

การถ่ายยีนในถั่วเขียว

Gene Transformation of Mungbean (*Vigna radiata*)

สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล จีรรัตน์ ผลจันทร์ ประดิษฐ์ พงศ์ทองคำ เสดิม ระติสุนทร
เสาวนีย์ สุพุทธิธาดา และ เลิศลักษณ์ เงินศิริ¹

Surin Peyachoknagul, Chareerat Phonjun, Pradit Pongtongkam, Paderm Ratisoontorn,
Saowanee Suputtitada, and Lertlak Ngernsiri

ABSTRACT

Mungbean plants were subjected to *Agrobacterium* mediated transformation. Mungbean seedlings cultured on the modified MS medium for two days were wounded by cutting off one cotyledon. The recombinant plasmid containing a promoter (about 1 kb) of the WCI-2 gene fused with a coding region of a β -glucuronidase (GUS) gene was constructed. The pWCI-2 GUS fusion plasmid was then transferred to wounded mungbean seedlings by using *Agrobacterium tumefaciens*. The pBI121, a plasmid containing a CaMV 35S promoter fused with a GUS gene, was also used as a positive control. The putative transformed plants selected from kanamycin containing medium were tested for GUS activity and confirmed for the presence of transgene by PCR and Southern blot hybridization. The results showed that this method of gene transfer was possible for those plants with no regeneration system available.

Key words : mungbean transformation, *Vigna radiata*, *Agrobacterium* mediated gene transfer

บทคัดย่อ

นำเมล็ดถั่วเขียวมาเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 วันบนอาหารสูตร MS ดัดแปลง แล้วจึงทำให้เกิดบาดแผลบนต้นอ่อนโดยการตัดใบเลี้ยงออก 1 ใบ ตัดต่อเพื่อสร้างพลาสมิดสายผสมที่ประกอบด้วยโปรโมเตอร์ (ประมาณ 1 กิโลเบส) ของยีน WCI-2 ต่อกับส่วน coding region

ของยีน GUS นำพลาสมิดสายผสมนี้ถ่ายเข้าสู่ต้นอ่อนที่มีบาดแผลโดยใช้แบคทีเรีย *Agrobacterium tumefaciens* พร้อมทั้งใช้พลาสมิด pBI121 ซึ่งมีส่วนของโปรโมเตอร์ CaMV 35S ต่อกับยีน GUS ถ่ายเข้าสู่ต้นถั่วเขียวเพื่อเป็นตัวควบคุม นำต้นพืชที่ได้รับการถ่ายยีนซึ่งคัดเลือกมาจากการเลี้ยงในอาหารที่ใส่สารปฏิชีวนะกานามัยซินมาทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์

¹ ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Department of Genetics, Faculty of Science, Kasetsart University, Bangkok 10900, Thailand.

GUS และพิสูจน์ยืนยันว่ามีส่วนของยีนที่ถ่ายให้จริง โดยใช้เทคนิค PCR และ Southern blot hybridization จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าการถ่ายยีนโดยวิธีนี้เป็นไปได้ในพืชที่ยังไม่มีระบบการพัฒนาเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

คำนำ

ถั่วเขียวเป็นพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจชนิดหนึ่ง มีปลูกมากทางภาคเหนือ ปัจจุบันมีการพัฒนาพันธุ์ถั่วเขียวขึ้นหลายพันธุ์ โดยวิธีการผสมข้ามหรือปรับปรุงพันธุ์โดยวิธีมาตรฐาน นอกจากนี้มีการนำเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมาใช้ร่วมด้วย แต่ยังไม่ได้ผลเป็นที่พอใจ เนื่องจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อให้พัฒนาเป็นต้นทำได้ยากในพืชตระกูลถั่ว การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของพืชตระกูลถั่วส่วนใหญ่เป็นการเพาะเลี้ยงใบเลี้ยงอ่อนเพื่อทำให้เกิดยอดหลายยอด (สาวนีย์ และคณะ, 2532; สิริสุข และคณะ, 2534; Avenido *et al.*, 1991) การพัฒนาเป็นต้นโดยผ่านแคลลัสมีรายงานความสำเร็จเฉพาะในถั่วเหลืองเท่านั้น (Wright *et al.*, 1987) สำหรับถั่วเขียวยังไม่มีรายงานถึงการพัฒนาจากแคลลัสไปเป็นต้นที่สมบูรณ์

การถ่ายยีนในพืชทำได้หลายวิธี แต่วิธีหนึ่งที่นิยมกันมาก คือ การถ่ายยีนโดยผ่านทางแบคทีเรีย *Agrobacterium* ซึ่งทำได้สำเร็จในพืชใบเลี้ยงคู่หลายชนิด เช่น ยาสูบ (Marton *et al.*, 1979) พืชุนี (Pollock *et al.*, 1985) มะเขือเทศ (McCormick *et al.*, 1986) และมันฝรั่ง (Brunke and Mecusen, 1991) เป็นต้น การถ่ายยีนโดยใช้ *Agrobacterium* นี้ทำได้โดยเพาะเลี้ยงโปรโตพลาสต์ร่วมกับเชื้อ *Agrobacterium* (Herrera-Estrella *et al.*, 1984) หรือถ่ายยีนเข้าสู่ใบที่ตัดเป็นชิ้นเล็กๆ (leaf disc) (Horsch *et al.*, 1985) นอกจากนี้มีการประยุกต์ใช้ชิ้นส่วนอื่น ๆ ของพืช เช่น hypocotyl, microspore และ proembryo เป็นต้น จุ่มลงในอาหาร

เหลวที่มี *Agrobacterium* แล้วจึงนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารที่มีสารสำหรับคัดเลือก และเพาะเลี้ยงจนเป็นต้นต่อไป ในการทดลองครั้งนี้ใช้วิธีถ่ายยีนโดยพืชเชื้อ *Agrobacterium* ไปบนรอยแผลของต้นอ่อนแล้วจึงนำไปเลี้ยงบนอาหารที่มีสารสำหรับชักนำให้เกิดยอดหลายยอด โดยคาดว่ามีความปลอดภัยที่เกิดจากเซลล์ที่ได้รับยีนที่ต้องการ และจะพัฒนาเป็นต้นได้สมบูรณ์

สำหรับยีนที่ถ่ายเป็นยีนรายงาน (reporter gene) ซึ่งได้จากแบคทีเรียทีนิยมิใช้สำหรับตรวจสอบการถ่ายยีนในพืชหลายชนิด คือ β -glucuronidase (GUS) โดยยีนดังกล่าวนี้ได้ทำการ ตัดต่อกับโปรโมเตอร์สำหรับควบคุมการแสดงออกของยีนนี้ในพืช โปรโมเตอร์ที่ใช้มี 2 ชนิด คือ โปรโมเตอร์จาก cauliflower mosaic virus 35S (CaMV 35S promoter) ซึ่งใช้กันอย่างแพร่หลายในพืช และโปรโมเตอร์ของยีน chymotrypsin inhibitor จากถั่วพู (WCI promoter) (Peyachoknagul *et al.*, 1989) ซึ่งเป็นโปรโมเตอร์ที่ควบคุมให้มีการแสดงออกของยีนเฉพาะที่และเฉพาะช่วงหนึ่งของการพัฒนาเท่านั้น สามารถทดสอบผลของโปรโมเตอร์ทั้งสองได้จากกิจกรรมของเอนไซม์ GUS (Jefferson, 1987) และตรวจสอบดีเอ็นเอที่ถ่ายเข้าไปโดยเทคนิค PCR และ Southern blot hybridization

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อถั่วเขียว

นำเมล็ดถั่วเขียวพันธุ์กำแพงแสน 1 มาเพาะในสภาพปลอดเชื้อบนอาหารแข็งสูตร MS (Murashige and Skoog, 1962) ที่เติมน้ำตาลทราย 3 เปอร์เซ็นต์ น้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซ็นต์ BAP 10 มิลลิกรัมต่อลิตร และ GA3 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 2 วัน นำต้นถั่วเขียวที่ได้ตัดใบเลี้ยงทั้ง 1 ใบ และทำบาดแผลบริเวณลำต้นเพื่อเตรียมถ่ายยีนเข้าสู่ต้นโดยใช้ *Agrobacterium*

2. การตัดต่อยีนเพื่อสร้างพลาสมิดสายผสม

ตัดส่วนโปรโมเตอร์ของยีน WCI-2 ประมาณ 1 กิโลเบส นำมาต่อเข้าข้างหน้าของยีน GUS ในพลาสมิด pBI101 (Clontech) เพื่อสร้าง WCI-2 GUS fusion plasmid ตามวิธีที่อธิบายใน Peyachoknagul *et al.*, (1994) และใช้ถ่ายยีนโดยเปรียบเทียบกับการใช้พลาสมิด pBI121 (Clontech) ซึ่งมีโปรโมเตอร์ CaMV 35S อยู่แทนที่ (Figure 1)

โปรโมเตอร์ของยีน WCI-2 นำมาจากพลาสมิดซึ่งมียีนนี้อยู่ขนาด 5.5 กิโลเบส (Figure 1A) ตัดเอาเฉพาะส่วนปลาย 5' ของยีนประมาณ 1 กิโลเบส มาต่อแทรกไว้ข้างหน้าของยีน GUS ซึ่งอยู่ภายในพลาสมิด pBI101 (Figure 1B) เพื่อใช้ถ่ายเข้าสู่ตัวเขียวเปรียบเทียบกับพลาสมิด pBI121 (Figure 1B)

โดยพลาสมิดที่สร้างขึ้นนี้ต่างกับพลาสมิด pBI121 เฉพาะส่วนโปรโมเตอร์เท่านั้น pBI121 มีโปรโมเตอร์ CaMV 35S ส่วน pWCI-2 GUS มีส่วนปลาย 5' ของยีน WCI ซึ่งคาดว่าเป็นส่วนของโปรโมเตอร์ เนื่องจากมีบริเวณที่มีเบสซ้ำ และมีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่คล้ายกับที่พบในโปรโมเตอร์ของสิ่งมีชีวิตชั้นสูงทั่วไป (Goldberg, 1986; Habu *et al.*, 1992) ขนาดของดีเอ็นเอที่มีรายงานว่าใช้เป็นโปรโมเตอร์ในพืชมีตั้งแต่หลายร้อยคู่เบสจนถึงกว่า 1 กิโลเบส (Herrera-Estrella *et al.*, 1984; Bird *et al.*, 1988) จึงเชื่อว่าชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ใช้ครั้งนี้ น่าจะพอเพียงสำหรับทำหน้าที่เป็นโปรโมเตอร์ได้

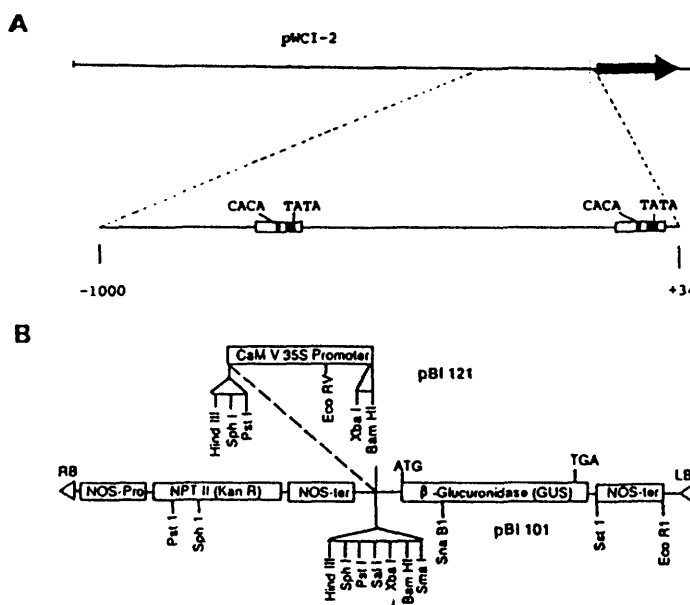


Figure 1 A. Schematic figure of WCI-2 gene. Filled arrow indicated the position and the direction of the WCI gene coding region. Sequence of about 1 kb 5' upstream region was enlarged showing two homologous boxes containing TATA and CACA sequences which were inserted into pBI101 plasmid. **B.** Restriction map of the pBI101 and pBI121 plasmids containing GUS gene and the site for promoter sequence insertion.

3. การเตรียมเชื้อแบคทีเรีย

นำพลาสมิดที่ตัดต่อเรียบร้อยแล้ว (pWCI-2GUS และ pBI121) ถ่ายเข้าสู่แบคทีเรีย *Escherichia coli* HB101 แล้วจึงถ่ายยีนจากแบคทีเรียดังกล่าวเข้าสู่ *Agrobacterium tumefaciens* สายพันธุ์ LBA4404 โดยวิธี triparental mating (Herrera-Estrella and Simpson, 1988) คัดเลือกแบคทีเรีย *Agrobacterium* ที่มีพลาสมิดโดยเลี้ยงบนอาหารที่มีสารปฏิชีวนะสเตรปโตมัยซิน 25 มิลลิกรัมต่อลิตร และกานามัยซิน 100 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อไวถ่ายยีนเข้าสู่ต้นถั่วเขียวในขั้นต่อไป

4. การถ่ายยีนเข้าสู่ต้นถั่วเขียว

เตรียมเชื้อแบคทีเรีย *Agrobacterium* LBA4404 ที่มีพลาสมิด pBI121 และ pWCI-2 GUS โดยเลี้ยงในอาหารเหลว LB ที่มีสเตรปโตมัยซิน 25 มิลลิกรัมต่อลิตร และกานามัยซิน 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 36 ชั่วโมง หมุนเหวี่ยงที่ 3000g นาน 3 นาที ดูดส่วนของเหลวทิ้ง และนำตะกอนมาละลายในอาหารเหลวสูตร MS ให้มีค่า OD₆₀₀ ประมาณ 0.1 นำต้นถั่วเขียวที่ทำให้เกิดบาดแผลเรียบร้อยแล้วจากข้อ 1. มาแช่ลงในสารละลายเซลล์ดังกล่าวเป็นเวลา 30 นาที ย้ายต้นถั่วเขียวมาวางบนกระดาษซับเพื่อซับเชื้อส่วนเกินออก และนำกลับมาเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งสูตรเดิมเป็นเวลา 2 วัน แล้วจึงย้ายมาเพาะเลี้ยงในอาหารที่เติมคาร์เบนนิซิลิน 500 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อกำจัดเชื้อ *Agrobacterium* และกานามัยซิน 100 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อคัดเลือต้นถั่วเขียวที่ได้รับการถ่ายยีน เปลี่ยนอาหารทุก 2 สัปดาห์ เมื่อได้จำนวนยอดมากพอแล้วจึงย้ายต้นถั่วเขียวมาเลี้ยงในอาหาร MS ที่ไม่เติมฮอร์โมนเร่งการเจริญเติบโตเป็นเวลา 2 สัปดาห์ แล้วย้ายลงในอาหาร MS ที่เติม 2,4-D 4 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อกระตุ้นให้เกิดราก

5. ตรวจสอบผลการถ่ายยีนโดยวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ GUS

ตรวจกิจกรรมของเอนไซม์ GUS ในเนื้อเยื่อส่วนต่าง ๆ ของต้นถั่วที่ได้จากการถ่ายยีนทั้งจากพลาสมิด pBI121 และ pWCI-2 GUS ใช้วิธี histochemical staining (Jefferson, 1987) โดยตัดเนื้อเยื่อให้เป็นชิ้นบาง ๆ บ่มในสารละลายสับสเตรท คือ 1 mM 5-bromo-4-chloro-3-indolyl β -glucuronic acid (X-gluc) ใน 100 mM sodium phosphate buffer pH 7.0, 0.5 mM potassium ferricyanide, 0.5 mM potassium ferrocyanide และ 10 mM EDTA ที่ 37 องศาเซลเซียส 1 ชั่วโมงจนถึงข้ามคืน ในเนื้อเยื่อที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ GUS จะเกิดการย่อยสาร X-gluc ได้สารสีฟ้า ซึ่งอาจจะเห็นได้ไม่ชัดเจนเพราะส่วนของพืชที่ใช้ทดสอบมีสีเขียว จึงต้องนำชิ้นส่วนพืชมาแช่ในแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ 5 นาที เพื่อสกัดคลอโรฟิลล์ออกเพื่อให้เห็นสีฟ้าได้ชัดเจนขึ้น ตรวจสอบชิ้นส่วนพืชภายใต้กล้องจุลทรรศน์

6. ตรวจสอบผลการถ่ายยีนโดยเทคนิค PCR และ Southern blot hybridization

สกัดดีเอ็นเอจากต้นถั่วเขียวที่ได้รับการถ่ายยีนและต้น control โดยวิธีของ Ying et al. (1992) นำดีเอ็นเอที่ได้มาตรวจหาส่วนของยีน GUS โดยเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค PCR ใช้ไพรเมอร์ (primer) ที่จำเพาะซึ่งเป็นส่วนหนึ่งของยีน GUS โดยจะเพิ่มปริมาณส่วนของยีนขนาด 496 คู่เบส (นากาอูมู, 2537) จากตำแหน่งที่ 601-1,096 ตรวจสอบผลที่ได้ด้วยอะกาโรสเจล อิเล็กโทรโฟรีซิส

การตรวจสอบโดย Southern blot hybridization ทำโดยสกัดดีเอ็นเอจากต้นถั่วเขียวนำมาตัดด้วยเอนไซม์ EcoRV นำไปแยกขนาดด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส แล้วจึงย้ายดีเอ็นเอจากแผ่นเจลลงสู่แผ่นเมมเบรนฟิลเตอร์ตามวิธีของ Sambrook et al. (1989)

นำมาไฮบริดซ์กับดีเอ็นเอ ตรวจสอบ (probe) ซึ่งมาจากส่วนของยีน GUS ที่เพิ่มปริมาณโดยเทคนิค PCR คัดลอกด้วยสารฟลูออเรสซิน ตรวจสอบผลโดยวิธี enhanced chemiluminescence (ECL) วิธีคัดลอก ดีเอ็นเอตรวจสอบ การไฮบริดเซชันและการตรวจสอบทำตามคำอธิบายของบริษัทอะเมอร์แชม

ผลและวิจารณ์

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยและกล้วย

ก่อนที่จะถ่ายยีนเข้าสู่ต้นกล้วยต้องทดสอบความทนทานของกล้วยต่อสารกานามัยซินก่อน เพื่อจะเลือกใช้ระดับของสารกานามัยซินได้ถูกต้องในขั้นตอนการคัดเลือกต้นที่ได้รับการถ่ายยีน ซึ่งในการทดลองครั้งนี้พบว่า เมื่อใช้ความเข้มข้นของกานามัยซิน 40 มิลลิกรัมต่อลิตร ต้นกล้วยจะเริ่มมีสีขาวซีด และแห้งตายเมื่อใช้ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร

เมื่อทดสอบความเข้มข้นของกานามัยซินแล้ว จึงเพาะเลี้ยงกล้วยและถ่ายยีนตามข้ออธิบายในวิธีการ

ต้นกล้วยที่ได้จากการถ่ายพลาสมิด pBI121 และ pWCI-2 GUS ไม่มีความแตกต่างกันทั้งรูปร่างและการเจริญเติบโต แต่จะเจริญเติบโตช้ากว่าต้นที่ไม่ได้ถ่ายยีน และลักษณะยอดที่ออกมาจะสั้นกว่า เมื่อเปลี่ยนอาหารเป็นสูตรที่ชักนำให้เกิดรากประมาณ 4 สัปดาห์ก็จะงอกรากได้ แต่จำนวนต้นที่เกิดรากจะต่ำมากประมาณ 5 เปอร์เซ็นต์

การตรวจสอบผลการถ่ายยีนโดยวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ GUS

การตรวจสอบเบื้องต้นภายหลังการถ่ายยีนให้กับต้นกล้วยเป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบ กิจกรรมของเอนไซม์ GUS ย่อยสลายสาร X-gluc ซึ่งเป็นสับสเตรทเกิดเป็นสารเชิงซ้อนสีฟ้า (Figure 2) แต่พบการกระจายที่ไม่สม่ำเสมอ อาจเนื่องมาจากการถ่ายยีนเฉพาะบางส่วนของเนื้อเยื่อ โดยบางเซลล์ได้รับยีน บางเซลล์ก็ไม่ได้รับ (Chyi and Phillips, 1987) หรือเกิดจากยีนที่ถ่ายเข้าไป เข้าไปแทรกในโครโมโซมแบบสุ่ม และมีผลกระทบจากดีเอ็นเอหรือยีนที่อยู่ข้าง

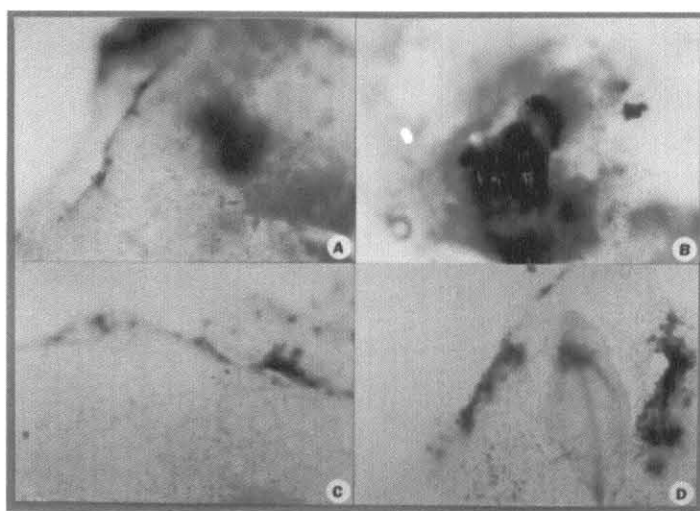


Figure 2 Histochemical analysis of GUS activity in stem section of plants transformed with pBI121 (A and B) and pWCI-2 GUS plasmids (C and D).

เคียง (position effect) ทำให้มีการแสดงออกไม่สม่ำเสมอ (Jones *et al.*, 1985) อย่างไรก็ตามพบว่า โปรโมเตอร์ CaMV 35S ในพลาสมิด pBI121 กวบรวมให้มีการแสดงออกของยีนในระดับสูงกว่า ปรากฏสีฟ้าชัดเจน และเป็นบริเวณกว้างกว่า ยีน WCI ในตัวพืชนั้นมีการ

แสดงออกเฉพาะในเมล็ดที่โตแล้วและในลำต้นแก่เท่านั้น (Peyachoknagul *et al.*, 1989) แต่ในการทดลองครั้งนี้ยังไม่สามารถตรวจสอบได้เนื่องจากต้นถั่วเขียวที่ได้รับยีนยังไม่ออกดอกและติดเมล็ด ซึ่งจะต้องติดตามผลต่อไป

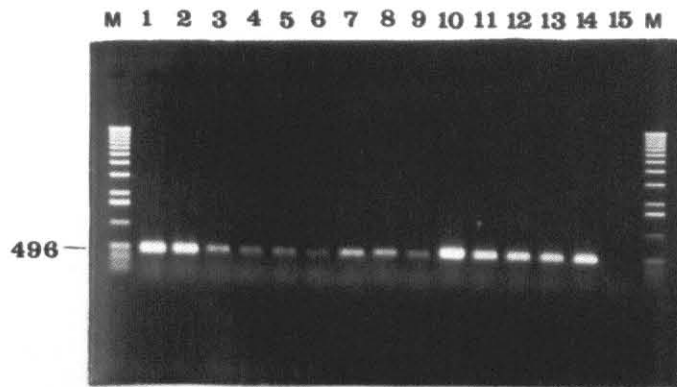


Figure 3 Agarose gel electrophoresis of PCR-amplified DNA from pBI121 plasmid (lane 1), pWCI-2 GUS plasmid (lane 2), individual plant transformed with pWCI-2 GUS (lane 3-9), transformed with pBI121 (lane 10-14) and control, non transformed plant (lane 15). Lane M is a 1 kb ladder DNA as a molecular weight marker.

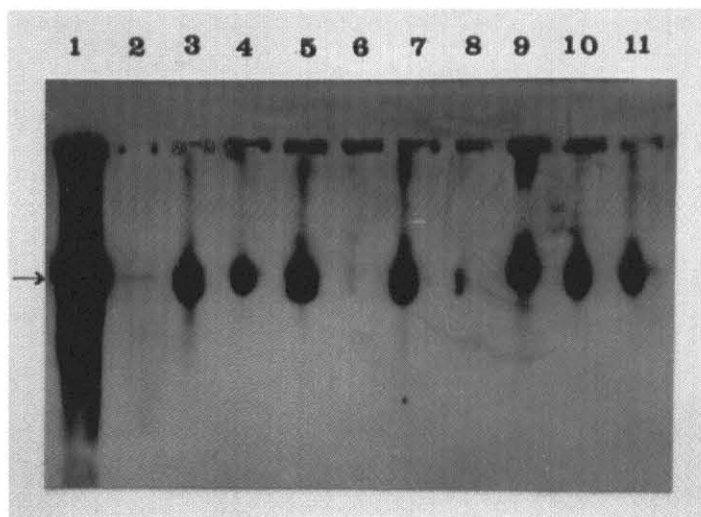


Figure 4 Southern blot hybridization of DNA samples from pBI121 (lane 1), individual plant transformed with pWCI-2 GUS (lane 2-6) and with pBI121 (lane 7-11) The arrow showed one of the positive band.

การตรวจสอบผลการถ่ายยีนโดยเทคนิค PCR และ Southern blot hybridization

จากการแยกดีเอ็นเอของถั่วเขียวที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน และต้นถั่วเขียวที่ได้รับการถ่ายยีนจากพลาสมิด pWCI-2 GUS 7 ตัวอย่าง และที่ได้รับยีนจากพลาสมิด pBI121 5 ตัวอย่าง เพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของยีน GUS ขนาด 496 คู่เบส เปรียบเทียบกับที่ใช้พลาสมิด pWCI-2 GUS และ pBI121 โดยเทคนิค PCR และนำมาตรวจสอบด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายได้ในขณะที่ไม่พบชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดเดียวกันนี้ในต้นที่ไม่ได้ถ่ายยีน (Figure 3) การใช้เทคนิค PCR ในการตรวจสอบผลการถ่ายยีนในพืชนี้ทำได้รวดเร็ว มีความไวสูง ทั้งยังต้องการตัวอย่างพืชเพียงเล็กน้อยเท่านั้น จึงเหมาะกับการที่ต้องการตรวจสอบพืชจำนวนมาก หรือการตรวจสอบในระยะแรกขณะที่ต้นยังเล็กอยู่ ดังจะเห็นได้จากรายงานที่มีการตรวจสอบผลการถ่ายยีนในเบญจมาศ (Ledger *et al.*, 1991) ข้าว (Li *et al.*, 1993) และมะละกอ (Fitch *et al.*, 1993) โดยใช้เทคนิค PCR

จากการสุ่มตัวอย่างดีเอ็นเอจากต้นถั่วเขียวที่ได้รับยีนมาตรวจสอบโดย Southern blot hybridization โดยแยกส่วนของยีน GUS ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณโดยเทคนิค PCR มาใช้เป็น ดีเอ็นเอตรวจสอบ พบว่าดีเอ็นเอตรวจสอบสามารถไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอจากต้นถั่วเขียวบางตัวอย่างเท่านั้น (Figure 4) อาจเกิดจากยีนที่ถ่ายเข้าไปมีปริมาณน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับจีโนมของพืชซึ่งมีขนาดใหญ่ และความไวในการตรวจสอบไม่สูงพอ หรือเกิดจากต้นถั่วที่ได้มีลักษณะเป็น chimera คือ มีเนื้อเยื่อบางส่วนได้รับยีนบางส่วนก็ไม่ได้รับ จะเห็นได้ว่าการตรวจสอบโดยวิธี PCR มีความไวและทำได้รวดเร็วกว่า เพราะบางต้นที่แสดงผลบวกเมื่อตรวจสอบด้วย PCR เมื่อตรวจสอบโดยวิธีนี้ก็ตรวจสอบไม่พบ

สรุป

เนื่องจากระบบการพัฒนาเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์ในพืชตระกูลถั่วทำได้ยาก ในการทดลองครั้งนี้จึงใช้วิธีถ่ายยีนโดยใช้ต้นอ่อนที่ตัดใบเลี้ยงออกไป 1 ใบ และทำให้เกิดบาดแผลเพื่อให้แบคทีเรีย *Agrobacterium* สามารถเข้าสู่ต้นและส่งถ่ายยีนให้กับพืชได้ แล้วชักนำให้เกิดยอดหลายยอด ซึ่งอาจมีบางยอดที่เจริญมาจากเซลล์บริเวณที่ได้รับยีน ในการคัดเลือกเบื้องต้นใช้สารกานามัยซินความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร แล้วนำต้นที่ได้มาตรวจหากิจกรรมของเอนไซม์ GUS พบว่ามีการแสดงออกไม่สม่ำเสมอ โดยโปรโมเตอร์ CaMV 35S ควบคุมให้มีการแสดงออกได้ดีกว่าโปรโมเตอร์ WCI เมื่อตรวจจากดีเอ็นเอโดยวิธี PCR และ Southern blot hybridization พบส่วนของยีน GUS ซึ่งถ่ายเข้าไปในต้นถั่วเขียวจริง วิธีถ่ายยีนโดยผ่านเนื้อเยื่อที่พัฒนาเป็นยอดโดยตรงนี้น่าจะเป็นทางเลือกสำหรับพืชที่มีระบบการพัฒนาเป็นต้นได้ยากอื่นๆต่อไป โดย คัดเลือกต้นจำนวนมากขึ้น

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณสถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ที่ให้ทุนสนับสนุนโครงการวิจัยนี้

เอกสารอ้างอิง

- นภาพรณัฏ์ ดันดีสุวิชาชนย์. 2537. การตรวจสอบการทำงานของโปรโมเตอร์ของถั่วพูในต้นมะเขือเทศ. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- สิรินุช ลามศรีจันทร์, อรุณี วงศ์ปิยะสกลิต์, และ วราภรณ์ โจนศิริวงศ์. 2534. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อถั่วแดง. ว. เกษตรศาสตร์ (วิทย.) 25:292-298.

- เสาวนีย์ สุพุทธิธาดา, ประดิษฐ์ พงศ์ทองคำ, และ เติมระติสุนทร. 2532. การเกิดยอดหลายยอดโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของถั่วเขียว, น. 211-218. ใน รายงานการวิจัยในการประชุมวิชาการครั้งที่ 27 สาขาวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- Avenido, R.A., D.M. Hautea, C.J. Mendoza, and S.L. Carandang. 1991. Clonal propagation of F1 hybrid of mungbean (*Vigna radiata* L. Wilczek) *blackgram (*V. mungo* L. Hepper) by tissue culture. Philip. J. Crop Sci. 16:63-67.
- Bird, C.R., C.J.S. Smith, J.A. Ray, P. Moureau, M.W. Bevan, A.S. Bird, S. Hughes, P.C. Morris, D. Grierson, and W. Schuch. 1988. The tomato polygalacturonase gene and ripening-specific expression in transgenic tomato plants. Plant Mol. Biol. 11:651-662.
- Brunke, K. and R. Mecusen. 1991. Insect control with genetically engineered crops. Trends Biotechnol. 9:197-200.
- Chyi, Y and G.C. Phillips. 1987. High efficiency *Agrobacterium*-mediated transformation of *Lycopersicon* based on conditions favorable for regeneration. Plant Cell Rep. 6:105-108.
- Fitch, M.M.M., R.M. Manshardt, D. Gonsalves, and J.L. Slightom. 1993. Transgenic papaya plants from *Agrobacterium*-mediated transformation of somatic embryos. Plant Cell Rep. 12:245-249.
- Goldberg, R.B. 1986. Regulation of plant gene expression. Phil. Trans. Roy. Soc. (Lond) B314:343-353.
- Habu, Y., S. Peyachoknagul, K. Umemoto, Y. Sakata, and T. Ohno. 1992. Structure and regulated expression of Kunitz chymotrypsin inhibitor genes in winged bean (*Psophocarpus tetragonolobus* (L.) DC.) J. Biochem. 111:249-258.
- Herrera-Estrella, L. and J. Simpson. 1988. Foreign gene expression in plants, pp. 131-160. In C.H. Show (ed.), Plant Molecular Biology. IRL press, Washington, DC. 313 p.
- Herrera-Estrella, L., G. Van den Broeck, R. Maenhaut, M. Van Montagu, and J. Schell. 1984. Light-inducible and chloroplast associated expression of a chimeric gene introduced into *Nicotiana tabacum* using a Ti plasmid vector. Nature 310:115-120.
- Horsch, R.B., J.E. Fry, N.L. Hoffmann, D. Eichholtz, S.G. Rogers, and R.T. Fraley. 1985. A simple and general method for transferring genes into plants. Science 227:1229-1231.
- Jefferson, R.A. 1987. Assaying chimeric genes in plants : the GUS gene fusion system. Plant Mol. Biol. Rep. 5:387-407.
- Jones, J.D.G., P. Dunsmuir, and J. Bedbrook. 1985. High level expression of introduced chimeric genes in regenerated transformed plants. EMBO J. 4:2411-2418.
- Ledger, S.E., S.C. Deroles, and N.K. Given. 1991. Regeneration and *Agrobacterium*-mediated transformation of chrysanthemum. Plant Cell Rep. 10:195-199.
- Li, L., R. Qu, A. deKochko, C. Fauguet, and R.N. Beachy. 1993. An improved rice transformation system using the biolistic method. Plant Cell Rep. 12:250-255.
- Marton, L., G.J. Wullems, L. Molondijk, and R.A. Schilperoort. 1979. In vitro transformation of

- cultured cells from *Nicotiana tabacum* by *Agrobacterium tumefaciens*. *Nature* 277:129-131.
- McCormick, S., J. Niedermeyer, and J. Fry. 1986. Leaf disc transformation of cultivated tomato (*L. esculentum*) using *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell Rep.* 5:81-84.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bio-assay with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15:473-497.
- Peyachoknagul, S., N. Tantisuwichwong, P. Pongtongkam, S. Suputtitada, and T. Ohno. 1994. Regulation of beta-glucuronidase expression in transformed tomato by a 5' flanking region of winged bean chymotrypsin inhibitor gene, pp. 121-130. *In* Proceedings of the international colloquium on Impact of Plant Biotechnology on Agriculture. Rogla, December 5-7.
- Peyachoknagul, S., T. Matsui, H. Shibata, S. Hara, T. Ikenaka, Y. Okada, and T. Ohno. 1989. Sequence and expression of the mRNA encoding the chymotrypsin inhibitor in winged bean [*Psophocarpus tetragonolobus* (L.) DC] *Plant Mol. Biol.* 12:51-58.
- Pollock, K., D.G. Barfield, S.J. Robinson, and R. Shields. 1985. Transformation of protoplast-derived cell colonies and suspension culture by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell Reports.* 4:202-205.
- Sambrook, J., E.F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. *Molecular Cloning : A Laboratory Manual*. 2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Wright, M.S., D.V. Ward, M.A. Hinchey, M.G. Carnes, and R.J. Kaufman. 1987. Regeneration of soybean (*Glycine max* L. Merr.) from cultured primary leaf tissue. *Plant Cell Reports* 6:83-89.
- Ying, M., W.E. Dyer, and J.W. Bergman. 1992. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of safflower (*Carthamus tinctorius* L.) cv. 'Centennial' *Plant Cell Rep.* 11:581-585.