บทที่ 4

วิจารณ์ผลการทดลอง

1. การศึกษา intron ของยีน Malate synthase (MS) ในปาล์มน้ำมันด้วยเทคนิค EPIC-PCR

EPIC-PCR เป็นเทคนิคที่ศึกษาส่วนที่เป็น intron ของยีน โดยออกแบบไพรเมอร์จากส่วนของ exon ซึ่งเป็นบริเวณอนุรักษ์ มีหลักการว่าส่วนที่เป็น intron ของยีนที่อนุรักษ์ มักมีความแตกต่างกันในตัวอย่าง โดยมีระดับความแตกต่างที่นิวคลีโอไทด์ การใช้วิธีนี้ทำให้สามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอได้ง่าย เนื่องจากใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะสูง แต่ได้ชิ้นดีเอ็นเอที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์แตกต่างกันภายในทำให้เหมาะกับการนำมาใช้ศึกษา phylogenetic ในปาล์มน้ำมัน เพื่อค้นหาเครื่องหมายพันธุกรรมในการจำแนกพันธุ์ปาล์มน้ำมัน ในการทดลองได้เลือกศึกษาในยีน MS เพราะเป็น single-copy nuclear genes ทำให้ลดปัญหาในการวิเคราะห์ข้อมูลอันเนื่องมาจากความแปรปรวนในตำแหน่งบริเวณที่ทำการศึกษา เนื่องมาจากมีการพบว่าหากเลือกศึกษาที่มีหลาย copy หรือมีหลาย multigene families ทำให้เกิดความสับสนในการประมวลและสรุปผลข้อมูลที่แน่นอน (Lewis and Doley, 2001) ในการศึกษาครั้งได้ทดลองและออกแบบไพรเมอร์จนกระทั่งได้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะในการศึกษาความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันของพันธุ์ปาล์มน้ำมันจากตัวอย่างจำนวน 3 คู่ผสม ด้วย EPIC-PCR คือไพรเมอร์ MS01 และ MS01r พบว่านำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากตัวอย่างปาล์มน้ำมันจากทั้ง 3 คู่ผสม เมื่อศึกษา phylogenetic ด้วยโปรแกรม PHYLIP เพื่อหาความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันของตัวอย่างพบว่ากลุ่มตัวอย่างใน คู่ผสม 116 จะแยกออกจาก คู่ผสม 105 และ 109 ได้แต่เมื่อนำข้อมูลทั้งหมดมาวิเคราะห์รวมกัน จะยังไม่สามารถที่จะจำแนกปาล์มทั้งสามพันธุ์ (type) คือ เทเนอรา (T) ดูรา (D) และ พิสิเฟอรา (P) ออกเป็นจากกันได้ทั้งหมด แต่เมื่อมาพิจารณาภายในตัวอย่างของแต่ละคู่ผสม พบว่าสามารถที่แยกพันธุ์ปาล์มน้ำมันออกจากกันได้ เช่นกรณี คู่ผสม 105 พบว่าสามารถที่จะแยกพันธุ์ พิสิเฟอรา (P) ออกจากพันธุ์ เทเนอรา (T) และ ดูรา (D) ได้ แต่เมื่อพิจารณาในคู่ผสม อื่นๆ พบว่าสามารถที่จะแยกปาล์มน้ำมันออกจากกันได้ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับงานของ กณพ และคณะ (2546) ที่ใช้ไพรเมอร์ CAMXIF และ CAMXIR ที่ได้จากยีน Calmodulin ด้วยเทคนิค EPIC-PCR และไพรเมอร์ MJT1 และ MJT2 ที่ได้จากการเตรียม Microsatellite DNA ที่เป็น $(CA)_n$ repeat ซึ่งสามารถแยกคู่ผสมของ 105 109 และ 116 ออกจากกันได้ แต่ยังไม่สามารถแยก ดูรา (D) เทเนอรา (T) และ พิสิเฟอรา (P) ออกจากกัน

2. การศึกษายีน Acetyl CoA Carboxylase, Carboxyl Transferase subunit beta (*accD*) ในปาล์มน้ำมัน

2.1 การโคลน *accD* และการสังเคราะห์ cDNA สายเต็ม (Full length cDNA) ของยีน *accD*

จากการโคลนยีน *accD* เริ่มแรกโดยเทคนิค RT-PCR ได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ขนาด 395 นิวคลีโอไทด์ มีความเหมือนกับยีน *accD* ที่พบจากพืชชนิดอื่นในฐานข้อมูลธนาคารยีนสูงถึง 90-97% คาดว่าผลผลิตของ RT-PCR ที่ได้เป็นยีน *accD* ในปาล์มน้ำมันจริง ดังนั้นจึงทำการสังเคราะห์ cDNA สายเต็มของยีน *accD* จากใบปาล์มน้ำมัน พบว่ามี ORF 1530 นิวคลีโอไทด์ แปลรหัสได้อะมิโน 509 ชนิด มีค่า pI เป็น 5.29 และคำนวณน้ำหนักโมเลกุลได้เป็น 57.54 กิโลดาลตัน เมื่อศึกษาความเหมือนในสายโพลีเปปไทด์ของ β-CT หรือ accD ที่พบในปาล์มน้ำมันกับพืชชนิดอื่นๆ พบว่าด้านปลาย NH_2 จะมีความหลากหลาย (variation) สูงทั้งนี้คาดว่าน่าจะเกิด proteolysis หลังจากที่ทำการแปลรหัสอะมิโน ซึ่งอาจจะมีกระบวนการ post-translational ก่อนที่จะมีการจับกับ α-CT ได้เป็น CT complex ($\alpha_2\beta_2$) (Sasaki *et al.*, 2001) และจากการที่พบตำแหน่งอนุรักษ์ putative zinc finger motif พบใน β-CT ของปาล์มน้ำมันได้เช่นเดียวกับ β-CT ที่พบพืชชนิดอื่นๆ เช่น สาหร่าย และแบคทีเรีย (Sasaki *et al.*, 2001) จึงมีความเป็นไปได้ว่าตำแหน่งที่เกิดการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ β-CT อยู่บริเวณทางด้านปลาย COOH ของสาย โพลีเปปไทด์ จึงทำให้ด้านปลาย COOH ที่พบมีความเหมือน (homology) มากกว่าทางด้าน NH_2 เมื่อพิจารณาค่า pI ของ β-CT จากในปาล์มน้ำมันเป็น 5.29 จัดเป็น acidic protein เช่นเดียวกับ β-CT จากพืชอื่นเช่น *Glycine max* ซึ่ง β-CT มีค่า pI เป็น 5.7 ในขณะที่ α-CT ค่า pI เป็น 9.7 และจากการศึกษาการเร่งปฏิกิริยาของ CT complex ($\alpha_2\beta_2$) ที่ได้จาก *Glycine max* ทั้งในสภาพ recombinant และสภาพธรรมชาติพบว่าจะไม่เร่งปฏิกิริยาในช่วง pH 6.5-8.5 แต่จากการศึกษาการเร่งปฏิกิริยาของ CT complex ที่รวมตัวกับหน่วยย่อย BC-BCCP complex แล้วได้เป็น heteromeric ACCase พบว่าจะสามารถที่เร่งปฏิกิริยาได้ดีในช่วง pH 7-8 ทั้งอาจจะเป็นผลมาจากที่ CT complex รวมตัวกันกับหน่วยย่อย BC-BCCP complex ทำให้ลักษณะทางกายภาพเปลี่ยนแปลงไป จึงผลต่อค่า pH ที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาของ CT เปลี่ยนแปลงไปอยู่ในช่วง 7-8

2.2 การแสดงออกของยีน *accD* ในปาล์มน้ำมัน

ACCase เป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาตัวแรกของการสังเคราะห์กรดไขมัน โดยทำหน้าที่ในการเปลี่ยน Acetyl-CoA เป็น Malonyl-CoA ในกระบวนการสังเคราะห์กรดไขมันในพืช ACCase มี 2 แบบคือ Homomeric ACCase พบได้ในไซโตพลาสซึมของพืช และ Heteromeric ACCase พบได้ในพลาสติดของพืชยกเว้นพืชตระกูล Graminae มี 4 หน่วยย่อย คือ BC, BCCP, α-CT และ β-CT โดยยีน *accD* จะพบอยู่ในจีโนมของ พลาสติดในขณะที่ยีนอื่นๆ จะพบอยู่ในจีโนมของนิวเคลียสของเซลล์ โดยแต่ละหน่วยย่อยของ Heteromeric ACCase จะมีขนาดแตกต่างกัน และแต่ละหน่วยย่อยที่พบในแต่ละชนิดของพืชก็จะมีขนาดแตกต่างกัน แต่ก็จะมีตำแหน่งอนุรักษ์ที่สามารถจะพบได้ในพืชส่วนใหญ่ (Egli *et al.*, 1993; Gornicki *et al.*, 1994; Sasaki *et al.*, .1995; Ke *et al.*, 2000; Crona *et al.*, 2002; Madoka *et al.*, 2002; Nikolau *et al.*, 2003)

ในการศึกษาครั้งนี้เลือกศึกษา Heteromeric ACCase หน่วยย่อย β-CT ในปาล์มน้ำมัน(ในที่นี้แทนด้วย *accD*) เนื่องจากมีการทดลองพบว่าในระหว่างการเจริญเติบโตของเมล็ดเรพ (*Brassica napus*) อัตราการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ ACCase เพิ่มขึ้นควบคู่กับปริมาณไขมันที่เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วงตั้งแต่วันที่ 18 จนมีค่าสูงสุดในวันที่ 22 หลังจากนั้น ปริมาณไขมันมีค่าคงที่ แต่แอคทิวิตีของเอนไซม์ ACCase เริ่มลดลงจนต่ำสุดในวันที่ 34 (Turnham and Northcote 1982) ต่อมา Roesler และคณะ (1997) ทดลองส่งผ่าน (transgenic) *Arabidopsis*-multifunctional ACCase เข้าไปในพลาสติดของ *B. napus* พบว่ามีปริมาณน้ำมันในเมล็ดเรพเพิ่มขึ้น 5% และจากการศึกษาของ Madoka และคณะ (2002) ในใบยาสูบพบว่าการเพิ่มปริมาณการแสดงออกของยีน *accD* ในระดับการ transcription จะมีผลให้มีระดับการแสดงออกของยีนอื่นๆ ที่อยู่ในจีโนมของนิวเคลียสของเซลล์เพิ่มขึ้นและเพิ่มการเร่งปฏิกิริยาของ multi-subunit ACCase ในพลาสติดนั้นคือเมื่อระดับของ multi-subunit ACCase เพิ่มขึ้นทำให้มีปริมาณ Malonyl-CoA มากขึ้นและส่งผลเพิ่มปริมาณการสังเคราะห์กรดไขมันมากขึ้น และนอกจากนี้ยังพบว่าการเพิ่มปริมาณการแสดงออกของยีน *accD* ส่งผลให้ต้นใบยาสูบมีการปริมาณเมล็ดเพิ่มขึ้นเป็น 2 เท่าเมื่อเทียบกับต้นยาสูบปกติ จากข้อมูลข้างต้นจึงมีความเป็นไปได้ว่าปริมาณการแสดงออกของยีน *accD* จะมีผลให้พืชมีเมล็ดมากขึ้น ทำให้ปริมาณผลผลิตน้ำมันที่ได้ต่อต้นของพืชให้น้ำมันก็จะมีมากขึ้นด้วยเช่นกัน ดังนั้นจึงเลือกที่จะศึกษาปริมาณการแสดงออกของยีน *accD* ในปาล์มน้ำมัน เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานในการศึกษาเพื่อปรับปรุงพันธุ์ปาล์มเพื่อเพิ่มปริมาณผลิตน้ำมันปาล์มและผลผลิตต่อทะลายปาล์มน้ำมันให้มากขึ้น

จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าระดับปริมาณการแสดงออกของ *accD* ในตัวอย่างเนื้อเยื่อแคลลัสและใบจากการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอปาล์มน้ำมันพันธุ์เทเนอราที่เพาะเลี้ยงในสภาวะปลอดเชื้อ พบว่ามีค่าใกล้เคียงกัน แสดงให้เห็นว่า หากศึกษาระดับปริมาณการแสดงออกของ *accD* ในตัวอย่างเดียว

กันจะใช้ตัวอย่างส่วนแคลลัสหรือจากใบก็ได้เพราะผลที่ได้จะไม่แตกต่างกัน ดังนั้นในทางปฏิบัติหากศึกษาจากพืชที่ลงแปลงปลูกแล้วก็เลือกตรวจจากใบได้เนื่องจากสะดวกในการเก็บตัวอย่าง ถ้าเป็นการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อก็สามารถวิเคราะห์ได้ทั้งจากแคลลัสและใบ เมื่อพิจารณาปริมาณการแสดงออกของ *accD* ตัวอย่างใบปาล์มน้ำมันที่ได้จากการผสมเพื่อคัดเลือกพันธุ์จากภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติมีค่าเป็น 1.33 $\pm$ 0.145 ซึ่งมีปริมาณการแสดงออกของ *accD* มากกว่าตัวอย่างใบปาล์มน้ำมันจากศูนย์วิจัยพืชสวนสุราษฎร์ธานีซึ่งค่าปริมาณการแสดงออกของ *accD* เป็น 0.774 $\pm$ 0.207 เมื่อมาพิจารณาปริมาณการแสดงออกของ *accD* เทียบกับปริมาณน้ำมันปาล์มที่ได้ต่อทะลายที่มีข้อมูลเก็บไว้ที่ศูนย์วิจัยพืชสวนสุราษฎร์ธานี พบว่าค่าที่ได้มีความใกล้เคียงกันไม่สามารถที่จะสรุปผลได้แน่นอนเพราะ จากรายงานของ ศูนย์วิจัยพืชสวนสุราษฎร์ธานี จะระบุว่าตัวอย่าง 1501 มีปริมาณน้ำมันปาล์มที่ได้ต่อทะลายอยู่ในระดับต่ำและตัวอย่าง 1561 มีปริมาณน้ำมันปาล์มที่ได้ต่อทะลายอยู่ในระดับสูง และเมื่อขอข้อมูลตัวเลขมาเปรียบเทียบก็จะพบว่า ตัวอย่าง 1501 และ 1561 มีค่าปริมาณน้ำมันปาล์มที่ได้ต่อทะลายจะอยู่ในช่วง 23.236-28.284 และ 25.876-30.924 ตามลำดับ แต่เมื่อมาพิจารณาส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของทั้งปริมาณน้ำมันปาล์มที่ได้ต่อทะลายและปริมาณการแสดงออกของ *accD* ซึ่งมีค่าอยู่ในช่วง 0.5246-0.6714 และ 0.4796-0.6264 สังเกตได้ว่าเมื่อพิจารณาส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานแล้วค่าที่ได้จะอยู่ช่วงที่คาบเกี่ยวกันไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ดังนั้นการระบุผลผลิตของศูนย์วิจัยพืชสวนสุราษฎร์ธานี ว่าผลผลิตต่ำหรือสูงนั้นยังอาจมีความคลาดเคลื่อนได้ ในขณะที่ค่าการแสดงออกของ *accD* ค่อนข้างจะใกล้เคียงกันและสอดคล้องกับปริมาณปาล์มน้ำมันที่ใกล้เคียงกันด้วย อย่างไรก็ตามการดูปริมาณการแสดงออกด้วยวิธี RT-PCR ยังมีข้อบกพร่องอยู่ เป็นวิธีที่อาจใช้ได้ผลดีในกรณีที่มีความแตกต่างในระดับสูง สำหรับกรณีของยีน *accD* ของปาล์มน้ำมันคาดว่าจะต้องใช้ Real Time PCR ซึ่งจะมีความแม่นยำและเที่ยงตรงกว่า อย่างไรก็ตามวิธี RT-PCR ก็เหมาะที่จะเป็นงานสำรวจเบื้องต้น เพราะ สะดวกและประหยัดค่าใช้จ่าย

2.3 โคลนยีน Acetyl CoA carboxylase, Biotin Carboxylase subunit (*accC*) ในปาล์มน้ำมัน

BC เป็นหน่วยย่อยหนึ่งในสี่หน่วยย่อยของ ACCase โดยจะมีการจับกับหน่วยย่อย BCCP กลายเป็น BC-BCCP complex ก่อนที่จะรวมตัวกับ CT complex ($\alpha_2\beta_2$) แล้วได้เป็น heteromeric ACCase โดยหน่วยย่อย BC จะมีตำแหน่งจับสำหรับ biotin สำหรับในการเร่งปฏิกิริยาของ ACCase ในช่วงแรกโดยจะเร่งปฏิกิริยาการเกิดพันธะระหว่าง HCO_3 กับ ไบโอตินใน BCCP ก่อนที่เร่งปฏิกิริยาในช่วงที่สองโดยเอนไซม์ Carboxyltransferase (Blancard *et al.*, 1999) คาดว่า BC อาจจะมีความสัมพันธ์ในการสร้างน้ำมันในพืชเช่นเดียวกับ β-CT เนื่องเป็นหน่วยย่อยหนึ่งใน heteromeric

ของ ACCase ในที่นี้ทำเพียงการหาลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนเพื่อใช้ออกแบบไพรเมอร์ที่เหมาะสมสำหรับการทำ Real time PCR แต่ยังไม่สามารถศึกษาการแสดงออกของยีนเปรียบเทียบกับปริมาณผลผลิตน้ำมัน ทั้งนี้เนื่องจากจะต้องเลือกตัวอย่างที่ดี ซึ่งมีข้อมูลของผลผลิตปาล์มน้ำมันที่ถูกต้องเสียก่อน มิฉะนั้นจะทำให้เสียเวลาและค่าใช้จ่าย