Final report

คุณลักษณะของโปรตีโอมในผลส้มต่อการต้านทานโรคซึ่งเหนี่ยวนำโดยสารไลโปเปปไทด์จากแบซิลลัส ซับทิลลิส อิลิซิเตอร์และเชื้อราก่อโรค

Proteomic characterization of citrus fruit for disease resistance induced by *Bacillus subtilis* lipopeptides elicitors and fungal pathogen

รองศาสตราจารย์ วิจิตรา ลีละศุภกุล
ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่

Associate Professor Wichitra Leelasuphakul
Department of Biochemistry,
Faculty of Science,
Prince of Songkla University, Hat Yai Campus

(งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากทุนงบประมาณแผ่นดินของ
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ประจำปี 2560-2561 สัญญาเลขที่ SCI600214S)

บทคัดย่อ

สารสกัดในกลุ่ม cyclic lipopeptides (CLPs) ที่ผลิตจากเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* ABS-S14 กระตุ้นการแสดงออกของยีน รวมไปถึงโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่อสภาวะเครียดของผลส้มที่ค้นพบในงานวิจัยนี้ สาร iturin A fengycin และ surfactin พบใน crude extract ของ *B. subtilis* ยับยั้งการเจริญเติบโตของราเขียว *Penicillium digitatum* ได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยมีกลไกที่กระทบต่อการเปลี่ยนแปลงระดับ mRNA ทั้งในสภาวะที่มีและไม่มีการติดเชื้อโรคเน่าราเขียวผ่านการกระตุ้นยีนที่เกี่ยวข้องกับการต้านทางโรคในผลส้มระดับ transcription คือ 1. กลุ่มของยีนนำสัญญาณการกระตุ้นในฮอร์โมนพืช ได้แก่ (1). *phenylalanine ammonia-lyase* (*PAL*) ใน salicylic acid (SA) signaling pathway (2). *lipoxygenase* (*LOX*) ใน jasmonic acid (JA) signaling pathway (3). *1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase* (*ACS*) และ (4). *1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase* (*ACO*) ใน ethylene (ET) signaling pathway 2. กลุ่มของยีนที่เกี่ยวข้องสำหรับการสร้างโปรตีนเพื่อตอบสนองต่อเชื้อก่อโรค ได้แก่ (1). *glucanase* (*GLU*) (2). *chitinase* (*CHI*) (3). *peroxidase* (*POX*) และ (4). *pathogenesis-related protein 1* (*PR1*) เมื่อเปรียบเทียบกับการกระตุ้นจากฮอร์โมนพืชจากภายนอก 3 ชนิด คือ 1. SA 2. methyl JA และ 3. ethephon ซึ่งผลของสารสกัดในกลุ่ม CLPs มีประสิทธิภาพในการกระตุ้นยีนของกลุ่มควบคุมและการสร้างโปรตีนเพื่อตอบสนองต่อเชื้อก่อโรคได้ดีผ่านทาง SA- JA- และ ET signaling pathways ในขณะที่ฮอร์โมนพืชจากภายนอกแต่ละชนิดสามารถกระตุ้นยีนต่าง ๆ ได้เฉพาะวิถีการส่งสัญญาณของฮอร์โมนชนิดนั้น ๆ แบบแผนการเปลี่ยนแปลงระดับโปรตีนในผลส้มขณะที่มีและไม่มีการติดเชื้อโรคเน่าราเขียวนั้นแตกต่างกันอย่างเห็นได้ชัดเจน โดยปริมาณโปรตีนที่แสดงออกในกลุ่มที่ไม่มีการติดเชื้อ 3,426 ชนิด แต่เมื่อมีการติดเชื้อปริมาณโปรตีนลดลงเหลือเพียง 1,832 ชนิด เมื่อจำแนกโปรตีนตามหน้าที่แล้วโปรตีนในกลุ่มที่ทำหน้าที่ catalytic activity พบได้ในปริมาณที่มากที่สุด

คำสำคัญ: mandarin, cyclic lipopeptides, *Bacillus subtilis*, *Penicillium digitatum*, transcription, proteomics

Abstract

Activation of defense related gene expression and protein production involving mandarin fruit response to stress by cyclic lipopeptides (CLPs) produced by *Bacillus subtilis* ABS-S14 was demonstrated in this work. The CLPs extract which comprises iturin A, fengycin and surfactin showed strongly growth inhibition of green mold fungus *Penicillium digitatum.* Their action occurred through change of mRNA abundances under with and without pathogen attack by elucidating defense related gene expression at transcriptional level. Group of plant derived genes involving in signal transduction pathway mediating by plant hormones consists of (1). *phenylalanine ammonia-lyase* (*PAL*) in salicylic acid (SA) signaling pathway, (2). *lipoxygenase* (*LOX*) in jasmonic acid (JA) signaling pathway, (3). *1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase* (*ACS*), and (4). *1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase* (*ACO*) in ethylene (ET) signaling pathway. Another group of pathogenesis-related proteins (PR proteins) composes of (1). *glucanase* (*GLU*) (2). *chitinase* (*CHI*) (3). *peroxidase* (*POX*) และ (4). *pathogenesis-related protein 1* (*PR1*). Significant finding of greater effect of the CLPs extract in comparison to exogenous plant hormones used (SA, methyl JA and 3. Ethephon) via all plant hormones mediating pathways was revealed. Differential proteome patterns in fruit tissues between non- and fungal infection were demonstrated. Protein abundance of 3,426 was found in non-fungal treated plants whereas 1,832 proteins were discovered under fungal attack. These plant proteins in all treatments were characterized according to their functions indicated that protein group involving catalytic activity was mainly showed up.

Keywords: mandarin, cyclic lipopeptides, *Bacillus subtilis*, *Penicillium digitatum*, transcription, proteomics

สารบาญ

	หน้า
บทคัดย่อ	i
Abstract	ii
สารบาญ	iii
รายการตาราง	iv
รายการรูป	v
บทนำ	1
วัตถุประสงค์	12
วัสดุ สารเคมีและวิธีการดำเนินการวิจัย	13
ผลการทดลองและวิจารณ์	21
สรุปผลการทดลอง	55
เอกสารอ้างอิง	56

รายการตาราง

ตารางที่ หน้า

2.1 สารที่ใช้ในการหยอดลงในแผลของผลส้มในชุดการทดลองที่ 1 (single treatment) 16

2.2 สารที่ใช้ในการหยอดลงในแผลของผลส้มในชุดการทดลองที่ 2 (combine treatment) 16

2.3 Primer ที่ใช้ในการศึกษายีนที่เกี่ยวข้องกับการต้านทานโรคส้ม 18

3.1 รายละเอียดของตัวอย่าง S1 - S40 ของการทดลองชุดที่ 1 29

3.2 รายละเอียดของตัวอย่าง S1 - S40 ของการทดลองชุดที่ 2 36

รายการรูป

รูปที่ หน้า

3.1 การแยกวิเคราะห์ iturin A fengycin surfactin จากสารสกัดหยาบ CLPs ด้วยวิธี TLC 21

3.2 การทำบริสุทธิ์สาร iturin A fengycin surfactin จากสารสกัดหยาบ CLPs ด้วยวิธี PTLC 22

3.3 chromatogram ของ CLPs ด้วยเทคนิค RP-HPLC 23

3.4 chromatogram ของ Fraction ที่ได้จาก C18-cartridge ช่วง 3-5 ด้วยเทคนิค RP-HPLC 24

3.5 chromatogram ของ Fraction ที่ได้จาก C18-cartridge ช่วง 8-10 ด้วยเทคนิค RP-HPLC 24

3.6 chromatogram ของ Fraction ที่ได้จาก C18-cartridge ช่วง 15-17 ด้วยเทคนิค RP-HPLC 24

3.7 chromatogram ของ fraction ต่าง ๆ ที่ได้จาก C18-cartridge ด้วยเทคนิค MALDI-TOF MS (A): fraction no. 3-5 (B): fraction no. 8-10 และ (C): fraction no. 15-17 24

3.8 การยับยั้งการเจริญเติบโต ของ *P. digitatum* ด้วย *B. subtilis* endospores 25

3.9 การยับยั้งการเจริญเติบโต ของ *P. digitatum* ด้วย *B. subtilis* cell-free supernatant 26

3.10 การยับยั้งการเจริญเติบโต (Mycelium growth) ของ *P. digitatum* ด้วย CLPs 28

3.11 PCR product ของ *EF-1α* (internal control) และค่า C_T ของการทดลองชุดที่ 1 30

3.12 การเปลี่ยนแปลงของกลุ่มยีนในช่วงเวลาที่ 24 48 และ 72 ชั่วโมง ของการทดลองชุดที่ 1 ในกลุ่มที่กระตุ้นด้วยฮอร์โมนพืช 32

3.13 การเปลี่ยนแปลงของกลุ่มยีนการทดลองชุดที่ 1 ในกลุ่มที่กระตุ้นด้วยสารที่ได้จากแบคทีเรีย 35

3.14 PCR product ของ *EF-1α* (internal control) และค่า C_T ของการทดลองชุดที่ 2 37

3.15 การเปลี่ยนแปลงของกลุ่มยีน ของการทดลองชุดที่ 2 ในกลุ่มที่กระตุ้นด้วยฮอร์โมนพืช 39

รายการรูป (ต่อ)

รูปที่ หน้า

3.16 การเปลี่ยนแปลงของกลุ่มยีน ของการทดลองชุดที่ 2 ในกลุ่มที่กระตุ้นด้วยสารที่ได้จากแบคทีเรีย 40

3.17 แถบโปรตีนจากเนื้อเยื่อเปลือกส้มในชุดการทดลองที่ 1 42

3.18 แถบโปรตีนจากเนื้อเยื่อเปลือกส้มในชุดการทดลองที่ 2 43

3.19 กลุ่มของโปรตีนที่แสดงออกจากการกระตุ้นด้วยสารชนิดต่าง ๆ ซึ่งแบ่งตาม molecular function ในชุดการทดลองที่ 1 44

3.20 ความเข้มข้นของโปรตีนกลุ่ม antioxidant ในชุดการทดลองย่อยของชุดที่ 1 45

3.21 ความเข้มข้นของโปรตีนกลุ่ม binding ในชุดการทดลองย่อยของชุดที่ 1 45

3.22 ความเข้มข้นของโปรตีนกลุ่ม catalytic ในชุดการทดลองย่อยของชุดที่ 1 46

3.23 ความเข้มข้นของโปรตีนกลุ่ม receptor ในชุดการทดลองย่อยของชุด 1 47

3.24 ความเข้มข้นของโปรตีนกลุ่ม signal transducer ในชุดการทดลองย่อยของชุดการทดลองที่ 1 47

3.25 ความเข้มข้นของโปรตีน structural molecule ชุดการทดลองย่อยของชุดที่ 1 47

3.26 ความเข้มข้นของโปรตีนกลุ่ม transporter ในชุดการทดลองย่อยของชุดการทดลองที่ 1 48

3.27 กลุ่มของโปรตีนที่แสดงออกจากการกระตุ้นด้วยสารชนิดต่าง ๆ ซึ่งแบ่งตาม molecular function ในชุดการทดลองที่ 2 48

3.28 ความเข้มข้นของโปรตีนกลุ่ม binding ในชุดการทดลองย่อยของชุดที่ 2 49

3.29 ความเข้มข้นของโปรตีนกลุ่ม catalytic ในชุดการทดลองย่อยของชุดที่ 2 50

3.30 ความเข้มข้นของโปรตีนกลุ่ม receptor ในชุดการทดลองย่อยของชุดที่ 2 51

3.31 ความเข้มข้นของโปรตีนกลุ่ม signal transducer ในชุดการทดลองย่อยของชุดที่ 2 51

3.32 ความเข้มข้นของโปรตีนกลุ่ม translation regulator ในชุดการทดลองย่อยของชุดที่ 2 51

3.33 ความเข้มข้นของโปรตีนกลุ่ม transporter ในชุดการทดลองย่อยของที่ 2 52