



วิทยานิพนธ์

ความสัมพันธ์ระหว่างความเสียหายของเยื่อหุ้มเซลล์และการเกิดอาการ
สะท้อนหนาวของใบพืชสกุลกะเพรา

THE RELATIONSHIP BETWEEN MEMBRANE DAMAGE
AND CHILLING INJURY IN BASIL LEAVES (*OCIMUM* SPP.)

นางธิติมา วงษ์ชีรี

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

พ.ศ. 2551



ใบรับรองวิทยานิพนธ์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ปรัชญาดุษฎีบัณฑิต (เทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว)

ปริญญา

เทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว

โครงการสหวิทยาการระดับบัณฑิตศึกษา

สาขา

ภาควิชา

เรื่อง ความสัมพันธ์ระหว่างความเสียหายของเยื่อหุ้มเซลล์และการเกิดอาการสะท้อนหนาว
ของใบพืชสกุลกะเพรา

The Relationship between Membrane Damage and Chilling Injury in Basil Leaves
(*Ocimum* spp.)

นามผู้วิจัย นางธิดิมา วงษ์ศรี

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

ประธานกรรมการ

(ศาสตราจารย์สายชล เกตุษา, Ph.D.)

กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ผ ภาณุตานนท์, Ph.D.)

กรรมการ

(อาจารย์พุทธพร ส่องศรี, Ph.D.)

ประธานสาขาวิชา

(ศาสตราจารย์สายชล เกตุษา, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์กัญญา ชีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ 4 เดือน สิงหาคม พ.ศ. 2551

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

ความสัมพันธ์ระหว่างความเสียหายของเยื่อหุ้มเซลล์และการเกิดอาการสะท้านหนาวของใบพืช
สกุลกะเพรา

The Relationship between Membrane Damage and Chilling Injury in Basil Leaves (*Ocimum* spp.)

โดย

นางรัชติมา วงษ์ศิริ

เสนอ

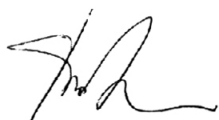
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาปรัชญาดุษฎีบัณฑิต (เทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว)

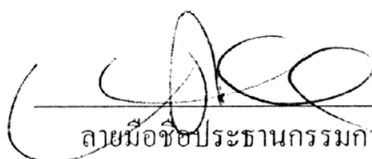
พ.ศ. 2551

ธิดิมา วงษ์ชีรี 2551: ความสัมพันธ์ระหว่างความเสียหายของเยื่อหุ้มเซลล์และการเกิดอาการ
สะท้อนหนาวของใบพืชสกุลกะเพรา. ปรินญาปรัชญาคุณวุฒิบัณฑิต (เทคโนโลยีหลังการเก็บ
เกี่ยว) สาขาวิชาเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว โครงการสหวิทยาการระดับบัณฑิตศึกษา
ประธานกรรมการที่ปรึกษา: ศาสตราจารย์สายชล เกตุษา, Ph.D. 125 หน้า

การเก็บรักษาใบกะเพรา โหระพาและแมงลัก ในถุงพลาสติกพอลิเอทิลีน ที่อุณหภูมิ 4 8 12 และ 25 องศาเซลเซียส (ความชื้นสัมพัทธ์ 80-85%) ใบพืชสกุลกะเพราแสดงอาการสะท้อนหนาวที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยเกิดจุดหรือแถบสีน้ำตาลที่มีขนาดไม่สม่ำเสมอเกิดขึ้นก่อนที่บริเวณท้องใบ โดยมีการยุบตัวของเซลล์ spongy ก่อนเซลล์ palisade โดยพบว่าใบแมงลักมีความไวต่ออุณหภูมิต่ำมากที่สุด ในขณะที่ใบโหระพามีความไวน้อยที่สุด ใบแก่แสดงอาการสะท้อนหนาวเกิดขึ้นก่อนและมีความรุนแรงมากกว่าใบอ่อน และพบว่าค่าการรั่วไหลของประจุจากเนื้อเยื่อใบแก่มีค่าสูงกว่าเนื้อเยื่อใบอ่อนระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แต่การรั่วไหลของประจุมีค่าคงที่ระหว่างการเก็บรักษาใบที่ 12 องศาเซลเซียส แมงลักใบแก่มีกิจกรรมเอนไซม์ catalase (CAT) และ guaiacol peroxidase (GPX) ต่ำกว่าใบอ่อนอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่กิจกรรมเอนไซม์ superoxide dismutase (SOD) และ ascorbate peroxidase (APX) ไม่แตกต่างกันทางสถิติ เมื่อทำการเปรียบเทียบกิจกรรมเอนไซม์ lipoxygenase (LOX) และระดับ transcript mRNA ของยีน *OcLOX* ในระหว่างเก็บรักษาที่ 4 องศาเซลเซียส พบว่าเนื้อเยื่อใบแก่มีกิจกรรมเอนไซม์ LOX และการแสดงออกของยีนสูงกว่าเนื้อเยื่อใบอ่อน แต่มีลักษณะการเปลี่ยนแปลงปริมาณ thiobarbituric acid-reactive compounds ที่เหมือนกันทั้งในใบแก่และใบอ่อน นอกจากนี้ยังพบว่าภายหลังการเก็บรักษาที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 12 และ 24 ชั่วโมง ใบแก่มีอัตราส่วนของกรดไขมันไม่อิ่มตัวต่อกรดไขมันอิ่มตัวต่ำกว่าใบอ่อนและยังพบว่าตลอดระยะเวลาการเก็บรักษาใบแก่มีปริมาณกรดไขมันไม่อิ่มตัว linoleic acid (C18:2) น้อยกว่าใบอ่อน 2 เท่า ในทางตรงกันข้ามกิจกรรมเอนไซม์ PPO ในแมงลักใบแก่มีค่าต่ำกว่าในใบอ่อนและมีกิจกรรมลดลงอย่างรวดเร็วระหว่างการเก็บรักษาที่ 4 องศาเซลเซียส ในขณะที่กิจกรรมเอนไซม์ PPO มีค่าค่อนข้างคงที่ทั้งในใบอ่อนและใบแก่ระหว่างการเก็บรักษาที่ 12 องศาเซลเซียส โดยพบว่าสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ในใบแก่และใบอ่อนมีปริมาณไม่แตกต่างกันทางสถิติ และไม่มีการเปลี่ยนแปลงตลอด 48 ชั่วโมงของการเก็บรักษา การให้สารเคมีหรือความร้อนกับใบแมงลักก่อนเก็บรักษาในอุณหภูมิต่ำ โดยจุ่มก้านใบแก่ในสารละลาย salicylic acid ความเข้มข้น 0.5 mM นาน 10 นาที สามารถชะลอการพัฒนาอาการสะท้อนหนาวและชะลอการเพิ่มค่าการรั่วไหลของประจุจากเนื้อเยื่อใบแก่ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม จากข้อมูลของผลการทดลองแสดงว่าความไวต่อการเกิดอาการสะท้อนหนาวของใบพืชสกุลกะเพรานั้นจะมีความสัมพันธ์กับความเสียหายของเยื่อหุ้มเซลล์มากกว่ากระบวนการเมแทบอลิซึมของสารประกอบฟีนอลิก



ลายมือชื่อนิสิต

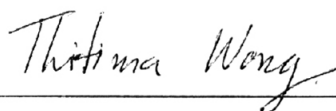


ลายมือชื่อประธานกรรมการ

21 / พ.ค. / 2551

Thitima Wongseree 2008: The Relationship between Membrane Damage and Chilling Injury in Basil Leaves (*Ocimum* spp.). Doctor of Philosophy (Postharvest Technology), Major Field: Postharvest Technology, Interdisciplinary Graduate Program. Thesis Advisor: Professor Saichol Ketsa, Ph.D. 125 pages.

Leaves of holy basil, sweet basil and lemon basil were stored in twist-tied polyethylene bags at 4, 8, 12 and 25°C (80-85% RH). At chilling temperature (4°C), browning spots or brown patches were irregular shape and firstly appeared on the dorsal leaves. The spongy cells of initially chilled leaves collapsed before the palisade cells. Lemon basil was the most sensitive to chilling while sweet basil was the least sensitive. The visible symptom of chilling injury of mature leaves occurred earlier and was more severe than that of young leaves. Mature leaves of lemon basil showed greater electrolyte leakage than young leaves stored at 4°C, while electrolyte leakage remained constant for leaves stored at 12°C. Moreover, mature leaves exhibited lower activities of catalase (CAT) and guaiacol peroxidase (GPX) than young leaves, but found no significant difference in superoxide dismutase (SOD) and ascorbate peroxidase (APX). Compared to young leaves, mature leaves also showed higher lipoxygenase (LOX) activity and level of *OcLOX* mRNA transcripts throughout the period of low temperature storage. In addition, mature leaves had a lower ratio of saturated to unsaturated fatty acids at 12 and 24 h after onset of low temperature storage. Similarly, mature tissue had twice less linoleic acid (C18:2) than young tissue throughout the storage period. However, both young and mature leaves showed a similar trend on the content of thiobarbituric acid-reactive compounds. On contrary, PPO activity in young leaves was higher than mature leaves and their activities decreased sharply during storage at 4°C, whereas the activities showed a slow decrease at 12°C. Total phenolic content in young and mature leaves was not significantly different and the content remained unchanged during 48-h storage. Pretreatment of lemon basil by dipping the petiole of mature leaves in 0.5 mM salicylic acids for 10 min delayed both of chilling injury symptom development and electrolyte leakage in mature tissue stored at low temperature compared with untreated leaves. The results suggest that chilling injury of basil leaves was closely related to membrane damage rather than phenolic metabolism.



Student's signature



Thesis Advisor's signature

21 / May / 2008

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จได้ ด้วยความกรุณาของศาสตราจารย์ ดร.สายชล เกตุษา อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ซึ่งให้โอกาส กำลังใจ ความรู้ คำแนะนำ ความช่วยเหลือตลอดระยะเวลาที่ทำการศึกษา จนกระทั่งงานวิจัยลุล่วงไปได้ด้วยดี ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงมา ณ ที่นี้

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ลพ ภาณุตานนท์ และอาจารย์ ดร.พุทธร ส่องศรี กรรมการที่ปรึกษาร่วม ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สมโภชน์ น้อยจินดา อาจารย์ผู้แทนบัณฑิตวิทยาลัย ที่ให้ข้อเสนอแนะเกี่ยวกับการวิจัย และกรุณาแก้ไขข้อบกพร่องต่าง ๆ ของงานวิจัยเป็นอย่างดี ผศ.ดร.ปราโมทย์ สฤณศิริรัตน์ กรุณาให้ข้อมูลด้านการศึกษารวบรวมและปรับปรุงพันธุ์พืชสกุลกะเพราในประเทศไทย และ Dr. Wouter G. van Doorn ให้คำแนะนำในการวิจัย การเขียนและตีพิมพ์ผลงานในวารสารวิชาการต่างประเทศ

ขอขอบพระคุณ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี และโครงการพัฒนาระดับบัณฑิตศึกษาและวิจัยเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว สนับสนุนทุนในการศึกษาต่อและทำการวิจัย บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ สนับสนุนทุนเพื่อการตีพิมพ์ในวารสารระดับนานาชาติ และศูนย์เทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว อนุเคราะห์สถานที่ในการทดลอง

ขอขอบคุณพี่-น้อง ชาว lab postharvest กำแพงแสน ที่ให้ความช่วยเหลือและเป็นกำลังใจตลอดมา และขอบคุณเจ้าหน้าที่ ศูนย์เทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยวทุกท่านที่ กรุณาอำนวยความสะดวกในระหว่างทำการวิจัย ไม่เว้นวันหยุดราชการ

สุดท้ายขอกราบขอบพระคุณแม่ประจวบ วงษ์ชีรีครูคนแรกของชีวิต ที่ให้ความสำคัญกับศึกษาตลอดมา ขอระลึกถึงพระคุณของคุณพ่อสุธี วงษ์ชีรี ผู้ล่วงลับ และพระเมตตา ความรักขององค์พระผู้เป็นเจ้า ที่โปรดประทานทุกสิ่งทุกอย่างในชีวิตของผู้วิจัย

ธิดิมา วงษ์ชีรี

พฤษภาคม 2551

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(3)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	22
ผล	41
วิจารณ์	81
สรุป	95
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	97
ภาคผนวก	118
ประวัติการศึกษาและการทำงาน	125

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ชนิดและปริมาณกรดไขมันอิ่มตัว (SFA) และกรดไขมันไม่อิ่มตัว (UFA) ของแมงลัก	62
2	ปริมาณรวมของกรดไขมันไม่อิ่มตัว (UFA) และกรดไขมันอิ่มตัว (SFA) ของแมงลักใบอ่อนและใบแก่หลังการเก็บรักษาที่ 4 °ซ ในช่วงเวลาที่แตกต่างกัน	63
3	ชนิดและปริมาณกรดไขมันอิ่มตัว (SFA) และกรดไขมันไม่อิ่มตัว (UFA) ของแมงลักใบแก่หลังการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 และ 12 °ซ ในช่วงเวลาแตกต่างกัน	64
4	ปริมาณรวมของกรดไขมันไม่อิ่มตัว (UFA) และกรดไขมันอิ่มตัว (SFA) ในแมงลักใบแก่หลังการเก็บรักษาที่ 4 และ 12 °ซ ในช่วงเวลาที่แตกต่างกัน	65
 ตารางผนวกที่		
1	การวิเคราะห์ความแปรปรวนดัชนีสะท้อนหาวของใบกะเพรา โหระพาและใบแมงลักใบอ่อนและใบแก่ระหว่างการเก็บรักษาที่ 4 และ 12 °ซ	119
2	การวิเคราะห์ความแปรปรวนอัตราส่วนของกรดไขมันไม่อิ่มตัวต่อกรดไขมันอิ่มตัวของแมงลักใบอ่อนและใบแก่เก็บรักษาที่ 4 °ซ	120
3	ค่าเฉลี่ยของอัตราส่วนของกรดไขมันไม่อิ่มตัวต่อกรดไขมันอิ่มตัวของแมงลักใบแก่เก็บรักษาที่ 4 และ 12 °ซ	120
4	การวิเคราะห์ความแปรปรวนปริมาณรวมกรดไขมันไม่อิ่มตัวของแมงลักใบอ่อนและใบแก่เก็บรักษาที่ 4 °ซ	120
5	การวิเคราะห์ความแปรปรวนปริมาณรวมกรดไขมันอิ่มตัวของแมงลักใบอ่อนและใบแก่เก็บรักษาที่ 4 °ซ	121
6	การวิเคราะห์ความแปรปรวนปริมาณรวมกรดไขมันไม่อิ่มตัวของแมงลักใบแก่เก็บรักษาที่ 4 และ 12 °ซ	121
7	การวิเคราะห์ความแปรปรวนปริมาณรวมกรดไขมันอิ่มตัวของแมงลักใบแก่เก็บรักษาที่ 4 และ 12 °ซ	121

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	ปฏิกิริยาลูกโซ่ของ radical กลไกการเกิด lipid peroxidation	13
2	ดัชนีสะท้อนทึบของใบแมงลัก (A) ใบโหระพา (B) และใบกะเพรา (C) ระหว่างการเก็บรักษาใบอ่อน (□, △, ○, ◇) และใบแก่ (■, ▲, ●, ◆) ที่ 4 (□, ■) 8 (△, ▲) 12 (○, ●) และ 25°C (◇, ◆)	44
3	คะแนนกลิ่นของใบกะเพรา โหระพา และแมงลัก หลังการเก็บรักษาที่ 4 และ 12°C นาน 24 และ 48 ชั่วโมง	45
4	อาการสะท้อนทึบในใบแมงลัก (A) ใบโหระพา (B) และใบกะเพรา (C) หลังการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4°C นาน 24 ชั่วโมง	46
5	ดัชนีสะท้อนทึบของแมงลักเก็บรักษาที่ 4°C ในใบอ่อน (□) และใบแก่ (■) อายุการเก็บเกี่ยว 30 วันหลังการย้ายปลูก และใบแก่และใบอ่อน (△) และใบแก่ (▲) อายุการเก็บเกี่ยว 120 วันหลังการย้ายปลูก	47
6	ดัชนีสะท้อนทึบของแมงลัก ใบอ่อน (□) และใบแก่ (■) เก็บรักษาที่ 4°C ภายใต้สภาพความชื้นสัมพัทธ์ 75% (A) 85% (B) และ 97% (C)	48
7	การร่วงไหลของประจุของเนื้อเยื่อใบแมงลัก (A, B) และใบโหระพา (C, D) ในใบอ่อน (□) และใบแก่ (■) เก็บรักษาที่ 4 (A, C) และ 12°C (B, D)	54
8	การร่วงไหลของประจุของเนื้อเยื่อแมงลักใบแก่ที่มีอาการสะท้อนทึบระดับแตกต่างกัน หลังการเก็บรักษาที่ 4°C โดยเปรียบเทียบเนื้อเยื่อปกติ (A, □) และเนื้อเยื่อที่เกิดสีน้ำตาล (B, ▨)	55
9	ปริมาณ TBA-reactive compounds (A) และ กิจกรรมของเอนไซม์ lipoxygenase (B) ของใบแมงลักใบอ่อน (□) และ ใบแก่ (■) เก็บรักษาที่ 4°C	56
10	ปริมาณ TBA-reactive compounds ของเนื้อเยื่อแมงลักใบแก่ (□) และ โหระพา ใบแก่ (▨) ที่มีอาการสะท้อนทึบระดับแตกต่างกัน หลังการเก็บรักษาที่ 4°C	57

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
11	กิจกรรมของเอนไซม์ catalase (CAT) (A), guaiacal peroxidase (GPX) (B) และ superoxide dismutase (SOD) (C) ของเนื้อเยื่อแมงลักใบอ่อน (□) และใบแก่ (■) หลังการเก็บรักษาที่ 4°C	58
12	กิจกรรมของเอนไซม์ catechol oxidase ของใบอ่อน (□) และใบแก่ (■) ในแมงลัก (A, C) และโหระพา (B, D) เก็บรักษาที่ 4 (A, B) และ 12°C	59
13	กิจกรรมของเอนไซม์ polyphenol oxidase (A) phenylalanine ammonia lyase (B) และ total free phenolic (C) ในใบแก่ของแมงลัก (□) และโหระพา (▨) ที่มีค่าดัชนีการสะท้อนหาแตกต่างกัน	60
14	ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด (GAE equivalent) ของใบอ่อน (□) และใบแก่ (■) ในแมงลัก (A, C) และโหระพา (B, D) เก็บรักษาที่ 4 (A, B) และ 12°C (C, D)	61
15	อัตราส่วนของปริมาณรวมกรดไขมันไม่อิ่มตัว (UFA) และปริมาณรวมกรดไขมันอิ่มตัว (SFA) ของแมงลักใบอ่อน (□) และใบแก่ (▨) เก็บรักษาที่ 4°C (A) และแมงลักใบแก่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 (□) และ 12°C (▨) (B)	66
16	ภาพตัดขวางเนื้อเยื่อแมงลักใบแก่ ก่อนการเก็บรักษา (A) และหลังการเก็บรักษาที่ 4 °ซ นาน 24 ชั่วโมง ค่าดัชนีการสะท้อนหาในระดับต้น CI2 (B)	68
17	ภาพตัดขวางเนื้อเยื่อแมงลักใบแก่ ก่อนการเก็บรักษา (A) และหลังการเก็บรักษาที่ 4 °ซ นาน 24 ชั่วโมง ค่าดัชนีการสะท้อนหาในระดับค่อนข้างรุนแรง CI4 (B)	69
18	ดัชนีการสะท้อนหา (A) และการรั่วไหลของประจุ (B) ของเนื้อเยื่อแมงลักใบแก่ที่ไม่ได้รับสาร 1-MCP (○) ได้รับ 100 nL L ⁻¹ 1-MCP (■) และ 500 nL L ⁻¹ 1-MCP (▲)	72
19	ดัชนีการสะท้อนหา (A) และการรั่วไหลประจุ (B) ของเนื้อเยื่อแมงลักใบแก่ที่ไม่ได้รับสาร salicylic acid (○) ได้รับ 0.25 mM SA (■) และ 0.5 mM SA (▲)	73

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
20	อาการสะท้อนหนาวใน แมงลักใบแก่ที่ให้สาร 0.5 mM salicylic acid (A) หรือแช่ในน้ำกลั่น (B) ก่อนเก็บรักษาที่ 4°C นาน 24 ชั่วโมง หรือแช่ในน้ำกลั่น (B) ก่อนเก็บรักษาที่ 4°C นาน 24 ชั่วโมง
21	ดัชนีอาการสะท้อนหนาว (A) และการรั่วไหลของประจุ (B) ของเนื้อเยื่อแมงลักใบแก่บรรจุ HDPE แบบปิด (■) HDPE แบบเจาะรู (□) PE แบบปิด (▲) และ PE แบบเจาะรู (△) ระหว่างการเก็บรักษาที่ 4°C
22	ดัชนีอาการสะท้อนหนาว (A) และการรั่วไหลของประจุ (B) ของเนื้อเยื่อแมงลักใบแก่ (▲) และใบอ่อน (△) ที่ไม่ได้รับความร้อน และได้รับความร้อน 38°C นาน 15 นาที ในใบแก่ (■) และใบอ่อน (□) ระหว่างการเก็บรักษาที่ 4°C
23	ลำดับนิวคลีโอไทด์ยีน <i>OcLOX</i> ที่แยกได้จากใบแมงลัก ความยาว 468 คู่เบสและใช้ออกแบบไพรเมอร์และไพรเมอร์ สำหรับ semi-PCR
24	ลำดับกรดอะมิโนของยีน <i>OcLOX</i> ที่แปลรหัสจากนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>OcLOX</i>
25	การแสดงออกของยีน <i>OcLOX</i> ในแมงลักใบอ่อนและใบแก่เก็บรักษาที่ 4 (A) และ 12°C (C) โดยมียีน <i>18S</i> เป็นชุดควบคุม (B และ D)

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพผนวกที่	หน้า
1 ผลผลิตจากปฏิกิริยา PCR ของยีน <i>LOX</i> ขึ้นบน (A) มีขนาดประมาณ 520 bp ขึ้นล่าง (B) มีขนาดประมาณ 360 bp โดยใช้ degenerate primer: FNui และ PrepR1 เปรียบเทียบกับ M: 1kb marker (Fermantas, USA) ตัวอย่าง RNA จากแมงลักใบแก่ที่เก็บรักษาที่ 4 °ซ นาน 36 ชั่วโมง	112
2 ผลผลิตจากปฏิกิริยา PCR ของยีน <i>LOX</i> มีขนาดประมาณ 468 bp โดยใช้ specific primer: FLOX4B และ RLOX4B เปรียบเทียบกับ M: 1kb marker (Fermantas, USA) ตัวอย่าง RNA จากแมงลักใบแก่ที่เก็บรักษาที่ 4 °ซ นาน 36 ชั่วโมง	112
3 ผลผลิตจากปฏิกิริยา PCR ของยีน <i>PPO</i> มีขนาดประมาณ 500 bp โดยใช้ degenerate primer: PPO_LEFT และ PPO_RIGHT เปรียบเทียบกับ M: 1kb marker (Fermantas, USA) ตัวอย่าง RNA จากแมงลักใบแก่ที่เก็บรักษาที่ 4 °ซ นาน 36 ชั่วโมง	123
4 สัมประสิทธิ์สหคดอยระหว่างค่ารั้วไหลของประจุและดัชนีสะท้อนนาว (A) กิจกรรมของเอนไซม์ PPO และดัชนีสะท้อนนาว (B)	124

ความสัมพันธ์ระหว่างความเสียหายของเยื่อหุ้มเซลล์และการเกิดอาการสะท้านหนาว ของใบพืชสกุลกะเพรา

The Relationship between Membrane Damage and Chilling Injury in Basil Leaves (*Ocimum* spp.)

คำนำ

กะเพรา เป็นพืชสกุลเดียวกันกับ โหระพาและแมงลัก จัดอยู่ใน สกุล *Ocimum* วงศ์มินท์ (Labiatae) เป็นวงศ์พืชสมุนไพรที่ใช้เป็นเครื่องปรุงรส (culinary herb) ที่ใช้บริโภคสดแพร่หลายที่สุดในประเทศไทย โดยมีแหล่งผลิตพืชเพื่อขายใบสดที่สำคัญคือ จังหวัดนครปฐมและ กระจายทั่วทุกภาคของประเทศไทยประมาณ 1,009 ไร่ ส่วนในประเทศสหรัฐอเมริกา ซึ่งจัดเป็นประเทศที่มีการบริโภคและนำเข้าสมุนไพรแหล่งใหญ่ที่สุดของโลก โดยนิยมบริโภคพืชสมุนไพรวงศ์ Labiatae มากที่สุด และมีการนำเข้าสมุนไพรและผักสมุนไพรปรุงรสสด เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง ในปี 1980 สหรัฐอเมริกามีการนำเข้าเครื่องเทศและพืชสมุนไพรประมาณ 2.1 พันล้านปอนด์ และในปี 2000 มีการนำเข้าเพิ่มขึ้นเป็น 3.6 พันล้านปอนด์ เนื่องจากการขยายตัวของประชากรชาวต่างชาติ และวัฒนธรรมการบริโภคอาหารสุขภาพ โดยมีประเทศผู้ส่งออกผักสมุนไพรปรุงรสที่สำคัญ ได้แก่ อินโดนีเซีย อินเดีย แคนาดาและจีน (กรมวิชาการเกษตร, 2550; Buzzanell *et al.*, 1995; ASTA, 2001)

ปัญหาที่สำคัญในการส่งออกและการวางขาย ผักสมุนไพรปรุงรส คือ ผลผลิตเน่าเสียง่าย และมีอายุการเก็บรักษาสั้น (Cantwel and Reid, 2002) โดยเฉพาะพืชสกุลกะเพรา มีความไวต่อการเกิดความเสียหายจากอาการสะท้านหนาว (Chilling injury) มากกว่าผักสมุนไพรปรุงรสชนิดอื่น ๆ โดยเนื้อเยื่อของใบและลำต้น เปลี่ยนเป็นสีดำภายหลังจากเก็บรักษาในอุณหภูมิ 5-10 องศาเซลเซียส (Aharoni *et al.*, 1993) จากการศึกษาเบื้องต้นในพืชสกุลกะเพราที่มีการปลูกเป็นการค้าในประเทศไทยจำนวน 3 ชนิด (species) คือ กะเพรา โหระพา และแมงลัก พบว่าใบแมงลักมีความไวต่อการเกิดอาการสะท้านหนาวมากที่สุด และโหระพามีความไวต่ออุณหภูมิต่ำน้อยที่สุด โดยใบอ่อนมีความไวต่ออุณหภูมิต่ำน้อยกว่าใบแก่อย่างชัดเจน การศึกษาเปรียบเทียบความแตกต่างทางสรีรวิทยา องค์ประกอบทางเคมีและการเปลี่ยนแปลงชีวเคมีบางอย่างระหว่างได้รับความเครียดจากอุณหภูมิต่ำอาจสามารถอธิบายกลไกหรือสาเหตุการเกิดอาการสะท้านหนาวของพืชสกุลนี้

เยื่อหุ้มเซลล์เป็นส่วนแรกที่สัมผัสและได้รับผลกระทบจากสิ่งแวดล้อม ในสภาพอุณหภูมิ ต่ำกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์หลายชนิด เช่น lipoxygenase (LOX) phospholipase (PL) ซึ่งมีบทบาทในการย่อยสลายและเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบของไขมันในเยื่อหุ้ม โดยทำความเสียหายหรือรบกวนคุณสมบัติในการคัดเลือกสารของเยื่อหุ้ม (Shewfelt, 1992) จึงส่งเสริมการทำงานของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการเกิดสีน้ำตาล ได้แก่ phenylalanine ammonia lyase (PAL) และ polyphenol oxidase (PPO) และอาจทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงปริมาณสารประกอบฟีนอลิก ซึ่งพบในผักในเขตร้อนหลายชนิด เช่น ข้าวโพดฝักอ่อน โหระพา ผักบุ้ง ผักกาดหอมห่อ และใบปอ เป็นต้น (สายชลและอาภาภรณ์, 2537; Buritau *et al.*, 1991; Ose *et al.*, 1995; Hisaminato *et al.*, 2001; Tulio *et al.*, 2002) นอกจากนี้อนุมูลมีด้ายกระตุ้นให้มีการผลิต radical oxygen species (ROS) และเกิดการเปลี่ยนแปลงของสารหรือกิจกรรมเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ (antioxidants) (Shewfelt and del Rosario, 2000) ลำดับเหตุการณ์หรือการเปลี่ยนแปลงที่กล่าวมาในพืชแต่ละชนิดอาจไม่เหมือนกันและบทบาทต่อการปรากฏอาการสะท้อนหนาวของพืชที่ทำการศึกษาก็แตกต่างกัน

ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงได้เปรียบเทียบข้อมูลทางด้านชีวเคมีบางอย่างเกี่ยวกับความเสียหายของเยื่อหุ้มเซลล์ ได้แก่ ปริมาณและชนิดของกรดไขมัน กิจกรรมและผลิตภัณฑ์ของเอนไซม์ LOX การเปลี่ยนแปลงของกิจกรรมเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ และเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการเกิดสีน้ำตาล เพื่ออธิบายสาเหตุหรือกลไกการเกิดอาการสะท้อนหนาวของใบพืชสกุลกะเพรา

วัตถุประสงค์

การศึกษาวิจัยความสัมพันธ์ระหว่างความเสียหายของเยื่อหุ้มเซลล์และการเกิดอาการ สะท้อนหนาวของใบพืชสกุลกะเพรา มีวัตถุประสงค์ดังต่อไปนี้

1. ศึกษาเปรียบเทียบบทบาทของเอนไซม์ lipoxygenase (LOX) และการแสดงออกของ ยีน ที่มีความสัมพันธ์กับความเสียหายของเยื่อหุ้มเซลล์ในใบพืชสกุลกะเพรา
2. อธิบายความสัมพันธ์ระหว่างการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์ antioxidants ได้แก่ ascorbate peroxidase (APX) catalase (CAT) และ superoxide dismutase (SOD) กับการตอบสนองต่ออุณหภูมิต่ำในใบพืชสกุลกะเพรา
3. ศึกษาการเปลี่ยนแปลงและหาความสัมพันธ์ระหว่างชนิดและปริมาณของกรดไขมัน ในระหว่างการเก็บรักษาใบพืชสกุลกะเพราที่อุณหภูมิต่ำ
4. ศึกษาการเปลี่ยนแปลงและหาความสัมพันธ์ระหว่างกิจกรรมเอนไซม์ phenylalanine ammonia lyase (PAL) polyphenol oxidase (PPO) และสารประกอบฟีนอลิกกับการเกิดอาการ สะท้อนหนาวในใบพืชสกุลกะเพรา

การตรวจเอกสาร

1. ลักษณะทางพฤกษศาสตร์และเคมีของพืช การใช้ประโยชน์และแนวโน้มตลาด

พืชสกุลกะเพรา (*Ocimum* spp.) อยู่ในวงศ์ Labiatae จัดเป็นพืชล้มลุก (annual) ลักษณะเฉพาะของพืชสกุลนี้คือ ลำต้นมีรูปร่างสี่เหลี่ยม มีขนที่ใบอ่อนและสร้างใบทิศทางตรงกันข้าม และมีน้ำมันหอมระเหย ถิ่นกำเนิดของพืชชนิดนี้อยู่ในแถบเอเชียเขตร้อน และในทวีปแอฟริกา แต่มีการปลูกแพร่หลาย ในประเทศแถบอเมริกาเหนือ ยุโรป เมดิเตอร์เรเนียนและเอเชีย พืชสกุลนี้ทั่วโลกมีประมาณ 35 ชนิด ในประเทศไทยมีการปลูกเพื่อใช้ใบในการปรุงอาหารจำนวน 4 ชนิดคือ กะเพรา (*Ocimum sanctum* L. หรือ *O. tenuiflorum*) โหระพา (*Ocimum basilicum*) แมงลัก (*Ocimum x citriodorum*) และโหระพาช้างหรือยี่ห่วย (*Ocimum gratissimum* L.) ในกะเพรา 3 ชนิดคือกะเพราแดง กะเพราเขียว และกะเพราลูกผสมระหว่างกะเพราเขียวและกะเพราแดง กะเพราเขียวมีใบสีเขียวขนาดใหญ่ ทรงพุ่มขนาดเล็กและหนาแน่นกว่ากะเพราแดง ส่วนกะเพราลูกผสมมีลำต้นสีแดงและใบสีเขียว (กัทธยา, 2542; Uhl, 2000) การศึกษารวบรวมและปรับปรุงพันธุ์พืชสกุล *Ocimum* ในประเทศไทยมีค่อนข้างน้อยและมีบริษัทเอกชนที่ทำการผลิตเมล็ดพันธุ์เพียงแห่งเดียว เมล็ดจึงมีราคาค่อนข้างแพง โดยมีการปรับปรุงพันธุ์โหระพาลูกผสมให้มีใบขนาดใหญ่ข้อสั้น ติดกันเป็นพวง ทำให้มีน้ำหนักใบแก่ต่อช่อค่อนข้างสูง แต่มีปัญหาด้านโรคและแมลงมากกว่า โหระพาพันธุ์ปลูกปกติที่มีข้อห่างและใบเป็นช่อ ส่วนแมงลักพันธุ์ลูกผสมจะมีใบใหญ่ลำต้นแตกแขนง และเกษตรกรนิยมปลูกแบบหวาน แล้วทำการเก็บเกี่ยวทั้งราก แต่ส่วนใหญ่เกษตรกรจะเป็นผู้คัดเลือกต้นพันธุ์และเก็บเมล็ดพันธุ์เองมากกว่าการซื้อเมล็ดพันธุ์ ในต่างประเทศมีการพัฒนาสายพันธุ์เพื่อการใช้ประโยชน์เฉพาะอย่าง เช่น บริโภคสด สกัดน้ำมันหอมระเหย และเป็นไม้ประดับ แต่ในประเทศไทยมีการปรับปรุงเพื่อการบริโภคเท่านั้น (สอบถามส่วนตัว)

ใบกะเพรา มีกลิ่นและรสของใบแตกต่างจากพืชอื่น เนื่องจากมีน้ำมันหอมระเหยและสารฟีนอลิกอีกหลายชนิด ซึ่งมีปริมาณต่างกันตามแต่นิสัยและพื้นที่ปลูกพืช ในโหระพาไทย (Anise basil หรือ Thai basil) พบว่าประกอบด้วย สาร methyl chavicol 85% ซึ่งเป็นสารที่ออกซิไดซ์ในสภาพมีแสงหรืออากาศ และมี linalool เพียง 1% สารอื่นที่มีปริมาณน้อย ได้แก่ camphor borneol eugenol และ cineole แต่โหระพายุโรป มี linalool มากที่สุดประมาณ 40% methyl chavicol ประมาณ 25% สารอื่นๆ ที่พบในปริมาณเล็กน้อย ได้แก่ eugenol cineole และ geraniol สำหรับใบกะเพรานอกจากมีน้ำมันหอมระเหย ยังมีสารประกอบฟีนอลิกที่มีฤทธิ์ทางยาอีกหลายชนิด เช่น eugenol methyl chavicol rosmarinic acid alkaloids saponins flavonoids phenylpropane

glycoside และ tannin เป็นต้น จึงทำให้ใบกะเพราที่มีสรรพคุณทางยาที่หลากหลาย ทั้งลดไข้ แก้คลื่นไส้ อาเจียน บรรเทาอาการหลอดลมอักเสบ ลดน้ำตาลในเลือด รักษาอาการกล้ามเนื้อและด้านทานการอักเสบจากเชื้อราและแบคทีเรีย รวมทั้งเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ป้องกันการเกิดโรคมะเร็ง และฟื้นฟูสภาพร่างกายให้สู่สภาวะปกติ ปัจจุบันมีการแปรรูปใบกะเพราเป็นผลิตภัณฑ์สำเร็จรูปในประเทศแถบยุโรปและอินเดีย (Lawton, 2002)

จากการสัมมนาภาพรวมของตลาดสมุนไพรและเครื่องเทศโดยหน่วยงานการค้าระหว่างประเทศร่วมกับ WTO พบว่าตลาดส่งออกและนำเข้าเครื่องเทศและพืชสมุนไพรของโลกคือประเทศสหรัฐอเมริกา มีการขยายตัวของตลาดเพิ่มขึ้นเฉลี่ย 8.5% ต่อปี โดยมีมูลค่ารวมมากกว่า 2.3 พันล้านดอลลาร์ และพบว่าประเทศอินเดียเป็นประเทศที่มีการส่งออกเครื่องเทศและสมุนไพรมากที่สุดในโลก ประมาณ 30% ของปริมาณการส่งออกทั้งหมด (Furth and Cox, 2004)

สาเหตุที่ทำให้ปริมาณการนำเข้าเครื่องเทศและสมุนไพรเพิ่มขึ้นในสหรัฐอย่างต่อเนื่องเกิดจากค่านิยมบริโภคอาหารเพื่อสุขภาพ การแนะนำในการทำอาหารหรือใช้เครื่องปรุงรสจากสื่อการอพยพเข้าไปทำงานของชาวต่างชาติ และการเพิ่มขึ้นของประชากรที่เป็นลูกครึ่งอเมริกันกับชาวต่างชาติ มีการคาดการณ์ว่าใน ปี 2010 จะมีประชากรลูกครึ่งอเมริกันเอเชียเพิ่มขึ้นมากกว่า 110% จึงทำให้ร้านอาหารเติบโตขึ้นตามความต้องการของผู้บริโภค (Raghavan, 2004) จากค่านิยมใช้สมุนไพรปรุงรสอาหารดังกล่าว ทำให้หลายพื้นที่ในประเทศออสเตรเลีย หรือสหรัฐอเมริกา ที่มีสภาพอากาศที่คล้ายคลึงกับทางเขตร้อนทางเอเชีย มีการปลูกเครื่องเทศและผักสมุนไพรเขตร้อนแต่ยังไม่เพียงพอต่อความต้องการ อีกทั้งมีคุณภาพของกลิ่นหรือรสชาติด้อยกว่าพืชที่มาจากถิ่นกำเนิดโดยตรง แต่การขนส่งพืชสมุนไพรสดไปยังประเทศผู้นำเข้ายังคงมีข้อจำกัดเนื่องจากปัญหาด้านการเน่าเสียและความเสียหายจากความไวต่อการสะท้อนหนาวของพืชระหว่างการขนส่งและเก็บรักษาในอุณหภูมิต่ำ

2. ปัญหาการเก็บรักษาผักใบและสมุนไพรปรุงรสในอุณหภูมิต่ำ

เนื่องจากลักษณะทางคุณภาพที่สำคัญของผักใบสีเขียว คือการคงสภาพความสดเขียว แต่ผักใบสดมีพื้นที่สัมผัสกับอากาศมากและมีน้ำเป็นองค์ประกอบสูง ภายหลังจากเก็บเกี่ยว จึงมีอัตราการคายน้ำและการหายใจสูง ทำให้พืชใบมีอายุการเก็บรักษาสั้น การใช้อุณหภูมิต่ำ จึงเป็นวิธีการเบื้องต้นที่ใช้ในการชะลอกระบวนการเมแทบอลิซึมของพืช ลดการหายใจและการคายน้ำ การใช้อุณหภูมิต่ำที่ได้ผล ต้องมีการเก็บรักษาในสภาพแวดล้อมที่มีความชื้นมากกว่า 95% แต่ใน

ผักเขตร้อนและสมุนไพร จะเกิดความเสียหายภายหลังจากการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำเหนือจุดเยือกแข็ง (Wang, 2003)

การเก็บเกี่ยวผักสมุนไพรสดเพื่อใช้ปรุงอาหาร (culinary herbs) จะตัดทั้งกิ่ง ในช่วงผักเกิดดอกอ่อน ซึ่งมีทั้งใบอ่อนและใบแก่ กลิ่นของผักสมุนไพรเป็นคุณสมบัติเฉพาะที่สำคัญของสมุนไพรใบสดต้องรักษาไว้ จึงยากต่อการปฏิบัติในการเก็บรักษาหรือการขนส่งร่วมกับผลิตภัณฑ์อื่น ใบสมุนไพรสดในสกุล Labiatae ได้แก่ savory marjoram thyme และ rosemary มีอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเก็บรักษาคุณภาพของผลผลิตที่ 0 องศาเซลเซียส (°C) แต่ใบโหระพาแสดงอาการสะท้อนหนาว เกิดลักษณะจุดช้ำน้ำ จากนั้นเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลแห้งดำ โดยเฉพาะบริเวณฐานและปลายใบ ใบจะเหี่ยวอย่างรวดเร็วและสูญเสียความมันวาวของใบ ลำต้นมีสีซีดจางหรือเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล และสูญเสียกลิ่นรส ภายหลังการเก็บใบโหระพาไว้ที่ 0°C เพียง 1 วัน อย่างไรก็ตามการเก็บรักษาที่ 5-10°C นาน 3 วัน ยังพบความเสียหายในระดับปานกลาง ภายหลังการเก็บรักษา 3 วัน อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเก็บใบโหระพาสดคือ 12°C โดยมีอายุการเก็บรักษาได้นานที่สุดเฉลี่ย 12 วัน (Aharoni *et al.*, 1993; Lange and Carmeron, 1994; Cantwell and Reid, 2002) สำหรับโหระพาไทย (Thai basil) ที่ปลูกในออสเตรเลียมีความไวต่อการสะท้อนหนาวมากกว่าโหระพาพันธุ์ยุโรป ใบโหระพาเกิดแผลสีดำและเน่าเสีย ถึงแม้ว่าจะเก็บรักษาไว้ที่ 12°C ก็ยังพบอาการสะท้อนหนาวหลังจากเก็บไว้นาน 1 สัปดาห์ และมีอาการรุนแรงขึ้น หลังจากย้ายไปเก็บที่ 15°C นาน 2 วัน โหระพาที่ปลูกในเขตร้อนยังมีความไวต่ออาการสะท้อนหนาวมากขึ้น การเก็บรักษาใบโหระพา โดยบรรจุในถุงพอลิเอทิลีนที่ 7-12°C ยังคงเกิดความเสียหาย และพบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเก็บรักษา คือ 15°C โดยมีอายุการเก็บรักษานาน 2 สัปดาห์ ลักษณะของความเสียหายที่พบคือ เนื้อเยื่อระหว่างเส้นใบบริเวณใกล้กึ่งกลางใบเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล และเปื่อยเน่า (Thomson *et al.*, 2001; Penchaiya, 2003)

ส่วนผักใบเขียวและสมุนไพรเขตร้อนชนิดอื่น มีลักษณะอาการสะท้อนหนาวคล้ายกัน และมีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเก็บรักษาใกล้เคียงกันกับพืชสกุลกะเพรา ได้แก่ ใบปอกระเจา พบว่าบริเวณ ยอดอ่อน ใบและลำต้นที่แก่ เกิดสีน้ำตาลเข้มเป็นจุด ๆ และขยายใหญ่ทั่วพื้นที่ ภายหลังการเก็บรักษาที่ 1 และ 8°C นาน 11 และ 13 วัน (Tullio *et al.*, 2002) ในผักบุ้งเกิดจุดสีน้ำตาลที่ปลายใบอ่อนและลำต้น ภายหลังการเก็บรักษาที่ 9°C สารประกอบที่เกี่ยวข้องได้แก่ กรดคลอโรจีนิก และ เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องพบว่า กิจกรรมของเอนไซม์ PPO เพิ่มขึ้นสูงสุดก่อนปรากฏอาการสะท้อนหนาว (Ose *et al.*, 1995)

3. สาเหตุการเกิดอาการสะท้านหนาว

การศึกษาเกี่ยวกับการเกิดอาการสะท้านหนาว มีการบันทึกครั้งแรกในปี ค.ศ. 1778 Bietkander พบว่ามีพืชหลายชนิดตายเมื่อมีการนำไปไว้ที่อุณหภูมิ 1-2 °ซ ซึ่งเป็นอุณหภูมิเหนือจุดเยือกแข็งและต่อมาได้มีนักวิทยาศาสตร์ศึกษาพบลักษณะเช่นเดียวกันในพืชอีกหลายชนิด รวมทั้งพืชในเขตร้อน ต่อมา Molisch ได้ให้คำจำกัดความของคำว่า chilling injury (CI) (Erkältturn) เป็นคนแรก (Levitt, 1980) ในอดีตจนถึงปัจจุบัน มีแนวคิดว่าการเกิด CI ในเซลล์พืชมีสาเหตุเริ่มต้นมาจากสาเหตุหรือเหตุการณ์เดียว โดยพิจารณาจากเกิดเหตุการณ์แรก (primary event) เมื่อเซลล์พืชได้รับอุณหภูมิวิกฤต (critical temperature) การเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นสามารถย้อนกลับได้ (reversible) ถ้านำพืชกลับสู่สภาพเดิมหรือออกจากอุณหภูมิดังกล่าว ก่อนเกิดเหตุการณ์หลัง (secondary event) ซึ่งมีการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีอย่างมาก และไม่สามารถกลับสู่สภาพเดิม และนำไปสู่การเสื่อมสภาพหรือการตายของเซลล์ (Raison and Orr, 1990) การพิสูจน์หาสาเหตุเบื้องต้นเพื่ออธิบายอาการสะท้านหนาวซึ่งเป็นเหตุการณ์ที่เกิดขึ้นในตอนหลัง บางกรณีอาจไม่สอดคล้องกัน เนื่องจากถ้าสาเหตุเริ่มต้นมีความแตกต่างกัน แต่ถ้ากลไกทางชีวเคมีที่เกิดขึ้นในตอนหลัง เช่น การเกิดลิพิดเปอร์ออกไซด์ที่เกี่ยวกับเอนไซม์ไม่มีความแตกต่างกัน อาจทำให้การเปลี่ยนแปลงทางกายภาพเมื่ออุณหภูมิต่ำลงเกิดความเสียหายใกล้เคียงกัน ดังนั้นการศึกษาเรื่องการเกิดอาการสะท้านหนาวจึงต้องวัดสิ่งที่เกิดขึ้นในเหตุการณ์แรกเริ่มเมื่ออุณหภูมิต่ำลงจนถึงเหตุการณ์สุดท้าย เมื่ออาการสะท้านหนาวปรากฏขึ้น (จริงแท้, 2549)

ทฤษฎีที่อธิบายสาเหตุการเกิด CI มีหลายแนวทางได้แก่ การหยุดไหลหรือการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างไซโตพลาสซึม การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของเอนไซม์หลักที่ควบคุมกระบวนการต่าง ๆ การเปลี่ยนแปลงสถานะ (phase transition) ของกรดไขมันในเยื่อหุ้มเซลล์ การเกิดสารอนุมูลอิสระ และการเพิ่มขึ้นของไอออนในไซโตพลาสซึม สำหรับสองทฤษฎีแรกยังไม่มีข้อมูลสนับสนุนเพิ่มเติมว่าเกี่ยวข้องกับการเกิด CI แต่สามทฤษฎีหลังนี้มีความสัมพันธ์กันอย่างใกล้ชิด และมีการศึกษาที่สนับสนุนว่ามีความเกี่ยวข้องกับการเกิดหรือความไวต่อการเกิด CI ในทางตรงหรือทางอ้อม

3.1 การเปลี่ยนแปลงสถานะของกรดไขมันในเยื่อหุ้มเซลล์

ทฤษฎีนี้เสนอโดย Lyons ในปี 1973 เป็นทฤษฎีที่ได้รับความสนใจและมีการศึกษามากที่สุดที่สนับสนุนว่าการเปลี่ยนแปลงสถานะหรือองค์ประกอบของไขมันในเยื่อหุ้มเซลล์มีผล

ต่อการเกิด CI ทฤษฎีนี้อธิบายว่า ณ อุณหภูมิวิกฤต กรดไขมันอิ่มตัว (saturated fatty acid) ซึ่งเป็นองค์ประกอบเยื่อหุ้มเซลล์ต่าง ๆ โดยเฉพาะในพืชที่ไวต่ออุณหภูมิต่ำจะมีการเปลี่ยนสถานะจากลักษณะที่อ่อนตัว (liquid crystalline) เป็นลักษณะแข็ง (solid gel) ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างและการจัดเรียงตัวของไขมันในเยื่อหุ้มเซลล์ เกิดการรั่วไหลของประจุ เกิดการเสียสมดุลของกระบวนการเมแทบอลิซึมและเยื่อหุ้มเซลล์เกิดความเสียหายหรือเกิดอันตรายต่อเซลล์ นอกจากนี้การเปลี่ยนแปลงของเยื่อหุ้มเซลล์ทำให้ต้องการเพิ่มพลังงานกระตุ้น (activation energy) ของเอนไซม์ที่เกาะอยู่กับเยื่อหุ้ม (membrane-bound enzyme) จึงทำให้การเกิดปฏิกิริยาต่าง ๆ ช้าลง การส่งผ่าน ATP ไปยังแหล่งใช้พลังงานช้าลง มีผลทำให้การเคลื่อนที่ของโปรโตพลาสซึมหยุด ทำให้ผลผลิตเสื่อมคุณภาพและตายในที่สุด การเปลี่ยนแปลงของเยื่อหุ้มนี้สามารถกลับคืนสู่สภาพเดิมได้ถ้าอยู่ในอุณหภูมิต่ำในช่วงสั้น ๆ แล้วนำกลับมาไว้ที่อุณหภูมิปกติ อันตรายที่เกิดจากอุณหภูมิต่ำจะไม่เกิดขึ้น (สายชล, 2528) การศึกษาในต้นกล้าหรือผลแดงกวา ต้นข้าวโพด ผลมะเขือเทศ ผลพริกหวาน สนับสนุนทฤษฎีนี้โดยพบว่าการเปลี่ยนแปลงอัตราส่วนระหว่างกรดไขมันไม่อิ่มตัวและกรดไขมันอิ่มตัว มีปริมาณ phospholipid ในเยื่อหุ้มเพิ่มขึ้นสอดคล้องกับความเสียหายของเยื่อหุ้มเซลล์และการแสดงอาการ CI เนื่องจากอุณหภูมิต่ำ ในการให้สารชะลอการเจริญเติบโตแก่กล้าแดงกวาสามารถชะลออาการ CI มีความสัมพันธ์กับการชะลอการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบของไขมันในเยื่อหุ้ม (Whitaker and Wang, 1987; Parkin and Ku, 1989; Sharom *et al.*, 1994; Whitaker, 1995; Kaniuga *et al.*, 1999)

ในพืชที่ทนทานต่อความเย็นหรือพืชที่มีถิ่นกำเนิดในเขตหนาวมักมีอัตราส่วนหรือปริมาณของไขมันไม่อิ่มตัวสูงกว่าพืชที่มีถิ่นกำเนิดในเขตร้อน ทำให้เยื่อหุ้มยังคงรักษาสภาพอ่อนตัวและการทำงานของเซลล์ให้อยู่ในสภาพปกติ (Murata *et al.*, 1982; Roughan, 1985) การทำ chilling hardening กับต้นถั่ว *Phaseolus vulgaris* ซึ่งเป็นพืชที่ไวต่ออุณหภูมิต่ำ ทำให้พืชมีความทนต่ออุณหภูมิต่ำมากขึ้น เมื่อวิเคราะห์ชนิดของไขมันในใบพบว่าไขมันไม่อิ่มตัวเพิ่มขึ้น แต่การทำ drought hardening ในพืชชนิดเดียวกัน กลับไม่พบการเปลี่ยนแปลงของกรดไขมัน โดยอธิบายว่าปัจจัยเบื้องต้นในการชักนำให้เกิดความทนทานต่อ CI จากการขาดน้ำ อาจเกี่ยวข้องกับฮอร์โมนพืชบางชนิดที่มีผลต่อการเปิดของปากใบหรือการสูญเสียน้ำ (Wilson, 1976) การศึกษาด้านกล้าข้าวโพดและยาสูบ พบว่าความทนทานต่อการเกิด CI มีความสัมพันธ์กับการเปลี่ยนแปลงของฮอร์โมน abscisic acid (ABA) การให้ ABA มีผลในการยับยั้งการลดลงของ phospholipid และ glutathione ช่วยป้องกันการเกิด CI (Rikin *et al.*, 1979; Janowiak *et al.*, 2002)

การศึกษาในพืชคัดแปลงพันธุกรรมโดยการตัดต่อยีนที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบของ polyunsaturated fatty acid ซึ่งมีผลกระทบต่อความไวต่อการตอบสนองต่อ CI ยีนที่ได้รับความสนใจศึกษามากคือ ยีนที่ถอดรหัสให้โปรตีนหรือเอนไซม์ glycerol-3-phosphate acyltransferase (GPATs) ซึ่งมีบทบาทในการสังเคราะห์ phospholipid จาก glycerol-3-phosphate และมีความสัมพันธ์กับการเปลี่ยนแปลงปริมาณของไขมันไม่อิ่มตัว ใน phosphatidylglycerol (PG) ซึ่งเป็นลิพิดที่เป็นองค์ประกอบของเยื่อหุ้มกลุ่มเดียวที่สามารถชักนำให้เกิดการเปลี่ยนสถานะในสภาพหลอมเหลวและลิพิดกลุ่มนี้ส่วนใหญ่มาจากคลอโรพลาสต์ของใบ ดังนั้นการเปลี่ยนแปลงอาจเริ่มเกิดขึ้นในเยื่อหุ้มคลอโรพลาสต์ Murata *et al.* (1992) ทดลองถ่ายยีน acyltransferase จากต้นฝักซึ่งเป็นพืชที่มีความไวต่ออุณหภูมิต่ำให้กับต้นยาสูบซึ่งมีความไวต่ออุณหภูมิต่ำในระดับปานกลาง ทำให้ความทนทานต่ออุณหภูมิต่ำของต้นยาสูบลดลง แต่เมื่อถ่ายยีน acyltransferase จากต้น *Arabidopsis* ซึ่งเป็นพืชที่ไม่ไวต่ออุณหภูมิต่ำให้กับต้นยาสูบ ทำให้ต้นยาสูบมีความทนทานต่ออุณหภูมิต่ำเพิ่มขึ้น โดยมีความสัมพันธ์กับอัตราส่วนเพิ่มขึ้นของไขมันไม่อิ่มตัวที่เป็นองค์ประกอบของ PG แต่จากการศึกษาใน *fab1* ในต้น *Arabidopsis* กลายพันธุ์ ที่มีไขมันไม่อิ่มตัวลดลงหรือ มีเปอร์เซ็นต์ของไขมันอิ่มตัวสูงกว่าต้นปกติ แต่กลับพบว่าต้นกลายพันธุ์มีการตอบสนองต่ออุณหภูมิต่ำไม่แตกต่างกับต้นปกติ นอกจากนั้นการถ่ายยีน ω -3 fatty acid desaturase ซึ่งเร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนกรดไขมันไม่อิ่มตัว linoleic acid (18:2) เป็น α -linolenic acid (18:3) ในต้นยาสูบทำให้มีปริมาณกรดไขมันชนิดนี้ ใน phospholipids เพิ่มขึ้น แต่ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติของเยื่อหุ้มเซลล์ และยังมีการศึกษาอีกจำนวนมากที่สนับสนุนและไม่สนับสนุนความสัมพันธ์ระหว่างองค์ประกอบของไขมันกับความทนทานต่อการเกิด CI แต่อย่างไรก็ตามการศึกษาส่วนใหญ่พบว่าปริมาณไขมันไม่อิ่มตัวในเยื่อหุ้ม โดยเฉพาะ disaturated phosphatidylglycerols น่าจะมีผลกระทบในการตอบสนองของพืชต่ออุณหภูมิต่ำไม่ทางตรงก็ทางอ้อม แต่ไม่ได้เป็นปัจจัยหลักปัจจัยเดียวที่มีผลต่อความไวต่อ CI ของพืช (Murata and Yamaya, 1984; Miquel *et al.*, 1993; Wu and Browse, 1995; Hamada *et al.*, 1998)

Wang *et al.* (2006b) ศึกษาการเปลี่ยนแปลง profile ของกรดไขมันบางชนิดในต้น *Arabidopsis* โดยใช้เครื่อง electro spray ionization tandem mass spectrometry (ESI-MS/MS) พบว่าในต้นที่มีการปรับสภาพให้ทนทานต่ออุณหภูมิต่ำ (cold-acclimated) ที่อุณหภูมิ 4 °C เกิดการสะสมของไขมันไม่อิ่มตัวที่มีความจำเพาะต่อการเป็นสารตั้งต้นของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายไขมัน (lipolytic enzymes) และมี lipid metabolites บางชนิดเพิ่มขึ้น ซึ่งอธิบายได้ว่าในระหว่างการปรับสภาพให้ทนทานต่ออุณหภูมิเกิดการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ phospholipase

3.2 การเกิดสารอนุมูลอิสระ (Free radicals)

Shewfelt and del Rosario (2000) นำเสนอสมมติฐานการเกิด CI โดยมีอนุมูลอิสระเป็นตัวกลางที่สำคัญ ได้แก่ $\text{superoxide (O}_2^-)$ $\text{hydroxyl radical (}^\bullet\text{OH)}$ และ $\text{hydrogen peroxide (H}_2\text{O}_2)$ อนุมูลอิสระเหล่านี้จะถูกสร้างมากขึ้นในส่วนของไมโทคอนเดรียและคลอโรพลาสต์ เมื่อพืชได้รับความเครียดต่าง ๆ รวมทั้งความเครียดเนื่องจากอุณหภูมิต่ำ อนุมูลอิสระที่สร้างขึ้นมาก ทำให้เกิดความเสียหายให้กับโมเลกุลของไขมัน โปรตีน DNA รวมทั้งเยื่อหุ้ม โดยการเกิดปฏิกิริยากับกรดไขมันไม่อิ่มตัว (polyunsaturated fatty acid) ซึ่งเป็นส่วนประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์ โดยเกิดปฏิกิริยา lipid oxidation และชักนำให้เกิดการสะสมสารที่เป็นพิษต่อเซลล์พืช เช่น เอทานอล อะเซทาลดีไฮด์ ทำให้เยื่อหุ้มเสื่อมสภาพในเวลาต่อมา นอกจากนั้นการที่อนุมูลอิสระเข้าทำลายโปรตีนมีผลต่อการลดประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ที่ติดอยู่กับเยื่อหุ้มต่าง ๆ (membrane-bound enzymes) ทำให้เกิดความไม่สมดุลของกระบวนการเมแทบอลิซึม ทำให้เซลล์ตายในที่สุด แต่ตัวพืชเองก็มีกลไกควบคุมไม่ให้มีการผลิตอนุมูลอิสระมากเกินไป เรียกว่า ระบบต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant systems) ซึ่งมีทั้งที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระและจัดเป็นเอนไซม์ มีบทบาทในการควบคุมปริมาณอนุมูลอิสระให้อยู่ในระดับที่ไม่เป็นอันตรายต่อเซลล์พืช โดยแย่งจับอิเล็กตรอนอิสระ เพื่อทำให้อนุมูลอิสระหมดคุณสมบัติในการเป็นตัวออกซิไดซ์ การศึกษาที่สนับสนุนสมมติฐานนี้ได้แก่ การศึกษาในต้นกล้าของแตงกวา ถั่วเขียว ถั่วเหลืองและข้าวที่มีความไวต่ออุณหภูมิต่ำ เมื่อนำไปไว้ในที่อุณหภูมิสูงกว่าอุณหภูมิที่ทำให้เกิด CI ช่วงระยะเวลาหนึ่ง ก่อนนำไปไว้ในที่อุณหภูมิที่ทำให้เกิด CI (precondition) ทำให้มีความทนทานต่ออาการ CI มากกว่าต้นที่ไม่ได้ทำ precondition ซึ่งสาเหตุที่พืชมีความทนทานมากขึ้นเนื่องจากเอนไซม์ในระบบต้านอนุมูลอิสระบางชนิด เช่น catalase (CAT) superoxide dismutase (SOD) มีกิจกรรมเพิ่มมากขึ้น หรือมีการสร้างตัวต้านอนุมูลอิสระที่ไม่เป็นเอนไซม์บางชนิดเพิ่มขึ้น (MacRae and Ferguson, 1985; Prasad *et al.*, 1994; Kuk *et al.*, 2003; Posmyk *et al.*, 2005) แต่จากการศึกษาปริมาณตัวต้านออกซิเดชันในรูปของ total antioxidant capacity (TAC) ในเปลือกและเนื้อติด endocarp ของผลมะม่วงก่อนการเกิดอาการสะท้านหนาว พบว่าไม่มีความสัมพันธ์กับสายพันธุ์มะม่วงที่มีระดับความทนทานต่ออาการสะท้านหนาวต่างกัน (สุทิน, 2547)

การศึกษการให้ความร้อนในผลิตผลหลายชนิด เช่น ส้ม องุ่น มีผลในการชะลอการลดลงของเอนไซม์ในระบบต้านอนุมูลอิสระ CAT และ SOD ทำให้ผลผลิตต้านทานต่อการเกิด CI เพิ่มขึ้น (Sala and Lafuente, 2000; Zhang *et al.*, 2005) นอกจากนั้นพืชยังมีกลไกการกำจัดอนุมูล

อิสระในลักษณะพิเศษซึ่งพบในพริกยักษ์ เมื่อได้รับอนุมูลิดำโดยจะสร้างเอนไซม์ alternative oxidase (AOS) บนเยื่อหุ้มชั้นในของไมโทคอนเดรียมากขึ้น เอนไซม์นี้จะแย่งรับเอาอิเล็กตรอนออกไปจากระบบลำเลียงอิเล็กตรอนในกระบวนการหายใจปกติ และทำให้การสร้างอนุมูลอิสระลดลง (Purvis, 1997)

ในปัจจุบันได้มีความพยายามอธิบายความสัมพันธ์ร่วม (interlink) ระหว่างการสร้างอนุมูลอิสระกับความเครียดเนื่องจากอนุมูลิ พบว่าในสภาพที่มีความเครียดจากอนุมูลิ (temperature stresses) จะทำให้เกิดการผลิตอนุมูลอิสระเพิ่มมากขึ้น (stress-generated ROS) ซึ่งอาจทำหน้าที่เป็นสัญญาณ (ROS signaling) กระตุ้นให้เกิดกระบวนการป้องกันตนเอง (ROS defense หรือ temperature defense) ผ่าน ROS หรือ temperature sensor ปริมาณหรือระดับของอนุมูลอิสระที่ถูกสร้างขึ้นใหม่ อาจเป็นตัวกำหนดบทบาทการทำงานของอนุมูลอิสระ ในการทำหน้าที่เป็นสัญญาณกระตุ้นให้เกิดกระบวนการป้องกันตนเอง หรือกระตุ้นกระบวนการที่เกี่ยวข้องกับการทำลายเซลล์ (Suzuki and Mittler, 2006)

3.3 การเพิ่มขึ้นของความเข้มข้นของแคลเซียมไอออนในไซโตพลาสซึม

ทฤษฎีนี้เสนอโดย Minorsky ในปี 1985 ที่มาของทฤษฎีนี้ เกิดจากเซลล์พืชตอบสนองต่อ chilling โดยมีการเพิ่มขึ้นของ แคลเซียมไอออนในไซโตพลาสซึม มากกว่า 2 เท่า ซึ่งปกติแคลเซียมไอออนมีบทบาทต่อการเปลี่ยนแปลงกระบวนการเมแทบอลิซึมต่างๆ ของเซลล์ พืชที่มีความไวต่ออนุมูลิดำ (chilling-sensitive plant) ที่ได้รับอนุมูลิดำอย่างรวดเร็ว จะมีแคลเซียมอิสระเพิ่มขึ้นในไซโตพลาสซึมเป็นอย่างมาก ทำให้เกิดผลกระทบต่อการเปลี่ยนแปลงกระบวนการทางสรีรวิทยาหลายอย่าง การศึกษาในปัจจุบันสามารถอธิบายบทบาทและการทำงานของแคลเซียมไอออนต่อการเกิด CI ได้ชัดเจนขึ้น กล่าวคือแคลเซียมไอออนที่เพิ่มขึ้นเกี่ยวข้องกับการถ่ายโอนสัญญาณ โดยทำงานร่วมกับโปรตีน calmodulin แล้วจึงไปกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายกรดไขมันในเยื่อหุ้ม ทำให้เกิดกระบวนการ lipid oxidation และผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น ทำให้เยื่อหุ้มเซลล์เสื่อมสภาพ และสูญเสียคุณสมบัติในการคัดเลือกสาร นอกจากนี้การไหลของแคลเซียมไอออนเข้าสู่เซลล์ (Ca^{2+} influx) ยังเป็นสัญญาณกระตุ้นให้มีการสร้างอนุมูลอิสระเพิ่มมากขึ้น การเพาะเลี้ยงเซลล์ของข้าวโพด ในอนุมูลิดำที่ทำให้เกิด chilling การทดลองให้สารคีเลตและสาร channel blocker ของแคลเซียมไอออนในอาหารที่ใช้ ทำให้การผลิตอนุมูลอิสระและการเกิด lipid oxidation ให้เกิดขึ้นน้อยลง นอกจากนั้นการให้สาร abscisic acid

(ABA) จะยับยั้งการเพิ่มขึ้นของ Ca^{2+} influx ซึ่งจะช่วยป้องกันการชักนำการเกิด oxidative stress และทำให้เกิด CI น้อยลง (Chen and Li, 2001; Lukatkin, 2005)

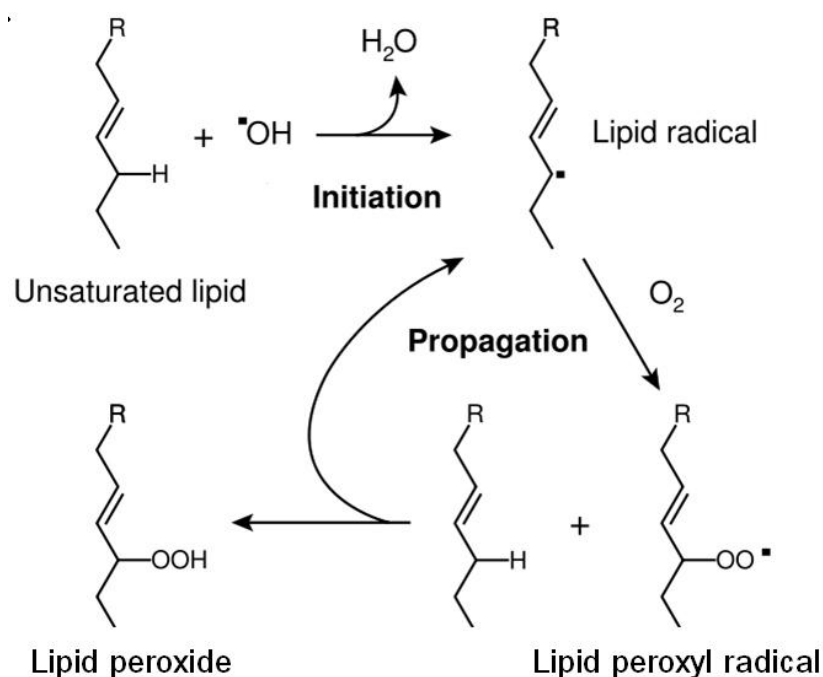
ทฤษฎีการเกิด CI ที่กล่าวมาข้างต้นมีความสัมพันธ์ร่วมกันอย่างมากต่อการเปลี่ยนแปลงของอนุมูลิ นอกจกามีผลกระทบต่อเปลี่ยนแปลงสถานะของเยื่อหุ้มแล้ว ยังทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติการยอมให้สารผ่านของเยื่อหุ้ม ซึ่งทำให้การทำงานของโปรตีนหรือเอนไซม์บนเยื่อหุ้มทำงานผิดปกติหรือเกิดความเสียหาย ในขณะที่เดียวกันก็ทำให้ไอออนของแคลเซียมที่มีอยู่มากในส่วนผนังเซลล์ ในออร์แกเนลล์อื่น เช่น ในไมโทคอนเดรีย หรือคลอโรพลาสต์ เคลื่อนย้ายผ่านเยื่อหุ้มเข้ามาในส่วนไซโตซอลและเกิดการกระตุ้นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายกรดไขมันอิสระ กรดไขมันเหล่านี้จะถูกออกซิไดซ์ด้วยเอนไซม์ lipoxygenase (LOX) ซึ่งทำให้เกิดอนุมูลอิสระเพิ่มมากขึ้น หรืออาจถูกเปลี่ยนไปเป็นไฮโดรคาร์บอนหรืออัลดีไฮด์ต่าง ๆ ทำให้เกิดความเสียหายต่อเยื่อหุ้มเซลล์และมีการเปลี่ยนสถานะของเยื่อหุ้มมากขึ้น จนทำให้คุณสมบัติความขบเซตของออร์แกเนลล์และเซลล์หมดลง เกิดการรั่วไหลของประจุเพิ่มมากขึ้นและเซลล์ตายในที่สุด (Marangoni *et al.*, 1996) จะเห็นได้ว่าการเกิด CI เป็นปรากฏการณ์ที่มีความซับซ้อน ลำดับขั้นตอนของเหตุการณ์ที่เกิดขึ้น ที่ทำให้เกิดความเสียหายกับเซลล์พืชแต่ละชนิด ไม่จำเป็นต้องเหมือนกัน หรือมีสาเหตุแรกๆที่เหมือนกันในทุกพืช การศึกษาในพืชบางชนิดจำเป็นต้องใช้มากกว่าหนึ่งทฤษฎีในการอธิบาย

4. Lipid peroxidation กับ การเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติของเยื่อหุ้มเซลล์

การศึกษาในอดีตพบว่าในระหว่างกระบวนการแก่หรือการเข้าสู่ระยะการเสื่อมสภาพ (senescence) ของพืชหรือผลิตผลหลายชนิด เช่น มันฝรั่ง บร็อคโคลี่ มีการเกิด lipid peroxidation (LP) และผลิตภัณฑ์เพิ่มขึ้นสัมพันธ์กับการสูญเสียคุณสมบัติของเยื่อหุ้มเซลล์ (Kumar and Knowles, 1993; Zhuang *et al.*, 1997) การศึกษาในปัจจุบันโดยใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุลช่วยยืนยันบทบาทสำคัญของ LP ต่อความเสียหายของเยื่อหุ้มเซลล์ ซึ่งเกี่ยวข้องกับการสลายตัวของกรดไขมันที่คาร์บอนมีพันธะคู่ (poly unsaturated fatty acids; PUFAs) ได้แก่ linoleic acid โดยปฏิกิริยาออกซิเดชัน ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ fatty acid radical ที่มีหมู่ hydroperoxide หรือ aldehyde ซึ่งสามารถกลับไปออกซิไดซ์ ที่ส่วนหางของกรดไขมันใน lipid ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง (conformation change) ซึ่งมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติการคัดเลือกสารเข้าออกและความเสียหายของเยื่อหุ้มเซลล์ (Wong-ekkabut *et al.*, 2007) ในสถานะที่พืชหรือผลิตผลได้รับความเครียดจากสิ่งแวดล้อม ไม่ว่าจะเป็นอนุมูลิหรือการขาดน้ำ จะมีการสะสมของ free fatty

acid ซึ่งเป็นสารตั้งต้นของการเกิด LP เพิ่มมากขึ้น จึงชักนำให้มีการเกิด LP มากขึ้น และส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบของไขมันและคุณสมบัติของเยื่อหุ้มเซลล์ (Barclay and McKersie, 1994; Gardner, 1995) โดยมีกลไกการทำงานของ LP ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายกรดไขมัน (fatty acid oxidation) แบ่งได้เป็น 3 ปฏิกิริยา ดังนี้

1. Auto-oxidation เกิดขึ้นโดยกรดไขมันไม่อิ่มตัวเกิดปฏิกิริยากับ free radical มี 3 ขั้นตอน ดังนี้ ดังภาพ



ภาพที่ 1 ปฏิกิริยาลูกโซ่ของ radical กลไกการเกิด lipid peroxidation

ที่มา: http://commons.wikimedia.org/wiki/Image:Lipid_peroxidation.svg

ขั้น initiation เป็นช่วงที่เกิดการสร้าง lipid radicals โดยอนุมูลอิสระ เช่น $\cdot\text{OH}$ จะเข้าจับกับโมเลกุลไฮโดรเจน ในกรดไขมันไม่อิ่มตัว กลายเป็นโมเลกุลน้ำ และ lipid radical ซึ่งเป็นโมเลกุลที่ไม่เสถียร ในขั้น propagation โมเลกุลของ lipid radical จากขั้นแรกจะเข้าทำปฏิกิริยากับโมเลกุลออกซิเจนเปลี่ยนแปลงเป็น lipid peroxyl radical ทำให้มีความไม่เสถียรเพิ่มมากขึ้น ซึ่งอาจเปลี่ยนไปเป็น lipid peroxide หรือย้อนกลับไปทำปฏิกิริยากับกรดไขมันไม่อิ่มตัว (สารตั้งต้น) เปลี่ยนเป็น lipid radical เพิ่มมากขึ้น ส่วนขั้น termination เป็นขั้นตอนสุดท้าย เป็นการหยุดปฏิกิริยาการผลิต radical ที่เป็นปฏิกิริยาที่เป็นแบบลูกโซ่ในขั้น propagation โดยการเปลี่ยนเป็น

โครงสร้างที่ไม่มีคุณสมบัติเป็น radical เช่น lipid peroxide (LOOH) ซึ่งอาจเปลี่ยนไปสาร โมเลกุล
 ต่ำอื่น ๆ เช่น aldehydes

2. Photo-oxidation เกี่ยวข้องกับการเกิดปฏิกิริยาของกรดไขมันไม่อิ่มตัว กับ singlet
 oxygen (O_2) ที่มีการสร้างขึ้นจากออกซิเจนในกระบวนการสังเคราะห์แสง ปฏิกิริยาเกิดขึ้นรวดเร็ว
 กว่า กระบวนการ auto-oxidation และการทำปฏิกิริยาเกิดในตำแหน่งของโครงสร้างไขมันที่
 แตกต่างกัน ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่เป็น 12 หรือ 13-hydroperoxide ปกติพืชมีระบบป้องกันการเกิด
 photo-oxidation โดยมีสารพวก carotenoids หรือ tocopherols ซึ่งจะไปรบกวนหรือลดการผลิต O_2

3. Enzymatic peroxidation เอนไซม์ LOXs (EC 1.13.11.12) เป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยา
 การเติมออกซิเจนในการเกิด LP และมีความสัมพันธ์กับกระบวนการ auto-oxidation ของกรด
 ไขมัน โดย LOX เร่งปฏิกิริยาการสลายตัวของพันธะคู่ *cis-cis* unsaturated diene ใน PUFAs ได้แก่
 linoleic acid (back bone) ($r = 0.51$ nm) ทำให้เกิดผลิตภัณฑ์ที่เป็นอนุพันธ์ของ *cis-trans*-diene
 hydroperoxyl ได้แก่ 9 hydroperoxides (9-HP) ($r = 0.44$ nm) และ 13 hydroperoxides (13-HP) ($r =$
 0.39) ซึ่งมีผลต่อการเพิ่มจำนวนโมเลกุลในเยื่อหุ้มได้มากขึ้นและทำให้เพิ่มความไม่ยืดหยุ่นของเยื่อ
 หุ้ม หรือความแข็ง (rigidity) ของเยื่อหุ้ม และสร้าง PUFA free radical ที่สามารถเปลี่ยนเป็น
 peroxy ($ROO^\cdot$) alkoxy ($RO^\cdot$) หรือ $O_2^\cdot$ ในการทำงานของ LOX มี hydroperoxides และ oxylipins
 เป็นผลิตภัณฑ์ตัวกลางที่สามารถกลับเข้าไปทำปฏิกิริยากับ LOX หรือเปลี่ยนเป็นสารอื่น เช่น
 aldehydes ketones alcohols หรือ jasmonates ซึ่งมีบทบาทต่อกระบวนการที่เกี่ยวข้องกับการ
 พัฒนาหรือการตอบสนองของพืชต่อการเกิดบาดแผลหรือการเข้าทำลายของโรคหรือแมลง รวมทั้ง
 ตอบสนองต่อสภาพเครียดเนื่องจากสิ่งแวดล้อม เช่น อุณหภูมิต่ำ หรือการขาดน้ำ (Porta *et al.*,
 1999; Porta and Rocha-Sosa, 2002; Liavonchanka and Feussner, 2006) การให้สารพวกอนุพันธ์
 ของ jasmonic acid กับพืชผลบางชนิด เช่น ผลฝรั่ง ช่วยลด CI เนื่องจากอนุพันธ์ของ jasmonic
 acid มีการกระตุ้นกระบวนการ defense mechanisms โดยมีการเพิ่มกิจกรรมของเอนไซม์ LOX และ
 PAL เพิ่มการสะสมสารประกอบฟีนอลิกและปริมาณน้ำตาลในพืช (González-Aguilar *et al.*,
 2004) นอกจากนั้นการให้ methyl jasmonate (MeJA) กับใบโหระพา ชักนำให้ยีนหลายชนิดมีการ
 แสดงออกเพิ่มขึ้น ส่วนใหญ่เป็นยีนที่มีบทบาทต่อการสร้าง secondary metabolites รวมทั้งยีน LOX
 และ PPO โดยมีการสังเคราะห์สารประกอบฟีนอลิกและสารที่เป็นน้ำมันหอมระเหยบางชนิด
 เพิ่มขึ้น (Li *et al.*, 2007)

LOXs ในเซลล์พืชโดยทั่วไปพบได้ทั้งใน lipid bodies microsomal และ plasma membrane โดยพบส่วนต่าง ๆ ของพืช ซึ่งมี isozymes จำนวนมาก ตัวอย่างเช่น ในต้นอ่อนของแตงกวามี LOX จำนวน 5 isozymes ส่วนในใบถั่วเหลืองมี LOX 6 isozymes ชนิดพืชที่มีการศึกษาเอนไซม์หรือยีน LOX มากที่สุดคือ ถั่วเหลืองและมันฝรั่ง LOX-1 และ LOX-2 ที่พบในถั่วเหลือง มีความยาวของ amino acid และน้ำหนักโมเลกุลแตกต่างกัน LOX-1 ประกอบด้วย single polypeptide chain มีความยาว 838 amino acid มีน้ำหนักโมเลกุล 94 KD มีส่วน conserve ที่ Cys 4 ตำแหน่ง และ Trp residues ส่วน LOX-2 มีความยาว 865 amino acids มีน้ำหนักโมเลกุล 97 KD มี conserve region ที่ Cys 2 ตำแหน่ง และ histidine-rich region 6 ตำแหน่ง บริเวณนี้มีบทบาทต่อการจับกับ iron ซึ่ง iron มีความสำคัญต่อการเร่งปฏิกิริยาโดย LOX โดยทำงานเหมือน electron shutter สนับสนุนการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน-รีดักชัน โดยการให้หรือรับอิเล็กตรอนและมีการเปลี่ยนแปลงไปมาระหว่าง Fe^{+2} เป็น Fe^{+3} ในวิธีการเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันโดย LOX (Wong, 1995; Feussne and Wasternack, 2002; Baysal and DemirdvÖen, 2007)

5. การเกิดสีน้ำตาลเนื่องจากปฏิกิริยาเอนไซม์ (Enzymatic browning)

การเกิดสารสีน้ำตาล เริ่มต้นจากการสังเคราะห์สารประกอบฟีนอลิก โดยการรวมตัวของโมเลกุล phosphoenol pyruvic acid จาก glycolysis และ erythrose-4-phosphate จาก calvin cycle หรือ pentose phosphate pathway เข้าสู่ shikimate pathway ได้ผลิตภัณฑ์ aromatic amino acids กรดอะมิโน tyrosine tryptophan และ phenylalanine ซึ่งเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์สารประกอบฟีนอลิก ผ่าน phenylpropanoid pathway โดยเอนไซม์ PAL ทำหน้าที่เป็นสารเร่งปฏิกิริยา โดยการดึงหมู่อะมิโนออกจาก สาร phenylalanine เปลี่ยนเป็นสาร cinnamic acid จากนั้นจะเปลี่ยนเป็นสารประกอบฟีนอลิกรูปแบบต่าง ๆ เช่น *p*-coumaric acid feruric acid และ sinapic acid สารเหล่านี้มีการเปลี่ยนแปลงเป็นสารประกอบ phenylpropanoid และสะสมในส่วน of แวกิวโอล เมื่อพืชอยู่ในสภาพเครียด เช่น การสูญเสีย น้ำ การเก็บรักษาในอุณหภูมิที่สูงหรือต่ำเกินไป การเข้าทำลายของเชื้อโรค การเกิดการบอบช้ำ หรือบาดแผล ทำให้เชื้อหุ้มแวกิวโอลเกิดความเสียหาย สารประกอบฟีนอลิกจึงเข้าทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ PPO ที่อยู่ในส่วนไซโทพลาซึม กลายเป็นสาร quinone ซึ่งเป็นสารไม่มีสี แต่มีความไวต่อการรวมตัวกันเองหรือรวมตัวกับโปรตีนที่อยู่ในเซลล์เป็นสารโมเลกุลใหญ่ กลายเป็นสารสีน้ำตาล (Davin and Lewis, 1992; Dixon and Paiva, 1995; Amiot *et al.*, 1997)

ปัจจัยที่มีผลต่อความไวและความรุนแรงของการเกิดสีน้ำตาล ได้แก่ ลักษณะเฉพาะของพืช หรือปริมาณหรือชนิดของสารตั้งต้น กิจกรรมของเอนไซม์ที่ออกซิไดซ์ออกซิเจนเป็นสารสีน้ำตาล รวมทั้งสภาพการเก็บรักษา ผักใบแต่ละชนิดอาจมีสารประกอบฟีนอลิกหรือสารตั้งต้นที่ทำให้เกิดสีน้ำตาลแตกต่างกัน สำหรับพืชสมุนไพรในวงศ์ Labiatae มีเนื้อเยื่อใบที่อ่อนบาง และมีสารประกอบฟีนอลิกเป็นองค์ประกอบในใบจำนวนมาก จึงอาจมีการเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลง่าย ในผลิตภัณฑ์โหระพาอบแห้งมีสารในกลุ่มอนุพันธ์ของ hydroxycinnamol ในรูป 3-caffeoyl esters ปริมาณมากกว่า 2% คือน้ำหนักแห้ง สารประกอบฟีนอลิกที่พบมากที่สุดคือ rosmarinic acid และมี PPO เป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล นอกจากนั้นสภาพของเหลวในเซลล์มีความเป็นกรดต่ำ ประมาณ 5.6 จึงเอื้อต่อการเกิดสีน้ำตาลง่ายขึ้น อีกทั้งยังพบว่าปริมาณ rosmarinic acid มีปริมาณลดลงมากกว่า 50% ในระหว่างการเปลี่ยนสีของใบโหระพาที่มีการอบในสภาพไม่เหมาะสม (Buritau *et al.*, 1991; Zgorka and Glowinski, 2001; Venere *et al.*, 2002)

การศึกษาการสังเคราะห์สารประกอบฟีนอลิกในใบโหระพา พบว่าใบโหระพามีอนุพันธ์ของ phenylpropanoid ที่มีปริมาณมาก ได้แก่ eugenol rosmarinic acid และ caffeic acid ในใบและขนของใบ (Gang *et al.*, 2001) นอกจากนั้นยังพบว่า PAL ในใบโหระพา เป็นชนิดใหม่ที่แตกต่างจากพืชอื่นคือ chemotype และ methyl cinnamate ลักษณะของเอนไซม์เป็น homotetramer มีน้ำหนักโมเลกุล 152 และ 153 KD แต่ละ subunit ประกอบด้วยโมเลกุลขนาด 38 KD เอนไซม์มีค่า Km เท่ากับ $329 \mu\text{mol}$ และมีค่า V_{max} เท่ากับ $11.43 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{protein}$ (Zhigang *et al.*, 1996)

เอนไซม์ PPO จัดว่าเป็นเอนไซม์ที่มีการศึกษาและมีบทบาทต่อการเกิดสีน้ำตาลมากที่สุด เอนไซม์ PPO ถูกค้นพบครั้งแรกในเห็ด โดย Schoebeen ในปี 1856 ต่อมาได้มีรายงานการค้นพบเอนไซม์ PPO ในสิ่งมีชีวิตเกือบทุกชนิด ทั้งเชื้อรา แบคทีเรีย พืช แมลง รวมทั้งมนุษย์ แต่มีชื่อเรียกหลายชื่อแตกต่างกันออกไปตามชนิดของสารตั้งต้น ได้แก่ tyrosinase phenolase catechol oxidase monophenol oxidase diphenol oxidase cresolase และ catecholase เป็นต้น ในพืชชั้นสูงจัดเอนไซม์นี้เป็น protection enzyme พืชจะสร้างเอนไซม์นี้ เพื่อต่อต้านแมลง จุลินทรีย์ และเมื่อได้รับบาดเจ็บ โดยพืชสร้างรงควัตถุสีน้ำตาลหรือเมลานิน ทำให้บาดเจ็บแห้งและปกป้องไม่ให้จุลินทรีย์เข้าทำลายพืช เอนไซม์ที่พบในเยื่อหุ้มเซลล์ของเนื้อเยื่อพืชส่วนใหญ่อยู่ในรูปไม่ทำงาน (inactive) ในลักษณะ membrane-bound enzyme หรือ proenzyme ซึ่งต้องการตัวกระตุ้น จึงสามารถทำงานได้ โครงสร้างของเอนไซม์ PPO ส่วน active site ประกอบด้วย 2 domain มีส่วนของโมเลกุลทองแดงอยู่ตรงกลาง 2 อะตอม เชื่อมต่อกัน ซึ่งเป็นบริเวณที่ออกซิเจนจะเข้ามาจับและ

มีการขนส่งออกซิเจน อะตอมของทองแดงแต่ละอะตอมจะจับกับ histidine residue จำนวน 3 ตัว และส่วนของ histidine นี้จะปรากฏมากบริเวณอนุรักษ์ (conserve region) อะตอมของทองแดงมีความสำคัญต่อการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์ PPO ถ้ามีการเพิ่มสารคอปเปอร์ซัลเฟต ในสารสกัดจากพืช ปฏิกิริยาออกซิเดชันของ monophenol และ *o*-phenol จะเกิดเร็วขึ้น แต่ถ้ามีการให้สารพกรีดักชัน เช่น ascorbate จะเข้าไปจับที่ทองแดง ทำให้เอนไซม์เปลี่ยนอยู่ในรูปไม่ทำงาน ส่วนบทบาทของ histidine พบว่าถ้าหมู่ histidine หลุดออกจะทำให้ หมู่ทองแดงหลุดออกและ กิจกรรมของเอนไซม์เพิ่มขึ้น (Wong, 1995)

การศึกษายีนและโปรตีนของเอนไซม์ PPO ที่เกี่ยวข้องกับการเกิดสีน้ำตาลในส่วนต่างๆ ของพืชเช่น ถั่วลิสง มันเทศ พบว่าชนิดของยีนและการแสดงออกแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดและอายุของเนื้อเยื่อ ยีน *IbPPO* ในมันเทศ มีความยาว 1984 bp ถอดรหัสเป็นโปรตีนความยาว 588 amino acids มีน้ำหนักโมเลกุล 657 kDa มีส่วน conserve Cu A และ Cu B ยีนมีการแสดงออกมากที่สุด ในส่วนราก ร่องลงมาได้แก่ใบอ่อนและใบแก่ ตามลำดับ ในส่วน petiole มีการแสดงออกน้อยที่สุด (Liao *et al.*, 2006) ในผลถั่วลิสงพบยีน PPO ชนิดใหม่จากโคลนของ cDNA จำนวน 4 โคลนคือ *BPO1*, *BPO11*, *BPO34*, *BPO35* ซึ่งมีการแสดงออกในระยะเวลาพัฒนาผลที่แตกต่างกัน *BPO1* มีการแสดงออกในเนื้อของผลอ่อนแต่ไม่มีการแสดงออกในเปลือก และ *BPO11* มีการแสดงออกเฉพาะผลที่ยังอ่อนมากๆ ส่วนยีน *BPO34* และ *BPO35* ไม่มีการแสดงออกในผล ยีน *BPO* ยังมีการแสดงออกในดอก ลำต้น รากและใบอ่อนที่อยู่ในระยะใบม้วน แต่ไม่มีการแสดงออกในใบแก่ แต่จะพบการแสดงออกของยีน *BPO34* เฉพาะในใบแก่เท่านั้น ยีน *BPO1* ที่น่ามีบทบาทเกี่ยวข้องกับการเกิดสีน้ำตาลในผลถั่วลิสงมากที่สุด (Gooding *et al.*, 2001) การใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุลในการควบคุมการเกิดสีน้ำตาลในมันฝรั่ง โดยทำการถ่ายยีนส่วนของ RNA ของยีน PPO แบบสวนทิศทาง (antisense RNA) พบว่า 70% ของพืชที่มีการถ่ายยีนมีกิจกรรมของเอนไซม์ PPO ลดลงมากกว่าต้นปกติ และมีการเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลช้ากว่าต้นปกติอย่างเห็นได้ชัด (Martinez and Whitaker, 1995) เช่นเดียวกับการศึกษาในแคลลัสของแอปเปิ้ลที่มีการถ่าย antisense PPO พบว่าแคลลัสมีกิจกรรมของเอนไซม์ PPO ลดลงครึ่งหนึ่ง เมื่อเปรียบเทียบกับแคลลัสที่ไม่ได้มีการถ่ายยีนแคลลัสเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลช้าลงและเกิดยับยั้งการแสดงออกของยีน PPO (Murata *et al.*, 2001)

6. การควบคุมอาการสะท้านหนาว

การควบคุมอาการสะท้านหนาวในผักใบและผลไม้หลังการเก็บเกี่ยวที่มีการประยุกต์ใช้ในเชิงการค้ามี 2 แนวทางหลักคือ การใช้วิธีทางกายภาพ ได้แก่ การปรับสภาพก่อนการเก็บรักษา

(Conditioning) การให้ความร้อน หรือการใช้สภาพดัดแปลงบรรยากาศ และการใช้วิธีทางเคมี สารเคมีสามารถลดอาการสะท้อนหนาวในพืชผักและไม้ผล ได้แก่ 1-methylcyclopropene (1-MCP) salicylic acid (SA) jasmonic acid (JA) methyl salicylate (MeSA) และ methyl jasmonate (MeJA)

6.1 การใช้สาร 1-MCP

1-MCP เป็นสารยับยั้งการทำงานของเอทิลีน โดยการจับกับส่วน receptors ของเอทิลีน และป้องกันการตอบสนองของพืชต่อเอทิลีน (Sisler and Serek, 2003) การใช้สาร 1-MCP มีผลในการยืดอายุการเก็บรักษาและลดความรุนแรงของการเกิดอาการสะท้อนหนาวในผักใบ ได้แก่ ผักชี พาสเลย์ และผักในเขตเอเชียหลายชนิด โดยไปลดกระบวนการเสื่อมสภาพของใบพืช ได้แก่ ลดอัตราการสลายตัวของคลอโรฟิลล์ ลดการสลายตัวของโปรตีนหรือการสะสมของ amino acids (Jiang *et al.*, 2002; Able *et al.*, 2003; Ella *et al.*, 2003) พืชและผลผลิตแต่ละชนิดมีการตอบสนองต่อ 1-MCP และการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมี ที่เกี่ยวข้องกับความผิดปกติเนื่องจากการเก็บรักษาในอุณหภูมิต่ำในลักษณะที่แตกต่างกัน การให้ 1-MCP กับผลแอปเปิล อะโวคาโด และสับปะรด ช่วยลดความผิดปกติจากอาการสะท้อนหนาว เช่น superficial scald หรือการเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลในส่วนของเนื้อผล แต่การให้ 1-MCP กับผลท้อ บัวยและผลส้ม ทำให้เกิดความผิดปกติเพิ่มขึ้นเนื่องจากผลไม้เหล่านี้ต้องการเอทิลีนในการเร่งกระบวนการสุก แต่สำหรับความผิดปกติเนื่องจากการชักนำของเอทิลีน เช่น การเกิดสีน้ำตาลในส่วนที่มีการตัดแต่งของผักสลัด การเกิดอาการจ้ำน้ำในผลแตงโม หรือการสะสมสาร isocoumarin ในหัวแครอท สามารถลดความผิดปกติโดยการให้ 1-MCP ก่อนเก็บรักษาหรือก่อนการตัดแต่ง (Waltkins, 2006) ดังนั้นการใช้ 1-MCP จึงจำเป็นต้องเข้าใจบทบาทและเมแทบอลิซึมของเอทิลีนในผลิตผลนั้น ๆ ก่อน จึงจะสามารถใช้สารชนิดนี้ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

6.2 การใช้สาร SA JA MeSA และ MeJA

สาร SA และอนุพันธ์ของ SA เป็นโมเลกุลสัญญาณที่พืชสร้างขึ้น หลังจากพืชต่อความเครียดจากสิ่งแวดล้อม การเข้าทำลายของโรคหรือแมลง กระตุ้นให้พืชมีการตอบสนองโดยการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีต่างๆ ในการป้องกันตัวเอง (Klessig and Malamy, 1994) การใช้สาร MeJA ในการลดการเกิด CI มีรายงานครั้งแรกในปี 1994 โดยทำการศึกษาในผลแตงงูจีนี ซึ่งสาเหตุการลด CI ในพืชชนิดนี้ เกี่ยวข้องกับการเพิ่มขึ้นของปริมาณ ABA และ polyamine (Wang and Buta, 1994) แต่การศึกษาในผลฝรั่งรายงานว่า ความต้านทานของ CI มีความสัมพันธ์กับการ

เพิ่มขึ้นของปริมาณน้ำตาล กิจกรรมเอนไซม์ LOX PAL และการสะสมของสารประกอบฟีนอลิก (González-Aguilar *et al.*, 2004) นอกจากนั้นสาร MeJA ยังชักนำให้มีการแสดงออกของ alternative oxidase (AOX) เพิ่มขึ้น เพิ่มการสะสมของ heat shock protein (HSP) เพิ่มกิจกรรมของ เอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ และเพิ่ม antioxidant capacity ที่มีบทบาทต่อการปรับตัวของพืชให้ทนต่อการเกิด CI (González-Aguilar *et al.*, 2006) เอนไซม์ AOX มีการทำงานลักษณะคล้ายกับ เอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ โดยจะลดการเกิด free radical ในไมโทคอนเดรีย (Purvis, 1997)

6.3 การใช้สภาพดัดแปลงบรรยากาศ (modified atmosphere)

การห่อหุ้มผลิตผลด้วยฟิล์มหรือถุงพลาสติกระหว่างการเก็บรักษา ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบของบรรยากาศรอบผลิตผล เนื่องจากการใช้ออกซิเจนและการปลดปล่อย คาร์บอนไดออกไซด์และน้ำของผลิตผลในกระบวนการหายใจ ทำให้เกิดสภาพดัดแปลงบรรยากาศ (Kader, 1986) การใช้สภาพดัดแปลงบรรยากาศช่วยลดความผิดปกติจากอาการ CI ในการขนส่ง หรือเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำในผลไม้หลายชนิด เช่น มะม่วง กล้วย ส้ม แต่ประสิทธิภาพในการชะลอ CI ขึ้นอยู่กับชนิดของพืชและระดับความชื้นสัมพัทธ์ ในการเก็บรักษาผลมะม่วงที่ความชื้นสัมพัทธ์ 90% (บรรจุในถุงพอลิเอทิลีน) แรงการเน่าเสียของผลผลิต แต่ความชื้นสัมพัทธ์ที่สูงกว่า 90% ไม่มีผลต่อการเน่าเสียของผลส้มและมีความเสียหายจาก CI เพียงเล็กน้อย (Pesis *et al.*, 2000; Henroid, 2006) สาเหตุของการลด CI เกี่ยวข้องกับการลดอัตราการหายใจ การผลิตเอทิลีน ชะลอกระบวนการสุกและการอ่อนนุ่มของผล การลดกิจกรรมของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการเกิดสีน้ำตาลเช่น PAL PPO และลดปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด ในผลกล้วยหรือหัว fennel ที่เก็บรักษาในอุณหภูมิต่ำ (Escalona *et al.*, 2004; Nguyen *et al.*, 2004) การเก็บรักษาใบกระเพราเขียว (*Ocimum sanctum* L.) ในถุงพอลิเอทิลีนที่บรรจุตัวดูดซับเอทิลีนหรือมีความเข้มข้นเริ่มต้นของ คาร์บอนไดออกไซด์ 5 % สามารถรักษาสภาพคุณภาพภายนอกที่อุณหภูมิ 13°C ได้นาน 12 วัน แต่ปริมาณ methyl eugenol ซึ่งเป็นน้ำมันหอมระเหยที่พบมากในใบแก่ มีปริมาณลดลงระหว่างการเก็บรักษา (Wongs-Aree and Jirapong, 2007)

6.4 การใช้ความร้อน (heat treatment)

ในอดีตการใช้ความร้อนหลังการเก็บเกี่ยว มีจุดประสงค์เพื่อป้องกันกำจัดหนอน แมลง หรือป้องกันโรคในผลิตผลหลายชนิด เช่น ดอกไม้ ผลไม้และผัก การใช้ความร้อนกับผลิตผลสดมี 3 วิธี ได้แก่ การใช้น้ำร้อน การใช้ไอน้ำและการใช้อากาศร้อน การใช้ไอร้อนสามารถใช้ควบคุม

ได้ทั้งเชื้อราและแมลง และนิยมใช้ในศึกษาการตอบสนองของพืชต่อการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยา (Lurie, 1998) การตอบสนองของผลผลิตต่อความร้อนมีลักษณะที่แตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดหรือลักษณะกายภาพของผลผลิต วิธีการให้ความร้อน ช่วงระยะเวลาและอุณหภูมิที่ใช้ ในผลไม้และผักผลประเภท climacteric พบว่าความร้อนมีผลต่อการชะลอการสุกของผล โดยการยับยั้งเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายผนังเซลล์ ยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ ACS และ ACO และชะลอการผลิต ACC ซึ่งทำให้เกิดการยับยั้งการสังเคราะห์เอทิลีน และเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีน (Klein and Lurie, 1990; Ketsa *et al.*, 1999)

พืชที่ได้รับอุณหภูมิที่สูงกว่า 35°C ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของ polyribosome ส่วนใหญ่มีการแยกออกจากกัน แต่ polyribosome ของ heat shock protein (HSP) ที่ชอบสภาพอุณหภูมิสูงจะมีการจับตัวกัน แปรรหัสเป็น mRNA (Ferguson *et al.*, 1994) ในผลไม้เขือเทศที่ได้รับความร้อนสามารถลดอาการ CI มีความสัมพันธ์กับการแสดงออกของยีน HSPs แต่ระบุว่าอาจมีสาเหตุอื่นหรือปัจจัยอื่นที่เกี่ยวข้องกับความต้านทานต่อ CI ของผลไม้เขือเทศ (Vlachonasios, 1999) เอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระหลายชนิด เช่น CAT SOD POD หรือ APX มีกิจกรรมเพิ่มขึ้นหลังจากได้รับความร้อน และชะลอความเสียหายจากการเกิด CI ในผลผลิตหลายชนิด เช่น ส้มแมนดาริน สตรอเบอรี่ (Vicente *et al.*, 2006 ; Ghasemnezhad *et al.*, 2007) การปรับสภาพพืชโดยการให้ความร้อนเป็นช่วงเวลานาน สามารถชักนำให้ผลสัมฤทธิ์ความต้านทานต่อความเย็น โดยพบการสังเคราะห์ transcription factors ชนิดใหม่ มีการกระตุ้นให้เกิด secondary metabolism และ stress-related proteins (Sanchez-Ballesta *et al.*, 2003) สารเคมีหลายชนิดที่มีบทบาทเป็น signal molecule เช่น SA MeJA สามารถชักนำให้เกิดการสร้าง HSP เช่นเดียวกันกับการให้ความร้อน HSP ที่พืชสร้างขึ้นอาจจะมีบทบาทสำคัญในการปรับตัวในสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม (González-Aguilar *et al.*, 2006)

การประยุกต์ใช้ความร้อนสูงในช่วงเวลาสั้น ๆ สามารถลดความเสียหายจากอาการสะท้านหนาวของพืชที่มีความไวต่ออุณหภูมิต่ำและการเกิดสีน้ำตาลในผักพร้อมบริโภคบางชนิด การให้ความร้อนกับขมิ้นหรือขมิ้นที่อุณหภูมิ 38°C นาน 4-8 ชั่วโมงก่อนการเก็บรักษาในอุณหภูมิ 9°C ทำให้ขมิ้นหรือขมิ้นมีความไวต่ออาการสะท้านหนาวลดลง มีความสัมพันธ์กับการแสดงออกของยีนที่ถอดรหัสเป็นโปรตีนหรือเอนไซม์ ribulose 1-5 bisphosphate carboxylase oxygenase (Rubisco) ซึ่งมีบทบาทในการย่อยสลายโปรตีน (Aharoni *et al.*, 2004; Faure *et al.*, 2004) ในการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 45°C เป็นเวลา 4 ชั่วโมงกับผักกาดหอมห่อพันธุ์ Iceberg ก่อนเกิดบาดแผลจากการหั่นชิ้นหรือการให้ความร้อนที่ 45°C นาน 2 ชั่วโมง หลังจากหั่นชิ้น ชะลอการทำงานของเอนไซม์ PAL

และลดการสะสมของสารประกอบฟีนอลิก สัมพันธ์กับการชะลอการเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลของ
 บาดแผลจากการหั่นชิ้น (Salveit, 2000) ในผลทับทิมพบว่าการจุ่มผลในน้ำร้อน 45°C เพียง 4 นาที
 สามารถลดอาการสะท้อนขาวหรือชะลอการเปลี่ยนสีเปลือกเป็นสีน้ำตาล เกี่ยวข้องกับการกระตุ้น
 การสังเคราะห์ free polyamines บางชนิด การชะลอการลดลงของอัตราส่วนของกรดไขมันไม่อิ่มตัวต่อกรดไขมันอิ่มตัวและการคงสภาพการเป็นของไหลของเยื่อหุ้มเซลล์ (Mirdehghan *et al.*,
 2007)

อุปกรณ์และวิธีการ

ใบพืชสกุลกะเพราที่ใช้ทดลอง ซื้อมาจากแปลงเกษตรกรรายเดียว ที่มีการปลูกเป็นการค้า ทั้ง 3 ชนิดและปลูกหมุนเวียนตลอดทั้งปี มีที่ตั้งในหมู่ 7 ตำบลทุ่งบัว อำเภอกำแพงแสน จังหวัด นครปฐม ดินปลูกในพื้นที่นี้จัดอยู่ในชุดดินกำแพงแสน หรือ fine-silty soil การเก็บเกี่ยวหลังจาก ย้ายปลูกประมาณ 50 วันในช่วงเวลา 7.00-8.00 น. โดยใช้มีดตัดกิ่ง มีความยาวประมาณ 25 เซนติเมตร ห่อด้วยกระดาษหนังสือพิมพ์ ห่อละประมาณ 1 กิโลกรัม บรรจุลงในถุงพลาสติก น้ำหนักผักไม่เกิน 3 กิโลกรัม แล้วขนย้ายมาห้องปฏิบัติการด้วยรถยนต์ ทำการคัดเลือกและตัดแต่ง ผักที่มีรอยชำหรือมีการเข้าทำลายของโรคและแมลง แล้วล้างทำความสะอาดด้วยสารละลายคลอ รอกซ์ ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร แล้วผึ่งให้ใบแห้งหมดที่อุณหภูมิห้อง บรรจุผักลงใน ถุงพลาสติกพอลิเอทิลีน (ขนาด 30 x 45 เซนติเมตร ความหนา 0.25 ไมครอน) ที่เจาะรู จำนวน 8 รู (ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.7 เซนติเมตร) น้ำหนักผัก 150 กรัมต่อถุง รัดปากถุงด้วยหนังยาง ก่อน นำไปเก็บรักษาในห้องเย็นที่มีสภาพมืดในอุณหภูมิที่ใช้ทดลอง

การทดลองที่ 1 ศึกษาชนิด และความแตกต่างทางสรีรวิทยาของใบที่มีต่อการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมี ของ พืชสกุลกะเพราเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำ

ทำทดลองเบื้องต้น หาอุณหภูมิที่ทำให้เกิดการสะท้อนหนาว (chilled temperature) และ อุณหภูมิที่ไม่ให้เกิดอาการสะท้อนหนาว (non-chilled temperature) ความไวต่อการเกิดการ สะท้อนหนาว และความแตกต่างทางสรีรวิทยาของใบพืชสกุลกะเพรา โดยเก็บรักษาใบแมงลัก (lemon basil) กะเพรา (holy basil) และ โหระพา (sweet basil) ที่อุณหภูมิ 4 8 12 และ 25 องศาเซลเซียส (°C) โดยทำการทดลองต่อไปนี้

การจัดทริทเมนต์แบบแฟกทอเรียลในแผนการทดลองแบบกลุ่มสมบูรณ์ (Factorial 3x2x2 in CRD) ทดลอง 3 ซ้ำ ๆ ละ 3 ถุง น้ำหนักผลผลิต 150 กรัมต่อถุง (ประมาณ 12-15 กิ่งต่อถุง) ปัจจัยที่ทดลองประกอบด้วย

ปัจจัยที่ 1 คือ ชนิด (species) ของพืชสกุลกะเพราที่ทำการศึกษามี 3 ชนิด คือ กะเพรา โหระพา และ แมงลัก

ปัจจัยที่ 2 คือ ความแก่ทางสรีรของใบพืช แบ่งเป็น 2 ระยะ คือ ใบอ่อน และใบแก่ ใบอ่อนที่ทำการศึกษาคือ ใบคู่ที่ 1 และ 2 นับจากส่วนยอด ส่วนใบแก่จะเป็นใบคู่ที่ 3 เป็นต้นไป

ปัจจัยที่ 3 คือ ระดับอุณหภูมิที่ใช้เก็บรักษา มี 2 ระดับคือ 4 และ 12 °ซ ความชื้นสัมพัทธ์ภายในภาชนะบรรจุประมาณ 80 ± 5 เปอร์เซ็นต์ (%)

สุ่มตัวอย่างพืชทุก 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง บันทึกการเปลี่ยนแปลงและประเมินคุณภาพของใบพืชหลังจากการเก็บรักษา และเก็บตัวอย่างใบสด (เฉพาะส่วนของแผ่นใบ) น้ำหนัก 5 กรัมต่อซ้ำเก็บ 3 ซ้ำต่อตัวอย่าง นำไปแช่แข็งในไนโตรเจนเหลว แล้วนำไปเก็บในตู้แช่แข็งที่อุณหภูมิ -70 °ซ เพื่อใช้ในการสกัด RNA และวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ รายละเอียดดังต่อไปนี้

1. การประเมินคุณภาพผลผลิต

1.1 ประเมินอาการสะท้อนหนาว (ดัดแปลงจาก Thomson *et al.*, 2001) โดยประเมินอาการสะท้อนหนาวใบเฉลี่ยแต่ละกิ่ง แบ่งออกเป็น 5 ระดับมีคะแนนตั้งแต่ 1 ถึง 5 ดังนี้

- 1 คะแนน ไม่มีความเสียหาย
- 2 คะแนน พบจุดสีน้ำตาลหรือสีน้ำตาลเกิดขึ้นหลายจุดบนใบ (ยังไม่เห็นชัด)
- 3 คะแนน เกิดจุดสีน้ำตาลขึ้นบนใบ มีพื้นที่ที่เกิดความเสียหายน้อยกว่า 30%
- 4 คะแนน มีจุดสีน้ำตาลเข้มถึงดำ บนใบค่อนข้างมาก มีพื้นที่ 30-50%
- 5 คะแนน มีความเสียหายเกิดขึ้นบนใบมีพื้นที่มากกว่า 50%

นับจำนวนกิ่งที่มีคะแนนแตกต่างกัน คำนวณค่าดัชนีการเกิดอาการสะท้อนหนาวดังสูตร

$$\text{ดัชนีการเกิดอาการสะท้อนหนาว} = \frac{\text{ระดับคะแนน} \times \text{จำนวนกิ่งที่เกิดอาการที่ระดับคะแนน}}{\text{จำนวนกิ่งทั้งหมดในซ้ำ (ถุง) พืชทดลอง}}$$

1.2 ประเมินคุณภาพของกลิ่นรส (ดัดแปลงจาก Loaiza and Cantwell, 1997)

เตรียมส้มตัวอย่างใบแก่ที่เกิดอาการสะท้านหนาวและใบที่เก็บรักษาอุณหภูมิห้องเป็นชุดควบคุม น้ำหนักใบ 5 กรัมต่อตัวอย่าง นำไปใส่ในถ้วยพลาสติกที่ห่อหุ้มฝาด้วยอลูมิเนียมฟอยล์เจาะรู กำหนดจำนวนผู้ประเมิน 8-10 คน เปรียบเทียบกลิ่นของตัวอย่างใบ และให้คะแนน 1 ถึง 5 ดังนี้

- 1 คะแนน ไม่มีกลิ่นหอม
- 2 คะแนน มีกลิ่นน้อยมาก
- 3 คะแนน มีกลิ่นหอมน้อย
- 4 คะแนน มีกลิ่นหอมปานกลาง
- 5 คะแนน มีกลิ่นหอมเท่ากับหรือใกล้เคียงกับชุดควบคุม

ทำการบันทึกผลกรณีที่พบว่าการทดลองที่พบว่ามีกลิ่นผิดปกติแตกต่างจากสายพันธุ์ของพืชสกุลกะเพราที่ทำการทดลอง

2. ค่าการรั่วไหลของประจุ (electrolyte leakage) (ดัดแปลงวิธีการของ Campos *et al.*, 2003)

นำตัวอย่างใบพืชมาตัดให้เป็นชิ้นสี่เหลี่ยมขนาดประมาณ 0.5 ตารางเซนติเมตร ด้วยใบมีดโกน ชั่งเนื้อเยื่อใบ 0.5 กรัมต่อซ้ำ ทำ 3 ซ้ำต่อตัวอย่าง ล้างเนื้อเยื่อด้วยน้ำ deionized 3 ครั้ง แล้วใส่ในขวดแก้วรูปชมพู่ที่มีน้ำ deionized ปริมาตร 30 มิลลิลิตร (mL) นำไปวางบนเครื่องเขย่าที่มีความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 ชั่วโมง วัดค่าการนำไฟฟ้าด้วย เครื่องวัดค่าการนำไฟฟ้า (conductance meter; Consort model C831, Belgium) จากนั้นนำขวดแก้วที่มีชิ้นเนื้อเยื่อใบไปแช่น้ำอุณหภูมิ 100°C นาน 10 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง วัดค่าการรั่วไหลของประจุอีกครั้ง นำข้อมูลไปคำนวณเปอร์เซ็นต์การรั่วไหลของประจุดังสูตร

$$\text{เปอร์เซ็นต์การรั่วไหลของประจุ} = \frac{\text{ค่าการนำไฟฟ้าก่อนต้ม} \times 100}{\text{ค่าการนำไฟฟ้าหลังต้ม}}$$

3. ปริมาณ thiobarbituric acid (TBA) reactive compounds (ดัดแปลงวิธีการของ Hodges *et al.*, 1999)

TBA-reactive compounds หรือ malondialdehyde (MDA) เป็น secondary end product จากกระบวนการ oxidation ของ polyunsaturated fatty acids (PUFA) ใช้เป็นตัวชี้วัดการเกิด lipid oxidation การวัดปริมาณ MDA ไม่สามารถวัดได้โดยตรง แต่จะวัดการเกิดปฏิกิริยากับ TBA แต่เนื่องจากในเนื้อเยื่อพืชมีสารประกอบที่รบกวนการเกิดปฏิกิริยา ได้แก่ สารพวกแอนโทไซยานิน และสารอื่น จึงมีการปรับปรุงวิธีการสกัดและการคำนวณสารให้มีความแม่นยำถูกต้องมากขึ้น โดยนำเนื้อเยื่อของใบพืชมาสกัดด้วย trichloroacetic acid (TCA) ความเข้มข้น 5% อัตราส่วน 1 ต่อ 10 แล้วบดละเอียดด้วยเครื่องปั่นละเอียด (homogenizer; Polytron PT2100, Switzerland) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางหัวปั่น 1.7 มิลลิเมตร และตกตะกอนด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge; Jouan KR 22i, France) ความเร็ว 10,000g อุณหภูมิ 4 °C นาน 15 นาที นำส่วนใส (crude extract) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ทำปฏิกิริยากับสารละลาย TCA ความเข้มข้น 20% (-TBA) และ TCA ความเข้มข้น 20% ที่มี TBA ผสมอยู่ 0.65% (+TBA) ในปริมาตรที่เท่ากับปริมาตรของส่วนใส ผสมให้เข้ากัน นำไปต้มในน้ำเดือดอุณหภูมิ 100 °C นาน 20 นาที แล้วนำไปแช่ในอ่างน้ำแข็ง นาน 10 นาที ก่อนนำไปตกตะกอนด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงอีกครั้ง ที่ความเร็ว 3,000g นาน 10 นาที นำส่วนใสไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer; Genesys 10-UV, USA) ที่ความยาวคลื่น (Abs) 440 532 และ 600 นาโนเมตร (nm) คำนวณหาปริมาณของ TBA-reactive compounds หรือ malondialdehyde (MDA) ดังสมการ

$$A = [(Abs\ 532_{+TBA} - Abs\ 600_{+TBA}) - (Abs\ 532_{-TBA} - Abs\ 600_{-TBA})]$$

$$B = [(Abs\ 440_{+TBA} - Abs\ 600_{+TBA}) 0.0571]$$

$$MDA\ equivalents\ (nmol.mL^{-1}) = (A-B/157000)10$$

4. ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (total free phenolics) (ดัดแปลงจาก Singleton *et al.*, 1999)

ทำการสกัดตัวอย่างใบพืชด้วย เมทานอลความเข้มข้น 80% อัตราส่วน 1 ต่อ 10 นำไปบดละเอียดและตกตะกอนด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง นำส่วนใสมาทำปฏิกิริยากับ Folin reagent (Sigma, Germany) และสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต เข้มข้น 20% เร่งปฏิกิริยาโดยอยู่ในอ่างน้ำ (water bath) ที่ปรับอุณหภูมิ 40 °C นาน 30 นาที แล้วแช่ในอ่างน้ำแข็งนาน 10 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นก่อน

นำไปวัดค่าการดูดกลืนของแสง ที่ความยาวคลื่น 760 nm เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของ gallic acid ตามวิธีมาตรฐานในการวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด หน่วยที่วัดได้เป็น mg gallic acid equivalent (mgGAE) หรือ มิลลิกรัมต่อน้ำหนักสด

5. การวิเคราะห์ปริมาณและชนิดของกรดไขมัน (ตามวิธีของ AOAC, 1995)

5.1 การสกัดไขมันจากตัวอย่างพืช

ชั่งตัวอย่างที่บดละเอียดแล้ว 5 กรัม ใส่ลงในหลอดที่มีฝาปิด เติมสารละลาย คลอโรฟอร์ม-เมทานอล (2 : 1) ปริมาตร 30 mL เขย่าอย่างแรงเพื่อให้เกิดการสกัดที่สมบูรณ์ กรองสารละลายผ่านกระดาษกรอง Whatman No.1 แล้วนำกากที่ได้มาสกัดซ้ำอีกสองครั้งด้วยสารละลายและปริมาตรเท่าเดิม รวมสารละลายที่กรองได้เทลงในกรวยแยก (separatory funnel) แล้วทิ้งไว้ให้แยกชั้นเก็บสารละลายส่วนชั้นล่าง ลงในขวดก้นกลม (round-bottom flask) ที่ทราบน้ำหนักแล้ว นำไประเหยให้แห้งด้วย เครื่อง rotary evaporator ใน water bath โดยใช้อุณหภูมิ 40 °C จนกระทั่งสารแห้ง นำไปชั่งน้ำหนัก จะได้ ปริมาณ total fat แล้วละลายด้วยคลอโรฟอร์ม ให้ได้ความเข้มข้นประมาณ 30 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

5.2 การเตรียมตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ชนิดไขมันด้วยเครื่อง gas chromatography (GC)

ดูดสารละลายที่สกัดได้ 1 mL ลงในขวดก้นกลมขนาด 250 mL ระเหยให้แห้งภายใต้ กระแสไนโตรเจน แล้วเติม 0.5 M NaOH ใน เมทานอล 4 mL และ internal standard (C23:0) ที่เตรียมใน dichloromethane 1 mL เขย่าให้เข้ากันนานประมาณ 30 วินาที นำไปรีฟลักซ์ (reflux) ที่ อุณหภูมิ 100 °C นาน 5 นาที ใน water bath shaker ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น เติม 14% borontrifluoride-methanol (BF₃ –Methanol) 2 mL นำไป reflux ซ้ำที่สภาพเดิม นาน 15 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น แล้ว เติมสารละลายเกลืออิ่มตัว (NaCl) 10 mL เขย่าให้เข้ากัน แล้วสกัดต่อด้วยสารละลาย petroleum ether (iso-octane(2,2,4-trimethylpentane)) 5 mL สกัด 3 ครั้ง เก็บสารละลายส่วนชั้นบน ลงในขวด ก้นกลม นำไประเหยให้แห้งโดยใช้อุณหภูมิ 40 °C จากนั้นละลายสารด้วย คลอโรฟอร์ม 1 mL กรองสารละลายที่ได้ผ่าน nylon filter membrane มีขนาด pore size 0.45 µm แล้วนำไปวิเคราะห์ ด้วยเครื่อง GC

5.3 การวิเคราะห์กรดไขมันด้วยเครื่อง GC

ฉีดสารละลายตัวอย่าง 1 μL เข้าเครื่อง GC (Varian model CD 3800, USA) ผ่านส่วนของ column แบบ BD-23 มีความยาว 60 เมตร ID 0.25 mm และ Film 0.25 μm เข้าปรับสถานะเครื่อง GC เพื่อการวิเคราะห์กรดไขมัน โดยทำการตั้งอุณหภูมิของ oven เริ่มต้นที่ 50°C ใช้เวลานาน 1 นาที แล้วปรับอัตราการเพิ่มของอุณหภูมิของ oven เป็น 25°C ต่อนาทีจนถึงอุณหภูมิ 175°C เปลี่ยนอัตราการเพิ่มเป็น 4°C ต่อนาทีจนได้อุณหภูมิ 230°C ตั้งอุณหภูมิเริ่มต้นที่ 220°C เป็นเวลานาน 10 นาที อัตราการเพิ่มของอุณหภูมิของ column 5°C ต่อนาที จนได้ 230°C ซึ่งใช้เวลา 2 นาที คงสภาพ 23°C นาน 13 นาที injector แบบ spit-spit ตั้งค่า spit ratio ที่ 50:1 ตั้งอุณหภูมิ ของ injector ที่ระดับ 250°C และ detector แบบ FID (flame ionized detector) ตั้งอุณหภูมิ 280°C

6. กิจกรรมของเอนไซม์

6.1 การเตรียมตัวอย่างและการสกัดเอนไซม์จากใบพืช

ชั่งตัวอย่างใบพืชแห้งในไนโตรเจนเหลว อัตราส่วน 1 ต่อ 10 ในบัฟเฟอร์ชนิดต่างๆ ขึ้นอยู่กับชนิดของเอนไซม์ที่ต้องการวัดกิจกรรม ดังนี้ เอนไซม์ lipoxygenase (LOX) และ catechol peroxidase หรือ polyphenol oxidase (PPO) สกัดด้วย 0.1 M phosphate buffer (pH 6.8) เติมสาร polyvinylpyrrolidone (PVPP) 1.5% (น้ำหนักต่อปริมาตร) เอนไซม์ catalase (CAT), ascorbate peroxidase (APX) และ guaiacol peroxidase (GPX) หรือ peroxidase (POD) สกัดด้วยสารละลาย 0.1 M phosphate buffer (pH 7.0) เอนไซม์ superoxide dismutase (SOD) สกัดด้วยสารละลาย 0.05 M phosphate buffer (pH 8.0) เติม 0.01 mM EDTA (ethylene diaminetetra acetic acid) และ 3 mM MgCl_2 ก่อนการสกัด ส่วนเอนไซม์ phenylalanine ammonium lyase (PAL) สารละลายบัฟเฟอร์ที่ใช้สกัดคือ 50 mM Bis-Tris (pH 8.8) เติมสาร β -mercaptoethanol ลงในสารละลายบัฟเฟอร์ให้ได้ความเข้มข้น 12 mM และกรีเซอร์อล 10%

วิธีการสกัดเอนไซม์ บดตัวอย่างใบในสารละลายบัฟเฟอร์ ด้วยเครื่องบดผสมสาร (homogenizer) นานประมาณ 30 วินาที กรองผ่านผ้าขาวบาง 4 ชั้น แล้วนำไปตกตะกอนด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงตะกอน (centrifuge) ความเร็วรอบ 12,000g นาน 20 นาที ที่อุณหภูมิ 4°C เก็บส่วนใส (crude extract) ในการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์

6.2 การวัดกิจกรรมของเอนไซม์

นำ crude extract ที่ได้มาทำปฏิกิริยากับสารตั้งต้น (substrate) ทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่มีความสัมพันธ์กับการสร้างผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นหรือปริมาณสารตั้งต้นที่ลดลงเนื่องจากกิจกรรมของเอนไซม์ ดังนี้

6.2.1 กิจกรรมเอนไซม์ LOX คัดแปลงจากวิธีของ Sovrano *et al.* (2006)

เตรียมสารผสม substrate ใน volumetric flask ขนาด 25 มิลลิลิตร (mL) ประกอบด้วย linoleic acid 10 ไมโครลิตร (μL) น้ำกลั่น 4 mL สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.1 N ปริมาตร 1 mL และ Tween 20 ปริมาตร 5 μL ผสมให้เข้ากัน ก่อนปรับปริมาตรเป็น 25 mL การวัดกิจกรรมของเอนไซม์ โดยทำปฏิกิริยาในหลอดแก้วใส ประกอบด้วย substrate 100 μL และ 0.1 M phosphate buffer (pH 6.8) ปริมาตร 1.85 mL ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่า (vortex mixer) เติม crude extract ปริมาตร 50 μL ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่าอย่างรวดเร็ว แล้ววัดการเปลี่ยนแปลงของค่าการดูดกลืนแสงที่เพิ่มขึ้นต่อเวลาที่ ความยาวคลื่น 234 nm

6.2.2 กิจกรรมเอนไซม์ CAT APX และ GPX คัดแปลงจากวิธีของ Ali *et al.* (2005)

วัดกิจกรรมของเอนไซม์ทั้งสามชนิด จากการทำปฏิกิริยาร่วมระหว่าง สารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) กับสารตั้งต้นหรือเอนไซม์ที่ความยาวคลื่นแตกต่างกันดังนี้

1. กิจกรรมของเอนไซม์ CAT ปริมาตรรวมของสารละลายในหลอดทดลองเท่ากับ 3 mL ประกอบด้วยบัฟเฟอร์ phosphate เข้มข้น 50 mM (pH 7.0) ปริมาตร 150 μL ผสมกับ crude extract ปริมาตร 100 μL ผสมให้เข้ากันแล้วเติม H_2O_2 เข้มข้น 30 mM ปริมาตร 50 μL (ความเข้มข้นของ H_2O_2 ในหลอดทดลองเท่ากับ 10 mM) กิจกรรมของ CAT วัดจากการสลายตัวของ H_2O_2 (extinction coefficient 39.4 mM cm^{-1}) ที่ความยาวคลื่น 420 nm

2. กิจกรรมของเอนไซม์ APX ปฏิกิริยาประกอบด้วย สารละลาย ascorbic acid เข้มข้น 0.5 mM เตรียมใน phosphate buffer ใช้ crude extract ปริมาตร 100 μL และเติม H_2O_2 ให้ได้ความเข้มข้นของ H_2O_2 ในหลอดทดลองเท่ากับ 0.1 mM กิจกรรมของ APX วัดการเกิด

oxidation ของ ascorbic acid (extinction coefficient 2.8 mM cm^{-1}) จากการลดลงของค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 290 nm

3. กิจกรรมของเอนไซม์ GPX หรือ POD ปฏิกริยาประกอบด้วย crude extract สารละลาย guaiacol เข้มข้น 10 mM phosphate buffer และสารละลาย H_2O_2 (ความเข้มข้นเดียวกันกับที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาเอนไซม์ CAT) วัดการเพิ่มขึ้นของค่าการดูดกลืนแสงจาก tetraguaiacol (guaiacol dehydrogenation product) ที่เกิดขึ้น (extinction coefficient 6.39 mM cm^{-1}) ที่ความยาวคลื่น 470 nm

6.2.3 กิจกรรมเอนไซม์ SOD คัดแปลงจากวิธีของ Ukeda *et al.* (1997)

เตรียมสารผสม substrate ประกอบด้วย phosphate buffer ความเข้มข้น 50 mM (pH 8.0) สารละลาย xanthine ความเข้มข้น 3 mM สารละลาย EDTA ความเข้มข้น 3 mM สารละลาย XTT (2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide) ความเข้มข้น 0.75 mM และเอนไซม์ xanthine oxidase เข้มข้น 0.14 units กิจกรรมของเอนไซม์วัดจากอัตราการลดลงของ XTT เปรียบเทียบหลอดที่ทำปฏิกิริยาที่เต็มและไม่เต็ม crude extract ที่ความยาวคลื่น 470 nm คำนวณหา unit ของ SOD จากปริมาณเอนไซม์ที่ทำให้เกิดการยับยั้งปฏิกิริยาลดลงครึ่งหนึ่ง

6.2.4 กิจกรรมเอนไซม์ PPO คัดแปลงจากวิธีของ Kazuhiro *et al.* (1999)

นำสารสกัดเอนไซม์ปริมาตร 0.05 mL มาเจือจางในสารละลายบัฟเฟอร์ 1.95 mL เติมสารละลายกรดแอสคอร์บิกที่เป็นสารตั้งต้น ความเข้มข้น 10 mM ผสมให้เข้ากัน ทำการวัดค่าการดูดกลืนของแสง หลังจากทำปฏิกิริยานาน 1 นาที เปรียบเทียบกับหลอดในชุดควบคุม (blank) ที่ความยาวคลื่น 420 nm จากนั้นนำสารสกัดเอนไซม์มาวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนด้วยวิธีมาตรฐาน (Bradford, 1976) ค่าที่วัดได้มีหน่วยเป็นหน่วยปฏิกิริยาของ catechol oxidase ต่อมิลลิกรัมโปรตีน

6.2.5 กิจกรรมเอนไซม์ PAL คัดแปลงจากวิธีของ Gang *et al.* (2001)

เตรียมกราฟมาตรฐานของ trans-cinnamic acid โดยวัดค่าการดูดกลืนของแสง ที่ความยาวคลื่น 290 nm บันทึกกราฟเส้นตรงที่ได้เพื่อนำไปเปรียบเทียบหาปริมาณผลิตภัณฑ์ที่ได้ จากปฏิกิริยาของเอนไซม์ในการทดลอง ปฏิกิริยาในหลอดทดลองประกอบด้วย สารละลาย บัฟเฟอร์ Tris ความเข้มข้น 50 mM pH 8.8 และสารสกัดเอนไซม์จากพืช เดิมสารตั้งต้น L-phenylalanine ความเข้มข้น 12 mM วัดค่าความยาวคลื่นที่ 290 nm เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน และวัดปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Bradford (1976) ค่าที่วัดได้เป็นนาโนโมลต่อชั่วโมงต่อมิลลิกรัม โปรตีน หรือหน่วยปฏิกิริยาของ PAL ต่อมิลลิกรัมโปรตีน

การทดลองที่ 2 ศึกษาวิธีการลดอาการสะท้อนหนาวในพืชสกุลกะเพรา

จากผลการทดลองที่ 1 ใบแมงลักเป็นพืชสกุลกะเพราชนิดที่มีความไวต่ออาการสะท้อนหนาวมากที่สุดและมีการตอบสนองต่ออาการสะท้อนหนาวใบอ่อนและใบแก่แตกต่างกัน

2.1 การรมด้วย 1-methylcyclopropene (1-MCP)

นำตะกร้าที่บรรจุด้วยกิ่งแมงลัก มารมด้วยไอของสารเคมี ในตู้รวมพลาสติกที่มีปริมาตร 0.07 ลูกบาศก์เมตร คำนวณปริมาณสาร 1-MCP ให้มีความเข้มข้น 100 500 1,000 และ 2,000 nL L^{-1} ใช้เวลารมนาน 4 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง โดยมีอากาศปกติเป็นชุดควบคุม ทดลอง 3 ซ้ำๆ ละ 15 กิ่ง นำไปเก็บไว้ที่ 4°C ประเมินอาการสะท้อนหนาวของใบอ่อนและใบแก่ทุก 12 ชั่วโมงจนครบ 48 ชั่วโมง เลือกชนิดของสารและความเข้มข้นที่มีผลต่อการชะลอการเกิดอาการสะท้อนหนาวทดสอบซ้ำ นำไปเก็บไว้ที่ 4°C ประเมินอาการสะท้อนหนาวในใบแก่และวัดค่าการรั่วไหลของประจุ

2.2 การใช้สาร salicylic acid (SA)

การให้สารละลาย SA โดยการจุ่มทั้งกิ่งพืชลงในสารละลาย ความเข้มข้น 0 0.25 0.5 1.0 และ 2.0 mM เป็นเวลานาน 5 นาที แล้วปล่อยให้แห้งก่อนบรรจุในถุงพลาสติกเจาะรู แล้วนำพืช ทดลองไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°C นาน 24 ชั่วโมง บันทึกคะแนนอาการสะท้อนหนาวที่เกิดขึ้นทั้งใน ใบแก่และใบอ่อน เลือกความเข้มข้นและระยะเวลาการแช่ที่มีผลต่อการชะลอการเกิดอาการสะท้อนหนาวมาทดสอบซ้ำ โดยตัดใบ จำนวน 10 ใบต่อซ้ำ ทดลอง 3 ซ้ำต่อการทดลอง นำส่วนของก้านใบ

จุ่มในสารละลาย SA ความเข้มข้น 0.025 และ 0.5 mM เป็นเวลานาน 5 และ 10 นาที แล้วย้ายไปจุ่มในน้ำกลั่น นำตะกร้าพลาสติกที่บรรจุ ตัวอย่างวางบนถาดพลาสติกที่มีกระดาษที่ชุ่มด้วยน้ำกลั่น แล้วบรรจุในถุงพลาสติกเรียงเป็นชั้น ไปวางในนำไปเก็บไว้ที่ 4°C ประเมินอาการสะท้อนหนาวในใบแก่และวัดค่าการรั่วไหลของประจุในการทดลองที่เกิดความแตกต่างของอาการสะท้อนหนาว

2.3 การสภาพดัดแปลงบรรยากาศ (modified packaging)

บรรจุกิ่งแมงลักในถุงพลาสติก 3 ชนิดคือ พอลิเอทิลีน (polyethylene: PE), พอลิโพรไพลีน (polypropylene: PP) และพอลิเอทิลีนความหนาแน่นสูง (high-density polyethylene: HDPE) ขนาด 20 x 30 เซนติเมตร มีความหนาเฉลี่ย 0.25 ไมครอน เจาะรูขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.7 เซนติเมตร จำนวน 4 รู บรรจุผักน้ำหนัก 120 กรัมต่อถุง เปรียบเทียบถุงที่บรรจุแบบปิด (ไม่เจาะรู) และถุงเจาะรู ไปวางในนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°C ประเมินอาการสะท้อนหนาวในใบแก่ในแต่ละกิ่งและวัดค่าการรั่วไหลของประจุในการทดลองที่เกิดความแตกต่างของอาการสะท้อนหนาว

2.4 การใช้ความร้อน

ตัดกิ่งแมงลักให้มีความยาวประมาณ 120 เซนติเมตร เสียบปลายก้านในหลอดพลาสติกบรรจุน้ำกลั่น นำไปวางในตะกร้าพลาสติกและคลุมด้วยถุงพลาสติก ความชื้นภายในตะกร้าเฉลี่ย 90% เพื่อป้องกันไม่ให้พืชทดลองสูญเสียน้ำ นำตะกร้าไปวางในตู้อบลมร้อนอุณหภูมิ 38°C มีความชื้นสัมพัทธ์เฉลี่ย 70% ให้ความร้อนเป็นเวลานาน 0 15 30 และ 45 นาที นำมาปล่อยให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง แล้วถอดหลอดน้ำออก นำกิ่งพืช บรรจุในถุงพลาสติกเจาะรู ซึ่งน้ำหนักถุงละ 150 กรัม แล้วปิดปากถุง นำไปเก็บไว้ที่ 4°C ประเมินอาการสะท้อนหนาวของใบอ่อนและใบแก่ทุก 12 ชั่วโมง จนครบ 48 ชั่วโมง เลือกระยะเวลาที่มีผลต่อการชะลอการเกิดอาการสะท้อนหนาวทดสอบซ้ำ นำไปเก็บไว้ที่ 4°C ประเมินอาการสะท้อนหนาวในใบแก่และวัดค่าการรั่วไหลของประจุ

การทดลองที่ 3 ศึกษาลักษณะทางกายวิภาคของใบพืชสกุลกะเพรา

เปรียบเทียบลักษณะทางกายวิภาคของใบอ่อนและใบแก่ของพืชกะเพรา โหระพาและแมงลัก สุ่มเก็บตัวอย่างพืช ก่อนและหลังจากเก็บพืชที่ 4 และ 12°C เป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง โดยตรึงขึ้นเนื้อเยื่อใบในพาราฟิน ตามกรรมวิธีของ Brooks *et al.* (1950) ดังนี้ ตัดเนื้อเยื่อใบบริเวณที่เกิดอาการสีน้ำตาลที่เชื่อมต่อกับเนื้อเยื่อปกติ ออกเป็นชิ้นเล็กๆ ด้วยใบมีดโกน ขนาดชิ้นเนื้อเยื่อ 5-8

มิลลิเมตร ทำป้ายขนาดเล็กด้วยกระดาษ ระบุชื่อของตัวอย่างหรือรหัส นำชิ้นเนื้อเยื่อและป้ายแช่ลง (Fix) ในสารละลาย 50% FAA นาน 1 วัน ที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำไปผ่านขั้นตอนการดึงน้ำออก (dehydrate) ด้วย TBA series ที่ความเข้มข้น 50% 70% 85% 95% และ 100% (3:1 TBA:100% EtOH) ใช้เวลาแช่เนื้อเยื่อ 10-12 ชั่วโมง ในแต่ละความเข้มข้น หลังจากแช่ใน 100%TBA จนครบ เวลา เทสารเก่าออกเติม absolute TBA ที่ไว้ประมาณ 12 ชั่วโมง เปลี่ยนสาร absolute TBA ใหม่ แช่ซ้ำต่ออีก 12 ชั่วโมง จากนั้นย้ายเนื้อเยื่อลงในหลอด Eppendorf แล้วเติม liquid paraplast ปลอ่ยให้แข็งตัว เปิดฝาตัวอย่างนำไปเก็บไว้ในตู้อบ ประมาณ 2 วัน แล้วทำการเปลี่ยน paraplast ใหม่ทุกวัน เป็นเวลา 3 วัน จึงย้ายเนื้อเยื่อลงในบล็อกพลาสติกที่มีอะลูมิเนียมฟอยล์ขึ้นรูป จัดชิ้นเนื้อเยื่อให้อยู่ในระนาบที่ต้องการ ปลอ่ยให้แข็งตัว แช่ตัวอย่างในน้ำแข็ง ก่อนนำไปตัดตามขวาง ด้วย เครื่องตัดเนื้อเยื่อแบบมือหมุน (rotary microtome; MH335, Germany) ความหนาของชิ้นเนื้อเยื่อ 8 ไมครอน ย้อมสีสไลด์ด้วย toluidine blue (Sekai, 1973) ตรวจเช็คการเปลี่ยนแปลงลักษณะองค์ประกอบของเซลล์ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 100 เท่า

การทดลองที่ 4 ศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดสื่อน้ำตาลในใบพืชสกุลกะเพรา

การศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดสื่อน้ำตาลในใบพืชสกุลกะเพรา มีขั้นตอนการดำเนินงานดังต่อไปนี้

4.1 การออกแบบไพรเมอร์ ตามขั้นตอนต่อไปนี้

4.1.1 สืบค้นข้อมูล nucleotide ในฐานข้อมูล NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) โดยใช้ชื่อที่มีความเฉพาะเจาะจงกับสิ่งที่ทำการศึกษามากที่สุด ซึ่งใช้สองคำคือ lipxygenase หรือ polyphenol oxidase และคำว่า chilling หรือ low temperature ตรวจเช็ครายละเอียดของผลที่ได้ว่าเป็นยีนแบบ full length หรือ partial รายละเอียดของยีน การตีพิมพ์ในวารสาร และคัดเลือกที่เราสนใจเป็นยีนหลัก

การออกแบบไพรเมอร์แบบเฉพาะเจาะจง (specific primer) โดยคัดลอกลำดับเบสของยีนหลัก นำไปเทียบคู่ (alignment) ในส่วน nucleotide blast (blastn) เลือกยีนที่มีความเหมือน (identity) ของนิวคลีโอไทด์ใน DNA กับฐานข้อมูล มากกว่า 85% จำนวน 5-7 ชนิด คัดลอกลำดับเบสของยีนเหล่านั้น เพื่อไปตรวจสอบหาบริเวณอนุรักษ์ (conserve region) ถ้าผลยีนที่ได้จาก blastn มีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนต่ำหรือมียีนที่มีความเหมือน 100 เปอร์เซ็นต์ เพียง 1-

2 ยีน ต้องทำการออกแบบจากกรดอะมิโนหรือโปรตีนของยีนหลัก หรือออกแบบไพรเมอร์แบบไม่เฉพาะ (degenerate primer) โดยคัดลอกลำดับโปรตีนของยีนหลัก เข้าโปรแกรม standard protein blast หรือ blastp เปรียบเทียบลำดับของ sequence ในฐานข้อมูล

4.1.2 นำลำดับเบสของยีนที่ได้จากข้อ 1 มาเทียบกับ DNA โดยใช้โปรแกรม ClustalW (<http://clustalw.genome.ad.jp>) ตรวจสอบหาตำแหน่งของลำดับเบสที่มีความเหมือนกัน เลือกส่วนของยีนที่เป็นบริเวณอนุรักษ์ 2 ตำแหน่งอยู่ห่างกัน ควรมีจำนวนเบสอย่างน้อย 23-30 เบส และมีเปอร์เซ็นต์ความแตกต่าง (% degeneracy) ไม่เกิน 128 โดยอาจตัดลดเบสบางตัวที่มีความแตกต่างออกเพื่อให้ได้เบสที่มีความเหมือนกันขึ้น กรณีที่ออกแบบไพรเมอร์แบบเฉพาะเจาะจง ต้องมีลำดับเบสที่เหมือนกันติดต่อกันอย่างน้อย 7 ตำแหน่ง

4.1.3 เปรียบเทียบตำแหน่งที่ได้กับลำดับเบสของยีนหลัก ทำเครื่องหมายบริเวณที่เป็นบริเวณอนุรักษ์ แล้วนำมาไปเข้าโปรแกรม Primer3 (<http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3>) จากการประมวลผลของโปรแกรมให้จำนวนไพรเมอร์ 3-4 คู่ นำไปตรวจเช็คการจับคู่ระหว่างไพรเมอร์ (primer dimer) ด้วยโปรแกรม Fast PCR ถ้าพบ dimer ให้ทดสอบไพรเมอร์คู่ใหม่หรือออกแบบใหม่ให้มีความจำเพาะ ควรมีความยาวมากกว่า 17 เบสขึ้นไป ควรมี annealing temperature สูงเพื่อให้การจับของไพรเมอร์มีความจำเพาะสูง และปริมาณ GC content อยู่ในระดับ 40-60%

4.2 การสกัด RNA จากเนื้อเยื่อใบพืช ด้วยวิธี Pine tree method (Chang *et al.*, 1993)

ลุ่มใบอ่อนและใบแก่ของพืชสกุลกะเพรา ก่อนการเก็บและหลังจากการเก็บรักษาที่ 4 และ 12 °ซ นาน 12 24 และ 48 ชั่วโมง ซึ่งเป็นระยะก่อนและหลังจากใบพืชแสดงอาการ สะท้อนหนาว นำตัวอย่างพืช แช่แข็งในไนโตรเจนเหลว แล้วเก็บตัวอย่างในตู้แช่แข็งที่อุณหภูมิ -70 °ซ ทำการสกัด RNA ตามขั้นตอนดังต่อไปนี้

4.2.1 เตรียมสารบัฟเฟอร์ extraction buffer ประกอบด้วย 2% CTAB (hexadecyltrimethylammonium bromide), 2% PVPP (polyvinylpyrrolidone), 100 mM Tris-HCl (pH 8.0), 25 mM EDTA (pH 8.0) และ 2.0 M NaCl สารละลายต่าง ๆ เตรียมด้วยน้ำ DEPC (diethylpyrocarbonate) ผสมให้เข้ากัน นำไปนึ่งฆ่าเชื้อใน autoclave ปลดออกทิ้งไว้ให้เย็น เติมสารละลาย spermidine 7.5 μ L ต่อ 15 mL หรือต่อหนึ่งตัวอย่าง และ 2% β -mercaptoethanol

ก่อนทำการสกัด และอุ่นสารสกัดบัฟเฟอร์ ในอ่างน้ำ อุณหภูมิ 65 °ซ เป็นเวลา 10 นาที ก่อนใส่เนื้อเชื้อพืช ส่วนการเตรียมบัฟเฟอร์ SSTE ประกอบด้วย 1.0 M NaOH, 0.5% SDS, 10 mM Tris-HCl (pH 8.0) และ 1 mM EDTA (pH 8.0) เตรียมสารละลายทุกชนิดด้วย RNAase-free water

4.2.2 บดเนื้อเชื้อใบในไนโตรเจนเหลวด้วยโกร่งให้ละเอียด ซึ่งจำนวน 1 กรัมใส่ในหลอด centrifuge (หลอดกันกลม) ที่ปราศจาก DNA และ RNA (RNase/DNase free) เดิมสกัดบัฟเฟอร์จากข้อ 4.1.1 ปริมาตร 15 mL ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่า ที่ความเร็วรอบสูงนาน 1 นาที ปั่นละเอียดใน เครื่องบดผสมสาร นาน 1 นาที เดิมสารละลาย SEVAX (chloroform-isomyalcohol; 24:1 v/v) ในปริมาตร 15 mL ตกตะกอนด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอน ความเร็ว 7,000g นาน 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °ซ เก็บส่วนใส ใส่หลอดใหม่ เดิมสารละลาย SEVAX ปริมาตรเท่าเดิม ตกตะกอนซ้ำด้วยสภาพเดิม เก็บส่วนใสกรองผ่าน Mira cloth ที่มาซื้อแล้ว ลงในหลอดกันกลม เดิมสารละลาย LiCl ความเข้มข้น 8 M ปริมาตร 1 ใน 3 ของปริมาตรรวมของส่วนใสที่อยู่ในหลอด เพื่อตกตะกอน RNA นำหลอดไปเก็บในอุณหภูมิ 4 °ซ นาน 1 คืน แล้วจึงนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000g ที่ 4 °ซ นาน 20 นาที เก็บส่วนตะกอน เพื่อนำไปทำการสกัดในขั้นตอนต่อไป

4.2.3 นำตะกอนที่ได้มาละลายด้วยบัฟเฟอร์ SSTE อุ่นที่อุณหภูมิ 65 °ซ นาน 10 นาที ปริมาตร 500 μ L คูณสารละลายใส่ในหลอด Eppendorf ขนาด 1.5 mL ผสมสารให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่า เดิม SEVAX ปริมาตรเท่ากับปริมาตรรวมของส่วนใสที่อยู่ในหลอด และผสมให้เข้ากันแล้วนำไปตกตะกอนด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอน ที่ความเร็ว 12,500g นาน 5 นาที ที่ 4 °ซ เก็บส่วนใสในหลอด Eppendorf หลอดใหม่ เดิม absolute ethanol ที่เย็นจัด ปริมาตรเท่ากับปริมาตรรวมของส่วนใสในหลอด คั่วหลอดกลับไปมา นำไปเก็บไว้ที่ -70 °ซ นาน 30 นาที แล้วนำไปตกตะกอนซ้ำที่ความเร็ว 12,000g นาน 20 นาที ที่ 4 °ซ เทส่วนใสทิ้ง ล้างตะกอนด้วย 70% ethanol ปริมาตร 0.5 mL ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่า นำไปตกตะกอนอีกครั้งที่ความเร็ว 12,000g นาน 5 นาที ที่ 4 °ซ เทส่วนใสทิ้ง คั่วหลอดบนกระดาษซับแห้งหรือทำให้แห้งใน vacuum desiccator jar จากนั้นละลายตะกอนด้วยน้ำ DEPC ปริมาตร 20 μ L คูณสารละลาย RNA ส่วนหนึ่งไปตรวจสอบและวัดปริมาณ RNA ที่สกัดได้ และนำสารละลาย RNA ไปแช่ในตู้แช่แข็งที่อุณหภูมิ -70 °ซ จนกว่าใช้งาน

4.3 การตรวจสอบคุณภาพและวัดปริมาณ RNA

4.3.1 การวัดปริมาณ RNA โดยใช้เครื่อง UV spectrophotometer

ดูดสารละลาย RNA มาเจือจาง 50 เท่าโดยใช้ ปริมาตร RNA 2 μ L ผสมในน้ำกลั่น 98 μ L วัดค่าการดูดกลืนแสง เพื่อหาความเข้มข้นของ RNA ด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 nm โดยใช้ น้ำกลั่นเป็นตัวเปรียบเทียบ (blank) คำนวณหาความเข้มข้นของสารละลาย RNA ดังนี้

$$\text{ความเข้มข้น RNA } (\mu\text{g}/\mu\text{L}) = \frac{\text{A}_{260} \times \text{dilution factor} \times k}{1,000}$$

A₂₆₀ คือ ค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 260 nm

Dilution factor เท่ากับ 50 เท่า

K เท่ากับ 40 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ คือค่าคงที่ของปริมาณ RNA เมื่อวัด absorbance ของ RNA ที่ 260 nm ได้เท่ากับ 1

คุณภาพของ RNA พิจารณาจากสัดส่วนของค่า A₂₆₀/A₂₈₀ มีค่าระหว่าง 1.8-2.0 แสดงว่าสารละลาย RNA ที่ได้มีคุณภาพดี

4.3.2 การตรวจสอบคุณภาพ RNA โดยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิส (electrophoresis)

เตรียม เจลแข็ง 0.8% agarose gel ในบัฟเฟอร์ 0.5xTBE (0.045 M Tris-borate ผสมกับ 0.001 M EDTA) วางแผ่นเจล ในเครื่องอิเล็กโตรโฟรีซิส ในทิศทางจากลบไปบวก เดิมบัฟเฟอร์จนท่วมแผ่นเจล จากนั้นนำสารละลาย RNA ที่สกัดได้จำนวน 2 μ L ผสมกับ 2x dye หยดลงหลุมบนแผ่นเจล เปรียบเทียบกับสารละลาย DNA มาตรฐาน 1kb marker ติดตั้งเครื่องอิเล็กโตรโฟรีซิส กระแสที่ 100 โวลต์ นาน 25 นาที เมื่อครบกำหนดนำเจล ที่ได้มาย้อมด้วย ethidium bromide (EtBr) ความเข้มข้นที่ใช้ประมาณ 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ นาน 5-10 นาที ล้างแผ่นเจล ในน้ำสะอาด ตรวจสอบภายใต้รังสีอัลตราไวโอเลต ด้วยเครื่องถ่ายภาพเจล (Gel documentation and analysis system; Gene genius, UK) ลักษณะ RNA ของใบพืชสกุลกะเพราปรากฏแถบจำนวนมาก แต่มีแถบสว่างมากที่สุด 2 แถบ แถบบนใหญ่กว่าแถบล่าง และสองแถบนี้อยู่ในระนาบเดียวกับชั้น DNA มาตรฐานที่ 2,000 bp และ 3,000 bp

4.4 การสังเคราะห์ cDNA จาก RNA (cDNA synthesis)

นำสารละลาย RNA ที่สกัดได้ จำนวน 1 μg มากำจัด DNA บนเปื้อนด้วยชุดสารละลาย RNase-free DNase I (Fermentas, USA) ตามวิธีการที่ระบุโดยบริษัทผู้ผลิต ทำการจำลอง RNA สายเดี่ยว เพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ cDNA สายสั้นๆ จำนวนมาก โดยใช้ชุดสำเร็จรูป Omiscript Reverse Transcriptase (Qiagen, Germany) โดยใช้ 18 μL RNA ที่ผ่านการกำจัด DNA บนเปื้อนแล้ว ตามวิธีการที่ระบุโดยบริษัทผู้ผลิต ทำการตรวจเช็ค cDNA ที่ได้ โดยใช้เป็นสายต้นแบบ (template) ในการสร้างยีนเป้าหมาย ต่อจาก ไพรเมอร์ ของ house keeping gene (18S) ด้วยเครื่อง PCR แยกขนาดของ DNA ใน 0.8% agarose gel ย้อมด้วย EtBr ตรวจภายใต้กล้อง UV จะปรากฏแถบเหนือ DNA มาตรฐานที่ 250 bp ตัวอย่างที่ไม่เกิด PCR product ต้องทำการสังเคราะห์ cDNA หรือสกัด RNA ใหม่

4.5 การเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของยีนเป้าหมาย

นำ cDNA ที่ได้มาทำ PCR reaction โดยนำไพรเมอร์แบบไม่เฉพาะจำนวน 1 คู่ใส่ลงในหลอด PCR เติมสารละลาย PCR (Qiagen, Germany) ปริมาตรรวม 25 μL ประกอบด้วย 2.5 μL 10x buffer , 1.5 μL 3 mM MgCl_2 , 0.5 μL 10 mM dNTP, 5 μL 10 μM primer Forward, 5 μL 10 μM primer Reverse , 0.125 μL taq polymerase, 1 μL template หรือ cDNA และ double deionized water นำใส่เครื่อง PCR โดยตั้งอุณหภูมิและเวลาสำหรับการทำปฏิกิริยาของยีน *LOX* และ *PPO* (ใช้อุณหภูมิและเวลาที่แตกต่างกันในส่วนวงเล็บ) ดังนี้

ช่วงที่ 1 อุณหภูมิ 94°C นาน 3 นาที

ช่วงที่ 2 อุณหภูมิ 94°C นาน 30 วินาที

อุณหภูมิ 55°C นาน 1 นาที (54°C นาน 30 วินาที)

อุณหภูมิ 72°C นาน 1 นาที (72°C นาน 40 วินาที) ทำซ้ำจำนวน 35 รอบ

ช่วงที่ 3 อุณหภูมิ 72°C นาน 10 นาที

ทำการตรวจชิ้นส่วน DNA ด้วย 0.8% agarose gel ด้วยเครื่องอิเล็กโตรโฟรีซิส และย้อมด้วย EtBr ตรวจภายใต้กล้อง UV กรณีที่มีผลิตภัณฑ์ปรากฏมากกว่า 1 แถบต้องทำการแยกชิ้น DNA โดยการตัดเจลภายใต้แสง UV นำเจลที่ได้มาสกัด DNA ให้บริสุทธิ์ด้วยชุดสำเร็จรูป QIA quick gel extract (Qiagen, Germany)

4.6 การโคลนชิ้นส่วนของยีน (cloning) ดัดแปลงจากวิธีการของ Sambrook *et al.* (1989) ประกอบด้วยขั้นตอนดังนี้

4.6.1 นำชิ้นส่วน DNA ที่ได้มาเชื่อมต่อ (ligation) กับพลาสมิด โดยใช้ชุดสำเร็จรูป pGEM[®]-T Easy vector system (Promega, USA) ตามวิธีการที่ระบุโดยบริษัทผู้ผลิต โดยการตัดส่วนปลายของ DNA ขนาดเล็กออกด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะแล้วทำให้ตกตะกอน นำ DNA ที่ได้ไปเชื่อมต่อกับพลาสมิด โดยเตรียมพลาสมิดพาหะ ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ ทำปฏิกิริยาซ้ำ เพื่อเปลี่ยนหมู่ฟอสเฟตเป็นหมู่ไฮดรอกซี โดยใช้เอนไซม์ alkaline phosphatase เพื่อป้องกันการเชื่อมต่อกลับ จากนั้นทำการเชื่อมต่อชิ้นส่วนของ DNA กับพลาสมิดจะได้ พลาสมิดลูกผสม (recombinant plasmid)

4.6.2 นำพลาสมิดลูกผสม เข้าสู่เซลล์ (transformation) แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α ระยะ log phase ซึ่งเป็นเซลล์ที่สามารถรับและนำ DNA เข้าสู่เซลล์ได้ (competent cell) นำไปเพิ่มจำนวน โดยเลี้ยงในอาหารเหลว SOC บนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาทีที่ 37°C นาน 1 ชั่วโมง นำไปปั่นตกตะกอนและนำไปเลี้ยงบนอาหาร LB แข็งที่ผสมสารปฏิชีวนะ Ampicillin 50 $\mu\text{g/mL}$ เติมสาร IPTG และ X-gal ปริมาตร 40 μL บนผิวอาหารเลี้ยงเชื้อ นำไปเลี้ยงในตู้ควบคุมอุณหภูมิ 37°C นาน 18 ชั่วโมง

4.6.3 โคโลนีที่เป็นสีขาวแสดงว่า transform ได้สำเร็จ ทำ master plate โดยใช้ไม้จิ้มฟันที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว จิ้มส่วนกลางโคโลนี ไปขีดบนอาหารแข็งที่ผสมสารปฏิชีวนะ เติมสาร IPTG และ X-gal ความเข้มข้นและปริมาตรเท่ากับข้อ 4.6.2 นำไปเลี้ยงต่อในตู้ควบคุมอุณหภูมิ 37°C นาน 18 ชั่วโมง เลือกลูกโคลนแบคทีเรียที่มีการเจริญเป็นโคโลนีสีขาว ไปเลี้ยงในอาหารเหลว LB ที่มีสารปฏิชีวนะ ปริมาตร 1 mL ในหลอด Eppendorf ในเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ 37°C นาน 18 ชั่วโมง ตรวจสอบหาพลาสมิดเพื่อค้นหาชิ้นที่แทรกเข้าไปโดยสกัด DNA จากเซลล์แบคทีเรียโดยใช้ชุดสำเร็จรูป QIAprep[®] Spin Miniprep (Qiagen) ตามวิธีการที่ระบุโดยบริษัทผู้ผลิต

4.6.4 ตรวจสอบ DNA ที่ได้โดยใช้ชุดสำเร็จรูปสารละลายเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco* RI (Fermentas, USA) ตามวิธีการที่ระบุโดยบริษัทผู้ผลิตและตรวจสอบขนาดของ DNA ด้วยเครื่องอิเล็กโตรโฟรีซิส บน 0.8% agarose gel ย้อมด้วย EtBr ตรวจภายใต้กล้อง UV จะปรากฏจำนวน

ชั้น DNA 2 แถบ แถบบนสุดคือ DNA ของพลาสมิด แถบล่างเป็นชั้น DNA เป้าหมาย ซึ่งมีขนาดหรือจำนวนเบสใกล้เคียงกับที่ได้ทำการออกแบบไพรเมอร์ไว้

4.6.5 ตรวจสอบลำดับเบสของชิ้นส่วนยีนเป้าหมาย ด้วยเครื่อง Automatic DNA sequencer โดยใช้บริการของ DNA Technology ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นำผลลำดับเบสที่ได้มาตรวจวิเคราะห์โดยใช้โปรแกรม Blast alignment (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)

4.7 การตรวจสอบการแสดงออกของยีน *OcLOX* ด้วย semi-quantitative RT-PCR

4.7.1 สกัด RNA จากเนื้อเยื่อใบที่คาดว่าจะมีการแสดงออกของยีนเป้าหมาย คือใบที่เริ่มเกิดอาการสะท้านหนาว เปรียบเทียบกับใบที่ไม่เกิดอาการสะท้านหนาว (ใบเก็บรักษาที่ 12°ซ) ในใบอ่อนและใบแก่ ตรวจสอบคุณภาพและปริมาณ ทำความสะอาด ตามขั้นตอนที่กล่าวมาแล้วและเจือ cDNA ที่ได้ด้วยทำ PCR reaction กับไพรเมอร์ยีนควบคุมหรือ house keeping gene (18S) ที่ผ่านการโคลนจากเนื้อเยื่อจากดอกกล้วยไม้ มีลำดับเบสดังนี้ Forward 5'-GGACTATGGCCGT TTAGGC-3' และ Reverse 5'-CCGGACCATTCAATCGGTAG-3' (accession no. AB027309)

4.7.2 นำ cDNA ของตัวอย่างที่ผ่านการตรวจสอบว่าสามารถเกิดผลิตภัณฑ์จาก PCR reaction มาทดสอบหาจำนวนรอบที่เหมาะสม ในการ PCR reaction กับไพรเมอร์ยีนควบคุม (18S) โดยการหยุดการทำงานของเครื่อง PCR แบบชั่วคราวและนำหลอด PCR ออกมาเมื่อครบจำนวนรอบที่ต้องการทดสอบที่ 18 21 25 และ 30 รอบ ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่ได้ด้วย เครื่องอิเล็กโตรโฟรีซิส ย้อมด้วย EtBr ตรวจภายใต้กล้อง UV บน 0.8% agarose gel เลือกจำนวนรอบที่ไม่ทำให้แถบมีความสว่างจนเกินไป (อิ่มตัว) จากการทดลองใช้จำนวน 27 รอบที่อุณหภูมิ 45°ซ โดยตั้งอุณหภูมิและเวลาสำหรับการทำปฏิกิริยา ดังนี้

ช่วงที่ 1 อุณหภูมิ 94°ซ นาน 3 นาที

ช่วงที่ 2 อุณหภูมิ 94°ซ นาน 30 วินาที

อุณหภูมิ 45°ซ นาน 30 วินาที

อุณหภูมิ 72°ซ นาน 30 วินาที ทำซ้ำจำนวน 27 รอบ

ช่วงที่ 3 อุณหภูมิ 72°ซ นาน 5 นาที

4.7.3 นำ cDNA ของทุกตัวอย่างมาทำปฏิกิริยา PCR กับยีนควบคุม(18S) นำ PCR ที่ได้มาตรวจสอบด้วยเครื่องอิเล็กโตรโฟรีซิส บน 0.8% agarose gel และย้อมด้วย EtBr ตรวจภายใต้กล้องยูวี แถบที่ได้จะอยู่ในระนาบเดียวกัน ผลที่ได้รับแต่ละตัวอย่างมีความสว่างของแถบไม่เท่ากัน ต้องทำการปรับลดปริมาณหรือเจือจาง cDNA ที่ใช้ ทำปฏิกิริยา PCR ใหม่และปรับปริมาณ cDNA จนกว่า แถบที่ได้จากปฏิกิริยา PCR มีความสว่างใกล้เคียงกันมากที่สุดในทุกตัวอย่างที่ต้องการทดสอบ ซึ่งแสดงว่าทุกตัวอย่างมีการแสดงออกของยีนควบคุมเท่ากัน

4.7.4 นำตัวแทน cDNA มาหนึ่งตัวอย่างมาทดสอบหา annealing temperature ที่เหมาะสมต่อการทำปฏิกิริยา PCR ของไพรเมอร์เฉพาะของยีน *OcLOX* โดยใช้เครื่อง gradient PCR โดยทดสอบที่ 60, 55, 50 และ 45°C พบว่าที่ 50°C ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีความสว่างของแถบชัดเจนที่สุดจากนั้นนำทุกตัวอย่างที่ต้องการทดสอบมาทำปฏิกิริยา PCR reaction ในหลอด PCR ประกอบด้วย 2.5 μ L 10x buffer , 1.5 μ L 3 mM $MgCl_2$, 0.5 μ L 10 mM dNTP, 5 μ L 10 μ M primerForward , 5 μ L 10 μ M primerReverse , 0.125 μ L taq polymerase, 1 μ L template หรือ cDNA และ 18.375 μ L DEPC water มีปริมาตรรวม 25 μ L โดยใช้ปริมาณหรือความเข้มข้นของ cDNA แต่ละตัวอย่างเท่ากันกับยีนควบคุมที่ได้ทดสอบไว้แล้ว แต่เพิ่มจำนวนรอบมากกว่ายีนควบคุม เนื่องจากยีน *OcLOX* มีการแสดงออกน้อยกว่า ตั้งอุณหภูมิและเวลาสำหรับการทำปฏิกิริยา ดังนี้

ช่วงที่ 1 อุณหภูมิ 94°C นาน 3 นาที

ช่วงที่ 2 อุณหภูมิ 94°C นาน 30 วินาที

อุณหภูมิ 50°C นาน 1 นาที

อุณหภูมิ 72°C นาน 1 นาที ทำซ้ำจำนวน 30 รอบ

ช่วงที่ 3 อุณหภูมิ 72°C นาน 10 นาที

ตรวจวิเคราะห์ผลผลิต PCR ด้วยเครื่องอิเล็กโตรโฟรีซิส บน 0.8% agarose gel และย้อมด้วย EtBr ตรวจภายใต้กล้อง UV แถบที่ได้จะอยู่ในระนาบเดียวกัน ต่ำกว่าชิ้น DNA มาตรฐานที่ 500 bp ซึ่งมีขนาดประมาณ 470 bp เปรียบเทียบความสว่างของแถบที่ได้ ทำการสกัด RNA ใหม่และทำตามขั้นตอนต่าง ๆ ที่กล่าวมาทั้งหมด เปรียบเทียบความสว่างของแถบที่ได้หรือการแสดงออกของยีนเป้าหมายโดยเปรียบเทียบกับยีนควบคุม (18S)

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วยโปรแกรม Statistic Analysis System (SAS) โดยวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance) สัมประสิทธิ์สหถดถอย (Linear Regression) และทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ย โดยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT) และ Least Significant Difference (LSD) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p \leq 0.05$)

สถานที่และระยะเวลาทำการทดลอง

สถานที่ทำการทดลอง หน่วยวิจัยพืชผลหลังการเก็บเกี่ยว ศูนย์ปฏิบัติการวิจัยและเรือนปลูกพืชทดลอง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม

ระยะเวลาทำการทดลอง กันยายน 2546 – ธันวาคม 2550

ผล

การทดลองที่ 1 ปัจจัยที่มีผลต่อการพัฒนาอาการสะท้านหนาวของพืชสกุลกะเพรา

1.1 ระดับอุณหภูมิและช่วงเวลาในการเก็บรักษา

อุณหภูมิเป็นปัจจัยหลักที่ทำให้ใบพืชสกุลกะเพราเกิดการพัฒนาอาการสะท้านหนาว โดยการทดสอบหาอุณหภูมิที่ทำให้เกิดอาการสะท้านหนาว (chilled temperature) และอุณหภูมิที่ไม่ทำให้เกิดอาการสะท้านหนาว (non-chilled temperature) โดยการเก็บรักษาใบพืชสกุลกะเพรา 3 ชนิดที่อุณหภูมิ 4 °C 8 °C 12 °C และ 25 °C พบว่าที่ 4 °C ทำให้ใบพืชเกิดอาการสะท้านหนาวได้อย่างชัดเจน และมีความสม่ำเสมอหลังการเก็บรักษาไว้นาน 12 ชั่วโมง อาการมีการพัฒนาเพิ่มขึ้นเมื่อเก็บรักษานานขึ้น ใบพืชสกุลกะเพราทั้ง 3 ชนิดไม่เกิดอาการสะท้านหนาวตลอดระยะเวลาการเก็บรักษาที่ 12 °C โดยมีอายุการเก็บรักษานานถึง 1 สัปดาห์และมีคุณภาพที่ผู้บริโภคยอมรับได้ ส่วนที่ 8 °C การพัฒนาอาการสะท้านหนาวเกิดขึ้นอย่างช้า ๆ และเกิดการเสื่อมสภาพก่อนการพัฒนาอาการสะท้านหนาวถึงขั้นรุนแรงมากที่สุด สำหรับอุณหภูมิ 25 °C นั้นไม่เหมาะสมสำหรับการใช้ทดลองเนื่องจากใบแมงลักมีการสูญเสียและเหี่ยวอย่างรวดเร็ว (ภาพที่ 2)

1.2 สายพันธุ์และความเก่าแก่ทางสรีระของใบพืช

พืชสกุลกะเพราที่มีการปลูกเป็นการค้ามีความไวต่อการเกิดอาการสะท้านหนาวแตกต่างกัน ใบแมงลักมีความไวมากที่สุด รองลงมาได้แก่ใบกะเพรา และใบโหระพามีความไวน้อยสุด และใบแก่มีความไวต่ออุณหภูมิต่ำมากกว่าใบอ่อน โดยมีค่าดัชนีอาการสะท้านหนาวแตกต่างกันมีนัยสำคัญทางสถิติ (ภาพที่ 2)

พืชสกุลกะเพราแต่ละชนิดมีความไวต่อการสูญเสียกลั่นหรือเกิดกลั่นผิดปกติแตกต่างกัน การเกิดกลั่นผิดปกติมีความสัมพันธ์กับความรุนแรงของการเกิดอาการสะท้านหนาว ในใบแมงลักเก็บรักษาที่ 4 °C นาน 24 ชั่วโมง มีคะแนนจากการประเมินคุณภาพของกลั่นลดลง มีกลั่นน้อยลงหรือเกิดกลั่นผิดปกติ ส่วนใบกะเพราและโหระพาเก็บรักษาที่ 4 °C นาน 24 ชั่วโมง จากการประเมินกลั่นไม่มีความแตกต่างของคะแนน โดยมีเริ่มความแตกต่างของคะแนนหลังการเก็บรักษา

นาน 48 ชั่วโมง ส่วนใบพืชเก็บรักษาที่ 12°C มีคะแนนการประเมินกลิ่นสูงกว่าและมีคะแนนค่อนข้างคงที่ (ภาพที่ 4)

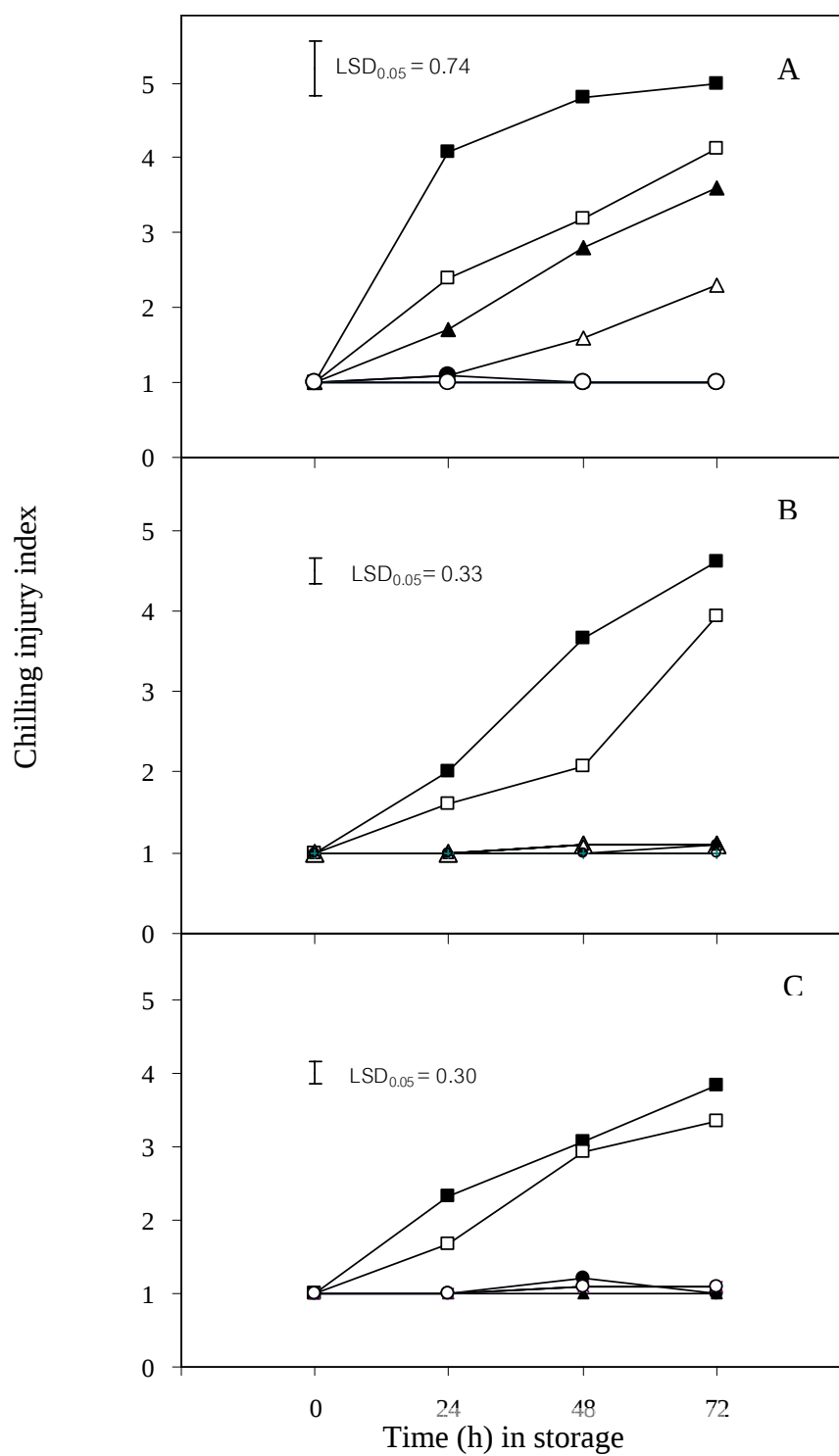
การพัฒนาอาการสะท้านหนาวมีความแตกต่างกันเล็กน้อยในแต่ละพันธุ์ (ภาพที่ 5) โดยแสดงอาการยุบหรือการตายของเนื้อเยื่อด้านหลังใบเกิดขึ้นก่อน ใบแมงลักมักเกิดจุดสีน้ำตาลขนาดเล็กที่บริเวณใกล้เส้นกลางใบ หรือปลายใบและขอบใบ เนื้อเยื่อเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลอ่อน ใบแก่ที่มีอาการรุนแรงเปลี่ยนเป็นสีดำคล้ำ ม้วนงอและเกิดการเหี่ยวอย่างเห็นได้ชัด ในกิ่งที่มีดอกพบว่าส่วนของกลีบเลี้ยงเปลี่ยนเป็นสีดำคล้ำและแสดงอาการหลังการเก็บไว้ที่ 4°C เพียง 4-8 ชั่วโมง แต่พบเพียงบางกิ่งเท่านั้น และอาการไม่สม่ำเสมอในทุกกิ่งในแต่ละซ้ำของการทดลอง ส่วนของก้านใบหรือลำต้นมีการพัฒนาอาการสะท้านหนาวช้าสุด โดยเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลคล้ำหลังการเก็บนานกว่า 48 ชั่วโมง อาการสะท้านหนาวในใบกะเพราส่วนใหญ่มีลักษณะคล้ายใบแมงลัก แต่มีลักษณะที่แตกต่างกัน เช่นลักษณะเป็นจุดหรือไม่เป็นจุด บริเวณเนื้อเยื่อเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลดำไม่แน่นอน บางครั้งเกิดมากที่ขอบใบแล้วพัฒนาขยายขนาดเพิ่มมากขึ้นไปยังส่วนกลางใบ ส่วนเนื้อเยื่อใบที่ไม่เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเปลี่ยนเป็นสีเขียวอ่อนหรือเหลืองและร่วง ใบแก่ที่อยู่ด้านล่างของกิ่งอาการสะท้านหนาวและการร่วงในใบแก่เกิดเร็วขึ้นและรุนแรงกว่าปกติ ถ้ามีร่องรอยการเข้าทำลายของโรคหรือแมลงก่อนการเก็บรักษา ซึ่งเกิดเนื้อเยื่อตายรอบรอยแผลที่เกิดขึ้น ในบางกิ่งหรือบางชุดของพืชทดลองที่มีการบำรุงต้นหรือเร่งปุ๋ยมาก ลำต้นและใบมีขนาดใหญ่และค่อนข้างอวบ น้ำมีก้านกิ่งค่อนข้างเปราะ พบลักษณะเฉพาะ ได้แก่ อาการยอดแดงหรือยอดดำในใบอ่อน โดยใบและยอดอ่อนที่แตกออกใหม่จากบริเวณข้อของกิ่งเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลแดงหรือสีดำและเหี่ยวทั้งกิ่ง ส่วนของท่อน้ำเลี้ยงในใบอ่อนเปลี่ยนเป็นสีดำคล้ำกว่าส่วนของเนื้อใบ ก้านใบและกิ่งแขนงเปลี่ยนเป็นสีดำ อาการปรากฏชัดหลังการเก็บรักษานาน 24 ชั่วโมง สำหรับอาการสะท้านหนาวในโหระพา มีลักษณะอาการแตกต่างจากใบแมงลักและโหระพาอย่างชัดเจน อาการเกิดขึ้นบริเวณหลังใบ เกิดการตายของเนื้อเยื่อเป็นแถบยาวๆ สีน้ำตาลแดง ในเนื้อเยื่อใบขนานกับท่อน้ำเลี้ยงน้ำหรือเกิดสีน้ำตาลดำที่ปลายใบ เมื่อมีอาการรุนแรงขึ้นเนื้อเยื่อเปลี่ยนเป็นสีดำคล้ำบริเวณหน้าใบ แผลแห้งและหลุดทำให้ใบเหี่ยวและใบร่วงได้ง่าย โดยเฉพาะใบที่เกิดโรคก่อนการเก็บรักษา พืชทดลองที่เก็บเกี่ยวในช่วงฤดูฝนมีโรคใบจุด หรือใบที่แก่มาก มีสีเขียวเข้มและสีเขียวอ่อนปนเหลืองผสมอยู่ มักพบในกิ่งที่มีขนาดใหญ่และมีอายุมาก

1.3 อายุการเก็บเกี่ยว

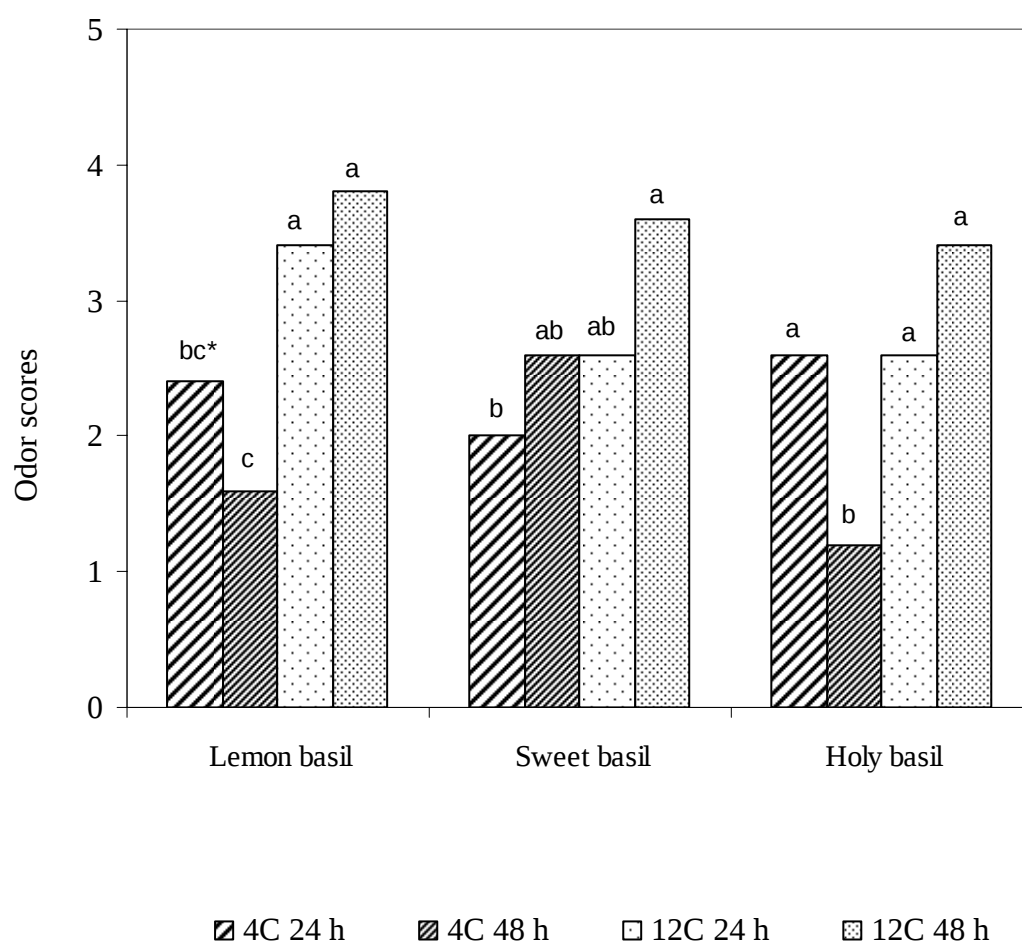
เนื่องจากพืชสกุลกะเพรามีการเก็บเกี่ยวหลายครั้ง (multiharvesting) ดังนั้นใบพืชที่เก็บเกี่ยวแต่ละครั้งอาจมีความแตกต่างกันของความไวต่ออุณหภูมิต่ำ เมื่อเปรียบเทียบใบแมงลักที่เก็บเกี่ยวครั้งแรก (อายุ 30 วันหลังย้ายปลูก) มีการพัฒนาของอาการสะท้อนหนาวช้ากว่าและมีระดับความรุนแรงน้อยกว่าใบพืชที่เก็บเกี่ยวหลังการย้ายปลูก 120 วัน และใบแก่อาการสะท้อนหนาวรุนแรงกว่าใบอ่อนแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ภาพที่ 5)

1.4 ความชื้นสัมพัทธ์ในการเก็บรักษา

มีการทดสอบสภาพการเก็บรักษา 3 แบบ คือ บรรจุเปียก (เสียบหลอดน้ำหรือจุ่มปลายก้านในแจกันที่มีน้ำเปล่า เฉลี่ยความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 97) บรรจุแห้ง (บรรจุกล่องกระดาษที่รองด้วยแผ่นพลาสติก เฉลี่ยความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 75) และบรรจุในถุงพลาสติกเลียนแบบการบรรจุเพื่อการค้า (บรรจุในถุงพอลิเอทิลีนเจาะรู และมัดปากถุงด้วยหนังยาง เฉลี่ยความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 85) พบว่า ใบแมงลักที่บรรจุเปียก มีการพัฒนาอาการสะท้อนหนาวช้าที่สุด รองลงมาได้แก่การบรรจุในถุง PE และการบรรจุแห้งในกล่องมีการเกิดอาการสะท้อนหนาวเร็วและรุนแรงมากที่สุด แสดงว่าความชื้นมีความสัมพันธ์โดยตรงกับการพัฒนาอาการสะท้อนหนาว (ภาพที่ 6)

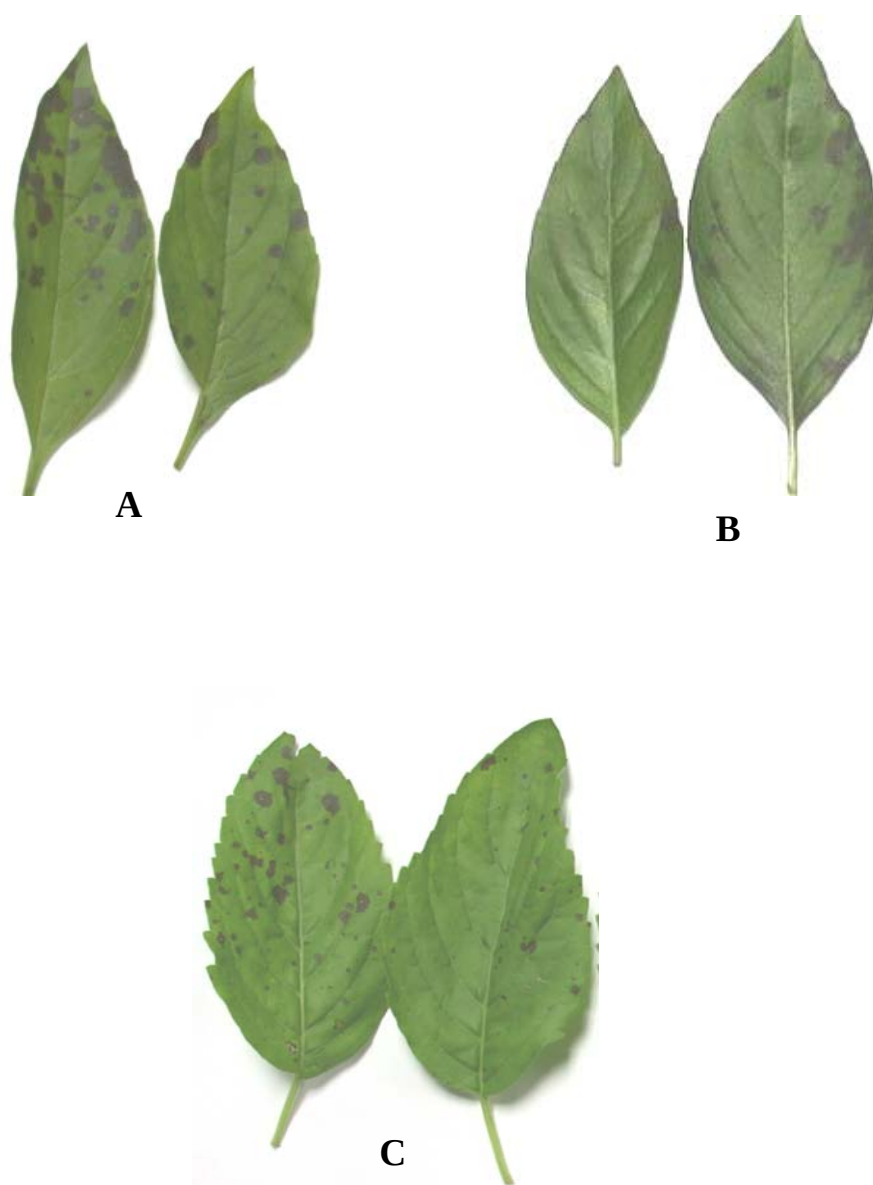


ภาพที่ 2 ดัชนีสะท้อนหนาวของใบแมงลัก (A) ใบโหระพา (B) และใบกะเพรา (C) ระหว่างการเก็บรักษาใบอ่อน (□, △, ○, ◇) และใบแก่ (■, ▲, ●, ◆) ที่ 4 (□, ■) 8 (△, ▲) 12 (○, ●) และ 25°C (◇, ◆)

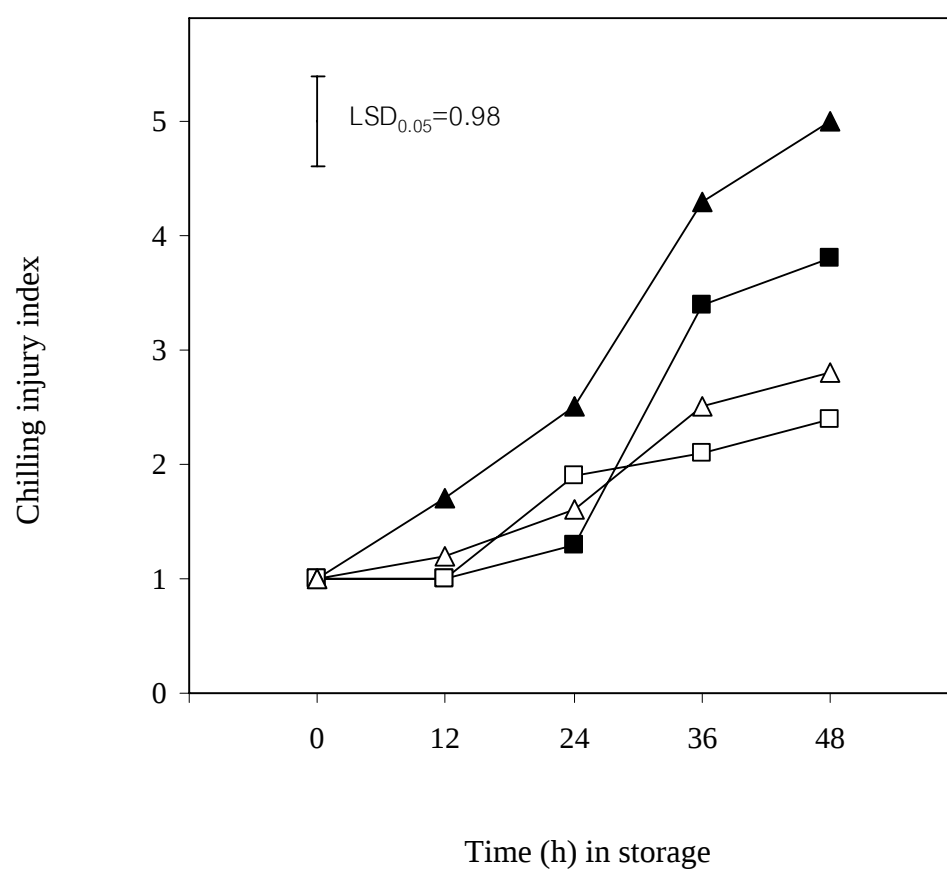


ภาพที่ 3 คะแนนกลิ่นของใบแมงลัก ใบโหระพา และใบกะเพรา หลังการเก็บรักษาที่ 4 และ 12°C นาน 24 และ 48 ชั่วโมง

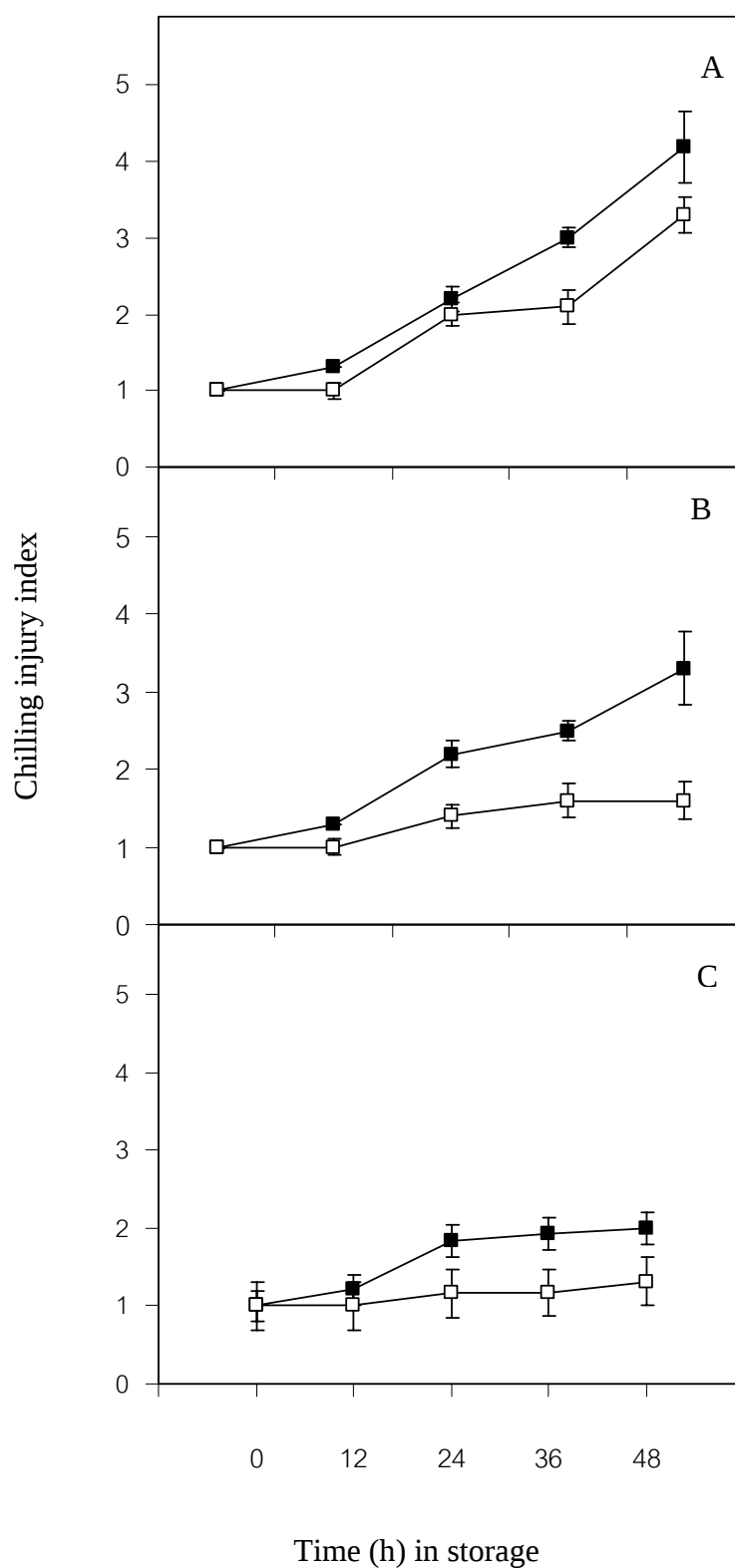
หมายเหตุ * ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรต่างกันในแต่ละชนิดพืช มีความแตกต่างกันที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยใช้วิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%



ภาพที่ 4 อาการสะท้อนขาวในใบแมงลัก (A) ใบโหระพา (B) และใบกะเพรา (C) หลังการเก็บ
รักษาที่อุณหภูมิ 4°C นาน 24 ชั่วโมง



ภาพที่ 5 ดัชนีสะท้อนหนาวของแมงลักระหว่างการเก็บรักษาที่ 4°C ในใบอ่อน (□) และใบแก่ (■) อายุการเก็บเกี่ยว 30 วันหลังการย้ายปลูก และในใบอ่อน (△) และใบแก่ (▲) อายุการเก็บเกี่ยว 120 วันหลังการย้ายปลูก



ภาพที่ 6 ดัชนีสะท้อนหนาวของแมงลัก ใบอ่อน (□) และใบแก่ (■) ระหว่างการเก็บรักษาที่ 4°C ภายใต้สภาพความชื้นสัมพัทธ์ 75% (A) 85% (B) และ 97% (C)

การทดลองที่ 2 ผลของอุณหภูมิต่อการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีและความเสียหายของเยื่อหุ้มเซลล์

จากผลการทดลองที่ 1 พบว่าแมงลักเป็นพืชที่มีความไวต่ออุณหภูมิต่ำมากที่สุดและโหระพามีความไวต่ออุณหภูมิน้อยที่สุด จึงเลือกเมื่อเปรียบเทียบพืชทั้งสองชนิดในการทดลองนี้

2.1 การรั่วไหลของประจุ (electrolyte leakage)

เมื่อเปรียบเทียบค่าการรั่วไหลของประจุ ระหว่างสาขพันธุ์และความแก่ทางสรีรของใบ โดยวัดการรั่วไหลของประจุจากใบแก่และจากใบอ่อนของใบแมงลักและโหระพาเก็บรักษาที่ 4 และ 12^oซ พบว่าใบแมงลักแก่เก็บรักษาที่ 4^oซ มีการรั่วไหลของประจุมากกว่าใบอ่อน หลังการเก็บรักษาไว้นาน 24 ชั่วโมง ส่วนใบโหระพามีการรั่วไหลของประจุน้อยกว่าใบแมงลัก โดยค่าการรั่วไหลของประจุในเนื้อเยื่อใบอ่อนและใบแก่ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ส่วนใบเก็บรักษาไว้ที่ 12^oซ มีค่าต่ำและคงที่ตลอดการเก็บรักษาทั้งใบแมงลักและใบโหระพา (ภาพที่ 7)

เมื่อเปรียบเทียบเนื้อเยื่อที่เกิดความเสียหายและเนื้อเยื่อปกติ โดยนำใบแก่ของใบแมงลักที่มีค่าดัชนีอาการสะท้อนหนาวแตกต่างกัน แยกเนื้อเยื่อที่เกิดสีน้ำตาลและเนื้อเยื่อปกติจากใบ เมื่อเปรียบเทียบค่าการรั่วไหลของประจุในเนื้อเยื่อที่เกิดสีน้ำตาลมีค่าสูงกว่าเนื้อเยื่อปกติ และมีการรั่วไหลเพิ่มสูงขึ้นสอดคล้องกับค่าดัชนีอาการสะท้อนหนาวที่เพิ่มขึ้น โดยในเนื้อเยื่อปกติมีการรั่วไหลของประจุคงที่ไม่่ว่าเป็นเนื้อเยื่อปกติที่แยกมาจากใบที่มีค่าดัชนีอาการสะท้อนหนาวมากขึ้นก็ตาม (ภาพที่ 8)

2.2 การเปลี่ยนแปลงปริมาณ thiobarbituric acid (TBA) reactive compounds หรือ malondialdehyde (MDA) และกิจกรรมของเอนไซม์ lipoxygenase (LOX)

ปริมาณ TBA- reactive compounds ที่คำนวณเป็นปริมาณ MDA ซึ่งแสดงถึงผลิตภัณฑ์ของ lipid oxidation ในใบแก่ของแมงลักและโหระพา พบว่าใบแมงลักเก็บรักษาที่ 4^oซ มีการเพิ่ม MDA มากขึ้นเมื่อเก็บรักษาไว้นานขึ้น แต่ในใบโหระพามีค่าน้อยกว่าใบแมงลักและมีค่าค่อนข้างคงที่ (ภาพที่ 9A) เมื่อเปรียบเทียบกับกิจกรรมเอนไซม์ LOX ในใบแก่และใบอ่อนของแมงลัก พบว่าในใบแก่มีปริมาณ MDA สูงกว่าใบอ่อนเล็กน้อย แต่กิจกรรมเอนไซม์ LOX ในใบแก่มีค่าสูงกว่าใบอ่อนอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยมีลักษณะการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์

แตกต่างกัน ใบแก่มีกิจกรรมเอนไซม์ LOX ลดลงในช่วง 0-24 ชั่วโมงและมีกิจกรรมเพิ่มขึ้นเล็กน้อยในชั่วโมงที่ 36 ของการเก็บรักษา แต่ในใบอ่อน มีกิจกรรมค่อนข้างคงที่ แต่หลังการเก็บรักษานาน 48 ชั่วโมง ทั้งในใบอ่อนและใบแก่มีกิจกรรมเอนไซม์ LOX ต่ำสุด (ภาพที่ 9 B)

การเปรียบเทียบใบแก่ของโหระพาและแมงลักที่มีค่าดัชนีอาการเสี้ยนหนาวหรืออาการสีน้ำตาลที่ระดับความรุนแรงต่างกัน พบว่าใบแมงลักมีปริมาณ MDA หรือ TBA- reactive compounds มากกว่าใบโหระพาเล็กน้อย แต่อาการที่ระดับสีน้ำตาลเท่ากับ 3 หรือเกิดสีน้ำตาล 30-50% ของพื้นที่ใบ ในใบแมงลักมีปริมาณ MDA เพิ่มขึ้นและแตกต่างทางสถิติกับใบโหระพา (ภาพที่ 10)

2.3 การเปลี่ยนแปลงของเอนไซม์ที่ควบคุมหรือกำจัดอนุมูลอิสระ

การเปลี่ยนแปลงของเอนไซม์ 4 ชนิด คือ ascorbate peroxidase (APX), catalase (CAT), guaiacol peroxidase (GPX) และ superoxide dismutase (SOD) ในใบแมงลัก ซึ่งเป็นพืชสกุลกะเพราที่อ่อนแอต่ออนุมูลอิสระมากที่สุด เมื่อเปรียบเทียบระหว่างใบอ่อนและใบแก่ ซึ่งมีความไวต่ออนุมูลอิสระต่างกัน ในการทดลองเก็บรักษาใบที่ 4^oC พบว่า ในใบอ่อนและใบแก่ก่อนการเก็บรักษามีค่ากิจกรรมเอนไซม์ CAT ใกล้เคียงกัน แต่การเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของ CAT ในใบอ่อนมีกิจกรรมเพิ่มขึ้นหลังการเก็บรักษานาน 12 ชั่วโมง และมีกิจกรรมเพิ่มขึ้นสูงสุดหลังการเก็บรักษานาน 24 ชั่วโมง และมีกิจกรรมค่อนข้างคงที่ หลังการเก็บไว้นาน 36 ชั่วโมง แต่ในใบแก่เอนไซม์ CAT มีกิจกรรมลดลงอย่างต่อเนื่อง โดยมีกิจกรรมเพิ่มขึ้นเล็กน้อย หลังจากเก็บไว้นาน 36 ชั่วโมง และมีกิจกรรมต่ำสุดหลังการเก็บไว้นาน 48 ชั่วโมง ส่วนเอนไซม์ GPX ในใบอ่อนมีกิจกรรมสูงกว่าในใบแก่ ทั้งก่อนและระหว่างการเก็บรักษาที่ 4^oC โดยในใบอ่อนมีกิจกรรมค่อนข้างคงที่ แต่ในใบแก่มีกิจกรรมลดลงตลอดระยะเวลาการเก็บรักษา สำหรับเอนไซม์ APX และ SOD ทั้งในใบอ่อนและใบแก่ มีกิจกรรมค่อนข้างคงที่และไม่แตกต่างกัน (ภาพที่ 11)

2.4 การเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการเกิดสีน้ำตาล และปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (total free phenolics)

ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของเอนไซม์ catechol oxidase หรือ polyphenol oxidase (PPO) และเอนไซม์ phenylalanine ammonia lyase (PAL) โดยเปรียบเทียบกิจกรรมของเอนไซม์ PPO ใน

ใบแมลงลักและโหระพา ใบอ่อนและใบแก่เก็บรักษาที่ 4 และ 12°C พบว่าใบอ่อนมีกิจกรรมสูงกว่าใบแก่ในการเก็บรักษาทั้ง 2 อุณหภูมิ โดยมีแนวโน้มการเปลี่ยนแปลงของกิจกรรมลดลง ระหว่างการเก็บรักษาที่ 4°C แต่ใบแก่มีกิจกรรมลดลงเร็วกว่าใบอ่อน (ภาพที่ 12 A และ C) ในใบแมลงลัก รักษาเก็บที่ 12°C พบว่ามีกิจกรรมค่อนข้างคงที่ทั้งในใบอ่อนและใบแก่ แต่ในใบอ่อนมีกิจกรรมเพิ่มขึ้นเล็กน้อยตลอดการเก็บรักษา ส่วนในใบแก่มีกิจกรรมเพิ่มขึ้นชั่วคราวหลังเก็บรักษานาน 12 ชั่วโมง จากนั้นมีกิจกรรมลดลงแล้วมีกิจกรรมคงที่ สำหรับใบโหระพาพบว่ามีกิจกรรม PPO ในใบอ่อนสูงกว่าใบแก่เหมือนกับใบแมลงลัก แต่มีกิจกรรมค่อนข้างคงที่ทั้งที่อุณหภูมิ 4 และ 12°C แต่ใบแก่มีกิจกรรมเพิ่มสูงขึ้นแบบชั่วคราว หลังการเก็บรักษาที่ 4°C นาน 36 ชั่วโมง แต่กิจกรรมลดลงต่ำสุดหลังการเก็บรักษานาน 48 ชั่วโมง (ภาพที่ 12 B และ D) กิจกรรมเอนไซม์ PPO โดยรวมในใบแมลงลักมีค่าสูงกว่าใบโหระพา

เมื่อเปรียบเทียบกิจกรรมเอนไซม์ PPO PAL และปริมาณสารประกอบฟีนอลิก (ในรูปของ rosmarinic acid) ในใบแก่ของโหระพาและแมลงลักที่มีค่าดัชนีอาการสะท้านหนาวหรืออาการสีน้ำตาลที่ระดับความรุนแรงต่างกัน หลังการเก็บรักษาที่ 4°C พบว่าโดยรวมกิจกรรมของเอนไซม์ PPO ใบแมลงลักสูงกว่าใบโหระพา โดยช่วงเริ่มต้นของการเกิดสีน้ำตาล (CI2) มีกิจกรรมเอนไซม์มากกว่าใบที่ยังไม่เกิดอาการสะท้านหนาว (CI1) อย่างเห็นได้ชัด แต่กลับมีกิจกรรมลดลงเมื่อมีการพัฒนาอาการสีน้ำตาลรุนแรงมากขึ้น แต่ในโหระพามีกิจกรรมค่อนข้างคงที่ โดยมีกิจกรรมสูงขึ้นเล็กน้อยเมื่อใบมีการพัฒนาอาการสีน้ำตาลรุนแรงมากที่สุด (CI4) (ภาพที่ 13 A) แต่กิจกรรมเอนไซม์ PAL ในใบแมลงลักมีค่าเพิ่มขึ้นเล็กน้อยระหว่างการพัฒนาอาการที่รุนแรงขึ้น แต่ในโหระพามีสูงขึ้น ช่วงเริ่มต้นของการเกิดสีน้ำตาล (CI2) และมีกิจกรรมลดลงเล็กน้อยเมื่ออาการสะท้านหนาวรุนแรงขึ้น (ภาพที่ 13 B) สำหรับการเปลี่ยนแปลงของปริมาณสารประกอบฟีนอลิก (เปรียบเทียบกับ rosmarinic acid) พบว่าในใบโหระพามีปริมาณมากกว่าในใบแมลงลักแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ โดยมีปริมาณค่อนข้างคงที่ระหว่างการพัฒนาอาการสะท้าน ยกเว้นในใบแมลงลักที่มีการพัฒนาอาการสีน้ำตาลรุนแรงมากที่สุด (CI4) มีปริมาณสารฟีนอลิกในใบลดลงอย่างเห็นได้ชัด (ภาพที่ 13 C)

เมื่อเปรียบเทียบปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในแมลงลักใบอ่อนและใบแก่ หลังการเก็บรักษาที่ 4 และ 12°C พบว่ามีค่าค่อนข้างใกล้เคียงกันทั้งในใบอ่อนและใบแก่ แต่ในใบโหระพามีปริมาณสารฟีนอลิกเพิ่มขึ้นหลังการเก็บรักษาใบแก่ที่ 4°C นาน 24 ชั่วโมง แต่โดยรวมแล้วปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในใบโหระพามีค่ามากกว่าใบแมลงลัก (ภาพที่ 14)

2.5 ชนิดและปริมาณกรดไขมัน

การวิเคราะห์ชนิดและปริมาณกรดไขมันอิ่มตัวและไม่อิ่มตัวในแมงลัก ใบอ่อนและใบแก่ ระหว่างการเก็บรักษาที่ 4°C พบว่าปริมาณกรดไขมันอิ่มตัวที่พบมากที่สุดคือ palmitic acid (C16:0) รองลงมาได้แก่ steric acid (C18:0) และ myristic acid (C14:0) มีปริมาณน้อยที่สุด โดยกรดไขมัน C16:0 และ C14:0 มีปริมาณลดลงระหว่างการเก็บรักษาทั้งในใบอ่อนและใบแก่ เมื่อเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงปริมาณกรดไขมันระหว่างการเก็บรักษา พบว่าหลังการเก็บรักษาใบอ่อนนาน 12 ชั่วโมง กรดไขมัน C16:0 มีปริมาณลดลงแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ในใบแก่มีปริมาณกรดไขมัน C16:0 ลดต่ำลงหลังการเก็บรักษานาน 48 ชั่วโมงแล้ว

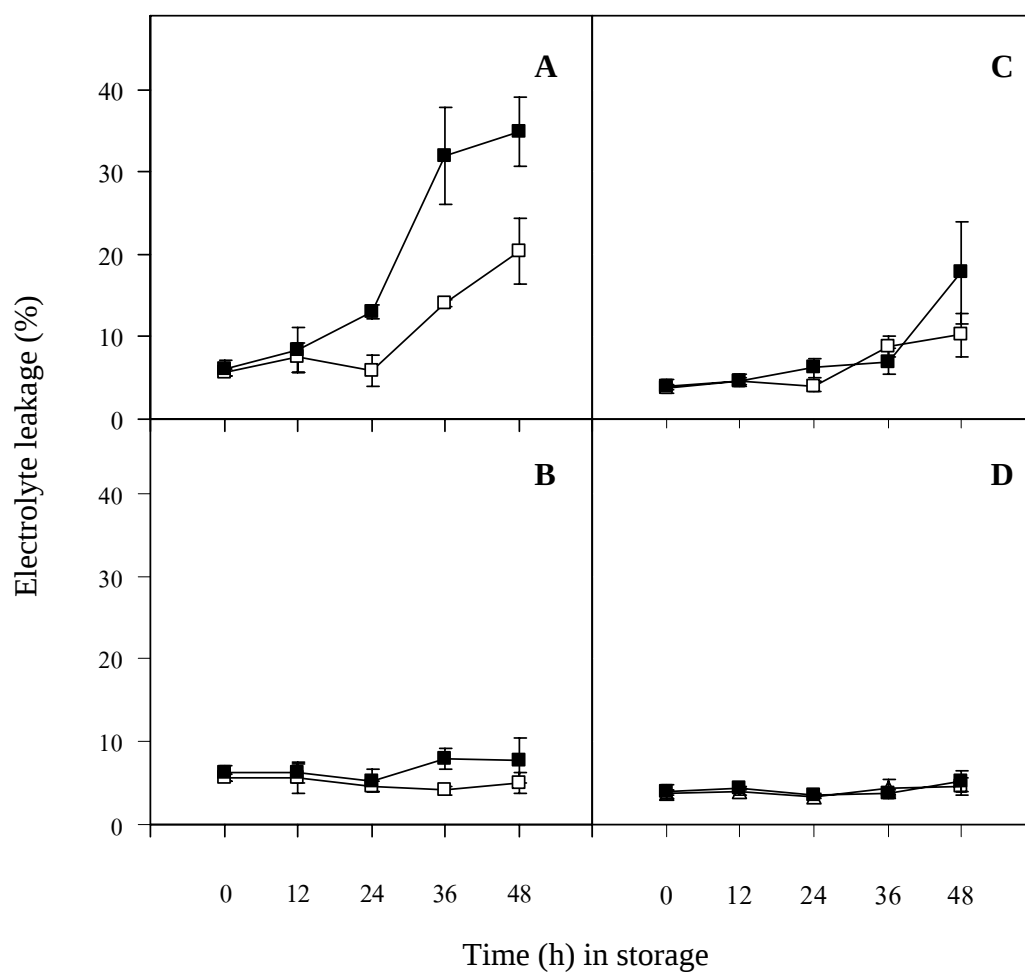
ส่วนชนิดของกรดไขมันไม่อิ่มตัวที่มีมากที่สุดได้แก่ linolenic acid (C18:3) รองลงมาได้แก่ linoleic acid (C18:2) palmitoleic acid (C16:1) และ petroselinic acid (C18:1) ตามลำดับ โดยกรดไขมันทั้งสองชนิดแรกมีปริมาณเพิ่มขึ้นระหว่างการเก็บรักษาทั้งในใบอ่อนและใบแก่ เมื่อพิจารณาปริมาณโดยรวมพบว่าในใบอ่อนมีปริมาณกรดไขมัน C18:2 สูงกว่าในใบแก่ แต่ในทางตรงข้ามใบอ่อนมีปริมาณกรดไขมัน C18:3 และ C16:1 น้อยกว่าในใบแก่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และพบว่าหลังการเก็บรักษาใบอ่อนนาน 12 ชั่วโมง มีปริมาณกรดไขมัน C16:1 C18:1 และ C18:3 เพิ่มขึ้นแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ในใบแก่กลับมีปริมาณกรดไขมัน C16:1 และ C18:1 ลดลง (ตารางที่ 1)

เมื่อเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงปริมาณกรดไขมันรวมของกรดไม่อิ่มตัวกับกรดไขมันอิ่มตัว พบว่าหลังจากเก็บรักษาใบอ่อนที่ 4°C นาน 12 ชั่วโมง มีปริมาณกรดไม่อิ่มตัวเพิ่มขึ้นและกรดไขมันอิ่มตัวลดลงแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับก่อนการเก็บรักษา และหลังการเก็บรักษา ใบแก่มีการเปลี่ยนแปลงในลักษณะเดียวกันหลังการเก็บรักษา 24 ชั่วโมงแล้ว (ตารางที่ 2) และเมื่อเปรียบเทียบอัตราส่วนกรดไขมันไม่อิ่มตัวต่อกรดไขมันอิ่มตัว พบว่าหลังการเก็บรักษานาน 12 ชั่วโมง ใบอ่อนมีค่าอัตราส่วนสูงกว่าใบแก่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่หลังการเก็บรักษานาน 24 ชั่วโมง ใบอ่อนมีค่าอัตราส่วนลดลง (ภาพที่ 15 A)

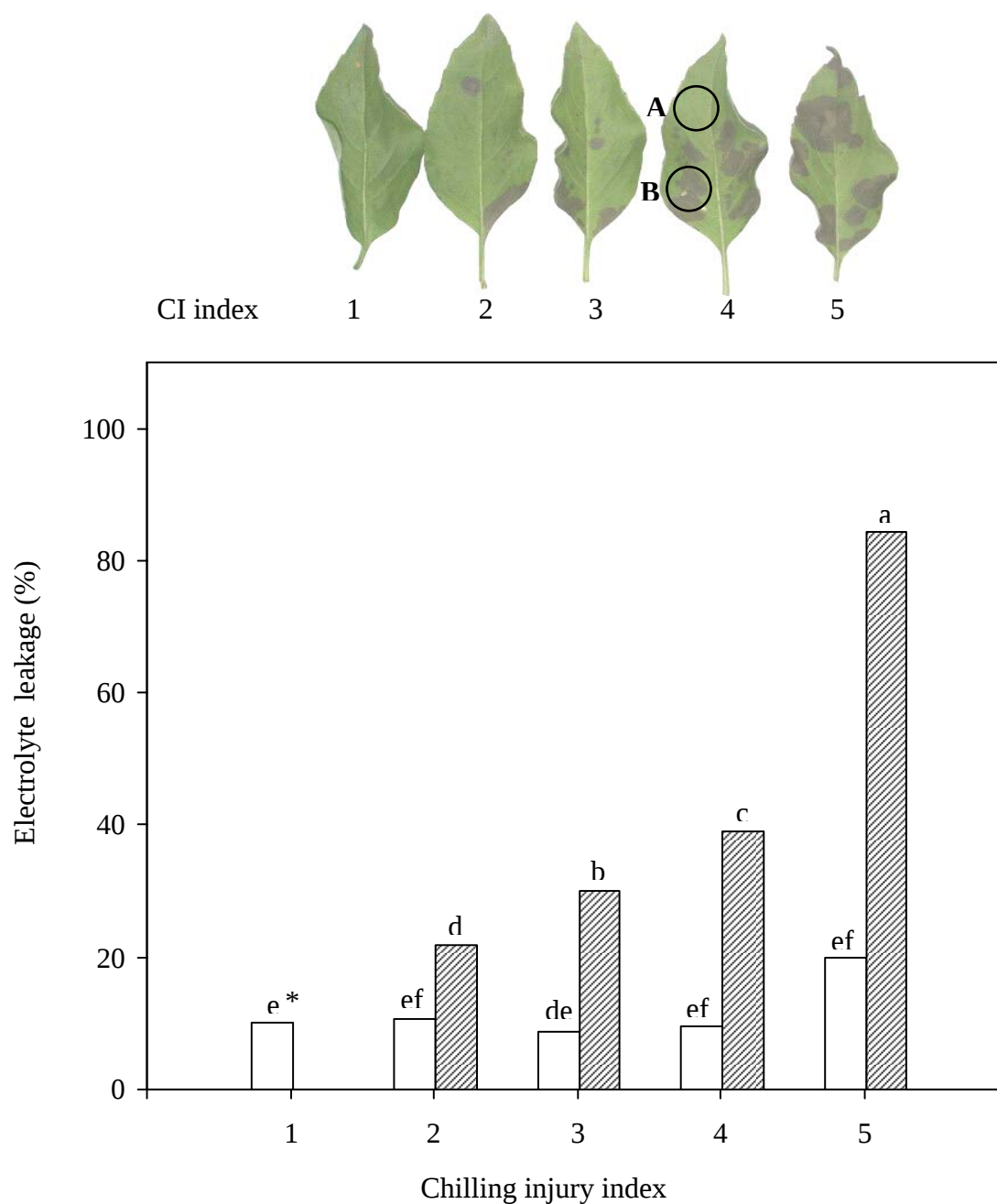
เมื่อเปรียบเทียบชนิดและปริมาณกรดไขมันไม่อิ่มตัวและไขมันอิ่มตัวในแมงลักใบแก่ หลังการเก็บรักษาที่ 4 และ 12°C พบว่าหลังการเก็บรักษาไว้นาน 12 ชั่วโมง กรดไขมันอิ่มตัว C14:0 มีปริมาณลดลง โดยในใบเก็บรักษาที่ 12°C มีปริมาณต่ำมากจนไม่สามารถวัดได้หรือมีค่า

เป็นศูนย์ ส่วนกรดไขมันไม่อิ่มตัว C16:0 มีปริมาณไม่แตกต่างกันและมีปริมาณคงที่ตลอดการเก็บรักษาทั้งที่ 4 และ 12°ซ และพบว่ากรดไขมันไม่อิ่มตัว C16:1 และ C18:1 มีปริมาณลดลง หลังการเก็บรักษาที่ 4°ซ นาน 12 ชั่วโมง แต่ในใบเก็บรักษาที่ 12°ซ ไม่มีการเปลี่ยนแปลงเพิ่มขึ้นกรดไขมันไม่อิ่มตัวทั้งสองชนิด โดยมีปริมาณลดลงหลังจากเก็บรักษานาน 24 ชั่วโมง (ตารางที่ 3)

เมื่อเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงปริมาณกรดไขมันรวมของกรดไม่อิ่มตัวและกรดไขมันอิ่มตัว พบว่าหลังการเก็บรักษาใบแก่ที่ 12°ซ นาน 12 ชั่วโมง มีปริมาณกรดไม่อิ่มตัว เพิ่มขึ้นและกรดไขมันอิ่มตัวลดลงอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบกับก่อนการเก็บรักษาที่ 4°ซ พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงปริมาณของกรดไม่อิ่มตัวและกรดไขมันอิ่มตัวในลักษณะเดียวกัน หลังการเก็บรักษานาน 24 ชั่วโมง (ตารางที่ 4) และเมื่อเปรียบเทียบอัตราส่วนกรดไขมันไม่อิ่มตัวต่อกรดไขมันอิ่มตัว พบว่าหลังการเก็บรักษาใบแก่ที่ 12°ซ นาน 12 ชั่วโมง มีค่าอัตราส่วนสูงกว่าการเก็บรักษาที่ 4°ซ ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ภาพที่ 15B)

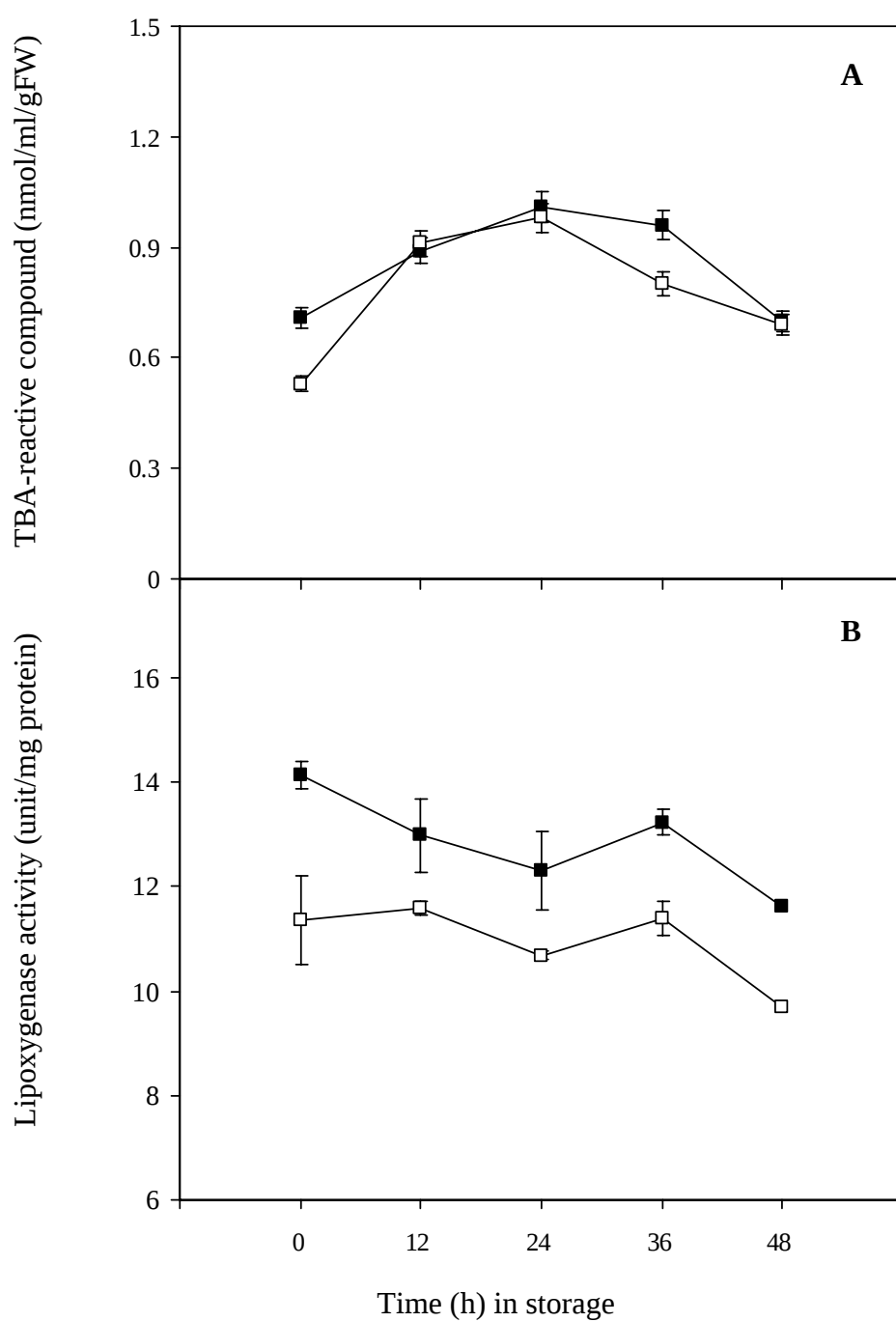


ภาพที่ 7 การรั่วของไหลประจุของเนื้อเยื่อใบแมงลัก (A, B) และใบโพธิ์พา (C, D) ในใบอ่อน (□) และใบแก่ (■) ระหว่างการเก็บรักษาที่ 4 (A, C) และ 12°C (B, D)

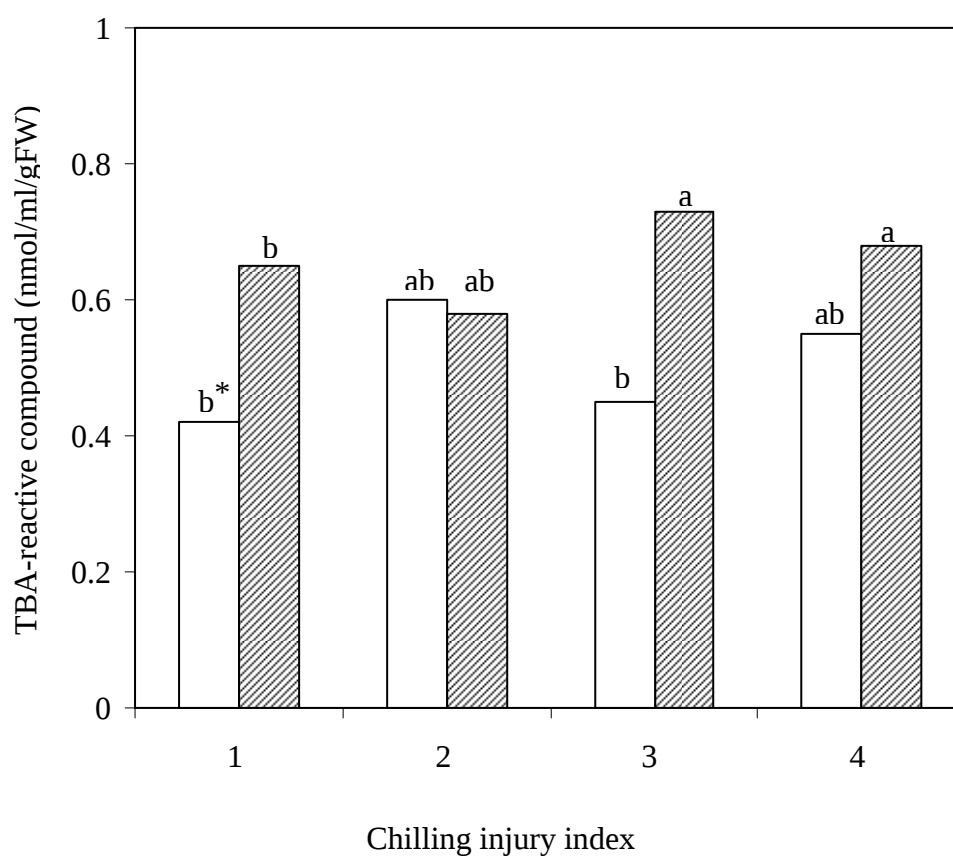


ภาพที่ 8 การร่วงไหลประจุของเนื้อเยื่อแมงลักใบแก่ที่มีอาการสะท้อนหนาวระดับแตกต่างกันหลังการเก็บรักษาที่ 4°C โดยเปรียบเทียบเนื้อเยื่อปกติ (A, □) และเนื้อเยื่อที่เกิดสีน้ำตาล (B, ▨)

หมายเหตุ * ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรต่างกันมีความแตกต่างกันที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยใช้วิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

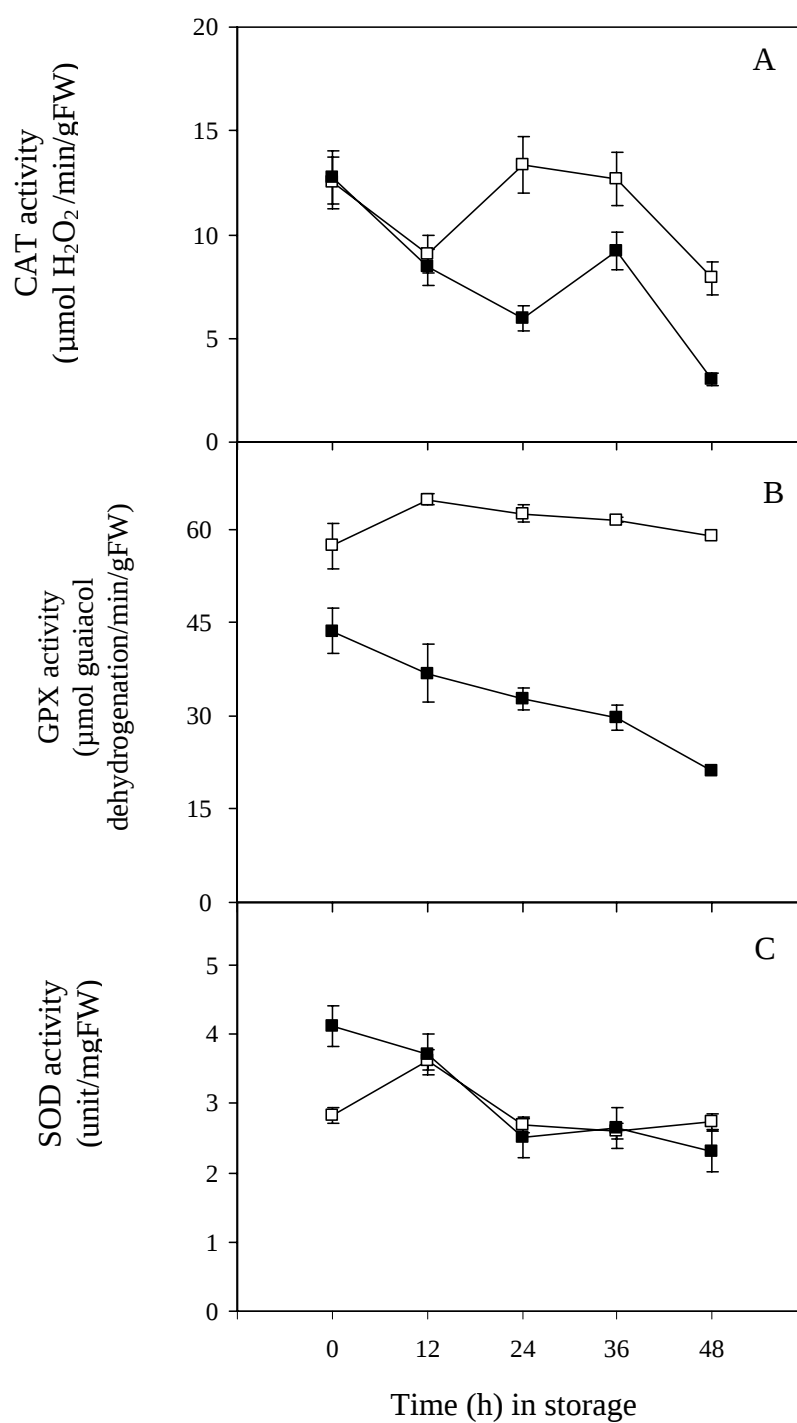


ภาพที่ 9 ปริมาณ TBA-reactive compounds (A) และ กิจกรรมของเอนไซม์ lipoxygenase (B) ของแมงลักใบอ่อน (□) และ ใบแก่ (■) ระหว่างการเก็บรักษาที่ 4°C

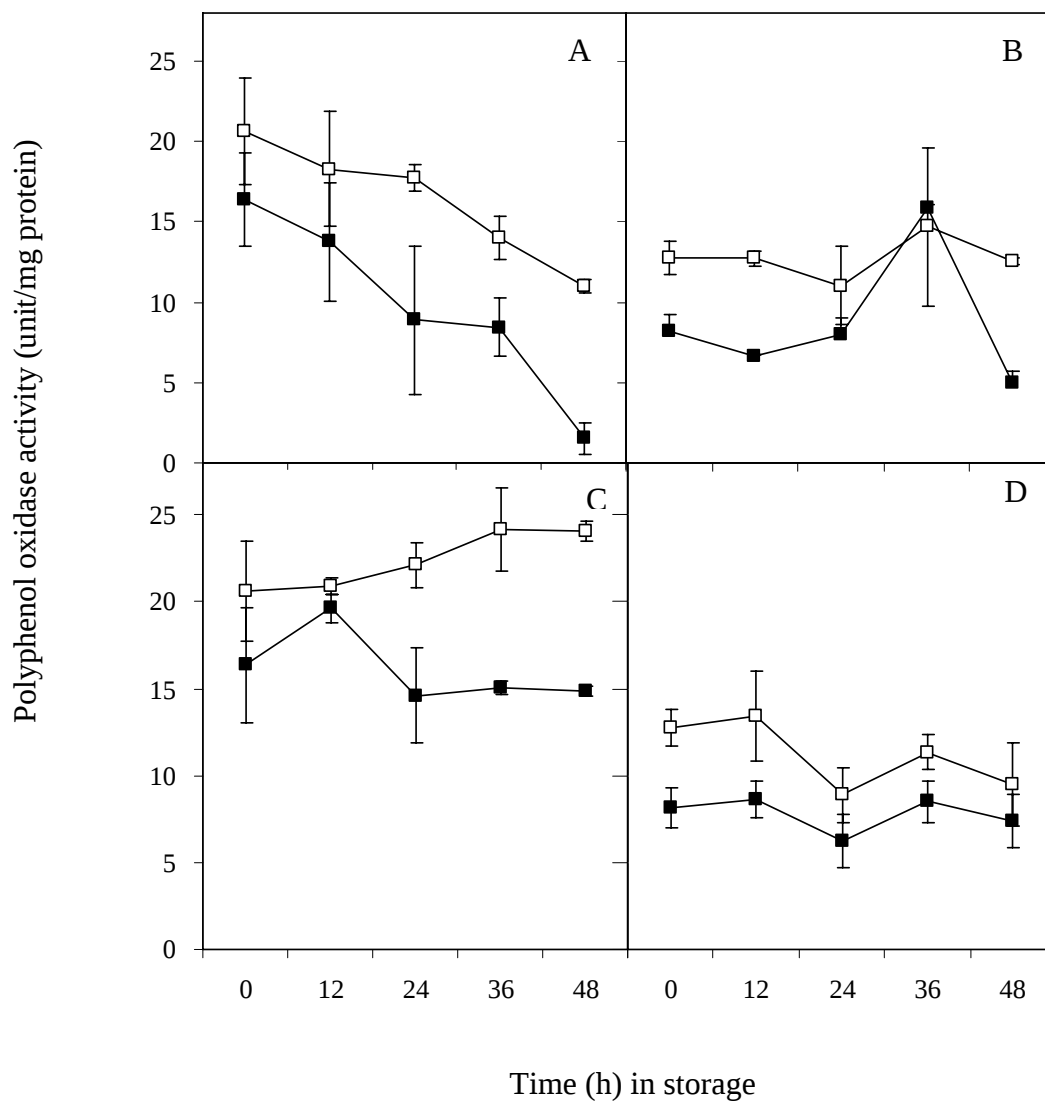


ภาพที่ 10 ปริมาณ TBA-reactive compounds ของเนื้อเยื่อแมงลักใบแก่ (□) และโหระพาใบแก่ (▨) ที่มีอาการสั้หนานวระดับแตกต่างกันหลังการเก็บรักษาที่ 4°C

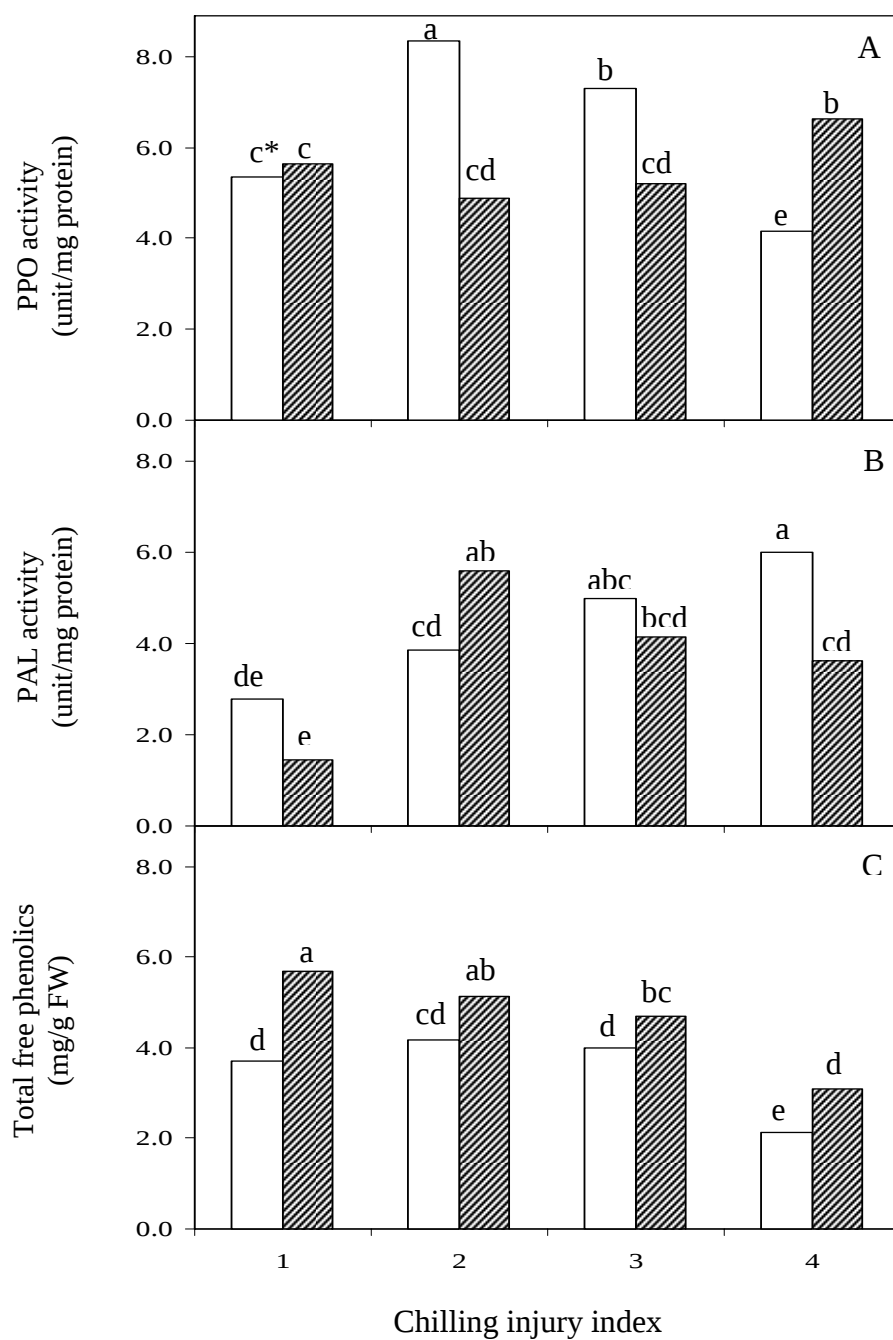
หมายเหตุ * ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรที่ต่างกันมีความแตกต่างกันที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%



ภาพที่ 11 กิจกรรมของเอนไซม์ catalase (CAT) (A), guaiacal peroxidase (GPX) (B) และ superoxide dismutase (SOD) (C) ของเนื้อเชื้อแมงลักใบอ่อน (□) และใบแก่ (■) ระหว่างการเก็บรักษาที่ 4°C

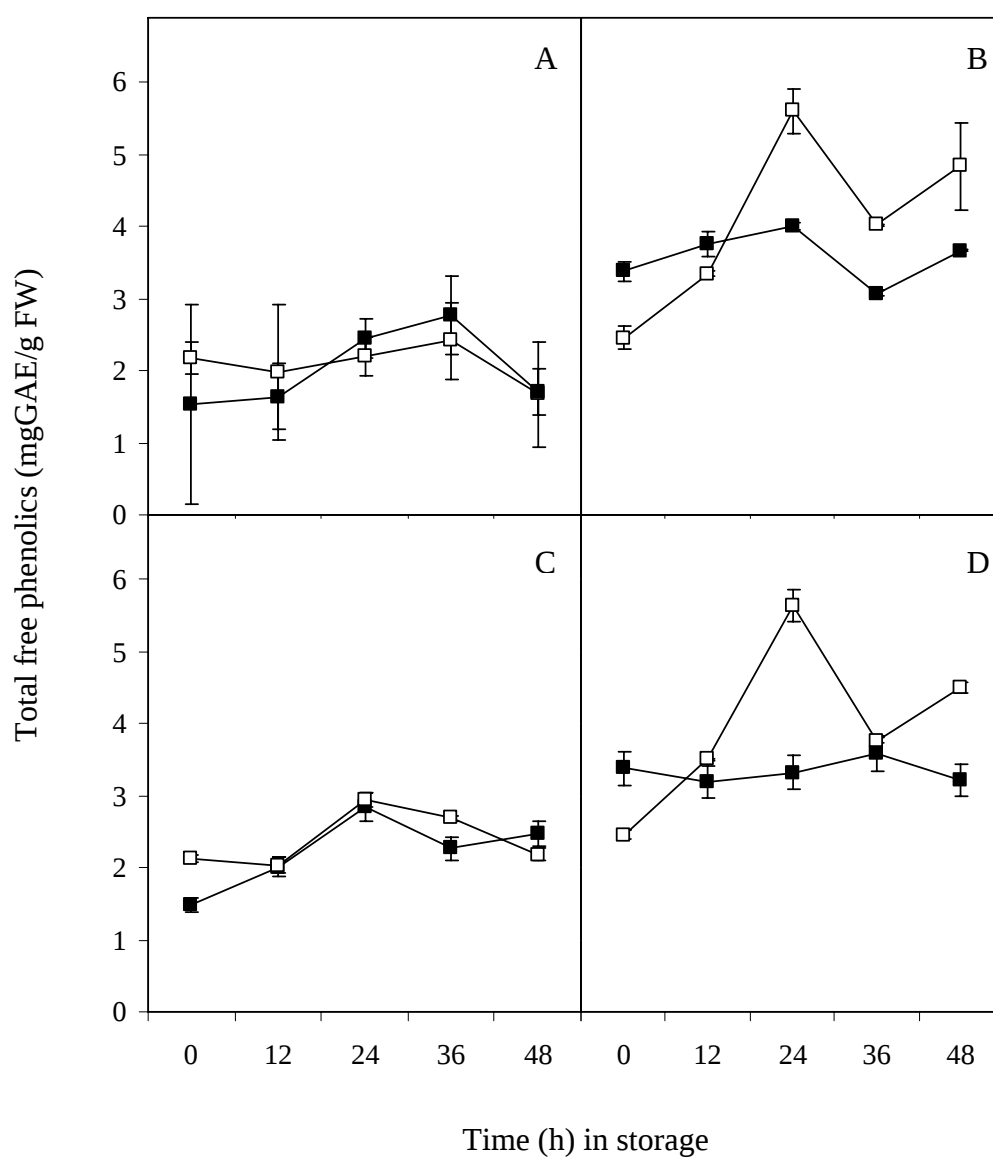


ภาพที่ 12 กิจกรรมของเอนไซม์ polyphenol oxidase ของใปอ่อน (□) และใปแก่ (■) ในแมงลัก (A, C) และโหระพา (B, D)ระหว่างการ เก็บรักษาที่ 4 (A, B) และ 12°C (C, D)



ภาพที่ 13 กิจกรรมของเอนไซม์ polyphenol oxidase (A) phenylalanine ammonia lyase (B) และ total free phenolics (C) ในใบแก่ของแมงลัก (□) และโหระพา (▨) ที่มีค่าดัชนีอาการสะท้านหนาวแตกต่างกัน

หมายเหตุ * ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรที่ต่างกันมีความแตกต่างกันที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%



ภาพที่ 14 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (GAE equivalent) ของใบอ่อน (□) และใบแก่ (■) ในใบแมงลัก (A, C) และใบโหระพา (B, D) เก็บรักษาที่ 4 (A, B) และ 12°C (C, D)

ตารางที่ 1 ชนิดและปริมาณ กรดไขมันอิ่มตัว (SFA) และกรดไขมันไม่อิ่มตัว (UFA) ของแมงลัก ใบอ่อนและใบแก่หลังการเก็บรักษาที่ 4°C ในช่วงเวลาที่แตกต่างกัน

Time in storage							
(h)	SFA (g/100 g fatty acid) *			UFA (g/100 g fatty acid) *			
	Myristic	Palmitic	Stearic	Palmitoleic	Petroselinic	Linoleic	Linolenic
	acid	acid	acid	acid	acid	acid	acid
	(C14:0)	(C16:0)	(C18:0)	(C16:1)	(C18:1)	(C18:2)	(C18:3)
at 4 °C							
Young leaves							
0	1.62 ab	4.68 a	2.25 cd	3.08 e	1.92 d	13.59 b	72.86 f
12	0.00 d	3.45 b	2.25 cd	3.38 d	2.28 a	14.00 b	74.63 de
24	1.27 bc	4.65 a	2.19 d	2.93 c	1.85 d	13.76 b	73.35 f
36	0.00 d	4.02 b	2.43 ab	3.03 e	1.97 cd	14.07 b	74.46 e
48	0.00 d	3.39 b	2.59 a	2.79 f	0.00 e	15.55 a	75.68 d
Mature leaves							
0	1.67 a	4.59 a	2.37 c	4.23 a	2.31 a	7.97 e	76.85 c
12	1.21 c	4.96 a	2.55 a	3.67 c	2.08 bc	7.34 e	78.21 b
24	0.00 d	4.53 a	2.38 bc	4.04 ab	2.23 ab	8.80 d	78.10 b
36	0.00 d	4.56 a	2.34 bcd	4.10 a	2.20 ab	9.34 d	77.46 bc
48	0.00 d	3.36 b	2.59 a	3.88 b	0.00 e	10.35 c	79.82 a

หมายเหตุ * ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรที่ต่างกันในแต่ละคอลัมน์มีความแตกต่างกันที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ตารางที่ 2 ปริมาณรวมของกรดไขมันไม่อิ่มตัว (UFA) และกรดไขมันอิ่มตัว (SFA) ของแมงลัก ใบอ่อนและใบแก่หลังการเก็บรักษาที่ 4°C ในช่วงเวลาที่แตกต่างกัน

Maturity	Time in storage (h) at 4°C	UFA (g/100g fatty acid)	SFA (g/100g fatty acid)
Young leaves	0	91.45 c*	8.55 a*
	12	94.30 a	5.70 c
	24	91.90 c	8.10 a
	36	93.55 ab	6.45 bc
	48	94.02 ab	5.98 bc
Mature leaves	0	91.36 c	8.64 a
	12	91.28 c	8.72 a
	24	93.09 b	6.91 b
	36	93.10 b	6.90 b
	48	94.05 ab	5.95 bc

หมายเหตุ * ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรที่ต่างกันในแต่ละคอลัมน์มีความแตกต่างกันที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ตารางที่ 3 ชนิดและปริมาณ กรดไขมันอิ่มตัว (SFA) และกรดไขมันไม่อิ่มตัว (UFA) ของแมงลัก ใบแก่หลังการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 และ 12°ซ ในช่วงเวลาแตกต่างกัน

Storage temperature	Time in storage		SFA (g/100g fatty acid) *			UFA (g/100g fatty acid) *		
	(h)		Myristic	Palmitic	Stearic	Palmitoleic	Petroselinic	Linoleic
			acid	acid	acid	acid	acid	acid
			(C14:0)	(C16:0)	(C18:0)	(C16:1)	(C18:1)	(C18:2)
4°C	0		1.67 a	4.59 ns	2.37 bc	4.23 a	2.31 a	7.97ns
	12		1.21 b	4.96	2.55 a	3.67 b	2.08 bcd	7.34
	24		0.00 c	4.53	2.38 bc	4.04 a	2.23 ab	8.80
	36		0.00c	4.56	2.34 c	4.10 a	2.20 abc	9.34
12°C	0		1.67 a	4.59	2.37 bc	4.23 a	2.31 a	7.97
	12		0.00 b	4.14	2.43 ab	3.91 ab	2.24 ab	8.24
	24		0.00 c	4.54	2.22 c	3.67 b	2.01 d	9.36
	36		0.00 c	4.94	2.22 c	4.01 a	2.03 cd	7.95

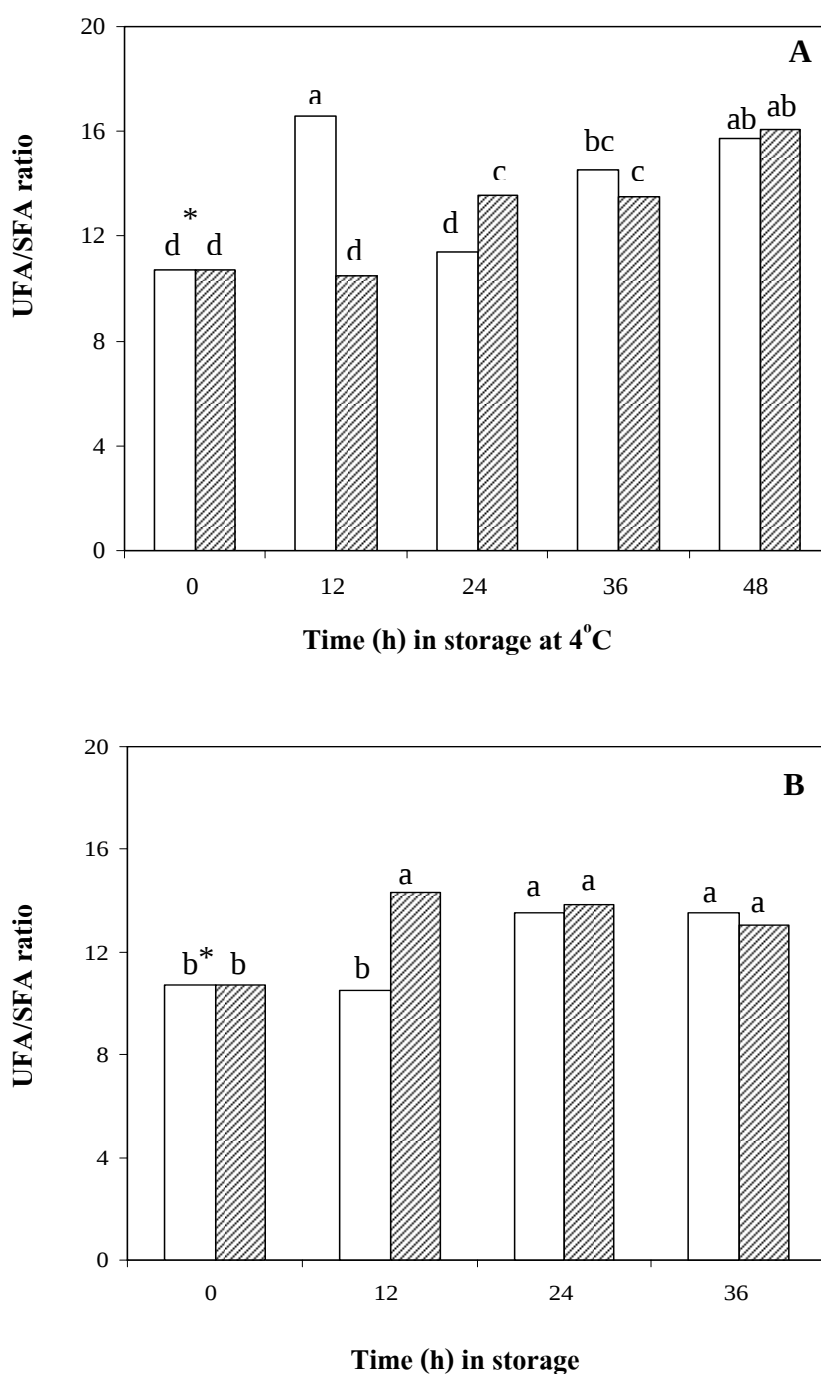
หมายเหตุ ns ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

* ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรที่ต่างกันในแต่ละคอลัมน์มีความแตกต่างกันที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ตารางที่ 4 ปริมาณรวมของกรดไขมันไม่อิ่มตัว (UFA) และกรดไขมันอิ่มตัว (SFA) ในแมงลักใบแก่หลังการเก็บรักษาที่ 4 และ 12°C ในช่วงเวลาที่แตกต่างกัน

Storage temperature	Time in storage (h) mature leaves	UFA (g/100g fatty acid) ^η	SFA (g/100g fatty acid) [*]
4°C	0	91.36 b	8.64 a
	12	91.28 b	8.72 a
	24	93.09 a	6.91 b
	36	93.10 a	6.90 b
12°C	0	91.36 b	8.64 a
	12	93.43 a	6.56 b
	24	93.24 a	6.76 b
	36	92.84 a	7.16 b

หมายเหตุ * ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรที่ต่างกันในแต่ละคอลัมน์มีความแตกต่างกันที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

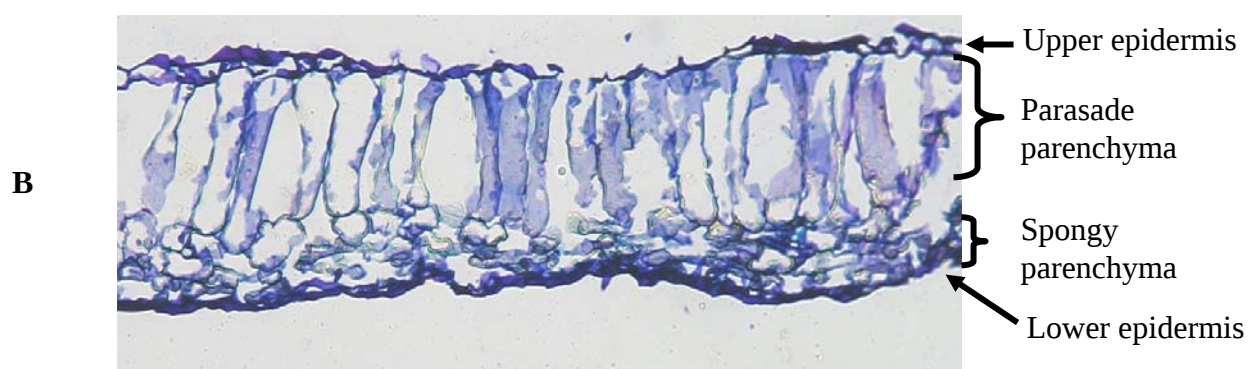
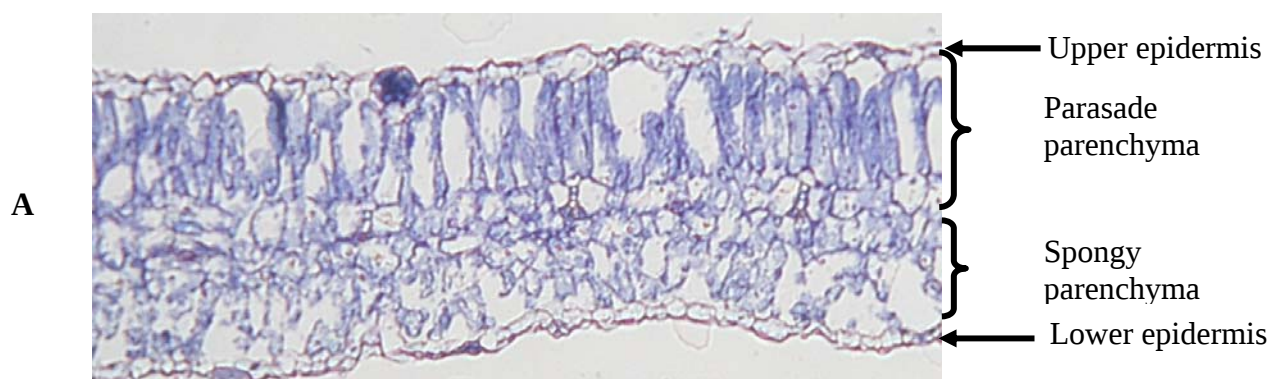


ภาพที่ 15 อัตราส่วนของปริมาณรวมกรดไขมันไม่อิ่มตัว (UFA) และปริมาณรวมกรดไขมันอิ่มตัว (SFA) ของแมงลักใบอ่อน (□) และใบแก่ (▨) เก็บรักษาที่ 4°C (A) และแมงลักใบแก่ เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 (□) และ 12°C (▨) (B)

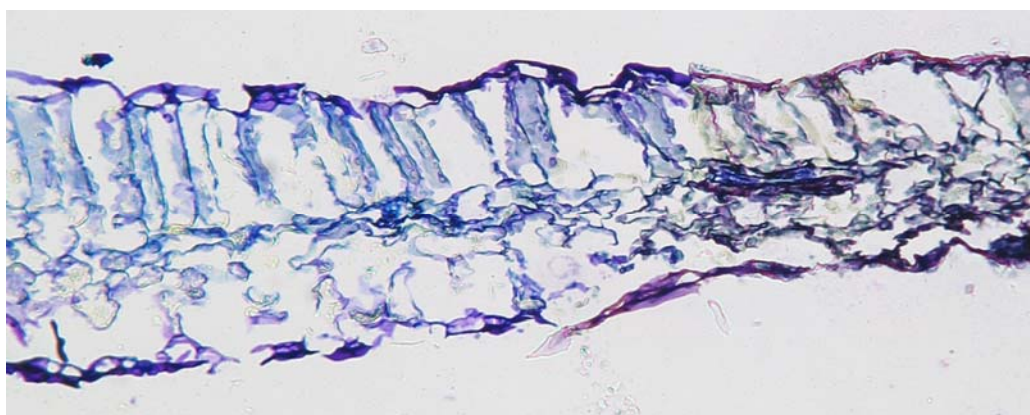
หมายเหตุ * ตัวอักษรที่เหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ย โดยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

การทดลองที่ 3 ศึกษาลักษณะทางกายวิภาคของใบพืชสกุลกะเพรา

เมื่อเปรียบเทียบลักษณะกายวิภาคใบแก่ของแมงลัก หลังการเก็บรักษาที่ 4^๐ซ นาน 24 ชั่วโมง พบว่าเซลล์ในชั้น spongy parenchyma ซึ่งอยู่ติดกับบริเวณด้านหลังใบ เกิดการยุบตัว สอดคล้องกับการปรากฏอาการยุบตัวของเนื้อเยื่อใบที่เกิดขึ้นบริเวณท้องใบก่อน ส่วนเซลล์ในชั้น palisade parenchyma มีสภาพสมบูรณ์ไม่แตกต่างกับก่อนการเก็บรักษา (ภาพที่ 16 A และ B) แต่เมื่อใบแมงลักมีอาการสะท้อนขาวในระดับรุนแรงขึ้น พบว่าบริเวณเนื้อเยื่อที่เกิดสีน้ำตาล มีการยุบตัวทั้งเซลล์ในชั้น spongy parenchyma และ palisade parenchyma ในขณะที่เนื้อเยื่อใบที่ไม่เกิดสีน้ำตาล (healthy tissue) ซึ่งอยู่ติดกับบริเวณที่เกิดสีน้ำตาล ยังคงมีสภาพของเซลล์ปกติ (ภาพที่ 17) เมื่อเปรียบเทียบลักษณะกายวิภาคใบอ่อนและใบแก่ของแมงลัก โหระพาและกะเพรา พบว่าใบแก่มีความหนาแน่นของเซลล์ palisade parenchyma น้อยกว่าใบอ่อน แต่ใบกะเพรามีลักษณะที่คล้ายกันทั้งใบอ่อนและใบแก่ (ไม่แสดงข้อมูล)



ภาพที่ 16 ภาพตัดขวางเนื้อเยื่อแมงลักใบแก่ ก่อนการเก็บรักษา (A) และหลังการเก็บรักษาที่ 4 °ซ นาน 24 ชั่วโมง ค่าดัชนีอาการสะท้อนหนาวในระดับ CI2 (B)



Healthy tissue Browning tissue

ภาพที่ 17 ภาพตัดขวางเนื้อเยื่อแมงลักใบแก่ เปรียบเทียบเนื้อเยื่อปกติและเนื้อเยื่อที่เกิดอาการ
 สะท้อนขาวในระดับรุนแรง CI4 หลังการเก็บรักษาที่ 4 °ซ นาน 24 ชั่วโมง

การทดลองที่ 4 การใช้ความร้อนและสารเคมีบางชนิดเพื่อลดอาการสะท้อนหนาวของใบพืชสกุลกะเพรา

แบ่งออกเป็น 4 การทดลองย่อย ซึ่งมีวัตถุประสงค์เพื่อหาวิธีการลดอาการสะท้อนหนาวของพืชทดลองและอธิบายความสัมพันธ์บางอย่างที่เกี่ยวข้องกับอาการสะท้อนหนาวที่ปรากฏ

4.1 การใช้สาร 1-methylcyclopropene (1-MCP)

ผลการทดลองพบว่าการรมสาร 1-MCP เข้มข้น 100 nL L^{-1} จะลดการเกิดอาการสะท้อนหนาวในใบแก่ของแมงลัก นาน 24 ชั่วโมง แต่หลังจากการเก็บรักษาที่ 4°C นาน 36 ชั่วโมง กลับมีค่าดัชนีอาการสะท้อนหนาวมากกว่าชุดควบคุม แต่การให้สาร 1-MCP ที่เข้มข้นสูงกว่า (500 nL L^{-1}) กลับไม่สามารถชะลออาการสะท้อนหนาว เมื่อเปรียบเทียบค่าการรั่วไหลของประจุ พบว่าหลังจากการเก็บรักษาใบที่ 4°C นาน 24-36 ชั่วโมง ใบแก่ที่ได้รับ 1-MCP เข้มข้น 500 nL L^{-1} มีค่าการรั่วไหลของประจุสูงกว่าชุดควบคุมแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ภาพที่ 18)

4.2 การใช้สาร salicylic acid (SA)

การทดลองเบื้องต้นโดยจุ่มใบแมงลักทั้งก้านลงในสารละลาย SA ที่ความเข้มข้นแตกต่างกันนาน 10 นาที ก่อนเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4°C พบว่าที่ระดับความเข้มข้น 0.5 และ 0.25 mM สามารถชะลอการพัฒนาอาการสะท้อนหนาวในใบแมงลักได้ (ไม่แสดงข้อมูล) ทำการทดสอบซ้ำโดยการจุ่มก้านใบแก่ในสารละลาย SA ความเข้มข้น 0.5 และ 0.25 mM นาน 5 และ 10 นาที พบว่าการจุ่มสารนาน 10 นาที ชะลอการพัฒนาของอาการสะท้อนหนาวได้นาน 24 ชั่วโมง เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่จุ่มก้านใบในน้ำกลั่น การเปรียบเทียบค่าการรั่วไหลของประจุพบว่าใบแมงลักที่ได้รับสาร SA มีการเพิ่มขึ้นของค่าการรั่วไหลของประจุสูงกว่าชุดควบคุม แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ภาพที่ 19) และสอดคล้องกับการชะลอการปรากฏอาการสะท้อนหนาว (ภาพที่ 20)

4.3 การใช้สภาพดัดแปลงบรรยากาศ (modified atmosphere packaging)

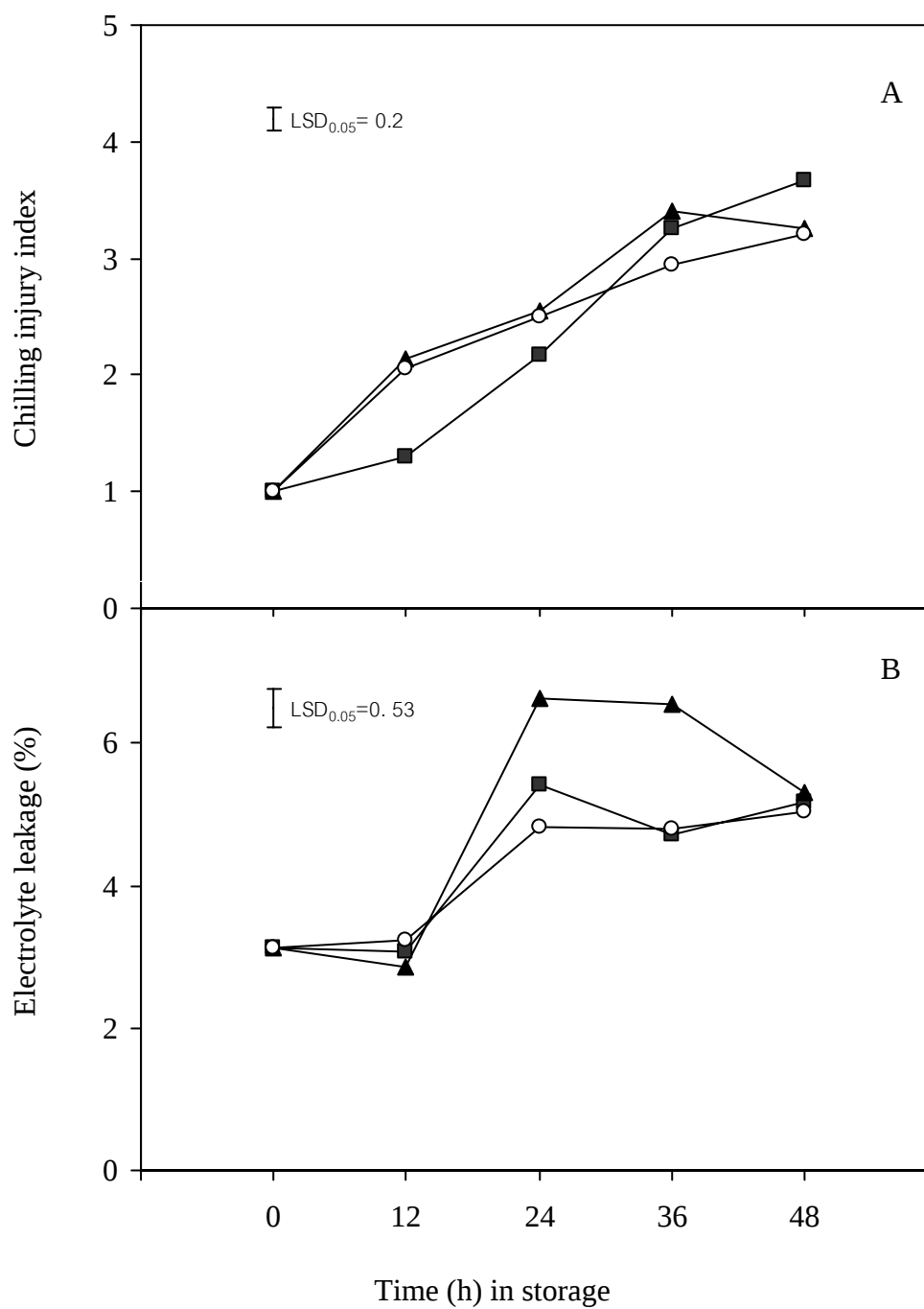
การทดลองเบื้องต้นทดลองบรรจุใบแมงลักในถุงพลาสติก 3 ชนิดคือ polypropylene (PP), polyethylene (PE) และ high density polyethylene (HDPE) บรรจุในสภาพปิดและเจาะรูที่ถุง

แล้วนำไปเก็บรักษาที่ 4°C พบว่าไบฟิซที่บรรจุถุง PP และ HDPE มีค่าดัชนีอาการสะท้อนหนาวในไบแกที่เก็บในสภาวะคัดแปลงบรรยากาศ (ปิดปากถุง) น้อยกว่าหรือมีอาการสะท้อนหนาวน้อยกว่าไบที่เก็บในสภาพอากาศปกติ (ถุงเจาะรู) ทำการทดลองซ้ำและเมื่อเปรียบเทียบค่าการรั่วไหลของประจุระหว่างเก็บรักษา พบว่าไบแมงลักที่เก็บรักษาในถุง HDPE สภาพปิดมีการพัฒนาอาการสะท้อนหนาวช้ากว่าไบแมงลักที่บรรจุในถุงเจาะรูแตกต่างกันอย่างชัดเจนหลังการเก็บรักษานานกว่า 24 ชั่วโมง โดยชะลอการเกิดอาการสะท้อนหนาวได้มากกว่าไบฟิซที่บรรจุในถุง PE (ภาพที่ 21 A) เมื่อเปรียบเทียบการรั่วไหลของประจุพบว่าไบแมงลักที่บรรจุในถุงปิดมีค่าการรั่วไหลของประจุต่ำกว่าเนื้อเยื่อไบที่บรรจุในถุงเจาะรู แตกต่างอย่างนัยสำคัญทางสถิติ หลังการเก็บไบไว้นาน 48 ชั่วโมง (ภาพที่ 21 B)

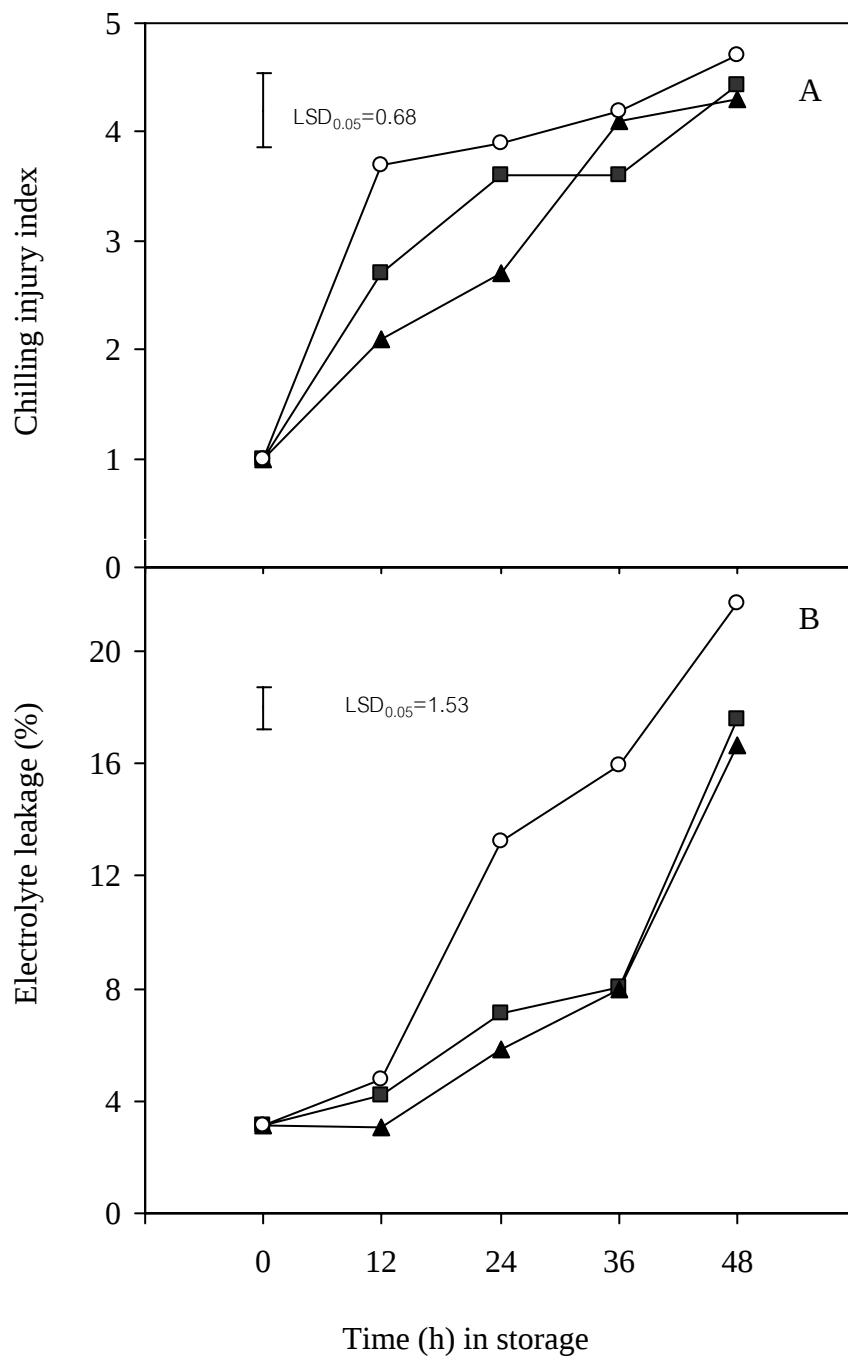
4.4 การใช้ความร้อนเพื่อลดการเกิดอาการสะท้อนหนาว

ผลการทดสอบเบื้องต้นพบว่าให้ความร้อนกับพืชสกุลกะเพรา 3 ชนิดคือ กะเพรา โหระพาและแมงลัก ที่ 38°C 15 นาที สามารถชะลอการพัฒนาอาการสะท้อนหนาวในไบแกของแมงลักได้ ส่วนการให้ความร้อนในไบโหระพาและกะเพรา พบว่าให้ผลไม่แตกต่างกัน เมื่อเปรียบเทียบกับพืชที่ไม่ได้ให้ความร้อนหรือชุดควบคุม (ไม่แสดงข้อมูล) แต่การให้ความร้อนนานกว่า 15 นาที กลับให้ผลในทิศทางตรงข้าม กล่าวคือไบแกมีอาการสะท้อนหนาวรุนแรงกว่าชุดควบคุม และเกิดความเสียหายจากความร้อน (heat injury) อาการปรากฏชัดในไบกะเพรา ส่วนของท่อน้ำในไบเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล

การทดสอบซ้ำในไบแมงลักเมื่อเปรียบเทียบไบอ่อนและไบแก่ พบว่าในไบอ่อนได้รับความร้อนมีการพัฒนาอาการสะท้อนหนาวช้ากว่าไบที่ไม่ได้รับความร้อน หลังการเก็บรักษาที่ 4°C นาน 24 ชั่วโมงเป็นต้นไป แต่ในไบแก่พบความแตกต่างหลังการเก็บรักษานาน 24 ชั่วโมงเท่านั้น (ภาพที่ 22 A) แต่เมื่อเปรียบเทียบค่าการรั่วไหลของประจุหลังการนำพืชไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิที่ทำให้เกิดอาการสะท้อนหนาวนาน 12 ชั่วโมง มีค่าการรั่วไหลของประจุจากเนื้อเยื่อไบแก่และไบอ่อนที่ได้รับความร้อนมีค่าต่ำกว่าเนื้อเยื่อที่ไม่ได้รับความร้อน แต่เมื่อเก็บรักษานานมากกว่า 12 ชั่วโมง ค่าการรั่วไหลของประจุกลับไม่มีความแตกต่างทางสถิติในระหว่างเนื้อเยื่อที่ได้รับและไม่ได้รับความร้อน โดยเฉลี่ยค่าการรั่วไหลของประจุในไบแก่มีค่าสูงกว่าไบอ่อนแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (ภาพที่ 22 B)



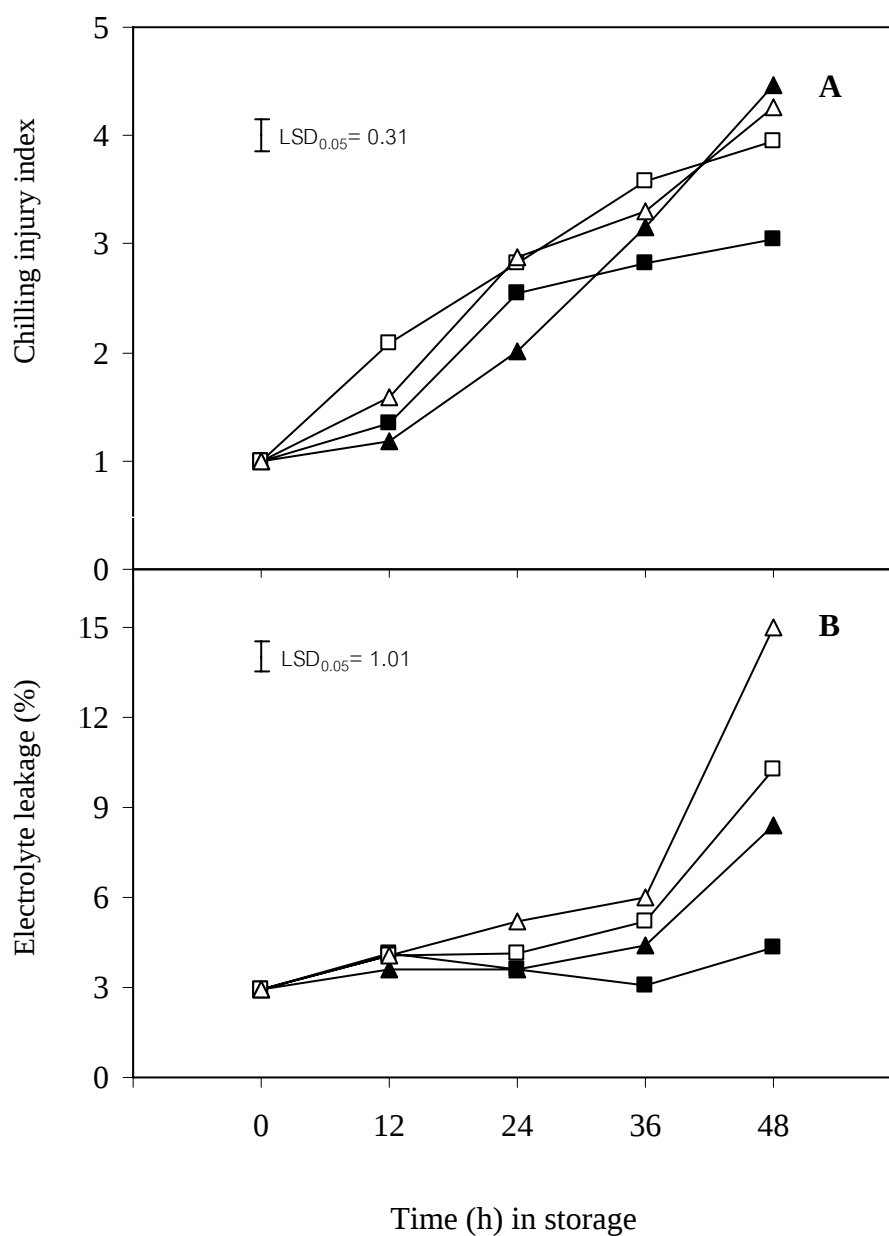
ภาพที่ 18 ดัชนีอาการสะท้อนหนาว (A) และการรั่วไหลของประจุ (B) ของเนื้อเยื่อแมงลักใบแก่ที่ไม่ได้รับสาร 1-MCP (O) ได้รับ 100 nL L⁻¹ 1-MCP (■) และ 500 nL L⁻¹ 1-MCP (▲) ระหว่างการเก็บรักษาที่ 4°C



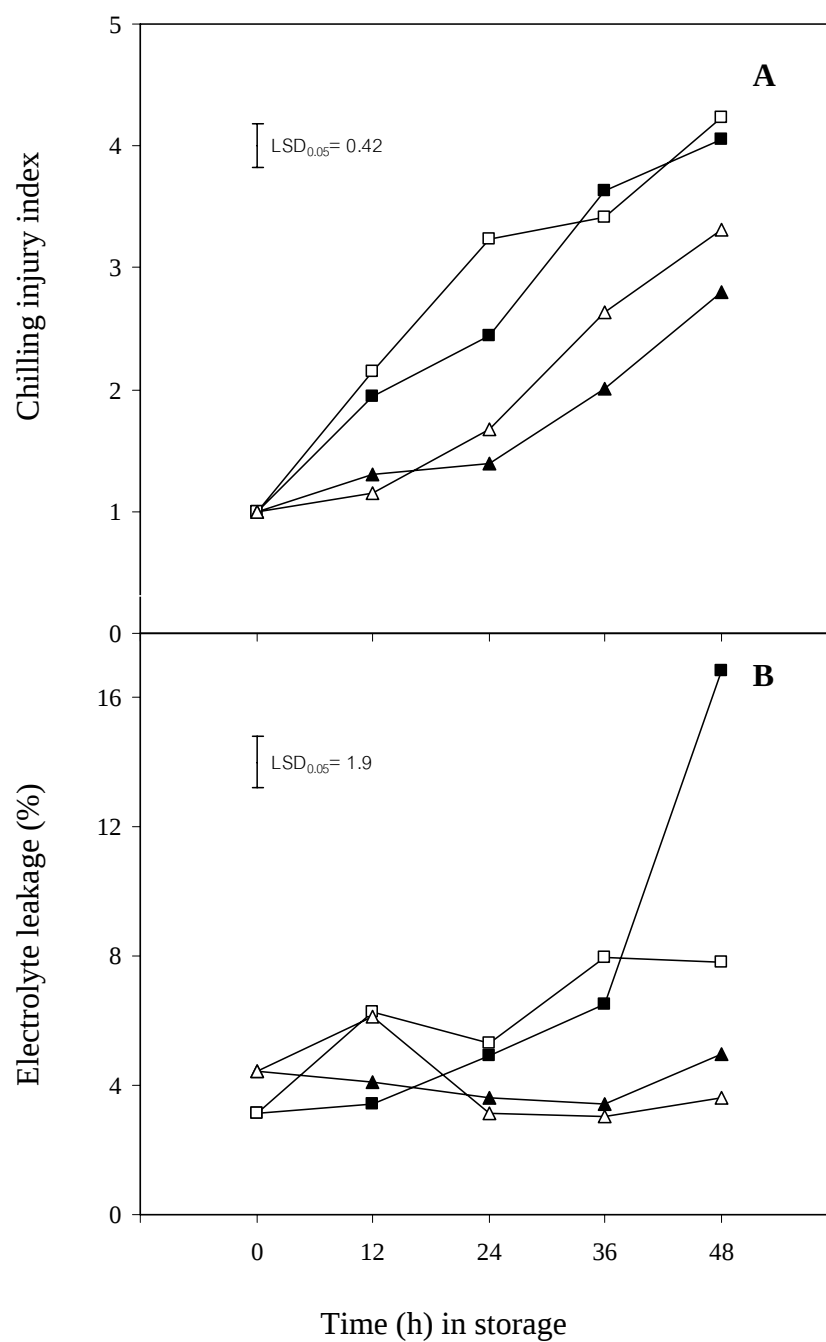
ภาพที่ 19 คำนี้อาการสะท้อนหนาว (A) และการรั่วไหลของประจุ (B) ของเนื้อเยื่อแมงลักใบแก่ที่ไม่ได้รับสาร salicylic acid (○) ได้รับ 0.25 mM SA (■) และ 0.5 mM SA (▲) ระหว่างการเก็บรักษาที่ 4°C



ภาพที่ 20 อาการสะท้อนหวาใน แมงลักใบแก่ที่ใส่สาร 0.5 mM salicylic acid (A) หรือแช่ใน น้ำกลั่น (B) ก่อนเก็บรักษาที่ 4°C นาน 24 ชั่วโมง



ภาพที่ 21 ดัชนีอาการสะท้อนหนาว (A) และการรั่วไหลของประจุ (B) ของเนื้อเยื่อแมงลักใบแก่บรรจุ HDPE แบบปิด (■) HDPE แบบเจาะรู (□) PE แบบปิด (▲) และ PE แบบเจาะรู (△) ระหว่างการเก็บรักษาที่ 4°C



ภาพที่ 22 ดัชนีอาการสะท้อนหนาว (A) และการรั่วไหลของประจุ (B) ของเนื้อเยื่อแมงลักใบแก่ (▲) และใบอ่อน (△) ที่ไม่ได้รับความร้อน และได้รับความร้อน 38°C นาน 15 นาที ใบแก่ (■) และใบอ่อน (□) ระหว่างการเก็บรักษาที่ 4°C

การทดลองที่ 5 ผลของอุณหภูมิต่อการแสดงออกของยีนที่ควบคุมการผลิตเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการเกิดอาการสะท้านหนาวของพืชสกุลกะเพรา

5.1 การแสดงออกของยีนที่ควบคุมการผลิตเอนไซม์ lipoxxygenase (LOX) ในใบแมงลัก (*Ocimum x citriodorum*)

ทดสอบ degenerate primer ที่มีการออกแบบไว้แล้ว คู่ที่ได้ผลิตภัณฑ์และสามารถโคลนได้คือ FNui (forward LOX) 5'-ATG GAK RAC HGA TGA RGA RTT YG-3' (Promyou, 2007) และ PrepR1(reverse LOX) 5'-CCA RTG RCT NAT KAG YTG-3' (Boonsiri, 2007) หลังการทำ PCR และ โคลนได้ มีขนาด 470 คู่เบส ซึ่งประกอบด้วยแถบ 2 แถบ (ภาพผนวกที่ 1) จึงทำการแยกเจลด้วยชุดสำเร็จรูป QIAquick gel extract (Qiagen, Germany) แถบบนตั้งชื่อ LOX4 A และแถบล่างให้ชื่อว่า LOX4B ทำการโคลนทั้ง 2 แถบ แต่โคลนได้เฉพาะ LOX4 B จึงทำการออกแบบ specific primer จำนวน 2 เส้น Forward LOX4B 5'-TCC AGG AGT TTC CAC CAA AG-3' และ Reverse LOX4B 5'-GTA CCC GGA TTC GTT CAC TG-3' หลังการทำ PCR ได้ product ขนาด 468 คู่เบส (ภาพผนวกที่ 2) ทำการตรวจเช็คพบว่า เป็นโคลนใหม่ได้ตั้งชื่อว่า *OcLOX* (EU140837) นำลำดับเบสเข้าโปรแกรม Blastn พบว่าลำดับเบสมีความคล้ายคลึงกับยีน *LOX* ของ *Fragaria x ananassa* (AJ578035) 73%, *Cucumis sativus* (AJ271161) 72%, *Lycopersicon esculentum* (AY008278) 69% และ *Brassica napus* (AY162142) 69% ซึ่งมีลำดับของนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโน ดังภาพที่ 23 และ 24

```

1  CGAAAAATGC TTGCTGGAGA CAACCCGGTT ATCATTCGAC GCCTCCAGGA GTTTCCACCA
61  AAGAGCAAAT TAGACCCTCA AAAATATGGG AATCATGACA GCACCATCAC AAGGGAGCAC
121 ATCGAGAAAA ACATGAACGG CCTCTCTGTT GAAGAGGCAA TAGAGAAGAA CAAGTTGTTC
181 ATACTAGAAC ATCACGACGC GCTGATGCCA CACCTGAGAC GAATCAACAC GACAGCAACA
241 AAGACTTACG CCACCAGAAC TCTCCTCCTA CTTCAAGACG ACGGCACGCT GAAGCCCCTA
301 GCGATCGAGC TGAGCTTGCC ACATGAAGAC GGAGACTCGT GTGGAGCAGTGAGCAAAGTG
361 ATCACTCCGT GCCACGACGG CGGCATCCAA GGCACCATCT GGCAGCTGGC GAAAGCCTAC
421 GCTGCAGTGA ACGAATCCGG GTACCACCAA CTCATCAGCC ACTGGAAT 468

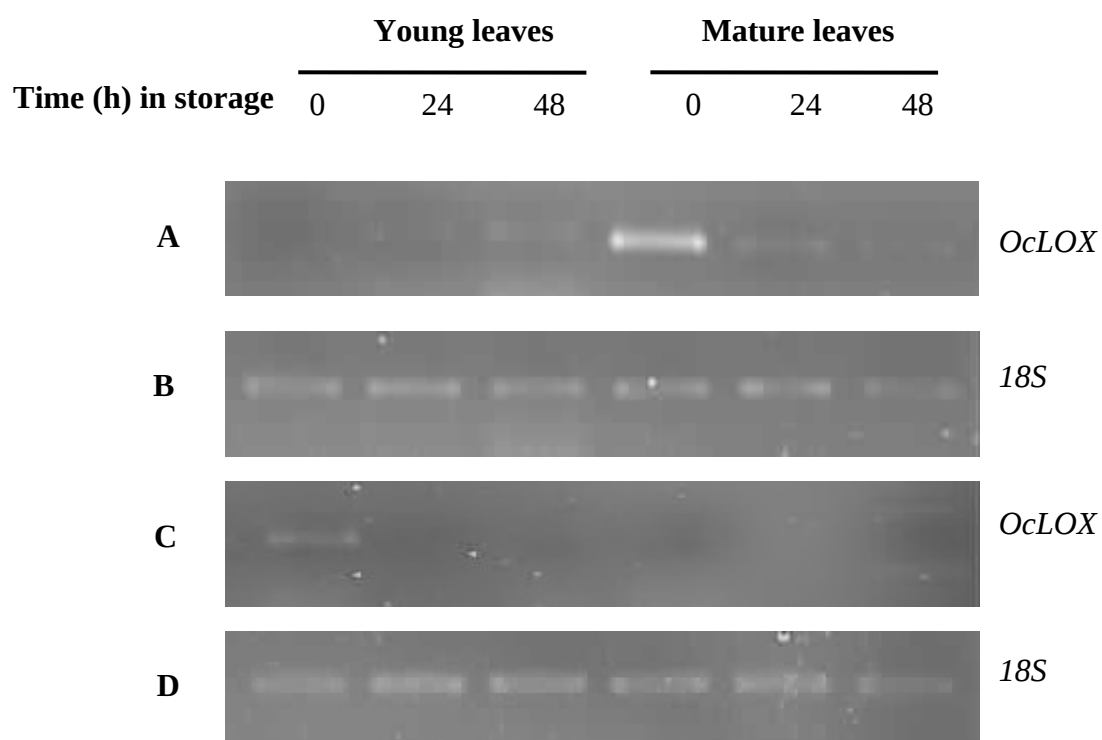
```

ภาพที่ 23 ลำดับนิวคลีโอไทด์ยีน *OcLOX* ที่แยกได้จากใบแมงลัก ความยาว 468 คู่เบสและใช้
ออกแบบไพรเมอร์และไพรเมอร์ สำหรับ semi-PCR

1 RKMLAGDNPVIIRRLQEFPPKSKLDPQKYGNHDSITREHIEKN
 45 MNGLSVEEAIEKNKLFILEHHDALMPHLRRINTTATKTYATRLL
 100 LLLQDDGTLKPLAIELSLPHEDGDSCGAVSKVITPCHDGGIQT
 145 IWQLAKAYAAVNESGYHQLISHWN 169

ภาพที่ 24 ลำดับกรดอะมิโนของยีน *OcLOX* ที่แปลรหัสจากนิวคลีโอไทด์ของยีน *OcLOX*

ตรวจสอบการแสดงออกของยีน *OcLOX* ด้วยเทคนิค semi quantitative พบว่าเนื้อเยื่อ
 เมงลักใบแก่มีการสะสมปริมาณ mRNA ของยีน *OcLOX* มากกว่าเนื้อเยื่อใบอ่อน และมีปริมาณการ
 สะสม mRNA ลดลงระหว่างการเก็บรักษาที่ 4°ซ แต่ไม่พบการสะสม mRNA ของยีน *OcLOX* ทั้ง
 ในใบแก่และใบอ่อนเก็บรักษาที่ 12°ซ (ภาพที่ 25)



ภาพที่ 25 การแสดงออกของยีน *OcLOX* ในแมงลักใบอ่อนและใบแก่เก็บรักษาที่ 4 (A) และ 12°C (C) โดยมียีน *18S* เป็นชุดควบคุม (B และ D)

5.2 ยีนที่ควบคุมการผลิตเอนไซม์ polyphenol oxidase ในใบกะเพรา (*Ocimum. sanctum*)

ออกแบบ degenerate primer จำนวน 1 คู่ เส้น PPO_LEFT (forward) 5'-TYC ACA ACT CHT GGC TCT TCY TC-3' และเส้น PPO_RIGHT (reverse) 5'-NGA RTA RAA RTT SCC CAT GTC YT-3' หลังการทำ PCR ได้ product ขนาดประมาณ 500 คู่เบส (ภาพผนวกที่ 3) นำ PCR ที่ได้ผ่านขั้นตอนการ cloning พบว่าเป็นโคลนใหม่ตั้งชื่อว่า *OcPPO* (EU139474) นำลำดับเบสเข้าโปรแกรม Blastn พบว่าลำดับเบสมีความคล้ายคลึงกับยีน *PPO* ของ *Populus trichocarpa* (AC185364) 91%, *Ipomoea batatas* (AY822711) 81%, *Pyrus pyrifolia* (AB056680) 76%, *Prunus mexicana* (DQ851217) 72% ซึ่งมีลำดับของนิวคลีโอไทด์และลำดับของกรดอะมิโน ดังภาพที่ 26 และ 27

```

1  CCCTTCCACA GATATTATCT CTACTTCTTC GAGAGAATCT TGGGGAAGCT GATCGACGAT
61  CCCACCTTCG CCATGCCCTT CTGGAAGTGG GATTCCCCCG CCGGTATGCA GATCCCGTCT
121 CTCTACACCA ACCCGAACTC CGCCTTGTAC GACCGGTTTC GCGACAAGGC GCATCAGCCG
181 CCGGCCGTCG TCAATCTCAA CTTCAGCGGC GACGCGAACA CCACCGCCGA TCAGCAAATG
241 AAGACAAACT TGACGGTAAT GTACAGGCAA ATGGTGTCCA ACTCGAAGAC TCCCCGTCTT
301 TTCTTCGGCA GTCCTTACCG CCGCGGCGAG GATCCCAACC CTGGATCCGG TTCGATCGAG
361 GGTATCCCTC ACGGCCCGGT TCATGTCTGG ACCGGAGACA GCACCCAACC GAATACA

```

ภาพที่ 26 ลำดับนิวคลีโอไทด์ยีน *OcPPO* ที่แยกได้จากใบแมงลัก ความยาว 417 คู่เบสและใช้ออกแบบไพรเมอร์และไพรเมอร์ สำหรับ semi-PCR

```

1  PFHRYLYFFERILGKLIDDPFAMPFWNWDSPAGMQIPSLYTNPNLSALYDRFRDKAHQPPAVVN
66  LNFSGDANTTADQQMKTNTVMYRQMVSNSKTPLFFGSPYRRGEDPNPGSGSIEGIPHPVHVW
130  TGDSTQPNT 139

```

ภาพที่ 27 ลำดับกรดอะมิโนของยีน *OcPPO* ที่แปลรหัสจากนิวคลีโอไทด์ของยีน *OcPPO*

วิจารณ์

1. ปัจจัยที่มีผลต่อการพัฒนาการสะท้อนหนวของพืชสกุลกะเพรา

สายพันธุ์และชนิดของเนื้อเยื่อพืชเป็นปัจจัยเบื้องต้น ที่ทำให้พืชมีการตอบสนองต่ออุณหภูมิแตกต่างกัน (Yang *et al.*, 2001; Phakawatmongkol, 2004; Phomyou *et al.*, 2005; Boonsiri *et al.*, 2007) ในพืชสกุลกะเพรามีความแตกต่างกันอย่างชัดเจนในระหว่างสายพันธุ์โดยใบแมงลักมีความไวต่ออุณหภูมิต่ำมากที่สุด รองลงมาได้แก่ใบกะเพรา และใบโหระพามีความไวต่ออุณหภูมิต่ำน้อยที่สุด ความรุนแรงของการเกิด CI มีผลต่อการสูญเสียคุณภาพทางกลิ่นหรือเกิดกลิ่นผิดปกติ โดยพบว่าใบแมงลักมีกลิ่นลดลง และเกิดกลิ่นผิดปกติ หลังการเก็บรักษาที่ 4 °ซ นาน 48 ชั่วโมง ขณะที่ใบโหระพามีความไวต่อ CI น้อยกว่ามีกลิ่นของใบคงที่ (ภาพที่ 3)

สารฟีนอลิกเป็นสารตั้งต้นของการเกิดปฏิกิริยาในการเกิดสีน้ำตาลโดยเอนไซม์ PPO และ PAL และมีบทบาทเกี่ยวข้องกับความไวต่อการเกิด CI ในผลไม้และพืชผักหลายชนิด (Amiot *et al.*, 1997) ในใบพืชสกุลกะเพราสายพันธุ์ต่าง ๆ มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิก และมีคุณสมบัติของการต้านอนุมูลอิสระที่แตกต่างกัน (Juiani and Simon, 2002) ซึ่งอาจมีผลต่อการเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลหลังการเก็บรักษาใบพืชสกุลกะเพราที่อุณหภูมิต่ำ จากผลการทดลองพบว่าโหระพาใบแก่มีความไวต่ออุณหภูมิต่ำน้อยกว่า แต่มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดสูงกว่าใบแมงลักที่มีค่าดัชนีการสะท้อนหนวที่มากกว่า แสดงว่าปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดไม่ใช่เป็นตัวปัจจัยที่กำหนดการเกิด CI ของพืชกลุ่มนี้ (ภาพที่ 13C) องค์ประกอบทางเคมีหรือปริมาณ essential oil เป็นคุณสมบัติที่สำคัญของพืชสกุลกะเพราที่มีปริมาณแตกต่างกันระหว่างสายพันธุ์ และแหล่งปลูก พืชสกุลกะเพราโดยส่วนใหญ่มีปริมาณ essential oil ในใบสดประมาณ 0.5-1.4% แต่ในใบยี่หระหรือโหระพาช้าง (*O. gratissimum*) ซึ่งอยู่ในพืชสกุลกะเพรา มี essential oil สูงถึง 3.2-4.1% และไขมันที่พบเป็นไขมันไม่อิ่มตัวที่โครงสร้างเป็นโซ่ยาว (Hiltuneh and Holm, 1999) ซึ่งผลการทดลองเบื้องต้น (ไม่แสดงข้อมูล) พบว่าใบยี่หระมีความทนต่ออุณหภูมิต่ำมากกว่าใบพืชสกุลกะเพราชนิดอื่น แต่เนื่องจากไม่มีการปลูกโหระพาช้างเป็นการค้า และพืชนี้มีการเจริญเติบโตช้า ต้องปล่อยให้เจริญเติบโตข้ามปี จึงไม่ได้เลือกพืชชนิดนี้ในการทดลอง ดังนั้นอาจเป็นไปได้ว่าในโหระพาใบสดอาจมี essential oil และไขมันไม่อิ่มตัวมากกว่าใบแมงลัก จึงทำให้ใบโหระพามีความทนต่ออุณหภูมิต่ำมากกว่าใบแมงลัก

จากผลการทดลองพบว่าองค์ประกอบทางเคมีหรือคุณสมบัติทางชีวเคมีของเนื้อเยื่อพืชที่แตกต่างกัน เป็นปัจจัยที่สำคัญที่มีผลต่อการพัฒนาการสะท้อนหนาวของใบพืชสกุลกะเพรา แต่ปัจจัยด้านลักษณะทางกายวิภาคของพืชอาจเป็นปัจจัยร่วมจึงควรมีการศึกษาด้วย จากผลการศึกษาลักษณะกายวิภาคใบพืชสกุลกะเพรา โดยการตรึงเนื้อเยื่อใน paraffin และตัดขวางเนื้อเยื่อใบด้วยเครื่อง rotary microtome แล้วศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบธรรมดา (light microscope) พบว่าเมงลักใบแก่มีหนาแน่นของเซลล์ในชั้น palisade parenchyma น้อยกว่าสายพันธุ์อื่นเล็กน้อย (ไม่แสดงผล) โดยเซลล์ในชั้นนี้มีการเปลี่ยนแปลงต่อเมื่อปรากฏอาการสะท้อนหนาวในขั้นรุนแรงแล้ว แต่พบว่าเนื้อเยื่อพืชบริเวณเซลล์ในชั้น spongy parenchyma ซึ่งอยู่ติดกับส่วน lower epidermis เกิดการยุบตัวขึ้นก่อนชั้น palisade parenchyma ที่อยู่ติดกับส่วน upper epidermis สอดคล้องกับอาการ CI ที่ปรากฏครั้งแรกที่บริเวณท้องใบหลังเก็บรักษาที่ 4°C เป็นเวลานาน 4-6 ชั่วโมง (ภาพที่ 16B) แสดงว่าเซลล์ palisade parenchyma อาจมีความแข็งแรงมากกว่า เนื่องจากเซลล์มีลักษณะเป็นทรงกระบอกเรียงตัวเป็นระเบียบชิดกันและมีช่องว่างระหว่างเซลล์น้อย ในขณะที่เซลล์ชั้น spongy parenchyma มีลักษณะเป็นทรงกลม อยู่ห่างกันและมีช่องว่างระหว่างเซลล์มากกว่าเซลล์ชั้น palisade (ภาพที่ 15A) อย่างไรก็ตามการศึกษาโดยใช้กล้องจุลทรรศน์แบบธรรมดาไม่สามารถระบุเซลล์หรือออร์แกเนลล์ ที่เกิดการเปลี่ยนแปลงในช่วงเริ่มต้นของ CI ได้อย่างเด่นชัด แต่การศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนสามารถแยกความแตกต่างระหว่างเซลล์หรือการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ เนื่องจากผลของอุณหภูมิต่ำได้อย่างชัดเจน (Kratsch and Wise, 2000; Boonsiri *et al.*, 2007; Concellón *et al.*, 2007) ซึ่งควรจะมีการศึกษาเพิ่มเติมในส่วนนี้

ความแก่ทางสรีรวิทยาเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่มีอิทธิพลต่อการทนหนาวหรือพัฒนา CI ในการศึกษาพืชผักและผลไม้หลายชนิด ได้แก่ ผักบุ้ง พริก พุทรา มะม่วง และส้ม พบว่าผลอ่อนหรือเนื้อเยื่อที่มีอายุน้อยมีความไวต่ออุณหภูมิต่ำมากกว่าผลแก่หรือเนื้อเยื่อที่มีอายุมาก (คุชฎี, 2541; Ose *et al.*, 1995; Mohammed and Brecht, 2002; Lafuente *et al.*, 2003; Boonsiri *et al.*, 2007) แต่ในผลิตผลบางชนิด เช่น ผลพลัม สับปะรด ใบเขียวหมีน้ำปี (agronema) มีลักษณะที่ตรงกันข้ามกล่าวคือในผลแก่หรือใบแก่มีความไวต่ออุณหภูมิต่ำมากกว่า (Abdi *et al.*, 1997; Zhou *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2007) เช่นเดียวกับใบแก่ของสกุลกะเพรามีความไวต่ออุณหภูมิต่ำมากกว่าใบอ่อน (ภาพที่ 5) สาเหตุที่ใบแก่มีความไวต่ออุณหภูมิต่ำมากกว่าใบอ่อน อาจเกี่ยวข้องกับปริมาณการสะสมของกรดไขมันไม่อิ่มตัว จากผลการทดลองพบว่าในใบแก่มีปริมาณกรดไขมันไม่อิ่มตัวคงที่หลังการเก็บรักษาที่ 4°C นาน 12 และ 24 ชั่วโมง ในขณะที่ใบอ่อนมีปริมาณกรดไขมันไม่อิ่มตัวรวมเพิ่มขึ้นถึงระดับสูงสุดและมีอัตราส่วนระหว่างกรดไขมันไม่อิ่มตัวและกรดไขมันอิ่มตัวเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ หลังการเก็บรักษาที่ 4°C นาน 12 ชั่วโมง (ตารางที่ 2 และภาพที่ 15A) สอดคล้องกับการศึกษาในใบ

แอปเปิล รายงานว่าในแอปเปิลไบนารีซึ่งมีความไวต่ออนุมูลอิสระมากกว่ามีการสะสมกรดไขมันไม่อิ่มตัวน้อยกว่าใบแก่ที่มีความทนทานต่ออนุมูลอิสระมากกว่า (Ketchi and Kuiper, 1979) นอกจากนี้ในไบนารีอาจมีกระบวนการ oxidative stress น้อยกว่าใบแก่ เนื่องจากการเก็บรักษาที่อนุมูลอิสระทำให้เกิดกิจกรรมของเอนไซม์ CAT ในไบนารีเพิ่มขึ้น นอกจากนี้ยังพบว่าในไบนารีมีกิจกรรมเอนไซม์ GPX สูงกว่าในใบแก่ จึงทำให้การปรากฏอาการ CI ในไบนารีช้ากว่าใบแก่อย่างชัดเจน

ความชื้นสัมพัทธ์ในการเก็บรักษาผลิตผลเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลอย่างมากต่อการพัฒนาอาการ CI การเก็บรักษาในสภาพความชื้นสัมพัทธ์สูง สามารถลดความผิดปกติและความรุนแรงของอาการสะท้านหนาว และชะลอการเสื่อมสภาพของผลิตผลหลายชนิด (Wang, 2003) ผลการทดลองกับใบแมงลักชี้ให้เห็นว่า การเก็บรักษาในสภาพความชื้นสัมพัทธ์สูง และป้องกันไม่ให้พืชขาดน้ำ โดยการบรรจุเปียก ช่วยชะลอการพัฒนาอาการสะท้านหนาวได้ (ภาพที่ 6) โดยมีน้ำหนักสดของใบในระหว่างการเก็บรักษาก่อนข้างคงที่ (ไม่แสดงผล) สอดคล้องกับผลการศึกษาในใบแตงกวา ที่ทำการเก็บรักษาในความชื้นสัมพัทธ์ระดับอิ่มตัว และอนุมูลอิสระสามารถยับยั้งการสูญเสียน้ำหนัก เมื่อเปรียบเทียบกับใบที่เก็บในสภาพความชื้นต่ำกว่า (Wright and Simon, 1973)

2. การเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีและความเสียหายของเยื่อหุ้มเซลล์

การรั่วไหลของประจุ (EL) เป็นค่าที่ได้รับการยอมรับอย่างกว้างขวาง ในการใช้เป็นตัววัดความแตกต่างของความไวต่อการเกิดอาการสะท้านหนาว (Campos *et al.*, 2003; Lafuente *et al.*, 2003; Maalekuu *et al.*, 2006; Boonsiri *et al.*, 2007) ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองครั้งนี้ กล่าวคือใบแมงลักที่มีความไวต่ออนุมูลอิสระมากกว่ามีค่า EL สูงกว่าใบโหระพาที่มีความไวต่ออนุมูลอิสระน้อยกว่า และใบแก่ที่มีความไวต่ออนุมูลอิสระมีค่า EL สูงกว่าไบนารี (ภาพที่ 7) นอกจากนี้เมื่อเปรียบเทียบเนื้อเยื่อบริเวณที่เกิดสีน้ำตาลและเนื้อเยื่อปกติที่แยกมาจากใบเดียวกัน พบว่าการเพิ่มขึ้นของค่า EL ในเนื้อเยื่อที่เกิดสีน้ำตาลสอดคล้องกับค่าดัชนีอาการสะท้านหนาวที่เพิ่มขึ้น แต่ส่วนของเนื้อเยื่อปกติที่แยกมาจากใบที่มีค่าดัชนีอาการสะท้านหนาวเพิ่มขึ้นกลับมีค่า EL คงที่ (ภาพที่ 8) เปรียบเทียบความสัมพันธ์ระหว่างค่า EL และค่าดัชนีของอาการสะท้านหนาว (CI index) มีความสัมพันธ์เชิงบวก ($R^2 = 0.92$; $P < 0.001$) (ภาพผนวกที่ 4A) เป็นการสนับสนุนว่าค่า EL สามารถใช้เป็นดัชนีบ่งชี้ความเสียหายของเซลล์พืชทดลองได้ (Murata, 1990; Shewfelt, 1992; Friendman and Rot, 2006)

การเปลี่ยนแปลงปริมาณ TBA reactive compounds หรือ malondialdehyde (MDA) กิจกรรมของเอนไซม์ LOX และ การแสดงออกของยีน *ocLOX* มีความสัมพันธ์กับการเกิด CI ของใบพืชสกุลกะเพราในสภาพที่พืชเกิดความเครียดเนื่องจากการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำหรือสภาพขาดน้ำกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายไขมันซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักในเยื่อหุ้มเซลล์ lipid peroxidation (LP) เป็นกระบวนการสำคัญในการเสื่อมสลายของเยื่อหุ้มเซลล์ โดยมีเอนไซม์ที่สำคัญคือ LOX และผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากกระบวนการนี้ได้แก่ TBA reactive compounds หรือ MDA (Marangoni *et al.*, 1996; Maalekuu *et al.*, 2006; Mao *et al.*, 2007) จากผลการทดลองพบว่าแมงลักใบแก่ที่มีความไวต่ออุณหภูมิต่ำมีกิจกรรมเอนไซม์ LOX สูงกว่าใบอ่อนแต่มีปริมาณ TBA reactive compounds ค่อนข้างใกล้เคียงกัน โดยใบแก่มีปริมาณมากกว่าเล็กน้อย (ภาพที่ 9) แต่ลักษณะการเปลี่ยนแปลงมีความแตกต่างกัน ปริมาณ TBA reactive compounds เพิ่มขึ้นในช่วงแรกและลดต่ำลงในช่วงท้ายของการทดลอง ส่วนกิจกรรมของเอนไซม์ LOX มีแนวโน้มลดลงอย่างต่อเนื่อง แต่จากศึกษาการเสื่อมสภาพของใบพืชสมุนไพรหลายชนิดที่อุณหภูมิห้อง พบว่ามีความสัมพันธ์กับการลดลงของปริมาณ TBA reactive compounds (Philosoph-Hadas *et al.* 1994) แต่จากผลการทดลองการใช้อุณหภูมิต่ำอาจไปกระตุ้นให้ใบแมงลักเข้าสู่กระบวนการเสื่อมสภาพ (senescence) เร็วขึ้นและมีกระบวนการ LP เพิ่มขึ้น จึงมีสะสมของ TBA reactive compounds เพิ่มขึ้นในช่วงแรก และมีปริมาณลดลงถึงระดับต่ำสุดในช่วงท้ายของการทดลอง (Dhindsa *et al.* 1981) ดังนั้นเอนไซม์ LOX น่าจะมีบทบาทเกี่ยวข้องกับการสลายตัวของเยื่อหุ้มเซลล์ใบพืชสกุลกะเพราที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำ ข้อมูลที่สามารถยืนยันบทบาทดังกล่าวคือ การแสดงออกของยีน *LOX* ซึ่งผลการศึกษาการแสดงออกของยีน *OcLOX* ซึ่งมีการแสดงออกระหว่างการเก็บรักษาใบแมงลักที่อุณหภูมิต่ำโดยพบว่าใบแก่มีการสะสมของ mRNA transcripts มากกว่าใบอ่อนอย่างชัดเจนและมีปริมาณการสะสมลดลงระหว่างการเก็บรักษา โดยมีการสะสมสูงสุดก่อนการเก็บรักษาซึ่งสอดคล้องกับกิจกรรมของเอนไซม์ LOX ที่สูงสุดในช่วงก่อนการเก็บรักษา สำหรับใบแก่เก็บรักษาที่ 12 °ซ ไม่มีการสะสมของ LOX mRNA โดยมีการแสดงออกช่วงก่อนการเก็บรักษาเล็กน้อย (ภาพที่ 25) แสดงว่าการเกิดสีน้ำตาลซึ่งเป็น CI ในใบแมงลักเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำมีความสัมพันธ์กับการแสดงออกของยีนหรือการทำงานของเอนไซม์ LOX ซึ่งอาจเกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงของเยื่อหุ้มเซลล์ สอดคล้องกับการศึกษาในผักกิ้นผล และผลไม้ชนิดอื่น ๆ เช่น พริก กะหล่ำ และฝรั่ง (González-Aguilar *et al.*, 2004; Boonsiri *et al.*, 2007; Promyou *et al.*, 2007) การแสดงออกของยีน *LOX* ที่พบในใบอ่อนแม้ว่าน้อยกว่าใบแก่ แต่เนื่องจาก *LOX* มีบทบาทกว้างขวางต่อการเจริญเติบโตและการพัฒนาของพืชในระยะต่างๆ ในช่วงที่มีการเจริญเติบโต หรือพืชได้รับสถานะเครียดจากอุณหภูมิต่ำ ทำให้เกิดการสะสมของ LOX mRNA พืชเกิดปฏิกิริยา peroxidation ของกรดไขมันในเยื่อหุ้มมากขึ้น ซึ่งอาจส่งผลให้มีกรดไขมันอิ่มตัว

เพิ่มขึ้นหรือเยื่อหุ้มมีสภาพเป็นของไหลเพิ่มขึ้น (Porta *et al.*, 1999; Lee *et al.*, 2005) ดังนั้นข้อมูลการเปลี่ยนแปลงชนิดหรือปริมาณกรดไขมันไม่อิ่มตัวและไม่อิ่มตัว อาจช่วยอธิบายบทบาทของ LOX ต่อการเกิด CI ของใบพืชสกุลกระเพราได้ชัดเจนยิ่งขึ้น แต่อย่างไรก็ตามมีรายงานว่าอนุมูลมีด้ายยังสามารถกระตุ้นการเพิ่มกิจกรรมของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายเยื่อหุ้มเซลล์ชนิดอื่น ๆ ได้แก่ เอนไซม์ phospholipase D phospholipase C ATPase kinase desaturase lipid acyl hydrolase (LAH) และ galactolipase (Palta *et al.*, 1993; Wang *et al.*, 2006; Mao *et al.*, 2007)

เมื่อเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงชนิดและปริมาณของกรดไขมันในใบแมงลัก ซึ่งเป็นพืชสกุลกระเพราที่มีความไวต่ออนุมูลมีด้ายมากที่สุด โดยมีกรดไขมันไม่อิ่มตัวเป็นองค์ประกอบมากกว่าร้อยละ 90 (ตารางที่ 2) ถูกจัดอยู่ในกลุ่มพืชที่มีความไวต่ออนุมูลมีด้ายมาก (Roughan, 1995) แต่พืชที่ไม่ไวต่ออนุมูลมีด้ายหรือทนทานต่ออนุมูลมีด้าย มีกลไกการปรับตัวหรือเตรียมตัวรับสภาพหนาวเย็น โดยมีการสร้างเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์กรดไขมันไม่อิ่มตัว ทำให้มีสัดส่วนของกรดไขมันไม่อิ่มตัวต่อกรดไขมันอิ่มตัวเพิ่มขึ้นในเยื่อหุ้มเซลล์ระหว่างการเก็บรักษาที่อนุมูลมีด้าย (Larsson and Möller, 1990; Wang *et al.*, 2006) จากการเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงอัตราส่วนกรดไขมันไม่อิ่มตัวต่อกรดไขมันอิ่มตัวระหว่างการเก็บรักษาของแมงลักใบอ่อนและใบแก่ที่ 4 °C พบว่าหลังการเก็บรักษานาน 12 ชั่วโมง ใบอ่อนมีปริมาณรวมของกรดไขมันไม่อิ่มตัวเพิ่มขึ้นและมีปริมาณรวมกรดไขมันอิ่มตัวลดลง (ตารางที่ 2) จึงทำให้ใบอ่อนมีอัตราส่วนกรดไขมันไม่อิ่มตัวต่อกรดไขมันอิ่มตัวเพิ่มขึ้นแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ภาพที่ 15A) โดยที่ใบยังอยู่ในสภาพปกติ ขณะที่ใบแก่มีอัตราส่วนกรดไขมันไม่อิ่มตัวต่อกรดไขมันอิ่มตัวคงที่และมีการพัฒนาอาการสะท้านหนาวเกิดขึ้นแล้ว และเมื่อเปรียบเทียบกับใบแก่เก็บรักษาที่ 12 °C พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงอัตราส่วนกรดไขมันไม่อิ่มตัวต่อกรดไขมันอิ่มตัวลักษณะเดียวกันกับใบอ่อน กล่าวคือมีอัตราส่วนกรดไขมันไม่อิ่มตัวต่อกรดไขมันอิ่มตัวเพิ่มขึ้นหลังการเก็บรักษานาน 12 ชั่วโมง ปริมาณกรดไขมันไม่อิ่มตัวที่เพิ่มขึ้นมีผลทำให้คุณสมบัติการเป็นของไหลของเยื่อหุ้ม (membrane fluidity) เพิ่มขึ้น ทำให้เยื่อหุ้มไม่เปลี่ยนเป็นลักษณะแข็งเมื่อได้รับอนุมูลมีด้าย จึงสามารถรักษาคุณสมบัติในการควบคุมการผ่านเข้าออกของอนุมูลและสารละลายต่าง ๆ ทำให้ค่าการรั่วไหลของประจุของเนื้อเยื่อใบอ่อนเพิ่มขึ้นช้ากว่าเนื้อเยื่อใบแก่ (ภาพที่ 6) และชะลอการแสดงอาการสะท้านหนาวในแมงลักใบอ่อน ซึ่งในข้อสันนิษฐานของ Lyons (1973) ได้กล่าวรายละเอียดไว้แล้ว นอกจากนั้นผลการศึกษาในต้นข้าวโพด ต้นหญ้าสนาม หรือรากของต้นบวบ ในสายพันธุ์ที่มีความไวต่ออนุมูลมีด้ายน้อยกว่ามีปริมาณกรดไขมันไม่อิ่มตัวบางชนิดเพิ่มขึ้นระหว่างการเก็บรักษาที่อนุมูลมีด้าย (Kaniuga *et al.*, 1999; Cyril *et al.*, 2002; Ko *et al.*, 2006)

ชนิดกรดไขมันไม่อิ่มตัวในเมมเบรนที่อุณหภูมิเย็นที่มีปริมาณเพิ่มขึ้นได้แก่ palmitoleic acid (C16:1) และ petroselinic acid (C18:1) และ linolenic acid (C18:3) ส่วนกรดไขมันอิ่มตัวที่มีปริมาณลดลง ได้แก่ palmitic acid (C16:0) และ myristic acid (C14:0) โดยพบว่า C14:0 มีค่าเป็นศูนย์ หลังการเก็บรักษาที่ 4 °C นาน 12 ชั่วโมง ซึ่งการเปลี่ยนแปลงลักษณะนี้มีผลอย่างมากต่อการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติทาง biophysics ของเยื่อหุ้ม เนื่องจากจุดหลอมเหลวของไขมันไม่อิ่มตัว C18:2 ต่ำกว่ากรดไขมันอิ่มตัว C14:0 อย่างมาก ดังนั้นจุดหลอมเหลวของไขมันในเยื่อหุ้มลดต่ำลงทำให้อุณหภูมิที่มีการเปลี่ยนสถานะของไขมัน (phase transition) ลดต่ำลงด้วย จึงทำให้เนื้อเยื่อพืชมีความต้านทานต่อความเย็นได้มากขึ้น (Lyons and Asmundson, 1965; Palta *et al.*, 1993) ในทางตรงข้ามหลังการเก็บรักษาเมมเบรนที่ 4 °C นาน 12 ชั่วโมง พบว่ากรดไขมันไม่อิ่มตัว C16:1 และ C18:1 มีปริมาณลดลง แต่ปริมาณของ C18:3 เพิ่มขึ้น (ตารางที่ 1) จึงทำให้ปริมาณรวมกรดไขมันไม่อิ่มตัวไม่เปลี่ยนแปลง นอกจากนั้นใบแก่ยังมีปริมาณกรดไขมันอิ่มตัวรวมคงที่ (ตารางที่ 2) ทำให้อัตราส่วนกรดไขมันไม่อิ่มตัวต่อกรดไขมันอิ่มตัวในใบแก่มีค่าน้อยกว่าใบอ่อนอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติและอาจเป็นสาเหตุส่วนหนึ่งที่ทำให้ใบแก่มีความไวต่อการเกิดอาการ CI เร็วกว่าใบอ่อน

ปริมาณหรือชนิดของไขมันไม่อิ่มตัวที่มีการเปลี่ยนแปลงอาจมีบทบาทต่อความไวต่อการเกิดอาการสะท้านหนาวได้เช่นกัน จากผลการวิเคราะห์ปริมาณกรดไขมันไม่อิ่มตัวในเมมเบรนที่ใบอ่อนและใบแก่ พบว่าใบอ่อนมีปริมาณ linoleic acid (C18:2) สูงกว่าในใบแก่เกือบ 2 เท่า ในทางตรงข้ามใบแก่มีปริมาณ C18:3 และ C16:1 มากกว่าในใบอ่อน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 1) ดังนั้นบทบาทของกรดไขมัน C18:2 น่าจะเกี่ยวข้องกับการชะลอการเกิดอาการสะท้านหนาว ซึ่งจากการศึกษาของ Wilson and Crawford (1974a) ในต้นกล้าฝ้าย ถั่ว และแตง ซึ่งเป็นพืชที่ไวต่ออุณหภูมิต่ำ พบว่าการทำ hardening ที่ 12 °C นาน 4 วัน ก่อนย้ายต้นกล้าไปที่ 4 °C สามารถลดความเสียหายจากการเกิดอาการสะท้านหนาวในใบได้มากกว่าร้อยละ 50 โดยพบว่ามีปริมาณของกรดไขมันไม่อิ่มตัว C18:2 ในใบพืชเพิ่มขึ้น แต่ไม่มีการเปลี่ยนแปลงระดับของไขมันไม่อิ่มตัวหรือปริมาณกรดไขมันรวมในใบพืชทดลอง ส่วนต้นกล้าที่ไม่ได้ทำ hardening ภายหลังจากนำไปไว้ที่ 4 °C มีปริมาณกรดไขมันไม่อิ่มตัว C18:3 และน้ำหนักรวมของกรดไขมันลดลงอย่างรวดเร็ว แต่ในพืชที่ทนทานต่ออุณหภูมิต่ำไม่มีการเปลี่ยนแปลงดังกล่าว นอกจากนั้นยังพบความสัมพันธ์เชิงบวกระหว่างความแก่ทางสรีรวิทยากับความไวต่ออุณหภูมิที่เพิ่มขึ้น ในใบต้นกล้าฝ้ายและถั่ว โดยมีระดับ (degree) ของกรดไขมันไม่อิ่มตัว และน้ำหนักรวมของ phospholipid ลดลง (Wilson and Crawford, 1974b) การศึกษาในใบพืชสกุล Solanum สายพันธุ์ที่ทนทานต่อความหนาวเย็น มีการปรับตัวโดยเกิด cold-acclimate เพิ่มขึ้นสัมพันธ์กับการเพิ่มขึ้นของ C18:2 โดยที่ลักษณะนี้มีการ

ถ่ายทอดผ่านทางพันธุกรรม (Palta *et al.*, 1993) จะเห็นได้ว่าผลการทดลองในพืชต่าง ๆ ดังกล่าวสนับสนุนว่าบทบาทของกรดไขมันไม่อิ่มตัว linoleic acid (C18:2) อาจจะมีส่วนทำให้เกิดความไวต่อ CI ของใบพืชสกุลกะเพราได้

แต่การศึกษาในพืชหลายชนิด พบว่าการสะสมของ linolenic acid (C18:3) มีบทบาทต่อความต้านทานต่ออนุมูลิ้ามากกว่ากรดไขมันไม่อิ่มตัวชนิดอื่น (John and Christiansen, 1976; Cyril *et al.*, 2002) นอกจากนั้นกรดไขมันไม่อิ่มตัวยังมีผลต่อการอยู่รอดของต้น *Arabidopsis* ที่อนุมูลิ้าม โดยต้นกลายพันธุ์ที่มีระดับของกรดไขมันไม่อิ่มตัวในเยื่อหุ้มลดลง ทำให้ต้นพืชมีความแข็งแรงน้อยกว่าต้นปกติหรือตายหลังการปลูกที่อนุมูลิ้าม อธิบายว่าต้นกลายพันธุ์มีการยับยั้งหรือเกิดความเสียหายของเยื่อหุ้มง่ายกว่าต้นปกติ (Hugly and Somerville, 1992; Miquel *et al.*, 1993) แต่การศึกษากการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพของ microsomal membrane ของผลมะเขือเทศ โดยใช้เทคนิค wide-angle x-ray diffraction พบว่าในระหว่างเก็บรักษาที่อนุมูลิ้าม มีปริมาณ gel phase เปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อย แต่หลังจากย้ายผลมะเขือเทศไปที่อนุมูลิ้าม จึงมีปริมาณ gel phase เพิ่มขึ้น ทำให้กรดไขมันในเยื่อหุ้มเกิด phase separation และเกิดการรั่วไหลของประจุเพิ่มขึ้น แสดงว่าการเปลี่ยนแปลงสถานะของไขมันในเยื่อหุ้มไม่ได้เกิดขึ้นที่อนุมูลิ้าม และไม่ได้เป็นสาเหตุของการเกิด CI (Sharom *et al.*, 1994) ดังนั้นส่วนประกอบของไขมันในเยื่อหุ้มเซลล์อาจไม่ได้เป็นปัจจัยหลักของความไวต่อการเกิด CI

การแสดงอาการ CI ของต้นอ่อนข้าวโพดที่สภาพอนุมูลิ้าม เกี่ยวข้องกับ การเพิ่มขึ้นของอนุมูลอิสระ (free radicals) หรือ reactive oxygen species (ROS) ซึ่งไปกระตุ้นการเกิดกระบวนการออกซิเดชันของโปรตีน ไขมันและยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ proteases การทำให้พืชมีการปรับตัว (acclimated seedling) ทำให้มีระดับของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ ได้แก่ catalase (CAT) glutathione reductase (GR) และ guaiacol peroxidase (GPX) เพิ่มขึ้น 35-120% ซึ่งช่วยป้องกันการสะสมของ ROS และการเกิดออกซิเดชัน ของโปรตีน ไขมัน และป้องกันการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ proteases (Prasad, 1996) ในพืชสายพันธุ์ทนทานต่ออนุมูลิ้ามก็มีปริมาณสารหรือเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระมากกว่าหรือมีการสร้าง ROS น้อยกว่าพันธุ์ที่ไวต่ออนุมูลิ้าม จึงช่วยชะลอการแสดงอาการ CI ที่มีสาเหตุจากกระบวนการ oxidative stress หรือ lipid oxidation ในเซลล์พืช (Wismer, 1998) เช่นเดียวกับผลการศึกษากครั้งนี้ ในแมงลักใบอ่อนมีความไวต่ออนุมูลิ้ามต่ำกว่าใบแก่ แต่มีกิจกรรมของเอนไซม์ CAT และ POD หรือ GPX มากกว่าใบแก่ ขณะที่กิจกรรมของเอนไซม์ ascorbate peroxidase (APX) และ superoxide dismutase (SOD) ไม่แตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับใบแก่ซึ่งมีความไวต่ออนุมูลิ้ามมากกว่า (ภาพที่ 11) ดังนั้นความ

แตกต่างของความไวต่ออุณหภูมิต่ำในแมงลักใบอ่อนและใบแก่อาจเป็นผลมาจากความแตกต่างของปริมาณเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ จึงทำให้ความสามารถปรับตัวในสภาพอุณหภูมิต่ำหรือปรากฏอาการ CI แตกต่างกัน เช่นเดียวกับการศึกษาในพืชหลายชนิด เช่น ใบอ้อฝรั่งไวโอเล็ต ต้นข้าวโพด ผลส้ม และผลมะเขือเทศ พบว่าพืชสายพันธุ์ทนทานต่ออุณหภูมิต่ำหรือมีความไวต่ออุณหภูมิต่ำน้อย มีการปรับระดับของสารหรือเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ บางชนิดเพิ่มขึ้นมากกว่าสายพันธุ์ที่อ่อนแอต่ออุณหภูมิต่ำ (Sala and Lafuete, 1991; Walker and McKersie, 1993; Hodges *et al.*, 1997; Yang, 2001) ในการทดลองทำ cold acclimation กับพืชที่ไวต่ออุณหภูมิต่ำ ช่วยยืนยันบทบาทของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ ที่มีผลต่อการชะลอการเกิดอาการ CI ของใบข้าว (Kuk *et al.*, 2003 a) ปัจจัยด้านอายุการเกี่ยวหรือความแก่ทางสรีรวิทยาของพืชมีความสัมพันธ์กับปริมาณสารและกิจกรรมของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ ในผลสาเกที่มีความแก่ทางสรีรวิทยาของผลเพิ่มขึ้น มีความสัมพันธ์กับกิจกรรมเอนไซม์ POD เพิ่มขึ้น (Lentheric *et al.*, 1999) สำหรับเอนไซม์ POD หรือ GPX นั้นเป็นเอนไซม์ที่มีบทบาททั้งเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ และ เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการเกิดสีน้ำตาล สอดคล้องกับการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์ CAT ที่พบในใบอ่อนและใบแก่ ซึ่งเอนไซม์ทั้งสองชนิดนี้มีบทบาทเกี่ยวข้องกับการเป็นเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ โดยการเปลี่ยน O_2 และ H_2O_2 กลายเป็นน้ำและออกซิเจน ช่วยชะลอหรือป้องกันการเกิด lipid oxidation ที่เป็นสาเหตุของการผลิตอนุมูลอิสระ (Kumer and Knowles, 1993)

กิจกรรมของเอนไซม์ catechol oxidase หรือ polyphenol oxidase (PPO) เป็นเอนไซม์ที่มีการศึกษามากที่สุด เนื่องจากถูกจัดเป็นเอนไซม์หลัก (key enzyme) ในกระบวนการเกิดสีน้ำตาลของผลิตผลหลายชนิด เช่น กล้วย พริก และมะม่วง (Solecka *et al.*, 1999; Nguyen *et al.*, 2004, Boonsiri *et al.*, 2007) ในสภาวะอุณหภูมิต่ำ สามารถชักนำการสังเคราะห์สารประกอบฟีนอลิกในพืช ซึ่งเป็นสารตั้งต้นของเอนไซม์ที่ทำให้เกิดสีน้ำตาลและมีความสัมพันธ์กับการเกิดสีน้ำตาล (Tomás-Barberán *et al.*, 2001; Pennycooke *et al.*, 2005) เปรียบเทียบความสัมพันธ์ระหว่างกิจกรรมเอนไซม์ PPO และค่าดัชนีของอาการสะท้านหนาว (CI index) ในแมงลักใบอ่อนและใบแก่เก็บรักษาที่ 4°C พบว่ามีความสัมพันธ์เชิงลบ ($R^2 = 0.85$; $P < 0.001$) (ภาพผนวกที่ 4B) และพบว่าใบอ่อนมีกิจกรรมสูงกว่าใบแก่ แต่ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในใบแมงลักมีค่าคงที่และมีปริมาณใกล้เคียงกันทั้งในใบอ่อนและใบแก่ ส่วนใบเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 12°C มีกิจกรรม PPO ก่อนข้างคงที่ แต่ในใบโหระพาซึ่งเป็นพันธุ์ที่ไวต่ออุณหภูมิต่ำน้อยกว่า ในช่วงเริ่มต้นมีกิจกรรมของเอนไซม์ PPO ในใบอ่อนและใบแก่ต่ำกว่าใบแมงลักอย่างมาก แต่มีกิจกรรมก่อนข้างคงที่ อย่างไรก็ตามทั้งสองสายพันธุ์มีกิจกรรมของเอนไซม์ PPO ในใบอ่อนสูงกว่าใบแก่ (ภาพที่ 12) แสดงว่ากิจกรรมของ

PPO อาจไม่มีบทบาทโดยตรงต่อการเกิดอาการ CI (สีน้ำตาล) ของใบพืชสกุลกะเพราเนื่องจากการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำ

เอนไซม์ชนิดอื่นที่มีบทบาทเกี่ยวข้องกับการเกิดสีน้ำตาล ได้แก่ peroxidase (POD) และ PAL ซึ่งมีกิจกรรมในใบแก่ของโหระพาและแมงลักที่มีค่าดัชนีการเกิดอาการ CI แตกต่างกัน ใบแมงลักและโหระพาปกติที่ยังไม่เกิดอาการสะท้านหนาว (CI index = 1) หรือเริ่มเกิดอาการสะท้านหนาวระดับสอง พบว่ากิจกรรมเอนไซม์ GPX ใบโหระพาสูงกว่าใบแมงลัก แต่เมื่อมีการพัฒนาอาการ CI เพิ่มขึ้นพบว่าไม่แตกต่างกันทั้งสองสายพันธุ์ (ไม่แสดงข้อมูล) จะเห็นได้ว่าพันธุ์และความแก่ของใบที่มีความทนทานต่ออุณหภูมิต่ำมากกว่า มีความสัมพันธ์กับกิจกรรมเอนไซม์ GPX ที่สูงกว่า ดังนั้นบทบาทของเอนไซม์ชนิดนี้ในพืชสกุลกะเพราจะเกี่ยวข้องกับการเป็นเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระมากกว่าเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการเกิดสีน้ำตาล (Lamikanra, 2002) สำหรับเอนไซม์ PAL ในใบแก่แมงลักซึ่งมีความไวต่ออุณหภูมิต่ำมีกิจกรรมสูงขึ้นสอดคล้องกับระดับความรุนแรงของอาการสีน้ำตาล แต่ในใบแก่โหระพาซึ่งมีความไวต่ออุณหภูมิต่ำน้อยกว่ามีกิจกรรมของเอนไซม์ PAL สูงขึ้นในช่วงเริ่มเกิดอาการสะท้านหนาว (CI index = 2) มีกิจกรรมเพิ่มขึ้นอย่างมาก แต่ภายหลังจากมีการพัฒนาอาการสีน้ำตาลรุนแรงขึ้นกลับมีกิจกรรมลดลง แต่การเปลี่ยนแปลงของปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมดในใบโหระพามีปริมาณลดลงระหว่างการเกิดอาการ CI ที่รุนแรงเพิ่มขึ้น (ภาพที่ 13) ถ้าพิจารณาวิถีการสังเคราะห์สารประกอบฟีนอลิกในใบโหระพาพบว่าการทำงานของเอนไซม์ PAL อยู่ในช่วงเริ่มต้นของวิถี โดยเร่งปฏิกิริยาในการเปลี่ยนสารตั้งต้น phenylalanine เป็น cinnamic acid แล้วจึงมีการเปลี่ยนแปลงเป็นสารอื่นและมีเอนไซม์อื่นอีกจำนวนมากทำงานร่วม จนท้ายสุดจึงเปลี่ยนเป็นสาร rosmarinic acid หรือ caffeic acid (Gang *et al.*, 2001) จะเห็นได้ว่าเอนไซม์ PAL อาจมีบทบาทเฉพาะในช่วงเริ่มต้นของการสังเคราะห์สารตัวกลางในวิถีการสังเคราะห์สารประกอบฟีนอลิก จึงอาจไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ดังนั้นจากผลการทดลองจึงอาจกล่าวได้ว่าเอนไซม์ PAL ไม่มีบทบาทเกี่ยวข้องกับการเกิดสีน้ำตาลในใบพืชสกุลกะเพราที่แสดงอาการ CI

3. การใช้สารเคมีบางชนิดและความร้อนเพื่อลดอาการสะท้านหนาวของใบพืชสกุลกะเพรา

3.1 การใช้สาร 1-methylcyclopropene (1-MCP)

การใช้สาร 1-MCP มีผลต่อการลดการเกิดสีน้ำตาล และความผิดปกติจากอาการสะท้านหนาวในพืชผักและผลไม้หลายชนิด ได้แก่ ผักกาดหอม แครอท อะโวคาโด สับปะรด และ

ส้ม ซึ่ง 1-MCP เกี่ยวข้องกับการยับยั้งการทำงานของเอทิลีนในการเร่งกระบวนการสุกหรือเร่งการเสื่อมสภาพของผลิตผล (Sisler and Serek, 2003; Watkins *et al.*, 2006) ในการทดลองครั้งนี้พบว่าผลของสาร 1-MCP ช่วยชะลอการพัฒนาอาการ CI ในใบแก่ของแมงลักที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำในช่วงระยะเวลาสั้น ๆ หรือเป็นแบบชั่วคราว และพบว่าการเพิ่มความเข้มข้น 1-MCP ไม่ทำให้มีการชะลออาการ CI เพิ่มขึ้น (ภาพที่ 18) แต่หลายการศึกษาระบุว่าใบพืชสกุลกะเพราจัดเป็นพืชที่มีความไวต่อเอทิลีนสูง และ การใช้ 1-MCP ความเข้มข้นต่ำ สามารถยืดอายุการเก็บรักษา ชะลอการสูญเสียคลอโรฟิลล์ ลดการร่วงของใบ รวมทั้งลดความเสียหายจากการเกิด CI ได้ โดยการยับยั้งหรือป้องกันการดำเนินงานของเอทิลีนจากแหล่งภายนอก (Aharoni *et al.*, 1993; Bower and Mitcham, 2001; Able *et al.*, 2003) แต่จากผลการทดลองการใช้ 1-MCP ความเข้มข้น 100 nL^{-1} สามารถชะลอ CI แบบชั่วคราวแตกต่างทางสถิติกับชุดควบคุม ในช่วง 0-12 ชั่วโมง แต่หลังจากการเก็บรักษาที่ 4°ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง มีการสะสมของเอทิลีนในถุงที่บรรจุใบแมงลักเพิ่มมากขึ้น สอดคล้องกับอาการสะท้านหนาวที่รุนแรงขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับใบแมงลักที่เก็บรักษาที่ 12°ซ (ไม่ได้แสดงข้อมูล) การให้ 1-MCP ความเข้มข้นต่ำไม่มีผลต่อการร่วงไหลของประจุ ในทางตรงข้ามกลับเพิ่มขึ้น

3.2 การใช้สาร salicylic acid (SA)

สาร SA เป็นสารที่พืชมีการสังเคราะห์เพิ่มขึ้นในสภาพที่เกิดความเครียดเนื่องจากสิ่งมีชีวิตและสิ่งไม่มีชีวิต บทบาทของสารนี้เกี่ยวข้องกับการถ่ายทอดสัญญาณทำให้พืชมีการปรับตัวในสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม (Klessing and Malamy, 1994) การให้สาร SA และสาร methyl salicylate ก่อนการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำ ในผักกิ้นผลหรือผลไม้บางชนิด ได้แก่ ฝรั่ง มะเขือเทศ พริกหวาน สามารถชะลอเกิด CI ภายหลังการเก็บรักษา (Ding *et al.*, 2001; Fung *et al.*, 2004; González-Aguilar *et al.*, 2004) จากผลการทดลองพบว่า การจุ่มก้านแมงลักใบแก่ในสารละลาย SA ที่ความเข้มข้น 0.5 mM เป็นเวลานาน 10 นาทีก่อนเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำ สามารถชะลอการพัฒนาของอาการ CI ได้นาน 24 ชั่วโมง และชะลอการเพิ่มขึ้นของค่า EL (ภาพที่ 19) สอดคล้องกับผลการศึกษาใน ต้นกล้าข้าวโพด ต้นกล้าข้าว และผลท้อ พบว่าการให้สาร SA ช่วยเพิ่มความต้านทานต่อการเกิดอาการสะท้านหนาว ชะลอการเพิ่มขึ้นของค่า EL จากเนื้อเยื่อใบและไฮโปคอทิล และเกี่ยวข้องกับการเพิ่มกิจกรรมของเอนไซม์ในระบบต้านอนุมูลอิสระ ได้แก่ GR และ GPX (Kang and Saltveit, 2002; Wang *et al.*, 2006a)

3.3 การใช้สภาพคัดแปลงบรรยากาศ (modified atmosphere packaging)

การบรรจุผลิตผลสดในภาชนะปิดหรือถุงพลาสติก มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงสภาพบรรยากาศ เนื่องจากการหายใจของผลิตผล มีการสะสมของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ น้ำและการลดลงของปริมาณก๊าซออกซิเจน สภาพที่เกิดขึ้นมีประโยชน์ต่อการลดอาการสะท้อนหนาวในพืชที่มีความไวต่ออุณหภูมิต่ำ (Forney and Lipton, 1990) จากผลการทดลองพบว่าการบรรจุใบแมงลักในถุงพลาสติกในสภาพปิด ชะลอการเกิด CI ได้มากกว่าใบที่เก็บในสภาพอากาศปกติ (อุณเจาะรู) สอดคล้องกับการชะลอการเพิ่มขึ้นของการร่วงไหลของประจุระหว่างเก็บรักษาในอุณหภูมิต่ำ (ภาพที่ 21) ความแตกต่างของความไวต่ออุณหภูมิต่ำ อาจเกี่ยวข้องกับความสัมพันธ์และปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) ที่สะสมในถุงบรรจุใบแมงลัก ความชื้นสัมพัทธ์ในถุงบรรจุใบแมงลักแบบปิดมีร้อยละความชื้นสูงกว่าถุงพลาสติกเจาะรู เฉลี่ยร้อยละ 5-10 และมีความเข้มข้นของก๊าซ CO_2 เฉลี่ยสูงกว่า 1 เปอร์เซ็นต์ (ไม่แสดงข้อมูล) การใช้ฟิล์มห่อหุ้มกล่องบรรจุผลส้ม เพื่อเพิ่มความชื้นในระหว่างการขนส่งและการเก็บรักษา มีประสิทธิภาพในการลดหรือการชะลออาการสะท้อนหนาว และสามารถประยุกต์ใช้ในการส่งออก (Henriod, 2006) การบรรจุใบแมงลักในถุง HDPE สามารถชะลอการพัฒนาอาการ CI มากกว่าการบรรจุในถุง PE สาเหตุของความแตกต่างของการพัฒนาอาการ CI น่าจะเกี่ยวข้องกับการสะสมของปริมาณก๊าซ CO_2 ในถุงบรรจุมากกว่าความชื้นสัมพัทธ์ที่เพิ่มขึ้น ความชื้นสัมพัทธ์ในถุง PP ที่บรรจุใบแมงลักมีค่าเฉลี่ยสูงกว่าร้อยละ 95 มากกว่าความชื้นในถุงชนิด HDPE ซึ่งมีความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 85-90 (ไม่แสดงข้อมูล) ความเข้มข้นของก๊าซ CO_2 ที่เพิ่มขึ้นมีผลชะลอการพัฒนาอาการสะท้อนหนาวในผลกล้วยไข่ ผลท้อ และ nectarine บางสายพันธุ์ มีความสัมพันธ์กับการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการผลิตเอทิลีน และเกิดการสร้างโปรตีนบางอย่างขึ้นมาใหม่เพิ่มขึ้นกว่าปกติ (Luan *et al.*, 2003; Uthairatanakij, 2003) แต่ความเข้มข้นของก๊าซ CO_2 ที่มากกว่าร้อยละ 10 หรือปริมาณออกซิเจนที่น้อยกว่าร้อยละ 1 เป็นสาเหตุให้เกิดกลิ่นผิดปกติมากขึ้น ใบแมงลักที่บรรจุในถุงพลาสติกชนิด PE ที่มีการเจาะรู มีกลิ่นผิดปกติหลังจากเก็บรักษาอุณหภูมิต่ำเพียง 24 ชั่วโมง (ไม่แสดงข้อมูล)

3.4 การใช้ความร้อนเพื่อลดการเกิดอาการสะท้อนหนาว

การให้ความร้อนในระดับปานกลาง ($38-42^{\circ}\text{C}$) ในช่วงระยะเวลาสั้น ๆ นานเป็นชั่วโมงสามารถลดความไวต่อการเกิด CI ในผลไม้และผักกินผลหลายชนิดที่มีความไวต่ออุณหภูมิต่ำค่อนข้างมาก ได้แก่ อะโวคาโด ส้ม มะม่วง มะเขือเทศ แตงกวา พริก และชุกินี เนื้อเยื่อพืชเกิด

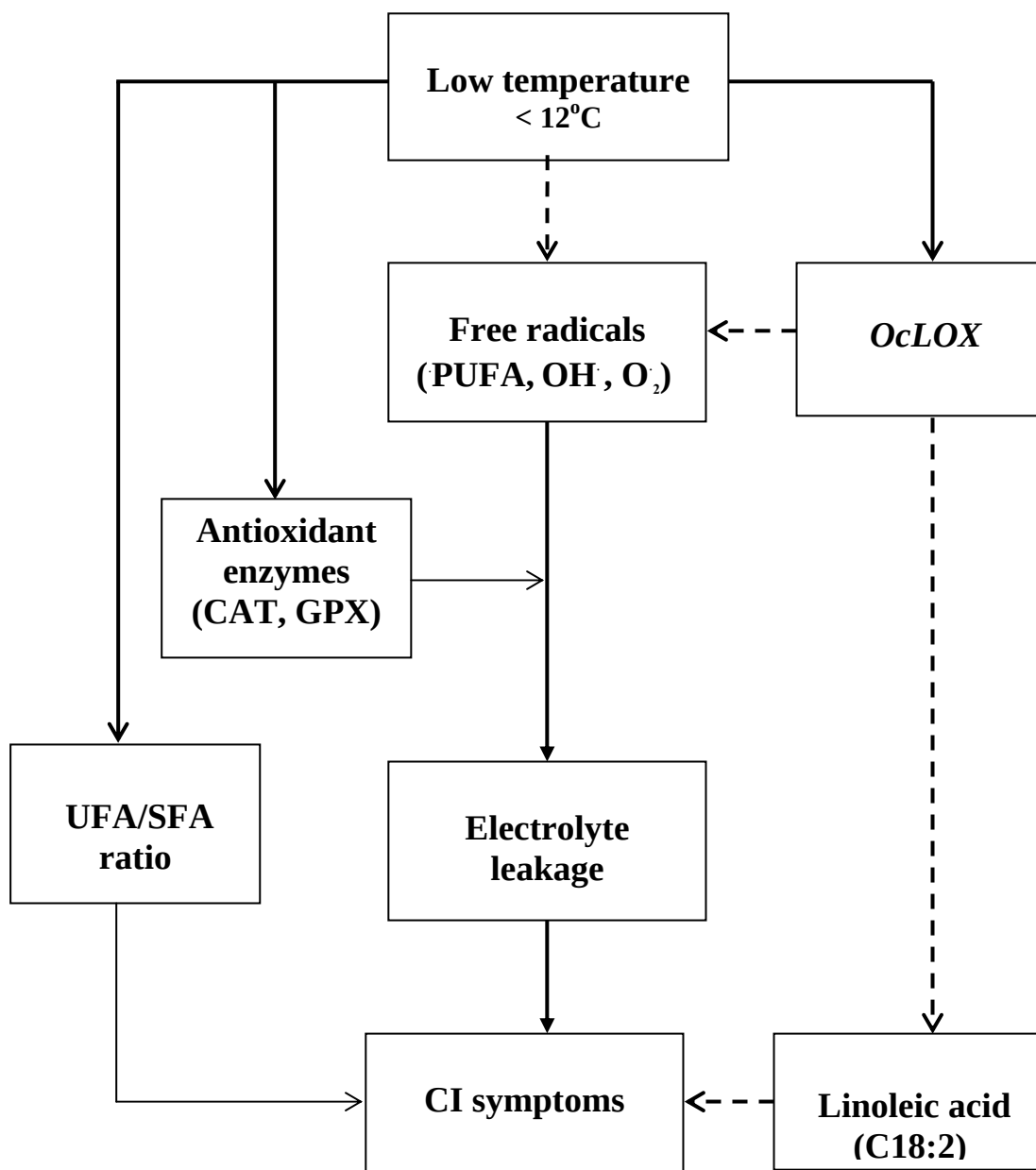
การปรับตัวในสภาพอุณหภูมิต่ำ และลดความเสียหายจากอาการ CI หลังได้รับอุณหภูมิสูง โดยการสังเคราะห์ heat shock protein (HSP) เพิ่มขึ้น ลดค่าการรั่วไหลของประจุจากเนื้อเยื่อผลมะเขือเทศ หรือการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบของไขมันในเยื่อหุ้มเซลล์ (Lurie, 1998) ในการทดลองครั้งนี้พบว่า การให้ความร้อนกับใบแมงลักที่ 38 °ซ เป็นเวลานาน 15 นาที ชะลอการพัฒนาอาการ CI ในแมงลักใบแก่ ภายหลังจากการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °ซ ได้นานมากกว่า 24 ชั่วโมง (ภาพที่ 22) แต่การให้ความร้อน เป็นเวลานาน 30 นาทีหรือ 1 ชั่วโมงทำให้เกิดความเสียหายจากความร้อน (heat injury) และมีอาการ CI รุนแรงขึ้น (ไม่แสดงข้อมูล) แต่จากการศึกษาในโหระพา ที่ให้อุณหภูมิสูงเท่ากันกับการทดลองนี้ เวลาที่ให้ความร้อนนานมากกว่า 6 ชั่วโมง สามารถยับยั้งการแสดงอาการ CI ได้ตลอดการทดลอง โดยไม่เกิดความเสียหายจากความร้อน (Aharoni, *et al.*, 2004) ผลของการใช้ความร้อนในใบแมงลัก น่าจะเกี่ยวข้องกับการลดความเสียหายของเยื่อหุ้มเซลล์ จึงพบว่าหลังจากเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำเพียง 12 ชั่วโมง สามารถชะลอการเพิ่มขึ้นของค่าการรั่วไหลของประจุจากเนื้อเยื่อใบ สอดคล้องกับการให้ความร้อนระยะสั้น กับผลสตรอเบอรี่ หรือชิ้นส่วนของใบและราก ต้นกล้วยไม้ มีการชักนำให้เพิ่มขึ้นของกิจกรรม antioxidant enzymes บางชนิด เช่น SOD และ CAT ซึ่งมีบทบาทในการปกป้องอันตรายของเซลล์พืชจาก ROS (Ali *et al.*, 2005; Vicente *et al.*, 2006) การให้ความร้อนกับผักสลัดก่อนที่ทำการตัดแต่งบางส่วน สามารถลดการเกิดสีน้ำตาลบริเวณบาดแผลจากการตัดแต่ง เนื่องจากหลังจากพืชได้รับความร้อนทำให้มีการสังเคราะห์ HSP เพิ่มขึ้น และลดการสังเคราะห์โปรตีนหรือเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับ phenolic metabolism ได้แก่ PAL (Saltveit, 2000)

4. กลไกการเกิดอาการสะท้านหนาวของใบพืชสกุลกะเพรา

จากผลการทดลองที่กล่าวมาข้างต้น โดยการเปรียบเทียบแมงลักใบอ่อนและใบแก่ ซึ่งมีความไวต่ออุณหภูมิต่ำและความแตกต่างทางสรีรวิทยาและชีวเคมีบางอย่างแตกต่างกัน สาเหตุเบื้องต้นในการเกิด CI ของใบพืชสกุลกะเพรานั้น่าจะเกี่ยวข้องกับความเสียหายของเยื่อหุ้มเซลล์ ซึ่งอาจมีความสัมพันธ์กับการเปลี่ยนแปลงอัตราส่วนของกรดไขมันไม่อิ่มตัวต่อกรดไขมันอิ่มตัวรวม (UFA/SFA ratio) ในใบอ่อนมี UFA/SFA ratio เพิ่มขึ้นหลังการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำ (4 °ซ) นาน 12 ชั่วโมง โดยที่ใบอ่อนยังไม่มีอาการ CI เกิดขึ้น ขณะที่ใบแก่ ไม่มีการเปลี่ยนแปลงของ UFA/SFA ratio และใบแก่แสดงอาการ CI แล้ว นอกจากนั้นองค์ประกอบของกรดไขมันไม่อิ่มตัวที่แตกต่างกันอาจมีความสัมพันธ์กับอาการ CI ของใบแมงลัก จากผลการทดลองพบว่าใบอ่อนมีปริมาณ linoleic acid (C18:2) มากกว่าใบแก่เกือบ 2 เท่า แต่ในทางตรงกันข้ามพบ linolenic acid (C18:3) ในใบอ่อนน้อยกว่าใบแก่อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ กรดไขมันไม่อิ่มตัวทั้งสองชนิดนี้ เป็น

polyunsaturated fatty acids (PUFAs) ซึ่งเป็นสารตั้งต้น(substrate) ของเอนไซม์ LOX จากการทดลองพบว่ากิจกรรมของ LOX และการแสดงออกของยีน *OcLOX* ในใบแก่สูงกว่าในใบอ่อน จึงเป็นไปได้ว่าเอนไซม์ LOX ในใบแก่มีมากกว่า C18:2 เป็นสารตั้งต้น จึงทำให้มีปริมาณ C18:2 ในใบแก่น้อยกว่าในใบอ่อน

LOX เป็นเอนไซม์ที่มีศักยภาพสูงต่อการย่อยสลายเยื่อหุ้มเซลล์ในสองทิศทางคือ เร่งปฏิกิริยาการเติมออกซิเจนใน PUFAs ที่มีโครงสร้างเป็น cis-cis double bound ใน C18:2 (back bone) แล้วเปลี่ยนเป็นสารตัวกลาง hydroperoxides (LOOH) สองชนิดคือ cis-trans (13HP) หรือ trans-cis (9HP) ทำให้นาครีสมิของโมเลกุลของไขมัน (C18:2) ลดลง โดยที่ 13HP น่าจะมีบทบาทต่อการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาของเยื่อหุ้มมากกว่า เนื่องจากมีขนาดรีสมิโมเลกุลลดลงอย่างมาก ทำให้มีจำนวนโมเลกุลต่อพื้นที่เพิ่มขึ้น ซึ่งอาจชักนำให้เยื่อหุ้มมีสภาพไม่ยืดหยุ่น (membrane rigidity) จึงเกิดการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติในการคัดเลือกสารผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ (permeability) และมีผลทำให้ค่าการรั่วไหลของประจุของเยื่อหุ้มเพิ่มขึ้น ความเป็นไปได้อีกทางหนึ่งคือผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นในระหว่างเกิดกระบวนการ catabolism โดยเอนไซม์ LOX อาจเปลี่ยนรูป PUFAs เป็น PUFA free radical (PUFA) ซึ่งสามารถเปลี่ยนเป็น peroxy (ROO[•]), alkoxy (RO[•]) หรือ superoxide (O₂^{•-}) free radical ซึ่งทำความเสียหายเยื่อหุ้มเซลล์ (Shewfelt, 1992; Lester, 2003) แต่พืชมีระบบป้องกันตัวเองโดยการสร้างสารหรือเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระเพื่อควบคุมหรือป้องกันอันตรายจากอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้น (Shewfelt and del Rosario, 2000) จากผลการทดลองในใบอ่อนมีกิจกรรมของเอนไซม์ CAT และ GPX สูงกว่าในใบแก่ เอนไซม์ CAT มีบทบาทในการเปลี่ยนสารอนุมูลอิสระให้อยู่ในรูปไม่เป็นอันตรายต่อเซลล์ โดยการเปลี่ยน superoxide และ hydrogen peroxide กลายเป็นน้ำและออกซิเจน จึงอาจช่วยชะลอกระบวนการ lipid oxidation และการปรากฏอาการสะท้อนหนาวในแมงลักใบอ่อน จะเห็นได้ว่า UFA/SFA ratio ปริมาณกรดไขมันไม่อิ่มตัว C 18:2 การแสดงออกของยีนหรือกิจกรรมของเอนไซม์ LOX และกิจกรรมของเอนไซม์ CAT มีความสัมพันธ์ร่วมกัน (interrelationship) ต่อการเกิดอาการสะท้อนหนาวในใบแมงลัก ซึ่งอาจสรุปความสัมพันธ์ของปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการเกิด CI ในใบพืชสกุลกะเพราดังภาพที่ 28



ภาพที่ 28 กลไกการเกิดอาการสะท้านหนาวในไบแมงลัก

- | | | |
|---------|----------------------------|---|
| ————— | ผลจากการทดลอง | PUFA: polyunsaturated fatty acids |
| ————— | ผลกระทบที่เกิดขึ้น | OcLOX: basil lipoxigenase gene |
| - - - - | ผลกระทบที่คาดว่าจะเกิดขึ้น | CAT: catalase |
| | | UFA/SFA: unsaturated/saturated fatty acid |

สรุป

การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างความเสียหายของเยื่อหุ้มเซลล์และการเกิดอาการสะท้อนหนาวของใบพืชสกุลกะเพรา สามารถสรุปผลดังต่อไปนี้

1. ใบพืชสกุลกะเพรามีการพัฒนาอาการสะท้อนหนาวระหว่างการเก็บรักษาที่ 4°C โดยแสดงอาการยุบตัวหรือการตายของเนื้อเยื่อด้านท้องใบเกิดขึ้นก่อน มีการยุบตัวของเซลล์ spongy ก่อนเซลล์ palisade อาการสะท้อนหนาวที่เด่นชัดคือ เกิดจุดสีน้ำตาล หรือ แถบสีน้ำตาลแดง มีขนาดไม่สม่ำเสมอ บริเวณปลายใบ ขอบใบ หรือเนื้อเยื่อใกล้เส้นกลางใบ ต่อมาเนื้อเยื่อเปลี่ยนเป็นสีดำ ขยายขนาดเพิ่มขึ้น และอาจเกิดการหลุดตัวของเนื้อเยื่อทำให้ใบเหี่ยว สำหรับอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาและไม่ทำให้เกิดอาการสะท้อนหนาวคือ 12°C โดยมีอายุการเก็บรักษานานประมาณ 1 สัปดาห์

2. พืชสกุลกะเพรามีความไวและระดับความรุนแรงต่อการเกิดอาการสะท้อนหนาวแตกต่างกัน ใบแมงลักมีความไวต่ออุณหภูมิต่ำมากที่สุด รองลงมาได้แก่ใบกะเพราและใบโหระพามีความไวต่ออุณหภูมิต่ำน้อยที่สุด โดยใบอ่อนมีความไวต่ออุณหภูมิต่ำกว่าใบแก่ในทุกสายพันธุ์ โดยพบว่าเนื้อเยื่อใบแก่มีการรั่วไหลของประจุมากกว่าเนื้อเยื่อใบอ่อนและเนื้อเยื่อบริเวณที่เกิดสีน้ำตาลมีการเพิ่มขึ้นของค่าการรั่วไหลของประจุสอดคล้องกับค่าดัชนีอาการสะท้อนหนาวที่เพิ่มขึ้น แต่ส่วนของเนื้อเยื่อปกติที่แยกมาจากใบที่มีดัชนีอาการสะท้อนหนาวแตกต่างกันมีค่าการรั่วไหลของประจุคงที่

3. กิจกรรมเอนไซม์ PPO ในใบแมงลักโดยรวมมีค่าสูงกว่าใบโหระพา แต่มีลักษณะการเปลี่ยนแปลงที่แตกต่างกัน ใบแมงลักกิจกรรม PPO ลดลงอย่างต่อเนื่อง ขณะที่ใบโหระพามีกิจกรรม PPO ค่อนข้างคงที่ในระหว่างการเก็บรักษาอุณหภูมิต่ำ โดยใบอ่อนมีกิจกรรมเอนไซม์ PPO มากกว่าใบแก่ทั้ง 2 ชนิด ส่วนปริมาณสารฟีนอลิกในใบโหระพาโดยรวมมีปริมาณมากกว่าใบแมงลัก แต่ในใบอ่อนและใบแก่มีปริมาณสารใกล้เคียงกัน

4. ใบแมงลักใบแก่มีกิจกรรมเอนไซม์ LOX และมีการสะสมของ mRNA transcript ของยีน *OcLOX* ระหว่างการเก็บรักษาที่ 4°C มากกว่าใบแมงลักใบอ่อน ส่วนใบแก่เก็บรักษาที่ 12°C ไม่มีการแสดงออกของตลอดการเก็บรักษา สำหรับปริมาณ TBA-reactive compound มีลักษณะการเปลี่ยนแปลงคล้ายกันทั้งในใบแก่และใบอ่อน

5. อัตราส่วนของกรดไขมันไม่อิ่มตัวและไขมันอิ่มตัว ในใบอ่อนมีค่าเพิ่มขึ้นอย่างมาก หลังการเก็บรักษาที่ 4 °ซ นาน 12 ชั่วโมง โดยมีความสัมพันธ์กับการเพิ่มขึ้นของปริมาณรวมของกรดไขมันไม่อิ่มตัวเพิ่มขึ้น และกรดไขมันอิ่มตัว palmitic acid (C16:0) ลดลง และพบว่ามีปริมาณกรดไขมันไม่อิ่มตัว linoleic acid (C18:2) มากกว่าใบแก่ประมาณสองเท่า แต่ปริมาณกรดไขมันไม่อิ่มตัว linolenic acid (C18:3) ในใบอ่อนมีปริมาณน้อยกว่าใบแก่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

6. เอนไซม์ CAT ในใบอ่อนมีกิจกรรมเพิ่มขึ้นหลังการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำนาน 24 ชั่วโมง ขณะที่กิจกรรมเอนไซม์ในใบแก่มีแนวโน้มลดลง นอกจากนั้นยังพบว่ากิจกรรมเอนไซม์ GPX ในใบอ่อนสูงกว่าใบแก่อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ขณะที่กิจกรรมค่อนข้างคงที่ แต่ในใบแก่มีกิจกรรมลดลงอย่างช้า ๆ ระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำ สำหรับเอนไซม์ SOD และ APX มีกิจกรรมค่อนข้างคงที่และไม่แตกต่างกันทั้งในใบอ่อนและใบแก่

7. การให้สาร salicylic acid เข้มข้น 0.5 mM นาน 10 นาที สามารถชะลอการพัฒนาการ สะท้อนหนวและชะลอการเพิ่มค่าการรั่วไหลของประจุจากเนื้อเยื่อใบแก่ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม ส่วนการให้ความร้อนกับใบแมงลักด้วยการอบด้วยลมร้อนที่อุณหภูมิ 38° ซ นาน 15 นาที การให้สาร 1-MCP เข้มข้น 100 $\mu\text{L L}^{-1}$ นาน 4 ชั่วโมงและการใช้สภาพคัดแปลงบรรยากาศโดยบรรจุใบแมงลักในถุงพลาสติกพอลิเอทิลีนสภาพปิด สามารถชะลอการพัฒนาการ สะท้อนหนวได้เพียง 24 ชั่วโมง หลังการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำและไม่สามารถลดค่าการรั่วไหลของประจุจากเนื้อเยื่อใบ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

- กรมวิชาการเกษตร. 2550. สถิติการเกษตร. แหล่งที่มา: http://www.doa.go.th/pl_data/index.html, 15 ธันวาคม 2550.
- คัทลียา จัตรเที่ยง. 2542. การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการสร้างผลผลิตของพืชสกุล
โหระพา 4 ชนิด. ปัญหาพิเศษปริญญาตรี, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- จริงแท้ ศิริพานิช. 2549. ชีววิทยาหลังการเก็บเกี่ยวและการวางของพืช. โรงพิมพ์ศูนย์ส่งเสริมและ
ฝึกอบรมการเกษตรแห่งชาติ, นครปฐม.
- ดุยฎี วิสุทธิแพทย. 2541. ผลของวัย อุณหภูมิและความชื้นสัมพัทธ์ต่อการเกิดอาการสะท้าน
หนาวของผลพุทราพันธุ์บอมเบย์. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเทคโนโลยี
พระจอมเกล้าธนบุรี.
- สายชล เกตุษา. 2528. สรีรวิทยาและเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยวผักและผลไม้. โรงพิมพ์ศูนย์
ส่งเสริมและฝึกอบรมการเกษตรแห่งชาติ, นครปฐม.
- สายชล เกตุษา และ อาภาภรณ์ มีนาพันธ์. 2537. การพัฒนาเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยวเพื่อ
ปรับปรุงคุณภาพของข้าวโพดฝักอ่อนเพื่อการส่งออก. รายงานผลการวิจัยประจำปี 2537
ภาควิชาพืชสวน. คณะเกษตร, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- สุทิน กันยะมี. 2547. ความสัมพันธ์ระหว่างอาการสะท้านหนาวกับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และ
ตัวต้านออกซิเดชันในมะม่วงพันธุ์ต่าง ๆ. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัย
เกษตรศาสตร์.
- ASTA. 2001. **Statistics Report**. American Spice Trade Association, Washington, D.C.
- A.O.A.C. 1995. **Official Methods of Analysis**, 16th ed. Association of Official Analytical
Chemists International, Washington, DC.

- Abdi, N., P. Holford and W.S.McGlasson. 1997. Effects of harvest maturity on the storage life of Japanese plums. **Aust. J. Exp. Agric.** 37: 391-397.
- Able, A.J., L.S. Wong, A. Prasad and T.J. O'Hare. 2003. The effect of the 1-ethylcyclopropane on the shelf life of minimally processed leafy Asian vegetables. **Postharvest Biol. Technol.** 27: 157-161.
- Aharoni, N., O. Dvir, D. Chalupowicz and Z. Aharon. 1993. Coping with postharvest physiology of fresh culinary herbs. **Acta Hortic.** 344: 69-78.
- _____, D. Chalupowicz, M. Faure-Mlinski, Z. Aharon, D. Maurer and A. Lers. 2004. Heat pretreatment reduces decay and chilling injury in sweet basil, Volume of abstracts. *In* The postharvest working group of the Italian Horticultural Society, eds. **5th International Postharvest Symposium.** Verona, Italy.
- Ali, M.B., E. Hahn, J. and K. Y. Paek. 2005. Effects of temperature on oxidative stress defense systems, lipid peroxidation and lipoxygenase activity in *Phalaenopsis*. **Plant Physiol. Biochem.** 43: 213-223.
- Amiot, M.J., A. Fleureit, V. Cheynier and J. Nicolas. 1997. Phenolic compounds and oxidative mechanisms in fruits and vegetables, pp. 52-85. *In* F. A. Tomas-Barberan and R.J. Robins, eds. **Phytochemistry of Fruits and Vegetables.** Charedon Press, Oxford.
- Arrizumi, T., S. Kishitani, R. Inatsugi, I. Nishida, N. Murata and K. Toriyama. 2002. An increase in unsaturation of fatty acids in phosphatidylglycerol from leaves improves the rates of photosynthesis and growth at low temperatures in transgenic rice seedlings. **Plant Cell Physiol.** 43: 751-758.
- Barclay, K.D. and B.D. McKersie. 1994. Peroxidation reaction in plant membrane: effects of free fatty acids. **Lipids** 12: 877-83.

- Baysal, T. and A. DemirdvÖen. 2007. Lipoxygenase in fruits and vegetables: A review. **Enzyme Micro. Technol.** 40: 491-496.
- Boonsiri, K., S. Ketsa and W.G. van Doorn. 2007. Seed browning of hot peppers during low temperature storage. **Postharvest Biol. Technol.** 45: 358-368.
- Bower J. and B.M. Mitcham. 2001. Application of 1-MCP to vegetables crops, pp. 26-27 *In: Perishables handling quarterly*. Available Source: <http://postharvest.ucdavis.edu/datastorefiles/234-99.pdf>, March 4, 2008.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the determination of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.** 72: 248-254.
- Brooks, R. M., M.V. Bradley and T. I. Anderson .1950. **Plant Microtechnique Manual**. University of California, Davis.
- Buritaux, O., M.J. Amiot and J. Nicolas. 1991. Enzymatic browning of basil (*Ocimum basilicum* L.): studies on phenolic compounds and polyphenol oxidase. **Sci. Aliments** 11: 49-62.
- Buzzanell, P. J., R. Dull and F. Gray. 1995. The spice market in the United States: Recent developments and prospects. **Agriculture Information Bull.** 709, U.S. Dept. of Agriculture, Washington, D.C. Available Source: <http://www.ers.usda.gov/publications>, December 23, 2004.
- 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. **J. Plant Physiol.** 160: 283-292.

- Cantwell, M.I. and M.S. Reid. 2002. Postharvest handling systems: fresh herbs, pp. 327-33. *In* A.A. Kader, ed. **Postharvest Technology for Horticultural Crops**. Univ. of California Press, California.
- Chang, S., J. Puryear and J. Cairney. 1993. A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. **Plant Mol. Biol. Rep.** 11: 113-116.
- Chen, J., R.W. Henley, R.J. Henny, R.D. Caldwell and C.A. Robinson. 2007. **Chilling injury in tropical foliage plants: II. Aglaonema**. Available Source: <http://www.edis.ifas.ufl.edu/EP103>, January 30, 2007.
- Chen, W.P. and P.H. Li. 2001. Chilling-induces Ca^{2+} overload production of active oxygen species in maize (*Zea may* L.). **Plant Cell Environ.** 2: 791-800.
- Concellón, A., M.C. Añón and A.R. Chaves. 2007. Effect of low temperature storage on physical and physiological characteristics of eggplant fruit (*Solanum melongena* L.). **LWT** 40: 389-396.
- Cyril, J.C., G.L. Powell, R.R. Duncan and W.V. Baird. 2002. Changes in membrane polar lipid fatty acids of *Seashore paspalum* in response to low temperature exposure. **Crop Sci.** 42: 2031-2037.
- Davin, L.B. and N.G. Lewis. 1992. Phenylpropanoid metabolism: Biosynthesis of monolignols, lignans, lignins and suberins, pp. 325-375. *In* A.S. Helen and K. Ragai, eds. **Phenolic Metabolism in Plants**. Plenum Press, New York.
- Dhindsa, R.S., P. Plumb-Dhindsa and T.A. Thorpe. 1981. Leaf senescence: correlated with increased levels of membrane permeability and lipid oxidation, and decreased levels of superoxide dismutase and catalase. **J. Exp. Bot.** 32: 93-101.

- Ding, Chang-Kui., C.Y. Wang, K. C. Gross and D. L. Smith. 2001. Reduction of chilling injury and transcript accumulation of heat shock proteins in tomato fruit by methyl jasmonate and methyl salicylate. **Plant Sci.** 161: 1153-1159.
- Dixon, R.A. and N.L. Paiva. 1995. Stress-induced phenylpropanoid metabolism. **Plant Cell** 7: 1085-1097.
- Ella, L., A. Zion, A. Nehemia and L. Amnon. 2003. Effect of the ethylene action inhibitor 1-methylcyclopropane on parsley leaf senescence and ethylene synthesis. **Postharvest Biol. Technol.** 30: 67-74.
- Escalona V.H., E. Aguayo, P. Gómez and F. Artés. 2004. Modified atmosphere packaging inhibits browning in fennel. **LWT** 37: 115-121.
- Faure, M.M., N. Aharoni , S. Mayak and A. Lers. 2004. Mode of action of heat treatment applied to sweet basil (*Ocimum basilicum*) for reduction of chilling injury, Volume of abstracts. *In* The postharvest working group of the Italian Horticultural Society, eds. **5th International Postharvest Symposium**. Verona, Italy.
- Ferguson, I.B., S. Lurie and J.H. Bowen. 1994. Protein synthesis and breakdown during heat shock of cultured pear (*Pyrus communis* L.) cells. **Plant Physiol.** 104: 1429-1437.
- Feussne, I. and C. Wasternack. 2002. The lipoxygenase pathway. **Ann. Rev. Plant Biol.** 53: 275-297.
- Forney, C.F. and W.Y. Lipton. 1990. Influence of controlled atmospheres and packaging on chilling sensitivity , pp. 258-267. *In* C. Y. Wang, ed. **Chilling Injury of Horticulture Crops**. CRC Press, Florida.
- Friendman H. and I. Rot. 2006. Characterization of chilling injury in *Heliotropium arborescens* and *Lantana camara* cutting. **Postharvest Biol. Technol.** 40: 224-249.

- Fung , R.W.H., C.Y. Wang, D.L. Smith, K.C. Gross and M. Tain. 2004. MeSA and MeJA increase steady state transcript levels of alternative oxidase and resistance against chilling injury in sweet peppers (*Capsicum annuum* L.). **Plant Sci.** 116: 711-719.
- Furth, P. and D. Cox. 2004. Spices and ethnic foods: the spice market expands. **Food Technol.** 58: 30-34.
- Gang, D.R., J. Wang, N. Dudareva, K.H. Nam, J.E. Simon, E. Lewinsohn and E. Pichersky. 2001. An investigation of the storage and biosynthesis of phenylpropenes in sweet basil. **Plant Physiol.** 125: 539-555.
- Gardner, H.W. 1995. Biological roles and biochemistry of the lipoxygenase pathway. **HortScience** 35: 197-204.
- Ghasemnezhad, M., K. Marsh, R. Shilton, M. Babara and A. Woolf. 2007. Effect of hot water treatment on chilling injury and heat damage in 'satsuma' mandarins: Antioxidant enzymes and vacuolar ATPase, and pyrophosphatase. **Postharvest Biol. Technol.** *Inpress. Available online, 25 October 2007.*
- González-Aguilar, G.A., M.E. Tiznado-Hernández, R. Zavaleta-Gatica and M.A. Martínez-Téllez. 2004. Methyl jasmonate treatment reduce chilling injury and activate the defense response of guava fruits. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 313: 694-701
- _____, _____ and C.Y. Wang. 2006. Physiological and biochemical responses of horticultural products to methyl jasmonate, pp. 1-9. *In Stewart Postharvest Review*, Available Source: <http://www.stewartpostharvest.com>
- Gooding, P.S., C. Bird and S.P. Robinson. 2001. Molecular cloning characterization of banana fruit polyphenol oxidase. **Planta** 213: 748-754.

Grechkin, A. 1998. Recent developments in biochemistry of the plant lipoxygenase pathway.

Prog. Lipid Res. 37: 317-352.

Hamada, T., H. Kodama, K. Takeshita, H. Utsumi and K.Iba. 1998. Characterization of transgenic tobacco with an increased α -linolenic acid level. **Plant Physiol.**

118: 591-598.

Henroid, R.E. 2006. Postharvest characteristics of navel oranges following high humidity and low temperature storage and transport. **Postharvest Biol. Technol.** 42: 57-64.

Hiltuneh, R. and Y. Holm. 1999. **Basil: the Genus *Ocimum***. Harwood Academic, Amsterdam.

Hodges, D.M., C.J. Andrews, D.A. Johnson and R.I. Hamilton. 1997. Antioxidant enzyme and compound responses to chilling stress and their combining abilities in differentially sensitive maize hybrids. **Crop Sci.** 37: 857-863.

_____, J.M. DeLong, C.F. Forney and R.K Prange. 1999. Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid oxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. **Planta** 207: 604-611.

Hugly, S. and C. Somerville. 1992. A role for membrane lipid polyunsaturation in the chloroplast biogenesis at low temperature. **Plant Physiol.** 99: 197-202.

Janowiak, F., B. Mass and K. Dorffling. 2002. Importance of abscisic for chilling tolerance of maize seedlings. **J. Plant Physiol.** 159: 635-643.

Jiang, W., Q. Sheng, Xiang-Juan Zhou, Ming-Jing Zhang and Xue-Jun Liu. 2002. Regulation of detached coriander leaf senescence by 1-methylcyclopropane and ethylene. **Postharvest Biol. Technol.** 26: 339-345.

- John, J.B. St. and M.N. Christiansen. 1976. Inhibition of linolenic acid synthesis and modification of chilling resistance in cotton seedlings. **Plant Physiol.** 57: 257-259.
- Juani, H.R. and J.E. Simon. 2002. Antioxidant activity of basil, pp. 575-579. *In*: J. Janick and A. Whipkey, eds. **Trends in New Crop and New Uses**. ASHS Press, Alexandria, VA.
- Kader, A.A. 1986. Biochemical and physiological basis for effects of controlled and modified atmospheres on fruits and vegetables. **Food Techol.** 40: 99-104.
- Kang Ho-Min and M.E. Saltveit. 2002. Chilling tolerance of maize, cucumber and rice seedling leaves and roots are differentially affected by salicylic acid. **Physiol. Plant.** 115: 571-576.
- Kaniuga, Z., V. Saczyńska, E. Miśkiewicz and M. Garstka. 1999. Changes in fatty acids of leaf polar lipids during chilling and post-chilling rewarming of *Zea mays* genotypes differing in response to chilling. **Acta Physiol. Plant.** 21: 231-241.
- Kazuhiro, D., N. Masayasu and Y. Ichiji. 1999. Changes in phenylalanine ammonia lyase and polyphenol oxidase activities with occurrence of browning in shredded lettuce during storage. **Food Preservation Sci.** 25: 209-212.
- Ketchi, D.O. and P.J.C. Kuiper. 1979. Fatty acid level in apple leaves of different age as affected by temperature. **Physiol. Plant.** 46: 93-96.
- Ketsa, S., S. Chidtragool, J.D. Klein and S. Lurie. 1999. Ethylene synthesis in mango fruit following heat treatment. **Postharvest Biol. Technol.** 15:65-72.
- Klein, J.D. and S. Lurie. 1990. Prestorage heat treatment as a mean of improving poststorage quality of apple. **J. Am. Soc. Hort. Sci.** 115: 255-259.
- Klessig, D.F. and J. Malamy. 1994. The salicylic acid signal in plant. **Plant Mol. Biol.** 26: 1439-1458.

- Ko, B.R., S.W. Know, M.J. Jaskani and J.S. Choi. 2006. Fatty acid composition and Fad3 gene expression in root of watermelon and gourd under low temperature. **Acta Hortic.** 710: 377-382.
- Kratsch, H.A. and R.R. Wise. 2000. The ultrastructure of chilling stress. **Plant Cell Environ.** 23: 337-350.
- Kuk, Y.I., J.H. Lee, H.Y. Kim, S.J. Chang, J.O. Guh, H.J. Lee and N.R. Burgos. 2003a. Relationships of cold acclimation and antioxidative enzymes with chilling tolerance in cucumber (*Cucumis sativus* L.). **J. Am. Soc. Hortic. Sci.** 128: 661-666.
- _____, J.S. Shin, N.R. Burgos, T.E. Hwang, O. Han, B.H. Cho, S. Jung and J.O. Guh. 2003b. Antioxidative enzymes offer protection from damage in rice plants. **Crop Sci.** 43: 2109-2117.
- Kumer, G.N.M. and N.R. Knowles. 1993. Changes in lipid peroxidation and lipolytic and free-radical scavenging enzyme activities during aging and sprouting of potato (*Solanum tuberosum*) seed-tubers. **Plant Physiol.** 102: 115-124.
- Lafuente, M.T., L. Zacarias, M.A. Martínez-Téllez, M.T. Sánchez-Ballesta and A. Granell. 2003. Phenylalanine ammonia lyase and ethylene in relation to chilling injury as affected by fruit age in citrus. **Postharvest Biol. Technol.** 29: 308-317.
- _____, L. Zacarias, J.M. Sala, M.T. Sánchez-Ballesta, M.J. Gosalbes, J.F. Marcos, L. González-Candels, Y. Lluch and A. Granell. 2005. Understanding the basis of chilling injury in citrus fruit. **Acta Hortic.** 682: 831-842.
- Lamikanra, O. 2002. Enzymatic effects on flavor and texture of fresh-cut fruits and vegetables, pp. 125-185. In O. Lamikanra, ed. **Fresh-cut Fruits and Vegetables: Science, Technology, and Market.** CRC Press, Florida.

- Lange, D.D. and A.C. Carmeron. 1994. Postharvest shelf life of sweet basil. **HortScience** 29: 102-103.
- Larsson, C. and I.M. Møller. 1990. **The Plant Plasma Membrane. Structure, Function and Molecular Biology**. Springer, Berlin Heideberg.
- Lawton, B.P. 2002. **Mints: A Family of Herbs and Ornamentals**. Timber Press, Portland.
- Lee, D.H. and C.B. Lee. 2000. Chilling stress-induced changes of antioxidant enzymes in the leaves of cucumber: in gel enzyme activity assays. **Plant Sci.** 159: 75-85.
- Lee, S.H., S.J. Ahn, Y.J. Im, K. Cho, G.C. Chung, B.H. Cho and O. Han. 2005. Differential impact of low temperature on fatty acid unsaturation and lipoxygenase activity in figleaf gourd and cucumber roots. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 330: 1194-1198.
- Lentheric I., E. Pinto, M. Vendrell and C. Larrigaudiere. 1999. Harvest date affects the antioxidative systems in pear fruits. **J. Hortic. Sci. Biotec.** 74: 791-795.
- Lester, G.E. 2003. Oxidative stress affecting fruit senescence, pp. 113-127. *In* D.M. Hodges, ed. **Postharvest Oxidative Stress in Horticulture Crops**. The Haworth Press, New York.
- Levitt, J. 1980. **Responses of Plants to Environmental Stresses**. Volume II, 2nd ed. Academic Press, New York.
- Li, Z., X. Wang, F. Chen and Hyun-Jin Kimt. 2007. Chemical changes and over expressed genes in sweet basil (*Ocimum basilicum* L.) upon methyl jasmonate treatment. **J. Agric. Food Chem.** 55: 706-713.

- Liao, Z., R. Chen, M. Chen, Y. Yang, Y. Fu, Q. Zhang and X. Lan .2006. Molecular cloning and characterization of the polyphenol oxidase gene from sweet potato. **Mol. Biol.** 40: 907-913.
- Liavonchanka, A. and I. Feussner. 2006. Lipoxygenases: Occurrence, functions and catalysis. **J. Plant Physiol.** 163: 348-357.
- Loaiza, J. and M. Cantwell. 1997. Postharvest physiology and quality of cilantro (*Coriandrum sativum* L.). **HortScience** 32: 104-107.
- Luan, L.V., A. Suwanagul and J. Siriphanich. 2003. Alleviation of chilling injury in banana (*Musa acuminata*) cv. Kluai Khai (AA Group) by treatment with high concentration of carbon dioxide and methyl jasmonate. **Thai J. Agric. Sci.** 36: 105-120.
- Lukatkin, A.S. 2005. Initiation and development of chilling injury in leaves of chilling-sensitive plants. **Russ. J. Plant Physiol.** 52: 542-546.
- Lurie, S. 1998. Postharvest heat treatments. **Postharvest Biol. Technol.** 14: 257-269.
- Lyons, J.M. and C.M. Asmundson. 1965. Solidification of unsaturated/saturated fatty acid mixtures and its relationship to chilling sensitivity in plants. **J. Am. Oil Chem. Soc.** 42: 1052-1058.
- _____ and J.K. Raison. 1970. Oxidative activity of mitochondria isolated from plant tissue sensitive and resistant to chilling injury. **Plant Physiol.** 45: 386-389.
- _____. 1973. Chilling injury in plants. **Annu. Rev. Plant Physiol.** 24: 445-466.
- Maalekuu, K., Y. Elkind, A. Leikin-Frenkel, S. Lurie and E. Fallik. 2006. The relation between water loss, lipid content, membrane integrity and LOX activity in ripe pepper fruit after storage. **Postharvest Biol. Technol.** 42: 248-255.

- MacRae, E.A. and I.B. Ferguson. 1985. Changes in catalase activity and hydrogen peroxide concentration in plants in response to low temperature. **Physiol. Plant.** 65: 51-56.
- Mao, L., H. Pang, G. Wang and C. Zhu. 2007. Phospholipase D and lipoxygenase activity of cucumber fruit in response to chilling stress. **Postharvest Biol. Technol.** 44: 42-47.
- Marangoni, A.G., T. Palma and D.W. Stanley. 1996. Membrane effects in postharvest physiology. **Postharvest Biol. Technol.** 7: 193-217.
- Martinez, M.V. and J. R. Whitaker. 1995. The biochemistry and control of enzymatic browning. **Trend in Food Sci. Technol.** 6: 195-200.
- Meir, S., R. Ronen, S. Lurie and S. Philosoph-Hadas. 1997. Assessment of chilling injury during storage: chlorophyll fluorescence characteristics of chilling-susceptible and triazole-induced chilling tolerant basil leaves. **Postharvest Biol. Technol.** 10, 213-220.
- Mercado-Silva, E.R. Garcia, A. Heredia-Zepeda and M. Cantwell. 1998. Development of chilling injury in five jicama cultivars. **Postharvest Biol. Technol.** 13: 37-43.
- Minorsky, P.V. 1985. An heuristic hypothesis of chilling injury in plants: a role for calcium as the primary physiological transducer of injury. **Plant Cell Environ.** 8: 75-94.
- Miquel, M., D. James, H. Dooner and J. Browse. 1993. *Arabidopsis* requires polyunsaturated lipids for low temperature survival. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 90: 6208-6212.
- Mirdehghan, S.H., M. Rahemi, D. Martínez-Romero, F. Guillén, J.M. Valverde, P.J. Zapata, M. Serrano and D. Valero. 2007. Reduction of pomegranate chilling injury during storage after heat treatment : Role of polyamine. **Postharvest Biol. Technol.** 44: 19-25.
- Mohammed, M. and J.K. Brecht. 2002. Reduction of chilling injury in ‘Tommy Atkins’ mangoes during ripening. **Scientia Hort.** 95: 297-308.

- Murata, M., M. Nishimura, N. Murai, M. Haruta, S. Homma and Y. Itoh. 2001. A transgenic apple callus showing reduced polyphenol oxidase activity and lower browning potential. **Biosci. Biotechnol. Biochem.** 65: 383-388.
- Murata, N., N. Sato, N. Takahashi and Y. Hamazaki. 1982. Composition and positional distributions of fatty acids in phospholipids from leaves of chilling-sensitive and chilling-resistant plants. **Plant Cell Physiol.** 23: 1071-1079.
- _____ and J. Yamaya. 1984. Temperature-dependent phase behavior of phosphatidylglycerols from chilling-sensitive and chilling-resistant plants. **Plant Physiol.** 74: 1016-1024.
- _____, O. Ishizaki-Nisshizawa, S. Higashi, H. Hayashi, Y. Tasaka and I. Nishida. 1992. Genetically engineered alteration in the chilling sensitivity of plants. **Nature** 356: 710-713.
- Murata, T., 1990. Relation of chilling stress to membrane permeability, pp. 201-209. In C.Y. Wang, ed. **Chilling Injury of Horticultural Crops**. CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida.
- Nguyen, T.B.T., S. Ketsa and W.G. van Doorn . 2004. Effect of modified atmosphere packaging on chilling-induced peel browning in banana. **Postharvest Biol. Technol.** 31: 313-317.
- Ose, K., K. Chachin and Y. Imahori. 1995. Browning mechanism of water convolvulus (*Ipomoea aquatica* Forsk.) stored at low temperature, pp. 178-187. In Y.L. Chang and J. R. Whitaker, eds. **Enzymatic Browning and its Prevention**. ACS Symposium Series 600, Washington DC.

- Palta, J.P., L.S. Weiss, J.F. Harbage, J.B. Bamberg and J.M. Stone. 1993. Molecular mechanisms of freeze thaw injury and cold acclimation in herbaceous plants: Merging physiological and genetic approaches, pp. 659-680. *In* M.B. Jacksons and C. R. Black, eds. **Interaction Stress on Plants in a Changing Climate**. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Parkin, K.L. and Shu-Jung Kuo. 1989. Chilling-induced lipid degradation in cucumber (*Cucumis sativa* L. cv Hybrid C) fruit. **Plant Physiol.** 90: 1049-1056.
- Penchaiya, P. 2003. **Effect of Controlled Atmosphere, Temperature and Packaging on Quality and Storage Life of Sweet Basil (*Ocimum basillicum* L.)**. MS Thesis, King Mongkut's University of Technology Thonburi (KMUTT).
- Pennycooke J.C., S. Cox and C. Stushnoff. 2005. Relationship of cold acclimation, total phenolic content and antioxidant capacity with chilling tolerance in petunia (*Petunia × hybrida*). **Environ. Exp. Bot.** 53: 225-232.
- Pesis E., D. Aharoni, Z. Aharon, R. Ben-Arie, N. Aharoni and Y. Fuchs. 2000. Modified atmosphere and modified humidity packaging alleviates chilling injury symptoms in mango fruit. **Postharvest Biol. Technol.** 19: 935-101.
- Phakawatmongkol, W., S. Ketsa and W.G. van Doorn. 2004. Variation in fruit chilling injury among mango cultivars. **Postharvest Biol. Technol.** 32: 115-118.
- Philosoph-Hadas, S., S. Meir, B. Akiti and J. Kanner. 1994. Oxidative defense systems in leaves of three edible herb species in relation to their senescence rate. **J. Agric. Food Chem.** 42: 2376-2381.

- Porta, H., P. Rueda-Benítez, F.Compos, J.M. Colmenero-Flores, J.M. Colorado, M.J. Carmona, A.A. Covarrubias and M. Rocha-Sosa. 1999. Analysis of lipoxygenase mRNA accumulation in the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) during development and under stress conditions. **Plant Cell Physiol.** 40: 850-858.
- _____and M. Roch-Sosa. 2002. Plant lipoxygenase. Physiological and molecular features. **Plant Physiol.** 130: 15-21.
- Posmyk, M.M., C. Bailly, K. Szafrńska, K.M. Janas and F.Corbineau. 2005. Antioxidant enzymes and isoflavonoids in chilled soybean (*Glycine max* L. Merr.) seedlings. **J. Plant Physiol.** 162: 403-412.
- Prasad, T.K.. 1996. Mechanism of chilling-induced oxidative stress injury and tolerance in developing maize seedlings : changes in antioxidant system, oxidation of proteins and lipids, and protease activities. **Plant J.** 10: 1017-1026.
- _____, M.D. Anderson, B.A. Martin and C.R. Stewart. 1994. Evidence for chilling-induced oxidative stress in maize seedlings and a regulatory role for hydrogen peroxide. **Plant Cell** 6: 65-74.
- Promyou, S., S. Ketsa and W.G. van Doorn. 2007. Hot water treatment delay cold-induced banana peel blackening. **Postharvest Biol. Technol.** 48: 132-138.
- Purvis, A.C. 1997. Role of alternative oxidase in limiting superoxide production by plant mitochondria. **Physiol. Plant.** 100: 165-170.
- Raghavan, S. 2004. Developing ethnic foods and ethnic flair with spices. **Food Tech.** 58: 35-41.
- Raison, J.K. and G.R. Orr. 1990. Proposals for a better understanding of the molecular basis of chilling injury, pp. 145-164. *In* C. Y. Wang , ed. **Chilling Injury of Horticultural Crops.** CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida.

- Rikin, A., D. Atsmon and C. Gitler. 1979. Chilling injury in cotton (*Gossypium hirsutum* L.) prevention by abscisic acid. **Plant Cell Physiol.** 20: 1537-1546.
- Roughan, P.G. 1995. Phosphatidylglycerol and chilling sensitivity in plants. **Plant Physiol.** 77: 740-746.
- Sala, J. and M.T. Lafuente. 1991. Catalase enzyme activity is related to tolerance of mandarin fruit to chilling. **Postharvest Biol. Technol.** 20: 81-89.
- Salviet, M.E. 2000. Wound induced changes in phenolic metabolism and tissue browning are altered by heat shock. **Postharvest Biol. Technol.** 21: 61-69.
- Sambrook, J., E.F. Fritsch and T. Maniatis. 1989. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual.** 2nd. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Sanchez-Ballesta, M.T., Y. Lluch, M.J. Gosalbes, L. Zacarias, A. Granell and M.T. Lafuente. 2003. A survey of gene differentially expressed during long-term heat-induced chilling tolerance in citrus fruit. **Planta** 218: 65-70.
- Sanz, C., J.M. Olias and A.G. Perez. 1997. Aroma biochemistry of fruits and vegetables, pp. 125-155. In F.A. Tomas-Barberan and R.J. Robins, eds. **Phytochemistry of Fruits and Vegetables.** Charedon Press, Oxford.
- Sekai, W.S. 1973. Simple method for differential straining of paraffin embedded plant materials using toluidine blue o. **Stain Technol.** 48: 247-249.
- Sharom, M., C. Willemot and J.E. Thompson. 1994. Chilling injury induces lipid phase changes in membranes of tomato fruit. **Plant Physiol.** 105: 305-308.

- Shewfelt, R.L. 1992. Response of plant membrane to chilling and freezing, pp. 192-219.
In Y.Y. Leshem, ed. **Plant Membranes: A Biophysical Approach to Structure, Development and Senescence**. Kluwer Academic, the Netherlands.
- _____ and A.C. Purvis. 1995. Toward a comprehensive model for lipid peroxidation in plant tissue disorders. **HortScience** 30: 213-218.
- _____ and B.A. del Rosario. 2000. The role of lipid peroxidation in storage disorders of fresh fruits and vegetables. **HortScience** 35: 575-579.
- Singleton, V.L., R. Orthofer and R.M. Lemuela-Raventos. 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. **Methods in Enzymol.** 229: 152-178.
- Sisler, E.C. and M. Serek. 2003. Compounds interacting with the ethylene receptor in plants. **Plant Biol.** 5: 473-480.
- Solecka, D., A. Boudet and A. Kacperska. 1999. Phenylpropanoid and anthocyanin changes in low-temperature treated winter oilseed rape leaves. **Plant Physiol. Biochem.** 37: 491-496.
- Sovrano, S., S. Buiatti and M. Anese. 2006. Influence of malt browning degree on lipoxygenase activity. **Food Chem.** 99: 711-717.
- Suzuki, N. and R. Mittler. 2006. Reactive oxygen species and temperature stresses: A delicate balance between signaling and destruction. **Physiol. Plant.** 126: 45-51.
- Thomson, G., S. Winkler and Hopkings. 2001. **Diversifying Asian Vegetable Markets**. Research Report, Rural Industries Research & Development Corporation of Australia (IRDC). Available Source: <http://www.rirdc.gov.au/report/FAO/01-02.pdf> January 10, 2004.

- Tomás-Barberán, F.A. and J.C. Espín. 2001. Phenolic compounds and related enzymes as determinants of quality in fruits and vegetables. **J. Sci. Food Agric.** 81: 853-876.
- Tulio, A.Z., K. Ose, K. Chachin and Y. Ueda. 2002. Effect of storage temperatures on the postharvest quality of jute leaves (*Corchorus olitorius* L.). **Postharvest Biol. Technol.** 26: 329-338.
- Uhl, S.R. 2000. **Handbook of Spices, Seasonings, Flavoring.** Technomic Publishing, Pennsylvania.
- Ukeda, H., S. 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 xanthin-xanthine oxidase. **Anal. Biochem.** 251: 206-209.
- Uthairatanakij, A. 2003. **Responses of Nectarines to Atmosphere Containing High Carbon Dioxide Concentration.** PhD Thesis, University of Western Sydney, Australia.
- Venere, D.D., L. Sergio and V. Linsalata. 2002. Biochemical assessment of basil (*Ocimum basilicum* L.) cultivars for processing. **Acta Hortic.** 576: 177-179.
- Vicente A.R., G.A. Martínez, A.R. Chaves and P.M. Civello. 2006. Effect of heat treatment on strawberry fruit damage and oxidative metabolism during storage. **Postharvest Biol. Technol.** 40: 116-122.
- Vickers, T. 2007. **Radical chain reaction mechanism of lipid peroxidation.** Available Source: http://commons.wikimedia.org/wiki/Image:Lipid_peroxidation.svg, July 31, 2007.
- Vlachonassios, K.E. 1999. **Prestorage Heat Treatment to Inhibit Chilling Injury and Synchronize Ripening in Tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill) Fruit.** PhD Thesis, Michigan State University, US.

- Walker, M.A. and B.D. McKersie. 1993. Role of ascorbate-glutathione antioxidant system in chilling resistance in tomato. **J. Plant Physiol.** 141: 234–239.
- Waltkins, C.B. 2006. The use of 1-methylcyclopropane (1-MCP) on fruits and vegetables. **Biotech. Adv.** 24: 389-409.
- Wang, C.Y. 2003. Leafy, floral and succulent vegetables, pp. 691-712 *In* J.A. Bartz and M. Brecht, eds. **Postharvest Physiology and Pathology of Vegetables**. Dekker Inc., New York.
- _____ and J.G. Buta. 1994. Methyl jasmonate improves quality of stored zucchini squash. **J. Food Qual.** 22: 663-670.
- Wang, L., S. Chen, W. Kong, S. Li and D.D. Archbold. 2006a. Salicylic acid pretreatment alleviates chilling injury and affects the antioxidant system and heat shock proteins of peaches during cold storage. **Postharvest Biol. Technol.** 41: 244-251.
- Wang, X., W. Li, M. Li and R. Welti. 2006b. Profiling lipid change in plant response to low temperature. **Physiol. Plant.** 126: 90-96.
- Whitaker, B.D. and C.Y. Wang. 1987. Effect of paclobutrazol and chilling injury on leaf membrane lipids in cucumber seedlings. **Physiol. Plant.** 70: 404-411.
- _____ and _____. 1995. Lipid changes in mature-green bell pepper fruit during chilling at 2°C and after transfer to 20°C subsequent to chilling. **Physiol. Plant.** 93: 683-688.
- Wilson, J.M. 1976. The mechanism of chill- and drought-hardening of *Phaseolus vulgaris* leaves. **New Phytol.** 76: 257-270.
- _____ and R.M.M. Crawford. 1974a. Leaf fatty acid content in relation to hardening and chilling injury. **J. Exp. Bot.** 84: 121-131.

- _____ and _____. 1974b. The acclimatization of plants to chilling temperatures in relation to the fatty acid composition of leaf polar lipids. **New Phytol.** 73: 805-820.
- Wismer W.V., W.M. Worthing, R.Y. Yada and A.G. Marangoni. 1998. Membrane lipid dynamics and lipid peroxidation in the early stages of low-temperature sweetening in tubers of *Solanum tuberosum*. **Physiol. Plant.** 102: 396-410.
- Wong, D.W.S. 1995. **Food Enzymes : Structure and Mechanism.** Chapman and Hall, New York.
- Wong-Aree, A. and C. Jirapong. 2007. Active modified atmosphere affecting quality of holy basil. **Acta Hortic.** 746: 461-466.
- Wong-ekkabut, J., Z. Xu, W. Triampo, I-Ming Tang, D. P. Tieliman and L. Monticelli. 2007. Effect of lipid peroxidation on the properties of lipid bilayers: A molecular dynamics study. **Biophys. J.** 93: 4225-4236.
- Wright, M. and E.W. Simon. 1973. Chilling injury in cucumber leaves. **J. Exp. Bot.** 79: 400-411.
- Wu J. and J. Browse. 1995. Elevated levels of high-melting-point phosphatidyl glycerols do not induce chilling sensitivity in a mutant of *Arabidopsis*. **Plant Cell** 7:17-27.
- Yang, S.J., M. Hosokawa, Y. Mizuta, J.G. Yan, J. Mano and S. Yazawa. 2001. Antioxidant capacity is correlated with susceptibility to leaf spot caused by rapid temperature drop in *Saintpaulia* (African violet). **Scientia Hortic.** 88: 59-69.
- Zgorka, G. and K. Glowinski. 2001. Variation of free phenolic acids in medicinal plants belonging to *Lamiaceae* family. **J. Pharm. Biomed. Anal.** 26: 79-87.

- Zhang, J., W. Huang, Q. Pan and Y. Lui. 2005. Improvement of chilling tolerance and accumulation of heat shock proteins in grape berries (*Vitis vinifera* cv. Jimgxiu) by heat pretreatment. **Postharvest Biol. Technol.** 38: 80-90.
- Zhigang, H.D., D.J. Charles, L. Yu and J.E. Simon. 1996. Purification and characterization phenylalanine ammonia lyase from *Ocimum basilicum*. **Phytochem.** 43: 735-739.
- Zhong, G.Y., M. Humberman, X.Q. Feng, E.C. Sisler, D. Holland and R. Goren. 2001. Effect of 1-methylcyclopropane on ethylene-induced abscission in citrus. **Physiol. Plant.** 113: 134-141.
- Zhou, Y., J.M. Dahler, S.J.R. Underhill and R.B.H. Wills. 2003. Enzymes associated with blackheart development in pine apple. **Food Chem.** 80: 565-572.
- Zhuang, H., D.F. Hildenbrand and M.M. Barth. 1997. Temperature influenced lipid peroxidation and deterioration in broccoli buds during postharvest storage. **Postharvest Biol. Technol.** 10: 49-58.

ภาคผนวก

ตารางผนวกที่ 1 การวิเคราะห์ความแปรปรวนดัชนีสะท้อนนาฬิกายางของใบกะเพรา โหระพาและใบแมงลักใบอ่อนและใบแก่ระหว่างการเก็บรักษาที่ 4 และ 12 °ซ

พันธุ์	ระยะเวลาเก็บรักษา (ชั่วโมง)		
	24	48	72
กะเพรา	2.00b*	3.60a	3.58a
โหระพา	1.80b	2.87b	4.27a
แมงลัก	3.24a	4.00a	4.75a
ความแก่ของใบ	ระยะเวลาเก็บรักษา (ชั่วโมง)		
	24	48	72
ใบอ่อน	1.98b	2.73b	3.80a
ใบแก่	2.80a	3.84a	4.48a
อุณหภูมิ (°ซ)	ระยะเวลาเก็บรักษา (ชั่วโมง)		
	24	48	72
4	2.35a	3.29a	4.14a
12	1.00b	1.040b	1.10b
<i>P</i> _Value			
ปัจจัย	ระยะเวลาเก็บรักษา (ชั่วโมง)		
	24	48	72
พันธุ์	0.0475**	0.0254	0.0009
ความแก่ของใบ	0.0001	0.0001	0.8300
อุณหภูมิ	0.0001	0.0001	0.0001
พันธุ์ x ความแก่ของใบ	0.0018	0.0001	0.0007
ความแก่ของใบ x อุณหภูมิ	0.0001	0.0001	0.0025
พันธุ์ x อุณหภูมิ	0.0001	0.0001	0.1819
พันธุ์ x ความแก่ของใบ x อุณหภูมิ	0.0018	0.0001	0.0016
C.V.	11.96	7.77	9.48

หมายเหตุ * ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรต่างกันในแนวคอลัมน์มีความแตกต่างกันที่ระดับความเชื่อมั่นเท่ากับ 95% โดยใช้วิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

** $P > 0.05$ ไม่แตกต่างทางสถิติ

$0.01 < P \leq 0.05$ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

$P \leq 0.01$ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 99%

ตารางผนวกที่ 2 การวิเคราะห์ความแปรปรวนอัตราส่วนของกรดไขมันไม่อิ่มตัวต่อกรดไขมันอิ่มตัวของแมงลักใบอ่อนและใบแก่เก็บรักษาที่ 4°ซ

source	df	ss	ms	F	Prob
Model	9	152.86	16.98	13.18 **	0.0001
Error	20	25.77	1.28		
total	29	178.63			

หมายเหตุ ** = แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 99% C.V. = 8.52%

ตารางผนวกที่ 3 ค่าเฉลี่ยของอัตราส่วนของกรดไขมันไม่อิ่มตัวต่อกรดไขมันอิ่มตัวของแมงลักใบแก่เก็บรักษาที่ 4 และ 12°ซ

Source	df	Ss	ms	F	Prob
Model	5	27.56	5.51	4.89 *	0.0114
Error	12	13.54	1.13		
Total	17	41.10			

หมายเหตุ * = แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% C.V. = 8.09%

ตารางผนวกที่ 4 การวิเคราะห์ความแปรปรวนปริมาณรวมกรดไขมันไม่อิ่มตัวของแมงลักใบอ่อนและใบแก่เก็บรักษาที่ 4°ซ

Source	df	ss	ms	F	Prob
Model	9	38.16	4.24	13.96 **	0.0001
Error	20	6.07	.30		
Total	29	44.23			

หมายเหตุ ** = แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 99% C.V. = 0.59%

ตารางผนวกที่ 5 การวิเคราะห์ความแปรปรวนปริมาณรวมกรดไขมันอิ่มตัวของแมงลักใบอ่อนและใบแก่เก็บรักษาที่ 4°ซ

source	df	ss	ms	F	Prob
Model	9	39.22	4.36	13.21**	0.0001
Error	20	6.59	.33		
total	29	45.81			

หมายเหตุ ** = แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 99% C.V. = 7.99%

ตารางผนวกที่ 6 การวิเคราะห์ความแปรปรวนปริมาณรวมกรดไขมันไม่อิ่มตัวของแมงลักใบแก่เก็บรักษาที่ 4 และ 12°ซ

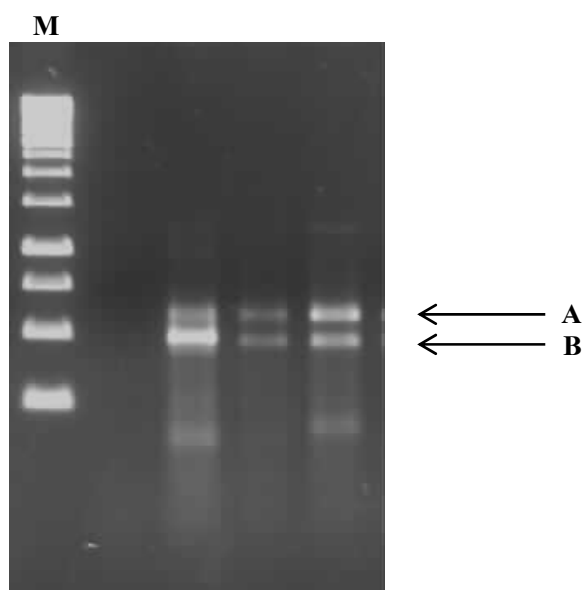
source	df	ss	ms	F	Prob
Model	5	9.18	1.83	6.38**	0.0031
Error	12	3.22	.27		
total	17	12.40			

หมายเหตุ ** = แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 99% C.V. = 0.56%

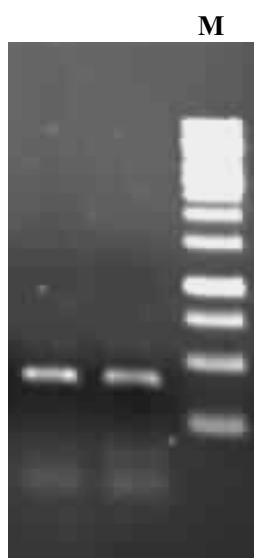
ตารางผนวกที่ 7 การวิเคราะห์ความแปรปรวนปริมาณรวมกรดไขมันอิ่มตัวของแมงลักใบแก่เก็บรักษาที่ 4 และ 12°ซ

source	df	ss	ms	F	Prob
Model	5	9.20	1.84	6.81**	0.0032
Error	12	3.24	.27		
total	17	12.44			

หมายเหตุ ** = แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 99% C.V. = 7.25%

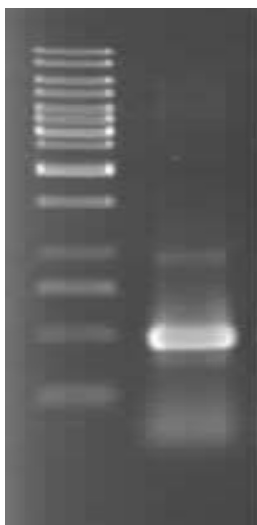


ภาพผนวกที่ 1 ผลผลิตจากปฏิกิริยา PCR ของยีน *LOX* ขึ้นบน (A) มีขนาดประมาณ 520 bp ขึ้นล่าง (B) มีขนาดประมาณ 360 bp โดยใช้ degenerate primer: FNui และ PrepR1 เปรียบเทียบกับ M: 1kb marker (Fermantas, USA) ตัวอย่าง RNA จากแมงลักใบแก่ ที่เก็บรักษาที่ 4 °ซ นาน 36 ชั่วโมง

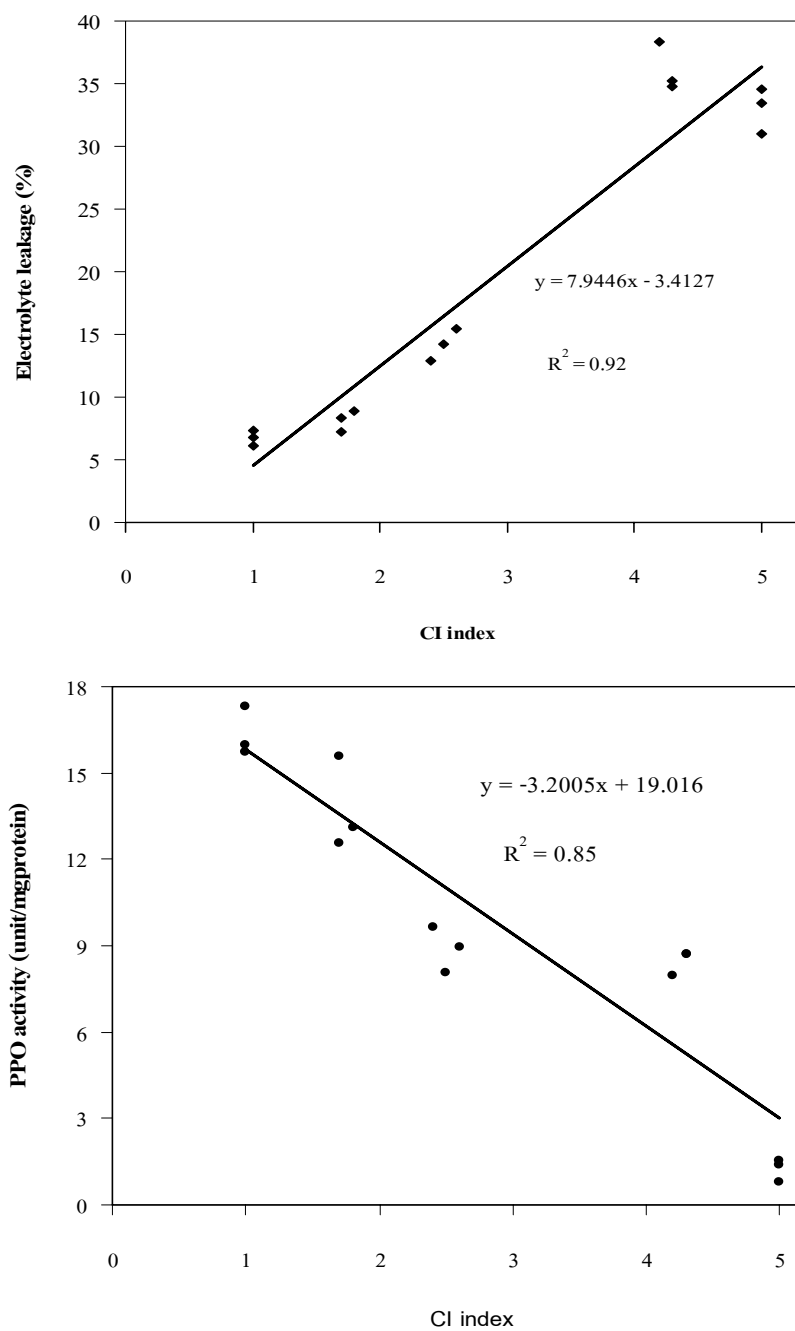


ภาพผนวกที่ 2 ผลผลิตจากปฏิกิริยา PCR ของยีน *LOX* มีขนาดประมาณ 468 bp โดยใช้ specific primer: FLOX4B และ RLOX4B เปรียบเทียบกับ M: 1kb marker (Fermantas, USA) ตัวอย่าง RNA จากแมงลักใบแก่ที่เก็บรักษาที่ 4 °ซ นาน 36 ชั่วโมง

M



ภาพผนวกที่ 3 ผลผลิตจากปฏิกิริยา PCR ของยีน *PPO* มีขนาดประมาณ 500 bp โดยใช้ degenerate primer: PPO_LEFT และ PPO_RIGHT เปรียบเทียบกับ M:1 kb marker (Fermantas, USA) ตัวอย่าง RNA จากแมงลักใบแก่ที่เก็บรักษาที่ 4^oซ นาน 36 ชั่วโมง



ภาพผนวกที่ 4 สัมประสิทธิ์สหຄถยระหว่างค่ารั้วไหลของประจุและดัชนีสะท้อนหว (A)
กิจกรรมของเอนไซม์ PPO และดัชนีสะท้อนหว (B)

ประวัติการศึกษา และการทำงาน

ชื่อ –นามสกุล	นางธิติมา วงษ์ชีรี
วัน เดือน ปี ที่เกิด	31 ตุลาคม 2510
สถานที่เกิด	จังหวัดระยอง
ประวัติการศึกษา	ปริญญาตรี วทบ. (พืชสวน) สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้า เจ้าคุณทหารลาดกระบัง ปริญญาโท วทม. (วิทยาการหลังการเก็บเกี่ยว) มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
ตำแหน่งหน้าที่การงานปัจจุบัน	นักวิจัย ระดับ 6
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	สำนักวิจัยและบริการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (สวท.) มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี (มจธ.)
ผลงานดีเด่นและรางวัลทางวิชาการ	รางวัลคุณภาพวิจัยระดับดี สาขาพืช ใน การประชุมวิชาการ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์วิทยาเขตกำแพงแสน ครั้งที่ 2 วันที่ 7-8 ธันวาคม 2548
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	ทุน มจธ. วิทยาเขตราชบุรี ทุนโครงการพัฒนาระดับบัณฑิตศึกษาและวิจัยเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว ทุนสนับสนุนคุณภาพงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษา บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์