บทที่ 1

บทนำ

กลไกการควบคุมการแสดงออกของจีนในพืช สามารถเกิดได้หลายระดับ และมีความแตกต่างกันไปตามชนิด และระยะการเจริญของพืช การเปลี่ยนแปลงการทำงานของจีนอย่างชั่วคราวหรือถาวรในระหว่างขั้นตอนของพัฒนาการ เกิดจากความสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนและดีเอ็นเอ ซึ่งอาจเกิดจากการเปลี่ยนรูปทางเคมีของเบส ในดีเอ็นเอ ซึ่งอธิบายโดย Scarno ในปี ค.ศ 1971 (Holliday,1987) กลไกสำคัญอย่างหนึ่ง ที่สามารถควบคุมการแสดงออกของจีน ได้แก่ ดีเอ็นเอเมทธิลเลชัน (DNA-methylation) ซึ่งเป็นกระบวนการที่เอนไซม์เมทธิลทรานสเฟอเรส (methyltransferase) หรือ เมทธิลเลส (methylase) ทำการเคลื่อนย้ายหมู่อนุมูลเมทธิล ($-CH_3$) ไปต่อยังเบสของนิวคลีโอไทด์ บนสายดีเอ็นเอที่ตำแหน่งต่างๆ โดยมี S-adenosylmethionine เป็นตัวให้หมู่อนุมูลเมทธิล ซึ่งส่วนมากมักเกิดที่เบส cytosine (C) ทำให้ได้เป็น 5-methylcytosine (Adams and Burdon, 1985) การเกิดดีเอ็นเอเมทธิลเลชันบริเวณตำแหน่งที่ 5 ของ cytosine residue นี้เป็นกระบวนการที่เกิดขึ้น ภายหลังการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ ซึ่งจะเกิดขึ้นทั้งในสิ่งมีชีวิตทั้งโปรคาริโอตและยูคาริโอต (Cedar, 1988)

ในปี ค.ศ 1955 ได้มีการค้นพบ methylated bases ในดีเอ็นเอของแบคทีเรีย พืช สัตว์ และ คน ในแบคทีเรียพบว่าการเกิดดีเอ็นเอเมทธิลเลชัน เป็นกลไกป้องกันไม่ให้

เรสทริกชันเอนไซม์ย่อยดีเอ็นเอของตัวเอง ส่วนในเซลล์สัตว์ได้มีรายงานมากมาย เกี่ยวกับบทบาทของดีเอ็นเอเมทธิลเลชัน ว่ามีความสัมพันธ์กับสภาวะมะเร็งของเซลล์ รวมทั้งสามารถชะลอความแก่ของเซลล์ (Adams, 1985; Cedar,1988) พบว่าดีเอ็นเอเมทธิลเลชันมีส่วนในการควบคุมการแสดงออกของจีน (Weissbach et al., 1990),การเกิด epigenesis (Holliday, 1987), carcinogenesis (Jones and Buckley, 1990) และ genomic imprinting (Monk, 1988) ในเซลล์ของสัตว์เลี้ยวลูกด้วยนมพบว่าเมื่อจีนที่อยู่ในสภาพถูกเติมหมู่อนุมูลเมทธิล เมื่อเข้าไปรวมตัวอยู่ในจีโนม จะไปยับยั้งการจัดเรียงโครงสร้างของโครมาติน ซึ่งจะส่งผลให้จีนไม่สามารถแสดงออกได้ (Keshet et al., 1986) เมื่อดีเอ็นเอเกิดการเปลี่ยนแปลงเบสจาก cytosine เป็น 5-methylcytosine จะส่งผลทำให้ดีเอ็นเอ เปลี่ยนแปลงการจัดเรียงโครงสร้างไปจาก B - form กลายเป็น Z - form (Adams and Burdon, 1985) ซึ่งส่งผลต่อการจับกันระหว่างดีเอ็นเอและโปรตีนที่จับกับดีเอ็นเอ (Ehrlich et al., 1985) ซึ่งการเปลี่ยนแปลงนี้จะส่งผลกระทบโดยตรงต่อการแสดงออกของจีน (Cedar and Razin, 1990) ในปี ค.ศ 1988 ได้มีการศึกษาในข้าวโพด (*Zea mays*) พบว่าการเกิดดีเอ็นเอเมทธิลเลชันจะส่งผลทำให้เกิดการจับกันระหว่าง โปรตีนที่จับดีเอ็นเอกับตำแหน่งเป้าหมายลดลง (Giert et al., 1988)

ในสัตว์พบว่า 8% ของ cytosine ทั้งหมด จะเกิดการเปลี่ยนแปลงโดยการเติมหมู่อนุมูลเมทธิลที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 5 ของเบส cytosine ได้เป็น 5-methylcytosine (5-mC) โดย 90 % ของ methylated cytosine จะเกิดในลำดับนิวคลีโอไทด์จำเพาะคือ CpG dinucleotide และรูปแบบของดีเอ็นเอเมทธิลเลชัน จะมีลักษณะจำเพาะต่อเนื้อเยื่อ (Razin and Cedar, 1991) และพบว่าเปอร์เซ็นต์ของ methylated cytosine จะลดลงในพวกแมลงและในยูคาริโอตชนิดเซลล์เดียว ซึ่งแทบจะตรวจไม่พบ 5-methylcytosine เลย (Adams, 1990) สำหรับในดีเอ็นเอของพืชชั้นสูงนั้น จะพบ methylated cytosine กว่า 30 % ของ cytosine ทั้งหมด โดยไม่เพียงแต่จะพบที่บริเวณลำดับนิวคลีโอไทด์จำเพาะ

ที่เป็น CpG dinucleotide เท่านั้น แต่ยังพบในบริเวณที่เป็น CpNpG trinucleotide ด้วย (เมื่อ N คือเบส A,T,C หรือ G) (Gruenbaum et al., 1981; Nick et al., 1986) การตรวจสอบ 5-methylcytosine สามารถกระทำได้โดยการ ใช้ methyl cytosine - sensitive restriction enzyme ซึ่งจะมีบริเวณจดจำคือ CpGs ซึ่งจะช่วยทำให้สามารถบอกความแตกต่างระหว่างการเกิด methylation และ unmethylation ได้ (Cedar and Rezin, 1990) ปริมาณของ 5-methylcytosine ในพืชนั้นจะมีมากน้อยแตกต่างกันไป ขึ้นกับ species ของพืช และชนิดของเนื้อเยื่อของพืชนั้นๆ 5-methylcytosine ในดีเอ็นเอพืชมีส่วนเกี่ยวข้องกับการแสดงออกของจีน (Adams and Burdon, 1985) และมีส่วนเกี่ยวข้องกับการเกิด DNA mismatches ด้วย (Hepburn et al., 1987) และจากการศึกษาใน T-DNA ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งของ Ti plasmid จาก *Agrobacterium tumefaciens* ซึ่งใช้ในการถ่ายจีน พบว่าภายหลังการเข้าไปรวมกับ host plant chromosome แล้ว T-DNA จะถูกยับยั้งการแสดงออกโดยกลไกเมทธิลเลชัน และในบริเวณ promoter ของจีน ก็มักจะเป็นบริเวณ ที่เกิดการเติมหมู่อนุมูลเมทธิลที่ cytosine residues (Hepburn et al., 1983 ; Amasino et al., 1984) แต่ก็ยังไม่เป็นที่ยืนยันแน่ชัดว่า การเติมหมู่อนุมูลเมทธิลที่บริเวณ promoter นี้ จะมีส่วนสำคัญในการควบคุมการแสดงออกของจีน (Doerfler et al., 1990 ; Linn et al., 1990) มีรายงานว่าการเติมหมู่อนุมูลเมทธิลที่บริเวณปลาย 3′ ของจีน จะมีผลกระทบในการแสดงออกของจีน มากกว่าการเติมหมู่อนุมูลเมทธิลที่ปลาย 5′ ของจีน (Keshet et al., 1986 ; John and Amasino, 1989) ในสาหร่ายสีเขียว *Chlamydomonas* คาดว่า 5-methylcytosine จะมีบทบาทต่อการถ่ายทอด chloroplast DNA จากรุ่นพ่อแม่ไปสู่รุ่นลูก (Sanger et al., 1984)

บริเวณที่มีลักษณะเป็น repetitive DNA มีโอกาสที่จะเกิดเมทธิลเลชันได้มาก (Adams and Burdon, 1985) และขนาดของจีโนม ก็มีความสัมพันธ์กับการเกิดเมทธิลเลชันเช่นกัน เช่นใน *Arabidopsis thaliana* ซึ่งมีขนาดของจีโนมเล็ก และมี

repetitive sequence น้อย พบว่ามี methylated cytosine เพียง 4.6 % หรือใน *Drosophila* ซึ่งมีโครโมโซมเป็น haploid และมีปริมาณดีเอ็นเอต่อเซลเท่ากับ 0.17 pg จะตรวจไม่พบ methylated cytosine เลย (Adams, 1990)

ตัวอย่างการศึกษาเปอร์เซ็นต์ การเกิดดีเอ็นเอเมทธิลเลชัน ในดีเอ็นเอของพืชด้วยวิธี Nearest-neighbour analysis โดยการวัดปริมาณของ 5-methylcytosine ทั้งหมดใน wheat-germ DNA พบว่ามีความจำเพาะต่อลำดับของเบส ดังตารางที่ 1 (Gruenbaum et al.,1981)

ตารางที่ 1 เปอร์เซ็นต์การเกิด ดีเอ็นเอเมทธิลเลชัน ใน wheat-germ DNA ที่ลำดับเบสต่างๆ (Gruenbaum และคณะ, 1981)

DNA sequence	% Methylation
C-G	82
C-A	19
C-T	19
C-C	7
C-A-G	>80
C-T-G	>80
C-A-T	<4

กลไกการเติมหมู่อนุมูลเมทธิลลงบนสายดีเอ็นเอ เกิดจากการทำงานของเอนไซม์ที่กระตุ้นปฏิกิริยา electrophilic substitution ที่ตำแหน่งที่ 5 ซึ่งเป็นคาร์บอนของ pyrimidine ring โดยเริ่มต้นด้วยเอนไซม์ DNA-cytosine methyltransferase (DCMT) จับกับคาร์บอนตำแหน่งที่ 6 ของ cytosine ซึ่งกระตุ้นโดยปฏิกิริยา nucleophilic ทำให้เกิดขั้วลบที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 5 มีผลทำให้คาร์บอนสามารถทำปฏิกิริยากับ electrophile (R^+) ได้ ได้เป็น intermediate จากนั้นจะเกิดการสูญเสียโปรตรอนไปจากคาร์บอนตำแหน่งที่ 5 และเกิด β-elimination ให้ผลิตภัณฑ์เป็น 5-methylcytosine และเอนไซม์อิสระที่สามารถทำงานได้อีก เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกลไกนี้ นอกจาก DCMT แล้วยังมี dTMP synthase , dUMP hydroxymethylase และ dCMP hydroxymethylase จากกลไกข้างต้นและข้อมูลที่เชื่อถือได้ แสดงให้เห็นว่ากลไกของเอนไซม์ DCMT นี้จะใช้ electrophile คือหมู่เมทธิลที่ถูกกระตุ้นจาก S-adenosylmethionine (Santi et al., 1983)

การกระจายตัวของ methylated cytosine ในสายดีเอ็นเอจะเป็นแบบสุ่ม และบริเวณที่มีโอกาสเกิดดีเอ็นเอเมทธิลเลชัน มักจะเป็นบริเวณที่มีเบส CG มาก (Adams and Eason, 1984; Adams et al., 1987) แต่ก็ยังพบว่าลำดับเบสของดีเอ็นเอที่เป็น CG dinucleotide บางแห่งอาจเป็นตำแหน่งที่ไม่ถูกเติมหมู่อนุมูลเมทธิล พบทั้งในพืชและสัตว์ เช่นใน housekeeping gene (Stein, 1983) เรียกบริเวณนี้ว่า CpG islands หรือ HTF islands (HTF = HpaII tiny fragments) (Bird, 1986) ซึ่งพบว่ามีส่วนเกี่ยวข้อง กับการควบคุมการแสดงออกของจีน ซึ่งอาจมีประโยชน์ในการทำ gene mapping, การแยกจีน รวมทั้งอาจมีประโยชน์ในด้านการศึกษาวิวัฒนาการด้วย (Anteguera and Bird, 1988)

บทบาทและหน้าที่ ของดีเอ็เอเมทธิลเลชัน ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมนั้น ยังไม่เป็นที่กระจ่างชัดนัก แต่คาดว่าดีเอ็นเอเมทธิลเลชัน มีผลต่อการควบคุมการแสดงออกของจีน (Cedar, 1984; 1988) ในตำแหน่งที่ไวต่อการเกิดมิวเตชัน โดยอาจเปลี่ยนแปลงจาก

5-methylcytosine เป็น thymine (Youssoutian et al., 1986; Bird 1987) เป็นสัญญาณในการซ่อมแซมดีเอ็นเอ (Hare and Tayler, 1985) เป็นต้น คาดว่าการเติมอนุมูลหมู่เมทธิลที่ตำแหน่ง cytosine บนสายดีเอ็นเอ จะขัดขวางการจับของ RNA polymerase บนสายดีเอ็นเอ ทำให้ไม่สามารถเกิดทรานสคริปชัน และส่งผลให้ไม่มีการแสดงออกของจีน (Holliday, 1989) และพบว่า ในบางครั้งการเพิ่มระดับของการเติมหมู่อนุมูลเมทธิลที่สายดีเอ็นเอ จะส่งผลให้การทรานสคริปชันของจีนในพืชลดลง (Watson et al., 1987 ; Bianchi and Viotti, 1988 ; Matzke et al., 1989 ; Ngernprasirtsiri et al., 1989; Linn et al., 1990)

methylated base ในสายดีเอ็นเอ ไม่ได้เกิดขึ้นในระหว่างที่มีการสร้างสายดีเอ็นเอ แต่จะเกิดขึ้นทันที ภายหลังการเรพริเคชัน และจะเกิดในบริเวณที่มีลักษณะเป็น symetrical sequence (Adams, 1990) เช่น

$$\overset{m}{CCGG} \quad \text{หรือ} \quad \overset{m}{GAATTC} \quad \text{หรือ} \quad \overset{m}{CG} \quad \text{หรือ} \quad \overset{m}{CNG}$$

$$GGCC \quad\quad CTTAAG \quad\quad GC \quad\quad GNC$$
$$\quad\; m \quad\quad\quad\; m \quad\quad\; m \quad\quad\;\; m$$

รูปแบบการเกิด ดีเอ็นเอเมทธิลเลชันในยูคาริโอต จะสามารถถ่ายทอดไปสู่รุ่นลูกหลานได้โดยตรง โดยจะมีรูปแบบของดีเอ็นเอเหมือนของรุ่น พ่อ แม่ โดยมีการคงสภาพการเติมหมู่อนุมูลเมทธิล ซึ่งจะเติมหมู่อนุมูลเมทธิลบนสายดีเอ็นเอสายใหม่ทันที หลังจากการจำลองตัวเอง ทำให้ได้สายดีเอ็นเอที่เป็น methylated DNA ทั้งสองสาย และทำให้มีการถ่ายทอดรูปแบบของเมทธิลเลชันสู่รุ่นต่อไป (Holliday, 1989 ; Brettell and Dennis, 1991)

แต่ในบางกรณีจะพบการเปลี่ยนแปลงรูปแบบ ของการเกิดดีเอ็นเอเมทธิลเลชัน การเปลี่ยนแปลงของดีเอ็นเอเมทธิลเลชัน ในระหว่างการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ อาจเกิดขึ้นได้เนื่องจากอิทธิพลของฮอร์โมน หรือ การเกิด differentiation (Lo Schiavo et al.,

1989; Vergara et al., 1990; Arnholdt-Schmitt et al., 1991) มีรายงานว่าในช่วงแรกของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (เช่น dedifferentiation phase) และระยะที่มีการเพิ่มปริมาณของ repetitive DNA sequence จะเกิดการเปลี่ยนแปลงปริมาณ total cytosine methylation (^{m}C) (Durante et al., 1982; Arnholdt-Schmitt et al., 1991; Palmgren et al., 1991)

พบว่า nuclear ribosomal genes มักเป็นบริเวณที่ถูกเติมหมู่อนุมูลเมทธิลมาก (Steele-Scott et al.,1984) แต่ใน active nucleolar organizers specific sites ซึ่งอยู่ในบริเวณ non-transcribed intergenic spacer มักเป็นบริเวณที่มีระดับของการถูกเติมหมู่อนุมูลเมทธิลน้อย (Hypomethylated) (Flavell, 1986) รายละเอียดหรือข้อมูล ของการเปลี่ยนแปลงรูปแบบของเมทธิลเลชัน ใน rRNA ว่ามีความเกี่ยวข้องกันอย่างไร กับสภาวะการเจริญเติบโตหรือการทำงานของจีนยังมีน้อยมาก แต่ก็มีผู้ศึกษาอยู่บ้าง เช่น ในปี ค.ศ 1984 ได้มีผู้ศึกษาในผักกาด (*Raphanus sativus*) พบว่าสภาพแวดล้อมมีส่วนในการกระตุ้น ให้เกิดการเปลี่ยนแปลง รูปแบบของเมทธิลเลชัน ของ rRNA genes (Delsney et al., 1984) ในทางตรงข้ามเมื่อศึกษาในข้าว (*Oryza sativa* L.) สภาวะการเจริญเติบโต ภายใต้เงื่อนไขของการได้รับหรือไม่ได้รับออกซิเจน กลับไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงรูปแบบของเมทธิลเลชัน (Olmedilla et al., 1984) ดังนั้นจึงยังไม่เป็นที่กระจ่างชัดว่า การเกิดเมทธิลเลชันใน coding region ของ ribosomal genes จะมีบทบาทต่อการแสดงออกของจีนอย่างไร อย่างไรก็ตามมีรายงานว่า ระดับของการเกิดดีเอ็นเอเมทธิลเลชันใน rRNA gene จะมีการเปลี่ยนแปลงไปตามระยะการพัฒนาการของพืช (Watson et al., 1987) และพบว่าการเกิดดีเอ็นเอเมทธิลเลชัน มีความสัมพันธ์กับขนาดของ intergenic spacers ของ rRNA gene (Sardana et al., 1993)

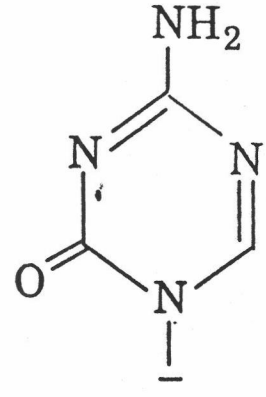
ปัจจัย 2 ประการที่อาจส่งผลกระทบต่อ รูปแบบของดีเอ็นเอเมทธิลเลชัน ประการแรกคือ เอนไซม์ maintenance methylase ซึ่งจะคงสภาพแบบแผนในการเติมหมู่อนุมูล

เมทธิลให้ถ่ายทอดไปสู่รุ่นลูกหลาน ประการที่สอง ก็ได้แก่ปัจจัยภายนอกหรือภายใน ซึ่งอาจจะกระตุ้นให้เกิด *de novo* methylation หรือ demethylation (Vyskot et al., 1993) และในการเพาะเลี้ยงเซลล์พืช การเกิด somaclonal variation จะส่งผลในการเปลี่ยนแปลง nucleotides sequence และ รูปแบบของเมทธิลเลชันด้วย (Brown, 1989)

ได้มีการศึกษา รูปแบบของดีเอ็นเอเมทธิลเลชันในแคลลัสยาสูบ พบว่ารูปแบบของดีเอ็นเอเมทธิลเลชันมีการเปลี่ยนแปลงไปตามระยะของการ differentiation ของเซลล์พืชดังกล่าว ทำให้มีข้อสรุปว่ากระบวนการ differentiation และ dedifferentiation อยู่ภายใต้อิทธิพลของดีเอ็นเอเมทธิลเลชัน (Vyskot et al., 1993)

ได้มีการรายงานว่าสาร chemical carcinogens หลายชนิด เช่น benzo(a) pyrene (BP), ethionine, N-methyl-N-nitrosourea, N-acetoxy-N-2-acetyl aminofluorene, และ N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine สามารถยับยั้งการเกิด ดีเอ็นเอเมทธิลเลชัน *in vivo* และใน subcellular assays ได้ (Boehm and Drahovsky, 1981 ; Cox, 1980 ; Kasten et al.,1982 ; Wilson and Jones, 1983) ในปี ค.ศ 1983 ได้มีรายงานว่ามีสารเคมี ซึ่งสามารถจะยับยั้งการเกิดดีเอ็นเอเมทธิลเลชันได้ คือ 5-azacytidine (5-azaC) ซึ่งเป็นสารที่มีลักษณะเป็น nucleoside analog ที่มีเบสเป็น 5-azacytosine (รูปที่ 1) ซึ่งเป็น analog ของ cytosine ต่างกันที่ตำแหน่งที่ 5 ของ pyrimidine ring โดยเป็นคาร์บอนใน cytosine และเป็นไนโตรเจนใน 5-azacytosine (Santi et al., 1983)

สารเคมีที่กล่าวมาแล้ว รวมทั้ง 5-azacytidine นั้นสามารถที่จะใช้ในการยับยั้งหรือลดระดับการเกิด ดีเอ็นเอเมทธิลเลชันได้ แต่สารเคมีแต่ละตัว ก็มีคุณสมบัติเฉพาะตัวหรือมีกลไกในการทำงานที่แตกต่างกันไป ตัวอย่างเช่น การศึกษาในยาสูบ *N. tabacum* ถึงการใช้สารลดระดับการเติมหมู่อนุมูลเมทธิล (demethylating agent) 2 ชนิด คือ ethionine และ 5-azacytidine โดยใช้ที่ความเข้มข้น 50 mg/l พบว่า



5-Azacytosine
(5-azaC)

รูปที่ 1 โครงสร้างของ 5-azacytosine (Voet, 1990)

5-azacytidine มีผลที่จะลดระดับการเติมหมู่อนุมูลเมทธิลที่ดีเอ็นเอได้ ทั้งในบริเวณที่เป็น CG doublets และ CCG triplets ส่วน ethionine มีผลที่จะลดระดับการเติมหมู่อนุมูลเมทธิลได้ในบริเวณที่เป็น CCG triplets แต่ในบริเวณที่เป็น CG doublets จะลดระดับการเติมหมู่อนุมูลเมทธิลได้น้อยมาก (Bezdek et al., 1992) หรือในกรณีการกระตุ้นการแสดงออกของจีน *ipt* ในยาสูบ ด้วยการให้สาร 5-azacytidine และ 5-azacytosine พบว่า 5- azacytidine ที่ความเข้มข้น 2.5 μM สามารถกระตุ้นการแสดงออกของจีนได้ดีกว่าการใช้ 5-azacytosine และไม่ก่อให้เกิดการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ด้วย (Klass et al., 1989)

เมื่อ nucleoside analog นี้ เข้าไปรวมเป็นส่วนหนึ่งของสายดีเอ็นเอที่ถูกสร้างขึ้นใหม่แทน cytidine มีผลทำให้ไม่สามารถถูกเติมอนุมูลเมทธิลเป็น 5-methylcytosine นอกจากนี้ สารดังกล่าวยังมีผลโดยตรงในการยับยั้ง methyltransferase activity (Creusot et al., 1982 ; Santi et al., 1983 ; Jones, 1985) ทำให้เซลล์ที่ได้รับ 5-azacytidine มีระดับของการเติมหมู่อนุมูลเมทธิลที่จีโนมิคดีเอ็นเอลดลง เรียกว่า demethylation หรือ hypomethylation หรือ undermethylation (Santi et al.,1983 ; Jones, 1985) ในปัจจุบัน 5-azacytidine เป็นสารที่กำลังได้รับความสนใจอย่างมาก โดยเฉพาะการศึกษาทางด้าน cell and molecular biology เนื่องจากมีคุณสมบัติสามารถที่จะกระตุ้นการแสดงออกของจีน ในยูคาริโอต ยับยั้งเอนไซม์ methyltransferase ในขบวนการเกิดเมทธิลเลชันที่ cytosine residue และสามารถเปลี่ยนแปลง differentiated state ของเซลล์ (Jones, 1985) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า จีนที่ถูกยับยั้งโดยขบวนการเมทธิลเลชันด้วยเอนไซม์ methyltransferase สามารถที่จะกระตุ้นให้แสดงออกได้ใหม่ ด้วยการให้สาร 5-azacytidine เช่น เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเซลล์สัตว์ และให้ได้รับสาร 5-azacytidine พบว่าจีนที่ถูกกดการแสดงออก สามารถกลับมาแสดงออกได้เป็นปกติ (Mohandas et al., 1981 ; Hsiao et al., 1985) และการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของจีน ภายหลังการถูกกระตุ้นให้กลับ

มาแสดงออก ด้วยสาร 5-azacytidine แล้ว สามารถที่จะถ่ายทอดไปสู่รุ่นลูกหลานได้ต่อไป โดยไม่จำเป็นต้องให้สาร 5-azacytidine อีก (Jones,1985) แต่ในการใช้สาร 5-azacytidine เพื่อที่จะยับยั้งขบวนการเกิดเมทธิลเลชันนี้ ก็มีข้อที่ควรคำนึงถึง เนื่องจากว่า 5-azacytidine เป็นสารที่มีพิษต่อเซลล์ ซึ่งสามารถที่จะเปลี่ยนแปลงสัณฐานของโครโมโซม (Shafer and Priest,1984) และยังมีผลในการเปลี่ยนแปลงเซลล์ที่ไม่มี 5-methylcytosine ด้วย (Tamame et al.,1984)

ได้มีผู้ศึกษา ถึงบทบาทของดีเอ็นเอเมทธิลเลชัน ในผลมะเขือเทศระหว่างการสุก พบว่าในช่วงที่มะเขือเทศมีการสุก และเกิดการเปลี่ยนสีเป็นสีแดง จะมีระดับของดีเอ็นเอเมทธิลเลชันเพิ่มสูงขึ้น (Ngernprasirtsiri et al., 1988c) นอกจากนี้ยังพบว่าดีเอ็นเอเมทธิลเลชัน เป็นกลไกสำคัญในการควบคุมการทรานสคริปชันในเซลล์พืช โดยที่ดีเอ็นเอเมทธิลเลชัน มีความเกี่ยวข้องในการแสดงออกของจีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แสงในเนื้อเยื่อสีขาวของพืช ซึ่งศึกษาในเซลล์เพาะเลี้ยงของ sycamore (*Acer pseudoplatanus*) พบว่ามีความแตกต่างระหว่างปริมาณ methylated DNA ในเซลล์พืชที่เป็นมิวแตนท์ซึ่งมีสีเขียว เนื่องจากมีคลอโรพลาสต์ และในเซลล์พืชดั้งเดิมที่ไม่มีสี เนื่องจากมีอะไมโลพลาสต์ โดยเซลล์ชนิดหลังมีปริมาณ methylated base มากกว่า (Ngernprasirtsiri et al., 1988a,b,d) และมีข้อสรุปว่า การเกิดดีเอ็นเอเมทธิลเลชัน เป็นกลไกที่เกี่ยวข้องกับการทรานสคริปชันของ photosynthetic gene ในมิวแตนท์ดังกล่าว (Ngernprasirtsiri et al., 1989)

ในปี ค.ศ 1989 และ 1990 ได้มีการศึกษาถึงการใช้สาร 5- azacytidine ในการลดระดับการเติมหมู่อนุมูลเมทธิลที่ดีเอ็นเอ (DNA undermethylation) ซึ่งอาจมีผลต่อการแสดงออกของจีนในข้าว (*Oryza sativa* L.) และข้าวโพด (*Zea mays*) จากการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่าง ดีเอ็นเอเมทธิลเลชันกับลักษณะต้นเตี้ยของข้าวโพด พบว่าในข้าวโพดที่เป็นต้นเตี้ย จะมีระดับของ 5-methylcytosine ในสายดีเอ็นเอลดลง 8 % เป็นอย่างน้อย เมื่อเทียบกับต้นสูงปกติ การศึกษาทำโดยการให้เมล็ดที่กำลังงอกได้รับ

5-azacytidine ความเข้มข้น 0.3 mM เป็นเวลา 16 ชั่วโมง จากนั้นล้างน้ำแล้วนำไปปลูก เมื่อทำการตรวจวัดความสูงของต้น พบว่า พืชที่เคยได้รับ 5-azacytidine มีความสูงของลำต้นลดลง 28 %เมื่อเทียบกับต้นปกติที่ไม่ผ่านการได้รับสาร 5-azacytidine เมื่อทำการแยกเอาgenomic DNA ไปตรวจสอบปริมาณ 5-methylcytosine ด้วยวิธี Nearest neighbor analysis พบว่า มีปริมาณของ 5-methylcytosine ลดลง 8 % และทำการตรวจสอบโดยทำ Southern hybridization โดยใช้ rice repeated sequence ขนาด 960 bp เป็น probe พบว่าเกิดดีเอ็นเอเมทธิลเลชัน ในบริเวณที่เป็น repeated sequence แสดงว่า 5-azacytidine สามารถชักนำให้เกิดลักษณะต้นเตี้ย และลดระดับการเติมหมู่อนุมูลเมทธิลที่ดีเอ็นเอ อย่างไรก็ตามความสัมพันธ์ระหว่าง การลดระดับการเติมหมู่อนุมูลเมทธิลที่ดีเอ็นเอ และการเกิดลักษณะต้นเตี้ยยังไม่เป็นที่กระจ่างชัดนัก แต่จากผลการทดลองที่ได้นี้ก็พอจะยืนยันได้ว่า การเกิด ดีเอ็นเอเมทธิลเลชัน มีส่วนเกี่ยวข้องในการ ควบคุมจีนที่ควบคุมความสูง (Sano et al., 1989)

ต่อมาได้มีการศึกษาในลักษณะเดียวกันในปี ค.ศ 1990 โดยผู้ศึกษากลุ่มเดิมได้ศึกษาในข้าว โดยให้ 5-azacytidine หรือ 5-azadeoxytidine แก่เมล็ดข้าวที่กำลังงอกในความเข้มข้น 0.3 mM เพื่อชักนำให้เกิดลักษณะต้นเตี้ย เมื่อต้นข้าวเจริญเติบโต พบว่าเมล็ดที่ได้รับสาร 5-azacytidine มีลักษณะทางสัณฐานเหมือนเดิมทุกประการ ยกเว้นความสูงที่ขนาดลดลง 15 % เมื่อเทียบกับต้นปกติที่ไม่ได้รับสาร 5-azacytidine เมื่อนำต้นที่ถูกชักนำให้เกิดลักษณะต้นเตี้ย ด้วยสาร 5-azacytidine มาผสมตัวเอง (self-fertilization) ได้รุ่นลูก M_1 ที่มีการกระจายลักษณะของต้นเตี้ย 35 % และต้นสูง 65 % แล้วทำการศึกษาต่อโดยนำรุ่นลูก M_1 ที่มีลักษณะต้นเตี้ยมาผสมตัวเอง ได้เป็นรุ่นลูก M_2 พบว่าต้นข้าวรุ่น M_2 ที่ได้จะมีลักษณะเตี้ยหมด ในขณะที่เมื่อนำรุ่น M_1 ที่แสดงลักษณะต้นสูงมาผสมตัวเอง ก็จะได้รุ่น M_2 ที่มีลักษณะของต้นสูงทั้งหมด เมื่อทำการสกัดดีเอ็นเอออกจากใบข้าวที่ได้รับสาร 5-azacytidine เพื่อตรวจสอบปริมาณ 5-methyl-cytosine โดยวิธี Nearest neighbor analysis พบว่ามีปริมาณของ 5 - methylcytosine

ลดลง 16 % โดยเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอ ที่ไม่ได้รับสาร 5-azacytidine ซึ่งปริมาณที่ลดลงของ 5-methylcytosine นี้ตรวจพบทั้งในรุ่น M_1 และ M_2 ดังนั้นการชักนำให้เกิดลักษณะต้นเตี้ย และการลดระดับการเติมหมู่อนุมูลเมทธิลด้วยสาร 5-azacytidine สามารถที่จะถ่ายทอดไปสู่รุ่นลูกหลานได้ ผลจากการศึกษาสรุปได้ว่า 5-azacytidine สามารถกระตุ้นให้เกิด การลดระดับการเติมหมู่อนุมูลเมทธิล ของจีโนมิคดีเอ็นเอได้ ซึ่งส่งผลให้มีการเปลี่ยนแปลงรูปแบบ การแสดงออกของจีนและส่งผลในการลดระดับความสูงของต้นพืช (Sano et al., 1990) และการศึกษาเพิ่มเติมในข้าว โดยการให้ได้รับสาร 5-azacytidine เมื่อทำการตรวจสอบจีนที่ ได้รับผลกระทบจากการให้สารชนิดนี้ พบว่า การแสดงออกของจีน *rgp1* ในข้าวลักษณะต้นเตี้ย ที่เกิดจากการชักนำด้วยสาร 5-azacytidine และรุ่นลูกมีระดับต่ำกว่าข้าวปกติ แสดงว่าจีน *rgp1* อาจถูกชักนำโดยตรงหรือโดยอ้อม โดยการเติมหมู่อนุมูลเมทธิลที่ดีเอ็นเอ และโปรตีนที่สร้างจากจีน *rgp1* อาจมีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการพัฒนาการ และการเจริญเติบโตในพืชชนิดนี้ (Sano and Youssefian, 1991)

ในปี ค ศ.1991 ได้มีการศึกษาถึงการใช้ 5-azacytidine ในการกระตุ้นให้เกิด hypomethylation ในดีเอ็นเอของยาสูบ *N. tabacum* L. โดยให้สาร 5-azacytidine จากนั้น ทำการสกัดดีเอ็นเอ และตัดด้วย cytosine methylation - sensitive restriction enzyme ; MspI และ HpaII เพื่อตรวจสอบการเกิดเมทธิลเลชันที่ตำแหน่ง cytosine จากการทดลองพบว่า ในดีเอ็นเอจาก แคลลัส และ ใบ ที่ไม่ได้รับสาร 5-azacytidine เกิดเมทธิลเลชันที่บริเวณ CpG dinucleotides และ CpNpG trinucleotides และมีรูปแบบของเมทธิลเลชั่นที่คล้ายกันมาก และพบว่าสามารถที่จะกระตุ้นดีเอ็นเอของพืชชนิดนี้ให้เกิด hypomethylation ได้ ด้วยการให้สาร 5-azacytidine (Bezdek et al., 1991)

ในปัจจุบันพบว่า กลไกการเกิดดีเอ็นเอเมทธิลเลชัน มีผลอย่างมากต่อการควบคุมการแสดงออกของจีน โดยเฉพาะอย่างยิ่งในพืชที่ได้รับการถ่ายจีน ในยุคแรกเริ่มของการ

ถ่ายจีนเข้าสู่เซลล์พืช วิธีการที่ยอมรับและใช้กันอย่างกว้างขวาง ก็คือการถ่ายจีนโดยใช้ *A. tumefaciens* เป็นพาหะ (Otten et al., 1981) เนื่องจากเป็นวิธีการที่ไม่ซับซ้อนมากนัก (Horsch et al., 1985) กลไกที่เกิดขึ้นมีการศึกษาลึกถึงรายละเอียด (Zambryski et al., 1989) และสามารถพิสูจน์ได้ว่า จีนหลายชนิดที่ถ่ายเข้าสู่พืชโดยวิธีนี้สามารถปรากฏอยู่ และมีการแสดงออกของจีนในเซลล์พืชเหล่านี้ได้ (De Block et al., 1984) และสามารถที่จะถ่ายทอดจีนดังกล่าว ไปยังประชากรรุ่นต่อไปได้ตามหลักเมนเดล (Budar et al., 1986) การถ่ายจีนโดยวิธีนี้ จึงมีการนำมาปรับใช้กับพืชหลายชนิด แต่ก็พบปัญหาตามมาคือ เซลล์หรือเนื้อเยื่อพืชใบเลี้ยงเดี่ยว ไม่มีการตอบสนองหรือมีการตอบสนองน้อยมากต่อ *A. tumefaciens* (Hooykass-Van Slogkeren et al., 1984) ดังนั้นจึงได้มีการพัฒนาวิธีการถ่ายจีนโดยไม่ต้องอาศัยพาหะ หรือการถ่ายจีนโดยตรง (direct gene transfer) ขึ้นมา ซึ่งวิธีการที่นิยมใช้ในระยะแรก คือการผสมสารละลายดีเอ็นเอที่มีจีนที่ต้องการกับโปรโตพลาสต์โดยตรง ซึ่งเป็นวิธีการที่สะดวก และสามารถนำมาปรับใช้ได้อย่างกว้างขวาง (Potrykus et al., 1985 ; Pietrzke et al., 1986 ; Negrutiu et al., 1987) รวมทั้งสามารถที่จะวิเคราะห์รูปแบบการรับพลาสมิดดีเอ็นเอนั้นๆ รวมถึงการถ่ายทอดทางพันธุกรรมได้ (Gharti-Chhetri et al., 1990; Gharti-Chhetri et al., 1992; Cherdshewasart et al., 1993) จนได้มีการพัฒนามาจนถึงการใช้ particle gun bombardment ซึ่งเป็นที่นิยมมากในปัจจุบัน (Wang et al., 1988)

ในระยะต่อมาภายหลังการถ่ายจีน ได้มีการพบความผิดปกติของจีน ที่ใส่เข้าไปในเซลล์พืช โดยพบว่า อัตราส่วนการกระจายของการแสดงออกของจีน เบี่ยงเบนไปจากปกติ ซึ่งสาเหตุที่อาจเป็นไปได้มี 2 ประการคือ อาจเกิดการขาดหายไปบางส่วนของจีน หรืออาจเกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของจีน หรืออาจเกิดการยับยั้งการแสดงออกของจีน ทั้งๆที่จีนยังคงอยู่ครบถ้วนภายในเซลล์พืช ทำให้เซลล์พืชที่ได้รับจีนนั้น ไม่สามารถแสดงออกลักษณะของจีนที่ใส่เข้าไปได้ ซึ่งประการหลังนี้พบว่า ส่วนใหญ่เกิดจากการเติมหมู่อนุมูลเมทธิลที่

เบสบางตัวของดีเอ็นเอดังกล่าว (Matzke et al., 1989 ; Nelsen-Salz and Doring, 1990)

ได้มีการศึกษาในยาสูบ (tobacco) ที่ได้รับการถ่ายจีน 2 ชนิด โดยใช้ T-DNA โดยที่ T-DNA-I มีจีน kanamycin resistance และ nopaline synthase และ T-DNA-II มีจีน hygromycin resistance และ octopine synthase เมื่อวิเคราะห์ดูการถ่ายทอดจีนไปสู่รุ่นลูกหลาน พบว่า T-DNA-I ถูกยับยั้งการแสดงออก ซึ่งการถูกยับยั้งนี้เกี่ยวข้องกับการเกิดเมทธิลเลชัน ในบริเวณ promoter ของจีนนี้ และสิ่งที่น่าสนใจก็คือการเกิดเมทธิลเลชัน และการไม่แสดงออกของ T-DNA-I gene นี้ จะเกิดขึ้นกับพืชที่มีจีนทั้งสองชนิดคือ T-DNA-I และ T-DNA-II เท่านั้น เมื่อทำ self-fertilization และ back-crossing พบว่า ได้รุ่นลูกหลานที่มีเฉพาะ T-DNA-I ซึ่งจะกลับมามีการแสดงออกตามเดิม และบริเวณ promoter ก็จะพบว่า เกิดการลดระดับการเติมหมู่อนุมูลเมทธิล บางส่วนหรือทั้งหมด (partial or complete demethylate) (Matzke et al., 1989)

การศึกษาถึงการเปลี่ยนแปลงแบบแผน ของการเกิดดีเอ็นเอเมทธิลเลชันในยาสูบ *N. tabacum* ที่ได้รับการถ่ายจีน T-DNA *ipt* oncogene ซึ่งอยู่ในสภาพที่ถูกเติมหมู่อนุมูลเมทธิล (hypermethylated) โดยใช้ *A. tumefaciens* เป็นพาหะ ภายหลังการถ่ายจีน พบว่าสภาพการเติมหมู่อนุมูลเมทธิลที่ *ipt* oncogene ก็ยังคงอยู่ตามเดิม และสามารถถ่ายทอดต่อกันไปได้ ในขั้นตอนการแบ่งเซลล์แบบไมโอซีส เมื่อนำชิ้นเนื้อเยื่อของยาสูบที่มีจีนที่ถูกยับยั้งนี้ มาทำการเพาะเลี้ยง พบว่า *ipt* gene สามารถที่จะกลับมาแสดงออกได้เองเล็กน้อย แต่เมื่อทำการให้สาร 5-azacytidine ความเข้มข้น 5 μM ลงในอาหารเพาะเลี้ยง พบว่า *ipt* gene สามารถกลับมาแสดงออกได้ใหม่ ในสัดส่วนที่สูงกว่าเมื่อไม่ได้รับสาร 5-azacytidine เมื่อทำการศึกษารูปแบบของดีเอ็นเอเมทธิลเลชันใน *ipt* gene ที่ไม่มีการแสดงออก , ในกลุ่มที่กลับมาแสดงออกได้เอง, และในกลุ่มที่กลับมาแสดงออกเมื่อได้รับสาร 5-azacytidine พบว่าเกิดการเติมหมู่อนุมูลเมทธิล ในปริมาณสูง

มากใน *ipt* gene ที่ไม่มีการแสดงออก แต่ในกลุ่มที่กลับมาแสดงออกได้เองหรือเมื่อใช้สาร 5-azacytidine ในการกระตุ้นให้แสดงออกใหม่พบว่าจะมีระดับการเติมหมู่อนุมูลเมทธิลลดลง ในบริเวณ 5´upstream region, coding region และ 3´downstream region (John and Amasino, 1989)

ในปี ค.ศ 1990 ได้มีการศึกษาถึงผลของดีเอ็นเอเมทธิลเลชัน ในการยับยั้งการแสดงออกของจีนในยาสูบที่ได้รับการถ่ายจีน (transgenic tobacco) โดยการถ่ายจีนลูกผสม (chimeric gene) ซึ่งประกอบด้วย cauliflower mosaic virus 35S promoter, β-glucuronidase coding region และ polyadenylation signal of nopaline synthase ซึ่งเป็นจีนที่อยู่ในสภาพที่ถูกเติมหมู่อนุมูลเมทธิล (hemimethylated) เข้าสู่โปรโตพลาสต์ของยาสูบ ซึ่งการเกิด hemimethylation นี้สามารถยับยั้งการแสดงออกของจีน ได้อย่างสมบูรณ์ ภายหลังการถ่ายจีน เมื่อทำการ regenerate ก็พบว่า เกิดการลดระดับการเติมหมู่อนุมูลเมทธิล (hypomethylated) ที่บริเวณ CpG และ CpNpG sequnce ในบางตัวอย่างซึ่งการเกิด hypomethylation นี้จะมีส่วนสัมพันธ์กับการแสดงออก ของจีน β-glucuronidase โดยศึกษาในตัวอย่าง 18 ต้น พบว่ามี 12 ต้น เกิดการยับยั้งอย่างสมบูรณ์ , 2 ต้น เกิดการยับยั้งเล็กน้อย และอีก 4 ต้น ยังคงมีการแสดงออกของจีน β-glucuronidase เป็นปกติ และเมื่อศึกษาจากส่วนที่เป็นชุดควบคุม 10 ต้น ซึ่งได้ผ่านการถ่ายจีนเช่นเดียวกัน แต่เป็นจีนที่อยู่ในสภาพ non-methylated พบว่า 2 ใน 10 ต้นนี้เกิดการยับยั้งอย่างสมบูรณ์ 3 ต้น เกิดเล็กน้อยและอีก 5 ต้น ยังคงเป็น non-methylated และเมื่อให้เนื้อเยื่อพืชที่เกิด hypomethylation ได้รับสาร 5-azacytidine พบว่าต้นอ่อนที่เจริญเติบโตขึ้นมาใหม่สามารถสร้างเอนไซม์ β-glucuronidase ได้ใหม่ และเกิดการลดระดับการเติมหมู่อนุมูลเมทธิล ที่จีนนี้ด้วย (Weber et al., 1990)

ได้มีผู้ศึกษาพบว่าการเกิดการยับยั้งการแสดงออกของจีน และ การกลับมาแสดงออกได้ใหม่ สามารถที่จะเกิดย้อนกลับไปมาได้ โดยศึกษาใน *Arabidopsis thaliana* ที่ได้

รับการถ่ายจีน hygromycin resistance โดยในตอนแรก พบว่า 50 % ของพืชในรุ่นลูกที่ได้รับการถ่ายจีนนี้ไม่มีการแสดงออกทางฟีโนไทป์ ทั้งๆที่ในขั้นตอนการถ่ายจีนก็เกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์ ทำ Southern analysis ร่วมกับการใช้ isoschizomeric restriction enzymes เพื่อหาความแตกต่างของการเกิดเมทธิลเลชัน พบว่ามีความแตกต่างกันระหว่างฟีโนไทป์ และรูปแบบของจีนดังกล่าวใน autoradiogram ซึ่งเป็นผลเนื่องมาจากมีการลดระดับของการสังเคราะห์อาร์เอ็นเอ ในตัวอย่างที่นำมาศึกษา ซึ่งการเกิดยับยั้งการแสดงออกของจีนจะเกิดกับพืชที่มีการสอดแทรกของจีนเข้าไปแบบหลายชุด และไม่พบความสัมพันธ์ที่แน่นอนระหว่างการเกิดการยับยั้งการแสดงออกของจีน และการเกิดเมทธิลเลชันของ cytosine residue ในบริเวณ sequence ของจีนที่ถ่ายเข้าไป เมื่อนำชิ้นส่วนของพืชมาเพาะเลี้ยงบนอาหารที่ชักนำให้เกิดแคลลัส พบว่าพืชกลับมีการต้านทานต่อไฮโกรไมซินได้เล็กน้อย พืชในรุ่นต่อมาที่ได้จากการทำ self-pollination จะกลับไปแสดงลักษณะไม่ต้านไฮโกรไมซินอีก ในทางตรงข้าม เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเมล็ด ที่ได้จากการผสมกับต้นปกติ หรือกับต้นอื่นที่ไม่แสดงออกซึ่งจีนนี้ จะได้ต้นที่กลับมาแสดงลักษณะต้านไฮโกรไมซินได้เอง โดยที่การกลับมาแสดงลักษณะได้เองนี้ มักจะเกิดขึ้นได้โดยไม่จำเป็นต้องมีการลดจำนวนชุดของจีน และในรุ่นถัดมาอีกก็พบว่า มักจะมีการสูญเสียลักษณะการต้านไฮโกรไมซินอีก ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการเกิดการยับยั้งการแสดงออกของจีน และการกลับมาแสดงออกได้ใหม่นั้น เป็นกลไกที่สามารถเกิดย้อนกลับไปมาได้ (Mittelsten Scheid et al., 1991)

จากการศึกษาในพืชชนิด *Petunia hybrida* ที่ได้รับการถ่ายจีน T-DNA gene *2* จาก *A. tumefaciens* โดยการแสดงออกของ gene *2* จะทำให้เกิดเป็นเอนไซม์ indole-3-acetamide hydrolase ซึ่งเอนไซม์ชนิดนี้จะทำหน้าที่ในการเปลี่ยน auxin precursor ซึ่งก็คือสาร indole-3-acetamide (IAM) และ analogue คือ 1-napthaline acetamide (NAM) ให้เป็น active auxin คือ indole-3-acetic acid (IAA) และ 1-napthalele acetic acid (NAA) พืชที่ได้รับการถ่ายจีนนี้ และมีการแสดงออกของจีนในสภาพปกติ จะเจริญเติบโตได้ในสารอาหารที่มีความ

เข้มข้นของ auxin precursor ต่ำๆ เพื่อเปลี่ยนเป็น active auxin ได้ แต่ในสภาพที่มีความเข้มข้นของ auxin precursor สูงๆ จะกลับ sensitive และเป็นพิษต่อพืชด้วย เมื่อทำการคัดเลือกพืชที่มี gene *2* จากเมล็ดที่กำลังงอก และ แคลลัส พบว่ามีการแสดงออกที่เปลี่ยนแปลงไปจากเดิม โดยสามารถที่จะเจริญเติบโตได้บนสารอาหารที่มีความเข้มข้นของ auxin precursor สูงๆ แสดงว่า gene *2* มีการทำงานผิดปกติไปจากเดิม เมื่อทำการตรวจสอบโดยวิธี Southern analysis พบว่าใน 31 ตัวอย่าง ที่มีการแสดงออกของ gene *2* เปลี่ยนแปลงไปนั้น มี 1 ตัวอย่างที่เกิดการ deletion ของ T-DNA แต่ในอีก 30 ตัวอย่าง พบว่าโครงสร้างของ gene *2* ยังคงอยู่ตามปกติ ไม่มีการเปลี่ยนแปลงแต่อย่างใด แสดงว่าการเกิดการรวมตัวของ transposable element ไม่ได้เกี่ยวข้องกับการไม่แสดงออกของ gene *2* นี้ และเมื่อทำการตรวจสอบโดยใช้ 5-methylcytosine sensitive-restriction enzymes ซึ่งจะช่วยบอกให้ทราบถึง ความแตกต่างระหว่างการเกิด methylated และ non-methylated ผลที่ได้พบว่า gene *2* ที่ไม่มีการแสดงออกเกิด methylation จริง และเมื่อทำการเติม 5-azacytidine ซึ่งเป็น สารยับยั้งการเกิดเมทธิลเลชันลงในสารอาหาร พบว่า สามารถกระตุ้นให้ gene *2* กลับมาแสดงออกตามปกติ จากผลที่ได้นี้พอจะสรุปผลได้ว่า DNA-methylation เป็นสาเหตุใหญ่ในการทำให้ gene *2* นี้ไม่สามารถแสดงออกได้ตามปกติ (Renkens et al., 1992)

งานวิจัยนี้มุ่งที่จะศึกษาเกี่ยวกับ การยับยั้งการแสดงออกของจีน ที่เกิดขึ้นเนื่องจากการเติมหมู่อนุมูลเมทธิลที่ดีเอ็นเอ รวมทั้งการใช้สาร 5-azacytidine ในการลดระดับการเติมหมู่อนุมูลเมทธิลที่ดีเอ็นเอ เพื่อกระตุ้นจีนที่ถูกยับยั้งการแสดงออกให้กลับมามีการแสดงออกของจีนตามปกติ ในพืชที่ผ่านกระบวนการถ่ายจีนโดยตรง การศึกษาในเรื่องนี้จะช่วยให้เข้าใจถึง การยับยั้งการแสดงออกของจีนที่ได้รับการถ่ายเข้าสู่เซลล์พืช โดยกระบวนการดังกล่าวได้ ความรู้ที่ได้อาจนำมาใช้ในการหาทางยับยั้ง ไม่ให้จีนที่ได้รับการถ่ายเข้าสู่เซลล์พืชถูกกดการแสดงออก หรืออาจกระตุ้นจีนที่ถูกกดการแสดงออก ให้กลับมาแสดงออกได้ใหม่ ซึ่งความรู้ที่ได้นี้จะมีประโยชน์มาก ต่อการผลิตพืชที่ผ่านกระบวนการทางวิศวกรรมพันธุศาสตร์

และความรู้เบื้องต้น ที่จะนำไปสู่การหาทางกระตุ้น หรือควบคุมการแสดงออกของจีนที่มีอยู่แล้วในพืช โดยวิธีการดังกล่าวนี้ได้

วัตถุประสงค์

1. ศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ 5-azacytidine ในการกระตุ้นให้เกิดการแสดงออกของจีน
2. ศึกษาผลของ 5-azacytidine ต่อการกระตุ้นการแสดงออกของจีน
3. ศึกษาผลของ 5-azacytidine ในประชากรเมล็ดรุ่นต่อไป (R_4)
4. ศึกษาเปรียบเทียบแบบแผนของดีเอ็นเอก่อนและหลังการกระตุ้นด้วย 5-azacytidine