Agricultural Sci. J. 38 : 5 (Suppl.) : 152-155 (2007) ว. วิทย. กษ. 38 : 5 (พิเศษ) : 152-155 (2550)

การเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีของข้าวโพดเลี้ยงสัตว์พันธุ์สุวรรณ 5 ภายหลังการทำ hydropriming

Biochemical changes of maize seed cv. 'Suwan 5' as affected by hydropriming

ทักษอร บุญชู [1] **และ ทรงศิลป์ พจน์ชนะชัย** [1]
Taksaon Boonchoo [1] and Songsin Photchanachai [1]

Abstract

Maize seed cv. 'Suwan 5' was primed by soaking in water for 0-12 h before drying at 40°C in hot air oven for 24 h to their initial moisture content (9-10%). Superoxide dismutase (SOD) activity gradually increased by arising of the soaking time and reached to a peak at 6 h thereafter the activity dramatically reduced. The longer soaking the slowly higher activity of peroxidase (POD) was found. The change of SOD and POD activities did not affect to germination percentage of the primed seed but the reduction of SOD activity after soaking for 6 h caused significant decrease of the seed vigor (analyzed by accelerate aging) and had higher percentage leakage of the soaked seed at 12 h. Catalase (CAT) activity was not affected by priming treatment.

Keywords: Maize, priming, germination, vigor, Superoxide dismutase, Peroxidase, Catalase

บทคัดย่อ

การ priming เมล็ดข้าวโพดเลี้ยงสัตว์พันธุ์สุวรรณ 5 ด้วยการแช่น้ำที่ระยะเวลา 0-12 ชม. ก่อนนำเมล็ดมาอบด้วยตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 40°C เป็นเวลา 24 ชม. จนความชื้นลดลงเท่ากับความชื้นเริ่มต้น (ร้อยละ 9-10) พบว่า ระยะเวลาการแช่น้ำเพิ่มขึ้นทำให้กิจกรรมเอนไซม์ superoxide dismutase (SOD) เพิ่มขึ้นและสูงสุดที่ระยะเวลาการแช่ 6 ชม. หลังจากนั้นกิจกรรมเอนไซม์ลดลงอย่างเด่นชัด ส่วนกิจกรรมเอนไซม์ peroxidase (POD) ค่อยๆ เพิ่มขึ้นตามระยะเวลาในการแช่เมล็ด การเปลี่ยนแปลงกิจกรรมเอนไซม์ SOD และ POD ไม่มีผลต่อร้อยละการงอก แต่การลดลงของกิจกรรม SOD หลังจากการแช่น้ำ 6 ชม. ทำให้ความแข็งแรงของเมล็ดที่ทดสอบด้วยวิธี accelerate aging test ลดลงอย่างมีนัยสำคัญยิ่งโดยเฉพาะการแช่เมล็ดในน้ำเป็นเวลา 12 ชม. ที่ทำให้ percentage leakage เพิ่มขึ้น อย่างไรก็ตามการ priming ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมเอนไซม์ catalase (CAT)

คำสำคัญ: เมล็ดข้าวโพด, priming, การงอก, ความแข็งแรง, Superoxide dismutase, Peroxidase, Catalase

คำนำ

การ priming เป็นวิธีการกระตุ้นเมล็ดให้มีความงอกสม่ำเสมอและแข็งแรงมากยิ่งขึ้น โดยช่วยเร่งให้เมล็ดเกิดกระบวนการทางชีวเคมีขึ้นเพื่อเตรียมพร้อมสำหรับการงอก แม้ว่าการ priming มีข้อดีดังกล่าวแต่การ priming กระตุ้นให้เกิดอนุมูลอิสระในเซลล์ซึ่งพบมากในระยะการดูดน้ำที่เรียกว่า phase G1 ถึง S หรือ G2 (Van Pijlen *et al*., 1996) ส่งผลให้โปรตีนและกรดนิวคลีอิกได้รับความเสียหาย อีกทั้งการลดความชื้นภายหลังการดูดน้ำ (re-drying) ส่งเสริมการเกิด lipid peroxidation ทำให้เกิดอนุมูลอิสระซึ่งทำความเสียหายให้กับเซลล์เมมเบรน เอนไซม์ รวมทั้งโครมาทิน (Leprince *et al*., 1994) และอาจทำให้ความงอก และความแข็งแรงของเมล็ดลดลง โดยเฉพาะถ้าหากการปฏิบัติในขั้นตอนทั้งการดูดน้ำและการลดความชื้นไม่เหมาะสม โดยทั่วไปเมล็ดพืชแต่ละชนิดมีกลไกในการป้องกันความเสียหายจากอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นแตกต่างกัน จึงทำให้เมล็ดพืชที่ทำ priming แต่ละชนิดมีความงอกและความแข็งแรงเพิ่มขึ้นแตกต่างกัน เช่น ในปี 1998 Chang and Sung พบว่าข้าวโพดพันธุ์ *sh-2* มีความแข็งแรงลดลงภายหลังการ priming เนื่องจากเกิด peroxidation มากขึ้น และทำให้กิจกรรมเอนไซม์ที่กำจัดอนุมูลอิสระลดลง แต่อย่างไรก็ตาม Wang *et al.* (2003) รายงานว่าการ priming เมล็ดมะระ (bitter gourd seed) ที่อุณหภูมิ 20°C ทำให้ความแข็งแรงเพิ่มขึ้น เนื่องจากพบกิจกรรมที่กำจัดอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้น งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการกำจัดอนุมูลอิสระภายหลังการ priming เมล็ดข้าวโพดไร่พันธุ์สุวรรณ 5 ที่เป็นพันธุ์ส่งเสริมและนิยมปลูกในประเทศไทย

[1] สายวิชาเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว คณะทรัพยากรชีวภาพและเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี กรุงเทพฯ 10150
[1] Division of Postharvest Technology, School of Bioresources and Technology, King Mongkut's University of Technology, Thonburi, Bangkok, 10140

อุปกรณ์และวิธีการ

นำเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดไร่พันธุ์สุวรรณ 5 ที่ปลูกและเก็บเกี่ยวในปี 2549 ณ ศูนย์วิจัยข้าวโพดและข้าวฟ่างแห่งชาติ จ. นครราชสีมา ความชื้นร้อยละ 8.79 และความงอกร้อยละ 100 มาทำ priming ด้วยการแช่ในน้ำกลั่นที่เวลา 3, 6, 9, 12 ชม. และไม่แช่น้ำ (0 ชม.) ที่อุณหภูมิห้อง (28±2°C) จากนั้นนำเมล็ดมาอบลดความชื้นด้วยตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 40±1°C เป็นเวลาประมาณ 24 ชม. จนกระทั่งความชื้นลดลงเท่ากับความชื้นเริ่มต้น ทำการทดลอง 3 ซ้ำๆ ละ 250 เมล็ด วางแผนการทดลองแบบ completely randomized design และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 จากนั้นนำเมล็ดที่ทำ priming มาทดสอบการงอก (%germination) ตามวิธีมาตรฐานของ ISTA (1993) และความแข็งแรงของเมล็ดโดยวิธี seedling growth rate (SGR), accelerate aging test (AA-Test) โดยนำเมล็ดมาบ่มในโถแก้วที่อุณหภูมิ 42°C ความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 98±2 เป็นเวลา 96 ชม. cold test ที่อุณหภูมิ 10°C (จวงจันทร์, 2529) และ percentage leakage (Stewart and Bewley,1980) และทดสอบกิจกรรมเอนไซม์ได้แก่ superoxide dismutase (SOD) ตามวิธีของ Stewart and Bewley (1980), peroxidase (POD) (Shannon, 1966) และ catalase (CAT) (Aebi, 1984)

ผล

การ priming เมล็ดข้าวโพดไร่พันธุ์สุวรรณ 5 ที่ระยะเวลา 3-9 ชม. มีผลทำให้กิจกรรม SOD เพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับเมล็ดที่ไม่แช่น้ำ และมีกิจกรรมเอนไซม์สูงสุดที่ระยะเวลาการแช่ 6 ชม. เท่ากับ 6 unit/mg protein หลังจากนั้นกิจกรรมเอนไซม์เริ่มลดลงในชั่วโมงที่ 9 จนถึงชั่วโมงที่ 12 (Figure 1A) ส่วนกิจกรรมเอนไซม์ POD ค่อยๆ เพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการแช่น้ำที่เพิ่มขึ้น โดยกิจกรรมเอนไซม์เพิ่มขึ้นสูงสุดที่ระยะเวลาการแช่ 12 ชม. ซึ่งมากกว่าเมล็ดที่ไม่แช่น้ำประมาณสองเท่าคือ 3.08 และ 1.50 unit/mg protein ตามลำดับ (Figure 1B) อย่างไรก็ตามการ priming ไม่มีผลต่อกิจกรรม CAT (Figure 1C) และพบว่าการ priming ไม่มีผลทำให้ร้อยละการงอกของเมล็ดลดลง และยังคงความงอกเท่ากับร้อยละ 100 (Table 1) อย่างไรก็ตามการ priming ทำให้ความแข็งแรงของเมล็ดที่ทดสอบด้วยวิธี AA-Test ลดลงโดยเฉพาะการแช่เมล็ดในน้ำเป็นเวลา 12 ชม. ทำให้ความงอกลดลงอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง (เหลือร้อยละ 64.67) (Table 1) ส่วนเมล็ดที่ทดสอบด้วยวิธี SGR และ cold test พบว่าไม่มีความแตกต่างกันในทุกชุดการทดลอง (Table 1) แต่การแช่เมล็ดในน้ำนาน 12 ชม. มีทำให้ percentage leakage เพิ่มขึ้นมากที่สุด (Table 1)

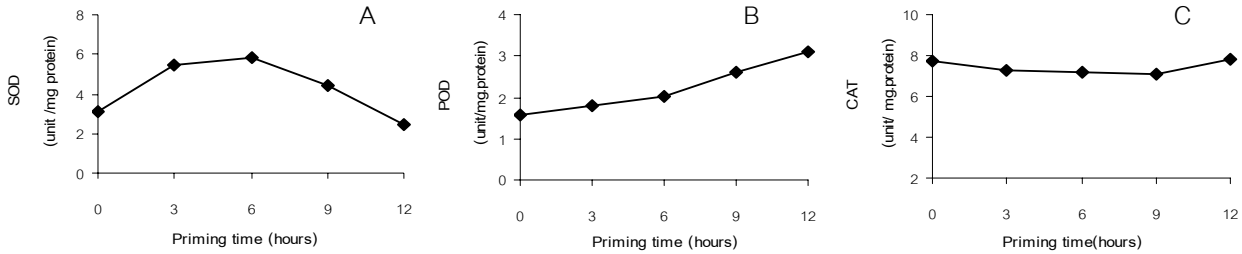

Figure 1 The activities of enzyme in Mize after priming with distill water for 0, 3, 6, 9 and 12 hours, SOD (1A), POD (1B) and CAT (1C)

Table 1 Germination percentage, germination after cold test and AA-test, SGR and percentage leakage in maize seed after hydropriming for 0, 3, 6, 9 and 12 hours

Priming	Germination	Germination (%)		SGR	Percentage
hours	(%)	Cold test	AA-test	g/plant	leakage
0	100	100.00	85.33a	0.248	1.11
3	100	99.33	89.33a	0.251	1.09
6	100	99.33	88.00a	0.238	1.09
9	100	100.00	84.67a	0.247	1.17
12	100	99.33	64.67b	0.240	1.23
F-test	ns	ns	**	ns	ns

วิจารณ์ผล

การ priming เมล็ดข้าวโพดมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมเอนไซม์ต่าง ๆ ภายในเมล็ด เพราะเมื่อเมล็ดเริ่มดูดน้ำ กิจกรรมทางชีวเคมีจะเริ่มขึ้น ได้แก่ ขบวนการหายใจ การสังเคราะห์โปรตีน และสารชีวเคมีที่จำเป็นต่อกระบวนการงอกของเมล็ดซึ่งขบวนการต่างๆ เหล่านี้ก่อให้เกิดอนุมูลอิสระขึ้น อีกทั้งการลดความชื้นอีกครั้งยิ่งส่งเสริมให้เกิดการสะสมอนุมูลอิสระมากขึ้น (Leprince *et al*., 1994) จากการทดลองพบว่า กิจกรรม SOD ที่ทำหน้าที่ขจัด O_2^- ไปเป็น H_2O_2 และ O_2 (Scandalios, 1993 and Stefan, 2007) ในเมล็ดข้าวโพดเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการแช่น้ำที่เพิ่มขึ้นและเพิ่มขึ้นสูงสุดภายหลังการแช่น้ำ 6 ชม. หลังจากนั้นกิจกรรมเอนไซม์เริ่มลดลง (Figure 1A) ส่วนกิจกรรม POD ที่เปลี่ยน H_2O_2 เป็นน้ำมีกิจกรรมเอนไซม์ค่อยๆ เพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการแช่น้ำที่เพิ่มขึ้นเช่นกัน (Figure 1B) แสดงว่าปริมาณ H_2O_2 มีมากขึ้นอย่างชัดเจนภายหลังการแช่น้ำ 6 ชม. ส่วน CAT พบการเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อย (Figure 1B) เมื่อพิจารณากิจกรรมเอนไซม์ร่วมกับความงอกและความแข็งแรง (ทดสอบด้วย AA-test) ของเมล็ด พบว่า เมล็ดข้าวโพดที่แช่น้ำ 12 ชม. มีความแข็งแรงน้อยที่สุด (Table 1) ทั้งนี้น่าจะเป็นผลเนื่องจากการลดลงของกิจกรรม SOD อย่างชัดเจนจึงทำให้เมล็ดที่แช่น้ำเป็นเวลานานมากกว่า 9 ชม. มีการสะสมอนุมูลอิสระมากขึ้นและมากกว่าเมล็ดที่แช่น้ำเป็นเวลา 3-6 ชม. ดังนั้นแม้ว่ากิจกรรม POD เพิ่มขึ้นเมื่อแช่เมล็ดในน้ำนานมากกว่า 6 ชม. ก็ตาม แต่กิจกรรม SOD ที่ลดลงในขณะที่เมล็ดยังคงมีขบวนการชีวเคมีต่างๆ อยู่จึงอาจทำให้มีการสะสมอนุมูลอิสระซึ่งมีความรุนแรงในการเข้าทำลายไขมัน (ขบวนการ lipid peroxidation) โดยเฉพาะไขมันที่เป็นองค์ประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์จนมีผลต่อการทำหน้าที่ในการเลือกผ่านสารลดลง ซึ่งสามารถสังเกตได้จากค่า percentage leakage ที่มีค่าสูงเพิ่มขึ้นในเมล็ดที่แช่น้ำ 12 ชม. (Table 1) แสดงว่าเยื่อหุ้มเซลล์เสื่อมสภาพมากขึ้นจึงเป็นสาเหตุให้เมล็ดที่แช่น้ำในระยะเวลา 12 ชม. เสื่อมสภาพมากที่สุด ดังนั้นเมื่อนำเมล็ดมาเร่งอายุจึงทำให้ร้อยละความงอกลดลงอย่างชัดเจน และแตกต่างจากเมล็ดที่แช่น้ำในระยะเวลา 3-9 ชม. (Table 1) เพราะการเร่งอายุเมล็ดพันธุ์เป็นวิธีการที่สามารถตรวจสอบเมล็ดที่เสื่อมสภาพเพียงเล็กน้อยได้ดีกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีอื่นๆ และเป็นวิธีการตรวจสอบที่นิยมปฏิบัติในเมล็ดพืชหลายชนิด นอกจากนี้ Chang and Sung (1998) อธิบายว่าความงอกของเมล็ดที่ลดลงเกี่ยวข้องกับความเสียหายของเซลล์เมมเบรนที่เกิดจาก lipid peroxidation (ที่มี O_2^- เป็นตัวเร่งอย่างรุนแรง) จนทำให้แรงยึดเกาะระหว่างโมเลกุล phospholipid ของเซลล์เมมเบรนลดลงทำให้เกิดการรั่วไหลของสารต่างๆ ออกนอกเซลล์ซึ่งน่าจะเกิดขึ้นเช่นเดียวกับเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดที่ใช้ในการทดลองนี้

สำหรับสาเหตุของการลดลงของกิจกรรม SOD นั้นยังไม่มีการรายงานชัดเจนแต่อาจเป็นไปได้ว่าสภาพที่มีอนุมูลอิสระมากอาจส่งผลต่อสมดุลย์ภายในเซลล์ การเปลี่ยนแปลง pH ตลอดจนการเปลี่ยนแปลงโปรตีนบางชนิด (Fujikura and Karssen, 1995) ทำให้ปริมาณ SOD ถูกผลิตน้อยลงและ/หรือ SOD ที่สร้างขึ้นไม่สามารถทำงานได้ ส่วนกิจกรรม POD แม้ว่าจะเพิ่มขึ้นก็ตามแต่ความเสียหายที่เกิดจากการสะสมอนุมูลอิสระต่อเซลล์เกิดขึ้นก่อนหน้านั้นแล้ว (ใน ชม. ที่ 6-9 ของการแช่เมล็ด) ดังนั้นการขจัด H_2O_2 ที่เป็นผลผลิตของการทำงานของ SOD ในช่วงแรกของ POD จึงเพิ่มขึ้นภายหลังการแช่น้ำ 6 ชม. (Figure 1B) สำหรับ CAT ในเมล็ดข้าวโพดพันธุ์สุวรรณ 5 อาจไม่มีบทบาทสำคัญในการควบคุมปริมาณการสะสม H_2O_2 ซึ่งแตกต่างจากการรายงานของ Hsu *et al*. (2003) พบว่า กิจกรรม CAT ใน bitter gourd seed เพิ่มขึ้นภายหลังการ priming ด้วยการแช่น้ำที่ 40°C 4 ชม. อย่างไรก็ตามควรทำการทดลองเพื่อยืนยันผลอีกครั้ง

สรุป

การ priming เมล็ดข้าวโพดไร่พันธุ์สุวรรณ 5 โดยการแช่น้ำที่เวลา 3-12 ชม. ไม่ทำให้ร้อยละความงอก ความแข็งแรงของเมล็ดที่วัดจาก ค่า SGR และ cold test แตกต่างจากเมล็ดในชุดควบคุม อย่างไรก็ตามแม้ว่ากิจกรรม POD ของเมล็ดที่แช่น้ำนาน 12 ชม. เพิ่มสูงขึ้นมากกว่าเมล็ดที่แช่น้ำ 0-6 ชม. แต่ผลจากการแช่น้ำนาน 12 ชม. ทำให้เมล็ดเสื่อมสภาพมากที่สุดโดยสามารถตรวจสอบได้จากความงอกของเมล็ดภายหลังการเร่งอายุเมล็ดพันธุ์และกิจกรรม SOD ที่ลดลงมากที่สุดแต่ percentage leakage เพิ่มขึ้นสูงสุด การ priming ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงกิจกรรม CAT ดังนั้นจึงอาจรายงานได้ว่า SOD มีอิทธิพลต่อการเสื่อมสภาพของเมล็ดข้าวโพดพันธุ์นี้มากกว่า POD และ CAT

เอกสารอ้างอิง

จวงจันทร์ ดวงพัตรา. 2529. การตรวจสอบและวิเคราะห์คุณภาพเมล็ดพันธุ์. ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ. 194 น.

Aebi, H.1984. Catalase *in vitro*. Methods Enzymol. 105: 121–126.

Chang, S.M. and Sung, J.M. 1998. Deteriorative changes in primed sweet corn seeds during storage. Seed Sci. Technol. 26: 613–626.

Fujikura, Y. and Karssen C.M. 1995. Molecular studies on osmoprimed seeds of cauliflower: a partial amino acid sequence of a vigour-related protein and osmopriming-enhanced expression of putative aspartic protease. Seed Sci. Res. 5: 177–181.

Hsu, C.C., C.L. Chen, J.J. Chen and J.M. Sung. 2003. Accelerated aging-enhanced lipid peroxidation in bitter gourd seeds and effects of priming and hot water soaking treatments, Scientia Horticulturae. 98: 201–212.

ISTA. 1993. International Rules for Seed Testing Rules. Seed Sci. & Technol. 21, Supplement.

Leprince, O., Atherton, N.M., Deltour, R., Hendry, G.A.F. 1994. The involvement of respiration in free radical processes during loss of desiccation tolerance in germinating *Zea mays* L. An electron paramagnetic resonance study. Plant Physiol. 104: 1333–1339.

Stewart, R.R. C. and Bewley, J.D. 1980. Lipid peroxidation associated with accelerated aging of soybean axes. Plant Physiol. 65: 245-248.

Scandalios, J.G.1993. Oxygen stress and superoxide dismutase. Plant Physiol. 101: 7–12.

Shannon, L.M., Kay, E. and Law , J.Y.,1966. Peroxidase isoenzyme from horse radish roots: isolation and physical properties. J. Biol. Chem. 241: 2166–2172.

Stefan I. Liochev and Irwin Fridovich. 2007. The effects of superoxide dismutase on H_2O_2 formation. Free Radical Biology & Medicine. 42: 1465–1469.

Van Pijlen, J.G., Groot, S.P.C., Kraak, H.L., Bergervoet, J.H.W. and Bino, R.J.1996. Effects of pre-storage hydration treatments on germination performance, moisture content, DNA synthesis and controlled deterioration tolerance of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill) seeds. Seed Sci. Res. 6: 57–63.

Wang, H.Y., Chen, C.L., Sung, J.M.2003. Both warm water soaking and solid priming treatments enhance antioxidation of bitter gourd seeds germinated at sub-optimal temperature. Seed Sci. Technol. 31: 47–56.