# บทที่ 1 บทนำ

## 1.1 ปัญหาและที่มาของงานวิจัย

ในปัจจุบันการศึกษาเรื่องการตายแบบโปรแกรม หรือ Programmed cell death (PCD) ได้รับความสนใจเป็นอย่างมากในต่างประเทศ มีนักวิทยาศาสตร์หลายท่านได้พยายามพิสูจน์ว่า การตายของเซลล์พืช ที่เกิดจากสิ่งกระตุ้นทั้งหลายไม่ว่าจากสิ่งกระตุ้นจากภายนอกและภายใน และเชื้อจุลลินทรีย์ กระตุ้นให้เซลล์พืชเกิดกระบวนการทำลายตัวเอง หรือกระบวนการตายแบบโปรแกรม โดยปกติรูปแบบการตายของเซลล์พืชและสัตว์ โดยทั่วๆไปจะแบ่งเป็น 2 ประเภทใหญ่ๆได้แก่ 1. Necrosis เป็นการตายแบบที่เซลล์โดนทำลาย โดยสิ่งที่เป็นอันตรายอย่างรุนแรงจากสิ่งภายนอก เช่น สารเคมี ทางกลทำให้เกิดการบาดเจ็บ หรืออักเสบจากบาดแผล ซึ่งส่งผลกระทบโดยตรงต่อเซลล์นั้น โดยอาการที่เกิดขึ้นในระดับเซลล์ ได้แก่ เซลล์บวม ผนังเซลล์ถูกทำลาย และเกิดการแตกสลายของส่วนประกอบต่างๆภายในเซลล์ จนในที่สุด DNA ถูกย่อยสลายจนหมด โดยเมื่อมีการวิเคราะห์แยก DNA โดยวิธี electrophoresis จะไม่พบแบนที่เด่นชัดของ DNA แต่จะพบลักษณะ smear ของ DNA การตายประเภทที่ 2 ได้แก่ การตายแบบ Programmed cell death (PCD) เป็นการตายเมื่อเซลล์นั้นๆ โดนสิ่งกระตุ้นต่างๆ เช่น สารเคมี อุณหภูมิ เชื้อจุลินทรีย์ ส่งผลให้ตัวมันเองตั้งโปรแกรมเพื่อทำลายตัวเอง เช่น การตอบสนองของพืชต่อการรุกรานของเชื้อจุลินทรีย์ซึ่งพบว่า บริเวณที่พืชถูกเชื้อโรคเข้าทำลาย ในส่วนบริเวณพื้นที่รอบๆของเชื้อจุลินทรีย์ พืชจะตั้งโปรแกรมทำลายตัวเองโดยโอบล้อมเชื้อไว้ ทำให้การแพร่กระจายของเชื้อไม่สามารถเกิดขึ้นได้ ปฏิกิริยาของพืชที่ตอบสนองต่อการเข้าทำลายของเชื้อจุลินทรีย์นี้ เป็นที่รู้จักกันว่า Hypersensitive response (HR) การตอบสนองนี้ จะจำกัดการแพร่กระจายของเชื้อ โดยการที่ตัวพืชเองเกิดการตายแบบโปรแกรม (PCD) (Pennell and Lamb,1997)

นอกจากนี้ ยังมีงานวิจัยพบว่า การตายแบบโปรแกรม (PCD) มีความเกี่ยวข้องกับการวาย (Senescence) ตามธรรมชาติของพืช ทั้งในส่วนของใบ ราก ดอกไม้ แต่ทั้งนี้การวายของผลผลิตทางการเกษตรภายหลังการเก็บเกี่ยวและการตายแบบโปรแกรม (PCD)ยังไม่เป็นที่แน่ชัดว่ามีความเกี่ยวข้องกันหรือไม่ ดังนั้น การพิสูจน์และค้นหาความสัมพันธ์ระหว่างการตายแบบ PCD ในพืชและการเสื่อมสภาพของผลิตผลหลังการเก็บเกี่ยว จะช่วยให้ทราบถึงสาเหตุการตายและเสื่อมสภาพของผลผลิตเพื่อที่จะหาวิธีป้องกันและชะลอการสูญเสียที่เพิ่มมากขึ้น ภายหลังการเก็บเกี่ยวของผลิตผลทางการเกษตร และจะทำให้อายุการเก็บรักษาของผลิตผลหลังการเก็บเกี่ยวยาวนานขึ้น ในช่วงเวลา 6 ปีที่ผ่านมา ได้มีการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับ การตายแบบโปรแกรมในพืชหรือ Plant Programmed cell death (PCD) ในผลิตผลหลังการเก็บเกี่ยวโดย Eason และคณะ (2002) พบ DNA laddering ซึ่งเป็นลักษณะอาการของ PCD ในหน่อไม้ฝรั่งที่เสื่อมคุณภาพภายหลังการเก็บเกี่ยว ซึ่ง DNA laddering เป็นลักษณะของ DNA ที่ถูกย่อยให้มีขนาด 180 bp โดย endonuclease ซึ่งจะพบกระบวนการนี้เฉพาะการตายแบบโปรแกรม (PCD) เท่านั้น นอกจากนี้ Coupe และคณะ (2003, 2004) พบว่า การเสื่อมสภาพของบรอคโค

ลี่ภายหลังการเก็บเกี่ยวมีความเกี่ยวของกับการทำงานของเอนไซม์พวก cysteine protease ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการตายแบบ PCD ในการศึกษาวิจัยเรื่องการตายแบบโปรแกรมในเซลล์พืชหลายๆชนิดได้ใช้อุณหภูมิ 55 ˚C เป็นเวลา 10 นาที เป็นตัวกระตุ้นให้เซลล์พืชแสดงอาการ PCD เพื่อวัตถุประสงค์ในการศึกษากระบวนการทางชีวเคมีและกลไกการเกิด PCD ในพืช เช่น การกระตุ้นเซลล์ของใบยาสูบ (Tobacco, TBY-2 ) โดยความร้อนที่ 55 ˚C เป็นเวลา 10 นาที เพื่อศึกษาลักษณะการเกิดอาการ PCD (Vacca และคณะ,2004)

ผลิตผลสดภายหลังการเก็บเกี่ยว จะมีอัตราการหายใจและการผลิตเอทิลีนที่เพิ่มสูงขึ้น ซึ่งการเปลี่ยนแปลงดังกล่าว ส่งผลให้มีการเร่งให้เกิดการเสื่อมสภาพของผักและผลไม้ โดยการหั่น ปอก และตัด จะชักนำให้เกิดการสังเคราะห์เอทิลีน ได้มีการนำมาใช้เพื่อป้องกันและชะลอการเสื่อมสภาพของผลิตผลหลายชนิด ในการวิจัยนี้จะทำการศึกษาถึงการสัมพันธ์ระหว่างการเสื่อมสภาพของผลิตผลหลายชนิด ในการวิจัยนี้จะทำการศึกษาถึงการสัมพันธ์ระหว่างการเสื่อมสภาพภายหลังการเก็บเกี่ยวของบรอคโคลี่ ต่อการเกิดการตายแบบโปรแกรม (PCD) และศึกษาถึงบทบาทของเอทิลีนต่อการเกิด การตายแบบโปรแกรมในบรอคโคลี่ภายหลังการเก็บเกี่ยว

**1.2 สมมุติฐานของงานวิจัย**

1.2.1 การวายของบรอคโคลี่ภายหลังการเก็บเกี่ยวคาดว่าอาจมีส่วนสัมพันธ์กับการเกิดการตายแบบโปรแกรม (PCD) แต่ทั้งนี้ยังไม่มีข้อมูลที่ชัดเจน

1.2.2 การใช้ความร้อนที่ 55 ˚C 10 นาที ซึ่งเป็นสภาวะที่ใช้ในการกระตุ้นให้เกิดการตายแบบโปรแกรม ในอื่นๆได้ถูกนำมาใช้เพื่อศึกษาและยืนยันการเกิดอาการตายแบบโปรแกรมในบรอคโคลี่ที่เสื่อมสภาพภายหลังการเก็บเกี่ยว

1.2.3 การใช้ 1- methylcyclopropene (1-MCP) ซึ่งเป็นสารยับยั้งการทำงานของเอทิลีน คาดว่าสามารถลดการตายแบบโปรแกรมในบรอคโคลี่ภายหลังการเก็บเกี่ยว

1.2.4 งานวิจัยเรื่องการวายของผลิตผลภายหลังการเก็บเกี่ยว เนื่องจากเอทิลีนต่อการเกิดการตายแบบ โปรแกรม ยังไม่เคยมีการศึกษาในบรอคโคลี่ งานวิจัยนี้จึงเน้นเรื่องการเสื่อมสภาพหลังการเกิดการตายแบบโปรแกรมในบรอคโคลี่ เพื่อที่จะทราบถึงความสัมพันธ์เพื่อเป็นแนวทางในการป้องกันและวิจัยเพื่อชะลอการเสื่อมสภาพ และยืดอายุของผลิตผลหลังการเก็บเกี่ยวต่อไป

**2. วัตถุประสงค์ (Objective)**

2.1 เพื่อศึกษาลักษณะการวายภายหลังการเก็บเกี่ยวในบรอคโคลี่

2.2 เพื่อศึกษาผลของสภาวะการกระตุ้นให้เกิดการตายแบบโปรแกรม (PCD) โดยใช้ความร้อนที่อุณหภูมิ

55˚C 10 นาที ต่อการตอบสนองของบรอคโคลี่ภายหลังการเก็บเกี่ยว

2.3 เพื่อศึกษาถึงบทบาทของเอทิลีนและตัวยับยั้งการทำงานของเอทิลีน 1-methylcyclopropene (1-MCP) ต่อการเกิดการตายแบบโปรแกรม (PCD) ภายหลังการเก็บเกี่ยวของบรอคโคลี่

**3. ขอบเขตของงานวิจัย**

3.1 นำบรอคโคลี่ที่เก็บเกี่ยวมาจากสวน นำมาเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 20 ˚C และมืดสนิทที่ 0, 12, 24, 48 ชั่วโมง ต่อการเกิดการตายแบบโปรแกรม (PCD)

3.2 นำบรอคโคลี่มากระตุ้นให้เกิดการตายแบบโปรแกรม(PCD) โดยผ่านด้วยความร้อนที่ 55 ˚C 10 นาที และที่ไม่ผ่านความร้อน (ชุดควบคุม) หลังจากนั้นนำมาเก็บที่ 20˚C และ 10˚C เป็นเวลา 0, 12, 24, 48 ชั่วโมง ต่อการเกิดการตายแบบโปรแกรม (PCD)

3.3 นำบรอคโคลี่มารมด้วย 1- methylcyclopropene (1-MCP) ความเข้มข้น 1 ไมโครลิตร หลังจากนั้นนำมากระตุ้นให้เกิดการตายแบบโปรแกรม (PCD) โดยผ่านด้วยความร้อนที่ 55 ˚C 10 นาที และที่ไม่ผ่านความร้อน (ชุดควบคุม) หลังจากนั้นนำมาเก็บที่ 20˚C และ 10˚C เป็นเวลา 0 , 12, 24 , 48 ชั่วโมง ต่อการเกิดการตายแบบโปรแกรม