สมบัติและการทำงานของเอนไซม์เมวาโลเนทไคเนส ของต้นยางพารา

และ

การทดลองเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อต้นยางพารา

รายงานการวิจัยระหว่างการลาเพื่อเพิ่มพูนความรู้ทางวิชาการ
ภายในประเทศ

ระหว่าง 17 พฤศจิกายน 2529 – 16 พฤศจิกายน 2530

โดย

รพีพร โสตถิพันธุ์

ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

บทคัดย่อ

การวัดความว่องไวของเอนไซม์เมวาโลเนทไคเนสในน้ำยางและในส่วน C-serum สามารถใช้วิธีทางสเปคโตรโฟโตเมตรีวิเคราะห์ปริมาณ ADP ที่ผลิตจากปฏิกิริยาที่เร่งโดยเอนไซม์ แต่ไม่สามารถใช้วิธีนี้วัดความว่องไวของเอนไซม์ในใบยางพารา จากการเปรียบเทียบความว่องไวจำเพาะของเอนไซม์นี้ในต้นยางพาราที่ให้ผลผลิตต่าง ๆ กัน พบว่ามีค่าครรชนีสหสัมพันธ์เป็นลบ

จากการศึกษาสมบัติของเอนไซม์เมวาโลเนทไคเนสใน C-serum พบว่ามีค่า K_m ของ ATP เท่ากับ 2.18 mM และ K_m ของ DL-MVA เท่ากับ 1.13 mM เอนไซม์มีความต้องการไอออนโลหะ Mg^{2+} หรือ Mn^{2+} ในการเร่งปฏิกิริยา

ผลการทดลองเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อยางพาราพบว่าได้แคลลัสจากอับละอองเรณูของดอกตัวผู้เมื่อใช้อาหารวุ้นสูตร MB และ MLHM ซึ่งมีระดับของเกลือไนเตรตประมาณ 0.02 โมล/ลิตร การใช้อาหารวุ้นสูตร WM และ MS จะไม่ได้แคลลัส เมื่อพิจารณาองค์ประกอบอื่น ๆ พบว่าปริมาณใกล้เคียงกัน

เลขหมู่ TS934 S36 2B30 ก. 2
เลขทะเบียน.....
12 / ก.ค. / 38

Order Key 4960
BIB Key 82356
19969

บทนำ

ยางพาราเป็นสินค้าออกสำคัญชนิดหนึ่งของประเทศไทย คิดผลผลิตเป็นร้อยละ 15 ของปริมาณผลผลิตยางพาราทั่วโลกและมีแนวโน้มที่จะเพิ่มผลผลิตอีกโดยการสรรหาต้นพันธุ์ยางพารา *(Hevea brasiliensis)* ที่ให้ผลผลิตสูงมาปลูกทดแทนต้นเก่าที่ให้ผลผลิตต่ำ ในปัจจุบันการคัดเลือกพันธุ์ยางพาราที่ให้ผลผลิตน้ำยางมากนั้นจะต้องรอให้ต้นพันธุ์มีอายุถึง 6 ปีจึงจะทดสอบได้ หากสามารถนำข้อมูลทางชีวเคมีมาใช้เป็นข้อบ่งชี้ในการคัดเลือกพันธุ์ยางพาราที่มีศักยภาพในการผลิตน้ำยางก็จะสามารถคัดเลือกต้นพันธุ์ยางพาราที่จะนำไปปลูกได้ในระยะเวลาอันสั้น

เอนไซม์ที่อยู่ในวิถีการสังเคราะห์ยางธรรมชาติ(rubber biosynthetic pathway) เป็นเป้าหมายหนึ่งที่นำมาศึกษาเพื่อจะทราบสมบัติและหาความสัมพันธ์กับปริมาณผลผลิตของต้นพันธุ์ เชื่อกันว่าเอนไซม์ hydroxy-methyl-glutaryl CoA reductase(HMG CoA reductase) เป็นเอนไซม์ที่ควบคุมวิถีสังเคราะห์ยางในต้นยาง(Benedict, 1982) แบบเดียวกับที่พบว่าในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม เอนไซม์นี้ควบคุมการสังเคราะห์สารสเตอรอล (sterol) ซึ่งมีจุดเริ่มต้นการสังเคราะห์ที่เหมือนกันกับยางดังรูปที่ 1.1 นอกจากนี้ยังพบว่าความว่องไวของเอนไซม์นี้ในน้ำยางเปลี่ยนแปลงได้ในช่วงเวลาของวันหนึ่งๆ(Wititsuwannakul, 1986) โดยมีความว่องไวสูงสุดในเวลาเย็น(18 นาฬิกา)หลังจากที่ได้รับแสงแดดเพื่อสังเคราะห์อาหารเต็มวันแล้ว ปริมาณยาง(rubber content) ในน้ำยางก็เปลี่ยนแปลงในลักษณะเดียวกัน คือมีค่าสูงสุดที่เวลา 18 นาฬิกาเช่นเดียวกัน จึงเป็นข้อมูลที่บ่งชี้ว่าเอนไซม์ HMG CoA reductase อาจมีบทบาทในการควบคุมการสังเคราะห์ยางในต้นยางพารา

เมวาโลเนทไคเนส(mevanolate kinase) เป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกริยาต่อจากเอนไซม์ HMG CoA reductase ในวิถีการสังเคราะห์ยางธรรมชาติ(รูปที่ 1.1) การศึกษาสมบัติและการทำงานของเอนไซม์นี้เปรียบเทียบกับ HMG CoA reductase รวมทั้งดูความสัมพันธ์กับปริมาณยางที่เป็นผลผลิตจะให้ข้อมูลที่บ่งชี้ว่าน่าจะใช้สมบัติของเอนไซม์ใดประกอบการคัดเลือกพันธุ์ยางได้

สมบัติบางประการของเอนไซม์เมวาโลเนทไคเนสในน้ำยางได้มีการศึกษาไว้ตั้งแต่ปี ค.ศ.1965โดย Williamson & Kekwickโดยใช้น้ำยางสดและซีรัมสกัดแห้ง(freeze-dried serum) เอนไซม์นี้สามารถใช้ ITP ได้ดีเท่ากับ ATP ในการเร่งปฏิกริยาการ

เปลี่ยน MVA เป็นMVA-P เมื่อใช้DEAE cellulose สกัดเอนไซม์ได้บริสุทธิ์ขึ้นเล็กน้อย ได้ค่า K_m ของ ATP เท่ากับ 2.0mM และ K_m ของ MVA เท่ากับ 0.13mM ที่pH 7.5 เอนไซม์ต้องการไอออนโลหะเช่น Mg^{2+} หรือ Mn^{2+} เมื่อใช้ Mn^{2+} เข้มข้น 1mM จะเร่งปฏิกิริยาได้ดีที่สุดและ Mg^{2+} จะเร่งได้ดีที่สุดที่ 4mM แต่ไอออนโลหะทั้งสองที่เข้มข้น 10mM จะยับยั้งความเร็วของปฏิกิริยาได้ถึง 70% Ca^{2+} ที่ 5mM สามารถเร่งปฏิกิริยาได้ประมาณ 30%ของ Mg^{2+} แต่ที่ความเข้มข้นสูงกว่านี้จะยับยั้งปฏิกิริยา เอนไซม์นี้ไม่ต้องใช้สารประกอบเช่น cysteine หรือ reduced glutathione ซึ่งมีหมู่ -SHเพื่อการเร่งปฏิกิริยา

การศึกษาเอนไซม์นี้ในพืชอื่นเช่น French bean(*Phaseolus vulgaris*) พบว่ามีเอนไซม์นี้ทั้งในส่วนไซโตซอล(cytosol) และคลอโรพลาสต์ของใบพืช(Gray & Kekwick, 1973) K_m ของ MVA สำหรับเอนไซม์ที่บริสุทธิ์พอควรในใบพืชนี้มีค่าในช่วง 42.6-45.5 µM ที่pH 7.0 ส่วน K_m ของ ATP มีค่า 1.54mM เอนไซม์มี MW ประมาณ 100,000

จุดประสงค์ของการศึกษาสมบัติบางประการในงานวิจัยนี้คือการตรวจสอบว่าสามารถใช้วิธีทางสเปคโตรโฟโตเมตรีเพื่อวัดความว่องไวของเมวาโลเนทไคเนสในน้ำยางและใบยางพาราได้หรือไม่ ทั้งนี้เพื่อนำไปใช้ในการเปรียบเทียบความว่องไวของเอนไซม์นี้ระหว่างพันธุ์ยางพาราที่มีผลผลิตแตกต่างกัน และศึกษาการทำงานของเอนไซม์ในสภาวะต่างๆต่อไป

ตัวย่อ (Abbreviations)

ADP, ATP	adenosine 5'-di, และ triphosphate
ATPase	ATP phosphohydrolase
BSA	bovine serum albumin
Co A	coenzyme A
2,4-D	dichlorophenoxyacetic acid
DEAE cellulose	diethylamino-ethyl cellulose
DTT	DL-dithiothreitol (Cleland's reagent)
EDTA	ethylenediaminetetra-acetate
GTP	guanosine 5'-triphosphate
IAA	indole 3-acetic acid
ITP	inosine 5'-triphosphate
MOPS	3-(N-morpholino) propanesulfonic acid
NAD^+	nicotinamide-adenine dinucleotide
NADH	reduced nicotinamide-adenine dinucleotide
PEP	phosphoenolpyruvate
PVP	polyvinylpyrrolidone
TCA	trichloroacetic acid

วัสดุและวิธีทดลอง

1. สารเคมีและเอนไซม์ประกอบการศึกษา

สารเคมีที่ใช้ในการศึกษาเอนไซม์เป็นชนิดเกรดดี (analytical grade) ADP,ATP,NADH,mevalonolactone,phosphoenol pyruvate (PEP),DL-dithiothreitol (DTT), BSA,IAA, inositol, nicotinic acid, pyruvate kinase (PK), lactate dehydrogenase (LDH), MOPS,PPO และ POPOP ซื้อจากบริษัท Sigma,EDTA จาก Mallinckrodt, $MgCl_2$ และ $MnCl_2$ เป็นผลิตภัณฑ์ของบริษัท BDH KH_2PO_4, sucrose Folin and Ciocalteu's phenol reagent ของบริษัท Merck K_2HPO_4 ของบริษัท Ajax Chemicals, cysteine, calcium-D-pantothenate, thiamin HCl, Pyridoxine (B_6) และ 2,4-D ของบริษัท Fluka, yeast extract และ agar เป็นของบริษัท Difco, DL[2-H^3]-mevalonic acid lactone เป็นผลิตภัณฑ์ของบริษัท Amersham ประเทศอังกฤษ

2. การเก็บน้ำยาง

น้ำยางที่นำมาใช้ศึกษาได้จากศูนย์วิจัยยางจ.สงขลา โดยการกรีดต้นยางที่มีอายุประมาณ 17 ปี ซึ่งมีการกรีดอยู่เป็นประจำแบบครึ่งรอบต้นวันเว้นวัน (S.2/D.2) กรีดต้นยางเวลาประมาณ 6 น. และเก็บน้ำยางโดยใช้บีกเกอร์ (ที่แช่อยู่ในน้ำแข็งบดละเอียด) รองรับน้ำยางจากท่อต่อให้น้ำยางหยดตามปกติจะใช้เวลาเก็บน้ำยางประมาณ 30 นาทีต่อต้น ยกเว้นกรณีที่ต้องการทราบปริมาณน้ำยางที่ได้จากการกรีดต่อต้นต่อครั้งจะเก็บน้ำยางจนกว่าน้ำยางหยุดไหล เมื่อได้น้ำยางตามต้องการแล้วจะถ่ายใส่ฟลาสก์ (flask) แช่ในกระติกน้ำแข็งนำมายังห้องทดลอง

3. การแยก C-serum จากน้ำยาง

แบ่งน้ำยางที่แช่เย็นไว้ตลอดเวลาใส่หลอดเซนตริฟิวจ์ และนำไปหมุนเหวี่ยงแยกส่วนด้วยอัลตราเซนตริฟิวจ์ (Beckman Ultracentrifuge model L5-65) โดยใช้แรงเหวี่ยง 49,000 g (โรเตอร์ชนิด 50.2 Ti) เป็นเวลา 40 นาที น้ำยางจะถูกแยกเป็น 3 ชั้น ตามความหนาแน่นขององค์ประกอบในน้ำยาง ชั้นบนสุดเป็นชั้นของยางสีขาว

และมีส่วนสีเหลืองซึ่งเรียกว่า Frey-Wyssling zone ปรากฏอยู่ข้างๆ ชั้นกลางเป็นชั้นของสารละลายใสมีปริมาตรประมาณครึ่งหนึ่งของปริมาตรน้ำยางที่นำมาแยก ส่วนใสนี้เรียกว่า C-serum หรือ latex cytoplasm ซึ่งจะมีแอคติวิตีของเมวาโลเนทไคเนสมากที่สุด ชั้นล่างสุดเป็นชั้นของสารข้นสีเหลืองอ่อน ซึ่งเรียกว่า Bottom fraction และมีแอคติวิตีของ HMG-CoA reductase มากที่สุด (Sipat,1982)

อีกวิธีหนึ่งที่สามารถแยกน้ำยางเป็นส่วน ๆ ได้เมื่อมีน้ำยางปริมาตรน้อยคือการหมุนเหวี่ยงโดยใช้เครื่องหมุนเหวี่ยงขนาดเล็ก Kokusan H-31 ด้วยความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที นาน 1 ชั่วโมง น้ำยางที่บรรจุในหลอดขนาดความจุ 1.5 มล. จะแยกส่วนเป็น 3 ชั้นเช่นกัน

4. การทำไดแอลิซิส (dialysis) ส่วน C-serum

ในการศึกษาอิทธิพลของความเข้มข้นของสับสเตรท (substrate) และไลออนโลหะ (metal ion) ต่อความว่องไวของเอนไซม์ ต้องนำ C-serum มาผ่านกระบวนการไดแอลิซิสโดยนำ C-serum (15 มล.) มาบรรจุในถุงไดแอลิซิสที่ยอมให้โมเลกุลขนาดเล็กกว่า 8,000 ดอลตัน ผ่านออกได้ (Cat.no. 3787-F27, A.H.Thomas, Co. Philadelphia, Pa. USA) นำถุงไดแอลิซิสที่มี C-serum แช่ในสารละลายบัฟเฟอร์ปริมาตร 1 ลิตร ซึ่งประกอบด้วยโปแตสเซียมฟอสเฟตเข้มข้น 50 mM และ EDTA 1 mM และกวนบัฟเฟอร์ตลอดเวลา 15 ชั่วโมง (ทิ้งไว้ค้างคืน) ในตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

5. การเตรียม MVA จาก mevalonolactone

เตรียมสารละลาย MVA ให้มีความเข้มข้น 0.1 M ปริมาตร 1 มล. โดยผสม KOH เข้มข้น 2 M ลงไปด้วย 0.1 มล. เพื่อเปลี่ยน mevalonolactone ให้อยู่รูปของโปแตสเซียมเมวาโนเนท

6. การวิเคราะห์ความว่องไวของเอนไซม์เมวาโลเนทไคเนส

6.1 การวิเคราะห์โดยวัดปริมาณ ADP ที่เกิดจากปฏิกิริยา

$$\text{MVA} + \text{ATP} \xrightarrow{\text{MVA kinase}} \text{MVA P} + \text{ADP}$$

วิธีการที่ใช้ในงานวิจัยนี้ดัดแปลงจากวิธีของ Grey and Kekwick (1973) ผสมน้ำยางหรือ C-serum ปริมาตร 0.1 มล. กับสารละลายสำหรับทำปฏิกิริยา (assay medium) ซึ่งประกอบด้วย MVA 3 ไมโครโมล, ATP 6 ไมโครโมล ในบัฟเฟอร์ที่มีโปแตสเซียมฟอสเฟตข้น 50 mM, pH 7.0 และมี $MgCl_2$ 5 mM โดยให้มีปริมาตรทั้งหมดเท่ากับ 0.5 มล. ทำปฏิกิริยาในหลอดเซนตริฟิวจ์พลาสติกขนาดเล็กซึ่งจุ 1.5 มล. (สำหรับหลอดควบคุมไม่ใส่ MVA) แช่หลอดในอ่างน้ำอุ่นที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสนาน 10 นาที นับจากการเติม ATP ให้เกิดปฏิกิริยา หยุดปฏิกิริยาโดยเติมสารละลาย trichloroacetic acid (TCA) ข้น 1 M ปริมาตร 0.2 มล. ผสมให้เข้ากันดี แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนโปรตีนในเครื่องหมุนเหวี่ยงขนาดเล็ก (Kokusan H-31) ด้วยความแรง 10,000 g รอบต่อนาที นาน 3 นาที ใช้ Pasteur pipette ดูดสารละลายใสข้างบนมาใส่ในหลอดใหม่แล้วทำให้เป็นกลางด้วยสารละลาย KOH ข้น 2 M ปริมาตร 0.1 มล. ตรวจสอบ pH ให้แน่ใจว่าเป็นกลางด้วยกระดาษพีเอช (pH paper) นำสารละลายที่เป็นกลางนี้ไปตรวจวิเคราะห์ปริมาณ ADP ที่ถูกปล่อยออกจากปฏิกริยาโดยใช้เครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์วัดการลดการดูดแสงของ NADH ซึ่งเกิดจากปฏิกริยาการเปลี่ยน phosphoenolpyruvate เป็น lactate ในขณะที่มี NAD^+ และ ADP ตามขั้นตอนดังนี้

(1) $$ADP + PEP \xrightarrow{PK} ATP + pyruvate$$

(2) $$Pyruvate + NAD^+ \xrightarrow{LDH} lactate + NADH$$

ปริมาณของ NADH ที่วัดได้จะเท่ากับปริมาณ ADP ที่นำมาวิเคราะห์ ส่วนผสมที่ใช้วิเคราะห์ปริมาณ ADP ประกอบด้วย NADH 0.2 ไมโครโมล, PEP 3 ไมโครโมล, pyruvate kinase (PK) 3.5 ยูนิต, lactate dehydrogenase (LDH) 5 ยูนิต และสารละลายที่มี ADP ปริมาตร 0.05 - 0.10 มล.ในบัฟเฟอร์ฟอสเฟต ข้น 50 mM pH 7.0 ซึ่งมี $MgCl_2$ 5 mM และ KCl 40 mM ให้ส่วนผสมมีปริมาตรทั้งหมด 1.0 มล. โดยเติม PEP เป็นตัวสุดท้าย วัดค่าการดูดกลืนแสง (O.D.) ที่ 340 nm ก่อนและหลังการเติม PEP เป็นเวลาอย่างน้อย 3 นาที นำค่าแตกต่างของ O.D. 340 nm ไปคำนวณหาปริมาณของ NADH และ ADP โดยใช้ค่าสัมประสิทธิ์การดูดกลืนแสงของ NADH ที่ 340 nm 6.035 $mM^{-1}cm^{-1}$ (เป็นค่าที่ตรวจสอบ NADH มาตรฐานกับเครื่องแล้ว)

6.2 การวิเคราะห์โดยวัดปริมาณ MVA-P ที่ผลิตจากการเร่งปฏิกิริยาของเมวาโล-เนทไดเนส

ใช้ DL[2-^{3}H] mevalonic acid ผสมกับ MVA ธรรมดาให้มีความเข้มข้นเหมือนกับในการวิเคราะห์ความว่องไวในข้อ 6.1 แต่ใช้ C-serum ปริมาตร 0.02 มล. ในปริมาตรทั้งหมด 0.1 มล. ใส่ปริมาณสารกัมมันตรังสี 149,000 dpm ต่อหลอด หยุดปฏิกิริยาโดยการต้มในน้ำเดือด 2 นาที แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนโปรตีน นำส่วนใส ปริมาตร 0.05 มล. ไปแยกโดยวิธีโครมาโทกราฟีตามวิธีของ Gray and Kekwick (1973) โดยใช้กระดาษกรอง Whatman no.1 กับสารละลาย 2-methylpropan-2-ol-formic acid-น้ำ (อัตราส่วน 20:5:8 โดยปริมาตร) เนื่องจากไม่สามารถหาซื้อสาร MVA-P ทั้งที่มีธาตุกัมมันตรังสีและชนิดธรรมดา จึงตัดขึ้นกระดาษกรองเป็นส่วน ๆ และแยกไปหาตำแหน่ง R_f ของ ^{3}H-MVA-P โดยใช้สารละลายที่มีส่วนผสม PPO (2,5-diphenyl oxazole) 5 g, POPOP (1,4-bis-[2-(5-phenyloxazolyl)] benzene) 0.1 g, naphthalene 80 g ใน 1 ลิตร ของ toluene : 1,4-dioxane:ethanol (อัตราส่วน 3.5:3.5:2 โดยปริมาตร) วัดในเครื่อง Scintillation Counter

7. <u>การเตรียมสารสกัดจากใบยาง</u>

ใช้ใบยางสดที่ล้างสะอาดแล้ว 10 กรัม หั่นให้เป็นฝอยและตำให้เป็นผงละเอียด โดยเติมไนโตรเจนเหลวลงไปเล็กน้อย ปั่นผสมใบยางที่ละเอียดนี้ 2 นาที ในบัฟเฟอร์ฟอสเฟต 20 mM pH 7.0 ที่มี EDTA 1 mM, PVP 1% w/v และ BSA 0.1% w/v ปริมาตร 40 มล. กรองส่วนผสมผ่านผ้าก๊อซ 8 ชั้น นำน้ำกรองไปปั่นตกตะกอนที่ 3,500 g นาน 5 นาที ทิ้งตะกอน นำส่วนใสไปปั่นตกตะกอนในอัลตราเซนตริฟิวจ์ ที่ 49,000 g นาน 40 นาที แยกตะกอนออกจากส่วนใส และละลายตะกอนในบัฟเฟอร์ประมาณ 0.5 มล. หาความว่องไวของเมวาโลเนทไดเนสทั้งในส่วนใสและส่วนตะกอน

8. <u>การหาปริมาณโปรตีน</u>

ใช้วิธีของ Lowry *et al.* (1951) และวัด O.D. ที่ 600 nm.

ผลการทดลอง

1. การวัดความว่องไวของเมวาโลเนทไคเนสด้วยวิธีการทางสเปคโตรโฟโตเมตรี

เมื่อวัดปริมาณADP ที่เกิดจากปฏิกริยาซึ่งเร่งโดยเมวาโลเนทไคเนสขณะที่มี MVA และ ATPในอัตราที่ใช้ พบว่าสามารถวัดค่าความว่องไวได้ดีเมื่อปล่อยให้เกิดปฏิกริยานาน 10 นาที วิธีการนี้ใช้วัดความว่องไวของเอนไซม์ได้ดีในส่วน C-serum และในน้ำยางสด แต่ไม่สามารถวัดความว่องไวของเอนไซม์ในใบยาง เพราะระดับของเอนไซม์ในใบต่ำมากจนไม่สามารถตรวจจับปริมาณADP ที่แตกต่างกันระหว่างหลอดที่วิเคราะห์(+MVA) กับหลอดควบคุม (-MVA) และพบว่าใบยางมีแอคติวิตีของ ATPase ค่อนข้างสูง

อนึ่ง ในงานวิจัยนี้ใช้ TCA เป็นสารตกตะกอนโปรตีน และหยุดปฏิกริยาแทนการใช้ perchloric acid เพราะพบว่ามีการสลาย ATP ในperchloric acid ทำให้ผลการวิเคราะห์ผิดไป อย่างไรก็ตามพบการสลาย ATP เล็กน้อยใน TCA เมื่อเก็บหลอดตัวอย่างไว้นานเกิน 4 ชั่วโมงก่อนนำไปวัดปริมาณADP ที่ผลิตจากปฏิกริยา ดังนั้นในกรณีที่ต้องวิเคราะห์สารตัวอย่างจำนวนมากๆ จะต้องเก็บหลอดที่ทำปฏิกริยาแล้วไว้ในช่องแข็งของตู้เย็น หลังจากตกตะกอนโปรตีน เมื่อจะวัดปริมาณ ADP จึงนำออกมาให้ละลาย(ในน้ำแข็ง)แล้วปรับ pH ให้เป็นกลาง

2. การวัดความว่องไวของเมวาโลเนทไคเนสโดยใช้สารกัมมันตรังสี ^{3}H-mevalonate

ขณะนี้ยังไม่สามารถวัดปริมาณ ^{3}H-MVA-P ที่ได้จากปฏิกริยาการเร่งโดยเมวาโลเนทไคเนส แม้ว่าจะทดลองใช้ส่วน C-serum เป็นตัวตรวจสอบเนื่องจากไม่พบสารกัมมันตรังสีที่ตำแหน่ง R_f 0.55 (ซึ่งเป็นของ MVA-P และรายงานไว้โดยWilliamson and Kekwick, 1965)หรือบริเวณใกล้เคียงบนโครมาโตแกรม ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการสลายของ ^{3}H-MVA-P โดยหมู่ฟอสเฟตถูกตัดออกไประหว่างการแยกด้วยวิธีโครมาโตกราฟีซึ่งใช้เวลา 7 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง(เกินกว่า 30 °C) หรือเนื่องจากการต้มเพื่อหยุดปฏิกริยา แต่ในรายงานอื่นก็ใช้วิธีการต้มเพื่อหยุดปฏิกริยาและตกตะกอนโปรตีนเช่นกัน(Gray and Kekwick, 1973) การทดลองหยุดปฏิกริยาด้วยวิธีอื่น เช่น เติมเอทานอล ทำให้ปริมาตรเพิ่มขึ้นและเป็นปัญหาในการแยกด้วยวิธีโครมาโตกราฟี เนื่องจากขณะนี้อุปกรณ์ Freeze-dryer ของภาควิชาชีวเคมีเสีย จึงไม่สามารถใช้ลดปริมาตรของสารตัวอย่างได้ ระหว่างทำการทดลองนี้ต้องส่ง

ขวด สารกัมมันตรังสีไปวิเคราะห์ที่กรุงเทพฯเพราะอุปกรณ์ Scintillation Counter ของภาควิชาฯเสีย ต้องใช้เวลา 2-3สัปดาห์กว่าจะทราบผลของแต่ละวิธีการ จึงไม่สามารถทำงานในส่วนนี้ได้ตามเป้าหมาย คือวัดความว่องไวของเอนไซม์เมวาโลเนทไคเนสของใบยางพารา ไม่ได้

3. สมบัติของเอนไซม์เมวาโลเนทไคเนสในส่วน C-serum

3.1 เมื่อวัดความว่องไวของเอนไซมในส่วน C-serum สดทันทีที่ได้จากการแยกส่วนน้ำยางด้วยการหมุนเหวี่ยงในอัลตราเซนตริฟิวจ์ เปรียบเทียบกับ C-serum ที่เก็บในตู้เย็นเป็นเวลานานถึง 24 ชั่วโมง และที่เก็บแช่แข็งที่อุณหภูมิ -60องศาเซลเซียสนาน 50 ชั่วโมง พบว่า ความว่องไวของเอนไซม์ไม่เปลี่ยนแปลงดังแสดงในตารางที่ 1 ดังนั้นในการวัดความว่องไวของเอนไซมนี้ในส่วน C-serum ซึ่งได้จากน้ำยางที่กรีดในเวลากลางคืน จึงสามารถเก็บ C-serumไว้วิเคราะห์ในวันต่อไปได้

3.2 ในการศึกษาอิทธิพลของความเข้มข้นของสับสเตรท(substrate) ต่อความว่องไวของเอนไซม์ของ C-serum พบว่าวัดความว่องไวสูงสุดได้เมื่อใช้ MVA ข้นไม่ต่ำกว่า 3mM และ ATP ข้น 10mM ดังผลที่แสดงในรูปที่ 1.2 และรูปที่ 1.3 เมื่อนำค่าความว่องไวไปหาค่า K_m ด้วย Lineweaver-Burke Plot และคำนวณสมการเส้นถดถอย(regression line) ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ STAT VIEW ได้ค่าK_m ของ MVA จากการทดลองนี้เท่ากับ 1.13mM ซึ่งสูงกว่าที่รายงานไว้โดย Williamson and Kekwick ส่วน K_m ของ ATP ได้เท่ากับ 2.18mM ซึ่งใกล้เคียงกับผลของรายงานเก่า การที่ได้ค่า K_m ของMVA สูงนี้ เป็นเพราะใช้เอนไซม์ที่ไม่บริสุทธิ์ MVA อาจไปจับกับสิ่งปนอื่นๆจึงทำหน้าที่เป็นสับสเตรทได้ไม่เต็มที่ แต่วิธีการนี้ใช้ได้สำหรับการเปรียบเทียบความว่องไวของเอนไซม์ในน้ำยางและ C-serum ในงานวิจัยนี้

3.3 การศึกษาอิทธิพลของไอออนโลหะ Mg^{2+} และ Mn^{2+} ต่อความว่องไวของเอนไซม์(รูปที่ 1.4)มีผลพอสรุปได้ว่า เอนไซม์มีความว่องไวสูงสุดเมื่อมี Mg^{2+} เข้มข้น 4-5mM หรือMn^{2+} 4mM เมื่อใช้ความเข้มข้นของ Mg^{2+} สูงถึง 10mM จะไม่ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ แต่เมื่อใช้ Mn^{2+} 10mM จะยับยั้งเอนไซม์ได้ประมาณ 70% และ Mg^{2+} สามารถเร่งปฏิกริยาได้ดีกว่า Mn^{2+} ดังนั้น ในการศึกษาความว่องไวของเมวาโลเนทไคเนสจึงใช้ Mg^{2+} ที่ความเข้มข้น 5mM ในสารละลายที่ใช้ทำปฏิกริยา

3.4 การศึกษาผลของสารไธออลซึ่งมีหมู่ -SH ต่อความว่องไวของเอนไซม์เมวาโลเนทไคเนส ได้ผลว่าความว่องไวของเอนไซม์ไม่เปลี่ยนแปลงเมื่อผสม dithiothreitol (DTT) ที่ความเข้มข้น 5mM ในสารละลายที่ใช้ทำปฏิกริยา

4. การเปลี่ยนแปลงความว่องไวของเอนไซม์เมวาโลเนทไคเนสในช่วงวัน(Diurnal variation)

เมื่อนำวิธีการวัดความว่องไวของเอนไซม์เมวาโลเนทไคเนสมาใช้ในการหาความว่องไวของเอนไซม์ใน C-serum ที่แยกจากน้ำยางของต้นยางพารา 3 พันธุ์คือRRIM 600, KRS 25 และ GT1 ซึ่งกรีดที่เวลาต่างๆกันในรอบวัน ผลการศึกษาพบว่าความว่องไวจำเพาะ(คิดเป็น n moles/min.mg protein) ของเอนไซม์นี้ใน C-serum มีค่าเปลี่ยนแปลงเล็กน้อยในรอบวัน ความว่องไวจำเพาะในช่วงเวลากลางวันจะสูงกว่าในช่วงกลางคืน ได้ค่าความว่องไวจำเพาะต่ำสุดเมื่อกรีดยางเวลา 22.00 น. และค่าสูงสุดอยู่ในช่วงเวลา 10.00-14.00 น.(รูปที่ 1.6) อนึ่งพบว่าความว่องไวจำเพาะของเอนไซม์นี้ในต้นยางพาราทั้ง 3 พันธุ์อยู่ในช่วงที่ใกล้เคียงกันมาก

5. การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างผลผลิตกับความว่องไวของเอนไซม์เมวาโลเนทไคเนสในน้ำยางและส่วน C-serum

จากการหาความว่องไวของเมวาโลเนทไคเนสใน C-serum ที่แยกจากน้ำยางซึ่งกรีดจากต้นยางพันธุ์ RRIM 600 10 ต้น การกรีดทำในวันเดียวกันและแต่ละต้นให้น้ำยางปริมาตรต่างๆกัน พบความว่องไวของเอนไซม์นี้ในแต่ละต้นแตกต่างกัน ทั้งยังพบว่าน้ำยางที่ได้มีปริมาณสารแห้ง(% dry matter)ต่างกันด้วย เมื่อนำข้อมูลปริมาณสารแห้งกับความว่องไวของเมวาโลเนทไคเนสใน C-serum ปริมาตร 1 มล.มาหาสหสัมพันธ์(correlation) จะได้ค่าดัชนีสหสัมพันธ์(R)ระหว่างข้อมูลนี้เท่ากับ -0.287 แสดงว่าข้อมูลสองชนิดนี้มีความสัมพันธ์กันน้อย(Dominowski, 1980)

เมื่อนำข้อมูลปริมาณสารแห้งกับความว่องไวจำเพาะของเอนไซม์(n moles/min. mg protein)มาคำนวณหาค่าสหสัมพันธ์จะได้ค่าดัชนีสหสัมพันธ์ระหว่างข้อมูลเท่ากับ -0.664 แสดงว่าข้อมูลสองชนิดนี้จะมีความสัมพันธ์กันแบบลบ(ค่า R เป็นลบ)

เมื่อนำข้อมูลปริมาณสารแห้งกับความว่องไวของเมวาโลเนทไคเนสในน้ำยาง

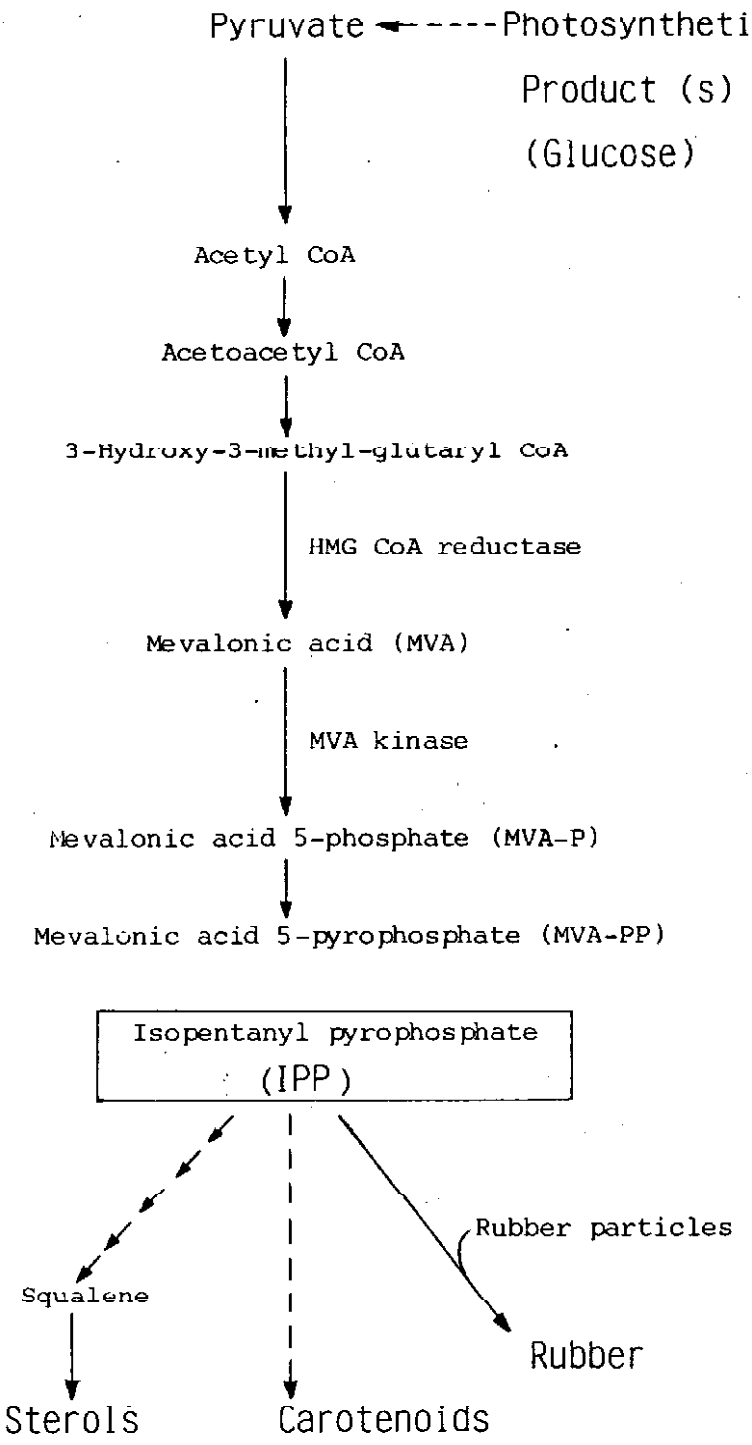
(latex MVA kinase)ปริมาตร 1 มล.มาคำนวณหาค่าสหสัมพันธ์จะได้ค่าดัชนีสหสัมพันธ์ระหว่างข้อมูลเท่ากับ -0.771(รูปที่1.9) แสดงว่าข้อมูลคู่นี้มีสหสัมพันธ์กันมากกว่าข้อมูลในรูปที่ 1.8 และเมื่อเปรียบเทียบข้อมูลระหว่างต้นยางต่างพันธุ์กัน (ตารางที่ 2) จะได้ผลในลักษณะเดียวกันคือต้นที่ให้น้ำยางปริมาตรมากจะมีความว่องไวของเมวาโลเนทไคเนสต่ำ ส่วนต้นที่ให้น้ำยางน้อยจะมีความว่องไวสูง

ตารางที่ 1 ความว่องไวของเมวาโลเนทไคเนสในส่วน C-serum สด เปรียบเทียบกับที่เก็บไว้ในที่เย็นและที่แช่แข็ง(ใช้ C-serumจากน้ำยางพันธุ์ RRIM600 แต่ละเวลาที่วัดใช้หลอดตัวอย่างและหลอดควบคุมอย่างละ 3 หลอด)

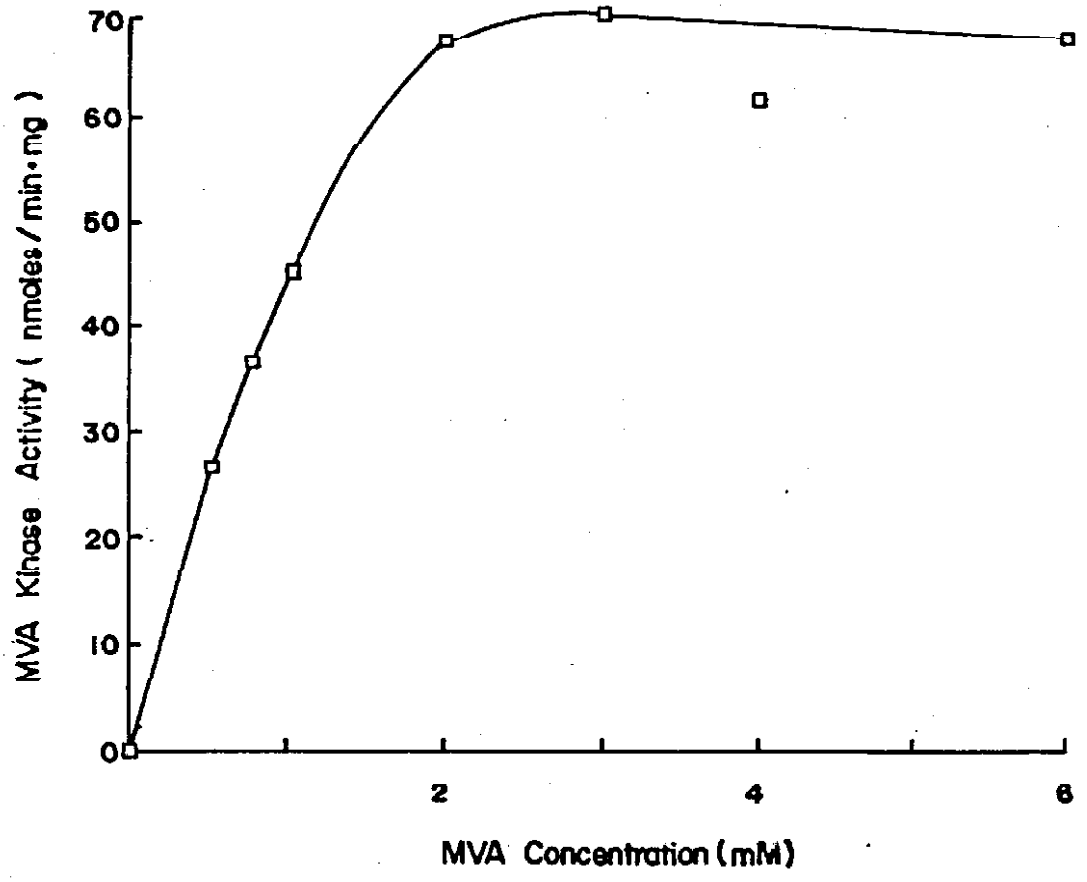
	ความว่องไวจำเพาะ(nmol/min.mg)	
	$\bar{x}$	S.E.
C-serum สด	39.45	1.47
C-serumเก็บในตู้เย็น		
4 ช.ม.	43.19	1.86
8 ช.ม.	40.64	0.64
24 ช.ม.	43.70	0.92
C-serumแช่แข็ง -60 °C		
50 ช.ม.	41.76	1.76

ตารางที่ 2 ความว่องไวของเอนไซม์เมวาโลเนทไคแนสใน c-serum ของต้นยางพันธุ์ RRIM 600 และ KRS 208 ซึ่งให้ผลผลิตน้ำยางปริมาตรสูง, กลาง และต่ำ

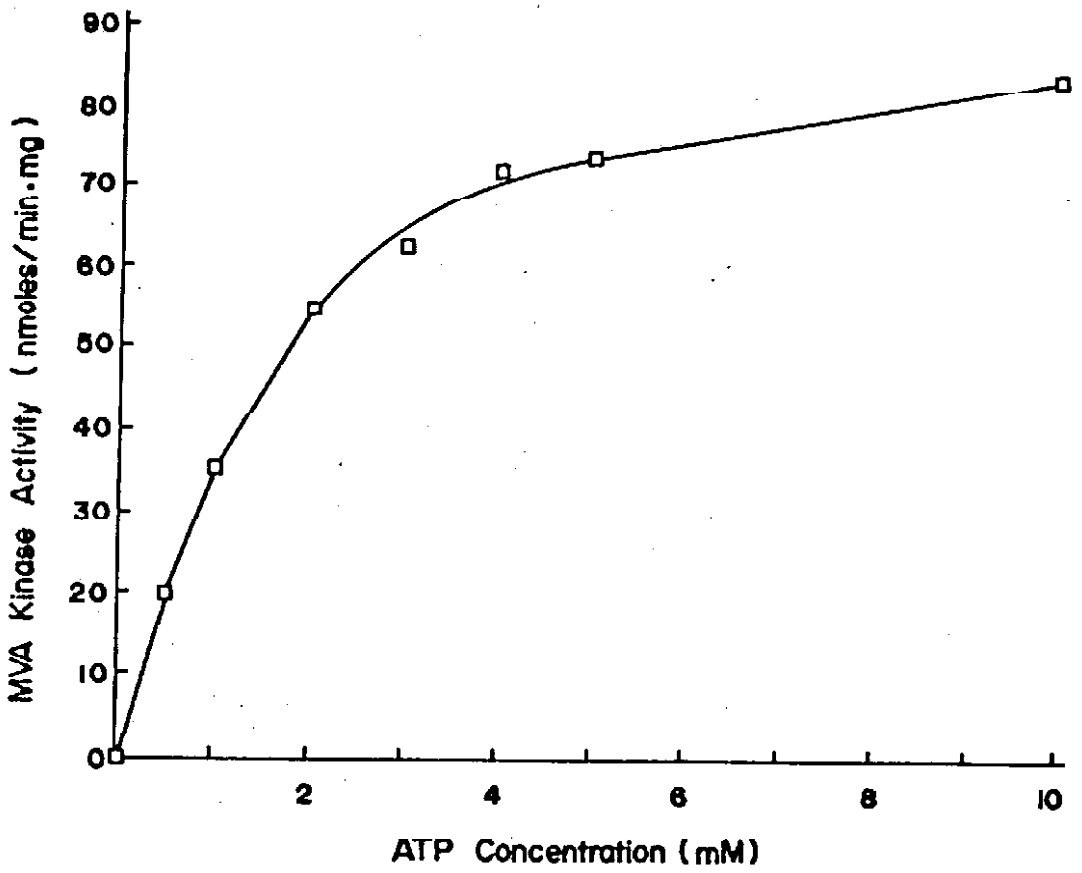
พันธุ์	ผลผลิต (มล./ต้น)	MVA kinase activity (n moles/นาที/มก.โปรตีน)	
		$\bar{x}$	SE
RRIM 600(H)	185	60.45	1.28
RRIM 600(M)	100	78.59	6.57
RRIM 600(L)	80	75.97	1.81
KRS 208(H)	210	60.51	6.31
KRS 208(M)	98	63.14	7.39
KRS 208(L)	27	76.11	1.79



รูปที่ 1.1 วิถีการสังเคราะห์โมเลกุลของสเตอรอล, สารคาโรทีนอยด์ และยาง แสดงเส้นทางเริ่มต้นที่เหมือนกัน

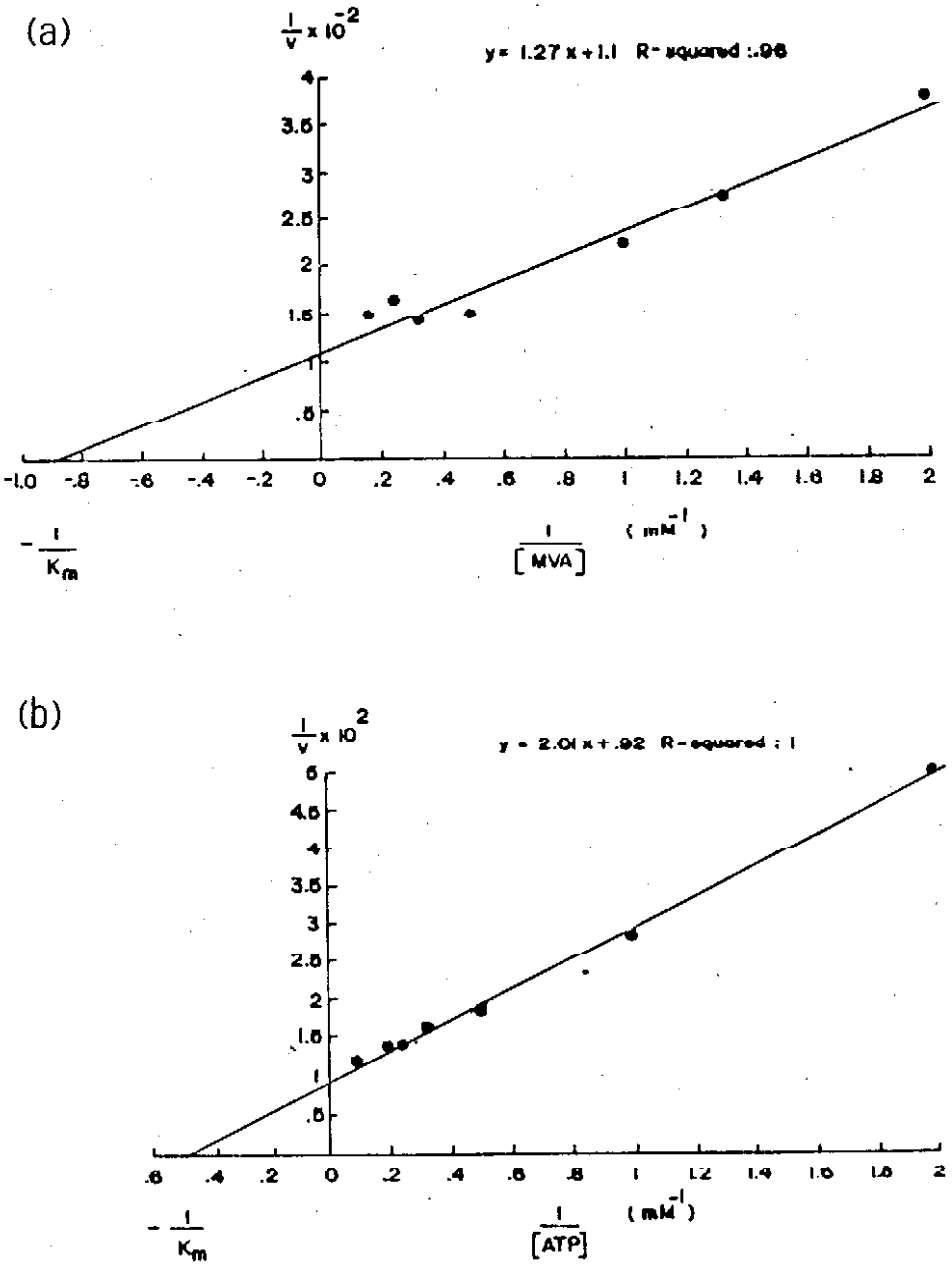


รูปที่ 1.2 อิทธิพลของความเข้มข้นของ MVA ต่อความว่องไวของเอนไซม์เมวาโลเนทไคเนส ในส่วน C-serum (ซึ่งผ่านไดแอไลซิสแล้ว) ทดลองเปลี่ยนความเข้มข้นของ MVA ระหว่าง 0.5-6mM ขณะที่ใช้ ATP ที่ 10mM, Mg^{2+}ที่ 5mM โดยมีโปรตีนในหลอดเท่ากับ 0.9 มก.ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่ pH 7.0 และอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส(แต่ละความเข้มข้นใช้หลอดตัวอย่างและหลอดควบคุมอย่างละ 3หลอด)



รูปที่ 1.3 อิทธิพลของความเข้มข้นของ ATP ต่อความว่องไวของเอนไซม์เมวาโลเนทไคเนสในส่วน C-serum (ซึ่งผ่านไดแอไลซิสแล้ว) ทดลองเปลี่ยนความเข้มข้นของ ATP ระหว่าง 0.5-10mM ขณะที่ใช้ MVA เข้มข้น 6mM, Mg^{2+} 5mM และมีโปรตีน 0.9 มก.ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่ pH 7.0 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส(แต่ละความเข้มข้นใช้หลอดตัวอย่างและหลอดควบคุมอย่างละ 3 หลอด)

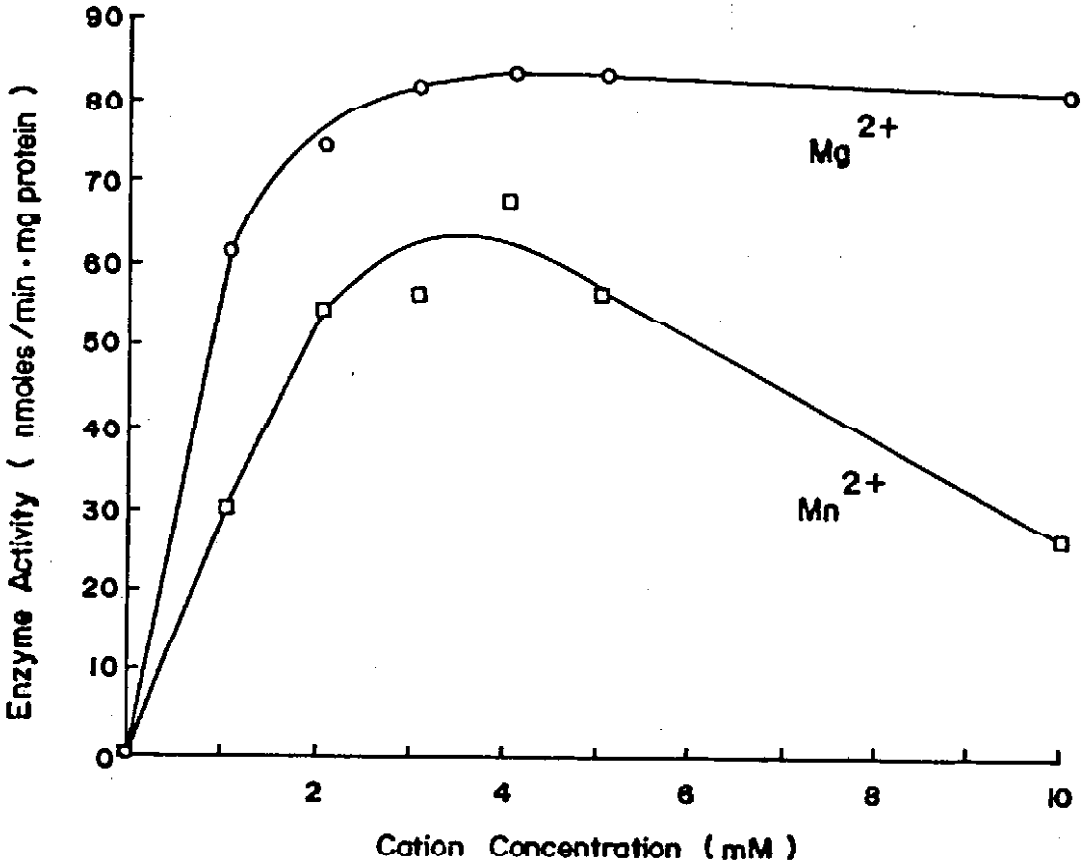
CENTRAL LIBRARY
PRINCE OF SONGKLA UNIVERSITY



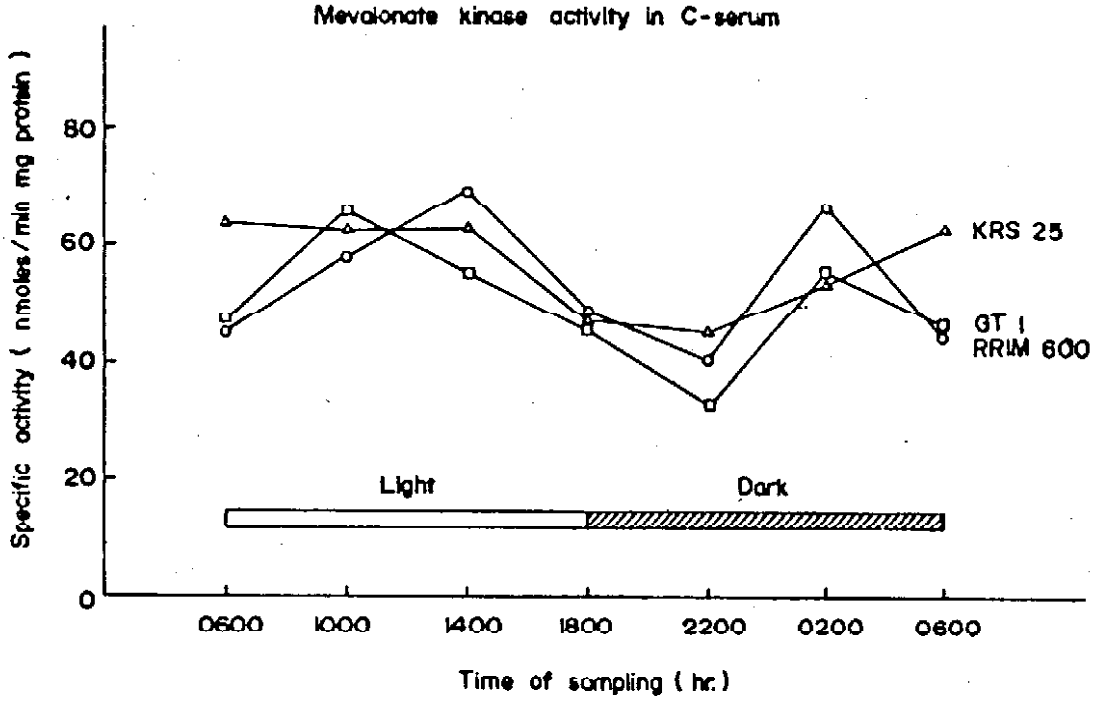
รูปที่ 1.4 Lineweaver-Burke Plotแสดงความสัมพันธ์ระหว่างส่วนกลับของความว่องไว(1/v)ของเอนไซม์เมวาโลเนทไคเนสในส่วน C-serum กับส่วนกลับของค่าความเข้มข้นของสับสเตรท(1/S)

(a)เปลี่ยนความเข้มข้นของ MVA ขณะที่ใช้ ATP เข้มข้น 10mM

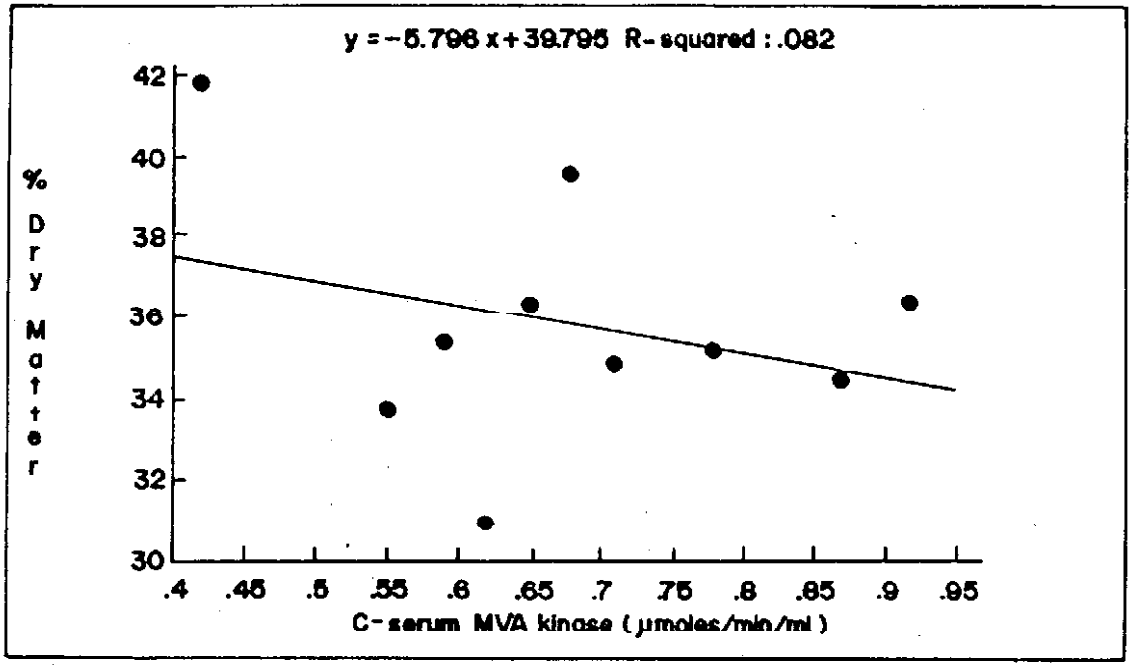
(b)เปลี่ยนความเข้มข้นของ ATP ขณะที่ใช้ MVA เข้มข้น 6mM สภาพการทดลองดังอธิบายไว้ใต้รูปที่ 1.2 และ 1.3



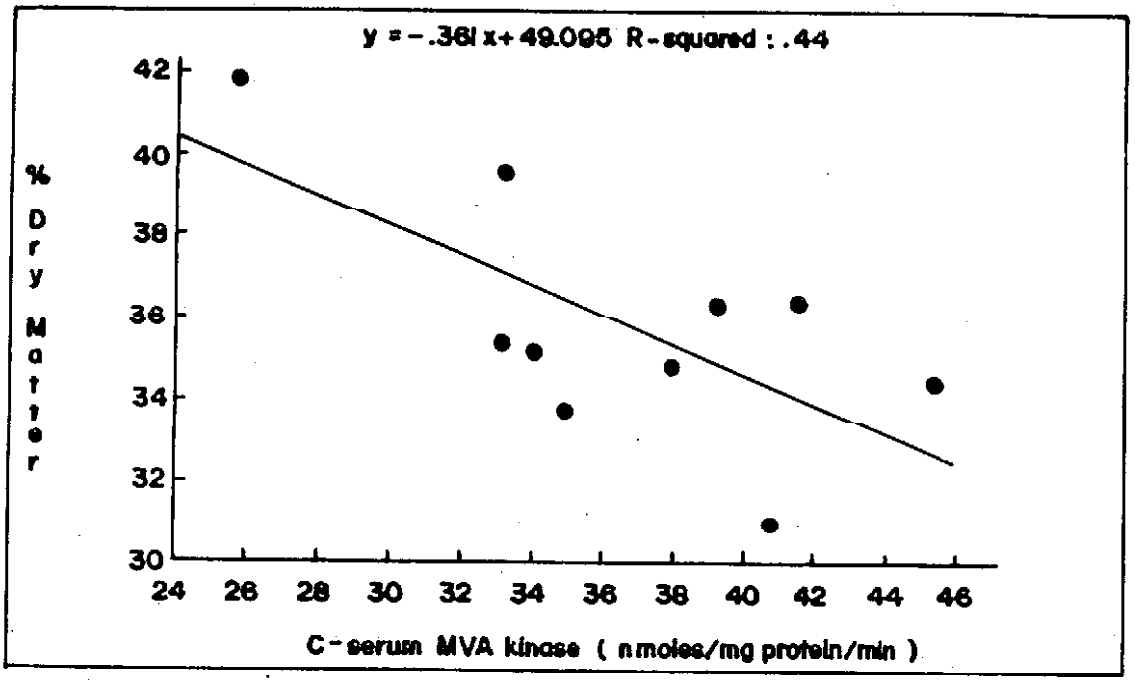
รูปที่ 1.5 อิทธิพลของ Mg^{2+} และ Mn^{2+} ต่อความว่องไวของเอนไซม์เมวาโลเนทไคเนสในส่วน C-serum (ซึ่งผ่านไดแอไลซิสแล้ว) ทดลองเปลี่ยนความเข้มข้นของไอออนโลหะขณะที่ใช้ ATP เข้มข้น 10mM และ MVA เข้มข้น 6mM และมีปริมาณโปรตีนในหลอดทดลองเท่ากับ 0.6 มก. ใช้สารละลายฟอสเฟต 50mM เป็นบัฟเฟอร์ประกอบกับ Mg^{2+} และใช้ MOPS-KOH(50mM) เป็นบัฟเฟอร์ประกอบกับ Mn^{2+} ทำการทดลองที่pH 7.0,อุณหภูมิ 30 °C



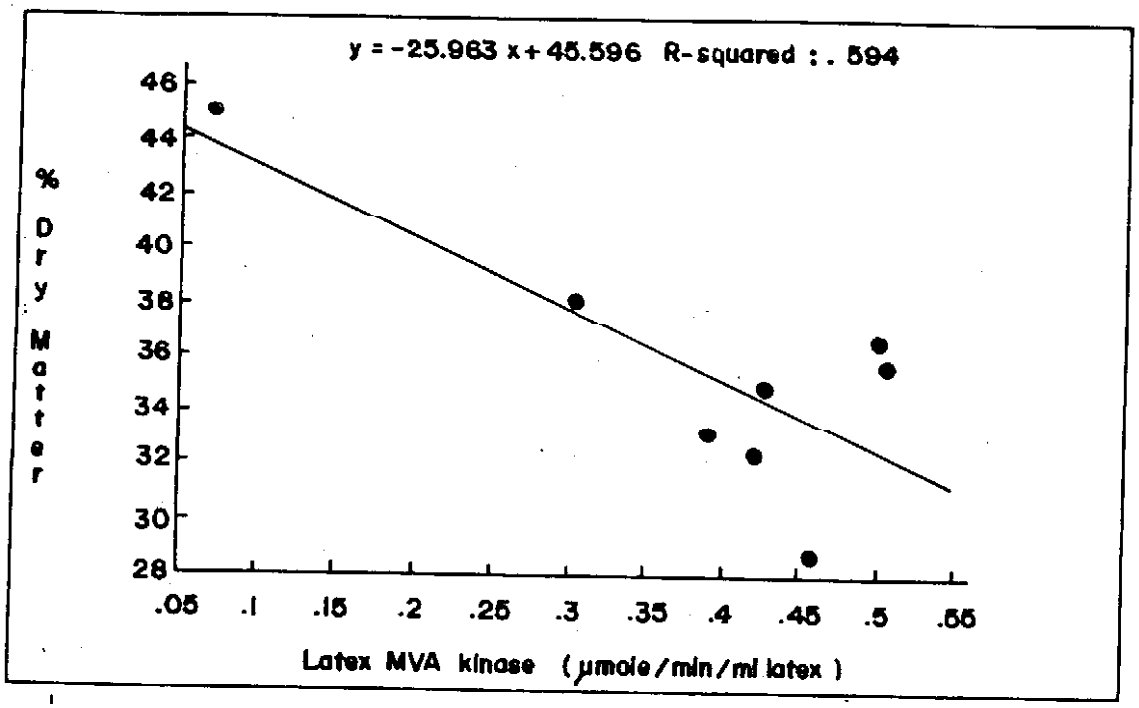
รูปที่ 1.6 ค่าความว่องไวจำเพาะของเมวาโลเนทไคเนสใน C-serum ซึ่งแยกจากน้ำยางของต้นยาง 3 พันธุ์คือ RRIM 600, KRS 25และ GT1 กรีดที่เวลาต่างๆกันในรอบวัน โดยกรีดต้นยางวันเว้นวันเวลา 2.00, 6.00, 10.00, 14.00, 18.00 และ 22.00 น.(เวลากรีดห่างกัน 52 ชั่วโมง)และทดสอบซ้ำสองรอบ แต่ละจุดได้จากการคำนวณค่าเฉลี่ยของความว่องไวจำเพาะที่คำนวณได้จากตัวอย่าง 2 ชุดและแต่ละชุดใช้หลอดตัวอย่าง 3 หลอดกับหลอดควบคุม 3 หลอด



รูปที่ 1./ เส้นถดถอย(regression line) และสหสัมพันธ์(correlation)ระหว่างข้อมูลปริมาณสารแห้งคิดเป็นร้อยละ กับความว่องไวของเมวาโลเนทไคเนสใน C-serum ปริมาตร 1 มล.โดยแยก C-serum จากน้ำยางของต้นยางพันธุ์RRIM 600 10 ต้นซึ่งกรีดในวันเดียวกันและให้น้ำยางปริมาตรต่างกัน เส้นถดถอยมีค่า R^2 เท่ากับ 0.082 และค่าครรชนีสหสัมพันธ์(R)ระหว่างข้อมูลเท่ากับ -0.287



รูปที่ 1.8 เส้นถดถอยและสหสัมพันธ์ระหว่างข้อมูลปริมาณสารแห้ง คิดเป็นร้อยละกับค่าความว่องไวจำเพาะของเอนไซม์เมวาโลเนทไคเนสใน C-serum ซึ่งแยกได้จากน้ำยางต้นยางพันธุ์ RRIM 600 จำนวน 10 ต้นซึ่งกรีดในวันเดียวกันและให้น้ำยางปริมาตรต่างกัน เส้นถดถอยมีค่า R^2 เท่ากับ 0.44 และค่าครรชนีสหสัมพันธ์(R)ระหว่างข้อมูลเท่ากับ -0.664



รูปที่ 1.9 เส้นถดถอยและสหสัมพันธ์ระหว่างข้อมูลปริมาณสารแห้ง(dry matter)เป็นร้อยละกับความว่องไวของเมวาโลเนทไคเนสในน้ำยาง(latex) ปริมาตร 1 มล.โดยใช้น้ำยางจากต้นยางพันธุ์ RRIM 600 8 ต้นที่กรีดในวันเดียวกันและให้น้ำยางปริมาตรต่างกัน เส้นถดถอยมีค่า R^2เท่ากับ 0.594 และค่าดรรชนีสหสัมพันธ์(R)ระหว่างข้อมูลเท่ากับ -0.771

บทอภิปรายและสรุป

ในการศึกษาความว่องไวของเอนไซม์เมวาโลเนทไคเนสในน้ำยางและในส่วน C-serum สามารถใช้วิธีวิเคราะห์ปริมาณ ADP ที่ผลิตจากปฏิกริยาของเอนไซม์ด้วยสเปค-โตรโฟโตมิเตอร์โดยเชื่อมโยงกับการออกซิไดส์ NADH ในสารละลายที่มี PEP และเร่งปฏิ-กริยาโดยเอนไซม์ pyruvate kinase ร่วมกับ lactate dehydrogenase จากการศึกษาสมบัติของเมวาโลเนทไคเนสใน C-serum ของน้ำยางพบว่า ได้ค่า K_m ของ ATP ใกล้เคียงกับที่มีรายงานไว้ แต่ค่า K_m ของ MVA ซึ่งเป็นสับสเตรทอีกตัวหนึ่งมีค่าสูงกว่า.ส่วนความต้องการไอออนโลหะเพื่อทำปฏิกริยาพบว่า ได้ผลใกล้เคียงกับรายงานเก่า แต่ Mg^{2+}ที่ความเข้มข้นสูงไม่ยับยั้งปฏิกริยา

วิธีการวัดความว่องไวดังกล่าวใช้วัดความว่องไวของเอนไซม์ในใบยางพาราไม่ได้ เพราะในใบมีเอนไซม์นี้น้อยเมื่อเทียบกับเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ในกระบวนการสังเคราะห์แสง

ในงานวิจัยนี้พบว่า เอนไซม์นี้ในต้นยางพารามีการเปลี่ยนแปลงความว่องไวในรอบวัน ด้วยเช่นเดียวกับ HMG CoA reductase คือสูงในเวลากลางวันและต่ำในเวลากลางคืน อย่างไรก็ดีความว่องไวของเมวาโลเนทไคเนสวัดได้ในระดับ 30-80 นาโนโมล/นาที มก.โปรตีน ใน C-serum หรือ 300-500 นาโนโมล/นาที.มล.ของน้ำยาง ส่วนความว่องไวของ HMG CoA reductase วัดได้ในระดับ 1-4 พิโกโมล/นาที.มก.โปรตีนใน Bottom fraction หรือในช่วง 8-20 นาโนโมล/นาที.มล.ของน้ำยาง(Wititsuwannakul, Progress Report no.3, 1988) เอนไซม์อีกตัวหนึ่งซึ่งศึกษาโดย ดร.วัลลี สุวจิตตานนท์ คือ HMG CoA synthase (รูปที่ 1.1)มีความว่องไวในระดับเดียวกับ MVA kinase ดังนั้นพอจะสรุปได้ว่า HMG CoA reductase เป็นเอนไซม์ที่ควบคุมวิถีการสังเคราะห์ยางในต้นยางพารา เพราะเร่งปฏิกริยาให้เกิดขึ้นในอัตราต่ำสุด

ข้อมูลอีกส่วนหนึ่งที่นำมาพิจารณาคือสหสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารแห้งกับความว่องไวของเอนไซม์ ในงานวิจัยนี้พบว่าความว่องไวของเมวาโลเนทไคเนสกับปริมาณสารแห้งให้ค่าดัชนีสหสัมพันธ์เป็นค่าลบ ส่วนความว่องไวของ HMG CoA reductase กับปริมาณสารแห้งให้ดัชนีสหสัมพันธ์เป็นค่าบวก(R= +0.76)(Wititsuwannakul, Progress Report

no.3, 1988)

ดังนั้นพอจะสรุปได้ว่า MVA kinase ไม่ใช่เอนไซม์ที่ควบคุมวิถีการสังเคราะห์ยางในต้นยางพารา และหากจะใช้ข้อมูลทางเอนไซม์เป็นเครื่องบ่งชี้ศักยภาพในการผลิตยางในการคัดเลือกพันธุ์ยาง น่าจะใช้เอนไซม์ HMG CoA reductase

ส่วนที่ 2

การทดลองเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อต้นยางพารา

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของต้นยางพาราในงานวิจัยนี้มีจุดประสงค์สำคัญคือ นำแคลลัส ที่ได้ไปใช้ในการทดสอบความต้านทานของพันธุ์ยางพาราต่อเชื้อรา ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคในต้นยาง เช่น *Phytophthora*, *Colleotrichium* และ *Oidium* พันธุ์ยางพาราที่เป็นโรคจากเชื้อราเหล่านี้คือพันธุ์ RRIM 600 ส่วนพันธุ์ GT 1 สามารถทนต่อเชื้อ *Phytophthora* ได้ และ PB 5/51 จะทนต่อเชื้อ *Colleotrichium* และ *Oidium*

รายงานที่เกี่ยวกับงานเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อต้นยางพาราจนสำเร็จเป็นต้นใหม่ มีเพียงรายงานเดียว (Chen *et al.*,1979) โดยเริ่มจากอับละอองเรณูของดอกยาง ส่วนใหญ่ทำได้เพียงเพาะเลี้ยงจนได้แคลลัส และพบว่าเนื้อเยื่อที่จะให้แคลลัสได้ดีคืออับละอองเรณูจากดอกตัวผู้ การทดลองนี้ได้ทดสอบอาหารเพาะเลี้ยงบางสูตรสำหรับเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากส่วนใบอ่อนและยอดอ่อนร่วมกับอับละอองเรณู

วัสดุและวิธีทดลอง

1. วัสดุ

ใช้ใบอ่อน, ยอดอ่อน และช่อดอกยางพาราที่ยังไม่บาน ดอกที่นำมาใช้มีพันธุ์ RRIM 600, RRIC 6, GT 1 และ PR 255 นำมาแช่ตู้เย็นที่ 15° เซลเซียส ทิ้งไว้ค้างคืนก่อนฆ่าเชื้อ

2. สารเคมี

สารเคมี, สารฮอร์โมน และวิตามิน ใช้ผลิตภัณฑ์ดังที่ระบุไว้ในส่วนที่ 1

3. การฆ่าเชื้อวัสดุที่นำมาเพาะเลี้ยง

ล้างส่วนของพืชที่นำมาใช้เพาะเลี้ยงด้วยน้ำสะอาดจนหมดฝุ่นละออง นำไปแช่ในสารละลาย $HgCl_2$ 0.2% นาน 10 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว (autoclaved) 5-6 ครั้ง

4. การเตรียมอาหารวุ้นสำหรับเพาะเลี้ยง

ใช้ส่วนผสมตามรายละเอียดที่ระบุในภาคผนวก 1-4 ในการเตรียมอาหารวุ้นสูตร Modified White's medium (WM) และ สูตรของ Murashige and Skook (MS) ใช้วิธีกรองฆ่าเชื้อสารละลายวิตามินและฮอร์โมนก่อนผสมกับอาหารวุ้นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว และเปลี่ยนปริมาณฮอร์โมนไปตามการทดลอง

ส่วนอาหารวุ้นสูตร MB และ MLIM ใช้วิธีนึ่งฆ่าเชื้อวิตามินและฮอร์โมนร่วมกับส่วนผสมอื่น ๆ ทั้งหมด โดยคุณมาณี แก้วชนิด เป็นผู้เตรียมจากวิธีของ Chen et al.(1979)

5. การเพาะเลี้ยง

ใช้เฉพาะเนื้อเยื่อเจริญภายในตายอดที่เพิ่งแตกใหม่, เนื้อเยื่อใบ ตัดให้มีขนาดประมาณ 3-5 มม. ดอกตัวผู้ตัดเอาเฉพาะอับละอองเรณูจากดอกที่ไม่บาน เพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตรต่าง ๆ ที่อุณหภูมิประมาณ 25° เซลเซียส ให้แสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ 12 ชั่วโมง/วัน

ผลการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

การทดลองเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนต่าง ๆ ของต้นยางพาราในอาหารวุ้นสูตรต่างๆ ได้ผลพอสรุปได้ดังนี้

1. ไม่ได้แคลลัสเมื่อใช้อาหารสูตร WM และ MS (รูปที่ 2.1, 2.2 และ 2.7 ส่วนใหญ่เนื้อเยื่อกลายเป็นสีดำและไม่เพิ่มขนาด เมื่อทดลองใช้รังไข่จากดอกยางพันธุ์ RRIM 600 พบบางชิ้นไม่เปลี่ยนเป็นสีดำแต่ขนาดไม่โตขึ้น (รูปที่ 2.1)

2. อาหารวุ้นที่ทำให้อับละอองเรณูของดอกยางเกิดเป็นแคลลัสได้ดี คืออาหารสูตร MB และ MLIM ดังตัวอย่างในรูปที่ 2.3, 2.4, 2.5 และ 2.6 (บางส่วนเป็นผลการเพาะเลี้ยงของคุณ มาณี แก้วชนิด)

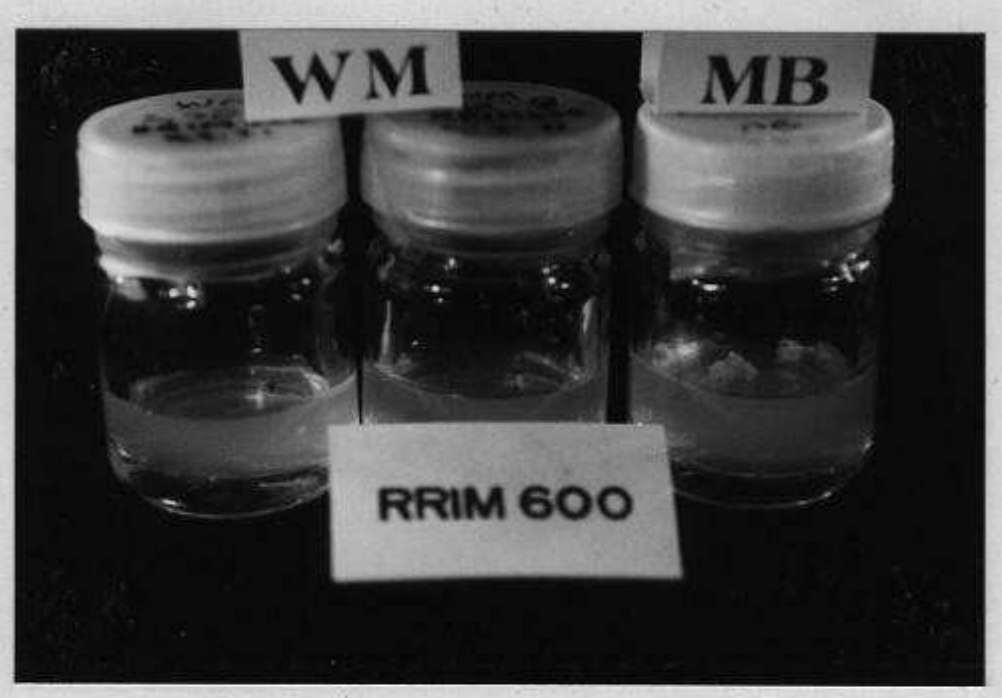
3. เนื้อเยื่อจากใบอ่อนและยอดอ่อนไม่เจริญในอาหารวุ้นสูตรใดที่ใช้เลย

พันธุ์ยางที่ให้แคลลัสมีอัตราเจริญดีคือ PR 255, RRIM 600 และ GT1 เมื่อแคลลัสมีอายุได้ 3 เดือน จะมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 3 มม. ส่วนแคลลัสของพันธุ์ RRIC 6 เจริญช้ากว่า

รูปที่ 2.1 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของต้นยางพาราพันธุ์ RRIM 600 ใน White's medium

ขวดซ้าย - อับละอองเรณูในอาหารผสม 2,4-D 1 mg/l.

ขวดขวา - รังไข่ ในอาหารผสม IAA 1 mg/l.



รูปที่ 2.2 เปรียบเทียบการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของต้นยางพาราพันธุ์ RRIM 600

ขวดซ้าย - อับละอองเรณู และ กลาง - รังไข่ ซึ่งเพาะเลี้ยงใน White's medium

ขวดขวา - อับละอองเรณู ซึ่งเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MB

(อายุการเพาะเลี้ยง 2 เดือน)

รูปที่ 2.3 การเพาะเลี้ยงอับละอองเรณูของต้นยางพาราพันธุ์ RRIC 6

ขวดซ้าย - เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS

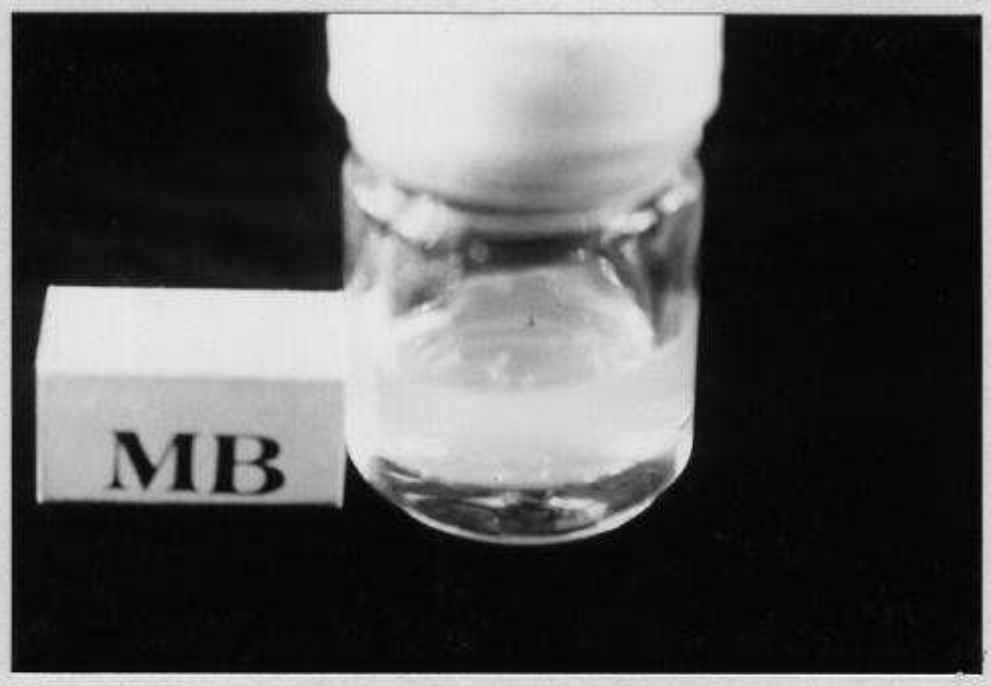
ขวดขวา - เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MLHM

(อายุการเพาะเลี้ยง 3 เดือน)

รูปที่ 2.4 การเพาะเลี้ยงอับละอองเรณูของต้นยางพาราพันธุ์ GT 1

ขวดซ้าย - ใช้อาหารสูตร MLHM (อายุ 3 เดือน)

ขวดขวา - ใช้อาหารสูตร MB (อายุ 2 สัปดาห์)



รูปที่ 2.5 การเพาะเลี้ยงอับละอองเรณูของต้นยางพาราพันธุ์ PR 255 ในอาหารสูตร MB (อายุ 2 สัปดาห์)

รูปที่ 2.6 การเพาะเลี้ยงอับละอองเรณูของต้นยางพาราพันธุ์ PR 255
ขวดซ้าย - ใช้อาหารสูตร MB (อายุ 7 สัปดาห์)
ขวดขวา - ใช้อาหารสูตร MLHM (อายุ 2 สัปดาห์)

รูปที่ 2.7 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อใบอ่อนของต้นยางพาราพันธุ์ RRIM 600 ในอาหารสูตร MS

ขวดซ้าย - ผสม 2,4-D 1 mg/l

ขวดขวา - ผสม 2,4-D 0.5 mg/l และ kinetin 0.2 mg/l

(เพาะเลี้ยงนาน 3 เดือน)

จากการศึกษาของคณะวิจัยได้ผลว่าเมื่อเก็บแคลลัสไว้ในอาหารวุ้นที่นำมาเพาะเลี้ยงครั้งแรกเกิน 3 เดือน แคลลัสจะกลายเป็นสีน้ำตาลและตายไปในที่สุด หากย้ายแคลลัสหรือแบ่งแยกออกไปเลี้ยงในอาหารสูตร MLHM จะเจริญต่อไปได้

สรุป

จากการวิเคราะห์องค์ประกอบของอาหารวุ้นสูตรต่าง ๆ ที่ใช้พบว่ามีความแตกต่างกันในปริมาณสารไนเตรต อาหารสูตรที่ใช้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อยางพาราได้จะมีสารประกอบพวกไนเตรตในช่วงกลางคือประมาณ 0.02 โมล/ลิตร (เช่นใน MLHM มี NH_4No_3 0.8005, KNO_3 1.01 กรัม/ลิตร) ถ้ามีไนเตรตเพิ่มเป็น 2 เท่า คือ ประมาณ 0.04 โมล/ลิตร เช่นในอาหารสูตร MS หรือมีไนเตรตน้อยเกินไปเช่นในอาหารสูตร WM มีเกลือไนเตรต (KNO_3 และ $Ca(NO_3)_2$) ประมาณ 0.001 โมล/ลิตร จะใช้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อยางพาราไม่ได้

เอกสารอ้างอิง

พรทิพย์ ธนูทอง (2528) วิธีเพาะเลี้ยงเซลและเนื้อเยื่อพืช โครงการผลิตสิ่งตีพิมพ์ทางเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ ม.ขอนแก่น หน้า 110-112

Benedict, C.R. (1982) Rubber biosynthesis in "Biosynthesis of Isoprenoid Compounds Vol.2. eds. J.W. Porter and S.L. Spurgeon. John Wiley & Son Inc., New York. p. 355.

Chen, Z., Chen, F., Chien, C., Wang, C, Chang, S., Hsu, H., Ou, H., Ho, Y. and Lu, T. (1979) A process of obtaining pollen plants of Hevea brasileinsis, Muell.,-Ary. Sci. Sin. 22, 81.

Dominowski, R.L. (1980) Research Methods. Prentice Hall, Inc. Englewood Cliffs, N.J. pp. 252-276.

Gray, J.C. and Kekwick, R.G.O. (1973) Biochem. J.133, 335.

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. (1951) J. Biol. Chem. 193, 265.

Sipat, A.B. (1982) Phytochemistry 21, 2613.

Smith, M.M. and Stone, B.A. (1973) Aust. J. Biol. Sci. 26, 123.

Williamson, I.P. and Kekwick, R.G.O. (1965) Biochem. J. 96,862

Wititsuwannakul, R. (1986) Experientia 42, 44.

Wititsuwankul, R. "Biotechnology application for characterization and selection of better-yielding rubber clones." Progress report no.3 USAID/PSTC Program Grant no. 936-5542-G-00-6054-00.

ภาคผนวก 1

Modified White's medium

(Smith and Stone, 1973)

Major elements	g/l
$MgSO_4.7H_2O$	0.7296
Na_2SO_4	0.7296
$Ca(NO_3).4H_2O$	0.2903
KCl	0.0700
$NaH_2PO_4.2H_2O$	1.8096
KNO_3	0.0800

Minor elements	g/l
$MnSO_4.1H_2O$	0.003
$ZnSO_4.7H_2O$	0.0005
H_3BO_3	0.0005
$CuSO_4.5H_2O$	0.000025
$CoCl_2.6H_2O$	0.000026
$FeCl_3.6H_2O$	0.011
Citric acid	0.0085

วิตามิน

Nicotinic acid	0.0000012
Thiamin hydrochloride	0.00024
Calcium pantothenate	0.00025
Pyridoxine	0.00025

สารอื่นๆ

Sucrose	2-3%
(ปรับตามการทดลอง)	
Yeast extract (Difco)	0.4%
pH	5.5
Agar	10.0 g/l

ฮอร์โมน (ปรับตามการทดลอง)

Indole 3-acetic acid	1 mg/l
2,4-D	1 mg/l
Kinetin	0.5-1 mg/l

ภาคผนวก 2

Murashige and Skoog Plant Salt Mixture

Macroelement	g/l	Microelements	mg/l
NH_4NO_3	1.650	H_3BO_3	6.2
KNO_3	1.900	$MnSO_4.H_2O$	16.19
$CaCl_2.2H_2O$	0.440	$ZnSO_4.7H_2O$	8.6
$MgSO_4.7H_2O$	0.370	KI	0.83
KH_2PO_4	0.170	$Na_2MoO_4.2H_2O$	0.25
Na_2-EDTA	0.0370	$CuSO_4.5H_2O$	0.025
$FeSO_4.7H_2O$	0.0278	$CoCl_2.6H_2O$	0.025

สารอินทรีย์อื่นๆ

Sucrose	2-3% (ตามการทดลอง)	Agar (1 %)	10.0 g/l
Inositol	0.1 g/l	pH	5.8
Nicotinic acid	0.5 mg/l		
Pyridoxine	0.5 mg/l		
Thiamin. HCl	0.1 mg/l		
Glycine	2.0 mg/l		
Yeast extract (0.4%)	4.0 g/l		

ฮอร์โมน (ใส่ตามการทดลอง)

IAA	1 mg/l
2,4-D	1 mg/l
Kinetin	0.5-1 mg/l

ภาคผนวก 3

MB Medium

I.	KNO_3	0.954	gm/l	III.	Na_2-EDTA	0.4099 mg/l
	NH_4NO_3	0.0065	gm/l		$FeSO_4.2H_2O$	0.0305 mg/l
	$MgSO_4.2H_2O$	0.37	gm/l			
	$CaCl_2.2H_2O$	0.53	gm/l			
	KH_2PO_4	0.503	gm/l			
II.	H_3BO_3	0.7264	gm/l	IV.	Myo-inositol	0.1817 mg/l
	$MnSO_4.4H_2O$	0.1696	gm/l		Pyridoxine	0.1016 mg/l
	$ZnSO_4.7H_2O$	0.3938	gm/l		Thiamin	0.1707 mg/l
	$Na_2MoO_4.5H_2O$	0.0622	gm/l		Nicotinic acid	0.0529 mg/l
	Sucrose	9.89	gm/l		Glycine	0.1609 mg/l

ฮอร์โมน

-Kinetin	0.9	mg/l
-2,4-D	0.9	mg/l
-NAA	1.0	mg/l
pH	5.8	
Agar	13.0	g/l

ภาคผนวก 4

MLHM Medium

M= Medium concentration of minerals

I	g/l	II	mg/l
NH_4NO_3	0.8005	H_3BO_3	4.7
KNO_3	1.011	$MnSO_4$	1.2
NaH_2PO_4	0.1379	$ZnSO_4$	5.8
$CaCl_2$	0.1665	$CuSO_4$	0.2
$MgSO_4$	0.3698	Na_2MoO_4	0.2
		$CoCi_2$	0.1
		KI	0.5
		EDTA	18.6

L= Low concentration of Auxin

2,4-D	0.1	mg/l
IAA	0.1	mg/l
IBA	0.1	mg/l
NAA	0.1	mg/l

H= High concentration of Cytokinin

Kinetin	3.0	mg/l
BAP	3.0	mg/l

M= Medium concentration of growth factors and amino acids

Growth factors	mg/ml	Amino Acids	mg/l
Inositol	54.1	L-Cysteine.HCl	7.3
Nicotinic acid	2.5	Glycine	1.9
Pyridoxine.HCl	0.7		
Thiamin.HCl	6.8	Sucrose	20.54 g/l
Biotin	0.2	pH	5.5
D-Ca-Pantothene	1.9	Agar	13.0 g/l
Riboflavin	1.9		
L-Ascorbic acid	0.9		
Choline Chloride	0.7		