

การถ่ายยีนรายงานผล *gus* และ *mgfp* เข้าสู่เนื้อเยื่อสัก โดยการใช้อะโกรแบคทีเรีย Agrobacterium-mediated Transformation of *gus* and *mgfp* Reporter Genes into Teak Tissue

ประกาย อ่อนวิมล^{1,2}, เยาวพรรณ สอนิกุล^{1,4}, สอนิชัย จันทร์เปรม^{1,2,3} และเสริมศิริ จันทร์เปรม^{1,2,4}
Prakay Onwimol^{1,2}, Yaowaphan Sontikun^{1,4}, Sontichai Chanprame^{1,2,3} and Sermsiri Chanprame^{1,2,4}

บทคัดย่อ

การทดสอบปัจจัยบางประการที่มีผลต่อความสำเร็จในการถ่ายยีนเข้าสู่เนื้อเยื่อสัก โดยใช้เชื้อ *Agrobacterium tumefaciens* 2 สายพันธุ์คือ EHA 105 และ AGL1 ที่มีพลาสมิด pCambia 1304 พบว่า *A. tumefaciens* สายพันธุ์ EHA 105 ความเข้มข้นเชื้อที่ $OD_{600} = 1.0$ ปลูกเขื่อนาน 3 ชั่วโมง และเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อร่วมกับเขื่อนาน 3 วัน ให้ประสิทธิภาพในการถ่ายยีนและมีการแสดงออกของยีนรายงานผล *gus* แบบชั่วคราวดีที่สุด และพบว่าการถ่ายยีนเข้าสู่เนื้อเยื่อข้อให้ผลดีกว่าเนื้อเยื่อฐานใบ และเมื่อใช้สภาวะดังกล่าวถ่ายยีนด้านทวนสารปฏิชีวนะ hygromycin (*hpt*) และยีนรายงานผล *membrane bound green fluorescence protein (mgfp)* เข้าสู่เนื้อเยื่อสัก 3 ชนิดคือ ปลายยอดข้อที่ตาข้างเริ่มพัฒนา และแคลลัส หลังจากนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติมสารปฏิชีวนะ hygromycin ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตรเป็นเวลา 2 สัปดาห์ จึงนำไปตรวจการเรืองแสงของโปรตีน *mgfp* แบบชั่วคราวภายใต้กล้อง fluorescence stereo microscope พบว่าส่วนปลายยอดมีจำนวนชิ้นที่เรืองแสงมากที่สุดคิดเป็นร้อยละ 90 รองลงมาคือ ข้อที่ตาข้างเริ่มพัฒนา คิดเป็นร้อยละ 73 และในแคลลัสคิดเป็นร้อยละ 33 โดยเนื้อเยื่อบริเวณปลายยอดและใบอ่อนพบมีการเรืองแสงสีเขียวของโปรตีน *mgfp* มากที่สุด แต่มีเพียงข้อที่ตาข้างเริ่มพัฒนา จำนวน 2 ชิ้น เท่านั้นที่มีการแสดงออกของยีน *mgfp* แบบถาวร

คำสำคัญ : ไม้เนื้อแข็ง การถ่ายยีน เชื้ออะโกรแบคทีเรีย ยีนเรืองแสงสีเขียว

Abstract

Certain factors affecting transformation efficiency of teak was investigated. Two strains of *Agrobacterium tumefaciens*, EHA 105 and AGL1 harboring plasmid pCambia 1304 were used. It was found that *A. tumefaciens* strain EHA105 with $OD_{600} = 1.0$, inoculation period of 3 hours and co-cultivation period of 3 days resulted the highest efficiency of transformation and transient expression of *gus* reporter gene. The transformation of node explants yielded better result than using leaf base explants. These conditions were used to transform hygromycin phosphotransferase (*hpt*) gene and *membrane bound green fluorescence protein (mgfp)* reporter gene into *in vitro* shoot apices, node with developing shoot, and callus tissue. Two weeks after selection on 50 mg/L hygromycin containing media, the transient expression of *mgfp* gene was visualized. The highest percentage of *mgfp*-positived tissue was found in the shoot apices (90%) followed by node with developing shoot (73%) and callus (33%) respectively. The expression of *mgfp* was found in shoot tip and young leaf. However, only 2 pieces of node explants showed stable expression of *mgfp* gene.

Keywords: woody plant, genetic transformation, agrobacterium, green fluorescent protein

¹ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน และ ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยี ชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและการวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี, สกอ., กรุงเทพฯ 10900

²ศูนย์วิทยาการขั้นสูงเพื่อเกษตรและอาหาร สถาบันวิทยาการขั้นสูงแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ 10900

⁴ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการเกษตร คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีอุตสาหกรรม มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตสุราษฎร์ธานี จ.สุราษฎร์ธานี 84000

Corresponding author: agrsrc@ku.ac.th, agrsrc@gmail.com

คำนำ

สัก (*Tectona grandis* Linn.) เป็นไม้พื้นเมืองของประเทศไทยที่มีค่าทางเศรษฐกิจมากชนิดหนึ่ง ไม้สักเป็นไม้ที่มีชื่อเสียงรู้จักกันแพร่หลาย เนื่องจากเนื้อไม้มีคุณภาพสูง มีสีสวยและลวดลายตามธรรมชาติที่สวยงาม มีความทนทานต่อการทำลายของแมลงจำพวกมอด ปลวก เชื้อรา รวมทั้งยังทนทานต่อสภาพอากาศที่จะเข้ามาทำลายเนื้อไม้ได้เป็นอย่างดี จึงเป็นที่นิยมนำมาใช้ประโยชน์กันอย่างแพร่หลาย (สมคิด, 2517) ปัจจุบันความต้องการไม้สักได้ขยายตัวเพิ่มมากขึ้น ในขณะที่แนวโน้มในการผลิตไม้สักอยู่ในสภาวะที่จำกัดทั้งในด้านปริมาณและคุณภาพ จึงได้มีการปลูกสร้างสวนป่าไม้สักขึ้นในหลายประเทศ เช่น อินโดนีเซีย ใต้หวัน จีน มาเลเซีย อินเดีย ลาว เมียนมาร์ ฟิลิปปินส์ และไทย (Rao, 1997) ไม้สักในประเทศไทยได้รับการยอมรับว่าดีที่สุดในโลกและเป็นที่ต้องการของตลาดโลกอย่างมาก จึงทำให้มีความต้องการใช้สูง รัฐบาลจึงมีนโยบายส่งเสริมให้เกษตรกรหันมาปลูกไม้สักเพื่อใช้เองหรือเพื่อการค้าได้ แต่การปลูกไม้สักนั้นมีข้อจำกัดที่สำคัญคือลักษณะการปลูกเป็นพืชเชิงเดี่ยวในพื้นที่กว้าง ทำให้มีปัญหาเรื่องแมลงเข้าทำลายต้นสัก โดยแมลงศัตรูสักที่สำคัญคือ หนอนผีเสื้อเจาะต้นสัก (teak beehole borer: *Xyleutes ceramicus* Walker) ซึ่งจะทำลายเนื้อไม้จากภายใน และ หนอนผีเสื้อกินใบสัก (teak defoliator: *Hyblaea puera* Cramer) ซึ่งกัดกินเนื้อใบสักส่งผลให้ต้นสักเจริญได้ไม่ดี (อภิชาติ, 2531) แนวทางแก้ไขวิธีหนึ่งคือการปรับปรุงพันธุ์เพื่อสร้างสายพันธุ์สักที่ต้านทานต่อแมลงเหล่านี้ แต่การปรับปรุงพันธุ์แบบมาตรฐาน (conventional breeding) ในสักนั้น มีข้อจำกัดหลายประการ เช่น ใช้เวลาหลายปีกกว่าจะออกดอก ผสมติดยาก และเมล็ดมีการงอกต่ำและไม่สม่ำเสมอ รวมทั้งในธรรมชาติมีความหลากหลายทางพันธุกรรมต่ำ แนวทางในการแก้ไขปัญหานี้คือการนำวิธีการพันธุวิศวกรรมหรือการถ่ายยีนมาใช้เพื่อสร้างสายพันธุ์สักที่ดีที่ต้านทานต่อแมลงและโรค หรือมีอัตราการเจริญเติบโตสูงและให้ผลผลิตที่มีคุณภาพดี ซึ่งจะส่งผลให้เกิดการปลูกป่าสักเชิงเศรษฐกิจได้อย่างกว้างขวางมากขึ้น

ปัจจุบันมีงานวิจัยที่ประสบผลสำเร็จในการถ่ายยีนเข้าสู่ไม้เนื้อแข็งหลายชนิด เช่น ยูคาลิปตัส (Mullins *et al.*, 1997; Ho *et al.*, 1998), aspen (Tzfira *et al.*, 1999), *Pinus pinea* L. (Humara *et al.*, 1999), ยางพารา (*Hevea brasiliensis*) (Montoro *et al.*, 2000), *Populus* spp. (Thakur *et al.*, 2005) เป็นต้น การถ่ายยีนเข้าสู่พืชอย่างมีประสิทธิภาพและประสบผลสำเร็จนั้นมีปัจจัยต่างๆ ที่ต้องพิจารณาหลายปัจจัย เช่น การเลือกเนื้อเยื่อพืชที่เหมาะสม ซึ่งจะมีผลต่อการชักนำให้เกิดเป็นต้นใหม่ภายหลังการถ่ายยีน (Southerton, 2007) และปัจจัยต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับการในกระบวนการถ่ายยีน เช่น สายพันธุ์ของเชื้อ ความเข้มข้นของเชื้อ ระยะเวลาในการปลูกเชื้อ และระยะเวลาในการเลี้ยงรวม (Yong *et al.*, 2006) ดังนั้นในการทดลองครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบปัจจัยต่างๆ ที่เหมาะสมสำหรับการถ่ายยีนเข้าสู่สักโดยใช้ เชื้ออะโกรแบคทีเรีย

อุปกรณ์และวิธีการ

การทดสอบปัจจัยที่มีผลต่อการถ่ายยีนรายงานผล *gus* เข้าเนื้อเยื่อสักโดยใช้อะโกรแบคทีเรีย

การเตรียมเนื้อเยื่อสัก เตรียมเนื้อเยื่อสักโดยตัดชิ้นส่วนฐานใบและข้อจากต้นอ่อนอายุประมาณ 2 เดือน ซึ่งเพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อในอาหารเชิงสูตร MS (Murashige and Skoog, 1962) ที่เติม BA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยเลือกใช้เนื้อเยื่อจากทุกส่วนของต้น ซึ่งก่อนการถ่ายยีนจะทำบาดแผลให้กับเนื้อเยื่อโดยการนำเนื้อเยื่อใส่ในอาหารเหลวสูตรเดิมแล้วนำไปทำบาดแผลโดยใช้คลื่นเสียงความถี่สูงจากเครื่อง sonicator bath (Transsonic T460/H, 35 KHz, Elma Hans Schmidbauer, Germany) นาน 10 วินาที

สายพันธุ์อะโกรแบคทีเรีย ทดสอบประสิทธิภาพการถ่ายยีนของ *Agrobacterium tumefaciens* 2 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์ EHA 105 และ AGL1 ที่มีพลาสมิด pCambia 1304 ซึ่งมียีน *β -glucuronidase (gus)* และยีน *mgfp* เป็นยีนรายงานผล และยีน *hygromycin phosphotransferase (hpt)* ซึ่งควบคุมลักษณะต้านทานต่อสารปฏิชีวนะ hygromycin เป็นยีนเครื่องหมายเพื่อคัดเลือกชิ้นส่วนที่ได้รับการถ่ายยีน

ความเข้มข้นของ *A. tumefaciens* ที่ 2 ระดับ คือเซลล์แขวนลอยเชื้อที่มีค่า $OD_{600}=1.0$ ซึ่งได้จากการเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวสูตร LB นาน 16 ชั่วโมง แล้วนำมาปั่นเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนเซลล์จากนั้นนำตะกอนเซลล์มาละลายด้วยอาหารเหลวสูตร MS ปริมาตรเท่าอาหารสูตร LB ที่ใช้เลี้ยงเซลล์ และเซลล์แขวนลอยเชื้อที่มีค่า $OD_{600}=0.5$ ซึ่งได้จากการนำสารแขวนลอยเชื้อที่ละลายตะกอนด้วยอาหารสูตร MS ในขั้นตอนแรกมาเจือจางด้วยอาหารสูตร MS ปริมาตรเท่ากัน ทั้งนี้ ที่ความเข้มข้นของเชื้อทั้ง 2 ระดับจะเติมสาร acetosyringone ที่ความเข้มข้นสุดท้าย 100 ไมโครโมลาร์

ระยะเวลาปลูกเชื้อ (inoculation) ใช้ระยะเวลาปลูกเชื้อ 2 ระดับคือ 1 และ 3 ชั่วโมง ทำโดยนำเนื้อเยื่อแช่ในเซลล์แขวนลอยเชื้อและวางบนเครื่องเขย่าความเร็ว 100 รอบต่อนาที

ระยะเวลาการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนร่วมกับเชื้อ (co-cultivation) ทำโดยการนำเนื้อเยื่อที่ผ่านการปลูกเชื้อแล้ว วางลงบนกระดาษซับที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้วเพื่อซับเอาเชื้ออะโกรแบคทีเรียมีส่วนเกินออกจากชิ้นส่วนพืช นำชิ้นส่วนพืชที่ได้ไปเพาะเลี้ยงต่อบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติมสาร acetosyringone 100 ไมโครโมลาร์ในสภาพมืดที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 3 และ 5 วัน หลังจากผ่านการ co-cultivation แล้วนำเนื้อเยื่อทั้งหมดมาล้างเชื้อออกด้วยอาหารเหลวสูตร MS ที่เติมสารปฏิชีวนะ cefotaxime ความเข้มข้น 300 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยทำซ้ำ 3 ครั้ง เพื่อกำจัดเชื้ออะโกรแบคทีเรียส่วนเกิน จากนั้นนำเนื้อเยื่อมาเพาะเลี้ยงบนอาหารคัดเลือกโดยใช้อาหารแข็งสูตร MS ที่เติม cefotaxime ความเข้มข้น 300 มิลลิกรัมต่อลิตร และ hygromycin ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ในสภาพที่มีแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสง 55 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที

ตรวจสอบผลของปัจจัยต่างๆ ที่มีต่อการถ่ายยีน โดยตรวจสอบการแสดงออกแบบชั่วคราวของยีน gus ด้วยวิธี GUS histochemical assay (Jefferson, 1987) ในเนื้อเยื่อสักภายหลังการ co-cultivation 3 วัน โดยบันทึกจำนวนชิ้นของเนื้อเยื่อ และเปอร์เซ็นต์พื้นที่ที่ติดสีน้ำเงินซึ่งเป็นผลมาจากการแสดงออกของยีน gus

การวิเคราะห์สถิติ วางแผนการทดลองแบบ completely randomized design (CRD) โดยในแต่ละขั้นตอนทำการทดลองทรีทเมนต์ละ 4 ซ้ำ ซ้ำละ 30 ชิ้นเนื้อเยื่อ วิเคราะห์ค่าทางสถิติด้วยวิธี ANOVA และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT ที่ระดับ $p \leq 0.05$

การถ่ายยีนรายงานผล green fluorescence protein เข้าสู่เนื้อเยื่อสัก

การทดลองนี้ใช้ต้นสักในสภาพเพาะเลี้ยงเช่นเดียวกับการทดลองแรก แต่ใช้เนื้อเยื่อสัก 3 ชนิด คือ ส่วนปลายยอด (ขนาดยาวประมาณ 0.3 มิลลิเมตร) ส่วนข้อที่ตาข้างเริ่มพัฒนา (ได้จากการตัดข้อเดียว ๆ ที่ไม่มีใบติดแล้วนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS เป็นเวลา 2 สัปดาห์ เพื่อกระตุ้นให้ตาข้างพัฒนา) และ callus (ได้จากการเพาะเลี้ยงส่วนของฐานใบบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 6 สัปดาห์) อย่างละ 30 ชิ้น นำมาถ่ายยีนโดยใช้ปัจจัยที่ให้ผลดีที่สุดจากการทดลองกับยีน gus โดยทำให้เนื้อเยื่อเกิดบาดแผลโดยใช้เครื่อง sonicator bath เป็นเวลา 10 วินาที และปลูกเชื้อ (inoculation) โดยแช่เนื้อเยื่อในสารแขวนลอยเชื้อ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ EHA 105 ที่มีค่า $OD_{600}=1.0$ (เตรียมเชื้อโดยวิธีการเดียวกับการถ่ายยีน gus) จากนั้นนำเนื้อเยื่อที่แช่อยู่ในเซลล์แขวนลอยเชื้อไปทำ vacuum infiltration โดย vacuum ที่ 600 mmHg นาน 5 นาที เพื่อให้เชื้อสัมผัสกับเนื้อเยื่อพืชดีขึ้น แล้วนำเนื้อเยื่อมาวางบนเครื่องเขย่าความเร็ว 100 รอบต่อนาที นาน 1 ชั่วโมง จากนั้นนำเนื้อเยื่อทั้งหมดวางลงบนกระดาษซับที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้วเพื่อซับเอาเชื้ออะโกรแบคทีเรียส่วนเกินออกจากชิ้นส่วนพืช นำชิ้นส่วนพืชที่ได้ไปเลี้ยงร่วมกับเชื้อ (co-cultivation) บนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติมสาร acetosyringone เข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ เพาะเลี้ยงในสภาพมืดที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน หลังจากนั้นนำเนื้อเยื่อทั้งหมดมาล้างในอาหารสูตร MS ที่เติมสารปฏิชีวนะ cefotaxime ความเข้มข้น 300 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อกำจัดเชื้ออะโกรแบคทีเรียส่วนเกิน แล้วนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารคัดเลือกซึ่งใช้อาหารแข็งสูตร MS ที่เติม cefotaxime ความเข้มข้น 300 มิลลิกรัมต่อลิตร และ hygromycin ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ในสภาพที่มีแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสง 55 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 2 สัปดาห์ แล้วจึงนำมาตรวจสอบการ

แสดงออกของยีน *mgfp* จากการเรืองแสงสีเขียวในเนื้อเยื่อพืช ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบสแตโรอิโอ (Olympus รุ่น SZX12) ภายใต้แสงในสภาพ excitation ที่ 488 นาโนเมตร และแสงในสภาพ emission ที่ 510 นาโนเมตร

จากนั้นย้ายเนื้อเยื่อมาเพาะเลี้ยงต่อบนอาหารคัดเลือก ซึ่งใช้อาหารแข็งสูตร MS ที่เติม BA เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ hygromycin เข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยเปลี่ยนอาหารทุกเดือนเป็นเวลา 2 เดือน เพื่อคัดเลือกชิ้นเนื้อเยื่อที่ได้รับการถ่ายยีนและมีการแสดงออกของยีน *mgfp* แบบถาวร โดยตรวจสอบการแสดงออกของยีน *mgfp* ในเนื้อเยื่อพืชภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสแตโรอิโอ ตามวิธีการที่กล่าวแล้ว

ผลการทดลองและวิจารณ์

ปัจจัยที่มีผลต่อการถ่ายยีน *gus* เข้าเนื้อเยื่อสักโดยใช้อะโกรแบคทีเรีย

ในการถ่ายยีนเข้าสู่พืชโดยใช้อะโกรแบคทีเรียเป็นพาหะนั้น นอกเหนือไปจากความสามารถในการพัฒนาเป็นต้นใหม่ที่มีเนื้อที่เรานั้นใจถูกถ่ายเข้าไปแล้วจะแตกต่างกันยังมีรายงานในพืชหลายชนิดว่าการเลือกใช้เนื้อเยื่อต่างกันก็อาจมีผลต่อประสิทธิภาพของการถ่ายยีนที่แตกต่างกันด้วยเช่นกัน ในการทดลองนี้ได้ทดลองถ่ายยีนเข้าสู่สักโดยใช้อะโกรแบคทีเรียสองสายพันธุ์ คือ สายพันธุ์ EHA105 และ AGL1 เข้าสู่เนื้อเยื่อสัก 2 ชนิดคือ เนื้อเยื่อส่วนข้อ และส่วนฐานใบ ซึ่งพบว่าค่าเฉลี่ยของการแสดงออกของยีน *gus* จากการถ่ายยีนโดยใช้อะโกรแบคทีเรียทั้ง 2 สายพันธุ์ในเนื้อเยื่อส่วนข้อให้ค่าสูงกว่าส่วนฐานใบอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Table 1)

Table 1 Effect of explants on the efficiency of *Agrobacterium*-mediated transformation determined by transient expression of *gus* gene evaluated by GUS histochemical assay after transformed with *A. tumefaciens* harboring plasmid pCambia 1304.

<i>A. tumefaciens</i> Strain	Blue stained explant (%) ^{1/}	Blue stained area (%) ^{1/}
Node	91.71 ^a	58.33 ^a
Leaf base	75.19 ^b	44.45 ^b
F-test	*	*
C.V. (%)	22.63	36.801

* Significantly different ($p \leq 0.05$), ^{1/} Means in each column and each parameter followed by the same letter were not significantly different according to DMRT.

สำหรับประสิทธิภาพของสายพันธุ์เชื้อนั้น ในการถ่ายยีนเข้าสู่สักโดยใช้อะโกรแบคทีเรียสองสายพันธุ์ คือ สายพันธุ์ EHA105 และ AGL1 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่รุนแรง (hypervirulent strain) เพื่อทดสอบประสิทธิภาพในการถ่ายยีนเข้าสู่เนื้อเยื่อสัก 2 ชนิด คือ ส่วนฐานใบ และส่วนข้อ โดยเปรียบเทียบประสิทธิภาพของการถ่ายยีนจากการตรวจสอบการแสดงออกของยีน *gus* แบบชั่วคราวโดยวิธี GUS histochemical assay พบว่าการใช้ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ EHA105 เป็นพาหะมีผลทำให้ชิ้นเนื้อเยื่อที่ให้ผลการแสดงออกของยีน *gus* เฉลี่ยรวมของทั้ง 2 ชิ้นส่วนพืชสูงถึง 83.29 เปอร์เซ็นต์ และมีพื้นที่ของชิ้นส่วนที่ติดสีน้ำเงิน 55.43 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสูงกว่าการใช้สายพันธุ์ AGL 1 (Table 2) แสดงว่าสายพันธุ์ EHA 105 มีประสิทธิภาพในการถ่ายยีนเข้าสู่เนื้อเยื่อสักสูงกว่าสายพันธุ์ AGL1

ทั้งนี้สายพันธุ์ของเชื้อ *A. tumefaciens* ที่แตกต่างกันมีความสามารถและความจำเพาะในการถ่ายยีนเข้าสู่พืชแต่ละชนิดหรือพืชชนิดเดียวกันแต่ต่างพันธุ์กันได้แตกต่างกัน เช่น รายงานของ Jube and Borthakur (2009)

ได้ศึกษาประสิทธิภาพของ *A. tumefaciens* 3 สายพันธุ์ ได้แก่ EHA 105 LBA 4404 และ C58C1 ในการถ่ายยีนเข้าสู่ *Leucaena leucocephala* พบว่า สายพันธุ์ C58C1 มีประสิทธิภาพการถ่ายยีนสูงที่สุด ส่วน Widiyanto *et al.* (2004) ได้ศึกษาการใช้สายพันธุ์ LBA 4404 และ GV3101 ในการถ่ายยีนเข้าสู่เนื้อเยื่อเลี้ยง พบว่า การใช้สายพันธุ์ LBA 4404 ทำให้มีการแสดงออกของยีน *gus* แบบชั่วคราวสูง

Table 2 Effect of *Agrobacterium tumefaciens* strain on transient expression of *gus* gene evaluated by GUS histochemical assay after transformed with *A. tumefaciens* harboring plasmid pCambia 1304.

<i>A. tumefaciens</i> Strain	Blue stained explant (%) ^{1/}	Blue stained area (%) ^{1/}
AGL 1	72.89 ^b	46.18 ^b
EHA 105	83.29 ^a	55.43 ^a
F-test	*	*
C.V. (%)	21.16	26.74

^{1/} Significantly different ($p \leq 0.05$), ^{1/} Means in each column and each parameter followed by the same letter were not significantly different according to DMRT.

เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการถ่ายยีนโดยใช้เชื้อ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ EHA 105 ที่มีความเข้มข้นของเชื้อแตกต่างกัน คือใช้เชื้อที่มีค่า OD₆₀₀ =1.0 เปรียบเทียบกับเชื้อที่มีค่า OD₆₀₀ =0.5 พบว่าการใช้เชื้อที่ OD₆₀₀ =1.0 ส่งผลให้มีชิ้นเนื้อเยื่อทั้ง 2 ชนิดมีการแสดงออกของยีน *gus* สูงสุด คือ มีค่าเฉลี่ยรวมจากจำนวนชิ้นที่ติดสีน้ำเงินจากทั้ง 2 ชนิดของเนื้อเยื่อ คิดเป็นร้อยละ 85.88 โดยมี ร้อยละของพื้นที่การแสดงออกของยีน *gus* อยู่ที่ 43.66 ส่วนการเจือจางเชื้อที่อัตราส่วน 1:1 พบว่ามีชิ้นเนื้อเยื่อที่ติดสีน้ำเงินร้อยละ 72.27 และมีพื้นที่ที่ติดสีน้ำเงินร้อยละ 56.70 (Table 3) ความเข้มข้นของเชื้อ *A. tumefaciens* ที่ใช้มีผลต่อประสิทธิภาพการถ่ายยีน เนื่องจากเชื้อที่มีความเข้มข้นสูงจะเพิ่มโอกาสให้เซลล์พืชถูกเชื้อเข้าบุกรุกได้มากขึ้น แต่ความเข้มข้นของเชื้อที่มากเกินไปจะทำให้กำจัดได้ยากในภายหลัง ซึ่งส่งผลในทางอ้อมให้ประสิทธิภาพการถ่ายยีนต่ำลงได้เช่นกัน ซึ่ง รักชนก (2549) พบว่าการใช้เชื้อ *A. tumefaciens* ที่มีค่า OD₆₀₀ =1.0 มีประสิทธิภาพการถ่ายยีนกล้วยไม้สกุลหวายสูง นอกจากนี้ Zhang *et al.* (2003) รายงานว่าการใช้ *A. tumefaciens* ที่ความเข้มข้นสูงนั้น อาจมีความจำเป็นต่อพืชที่มีประสิทธิภาพการถ่ายยีนต่ำ เช่น ไม้ยืนต้นและไม้ผล ซึ่งจากการทดลองนี้พบว่าการถ่ายยีนในสักโดยใช้ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ EHA 105 เป็นพาหะ ควรเลือกใช้ความเข้มข้นของเชื้อที่ค่า OD₆₀₀ =1.0

Table 3 Effect of *Agrobacterium tumefaciens* concentration on transient expression of *gus* gene which evaluated by GUS histochemical assay after transformed with *A. tumefaciens* strain EHA 105 harboring plasmid pCAMBIA 1304.

<i>Agrobacterium</i> concentration	Blue stained explant (%) ^{1/}	Blue stained area (%) ^{1/}
OD ₆₀₀ =1.0	85.88 ^a	43.66 ^a
OD ₆₀₀ =0.5	72.27 ^b	56.70 ^b
F-test	*	*
C.V. (%)	20.29	28.49

^{*} Significantly different ($p \leq 0.05$), ^{1/} Means in each column and each parameter followed by the same letter were not significantly different according to DMRT.

สำหรับการปลูกเชื้อ (inoculation) นั้น เป็นขั้นตอนที่ช่วยให้เชื้อ *A. tumefaciens* ยึดเกาะกับผิวของชิ้นส่วนพืช ซึ่งมีความสำคัญต่อประสิทธิภาพการถ่ายยีน การใช้ระยะเวลาในการปลูกเชื้อที่เหมาะสมจะช่วยส่งเสริมประสิทธิภาพในการถ่ายยีน แต่ถ้าใช้ระยะเวลาในการปลูกเชื้อนานเกินไปจะส่งผลทำให้อัตราการรอดชีวิตและการชักนำให้เกิดต้นของพืชลดลง ซึ่งโดยส่วนใหญ่แล้วมีรายงานว่า การถ่ายยีนในพืชชนิดต่างๆ นิยมใช้ระยะเวลาการปลูกเชื้อ 1-3 ชั่วโมง (Yong *et al.*, 2006) จากการทดสอบระยะเวลาที่ใช้ในการปลูกเชื้อบนเนื้อเยื่อสัก พบว่าการปลูกเชื้อที่ระยะเวลา 1 และ 3 ชั่วโมง มีชิ้นเนื้อเยื่อที่มีการแสดงออกของยีน *gus* ร้อยละ 77.25 และ 85.53 ตามลำดับ โดยมีร้อยละของพื้นที่การแสดงออกของยีน *gus* ที่ 47.42 และ 48.99 ตามลำดับ ซึ่งเมื่อวิเคราะห์ค่าทางสถิติแล้วพบว่า ไม่มีความแตกต่างกัน (Table 3)

อย่างไรก็ตาม ระยะเวลาการปลูกเชื้อที่เหมาะสมนอกจากจะขึ้นอยู่กับชนิดและชิ้นส่วนของพืชแล้ว ยังขึ้นอยู่กับสายพันธุ์และความเข้มข้นของเชื้ออีกด้วยเช่น การถ่ายยีนใน *Platanus acerifolia* พบว่าการปลูกเชื้อโดยใช้ความเข้มข้นของเชื้อที่ OD₆₀₀ = 0.8-1.0 และใช้เวลาในการปลูกเชื้อเป็นระยะเวลา 8-20 นาที มีการแสดงออกของยีน *gus* สูงถึงร้อยละ 60-70 ในขณะที่การใช้เชื้อที่ OD₆₀₀ น้อยกว่า 0.4 ไม่พบการแสดงออกของยีน *gus* ในทุกๆ ระยะเวลาการปลูกเชื้อที่ทดสอบ นอกจากนี้การใช้ระยะเวลาในการปลูกเชื้อที่นานถึง 20 นาที ยังส่งผลเสียต่ออัตราการรอดชีวิตของชิ้นส่วนพืชอีกด้วย (Li *et al.*, 2007) ส่วนการถ่ายยีนในถั่วเหลือง พบว่าการปลูกเชื้อโดยใช้เชื้อที่มีค่า OD₆₀₀ =1.0 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง มีประสิทธิภาพการถ่ายยีนและอัตราการรอดชีวิตของเนื้อเยื่อสูงสุด ในขณะที่การปลูกเชื้อเป็นระยะเวลา 30 นาที มีอัตราการรอดชีวิตของชิ้นส่วนเพิ่มขึ้น แต่มีการแสดงออกของยีน *gus* ลดลง (Zia *et al.*, 2010)

Table 4 Effect of inoculation periods on transient expression of *gus* gene which evaluated by GUS histochemical assay after transformed with *Agrobacterium tumefaciens* strain EHA105 harboring plasmid pCAMBIA 1304.

Parameters	Blue stained explant (%)	Blue stained area (%)
1 Hours inoculation	77.25	47.42
3 Hours inoculation	85.53	48.99
F test	ns	ns
C.V. (%)	22.32	30.00

ns = non significantly different

นอกจากนี้ ระยะเวลาการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนร่วมกับเชื้อ *A. tumefaciens* หรือการ co-cultivation นั้นจัดเป็นปัจจัยที่มีความสำคัญเนื่องจากในขั้นตอนนี้จะมีการถ่ายยีนส่วนของยีนเข้าสู่จีโนมของพืช และเป็นช่วงที่เซลล์พืชต้องการระยะเวลาในการปรับตัว และฟื้นฟูเซลล์เนื่องจากมีการรับยีนที่แปลกปลอมเข้าไป การเพาะเลี้ยงร่วมในระยะเวลาสั้นๆ อาจทำให้การถ่ายยีนไม่สมบูรณ์ แต่ถ้าเพาะเลี้ยงร่วมเป็นระยะเวลานานเกินไปจะทำให้เชื้อ *A. tumefaciens* เจริญปกคลุมชิ้นส่วน ทำให้กำจัดได้ยาก และอาจทำให้เนื้อเยื่อเสียหายไม่สามารถพัฒนาต่อไปได้ (Li *et al.*, 2007) ระยะเวลาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชร่วมกับเชื้อแบคทีเรียที่เหมาะสมในพืชแต่ละชนิดจะแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับความสามารถในการปรับตัวของเซลล์พืชและการเจริญเติบโตของเชื้อ (Mannan *et al.*, 2009)

จากการศึกษาการถ่ายยีนเข้าสู่เนื้อเยื่อผักครั้งนี้พบว่าการใช้ ระยะเวลา co-cultivation ที่ 3 และ 5 วัน ให้ร้อยละของเนื้อเยื่อและร้อยละของพื้นที่ที่มีการแสดงออกของยีน *gus* ไม่แตกต่างกันทางสถิติ คือ 82.0 และ 84.9 ตามลำดับ และ 51.26 และ 51.82 ตามลำดับ (Table 5) ดังนั้นระยะเวลาในการ co-cultivation ที่เหมาะสมสำหรับการถ่ายยีนในผักจึงควรใช้ที่ 3 วัน เนื่องจากเป็นระยะเวลาที่มีเชื้อแบคทีเรียเจริญในปริมาณที่น้อยกว่าระยะเวลา 5 วัน ซึ่งส่งผลให้การกำจัดเชื้อจากชิ้นส่วนพืชทำได้ง่ายกว่า นอกจากนี้ยังช่วยลดเวลาในขั้นตอนการถ่ายยีน ทำให้การปฏิบัติงานสะดวกขึ้นอีกด้วย

Table 5 Effect of co-cultivation periods on transient expression of *gus* gene which evaluated by GUS histochemical assay after transformed with *Agrobacterium tumefaciens* strain EHA105 harboring plasmid pCambia 1304.

Co-cultivation period	Blue stained explant (%)	Blue stained area (%)
3 Days	82.00	51.26
5 Days	84.90	51.82
F test	ns	ns
C.V. (%)	22.64	36.80

ns = non significantly different

การถ่ายยีนรายงานผล *green fluorescence protein (mgfp)* เข้าสู่เนื้อเยื่อผัก

จากการถ่ายยีน *mgfp* เข้าสู่เนื้อเยื่อผักโดยใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรียเป็นพาหะนี้ใช้เนื้อเยื่อส่วนปลายยอด ข้อที่ตาข้างเริ่มพัฒนา และแคลลัส หลังการเพาะเลี้ยงบนอาหารคัดเลือกที่มีสารปฏิชีวนะ hygromycin 50 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 2 สัปดาห์ พบเนื้อเยื่อส่วนยอดจำนวน 27 ชิ้น ข้อที่ตาข้างเริ่มพัฒนาจำนวน 22 ชิ้น และแคลลัส 10 ชิ้น ที่มีการเรืองแสงสีเขียว คิดเป็นการแสดงออกแบบชั่วคราวร้อยละ 90 73 และ 33 ตามลำดับ (Table 6) โดยพบการเรืองแสงสีเขียวในบางส่วนของชิ้นเนื้อเยื่อ (Figure 1 B, D and F) โดยในชิ้นส่วนยอดพบมีการเรืองแสงสีเขียวในบริเวณโคนใบ ในเนื้อเยื่อส่วนข้อที่ตาข้างเริ่มพัฒนาพบการเรืองแสงสีเขียวตรงบริเวณยอดที่แตกออกมาใหม่ สำหรับในแคลลัสนั้นพบการเรืองแสงสีเขียวน้อยกว่าเนื้อเยื่อทั้งสองส่วนที่กล่าวแล้ว ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากแคลลัสมีลักษณะแข็งและหนากว่าชิ้นส่วนอื่น การทำบาดแผลจึงอาจทำได้ไม่ดีเท่าที่ควร จึงทำให้การถ่ายยีนมีประสิทธิภาพต่ำกว่าการใช้เนื้อเยื่อส่วนอื่น ๆ ซึ่งมีรายงานผลในลักษณะนี้ในผักด้วยเช่นกัน (Widiyanto *et al.*, 2003 and 2005)

เมื่อนำเนื้อเยื่อทั้งหมดที่ผ่านการตรวจการเรืองแสงของโปรตีน *mgfp* ย้ายไปเพาะเลี้ยงบนอาหารคัดเลือกที่มีสารปฏิชีวนะ hygromycin 50 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 2 เดือน กลับพบว่าส่วนยอดและแคลลัสไม่มีชีวิตรอดหลังการคัดเลือก แต่สำหรับส่วนข้อที่ตาข้างเริ่มพัฒนาพบว่ามีชิ้นเนื้อเยื่อที่สามารถรอดชีวิตอยู่บนอาหารคัดเลือกได้จำนวน

2 ชิ้น ซึ่งคิดเป็นร้อยละ 6.67 (Table 6) และเมื่อนำเนื้อเยื่อที่รอดชีวิตนี้ไปเพาะเลี้ยงบนอาหารคัดเลือกต่ออีกเป็นเวลา 2 เดือน พบว่าเนื้อเยื่อเกิดการพัฒนาเป็นแคลลัส ซึ่งเมื่อนำแคลลัสที่เกิดขึ้นนี้มาตรวจการเรืองแสงของโปรตีน *mgfp* อีกครั้ง พบว่าแคลลัสทั้งสองชิ้นมีการเรืองแสงสีเขียวภายใต้แสง UV (Figure 1 G and H) จึงจัดว่าเป็นเนื้อเยื่อที่มีการแสดงออกของยีน *mgfp* แบบถาวร (stable transformant) แล้ว เนื่องจากเป็นเนื้อเยื่อที่เกิดขึ้นใหม่ที่พัฒนามาจากชิ้นส่วนข้อเดิมบนอาหารคัดเลือกและมีการแสดงออกของยีนได้

Table 6 The results of *mgfp* transformation as evaluated by the green florescence of tissue by fluorescence stereo microscope (Olympus/SZX12)

Explant type	Number of explants	Number (and %) of explants with green florescence after 2 weeks	Number (and %) of explants with green florescence after 2 months
Shoot	30	27 (90 %)	0 (0 %)
Node with developing shoot	30	22 (73 %)	2 (6.67 %)
Callus	30	10 (33 %)	0 (0 %)

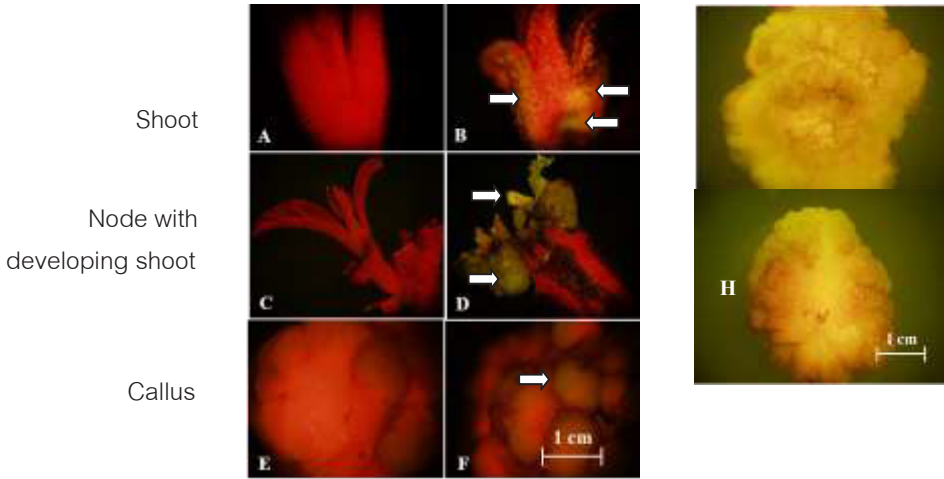


Figure 1 Visualization of green fluorescence spots under blue light on explants (indicated by arrows) after 2 weeks of transformation (B, D and F) compared with the non-transformed teak tissues (A, C and E).The green fluorescence of *mgfp* protein detected on whole piece of calli after 2 months cultured on MS selective medium containing 2 mg/L BA and 50 mg/L hygromycin in figure G and H demonstrated the stable transformation.

จากผลการทดลองครั้งนี้พบว่า การใช้เนื้อเยื่อข้อที่ตาข้างเริ่มพัฒนาของสักเป็นเนื้อเยื่อเป้าหมายในการถ่ายยีนมีโอกาสที่จะประสบความสำเร็จได้มากกว่าการใช้ปลายยอดและแคลลัส อาจเนื่องจากเนื้อเยื่อส่วนนี้มีส่วนของตาข้างที่เริ่มพัฒนาขึ้นใหม่ซึ่งเป็นเนื้อเยื่ออ่อนที่มีอายุน้อยกว่า ทำให้การทำบาดแผลมีประสิทธิภาพดีกว่า เชื้ออะโกรแบคทีเรียจึงอาจบุกรุกเข้าสู่เซลล์ได้ดีกว่า อย่างไรก็ตามการรอดชีวิตของเนื้อเยื่อในอาหารคัดเลือกยังค่อนข้างน้อย ดังนั้นจึงควรมีการศึกษาเพิ่มเติมโดยทดลองใช้เนื้อเยื่อเป้าหมายชนิดอื่นๆ ซึ่งอาจจะเป็นแนวทางหนึ่งซึ่งช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการถ่ายยีนในสักให้มีความสำเร็จมากขึ้น

สรุป

ในการถ่ายยีนเข้าสู่เนื้อเยื่อสักโดยใช้ยีนรายงานผล *gus* นั้น พบว่า การใช้เนื้อเยื่อส่วนข้อให้ผลดีกว่าส่วนฐานใบ ส่วนปัจจัยที่เหมาะสมต่อการถ่ายยีนเข้าเนื้อเยื่อสักได้แก่การใช้ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ EHA 105 ความเข้มข้นของเซลล์แขวนลอยแบคทีเรียที่ $OD_{600} = 1.0$ ปลุกเขื่อนาน 1 ชั่วโมง และเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อร่วมกับเขื่อนาน 3 วัน สำหรับการถ่ายยีนรายงานผล *green fluorescence protein (mgfp)* เข้าสู่เนื้อเยื่อสัก 3 ชนิดคือ ปลายยอด ข้อที่ตาข้างเริ่มพัฒนาและแคลลัส เมื่อตรวจการเรืองแสงของโปรตีน *mgfp* แบบชั่วคราวภายใต้กล้อง fluorescence stereo microscope พบว่า ปลายยอดมีจำนวนชิ้นที่เรืองแสงมากที่สุดคิดเป็นร้อยละ 90 รองลงมาคือข้อที่ตาข้างเริ่มพัฒนา คิดเป็นร้อยละ 73 และในแคลลัสคิดเป็นร้อยละ 33 แต่มีเฉพาะเนื้อเยื่อจากข้อที่ตาข้างเริ่มพัฒนาจำนวน 2 ชิ้นเท่านั้น ที่รอดชีวิตได้ในอาหารคัดเลือกและเนื้อเยื่อพัฒนาเป็นแคลลัสที่มีการแสดงออกของยีน *mgfp* อย่างถาวร

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร และศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษา และวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (สว.) สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ และจากศูนย์วิทยาการขั้นสูงเพื่อเกษตรและอาหาร สถาบันวิทยาการขั้นสูงแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ภายใต้โครงการมหาวิทยาลัยวิจัยแห่งชาติ สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา (สกอ.)

เอกสารอ้างอิง

- รักชนก โคโต. 2549. การถ่ายยีน *CPACO antisense* เข้าสู่กล้วยไม้สกุลหวาย. วิทยานิพนธ์ปริญญาเอก, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 152 น.
- อภิชาติ ชาวสอาด. 2531. ข้อมูลการเจริญเติบโตของไม้สักในสวนป่าภาคเหนือ. ศูนย์บำรุงพันธุ์ไม้สัก, จาว, ลำปาง. 11 น.
- สมคิด สิริพัฒน์ดิกล. 2517. การเจริญเปลี่ยนแปลงของดอกสัก. รายงานงานวิทยาศาสตร์วิจัย เล่มที่ 31. คณะวนศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- Ho, C.-K., S.-H. Chang, J.-Y. Tsay, C.-J. Tsai, V.-L. Chiang. and Z.-Z. Chen. 1998. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Eucalyptus camaldulensis* and production of transgenic plants. *Plant Cell Rep.* 17: 675-680.
- Humara, J.M., M. López and R. J. Ordas. 1999. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Pinus pinea* L. cotyledons: an assessment of factors influencing the efficiency of *uidA* gene transfer. *Plant Cell Rep.* 19: 51-58.
- Jefferson, R.A. 1987. Assaying chimeric gene in plant: the *gus* gene fusion system. *Plant Mol. Biol. Rep.* 5: 378-405.
- Jube, S. and D. Borthakur. 2009. Development of an *Agrobacterium*-mediated transformation protocol for the tree-legume *Leucaena leucocephala* using immature zygotic embryos. *Plant Cell, Tiss. Organ Cult.* 96: 325-333.
- Li, Z.N., F. Fang, G.F. Liu and M.Z. Bao. 2007. Stable *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of London plane tree (*Platanus acerifolia* Willd.). *Plant Cell Rep.* 26: 641-650.
- Mannan, A., T.N. Syed and B. Mirza. 2009. Factors affecting *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation of *Artemisia absinthium* L. *Pakistan J. Bot.* 41: 3239-3246.

- Montoro, P., N.Teinseree., W. Rattana, P. Kongsawadworakul and N. Michaux-Ferriere. 2000. Effect of exogenous calcium on *Agrobacterium tumefaciens*-mediated gene transfer in *Hevea brasiliensis* (rubber tree) friable calli. Plant Cell Rep. 19: 851-855.
- Mullins, K.V., D.J. Llewellyn, V.J. Hartney, S. Strauss. and E. Dinnis. 1997. Regeneration and transformation of *Eucalyptus camaldulensis*. Plant Cell Rep.. 16: 787-791.
- Rao, Y.S. 1997. Keynote address of International Teak Symposium. In Proceedings of the International Teak Symposium, Kerala, India, 2-4 December 1991, eds. Chand Basha S, Mohanan C and Sankar S. pp. 1-6.
- Southerton, S.G. 2007. Early flowering induction and *Agrobacterium* transformation of the hardwood tree species *Eucalyptus occidentalis*. Func. Plant Biol. 34: 707-713.
- Thakur, A.K., S. Sharma and D.K. Srivastava. 2005. Plant regeneration and genetic transformation studies in petiole tissue of Himalayan poplar (*Populus ciliate* Wall.). Curr. Sci. 89: 664-668.
- Tzfira, T., A. Vainstein and A. Altman. 1999. *RoI*-gene expression in transgenic aspen (*Populus tremula*) plants results in accelerated growth and improved stem production index. Trees 14: 49-54.
- Widiyanto S. N., H. Rahmania and S. Suhandono. 2003. Shoot formation on *Agrobacterium* co-cultivated tissues of teak. Dev. Biol. Plant. 39: 23A.
- Widiyanto, S.N., D. Erytrina and H. Rahmania. 2005. Adventitious shoot formation on teak (*Tectona grandis* L.f.) callus cultures derived from internodal segments. Acta Hort. 692: 153-158.
- Widiyanto, S.N., D.S. Diningrat and A. Sukmawan. 2004. Strain specificity in *Agrobacterium*-mediated transformation of teak shoots. In The 15th TSB Annual Meeting, February 3-6, 2004, Chiang Mai-Thailand.
- Yong, W.T L., J.O. Abdullah and M. Mahmood. 2006. Optimization of *Agrobacterium*-mediated transformation parameters for *Melastomataceae* spp. using *green fluorescentprotein* (GFP) as a reporter. Scientia Horticulturae 109: 75-85.
- Zhang, W., S. Subbarao, P. Addae, A. Shen, C. Armstrong, V. Peschke and L. Gilbertson. 2003. *Cre/lox* mediated gene excision in transgenic maize (*Zea mays* L.) plants. Theor. Appl. Genet. 107: 1157-1168.
- Zia, M., Z.F. Rizvi, R.U. Rehman and M.F. Chaudhary. 2010. *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean (*Glycine max* L.): some conditions standardization. Pakistan J. Bot. 42: 2269-2279.