

การเปลี่ยนแปลงของโปรตีนในใบลำไยก่อนการออกดอก ที่ชักนำด้วยโพแทสเซียมคลอเรต

Change of Proteins in Longan Leaves Before Flowering Induced by Potassium Chlorate

วิทยา ศิลปสมบุญ^{1/} และ ธนะชัย พันธุ์เกษมสุข^{1/}
Wittaya Sinlaphasomboon^{1/} and Tanachai Pankasemsuk^{1/}

Abstract: The change of proteins in longan leaves, before flowering by potassium chlorate induction, was studied on 3 years old grafting longan cv. 'Daw', growing in 15-inch-diameter pots which treated with 10 g of potassium chlorate per pot. After treated for 14 days, it was found that total protein concentration, determined by Bradford assay, in treated leaves were higher than the untreated leaves. SDS-PAGE analysis revealed that treated leaves had new protein band in gel while untreated leaves did not have this protein band after treated for 14 days.

Keywords: Longan, protein, potassium chlorate, flowering

บทคัดย่อ: ศึกษาการเปลี่ยนแปลงโปรตีนในใบลำไยก่อนการออกดอก ที่ชักนำให้ออกดอกด้วยโพแทสเซียมคลอเรต ในต้นลำไยเสียบยอดพันธุ์ดอ อายุ 3 ปี ที่ได้รับโพแทสเซียมคลอเรต อัตรา 10 กรัมต่อต้น (ในกระถางขนาด 15 นิ้ว) พบว่า ปริมาณของโปรตีนรวมของใบ โดยวิธี Bradford assay ในกลุ่มที่ได้รับโพแทสเซียมคลอเรต มีมากกว่าในใบของกลุ่มที่ไม่ได้รับโพแทสเซียมคลอเรต หลังจากที่ดินลำไยได้รับโพแทสเซียมคลอเรตแล้ว 14 วัน เมื่อทำการวิเคราะห์ชนิดของโปรตีนโดยวิธี SDS-PAGE พบว่าในใบจากต้นลำไยที่ได้รับโพแทสเซียมคลอเรต มีการเพิ่มขึ้นของแถบโปรตีนใหม่ ในแผ่นเจลหลังจากที่ดินลำไยได้รับโพแทสเซียมคลอเรตแล้ว 14 วัน ขณะที่ ใบจากต้นที่ไม่ได้รับโพแทสเซียมคลอเรต จะไม่พบแถบโปรตีนนี้

คำสำคัญ: ลำไย โปรตีน โพแทสเซียมคลอเรต การออกดอก

^{1/} ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จ. เชียงใหม่ 50200

^{1/} Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200

คำนำ

ลำไย (*Dimocarpus longan* Lour.) เป็นไม้ผลกึ่งร้อน (sub-tropical fruit) ที่มีถิ่นกำเนิดในประเทศจีนตอนใต้ ในด้านความสำคัญทางเศรษฐกิจ ลำไยจัดเป็นไม้ผลที่สำคัญทางเศรษฐกิจของไทยชนิดหนึ่ง ดังนั้น จึงมีผู้นิยมปลูกลำไยกันอย่างกว้างขวางโดยเฉพาะในเขตภาคเหนือตอนบน เช่น จังหวัดลำพูน เชียงใหม่ ลำปาง เชียงราย น่าน และแพร่ เป็นต้น อย่างไรก็ตาม ด้วยที่ลำไยเป็นไม้ผลกึ่งร้อน ดังนั้นอุณหภูมิจึงเป็นปัจจัยที่สำคัญต่อการออกดอกของลำไย และเป็นปัญหาที่สำคัญของเกษตรกรผู้ปลูกลำไย จนกระทั่งในปี พ.ศ. 2541 ได้มีการพบว่า สารโพแทสเซียมคลอเรต (potassium chlorate, KClO_3) สามารถชักนำให้ลำไยออกดอกได้แม้ว่าจะเป็นนอกฤดูก็ตาม

การค้นคว้าชักนำให้ลำไยออกดอกนี้ได้รับความสนใจ ทำให้มีผู้สนใจในเชิงของวิธีการ ปริมาณ และช่วงเวลาของการใช้สารอย่างต่อเนื่องแต่ในด้านของกลไกกลับมีการศึกษาที่ค่อนข้างน้อยมาก ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นศึกษาหาความสัมพันธ์ของการออกดอกของลำไยกับการเปลี่ยนแปลงเชิงปริมาณและคุณภาพของโปรตีนรวมในใบลำไยหลังได้รับโพแทสเซียมคลอเรต

โพแทสเซียมคลอเรต เป็นสารออกซิไดซ์ (oxidizing agent) ชนิดหนึ่ง ซึ่งมีการนำมาใช้ทำดอกไม้ไฟ นอกจากนี้ในสารเคมีในกลุ่มเดียวกันเช่น โซเดียมคลอเรต (sodium chlorate) แคลเซียมคลอเรต (calcium chlorate) และแมกนีเซียมคลอเรต (magnesium chlorate) ได้นำไปใช้ในการเป็นสารกำจัดวัชพืชอีกด้วย (Hayes and Law, 1991) โพแทสเซียมคลอเรต เมื่อใส่ลงดินจะมีการแตกตัวเป็น อนุมูลของโพแทสเซียม (K^+) และ อนุมูลคลอเรต (chlorate ion, ClO_3^-) โดยอนุมูลคลอเรตนี้จะเคลื่อนที่เข้าสู่ต้นผ่านทางท่อลำเลียงน้ำ (xylem) ไปยังส่วนใบที่แก่ เพื่อทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลง หรือชักนำให้เกิดสารชนิดหนึ่งในส่วนของใบ และสารดังกล่าวจะเคลื่อนไปยังส่วนยอดเพื่อชักนำให้ลำไยออกดอกต่อไป (วิทยา และธนะชัย, 2547) จากการศึกษาของรุ่งเกียรติ (2547) พบว่า เมื่อให้โพแทสเซียมคลอเรตกับลำไย 3 พันธุ์ ได้แก่ พันธุ์ดอ ชมพู และเบ๊ยวเขียว ปริมาณของโพรลีน

อิสระ (free proline) มีค่าเพิ่มขึ้น ในขณะที่โปรตีนรวมมีแนวโน้มไม่เปลี่ยนแปลง โดยเมื่อศึกษารูปแบบของไอโซไซม์ของลำไยพบว่า รูปแบบของไอโซไซม์ของ peroxidase และ esterase ของลำไยพันธุ์ดอ ไม่เปลี่ยนแปลง แต่จากการศึกษาของ วิทยาและธนะชัย (2548) กลับพบว่า รูปแบบไอโซไซม์ของ peroxidase และ esterase ก่อนการออกดอกมีการเปลี่ยนแปลง ซึ่งรูปแบบ peroxidase ที่เปลี่ยนแปลงนี้คล้ายกับการศึกษาของ Zheng *et al.* (2000) ที่พบว่า zymogram ของ POX (peroxidase) isozyme จากส่วนยอดมีการเปลี่ยนแปลงในระหว่างที่เกิด differentiation ของส่วนสืบพันธุ์

อุปกรณ์และวิธีการ

การวิจัยนี้ใช้ลำไยเสียบยอดพันธุ์ดอ อายุ 3 ปี ปลูกในกระถางเส้นผ่านศูนย์กลาง 15 นิ้ว (38.1 เซนติเมตร) แบ่งออกเป็น 2 กรรมวิธี ได้แก่ กรรมวิธีที่ 1 ไม่ให้โพแทสเซียมคลอเรต และกรรมวิธีที่ 2 ให้โพแทสเซียมคลอเรต อัตรา 10 กรัมต่อกระถาง โดยวิธีให้ทางดิน จำนวน 3 ซ้ำ ๆ ละ 2 ต้น หลังจากให้โพแทสเซียมคลอเรตแล้ว เก็บตัวอย่างใบในวันที่ 0, 1, 3, 5, 7, 14, 21 และ 28 วัน ของทั้งสองกรรมวิธี เพื่อนำมาวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการ

การวิเคราะห์ความเข้มข้นของโปรตีนทั้งหมดในใบ

การสกัดโปรตีน นำใบลำไยมาล้างทำความสะอาด เช็ดให้แห้ง ชั่งตัวอย่างละ 1.0 กรัม ตัดเป็นชิ้นเล็กๆ บดให้ละเอียดโดยใช้ไนโตรเจนเหลว จนละเอียดได้ที่แล้วเติม extraction buffer (0.2 M Tris-HCl buffer pH 6.8, 2 % PVPP) นำ crude protein ที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงที่ 4°C ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที (rpm) 30 นาที แยกส่วนใสด้านบน (supernatant) สำหรับนำไปวิเคราะห์ปริมาณความเข้มข้นของโปรตีน

การเตรียมกราฟโปรตีนมาตรฐาน เตรียมตัวอย่างโปรตีนมาตรฐาน โดยใช้ 200 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ของ bovine serum albumin (BSA) ใส่ในหลอดทดสอบ ปริมาตร 0, 5, 10, 15, 20 และ 25 ไมโครลิตร ปรับปริมาตรด้วย 0.5 M phosphate buffer saline pH

7.5 ให้เป็น 300 ไมโครลิตร เติม 0.05 % coomassie brilliant blue R-250 (CBB) ใน 5% ethanol, 10% phosphoric acid จำนวน 3 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ทิ้งไว้ 10 นาที นำวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นแสง 595 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาสร้างกราฟมาตรฐาน

การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนทั้งหมด นำตัวอย่างโปรตีนที่ได้จำนวน 20 ไมโครลิตร ปรับปริมาตรให้เป็น 300 ไมโครลิตร โดยใช้ 0.5 M phosphate buffer saline pH 7.5 แล้วจึงเติมสารละลาย 0.05 % CBB จำนวน 3 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ทิ้งไว้ 10 นาที นำวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ ความยาวคลื่นแสง 595 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณหาปริมาณโปรตีนในสารละลายตัวอย่างโดยเทียบกับกราฟโปรตีนมาตรฐานที่เตรียมไว้

การวิเคราะห์หารูปแบบของโปรตีนทั้งหมดโดยวิธี sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

การสกัดโปรตีน นำใบลำไยมาล้างทำความสะอาด เช็ดให้แห้ง ชั่งตัวอย่างละ 1.0 กรัม ตัดเป็นชิ้นเล็กๆ บดให้ละเอียดโดยใช้ liquid nitrogen จนละเอียดได้ที่แล้วเติม extraction buffer (0.5 Tris-HCl pH 7.2, 2% PVPP, 1.5% SDS, 2% β -mercaptoethanol, 0.02 % PMSF, 0.06% Na-EDTA และ 2% Tween 20) นำ crude protein ที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงที่ 4°C ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที (rpm) 30 นาที แยกส่วนใสด้านบน สำหรับนำไปวิเคราะห์หารูปแบบของโปรตีนโดยวิธี SDS-PAGE

การเตรียม gel ใช้ polyacrylamide gel ความเข้มข้น 12.0 % ใน 0.375 M Tris-HCl buffer pH 8.8,

0.5% SDS สำหรับ separating gel และใช้ polyacrylamide gel ความเข้มข้น 4.0 % ใน 0.5 M Tris-HCl buffer pH 6.8, 0.1% SDS สำหรับ stacking gel

นำสารละลายโปรตีนที่สกัดได้ ผสมกับ sample buffer (62.5 mM Tris-HCl, pH 6.8, 20% Glycerol, 2% SDS, 5% β -mercaptoethanol) ในอัตรา 1:4 จากนั้นนำไปทำให้ร้อนที่ 95 °C นาน 5 นาที ก่อนนำไป load บน gel โดยตั้ง power supply ไว้ที่ 50 mA และ 1.30 ชั่วโมง โดยใช้ 25 mM Tris-HCl, 192 mM glycine, 0.1% SDS เป็น electrode buffer รอจนตัวอย่างเคลื่อนไปจนสุด gel แล้วจึงนำเจลที่ได้มาล้างและ ย้อมสี (stain) โดยใช้ coomassie blue (0.2 % CBB ใน 45% methanol, 10% acetic acid) บนเครื่องเขย่า นาน 3 ชั่วโมง แล้วจึงล้างสีส่วนเกิน (destain) ออกโดยใช้ 25% methanol, 10% acetic acid นำเจลที่ล้างสีส่วนเกิน แล้วเก็บไว้ใน 10% glycerol, 7% acetic acid (Bollag *et al.*, 1996) ก่อนนำมาศึกษาความแตกต่างของแถบ (band) ที่เกิดขึ้น

ผลการทดลอง

การวิเคราะห์ความเข้มข้นของโปรตีนทั้งหมดในใบ

จากการศึกษาปริมาณโปรตีนทั้งหมดในใบของลำไยที่ให้โพแทสเซียมคลอไรด์และไม่ให้โพแทสเซียมคลอไรด์ ตั้งแต่วันที่ 0, 1, 3, 5, 7, 14, 21 และ 28 วัน พบว่า ในกลุ่มที่ให้โพแทสเซียมคลอไรด์ เริ่มออกดอกหลังจากวันที่ 35 ไปแล้ว ส่วนที่ไม่ได้รับโพแทสเซียมคลอไรด์ไม่มีการออกดอก เมื่อนำตัวอย่างใบมาวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนทั้งหมด พบว่า ในกลุ่มที่ได้รับโพแทสเซียมคลอไรด์ มีการเพิ่มขึ้นของโปรตีนตั้งแต่วันที่ 14 ซึ่งการเพิ่มขึ้นนี้เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 1 และ ภาพที่ 1)

Table 1 Concentration of total protein in leaves of potassium chlorate treated and non-treated longan trees at different time after treated.

Days after treated	Concentration of total protein in leaves (mg/ml) ^{1/}	
	Treated with potassium chlorate	Non-treated with potassium chlorate
0	0.25 a	0.24 a
1	0.27 a	0.26 a
3	0.30 a	0.24 b
5	0.27 a	0.27 a
7	0.28 a	0.26 a
14	0.38 a	0.29 b
21	0.39 a	0.28 b
28	0.44 a	0.27 b

^{1/} Means within the same row followed by the same letter did not significant differences by paired comparison at P = 0.05

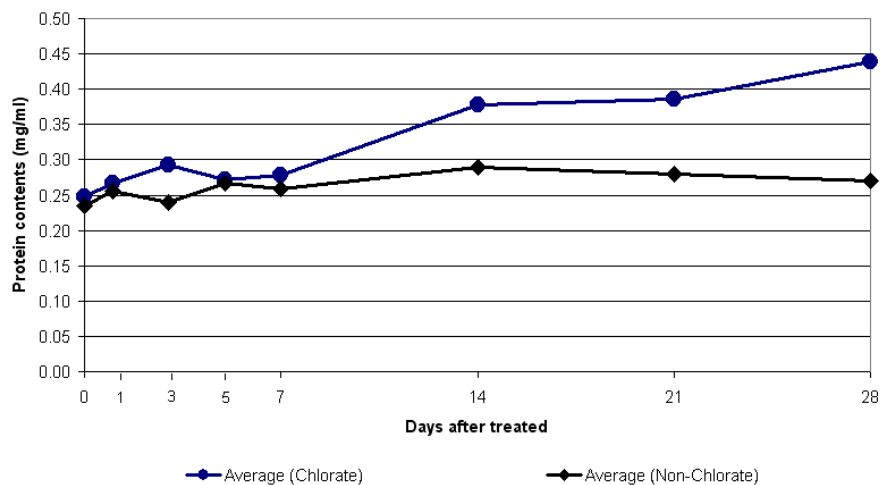


Figure 1 Concentration of total protein in longan leaves from potassium chlorate treated and non-treated.

การวิเคราะห์หารูปแบบของโปรตีนโดยวิธี sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

จากการศึกษารูปแบบของโปรตีนโดยใช้ SDS-PAGE พบว่า ลำไยที่ไม่ได้รับโพแทสเซียมคลอเรตให้

รูปแบบของโปรตีนที่ไม่แตกต่างกันตั้งแต่วันที่ 0 จนถึงวันที่ 28 (ภาพที่ 2) ในขณะที่ ลำไยที่ได้รับโพแทสเซียมคลอเรตนั้น มีรูปแบบของโปรตีนในวันที่ 14, 21 และ 28 แตกต่างจากวันที่ 0-7 ซึ่งเหมือนกับรูปแบบที่พบในใบลำไยที่ไม่ได้รับโพแทสเซียมคลอเรต (ภาพที่ 2)

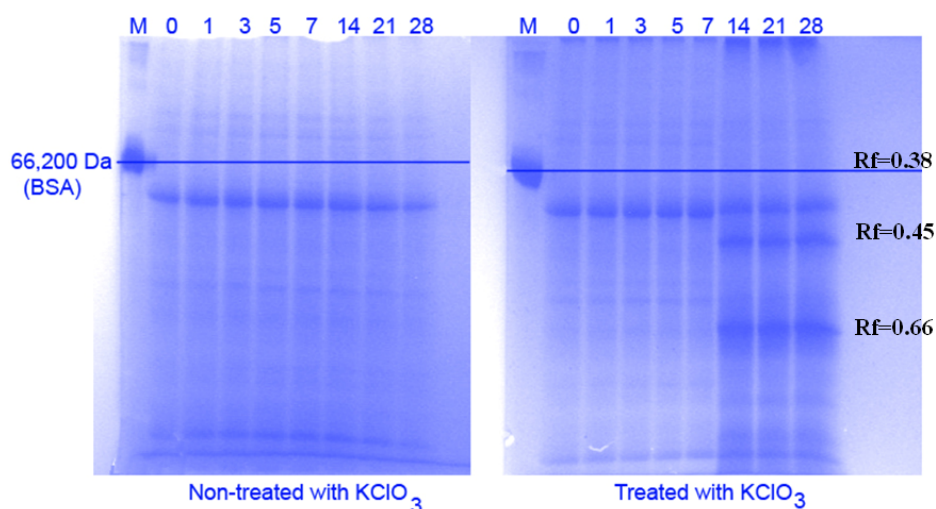


Figure 2 Protein bands of total protein in leaves from potassium chlorate treated and non-treated longan tree obtained by SDS-PAGE.

วิจารณ์

จากการศึกษาลำไยเสียบยอดพันธุ์ดอ ที่ไม่ได้รับและได้รับโพแทสเซียมคลอเรตในอัตรา 10 กรัมต่อกระถาง พบว่า ในลำไยพันธุ์ดอที่ได้รับสารเริ่มมีการแทงช่อดอกในระหว่างวันที่ 18-35 หลังจากได้รับสาร ในขณะที่ต้นที่ไม่ได้รับสารไม่มีการออกดอกเลย โดยในการศึกษครั้งนี้ ให้โพแทสเซียมคลอเรตในช่วงเดือนเมษายน ซึ่งช่วงดังกล่าวในธรรมชาติเป็นช่วงที่ต้นลำไยมีการเจริญเติบโตทางด้านกิ่งใบ (vegetative growth) เท่านั้น ดังนั้น การออกดอกของต้นลำไยจึงเป็นผลโดยตรงจากการที่ต้นลำไยได้รับโพแทสเซียมคลอเรต เมื่อนำมาทำการศึกษเกี่ยวกับปริมาณของโปรตีนในใบในขณะที่ต้นลำไยออกดอก จึงค่อนข้างที่จะมั่นใจได้ว่า การเปลี่ยนแปลงปริมาณโปรตีนที่เกิดขึ้นภายหลังจากที่ต้นลำไยได้รับโพแทสเซียมคลอเรตน่าจะเกี่ยวข้องกับการออกดอกของต้นลำไย เมื่อพิจารณาปริมาณโปรตีนในใบพบว่า ปริมาณโปรตีนเริ่มต้นในลำไยกลุ่มที่ไม่ได้รับโพแทสเซียมคลอเรต มีค่าเฉลี่ยน้อยกว่ากลุ่มที่ได้รับโพแทสเซียมคลอเรต โดยพบความแตกต่างอย่างมีนัย

สำคัญของโปรตีนรวมในใบ หลังจากที่ได้ต้นลำไยได้รับโพแทสเซียมคลอเรตแล้ว 14 วัน (ตารางที่ 1) และพบความแตกต่างปริมาณโปรตีนมากขึ้นในวันที่ 21 และ 28 สอดคล้องกับวิทยาและธนะชัย (2547) รายงานว่ารูปแบบไอโซไซม์ของ peroxidase และ esterase พบว่า ในช่วงวันที่ 14, 21 และ 28 รูปแบบของไอโซไซม์ peroxidase มีความเข้มข้นเพิ่มมากขึ้น และ Zheng *et al.* (2000) ก็พบในลักษณะเดียวกัน ดังนั้นจึงพอสรุปได้ว่าปริมาณของโปรตีนทั้งหมดในใบของลำไยมีปริมาณเพิ่มมากขึ้นก่อนการออกดอก

จากการศึกษา SDS-PAGE พบว่าการเพิ่มปริมาณของโปรตีนทั้งหมดในช่วงตั้งแต่วันที่ 14 เป็นต้นมา เนื่องมาจากการสร้างโปรตีนชนิดใหม่ ที่ตำแหน่ง Rf=0.45 และมีการเพิ่มปริมาณของโปรตีนที่ตำแหน่ง Rf=0.66 โดยในช่วงแรกหลังจากลำไยได้รับโพแทสเซียมคลอเรตแล้ว โปรตีนที่ตำแหน่ง Rf =0.66 มีลักษณะคล้ายกับที่ปรากฏในรูปแบบของโปรตีนทั้งหมดจากใบลำไยที่ไม่ได้โพแทสเซียมคลอเรต แต่เมื่อวันที่ 14 กลับพบว่ามี ความเข้มของแถบ มาขึ้น จึงเป็นไปได้ที่โปรตีนที่ตำแหน่งนี้จะมีปริมาณเพิ่มขึ้น เมื่อพิจารณาที่ตำแหน่ง Rf = 0.45

พบว่า ก่อนหน้าวันที่ 14 ไม่ปรากฏแถบที่ตำแหน่งนี้ หรืออาจมีแต่มีปริมาณน้อยมาจน CBB ไม่สามารถย้อมได้ ซึ่งโดยปกติแล้วความเข้มข้นที่ CBB สามารถตรวจได้อยู่ที่ประมาณ 3 µg ดังนั้นมีโอกาสเป็นได้ทั้งที่ว่า โปรตีนนี้มีปริมาณเพิ่มมากขึ้นหรือเกิดขึ้นใหม่หลังจากที่ลำไยได้รับโพแทสเซียมคลอไรด์ และจากการทำ SDS-PAGE ซึ่งเป็นการแยกโปรตีนออกโดยอาศัยน้ำหนัก ดังนั้นโปรตีนในตำแหน่งดังกล่าวจึงอาจเป็นโปรตีนเดียว หรือกลุ่มของโปรตีนก็ได้

สรุป

ในช่วงก่อนการออกดอกของลำไย จะมีการเปลี่ยนแปลงทั้งปริมาณและชนิดของโปรตีนในใบลำไย การเปลี่ยนแปลงนี้มีทั้งเพิ่มปริมาณและสร้างโปรตีนชนิดใหม่ขึ้นมา

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ คุณพรรัตน์ ศิริคำ และเจ้าหน้าที่ประจำห้องปฏิบัติการพืชสวน, คุณพสุ สุลาภิวัฒนา เจ้าหน้าที่ในโครงการย่อยบัณฑิตศึกษาและวิจัยสาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ในการให้คำปรึกษาและช่วยอำนวยความสะดวกในการปฏิบัติงานเป็นอย่างดี และขอขอบคุณโครงการเพิ่มจำนวนวิทยานิพนธ์และผลงานวิจัยตีพิมพ์ ที่ได้สนับสนุนเงินทุนสำหรับการวิจัยครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

- รุ่งเกียรติ แก้วเพชร. 2547. ผลของโพแทสเซียมคลอไรด์ต่อรูปแบบของไอโซไซม์และระดับโปรตีนอิสระในใบลำไยพันธุ์ดอ พันธุ์ชมพู และพันธุ์เปี้ยวเขียว. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่.
- วิทยา ศิลปสมบุญ และ ธนะชัย พันธุ์เกษมสุข. 2547. ผลของใบและการลำเลียงทางท่ออาหารต่อการกระตุ้นการออกดอกของลำไยพันธุ์ดอโดยโพแทสเซียมคลอไรด์. วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร 35(5-6): 121-125.
- วิทยา ศิลปสมบุญ และ ธนะชัย พันธุ์เกษมสุข. 2548. ผลของโพแทสเซียมคลอไรด์ต่อการเปลี่ยนแปลงรูปแบบไอโซไซม์ในใบของลำไยพันธุ์ดอ, [CD ROM]. วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร 36(5-6): 1-4.
- Bollag, D. M., M. D. Rozycki and S. J. Edelstein. 1996. Protein Methods. Second edition. John Wiley & Sons, Inc., Singapore.
- Hayes, W. J. J. and E. R. Law. 1991. Handbook of Pesticide Toxicology. Academic Press, New York.
- Zheng, Z. B., H.J. Luo, S.Q. Lin, X. Guan and G. Song. 2000. Changes in pox isozyme patterns during flower differentiation in litchi and longan. (Online). Available: http://www.actahort.org/books/558/558_41.htm. (14 November 2005)