



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การศึกษาโปรตีโอมิกส์จากใบกล้วยในกลุ่ม diploid triploid
และ tetraploid
(Study of proteomics from banana leaves in diploid triploid
and tetraploid)

ชื่อหัวหน้าโครงการผู้รับทุน / ผู้วิจัย
ดร. บังอร ประจันบาล

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้
(เงินอุดหนุนจากรัฐบาล)ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2562 มหาวิทยาลัยบูรพา

รหัสโครงการ 60955
สัญญาเลขที่ 29/2562

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การศึกษาโปรตีโอมิกส์จากใบกล้วยในกลุ่ม diploid triploid
และ tetraploid
(Study of proteomics from banana leaves in diploid triploid
and tetraploid)

ชื่อหัวหน้าโครงการผู้รับทุน / ผู้วิจัย
ดร.บังอร ประจันบาล

คณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยบูรพา วิทยาเขตสระแก้ว

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้ (เงินอุดหนุนจากรัฐบาล)
ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2562 มหาวิทยาลัยบูรพา ผ่านสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ เลขที่
สัญญา 29/2562

บทคัดย่อ

กล้วยที่มีความแตกต่างของจีโนมยังไม่เคยมีการรายงานเกี่ยวกับโปรตีน การศึกษาครั้งนี้จึงเปรียบเทียบรูปแบบของโปรตีนในใบกล้วยกลุ่ม ดิพลอยด์ ทริพลอยด์ และเตตระพลอยด์ เพื่อป้องกันความแตกต่างของโปรตีนที่สะสมในกล้วยแต่ละชนิด โดยตัวอย่างโปรตีนวิเคราะห์ด้วยวิธี shotgun proteomics พบโปรตีนทั้งหมดจำนวน 42,510 ชนิดที่วิเคราะห์ด้วย MaxQuant proteomics software โดยมีโปรตีนที่พบเหมือนกันของใบกล้วยในกลุ่มพลอยด์ ทริพลอยด์ และเตตระพลอยด์ แต่มีการแสดงออกของโปรตีนที่ไม่เท่ากันที่มีค่านัยสำคัญทางสถิติ False discovery rate (FDR) น้อยกว่า 0.05 พบจำนวน 30 ชนิด นอกจากนี้กล้วยทั้ง 7 สายพันธุ์ที่มีความแตกต่างของยีนยังทำให้พบชนิดของโปรตีนในใบกล้วยที่จำเพาะแตกต่างกันของใบกล้วยในแต่ละสายพันธุ์ที่มีค่านัยสำคัญทางสถิติ น้อยกว่า 0.05 คือ ใบกล้วยน้ำไท (AA) ใบกล้วยตานี (BB) ใบกล้วยนาก (AAA) ใบกล้วยน้ำว้า (ABB) ใบกล้วยสามเดือน (AAB) ใบกล้วยหิน (BBB) และใบกล้วยเทพรส (ABBB) พบโปรตีนที่แสดงออกจำเพาะจำนวน 6 โปรตีน 11 โปรตีน 7 โปรตีน 8 โปรตีน 14 โปรตีน 9 โปรตีน และ 8 โปรตีน ตามลำดับ ซึ่งความแตกต่างของยีนอาจมีผลต่อการแสดงออกของโปรตีนและการทำหน้าที่แตกต่างกันของโปรตีนในใบกล้วยแต่ละสายพันธุ์ นอกจากนี้โปรตีนที่แสดงออกจำเพาะอาจนำไปพัฒนาเป็น molecular marker สำหรับกล้วยในแต่ละสายพันธุ์ได้

Abstract

Banana with different genomes have not been reported in the protein. This study compared the protein profile of diploid banana leaves were performed for identify differentially accumulated proteins to each type. Protein samples were analyzed by shotgun proteomics. A total of 42,510 proteins were identified using MaxQuant proteomics software. Thirty proteins were significantly obtained as the same protein but showing different quantitative expressions from diploid, triploid and tetraploid banana leaves (FDR< 0.05). Moreover, seven banana genotypes revealed differential expression patterns of specific banana leaves proteins. This result significantly demonstrated 6, 11, 7, 8, 14, 9 and 8 specific proteins in leaves of Klui Nam Thai (AA), Klui Ta Nee (BB), Klui Nak (AAA), Klui Nam Wa (ABB), Klui Sam Doen (AAB), Klui Hin (BBB) and Klui Teparod (ABBB), respectively (FDR< 0.05). The different gene expressions in each banana type may result in different expression and functionalities of the proteins. Moreover, the specific protein may have interest in developing molecular markers for each banana type.

สารบัญเรื่อง

เนื้อหา	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
สารบัญเรื่อง	ง
สารบัญตาราง	จ
สารบัญภาพ	ฉ
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย	ช
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 เนื้อหาของเรื่องที่เคยมีผู้ทำการวิจัยมาก่อน	1
1.2 ที่มาและความสำคัญ	2
1.3 วัตถุประสงค์และขอบเขตการวิจัย	4
1.4 วิธีดำเนินการวิจัยโดยสรุปทฤษฎี และ/หรือ แนวทางความคิดที่นำมาใช้ในการวิจัย	5
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ ฯลฯ	5
บทที่ 2 เนื้อเรื่อง	6
2.1 รายละเอียดเกี่ยวกับวิธีดำเนินการวิจัย	6
2.2 ผลการวิจัย	8
บทที่ 3 อภิปรายผลการทดลอง	28
บทที่ 4 สรุปและเสนอแนะ	31
บทที่ 5 ผลผลิต (Output)	32
รายงานการเงิน	43
เอกสารอ้างอิง	44
ประวัตินักวิจัยและคณะ	48

สารบัญตาราง

ตาราง	หน้า
ตารางที่ 1 กล้วยที่ใช้ในการวิจัย	4
ตารางที่ 2 จำนวนแถบโปรตีนทั้งหมดของใบกล้วย	9
ตารางที่ 3 แสดงผลการระบุชนิดของโปรตีนด้วย LC-MS/MS	12
ตารางที่ 4 แสดงชื่อและการทำนายหน้าที่ของโปรตีนจากโปรตีนที่พบในใบกล้วยทั้ง 7 สายพันธุ์แต่มีการแสดงออกที่แตกต่างกัน	17
ตารางที่ 5 แสดงชนิดของโปรตีนในใบกล้วยที่พบจำเพาะในใบกล้วยแต่ละสายพันธุ์ของกลุ่ม diploid triploid และ tetraploid	21

สารบัญภาพ

ภาพ	หน้า
ภาพที่ 1 SDS-PAGE ของโปรตีนจากใบกล้วยที่สกัดด้วย lysis buffer (ก) และ 0.25% SDS (ข).	8
ภาพที่ 2 2D-PAGE โปรตีนจากใบกล้วยที่สกัดด้วย lysis buffer	10
ภาพที่ 3 แสดงจุดโปรตีนจากใบกล้วยตานี (ซ้าย) และใบกล้วยน้ำว้า (ขวา)	11
ภาพที่ 4 การเปรียบเทียบแบบแผนโปรตีนของใบกล้วยน้ำว้าที่แยกด้วย IPG pH 3-10 (ซ้าย) IPG pH 4-7 (ขวา) ขนาด 7 เซนติเมตร	13
ภาพที่ 5 โปรตีนที่พบในใบกล้วยทั้ง 7 สายพันธุ์แต่มีการแสดงออกที่แตกต่างกัน แสดงในรูปแบบ heat map	16

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย (List of Abbreviations)

คำอธิบายสัญลักษณ์

สัญลักษณ์	ชื่อเต็ม
%	เปอร์เซ็นต์

คำย่อ

คำย่อ	ชื่อเต็ม
2D-PAGE	Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis
HPLC	High-performance liquid chromatography
IEF	Isoelectric focusing
kDa	Kilo Dalton
KH	Kluai Hin (กล้วยหิน)
KN	Kluai Nak (กล้วยนาก)
KNT	Kluai Nam Thai (กล้วยน้ำไท)
KNW	Kluai Nam Wa (กล้วยน้ำว้า)
KSD	Kluai Sam Doen (กล้วยสามเดือน)
KT	Kluai Teparod (กล้วยเทพรส)
KTN	Kluai Ta Nee (กล้วยตานี)
LC	liquid chromatography
ml	Mililiter (มิลลิลิตร)
Mw	Molecular weight
pI	Isoelectric point
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
Vhr	Volt hours
μg	Microgram (ไมโครกรัม)
μl	Microliter (ไมโครลิตร)

บทที่ 1 บทนำ

1.1 เนื้อหาของเรื่องที่เคยมีผู้ทำการวิจัยมาก่อน

กล้วยเป็นหนึ่งในพืชอาหารที่สำคัญของประเทศไทย และประเทศอื่น ๆ ทั่วโลกในเช่นประเทศในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ แอฟริกา และออสเตรเลีย โดยความหลากหลายของกล้วยทั่วโลกจัดเป็นพันธุ์ลูกผสมระหว่างdiploid ของกล้วย 2 สปีชีส์ คือ *Musa acuminata* (จีโนม A) และ *Musa balbisiana* (จีโนม B) ซึ่งโปรตีนเป็นส่วนที่นำมาศึกษาเกี่ยวกับความหลากหลายของยีนของกล้วยในแต่ละสายพันธุ์ ที่มีบทบาทสำคัญในหน้าที่ทางชีวภาพ ซึ่งโปรตีนโอมิกส์นำมาศึกษาความแตกต่างของโปรตีนที่เป็นผลมาจากยีนที่หลากหลายที่มีผลต่อการเจริญและการพัฒนาของพืช โดยมีการศึกษาโปรตีนโอมิกส์จากใบกล้วยดังนี้

ในปี 2012 Vanhove และคณะ ได้ศึกษาหาความหลากหลายทางชีวภาพของกล้วยในกลุ่มต่างๆ ในการทนแล้ง ซึ่งเป็นกล้วยที่เพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ จำนวน 5 กลุ่มที่มีความแตกต่างในด้านของจีโนม (AAAh, AAA, AAB, AABp และ ABB) ถูกนำมาทดสอบในสภาวะที่มีออกซิเจนต่ำ คือลดปริมาณการให้น้ำ โดยสายพันธุ์ ABB แสดงการเหนียวทำให้เกิดสภาวะเครียดน้อยที่สุด เมื่อนำใบกล้วยไปศึกษาโปรตีนโอมิกส์ด้วยวิธี 2D-DIGE พบโปรตีนที่มีลักษณะเด่น 2600 จุด โดยโปรตีน 120 จุด พบมากในพืชที่มีสภาวะเครียด และโปรตีน 18 จุดพบมากในพืชกลุ่มควบคุมที่มีค่านัยสำคัญทางสถิติ มีโปรตีน 24 ชนิดที่สามารถบ่งชี้ชนิดของโปรตีนได้ โดยพบว่าเป็นโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการหายใจ เมตาบอลิซึมของสารอนุมูลอิสระ (ROS) และเอนไซม์ dehydrogenase ที่มีบทบาทสำคัญในการเหนียวทำให้เกิดสภาวะสมดุลของ NAD/NADH (Vanhove et al., 2012) นอกจากนี้ยังพบว่าความแห้งแล้งเป็นหนึ่งในปัจจัยสำคัญที่กำจัดการให้ผลผลิตของกล้วย ซึ่งให้ผลที่เด่นชัดในด้านการเปลี่ยนแปลงของสภาพภูมิอากาศ โดยกล้วยเป็นพืชที่ค่อนข้างไวต่อความแห้งแล้ง แต่อย่างไรก็ตามพบว่า กล้วยที่มีจีโนไทป์ (genotype) ที่มีจีโนม B จะต้านทานสภาวะเครียดของพืชที่มาจากสภาวะแวดล้อมที่ไม่มีชีวิต เช่น น้ำและอุณหภูมิ ได้ดีกว่ากล้วยที่มีจีโนไทป์ ที่มีจีโนม A โดยเฉพาะอย่างยิ่งกล้วยที่มีจีโนม “ABB” จะมีความต้านทานต่อความแห้งแล้งและสภาวะเครียดจากสภาวะแวดล้อมอื่น ๆ ได้ดีกว่ากล้วยจีโนไทป์อื่น ๆ (Ravi et al., 2013)

ต่อมาได้มีการศึกษาโปรตีนโอมิกส์จากใบกล้วยป่า *Musa acuminata* Colla ซึ่งวิเคราะห์ด้วยวิธี 2D-PAGE ด้วยการใช IPG-strip pH 3-10 ขนาด 13 เซนติเมตร และวิเคราะห์ด้วย Mass spectrometry และระบุชนิดของโปรตีนด้วย NCBIInr, SwissProt, และ expressed sequence tag (EST) database พบ 41 โปรตีนที่สามารถบ่งชี้ชนิดของโปรตีนได้ โปรตีนหลักที่พบอยู่ในกลุ่มที่เกี่ยวข้องกับเมแทบอลิซึมของพลังงาน ที่มีหลายไอโซฟอร์ม รองลงมาคือ กลุ่มที่ทำหน้าที่ด้านภูมิคุ้มกันและการป้องกันตัวเอง พลังงาน/ โกลโคไลซิส/ โกลออกซิเลตไซเคิล /กลูโคซิโนซิส, พลังงาน/ การสังเคราะห์แสง, เมตาบอลิซึม, ออกซิเดชัน ไรต์ักชัน, เมตาบอลิซึมของกรดอะมิโน เป็นต้น (Lu et al., 2013)

นอกจากนี้ยังมีการศึกษาการตอบสนองของกล้วยต่อสภาวะของความหนาวเย็น โดยดูการแสดงออกของโปรตีน โดยใช้วิธีการเปรียบเทียบทางด้านโปรตีนโอมิกส์ โดยนำต้นกล้าของกล้วยพันธุ์

บราซิล (Brazil) มาเลี้ยงที่อุณหภูมิ 5 องศา เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นก็สกัดโปรตีนทั้งหมดจากใบกล้วย แล้วนำไปแยกด้วยวิธี 2D-PAGE และบ่งชี้ชนิดของโปรตีนด้วย mass spectrometry สามารถบ่งชี้ชนิดของโปรตีนที่แสดงออกได้ 28 โปรตีน ซึ่งเป็นโปรตีนที่เป็นที่รู้จักกันดีและโปรตีนตัวใหม่ที่ตอบสนองต่อความเย็น จัดเป็นโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการโดยทั่วไปของเซลล์ได้แก่ การต้านอนุมูลอิสระ (antioxidation) ต้านเชื้อก่อโรค (antipathogen) การสังเคราะห์แสง (photosynthesis) โปรตีนที่คอยพุงช่วยเหลือโปรตีนอื่น (chaperones) การสังเคราะห์โปรตีน (protein synthesis) การส่งต่อสัญญาณ (signal transduction) เมตาบอลิซึมของพลังงาน (energy metabolism) และโปรตีนที่ทำหน้าที่อื่น ๆ (Feng et al., 2015)

ต่อมาได้มีการศึกษาเกี่ยวกับโปรตีนโอมิกส์ของโปรตีนในใบกล้วยที่มีความแตกต่างกันในการเปลี่ยนแปลงของการผันแปรด้านพันธุกรรมของกล้วย *Musa spp. Cultivar Prata Ana* (AAB) ที่มีขนาดปกติ และที่มีขนาดใหญ่ ด้วยวิธี 2D-PAGE โดยใช้ IPG strip pH 3-10 ขนาด 18 เซนติเมตร แล้วคัดเลือกโปรตีนที่มีจำนวนมากที่แตกต่างกันระหว่างใบกล้วยจากขนาดปกติและขนาดใหญ่ แล้วนำมาวิเคราะห์ด้วย MALDI-TOF และระบุชนิดของโปรตีนด้วยการใช้ โปรแกรม MASCOT และ NCBI database โดยพบโปรตีนที่มีจำนวนมากที่แตกต่างกัน 36 จุด และโปรตีน 21 จุดสามารถบ่งชี้ชนิดของโปรตีนได้ ซึ่งเป็นโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับระบบเมตาบอลิซึมของราก (root metabolism) กระบวนการสังเคราะห์แสง (photosynthesis) การแปลรหัสของโปรตีน (protein translation) และการตรึงคาร์บอนและไนโตรเจน (carbon and nitrogen fixation) (Livramento et al., 2018)

1.2 ที่มาและความสำคัญ

กล้วยจัดเป็นพืชเศรษฐกิจชนิดหนึ่ง ที่มีการเพาะปลูกอย่างแพร่หลายในประเทศเขตร้อน ปัจจุบันเป็นที่ยอมรับกันทั่วโลกว่ากล้วยเป็นผลไม้ที่มีประโยชน์ต่อสุขภาพ ดังนั้นกล้วยจึงเป็นที่ต้องการของตลาดมากขึ้น ซึ่งนำมาใช้ประโยชน์ด้านอุตสาหกรรมอาหาร โดยเฉพาะอย่างยิ่งในส่วนของผลกล้วย นอกจากนี้ยังพบว่ามีผลพลอยได้จำนวนมาก จากการนำวัตถุดิบของเสียทางด้านเกษตรนำกลับมาใช้ใหม่ เป็นการช่วยลดการสูญเสียทางด้านชีวมวลที่ไม่ได้ใช้ประโยชน์ โดยการใช้ผลพลอยได้จากกล้วยเช่น เปลือก ใบ ลำต้น ก้าน และช่อดอกที่ใช้เป็นอาหารและที่ไม่ใช่เป็นอาหารโดยนำมาประยุกต์ใช้ทางด้านสีและรส เป็นแหล่งทางเลือกด้านธาตุอาหารหลักและธาตุอาหารรอง ผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร อาหารปศุสัตว์ เส้นใยธรรมชาติ และเป็นแหล่งของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ได้จากธรรมชาติและปุ๋ยชีวภาพ (Padam et al., 2014) โดย มหาวิทยาลัยบูรพา วิทยาเขตสระแก้ว มีโครงการฟาร์มตัวอย่างที่ได้รวบรวมพันธุ์กล้วย diploid (โครโมโซม 2 ชุด) triploid (โครโมโซม 3 ชุด) และ tetraploid (โครโมโซม 4 ชุด) มาปลูกไว้ภายในพื้นที่ของฟาร์มตัวอย่าง เพื่อเป็นแหล่งเรียนรู้ให้กับนักเรียน และประชาชนทั่วไปในเขตจังหวัดสระแก้ว และจังหวัดใกล้เคียงได้ใช้ประโยชน์อย่างต่อเนื่อง แต่อย่างไรก็ตามยังขาดข้อมูลด้านแบบแผนของโปรตีนที่อยู่ในกล้วยที่ทำการเพาะปลูก โดยทางผู้วิจัยสนใจศึกษาโปรตีนในใบกล้วยเพราะใบกล้วยมีหน้าที่หลัก ๆ คือการสร้างอาหารด้วยกระบวนการสังเคราะห์แสง การหายใจและการคายน้ำในขณะที่ลำต้นเทียมมีการเจริญนั้น จำนวนใบจะเพิ่มขึ้นและมีขนาดใหญ่ขึ้น การเจริญจะเป็นไปเรื่อยๆ ใบจะเริ่มเล็กลงในช่วง 6-8 ใบก่อนการออกดอก แต่เริ่มช้าลงและหยุดเจริญของใบเมื่อแทงช่อดอก (แทงปลี) (เบญจมาศ ศิลาชัย) ในระยะนี้

อาจจะมีการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนเกิดขึ้นได้ โดยในเบื้องต้นมีรายงานว่าโปรตีนพบมากในใบกล้วย มีโปรตีนคิดจากน้ำหนักแห้ง 12 เปอร์เซ็นต์ (สำนักพัฒนาอาหารสัตว์) การศึกษาโปรตีโอมิกส์ของใบกล้วยนั้น ส่วนใหญ่เป็นการศึกษาในระดับของการเพาะเลี้ยงกล้วยในระดับห้องปฏิบัติการ โดยหาความหลากหลายทางชีวภาพของกล้วยในกลุ่มต่างๆ ในการทนแล้ง โดยทดสอบในกล้วยที่ทำการเพาะเลี้ยงในห้องทดลอง จำนวน 5 กลุ่มที่มีความแตกต่างในด้านของจีโนม (AAA, AAA, AAB, AAB และ ABB) ถูกนำมาทดสอบในสภาวะที่มีออกซิเจนต่ำ พบโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการหายใจ เมตาโบลิซึมของสารอนุมูลอิสระ (ROS) และเอนไซม์ dehydrogenase ที่มีบทบาทสำคัญในการเหนี่ยวนำให้เกิดสภาวะสมดุลของ NAD/NADH (Vanhove et al., 2012) และการศึกษาการตอบสนองของกล้วยต่อสภาวะของความหนาวเย็น โดยดูการแสดงออกของโปรตีน โดยใช้วิธีการเปรียบเทียบทางด้านโปรตีโอมิกส์ โดยนำต้นกล้าของกล้วยพันธุ์บราซิล (Brazil) มาเลี้ยงที่อุณหภูมิ 5 องศา เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นก็สกัดโปรตีนทั้งหมดจากใบกล้วย แล้วนำไปแยกด้วยวิธี 2D-PAGE และบ่งชี้ชนิดของโปรตีนด้วย mass spectrometry สามารถบ่งชี้ชนิดของโปรตีนที่แสดงออกได้ 28 โปรตีน ซึ่งเป็นโปรตีนที่เป็นที่รู้จักกันดีและโปรตีนตัวใหม่ที่ตอบสนองต่อความเย็น จัดเป็นโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการโดยทั่วๆ ไปของเซลล์ได้แก่ การต้านอนุมูลอิสระ (antioxidation) ด้านเชื้อก่อโรค (antipathogen) การสังเคราะห์แสง (photosynthesis) โปรตีนที่คอยพยุงช่วยเหลือโปรตีนอื่น (chaperones) การสังเคราะห์โปรตีน (protein synthesis) การส่งต่อสัญญาณ (signal transduction) เมตาโบลิซึมของพลังงาน (energy metabolism) และโปรตีนที่ทำหน้าที่อื่น ๆ (Feng et al., 2015) นอกจากนี้ยังมีการโปรตีโอมิกส์จากใบกล้วยป่า *Musa acuminata* Colla ซึ่งวิเคราะห์ด้วยการใช้วิธี 2D-PAGE ด้วยการใช้อิเล็กโตรโฟรีซิส IPG-strip pH 3-10 ขนาด 13 เซนติเมตร และวิเคราะห์ด้วย Mass spectrometry และระบุชนิดของโปรตีนด้วย NCBI nr, SwissProt, และ expressed sequence tag (EST) database พบ 41 โปรตีนที่สามารถบ่งชี้ชนิดของโปรตีนได้ โดยโปรตีนหลักที่พบจะอยู่กลุ่มที่เกี่ยวข้องกับเมแทบอลิซึมของพลังงาน ที่มีหลายไอโซฟอร์ม รองลงมาคือ กลุ่มที่ทำหน้าที่ด้านภูมิคุ้มกันและการป้องกันตัวเอง พลังงาน/ไกลโคไลซิส/ไกลออกซิเลตไซเคิล/กลูโคซิโนอีจีนีส, พลังงาน/การสังเคราะห์แสง, เมตาบอลิซึม, ออกซิเดชัน รีดักชัน, เมตาบอลิซึมของกรดอะมิโน เป็นต้น (Lu et al., 2013) ต่อมาก็มีการศึกษาเกี่ยวกับโปรตีโอมิกส์ของโปรตีนในใบกล้วยที่มีความแตกต่างกันในการเปลี่ยนแปลงของการผันแปรด้านพันธุกรรมของกล้วย *Musa* spp. Cultivar Prata Ana (AAB) ที่มีขนาดปกติ และมีขนาดใหญ่ ด้วยวิธี 2D-PAGE โดยใช้ IPG strip pH 3-10 ขนาด 18 เซนติเมตร แล้วคัดเลือกโปรตีนที่มีจำนวนมากที่แตกต่างกันระหว่างใบกล้วยจากขนาดปกติและขนาดใหญ่ แล้วนำมาวิเคราะห์ด้วย MALDI-TOF และระบุชนิดของโปรตีนด้วยการใช้โปรแกรม MASCOT และ NCBI database โดยพบโปรตีนที่มีจำนวนมากที่แตกต่างกัน 36 จุด และโปรตีน 21 จุดสามารถบ่งชี้ชนิดของโปรตีนได้ ซึ่งเป็นโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับระบบเมตาบอลิซึมของราก (root metabolism) กระบวนการสังเคราะห์แสง (photosynthesis) การแปลรหัสของโปรตีน (protein translation) และการตรึงคาร์บอนและไนโตรเจน (carbon and nitrogen fixation) (Livramento et al., 2018) แต่อย่างไรก็ตามยังไม่มีมีการประยุกต์ใช้เทคนิคทางโปรตีโอมิกส์ในการศึกษาการแสดงออกของโปรตีนทั้งหมดที่อยู่ในใบกล้วยที่มีความแตกต่างด้านโครโมโซม การทดลองครั้งนี้จึงศึกษาโปรตีนจากใบกล้วยที่อยู่ในในกลุ่ม diploid triploid และ tetraploid เปรียบเทียบโปรตีนที่พบ

ในโบลัวด้วยวิธี shotgun proteomics โดยองค์ความรู้ที่ได้ทำให้ทราบการแสดงออกของแบบแผนโปรตีนและสามารถระบุชนิดของโปรตีนที่พบได้ในโบลัวแต่ละกลุ่ม นำไปสู่การนำข้อมูลของโปรตีนจากโบลัวมาวิจัยและพัฒนาต่อยอดในการใช้ประโยชน์จากโปรตีนในโบลัวที่เป็น by product

1.3 วัตถุประสงค์และขอบเขตการวิจัย

เพื่อศึกษาแบบแผนการแสดงออกของโปรตีนทั้งหมดของโบลัวในกลุ่ม diploid triploid และ tetraploid ด้วยเทคนิคโปรตีโอมิกส์

ขอบเขตการวิจัย

นำโบลัวในกลุ่มของชุดโครโมโซม diploid (2n), triploid (3n) และ tetraploid (4n) ดังตารางที่ 1 มาสกัดโปรตีนด้วยการใช้ lysis buffer จากนั้นตรวจสอบแบบแผนของโปรตีนเบื้องต้นด้วยเทคนิค SDS-PAGE ต่อมาก็วิเคราะห์แบบแผนของโปรตีนจากโบลัวตานี (diploid) กล้วยนาก กล้วยน้ำว่า กล้วยหิน triploid และกล้วยเทพรส (tetraploid) ด้วยวิธี 2D-PAGE โดยใช้ IPG strip pH 3-10 ขนาด 7 เซนติเมตร พบว่าแบบแผนของโปรตีนระหว่างโบลัวในแต่ละสายพันธุ์มีการแสดงออกของโปรตีนบางส่วนที่เหมือนกัน และโปรตีนบางส่วนที่แตกต่างกัน และมีบางจุดโปรตีนที่ไม่สามารถแยกเป็นจุดโปรตีนเดี่ยวๆได้ในช่วง pH 4-7 ดังนั้นจึงเปลี่ยนมาใช้ IPG strip pH 4-7 โดยในเบื้องต้นก็ใช้แยกโปรตีนกล้วยน้ำว่า พบว่าสามารถแยกจุดโปรตีนจากจุดเดี่ยวออกเป็น 2 จุดโปรตีนได้ แต่อย่างไรก็ตามพบว่าวิธีการแยกด้วย 2D-PAGE มีข้อจำกัดหลายอย่างที่ไม่สามารถแยกโปรตีนบางส่วนได้ ดังนั้นจึงเปลี่ยนวิธีการวิเคราะห์โปรตีโอมิกส์จากตัวอย่างโบลัวในกลุ่ม diploid triploid และ tetraploid ด้วยวิธี shotgun proteomics เพื่อให้สามารถหาโปรตีนทั้งหมดที่พบได้ในโบลัวแต่ละสายพันธุ์ ที่พบได้เหมือนกันแต่มีระดับการแสดงออกของโปรตีนแตกต่างกันจากโบลัวในแต่ละสายพันธุ์ในกลุ่ม ในกลุ่ม diploid triploid และ tetraploid และชนิดของโปรตีนที่พบเป็นโปรตีน marker ของโบลัวแต่ละสายพันธุ์ในทั้ง 3 ชุดโครโมโซม

ตารางที่ 1 กล้วยที่ใช้ในการวิจัย จำนวนชุดโครโมโซม diploid (2n), triploid (3n) และ tetraploid (4n)

จำนวนชุดโครโมโซม	กลุ่ม	พันธุ์ (Cultivars)
Diploid (2n)	AA	กล้วยน้ำไท (Kluai Nam Thai)
	BB	กล้วยตานี (Kluai Ta Nee)
Triploid (3n)	AAA	กล้วยนาก (Kluai Nak)
	ABB	กล้วยน้ำว่า (Kluai Nam Wa)
	AAB	กล้วยสามเดือน (Kluai Sam Doen)
	BBB	กล้วยหิน (Kluai Hin)
Tetraploid (4n)	ABBB	กล้วยเทพรส (Kluai Teparod)

1.4 วิธีดำเนินการวิจัยโดยสรุปทฤษฎี และ/หรือ แนวทางความคิดที่นำมาใช้ในการวิจัย

กล้วยเป็นพืชอาหารชนิดหนึ่งที่มีความหลากหลายทางด้านจีโนมไทป์และฟีโนไทป์ โดยความหลากหลายของกล้วยทั่วโลกจัดเป็นพันธุ์ผสมระหว่างdiploid ของกล้วย 2 สปีชีส์ คือ *Musa acuminata* (จีโนม A) และ *Musa balbisiana* (จีโนม B) ซึ่งโปรตีนเป็นส่วนที่นำมาศึกษาเกี่ยวกับความหลากหลายของยีนของกล้วยในแต่ละสายพันธุ์ ที่มีบทบาทสำคัญในหน้าที่ทางชีวภาพ ซึ่งโปรตีโอมิกส์นำมาศึกษาความแตกต่างของโปรตีนที่เป็นผลมาจากยีนที่หลากหลายที่มีผลต่อการเจริญและการพัฒนาของพืช โดยจีโนมที่เป็นองค์ประกอบของกล้วยก็เป็นส่วนหนึ่งที่มีผลต่อการแสดงออกของโปรตีนความต้านทานต่อสภาพแวดล้อมที่มีทั้งสภาวะที่แล้งจัดและหนาวจัด หรือพบโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แสง กระบวนการเมตาบอลิซึมทางชีวเคมีของพืช โปรตีนด้านการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน และการต้านอนุมูลอิสระ เป็นต้น แต่อย่างไรก็ตามจากการศึกษาโปรตีโอมิกส์จากใบกล้วยยังไม่เคยมีการรายงานเกี่ยวกับการศึกษาโปรตีโอมิกส์ของใบกล้วยในกลุ่ม diploid triploid และ tetraploid ซึ่งเป็นกล้วยที่มีการเพาะปลูกในประเทศไทย ที่มีจีโนมไทป์แตกต่างกัน โดยใช้วิธี shotgun proteomics เพื่อทราบชนิดของโปรตีนทั้งหมดที่พบเหมือนกัน แต่มีการแสดงออกที่แตกต่างกัน และ ชนิดของโปรตีนที่พบเป็นโปรตีน marker ของใบกล้วยแต่ละสายพันธุ์ในทั้ง 3 ชุดโครโมโซม เพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการนำไปวิจัยต่อยอดในด้านการพัฒนาชุดตรวจสอบสายพันธุ์ของกล้วย และการนำข้อมูลโปรตีนจากใบกล้วยมาใช้ประโยชน์ในด้านอื่น ๆ ต่อไป

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ ฯลฯ

1. เป็นองค์ความรู้เกี่ยวกับชนิดของโปรตีนที่พบเหมือนกันระหว่างใบกล้วยในแต่ละสายพันธุ์ในกลุ่ม diploid triploid และ tetraploid
2. เป็นองค์ความรู้เกี่ยวกับชนิดของโปรตีนที่เป็น marker ของใบกล้วยในแต่ละสายพันธุ์ในกลุ่ม diploid triploid และ tetraploid
3. ผลการทดลองที่ได้ สามารถเป็นองค์ความรู้ให้นักวิจัยนำโปรตีนที่เป็น marker ของใบกล้วยในแต่ละสายพันธุ์ นำไปวิจัยและพัฒนาต่อยอดต่อไป

บทที่ 2

เนื้อเรื่อง

2.1 รายละเอียดเกี่ยวกับวิธีดำเนินการวิจัย

1) ตัวอย่างใบกล้วย

ใบกล้วยที่นำมาศึกษาเป็นใบกล้วยที่สมบูรณ์อยู่ในระยะก่อนการออกปลีได้แก่ กล้วยน้ำไทย กล้วยตานี กล้วยนาก กล้วยน้ำว้า กล้วยสามเดือน กล้วยหิน และกล้วยเทพรส ซึ่งเพาะปลูกในฟาร์มตัวอย่าง ของคณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยบูรพา วิทยาเขตสระแก้ว

2) การสกัดโปรตีนจากใบกล้วย

ใบกล้วยที่จะนำมาสกัดโปรตีนคือใบกล้วยที่มีจำนวนชุดโครโมโซม diploid (2n) ได้แก่ กลุ่ม AA คือพันธุ์กล้วยน้ำไทย (Kluai Nam Thai) กลุ่ม BB คือพันธุ์กล้วยตานี (Kluai Ta Nee) ใบกล้วยที่มีจำนวนชุดโครโมโซม Triploid (3n) ได้แก่กลุ่ม AAA คือ พันธุ์กล้วยนาก (Kluai Nak) กลุ่ม ABB คือพันธุ์กล้วยน้ำว้า (Kluai Nam Wa) กลุ่ม AAB คือพันธุ์กล้วยสามเดือน (Kluai Sam Doen) กลุ่ม BBB คือพันธุ์กล้วยหิน (Kluai Hin) ใบกล้วยที่มีจำนวนชุดโครโมโซม Tetraploid (4n) ได้แก่กลุ่ม ABBB คือพันธุ์กล้วยเทพรส (Kluai Teparod) วิธีการสกัดโปรตีนจากใบกล้วยจะใช้ 2 วิธีคือการสกัดด้วย 2.5 % SDS และสกัดด้วย lysis buffer (7 M urea, 2 M thiourea, 4 % (w/v) CHAPS, 2 % (w/v) DTT) โดยเริ่มจากนำใบกล้วยมาบดในโถรงบดที่มี liquid nitrogen โดยนำส่วนที่บดเป็นเนื้อเดียวกันมาละลายด้วยตัวสกัดตัวแรกคือ 2.5 % SDS และตัวสกัดที่สองคือ lysis buffer จากนั้นนำไปเซนตริฟิวที่ 12,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นเก็บส่วนใสเพื่อวิเคราะห์โปรตีนต่อไป

3) การหาปริมาณโปรตีนด้วยวิธีการของ Bradford

ปิเปตสารละลาย Bradford dry จำนวน 1 มิลลิลิตร ลงใน microcentrifuge tube และใช้เป็น blank ด้วย จากนั้นปิเปตโปรตีนจากใบกล้วยแต่ละชนิด อย่างละ 1 μ l ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 15 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 595 นาโนเมตร จากนั้นคำนวณหาปริมาณโปรตีนจากกราฟมาตรฐานปริมาณโปรตีนโดยใช้ Bovine serum albumin เป็นโปรตีนมาตรฐาน

4) SDS-PAGE

เตรียม 15% separating gel, 4% stacking polyacrylamide gel หลังจากนั้นผสมตัวอย่างโปรตีนปริมาณ 15 ไมโครกรัม กับ 2x solubilizing solution แล้วนำไปต้มประมาณ 2 นาที จากนั้นโหลดตัวอย่างลงในแผ่นเจล แล้วทำการแยกโปรตีนโดยใช้ Tris-glycine เป็น electrod buffer จากนั้นย้อมด้วย coomassie brilliant blue R-250 จนเห็นแถบโปรตีนชัดเจน ทำการ destain ประมาณ 1 ชั่วโมง หรือให้เจลที่ไม่มีแถบโปรตีนใส

5) 2D-PAGE

นำส่วนใสของโปรตีนที่สกัดด้วย lysis buffer ปริมาณ 100 µg มาสกัดแยกด้วย 2D-cleanup kit จากนั้นนำผสมกับ rehydration ที่มี DTT กับ IPG buffer pH 3-10 ให้ได้ปริมาตร 125 µl จากนั้นก็โหลดตัวอย่างโปรตีนดังกล่าวลงบน strip holder ที่วางอยู่บนเครื่อง Ettan® IPGphor (Amersham Biosciences) แล้วค่อยๆ วาง IPG strip ขนาด 7 cm โดยคว่ำหน้าเจลลง แล้ว rehydration เป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นตั้งโปรแกรมสำหรับ run IEF ด้วยการที่มีกระแสไฟฟ้าสุทธิ 9,250 Vhr จากนั้นทำการ equilibrate IPG strip โดยการ incubate IPG strip กับ equilibration solution ปริมาตร 2.5 ml ที่มี DTT 0.025 g เป็นเวลา 15 นาที จากนั้น incubate IPG strip ต่อด้วย equilibration solution ปริมาตร 2.5 ml ที่มี IAA 0.0625 g เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นมาแยกด้วย 15 % SDS-PAGE แล้วทำการย้อมด้วย colloidal coomassie brilliant blue G-250 แล้วล้างสีส่วนเกินออกด้วยน้ำกลั่น จากนั้นนำเจลมาถ่ายรูบด้วยการใช้ เครื่อง ImageQuant LAS 500 GE Healthcare Bio-Sciences AB, Sweden) และวิเคราะห์จุดโปรตีนด้วยโปรแกรม Image Master 2D Platinum v. 5.0 software (Amersham Biosciences, USA)

6) การวิเคราะห์ชนิดของโปรตีนด้วย LC-MS/MS

ทำการคัดเลือกจุดโปรตีนที่น่าสนใจ มาวิเคราะห์หาชนิดของโปรตีน โดยทำการย่อยด้วย เอนไซม์ทริปซิน จากนั้นวิเคราะห์เปปไทด์แต่ละชนิดด้วยระบบ nano-liquid chromatography system (EASY-nLC II, Bruker) คู่กับ ion trap mass spectrometer (Amazon Speed ETD, Bruker) ที่ต่อกับ ESI nano-sprayer โดย ESI-TRAP จะวัดค่า m/z ในช่วงระหว่าง 50-3000 โดยวัดตามวิธีมาตรฐาน โดยใช้โปรแกรม HyStar v.3.2 เป็นตัวควบคุม ion trap ที่ได้ จากนั้นนำข้อมูลที่อยู่ในรูปของ Mascot generic files (mgf) มาบ่งชี้ชนิดของโปรตีนต่อด้วยการใช้โปรแกรม MASCOT MS/MS Ion Search (www.matrixscience.com)

7) การวิเคราะห์ชนิดของโปรตีนด้วยเทคนิค shotgun proteomics

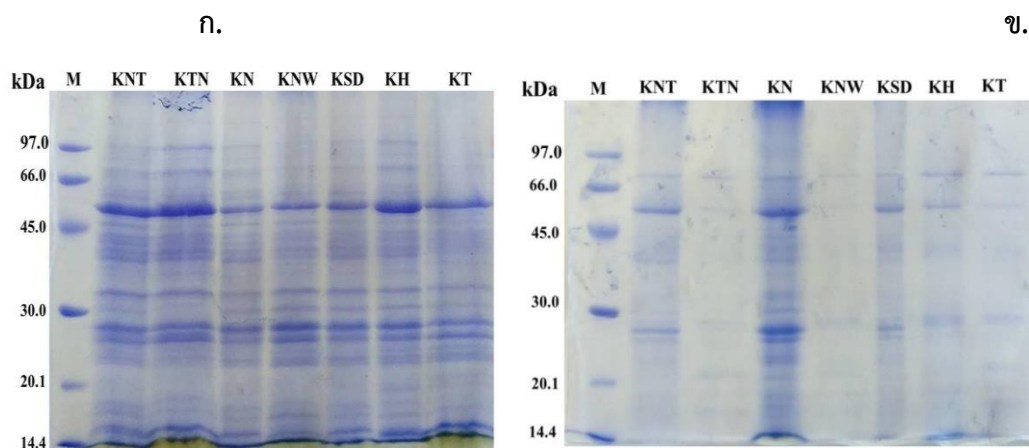
นำโปรตีนที่สกัดได้จากใบกล้วยในแต่ละสายพันธุ์ มาสกัดโปรตีนต่อด้วยสารละลาย 1% Triton-X100/ 50mM EDTA /50mM HEPES-KOH, pH 8.0 จากนั้นทำการตกตะกอนโปรตีนด้วยตัวทำละลาย Acetone เย็น ในอัตราส่วน 1:2 (v/v) ที่อุณหภูมิ -20°C เป็นเวลา 16 ชั่วโมงปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10000g นาน 10 นาที แล้วละลายตะกอนโปรตีนใน 0.1% RapidGest SF/20 mM Ammonium bicarbonate ก่อนวัดความเข้มข้นโปรตีนด้วยเทคนิค Lowry (1951) ใช้ BSA เป็นโปรตีนมาตรฐาน แล้วผสมสารละลายทริปซินกับโปรตีน 5 ไมโครกรัม ด้วยอัตราส่วน 1:20 (w/w) แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 12 ชั่วโมง ต่อมาแยกเปปไทด์ด้วย nanoACQUITY UPLC system ใช้คอลัมน์ PepSwift C18 Nano Column (100 µm × 15 cm, i.d.) และวิเคราะห์เปปไทด์ด้วย Mass Spectrometer รุ่น Q-ToF impact II™ (Bruker Daltonics GmbH, Germany) แล้ววิเคราะห์ข้อมูลเชิงปริมาณด้วยโปรแกรมและระบุชนิดของโปรตีนที่พบด้วยโปรแกรม Maxquant โดยใช้ฐานข้อมูล Musa species (retrieved 20Aug19) (Stefka et al., 2016) แสดงผลโปรตีโอม

เป็น Heatmap ด้วยโปรแกรม MultiExperiment Viewer (MEV) version 4.6.1 (Howe et al., 2010)

2.2 ผลการวิจัย (Results)

1) การแยกโปรตีนด้วย SDS-PAGE

จากการสกัดโปรตีนจากใบกล้วยด้วย lysis buffer เปรียบเทียบกับการสกัดด้วย 0.25% SDS พบว่าการสกัดโปรตีนจากใบกล้วยด้วย lysis buffer ให้จำนวนแถบแบนของโปรตีนมากกว่าการสกัดด้วยการใช้ 0.25% SDS (ภาพที่ 1) แต่อย่างไรก็ตามพบว่าในใบกล้วยนาที่สกัดด้วย 0.25% SDS ให้จำนวนแถบโปรตีนที่ใกล้เคียงกับการใช้ lysis buffer ซึ่งพบว่าโปรตีนโดยส่วนใหญ่ของใบกล้วยจะอยู่ในช่วงน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 50-25 kDa เมื่อเปรียบเทียบโปรตีนในใบกล้วยที่พบในกลุ่มของใบกล้วยที่มีจำนวนชุดโครโมโซม diploid (2n) Triploid (3n) และ Tetraploid (4n) พบว่าจำนวนแถบแบนของโปรตีนใกล้เคียงกัน โดยกล้วยเทพรมีจำนวนแถบแบนโปรตีนหลักน้อยที่สุด คือ 9 แถบ ส่วนกล้วยหินมีจำนวนแถบแบนโปรตีนมากที่สุด คือ 13 แถบ (ตารางที่ 2)



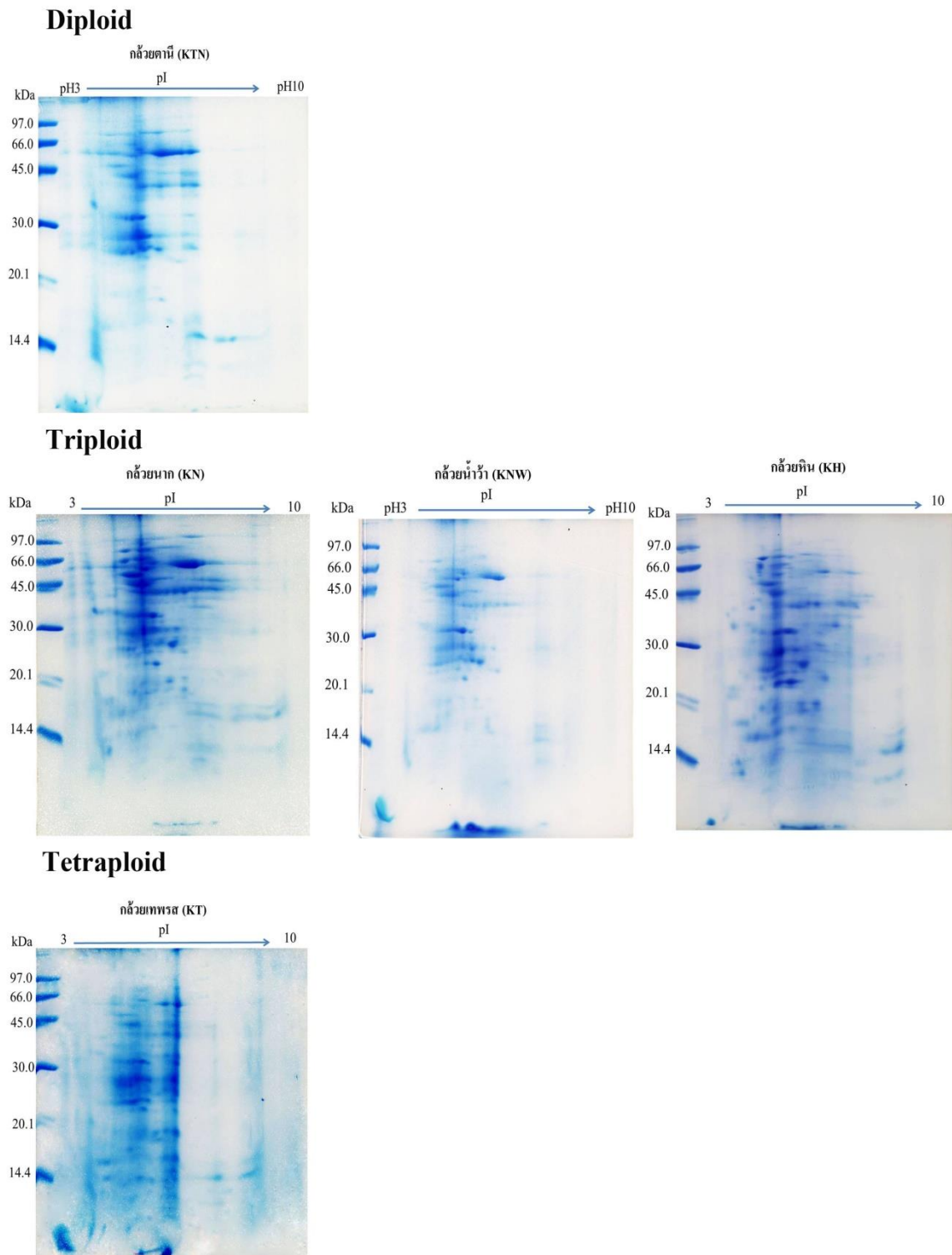
ภาพที่ 1 SDS-PAGE ของโปรตีนจากใบกล้วยที่สกัดด้วย lysis buffer (ก) และ 0.25% SDS (ข). โปรตีนที่โหลดปริมาณ 10 $\mu\text{g}/\text{lane}$ แยกด้วยการใช้ 13.5 % polyacrylamide gel แล้วย้อมด้วยสี Coomassie Brilliant Blue R-250 Lane 1: Marker; lane 2-3 diploid chromosome: KNT (Kluai Nam Thai), KTN (Kluai Nam Thai); lane 4-7 Triploid chromosome: KN (Kluai Nak), KNW (Kluai Nam Wa), KSD (Kluai Sam Doen), KH (Kluai Hin); lane 8 Tetraploid chromosome: KT (Kluai Teparod)

ตารางที่ 2 จำนวนแถบโปรตีนทั้งหมดของใบกล้วยในจำนวนชุดโครโมโซม diploid (2n) Triploid (3n) และ Tetraploid (4n) ที่สกัดจาก lysis buffer

ตัวอย่างใบกล้วย	จำนวนแถบโปรตีน SDS-PAGE
ชุดโครโมโซม diploid (2n)	
กลุ่ม AA พันธุ์กล้วยน้ำไทย (KNT)	10
กลุ่ม BB พันธุ์กล้วยตานี (KTN)	11
ชุดโครโมโซม Triploid (3n)	
กลุ่ม AAA พันธุ์กล้วยนาก (KN)	10
กลุ่ม ABB พันธุ์กล้วยน้ำว้า (KNW)	11
กลุ่ม AAB พันธุ์กล้วยสามเดือน (KSD)	12
กลุ่ม BBB พันธุ์กล้วยหิน (KH)	13
ชุดโครโมโซม Tetraploid (4n)	
กลุ่ม AB BB พันธุ์กล้วยเทพรส (KT)	9

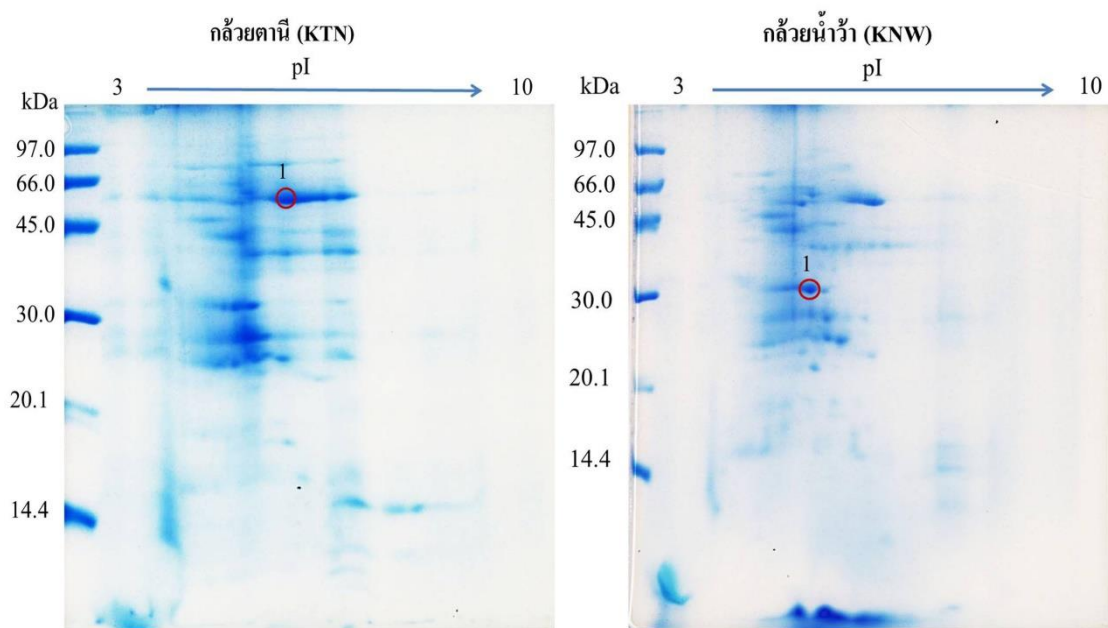
2) การแยกโปรตีนด้วย 2D-PAGE

จากการแยกแบบแผนโปรตีนจากใบกล้วยตานี กล้วยนาก กล้วยน้ำว้า กล้วยหินและกล้วยเทพรสซึ่งเป็นตัวแทนของใบกล้วยจากชุดโครโมโซม diploid triploid และ tetraploid ด้วยเทคนิค 2D-PAGE ซึ่งจากการใช้ IPG strip pH 3-10 พบว่าโปรตีนโดยส่วนใหญ่ในใบกล้วยทั้ง 5 ชนิดจะอยู่ในช่วง pI ประมาณ 4-7 และอยู่ในช่วงน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 55-25 kDa (ภาพที่ 2) โดยพบว่าแบบแผนโปรตีนจากใบกล้วยในกลุ่ม diploid คือใบกล้วยตานีมีจำนวนของโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 21-14 kDa น้อยกว่าโปรตีนในใบกล้วยในกลุ่ม triploid และ tetraploid



ภาพที่ 2 2D-PAGE โปรตีนจากใบกล้วยที่สกัดด้วย lysis buffer ของกล้วยตานี (diploid) กล้วยนาก กล้วยน้ำว้า กล้วยหิน (Triploid) และกล้วยเทพรส (Tetraploid) โปรตีนที่โหลดปริมาณ 100 μ g โดยใช้ IPG strip pH 3-10 ขนาด 7 เซนติเมตร แยก IEF ทั้งหมด 9,750 Vhr. SDS-PAGE ด้วยการใช้อย่าง 15% polyacrylamide gel แล้วย้อมด้วยสี colloidal coomassie brilliant blue G-250

จากนั้นนำจุดของโปรตีนในกลุ่มของ diploid คือกล้วยตานีและ triploid คือ กล้วยน้ำว้า โดยคัดเลือก จุดโปรตีนที่มีความเข้มของแบนโปรตีนมากที่สุดในใบกล้วยตานีแต่มีการแสดงออกของจุดโปรตีนที่มีความเข้มของแบนน้อยในตำแหน่งเดียวกันของใบกล้วยน้ำว้า และจุดโปรตีนที่มีความเข้มของแบนโปรตีนมากที่สุดในใบกล้วยน้ำว้าแต่แต่มีการแสดงออกของจุดโปรตีนที่มีความเข้มของแบนน้อยในตำแหน่งเดียวกันของใบกล้วย (ภาพที่ 3) ซึ่งพบว่าจุดโปรตีนหมายเลข 1 ของใบกล้วยตานี สอดคล้องกับโปรตีน Ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit จุดโปรตีนหมายเลข 1 ของใบกล้วยน้ำว้า สอดคล้องกับโปรตีน LOW QUALITY PROTEIN: oxygen-evolving enhancer protein 1, chloroplastic-like (ตารางที่ 3)

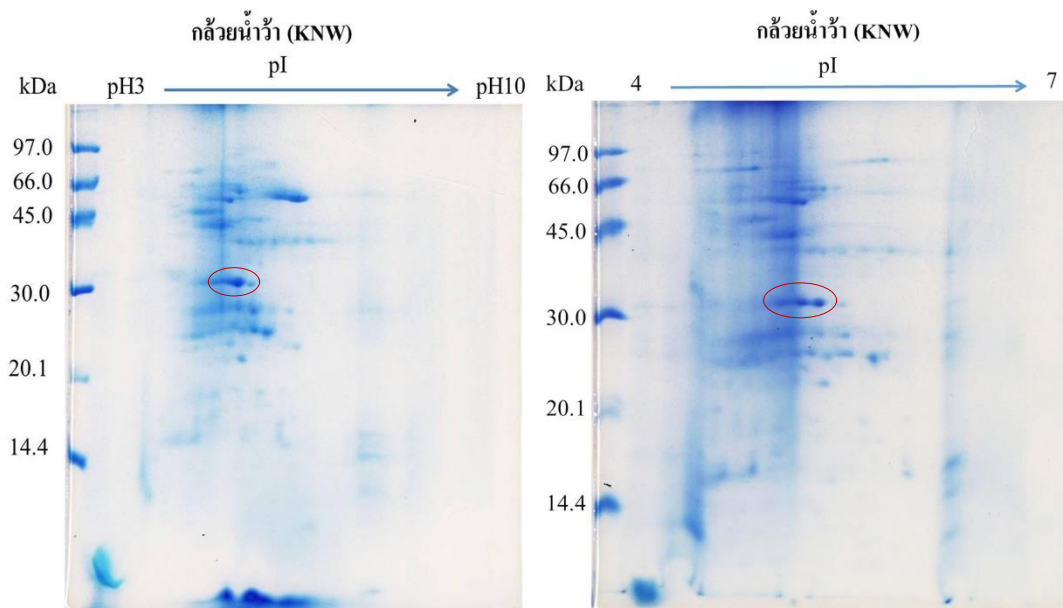


ภาพที่ 3 แสดงจุดโปรตีนจากใบกล้วยตานี (ซ้าย) และใบกล้วยน้ำว้า (ขวา) ที่นำไปวิเคราะห์ด้วย LC-MS/MS

ตารางที่ 3 แสดงผลการระบุชนิดของโปรตีนด้วย LC-MS/MS

Spot No.	Match to	Protein name	Score	Theory		Calculated		Sequence coverage (%)	Peptide sequences
				pI	Mw. (kDa)	pI	Mw. (kDa)		
Kluai Ta Nee									
1	YP_008854433.1	Ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit [Musa textilis]	522	6.23	54.68	5.91	57	17%	KDTDILAAFRV, RFLFCA EAIFFKA, REMTLGFVDLLD,R EMTLGFVDLLRD, KDDE NVNSQ PFMRW, KTFQGP PHGIQVERD, KD DENVNSQPFMRW, KWSPELAAA CEVWKE, KGHY LNATAGTCEEMM KR
Kluai Nam Wa									
1	XP_009412420.1	LOW QUALITY PROTEIN: oxygen-evolving enhancer protein 1, chloroplastic-like [Musa acuminata subsp. malaccensis]	508	6.77	36.23	5.43	31	22%	KRLTYDEIQSKT,K RLTY DEIQSKT, KRLTYDEIQ SKT, KRLTYDEIQSKT, RLTYDEIQSKT, KDGIDYAAVTV QLPGGERV, KD GIDYAAVTVQLPG GERV, KDGIDY AAVTVQLPG GE RV, RVPFLFTIKQ, RGGSTGYDNAVAL PAGGRG, RGD EEELSKENI KN, KIQGVWYAQLEQ

นอกจากนี้ยังพบว่าโปรตีนหลักๆ ของใบกล้วยอยู่ในช่วง pH 4-7 จึงเปลี่ยนมาใช้ IPG strip pH 4-7 เพื่อที่จะสามารถแยกโปรตีนได้ดีขึ้น โดยใช้ตัวอย่างจากใบกล้วยน้ำว้า ซึ่งผลการทดลองพบว่า จุดโปรตีนโดยส่วนใหญ่ไม่มีความแตกต่างกันมากนัก โดยพบว่าจุดที่วงกลมสีแดงของใบกล้วยน้ำว้าที่แยกด้วย IPG strip pH 3-10 พบมีโปรตีน 1 จุดที่มีความเข้มของแบนมากที่สุด แต่ในขณะที่การแยกด้วยการแยกด้วย IPG strip pH 4-7 พบมีโปรตีน 2 จุดที่มีความเข้มของแบนมากที่สุด (จุดวงกลมสีแดง) (ภาพที่ 4)



ภาพที่ 4 การเปรียบเทียบแบบแผนโปรตีนของใบกล้วยน้ำว้าที่แยกด้วย IPG pH 3-10 (ซ้าย) IPG pH 4-7 (ขวา) ขนาด 7 เซนติเมตร โปรตีนที่โหลดปริมาณ 100 μ g โดยใช้ IPG strip pH 3-10 ขนาด 7 เซนติเมตร แยก IEF ทั้งหมด 9,750 Vhr. SDS-PAGE ด้วยการใช้อย่างน้อย 15% polyacrylamide gel แล้วย้อมด้วยสี colloidal coomassie brilliant blue G-250

3) การวิเคราะห์โปรตีนด้วยวิธี shotgun proteomics

จากการศึกษาโปรตีนจากใบกล้วยในกลุ่ม diploid triploid และ tetraploid พบโปรตีนทั้งหมดจำนวน 42510 ชนิด เมื่อเปรียบเทียบระหว่างใบกล้วยทั้ง 7 สายพันธุ์มีโปรตีนที่พบเหมือนกัน แต่มีการแสดงออกของโปรตีนที่ไม่เท่ากันจำนวน 30 ชนิด โดยมีค่านัยสำคัญทางสถิติ False discovery rate (FDR) น้อยกว่า 0.05 โดยมีโปรตีน 12 ชนิด ที่มีการแสดงออกของโปรตีนโดยส่วนใหญ่อยู่ในช่วงประมาณ 7.5-5.4 ได้แก่ โปรตีน PREDICTED: ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase activase, chloroplastic-like, PREDICTED: chromoplast-specific carotenoid-associated protein C1, chromoplastic-like, PREDICTED: 2-Cys peroxiredoxin BAS1, chloroplastic, PREDICTED: 2-Cys peroxiredoxin BAS1, chloroplastic, PREDICTED: glycine cleavage system H protein, mitochondrial-like, PREDICTED: phosphoglycerate kinase, chloroplastic, PREDICTED: peroxiredoxin-2E-2, chloroplastic-like, PREDICTED: ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase activase 2, chloroplastic, PREDICTED:

uncharacterized protein LOC103988823, PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: oxygen-evolving enhancer protein 1, chloroplastic-like, PREDICTED: 2-methylene-furan-3-one reductase, PREDICTED: ruBisCO large subunit-binding protein subunit alpha และ PREDICTED: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase A, chloroplastic จากโปรตีนทั้ง 12 ชนิดพบว่าโปรตีนมีการแสดงออกของปริมาณโปรตีนแตกต่างกันมากระหว่างกลุ่มของ diploid triploid และ tetraploid คือ PREDICTED: chromoplast-specific carotenoid-associated protein C1, chromoplastic-like ที่พบการแสดงออกในมากในช่วงประมาณ 7.5 -6.6 โดยมีการแสดงออกมากที่สุดคือใบกล้วยกล้วยตานี และกล้วยนาก ส่วนใบกล้วยเทพรส พบการแสดงออกน้อยที่สุดคือประมาณ 5.5 และโปรตีนอีก 18 ชนิดที่มีการแสดงออกของโปรตีนโดยส่วนใหญ่อยู่ในช่วงประมาณ 6.9-5.4 ซึ่งพบว่ามีการแสดงออกที่น้อยเมื่อเปรียบเทียบกับโปรตีน 12 ชนิดข้างต้นที่พบส่วนใหญ่ในใบกล้วยทั้ง 7 สายพันธุ์ (ภาพที่ 5 ตารางที่ 4)

นอกจากนี้ยังพบว่าใบกล้วยในแต่ละสายพันธุ์ในกลุ่ม diploid triploid และ tetraploid

พบชนิดของโปรตีนที่จำเพาะแตกต่างกัน โดยมีค่านัยสำคัญทางสถิติน้อยกว่า 0.05 ดังแสดงในตารางที่ 5 โดยใบกล้วยน้ำไท พบจำนวน 6 โปรตีน ได้แก่ PREDICTED: probable thimet oligopeptidase isoform X2, PREDICTED: nodulin-related protein 1-like, PREDICTED: heat shock cognate 70 kDa protein 2, PREDICTED: dirigent protein 1-like, PREDICTED: light-regulated protein, และ PREDICTED: nucleoside diphosphate kinase 1

ใบกล้วยตานี พบจำนวน 11 โปรตีน ได้แก่ PREDICTED: chlorophyll a-b binding protein 151, chloroplastic, PREDICTED: photosystem I reaction center subunit N, chloroplastic-like, partial, PREDICTED: nuclear transcription factor Y subunit A-7-like isoform X1, PREDICTED: heat shock 22 kDa protein, mitochondrial isoform X2, PREDICTED: glutathione transferase GST 23-like, PREDICTED: V-type proton ATPase subunit B 2-like isoform X2, PREDICTED: glycine cleavage system H protein, mitochondrial-like, PREDICTED: protein GOS9-like, PREDICTED: uncharacterized protein At1g32220, chloroplastic, PREDICTED: phosphoribulokinase, chloroplastic-like, และ PREDICTED: 20 kDa chaperonin, chloroplastic-like,

ใบกล้วยนากพบจำนวน 7 โปรตีน ได้แก่ PREDICTED: uncharacterized protein LOC103985361, PREDICTED: ribulose biphosphate carboxylase small chain, chloroplastic, PREDICTED: stellacyanin-like, PREDICTED: protein ECERIFERUM 3-like, PREDICTED: WAT1-related protein At5g07050-like, PREDICTED: ACT domain-containing protein DS12, chloroplastic-like isoform X4 และ PREDICTED: endochitinase EP3-like

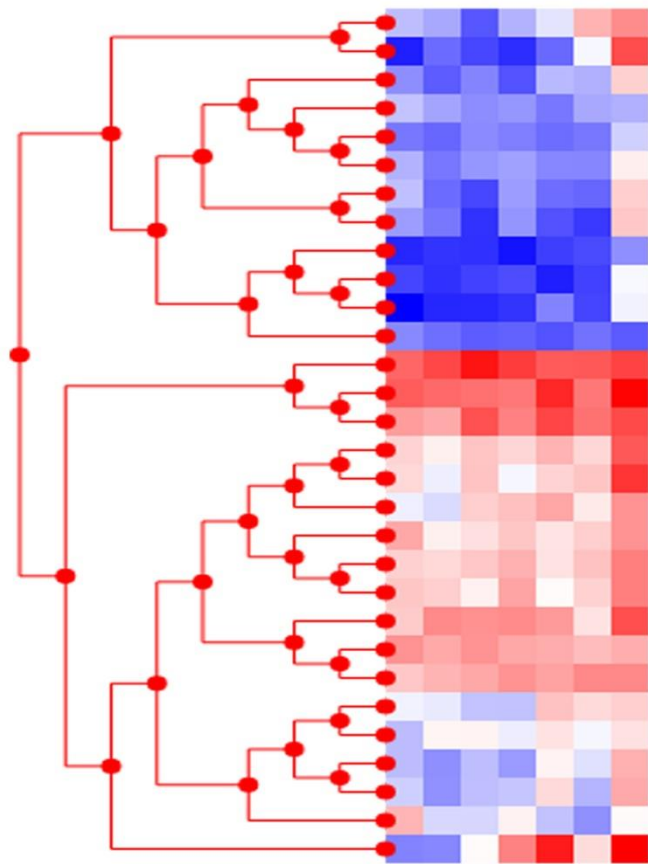
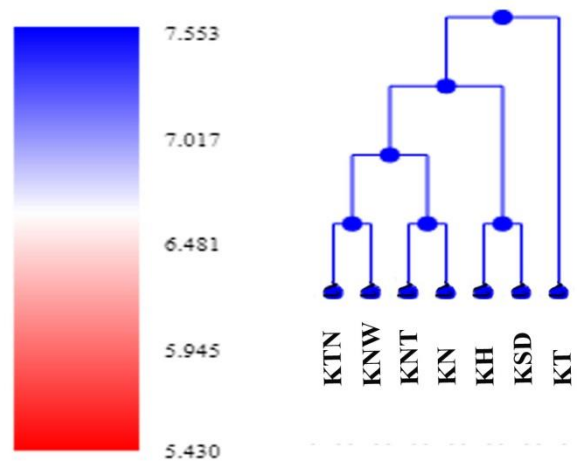
ใบกล้วยน้ำว้า พบจำนวน 8 โปรตีน ได้แก่ PREDICTED: uncharacterized protein LOC103999928, PREDICTED: cysteine synthase, PREDICTED: pyruvate dehydrogenase E1 component subunit alpha-1, mitochondrial-like, PREDICTED: putative leucine-rich repeat receptor-like protein kinase At2g19210, PREDICTED: agamous-like MADS-box protein AGL9 homolog, PREDICTED: cyclin-SDS-like, PREDICTED: flavonoid 3,5-

hydroxylase 1-like, และ PREDICTED: probable 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase 2, chloroplastic

ใบกล้วยสามเดือน พบจำนวน 14 โปรตีน ได้แก่ PREDICTED: uncharacterized protein LOC103990605, PREDICTED: elongation factor 1-alpha-like, PREDICTED: uncharacterized protein LOC103993528, PREDICTED: uncharacterized protein At4g28440-like, PREDICTED: protein GOS9-like isoform X2, PREDICTED: protein GOS9-like isoform X1, PREDICTED: molybdopterin synthase sulfur carrier subunit isoform X2, PREDICTED: 60S acidic ribosomal protein P2A-like, PREDICTED: putative BPI/LBP family protein At1g04970, PREDICTED: uncharacterized protein LOC103991959, PREDICTED: heme-binding protein 2, PREDICTED: soluble inorganic pyrophosphatase isoform X3, PREDICTED: chlorophyll a-b binding protein of LHCII type 1-like, และ PREDICTED: 65-kDa microtubule-associated protein 1

ใบกล้วยหिन พบจำนวน 9 โปรตีน ได้แก่ PREDICTED: 65-kDa microtubule-associated protein 1, PREDICTED: transmembrane 9 superfamily member 9, PREDICTED: flavonol synthase/flavanone 3-hydroxylase, PREDICTED: pathogenesis-related protein 1-like, PREDICTED: heat shock 22 kDa protein, mitochondrial isoform X1, PREDICTED: sugar transport protein 14-like, PREDICTED: 2-Cys peroxiredoxin BAS1, chloroplastic-like, PREDICTED: non-specific lipid-transfer protein 2-like isoform X3 และ PREDICTED: non-specific lipid-transfer protein 1-like isoform X2

และใบกล้วยเทพรส พบจำนวน 8 โปรตีน ได้แก่ PREDICTED: chlorophyll a-b binding protein 151, chloroplastic, PREDICTED: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 2, cytosolic, PREDICTED: 28 kDa ribonucleoprotein, chloroplastic, PREDICTED: probable receptor-like serine/threonine-protein kinase At4g34500, PREDICTED: uncharacterized protein LOC103981684, PREDICTED: ATP synthase delta chain, chloroplastic-like, PREDICTED: ATP synthase delta chain, chloroplastic-like, และ PREDICTED: ribulose biphosphate carboxylase small chain, chloroplastic-like



XP_009388609
 XP_009392110
 XP_009413408
 XP_009395148
 XP_009397212
 XP_009421123
 XP_009384868
 XP_009405744
 XP_009412420
 XP_009395684
 XP_009384573
 XP_009420999
 XP_009412177
 XP_009413542
 XP_009380439
 XP_009401920
 XP_009402493
 XP_009404263
 XP_009418696
 XP_009397428
 XP_009408003
 XP_018679260
 XP_009395134
 XP_009409911
 XP_009384600
 XP_009390874
 XP_009404913
 XP_009418590
 XP_009402843
 XP_009389036

ภาพที่ 5 โปรตีนที่พบในใบกล้วยทั้ง 7 สายพันธุ์แต่มีการแสดงออกที่แตกต่างกัน แสดงในรูปแบบ heat map โดยได้จากการแสดงออกมากแสดงในสีน้ำเงิน และการแสดงออกน้อยแสดงในสีแดง

ตารางที่ 4 แสดงชื่อและการทำนายหน้าที่ของโปรตีนจากโปรตีนที่พบในใบกล้วยทั้ง 7 สายพันธุ์แต่มีการแสดงออกที่แตกต่างกัน

หมายเลขโปรตีน (Protein number)	ชื่อ (Name)	การทำนายหน้าที่โปรตีน (Protein function prediction)
XP_009388609	PREDICTED: ribulose bisphosphate carboxylase/oxygenase activase, chloroplastic-like [<i>Musa acuminata</i> subsp. malaccensis]	Energy/photosynthesis (Lu et al., 2013)
XP_009392110	PREDICTED: chromoplast-specific carotenoid-associated protein C1, chromoplastic-like [<i>Musa acuminata</i> subsp. malaccensis]	Carotenoids accumulate in chromoplasts (Barsan et al., 2010)
XP_009413408	PREDICTED: 2-Cys peroxiredoxin BAS1, chloroplastic [<i>Musa acuminata</i> subsp. malaccensis]	antioxidant (Baier and Dietz, 1997)
XP_009395148	PREDICTED: glycine cleavage system H protein, mitochondrial-like [<i>Musa acuminata</i> subsp. malaccensis]	Protein metabolism (Kikuchi et al., 2008)
XP_009397212	PREDICTED: phosphoglycerate kinase, chloroplastic [<i>Musa acuminata</i> subsp. malaccensis]	glycolysis, gluconeogenesis (Kopke-Secundo et al., 1990)
XP_009421123	PREDICTED: peroxiredoxin-2E-2, chloroplastic-like [<i>Musa acuminata</i> subsp. malaccensis]	Antioxidant (Rhee et al., 2012)
XP_009384868	PREDICTED: ribulose bisphosphate carboxylase/oxygenase activase 2, chloroplastic [<i>Musa acuminata</i> subsp. malaccensis]	Energy/photosynthesis (Lu et al., 2013)
XP_009405744	PREDICTED: uncharacterized protein LOC103988823 [<i>Musa acuminata</i> subsp. malaccensis]	Unknown

ตารางที่ 4 แสดงชื่อและการทำนายหน้าที่ของโปรตีนจากโปรตีนที่พบในใบกล้วยทั้ง 7 สายพันธุ์แต่มีการแสดงออกที่แตกต่างกัน (ต่อ)

หมายเลขโปรตีน (Protein number)	ชื่อ (Name)	การทำนายหน้าที่โปรตีน (Protein function prediction)
XP_009412420	PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: oxygen-evolving enhancer protein 1, chloroplastic-like [<i>Musa acuminata</i> subsp. malaccensis]	Energy/photosynthesis (Lu et al., 2013)
XP_009395684	PREDICTED: 2-methylene-furan-3-one reductase [<i>Musa acuminata</i> subsp. malaccensis]	Volatile against pathogens (Collu et al., 2017)
XP_009384573	PREDICTED: ruBisCO large subunit-binding protein subunit alpha [<i>Musa acuminata</i> subsp. malaccensis]	Energy/photosynthesis (Lu et al., 2013)
XP_009420999	PREDICTED: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase A, chloroplastic [<i>Musa acuminata</i> subsp. malaccensis]	Energy/glycolysis/glyoxylate cycle/gluconeogenesis (Lu et al., 2013)
XP_009412177	PREDICTED: peptide methionine sulfoxide reductase B5-like [<i>Musa acuminata</i> subsp. malaccensis]	Antioxidant (Rey and Tarrago, 2018)
XP_009413542	PREDICTED:fructose-bisphosphate aldolase, chloroplastic-like [<i>Musa acuminata</i> subsp. malaccensis]	Energy/photosynthesis (Lu et al., 2013; Livramento et al., 2018)
XP_009380439	PREDICTED: 17.3 kDa class II heat shock protein-like [<i>Musa acuminata</i> subsp. malaccensis]	Immunity and defence (Lu et al., 2013)
XP_009401920	PREDICTED: enolase-like [<i>Musa acuminata</i> subsp. malaccensis]	Glycolysis (Van der Straeten et al., 1991)
XP_009402493	PREDICTED: peptidyl-prolyl cis-trans isomerase CYP38, chloroplastic [<i>Musa acuminata</i> subsp. malaccensis]	Photosynthesis (Vasudevan et al., 2012)

ตารางที่ 4 แสดงชื่อและการทำนายหน้าที่ของโปรตีนจากโปรตีนที่พบในใบกล้วยทั้ง 7 สายพันธุ์แต่มีการแสดงออกที่แตกต่างกัน (ต่อ)

หมายเลขโปรตีน (Protein number)	ชื่อ (Name)	การทำนายหน้าที่โปรตีน (Protein function prediction)
XP_009404263	PREDICTED: stromal 70 kDa heat shock-related protein, chloroplastic-like [Musa acuminata subsp. malaccensis]	Immunity and defence (Lu et al., 2013)
XP_009418696	PREDICTED: triosephosphate isomerase, chloroplastic-like [Musa acuminata subsp. malaccensis]	Redox regulation (López-Castillo et al., 2016)
XP_009397428	PREDICTED: methyl-CpG-binding domain-containing protein 11-like [Musa acuminata subsp. malaccensis]	plant development (Berg et al., 2003)
XP_009408003	PREDICTED: probable plastid-lipid-associated protein 2, chloroplastic [Musa acuminata subsp. malaccensis]	Secondary metabolism (Tamburino et al., 2017)
XP_018679260	PREDICTED: glycine-rich RNA-binding protein 10-like [Musa acuminata subsp. malaccensis]	abiotic stress (Lu et al., 2019)
XP_009395134	PREDICTED: chloroplast stem-loop binding protein of 41 kDa a, chloroplastic [Musa acuminata subsp. malaccensis]	Protein synthesis (Tamburino et al., 2017)
XP_009409911	PREDICTED: calphotin-like isoform X2 [Musa acuminata subsp. malaccensis]	unknown
XP_009384600	PREDICTED: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase B, chloroplastic isoform X2 [Musa acuminata subsp. malaccensis]	Energy/glycolysis/glyoxylate cycle/gluconeogenesis (Lu et al., 2013)

ตารางที่ 4 แสดงชื่อและการทำนายหน้าที่ของโปรตีนจากโปรตีนที่พบในใบกล้วยทั้ง 7 สายพันธุ์แต่มีการแสดงออกที่แตกต่างกัน (ต่อ)

หมายเลขโปรตีน (Protein number)	ชื่อ (Name)	การทำนายหน้าที่โปรตีน (Protein function prediction)
XP_009390874	PREDICTED: 20 kDa chaperonin, chloroplastic [Musa acuminata subsp. malaccensis]	Photosynthesis (Zhao and Liu, 2018)
XP_009404913	PREDICTED: 2-Cys peroxiredoxin BAS1, chloroplastic-like [Musa acuminata subsp. malaccensis]	antioxidant (Baier and Dietz, 1997)
XP_009418590	PREDICTED: ruBisCO large subunit-binding protein subunit beta, chloroplastic [Musa acuminata subsp. malaccensis]	Energy/photosynthesis (Lu et al., 2013)
XP_009402843	PREDICTED: phosphoglycerate kinase, chloroplastic [Musa acuminata subsp. malaccensis]	glycolysis, gluconeogenesis (Kopke-Secundo et al., 1990)
XP_009389036	PREDICTED: small heat shock protein, chloroplastic [Musa acuminata subsp. malaccensis]	Immunity and defence (Lu et al., 2013)

ตารางที่ 5 แสดงชนิดของโปรตีนในใบกล้วยที่พบจำเพาะในใบกล้วยแต่ละสายพันธุ์ของกลุ่ม diploid triploid และ tetraploid (FDR < 0.05) และการทำนายหน้าที่ของโปรตีนแต่ละชนิด

ชนิดใบกล้วย/ โปรตีน	การทำนายหน้าที่ของโปรตีน
กลุ่ม diploid	
โปรตีนที่พบเฉพาะในตัวอย่างกลุ่ม KNT จำนวน 6 โปรตีน	
XP_018685910.1 PREDICTED: probable thimet oligopeptidase isoform X2 [Musa acuminata subsp. malaccensis]	innate immunity (Wang et al., 2014)
XP_009395631.1 PREDICTED: nodulin-related protein 1-like [Musa acuminata subsp. malaccensis]	transport of nutrients, solutes, amino acids or hormones (Denance et al., 2013)
XP_009409520.1 PREDICTED: heat shock cognate 70 kDa protein 2 [Musa acuminata subsp. malaccensis]	Immunity and defence (Lu et al., 2013)
XP_018674708.1 PREDICTED: dirigent protein 1-like [Musa acuminata subsp. Malaccensis]	Cell wall modification (Gutsch et al., 2018)
XP_009406426.1 PREDICTED: light-regulated protein [Musa acuminata subsp. malaccensis]	Photosynthesis (Giuliano et al., 1988; Kami et al., 2010)
XP_009401984.1 PREDICTED: nucleoside diphosphate kinase 1 [Musa acuminata subsp. malaccensis]	- energy metabolism and stress response (Dorion et al., 2006) energy for ethylene biosynthesis (Zhang et al., 2012)
โปรตีนที่พบเฉพาะในตัวอย่างกลุ่ม KTN จำนวน 11 โปรตีน	
XP_009397219.1 PREDICTED: chlorophyll a-b binding protein 151, chloroplastic [Musa acuminata subsp. malaccensis]	Photosynthesis (Lu et al., 2013)
XP_009385444.1 PREDICTED: photosystem I reaction center subunit N, chloroplastic-like, partial [Musa acuminata subsp. malaccensis]	Photosynthesis (Caffari et al., 2014)
XP_018677234.1 PREDICTED: nuclear transcription factor Y subunit A-7-like isoform X1 [Musa acuminata subsp. malaccensis]	plant growth, development, stress responses (Yu et al., 2013; Zhao et al., 2017)

ตารางที่ 5 แสดงชนิดของโปรตีนในใบกล้วยที่พบจำเพาะในใบกล้วยแต่ละสายพันธุ์ของกลุ่ม diploid triploid และ tetraploid (FDR < 0.05) และการทำนายหน้าที่ของโปรตีนแต่ละชนิด (ต่อ)

ชนิดใบกล้วย/ โปรตีน	การทำนายหน้าที่ของโปรตีน
XP_009381499.1 PREDICTED: heat shock 22 kDa protein, mitochondrial isoform X2 [Musa acuminata subsp. malaccensis]	Immunity and defence
XP_009419844.2 PREDICTED: glutathione transferase GST 23-like [Musa acuminata subsp. malaccensis]	- oxidative stress -detoxification of herbicides (Dixon et al., 2002)
XP_009388566.1 PREDICTED: V-type proton ATPase subunit B 2-like isoform X2 [Musa acuminata subsp. malaccensis]	- salt stress tolerance in plants (Zhang et al.,2014)
XP_009387258.1 PREDICTED: glycine cleavage system H protein, mitochondrial-like [Musa acuminata subsp. malaccensis]	Protein metabolism (Kikuchi et al., 2008)
XP_009413935.2 PREDICTED: protein GOS9-like [Musa acuminata subsp. malaccensis]	disease resistance (Niu et al.,2018)
XP_009396199.1 PREDICTED: uncharacterized protein At1g32220, chloroplastic [Musa acuminata subsp. malaccensis]	Unknown
XP_009399432.1 PREDICTED: phosphoribulokinase, chloroplastic-like [Musa acuminata subsp. malaccensis]	Photosynthesis (Calvin cycle) (Rumphoa et al.,2009)
XP_009379927.1 PREDICTED: 20 kDa chaperonin, chloroplastic-like [Musa acuminata subsp. Malaccensis]	Photosynthesis (Zhao and Liu, 2018)
โปรตีนที่พบเฉพาะในตัวอย่างกลุ่ม KN จำนวน 7 โปรตีน	
XP_018681331.1 PREDICTED: uncharacterized protein LOC103985361 [Musa acuminata subsp. Malaccensis]	Unknown
XP_009390221.1 PREDICTED: ribulose bisphosphate carboxylase small chain, chloroplastic [Musa acuminata subsp. malaccensis]	-Photosynthesis (Lu et al., 2013)

ตารางที่ 5 แสดงชนิดของโปรตีนในใบกล้วยที่พบจำเพาะในใบกล้วยแต่ละสายพันธุ์ของกลุ่ม diploid triploid และ tetraploid (FDR < 0.05) และการทำนายหน้าที่ของโปรตีนแต่ละชนิด (ต่อ)

ชนิดใบกล้วย/ โปรตีน	การทำนายหน้าที่ของโปรตีน
XP_018675332.1 PREDICTED: stellacyanin-like [Musa acuminata subsp. malaccensis]	- redox reactions (of copper protein) occurring during primary defense responses in plants (Nersissian et al., 1998)
XP_009390985.1 PREDICTED: protein ECERIFERUM 3-like [Musa acuminata subsp. malaccensis]	-biotic and abiotic stresses (cuticle membrane and cuticular waxes) (Bourdenx et al., 2011)
XP_009382149.1 PREDICTED: WAT1-related protein At5g07050-like [Musa acuminata subsp. malaccensis]	- auxin transport (fibre differentiation) (Ranocha et al., 2013)
XP_009396233.1 PREDICTED: ACT domain-containing protein DS12, chloroplastic-like isoform X4 [Musa acuminata subsp. Malaccensis]	- regulatory or sensor proteins (Hsieh and Goodman, 2002)
XP_009416020.1 PREDICTED: endochitinase EP3-like [Musa acuminata subsp. malaccensis]	Immunity and defence (Lu et al., 2013)
โปรตีนที่พบเฉพาะในตัวอย่างกลุ่ม KNW จำนวน 8 โปรตีน	
XP_009420106.1 PREDICTED: uncharacterized protein LOC103999928 [Musa acuminata subsp. malaccensis]	Unknown
XP_009401140.1 PREDICTED: cysteine synthase [Musa acuminata subsp. malaccensis]	cysteine biosynthesis (Lu et al., 2013)
XP_009381402.1 PREDICTED: pyruvate dehydrogenase E1 component subunit alpha-1, mitochondrial-like [Musa acuminata subsp. malaccensis]	Carbohydrate and energy metabolism (Mostek et al., 2015)
XP_009408906.1 PREDICTED: putative leucine-rich repeat receptor-like protein kinase At2g19210 [Musa acuminata subsp. malaccensis]	Stress Response (Alam et al., 2010)

ตารางที่ 5 แสดงชนิดของโปรตีนในใบกล้วยที่พบจำเพาะในใบกล้วยแต่ละสายพันธุ์ของกลุ่ม diploid triploid และ tetraploid (FDR < 0.05) และการทำนายหน้าที่ของโปรตีนแต่ละชนิด (ต่อ)

ชนิดใบกล้วย/ โปรตีน	การทำนายหน้าที่ของโปรตีน
XP_018682855.1 PREDICTED: agamous-like MADS-box protein AGL9 homolog [Musa acuminata subsp. malaccensis]	ovule development (Favaro et al., 2002)
XP_009413751.2 PREDICTED: cyclin-SDS-like [Musa acuminata subsp. malaccensis]	Meiosis (Bulankova et al., 2013)
XP_009383876.1 PREDICTED: flavonoid 3,5-hydroxylase 1-like [Musa acuminata subsp. malaccensis]	- Flavonoid biosynthesis - against biotic and abiotic stress - regulation of developmental processes (colouration of flowers and fruit) (Seitz et al., 2015)
XP_009400868.1 PREDICTED: probable 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase 2, chloroplastic [Musa acuminata subsp. malaccensis]	Flavonoid biosynthesis (Lois et al., 2000; Wanke et al., 2001)
โปรตีนที่พบเฉพาะในตัวอย่างกลุ่ม KSD จำนวน 14 โปรตีน	
XP_009408083.1 PREDICTED: uncharacterized protein LOC103990605 [Musa acuminata subsp. malaccensis]	Unknown
XP_009381509.1 PREDICTED: elongation factor 1-alpha-like [Musa acuminata subsp. Malaccensis]	protein synthesis (Pokalsky et al., 1989; Sasikumar et al., 2012)
XP_009411896.1 PREDICTED: uncharacterized protein LOC103993528 [Musa acuminata subsp. malaccensis]	Unknown
XP_009404422.1 PREDICTED: uncharacterized protein At4g28440-like [Musa acuminata subsp. malaccensis]	Unknown

ตารางที่ 5 แสดงชนิดของโปรตีนในใบกล้วยที่พบจำเพาะในใบกล้วยแต่ละสายพันธุ์ของกลุ่ม diploid triploid และ tetraploid (FDR < 0.05) และการทำนายหน้าที่ของโปรตีนแต่ละชนิด (ต่อ)

ชนิดใบกล้วย/ โปรตีน	การทำนายหน้าที่ของโปรตีน
XP_018673706.1 PREDICTED: protein GOS9-like isoform X2 [Musa acuminata subsp. malaccensis];	disease resistance (Niu et al.,2018)
XP_018673705.1 PREDICTED: protein GOS9-like isoform X1 [Musa acuminata subsp. malaccensis]	disease resistance (Niu et al.,2018)
XP_018686453.1 PREDICTED: molybdopterin synthase sulfur carrier subunit isoform X2 [Musa acuminata subsp. malaccensis]	Molybdenum synthesis (metalloenzymes) (Mendel and Kruse, 2012)
XP_009394805.1 PREDICTED: 60S acidic ribosomal protein P2A-like [Musa acuminata subsp. malaccensis]	Protein synthesis (Bailey-Serres et al., 1997)
XP_009418197.1 PREDICTED: putative BPI/LBP family protein At1g04970 [Musa acuminata subsp. malaccensis]	Immune response (Iizasa et al., 2016)
XP_009409781.1 PREDICTED: uncharacterized protein LOC103991959 [Musa acuminata subsp. malaccensis]	Unknown
XP_009389988.1 PREDICTED: heme-binding protein 2 [Musa acuminata subsp. malaccensis]	Abiotic stresses (Vanhee et al., 2011; Lee et al., 2012)
XP_018681974.1 PREDICTED: soluble inorganic pyrophosphatase isoform X3 [Musa acuminata subsp. malaccensis]	Energy metabolism (Segami et al., 2018)
XP_009395692.1 PREDICTED: chlorophyll a-b binding protein of LHCII type 1-like [Musa acuminata subsp. malaccensis]	Photosynthesis (Cinque et al., 2000)
XP_009392160.1 PREDICTED: 65-kDa microtubule-associated protein 1 [Musa acuminata subsp. malaccensis]	plant morphology and physiology (Jana Krtková et al., 2016)

ตารางที่ 5 แสดงชนิดของโปรตีนในใบกล้วยที่พบจำเพาะในใบกล้วยแต่ละสายพันธุ์ของกลุ่ม diploid triploid และ tetraploid (FDR < 0.05) และการทำนายหน้าที่ของโปรตีนแต่ละชนิด (ต่อ)

ชนิดใบกล้วย/ โปรตีน	การทำนายหน้าที่ของโปรตีน
โปรตีนที่พบเฉพาะในตัวอย่างกลุ่ม KH จำนวน 8 โปรตีน	
XP_009396776.1 PREDICTED: transmembrane 9 superfamily member 9 [Musa acuminata subsp. malaccensis]	Transport (Geisler, 2018)
XP_009380921.2 PREDICTED: flavonol synthase/flavanone 3-hydroxylase [Musa acuminata subsp. malaccensis]	Flavonoid biosynthesis
XP_009417750.1 PREDICTED: pathogenesis-related protein 1-like [Musa acuminata subsp. malaccensis]	Immunity and defence (Lu et al., 2013)
XP_018674853.1 PREDICTED: heat shock 22 kDa protein, mitochondrial isoform X1 [Musa acuminata subsp. malaccensis]	Immunity and defence (Lu et al., 2013)
XP_009405730.1 PREDICTED: sugar transport protein 14-like [Musa acuminata subsp. malaccensis]	- provide energy - signal molecule components (carbon) - metabolic intermediates for plant growth and development - abiotic and biotic stresses responses (Miao et al., 2017)
XP_018678676.1 PREDICTED: 2-Cys peroxiredoxin BAS1, chloroplastic-like [Musa acuminata subsp. malaccensis]	Antioxidant (Baler and Dietz, 1997)
XP_018680689.1 PREDICTED: non-specific lipid-transfer protein 2-like isoform X3 [Musa acuminata subsp. malaccensis];	- abiotic and biotic stress - antimicrobial activity - plant immune system - allergenic (Scheurer and Schülke, 2018)
XP_009396874.1 PREDICTED: non-specific lipid-transfer protein 1-like isoform X2 [Musa acuminata subsp. malaccensis]	- abiotic and biotic stress - antimicrobial activity - plant immune system - allergenic (Scheurer and Schülke, 2018)

ตารางที่ 5 แสดงชนิดของโปรตีนในใบกล้วยที่พบจำเพาะในใบกล้วยแต่ละสายพันธุ์ของกลุ่ม diploid triploid และ tetraploid (FDR < 0.05) และการทำนายหน้าที่ของโปรตีนแต่ละชนิด (ต่อ)

ชนิดใบกล้วย/ โปรตีน	การทำนายหน้าที่ของโปรตีน
กลุ่ม tetraploid	
โปรตีนที่พบเฉพาะในตัวอย่างกลุ่ม KT จำนวน 8 โปรตีน	
XP_009397219.1 PREDICTED: chlorophyll a-b binding protein 151, chloroplastic [Musa acuminata subsp. malaccensis]	Photosynthesis (Lu et al., 2013)
XP_009402724.1 PREDICTED: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 2, cytosolic [Musa acuminata subsp. malaccensis]	Energy/glycolysis/glyoxylate cycle/gluconeogenesis
XP_009387705.1 PREDICTED: 28 kDa ribonucleoprotein, chloroplastic [Musa acuminata subsp. malaccensis]	location in the chloroplast (Lisitsky et al., 1995)
XP_009405967.1 PREDICTED: probable receptor-like serine/threonine-protein kinase At4g34500 [Musa acuminata subsp. malaccensis]	plant disease resistance (Dang et al., 2019)
XP_009396701.2 PREDICTED: uncharacterized protein LOC103981684 [Musa acuminata subsp. malaccensis]	Unknown
XP_009417431.1 PREDICTED: ATP synthase delta chain, chloroplastic-like [Musa acuminata subsp. malaccensis];	Photosynthesis (Yamori et al., 2011)
XP_018673556.1 PREDICTED: ATP synthase delta chain, chloroplastic-like [Musa acuminata subsp. malaccensis]	Photosynthesis (Yamori et al., 2011)
XP_009403968.1 PREDICTED: ribulose biphosphate carboxylase small chain, chloroplastic-like [Musa acuminata subsp. malaccensis]	-Photosynthesis (Lu et al., 2013)

บทที่ 3 อภิปรายผลการทดลอง

ในการศึกษาแบบแผนโปรตีนเบื้องต้นจากการแยกโปรตีนในโบลัวด้วยวิธี SDS-PAGE พบว่าจำนวนแถบของโปรตีนแตกต่างกันของกล้วยในแต่ละสายพันธุ์ของแต่ละชุดโครโมโซม และเมื่อนำโปรตีนจากโบลัวของกล้วยในแต่ละชุดโครโมโซม ทั้ง diploid triploid และ tetraploid มาแยกด้วยวิธี 2D-PAGE พบว่ามีบางตำแหน่งของจุดโปรตีนมีเหมือนกัน แต่ระดับความเข้มของจุดโปรตีนแตกต่างกัน และมีบางตำแหน่งของจุดโปรตีนที่พบแตกต่างกันระหว่างโบลัวในแต่ละชุดโครโมโซม ทั้ง diploid triploid และ tetraploid แต่อย่างไรก็ตามพบว่าการใช้ IPG strip pH 3-10 พบโปรตีนหลัก ๆ ของโบลัวอยู่ในช่วง pH 4-7 และเมื่อใช้ IPG strip pH 4-7 ในการแยกตัวอย่างจากโบลัวนี้พบว่าแยกโปรตีนได้ดีกว่าการใช้ IPG strip pH 3-10 แต่อาจมีการสูญเสียโปรตีนบางส่วนในช่วงการแยกด้วยกระแสไฟฟ้าเป็นระยะเวลาสั้น นอกจากนี้ยังพบว่าการใช้ IPG-strip ขนาด 7 ซม. นั้นมี resolution ในการแยกโปรตีนได้น้อย วิธี 2D-PAGE ยังมีข้อจำกัดในเรื่องของตัวอย่างโปรตีนที่อยู่ในเมมเบรนที่มีความเป็นไฮโดรโฟบิกสูงและมีความเป็นกรดเบสสูงจะไม่สามารถแยกได้ในช่วงของ pH ของ IPG ที่เราใช้ นอกจากนี้โปรตีนที่มีขนาดของโมเลกุลใหญ่หรือโมเลกุลที่เล็กมากอาจไม่สามารถแยกได้ด้วยเปอร์เซ็นต์ของ SDS-PAGE ที่ใช้ด้วย (Magdeldin et al., 2014)

ดังนั้นจึงเลือกใช้วิธีการศึกษาโปรตีโอมิกส์จากโบลัวในกลุ่ม diploid Triploid และ Tetraploid ด้วย shotgun proteomics เพื่อให้สามารถหาโปรตีนทั้งหมดที่พบได้ในโบลัว ที่พบได้เหมือนทั้ง 3 ชุดโครโมโซม และโปรตีนที่พบเป็นโปรตีน marker ของโบลัวแต่ละสายพันธุ์ในทั้ง 3 ชุดโครโมโซม ซึ่งเป็นเทคนิคที่สามารถศึกษาโปรตีนในสเกลที่กว้างขึ้น โดยโปรตีนที่เป็นคอมเพล็กซ์อยู่ในตัวอย่างจะถูกย่อยด้วยเอนไซม์เป็นเปปไทด์ที่แยกต่อยด้วย HPLC ที่ต่ออยู่กับเครื่องแมสสเปกโตรเมทรี และลำดับกรดอะมิโนของเปปไทด์จะถูกบ่งชี้ชนิดของโปรตีนด้วยการค้นหาจากฐานข้อมูลของโปรตีน โดยในแต่ละตัวอย่างที่ประกอบด้วยเปปไทด์หลายพันชนิด จะถูกแยกด้วยเครื่อง LC ที่มีเวลาของการชะอย่างรวดเร็วจนให้ได้ MS/MS จำนวนมาก ที่มีความเร็วของการหมุนวนรอบของเครื่องสูงที่สุด โดยวงรอบที่เกิดขัดจำกัดทำให้เกิดผลของเปปไทด์ที่พบในปริมาณที่สูง ซึ่งแสดงถึงการแสดงออกของโปรตีนในปริมาณที่สูงขึ้น (Dowell et al., 2008) ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้จะพบโปรตีนทั้งหมดจำนวน 42510 ชนิดจากโบลัวในกลุ่ม diploid triploid และ tetraploid โดยเมื่อเปรียบเทียบระหว่างโบลัวทั้ง 7 สายพันธุ์มีโปรตีนที่พบเหมือนกัน แต่มีการแสดงออกของโปรตีนที่ไม่เท่ากันจำนวน 30 ชนิด โดยมีโปรตีน 12 ชนิด ที่มีการแสดงออกของโปรตีนโดยส่วนใหญ่อยู่ในช่วงประมาณ 7.5-5.4 และโปรตีนอีก 18 ชนิดที่มีการแสดงออกของโปรตีนโดยส่วนใหญ่อยู่ในช่วง 7.0-5.4 ซึ่งพบว่าโปรตีนที่พบโดยส่วนใหญ่เป็นโปรตีนหลักที่ทำหน้าที่เกี่ยวกับกระบวนการสังเคราะห์แสง รองลงมาคือโปรตีนที่ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับ การต้านอนุมูลอิสระ กระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันและการป้องกันโรค ระบบเมตาบอลิซึม เมตาบอลิซึมของคาร์โบไฮเดรต เมตาบอลิซึมของโปรตีน การควบคุมปฏิกิริยารีดอกซ์ เป็นต้น ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้านี้ที่มีการศึกษาโปรตีโอมิกส์จากโบลัว *Musa acuminata* Colla ที่พบโปรตีนที่สามารถจัดจำแนกได้เป็น 6 กลุ่ม คือ โปรตีนที่ทำหน้าที่ด้านภูมิคุ้มกันและการป้องกัน

ตัวเอง พลังงาน/ไกลโคไลซิส/ไกลออกซิเลตไซเคิล/กลูโคซิโนลินซิส, พลังงาน/การสังเคราะห์แสง, เมตาบอลิซึม, ออกซิเดชัน รีดักชัน, เมตาบอลิซึมของกรดอะมิโน เป็นต้น โดยโปรตีนที่พบมากอยู่ในกลุ่มที่เกี่ยวข้องกับเมตาบอลิซึมของพลังงาน ที่มีหลายไอโซฟอร์ม (Lu et al., 2013) แต่อย่างไรก็ตามพบว่าการศึกษาโปรตีนในใบกล้วยก่อนหน้านี้ยังไม่เคยมีรายงานการพบโปรตีน PREDICTED: chromoplast-specific carotenoid-associated protein C1, chromoplastic-like ซึ่งพบได้ในใบกล้วยทั้ง 3 ชุดโครโมโซม แต่ปริมาณโปรตีนมีการแสดงออกแตกต่างกันมากระหว่างกลุ่มของ diploid triploid และ tetraploid โดยมีการแสดงออกมากที่สุดคือใบกล้วยกล้วยตานี (diploid) และกล้วยนาก (triploid) และมีการแสดงออกน้อยที่สุดในใบกล้วยเพชร (tetraploid) โดยแคโรทีนอยด์จะสะสมในคลอโรพลาสต์ที่เป็นส่วนของพลาสทิดที่ไม่ใช้ส่วนที่สังเคราะห์แสงที่พบในบ่อใยในผลและดอก และพบได้บ้างในรากและใบของพืช (Barsan et al., 2010)

นอกจากนี้ยังพบว่านอกจากนี้ยังพบว่าใบกล้วยในแต่ละสายพันธุ์ในกลุ่ม diploid triploid และ tetraploid พบชนิดของโปรตีนที่จำเพาะแตกต่างกัน โดยกล้วยในกลุ่ม diploid คือกล้วยน้ำไท พบโปรตีนจำเพาะจำนวน 6 โปรตีน ซึ่งคาดว่าเป็นโปรตีนที่ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แสง การสร้างผนังเซลล์ การกระตุ้นภูมิคุ้มกัน การตอบสนองต่อสภาวะเครียด และโปรตีนที่ทำหน้าที่ด้านการขนส่งสารอาหาร/กรดอะมิโน/ฮอร์โมน กล้วยตานี พบโปรตีนจำเพาะจำนวน 11 โปรตีน ซึ่งคาดว่าเป็นโปรตีนที่ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แสง การเจริญและพัฒนาของพืช การกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน การตอบสนองต่อสภาวะเครียดของพืช การต้านทานต่อเชื้อ การต้านทานโรค และเมตาบอลิซึมของโปรตีน กล้วยในกลุ่ม triploid คือกล้วยนาก พบโปรตีนจำเพาะจำนวน 7 โปรตีน ซึ่งคาดว่าเป็นโปรตีนที่ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แสง ปฏิริยาโรคพืชในการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของพืชครั้งแรก การตอบสนองต่อสภาวะเครียดจากสิ่งแวดล้อมที่ไม่มีชีวิต (abiotic) และสิ่งมีชีวิต (biotic) การขนส่งออกซิน โปรตีนเซนเซอร์ และการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันและป้องกันโรค กล้วยน้ำว้าพบโปรตีนจำเพาะจำนวน 8 โปรตีน ซึ่งคาดว่าเป็นโปรตีนที่ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ซิสเตอีน เมตาบอลิซึมของคาร์โบไฮเดรต การตอบสนองต่อสภาวะเครียด การพัฒนาของผลไม้ออกซิส และการสังเคราะห์ฟลาโวนอยด์ กล้วยสามเดือนพบโปรตีนจำเพาะจำนวน 11 โปรตีนซึ่งคาดว่าเป็นโปรตีนที่ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์โปรตีน การต้านทานโรค การสังเคราะห์ไมลิพิดินัม การตอบสนองด้านภูมิคุ้มกัน การต้านทานต่อสภาวะเครียดจากสิ่งแวดล้อมที่ไม่มีชีวิต เมตาบอลิซึมของพลังงาน และการสังเคราะห์แสง กล้วยหินพบโปรตีนจำเพาะจำนวน 8 โปรตีนซึ่งคาดว่าเป็นโปรตีนที่ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แสง การขนส่งสาร การสังเคราะห์ฟลาโวนอยด์ การกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันและป้องกันโรค แหล่งพลังงาน ด้านอนุมูลอิสระ การตอบสนองต่อสภาวะเครียดจากสิ่งแวดล้อมที่ไม่มีชีวิตและสิ่งมีชีวิต กลุ่ม tetraploid คือกล้วยเพชร พบโปรตีนจำเพาะจำนวน 8 โปรตีนซึ่งคาดว่าเป็นโปรตีนที่ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แสง การเป็นแหล่งพลังงาน/เมตาบอลิซึมของคาร์โบไฮเดรต โปรตีนที่อยู่ในส่วนของคลอโรพลาสต์ และการต้านทานโรค (ตารางที่ 5)

ซึ่งการแสดงออกของโปรตีนที่เพิ่มขึ้นหรือลดน้อยลงในแต่ละสายพันธุ์จะมีความสัมพันธ์กับลักษณะทางสัณฐานวิทยาของกล้วย สามารถนำมาใช้เป็นข้อมูลทางกระบวนการทางชีวเคมีที่สัมพันธ์เซลล์ร่างกายที่มีความหลากหลาย (Livramento et al., 2018) ซึ่งโปรตีนที่พบจำเพาะในใบกล้วยในแต่ละสายพันธุ์เหล่านี้สามารถใช้ศึกษาเพิ่มเติมและพัฒนาเป็นโปรตีน marker ในการระบุชนิดของกล้วยในแต่ละสายพันธุ์ได้

บทที่ 4 สรุปและเสนอแนะ

สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาโปรตีนจากใบกล้วยในกลุ่ม diploid triploid และ tetraploid พบโปรตีนทั้งหมดจำนวน 42,510 ชนิด โดยมีโปรตีนที่พบเหมือนกัน แต่มีการแสดงออกของโปรตีนที่ไม่เท่ากันจำนวน 30 ชนิด โดยมีค่านัยสำคัญทางสถิติ False discovery rate (FDR) น้อยกว่า 0.05 นอกจากนี้ยังพบโปรตีนที่แสดงออกจำเพาะของใบกล้วยในแต่ละสายพันธุ์ในกลุ่ม diploid triploid และ tetraploid ที่มีค่านัยสำคัญทางสถิติน้อยกว่า 0.05 คือ ใบกล้วยน้ำไท ใบกล้วยตานี ใบกล้วยนาก ใบกล้วยน้ำว้า ใบกล้วยสามเดือน ใบกล้วยหิน และใบกล้วยเทพรส พบโปรตีนที่แสดงออกจำเพาะจำนวน 6 โปรตีน 11 โปรตีน 7 โปรตีน 8 โปรตีน 14 โปรตีน 9 โปรตีน และ 8 โปรตีนตามลำดับ

ข้อเสนอแนะ

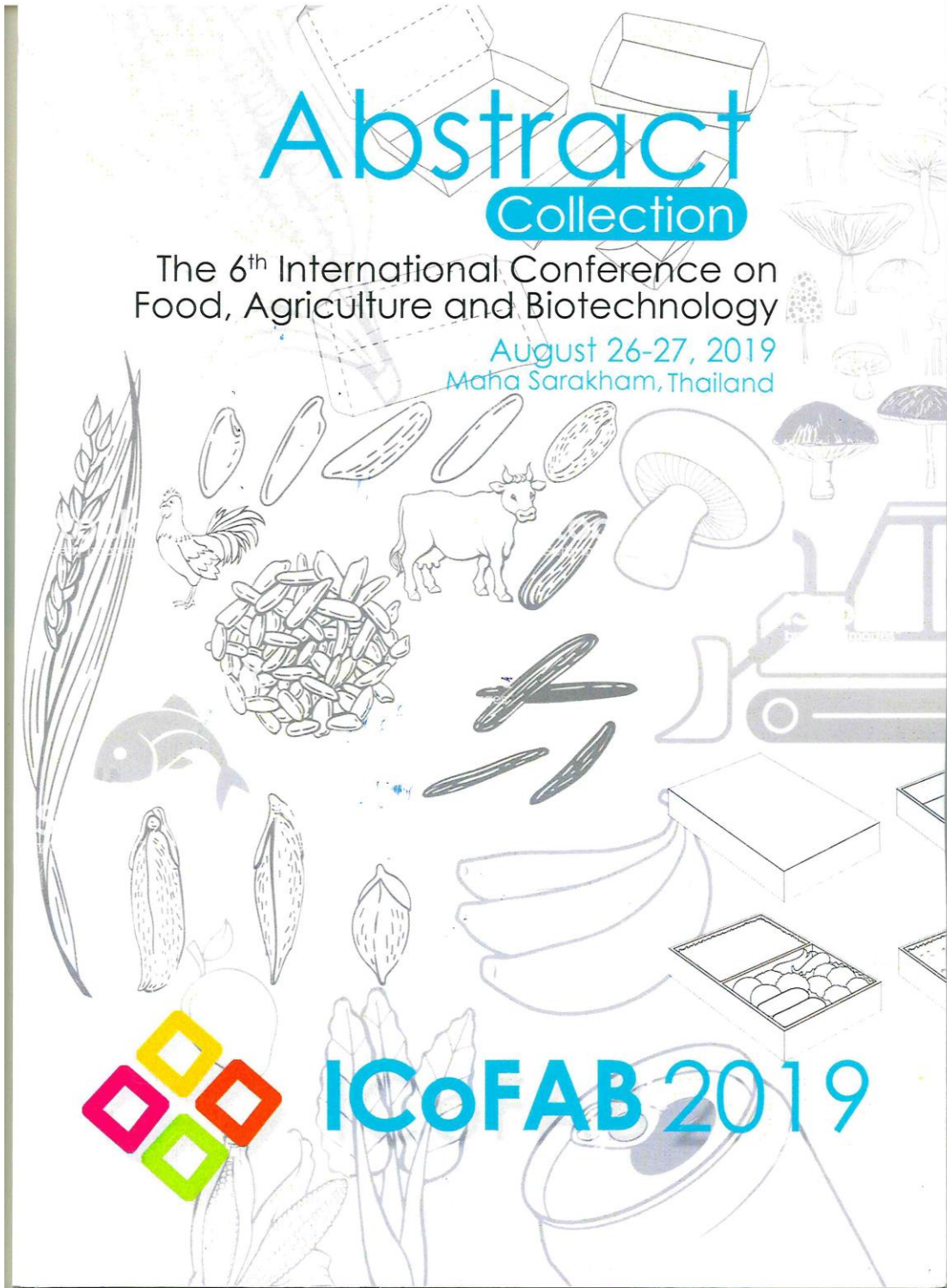
การศึกษาครั้งนี้เป็นการหาชนิดของโปรตีนที่พบในใบกล้วยในแต่ละสายพันธุ์ซึ่งเป็นตัวอย่างใบกล้วยที่อยู่ในกลุ่ม diploid triploid และ tetraploid ซึ่งเป็นการเปรียบเทียบจากฐานข้อมูลโปรตีนของ *Musa species* แต่อย่างไรก็ตามก็ยังมีข้อมูลที่แน่ชัดเกี่ยวกับการทำหน้าที่ของโปรตีนในแต่ละชนิดที่อยู่ในใบกล้วยในแต่ละสายพันธุ์ และโปรตีน marker ที่พบในกล้วยแต่ละสายพันธุ์มีจำนวนมากกว่า 1 โปรตีน ดังนั้นอาจต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อยืนยันโปรตีนที่เป็น marker ของใบกล้วยในแต่ละสายพันธุ์เพื่อนำข้อมูล marker ที่ได้ไปประยุกต์ใช้ในประโยชน์ด้านอื่น ๆ ต่อไป

บทที่ 5
ผลผลิต (Output)

ผลงานวิจัยบางส่วนได้นำเสนอในรูปแบบโปสเตอร์ และบทความวิจัย **proceeding** ในงานประชุมวิชาการระดับนานาชาติ

1. Bung-on Prajanban, Wichuda Jankangram and Nisachon Jangpromma. Comparative study proteome pattern of Kluai Ta Nee and Kluai Nam Wa leaves proteins. The 6 th International Conference on Food, Agriculture and Biotechnology. 2562. หน้า 38.

หมายเหตุ: บทความวิจัยที่ตีพิมพ์ในรูปแบบ **proceeding** ในงานประชุม The 6 th International Conference on Food, Agriculture and Biotechnology จะออกหมายเลขหน้าในช่วงเดือนตุลาคม พ.ศ. 2562



Abstract Collection

The 6th International Conference on
Food, Agriculture and Biotechnology

August 26-27, 2019
Maha Sarakham, Thailand



ICoFAB 2019

Contents

Abstracts:	Page
P_010 Effect of Acid-Alkaline Pretreatment on Reducing Sugar Yield and Lignocellulosic Compositions of Rice (<i>Oryza sativa</i> L.) Residues <div style="text-align: right; padding-right: 20px;"><i>Kaewkanlaya Soththisawad</i></div>	37
P_011 Comparative Study Proteome Pattern of Kluai Ta Nee and Kluai Nam Wa Leaves Proteins <div style="text-align: right; padding-right: 20px;"><i>Bung-on Prajanban</i></div>	38
P_012 Random Mutagenesis of <i>Aspergillus sclerotiorum</i> PSU-RSPG 178 for Improvement a Lovastatin Production <div style="text-align: right; padding-right: 20px;"><i>Supawan Meena</i></div>	39
P_013 Effect of Cinnamon Oil and Garlic Extract for Fresh Shrimp Preservation <div style="text-align: right; padding-right: 20px;"><i>Supraewpan Lohalaksnadech</i></div>	40
P_014 Effect of Sugar Substitution by Stevia Extract on Sensory Acceptance, Color, and Texture Profiles of Brownie <div style="text-align: right; padding-right: 20px;"><i>Naruetit Sriharbutr</i></div>	41
P_015 Sensory Characteristic of No Sugar Black Rice Tea Drinks <div style="text-align: right; padding-right: 20px;"><i>Jutawan nuanchankong</i></div>	42
P_016 Different Drying Methods Affected Bioactive Compounds, Antioxidant Capacity, and Cytotoxicity of Mulberry Leaf Tea <div style="text-align: right; padding-right: 20px;"><i>Jintana Sangsopha</i></div>	43
P_017 Phytochemical Screening, Total Phenolic Contents and Antioxidant Activity of the Aqueous Extracts of <i>Dendrocalamus membranaceus</i> and <i>Thyrsostachys siamensis</i> <div style="text-align: right; padding-right: 20px;"><i>Agarat Kamcharoen</i></div>	44
P_018 Distribution of Melatonin and Its Derivative in Germinated Rice Grain <div style="text-align: right; padding-right: 20px;"><i>Jakkaphan Kaennok</i></div>	45
P_019 Phenolic and Antioxidant Properties of Male Bud Flowers and Fruit of <i>Musa</i> Genotypes with Different Ploidy <div style="text-align: right; padding-right: 20px;"><i>Somkit Jaitrong</i></div>	46

P_011

Comparative Study Proteome Pattern of Kluai Ta Nee and Kluai Nam Wa Leaves Proteins

Bung-on Prajanban^{1*}, Wichuda Jankangram² and Nisachon Jangpromma^{3,4}

¹Faculty of Agricultural Technology, Burapha University, Sakaeo Campus, Sakaeo 27160
Thailand

²Faculty of Science and Social Sciences, Burapha University, Sakaeo Campus,
Sakaeo 27160 Thailand

³Protein and Proteomics Research Center for Commercial and Industrial Purposes
(ProCCI), Faculty of Science, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002 Thailand

⁴Department of Integrated Science, Forensic Science Program, Faculty of Science, Khon
Kaen University, Khon Kaen, 40002 Thailand.

*Corresponding author's e-mail: bungon.pr@buu.ac.th

ABSTRACT:

This study compared the protein profiles in leaves of diploid and triploid banana to identify the differentially accumulated proteins unique to each type of banana. Protein samples were analyzed by 2D-PAGE using IPG strip pH3-10. Fifty and 44 protein spots were detected in leaves of *Musa acumimata* (BB group) "Kluai Ta Nee" and *Musa Xparadisiaca*. (ABB group) "Kluai Nam Wa", respectively. Many spots of leaf proteins were corresponding to leaf proteins of *Musa acuminata* Colla (banana) reported previously such as ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase, oxygen-evolving enhancer protein and superoxide dismutase. Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase, oxygen-evolving enhancer protein and superoxide dismutase in Kluai Ta Nee leaves had pIs and number of isoforms different from those in Kluai Nam Wa leaves. Three isoforms of endochitinase were found in Kluai Ta Nee leaves only. The major protein found in Kluai Ta Nee leaves, which had higher intensity than that in Kluai Nam Wa leaves, was identified as ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit. A low quality protein: oxygen-evolving enhancer protein 1, chloroplastic-like, found in Kluai Nam Wa leaves had higher intensity than that in Kluai Ta Nee leaves. The polymorphism of these proteins observed between leaves of Kluai Ta Nee and Kluai Nam Wa would be possibly due to different gene expressions in each banana type and may result in different functionalities of the proteins.

Keywords: 2D-PAGE, Kluai Ta Nee, Kluai Nam Wa and Banana leaves

Comparative study proteome pattern of Kluai Ta Nee and Kluai Nam Wa leaves proteins

Bung-on Prajanban^{1*}, Wichuda Jankangram² and Nisachon Jangpromma^{3,4}
¹Faculty of Agricultural Technology, Burapha University, Sakaeo Campus, Sakaeo
 27160, Thailand
²Faculty of Science and Social Sciences, Burapha University, Sakaeo Campus,
 Sakaeo 27160, Thailand
³Protein and Proteomics Research Center for Commercial and Industrial Purposes
 (ProCCI), Faculty of Science, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand
⁴Department of Integrated Science, Forensic Science Program, Faculty of Science,
 Khon Kaen University, Khon Kaen, 40002, Thailand.

(*Corresponding author's e-mail: bungon.pr@buu.ac.th)

Abstract:

This study compared the protein profiles in leaves of diploid and triploid banana to identify the differentially accumulated proteins unique to each type of banana. Protein samples were analyzed by 2D-PAGE using IPG strip pH3-10. Fifty and 44 protein spots were detected in leaves of *Musa acuminata* (BB group) “Kluai Ta Nee” and *Musa Xparadisiaca* (ABB group) “Kluai Nam Wa”, respectively. Many spots of leaf proteins were corresponding to leaf proteins of *Musa acuminata* Colla (banana) reported previously such as ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase, oxygen-evolving enhancer protein and superoxide dismutase. Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase, oxygen-evolving enhancer protein and superoxide dismutase in Kluai Ta Nee leaves had pIs and number of isoforms different from those in Kluai Nam Wa leaves. Three isoforms of endochitinase were found in Kluai Ta Nee leaves only. The major protein found in Kluai Ta Nee leaves, which had higher intensity than that in Kluai Nam Wa leaves, was identified as ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit. A low quality protein: oxygen-evolving enhancer protein 1, chloroplastic-like, found in Kluai Nam Wa leaves had higher intensity than that in Kluai Ta Nee leaves. The polymorphism of these proteins observed between leaves of Kluai Ta Nee and Kluai Nam Wa would be possibly due to different gene expressions in each banana type and may result in different functionalities of the proteins.

Keywords: 2D-PAGE, Kluai Ta Nee, Kluai Nam Wa, banana leaves

Introduction

Banana is one of the most important food crop of Musaceae family distributes in South East Asia, Africa and Australia [1]. Banana varieties grown in most parts of the world are hybrids derived from natural inter- and intraspecific crosses between two diploid wide species, *Musa acuminata* (genome A) and *Musa balbisiana* (genome B) [2]. Protein patterns can be used to study genetic diversity in banana. Proteins play a central role in biological processes, and proteomics differential assay can be used to determine the proteins that are affected by genetic variation during plant growth and development [3]. The majority of the identified leaf proteins from *Musa acuminata* Colla (AA) were found to be involved in energy metabolism. Moreover, the minority of leaf proteins identified by 2D-PAGE and MALDI-TOF MS were found to be involved in immunity and defense mechanisms [4]. In the case of leaves from normal banana and giant banana cultivar Prata Ana (AAB) with different genome from *Musa acuminata* Colla (AA) that were analyzed by 2D-PAGE and MALDI-TOF/TOF, the abundant proteins from the leaves of both normal banana and giant banana cultivar Prata Ana (AAB) were identified as being related to root metabolism, photosynthesis, protein translation carbon assimilation and nitrogen fixation [3].

In contrast, *M. acuminata* (BB group) “Kluai-Tanee” and *M. Xparadisiaca* (ABB group) “Kluai Nam Wa” with different genomes from *Musa acuminata* Colla (AA) and banana cultivar Prata Ana (AAB) have not been reported in the protein reference map. In Thailand, *M. acuminata* BB (Kluai-Tanee) and *M. Xparadisiaca* ABB group (Kluai Nam Wa) are important types for leaf and fruit production. The analysis of protein compositions in banana leaves can increase the potential applications of these types of banana for both production efficiency and further improvement of banana through

breeding. The aims of this study were to analyze and compare leaf proteins from different genomes of BB (Kluai-Tanee) and ABB (Kluai Nam Wa) by 2D-PAGE using known *Musa acuminata* Colla (banana) leaf proteins that were previously reported for comparison. The proteins from leaves of both banana types were compared, and two protein spots with different intensity between two banana types were selected for identification of each type by using LC-ESI-MS/MS method [5].

Materials and methods

Plant materials and field experiment

The banana varieties of both types used in this study were planted at the experimental farm of the Faculty of Agricultural Technology, Burapha University, Sakaeo Campus, Sakaeo, Thailand.

Protein extraction from leaves

Leaf samples were extracted by the method described previously [6] with some modifications. The leaf samples were ground into powder in a mortar with liquid nitrogen. The ground samples were suspended in lysis buffer (7 M urea, 2 M thiourea, 4 % (w/v) CHAPS, 2 % (w/v) DTT). After centrifugation at 12,000 rpm for 30 min at 4°C, the supernatant for each sample was collected and cleaned with the 2D-clean up kit to remove contaminants such as carbohydrate, lipids and others. (Amersham Bioscience, Sweden). The protein pellets were suspended in rehydration buffer (7 M urea, 2 M thiourea, 2 % (w/v) CHAPS, 2 mM DTT, 0.8 % (w/v) IPG buffer and 0.2 % bromophenol blue). The protein concentration was determined using the Bradford assay with bovine serum albumin (Amersham Biosciences, USA) as the standard.

2D-PAGE electrophoresis

Proteins were analyzed by 2D-PAGE as described by O'Farrel [7] and some modified method on linear (3-10) pH gradient. Protein samples of 100 µg each were solubilized in a focusing solution containing 7 M urea, 2 M thiourea, 0.3% DTT, 2% CHAPS and 2% IPG buffer corresponding to the pH gradient used. Isoelectric focusing (IEF) was conducted with a Ettan IPG phor 3 (Amersham Bioscience, USA) on 7 cm IPG strips using a gradient mode yielding 9,750 Vhr. After focalization, the gel strips were equilibrated for 15 min in buffer containing 50 mM Tris-HCl, pH 8.8, 6 M urea, 30% glycerol, 1% SDS and 25 mM DTT. A second 15 min equilibration step in the same solution containing 250 mM iodoacetamide instead of DTT was then performed. Proteins were then subjected to SDS-PAGE. IPG strip was placed on second dimension 15% SDS polyacrylamide gels. The gel was then stained with colloidal coomassie brilliant blue G250 solution. These gels were then washed with double distilled water until the background was clear. The gel images were captured using ImageQuant LAS 500 (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Sweden) and protein spots were then analyzed by Image Master 2D Platinum v. 5.0 software (Amersham Biosciences, USA).

Protein Identification by LC-ESI-MS/MS

The protein spots with differential expressions were excised with trypsin using sequencing grade reagent (Promega, USA) according to the manufacturer's specifications. Each tryptic peptides were analyzed with a nano-liquid chromatography system (EASY-nLC II, Bruker) coupled to an ion trap mass spectrometer (Amazon Speed ETD, Bruker) equipped with an ESI nano-sprayer. The ESI-TRAP instrument was calibrated in the m/z range of 50-3000 using an internal calibration standard (Tune mix solution), which was supplied from Agilent. Bruker Daltonics software package, HyStar v.3.2, was used to control the ion trap device. LC-MS/MS spectra were analyzed using Compass Data Analysis v.4.0. Compound lists were exported as Mascot generic files (mgf) for further identification of proteins, which was performed by searching against the protein database from NCBIprot (Other green plants) using MASCOT MS/MS Ion Search program (www.matrixscience.com).

Results and discussion

In our preliminary study, we separated Kluai Ta Nee and Kluai Nam Wa leaves proteins by 2D-PAGE using linear IPG strip (pH3-10) size 7 cm. Figure 1 showed the protein patterns of Kluai Ta Nee (Figure 1A) and Kluai Nam Wa (Figure 1B) leaves. The results demonstrated that approximately 50 and 44 protein spots were reproducibly detected for Kluai Ta Nee and Kluai Nam Wa leaves, respectively. The overall protein patterns of Kluai Ta Nee leaves were different from those of Kluai Nam Wa leaves. However, the molecular weights of major leaf proteins common to both Kluai Ta Nee and Kluai Nam Wa ranged from approximately 25 kDa to 70.0 kDa and pI (isoelectric point) range was between 4 and 7. The ranges of protein molecular weights and pI in previous study were wider than in our study. According to Lu et al.[4], the protein molecular weights of *M. acuminata* Colla (banana) leaves ranged from approximately 10 kDa to 100 kDa and the range of pI was from 3 to 10. However, the major leaf proteins from both normal and giant plants of *Musa* spp. cultivar Prata Ana (AAB)

had molecular weights ranging from 14.0 kDa to 50.0 kDa and pI range was between 3 and 10 [3].

The protein patterns of two banana genomes were compared and analyzed. Some protein spots from each genome were separated and identified by Image Master 2D Trial. Table 1 summarized leaf proteins identified by pI and molecular weight on two referent gels compared with *M. acuminata* Colla (banana) leaf proteins reported previously [4]. The well-separated protein spots are known banana leaf proteins such as ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase, oxygen-evolving enhancer protein and superoxide dismutase.

Table 2 summarized proteins identified by LC-ESI-MS/MS. Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase is an important primary enzyme in photosynthesis with a carboxylase that catalyzes the assimilation of carbon dioxide into organic compounds. Therefore, it is not surprising that we found ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase in both Klui Ta Nee and Klui Nam Wa leaves, and these enzymes were also found in *M. acuminata* Colla leaf and *Musa* spp. cultivar Prata Ana (AAB) leaves [3, 4].

However, Klui Nam Wa leaves had higher number of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase spots than Klui Ta Nee leaves. In addition, ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit found in Klui Ta Nee leaves had higher intensity than in Klui Nam Wa leaves. Moreover, oxygen-evolving enhancer protein is one of protein complex of photosystem II found in thylakoid membranes [8]. We found that oxygen evolving enhancer protein from Klui Nam Wa leaves had higher number of multiple spots than *M. acuminata* Colla leaves. Moreover, the authors found that a low quality protein: oxygen-evolving enhancer protein 1, chloroplastic-like, in Klui Nam Wa leaves had higher intensity of protein bands than in Klui Ta Nee leaves.

Interestingly, we found that superoxide dismutase from Klui Ta Nee and Klui Nam Wa leaves had multiple spots similar to that found in *M. acuminata* Colla leaves [4]. Superoxide dismutase acts as the first line of defense against ROS. It is induced by cold stress in plantain (*Musa paradisiaca* L.; ABB group) [2]. As the leaves of Klui Ta Nee and Klui Nam Wa were collected on 1st December, 2018, superoxide dismutase found in this study may respond to low temperature in the winter season. In addition, endochitinase was found in Klui Ta Nee leaves, which was in agreement with that found in *M. acuminata* Colla (banana) leaves [4]. The general function of endochitinase is believed to be the hydrolysis of chitin in the cell walls of fungi and bacteria. Most of plant endochitinases are inducible with wounding, cold, pathogen infections, or hormones, like ethylene, methyl jasmonate and gibberellins [9]. In this study, four proteins (ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase, oxygen-evolving enhancer protein superoxide dismutase and endochitinase) in Klui Ta Nee and Klui Nam Wa leaves had multiple spots. The differentiations of pI and/or molecular weight of these proteins are the results of post-translational modification [4].

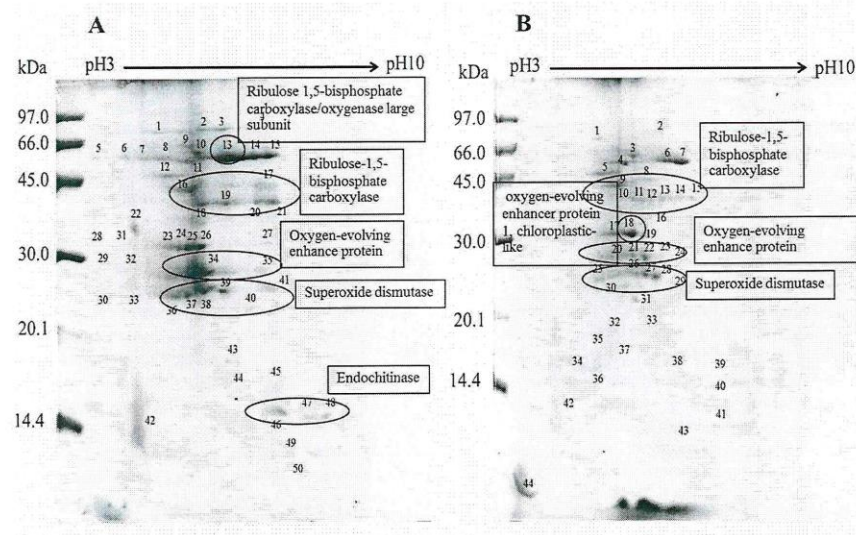


Fig.1 2D-PAGE of Klui Ta Nee (A) and Klui Nam Wa (B) leaf proteins.

Table 1. Summary of proteins identified by pI and molecular weight.

Banana leaves protein	pI		Molecular weight (kDa)	
	Experimental	Theory	Experimental	Theory
Kluai Ta Nee				
- Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase	5.09	6.40 [4]	43	44.778 [4]
	6.71		44	
	5.40		40	
	5.90		40	
	6.54		40	
	6.90		40	
- Oxygen-evolving enhance protein	5.26	8.26 [4]	28	27.775 [4]
	6.63		28	
- Superoxide dismutase	5.12	7.1 [4]	25	25.823 [4]
	5.41		25	
	5.85		25	
- Endochitinase	6.94	6.07 [4]	15	14.295 [4]
	7.60		14	
	7.94		14	
Kluai Nam Wa				
- Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase	5.82	6.40 [4]	44	44.778 [4]
	5.12		43	
	5.48		40	
	5.67		39	
	5.85		40	
	6.13		40	
	6.47		40	
	6.72		40	
- Oxygen-evolving enhance protein	5.14	8.26 [4]	28	27.775 [4]
	5.45		28	
	5.70		28	
	6.06		27	
	6.38		27	
- Superoxide dismutase	5.48	7.1 [4]	25	25.823 [4]
	5.71		25	
	5.95		25	

Table 2. Identification of the selected proteins from leaves of Kluai Ta Nee and Kluai Nam Wa identified by LC-ESI-MS/MS.

Spot No.	Match to	Protein name	Score	Theory		Calculated		Sequence coverage (%)	Peptide sequences
				pI	Mw. (kDa)	pI	Mw. (kDa)		
Kluai Ta Nee									
13	YP_008854433.1	Ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit [Musa textilis]	522	6.23	54.68	5.91	57	17%	KDTDILAAFRV, RFLFCA EAIKFA, REMTLGFVDLLD, REMTLGFVDLLR, D, KDDE NVNSQ PFMRW, KTFQGP PHGIQVERD, KD DENVNSQPFMR W, KWSPELAAA CEVWKE, KGHY LNATAGTCEEM MKR
Kluai Nam Wa									
18	XP_009412420.1	LOW QUALITY PROTEIN: oxygen-evolving enhancer protein 1, chloroplastic-like [Musa acuminata subsp. malaccensis]	508	6.77	36.23	5.43	31	22%	KRLTYDEIQSKT, KRLTY DEIQSKT, KRLTYDEIQ SKT, KRLTYDEIQSKT, RLTYDEIQSKT, KDGIDYAAVTV QLPGGERV, KD GIDYAAVTVQLP GGERV, KDGIDY AAVTVQLPG GE RV, RVPFLTIKQ, RGGSTGYDNAV ALPAGGRG, RGD EEELSKENI KN, KIQGVWYAQLE Q

Conclusions (Optional)

The 2D-PAGE patterns of Kluai Ta Nee leaves revealed ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase, oxygen-evolving enhancer protein and superoxide dismutase with different pI and number of isoforms

compared with the 2D-PAGE patterns of Klui Nam Wa leaves. Moreover, 3 isoforms of endochitinase were found in Klui Ta Nee leaves only. The major protein, ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit found in Klui Ta Nee leaves had higher intensity than in Klui Nam Wa leaves. However, a low quality protein: oxygen-evolving enhancer protein 1, chloroplastic-like found in Klui Nam Wa leaves had higher intensity than in Klui Ta Nee leaves. The polymorphism of these proteins found in Klui Ta Nee leaves and Klui Nam Wa leaves might be responsible for different biological functions in each type. The further investigations are required to use other techniques for identification, characterization and better understanding on functional properties of the proteins.

Acknowledgements

This work was financially supported by the Research Grant of Burapha University through National Research Council of Thailand (Grant no. 29/2562).

References

- [1] Padam BS, Tin HS, Chye FY, Abdullah MI. Banana by-products: an under-utilized renewable food biomass with great potential. *J. Food Sci. Technol.* 2014; 51(12), 3527-3545.
- [2] Yang QS, Wu JH, Li CY, Wei YR, Sheng O, Hu CH, et al. Quantitative Proteomic Analysis Reveals that Antioxidation Mechanisms Contribute to Cold Tolerance in Plantain (*Musa paradisiaca* L.; ABB Group) seedlings. *Mol. Cell Proteomics.* 2012; 11(12), 1853-1869.
- [3] Livramento K, Fialho L, Santos A, Livramento D, Cardoso T, Paiva L. Proteomic analysis reveals differentially accumulated proteins in banana somaclonal variants. *J. Exp. Agric. Int.* 2018; 21(6), 1-13.
- [4] Lu Y, Qi YX, Zhang H, Zhang HQ, Pu JJ, Xie YX. Separation and identification of *Musa acuminata* Colla (banana) leaf proteins by two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *Genet. Mol. Res.* 2013; 12(4), 6871-6881.
- [5] Janwan P, Intapan PM, Laummaunwai P, Rodpai R, Wongkham C, Insawang T, et al. Proteomic analysis identification of antigenic proteins in *Gnathostoma spinigerum* larvae. *Exp. Parasitol.* 2015; 159: 53-58.
- [6] Khueychai S, Jangpromma N, Daduang S, Jaisil P, Lomthaisong K, Dhiravisit A, et al. Comparative proteomic analysis of leaves, leaf sheaths, and roots of drought-contrasting sugarcane cultivars in response to drought stress. *Acta Physiol. Plant.* 2015; 37 (4), 88.
- [7] O'Farrell, P.H. High-Resolution Two-dimensional Electrophoresis of Proteins, *J. Biol. Chem.* 1975; 250, 4007-4021.
- [8] Sasi S, Venkatesh J, Daneshi RF, Gururani MA. Photosystem II extrinsic proteins and their putative role in abiotic stress tolerance in higher plants. *Plants (Basel.)* 2018; 7(4), 100.
- [9] Liu, JH, Zhang, J, Xu, BY, Zhang, JB, Jia, CH, Wang, JS, et al. Expression analysis of banana MaECH1 during fruit ripening with different treatments. *Afr. J. Biotechnol.* 2012; 11, 12951-12957.



Comparative study proteome pattern of Klui Ta Nee and Klui Nam Wa leaves proteins



Bung-on Prajanban¹, Wichuda Jankangram² and Nisachon Jangpromma^{3,4}

¹Faculty of Agricultural Technology, Burapha University, Sakaeo Campus, Sakaeo 27160, Thailand

²Faculty of Science and Social Sciences, Burapha University, Sakaeo Campus, Sakaeo 27160, Thailand

³Protein and Proteomics Research Center for Commercial and Industrial Purposes (ProCCI), Faculty of Science, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand

⁴Department of Integrated Science, Forensic Science Program, Faculty of Science, Khon Kaen University, Khon Kaen, 40002, Thailand.

Abstract:

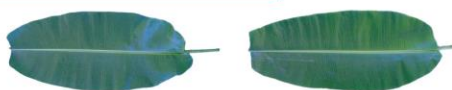
This study compared the protein profiles in leaves of diploid and triploid banana to identify the differentially accumulated proteins unique to each type of banana. Protein samples were analyzed by 2D-PAGE using IPG strip pH3-10. Fifty and 44 protein spots were detected in leaves of *Musa acuminata* (BB group) “Klui Ta Nee” and *Musa Xparadisica* (ABB group) “Klui Nam Wa”, respectively. Many spots of leaf proteins were corresponding to leaf proteins of *Musa acuminata* Colla (banana) reported previously such as ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase, oxygen-evolving enhancer protein and superoxide dismutase. Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase, oxygen-evolving enhancer protein and superoxide dismutase in Klui Ta Nee leaves had pIs and number of isoforms different from those in Klui Nam Wa leaves. Three isoforms of endochitinase were found in Klui Ta Nee leaves only. The major protein found in Klui Ta Nee leaves, which had higher intensity than that in Klui Nam Wa leaves, was identified as ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit. A low quality protein: oxygen-evolving enhancer protein 1, chloroplastic-like, found in Klui Nam Wa leaves had higher intensity than that in Klui Ta Nee leaves. The polymorphism of these proteins observed between leaves of Klui Ta Nee and Klui Nam Wa would be possibly due to different gene expressions in each banana type and may result in different functionalities of the proteins.

Introduction

Banana varieties grown in most parts of the world are hybrids derived from natural inter- and intraspecific crosses between two diploid wide species, *Musa acuminata* (genome A) and *Musa balbisiana* (genome B) [1]. Protein patterns can be used to study genetic diversity in banana. Proteins play a central role in biological processes, and proteomics differential assay can be used to determine the proteins that are affected by genetic variation during plant growth and development [2]. The majority of the identified leaf proteins from *Musa acuminata* Colla (AA) were found to be involved in energy metabolism, the minority of leaf proteins were found to be involved in immunity and defense mechanisms.

In contrast, *M. acuminata* (BB group) “Klui-Tanee” and *M. Xparadisica* (ABB group) “Klui Nam Wa” with different genomes from *M. acuminata* Colla (AA) and banana cultivar Prata Ana (AAB) have not been reported in the protein reference map. The aims of this study were to analyze and compare leaf proteins from different genomes of BB (Klui-Tanee) and ABB (Klui Nam Wa) by 2D-PAGE using known *M. acuminata* Colla (banana) leaf proteins that were previously reported for comparison. The proteins from leaves of both banana types were compared, and two protein spots with different intensity between two banana types were selected for identification of each type by using LC-ESI-MS/MS method.

Materials and methods



Protein from leaves were extracted by liquid nitrogen, lysis buffer and cleaned with the 2D-clean up kit.

2D-PAGE

Protein Identification

pI and molecular weight on two referent gels compared with *M. acuminata* Colla (banana) leaf proteins.

LC-ESI-MS/MS

Results

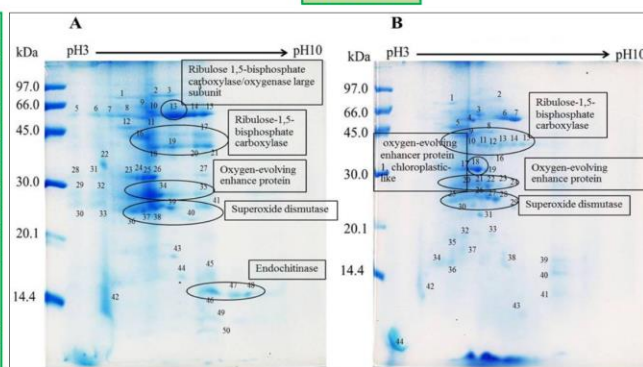


Fig.1 2D-PAGE of Klui Ta Nee (A) and Klui Nam Wa (B) leaf proteins.

Table 1. Identification of the selected proteins from leaves of Klui Ta Nee and Klui Nam Wa identified by LC-ESI-MS/MS.

Spot No.	Protein name	Score	Theory		Calculated		Sequence coverage (%)	Peptide sequences
			pI	Mw. (kDa)	pI	Mw. (kDa)		
Klui Ta Nee								
13	Ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit [<i>Musa textilis</i>]	522	6.23	54.68	5.91	57	17%	KDITDILAIFRV, RFLFCAEAFKA, REMTLGFVDDLD, REMTLGFVDDLRD, KD DENVNSQPFMRW, KTFQGPFGH, IQVERD, KDDENVNSQPFMRW, KWS PELAACEVFWKE, KGHYLNATAGTC EEMMKR
Klui Nam Wa								
18	LOW QUALITY PROTEIN: oxygen-evolving enhancer protein 1, chloroplastic-like [<i>Musa acuminata</i> subsp. <i>malaccensis</i>]	508	6.77	36.23	5.43	31	22%	KRLTYDEIQSKT, KRLTYDEIQSKT, KRLTYDEIQSKT, KRLTYDEIQSKT, RLTLYDEIQSKT, KDGDYAAVTVQLP, GGERV, KDGDYAAVTVQLP, GGERV, KDGDYAAVTVQLP, GGERV, RVPFLTIKQ, RGGSTGYDNAVALPAGGR, RG DEEELSKENIKN, KIQQGVWYQLEQ

Conclusions

The 2D-PAGE patterns of Klui Ta Nee leaves revealed ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase, oxygen-evolving enhancer protein and superoxide dismutase with different pI and number of isoforms compared with the 2D-PAGE patterns of Klui Nam Wa leaves. Moreover, 3 isoforms of endochitinase were found in Klui Ta Nee leaves only. The major protein, ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit found in Klui Ta Nee leaves had higher intensity than in Klui Nam Wa leaves. However, a low quality protein: oxygen-evolving enhancer protein 1, chloroplastic-like found in Klui Nam Wa leaves had higher intensity than in Klui Ta Nee leaves.

References:

- [1] Yang QS, Wu JH, Li CY, Wei YR, Sheng O, Hu CH, et al. Quantitative Proteomic Analysis Reveals that Antioxidant Mechanisms Contribute to Cold Tolerance in Plantain (*Musa paradisica* L.; ABB Group) seedlings. *Mol. Cell Proteomics*. 2012; 11(12), 1853-1869.
- [2] Livramento K, Fialho L, Santos A, Livramento D, Cardoso T, Paiva L. Proteomic analysis reveals differentially accumulated proteins in banana somaclonal variants. *J. Exp. Agric. Int.* 2018; 21(6), 1-13.

Acknowledgements

This work was financially supported by the Research Grant of Burapha University through National Research Council of Thailand (Grant no. 29/2562).

รายงานสรุปการเงิน

เลขที่โครงการระบบบริหารงานวิจัย (NRMS 13 หลัก) 60955 สัญญาเลขที่ 29/2562

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน)

ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2562 มหาวิทยาลัยบูรพา

ชื่อโครงการ โปรตีนโอมิกส์จากใบกล้วยในกลุ่ม diploid triploid และ tetraploid

ชื่อหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน ดร. บังอร ประจันบาล

รายงานตั้งแต่วันที่ 1 ตุลาคม 2561 ถึงวันที่ 30 กันยายน 2562

ระยะเวลาดำเนินการ 1 ปี ตั้งแต่วันที่ 1 ตุลาคม 2561

รายรับ

จำนวนเงินที่ได้รับ

งวดที่ 1 (50%) 134,750 บาท เมื่อวันที่ 11 ธันวาคม 2561

งวดที่ 2 (40%) 107,800 บาท เมื่อวันที่ 10 เมษายน 2562

งวดที่ 3 (10%) 26,950 บาท เมื่อวันที่ 12 กันยายน 2562

(วันที่ส่งเล่มรายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์)

รวม 269,500 บาท

รายจ่าย

รายการ	งบประมาณที่ตั้งไว้	งบประมาณที่ใช้จริง	จำนวนเงินคงเหลือ/เกิน
1. ค่าตอบแทน	-	-	-
2. ค่าจ้าง	26,950	26,950	0
3. ค่าวัสดุ	135,600	135,600	0
4. ค่าใช้สอย	80,000	80,000	0
5. ค่าครุภัณฑ์	-	-	-
6. ค่าใช้จ่ายอื่นๆ			
6.1 ค่าสาธารณูปโภค	26,950	26,950	0
รวม	269,500	269,500	0

.....
บังอร ประจันบาล

(นางสาวบังอร ประจันบาล)

หัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน

เอกสารอ้างอิง

- เบญจมาศ ศิลาชัย. กล้วย/เบญจมาศ ศิลาชัย. พิมพ์ครั้งที่ 4. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 2558.
- สำนักพัฒนาอาหารสัตว์. การนำผลิตผลจากต้นกล้วยมาใช้เลี้ยงสัตว์ [ออนไลน์] [อ้างเมื่อ 3 ตุลาคม 2560] จาก http://nutrition.dld.go.th/Nutrition_Knowledge/ARTICLE/ArticleF.htm
- Alam MM, Sharmin S, Nabi Z, Mondal SI, Islam MS, Nayeem SB, et al. A Putative Leucine-Rich Repeat Receptor-Like Kinase of Jute Involved in Stress Response. *Plant Molecular Biology Reporter* 2010; 28(3): 394-402.
- Amarnath R, Balakrishnan V. Evaluation of the banana (*Musa paradisiaca*) plant by-product's fermentantion characteristics to assess their fodder potential. *Int J Dairy Sci.* 2007; 2(3):217–225.
- Baier M, Dietz KJ. The plant 2-Cys peroxiredoxin BAS1 is a nuclear-encoded chloroplast protein: its expressional regulation, phylogenetic origin, and implications for its specific physiological function in plants. *Plant J* 1997; 12(1): 179-190.
- Bailey-Serres J, Vangala S, Szick K, Lee CH. Acidic phosphoprotein complex of the 60S ribosomal subunit of maize seedling roots. Components and changes in response to flooding. *Plant Physiol* 1997; 114(4): 1293-1305.
- Barsan C, Sanchez-Bel P, Rombaldi C, Egea I, Rossignol M, et al. 2010. Characteristics of the tomato chromoplast revealed by proteomic analysis. *J. Exp. Bot.* 61:2413–2431.
- Berg, A., Meza, T. J., Mahić, M., Thorstensen, T., Kristiansen, K., & Aalen, R. B. (2003). Ten members of the Arabidopsis gene family encoding methyl-CpG-binding domain proteins are transcriptionally active and at least one, AtMBD11, is crucial for normal development. *Nucleic acids research*, 31(18), 5291–5304.
- Bourdenx B, Bernard A, Domergue F, Pascal S, Léger A, Roby D, Pervent M, Vile D, Haslam RP, Napier JA, Lessire R, Joubès J. Overexpression of Arabidopsis ECERIFERUM1 promotes wax very-long-chain alkane biosynthesis and influences plant response to biotic and abiotic stresses. *Plant Physiol.* 2011; 156(1):29-45.
- Bulankova P, Akimcheva S, Fellner N, Riha K. Identification of Arabidopsis meiotic cyclins reveals functional diversification among plant cyclin genes. *PLoS Genet* 2013; 9(5): e1003508.

- Carpentier SC, Witters E, Laukens K, Deckers P, Swennen R, Panis B. 2005. Preparation of protein extracts from recalcitrant plant tissues: an evaluation of different methods for two-dimensional gel electrophoresis analysis. *Proteomics*. 5(10): 2497-2507.
- Cinque G, Croce R, Bassi R. Absorption spectra of chlorophyll a and b in Lhcb protein environment. *Photosynthesis Research* 2000; 64(2): 233-42.
- Dowell JA, Frost DC, Zhang J, Li L. Comparison of two-dimensional fractionation techniques for shotgun proteomics. *Anal Chem*. 2008; 80(17): 6715-6723.
- Emaga TH, Roberta C, Ronkart SN, Wathelet B, Paquot M. 2008. Characterization of pectins extracted from banana peels (*Musa AAA*) under different conditions using an experimental design. *Food Chem*. 108:463-471.
- Favaro R, Immink RG, Ferioli V, Bernasconi B, Byzova M, Angenent GC, et al. Ovule-specific MADS-box proteins have conserved protein-protein interactions in monocot and dicot plants. *Mol Genet Genomics* 2002; 268(2): 152-159.
- Feng R, Zhang L, Wang J, Luo J, Peng M, Qi J, Zhang Y. Proteomic Analysis of Cold Stress Responses in Banana Leaves. *J Amer Soc Hort Sci*. . 2015; 140:214-222.
- Hsieh MH, Goodman HM. Molecular characterization of a novel gene family encoding ACT domain repeat proteins in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 2002; 130(4): 1797-1806.
- Kitdamrongsont K, Pothavorn P, Swangpol S, Wongniam S, Atawongsa K, Svasti J, Somana J. 2008. Anthocyanin composition of wild bananas in Thailand. *J Agric Food Chem*. 56:10853-10857.
- Kikuchi G, Motokawa Y, Yoshida T, Hiraga K. Glycine cleavage system: reaction mechanism, physiological significance, and hyperglycinemia. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci*. 2008; 84(7):246-263.
- Kopke-Secundo E, Molnar I, Schnarrenberger C. Isolation and characterization of the cytosolic and chloroplastic 3-phosphoglycerate kinase from spinach leaves. *Plant Physiol* 1990; 93(1): 40-47.
- Kuo JM, Hwang A, Yeh DB, Pan MH, Tsai ML, Pan BN. 2006. Lipoxygenase from banana leaf: purification and characterization of an enzyme that catalyzes linoleic acid oxygenation and the 9-position. *J Agric Food Chem*. 54:3151-3156.
- Livramento K, Fialho L, Santos A, Livramento D, Cardoso T, Paiva L. Proteomic analysis reveals differentially accumulated proteins in banana somaclonal variants. *J. Exp. Agric. Int*. 2018; 21(6), 1-13.

- López-Castillo LM, Jiménez-Sandoval P, Baruch-Torres N, Trasviña-Arenas CH, Díaz-Quezada C, Lara-González S, Winkler R, Brieba LG. Structural Basis for Redox Regulation of Cytoplasmic and Chloroplastic Triosephosphate Isomerases from *Arabidopsis thaliana*. *Front Plant Sci.* 2016; 7:1817.
- Lee HJ, Mochizuki N, Masuda T, Buckhout TJ. Disrupting the bimolecular binding of the haem-binding protein 5 (AtHBP5) to haem oxygenase 1 (HY1) leads to oxidative stress in *Arabidopsis*. *J Exp Bot* 2012; 63(16): 5967-5978.
- Lu Y, Liao D, Pu J, Qi Y, Xie Y. Proteome analysis of resistant and susceptible Cavendish banana roots following inoculation with *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 2013; 84: 163-1671.
- Lu Y, Qi YX, Zhang H, Zhang HQ, Pu JJ, Xie YX. Separation and identification of *Musa acuminata* Colla (banana) leaf proteins by two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *Genet. Mol. Res.* 2013; 12(4), 6871-6881.
- Lu Y, Sun J, Yang Z, Zhao C, Zhu M, Ma D, et al. Genome-wide identification and expression Magdeldin S, Enany S, Yoshida Y, Xu B, Zhang Y, Zureena Z, Lokamani I, Yaoita E, Yamamoto T. Basics and recent advances of two dimensional- polyacrylamide gel electrophoresis. *Clin Proteomics.* 2014; 11(1):16.
- Marie-Magdeleine C, Limea L, Etienne T, Lallo CHO, Archimede H, Alexandre G. 2009. The effects of replacing *Dichantium* hay with banana (*Musa paradisiaca*) leaves and pseudostem in carcass traits of Ovin Martinik sheep. *Trop Anim Health Prod.* 41:1531–1538.
- Padam BS, Tin HS, Chye FY, Abdullah MI. 2014. Banana by-products: an under-utilized renewable food biomass with great potential. *J Food Sci Technol.* 51(12): 3527-3545.
- Ravi I, Uma S, Vaganan MM, Mustaffa MM. Phenotyping bananas for drought resistance. *Front Physiol.* 2013; 7;4:9.
- Rey, P.; Tarrago, L. Physiological Roles of Plant Methionine Sulfoxide Reductases in Redox Homeostasis and Signaling. *Antioxidants* 2018, 7, 114.
- Rhee, S. G., Woo, H. A., Kil, I. S., and Bae, S. H. (2012) Peroxiredoxin functions as a peroxidase and a regulator and sensor of local peroxides. *J. Biol. Chem.* 287, 4403–4410.

- Robinson, JC. 1996. Bananas and Plantains. *Crop Production Science in Horticulture*. (CAB International UK). Sasikumar AN, Perez WB, Kinzy TG. The many roles of the eukaryotic elongation factor 1 complex. *Wiley Interdiscip Rev RNA* 2012; 3(4): 543-555.
- Simmonds, NW. 1962. *The Evolution of Bananas*. Tropical Science Serues Longmahms, London. Scheurer S, Schülke S. Interaction of Non-Specific Lipid-Transfer Proteins With Plant-Derived Lipids and Its Impact on Allergic Sensitization. *Front Immunol*. 2018 Jun 20;9:1389.
- Tamburino, R., Vitale, M., Ruggiero, A., Sassi, M., Sannino, L., Arena, S., ... Scotti, N. (2017). Chloroplast proteome response to drought stress and recovery in tomato (*Solanum lycopersicum* L.). *BMC plant biology*, 17(1), 40.
- Van der Straeten D, Rodrigues-Pousada RA, Goodman HM, Van Montagu M. Plant enolase: gene structure, expression, and evolution. *Plant Cell*. 1991 Jul;3(7):719-735.
- Vanhee C, Zapotoczny G, Masquelier D, Ghislain M, Batoko H. The Arabidopsis Multistress Regulator TSPO Is a Heme Binding Membrane Protein and a Potential Scavenger of Porphyrins via an Autophagy-Dependent Degradation Mechanism. *The Plant Cell* 2011; 23(2): 785-805.
- Vanhove A-C, Vermaelen W, Panis B, Swennen R, Carpentier SC. 2012. Screening the banana biodiversity for drought tolerance: can an in vitro growth model and proteomics be used as a tool to discover tolerant varieties and understand homeostasis. *Frontiers in Plant Science*. 3:176.
- Vasudevan D, Fu A, Luan S, Swaminathan K. Crystal Structure of Arabidopsis Cyclophilin38 Reveals a Previously Uncharacterized Immunophilin Fold and a Possible Autoinhibitory Mechanism. *The Plant Cell* 2012; 24(6): 2666-2674.
- Wang R, Rajagopalan K, Sadre-Bazzaz K, Moreau M, Klessig DF, Tong L. Structure of the Arabidopsis thaliana TOP2 oligopeptidase. *Acta Crystallogr F Struct Biol Commun* 2014; 70(Pt 5): 555-559.
- Wang YS, Xu YJ, Gao LP, Yu O, Wang XZ, He XJ, et al. Functional analysis of flavonoid 3',5'-hydroxylase from tea plant (*Camellia sinensis*): critical role in the accumulation of catechins. *BMC Plant Biol* 2014; 14: 347.
- Wanke M, Skorupinska-Tudek K, Swiezewska E. Isoprenoid biosynthesis via 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate/2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate (DOXP/MEP) pathway. *Acta Biochim Pol* 2001; 48(3): 663-672.

- Yamori W, Takahashi S, Makino A, Price GD, Badger MR, von Caemmerer S. The roles of ATP synthase and the cytochrome b6/f complexes in limiting chloroplast electron transport and determining photosynthetic capacity. *Plant Physiol.* 2011; 155(2): 956-962.
- Zhang P, Whistler RL, BeMiller JN, Hamaker BR. 2005. Banana starch: production, physicochemical properties and digestibility—a review. *Carbohydr Polym.* 59:443–458
- Zhao Q, Liu C. Chloroplast Chaperonin: An Intricate Protein Folding Machine for Photosynthesis. *Frontiers in Molecular Biosciences* 2018; 4(98).