เมทิลจัสโมเนทและการทำให้เกิดแผลกระตุ้นการแสดงออกของยีน *sesquiterpene synthase* ในเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงพลู

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

กำไร วรนุช[1], รัตติกานต์ บัวเรือง[2], อนุพันธ์ กงบังเกิด[1], คำรพ รัตนสุต[3], ชนนิษฏ์ ชูพยัคฆ์[2,4]*

Kamrai Woranoot[1], Rattikarn Buaruaeng[2], Anupan Kongbangkerd[1], Kumrop Ratanasut[3], Chonnanit Choopayak[2,4]*

[1]ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร พิษณุโลก 65000

[2]ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร พิษณุโลก 65000

[3]ภาควิชาวิทยาศาสตร์การเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยนเรศวร พิษณุโลก 65000

[4]สถานวิจัยเพื่อความเป็นเลิศทางวิชาการ ด้านเทคโนโลยีชีวภาพทางการแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร พิษณุโลก 65000

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

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

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

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

**Corresponding author: chonnanitc@nu.ac.th*

บทคัดย่อ

สารเซสควิเทอร์ปีนเป็นสารอินทรีย์ระเหยง่ายที่พบได้ในพลู ถึงแม้ว่าสารในกลุ่มนี้มีฤทธิ์ทางชีวภาพหลากหลายแต่การใช้ประโยชน์จากสารยังคงมีอยู่จำกัด เนื่องจากโครงสร้างโมเลกุลของสารซับซ้อน 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 µM เป็นเวลา 12 ชั่วโมง นอกเหนือจากนั้นการทำให้เกิดบาดแผลมีผลกระตุ้นการแสดงออกของยีน *STS* ด้วย การค้นพบนี้แสดงให้เห็นถึงกลไกที่พลูใช้ตอบสนองต่อสภาวะเครียดจากสิ่งแวดล้อม 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 100μM 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: พลู; เซสควิเทอร์ปีน; *sesquiterpene synthase*; การทำให้เกิดแผล; เมทิลจัสโมเนท

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) พืชสร้างสารเซสควิเทอร์ปีนที่ในไซโตพลาสซึมโดยผ่านวิถีเมวาโลเนท (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) จัสโมเนท (JA) เมทิลจัสโมเนท (MeJA) (Cheng *et al*., 2007) ซาลิไซเลท (SA) (Ament *et al*., 2006) เซลลูเลส (Piel *et al*., 1997) และไคโตซาน (Obara et al., 2002) เป็นต้น

สารเซสควิเทอร์ปีนพบได้ในพืชบางกลุ่มเท่านั้น โดยเฉพาะพืชในวงศ์พริกไทย (Piperaceae) ได้แก่ พลู (*Piper betle* L.) พบว่าในพลูมีสารอินทรีย์ระเหยง่าย กลุ่มฟีนิลโพรพานอยด์และกลุ่มเซสควิเทอร์ปีน (Choopayak *et al*., 2010) เป็นองค์ประกอบหลัก ทำให้พลูมีสรรพคุณทางยา เช่น ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ต้านการอักเสบ (Pin *et al*., 2010) ฤทธิ์ควบคุมระดับน้ำตาลในเลือด (Arambewela *et al*., 2005) ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย (Nalina and Rahim, 2007) และฤทธิ์ปรับสมดุลภูมิคุ้มกัน (Kanjwani *et al*., 2008) สารเซสควิเทอร์ปีนที่พบในปริมาณมากในพลู 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 พลูจึงเป็นพืชที่เหมาะสมที่จะใช้เป็นต้นแบบในการศึกษาชีวสังเคราะห์

ของสารเซสควิเทอร์ปีน เนื่องจากพลูมีการสร้างสารเซสควิเทอร์ปีนอยู่แล้ว ดังนั้นการหาปัจจัยจากภายนอกมากระตุ้นเอนไซม์ STS เพื่อให้มีการสร้างเซสควิเทอร์ปีนเพิ่มขึ้นเป็นปริมาณมากในพลูจึงมีความเป็นไปได้ งานวิจัยนี้จึงได้ทำการศึกษาหาปัจจัยที่กระตุ้นการแสดงออกของยีน *STS* ได้ และหาสภาวะที่ปัจจัยเหล่านั้นกระตุ้นการแสดงออกของยีน *STS* ได้สูงสุด ความรู้ที่ได้จะเป็นประโยชน์ในการนำไปพัฒนาหาวิธีการเพื่อการผลิตสารเซสควิเทอร์ปีนในพืช หรือโดยใช้เทคโนโลยีชีวภาพเข้ามาช่วย เพื่อจะได้สารเซสควิเทอร์ปีนที่มีคุณภาพดี และปริมาณเพียงพอที่จะนำไปใช้ต่อไปได้

อุปกรณ์และวิธีการดำเนินการวิจัย

การเพิ่มจำนวนต้นพลูในสภาพปลอดเชื้อ

นำข้อและยอดจากต้นพลูที่ปลูกในโรงเรือนของหน่วยวิจัยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร มาฟอกฆ่าเชื้อด้วย คาร์เบนดาซิม 2% นาน 10 นาที โซเดียมไฮโปคลอไรด์ 15% นาน 10 นาที และเมอร์คิวริก (II) คลอไรด์ 0.1% นาน 10 นาที ตามลำดับ ล้างด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 2 ครั้ง จากนั้นตัดชิ้นส่วนพืชให้มีขนาด 1 ซม. เลี้ยงบนอาหารสูตร MS (Murashige and Skoog, 1962) เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25±2 °C ให้แสง 12 ชั่วโมงต่อวัน (20 μmol m^{-2} s^{-1}) เมื่อครบ 10 สัปดาห์ จะได้ต้นพลูในสภาพปลอดเชื้อที่สามารถใช้ในการทดลองต่อไป

การกระตุ้นพืชด้วยปัจจัยต่าง ๆ

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 เซลลูเลส (phytotechnology laboratories, USA) บนใบพลู ในกรณีกระตุ้นด้วยการทำให้เกิดบาดแผลใช้เข็มฉีดยาแทงที่ใบพลู 20 ครั้ง ให้กระจายทั่วทั้งใบ สำหรับชุดการทดลองควบคุมให้ฉีดพ่นด้วยน้ำกลั่น เก็บตัวอย่างพืชเมื่อเวลาผ่านไป 12 ชั่วโมง โดยเก็บใบที่ 2 นับจากยอด ชั่งให้ได้ 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 ฉีดพ่นบนใบพลู ชุดการทดลองควบคุมใช้น้ำกลั่นฉีดพ่น เมื่อเวลาผ่านไป 12 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างพืช สำหรับการศึกษาหาเวลาที่ MeJA กระตุ้นการแสดงออกของยีน *STS* ได้สูงที่สุดนั้น เมื่อทราบความเข้มข้นของ MeJA ที่เหมาะสมแล้ว จึงเลือกความเข้มข้นนั้นมาฉีดพ่นบนใบพลู เก็บตัวอย่างที่เวลา 0 6 12 และ 24 ชั่วโมง แล้วนำไปศึกษาการแสดงออกของยีน *STS* ด้วยวิธี RT-PCR และวิธี RT-qPCR ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

การสกัดอาร์เอ็นเอและการสังเคราะห์ cDNA

บดใบพลู 100 มก. ที่แช่ในไนโตรเจนเหลวด้วยโกร่งจนเป็นผงละเอียด 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 ไปใช้ในศึกษาต่อไป

ศึกษาการแสดงออกของยีน *STS*

ตรวจวัดการแสดงออกของ *STS* ด้วยเทคนิค Reverse transcription PCR (RT-PCR) ทำด้วยไพรเมอร์ NB-Probe-F2 และ NB-Probe-R2 (Table 1) โดยใช้ *Actin* เป็นยีนอ้างอิง ปฏิกิริยาประกอบด้วย cDNA 2 μl, ไพรเมอร์ตัวละ 0.25 μM, 0.25μM 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 ปฏิกิริยาประกอบด้วย 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; ΔΔCq)

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	TCGTACTCAGCCTTGGCAATCCAC	61.1
FwInt750	CGATATAGAAGGCATGTTGAGC	58.4
RvInt630	CATGAGATTGACCTCCTTGC	57.3
NB-Probe-F2	TAATCCCCTACATCAAAGCATAC	57.1
NB-Probe-R2	TCCAACTAAAGATACCAAAAACAAG	56.4

ผลการทดลอง

พลูเพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ

เนื้อเยื่อพลูเพาะเลี้ยงที่ใช้ในการศึกษา อายุ 10 สัปดาห์ ได้มาจากการเพาะเลี้ยงจากส่วนข้อและยอดของพลูที่ปลูกไว้ในโรงเรือนเพาะชำ ถูกนำมาผ่านขบวนการทำปลอดเชื้อ แล้วเพาะเลี้ยงในอาหาร MS เปลี่ยนถ่ายชิ้นส่วนในอาหาร MS และเลี้ยงจนได้พลูที่คงสภาพ ไม่มีความแปรปรวนในกลุ่มประชากร จึงถูกนำมาใช้ในการศึกษาต่อได้

การศึกษาผลของปัจจัยภายนอกต่อการแสดงออกของยีน *STS*

จากการกระตุ้นเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงพลูในสภาพปลอดเชื้อด้วย MeJA, SA, ไคโตซาน เซลลูเลส และการทำให้เกิดบาดแผล พบว่า MeJA กระตุ้นแสดงออกของยีน *STS* ได้มากที่สุด รองลงมาคือการทำให้เกิดบาดแผล (Figure 1) ในขณะที่ SA มีการแสดงออกของยีน *STS* ไม่แตกต่างจากชุดควบคุม สำหรับไคโตซาน และเซลลูเลส ทำให้การแสดงออกของยีน *STS* ลดลงเมื่อเทียบกับชุดควบคุม

ความเข้มข้นที่เหมาะสมของ MeJA

จากผลการศึกษาการแสดงออกของยีน *STS* ในใบพลูที่ถูกกระตุ้นด้วย MeJA ที่ความเข้มข้นต่างๆ กัน นาน 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

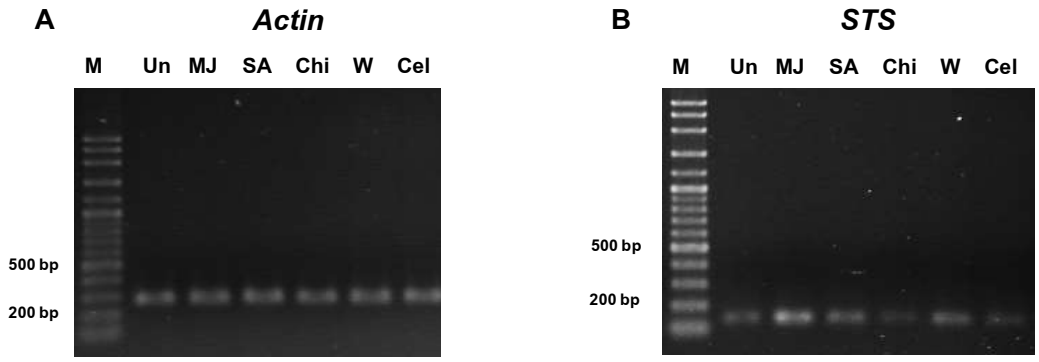

Figure 1 Transcription analysis of *Actin* and *STS* in *Piper betle* leaves upon different treatments for 12 hr. by RT-PCR. (A) *Actin* transcripts sized 270 bp (B) *STS* transcripts sized 137 bp. M: ZR100 bp DNA marker, MJ: 200 μM MeJA, SA: 200 μM SA, Chi: 10 mg/L chitosan and Cel: 50 mg/L cellulase.

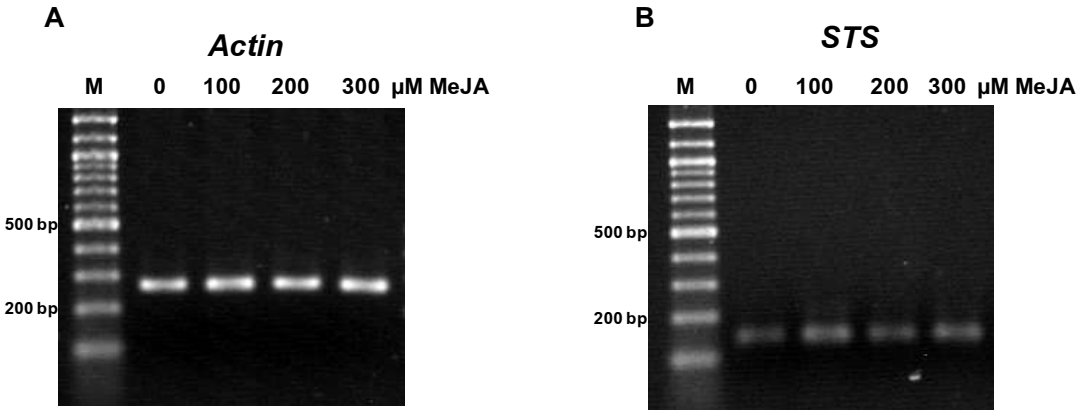

Figure 2 Transcription analysis of *Actin* and *STS* in *Piper betle* leaves induced by methyl jasmonate at different concentrations by RT-PCR. (a) *Actin* transcripts sized 270 bp (b) *STS* transcripts sized 137 bp. M: ZR 100 bp DNA marker.

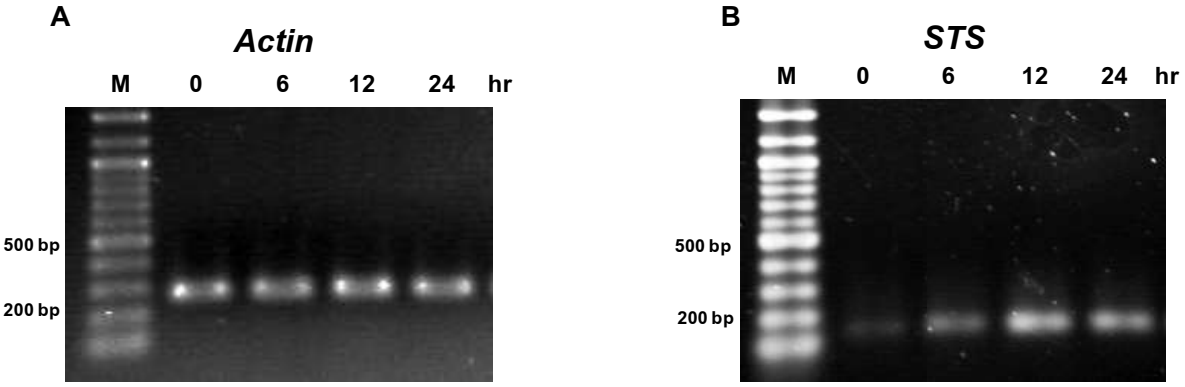

Figure 3 Transcription analysis of *Actin* and *STS* in *Piper betle* leaves treated by methyl jasmonate at different duration by RT-PCR. (a) *Actin* transcripts sized 270 bp (b) *STS* transcripts sized 137 bp. M: ZR100 bp DNA marker.

การศึกษาการแสดงออกของ *STS* ด้วยเทคนิค RT-qPCR

จากผลการศึกษาการแสดงออกของ *STS* ในใบพลูที่ถูกกระตุ้นด้วย 100 µM MeJA และการทำให้เกิดบาดแผล นาน 12 ชั่วโมง พบว่าทั้งสองปัจจัยสามารถกระตุ้นการแสดงออกของยีนได้แตกต่างจากตัวอย่างควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Figure 4)

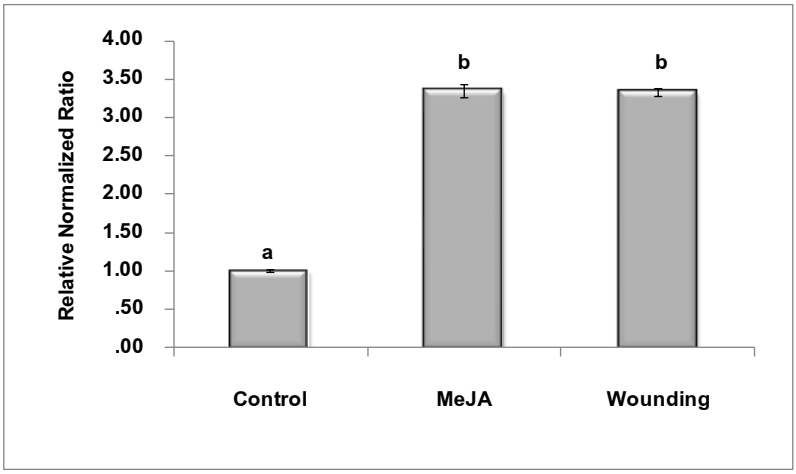

Figure 4 Expression analysis of *STS* in *P. betle* tissue culture upon methyl jasmonate and mechanical wounding treatments by RT-qPCR. The experiments were triplicate and significant at *P*-value ≤ 0.05

วิจารณ์ผลการทดลอง

ในธรรมชาติพลูสร้างสารเซสควิเทอร์ปีนขึ้นมาเพื่อป้องกันตัวทั้งทางตรงและทางอ้อม ในทางตรงนั้นพบว่าพลูได้สร้างสารเหล่านี้ไว้อยู่ตลอดเวลา เพื่อยับยั้งการรุกรานจากเชื้อจุลชีพ แบคทีเรีย และ เชื้อรา (Kollner *et al*., 2008) ในทางอ้อมนั้น เมื่อพลูถูกทำร้าย เช่นมีหนอนมากัดกิน พลูจะปล่อยสารเซสควิเทอร์ปีนออกสู่บรรยากาศเพื่อไปดึงดูดแมลงควบคุมศัตรูพืชให้เข้ามาทำลายหนอนศัตรูพืช โดยพบว่ากลไกที่พลูใช้ในการตอบสนองนี้ คือ เพิ่มการสร้างสารเซสควิเทอร์ปีนเพิ่มขึ้น โดยไปกระตุ้นที่การแสดงออกของยีน *STS* ซึ่งเป็นยีนสำหรับเอนไซม์ sesquiterpene synthase มีการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่า ฮอร์โมนพืชจัสโมเนท (MeJA) ซาลิไซเลท (SA) สารไคโตซาน เอนไซม์เซลลูเลส และการทำให้เกิดบาดแผล มีผลกระตุ้นการแสดงออกของยีน *STS* และเพิ่มการสร้างสารเซสควิเทอร์ปีนในพืชต่างๆ งานวิจัยนี้จึงได้ทำการศึกษาว่าปัจจัยดังกล่าวนี้มีผลต่อการแสดงออกของยีน *STS* ในพลูหรือไม่

จากผลการศึกษาในงานวิจัยนี้พบว่า จากปัจจัยที่ทดสอบทั้ง 5 ชนิด มีเพียง MeJA และ การทำให้เกิดบาดแผล ที่สามารถกระตุ้นการแสดงออกของยีน *STS* ได้ในขณะที่ SA ไม่เพิ่มการแสดงออกของยีน ในทางตรงกันข้ามสารไคโตซานและเซลลูเลส กลับลดการแสดงออกของยีน *STS* ลงเมื่อเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ได้รับปัจจัย โดยมีผลงานวิจัยรายงานก่อนหน้าทั้งในทางที่สอดคล้องและในทางขัดแย้งกับผลการศึกษานี้ ดังต่อไปนี้

จัสโมเนทและเมทิลจัสโมเนท (JA/MeJA) คือฮอร์โมนที่พืชสร้างขึ้นเพื่อทำหน้าที่เป็นตัวส่งสัญญาณเมื่อถูกบุกรุกจากแมลงและเชื้อโรคชนิดที่เข้าทำลายให้เซลล์ตาย (Necrotrophic pathogen) (Smith *et al*., 2009; War *et al*., 2011) งานวิจัยของ Taniguchi และคณะ (Taniguchi *et al*., 2014) แสดงให้เห็นว่า เมื่อฉีดพ่น JA ลงบนต้นข้าว จะกระตุ้นการแสดงออกของ *monoterpene synthase* gene และทำให้สร้างสารอินทรีย์ระเหยง่ายเพิ่มขึ้น ซึ่งกลไกนี้ถูกควบคุมโดย jasmonate ZIM domain protein (OsJAZ8) ผ่าน jamonate signalling pathway ซึ่งจากผลการวิจัยในครั้งนี้ที่พบว่า MeJA และการทำให้เกิดบาดแผลสามารถกระตุ้นการแสดงออกของยีน *STS* ได้เช่นกัน สอดคล้องกับงานวิจัยอื่นที่รายงานว่าลำต้นสนที่ถูกฉีดพ่นด้วย 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 เช่นเดียวกันกับที่พบในใบของ *Artemisia annua* เกิดบาดแผล ทำให้ระดับการแสดงออกของยีน *β-caryophyllene synthase* เพิ่มขึ้นหลังจาก 24 ชั่วโมง (Cai *et al*., 2002; Wang *et al*., 2009) ในใบของ *Mikania amicrantha* ที่ทำให้เกิดแผลด้วยกรรไกรมีแสดงออกของยีน *β-caryophyllene synthase* สูงที่สุดเมื่อเวลาผ่านไป 1 วัน ในขณะที่บางงานวิจัยพบว่า ในพืช *Picea abies* นั้น MeJAไม่สามารถกระตุ้นการแสงออกของยีน *STS* ได้ แต่สามารถกระตุ้นยีน *monoterpene synthase* และ *diterpene synthase* (Fäldt *et al*., 2003)

ซาลิไซเลทและเมทิลซาลิไซเลท (SA/MeSA) เป็นฮอร์โมนพืชที่ตอบสนองต่อการบุกรุกจากเชื้อจุลชีพชนิดที่เข้าทำลายในเซลล์ที่มีชีวิตอยู่ (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 รวมถึงไคโตซานด้วยเช่นกัน (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. (Deschampsa 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* ในพลูถูกกระตุ้นได้โดย MeJA และ wounding แสดงถึงความเป็นไปได้ที่พลูจะตอบสนองต่อสภาวะเครียดจากสิ่งแวดล้อม เช่น การได้รับบาดเจ็บ โดยผ่านการทำงานของฮอร์โมนเมทิลจัสโมเนท และมีผลเพิ่มการสร้างสารเซสควิเทอร์ปีนในที่สุด ดังนั้นการทำให้พลูได้รับบาดเจ็บ หรือ การเติมปัจจัยที่กระตุ้นให้พลูสร้างเมทิลจัสโมเนท หรือ การเติมเมทิลจัสโมเนทลงไปโดยตรง จะสามารถเพิ่มการผลิตสารเซสควิเทอร์ปีนได้ โดยเฉพาะถ้าใช้เทคโนโลยีชีวภาพมาช่วยในการผลิตโดยใช้ปัจจัยที่เกี่ยวข้องดังกล่าวนี้มากระตุ้น จะสามารถควบคุมการผลิตสารเซสควิเทอร์ปีนให้มีคุณภาพดี ปริมาณสูงเพียงพอที่จะนำไปประยุกต์ใช้ทางด้านการแพทย์ เภสัชกรรม และเกษตรกรรมได้ต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยนเรศวร ได้รับความอนุเคราะห์จากหน่วยวิจัยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ในการทำปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพลู สถานบริการวิชาการด้านวิทยาศาสตร์การแพทย์ คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร สำหรับเครื่องมือทางวิทยาศาสตร์ ขอบพระคุณ ดร.

สุพัชรี เนตรพันธุ์ สำหรับคำแนะนำในการวิเคราะห์ผลและเอื้อเฟื้อไพรเมอร์ *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.

Deschampsa 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, Hiltpold 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 biosyntheticgenes 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, Piaggesi 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 7171: 625–632.

Wang R, Peng S, Zeng R, Ding L, Wen L, XuZ (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.