

การหาลำดับเบสด้านข้าง LB ของ T-DNA ที่สอดแทรกในจีโนมกล้วยไม้สกุลหวาย
พันธุ์ เอียสกุล ดัดแปลงพันธุกรรมด้วยเทคนิค AL-PCR
The Verification of DNA Sequences Adjacent to LB of T-DNA in Transgenic
Dendrobium 'Sonia' Earsakul Genome Using AL-PCR Technique

ปัทมา สนสา¹, ปิยนุช ศรชัย^{2,3}, ปาริชาติ เบิร์นส⁴, สอนิชชัย จันท์เปรม^{1,5} เสริมศิริ จันท์เปรม^{1,3,6,*}
Pattama Sonsaka¹, Piyanuch Sornchai^{2,3}, Parichart Burns⁴, Sontichai Chanprame^{1,5} Sermsiri Chanprame^{1,3,6,*}

Received 16 Nov 2020/Revised 9 Feb 2021/Accepted 2 Mar 2021

ABSTRACT

In *Agrobacterium*-mediated genetic transformation, the integration site of T-DNA in plant genome was non-predictability. The inserted position of transgenes may affect gene expression and subsequent physiological traits. This research explained the utilization of Adaptor Ligation-Polymerase Chain Reaction (AL-PCR) technique to verify the sequence adjacent to the left border of T-DNA (LB T-DNA) of the transgenic *Dendrobium* 'Sonia' Earsakul possesses antisense *CP-ACO1*. The genomic DNA of transgenic orchid was digested with restriction enzyme *PsiI* to generate blunt ended DNA strands prior to ligating with the blunt end adapter. The PCR was performed using adapter ligated DNA fragments as the templates. The forward primer was designed to be complimentary with adapter sequences and reverse primer was specific to known sequence of *hpt* gene that was inserted into the plant genome. The analysis of amplicons resulted from AL-PCR technique revealed 3 DNA bands at the sizes of approximately 750, 1,500 and 2,000 base pairs. The DNA sequence analysis of 750 bp band revealed that part of *hpt* gene in T-DNA was connected to LB sequence that fused to the 160 bp upstream of vector backbone sequences. For the bands of 1,500 and 2,000 base pairs, the DNA sequence analysis could not be achieved due to their low purity and amount.

Keywords: Transgenic plant, AL-PCR, insertion position

^{1/} ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ.นครปฐม 73140 และศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนานวัตกรรมการศึกษาและการวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กรุงเทพฯ 10900

^{1/} Center for Agricultural Biotechnology, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom 73140 and Center of Excellence on Agricultural Biotechnology: (AG-BIO/PERDO-CHE), Bangkok 10900, Thailand.

^{2/} สำนักวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพฯ 10220

^{2/} Biotechnology Research and Development Office, Department of Agriculture, Bangkok 10220, Thailand.

^{3/} ศูนย์วิทยาการขั้นสูงเพื่อเกษตรและอาหาร สถาบันวิทยาการขั้นสูงแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ภายใต้โครงการส่งเสริมการวิจัยในอุดมศึกษาและพัฒนามหาวิทยาลัยวิจัยแห่งชาติ

^{3/} Center for Advanced Studies for Agriculture and Food, Kasetsart University Institute for Advanced Studies (CASAF, NRU-KU), Bangkok 10900, Thailand.

^{4/} ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ, สวทช. คลองหลวง จ.ปทุมธานี 12120

^{4/} National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, (BIOTEC), NSTDA, Klong Luang, Pathum Tani 12120, Thailand.

^{5/} ภาควิชาพืชไร่นา และ ^{6/} ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ จ.นครปฐม 73140

^{5/} Dept. of Agronomy and ^{6/} Dept. of Horticulture, Fac. of Agriculture at Kamphaeng Saen, Kasetsart University, Nakhon Pathom 73140, Thailand.

*Corresponding author: agrsrc@ku.ac.th

บทคัดย่อ

การถ่ายยีนในพืชโดยใช้แบคทีเรีย *Agrobacterium tumefaciens* เป็นพาหะนั้น T-DNA ที่ถูกส่งถ่ายเข้าสู่เซลล์พืชจะแทรกเข้าไปในจีโนมพืชแบบสุ่ม ซึ่งตำแหน่งที่มีการสอดแทรกนี้ อาจมีผลกระทบต่อการแสดงออกของยีนและลักษณะทางสรีระได้ ในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการตรวจสอบลำดับเบสที่อยู่ด้านข้างของปลายด้าน LB ของ T-DNA ที่สอดแทรกอยู่ในจีโนมกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์เอี้ยสกุล ที่ได้รับการถ่ายยีน *antisense CP-ACO1* ด้วยเทคนิค Adaptor Ligation-Polymerase Chain Reaction (AL-PCR) ซึ่งทำโดยการย่อยจีโนมดีเอ็นเอของกล้วยไม้ตัดแปลงพันธุกรรม ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *PsiI* ที่มีจุดตัดอยู่ในยีนที่ถ่ายเข้าไป และให้ผลผลิตชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีลักษณะปลายทู่ (blunt end) จากนั้นนำมาเชื่อมต่อกับส่วนปลายของ adaptor ซึ่งมีลักษณะปลายทู่เช่นเดียวกัน แล้วนำมาทำปฏิกิริยา PCR โดยใช้ forward primer ที่มีลำดับเบสคู่สมกับ adaptor ส่วนของ reverse primer นั้นออกแบบให้มีลำดับเบสที่จำเพาะกับ ยีน *hpt* ที่ถูกถ่ายเข้าไปในพืช ผลจากการวิเคราะห์ผลผลิตของ AL-PCR พบว่า ได้แถบดีเอ็นเอ จำนวน 3 แถบ ขนาดประมาณ 750, 1,500 และ 2,000 คู่เบส ซึ่งเมื่อวิเคราะห์ลำดับเบสของแถบดีเอ็นเอที่มีความยาว 750 คู่เบส พบว่า ประกอบด้วยลำดับเบสในส่วนที่ยีน *hpt* และ LB ของ T-DNA ความยาว 554 คู่เบส ที่เชื่อมต่อกับลำดับเบสของพลาสมิด (vector backbone) ที่ตัดออกไปจาก LB จำนวน 160 คู่เบส สำหรับแถบดีเอ็นเอที่มีขนาด 1,500 และคู่เบส 2,000 นั้น ไม่สามารถวิเคราะห์ลำดับเบสได้ เนื่องจากมีความบริสุทธิ์และปริมาณไม่เพียงพอ

คำสำคัญ: พืชตัดแปลงพันธุกรรม, เทคนิค AL-PCR, ตำแหน่งสอดแทรกของยีนเป้าหมาย

คำนำ

การถ่ายยีนในพืชโดยใช้แบคทีเรีย *Agrobacterium tumefaciens* เป็นพาหะนั้น เป็นวิธีการหนึ่งที่นิยมนำมาใช้ในการสร้างพืชตัดแปลงพันธุกรรม เพื่อให้มีการแสดงออกในลักษณะที่

ต้องการ โดยการอาศัยกลไกการตามธรรมชาติของเชื้อชนิดนี้ ส่งถ่ายชิ้นส่วน transfer DNA (T-DNA) ที่มีชิ้นส่วนยีนที่เราสนใจเข้าสู่จีโนมของพืช ซึ่งในการทำพันธุวิศวกรรมของพืชนั้น สามารถทำการตัดแปลงพันธุกรรมพืชได้ โดยการตัดต่อยีนเป้าหมายเข้าไปอยู่ในส่วนของ T-DNA จากนั้น นำ T-DNA ที่ได้รับการตัดแปลงนี้ใส่กลับเข้าไปในเซลล์ของแบคทีเรีย และเมื่อนำเชื้อไป infect เซลล์พืช เชื้อก็จะสามารถนำพาเป้าหมายที่ต้องการเข้าสู่เซลล์พืชได้ อย่างไรก็ตาม กระบวนการที่เขื่อนำส่วนของ T-DNA สอดแทรกเข้าไปในจีโนมพืชนั้น ไม่สามารถควบคุมให้มีการแทรกตัวในตำแหน่งที่เฉพาะเจาะจงได้ จึงทำให้ไม่สามารถกำหนดตำแหน่งของยีนเป้าหมายภายในจีโนมพืชได้ การทราบบริเวณที่เกิดการสอดแทรกของยีนเป้าหมายในจีโนมพืชนั้น เป็นส่วนสำคัญที่จะช่วยสร้างความเข้าใจในกลไกทางสรีรวิทยาที่เกิดการเปลี่ยนแปลงไป อันเนื่องมาจากการถ่ายยีนได้ชัดเจนยิ่งขึ้น ปัจจุบันนี้ ได้มีการประยุกต์เทคนิคการตรวจสอบตำแหน่งสอดแทรกของยีน โดยอาศัยพื้นฐานของเทคนิค PCR ในการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่อยู่ด้านข้างของบริเวณที่ทราบลำดับเบสแล้ว เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ลำดับเบสบริเวณรอยต่อดังกล่าว ซึ่งเทคนิคที่มีรายงานว่าใช้ได้ผลดี คือ เทคนิค Adaptor-ligation PCR

เทคนิค Adaptor-ligation PCR (AL-PCR) หรือ Ligation-mediated PCR (LM-PCR) เดิมมีการนำมาใช้สำหรับการทำ chromosome walk (Padegimas and Reichert, 1998) และต่อมามีรายงานการนำเทคนิคดังกล่าวมาใช้ในการหาลำดับเบสของจีโนมพืชที่อยู่ด้านข้างของปลาย T-DNA (Choi *et al.*, 1999) ซึ่งเทคนิค AL-PCR นี้เป็นการประยุกต์เทคนิค PCR ร่วมกับการอาศัยคุณสมบัติของเอนไซม์ตัดจำเพาะ ที่สามารถตัดย่อยดีเอ็นเอ ให้มีลักษณะเป็นชิ้นส่วนขนาดต่าง ๆ โดยมีขั้นตอนดังแสดงใน Figure 1 ซึ่งในขั้นตอนแรก จะใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะตัดย่อยดีเอ็นเอของพืชตัดแปลงพันธุกรรมแบบสุ่ม ให้ได้เส้นดีเอ็นเอที่เป็นปลายทู่ (blunt end) โดยจะได้ชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่มีขนาดแตกต่างกัน จำนวนมาก ซึ่งชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีบริเวณส่วนที่เป็นรอยต่อของ T-DNA กับจีโนมพืช จะถูกตัดและปะปนอยู่กับชิ้น

ส่วนดีเอ็นเออื่น ๆ (Figure 1A and 1B) ขั้นตอนต่อไป คือ การเชื่อมต่อปลายทั้งสองด้านของชิ้นส่วนดีเอ็นเอเหล่านี้ด้วย adaptor (Figure 1B) แล้วเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนที่มี adaptor เชื่อมต่ออยู่ด้วยเทคนิค PCR (Figure 1C) โดยในการทำ PCR ครั้งแรก จะใช้คู่ไพรเมอร์ที่มีไพรเมอร์หนึ่งเส้นที่มีความจำเพาะกับลำดับเบสของ adaptor ด้านใดด้านหนึ่ง และไพรเมอร์อีกหนึ่งเส้นมีความจำเพาะกับยีนที่เราส่งถ่ายเข้าไป ดังนั้น ผลผลิตของปฏิกิริยา PCR ในครั้งแรก หรือ primary AL-PCR Products คือ ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่อยู่ในบริเวณที่เป็นรอยต่อของ T-DNA และลำดับเบสที่อยู่เหนือชิ้น

ไปจนถึงส่วนของจีโนมพืช

อย่างไรก็ตาม ผลผลิตของปฏิกิริยา PCR ในรอบแรกนี้มักมีปริมาณน้อย ทำให้การตรวจวิเคราะห์ทำได้ยาก จึงมีการประยุกต์โดยนำผลผลิตของ PCR ในรอบแรกตั้งอธิบายข้างต้น มาเพิ่มปริมาณโดยใช้ไพรเมอร์อีกคู่หนึ่งที่ออกแบบให้อยู่ด้านในของผลผลิตเดิม (Figure 1C) ซึ่งการทำ PCR ครั้งที่สองหรือ secondary PCR นี้ จัดเป็น nested PCR ซึ่งจะให้ได้ผลผลิตชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เป็นช่วงรอยต่อดังกล่าวจำนวนมากเพียงพอที่จะนำไปใช้ในการวิเคราะห์ลำดับเบสได้ ซึ่งที่ผ่านมา มีผู้รายงานการนำเทคนิค nested PCR

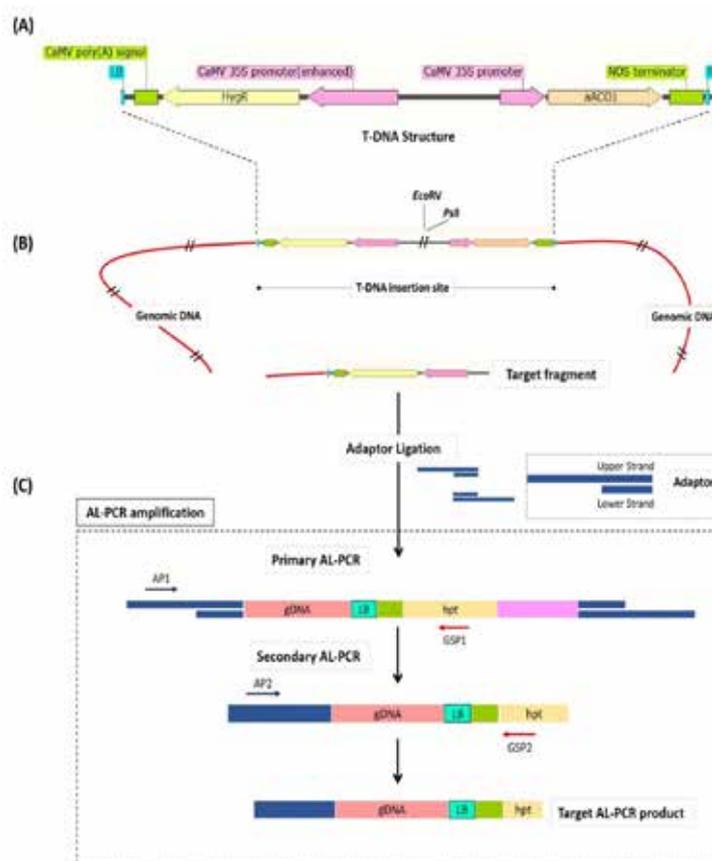


Figure 1 Model diagram of isolation of flanking sequences of LB T-DNA inserted in transgenic orchid genome by AL-PCR technique. (A) T-DNA structure of pCAMBIA1301aACO1 contained antisense *CP-ACO1* (*aACO1*) gene located near RB and *hygromycin phosphotransferase* (*hpt*) gene in LB side. (B) Restricted genomic DNA orchid (//) with either *EcoRV* or *PstI* that cut inside T-DNA region and random cut outside. The target fragment contained LB T-DNA region linked flanking sequences was ligated with adapter. (C) AL-PCR amplification process contained 2 steps; primary AL-PCR showed the target template and AP1 and GSP1 primer binding site (blue and red arrow, respectively). For specific isolation, 1 ul of 50-fold dilution of primary PCR products were used to template in secondary AL-PCR to amplified target AL-PCR product by AP2 and GSP2 primer (blue and red arrow in secondary AL-PCR step, respectively). Furthermore, target AL-PCR product was used to analyze the flanking sequences of LB T-DNA

มาใช้ร่วมกับเทคนิค AL-PCR เพื่อเพิ่มปริมาณชิ้น ดีเอ็นเอบริเวณรอยต่อของ T-DNA กับลำดับเบส ในจีโนมพืช ทำให้สามารถวิเคราะห์ตำแหน่งสอดแทรกของยีนเป้าหมายได้สำเร็จในหลายกรณี เช่น ใน *Arabidopsis* (Malley *et al.*, 2007; Spertini *et al.*, 1999) ในหอมแดง (Zheng *et al.*, 2001) เป็นต้น

งานวิจัยนี้ได้ประยุกต์ใช้เทคนิค AL-PCR ในการศึกษาลำดับเบสที่อยู่ด้านข้างของปลายด้าน LB ของ T-DNA ในกล้วยไม้สกุลหวายที่ได้รับการถ่ายยีน antisense CP-ACO1 และยีน *hpt* เพื่อให้ทราบตำแหน่งที่สอดแทรกของยีนบนจีโนมของกล้วยไม้ดัดแปลงพันธุกรรม

อุปกรณ์และวิธีการ

1. พืชที่ใช้ในการทดลอง

กล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์ เอียสกุล (*Dendrobium Sonia* 'Earsakul') สายต้น AE3 ที่ได้รับการถ่ายยีน antisense CP-ACO1 โดยวิธีการใช้ *Agrobacterium tumefaciens* สายพันธุ์ AGL-1 เป็นพาหะ มีพลาสมิด pCAMBI-A1301aACO1 ที่ดัดแปลงให้มียีน antisense CP-ACO1 วางตัวอยู่ในบริเวณ T-DNA ทางปลายด้าน RB และมียีน hygromycin phosphotransferase (*hpt*) ซึ่งเป็นยีนคัดเลือก (selectable marker gene) วางตัวอยู่ใกล้กับด้าน LB ของ T-DNA (Figure 1A) ต้นกล้วยไม้ดัดแปลงพันธุกรรมดังกล่าว มีการตรวจสอบยืนยันการคงอยู่ของยีน antisense CP-ACO1 และ *hpt* แล้ว (Sornchai *et al.*, 2015) เนื้อเยื่อพืชที่ใช้ คือ ส่วนใบอ่อนจากต้นกล้วยไม้ ที่ปลูกในโรงเรือนชีวนิรภัย ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ.นครปฐม

2. การสกัด genomic DNA จากใบอ่อนกล้วยไม้ และตรวจสอบการคงอยู่ของยีน

สกัด genomic DNA จากใบอ่อนกล้วยไม้ดัดแปลงพันธุกรรมด้วยวิธี CTAB (Doyle and Doyle, 1990) โดยใช้ใบอ่อนน้ำหนัก 0.1 กรัม แล้วนำดีเอ็นเอมาตรวจสอบความเข้มข้นโดยใช้สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ และตรวจสอบคุณภาพโดยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส นำมาตรวจสอบการ

คงอยู่ของยีน *hpt* และยีน antisense CP-ACO1 ซึ่งเป็นส่วนที่อยู่ภายใน T-DNA ด้วยเทคนิค PCR จากนั้นนำผลผลิตของแต่ละตัวอย่างที่ได้จากการทำปฏิกิริยา PCR มาตรวจสอบด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส โดยมียีน *actin* เป็น internal control ตามกรรมวิธีของ ปิยนุช (2558)

3. การตรวจสอบตำแหน่งที่สอดแทรกของยีนบนจีโนมของกล้วยไม้ดัดแปลงพันธุกรรม

3.1 การตัดย่อย genomic DNA กล้วยไม้ ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

สร้าง genomic DNA libraries โดยย่อย genomic DNA ของกล้วยไม้ดัดแปลงพันธุกรรมที่สกัดได้จากข้อ 1 ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะที่ให้ผลผลิตชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีลักษณะปลายทู่ (blunt end) สามารถเชื่อมต่อกับส่วนปลายของ adaptor ซึ่งมีลักษณะปลายทู่เช่นเดียวกัน ในงานวิจัยนี้เลือกใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Pst*I มีตำแหน่งตัดอยู่ภายในชิ้นส่วน T-DNA (อ้างอิงข้อมูลลำดับเบสของ pCAMBIA1301 บริเวณ T-DNA จากฐานข้อมูล NCBI Accession No.: AF234297.1) จากนั้น ตรวจสอบผลของปฏิกิริยาของเอนไซม์ตัดจำเพาะด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb DNA ladder marker และนำผลผลิตดังกล่าวมาทำให้บริสุทธิ์ โดยการใช้ GenepHlow™ Gel/PCR Kit เพื่อนำดีเอ็นเอที่ตัดแล้วนี้ไปใช้ในขั้นตอนของการเชื่อมต่อกับ adaptor

3.2 การเตรียม adaptor และการเชื่อมต่อกับชิ้นดีเอ็นเอ

สำหรับ adaptor ที่ใช้ในงานวิจัยนี้ เป็นชิ้นส่วนดีเอ็นเอสายคู่ที่ถูกรวบรวมและสังเคราะห์ขึ้นโดยอ้างอิงลำดับเบสจาก Universal Genome-Walker™ 2.0 User Manual (Clontech Laboratories, Inc.) จะประกอบด้วยสาย upper strand (48 นิวคลีโอไทด์) และ lower strand (8 นิวคลีโอไทด์) ที่เป็นคู่สมกัน

การเชื่อมต่อ (ligation) ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ถูกรวบรวมด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะเข้ากับ adaptor ในปฏิกิริยาที่ประกอบด้วย 5' extended adaptor (25 M) ปริมาตร 0.95 ไมโครลิตร, 10x Ligation buffer ปริมาตร 0.4 ไมโครลิตร, T4 DNA Ligase

(6 units/ μ l) ปริมาตร 0.25 ไมโครลิตร และ purified-digested genomic DNA ปริมาตร 2.4 ไมโครลิตร ซึ่งมีปริมาตรรวม 4 ไมโครลิตร บ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 16 °ซ. เป็นเวลา 16 ชม. และหยุดปฏิกิริยาโดยแช่หลอดในน้ำที่อุณหภูมิ 70 °ซ. เป็นเวลา 5 นาที หลังจากนั้นเติมน้ำกลั่นปริมาตร 16 ไมโครลิตร เพื่อให้มีปริมาตรสุดท้าย 20 ไมโครลิตร แล้วจึงนำไปใช้เป็นดีเอ็นเอแม่แบบ (DNA template) ในปฏิกิริยา AL-PCR amplification ต่อไป

3.3 การออกแบบไพรเมอร์และการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยา AL-PCR amplification

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในปฏิกิริยา AL-PCR amplification นี้ ประกอบด้วย ไพรเมอร์ จำนวน 2 ชุด คือ ชุดไพรเมอร์สำหรับ primary AL-PCR และ secondary (nested) AL-PCR โดยในแต่ละชุดจะมี forward primer หรือในที่นี้คือ adaptor primer (AP) ซึ่งมีลำดับเบสที่จำเพาะต่อ upper strand ของ adaptor ในลักษณะซ้อนเหลื่อมกัน ได้แก่ ไพรเมอร์ AP1 (22 คู่เบส) และ AP2 (19 คู่เบส) (Table 1) สำหรับ reverse primer หรือที่เรียกว่า gene specific primer (GSP) เป็นไพรเมอร์ที่มีการออกแบบให้มีความจำเพาะเจาะจงกับบริเวณลำดับเบสของยีน *hpt* ซึ่งมีตำแหน่งอยู่ใกล้กับด้านปลาย LB ของ T-DNA และเป็นส่วนที่มีการตรวจสอบการคงอยู่ของยีนภายในจีโนมแล้ว ข้อมูลลำดับเบสที่ใช้ในการออกแบบไพรเมอร์บริเวณดังกล่าวอ้างอิงจากฐานข้อมูลลำดับเบสของยีน *hpt* ใน T-DNA ของ

พลาสมิด pCAMBIA1301 จาก NCBI Database accession No.: AF234297.1 ซึ่งไพรเมอร์ GSP1 ที่ใช้ในปฏิกิริยา primary AL-PCR และไพรเมอร์ GSP2 สำหรับ secondary (Nested) AL-PCR จะไม่ซ้อนเหลื่อมกัน และ GSP2 ซึ่งมีตำแหน่งที่ใกล้ทางด้านปลาย LB มีความยาวถึง 28 คู่เบส เพื่อเพิ่มความจำเพาะเจาะจงมากยิ่งขึ้น (Table 1)

ปฏิกิริยา primary AL-PCR ประกอบด้วย สารละลายที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา ได้แก่ 10x Taq Buffer with $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ปริมาตร 2 ไมโครลิตร, 1 mM dNTP mix ปริมาตร 4 ไมโครลิตร, 25 mM MgCl_2 ปริมาตร 1 ไมโครลิตร, AP1 primer ปริมาตร 1 ไมโครลิตร, GSP1 primer ปริมาตร 1 ไมโครลิตร, 2U Taq DNA polymerase (Invitrogen) ปริมาตร 1 ไมโครลิตร, น้ำกลั่น ปริมาตร 8 ไมโครลิตร และ Adaptor-Ligated DNA ปริมาตร 1 ไมโครลิตร มีปริมาตรรวม 20 ไมโครลิตร โดยใช้อุณหภูมิสำหรับทำปฏิกิริยา 2 ขั้นตอน คือ ขั้นตอนแรก จำนวน 7 รอบ เริ่มด้วยการ denaturation ที่อุณหภูมิ 94 °ซ. เป็นเวลา 25 วินาที และตามด้วย annealing/extension ที่อุณหภูมิ 72 °ซ. เป็นเวลา 3 นาที ขั้นตอนที่สอง จำนวน 32 รอบ ประกอบด้วย denaturation ที่อุณหภูมิ 94 °ซ. 25 วินาที และ annealing/extension ที่อุณหภูมิ 67 °ซ. เป็นเวลา 3 นาที และสิ้นสุดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 67 °ซ. เป็นเวลา 7 นาที จากนั้น นำผลผลิตของแต่ละตัวอย่างที่ได้จากการทำปฏิกิริยา PCR มาตรวจสอบด้วยวิธี

Table 1 Oligonucleotide sequences of adaptor and primers that were used in AL-PCR

Oligonucleotide name	Sequence (5'-3')	
	AP1	AP2
Adaptor*		
Upper strand of adaptor	GTAATACGACTCACTATAGGGCACGCGTGGTCGACGGCCC GGGCTGGT	
Lower strand of Adaptor	PO ₄ -ACCAGCCC-NH ₂	
AL-PCR Primers		
Adaptor primer1 (AP1)	GTAATACGACTCACTATAGGGC	
Gene specific primer1 (GSP1)	AATACGAGGTCGCCAACATCTTCTCTG	
Adaptor primer2 (AP2)	ACTATAGGGCACGCGTGGT	
Gene specific primer2 (GSP2)	TATATGCTCCGCATTGGTCTTGACCAAC	

Noted: *The sequences of **AP1** and **AP2** showed primer binding site of AP1 (____) and AP2 (____) on upper strand of adaptor.

อะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ความเข้มข้น 0.8% ใน 0.5x TBE buffer ใช้แรงเคลื่อนไฟฟ้า 100 โวลต์ นาน 30 นาที เทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb DNA ladder marker สำหรับปฏิกิริยา secondary (nested) AL-PCR ประกอบด้วย สารละลายและวิธีการเช่นเดียวกันกับปฏิกิริยา primary AL-PCR แต่ใช้ผลผลิตจากปฏิกิริยา primary AL-PCR ซึ่งเจือจาง 50 เท่า ปริมาตร 1 ไมโครลิตร เป็นดีเอ็นเอแม่แบบ และใช้ไพรเมอร์ AP2 และ GSP2 ในการทำปฏิกิริยา

3.4 การวิเคราะห์ลำดับเบสและข้อมูลจากผลผลิตจากปฏิกิริยา AL-PCR amplification

นำผลผลิตของแต่ละตัวอย่างที่ได้จากปฏิกิริยา secondary (nested) AL-PCR มาตรวจสอบด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ความเข้มข้น 0.8% ใน 0.5x TBE buffer ใช้แรงเคลื่อนไฟฟ้า 100 โวลต์ นาน 30 นาที เทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb DNA ladder marker จะปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาดต่าง ๆ ตัดและสกัดแยกดีเอ็นเอที่แยกแถบได้ชัดเจนจากเจลโดยใช้ GenepHlow™ Gel/PCR Kit และนำดีเอ็นเอแต่ละขนาดที่สกัดแยกได้ไปตรวจสอบหาลำดับเบสดีเอ็นเอด้วยเทคนิค DNA sequencing จากนั้น ทำการวิเคราะห์ข้อมูลลำดับเบสที่ได้มาโดย VecScreen และเปรียบเทียบลำดับเบสที่ได้กับลำดับเบสอ้างอิงจากพลาสมิด pCAMBIA1301 โดยโปรแกรม MEGA6 และ SnapGene® Viewer

ผลทดลองและวิจารณ์

1. การสกัด genomic DNA จากใบอ่อนกล้วยไม้ และการตรวจสอบการคงอยู่ของยีน

ผลผลิตจากปฏิกิริยา secondary (nested) AL-PCR ในตัวอย่างที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Pst*I พบแถบดีเอ็นเอ จำนวน 3 แถบ ที่ขนาดประมาณ 2,000, 1,500 และ 750 คู่เบส (Figure 2A) จำนวนแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏจำนวน 3 แถบนี้ แสดงว่าน่าจะมีดีเอ็นเอที่ถูกถ่ายเข้าไปในกล้วยไม้สายต้นนี้ประมาณอย่างน้อย 3 ชุด ซึ่งสอดคล้องกับผลงานวิจัยของ Sornchai *et al.* (2015) ที่ศึกษาจำนวนชุดยีนที่ถูกถ่ายเข้าไปในกล้วยไม้สายต้นนี้ ด้วยเทคนิค Southern blot analysis โดยใช้ดีเอ็นเอโพรบที่จำเพาะเจาะจงกับ

บริเวณ CaMV35S promoter และยีน antisense *CP-ACO1* ที่วางตัวอยู่ทางด้าน RB ของ T-DNA และรายงานที่ตรวจพบชุดยีนที่ถูกถ่ายเข้าสู่กล้วยไม้สายต้น AE3 จำนวน 4 ชุด ทั้งนี้ สำหรับการตรวจด้วยเทคนิค AL-PCR และพบแถบดีเอ็นเอ จำนวน 3 แถบ อาจเป็นไปได้ว่ามี 1 ชุดยีนที่ไม่สามารถตรวจพบได้ เพราะอาจมีส่วนของ T-DNA และ LB ที่ไม่สมบูรณ์ จึงไม่สามารถให้ผลผลิตดีเอ็นเอได้ และเมื่อสกัดแยกดีเอ็นเอแต่ละแถบจากอะกาโรสเจลเพื่อนำไปวิเคราะห์ลำดับเบส (Figure 2B) พบว่า แถบดีเอ็นเอแถบที่ 1 (2,000 bp) และ 2 (1,500 bp) ไม่สามารถวิเคราะห์ผลลำดับเบสได้ เนื่องจากมีความบริสุทธิ์และปริมาณความเข้มข้นที่ไม่เพียงพอต่อการตรวจสอบลำดับเบสได้ ทำให้สามารถวิเคราะห์ได้เพียงแถบที่ 3 ที่มีขนาด 750 คู่เบส เท่านั้น

2. การวิเคราะห์ตำแหน่งที่สอดแทรกของยีนบนจีโนมของกล้วยไม้ตัดแปลงพันธุกรรม

สำหรับการวิเคราะห์ลำดับเบสของแถบที่ 3 ด้วยเทคนิค DNA sequencing แล้วนำข้อมูลมาวิเคราะห์ด้วย VecScreen พบว่า ลำดับเบสของแถบที่ 3 มีความยาว 751 คู่เบส มีความเหมือนกับลำดับเบสของ vector ในระดับที่สูง (Figure 3A) และเมื่อวิเคราะห์ข้อมูลเปรียบเทียบกับลำดับเบสของ pCAMBIA1301 ที่รายงานบนฐานข้อมูล NCBI database โดยใช้โปรแกรม MEGA6 และ SnapGene พบว่า ลำดับเบสของแถบดีเอ็นเอที่ 3 ที่ตำแหน่งที่ 1-37 เหมือนกับลำดับเบสของ adaptor และไพรเมอร์ AP2 สำหรับตำแหน่งที่ 38-197 ซึ่งเป็นบริเวณที่เชื่อมต่อกับ LB T-DNA พบว่า มีความเหมือนกับลำดับเบสดีเอ็นเอในส่วนของพลาสมิด pCAMBIA1301 ซึ่งอยู่นอกบริเวณขอบเขตของ T-DNA ออกไป มีความยาวในส่วนดังกล่าว 160 คู่เบส ส่วนตำแหน่งที่ 198-751 นั้น เหมือนกันกับลำดับเบสของ T-DNA ตั้งแต่บริเวณปลาย LB ถัดเข้าไปจนถึงบริเวณยีน *hpt* ตรงตำแหน่ง GSP2 primer โดยมีความยาวในส่วนนี้ทั้งสิ้น 554 คู่เบส (Figure 3B)

จากผลการศึกษาดังกล่าว ทำให้ทราบว่าในกล้วยไม้ที่ได้รับการตัดแปลงพันธุกรรมสายต้น AE3 พบการมีอยู่ของส่วน T-DNA และลำดับเบส

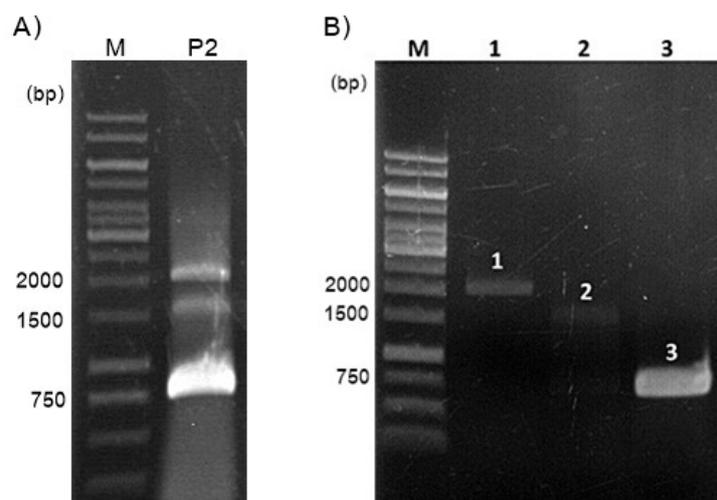


Figure 2 The secondary (nested) AL-PCR products of *Pst*I-digested DNA library (P2) compared with 1 kb DNA ladder marker (M) (A). Three bands of the secondary (Nested) AL-PCR product were then eluted and separately analyzed on agarose gel and approximately size showed 2,000 (1), 1,500 (2) and 750 (3) bp (B)

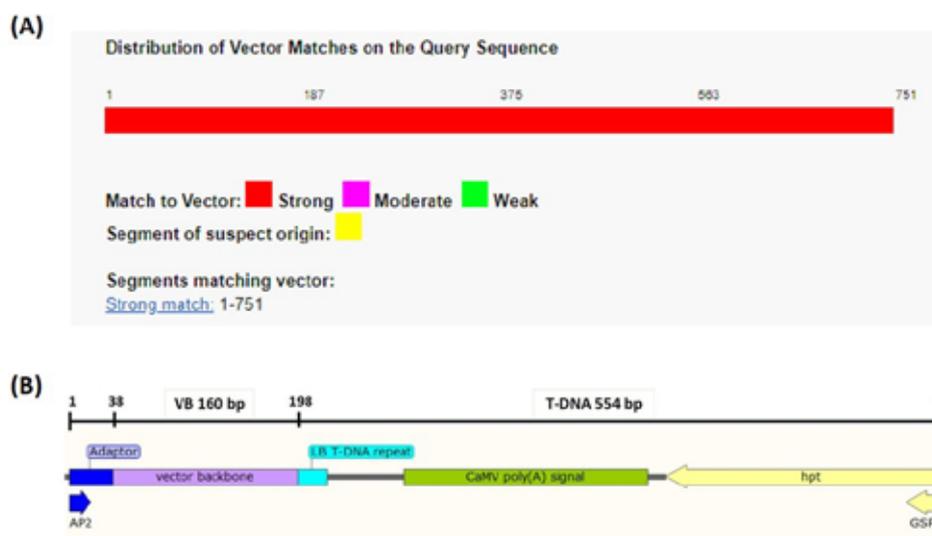


Figure 3 (A) VecScreen result of *Pst*I band no.3 (751 bp) sequences showed high matching of vector. **(B)** This sequences were analyzed and identified by MEGA6 and SnapGene programs, the result revealed Adaptor sequences (37 bp), T-DNA sequences contained partial *hpt* gene and CAMV poly(A) signal terminator and intact LB (554 bp), which linked with 160 bp of vector backbone (VB) sequences of pCAMBIA1301aACO1 plasmid. Blue and yellow short arrows represented AP2 and GSP2 primer sites of sequences (respectively)

ที่อยู่นอกเหนือจากขอบเขตของ T-DNA โดยส่วน
ที่อยู่อกเหนือขอบเขตดังกล่าว เป็นส่วนของ
พลาสมิด pCAMBIA1301 หรือที่เรียกว่า vector
backbone (VB) ที่ถูกส่งถ่ายเข้าไปด้วย โดย

เหตุการณ์ดังกล่าว เรียกว่า co-transformation
ซึ่งพบได้บ่อยในการถ่ายยีนพืช

สำหรับกระบวนการเกิด co-transformation
ของ VB นั้น เกิดขึ้นจาก 2 สมมติฐาน โดย

สมมติฐานแรก อธิบายว่า อาจเกิดจากขั้นตอนของการสร้าง T-Strand ซึ่งในบางกรณีโปรตีน Vir (VirD) ของเชื้ออาจมีความผิดปกติ ทำให้ไม่สามารถจดจำตำแหน่งตัดที่จำเพาะเจาะจงบริเวณ LB ของ T-DNA ซึ่งเป็นบริเวณปลายที่สิ้นสุดของ T-Strand ได้ ดังนั้น เมื่อกระบวนการสร้าง T-Strand เริ่มจากทางด้าน RB จนมาถึงด้าน LB จึงอาจเกิดเหตุการณ์ที่เรียกว่า “read-through” หรือ “overdrive” โดยไม่จดจำตำแหน่ง LB ของ T-DNA ทำให้มีตำแหน่งตัดที่เลยออกไป ซึ่งเป็นบริเวณของ VB (Kononov *et al.*, 1997; Kuraya *et al.*, 2004) สำหรับสมมติฐานที่สอง มีข้อสันนิษฐานว่า อาจเกิดจากกระบวนการสร้าง T-Strand เริ่มจากทางด้าน LB และมีความต่อเนื่องไปทางด้าน RB ซึ่งเป็นผลให้ติดส่วน VB ไปด้วย โดยอาจจะปรากฏหรือไม่ปรากฏบริเวณของ T-DNA ก็ได้ (Kohli *et al.*, 2010) แต่อย่างไรก็ตาม สมมติฐานข้อที่สองไม่มีข้อพิสูจน์ที่เด่นชัดเท่าข้อแรก จากการรายงานผลการวิจัยที่ผ่านมา พบว่ามีลำดับเบสของ VB เชื่อมต่อกับบริเวณปลายของ T-DNA นั้น เกิดขึ้นเพียงด้านใดด้านหนึ่งเท่านั้น (Sha *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2008) ซึ่งส่วนใหญ่เกิดขึ้นกับทางด้านปลาย LB (De Buck *et al.*, 2000; Fu *et al.*, 2006) เช่น จากการศึกษาลำดับเบสที่อยู่ด้านข้างของ LB T-DNA ในฝ้ายตัดแปลงพันธุกรรม พบว่า 51% ของตัวอย่างมีส่วนของ VB อยู่ด้วย Yang *et al.* (2013) และ Zeng *et al.* (2010) รายงานว่า ในการศึกษาต้น birch ตัดแปลงพันธุกรรม พบว่า มีสายต้นที่มีส่วนของ VB เชื่อมต่อกับทางด้านปลาย LB T-DNA จำนวน 10 ตัวอย่าง จากทั้งหมด 26 ตัวอย่าง และ Afolabi *et al.* (2004) พบว่า ในข้าวตัดแปลงพันธุกรรมมีความถี่ของการพบ VB อยู่ถึง 53-66% นอกจากนี้ ยังมีรายงานการพบ VB ในพืชตัดแปลงพันธุกรรมชนิดอื่นด้วย เช่น ยาสูบ (Kononov *et al.* 1997) สตรอเบอร์รี่ (Abdal-Aziz *et al.*, 2006) และมันฝรั่ง (Cullen *et al.*, 2011) เป็นต้น

ปัจจัยที่เกี่ยวข้องที่ทำให้เกิด VB ในพืชตัดแปลงพันธุกรรมอาจเกิดได้จากหลายปัจจัย เช่น Oltmanns *et al.* (2010) ได้อธิบายว่า อาจจะเกี่ยวข้องกับสายพันธุ์ของ *Agrobacterium tumefaciens* โดยสายพันธุ์ที่แตกต่างกันมีอัตรา

การเกิด VB ที่แตกต่างกัน Petti *et al.* (2009) ได้รายงานว่าการใช้ *Agrobacterium tumefaciens* สายพันธุ์ LBA4404 มีโอกาสในการพบ VB ของปลายทั้งสองด้านของ T-DNA มากกว่า *Agrobacterium tumefaciens* สายพันธุ์ AGL1 และจากการศึกษาของ Okwuonu *et al.* (2019) พบว่า จำนวนชุดของยีนหรือ T-DNA มีความสัมพันธ์กับอัตราการพบ VB โดยพบว่า มันสำปะหลังที่ได้รับการถ่ายยีนที่มีจำนวนชุดยีนภายในจีโนม 3 ชุด ขึ้นไป มีโอกาสพบ VB สูงกว่ากลุ่มตัวอย่างที่มีจำนวนชุดยีน 1-2 ชุด ซึ่ง Ziemienowicz *et al.* (2008) รายงานผลในทำนองเดียวกัน คือ *Arabidopsis* ตัดแปลงพันธุกรรมที่มี 1 ชุดยีนภายในจีโนม (single-copy) มีการพบ VB น้อย ดังนั้น ในการศึกษาที่มี การตรวจสอบในเบื้องต้นแล้วว่าต้นกล้วยไม้ที่ได้รับการถ่ายยีนสายต้น AE3 มีจำนวนชุดยีนมากถึง 4 ชุด จึงมีโอกาสที่จะพบ VB ได้เช่นกัน

สำหรับข้อจำกัดของการศึกษาคั้งนี้ พบว่า ยังไม่สามารถหาตำแหน่งที่เป็นจุดสิ้นสุดรอยต่อของ VB กับจีโนมคติเอ็นเอของกล้วยไม้ได้ ซึ่งเป็นไปได้ว่า VB อาจมีความยาวมาก สอดคล้องกับ รายงานวิจัยที่พบการมีอยู่ของ VB ขนาดยาวในพืชที่ได้รับการถ่ายยีน เช่น การศึกษาของ Nicolia *et al.* (2017) พบว่า ใน Alfalfa ตัดแปลงพันธุกรรม ปรากฏลำดับเบสของ VB ทางด้าน LB ของ T-DNA ที่มีความยาว 346 คู่เบส และ Meza *et al.* (2002) พบว่า ความยาวของ VB ทางด้าน LB T-DNA ใน *Arabidopsis* มีความยาวอยู่ในช่วง 1239 – 5324 คู่เบส ดังนั้น การศึกษาเพิ่มเติมจะสามารถทำได้โดยการเปลี่ยนคูโพรเมอร์ให้อยู่บนส่วนของ VB ที่ได้ลำดับเบสมาแล้ว เพื่อที่จะสามารถศึกษาส่วนดีเอ็นเอที่อยู่ห่างออกไปจาก LB มากยิ่งขึ้น ซึ่งจะช่วยให้พบส่วนที่เป็นรอยต่อระหว่าง VB และจีโนมคติเอ็นเอของกล้วยไม้ และทำให้ทราบตำแหน่งสอดแทรกในจีโนมของยีนที่ถ่ายเข้าไปได้

อย่างไรก็ตาม การที่พบว่าส่วนของ VB ถูกส่งถ่ายเข้าไปในจีโนมกล้วยไม้สายต้น AE3 นี้ ไม่ส่งผลกระทบต่อลักษณะทางสรีระในภาพรวม ซึ่งยืนยัน โดยงานวิจัยที่มีมาก่อนหน้านี้ของ Somchai *et al.* (2020) ที่รายงานลักษณะประจำพันธุ์ของต้นกล้วยไม้สกุลหวายที่ได้รับการถ่ายยีนสายต้น AE3 นี้ ที่อายุ

2 ปี หลังออกปลูกในสภาพโรงเรือน เปรียบเทียบกับ กล้วยไม้สกุลหวายที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน จากการตรวจสอบทั้งหมด 117 ลักษณะ ประกอบด้วย ลักษณะเชิงคุณภาพ 103 ลักษณะ และลักษณะเชิงปริมาณ 14 ลักษณะ พบว่า ลักษณะเชิงคุณภาพของกล้วยไม้สายต้น AE3 จำนวน 99 ลักษณะ ไม่แตกต่างจาก กล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์ เอียสกุล ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน และมีเพียง 4 ลักษณะ เท่านั้น ที่แตกต่างกันเพียงเล็กน้อย คือ ส่วนของกลีบปาก และในการวิเคราะห์ลักษณะเชิงปริมาณนั้น ผลในภาพรวมสรุปได้ว่า กล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์ เอียสกุล ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนสายต้น AE3 มีจำนวนใบต่อกอเฉลี่ย ความกว้างลำเมื่อสุดลำ ความสูงเมื่อสุดลำ และจำนวนลำต่อกอไม่แตกต่างทางสถิติกับต้นกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์ เอียสกุล ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน นอกจากนี้ Somchai *et al.* (2020) ยังรายงานด้วยว่า ปริมาณดีเอ็นเอของกล้วยไม้ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนมีปริมาณดีเอ็นเอเฉลี่ย 2.54 pg/2C ซึ่งไม่แตกต่างทางสถิติกับปริมาณดีเอ็นเอของกล้วยไม้สายต้น AE3 ที่มีค่าเฉลี่ย 2.41 pg/2C และมีระดับ ploidy เป็น 2n นอกจากนี้ จากการประเมินความปลอดภัยทางชีวภาพของต้นกล้วยไม้ดัดแปลงพันธุกรรมสายต้น AE3 ที่รายงานโดย ปิยนุช, (2558) พบว่า ไม่แตกต่างกับกล้วยไม้ที่ไม่ได้รับการดัดแปลงพันธุกรรมอีกด้วย ซึ่งสอดคล้องกับ De Buck *et al.* (2000) ที่รายงานว่า VB ที่ถูกส่งถ่ายเข้าไปในจีโนมพืชนั้น อาจไม่ส่งผลกระทบต่อสรีรวิทยาพืช หรือส่งผลต่อการแสดงออกของยีนที่ถ่ายเข้าไป ทำให้สรีรวิทยาหรือเป้าหมายที่ได้จากการถ่ายยีนแตกต่างออกไป

สรุปผลการทดลอง

การตรวจสอบลำดับเบสด้านข้างของปลาย LB ของ T-DNA ของกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์ เอียสกุล สายต้น AE3 ที่ได้รับการถ่ายยีน antisense CP-ACO1 ด้วยเทคนิค AL-PCR พบว่า ได้ผลิตดีเอ็นเอ จำนวน 3 แถบ ขนาดประมาณ 750, 1,500 และ 2,000 คู่เบส ซึ่งผลการวิเคราะห์ลำดับเบสของแถบดีเอ็นเอขนาด 751 คู่เบส พบว่า ประกอบด้วยลำดับเบสในส่วนของยีน *hpt* และ LB ของ T-DNA ความยาว 554 คู่เบส และพบส่วนที่อยู่ถัดออกไปจาก LB ซึ่งเป็นลำดับเบสของพลาสมิด (vector backbone; VB)

จำนวน 160 คู่เบส แต่ยังไม่พบจุดเชื่อมต่อกับจีโนมกล้วยไม้ ทั้งนี้ ลำดับเบสส่วน VB ที่เกินมานั้นไม่ส่งผลกระทบต่อลักษณะทางสรีรวิทยาและระดับ ploidy ของกล้วยไม้ที่ได้รับการถ่ายยีนสายต้น AE3 สำหรับแถบดีเอ็นเอขนาด 2,000 และ 1,500 คู่เบส ไม่สามารถวิเคราะห์ลำดับเบสได้ เนื่องจากผลผลิตมีความบริสุทธิ์และปริมาณไม่เพียงพอ

คำขอบคุณ

งานวิจัยนี้ ได้รับการสนับสนุนจาก ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน และ ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวงการอุดมศึกษา วิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม และศูนย์วิทยาการขั้นสูงเพื่อเกษตรและอาหาร สถาบันวิทยาการขั้นสูงแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ภายใต้โครงการส่งเสริมการวิจัยในอุดมศึกษาและพัฒนามหาวิทยาลัยวิจัยแห่งชาติ สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา

เอกสารอ้างอิง

- ปิยนุช ศรชัย. 2558. การตรวจสอบความปลอดภัยทางชีวภาพของกล้วยไม้สกุลหวายที่ได้รับการถ่ายยีน antisense CP-ACO1 ในระดับโรงเรือน. วิทยานิพนธ์ปริญญาเอก, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- Abdal-Aziz, S.A., F. Pliego-Alfaro, M.A. Quesada and J.A. Mercado. 2006. Evidence of frequent integration of non-T-DNA vector backbone sequences in transgenic strawberry plants. *J. Biosci. Bioeng.* 101(6): 508-510.
- Afolabi, A.S., B. Worland, J.W. Snape and P. Vain. 2004. A large-scale study of rice plants transformed with different T-DNAs provides new insights into locus composition and T-DNA linkage configurations. *Theor. Appl. Genet.* 109: 815–826.

- Choi, Y.I, E.W. Noh, M.S. Han and S.H. Son. 1999. Adaptor-aided PCR to identify T-DNA junctions in transgenic plants. *BioTechniques*. 27: 222-226.
- Cullen, D., W. Harwood, M. Smedley, H. Davies and M. Taylor. 2011. Comparison of DNA Walking Methods for Isolation of Transgene-Flanking Regions in GM Potato. *Mol Biotechnol*. 49(1): 19-31.
- De Buck, S.D., C.D. Wilde, M.V. Montagu and A. Depicker. 2000. T-DNA vector backbone sequences are frequently integrated into the genome of transgenic plants obtained by *Agrobacterium*-mediated transformation. *Mol. Breeding*. 6: 459-468.
- Fu, D., P.C.St. Amand, Y. Xiao, S. Muthukrishnan and G.H. Liang. 2006. Characterization of T-DNA integration in creeping bentgrass. *Plant Sci*. 170: 225-237.
- Kohli, A., B. Miro and R.M. Twyman. 2010. Transgene integration, expression and stability in plants: strategies for improvements. In: Kole, C., C.H. Michler, A.G. Abbott, T.C. Hall (eds.). *Transgenic Crop Plants*. 451: 201-237.
- Kononov, M.E., B. Bassuner and S.B. Gelvin. 1997. Integration of T-DNA binary vector 'backbone' sequences into the tobacco genome: evidence for multiple complex patterns of integration. *The Plant J*. 11(5): 945-957.
- Kuraya, Y., S. Ohta and M. Fukude. 2004. Suppression of transfer of non-T-DNA 'vector backbone' sequences by multiple left border repeat in vector for transformation of higher plants mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Mol Breed*. 14: 309-320.
- Malley, R.C.O., J.S. Alonso, C.J. Kim, T.J. Lisse and J.R. Ecker. 2007. An adapter ligation-mediated PCR method for high throughput mapping of T-DNA inserts in the *Arabidopsis* genome. *Nat. Protoc*. 2(11): 2910-2917.
- Meza, T.J., B. Stangeland, I.S. Mercy, M. Skarn, D.A. Nymoen, A. Berg, M.A. Butenko, A.M. Hakelian, C. Haslekas, L.A. Meza-Zepeda and R.B. Aalen. 2002. Analyses of single-copy *Arabidopsis* T-DNA-transformed lines show that the presence of vector backbone sequences, short inverted repeats and DNA methylation is not sufficient or necessary for the induction of transgene silencing. *Nucleic Acids Res*. 30(20): 4556-4566.
- Nicolia, A., N. Ferradini, F. Veronesi and D. Rosellini. 2017. An insight into T-DNA integration events in *Medicago sativa*. *Int. J. Mol. Sci*. 18: 1951-1966.
- Okwuonu, I.C., C.N. Egesi and N.J. Taylor. 2019. Vector backbone integration in transgenic cassava is significantly correlated to T-DNA copy number. *Nig. J. Biotech*. 36(2): 77-86.
- Oltmanns, H., B. Frame, L.Y. Lee, S. Johnson, B. Li, K. Wang and S.B. Gelvin. 2010. Generation of Backbone-free, Low transgene copy plants by launching T-DNA from the *Agrobacterium* chromosome. *Plant Physiol*. 152: 1158-1166.
- Padegimas, L.S. and N.A. Reichert. 1998. Adaptor ligation-based polymerase chain reaction mediated walking. *Anal Biochem*. 260: 149-153.
- Petti, C., T. Wendt, C. Meade and E. Mullins. 2009. Evidence of genotype dependency within *Agrobacterium tumefaciens* in relation to the integration of vector backbone sequence in transgenic *Phytophthora infestans*-tolerant potato. *J. Biosci. Bioeng*. 107(3): 301-306.

- Sha, Y., S. Li, Z. Pei, L. Luo, Y. Tian and C. He. 2004. Generation and anking sequence analysis of rice T-DNA tagged population. *Theor.Appl.Genet.* 108: 306-314.
- Sornchai, P., R. Koto, P. Burns, S. Chanprame, W. Imsabai and S. Chanprame. 2015. Genetic transformation of *Dendrobium* 'Sonia Earsakul' with antisense *Carica papaya ACO1* gene. *Mod. Appl. Sci.* 9(12): 125-133.
- Sornchai, P., W.G. van Doorn, W. Imsabai, P. Burns and S. Chanprame. 2020. *Dendrobium* orchids carrying antisense ACC oxidase: Small changes in ower morphology and a delay of bud abortion, ower senescence, and abscission of owers. *Transgenic Res.* 29:429-442.
- Spertini, D., C. Beliveau and G. Bellemare. 1999. Screening of transgenic plants by amplication of unknown genomic DNA anking T-DNA. *Biotechniques.* 27: 308-314.
- Yang, X., F. Li, X. Zhang, K. Liu, Q. Wang, C. Zhang, C. Liu, W. Zhu, G. Shan, C.K. Chin and W. Fang. 2013. Integration and characterization of T-DNA insertion in Upland Cotton. *Czech j. Genet. Plant Breed.* 49(2): 51-57.
- Zeng, F., Y. Zhan, H. Zhao, Y. Xin, H. Qi and C. Yang. 2010. Molecular characterization of T-DNA integration sites in transgenic birch. *Trees.* 24: 753-762.
- Zhang, J., C. Lin, J.Q. Cheng, H.Z. Mao, X.P. Fan, Z.H. Meng, K.M. Chan, H.J. Zhang, J.F. Qi, L.H. Ji and Y. Hong. 2008. Transgene integration and organization in cotton (*Gossypium hirsutum* L.) genome. *Transgenic Res.* 17: 293-306.
- Zheng, S.J., B. Henken, Soari, E. Jacobsen, F.A. Krens and C. Kik. 2001. Molecular characterization of transgenic shallots (*Allium cepa* L.) by adaptor ligation PCR (AL-PCR) and sequencing of genomic DNA anking T-DNA borders. *Transgenic Res.* 10: 237-245.
- Ziemienowicz, A., T. Tzvi and B. Hohn. 2008. Mechanisms of T-DNA integration. Pages 395-440. *In: Agrobacterium: From Biology to Biotechnology*; Tzvi Tzfira and Vitaly Citrovsky, Ed.; Springer New York