

บทที่ 7

เจเนติกส์และอีพีเจเนติกส์

Genetics and Epigenetics

การศึกษาความเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมของพืชเริ่มประสบความสำเร็จมากขึ้นเนื่องจากความเข้าใจเกี่ยวกับคุณสมบัติ totipotency ของพืชที่เซลล์ทุกเซลล์มีความสามารถในการพัฒนาไปเป็นพืชทั้งต้นที่สมบูรณ์ได้ภายใต้สภาวะแวดล้อมที่เหมาะสม จึงเกิดความพยายามในการเพาะเลี้ยงและชักนำให้พืชมีการพัฒนาดังกล่าวและสามารถประสบความสำเร็จเพิ่มขึ้นต่อเนื่องอย่างรวดเร็ว แต่อย่างไรก็ตามบางครั้งพบว่ามีอุปสรรคที่ไม่สามารถแก้ปัญหาได้เนื่องจากกระบวนการเจริญ (growth) และการเปลี่ยนสภาพ (differentiation) ของพืชมีอิทธิพลมาจากปัจจัยสำคัญเกี่ยวข้องกับกฎการแสดงออกของยีนที่กล่าวว่า “ยีนทั้งหมดอาจจะทำหน้าที่บางเวลาและมีบางยีนเท่านั้นที่ทำหน้าที่ตลอดเวลาแต่ไม่ใช่ทุกยีนที่ทำหน้าที่ตลอดเวลา” ซึ่งกฎดังกล่าวนี้มีผลต่อลักษณะฟีโนไทป์ของพืชที่ทำให้เกิดการผันแปรทั้งประเภทที่มีความคงที่และไม่คงที่

การเจริญของพืชและอีพีเจเนติกส์

การศึกษากฎการแสดงออกของยีนโดยการแยกเอ็มอาร์เอ็นเอจากโพลีโซมของเนื้อเยื่อใบยาสูบแล้วนำมาทำการเข้าคู่ (hybridized) กับดีเอ็นเอที่มีการติดฉลากกัมมันตรังสี (radioactivity labeled) ซึ่งแสดงโครงสร้างทั้งหมดของยีนที่มีอยู่ในจีโนมของยาสูบ พบว่าชิ้นส่วนดีเอ็นเอประมาณ 5 เปอร์เซ็นต์ เท่านั้นที่เข้าคู่กันได้ดีกับเอ็มอาร์เอ็นเอของจีโนมแสดงให้เห็นว่ามียีนเพียงส่วนน้อยเท่านั้นที่มีการแสดงออกในส่วนใบ ถึงแม้ว่าใบจะเป็นอวัยวะที่มีความซับซ้อนประกอบด้วยเซลล์ที่พัฒนาไปหลายรูปแบบแล้วก็ตามผลการทดลองดังกล่าวอาจสันนิษฐานว่าเป็นเพราะกิจกรรมการถอดรหัส (transcription)

ของเซลล์พาราเรณิมา (parenchyma) ซึ่งเป็นเซลล์พื้นฐานที่มีอยู่เป็นจำนวนมากในใบ แม้ว่ายีนที่แสดงออกในเซลล์ของใบส่วนใหญ่จะควบคุมการทำหน้าที่เกี่ยวกับปฏิกิริยาเคมีพื้นฐานในเซลล์ปกติที่พบได้ในเซลล์ทั่วไปแต่เอนไซม์ที่พบเฉพาะในใบมีเพียง 5 เปอร์เซนต์ เท่านั้น จึงอาจกล่าวได้ว่าแต่ละระยะการเจริญหรือพัฒนาของพืชจะมียีนเพียงบางส่วนของจีโนมเท่านั้นที่ทำหน้าที่โดยยีนจะมีการแสดงออกอย่างเฉพาะเจาะจงกับเซลล์แต่ละประเภท

หลักฐานที่แสดงถึงกระบวนการเจริญและพัฒนาของเซลล์ซึ่งเกี่ยวข้องกับการแสดงออกของยีนปรากฏขึ้นครั้งแรกในปี ค.ศ. 1932 โดย Haldane ให้คำจำกัดความว่า "epigenesis" ถูกนำมาใช้กันอย่างกว้างขวางในการอธิบายเกี่ยวกับกิจกรรมของยีนที่ปรากฏระหว่างกระบวนการเจริญเนื่องจากระบบชีววิทยาของสิ่งมีชีวิตมีการเปลี่ยนแปลงตลอดเวลาซึ่งอาจเกี่ยวข้องกับการแสดงออกของยีน ต่อมาในปี ค.ศ. 1958 มีการให้คำคำว่า "epigenetic" โดย Nancy หมายถึงการเปลี่ยนแปลงทั้งหมดที่ยีนแสดงออกซึ่งอาจเกิดขึ้นอย่างต่อเนื่องตลอดกระบวนการแบ่งเซลล์ตามการเปลี่ยนแปลงของสภาวะชักนำลักษณะการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นแบบนี้เรียกว่า "epigenetic change" เป็นคุณสมบัติที่มีเสถียรภาพสามารถแบ่งแยกการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาของเซลล์เหล่านี้ออกจากเซลล์ปกติในสภาวะที่มีสิ่งกระตุ้น แต่ลักษณะดังกล่าวอาจจะไม่ปรากฏเมื่อปราศจากสิ่งกระตุ้น

กลไกของอีพิเจเนติกส์

การควบคุมกิจกรรมของยีนแบบอีพิเจเนติกส์อาจจะประสบความสำเร็จได้ด้วยการคัดเลือกอย่างสม่ำเสมอหลาย ๆ ขั้นตอนตลอดกระบวนการแบ่งเซลล์ ตัวอย่างของการควบคุมการถอดรหัสในพืชมักพบได้เสมอโดยการสังเคราะห์เอนไซม์ไรบูโลส บิสฟอสเฟต คาร์บอกซิเลส (ribulose biphosphate carboxylase; RUBPase) ในคลอโรพลาสต์ของข้าวโพด (*Zey mays*) และพืช C₄ ชนิดอื่นๆ พบว่าโพลีเปปไทด์ชนิดนี้จะปรากฏในคลอโรพลาสต์ของเยื่อหุ้มท่อลำเลียง (bundle sheath) ซึ่งประกอบด้วยเซลล์พาราเรณิมา และสเกลอเรณิมา (sclerenchyma) แต่ไม่พบในเซลล์มีโซฟิลล์ (mesophyll)

นอกจากนี้ มีรายงานเกี่ยวกับการตรวจสอบอาร์เอ็นเอของยาสูบโดยนำนิวคลีโอไทด์เอกลักษณ์มาเข้าคู่กับดีเอ็นเอสายเดี่ยวที่ทำการติดฉลากด้วยกัมมันตรังสี พบว่ามีเพียง 19 เปอร์เซนต์ เท่านั้นที่เข้าคู่กันได้โดยมีส่วนของโพลีโซมัล เอ็มอาร์เอ็นเอ (polysomal mRNA) เพียง 5 เปอร์เซนต์ แสดงให้เห็นว่าส่วนประกอบของจีโนมพืชที่ลอกรหัสเป็นเอชเอ็นอาร์เอ็นเอ (HnRNA) ซึ่งเป็นสารตั้งต้น (precursor) ของเอ็มอาร์เอ็นเอ นั้นก็มีเพียงส่วนน้อยเท่านั้นที่มีการลำเลียงไปยังไซโทพลาซึม ดังนั้นจึงปรากฏว่ามีอาร์เอ็นเอในนิวเคลียสลดลง และ/หรือมีการคัดเลือกการส่งผ่านเยื่อหุ้มนิวเคลียสซึ่งพบในพืชชั้นสูงเกิดขึ้นจากกิจกรรมของยีน

การแสดงออกของยีนอาจเกิดขึ้นอย่างสม่ำเสมอโดยควบคุมตามการแปลรหัสของเอ็มอาร์เอ็นเอไปเป็นโปรตีนเมื่อเข้าสู่ไซโทพลาซึม การแปลรหัสอาจถูกขัดขวางหรือชะลอโดยการแยกเอ็มอาร์เอ็นเอที่ไม่แยกที่ฟแต่มีเสถียรภาพหรือโดยการลดความสัมพันธ์ระหว่างเอ็มอาร์เอ็นเอและปัจจัยอย่างใดอย่างหนึ่งที่เกี่ยวข้องกับการแปลรหัส ดังเช่น มีรายงานเกี่ยวกับการศึกษาผลกระทบของสารยับยั้งต่ออาร์เอ็นเอและการสังเคราะห์โปรตีนในระหว่างที่เมล็ดกำลังงอกโดยใช้สารไซโคลเฮกซิมิด (cycloheximide) กับเมล็ดฝ้ายพบว่า มีผลยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนและการเจริญของเอ็มบริโอ อย่างไรก็ตาม การใช้สารแอกทิโนไมซินดี (actinomycin D) มีผลยับยั้งการสังเคราะห์อาร์เอ็นเอแต่ไม่มีผลกระทบต่อการสังเคราะห์โปรตีนหรืออัตราการเจริญของเอ็มบริโอ เนื่องจากการสังเคราะห์โปรตีนในช่วงแรกของการงอกเมล็ดฝ้ายจะมีการสร้างอาร์เอ็นเอแม่แบบ (RNA template) และไรโบโซมขึ้นมาสะสมในเมล็ดไว้ก่อน

การเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของยีนแสดงออกตลอดการเจริญและการเปลี่ยนแปลงสภาพของเซลล์สิ่งมีชีวิต มีรายงานจำนวนมากเกี่ยวกับการควบคุมความเปลี่ยนแปลงในพืชชั้นสูงแบบอิมูโนเจนิกที่ เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์โปรตีน แต่อย่างไรก็ตามสาเหตุของการเปลี่ยนแปลงบางอย่างไม่จัดเข้าอยู่ในกฎของอิมูโนเจนิกได้แก่ การเข้าแทนที่คู่เบส (base substitution) การสอดแทรก (insertion) การขาดหาย (deletion) ของนิวคลีโอไทด์ การเข้าต่อแบบสลับ (inversion) การแลกเปลี่ยนชิ้นส่วนโครโมโซมที่ไม่ใช่คู่เหมือน (translocation) รวมทั้งการเปลี่ยนแปลงจำนวนโครโมโซม

การแสดงออกของการเปลี่ยนแปลงแบบอพิเจเนติกส์ในเซลล์เพาะเลี้ยง

การแสดงออกของลักษณะฟีโนไทป์ใหม่ๆ โดยการเลี้ยงเซลล์อาจเป็นผลมาจากการเปลี่ยนแปลงทางอพิเจเนติกส์มากกว่าเจเนติกส์ ความผันแปรทางฟีโนไทป์ของเซลล์เพาะเลี้ยงอาจสะท้อนถึงการแสดงออกของข้อมูลที่มีอยู่ในจีโนมพืชซึ่งไม่แสดงออกในภาวะปกติแต่เป็นผลจากอัตราการสังเคราะห์ผลิตภัณฑ์ของยีนเปลี่ยนไปโดยนิวคลีโอไทด์ของยีนยังคงเป็นปกติ

การเปลี่ยนแปลงแบบอพิเจเนติกส์ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชที่เกี่ยวข้องกับความต้องการฮอร์โมนที่เปลี่ยนแปลงไปเมื่อมีปริมาณเซลล์เพิ่มขึ้นเริ่มมีการศึกษาในปี ค.ศ. 1946 Gautheret พบว่าเนื้อเยื่อของ *Scorzonera* ซึ่งปกติต้องการออกซินแต่เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลาสั้นโดยเปลี่ยนถ่ายอาหารหลายๆ ครั้งสามารถเติบโตได้โดยปราศจากออกซินเรียกปรากฏการณ์นี้ว่าออกซินออโทโทรฟี (auxin autotrophy) ซึ่งเซลล์ลักษณะนี้จะตอบสนองต่อการได้รับออกซินจากอาหารในช่วงระยะเวลาไม่นานนักก็จะเปลี่ยนแปลงลักษณะทางสัณฐานวิทยาจากเนื้อเยื่อที่ต้องการฮอร์โมนไปเป็นเนื้อเยื่อที่ไม่ต้องการฮอร์โมน เช่นเดียวกับการเพาะเลี้ยงแครอทที่ไม่ต้องการออกซินจากภายนอกในการเติบโตปรากฏการณ์นี้ภายหลังพบในการเพาะเลี้ยงพืชหลายชนิดโดย Gautheret เรียกลักษณะเช่นนี้ว่าแฮบิทูเอชัน (habituation) เซลล์ที่มีลักษณะนี้เรียกว่าเซลล์แฮบิทูเอชัน (habituated cell) ซึ่งรวมถึงกรณีที่เซลล์พืชเพาะเลี้ยงไม่ต้องการไซโทไคนินด้วย สถานภาพของแฮบิทูเอชันมีความคงตัวมากที่สุดเมื่อเซลล์ที่มีฟีโนไทป์รุ่นเดียวกันและขึ้นอยู่กับฮอร์โมนที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงซึ่งชักนำให้พืชกลับมาที่มีความต้องการฮอร์โมนอีกครั้งได้ยากเนื่องจากเซลล์ลักษณะนี้ถูกเปลี่ยนแปลงสภาพภายในให้มีฮอร์โมนเพิ่มมากขึ้นเพื่อสามารถในการเจริญเติบโตได้เอง มีข้อสันนิษฐานว่าการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวเป็นผลมาจากการเปลี่ยนแปลงอัตราการสังเคราะห์ฮอร์โมนให้เพิ่มขึ้นหรือลดลงซึ่งจึงตอบได้ว่าเป็นเพราะการเปลี่ยนแปลงแบบอพิเจเนติกส์จากเซลล์ที่มีความต้องการฮอร์โมนไปสู่ความไม่ต้องการฮอร์โมนนั่นเอง

หลักฐานบางประการที่แสดงให้เห็นว่าแอสปีทูเอชันเป็นปรากฏการณ์อพิเจเนติกส์ ได้แก่การศึกษาการเปลี่ยนสภาพกลับ (redifferentiation) ลักษณะทางฟีโนไทป์ในเซลล์พืชเพาะเลี้ยงที่ปล้ำงความสามารถในการเจริญเติบโตในสภาวะปราศจากฮอร์โมน ดังเช่น แคลลัสของยาสูบที่เริ่มต้นจากต้นยาสูบที่รีเจเนอเรต (regenerate) ขึ้นมาจากเซลล์ที่เป็นออกซินแอสปีทูเอชัน (auxin habituated) และเซลล์ของ *Crepis capillaries* ที่ได้จากต้นซึ่งรีเจเนอเรตมาจากเซลล์ลักษณะออกซินออโทโทรฟิก (auxin autotrophic) และไคเนทินออโทโทรฟิก (kinetin autotrophic) จะเห็นว่าแคลลัสใหม่นั้นมีความต้องการฮอร์โมนในการเติบโต อย่างไรก็ตามเซลล์เพาะเลี้ยงโดยทั่วไปมีลักษณะเป็นเฮเทอโรจีนิส (heterogeneous) คือมีความแตกต่างกันและมีจีโนไทป์คงที่ การรีเจเนอเรตอาจไม่ใช่สาเหตุชักนำให้สูญเสียลักษณะแอสปีทูเอชันแต่การที่ตรวจพบว่าแอสปีทูเอชันยังคงอยู่ได้นั้น อาจเป็นเพราะมีการกลายพันธุ์ (mutation) เกิดขึ้นส่วนแคลลัสเกิดขึ้นใหม่ที่มาตรวจสอบนั้นเริ่มต้นมาจากเซลล์ปกติที่ต้องการฮอร์โมนปะปนอยู่กับเซลล์ที่มีการกลายเกิดขึ้น

ในการพิสูจน์ปรากฏการณ์แอสปีทูเอชันโดยตรวจสอบสายพันธุ์ออโทโทรฟิกจำนวนมากที่ได้จากการแยกเซลล์เดี่ยวจากกลุ่มเซลล์ที่มีลักษณะแอสปีทูเอชัน แม้ว่าจะยังคงพบปรากฏการณ์ผันกลับระหว่างการเพิ่มปริมาณเซลล์ แต่เซลล์ส่วนน้อยเท่านั้นที่มีพฤติกรรมเช่นนี้ ถ้าแอสปีทูเอชันมีพื้นฐานมาจากอพิเจเนติกส์มากกว่าเจเนติกส์ สายพันธุ์กลายกันน่าจะพบได้ในทุกเซลล์ ในปี ค.ศ. 1973 Binns และ Meins ศึกษาเซลล์ยาสูบ (*Nicotiana tabacum*) ลักษณะไซโทไคนินแอสปีทูเอชัน (cytokinin habituated) ต้นที่รีเจเนอเรตจากไซโทไคนิน ออโทโทรฟิก จำนวน 19 สายพันธุ์ ที่เริ่มต้นจากเซลล์เดี่ยวและแคลลัสที่ได้จากชิ้นส่วนเริ่มต้น (explant) คือ ใ้ไม้ (pith) ซึ่งมีความต้องการไซโทไคนินในการเติบโต จากการทดลองนี้ได้ข้อสรุปว่าแอสปีทูเอชันมีความเกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีนซึ่งควบคุมด้วยฮอร์โมนจากภายในพืช (endogenous hormone) การแสดงออกของยีนแบบสลับนี้เป็นลักษณะเชิงคุณภาพที่คงอยู่เรื่อยไปในเซลล์ลูกที่ได้จากการแบ่งเซลล์แบบไมโททิกและเมื่อผ่านกระบวนการเปลี่ยนสภาพ (differentiation) และ/หรือการสูญเสียสภาพ (dedifferentiation)

ในการชักนำให้เซลล์ของ *Nicotiana sylvestris* แสดงความทนทานต่อความหนาวเย็นเพิ่มมากขึ้นโดยชักนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงแบบอพิเจเนติกส์ ด้วยการเพาะเลี้ยงเซลล์ ณ อุณหภูมิปกติ คือ 25 องศาเซลเซียสแล้วย้ายไปเลี้ยงที่อุณหภูมิ 0 หรือ -3 องศาเซลเซียส นาน 3 สัปดาห์ จากนั้นย้ายกลับมาเพาะเลี้ยงในอุณหภูมิปกติแล้วทำการคัดเลือกเซลล์ที่เติบโตได้อีกครั้งซึ่งแสดงถึงการมีความต้านทานสูงกว่าสายพันธุ์ปกติ

ความต้านทานต่อสารกำจัดวัชพืชพิกลอรแอม (picloram) ของยาสูบ 1 ใน 7 สายพันธุ์ ที่เป็นผลมาจากการเปลี่ยนแปลงแบบอพิเจเนติกส์ แม้ว่าเซลล์สายพันธุ์เหล่านี้จะยังคงแสดงความต้านทานพิกลอรแอมเมื่อผ่านการเปลี่ยนถ่ายอาหารเป็นระยะเวลาสั้นโดยมีเพียง 10 วัน เท่านั้นที่แสดงความอ่อนแอ โดยในส่วนที่เหลือซึ่งสามารถยืนยันว่าเป็นการเปลี่ยนแปลงแบบอพิเจเนติกส์มีอยู่ 4 สายพันธุ์ เนื่องจากต้นพืชที่รีเจเนอเรตมาจากเซลล์เหล่านี้เมื่อนำไปชักนำให้เกิดแคลัสจะมีความต้านทานสูงขึ้นและเมื่อผสมพันธุ์กับต้นที่รีเจเนอเรตขึ้นมาจากสายพันธุ์ที่ทนทานก็จะสามารถส่งถ่ายอัลลีลของยีนเดี่ยวต่อไปได้

มีรายงานการทดลองกับเซลล์แฮบิทูเอชันพบว่าฟิโนไทป์ที่เป็นเซลล์ผันแปรจากการเพาะเลี้ยงที่ปราศจากสภาวะคัดเลือกนั้นไม่มีเสถียรภาพ โดยแบ่งออกเป็นอพิเจเนติกส์และอพิเจเนติกส์ ในกรณีสายพันธุ์ต้านทานต่ออุณหภูมิต่ำและสายพันธุ์ต้านทานสารกำจัดวัชพืชพิกลอรแอมดังกล่าวอาจจะมีผลมาจากอพิเจเนติกส์ซึ่งมีการแสดงออกที่ไม่เปลี่ยนแปลงจากการแบ่งเซลล์หลายๆ ชั่วรุ่นของการเพาะเลี้ยงแต่จนกระทั่งมีการศึกษาสายพันธุ์ต่างๆ ที่เกิดมาจากสายพันธุ์เหล่านี้ซึ่งไม่สามารถรู้ได้ว่าเกิดการสูญเสียฟิโนไทป์เหล่านี้ไปแม้จะเคยมีปะปนอยู่ในประชากรเซลล์ก็ตาม

จากรายงานต่างๆ เหล่านี้อาจใช้พิสูจน์การเปลี่ยนแปลงของเซลล์ได้โดยนำเซลล์แฮบิทูเอชันไปเพิ่มปริมาณในสภาพเพาะเลี้ยงแล้วตรวจสอบแคลัสที่ได้จากต้นซึ่งรีเจเนอเรตขึ้นมาหากมีการคงอยู่ของลักษณะทางฟิโนไทป์แบบสลับก็แสดงว่าไม่มีการเปลี่ยนแปลงแบบอพิเจเนติกส์ อย่างไรก็ตามการเปลี่ยนแปลงแบบอพิเจเนติกส์อาจเกี่ยวข้องกับการแสดงหน้าที่ของเซลล์อื่นทั่วไปซึ่งแยกที่ฟิโนไทป์เนื้อเยื่อที่มีการเปลี่ยนสภาพ นอกจากนี้การเปลี่ยนแปลงแบบอพิเจเนติกส์อาจจะมีการคงอยู่ผ่านวัฏจักรการเปลี่ยน

สภาพและการสูญเสียสภาพได้ ดังนั้นเกณฑ์ที่จะใช้แบ่งแยกปรากฏการณ์เปลี่ยนแปลงแบบเจเนติกส์ออกจากอีพิเจเนติกส์จึงน่าจะเป็นคุณสมบัติในการถ่ายทอดสู่รุ่นต่อไปผ่านการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิสและไมโทซิสได้ซึ่งแสดงให้เห็นว่ามีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างในดีเอ็นเอ นอกจากนี้สำหรับกรณีที่มีการถ่ายทอดลักษณะสู่รุ่นลูกแบบเอกซ์ทรา-โครโมโซมัล (extra-chromosomal) ซึ่งถูกควบคุมด้วยยีนที่อยู่ในไมโทคอนเดรียหรือคลอโรพลาสต์ การวิเคราะห์ด้วยวิธีผสมข้ามอาจไม่เพียงพอต่อการตรวจสอบเพื่อแบ่งแยกระหว่างการเปลี่ยนแปลงแบบอีพิเจเนติกส์และเจเนติกส์เพราะออร์แกเนลล์ส่วนใหญ่มาจากส่วนที่อยู่ในไซโทพลาซึมของฝ่ายแม่จึงอาจเป็นการยากที่จะจำแนกความเป็นไปได้ของฟีโนไทป์ที่เป็นผลมาจากอิทธิพลของนอนเจเนติก คอมโพเนนท์ (nongenetic component) จากไซโทพลาซึม

ในทางตรงข้ามต่อกรณีต่างๆ ที่กล่าวมาข้างต้น มีรายงานถึงยาสูบสายพันธุ์ต้านทานต่อไซโคลเฮกซีไมด์ซึ่งมีความไม่เสถียรอย่างมากเมื่อทำการคัดเลือกโดยนำสายพันธุ์ต้านทานมาเพิ่มปริมาณเพื่อกำจัดเซลล์ที่ปราศจากความต้านทานในอาหารที่ไม่มีไซโคลเฮกซีไมด์ พบว่าเซลล์ที่มีความต้านทานนั้นกลับมาแสดงความอ่อนแอทันทีเมื่อนำกลับมาเลี้ยงด้วยอาหารที่ไม่มีไซโคลเฮกซีไมด์เพียงครั้งเดียว จากการตรวจสอบรูปแบบไอโซไซม์เพอร์ออกซิเดสของสายพันธุ์ต้านทานและพันธุ์อ่อนแอ Meliga และคณะสรุปว่าความต้านทานที่แสดงออกนั้นเป็นผลจากการที่ยีนได้รับการกระตุ้นให้แสดงออกในระหว่างที่มีการเปลี่ยนสภาพของเนื้อเยื่อซึ่งจะไม่พบในระหว่างการเพาะเลี้ยงแคลลัส

การเปลี่ยนแปลงแบบอีพิเจเนติกส์ที่ปรากฏในเซลล์เพาะเลี้ยงอาจคล้ายกับการแสดงออกของยีนในเซลล์ปกติซึ่งไม่แยกที่ฟ โดยในระหว่างที่มีการเปลี่ยนสภาพของเซลล์ลักษณะที่เปลี่ยนแปลงนั้นอาจเสถียรดังเช่นลักษณะแฮบิทูเอชันหรือไม่เสถียรเช่นความต้านทานต่อไซโคลเฮกซีไมด์ เป็นต้น การคงลักษณะฟีโนไทป์ของเซลล์ผันแปรที่พบในแคลลัสจากต้นพืชที่รีเจเนอเรตขึ้นมาอาจใช้เป็นจุดเริ่มต้นพิจารณาเพื่อบ่งชี้ว่าเป็นการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมอย่างแท้จริง แต่สำหรับการผสมข้ามพันธุ์เป็นเพียงการตรวจสอบเบื้องต้นถึงการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมเนื่องจากยังมีหลายกรณีที่ไม่สามารถชักนำให้ลูกที่ได้จากการผสมนั้นพัฒนาขึ้นเป็นต้นสมบูรณ์ได้

นอกจากนี้การเปลี่ยนแปลงแบบเจนีติกส์และอีพิเจนีติกส์สามารถแบ่งแยกโดยอาศัยความถี่ในการปรากฏและผลที่มีต่อความถี่ของการกลาย เนื่องจากการแสดงออกของยีนที่เปลี่ยนแปลงไปมักไม่ค่อยมีผลต่อการกลายพันธุ์ ขณะที่การกลายพันธุ์มักเกิดจากการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของดีเอ็นเอซึ่งมีโอกาสเกิดขึ้นน้อยมากแต่สามารถกระตุ้นให้เกิดได้มากขึ้นด้วยสิ่งก่อกลายพันธุ์ต่างๆ สำหรับกรณีของไซโทไคนินแฮบิทูเอชันในเซลล์ยาสูบซึ่งสันนิษฐานว่าเป็นลักษณะอีพิเจนีติกส์มีความถี่ของการปรากฏด้วยอัตราประมาณ 10^{-3} ต่อ เซลล์ของเซลล์ อย่างไรก็ตามความถี่ของการกลายที่เกิดขึ้นเองในสายพันธุ์ด้านทานที่ไม่เสถียรจะมีค่าประมาณ 4×10^{-6} และสายพันธุ์ด้านทานพิคโลแรมมีค่าประมาณ 2×10^{-5} แต่ต่อมาพบกรณีที่มีการเปลี่ยนแปลงแบบเจนีติกส์มากกว่า คือ จาก 7 สายพันธุ์ที่ทำการคัดเลือกมี 4 สายพันธุ์ที่เป็นการกลายพันธุ์อย่างแท้จริงโดยมีเพียง 1 สายพันธุ์ที่เกิดจากการเปลี่ยนแปลงแบบอีพิเจนีติกส์

ความผันแปรที่พบจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชอาจก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาซึ่งเป็นผลจากอิทธิพลของสภาวะในการเพาะเลี้ยง นอกจากนี้ความผันแปรอาจมีการแสดงออกชั่วคราวหรือไม่มีการแสดงออกเมื่อเปลี่ยนแปลงสภาวะในการเพาะเลี้ยง อย่างไรก็ตามบางครั้งฟีโนไทป์ที่ผันแปรไปอาจยังคงอยู่เป็นระยะเวลาอันนานแม้จะเปลี่ยนสภาวะในการเพาะเลี้ยงแล้วก็ตามและยังสามารถถ่ายทอดลักษณะดังกล่าวผ่านการแบ่งเซลล์รุ่นต่อมาได้ด้วย สำหรับความผันแปรที่ไม่มีการถ่ายทอดผ่านทาง การแบ่งเซลล์รุ่นต่อมาได้ด้วย สำหรับความผันแปรที่ไม่มีการถ่ายทอดผ่านทาง การแบ่งเซลล์เพื่อการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศจะมีสาเหตุมาจากการเปลี่ยนแปลงแบบอีพิเจนีติกส์ ความแตกต่างระหว่างการเปลี่ยนแปลงแบบเจนีติกส์และอีพิเจนีติกส์ที่พบในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อตั้งแสดงในตารางที่ 7.1

ตารางที่ 7.1 เปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงแบบเจนีติกส์และอีพิเจนีติกส์ที่พบจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (ดัดแปลงจาก Bhojwani และ Razdan, 1996)

เจนีติกส์	อีพิเจนีติกส์
ความถี่ในการเกิดต่ำประมาณ $10^{-5} - 10^{-7}$ ต่อเซลล์	ความถี่ในการเกิดสูงประมาณ 10^{-3} ต่อเซลล์
การเปลี่ยนแปลงแบบสุ่ม	การเปลี่ยนแปลงโดยตรง
ค่อนข้างเสถียร	มีความเสถียรแต่ผันกลับได้
ถ่ายทอดผ่านการแบ่งเซลล์เกี่ยวกับเพศ	ไม่ถ่ายทอดผ่านการแบ่งเซลล์เกี่ยวกับเพศ

นอกจากนี้ยังมีปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงพันธุซึ่งต้องพิจารณา เช่น ทรานสโพเซเบิลอีลิเมนต์เข้าแทรกแซงกิจกรรมของยีนโดยไปสอดแทรกในส่วนต่างๆ ของโครโมโซมที่เกี่ยวข้องกับการแสดงออกของยีน อย่างไรก็ตามยีนสามารถกลับมาทำหน้าที่ได้เหมือนเดิมเมื่อทรานสโพเซเบิลอีลิเมนต์ย้ายออกไปถึงแม้จะเพียงบางส่วนหรือทั้งหมดหรือบางครั้งอาจสูญเสียกิจกรรมไปอย่างถาวร ด้วยกลไกต่างๆ เหล่านี้จึงเป็นสาเหตุให้อัตราการกลายพันธุ์สูงขึ้นในพืชหลายชนิด กรณีของทรานสโพเซเบิลอีลิเมนต์ที่พบในข้าวโพดเป็นสาเหตุของการกลายพันธุ์ในเซลล์สืบพันธุ์ (germ cell) ด้วยความถี่ประมาณ 0.1 – 50 เปอร์เซ็นต์ แม้ว่าการปรากฏของทรานสโพเซเบิลอีลิเมนต์จะทำให้ความถี่ของการกลายสูงแต่การทำงานของมันก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างโครโมโซมด้วยการสอดแทรก (insertion) หรือการตัด (excision) ซึ่งสามารถถ่ายทอดผ่านการผสมพันธุ์ ดังนั้นทรานสโพเซเบิลอีลิเมนต์จึงจัดเป็นปรากฏการณ์ทางเจนีติกส์

ในการวิเคราะห์รูปแบบของการกลายสามารถทำได้โดยอาศัยข้อมูลหลายประการ ได้แก่ การคาดเดารูปแบบของลูกที่เกิดจากการผสมพันธุ์ อัตราการกลายและความถี่ในการสูญเสียลักษณะการกลาย ผลกระทบของการกลายพันธุ์ การเกิดรีคอมบิเนชัน เป็นต้น อย่างไรก็ตามการยืนยันผลการวิเคราะห์ที่ถูกต้องแน่นอนควรจะใช้การตรวจสอบหลายวิธี

ดังกล่าวร่วมกัน เนื่องจากมีการศึกษาเพิ่มขึ้นแนวคิดในการจำแนกการเปลี่ยนแปลงเป็นแบบอพิเจเนติกส์และเจเนติกส์จึงเปลี่ยนไป เช่น พบว่าการเปลี่ยนแปลงแบบอพิเจเนติกส์บางกรณีก็สามารถถ่ายทอดผ่านการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิสได้ หรือการเปลี่ยนแปลงแบบเจเนติกส์ก็อาจไม่ปรากฏในรุ่นต่อมา ดังนั้นจึงมีการให้คำจำกัดความว่า “พันธุ์กลาย” (mutant) เพื่อใช้เรียกกรณีที่การเปลี่ยนแปลงทางฟีโนไทป์สามารถถ่ายทอดสู่รุ่นต่อไปได้ โดยการผสมข้ามรุ่นและคำว่า “เซลล์ผันแปร” (variant) เมื่อลักษณะฟีโนไทป์ที่เปลี่ยนแปลงไปนั้นไม่สามารถถ่ายทอดสู่ลูกหลานได้หรือไม่แสดงออกเมื่อตรวจสอบด้วยเทคนิคทางพันธุศาสตร์

การแสดงออกของยีนที่ปรากฏในระดับต้นพีช

ยีนที่แสดงออกในระดับเซลล์ซึ่งยังไม่มี การเปลี่ยนสภาพ (undifferentiated cell) อาจจะไม่ทำหน้าที่ในต้นเต็มวัยหรืออย่างน้อยที่สุดก็ไม่แสดงออกในทุกอวัยวะของพืช กรณีนี้การกลายพันธุ์อาจแสดงออกได้ในเซลล์เพาะเลี้ยงแต่ไม่ปรากฏว่ามีการเปลี่ยนแปลงฟีโนไทป์ของต้นพีช นอกจากนี้หากต้นที่รีเจเนอเรตจากเซลล์ผันแปรไม่แสดง ความผิดปกติก็ยิ่งเป็นการยืนยันว่าการเปลี่ยนแปลงนั้นเป็นการแบบอพิเจเนติกมากกว่าเจเนติกส์ ดังนั้นเพื่อแก้ปัญหาดังกล่าวจึงจำเป็นต้องตรวจสอบแคลลัสที่ได้จากต้นพีชซึ่งรีเจเนอเรตมาจากแคลลัสที่มีการเปลี่ยนแปลง เรียกแคลลัสนี้ว่า “แคลลัสทุติยภูมิ” (secondary callus) ถ้าลักษณะที่เปลี่ยนแปลงไม่ปรากฏในแคลลัสทุติยภูมิแสดงว่าเป็น การเปลี่ยนแปลงแบบอพิเจเนติกส์ อย่างไรก็ตามลักษณะฟีโนไทป์ที่เปลี่ยนแปลงนั้นอาจปรากฏทั้งในแคลลัสทุติยภูมิและต้นลูกในรุ่นต่อมาก็ได้ โดยเป็นการแสดงออกของยีนซึ่งไม่เคยแสดงออกในระดับต้นมาก่อนแต่สามารถพบได้ในเซลล์เพาะเลี้ยง

การเปลี่ยนแปลงแบบเจเนติกส์ที่พบในยาสูบเรียกว่า กลีเซอรอล-ยูทิลไลซิง มิวแทนท์ (glycerol-utilizing mutant; GUT mutant) เป็นตัวอย่างการกลายพันธุ์ที่พบได้เพียงแค่ระดับเซลล์แต่ไม่ปรากฏในต้นพีชโดยเซลล์ GUT สามารถเติบโตบนอาหารที่มีกลีเซอรอลเพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานขณะที่เซลล์ปกติไม่สามารถทำได้ ในการตรวจสอบแคลลัสของต้นลูกที่ได้จากการผสมข้ามจำนวนมากโดยนำมาเลี้ยงบนอาหารที่มี

กลีเซอรอลเปรียบเทียบกับแคลลัสของเซลล์ GUT ปรากฏว่าไม่มีความแตกต่างกันทั้งคุณสมบัติในการงอกและในด้านสัณฐานวิทยาจึงเป็นปัญหาในการจำแนกสายพันธุ์ทั้งสอง ซึ่งอาจเนื่องมาจากต้นพืช GUT อาจจะมีผลผลิตโปรตีนที่แตกต่างออกไปแต่ไม่มีผลต่อลักษณะทางสัณฐานวิทยาของต้นและไม่สามารถตรวจสอบด้วยเทคนิคทางชีวเคมีอย่างง่ายทั่วไป

นอกจากนี้การแสดงลักษณะฟีโนไทป์ที่มีความเฉพาะเจาะจงกับเนื้อเยื่อพืชดังกล่าวที่พบได้จากพันธุ์กลายของยาสูบต้านทานไฮดรอกซียูเรีย (hydroxyurea) โดยแคลลัสจากต้นลูกของต้นที่ได้รับไฮดรอกซียูเรียมีการกลายเกิดขึ้นแบบตำแหน่งเดียวและการกระจายเป็นไปตามกฎของเมนเดล แต่อย่างไรก็ตามเมื่อตรวจสอบการงอกของเมล็ดจากต้นกลายพันธุ์พบว่าอ่อนแอต่อไฮดรอกซียูเรียมากกว่าเมล็ดพืชปกติแต่ต้นที่ได้มีลักษณะสัณฐานวิทยาเหมือนต้นปกติ เนื่องจากลักษณะความต้านทานไฮดรอกซียูเรียที่เปลี่ยนไปนั้นมีการแสดงออกในระดับแคลลัสเท่านั้น

อย่างไรก็ตามในทางตรงข้ามกับหัวข้อที่กล่าวมาแล้วจะพบว่ามียีนที่ควบคุมลักษณะบางอย่างซึ่งแสดงออกในต้นพืชแต่ไม่ปรากฏในเซลล์เพาะเลี้ยง จึงไม่สามารถคัดเลือกพันธุ์กลายจากเซลล์ได้ เนื่องจากเนื้อเยื่อและอวัยวะที่เปลี่ยนสภาพหลายชนิดไม่ปรากฏในการเพาะเลี้ยงเซลล์ เช่น ใบ ดอก เมล็ด เป็นต้น ดังนั้นยีนที่อยู่ในอวัยวะเหล่านั้นจึงไม่สามารถแสดงออกในสภาพเพาะเลี้ยงดังกล่าว มีรายงานตัวอย่างพืชจำนวนมากที่มีความต้านทานต่อโรคซึ่งได้จากการคัดเลือกระดับเซลล์และต้นพืชดังแสดงในตารางที่ 7.2

ตารางที่ 7.2 ตัวอย่างชนิดพืชต้านทานโรคที่ได้จากการคัดเลือกทั้งระดับเซลล์และต้นพืช
(ดัดแปลงจาก Bhojwani และ Razdan, 1996)

ชนิดพืช	เชื้อสาเหตุโรค
การคัดเลือกระดับเซลล์	
อัลฟาฟา	<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp.medicaginis
ข้าวบาร์เลย์	<i>Helminthosporium sativum</i>
มะเขือม่วง	Microplasma-like organism
ข้าวโพด	<i>H. maydis</i>
ข้าวโอ๊ต	<i>H. victoriae</i>
เรพ	<i>Phoma lingam</i>
ข้าว	<i>H. oryzae</i>
อ้อย	<i>H. sacchari</i>
ยาสูบ	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. tabaci
ยาสูบ	Tobacco mosaic virus
มะเขือเทศ	<i>F. oxysporum</i> f.sp.lycopersici
มะเขือเทศ	Tobacco mosaic virus
ข้าวสาลี	<i>H. sativum</i>
การคัดเลือกระดับต้น	
กล้วย	<i>F. oxysporum</i> f.sp.cubense
เซเรอรี	<i>F. oxysporum</i> f.sp. apii
ข้าวโพด	<i>H. maydis</i>
พืช	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. pruni
มันฝรั่ง	<i>Alternaria solani</i>
มันฝรั่ง	<i>Phytophthora infestans</i>
มันฝรั่ง	Potato virus X, Potato virus Y
มันฝรั่ง	<i>Streptomyces scabies</i>

ตารางที่ 7.2 ตัวอย่างชนิดพืชต้านทานโรคที่ได้จากการคัดเลือกทั้งระดับเซลล์และต้นพืช
(ต่อ) (ดัดแปลงจาก Bhojwani และ Razdan, 1996)

ชนิดพืช	เชื้อสาเหตุโรค
การคัดเลือกระดับต้น	
เรพ	<i>Phoma lingam</i>
ข้าว	<i>H. oryzae</i>
สตรอเบอร์รี่	<i>F. oxysporum f.sp.fragariae</i>
อ้อย	<i>Fiji virus</i>
มะเขือเทศ	Tobacco mosaic virus
มะเขือเทศ	<i>F. oxysporum f.sp.lycopersici race 2</i>

อย่างไรก็ตามลักษณะบางประการของพืชไม่สามารถคัดเลือกได้จากเซลล์เพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ เช่น จำนวนปากใบ สีและรูปร่างของดอก เป็นต้น นอกจากนี้การเปลี่ยนแปลงลักษณะบางอย่างที่เกิดจากการรวมกันของโครงสร้างหลายชนิดและหน้าที่ของพืชทั้งต้น เช่น ผลผลิตและความต้านทานโรคพืช เป็นต้น จึงอาจกล่าวได้ว่าระบบการเพาะเลี้ยงเซลล์เป็นอุปสรรคในการคัดเลือกพันธุ์กลายหลายๆ ชนิด แต่ความสำเร็จในการคัดเลือกสายพันธุ์กลายโดยอาศัยการเพาะเลี้ยงเซลล์ก็มีโอกาสเป็นไปได้สูงเช่นกัน ดังที่พบจากเซลล์ยาสูบซึ่งมีความอ่อนแอต่อสารกำจัดวัชพืชชนิดต่างๆ ได้แก่ พิคลอรแอม (picloram) เบนทาโซน (bentazol) และ เฟนมีดิฟาร์ม (phenmedipharm) เมื่อเซลล์ดังกล่าวพัฒนาไปเป็นต้นยังคงปรากฏลักษณะอ่อนแออยู่ ดังนั้นจึงสามารถทำการคัดเลือกสายพันธุ์ทนทานได้โดยตรงตั้งแต่ระดับเซลล์ เป็นต้น