

ABSTRACT

Aphanomyces invadans was cultured in peptone glucose medium (PG-1), a regular medium used in laboratory, and fish-extracted glucose medium (FG), a modify medium by replace mycological peptone with fish-extracted in the same amount of protein. The growth of fungus in these media was not statistically different. The growth was 0.02 and 0.04 g/day when grew in PG-1 and FG, respectively. The proteinase activity from PG-1 and FG culture filtrate from 3-15 days was not statistically different. The proteinase activity in the presence of proteinase inhibitors indicated that the fungus produced 85% of non-trypsin type serine proteinase and 30% of cysteine proteinase when grew in PG-1 whereas, it produced 55% of non-trypsin type serine proteinase, 15% of trypsin and 40% of cysteine proteinase when cultured in FG. The cysteine proteinase and trypsin gene fragments were amplified by PCR using the degenerated primers designed from consensus sequences of the known proteins. The cysteine proteinase gene fragment was 513 bp and the deduced amino acid was similar to cysteine proteinase from fungi and plants. The trypsin gene fragment was 428 bp and the deduced amino acid was similar to trypsin from fungi and insects. The gene expression by RT-PCT technique revealed that these genes were up-regulated when the fungus was grown in FG compared to PG-1. The results revealed that the expression of cysteine proteinase and trypsin of *A. invadans* is specifically induced by fish protein, implying the role as the virulence factors toward the host.

บทคัดย่อ

เมื่อทำการเลี้ยงรา *Aphanomyces invadans* ในอาหารเลี้ยงราสูตร peptone glucose (PG-1) ซึ่งเป็นสูตรที่เลี้ยงในห้องปฏิบัติการเปรียบเทียบกับอาหารสูตร fish-extract glucose (FG) ซึ่งเป็นสูตรปรับปรุงโดยใช้น้ำซูปลาแทนการใช้ mycological peptone ในปริมาณโปรตีนที่เท่ากัน พบว่าการเจริญของราในอาหารเลี้ยงราทั้งสองสูตรแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ โดยในอาหารสูตร PG-1 และ FG รามีการเจริญ 0.02 และ 0.04 กรัมต่อวันตามลำดับ เมื่อศึกษากิจกรรมของเอนไซม์โปรตีนเนส พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรตีนเนสในอาหารสูตร PG-1 และ FG เมื่อเลี้ยงรา 3-15 วัน แตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อวัดกิจกรรมของเอนไซม์โปรตีนเนสโดยเติม proteinase inhibitor พบว่าในอาหารสูตร PG-1 ราสร้าง serine proteinase ที่ไม่ใช่ trypsin ประมาณ 85% และ cysteine proteinase ประมาณ 30% ในขณะที่อาหารสูตร FG ราสร้างเอนไซม์ในกลุ่มของ serine proteinase ประมาณ 70% สามารถจัดจำแนกเป็น trypsin ประมาณ 15% และเอนไซม์ serine proteinase ที่ไม่ใช่ trypsin ประมาณ 55% และ cysteine proteinase ประมาณ 40% เมื่อทำการโคลนนิ่งโดยใช้ degenerate primer ที่ออกแบบมาจากบริเวณอนุรักษ์ของโปรตีนเนสยีนในฐานข้อมูล สามารถได้ชิ้นส่วนของ cysteine proteinase ขนาด 513 bp ซึ่งลำดับของ deduced amino acid เหมือนกับ cysteine proteinase ของราและพืช และชิ้นส่วนของ trypsin ขนาด 428 bp ซึ่งลำดับของ deduced amino acid เหมือนกับ trypsin ของราและแมลง เมื่อศึกษาการแสดงออกของโปรตีนเนสยีนทั้งสองชนิดโดยใช้เทคนิค RT-PCR พบว่ารามีการแสดงออกของยีนเมื่อเลี้ยงในอาหารสูตร FG มากกว่าในอาหารสูตร PG-1 กิจกรรมของเอนไซม์และการแสดงออกของยีนที่เพิ่มมากขึ้นในอาหารสูตร FG บ่งชี้ได้ว่าเป็นผลจากการชักนำอย่างจำเพาะเจาะจงโดยโปรตีนจากเนื้อปลา จึงมีความเป็นไปได้ว่าโปรตีนเนสทั้งสองชนิดอาจจะมีการแสดงออกมากและมีมากในขณะที่เกิดการก่อโรคในปลาและทำหน้าที่เป็น virulence factor