

## กระบวนการผันแปรทางพันธุกรรมที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

สาเหตุของการเกิดการผันแปรทางพันธุกรรมที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชนับตั้งแต่ Steward ในปี ค.ศ.1958 แสดงให้เห็นว่าสามารถชักนำให้เซลล์หรือเนื้อเยื่อพืชที่เพาะเลี้ยงไว้เกิดเป็นต้นที่สมบูรณ์ได้ ทำให้การใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเพื่อ การขยายพันธุ์ (clonal propagation หรือ micropropagation) ได้รับความสนใจและถูกพัฒนาให้มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งในพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจหลายชนิดโดยหลักการของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเพื่อขยายพันธุ์นั้น ต้นที่ได้เหล่านี้ควรจะมีพันธุกรรม (ยีนไทป์) ที่เหมือนต้นแม่ทุกประการ แต่ในทางปฏิบัติพบว่ามีต้นที่มีฟีโนไทป์เปลี่ยนแปลงไปเกิดขึ้นในขั้นตอนการเพาะเลี้ยง โดยเกิดเซลล์หรือเนื้อเยื่อที่มีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างได้มากหรือน้อยขึ้นกับสภาพเงื่อนไขของการเพาะเลี้ยงและสูตรอาหารที่ใช้ เซลล์และเนื้อเยื่อเหล่านี้ต่อไปจะมีการเพิ่มจำนวนและพัฒนาผ่านกระบวนการกำเนิดเป็นคัพภะ/อวัยวะ เป็นต้นที่สมบูรณ์ในที่สุด และแตกต่างกันไปในพืชแต่ละชนิด ซึ่งแต่เดิมเชื่อว่าอาจเป็นผลมาจากอิทธิพลของฮอร์โมนที่ใส่ในอาหารเพาะเลี้ยง (exogenous phytohormones) และน่าจะเป็นลักษณะที่ไม่สามารถถ่ายทอดทางพันธุกรรมไปยังรุ่นลูกได้แต่ต่อมาหลักฐานชี้ว่าความเข้าใจดังกล่าวคลาดเคลื่อนและไม่ถูกต้องทีเดียวนัก เนื่องจากฟีโนไทป์ที่เปลี่ยนแปลงไปนี้ บางลักษณะเกิดจากการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมที่สามารถถ่ายทอดได้ และบางลักษณะมีความสำคัญทางเศรษฐกิจในพืชหลายชนิด ความสำคัญของความแปรปรวนทางพันธุกรรม ที่เกิดขึ้นเองในระหว่างการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเริ่มเป็นที่สนใจในครั้งแรกเมื่อพบว่า ลักษณะฟีโนไทป์ที่เปลี่ยนแปลงไปนี้ในพืชสวนหลายชนิด เป็นการเปลี่ยนแปลงของยีนไทป์ ซึ่งก่อให้เกิดประโยชน์ในการปรับปรุงลักษณะนั้น ๆ และเรียกพืชที่ได้ชื่อว่า calliclones หรือ clonal variants ต่อมาเมื่อผู้แสดงให้เห็นถึงความแปรปรวนทางพันธุกรรมหลากหลายชนิด ที่เกิดขึ้นได้ในต้นพืชที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ พืชเหล่านี้นิยมเรียกว่าทั่ว ๆ ไปว่า protoclonal จากการพบในการเพาะเลี้ยง โพรโทพลาสต์ของใบมันฝรั่ง ซึ่งเชื่อกันว่าความแปรปรวน (somaclonal variation) ดังนี้ น่าจะมีบทบาทที่สำคัญอย่างยิ่งในแง่เป็นแหล่งความแปรปรวนทางพันธุกรรมของพืชต่อไปในอนาคต

### สาเหตุของการเกิดความแปรปรวน

เชื่อกันว่าการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมอย่างฉับพลัน หรือการกลายพันธุ์ (mutation) ที่เกิดขึ้นเองของเซลล์ร่างกาย (somatic cells) หรือเนื้อเยื่อที่กำลังเพาะเลี้ยงก่อนการชักนำให้เกิดเป็นต้น น่าจะเป็นสาเหตุสำคัญของการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรม (ยีนไทป์) และส่งผลให้เกิดความแปรปรวนที่แสดงออกมาให้เห็นทางฟีโนไทป์ และต้องเกี่ยวข้องกับ การเปลี่ยนแปลงของสารพันธุกรรม (genetic materials) กล่าวโดยทั่ว ๆ ไป คือ ยีนหรือดีเอ็นเอ และการเปลี่ยนแปลงกลไกการถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรม (mode of inheritance) ลักษณะที่เปลี่ยนแปลงไปเหล่านี้จะถูกถ่ายทอดไปยังรุ่นลูก โดยการสืบพันธุ์แบบมีเพศ (sexual transmission) ผ่านกระบวนการไมโอซิส เมื่อใดก็ตามที่การเปลี่ยนแปลงฟีโนไทป์ของพืชนั้น ๆ ไม่ได้เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงสารพันธุกรรม และไม่สามารถถ่ายทอดไปยังรุ่นลูกแล้ว การเปลี่ยนแปลงนั้นเรียกว่า epigenetic change ซึ่งมักหมายถึงการเปลี่ยนแปลงที่มีกลไกบางอย่างทำให้เซลล์พืชที่เพาะเลี้ยงผิดปกติไป แต่มีลักษณะไม่คงที่เมื่อเทียบกับการกลายพันธุ์ ดังนั้นบ่อยครั้งเมื่อชักนำให้เกิดเป็นต้นแล้ว ลักษณะดังกล่าวจะสูญหายไปโดยที่สุด ตัวอย่างการที่เซลล์หรือเนื้อเยื่อที่เพาะเลี้ยงสูญเสียความต้องการออกซินและไซโตไคนินไปชั่วขณะระหว่างการเพาะเลี้ยง หรือในกรณีความต้านทานของยาสูบต่อสาร cycloheximide ซึ่งเกิดขึ้นขณะเพาะเลี้ยงเซลล์หรือเนื้อเยื่อ เนื่องจากเกิดการเปลี่ยนแปลงกระบวนการต่าง ๆ ทางชีวเคมี ไปอยู่ในรูปที่ไม่ทำงาน ดังนั้นความเข้าใจถึงสาเหตุของการเกิดความแปรปรวนจึงเป็นสิ่งสำคัญ เพื่อกระตุ้นหรือส่งเสริมให้มีการชักนำให้เกิดความแปรปรวนทางพันธุกรรมมากยิ่งขึ้น และ เปิดโอกาสคัดเลือกได้ลักษณะที่ดีหรือเป็นที่ต้องการ ในขณะที่หากต้องการขยายพันธุ์พืชให้ยังคงมียีนไทป์เดิมโดยวิธีการ

เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแล้ว จำเป็นต้องหาทางจำกัดหรือควบคุมการเกิด ความแปรปรวนดังกล่าว ซึ่งอาจเกิดจากสาเหตุต่าง ๆ ดังนี้

1. การเปลี่ยนแปลงการแสดงออกโดยรวมของคาริโอไทป์ (gross karyotypic changes) เกิดขึ้นได้ทั้งในขณะเพาะเลี้ยงหรือเมื่อชักนำให้เกิดเป็นต้นแล้ว การเปลี่ยนแปลงโดยตรงต่อคาริโอไทป์ (ซึ่งหมายถึงลักษณะทางฟิสิกส์ของโครโมโซม เช่น จำนวน ขนาดและรูปร่าง ที่มีความจำเพาะเจาะจงในพืชแต่ละชนิด และสังเกตได้ง่ายใน ระยะ mitotic metaphase) นี้ดูเหมือนว่าจะเกิดกับเซลล์หรือเนื้อเยื่อที่เพาะเลี้ยง และทำให้ความสามารถในการเกิดเป็นต้นเปลี่ยนแปลงไป มากกว่าที่จะมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงพีโนไทป์ของพืช ตัวอย่าง มีรายงานว่าสามารถแยก protoclones จำนวน 5 สายพันธุ์ ที่ส่งผลให้มันฝรั่งให้ผลผลิต (หัว หรือ tuber) สูงขึ้น ทั้ง ๆ ที่ยังคงมีคาริโอไทป์เหมือนเดิม เช่นเดียวกับในกรณีของการแยก somaclones ของข้าวฟ่างที่มีคาริโอไทป์ปกติ แต่มีลักษณะของใบและการเจริญเติบโตที่ผิดปกติไป

2. การจัดเรียงตัวใหม่ของโครโมโซม (cryptic chromosomal rearrangements) ซึ่งเชื่อกันว่าจะเป็นสาเหตุสำคัญที่สุด เช่น ความแปรปรวนที่พบในต้นข้าวบาร์เลย์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ พบว่า เกิดจากการแตกหัก (breakage) การรวมตัวใหม่ (reunion) การมีเซนโตรเมียหลายแห่ง (multicentric) หรือ การเคลื่อนย้าย (translocation) ของชิ้นส่วนโครโมโซม เช่นเดียวกับการศึกษาการจับคู่กันของโครโมโซมของพืชหลายชนิดที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ซึ่งชี้ให้เห็นว่าเป็นผลมาจากการขาดหายไป การกลับเปลี่ยนตำแหน่ง การเคลื่อนย้ายและสลับ ย้ายของชิ้นส่วนโครโมโซมทั้งที่เป็นคู่กันและที่ไม่ได้เป็นคู่กัน รวมถึงการแตกหักของโครโมโซมที่เกิดเป็น acentric และ centric segments การจัดเรียงตัวใหม่ของโครโมโซมดังกล่าว ส่งผลให้มีการสูญเสียสารพันธุกรรม ซึ่งอาจเป็นผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลง พีโนไทป์ได้ เช่นในกรณีโครโมโซมที่แตกหัก อาจมียีนหรือดีเอ็นเอบางส่วนขาดหายไป และยีนอยู่ใกล้เคียงซึ่งเคยทำงานสัมพันธ์กันถูกกระทบกระเทือนไปด้วย ถ้ามีการรวมตัวใหม่ของ ชิ้นส่วนโครโมโซม แต่ได้ชิ้นส่วนที่เดิมเคยอยู่ห่างไกลออกไปมาก ๆ ยีนที่ได้มาใหม่อาจส่งผลต่อยีนเดิมที่มีอยู่แล้วในบริเวณนั้น ๆ หรือ การขาดหายไปของชิ้นส่วนโครโมโซมอาจไปกระตุ้นการแสดงออกของยีนที่ถูกข่มเอาไว้ให้ปรากฏออกมาได้

3. การแลกเปลี่ยนชิ้นส่วนของโครมาทิด (sister chromatids exchange) และการเกิด somatic crossing over ในลั่วเหลียงและยาสูบที่เป็นเฮเทอโรไซกัส โอกาสที่จะเกิดการแลกเปลี่ยนยีนบนโครโมโซม (crossing over) ในระยะไมโทซิสของยีนสองตำแหน่งที่อยู่ใกล้กันจะมีค่าอยู่ระหว่าง  $5.7 \times 10^{-5}$  ถึง  $7.7 \times 10^{-6}$  ต่อตำแหน่ง การแลกเปลี่ยนนี้อาจมีส่วนที่เพิ่มขึ้นจากการกระตุ้นการแลกเปลี่ยนชิ้นส่วนของโครมาทิด ทำให้เกิดการขาดหายหรือเพิ่มขึ้นของชิ้นส่วนโครโมโซม ทำให้มีการกระจายตัวที่ผิดปกติ เช่น ในข้าวบาร์เลย์ พบว่ามีอัตราการแลกเปลี่ยนชิ้นส่วนโครมาทิดนี้สูงถึง 20.6 หน่วยต่อเซลล์ต่อครั้งของการแบ่งเซลล์

4. อิทธิพลของชิ้นส่วนพันธุกรรมที่สามารถเคลื่อนย้ายได้ (transposable elements หรือ transposons) ซึ่งเป็นชิ้นส่วนขนาดเล็กที่ยีนออกมาจากดีเอ็นเอ จึงสามารถเคลื่อนย้ายจากตำแหน่งหนึ่งในยีนหนึ่ง ไปยังอีกยีนหนึ่งได้อย่างอิสระ การแยกออก และการเข้าไปเชื่อมต่อใหม่ของชิ้นส่วนเหล่านี้เป็นผลโดยตรงทำให้การแสดงออกของยีนหลักที่เป็นโครงสร้างทางพันธุกรรมเดิมเปลี่ยนแปลงไปได้ หากเป็นชิ้นส่วนของแบคทีเรียด้วยแล้ว จะยังมีโอกาสชักนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมในโครโมโซมได้ง่ายขึ้น อย่างไรก็ตาม การเปลี่ยนแปลงพันธุกรรมโดยสาเหตุดังกล่าวนี้มักไม่คงตัว จากการศึกษาในข้าวโพดพบว่าชิ้นส่วนเหล่านี้มีคุณสมบัติทางพันธุกรรมที่เหมือนกับชิ้นส่วนที่มีอยู่ในแบคทีเรีย (เรียกว่า andogous) และชิ้นส่วนนี้ในดีเอ็นเอของไมโทคอนเดรียมีผลไปเปลี่ยนแปลงไซโตพลาสซึมที่เป็นมัน (S-cytoplasm) ให้เป็นปกติ (F-cytoplasm)

5. การเพิ่มจำนวนตัวเอง (amplification) และการลดจำนวนตัวเอง (diminution) ของยีนบางตัว โดยเฉพาะอย่างยิ่งยีนที่ไม่เกี่ยวกับการควบคุมการแสดงออกจะง่ายต่อการเปลี่ยนแปลงหากได้รับสภาพแวดล้อมที่เหมาะสม เช่น ในการคัดเลือกความต้านทานต่อสาร methotrexate ซึ่งไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ dihydrofolate reductase และกระตุ้นให้มีการเพิ่มของกลุ่มยีนที่กำหนดการสร้างเอนไซม์ชนิดนี้ถึง 200 เท่า

เช่นเดียวกับในกรณีของกลุ่มยีนที่ซับซ้อนในการกำหนดลำดับการสร้างเอ็มไซม์ aspartate transcarbamylase จะเพิ่มขึ้นถึง 190 เท่า เมื่อเซลล์ของต้น hamsters ถูกคัดเลือกให้ต้านทานต่อสารที่เป็น transition state analogue ของเอ็มไซม์ดังกล่าว ในพืชโดยเฉพาะอย่างยิ่งใน rRNA (ribosomal RNA) การเพิ่มหรือลดจำนวนตัวเองนี้ พบได้ในข้าวสาลี ข้าวไรย์ ข้าวโพด Vicia, hyacinth, melon และยาสูบ ส่วนใน falx พบว่าดีเอ็นเอจะเปลี่ยนแปลงการตอบสนองต่อสภาพแวดล้อมที่เปลี่ยนไป ในถั่วเหลือง เซลล์ที่ปรับตัวได้ดีในอาหารที่เติมน้ำตาลมอลโตสเป็นระยะเวลาเวลานานพอสมควร จะสูญเสียยีนใน rRNA ไปถึง 1 ใน 3 ส่วน เป็นต้น การเปลี่ยนแปลงยีนของพืชชั้นสูง เช่นการสร้างลำดับดีเอ็นเอที่มีการจำลองตัวเอง (DNA replication) อาจเป็นผลให้เกิดการเพิ่มหรือลดจำนวนยีนหลายตัวในพืชที่มียีนเป็นจำนวนมากที่ควบคุมลักษณะทางพันธุกรรม และไปเปลี่ยนแปลงอนุมูลของสารประกอบที่ถ่ายทอดทางพันธุกรรม การเพิ่มตัวเองของยีนโดยการจำลองดีเอ็นเอ โดยการไปเปลี่ยนแปลงสารประกอบพวกนิวคลีโอไทด์หรือนิวคลีโอไทด์ที่แทรกเข้าไปใหม่ไปทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของดีเอ็นเอ (DNA transition) ซึ่งส่งผลให้การแสดงออกของยีนเปลี่ยนแปลงไปได้หลายรูปแบบแม้จะยังไม่มีข้อพิสูจน์ในระดับโมเลกุลถึงกลไกที่ก่อให้เกิดความแปรปรวนแต่ข้อมูลและหลักฐานเท่าที่มีการศึกษาในปัจจุบันชี้ว่า การเกิดสภาพที่เรียกว่า genomic shock ในระดับโครโมโซมขณะเพาะเลี้ยงน่าจะเป็นสาเหตุที่เกี่ยวข้อง โดยเฉพาะอย่างยิ่งจากการศึกษาใน somaclones ที่มีลักษณะเป็นอะนิพลอยด์ และมีการจัดเรียงตัวใหม่ของโครโมโซม ตัวอย่าง พบในพืชหลายชนิดเช่น ข้างบาร์เลย์ ข้าวโอ๊ต ข้าวสาลี กระจับถั่วและ Triticale ซึ่งชี้ให้เห็นว่ามีการแลกเปลี่ยน การกลับตำแหน่ง การเพิ่มขึ้น และการขาดหายไป ของชิ้นส่วนโครโมโซม อย่างไรก็ตาม มีหลักฐานน้อยมากที่ชี้ถึงความสัมพันธ์ระหว่างการผิดปกติของโครโมโซม (chromosomal aberration) กับการกลายพันธุ์ของยีน (gene mutation) ในพืชที่เป็น somaclones และลูกหลาน นอกจากนี้ การศึกษาพันธุกรรมในข้าวสาลีที่เกิดความแปรปรวน ยังชี้ให้เห็นว่ามีไมโอซิส และ mitotic karyotype ที่เป็นปกติทุกอย่าง ทำให้เชื่อว่าความแปรปรวนที่เกิดขึ้นน่าจะเป็นผลมาจากการเปลี่ยนแปลงของโครโมโซมของพืชในขณะเพาะเลี้ยงและชักนำให้เป็นต้นมากกว่าที่จะเป็นผลมาจากการกลายพันธุ์ของยีน

### วิธีการป้องกันการเกิดการผันแปรทางพันธุกรรมที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

ปัจจัยการป้องกันการเกิดการผันแปรทางพันธุกรรมที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช มี 2 ปัจจัย คือ

1. ปัจจัยพืช พืชที่เจริญเติบโตในธรรมชาติย่อมมีความแปรปรวนแปรอันเนื่องมาจากสภาพแวดล้อมการเลี้ยง การเปลี่ยนแปลงที่อาจเกิดขึ้นกับต้นพืชทั้งต้น หรือเกิดกับเฉพาะ ส่วนใดส่วนหนึ่ง ดังนั้นนำชิ้นส่วนจากต้นพืชที่เลี้ยงที่มีความแปรปรวนโดยการกำเนิดมาจาก การเพาะเลี้ยงแล้วพืชต้นใหม่มีการชักนำย้อมไม่เหมือนต้นแม่เดิม อัตราการแปรปรวนมากน้อยเพียงใดขึ้นอยู่กับองค์ประกอบของเซลล์ตั้งต้น หากเซลล์ตั้งต้นแปรปรวนในหลายลักษณะพืชที่ ชักนำได้มีความแปรปรวนในอัตราสูง

2. ปัจจัยสภาพแวดล้อมการเลี้ยง มีหลายประการด้วยกันที่สำคัญที่สุดคือ สารควบคุมการเจริญเติบโต โดยเฉพาะ 2,4-D ที่เติมลงไปในการเลี้ยงเพื่อชักนำพืชใหม่ สารดังกล่าวไปชักนำให้ชิ้นส่วนพืชมีการแบ่งเซลล์อย่างรวดเร็ว วงจรการแบ่งเซลล์ (cell cycle) ถูกเร่งให้สั้นกว่าปกติ เมื่อเป็นเช่นนี้สารที่จำเป็นต่อกระบวนการแบ่งเซลล์ได้แก่ เอ็นไซม์ และโปรตีนถูกสร้างอย่างรวดเร็วเช่นกันในบางครั้งทำให้เกิดความบกพร่องในการสร้างสารที่จำเป็นบางตัว เซลล์ลูกที่ได้หลังจากกระบวนการแบ่งเซลล์จึงผิดปกติ นอกจากนี้สารที่เติมลงไปในการเลี้ยงไปมีผลแย่งที่กับเอ็นไซม์ที่จำเป็นต่อกระบวนการแบ่งเซลล์ ผลที่ตามมาคือ ความผิดปกติของเซลล์ลูก ปัจจัยที่สองที่ทำให้เกิดความแปรปรวน

(ที่มา : หลักการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเพื่อการขยายพันธุ์ โดย ผศ.ดร.อภิชาติ ชิตบุรี สถาบันวิจัยและฝึกอบรมการเกษตรลำปาง มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลล้านนา )