

โปรตีนบางชนิดที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่อเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนสในหน้าวัว

ปิยะฉัตร วิริยะอำไพวงศ์*, แก้วตา สุตรสุวรรณ, ปิยนันท์ ชมนาวัง และ ญัฐพงษ์ ศรีสมุท

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะเทคโนโลยีอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยกาฬสินธุ์ อำเภอเมือง จังหวัดกาฬสินธุ์ 46000

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อค้นหาโปรตีนบางชนิดที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่อเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนสในหน้าวัว โดยเปรียบเทียบการแสดงออกของโปรตีนระหว่างหน้าวัวที่ได้รับการปลูกเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* กับหน้าวัวปกติด้วยเทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบ 2 มิติ ซึ่งผลการวิจัยพบว่าหน้าวัวที่ได้รับเชื้อรา มีระดับการแสดงออกของโปรตีนบางชนิดเพิ่มขึ้นและลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เมื่อเทียบกับหน้าวัวปกติ รวมทั้งมีโปรตีนใหม่เกิดขึ้น ซึ่งการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของโปรตีนนี้เป็นการตอบสนองของหน้าวัวต่อเชื้อราก่อโรค และจากการวิเคราะห์จุดโปรตีนที่สนใจด้วยเทคนิคลิควิดโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโทรสโกปี พบว่า ได้โปรตีนจำนวน 6 ชนิด ได้แก่ Oxygen-evolving enhancer protein 1, Oxygen-evolving enhancer protein 2, Triosephosphate isomerase, Fructose-bisphosphate aldolase, Superoxide dismutase และ Glutathione S-transferase ซึ่งโปรตีนเหล่านี้มีบทบาทที่สำคัญในกระบวนการชีวเคมีภายในเซลล์พืช

คำสำคัญ: *Colletotrichum gloeosporioides* โรคแอนแทรคโนส หน้าวัว และ อิเล็กโทรโฟรีซิสแบบ 2 มิติ

*ผู้เขียนให้ติดต่อ: E-mail: piyachat.wi@ksu.ac.th โทรศัพท์: 08 6921 5582

Related Proteins for Responding of Fungal Pathogen Causing Anthracnose Disease in *Anthurium*

Piyachat Wiriyampaiwong^{*}, Kaewta Sootsuwan, Piyanan Chomnawang and
Nuttapong Srisamoot

*Department of Biotechnology, Faculty of Agro-Industrial Technology, Kalasin University,
Kalasin, 46000, Thailand*

Abstract

The purpose of this study was to investigate some proteins which response to fungal pathogen causing anthracnose disease in *Anthurium*. The protein expression between infected *Anthurium* with *Colletotrichum gloeosporioides* and non-infected *Anthurium* was performed using two-dimensional gel electrophoresis (2-DE) technique. Results exhibited that some protein expression showed significantly ($p < 0.05$) increased whilst decreased in infected *Anthurium*. In addition, new proteins were also occurred in infected *Anthurium*. The alteration in protein expression was the response produced by *Anthurium* against fungal pathogen. Liquid chromatography–mass spectrometry was use to analyze interested protein spots. Six proteins were identified including oxygen-evolving enhancer protein 1, oxygen-evolving enhancer protein 2, triosephosphate isomerase, fructose-bisphosphate aldolase, superoxide dismutase, and glutathione s-transferase. These proteins played an important role in biochemical process of plant cells.

Keywords: *Colletotrichum gloeosporioides*, anthracnose, *Anthurium* and Two-dimensional electrophoresis

^{*} Corresponding author: E-mail: piyachat.wi@ksu.ac.th Tel: 08 6921 5582

หน้าวัวเป็นไม้ดอกไม้ประดับอยู่ในสกุล *Anthurium* และมีชื่อสามัญว่า flamingo flower มีถิ่นกำเนิดในเขตร้อนชื้นของทวีปอเมริกาเหนือและทวีปอเมริกาใต้แถบประเทศโคลัมเบีย (Poopaiboon *et al.*, 2009) ในประเทศไทยพบหน้าวัว 2 ชนิดใหญ่ ๆ คือ *Anthurium andraeanum* และ *Anthurium schzerianum* มีการนำเข้ามาครั้งแรกเมื่อปี พ.ศ. 2440 (Kasetsart University, 2004; Thaikasetsart, 2012) จัดเป็นไม้ดอกไม้ประดับที่มีความสำคัญซึ่งทำรายได้ต่อพื้นที่สูงที่สุดและเป็นที่ยอดนิยมของตลาด (Ampawan *et al.*, 2016) อย่างไรก็ตามปัญหาสำคัญที่ทำให้ผลผลิตหน้าวัวลดลง คือ โรคแอนแทรกโนส (Anthracnose) ที่มีสาเหตุมาจากเชื้อราสกุล *Colletotrichum* ลักษณะอาการ คือ มีแผลจุดสีน้ำตาลค่อนข้างกลมที่ใบและจานรองดอก ขอบแผลมีสีน้ำตาลเข้มรอบนอกมีสีเหลืองจาง เมื่อสภาพอากาศร้อนชื้นแผลจะขยายใหญ่ขึ้นอย่างรวดเร็ว (Soonswon *et al.*, 2010; Dibanuka, 2016) ซึ่งนอกจากหน้าวัวแล้ว โรคแอนแทรกโนสยังก่อให้เกิดความเสียหายกับพืชผลการเกษตรอื่นอีกหลายชนิด เช่น มะม่วง สตรอเบอร์รี่ มันฝรั่ง มะเขือเทศ พริกไทย เป็นต้น โดยสามารถเกิดขึ้นได้ทั้งก่อนและหลังการเก็บเกี่ยว (Lewis-Ivey *et al.*, 2004) การควบคุมโรคแอนแทรกโนสในหน้าวัวสามารถทำได้ด้วยการฉีดพ่นสารเคมีกำจัดเชื้อรา เช่น คลอโรธาโลนิล (chlorothalonil) ไพราโคลสโตรบิน (pyraclostrobin) บอสคาลิด (boscalid) เป็นต้น (Brown, 2012) ซึ่งการควบคุมโรคพืชด้วยสารเคมีนี้แม้จะได้ผลดีแต่ก็เป็นอันตรายต่อคน สัตว์และสิ่งแวดล้อม ดังนั้นหากมีข้อมูลพื้นฐานที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองของหน้าวัวต่อการบุกรุกของเชื้อก่อโรคจะทำให้เข้าใจถึงกลไกการต้านทานโรคของหน้าวัว ซึ่งผลจากการศึกษากลไกมีประโยชน์สำหรับนักปรับปรุงพันธุ์โดยตรงในการสร้างพืชให้ต้านทานต่อโรคได้ (Perintawong, 2013)

วิธีการทางโปรตีโอมิกส์ (Proteomics) เป็นวิธีที่ใช้กันอย่างแพร่หลายในการศึกษาหรือวิเคราะห์โปรตีนที่แสดงออกเมื่อพืชถูกบุกรุกด้วยเชื้อก่อโรค (Mehta *et al.*, 2008) มีงานวิจัยที่ศึกษาโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับโรคแอนแทรกโนสในพืช เช่น Vasanthaiah *et al.* (2009) ศึกษาการ

แสดงออกของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับความต้านทานโรคแอนแทรกโนสในองุ่นฟลอริดา โดยเก็บตัวอย่างใบจากองุ่นที่ปลูกเชื้อรา *Elsinoe ampelina* มาตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีนด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบ 2 มิติ (Two-dimensional gel electrophoresis, 2-DE) พบโปรตีนที่แตกต่างกัน 32 ชนิด และมีโปรตีน 2 ชนิดที่พบเฉพาะในองุ่นที่สามารถต้านทานเชื้อราหรือตอบสนองต่อเชื้อราน้อย โปรตีนดังกล่าว คือ Mitochondrial adenosine triphosphate synthase และ Glutamine synthetase ซึ่งเป็นโปรตีนที่มีบทบาทในกระบวนการเมแทบอลิซึมและกลไกการป้องกันตัวเองของพืช นอกจากนี้ Moura *et al.* (2014) ได้ศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางโปรตีโอมิกส์ของถั่วฝักยาวที่เป็นโรคแอนแทรกโนส เมื่อได้รับเชื้อรา *C. gloeosporioides* ด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบ 2 มิติ พบโปรตีนที่สนใจจำนวน 126 จุด โดยเป็นโปรตีนที่มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นจำนวน 102 จุด และเป็นโปรตีนที่มีการแสดงออกลดลงจำนวน 16 จุด เมื่อนำโปรตีนเหล่านี้ไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค LC-MS พบว่าเป็นโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเมแทบอลิซึม การสังเคราะห์แสง ปฏิกิริยารีดอกซ์ภายในเซลล์ การตอบสนองต่อสภาวะเครียด การตอบสนองต่อการต้านทานโรค การส่งสัญญาณ และกระบวนการตัดแต่งอาร์เอ็นเอ ซึ่งการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนในหน้าที่ต่างๆ ดังกล่าวมีผลมาจากการแสดงออกต้านทานต่อเชื้อรา *C. gloeosporioides* ของถั่วฝักยาว

การศึกษาความเปลี่ยนแปลงของโปรตีนในพืชที่ถูกเชื้อราเข้าบุกรุก ส่วนใหญ่จะศึกษาในพืชประเภทไม้ผลหรือพืชผัก เช่น ผักกาด (Subramanian *et al.*, 2005) องุ่น (Vasanthaiyah *et al.*, 2009) สตรอเบอร์รี่ (Fang *et al.*, 2012) ข้าวสาลี (Zhang *et al.*, 2013) ถั่วฝักยาว (Moura *et al.*, 2014) ข้าวโพด (Zhang *et al.*, 2014) และมะม่วงหิมพานต์ (Cipriano *et al.*, 2015) เป็นต้น อย่างไรก็ตาม รายงานที่กล่าวถึงการศึกษานี้ในพืชประเภทไม้ดอกไม้ประดับยังมีน้อย ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาเบื้องต้นถึงโปรตีนบางชนิดที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่อเชื้อรา *C. gloeosporioides* ซึ่งเป็นสาเหตุโรคแอนแทรกโนสในหน้าวัวเพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานในการปรับปรุงพันธุ์หน้าวัวต่อไป

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การเตรียมตัวอย่าง

เชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนสได้มาจากงานวิจัยของ Wiriyampaiwong *et al.* (2013) ซึ่งได้ทำการแยกเชื้อราจากหน้าวัวที่เป็นโรคแอนแทรคโนส พิสูจน์การเป็นเชื้อสาเหตุโรคด้วยวิธี Koch's postulate และประเมินระดับความรุนแรงของการเกิดโรค รวมทั้งได้ตรวจสอบลักษณะโคโลนีและลักษณะสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แล้ว คาดว่าเป็นเชื้อราสกุล *Colletotrichum*

เก็บรักษาเชื้อราที่ได้ในกลีเซอรอล 10 % ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ดังนั้นในการเตรียมเชื้อราสำหรับการทดลองจะนำเชื้อราที่เก็บไว้มาทำให้อุ่นที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นจึงย้ายเชื้อรามาวางบนอาหาร PDA แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 26 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน เพื่อเตรียมไว้สำหรับการทดลอง

เตรียมหน้าวัว (*Anthurium andraeanum*) สำหรับการทดลองอายุประมาณ 8 เดือน มาปรับสภาพในโรงเรือนแบบเปิด ณ สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยกาฬสินธุ์ โดยทำการรดน้ำตามปกติ

2. การตรวจสอบสายพันธุ์เชื้อราด้วยเทคนิค PCR

ในขั้นตอนนี้ทำเพื่อตรวจสอบสายพันธุ์เชื้อราสกุล *Colletotrichum* ที่ได้จากข้อ 1 ว่าเป็นสายพันธุ์ใดด้วยเทคนิค PCR โดยสกัด DNA จากเชื้อรา ด้วยชุด GF-1 Plant DNA Extraction Kit (Vivantis, Malaysia) จากนั้นทำ PCR เพื่อเพิ่มปริมาณส่วนของ ITS1-5.8S-ITS2 โดยใช้ universal primers ได้แก่ ITS5 (5'-GGAAGTAAAGTCGTAACAAGG-3') และ ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') แล้วตรวจสอบผลด้วย agarose gel electrophoresis ทำขึ้น PCR ให้บริสุทธิ์ด้วยชุด GF-1 Gel DNA Recovery Kit (Vivantis, Malaysia) เพื่อส่งไปตรวจหาลำดับเบส (BIOTECH, Thailand) จากนั้นตรวจวิเคราะห์ลำดับเบสโดยเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GenBank ของ National Center for Biotechnology Information (NCBI) โดยใช้โปรแกรม BLAST search

3. การปลูกเชื้อราบนหน้าวัวสำหรับวิเคราะห์โปรตีน

แบ่งหน้าวัวออกเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มละ 5 ต้น ได้แก่ กลุ่มทดลองหรือหน้าวัวที่ได้รับการปลูกเชื้อรา (Infected) และกลุ่มควบคุมหรือหน้าวัวปกติ (Non-infected) ซึ่งกลุ่มทดลองทำการปลูกเชื้อราโดยนำเชื้อรา *C. gloeosporioides* ที่เตรียมไว้มาชะสปอร์ที่ผิวหน้าโคโลนีด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ ใช้แท่งแก้วชุดผิวหน้าโคโลนีเบาๆ แล้วจึงนำส่วนของสารละลายสปอร์ที่ได้มาปรับความเข้มข้นให้ได้ 10^7 สปอร์/มม. และฉีดพ่นลงบนหน้าวัวบริเวณใบที่ทำแผลด้วยเข็มเย็บเชื้อ ส่วนกลุ่มควบคุมฉีดพ่นด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อเพียงอย่างเดียวโดยทำแผลที่ใบเช่นเดียวกัน หลังจากนั้นให้น้ำตามปกติเป็นเวลา 4 สัปดาห์

4. การสกัดโปรตีนจากใบหน้าวัว

ตัดชิ้นส่วนใบหน้าวัวจากกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุมมาต้นละ 1 ใบ เติมนิโตรเจนเหลวและเก็บรักษาไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการทดลอง จากนั้นสกัดโปรตีนโดยชั่งใบหน้าวัวประมาณ 1 กรัม นำมาสกัดโปรตีนด้วยชุดสกัดสำเร็จรูป P-PER Plant Protein Extraction Kit (Thermo Scientific, USA) และวัดปริมาณโปรตีนที่สกัดได้ด้วยวิธี แบริดฟอร์ด (Bradford method) (Bradford, 1976)

5. การทำอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบ 2 มิติและการวิเคราะห์หาชนิดของจุดโปรตีน

ทำการเตรียมตัวอย่างโปรตีนหน้าวัวก่อนที่จะนำไปทำอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบ 2 มิติด้วยชุด 2D Clean-up kit (GE Healthcare, USA) จากนั้นแยกทิศทางแรกโดยนำตัวอย่างโปรตีนปริมาณ 60 ไมโครกรัม ผสมกับ rehydration buffer (8 M urea, 4% CHAPS, 0.001% bromphenol blue และ 3 mM dithiothreitol) ปริมาณ 125 ไมโครกรัม และ 1% IPG buffer (pH 3-10) ปีเปิดสารละลายผสมลงใน IPG strip ขนาด 7 เซนติเมตร นำไปวางบนเครื่อง Ettan IPGphor II (GE Healthcare, USA) และตั้งโปรแกรมทำไอโซอิเล็กตริกโฟกัสซิง (Isoelectric focusing, IEF)

หลังจากแยกโปรตีนทิศทางแรกแล้วนำ IPG strip มาแช่ใน equilibration buffer (50 mM Tris pH 8.8,

6 M urea, 30% glycerol, 2% SDS, 0.03% bromphenol blue) ที่มี 65 mM DTT และ 135 mM iodoacetamide เป็นเวลา 15 นาที จำนวน 2 ครั้ง ต่อมาทำการแยกทิศทางที่ 2 ใน 12.5% SDS-polyacrylamide gel (SDS-PAGE) ย้อมสีเจลด้วยวิธี Coomassie blue staining ซึ่งเมื่อได้รูปแบบเจล 2 มิติแล้วจึงนำจุดโปรตีนที่สนใจไปวิเคราะห์การแสดงผลออกด้วยการเปรียบเทียบความเข้มจากโปรแกรม ImageJ (National Institutes of Health, NIH) และคัดเลือกเฉพาะจุดโปรตีนที่สนใจไปหาชนิดของโปรตีนด้วยเทคนิค LC-MS (ศูนย์วิจัยพัฒนานวัตกรรม คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยมหิดล) นำข้อมูลที่ได้ไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลเพื่อวิเคราะห์ชนิดของโปรตีนจากเว็บไซต์ ดังนี้ พิมพ์ URL www.matrixscience.com เลือก Mascot database search หัวข้อ MS/MS Ions Search

6. การวิเคราะห์ทางสถิติ

ความเข้มของจุดโปรตีนระหว่างหน้าวัวที่ได้รับการปลูกเชื้อราและหน้าวัวที่ไม่ได้รับการปลูกเชื้อรา ใช้การเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของข้อมูลโดยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT) ด้วยโปรแกรม STAR 2.0.1

ผลและวิจารณ์ผลการวิจัย

1. ผลการวิจัย (Results)

1.1 ผลการตรวจสอบสายพันธุ์เชื้อราด้วยเทคนิค PCR

จากการตรวจสอบลำดับเบสบริเวณ ITS โดยใช้ไพรเมอร์ ITS5/ITS4 พบว่าผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้มีขนาดประมาณ 570 คู่เบส (Fig. 1) ซึ่งเมื่อนำไปตรวจหาลำดับเบสแล้วพบว่ามีความยาว 598 คู่เบส

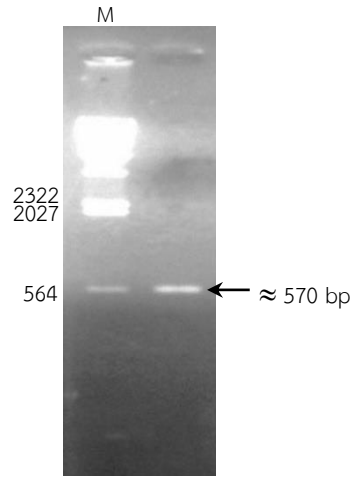


Fig. 1 PCR product of *Collectotrichum* sp.

โดย Photita *et al.* (2005) ใช้คู่ไพรเมอร์ ITS5/ITS4 ในการหาลำดับเบสบริเวณ ITS ของเชื้อรา *Collectotrichum* ที่แยกได้จาก กล้วย ชิง ถั่วเหลือง ลำไย มะม่วง *Eupatorium thymifolia* และ *Draceana sanderiana* พบว่าลำดับเบสที่ได้มีขนาดตั้งแต่ 581 – 620 คู่เบส และเมื่อตรวจสอบสายพันธุ์ของเชื้อราโดยใช้โปรแกรม BLAST search จากฐานข้อมูล GenBank ของ NCBI ส่วนใหญ่ระบุว่าเป็นเชื้อรา *C. gloeosporioides* ซึ่งมี%ความเหมือนเท่ากับ 99% (Table 1) ดังนั้น จากผลการตรวจสอบสายพันธุ์ราทางอณูชีววิทยา สามารถกล่าวได้ว่าเชื้อราที่ได้นี้เป็น *C. gloeosporioides*

Table 1 Results of blast analysis

GenBank accession no.	Organisms	% Identity
AY266378	<i>C. gloeosporioides</i> strain CMUBE1814	99
JF826502	<i>C. gloeosporioides</i> 18S ribosomal RNA gene	99
EU326190	<i>C. gloeosporioides</i> isolate XSD-139	99
AY266392	<i>C. gloeosporioides</i> strain CMUBE1852	99
AY266391	<i>C. gloeosporioides</i> strain CMUBE1851	99

1.2 ผลการทำอิเล็กโทรโพรซิสมแบบ 2 มิติ

รูปแบบจุดโปรตีนของหน้าวัวที่เกิดขึ้นบนเจล 2 มิติ (Fig. 2) จะเห็นว่าจากโปรตีนที่สนใจจำนวน 28 จุด หน้าวัวที่ได้รับการปลูกเชื้อรามีการแสดงออกของโปรตีนเพิ่มขึ้นตั้งแต่ 1.2 ถึง 4.7 เท่า เมื่อเทียบกับหน้าวัวปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) จำนวน 10 จุด (Table 2 และ Fig. 3) ได้แก่ จุดโปรตีนหมายเลข 2 3 4 5 9 10 11 12 13 24 และ 25 มีการแสดงออกลดลงจำนวน 2 จุด (Table 2 และ Fig. 3) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ได้แก่ จุดโปรตีนหมายเลข 1 (ลดลง 1 เท่า) และ 7 (ลดลง 1.5 เท่า) และมีโปรตีนที่เกิดขึ้นใหม่ในหน้าวัวที่ได้รับการปลูกเชื้อราจำนวน 7 จุด ได้แก่ จุดโปรตีนหมายเลข 6 16 17 18 26 27 และ 28 สำหรับโปรตีนที่พบเฉพาะในหน้าวัวกลุ่มควบคุมมีจำนวน 9 จุด ได้แก่ จุดโปรตีนหมายเลข 8 11 14 15 19 20 21 22 และ 23

1.3 ผลการวิเคราะห์โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับความต้านทานโรคแอนแทรกคโนสด้วยเทคนิค LC-MS

ได้ทำการคัดเลือกโปรตีนจำนวน 8 จุด (จุดโปรตีนหมายเลข 1-8) นำไปวิเคราะห์หาชนิดของโปรตีนด้วยเทคนิค LC-MS และนำข้อมูลไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลพบว่าสามารถระบุชนิดของโปรตีนได้เพียง 6 จุดจาก 8 จุด (Table 3) ได้แก่ จุดโปรตีนหมายเลข 1 2 5 6 7 และ 8 อย่างไรก็ตามแต่ละจุดโปรตีนก็มีความใกล้เคียงของน้ำหนักโมเลกุลและชนิดของโปรตีนที่สืบค้นได้จากฐานข้อมูล

2. วิจารณ์ผลการวิจัย

รูปแบบโปรตีนบนเจล 2 มิติของหน้าวัวที่ได้รับเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรกคโนส แสดงให้เห็นถึงความสามารถของพืชในการเพิ่มการแสดงออกของโปรตีนบางชนิดและการเหนี่ยวนำให้เกิดโปรตีนใหม่ เป็นการตอบสนองต่อการเข้าทำลายของเชื้อก่อโรคเพื่อให้สามารถควบคุมกระบวนการทางชีวเคมีต่างๆ ที่เกิดขึ้นในพืชให้เป็นปกติ (Vasanthaiyah *et al.*, 2009)

Oxygen-evolving enhancer protein 1 (OEE1, จุดโปรตีนหมายเลข 1) และ Oxygen-evolving enhancer protein 2 (OEE2, จุดโปรตีนหมายเลข 8) เป็นโปรตีนที่สำคัญในกระบวนการสังเคราะห์แสงในระบบแสง II (Photosystem II) และยังเกี่ยวข้องกับกลไกการป้องกัน

ตัวเองของพืชจากสภาวะเครียด เช่น สภาวะที่มีความเข้มข้นของเกลือสูง (Sugihara *et al.*, 2000) โดยเชื้อสาเหตุโรคพืชหลายชนิดมีความสามารถในการยับยั้งกระบวนการสังเคราะห์แสงของพืช (Vasanthaiyah *et al.*, 2009) ดังนั้นการที่กระบวนการสังเคราะห์แสงถูกยับยั้งเป็นผลให้โปรตีน OEE ไม่แสดงออกหรือมีการแสดงออกลดลง (Dahal *et al.*, 2010) ดังผลการศึกษาที่พบว่าโปรตีน OEE1 ในหน้าวัวที่ได้รับเชื้อรา *C. gloeosporioides* มีการแสดงออกลดลง 1 เท่า เมื่อเทียบกับหน้าวัวกลุ่มควบคุม อีกทั้งยังไม่พบการแสดงออกของโปรตีน OEE2 อีกด้วย สำหรับโปรตีนอีกชนิดหนึ่งที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมกระบวนการสังเคราะห์แสง คือ Fructose biphosphate aldolase (FBA, จุดโปรตีนหมายเลข 7) เป็นโปรตีนที่มีบทบาทสำคัญในวัฏจักรคัลวิน (Calvin cycle) (Subramanian *et al.*, 2005) โดยจากผลอิเล็กโทรโพรซิสมแบบ 2 มิติ หน้าวัวที่ได้รับเชื้อรา *C. gloeosporioides* มีการแสดงออกของโปรตีน FBA ลดลง 1.5 เท่า ซึ่ง Polesani *et al.* (2008) พบว่า ยีนที่แปลรหัสได้เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับวัฏจักรคัลวินหลายชนิด เช่น Ribulose biphosphate carboxylase Phosphoribulokinase และ Fructose biphosphate aldolase มีการแสดงออกลดลงเมื่ออุณหภูมิที่ใช้ทำไวน์ได้รับเชื้อรา *Plasmopara viticola* ตรงข้ามกับการศึกษาของ Campo *et al.* (2004) ที่พบว่าข้าวโพดที่ถูกบุกรุกด้วยเชื้อรา *Fusarium verticillioides* มีการแสดงออกของโปรตีน FBA เพิ่มขึ้น อย่างไรก็ตามในการศึกษาครั้งนี้ทั้งโปรตีน OEE และ FBA มีการแสดงลดลงแสดงว่ากระบวนการสังเคราะห์แสงในหน้าวัวไม่เป็นปกติหลังจากถูกเชื้อรา *C. gloeosporioides* เข้าทำลาย

Triosephosphate isomerase (TPI) เป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการไกลโคไลซิส (Glycolysis) กลูโคโนโอเจเนซิส (Gluconeogenesis) และวัฏจักรคัลวิน (Chen and Thelen, 2010) ซึ่งเป็นจุดโปรตีนหมายเลข 2 มีการแสดงออกเพิ่มขึ้น 2.4 เท่า เมื่อหน้าวัวถูกบุกรุกด้วยเชื้อรา *C. gloeosporioides* โดย Mutuku and Nose (2010) ได้ศึกษาการแสดงออกของ mRNA ของเอนไซม์ TPI ในข้าวที่ได้รับเชื้อรา *Rhizoctonia solani* และพบว่ามีระดับการแสดงออกเพิ่มขึ้น โดยต่อมาได้แสดงให้เห็นว่ากิจกรรมของเอนไซม์ TPI ในข้าวมีปริมาณเพิ่มขึ้นหลังจาก

ได้รับเชื้อรา *R. solani* ด้วย ดังนั้นการเพิ่มขึ้นของโปรตีน TPI นี้อาจเนื่องมาจากการรักษาสภาพของวิถีไกลโคไลซิสในพลาสติดและเกิดการสร้างวิถีไกลโคไลซิสในไซโทซอล (cytosol) เป็นการตอบสนองของพืชเมื่อถูกบุกรุกด้วยเชื้อรา (Mutuku and Nose, 2012)

Superoxide dismutase (SOD, จุดโปรตีน หมายเลข 5) มีการแสดงออกของโปรตีนเพิ่มขึ้น 4.7 เท่า ในหน้าวัวที่ได้รับเชื้อรา *C. gloeosporioides* ซึ่งโปรตีนนี้มีบทบาทในการป้องกันตัวเองของพืชจากสภาพแวดล้อมและการกำจัดอนุมูลอิสระ (Reactive oxygen species, ROS) รวมทั้งการกำจัดสารพิษ (Alscher *et al.*, 2002; Marrs, 1996) Wang *et al.* (2015) ได้ศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ SOD ในสตรอเบอร์รี่ 4 สายพันธุ์ พบว่า เมื่อสตรอเบอร์รี่ได้รับเชื้อรา *Mycosphaerella fragariae* ระดับกิจกรรมของเอนไซม์ SOD เพิ่มขึ้น โดยสตรอเบอร์รี่สายพันธุ์ HR SJ8976-1 และ MR มีระดับกิจกรรมของเอนไซม์ SOD สูงกว่าสายพันธุ์ HS เช่นเดียวกับผลการศึกษาของ Fang *et al.* (2012) ที่พบว่าสตรอเบอร์รี่ที่ได้รับเชื้อรา *C. fragariae* มีระดับกิจกรรมของเอนไซม์ SOD เพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับสตรอเบอร์รี่ปกติและจากผลอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบ 2 มิติยังพบว่าจุดโปรตีน SOD ของสตรอเบอร์รี่ที่ได้รับเชื้อราก็มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นด้วย จะเห็นได้ว่าเวลาที่โปรตีน SOD มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นในหน้าวัวที่ได้รับการปลูกเชื้อรานั้น เนื่องมาจากในบางกรณีเชื้อรากระตุ้นให้พืชเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมัน (Lipid peroxidation) อันเนื่องมาจากอนุมูลอิสระ ดังนั้นจึงทำให้พืชสร้างโปรตีน SOD เพิ่มขึ้นเพื่อป้องกันไม่ให้เซลล์ถูกทำลายในสถานการณ์นี้ (Bowler *et al.*, 1992)

Glutathione S-transferase (GST, จุดโปรตีน หมายเลข 6) เป็นโปรตีนอีกชนิดหนึ่งที่มีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระและกำจัดสารพิษ (Dalton *et al.*, 2009) ซึ่งการศึกษาในครั้งนี้พบการแสดงออกของ GST เฉพาะในหน้าวัวที่ได้รับเชื้อรา *C. gloeosporioides* จากการศึกษาของ Liao *et al.* (2014) พบว่า ระดับการแสดงออกของเอนไซม์ GST เพิ่มขึ้นสูงเมื่อ *Populus tomentosa* ถูกบุกรุกด้วยเชื้อรา *Botryosphaeria dothidea* แสดงว่าเอนไซม์ GST เกี่ยวข้องกับการต้านทานการเข้าทำลายของเชื้อก่อโรคพืชคือ สามารถป้องกันการลุกลามของโรคโดยกำจัดความเป็น

พิษของสารอินทรีย์เปอร์ออกไซด์ต่าง ๆ ซึ่งผลิตขึ้นระหว่างที่พืชถูกเชื้อก่อโรคบุกรุก อีกทั้งระดับออกซินที่เพิ่มขึ้นยังสามารถเหนี่ยวนำให้พืชสร้างเอนไซม์ GST ได้อีกด้วย (Shahrtash, 2013) และจากการศึกษาการแสดงออกของเอนไซม์ GST ใน *Nicotiana benthamiana* ด้วยการปลูกเชื้อ *C. destructivum* และ *C. orbiculare* พบว่ายีน GST มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นอย่างมากหลังจากการปลูกเชื้อราดังกล่าว (Dean *et al.*, 2005)

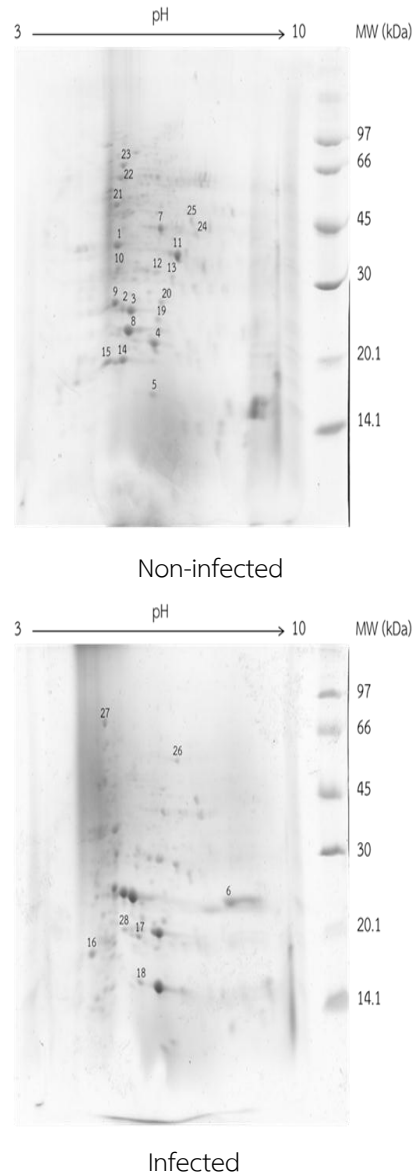


























Fig. 2 Two-dimensional gel electrophoresis patterns of non-infected and infected *Anthurium*

Table 2 Close-up view of differentially expressed protein spots which presented in non-infected and infected *Anthurium*

Spot no.	Non-infected	Infected
1		
2		
3		
4		
5		
7		
9		
10		
12		
13		
24		
25		

สรุปผลการวิจัย

การศึกษาในครั้งนี้พบโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่อเชื้อรา *C. gloeosporioides* ที่เป็นสาเหตุโรคแอนแทรคโนสในหน้วว โดยผลจากการทำอิเล็กโทรโฟริซิสแบบ 2 มิติ มีโปรตีนที่สนใจจำนวน 28 จุด ซึ่งโปรตีนดังกล่าวถูกเหนี่ยวนำให้มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นและลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) เมื่อเทียบกับหน้ววปกติ รวมทั้งยังมีโปรตีนที่ถูกกระตุ้นให้สร้างขึ้นใหม่อีกด้วย และเมื่อวิเคราะห์ชนิดของโปรตีนที่สนใจจำนวน 8 จุดด้วยเทคนิค LC-MS พบว่าสามารถระบุได้โปรตีน 6 ชนิด ที่มีบทบาทในกระบวนการสังเคราะห์แสง กระบวนการเมแทบอลิซึมของคาร์โบไฮเดรต และเกี่ยวข้องกับกลไกการป้องกันตัวเองของพืชจากสภาพแวดล้อม เช่น การต้านอนุมูลอิสระและกำจัดสารพิษ ทั้งนี้ข้อมูลจากการศึกษาสามารถนำไปใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการศึกษากลไกการตอบสนองของพืชต่อการเข้าบุกรุกทำลายของเชื้อก่อโรคในพืชชนิดอื่น อีกทั้งยังเป็นข้อมูลสำหรับนักปรับปรุงพันธุ์เพื่อนำไปสู่การสร้างหน้ววต้านทานโรคต่อไปได้

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณทุนสนับสนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลอีสาน ขอขอบคุณศูนย์วิจัยโปรตีนและโปรตีโอมิกส์เพื่อการพาณิชย์และอุตสาหกรรม (ศปพ.) มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่ให้ความอนุเคราะห์เครื่องมือในการทำอิเล็กโทรโฟริซิสแบบ 2 มิติ และขอขอบคุณสาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะเทคโนโลยีอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยกาฬสินธุ์ ที่ให้ความอนุเคราะห์ใช้อุปกรณ์เครื่องมือวิจัย และสถานที่ตลอดระยะเวลาของการวิจัย

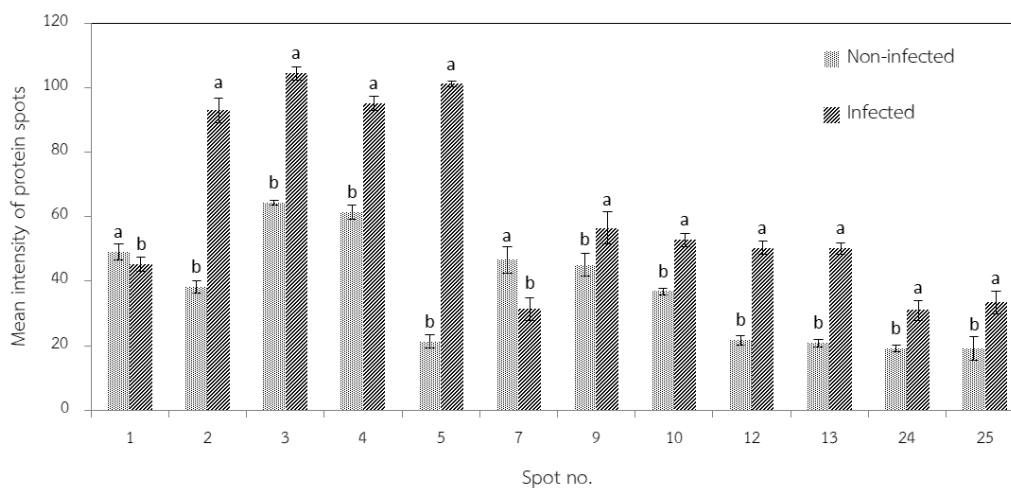


Fig. 3 Expression levels of protein spots identified in non-infected and infected *Anthurium*. The mean intensity of protein spots were analyzed manually using Image J program. Results are presented as the mean intensity \pm SE of protein spots for gels from 3 replicates. The different letters ($p < 0.05$) above the error bars indicate statistically significant difference (Duncan's Multiple Range Test) between non-infected and infected

Table 3 LC-MS identification of selected protein spots of non-infected and infected *Anthurium*

Spot no.	Name of the protein	MW (kDa)/pI	Organism matched	Accession no.
1	Oxygen-evolving enhancer protein 1	35.1/6.26	<i>Fritillaria agrestis</i>	O49079
2	Triose-phosphate isomerase	27.3/5.38	<i>Oryza sativa</i> subsp. <i>japonica</i>	P48494
5	Superoxide dismutase	15.4/5.13	<i>Capsicum annuum</i>	O22373
6	Glutathione S-transferase	24.6/5.88	<i>Silene vulgaris</i>	Q04522
7	Fructose-bisphosphate aldolase	42.4/6.85	<i>Fritillaria agrestis</i>	P16096
8	Oxygen-evolving enhancer protein 2	23.4/4.91	<i>Brassica juncea</i>	Q96334

References

- Alscher, R.G., Erturk, N. and Heath, L. S. 2002. Role of Superoxide Dismutases (SODs) in Controlling Oxidative Stress in Plants. *J. Exp. Bot.* 53(372): 1331-1341.
- Ampawan, R., Pookmanee, T., Samransakul, P., Duangban, D., Teja, S. and Wongchai, K. 2016. Anthurium Propagation by Tissue Culture Technique. [online] [Accessed December 13, 2016]. Available from: URL: <http://research.rae.mju.ac.th/raebase/index.php/knowledge/blog2/710-anthurium1?showall=1&limitstart=>.
- Bowler, C., Montagu, M. V. and Inze, D. 1992. Superoxide Dismutase and Stress Tolerance. *Annu. Rev. Plant Biol.* 43(1): 83-116.

- Bradford, M.M. 1976. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem.* 72: 248–254.
- Brown, S.H. 2012. Anthracnose Disease of Ornamental Plants: A Pictorial [online]. [Accessed December 14, 2016]. Available from: URL: <http://lee.ifas.ufl.edu/Hort/GardenPubsAZ/Anthracnose.pdf>.
- Campo, S., Carrascal, M., Coca, M., Abián, J. and San Segundo, B. 2004. The Defense Response of Germinating Maize Embryos Against Fungal Infection: A Proteomics Approach. *Proteomics.* 4(2): 383-396.
- Chen, M. and Thelen, J.J. 2010. The Plastid Isoform of Triose Phosphate Isomerase Is Required for the Postgerminative Transition from Heterotrophic to Autotrophic Growth in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* 22(1): 77-90.
- Cipriano, A.K., Gondim, D.M., Vasconcelos, I.M., Martins, J.A., Moura, A.A., Moreno, F.B., Monteiro-Moreira, A.C.O., Melo, J.G.M., Cardoso, J.E., Paiva, A.L.S. and Oliveira, J.T.A. 2015. Proteomic Analysis of Responsive Stem Proteins of Resistant and Susceptible Cashew Plants After *Lasiodiplodia theobromae* Infection. *J. Proteomics.* 15(113): 90-109.
- Dahal, D., Pich, A., Braun, H.P. and Wydra, K. 2010. Analysis of Cell Wall Proteins Regulated in Stem of Susceptible and Resistant Tomato Species After Inoculation with *Ralstonia solanacearum*: A Proteomic Approach. *Plant Mol. Biol.* 73(6): 643-658.
- Dalton, D.A., Boniface, C., Turner, Z., Lindahl, A., Kim, H.J., Jelinek, L., Govindarajulu, M., Finger, R.E. and Taylor, C.G. 2009. Physiological Roles of Glutathione S-Transferases in Soybean Root Nodules. *Plant Physiol.* 150(1): 521-530.
- Dean, J.D., Goodwin, P.H. and Hsiang, T. 2005. Induction of Glutathione S-Transferase Genes of *Nicotiana benthamiana* Following Infection by *Colletotrichum destructivum* and *C. orbiculare* and Involvement of One in Resistance. *J. Exp. Bot.* 56(416): 1525-1533.
- Dibanuka, C. 2016. Anthurium Cut Flowers. [Accessed December 13, 2016]. Available from: URL: <http://ag-ebook.lib.ku.ac.th/ebooks/2016/20160068/index.html#>.
- Fang, X., Chen, W., Xin, Y., Zhang, H., Yan, C., Yu, H., Liu, H., Xiao, W., Wang, S., Zheng, G. and Liu, H. 2012. Proteomic Analysis of Strawberry Leaves Infected with *Colletotrichum fragariae*. *J. Proteomics.* 75(13): 4074-4090.
- Kasetsart University. 2004. Anthurium. [online] [Accessed December 13, 2016]. Available from: URL: <http://www.ku.ac.th/e-magazine/september47/agri/flower.html>.
- Lewis-Ivey, M.L., Nava-Diaz, C. and Miller, S.A. 2004. Identification and Management of *Colletotrichum acutatum* on Immature Bell Peppers. *Plant Dis.* 88 (11):1198–1204.
- Liao, W., Ji, L., Wang, J., Chen, Z., Ye, M., Ma, H. and An, X. 2014. Identification of Glutathione S-Transferase Genes Responding to Pathogen Infestation in *Populus tomentosa*. *Funct. Integr. Genomics.* 14(3): 517-529.
- Marrs, K.A. 1996. The Functions and Regulation of Glutathione S-Transferases in Plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47: 127-158.
- Mehta, A., Brasileiro, A., Souza, D. S., Romano, E., Campos, M. A., Grossi-de-Sá, M. F. Silva, M.S., Franco, O.L., Fragoso, R.R., Bevitori, R. and Rocha, T. L. 2008. Plant-Pathogen Interactions: What is proteomics telling us?. *FEBS J.* 275(15). 3731-3746.
- Moura, H.F., Vasconcelos, I.M., Souza, C.E., Silva, F.D., Moreno, F.B., Lobo, M.D., Monteiro-Moreira, A.C., Moura,

- A.A., Costa, J.H. and Oliveira, J.T. 2014. Proteomics Changes During the Incompatible Interaction Between Cowpea and *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz and Sacc. Plant Sci. 217(218): 158– 175.
- Mutuku, J. M. and Nose, A. 2012. Changes in the Contents of Metabolites and Enzyme Activities in Rice Plants Responding to *Rhizoctonia solani* Kuhn Infection: Activation of Glycolysis and Connection to Phenylpropanoid Pathway. Plant Cell Physiol. 53(6): 1017-1032.
- Mutuku, M. and Nose, A. 2010. *Rhizoctonia solani* Infection in Two Rice Lines Increases mRNA Expression of Metabolic Enzymes Genes in Glycolytic, Oxidative Pentose Phosphate Pathways and Secondary Metabolism. Trop. Agr. Develop. 54(4): 119-131.
- Perintawong, N. 2013. Mechanism of Disease Resistance in Plants. King Mongkut's Agricultural Journal 31(3): 76-82. (in Thai)
- Photita, W., Taylor, P. W., Ford, R., Hyde, K. D., and Lumyong, S. 2005. Morphological and Molecular Characterization of *Colletotrichum* Species from Herbaceous Plants in Thailand. Fungal Divers. 18: 117-133.
- Polesani, M., Desario, F., Ferrarini, A., Zamboni, A., Pezzotti, M., Kortekamp, A. and Polverari, A. 2008. cDNA-AFLP Analysis of Plant and Pathogen Genes Expressed in Grapevine Infected with *Plasmopara viticola*. Bmc Genomics. 9(1): 142.
- Pooaipoon, A., Kaosiri, T. and Leelapiromkul, P. 2009. Anthurium: Black Rot Disease Resistance. Kasikorn. 82(4): 63-67. (in Thai)
- Shahrtash, M. 2013. Plant Glutathione S-Transferases Function During Environmental Stresses: A Review Article. Rom. J. Biol. - Plant Biol. 58(1): 19-25.
- Soonuwon, W., Chuenchitt, S., Yenyongsawad, C., Techato, S. and Poonthong, O. 2010. Anthurium Breeding for Cut Flower. Research report which received financial support from annual government statement of expenditure 2004-2006. (in Thai)
- Subramanian, B., Bansal, V.K., and Kav, N.N. 2005. Proteome-Level Investigation of *Brassica carinata*-Derived Resistance to *Leptosphaeria maculans*. J. Agric. Food Chem. 53(2): 313-324.
- Sugihara, K., Hanagata, N., Dubinsky, Z., Baba, S. and Karube, I. 2000. Molecular Characterization of cDNA Encoding Oxygen Evolving Enhancer Protein 1 Increased by Salt Treatment in the Mangrove *Bruguiera gymnorhiza*. Plant Cell Physiol. 41(11): 1279–1285.
- Thaikasetsart. 2012. Typical Characteristics of Anthurium. [Accessed December 13, 2016] Available from: URL: <http://www.thaikasetsart.com/>.
- Vasanthaiyah, H.K.N., Katam, R. and Basha, S.M. 2009. Characterization of Unique and Differentially Expressed Proteins in Anthracnose-Tolerant Florida Hybrid Bunch Grapes. Appl. Biochem. Biotechnol. 157(3): 395–406.
- Wang, Y., Moidu, H., Charles, M.T., Dubé, C. and Khanizadeh, S. 2015. Differential Regulation of Superoxide Dismutase Activity in Selected Strawberry Lines Exposed to *Mycosphaerella fragariae*. J. Plant Stud. 4(2): 30-41.
- Wiriyaampaiwong, P., Chomnawang, P. Sootsuwan, K. and Samranpong, O. 2013. Preliminary Study on Isolation of Fungal Pathogen Causing Anthracnose of *Anthurium andraeanum* in Thailand. [Abstract]. Proceedings of the 25th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology and International Conference. Bangkok. 226. (in Thai)
- Zhang, X., Fu, J., Hiromasa, Y., Pan, H., and Bai, G. 2013. Differentially Expressed Proteins Associated with

Fusarium Head Blight Resistance in Wheat. PloS ONE, 8(12): 1-10.

Zhang, X.L., Si, B.W., Fan, C.M., Li, H.J. and Wang, X.M. 2014. Proteomics Identification of Differentially Expressed Leaf Proteins in Response to *Setosphaeria turcica* Infection in Resistant Maize. J. Integr. Agric. 13(4): 789-803.