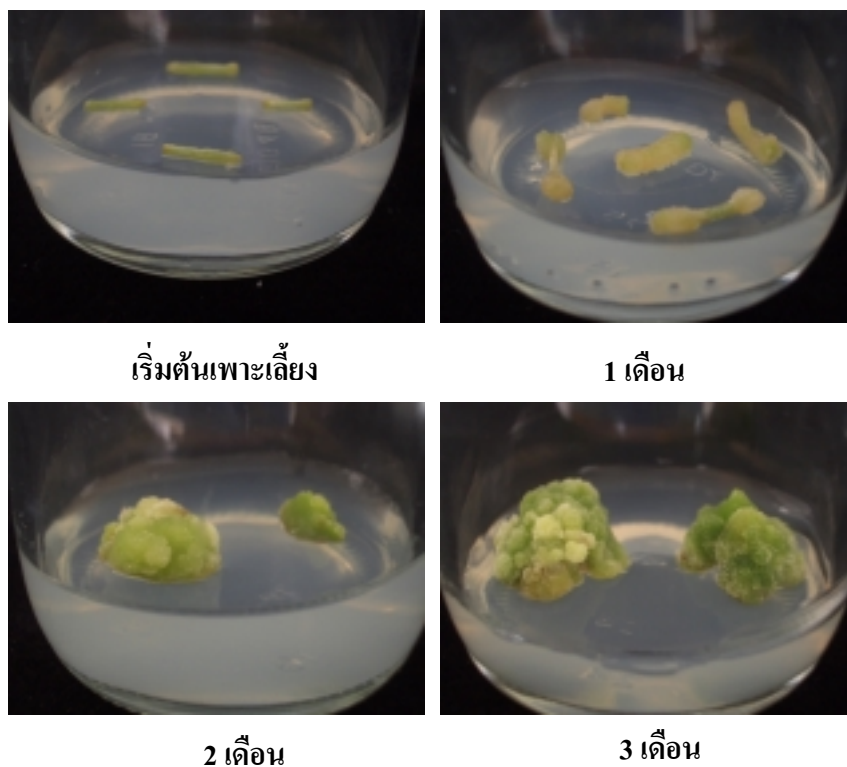


ผลและวิจารณ์

1. การชักนำให้เกิดแคลลัส

จากการนำส่วน hypocotyl ของต้นกล้าถั่วฮามาต้าอายุ 10 วันหลังออกในสภาพปลอดเชื้อ ที่ตัดให้มีขนาดยาวประมาณ 1 เซนติเมตรมาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม 2,4-D 5 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาล 30 กรัมต่อลิตร pH 7.5 เลี้ยงในที่ที่มีความเข้มแสง 55 ไมโครโมลต่อตาราง เมตรต่อวินาที เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส พบว่าเนื้อเยื่อเริ่มสร้างแคลลัสบริเวณบาดแผล โดยในช่วง 2 สัปดาห์แรกแคลลัสที่เกิดขึ้นมีลักษณะเกาะตัวกันอย่างหลวม ๆ (friable callus) สีเขียวอ่อน และเมื่อย้ายแคลลัสไปเลี้ยงบนอาหารใหม่ทุก ๆ 1 เดือน เป็นเวลา 3-4 เดือน แคลลัสเปลี่ยนเป็นสีเขียวเข้มมีลักษณะเป็นกลุ่มก้อนเกาะกันค่อนข้างแน่น (compact callus) ดังภาพที่ 13 ซึ่งเซลล์ที่ประกอบกันเป็น compact callus ลักษณะนี้มักเป็นเซลล์ที่มีไซโทพลาสซึมเข้มข้น และมีออร์แกเนลหนาแน่น และแคลลัสชนิดนี้มักจะสามารถพัฒนาเป็นต้นใหม่ได้ง่าย (สุพรรณิ, 2532) ซึ่งรายงานของ Week *et al.* (2000) ก็พบเช่นกันว่าแคลลัสของข้าวสาลีที่มีลักษณะเป็น compact callus สามารถพัฒนาเป็นต้นได้ดีกว่า friable callus

สำหรับการเลือกใช้ hypocotyl เป็นเนื้อเยื่อเริ่มต้นในการชักนำให้เกิดแคลลัสนี้ แม้ว่า กิริยา (2547) จะได้ทดสอบเนื้อเยื่อเริ่มต้นของการชักนำให้เกิดแคลลัสของถั่วฮามาต้าจากเนื้อเยื่อส่วนใบ ใบเลี้ยงและ hypocotyl และพบว่าเนื้อเยื่อทั้ง 3 ชนิดสามารถชักนำให้เกิด compact callus ได้บนอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D 5 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยเนื้อเยื่อส่วนใบสามารถเกิดเป็นแคลลัสได้มากกว่าใบเลี้ยง และ hypocotyl ก็ตามแต่ในงานวิจัยนี้เลือกใช้ส่วนของ hypocotyl เนื่องจากเนื้อเยื่อส่วน hypocotyl เป็นเนื้อเยื่อที่ทำงานได้สะดวกที่สุด เนื่องจากเป็นเนื้อเยื่อที่ไม่บอบบางเมื่อเทียบกับใบและใบเลี้ยง และในต้นอ่อนหนึ่งต้นสามารถตัดชิ้นส่วนได้หลายชิ้น เนื่องจากการเพาะเมล็ดในสภาพมืดในช่วงแรกจะทำให้ได้ส่วนของ hypocotyl ที่ยืดยาวทำให้มีชิ้นส่วนสำหรับทดลองได้มากขึ้น ดังนั้นจึงเลือกใช้ชิ้นส่วน hypocotyls ในการชักนำให้เกิดแคลลัสเพื่อนำแคลลัสที่ได้มาใช้เป็นเนื้อเยื่อเริ่มต้นในการถ่ายยีน



ภาพที่ 13 การชักนำให้เกิดแคลลัสจาก hypocotyl ของ *Stylosanthes hamata* 'Verano' ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม 2,4-D 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เลี้ยงในสภาพแสง 55 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที 16 ชั่วโมงต่อวัน ที่อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส โดยเปลี่ยนอาหารใหม่ทุกเดือน เป็นเวลา 3 เดือน

2. การชักนำให้แคลลัสพัฒนาเป็นยอด

เมื่อนำแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D 5 มิลลิกรัมต่อลิตร มาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม BA 15 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร pH 5.7 เพาะเลี้ยงในสภาพความเข้มแสง 55 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส พบว่าสามารถชักนำให้เกิดยอดขึ้นจำนวนมากจากก้อนแคลลัส ซึ่งอาหารที่ใช้เป็นสูตรอาหารเดียวกับงานทดลองของ กิริยา (2547) ที่ชักนำให้เกิดยอดจาก แคลลัสของถั่วฮามาต้าได้สำเร็จ ความเข้มข้นของ BA ที่ใช้เป็นความเข้มข้นที่สูงเมื่อเปรียบเทียบกับ การทดลองในพืชวงศ์ถั่วชนิดอื่น เช่น Gulati and Jaiwal (1992) สามารถชักนำแคลลัสของ ถั่วเขียวให้เกิดยอดได้บนอาหารสูตร MS ที่ใช้วิตามินสูตร B5 โดยเติม BA ความเข้มข้น 0.001 มิลลิกรัมต่อลิตรเท่านั้น และ Muthukumar *et al.* (1995) พบว่าสามารถชักนำให้เกิดยอดในถั่วพุ่ม ได้ โดยเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ใช้วิตามินสูตร B5 ที่เติม BAP ความเข้มข้น 0.001 มิลลิกรัมต่อลิตร ทั้งนี้เนื่องจากพืชแต่ละชนิดมีพันธุกรรมที่แตกต่างกัน ดังนั้นความต้องการชนิด และ ปริมาณของสารควบคุมการเจริญเติบโตจึงแตกต่างกัน รวมทั้งความเหมาะสมของชิ้นส่วนและ ชนิดของเนื้อเยื่อพืชที่ใช้ก็มีผลเช่นเดียวกัน (Auge *et al.*, 1995)

3. การชักนำให้เกิดรากจากยอดที่พัฒนามาจากแคลลัส

ตัดยอดของต้นถั่วฮามาต้าที่พัฒนามาจากแคลลัสโดยให้มีขนาดความสูง 1 เซนติเมตร มาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม IBA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร pH 5.7 เพาะเลี้ยงในสภาพความเข้มแสง 55 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส เปลี่ยนอาหารทุก ๆ เดือน พบว่าในเดือนแรกบางต้นเริ่มมีการสร้าง รากขึ้น แต่ในบางต้นมีการสร้างแคลลัสชนิด friable สีน้ำตาลที่โคนต้นขึ้นมาก่อนที่จะมีการเกิด ราก ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากผลของการใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโตไคนินคือ BA ในปริมาณค่อนข้างสูงคือ 15 มิลลิกรัมต่อลิตร ในช่วงการชักนำให้เกิดยอด ดังนั้นเมื่อนำยอดมา เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม IBA 1 มิลลิกรัมต่อลิตรเพื่อชักนำให้เกิดรากจึงอาจทำให้เกิด แคลลัสขึ้นได้เนื่องจากผลของ BA ที่ตกค้างภายในเนื้อเยื่อ แต่อย่างไรก็ตามเมื่อเพาะเลี้ยงจนถึง เดือนที่ 2 พบว่าสามารถชักนำให้เกิดรากได้มากขึ้น ซึ่งอาจเนื่องมาจากผลของ BA ที่ตกค้างอยู่ ลดลง จึงทำให้สัดส่วนของออกซินต่อไซโตไคนินสูงขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Saunders

and Bingham (1975) ที่พบว่าการใช้สัดส่วนความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่ม ออกซินสูง และไซโตไคนินต่ำมีผลทำให้ต้นอ่อนเกิดรากได้

4. การทดสอบความต้านทานต่อสารปฏิชีวนะที่ใช้กำจัดเชื้อ *Agrobacterium tumefaciens* และประสิทธิภาพของสารปฏิชีวนะที่ใช้ในการกำจัดเซลล์แก้วฮามาต้าที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน

4.1 การทดสอบความต้านทานต่อสารปฏิชีวนะ cefotaxime

การถ่ายยีนด้วยเชื้ออะโกรแบคทีเรียชนิดนั้น ภายหลังการถ่ายยีนต้องกำจัดเชื้อ อะโกรแบคทีเรียซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมลบออกจากพืชให้หมด สารปฏิชีวนะที่นิยมใช้ในการกำจัด แบคทีเรียชนิดนี้มีหลายชนิด เช่น cefotaxime carbenicillin timentin และ paromomycin เนื่องจากสารปฏิชีวนะดังกล่าวมีความสามารถในการกำจัดแบคทีเรีย โดยจะเข้าไปจับกับ penicillin binding protein ซึ่งเป็นโปรตีนองค์ประกอบของ inner membrane ที่ใช้ในการแบ่ง เซลล์ของแบคทีเรีย ซึ่งปริมาณการใช้ควรต้องให้เหมาะสมในการกำจัดเชื้ออะโกรแบคทีเรีย ออกจากเนื้อเยื่อพืชได้โดยไม่เป็นอันตรายต่อเนื้อเยื่อ (Mathais and Boyd, 1986)

สารปฏิชีวนะ cefotaxime นั้นมีรายงานว่ามีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ได้ หลายชนิด มีความเป็นพิษต่อเนื้อเยื่อพืชน้อย และยังพบว่าการใช้สารนี้ที่ระดับความเข้มข้นต่ำ ๆ สามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของแคลลัส การชักนำให้เกิดคัพภะ และช่วยในการพัฒนาเป็น ยอดในข้าวสาลีได้อีกด้วย (Mathais and Boyd, 1986) แต่การใช้สารปฏิชีวนะ cefotaxime ใน ระดับความเข้มข้นที่สูงจะมีผลกระทบต่อเนื้อเยื่อพืชบางชนิด เช่น Yu et al. (2001) พบว่าการใช้ สารปฏิชีวนะ cefotaxime ที่ความเข้มข้น 375-500 มิลลิกรัมต่อลิตร มีผลยับยั้งการเจริญเติบโต ของแคลลัสมะละกอ และฉัตรนภา (2545) ทดลองใช้สารปฏิชีวนะ cefotaxime ความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร ในการกำจัดเชื้ออะโกรแบคทีเรียภายหลังการถ่ายยีนเข้าสู่ถั่วเขียว พบว่าที่ ระดับความเข้มข้นนี้จะมีผลต่อการเกิดยอด โดยทำให้ยอดที่ได้มีขนาดสั้นลง ดังนั้นการเลือกใช้ ระดับความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะ cefotaxime ที่เหมาะสมคือ ควรเลือกใช้ความเข้มข้นของ สารในระดับที่สามารถกำจัดเชื้อ *A. tumefaciens* ได้หมด และมีผลเชิงลบต่อการเจริญของ เนื้อเยื่อพืชน้อยที่สุด ซึ่งระดับความเข้มข้นของ cefotaxime ที่เหมาะสมขึ้นอยู่กับชนิดพืช และ ขนาดของเนื้อเยื่อพืช ดังนั้นจึงต้องมีการทดสอบระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมก่อนที่จะนำมาใช้

จากการทดลองนี้ได้ตัดส่วนของแคลลัสของถั่วฮามาต้าให้มีขนาด 5x5 มิลลิเมตร หน้า 2 มิลลิเมตร นำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม 2,4-D 5 มิลลิกรัมต่อลิตร และเติม สารปฏิชีวนะ cefotaxime ความเข้มข้น 0 100 200 300 400 500 และ 600 มิลลิกรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงในสภาพที่มีแสง 55 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 สัปดาห์ โดยเปลี่ยนอาหารใหม่ทุก 2 สัปดาห์ เมื่อเพาะเลี้ยงแคลลัสในอาหารที่เติม cefotaxime ครบ 4 สัปดาห์ แล้วจึงย้ายแคลลัสมาเพาะเลี้ยงในสูตรอาหารที่ชักนำให้เกิดยอดเป็นเวลา 3 เดือน พบว่าทุกความเข้มข้นของ cefotaxime ที่ทดสอบแคลลัสสามารถ เจริญเติบโตและสามารถพัฒนาเป็นยอดได้ แต่จำนวนยอดที่ได้จะลดลงเมื่อความเข้มข้นของ สารปฏิชีวนะ cefotaxime เพิ่มขึ้น ซึ่งเห็นได้ชัดที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 300 มิลลิกรัมต่อลิตรขึ้นไป (ตารางที่ 1) ผลดังกล่าวนี้สอดคล้องกับรายงานของเกศณี (2546) ที่พบว่าสารปฏิชีวนะ cefotaxime ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 100 มิลลิกรัมต่อลิตรขึ้นไปมีผลต่อการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อ ของมะเขือเทศพันธุ์วีเอฟ 134-1-2 โดยพบว่าชิ้นส่วนใบเลี้ยงมีการเกิดแคลลัสน้อยลง และยอดที่ เจริญมาจากชิ้นส่วนใบเลี้ยงมีขนาดเล็ก และพบว่าเนื้อเยื่อบางส่วนเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีเหลือง ชีดและตายในที่สุด และงานวิจัยของ Hoffmann and Vieira (2000) ที่พบว่าความสามารถใน การพัฒนาเป็นยอดของ *Stylosanthes guinesis* ลดลงเมื่อเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม cefotaxime 250 มิลลิกรัมต่อลิตร

อย่างไรก็ตามในการทดสอบประสิทธิภาพของสารปฏิชีวนะ cefotaxime ในการกำจัด เชื้ออะโกราแบคทีเรียมสายพันธุ์ AGL-1 นั้นจากรายงานของเกศณี (2546) ที่ใช้ cefotaxime ที่ ความเข้มข้น 100 250 500 และ 1000 มิลลิกรัมต่อลิตร ในการกำจัดเชื้ออะโกราแบคทีเรียจาก ชิ้นส่วนใบของมะเขือเทศพบว่าการปนเปื้อนของเชื้อ 43.33 40.33 6.67 และ 1.33 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งแสดงให้เห็นอย่างชัดเจนว่าความเข้มข้นของ cefotaxime ต่ำ ๆ ไม่สามารถกำจัดเชื้อ ได้ ดังนั้นเพื่อความเหมาะสมในการปฏิบัติงานในการใช้ cefotaxime ในการกำจัดเชื้อ อะโกราแบคทีเรียสำหรับการถ่ายยีนเข้าสู่แคลลัสของถั่วฮามาต้าในการทดลองนี้จึงเลือกใช้ cefotaxime ที่ความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยใช้ตั้งแต่ขั้นตอนการล้างเนื้อเยื่อ โดยล้าง เนื้อเยื่อภายหลังการ co-cultivation ด้วยอาหารเหลวสูตร MS ที่เติม cefotaxime ความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร 3 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที จากนั้นซับแคลลัสด้วยกระดาษซับที่นิ่งฆ่าเชื้อก่อนนำ แคลลัสมาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS เติม 2,4-D 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่เติม cefotaxime ความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตรเป็นเวลา 1 สัปดาห์ เพื่อให้สามารถกำจัดเชื้ออะโกราแบคทีเรีย

ได้อย่างมีประสิทธิภาพ และหลังจากนั้นลดความเข้มข้นลงเหลือ 250 มิลลิกรัมต่อลิตร ในการเปลี่ยนอาหารครั้งต่อไปเพื่อที่แคลลัสจะสามารถพัฒนาเป็นยอดต่อไปได้

ตารางที่ 1 เปอร์เซ็นต์เฉลี่ยของแคลลัสถั่วฮามาต้า (*Stylosanthes hamata* 'Verano') ที่สามารถพัฒนาเป็นยอดและจำนวนยอดต่อชิ้น เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D 5 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยเติม cefotaxime ที่ความเข้มข้น 0-600 มิลลิกรัมต่อลิตร ในสภาพที่มีแสง 55 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที 16 ชั่วโมงต่อวัน ที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 สัปดาห์ แล้วนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 15 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ไม่เติม cefotaxime เพื่อชักนำให้เกิดยอด โดยเพาะเลี้ยงในสภาพที่กล่าวแล้วข้างต้น เป็นเวลา 3 เดือน

ความเข้มข้นของ cefotaxime (มก./ล.)	เปอร์เซ็นต์เฉลี่ยของ ^{1/} แคลลัสที่พัฒนาเป็นยอด	จำนวนยอดเฉลี่ยต่อชิ้น ^{1/} แคลลัส
0	100a	26.19a
100	84ab	20.58ab
200	100a	21.09ab
300	92ab	14.48b
400	100a	11.17c
500	85ab	13.3bc
600	76b	8.56c
F-test	**	**
C.V.	11.66	67.03

หมายเหตุ ** แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ

^{1/} อักษรที่เหมือนกันในแนวตั้งไม่แตกต่างกันทางสถิติ ที่ความเชื่อมั่น 99%
เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT

4.2 การทดสอบความต้านทานของแคลลัสถั่วฮามาต้าต่อสารปฏิชีวนะที่ใช้คัดเลือกเซลล์ที่ได้รับการถ่ายยีน

ในการถ่ายยีนเข้าสู่เซลล์พืชนั้น นอกจากจะมียีนที่สนใจแล้วมักจะต้องมียีนเครื่องหมายในการช่วยคัดเลือกเนื้อเยื่อพืชที่ได้รับการถ่ายยีนถ่ายเข้าสู่เซลล์พืชร่วมไปด้วย การใช้ยีนคัดเลือกที่เหมาะสมมีส่วนช่วยอย่างมากต่อความสำเร็จของการถ่ายยีนในพืช ยีนเครื่องหมายนี้จะแทรกอยู่ในส่วนของเวกเตอร์ และจะแทรกเข้าไปในจีโนมของพืชหลังจากการถ่ายยีน ซึ่งจะทำให้เซลล์ที่ได้รับการถ่ายยีนแสดงลักษณะต้านทานต่อสารเคมีต่าง ๆ ที่จำเพาะกับยีนที่ใช้ในการคัดเลือกทำให้เซลล์ดังกล่าวเจริญเติบโตในอาหารคัดเลือกได้ ส่วนเซลล์ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน จะไม่สามารถเจริญบนอาหารคัดเลือกได้ (Komari *et al.*, 1996) การใช้สารคัดเลือกจำเป็นต้องใช้ความเข้มข้นที่เหมาะสม เนื่องจากการใช้ความเข้มข้นที่ระดับต่ำเกินไปจะทำให้เซลล์ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนสามารถเจริญเติบโตได้ มีผลทำให้การคัดเลือกล้มเหลวไม่ประสบความสำเร็จ ทำให้ต้นที่ได้จากการคัดเลือกบางต้นเป็นต้นที่ไม่มียีนที่ต้องการเข้าไปแทรกอยู่ในจีโนม ในทางตรงกันข้ามถ้าใช้ความเข้มข้นที่สูงเกินไปอาจทำให้เซลล์ที่ได้รับการถ่ายยีนไม่สามารถเจริญได้ เนื่องจากเซลล์ที่ได้รับการถ่ายยีนนั้น สามารถทนทานต่อสารคัดเลือกได้ในที่ระดับความเข้มข้นหนึ่งเท่านั้น ดังนั้นจึงต้องทำการทดสอบหาความเข้มข้นที่เหมาะสมที่ใช้กำจัดเนื้อเยื่อแคลลัสที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน โดยที่ความเข้มข้นของสารคัดเลือกที่เหมาะสมนั้น เนื้อเยื่อที่ได้รับการถ่ายยีนจะสามารถมีชีวิตรอดอยู่ได้ ส่วนเนื้อเยื่อที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนจะตาย ซึ่งในการทดลองนี้ได้ทดสอบความต้านทานของเนื้อเยื่อแคลลัสถั่วฮามาต้าต่อสารปฏิชีวนะที่ใช้ในการคัดเลือก 2 ชนิดคือ ไฮโกรมัยซิน และ กานามัยซิน ซึ่งสารปฏิชีวนะทั้ง 2 ชนิดนี้มีรายงานว่ามีการใช้เป็นสารคัดเลือกสำหรับการถ่ายยีนเข้าสู่พืชมากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ของงานวิจัยที่ตีพิมพ์ (Miki and McHugh, 2004) แต่อย่างไรก็ตามยังไม่มีรายงานการทดสอบความเข้มข้นที่ใช้ในการใช้สารทั้ง 2 ชนิดนี้เป็นสารคัดเลือกสำหรับเนื้อเยื่อแคลลัสของถั่วฮามาต้า

4.2.1 การทดสอบความต้านทานต่อสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน

การทดสอบความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน ที่ทำให้เซลล์ของถั่วฮามาต้าที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน *hpt* ตาย ทำโดยนำส่วนของแคลลัสขนาด 5x5 มิลลิเมตร หนา 2 มิลลิเมตร มาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม 2,4-D 5 มิลลิกรัมต่อลิตร และเติมสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินที่ระดับความเข้มข้น 0 10 20 30 40 50 และ 70 มิลลิกรัมต่อลิตร

เพาะเลี้ยงในสภาพที่มีแสง 55 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส โดยเปลี่ยนอาหารใหม่ทุก ๆ 2 สัปดาห์ จากผลการทดลองพบว่าแคลลัสของ ถั่วฮามาต้าที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติมไฮโกรมัยซินความเข้มข้น 50 และ 70 มิลลิกรัมต่อลิตร ตายทั้งหมดภายใน 4 สัปดาห์ และ 3 สัปดาห์ ตามลำดับ (ตารางที่ 2 และภาพที่ 14 และ 15) ผลในลักษณะนี้สอดคล้องกับงานวิจัยในพืชหลายชนิด ซึ่งโดยทั่วไปแล้วพบว่าเมื่อใช้ความเข้มข้นของไฮโกรมัยซินที่ต่ำแคลลัสจะสามารถเจริญเติบโตได้ดีกว่าที่ความเข้มข้นสูง นอกจากนี้ ความเข้มข้นสูงมีรายงานว่าส่งผลต่อการพัฒนาไปเป็นยอดด้วยเช่นกัน ดังนั้นในการถ่ายยีนเข้าสู่ ถั่วฮามาต้านี้จึงควรเลือกใช้สารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินที่ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตรในการคัดเลือกต้นที่ได้รับการถ่ายยีน ซึ่งความเข้มข้นดังกล่าวใกล้เคียงกับงานทดลองของ วัชรและ สุนธิชัย (2549) ที่ใช้ไฮโกรมัยซินที่ความเข้มข้น 45 มิลลิกรัมต่อลิตรในการคัดเลือกเนื้อเยื่อละหุ่งที่ได้รับการถ่ายยีน ในขณะที่ ฉัตรนภา (2545) ใช้ความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินเข้มข้นเพียง 25 มิลลิกรัมต่อลิตร ในการคัดเลือกใบเลี้ยงของถั่วเขียวที่ได้รับการถ่ายยีน ซึ่งแม้ว่าจะจะเป็น พืชวงศ์ถั่วเช่นเดียวกับถั่วฮามาต้า แต่จากการทดลองนี้ชี้ให้เห็นว่าไม่สามารถใช้ความเข้มข้นต่ำกว่า 50 มิลลิกรัมต่อลิตรได้ เนื่องจากที่ความเข้มข้นต่ำกว่า 50 มิลลิกรัมต่อลิตรแคลลัสสามารถรอดชีวิตได้เกิน 50 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 2)

อย่างไรก็ตามมีผู้เสนอแนวทางการเลือกใช้ความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะแนวทางอื่นอีก เช่น การใช้ความเข้มข้นสูงในระยะเริ่มต้น และลดความเข้มข้นลงเป็นลำดับ เช่นในรายงานของ Aoki *et al.* (2002) พบว่าการใช้สารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 20 วัน จากนั้นลดความเข้มข้นเหลือ 40 มิลลิกรัมต่อลิตร ในการคัดเลือกเซลล์ที่ได้รับการถ่ายยีนของถั่ว *Lotus japonicus* ได้ผลดีที่สุด แต่ก็มีรายงานวิธีการที่ตรงกันข้ามคือ ใช้ความเข้มข้นต่ำในช่วงแรกและเพิ่มความเข้มข้นขึ้นเป็นลำดับ เช่น รายงานของ Kondo *et al.* (2000) ใช้ความเข้มข้นของไฮโกรมัยซินที่ 10-40 มิลลิกรัมต่อลิตร ในการคัดเลือกเนื้อเยื่อ กระเทียม (*Allium sativum* L.) ที่ได้รับการถ่ายยีน โดยเพิ่มระดับความเข้มข้นขึ้นในแต่ละครั้งของการเปลี่ยนอาหาร และรายงานของ พรสุข (2543) ใช้สารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินความเข้มข้น 10 และ 25 มิลลิกรัมต่อลิตร ในการคัดเลือกโปรโตคอร์มของกล้วยไม้สกุลหวาย โดยครั้งแรกใช้ความเข้มข้นต่ำ แล้วคัดเลือกอีกครั้งโดยใช้ความเข้มข้นสูงขึ้น

4.2.2 การทดสอบความต้านทานต่อสารปฏิชีวนะกานามัยซิน

การทดสอบความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะกานามัยซินที่เหมาะสมที่ทำให้เนื้อเยื่อแคลลัสของถั่วฮามาต้าที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนตาย เพื่อใช้เป็นสารคัดเลือกในการถ่ายยีนที่มียีนเครื่องหมาย คือยีน *nptII* โดยนำส่วนของแคลลัสขนาด 5x5 มิลลิเมตรหนา 2 มิลลิเมตรมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D 5 มิลลิกรัมต่อลิตร และเติมสารปฏิชีวนะกานามัยซินความเข้มข้น 0 10 20 30 40 50 และ 70 มิลลิกรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงในสภาพที่มีแสง 55 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส จากผลการทดลองพบว่าแคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติมสารปฏิชีวนะกานามัยซินที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 30 มิลลิกรัมต่อลิตรขึ้นไปตายทั้งหมดภายใน 4 สัปดาห์ โดยใน 2 สัปดาห์แรกของการเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติมกานามัยซินทุกความเข้มข้น แคลลัสตายเพียง 10 เปอร์เซ็นต์เท่านั้น ซึ่งสังเกตได้จากเนื้อเยื่อแคลลัสที่ยังคงมีสีเขียวเป็นส่วนใหญ่ แต่เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าที่ระดับความเข้มข้นของกานามัยซินสูงกว่า 30 มิลลิกรัมต่อลิตร เนื้อเยื่อเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลและตาย (ตารางที่ 2 และภาพที่ 14)

จากการทดลองนี้เลือกใช้กานามัยซินที่ความเข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อลิตรในการคัดเลือกเนื้อเยื่อสำหรับการถ่ายยีนที่มียีน *nptII* เป็นยีนคัดเลือกในแคลลัสถั่วฮามาต้า ซึ่งแตกต่างจากการทดลองในถั่ว *Lotus japonicus* ที่พบว่าความเข้มข้นของกานามัยซินสูงถึง 400 มิลลิกรัมต่อลิตร ยังไม่เพียงพอที่จะทำให้เนื้อเยื่อตายได้ทั้งหมด (Aoki, et al. 2002) และ Krishnamurty et al. (2000) ใช้กานามัยซินความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตรในการคัดเลือกถั่วลูกไก่ (*Cicer arietinum*) ที่ได้รับการถ่ายยีน ในขณะที่งานทดลองของ Li et al. (2002) ที่ใช้ความเข้มข้นของกานามัยซิน 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ในการคัดเลือกใบกุหลาบที่ได้รับการถ่ายยีน Miguel and Oliveira (1999) ใช้กานามัยซินความเข้มข้นต่ำเพียง 10-15 มิลลิกรัมต่อลิตรในการคัดเลือก almond ที่ได้รับการถ่ายยีน จากหลายรายงานที่กล่าวมาจะเห็นได้ว่าความเข้มข้นของกานามัยซินที่ใช้ต่างกันนั้น เป็นเพราะพืชที่ใช้แตกต่างกันอีกทั้งเนื้อเยื่อที่ใช้ในการถ่ายยีนก็แตกต่างกันด้วยทำให้มีความทนทานต่อสารปฏิชีวนะที่ใช้แตกต่างกัน

ในกรณีของสารปฏิชีวนะที่อาจไม่มีผลต่อการเจริญและพัฒนาของเนื้อเยื่อพืชนั้น Dave (1990) ได้ทดสอบประสิทธิภาพของสารปฏิชีวนะในการยับยั้งการเกิดแคลลัส และการเกิดต้นจากใบเลี้ยงของ sugarbeet พบว่าไฮโกรมัยซินสามารถยับยั้งการเกิดแคลลัสได้มากที่สุด รองลงมาคือ

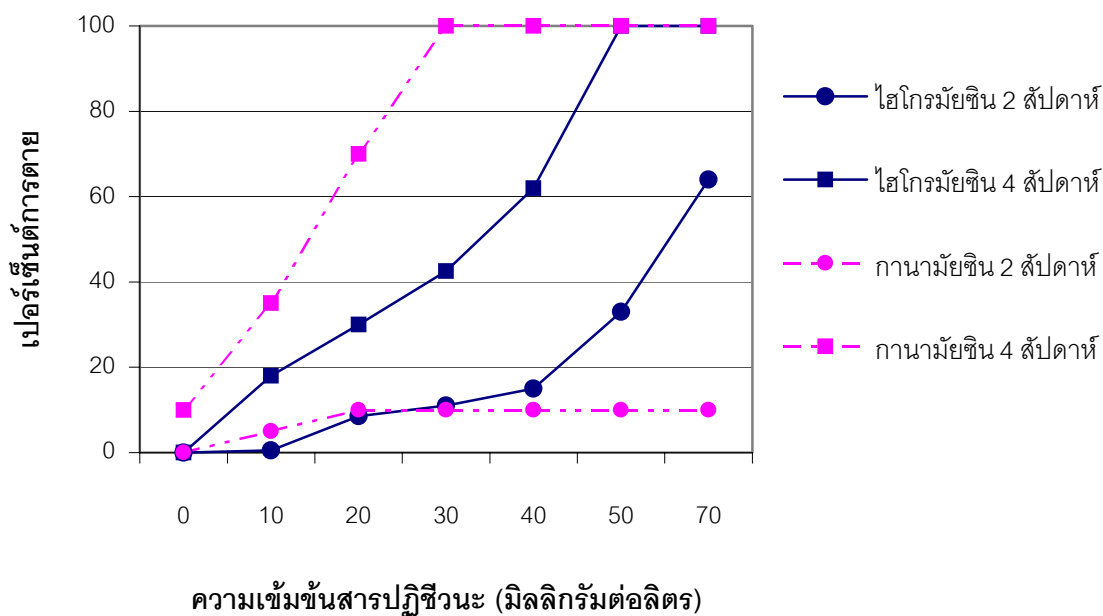
เจนินิติน นิโอมัยซิน กานามัยซิน และเจนตามัยซิน ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม Puonti-Kaerlas *et al.* (1990) รายงานว่าการใช้ยีน *nptII* เป็นยีนเครื่องหมายซึ่งต้องใช้สารคัดเลือกคือกานามัยซิน นั้นไม่เหมาะสมสำหรับการใช้เป็นยีนคัดเลือกสำหรับถั่วลันเตา (*Pisum sativum*) ในขณะที่ รายงานของ Sanchayita *et al.* (1996) พบว่าการใช้ยีน *nptII* เป็นยีนคัดเลือกการถ่ายยีนเข้าสู่ hypocotyl และ epicotyl ของถั่ว chickpea สามารถชักนำให้เกิดต้นภายหลังการถ่ายยีนได้ดี อย่างไรก็ตามการเลือกใช้ความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะที่ใช้คัดเลือกล้วนแตกต่างกัน เนื่องจากพืชแต่ละชนิดมีพันธุกรรมที่ต่างกัน ทำให้ทนต่อสารคัดเลือกได้แตกต่างกัน และแม้ในพืชชนิดเดียวกันแต่ใช้เนื้อเยื่อที่แตกต่างกันก็ทนต่อสารคัดเลือกได้แตกต่างกันเช่นกัน

ตารางที่ 2 เปอร์เซ็นต์การตาย และขนาดของแคลลัสของถั่วฮามาต้า (*Stylosanthes hamata* 'Verano') ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D 5 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยเติมสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน และกานามัยซิน ที่ความเข้มข้น 0-70 มิลลิกรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงในสภาพที่มีแสง 55 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 สัปดาห์

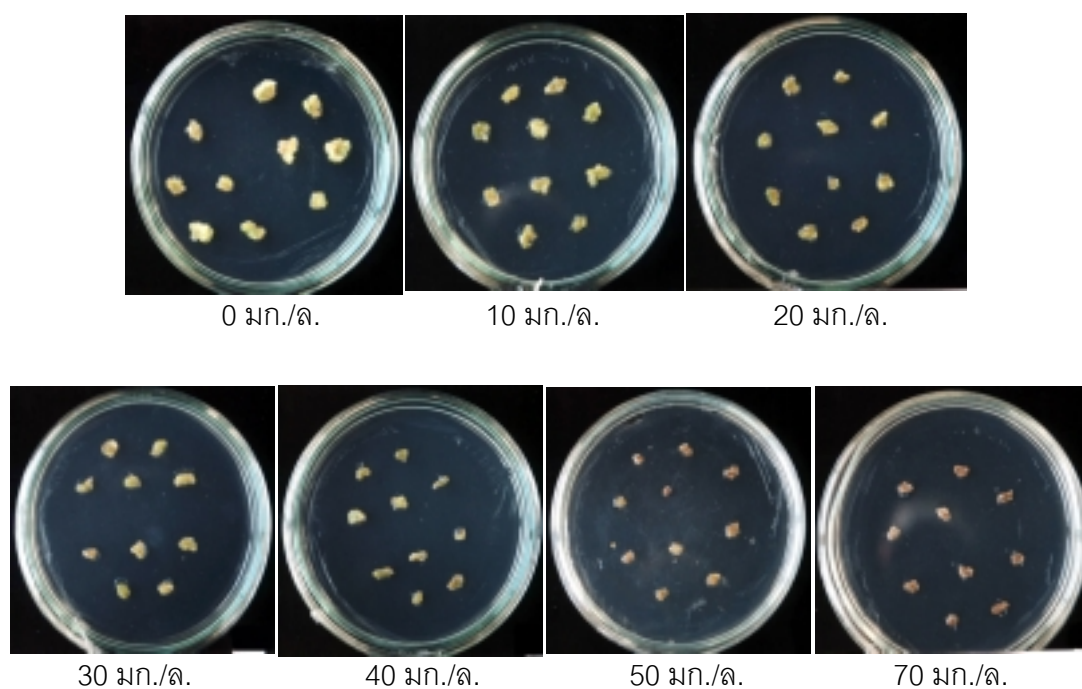
ความเข้มข้น มก./ล.	ไฮโกรมัยซิน		กานามัยซิน	
	%การตาย ^{1/}	ขนาดแคลลัส ^{1/} (ซม)	%การตาย ^{1/}	ขนาดแคลลัส ^{1/} (ซม)
0	0f	1.0a	10d	0.95a
10	18e	0.82b	35c	0.70b
20	30d	0.71c	70b	0.50c
30	41.5c	0.69cd	100a	0.50c
40	62b	0.63d	100a	0.50c
50	100a	0.54e	100a	0.50c
70	100a	0.54e	100a	0.50c
F-test	**	**	**	**
CV (%)	12.00	6.27	14.07	9.30

หมายเหตุ ** แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง

^{1/} อักษรที่เหมือนกันในแนวตั้งไม่แตกต่างกันทางสถิติ ที่ความเชื่อมั่น 99%
เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT



ภาพที่ 14 เปอร์เซ็นต์การตายของแคลลัสถั่วฮามาต้า (*Stylosanthes hamata* 'Verano') ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D 5 มิลลิกรัมต่อลิตร และเติมสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน และกานามัยซินความเข้มข้น 0-70 มิลลิกรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงในสภาพที่มีแสง 55 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 และ 4 สัปดาห์

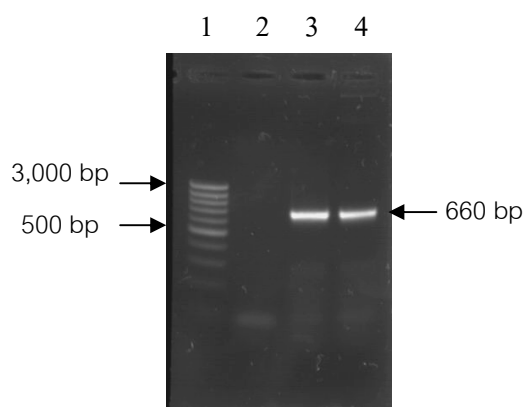


ภาพที่ 15 การทดสอบความต้านทานของแคลลัสถั่วฮามาต้า (*Stylosanthes hamata* 'Verano') ต่อสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน โดยเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D 5 มิลลิกรัมต่อลิตร และไฮโกรมัยซินความเข้มข้น 0-70 มิลลิกรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงในสภาพที่มีแสง 55 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 สัปดาห์

5. การสร้างพลาสมิด pCABVP1 สำหรับการถ่ายยีนโดยใช้ *Agrobacterium tumefaciens*

พลาสมิด pCABVP1 ที่มีขนาด 10,767 คู่เบส ได้จากการตัดยีน *VP1* ที่อยู่ในพลาสมิด pDriveVP1 มาต่อเข้าพลาสมิด pBI121 และ pCAMBIA1300 ตามวิธีในข้อ 3 พลาสมิด pCABVP1 นี้ประกอบด้วยส่วนของ T-DNA ขนาด 4.5 กิโลเบสและมียีน *VP1* ภายใต้การควบคุมของโปรโมเตอร์ 35SCaMV และเทอร์มิเนเตอร์ nos-T และยีนคัดเลือก *hpt* ภายใต้การควบคุมของโปรโมเตอร์ 35SCaMV และเทอร์มิเนเตอร์ poly A

เมื่อนำพลาสมิด pCABVP1 ถ่ายเข้าไปใน *A. tumefaciens* สายพันธุ์ AGL-1 ตามวิธีการในข้อ 4 แล้วแยกสกัดพลาสมิดออกมาจากเชื้อเพื่อตรวจสอบการมีอยู่ของพลาสมิด pCABVP1 โดยเทคนิค PCR ผลที่ได้พบว่าได้ชิ้นดีเอ็นเอของยีน *VP1* ขนาด 660 คู่เบส เช่นเดียวกับชิ้นเริ่มต้นในพลาสมิด pDriveVP1 แสดงว่าในเชื้ออะโกรแบคทีเรียที่ทดสอบนี้มีพลาสมิด pCABVP1 ที่มียีน *VP1* อยู่ (ภาพที่ 16) และสามารถใส่เชื้ออะโกรแบคทีเรียที่เตรียมได้นี้ในการถ่ายยีนเข้าสู่ถั่วฮามาต้าต่อไปได้



ภาพที่ 16 ตรวจสอบการมีอยู่ของยีน *VP1* ในพลาสมิดที่แยกสกัดได้จาก

Agrobacterium tumefaciens สายพันธุ์ AGL-1 ภายหลังจากการถ่ายยีน พลาสมิด pCABVP1 เข้าไป ตรวจสอบด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน *VP1*

ช่องที่ 1 100 bp DNA marker

ช่องที่ 2 negative control (น้ำกลั่น)

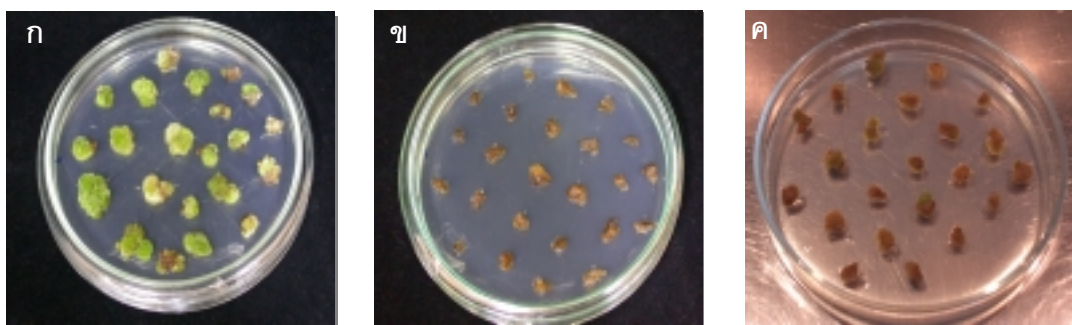
ช่องที่ 3 positive control ที่ใช้พลาสมิด pDriveVP1 เป็น template

ช่องที่ 4 PCR product ที่ใช้พลาสมิดที่แยกสกัดจาก *A. tumefaciens* เป็น template

6. การถ่ายยีน **VP1** เข้าสู่แคลลัสถั่วฮามาต้าโดยใช้เชื้อ ***Agrobacterium tumefaciens*** เป็นพาหะ

จากการถ่ายยีนเข้าสู่แคลลัสถั่วฮามาต้าโดยใช้อะโกรแบคทีเรียเป็นพาหะนี้ใช้แคลลัสถั่วฮามาต้าจำนวน 2,200 ชิ้น ได้แคลลัสที่สามารถรอดชีวิตบนอาหารคัดเลือกที่มีสารปฏิชีวนะไฮโอมัยซิน 50 มิลลิกรัมต่อลิตร (ภาพที่ 17) จำนวน 131 ชิ้น ซึ่งคิดเป็น 5.95 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งผลที่ได้ใกล้เคียงกับงานวิจัยของ Manners (1987) ที่ได้ทดลองถ่ายยีนโดยใช้ *A. tumefaciens* เป็นพาหะเข้าสู่ใบของถั่ว *Stylosanthes humilis* โดยมียีน *nptII* เป็นยีนคัดเลือกและพบว่าประสิทธิภาพของการคัดเลือก เมื่อใช้พลาสมิด BIN6 คือ 4 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อใช้พลาสมิด pGA472 คัดเลือกได้ 6 เปอร์เซ็นต์

เมื่อนำแคลลัสถั่วฮามาต้ามาที่รอดชีวิตในอาหารคัดเลือกมาชักนำให้เกิดยอดบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA 15 มิลลิกรัมพบว่าในแคลลัสแต่ละชิ้นสามารถเกิดยอดได้จำนวนมาก และยอดที่ได้สามารถชักนำให้เกิดรากได้เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหาร MS ที่เติม IBA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร จากนั้นนำยอดที่ได้ไปตรวจสอบการมีอยู่และการแสดงออกของยีน *VP1* และยีน *hpt* ต่อไป



ภาพที่ 17 แคลลัสของถั่ว *Stylosanthes hamata* หลังจากถ่ายยีน VP1 ที่อยู่บนพลาสมิด pCABVP1 และคัดเลือกบนอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D 5 มิลลิกรัมต่อลิตร สารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน 50 มิลลิกรัมต่อลิตร และสารปฏิชีวนะ cefotaxime 250 มิลลิกรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงในสภาพที่มีแสง 55 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 สัปดาห์

ก แคลลัสที่ไม่ได้ถ่ายยีนบนอาหารที่ไม่มีสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน
(positive control)

ข แคลลัสที่ไม่ได้ถ่ายยีนบนอาหารคัดเลือกที่มีสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน
(negative control)

ค แคลลัสที่ได้รับถ่ายยีนบนอาหารคัดเลือกที่มีสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน

7. การตรวจสอบการถ่ายยีนเข้าสู่ *Stylosanthes hamata*

7.1 การตรวจสอบผลการถ่ายยีน VP1 และ ยีน hpt โดยวิธีพีซีอาร์

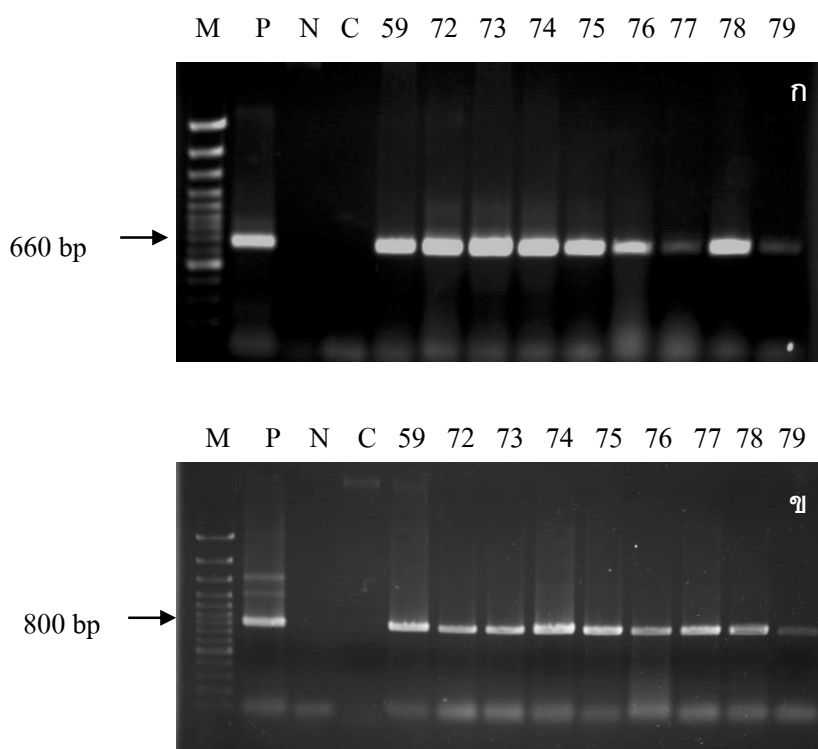
ทำการสกัดดีเอ็นเอจากใบถั่วฮามาต้าที่สามารถเจริญเติบโตได้ในอาหารคัดเลือก และต้นถั่วฮามาต้าปกติที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน นำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาตรวจสอบผลการถ่ายยีน โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อยีน VP1 และยีน hpt และใช้ส่วนผสมปฏิกิริยาตามรายละเอียดในภาคผนวกที่ 10.1 และ 10.2 โดยใช้อุณหภูมิของปฏิกิริยาดังในภาคผนวกที่ 10.5 จากนั้นนำ PCR product ที่ได้มาแยกขนาดดีเอ็นเอด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิส ในเจลอะกาโรส 0.8 เปอร์เซ็นต์ จากผลการตรวจสอบพบแถบดีเอ็นเอของยีน VP1 ขนาด 660 คู่เบส (ภาพที่ 18ก) และแถบดีเอ็นเอของยีน hpt ขนาด 800 คู่เบส (ภาพที่ 18ข) จากการตรวจสอบต้นที่สามารถเจริญเติบโตได้ในอาหารคัดเลือกที่เต็มสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน จำนวนทั้งสิ้น 300 ต้น พบต้นที่มียีน VP1 จำนวน 93 ต้น และต้นที่มียีน hpt จำนวน 97 ต้น โดยในจำนวนนี้มี 75 ต้นที่พบทั้งสองยีน (ตารางที่ 3)

ต้นถั่วฮามาต้าที่สามารถเจริญเติบโตได้ในอาหารคัดเลือกที่มีสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินแต่ตรวจด้วยวิธีพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน hpt และยีน VP1 แล้วไม่พบยีน hpt และยีน VP1 มีจำนวน 182 ต้นจากจำนวนต้นที่นำมาตรวจสอบ 300 ต้น คิดเป็น 60 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งต้นที่ได้เหล่านี้มาจากแคลลัสที่อยู่ด้านบนซึ่งไม่ได้สัมผัสกับอาหารคัดเลือกโดยตรง ความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะที่เคลือบย้ายเข้าไปในเนื้อเยื่อเหล่านี้อาจจะเจือจางลง ทำให้เซลล์ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนสามารถเจริญเติบโตและพัฒนาเป็นยอดได้ (Catlin, 1990) เมื่อนำต้นที่ได้เหล่านี้มาตรวจสอบจึงไม่พบยีน hpt หรือยีน VP1 ซึ่ง Vasil (1985) กล่าวว่าข้อเสียเปรียบของการถ่ายยีนเข้าสู่เนื้อเยื่อพืชที่มีขนาดใหญ่เมื่อเทียบกับการถ่ายเข้าสู่เซลล์คือ จะมีบางเซลล์ของพืชที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนสามารถเจริญขึ้นมาได้ สำหรับแนวทางในการแก้ปัญหานี้ Sanchayita et al. (1996) ได้ใช้วิธีการคัดเลือกต้นที่เกิดขึ้นซ้ำบนอาหารคัดเลือกอีกครั้งเพื่อกำจัดต้นที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนที่เจริญปะปนมา

สำหรับต้นที่ตรวจสอบด้วยวิธีพีซีอาร์แล้วไม่พบยีน hpt แต่ตรวจพบยีน VP1 ซึ่งมีจำนวน 16 ต้นจากต้นที่นำมาตรวจสอบ 300 ต้น (ตารางที่ 3) คิดเป็น 5.3 เปอร์เซ็นต์นั้น อาจอธิบายได้ว่าการถ่ายยีนโดยใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรียเป็นพาหะนั้น ในขั้นตอนการนำชิ้นส่วนของ T-DNA เข้าสู่เซลล์พืชมักจะนำส่วนของ right border ของ T-DNA เข้าสู่เซลล์พืชก่อน (Sheng and Citovsky,

1996) ซึ่งในพลาสมิด pCABVP1 ที่ใช้ในการทดลองนี้ยีน *VP1* เป็นยีนที่อยู่บริเวณ right border ของ T-DNA ซึ่งเป็นด้านที่จะเข้าไปเชื่อมกับโครโมโซมของเซลล์พืชก่อน ดังนั้นจึงเป็นไปได้ว่า ส่วนของยีน *hpt* ที่อยู่บริเวณด้าน left border อาจเกิดการขาดหายไปบางส่วน จึงทำให้ไม่สามารถตรวจพบได้ แต่ที่แคลลัสสามารถเจริญเติบโตได้ในอาหารคัดเลือกนั้นอาจเนื่องมาจากแคลลัสที่มีขนาดใหญ่ เซลล์บางเซลล์ไม่ได้สัมผัสกับอาหารคัดเลือกโดยตรง จึงทำให้เจริญเติบโตขึ้นมาได้ (Catlin, 1990)

นอกจากนี้ยังพบต้นที่ตรวจด้วยวิธีพีซีอาร์แล้วพบยีน *hpt* แต่ไม่พบยีน *VP1* จำนวน 19 ต้น จากจำนวนต้นที่นำมาตรวจสอบทั้งหมด 300 ต้น (ตารางที่ 3) คิดเป็น 6.3 เปอร์เซ็นต์นั้นอาจเนื่องจากเหตุผลหลายประการซึ่ง Durand-Tardif *et al.* (1985) อธิบายว่าการที่ถ่ายยีนเข้าไปในช่วงแรกอาจจะมีทั้งสองยีนอยู่ในเซลล์เดียวกัน แต่เมื่อเพาะเลี้ยงพืชต่อไปเป็นเวลานาน และพืชมีการแบ่งเซลล์ได้เซลล์ใหม่ ทำให้มีโอกาสที่ยีนที่ถ่ายเข้าไปบางส่วนขาดจะหายไปในช่วงนั้น สังเกตได้จากการกลับมาตรวจสอบต้นที่เคยตรวจพบยีน เมื่อขยายพันธุ์เพิ่มมากขึ้นมีบางต้นที่ได้ไม่มียีนอยู่หรือตรวจพบเพียงยีนเดียว นอกจากนี้อาจเกิดจากการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสบางส่วนของยีนที่อยู่บน T-DNA โดยกลไกของแบคทีเรียในขณะที่ย้ายถ่ายยีน T-DNA หรือเมื่อแทรกเข้าไปในโครโมโซมของเซลล์พืชทำให้ไม่สามารถตรวจพบได้โดยวิธีพีซีอาร์



ภาพที่ 18 การตรวจสอบการมีอยู่ของยีน *VP1* และ ยีน *hpt* ในถั่วฮามาต้าที่ได้รับ

การถ่ายยีนโดยใช้เชื้อ *Agrobacterium tumefaciens* สายพันธุ์ AGL-1 เป็นพาหะ ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยยีน *VP1* ได้แถบดีเอ็นเอขนาด 660 คู่เบส (ก) และยีน *hpt* ได้ แถบดีเอ็นเอขนาด 800 คู่เบส (ข)

M = 100 bp ladder marker

P = positive control (ดีเอ็นเอที่สกัดได้จากพลาสมิด pCABVP1)

N = negative control (ดีเอ็นเอที่สกัดได้จากต้นถั่วที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน)

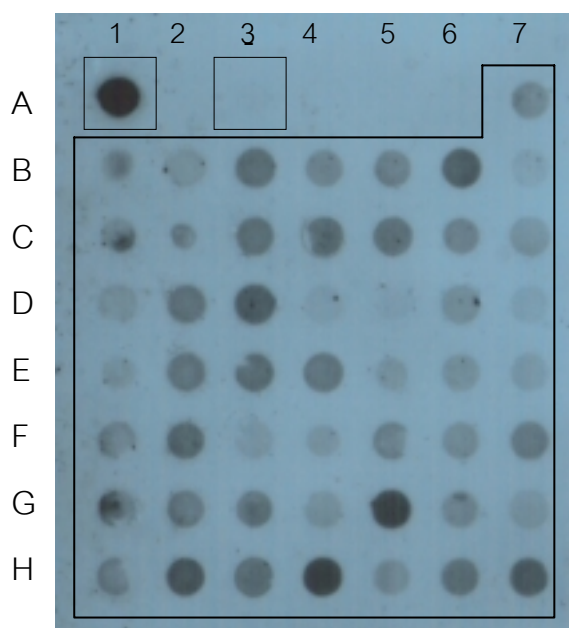
C = negative control (น้ำกลั่น)

59 72 73 74 75 76 77 78 79 = ดีเอ็นเอจากต้นถั่วฮามาต้าที่คาดว่าได้รับการถ่ายยีน

7.2 การตรวจสอบผลการถ่ายยีน VP1 โดยวิธี dot blot hybridization

การตรวจสอบการมีอยู่ของยีน VP1 โดยเลือกสกัดจีโนมดีเอ็นเอจากต้นพืชที่คาดว่าได้รับการถ่ายยีน ที่ผ่านการตรวจสอบด้วยเทคนิคพีซีอาร์ให้ผลเป็นบวกทั้ง 2 ยีน จากนั้นนำดีเอ็นเอที่ได้มาตรวจสอบด้วยวิธี dot blot hybridization โดยการหยดดีเอ็นเอลงบนแผ่นไนลอนเมมเบรน และไฮบริไดซ์ด้วยดีเอ็นเอตรวจสอบของยีน VP1 ที่ติดฉลากด้วยสารไวรั้งสี digoxigenin (DIG) แล้วนำไปตรวจสอบผลโดยนำเมมเบรนไปทาบบกับแผ่นฟิล์ม X-ray ซึ่งหากมีการเข้าคู่กันระหว่างดีเอ็นเอตรวจสอบกับดีเอ็นเอที่สกัดได้จะปรากฏจุดสัญญาณสีดำบนแผ่นฟิล์ม การตรวจสอบนี้ใช้ดีเอ็นเอจากต้นพืชที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนเป็น negative control และดีเอ็นเอที่ได้จากการทำพีซีอาร์ของยีน VP1 เป็น positive control พบว่าทุกต้นที่ตรวจสอบด้วยเทคนิคพีซีอาร์ให้ผลบวก เมื่อนำมาตรวจสอบด้วยเทคนิค dot blot hybridization ให้ผลบวกเช่นเดียวกันทุกต้น (ภาพที่ 19 และตารางที่ 3) แต่อย่างไรก็ตามจุดที่ปรากฏมีความเข้มแตกต่างกันทั้งนี้น่าจะเนื่องมาจากความสะอาดของดีเอ็นเอที่สกัดได้ในแต่ละครั้งที่แตกต่างกัน ทำให้มีผลต่อการวัดความเข้มของดีเอ็นเอที่ได้ทำให้ได้ค่าสูงกว่าความเป็นจริง เมื่อนำมาใช้ในปริมาณที่เท่า ๆ กันจึงมีปริมาณดีเอ็นเอไม่เท่ากันเป็นผลให้ได้จุดสัญญาณที่มีความเข้มต่างกัน

จากการนำต้นที่ตรวจพบเฉพาะยีน *hpt* จำนวน 7 ต้นมาตรวจสอบการมีอยู่ของยีน VP1 โดยวิธีการ dot blot hybridization นั้นมีต้นที่ตรวจไม่พบยีน VP1 จำนวน 4 ต้น ตรวจพบยีน VP1 จำนวน 3 ต้น ซึ่งต้นที่ตรวจพบยีน VP1 นี้ อาจอธิบายได้ว่าเกิดจากการเปลี่ยนแปลงของยีน VP1 ที่อยู่บน T-DNA โดยกลไกของแบคทีเรียในขณะที่ย้ายถ่ายยีน T-DNA หรือเมื่อแทรกเข้าไปในโครโมโซมของเซลล์พืช หรือกลไกภายในพืชเองที่ยังไม่ทราบแน่ชัด ซึ่งเมื่อเกิดการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสของยีนขึ้น ทำให้ไม่สามารถตรวจพบได้โดยวิธีพีซีอาร์ซึ่งใช้ไพรเมอร์ช่วงสั้น ๆ (Durand-Tafidif *et al.*, 1985) แต่เมื่อนำมาตรวจสอบโดยวิธี dot blot hybridization นั้นดีเอ็นเอตรวจสอบที่นำมาใช้ในการตรวจสอบยีน VP1 ได้มาจาก PCR product ของยีน VP1 ทั้งยีนจึงสามารถตรวจพบยีน VP1 ที่อาจมีลำดับเบสที่เปลี่ยนไปบางส่วนได้



ภาพที่ 19 การตรวจสอบการคงอยู่ของยีน *VP1* ในต้นถั่ว *Stylosanthes hamata* ที่คาดว่าได้รับการถ่ายยีนด้วยเชื้อ *Agrobacterium tumefaciens* สายพันธุ์ AGL-1 ที่มีพลาสมิด pCABVP1 โดยเทคนิค dot blot hybridization ที่ตรวจสอบด้วยดีเอ็นเอตรวจสอบของยีน *VP1*

A1 = positive control (ดีเอ็นเอที่สกัดได้จากพลาสมิด pCABVP1)

A3 = negative control (ดีเอ็นเอที่สกัดได้จากต้นถั่วที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน)

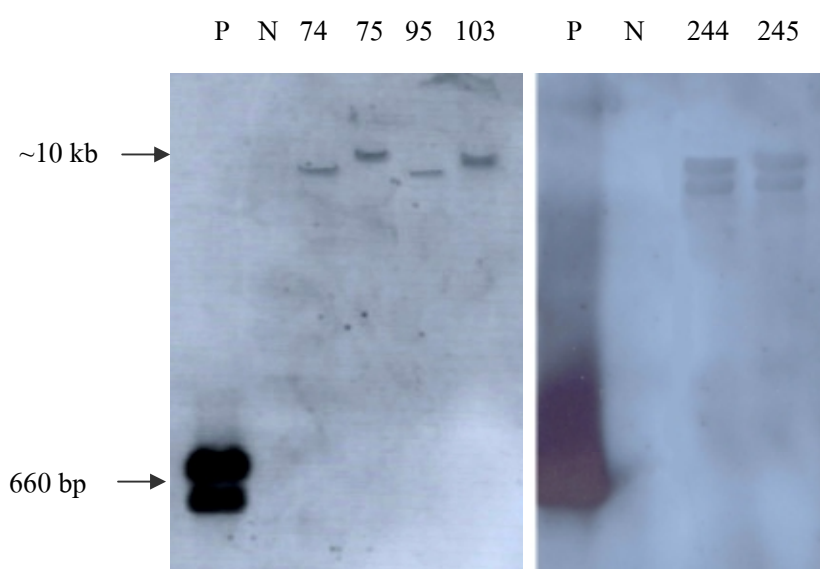
A7-H7 = ดีเอ็นเอที่สกัดได้จากต้นที่คาดว่าได้รับการถ่ายยีน

7.3 การตรวจสอบผลการถ่ายยีน VP1 โดยวิธี Southern blot hybridization

การตรวจสอบการเข้ารวมตัวของยีน VP1 กับจีโนมของถั่วฮามาต้า โดยเลือกทดสอบกับต้นถั่วฮามาต้าที่คาดว่าได้รับการถ่ายยีน ซึ่งตรวจสอบด้วยวิธี PCR ให้ผลบวกจำนวน 6 ต้น และนำมาตรวจสอบด้วยวิธี Southern blot hybridization เพื่อยืนยันว่ามียีน VP1 เข้าไปรวมตัวกับจีโนมของถั่วฮามาต้าโดยใช้ดีเอ็นเอจากต้นพืชที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนเป็น negative control และดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ PCR ของยีน VP1 ที่ใช้พลาสมิด pCABVP1 เป็น template เป็น positive control โดยนำจีโนมดีเอ็นเอที่แยกสกัดได้จากต้นถั่วมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI จากนั้นนำมาแยกขนาดด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิสบนเจลอะกาโรส 0.8% แล้วย้ายดีเอ็นเอจากเจลลงบนแผ่นไนลอนเมมเบรน และไฮบริไดซ์ด้วยดีเอ็นเอตัวตรวจสอบของยีน VP1 ที่ติดฉลากด้วย

สารไรรังสี DIG แล้วนำไปตรวจสอบผลโดยนำเมมเบรนไปทาบบกับแผ่นฟิล์ม X-ray ซึ่งหากมีการเข้าคู่กันระหว่างดีเอ็นเอตรวจสอบกับดีเอ็นเอที่สกัดได้จะให้ผลเป็นแถบสัญญาณสีดำบนแผ่นฟิล์ม ซึ่งผลของการทำ Southern blot hybridization นั้นสามารถไขบอจำนวนซ้ำของ T-DNA ที่เข้าไปแทรกตัวอยู่ในจีโนมของพืชที่ได้รับการถ่ายยีนได้ด้วย (Eady *et al.*, 2000; Kushikawa

et al., 2001) จากการทดลองนี้พบว่า ต้นที่นำมาตรวจสอบได้จำนวนแถบสี 1 แถบจำนวน 4 ต้น และ 2 แถบจำนวน 2 ต้น (ภาพที่ 20) ดังนั้นจำนวนซ้ำ (copy) ของ T-DNA ที่ถูกถ่ายเข้าสู่เซลล์มีทั้งที่เป็น 1 และ 2 ชุด อย่างไรก็ตามแถบขึ้นดีเอ็นเอที่ได้ในแต่ละต้นมีขนาดแตกต่างกัน เนื่องจากดีเอ็นเอที่เข้าไปรวมกับจีโนมเป็นการรวมกันแบบสุ่มและแทรกอยู่ในตำแหน่งของดีเอ็นเอพืชในตำแหน่งที่ต่างกัน ทำให้เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะแล้วได้ขึ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดต่างกัน ซึ่งจากรายงานของ Kumpatla *et al.* (1997) กล่าวว่า การถ่ายยีนเข้าสู่พืชนั้นจำนวนชุดของยีนที่เข้าไปแทรกอยู่ในจีโนมพืชนั้นหากมีเพียงชุดเดียว (single copy) จะดีที่สุดเพราะการที่มียีนเข้าไปแทรกอยู่ในจีโนมพืชหลายชุด (multiple copy) นั้น จะทำให้เกิดยีน silencing ได้



ภาพที่ 20 การตรวจสอบการเข้ารวมตัวของยีน *VP1* กับจีโนมของถั่วฮามาต้า (*Stylosanthes hamata*) ที่ได้รับการถ่ายยีนที่มีพลาสมิด pCABVP1 โดยเทคนิค Southern blot hybridization ที่ตรวจสอบด้วยดีเอ็นเอตรวจสอบของยีน *VP1*
P = positive control (PCR product ของยีน *VP1* ที่ใช้พลาสมิด pCABVP1 เป็น template)
N = negative control (ดีเอ็นเอจากต้นถั่วฮามาต้าที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน)
74 75 95 103 244 และ 245 = ดีเอ็นเอจากต้นถั่วฮามาต้าที่คาดว่าได้รับการถ่ายยีน *VP1*

ตารางที่ 3 ผลการตรวจสอบการมีอยู่ของยีน *VP1* และยีน *hpt* ในโครโมโซมของถั่วฮามาต้า (*Stylosanthes hamata*) จำนวน 300 ต้น ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ และ dot blot hybridization ด้วยไพรเมอร์ และดีเอ็นเอตรวจสอบที่จำเพาะกับยีน *VP1* และยีน *hpt*

วิธีการ	ต้น																			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
PCR: ยีน <i>VP1</i>	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-
PCR: ยีน <i>hpt</i>	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-
dot blot hybridization: ยีน <i>VP1</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

0 = ไม่ได้ทดสอบ

วิธีการ	ต้น																			
	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
PCR: ยีน <i>VP1</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
PCR: ยีน <i>hpt</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
dot blot hybridization: ยีน <i>VP1</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

0 = ไม่ได้ทดสอบ

วิธีการ	ต้น																			
	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
PCR: ยีน <i>VP1</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
PCR: ยีน <i>hpt</i>	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+	-
dot blot hybridization: ยีน <i>VP1</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

0 = ไม่ได้ทดสอบ

ตารางที่ 3 (ต่อ)

วิธีการ	ต้นไม้																			
	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80
PCR: ยีน <i>VP1</i>	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
PCR: ยีน <i>hpt</i>	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
dot blot hybridization: ยีน <i>VP1</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+	+	0	+	0	0	0	+	0	0	+

0 = ไม่ได้ทดสอบ

วิธีการ	ต้นไม้																			
	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100
PCR: ยีน <i>VP1</i>	+	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	+	-
PCR: ยีน <i>hpt</i>	+	+	-	-	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	+	-
dot blot hybridization: ยีน <i>VP1</i>	+	+	-	0	0	-	0	+	0	0	0	+	0	0	+	+	0	0	+	0

0 = ไม่ได้ทดสอบ

วิธีการ	ต้นไม้																
	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113	114	115	116	117
PCR: ยีน <i>VP1</i>	-	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+	-
PCR: ยีน <i>hpt</i>	-	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+
dot blot hybridization: ยีน <i>VP1</i>	0	+	+	0	+	0	+	-	+	0	+	0	+	+	-	+	-

0 = ไม่ได้ทดสอบ

ตารางที่ 3 (ต่อ)

วิธีการ	ต้นไม้																
	118	119	120	121	122	123	124	125	126	127	128	129	130	131	132	133	134
PCR: ยีน <i>VP1</i>	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-
PCR: ยีน <i>hpt</i>	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-
dot blot hybridization: ยีน <i>VP1</i>	0	-	+	0	0	+	0	+	0	0	-	+	+	0	0	0	0

0 = ไม่ได้ทดสอบ

วิธีการ	ต้นไม้																
	135	136	137	138	139	140	141	142	143	144	145	146	147	148	149	150	151
PCR: ยีน <i>VP1</i>	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-
PCR: ยีน <i>hpt</i>	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-
dot blot hybridization: ยีน <i>VP1</i>	0	0	+	0	+	+	0	0	0	0	0	0	0	+	0	+	0

0 = ไม่ได้ทดสอบ

วิธีการ	ต้นไม้																
	152	153	154	155	156	157	158	159	160	161	162	163	164	165	166	167	168
PCR: ยีน <i>VP1</i>	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
PCR: ยีน <i>hpt</i>	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-
dot blot hybridization: ยีน <i>VP1</i>	0	+	+	0	0	0	0	0	0	+	0	0	+	0	-	0	0

0 = ไม่ได้ทดสอบ

ตารางที่ 3 (ต่อ)

วิธีการ	ต้นไม้																
	169	170	171	172	173	174	175	176	177	178	179	180	181	182	183	184	185
PCR: ยีน <i>VP1</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PCR: ยีน <i>hpt</i>	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
dot blot																	
hybridization:	0	0	0	0	-	-	0	0	-	0	0	0	0	0	0	0	0
ยีน <i>VP1</i>																	

0 = ไม่ได้ทดสอบ

วิธีการ	ต้นไม้																
	186	187	188	189	190	191	192	193	194	195	196	197	198	199	200	201	202
PCR: ยีน <i>VP1</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PCR: ยีน <i>hpt</i>	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
dot blot																	
hybridization:	0	0	0	0	+	0	-	0	0	0	0	0	0	0	+	0	0
ยีน <i>VP1</i>																	

0 = ไม่ได้ทดสอบ

วิธีการ	ต้นไม้																
	203	204	205	206	207	208	209	210	211	212	213	214	215	216	217	218	219
PCR: ยีน <i>VP1</i>	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-
PCR: ยีน <i>hpt</i>	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-
dot blot																	
hybridization:	0	0	0	0	0	0	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ยีน <i>VP1</i>																	

0 = ไม่ได้ทดสอบ

ตารางที่ 3 (ต่อ)

วิธีการ	ต้น																
	220	221	222	223	224	225	226	227	228	229	230	231	232	233	234	235	236
PCR: ยีน <i>VP1</i>	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
PCR: ยีน <i>hpt</i>	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
dot blot																	
hybridization:	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ยีน <i>VP1</i>																	

0 = ไม่ได้ทดสอบ

วิธีการ	ต้น																
	237	238	239	240	241	242	243	244	245	246	247	248	249	250	251	252	253
PCR: ยีน <i>VP1</i>	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
PCR: ยีน <i>hpt</i>	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+
dot blot																	
hybridization:	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ยีน <i>VP1</i>																	

0 = ไม่ได้ทดสอบ

วิธีการ	ต้น																
	254	255	256	257	258	259	260	261	262	263	264	265	266	267	268	269	270
PCR: ยีน <i>VP1</i>	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PCR: ยีน <i>hpt</i>	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
dot blot																	
hybridization:	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ยีน <i>VP1</i>																	

0 = ไม่ได้ทดสอบ

ตารางที่ 3 (ต่อ)

วิธีการ	ต้นไม้																
	271	272	273	274	275	276	277	278	279	280	281	282	283	284	285	286	287
PCR: ยีน <i>VP1</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PCR: ยีน <i>hpt</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
dot blot hybridization: ยีน <i>VP1</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

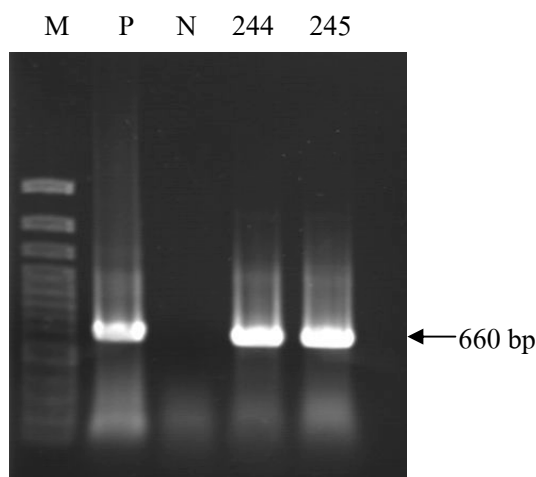
0 = ไม่ได้ทดสอบ

วิธีการ	ต้นไม้												
	288	289	290	291	292	293	294	295	296	297	298	299	300
PCR: ยีน <i>VP1</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PCR: ยีน <i>hpt</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
dot blot													
hybridization:	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ยีน <i>VP1</i>													

0 = ไม่ได้ทดสอบ

7.4 การตรวจสอบการแสดงออกของยีน VP1 โดยวิธี reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR)

สกัดอาร์เอ็นเอจากต้นถั่วฮามาต้าที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน และต้นที่ได้รับการถ่ายยีนต้นที่ 244 และ 245 โดยใช้ Rneasy Mini kit (Qiagen) จากนั้นนำมาตรวจสอบการสร้าง mRNA ของยีน VP1 โดยใช้ Qiagen one step RT-PCR kit (Qiagen) จากการตรวจสอบพบแถบดีเอ็นเอที่ถูกเพิ่มปริมาณจาก mRNA template ของยีน VP1 ขนาด 660 คู่เบส (ภาพที่ 21) จากทั้งสองต้นที่ตรวจสอบขนาดของดีเอ็นเอที่ได้ดังกล่าวสอดคล้องกับขนาดของยีน VP1 ที่ใช้ในการทดลองนี้



ภาพที่ 21 การตรวจสอบการแสดงออกของยีน VP1 ในต้นถั่ว *Stylosanthes hamata* จาก total RNA โดยเทคนิค reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) ซึ่งได้แถบดีเอ็นเอขนาด 660 คู่เบสจากต้นที่ได้รับการถ่ายยีน

M = 100 bp ladder marker

P = positive control (ดีเอ็นเอที่ได้จากพลาสมิด pCABVP1)

N = negative control (อาร์เอ็นเอที่ได้จากต้นถั่วฮามาต้าที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน)

244 245 = อาร์เอ็นเอจากต้นถั่วฮามาต้า 244 และ 245 ที่ได้รับการถ่ายยีน

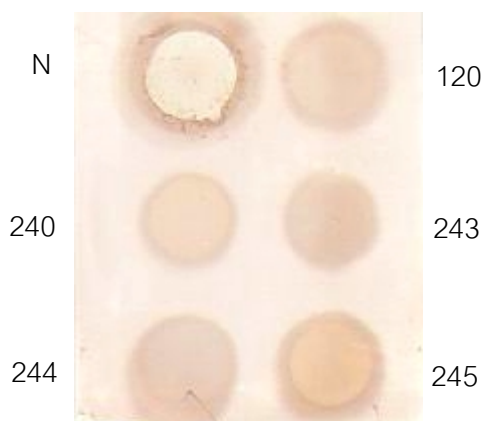
7.5 ตรวจสอบการแสดงออกของยีน *VP1* โดย protein dot blot

สกัดโปรตีนจากต้นถั่วฮามาต้าที่ไม่ได้ถ่ายยีน และต้นที่ได้รับถ่ายยีน ต้นที่ 240 243 244 และ 245 ซึ่งต้นเหล่านี้ได้รับการยืนยันการคงอยู่ของยีน *VP1* และยีน *hpt* โดยวิธีพีซีอาร์ นำโปรตีนที่ได้มาตรวจสอบโปรตีน *VP1* โดยใช้เทคนิค dot immunoblotting โดยการหยดโปรตีนที่ได้ลงบนแผ่นไนโตรเซลลูโลสเมมเบรน และตรวจสอบด้วยแอนติบอดีที่ได้จากซีรัมของหนูที่แสดงอาการของโรคปากและเท้าเปื่อยจากเชื้อไวรัส FMD โดยใช้ซีรัมที่เจือจางอัตราส่วน 1:1,000 พบว่าแอนติบอดีสามารถจับกับโปรตีนของถั่วฮามาต้าต้นที่ได้รับการถ่ายยีน แต่ไม่สามารถจับกับโปรตีนจากถั่วฮามาต้าที่ไม่ได้ถ่ายยีน (ภาพที่ 22) อย่างไรก็ตามแม้ว่าการตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีนโดยวิธี protein dot blot นี้จะมีข้อดีคือ สามารถตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีนได้ง่าย และประหยัดสารเคมีที่ใช้ตรวจสอบ แต่ก็มีข้อเสียคือ โปรตีนที่ตรวจสอบได้อาจเป็นโปรตีนชนิดอื่นที่ไม่ใช่โปรตีน *VP1* แต่มีบางส่วนที่สามารถจับได้กับแอนติบอดีที่เป็น polyclonal antibody ดังนั้นจึงควรมีการตรวจสอบโดยวิธี western blot อีกครั้งเพื่อให้ทราบว่าโปรตีนที่ได้เป็นโปรตีน *VP1* หรือไม่โดยดูจากขนาดของโปรตีนนั้น

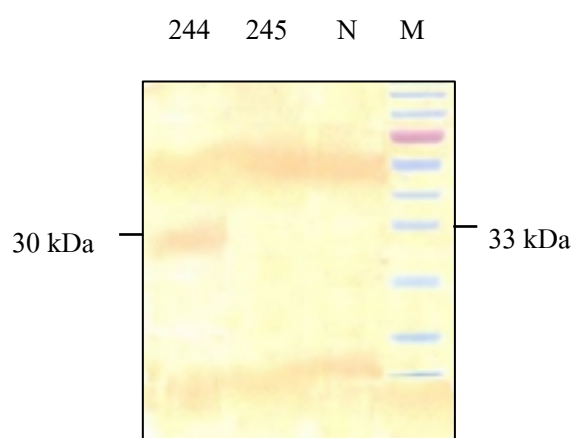
7.6 ตรวจสอบการแสดงออกของยีน *VP1* โดย western blot analysis

สกัดโปรตีนจากต้นถั่วฮามาต้าที่ไม่ได้ถ่ายยีน และต้นที่ 244 และ 245 ที่ได้รับถ่ายยีน ที่มีการยืนยันผลโดยวิธี protein dot blot ว่ามีโปรตีน *VP1* อยู่ นำมาแยกโปรตีนด้วยเทคนิค SDS PAGE จากนั้นย้ายโปรตีนจากเจลลงบนแผ่นไนโตรเซลลูโลสเมมเบรนและตรวจสอบการจับกันของโปรตีนที่ได้กับแอนติบอดีซึ่งใช้ซีรัมของหนูที่แสดงอาการของโรคปากและเท้าเปื่อยที่เกิดจากเชื้อไวรัส FMD ที่เจือจางในอัตราส่วน 1:1,000 ผลปรากฏว่าต้นที่ 245 ไม่พบโปรตีน *VP1* ซึ่งเป็นไปได้ว่าการที่ผลจาก protein dot blot ของต้น 245 ที่ให้ผลบวกอาจจะเป็นโปรตีนชนิดอื่นที่สามารถจับกับซีรัมนี้ได้จึงแสดงผลบวกแต่เมื่อทำการตรวจสอบโดย western blot ไม่ได้ขนาดของโปรตีนตามที่ควรจะเป็น ส่วนในต้นที่ 244 สามารถตรวจพบแถบโปรตีนขนาด 30 kDa ของโปรตีน *VP1* ที่มีความจำเพาะต่อซีรัมที่ใช้ แสดงว่ายีน *VP1* ที่ถ่ายเข้าไปในถั่วฮามาต้าในการทดลองนี้ เข้าไปรวมกับจีโนมของถั่วฮามาต้าได้อย่างสมบูรณ์ และมีการแสดงออกของโปรตีนอย่างถูกต้อง (ภาพที่ 23)

Carrillo (1998) ที่ถ่ายยีน *VP1* เข้าสู่ *Arabidopsis thaliana* และเมื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีนโดยตรวจสอบการกระตุ้นภูมิคุ้มกันในหนูนั้น พบว่าสามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันในหนูได้ และงานของ Santos *et al.*, (2002) ทำการถ่ายยีนเข้าสู่อัลฟัลฟา โดยใช้ส่วน amino acid ที่ 135-160 ของยีน *VP1* ซึ่งเป็นบริเวณ epitope ของยีน *VP1* ที่มีความสำคัญต่อการจดจำของแอนติบอดี โดยนำไปเชื่อมต่อกับยีน *gus* ซึ่งเมื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีนในต้นถั่วอัลฟัลฟาที่ได้รับการถ่ายยีนด้วยวิธี western blot ตรวจพบโปรตีน VP-GUS ขนาด 69 kDa และโปรตีนที่สามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันในหนูได้เช่นกัน จากงานวิจัยที่กล่าวมาจะเห็นว่ามีความสำเร็จในการถ่ายยีนเพื่อสร้างโปรตีน *VP1* ที่กระตุ้นภูมิคุ้มกันสำหรับป้องกันโรคปากและเท้าเปื่อยในพืชหลายชนิด และมีการทดสอบว่าสามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อโรคนี้ในหนูได้ อย่างไรก็ตามงานวิจัยนี้นับว่าเป็นงานแรกในประเทศไทยที่ประสบความสำเร็จในการถ่ายยีน *VP1* เข้าสู่ถั่วฮามาต้า ซึ่งเป็นพืชอาหารสัตว์เขตร้อน และถั่วฮามาต้าที่ได้รับการถ่ายยีนนี้มีการแสดงออกของยีน *VP1* ได้อย่างสมบูรณ์ งานในขั้นตอนต่อไปคือ การทดสอบการใช้ถั่วฮามาต้าที่ได้รับการถ่ายยีนนี้ในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันในสัตว์ต่อไป



ภาพที่ 22 การตรวจสอบการแสดงออกของยีน VP1 ในต้นถั่ว *Stylosanthes hamata* ที่ได้รับ การถ่ายยีน โดยเทคนิค dot immunoblotting และตรวจสอบด้วยแอนติบอดีที่ได้จาก ซีรัมของหมูที่แสดงอาการของโรคปากและเท้าเปื่อยที่เกิดจากเชื้อไวรัส FMD
 N = negative control (โปรตีนที่สกัดได้จากต้นถั่วฮามาต้าที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน)
 120 240 243 244 245 = โปรตีนจากต้นถั่วฮามาต้าที่ได้รับการถ่ายยีน



ภาพที่ 23 ผลการตรวจสอบการแสดงออกของยีน VP1 ในต้นถั่ว *Stylosanthes hamata* ที่ได้รับการถ่ายยีน โดยเทคนิค western blot hybridization

M = protein marker

N = negative control (โปรตีนที่สกัดได้จากต้นถั่วฮามาต้าที่ไม่ได้รับถ่ายยีน)

244 245 = โปรตีนจากถั่วฮามาต้าต้น 244 และ 245 ที่ได้รับการถ่ายยีน

สรุป

การถ่ายยีน *VP1* เข้าสู่แคลลัสของถั่ว *Stylosanthes hamata* โดยใช้ *Agrobacterium tumefaciens* สายพันธุ์ AGL-1 เป็นพาหะ ซึ่งมียีน *hpt* เป็นยีนคัดเลือก แคลลัสสามารถรอดชีวิตบนอาหารคัดเลือกสูตร MS ที่เติม 2,4-D 5 มิลลิกรัมต่อลิตร และเติมสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน 50 มิลลิกรัมต่อลิตรจำนวน 131 ชิ้นจากแคลลัสจำนวน 2,200 ชิ้น จากนั้นเมื่อชักนำให้แคลลัสพัฒนาเป็นต้นแล้ว นำต้นที่ได้มาตรวจสอบทั้งหมด 300 ต้น พบว่าเมื่อตรวจด้วยเทคนิคพีซีอาร์ พบต้นที่มียีน *VP1* เพียงยีนเดียวจำนวน 93 ต้น ต้นที่มีเพียงยีน *hpt* เพียงยีนเดียวจำนวน 97 ต้น และมีต้นที่พบทั้งสองยีนจำนวน 75 ต้น จากนั้นเลือกเฉพาะต้นที่มีทั้งยีน *VP1* และ *hpt* จำนวน 50 ต้น มายืนยันผลโดยวิธี dot blot hybridization ด้วยดีเอ็นเอตรวจสอบสำหรับยีน *VP1* พบว่าทั้ง 50 ต้น นั้นพบว่ามียีน *VP1* อยู่ และเมื่อคัดเลือกต้นที่มียีน *VP1* นี้จำนวน 6 ต้น มายืนยันการมีอยู่ของยีน *VP1* ด้วยวิธี Southern blot analysis พบว่าทั้ง 6 ต้นมียีน *VP1* อยู่จริงโดยพบว่ามีจำนวนชุดของยีนที่เข้าร่วมตัวกับจีโนมถั่วฮามาต้าจำนวน 1-2 ชุด และมีตำแหน่งที่สอดคล้องกันในจีโนมที่แตกต่างกัน โดยแสดงผลจากขนาดของแถบดีเอ็นเอที่ได้มีขนาดแตกต่างกัน และเมื่อนำบางต้นที่ให้ผลบวกเอตรวจด้วยวิธี Southern blot มาตรวจสอบการแสดงออกของยีน *VP1* ในระดับ mRNA โดยวิธี RT-PCR และการแสดงออกในระดับโปรตีนโดยวิธี dot immunoblot และ western blot โดยใช้แอนติบอดีที่ได้จากซีรัมของหนูที่แสดงอาการของโรคปากและเท้าเปื่อยเนื่องจากเชื้อไวรัส FMD พบว่า 1 ใน 2 ต้นที่นำมาทดสอบมีการแสดงออกในระดับ mRNA และระดับโปรตีนอย่างสมบูรณ์ โดยยืนยันจากการได้แถบดีเอ็นเอขนาด 660 คู่เบส จากการทำ RT-PCR และได้โปรตีนขนาด 30 kDa ในขณะที่อีกต้นหนึ่งพบเพียงแถบดีเอ็นเอขนาด 660 คู่เบสจากการทำ RT-PCR แต่ไม่พบการแสดงออกของโปรตีนขนาด 30 kDa

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

- กิริยา สังข์ทองวิเศษ. 2547. ระบบการถ่ายยีนที่เหมาะสมสำหรับถั่ว *Stylosanthes hamata* พันธุ์ Verano. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- เกศณี มณีภาส. 2546. การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการถ่ายยีนเข้ามะเขือเทศโดยใช้ minibinary vector. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ฉัตรนภา ช่มอาวุธ. 2545. การชักนำให้เกิดยอดหลายยอดและเทคนิคที่เหมาะสมในการ ทำบาดแผลเพื่อการถ่ายยีนโดยใช้เชื้อ *Agrobacterium tumefaciens* ในถั่วเขียว. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- พรสุข ชัยสุข. 2543. การถ่ายยีนเข้ากล้วยไม้ไทยโดยวิธียิงอนุภาค. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- วรรณกรณ์ รุ่งรัตนกลิน. 2529. ผลของฟอสฟอรัสและการคลุมไรโซเบียมต่อการ เจริญเติบโตและการตรึงไนโตรเจนของถั่วฮามาตาและเซนโตรซีมาที่ปลูกบนดิน ชุดกำแพงแสน. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- วัชรระ วันลักษณ์ และสนธิชัย จันทร์เปรม. 2549. ปัจจัยบางประการที่มีผลต่อการถ่ายยีนใน ละหุ่ง. ว. วิทยาศาสตร์เกษตร. 37: 5-11.
- ปรีดา เลิศวัชรสารกุล. 2543. การผลิตโปรตีน 3AB ในเชื้อ *E. coli* สำหรับการตรวจสอบ แอนติบอดีต่อไวรัสโรคปากและเท้าเปื่อย. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- สายัณห์ ทัดศรี. 2540. พืชอาหารสัตว์เขตร้อน การผลิตและการจัดการ. สำนักพิมพ์ไร่เขียว. กรุงเทพฯ.

สนธิชัย จันทรเปรม. 2543. เทคนิคการถ่ายยีนกับการใช้ประโยชน์ในประเทศไทย, น. 109-111.

ใน เอกสารประกอบการสัมมนาวิชาการปรับปรุงพันธุ์และขยายพันธุ์พืชครั้งที่ 13: เทคโนโลยีใหม่พันธุ์พืชใหม่ ระหว่างวันที่ 13-14 ธันวาคม. สมาคมปรับปรุงพันธุ์และขยายพันธุ์พืชแห่งประเทศไทย. กรุงเทพฯ.

สุพรรณณี แก่นสาร. 2532. ผลของรังสีแกมมาต่อการพัฒนาไปเป็นต้นอ่อนของข้าว.

วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สุรินทร์ ปิยะโชคนากุล. 2543. พันธุ์วิศวกรรมเบื้องต้น. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 282 น

_____, จริรัตน์ ผลจันทร์, ประดิษฐ์ พงศ์ทองคำ, เติม ระติสุนทร, เสาวนีย์

สุพทุธิธาดา และ เลิศลักษณ์ เงินศิริ. 2539. การถ่ายยีนในถั่วเขียว. ว.เกษตรศาสตร์ (วิทย) 30: 303-311.

อารีย์ วรรณวัฒน์. 2541. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อการปรับปรุงพันธุ์พืช. สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี. 133 น.

Alan, J.C. 1997. Principle of Molecular Virology. 2 ed., Academic press, California. 310p.

Alt-Moerbe, J., P. Nedderman, J. von Lintig, E.W. Weiler and J. Schroder. 1988.

Temperature-sensitive step in Ti-plasmid vir region induction and correlation with cytokinin secretion by *Agrobacterium*. Mol. Gen. Genet. 213: 1-8.

Aoki, T., A. Kamizawa and S. Ayabe. 2002. Efficient *Agrobacterium*-mediated transformation of *Lotus japonicus* with reliable antibiotic selection. Plant Cell Rep. 21: 238-243.

- Arakawa, T., D.K. Chong and W.H.R. Langridge. 1998. Efficacy of food a food plant base oral cholera toxin B subunit vaccine. **Nat. Biotech.** 16: 292-297.
- Auge, R., G. Beauchesne, J. Boccon-Gibod, L. Decourtye, B. Digat, R. Jalouzot, R. Minier, J-Cl. Morand, J.P. Reynoird, D.G. Strullu and H. Vidalie. 1995. ***In Vitro Culture and Its Applications in Horticulture***. Oxford & IBP Publishing, Paris. 231 p.
- Bevan, M. 1984. Binary *Agrobacterium* vector for plant transformation. **Nucleic Acids Res.** 12: 8711-8721.
- _____, M.W., R.B. Flavell and M.D. Chilton. 1983. Achimaeric antibiotic resistance gene as a selectable marker for plant cell transformation. **Nature** 304: 184-187.
- Bond, J.E. and M.L. Roose. 1998. *Agrobacterium*-mediated transformation of the commercially important citrus cultivar Washington navel orange. **Plant Cell Rept.** 18: 229-234.
- Brown, F. 1992. New approaches to foot and mouth disease virus prior to development of lesions. **Vet. Rec.** 82: 387-388.
- Byrne, M.C., R.E. McDonnell, M.S. Wright and M.G. Carnes. 1987. Strain and cultivar specificity in *Agrobacterium*-soybean interaction. **Plant Cell Tiss. Org. Cult.** 8: 3-15.
- Carrillo, C., A. Wigdorovitz, J.C. Oliveros, P.I. Zamorano, A.M. Sadir, M. Gomez, J. Salinas, J.M. Escribano and M.V. Borca. 1998. Protective immune response to foot and mouth disease virus with VP1 expressed in transgenic plants. **J. Virol.** 72: 1688-1690.

- _____, _____, K. Trono, M.J. Dua Santos, S. Castanon, A.M. Sadir, R. Ordas, J.M. Escribano and M.V. Borca. 2001. Induction of a virus-specific antibody response to foot and mouth disease virus using the structural protein VP1 expressed in transgenic potato plants. **Viral Immuno.** 14: 49-57.
- Catlin, D.W. 1990. The effect of antibiotics on the inhibition of induction and plant regeneration from cotyledons of sugar-beet (*Beta vulgaris* L.) **Plant Cell Rep.** 9:285-288
- Chaisrisongkram, W. 1993. An overview of foot and mouth disease control in Thailand. pp. 23-25. In J.W. Copland, L.J. Gleeson and C.Chamnanpood (eds.). **Diagnosis and Epidemiology of Foot and Mouth Disease in Southeast Asia.** Australian Centre for International Agricultural Research, Canberra, Australia.
- Charest, P.J., L.A. Holbrook, J. Gabard, V.N. Iyer and B.L.Miki. 1988. *Agrobacterium*-mediated transformation of thin cell layer explants from *Brassica napus* L. **Theor. Appl. Genet.** 75: 438-445.
- Daniell, H., S. J. Streatfield and K. Wycoff. 2001. Medical molecular farming: production of antibodies, biopharmaceuticals and edible vaccines in plants. **Trends Plant Sci.** 6: 219-226.
- Dave, W. C. 1990. The effect of antibiotics on the inhibition of callus induction and plant regeneration from cotyledons of sugarbeet (*Beta vulgaris* L.). **Plant Cell Rep.** 9: 285-288.
- Doyle J.J. and J.L. Doyle. 1987. A rapid DNA isolation procedure from small quantities of fresh leaf tissues. **Phytochem. Bull.** 19: 11-15.

- Durand-Tardif, M., R. Broglic, J. Slightom and D. Tepfer. 1985. Structure and expression of Ri T-DNA from *Agrobacterium rhizogenes* in *Nicotiana tabacum*. **J. Mol. Biol.** 186: 557-564.
- During, K., S. Hippe, F. Kreuzaler and J. Schell. 1990. Synthesis and self-assembly of a functional monoclonal antibody in transgenic *Nicotiana tabacum*. **Plant Mol. Biol.** 15: 281-293.
- Eady, C.C., R.J. Weld and C.E. Lister. 2000. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation and transgenic plant regeneration of onion (*Allium cepa* L.). **Plant Cell Rep.** 19:376-381.
- Fraley, R.T., S.G. Rogers, R.B. Horsch, P.R. Sanders, J.S. Flick, S.P. Adams, M.L. Bittner, L.A. Brand, N.L. Hoffman, and S.C. Woo. 1983. Expression of bacterial gene in plant cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 80: 4803-4807.
- Gebauer, F., J.C. de la Torre, I. Gomes, M.G. Mateu, H. Barahona, B. Tiraboschi, I. Bergmann, P. A. de Mello and E. Domingo. 1988. Rapid selection of genetic and antigenic variant of foot and mouth disease virus during persistence in cattle. **J. Virol.** 62: 2041-2049.
- Godwin, I.D., B.V. Ford-Lloyd and H.J. Newbury. 1992. *In vitro* approaches to extending the host-range of *Agrobacterium* for plant transformation. **Aust. J. Bot.** 40: 751-763.
- Gulati, A. and P.K. Jaiwal. 1992. *In vitro* induction of mungbean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek). **Plant Cell Tiss. Org. Cult.** 29: 199-205.

Haq, T.A., H. S. Mason, J. D. Clements and C.J. Arntzen. 1995. Oral immunization with recombinant bacterial antigen produced in transgenic plants. **Science** 268: 714-716.

Hoffmann, L.V. and M.L.S. Vieira. 2000. *In vitro* response and *Agrobacterium* susceptibility of two cultivates of *Stylosanthes guianensis*. **Pesq. Agropec. Bras. Brasilia**. 35(4):733-742.

Horsch, R.B., J.E. Fly, N.L. Hoffmann, D. Eichpltz, S.G. Rogers and R.T. Fraley. 1985. A simple and general method for transferring genes into plants. **Science** 227: 1229-1231.

Humara, J., M.M. Lopez and R.J. Ords. 1999. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Pinus pinea* L. cotyledons: an assessment of factors influencing the efficiency of *uidA* gene transfer. **Plant Cell Rept.** 19: 51-58.

Jefferson, R.A., T.A. Kavanagh and M.W. Beran. 1987. GUS fusion: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. **The EMBO J.** 6: 3901-3907.

Khan, M.S. and P. Maliga. 1999. Fluorescent antibiotic resistance marker for tracking plastid transformation in higher plant. **Nat. Biotechnol.** 17: 910-915.

Klee, H., R. Horsch and R. Rogers. 1987. *Agrobacterium*-mediated plant transformation and its further application to plant biology. **Ann. Rev. Plant Physiol.** 38: 467-486.

Komari, T., Y. Satio., N. Murai and T. Kumashiro. 1996. Vector carrying two separate T-DNAs for cotransformation of higher plants mediated by *Agrobacterium tumefaciens* and segregation of transformants free from selectable marker. **Plant J.** 10: 165-174.

- Kondo, T., H. Hasegawa and M. Suzuki. 2000. Transformation and regeneration of garlic (*Allium sativum* L.) by *Agrobacterium*-mediated gene transfer. **Plant Cell Rep.** 19: 989-993.
- Krishnamurthy, K.U., K. Suhasini, A.P. Sagare, M. Meixner, A. de Katheren, T. Pickardt and O. Schieder. 2000. *Agrobacterium*-mediated transformation of chickpea (*Cicer arietinum*) embryo axes. **Plant Cell Rep.** 19: 235-240.
- Kumpatla, S.P., W. Teng, W.G. Buechholz and T.C. Hall. 1997. Epigenetic transformational silencing and 5-azacytidine-mediated reactivation of complex transgene in rice. **Plant Physiol.** 115:361-373.
- Kushikawa S., Y. Hoshino and M. Mii. 2001. *Agrobacterium*-mediated transformation of a *Saintpaulia ionantha* Wendi. **Plant Sci.** 161: 953-960.
- Li, X., S.F. Krasnyanski and S.S. Korban. 2002. Optimization of the *uidA* gene transfer into somatic embryos of rose via *Agrobacterium tumefaciens*. **Plant Physiol. Biochem.** 40: 453-459.
- Lin, J.J., N. Assad-Garcia and J. Kuo. 1999. Hygromycin B as an efficient antibiotic for the selection of transgenic plants. Available Source: <http://www.invitrogen.co.jp/focus/182047.pdf>, December, 2003.
- Manners, J.M. 1987. Transformation of *Stylosanthes* spp. using *Agrobacterium tumefaciens*. **Plant Cell Rep.** 6: 204-207.
- Manners, J.M. 1988. Transgenic plants of the tropical pasture legume *Stylosanthes humilis*. **Pant Sci.** 55: 61-68.

- Martinez-Trujillo, M., V. Limones-Briones., Cabrera-Ponce J.L. and L. Herrera-Estrella. 2004. Improving transformation efficiency of *Arabidopsis thaliana* by modifying the floral dip method. **Plant Mol. Biol. Rep.** 22: 63-70.
- Mason S. H., D.M. Lan and C.J. Arntzen. 1992. Expression of hepatitis B surface antigen in transgenic plants. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 89: 11745-11749.
- Mathais, R.J. and L.A. Boyd. 1986. Cefotaxime stimulates callus growth, embryogenesis and regeneration in hexaploid bread wheat (*Triticum aestivum* L. EM. Thell). **Plant Sci.** 46: 217-223.
- Meijer, E.G.M. 1982. High-Frequency plant regeneration from hypocotyls and leaf derived tissue cultures of the tropical pasture legume *Stylosanthes humilis*. **Plant Physiol.** 56: 381-385.
- Melchers, L.S., T.J.G. Regensburg-Tuink, R.B. Bourret, N.J.A. Sedee, R.A. Schiperoort and P.J.J. Hooykaas. 1989. Membrane topology and functional analysis of the sensory protein *Vir A* of *Agrobacterium tumefaciens*. **The EMBO J.** 8: 1919-1925.
- Miguel, C.M. and M.M. Oliveira. 1999. Transgenic almond (*Prunus dulcis* Mill.) plants obtained by *Agrobacterium*-mediated transformation of leaf explant. **Plant Cell Rep.** 18: 387-393.
- Miki, B. and S. McHugh. 2004. Selectable marker genes in transgenic plants: applications, alternatives and biosafety. **J. Biol.** 107:193-232.
- Monson PW., M.J. Frubman., T.M. Henry. 2002. Identification and characterization of a *cis* acting replication element (cre) adjacent to the internal ribosome entry site of foot and mouth disease virus. **J. Virol.** 72: 9686-9694.

- Murashige T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiol. Plant.** 15: 473-497.
- Murphy, F.A., E. Paul, J. Gibbs, M.C. Horzinek, and M.J. Studdert. 1999. **Veterinary Virology**. 3rd eds. Academic Press, USA. 629pp.
- Muthukumar, B., M. Mariamma and A. Gnanam. 1995. Regeneration of plants from primary leaves of cowpea. **Plant Cell Tiss. Org. Cult.** 42: 153-155.
- Nauerby, B., K. Billing. and R. Wyndale. 1997. Influence of the antibiotic timentin on plant regeneration compared to carbenicilin and cefotaxime in concentration suitable for elimination of *Agrobacterium tumefaciens*. **Plant Sci.** 123:169-177.
- Nilsson, O., T. Alden, F. Sitbon, C.H.A. Little, V. Chalupa, G. Sandberg and O. Olsson. 1992. Spatial pattern of CaMV35S promoter-luciferase fusion in transgenic hybrid aspen trees monitored by enzymatic assay and non-destructive imaging. **Transgenic Res.** 1: 209-220.
- Pang, S.Z. and J.C. Sandford. 1993. *Agrobacterium*- mediated gene transfer in papaya. **J. Amer. Soc. Hort. Sci.** 113: 287-291.
- Pensa, R., P.F. Lurquin and E. Fillipone. 1991. Gene transfer by co-cultivation of mature embryos with *Agrobacterium tumefaciens*: Application to mature cowpea embryos (*Vigna unguiculata* Walp.). **Plant Physiol.** 138: 39-42.
- Poster, A.G. 1993. Piconavirus non structural proteins: emerging roles in virus replication and inhibition of host cell function. **J. Virol.** 67: 6917-6921.
- Potrykus, I. and G. Spangenberg. 1995. **Gene Transfer to Plants**. Springer-Verlag, Berlin. 361p.

- Puonti-Kaerlas, J., T. Eriksson and P. Engstrom. 1990. Production of transgenic pea (*Pisum sativum* L.) plant by *Agrobacterium tumefaciens* mediated gene transfer. **Theor. Appl. Genet.** 80: 246-252.
- Saiz, J.C., A. Rodriguez, M. Gonzalez, F. Alonso and F. Sobrina. 1992. Heterotypic lymphoproliferative response in pigs vaccinated with foot and mouth disease virus involvement of isolated capsid proteins. **J. Gen. Virol.** 73: 2601-2607.
- Saiz, M., J.I. Nunez, M.A. Jimenez-Clavero, E. Baranowshi and F. Sobrino. 2002. Foot and mouth disease virus: biology and prospects for disease control. **Microbes and Infection.** 4: 1183-1192.
- Sanchayita, K., T.M. Johnson, P. Nayak and S.K. Sen. 1996. Efficient transgenic plant regeneration through *Agrobacterium*-mediated transformation of chickpea (*Cicer arietinum* L.). **Plant Cell Rep.** 16: 32-37.
- Santos, M.J.D., A. Wigdorovitz, K. Trono, R.D. Rios, P.M. Franzone, F. Gill, J. Moreno, C. Carrillo, J.M. Escribano and M.V. Borca. 2002. A novel methodology to develop a foot and mouth disease virus (FMDV) peptide-based vaccine in transgenic plants. **Vaccine** 20: 1141-1147.
- Saunders J.W. and E.T. Bingham 1975. Growth regulator effects on bud initiation in callus cultures of *Medicago sativa*. **Amer. J. Bot.** 62: 850-855.
- Sheikholeslam, S.N. and D.P. Week. 1987. Acetosyringone promotes high efficiency transformation of *Arabidopsis thaliana* explants by *Agrobacterium tumefaciens*. **Plant Mol. Biol.** 8: 291-298.
- Sheng, J. and V. Citovsky. 1996. *Agrobacterium*-plant cell DNA transport: have virulence proteins, will travel. **Plant Cell** 8: 1699-1710.

- Strachel, S.E., E. Messens, M. van Montagu and P. Zambryski. 1985. Identification of the signal molecules produced by wounded plant cells that activate T-DNA transfer in *Agrobacterium tumefaciens*. **Nature** 318: 624-629.
- Strebel, K., E. Beck, K. Stromaier and H. Schaller. 1986. Characterization of foot and mouth disease virus gene products with antisera against bacterially synthesized fusion proteins. **J. Virol.** 57: 983-991.
- Thanvala, Y. F., P. Yang, H. S. Lyons and C. J. Arntzen. 1995. Immunogenicity of transgenic plant derived hepatitis B surface antigen. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 92: 3358-3361.
- Vasil, L.K. 1985. Somatic embryogenesis and its consequence in the gramineae p 31-47. *In* R.R. Henke *et al.* (eds) **Tissue Culture in Agriculture and Forestry**. Vol. 31. Plenum Press, New York.
- Wagner E.K. and M.J. Hewlett 2004. Replication of positive-sense RNA viruses. **Basic Virology**. 2nd eds. Blackwell Publishing. 231-240.
- Week, J.T., K.Y. Koshiyama, U. Maier-Greiner, T. Schaeffner and O.D. Anderson (2000) Wheat transformation using cyanamide as a new selective agent. **Crop Sci.** 40: 1749-1754.
- Yamada, T., M. Teraishi, K. Hattori and M. Ishimoto. 2001. Transformation of azuki bean by *Agrobacterium tumefaciens*. **Plant Cell Tiss. Org. Cult.** 64: 47-54.
- Yamashita, T., A. Lida and H. Morikawa. 1991. Evidence that more than 90% of β -glucuronidase-expressing cells after particle bombardment directly receive the foreign gene in their nucleus. **Plant Physiol.** 97: 829-831.

Yu, T.A., S.D. Yeh and J.S. Yang. 2001. Effect of carbenicillin and cefotaxime on callus growth and somatic embryogenesis from adventitious roots of papaya. **Bot. Bull. Acad. Sinica.** 42: 281-286.

Zupan J., T.R. Muth, O. Draper and P. Zambryski. 2000. The transfer of DNA from *Agrobacterium tumefaciens* into plants: a feast fundamental insights. **Plant J.** 23: 11-28.