วิจารณ์

1. การสะท้านหนาวในพริก 3 ชนิด

ผลพริกเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิต่ำกว่าอุณหภูมิวิกฤตจะแสดงความผิดปกติที่เรียกว่าอาการสะท้านหนาว พริก 3 ชนิดแสดงอาการสะท้านหนาวเมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส แต่ไม่พบอาการสะท้านหนาวในผลพริกเก็บรักษาที่ 10 องศาเซลเซียส อาการสะท้านหนาวเห็นได้ชัดเจนและรุนแรงหลังจากนำมาไว้ที่อุณหภูมิห้องแล้ว 2 วัน อาการสะท้านหนาวที่เด่นชัดในพริก 3 ชนิดแตกต่างกันโดยอาการสะท้านหนาวในพริกชี้ฟ้ามีอาการบุ๋มที่ผิวผล พริกหยวกพบอาการเมล็ดสีน้ำตาลและอาการฉ่ำน้ำที่ผิวผล ส่วนพริกขี้หนูแสดงอาการเมล็ดสีน้ำตาล ทั้งนี้อาจเนื่องจากชนิดที่แตกต่างกันทำให้ความรุนแรงของอาการสะท้านหนาวแตกต่างกัน Smith *et al*.(2006) ทดลองเก็บรักษาพริก 6 พันธุ์ พบว่าแต่ละพันธุ์มีค่าดัชนีอาการสะท้านหนาวที่แตกต่างกัน นอกจากนั้นภายในผลเดียวกันเนื้อเยื่อแต่ละชนิดมีความอ่อนแอต่ออาการสะท้านหนาวที่แตกต่างกัน ในการศึกษานี้พบว่าอาการสะท้านหนาวแสดงออกและมีอาการรุนแรงที่เมล็ด ขณะที่เนื้อเยื่อผลและไส้เกิดความผิดปกติน้อยกว่า อาจเนื่องจากโครงสร้างของเนื้อเยื่อที่แตกต่างกัน ความแข็งแรงของเนื้อเยื่อแตกต่างกัน ตลอดจนองค์ประกอบของสารภายในเนื้อเยื่อที่แตกต่างกัน ทำให้อาการสะท้านหนาวที่แสดงออกแตกต่างกัน พริกหยวกมีปริมาณความชื้นหรือมีปริมาณน้ำในผลสูงมากกว่าพริกชี้ฟ้าและพริกขี้หนู (ภัทรา, 2545) ดังนั้นเมื่อมีความเสียหายกับเนื้อเยื่อจึงทำให้อาการฉ่ำน้ำที่ผิวผลปรากฏออกมา ขณะที่ไม่พบอาการฉ่ำน้ำในพริกขี้หนูและพริกชี้ฟ้า

2. ปัจจัยการเกิดอาการสะท้านหนาว

2.1 อายุของผลผลิต

อายุของผลผลิตขณะเก็บเกี่ยวเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่ออาการสะท้านหนาว ในพืชหลายชนิดผลอ่อนมีความอ่อนแอต่ออาการสะท้านหนาวมากกว่ามากกว่าผลแก่ เช่น ท้อ (Fernandez-Trujillo *et al*., 1998) พลับ (Salvador *et al*., 2005) และมะเขือเทศ (Autio and Bramlage, 1986) สำหรับพริกหวานพบว่าผลพริกในระยะเขียวแสดงอาการสะท้านหนาว ขณะที่พริกในระยะสีแดงไม่แสดงอาการสะท้านหนาว (Lin *et al*., 1993, Lurie *et al*., 1995, Mercado *et al*., 1995; Serrano *et al.,* 1995) ซึ่งสอดคล้องกับงานทดลองนี้ที่พบว่า ผลพริกในระยะเขียวเท่านั้นที่แสดงอาการสะท้านหนาว ขณะที่ผลในระยะเริ่มเปลี่ยนสี (breaker) และระยะผลสีแดงไม่แสดง

อาการสะท้านหนาว การที่ผลในระยะที่แก่ไม่แสดงอาการสะท้านหนาว อาจเนื่องมาจากผลในระยะแก่มี antioxidant ในปริมาณสูงกว่าในผลอ่อน (Howard *et al*., 2000) โดยผลในระยะสีแดงมีค่าวิตามินซี สูงกว่าผลเขียว (Marin *et al*., 2004 ; Guil-Guerrero and Martinez-Guirado, 2006) มีค่าวิตามินอีสูง (Conforti *et al*., 2007) และมีกิจกรรมของ ascorbate peroxidase และ SOD สูง (Jiménez *et al*., 2002)

นอกจากนั้นผลในระยะแก่ยังมีปริมาณน้ำตาลมากกว่าในระยะอ่อน (Murugan and Sumitha, 2006) ในข้าวพันธุ์ที่ต้านทานต่ออุณหภูมิต่ำจะมีปริมาณน้ำตาล galactose และ raffinose สูง และมีความสัมพันธ์กับการควบคุมความเต่งและรักษาสภาพของเยื่อหุ้ม (Morsy *et al*., 2007) ปริมาณน้ำตาลช่วยส่งเสริมการสร้าง antioxidant ในพืช (Couée *et al*., 2006)

ดังนั้นจึงเป็นไปได้ว่าเมื่อผลเขียวอายุน้อย เมล็ดจะอ่อนแอ แต่เมื่อผลเขียวเริ่มอายุมากขึ้น เมล็ดจะแข็งแรง ในการเจริญเติบโตและพัฒนาของเมล็ด ระยะแรกเป็นระยะแบ่งเซลล์ เอมบริโอและเอนโดสเปิร์มแบ่งเซลล์อย่างรวดเร็ว ระยะต่อมาเป็นระยะสะสมอาหาร ซึ่งมีการสะสมอาหารในส่วนเก็บสะสม ระยะนี้น้ำหนักแห้งของเมล็ดจะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว จนกระทั่งถึงจุดสูงสุด (maximum dry weight) จุดน้ำหนักแห้งสูงสุดนี้เป็นจุดแก่ทางสรีรวิทยาหรือระยะแก่ทางสรีรวิทยา (physiological maturity) (วันชัย, 2542) เมล็ดในระยะแก่ทางสรีรวิทยาเป็นระยะที่เม็ดมีความแข็งแรงสูงสุด (จวงจันทร์, 2529) ผลพริกในระยะเขียวที่เก็บเกี่ยวมาเมล็ดน่าจะอยู่ในระยะสะสมอาหารก่อนถึงระยะแก่ทางสรีรวิทยา จึงทำให้เมล็ดไม่แข็งแรง และแสดงความผิดปกติเมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำ เนื่องจากเมล็ดพริกขี้หนูพันธุ์ห้วยสีทนมีความสุกแก่ทางสรีรวิทยาของผลที่ 52 วันหลังดอกบาน (สมควร , 2530) สำหรับพริกชี้ฟ้าพันธุ์บางช้าง เมล็ดแก่ทางสรีรวิทยา เมื่ออายุ 48 วัน หลังดอกบาน (รุ่งทิพย์, 2531) ส่วนผลพริกหวานพันธุ์ California Wonder ในระยะผลเขียวสามารถเก็บเกี่ยวได้เมื่ออายุ 40-44 วันหลังดอกบาน (ปริยานุช, 2539) และเมล็ดพริกพันธุ์ California Wonder มีพัฒนาการที่สมบูรณ์ในผลที่อายุ 53 – 58 วันหลังดอกบาน (Demir and Ellis, 1992; ปริยานุช, 2539) ดังนั้นผลพริกหวานที่เก็บเกี่ยวมีพัฒนาการของเมล็ดใกล้ระยะแก่ทางสรีรวิทยามากกว่า จึงทำให้ไม่ค่อยพบอาการเมล็ดสีน้ำตาลเมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำ

ในการศึกษาครั้งนี้พบว่าการแสดงออกของอาการสะท้านหนาวในพริกแต่ละชนิดแตกต่างกันอาจเนื่องจากอายุของผลขณะเก็บเกี่ยวของพริก 3 ชนิดแตกต่างกัน โดยอายุของผลพริกชี้ฟ้าขณะเก็บเกี่ยวมีอายุมากกว่าพริกชนิดอื่นๆ เนื่องจากพบว่าสามารถเปลี่ยนสีผลจากเขียวเป็นสีแดงได้ เมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง และการทดลองทำเครื่องหมายที่ดอก เมื่อวันดอกบานพบว่า

ผลพริกชี้ฟ้ามีอายุเก็บเกี่ยวมากกว่า 20 วัน (ไม่ได้แสดงผลการทดลอง) และพริกหยวกมีอายุประมาณ 15-20 วันหลังจากดอกบาน (ติดต่อส่วนตัว) ผลจากภาพถ่าย SEM ในเมล็ดพริกหยวกและพริกขี้หนู พบว่าเมล็ดที่เกิดสีน้ำตาลเป็นเมล็ดที่อายุน้อยไม่มีเอมบริโอ ส่วนเมล็ดที่ไม่เกิดสีน้ำตาลเป็นเมล็ดที่อายุมากกว่าเนื่องจากพบเอมบริโอเจริญมีขนาดใหญ่ (ไม่แสดงผลการทดลอง) สำหรับพริกขี้หนูมีอายุเก็บเกี่ยวประมาณ 15-25 วันหลังจากดอกบาน (การทดลองที่ 2)

2.2 การเปลี่ยนแปลงของเยื่อหุ้มเซลล์

การศึกษาเพื่อทราบสาเหตุของการเกิดเมล็ดสีน้ำตาลในอาการสะท้านหนาวของพริก การศึกษาทางชีวเคมีได้แสดงให้เห็นอย่างชัดเจนถึงการเปลี่ยนแปลงของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการเสื่อมสภาพของเนื้อเยื่อ ซึ่งเป็นจุดเริ่มต้นทำให้อาการสะท้านหนาวแสดงออกมา และบทบาทของเอนไซม์ที่ทำหน้าที่กำจัดอนุมูลอิสระ นอกจากนั้นความรุนแรงของการเกิดอาการสะท้านหนาวยังสัมพันธ์กับปริมาณของกรดไขมันอิ่มตัวที่มีมาก และกรดไขมันไม่อิ่มตัวที่มีอยู่น้อยในเมล็ดของผลอายุ 15 วันหลังดอกบาน ซึ่งยังไปสัมพันธ์กับปริมาณ TBARS และกิจกรรมของเอนไซม์ LOX ที่มีอยู่สูง เมล็ดที่เกิดสีน้ำตาลมีกิจกรรมของเอนไซม์ CAT และ POD ต่ำ แต่มีกิจกรรมของ SOD สูง นอกจากนั้นยังพบว่ามีปริมาณฟีนอลิคสูง และกิจกรรมของ PPO ในช่วงต้นสูง รวมทั้งกิจกรรมของเอนไซม์ PAL ในระดับสูงด้วย

ความสัมพันธ์นี้สนับสนุนแนวคิดที่ว่า เยื่อหุ้มเซลล์เป็นบริเวณที่เกิดความเสียหายเนื่องจากอุณหภูมิต่ำ ปริมาณของกรดไขมันอิ่มตัวและไม่อิ่มตัวในเยื่อหุ้มเป็นตัวบ่งชี้ถึงสภาพไขมันยังคงสภาพเป็นของเหลวหรือของแข็ง เมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำ พืชที่มีปริมาณของกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงในเยื่อหุ้มเซลล์ สามารถที่เจริญเติบโตได้ดีกว่าที่อุณหภูมิต่ำ (Dalmannsdottir *et al*., 2001) Palta and Weiss (1993) พบว่าการเพิ่มของกรดไขมัน 18:2 (linoleic) และการลดลงของกรดไขมัน 16:0 (palmitic) ในเนื้อเยื่อของพืชตระกูลมะเขือ มีความสัมพันธ์กับการทนต่ออากาศหนาว ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองนี้ที่พบว่าเมล็ดของผลอายุ 15 วัน ซึ่งเกิดอาการสะท้านหนาวมีปริมาณกรดไขมัน 18:2 ที่ต่ำ และมีกรดไขมัน 16:0 ที่สูง ขณะที่เมล็ดของผลอายุ 25 วัน ซึ่งไม่พบอาการสะท้านหนาวมีปริมาณกรดไขมัน 18:2 สูง และมีกรดไขมัน 16:0 ต่ำ

การรั่วไหลของประจุเป็นวิธีการหนึ่งที่ใช้บ่งบอกการเสื่อมสภาพของเยื่อหุ้มเซลล์ ดังนั้นจึงมักใช้วิธีนี้เป็นตัววัดการเกิดอาการสะท้านหนาวในพืช (Woolf, 1997; Tai *et al*., 2004; Concellón *et al*., 2005; Ratule *et al*., 2006) ผลจากการศึกษาครั้งนี้แสดงว่าสามารถใช้การรั่วไหล

ของประจุเป็นดัชนีบ่งชี้การเกิดอาการสะท้านหนาวในเมล็ดพริก ภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแสดงว่าเมล็ดที่แสดงอาการสะท้านหนาว โดยเมล็ดมีสีน้ำตาลเกิดพร้อมกับการยุบตัวของเซลล์ที่เปลือกหุ้มเมล็ดและเอนโดสเปิร์ม Niki *et al*., (1978) รายงานว่า เซลล์ของ *Cornus stolonifera* ที่ได้รับอุณหภูมิต่ำนาน 48 ชั่วโมง มีการฉีกขาดของ โปรพลาสติด (proplastids) ร่างแหเอนโดพลาซึม (rough endoplasmic reticurum) และเยื่อหุ้มแวคิวโอล ผลมะเขือยาวที่เริ่มเกิดอาการสะท้านหนาว พบว่าเซลล์เริ่มแยกตัวออกจากกัน เกิดช่องว่างระหว่างเซลล์ ไซโตพลาซึมและเยื่อหุ้มเซลล์แยกจากผนังเซลล์ ต่อมาเมื่อมีอาการสะท้านหนาวรุนแรงขึ้น พบการฉีกขาดของเซลล์ การหดตัวของไซโตพลาสซึมและเยื่อหุ้มเซลล์ (Concellón *et al*., 2007) การยุบตัวของเซลล์ช่วยอธิบายกลไกการเกิดสีน้ำตาล โดยการเสื่อมสภาพของเยื่อหุ้มเซลล์ทำให้เอนไซม์และสารตั้งต้นมารวมกันทำให้เกิดสารสีน้ำตาล (Veltman and Peppelenbos, 2003)

โดยปกติแล้วการเกิดสีน้ำตาลที่เนื้อเยื่อพืชนั้นเกิดจากการออกซิเดชันของสารประกอบฟีนอลิคไปเป็น *o*-quinone โดยเอนไซม์ PPO (Mayer and Harel, 1979) ผลจากการทดลองแสดงว่าปริมาณฟีนอลิคและกิจกรรมของเอนไซม์ PPOในเมล็ดของผลอายุ 15 วันหลังดอกบานมีอยู่มากกว่าในเมล็ดของผลอายุ 25 วันหลังดอกบานเมื่อเริ่มต้นการทดลอง ซึ่งอาจเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดเมล็ดสีน้ำตาลในเมล็ดพริกอายุ 15 วันหลังดอกบาน การสังเคราะห์สารฟีนอลิคขึ้นอยู่กับกิจกรรมของเอนไซม์ PAL ซึ่งในเมล็ดของผลที่อายุ 15 วันหลังดอกบานมีกิจกรรมของเอนไซม์ PAL ที่สูงกว่าเมล็ดพริกอายุ 25 วันดอกบานเมื่อเริ่มต้นการทดลองแล้วลดลงตลอดระยะเวลาการเก็บรักษา แต่ยังคงสูงกว่ากิจกรรมของ PAL ในเมล็ดอายุ 25 วันหลังดอกบานซึ่งไม่เกิดอาการสะท้านหนาว การที่เมล็ดพริกอายุ 15 วันหลังดอกบานมีค่า total phenolics กิจกรรมของเอนไซม์ PPO และ PAL มากกว่าเมล็ดพริกอายุ 25 วันหลังดอกบาน อาจเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้เมล็ดพริกอายุ 15 วันหลังดอกบานเกิดสีน้ำตาลมาก

กระบวนการ lipid peroxidation โดยเอนไซม์ LOX ทำให้เกิดการสูญเสียสภาพของเยื่อหุ้ม (Elkahoni *et al.,* 2005) MDA ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ของ lipid peroxidation ใช้เป็นตัวบ่งบอกถึงการเกิด lipid peroxidation และมีความสัมพันธ์กับการรั่วไหลของประจุ (Ali *et al*., 2005) ปริมาณของสาร TBARS ที่บอกถึงปริมาณ MDA และกิจกรรมของเอนไซม์ LOX ในเมล็ดอายุ 15 วันหลังดอกบาน มีมากตั้งแต่เริ่มต้นการทดลอง และกิจกรรมของ LOX ไม่เปลี่ยนแปลงตลอดระยะเวลาการเก็บรักษาที่ 5 องศาเซลเซียส ซึ่งอาจชี้ได้ว่าอุณหภูมิต่ำไม่ได้กระตุ้นหรือมีผลให้กิจกรรมของเอนไซม์ LOX เพิ่มขึ้น แต่กิจกรรมของ LOX ที่สูงมีผลให้เกิด lipid peroxidation

ขณะที่ปริมาณ TBARS เพิ่มขึ้นในวันที่ 2 ของการเก็บรักษา ซึ่งแสดงว่าเกิดการเสื่อมสภาพของเยื่อหุ้มโดยกระบวนการอื่นที่มีอุณหภูมิต่ำเป็นตัวการสำคัญ

การเสื่อมสภาพของเยื่อหุ้มเป็นเหตุการณ์ที่คาดว่าเป็นสาเหตุของการเกิดอาการสะท้านหนาว และการเปลี่ยนแปลงของไขมันที่เยื่อหุ้มมีความเกี่ยวข้องกับการเสื่อมสภาพของเยื่อหุ้มเซลล์ เอนไซม์ LOX ทำหน้าที่ออกซิไดซ์ polyunsaturated fatty acid ได้ hydroperoxide ของกรดไขมันเป็นอนุมูลอิสระด้วย ซึ่งสามารถเกิดปฏิกริยาต่อเนื่องโดยเอนไซม์ LOX และได้ อนุมูลอิสระอื่นๆ (จริงแท้, 2549) ดังนั้นกิจกรรมของเอนไซม์ LOX จึงมีความสัมพันธ์กับการเสื่อมสภาพของเยื่อหุ้ม

ผลจากการทดลองพบว่าเมล็ดจากผลที่อายุ 15 วันหลังดอกบานมีกิจกรรมของเอนไซม์ LOX สูงกว่าเมล็ดจากผลที่อายุ 25 วันหลังดอกบาน แต่มีการแสดงออกของยีน LOX ต่ำกว่า ทั้งนี้เนื่องจากการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ LOX นั้น เป็นการวิเคราะห์กิจกรรมรวมของทุกไอโซไซม์ แต่ในการศึกษาการแสดงออกของยีน ยีน LOX ที่โคลนได้มีความเหมือนกับ ยีน LOX ของ hazelnut อยู่ 87% ซึ่งกิจกรรม LOX ของ hazelnut ได้ 9- HPOD เป็นผลิตภัณฑ์ (Santino *et al*., 2003) ดังนั้นจากเหตุผลดังกล่าว ทำให้ยีน LOX ที่ศึกษาเป็น LOX1 ซึ่ง LOX1 มีการแสดงออกมากในเมล็ดจากผลที่อายุ 25 วันหลังดอกบาน และมีการแสดงออกน้อยในเมล็ดจากผลที่อายุ 15 วันหลังดอกบาน และคาดว่าเอนไซม์ LOX มีการแสดงออกมากในต้นอ่อน จึงทำให้พบการแสดงออกของยีน LOX มากในเมล็ดจากผลที่อายุ 25 วันหลังดอกบาน และทำหน้าที่เป็น seed storage protein เหมือนในถั่วเหลือง (Hildebrand *et al*., 1991)

ในการศึกษาการแสดงออกของยีน *Lox1* พบการแสดงออกของยีนในเมล็ดอายุ 15 วันหลังดอกบาน ในวันที่ 4 ของการเก็บรักษาเท่านั้น อาจเนื่องจากการสะสมของ LOX mRNA ในเมล็ดมีน้อยมากทำให้ไม่สามารถตรวจพบได้ด้วยวิธี semiquantitative RT-PCR และอุณหภูมิต่ำกระตุ้นให้มีการแสดงออกของ *CaLox1* มากขึ้นในวันที่ 4 ของการเก็บรักษา และทำให้ *CaLox1* เปลี่ยนหน้าที่ทำให้เกิด lipid peroxidation ส่วนเมล็ดอายุ 25 วันมีการแสดงออกของ *CaLox1* ในวันแรกของการเก็บรักษาจนถึงวันที่ 4 ของการเก็บรักษาและไม่พบการแสดงออกในวันที่ 6 และ 8 ของการเก็บรักษา คาดว่าอุณหภูมิต่ำทำให้ *CaLox1* เปลี่ยนหน้าที่เกิด lipid peroxidation แต่เพื่อป้องกันอันตรายจากเซลล์จึงลดการแสดงออกของ *CaLox1* ทำให้เกิดการสะสมโปรตีนจาก LOX ใน isoform อื่น Nemchenko *et al*. (2006) ศึกษายีน *ZmLOX10* และ *ZmLOX 11* ในต้นกล้าข้าวโพดซึ่ง

มีลำดับกรดอะมิโนเหมือนกันมากกว่า 90% พบว่ายีนทั้งสองมีการตอบสนองต่อการเกิดบาดแผล methyl jasmonate และอุณหภูมิต่ำแตกต่างกัน

เอนไซม์ LOX มีบทบาทหลายประการในพืช เกี่ยวข้องทั้งการเจริญเติบโต การตอบสนองต่อสภาวะเครียด (Porta *et al*., 1999) นอกจากนั้นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำงานของเอนไซม์ LOX ยังสามารถเปลี่ยนไปเป็นสารประกอบหลายชนิด เช่น อนุมูลอิสระ hydroxides cetones และ aldehydes (Feussner and Wasternack, 2002) ประกอบกับเอนไซม์ LOX เป็นเอนไซม์กลุ่มใหญ่มีหลาย isoform ในการศึกษาความสัมพันธ์ของการแสดงออกของยีน *Lox* กับอาการสะท้านหนาวอาจต้องมีการศึกษายีน *Lox*ในหลาย isoform เพื่อที่จะสามารถอธิบายได้ชัดเจนขึ้น Zhang *et al*.(2006) พบว่าในการสุกของกีวีฟรุตมีการแสดงออกของยีน *AdLox* ถึง 5 isoform และเมื่อให้เอทิลีนกับผลกีวีฟรุต ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ LOX ที่วัดได้เพิ่มขึ้นเมื่อผลสุก แต่การแสดงออกของยีน *AdLox* ในแต่ละ isoform แตกต่างกัน

2.3 การเกิดอนุมูลอิสระ

เมล็ดอายุ 15 วันหลังดอกบาน อาจจะผลิตอนุมูลอิสระมากกว่าเมล็ดอายุ 25 วันหลังดอกบาน จากการศึกษาความมีชีวิตของเซลล์ที่เปลือกหุ้มเมล็ด โดยแช่เมล็ดในสาร 2,3,5 triphenyl tetrazolium chloride ซึ่งสารนี้ทำปฏิกริยากับเนื้อเยื่อที่มีการหายใจอยู่พบว่า เปลือกหุ้มเมล็ดอายุ 15 วันหลังดอกบาน ติดสีแดงเข้มกว่าเมล็ดอายุ 25 วันหลังดอกบาน (ภาพผนวกที่ 2) ซึ่งแสดงว่าเมล็ดอายุ 15 วันมีการหายใจที่สูงกว่าเมล็ดอายุ 25 วัน และไมโตคอนเดรียเป็นออร์แกเนลล์หนึ่งที่ผลิตอนุมูลอิสระมากในเนื้อเยื่อที่ไม่มีสีเขียว (Navot *et al*., 2007) ดังนั้นเมล็ดอายุ 15 วันหลังดอกบานจึงมีโอกาสที่จะผลิตอนุมูลอิสระได้มากกว่าเมล็ดอายุ 25 วัน

2.4 การทำงานของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ

antioxidant enzymes มีความสำคัญในการป้องกันเซลล์จาก oxidative stress (Mach and Greenberg, 2004) อุณหภูมิต่ำชักนำให้เกิดอนุมูลอิสระเพิ่มมากขึ้นผ่านกระบวนการ lipid peroxidation ทำให้เกิดการเสื่อมสภาพของเยื่อหุ้ม (Wismer, 2003) สารและเอนไซม์ antioxidant เป็นระบบป้องกันพืชจากอันตรายของอนุมูลอิสระ เอนไซม์ SOD ทำหน้าที่เปลี่ยน superoxide anions ให้เป็นไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ซึ่งเป็นสารที่ทำอันตรายเซลล์ได้น้อย ในการศึกษานี้พบว่าเมล็ดของผลอายุ 15 วันหลังดอกบานและเกิดอาการสะท้านหนาวนั้นมีกิจกรรมของเอนไซม์ SOD

ในระดับที่สูง ทั้งนี้กิจกรรมของเอนไซม์ SOD สูง อาจเนื่องจากเมล็ดที่อายุน้อยมีการแบ่งเซลล์ ทำให้มีอัตราการหายใจสูงกว่าเมล็ดแก่ (Bailly, 2004) เกิด superoxide anions มาก และเซลล์พยายามกำจัด superoxide anions จึงมีกิจกรรมของเอนไซม์ SOD สูงซึ่ง SOD ผลิตมาจากไมโตคอนเดรีย (Purvis *et al*., 1995) ดังนั้นข้อมูลนี้แสดงว่ากิจกรรมของเอนไซม์ SOD ไม่ได้สัมพันธ์กับอาการสะท้านหนาว ส่วนกิจกรรมของเอนไซม์ CAT เป็นส่วนหนึ่งของกลไกการป้องกันการเกิดอาการสะท้านหนาว (Kuk *et al*., 2003) เอนไซม์ CAT และ POD ทำงานเหมือนกันในการเปลี่ยนไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ให้เป็นน้ำและออกซิเจน การทดลองนี้พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ CAT และ POD มีอยู่สูงในเมล็ดของผลอายุ 25 วันหลังดอกบานซึ่งไม่เกิดอาการสะท้านหนาว ตั้งแต่เริ่มต้นการทดลอง ทั้ง CAT และ POD อาจมีส่วนทำให้เมล็ดไม่มีความอ่อนแอต่อการสะท้านหนาว แต่กิจกรรมของ CAT และ POD ในเมล็ดที่อายุ 15 วันหลังดอกบานมีน้อย แสดงถึงความสามารถในการกำจัดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ได้น้อย ทำให้มีการสะสมไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ภายในเซลล์ ซึ่งเป็นอันตรายต่อเซลล์ เอนไซม์ CAT มีความสัมพันธ์ในการลดอาการสะท้านหนาวในส้ม (Sala and Lafuente, 2000) และมีความสำคัญในการป้องกันต้นกล้าข้าวโพด (Prasad and Stewart, 1998) และข้าว (Kuk *et al*., 2003) จากอนุมูลอิสระที่เกิดจากอุณหภูมิต่ำ

ผลจากการศึกษาสาเหตุของการเกิดเมล็ดสีน้ำตาลพบว่าเมล็ดจากผลที่อายุน้อยมีความอ่อนแอต่ออุณหภูมิต่ำมากกว่าเมล็ดของผลที่อายุมากว่า การเกิดสีน้ำตาลที่เมล็ดมีความสัมพันธ์กับปริมาณกรดไขมันไม่อิ่มตัวที่น้อย และ กรดไขมันอิ่มตัวที่มาก การสูญเสียสภาพของเยื่อหุ้มเซลล์อาจเป็นสาเหตุแรกของการเกิดสีน้ำตาล นอกจากนั้นการที่กิจกรรมของเอนไซม์ที่ทำหน้าที่กำจัดอนุมูลอิสระ (CAT และ POD) มีความสัมพันธ์กับอาการสะท้านหนาว ทำให้แสดงถึงความสามารถในการป้องกันความเสียหายของเมล็ดพริกเนื่องจากอุณหภูมิต่ำโดยกิจกรรมของเอนไซม์ CAT และ POD

2.4.1 การแสดงออกของเอนไซม์ CAT

เอนไซม์ CAT ที่ตรวจพบเป็นไอโซไซม์ CAT-1 ซึ่งมีการแสดงออกในเนื้อเยื่อที่กำลังพัฒนาของเมล็ด (Feirabend, 2005) การตรวจสอบการแสดงออกของยีน catalase ด้วยวิธี semiquantitative RT-PCR พบว่า มีการสะสม mRNA ของยีน *CaCat1* ในเมล็ดพริกที่อายุ 15 และ 25 วันหลังดอกบาน โดยพบว่าเมล็ดที่อายุ 15 วันหลังดอกบานมีการสะสมของ mRNA น้อยกว่าเมล็ดที่อายุ 25 วันหลังดอกบาน ซึ่งสอดคล้องกับกิจกรรมของเอนไซม์ที่ตรวจพบ และรายงานของ Lee and An (2005) ที่พบว่ามีการแสดงออกของ mRNA *CaCat1* มากในเมล็ดพริกที่อายุมาก ใน

การพัฒนาของเมล็ดทานตะวัน พบว่ามีการสะสมของ mRNA *CATA1* เพิ่มขึ้นเมื่อเมล็ดอายุมากขึ้น (Bailly *et al*., 2004) และในเมล็ดอายุ 25 วันหลังดอกบาน เมื่อเก็บรักษาในอุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียสนาน 6 วันมีการสะสม mRNA *CATA1* ที่ลดลงและเพิ่มขึ้นในวันที่ 8 ของการเก็บรักษา ซึ่งสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์

2.5 การแสดงออกของ aquqporin

ในการศึกษาการแสดงออกของยีน aquaporin ในเมล็ดพริกอายุ 15 และ 25 วันหลังดอกบาน พบว่า ยีน aquaporin ในเมล็ดอายุ 25 วันหลังดอกบานมีการแสดงออกมากกว่าในเมล็ดอายุ 15 วันหลังดอกบาน ส่วนเมล็ดอายุ 15 วันหลังดอกบานมีการแสดงออกของยีน aquaporin ในระดับต่ำและลดลงเล็กน้อยเมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำ แสดงว่าเมื่อเก็บรักษาผลพริกอายุ 15 วันหลังดอกบานในอุณหภูมิต่ำ อุณหภูมิต่ำอาจกระตุ้นให้มีการสร้างหรือมีการสะสมไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ประกอบกับมีการแสดงออกของยีน *CaCat1* น้อย จึงทำให้มีการสะสมไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เพิ่มสูงขึ้น และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่สูงยับยั้งการแสดงออกของยีน aquaporin ปริมาณไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่สูงนี้ทำให้เกิดการเสื่อมสภาพของเยื่อหุ้ม (Aroca *et al.*, 2005)

3. การลดอาการสะท้านหนาวโดยใช้อุณหภูมิสูงและสารเคมี

การที่พืชได้รับอุณหภูมิสูง นอกจากมีผลในการสร้าง heat shock protein ซึ่ง heat shock protein ช่วยการคงสภาพของโปรตีนและเยื่อหุ้ม และมีบทบาทอย่างมากในการปกป้องพืชจากสภาวะเครียด (Feder and Hofmann, 1999) ดังนั้นจึงพบว่าการให้อุณหภูมิสูงสามารถช่วยลดอาการสะท้านหนาวได้ (Woolf, 1997; Hofman *et al*., 2003) นอกจากนี้ยังพบว่า heat shock protein มีการส่งสัญญาณไปยังกลไกในการตอบสนองต่อสภาวะเครียดอื่นๆ (Wang *et al*., 2004) เช่น มีผลต่อกิจกรรมของ antioxidant enzyme ต้นสตรอเบอรี่ที่ได้รับอุณหภูมิสูงเพิ่มขึ้นทีละน้อยจนถึง 45 องศาเซลเซียส พบว่ามีกิจกรรมของเอนไซม์ peroxidase เพิ่มขึ้น และการเสื่อมสภาพของเยื่อหุ้มลดลง (Gulen and Eric, 2004) ในผลมะเขือเทศที่ได้รับอากาศร้อน 34 องศาเซลเซียส พบว่าเมื่อเก็บที่อุณหภูมิต่ำเกิดอาการสะท้านหนาวและมีกิจกรรมของเอนไซม์ glutathione reductase ลดลง (Soto-Zamora *et al*., 2005) ผลสตรอเบอรีที่ได้รับอุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง สามารถเก็บรักษาได้นานที่อุณหภูมิต่ำ พบว่ามีกิจกรรมของ antioxidant enzyme เพิ่มขึ้น (Vicente *et al*., 2006) ต้นกล้า*Vigna mungo* ที่งอกมาจากเมล็ดที่ได้รับความร้อน 40 องศาเซลเซียส นาน 2

ชั่วโมง พบว่า มีกิจกรรมของเอนไซม์ POD เพิ่มมากขึ้น แต่มีแนวโน้มยังยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ SOD (Kochhar and Kochhar, 2005)

ในการทดลองใช้อุณหภูมิสูงกับผลพริก พบว่าการให้อุณหภูมิสูงไม่สามารถลดอาการสะท้านหนาวได้ อาจเนื่องจาก เนื้อผลของพริกขี้หนูมีลักษณะบาง ความร้อนที่ให้อาจมีอุณหภูมิสูงเกินไปและอาจทำลายเนื้อเยื่อของผลและเมล็ด จึงทำให้ค่าการรั่วไหลของประจุของผลที่ได้รับความร้อนสูงกว่าชุดควบคุม นอกจากนั้นอาจเป็นไปได้ว่าความร้อนที่ให้ไม่สามารถกระตุ้นให้เกิด heat shock protein หรือกิจกรรมของ antioxidant enzyme เพิ่มขึ้น หรือ กิจกรรมของ antioxidant enzyme อาจเพิ่มขึ้นแต่ไม่ได้เพิ่มมากในระดับที่สามารถควบคุมอนุมูลอิสระได้ Nair *et al*. (2001) พบว่ามะม่วงพันธุ์ Kensington Pride ที่ได้รับอุณหภูมิ 38-40 องศาเซลเซียส นาน 14 ชั่วโมง หรือ 46-48 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที ไม่สามารถลดอาการสะท้านหนาวได้

สาร 1-MCP นอกจากมีบทบาทที่เด่นชัดในการยับยั้งการตอบสนองของเนื้อเยื่อต่อเอทิลีนแล้ว ยังมีผลต่อการลดและเพิ่มอาการสะท้านหนาวด้วย (Watkins, 2006) 1-MCP สามารถลดอาการสะท้านหนาวในผลแอปเปิล โดยไปยับยั้งการผลิต α- farnesene ซึ่งเป็นสารที่เกิดขึ้นเมื่อมีอาการสะท้านหนาวและให้อนุมูลอิสระเมื่อถูก oxidized (Watkins *et al*., 2000) และ ลดอาการเนื้อสีน้ำตาลในผลอะโวกาโด (Woolf *et al*., 2005) โดยลดกิจกรรมของเอนไซม์ PPO และ POD (Hershkovitz *et al*., 2005) แต่มีรายงานว่าการให้ 1-MCP เพิ่มอาการสะท้านหนาว ในท้อและ nectarin (Dong *et al*., 2001: Fan *et al*., 2002) และผลกล้วยที่ได้รับ 1-MCP พบว่ามีอาการสะท้านหนาวเพิ่มขึ้นด้วย (Jiang *et al*., 2004) ซึ่งเกิดจากการลดลงของ ethylene binding ในการศึกษาที่ให้สาร 1-MCP กับผลพริก ไม่สามารถลดอาการสะท้านหนาวได้ อาจเป็นไปได้ว่าทั้งความเข้มข้นและระยะเวลาไม่เหมาะสมหรือผลพริกไม่ตอบสนองต่อ 1-MCP เช่นเดียวกับการทดลองของ Tian *et al*. (2004) ที่พบว่า 1-MCP ไม่สามารถลดอาการสะท้านหนาวในพริกหวานได้

กลไกการลดความเสียหายจากการสะท้านหนาวโดยสาร methyl jasmonate นั้น คาดว่าเกิดจากสาร methyl jasmonate กระตุ้นให้มีการส่งผ่านอิเล็คตรอนแบบ alternative oxidase pathway ทำให้เกิดอนุมูลอิสระน้อยลง (Fung *et al*., 2004) เพิ่มประสิทธิภาพของสาร antioxidant ในพืช (Ayala-Zavala *et al*., 2005) และทำให้มีการแสดงออกของยีน heat shock protein เพิ่มขึ้น (Diang *et al*., 2001) ในการทดลองใช้ methyl jasmonate กับผลพริก พบว่า methyl jasmonate กระตุ้นให้มีกิจกรรมของ antioxidant enzyme เพิ่มมากขึ้น โดยเพิ่มขึ้นในวันที่1 และ 2 ของการเก็บรักษาหลังจากนั้นลดลงเท่ากับชุดควบคุม (ไม่แสดงข้อมูล) แต่กิจกรรมของ antioxidant

enzyme ที่เพิ่มนี้เพิ่มขึ้นในปริมาณไม่มากพอจะควบคุมอนุมูลอิสระเกิดขึ้น จึงไม่สามารถลดการเกิดสีน้ำตาลของเมล็ดพริกได้

4. กลไกการเกิดอาการสะท้านหนาวในพริก

จากภาพรวมทั้งหมดของข้อมูลที่ได้จากการทดลองในครั้งนี้ ทำให้คาดว่ากลไกการเกิดอาการสะท้านหนาวในเมล็ดพริก น่าจะเกิดจากการเสื่อมสภาพของเยื่อหุ้มเซลล์ โดยอุณหภูมิต่ำชักนำให้สร้างอนุมูลอิสระในส่วนต่างๆ เช่น ไมโตคอนเดรีย เพอร์ออกซิโซม และบริเวณ apoplast (Mittler, 2004) ในผลพริกอายุ 15 วันหลังดอกบานเมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำ เมล็ดมีกิจกรรมของเอนไซม์ SOD สูง ซึ่ง SOD เปลี่ยนซูเปอร์ออกไซด์ให้เป็นไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ซึ่งเป็นอนุมูลอิสระที่ทำอันตรายกับเยื่อหุ้ม (Mach and Greenberg, 2004) ขณะเดียวกันกิจกรรมของเอนไซม์ CAT และ POD ในเมล็ดพริกอายุ 15 วันหลังดอกบานมีน้อย จึงมีการเปลี่ยนไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เป็นน้ำได้น้อย ประกอบกับช่องผ่านของน้ำ (aquaporin) ที่มีการแสดงออกน้อย ทำให้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ไม่สามารถแพร่กระจายออกนอกเซลล์โดยช่องผ่านของน้ำ ทำให้ปริมาณไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่สะสมภายในเซลล์ของเมล็ดพริกอายุ 15 วัน หลังดอกบานอยู่ในระดับสูง เมื่อเปรียบเทียบกับเมล็ดพริกอายุ 25 วันหลังดอกบาน ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในระดับสูงที่สะสมทำให้เกิดอันตรายกับเยื่อหุ้ม เมื่อเยื่อหุ้มของแวคิวโอลและพลาสติดเสื่อมสภาพทำให้สารฟีนอลิคเข้าทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ PPO ทำให้เกิดสีน้ำตาลขึ้นที่เมล็ด ภายใต้สภาวะเครียดของอุณหภูมิต่ำ เมล็ดของผลอายุ 15 วันหลังดอกบานจึงได้รับผลกระทบของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่สะสมอยู่มากภายในเซลล์มากกว่าเมล็ดพริกอายุ 25 วันหลังดอกบาน ดังนั้นอนุมูลอิสระที่เกิดจากการชักนำของอุณหภูมิต่ำหลังการเก็บรักษา และทำให้เกิดการเสื่อมสภาพของเยื่อหุ้มในกรณีของพริกน่าจะเป็นไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ดังแสดงให้เห็นในภาพผนวกที่ 3