บทที่ 4

วิจารณ์ผลการทดลอง

ในการทดลองครั้งนี้มีเป้าหมายหลักคือการคัดเลือกดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่างระหว่างปาล์มน้ำมันสามแบบ โดยใช้ตัวอย่างปาล์มน้ำมันจากศูนย์วิจัยพืชสวนสุราษฎร์ธานี สถาบันวิจัยพืชสวน กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เนื่องจากต้องการตัวอย่างที่ทราบประวัติความเป็นมาแน่นอน เพื่อลดความแปรปรวนของแบบแผนดีเอ็นเออันเนื่องมาจากเป็นความแตกต่างของคู่ผสม การทดลองแบ่งออกเป็น 2 ส่วนใหญ่ๆ คือ ส่วนแรกเป็นการศึกษาหาเครื่องหมายดีเอ็นเอที่สามารถใช้แยกความแตกต่างระหว่างพันธุ์ปาล์มน้ำมันด้วยเทคนิคต่างๆ และส่วนที่สองคือการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอนั้นๆ ทดสอบกับตัวอย่าง เพื่อค้นหาแถบดีเอ็นเอที่เป็น polymorphic DNA

1. การเตรียมโครโมโซมอลดีเอ็นเอ

ในการสกัดโครโมโซมอลดีเอ็นเอได้ใช้วิธีสกัดสองวิธีคือ CTAB method และ DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) สาเหตุที่เลือกใช้สองวิธีคือในเบื้องต้นได้เลือกวิธี CTAB เนื่องจากเป็นวิธีที่ประหยัดและต้องการเตรียมโครโมโซมอลดีเอ็นเอปริมาณมากจากตัวอย่างเพียงสามตัวอย่างสำหรับใช้เตรียมห้องสมุดดีเอ็นเอ ส่วนวิธีที่สองเป็นวิธีที่สะดวกรวดเร็วและหลีกเลี่ยงการใช้สารพิษ เช่น Phenol เหมาะสำหรับใช้เตรียมกับตัวอย่างหลายๆ ตัวอย่าง ตัวอย่างละไม่มากเพื่อใช้ทำพีซีอาร์ต่อไป อย่างไรก็ตามพบว่าทั้งสองวิธีต่างให้ดีเอ็นเอคุณภาพใกล้เคียงกัน แม้วิธีแรกจะประหยัดแต่ก็ใช้สารเคมีที่เป็นพิษในการเลือกใช้แต่ละวิธีจึงขึ้นอยู่กับสถานการณ์ความเหมาะสมในการทดลองแต่ละครั้ง

2. การคัดเลือกไมโครแซตเทลไลท์ดีเอ็นเอ

การทดลองนี้เลือกที่จะใช้ไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอ เนื่องจากมีรายงานความสำเร็จของการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอประเภทนี้ในพืชอื่นๆ เช่น หัวหอม (Fischer and Bachmann, 1998), มะพร้าว (Perera *et. al.*, 2000) และ ข้าว (Thanh, 1999) เป็นต้น โดยการทดลองระบุว่าสามารถใช้จำแนกชนิดและสายพันธุ์ได้ดี ตลอดจนสามารถนำมาใช้ศึกษา population genetics และ linkage analysis นอกจากนั้น Billotte และคณะ (2001) ได้เคยรายงานการเตรียม microsatellite DNA จากปาล์มน้ำมัน และคาดว่าจะสามารถใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอดังกล่าวในการทำ linkage map เพื่อค้นหาความสัมพันธ์ระหว่าง ดูรา, พิสิเฟอรา และ เทเนรา ตลอดจนการทำ Quantitative Trait Loci (QTL) ในอนาคต อย่างไรก็ตามเครื่องหมายดีเอ็นเอของ Billotte และคณะ (2001) ก็ไม่เป็นที่เปิดเผย ทำให้ไม่สามารถนำข้อมูลมาต่อยอดงานวิจัยได้ จึงได้เริ่มต้นเตรียมเอง โดยเตรียมห้องสมุดดีเอ็นเอสองชนิดคือ $(CA)_n$ และ $(GA)_n$ ในการเตรียมห้องสมุดดีเอ็นเอได้ใช้เทคนิคการคัดเลือกแบบจำเพาะ (hybridization based capture) เพื่อให้ได้โคลนที่มีจำนวนของ repeated sequence สูง ภายหลังการเตรียมห้องสมุดดีเอ็นเอได้นำโคลนต่างๆ มาทดสอบซ้ำด้วยวิธี dot blot hybridization กับดีเอ็นเอตรวจจับชนิด $(CA)_{15}$ และ $(GA)_{15}$ ก็ปรากฏว่ามีจำนวนทั้งสิ้น 57 โคลนที่คาดว่าจะมีลำดับเบสเป็น repeat sequences ซึ่งได้สุ่มนำไปหาการเรียงดับเบสจำนวน 32 โคลน พบว่ามีอยู่ 10 โคลนที่เป็น repeated sequence จริง ส่วนที่เหลือเป็น false positive ซึ่งคิดเป็น 68.75% ซึ่งนับว่ามาก ทั้งนี้อาจมีสาเหตุมาจาก การเตรียมห้องสมุดดีเอ็นเอครั้งนี้ไม่สมบูรณ์เท่าที่ควร ต้องปรับปรุงวิธีการเพิ่มเติม นอกจากนั้นในงานวิจัยครั้งนี้ไม่สามารถนำโคลนที่ได้ทั้งหมดไปหาการเรียงลำดับเบส เนื่องจากค่าใช้จ่ายค่อนข้างสูง งบประมาณการทำวิทยานิพนธ์ไม่เพียงพอที่จะสำรวจโคลนทั้งหมด อย่างไรก็ตามยังสามารถเก็บโคลนที่เหลือไว้เพื่อนำไปหาการเรียงลำดับเบสได้ในอนาคตเมื่อมีงบประมาณ ในจำนวนโคลนที่ทราบการเรียงลำดับเบสทั้งหมด 32 โคลน สามารถนำมาใช้ออกแบบไพรเมอร์ได้ 5 ชุด คือ MJT1/2, MJT2/3, MJT3/4, T:CT-1 และ T:CT-2/3 และนำไปใช้ทดสอบกับตัวอย่างในขั้นตอนต่อไป

3. การศึกษา polymorphic DNA ของปาล์มน้ำมันโดยใช้เทคนิคไมโครแซทเทลไลท์

การศึกษาในขั้นตอนนี้เป็นการทดสอบไพรเมอร์ทั้งห้าที่ได้มีการออกแบบมาจากการศึกษาในข้อ 2. โดยทดสอบกับปาล์มน้ำมันคู่ผสมทั้งสี่ คือ 105, 109, 110 และ 116 พบว่า ไพรเมอร์ MJT1 และ MJT2 ให้ polymorphic band 75% และ monomorphic band 25% สามารถจำแนกปาล์มน้ำมันคู่ผสม 105 และ 116 ด้วยแถบ CA1 และ CA2

4. การศึกษา polymorphic DNA ของปาล์มน้ำมันโดยใช้เทคนิค EPIC

เป็นเทคนิคที่ศึกษาส่วนที่เป็น intron ของยีน โดยมีหลักการว่าส่วนที่เป็น intron ของยีนที่ conserve มักมีความแตกต่างกันในตัวอย่าง โดยมีระดับความแตกต่างที่ nucleotide การใช้วิธีนี้เราสามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอได้ง่าย เนื่องจากออกแบบไพรเมอร์จากส่วนของยีนที่เป็น exon ซึ่ง conserve เพื่อให้ได้ชิ้นดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสภายในที่แตกต่าง (variable) จึงน่าจะเป็นวิธีการที่ประหยัดและง่าย ในการทดลองได้เลือกศึกษาในยีนสามชนิดคือ 1) glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (*G3pdh*) เมื่อทำการทดลองพบว่าแบบแผนดีเอ็นเอที่ได้ไม่มีความแตกต่างกันในแต่ละคู่ผสมของปาล์มน้ำมัน จึงไม่ได้ศึกษาต่อ 2) alcohol dehydrogenase (*Adh*) ในครั้งแรกที่ทำการศึกษาแบบแผนดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นมีความแตกต่างแต่ไม่ชัดเจนจึงได้ทดลองปรับเปลี่ยนอุณหภูมิ annealing พบว่าที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ให้แบบแผนดีที่สุด อย่างไรก็ตามแบบแผนไม่ชัดเจนพอที่จะใช้แยกความสัมพันธ์ในแต่ละคู่ผสมของปาล์มน้ำมัน จึงไม่เลือกใช้ยีนนี้ในการทดลองต่อ 3) calmodulin (*Cal*) ได้มีการศึกษาปรับเปลี่ยนอุณหภูมิ annealing ให้เหมาะสมคือที่ 45 องศาเซลเซียส จึงได้นำสภาวะที่เหมาะสมมาใช้เปรียบเทียบเพื่อค้นหา polymorphic band ต่อไป โดยพบว่าไพรเมอร์ CAMXIF และ CAMXIR ให้ polymorphic band 85% และ monomorphic band 15% สามารถจำแนกปาล์มน้ำมันคู่ผสม 105 และ 116 ด้วยแถบ CAM1 และ CAM2

5. การศึกษา polymorphic DNA ของปาล์มน้ำมันโดยใช้เทคนิค RAPD

เป็นเทคนิคที่ไม่ต้องอาศัยความรู้เบื้องต้นใดๆ เพียงแต่ต้องปรับสภาวะการทำพีซีอาร์ ให้เหมาะสมและสุ่มเลือกชนิดของไพรเมอร์ที่เหมาะสม ในการทดลองนี้ได้สำรวจไพรเมอร์ทั้งหมด 27 ชุด มีจำนวน 10 ชุด ที่ให้แบบแผนดีเอ็นเอออกมา แต่มีไพรเมอร์เพียงชุดเดียวคือ UBC 731 ที่ให้แบบแผน ดีเอ็นเอดีที่สุดซึ่งมี GC content 70 และได้ทดลองนำ UBC 731 ไปทดสอบกับตัวอย่างปาล์มน้ำมันเพื่อให้แบบแผนที่เกิดชัดเจนขึ้นจึงได้ปรับความเข้มข้นของดีเอ็นเอ และอุณหภูมิ annealing จนได้แบบแผนที่ชัดเจน โดยไพรเมอร์ดังกล่าว ให้ polymorphic band 60% และ monomorphic band 40% สามารถจำแนกปาล์มน้ำมันคู่ผสม 105 และ 110 ด้วยแถบ RAP1 และ RAP2