

ความแปรปรวนของยีนตรวจจับเอทิลีนในเชื้อราสกุล *Colletotrichum* สาเหตุโรคหลังการเก็บเกี่ยว  
Variability of Ethylene-sensing Gene in the Genus *Colletotrichum* Causing Postharvest Diseases

สันธิติ บินคาเดอร์<sup>1</sup> รัตติยา พงศ์พิสุทธา<sup>2</sup> ธนวรรธน์ พรหมขลิบนิล<sup>1</sup>

ทิพย์วรา เทียนสว่าง<sup>1</sup> พิสุทธิ เขียวมณี<sup>2</sup> และชัยณรงค์ รัตนกริฑากุล<sup>2</sup>

Santiti Bincader<sup>1</sup>, Ratiya Pongpisutta<sup>2</sup>, Tanawan Promkhlilnil<sup>1</sup>,

Thipwara Tiansawang<sup>1</sup>, Pisut Keawmanee<sup>2</sup>, and Chainarong Rattanakreetakul<sup>2</sup>

Abstract

Ethylene is one of the factors that affects postharvest product losses. Moreover, several fungi, especially, genus *Colletotrichum*, caused latent infection and postharvest disease in economically important plants, which could represent a signal that can be sensed by plant pathogenic fungi to accelerate their appressorium and spore germination for quiescent infection. This research was to investigate the genetic variability of the ethylene sensing gene in 8 isolates of *Colletotrichum*, nucleotide differentiation, and phylogenetic tree relationships. The finding indicated that the nucleotides of the necrosis and ethylene-inducing protein and ethylene inducing peptide region differed in 67 bp from 711 bp, representing 0.42–9.42% of nucleotide difference, and related to the pairwise sequence comparison. Additionally, estimates of evolutionary divergence between sequences were genetic relationship between 0.0056–0.0985 which shows the interaction between fungi and host plants. This research is part of the mechanism relationship between crop yield and pathogens that cause post-harvest diseases, which will lead to inspection, control, and management of post-harvest produce that is efficient and safe for consumers.

**Keywords:** *Colletotrichum*, ethylene, gene, plant pathogenic fungi

บทคัดย่อ

เอทิลีนเป็นหนึ่งในปัจจัยสำคัญที่ส่งผลให้เกิดความสูญเสียต่อผลผลิตหลังการเก็บเกี่ยว นอกจากนี้เชื้อราหลายชนิด โดยเฉพาะในเชื้อราสกุล *Colletotrichum* ที่พบการเข้าทำลายแฝงและก่อให้เกิดโรคหลังการเก็บเกี่ยวเกี่ยวกับพืชเศรษฐกิจที่สำคัญยังสามารถรับรู้ได้ถึงเกิดการเกิดเอทิลีนในพืชที่มีการสุก เพื่อเริ่มการพัฒนาตนเองในส่วนของวงจรการกระตุ้นการสร้างโครงสร้าง appressorium และการงอกของสปอร์เพื่อเข้าทำลายและก่อโรคหลังการเก็บเกี่ยว งานวิจัยนี้ได้ทำการตรวจสอบความแปรปรวนของยีนตรวจจับเอทิลีนในเชื้อราสกุล *Colletotrichum* จำนวน 8 ไอโซเลท ศึกษาความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ รวมถึงวิวัฒนาการความสัมพันธ์ระหว่างเชื้อราผลการทดลอง พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ necrosis and ethylene-inducing protein and ethylene inducing peptide มีความแตกต่างกัน 67 bp จาก 711 bp คิดเป็นค่าความแตกต่างของนิวคลีโอไทด์ระหว่าง 0.42–9.42 เปอร์เซ็นต์ สอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ pairwise sequence comparison นอกจากนี้เมื่อวิเคราะห์ความแปรปรวน พบว่าค่าความแตกต่างเชิงวิวัฒนาการระหว่างสายพันธุ์มีค่าระหว่าง 0.0056–0.0985 ซึ่งแสดงให้เห็นถึงปฏิสัมพันธ์ระหว่างเชื้อรา และพืชอาศัย งานวิจัยนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษากลไกความสัมพันธ์ระหว่างผลผลิตพืชกับเชื้อสาเหตุที่ก่อให้เกิดโรคหลังการเก็บเกี่ยว ซึ่งจะนำไปสู่การตรวจสอบ ควบคุมบริหารจัดการผลผลิตหลังการเก็บเกี่ยวที่มีประสิทธิภาพและปลอดภัยต่อผู้บริโภคต่อไป

**คำสำคัญ:** *Colletotrichum* เอทิลีน ยีน เชื้อราสาเหตุโรค

<sup>1</sup> สาขาวิชาพืชศาสตร์ คณะเทคโนโลยีการเกษตรและอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลสุวรรณภูมิ พระนครศรีอยุธยา 13000

<sup>1</sup> Program Plant Science, Faculty of Agricultural Technology and Agro-industry, Rajamangala University of Technology Suvarnabhumi, Phra Nakhon Si Ayutthaya, 13000, Thailand

<sup>2</sup> ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม 73140

<sup>2</sup> Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture at Kamphaeng Saen, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom 73140, Thailand

**คำนำ**

โรคแอนแทรคโนส (anthracnose disease) ซึ่งเกิดจากการเข้าทำลายของเชื้อราในสกุล *Colletotrichum* เป็นปัญหาสำคัญของกระบวนการผลิตพืชเศรษฐกิจหลายชนิด เนื่องจากเชื้อราสามารถตกค้างในวัสดุปลูก หรือสภาพแวดล้อมได้นาน อีกทั้งยังมีพืชอาศัยที่มากกว่า 500 สายพันธุ์ นอกจากนี้ยังส่งผลกระทบต่อผลผลิตของพืชหลังการเก็บเกี่ยว เนื่องจากเชื้อราสามารถเข้าทำลายพืชแต่ไม่แสดงอาการ เรียกว่าการดักกล่าว “การเข้าทำลายแบบแฝง (quiescent)” โดยอาการจะแสดงให้เห็นเมื่อผลผลิตเข้าสู่ระยะสุกแก่ หรือเสื่อมสภาพ เชื้อราสาเหตุโรคก็จะเข้าทำลายทำให้เกิดอาการของโรค สำหรับในช่วงระยะผลผลิตยังอ่อนนั้น พืชจะสร้างกลไกการป้องกันตัวเพื่อจำกัดการเจริญของเชื้อรา จึงทำให้ไม่พบอาการโรคในช่วงระยะดังกล่าว (Silva *et al.*, 2017) นอกจากนี้ เอทิลีนก็เป็นอีกหนึ่งในปัจจัยสำคัญที่ส่งผลให้เกิดความสูญเสียต่อผลผลิตหลังการเก็บเกี่ยวและกระตุ้นการเข้าทำลายของเชื้อราแฝง จากข้อมูลของ พบว่า ยีน Necrosis- and ethylene-inducing peptide (NLPs) เป็นหนึ่งในยีนที่พบการผลิตมากในเชื้อราและแบคทีเรียสาเหตุโรค (Oome and Van den Ackerveken, 2014) โดยยีนดังกล่าวจะมีส่วนรับและตรวจสอบการผลิตน้ำตาลของพืช ซึ่งเมื่อพืช โดยเฉพาะไม้ผลมีการเปลี่ยนแปลงเป็นน้ำตาล ยีนดังกล่าวจะแสดงออก โดยมี Glycosylinositol phosphorylceramide (GIPC) ซึ่งอยู่บริเวณเยื่อหุ้มพลาสมาของพืชเป็นตัวรับสัญญาณของยีน NLPs ที่ผลิตขึ้น และยังพบว่า ยีน NLPs มี strongly conserved heptapeptide motif (GHRHDWE) ซึ่งเป็นส่วนอนุรักษ์ที่มีความจำเพาะสูงต่อสายพันธุ์เชื้อราสาเหตุโรค แต่สำหรับเชื้อราในสกุล *Colletotrichum* นั้น พบว่า ยีนบริเวณดังกล่าวมีความแปรปรวนสูง โดยมีสาเหตุมาจากความหลากหลายทางชีวภาพของตัวเชื้อราเอง และความแปรปรวนนั้น ส่งผลให้การเข้าทำลายของพืช และการสร้างอวัยวะเข้าทำลาย หรือ appressorium ของเชื้อราในสกุลดังกล่าวเปลี่ยนแปลงไปเช่นกัน งานวิจัยนี้จึงได้ทำการตรวจสอบความแปรปรวนของยีนตรวจจับเอทิลีนในเชื้อราสกุล *Colletotrichum* เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษากลไกความสัมพันธ์ระหว่างผลผลิตพืชกับเชื้อราสาเหตุที่ก่อให้เกิดโรคหลังการเก็บเกี่ยว ซึ่งจะนำไปสู่การบริหารจัดการผลิตผลหลังการเก็บเกี่ยวที่มีประสิทธิภาพต่อไป

**อุปกรณ์และวิธีการ**

**1. ลำดับนิวคลีโอไทด์สำหรับการวิเคราะห์**

ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ Necrosis- and ethylene-inducing peptide (NLPs) ของเชื้อรา *Colletotrichum* ได้รับจากฐานข้อมูล GenBank ใน National Center for Biotechnology Information (NCBI) โดยใช้ฟังก์ชันการค้นหาแบบ NCBI Genome Project ดังแสดงใน **Table 1**

**Table 1** Nucleotide sequencing details of *Colletotrichum* 8 isolates from GenBank.

Accession number	Genus-species	Host	Country
XM_060585355.1	<i>Colletotrichum phormii</i> CBS 102054	<i>Phormium</i> sp	New Zealand
XM_060570280.1	<i>Colletotrichum godetiae</i> CBS 193.32	<i>Olea europaea</i>	Greece
XM_060528687.1	<i>Colletotrichum tamarilloi</i> CBS 129955	<i>Solanum betaceum</i>	Colombia
XM_060549384.1	<i>Colletotrichum abscissum</i> IMI 504890	<i>Citrus sinensis</i>	USA
XM_060495914.1	<i>Colletotrichum paranaense</i> IMI 384185	<i>Caryocar brasiliense</i>	Brazil
XM_060458495.1	<i>Colletotrichum costaricense</i> IMI 309622	<i>Coffea</i> sp.	Costa Rica
XM_049294823.1	<i>Colletotrichum lupini</i> IMI 504893	<i>Lupinus albus</i>	France
XM_035474555.1	<i>Colletotrichum scovillei</i> TJNH1	<i>Capsicum annuum</i>	China

**2. การวิเคราะห์และการประมาณค่าความแตกต่างทางวิวัฒนาการ**

ลำดับนิวคลีโอไทด์จากฐานข้อมูลนำมาตรวจสอบและจัดลำดับด้วยโปรแกรม MEGA version X โดยใช้ฟังก์ชัน Multiple sequence alignments รูปแบบ ClustalW alignment (Thompson *et al.*, 1994) จากนั้นเปรียบเทียบความสัมพันธ์ของลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่างเชื้อรา ด้วยวิธีการ pairwise sequence comparison โดยใช้โปรแกรม sequence demarcation tool version 1.2 (SDTv 1.2) (Muhire *et al.*, 2014) กำหนดให้ค่า identify percentage มากกว่า 95 เปอร์เซ็นต์ บันทึก matrix of pairwise similarity scores และ plot of pairwise similarity scores เปรียบเทียบกับแผนผังวิวัฒนาการความสัมพันธ์แบบ UPGMA ที่ค่าความเชื่อมั่นเท่ากับ 1,000 ครั้ง ด้วยโปรแกรม MEGA version 11 (Tamura *et al.*, 2021)

ผล

1. ลำดับนิวคลีโอไทด์สำหรับการวิเคราะห์

จากการเปรียบเทียบความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ในเชื้อราสกุล *Colletotrichum* จำนวน 8 ไอโซเลท พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ necrosis and ethylene-inducing protein and ethylene inducing peptide มีความแตกต่างกัน 67 bp จาก 711 bp คิดเป็นค่าความแตกต่างของนิวคลีโอไทด์ระหว่าง 0.42–9.42 เปอร์เซ็นต์ โดยเชื้อรา *C. phormii* ไอโซเลท CBS 102054 (accession number: XM\_060585355.1) และ *C. godetiae* ไอโซเลท CBS 193.32 (accession number: XM\_060570280.1) มีความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์มากที่สุด คิดเป็น 9.42 และ 8.16 เปอร์เซ็นต์ ส่วนเชื้อรา *C. paranaense* ไอโซเลท IMI 384185 (accession number: XM\_060495914.1) มีความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์น้อยที่สุด (0.42 เปอร์เซ็นต์) (Figure 1A)

Table 1 Estimates of evolutionary divergence between 8 different isolates *Colletotrichum* sequences.

<i>Colletotrichum phormii</i> CBS102054								
<i>Colletotrichum godetiae</i> CBS193.32	0.04923							
<i>Colletotrichum tamarilloi</i> CBS129955	0.09845	0.08720						
<i>Colletotrichum abscissum</i> IMI504890	0.09845	0.08720	0.00563					
<i>Colletotrichum paranaense</i> IMI 384185	0.09705	0.08579	0.00985	0.00985				
<i>Colletotrichum costaricense</i> IMI309622	0.09845	0.08720	0.01406	0.01406	0.01266			
<i>Colletotrichum lupini</i> IMI504893	0.09705	0.08720	0.00563	0.00563	0.00985	0.01406		
<i>Colletotrichum scovillei</i> TJNH1	0.08579	0.08720	0.02391	0.02391	0.02250	0.02672	0.02391	

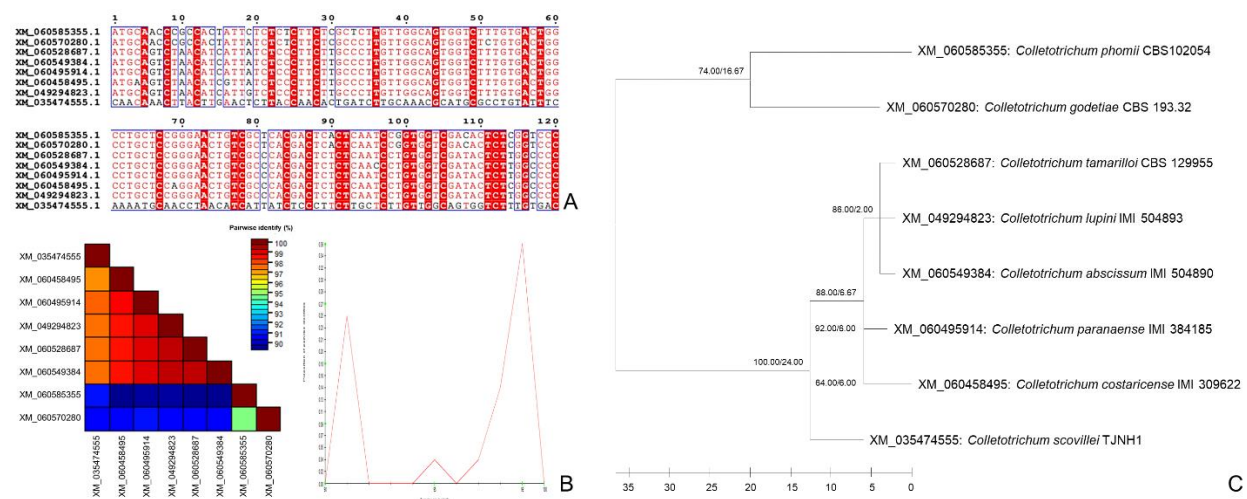


Figure 1 The genetic variability of the ethylene sensing gene in 8 isolates of *Colletotrichum*, nucleotide differentiation (A), and UPGMA phylogenetic tree relationships (B). The pairwise sequence comparison using sequence demarcation tool version 1.2 (SDTv 1.2) configured identify percentage more than 95%. The matrix of pairwise similarity scores and plot of pairwise similarity scores were recorded (C).

2. การวิเคราะห์และการประมาณค่าความแตกต่างทางวิวัฒนาการ

ผลการวิเคราะห์ pairwise sequence comparison พบว่าค่าความแตกต่างเชิงวิวัฒนาการระหว่างสายพันธุ์มีค่าระหว่าง 0.0056-0.0985 ซึ่งมีความแตกต่างกันค่อนข้างสูง คิดเป็น 0.0929 โดยเชื้อรา *C. phormii* ไอโซเลท CBS 102054 (accession number: XM\_060585355.1) และ *C. godetiae* ไอโซเลท CBS 193.32 (accession number: XM\_060570280.1) มีความแตกต่างสูงที่สุด (ค่า pairwise identity น้อยกว่า 94 เปอร์เซ็นต์) ในขณะที่เชื้อราอีก 6 ไอโซเลท มีค่า pairwise identity มากกว่า 97 เปอร์เซ็นต์ (Table 1; Figure 1B) และเมื่อทำการสร้างแผนผังวิวัฒนาการแบบ UPGMA พบว่าให้ผลที่สอดคล้องกัน คือ เชื้อรา *C. phormii* ไอโซเลท CBS 102054 และ *C. godetiae* ไอโซเลท CBS 193.32 แยกออกจากเชื้อราไอโซเลทอื่นอย่างชัดเจน โดยมีค่าความเชื่อมั่น (bootstrap value) เท่ากับ 100.00 เปอร์เซ็นต์ และยังมีความแตกต่างในระหว่างกลุ่มเท่ากับ 74.00 เปอร์เซ็นต์ สำหรับเชื้อราไอโซเลทอื่นๆจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกันโดยมีค่าความเชื่อมั่นเท่ากับ 88.00 เปอร์เซ็นต์ ยกเว้นเชื้อรา *C. scovillei* ไอโซเลท TJNH1 (accession number: XM\_035474555.1) ที่แยกตัวออกจากกลุ่มดังกล่าว (ค่าความเชื่อมั่นเท่ากับ 100.00 เปอร์เซ็นต์) ตามลำดับ (Figure 1C)

### วิจารณ์ผล

จากการศึกษาความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ รวมถึงแผนผังวิวัฒนาการความสัมพันธ์ระหว่างเชื้อรา *Colletotrichum* ซึ่งเป็นเชื้อก่อให้เกิดโรคลำต้นการเก็บเกี่ยวเกี่ยวกับพืชเศรษฐกิจหลายชนิด ผลการทดลองพบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนบริเวณ Necrosis- and ethylene-inducing peptide (NLPs) ที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรคมืดความแปรปรวนประมาณ 0.0056-0.0985 ซึ่งถือว่ามีความแปรปรวนค่อนข้างสูง โดยเฉพาะในเชื้อราในสกุลดังกล่าว ซึ่งมีความแปรปรวนทางพันธุกรรมที่สูงอยู่แล้ว (Bincader *et al.*, 2022) สำหรับยีน NLPs เป็นยีนที่พบในสิ่งมีชีวิตจำพวกเชื้อราและแบคทีเรียสาเหตุโรค โดยเฉพาะเชื้อราใน Kingdom Straminipila และ Kingdom Fungi (Oome and Van den Ackerveken, 2014) กลไกการทำงานของยีน NLPs ส่วนใหญ่เกี่ยวข้องกับการกระตุ้นการตายของเซลล์และการสังเคราะห์เอทิลีน โดยเฉพาะในพืชใบเลี้ยงเดี่ยวหลายชนิด (Lenarčič *et al.*, 2017) ตัวกระตุ้นของยีน NLPs คาดว่าเกิดจาก Glycosylinositol phosphorylceramide (GIPC) และโครงสร้างของโปรตีนที่ผลิตโดยยีน NLPs ซึ่งใช้สำหรับการจับน้ำตาลที่เปลี่ยนมาจากแป้ง โดยเฉพาะในพืชผลที่มีการสุกแก่ (Lenarčič *et al.*, 2017) การทราบถึงความแปรปรวนของยีนดังกล่าวอาจไม่สามารถประยุกต์ใช้ได้โดยตรงกับการจัดการหลังการเก็บเกี่ยว แต่ในทางอ้อมสามารถอธิบายถึงการเกิดโรคลำต้นการเก็บเกี่ยวโดยเฉพาะในเชื้อราสกุล *Colletotrichum* ที่มีการเข้าทำลายแบบแฝง ซึ่งหากประยุกต์ใช้ร่วมกับกระบวนการเทคโนโลยีชีวภาพ อาทิ การตรวจสอบสิ่งเร้าจากกระบวนการเสื่อมสภาพของผลผลิตทางการเกษตร (Deterioration pathway) ด้วยวิธี LAMP, real time PCR หรือ Transcriptome ก็อาจสามารถหาวิธีการลดการแสดงออกของยีน ซึ่งจะเป็นการป้องกันการแสดงออกของเชื้อที่เข้าทำลายแฝง ซึ่งจะส่งผลต่อต้นทุนในการบริหารจัดการหลังการเก็บเกี่ยวที่ลดลงได้ต่อไปในอนาคต

### คำขอบคุณ

ขอขอบคุณห้องปฏิบัติการโรคพืชวิทยา สาขาวิชาพืชศาสตร์ คณะเทคโนโลยีการเกษตรและอุตสาหกรรมเกษตร และห้องปฏิบัติการราวิทยา ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ที่เอื้อเฟื้อทุนวิจัย ข้อมูล และอุปกรณ์สำหรับภาควิเคราะห์ในครั้งนี้

### สรุป

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนบริเวณ NLPs เกี่ยวข้องกับการเกิดโรคของเชื้อราสกุล *Colletotrichum* ซึ่งสอดคล้องกับความแปรปรวนที่สูงทางพันธุกรรมของเชื้อราสกุลดังกล่าว ซึ่งสามารถอธิบายถึงกระบวนการเกิดโรคลำต้นการเก็บเกี่ยวและการเข้าทำลายแบบแฝงของเชื้อราสกุลนี้ในพืชเศรษฐกิจที่สำคัญหลายชนิด

### เอกสารอ้างอิง

- Bincader, S., R. Pongpisutta and C. Rattanakreetakul. 2022. Diversity of *Colletotrichum* species causing anthracnose disease from mango cv. Nam Dork Mai See Tong based on ISSR-PCR. *Indian Journal of Agricultural Research* 56(1): 81-90.
- Lenarčič, T., I. Albert, H. Böhm, V. Hodnik, K. Pirc, A.B. Zavec, M. Podobnik, D. Pahovnik, E. Žagar, R. Pruitt, P. Greimel, A. Yamaji-Hasegawa, T. Kobayashi, Aa Zienkiewicz, J. Gömann, J.C. Mortimer, L. Fang, A. Mamode-Cassim, M. Deleu, L. Lins, C. Oecking, I. Feussner, S. Mongrand, G. Anderluh and T. Nürnberger. 2017. Eudicot plant-specific sphingolipids determine host selectivity of microbial NLPs cytolysins. *Science* 358: 1431.
- Muhire, B.M., A. Varsani and D.P. Martin. 2014. SDT: A virus classification tool-based on pairwise sequence alignment and identity calculation. *PLoS One* 9: e108277.
- Oome, S. and G. Van den Ackerveken. 2014. Comparative and functional analysis of the widely occurring family of nep1-like proteins. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 27: 1081-1094.
- Silva, D.D., P.W. Crous, P.K. Ades, K.D. Hyde and P. Taylor. 2017. Life styles of *Colletotrichum* species and implications for plant biosecurity. *Fungal Biology Reviews* 31: 155-168.
- Tamura, K., G. Stecher and S. Kumar. 2021. MEGA11: Molecular evolutionary genetics analysis version 11. *Molecular Biology and Evolution* 38(7): 3022-3027.
- Thompson, J.D., D.G. Higgins and T.J. Gibson. 1994. CLUSTAL W: 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.