

เมทิลจัสโมเนทและการทำให้เกิดแผลกระตุ้นการแสดงออกของยีน *sesquiterpene synthase* ในเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงพลู

Methyl jasmonate and wounding upregulated *Sesquiterpene synthase* gene expression in *Piper betle* L. tissue culture

กำไร วรนุช¹, รัตติกานต์ บัวเรือง², อนูปันท์ กงบังเกิด¹, คำพร รัตนสุต³, ชนนิษฐ์ ชูพยัคฆ์^{2,4*}

Kamrai Woranoot¹, Rattikarn Buaruaeng², Anupan Kongbangkerd¹, Kumrop Ratanasut³, Chonnanit Choopayak^{2,4*}

¹ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร พิษณุโลก 65000

²ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร พิษณุโลก 65000

³ภาควิชาวิทยาศาสตร์การเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยนเรศวร พิษณุโลก 65000

⁴สถานวิจัยเพื่อความเป็นเลิศทางวิชาการ ด้านเทคโนโลยีชีวภาพทางการแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร พิษณุโลก 65000

¹Department of Biology, Faculty of Science, Naresuan University, Phitsanulok 65000, Thailand

²Department of Biochemistry, Faculty of Medical Science, Naresuan University, Phitsanulok 65000, Thailand

³Department of Agricultural Science, Faculty of Agriculture, Nature Resources and Environment, Naresuan University, Phitsanulok 65000, Thailand

⁴Centre of Excellent in Medical Biotechnology, Naresuan University, Phitsanulok 65000, Thailand

*Corresponding author: chonnanitc@nu.ac.th

บทคัดย่อ

สารเซสควิเทอร์ปีนเป็นสารอินทรีย์ระเหยง่ายที่พบได้ในพลู ถึงแม้ว่าสารในกลุ่มนี้มีฤทธิ์ทางชีวภาพหลากหลายแต่การใช้ประโยชน์จากสารยังคงมีอยู่จำกัดเนื่องจากโครงสร้างโมเลกุลของสารซับซ้อน ทำให้การสังเคราะห์โดยขบวนการทางเคมีทำได้ยาก นอกเหนือจากนั้นพืชเองก็สังเคราะห์ได้ไม่เพียงพอ การใช้เทคโนโลยีทางชีวภาพเข้ามาช่วย จึงเป็นทางเลือกสำหรับการเพิ่มการผลิตสารกลุ่มนี้ได้ งานวิจัยนี้จึงได้ทำการศึกษาหาปัจจัยกระตุ้นการแสดงออกของยีน *sesquiterpene synthase* (STS) ซึ่งเป็นเอนไซม์หลักในวิถีสังเคราะห์สารเซสควิเทอร์ปีนในเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงพลู โดยฉีดพ่นเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงพลูอายุ 10 สัปดาห์ ด้วยสารเมทิลจัสโมเนท

ซาลิไซเลท ไคโตซาน เซลลูเลส และการทำให้เกิดบาดแผลบนใบ หลังจากนั้นทำการวัดระดับทรานสคริปของ STS ด้วยวิธี reverse transcription PCR (RT-PCR) และ real-time quantitative PCR (RT-qPCR) พบว่าระดับทรานสคริปของ STS สูงที่สุด เมื่อพลูได้รับ MeJA 100 μ M เป็นเวลา 12 ชั่วโมง นอกเหนือจากนั้นการทำให้เกิดบาดแผลมีผลกระตุ้นการแสดงออกของยีน STS ด้วยการค้นพบนี้แสดงให้เห็นถึงกลไกที่พลูใช้ตอบสนองต่อสถานะเครียดจากสิ่งแวดล้อม โดยการส่งสัญญาณผ่านเมทิลจัสโมเนทและการเพิ่มการสร้างสารเซสควิเทอร์ปีนด้วยการกระตุ้นเอนไซม์ *sesquiterpene synthase* ความรู้ที่ได้จะเป็นประโยชน์ต่อการพัฒนาวิธีการเพื่อเพิ่มการผลิตสารเซสควิเทอร์ปีนเพื่อนำไปประยุกต์ใช้ต่อไป

ABSTRACT

Sesquiterpenes are volatile organic compounds found in *Piper betle* L. Even though the compounds have varieties of biological properties, their applications have still been limited. Because of the complexity of the chemical structure, the synthesis by chemical processes is difficult. Moreover, the sesquiterpene quantity biosynthesized in *P. betle* is not enough. Biotechnology is an alternative way for promotion of sesquiterpene production. Hence in this paper, the gene expression inducers of *sesquiterpene synthase* (*STS*), the key enzyme of sesquiterpene biosynthesis pathway, were investigated in the *P. betle* tissue culture. Methyl jasmonate, salicylate, chitosan, cellulase and mechanical wounding were applied to the ten-week-old betel tissue culture. Afterwards, the *STS* mRNA level was measured by reverse transcription PCR (RT-PCR) and real-time quantitative PCR (RT-qPCR) techniques. The results demonstrated that the highest *STS* level was detected after 100 μ M MeJA subjection for 12 hours. Furthermore, the wounding was also able to upregulate *STS* expression. The finding might reveal the mechanism which *P. betle* responded to environmental stresses through methyl jasmonate signaling and then the sesquiterpene production via sesquiterpene synthase activation. The gained knowledge will be useful for the method development in order to enhance sesquiterpene production for further applications.

คำสำคัญ: พลุ; เซสควิเทอร์ปีน; *sesquiterpene synthase*; การทำให้เกิดแผล; เมทิลจัสโมเนต

Keywords: *Piper betle* L.; sesquiterpene; sesquiterpene synthase; wounding; methyl jasmonate

บทนำ

เซสควิเทอร์ปีน ($C_{15}H_{24}$) เป็นสารอินทรีย์ระเหยง่ายในกลุ่มเทอร์ปีน เกิดจากหน่วยไอโซพรีนที่มีคาร์บอน 5

อะตอมต่อกัน 3 หน่วย ในธรรมชาติเซสควิเทอร์ปีนมีบทบาทสำคัญเกี่ยวกับการป้องกันตัวของพืชทั้งทางตรงและทางอ้อม ในทางตรงนั้นสารเซสควิเทอร์ปีนมีฤทธิ์ต้านเชื้อรา ต้านเชื้อแบคทีเรีย (Huanget *et al.*, 2012) และมีฤทธิ์ควบคุมการเจริญเติบโตของพืชอื่นที่อยู่รอบข้าง (Wang *et al.*, 2009) สำหรับในทางอ้อมนั้น พบว่าเมื่อพืชถูกหนอนกัดกิน พืชจะปล่อยสารกลุ่มนี้ออกไปสู่บรรยากาศเพื่อดึงดูดแมลงนักล่าให้เข้ามาทำลายหนอนศัตรูพืช (Kollner *et al.*, 2008) พืชสร้างสารเซสควิเทอร์ปีนที่ในไซโตพลาสซึมโดยผ่านวิถีเมวาโลเนต (Mevalonate pathway) เอนไซม์หลักในวิถีสังเคราะห์คือ sesquiterpene synthase (*STS*) พบว่าในธรรมชาติพืชมีการสังเคราะห์สารเซสควิเทอร์ปีนอยู่ตลอดเวลา (constitutive production) เพื่อไว้ใช้ในการปกป้องตนเอง และเมื่อพืชถูกกระตุ้นจากปัจจัยภายนอกบางชนิด พืชจะมีการสังเคราะห์สารนี้เพิ่มขึ้นอีก (inducible production) โดยพบว่าปัจจัยจากภายนอกเหล่านั้นกระตุ้นการแสดงออกของยีน *STS* เพิ่มการสังเคราะห์เอนไซม์ *STS* และมีผลเพิ่มการสังเคราะห์เซสควิเทอร์ปีนในที่สุด ปัจจัยดังกล่าวได้แก่ การทำให้เกิดบาดแผล (Wang *et al.*, 2009) จัสโมเนต (JA) เมทิลจัสโมเนต (MeJA) (Cheng *et al.*, 2007) ซาลิไซเลต (SA) (Ament *et al.*, 2006) เซลลูเลส (Piel *et al.*, 1997) และไคโตซาน (Obara *et al.*, 2002) เป็นต้น

สารเซสควิเทอร์ปีนพบได้ในพืชบางกลุ่มเท่านั้น โดยเฉพาะพืชในวงศ์พริกไทย (Piperaceae) ได้แก่ พลุ (*Piper betle* L.) พบว่าในพลุมีสารอินทรีย์ระเหยง่าย กลุ่มฟีนิลโพรพานอยด์และกลุ่มเซสควิเทอร์ปีน (Choopayak *et al.*, 2010) เป็นองค์ประกอบหลัก ทำให้พลุมีสรรพคุณทางยา เช่น ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ต้านการอักเสบ (Pin *et al.*, 2010) ฤทธิ์ควบคุมระดับน้ำตาลในเลือด (Arambewela *et al.*, 2005) ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย (Nalina and Rahim, 2007) และฤทธิ์ปรับสมดุลภูมิคุ้มกัน (Kanjwani *et al.*, 2008) สารเซสควิเทอร์ปีนที่พบในปริมาณมากในพลุ คือ β -caryophyllene (Choopayak *et al.*, 2010) สารนี้มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา เช่น ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Calleja *et al.*, 2013) เป็นยาชาเฉพาะที่ (Ghelardini *et al.*, 2001) ฤทธิ์ต้านมะเร็ง และฤทธิ์ต้านจุลชีพ (Dahham *et al.*, 2015)

จากความสำคัญดังที่กล่าวข้างต้น พลุจึงเป็นพืชที่เหมาะสมที่จะใช้เป็นต้นแบบในการศึกษาชีวสังเคราะห์

ของสารเซสควิเทอร์ปีน เนื่องจากพืชมมีการสร้างสารเซสควิเทอร์ปีนอยู่แล้ว ดังนั้นการหาปัจจัยจากภายนอกมากระตุ้นเอนไซม์ STS เพื่อให้มีการสร้างเซสควิเทอร์ปีนเพิ่มขึ้นเป็นปริมาณมากในพืชมจึงมีความเป็นไปได้ งานวิจัยนี้จึงได้ทำการศึกษาหาปัจจัยที่กระตุ้นการแสดงออกของยีน STS ได้ และหาสภาวะที่ปัจจัยเหล่านั้นกระตุ้นการแสดงออกของยีน STS ได้สูงสุด ความรู้ที่ได้จะเป็นประโยชน์ในการนำไปพัฒนาหาวิธีการเพื่อการผลิตสารเซสควิเทอร์ปีนในพืช หรือโดยใช้เทคโนโลยีชีวภาพเข้ามาช่วย เพื่อจะได้สารเซสควิเทอร์ปีนที่มีคุณภาพดี และปริมาณเพียงพอที่จะนำไปใช้ต่อไปได้

อุปกรณ์และวิธีการดำเนินการวิจัย

การเพิ่มจำนวนต้นพืชมในสภาพปลอดเชื้อ

นำข้อและยอดจากต้นพืชมที่ปลูกในโรงเรือนของหน่วยวิจัยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร มาฟอกฆ่าเชื้อด้วย คาร์เบนดาซิม 2% นาน 10 นาที โซเดียมไฮโปคลอไรต์ 15% นาน 10 นาที และเมอร์คิวริก (II) คลอไรด์ 0.1% นาน 10 นาที ตามลำดับ ล้างด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 2 ครั้ง จากนั้นตัดชิ้นส่วนพืชมให้มีขนาด 1 ซม. เลี้ยงบนอาหารสูตร MS (Murashige and Skoog, 1962) เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ให้แสง 12 ชั่วโมงต่อวัน ($20 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) เมื่อครบ 10 สัปดาห์ จะได้ต้นพืชมในสภาพปลอดเชื้อที่สามารถใช้ในการทดลองต่อไป

การกระตุ้นพืชด้วยปัจจัยต่างๆ

การศึกษาผลของปัจจัยต่างๆ ต่อการแสดงออกของยีน STS ทำโดยการฉีดพ่น 200 μM MeJA (Sigma-Aldrich, USA), 200 μM SA (Sigma-Aldrich, USA), ไคโตซาน 10 mg/L (Sigma-Aldrich, USA) และ 50 mg/L เซลลูโลส (phytotechnology laboratories, USA) บนใบพืชม ในกรณีกระตุ้นด้วยการทำให้เกิดบาดแผลใช้เข็มฉีดยาแทงที่ใบพืชม 20 ครั้ง ให้กระจายทั่วทั้งใบ สำหรับชุดการทดลองควบคุมให้ฉีดพ่นด้วยน้ำกลั่น เก็บตัวอย่างพืชเมื่อเวลาผ่านไป 12 ชั่วโมง โดยเก็บใบที่ 2 นับจากยอด ซึ่งให้ได้ 100 mg ห่อด้วยแผ่นฟอยล์ แช่ในไนโตรเจนเหลว จากนั้นนำไปศึกษาการแสดงออกของยีน STS ด้วยวิธี RT-PCR ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

การศึกษาหาความเข้มข้นที่ MeJA กระตุ้นการแสดงออกของยีน STS ได้สูงที่สุด โดยใช้ MeJA ความเข้มข้น 100, 200 และ 300 μM ฉีดพ่นบนใบพืชม ชุดการทดลองควบคุมใช้น้ำกลั่นฉีดพ่น เมื่อเวลาผ่านไป 12 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างพืช สำหรับการศึกษาหาเวลาที่ MeJA กระตุ้นการแสดงออกของยีน STS ได้สูงที่สุดนั้น เมื่อทราบความเข้มข้นของ MeJA ที่เหมาะสมแล้ว จึงเลือกความเข้มข้นนั้นมาฉีดพ่นบนใบพืชม เก็บตัวอย่างที่เวลา 0 6 12 และ 24 ชั่วโมง แล้วนำไปศึกษาการแสดงออกของยีน STS ด้วยวิธี RT-PCR และวิธี RT-qPCR ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

การสกัดอาร์เอ็นเอและการสังเคราะห์ cDNA

บดใบพืชม 100 มก. ที่แช่ในไนโตรเจนเหลวด้วยโกรงจนเป็นผงละเอียด ทำการสกัดอาร์เอ็นเอโดยใช้น้ำยา easy-RED™ Total RNA Extraction Kit (iNtRON Biotechnology, Korea) จากนั้นบ่มอาร์เอ็นเอด้วย DNase I (Sigma-Aldrich, USA) วิเคราะห์หาปริมาณและคุณภาพของอาร์เอ็นเอด้วยเครื่อง Nanodrop spectrophotometer (NanoDrop2000, Thermo Scientific) และ 1% agarose gel electrophoresis

การสร้าง cDNA สายแรกจากอาร์เอ็นเอ ใช้ RNA 500 ng และไพรเมอร์ Oligo dT18 (Invitrogen, USA) RiboLock RNase Inhibitor (Thermo Scientific, USA) และ RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific, USA) หลังจากบ่มที่ 42°C เป็นเวลา 90 นาที หยุดปฏิกิริยาที่ 70°C 10 นาที แล้วนำ cDNA ไปใช้ในการศึกษาต่อไป

ศึกษาการแสดงออกของยีน STS

ตรวจวัดการแสดงออกของ STS ด้วยเทคนิค Reverse transcription PCR (RT-PCR) ทำด้วยไพรเมอร์ NB-Probe-F2 และ NB-Probe-R2 (Table 1) โดยใช้ Actin เป็นยีนอ้างอิง ปฏิกริยาประกอบด้วย cDNA 2 μL , ไพรเมอร์ตัวละ 0.25 μM , 0.25 μM dNTP, 2.5 mM MgCl_2 และ Taq DNA polymerase (Thermo Scientific, USA) จากนั้นนำไปทำปฏิกิริยาด้วยเครื่อง BIO-RAD C1000 THERMAL CYCLER (Bio-Rad, USA) สภาวะที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาคือ 94°C 2 นาที 94°C 30 วินาที

55 °C 30 วินาที 72 °C 30 วินาที 28 รอบ ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่ได้ด้วย 1% agarose gel electrophoresis เปรียบเทียบขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอกับ ZR 100 bp DNA Marker (Zymo Research, USA)

ตรวจวัดการแสดงออกของ STS ด้วยเทคนิค Real-Time quantitative PCR (RT-qPCR) ทำด้วยไพรเมอร์ FwInt750 และ RvInt630 (Table 1) โดยใช้ *Actin* เป็นยีนอ้างอิง ปฏิบัติการประกอบด้วย cDNA 2 µl ไพรเมอร์ 0.25 µM และส่วนผสมของชุด RBC ThermOne™ Real-Time PCR Premix (SYBR Green) (RBC Bioscience, Taiwan) นำไปทำปฏิกิริยาที่ 95 °C 10 นาที 95 °C 30 วินาที 55 °C 30 วินาที 72 °C 30 วินาที

35 รอบ ด้วยเครื่อง LightCycler® 96 Real-Time PCR (Roche, US) จากนั้นวิเคราะห์ผลด้วยโปรแกรม LightCycler® 96 SW 1.1 โดยรายงานการแสดงออกของยีน STS เป็นจำนวนเท่าของความสัมพันธ์ระหว่างยีน STS และยีนอ้างอิง *Actin* (Relative normalized expression; $\Delta\Delta Cq$)

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วิเคราะห์ความแตกต่างของการแสดงออกของยีนพืชที่ได้รับการบำบัดและพืชควบคุมโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) ที่ $P \leq 0.05$ ด้วยโปรแกรม SPSS Statistics 17.0

Table 1 Primers used in this study.

Primers	Sequence 5'→3'	Tm (°C)
ACTINs-F	CATGAGACTACATACAACTCCATC	52.7
ACTINs-S	TCGTACTCAGCCTTGGAATCCAC	61.1
FwInt750	CGATATAGAAGGCATGTTGAGC	58.4
RvInt630	CATGAGATTGACCTCCTTGC	57.3
NB-Probe-F2	TAATCCCCTACATCAAAGCATAC	57.1
NB-Probe-R2	TCCAACCTAAAGATACCAAAAACAAG	56.4

ผลการทดลอง

พลูเพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ

เนื้อเยื่อพลูเพาะเลี้ยงที่ใช้ในการศึกษา อายุ 10 สัปดาห์ ได้มาจากการเพาะเลี้ยงจากส่วนข้อและยอดของพลูที่ปลูกไว้ในโรงเรือนเพาะชำ ถูกนำมาผ่านขั้นตอนการปลอดเชื้อ แล้วเพาะเลี้ยงในอาหาร MS เปลี่ยนถ่ายชิ้นส่วนในอาหาร MS และเลี้ยงจนได้พลูที่คงสภาพ ไม่มีความแปรปรวนในกลุ่มประชากร จึงถูกนำมาใช้ในการศึกษาต่อไป

การศึกษาผลของปัจจัยภายนอกต่อการแสดงออกของยีน STS

จากการกระตุ้นเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงพลูในสภาพปลอดเชื้อด้วย MeJA, SA, ไคโตซาน เซลลูโลส และการทำให้เกิดบาดแผล พบว่า MeJA กระตุ้นแสดงออกของยีน STS ได้มากที่สุด รองลงมาคือทำให้เกิดบาดแผล (Figure 1) ในขณะที่ SA มีการแสดงออกของยีน STS ไม่

แตกต่างจากชุดควบคุม สำหรับไคโตซาน และเซลลูโลส ทำให้การแสดงออกของยีน STS ลดลงเมื่อเทียบกับชุดควบคุม

ความเข้มข้นที่เหมาะสมของ MeJA

จากผลการศึกษาการแสดงออกของยีน STS ในใบพลูที่ถูกกระตุ้นด้วย MeJA ที่ความเข้มข้นต่างๆ กันนาน 12 100 ชั่วโมง (Figure 2) พบว่าผลผลิตดีเอ็นเอของ *Actin* และ STS คือ 270 bp และ 137 bp ตามลำดับ และ MeJA ความเข้มข้น 100 µM สามารถกระตุ้นการแสดงออกของ STS ได้มากที่สุด

เวลาที่เหมาะสมในการกระตุ้นด้วย MeJA

จากการฉีดพ่นพลูด้วย MeJA 100µM เป็นเวลา 0, 6, 12 และ 24 ชั่วโมง (Figure 3) พบว่าเมื่อเวลาผ่านไป 6 ชั่วโมง STS มีการแสดงออกมากขึ้นและแสดงออกมากที่สุดที่ 12 ชั่วโมง และลดลงเล็กน้อยที่ 24 ชั่วโมง

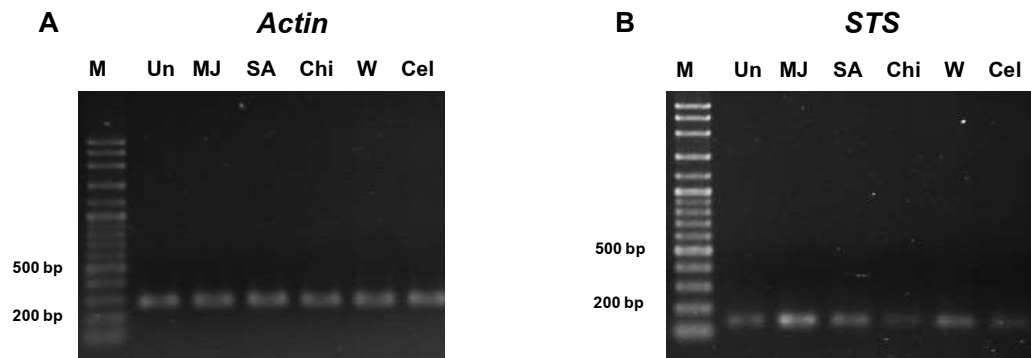


Figure 1 Transcription analysis of *Actin* and *STS* in *Piper betle* leaves upon different treatments for 12 hr. by RT-PCR. (A) *Actin* transcripts sized 270 bp (B) *STS* transcripts sized 137 bp. M: ZR100 bp DNA marker, MJ: 200 μM MeJA, SA: 200 μM SA, Chi: 10 mg/L chitosan and Cel: 50 mg/L cellulase.

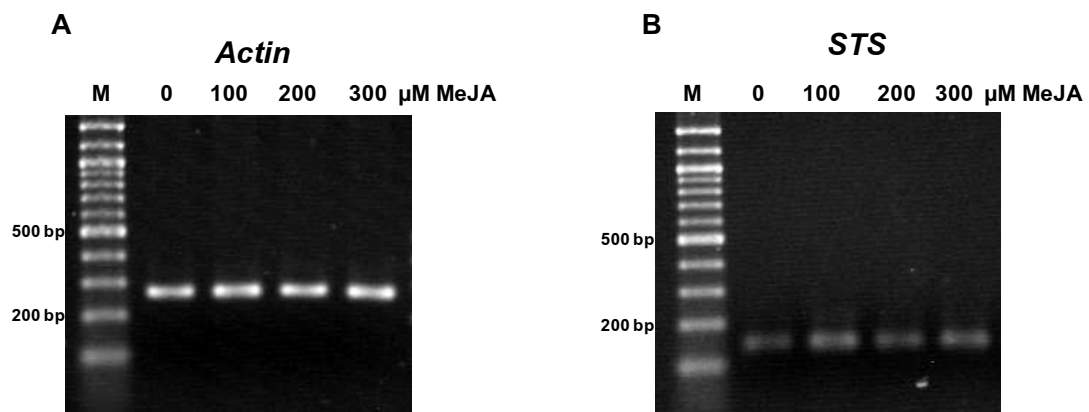


Figure 2 Transcription analysis of *Actin* and *STS* in *Piper betle* leaves induced by methyl jasmonate at different concentrations by RT-PCR. (a) *Actin* transcripts sized 270 bp (b) *STS* transcripts sized 137 bp. M: ZR 100 bp DNA marker.

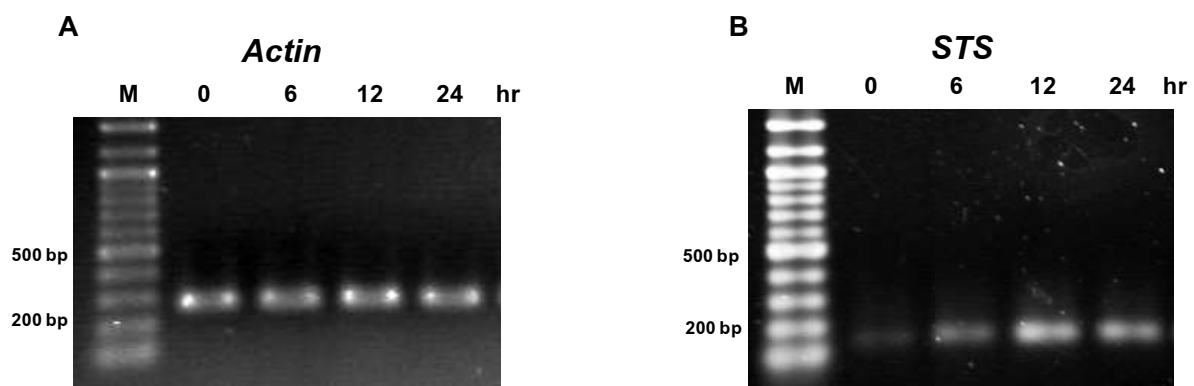


Figure 3 Transcription analysis of *Actin* and *STS* in *Piper betle* leaves treated by methyl jasmonate at different duration by RT-PCR. (a) *Actin* transcripts sized 270 bp (b) *STS* transcripts sized 137 bp. M: ZR100 bp DNA marker.

การศึกษาการแสดงออกของ STS ด้วยเทคนิค RT-qPCR

จากผลการศึกษาการแสดงออกของ STS ในใบพลูที่ถูกกระตุ้นด้วย 100 μ M MeJA และการทำให้เกิด

บาดแผล นาน 12 ชั่วโมง พบว่าทั้งสองปัจจัยสามารถกระตุ้นการแสดงออกของยีนได้แตกต่างจากตัวอย่างควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Figure 4)

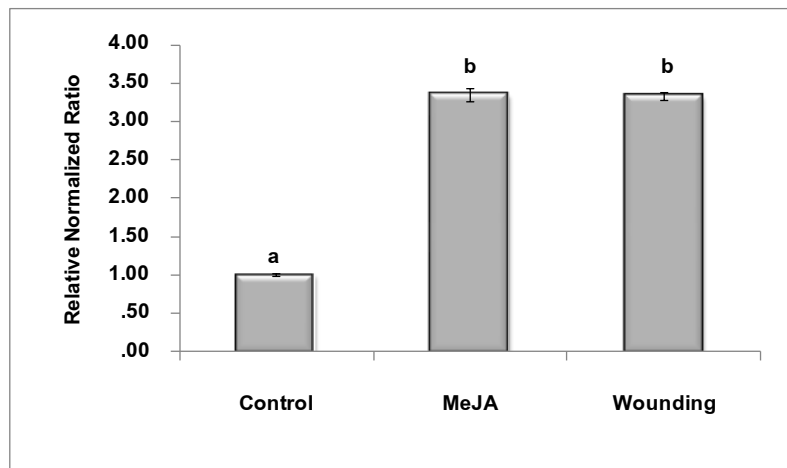


Figure 4 Expression analysis of STS in *P. betle* tissue culture upon methyl jasmonate and mechanical wounding treatments by RT-qPCR. The experiments were triplicate and significant at P -value ≤ 0.05

วิจารณ์ผลการทดลอง

ในธรรมชาติพลูสร้างสารเซสควิเทอร์ปีนขึ้นมาเพื่อป้องกันตัวทั้งทางตรงและทางอ้อม ในทางตรงนั้นพบว่าพลูได้สร้างสารเหล่านี้ไว้อยู่ตลอดเวลา เพื่อยับยั้งการรุกรานจากเชื้อจุลินทรีย์ แบคทีเรีย และ เชื้อรา (Kollner *et al.*, 2008) ในทางอ้อมนั้น เมื่อพลูถูกทำร้าย เช่นมีหนอนมากัดกิน พลูจะปล่อยสารเซสควิเทอร์ปีนออกสู่บรรยากาศเพื่อไปดึงดูดแมลงควบคุมศัตรูพืชให้เข้ามาทำลายหนอนศัตรูพืช โดยพบว่ากลไกที่พลูใช้ในการตอบสนองนี้ คือ เพิ่มการสร้างสารเซสควิเทอร์ปีนเพิ่มขึ้น โดยไปกระตุ้นการแสดงออกของยีน STS ซึ่งเป็นยีนสำหรับเอนไซม์ sesquiterpene synthase มีการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่า ฮอร์โมนพืชจัสโมเนต (MeJA) ซาลิไซเลต (SA) สารโคโตซาน เอนไซม์เซลลูเลส และการทำให้เกิดบาดแผล มีผลกระตุ้นการแสดงออกของยีน STS และเพิ่มการสร้างสารเซสควิเทอร์ปีนในพืชต่างๆ งานวิจัยนี้จึงได้ทำการศึกษาว่าปัจจัยดังกล่าวนี้มีผลต่อการแสดงออกของยีน STS ในพลูหรือไม่

จากผลการศึกษาในงานวิจัยนี้พบว่า จากปัจจัยที่ทดสอบทั้ง 5 ชนิด มีเพียง MeJA และการทำให้เกิดบาดแผล ที่สามารถกระตุ้นการแสดงออกของยีน STS ได้

ในขณะที่ SA ไม่เพิ่มการแสดงออกของยีน ในทางตรงกันข้ามสารโคโตซานและเซลลูเลส กลับลดการแสดงออกของยีน STS ลงเมื่อเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ได้รับปัจจัย โดยมีผลงานวิจัยรายงานก่อนหน้านี้ทั้งในทางที่สอดคล้องและในทางขัดแย้งกับผลการศึกษานี้ ดังต่อไปนี้

จัสโมเนตและเมทิลจัสโมเนต (JA/MeJA) คือฮอร์โมนที่พืชสร้างขึ้นเพื่อทำหน้าที่เป็นตัวส่งสัญญาณเมื่อถูกบุกรุกจากแมลงและเชื้อโรคชนิดที่เข้าทำลายให้เซลล์ตาย (Necrotrophic pathogen) (Smith *et al.*, 2009; War *et al.*, 2011) งานวิจัยของ Taniguchi และคณะ (Taniguchi *et al.*, 2014) แสดงให้เห็นว่า เมื่อนิ้ดพน JA ลงบนต้นข้าว จะกระตุ้นการแสดงออกของ *monoterpene synthase* gene และทำให้สร้างสารอินทรีย์ระเหยง่ายเพิ่มขึ้น ซึ่งกลไกนี้ถูกควบคุมโดย jasmonate ZIM domain protein (OsJAZ8) ผ่าน jamonate signalling pathway ซึ่งจากผลการวิจัยในครั้งนี้ที่พบว่า MeJA และการทำให้เกิดบาดแผลสามารถกระตุ้นการแสดงออกของยีน STS ได้เช่นกัน สอดคล้องกับงานวิจัยอื่นที่รายงานว่า ลำต้นสนที่ถูกนิ้ดพนด้วย MeJA และที่ถูกแมลงกัดจนเป็นบาดแผล สามารถกระตุ้นการแสดงออกของ STS เพิ่มขึ้นได้ โดยมีการแสดงออกมากที่สุด 12 ชั่วโมงหลังจากจาก

ฉีดพ่น MeJA (Miller *et al.*, 2005) นอกจากนี้ Cheng และคณะ (Cheng *et al.*, 2007) รายงานว่าใน transgenic *Arabidopsis thaliana* เมื่อฉีดพ่น MeJA มีการแสดงออกของยีน β -caryophyllene synthase เพิ่มขึ้น และสาร β -caryophyllene ที่สร้างขึ้นมานี้สามารถดึงดูดแตนเบียน (*Anagrus nilaparvatae*) ได้มากกว่าพืช wild-type อีกด้วย เช่นเดียวกับที่พบในใบของ *Artemisia annua* เกิดบาดแผล ทำให้ระดับการแสดงออกของยีน β -caryophyllene synthase เพิ่มขึ้นหลังจาก 24 ชั่วโมง (Cai *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2009) ในใบของ *Mikania amarantha* ที่ทำให้เกิดแผลด้วยกรรไกรมีแสดงออกของยีน β -caryophyllene synthase สูงที่สุดเมื่อเวลาผ่านไป 1 วัน ในขณะที่บางงานวิจัยพบว่า ในพืช *Picea abies* นั้น MeJA ไม่สามารถกระตุ้นการแสดงออกของยีน STS ได้ แต่สามารถกระตุ้นยีน monoterpene synthase และ diterpene synthase (Fäldt *et al.*, 2003)

ซาลิไซเลตและเมทิลซาลิไซเลต (SA/MeSA) เป็นฮอร์โมนพืชที่ตอบสนองต่อการบุกรุกจากเชื้อจุลินทรีย์ชนิดที่เข้าทำลายในเซลล์ที่มีชีวิตอยู่ (Biotrophic pathogen) พืชจะมีกลไกตอบสนองโดยทำให้เซลล์พืชมีการตายเกิดขึ้น เพื่อช่วยในการทำลายแหล่งอาหาร และยับยั้งการแพร่กระจายของเชื้อ เรียกกระบวนการนี้ว่า cell death (Brodersen *et al.*, 2005) มีรายงานว่า SA สามารถชักนำให้เกิดการแสดงออกของยีน geranylgeranyl pyrophosphate (GGPP) synthases ที่เกี่ยวข้องกับวิถีการสังเคราะห์สารเซสควิเทอร์ปีนในใบมะเขือเทศได้ (Ament *et al.*, 2006) นอกจากนี้ SA ยังสามารถกระตุ้นการแสดงออกของยีน Hydroxymethylglutaryl coenzyme A reductase (HMGR) ในวิถี MVA ให้แสดงออกมากขึ้นอีกด้วย (Pateraki and Kanellis, 2010) จากการที่ SA สามารถกระตุ้นยีนเหล่านี้ได้ ทำให้มีการผลิตสารควิเทอร์ปีนเพิ่มขึ้น แต่อย่างไรก็ตามยังไม่มีรายงานว่า SA สามารถกระตุ้นการแสดงออกของยีน STS ได้

ไคโตซานได้จากการย่อยไคตินที่เป็นองค์ประกอบของเปลือกแมลงและผนังเซลล์ของเชื้อจุลินทรีย์ เมื่อพืชถูกบุกรุก แมลงหรือเชื้อโรคไม่ว่าจะเป็นแบคทีเรียหรือเชื้อราจะปล่อยสารที่เป็นตัวกระตุ้นกลไกการป้องกันตัวของพืช ได้แก่ oligosaccharides, (glyco) proteins, (glyco) peptides และ lipids รวมถึงไค

โตซานด้วยเช่นกัน (Shibuya and Minami, 2001) มีรายงานว่าไคโตซานสามารถกระตุ้นกลไกการป้องกันตัวทำให้พืชต้านทานต่อเชื้อโรคได้ (Povero *et al.*, 2011; Sathiyabama *et al.*, 2014) นอกจากนี้ไคโตซานสามารถกระตุ้นการสร้าง β -caryophyllene ในข้าว (Obara *et al.*, 2002) และสารกลุ่มเซสควิเทอร์ปีนในมะเขือเทศได้ (Zhang and Chen, 2009) แต่บางรายงานพบว่าไคโตซานไม่สามารถกระตุ้นการสร้างสารกลุ่มเทอร์ปีนอยด์ในพืช *Ocimum basilicum* L. (Deschamps and Simonb, 2006)

ในกรณีของเอนไซม์เซลลูเลสที่ถูกปล่อยออกมาจากผู้บุกรุก เพื่อย่อยผนังเซลล์พืชซึ่งมีเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบหลักนั้น มีรายงานว่าเซลลูเลสสามารถกระตุ้นการสร้างสารกลุ่มเทอร์ปีนได้ เช่น เซลลูเลสจากเชื้อรา *Trichoderma viride* สามารถกระตุ้นการสร้างสารกลุ่มเทอร์ปีนอยด์ในพืช *Nicotiana plumbaginifolia*, *Phaseolus lunatus*, และ *Zea mays* ได้ (Piel *et al.*, 1997)

การทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าการแสดงออกของ STS ในพืชมุขกระตุ้นได้โดย MeJA และ wounding แสดงถึงความเป็นไปได้ที่พืชมุขจะตอบสนองต่อสภาวะเครียดจากสิ่งแวดล้อม เช่น การได้รับบาดเจ็บ โดยผ่านการทำงานของฮอร์โมนเมทิลจัสโมเนต และมีผลเพิ่มการสร้างสารเซสควิเทอร์ปีนในที่สุด ดังนั้นการทำให้พืชมุขได้รับบาดเจ็บ หรือ การเติมปัจจัยที่กระตุ้นให้พืชมุขสร้างเมทิลจัสโมเนต หรือ การเติมเมทิลจัสโมเนตลงโดยตรง จะสามารถเพิ่มการผลิตสารเซสควิเทอร์ปีนได้ โดยเฉพาะถ้าใช้เทคโนโลยีชีวภาพมาช่วยในการผลิตโดยใช้ปัจจัยที่เกี่ยวข้องดังกล่าวนี้มากระตุ้น จะสามารถควบคุมการผลิตสารเซสควิเทอร์ปีนให้มีคุณภาพดี ปริมาณสูงเพียงพอที่จะนำไปประยุกต์ใช้ทางด้านการแพทย์ เกษษกรรม และเกษตรกรรมได้ต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยนเรศวร ได้รับความอนุเคราะห์จากหน่วยวิจัยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ในการทำปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมุข สถาบันการศึกษาด้านวิทยาศาสตร์การแพทย์ คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร สำหรับเครื่องมือทางวิทยาศาสตร์ ขอขอบคุณ ดร.

สุพัชรี เนตรพันธุ์ สำหรับคำแนะนำในการวิเคราะห์ผลและ
เอื้อเพื่อไพรมอร์ *Actin*

เอกสารอ้างอิง

- Ament K, Chris C, SchieV, Bouwmeester HJ, Haring MA, Schuurink RC (2006) Induction of a leaf specific geranylgeranyl pyrophosphate synthase and emission of (E,E)-4,8,12-trimethyltrideca-1,3,7,11-tetraene in tomato are dependent on both jasmonic acid and salicylic acid signaling pathways. *Planta* 224: 1197–1208.
- Arambewela LS, Arawwawala LD, Ratnasooriya WD (2005) Antidiabetic activities of aqueous and ethanolic extracts of *Piper betle* leaves in rats. *J Ethnopharmacol* 102: 239–245.
- Brodersen P, Malinovsky FG, He´maty K, Newman M, Mundy J (2005) The role of salicylic acid in the induction of cell death in *Arabidopsis acd11*¹. *Plant Physiol* 138: 1037–1045.
- Cai Y, Jia J, Crock J, Lin Z, Chen X, Croteau R (2002) A cDNA clone for β -caryophyllene synthase from *Artemisia annua*. *Phytochemistry* 61: 523–529.
- Calleja MA, Vieites MJ, Montero-Meterdez T, Torres MI, Faus MJ, Gil A, Sua´rez A (2013) The antioxidant effect of β -caryophyllene protects rat liver from carbontetrachloride-induced fibrosis by inhibiting hepatic stellate cell activation. *Br J Nutr* 109: 394–401.
- Cheng AX, Xiang CY, Li JX, Yang CQ, Hu WL, Wang LJ, Lou YJ, Chen XY (2007) The rice (E)- β -caryophyllene synthase (OsTPS3) accounts for the major inducible volatile sesquiterpenes. *Phytochemistry* 68: 1632–1641.
- Choopayak C, Laksuk H, KongbangkerdA (2010) Volatile compounds from *Piper betle* Linn. sample collected from Phitsanulok Thailand by SPME method. 6th Naresuan Research Conference. Phitsanulok, Thailand. pp 79.
- Dahham SS, Tabana YM, Iqbal MA, Ahamed MBK, Ezzat MO, Majid MSA, Majid AMSA (2015) The anticancer, antioxidant and antimicrobial properties of the sesquiterpene β -caryophyllene from the essential oil of *Aquilaria crassna*. *Molecules* 20: 11808–11829.
- Deschamps C, Simonb JE (2006) Terpenoid essential oil metabolism in basil (*Ocimum basilicum* L.) following elicitation. *J Essent Oil Res* 18: 618–621.
- Fäldt J, Martin D, Miller B, Rawat S, Bohlmann J (2003) Traumatic resin defense in Norway spruce (*Piceaabies*): methyl jasmonate-induced terpene synthase gene expression, and cDNA cloning and functional characterization of (+)-3-carene synthase. *Plant MolBiol* 51: 119–133.
- Ghelardini C, Galeotti N, Mannelli LDC, Mazzanti G, Bartolini A (2001) Local anaesthetic activity of β -caryophyllene. *Il Farmaco* 56: 387–389.
- Huang M, Sanchez-Moreiras AM, Abel C, Sohrabi R, Lee S, Gershenzon J, Tholl D (2012). The major volatile organic compound emitted from *Arabidopsis thaliana* flowers, the sesquiterpene (E)- β -caryophyllene, is a defense against a bacterial pathogen. *New Phytol* 193: 997–1008.
- Kanjwani DGM, Chiplunkar TP, Sathaye SV (2008) Evaluation of immunomodulatory activity of methanolic extract of *Piper betel*. *Scand J Immunol* 67: 589–593.
- Kollner TG, Held M, Lenk C, Hiltbold I, Turlings TCJ, Gershenzon J (2008) A maize (E)- β -caryophyllene synthase implicated in indirect defense responses against herbivores is not expressed in most american maize varieties. *Plant Cell* 20: 482–494.
- Miller B, Madilao L, Ralph S, Bohlmann J (2005) Insect-induced conifer defense white pine weevil and methyl jasmonate induce *Traumatic Resinosis*, de novo formed volatile emissions, and accumulation of terpenoid synthase and

- putative octadecanoid pathway transcripts in sitka spruce. *Plant Physiol* 137: 369–382.
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473–497.
- Nalina T, Rahim ZHA (2007) The crude aqueous extract of *Piper betle* L. and its antibacterial effect towards *Streptococcus mutans*. *Am J Biochem Biotechnol* 3: 10–15.
- Obara N, Hasegawa M, Kodama O (2002) Induced volatiles in elicitor-treated and rice blast fungus-inoculated rice leaves. *Biosci Biotechnol Biochem* 66: 2549–2559.
- Pateraki I, Kanellis AK (2010) Stress and developmental responses of terpenoid biosynthetic genes in *Cistus creticus* sub sp. *Creticus*. *Plant Cell Rep* 29: 629–641.
- Piel J, Atzorn R, Gäbler R, Kühnemann F, Boland W (1997) Cellulysin from the plant parasitic fungus *Trichoderma viride* elicits volatile biosynthesis in higher plants via the octadecanoid signaling cascade. *FEBS Lett* 416: 143–148.
- Pin KY, Luqman Chuah A, Abdull Rashih A, Mazura MP, Fadzureena J, Vimala S, Rasadah MA (2010) Antioxidant and anti-inflammatory activities of extracts of betel leaves (*Piper betle*) from solvents with different polarities. *J Trop For Sci* 22: 448–455.
- Povero G, Loreti E, Pucciariello C, Santaniello A, Tommaso DD, Tommaso GD, Kapetis D, Zolezzi F, Piaggese A, Perata P (2011) Transcript profiling of chitosan-treated Arabidopsis seedlings. *J Plant Res* 124: 619–629.
- Sathiyabama MGA, Charles RE (2014) Chitosan-induced defence responses in tomato plants against early blight disease caused by *Alternaria solani* (Ellis and Martin) sorauer. *Arch Phytopath Plant Protect* 47: 1777–1787.
- Shibuya N, Minami E (2001) Oligosaccharide signalling for defence responses in plant. *Physiol Mol Plant Pathol* 59: 223–233.
- Smith JL, Moraes CM, Mescher MC (2009) Jasmonate- and salicylate-mediated plant defense responses to insect herbivores, pathogens and parasitic plants. *Pest Manag Sci* 65: 497–503.
- Taniguchi S, Miyoshi S, Tamaoki D, Yamada S, Tanaka K, Uji Y, Tanaka S, Akimitsu K, Gomi K (2014) Isolation of jasmonate-induced sesquiterpene synthase of rice: Product of which has an antifungal activity against *Magnaporthe oryzae*. *J Plant Physiol* 171: 625–632.
- Wang R, Peng S, Zeng R, Ding L, Wen L, Xu Z (2009) Cloning, expression and wounding induction of β -caryophyllene synthase gene from *Mikania micrantha* H.B.K. and allelopathic potential of β -caryophyllene. *Allelopathy J* 24: 35–44.
- War AR, Paulraj MG, War MY, Ignacimuthu S (2011) Role of salicylic acid in induction of plant defense system in chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Plant Signal Behav* 6: 1787–1792.
- Zhang P, Chen K (2009) Age-dependent variations of volatile emissions and inhibitory activity toward *Botrytis cinerea* and *Fusarium oxysporum* in tomato leaves treated with chitosan oligosaccharide. *J Plant Biol* 52: 332–339.