

บทที่ 6

สรุปผลการทดลอง

1. ศึกษาวิธีการสกัด total RNA ที่เหมาะสมสำหรับกล้วยไม้สกุลหวาย 'เอี้ยสกุล'

วิธีที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการสกัด total RNA ของกล้วยไม้สกุลหวาย 'เอี้ยสกุล' คือ วิธีดัดแปลง Yu และ Goh (2000) แบบที่ 2 ซึ่งเป็นวิธีลดขั้นตอนการบ่มเนื้อเยื่อพืชที่บดละเอียดใน extraction buffer ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส และปรับเปลี่ยนองค์ประกอบของ extraction buffer โดยการใช้ PVPP แทนการใช้ PVP และปริมาณเนื้อเยื่อจากใบอ่อนของกล้วยไม้ที่เหมาะสมกับการสกัด RNA ด้วยวิธีนี้ คือ 0.1 กรัมต่อ extraction buffer 1 มิลลิลิตร

2. ศึกษาการแสดงออกของยีน โดยวิธี differential display

ผลการเปรียบเทียบรูปแบบของแถบ cDNA ที่ได้จากกล้วยไม้สกุลหวาย 'เอี้ยสกุล' ชุดควบคุม และชุดที่ได้รับโคโตซาน เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบความแตกต่างของ cDNA ที่เกิดขึ้นทั้งหมด 145 แถบ จาก 54 คู่ไพรเมอร์ โดยมี cDNA ที่เกิดขึ้นใหม่หลังได้รับโคโตซานจำนวน 27 แถบ หายไปหลังได้รับโคโตซานจำนวน 36 แถบ มีแถบ cDNA ที่ปริมาณเพิ่มขึ้น 45 แถบ และ 37 แถบ cDNA มีปริมาณลดลงหลังจากกล้วยไม้ได้รับโคโตซาน แสดงว่าโคโตซานมีผลต่อการแสดงออกของยีนต่างๆ ในกล้วยไม้สกุลหวาย 'เอี้ยสกุล'

3. โคลนชิ้นส่วน cDNA ที่แตกต่างระหว่างกล้วยไม้ทั้ง 2 ชุดการทดลอง เข้าในเวกเตอร์ที่เหมาะสม

การคัดเลือกแถบ cDNA ที่แตกต่างระหว่างกล้วยไม้ทั้ง 2 ชุดการทดลอง จำนวน 67 แถบ พบว่ามีชิ้นส่วน cDNA จำนวน 19 ชิ้น ที่สามารถโคลนเข้าในเวกเตอร์ pGEM-T

4. วิเคราะห์ชนิดของยีนที่มีการตอบสนองต่อโคโตซานในกล้วยไม้สกุลหวาย 'เอี้ยสกุล'

เมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ cDNA ที่มีการแสดงออกแตกต่างกันในกล้วยไม้สกุลหวาย 'เอี้ยสกุล' ชุดควบคุม และชุดที่ได้รับโคโตซาน ทั้ง 19 โคลน ในฐานข้อมูลสากล ได้แก่ NCBI และ EMBL พบว่า *De7696* น่าจะเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับยีน *Ycf2* ซึ่งอยู่ในคลอโรพลาสต์

จีโนม *De541* น่าจะเป็นยีน 26S ribosomal RNA และ *De642* น่าจะเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับ calnexin ในขณะที่ *De362* มีลำดับนิวคลีโอไทด์คล้ายคลึงกับโครโมโซมที่ 7 ในข้าว (*Oryza sativa*) และเมื่อทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูลสากลระดับ EST พบว่า *De362* มีลำดับนิวคลีโอไทด์คล้ายคลึงกับ cDNA ของ *Sorghum propinquum* ที่อยู่ในเนื้อเยื่อเจริญที่ชักนำการเกิดดอก และ cDNA ของ *Sorghum bicolor* ในต้นกล้าที่ได้รับแสง ในการวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนของ *De362* พบว่ามีลำดับกรดอะมิโนคล้ายคลึงกับโปรตีนที่ไม่ทราบหน้าที่ของ *Arabidopsis thaliana* ดังนั้น *De362* จึงยังไม่มีข้อสรุปที่แน่ชัดว่ามีหน้าที่อย่างไร

นอกจากนี้พบโคลนจำนวน 5 โคลนที่ไม่สามารถวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ได้ แต่สามารถวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนได้ โดยแบ่งเป็น 2 โคลน ได้แก่ *De182* และ *De183* มีความคล้ายคลึงกับโปรตีนที่ยังไม่ทราบหน้าที่ในข้าว และอีก 3 โคลน ได้แก่ *De161* *De192* และ *De441* มีความคล้ายคลึงกับโปรตีนที่ยังไม่ทราบหน้าที่ในแบคทีเรีย

สำหรับโคลนที่ไม่มีรายงานในฐานข้อมูลสากล (NCBI และ EMBL) พบจำนวน 9 โคลน ได้แก่ *De163* *De181* *De461* *De521* *De631* *De643* *De7323* *De7625* และ *De8612*

5. วิเคราะห์การแสดงออกของยีนที่คัดเลือกได้จากการทำ differential display

เมื่อศึกษาการแสดงออกของยีนที่โคลนได้จากกล้วยไม้สกุลหวาย 'เอี้ยสกุล' ทั้ง 2 ชุดการทดลอง โดยใช้วิธี RT-PCR analysis จากการทำทั้งสิ้น 3 ชุดเนื้อเยื่อพืช พบว่า *De362* และ *De7696* มีการแสดงออกลดลง หลังจากต้นกล้วยไม้สกุลหวาย 'เอี้ยสกุล' ได้รับโคโคซานเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม แสดงว่าโคโคซานมีผลต่อการแสดงออกของ *De362* และ *De7696* ในกล้วยไม้สกุลหวาย 'เอี้ยสกุล' ให้มีการแสดงออกลดลง หลังจากได้รับโคโคซานเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากผลการวิจัยในครั้งนี้ทำให้ทราบผลของโคโคซานที่มีต่อการแสดงออกของยีนในแง่มุมใหม่ ที่พบว่าโคโคซานมีผลต่อการแสดงออกของยีน *Ycf2* ในคลอโรพลาสต์จีโนม ให้มีการแสดงออกลดลง และจากการที่ *De362* ยังไม่มีข้อสรุปที่แน่ชัดว่ามีบทบาท และหน้าที่อย่างไร จึงเป็นที่น่าสนใจในการศึกษาต่อไป เพราะอาจทำให้เข้าใจถึงผลของโคโคซานที่มีต่อการแสดงออกของยีนต่างๆ นอกเหนือจากยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารป้องกันตัวเองของพืช ซึ่งอาจทำให้ค้นพบยีนใหม่ที่ตอบสนองต่อโคโคซานได้อีกด้วย

ข้อเสนอแนะ

1. ควรทำการเก็บตัวอย่างพืชที่ระยะเวลาต่างๆ หลังได้รับโคโตซาน โดยเพิ่มจากที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อวิเคราะห์ความแตกต่างของการแสดงออกของยีนที่ได้จากงานวิจัยครั้งนี้
2. ศึกษาบทบาท และหน้าที่ของ *De362* และ *De7696* เพื่อให้มีความเข้าใจในสองยีนนี้มากขึ้น
3. ศึกษาอื่น ๆ ที่มีความสัมพันธ์กับ *De362* และ *De7696* ที่ได้จากการวิจัยในครั้งนี้ ซึ่งอาจทำให้ทราบถึงกลไกการกระตุ้นการแสดงออกของยีนต่างๆ ที่มีความเกี่ยวข้องกันเพิ่มขึ้น
4. ศึกษาการแสดงออกของยีนอื่นที่น่าสนใจ จากจำนวน cDNA ที่โคลนได้