. *Molecular Plant Microbe Interactions* 11(2): 91-98.
- Dumas, B., S. Centis, N. Sarrazin and M.T. Esquerré-Tugayé. 1999. Use of green fluorescent protein to detect expression of an endopolygalacturonase gene of *Colletotrichum lindemuthianum* during bean infection. *Applied and Environmental Microbiology* 65(4): 1769-1771.
- Ettinger, W.F., S.K. Thukral and P.E. Kolattukudy. 1987. Structure of cutinase gene, cDNA

- and the derived amino acid sequence from phytopathogenic fungi. *Biochemistry* 26(24): 7883-7892.
- Herbert, C., R. O'Connell, E. Gaulin, V. Saleuses, M.T. Esquerré-Tugayé and B. Dumas. 2004. Production of a cell wall-associated endopolygalacturonase by *Colletotrichum lindemuthianum* and pectin degradation during bean infection. *Fungal Genetics and Biology* 41(2): 140-147.
- Huertas-Gonzalez, M.D., M.C. Ruiz-Roldan, F.I. Garcia-Maceira, M.I. Roncero and A. Di Pietro. 1999. Cloning and characterization of p11 encoding and in planta-secreted pectate lyase of *Fusarium oxysporum*. *Current Genetics* 35(1): 36-40.
- Leroch, M., A. Kleber, E. Silva, T. Coenen, D. Koppenhöfer, A. Shmayahu, P.D.T. Valenzuela and M. Hahn. 2013. Transcriptome profiling of *Botrytis cinerea* conidial germination reveals upregulation of infection-related genes during the prepenetration stage. *Eukaryotic Cell* 12(4): 614-626.
- Livak, K.J. and T.D. Schmittgen. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. *Methods* 25: 402-408.
- Münch, S., U. Lingner, D.S. Floss, N. Ludwig, N. Sauer and H.B. Deising. 2008. The hemibiotrophic lifestyle of *Colletotrichum* species. *Journal of Plant Physiology* 168(1): 41-51.
- Nayaka, C.S., A.C.U. Shankar, S.R. Niranjana, H.S. Prakash and C.N. Mortensen. 2009. Anthracnose disease of chili pepper, Technical Bulletin. Asian Seed Health Centre, Karnataka, India.
- Perfect, S.E., H.B. Hughes and R.J. O'Connell. 1999. *Colletotrichum*: A model genus for studies on pathology and fungal-plant interactions. *Fungal Genetics and Biology* 27(2-3): 186-198.
- Pring, R.J., C. Nash, M. Zakaria and J.A. Bailey. 1999. Infection process and host range of *Colletotrichum capsici*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 46: 137-152.
- Prusky, D. 1996. Pathogen quiescence in postharvest diseases. *Annual Review of Phytopathology* 34: 413-434.
- Rudd, J.J., K. Kanyuka, K. Hassani-Pak, M. Derbyshire, A. Andongabo, J. Devonshire, A. Lysenko, M. Sagi, N.M. Desai, S.J. Powers, J. Hooper, L. Ambroso, A. Bharti, A. Farmer, K.E. Hammond-Kosack, R.A. Dietrich and M. Courbot. 2015. Transcriptome and metabolite profiling the infection cycle of *Zymoseptoria tritici* on wheat (*Triticum aestivum*) reveals a biphasic interaction with plant immunity involving differential pathogen chromosomal contributions, and a variation on the hemi-biotrophic lifestyle definition. *Plant Physiology* 167: 1158-1185.
- Sutton, B. C. 1992. The genus *Glomorella* and its anamorph *Colletotrichum*. pp. 1-26. In: J.A. Bailey and M.J. Jeger (eds.). *Colletotrichum*: Biology, Pathology and Control. CAB International, Wallingford.
- Thompson, J.D., D.G. Higgins and T.J. Gibson. 1994. CLUSTALW: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22: 4673-4680.

- Tomassini, A., L. Sella, A. Raiola, R. D'Ovidio and F. Favaron. 2009. Characterization and expression of *Fusarium graminearum* endopolygalacturonases *in vitro* and during wheat infection. *Plant Pathology* 58(3): 556-564.
- Untergasser, A., H. Nijveen, X. Rao, T. Bisseling, R. Geurts and J.A. Leunissen. 2007. Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. *Nucleic Acids Research* 35: 71-74.
- van Kan, J.A., J.W. van't Klooster, C.A. Wagemakers, D.C. Dees and C.J. van der Vlugt-Bergmans. 1997. Cutinase A of *Botrytis cinerea* is expressed, but not essential, during penetration of gerbera and tomato. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 10(1): 30-38.
-