บทที่ 5

อภิปรายผลการทดลอง

1. ศึกษาวิธีการสกัด total RNA ที่เหมาะสมสำหรับกล้วยไม้สกุลหวาย 'เอียสกุล'

1.1 เปรียบเทียบปริมาณ และคุณภาพของ total RNA ที่สกัดจากใบอ่อนของกล้วยไม้สกุลหวาย 'เอียสกุล' ที่ได้จากวิธีการสกัด total RNA 3 วิธี ได้แก่ วิธีของ Thikart และคณะ (2005) วิธีดัดแปลง Yu และ Goh (2000) แบบที่ 1 และวิธีดัดแปลง Yu และ Goh (2000) แบบที่ 2

วิธีดัดแปลง Yu และ Goh (2000) แบบที่ 1 พบว่ามีการสลายของ total RNA เกิดขึ้น กับตัวอย่างการทดลอง อาจเนื่องจากสาร PVP ไม่สามารถกำจัดเมือกของกล้วยไม้ซึ่งคาดว่าเป็นสารพวกโพลีแซคคาไรด์ (polysaccharide) ซึ่งมีปริมาณมาก ทำให้สารละลายส่วนใส (supernatant) ระหว่างการทดลอง มีสักษณะหนืด และปิเปตยาก ซึ่งอาจส่งผลให้ total RNA บางส่วนเกิดการสลายตัว (Zang และ Yang, 2002) วิธีดัดแปลง Yu และ Goh (2000) แบบที่ 2 ไม่พบการสลายตัวของ total RNA แต่ปริมาณ total RNA ที่สกัดได้มีน้อย และมีคุณภาพไม่ดี เนื่องจากสัดส่วนของ $OD_{260/280}$ ซึ่งแสดงคุณภาพของ total RNA มีค่าต่ำกว่า 1.8 ซึ่งต่างกับวิธีของ Thikart และคณะ (2005) ซึ่งมีปริมาณ total RNA มาก และมีคุณภาพดีกว่า แต่มีการปนเปื้อนของ DNA และปริมาณเมือกสูง นอกจากนี้วิธีของ Thikart และคณะ (2005) พบการสลายตัวของ total RNA ในบางตัวอย่างการทดลองอีกด้วย

ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้ วิธีที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการสกัด total RNA ของกล้วยไม้ คือ วิธีดัดแปลง Yu และ Goh (2000) แบบที่ 2 ซึ่งเป็นวิธีที่ลดขั้นตอนการบ่มเนื้อเยื่อพืชที่บดละเอียด ใน extraction buffer ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส และปรับเปลี่ยนองค์ประกอบของ extraction buffer โดยการใช้ PVPP แทนการใช้ PVP เนื่องจากไม่พบการสลายตัวของ total RNA เกิดขึ้น

จากการศึกษาทำให้คาดว่าสารประกอบต่างๆ ใน extraction buffer ของวิธีการสกัด total RNA ทั้ง 3 วิธีการ อาจมีผลต่อขั้นตอนการสกัด คุณภาพ และการสลายตัวของ total RNA ที่สกัดได้ สารเคมีที่คาดว่ามีผลต่อการทดลองมีหลายประการ เช่น PVPP เป็นสารที่สามารถกำจัดโพลีฟีนอล (polyphenol) และโพลีแซคคาไรด์ที่ไม่ละลายน้ำออกจาก total RNA ได้ (Venkatachalam, 1999) ดังนั้นเมื่อทำการเปรียบเทียบวิธีดัดแปลง Yu และ Goh (2000) แบบที่ 2

ซึ่งมีสารนี้กับวิธีของ Thikart และคณะ (2005) พบว่าการปิเปตสารละลายส่วนใสด้านบนในขั้นตอนต่างๆ ของการสกัด total RNA เป็นไปค่อนข้างสะดวกกว่าวิธีของ Thikart และคณะ (2005) เพราะเมือกจากใบของกล้วยไม้ ที่คาดว่าเป็นสารโพลีแซคคาไรด์ ที่ไม่ละลายน้ำ สามารถตกตะกอนพร้อมกับเนื้อเยื่อจากใบอ่อนของกล้วยไม้ หลังการปั่นเหวี่ยง และเมื่อทำการเปรียบเทียบวิธีดัดแปลง Yu และ Goh (2000) แบบที่ 2 กับวิธีดัดแปลง Yu และ Goh (2000) แบบที่ 1 พบว่าการปิเปตสารละลายส่วนใสด้านบนในขั้นตอนต่างๆ ของการสกัด total RNA โดยวิธีดัดแปลง Yu และ Goh (2000) แบบที่ 2 เป็นไปค่อนข้างสะดวกกว่าวิธีดัดแปลง Yu และ Goh (2000) แบบที่ 1 เนื่องจากปริมาณเมือกจากใบของกล้วยไม้สามารถตกตะกอนพร้อมกับเนื้อเยื่อจากใบอ่อนของกล้วยไม้ หลังการปั่นเหวี่ยงได้ดีกว่า

เนื่องจากกล้วยไม้เป็นพืชอวบน้ำ เมื่อสัมผัสกับไนโตรเจนเหลวทำให้เนื้อเยื่อมีความแข็งมาก และบดยาก ดังนั้นจึงต้องตัดเนื้อเยื่อบริเวณใบอ่อนของกล้วยไม้เป็นชิ้นเล็กๆ ก่อนเพื่อให้สะดวกในการบดในไนโตรเจนเหลว จากการทำเช่นนี้อาจมีผลทำให้เนื้อเยื่อนี้ มีปริมาณสารฟีนอลิค (phenolic) สูงขึ้น เพราะเนื้อเยื่อดังกล่าวเกิดบาดแผล (Campos-Vargas และ Saltveit, 2002) ซึ่งจะส่งผลต่อคุณภาพของ total RNA เนื่องจากสารฟีนอลิคเมื่อถูกออกซิไดซ์ (oxidize) จะเปลี่ยนเป็นสารควิโนน (quinone) ซึ่งสามารถสร้างพันธะโควาเลนต์กับกรดนิวคลีอิก (nucleic acid) ทำให้คุณภาพของ total RNA ลดลง ซึ่งอาจไม่เหมาะสมกับการทำการทดลองขั้นต่อๆ ไป (Loomis, 1974) ดังนั้นวิธีที่ดัดแปลงจากวิธีของ Yu และ Goh (2000) แบบที่ 2 ซึ่งเป็นวิธีปรับเปลี่ยนองค์ประกอบของ extraction buffer โดยการใช้ PVPP ทดแทนการใช้ PVP และมีความเข้มข้นของ ß-mercaptoethanol ปริมาณสูงกว่าวิธีของ Thikart และคณะ (2005) จึงมีผลช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของการสกัด total RNA ครั้งนี้ เนื่องจาก ß-mercaptoethanol ที่ความเข้มข้นสูง สามารถรักษาสภาพของ total RNA ได้ โดยช่วยป้องกันสารฟีนอลิคมาจับกับ total RNA ป้องกันการผลิตสารควิโนนจากสารฟีนอลิค และอาจช่วยหยุดการทำงานของเอนไซม์ไรโบนิวคลีเอส (ribonucleases) โดยการทำลายพันธะไดซัลไฟด์ (disulfide) ระหว่างโมเลกุลของโปรตีนได้อีกด้วย (Vankatachalam, 1999) นอกจากนี้ Lal และคณะ (2001) พบว่า ß-mercaptoethanol ที่มีความเข้มข้น 200 mM เหมาะสมกับการสกัด total RNA จากเนื้อเยื่อพืชที่มีโพลีฟีนอลปริมาณสูง และทำให้ total RNA ที่สกัดได้ไม่เกิดการสลายตัว ดังนั้น total RNA จึงมีคุณภาพ และสามารถประยุกต์ใช้ในการทดลองขั้นต่อไป เช่น การแยก mRNA การทำ reverse transcription และ differential display ทั้งนี้ Lal และคณะ (2001) ยังได้แนะนำว่าอาจเพิ่มปริมาณ ß-mercaptoethanol ใน extraction buffer ให้มีความเข้มข้นสูงถึง 300 mM เมื่อต้องการสกัด total RNA จากเนื้อเยื่อพืชที่มีปริมาณโพลีฟีนอลสูงมาก

วิธีดัดแปลง Yu และ Goh (2000) แบบที่ 2 มีความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ใน extraction buffer สูงกว่าวิธีของ Thikart และคณะ (2005) ส่งผลให้ลดการตกตะกอนร่วมกันระหว่างโพลีแซคคาไรด์กับ total RNA เนื่องจากโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นสูงจะไปเพิ่มการละลายของโพลีแซคาไรด์ในเอทานอล (Fang, Hammar และ Grumet, 1992; Lodhi และคณะ, 1994) ดังนั้น total RNA ที่สกัดได้จึงมีความสะอาดเพิ่มขึ้น นอกจากนี้การใช้ CTAB ร่วมกับโซเดียมคลอไรด์ที่มีความเข้มข้น 4 M จะช่วยยับยั้งการตกตะกอนร่วมกันระหว่างโพลีแซคคาไรด์กับกรดนิวคลีอิคได้อีกด้วย (Tel-Zur และคณะ, 1999)

จากการที่ extraction buffer ของวิธี Thikart และคณะ (2005) ไม่มีสารเคมีที่สามารถกำจัดเมือกของกล้วยไม้ ทำให้ขั้นตอนการกำจัดโปรตีน และไขมันออกนั้นเป็นไปค่อนข้างยาก เนื่องจากเมือกของกล้วยไม้มีความหนืดมาก ส่งผลให้โปรตีน และไขมัน ซึ่งเป็นชั้นที่อยู่ระหว่างสารละลายส่วนใสกับ phenol : chloroform ถูกดูดติดขึ้นมาพร้อมกับเมือกของกล้วยไม้ในระหว่างการปิเปตสารละลายส่วนใส ทำให้ตะกอน total RNA ที่ได้จากการทำ LiCl precipitation มีลักษณะขุ่น และเมื่อละลายด้วย DEPC-treated water สารละลายที่ได้มีความขุ่น และมีบางส่วนที่ไม่สามารถละลายได้ ซึ่งผลจากการสกัด RNA ด้วยวิธีของ Thikart และคณะ (2005) คล้ายกับการสกัด total RNA จาก *Cinnamomum tenuipilum* ที่ใช้วิธี phenol/SDS ของ Zang และ Yang (2002) ซึ่งได้รายงานว่าการที่ total RNA ที่สกัดได้ ไม่สามารถละลายน้ำได้ อาจเนื่องมาจากการเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนของ RNA–phenol-polysaccharide (Tesniere และ Vayda, 1991; Ainsworth, 1994) ในขณะที่ total RNA ที่สกัดได้จากวิธีดัดแปลง Yu และ Goh (2000) แบบที่ 2 พบว่าเมื่อละลายตะกอน total RNA ด้วย DEPC-treated water สารละลายที่ได้มีลักษณะใส และไม่หนืดเหมือน total RNA ที่สกัดจากวิธีของ Thikart และคณะ (2005)

นอกจากนี้ในขั้นตอนการกำจัดโปรตีน และไขมันออกจาก total RNA ของวิธีดัดแปลง Yu และ Goh (2000) แบบที่ 2 มีการใช้สารอินทรีย์ chloroform : isoamyl alcohol (24:1) แทนการใช้ phenol : chloroform เนื่องจากคาดว่า PVPP ซึ่งเป็นโพลีเมอร์ของ PVP ที่เป็นส่วนประกอบในสารละลาย extraction buffer ไม่เหมาะสมกับการใช้ร่วมกับ phenol ในขั้นตอนกำจัดโปรตีน และไขมัน เนื่องจาก Salzman และคณะ (1999) พบว่าการใช้ PVP ร่วมกับ phenol ส่งผลให้เกิดการสลายตัวของ total RNA (Salzman และคณะ, 1999)

วิธีการสกัด total RNA จากกล้วยไม้สกุลหวาย 'เอียสกุล' ต้องดัดแปลงขั้นตอนจากวิธีของ Yu และ Goh (2000) โดยการลดขั้นตอนการบ่มเนื้อเยื่อพืชที่บดละเอียด ใน extraction buffer ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เนื่องจากเมื่อทำการบ่มเนื้อเยื่อกล้วยไม้สกุลหวาย 'เอียสกุล' ที่บดละเอียดใน extraction buffer ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที พบว่าสารละลายส่วนใสเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลภายหลังการบ่ม ซึ่งการเปลี่ยนสีของสารละลายนั้นอาจเกิดจากสารฟีนอลิคถูกออกซิไดซ์ สารละลายนั้นจึงกลายเป็นสีน้ำตาล (Mateos และคณะ, 1993) และสารฟีนอลิคที่เกิดขึ้น อาจเปลี่ยนเป็นสารควิโนน ซึ่งสามารถสร้างพันธะโควาเลนต์กับกรดนิวคลีอิก ทำให้คุณภาพของ total RNA ลดลง (Loomis, 1974) และเกิดการสลายตัวของ total RNA ในการทดลอง

1.2 ศึกษาปริมาณเนื้อเยื่อที่เหมาะสมต่อการสกัด total RNA ของกล้วยไม้สกุลหวาย 'เอียสกุล'

จากการทดลองที่ 1.1 พบว่าสัดส่วนของ $OD_{260/280}$ ซึ่งแสดงคุณภาพของ total RNA ที่สกัดจากเนื้อเยื่อใบอ่อนของกล้วยไม้ 0.4 กรัม ด้วยวิธีดัดแปลง Yu และ Goh (2000) แบบที่ 2 มีค่าต่ำกว่า 1.8 ซึ่งมีผลให้คุณภาพของ total RNA ที่สกัดได้ไม่เหมาะสมที่ใช้ในขั้นตอนต่อไป เนื่องจากคุณภาพ total RNA ที่เหมาะสม ควรมีสัดส่วน $OD_{260/280}$ อยู่ระหว่าง 1.8-2.0 (Sambrook และคณะ, 1989)

ดังนั้นจึงทำการทดลองเปรียบเทียบปริมาณเนื้อเยื่อจากใบอ่อนของกล้วยไม้ 0.1 0.2 0.3 และ 0.4 กรัมต่อ extraction buffer 1 มิลลิลิตร ตามลำดับ เพื่อหาปริมาณเนื้อเยื่อที่เหมาะสมสำหรับการสกัด total RNA ด้วยวิธีดังกล่าว และเพื่อพัฒนาคุณภาพของ total RNA ที่สกัดได้

จากการทดลองพบว่า total RNA ที่สกัดจากเนื้อเยื่อจากใบอ่อนของกล้วยไม้ปริมาณ 0.1 กรัมต่อ extraction buffer 1 มิลลิลิตร มีคุณภาพดีที่สุด เนื่องจากสัดส่วน $OD_{260/280}$ ของ total RNA มีค่าอยู่ระหว่าง 1.8-2.0 ในขณะที่ปริมาณเนื้อเยื่อจากใบอ่อนของกล้วยไม้ 0.2 0.3 และ 0.4 กรัมต่อ extraction buffer 1 มิลลิลิตร มีสัดส่วน $OD_{260/280}$ ของ total RNA ต่ำกว่าค่า 1.8 ที่เป็นเช่นนี้อาจเกิดจากปริมาณของ extraction buffer ไม่เพียงพอต่อการแทรกผ่านเนื้อเยื่อที่มีปริมาณมาก เพื่อเข้าไปจับกับกรดนิวคลีอิก หรืออาจเกิดจากการที่เนื้อเยื่อพืชมีปริมาณมาก ทำให้สารส่วนละลายส่วนใสมีความหนืดมากจนไม่สามารถปิเปตได้ ทำให้ total RNA ที่สกัดได้มีคุณภาพลดลง และอาจเกิดการสลายตัว (Zang และ Yang, 2002)

สำหรับปริมาณ RNA ที่สกัดได้ เมื่อเทียบเป็นไมโครกรัม total RNA/100 มิลลิกรัม ของเนื้อเยื่อจากใบอ่อนของกล้วยไม้ พบว่า total RNA ที่สกัดจากเนื้อเยื่อจากใบอ่อนของกล้วยไม้ ปริมาณ 0.2 กรัม นั้นมีปริมาณมากที่สุด และใกล้เคียงกับปริมาณ total RNA ที่สกัดได้จากการใช้ เนื้อเยื่อจากใบอ่อนของกล้วยไม้ปริมาณ 0.1 กรัม รองลงมาคือ RNA ที่สกัดจากเนื้อเยื่อจากใบ อ่อนของกล้วยไม้ปริมาณ 0.3 และ 0.4 กรัม ตามลำดับ

เนื่องจาก total RNA ที่สกัดได้ ต้องนำไปใช้ในการทดลองขั้นต่อไป จึงต้อง คำนึงถึงคุณภาพของ total RNA เป็นหลัก ดังนั้นจึงเลือกการสกัด total RNA จากเนื้อเยื่อจากใบ อ่อนของกล้วยไม้ปริมาณ 0.1 กรัม เพื่อใช้ในการศึกษาในครั้งนี้ ถึงแม้ total RNA ที่สกัดได้จะมี ปริมาณน้อยกว่า total RNA ที่สกัดจากเนื้อเยื่อจากใบอ่อนของกล้วยไม้ปริมาณ 0.2 กรัม

2. **ศึกษาการแสดงออกของยีน โดยวิธี** differential display

จากการศึกษาการแสดงออกของยีนที่แตกต่างของกล้วยไม้สกุลหวายทั้ง 2 ชุด การทดลอง โดยวิธี differential display (Liang และ Pardee, 1992) โดยใช้คู่ไพรเมอร์จำนวน 72 คู่ พบว่ามีความแตกต่างของแถบ cDNA ของกล้วยไม้สกุลหวายระหว่างชุดควบคุม และชุดที่ ได้รับไคโตซาน จำนวน 145 แถบ cDNA จากจำนวนคู่ไพรเมอร์ 54 คู่ ซึ่งความแตกต่างนี้อาจเกิด จากกล้วยไม้ทั้ง 2 ชุดการทดลอง มีชนิด และ/หรือ ปริมาณ mRNA ที่แตกต่างกัน ทำให้ไพรเมอร์ เข้าไปจับกับ mRNA ที่เป็น complementrary ได้ต่างกัน (Burpo, 2001) แต่อย่างไรก็ดีความ แตกต่างนี้อาจเกิดจาก false positive ที่เกิดจากเทคนิคดังกล่าวได้ด้วย (Liang, 1998)

รูปแบบแถบ cDNA ที่แตกต่าง สามารถแบ่งได้เป็น 4 แบบ เมื่อเปรียบเทียบกับ ชุดควบคุม

แบบที่ 1 พบว่ามีการสร้างแถบ cDNA ขึ้นมาใหม่ หลังจากกล้วยไม้ได้รับไคโตซาน เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

แบบที่ 2 พบว่ามีการหายไปของแถบ cDNA หลังจากกล้วยไม้ได้รับไคโตซาน เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

แบบที่ 3 พบว่ามีความเข้มของแถบ cDNA เพิ่มขึ้น หลังจากกล้วยไม้ได้รับ ไคโตซาน เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

แบบที่ 4 พบว่ามีความเข้มของแถบ cDNA ลดลง หลังจากกล้วยไม้ได้รับ ไคโตซาน เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ความแตกต่างของรูปแบบของ cDNA ที่เกิดขึ้นนี้ แสดงให้เห็นว่าไคโตซาน O80 น่าจะมีผลต่อการแสดงออกของยีนในกล้วยไม้สกุลหวาย 'เอียสกุล' ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ Mason และ Davis (1997) ที่พบว่าไคโตซานมีผลต่อการเพิ่มปริมาณของ mRNA ของเซลล์สน (*Pinus elliottii* var. *elliottii* Engelm.) ที่มีลำดับเบสคล้ายยีน cinnamic acid-4-hydroxylase และ chitinase หลังจากได้รับไคโตซานเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อทำการวิเคราะห์ด้วยวิธี differential display

นอกจากนี้ยังพบว่าไคโตซานมีผลต่อการแสดงออกของยีนต่างๆ ในพืช เมื่อทำการวิเคราะห์ด้วยวิธี northern blot analysis กับพืชที่ได้รับไคโตซาน ที่ระยะเวลาต่างๆ ภายใน 24 ชั่วโมง ทำให้ทราบว่า mRNA ของ *Pschi4* ในเซลล์สน (*Pinus strobus*) ซึ่งมีลำดับกรดอะมิโนคล้ายคลึงกับลำดับกรดอะมิโนของ chitinase ในต้นยาสูบ มีปริมาณเพิ่มขึ้นหลังจากเซลล์สนได้รับไคโตซานเป็นเวลา 3 ชั่วโมง และมีปริมาณเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องจนถึงที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมง (Wu และคณะ, 1997) ในขณะที่ mRNA ของ *REK* ในต้นข้าว (*Oryza sativa* L. cv. Nipponbare) ซึ่งคาดว่ามีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารป้องกันตนเองของพืช มีผลการทดลองสอดคล้องกับยีน *Pschi4* ในเซลล์สน (Jwa และคณะ, 2002) ในขณะที่ mRNA ของ *OsPR5* และ*OsPR10* ซึ่งเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารป้องกันตนเองของพืชในต้นข้าว มีปริมาณเพิ่มขึ้น หลังจากต้นข้าวได้รับไคโตซานเป็นเวลา 30 นาที และมีปริมาณเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องถึงที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมง (Agrawal และคณะ, 2002) ในปี 2003 Agrawal และคณะ พบว่า mRNA ของ *OsAOC* ในต้นข้าว ซึ่งมีลำดับกรดอะมิโนคล้ายคลึงกับลำดับกรดอะมิโนของ cyclase (*AOCs*) ที่มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารป้องกันตนเองของพืชในส่วนที่เป็น jasmonic acid (JA) biosynthesis pathway มีปริมาณเพิ่มขึ้น หลังจากต้นข้าวได้รับไคโตซาน เป็นเวลา 1.5-2 ชั่วโมง แต่หลังจากระยะเวลาดังกล่าว พบว่า mRNA ของ *OsAOC* มีปริมาณลดลงจนถึงที่เวลา 24 ชั่วโมงของการทดลอง

จากข้อมูลข้างต้นทำให้ทราบว่าการศึกษาผลของไคโตซานที่มีต่อการแสดงออกของยีนในพืช ส่วนใหญ่มักให้ความสนใจกับยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารป้องกันตัวเองของพืช ทั้งนี้อาจเนื่องจากไคโตซานมีคุณสมบัติเป็นสารกระตุ้น นอกจากนี้ยังพบว่ายีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารป้องกันตัวเองของพืช เช่น chitinase (Wuและคณะ, 1997) และ PR protein (Agrawal และคณะ, 2002) มักมีการแสดงออกเพิ่มขึ้นมากที่สุด หลังจากพืชได้รับไคโตซานที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมง แต่อย่างไรก็ดีที่ระยะเวลานี้ ยังพบว่ามีบางยีนที่เกี่ยวข้องกับ JA biosynthesis pathway มีการแสดงออกลดลง (Agrawal และคณะ, 2003) จากข้อมูลดังกล่าว ทำให้เป็นที่น่าสนใจทำการศึกษาการแสดงออกของยีนในกล้วยไม้สกุลหวาย 'เอียสกุล' หลังจากได้รับไคโตซาน เป็นระยะเวลา 24

ชั่วโมง เปรียบเทียบกับกล้วยไม้ชุดควบคุม โดยใช้วิธี differential display ซึ่งเป็นวิธีที่อาจทำให้ค้นพบยีนใหม่ๆ ที่ตอบสนองต่อไคโตซานในแง่มุมต่างๆ ได้อีกด้วย

3. โคลนชิ้นส่วน cDNA ที่แตกต่างระหว่างกล้วยไม้ทั้ง 2 ชุดการทดลอง เข้าในเวกเตอร์ที่เหมาะสม

หลักการคัดเลือกแถบ cDNA ที่แตกต่างระหว่างกล้วยไม้ทั้ง 2 ชุดการทดลอง เพื่อนำมาโคลน คือ ความเข้มของแถบ cDNA ที่ปรากฏบน polyacrylamide gel เนื่องจากแถบ cDNA ที่มีความเข้มมาก สามารถสกัด cDNA ออกจาก polyacrylamide gel ได้ปริมาณมากกว่าการสกัด cDNA ออกจากแถบ cDNA ที่มีความจางมาก ดังนั้นการทดลองครั้งนี้ จึงทำการคัดเลือกแถบ cDNA ที่แตกต่างจำนวน 67 แถบ แล้วทำการสกัด cDNA ดังกล่าวออกจาก polyacrylamide gel และเพิ่มจำนวน cDNA ด้วยวิธี PCR โดยใช้ไพรเมอร์ชุดเดิม พบว่ามีการสูญหายของแถบ cDNA บางแถบเกิดขึ้น หลังจากตรวจสอบด้วยวิธี agarose gel electrophoresis ที่เป็นเช่นนี้อาจเกิดจากปริมาณ cDNA ที่อยู่บน polyacrylamide gel มีปริมาณน้อยมาก ดังนั้นเมื่อทำการสกัด cDNA ด้วยวิธี crush and soak (Sambrook และคณะ, 1989) และเพิ่มปริมาณ cDNA ด้วยวิธี PCR ก็ไม่สามารถเพิ่มปริมาณการสังเคราะห์ cDNA ให้มีปริมาณมากพอที่จะสามารถมองเห็นแถบ cDNA ดังกล่าวบน agarose gel ได้

จากการสกัด cDNA ที่สังเคราะห์ได้ บน agarose gel โดยใช้ Ultra Clean™ 15 DNA purification kit (MO BIO Laboratories, Inc., CA, USA) พบว่ามีการสูญหายของ cDNA บางแถบ ทั้งนี้อาจเกิดจาก cDNA ที่อยู่บน agarose gel นั้นมีปริมาณน้อยเกินกว่าที่จะสามารถสกัดออกมาได้

หลังจากการโคลนชิ้นส่วน cDNA ที่แตกต่างระหว่างกล้วยไม้ทั้ง 2 ชุดการทดลอง เข้าในเวกเตอร์ pGEM-T โดยใช้ pGEM-T cloning kit (Promega, MD, USA) พบว่ามีชิ้นส่วน cDNA ที่สามารถโคลนได้ จำนวน 19 ชิ้น

การคัดเลือกเวกเตอร์ pGEM-T มาใช้ในการวิจัย เนื่องจากชิ้นส่วน cDNA ที่ใช้ในการโคลน ได้มาจากการสังเคราะห์ด้วยวิธี PCR ดังนั้นบริเวณปลาย 3' ของ cDNA ส่วนใหญ่จึงเป็นเบส A (adenosine overhang) ซึ่งเกิดจากปฏิกิริยา terminal transferase ของเอนไซม์ Taq polymerase (Clark, 1988) ดังนั้นการใช้เวกเตอร์ที่มีบริเวณปลาย 3' ที่เป็นเบส T (thymidine

overhang) เช่น เวกเตอร์ pGEM-T จึงสามารถเชื่อมต่อกับ PCR product ได้โดยตรง และมีประสิทธิภาพมากกว่าการใช้เวกเตอร์ที่เป็นปลายทู่ (Marchuk และคณะ, 1990; Ichihara และ Kurosawa, 1993) เนื่องจากการเชื่อมต่อ cDNA ที่เป็น PCR product กับเวกเตอร์ปลายทู่จะต้องผ่านขั้นตอนการเติม klenow fragment ให้กับปลาย 3' A overhang ของ PCR product เพื่อให้ PCR product สามารถเชื่อมต่อกับเวกเตอร์ปลายทู่ได้ ซึ่งวิธีการนี้มักมีผลให้ประสิทธิภาพการโคลนลดลง (Marchuk และคณะ, 1990)

4. วิเคราะห์ชนิดของยีนที่มีการตอบสนองต่อไคโตซานในกล้วยไม้สกุลหวาย 'เอียสกุล'

เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของ cDNA ที่มีการแสดงออกแตกต่างกันในกล้วยไม้สกุลหวายที่ได้รับ และไม่ได้รับไคโตซาน ทั้ง 19 โคลน มาเปรียบเทียบกับข้อมูลในฐานข้อมูลสากล ได้แก่ NCBI และ EMBL พบว่า

De164 และ *De7696* มีลำดับนิวคลีโอไทด์คล้ายคลึงกับคลอโรพลาสจีโนมของ *Calycanthus floridus* var. glaucus และเมื่อทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งสองนี้กับบางส่วนของยีน (Expressed Sequence Tags, EST) ที่อยู่ในฐานข้อมูล พบว่า *De164* มีลำดับนิวคลีโอไทด์คล้ายคลึงกับ mRNA ที่อยู่ในเนื้อเยื่อ male inflorescences ของหน่อไม้ฝรั่ง *(Asparagus officinalis)* (accession no. CV290069, CV289592 และ CV289014) โดยพบค่า % nucleotide identity อยู่ในสองช่วง คือ 94% (84/89) และ 98% (57/58) ในขณะที่ *De7696* มีลำดับนิวคลีโอไทด์คล้ายคลึงกับ cDNA clone ของแอปเปิ้ล (Malus x domestica) (accession no. CN933364, CN872933, CN872816, CN872567, CN872562, CN859554, CN859384, CN858964, CN857947 และ DR996644) ซึ่งมีค่า % nucleotide identity 92% (150/163) สำหรับ accession no. DR996644 ในฐานข้อมูลมีการอ้างอิงว่ามีลำดับนิวคลีโอไทด์คล้ายคลึงกับยีน *Ycf2* ในยาสูบ *Nicotiana tabacum* ในการวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนของ *De164* และ *De7696* พบว่ามีความคล้ายคลึงกับโปรตีน Orf 204 ที่แปลรหัสในไมโตคอนเดรียน (Mitochondrion) ของ *Beta vulgaris L.* นอกจากนี้ในฐานข้อมูลยังพบว่าโปรตีน Orf 204 อาจมีความเกี่ยวข้องกับยีน *Ycf2* ด้วย

ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ และลำดับกรดอะมิโนของ *De164* และ *De7696* พบว่ามีความคล้ายคลึงกันมาก ดังนั้นจึงทำการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่าง

De164 และ *De7696* โดยใช้โปรแกรม align two sequence (bl2seq) ของ NCBI ทำให้ทราบว่าโคลนทั้งสองมีลำดับนิวคลีโอไทด์คล้ายคลึงกัน 90% (160/177)

จากข้อมูลข้างต้น ทำให้คาดว่า *De164* และ *De7696* น่าจะเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับยีน *Ycf2* ซึ่งอยู่ในคลอโรพลาสต์จีโนม (Wakasuki และคณะ, 1997) เนื่องจากคลอโรพลาสต์จีโนมในพืชชั้นสูงส่วนใหญ่ประกอบด้วย 2 ORFs ขนาดใหญ่ คือ *Ycf1* และ *Ycf2* เมื่อทำการมิวแตนท์ (mutant) ทั้งสองยีนนี้ในต้นยาสูบ พบว่ายีนทั้งสองน่าจะมีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการอยู่รอดของเซลล์ (Drescher และคณะ, 2000) จากข้อมูลข้างต้นทำให้คาดว่าโปรตีน Orf 204 ของ *Beta vulgaris L.* ก็อาจมีส่วนเกี่ยวข้องกับการอยู่รอดของเซลล์เช่นกัน

De362 มีลำดับนิวคลีโอไทด์คล้ายคลึงกับโครโมโซมที่ 7 ในข้าว (*Oryza sativa*) และเมื่อทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูลสากลระดับ EST พบว่า *De362* มีลำดับนิวคลีโอไทด์คล้ายคลึงกับ cDNA ของ *Sorghum propinquum* ที่อยู่ในเนื้อเยื่อเจริญที่ชักนำการเกิดดอก และ cDNA ของ *Sorghum biocolor* ในต้นกล้าที่ได้รับแสง (accession no. BF481236 และ AW565213 ตามลำดับ) โดยพบว่ามี % nucleotide identity 84% (58/69) และเมื่อทำการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของโครโมโซมที่ 7 ในข้าว (*Oryza sativa*) กับ cDNA ของ *Sorghum propinquum* และ *Sorghum biocolor* ในส่วนที่มีความคล้ายคลึงกับ *De362* พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของโครโมโซมที่ 7 ในข้าว มีความคล้ายคลึงกับ cDNA ของ *Sorghum propinquum* และ *Sorghum biocolor* ที่ % nucleotide identity 90% (54/60) ในการวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนของ *De362* พบว่ามีลำดับกรดอะมิโนคล้ายคลึงกับโปรตีนที่ไม่ทราบหน้าที่ของ *Arabidopsis thaliana* และเมื่อทำการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *De362* กับ *Arabidopsis thaliana* ที่แปลรหัสให้โปรตีนที่ไม่ทราบหน้าที่นี้ พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ไม่มีความคล้ายคลึงกัน ดังนั้น *De362* จึงยังไม่มีข้อสรุปที่แน่ชัดว่ามีหน้าที่อย่างไร ทำให้เป็นที่น่าสนใจในการศึกษาหน้าที่ของยีนนี้ต่อไป

De541 มีลำดับนิวคลีโอไทด์คล้ายคลึงกับยีน 26S ribosomal RNA ของ *Drimys sp.* และ *Drimys winteri* ในการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูลสากลระดับ EST พบว่า *De541* มีลำดับนิวคลีโอไทด์คล้ายคลึงกับ cDNA clone ของ *Aquilegia formosa x Aquilegia* (unknown) (accession no. DR937798) โดยมี % nucleotide identity 98% (508/515) ในการวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนของ *De541* ไม่พบความคล้ายคลึงกับลำดับกรดอะมิโนอื่นในฐานข้อมูลสากล จากข้อมูลข้างต้นเมื่อทำการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่าง 26S ribosomal

RNA ของ Drimys และ cDNA clone ของ *Aquilegia formosa x Aquilegia* ในส่วนที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์คล้ายคลึงกับ *De541* พบ % nucleotide sequence 98% (526/532) ดังนั้นจากข้อมูลนี้คาดว่า cDNA clone ของ *Aquilegia formosa x Aquilegia* น่าจะเป็น 26S ribosomal RNA และจากการที่ *De541* มีความคล้ายคลึงกับ 26S ribosomal RNA ของ *Drimys* cDNA clone ของ *Aquilegia formosa x Aquilegia* ดังนั้น *De541* น่าจะเป็นยีน 26S ribosomal RNA เช่นกัน ที่เป็นเช่นนี้อาจเกิดจาก 26S ribosomal RNA อาจปนเปื้อนมาหลังจากขั้นตอน reverse transcription แม้ว่าใช้ไพรเมอร์ oligo dT ก็ตาม ดังนั้นเมื่อถึงขั้นตอน PCR จึงมีการเพิ่มยีนนี้ขึ้นมาด้วย จึงมีผลให้เมื่อทำการโคลนจึงมียีนที่เป็น rRNA ติดมาด้วย

De642 มีลำดับนิวคลีโอไทด์คล้ายคลึงกับ calnexin ของถั่วเหลือง (*Glycine max*)_และเมื่อทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูลสากลระดับ EST พบว่า *De642* มีลำดับนิวคลีโอไทด์คล้ายคลึงกับ cDNA clone ของ *Liriodendron tulipifera* (accession no. CK760688) โดยมี % nucleotide identity 85% (131/153) แต่ในการวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนของ *De642* พบว่ามีลำดับกรดอะมิโนคล้ายกับโปรตีน Calnexin [Fragment] ของข้าวโพด (*Zea mays*) ซึ่งเป็นโปรตีนบนเมมเบรนของ ER (endoplasmic reticulum) ที่สามารถจับแคลเซียมไอออนได้ เนื่องจากแคลเซียมไอออนมีบทบาทเกี่ยวกับการควบคุมกระบวนการเมตาบอลิซึมของเซลล์ (Wada และคณะ, 1991) จากข้อมูลข้างต้นคาดว่า *De642* น่าจะเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับ calnexin เนื่องจากมีลำดับนิวคลีโอไทด์ และลำดับกรดอะมิโนคล้ายคลึงกับ calnexin

นอกจากนี้พบโคลนจำนวน 5 โคลนที่ไม่สามารถวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ได้ แต่สามารถวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนได้ โดยแบ่งเป็น 2 โคลน ได้แก่ *De182* และ*De183* มีความคล้ายคลึงกับโปรตีนที่ยังไม่ทราบหน้าที่ในข้าว และอีก 3 โคลน ได้แก่ *De161 De192* และ *De441* มีความคล้ายคลึงกับโปรตีนที่ยังไม่ทราบหน้าที่ในแบคทีเรีย ที่เป็นเช่นนี้อาจเกิดจากระหว่างขั้นตอนการสกัด total RNA มีการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ต่างๆ ที่อยู่ในเนื้อเยื่อใบอ่อนของกล้วยไม้สกุลหวาย 'เอียสกุล' ที่ปลูกในโรงเรือนกระจก

สำหรับโคลนที่ไม่มีรายงานในฐานข้อมูลสากล (NCBI และ EMBL databases) พบจำนวน 9 โคลน ได้แก่ *De163*, *De181*, *De461*, *De521*, *De631*, *De643*, *De7323*, *De7625* และ *De8612* อาจเนื่องจากยังไม่มีผู้ศึกษาเกี่ยวกับ cDNA ดังกล่าว ดังนั้นถ้าหากทำการศึกษาลำดับกรดอะมิโน และหน้าที่ของโปรตีนจากโคลนดังกล่าว อาจทำให้ทราบถึงหน้าที่ของยีนชนิดใหม่ที่เกี่ยวข้องกับไคโตซานได้อีกด้วย

5. วิเคราะห์การแสดงออกของยีนที่คัดเลือกได้จากการทำ differential display

แม้ว่าเทคนิค differential display เป็นวิธีที่นิยมใช้ศึกษาการแสดงออกของ mRNA แต่ละเซลล์หรือเนื้อเยื่อ ภายใต้สภาวะที่ต่างกัน (Liang, 1998) แต่ปัญหาของเทคนิคนี้ คือ cDNA ที่แตกต่างระหว่างแต่ละตัวอย่าง มีจำนวนมาก และอาจเป็น false positive จำนวนมากเช่นกัน ดังนั้นจึงควรทำการคัดเลือกโคลนดังกล่าวที่เป็นผล positive ที่แท้จริง ก่อนการตรวจสอบการแสดงออกของยีนต่างๆ เช่นวิธี reverse northern blot analysis (Vogeli–Lange และคณะ, 1996) หรือ cDNA blot hybridization (สุภาลัย ไชยสุต, 2548) แล้วจึงทำการตรวจสอบการแสดงออกของ cDNA ดังกล่าวที่เป็น positive อีกครั้ง (Liang และ Pardee, 1992) ด้วยวิธีการ northern blot analysis หรือ RT-PCR analysis เป็นต้น (Dean, Goodwin และ Hsiang, 2002)

วิธี cDNA blot hybridization (สุภาลัย ไชยสุต, 2548) เป็นวิธีที่ใช้ในการคัดเลือกโคลนที่ได้จากการทำ differential display ว่ามีการแสดงออกจริงหรือไม่ และเพื่อเป็นการลดปริมาณ total RNA ที่ใช้ในการศึกษาการแสดงออกของโคลนต่างๆ วิธี cDNA blot hybridization เป็นวิธีที่ใช้โคลนที่ต้องการศึกษาเป็น probe จากการศึกษาพบว่าการทำ RT-PCR กับ mRNA ปริมาณ 1 ไมโครกรัม ของแต่ละเนื้อเยื่อภายใต้สภาวะที่ต่างกัน โดยใช้ oligo dT_{18} ไพรเมอร์ร่วมกับ arbitrary ไพรเมอร์ของโคลนที่ต้องการศึกษา ที่จำนวนรอบของขั้นตอน PCR จำนวน 35 รอบ มีความเหมาะสมที่สุดสำหรับการคัดเลือกโคลนที่เป็น positive จากการศึกษาในครั้งนี้ยังทำให้ทราบว่า *De362* และ *De7696* มีการแสดงออกในกล้วยไม้สกุลหวาย 'เอียสกุล' ขณะที่ *De642* ไม่มีการแสดงออกในกล้วยไม้สกุลหวาย 'เอียสกุล'

สำหรับการศึกษาการแสดงออกของยีนที่โคลนได้จากกล้วยไม้สกุลหวาย 'เอียสกุล' ทั้ง 2 ชุดการทดลอง ที่มาจากการทำ differential display ได้คัดเลือกวิธี RT-PCR analysis เนื่องจากปริมาณ total RNA ที่สกัดได้จากใบอ่อนของกล้วยไม้สกุลหวาย 'เอียสกุล' มีปริมาณต่ำไม่เพียงพอต่อการวิเคราะห์การแสดงออกของยีนโดยวิธี northern blot analysis นอกจากนี้วิธี RT-PCR analysis ใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะเจาะจงกับยีนที่ต้องการศึกษา ดังนั้นวิธีการนี้จึง sensitive และมีความจำเพาะต่อยีนมากกว่าวิธี northern blot analysis (Dean และคณะ, 2002)

ในการทำ RT-PCR analysis จำเป็นต้องหาสภาวะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา เช่น จำนวนรอบในการทำ PCR เพราะถ้าจำนวนรอบมีมากเกินกว่าที่เอนไซม์ DNA polymerase ทำงานได้ ส่งผลให้ PCR product ที่ต้องการ ซึ่งมีขนาดใหญ่ มีจำนวนลดลง ในขณะที่ PCR

product ที่มีขนาดเล็ก มีจำนวนเพิ่มขึ้น (Kocher และ Wilson, 1993) นอกจากนี้ปริมาณ template ที่ใช้ในการทำ PCR ก็มีผลต่อการทดลอง เพราะถ้าใช้ปริมาณ template จำนวนมาก ส่งผลให้ cDNA เข้าสู่สภาวะอิ่มตัว (saturation phase) ได้เร็วกว่าการใช้ template ที่มีปริมาณน้อย ดังนั้น การทำ PCR จาก template ที่มีปริมาณมาก จึงใช้จำนวนรอบในการทำ PCR น้อยกว่าการใช้ template ที่มีปริมาณน้อย (Raeymaekers, 1999) เป็นต้น

จากการที่วิธี RT-PCR analysis ประกอบด้วยเทคนิค PCR ดังนั้นจึงต้องทำการศึกษาการแสดงออกของยีนที่ใช้เป็น internal control ร่วมด้วย เพื่อเป็นการตรวจวัดปริมาณ template ในแต่ละตัวอย่างว่าใช้ในการทำปฏิกิริยาเท่ากันหรือไม่ นอกจากนี้ยังสามารถใช้เป็นตัวมาตรฐานเพื่อเปรียบเทียบระดับการแสดงออกของยีนต่างๆ ว่ามีการแสดงออกอย่างไร เมื่ออยู่ในสภาวะที่เปลี่ยนไป เป็นต้น (Stürzenbaum และ Kille, 2001)

ยีนที่ใช้เป็น internal control ควรมีการแสดงออกในระดับคงที่อย่างต่อเนื่อง เช่น ยีน actin GAPDH และ ribosomal protein subunit เป็นต้น สำหรับการวิจัยครั้งนี้คัดเลือกยีน actin เนื่องจากยีนนี้มีการแสดงออกมากกว่ายีน GAPDH และสามารถใช้เป็นชุดควบคุมปริมาณ first strand cDNA ของยีนที่ต้องการศึกษาในขั้นตอน PCR ได้ ในขณะที่ยีน ribosomal ไม่สามารถใช้ poly T_{18} ไพรเมอร์ ในขั้นตอนการสังเคราะห์ first strand cDNA (Stürzenbaum และ Kille, 2001) ในงานวิจัยนี้ได้

การศึกษายีน actin เพื่อใช้เป็น internal control ในงานวิจัยนี้ ได้ทำการออกแบบไพรเมอร์ให้มีความจำเพาะกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ actin mRNA ของ *Dendrobium thyrsiflorum* (Skipper, 2005) ในบริเวณที่เป็น conserve กับ actin mRNA ของถั่วเหลือง (accession no. J01297) (Cascardo และคณะ, 2001) เพื่อให้มีความใกล้เคียงกับยีน actin ในกล้วยไม้สกุลหวาย 'เอียสกุล'

หลักการคัดเลือก cDNA เพื่อใช้ในการศึกษาการแสดงออกโดยวิธี RT-PCR analysis คือ ข้อมูลที่ได้จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ซึ่งหลังจากวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์พบว่ามี cDNA ที่น่าสนใจมากที่สุดจำนวน 5 ชิ้น ได้แก่ *De164* *De362* *De541* *De642* และ *De7696* สำหรับการทดลองนี้คัดเลือก *De362* และ *De7696* เนื่องจาก *De362* ถือเป็นตัวแทนของ cDNA ที่ยังไม่มีข้อสรุปที่แน่ชัดว่ามีหน้าที่อย่างไร และเกี่ยวข้องกับยีนอื่นอย่างไร และ *De7696* ถือเป็นตัวแทนของ cDNA ที่มีความคล้ายคลึงกับยีนที่อยู่ในฐานข้อมูลสากล ในขณะที่ *De541*

คาดว่าเป็นยีน 26S ribosomal RNA ที่อาจปนเปื้อนมาหลังจากขั้นตอน reverse transcription แม้ว่าใช้ไพรเมอร์ oligo dT ก็ตาม สำหรับ *De642* หลังจากการวิเคราะห์โดยวิธี cDNA blot hybridization พบว่า *De642* ไม่มีการแสดงออกในกล้วยไม้สกุลหวาย 'เอียสกุล' ดังนั้นการศึกษาการแสดงออกยีนโดยวิธี RT-PCR analysis จึงไม่คัดเลือก *De541* และ *De642* สำหรับ *De164* มีความคล้ายคลึงกับ *De7696* จึงไม่ทำการคัดเลือกซ้ำ

De362 มีการแสดงออกลดลงหลังจากกล้วยไม้สกุลหวาย 'เอียสกุล' ได้รับไคโตซานเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ซึ่ง *De362* มีลำดับนิวคลีโอไทด์คล้ายคลึงกับบางส่วนของโครโมโซมที่ 7 ของข้าว (*Oryza sativa*) นอกจากนี้ยังมีลำดับนิวคลีโอไทด์คล้ายคลึงกับ cDNA ของ *Sorghum propinquum* ที่อยู่ในเนื้อเยื่อเจริญที่ชักนำการเกิดดอก และ cDNA ของ *Sorghum biocolor* ในต้นกล้าที่ได้รับแสง เมื่อวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนพบว่า *De362* มีลำดับกรดอะมิโนคล้ายกับโปรตีนที่ไม่ทราบหน้าที่ของ *Arabidopsis thaliana* ดังนั้น *De362* จึงยังไม่มีข้อสรุปที่แน่ชัดว่ามีหน้าที่อย่างไร และเกี่ยวข้องกับยีนอื่นอย่างไร จึงเป็นที่น่าสนใจในการศึกษายีนนี้ต่อไป ซึ่งอาจทำให้เข้าใจถึงสาเหตุที่ทำให้ยีนนี้มีการแสดงออกลดลงหลังได้รับไคโตซาน (O80) ที่ความเข้มข้น 10 ppm เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

De7696 มีการแสดงออกลดลงหลังจากกล้วยไม้สกุลหวาย 'เอียสกุล' ได้รับไคโตซานเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จึงคาดว่าไคโตซานน่าจะมีผลต่อการแสดงออกของยีนที่อยู่ในคลอโรพลาสต์จีโนม เนื่องจากพบว่า *De7696* มีลำดับนิวคลีโอไทด์คล้ายยีน *Ycf2* ซึ่งเป็น open reading frames (ORFs) ของคลอโรพลาสต์จีโนมในพืชชั้นสูงส่วนใหญ่ (Wakasuki และคณะ, 1997) ซึ่งในคลอโรพลาสต์จีโนม ประกอบด้วย 2 ORFs ขนาดใหญ่ คือ *Ycf1* และ*Ycf2* เมื่อทำการมิวแตนท์ (mutant) ทั้งสองยีนนี้ในต้นยาสูบ พบว่ายีนทั้งสองน่าจะมีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการอยู่รอดของเซลล์ (Drescher และคณะ, 2000)

จากการศึกษาด้วยวิธี RT-PCR analysis พบว่า *De362* และ *De7696* มีการแสดงออกลดลงหลังจากที่กล้วยไม้สกุลหวาย 'เอียสกุล' ได้รับไคโตซานเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ซึ่งแตกต่างกับผลการศึกษาด้วยวิธี differential display ที่พบว่า *De362* มีการสร้างแถบ cDNA ขึ้นมาใหม่ หลังจากกล้วยไม้ได้รับไคโตซาน และ *De7696* มีการแสดงออกเพิ่มขึ้น หลังจากกล้วยไม้ได้รับไคโตซาน ที่เป็นเช่นนี้อาจเกิดจากการศึกษาด้วยวิธี RT-PCR analysis ใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับยีนที่ต้องการศึกษา (Dean และคณะ, 2002) ในขณะที่วิธี differential display ใช้ไพรเมอร์แบบสุ่มในการศึกษา (Liang และ Pardee, 1992) ซึ่งอาจส่งผลให้ cDNA ที่เกิดขึ้น

เป็น false positive ได้ (Liang, 1998) แต่อย่างไรก็ดีการศึกษาความแตกต่างของการแสดงออกของยีนด้วยวิธี differential display ก็ยังสามารถทำให้พบความแตกต่างของยีนระหว่างตัวอย่างที่แตกต่างกันได้ แม้ว่าวิธีนี้จะมีข้อเสียบ้างก็ตาม

De362 และ *De7696* มีการแสดงออกลดลงหลังจากกล้วยไม้ได้รับไคโตซานเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ซึ่งแตกต่างกับงานวิจัยส่วนใหญ่ที่ศึกษาผลของไคโตซานในระดับโมเลกุลของพืช ทั้งนี้อาจเป็นเพราะงานวิจัยส่วนใหญ่มักสนใจศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารป้องกันตัวเองของพืช เนื่องจากไคโตซานสามารถออกฤทธิ์เป็นตัวกระตุ้น ดังนั้นเมื่อทำการศึกษาการแสดงออกของยีนดังกล่าวในเซลล์หรือต้นพืชที่ได้รับไคโตซานในช่วงระยะเวลา 24 ชั่วโมง จึงพบการแสดงออกของยีนเพิ่มขึ้น (Mason และ Davis, 1997; Wu และคณะ, 1997; Jwa และคณะ, 2002; Agrawal และคณะ, 2002) แต่มีบางรายงานพบว่ายีนที่มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารป้องกันตนเองของพืชในส่วนที่เป็น JA biosynthesis pathway ในข้าว มีการแสดงออกลดลง หลังจากต้นข้าวได้รับไคโตซานที่เวลา 24 ชั่วโมง (Agrawal และคณะ, 2003) ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับการทดลองในกล้วยไม้สกุลหวาย 'เอียสกุล' ในครั้งนี้

สำหรับการวิจัยครั้งนี้ ยังไม่สามารถระบุสาเหตุที่แน่ชัดว่าโอลิโกเมอร์ไคโตซาน ที่ 80% DD ความเข้มข้น 10 ppm มีผลต่อการเร่งการออกดอกของกล้วยไม้ 'เอียสกุล' ในแปลงทดลอง (Limpanavech และคณะ, 2003) ได้อย่างไร อาจเนื่องจากการวิจัยครั้งนี้ใช้วิธี differential display ในการศึกษาผลของไคโตซานที่มีต่อการแสดงออกของยีนในกล้วยไม้สกุลหวาย 'เอียสกุล' ทำให้ยีนที่พบยังไม่ทราบหน้าที่ และบทบาทที่ชัดเจน ทั้งนี้ยีนดังกล่าวอาจเป็นยีนใหม่ที่ยังไม่มีผู้ทำการศึกษา ดังนั้นการศึกษาหน้าที่ของยีนต่างๆ ที่ได้จากการทำวิจัยในครั้งนี้ อาจทำให้ตอบปัญหาข้างต้นได้ดียิ่งขึ้น นอกจากนี้ผลการวิจัยครั้งนี้ ทำให้ทราบผลของไคโตซานที่มีต่อการแสดงออกของยีนในแง่มุมใหม่ ที่พบว่าไคโตซานมีผลต่อการแสดงออกของยีน *Ycf2* ในคลอโรพลาสต์จีโนม ให้มีการแสดงออกลดลง และจากการที่ *De362* ยังไม่มีข้อสรุปที่แน่ชัดว่ามีบทบาท และหน้าที่อย่างไร จึงเป็นที่น่าสนใจในการศึกษาต่อไป เพราะอาจทำให้เข้าใจถึงผลของไคโตซานที่มีต่อการแสดงออกของยีนต่างๆ นอกเหนือจากยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารป้องกันตัวเองของพืช ซึ่งอาจทำให้ค้นพบยีนใหม่ที่ตอบสนองต่อไคโตซานได้อีกด้วย