Agricultural Sci. J. 46 : 3/1 (Suppl.) : 125-128 (2015) ว. วิทย. กษ. 46 : 3/1 (พิเศษ) : 125-128 (2558)

ผลของการรมด้วยก๊าซคลอรีนไดออกไซด์ (ClO_2) ต่อการแสดงออกของยีนของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระระหว่างการเกิดเปลือกสีน้ำตาลของผลลำไยพันธุ์ดอ

Effect of Gaseous Chlorine Dioxide (ClO_2) Fumigation on Gene Expression of Enzymatic Antioxidant During Pericarp Browning of Longan Fruit cv. Daw

วารุณี จอมกิติชัย[1] **กอบเกียรติ แสงนิล**[2] **และ ชนิกาญจน์ จันทร์มาทอง**[3]
Warunee Chomkitichai[1], Kobkiat Saengnil[2] and Chanikan Junmatong[3]

Abstract

The expression of antioxidant gene is one several factors for enhancing enzymatic antioxidant activity. The objective of this study was to evaluate the effects of gaseous chlorine dioxide (ClO_2) fumigation on enzymatic antioxidant gene expression (i.e., superoxide dismutase: *SOD*, catalase: *CAT* and ascorbate peroxidase: *APX*) during pericarp browning of longan fruit cv. Daw. Fresh longan fruits were fumigated with 10 mg l^{-1} ClO_2 gas for 10 minutes and stored at 25±1 °C with 82% relative humidity for 7 days. The fruits were randomly sampled each day to determine the expression of SOD, CAT and APX genes. The results showed that the expression of three antioxidant enzyme genes increased and reached the peak highest on the second day, but gradually decreased afterwards. Fumigation with gaseous ClO_2 promoted the expression of the *SOD*, *CAT* and *APX* genes. The expressions of these genes were significantly higher in ClO_2 fumigation fruits than those in the control group throughout the storage time.

Keywords: chlorine dioxide, gene expression, longan

บทคัดย่อ

การแสดงออกของยีนต้านอนุมูลอิสระนับเป็นปัจจัยหนึ่งที่ทำให้เอนไซม์นี้มีกิจกรรมเพิ่มสูงขึ้น งานวิจัยนี้ศึกษาผลของการรมด้วยก๊าซคลอรีนไดออกไซด์ (chlorine dioxide; ClO_2) ต่อการแสดงออกของยีนของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระซุปเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทส (superoxide dismutase; SOD) คะตะเลส (catalase; CAT) และแอสคอร์เบทเปอร์ออกซิเดส (ascorbate peroxidase; APX) ระหว่างการเกิดเปลือกสีน้ำตาลของผลลำไยพันธุ์ดอ โดยนำผลลำไยสดมารมด้วยก๊าซคลอรีนไดออกไซด์ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 10 นาที แล้วเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 25±1 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 82 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 7วัน และสุ่มตัวอย่างผลมาทุกวันเพื่อวิเคราะห์ การแสดงออกของยีนของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระทั้ง 3 ในระหว่างการเกิดเปลือกสีน้ำตาลของผลลำไย ผลการทดลองพบว่าการแสดงออกของยีนของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระทั้ง 3 เพิ่มสูงขึ้นและสูงสุดในวันที่ 2 ของการเก็บรักษา หลังจากนั้นจึงลดลงเรื่อยๆ การรมด้วยก๊าซคลอรีนไดออกไซด์มีผลส่งเสริมการแสดงออกของยีนทั้ง *SOD*, *CAT* และ *APX* โดยการแสดงออกของยีนทั้ง 3 สูงมากกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญตลอดการเก็บรักษา

คำสำคัญ: คลอรีนไดออกไซด์, การแสดงออกของยีน, ลำไย

คำนำ

การแสดงออกของยีนของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ เช่น ซุปเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทส (superoxide dismutase; SOD) คะตะเลส (catalase; CAT) และแอสคอร์เบทเปอร์ออกซิเดส (ascorbate peroxidase; APX) เป็นปัจจัยหนึ่งที่ทำให้เอนไซม์ดังกล่าวมีกิจกรรมเพิ่มสูงขึ้นในระหว่างเกิดสภาวะเครียดออกซิเดชัน โดยสารเคมีบางชนิด เช่น ก๊าซโอโซน (O_3) สารละลายกรดซาลิซิลิก (SA) และไนโตรเจน (N_2) มีผลชักนำการแสดงออกของยีน *SOD*, *CAT* และ *APX* ในพืชบางชนิดได้ ซึ่งสัมพันธ์กับกิจกรรมของเอนไซม์เหล่านี้ที่เพิ่มสูงขึ้นระหว่างการเก็บรักษา (Noormets *et.al*., 2000; Xu and Tian, 2008 และ Zhang *et.al*.,

[1] สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏอุตรดิตถ์ จังหวัดอุตรดิตถ์ 53000
[1] Department of Biology, Faculty of Science and Technology, Uttaradit Ratjabhat University, Uttaradit 53000
[2] ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จังหวัดเชียงใหม่ 50200
[2] Department of Biology, Faculty of Science, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200
[3] สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม จังหวัดพิษณุโลก 65000
[3] Department of Biology, Faculty of Science and Technology, Pibulsongkram Rajabhat University, 65000

2014) การศึกษาที่ผ่านมาพบว่าก๊าซคลอรีนไดออกไซด์สามารถชักนำกิจกรรมของเอนไซม์ SOD, CAT และ APX ระหว่างการเกิดเปลือกสีน้ำตาลของผลลำไยพันธุ์ดอที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ซึ่งคาดว่าน่าจะเกี่ยวข้องกับการแสดงออกของยีนเหล่านี้ ดังนั้นการศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของการรมด้วยก๊าซคลอรีนไดออกไซด์ต่อการแสดงออกของยีนของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ (*SOD*, *CAT*, *APX*) ระหว่างการเกิดเปลือกสีน้ำตาลของผลลำไยพันธุ์ดอ

อุปกรณ์และวิธีการ

นำผลลำไยพันธุ์ดอ (*Dimocarpus longan* Lour. cv. Daw) อายุประมาณ 180 วันหลังดอกบาน ขนาดใกล้เคียงกัน ไม่มีรอยการเข้าทำลายของโรคมาตัดก้านผลให้เหลือประมาณ 0.5 เซนติเมตร แล้วแบ่งผลเดี่ยวเหล่านี้เป็น 2 กลุ่มๆ ละ 480 ผล กลุ่มแรกเป็นชุดควบคุม และกลุ่มที่ 2 รมด้วยก๊าซคลอรีนไดออกไซด์ ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 10 นาที ซึ่งมีประสิทธิภาพลดการเกิดเปลือกสีน้ำตาลของผลลำไยพันธุ์ดอได้ดีที่สุด ภายหลังการรมนำผลวางผึ่งที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที เพื่อให้ก๊าซคลอรีนไดออกไซด์ระเหยออก จากนั้นแบ่งผลแต่ละกลุ่มเป็น 3 ซ้ำๆ ละ 160 ผล บรรจุผลแต่ละซ้ำลงในกล่องกระดาษลูกฟูก (กว้าง 14 x ยาว 20 x สูง 7 เซนติเมตร) จำนวน 8 กล่องๆ ละ 20 ผล แล้วเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 25±1 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 82 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 7 วัน ทำการสุ่มตัวอย่างผลในแต่ละซ้ำทุกวัน ตั้งแต่ภายหลังการรม เพื่อวิเคราะห์การแสดงออกของยีนของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ โดยนำเปลือกผลลำไยมาสกัด RNA ตามวิธีการของ Yu and Goh (2000) แล้วนำ RNA ที่ได้มาเตรียม cDNA โดยใช้ ReverTra Ace-α-cDNA synthesis kit จากนั้นออกแบบไพรเมอร์ (primer) ของยีน *SOD CAT APX* และ *UBQ* (Table 1) และนำไพรเมอร์ของยีนที่ได้ไปตรวจวัดการแสดงออกของยีนโดยใช้เทคนิค semi-quantitative RT-PCR แล้วจึงนำแถบแบน DNA ที่ได้มาตรวจวัดความเข้มแสงเพื่อหาค่าระดับการแสดงออกของยีน (relative expression) เทียบกับยีน *UBQ* (Lin and Lai, 2010) โดยใช้โปรแกรม Scion Image 4.03

Table 1 Specific primers used in the analysis of gene expression.

Primers	Nucleotide sequence (5'-3')	Annealing temperature (°C)	Product size (bp)
SOD (F)	TGGTACAAAAGATGAATGCTGATGG	52	389
(R)	AGTGCAAAAACGAAGAAAAACACAC		
CAT (F)	TGTCGGAAAAGAGGTCCTG	56	181
(R)	AGGGGCCCGAAGAAAATCAG		
APX (F)	TTTGGGACGATAAGGCACCC	56	143
(R)	GCAACAACTCCAGCCAACTG		
UBQ (F)	GCCGACTACAACATCCAGAAG	53	94
(R)	GCTTGGTGTA GGTCTTCTTC TT		

ผล

ในระหว่างการเกิดเปลือกสีน้ำตาลของผลลำไยพันธุ์ดอที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 25±1 องศาเซลเซียส มีการแสดงออกของยีนของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ *SOD CAT* และ *APX* เพิ่มสูงขึ้นและสูงสุดในวันที่ 2 ของการเก็บรักษา หลังจากนั้นจึงลดลงเรื่อยๆ (Figure 1) โดยชุดควบคุมมีค่าระดับการแสดงออกของยีน *SOD, CAT* และ *APX* 0.97-3.85, 1.29-3.53 และ 0.82-3.40 ตามลำดับ การรมผลลำไยด้วยก๊าซคลอรีนไดออกไซด์มีผลส่งเสริมการแสดงออกของยีนทั้ง *SOD*, *CAT* และ *APX* โดยมีค่าระดับการแสดงออกของยีน 1.30-4.47, 1.87-4.65 และ 1.02-4.06 ตามลำดับ ซึ่งผลที่รมด้วยก๊าซคลอรีนไดออกไซด์มีการแสดงออกของยีนทั้ง 3 สูงมากกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญตลอดการเก็บรักษา โดยสามารถเพิ่มการแสดงออกของยีน *SOD*, *CAT* และ *APX* ให้มากกว่าชุดควบคุม 15.98-55.09, 16.49-45.01 และ 23.24-86.07% ตามลำดับ

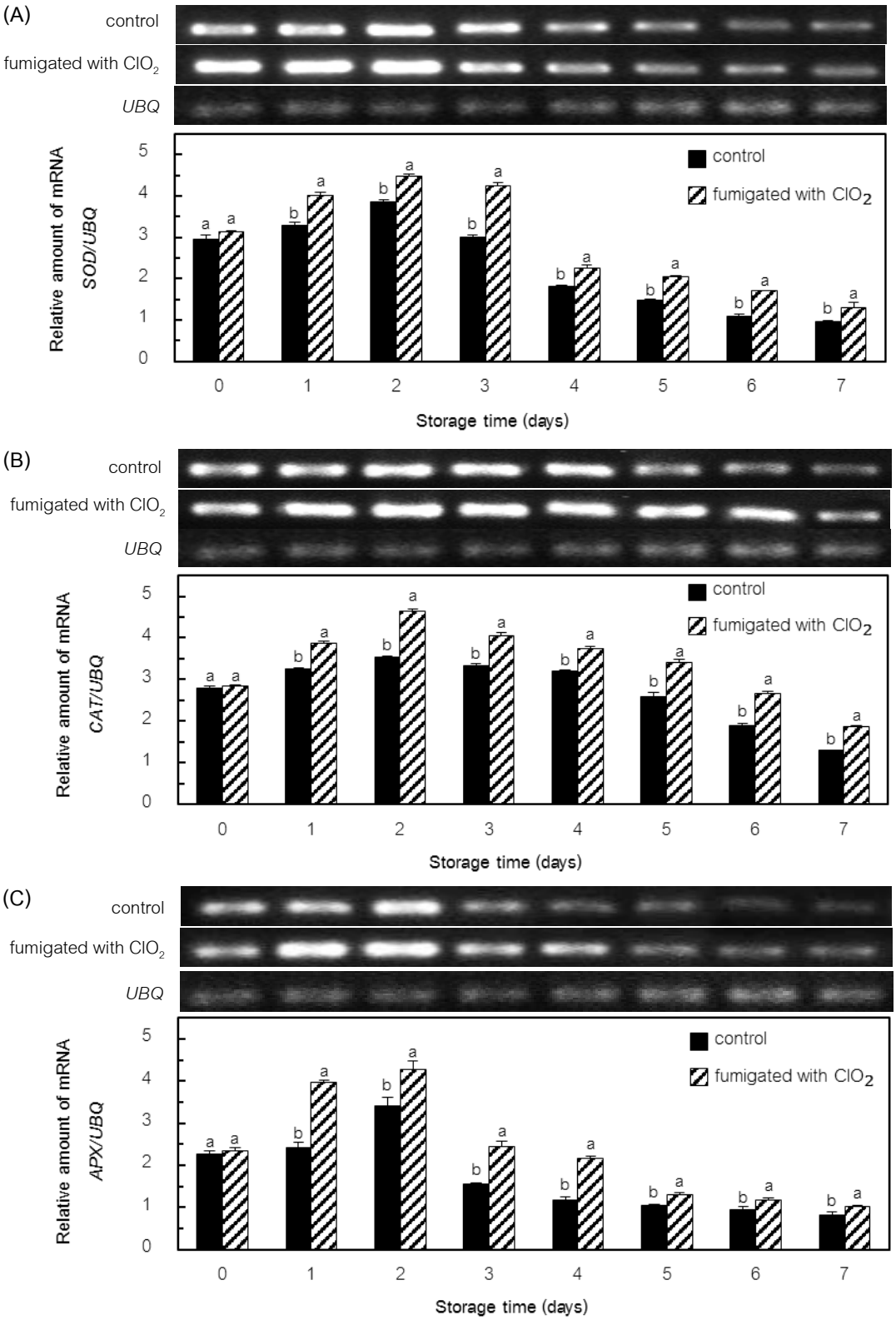

Figure 1 Change in relative expression level of *SOD* (A), *CAT* (B) and *APX* (C) genes in pericarp of longan fruit cv. Daw during storage at 25±1 °C. Each value is presented as mean ± standard deviation (n = 3).

วิจารณ์ผล

การแสดงออกของยีนของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ *SOD, CAT* และ *APX* เพิ่มสูงขึ้นและสูงสุดในวันที่ 2 ของการเก็บรักษา หลังจากนั้นจึงลดลงเรื่อยๆ สัมพันธ์กับกิจกรรมของเอนไซม์ทั้ง 3 ในเปลือกผลลำไยพันธุ์ดอระหว่างการเก็บรักษาที่ 25±1 องศาเซลเซียส (Chomkitichai *et al*., 2014b) ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากสภาพเครียดในระหว่างการเก็บรักษาชักนำการสร้างและสะสมอนุมูลอิสระซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญของการเกิดเปลือกสีน้ำตาลของผลลำไย (Chomkitichai *et al*., 2014a) โดยเฉพาะอย่างยิ่งอนุมูลอิสระกลุ่มที่มีออกซิเจนเป็นองค์ประกอบ (reactive oxygen speciese: ROS) เป็นตัวส่งสัญญาณสำคัญที่กระตุ้นการแสดงออกของยีนต้านอนุมูลอิสระซึ่งมี 2 กลไกคือ กลไกแรก ROS ความเข้มข้นต่ำๆ จะส่งสัญญาณไปกระตุ้นการทำงานของ transcription factor ซึ่งเป็นโปรตีนที่ควบคุมการแสดงออกของยีนทำให้มีการสร้างโปรตีนเอนไซม์เหล่านี้เพิ่มขึ้น กลไกที่ 2 ROS ความเข้มข้นต่ำๆ จะส่งสัญญาณไปกระตุ้นวิถีการทำงานของ mitogen activate protein kinase (MAPK) ซึ่งมีบทบาทควบคุมการทำงานของ transcription factor ทำให้การถอดรหัส (transcription) สร้างโปรตีนเอนไซม์เหล่านี้มากขึ้นนั่นเอง (Choudhury *et al*., 2013)

ก๊าซคลอรีนไดออกไซด์มีผลกระตุ้นการแสดงออกของยีนทั้ง *SOD CAT* และ *APX* ซึ่งสอดคล้องกับการที่คลอรีนไดออกไซด์สามารถเพิ่มกิจกรรมของเอนไซม์ทั้ง 3 ระหว่างการเกิดเปลือกสีน้ำตาลของผลได้ (Chomkitichai *et al*., 2014b) การที่คลอรีนไดออกไซด์กระตุ้นการแสดงออกของยีนได้นั้นมีข้อสันนิษฐาน 3 ข้อ คือ 1) คลอรีนไดออกไซด์อาจมีผลกระตุ้นการทำงานของ transcription factor 2) คลอรีนไดออกไซด์อาจมีผลกระตุ้นวิถีการทำงานของ MAPK ซึ่งจะส่งผลให้การถอดรหัสเพื่อสร้างโปรตีนเอนไซม์เพิ่มขึ้น สอดคล้องกับการใช้โซเดียมคลอไรด์ (sodium chloride) จัสโมเนต (jasmonate) และเอทธิลีน (ethylene) ที่สามารถกระตุ้นการแสดงออกของยีน transcription factor และ MAPK ในต้นอ่อนของข้าวโพด (Zhang *et al*., 2013) และ Arabidopsis (Rehrig *et al*., 2014) หรือ 3) คลอรีนไดออกไซด์อาจมีผลกระตุ้นการแสดงออกของยีนเพื่อสร้างโปรตีนเอนไซม์เหล่านี้โดยตรง

สรุป

การรมผลลำไยด้วยก๊าซคลอรีนไดออกไซด์สามารถเพิ่มการแสดงออกของยีนของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ *SOD*, *CAT* และ *APX* ได้ ระหว่างการเกิดเปลือกสีน้ำตาลของผลที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 25±1 องศาเซลเซียส

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณห้องปฏิบัติการสรีรวิทยาของพืช และเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ สำหรับการเอื้อเฟื้อสถานที่และอุปกรณ์ในการทำวิจัย และขอขอบคุณมหาวิทยาลัยราชภัฏอุตรดิตถ์ สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา และบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ สำหรับทุนสนับสนุนในการทำวิจัย

เอกสารอ้างอิง

Chomkitichai, W., A. Chumyam, P. Rachtanapun, J. Uthaibutra and K. Saengnil 2014a. Reduction of reactive oxygen species production and membrane damage during storage of 'Daw' longan fruit by chlorine dioxide. Scientia Horticulturae 170: 143-149.

Chomkitichai, W., B. Faiyue, P. Rachtanapun, J. Uthaibutra and K. Saengnil 2014b. Enhancement of the antioxidant defense system of post-harvested 'Daw' longan fruit by chlorine dioxide fumigation. Scientia Horticulturae 178: 138-144.

Choudhury, S., O. Panda, L. Sahoo, and S.K. Panda. 2013. Reactive oxygen species signaling in plants under abiotic stress. Plant Signaling and Behavior 8: 1-6.

Lin, Y.L. and Z.X. Lai. 2010. Reference gene selection for qPCR analysis during somatic embryogenesis in longan tree. Plant Science 178: 359-365.

Noormets, A., G.K. Podila and D.F. Karnosky. 2000. Rapid response of antioxidant enzymes to O_3-induced oxidative stress in *Populus tremuloides* clones varying in O_3 tolerance. Forest Genetics 7: 335-338.

Rehrig, E.M., H. Appel, A.D. Jones and J.C. Schultz. 2014. Roles for jasmonate and ethylene induced transcription factors in the ability of Arabidopsis to respond differentially to damage caused by two insect herbivores. Frontiers in Plant Science 5: 1-14.

Xu, X. and S. Tian. 2008. Salicylic acid alleviated pathogen-induced oxidative stress in harvested sweet cherry fruit. Postharvest Biology and Technology 49: 379-385.

Yu, H. and C.J. Goh. 2000. Identification and characterization of three orchid MADS-box genes of the AP1/AGL9 subfamily during floral transition. Plant Physiology 123: 1325-1336.

Zhang, D., S. Jiang, J. Pan, X. Kong, Y. Zhou, Y. Liu and D. Li. 2013. The overexpression of a maize mitogen-activated protein kinase gene (*ZmMPK5*) confers salt stress tolerance and induces defence responses in tobacco. Plant Biology 16: 558-570.

Zhang, F., X. Wan, Y. Zheng, L. Sun, Q. Chen, X. Zhu, Y.L. Guo and M. Liu. 2014. Effects of nitrogen on the activity of antioxidant enzymes and gene expression in leaves of Populus plants subjected to cadmium stress. Journal of Plant Interactions 9: 599-609.