

การตรวจสอบการเสื่อมของดีเอ็นเอ การรั่วไหล และความมีชีวิตของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง ในระหว่างการเสื่อมคุณภาพ

Detection of DNA degradation, seed leachate and viability of soybean
(*Glycine max* (L.) Merrill) seeds during deterioration

จตุพร กลมเกลี้ยง¹ วิชา หงษ์ตระกูล² อารมย์ ศรีพิจิตต์³ อธิวัฒน์ ศรีตโยภาส³

บทคัดย่อ

การเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง (*Glycine max* (L.) Merrill) ภายหลังจากสุกแก่ทางสรีรวิทยา เชื่อกันว่ามีสาเหตุมาจากการเสื่อมสภาพของเยื่อหุ้มเซลล์และความเสียหายของดีเอ็นเอ การศึกษานี้ทำขึ้นเพื่อตรวจสอบการเสื่อมของดีเอ็นเอ เยื่อหุ้มเซลล์ และคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง 2 พันธุ์ คือ เชียงใหม่ 60 และ Fort Lamy ที่เก็บเกี่ยวในระยะสุกแก่ทางสรีรวิทยาโดยใช้วิธีการประเมินความแข็งแรงของเมล็ดพันธุ์ที่ใช้กันอย่างแพร่หลาย คือ การเร่งอายุเมล็ดพันธุ์ เป็นเวลา 1-8 วัน ภายหลังจากการเร่งอายุแต่ละวันได้ทำการตรวจสอบความงอกมาตรฐาน การรั่วไหล และการเปลี่ยนแปลงของดีเอ็นเอ ผลการทดลองพบว่า ความงอกมาตรฐานของเมล็ดพันธุ์ในระยะ 3 วันแรกหลังการเร่งอายุลดลงค่อนข้างช้า หลังจากระยะนี้ความงอกมาตรฐานลดลงอย่างเห็นได้ชัด ขณะที่การรั่วไหลของสารจากเมล็ดพันธุ์ซึ่งวัดโดยใช้ค่าการนำไฟฟ้าพบว่ามีค่าการรั่วไหลของสารจากเมล็ดพันธุ์เกิดขึ้นก่อนพบการเปลี่ยนแปลงการงอกของเมล็ด โดยมีค่าการนำไฟฟ้าเพิ่มขึ้นอย่างชัดเจนหลังการเร่งอายุเมล็ดพันธุ์เป็นเวลา 2 วัน และตรวจพบการเสื่อมของดีเอ็นเอได้ตั้งแต่ภายหลังการเร่งอายุเมล็ดพันธุ์เพียง 1 วันและมีการเสื่อมเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องตลอดการเร่งอายุ 8 วัน โดยเมล็ดพันธุ์เชียงใหม่ 60 และ Fort Lamy ที่ไม่มีการเร่งอายุมีปริมาณดีเอ็นเอมากที่สุด 98.58 และ 103.25 นาโนกรัม/ไมโครลิตรและเมล็ดที่ผ่านการเร่งอายุ 8 วันมีดีเอ็นเอเหลืออยู่น้อยที่สุดเพียง 9.71 และ 12.53 นาโนกรัม/ไมโครลิตรตามลำดับ จากข้อมูลทั้งหมดนี้จึงอาจสรุปได้ว่าการเสื่อมของดีเอ็นเอและความเสียหายของเยื่อหุ้มเซลล์เป็นสาเหตุพื้นฐานของการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองที่นำไปสู่การสูญเสียความงอกและความแข็งแรงของเมล็ดพันธุ์

คำสำคัญ : ถั่วเหลือง การเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ การเร่งอายุ การเสื่อมของดีเอ็นเอ

Abstract

Deterioration of soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) seeds following physiological maturity is believed to be caused by membrane deterioration and DNA damage. This study was designed to detect DNA and membrane degradation, and determine deterioration of soybean seeds cv. CM 60 and Fort Lamy harvested at physiological maturity using the accelerated ageing test, the widely used method in seed vigor evaluation. The accelerated ageing seeds of 1-8 days were evaluated everyday by standard germination test, seed leachate and DNA degradation. The results showed that seed germination was slowly decreased at the early period of ageing for 3 days, then the germination was highly decreased. The

¹ สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง เขตลาดกระบัง กรุงเทพฯ 10520

² ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ เขตจตุจักร กรุงเทพฯ 10900

³ สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง เขตลาดกระบัง กรุงเทพฯ 10520

seed leachate evaluated by electrical conductivity test was detected prior to the change in seed germination. The conductivity value was significantly increased after accelerated ageing for 2 days. The DNA degradation was early observed starting from 1 day after accelerated ageing and continuously increased with increasing time of ageing along 8 days. The non-aged seeds of the CM 60 and Fort Lamy had highest DNA concentration of 98.58 and 103.25 ng/ μ l, while the 8 days aged seeds had a lowest of 9.71 and 12.53 ng/ μ l, respectively. All of the evidences obtained are consistent with the concept that DNA disintegrity and membrane deterioration may be the primary causes of seed deterioration in soybean leading to the loss of germination and seed vigor.

Key words: Soybean, Seed deterioration, Accelerated ageing, DNA degradation

คำนำ

เมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองเป็นเมล็ดพันธุ์ที่เกิดการเสื่อมคุณภาพค่อนข้างเร็ว โดยการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์นั้นมักเกิดในสภาพที่มีอุณหภูมิและความชื้นสูง ซึ่งเป็นสภาพอากาศปกติของเขตร้อนชื้น จึงเป็นอุปสรรคสำคัญต่อการผลิตและการเก็บรักษาเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองให้มีคุณภาพดีหรือมีความงอกและความแข็งแรงสูง (Nangju *et al.*, 1980) การเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์นั้นเป็นกระบวนการที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติ ซึ่งเกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงต่างๆ ทางเซลล์วิทยา สรีรวิทยา ชีวเคมี และทางกายภาพของเมล็ดพันธุ์ (Franca Neto *et al.*, 1994) การเปลี่ยนแปลงเหล่านี้ทำให้ความมีชีวิตของเมล็ดพันธุ์ลดลง และตายไปในที่สุด การเสื่อมคุณภาพของเมล็ดในระยะแรกๆ เป็นการเสื่อมทางสรีรวิทยาที่วัดได้ด้วยวิธีทางชีวเคมี เช่น การลดลงของเอนไซม์ การลดลงของการหายใจ และการรั่วไหลของสารจากภายในเมล็ด เป็นต้น ต่อมาจึงปรากฏอาการที่เกี่ยวข้องกับลักษณะทางกายภาพ และการเจริญเติบโตของต้นกล้า (วันชัย, 2538) กลไกหรือสาเหตุที่แท้จริงที่ทำให้เมล็ดพันธุ์เสื่อมคุณภาพภายใต้สภาพแวดล้อมดังกล่าวนี้ยังไม่เป็นที่เข้าใจกันดี อย่างไรก็ตามนักวิทยาศาสตร์หลายท่านได้เสนอว่า ความเสียหายของเมมเบรน (membrane damage) ซึ่งเกิดจากกระบวนการ lipid peroxidation เป็นสาเหตุที่เกิดขึ้นก่อนที่เมล็ดพันธุ์จะมีการเปลี่ยนแปลงคุณภาพอื่นๆ ตามมา (Stewart and Bewley, 1980; Basavarajappa *et al.*, 1991; Perez and Arguello, 1995) การเสื่อมของเยื่อหุ้มเซลล์ทำให้เกิดการสูญเสียความสามารถในการควบคุมการผ่านเข้าออกของสาร เมื่อนำเมล็ดพันธุ์ไปแช่น้ำจะทำให้เกิดการรั่วไหลของสารต่างๆ ออกมาจากเมล็ดซึ่งสามารถตรวจสอบได้โดยการวัดค่าการนำไฟฟ้าของสารละลายที่รั่วไหลออกมา (conductivity test) ซึ่งเป็นวิธีที่ง่าย ๆ ที่ใช้ตรวจสอบความเสียหายของเยื่อหุ้มเซลล์ เมื่อเมล็ดพันธุ์เกิดการเสื่อมคุณภาพเยื่อหุ้มเซลล์จะสูญเสียคุณสมบัติการเป็นเยื่อเลือกผ่าน ไม่สามารถควบคุมการเข้าออกของสารได้ จึงทำให้มีค่าการนำไฟฟ้าสูงขึ้น วิธีนี้เป็นวิธีการที่ใช้กันอย่างแพร่หลายเพราะสามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้ถึงศักยภาพการงอกของเมล็ดได้ (Spanò *et al.*, 2007; Goel *et al.*, 2003; Sung and Chui, 1995; Vieira *et al.*, 1999)

การเสื่อมของดีเอ็นเอก็ได้รับการเสนอด้วยเช่นกันว่าอาจเป็นอีกหนึ่งสาเหตุเบื้องต้นที่ทำให้เมล็ดพันธุ์สูญเสียความงอกและความแข็งแรง เพราะการเสื่อมของดีเอ็นเอจะมีผลทำให้การสังเคราะห์เอนไซม์อยู่ในระดับที่วิกฤติต่อการงอกในระยะแรก ดังนั้นการเปลี่ยนแปลงของเมมเบรนที่ผิดปกติและ/หรือการเสื่อมของดีเอ็นเออาจเป็นสาเหตุเบื้องต้นของการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ที่จะนำไปสู่การสูญเสียความงอกและความแข็งแรงของเมล็ดพันธุ์ (วันชัย, 2538) จึงได้ทำการทดลองเพื่อตรวจสอบสาเหตุที่ทำให้เมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองเสื่อมคุณภาพ ว่าเกิดจากการเสื่อมสภาพของดีเอ็นเอ และ/หรือเยื่อหุ้มเซลล์หรือไม่

อุปกรณ์และวิธีการ

1. พันธุ์ถั่วเหลืองที่ใช้ในการศึกษา

ปลูกถั่วเหลืองทั้ง 2 พันธุ์ คือ เชียงใหม่ 60 (CM 60) ซึ่งเป็นพันธุ์ที่อ่อนแอต่อการเสื่อมคุณภาพ และ Fort Lamy ซึ่งเป็นพันธุ์ที่ต้านทานต่อการเสื่อมคุณภาพ ที่แปลงทดลองของศูนย์วิจัยข้าวโพดและข้าวฟ่างแห่งชาติ อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา นำเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองที่เก็บเกี่ยวในระยะสุกแก่ทางสรีรวิทยามาผึ่งในที่ร่มซึ่งอากาศถ่ายเทได้สะดวกประมาณ 4 วัน แล้วจึงนำมาลดความชื้นด้วยแสงอาทิตย์โดยการนำเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองทั้งฝักวางให้กระจายเป็นชั้นเดียวทั่วตะแกรงพลาสติก ลดความชื้นด้วยแสงอาทิตย์ประมาณวันละ 8 ชั่วโมง เกลี่ยฝักกลับไปมาวันละ 2 ครั้ง เพื่อให้เมล็ดพันธุ์แห้งทั่วถึงกัน เมื่อความชื้นของเมล็ดลดลงเหลือประมาณ 15 % จึงนวดเมล็ดด้วยมือ นำเมล็ดพันธุ์ที่ได้ลดความชื้นด้วยแสงอาทิตย์ต่อไป จนกระทั่งเมล็ดมีความชื้นประมาณ 12% หลังจากนั้นจึงนำมาเร่งอายุเมล็ดพันธุ์ (Accelerated ageing) โดยวิธี Tray Method (McDonald and Phaneendranath, 1978) โดยนำเมล็ดพันธุ์ไปอบที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ประมาณ 90% เป็นระยะเวลาระหว่าง 1-8 วัน นำเมล็ดพันธุ์ที่เร่งอายุในแต่ละวันมาล้างทำความสะอาดด้วย alcohol 95% และล้างด้วยน้ำประปาอีกครั้ง ฝักลงไว้ในที่อุณหภูมิห้องนาน 48 ชั่วโมง นำเมล็ดพันธุ์ที่ได้มาตรวจสอบคุณภาพ

2. การตรวจสอบคุณภาพเมล็ดพันธุ์

2.1 การตรวจสอบความงอกมาตรฐาน (standard germination test) ทำตามวิธีการของ ISTA (1985) โดยนำเมล็ดพันธุ์จำนวน 25 เมล็ด วางเรียงบนกระดาษเพาะที่ทำให้ชื้นด้วยน้ำกลั่น ม้วนกระดาษหลวมๆแล้วนำไปใส่ในกล่องพลาสติก ปิดฝากล่อง นำไปเพาะไว้ในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 25 องศาเซลเซียส ประเมินผลความงอกโดยนับต้นกล้าที่งอกปกติภายหลังเพาะได้ 5 และ 8 วัน บันทึกผลเป็นเปอร์เซ็นต์ความงอก (%) ทำ 3 ซ้ำ

2.2 การตรวจสอบการรั่วไหลของเมล็ดพันธุ์ โดยการวัดค่าการนำไฟฟ้า (electrical conductivity, EC) ตามวิธีการของ AOSA (1983) โดยชั่งน้ำหนักเมล็ดพันธุ์จำนวน 25 เมล็ด แช่เมล็ดพันธุ์ในบีกเกอร์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีน้ำ deionized water อยู่ 75 มิลลิลิตร ปิดปากบีกเกอร์ด้วยอลูมิเนียมฟอยล์ นำไปไว้ในที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส ตรวจสอบค่าการนำไฟฟ้าของสารที่รั่วไหลออกมาจากเมล็ดหลังจากแช่เมล็ดพันธุ์ไว้นาน 24 ชั่วโมง บันทึกค่าการนำไฟฟ้า มีหน่วยเป็นไมโครซีเมน / เซนติเมตร / กรัมเมล็ด ($\mu\text{s} / \text{cm} / \text{g seed}$) ทำ 3 ซ้ำ

2.3 การตรวจสอบปริมาณและคุณภาพดีเอ็นเอ ทำโดยการสกัดดีเอ็นเอจากเมล็ดพันธุ์ 10 เมล็ด ตามวิธีการที่ประยุกต์จากวิธีการของ Dellaporta *et al.* (1983) ดังนี้ บดเอ็มบริโอ (embryo) จาก 10 เมล็ดในไนโตรเจนเหลวที่บรรจุในโถงอย่างรวดเร็วให้ละเอียดแล้วเติม extraction buffer (200 mM Tris-HCl pH8.0, 200 mM NaCl, 25 mM EDTA, 0.5% SDS) 400 ไมโครลิตร ตูดสารละลายจากโถงใส่ลงในหลอด 1.5 มิลลิลิตร เติม proteinase K (10 mg/ml) 1 ไมโครลิตร กลับหลอดไปมา แล้วนำไปบ่มที่ 65 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที เติม 2x CTAB (2% CTAB, 100mM Tris-HCl pH8.0, 1.4 M NaCl, 25 mM EDTA pH 8.0) 400 ไมโครลิตร กลับหลอดไปมา บ่มที่ 65 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที เติม chloroform: isoamyl (24:1) 700 ไมโครลิตร กลับหลอดไปมาเบาๆนาน 10 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบ/นาที นาน 10 นาที ตูดสารละลายชั้นบนใส่ในหลอดใหม่ เติม 10% CTAB (CTAB, 5 M NaCl ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส) ในปริมาณ 1/10 เท่าของปริมาตรสารที่ตูดออกมา กลับหลอดไปมา 3 นาที แล้วเติม chloroform: isoamyl (24:1) 700 ไมโครลิตร กลับหลอดไปมาเบา ๆ 10 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบ/นาที นาน 10 นาที ตูดสารละลายชั้นบนใส่ในหลอดใหม่ เติม absolute ethanol ที่เย็นจัด ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันเบาๆ จนเห็นตะกอนดีเอ็นเอ ใช้ hook เขี่ยเอา DNA ขึ้นมา จากนั้นนำไปจุ่มล้างใน 70% ethanol และ 90% ethanol ที่เย็น ตามลำดับ แล้วนำไปผึ่งให้แห้ง ละลายตะกอน DNA ที่ติดปลาย hook ด้วย TE (Tris-EDTA, 10:0.1) 50 ไมโครลิตร เติม RNase A (10 mg/ml) ปริมาตร 1 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ซ้ำมึน แล้วเก็บ DNA ไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นนำดีเอ็นเอที่ได้บางส่วนมาตรวจวัดปริมาณด้วยเครื่องตรวจวัดปริมาณ

ดีเอ็นเอ (Thermo Science รุ่น Nanodrop 2000) และนำดีเอ็นเอบางส่วนมาตรวจสอบคุณภาพโดยอะกาโรส เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (agarose gel electrophoresis) ที่ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ใน 1X TBE (Tris borate EDTA) buffer

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การตรวจสอบความงอกมาตรฐานและการร่วไหลของเมล็ดพันธุ์

1.1 ความงอกมาตรฐานของเมล็ดพันธุ์

ความงอกของเมล็ดพันธุ์ทั้ง 2 พันธุ์ ลดลงอย่างต่อเนื่องตามระยะเวลาการเร่งอายุที่เพิ่มขึ้น โดยในช่วง 3 วันแรกของการเร่งอายุ เปอร์เซ็นต์ความงอกลดลงเล็กน้อย และลดลงอย่างรวดเร็วหลังจากการเร่งอายุเป็นระยะเวลา 4 วันเป็นต้นไป (Figure 1) โดยพบว่าเมล็ดพันธุ์เชียงใหม่ 60 ซึ่งเป็นพันธุ์ที่อ่อนแอต่อการเสื่อมคุณภาพ มีเปอร์เซ็นต์ความงอกต่ำกว่าเมล็ดพันธุ์ Fort Lamy ซึ่งเป็นพันธุ์ที่ต้านทานต่อการเสื่อมคุณภาพ (Table 1)

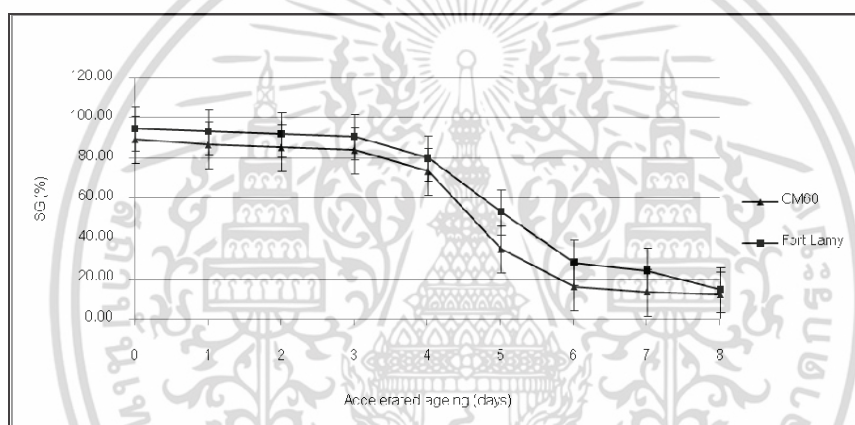


Figure 1 Effect of accelerated ageing on standard germination (SG) (%) of CM 60 and Fort Lamy seeds.

Table 1 Percentage of standard germination after accelerated ageing of CM 60 and Fort Lamy seeds.

Accelerated ageing (days)	Standard germination \pm SD* (%)	
	CM 60	Fort Lamy
0	89.33 \pm 4.62	94.67 \pm 2.31
1	86.67 \pm 2.31	93.33 \pm 2.31
2	85.33 \pm 4.62	92.00 \pm 0.00
3	84.00 \pm 4.00	90.67 \pm 2.31
4	73.33 \pm 4.62	80.00 \pm 4.00
5	34.67 \pm 2.32	53.33 \pm 2.31
6	16.00 \pm 4.00	28.00 \pm 6.93
7	13.33 \pm 6.11	24.00 \pm 8.00
8	12.00 \pm 6.93	14.67 \pm 4.00

* Standard deviation

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้拿去ใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.2 การร่วไหลของเมล็ดพันธุ์

การร่วไหลของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองทั้ง 2 พันธุ์เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วและต่อเนื่องตั้งแต่วันที่ 3 ของการเร่งอายุ โดยพบอัตราการร่วไหลในเมล็ดพันธุ์ Fort Lamy น้อยกว่าในเมล็ดพันธุ์เชียงใหม่ 60 (Figure 2 และ Table 2)

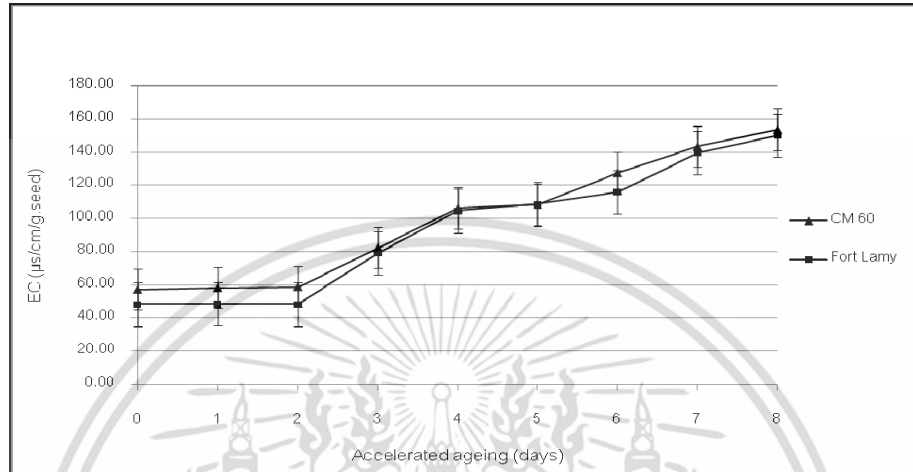


Figure 2 Effect of accelerated ageing on electrical conductivity (EC) ($\mu\text{s}/\text{cm}/\text{g seed}$) of CM 60 and Fort Lamy seeds.

Table 2 Electrical conductivity (EC) after accelerated ageing of CM 60 and Fort Lamy seeds.

Accelerated ageing (days)	Electrical conductivity \pm SD ($\mu\text{s}/\text{cm}/\text{g seed}$)	
	CM 60	Fort Lamy
0	57.27 \pm 2.58	48.32 \pm 2.95
1	58.29 \pm 5.02	48.49 \pm 0.46
2	58.97 \pm 0.9	48.32 \pm 5.15
3	82.60 \pm 11.19	79.28 \pm 1.47
4	106.41 \pm 10.56	104.59 \pm 10.35
5	108.50 \pm 2.91	108.63 \pm 10.85
6	127.64 \pm 2.30	116.10 \pm 17.04
7	143.47 \pm 28.20	139.77 \pm 19.58
8	153.71 \pm 12.46	150.21 \pm 0.60

* Standard deviation

การศึกษาความงอกมาตรฐานและการร่วไหลของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองในขณะที่มีการเร่งอายุนี้ให้ผลสอดคล้องกับการศึกษาการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดในถั่วเหลือง โดยอารมย์ และคณะ (2549) และ Vieira *et al.* (1999) ในฝ่ายโดย Goel *et al.* (2003) และในถั่วซิดีโดย Kapoor *et al.* (2010) ทั้งนี้พบว่าหลังจากการเร่งอายุความงอกของเมล็ดพันธุ์ลดลงในขณะที่มีการร่วไหลของสารจากเมล็ดเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการเร่งอายุที่มากขึ้น การ

รั้วไหลของสารเกิดจากการสูญเสียความสามารถของเยื่อหุ้มเซลล์ของเมล็ดในการเก็บรักษาสารต่างๆ ที่อยู่ภายในเมล็ด (Delouche and Baskin, 1973)

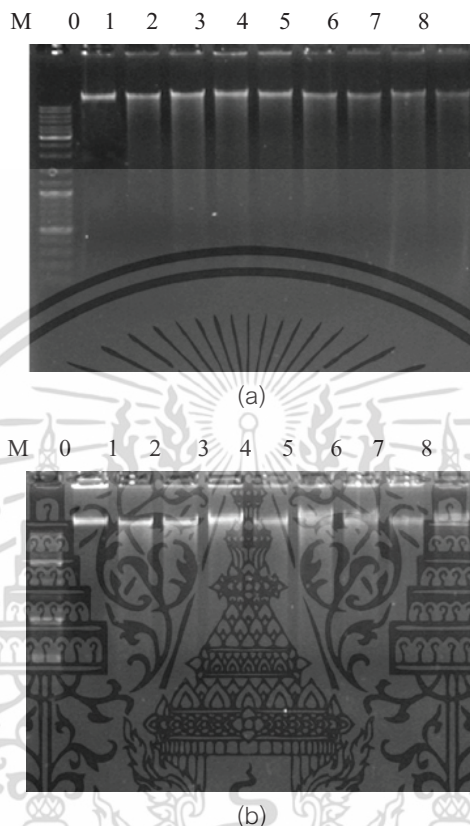


Figure 3 Genomic DNA from soybean seeds cv. CM 60 (a) and Fort Lamy (b) after 0-8 days of accelerated ageing test (M=100 bp DNA Ladder).

2. การตรวจสอบคุณภาพและปริมาณดีเอ็นเอ

จากการตรวจสอบคุณภาพของจีโนมดีเอ็นเอจากเอ็มบริโอของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองพันธุ์ เชียงใหม่ 60 และพันธุ์ Fort Lamy ที่เก็บเกี่ยวที่ระยะสุกแก่ทางสรีรวิทยา และเร่งอายุเป็นเวลา 1-8 วัน พบว่าเมล็ดพันธุ์ทั้ง 2 พันธุ์ที่ยังไม่ผ่านการเร่งอายุมีดีเอ็นเอที่มีคุณภาพดีที่สุดในเมล็ดพันธุ์ที่ผ่านการเร่งอายุ 1 วัน ดีเอ็นเอเริ่มมีการเสื่อมสภาพเกิดขึ้นโดยพบเป็นแถบ smear ของจีโนมดีเอ็นเอที่มีขนาดยาวขึ้น และการเสื่อมสภาพของดีเอ็นเอเพิ่มมากขึ้นเรื่อยๆตามจำนวนวันของการเร่งอายุที่เพิ่มขึ้น โดยดีเอ็นเอของเมล็ดพันธุ์ที่เร่งอายุ 8 วันมีการเสื่อมสภาพมากที่สุด เนื่องจากพบแถบ smear ของจีโนมดีเอ็นเอที่มีขนาดยาวที่สุด (Figure 3a and 3b) ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับการศึกษาของ Smith and Berjak (1995) ที่พบการเปลี่ยนแปลงอื่นๆ ของโครงสร้างในระดับเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ ได้แก่ การจับตัวกันเป็นก้อนของโครมาติน (chromatin) ความผิดปกติของนิวเคลียสและความเสียหายของไรโบโซม (ribosome) รวมทั้งโพลีโซม (polysome) ซึ่งการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นเหล่านี้ น่าจะส่งผลกระทบต่อระบบการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ อาร์เอ็นเอและโปรตีน อภิสรี (2547) พบว่าการเสื่อมของดีเอ็นเอก่อนเกิดการรั้วไหลของเมล็ด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้拿去ไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พันธุ์และการสูญเสียความงอกตามลำดับ อาจเกิดจากความผิดปกติในกิจกรรมของเอนไซม์ในเมล็ดที่มีการเร่งอายุ และการเพิ่มขึ้นของเอนไซม์นิวคลีเอสตามอายุของเมล็ดพันธุ์ที่เพิ่มขึ้น (Spanò *et al.*, 2007)

ส่วนปริมาณดีเอ็นเอในเมล็ดนั้นพบว่าเมล็ดพันธุ์ที่ไม่ผ่านการเร่งอายุมีปริมาณดีเอ็นเอมากที่สุด และปริมาณดีเอ็นเอในเมล็ดของทั้ง 2 พันธุ์ลดลงอย่างต่อเนื่องตามระยะเวลาการเร่งอายุเมล็ดพันธุ์ โดยเมล็ดพันธุ์เชียงใหม่ 60 ที่ผ่านการเร่งอายุเป็นเวลา 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 และ 8 วัน มีปริมาณดีเอ็นเอในเมล็ด 98.58, 78.01, 77.75, 69.80, 51.41, 30.37, 29.29, 11.88 และ 9.71 นาโนกรัม/ ไมโครลิตร ตามลำดับ ส่วนปริมาณดีเอ็นเอในเมล็ดพันธุ์ Fort Lamy เท่ากับ 103.48, 80.93, 77.52, 69.33, 59.92, 35.96, 32.14, 15.44 และ 12.53 นาโนกรัม/ ไมโครลิตร ตามลำดับ

สรุป

จากการเร่งอายุของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองทั้ง 2 พันธุ์เพื่อตรวจสอบการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ พบว่าการเปลี่ยนแปลงเกิดขึ้นดังนี้ การเสื่อมคุณภาพของดีเอ็นเอเกิดขึ้นภายหลังการเร่งอายุ 1 วัน ตามด้วยการรั่วไหลของสารออกจากเมล็ดในวันที่ 3 ของการเร่งอายุ และการลดลงของความงอกมาตรฐานอย่างรวดเร็วในวันที่ 4 ของการเร่งอายุ โดยพบว่าการเสื่อมคุณภาพของดีเอ็นเอ และการรั่วไหลของสารออกจากเมล็ดเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการเร่งอายุที่เพิ่มขึ้นขณะที่ความงอกของเมล็ดลดลง

เอกสารอ้างอิง

- วันชัย จันทร์ประเสริฐ. 2538. ศรีวิทย์เมล็ดพันธุ์. ภาควิชาพืชไร่. คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.
- อภิสิทธิ์ มีกลาง. 2547. การเปลี่ยนแปลงของดีเอ็นเอ เยื่อหุ้มเซลล์ และความมีชีวิตของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองในระหว่างการเสื่อมคุณภาพ. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาพืชไร่. บัณฑิตวิทยาลัย. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. กรุงเทพฯ.
- อารมย์ ศรีพิจิตร, อภิสิทธิ์ มีกลาง และวิภา หงษ์ตระกูล. 2549. การเปลี่ยนแปลงของดีเอ็นเอ การรั่วไหล ความงอก และความแข็งแรงของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองในระหว่างการเสื่อมคุณภาพ. ว.เกษตรพระจอมเกล้า 24 : 3 (68-83).
- AOSA. 1983. Seed vigor testing handbook: Contribution. No. 32. The Association of Official Seed Analyst.
- Basavarajappa, B.S., Shetty, H.S. and Prakash, H.S. 1991. Membrane deterioration and other biochemical changes, associated with accelerated aging of maize seeds. Seed Sci. and Technol. 19 : 279-286.
- Delouche, J.C. and Baskin, C.C. 1973. Accelerated aging techniques for predicting the relative storability of seed lots. Seed Sci. and Technol. 1 : 427-452.
- Dellaporta, S.L., Wood, J. and Hicks, J.B. 1983. A plant DNA miniprep: version II. Plant Mol. Biol. 1 : 19-21.
- Franca Neto, J.B., Henning, A.A. and Krzyzanowski, F.C. 1994. Seed production and technology for the tropics, pp 217-240. In Tropical soybean: Improvement and Production. Plant production and protection series 27. FAO, Rome.
- Goel, A., Goel, A.K. and Sheoran, I.S. 2003. Changes in oxidative stress enzymes during artificial ageing in cotton (*Gossypium hirsutum* L.) seeds. J. of Plant Physiol. 160 : 1093-1100.
- McDonald, M.B. and Phaneendranath, B.R. 1978. A modified accelerated ageing seed vigor test for soybeans. J. Seed Technol. 3 : 27-37.
- ISTA . 1985 . International rules for seed testing. Seed Sci. and Technol. 13: 299-355.
- Kapoor, N., Arya, A., Siddiqui, M.A., Amir, A. and Kumar, H. 2010. Seed deterioration in chickpea (*Cicer arietinum* L.) under accelerated ageing. Asian J. Plant Sci. 9: 158-162.
- Perez, M.A. and Arguello, J.A. 1995. Deterioration in peanut (*Arachis hypogaea* L. cv.Florman) seeds under natural and accelerated ageing. Seed Sci. and Technol. 23 : 439-445.
- Smith M.T., Berjak P. 1995. Deteriorative changes associated with the loss of viability of stored desiccation-tolerant and desiccation-sensitive seeds. pp. 701-746. In Kigel J. and Galili G.(ed). Seed development and germination. Marcel Dekker, New York.
- Spanò, C., Buselli, R., Castiglione, M.R., Bottega, S. and Grilli, I. 2007. RNases and nucleases in embryos and endosperms from naturally aged wheat seeds stored in different conditions. J. of Plant Physiol. 164 : 487-495.

- Stewart, R.C. and Bewley, J.D. 1980. Lipid peroxidation associated with accelerated ageing of soybean axes. *Plant Physiol.* 65 : 245-248.
- Sung, J.M. and Chui, C.C. 1995. Lipid peroxidation and peroxide-scavenging enzymes of naturally aged soybean seed. *Plant Sci.* 110 :45-52.
- Vieira, R.D., Paiva-Aguero, J.A., Percin, D. and Bittencourt, S.R. 1999. Correlation of electrical conductivity and other vigor tests with field emergence of soybean seedlings. *Seed Sci. and Technol.* 27 : 67-75.



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้