

การอันโลดน้ำตาลระหว่างการพัฒนาของผลมะละกอ Sugar unloading in papaya fruit during fruit development

พีรพงษ์ แสงวงวงศ์กุล¹ และ Robert E Paul²
Peerapong Sangwanangkul¹ and Robert E Paul²

Abstract

Glucose unloading during papaya fruit development was studied by comparing ¹⁴C-glucose uptake of mesocarp slices between two cultivars, 'Sunset' and UH801 (low sugar line). 'Sunset' papaya fruit though one third the weight of UH801, had higher total soluble solids (TSS) and total sugar than UH801. Both cultivars reached the color break stage at the same time, 139 days after anthesis (DAA). The pattern of ¹⁴C-glucose uptake, a measure of hexose transporter activity, by 'Sunset' papaya flesh discs was divided into three phases during fruit development. Uptake was low during the first (90-97 DAA) and last phase (132-153 DAA) of fruit development and high in the middle phase (97-132 DAA). The maximum glucose uptake in 'Sunset' occurred at 118 DAA prior to the increase in TSS and total sugar content and was higher than those in UH801. Two peaks of glucose uptake occurred in UH801 at 118 and 139 DAA. Papaya hexose transporter appeared to be an energy-dependent cotransporter. The first papaya hexose transporter cDNA has been cloned. The full length *Carica papaya* hexose transporter 1 (*CpHT1*) was proposed to encode a protein of 523 amino acids. *CpHT1* was 91 and 92% similar to a hexose transporter in grape berry (*VvHT1*) and *Arabidopsis* (*AtSTP1*), respectively.

Key words: sugar, unloading, papaya, CpHT1, uptake, glucose

บทคัดย่อ

การศึกษาการอันโลดน้ำตาลกลูโคสเข้าสู่ผลมะละกอระหว่างการพัฒนาของผลทำโดยการเปรียบเทียบการอัฟเทค กลูโคส -14 ของชิ้นเนื้อผลมะละกอสองพันธุ์ คือ ซันเซ็ท และ UH801 (พันธุ์หวานน้อย) พบว่า มะละกอพันธุ์ซันเซ็ทมีขนาดเล็กเพียงหนึ่งในสามของน้ำหนักผลมะละกอพันธุ์ UH801 แต่มีปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้และปริมาณน้ำตาลทั้งหมดสูงกว่าผลมะละกอทั้งสองพันธุ์เริ่มเปลี่ยนแปลงสีพร้อมกันเมื่อผลอายุ 139 วันหลังติดผล มะละกอพันธุ์ซันเซ็ทมีรูปแบบการอัฟเทค น้ำตาลกลูโคส-14 ซึ่งใช้วัดกิจกรรมของ hexose transporter ระหว่างการพัฒนาของผลที่สามารถแบ่งได้เป็นสามระยะ คือ อัฟเทคน้อยในระยะแรก (90-97 วัน) และระยะสุดท้าย (132-153 วัน) ของการพัฒนาผล แต่สูงในระยะกลาง (97-132 วัน) การอัฟเทคกลูโคส-14 ในซันเซ็ทเกิดขึ้นสูงสุดเมื่อผลอายุ 118 วัน ก่อนการเพิ่มขึ้นของของแข็งที่ละลายน้ำได้และปริมาณน้ำตาลทั้งหมดและสูงกว่าที่พบในพันธุ์ UH801 ซึ่งเกิดขึ้นสูงสองระยะเมื่อผลอายุ 118 และ 139 วัน กิจกรรมของ hexose transporter ในผลมะละกอจำเป็นต้องใช้พลังงานร่วม โดย hexose transporter cDNA ตัวแรกของผลมะละกอได้ถูกโคลนขึ้นโดยให้ชื่อว่า *Carica papaya* hexose transporter 1 (*CpHT1*) สามารถถอดรหัสได้โปรตีนที่มีกรดอะมิโน 523 ตัว คล้ายกับ hexose transporter ที่พบในผลองุ่น (*VvHT1*) และ *Arabidopsis* (*AtSTP1*) ถึง 91 และ 92% ตามลำดับ

คำสำคัญ: น้ำตาล, การอันโลด, มะละกอ, การอัฟเทค, กลูโคส

คำนำ

มะละกอเป็นผลไม้ที่ได้รับความนิยมทั้งบริโภคดิบและสุก ในการจำหน่ายมะละกอสุกในมลรัฐฮาวายนั้นมะละกอต้องมีปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ขั้นต่ำ 11.5% (Anon, 1990) เพื่อให้ถึงมาตรฐานขั้นต่ำนี้เกษตรกรต้องเก็บเกี่ยวเมื่อผลเปลี่ยนสีอย่างน้อย 5% ของพื้นที่ผิวผล (Akamine and Goo, 1971) ผลที่เก็บเกี่ยวก่อนระยะบริบูรณ์จะมีความหวานน้อย อย่างไรก็ตามหลายครั้งอาจพบว่าผลที่เก็บเกี่ยวบริบูรณ์ดีอาจมีปริมาณน้ำตาลน้อยได้เช่นกัน เนื่องจากผลมะละกอสะสมอาหารส่วนใหญ่ในรูปน้ำตาลซูโครส ซึ่งต่างจากผลไม้ประเภท climacteric อื่น เช่น กัลยและมะม่วง ที่สะสมอาหารในรูปแป้ง ดังนั้น

¹ ศูนย์เทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว สถาบันวิจัยและพัฒนา กำแพงแสน / ศูนย์นวัตกรรมเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน 73140

¹ Postharvest Technology Center, Research and Development Institute at Kampaengsaen / Postharvest Technology Innovation Center, Kasetsart University, Kampaengsaen campus

² Department of Tropical Plant and Soil Sciences, College of Tropical Agriculture and Human Resources, University of Hawai'i at Manoa, USA

ความหวานของมะละกอจึงขึ้นกับการสะสมน้ำตาลขณะที่ยังอยู่บนต้น โดยน้ำตาลที่สร้างขึ้นต่อไปจะเคลื่อนย้ายเข้าสู่ท่อลำเลียงอาหาร (phloem) เพื่อลำเลียงมายังผล จากนั้นน้ำตาลจากท่อลำเลียงอาหารจึงเคลื่อนเข้าสู่ผล เรียกว่า การอันโหนดน้ำตาล (sugar unloading) ซึ่งเกิดขึ้นได้สองเส้นทาง คือ apoplastic และ symplastic pathways (Williams *et al.*, 2000) symplastic unloading นั้นเกิดขึ้นในเนื้อเยื่อพืชที่กำลังเจริญเติบโตโดยอาศัยความต่างศักย์ของปริมาณน้ำตาลซูโครสระหว่างเซลล์ที่ติดกัน ขณะที่การอันโหนดแบบ apoplastic นั้น น้ำตาลซูโครสจะถูกเปลี่ยนเป็นกลูโคสและฟรุคโตสโดยเอนไซม์ invertase จากนั้นน้ำตาลเชิงเดี่ยวที่สร้างขึ้นจะเคลื่อนผ่าน hexose transporters ที่อยู่บน plasma membrane และ tonoplast เข้าสู่ cytoplasm และ vacuole ตามลำดับ การทำงานของ hexose transport ใน การเคลื่อนย้ายน้ำตาลนั้นพบมากในช่วงท้ายของการพัฒนาของผลสาลี (Shiratake *et al.*, 1997) มะเขือเทศ (Ruan *et al.*, 1997) องุ่น (Fillion *et al.*, 1999) และมีแนวโน้มที่จะเกิดในผลมะละกอ (Zhou *et al.*, 2003) Zhou and Paull (2001) พบว่าการสะสมน้ำตาลในผลมะละกอพันธุ์ซันเซ็ทเกิดขึ้นสูงในช่วงที่ผลอายุ 100-140 วันหลังดอกบาน สอดคล้องกับการเพิ่มขึ้นของกิจกรรมของเอนไซม์ acid invertase ที่เริ่มปรากฏเมื่อผลอายุ 90 วัน และสูงสุดเมื่อผลอายุ 125 วัน ขณะที่เอนไซม์ sucrose phosphate synthase และ sucrose synthase นั้นมีกิจกรรมสูงในระยะแรกของการเจริญของผลแต่มีกิจกรรมต่ำเมื่อผลเข้าสู่ระยะบริบูรณ์ แสดงให้เห็นว่าการอันโหนดน้ำตาลซูโครสระหว่างการบริบูรณ์ของผลมะละกอเกิดขึ้นทาง apoplast ซึ่งจำเป็นต้องผ่าน hexose transporter อย่างไรก็ตามข้อมูลกิจกรรมและการแสดงออกของยีน hexose transporter ระหว่างการสะสมน้ำตาลของผลมะละกอนี้ยังขาดการศึกษาอยู่ การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการทำงานของ hexose transporter และลำดับเบสของยีนนี้ ระหว่างการเจริญเติบโต การบริบูรณ์ และการสุกของผลมะละกอ

อุปกรณ์และวิธีการ

ทำการเก็บเกี่ยวผลมะละกอพันธุ์ซันเซ็ท (พันธุ์การค้า) และ UH801 (พันธุ์หวานน้อย) ทุกสัปดาห์ตั้งแต่ผลอายุ 90 วันหลังดอกบาน จนกระทั่งผลบริบูรณ์และสุกมีอายุ 160 วันหลังดอกบาน โดยบันทึกน้ำหนักผล สีเปลือกและเนื้อ น้ำหนักแห้งของเนื้อผล ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และ วัด ^{14}C -glucose uptake (Ruan and Patrick, 1995) ด้วยเครื่อง Beckman LS6500 Liquid Scintillation Analyzer (Beckman Instrument, CA, U.S.A.)

นำเนื้อมะละกอ 10 กรัม มาสกัด total RNA โดยวิธีของ Mason and Botella (1997) นำ amplicon ที่ได้จาก RT-PCR ต่อเชื่อมกับ pGEM[®]-T Easy vector (Promega, Madison, Wisconsin) และโคลนด้วย One Shot[®] TOP 10 competent cells (Invitrogen, Carlsbad, California) plasmid DNA ที่ได้นำไปหาลำดับเบส ทำการเปรียบเทียบลำดับเบสที่ได้กับ hexose transporter ของสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นบนฐานข้อมูลของ NCBI (National Center for Biotechnology Information) จากนั้นนำ cDNA ที่ทราบลำดับเบสบางส่วนมาขยายให้ได้สายเต็มด้วย GeneRacer[™] Kit (Invitrogen, Carlsbad, California) ทำการโคลน หาลำดับเบสและเปรียบเทียบลำดับเบสของสายเต็มที่ได้กับฐานข้อมูลของ NCBI และจีโนมมะละกอ (<http://cgpbbr.hawaii.edu/papaya/>)

ผลและวิจารณ์

มะละกอพันธุ์ซันเซ็ทมีขนาดเล็กเพียงหนึ่งในสามของน้ำหนักผลมะละกอพันธุ์ UH801 แต่มะละกอทั้งสองพันธุ์มีปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ (ภาพที่ 1) และปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (ภาพที่ 2) เพิ่มขึ้นพร้อมกันเมื่อผลอายุ 139 วันหลังติดผล โดยมะละกอพันธุ์ซันเซ็ทมีปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้และปริมาณน้ำตาลทั้งหมดสูงกว่ามะละกอพันธุ์ UH801 มะละกอพันธุ์ซันเซ็ทมีรูปแบบการอัปเดตน้ำตาลกลูโคส-14 ซึ่งใช้วัดกิจกรรมของ hexose transporter ระหว่างการพัฒนาของผลที่สามารถแบ่งได้เป็นสามระยะ คือ อัปเดตน้อยในระยะแรก (90-97 วัน) และระยะสุดท้าย (132-153 วัน) ของการพัฒนาผล แต่สูงในระยะกลาง (97-132 วัน) การอัปเดตกลูโคส-14 ในซันเซ็ทเกิดขึ้นสูงสุดเมื่อผลอายุ 118 วัน (ภาพที่ 3) ก่อนการเพิ่มขึ้นของปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้และปริมาณน้ำตาลทั้งหมดและสูงกว่าที่พบในพันธุ์ UH801 (ภาพที่ 4) ซึ่งเกิดขึ้นสูงสองระยะเมื่อผลอายุ 118 และ 139 วัน ทั้งนี้เมื่อทดลองให้เนื้อมะละกอได้รับ Erythrosin B (EB) (ภาพที่ 3) และ KNO_3 (ภาพที่ 4) ซึ่งเป็นสารยับยั้งการทำงานของ H^+ -ATPase ที่อยู่บน plasma membrane และ tonoplast ตามลำดับ ก่อนได้รับกลูโคส-14 ผลการทดลองพบว่า เนื้อเยื่อผลมะละกอมีการอัปเดตน้ำตาลกลูโคสน้อยลงโดยเฉพาะเมื่อผลมีอัตราการอัปเดตน้ำตาลสูง แสดงให้เห็นว่ากิจกรรมของ hexose transporter ในผลมะละกอจำเป็นต้องใช้พลังงานร่วมในการเคลื่อนย้ายน้ำตาลผ่านเข้าสู่ cytoplasm และ vacuole ตามลำดับ

hexose transporter cDNA ตัวแรกของผลมะละกอได้ถูกโคลนขึ้นโดยให้ชื่อว่า *Carica papaya* hexose transporter 1 (*CpHT1*) มีขนาด 1,663 bp (ภาพที่ 5) สามารถถอดรหัสได้โปรตีนที่มีกรดอะมิโน 523 ตัว คล้ายกับ hexose transporter ที่พบในผลงุ่น (*VvHT1*) และ *Arabidopsis* (*AtSTP1*) ถึง 91 และ 92% ตามลำดับ

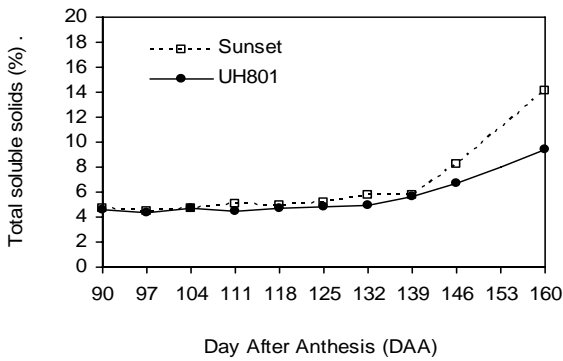


Figure 1 Total soluble solids of papaya cv. Sunset and UH801 during fruit development.

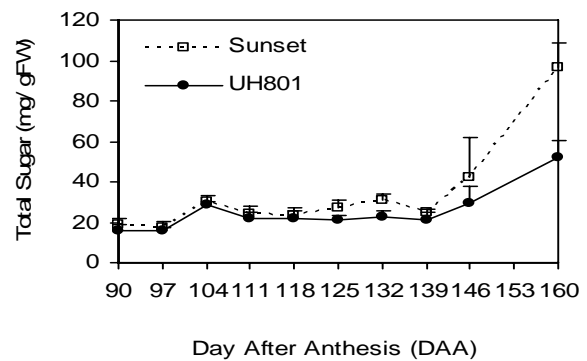


Figure 2 Total sugar content of papaya cv. Sunset and UH801 during fruit development.

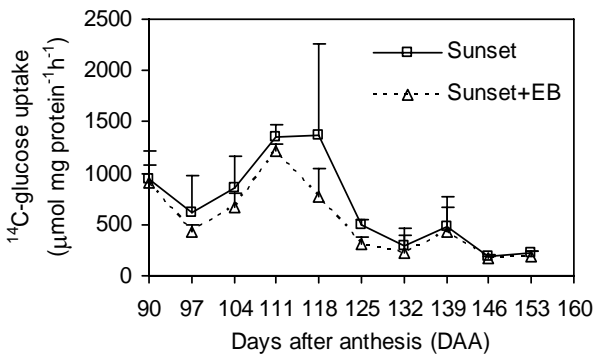


Figure 3 Total ¹⁴C-glucose uptake in 'Sunset' papaya mesocarp during fruit development pretreated with/ without Erythrosin B (EB, plasma membrane H⁺-ATPase inhibitor)

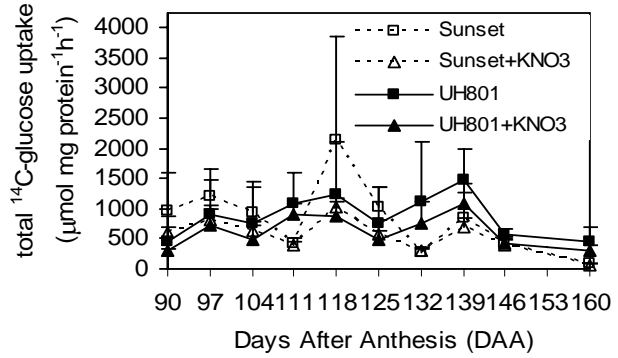


Figure 4 Total ¹⁴C-glucose uptake in 'Sunset' and 'UH801' papaya mesocarp during fruit development pretreated with/without KNO₃ (tonoplast H⁺-ATPase inhibitor)

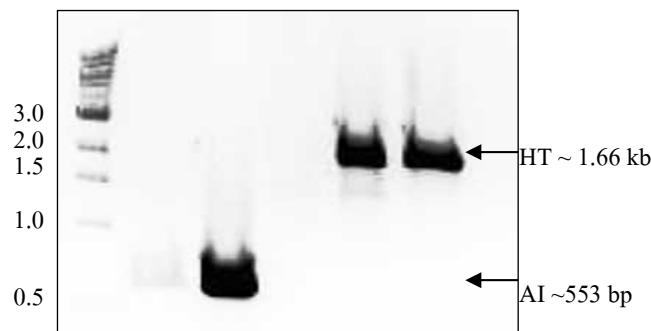


Figure 5 'Sunset' papaya hexose transporter cDNA amplicon at different annealing temperature. The electrophoresis was run on 1% agarose gel with 1xTAE buffer.

M = 500 ng of 1kb DNA ladder

- = Negative control, + = Acid invertase (AI) as positive control

1 = Hexose transporter PCR product annealing at 47.0 °C

2 = Hexose transporter PCR product annealing at 50.2°C

3 = Hexose transporter PCR product annealing at 53.4°C

สรุป

กิจกรรมของ hexose transporter ในผลมะละกอพันธุ์ซันเซ็ทเกิดขึ้นสูงสุดเมื่อผลอายุ 118 วัน และจำเป็นต้องใช้พลังงานร่วม hexose transporter cDNA ตัวแรกของผลมะละกอมีชื่อว่า *Carica papaya* hexose transporter 1 (*CpHT1*) มีความยาว 1,663 bp สามารถแปลรหัสได้โปรตีนที่มีกรดอะมิโน 523 ตัว โดยมีปลายอะมิโนและคาร์บอกซิลอยู่ในไซโตซอล

เอกสารอ้างอิง

- Akamine, E.K. and Goo, T. 1971. Relation between surface color development and total soluble solids in papaya. *HortScience*. 6: 567-568.
- Anon. 1990. Standards for Hawaii-grown papaya. Hawaii Department of Agriculture, Marketing Division.
- Fillion, L., A. Ageorges, S. Picaud, P. Coutos-Thevenot, R. Lemoine, C. Romieu and S. Delrot. 1999. Cloning and expression of a hexose transporter gene expressed during the ripening of grape berry. *Plant Physiology* 120: 1083-1093.
- Mason, M.G. and J.R. Botella. 1997. Identification and characterisation of two 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) synthase cDNAs expressed during papaya (*Carica papaya*) fruit ripening. *Aust. J. Plant Physiol.* 24: 239-244.
- Ruan, Y.L. and Patrick J.W. 1995. The cellular pathway of postphloem sugar transport in developing tomato fruit. *Planta* 196: 434-444.
- Ruan, Y.L., J.W. Patrick and C. Brady. 1997. Protoplast hexose carrier activity is a determinate of genotypic difference in hexose storage in tomato fruit. *Plant, Cell and Environment*. 20: 341-349.
- Shiratake, K., Y. Kanayama and S. Yamaki. 1997. Characterization of hexose transporter for facilitated diffusion of the tonoplast vesicles from pear fruit. *Plant Cell Physiol.* 38(8): 910-916.
- Williams, L.E., R. Lemoine and N. Sauer. 2000. Sugar transporters in higher plants - a diversity of roles and complex regulation. *Trends in Plant Science*. 5: 283-290.
- Zhou, L. and R.E. Paull. 2001. Sucrose metabolism during papaya (*Carica papaya*) fruit growth and ripening. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 126: 351-357.
- Zhou, L., C.C. Chen, R. Ming, D.A. Christopher and R.E. Paull. 2003. Apoplastic invertase and its enhanced expression and post translation control during fruit maturation and ripening. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 128: 628-635.