บทนำ

ปาล์มน้ำมัน หรือ oil palm เป็นพืชที่ให้น้ำมันพืชที่มีคุณภาพดีเยี่ยมเหนือน้ำมันที่ได้จากพืชอื่นๆ นอกจากนี้คุณภาพและปริมาณน้ำมันที่สกัดได้จากปาล์มน้ำมันก็ยังสูงกว่าที่สกัดได้จากพืชน้ำมันชนิดอื่นๆ เช่น มะพร้าว ถั่วเหลือง

<u>แหล่งกำเนิดและความสำคัญในด้านเศรษฐกิจ</u>

ตามการสันนิษฐานในปัจจุบันเชื่อว่าปาล์มมีแหล่งกำเนิดอยู่ที่อัฟริกา เดิมใช้น้ำมันจากพืชนี้มาปรุงอาหารและใช้เป็นเครื่องสำอางเท่านั้น ปัจจุบันปาล์มน้ำมันกลายเป็นพืชที่มีความสำคัญอย่างยิ่ง เพราะจากปาล์มน้ำมันนี้เองสามารถสกัดน้ำมันได้ 2 ชนิด คือ น้ำมันจากเนื้อปาล์ม(mesocarp) เรียกว่า น้ำมันปาล์ม(palm oil) มีประมาณ 30-70% ของน้ำหนัก เดิมใช้ในการทำสบู่และในอุตสาหกรรมฉาบเหล็ก และโลหะต่างๆ แต่ในปัจจุบันได้นำมาใช้ในการบริโภคและประโยชน์ด้านอื่นๆ น้ำมันอีกชนิดหนึ่งที่สกัดได้ คือ น้ำมันที่ได้จากเมล็ดใน เรียกว่า น้ำมันเมล็ดปาล์ม(palm kernal oil) น้ำมันชนิดนี้มีประมาณ 50% ของน้ำหนักเมล็ดใน มีคุณสมบัติคล้ายคลึงกับน้ำมันมะพร้าว และเมื่อไม่นานมานี้ได้นำเอากรดไขมัน(fatty acid) จากน้ำมันชนิดนี้มาใช้ทำสารซักฟอก (detergent) และน้ำมันหล่อลื่นหลายอย่างโดยเฉพาะใช้ทำน้ำมันหล่อลื่นพิเศษที่ใช้กับเครื่องไอพ่นและจรวด ส่วนกากเมล็ดที่เหลือหลังจากการสกัดเอาน้ำมันออกแล้วยังสามารถนำมาใช้เป็นอาหารสัตว์และปุ๋ยได้

ปาล์มน้ำมันเป็นพืชจัดอยู่ในสกุล *Elaies* มี 3 ชนิด คือ *guineensis*, *oleifera* และ *odora* โดยถิ่นกำเนิดของปาล์มน้ำมันทั้ง 3 ชนิด สรุปได้ดังนี้ คือ

1.*Elaies guineensis* ปาล์มน้ำมันในกลุ่มนี้มีความสำคัญทางเศรษฐกิจที่นิยมปลูกกันเป็นการค้าในปัจจุบัน มีถิ่นกำเนิดอยู่ในอัฟริกาตอนกลาง และตะวันตก

2.*E.oleifera* มีถิ่นกำเนิดอยู่ในอเมริกา ไม่นิยมปลูกเป็นการค้าเนื่องจากมีการเจริญเติบโตช้า ผลขนาดเล็กและให้ผลผลิตน้ำมันต่ำกว่า *E.guineensis*

3.*E.odora* ปาล์มน้ำมันพวกนี้จะพบบริเวณเดียวกับ *E.oleifera* บทบาทและความสำคัญของปาล์มน้ำมันในกลุ่มนี้ยังไม่มีการรายงาน

<u>ความสำคัญทางด้านพฤกษศาสตร์</u>

ปาล์มน้ำมันเป็นพืชอยู่ในวงศ์เดียวกับพวก มะพร้าว ตาล จาก สละ ระกำ เป็นไม้ลำต้นเดี่ยวขึ้นตรง ไม่มีกิ่งก้าน

<u>ใบ</u> ใบของปาล์มน้ำมันดูเผินๆจะคล้ายใบมะพร้าว หรือใบจาก รูปใบทั้งหมดคล้ายขนนก คือมีก้านใบยาว และมีใบย่อยๆแตกออกตามแกนก้านใบ โดยมีใบยาวที่สุดอยู่ตรงกลาง ส่วนใบย่อยจะค่อยๆสั้นลง และมีหนามเล็กแหลมอยู่หนาแน่นตามริมโคนใบ

<u>ราก</u> รากของปาล์มน้ำมันเป็นพวกรากแขนงประสานกันไปมาอย่างหนาแน่น เช่นเดียวกับพวกพืชใบเลี้ยงเดี่ยวอื่นๆ รากพวกนี้จะกระจายออกไปอยู่ตามดินชั้นบน แต่ในสภาพที่เหมาะสมอาจหยั่งลึกลงไปในดิน

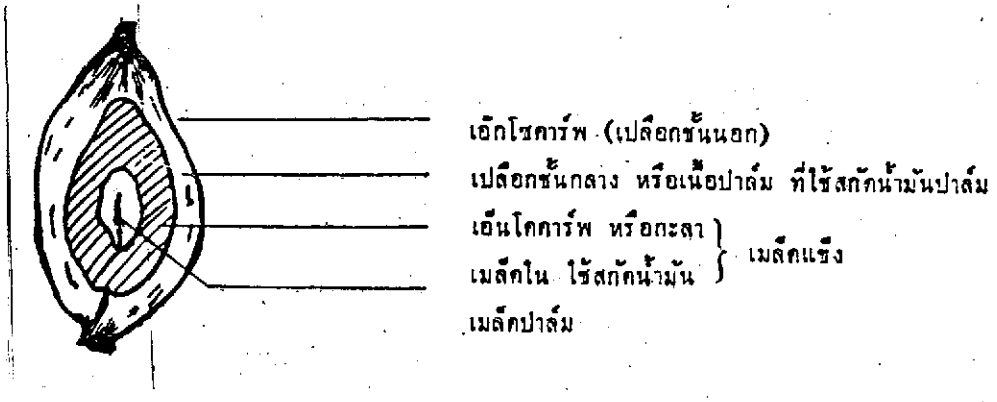
<u>ผล</u> มีลักษณะยาวรี ขนาดของผลแตกต่างกัน ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับแหล่งปลูก สภาพดินฟ้าอากาศ การให้ปุ๋ย และการเขตกรรม ระหว่างที่ผลสุก ผลส่วนบนๆจะเปลี่ยนเป็นสีเหลือง สีส้ม หรือม่วงปนน้ำเงิน ขึ้นกับพันธุ์ และความกล้าของแสง ลักษณะของผลนั้นเปลี่ยนแปลงได้อย่างมากมายในด้าน ขนาด สี ส่วนประกอบ และรูปร่าง สีของผลนี้เกิดจากพวกแอนโทไซยานิน(anthocyanin) และพวกแคโรทีน(carotene) ผลของปาล์มน้ำมัน ทางวิชาการด้านสวนผลไม้ เรียกว่า ดรูป (drope คือ ผลไม้ที่มีเมล็ดแข็งๆอยู่ตรงกลางรอบๆเป็นพวกเนื้ออ่อนๆ เช่น มะม่วง) เมื่อจำแนกภายในของผลปาล์มน้ำมันออกมาจะมีส่วนต่างๆ ดังนี้

-เมล็ดใน ซึ่งเต็มไปด้วยน้ำมัน

-กะลา (endocarp) ความหนาของกะลาอยู่ระหว่าง 0.2-8 มิลลิเมตร กะลาและเมล็ดในรวมกัน เรียกว่า เมล็ดแข็ง (stone)

-เนื้อปาล์ม (mesocarp) เป็นเปลือกชั้นกลาง มีความหนาโดยปกติประมาณ 0.75-6 มิลลิเมตร เนื้อเต็มไปด้วยน้ำมัน

-เปลือกชั้นนอก (exocarp)



<u>รูปที่ 1</u> แสดงภาพตัดขวางตามแนวยาวของผลปาล์มน้ำมัน

<u>พันธุ์ปาล์มน้ำมัน</u>

ในปัจจุบันนิยมแยกพันธุ์ปาล์มออกตามลักษณะความหนาบางของกะลา และขนาดของเนื้อปาล์มโดยพิจารณาลักษณะของผล ซึ่งมีหลักดังนี้

1. ลักษณะของกะลา
2. ลักษณะของกลีบหุ้มผล (mantle of carpels)
3. สีของผลก่อนสุก (ดำหรือเขียว)
4. น้ำมันจากเนื้อปาล์ม (มีแคโรทีนหรือไม่มี)

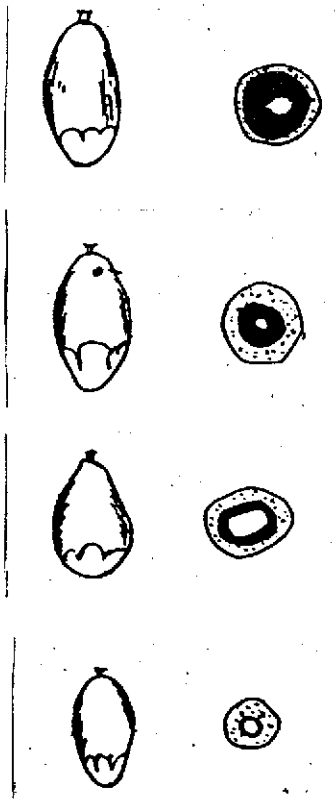
จากลักษณะดังกล่าวข้างต้นสามารถจำแนกพันธุ์ปาล์มน้ำมันได้ดังนี้

1.มาโคร์คาร์ย่า เป็นพวกกะลาหนาตั้งแต่ 4-8.5 มิลลิเมตร หรือประมาณ 50% ของน้ำหนักผลทั้งหมด มีเนื้อปาล์มบาง

2.ดูร่า (dura) มีกะลาหนาปานกลาง อยู่ระหว่าง 2-5 มิลลิเมตร หรือประมาณ 30% ของน้ำหนักผลทั้งหมด เนื้อปาล์มหนากว่าพันธุ์มาโคร์คาร์ย่า

3.พิสิเฟร่า (pisifera) พันธุ์นี้เกือบจะไม่มีกะลา บางแห่งจัดเป็นพวกไม่มีกะลา เมล็ดในเล็กมากขนาดถั่วลิสง ส่วนเนื้อปาล์มนั้นหนา แต่ผลเล็กและพบว่าจำนวนต้นตัวเมียของพิสิเฟร่าเป็นหมันสูง มักให้ช่อผลน้อย ด้วยเหตุนี้ทำให้ปลูกเป็นการค้าได้ไม่ดี

4.เทเนร่า (tenera) เป็นลูกผสมระหว่างดูร่ากับพิสิเฟร่า เป็นพวกกะลาบางประมาณ 1-2.5 มิลลิเมตร หรือ เพียง 10% ของน้ำหนักผลทั้งหมด เนื้อปาล์มหนาก็มีบางมากก็มี เมล็ดในก็เช่นกัน ขนาดไม่มาตรฐาน เล็กบ้างใหญ่บ้าง มีช่อผลมากกว่าพันธุ์ดูร่า แต่ขนาดช่อผลโดยทั่วๆไปเล็กกว่า เป็นพันธุ์ที่นิยมปลูกกันในขณะนี้ พวกดูร่าและเทเนร่า ผิดกันที่เทเนร่าเปลือกบางกว่าและมีวงแหวนซึ่งเกิดบนเปลือกนอกสุด พันธุ์นี้บางครั้งเรียกว่า โมไอ (mohei) หรือ ไลซอมเบ่ (lisombe)



รูปที่ 2 แสดงภาพเปรียบเทียบรูปร่างและภาพตัดขวางของผลปาล์มน้ำมันพันธุ์ต่างๆ

เนื้อปาล์ม เมล็ดใน กะลา

ตารางที่ 1 แสดงส่วนประกอบต่างๆในปริมาณของผลปาล์มน้ำมันทั้ง 4 พันธุ์

พันธุ์	เนื้อปาล์ม(%)	กะลา(%)	เมล็ดใน(%)
มาโครคาร์ย่า	30-50	40-60	10-12
ดูร่า	50-70	20-40	10
เทเนร่า	70-85	5-20	8-10
พิสิเฟร่า	92	0	8

เนื่องจากปาล์มน้ำมันเป็นพืชที่มีความสำคัญชนิดหนึ่งของภาคใต้ รองจากยางพารา ข้าว และมะพร้าว ปัจจุบันพื้นที่ปลูกปาล์มน้ำมันมีอัตราการขยายตัวเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว ปัญหาหลักอย่างหนึ่งในการผลิตของปาล์มน้ำมัน ในขณะนี้ คือ พันธุ์ปลูก เนื่องจากประเทศไทยยังไม่สามารถผลิตเมล็ดพันธุ์เพื่อจำหน่ายให้กับกสิกร พันธุ์ส่วนใหญ่ที่ปลูกกันในปัจจุบันมีการลักลอบสั่งซื้อจากประเทศมาเลเซีย ซึ่งเข้าใจว่าเป็นพันธุ์ลูกผสมเทเนร่า ที่ให้ผลผลิตสูง โดยวิธีการนำเมล็ดพันธุ์เข้ามาในลักษณะนี้ จึงเป็นการยากที่จะทราบประวัติของพันธุ์ปาล์มน้ำมันที่แน่นอนได้ เมื่อพิจารณาถึงปัญหาอื่นๆ ในด้านการเตรียมพันธุ์ปาล์มน้ำมัน จะพบปัญหาที่เกิดขึ้นดังนี้

1. ไม่มีความแน่ใจว่าเมล็ดพันธุ์จากประเทศมาเลเซียที่นำเข้ามานั้นเป็นพันธุ์เทเนร่าที่ถูกต้องหรือไม่

2. ไม่มีการพิสูจน์ว่าพันธุ์ลูกผสมที่นำเข้ามาสามารถปรับตัวตามสิ่งแวดล้อมของเมืองไทยได้ดีเพียงใด

3. ทางประเทศมาเลเซียกีดกันการขายกล้าปาล์มและเมล็ดพันธุ์ ปัจจุบันมีการลักลอบซื้อขายกันในตลาดมืด ทำให้เกษตรกรได้รับพันธุ์ที่ไม่ถูกต้องปะปนมาเป็นจำนวนมาก

4. เกษตรกรได้นำเมล็ดจากต้นเทเนร่ามาปลูก ซึ่งทำให้เกิดการกลายพันธุ์ (variation) เป็นดูร่า 25% พิสิเฟร่า 25% และเทเนร่า 50% ส่งผลให้มีการกระจายพันธุ์ที่ไม่ดีออกไปอย่างกว้างขวาง

5. ไม่มีการค้นคว้าวิจัยการผลิตเมล็ดพันธุ์ขึ้นเองส่งผลให้สูญเสียเงินตราในการซื้อพันธุ์เป็นจำนวนสูงมาก

จากปัญหาต่างๆที่กล่าวมาจะเห็นว่าถ้าสามารถพิสูจน์ได้ว่า ต้นกล้าหรือเมล็ดพันธุ์ที่เกษตรกรจะนำมาปลูกเป็นพันธุ์ใดแล้ว จะสามารถลดความสูญเสียที่เกิดจากการลงทุนปลูกปาล์มน้ำมันพันธุ์ไม่ดีได้เป็นจำนวนมาก ทั้งนี้การตรวจสอบพันธุ์ปาล์มนั้นต้องดูจากลักษณะของ

ผลเท่านั้น ซึ่งต้องใช้เวลานับตั้งแต่การปลูกกล้าจนได้ผลจะใช้เวลาไม่ต่ำกว่า 3 ปี การลงทุนในระยะ 3 ปีแรกจะค่อนข้างสูง โดยเฉลี่ยต้องลงทุน 4500 บาท/ไร่ หลัง 3 ปีแรกผลผลิตจะค่อนข้างต่ำ(ขึ้นกับดินฟ้าอากาศ)โดยเฉลี่ยประมาณ 1.4 ตัน/ไร่/ปี เมื่อถึงระยะการให้ผลผลิตเต็มที่ (ในช่วงปีที่ 9-25)จะให้ผลผลิตโดยเฉลี่ยประมาณ 3.2 ตัน/ไร่/ปี เพราะฉะนั้น หากเกษตรกรรายใดนำเมล็ดพันธุ์ที่ได้จากพันธุ์เทเนร่า หรือสักลอบซื้อจากตลาดมืดซึ่งมีการปลอมปน เกษตรกรรายนั้นๆกว่าจะทราบว่าได้พันธุ์ไม่ดีต้องใช้เวลานานกว่า 3 ปี สูญเสียเงินลงทุนที่ค่อนข้างสูงมาก จำเป็นต้องโค่นต้นเก่าทิ้ง นำต้นกล้าใหม่ที่ยังคงเสี่ยงอยู่มาปลูกต่อไปเรื่อยๆ ส่งผลให้ภาวะการผลิตน้ำมันปาล์มไม่เสถียรภาพเช่นในปัจจุบันนี้ เกิดขึ้นอย่างไม่รู้จบสิ้น

ปัจจุบันการคัดเลือกพันธุ์ปาล์มในระยะ 3 ปีแรก เมื่อเริ่มปลูกยังไม่มีวิธีการใดที่สะดวกและรวดเร็ว แม้แต่การศึกษาทางพันธุศาสตร์ก็ยังไม่เป็นที่แพร่หลาย จากการศึกษาทางพันธุศาสตร์ของพืชสกุลอื่นด้วยเทคนิคrestriction fragment analysis ดีเอ็นเอของคลอโรพลาสต์(chloroplast DNA) และไมโตคอนเดรีย (mitochondria DNA) พบว่าสามารถใช้หาความแตกต่างระหว่างชนิด(species) จนถึงระดับการเกิดการกลายพันธุ์(variety)ได้อย่างแม่นยำ จึงน่าจะสามารถนำเทคนิคนี้มาใช้ในการคัดเลือกพันธุ์ปาล์มน้ำมันได้

คลอโรพลาสต์

คลอโรพลาสต์เป็นพลาสติด(plastid) ที่แสดงสีเขียวเนื่องจากมีรงควัตถุ(pigment)ชนิดคลอโรฟิลล์(chlorophyll)เอ และบี อยู่มาก ซึ่งในกลุ่มพลาสติด แคโรทีน(carotene) และแซนโทฟิลล์ (xanthophyll) พบในใบและส่วนคอร์เท็กซ์(cortex)ของลำต้นที่มีอายุน้อย โดยเฉพาะในเนื้อเยื่อพาเรนไคมา(parenchyma) และคอร์เลนไคมา(collenchyma) ที่สัมผัสกับแสง คลอโรพลาสต์เกี่ยวข้องกับปฏิกิริยาการสร้างพลังงานในเซลล์ การสร้างไขมัน การสังเคราะห์แสง และการสร้างแป้งชนิดไม่ถาวร ในแต่ละเซลล์มีคลอโรพลาสต์จำนวนมาก เช่นในเซลล์มีโซฟิลล์(mesophyll)ของใบ 1 เซลล์จะมีคลอโรพลาสต์ 30 ถึง 500 เม็ด ในเซลล์ที่มีคลอโรพลาสต์อาจมีพลาสติดชนิดอื่นๆด้วย คลอโรพลาสต์และพลาสติดเหล่านี้มักมีการเคลื่อนที่อยู่ในเซลล์ ซึ่งอาจเกิดจากอิทธิพลของแสง

โครงสร้างของคลอโรพลาสต์

คลอโรพลาสต์มีเยื่อเมมเบรน(membrane)หุ้ม 2 ชั้น ภายในมีของเหลวใส ไม่มีสี เรียกว่า สโตรมา (stroma) ในของเหลวนี้มีสารพวกโปรตีน ซึ่งอาจอยู่ในรูปผลึกหรือรวมอยู่กับธาตุเหล็ก นอกจากนั้นยังมีเม็ดแป้ง หยดน้ำมัน ไรโบโซม ดีเอ็นเอ และเอนไซม์ที่เป็นตัวกระตุ้นให้เกิดปฏิกิริยาการสังเคราะห์แสงในช่วงที่ไม่ใช้แสง(dark reaction) ภายในสโตรมา มีโครงสร้างที่มีลักษณะคล้ายเงินเหรียญมีเมมเบรนหุ้ม 2 ชั้น เรียกโครงสร้างนี้ว่า ไทลาคอยด์(thyllakoid) ซึ่งไทลาคอยด์นี้จะเรียงซ้อนกันเป็นชั้นๆ ชั้นหนึ่งอาจมีถึง 2-100 อันก็ได้ เรียกแต่ละชั้นของไทลาคอยด์นี้ว่า กรานัม(granum) ใน 1 คลอโรพลาสต์ อาจมีมากกว่า 1 กรานัม ระหว่างไทลาคอยด์ที่ซ้อนกันแต่ละอันและกรานัมแต่ละชุดมีลาเมลลา(lamella)หรือเฟร็ท(fret) หรืออินเตอร์กรานา(intergrana) ซึ่งเป็นสายเมมเบรนที่บิดเป็นเกลียวเวียนขวาเป็นตัวเชื่อมถึงกัน ภายในกรานา (grana) มีคลอโรฟิลล์และรงควัตถุอื่นๆ เช่น แคโรทีน แซนโทฟิลล์ และไฟโคบิลิน(phycobilin) กรานาเป็นแหล่งที่เกิดปฏิกิริยาในช่วงใช้แสง(light reaction)ของการสังเคราะห์แสง

คลอโรฟิลล์ในกรานามีหลายชนิด เช่น คลอโรฟิลล์ เอ (chlorophyll A)มีสีเขียวแกมน้ำเงิน คลอโรฟิลล์ บี (chlorophyll B)มีสีเขียวแกมเหลือง คลอโรฟิลล์ ซี(chlorophyll C)มีสีน้ำตาล และคลอโรฟิลล์ ดี(chlorophyll D)มีสีแดง

รูปร่างคลอโรพลาสต์

รูปร่างคลอโรพลาสต์มีหลายแบบ เช่น รูปไข่(ovoid) รูปจาน(discoid) รูปกระบอง(club shape) หรืออาจเรียงตัวเป็นร่างแหเป็นดาว คลอโรพลาสต์ในพืชชั้นสูงมีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 4-6 ไมครอน

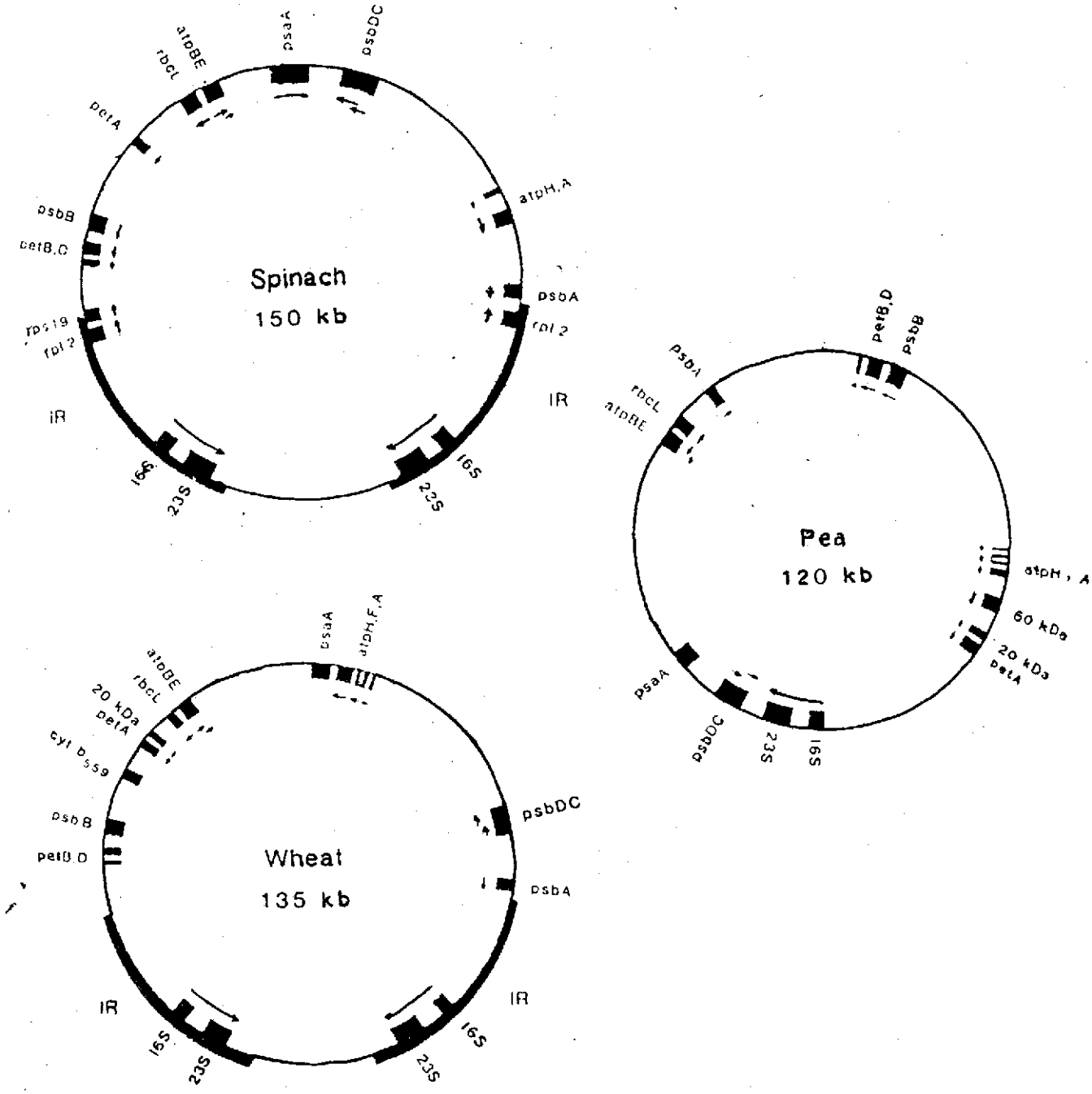
ดีเอ็นเอของคลอโรพลาสต์

รูปร่างและแผนผัง(gene map) ของดีเอ็นเอคลอโรพลาสต์ สามารถวิเคราะห์โดยใช้วิธี electron microscopy และใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะย่อยตามลำดับ รูปร่างของดีเอ็นเอของคลอโรพลาสต์จะเป็นแบบ circular, circular dimer หรือ catenated oligomer

ดีเอ็นเอของคลอโรพลาสต์โดยทั่วไปมีขนาดตั้งแต่ 120 Kb ถึง 210 Kb ส่วนของสาหร่ายจะยาวประมาณ 85 Kb ใน *Codium fragile* ถึง 196 Kb ใน *Chlamydomonas*ในทางตรงกันข้ามสาหร่ายสีเขียว(green algae) *Acetabularia* จะมีขนาดของดีเอ็นเอของคลอโรพลาสต์ยาวมากกว่า 400 Kb

การจัดเรียงตัวของยีนของคลอโรพลาสต์จะมีลักษณะเหมือนกัน ลักษณะของยีน rRNA จะมีทิศทางที่ตรงข้ามกัน แสดงดังรูปที่ 3 และจะเปลี่ยนแปลงตามชนิดโดยเฉพาะ *Fabaceae* ซึ่งเป็นพืชจำพวกถั่ว จะมียีนที่มีทิศทางตรงข้ามกันหายไป 1 คู่ ส่วนใน *Euglena* ก็จะหายไปเช่นเดียวกัน แต่จะมีคู่ยีนที่มีทิศทางเดียวกันมาแทนที่

คู่ของยีนที่มีทิศทางตรงข้ามกันนี้จะแบ่งยีนออกเป็นขนาดเล็ก(12-28Kb)จะอยู่ที่ปลาย 3′ ของ 23S rRNA ส่วนขนาดใหญ่(80-100Kb) จะอยู่ที่ปลาย 5′ ของ 16S rRNA



<u>รูปที่ 3</u> แสดงรูปร่างและแผนผัง(gene map) ดีเอ็นเอของคลอโรพลาสต์ แสดงให้เห็นความแตกต่างของขนาดและการจัดเรียงตัวของยีน ในผักขม(spinach)และ

ข้าวสาลี(wheat) คู่ยีนที่มีทิศทางตรงข้ามกันจะอยู่ประมาณ 20 Kb คือ atpH,F,A และ psbDC ส่วนถั่ว(pea) คู่ยีน inverted repeats (IR) จะหายไป และคู่ยีนที่มีทิศตรงข้ามกันที่ 50 Kb คือ rbcL และ psbA โดยที่ 16S คือ rRNA ขนาดเล็ก ส่วน 23S คือ rRNA ขนาดใหญ่

rbcL เป็นยีนของหน่วยย่อยขนาดใหญ่(large subunit)ของ ribulose-biphosphate carboxylase

atpA,B,E,F และH เป็นยีนของหน่วยย่อย CF_1 และ CF_o ของการสังเคราะห์ ATP(ATP synthase)

petA,B,C เป็นยีนของไซโตโครม เอฟ (cytochrome f), ไซโตโครม บี6 (cytochrome b6) และหน่วยย่อยที่ 4 (subunit IV) ของสารประกอบเชิงซ้อนของไซโตโครม(cytodhrome complex)

psbA,B,C,D เป็นยีนของ Q-beta, 51000 ดาลตัน chlorophyll a-binding, 44000 ดาลตัน chlorophyll a-binding, D-2 protein ของ photosystem II ตามลำดับ

psbE,rpl2,rps19 เป็นยีนของ putative chloroplast ribosomal protein

<u>การประยุกต์ใช้ดีเอ็นเอของคลอโรพลาสต์</u> (Application of chloroplast DNA)

จากลักษณะดีเอ็นเอของคลอโรพลาสต์ สามารถนำไปใช้ในการแยกชนิดของพืชซึ่งได้มีผู้ทำการทดลองมาแล้วคือ

ในปี ค.ศ.1986 Takashige Ishii และคณะได้ทำการทดลองโดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะวิเคราะห์ดีเอ็นเอของคลอโรพลาสต์เพื่อแยกข้าว 2 ชนิด คือ *Oryza sativa* และ *O.glaberrima* โดยการนำใบมาโฮโมจิไนซ์อย่างรวดเร็วในไนโตรเจนเหลว ทำการแยกสกัดคลอโรพลาสต์โดยใช้ sucrose step gradient 15-40-60% และใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะคือ EcoR I, Hind III, Pst I ตัดดีเอ็นเอของคลอโรพลาสต์ จากนั้น run gel electrophoresis พบว่าดีเอ็นเอของคลอโรพลาสต์ที่ตัดด้วยเอนไซม์EcoR I จะเห็นความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอของข้าว 2 ชนิดได้ คือ ใน *O.sativa* จะเห็นแถบที่ 7.3 และ 5.9 Kbp ส่วน *O.glaberrima* เห็นแถบที่ 7.6 และ 3.9 Kbp ส่วนแถบอื่นๆเหมือนกันหมด และเมื่อตัดด้วยเอนไซม์ Hind III จะเห็นความแตกต่างของทั้ง 2 ชนิด คือใน *O.sativa* เห็นแถบที่ 3.7 Kbp ส่วน *O.glaberrima* เห็นแถบที่ 3.6 Kbp ในทำนองเดียวกันถ้าตัดด้วย Pst I ใน *O.sativa* เห็นแถบที่ 3.9 Kbp และ *O.glaberrima* จะเห็นที่ 3.8 Kbp ส่วนแถบอื่นๆจะเหมือนกัน

ในปี ค.ศ. 1987 H.Lehvaslaiho, A.Saura และ J.Lokki ได้ทำการศึกษา variation ของดีเอ็นเอของคลอโรพลาสต์ในหญ้าพวก *Festuceae* โดยการโฮโมจิไนซ์ใบด้วยเครื่องปั่นโดยใช้บัฟเฟอร์ H (50mM Tricine-KOH pH 7.9, 330mM Sorbitol, 2mM EDTA, 1mM $MgCl_2$, 0.1% BSA) แยกคลอโรพลาสต์โดยใช้ 80% Percol ในบัฟเฟอร์ H และใช้ Triton X-100 ในการทำให้คลอโรพลาสต์แตกเพื่อให้ได้ดีเอ็นเอของคลอโรพลาสต์ จากนั้นใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ 5 ชนิด คือ BamH I, EcoR I, Hind III, Pvu II และ Sal I แล้ว run gel electrophoresis โดยใช้ 0.5% และ 1.5% agarose gel หลังจากนั้นทำ Southern blot analysis โดยกระดาษดูดซับดีเอ็นเอจากเจลให้มาติดบนแผ่นกระดาษไนโตรเซลลูโลส hybridization กับดีเอ็นเอของคลอโรพลาสต์ที่ label ด้วย ^{35}S-dATP และนำไปทำ autoradiography จะเห็นแถบของดีเอ็นเอคลอโรพลาสต์ของหญ้าแต่ละชนิดที่แตกต่างกัน

นอกจากใช้ในการแยกชนิดของพืชแล้ว ดีเอ็นเอของคลอโรพลาสต์ยังสามารถใช้ประโยชน์ในการศึกษาด้านอื่นๆอีก เช่น

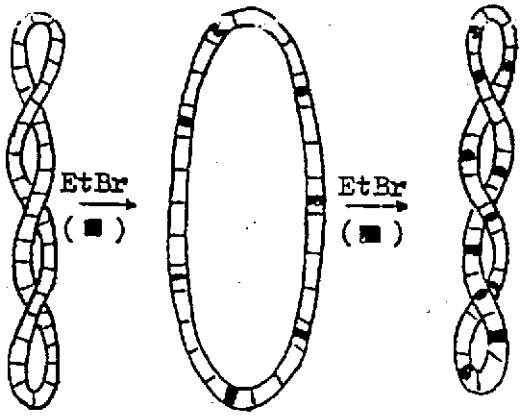
-ใช้ในการศึกษาวิวัฒนาการของพืชโดย J.D.Palmer และ Daniel Zamir ได้ทำการศึกษาวิวัฒนาการของ *Lycopersicon*

-ใช้ในการศึกษาการกระจายของพืชโดย JO ANN BANKS และ C.WILLIAM BIRKY ได้ทำการทดลองศึกษาการกระจายใน *Lupinus texensis*

การวิเคราะห์ดีเอ็นเอ

หลักการ

การวิเคราะห์ดีเอ็นเอโดยวิธี agarose gel electrophoresis เป็นวิธีที่เหมาะสมและสะดวกที่สุดวิธีหนึ่ง เนื่องจากทำได้ง่าย สะดวก และใช้เวลาไม่นานนัก นอกจากนี้ตำแหน่งดีเอ็นเอ(DNA fragment) บนเจล จะวิเคราะห์ได้ด้วยการย้อมด้วย Ethidium bromide (EtBr) ซึ่งเป็นสารที่สามารถเรืองแสงได้และมีประจุบวก รูปร่างเป็นสี่เหลี่ยมแบนราบ สามารถเข้าระหว่างชั้นของเบสดีเอ็นเอที่อยู่เรียงกันเป็นชั้นๆคล้ายราวบันได ในภาพ 4ก. เป็นดีเอ็นเอเกลียวคู่แบบซ้อนชนิดวนขวาพอที่ EtBr จะเข้ามาแทรกระหว่างชั้นของคู่เบสทำให้ดีเอ็นเอโป่งและแตกออกได้ หรือทำให้เกิดการคลายเกลียวที่ซ้อนกันออกกลายเป็นดีเอ็นเอเกลียวคู่ธรรมดา ในภาพ 4ข. เมื่อยังมี EtBr แทรกเข้าใน DNA เกลียวคู่ธรรมดานี้จะเกิดเกลียวซ้อนกันอีกครั้งเป็นเกลียวซ้อนชนิดวนซ้าย ดังในภาพ 4ค. เมื่อนำดีเอ็นเอไปส่องแสงอุลตร้าไวโอเลต(UV) ดีเอ็นเอจะดูดกลืนแสง UV ที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร และคายพลังงานผ่านไปยัง EtBr ที่มีความยาวคลื่น 300 นาโนเมตร และ 360 นาโนเมตร ณ ความยาวคลื่นนี้จะทำให้ EtBr มีพลังงานสูงมากจนคายพลังงานส่วนเกินออกมาในช่วงคลื่น 590 นาโนเมตร เกิดเป็นแสงสีส้มแดง ของช่วงแสงที่มองเห็นได้ (visible spectrum) ซึ่งสามารถใช้ติดตามการเดินทางของดีเอ็นเอบนเจลได้



(ก) (ข) (ค)

รูปที่ 4 แสดงการสอดแทรกของ EtBr ในดีเอ็นเอ

EtBr สามารถใช้ตรวจหาได้ทั้งกรดนิวคลีอิค(nucleic acid) ที่เป็นสายเดี่ยว(single strand) และสายคู่(double strand) คือทั้ง ดีเอ็นเอ และอาร์เอ็นเอ สำหรับกรดนิวคลีอิคที่เป็นสายเดี่ยวจะจับกับ EtBr ได้ไม่ดีเท่าที่ควร และเรืองแสงไม่ดี โดยทั่วไปแล้ว EtBr(0.5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) รวมในเจลและบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการ run gel electrophoresis ซึ่งจะทำให้การเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอลดลงประมาณ 15% และใช้แสง UV ในการตรวจหาดีเอ็นเอหลังจากการ run gel electrophoresis หรืออาจทำการย้อมเจลด้วย EtBr หลังการ run gel electrophoresis ก็ได้โดยการนำเจลไปย้อมในสารละลาย EtBr 45 นาที ที่อุณหภูมิห้อง แล้วแช่ในน้ำกลั่นเพื่อล้างเจลสักครู่ นำไปดูด้วยแสง UV

ข้อควรระวังในการทำการทดลอง ควรระมัดระวังเพราะ EtBr เป็นสารที่ทำให้เกิดมะเร็งได้

ในการวิเคราะห์จะอาศัยคุณสมบัติของดีเอ็นเอที่เคลื่อนที่ใน agarose gel เช่นเดียวกับการเคลื่อนที่ของโปรตีนใน polyacrylamide gel โดยขึ้นกับ

-ขนาดของดีเอ็นเอ ดีเอ็นเอที่มีขนาดใหญ่จะเคลื่อนที่ได้ช้ากว่าขนาดเล็ก

-รูปร่างของดีเอ็นเอ ดีเอ็นเอที่มีรูปร่างขดเป็นวงจะเคลื่อนที่ได้เร็วกว่าดีเอ็นเอที่มีรูปร่างคล้ายเส้น

-ความเข้มข้นของเจล ดีเอ็นเอจะเคลื่อนที่ในเจลที่มีความเข้มข้นสูงๆได้ช้ากว่าที่มีความเข้มข้นต่ำ

-กระแสไฟฟ้าและแรงเคลื่อนไฟฟ้า

บัฟเฟอร์ที่ใช้ในการ run gel electrophoresis ของดีเอ็นเอจะใช้บัฟเฟอร์ pH 8.0 เช่น Tris-acetate buffer , Tris-phosphate และ Tris-borate บัฟเฟอร์ทั้ง 3 ชนิดนี้ มีความแตกต่างกัน คือ

Tris-acetate เป็นบัฟเฟอร์ที่มีความจุของบัฟเฟอร์(buffer capacity) ต่ำที่สุด จึงจำเป็นต้องอาศัยการถ่ายเทหมุนเวียน (recirculation) ระหว่าง 2 ขั้วอยู่ตลอดเวลาในการวิเคราะห์เจลยาวๆหรือนานๆ

Tris-borate เป็นบัฟเฟอร์ที่นิยมใช้กันมากเนื่องจากกรดบอริค(boric acid)เป็นตัวที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของพวกจุลินทรีย์ จึงทำให้สามารถใช้บัฟเฟอร์นี้ได้นานๆ

Tris-phosphate เป็นบัฟเฟอร์ที่ให้ความสะดวกกว่า Tris-borate ในกรณีที่จะนำเจลนั้นไปละลายโดยใช้ โปตัสเซียมไอโอไดด์ หรือ โซเดียมเปอร์คลอเรต

การตัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (Restriction endonuclease)

คุณสมบัติ

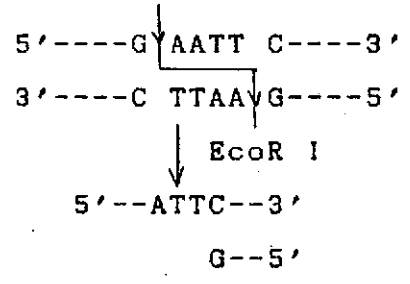
เอนไซม์ตัดจำเพาะเป็นกลุ่มของเอนไซม์ชนิดที่ตัดพันธะฟอสโฟไดเอสเตอร์ (phosphodiester bonds) ตรงตำแหน่งที่จำเพาะของดีเอ็นเอเกลียวคู่ จากคุณสมบัติที่จำเพาะนี้เองจึงทำให้เป็นประโยชน์ในการสร้างดีเอ็นเอสายผสม(recombinant DNA) สามารถแบ่งชนิดของเอนไซม์ตัดจำเพาะได้ 3 ชนิดด้วยกัน คือ

1.ชนิด I (type I) เป็นเอนไซม์พวกแรกที่ค้นพบโดย Linn และ Arber ในปี ค.ศ. 1968 เอนไซม์ชนิดนี้พบในแบคทีเรีย *E.coli* ประกอบด้วยหน้าที่ 2 อย่าง คือ restriction และ modification restriction หมายถึง หน้าที่ในการย่อย (endodeoxyribonuclease) ส่วน modification หมายถึง กระบวนการ methylation คือการเปลี่ยนแปลงหมู่ methyl ใน adenosine หรือ cytocine base เพื่อป้องกันไม่ให้ถูกย่อยด้วย endonuclease ทั้ง 2 หน้าที่นี้ ทำให้ *E.coli* สามารถย่อยดีเอ็นเอของตัวมันเองออกจากดีเอ็นเอภายนอกได้โดยการย่อยดีเอ็นเอภายนอกที่เข้ามาบุกรุกตัวมันได้เอนไซม์จำพวกนี้ต้องอาศัย ATP,S-adenosylmethionine (SAM) และ Mg^{2+} ในการย่อยดีเอ็นเอจะย่อยชนิดสุ่ม (randomly) บนเส้นดีเอ็นเอ จึงไม่เหมาะที่จะใช้สำหรับการสร้างดีเอ็นเอสายผสม

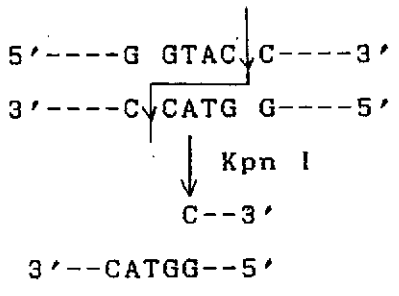
2.ชนิด II(type II)เป็นเอนไซม์ที่ตัดจำเพาะตามลำดับของเบสในดีเอ็นเอ และอาศัย Mg^{2+}เท่านั้นในการตัดดีเอ็นเอ เนื่องจากมีความจำเพาะในการตัดดีเอ็นเอ จึงเป็นประโยชน์ต่อการสร้างดีเอ็นเอสายผสม ในปัจจุบันนี้ได้ค้นพบเอนไซม์จำพวกนี้กว่า 250 ชนิด ซึ่งสกัดจากแบคทีเรียชนิดต่างๆ เช่น EcoR I เป็นเอนไซม์ type II ที่สกัดได้จาก *E.coli* RY13 เป็นต้น

ในการตัดดีเอ็นเอของเอนไซม์จำพวกนี้จะจำเพาะต่อลำดับของเบส 4 เบส หรือ 6 เบส ขึ้นกับชนิดของเอนไซม์นั้นๆ และลักษณะการตัด แบ่งเป็น 3 ลักษณะ คือ

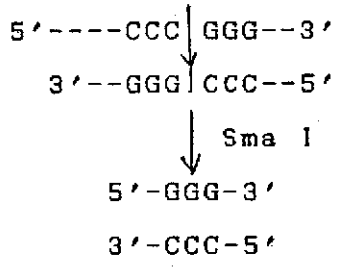
ก.ตัดจากปลาย 5′ ทำให้ได้ปลายเหนียวทางปลาย 5′ ตัวอย่างเอนไซม์จำพวกนี้ได้แก่ EcoR I, Hind III, Mbo I เป็นต้น



ข.ตัดจากปลาย 3′ ทำให้ได้ปลายเหนียวทางปลาย 3′ ตัวอย่างเอนไซม์จำพวกนี้ได้แก่ Pst I, Hha I, Kpn I เป็นต้น



ค.ตัดให้ปลายทู่(blunt end) ตัวอย่างเอนไซม์จำพวกนี้ได้แก่ Hae III, Sma I เป็นต้น



3.ชนิด III (type III) เป็นเอนไซม์จำพวกที่มีคุณสมบัติของทั้งชนิด I และชนิด II กล่าวคือ เอนไซม์นี้จะจำเพาะต่อลำดับของเบสในดีเอ็นเอแต่จะตัดพันธะฟอสโฟไดเอสเตอร์ ออกไปจากลำดับของเบสนั้น เอนไซม์จำพวกนี้พบใน bacteriophage เช่น P1 (Haberman,1974) เป็นต้น

<u>หลักการ</u>

เอนไซม์ตัดจำเพาะที่ใช้ในทางพันธุวิศวกรรมส่วนใหญ่เป็นชนิด II ซึ่งจะตัดจำเพาะตามลำดับของเบสในดีเอ็นเอ เมื่อนำเอาเอนไซม์นี้ไปตัดดีเอ็นเอที่มียีนที่ต้องการและนำไปตัดพลาสมิดพาหะก็จะได้ปลายเหนียวเหมือนกัน เมื่อนำมาต่อกันปลายเหนียวนี้สามารถจับคู่กันได้ตามกฎเบสคู่สม (complementary base)

ปกติเอนไซม์เหล่านี้จะเสถียรภาพเมื่อเก็บไว้ในที่อุณหภูมิต่ำๆถึง -20°ซ ในสภาพที่ไม่จับแข็ง ดังนั้นเอนไซม์เหล่านี้จึงมักจะเตรียมในสารละลายที่มี 50% Glycerol เพื่อช่วยสารละลายของเอนไซม์ไม่แข็งตัวที่อุณหภูมิต่ำ และยังช่วยรักษาการทำงาน (activities) ของเอนไซม์ด้วย แต่ขณะเดียวกันปริมาณของglycerolที่มากกว่า 10%ก็จะยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ด้วย

นอกจากนี้การทำงานของเอนไซม์แต่ละชนิดยังขึ้นกับสภาวะที่เหมาะสม ความเข้มข้นของเกลือ และบัฟเฟอร์ ซึ่งจำแนกเป็น 4 ชนิดด้วยกัน คือ

1.ที่ต้องการเกลือมาก (high salt)

2.ที่ต้องการเกลือปานกลาง (medium salt)

3.ที่ต้องการเกลือน้อย (low salt)

4.ที่ต้องการเกลือพิเศษ (specific salt)

ตารางที่ 2 แสดงส่วนประกอบของบัฟเฟอร์ที่เอนไซม์ต้องการ

buffer	NaCl (mM)	KCl (mM)	Tris-HCl pH7.5(mM)	$MgCl_2$ (mM)	DTT (mM)
high salt	100	-	50	10	1
medium salt	50	-	10	10	1
low salt	0	-	10	10	1
specific salt	-	20	10(pH8)	10	1

วัตถุประสงค์การทดลอง

1. เพื่อหาวิธีการสกัดดีเอ็นเอของคลอโรพลาสต์จากปาล์มน้ำมันเพื่อให้ได้ปริมาณดีเอ็นเอสูงสุด

2. เพื่อเป็นแนวทางในการแยกความแตกต่างของพันธุ์ปาล์มน้ำมันด้วยเทคนิคทางวิศวกรรมพันธุ์ศาสตร์

รายชื่อ สารเคมี และอุปกรณ์การทดลอง

สารเคมี

Agar	ตรามด
Agarose type V	Sigma
Absolute alcohol	Merck
Boric acid	Merck
Bovine serum albumin(BSA) A9647	Sigma
Chloroform	Merck
Ethylenediaminetetraacetic acid disodiumsalt(EDTA)	Fluka-Garantie
Ethidium bromide(EtBr)	Sigma
Ethanol(EtOH)	Merck
Glacial acetic acid	Merck
Low melting agarose type VII	Sigma
Mannitol	Merck
Magnesium chloride($MgCl_2.6H_2O$)	Merck
2-Mercaptoethanol(2-ME)	Merck
Proteinase K type XI	Sigma
Polyethyleneglycol 6000(PEG)	BDH
Polyvinylpyrrolidone (PVP)	Merck
Sorbitol	Difco
Sucrose	Fluka-Garantie
Sodium chloride (NaCl)	Fluka-Garantie
Sodium dodecyl sulphate(SDS)	Sigma
Sodium hydroxide (NaOH)	EKA KEMI
Sodium sarcosinate	Merck
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan(Tris-HCl)	Merck

อุปกรณ์การทดลอง

กล้องจุลทรรศน์ (microscope) ของ Olympus Model CH
เครื่องชั่ง (balance) ของ Mettler Model P1210
เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave) ของ Market forge sterilimatic
เครื่องบด (blender) ของ National
เครื่องปั่น (centrifuge) ของ Beckman Model TJ-6 และ J2-21
เครื่องบ่ม (incubator) ของ Thelco
เครื่องปั่นขนาดเล็ก (microcentrifuge) ของ KOKUSAN Model H-31
เครื่องอ่านกรด-ด่าง(pH Meter) ของ Activon Model 109pH/mv meter
เครื่องแปลงไฟฟ้ากระแสตรง(power supply) ของ Gelman
เครื่องปั่นอุลตร้า (ultracentrifuge) ของ Beckman Model L5-65
อ่างน้ำอุ่น (water bath) ของ HAAKEL
Gel chamber
Stir plate ของ nuova II
UV box ของ UVP