บทที่ 5
สรุปผลการทดลอง

การวิจัยนี้เป็นการศึกษาถึงผลของ demethylation ด้วย 5-azacytidine ต่อการแสดงออกของยีน โดยศึกษาในลักษณะการแตกกอ ความสูง ตลอดจนถึงการทนเค็ม ซึ่งผลการทดลองนี้ได้ศึกษาในพันธุ์เหลืองประทิว123 (LPT123) ขาวดอกมะลิ105 (KDML105) และกข.23 (RD23) ที่เริ่มจากการให้ 5-azacytidine แก่เมล็ดข้าวปกติซนิดเมล็ดพันธุ์หลัก (foundation) ส่วนสายพันธุ์ทนเค็มเป็นสายพันธุ์ที่คัดเลือกมาจาก somaclonal variation ที่เกิดขึ้นในขณะเลี้ยงเนื้อเยื่อและได้ทำการคัดเลือกต่อๆมาจนถึงรุ่นที่ 5 (R_5) จึงนำมาให้ 5-azacytidine โดยอาจสรุปผลการทดลองได้ดังนี้

1. ลักษณะต้นเตี้ยแตกกอมากและต้นเตี้ยของข้าวพันธุ์เหลืองประทิว123 รุ่น M_0 สายพันธุ์ LPT123 A10DB LPT123 A15DB และ LPT123 A13D และภาวะ hypomethylation ที่ genomic DNA สามารถถ่ายทอดมาได้ในรุ่น M_1 และยังไม่สามารถบอกได้ว่า ลักษณะต้นเตี้ยแตกกอมากใน LPT123 A10DB รุ่น M_0 ที่ยังคงลักษณะต้นเตี้ยแตกกอมากในรุ่น M_1 นี้สามารถถ่ายทอดมาในรุ่น M_2 ได้หรือไม่ เพราะจากการศึกษาในสายพันธุ์ LPT123 A10DB $M_1$52DB ไม่พบว่ามีการถ่ายทอดลักษณะดังกล่าวแต่ในอีก 5 สายพันธุ์ที่คงลักษณะต้นเตี้ยแตกกอมากยังไม่ได้ทำการศึกษาซึ่งถ้ามีการศึกษาเพิ่มเติมในส่วนนี้จะได้ข้อสรุปที่ดียิ่งขึ้น แต่อย่างไรก็ตามต้นเตี้ยที่ได้จากสายพันธุ์ LPT123 A10DB $M_1$52DB ในรุ่น M_2 ก็ยังคงมีระดับของ 5-methylcytosine ที่ต่ำกว่ารุ่นลูกของชุดควบคุม นอกจากนี้ยังพบว่า LPT123 A10DB รุ่น M_0 ที่มีลักษณะต้นเตี้ยแตกกอมากและแสดงลักษณะต้นสูงแตกกอมากในรุ่น M_1 มีการถ่ายทอดลักษณะดังกล่าวในสายพันธุ์ LPT123 A10DB $M_1$14HB ต่อมาได้ในรุ่น M_2

2. ลักษณะต้นเตี้ยของข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ105 สายพันธุ์ KDML105 A17D และ KDML105 A29D รุ่น M_0 และภาวะ hypomethylation ที่ genomic DNA สามารถถ่ายทอดมาได้ในรุ่น M_1 และจากผลการศึกษาในรุ่น M_2 ที่ได้จากการผสมตัวเองของข้าวขาวดอกมะลิ105 รุ่น M_0 สายพันธุ์ KDML105 A17D ที่มีลักษณะต้นเตี้ยและคงลักษณะดังกล่าวในรุ่น M_1 จำนวน 2 สายพันธุ์คือ KDML105 A17D $M_1$12D และ KDML105 A17D $M_1$19D ที่มีพบการถ่ายทอดของลักษณะต้นเตี้ยเฉพาะในสายพันธุ์ KDML105 A17D $M_1$12D และภาวะ

hypomethylation ที่ genomic DNA ของข้าวต้นเตี้ยก็สามารถถ่ายทอดต่อมาได้ในรุ่น M_2 ซึ่งจากการศึกษาเพียงบางส่วนของสายพันธุ์ที่คัดเลือกไว้นี้สามารถบอกได้ว่าลักษณะดังกล่าวสามารถถ่ายทอดมาในรุ่น M_2 ได้

3. ลักษณะต้นเตี้ยของข้าวพันธุ์กข.23 สายพันธุ์ RD23 A94DB $M_1$22D และ RD23 A94DB $M_1$43D ที่คัดเลือกมาจากข้าวกข.23 ที่มีลักษณะต้นเตี้ยแตกกอมากในรุ่น M_0 และแสดงลักษณะต้นเตี้ยในรุ่น M_1 มีโอกาสถ่ายทอดมายังรุ่น M_2 ได้ และจากผลการศึกษาการถ่ายทอดลักษณะต้นเตี้ยแตกกอมากที่ได้จากการผสมตัวเองของข้าวกข.23 ที่มีลักษณะต้นเตี้ยแตกกอมากในรุ่น M_0 และแสดงลักษณะต้นเตี้ยในรุ่น M_1 และกลับไปแสดงลักษณะต้นเตี้ยแตกกอมากในสายพันธุ์ RD23 A94DB $M_1$43D $M_2$14DB พบว่า มีการถ่ายทอดลักษณะมายังรุ่น M_3 ได้ 41.7% และมีการกระจายของลักษณะเป็นต้นที่แตกกอมาก ต้นปกติ ต้นเตี้ยแตกกอมาก และต้นเตี้ย ส่วนในการศึกษาการถ่ายทอดลักษณะต้นสูงแตกกอมากในสายพันธุ์ RD23 A94DB $M_1$43D $M_2$16HB ที่ได้จากการผสมตัวเองของข้าวกข.23 ที่มีลักษณะต้นเตี้ยแตกกอมากในรุ่น M_0 และแสดงลักษณะต้นเตี้ยในรุ่น M_1 และแสดงลักษณะต้นสูงแตกกอมากพบว่า มีการถ่ายทอดลักษณะต้นสูงแตกกอมากมายังรุ่น M_3 ได้ 44.4% และมีการกระจายของลักษณะเป็นต้นสูงแตกกอมาก ต้นสูง ต้นที่แตกกอมาก และต้นปกติ ภาวะ hypomethylation ที่ genomic DNA ของต้นเตี้ยสามารถถ่ายทอดมายังรุ่น M_2 และ M_3 ได้และใน genomic DNA ของข้าวต้นสูงรุ่น M_3 ก็พบว่าอยู่ในภาวะ hypomethylation เช่นเดียวกัน ส่วนในต้นที่เกิดการ reversion พบระดับของการเติมหมู่เมทธิลที่ไซโตซีนไม่แตกต่างจากชุดควบคุม

4.ระดับของการเติมหมู่เมทธิลที่ไซโตซีนมีความสัมพันธ์กับลักษณะที่แสดงออกคือ ระดับของ 5mC ที่ต่ำกว่าปกติ (hypomethylation) สามารถพบร่วมกับสายพันธุ์ที่ยังคงแสดงลักษณะที่แปรผัน ในขณะที่สายพันธุ์ที่กลับมาแสดงลักษณะปกติมีระดับของ 5mC ที่สูงขึ้นจนเท่ากับรุ่นลูกของชุดควบคุม

5. ในกรณีของลักษณะทนเค็มที่คัดเลือกมาจาก somaclonal variation นั้น เห็นได้ชัดว่า อัตราการอยู่รอดของประชากรเมื่อถูกปลูกในสภาวะที่เติมโซเดียมคลอไรด์ 0.5% ลงในน้ำปุ๋ยโดยควบคุมความเค็มของน้ำปุ๋ยที่ใช้ปลูกให้มีค่าการนำกระแสไฟฟ้า 9-10 mohm/cm^3 เริ่มคงที่ตั้งแต่รุ่นที่ 2 จนถึงรุ่นที่ 5 และเมื่อนำลูกของรุ่นที่ 5 มาแช่ใน 5-azacytidine ความเข้มข้น 300 ไมโครโมลาร์ ในระยะต้นอ่อนเป็นเวลา 3 วัน พบว่า ทุกสายพันธุ์มีอัตราการอยู่รอดเพิ่มขึ้นในระยะ 5 ใบ ซึ่งควรทดลองต่อไปอีก 2-3 รุ่น

6. การให้สาร 5-azacytidine เพื่อลดการเติมหมู่เมทธิลที่ดีเอ็นเอ เพื่อให้ยีนที่มีอยู่นั้นมีโอกาสแสดงออก เป็นวิธีการที่ทำได้ง่าย ค่าใช้จ่ายน้อย การแสดงออกของลักษณะต่างๆนั้นเห็นได้ทันทีในรุ่นนั้นๆ ซึ่งในการทดลองนี้เมื่อใช้ 5-azacytidine กับเมล็ดข้าวแล้วนำข้าวเหล่านั้นไปปลูกจะเห็นลักษณะต่างๆที่แปรปรวนไปจากเดิม เช่น พบต้นที่สูงขึ้น หรือ เตี้ยลง ต้นที่แตกกอมาก หรือ แตกกอน้อยลง อย่างไรก็ดีเมื่อคัดเลือกเอาลักษณะบางลักษณะที่สนใจไปปลูกต่อในรุ่น M_1 และ M_2 พบว่า ลักษณะบางอย่างที่พบในรุ่น M_0 กลับหายไปในทั้งสองรุ่นแต่ลักษณะบางอย่างก็ปรากฏเพิ่มขึ้นในประชากรนั้นๆ หรือบางครั้งเมื่อนำลักษณะใหม่ไปปลูกลักษณะเดิมที่ปรากฏในรุ่นก่อนกลับแสดงออกมาได้ ตัวอย่างเช่น LPT123 A10DB $M_1$14HB ที่มีต้นสูงแตกกอมากเป็นต้นที่คัดเลือกมาจากรุ่น M_0 ที่มีลักษณะต้นเตี้ยแตกกอมากเมื่อนำมาปลูกต่อพบว่ามีการกลับมาแสดงลักษณะต้นเตี้ยถึง 69.3% ในรุ่น M_2 และใน KDML105 A17D $M_1$12D เป็นต้นที่แสดงลักษณะต้นเตี้ยและแตกกอปกติในรุ่น M_0 และ M_1 เมื่อนำเมล็ดที่เกิดจากการผสมตัวเองของต้นนี้มาปลูกกลับพบว่า ในประชากรรุ่นนั้นมีต้นเตี้ยและแตกกอปกติในรุ่น M_2 เพียง 10.7% เท่านั้น สำหรับในข้าวพันธุ์กข.23 ซึ่งได้ศึกษามาถึงรุ่นที่ 3 เมื่อได้ศึกษาถึงลักษณะเตี้ยเพียงอย่างเดียว โดยนำเอาต้นเตี้ยมาปลูกในรุ่นต่างๆเช่น RD23 A94DB พบว่า การกระจายของประชากรที่เป็นต้นเตี้ยในรุ่น M_0 มี 41% แต่ในรุ่น M_1 กลับพบต้นเตี้ยเพียง 19.2% และในรุ่น M_3 พบลักษณะของต้นเตี้ยเพิ่มขึ้นเป็น 54.2%

จากข้อมูลทั้งหมดที่ได้นี้ ลักษณะที่คาดว่าเกิดจาก demethylation ซึ่งถ่ายทอดไปยังรุ่นต่างๆ ยังไม่แน่นอน โดยบางสายพันธุ์อาจจะคงที่ตั้งแต่รุ่นที่ 1 แต่บางสายพันธุ์กลับลดลงในรุ่นที่ 2 หรือบางสายพันธุ์เมื่อนำลูกของต้นสูงมาปลูกกลับได้ต้นเตี้ยมากกว่า เป็นต้น แต่เมื่อพิจารณาถึงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณ 5-methylcytosine ที่ genomic DNA กับการแสดงออกของลักษณะที่ผันแปรไปไม่ว่าจะเป็นต้นสูงหรือต้นเตี้ยก็ยังคงพบว่า มีการแสดงออกร่วมกัน คือ พบระดับของ 5-methylcytosine ที่ต่ำกว่าปกติ (hypomethylation) ในข้าวต้นเตี้ยหรือต้นสูงเมื่อเปรียบเทียบกับระดับของ 5-methylcytosine ของชุดควบคุม ขณะเดียวกันก็พบว่าในต้น revertant หรือต้นที่มีการกลับไปแสดงลักษณะปกติมีระดับของ 5-methylcytosine ที่ไม่แตกต่างจากชุดควบคุม จากผลอันนี้อาจกล่าวได้ว่า ระดับของ 5-methylcytosine ที่ genomic DNA ที่ต่ำกว่าปกตินำจะมีความสัมพันธ์กับความสูงที่ผันแปรไปคือ ถ้าในประชากรรุ่นต่อไปไม่มีการ methylate กลับเข้าไปใหม่ลักษณะความสูงที่ผันแปรไปนี้น่าจะคงอยู่ต่อไปได้ จึงยังไม่อาจกล่าวได้ในขณะนี้ว่า การใช้ 5-azacytidine จะมีผลให้ยีนนั้นแสดงออกต่อไปได้เรื่อยๆโดยไม่ถูก methylate กลับเข้าไปใหม่ จึงควรมีการทดลองมากกว่านี้

7. เมื่อสิ้นสุดการทดลองในระยะนี้ พบมีสายพันธุ์ที่มีลักษณะพิเศษที่น่าสนใจ 26 สายพันธุ์และสายพันธุ์ทนเค็มจากการชักนำด้วย 5-azacytidine อีก 18 สายพันธุ์ดังนี้

พันธุ์, สายพันธุ์	ลักษณะ	ความสูง (ซม.) / จำนวนยอด	ความยาวรวง (ซม.)
พันธุ์เหลืองประทิว123			
LPT123 A15DB $M_1$1/14DB*	ต้นเตี้ยแตกกอมาก	84/ 25	20
LPT123 A15DB $M_1$1/04DB*	ต้นเตี้ยแตกกอมาก	63/ 25	19
LPT123 A15DB $M_1$1/01DB*	ต้นเตี้ยแตกกอมาก	79/ 20	20
LPT123 A15DB $M_1$3/27DB	ต้นเตี้ยแตกกอมาก	64/ 20	19
LPT123 A13D $M_1$1/13DB*	ต้นเตี้ยแตกกอมาก	76/ 23	17
LPT123 A13D $M_1$1/10DB	ต้นเตี้ยแตกกอมาก	95/ 24	24
LPT123 A13D $M_1$1/17D*	ต้นเตี้ย	93/ 12	20
LPT123 A10DB $M_1$14HB $M_2$20HB	ต้นสูงแตกกอมาก	95/ 41	22
LPT123 A10DB $M_1$14 HB $M_2$13HB	ต้นสูงแตกกอมาก	91/ 49	21
พันธุ์ขาวดอกมะลิ105			
KDML105 A17D $M_1$1/10D*	ต้นเตี้ย	80/ 7	28
KDML105 A17D $M_1$1/06D	ต้นเตี้ย	69/ 7	22
KDML105 A17D $M_1$1/01D	ต้นเตี้ย	66/ 8	23
KDML105 A29D $M_1$1/19D*	ต้นเตี้ย	76/ 7	22
KDML105 A29D $M_1$1/11D*	ต้นเตี้ย	74/ 8	25
KDML105 A17D $M_1$12D $M_2$28D	ต้นเตี้ย	62/ 44	19
KDML105 A17D $M_1$12D $M_2$26D	ต้นเตี้ย	61/ 44	19
KDML105 A17D $M_1$12D $M_2$21D	ต้นเตี้ย	63/ 42	23
พันธุ์กข.23			
RD23 A94DB $M_1$43D $M_2$06D	ต้นเตี้ย	73/ 29	28
RD23 A94DB $M_1$43D $M_2$14DB $M_3$24DB	ต้นเตี้ยแตกกอมาก	62/ 23	23
RD23 A94DB $M_1$43D $M_2$14DB $M_3$22DB	ต้นเตี้ยแตกกอมาก	65/ 28	25
RD23 A94DB $M_1$43D $M_2$14DB $M_3$18DB*	ต้นเตี้ยแตกกอมาก	55/ 27	22
RD23 A94DB $M_1$43D $M_2$14DB $M_3$17DB	ต้นเตี้ยแตกกอมาก	65/ 31	22
RD23 A94DB $M_1$43D $M_2$14DB $M_3$09DB	ต้นเตี้ยแตกกอมาก	65/ 36	22
RD23A94DB M_1 43D $M_2$16HB $M_3$16HB*	ต้นสูงแตกกอมาก	72/ 31	23
RD23 A94DB $M_1$43D $M_2$16HB $M_3$04HB*	ต้นสูงแตกกอมาก	77/ 23	24
RD23 A94DB $M_1$43D $M_2$16HB $M_3$01HB	ต้นสูงแตกกอมาก	71/ 32	24

* ต้นที่นำไปศึกษาปริมาณเบส

ข้าวทนเค็มสายพันธุ์พิเศษจากการชักนำด้วย 5-azacytidine	
สายพันธุ์	ลักษณะ
RD23 TC26 NaO A01 SD	ต้นเตี้ยทนเกลือ NaCl
RD23 TC26 NaO A04 SE	ออกดอกเร็วทนเกลือ NaCl
RD23 TC26 NaO A05 SDB	ต้นเตี้ยแตกกอมากทนเกลือ NaCl
RD23 TC110 NaO A07 S	ต้นปกติทนเกลือ NaCl
RD23 TC110 NaO A12 SD	ต้นเตี้ยทนเกลือ NaCl
LPT123 TC110 NaO A02 SDB	ต้นเตี้ยแตกกอมากทนเกลือ NaCl
LPT123 TC110 NaO A03 SD	ต้นเตี้ยทนเกลือ NaCl
LPT123 TC110 NaO A06 S	ต้นปกติทนเกลือ NaCl
LPT123 TC127 Na1 A03 S	ต้นปกติทนเกลือ NaCl
LPT123 TC127 Na1 A07 SD	ต้นเตี้ยทนเกลือ NaCl
LPT123 TC127 Na1 A08 SE	ออกดอกเร็วทนเกลือ NaCl
LPT123 TC127 Na1 A09 SDB	ต้นเตี้ยแตกกอมากทนเกลือ NaCl
KDML105 TC26 NaO A05 SD	ต้นเตี้ยทนเกลือ NaCl
KDML105 TC26 NaO A06 SD	ต้นเตี้ยทนเกลือ NaCl
KDML105 TC26 NaO A08 SD	ต้นเตี้ยทนเกลือ NaCl
KDML105 TC161 NaO A01 SD	ต้นเตี้ยทนเกลือ NaCl
KDML105 TC161 NaO A02 SL	ออกดอกช้าทนเกลือ NaCl
KDML105 TC161 NaO A04 SDE	ต้นเตี้ยออกดอกเร็วทนเกลือ NaCl

8. การศึกษานี้เป็นการนำเอาความรู้เกี่ยวกับชีววิทยาโมเลกุลมาใช้ในการศึกษาการกระตุ้นการแสดงออกของลักษณะบางลักษณะในข้าวไทยโดยใช้ 5-azacytidine ซึ่งสามารถชักนำให้เกิดลักษณะที่แปรผันและมีแนวโน้มการถ่ายทอดต่อมาได้ในรุ่นลูก เช่น ต้นเตี้ยและการแตกกอมากกว่าปกติซึ่งเป็นลักษณะที่ดีซึ่งถ้าสามารถคัดเลือกได้สายพันธุ์ที่คงที่จะเป็นประโยชน์ต่อไปในอนาคต นอกจากนี้ยังมีโอกาสที่จะนำเอาหลักการนี้ไปประยุกต์ใช้กับพืชอื่นๆ ให้เกิดประโยชน์ต่อไปได้