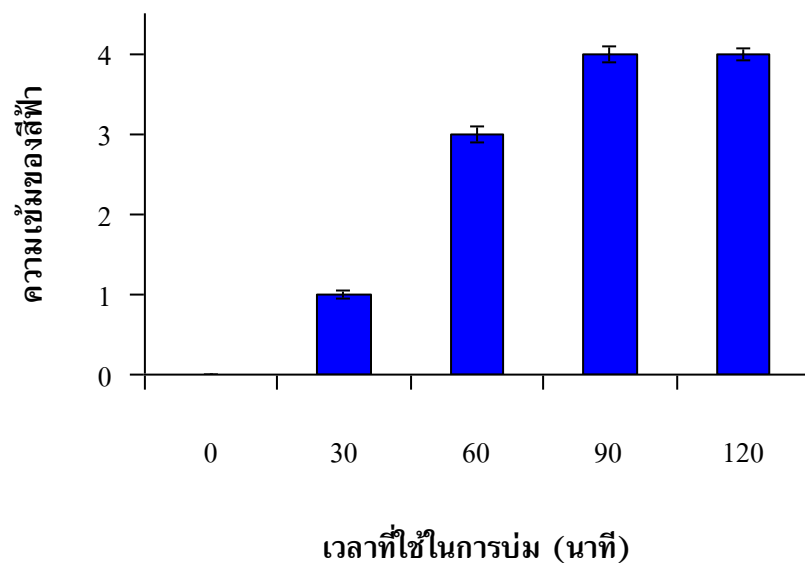
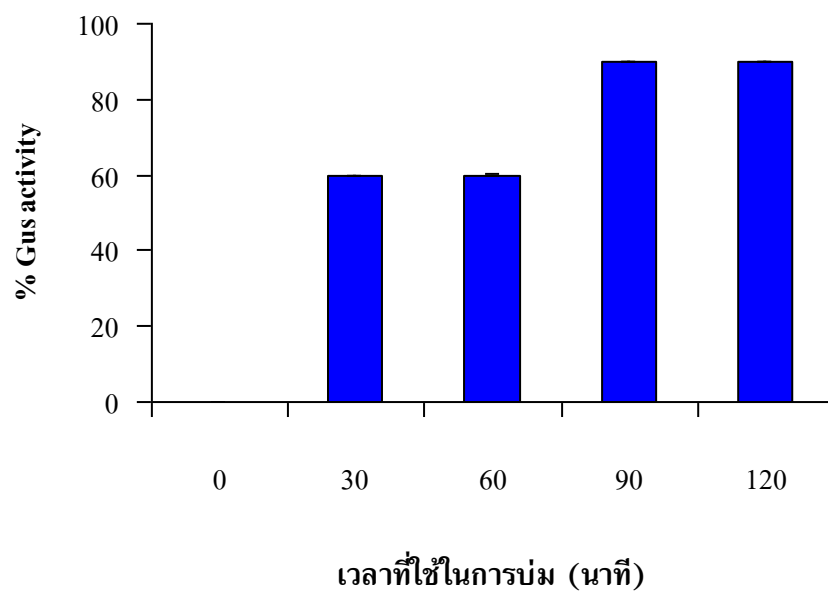




ภาพที่ 49 ความเข้มของสีฟ้าที่เกิดจากการแสดงออกของยีน *gus* บนแคลลัสอ้อยพันธุ Phil 66-07 ที่บ่มร่วมกับ *A. tumefaciens* พันธุ์ LBA4404 (pCAMBIA 1305.1) ในระยะเวลา 0, 30, 60, 90 และ 120 นาที

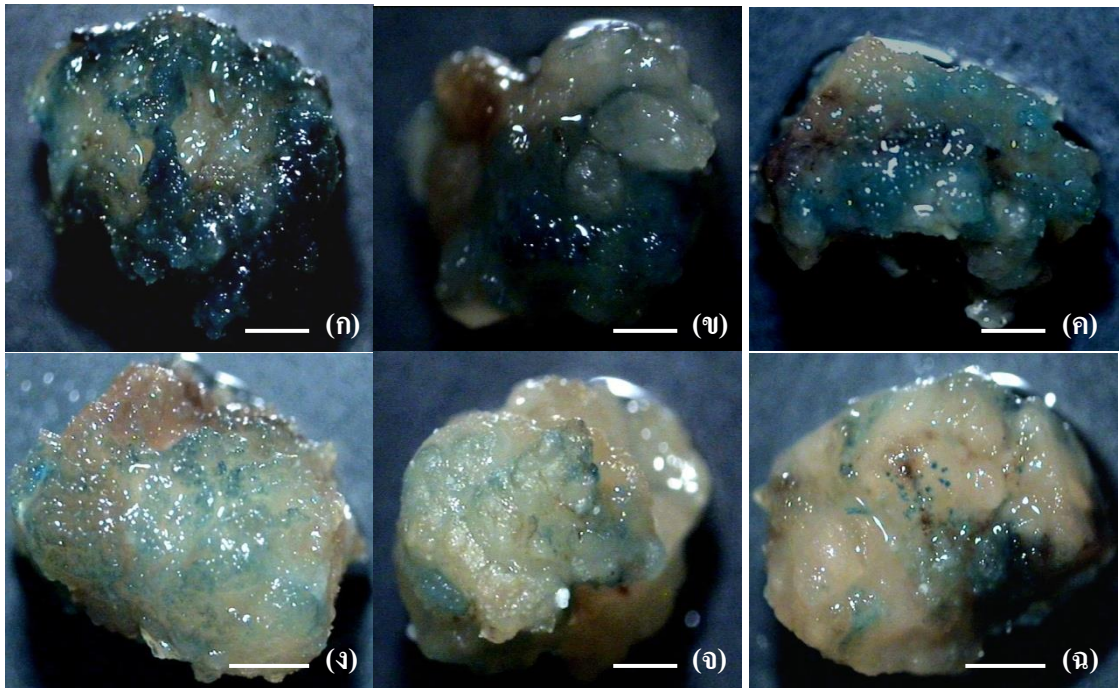


ภาพที่ 50 เปอร์เซ็นต์การแสดงออกของยีน *gus* บนแคลลัสอ้อยพันธุ Phil 66-07 ที่บ่มร่วมกับ *A. tumefaciens* พันธุ์ LBA4404 (pCAMBIA 1305.1) ในระยะเวลา 0, 30, 60, 90 และ 120 นาที

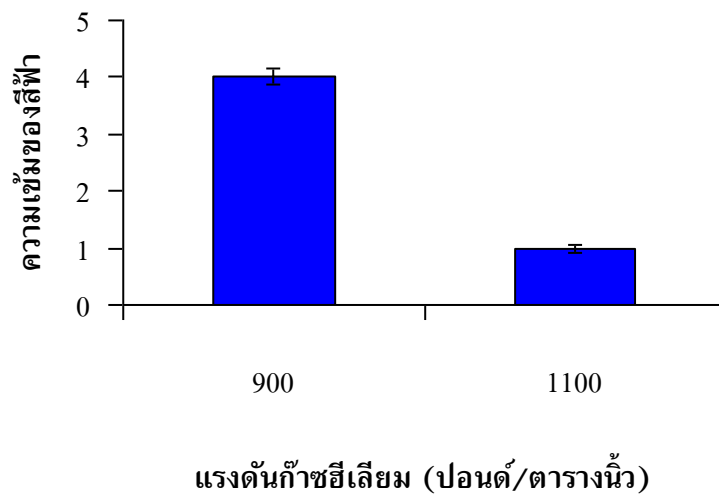
ผลการทดลองที่ 4 การส่งถ่ายยีน chitinase สู่มดแลคโตสอ้อยพันธุ์ Phil 66-07 โดยใช้
เครื่องยิงอนุภาค (particle bombardment)

การทดลองที่ 4.1 การเปรียบเทียบแรงดันก๊าซฮีเลียมที่ใช้ในการส่งถ่ายยีน

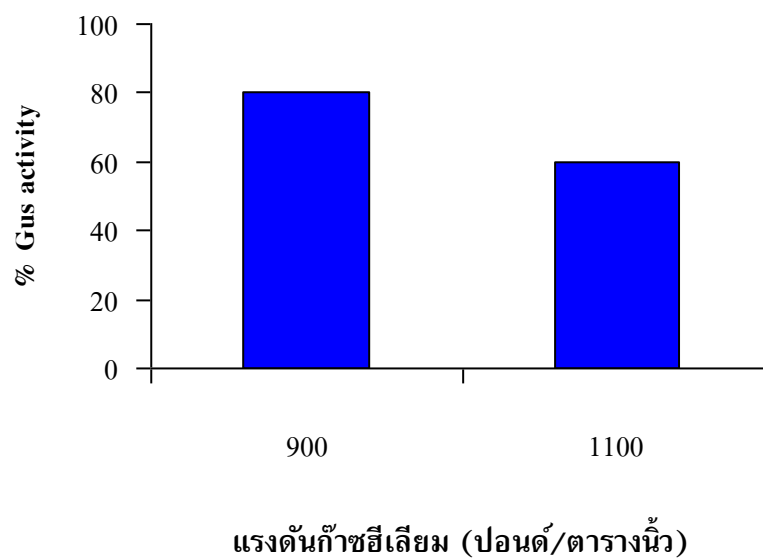
จากการส่งถ่ายยีนเข้าสู่เซลล์ของอ้อย โดยใช้กระสุนทังสเตน ขนาด 1.1 μm มีระยะห่างระหว่างจุดปล่อยกระสุนถึงเนื้อเยื่อเป้าหมายเท่ากับ 9 ซม. แรงดันก๊าซฮีเลียม 900 และ 1,100 ปอนด์/ตารางนิ้ว เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำให้เกิดแคลลัส ที่เติมไฮโกรมัยซินเป็นเวลา 1 สัปดาห์ ตรวจสอบผลการส่งถ่ายยีนพบว่า การส่งถ่ายยีนโดยใช้ความดันก๊าซฮีเลียม 900 ปอนด์ / ตารางนิ้ว มีความเข้มของสีฟ้าที่เกิดจากการแสดงออกของยีน *gus* สูงสุดและสามารถเพิ่มเปอร์เซ็นต์การแสดงออกของยีน *gus* มากกว่าความดัน 1,100 ปอนด์/ตารางนิ้ว คือมีค่าเท่ากับ 80 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 51, 52 และ 53)



ภาพที่ 51 ผลการตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus* บนแคลลัสอ้อยพันธุ์ Phil 66-07 โดยใช้
เครื่อง particle bombardment แรงดันก๊าซฮีเลียม 900 (ก-ค) และ 1100 psi (ง-จ)
(สเกล = 1 มม.)



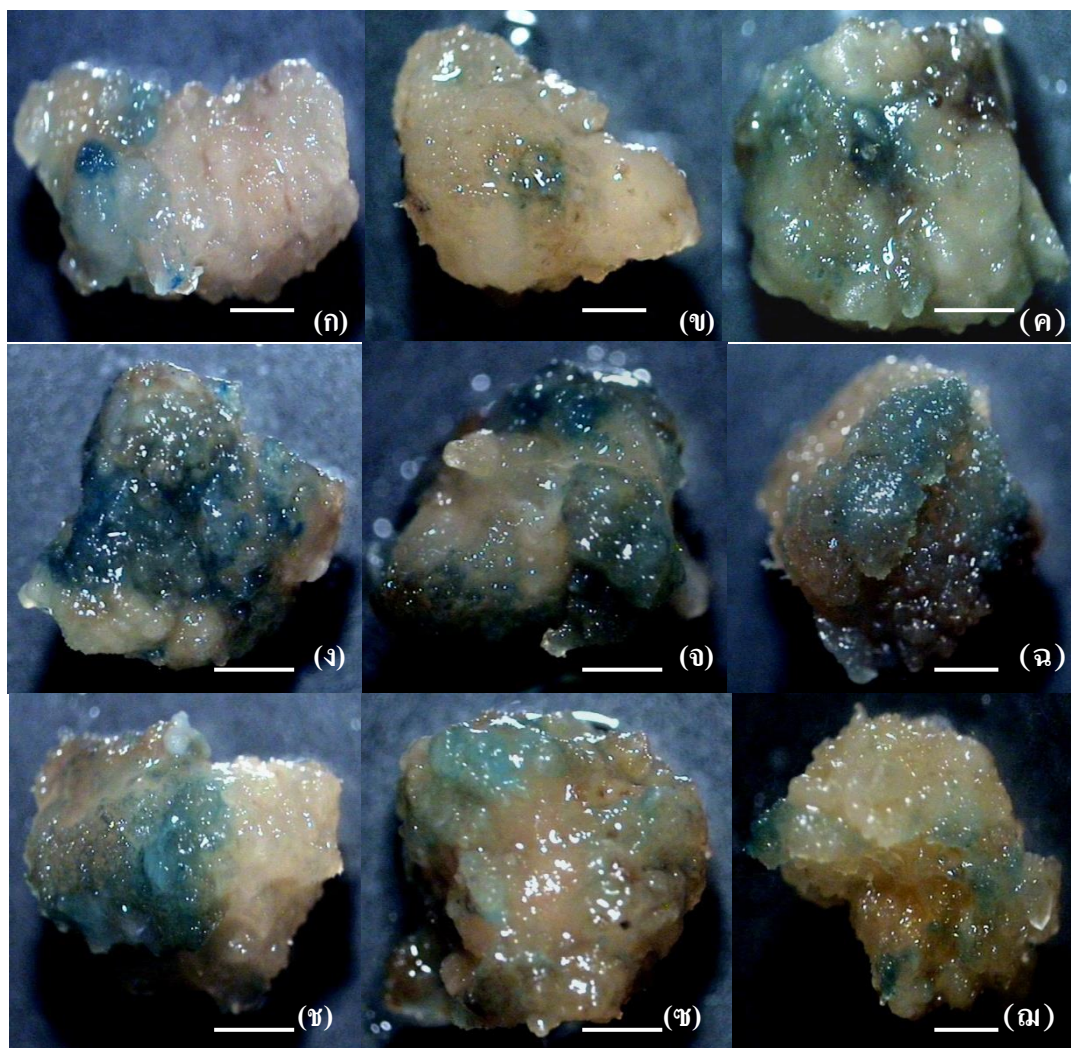
ภาพที่ 52 ความเข้มของสีฟ้าที่เกิดจากการแสดงออกของยีน *gus* บนแคลลัสอ้อยยพันธุ์ Phil 66-07 โดยใช้เครื่อง particle bombardment แรงดันก๊าซฮีเลียม 900 และ 1100 psi



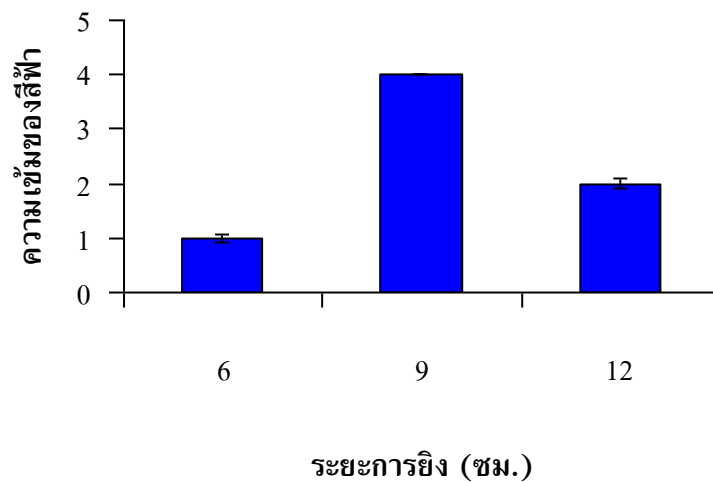
ภาพที่ 53 เปอร์เซ็นต์การแสดงออกของยีน *gus* บนแคลลัสอ้อยยพันธุ์ Phil 66-07 โดยใช้เครื่อง particle bombardment แรงดันก๊าซฮีเลียม 900 และ 1100 psi

ผลการทดลองที่ 4.2 การเปรียบเทียบระยะทางระหว่างจุดปล่อยกระสุน (stopping screen) ถึงเนื้อเยื่อเป้าหมาย (target tissue)

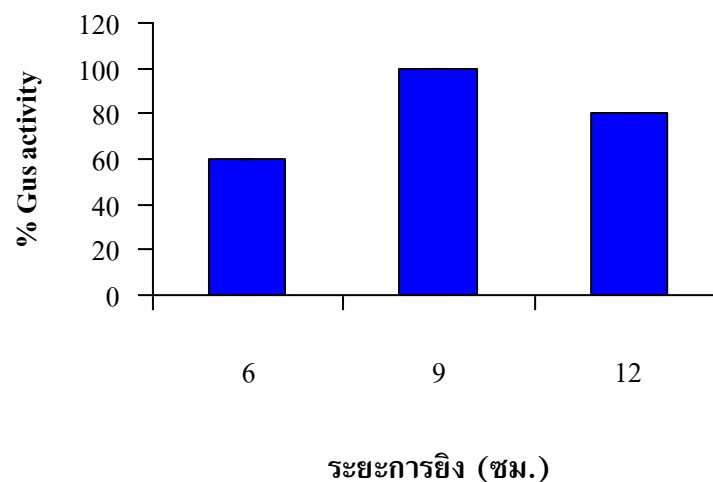
จากการส่งถ่ายยีนสู่แคลลัสของอ้อย โดยใช้กระสุนทั้งสแตน ขนาด 1.1 μm มีระยะห่างระหว่างจุดปล่อยกระสุนถึงเนื้อเยื่อเป้าหมาย 3 ระยะ คือ 6, 9 และ 12 ซม. ใช้แรงดันก๊าซฮีเลียมเท่ากับ 900 ปอนด์/ตารางนิ้ว เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำให้เกิดแคลลัสที่เติมไฮโกรมัยซิน ความเข้มข้น 25 มก./ล. เป็นเวลา 1 สัปดาห์ ตรวจสอบผลการส่งถ่ายยีน พบว่ามีการแสดงออกของยีน *gus* บนแคลลัสของอ้อยที่ระยะห่างระหว่างจุดปล่อยกระสุนถึงเนื้อเยื่อเป้าหมายทั้ง 3 ระยะคือ 6, 9 และ 12 ซม. โดยที่ระยะห่างระหว่างจุดปล่อยกระสุนถึงเนื้อเยื่อเป้าหมาย 9 ซม. มีเปอร์เซ็นต์การแสดงออกของยีน *gus* สูงสุด มีค่าเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ และมีค่าระดับความเข้มของสีฟ้าที่เกิดจากการตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus* สูงสุด ในขณะที่ระยะห่างระหว่างจุดปล่อยกระสุนถึงเนื้อเยื่อเป้าหมาย 6 และ 12 ซม. มีเปอร์เซ็นต์การแสดงออกของยีน *gus* เท่ากับ 30 และ 70 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และค่าระดับความเข้มของสีฟ้าที่เกิดจากการตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus* ที่ระยะห่างระหว่างจุดปล่อยกระสุนถึงเนื้อเยื่อเป้าหมาย 12 ซม. สูงกว่าระยะห่างระหว่างจุดปล่อยกระสุนถึงเนื้อเยื่อเป้าหมาย 6 ซม. (ภาพที่ 54, 55 และ 56)



ภาพที่ 54 ผลการตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus* บนแคลลัสอ้อยพันธุ์ Phil 66-07 โดยใช้
เครื่อง particle bombardment แรงดันก๊าซฮีเลียม 900 psi ที่ระยะการยิง 6 ซม. (ก-
ค) 9 ซม. (ง-จ) 12 ซม. (ข-ฉ) (สเกล = 1 มม.)



ภาพที่ 55 ความเข้มของสีฟ้าที่เกิดจากการแสดงออกของยีน *gus* บนแคลลัสอ้อยพันธุ์ Phil 66-07 โดยใช้เครื่อง particle bombardment แรงดันก๊าซฮีเลียม 900 psi ที่ระยะการยิง 6 ซม. 9 ซม. และ 12 ซม.



ภาพที่ 56 เปอร์เซ็นต์การแสดงออกของยีน *gus* บนแคลลัสอ้อยพันธุ์ Phil 66-07 โดยใช้เครื่อง particle bombardment แรงดันก๊าซฮีเลียม 900 psi ที่ระยะการยิง 6 ซม. 9 ซม. และ 12 ซม.

ผลการทดลองที่ 5 การตรวจสอบการส่งถ่ายยีนในต้นอ่อนอ้อยที่ได้รับการส่งถ่ายยีน chitinase

ผลการทดลองที่ 5.1 การตรวจสอบต้นอ่อนอ้อยที่ได้รับการส่งถ่ายยีน chitinase ด้วยวิธี gus assay

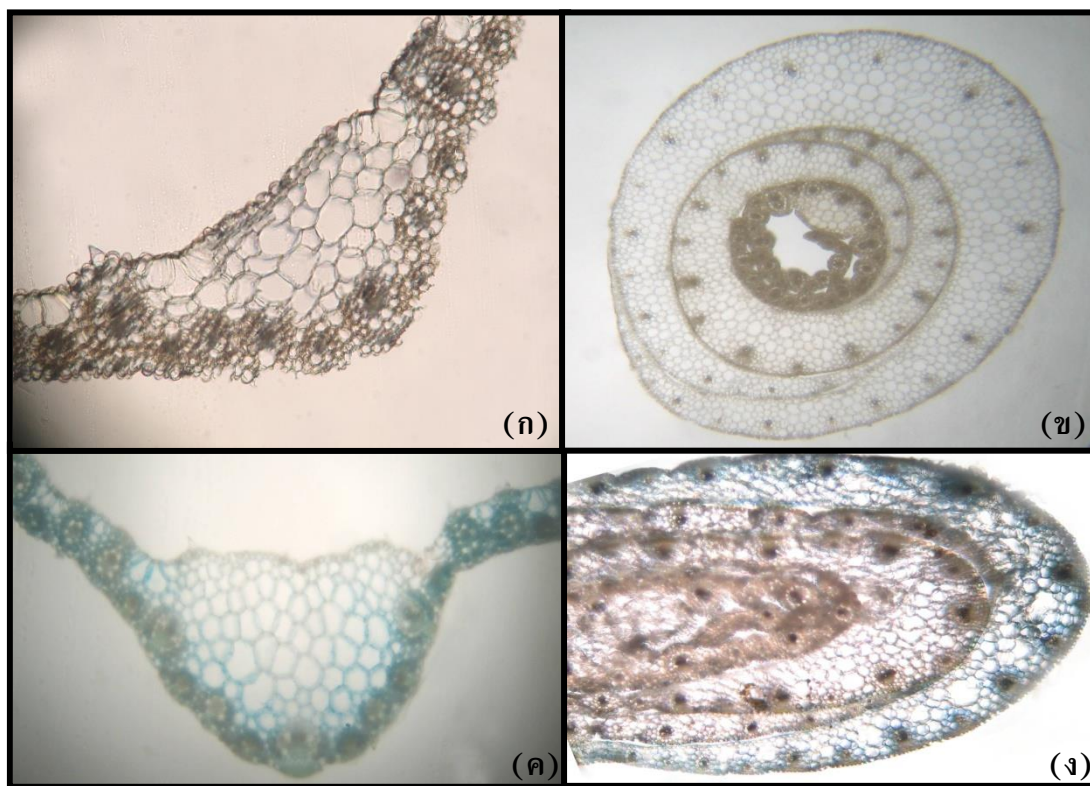
ภายหลังจากส่งถ่ายยีนเข้าสู่แคลลัสของอ้อย และทำการคัดเลือกแคลลัสอ้อยที่ได้รับการส่งถ่ายยีนบนอาหารชักนำให้เกิดแคลลัสและเป็นต้นในอาหารที่เติมไฮโกรมัยซิน พบว่าสามารถคัดเลือกต้นอ้อยตัดแปรพันธุ์กรรมได้ เมื่อสุ่ม ตัวอย่างใบอ้อยมาทดสอบ gus assay พบว่าใบอ้อยที่ได้รับการส่งถ่ายยีนมีการแสดงออกของยีน gus โดยสังเกตเห็นสีฟ้าบนใบอ้อย ส่วนใบอ้อยที่ไม่ได้รับการส่งถ่ายยีนจะไม่มีสีฟ้าเกิดขึ้นบนใบอ้อย (ภาพที่ 57)



ภาพที่ 57 การแสดงออกของยีน gus ในใบอ้อยพันธุ์ Phil 66-07 ที่ไม่ผ่านการส่งถ่ายยีน (ก) เปรียบเทียบกับใบอ้อยที่ได้รับการส่งถ่ายยีน (ข)

ผลการทดลองที่ 5.2 การศึกษากายวิภาคศาสตร์ของต้นอ่อนอ้อยที่ได้รับการส่งถ่ายยีน chitinase

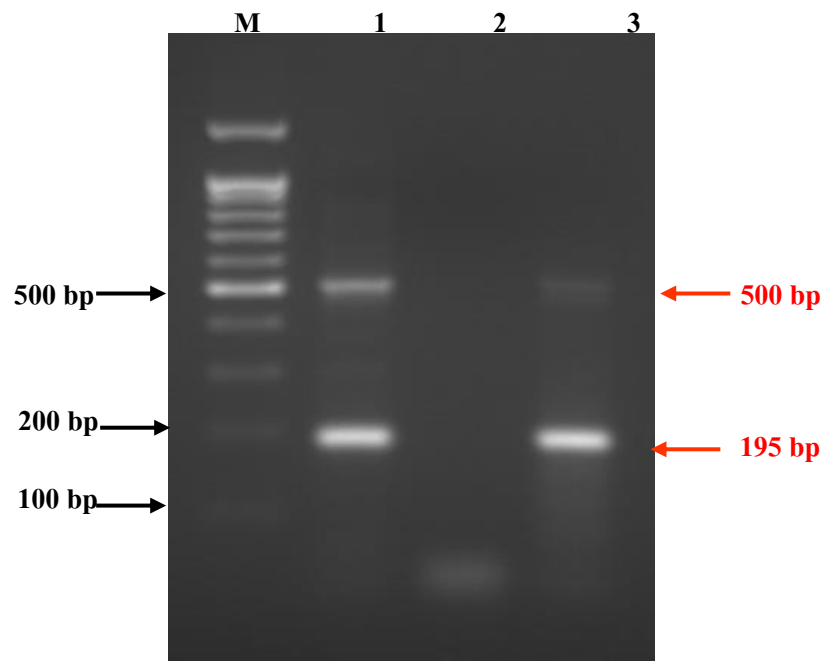
เมื่อนำต้นอ่อนอ้อยที่ผ่านการส่งถ่ายยีน chitinase และต้านทานต่อไฮโกรมัยซิน และต้นอ่อนอ้อยที่ไม่ผ่านการส่งถ่ายยีน มาทำการศึกษาโดยตัดตามขวางใบอ้อย นำไปตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่ามีสีฟ้าปรากฏภายในเซลล์ของอ้อยที่ผ่านการส่งถ่ายยีน ในขณะที่ภายในเซลล์ของอ้อยที่ไม่ผ่านการส่งถ่ายยีนจะไม่ปรากฏสีฟ้า (ภาพที่ 58)



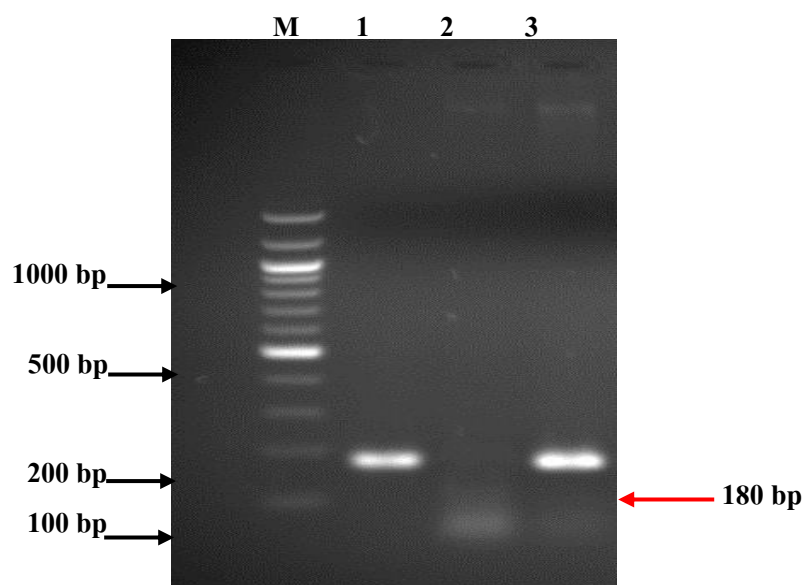
ภาพที่ 58 กายวิภาคศาสตร์ของใบอ้อยพันธุ์ Phil 66-07 ที่ไม่ผ่านการส่งถ่ายยีน (ก และ ข) และผ่านการส่งถ่ายยีน (ค และ ง)

ผลการทดลองที่ 5.3 การตรวจสอบการสอดแทรกของยีน chitinase โดยเทคนิค PCR (Polymerase Chain Reaction)

จากการนำดีเอ็นเอที่สกัดได้จากใบอ้อยที่ผ่านการส่งถ่ายยีน chitinase โดยใช้ *A. tumefaciens* และดีเอ็นเอของใบอ้อยที่ไม่ได้รับการส่งถ่ายยีน มาทำการตรวจการสอดแทรกของยีนโดยการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ primer 3 ชนิด คือ 35S, NOS และ chitinase พบว่ามีการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของใบอ้อยที่ได้รับการส่งถ่ายยีน เมื่อตรวจสอบด้วย gel electrophoresis โดยใช้ 35S เป็นไพรเมอร์ พบชิ้นดีเอ็นเอขนาด 500 และ 195 คู่เบส เมื่อใช้ NOS เป็นไพรเมอร์ พบชิ้นดีเอ็นเอขนาด 180 คู่เบส เมื่อใช้ chitinase เป็นไพรเมอร์ พบชิ้นดีเอ็นเอขนาด 464 คู่เบส ภายในใบของอ้อยที่ได้รับการส่งถ่ายยีน ซึ่งเท่ากับขนาดของดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของพลาสมิด pCAMBIA 1305.1 แสดงว่ามีการสอดแทรกของยีนที่ส่งถ่ายเข้าไปสู่ใบของอ้อยในขณะที่ใบอ้อยที่ไม่ได้รับการส่งถ่ายยีนตรวจไม่พบดีเอ็นเอเหล่านี้ (ภาพที่ 59, 60 และ 61)

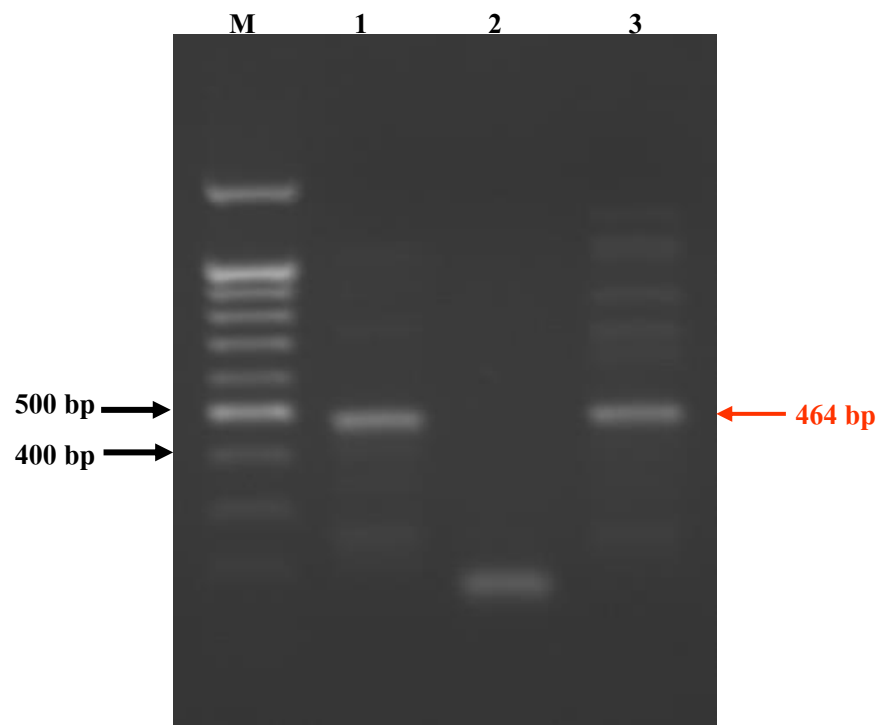


ภาพที่ 59 ผลการตรวจสอบการสอดแทรกของยีนโดยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ 35S คู่กับ anti-35S เลน M = 100 bp DNA Ladder, เลน 1 = พลาสมิด pCAMBIA1305.1, เลน 2 = ดีเอ็นเอของอ้อยที่ไม่ผ่านการส่งถ่ายยีน, เลน 3 = ดีเอ็นเอของอ้อยที่ผ่านการส่งถ่ายยีนโดย *A. tumefaciens*



ภาพที่ 60 ผลการตรวจสอบการสอดแทรกของยีนโดยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ NOS คู่กับ anti-NOS เลน M = 100 bp DNA Ladder, เลน 1 = พลาสมิด pCAMBIA1305.1,

เลน 2 = ดีเอ็นเอของอ้อยที่ไม่ผ่านการส่งถ่ายยีน, เลน 3 = ดีเอ็นเอของอ้อยที่ผ่านการส่งถ่ายยีนโดย *A. tumefaciens*

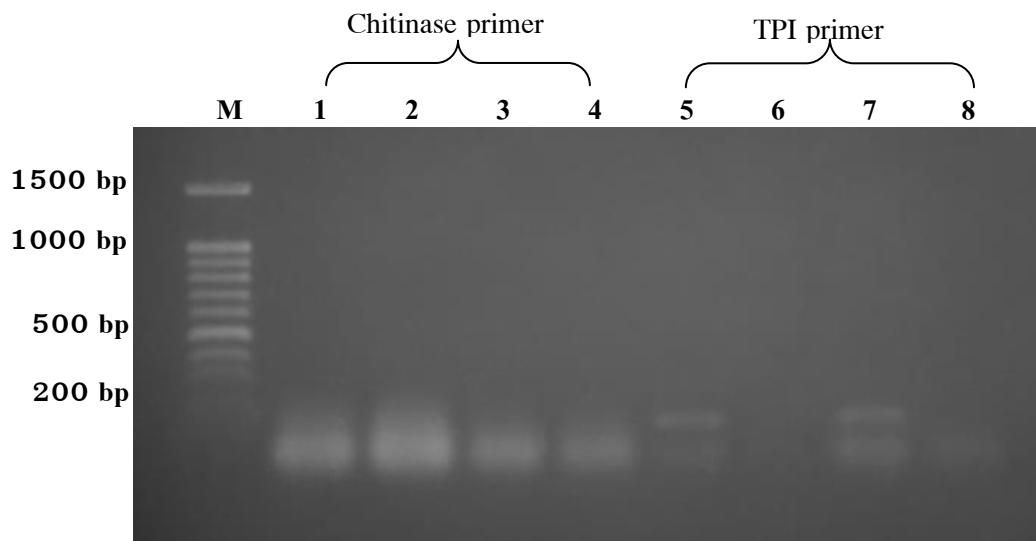


ภาพที่ 61 ผลการตรวจสอบการสอดแทรกของยีนโดยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ chitinase คู่กับ anti-chitinase เลน M = 100 bp DNA Ladder, เลน 1 = พลาสมิด pCAMBIA1305.1, เลน 2 = ดีเอ็นเอของอ้อยที่ไม่ผ่านการส่งถ่ายยีน, เลน 3 = ดีเอ็นเอของอ้อยที่ผ่านการส่งถ่ายยีนโดย *A. tumefaciens*

ผลการทดลองที่ 5.4 การตรวจสอบการแสดงออกของยีน chitinase โดยเทคนิค

RT-PCR (Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction)

จากการนำอาร์เอ็นเอที่สกัดได้จากอ้อยที่ผ่านการส่งถ่ายยีน chitinase และอาร์เอ็นเอของอ้อยที่ไม่ได้รับการส่งถ่ายยีน มาทำการตรวจสอบการแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค RT-PCR โดยใช้ primer 2 ชนิด คือ chitinase และ TPI (House keeping gene) พบว่า เมื่อใช้ไพรเมอร์ chitinase ไม่พบแถบดีเอ็นเอที่คาดว่าจะพบคือ ขนาด 464 คู่เบส ในอ้อยที่ได้รับการส่งถ่ายยีน และอ้อยที่ไม่ได้รับการส่งถ่ายยีน และเมื่อใช้ไพรเมอร์ TPI พบแถบดีเอ็นเอขนาด 176 คู่เบส ในตัวอย่างอ้อยที่ได้รับการส่งถ่ายยีนและอ้อยที่ไม่ได้รับการส่งถ่ายยีนรวมกับการเติมเอนไซม์ reverse transcriptase (ภาพที่ 62)



ภาพที่ 62 ผลการตรวจสอบการแสดงออกของยีนโดยเทคนิค RT-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ chitinase คู่กับ anti-chitinase (เลน 1-4) และใช้ไพรเมอร์ TPI คู่กับ anti-TPI (เลน 5-8) เลน M = 100 bp DNA Ladder, เลน 1 และ 5 = อ้อยที่ไม่ผ่านการส่งถ่ายยีน และเติมเอนไซม์ reverse transcriptase, เลน 2 และ 6 = อ้อยที่ไม่ผ่านการส่งถ่ายยีน และไม่เติมเอนไซม์ reverse transcriptase, เลน 3 และ 7 = อ้อยที่ผ่านการส่งถ่ายยีน และเติมเอนไซม์ reverse transcriptase, เลน 4 และ 8 = อ้อยที่ผ่านการส่งถ่ายยีนและไม่เติมเอนไซม์ reverse transcriptase

4. สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

การส่งถ่ายยีนสู่พืชโดยอาศัย *A. tumefaciens* มีปัจจัยหลายอย่างที่มีผลต่อประสิทธิภาพการส่งถ่ายยีน เช่น ชิ้นส่วนพืช สายพันธุ์ของ *A. tumefaciens* รวมทั้งระยะเวลาที่ใช้ในการบ่มชิ้นส่วนพืชร่วมกับ *A. tumefaciens* ในการศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ LBA4404 (pCambia1305.1) ในอาหารเหลว LB พบว่า ช่วงเวลาที่ *A. tumefaciens* มีการเจริญเติบโตสูงที่สุดคือช่วง 24-30 ชม. มีค่า OD₆₀₀ เท่ากับ 1.15-1.72 หลังจากนั้นการเจริญของแบคทีเรียจึงเข้าสู่ระยะ stationary phase การเจริญของเชื้อช้าลงแล้วคงที่ ในช่วง 32 ชั่วโมง ดังนั้น ช่วงระยะการเจริญเติบโตของ *A. tumefaciens* ที่เหมาะสมที่สามารถนำมาใช้ในการส่งถ่ายยีนได้คือ แบคทีเรียที่เจริญอยู่ในระยะ log phase ในช่วง 24 ชม. ไปจนถึง 32 ชม. ซึ่งอยู่ในระยะ stationary phase ผลที่ได้นี้แตกต่างจากรายงานการทดลองของเกศสุคนธ์ มณีวรรณ (2548) พบว่า ช่วงระยะเวลาที่เชื้อ *A. tumefaciens* เจริญเติบโตได้ดีและเหมาะสมในการนำไปใช้ในการส่งถ่ายยีนคือ 16-24 ชั่วโมง ความแตกต่างนี้อาจเนื่องมาจากจำนวนรอบในการเขย่า อุณหภูมิที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง โดย Petri et al. (2004) ศึกษาการเจริญเติบโตของ *A. tumefaciens* ที่เหมาะสมในการส่งถ่ายยีน พบว่าระยะการเจริญเติบโตของ *A. tumefaciens* ในช่วง log phase ให้ประสิทธิภาพการส่งถ่ายยีนได้ดีที่สุด แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติกับการส่งถ่ายยีนโดยใช้เชื้อ *A. tumefaciens* ที่เจริญอยู่ในระยะ stationary phase นอกจากนี้ Sridevi et al. (2005) ศึกษาการส่งถ่ายยีน chitinase สู่ข้าวโดย *A. tumefaciens* พบว่า ความหนาแน่นของเซลล์ *A. tumefaciens* ที่ใช้ในการส่งถ่ายยีนสู่ข้าวได้ดีคือ ใช้สารแขวนลอยของเชื้อที่มีค่า OD₆₀₀ เท่ากับ 1.0 ส่วนความหนาแน่นของเซลล์ *A. tumefaciens* ที่ใช้ในการส่งถ่ายยีนสู่อ้อย คือความหนาแน่นของเซลล์ที่มีค่า OD₆₀₀ เท่ากับ 1.0 (Manickavasagam et al., 2004)

จากการศึกษาผลของซีโฟแทกซิมต่อการเจริญของเชื้อ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ LBA4404 (pCambia1305.1) ในอาหารเหลว LB ที่เติมซีโฟแทกซิมความเข้มข้นต่างกัน พบว่าซีโฟแทกซิมความเข้มข้น 25 มก./ล. สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *A. tumefaciens* ได้สมบูรณ์ โดยมีค่า OD₆₀₀ เท่ากับ 0.016 และเมื่อนำเชื้อมาเชียบอาหารแข็ง LB ที่เติมกานามัยซิน 100 มก./ล. เพื่อยืนยันการทดลองก็ไม่พบการเจริญของเชื้อแต่อย่างใด ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ มณฑิณี กมลธรรม (2545) รายงานว่าซีโฟแทกซิมความเข้มข้น 25 มก./ล. สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ LBA4404 (pBI121) ได้สมบูรณ์ การที่ซีโฟแทกซิมสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียได้เนื่องจาก ซีโฟแทกซิมเป็นสารปฏิชีวนะที่จัดอยู่ในกลุ่มเซฟาโลสปอรินซึ่งสามารถออกฤทธิ์ยับยั้งการสร้างเปปทิโดไกลแคน ซึ่งเป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ ทำให้เซลล์แตก และมีผลเมื่อแบคทีเรียกำลังแบ่งตัว (แจ่มใส เพียรทอง และคณะ, 2525; Nauerby et al., 1997) ซึ่งถ้าใช้ความเข้มข้นต่ำจะสามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนของแบคทีเรียไม่ให้มีปริมาณมากเกินไปได้ คือจำนวนเชื้อคงที่เพราะไม่สามารถสร้าง

ผนังเซลล์ใหม่ได้ แต่ถ้าใช้ความเข้มข้นสูงจะเป็นสารฆ่าแบคทีเรีย (ยุพา ผึ้งน้อย, 2542; Yu *et al.*, 2001)

การศึกษาหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการบ่มแคลลัสอ้อยร่วมกับ *A. tumefaciens* มีความจำเป็นอย่างมากในการส่งถ่ายยีน โดยระยะเวลาที่เหมาะสมคือ เวลาที่น้อยที่สุดที่มีการแสดงออกของยีน *gus* มากที่สุด เนื่องจากเมื่อบ่มแคลลัสร่วมกับ *A. tumefaciens* นานเกินไปจะทำให้แคลลัสตายหรือมีอัตราการเจริญลดลง รวมทั้งยังเพิ่มปัญหาในการกำจัด *A. tumefaciens* ภายหลังจากการส่งถ่ายยีน เนื่องจากจะมีเชื้อเจริญขึ้นอยู่รอบๆ แคลลัสเป็นจำนวนมากกว่าการบ่มที่ใช้เวลาน้อย การศึกษาหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการบ่มแคลลัสอ้อยร่วมกับ *A. tumefaciens* พบว่า ระยะเวลาที่เหมาะสมในการบ่มแคลลัสอ้อยร่วมกับ *A. tumefaciens* คือ 90 นาที และมีเปอร์เซ็นต์การแสดงออกของยีน *gus* เท่ากับ 90 เปอร์เซ็นต์ Manickavasagum *et al.* (2004) รายงานว่าการศึกษาหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการบ่มแคลลัสอ้อยร่วมกับ *A. tumefaciens* พบว่าการบ่มแคลลัสอ้อยร่วมกับ *A. tumefaciens* เป็นเวลานานช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการส่งถ่ายยีน แต่ไม่ควรเกิน 4 วัน เนื่องจากการบ่มแคลลัสอ้อยร่วมกับ *A. tumefaciens* เป็นเวลานานยิ่งเพิ่มปัญหาในการกำจัดแบคทีเรียแต่อย่างไรก็ดีระยะเวลาที่เหมาะสมในการบ่ม 2 ถึง 4 วัน

การส่งถ่ายยีนโดยวิธีตรงโดยใช้เครื่อง particle bombardment สามารถแก้ปัญหาการส่งถ่ายยีนสู่พืชใบเลี้ยงเดี่ยว ซึ่งส่งถ่ายโดย *Agrobacterium* ได้ยาก (สุนทวิทย์ บุณนาค, 2540) ในปัจจุบันการส่งถ่ายยีนโดยเครื่อง particle bombardment สามารถส่งถ่ายยีนสู่พืชใบเลี้ยงเดี่ยวได้หลายชนิด ซึ่งประสิทธิภาพในการส่งถ่ายยีนสู่พืชขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่างเช่น ชนิดและขนาดของอนุภาคโลหะที่ใช้ แรงดันของก๊าซฮีเลียม ระยะทางระหว่างจุดปล่อยกระสุนถึงเนื้อเยื่อเป้าหมาย จากการศึกษาการส่งถ่ายยีน chitinase สู่แคลลัสอ้อย โดยเครื่อง particle bombardment ซึ่งใช้พลาสมิด pCambia1305.1 ที่มียีน chitinase เคลือบบนกระสุนทั้งสแตน ขนาด 1.1 μm ใช้ rupture disc ที่ทนแรงดันก๊าซฮีเลียม 900 และ 1,100 ปอนด์/ตารางนิ้ว แปรผันระยะการยิง 3 ระยะคือ 6, 9 และ 12 ซม. เมื่อเปรียบเทียบผลของแรงดันก๊าซฮีเลียม พบว่า แรงดันก๊าซฮีเลียมที่เหมาะสมสำหรับการส่งถ่ายยีนเข้าสู่แคลลัสอ้อย คือ 900 ปอนด์/ตารางนิ้ว เมื่อเปรียบเทียบระยะทางระหว่างจุดปล่อยกระสุนถึงแคลลัสอ้อย พบว่าระยะทาง 6 ซม. มีระดับการแสดงออกของยีน *gus* น้อย และเมื่อนำแคลลัสอ้อยมาเพาะเลี้ยงต่อ จะทำให้เซลล์ของแคลลัสบอบบี้และไม่สามารถเพาะเลี้ยงต่อไปได้ เนื่องจากผลกระทบจากแรงดันดังกล่าว ส่วนระยะทางที่เหมาะสมทำให้แคลลัสอ้อยมีชีวิตรอดมากคือ ที่ระยะ 9 และ 12 ซม. จากการทดลองพบว่าระยะทางระหว่างจุดปล่อยกระสุนถึงแคลลัสอ้อยที่เหมาะสมคือ 9 ซม. เพราะการแสดงออกของยีน *gus* มีเปอร์เซ็นต์สูงกว่าที่ระยะ 12 ซม. ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาการส่งถ่ายยีนเข้าสู่ข้าว โดยเกศสุคนธ์ มณีวรรณ (2548) พบว่า ระยะทาง 9 ซม. เหมาะสมในการส่งถ่ายยีนมากกว่าระยะ 12 ซม. เช่นเดียวกันการศึกษาของ Filho *et al.* (2003) ที่พบว่าระยะที่เหมาะสมในการส่งถ่ายยีนสู่ส้ม คือ 9 ซม.

เมื่อนำใบอ่อนของอ้อยตัดแปรพันธุ์กรรม ที่สามารถเจริญบนอาหารที่เติม ไฮโครมัยซิน มาตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus* พบว่าเกิดสีฟ้าบนใบอ้อย จากผลที่ได้นี้สามารถยืนยันได้ว่าอ้อยได้รับยีนที่ส่งถ่ายเข้าไป

จากการศึกษาเปรียบเทียบลักษณะทางกายวิภาคศาสตร์ของใบอ้อย ที่ผ่านการตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus* ด้วยวิธี GUS assay โดยการตัดตามขวางของใบและลำต้นอ้อย พบว่าเซลล์ภายในใบและลำต้นของอ้อยมีสีฟ้าเกิดขึ้น ในขณะที่ใบและลำต้นจากอ้อยปกติที่ไม่ผ่านการส่งถ่ายยีนจะไม่พบสีฟ้าเกิดขึ้น ซึ่งผลการทดลองดังกล่าวเป็นการยืนยันการแสดงออกของยีน *gus*

จากการตรวจสอบการสอดแทรกของยีนโดยเทคนิค PCR โดยใช้ดีเอ็นเอจากแคลลัสของอ้อยที่ผ่านการส่งถ่ายยีนโดย *A. tumefaciens* และโดยเครื่อง particle bombardment เมื่อใช้ไพรเมอร์ 35S พบว่า มีการเพิ่มจำนวนของปริมาณดีเอ็นเอที่มีขนาด 500 และ 195 bp ซึ่งตรงกับแถบดีเอ็นเอของ pCAMBIA 1305.1 ที่เป็น positive control และไม่พบในดีเอ็นเอของอ้อยที่ไม่ได้ผ่านการส่งถ่ายยีนซึ่งเป็น negative control เมื่อใช้ไพรเมอร์ NOS พบว่า มีการเพิ่มจำนวนของปริมาณดีเอ็นเอที่มีขนาด 180 bp ซึ่งตรงกับแถบดีเอ็นเอของ pCAMBIA 1305.1 ที่เป็น positive control และไม่พบในดีเอ็นเอของอ้อยที่ไม่ได้ผ่านการส่งถ่ายยีนซึ่งเป็น negative control และเมื่อใช้ไพรเมอร์ chitinase พบว่า มีการเพิ่มจำนวนของปริมาณดีเอ็นเอที่มีขนาด 464 bp ซึ่งตรงกับแถบดีเอ็นเอของ pCAMBIA 1305.1 ที่เป็น positive control และไม่พบในดีเอ็นเอของอ้อยที่ไม่ได้ผ่านการส่งถ่ายยีนซึ่งเป็น negative control สอดคล้องกับการทดลองของ นาถฤดี ชำนาญพล (2546) รายงานการตรวจสอบการสอดแทรกของยีนในเสาวรสีที่ผ่านการส่งถ่ายยีนโดย *A. tumefaciens* สายพันธุ์ LBA4404 (pCAMBIA1305.1) โดยใช้ไพรเมอร์ 35s และ NOS พบว่ามีการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอขนาด 195 และ 180 bp ตามลำดับ จารูวรรณ จาติเสถียร (2546) ทำการส่งถ่ายยีนโคทิเนสให้แก่ข้าวพื้นเมืองไทย ภายหลังการส่งถ่ายทำการตรวจสอบการคงอยู่ของยีนโดยวิธี PCR จากการใช้ primer 35S และ chi สามารถตรวจพบแถบดีเอ็นเอขนาด 195 และ 464 bp ตามลำดับ จากตรวจสอบการแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค RT-PCR โดยใช้ primer 2 ชนิด คือ chitinase และ TPI พบว่า เมื่อใช้ไพรเมอร์ chitinase ไม่พบแถบดีเอ็นเอในอ้อยที่ได้รับการส่งถ่ายยีนและอ้อยที่ไม่ได้รับการส่งถ่ายยีน และเมื่อใช้ไพรเมอร์ TPI พบแถบดีเอ็นเอขนาด 176 คู่เบส ในตัวอย่างอ้อยที่ได้รับการส่งถ่ายยีนและอ้อยที่ไม่ได้รับการส่งถ่ายยีน สอดคล้องกับ Lontom, W. (2009) รายงานการตรวจสอบการแสดงออกของยีนโดยเทคนิค RT-PCR ในอ้อยพันธุ์ K84-200 และอ้อยพันธุ์ K88-92 พบว่าเมื่อใช้ไพรเมอร์ TPI พบแถบดีเอ็นเอขนาด 176 คู่เบส ในอ้อยพันธุ์ K84-200 และอ้อยพันธุ์ K88-92