

## บทที่ 1

### บทนำ

การออกดอกของพืชบางชนิด เช่น ลำไย จำเป็นต้องได้รับอุณหภูมิต่ำในช่วงหนึ่ง ซึ่งต้องมีระยะเวลาที่ยาวนานพอที่กระตุ้นการสร้างตาออกหรือจัดการพักตัวของตาออก ดังนั้นเมื่อสภาพภูมิอากาศหนาวเย็นไม่เหมาะสม จึงส่งผลให้มีการติดช่อดอกของลำไยไม่สม่ำเสมอ ผลรายได้ของเกษตรกรลงปีละมากๆ เมื่อไม่นานมานี้ได้มีการค้นพบว่าการใช้สารโพแทสเซียมคลอเรทสามารถชักนำให้ลำไยออกดอกได้โดยไม่ต้องผ่านอุณหภูมิต่ำ (พาวิน และคณะ, 2542) นอกจากนี้ยังพบว่าสารดังกล่าวสามารถชักนำให้ปวยเล้งออกดอกได้ด้วย (นพมณี และคณะ, 2543) แต่อย่างไรก็ตามยังไม่มีรายงานถึงกลไกการทำงานของสารดังกล่าว

ก่อนหน้านี้มีรายงานการใช้สาร 5-azacytidine ในการชักนำให้เกิดการออกดอกในพืช 2 ชนิด ได้แก่ *Arabidopsis thaliana* และ *Thlaspi arvense* ซึ่งพบว่า สารดังกล่าวสามารถทำให้พืชออกดอกได้เช่นเดียวกับการได้รับอุณหภูมิต่ำ (Burn *et al.*, 1993) 5-azacytidine จัดเป็น demethylating agent ซึ่งจะลดการเติมหมู่เมทิลในนิวคลีโอไทด์บนสายดีเอ็นเอหรือยับยั้งกระบวนการ DNA methylation ซึ่งเป็นกระบวนการที่เกี่ยวข้องกับการแสดงออกของยีนในพืช (Santi *et al.*, 1983) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าการใช้สารดังกล่าวชักนำให้เกิดลักษณะต้นเตี้ยในข้าว (Sano *et al.*, 1990) และยับยั้งการเกิดยอดของพืชเนื้อที่เลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ (Prakash and Kumar, 1997) ซึ่งเป็นผลเนื่องมาจากการเกิด demethylation การที่สารโพแทสเซียมคลอเรทสามารถชักนำให้เกิดการออกดอกในลำไยและปวยเล้งได้นั้น มีการตั้งสมมติฐานว่าอาจเป็นผลเนื่องมาจากผลของกระบวนการ demethylation เช่นเดียวกับผลของสาร 5-azacytidine

ดังนั้นในการวิจัยครั้งนี้ได้ใช้เทคนิค HAT-RAPD ร่วมกับการใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *HpaII* และ *MspI* ในการตรวจสอบกระบวนการ DNA methylation ในลำไยพันธุ์ดอ และปวยเล้งที่ผ่านการชักนำให้ออกดอกด้วยสารโพแทสเซียมคลอเรท และ 5-azacytidine ทั้งนี้ได้นำข้าวและพืชเนื้อมาใช้ในการทดลองควบคุม เพื่อทดสอบประสิทธิภาพของเทคนิคดังกล่าวในการตรวจสอบ DNA methylation ด้วย เนื่องจากมีรายงานมาก่อนแล้วว่า สาร 5-azacytidine มีผลไปลดกระบวนการเติมหมู่เมทิลในจีโนมพืชทั้ง 2 ชนิดนี้ ในการตรวจสอบได้อาศัยหลักการทำงานของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HpaII* และ *MspI* ซึ่งมีตำแหน่งจดจำเป็น CCGG เหมือนกัน แต่ sensitive ต่อ methylation ต่างกัน โดยที่ *HpaII* จะตัดได้ในกรณีที่ internal C ไม่ถูก methylated พร้อมกันทั้งสองสาย หรือที่เรียกว่า full methylation ส่วน *MspI* จะสามารถตัดได้ ไม่ว่า internal C จะถูก methylated หรือไม่ แต่จะ

ตัดไม่ได้ถ้า external C ถูก methylated การปรากฏแถบดีเอ็นเอที่เกิดจากการตัดด้วยเอนไซม์แต่ละชนิดอาจเหมือนหรือต่างกันได้ ขึ้นอยู่กับว่ามีการเติมหมู่เมทิล ณ เบส cytosine ตำแหน่งใดของตำแหน่งจดจำ กล่าวคือ ถ้าตัวอย่างดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ *HpaII* และ *MspI* มีการปรากฏแถบดีเอ็นเอในตำแหน่งเดียวกัน แสดงว่าเบส ณ ตำแหน่งนั้นไม่ถูก methylated แต่ถ้ามีการปรากฏแถบดีเอ็นเอเฉพาะในตัวอย่างที่ตัดด้วยเอนไซม์ *HpaII* แสดงว่า external C ถูก methylated ในทำนองเดียวกันถ้ามีการปรากฏแถบดีเอ็นเอเฉพาะในตัวอย่างที่ตัดด้วยเอนไซม์ *MspI* แสดงว่า internal C เกิด full methylation จากหลักการข้างต้น ทำให้สามารถระบุได้ว่าเกิด methylation ขึ้นหรือไม่ โดยพิจารณาจากการปรากฏแถบหรือไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นจากการตัดด้วยเอนไซม์แต่ละชนิด เปรียบเทียบกันระหว่างพืชที่ได้รับ treatments ต่างๆ กับกลุ่มควบคุม ซึ่งถ้ามีแถบดีเอ็นเอที่มีน้ำหนักโมเลกุลแตกต่างไปจากกลุ่มควบคุม ก็เป็นไปได้ว่าอาจเป็นผลของกระบวนการ demethylation

#### วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อตรวจสอบกระบวนการ DNA methylation ในลำไยพันธุ์ดอและปวยเล้งที่ผ่านการชักนำให้ออกดอกด้วยสารโพแทสเซียมคลอเรทและ 5-azacytidine ด้วยเทคนิค HAT-RAPD