Agricultural Sci. J. 47 : 3 (Suppl.) : 143-146 (2016) ว. วิทย. กษ. 47 : 3 (พิเศษ) : 143-146 (2559)

ผลของกรดซาลิไซลิกจากภายนอกต่อการสร้างโปรตีนในผลส้มเขียวหวานภายใต้สภาวะเครียด

Effect of Exogenous Salicylic Acid on Protein Synthesis in Tangerine (*Citrus reticulata* Blanco) Fruit under Stress

ไพบูลย์ ตั้นสกูล[1] สิทธิรักษ์ รอยตระกูล[2] นฤมล เผ่านักรบ[2] จันทิมา จเรสิทธิกุลชัย[2] และ วิจิตรา ลีละศุภกุล[1,*]

Paiboon Tunsagool[1], Sittiruk Roytrakul[2], Narumon Phaonakrop[2], Janthima Jaresitthikunchai[2], Wichitra Leelasuphakul[1,*]

Abstract

Salicylic acid (SA), a plant hormone, was investigated for its role in stress responses of tangerine fruit, including synthesis of some proteins in cell wall differentiation processes, carbohydrate and amino acid synthetic pathways. Tangerine fruit was collected from a commercial orchard in Songkhla province, Thailand. Exogenous SA at 250 μmol/L was dropped onto the two-wounded sites of the tangerine peel. The treated fruits were incubated at 25°C for 72 hours. Crude proteins were extracted from the treated flavedo tissues by 0.5% sodium dodecyl sulfate, then the crude proteins were precipitated by 0.15% deoxycholate and 72% trichloroacetic acid and further separated using SDS-PAGE. The whole proteins in the peel tissues were analyzed by the shotgun proteomics method. A separating gel was cut into 1x1 mm^2 pieces and digested with trypsin. The obtained peptides were then identified by LC-MS. The results showed that 4 out of 74 proteins were present in the SA-treated flavedo compared with the control (ethanol). Polyamine oxidase was identified to be involved in cell wall differentiation processes. Sucrose synthase 4 and phosphoglycerate dehydrogenase-like protein were associated with carbohydrate synthesis whereas B-type asparagine synthetase chloroplast precursor was involved in amino acid synthesis. This evidence suggests that exogenous SA plays an important role in promoting biological process in terms of protein accumulation in response to stress in tangerine fruit tissues.

Keywords: salicylic acid, stress response, tangerine

บทคัดย่อ

กรดซาลิไซลิกเป็นฮอร์โมนพืชชนิดหนึ่งที่เกี่ยวข้องกับการสร้างโปรตีนในกระบวนการเปลี่ยนแปลงของผนังเซลล์ การสังเคราะห์คาร์โบไฮเดรตและกรดอะมิโนที่ตอบสนองต่อสภาวะเครียดของผลส้ม ใช้ผลส้มเขียวหวานตัวอย่างที่ได้มาจากสวนที่ปลูกในจังหวัดสงขลา หยดสารละลายกรดซาลิไซลิก 250 ไมโครโมลต่อลิตร บนแผลของผิวเปลือกส้มที่เจาะรูกึ่งกลางระหว่างจุกส้มและก้นส้มสองจุดต่อผล บ่มที่ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง สกัดโปรตีนจากเนื้อเยื่อเปลือกส้มโดยสารละลายโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต 0.5% ตกตะกอนโปรตีนด้วยสารละลายดีออกซีคอเลต 0.15% และไทรคลอโรอะซีเทต 72% แยกโปรตีนด้วยเทคนิค SDS-PAGE ระบุชนิดโปรตีนด้วยวิธีช็อตกันโปรติโอมิกส์ โดยตัดชิ้นเจลให้มีขนาด 1x1 มม^2 ย่อยด้วยเอนไซม์ทริพซิน นำสายเพปไทด์ที่ได้เข้าเครื่องลิควิดโครมาโทกราฟี-แมสส์สเปกโทรเมตรี ผลการวิเคราะห์พบว่ามีโปรตีนจำนวน 74 ชนิด ที่เกิดขึ้นเฉพาะในชุดการทดลองที่ใช้กรดซาลิไซลิก เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม โดยโปรตีน 4 ชนิด เกี่ยวข้องกับการตอบสนองของพืชในสภาวะเครียด คือ (1) ซูโครสซินเทส 4 และ (2) ฟอสโฟกลีเซอเรต ดีไฮโดรจีเนส-ไลค์ โปรตีน เกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์คาร์โบไฮเดรต (3) บีไทป์ แอสพาราจีน ซีนทีเทส คลอโรพลาสต์ พรีเคอเซอร์ สัมพันธ์กับกระบวนการสังเคราะห์กรดอะมิโน และ (4) พอลิเอมีน ออกซิเดส เกี่ยวข้องกับกระบวนการเปลี่ยนแปลงของผนังเซลล์ จึงสรุปได้ว่ากรดซาลิไซลิกมีบทบาทสำคัญในกระบวนการทางชีวภาพของการสร้างโปรตีนในผลส้มเขียวหวานภายใต้สภาวะเครียด

คำสำคัญ: กรดซาลิไซลิก, การตอบสนองสภาวะเครียด, ส้ม

[1]ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ สงขลา 90112

[1]Department of Biochemistry, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Songkhla 90112

[2]ห้องปฏิบัติการวิจัยโปรติโอมิกส์ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ ปทุมธานี 12120

[2]Proteomics Research Laboratory, National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, National Science and Technology Development Agency, Pathum Thani 12120

[*]Corresponding author's e-mail: wichitra.l@psu.ac.th

คำนำ

ส้มเขียวหวาน (*Citrus reticulata* Blanco) เป็นส้มชนิดหนึ่งที่ได้รับความนิยมอย่างสูงในประเทศไทย อีกทั้งยังมีบทบาทสำคัญในการสร้างมูลค่าทางเศรษฐกิจ (วิภาดา และ ตระกูล, 2546) การเพาะปลูกส้มเขียวหวานจึงเป็นที่นิยมอย่างแพร่หลายในหมู่เกษตรกรไทย หากแต่มีเชื้อโรค เช่น เชื้อราเขียว (*Penicillium digitatum*) ซึ่งก่อให้เกิดโรคเน่าราเขียว เป็นต้น สามารถก่อตัวขึ้นได้ระหว่างการเก็บรักษาหลังการเก็บเกี่ยว ส่งผลให้เกิดความเสียหายต่อระบบเศรษฐกิจ (Marcet-Houben *et al*., 2012) การควบคุมคุณภาพของผลิตผลจึงเกิดขึ้น เพื่อให้ได้มาซึ่งผลส้มเขียวหวานคุณภาพดีสำหรับการเตรียมความพร้อมก่อนออกสู่ท้องตลาด โดยวิธีการที่ใช้ในการควบคุมโรคพืชนั้นมีหลากหลายวิธี เช่น การใช้ความร้อน การเก็บรักษาในสภาวะเย็น (Perotti *et al*., 2015) หรือ การควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี เป็นต้น

การควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี คือ การใช้สิ่งมีชีวิตหรือเชื้อจุลินทรีย์มายับยั้งหรือทำลายเชื้อโรค เพื่อไม่ให้สร้างความเสียหายต่อพืช เชื้อจุลินทรีย์เหล่านี้เรียกว่า เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์มีกลไกการยับยั้งหรือควบคุมเชื้อที่เป็นสาเหตุของโรคพืชอยู่ 4 รูปแบบคือ (1) การทำลายชีวิต (antibiosis) (2) การแข่งขัน (competition) (3) การเป็นปรสิต (parasitism) และ (4) การชักนำให้ต้านทานต่อโรค (induced host resistance) (นิพนธ์, 2553) นอกจากนี้ การใช้ฮอร์โมนพืชจากภายนอกเป็นอีกหนึ่งวิธีที่เกษตรกรนิยมใช้ เพื่อชักนำการต้านทานโรคพืชที่มีบทบาทสำคัญต่อกระบวนการที่เรียกว่า induced systemic resistance (ISR) และ systemic acquired resistance (SAR) ซึ่งมีกรดซาลิไซลิก (salicylic acid) เป็นตัวกลางในการเหนี่ยวนำกลไก SAR ของพืช (Vallad and Goodman, 2004)

กรดซาลิไซลิกเป็นฮอร์โมนพืชชนิดหนึ่ง ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่ม phenylpropanoid มีบทบาทที่สำคัญในการควบคุมการเจริญเติบโตของพืช การเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยา และเมทาบอลิซึมในพืชทั้งก่อนและหลังการเก็บเกี่ยว (สุรัสวดี, 2555) รวมถึงการตอบสนองต่อสภาวะเครียดของผลส้ม ปัจจุบันเกษตรกรจึงนำเอากรดซาลิไซลิกจากภายนอกมาประยุกต์ใช้ในเทคโนโลยีการจัดการหลังการเก็บเกี่ยวเพื่อควบคุมการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ในผลส้ม งานวิจัยครั้งนี้มุ่งศึกษาผลของกรดซาลิไซลิกจากภายนอกที่มีต่อการสร้างโปรตีนบางชนิดในผลส้มเขียวหวานภายใต้สภาวะเครียด

อุปกรณ์และวิธีการ

1 การเตรียมผลส้ม

ใช้ผลส้มเขียวหวาน ที่มีขนาด สีของผลที่ใกล้เคียงกัน ไม่เป็นแผลและรอยตำหนิมาใช้ในการทดลอง นำมาล้างด้วยน้ำประปา แช่ในโซเดียมไฮโปคลอไรต์ 1% นาน 5 นาที ผึ่งให้แห้ง ณ อุณหภูมิห้อง เช็ดด้วยเอทานอล 70% แล้วเจาะรูทำแผลบนผิวของผลส้ม 2 แผลต่อผล ณ จุดกึ่งกลางระหว่างจุกส้มและก้นส้ม ด้วยเข็มปราศจากเชื้อ โดยแผล 1 จุดมีขนาด 0.5 เซนติเมตร 5 รู ลึก 3 มิลลิเมตร

2 ชุดการทดลอง

แบ่งออกเป็น 2 ชุดการทดลอง คือ ใส่กรดซาลิไซลิก และชุดควบคุม โดยใช้ความเข้มข้น 250 ไมโครโมลต่อลิตร และสารละลายเอทานอล 80% ตามลำดับ หยดลงบนแผลของผลส้ม 20 ไมโครลิตรต่อแผล บ่มที่ 25 องศาเซลเซียส นาน 72 ชั่วโมง เก็บเนื้อเยื่อเปลือกส้มบริเวณรอบๆ แผลของผลส้มในรัศมี 1 เซนติเมตร บดให้เป็นผงโดยใช้ไนโตรเจนเหลว เก็บไว้ -80 องศาเซลเซียส

3 การสกัดโปรตีนจากเนื้อเยื่อเปลือกส้ม

ด้วยสารละลายโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต 0.5% ตกตะกอนโปรตีนด้วยสารละลายดีออกซีคอเลต 0.15% และไตรคลอโรอะซีเทต 72% ทิ้งข้ามคืนไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส เก็บส่วนที่เป็นตะกอนไว้ จากนั้นเติมอะซีโตนที่เย็นจัด ปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที เก็บส่วนที่เป็นตะกอนไว้ แล้วละลายตะกอนที่ได้ด้วยโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต 0.5% ในแต่ละชุดการทดลอง ปรับความเข้มข้นให้เป็น 50 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร แล้วนำไปแยกแถบโปรตีนด้วยเทคนิค SDS-PAGE

4 การวิเคราะห์เพื่อระบุชนิดโปรตีน

ด้วยวิธีช็อตกันโปรติโอมิกส์ (shotgun proteomics) โดยการตัดชิ้นเจลให้มีขนาด 1x1 มม^2 ย่อยโปรตีนในชิ้นเจลให้ได้สายเพปไทด์ด้วยเทคนิค in-gel digestion ด้วยเอนไซม์ทริพซิน แยกสายเพปไทด์ออกจากชิ้นเจลด้วยแอซีโตไนไทรล์ จากนั้นนำตัวอย่างที่ได้มาวิเคราะห์ชนิดโปรตีนด้วยเครื่องลิควิดโครมาโทกราฟี-แมสส์สเปกโทรเมตรี

ผล

พบว่าสารละลายกรดซาลิไซลิกจากภายนอกที่มีความเข้มข้น 250 ไมโครโมลต่อลิตร ที่ใช้หยดลงในแผลของเปลือกส้ม สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดโปรตีนจำนวน 1,089 ชนิด ส่วนสารละลายเอทานอล 80% ที่ใช้ในชุดควบคุม พบโปรตีนจำนวน 1,025 ชนิด โดยทั้ง 2 ชุดการทดลองมีโปรตีนที่เป็นชนิดเดียวกันจำนวน 1,015 ชนิด โปรตีนจำนวน 74 ชนิดเกิดขึ้นเฉพาะจากการเหนี่ยวนำโดยใช้กรดซาลิไซลิกจากภายนอกเท่านั้น (Figure 1) ทั้งนี้ มีโปรตีนจำนวน 4 ชนิด จาก 74 ชนิด ที่เกิดขึ้นในชุดการทดลองกรดซาลิไซลิกเกี่ยวข้องกับกระบวนการเปลี่ยนแปลงของผนังเซลล์ การสังเคราะห์คาร์โบไฮเดรตและกรดอะมิโนที่ตอบสนองต่อสภาวะเครียดของผลส้ม (Table 1)

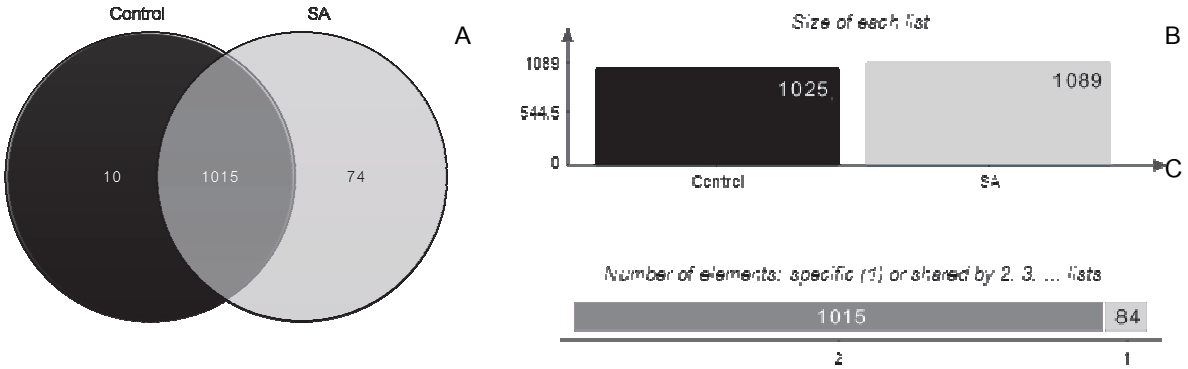

Figure 1 (A) Venn diagram representing a number of proteins in the salicylic acid treated citrus flavedo (gray colour), control (80% ethanol: black colour), and both treatments (gray-black colour). (B) A number of proteins in each treatment. (C) The same proteins (dark grey bar) and the total different proteins (light grey bar) in both treatments.

Table 1 Identification of citrus proteins related to cell wall differentiation processes, carbohydrate and amino acid synthetic pathways by exogenous salicylic acid induction.

Protein name	Protein function	Peptide	Relative molecular mass (Da)	Accession no.*
Sucrose synthase 4	Carbohydrate synthetic pathway	MANAER	707.1867	gi|22331535
Phosphoglycerate dehydrogenase-like protein	Carbohydrate synthetic pathway	KQAIMAIGVDDIPSK	1601.6015	gi|21536501
B-type asparagine synthetase chloroplast precursor	Amino acid synthetic pathway	SGSVGFISGLPDIMR	1551.0089	gi|303274306
Polyamine oxidase	Cell wall differentiation processes	EGYKGIMR	969.9969	gi|22002131

*Reference: The accession numbers can be obtained from NCBI database.

วิจารณ์ผล

อิทธิพลของกรดซาลิไซลิกจากภายนอกต่อการสร้างโปรตีนบางชนิดที่ตอบสนองต่อสภาวะเครียดของผลส้ม ที่ความเข้มข้น 250 ไมโครโมลต่อลิตร ชักนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโปรตีนบางชนิดที่สร้างขึ้นจำนวน 1,089 ชนิด และ 1,015 ชนิด ที่สร้างขึ้นเหมือนดังที่พบในชุดควบคุม แต่มีโปรตีนจำนวน 74 ชนิด ที่ถูกสร้างขึ้นเฉพาะในชุดการทดลองกรดซาลิไซลิกเท่านั้น ซึ่งโปรตีน 4 ชนิด ที่สามารถระบุชื่อชนิดและหน้าที่ คือ (1) ซูโครสซินเทส 4 (sucrose synthase 4) (2) ฟอสโฟกลีเซอเรต

ดีไฮโดรจีเนส-ไลค์ โปรตีน (phosphoglycerate dehydrogenase-like protein) เกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์คาร์โบไฮเดรต Subbaiah *et al*. (2007) และ Toujani *et al*. (2013) รายงานว่า โปรตีนทั้งสองชนิดนี้ มีส่วนช่วยในการเก็บสะสมน้ำตาลและการเสริมสร้างด้านโครงสร้างของผนังเซลล์และ (3) บีไทป์ แอสพาราจีน ซีนทีเทส คลอโรพลาสต์ พรีเคอเซอร์ (B-type asparagine synthetase chloroplast precursor) สัมพันธ์กับกระบวนการสังเคราะห์กรดอะมิโน โดยแอสพาราจีนจะมีอัตราส่วนระหว่างไนโตรเจนกับคาร์บอนที่สูง ซึ่งถือเป็นอีกแหล่งของคาร์บอนที่สำคัญสำหรับใช้ในการเจริญเติบโต (Tsai and Coruzzi,1991) และ (4) พอลิเอมีน ออกซิเดส (polyamine oxidase) เกี่ยวข้องกับกระบวนการเปลี่ยนแปลงของผนังเซลล์ (Angelini *et al*., 2008) ทั้งนี้ โปรตีนทั้งสี่ชนิดข้างต้น มีบทบาทสำคัญที่ช่วยในการเจริญเติบโตของผลส้ม ส่งผลในทิศทางที่ดีต่อการควบคุมคุณภาพของผลส้มเพื่อต้านทานความเสียหายที่อาจจะเกิดจากการรุกรานของเชื้อสาเหตุโรคเป็นต้น

สรุป

การใช้กรดซาลิไซลิกจากภายนอกที่มีความเข้มข้น 250 ไมโครโมลต่อลิตร หยดลงบนผิวของเปลือกส้มนั้น มีส่วนช่วยในการกระตุ้นการสังเคราะห์โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเปลี่ยนแปลงของผนังเซลล์ การสังเคราะห์คาร์โบไฮเดรตและกรดอะมิโนที่ตอบสนองต่อสภาวะเครียดของเปลือกผลส้ม อีกทั้งยังยืนยันได้ว่า กรดซาลิไซลิกจากภายนอกมีบทบาทสำคัญในกระบวนการทางชีวภาพของการสร้างโปรตีนเพื่อตอบสนองต่อสภาวะเครียดของผลส้ม

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณโครงการปริญญาเอกกาญจนาภิเษก สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) และบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์สำหรับการสนับสนุนทุนวิจัยและทุนสำหรับนักศึกษา รวมทั้งห้องปฏิบัติการ ST.416 ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ และห้องปฏิบัติการวิจัยโปรติโอมิกส์ ศูนย์พันธุวิศกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.) ที่ให้ความอนุเคราะห์อุปกรณ์และสถานที่ทำการทดลอง

เอกสารอ้างอิง

นิพนธ์ ทวีชัย. 2553. โรคพืชและการจัดการด้วยวิธีชีวภาพ. [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา: http://www.nstda.or.th/nstda-knowledge/22-knowledge/3106-biocontrol (20 พฤษภาคม 2559).

วิภาดา แสงสร้อย และตระกูล ตันสุวรรณ. 2546. อิทธิพลของต้นตอต่อการเจริญเติบโตและปริมาณธาตุอาหารของส้มเขียวหวาน. วารสารเกษตร 19(1): 12-20.

สุรัสวดี พรหมอยู่. 2555. บทบาทของกรดซาลิไซลิกต่อการเปลี่ยนแปลงหลังการเก็บเกี่ยวของผลิตผลพืชสวน. วารสารเกษตรพระจอมเกล้า 30(3): 95-102.

Angelini, R., A. Tisi, G. Rea, M.M. Chen, M. Botta, R. Federico and A. Cona. 2008. Involvement of polyamine oxidase in wound healing. Plant Physiology 146(1): 162-177.

Marcet-Houben, M., A.R. Ballester, B. de la Fuente, E. Harries, J.F. Marcos, L. González-Candelas and T. Gabaldón. 2012. Genome sequence of the necrotrophic fungus *Penicillium digitatum*, the main postharvest pathogen of citrus. BMC Genomics 13 (1): 646.

Perotti, V.E., A.S. Moreno, K. Trípodi, H.A.D. Vecchio, G. Meier, F. Bello, M. Cocco, D. Vázquez and F.E. Podestá. 2015. Biochemical characterization of the flavedo of heat-treated Valencia orange during postharvest cold storage. Postharvest Biology and Technology 99: 80-87.

Subbaiah, C.C., S.C. Huber, M.M. Sachs and D. Rhoads. 2007. Sucrose synthase: Expanding protein function. Plant Signaling & Behavior *2*(1): 28-29.

Toujani, W., J. Muñoz-Bertomeu, M. Flores-Tornero, S. Rosa-Téllez, A.D. Anoman, S. Alseekh, A.R. Fernie and R. Ros. 2013. Functional characterization of the plastidial 3-phosphoglycerate dehydrogenase family in *Arabidopsis*. Plant Physiology 163(3): 1164-1178.

Tsai, F.Y. and G. Coruzzi. 1991. Light represses transcription of asparagine synthetase genes in photosynthetic and nonphotosynthetic organs of plants. Molecular and Cellular Biology 11(10): 4966-4972.

Vallad, G.E. and R.M. Goodman. 2004. Systemic acquired resistance and induced systemic resistance in conventional agriculture. Crop Science 44(6): 1920-1934.