บทที่ 4

วิจารณ์และสรุปผลการทดลอง

4.1 การยับยั้งการแสดงออกของจีน NPT

การศึกษาการแสดงออกของจีน NPT ในเมล็ดพืชรุ่น R_3 ที่กำลังงอก ในสารอาหารคัดเลือกกึ่งแข็ง MS ที่มีคานาไมซิน 100 mg/ml (ตารางที่ 2) พบว่าถึงแม้จะเป็นเมล็ดรุ่น R_3 ที่ได้มาจากต้นรุ่น R_2 ซึ่งมาจากการทำ selfing ของต้นรุ่น R_1 ซึ่งมีการแสดงออกของจีนดังกล่าวเป็นแบบ monogenic heterozygous มาตั้งแต่แรกเริ่ม โดยปกติแล้วการแสดงออกของจีนดังกล่าวในรุ่น R_2 จะต้องมีเพียง 2 แบบ คือ อยู่ในรูปแบบของ homozygous ($Km^R Km^R$) หรือ heterozygous ($Km^R Km^-$) ดังนั้นเมล็ดที่ได้จากการทำ selfing ของพืชรุ่น R_2 ในโคลนนี้จึงน่าจะมีการถ่ายทอดของจีน NPT 2 แบบ คือ

แบบที่ 1 มีการกระจายของลักษณะเมล็ดที่กำลังงอก บนสารอาหารคัดเลือกกึ่งแข็ง MS ที่มีคานาไมซิน 100 mg/ml ; $Km^R : Km^- = 3:1$ ถ้าเป็นเมล็ดที่เกิดจากต้น R_2 ที่เป็น heterozygous

แบบที่ 2 มีการกระจายของลักษณะเมล็ดที่กำลังงอก บนสารอาหารคัดเลือกกึ่งแข็ง MS ที่มีคานาไมซิน 100 mg/ml ; $Km^R : Km^- = 1:0$ ถ้าเป็นเมล็ดที่เกิดจากต้น R_2 ที่เป็น homozygous

แต่จากผลการทดลองปรากฏว่ามีการแสดงออกปกติจำนวน 4 ตัวอย่าง โดยมีลักษณะที่เป็น homozygous จำนวน 2 ตัวอย่าง และแบบ heterozygous จำนวน 2 ตัวอย่าง โดยที่เหลือ มีการแสดงออกลดน้อยลงไปจากปกติ โดยลดลงจาก homozygous จำนวน 9 ตัวอย่าง (> 3:1 , < 1:0) และลดลงจาก heterozygous จำนวน 9 ตัวอย่าง (< 3:1 , > 0:1)

จากผลการศึกษาดังกล่าวแสดงว่า มีการยับยั้งการแสดงออกของจีน NPT ที่สอดใส่เข้าไปในจีโนมของพืช ซึ่งการยับยั้งการแสดงออกของจีน NPT นี้ มีทั้งแบบที่เป็นการยับยั้งเพียงบางส่วน (partial inactivation) และแบบที่เป็นการยับยั้งทั้งหมด (complete incctivation) ซึ่งเป็นที่น่าสังเกตว่า ในตัวอย่างพืชโคลนนี้ในรุ่น R_3 มีสัดส่วนที่ยังคงมีการแสดงออกของจีน NPT เป็นปกติเพียง 15.4 %

ผลการทดลองส่วนนี้ชี้ให้เห็นว่า โอกาสของการเกิดการยับยั้งการแสดงออกของจีนในพืชชนิดนี้อาจมีมากขึ้น ถ้าพืชทดลองมีจำนวน generation มากขึ้น

ซึ่งกลไกการยับยั้งการแสดงออกของจีนดังกล่าวนี้ เป็นสิ่งที่ผู้ทำการวิจัยได้เลือกเอาวิธี การลดระดับหมู่อนุมูลเมธิล (demethylation) โดยการใช้สาร 5-azacytidine ซึ่งเป็นสารลดระดับการเติมหมู่อนุมูลเมทธิล (demethylating agent) ที่ไซโตซีน (Santi et al., 1983) มาเป็นตัวช่วยในการพิสูจน์และตรวจสอบถึงสาเหตุของการเกิดการยับยั้งการแสดงออกของจีนดังกล่าว

4.2 ผลของ 5-azacytidine ต่อการกระตุ้นการแสดงออกของจีน NPT ที่ถูกยับยั้ง

ในการทดลองเบื้องต้น เพื่อหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ 5-azacytidine สำหรับการใช้กับเมล็ดที่กำลังงอกของพืชทดลอง โดยไม่ก่อให้เกิดความผิดปกติต่อการงอกและการเจริญเติบโตของเมล็ด และไม่เป็นการรบกวนต่อการแสดงออกของจีน NPT ในตัวอย่างพืชที่มีการแสดงออกของจีน NPT เป็นปกติอยู่แล้ว ผลปรากฏว่า ที่ความเข้มข้นของ 5-azacytidine ขนาด 100 μM เป็นความเข้มข้นที่ให้ผลในการกระตุ้นการแสดงออกของจีน

NPT ได้ดีที่สุด ต่อเมล็ดพืชที่กำลังงอกในสารอาหารคัดเลือกกึ่งแข็ง MS ที่มีคานาไมซิน 100 mg/ml

ดังนั้นในการทดลองครั้งต่อไปจึงได้ใช้ 5-azacytidine ที่ความเข้มข้น 100 μM โดยตลอด เป็นที่น่าสังเกตว่า ในการทดลองกับพืชชนิดนี้ คือยาสูบ ความเข้มข้นที่เหมาะสมของ 5-azacytidine ในการกระตุ้นการแสดงออกของจีน NPT ที่ถูกยับยั้งการแสดงออกให้กลับมาแสดงออกได้ใหม่นั้น คือที่ความเข้มข้น 100 μM เป็นเวลา 4 สัปดาห์ ซึ่งความเข้มข้นที่เหมาะสมที่ใช้ในการกระตุ้นการแสดงออกของจีนในพืชแต่ละชนิดนั้น จะมีความแตกต่างกันไป เช่น Weber และคณะ (1990) ได้ทดลองให้ 5-azacytidine เข้มข้น 10 ถึง 20 μM เป็นเวลา 10 วัน แก่แคลลัสของยาสูบ สามารถกระตุ้นให้จีนที่เคยถูกยับยั้ง กลับมาแสดงออกได้ใหม่และพบว่าหากได้รับความเข้มข้นของ 5-azacytidine ที่สูงกว่านี้ และระยะเวลาในการได้รับยาวนานกว่านี้ จะส่งผลให้เกิดการยับยั้งการแบ่งเซลล์และทำให้เซลล์ตาย หรือในการทดลองของ Amasino และคณะ (1984) ได้ใช้ความเข้มข้นของ 5-azacytidine ที่สูงขึ้น แต่ลดระยะเวลาในการให้ได้รับสารชนิดนี้ลงคือ ให้แคลลัสของยาสูบได้รับ 5-azacytidine ที่ความเข้มข้น 100 μM เป็นเวลา 48 ชั่วโมง สามารถที่จะกระตุ้นการแสดงออกของจีนได้ และการทดลองในข้าวโพดและข้าว โดย Sano และคณะ (1989, 1990) โดยให้สาร 5-azacytidine เพื่อศึกษาการแสดงออกของลักษณะบางประการ พบว่าความเข้มข้นและเวลาที่เหมาะสมคือ 300 μM เป็นเวลา 3 วัน ดังนั้นจะเห็นได้ว่า การใช้ 5-azacytidine ในการกระตุ้นให้เกิดการแสดงออกของจีนนั้น จะมีความเข้มข้นและระยะเวลาที่เหมาะสมแตกต่างกันไป ทั้งนี้ขึ้นกับชนิดของพืชนั้นๆ รวมทั้งชนิดของเนื้อเยื่อพืชที่ให้ได้รับสารชนิดนี้ด้วย

อย่างไรก็ตามเมื่อมีการเก็บข้อมูล ถึงความผิดปกติในการเจริญเติบโตของพืชทดลองภายหลังการได้รับ 5-azacytidine ปรากฏว่าในระยะเมล็ดที่กำลังงอก ไม่สามารถตรวจพบความผิดปกติ แต่เมื่อมีการนำพืชทดลองดังกล่าวไปปลูกในเรือนเพาะชำ พบว่ามีความผิดปกติเกิดขึ้น ซึ่งอาจเป็น albino บางส่วน รูปร่างลำต้น ใบ และดอก ผิดปกติ และพบว่ามี

การแตกกิ่งก้านมากกว่าปกติ ทั้งนี้อาจเนื่องจากว่า 5-azacytidine จัดเป็นสารมิวทาเจนอย่างอ่อน (weak mutagen) (Holliday, 1987) ซึ่งอาจก่อให้เกิดลักษณะมิวแตนท์ขึ้นได้ซึ่งลักษณะที่เกิดขึ้นใหม่นี้อาจเป็นประโยชน์ในการพัฒนาด้านการเกษตรเพื่อให้ได้พืชลักษณะใหม่ ถ้าหากว่าการเปลี่ยนแปลงลักษณะที่เกิดขึ้นนี้จะสามารถคงอยู่ไปจนถึงรุ่นลูกหลานได้

และจากข้อสังเกตเรื่องการแตกกิ่งก้านมากกว่าปกติภายหลังการได้รับสาร 5-azacytidine ได้มีการนำไปประยุกต์ใช้ในงานวิจัย เกี่ยวกับการกระตุ้นให้เกิดการแตกกอและลักษณะต้นเตี้ย ในต้นข้าวเป็นผลสำเร็จ โดยทรงศักดิ์ (2536) ได้รายงานว่า ภายหลังการให้สารลดระดับการเติมหมู่อนุมูลเมทธิลที่เบสไซโตซีนที่ดีเอ็นเอ คือ 5-azacytidine ความเข้มข้น 25 μM แก่เมล็ดข้าว (*Oryza sativa* Linn.) แก่ข้าวพันธุ์ กข23 เหลืองประทิว 123 และขาวดอกมะลิ 105 ในสภาพ *in vitro* เป็นเวลา 20 วัน ได้ข้าวลักษณะต้นเตี้ยลง และแตกกอเร็ว เมื่อข้าวเจริญเติบโตเต็มที่ พบลักษณะต้นเตี้ยและแตกกอมาก

จากการทดลองนี้เมื่อให้เมล็ดพืชที่กำลังงอก ได้รับสาร 5-azacytidine ที่ความเข้มข้น 100 μM ผลปรากฏว่า พืชทดลองที่เกิดการยับยั้งการแสดงออกของจีน NPT จะมีระดับการกลับมาแสดงออกได้ใหม่แตกต่างกันไป ในกลุ่มพืชทดลองที่จีน NPT ถูกยับยั้ง บางส่วน (ตารางที่ 4) เมื่อได้รับ 100 μM 5-azacytidine จะมีการกลับมาแสดงออกของจีน NPT เพิ่มขึ้นบางส่วน (หมายเลข 22) , เพิ่มขึ้นเกือบทั้งหมด (หมายเลข 19) หรือเพิ่มขึ้นทั้งหมด (หมายเลข 1) หรือในกลุ่มพืชทดลองที่จีน NPT ถูกยับยั้งทั้งหมด (ตารางที่ 4) เมื่อให้ได้รับ 100 μM 5-azacytidine เพื่อกระตุ้นการแสดงออกของจีน NPT จะพบการแสดงออกของจีน NPT เพิ่มขึ้นบางส่วน ซึ่งการเพิ่มขึ้นบางส่วนนี้จะมีสัดส่วนที่แตกต่างกันไปในแต่ละตัวอย่าง และเมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มพืชทดลองที่จีน NPT ถูกยับยั้งบางส่วน และกลุ่มพืชทดลองที่จีน NPT ถูกยับยั้งทั้งหมด เมื่อได้รับ 100 μM 5-azacytidine พบว่ากลุ่มพืชทดลองที่จีน NPT ถูกยับยั้งบางส่วน จะมีการกลับมาแสดงออกของจีน NPT ได้ใหม่ มากกว่าในกลุ่มพืชทดลองที่จีน NPT ถูกยับยั้งทั้งหมด ดังนั้นจะเห็นว่า

การกลับมาแสดงออกของจีน NPT ได้ใหม่นี้ จะมีตั้งแต่ การกลับมาแสดงออกในปริมาณน้อย (0.10 : 1) ไปจนถึงการกลับมาแสดงออกได้มากที่สุดถึง 100 % (1.0 : 1)

ผลการทดลองดังกล่าวแสดงว่า 5-azacytidine มีผลในการกระตุ้นการแสดงออกของจีน NPT ที่ถูกยับยั้งการแสดงออกให้สามารถกลับมาแสดงออกได้ใหม่ แต่ในการกระตุ้นการแสดงออกนี้ จะมีความแตกต่างในการตอบสนองต่อ 5-azacytidine ของพืชต่างสับโคลนกัน ทั้งนี้อาจเป็นเพราะระดับของเมทธิลเลชันในพืชดังกล่าวแตกต่างกัน หรือถึงแม้จะมีระดับของเมทธิลเลชันใกล้เคียงกัน แต่ก็อาจตอบสนองต่อ 5-azacytidine ได้แตกต่างกัน Sano และคณะ (1990) กล่าวว่า การลดระดับการเติมหมู่อนุมูลเมทธิลที่ดีเอ็นเอโดยการใช้สารชนิดนี้ ที่เกิดขึ้นในแต่ละเซลล์นั้นจะเกิดขึ้นแบบสุ่ม ดังนั้นผลของการลดระดับหมู่อนุมูลเมทธิลในแต่ละเซลล์จะแตกต่างกันไป

เป็นที่น่าสังเกตว่า การลด lethal effect ของคานาไมซิน ซึ่งเป็นสารที่ใช้ในการคัดเลือก จาก 100 mg/ml มาเป็น 50 mg/ml ผลปรากฏว่า ที่ความเข้มข้นดังกล่าวสามารถยับยั้งการเจริญของเมล็ดพืชที่ไม่มีจีน NPT หรือมีจีน NPT แต่ไม่แสดงออกได้ช้ากว่าที่ความเข้มข้น 100 mg/ml ผลของคานาไมซินที่แสดงออกมาได้น้อยกว่าที่ระดับความเข้มข้น 100 mg/ml นี่เองที่ช่วยทำให้ผลของ 5-azacytidine ในการกระตุ้นการแสดงออกของจีน NPT กลับมามีผลได้มากขึ้นในพืชที่ได้รับสารชนิดนี้เข้าไป

4.3 การแสดงออกของจีน NPT ในประชากรเมล็ดรุ่นต่อไป (R_4) ภายหลังการได้รับ 5-azacytidine

จากการศึกษาการกระจายของลักษณะ Km^R : Km^S ในเมล็ดพืชรุ่น R_4 ในสารอาหารคัดเลือกกึ่งแข็ง MS ที่มีคานาไมซิน 100 mg/ml ปรากฏว่าเมล็ดพืชรุ่นดังกล่าวถึงแม้จะสร้างมาจากต้นที่ถูกกระตุ้นให้จีน NPT ที่เคยถูกยับยั้งการแสดงออกให้กลับมาแสดงออกด้วย 5-azacytidine แต่ในรุ่นต่อมากลับมีการแสดงออกของจีน NPT ได้น้อยลงอีก (ตารางที่ 5 และ 6)

ผลการทดลองดังกล่าวแสดงว่า ผลในการลดระดับการเติมหมู่อนุมูลเมทธิล (demethylation effect) ในพืชชนิดนี้โดยการให้ได้รับ 5-azacytidine ในระยะหนึ่ง อาจไม่มีผลต่อเนื่องไปจนถึงประชากรในรุ่นต่อไป ดังนั้นถ้าต้องการกระตุ้นให้จีนที่ได้รับการถ่ายเข้าไปในพืชมีการแสดงออกตลอดเวลา อาจต้องใช้วิธีการที่ให้เนื้อเยื่อพืชได้รับ 5-azacytidine ตลอดเวลา

4.4 ผลของการกระตุ้นด้วย 5-azacytidine สิ้นสุดลงเมื่อใด

เป็นเรื่องที่น่าสนใจถ้าจะศึกษาให้รู้ว่า การได้รับ 5-azacytidine ในเมล็ดที่กำลังงอกเป็นเวลาประมาณ 1 เดือน แล้วไม่ได้รับสารดังกล่าวอีก จะมีผลต่อการแสดงออกของจีน NPT ในพืชอย่างไร

การทดลองโดยการทำ rooting test จากยอดพืชทดลองที่ปลูกในเรือนเพาะชำ ระยะก่อนออกดอก (ตารางที่ 7) ปรากฏว่าเกือบทั้งหมดสูญเสียความสามารถในการแสดงออกของจีน NPT ตั้งแต่ระยะก่อนออกดอก แสดงว่าการยับยั้งการแสดงอออกของจีน NPT ในพืชชนิดนี้ โดยกระบวนการเมทธิลเลชัน สามารถเกิดขึ้นได้ใหม่อีกครั้ง ภายหลังที่เนื้อเยื่อพืชไม่ได้รับ 5-azacytidine อย่างต่อเนื่อง ซึ่งผลการทดลองจุดนี้สอดคล้องกับการศึกษาของ Meyer และคณะ (1992) ซึ่งพบว่าการเกิดเมทธิลเลชัน จะมีโอกาสเกิดได้มากขึ้นตามจำนวนครั้งของการแบ่งเซลล์ที่เพิ่มมากขึ้น และการเกิดดีเอ็นเอเมทธิลเลชันนี้ สามารถที่จะเกิดขึ้นได้ในระยะใดระยะหนึ่งในช่วงวงจรชีวิตของพืช

นอกจากนี้ผลการทดลองจุดนี้ ยังเป็นสิ่งที่ช่วยอธิบายถึงการที่เมล็ดพืชตัวอย่างรุ่น R_4 ส่วนใหญ่สูญเสียการแสดงออกของจีน NPT ไปตั้งแต่ก่อนที่จะมีการสร้างเมล็ดดังกล่าวขึ้นมา หรืออีกนัยหนึ่งก็คือ เซลล์ที่จะเป็นตัวเริ่มสร้างเมล็ดได้สูญเสียการแสดงออกของจีน NPT ไปก่อนหน้านี้แล้ว

4.5 รูปแบบของดีเอ็นเอก่อนและหลังการกระตุ้นด้วย 5-azacytidine

ผลการศึกษา Southern blot analysis ของจีโนมิคดีเอ็นเอในพืชทดลองรุ่น

R_2 และ R_3 ปรากฏว่าทั้งตัวอย่างที่มีการแสดงออกของจีน NPT เป็นปกติ หรือมีการยับยั้งการแสดงออกของจีน NPT บางส่วน หรือมีการยับยั้งการแสดงออกของจีน NPT ทั้งหมด ยังคงมี functional copy ของจีน NPT อยู่เป็นปกติ (รูปที่ 25) ผลการทดลองในส่วนนี้จึงเป็นการช่วยชี้ว่า การที่จีน NPT ไม่แสดงออกหรือมีการแสดงออกเพียงบางส่วนในตัวอย่างพืชที่นำมาศึกษา ไม่ได้เกิดจากการสูญเสียชิ้นส่วนของจีน NPT ออกไปจากจีโนมของพืช หรือเกิดจากการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของจีน NPT ในจีโนมพืช

เมื่อทำการศึกษาโดยการใช้ isoschizomeric enzymes; MspI , HpaII ซึ่งสามารถบอกความแตกต่าง ของการเกิดดีเอ็นเอเมทธิลเลชันได้ โดยจะมีการตอบสนองต่อดีเอ็นเอที่เกิดเมทธิลเลชันได้ต่างกัน โดย MspI สามารถตัดตำแหน่งจำเพาะได้ไม่ว่าจะเกิดเมทธิลเลชันตรงจุดนั้นหรือไม่ก็ตาม ในขณะที่ HpaII จะไม่ตัดถ้าเกิดเมทธิลเลชันตรงจุดดังกล่าว ความแตกต่างของรูปแบบดีเอ็นเอ ภายหลังการตรวจสอบด้วยโพรบ 1.6 kb EcoRI fragment ของพลาสมิด pGP6 (sequence ของจีน NPT) ระหว่างตัวอย่างจีโนมิคดีเอ็นเอ ของพืชทดลองที่มีการแสดงออกของจีน NPT ต่างกัน โดยกลุ่มที่จีน NPT ถูกยับยั้งมีการตอบสนองต่อการตัดด้วยเอนไซม์ HpaII มากที่สุด ซึ่งจะสังเกตเห็นว่ามีชิ้นส่วนของดีเอ็นเอโมเลกุลใหญ่ที่ตอบสนองต่อโพรบดังกล่าวเพิ่มขึ้นมาก ในขณะที่ตัวอย่างที่มีการแสดงออกของจีน NPT เป็นปกติ มีการตอบสนองต่อการตัดด้วยเอนไซม์ HpaII น้อย ภายหลังการตรวจสอบด้วยโพรบ โดยมีชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่ระดับโมเลกุลต่ำกว่า ซึ่งแสดงว่าการเกิดการยับยั้งการแสดงออกของจีน NPT ในตัวอย่างพืชที่นำมาศึกษา น่าจะเกี่ยวข้องกับการเกิดเมทธิลเลชันที่ดีเอ็นเอของจีน NPT ในตัวอย่างพืชดังกล่าว

นอกจากนี้การตอบสนองของเมล็ดพืชที่กำลังงอก จากตัวอย่างที่จีน NPT ถูกยับยั้งบางส่วนหรือทั้งหมด ต่อ 5-azacytidine โดยการกลับมาแสดงออกได้มากขึ้นจนถึงขั้นแสดงออกได้ทั้งหมด ผลการทดลองตรงจุดนี้จึงเป็นสิ่งช่วยยืนยันว่า การยับยั้งการแสดงออกของจีนดังกล่าว น่าจะเกิดจากกระบวนการเมทธิเลชันที่จีน NPT ที่สอดแทรกอยู่ในจีโนมพืช ซึ่งผลการทดลองนี้สอดคล้องกับการศึกษาของ Renkens และคณะ (1992) ซึ่งสรุปว่า

ดีเอ็นเอเมทธิลเลชันเป็นสาเหตุสำคัญ ในการทำให้จีนที่ถ่ายเข้าไปในเซลล์พืชไม่สามารถแสดงออกได้ตามปกติ

ในการศึกษาครั้งนี้ ไม่มีข้อมูลของ Southern blot analysis ของจีน NPT ที่กลับมาแสดงออกได้ใหม่ เนื่องจากการทดลองในส่วนอื่น (ทั้งการทำ rooting test และการศึกษาสัดส่วนการกระจายของลักษณะ Km^R : Km^S ในเมล็ดรุ่น R_4) บ่งบอกว่า จีน NPT ที่เคยถูกกระตุ้นให้กลับมาแสดงออกได้ใหม่ด้วย 5-azacytidine กลับไปถูกยับยั้งการแสดงออกได้อีก ก่อนกระบวนการสร้างดอกเมื่อสร้างประชากรรุ่นต่อไป ซึ่งมีความเป็นไปได้ว่า อาจเกิดเมทธิลเลชันที่จีน NPT ได้อย่างรวดเร็ว ภายหลังจากที่เลิกกระตุ้นด้วย 5-azacytidine

สรุปผลการทดลอง

จากการทดลองดังกล่าวสามารถสรุปผลได้ดังนี้

1. มีความเบี่ยงเบนของการกระจายลักษณะการแสดงออกของจีน NPT ในประชากรเมล็ดรุ่น R_3 ทั้งๆที่เจริญมาจากโคลนดั้งเดิมเดียวกัน แสดงว่าเกิดการยับยั้งการแสดงออกของจีน NPT ในระดับต่างๆกันในประชากรดังกล่าว

2. จากการตรวจสอบ functional copy ของจีน NPT ด้วย α-^{32}P labelled EcoRI fragment ของ pGP6 ซึ่งเป็น sequence ของจีน NPT พบว่าทุกตัวอย่างพืชยังคงมีจีน NPT อยู่ในรูปแบบเดียวกัน ซึ่งแสดงว่าไม่มีการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพของชิ้นส่วนดีเอ็นเอดังกล่าว

3. จากการตรวจสอบด้วย isoschizomeric enzymes ; MspI และ HpaII แล้วโพรบด้วยชิ้นส่วนที่เป็น sequence ของจีน NPT พบว่ามีความแตกต่างของสัญญาณ autoradiogram แสดงว่าน่าจะเกี่ยวข้องกับกระบวนการเมทธิลเลชันของดีเอ็นเอ

4. ความเข้มข้นที่เหมาะสมของ 5-azacytidine ที่เหมาะสมในการใช้กับพืชชนิดนี้เมื่อกระตุ้นให้จีน NPT ที่ถูกยับยั้งการแสดงออกกลับมาแสดงออกได้ใหม่ คือที่ความเข้มข้น 100 μM

5. 5-azacytidine ซึ่งเป็นสารลดระดับการเติมหมู่อนุมูลเมทธิล (demethylating agent) มีผลต่อการกระตุ้นให้จีน NPT ที่ถูกยับยั้งการแสดงออก ให้สามารถกลับมาแสดงออกได้ใหม่ ซึ่งเป็นสิ่งหนึ่งที่ช่วยพิสูจน์ว่า การเกิดการยับยั้งการแสดงออกของจีน NPT ที่ถ่ายเข้าสู่เซลล์พืชชนิดนี้ เกิดขึ้นเนื่องจาก การเติมหมู่อนุมูลเมทธิลที่จีน NPT ของพืชทดลองดังกล่าว

6. ผลการกระตุ้นการแสดงออกของจีน NPT ที่ถูกยับยั้งโดยการใช้สาร 5-azacytidine จะมีระดับการกลับมาแสดงออกของจีน NPT ได้ใหม่ไม่เท่ากัน ถึงแม้จะมีระดับการยับยั้งการแสดงออกของจีน NPT อยู่ในระดับเดียวกันก็ตาม ซึ่งการแสดงออกนี้จะแปรผันได้ในแต่ละตัวอย่างที่นำทำการศึกษา แสดงว่าผลการกระตุ้นของสารชนิดนี้ยังแตกต่าง

กันได้ ถึงแม้จะเป็นประชากรเดียวกันของพืชทดลองก็ตาม ซึ่งผลดังกล่าวอาจเนื่องมาจากความแตกต่างในสรีระ หรือความแปรผันในพันธุกรรมภายในเซลล์ของพืชดังกล่าว

7. ผลของ 5-azacytidine ในการกระตุ้นการแสดงออกของจีน NPT ในพืชชนิดนี้ มีส่วนหนึ่งที่ไม่มีผลต่อประชากรรุ่นต่อไป แต่ในขณะเดียวกันในประชากรรุ่นต่อไปบางส่วนก็ยังคงมีการแสดงออกของจีน NPT ที่เกิดจากการกระตุ้นโดย 5-azacytidine ได้ในระดับหนึ่ง แสดงว่ากลไกการเกิดการเติมหมู่อนุมูลเมทธิล และการลดระดับการเติมหมู่อนุมูลเมทธิลที่เกิดขึ้นในพืชชนิดนี้ เป็นกลไกที่ผันกลับได้ ซึ่งเป็นสิ่งที่น่าสนใจศึกษาว่า องค์ประกอบใดภายในเซลล์หรือจีโนมของพืช ที่มีอิทธิพลต่อปรากฏการณ์ดังกล่าว เพราะจะช่วยให้การนำสารชนิดนี้มาใช้เป็นสารกระตุ้นจีนที่ถูกกดการทำงานให้กลับมาทำงานได้ใหม่ได้ผลมากยิ่งขึ้น

การนำผลการทดลองไปประยุกต์ใช้

1. จากการสังเกตว่า 5-azacytidine สามารถมีผลในการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของลำต้น, ใบ และ ดอก ของพืชทดลองได้บางส่วน ดังนั้น 5-azacytidine จึงน่าจะเป็นสารที่มีผลในการนำไปใช้ในการกระตุ้น ให้เกิดการเปลี่ยนแปลงลักษณะบางประการในพืชได้ แต่ทั้งนี้ จะต้องศึกษาว่าการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นจะเป็นแบบผันกลับได้ หรือเป็นการเปลี่ยนแปลงแบบถาวร และการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวมีประโยชน์ต่อพืช ทั้งทางตรงและทางอ้อมหรือไม่

2. เนื่องจาก 5-azacytidine มีผลกระตุ้นการแสดงออกของจีนที่ถูกยับยั้งให้กลับมาแสดงออกได้ใหม่ ดังนั้นสารชนิดนี้ จึงอาจเป็นสารที่มีแนะนำให้เติมลงในสารอาหารสำหรับ transgenic plant เป็นระยะๆ ในขณะที่เก็บสายพันธุ์อยู่ในสภาพ *in vitro* ทั้งนี้ก็เพื่อ ป้องกันการเกิดการเติมหมู่อนุมูลเมทธิลดังกล่าว ทั้งนี้จะต้องใช้ขนาดความเข้มข้นที่เหมาะสม เพื่อไม่ให้ถึงระดับที่ก่อให้เกิดความผิดปกติกับโครงสร้างทางกายภาพของพืชดังกล่าว