Agricultural Sci. J. 46 : 3/1 (Suppl.) : 190-194 (2015) ว. วิทย. กษ. 46 : 3/1 (พิเศษ) : 190-194 (2558)

ผลของออกซิเจนความเข้มข้นสูงต่อการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการตกกระในกล้วยไข่

Effect of High Oxygen Concentration on the Expression of Associated-Senescent Spotting Genes in 'Sucrier' Banana

เพชรรัตน์ เนตรลักษณ์[2] ดวงกมล ศศิวัฒนพร[1] และ วชิรญา อิ่มสบาย[1,3]

Petcharat Netlak[2], Duangkamon Sasiwattanapond[1] and Wachiraya Imsabai[1,3]

Abstract

The senescent spotting symptom in cv. 'Sucrier' banana is more severe and distinct during over-ripening period. Oxygen is one of the factors affecting the severity of this symptom. The effect of high oxygen concentration on the expression of associated-browning genes such as phenylalanine ammonia lyase (PAL) and polyphenol oxidase (PPO), lipoxygenase (LOX) gene associated with membrane degradation and also antioxidant gene were studied. Banana fruits were stored under air (control:O_2~21%) and high oxygen (O_2: ~90%). Senescent spotting score, color change values (L*, b* and h) and the expression of genes were investigated. It was found that the expression of *MaPAL*, *MaAPX,* and *MaGPX* genes were more abundant on day 1 and day 3 after treated with high oxygen concentration and clearly decreased on day 5, and coincided with senescent spotting score and color change values (L*, b* and hue). The expression of these genes was up-regulated in the control fruit throughout the experiment period. The strong expression of *MaLOX* gene was found on day 1, then decreased on day 5. However, the expression of *MaPPO* gene was not different in both concentrations of oxygen. The results showed that the oxygen level induced the expression of these genes. Senescent spotting of banana was closely correlated with the browning process, membrane degradation, and antioxidant mechanism.

Keywords: oxygen, senescent spotting, *MaPPO*

บทคัดย่อ

การตกกระในกล้วยไข่มีอาการรุนแรงและชัดเจนมากขึ้นในระหว่างการสุก โดยออกซิเจนเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการเพิ่มระดับความรุนแรงของอาการ งานวิจัยนี้จึงศึกษาถึงออกซิเจนความเข้มข้นสูงต่อการแสดงออกของยีนที่ควบคุมการสังเคราะห์เอนไซม์ในกระบวนการเกิดสีน้ำตาล ได้แก่ phenylalanine ammonia lyase (PAL), polyphenol oxidase (PPO), ยีนควบคุมการสังเคราะห์เอนไซม์ lipoxygenase (LOX) ที่เกี่ยวข้องกับการเสื่อมสภาพของเยื่อหุ้มเซลล์ และยีนที่ควบคุมการสังเคราะห์เอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ โดยทำการเก็บกล้วยไข่ในสภาพอากาศปกติ (ชุดควบคุม) และเก็บในสภาพที่มีออกซิเจนความเข้มข้นสูง (90%) บันทึกผลคะแนนการตกกระ การเปลี่ยนแปลงค่าสีเปลือก (L*, b* และ h) และการแสดงออกของยีนในกล้วยไข่ พบว่า ผลกล้วยไข่ที่ได้รับออกซิเจนความเข้มข้นสูง มีการแสดงออกของยีน *MaPAL*, *MaAPX* และ *MaGPX* ในวันที่ 1 และ 3 มากและหลังจากนั้นจึงลดลงอย่างเด่นชัดในวันที่ 5 ซึ่งสอดคล้องกับคะแนนการตกกระและการเปลี่ยนแปลงค่าสีของเปลือก (L*, b* และ h) ที่มีค่าลดลงเมื่อกล้วยตกกระมากขึ้น ในขณะที่กล้วยในชุดควบคุมมีการแสดงออกของยีนเหล่านี้ตลอดเวลา และเกิดการตกกระช้ากว่ากล้วยที่ได้รับออกซิเจนสูง ส่วนยีน *MaLOX* มีการแสดงออกมากในวันแรกและลดลงอย่างเด่นชัดในวันที่ 5 ในขณะที่ยีน *MaPPO* มีการแสดงออกไม่แตกต่างกันทั้งสองทรีทเมนต์ จากผลดังกล่าวจะเห็นได้ว่าระดับออกซิเจนมีผลทำให้ยีนเหล่านั้นมีการแสดงออกมากขึ้น การตกกระของกล้วยไข่ยังมีความสัมพันธ์กับยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเกิดสีน้ำตาล การเสื่อมสภาพของเซลล์และการต้านอนุมูลอิสระที่ช่วยลดความเสียหายของเยื่อหุ้มเซลล์

คำสำคัญ: ออกซิเจน, การตกกระ, *MaPPO*

[1]ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ.นครปฐม 73140

[1]Department of Horticulture, Faculty of Agriculture at Kamphaeng Saen, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom, 73140, Thailand.

[2]ศูนย์นวัตกรรมเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม 73140

[2]Postharvest Technology Innovation Center, Kasetsart University, Kampaeng Saen Campus, Nakhon Pathom 73140.

[3]ศูนย์นวัตกรรมเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กทม. 10400

[3]Postharvest Technology Innovation Center, Commission on Higher Education, Bangkok 10400,Thailand.

คำนำ

การตกกระ (peel spotting หรือ senescent spotting) เป็นลักษณะผิดปกติทางสรีระ (physiological disorder) ที่เกิดขึ้นระหว่างการสุกของผลกล้วย ซึ่งในกล้วยไข่เป็นตัวบ่งชี้ว่ากล้วยสุกเกินไป (over-ripe) โดยจะเริ่มปรากฏอาการเมื่อกล้วยอยู่ในระยะเปลือกสีเหลืองอมเขียว อาการตกกระจะเกิดรุนแรงและชัดเจนมากขึ้นเมื่อผลกล้วยสุก ทำให้ผู้บริโภคมองว่าผลกล้วยไข่สุกเกินไปหรือถูกโรคเข้าทำลาย (Marriot, 1980; Lizada *et al*., 1990; Ketsa, 2000) นอกจากนี้ปริมาณออกซิเจนเป็นปัจจัยสำคัญต่อการเกิดสีน้ำตาล (การตกกระ) ซึ่งจะไปเพิ่มระดับความรุนแรงของอาการ และการให้ออกซิเจนความเข้มข้นสูงเป็นสาเหตุหนึ่งทำให้เกิดการตกกระมากขึ้น (ธารารัตน์, 2548) การตกกระของกล้วยไข่ได้มีการศึกษามาพอสมควร ที่ผ่านมาเป็นการศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางสรีระและชีวเคมีที่เกี่ยวข้องกับกิจกรรมของเอนไซม์ในกระบวนการตกกระ มีรายงานว่ากิจกรรมเอนไซม์ *in vitro* polyphenol oxidase (PPO, catechol oxidase) และ *in vitro* phenylalanine ammonia lyase (PAL) ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเกิดสีน้ำตาลไม่มีความสัมพันธ์กับการตกกระ แต่มีความสัมพันธ์กับปริมาณสารประกอบฟีนอลลิกที่ลดลง (Choehom *et al*., 2004) จากที่กล่าวมาข้างต้นกลไกในกระบวนการตกกระยังเข้าใจไม่กระจ่าง ดังนั้นการศึกษาการแสดงออกของยีนต่าง ๆ ในระดับ mRNA อาจทำให้เข้าใจกลไกในกระบวนการตกกระมากขึ้น และข้อมูลที่ได้นี้จะเป็นองค์ความรู้พื้นฐานที่จะนำไปประยุกต์ใช้กับการศึกษาต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

1. ศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางสรีระของผลกล้วยไข่ระหว่างการได้รับปริมาณออกซิเจน

ผลกล้วยไข่ที่ใช้ในการทดลองนำมาจาก อ.คลองขลุง จ.กำแพงเพชร คัดเลือกกล้วยที่มีความแก่ 80% (Light Full ¾) ซึ่งเป็นระยะที่ผลกล้วยยังดิบ เปลือกเป็นสีเขียว และยังคงเห็นเหลี่ยมอยู่ คัดเลือกผลกล้วยไข่ที่มีขนาดรูปร่างและสีผิวที่สม่ำเสมอ นำมาตัดแบ่งเป็นคลัสเตอร์ ๆ ละ 7-8 ผล หลังจากนั้นนำไปล้างทำความสะอาดและแช่สารควบคุมเชื้อรา แล้วจุ่มในสารละลายเอทิฟอนความเข้มข้น 500 ppm นาน 2 นาที เพื่อให้ผลกล้วยสุกสม่ำเสมอ แล้วนำไปบ่มพัฒนาสีเปลือกที่อุณหภูมิ 25°C ความชื้นสัมพันธ์ 85-90% รอจนกระทั่งผลกล้วยไข่เปลี่ยนสีอยู่ในช่วง color index (CI) 3-4 ซึ่งผลกล้วยมีสีเหลืองอมเขียวและปลายขั้วผลยังเขียวอยู่ จึงนำผลกล้วยไข่ไปเข้าทรีทเมนต์ โดยบรรจุหวีกล้วยไข่ลงในถังฝาปิดสนิท ต่อเข้ากับชุดควบคุมการไหล (Flow board) ซึ่งให้ออกซิเจนความเข้มข้นปกติ (90±3 %) ที่ได้จากการปรับความเข้มข้นก๊าซไนโตรเจนด้วยการผสมก๊าซทั้งสองชนิดกันก่อนปล่อยเข้าสู่ถังบรรจุ ให้มีอัตราการไหล 500 (±10) มิลลิลิตรต่อนาที เปรียบเทียบกับชุดควบคุม (21±3 %) วางแผนการทดลองแบบ completely randomize design (CRD) เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี *t*-test โดยแต่ละทรีทเมนต์มี 4 ซ้ำ โดยกล้วย 1 กลุ่ม (cluster) คือ 1 ซ้ำ มีจำนวน 7 ผล ตรวจสอบความเข้มข้นของก๊าซออกซิเจนที่ผ่านเข้าถังบรรจุกล้วยไข่ทุกวัน โดยใช้เครื่อง Gas Chromatograph (GC) มีตัวตรวจสอบชนิด thermal conductivity detector (TCD) ทำการบันทึกคะแนนของอาการตกกระ (1-7 คะแนน) และการเปลี่ยนแปลงสีของเปลือก ได้แก่ L* (ความสว่าง), b*(สีเหลือง), h (ค่าเฉดสี) ทุกวัน จนกว่าผลกล้วยไข่จะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลทั้งหมด

2. ศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการตกกระของผลกล้วยไข่

เก็บตัวอย่างเปลือกกล้วยไข่มาวิเคราะห์การแสดงออกของยีนด้วยวิธี semi-quantitative RT-PCR โดยนำตัวอย่างพืชที่บดละเอียดด้วยไนโตรเจนเหลวมาสกัด RNA โดยดัดแปลงจากวิธีของ Chang *et al*. (1993) และตรวจสอบปริมาณของ RNA ก่อนนำไปกำจัด DNA ในขั้นตอนการสังเคราะห์ cDNA ใช้วิธี reverse transcription โดยใช้ RNA ที่กำจัด DNA แล้วเป็นแม่แบบ แล้วนำ cDNA ที่ได้มาทำการเพิ่มปริมาณ DNA และตรวจสอบผลผลิตที่ได้ โดยใช้ primer 18s เป็นต้นแบบ นำ cDNA แต่ละตัวอย่าง มาเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส เพื่อให้ 18s เป็น house keeping gene ประกอบด้วยขั้นตอน denature, annealing และ extention จนครบ 12 รอบ แล้วนำผลผลิตที่ได้แต่ละตัวอย่างไปตรวจดูความเข้มของแถบ cDNA แต่ละตัวอย่างใน agarose gel โดยแถบ cDNA (18s) ที่มีความสว่างเท่ากันจะเท่ากับมีปริมาณ cDNA เท่ากัน จากนั้นนำ cDNA ต้นแบบของแต่ละตัวอย่างโดยใช้ปริมาตรเท่ากับที่ใช้ในชุด primer 18s มาเพิ่มปริมาณ DNA โดยใช้ primer PAL, PPO, APX, GPX และ LOX (Table 1) เพื่อดูความแตกต่างของการแสดงออกของยีน โดยแต่ละยีนจะใช้ขั้นตอนสำหรับปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสเช่นเดียวกับ 18s แต่ต่างกันที่จำนวนรอบในการทำแต่ละยีนซึ่งมีจำนวนรอบของยีน PAL, PPO, LOX, APX และ GPX เป็น 33, 30, 30, 27 และ 27 รอบ ตามลำดับ แล้วนำผลผลิตจากการทำปฏิกิริยาแต่ละตัวอย่างไปตรวจสอบด้วย agarose gel เช่นเดียวกับข้างต้น เพื่อตรวจดูแถบ DNA ของแต่ละตัวอย่างที่แสดงออก

Table 1 Oligonucleotide primers were used in 'Sucrier' banana fruit.

Name	Oligonucleotide primers	Name	Oligonucleotide primers
MaPAL	F-5'>ACT ACT CCT TTG GCA CTC CC<3'	*MaGPX*	F-5'>CGA AGC CTA AAT CGT GGG TA<3'
	R-5'>CGG TGC GAA CTC CAT TTC AA<3'		R-5'>TGC AGA AAT CCA CCA TGA AA<3'
MaPPO	F-5'>TCC ACA ACT CCT GGC TCT TC<3'	*MaLOX*	F-5'>AGG AGT TTC CTC CGG TTA GC<3'
	R-5'>TAG GGT CGG TTC CGT TGT AG<3'		R-5'>TCA GAG TGC CAT CAT CCT TG<3'
MaAPX	F-5'>AAG GAG CAG TTC CCC ATC TT<3'	*18S rRNA*	F-5'>CTC CGG CGT TGT TAC TTT GAA GAA<3'
	R-5'>TCC ACC AGA TAA TGC AAC GA<3'		R-5'>CCC GAA GGC CAA CAG AAT AGG A<3'

ผลและวิจารณ์

ผลกล้วยไข่ที่ได้รับออกซิเจนความเข้มข้นสูงมีการตกกระเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว ขณะที่ในสภาพออกซิเจนปกติ (21%) เกิดการตกกระน้อยกว่าและอาการตกกระพัฒนาช้ากว่าด้วย (Figure 1A) สอดคล้องกับค่า L*, b* และค่า h ที่ ลดลงอย่างรวดเร็ว พบค่า L* ลดลงต่ำที่สุดเท่ากับ 37.6 ในระยะที่เปลือกของกล้วยไข่เกิดสีน้ำตาลเกือบทั้งผล เช่นเดียวกันกับค่าบวกของ b* และค่า hue ที่ลดลงอย่างต่อเนื่อง (Figure 1B) เนื่องจากอาการตกกระที่มีเพิ่มขึ้นทำให้สีผิวของผลกล้วยไข่เปลี่ยนจากสีเหลืองเป็นสีน้ำตาลอย่างรวดเร็ว ผลดังกล่าวสอดคล้องกับรายงานของ Maneenuam *et al.* (2007) ที่พบว่าในสภาพออกซิเจนความเข้มข้นสูง ทำให้ผลกล้วยไข่แสดงอาการตกกระรุนแรงกว่าการเก็บรักษาในสภาพออกซิเจนความเข้มข้นต่ำ (45% และ 18% ตามลำดับ) ออกซิเจนถือว่าเป็นตัวการที่สำคัญในการเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารประกอบฟีนอลิกให้เปลี่ยนไปเป็นสีน้ำตาลมากขึ้น (ธารารัตน์, 2548) ในสภาพออกซิเจนความเข้มข้นสูงพบการแสดงออกของยีน *MaPAL*, *MaAPX* และ *MaGPX* ในวันที่ 1 และ 3 มากและหลังจากนั้นจึงลดลงอย่างเด่นชัดในวันที่ 5 เมื่อกล้วยเกิดการเสื่อมสภาพ ขณะที่ยีน *MaPPO* มีการแสดงออกไม่แตกต่างจากชุดควบคุม การแสดงออกของยีนเหล่านี้น่าจะทำให้มีการสังเคราะห์เอนไซม์ PAL และ PPO ในกระบวนการเกิดสีน้ำตาล รวมทั้งการสังเคราะห์เอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ ได้แก่ ascorbate peroxidase (APX) และ glutathione peroxidase (GPX) (Figure 2) ส่วนยีน *MaLOX* ที่ควบคุมการสังเคราะห์เอนไซม์ lipoxygenase (LOX) ซึ่งเอนไซม์นี้มีหน้าที่เร่งปฏิกิริยา oxidation ของกรดไขมันในชั้น membrane ทำให้เกิดอนุมูลอิสระขึ้น (จริงแท้, 2550) มีการแสดงออกเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วเมื่อกล้วยถูกกระตุ้นให้มีการสุกและได้รับสภาพออกซิเจนความเข้มข้นสูง โอกาสที่เอนไซม์ LOX จะถูกสังเคราะห์เพิ่มขึ้นก็เป็นไปได้มากและน่าจะกระตุ้นให้เร่งการเสื่อมสภาพของเยื่อหุ้ม เมื่อเยื่อหุ้มเสื่อมสภาพโอกาสที่จะส่งเสริมให้เอนไซม์ PPO ที่อยู่ภายใน plastid และ substrates ที่อยู่ใน vacuole พบกันก็มีมากขึ้น ประกอบกับการแสดงออกของยีน *MaAPX* และ *MaGPX* ลดลง (Figure 2) เมื่อมีตัวต้านอนุมูลอิสระลดลง (APX และ GPX) ทำให้เกิดการรั่วของสารออกสู่ cytoplasm จึงน่าจะทำให้เอนไซม์ PPO ทำปฏิกิริยากับ substrates เกิดเป็นสาร quinone และสารดังกล่าวรวมตัวกันเป็นโมเลกุลใหญ่เกิด browning จึงแสดงการตกกระให้เห็น จึงทำให้พบอาการตกกระมากกว่ากล้วยในสภาพออกซิเจนปกติ แต่อย่างไรก็ตามกลไกการตกกระที่นำเสนอในงานวิจัยนี้ ยังไม่สามารถยืนยันได้ชัดเจน จำเป็นต้องมีการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับเอนไซม์ LOX และเอนไซม์กลุ่ม peroxidase เพิ่มเติม รวมถึงตรวจวัดปริมาณสารอนุมูลอิสระ (H_2O_2) และสารต้านอนุมูลอิสระ เช่น ascorbic acid เป็นต้น

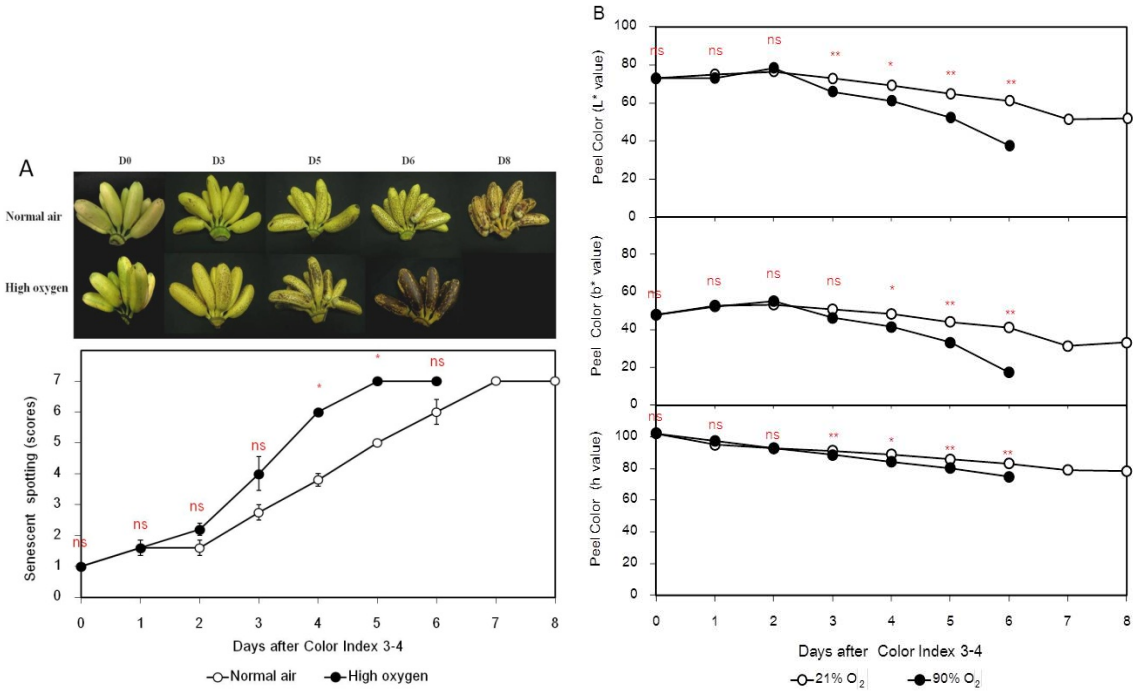

Figure 1 Development and scores of senescent spotting (A) and color changes of L*, b* and Hue values in the peel (B) of 'Sucrier' banana fruit during ripening. Mean values followed by ns were not significantly different at $P \leq 0.05$ by *t*-test. The lines represent the standard error of four replicates.

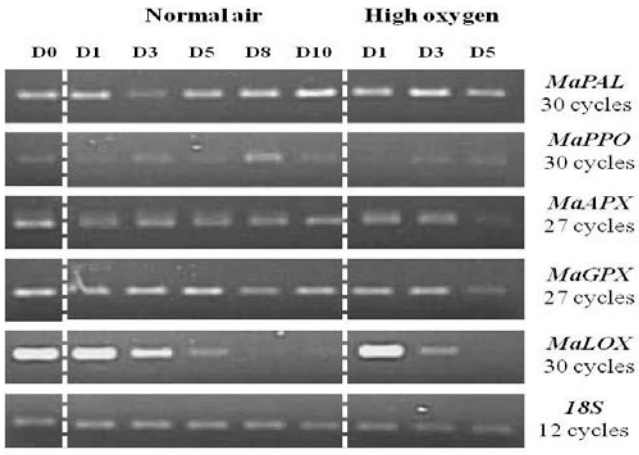

Figure 2 Semi-quantitative RT-PCR of PAL, PPO, LOX, APX and GPX expression in the peel of 'Sucrier' banana fruit during ripening.

สรุป

ผลกล้วยระยะผลสุก color index 3-4 ที่ได้รับสภาพออกซิเจนความเข้มข้นสูงเกิดการตกกระเร็วกว่าและมากกว่ากล้วยไข่ที่ได้รับสภาพออกซิเจนปกติ สอดคล้องกับการแสดงออกของยีน *MaPAL* ขณะที่ *MaPPO* มีระดับการแสดงออกของยีนไม่แตกต่างกัน ส่วนยีน *MaAPX* และ *MaGPX* มีการแสดงออกตลอดเวลาและลดลงเมื่อกล้วยไข่มีการตกกระมากขึ้น ส่วนยีน *MaLOX* พบการแสดงออกมากในช่วงแรกและลดลงเมื่อกล้วยสุกมากขึ้น การแสดงออกของยีนเหล่านี้มีความสัมพันธ์ต่อกลไกการตกกระของกล้วยไข่

คำขอบคุณ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยจากศูนย์นวัตกรรมเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กรุงเทพฯ 10400 และศูนย์เทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยวมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ.นครปฐม ที่เอื้อเฟื้ออุปกรณ์และเครื่องมือในการทำวิจัย

เอกสารอ้างอิง

จริงแท้. 2550. **ชีววิทยาหลังการเก็บเกี่ยวและการวายของพืช**. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, นครปฐม. 431 หน้า.

ธารารัตน์ มณีน่วม. 2548. **อิทธิพลของออกซิเจนความเข้มข้นสูงที่มีผลต่อการตกกระและคุณภาพของกล้วยไข่**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

Chang, S., J. Puryer and J. Cairney. 1993. A simple and efficient method for isolating RNA from pine tree. Plant Mol. Biol. Rep. 11: 113-116.

Choehom, R., S. Ketsa and W.G. van Doorn. 2004. Senescent spotting of banana peel is inhibited by modified atmosphere packaging. Postharvest Biol.Technol. 31: 167-175.

Ketsa, S. 2000. Development and control of senescent spotting in banana. Food Preserv. Sci. 26: 173–178.

Lizada, M.C.C., E.B. Pantastico, A.R. Shukor and S.D. Sabari. 1990. Ripening of banana: changes during ripening in banana. pp. 65–72. *In*: A. Hassan and E.B. Pantastico (eds.). Banana: Fruit Development, Postharvest Physiology, Handling and Marketing in ASEAN. ASEAN Food Handling Bureau, Kuala Lumpur.

Maneenuam, T., S. Ketsa and W.G.van Doorn. 2007. High oxygen levels promote peel spotting in banana fruit. Postharvest Biol. Technol. 43: 128-132.

Marriott, J. 1980. Banana-physiology and biochemistry of storage and ripening for optimum quality. CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutri. 13: 41–88.