บทที่ 5
อภิปรายและสรุปผล

5.1 อภิปรายผล

ชาเป็นพืชในสกุล *Camellia* ที่มีความหลากหลายของชนิดและสายพันธุ์ ซึ่งการจัดจำแนกโดยทั่วไปมักใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา เช่น ลักษณะทรงพุ่ม ขนาดของใบ สีของใบ และลักษณะของดอก เป็นต้น ซึ่งสายพันธุ์ที่มีความใกล้ชิดกันมากจำเป็นต้องอาศัยผู้เชี่ยวชาญในการตรวจสอบ และโดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อมีการนำใบชามาแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ เช่น ชาซอง ชาผง และชาชงพร้อมดื่ม จะไม่สามารถใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาในการจำแนกชนิดหรือสายพันธุ์ของชาได้ วิธีวิเคราะห์ทางเคมี เช่น เทคนิค HPLC (High Performance Liquid Chromatography) วิเคราะห์ปริมาณของสารคาเทชินที่เป็นองค์ประกอบของชา สามารถระบุชนิดของชาได้ ตัวอย่างเช่น ชาจีน (*C. sinensis*) มีปริมาณคาเทชินสูง คิดเป็น 5% ของน้ำหนักแห้ง แต่ *C. irrawadiensis* ซึ่งเป็นชาพันธุ์พื้นเมืองของประเทศพม่านั้นจะไม่มีสารคาเทชินอยู่เลย (Prabhakaran, 2010) แต่ทั้งนี้วิธีการวิเคราะห์ทางเคมีนั้นมีค่าใช้จ่ายสูง อีกทั้งต้องใช้เครื่องมือที่มีประสิทธิภาพ และราคาแพงในการตรวจสอบ ตลอดจนต้องอาศัยผู้เชี่ยวชาญในการอ่านและวิเคราะห์ผล ดังนั้นเทคนิคทางชีวเชิงโมเลกุล เช่น เทคนิค PCR จึงถูกนำมาประยุกต์ใช้เพื่อแก้ปัญหาดังกล่าว และสามารถนำมาใช้กับชาที่สามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอที่มีปริมาณน้อยจากตัวอย่างที่เสียสภาพที่เกิดจากการแปรรูปไปเป็นผลิตภัณฑ์แล้ว ร่วมกับเทคนิค RFLP ที่ตัดผลผลิต PCR ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะแล้วปรากฏแถบดีเอ็นเอที่ระบุเอกลักษณ์ของชาแต่ละชนิดหรือสายพันธุ์ แต่ทั้งนี้ปัจจุบันมีเอกลักษณ์ของชานี้ปรากฏเฉพาะในชาเขียวญี่ปุ่น (*C. sinensis*) ในรายงานการศึกษาของ Matsumoto, Kiriiwa, and Takeda (2002) ที่ศึกษายีน *PAL* (*Phenylalanine ammonia-lyase*) ในดีเอ็นเอของคลอโรพลาสต์สามารถแยกชาเขียวที่มีแหล่งกำเนิดมาจากจีนและญี่ปุ่นออกจากกันได้

ดังนั้นในงานวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอเอกลักษณ์ของชาสกุล *Camellia* ให้เป็นฐานข้อมูลไว้เทียบเคียงกับตัวอย่างของชาทดสอบ เริ่มจากการสืบค้นข้อมูลในฐานข้อมูล GenBank พบข้อมูลของยีน *ChS* ซึ่งเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับวิถีการสังเคราะห์สารฟลาโวนอยด์ที่นำไปสร้างเม็ดสีในพืชที่บันทึกไว้ในฐานข้อมูล GenBank จำนวน 64 ข้อมูล ซึ่งบริเวณของยีนนี้สามารถเพิ่มจำนวนได้ด้วยเทคนิค PCR ในห้องปฏิบัติการกับชาตัวอย่างจริงได้ (ชูตา บุญภักดี; ติดต่อส่วนตัว) แต่บริเวณยีน *ChS* นี้ยังไม่ปรากฏการนำไปใช้เป็นลายพิมพ์ดีเอ็นเอของชาแต่อย่างใด ผู้วิจัยจึงจัดเรียงข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้ง 64 ข้อมูล เป็นข้อมูลของชาที่มี

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

แหล่งกำเนิดมาจากประเทศจีน ไต้หวัน เวียดนาม ไทย และญี่ปุ่น (Vijayan, Zhang, & Tsou, 2009) และพบข้อมูลของชาที่มีการปลูกในภาคเหนือของประเทศไทย ได้แก่ ชาจีน (*C. sinensis*; GenBank accession no. D26594) ชาอัสสัม (*C. sinensis* var. *assamica*; GU722449) และชาน้ำมัน (*C. oleifera*; GU722488) ซึ่งผลการเทียบเคียงข้อมูลทั้งหมด พบว่ามีลำดับเบสแตกต่างกันจำนวน 97 คู่เบส จากทั้งหมด 768 คู่เบส คิดเป็นร้อยละ 12.63 (รายละเอียดแสดงในภาพภาคผนวก ก-1) ซึ่งมีความแตกต่างกันน้อย เป็นข้อมูลที่ได้มาจากลำดับเบสของ messenger RNA (mRNA) ที่ถอดรหัสมาจากดีเอ็นเอเพื่อนำไปสร้างเป็นเอนไซม์ในวิถีการสังเคราะห์ฟลาโวนอยด์ ยีน *ChS* ที่นำมาศึกษานี้เป็นยีนในคลอโรพลาสต์ดีเอ็นเอ ลำดับนิวคลีโอไทด์จึงมีลักษณะอนุรักษ์ คือมีความแปรปรวนหรือมีความแตกต่างกันน้อยระหว่างชนิด

อย่างไรก็ตามผลการทดลองในครั้งนี้ พบบริเวณจดจำตำแหน่งตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะ (ตารางที่ 4-1) ที่สามารถทำให้เกิดรูปแบบของแถบดีเอ็นเอของชาที่แตกต่างกันได้เมื่อใช้เอนไซม์ *Aci*I, *Bbv*I, *Hpa*II และ *Rsa*I ซึ่งปรากฏรูปแบบทั้งหมด 8, 6, 7 และ 3 รูปแบบ ตามลำดับ (ภาพที่ 4-3; *Aci*I= A_{1-8}; *Bbv*I= B_{1-6}; *Hpa*II= H_{1-7} และ *Rsa*I=R_{1-3} ตามลำดับ) และถ้าพิจารณาเฉพาะชนิดของชาที่ปลูกในภาคเหนือของประเทศไทยจะพบว่ารูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่เกิดจากการตัดของยีน *ChS* ด้วย *Aci*I ดังปรากฏในภาพที่ 4-4 สามารถระบุเอกลักษณ์ของชาจีน (ภาพที่ 4-4; 62-D26594) เป็นรูปแบบ A_4 แต่ไม่สามารถแยกชาอัสสัม (63-GU722449) และชาน้ำมัน (64-GU722488) ออกจากกันได้ เมื่อใช้เอนไซม์ชนิดที่สอง คือ *Bbv*I ดังปรากฏในภาพที่ 4-5 พบว่าสามารถจัดกลุ่มชาได้ทั้งหมด 6 กลุ่ม และแยกชาอัสสัมกับชาน้ำมันออกจากกัน (รูปแบบ B_6 และ B_2 ตามลำดับ) เมื่อพิจารณาใช้เอนไซม์ชนิดที่สาม คือ *Hpa*II ปรากฏรูปแบบดีเอ็นเอในภาพที่ 4-6 จะสามารถแยกชาออกเป็น 7 กลุ่ม (H_1- H_7) โดยแยกความแตกต่างระหว่างชาจีน ชาอัสสัม และชาน้ำมันออกจากกัน (ปรากฏรูปแบบ H_3, H_2 และ H_1 ตามลำดับ) เช่นเดียวกับเอนไซม์ชนิดที่สี่ คือ *Rsa*I ลายพิมพ์ดีเอ็นเอแสดงในภาพที่ 4-7 สามารถแยกชาจีน ชาอัสสัม และชาน้ำมันออกจากกันได้เช่นกัน (ปรากฏรูปแบบ R_3, R_2 และ R_1 ตามลำดับ) แต่ทั้งนี้การใช้เอนไซม์เพียงชนิดเดียวตัดในส่วนของยีน *ChS* ดังกล่าวมานั้นจะยังไม่สามารถแยกชาจีน ชาอัสสัม และชาน้ำมันออกจากชาชนิดอื่นซึ่งเป็นข้อมูลของชา ส่วนใหญ่ (ภาพที่ 4-8; 1-GU722500, 2-…, 18-GU722471) แต่ถ้าพิจารณารูปแบบที่เกิดจากเอนไซม์ทั้งสี่ชนิดรวมกัน จะพบรูปแบบของแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 27 รูปแบบ ที่จำแนกชาได้ 18 ชนิด และ 4 สายพันธุ์ที่แตกต่างกัน รวมถึงสามารถจำแนกชาจีน ชาอัสสัม และ ชาน้ำมันออกจากกันได้รูปแบบ $A_4B_1H_3R_3$, $A_2B_6H_2R_2$ และ $A_2B_2H_1R_1$ ตามลำดับ อนึ่งในกลุ่มของชาที่ยังไม่สามารถแยกความแตกต่างออกจากกัน ควรพิจารณาศึกษายีนที่มีความแปรปรวนสูงกว่ายีน *ChS* ดังรายงานใน Jena et al. (2009) ใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ในนิวเคลียดีเอ็นเอบริเวณ ITS สามารถ

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

จำแนกส้มอินเดีย *Citrus* spp. หลายสายพันธุ์ได้ แต่อย่างไรก็ตามรูปแบบของแถบดีเอ็นเอจากเทคนิค PCR-RFLP ที่ศึกษาในครั้งนี้สามารถวิเคราะห์ได้บนเจลอะกาโรสภายหลังทำอิเล็กโทรฟอริซีสซึ่งทำได้ง่าย และประหยัดค่าใช้จ่ายมากกว่าวิธีอื่น ๆ เช่น วิธีทางเคมี เป็นต้น

เมื่อทำการวิเคราะห์นำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *ChS* ทั้งหมด 768 คู่เบส ของทุกข้อมูลที่ศึกษาโดยนำไปสร้างเดนโดรแกรมแสดงความสัมพันธ์ของชาทุกข้อมูล และใช้พืชในวงศ์ Theaceae (*Pyrenaria menglaensis*) ที่เป็นพืชต่างสกุลกับ *Camellia* ที่เป็นตัวอย่างนอกกลุ่ม สามารถจัดกลุ่มชาได้เป็น 3 เคลด (ภาพที่ 4-4) ได้แก่ เคลด A, B และ C และพบว่าสามารถแยกชาน้ำมันออกจากชาอัสสัมและชาจีนอย่างชัดเจน และชาอัสสัมอยู่ต่างเคลดย่อยกับชาจีน สอดคล้องกับข้อมูลของลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เกิดจากการตัดด้วยยีน *ChS* ด้วยเอนไซม์ *Aci*I, *Bbv*I, *Hpa*II และ *Rsa*I ที่ได้มาจากเทคนิค PCR-RFLP ดังกล่าวมาข้างต้น และเป็นไปในทำนองเดียวกันกับการศึกษาของ Vijayan et al. (2009) วิเคราะห์ความสัมพันธ์ด้วย Phylogenetic tree ที่จำแนกกลุ่มชาสกุล *Camellia* จำนวน 112 ชนิด ศึกษาจากลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ ITS สามารถแยกชาน้ำมันออกจากชาอัสสัมและชาจีนได้ ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของชาที่ศึกษาใน Lin, Peng, Tang, and Hu (2005) พบว่าในชาน้ำมัน มีโลคุล (locules) จำนวน 3-5 อัน มีใบประดับและกลีบเลี้ยงไม่ติดทนกับผล ก้านชูเกสรตัวผู้เป็นอิสระหรือติดที่ฐาน เมล็ดมีการสะสมน้ำมันมากจัดเป็นลักษณะที่พบเฉพาะในชาน้ำมัน ส่วนชาอัสสัมและชาจีนมีโลคุลจำนวน 3-5 อัน เท่ากัน ก้านชูเกสรตัวผู้ไม่เป็นอิสระต่อกันรวมกันที่ฐาน มีใบประดับไม่ติดทน แต่กลีบเลี้ยงติดทนเป็นลักษณะที่พบในกลุ่มของชาอัสสัมและชาจีน

การสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอของชาจากบริเวณบางส่วนของยีน *ChS* ด้วยเทคนิค PCR-RFLP จากการวิจัยในครั้งนี้ จะสามารถนำไปใช้เป็นต้นแบบเพื่อเทียบเคียงกับชาตัวอย่างจริงในภาคปฏิบัติได้ โดยสกัดดีเอ็นเอจากใบหรือผลิตภัณฑ์ของชาที่ต้องการทดสอบ เพิ่มจำนวนในบริเวณยีน *ChS* ด้วยคู่ไพรเมอร์จำเพาะในปฏิกิริยา PCR แล้วตัดผลผลิตด้วยเอนไซม์ *Aci*I, *Bbv*I, *Hpa*II และ *Rsa*I นำผลิตภัณฑ์ไปวิเคราะห์ด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟริซีสเทียบเคียงกับลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ศึกษาก็จะสามารถระบุชนิดหรือสายพันธุ์ของชาได้เป็นการวิเคราะห์และจัดการข้อมูลก่อนล่วงหน้านี้ ทำให้ย่นระยะเวลา และมีค่าใช้จ่ายต่ำกว่าวิธีการอ่านและวิเคราะห์ลำดับเบส (sequencing) ทั้งหมดเมื่อนำไปปฏิบัติจริงในห้องปฏิบัติการ (Boonphakdee & Sawangwong, 2008)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

5.2 สรุปผลการทดลอง

5.2.1 สามารถสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอของชาสกุล *Camellia* จำนวน 64 ข้อมูล ที่ปรากฏบนฐานข้อมูล GenBank โดยวิเคราะห์ในส่วนของยีน *ChS* ขนาด 768 คู่เบส แล้วนำไปตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 4 ชนิด คือ *Aci*I, *Bbv*I, *Hpa*II และ *Rsa*I ปรากฏลายพิมพ์ดีเอ็นเอของชาสกุล *Camellia* แตกต่างกัน 8, 6, 7 และ 3 รูปแบบตามลำดับ และเมื่อพิจารณาจากรูปแบบที่เกิดจากการใช้เอนไซม์ 4 ชนิด รวมกันปรากฏลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ต่างกัน 28 รูปแบบ ที่สามารถบ่งชี้ชนิดและสายพันธุ์ของชาได้โดยเฉพาะชาจีน ชาอัสสัม และชาน้ำมัน ที่มีการปลูกอยู่ในภาคเหนือของประเทศไทย

5.2.2 เมื่อพิจารณาเฉพาะชนิดของชาที่ปลูกในภาคเหนือของประเทศไทย คือ ชาจีน ชาอัสสัม และชาน้ำมัน พบว่าลายพิมพ์ดีเอ็นเอของชาที่ได้จากเทคนิค PCR-RFLP นำยีน *ChS* มาเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิคพีซีอาร์ แล้วใช้เอนไซม์แต่ละชนิด คือ *Aci*I, *Bbv*I, *Hpa*II และ *Rsa*I ตัดผลผลิต PCR จะปรากฏรูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันสามารถแยกความแตกต่างระหว่างชาจีน ชาอัสสัม และชาน้ำมันได้

5.2.3 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของชาที่ได้จากการศึกษา มีความสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์จากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีความยาวทั้งหมด 768 คู่เบส ด้วยวิธีการสร้าง Phylogenetic tree โดยลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้สามารถแยกชนิดของชาจีน ชาอัสสัม และชาน้ำมัน ออกจากกันได้

5.2.4 เมื่อพิจารณาใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะมากกว่า 1 เอนไซม์ ตัดรวมกันจะเกิดลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่สามารถนำไปบ่งชี้เอกลักษณ์ของชาตัวอย่างอื่นที่นำมาศึกษาด้วย

5.2 ข้อเสนอแนะ

5.2.1 ทำการทดสอบชาตัวอย่างจริงในห้องปฏิบัติการ โดยเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอบริเวณยีน *ChS* ด้วยเทคนิค PCR และตัดผลผลิตด้วยเอนไซม์ข้างต้น เปรียบเทียบกับแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้เพื่อยืนยันผลซ้ำ

5.2.2 ศึกษายีนในนิวเคลียร์ดีเอ็นเอบริเวณ ITS ที่มีความแปรปรวนมากกว่ายีน *ChS* จะให้ผลสอดคล้องหรือแก้ปัญหาสายพันธุ์ที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันมากได้

5.2.3 ควรพิจารณาเทคนิคอื่นร่วมกันกับเทคนิค PCR-RFLP เช่น เทคนิค HPLC การวิเคราะห์ไอโซโทปของธาตุออกซิเจน เป็นต้น ที่สามารถนำไปพัฒนาเพื่อยืนยันผลซ้ำกับการตรวจสอบชาตัวอย่างจริง

5.2.4 การทดลองในห้องปฏิบัติการจริงควรเลือกใช้ความเข้มข้นของเจลอะกาโรสที่กำหนดไว้ (1% เจลอะกาโรส) จึงจะปรากฏรูปแบบของแถบดีเอ็นเอตามที่กำหนดไว้

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University