ผลของเอทีฟอน 6-เบนซิลอะมิโนพิวรีน เมทิลแจสโมเนท และกรดซาลิไซลิก ต่อเอนไซม์ที่สลายคลอโรฟิลล์ในส่วนตัดกลมของใบคะน้า (*Brassica oleracea* var. *alboglabra*)

Effect of Ethephon, 6-Benzylaminopurine, Methyl Jasmonate and Salicylic Acid on Chlorophyll Degrading Enzymes in Chinese Kale (*Brassica oleracea* var. *alboglabra*) Leaf Discs.

ภัทษร สำเนียงดี[1] ศิริชัย กัลยาณรัตน์[1,2] และ พนิดา บุญฤทธิ์ธงไชย[1]

Patsorn Sumniengdee[1], Sirichai Kanlayanarat[1,2] and Panida Boonyaritthongchai[1]

Abstract

Ethephon, benzylaminopurine (6-BAP), methyl jasmonate (MeJA) and salicylic acid (SA) are plant growth regulators that affect physiological and biochemical changes in plants. In this research, the effect of ethephon, 6-BAP, MeJA, and SA treatments on postharvest changes in Chinese kale (*Brassica oleracea* var. *alboglabra*) discs were investigated. The Chinese kale discs were dipped in the solutions containing either ethephon, 6-BAP, MeJA or SA and subsequently incubated in darkness at 20°C and 75%RH. The hue angle and chlorophyll content declined the least in the leaf discs treated with 100 ppm 6-BAP or 0.1 mM SA. Chlorophyllase and Mg-dechelatase activities increased the most in the leaf discs treated with 10 ppm ethephon or 1 mM MeJA. Treatment with 100 ppm 6-BAP or 0.1 mM SA could delay chlorophyll degradation by decreasing chlorophyllase and Mg-dechelatase activities. In contrast, treatment with 1 mM MeJA resulted in significantly higher chlorophyllase and Mg-dechelatase activities which induced faster chlorophyll degradation.

Keywords: ethephon, 6-benzylaminopurine, methyl jasmonate, salicylic acid, chinese kale

บทคัดย่อ

เอทีฟอน 6-เบนซิลอะมิโนพิวรีน (6-BAP) เมทิลแจสโมเนท (MeJA) และกรดซาลิไซลิก (SA) เป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตที่มีผลกระทบต่อการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาและชีวเคมีของพืช ในงานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาผลของการใช้เอทีฟอน 6-BAP MeJA และ SA ต่อการเปลี่ยนแปลงหลังการเก็บเกี่ยวของใบคะน้า (*Brassica oleracea* var. *alboglabra*) โดยนำใบคะน้าที่ตัดเป็นวงกลมมาจุ่มในสารละลายที่มี เอทีฟอน 6-BAP MeJA หรือ SA แล้วนำไปเก็บรักษาในที่มืดที่อุณหภูมิ 20°C ความชื้นสัมพัทธ์ 75% จากผลการทดลองพบว่าใบคะน้าที่ได้รับเอทีฟอน ความเข้มข้น 10 ppm หรือ MeJA ความเข้มข้น 1 mM มีค่า hue เพิ่มขึ้นมากกว่าชุดควบคุมในระหว่างการเก็บรักษา ในขณะที่ใบคะน้าที่ได้รับ 6-BAP ความเข้มข้น 100 ppm หรือ SA ความเข้มข้น 0.1 mM มีค่า hue เปลี่ยนแปลงน้อยกว่าชุดควบคุม นอกจากนี้ การได้รับ 6-BAP ความเข้มข้น 100 ppm หรือ SA ความเข้มข้น 0.1 mM สามารถชะลอการสูญเสียคลอโรฟิลล์ โดยไปลดกิจกรรมของเอนไซม์ chlorophyllase และ Mg-dechelatase ในทางตรงกันข้ามการได้รับเอทีฟอน ความเข้มข้น 10 ppm หรือ MeJA ความเข้มข้น 1 mM ไปเร่งการสลายของคลอโรฟิลล์โดยเพิ่มกิจกรรมของเอนไซม์ chlorophyllase และ Mg-dechelatase

คำสำคัญ: เอทีฟอน เบนซิลอะมิโนพิวรีน เมทิลจัสโมเนท กรดซาลิไซลิก คะน้า

คำนำ

คะน้า (*Brassica oleracea* var. alboglabra) เป็นผักที่นิยมบริโภคกันทั่วทุกภาคของประเทศ (สุนทร, 2540) ภายหลังการเก็บเกี่ยวคะน้ามีการเปลี่ยนสีจากสีเขียวเป็นสีเหลืองภายใน 2-3 วันเมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส หรือสูงกว่า ทั้งนี้ Matile *et al*. (1996) และ Vicentini *et al*. (1995) อธิบายการเปลี่ยนแปลงสีของใบที่เสื่อมสภาพว่า เกิดจากการเสื่อมสลายของคลอโรฟิลล์ ประกอบด้วย 3 ขั้นตอน คือ เริ่มจากการย้ายหมู่ phytol ออกจากโมเลกุลคลอโรฟิลล์ โดยเอนไซม์ chlorophyllase เป็นโมเลกุลของ chlorophyllide ซึ่งจะถูกเปลี่ยนต่อไปเป็น pheophobide โดยเอนไซม์ Mg-

[1] สายวิชาเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว คณะทรัพยากรชีวภาพและเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี กรุงเทพฯ 10140
[1] Division of Postharvest Technology, School of Bioresources and Technology, King Mongkut's University of Technology Thonburi, Bangkok 10140
[2] ศูนย์นวัตกรรมเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว สำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษา กรุงเทพฯ 10140
[2] Postharvest Technology Innovation Center, Commission of Higher Education, Bangkok, Thailand 10140

dechelatase และเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน porphyrin ring ของ pheophorbide โดยเอนไซม์ pheophorbide α- oxygenase ได้ fluorescent chlorophyll catabolite (FCC) เป็นสารเรืองแสงสีน้ำเงิน ซึ่งถูกเปลี่ยนเป็น nonfluorescent chlorophyll catabolite (NCC) ที่ไม่เรืองแสง Thimann (1980) รายงานการว่า การใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตพืช ได้แก่ 6-เบนซิลอะมิโนพิวรีน (6-BAP) ซึ่งเป็นสารตัวแรกในกลุ่มไซโตไคนินที่มีการสังเคราะห์ขึ้นมา มีผลในการชะลอการหายใจ การเสื่อมสภาพและการสลายตัวของคลอโรฟิลล์ ส่วนกรดซาลิไซลิก (SA) เป็นสารประกอบฟีโนลิก อย่างง่ายมีผลต่อกระบวนการเจริญเติบโตของพืช นอกจากนี้ยังมีความสัมพันธ์กับกระบวนการสังเคราะห์และการทำงานของเอธิลีน (Raskin,1992) และเมทิลแจสโมเนท (MeJA) ซึ่งเป็นสารที่มีคุณสมบัติควบคุม การเจริญเติบโตและการพัฒนาของพืชตามธรรมชาติ (Cheong and Choi, 2003) ทำให้พืชเกิดกลไกการป้องกันตัวเองเมื่อเกิดบาดแผล หรือมีการเข้าทำลายของแมลงและโรค (Liechti and Farmer, 2002) นั้น และสามารถยืดอายุการเก็บรักษาผลิตผลได้ (Gonzlez-Aguilar *et al*., 2004) ดังนั้นสารควบคุมการเจริญเติบโตแต่ละชนิดอาจมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณคลอโรฟิลด์ที่แตกต่างกัน ในงานวิจัยนี้ได้ศึกษาผลของเอทีฟอน, 6-BAP, SA และ MeJA ต่อปริมาณคลอโรฟิลด์และกิจกรรมของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสลายของคลอโรฟิลล์ในคะน้า

อุปกรณ์และวิธีการ

ในการทดลองนี้ใช้ผักคะน้า อายุ 45-50 วันหลังปลูกโดยเก็บเกี่ยวมาจากแปลงเกษตรกรในเขตจังหวัดนครปฐมในช่วงเดือนพฤษภาคม-กรกฎาคมมายังห้องปฏิบัติการสาขาวิชาเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว ทำการคัดเลือกคะน้าให้มีขนาดใกล้เคียงกัน ปราศจากโรค แมลง ตำหนิ และบาดแผล นำไปล้างทำความสะอาด และเจาะใบคะน้าเป็นวงกลมโดย cock borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2 ซ.ม. และนำชิ้นส่วนคะน้าที่เป็นวงกลม นำมาแบ่งเป็นชุดการทดลอง ซึ่งผู้วิจัยได้ทำงานทดลองก่อนหน้านี้และเลือกความเข้มข้นที่เหมาะสมมาทดลองในงานวิจัยนี้ดังนี้ ชุดการทดลองที่ 1 กลุ่มควบคุม จุ่มในน้ำกลั่น, ชุดการทดลองที่ 2 ให้ได้รับเอทีฟอน ที่ความเข้มข้น 10 ppm, ชุดการทดลองที่ 3 ให้ได้รับ 6-BAP ที่ความเข้มข้น 100 ppm, ชุดการทดลองที่ 4 ได้รับ MeJA ที่ความเข้มข้น 1 mM, ชุดการทดลองที่ 5 ให้ได้รับ SA ที่ความเข้มข้น 0.1 mM จากนั้นนำทุกชุดการทดลองไปเก็บรักษาในที่มืดอุณหภูมิ 20 °C ความชื้นสัมพัทธ์ 75% แล้วทำการบันทึกอัตราการหายใจ การผลิตเอทิลีน การเปลี่ยนแปลงค่าสีโดยใช้เครื่องวัดสี Colorimeter การเปลี่ยนแปลงปริมาณคลอโรฟิลล์ กิจกรรมของเอนไซม์ chlorophyllase และ Mg-dechelatase โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ทุกวันเป็นเวลา 4 วัน

ผลและวิจารณ์

การศึกษาผลของเอทีฟอน, 6-BAP, MeJA หรือ SA ต่อการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพและเคมีในคะน้า และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 20 °C เป็นเวลา 4 วัน จากการทดลอง พบว่า คะน้าที่ได้รับ 6-BAP ที่ความเข้มข้น 100 ppm หรือ SA ที่ความเข้มข้น 0.1 mM สามารถชะลอการเปลี่ยนไปเป็นสีเหลืองได้ตลอดการเก็บรักษา โดยชะลอการลดลงของปริมาณคลอโรฟิลล์ทั้งหมดและการเปลี่ยนแปลงสี (L* และ H^0 value) (Figure 1 และ Figure 2) เนื่องจาก 6-BAP สนับสนุนการเกิดคลอโรฟิลล์และการเปลี่ยน etioplast ไปเป็น chloroplast และอาจจะยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสลายของคลอโรฟิลล์ (Lerbs *et al*., 1984; Chory *et al*., 1994; Kusnetsov *et al*., 1994) ในขณะที่ชิ้นส่วนคะน้าที่ได้รับเอทีฟอน ความเข้มข้นที่ 10 ppm หรือ MeJA ที่ความเข้มข้น 1 mM มีผลเร่งให้เกิดการเปลี่ยนจากสีเขียวไปเป็นสีเหลืองและทำให้ปริมาณคลอโรฟิลล์ทั้งหมดลดลงมากกว่ากลุ่มควบคุม จากการศึกษาของ Funamoto *et al*. (2002) ที่รายงานว่ากิจกรรมของเอนไซม์ Chlorophyllase ที่เพิ่มขึ้นส่งผลให้เกิดการเหลืองหรือสลายตัวของคลอโรฟิลล์ในบร็อคโคลี ซึ่งจากการทดลองนี้พบว่า ชิ้นส่วนคะน้าที่ได้รับ 6-BAP ที่ความเข้มข้น 100 ppm หรือ SA ที่ความเข้มข้น 0.1mM สามารถลดกิจกรรมของเอนไซม์ Chlorophyllase และ Mg-dechelatase ได้ ในขณะที่กิจกรรมของเอนไซม์ Chlorophyllase และ Mg-dechelatase ในคะน้าที่ได้รับเอทีฟอน ความเข้มข้นที่ 10 ppm หรือ MeJA เข้มข้นที่ 1 mM มีค่าสูงกว่าชุดควบคุม (Figure 4) ทั้งนี้อาจเนื่องจาก MeJA ที่ความเข้มข้นสูงไปกระตุ้นกระบวนการผลิตเอทิลีน (Kondo *et al*., 2007) โดยไปเพิ่มกิจกรรมของเอนไซม์ ACC oxidase และ ACC synthase (Fan *et al*., 1998) ส่งผลให้เอทิลีนไปกระตุ้นกิจกรรมของเอนไซม์ Chlorophyllase และ Mg-dechelatase และทำให้อัตราการหายใจและการผลิตเอทิลีนสูงกว่ากลุ่มควบคุม (Figure 3) ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับการรายงานของ Perez *et al*. (1997) รายงานว่า การใช้ MeJA กับสตรอเบอรี่เขียวมีผลให้อัตราการหายใจเพิ่มขึ้น ในขณะที่ชิ้นส่วนคะน้าที่ได้รับ 6-BAP ที่ความเข้มข้น 100 ppm หรือ SA ที่ความเข้มข้น 0.1 mM มีผลลดอัตราการหายใจและการผลิตเอทิลีน ในระหว่างการเก็บรักษา Rushing (1990) รายงานว่า พืชที่ได้รับไซโตไคนินมีอัตราการหายใจต่ำกว่ากลุ่มควบคุมมีผลให้สามารถยืดอายุการเก็บรักษา

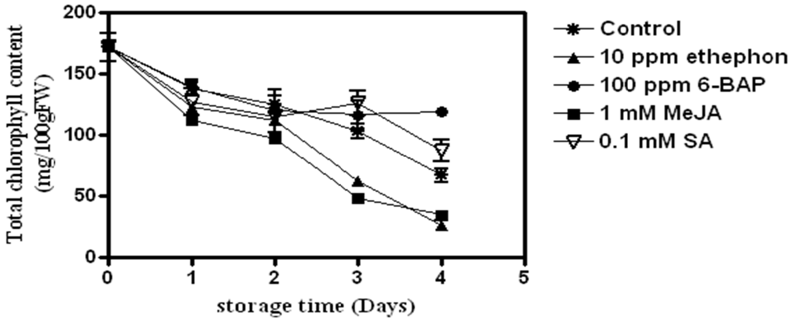

Figure 1 Total chlorophyll content of Chinese kale leaf discs treated with 6-benzylaminopurine (6-BAP), methyl jasmonate (MeJA), salicylic acid (SA) and ethephon then stored at 20 °C for 4 days.

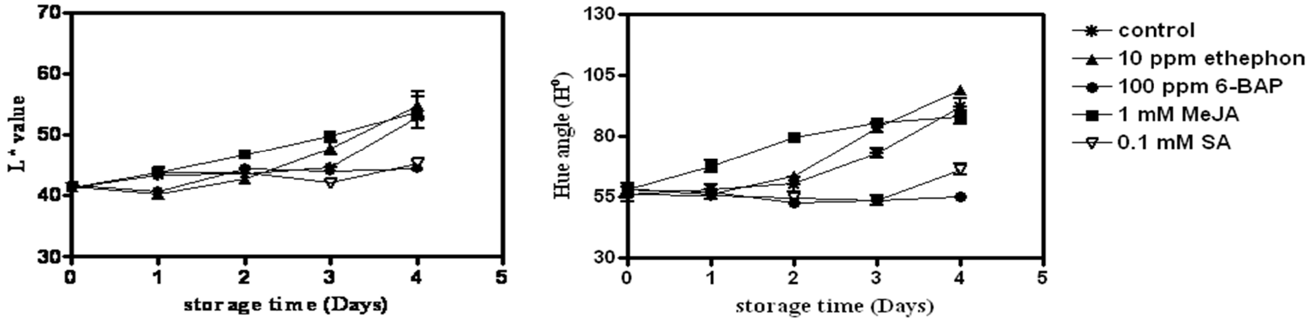

Figure 2 Color change (L* (A) and H^0 value (B)) of Chinese kale leaf discs treated with 6-benzylaminopurine (6-BAP), methyl jasmonate (MeJA), salicylic acid (SA) and ethephon then stored at 20 °C for 4 days.

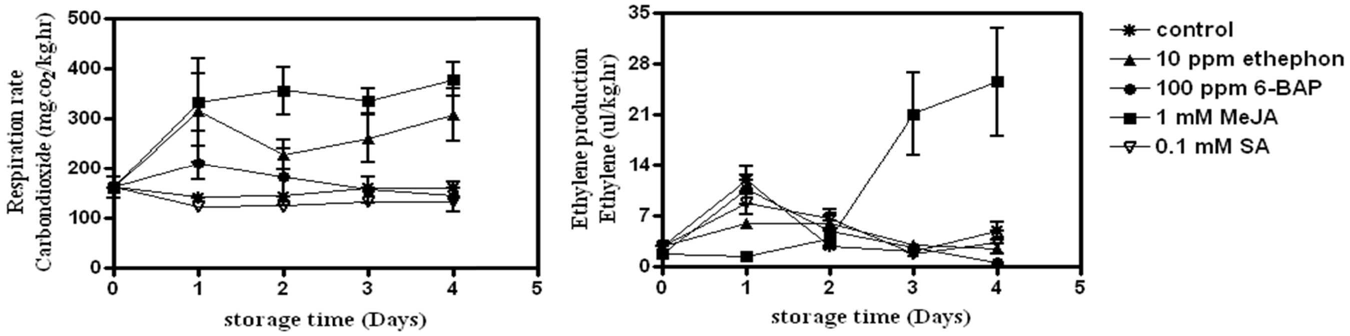

Figure 3 Respiration rate (A) and ethylene production (B) of Chinese kale leaf discs treated with 6-benzylaminopurine (6-BAP), methyl jasmonate (MeJA), salicylic acid (SA) and ethephon then stored at 20 °C for 4 days.

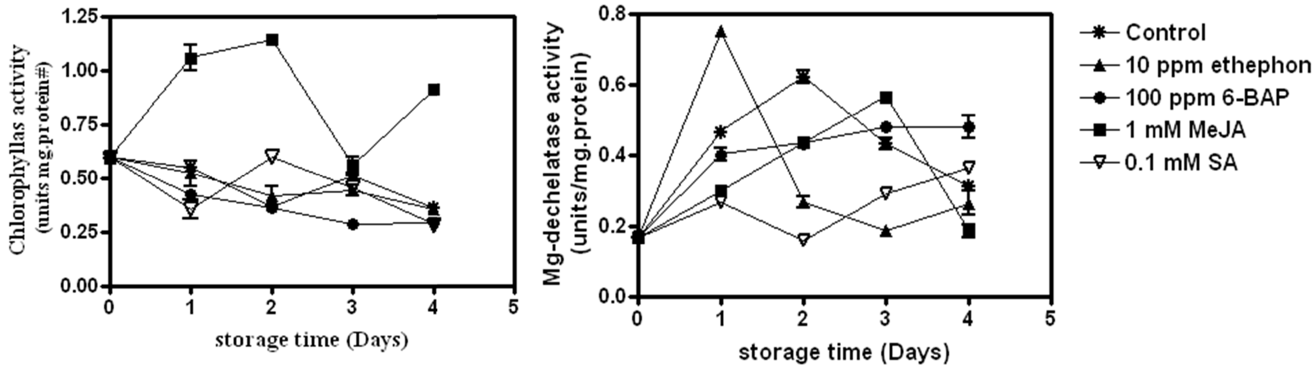

Figure 4 Evolution of chlorophyllase (A) and Mg-dechelatase (B) activity of Chinese kale leaf discs treated with 6-benzylaminopurine (6-BAP), methyl jasmonate (MeJA), salicylic acid (SA) and ethephon then stored at 20 °C for 4 days.

สรุปผลการทดลอง

ส่วนตัดกลมของใบคะน้าที่ได้รับ 6-BAP ที่ความเข้มข้น 100 ppm หรือ SA ที่ความเข้มข้น 0.1 mM สามารถชะลอการเปลี่ยนแปลงจากสีเขียวเป็นสีเหลืองได้ โดยชะลอการลดลงของปริมาณคลอโรฟิลล์ทั้งหมดและลดกิจกรรมของเอนไซม์ Chlorophyllase และ Mg-dechelatase รวมทั้งลดอัตราการหายใจและผลิตเอทิลีน ในขณะที่คะน้าที่ได้รับ ethephon ความเข้มข้นที่ 10 ppm หรือ MeJA ที่ความเข้มข้น 1 mM เร่งการเปลี่ยนเป็นสีเหลืองและมีปริมาณคลอโรฟิลล์ลดลง รวมทั้งมีกิจกรรมของเอนไซม์ Chlorophyllase และ Mg-dechelatase สูงกว่ากลุ่มควบคุม

เอกสารอ้างอิง

สุนทร เรืองเกษม. 2540. ผักกินใบ. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ. 88 หน้า.

Chory, J., D. Reinecke, S. Sim, T. Wasburn and M. Brenner. 1994. A role for cytokinins in de-etiolation in Arabidopsis. Plant Physiology 104: 339–347.

Funamoto, Y., N. Yamauchi, T. Shigenaga and M. Shigyo. 2002. Effect of heat treatment on chlorophyll degrading enzymes in stored broccoli (*Brassica oleracea* L.). Postharvest Biology and Technology 24: 163-170.

Fan, X., J. P. Mattheis and J. K. Fellman. 1998. A role of jasmonates in climacteric fruit ripening. Planta 204: 444–449.

Kondo, S., H. Yamada and S. Sethi. 2007. Effects of jasmonates differed at fruit ripening stages on 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) synthase and ACC oxidase gene expression in pears. Journal of the American Society for Horticultural Science 132: 120–125.

Kusnetsov, VV., R. Oelmüller, M. Sarwat, S. A. Porfirova, G. N. Cherepneva, R. G. Herrmann and O. N. Kulaeva. 1994. Cytokinins, abscisic acid and light affect accumulation of chloroplast proteins in *Lupinus luteus* cotyledons, without notable effect on steady-state mRNA levels. Planta 194: 318–327.

Lerbs, S., W. Lerbs, N. L. Klyachko, E. G. Romanko, O. N. Kulaeva, R. Wollgiehn and B. Parthier. 1984. Gene expression in cytokinin and Light mediated plastogenesis of *Cucurbita* cotyledons: ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase. Planta 162: 289–298.

Matile, P., S. Hortensteiner, H. Thomas and B. Krautler. 1996. Chlorophyll breakdown in senescence leaves. Plant Physiology 112: 749-753.

Perez, A. G., C. Sanz, R. Olias and M. Olias. 1997. Effect of methyl jasmonate on in vitro strawberry ripening. Journal of Agricultural and Food Chemistry 45: 3733–3737.

Rushing, J. W. 1990. Cytokinins affect respiration, ethylene production, and chlorophyll retention of packaged broccoli florets. HortScience 25: 88–90.

Vicentini, E., S. Hortensteiner, M. Schellenberg, H. Thomas and P. Matile. 1995. Chlorophyll breakdown in senescent leaves identification of the biochemical lesion in a stay green genotype of Festuca pratensis Huds, New Phytology 129: 247-252.