บทที่ 5
วิจารณ์และสรุปผลการทดลอง

การทดลองนี้ได้ใช้เทคนิค HAT-RAPD ในการตรวจสอบกระบวนการ DNA methylation ในพืช 4 ชนิด ได้แก่ ข้าว พิทูเนีย ปวยเล้ง และลำไย ที่ถูกชักนำด้วยสาร 5-azacytidine สารโพแทสเซียมคลอเรท และอุณหภูมิต่ำ แบ่งกลุ่มการทดลองออกเป็น 4 กลุ่ม ดังนี้

1. การตรวจสอบกระบวนการ DNA methylation ในข้าว

จากรายงานของ Cherdshewasart (1998) ระบุว่าการใช้สาร 5-azacytidine ความเข้มข้น 25 μM มีผลชักนำให้เกิดลักษณะต้นเตี้ย และเพิ่มจำนวนกอของต้นข้าว ทั้งยังมีผลไปลดระดับ 5-methylcytosine ในดีเอ็นเอข้าวด้วย ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงได้ใช้สารความเข้มข้นเดียวกันมาใช้ในการทดลอง ซึ่งจากผลการทดลองพบว่าต้นข้าวในกลุ่มที่ได้รับสาร 5-azacytidine มีค่าเฉลี่ยของความสูง และจำนวนกอต่อต้น ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่เมื่อพิจารณาความสูงของแต่ละต้นในกลุ่มที่ได้รับสาร 5-azacytidine พบว่ามีแนวโน้มที่จะเกิดต้นเตี้ย โดยมีอัตราส่วนต้นเตี้ย : ต้นปกติ เท่ากับ 5 : 7 หรือเกิดต้นเตี้ยคิดเป็นเปอร์เซ็นต์เท่ากับ 41.67% ดังนั้นในการตรวจสอบ DNA methylation จึงได้คัดเลือกต้นข้าว จากกลุ่มที่ได้รับสาร 5-azacytidine ทั้งที่แสดงลักษณะต้นเตี้ยและต้นปกติ มาใช้ในการทดลอง เพื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยนำตัวอย่างดีเอ็นเอข้าวมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hpa*II และ *Msp*I แล้วเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยปฏิกิริยา PCR ในเทคนิค HAT-RAPD ซึ่งจากผลการทดลองพบว่าเกิดแถบดีเอ็นเอที่มีน้ำหนักโมเลกุลแตกต่างกัน ระหว่างกลุ่มที่ได้รับสาร กับกลุ่มควบคุม นั่นคือ เกิด demethylation ในต้นข้าวที่ได้รับสารดังกล่าว ผลการทดลองสอดคล้องกับการทดลองของ Sano *et al.* (1990) ที่ได้ตรวจสอบกระบวนการ DNA methylation ในข้าวโดยการวัดปริมาณ 5-methylcytosine ในดีเอ็นเอข้าวที่ได้รับสาร 5-azacytidine เปรียบเทียบกับข้าวที่ไม่ได้รับสาร ซึ่งจากการทดลองพบว่าข้าวที่ได้รับสาร 5-azacytidine มีปริมาณของ 5-methylcytosine ลดลง 16 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเกิด demethylation ขึ้นในข้าวที่ได้รับสารดังกล่าว

สาร 5-azacytidine เป็นสารจำพวก demethylating agent ซึ่งมีผลไปลดการเติมหมู่เมทิลบนสายดีเอ็นเอ (Santi *et al.*, 1983) แสดงว่าผลจากการลดระดับการเติมหมู่เมทิลดังกล่าว มีผลไปชักนำให้เกิดลักษณะต้นเตี้ยในข้าว อย่างไรก็ตามความสัมพันธ์ระหว่าง การลดระดับการเติมหมู่เมทิลบนสายดีเอ็นเอ และการเกิดต้นเตี้ยยังไม่เป็นที่กระจ่างชัดนัก แต่จากการทดลองของ Sano and Youssefian ในปี 1991 ซึ่งได้ทดลองให้สาร 5-azacytidine แก่ต้นกล้าข้าว แล้วทำการทดสอบหายีน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ที่ได้รับผลกระทบจากการได้รับสารชนิดนี้ พบว่าในต้นข้าวที่เกิดลักษณะต้นเตี้ยซึ่งเป็นผลมาจากการถูกชักนำด้วยสาร 5-azacytidine นั้นจะมีการแสดงออกของยีน *rgp*1 ในระดับต่ำกว่าต้นข้าวปกติ แสดงว่า ยีน *rgp*1 อาจถูกชักนำโดยตรงหรือโดยอ้อมด้วยกระบวนการ DNA methylation โดยที่โปรตีนที่สร้างจากยีน *rgp*1 ซึ่งทำหน้าที่เกี่ยวกับ GTP-binding activity อาจมีผลเกี่ยวข้องกับพัฒนาการ และการเจริญเติบโตของข้าว

2. การตรวจสอบกระบวนการ DNA methylation ในพิทูเนีย

จากรายงานของ Prakash and Kumar (1997) และรายงานของ แก้วกาญจน์ และวิชัย (2542) ระบุว่าการใช้สาร 5-azacytidine ความเข้มข้น 50 μM และ 100 μM ตามลำดับ มีผลไปลดระดับการเติมหมู่เมทิลบนสายดีเอ็นเอ ซึ่งส่งผลไปยับยั้งการเกิดยอดของต้นพิทูเนีย นอกจากนี้ยังมีผลทำให้ต้นพิทูเนียมีความสูงของต้นลดลง และมีสีกลีบดอกผิดปกติ ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงได้ใช้สารความเข้มข้นเดียวกันมาใช้ในการทดลอง ซึ่งจากผลการทดลองพบว่า การให้สาร 5-azacytidine แต่ละความเข้มข้นดังกล่าว แก่พิทูเนียในขณะที่เมล็ดกำลังงอก มีผลทำให้ต้นพิทูเนียมีการออกดอกเร็วกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และพบว่ากลุ่มที่ได้รับสาร 5-azacytidine ความเข้มข้นสูง (100 μM) มีความสูงมากกว่ากลุ่มที่ได้รับสารความเข้มข้นต่ำ (50 μM) และกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ผลการทดลองที่ได้ขัดแย้งกับผลการทดลองของ แก้วกาญจน์ และวิชัย (2542) ที่พบว่าการให้สาร 5-azacytidine ไม่มีผลต่อจำนวนวันที่ใช้ในการออกดอกของต้นพิทูเนีย และการให้สารดังกล่าวมีผลทำให้ต้นพิทูเนียมีความสูงลดลง การที่ผลการทดลองไม่เป็นไปในทิศทางเดียวกันอาจเนื่องมาจากมีหลายปัจจัยเข้ามาเกี่ยวข้อง เช่น พันธุ์ของพิทูเนียที่นำมาใช้ในการทดลองมีความแตกต่างกัน เนื่องจากมีรายงานมาแล้วว่า ผลของสาร 5-azacytidine ต่อพืชจะมีมากน้อยแตกต่างกันขึ้นอยู่กับ สปีชีส์ของพืชและชนิดของเนื้อเยื่อพืชที่นำมาศึกษา นอกจากนี้อาจมีปัจจัยอื่นเช่น การควบคุมสภาพแวดล้อมในเรื่องของแสง และอุณหภูมิที่แตกต่างกัน เป็นต้น อย่างไรก็ตามไม่พบว่าการให้สาร 5-azacytidine มีผลต่อจำนวนยอดต่อต้น และจำนวนใบต่อต้น ของต้นพิทูเนีย ในการทดลองนี้ได้เลือกตัวอย่างพิทูเนียจากกลุ่มที่ได้รับสาร 5-azacytidine แต่ละความเข้มข้นมาตรวจสอบกระบวนการ DNA methylation โดยเทคนิค HAT-RAPD พบว่าเกิดแถบดีเอ็นเอที่มีน้ำหนักโมเลกุลแตกต่างกัน ระหว่างกลุ่มที่ได้รับสารแต่ละความเข้มข้นและกลุ่มควบคุม นั่นคือเกิด demethylation ในกลุ่มที่ได้รับสารดังกล่าว ผลการทดลองสอดคล้องกับการทดลองของ Prakash and Kumar (1997) ซึ่งได้ตรวจสอบการเกิด DNA methylation ในพิทูเนียที่ได้รับสาร 5-azacytidine เปรียบเทียบกับพิทูเนียที่ไม่ได้รับสาร ในการทดลองได้ตัด genomic DNA ด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *Hpa*II และ *Msp*I แล้วตรวจสอบด้วยเทคนิค RAPD พบว่าเกิดแถบดีเอ็นเอที่มี

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

น้ำหนักโมเลกุลแตกต่างกัน โดยที่ต้นที่ได้รับสารมีจำนวนแถบ DNA น้อยกว่าต้นที่ไม่ได้รับสาร จำนวน 5 แถบ แสดงให้เห็นว่าเกิด demethylation ในต้นพิทูเนียที่ได้รับสารดังกล่าว

3. การตรวจสอบกระบวนการ DNA methylation ในปวยเล้ง

จากรายงานของ นพมณี และคณะ (2543) ระบุว่าการใช้สาร 5-azacytidine ความเข้มข้น 125 μM สารโพแทสเซียมคลอเรทความเข้มข้น 250 μM และอุณหภูมิต่ำที่ 10 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 วัน มีผลทำให้ต้นปวยเล้งมีการออกดอกเร็วขึ้น และมีเปอร์เซ็นต์การออกดอกมากขึ้น ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงได้ใช้สารความเข้มข้นเดียวกันมาใช้ในการทดลอง ซึ่งจากผลการทดลองพบว่า ปวยเล้งในกลุ่มที่ได้รับสารแต่ละชนิดที่ความเข้มข้นดังกล่าว รวมทั้งกลุ่มที่ได้รับอุณหภูมิต่ำมีการออกดอกเร็วกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ทั้งยังมีเปอร์เซ็นต์การออกดอกมากกว่ากลุ่มควบคุมประมาณ 13 - 34% สอดคล้องกับผลการทดลองของนพมณีและคณะดังได้กล่าวไปแล้วข้างต้น นอกจากนี้ยังพบว่า ต้นปวยเล้งที่ได้รับ treatments ต่างๆ มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาแตกต่างกันอย่างเห็นได้ชัด กล่าวคือ ต้นที่ได้รับสาร 5-azacytidine และสารโพแทสเซียมคลอเรท จะมีการยืดยาวของลำต้นจนเห็นข้อปล้องชัดเจน ซึ่งจะมีการเจริญของดอกในเวลาต่อมา ส่วนต้นที่ได้รับอุณหภูมิต่ำ 10 °C เป็นเวลา 20 วัน จะมีใบขนาดเล็กกว่า ลำต้นมีการยืดยาวจนเห็นข้อปล้องชัดเจน และมีการพัฒนาของดอกไปพร้อมๆ กัน สำหรับต้นในกลุ่มควบคุมจะมีลักษณะเป็นพุ่มเตี้ย (resette)ไม่มีการยืดยาวของลำต้น สอดคล้องกับผลของผักกาดขาวปลีในการทดลองของ นพมณี และคณะ (2544a) ที่ได้ศึกษาผลของสาร 5-azacytidine สารโพแทสเซียมคลอเรท และอุณหภูมิต่ำในการชักนำการออกดอกของผักกาดขาวปลี และพบว่า ต้นผักกาดขาวปลีที่ได้รับ treatments ต่างๆ มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาแตกต่างกัน แบ่งเป็น 3 ลักษณะเช่นกัน ได้แก่ ต้นที่มีลักษณะเป็นพุ่มตลอด ซึ่งพบในกลุ่มควบคุม ในขณะที่กลุ่มที่ได้รับอุณหภูมิต่ำ จะมีการยืดยาวของลำต้นอย่างเห็นได้ชัด และมีเปอร์เซ็นต์การออกดอกสูง ตุ่มดอกพัฒนาไปเป็นดอกที่สมบูรณ์ ส่วนกลุ่มที่ได้รับสาร 5-azacytidine และสารโพแทสเซียมคลอเรท จะมีลักษณะคล้ายกับกลุ่มที่ได้รับความเย็น แต่จะมีปล้องสั้นกว่า และเตี้ยกว่าเล็กน้อย มีการเกิดตุ่มดอก แต่จะมีเปอร์เซ็นต์การเกิดน้อยกว่ากลุ่มที่ได้รับความเย็น และไม่พบว่ามีการพัฒนาของดอกจริง จากลักษณะที่แตกต่างกันทั้ง 3 ลักษณะ แสดงให้เห็นว่า การได้รับสารทั้ง 2 ชนิด และการได้รับอุณหภูมิต่ำ มีผลต่อการออกดอกของต้นปวยเล้งและผักกาดขาวปลี ในลักษณะที่คล้ายคลึงกัน ทั้งยังมีผลชักนำให้เกิดการออกดอกของพืชทั้ง 2 ชนิดด้วย อย่างไรก็ตาม จากผลการทดลองก็พบว่า ลักษณะทาง phenotype ของต้นที่ได้รับสาร 5-azacytidine และสารโพแทสเซียมคลอเรท มีความแตกต่างจากกลุ่มที่ได้รับอุณหภูมิต่ำ แม้ว่าผลสุดท้าย ต้นจาก 3 treatments จะตอบสนองเรื่องการออกดอกเหมือนกันก็ตาม แสดงให้เห็นว่า

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

รูปแบบการพัฒนา และการออกดอกของพืช สามารถเกิดขึ้นได้หลายทิศทางตามปัจจัยที่ได้รับ ซึ่งจากการศึกษาเกี่ยวกับกระบวนการออกดอกของ *Arabidopsis* เมื่อได้รับปัจจัยที่ชักนำการออกดอกที่แตกต่างกัน (Yaron and Dean, 1998) พบว่าพืชมีการตอบสนองต่อปัจจัยต่างๆ แตกต่างกัน แบ่งออกเป็น 4 ทิศทาง ได้แก่ floral repression pathway, autonomous promotion pathway, photoperiodic promotion pathway และ vernalization promotion pathway โดยในแต่ละทิศทางจะมีทั้งยีนควบคุมที่เหมือนกัน เช่น *LFY* และยีนควบคุมที่แตกต่างกัน เช่น *FRI*, *LD*, *CO* and *VRN* เป็นต้น

การที่สารโพแทสเซียมคลอเรทสามารถชักนำให้เกิดการออกดอกในปวยเล้งได้นั้น มีการตั้งสมมุติฐานว่าอาจเป็นผลเนื่องมาจากผลของกระบวนการ demethylation เช่นเดียวกับการใช้สาร 5-azacytidine และการใช้อุณหภูมิต่ำ ในการทดลองนี้จึงได้ทำการตรวจสอบกระบวนการ DNA methylation ในตัวอย่างปวยเล้งแต่ละกลุ่ม เปรียบเทียบกับตัวอย่างในกลุ่มควบคุม โดยใช้เทคนิค HAT-RAPD โดยได้เก็บตัวอย่างต้นปวยเล้งในแต่ละกลุ่มๆ ละ 5 ต้น มาทำการวิเคราะห์เป็นระยะทุกสัปดาห์จนกระทั่งมีการออกดอก นั่นคือ ทำการเก็บตัวอย่าง ณ วันที่ 14, 21 และ 28 วันหลังเมล็ดงอก ตามลำดับ จากผลการทดลองเมื่อตัด genomic DNA ด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *Msp*I แล้วตรวจสอบด้วยเทคนิค HAT-RAPD พบว่าตัวอย่างในแต่ละ treatment เกิดแถบดีเอ็นเอแตกต่างจากกลุ่มควบคุม นั่นคือ เกิด demethylation ขึ้นในตัวอย่างดังกล่าว นอกจากนี้ยังพบว่าการให้สารแต่ละชนิดและการให้อุณหภูมิต่ำ มีผลทำให้เกิด demethylation ณ ช่วงอายุต่างๆ กัน โดยเกิดขึ้นประมาณ 20% ของตัวอย่างที่นำมาตรวจสอบ (1 ต้นใน 5 ต้น) ทั้งนี้เนื่องจาก demethylation เป็นกระบวนการที่เกิดขึ้นแบบสุ่ม ดังนั้นเป็นไปได้ว่า ถ้าเพิ่มจำนวนตัวอย่างที่นำมาตรวจสอบให้มากขึ้น อาจมีโอกาสที่จะตรวจพบ demethylation มากขึ้นด้วย

4. การตรวจสอบกระบวนการ DNA methylation ในลำไย

ความเข้มข้นของสารโพแทสเซียมคลอเรทที่ใช้ในการทดลองนี้ เป็นความเข้มข้นที่ใช้จริงในสวนของ คุณทองดี ใจมูล เกษตรกรในเขตอำเภอหางดง จังหวัดเชียงใหม่ ซึ่งใช้สารโพแทสเซียมคลอเรทในอัตรา 1 กิโลกรัมต่อต้น ในการชักนำการออกดอกของต้นลำไยพันธุ์ดออายุ 10 ปี จากผลการให้สารในอัตราความเข้มข้นดังกล่าว พบว่า ต้นที่ได้รับสารโพแทสเซียมคลอเรทมีการออกดอกภายใน 38 วันหลังใส่สาร ในขณะที่ต้นที่ไม่ได้รับสารจะไม่มีการออกดอกเลย ผลที่ได้สอดคล้องกับการศึกษาของ พาวิน และคณะ (2542) ซึ่งได้รายงานการให้สารโพแทสเซียมคลอเรท แก่ต้นลำไยพันธุ์ดออายุ 10 ปี โดยการให้สารในอัตรา 40 กรัมต่อตารางเมตร พบว่าสามารถทำให้ลำไยแทงช่อดอกออกมามากที่สุดหลังจากการให้สารไปแล้ว 25 วัน ในขณะที่ต้นที่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ไม่ได้รับสารจะไม่มีการแทงช่อดอก แม้จะถึงฤดูกาลออกดอกตามปกติแล้วก็ตาม จากการศึกษาของนักวิจัยหลายท่าน และจากการสอบถามเกษตรกรพอจะสรุปได้ว่า ลำไยจะมีการแทงช่อดอกภายหลังจากการให้สารตั้งแต่ 21 วัน ถึงประมาณ 2 เดือน โดยการแทงช่อดอกจะเกิดขึ้นเร็วหรือช้าขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย เช่น ปริมาณของสารที่ใช้ อายุของใบ อายุของต้น และช่วงเวลาการให้สาร เป็นต้น อย่างไรก็ตามแม้ว่าสารโพแทสเซียมคลอเรทจะสามารถชักนำการออกดอกของลำไยได้ แต่กลไกในการที่สารดังกล่าวไปมีผลทำให้ลำไยออกดอกได้โดยไม่ต้องผ่านความหนาวเย็นนั้น ยังไม่ทราบแน่ชัด แต่คาดว่าอาจเกี่ยวข้องกับกระบวนการ DNA methylation ดังนั้นในการทดลองนี้จึงได้ทำการตรวจสอบกระบวนการ DNA methylation ในตัวอย่างลำไยพันธุ์ดอที่ได้รับสารโพแทสเซียมคลอเรท จำนวน 3 ต้น เปรียบเทียบกับต้นควบคุมที่ไม่ได้รับสาร จำนวน 1 ต้น โดยได้เก็บตัวอย่างใบจากต้นลำไยในแต่ละต้นๆ ละ 4 กิ่ง มาวิเคราะห์ทุก 10 วัน จนกว่าจะออกดอก นั่นคือทำการเก็บตัวอย่าง ณ วันที่ 20, 30 และ 40 วันหลังใส่สาร ตามลำดับ หลังจากที่ตัด genomic DNA ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hpa*II และ *Msp*I แล้วตรวจสอบกระบวนการ DNA methylation โดยเทคนิค HAT-RAPD ไม่พบว่าเกิดแถบดีเอ็นเอที่มีน้ำหนักโมเลกุลแตกต่างกัน ระหว่างตัวอย่างในกลุ่มที่ได้รับสารโพแทสเซียมคลอเรทที่ระยะต่างๆ และตัวอย่างในกลุ่มควบคุม นั่นคือ ตรวจไม่พบ demethylation ในตัวอย่างลำไยที่ระยะต่างๆ ที่นำมาตรวจสอบ ผลการทดลองสอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้านี้ ซึ่งได้ศึกษาผลของสารโพแทสเซียมคลอเรทในการชักนำการออกดอกในระหว่างการเจริญของต้นกล้าลำไยพันธุ์ดอ โดยได้มีการตั้งสมมุติฐานว่า ถ้ากระบวนการ DNA methylation มีผลไปยับยั้งการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการออกดอกของลำไยจริง แสดงว่าการแสดงออกของยีนดังกล่าวจะเกิดขึ้นได้ก็ต่อเมื่อมีสัญญาณที่เหมาะสมมาเปิดสวิตต์การทำงาน ในที่นี้ก็คือสารโพแทสเซียมคลอเรทนั่นเอง ดังนั้นการให้สารแก่ลำไยในระยะต่างๆ ของการเจริญเติบโต ไม่ว่าจะเป็นระยะที่เมล็ดกำลังงอก หรือระยะที่เป็นต้นอ่อนหรือต้นกล้า น่าจะสามารถกระตุ้นให้ต้นลำไยออกดอกได้ แต่จากผลการทดลองไม่พบว่ามีการออกดอกเกิดขึ้น ไม่ว่าจะให้สารในระยะใดของการเจริญ (ณัฏฐิณี, 2545) อย่างไรก็ตาม การออกดอกของพืชโดยเฉพาะพืชที่มีอายุหลายปี เช่น ลำไย มีกลไกที่ควบคุมการออกดอกที่ซับซ้อน และมีหลายปัจจัยเข้ามาเกี่ยวข้อง ในกรณีนี้จะเห็นว่ามีเรื่องของ ความสมบูรณ์ของต้น และการเจริญทางกิ่งใบหรืออายุพืช เข้ามาเกี่ยวข้องด้วย

จากผลการทดลองสามารถสรุปได้ว่า ยังตรวจไม่พบ demethylation ในลำไย ในระยะที่นำมาตรวจสอบ อาจต้องมีการทดลองเพิ่มเติมต่อไป โดยให้มีระยะเวลาในการเก็บตัวอย่างถี่ขึ้น รวมทั้งเพิ่มจำนวนตัวอย่างให้มากขึ้น นอกจากนี้อาจต้องเก็บตัวอย่างเพิ่มเติมในส่วนของใบแก่หรือใบในระยะเพสลาดด้วย จากเดิมที่เก็บเฉพาะใบอ่อน เนื่องจากมีรายงานว่า ต้นลำไยจะออกดอกได้ดีเมื่อให้สารโพแทสเซียมคลอเรท ในระยะใบแก่อายุประมาณ 40-45 วัน หรืออย่างน้อยที่สุดควรอยู่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ในระยะเพสลาด อายุใบประมาณ 20-25 วัน ในขณะที่การให้สารในระยะใบอ่อนจะทำให้มีการออกดอกเพียงเล็กน้อยเท่านั้น (พาวิน, 2543)

จากการที่ตรวจพบ demethylation ในข้าวที่ถูกชักนำให้เกิดลักษณะต้นเตี้ย รวมทั้งในพิทูเนียและปวยเล้งที่ถูกชักนำให้มีการออกดอกเร็วขึ้น แสดงให้เห็นว่ากระบวนการ demethylation อาจมีผลควบคุมการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับพัฒนาการ และการออกดอกของพืชทดลองดังกล่าว สำหรับการศึกษาเพื่อตรวจสอบหายีนที่ได้รับผลกระทบจากกระบวนการ demethylation นั้น อาจทำได้โดยการ subclone ชิ้นส่วน DNA ที่ตรวจพบว่าแตกต่างจากกลุ่มควบคุมในเทคนิค HAT-RAPD ข้างต้น แล้วนำไปใช้ในการวิเคราะห์ต่อไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สรุปผลการทดลอง

1. การให้สาร 5-azacytidine ความเข้มข้น 25 μM แก่ข้าวในขณะเมล็ดกำลังงอก พบว่ามีแนวโน้มที่จะทำให้เกิดต้นเตี้ย โดยมีอัตราส่วนต้นเตี้ย : ต้นปกติ เท่ากับ 5 : 7 หรือเกิดต้นเตี้ยคิดเป็นเปอร์เซ็นต์เท่ากับ 41.67% และเมื่อเลือกตัวอย่างข้าวมาตรวจสอบกระบวนการ DNA methylation โดยเทคนิค HAT-RAPD ด้วยการใช้ 3 ไพรเมอร์ ได้แก่ OPW-09, OPL-04 และ OPL-14 หลังจากการตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *Hpa*II และ *Msp*I พบว่าเกิด demethylation ขึ้นในตัวอย่างข้าวที่ได้รับสาร 5-azacytidine ดังกล่าว
2. การให้สาร 5-azacytidine ความเข้มข้น 50 และ 100 μM แก่พิทูเนียในขณะเมล็ดกำลังงอก พบว่ามีผลทำให้ต้นพิทูเนียมีการออกดอกเร็วขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับต้นที่ไม่ได้รับสาร และพบว่าการให้สารที่ความเข้มข้นสูงคือ 100 μM มีผลทำให้ต้นพิทูเนียมีความสูงเฉลี่ยมากกว่าในกลุ่มที่ไม่ได้รับสารอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ไม่พบว่ามีผลต่อจำนวนยอด และจำนวนใบของต้นพิทูเนีย เมื่อเลือกตัวอย่างพิทูเนียมาตรวจสอบกระบวนการ DNA methylation โดยเทคนิค HAT-RAPD ด้วยการใช้ 2 ไพรเมอร์ ได้แก่ OPW-09 และ OPL-04 หลังจากการตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *Hpa*II และ *Msp*I พบว่า เกิด demethylation ขึ้นในตัวอย่างพิทูเนียที่ได้รับสาร 5-azacytidine ดังกล่าว
3. การให้สาร 5-azacytidine ความเข้มข้น 125 μM, สารโพแทสเซียมคลอเรท ความเข้มข้น 250 μM และการให้อุณหภูมิต่ำ 10 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 20 วัน แก่ปวยเล้ง พบว่ามีผลทำให้ต้นปวยเล้งมีการออกดอกเร็วกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ทั้งยังมีเปอร์เซ็นต์การออกดอกมากกว่ากลุ่มควบคุมประมาณ 13 - 34% แต่ไม่มีผลต่อความสูง จำนวน vegetetive leaves และน้ำหนักสดของต้นปวยเล้ง นอกจากนี้ยังพบว่า ต้นปวยเล้งที่ได้รับ treatments ต่างๆ มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาแตกต่างกัน โดยที่ต้นที่ได้รับสาร 5-azacytidine และสารโพแทสเซียมคลอเรท จะมีการยืดยาวของลำต้นจนเห็นข้อปล้องชัดเจน ซึ่งจะมีการเจริญของดอกในเวลาต่อมา ส่วนต้นที่ได้รับอุณหภูมิต่ำ 10 °C เป็นเวลา 20 วัน จะมีใบขนาดเล็กกว่า ลำต้นมีการยืดยาวจนเห็นข้อปล้องชัดเจน และมีการพัฒนาของดอกไปพร้อมๆ กัน ในขณะที่ต้นในกลุ่มควบคุมจะมีลักษณะเป็นพุ่มเตี้ย (resette) ไม่มีการยืดยาวของลำต้น เมื่อนำตัวอย่างปวยเล้งมาตรวจสอบกระบวนการ DNA methylation โดยเทคนิค HAT-RAPD ด้วยการใช้ 2 ไพรเมอร์ ได้แก่ OPW-09 และ OPL-04 หลังจากการตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *Msp*I พบว่าเกิด demethylation ขึ้นในตัวอย่างปวยเล้งกลุ่มที่ได้รับสารทั้ง 2 ชนิด และกลุ่มที่ได้รับอุณหภูมิต่ำ โดยเกิดที่ช่วงอายุต่างๆ กัน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4. การให้สารโพแทสเซียมคลอเรทในอัตรา 1 กิโลกรัมต่อต้น แก่ต้นลำไยพันธุ์ดออายุ 10 ปี พบว่ามีผลทำให้ลำไยออกดอกภายใน 38 วันหลังการใส่สาร ในขณะที่ต้นที่ไม่ได้รับสารจะไม่มีการออกดอก เมื่อนำตัวอย่างลำไยมาตรวจสอบกระบวนการ DNA methylation โดยเทคนิค HAT-RAPD ด้วยการใช้ 5 ไพรเมอร์ ได้แก่ OPW-09, OPL-04 OPC-09, OPH-06 และ OPL-15 หลังจากการตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *Hpa*II และ *Msp*I พบว่า ไม่พบว่าเกิดแถบดีเอ็นเอที่มีน้ำหนักโมเลกุลแตกต่างกัน ระหว่างตัวอย่างในกลุ่มที่ได้รับสารโพแทสเซียมคลอเรทที่ระยะต่างๆ และตัวอย่างในกลุ่มควบคุม นั่นคือ ตรวจไม่พบ demethylation ในตัวอย่างลำไยที่ระยะต่างๆ ที่นำมาตรวจสอบ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved