หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 4

การอภิปรายผลการวิจัยและสรุป

ผลการทดลองสร้างยีสต์เซลผสมโดยวิธีการรวมตัวของเซลโปรโตพลาส และใช้ PEG (polyethylene glycol) ชนิดที่มีน้ำหนักโมเลกุล 8000 พบว่าความถี่การเกิดลูกผสม (fusion frequency) ซึ่งคำนวณจากจำนวนโคโลนีที่ขึ้นบนอาหารที่คัดเลือกเฉพาะเซลผสมต่อจำนวนโคโลนีที่ขึ้นบนอาหารสมบูรณ์ ($\frac{\text{Number of colony grow on selective media}}{\text{Number of colony on complete media}}$) มีค่าร้อยละ 2.5 ซึ่งแสดงว่า PEG-8000 สามารถนำมาใช้ได้นอกเหนือจากชนิดน้ำหนักโมเลกุล 4000 - 6000 (41) ซึ่งมีผู้รายงานว่าเป็นชนิดที่เหมาะสมและมีประสิทธิภาพสูงในการผสมยีสต์เทคนิคนี้

ในปี ค.ศ. 1977 Yamamoto และ Fukui (5) ได้ใช้ PEG-6000 ในการผสมแบบ Intraspecific fusion ของ Saccharomyces cerevisiae เกิดเซลผสมในอัตรา 3.0×10^{-7} และในปี ค.ศ. 1978 Svoboda (8) ได้ใช้ PEG-4000 ในการทดลองแบบเดียวกัน พบว่า อัตราการเกิดเซลผสมเป็นร้อยละ 1 - 3 และมีแนวโน้มว่าถ้าใช้ PEG ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงขึ้น อัตราการเกิดเซลผสมจะยิ่งลดลง (9) ผลการทดลองที่ได้ครั้งนี้พบว่า PEG-8000 สามารถใช้ได้และให้ผลดี โดยทำให้เกิดความถี่ของการเกิดเซลผสมร้อยละ 2.5 อย่างไรก็ดีกลไกที่แท้จริงของ PEG ในการชักนำให้เซลมารวมกลุ่มกัน (aggregate) และการทำลายผนังเซล (Cell membrane) เพื่อให้เกิดการผสมของเซลเป็นเซลเดียวกันในการเกิดเซลผสมใหม่ในกระบวนการรวมตัวของเซลโปรโตพลาส ยังไม่ทราบแน่ชัด (8)

ในการทดลองเลือกใช้สายพันธุ์พ่อเป็น α STX 166-17 C (lys 9 ade 2)และแม่เป็น α STX 174-4 D (lys 9 met 2 ura 1) โดยทั้ง 2 สายพันธุ์มีความผิดปกติของกรดอะมิโนและไนโตรจีเนียสเบส เป็นเครื่องหมายใช้ติดตามลูกผสม กล่าวคือสายพันธุ์ α STX 166-17 C มีความผิดปกติของการสร้างอะดีนีน ซึ่งมีผลทำให้มีการสะสมของรงค์วัตถุ (pigment) สีแดง ภายในเซล และสายพันธุ์ α STX 174-4 D มีความผิดปกติของการสร้างไลซีน มีผลทำให้มีการสะสมของรงค์วัตถุสีเหลืองภายในเซล โดยอาศัยหลักคอมพลี-

เมนทารีในการคัดเลือกเซลผสมเบื้องต้น จึงได้ว่าลูกผสมที่ได้ไม่ควรจะแสดงฟีโนไทพ์ที่มีการสะสมรงควัตถุสีแดง แต่ยังคงมีการสะสมรงควัตถุสีเหลือง เนื่องจากทั้ง ∝ STX 166-17 C และ ∝ STX 174-4 D มีความผิดปกติของการสร้างไลซีนตรงตำแหน่งเดียวกัน ทำให้ได้ฟีโนไทพ์ของเซลผสมเป็น ∝∝ lys 9

ลักษณะอื่น ๆ ที่นิยมใช้ในการตรวจสอบเอกลักษณ์เซลผสมที่ได้จากการรวมตัวของเซลโปรโตพลาสต์ ได้แก่ ขนาด, ปริมาตร, ปริมาณดีเอนเอภายในเซล และการกรองคัด (screening) โดยวิธี Haploidization โดยกระตุ้นให้เกิดการลดจำนวนโครโมโซมในเซลผสม โดยใช้สาร haploidizing agent เช่น p-fluorophenylalanine หรือ benlate แล้วศึกษาจากมิวแทนท์ (Mutant) ที่ได้ใหม่ (5, 11, 14, 16, 18, 42)

ในการทดลองครั้งนี้ได้ศึกษา ขนาด, ปริมาตร และปริมาณดีเอนเอภายในเซล พบว่า เซลผสมที่ได้มีขนาดและปริมาตรที่ใหญ่กว่าสายพันธุ์ ∝ STX 166-17 C และ ∝ STX 174-4 D โดยเซลผสม ∝∝ (Fu - d_1) มีขนาด 5.474 x 7.616 ไมครอน และปริมาตร 128.43 (ไมครอน)^3 เปรียบเทียบกับ ∝ STX 166-17 C ซึ่งมีขนาด 3.689 x 4.046 ไมครอน และปริมาตร 29.48 (ไมครอน)^3 และ ∝ STX 174-4 D ซึ่งมีขนาด 4.344 x 5.474 ไมครอน และปริมาตร 56.01 (ไมครอน)^3 ดังแสดงในตารางที่ 5 และรูปภาพที่ 3, 4 และ 5 ซึ่งสอดคล้องกับที่มีผู้รายงานว่า เซลผสมที่ได้จากการรวมเซลโปรโตพลาสต์ จะมีขนาด และปริมาตรที่ใหญ่กว่าสายพันธุ์พ่อแม่ (11, 14, 18, 42)

จากการศึกษารูปร่างเซลด้วยกล้องจุลทัศน์ดังรูปที่ 3, 4 และ 5 พบว่ารูปร่างเซลของเซลผสมเปลี่ยนไปจากสายพันธุ์พ่อแม่ที่นำมาผสมกันที่เป็นแฮพพลอยด์เซล ซึ่งมีรูปร่างกลมในสายพันธุ์ ∝ STX 166-17 C หรือผอมยาวรีใน ∝ STX 174-4 D โดยเปลี่ยนรูปร่างเซลเป็นเซลกลมยาวรูปไข่ (elliptical) ซึ่งลักษณะเช่นนี้ส่วนใหญ่จะเป็นลักษณะของดิพพลอยด์เซล ตามที่ Townsend และ Lindegren (43) รายงานไว้

จากผลการทดลองหาปริมาณดีเอนเอภายในเซล ให้ผลสนับสนุนว่าเซลผสมทั้งหมดที่ได้ ควรเป็นเซลผสมที่เกิดจากการผสมระหว่างสายพันธุ์ ∝ STX 166-17 C กับ ∝ STX 174-4 D โดยศึกษาจากผลบวกของปริมาณดีเอนเอทั้ง 2 สายพันธุ์ ซึ่งมีค่าเท่ากับ 5.377 มก./10^{11} เซล ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับปริมาณดีเอนเอที่หาได้ในเซลผสม เช่น ∝∝ (Fu - d_1)

5.292/10 ^{11} ดังตารางที่ 6 สอดคล้องกับที่มีผู้รายงานว่า (5, 11, 14, 42) เซลผสมที่ได้จากการรวมเซลโปรโตพลาสจะมีปริมาณดีเอนเอภายในเซลมากกว่าสายพันธุ์พ่อแม่ที่ใช้และสอดคล้องกับปริมาณดีเอนเอในดิพพลอยด์เซลของ S. cerevisiae ที่มีอยู่ตามธรรมชาติ ซึ่ง Takano และคณะรายงานไว้ (30)

ปกติการเกิดเซลผสมโดยวิธีการรวมตัวของเซลโปรโตพลาส โดยอาศัยอิทธิพลของ PEG ซึ่งยังไม่ทราบกลไกที่แท้จริงของการชักนำเซลให้รวมกัน สามารถทำให้เกิดการรวมของเซลมากกว่า 2 เซล ได้ (18) โดยเซลผสมที่เกิดจากการรวมของ 3 เซล จะเป็นทริพพลอยด์เซล และ 4 เซล จะเป็นเททราพลอยด์ แต่ผลการทดลองครั้งนี้ ปริมาณดีเอนเอภายในเซลผสมซึ่งวัดโดยวิธีของ Schneider (38) พบว่ามีปริมาณใกล้เคียงสายพันธุ์ α STX 166-17 C และ α STX 174-4 D รวมกันดังกล่าวแล้ว ทำให้สันนิษฐานได้ว่าเซลผสมที่กรองคัดทั้ง 7 ตัว น่าจะเป็นดิพพลอยด์ยีสต์ทั้งหมด

ในการทดลองอัตราการเจริญเติบโตของเซลผสม $\alpha\alpha$ (Fu - d_1) ในอาหารเหลววายพีดี โดยวัดการเจริญเติบโตเพิ่มจำนวนเซลโดยปริมาณความขุ่น (Turbidity) ของจำนวนเซลที่เพิ่มขึ้นได้พบลักษณะการเจริญที่แตกต่างจากสายพันธุ์ α STX 166-17 C และ α STX 174-4 D ดังกราฟที่ 2 โดยพบลักษณะที่มีอัตราการเจริญในช่วงทวีคูณ 2 ครั้ง หรือ Diauxic growth และค่า Generation time (1/K) ในช่วงทวีคูณทั้ง 2 แตกต่างกัน ดังตารางที่ 7 โดยช่วงทวีคูณที่ 1 เซลผสมมีอัตราการเจริญในหน่วย Generation time ประมาณ 1 ชม. 33 นาที ซึ่งเร็วกว่าสายพันธุ์ α STX 166-17 C และ α STX 174-4 D ต่อมาอัตราการเจริญในช่วงทวีคูณที่ 2 ลดลง หรือพิจารณาจากความชันของกราฟที่ลดลง แต่ไม่พบช่วงทวีคูณที่ 2 ในสายพันธุ์ α STX 166-17 C และ α STX 174-4 D

Diauxic growth ปกติจะเกิดในกรณีที่อาหารเลี้ยงเชื้อประกอบด้วยแหล่งคาร์บอน 2 ชนิด เมื่อมีการใช้แหล่งคาร์บอนตัวหนึ่งหมด จะมีการปรับตัวใหม่เพื่อที่จะใช้แหล่งคาร์บอนตัวใหม่ต่อไป (39) ทำให้เกิดระยะที่คล้ายกับหยุดชะงักการเจริญเติบโตชั่วขณะ (Lag period)

ในการทดลองครั้งนี้ ลักษณะ Diauxic growth ที่เกิดขึ้น ไม่ได้ทำการศึกษาต่อว่าเกิดจากเหตุใด แต่สันนิษฐานว่าอาจเกิดจากกลูโคสถูกเปลี่ยนเป็น matabolite ตัวอื่น และสะสมกันอยู่ภายในอาหาร จนถึงจุดที่เซลจะมีการใช้ metabolite ตัวใหม่นี้ จึงมีการปรับตัวให้เข้ากับอาหารใหม่ ทำให้เกิดช่วงทวีคูณที่ 2 ต่อไปได้

จากการทดสอบยีน KAR ในสายพันธุ์ ∝ STX 166-17 C และ ∝ STX 174-4 D ซึ่งเป็นแนวทางหนึ่งของการศึกษาปัญหาที่ว่า หลังจากทำการรวมเซลโดยวิธีการรวมตัวของเซลโปรโตพลาสต์ จนได้เซลผสมเกิดขึ้น เซลผสมที่ได้จะเกิดคารีโอกามีตามมาหรือไม่ และมีจำนวนนิวเคลียสเท่าไร อยู่ในสภาพเช่นไร กล่าวคือ แต่ละนิวเคลียสที่มาจากแต่ละสายพันธุ์ยังคงแยกกันตามลักษณะของสายพันธุ์พ่อแม่เดิม หรือสามารถรวมกันได้ตามคำสั่งของยีนที่ทำงานปกติในการควบคุมการรวมกันของนิวเคลียสโดยยีน KAR เมื่อบังคับให้เซลมาอยู่รวมกันโดยใช้สารเคมีทำลายผนังเซล แล้วให้นิวเคลียสมาอยู่ด้วยกัน

โดยอาศัยสมมติฐานนี้ จึงทดสอบยีน KAR ในสายพันธุ์ ∝ STX 166-17 C และ ∝ STX 174-4 D โดยนำไปผสมกับสายพันธุ์ a AH-22 (cir^+) ซึ่งมีสายพันธุ์บ่งเพศที่ต่างกัน พบว่าสามารถสร้างแอสโคสปอร์ได้ตามปกติ ดังแสดงในตารางที่ 10 และได้แสดงจำนวนและชนิดของแอสโคสปอร์ที่ได้ ดังกราฟที่ 4, 5

สรุปได้ว่ายีนที่ควบคุมการรวมกันของนิวเคลียสหรือยีน KAR ปกติในสายพันธุ์ ∝STX 166-17 C และ ∝ STX 174-4 D แสดงว่าหลังจากบังคับเซลให้เกิดการรวมกันของโปรโตพลาสต์ โดยการทำลายผนังเซลและทำให้เกิดการรวมตัวเป็นเซลเดียว นิวเคลียสในแต่ละเซลผสมที่ได้จะเกิดเป็นนิวเคลียสเดียวได้ดิพลอยด์เซลเกิดขึ้นในกรณีที่เกิดจาก 2 เซลมารวมกัน ถ้าสมมติฐานนี้ถูกต้อง

มีเหตุผลที่สนับสนุนว่า นิวเคลียสในเซลผสมที่มาจากแต่ละสายพันธุ์ ∝ STX 166-17 C และ ∝ STX 174-4 D ควรจะเกิดการรวมกันขึ้นในเซลผสม โดยนำเซลผสม ∝∝ (Fu - d_1) ไปตรวจจำนวนนิวเคลียส โดยใช้กล้องจุลทัศน์อิเลคตรอนแบบลำแสงผ่านตัวอย่าง พบว่าภายในเซลผสมมี 1 นิวเคลียสเกือบทุกเซล จากการตรวจหลาย ๆ ภาพใต้กล้อง ดังรูปภาพที่ 7

จากการศึกษาสภาพและจำนวนนิวเคลียสในเซลผสม ∝∝(Fu - d_1) โดยวิธีตรวจนิวเคลียสแบบใช้สีย้อมจิมซ่า ไม่สามารถจะสรุปได้ว่า นิวเคลียสในลูกผสมมีจำนวนเท่าไรที่แน่นอน จากรูปภาพที่ 6 พบว่าลักษณะที่มีการติดสีมีจำนวนแตกต่างกันตั้งแต่ 1 - 5 จุด นอกจากนี้แต่ละบริเวณที่ติดสียังมีขนาดแตกต่างกัน ซึ่งภาพที่เห็นอาจเป็นเพียงโครโมโซมหรือนิวคลีโอลัสภายในนิวเคลียสก็ได้

อย่างไรก็ดีถ้าภาพที่ พบจากการย้อมนิวเคลียส์แบบจิมซ่า เป็นนิวเคลียส์จริงที่มีอยู่ในเซล มีข้อที่น่าสังเกตว่าถึงแม้จำนวนนิวเคลียส์ที่พบจะมีจำนวนแตกต่างกันตั้งแต่ 1 - 5 แต่เมื่อเปรียบเทียบจำนวนนิวเคลียส์กับขนาดของเซล พบว่าขนาดของเซลที่มีจำนวนนิวเคลียส์เกินกว่า 2 จุด มิได้เพิ่มตามขนาดที่คาดว่าจะเกิดจากหลายเซลของแฮ่พพ์ลอยด์เซลมารวมกันแต่อย่างไร และมีขนาดไม่ต่างจากพวกที่มีนิวเคลียส์น้อย ๆ เปรียบเทียบรูปภาพที่ 6 ก,ข,ค ลักษณะเช่นนี้แสดงว่า เซลที่เกิดจากการรวมกันของหลาย ๆ นิวเคลียส์ เป็นโพลีคารีออน (Polykaryon) ไม่จำเป็นจะต้องมีขนาดที่ใหญ่กว่าเซลที่มีจำนวนนิวเคลียส์น้อย เช่นมี 1 นิวเคลียส์ภายในเซล (Monokaryon) หรือมี 2 นิวเคลียส์ภายในเซล (Dikaryon) เสมอไป

เทคนิคการใช้ลีย้อมนิวเคลียส์ เพื่อศึกษาจำนวนนิวเคลียส์ภายในเซลเป็นที่นิยมใช้ (11, 13, 14, 16, 17, 45) ดังนั้นการศึกษาจำนวนนิวเคลียส์ภายในเซลผสมที่ได้จากการรวมเซลโปรโตพลาส์โดยการใช้ลีย้อมจึงสามารถนำมาใช้ตรวจนิวเคลียส์ภายในเซลผสมได้เช่นกัน อย่างไรก็ตามผลที่ได้พบจำนวนนิวเคลียส์ภายในเซลผสมแตกต่างกัน

ตารางที่ 11 แสดงการทดสอบความเสถียรทางพันธุกรรมของเซลผสมทั้ง 7 ตัว ซึ่งเก็บรักษาที่ 4 °ซ. นาน 1 ปี พบว่าเซลผสมส่วนใหญ่ยังคงแสดงฟีโนไทพ์ที่ขาดไลซีน (lys) และไม่มีแอส์โคสปอร์เกิดขึ้น แสดงถึงความเสถียรทางพันธุกรรมของเซลผสมที่ได้ในเวลา 1 ปี นอกจากนี้ยังสนับสนุนว่ามีการรวมกันของนิวเคลียส์เกิดขึ้นในเซลผสม โดยการไม่พบฟีโนไทพ์ที่เหมือนสายพันธุ์ ∝ STX 174-4 D และ ∝ STX 166-17 C เพราะว่าในกรณีที่แต่ละนิวเคลียส์ที่มาจากแต่ละสายพันธุ์พ่อแม่ไม่เกิดการรวมกัน แต่ละนิวเคลียส์อยู่ในเซลผสมในสภาพ "ไดคารีโอทิค" (Dikaryotic) เมื่อเกิดการแตกหน่อ (budding) แต่ละนิวเคลียส์ที่มาจากแต่ละสายพันธุ์ของ ∝ STX 166-17 C และ ∝ STX 174-4 D มีการแบ่งนิวเคลียส์ไม่พร้อมกัน ก็จะเคลื่อนเข้าไปในเซลหน่อ (bud) ไม่พร้อมกัน ดังนั้นเซลลูกที่ได้ ควรจะมีฟีโนไทพ์ได้ 3 แบบ คือ แบบที่เหมือนสายพันธุ์ ∝ STX 166-17 C, ∝ STX 174-4 D และแบบที่เหมือนเซลผสมที่ได้แต่แรกคือต้องการเฉพาะไลซีนเท่านั้น แต่ในการทดลองพบฟีโนไทพ์ส่วนใหญ่เป็น lys ไม่พบฟีโนไทพ์ของ ∝ STX 166-17 C และ ∝ STX 174-4 D จึงแสดงว่ามีการรวมกันของนิวเคลียส์เกิดขึ้นในเซลผสมที่ได้

จากการทดสอบได้พบลักษณะที่เป็นพันธุ์แท้ (Prototroph) เกิดขึ้น สันนิษฐานว่าเป็นการกลายพันธุ์กลับ (Revertant) ของเซลผสมที่เกิดขึ้น เมื่อเก็บรักษาเชื้อไว้นาน ๆ

เนื่องจากมีความผิดปกติของยีนตรงตำแหน่งที่มีการสร้างไลซีน เพียงตำแหน่งเดียว และตำหนิของไลซีนใน ∝ STX 166-17 C และ ∝ STX 174-4 D ถึงแม้จะอยู่โลกัสที่ 9 เดียวกัน แต่อยู่ต่าง subunit กัน โอกาสที่จะกลายพันธุ์กลับเป็นพันธุ์แท้ควรเกิดได้ง่าย (personal communication with Prof. Heslot Institute National agronomique Paris) ความผิดปกตินี้อาจเกิดขึ้นในระดับโมเลกุล และเกี่ยวข้องกับเอนไซม์ พบว่าความผิดปกติของการสร้างไลซีน ตรงโลคัส (locus) ที่ 9 (lys 9) เกี่ยวข้องกับเอนไซม์ Saccharopine reductase ซึ่งอาจจะเป็น hybrid protein ที่ประกอบด้วยหน่วยย่อยที่เหมือนกัน (identical subunit) หลาย ๆ หน่วย ซึ่งมีสายเปปไทด์ (peptide) หลายสาย และสามารถทำหน้าที่ทดแทนกันได้ ทำให้เซลผสมเกิดฟีโนไทพ์ปกติคือไม่ต้องการไลซีน (26)

ในกรณี ∝∝ (Fu - d_1) และ ∝∝ (Fu - d_4) พบลักษณะที่มีฟีโนไทพ์เป็น lys met และ lys met ura เกิดขึ้นด้วย สันนิษฐานได้ว่าอาจเกิด Mitotic segregation โดยผ่าน haploidization เมื่อโครโมโซมเกิด non-disjunction ในเชื้อที่เก็บรักษาไว้นาน ๆ (26) ปกติการแบ่งนิวเคลียสแบบไมโตติค (Mitotic) แต่ละเซลหน่อจะต้องได้ชุดของโครโมโซมจากเซลพ่อแม่เป็นจำนวนเท่ากัน ในกรณีที่โครโมโซมที่เป็นคู่กันแยกตัวจากกันปกติในระยะอนาเฟส (Anaphase) ส่วนใหญ่เซลลูกที่ได้จะมีลักษณะแบบเดียวกับพ่อแม่ทุกประการ แต่ในบางกรณีพบว่า โครโมโซมที่เป็นคู่กันไม่สามารถแยกจากกันได้ เนื่องจากโคโมโซมมีการเรียงตัวที่ผิดปกติในระยะเมทาเฟส (Metaphase) ทำให้โครมาติด (chromatid) ทั้ง 2 แท่งรวมกันอยู่ในเซลหน่อ หรือโครมาติด ไม่เคลื่อนที่ไปรวมกันที่เซลใหม่

ซึ่งกรณีที่เซลพ่อแม่เป็นดิพพลอยด์จะทำให้เซลลูกที่ได้เป็นไตรโซมิค (trisomic) 2n + 1 และโมโนโซมิค (monosomic) คือ 2n - 1 เกิดขึ้น นี่คือกระบวนการ haploidization ซึ่งเซลจะกลับมาเสถียรที่ระยะแฮพพลอยด์ ซึ่งมีโครโมโซมที่ไม่เหมือนเดิม ทำให้ยีนด้อย (Recessive gene) บนโครโมโซมโมโนโซมิคปรากฏขึ้น (expressed) ลักษณะนี้เป็นประโยชน์ในการศึกษาถึงตำแหน่งของยีน 2 ยีนบนโครโมโซมแท่งเดียวกัน (26) จากแผนที่ยีนบนโครโมโซมของ S. cerevisiae ซึ่งมี 17 แท่ง (46) พบว่า lys 9 และ met 2 อยู่บนโครโมโซมแท่งเดียวกันคือ แท่งที่ 14 ซึ่งสอดคล้องกับลักษณะที่พบคือพบเซลหน่อที่มีฟีโนไทพ์เป็น lys met ปรากฏขึ้น

จากการฉายแสงอุลตราไวโอเลตไปยังเซลผสม $\alpha\alpha$ (Fu - d_1) ซึ่งสุ่มเป็นตัวแทนของเซลผสมที่ได้ทั้งหมด พบว่าแสงอุลตราไวโอเลตในขนาดความเข้มต่ำ (low dose) ฉายห่างจากลูกผสม 50 ซม. ไม่เกิน 20 วินาที ความเข้มของแสงที่จุดนี้ให้อัตราการรอดชีวิตไม่เกินร้อยละ 70 ดังแสดงในกราฟที่ 6 และสามารถชักนำให้เกิดการสร้างแอสโคสปอร์ภายในแอสคัสขึ้นได้ ดังแสดงในกราฟที่ 7 และรูปภาพที่ 8 จึงตั้งสมมติฐานเบื้องต้นว่าแสงอุลตราไวโอเลตสามารถชักนำให้เกิดการเปลี่ยนสายพันธุ์บ่งเพศในเซลผสมที่เกิดจากการรวมเซลโปรโตพลาสจากเดิม $\alpha|\alpha$ ให้เป็น $\alpha|a$ หรือ $a|\alpha$ ขึ้น คือมีการเปลี่ยนสายพันธุ์บ่งเพศจาก α เป็น a แล้วทำให้เกิดกระบวนการสร้างแอสโคสปอร์ เพื่อสนับสนุนสมมติฐานนี้จึงทำการแยกแต่ละแอสโคสปอร์ภายในแอสคัสมาศึกษาสายพันธุ์บ่งเพศที่เกิดขึ้น ปรากฏว่าพบสายพันธุ์บ่งเพศทั้งชนิด α และ a เกิดขึ้นภายในแอสคัสเดียวกัน โดยมีอัตราการกระจาย (segregation ratio) เป็นไปตามทฤษฎีของสายพันธุ์บ่งเพศ a : α เป็น 2 : 2 ดังตารางที่ 13 ซึ่งเป็นการพิสูจน์ว่าแสงอุลตราไวโอเลตสามารถชักนำให้เกิดการเปลี่ยนยีนที่ควบคุมสายพันธุ์บ่งเพศในยีสต์เซลผสมที่เกิดจากวิธีการรวมตัวของเซลโปรโตพลาส

จากอัตราการกระจายของสายพันธุ์บ่งเพศที่พบเป็น 2a : 2α เป็นอีกเหตุผลหนึ่งที่สนับสนุนว่า การสร้างเซลผสมโดยวิธีการรวมตัวของเซลโปรโตพลาส แบบ Intraspecific fusion นิวเคลียสที่มาจากแต่ละสายพันธุ์พ่อแม่จะต้องเกิดการรวมกัน ซึ่งในกรณีนี้พบว่าได้ดิพลอยด์นิวเคลียสเกิดขึ้น และหลังจากที่มีการชักนำด้วยแสงอุลตราไวโอเลต ทำให้เกิดการเปลี่ยนสายพันธุ์บ่งเพศจาก α เป็น a ก็สามารถสร้างแอสโคสปอร์ โดยผ่านกระบวนการมัยโอซีส มีการกระจายของยีนเกิดขึ้น ดังตารางที่ 13, 14

การทดลองได้แปรผัน (vary) ระยะเวลาการฉายแสงต่อเซลผสมในช่วง 2 - 20 วินาที พบว่าความถี่การเปลี่ยนสายพันธุ์บ่งเพศซึ่งคำนวณจากจำนวนโคโลนีที่พบการสร้างแอสคัส มีจำนวนแตกต่างกันตามระยะเวลาการฉายแสง โดยจะให้ความถี่การเปลี่ยนสายพันธุ์บ่งเพศสูงสุด เมื่อฉายแสง 10 วินาที เพื่อให้อัตราการรอดชีวิตประมาณร้อยละ 90 ดังกราฟรูปที่ 6, 7

จากผลการทดลองสรุปได้ว่า แสงอุลตราไวโอเลตสามารถชักนำให้เกิดการเปลี่ยนสายพันธุ์บ่งเพศในยีสต์เซลผสมที่เกิดจากการรวมตัวของเซลโปรโตพลาส ซึ่งมีสายพันธุ์บ่งเพศเป็น $\alpha|\alpha$ ให้เปลี่ยนเป็น $a|\alpha$ หรือ $\alpha|a$ และตามด้วยกระบวนการสร้างแอสโคสปอร์

แต่ไม่สามารถอธิบายในเบื้องต้นนี้ว่ากลไกที่แท้จริงของการเปลี่ยนสายพันธุ์บ่งเพศ ซึ่งถูกชักนำด้วยแสงอุลตราไวโอเลต ในยีสต์เซลผสมนี้เกิดขึ้นได้อย่างไร เนื่องจากกลไกการทำงานของยีน MAT ประกอบด้วยกลุ่มยีนหลายตัว (27) ซึ่งอาจเกิดความผิดปกติขึ้นที่ตำแหน่งใดก็ได้บนยีนเหล่านี้ในระดับโมเลกุล

จากแผนภาพการทำงานของยีนที่เกี่ยวข้องกับการแสดงออกของสายพันธุ์บ่งเพศในหน้า 7 โดยเฉพาะยีน MAR และ SIR ซึ่งเป็นยีนควบคุม (Regulatory gene) ของยีน MAT ในการเปลี่ยนยีนจาก $MAT_a \rightleftharpoons MAT_\alpha$ นอกเหนือจากยีน HO ที่เป็นตัวกระตุ้น (catalyst) การเปลี่ยนยีน MAT ยีน MAR และ SIR ยังควบคุมยีน HML_α และ HMR_a ซึ่งเป็น Silent gene บนโครโมโซมแท่งที่ 3 แบบ Negative control(46) จากการทดลองเป็นไปได้ว่าการฉายแสงอุลตราไวโอเลตมีผลต่อการกลายพันธุ์ของยีน MAR หรือ SIR ทำให้หน้าที่ของยีนนี้ต่อการควบคุม Silent gene ตรงยีน HML_α และ HMR_a ผิดปกติ

กราฟรูปที่ 8 แสดงจำนวนแอสคัสที่เกิดขึ้นจากการฉายแสงอุลตราไวโอเลต พบว่าเมื่อฉายแสงนาน 12 วินาที สามารถชักนำให้เกิดการสร้างแอสคัสได้สูงกว่าการฉายแสงที่เวลาอื่นในช่วง 2 - 20 วินาที และเมื่อศึกษาชนิดแอสคัสที่มีจำนวนแอสโคสปอร์ต่าง ๆ กันเป็น 2, 3 หรือ 4 แอสโคสปอร์ต่อแอสคัส พบว่ามีจำนวนต่างกันดังกราฟที่ 9, 10 และ 11

ผลการทดลองพบว่า การฉายแสงเป็นเวลา 12 วินาที นอกจากจะให้จำนวนแอสคัสทั้งหมดสูงสุดแล้ว ยังให้จำนวนแอสคัสที่มี 4 แอสโคสปอร์ต่อแอสคัสสูงสุดด้วย ดังกราฟที่ 8 และ 9

จากการศึกษาการงอกของแอสโคสปอร์ที่คัดเลือกเฉพาะแอสคัสที่มีจำนวน 4 แอสโคสปอร์ พบว่าการงอกหลังจากแยกด้วยไมโครมานิพูเลเทอร์แตกต่างกัน ดังตารางที่ 12 การที่แต่ละแอสโคสปอร์ไม่สามารถรอดชีวิตครบทั้ง 4 แอสโคสปอร์ที่แยกได้ อาจเนื่องจากมีการเปลี่ยนแปลงของโครโมโซมเกิดขึ้น (chromosomal change) ในขณะที่มีมัยโอซีส ซึ่งอาจเป็นแบบ recessive lethal, inversion,translocation เกิดขึ้น (26) นอกจากนี้พบว่าความสามารถในการรอดชีวิตของแอสโคสปอร์ ยังขึ้นกับขั้นตอนการทำลายผนังแอสคัสด้วย

เอนไซม์ พบว่าถ้าแอสคัสแช่อยู่ในเอนไซม์นานเกิน 60 นาที การรอดชีวิตของแอสโคสปอร์จะยิ่งลดลง หรือการใช้เชื้อที่มีอายุเกิน 7 วันบนอาหารแข็งอซีเตต การรอดชีวิตของแอสโคสปอร์จะลดลงตามลำดับ ซึ่งลักษณะนี้สอดคล้องกับที่ Mortimer และ Hawthrone (26) ศึกษา

ชนิดของจีโนไทพ์ของแต่ละแอสโคสปอร์ที่แยกได้ สันนิษฐานว่าเซลผสม $\alpha\alpha$ ($Fu - d_1$) ที่ได้เป็นเซลผสมที่เกิดจากการรวมตัวของเซลโปรโตพลาสต์สายพันธุ์ α STX 166-17 C กับ α STX 174-4 D ดังตารางที่ 13 โดยพบว่าการกระจายของยีน เกิดเป็นจีโนไทพ์ของสายพันธุ์พ่อแม่กลับคืนมา คือ lys 9 ade 2 ของ α STX 166-17 C และ lys 9 met 2 ura 1 ของ α TSX 174-4 D เช่น แอสคัสที่ 15 หรือพบรีคอมบิแนนท์ (Recombinant) อื่น ๆ เกิดขึ้นด้วย เช่น แอสคัสที่ 8 และสามารถสรุปสัดส่วนการกระจายของยีนภายในแอสคัสได้ดังตารางที่ 14

ตารางที่ 14 แสดงการกระจายของยีนที่ปรากฏในแต่ละแอสโคสปอร์ในสัดส่วนยีนด้อย : ยีนเด่น (Recessive : Dominant) ปกติการกระจายของยีนในดิพลอยด์ยีสต์ที่เป็นเฮทีโรไซกัส (Heterozygous) อัตราส่วนตามทฤษฎีเป็น 2 : 2 ทั้งในกรณีที่ฟีโนไทพ์นั้นถูกควบคุมด้วยยีนคู่เดียวหรือหลายคู่ก็ตาม อย่างไรก็ดีอัตราการกระจายของยีนในสัดส่วน 4 : 0, 3 : 1, 1 : 3 หรือ 0 : 4 ก็สามารถเกิดขึ้นได้ในแอสโคสปอร์ทั้ง 4 ที่ได้จากการมัยโอซีสสัดส่วนของยีนที่มีการกระจายตัวแบบนี้ มักเกิดขึ้นในกรณีที่ลักษณะนั้นถูกควบคุมด้วยยีนที่มากกว่า 1 คู่ ซึ่งมักพบในวิถีการสร้างชีวโมเลกุล (biosynthetic pathways) เช่นการสร้างกรดอะมิโน (26) ซึ่งถูกควบคุมด้วยเอนไซม์หลายชนิด ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองครั้งนี้ เหตุผลอื่น ๆ ที่ใช้อธิบายสัดส่วนการกระจายของยีนที่เป็น 3 : 1 หรือ 1 : 3 คือการเกิด gene conversion (47)

จากตารางที่ 13 และ 14 ถ้าให้การกระจายของแต่ละยีนเกิดในสัดส่วนปกติคือ 2 : 2 หรือเป็น 4 : 0 (ในกรณี lys : LYS) เราสามารถทาย (predict) จีโนไทพ์ของแอสโคสปอร์ที่ตายหรือไม่งอกในแอสคัสที่ 4, 6, 7, 14, 15, 18 และ 20 - 25 ได้ ดังแสดงในตารางที่ 15

จีโนไทพ์อีกแบบหนึ่งที่เกิดขึ้นคือการตรวจพบแอสโคสปอร์ที่เป็นเซลปกติหรือพันธุ์แท้ (Prototroph) และอธิบายได้ยากถึงสาเหตุการเกิดที่แท้จริงที่ไม่ต้องการกรดอะมิโนชนิดใด ๆ

ทั้งที่เป็นผลจากการมัยโอซีส์ของเซลผสม ∝∝ (Fu - d_1) ซึ่งมีจีโนไทพ์เป็น lys 9 ข้อสันนิษฐานเบื้องต้นที่ใช้อธิบายคาดว่า เกิดการกลายพันธุ์ครั้งที่ 2 (Second mutation) ที่เรียกว่า Supressor mutation ซึ่งอาจเกิดจากอิทธิพลของการฉายแสงอุลตราไวโอเลตในการกระตุ้นให้เกิดการเปลี่ยนสายพันธุ์บ่งเพศ ทำให้เกิดความผิดปกติอย่างอื่นเกิดขึ้นอีก โดยเฉพาะในขั้นตอนการแปลรหัสโปรตีน (translation) โดย t-RNA เกิดการผิดปกติ ทำให้ได้สายโพลีเปปไทด์ (polypeptide) ที่ถูกต้อง มีการสร้างไลซีนขึ้น โดยที่ m-RNA ยังคงมี codon ที่ผิดปกติของการสร้างเอนไซม์สำหรับการสร้างไลซีนอยู่ ข้อสันนิษฐานนี้จะถูกต้องหรือไม่เป็นสิ่งที่ควรจะมีการศึกษาต่อไป

สรุปผลการทดลอง

1. สามารถสร้างเซลผสมโดยวิธีการรวมตัวของเซลโปรโตพลาสจากสายพันธุ์ ∝ STX 166-17 C และ ∝ STX 174-4 D

2. เซลผสมที่ได้เป็นดิพลอยด์มีความเสถียร และมีการรวมกันของนิวเคลียสจากสายพันธุ์ ∝ STX 166-17 C (lys 9 ade 2) กับ ∝ STX 174-4 D (lys 9 met 2 ura 1) เป็น ∝∝ (Fu - d) lys 9

3. แสงอุลตราไวโอเลต สามารถชักนำให้เกิดการเปลี่ยนสายพันธุ์บ่งเพศจาก ∝|∝ ในเซลผสม เป็น ∝ |a หรือ a |∝

4. เซลผสมที่ได้มีลักษณะที่ต่างจากสายพันธุ์พ่อแม่คือ มีขนาด, ปริมาตร และปริมาณดีเอนเอ เพิ่มขึ้นจากสายพันธุ์พ่อแม่

5. เซลผสม ∝∝ (Fu - d) ที่ได้แสดงลักษณะการเจริญที่เป็น Diauxic growth ปรากฏให้เห็นเมื่อเลี้ยงเซลผสมนี้ในอาหาร ซึ่งมีแหล่งคาร์บอนเพียงชนิดเดียวคือ กลูโคส บนเครื่องเขย่าความเร็ว 250 รอบต่อนาที ซึ่งลักษณะนี้ไม่พบในสายพันธุ์ ∝ STX 166-17 C และ ∝ STX 174-4 D ซึ่งเป็นสายพันธุ์พ่อแม่ที่ใช้ เมื่อเลี้ยงในอาหารในสภาวะเดียวกันนี้

6. เซลผสม ∝∝ (Fu - d) แสดงสายพันธุ์บ่งเพศที่รวมกันในรูปแอสฟา มีการตอบสนองต่อสายพันธุ์บ่งเพศที่เป็น a ได้ตามธรรมชาติ และมีมัยโอซีสเกิดขึ้นโดยการสร้างแอสโคสปอร์ แต่ไม่ได้ศึกษาสปอร์เดี่ยวที่เกิดขึ้น

7. การศึกษาลักษณะของนิวเคลียสภายในเซลผสมโดยการย้อมนิวเคลียสด้วยจิมซ่า ไม่สามารถบอกจำนวนนิวเคลียสได้แน่ชัด แต่จากการศึกษาด้วยกล้องจุลทัศน์อิเลคตรอนพบว่ามี 1 นิวเคลียส ซึ่งแสดงว่าหลังจากการรวมตัวของเซลโปรโตพลาสต์ ถ้ายีน KAR ปกติในสายพันธุ์พ่อแม่ที่ใช้ศึกษา เซลผสมที่ได้จะมีการรวมตัวของนิวเคลียส

8. เซลผสม 7 ตัวจาก ∝∝ (Fu - d_1) ถึง ∝∝ (Fu - d_7) ที่ได้จากการรวมตัวของเซลโปรโตพลาสต์มีความเสถียรทางพันธุกรรมเมื่อเก็บรักษาไว้ที่ 4 ^{o}ซ. นาน 1 ปี

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย