ผลของการใช้รังสี UV-C ต่อการลด oxidative stress และการเกิดอาการสะท้านหนาวของผลกล้วยหอม
The Effect of UV-C treatment on reduction of cellular oxidative stress and the consequential chilling injury symptom of 'Hom' banana fruit

ณัฐชัย พงษ์ประเสริฐ[1] Yoshihiko Sekozawa[1] Sumiko Sugaya[1] และ Hiroshi Gemma[1]
Nutthachai Pongprasert[1], Yoshihiko Sekozawa[1], Sumiko Sugaya[1] and Hiroshi Gemma[1]

Abstract

The reduction of cellular oxidative stress causing chilling injury (CI) of banana fruit peel by UV-C treatment was investigated. Banana [*Musa* (AAA group, Cavendish subgroup) cv. Cavendish] fruits were treated with UV-C at dosages of 0.03 kJ m^{-2} prior to storage at 8 and 25°C. Symptoms of CI were observed when fruits stored at 8°C and the severity increased with time of storage. UV-C treatment reduced the severity of CI compared with that of control. Our results also showed that oxidative stress caused by CI in banana resulted from the accumulation of reactive oxygen species (ROS) intermediates such as H_2O_2 and superoxide anion, and at CI-inducing temperatures, a marked increased in H_2O_2 content was observed. However, UV-C treatment led to significantly higher activities of superoxide dismutase, catalase and peroxidase as compared to that of the control fruit during later storage. The activation of antioxidants by UV-C treatment reduced cellular oxidative stress damage, as indicated by lower levels of DNA degradation. Suggesting a possible mode of action of UV-C is involved in the prevention of cellular damage and maintenance of cellular homeostasis, thus preventing membrane degradation and DNA damage associated with CI.

Keywords: banana, chilling injury, UV-C

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาผลของการใช้รังสี UV-C ต่อการลด oxidative stress และการเกิดอาการสะท้านหนาวของผลกล้วยหอม โดยทำการฉายรังสี UV-C ให้กับกล้วยหอม [*Musa* (AAA group, Cavendish subgroup) cv. Cavendish] ที่ระดับ 0.03 กิโลจูลต่อตารางเมตร ก่อนทำการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 8 และ 25 องศาเซลเซียส พบว่ากล้วยหอมที่เก็บรักษาที่ 8 องศาเซลเซียส นั้นมีการแสดงอาการสะท้านหนาวและความรุนแรงของอาการเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาของการเก็บรักษา จากการทดลองยังแสดงให้เห็นอาการสะท้านหนาวที่เปลือกของกล้วยนั้นเกิดจากการสะสม และเพิ่มขึ้นของสารอนุมูลอิสระ เช่น ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และ ซุปเปอร์ออกไซด์แอนไอออน การฉายรังสี UV-C สามารถกระตุ้นกิจกรรมของเอนไซม์ superoxide dismutase, catalase และ peroxidase, การกระตุ้นกิจกรรมของเอนไซม์เหล่านี้ส่งผลช่วยลดความสียหายในระดับเซลล์ที่เกิดจาก oxidative stress ซึ่งสังเกตุได้จากการลดลงของการเสื่อมสลายของ DNA จากผลการทดลองแสดงให้เห็นถึงบทบาทและกลไกการทำงานของรังสี UV-C ในการป้องกันการเสื่อมสลายและรักษาเสถียรภาพของเซลล์ นอกจากนี้รังสี UV-C ยังสามารกระตุ้นกลไกการป้องกันตนเอง โดยเฉพาะอย่างยิ่งกระตุ้นกิจกรรมของเอนไซม์ที่เกี่ยวของกับกระบวนการต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งส่งผลป้องกันและลดการเกิดความเสียหายของเซลล์และ DNA อันเนื่องมาจาก oxidative stress ในระหว่างการเกิดอาการสะท้านหนาวของกล้วยหอม

คำสำคัญ: กล้วยหอม อาการสะท้านหนาว รังสียูวีซี

คำนำ

กล้วย (Musa sp.) เป็นผลไม้ที่มีการปลูกอย่างแพร่หลายในประเทศเขตร้อน และยังมีความสำคัญในทางเศรษฐกิจของประเทศที่ส่งกล้วยเป็นสินค้าออก (FAO, 2004) เช่นเดียวกันกับพืชเขตร้อนหลายชนิด กล้วยเป็นผลไม้ที่มีความไวต่ออุณหภูมิต่ำ ซึ่งก่อให้เกิด อาการสะท้านหนาว (Chilling injury: CI) ซึ่งอาการสะท้านหนาวของกล้วยนั้น ส่วนใหญ่จะแสดงอาการสีน้ำตาลที่เปลือก (Pantasitico., 1967) เป็นที่ทราบกันดีว่ากลไกการเกิดอาการสะท้านหนาวนั้นเป็นผลมาจากการสะสมของอนุมูลอิสระภายหลังจากพืชได้รับอุณหภูมิต่ำ ส่งผลให้เกิดความผิดปกติของเมมเบรน นอกจากนี้อนุมูลอิสระ

[1] Laboratory of Pomology, Graduate School of Life and Environmental Sciences, University of Tsukuba, Ibaraki 305-8572, Japan

เหล่านั้นยังมีผลทำลายโครงสร้างโปรตีน DNA และ RNA ส่งผลให้เกิดการเสื่อมสลายของเซลล์ในที่สุด อย่างไรก็ตามพืชมีกลไกในการป้องกันตนเองจากสารต้านอนุมูลอิสระเหล่านี้ โดยการสร้างสารต้านอนุมูลอิสระโดยเฉพาะเอนไซม์ในกระบวนการต้านอนุมูลอิสระ (Mittler, 2002) มีรายงานว่าการใช้รังสี UV-C สามารถช่วยรักษาคุณภาพและช่วยลดอาการสะท้านหนาวของพริกหวาน (Vicent et al., 2005) อย่างไรก็ตามไม่มีรายงานเกี่ยวกับกลไกการทำงานของ UV-C ในการกระตุ้นกระบวนการต้านอนุมูลอิสระทั้งในกล้วยที่ได้รับความเครียดจากอุณหภูมิต่ำและในระหว่างกระบวนการสุก วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้จึงทำขึ้นเพื่อศึกษาหน้าที่และกลไกการทำงานของรังสี UV-C ในการกระตุ้นกระบวนการต้านอนุมูลอิสระ ที่ส่งผลช่วยลดลดความเสียหายของเซลล์ที่เกิดจาก oxidative stress และอาการสะท้านหนาวของเปลือกกล้วย

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ

ในการทดลองนี้ใช้กล้วยหอม (Musa (AAA group, Cavendish subgroup) cv. Cavendish)) ระยะ mature green ภายหลังจากนำมายังห้องปฏิบัติการ ทำความสะอาด แยกออกจากหวี และทำการคัดเลือกเฉพาะผลที่สมบูรณ์ ผึ่งไว้ให้แห้งเพื่อเตรียมนำมาใช้ในการทดลองขั้นต่อไป ในขั้นตอนของการฉายรังสี UV-C นั้น ทำโดยการนำกล้วยที่เตรียมไว้มาฉายด้วยรังสี UV-C ที่ระดับ 0.03 kJm^{-2} (EL Series UV lamp, UVP Model UVS-28, Upland, California, USA) โดยทำการฉายทั้ง 2 ด้านของผล หลังจากนั้นนำกล้วยที่ฉายรังสีแล้วใส่ตะกร้า คลุมด้วยถุงพลาสติกเจาะรู และทำการเก็บรักษาที่ 8 และ 25 องศาเซลเซียส วางแผนการทดลองแบบ CRD (Completely Randomized Design) ทำการวัดคะแนนความรุนแรงของอาการสะท้านหนาว (Nguyen et al., 2003) ปริมาณ Superoxide anion (Chaitanya and Naithani, 1994) ปริมาณ Hydrogen peroxide (Mukherjee and Choudhuri, 1983) กิจกรรมของเอนไซม์ในกระบวนการต้านอนุมูลอิสระ (superoxide dismutase; SOD, peroxidase; POD และ catalase; CAT) (Ukeda et al., 1997; Zhang et al., 2005; Wang et al., 2005) และ การเสื่อมสลายของ DNA (Agarose gel electrophoresis method) (Wagner *et al*., 1987)

ผลและวิจารณ์

เป็นที่ทราบกันดีว่าอาการสะท้านหนาวของผลกล้วยนั้น เริ่มแสดงอาการสีน้ำตาลที่บริเวณ**เนื้อเยื่อท่อลำเลียง** หลังจากนั้นจึงเกิดสีน้ำตาลไปทั่วบริเวณของเปลือก โดยอาการสีน้ำตาลที่เกิดจากอาการสะท้านหนาวมักจะเกิดที่บริเวณเปลือกเท่านั้น ซึ่งลักษณะและความรุนแรงของอาการนั้นแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับปัจจัยต่างๆ เช่น ระยะเวลา และระดับอุณหภูมิที่กล้วยได้รับเป็นต้น (Pantasitico., 1967) จากการทดลองนี้พบว่า กล้วยที่ทำการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 8 องศาเซลเซียส เริ่มแสดงอาการสะท้านหนาวในวันที่ 4 ของการเก็บรักษา และระดับความรุนแรงของอาการสะท้านหนาวเพิ่มขึ้นตามระเวลาของการเก็บรักษา (Figure 1) อย่างไรก็ตามการฉายรังสี UV-C ที่ระดับ 0.03 kJ m^{-2} ให้แก่กล้วย พบว่าสามารถลดระดับความรุนแรงของอาการสะท้านหนาวได้ตลอดระยะเวลาการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม

เมื่อพืชได้รับความเครียดจากอุณหภูมิต่ำ จะเกิดการสร้างและสะสมของอนุมูลอิสระที่สำคัญคือ $O_2^{\bullet -}$ ซึ่งจะเปลี่ยนไปอยู่ในรูปของ H_2O_2 อนุมูลอิสระต่างๆเหล่านี้จะส่งผลให้เกิดความผิดปกติของเมมเบรน และทำลายโครงสร้างโปรตีน DNA และ RNA ส่งผลให้เกิดการเสื่อมสลายของเซลล์ (Mittler, 2002) ในการทดลองนี้พบว่า ที่อุณหภูมิ 8 องศาเซลเซียส ปริมาณ $O_2^{\bullet -}$ เพิ่มสูงสุดในวันที่ 7 ของการเก็บรักษา หลังจากนั้นลดลงอย่างต่อเนื่องจนกระทั่งสิ้นสุดการเก็บรักษา ซึ่งกล้วยที่ได้รับการฉายรังสี UV-C มีปริมาณ $O_2^{\bullet -}$ ต่ำกว่าชุดควบคุม อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติตลอดระยะเวลาการเก็บรักษา (Figure 2A) เมื่อพิจารณาปริมาณ H_2O_2 ซึ่งเป็นอนุมูลอิสระที่มีความเสถียรและมีความสำคัญในการเป็นตัวกลางส่งสัญญาณ ในการกระตุ้นกลไกการป้องกันของพืชจากความเครียดเนื่องจากอุณหภูมิต่ำ (Foyer and Noctor, 2003) ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองนี้ที่พบว่ากล้วยที่ได้รับอุณหภูมิต่ำมีปริมาณ H_2O_2 สูงกว่าที่อุณหภูมิปกติ อย่างไรก็ตาม UV-C สามารถลดปริมาณ H_2O_2 เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (Figure 2B)

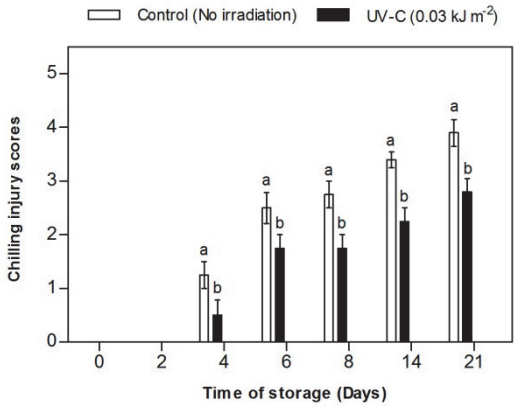

Figure 1. Changes in chilling injury (CI) scores of banana fruit treated with UV-C then stored at 8 °C. Values are means ± SE (n = 10). Different letters above the bars indicate significant mean differences at each day of storage [least significant difference (LSD) test; $P \leq 0.05$]

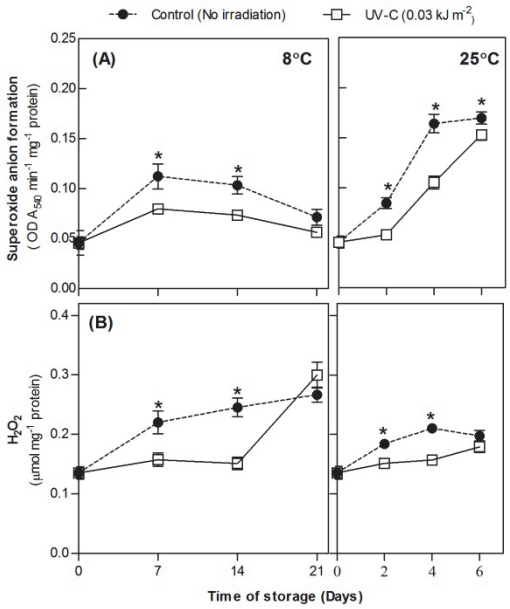

Figure 2. Changes in superoxide anion ($O_2^{\bullet -}$) formation (A) and hydrogen peroxide (H_2O_2) content (B) of banana fruit treated UV-C then stored at 8 and 25°C. Values are means ± SE (n = 3); asterisks (*) above the lines indicate significant differences between the means at each day of storage; LSD test, $P \leq 0.05$

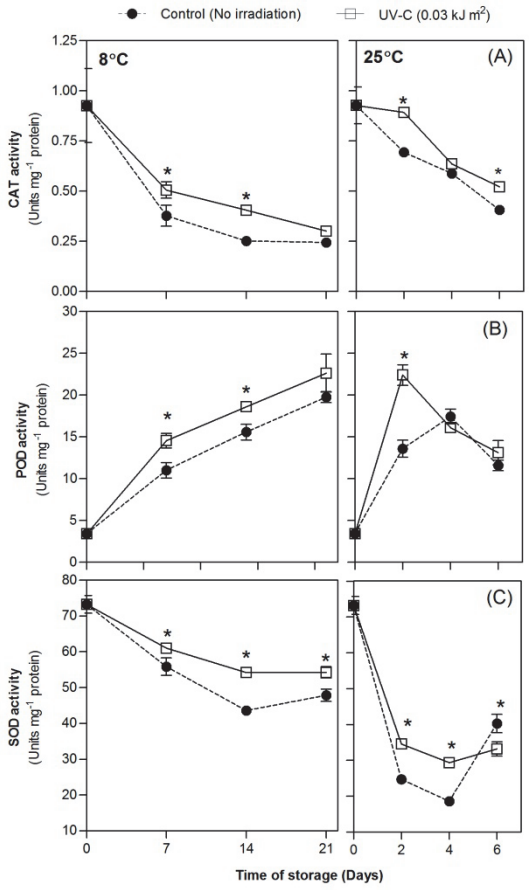

Figure 3. Changes in superoxide dismutase (SOD) (A), catalase (CAT) (B) and peroxidase (POD) (C) activity of banana fruit treated with UV-C dosages then stored at 5 and 25°C. Values are means ± SE (n = 3); asterisks (*) above the lines indicates significant differences between the means at each day of storage; LSD test, $P \leq 0.05$

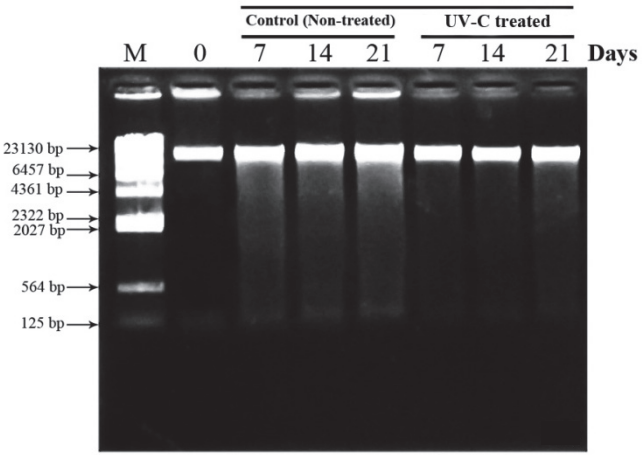

Figure 4. Agarose gel electrophoresis analysis showing DNA degradation: in banana fruit peel treated with UV-C and stored at 8°C for 0, 7,14, or 21 days. (Lane M, lambda DNA/*Hind*III marker)

พืชมีกลไกที่สามารถป้องกันตนเองจาก oxidative stress โดยการสร้างสารต้านอนุมูลอิสระทั้งที่อยู่ในรูปของเอนไซม์และไม่ใช่เอนไซม์ ซึ่งเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ต่อต้านอนุมูลอิสระที่สำคัญเช่น superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) และ peroxidase (POD) โดยที่ $O_2^{\cdot -}$ จะถูกเอนไซม์ SOD เปลี่ยนให้อยู่ในรูปของ H_2O_2 และ H_2O_2 จะสามารถถูกกำจัดต่อไปโดยเอนไซม์ CAT และ ascorbate peroxidase (APX) (Mittler, 2002) ผลการทดลองพบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ CATและ SOD ลดลงอย่างต่อเนื่องตลอดระยะเวลาในการเก็บรักษา ในขณะที่กิจกรรมของเอนไซม์ POD มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นโดยเฉพาะที่อุณหภูมิ 8 องศาเซลเซียส (Figure 3A, B และ C) อย่างไรก็ตาม UV-C สามารถกระตุ้นกิจกรรมของเอนไซม์เหล่านี้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นอกจากนี้งานวิจัยนี้ยังสามารถเชื่อมโยงความสัมพันธ์ของกลไกในการกระตุ้นกระบวนการต่อต้านอนุมูลอิสระของ UV-C ในขณะเกิดอาการสะท้านหนาวซึ่งสามารถช่วยลด oxidative stress และลดอันตรายที่เกิดขึ้นกับเซลล์ โดยพบว่า UV-C มีผลช่วยลดการเสื่อมสลายของ DNA ซึ่งอาจถูกทำลายโดยอนุมูลอิสระที่มีการสร้างและสะสมในขณะเกิดอาการสะท้านหนาว (Figure 4)

สรุป

งานวิจัยนี้สามารถสนับสนุนถึงหน้าที่การทำงานและกลไกของรังสี UV-C ในการกระตุ้นกลไลการป้องกันตนเองของพืชต่ออุณหภูมิต่ำ ซึ่งพบว่าอาการสะท้านหนาวของกล้วยเกิดจากการสร้างและสะสมของสารอนุมูลอิสระที่ส่งผลเกิดความเสียหายต่อเซลล์ โดยรังสี UV-C สามารถช่วยลดการสะสมของอนุมูลอิสระเหล่านั้นด้วยการกระตุ้นกิจจกรรมของเอนไซม์ที่สำคัญในกระบวนการต่อต้านอนุมูลอิสระ ได้แก่ CAT POD และ SOD ส่งผลช่วยลด oxidative stress และความเสียหายของเซลล์ที่เกิดจากกระบวนการออกซิเดชั่นโดยอนุมูลอิสระ ซึ่งส่งผลช่วยลดความรุนแรงของอาการสะท้านหนาวของผลกล้วย

เอกสารอ้างอิง

Chaitanya, K.S.K. and S.C. Naithani. 1994. Role of superoxide, lipid peroxidation and superoxide dismutase in membrane perturbation during loss of viability in seeds of *Shorea robusta* Gaertn. f. New Phytologis 126: 623–627.

FAO, 2004. AGROSTAT Database. Production Yearbook. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome.

Foyer, C.H. and G. Noctor. 2003. Redox sensing and signalling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria. Physiologia Plantarum 119: 355–364.

Mittler, R. 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. Trends in Plant Science 7: 405–410.

Mukherjee, S.P. and M.A. Choudhuri. 1983. Implication of water stress induced changes in the levels of endogenous ascorbic acid and hydrogen peroxide in *Vigna* seedlings. Physiologia Plantarum. 58: 166–70.

Nguyen, T.B.T., S. Ketsa and W.G. Van Doorn. 2003. Relationship between browning and the activities of polyphenoloxidase and phenylalanine ammonia lyase in banana peel during low temperature storage. Postharvest Biology and Technology 30: 187–193.

Pantastico, E.B., W. Grierson and J. Soule. 1967. Chilling injury in tropical fruits: bananas (*Musa pardisiaca* var. *sapientum* cv. Lacatan). Proceedings of the Tropical Region, American Society for Horticultural Science 11: 82–91.

Ukeda, H., S. T. Maeda, T. Ishii and M. Sawamura. 1997. Spectrophotometric assay for superoxide dismutase based on tetrazolium salt 3'-1-(phenylamino)- carbonyl-3, 4-tetrazolium]-bis(4-methoxy-6- nitro) benzenesulfonic acid hydrate reduction by xanthinexanthine oxidase. Analytical Biochemistry 251: 206–209.

Vicente, A.R., C. Pineda, L. Lemoine, P.M. Civello, G.A. Martinez and A.R. Chaves. 2005. UV-C treatments reduce decay, retain quality and alleviate chilling injury in pepper. Postharvest Biology and Technology 35: 69–78.

Wang, W.X., B. Vinocur, O. Shoseyov and A, Altman. 2004. Role of heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response. Trends Plant Science 9: 245–251.

Wang, Y.S., S.P. Tian and Y. Xu. 2005. Effect of high oxygen concentration on pro- and anti-oxidant enzymes in peach fruit during postharvest period. Food Chemistry 91: 99–104.

Zhang, Z.Q., X.Q. Pang, X. Xuewu, Z. Ji and Y. Jiang. 2005. Role of peroxidase in anthocyanin degradation in litchi fruit pericarp. Food Chemistry 90: 47–52.