บทที่ 1
บทนำ

การควบคุมการแสดงออกของลักษณะต่างๆในสิ่งมีชีวิตและการถ่ายทอดจากชั่วอายุหนึ่งไปยังอีกชั่วอายุหนึ่งนั้นเกิดจากการทำงานของยีน ซึ่งมีองค์ประกอบสำคัญสามส่วนคือ promoter structural gene และ terminator ข้อมูลทางพันธุกรรมนี้เรียงตัวกันอย่างเป็นระเบียบโดยลำดับของนิวคลิโอไทด์แบบต่างๆในสายดีเอ็นเอ ซึ่งข้อมูลเหล่านี้มีการแสดงออกเป็นลักษณะต่างๆโดยผ่านทางเอ็มอาร์เอ็นเอ ซึ่งเกี่ยวข้องโดยตรงกับการผลิตโปรตีนจำเพาะ ลักษณะที่ปรากฏในสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดนั้นเป็นผลรวมของการกระทำร่วมกันของโปรตีนหลายชนิด (Holliday and Pugh, 1975) ส่วนการควบคุมการแสดงออกของยีนอีกแบบหนึ่งคือ การเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีนในระหว่างพัฒนาการของสิ่งมีชีวิตซึ่งเชื่อว่าเกี่ยวข้องกับ epigenetic ซึ่งมีผลทำให้การทำงานของยีนเปลี่ยนแปลงไปโดยไปปิดหรือเปิดการแสดงออกของยีนที่ภาวะใดภาวะหนึ่งและอาจทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงการทำงานของยีนอย่างชั่วคราวหรือถาวรโดยไม่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสในสายดีเอ็นเอ(Holliday,1987) Scarano(1971)ได้อธิบายการเปลี่ยนแปลงการทำงานของยีนอย่างชั่วคราวหรือถาวรในระหว่างขั้นตอนการพัฒนาการว่าเกิดจากการเปลี่ยนแปลงของปฏิสัมพันธ์จำเพาะระหว่างโปรตีนกับดีเอ็นเออันเนื่องมาจากการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทางเคมีของเบสในดีเอ็นเอ การเปลี่ยนแปลงของดีเอ็นเอมีหลายรูปแบบ รูปแบบหนึ่งที่พบในปัจจุบันคือ การเปลี่ยนแปลงโดยผ่านกระบวนการเติมหมู่เมทธิลที่ดีเอ็นเอ (DNA methylation) (Holliday, 1987; 1989)

กระบวนการเติมหมู่เมทธิลที่ดีเอ็นเอเป็นกระบวนการที่เอนไซม์เมทธิลเลส (methylase) หรือ เมทธิลทรานสเฟอเรส (methyltransferase) ทำการเคลื่อนย้ายหมู่อนุมูลเมทธิล ($-CH_3$) ไปต่อยังเบสของนิวคลิโอไทด์บนสายดีเอ็นเอที่ตำแหน่งต่างๆ โดยมี S-adenosylmethionine เป็นตัวให้หมู่อนุมูลเมทธิลซึ่งมักเกิดที่ cytosine (C) ทำให้ได้เป็น 5-methylcytosine (Adam and Burdon, 1985) กระบวนการเติมหมู่เมทธิลที่ดีเอ็นเอที่เกิดบริเวณตำแหน่งที่ 5 ของ cytosine นี้เป็นกระบวนการที่เกิดขึ้นภายหลังการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ ซึ่งจะเกิดขึ้นทั้งในสิ่งมีชีวิตที่เป็นโปรคาริโอตและยูคาริโอต (Cedar, 1988)

ในแบคทีเรียกระบวนการเติมหมู่เมทธิลที่ดีเอ็นเอเกิดขึ้นเพื่อป้องกันดีเอ็นเอของเซลล์ไม่ให้ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) โดยอาศัยการเปลี่ยนแปลงของเบสในนิวคลิโอไทด์ด้วยเอนไซม์ methylase ซึ่งมีบริเวณจดจำแบบเดียวกับเอนไซม์ตัดจำเพาะที่เซลล์สร้างขึ้นเพื่อเติมเข้าที่ adenine (A) เป็น N^6-methyladenine หรือ เมื่อเกิดขึ้นกับ cytosine (C) จะได้เป็น 5-methylcytosine ที่อยู่ในบริเวณจดจำของเอนไซม์ การเติมหมู่

เมทธิลเข้าที่เบสของนิวคลิโอไทด์จะป้องกันไม่ให้เอนไซม์ตัดจำเพาะที่เป็นคู่กับ methylase นั้นตัดดีเอ็นเอที่ตำแหน่งนั้น การเติมหมู่เมทธิลในแบคทีเรียเป็นเหตุการณ์ตามปกติของดีเอ็นเอ และบางครั้งถ้าหมู่เมทธิลอยู่ที่เบสของนิวคลิโอไทด์ตรงตำแหน่งที่เป็นบริเวณจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะบางชนิดจะทำให้เอนไซม์ไม่สามารถตัดดีเอ็นเอที่ตำแหน่งนั้นได้ (Holliday and Pugh, 1975) ในดีเอ็นเอของพืชชั้นสูงมีโอกาสพบกระบวนการเติมหมู่เมทธิลที่ cytosine มากถึง 30% ของ cytosine ทั้งหมดในขณะที่ในดีเอ็นเอของสัตว์พบเพียง 8% เท่านั้น กระบวนการเติมหมู่เมทธิลที่ดีเอ็นเอที่พบในพืชและสัตว์จะพบในบริเวณที่มีลำดับนิวคลิโอไทด์จำเพาะ โดยในพืชพบในลำดับนิวคลิโอไทด์จำเพาะที่เป็น CpG dinucleotide และ CpNpG trinucleotide (เมื่อ N คือ A T C หรือ G) ส่วนในเซลล์สัตว์พบเฉพาะในลำดับนิวคลิโอไทด์ที่เป็น CpG dinucleotide (Gruenbaum, Cedar and Razin, 1981; Nick et al., 1986) ซึ่งกระบวนการเติมหมู่เมทธิลที่ดีเอ็นเอในยูคาริโอตนี้มีความแปรผันไปตามชนิด เนื้อเยื่อ และตำแหน่งบนโครโมโซม (Voet and Voet, 1990) การตรวจสอบเพื่อหา 5-methylcytosine (5mC) สามารถกระทำได้โดยการใช้ methylcytosine-sensitive restriction enzyme ที่สามารถตัดดีเอ็นเอได้แม้ว่าจะมีหมู่เมทธิลเกาะอยู่ เช่น ดีเอ็นเอจากสิ่งมีชีวิตชนิดหนึ่งมีบริเวณจดจำของเอนไซม์ *Hpa* II และ *Msp* I สองตำแหน่ง แต่มีการเติมหมู่เมทธิลที่เบส C ที่ตำแหน่งหนึ่ง เมื่อนำมาตัดด้วยเอนไซม์ทั้งสองชนิดจะให้ผลแตกต่างกัน เนื่องจาก *Hpa* II จะไม่ตัดดีเอ็นเอที่มีหมู่เมทธิล ส่วน *Msp* I จะตัดได้ซึ่งช่วยให้สามารถบอกความแตกต่างระหว่างการเกิด methylation และ unmethylation (Cedar and Razin, 1990)

รูปแบบของกระบวนการเติมหมู่เมทธิลที่ดีเอ็นเอในยูคาริโอตสามารถถ่ายทอดไปสู่รุ่นลูกหลานได้โดยตรง โดยมีรูปแบบของดีเอ็นเอเหมือนพ่อ แม่และมีการคงระดับการเติมหมู่เมทธิลที่ดีเอ็นเอ (maintenance methylation) ภายหลังจากการจำลองตัวเอง เอนไซม์ methylase สามารถจดจำต่อดีเอ็นเอสายที่สร้างใหม่ในลำดับ CpG dinucleotide หรือ CpNpG trinucleotide ในดีเอ็นเอซึ่งอยู่ในสภาพที่ดีเอ็นเอสายแม่แบบมีหมู่เมทธิลและอีกสายที่สร้างใหม่ไม่มีหมู่เมทธิล (hemimethylated DNA) จะเติมหมู่เมทธิลที่ได้จาก S-adenosylmethionine ให้กับเบส cytosine (Holliday, 1989; Brettel and Dennis, 1991) มีรายงานการศึกษาการคงระดับของการเติมหมู่เมทธิลในไข่ของ *Xenopus* ที่ได้รับการฉีดดีเอ็นเอที่ถูกเติมด้วยหมู่เมทธิลซึ่งภายหลังจากการจำลองตัวเองของดีเอ็นเอ พบการคงระดับของหมู่เมทธิลที่ดีเอ็นเอ โดยสูญเสีย 5-methylcytosine น้อยกว่า 1% ต่อรอบของการจำลองตัวเองของดีเอ็นเอ นอกจากนี้ยังมีรายงานการศึกษาการคงระดับของการมีหมู่เมทธิลที่ดีเอ็นเอใน inactive X-chromosome ที่ถูกเติมด้วยหมู่เมทธิลที่ HTF islands (Holliday, 1987)

บทบาทของการเติมหมู่เมทธิลที่ดีเอ็นเอพบว่า เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงเบสจาก cytosine เป็น 5-methylcytosine จะส่งผลทำให้ดีเอ็นเอที่มีโครงสร้างแบบ Z เสถียรมากขึ้น นอกจากนี้

ยังมีสิ่งที่น่าสนใจอีกอย่างหนึ่งก็คือ โปรตีนซึ่งเกาะเฉพาะ Z-DNA ไม่เกาะ B-DNA แต่สามารถทำให้เปลี่ยนรูปจาก B เป็น Z ได้ เนื่องจากมีโปรตีนหลายชนิดที่เกาะอยู่บนดีเอ็นเอและมีบทบาทสำคัญเกี่ยวกับการ transcription จึงอาจเป็นไปได้ว่าโปรตีนเหล่านั้นเป็นโปรตีนที่เกาะ Z-DNA ซึ่งการเปลี่ยนแปลงรูปแบบของดีเอ็นเอระหว่าง Z และ B อาจเป็นสัญญาณบอกให้ยีนเริ่มทำงาน (Adam and Burdon, 1985) ซึ่งการเปลี่ยนแปลงนี้จะส่งผลกระทบโดยตรงต่อการแสดงออกของยีน (Cedar and Razin, 1990) และในลำดับนิวคลิโอไทด์ที่เป็น CpG dinucleotide นั้นยังเป็นจุดที่ไวต่อการเกิดมิวเตชัน (mutation hotspot) โดยเปลี่ยน 5mC ไปเป็น Thymine (Youssoufian et al.,1986) นอกจากนั้นการมี 5mC ยังเป็นตัวที่บอกความแตกต่างในเบสคู่สมและยังเป็นสัญญาณให้เกิดการซ่อมแซมดีเอ็นเอด้วย (Hare and Tayler, 1985) แต่ถึงแม้ว่าในบริเวณที่มีลำดับนิวคลิโอไทด์ที่เป็น CpG dinucleotide มากมักจะมีโอกาสเกิดการเติมหมู่เมทธิลที่ดีเอ็นเอแต่ยังพบบริเวณที่เรียกว่า HTF islands (*Hpa* II tiny fragment) หรือ GC-rich islands มักไม่ถูกเติมด้วยหมู่เมทธิลซึ่งพบทั้งในเซลล์สัตว์ (Bird, 1986) และเซลล์พืช HTF islands นี้มีความเกี่ยวข้องกับการควบคุมการแสดงออกของยีนและอาจนำไปใช้ประโยชน์ในการศึกษาทางด้านวิวัฒนาการของกลุ่มสิ่งมีชีวิตอีกทั้งยังอาจนำไปทำ gene mapping และการแยกยีนได้ (Antequera and Bird, 1988)

มีการศึกษาเกี่ยวกับกระบวนการเติมหมู่เมทธิลที่บริเวณโครมาตินของพืชสามชนิดคือ ถั่ว ข้าวบาร์เลย์ และข้าวโพด ที่มีความจำเพาะต่อ *DNaseI* พบว่าระดับของการเติมหมู่เมทธิลที่ดีเอ็นเอลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอทั้งหมด (Klass and Amasino, 1989) ระดับของการเติมหมู่เมทธิลน้อย (hypomethylation) ในตำแหน่ง 5'upstream ของยีนในข้าวโพดบางยีนที่เป็น GC-rich (Antequera and Bird, 1988) และยีน *alcoholdehydrogenase*-1 (*Adh*1) (Walbot and Warren, 1990) และที่ตำแหน่งช่วงกว้างความยาวกว่า 3 กิโลเบสทางด้าน 5'upstream ของยีน *phosphoenolpyruvate carboxylase* (*PEPcase*) ของข้าว (Langdale, Taylor and Nelson, 1991) มีความสำคัญต่อการแสดงออกของยีน นอกจากนี้ยังมีหลักฐานหลายชิ้นที่เชื่อว่ากระบวนการเติมหมู่เมทธิลที่ดีเอ็นเอไปปิดการแสดงออกของยีนในยูคาริโอตโดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อไปเกิดที่บริเวณที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมการเริ่มการลอกรหัสของยีน (Voet and Voet, 1990) ซึ่งคาดว่าการเติมหมู่อนุมูลเมทธิลที่ตำแหน่ง cytosine บนสายดีเอ็นเอจะขัดขวางการจับของ RNA polymerase บนสายดีเอ็นเอทำให้ไม่สามารถเกิดการ transcription และส่งผลให้ไม่มีการแสดงออกของยีน (Holliday, 1989) ในบางครั้งการเพิ่มระดับของการเติมหมู่อนุมูลเมทธิลที่สายดีเอ็นเอนั้นจะทำให้การลอกรหัสของยีนในพืชลดลง (Matzke et al., 1989) ได้มีรายงานการศึกษาถึงการเติมหมู่เมทธิลที่ดีเอ็นเอต่อการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แสงในเนื้อเยื่อสีขาวของพืชจากการเพาะเลี้ยงเซลล์ของ Sycamore (*Acer pseudoplatanus* L.) พบว่า เซลล์ที่กลายไปมีลักษณะสีเขียวและสามารถ

สังเคราะห์แสงได้มีปริมาณ methylated base น้อยกว่าเซลล์ปกติที่มีสีขาวและไม่สามารถสังเคราะห์แสงได้ซึ่งจากการทดลองนี้บ่งชี้ว่ากระบวนการเติมหมู่เมทธิลที่ดีเอ็นเอเป็นกลไกสำคัญในการควบคุมการ transcription ของยีนในเซลล์พืช (Ngernprasirtsiri et al., 1988a) เช่นเดียวกับในผลมะเขือเทศระหว่างการสุก ซึ่งพบว่า ในช่วงที่มะเขือเทศมีการสุกและเกิดการเปลี่ยนเป็นสีแดงจะมีระดับของการเติมหมู่เมทธิลที่ดีเอ็นเอเพิ่มสูงขึ้น(Ngernprasirtsiri, Kobayashi and Akazawa, 1988b) ทำให้กล่าวได้ว่า 5mC ทำหน้าที่ในการควบคุมการแสดงออกของยีน โดยอาจมีผลโดยตรงต่อโครงสร้างของดีเอ็นเอทำให้ปฏิสัมพันธ์ระหว่างดีเอ็นเอกับเอนไซม์ RNA polymerase ในการ transcription และโปรตีนเอนไซม์อื่นที่จับกับดีเอ็นเอที่จดจำต่อลำดับของดีเอ็นเอแตกต่างกันระหว่างลำดับของดีเอ็นเอที่ไม่มีหมู่เมทธิลที่ cytosine กับที่มีหมู่เมทธิลที่ cytosine เปลี่ยนไปซึ่งมีผลต่อการ transcription และการแสดงออกของยีน (Sano et al., 1989)

ความสำคัญของการเติมหมู่เมทธิลที่ดีเอ็นเอในพืชที่ได้รับการศึกษากันมากอีกอย่างหนึ่งคือ การแสดงออกของพืชที่ได้รับการถ่ายยีน (transgenic plant) เนื่องจากประสบปัญหาการไม่สามารถแสดงลักษณะของยีนที่ใส่เข้าไปได้ทั้งที่ตรวจสอบว่ามียีนนั้นอยู่เช่น การไม่แสดงออกของ T-DNA ที่ย้าย จาก *Agrobacterium tumefaciens* สู่เซลล์พืช (Gelvin, Karcher and Dirita, 1983; Hepburn et al., 1983) ในยาสูบ *Nicotiana tabacum* ที่ได้รับ T-DNA พบว่าบางครั้งไม่มีการแสดงออกของยีนใน T-DNA เนื่องจากมีระดับของหมู่เมทธิลที่ดีเอ็นเอสูงกว่าปกติ (hypermethylation) และเมื่อให้ 5-azacytidine ที่ไปยับยั้งกระบวนการเติมหมู่เมทธิลที่ ดีเอ็นเอทำให้ระดับการมีหมู่เมทธิลลดต่ำลงและยีนนั้นแสดงออกได้ (Gelvin, Karcher and Dirita, 1983; Amasino, Powell and Gurdon, 1984; Klass and Amasino, 1989) จากการศึกษาการถ่ายยีน *A1* cDNA จากข้าวโพดที่ทำหน้าที่เป็นเอนไซม์ DFR ในการเปลี่ยน dihydrokaempferol ไปเป็น leucopelargonidin ซึ่งเป็นสารตั้งต้นของ pelargonidin ที่ทำให้เกิดสีแดงอิฐใส่เข้าไปใน *Petunia hybrida* ที่มีดอกสีขาว โดยใช้ 35SRNA promoter เป็นตัวควบคุม พบว่า *Petunia hybrida* ที่ได้รับการถ่ายยีน *A1* cDNA มีการแสดงออกของสีดอกที่แตกต่างกัน 3 กลุ่ม คือ แดง ขาวด่างแดง และขาว ทั้งนี้เนื่องมาจากการเกิดการเติมหมู่เมทธิลที่ 35SRNA promoter ในระดับที่แตกต่างกัน ซึ่งสภาวะการเกิดการเติมหมู่เมทธิลที่ promoter ไปมีผลต่อการแสดงออกของยีน *A1* cDNA (Linn et al., 1990) ระยะต่อมาได้มีการพบความผิดปกติของยีนที่ใส่เข้าไปในเซลล์พืชภายหลังการถ่ายยีน โดยพบว่า อัตราส่วนการกระจายของการแสดงออกของยีนเบี่ยงเบนไปจากปกติ ซึ่งอาจเกิดจากการขาดหายไปของยีนบางส่วนหรืออาจเกิดจากการแสดงออกของยีนนั้นถูกยับยั้งไว้ทั้ง ๆที่ยีนอยู่ครบถ้วนภายในเซลล์พืชการยับยั้งการแสดงออกนี้พบว่าส่วนใหญ่เกิดจากการเติมหมู่อนุมูลเมทธิลที่เบสบางตัวของดีเอ็นเอนั้น (Matzke et al., 1989; Nelsen-Salz and Doring, 1990) จากการศึกษาการถ่ายยีน 2

ชนิดในยาสูบ โดยได้ทำการถ่าย T-DNA I ที่มียีน kanamycin resistance และ nopaline synthase และ T-DNA II ที่มียีน hygromycin resistance และ octopine synthase ตามลำดับ เมื่อทำการตรวจสอบพบว่า การแสดงออกของ T-DNA I ได้ถูกยับยั้งไว้ซึ่งพบว่าที่บริเวณ promoter ของยีนเกิดกระบวนการเติมหมู่เมทธิลซึ่งการยับยั้งการแสดงออกของยีน T-DNA I นี้พบเฉพาะในพืชที่มียีนทั้งสองชนิดอยู่ด้วยกัน เมื่อนำเอาพืชนี้มาผสมตัวเอง ปรากฏว่าในรุ่นหลานที่มีเฉพาะยีน T-DNA I อย่างเดียวสามารถกลับมาแสดงออกได้ตามเดิมและระดับของการเติมหมู่เมทธิลที่ promoter ก็มีการลดลงมาบางส่วนหรือทั้งหมด (Matzke et al., 1989)

การศึกษาเกี่ยวกับ analog ของ nucleoside cytidine ซึ่งเป็นสารเคมีที่สามารถยับยั้งการเกิดกระบวนการเติมหมู่เมทธิลที่ดีเอ็นเอนั้นพบว่า สารเคมีที่มีสมบัติที่ไม่สามารถถูกเติมด้วยหมู่เมทธิลเป็น 5mC ได้แก่ 5-azacytidine 5-azadeoxycytidine และ 5-fluorocytidine เป็นต้น สำหรับ 5-azacytidine (5azaC) เป็น nucleoside ที่มีเบสเป็น 5-azacytosine ซึ่งเป็น analog ของ cytosine ต่างกันที่ตำแหน่งที่ 5 ของ pyrimidine ring โดยเป็น carbon ใน cytosine และเป็น nitrogen ใน 5azaC เมื่อ analog นี้รวมเป็นส่วนหนึ่งของดีเอ็นเอแทน cytidine มันจะไม่สามารถถูกเติมด้วยหมู่เมทธิลเป็น 5mC ทำให้เซลล์ที่ได้รับ 5azaC มีระดับการเติมหมู่เมทธิลที่ดีเอ็นเอลดลง เรียกว่า undermethylation หรือ hypomethylation (Jones, 1985; Santi, Garrett and Barr,1983) ในปัจจุบัน 5azaC เป็นสารที่กำลังได้รับความสนใจโดยเฉพาะการศึกษาทางด้านเซลล์และชีววิทยาโมเลกุล เนื่องจากมีคุณสมบัติสามารถที่จะกระตุ้นการแสดงออกของยีนในยูคาริโอตซึ่งภายหลังจากการกระตุ้นให้กลับมาแสดงออกด้วยสาร 5azaC แล้วสามารถที่จะถ่ายทอดไปสู่ลูกหลานต่อไปได้ นอกจากนี้ 5azaC ยังมีคุณสมบัติในการยับยั้งเอนไซม์ methyltransferase ในกระบวนการเติมหมู่เมทธิลที่ cytosine และสามารถเปลี่ยนแปลง differentiate state ของเซลล์ได้ (Jones,1985)

โดยอาศัยสมบัติของสารเคมีที่เป็น demethylating agent ได้มีการศึกษาเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการทำให้เกิดกระบวนการลดการเติมหมู่เมทธิล (demethylation) ของจีโนมและชักนำให้ *ipt* gene ในเซลล์ของยาสูบที่อยู่ในสภาพ hypermethyation มีการแสดงออกมากขึ้นโดยใช้สารที่เป็น 5-azacytosine derivatives พบว่า 5azaC มีประสิทธิภาพในการชักนำให้เกิดภาวะลดการเติมหมู่เมทธิลของจีโนมได้ดีกว่า 5-azadeoxycytidine (5azadC) อีกทั้งชักนำให้มีการแสดงออกของ *ipt* gene ได้ดีกว่า โดยการใช้ 5azaC ที่ความเข้มข้น 2.5 μM สามารถชักนำให้ *ipt* gene มีการแสดงออกได้ดีที่สุด โดยไม่ไปมีผลต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ (Klass and Amasino, 1989) และในการกระตุ้นการทำงานของยีนที่อยู่บน inactive X-chromosome โดยใช้ 5azaC สามารถชักนำให้มีการแสดงออกของยีนเพิ่มมากขึ้นอย่างน้อยพันเท่า (Holliday, 1987)

Durante et al (1989) สามารถชักนำให้เนื้อเยื่อของยาสูบลูกผสม amphidiploid ระหว่าง *Nicotiana glauca* กับ *N. langsdoffii* เจริญอย่างไม่จำกัดได้ในอาหารที่ไม่ให้ฮอร์โมน โดยใช้ 5azaC และจากการตรวจระดับของการเติมหมู่เมทธิลที่ repetitive DNA ของกลุ่มเซลล์ พบการเติมของหมู่เมทธิลต่ำกว่าปกติ ซึ่งระดับของการเติมหมู่เมทธิลนี้อาจมีผลต่อการทำงานของยีนที่เกี่ยวกับปัจจัยที่ใช้ในการเจริญ (Durante et al., 1989) นอกจากนี้ยังพบว่า 5azaC สามารถชักนำให้ยาสูบที่ได้รับ *Tam3* ซึ่งเป็น transposable element ใน *Antirrhinum majus* ซึ่งมีการเติมหมู่เมทธิลในดีเอ็นเอที่ตำแหน่งปลายในขณะที่ลำดับข้าง ๆ อยู่ในสภาพที่เป็น hypomethylation ทำให้ไม่สามารถตรวจสอบการเคลื่อนย้ายในรุ่นลูกสามารถกลับมาทำงานได้อีก (Martin et al., 1989) ซึ่งระดับของการเติมหมู่เมทธิลนี้ยังมีผลต่อการทำงานของ *Ac transposable element* อีกด้วย (Schwartz and Dennis, 1986)

ผลการศึกษาการแสดงออกของยีน Neomycin Phosphotransferase (NPT) ในประชากรเมล็ดรุ่น F_3 ของต้นยาสูบ (*Nicotiana plumbaginifolia*) ที่เจริญมาจากโคลนเดียวกันพบว่ามีความแตกต่างในระดับการแสดงออก โดยมีเพียง 15.4% ที่ยังมีการแสดงออกของยีน NPT ในระดับปกติ เมื่อตรวจสอบด้วย isoschizomer enzymes *Msp* I / *Hpa* II พบว่าเกิดการเติมหมู่อนุมูลเมทธิลที่ยีน NPT เมื่อให้สาร 5azaC แก่เมล็ดพืชที่ได้จากรุ่น F_3 พบว่ามีการกลับมาแสดงออกของยีนได้ใหม่ แต่ผลดังกล่าวไม่สามารถคงอยู่ในประชากรรุ่นต่อไป (Cherdshewasart et al., 1995)

ในปี ค.ศ. 1989 ได้มีการศึกษาถึงความสัมพันธ์ระหว่างกระบวนการเติมหมู่เมทธิลที่ดีเอ็นเอและการแสดงออกของลักษณะต้นเตี้ยในข้าวโพด (*Zea mays*) โดยการให้สาร 5azaC ที่มีความเข้มข้น 0.3 mM กับเมล็ดข้าวโพดพันธุ์ honey batum ที่กำลังงอกเป็นเวลา 16 ชั่วโมง เมื่อนำมาปลูกและวัดการเจริญเติบโต พบว่า เมื่อถึงระยะที่ต้นเจริญเต็มที่ ต้นข้าวโพดที่ได้รับ 5azaC มีความยาวของลำต้นลดลง 28% เมื่อเปรียบเทียบกับต้นปกติที่ไม่ได้รับ 5azaC นอกจากนี้ยังพบว่าปริมาณของ 5mC ในดีเอ็นเอของต้นที่มิวแตนท์มีระดับลดต่ำลงอย่างน้อย 8% เมื่อเทียบกับต้นสูงปกติ และจากการตรวจสอบโดยการทำ southern hybridization โดยใช้ rice repeated sequence ขนาด 960 bp เป็น probe พบว่าที่บริเวณที่เป็น repeated sequence เกิดกระบวนการเติมหมู่เมทธิลที่ดีเอ็น การทดลองนี้ได้ชี้ให้เห็นว่า 5azaC สามารถชักนำให้เกิดต้นเตี้ยในข้าวโพดและเกิดกระบวนการเติมหมู่เมทธิลที่ดีเอ็นเอได้ อีกทั้งยังอาจยืนยันได้ว่ากระบวนการเติมหมู่เมทธิลที่ดีเอ็นเอมีส่วนเกี่ยวข้องกับการควบคุมการแสดงออกของยีนที่ควบคุมความสูง (Sano et al., 1989) และต่อมาในปี ค.ศ. 1990 Sano และคณะได้ทำการทดลองที่คล้ายกันนี้ในข้าว (*Oryza sativa* L.) ซึ่งเป็นข้าว *japonica* โดยใช้ 5azaC หรือ 5azadC แก่เมล็ดข้าวที่กำลังงอก เมื่อต้นข้าวเจริญเต็มที่พบว่า ต้นข้าวที่ได้รับสาร 5azaC มีความสูงลดลง 15% แต่ลักษณะทางสัณฐานอื่น ๆ ยังคงปกติ เมื่อนำข้าวต้นเตี้ยที่ถูกชักนำโดย

5azaC มาผสมตัวเองได้ข้าวรุ่นลูก M_1 ที่มีการกระจายของลักษณะความสูง เป็นต้นเตี้ย 35% ต้นสูง 65% นำข้าวรุ่นลูก M_1 ที่ได้มาทำการผสมตัวเองอีกครั้ง พบว่าข้าวรุ่นลูก M_2 ที่ได้ไม่มีการกระจายของลักษณะความสูงโดยข้าวรุ่นลูก M_2 ที่ได้จากการผสมตัวเองของข้าวรุ่นลูก M_1 ที่มีลักษณะต้นเตี้ยได้แสดงลักษณะของต้นเตี้ยทั้งหมด ในขณะที่ข้าวรุ่นลูก M_2 ที่ได้จากการผสมตัวเองของข้าวรุ่นลูก M_1 ที่มีลักษณะต้นสูงมีการแสดงออกของลักษณะต้นสูงทั้งหมด เมื่อตรวจสอบปริมาณของ 5mC จากต้นข้าวที่ได้รับสาร 5azaC พบว่ามีระดับลดต่ำลง 16% เมื่อเปรียบเทียบกับต้นข้าวที่ไม่ได้รับสาร 5azaC ซึ่งปริมาณของ 5mC ที่ลดลงนี้ได้ตรวจพบทั้งในข้าวรุ่นลูก M_1 และ M_2 ดังนั้นการชักนำให้เกิดลักษณะต้นเตี้ยและการลดระดับของการเติมหมู่เมทธิลด้วยสาร 5azaC นี้สามารถถ่ายทอดต่อไปได้ในรุ่นลูกหลาน ซึ่งจากผลการทดลองพอจะยืนยันได้ว่า กระบวนการเติมหมู่เมทธิลที่ดีเอ็นเอเป็นสาเหตุของการเปลี่ยนแปลงรูปแบบการแสดงออกของยีนและการลดระดับของความสูงในพืช (Sano et al., 1990) ต่อมาในปี ค.ศ. 1991 Sano and Youssefian ได้ทำการศึกษาเพิ่มเติมในข้าวเกี่ยวกับยีนที่ได้รับผลกระทบจากการให้สาร 5azaC โดยการตรวจสอบกับ cDNA library ในข้าวที่มีลักษณะต้นเตี้ยที่ชักนำด้วยสาร 5azaC และในข้าวรุ่นลูกพบว่า *rpg1* ในข้าวที่มีลักษณะต้นเตี้ยมีระดับต่ำกว่าข้าวปกติ แสดงว่ายีน *rpg1* อาจถูกชักนำโดยทางตรงหรือทางอ้อมโดยการเติมหมู่เมทธิลที่ดีเอ็นเอและโปรตีนที่สร้างจากยีน *rpg1* อาจไปมีส่วนเกี่ยวข้องกับการพัฒนาการและการเจริญในข้าว (Sano and Youssefian , 1991)

ได้มีการทดลองเพื่อศึกษาผลของการใช้สาร 5azaC ต่อการแสดงออกของยีนในข้าว (*Oryza sativa* L.) ซึ่งเป็นข้าว *indica* พบว่า 5azaC ที่ความเข้มข้น 25 ไมโครโมลาร์ ซึ่งให้กับเมล็ดข้าวพันธุ์กข 23 เหลืองประทิว123 และขาวดอกมะลิ105 ในหลอดแก้วเป็นเวลา 20 วัน สามารถชักนำให้ต้นข้าวมีการแสดงออกของลักษณะที่แปรผันไป เช่น ต้นข้าวมีลักษณะต้นเตี้ยลงและแตกกอเร็ว เมื่อข้าวเจริญเต็มที่ก็ยังแสดงออกของลักษณะต้นเตี้ยและแตกกอมาก ลูกที่ได้จากการผสมตัวเองของข้าวพันธุ์กข.23 ที่มีลักษณะต้นเตี้ยและแตกกอมากเมื่อเจริญเต็มที่พบมีการกระจายของลักษณะเป็นต้นสูงปกติแตกกอปกติ ต้นเตี้ยแตกกอปกติ ต้นสูงปกติแตกกอมาก และต้นเตี้ยแตกกอมาก และจากการตรวจสอบระดับการเติมหมู่เมทธิลที่เบส cytosine ที่ genomic DNA ที่แยกจากใบข้าวที่เจริญเต็มที่ของข้าวลักษณะต้นเตี้ยที่ชักนำด้วย 5azaC ในข้าวทั้ง 3 พันธุ์ และลูกที่ได้จากการผสมตัวเองของข้าวพันธุ์กข.23 ลักษณะต้นเตี้ยและแตกกอมากที่ยังคงลักษณะต้นเตี้ยมีปริมาณ 5mC ต่ำกว่าข้าวปกติ แสดงว่า 5azaC ชักนำให้เกิดการลดหมู่เมทธิลที่ cytosine ของ genomic DNA ซึ่งเป็นสาเหตุของการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของลักษณะบางประการของข้าว เช่น ความสูง จำนวนยอดต่อกอ ลักษณะต้นเตี้ยและการมีหมู่เมทธิลต่ำกว่าปกติน่าจะถ่ายทอดได้ (ทรงศักดิ์ สำราญสุข, 2536)

การคัดเลือกสายพันธุ์ทนเค็มจาก somaclonal variation ได้ประสบความสำเร็จมาแล้วในข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิและเหลืองประทิว โดยการนำเอา embryonic callas ที่ชักนำมาจากเอมบริโอมาเลี้ยงต่อในสภาพอาหารที่เติมโซเดียมคลอไรด์ 1-2% พบว่ามีบางคัลลัสสามารถอยู่รอดและแบ่งตัวได้ในสภาพที่เติมโซเดียมคลอไรด์โดยมีอัตราการรอดเจริญเป็นต้นใหม่ (regeneration) ให้เป็นต้นสมบูรณ์ต่อไปได้เพียง 0.076% เท่านั้นในจำนวนทั้งหมดที่รอดนั้นมีสายพันธุ์ที่ดีที่สุด คือ เหลืองประทิว171 ซึ่งได้คัดเลือกต่อไปอีก 8 ชั่วอายุ พบว่า ข้าวสายพันธุ์ใหม่สามารถอยู่รอดถึง 94.3% ในสภาพที่เติมโซเดียมคลอไรด์ 0.5% ลงในน้ำปุ๋ยโดยควบคุมความเค็มของน้ำปุ๋ยที่ใช้ปลูกให้มีค่าการนำกระแสไฟฟ้าระหว่าง 9-10 มิลลิโมห์ต่อเซนติเมตร ที่ 25 องศาเซลเซียส (Vajrabhaya, Thanapaisal and Vajrabhaya, 1989) ซึ่งทรงศักดิ์ สำราญสุข (2536) ได้มีการทดลองใช้ 5azaC กับต้นอ่อนของข้าวพันธุ์กข.23 สายพันธุ์ทนเค็มที่คัดเลือกจาก somaclonal variation วิธีเดียวกับเหลืองประทิว171 สามารถชักนำให้ได้ต้นที่มีความสามารถในการทนเค็มมากขึ้น และรายงานจาก Muller และคณะ (1990) เกี่ยวกับการเกิด somaclonal variation ในต้นข้าวที่ชักนำจากคัลลัสที่เลี้ยงไว้ในช่วงระยะเวลาที่แตกต่างกัน พบว่า ช่วงระยะเวลาที่เลี้ยงคัลลัสมีผลต่อการเกิดและการเพิ่มของ somaclonal variation โดยต้นข้าวที่ชักนำจากคัลลัสที่เลี้ยงไว้เป็นเวลานาน (67 วัน) มีระดับของความไม่คงที่ของลักษณะทางพันธุกรรมสูงกว่าต้นข้าวที่ชักนำจากคัลลัสที่เลี้ยงในช่วงระยะเวลาสั้น (28 วัน) และจากการวิเคราะห์โดยวิธี RFLP และการตรวจสอบการเกิดกระบวนการเติมหมู่เมทธิลได้แสดงให้เห็นว่าต้นข้าวที่ได้จากคัลลัสนั้นมีทั้งกลุ่มที่มีการจัดเรียงตัวของดีเอ็นเอและกลุ่มที่เกิดกระบวนการเติมหมู่เมทธิลที่ดีเอ็นเอ (Muller et al., 1990)

งานวิจัยนี้ส่วนหนึ่งเป็นงานวิจัยต่อเนื่องจากงานของทรงศักดิ์ สำราญสุข (2536) ซึ่งได้คัดเลือกลักษณะบางประการ เช่น การแตกกอ ต้นเตี้ย และได้สิ้นสุดลงที่การศึกษาการแสดงออกของลักษณะต่างๆ ของข้าวพันธุ์กข.23 เหลืองประทิว123 และขาวดอกมะลิ105 รุ่น M_0 ที่ได้รับ 5azaC และการถ่ายทอดลักษณะต้นเตี้ยแตกกอมากในข้าวพันธุ์กข.23 รุ่น M_1 ซึ่งข้อมูลทางด้านพันธุศาสตร์ยังไม่มากพอที่จะสรุปว่า 5azaC สามารถชักนำให้เกิดกระบวนการลดการเติมหมู่เมทธิลในข้าวไทยสายพันธุ์ที่นำมาทดลองจนถึงรุ่นลูก

การศึกษานี้จึงมุ่งศึกษาการกระจายของลักษณะต้นเตี้ย และลักษณะต้นเตี้ยแตกกอมากในรุ่น M_1 ของข้าวพันธุ์เหลืองประทิว123 จำนวน 3 สายพันธุ์ และพันธุ์ขาวดอกมะลิ105 จำนวน 2 สายพันธุ์ และศึกษาการกระจายของลักษณะต้นเตี้ย ต้นเตี้ยแตกกอมาก และลักษณะต้นสูงแตกกอมาก ในรุ่น M_2 ของข้าวพันธุ์กข.23 จำนวน 2 สายพันธุ์ พันธุ์เหลืองประทิว123 จำนวน 2 สายพันธุ์ และพันธุ์ขาวดอกมะลิ105 จำนวน 2 สายพันธุ์ ตลอดจนศึกษาการกระจายของลักษณะต้นเตี้ยแตกกอมาก และลักษณะต้นสูงแตกกอมาก ในรุ่น M_3 ของข้าวพันธุ์กข.23 จำนวน 2 สายพันธุ์ โดยศึกษาเปรียบเทียบระดับของการเติมอนุมูล

เมทธิลในดีเอ็นเอดังกล่าว เพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างการคงอยู่ของลักษณะที่คัดเลือกไว้กับระดับการเติมหมู่อนุมูลเมทธิลที่ดีเอ็นเอในขณะนั้น ในขณะเดียวกันก็ได้ศึกษาผลของ 5azaC ต่อการเพิ่มความสามารถในการทนเค็มในข้าวสายพันธุ์ทนเค็มซึ่งยังไม่มีข้อมูลในข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ105 และพันธุ์เหลืองประทิว123 สายพันธุ์ทนเค็ม