Agricultural Sci. J. 46 : 3/1 (Suppl.) : 32-35 (2015) ว. วิทย. กษ. 46 : 3/1 (พิเศษ) : 32-35 (2558)

การประเมินการตายของเซลล์จากอาการสะท้านหนาวเชิงปริมาณโดยการใช้สีย้อมอีแวนส์บลู

Quantitative Evaluation of Cell Death from Chilling Injury Using Evans Blue Dye

วิรินญ์ สิงห์โทราช[1] **และอุษาวดี ชนสุต**[1,2]
Wirin Singtoraj[1] and Usawadee Chanasut[1,2]

Abstract

There are several methods to detect chilling injury (CI) such as evaluation by using a chilling injury index (CI index), measurement of electrolyte leakage (EL) and malondialdehyde (MDA content). However, those methods can detect CI after the symptoms occur such as surface pitting, water soaking and peel or flesh browning. Therefore, CI symptoms could not be prevented. Evans blue dye can pass through cell membrane but the dead cells with intact membrane cannot exclude dye which remains inside them. This dye has been used as a viability test. This study aimed to develop the technique that can detect CI by Evans blue dye. The technique may be able to quantitatively determine cell damage before the CI occurs. Thai cucumber fruits and eggplant fruits were stored at 4±1 °C. Each sample was divided into two groups. The first was evaluated CI index, determined the EL and MDA content. The second was cut to 5x5 mm with various thicknesses then dyed with different concentrations of Evans blue solution for 3 min. Stained tissues were extracted and the optical density (OD) of supernatants were measured at 600 nm. The relationship between OD values, CI index, EL, MDA content and the appearance of CI symptoms were determined. The results showed that the OD of the solution extracted from stained tissue was positively related to the CI index, EL and MDA content of the all chilling injured produce. There was a possibility to using this technique to quantitatively detect cell death prior to the occurrence of CI.

Keywords: viability test, evans blue dye, chilling injury

บทคัดย่อ

การตรวจสอบอาการสะท้านหนาว (Chilling injury; CI) สามารถทำได้หลายวิธี เช่น ประเมินและกำหนดดัชนีอาการสะท้านหนาว (Chilling injury index; CI index), วัดการรั่วไหลของประจุ (Electrolyte leakage; EL) และวัดปริมาณมาลอนไดอัลดีไฮด์ (malondialdehyde; MDA content) นั้น แต่วิธีการเหล่านี้จะสามารถตรวจพบ CI หลังจากผลิตผลแสดงอาการผิดปกติ เช่น ผิวยุบตัว (surface pitting), ฉ่ำน้ำ (water soaking) และเปลือกหรือเนื้อเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล (browning) เป็นต้น ทำให้ไม่สามารถป้องกันการเกิด CI ก่อนที่ผลิตผลจะแสดงอาการดังกล่าวได้ สีอีแวนส์บลู (Evans blue) สามารถผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ได้ เซลล์ที่ตายแต่เยื่อหุ้มเซลล์ไม่เสียหายจะไม่สามารถขับสีออกจากเซลล์ได้และถูกเก็บไว้ในเซลล์นั้น ด้วยคุณสมบัติดังกล่าวจึงนิยมนำมาใช้ในการตรวจสอบความมีชีวิตของเซลล์ การศึกษาในครั้งนี้จึงมุ่งเน้นพัฒนาเทคนิคที่ใช้ในการตรวจสอบ CI โดยใช้สี Evans blue ที่สามารถตรวจสอบความเสียหายระดับเซลล์เชิงปริมาณ ซึ่งอาจตรวจสอบการตายของเซลล์ได้ก่อนที่ผลิตผลจะแสดงอาการ CI โดยนำผลแตงกวาไทยและผลมะเขือม่วงมาเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4±1 °C แล้วสุ่มตัวอย่างทุกวัน นำตัวอย่างมาแบ่งเป็นสองส่วน ส่วนแรกนำไปประเมินค่า CI index, วัดค่า EL และ ปริมาณ MDA ส่วนที่สองนำมามาตัดให้มีขนาด 5x5 มิลลิเมตร ที่มีความหนาขนาดต่างๆ แล้วย้อมด้วยสี Evans blue ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ นาน 3 นาที จากนั้นนำเนื้อเยื่อไปสกัดสีและวัดค่าการดูดกลืนแสง (optical density; OD) ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร แล้วนำผลที่ได้ไปเปรียบเทียบกับ CI index, EL และปริมาณ MDA เพื่อหาความสัมพันธ์กับ CI ที่เกิดขึ้น จากการทดลองพบว่าค่า OD ที่วัดได้มีความสัมพันธ์เชิงบวกกับ CI, EL และปริมาณ MDA จึงมีความเป็นไปได้ในการใช้เทคนิคนี้ตรวจสอบการตายของเซลล์เชิงปริมาณ

คำสำคัญ: การตรวจสอบความมีชีวิตของเซลล์, สีย้อมอีแวนส์บลู, อาการสะท้านหนาว

---

[1] ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เชียงใหม่ 50200
[1] Department of Biology, Faculty of Science, Chiang Mai University, Chiang Mai
[1] สถาบันวิจัยเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว/ศูนย์นวัตกรรมเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยวมหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เชียงใหม่ 50200
[2] Postharvest Technology Research Institute/Postharvest Technology Innovation Center, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200

คำนำ

อาการสะท้านหนาวคืออาการที่พืชแสดงออกมาเมื่อได้รับความเสียหายจากอุณหภูมิต่ำที่ไม่ใช่อุณหภูมิจุดเยือกแข็ง โดยมักเกิดในพืชที่มีถิ่นกำเนิดในเขตร้อนหรือเขตกึ่งร้อน ซึ่งอาการที่พืชแสดงออกจะทำให้พืชมีลักษณะภายนอกเปลี่ยนแปลงไป เช่น การเกิดสีน้ำตาลบริเวณเปลือก การเกิดรอยบุ๋ม เป็นต้น (Lyons, 1965) ถึงแม้ว่าอาการเหล่านี้จะไม่ส่งผลกระทบต่อคุณภาพภายในของผลิตผล แต่ส่งผลเสียต่อราคาของผลผลิตทางการเกษตรเป็นอย่างมาก เนื่องจากไม่เป็นที่นิยมของผู้บริโภค ซึ่งเทคนิคที่ใช้ในการตรวจสอบอาการสะท้านหนาวของผักและผลไม้มีมากมายหลายวิธี วิธีที่นิยมใช้ในงานวิจัยอย่างแพร่หลาย ได้แก่ การวัดดัชนีการเกิดอาการสะท้านหนาว (chilling injury index; CI) การตรวจสอบความเสียหายของเยื่อหุ้มเซลล์โดยการวัดการรั่วไหลของประจุ (electrolyte leakage; EL) ซึ่งหากเซลล์เกิดความเสียหายมาก ค่า EL จะเพิ่มสูงขึ้น และการวัดปริมาณสารมาลอนไดออลดีไฮด์ (malondialdehyde; MDA) ที่เป็นผลผลิตจากกระบวนการลิพิดเพอรอกซิเดชั่น (lipid peroxidation) โดยปริมาณ MDA ที่เพิ่มขึ้นแสดงถึงความเสียหายของเนื้อเยื่อ ค่าต่างๆ ที่ได้จากการวัดเหล่านี้มักสัมพันธ์กับความรุนแรงของอาการ CI เช่น ในผลแตงกวา (Mao *et al*., 2007), ผลอะโวคาโด (Pathirana *et al*., 2010) แต่ในผลิตผลหลายชนิดค่า EL และปริมาณ MDA ที่วัดได้มักไม่สัมพันธ์กับลักษณะผิดปกติที่ปรากฏบนผลิตผลนั้น เช่น ในใบพืชสกุลกะเพรา (ธิติมา, 2551), ผลมะเขือม่วง (Analia *et al*., 2005) ดังนั้นการศึกษาในครั้งนี้จึงพัฒนาเทคนิคที่ใช้ในการตรวจสอบความมีชีวิตของเซลล์ (viability assay) ด้วยสีย้อม Evans blue ที่มีคุณสมบัติในการผ่านเข้าสู่เยื่อหุ้มเซลล์ โดยไม่ทำลายเซลล์ที่ยังมีชีวิต ส่วนเซลล์ที่ตายแล้วแต่เยื่อหุ้มเซลล์ยังไม่เสียหายจะไม่สามารถขับสีย้อมออกจากเซลล์ได้ เมื่อนำไปสกัดสี และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ค่าการดูดกลืนแสงที่เพิ่มขึ้นแสดงถึงจำนวนเซลล์ที่เกิดความเสียหายหรือตาย (Baker and Mock,1994) มาตรวจสอบความเสียหายระดับเซลล์ของผักบางชนิดในเชิงปริมาณ และนำข้อมูลที่ได้จากเทคนิคต่างๆ ข้างต้นมาเปรียบเทียบกับค่าต่างๆ ที่วัดได้ หาความสัมพันธ์และความเป็นไปได้ในการใช้เทคนิคนี้ตรวจสอบการตายของเซลล์เชิงปริมาณในผลิตผล และสามารถตรวจสอบการตายของเซลล์ได้ก่อนที่ผลิตผลจะแสดงอาการ CI

อุปกรณ์และวิธีการ

1. ศึกษาด้านเคมีกายภาพ

นำตัวอย่างผลแตงกวาไทย และมะเขือม่วงเล็ก มาเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4$\pm$1^{o}C ความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 85 นาน 0-5 วัน แล้วสุ่มตัวอย่างจำนวน 5 ซ้ำๆ ละ 3 ผล มาทุกวัน นำมาประเมินการเกิดอาการสะท้านหนาวโดยใช้ CI index, วัดค่า %EL ตามวิธีการของ Campos *et al.* (2003) และวัดปริมาณ MDA ตามวิธีการของ Guo *et al.* (2006)

2. ตรวจสอบความเสียหายระดับเซลล์เชิงปริมาณ

นำตัวอย่างผลแตงกวาไทยและมะเขือม่วงมาตัดให้มีขนาด 5x5 มิลลิเมตร โดยมีความหนา 0.5, 1.0 และ 1.5 เซนติเมตร แล้วนำชิ้นเนื้อเยื่อมาย้อมด้วยสารละลาย Evans blue ที่ระดับความเข้มข้น 0.5%, 1.0%, 1.5% และ 2.0% เป็นเวลา 3 นาที ล้างสีออกด้วยน้ำกลั่น จากนั้นนำชิ้นเนื้อเยื่อมาตรวจสอบการติดสีภายใต้กล้องจุลทรรศน์ นำเนื้อเยื่อที่ล้างจนสะอาดแล้วไปสกัดสีที่อยู่ภายในเซลล์โดยบดตัวอย่างกับน้ำกลั่นปริมาตร 4 มิลลิลิตร นำสารสกัดไปปั่นเหวี่ยงที่ 5,000g เป็นเวลา 5 นาที นำสารละลายที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ตามวิธีการของ Baker and Mock (1994) เพื่อหาปริมาณสีในเนื้อเยื่อ เปรียบเทียบค่าที่ได้กับค่า CI index, ค่า EL และปริมาณ MDA เพื่อหาความสัมพันธ์กับ CI ที่เกิดขึ้น

ผล

เมื่อนำผลแตงกวาไทยและผลมะเขือม่วงที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4$\pm$1^{o}C มาศึกษา พบว่า เกิดการยุบตัวบริเวณเนื้อเยื่อผิวเพียงเล็กน้อยหลังจากเก็บรักษานาน 1 วันจากนั้นอาการจะรุนแรงขึ้นเมื่อมีการยุบตัวของเนื้อเยื่อผิวเพิ่มมากขึ้น ซึ่งทำให้ค่าดัชนีอาการสะท้านหนาวเพิ่มขึ้น (Figure 1A) ส่วนค่าการรั่วไหลของประจุนั้นมีการเพิ่มขึ้นและลดลงไม่สอดคล้องกับลักษณะผิดปกติจากอาการ CI ค่า %EL ของผลแตงกวาไทยสูงสุดในวันแรกและมีแนวโน้มลดลงระหว่างการเก็บรักษาและต่ำสุดในวันที่ 4 ค่า EL ผลมะเขือม่วงมีแนวโน้มลดลงเช่นกัน โดยมีค่า %EL สูงสุดในวันแรกและต่ำสุดเมื่อเก็บรักษานาน 3 วัน (Figure 1B) ปริมาณ MDA ของผลแตงกวาไทยและมะเขือม่วงเพิ่มขึ้นตลอดระยะเวลาการเก็บรักษาและมีปริมาณสูงสุดหลังจากเก็บรักษานาน 5 วัน (Figure 1C)

เมื่อนำชิ้นเนื้อเยื่อของผลแตงกวาไทยและผลมะเขือม่วงขนาด 5x5 มิลลิเมตรมาตัดให้มีความหนาขนาดต่างๆ แล้วย้อมสีชิ้นเนื้อเยื่อด้วยสี Evans blue ที่ความเข้มข้นต่างๆ นาน 3 นาที พบว่าเนื้อเยื่อที่มีความหนา 0.5 เซนติเมตรนั้นสามารถ

ดูดซับสีย้อมได้ทั้งหมด เมื่อนำไปศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์จะเห็นเซลล์ที่ตายติดสีย้อมเป็นสีฟ้า แต่เนื้อเยื่อที่มีความหนา 1, 1.5 เซนติเมตรนั้นมีความหนามากเกินไป ทำให้ย้อมไม่ติดเซลล์ เมื่อนำไปศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์จะเห็นเซลล์เป็นสีใส ส่วนความเข้มข้นของสี Evans blue นั้น ที่ 0.5% มีความเข้มข้นต่ำเกินไป จึงย้อมไม่ติดเซลล์ และที่ความเข้มข้น 1-2% นั้นสามารถย้อมติดเซลล์ได้ทั้งหมด แต่ที่ความเข้มข้น 1.5, 2% นั้น ในขั้นตอนการล้างสีออกจากเนื้อเยื่อใช้ระยะเวลานานเกินไป จึงไม่เลือกใช้ความเข้มข้นดังกล่าว ดังนั้นขนาดของเนื้อเยื่อที่เหมาะสมที่สุดคือมีความหนา 0.5 เซนติเมตร และความเข้มข้นของสี Evans blue ที่เหมาะสมที่สุดคือ 1% เมื่อนำชิ้นเนื้อเยื่อดังกล่าวไปสกัดสีและวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เพื่อหาปริมาณสีในเนื้อเยื่อ พบว่าปริมาณสีในเนื้อเยื่อมีค่าเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการเก็บรักษา คือ มีปริมาณสีน้อยที่สุดเมื่อเก็บรักษานาน 0 วัน และมีปริมาณสีมากที่สุดเมื่อเก็บรักษานาน 5 วัน (Figure 1D) และเมื่อนำค่า EL, ปริมาณ MDA และค่า OD ที่ได้ไปหาความสัมพันธ์กับอาการสะท้านหนาวที่เกิดขึ้น พบว่าสัมประสิทธ์ของค่า OD มีความสัมพันธ์เชิงบวกกับอาการสะท้านหนาวที่เกิดขึ้นมากที่สุด (Figure 2A, B)

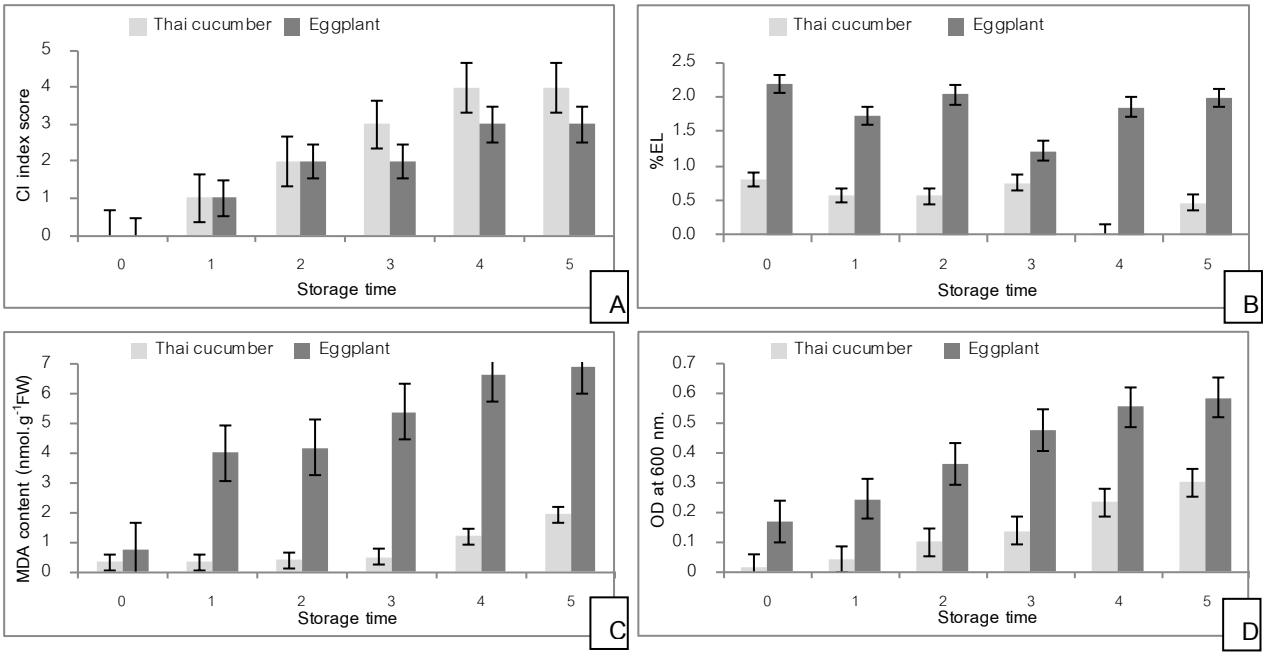

Figure 1 Chilling injury index (A) Electrolyte leakage (B), MDA content (C) and OD_{600} (D) of Thai cucumber fruits and eggplant fruits during storage at 4±1°C

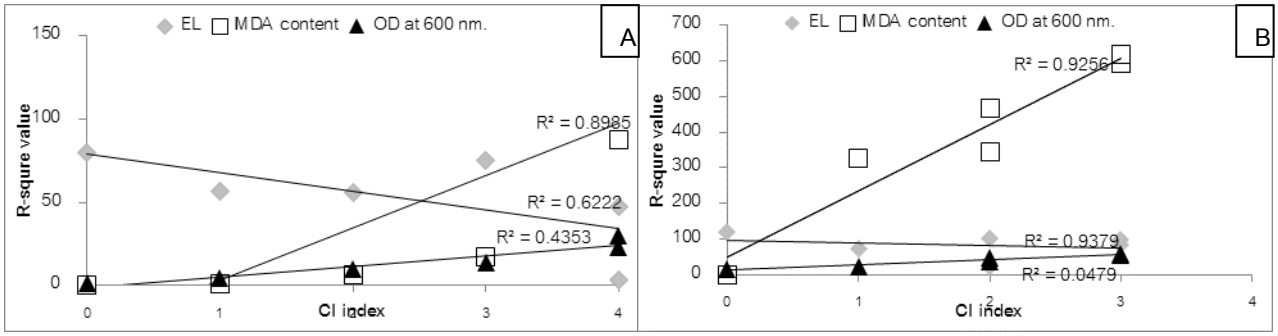

Figure 2 Relationship between Chilling injury index, Electrolyte leakage, MDA content and OD600 of Thai cucumber fruits (A) and eggplant fruits (B) during storage at 4+1°C

วิจารณ์ผล

สี Evans blue ที่ใช้ในการตรวจสอบความมีชีวิตของเซลล์นั้น มีคุณสมบัติพิเศษคือ สามารถผ่านเข้าสู่เยื่อหุ้มเซลล์ได้โดยไม่ทำลายเซลล์ที่ยังมีชีวิต ส่วนเซลล์ที่ตายแล้วแต่เยื่อหุ้มเซลล์ยังไม่เสียหายจะไม่สามารถขับสีย้อมออกจากเซลล์ได้ (Lindner *et al*., 1983) เมื่อนำสี Evans blue ไปย้อมเนื้อเยื่อที่เกิดอาการสะท้านหนาว จะเห็นเซลล์เป็นสีฟ้า เมื่อต้องการวัดการตายของเซลล์ในเชิงปริมาณจึงต้องพัฒนาให้สามารถใช้งานได้ง่ายและสะดวกขึ้น เช่น ขนาดของเนื้อเยื่อ ความเข้มข้นของสีย้อม ระยะเวลาที่ใช้ย้อม เพื่อให้ประเมินการตายของเซลล์ได้อย่างแม่นยำมากขึ้น ในการทดลองนี้ขนาดของเนื้อเยื่อที่เหมาะสมที่สุดคือมีความหนา 0.5 เซนติเมตร และความเข้มข้นของสี Evans blue ที่เหมาะสมที่สุดคือ 1% เมื่อใช้ระยะเวลาในการย้อม นาน 3 นาที เมื่อนำไปหาความสัมพันธ์ระหว่างอาการสะท้านหนาวที่เกิดขึ้นกับปริมาณสีที่สกัดได้จากเนื้อเยื่อผลแตงกวาไทยและผลมะเขือม่วงระหว่างการเก็บรักษาที่เกิดอาการสะท้านหนาวไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร โดยอาศัยหลักการว่าหากเซลล์ตายมากขึ้น จะติดสีย้อมมากขึ้น ทำให้มีค่าการดูดกลืนแสงเพิ่มขึ้น (Baker and Mock, 1994) ซึ่งในการทดลองนี้ปริมาณสีที่วัดได้มีค่าเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการเก็บรักษา ซึ่งมีความสัมพันธ์เชิงบวกกับค่าดัชนีการเกิดอาการสะท้านหนาวมากกว่าค่า %EL และปริมาณ MDA เนื่องจากการศึกษานี้ยังทำการทดลองในผลิตผลแค่สองชนิด คือผลแตงกวาไทยและผลมะเขือม่วง ดังนั้นยังต้องมีการพัฒนาเทคนิคและตรวจสอบในผลิตผลชนิดอื่นเพิ่มเติม

สรุป

เนื่องจากค่า OD มีความสัมพันธ์เชิงบวกกับดัชนีการเกิดอาการสะท้านหนาว จึงมีความเป็นไปได้ที่จะใช้เทคนิคนี้ในการตรวจสอบการตายของเซลล์จากอาการสะท้านหนาวเชิงปริมาณในผลิตผลได้

คำขอบคุณ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยจากคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ขอบคุณห้องปฏิบัติการสรีรวิทยาหลังการเก็บเกี่ยว ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่เอื้อเฟื้อสถานที่และอุปกรณ์ในการทำวิจัย และขอขอบคุณศูนย์นวัตกรรมเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยวมหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่สนับสนุนค่าใช้จ่ายในการนำเสนอผลงานครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

ธิติมา วงษ์ชีรี. 2551. ความสัมพันธ์ระหว่างความเสียหายของเยื่อหุ้มเซลล์และการเกิดอาการสะท้านหนาวของใบพืชสกุลกะเพรา. วิทยานิพนธ์ปริญญาเอก. สาขาวิชาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยว, โครงการสหวิทยาการระดับบัณฑิตศึกษา, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 125 น.

Analia, C., C.A. Maria and R.C. Alicia. 2005. Effect of chilling on ethylene production in eggplant fruit. *Food Chemistry* 92: 63–69.

Baker, C.J. and N.M. Mock. 1994. An improved method for monitoring cell death in cell suspension and leaf disc assays using Evans blue. *Plant Cell Tissue Organ Culture* 39: 7-12.

Campos, P.S., V. Quartin, J.C. Ramalho and M.A. Nunes. 2003. Electrolyte leakage and lipid degradation account for cold sensitivity in leaves of *Coffea* sp. plants. *Journal of Plant Physiology* 160: 283 –292.

Guo, J.F. 2006. Laboratory manual of plant physiology. *Higher Education Press, Beijing*. pp. 210-228.

Lindner, G.M., G.B. Anderson, R.H. BonDurant and R.H. Cupps. 1983. Survival of bovine embryos stored at 4 degrees C. *Theriogenology* 20: 311-319.

Lyons, J.M. and C.M. Asmundson. 1965. Solidification of unsaturated and saturated fatty acid mixtures and its relationship to chilling sensitivity in plants. *Journal of the American Oil Chemists Society* 42: 1052-1058.

Mao, L., H. Pang, G. Wang and C. Zhu. 2007. Phospholipase D and lipoxygenase activity of cucumber fruit in response to chilling stress. *Postharvest Biology and Technology* 44: 42-47.

Pathirana, P., Y. Sekozawa, S. Sugaya and H. Gemma. 2011. Effect of combined application of 1-MCP and low oxygen treatments on alleviation of chilling injury and lipid peroxidation stability of avocado (*Persea Americana* Mill.) under low temperature storage. *Fruits journal* 66: 161-170.