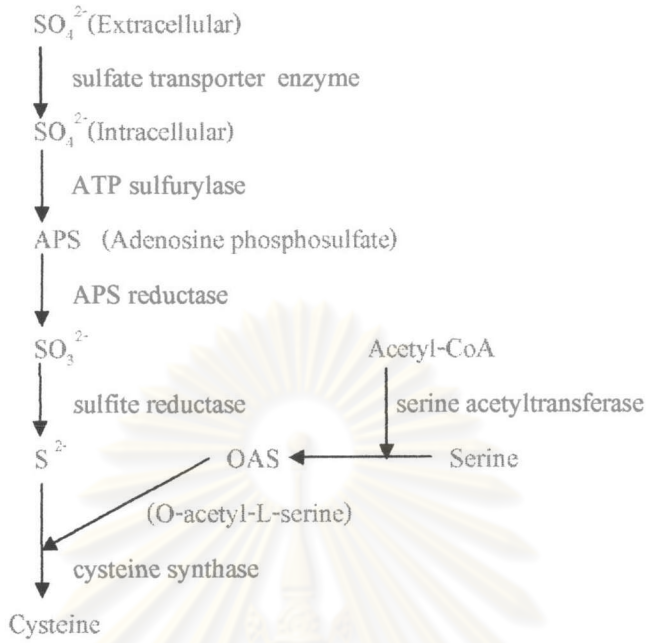
บทที่ 2

วารสารปริทัศน์

แนวคิดและทฤษฎี

น้ำที่เกิดจากกระบวนการทำเหมืองถ่านหินลิกไนต์ที่ อ.แม่เมาะ จ.ลำปาง มีซัลเฟตปนเปื้อนในปริมาณสูงถึง 800-2,000 มิลลิกรัม/ลิตร เพื่อที่จะกำจัดหรือลดปริมาณซัลเฟตในน้ำจากกระบวนการทำเหมืองนี้ให้สามารถปล่อยสู่แหล่งน้ำธรรมชาติได้ การไฟฟ้าฝ่ายผลิตแห่งประเทศไทยจึงได้สูบน้ำเหล่านี้ให้ไหลผ่านบริเวณร่องน้ำไร้อากาศ (wet land) โดยการใส่สารอินทรีย์ปริมาณมากลงไปในร่องน้ำ เพื่อให้จุลินทรีย์ในร่องน้ำใช้สารอินทรีย์เป็นแหล่งพลังงานเพื่อการเจริญ ผลของการเจริญของจุลินทรีย์เหล่านี้จะทำให้ออกซิเจนซึ่งละลายอยู่ในน้ำหมดไป และปลูกพืชที่เจริญเติบโตรวดเร็วอย่างหนาแน่นปกคลุมร่องน้ำเพื่อป้องกันการแพร่ของออกซิเจนในอากาศกลับเข้ามาทางผิวน้ำ เมื่อน้ำจากบริเวณเหมืองไหลผ่านบริเวณร่องน้ำไร้อากาศนี้ จุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการออกซิเจนเพื่อการเจริญจะใช้ซัลเฟตเป็นตัวรับอิเล็คตรอน ทำให้ซัลเฟตเปลี่ยนไปเป็นซัลไฟด์ โดยวิธีนี้พบว่าสามารถลดซัลเฟตไปได้เพียง 30 เปอร์เซ็นต์เท่านั้น (ข้อมูลจากการไฟฟ้าฝ่ายผลิตแห่งประเทศไทย) จึงยังไม่สามารถปล่อยน้ำจากบริเวณเหมืองออกสู่แหล่งน้ำธรรมชาติได้ ดังนั้นการไฟฟ้าฝ่ายผลิตแห่งประเทศไทยจึงได้กักน้ำจากบริเวณเหมืองที่ผ่านการบำบัดในร่องน้ำไร้ออกซิเจนเหล่านี้ไว้ในบ่อพักขนาดใหญ่ เรียกว่า Biological pond แล้วใช้วิธีสูบน้ำจากแหล่งน้ำบริเวณข้างเคียงเข้ามาเจือจางซัลเฟต ใน Biological pond นี้พบว่ามีผักบุ้ง (*Ipomoea aquatica*) เจริญอยู่ ผักบุ้งเป็นพืชที่เจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็วตามแหล่งน้ำธรรมชาติทั่วไป การเจริญมีการนำซัลเฟตในน้ำที่เจริญอยู่มาสังเคราะห์เป็นสารอินทรีย์ที่มีกำมะถันเป็นองค์ประกอบเช่นกรดอะมิโนซิสเตอีน เรียกกระบวนการ sulfate assimilation แต่ในธรรมชาติประสิทธิภาพการนำซัลเฟตมาใช้ในกระบวนการ sulfate assimilation ไม่สูงมาก

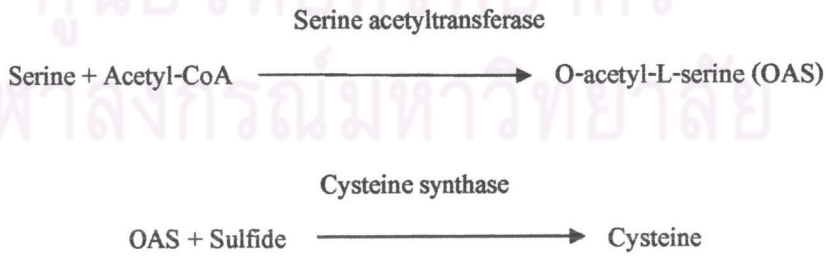
การสังเคราะห์กรดอะมิโนซิสเตอีน และสารเมตาโบไลต์อื่นที่มีกำมะถันเป็นองค์ประกอบโดยกระบวนการ sulfate assimilation ในพืช ดังแสดงในภาพที่ 2.1



ภาพที่ 2.1 กระบวนการ sulfate assimilation ของพืช และเอนไซม์ควบคุม (Saito 2002)

การสังเคราะห์กรดอะมิโนซีสเตอีน เป็นการทำงานร่วมกันของเอนไซม์ 2 ชนิด คือ เซอรีน แอซีทิลแทรนส์เฟอเรส และซีสเตอีนซินเตส ดังสมการ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Ruffet และคณะ (1994) รายงานว่า เซอรีนแอซีทิลแทรนส์เฟอเรส มีปริมาณและกิจกรรมที่ต่ำกว่าซีสเตอีนซินเตสอย่างมาก ดังนั้นโอ-แอซีทิล-แอล-เซอรีน (O-acetyl-L-serine) ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ของเซอรีนแอซีทิลแทรนส์เฟอเรสจึงน่าจะเป็นปัจจัยจำกัด (limiting factor) ของกระบวนการ sulfate assimilation

Saito และคณะ (1994b) ได้สร้างพลาสมิด 3 ชนิด ซึ่งบริเวณ T-DNA มียีนระบุรหัสซิสเตอีนซินเตส (*CSase* A) ชนิดที่อยู่ในไซโตพลาสซึมจากคอมพลีเมนทารีดีเอ็นเอของต้นผักขม (*Spinacia oleracea*) ซึ่งมีลักษณะต่างกันดังนี้ พลาสมิด pCSK3F ทิศทางการเรียงตัวของยีนระบุรหัสซิสเตอีนซินเตสและของโปรโมเตอร์ชนิด Cauliflower mosaic virus (CaMV) 35S RNA เหมือนกัน พลาสมิด pCSK3R ทิศทางการเรียงตัวของยีนระบุรหัสซิสเตอีนซินเตสตรงข้ามกับของโปรโมเตอร์ชนิด CaMV 35S พลาสมิด pCSK4F ยีนระบุรหัสซิสเตอีนซินเตสเชื่อมต่อกับทรานซิตเปปไทด์ที่แสดงออกในคลอโรพลาสต์ ซึ่งได้มาจากหน่วยย่อย (small subunit) ของ ribulose-1,5- bisphosphate carboxylase (RUBISCO) ในต้นถั่ว ทิศทางการเรียงตัวของยีนไปทางเดียวกับโปรโมเตอร์ชนิด CaMV 35S ถ่ายโอนพลาสมิด ทั้ง 3 ชนิดเข้าต้นยาสูบ โดยใช้ *Agrobacterium* ผลการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ในสารสกัดจากเซลล์ พบว่าต้นยาสูบที่มีพลาสมิด pCSK3F และ pCSK4F มีกิจกรรมของซิสเตอีนซินเตสมากกว่าต้นยาสูบพันธุ์เดิมและต้นยาสูบที่มี พลาสมิด pCSK3R 2 –3 เท่า ต้นยาสูบที่มีพลาสมิด pCSK4F มีกิจกรรมของซิสเตอีนซินเตสในคลอโรพลาสต์มากกว่าต้นยาสูบพันธุ์เดิม และต้นยาสูบที่มีพลาสมิด pCSK3F หลายเท่า แสดงว่าซิสเตอีนซินเตสได้ถูกขนส่งและไปสะสมในรูปที่สามารถทำงานได้ในคลอโรพลาสต์ เมื่อเติมโอ-แอซีทิล-แอล-เซอรีน และสารประกอบซัลเฟอร์ ที่คลอโรพลาสต์ของต้นยาสูบที่มีพลาสมิด pCSK4F มีการสังเคราะห์กรดอะมิโนซิสเตอีนได้มากกว่าที่คลอโรพลาสต์ ของต้นยาสูบพันธุ์เดิม ทั้งนี้เป็นเพราะกระบวนการ photoreduction ซัลไฟต์ของพืชเกิดที่คลอโรพลาสต์ การศึกษาเปรียบ เทียบความสามารถในการทนต่อพิษของซังไฟต์ของต้นยาสูบ โดยการนำชิ้นส่วนใบ (leaf discs) ของต้นยาสูบพันธุ์เดิมและต้นยาสูบทรานสฟอร์แมนท์มาเลี้ยงในอาหารที่มีการเติมสารประกอบซัลเฟอร์ชนิดต่างๆ พบว่าต้นยาสูบที่มีพลาสมิด pCSK4F สามารถทนต่อความเป็นพิษของซัลไฟต์ได้สูงขึ้นและสามารถสังเคราะห์กรดอะมิโนซิสเตอีนได้มากขึ้นด้วย แสดงว่าต้นยาสูบที่มี พลาสมิด pCSK4F สามารถลดความเป็นพิษของซัลไฟต์ได้ โดยนำซัลไฟต์ไปเป็นสับสเตรทในกระบวนการสังเคราะห์กรดอะมิโนซิสเตอีน

Murillo และคณะ (1995) โคลนยีนระบุรหัสเซอรีนแอซีทิลแทรนส์เฟอเรส (ยีน *SAT1)* จาก *A. thaliana* ขนาด 1079 เบส แปลรหัสเป็นโปรตีนขนาด 34 กิโลดาลตัน กรดอะมิโน 40 ตัวแรก ทำหน้าที่เป็น plastid transit peptide *A. thaliana* มียีน *SAT*1 เพียง 1 ชุดแสดงออกทั้งในราก และใบ

Noji และคณะ (1998) รายงานว่า *A. thaliana* มีเซอรีนแอซีทิลแทรนส์เฟอเรส 3 ไอโซฟอร์มคือ พลาสติดไอโซฟอร์ม (plastid isoform) , ไมโตคอนเดรียลไอโซฟอร์ม (mitochondrial isoform) และไซโตโซลิกไอโซฟอร์ม (cytosolic isoform) กิจกรรมของเซอรีนแอซีทิลแทรนส์เฟอเรสชนิดไมโตคอนเดรียลไอโซฟอร์ม และไซโตโซลิกไอโซฟอร์ม ถูกยับยั้งด้วยกรดอะมิโนซีสเตอีนที่สร้างขึ้นในขณะที่ชนิดพลาสติดไอโซฟอร์ม ได้แก่ยีน *SAT*1 ไม่อยู่ภายใต้การควบคุมแบบย้อนกลับ (feedback inhibition) โดยกรดอะมิโนซิสเตอีน

Inoue และคณะ (1999) ศึกษา ยีนระบุรหัสเซอรีนแอซีทิลแทรนส์เฟอเรสจากแตงโม (ยีน *WaSATase*) ซึ่งเป็นไอโซฟอร์มที่ถูกยับยั้งแบบย้อนกลับด้วยกรดอะมิโนซิสเตอีน พบว่าเมื่อเปลี่ยนกรดอะมิโนเมทไธโอนีน (methionine) ที่ตำแหน่ง Met280 ไปเป็นกรดอะมิโนไอโซลิวซีน (Isolucine) WaSATase ที่ได้จะไม่ถูกยับยั้งแบบย้อนกลับด้วยกรดอะมิโนซิสเตอีน และพบว่ากรดอะมิโน 5 ตัว ทางปลายด้านซี (C-terminus) คือกรดอะมิโนโพรลีน (proline) ที่ตำแหน่ง 276 ถึงกรดอะมิโนฟีนิลอะลานีน (phenylalanine) ที่ตำแหน่ง 285 ของ WaSATase ซึ่งต่างจากลำดับกรดอะมิโนของเซอรีนแอซีทิลแทรนส์เฟอเรสพลาสติดไอโซฟอร์ม (SAT-p) ของ *A. thaliana* นั้นมีผลทำให้ WaSATase ถูกยับยั้งแบบย้อนกลับด้วยกรดอะมิโนซิสเตอีน โดยเฉพาะอย่างยิ่งกรดอะมิโนไกลซีน (glycine) ที่ตำแหน่ง 277 นอกจากนั้นลำดับกรดอะมิโนทางปลายด้านเอ็น (N-terminal) ของ WaSATase ซึ่งไม่มีบริเวณเกิดปฏิกิริยา มีผลต่อความไว (sensitivity) ต่อการถูกยับยั้งแบบย้อนกลับโดยกรดอะมิโนซิสเตอีน จึงสรุปว่าการถูกยับยั้งแบบย้อนกลับและความไวต่อการถูกยับยั้งแบบย้อนกลับของเซอรีนแอซีทิลแทรนส์เฟอเรส โดยกรดอะมิโนซิสเตอีนนั้นเป็นผลมาจากลำดับกรด อะมิโนบริเวณปลายด้านเอ็นและปลายด้านซีไม่ใช่ที่บริเวณเกิดปฏิกิริยา

Yamaguchi และคณะ (1999) รายงานว่าการนำซัลเฟตมาใช้ในกระบวนการ sulfate assimilation ของ *A. thaliana* ถูกควบคุมในระดับของการถอดรหัสโดยภาวะขาดแคลนกำมะถัน ปริมาณ mRNA ซึ่งถอดรหัสจากยีนระบุรหัสซิสเตอีนซินเตสคลอโรพลาสต์ไอโซฟอร์มจะคงที่ถ้าได้รับแสง แต่จะเพิ่มขึ้นเล็กน้อยในที่มืด ปริมาณ mRNA ซึ่งถอดรหัสจากยีนระบุรหัสซิสเตอีนซินเตสไซโตพลาสซึมไอโซฟอร์มจะเพิ่มขึ้น 2.5 เท่า ถ้าได้รับแสง และจะเพิ่มขึ้น 2 เท่า ในที่มืด

ขณะที่ภาวะขาดแคลนกำมะถัน และการได้รับแสงหรือไม่ได้รับแสงไม่มีผลใด ๆ ต่อปริมาณ mRNA ซึ่งถอดรหัสจากยีนระบุรหัสซิสเตอีนซินเตสไมโตคอนเดรียลไอโซฟอร์ม นอกจากนั้น คณะผู้วิจัยยังรายงานว่า การตอบสนองของยีนระบุรหัสซิสเตอีนซินเตสต่อภาวะขาดแคลนกำมะถันจะเกิดเฉพาะในภาวะที่มีไนโตรเจนเท่านั้น

Nakamura และคณะ (1999) โคลนคอมพลีเมนทารีดีเอ็นเอ ซึ่งเป็นรหัสของซีสเตอีนซินเตส 4 ไอโซฟอร์มจากข้าวจ้าว *Oryza sativa* cv. Nipponbare คือ *rcs*1, *rcs*2 , *rcs*3 และ *rcs*4 จากลำดับกรดอะมิโนที่ทำนายจากลำดับนิวคลีโอไทด์ พบบริเวณอนุรักษ์คือ PXXSVKDR ซึ่งเป็นลำดับกรดอะมิโนเฉพาะของซีสเตอีนซินเตส โดยกลุ่ม ε amine ของไลซีนตำแหน่งที่ 6 ในบริเวณอนุรักษ์ดังกล่าวข้างต้นสามารถสร้างพันธะ imine กับกลุ่มแอลดีไฮด์ของไพรีดอกซอล 5'-ฟอสเฟตซึ่งเป็นโคแฟกเตอร์ นำไปสู่ปฏิกิริยาการสังเคราะห์กรดอะมิโนซิสเตอีนจากโอ-แอซีทิลเซอรีน และสารประกอบซัลไฟด์ ผลการวิเคราะห์ Molecular phylogenic พบว่า RCS1 และ RCS3 จัดอยู่ในกลุ่มไอโซฟอร์มที่พบในไซโตพลาสซึม ส่วน RCS2 และ RCS4 มีทรานซิตเปปไทด์ชนิดใหม่ที่แตกต่างจากทรานซิตเปปไทด์สำหรับไอโซฟอร์มที่พบในคลอโรพลาสต์หรือไมโตคอนเดรีย ดังนั้น Nakamura และคณะ (1999) เสนอว่า RCS2 และ RCS4 อาจเป็นไอโซฟอร์มกลุ่มใหม่ ผลการตรวจหา organ specificity ของกระบวนการถอดรหัสของแต่ละยีน และการตอบสนองต่อการขาดแคลนกำมะถัน ไนโตรเจน และแสง พบว่ายีน *rcs*1 ถอดรหัสในทุกส่วนของต้นข้าว การถอดรหัสของยีน *rcs*1 ทั้งที่ต้นและรากถูกเหนี่ยวนำได้โดยภาวะการขาดกำมะถัน แต่มีไนโตรเจน ยีน *rcs*2 ถอดรหัสที่ต้นเฉพาะเมื่อเจริญในที่ที่มีแสงเท่านั้น ยีน *rcs*3 ถอดรหัสที่รากได้มากกว่าที่ต้น การถอดรหัสจะลดลงในที่มืด ในภาวะที่ขาดกำมะถันร่วมกับไนโตรเจน แทบจะไม่พบการถอดรหัสของยีน *rcs*4 ในทุกส่วนของต้นข้าว ผลการทดลองที่ได้แสดงว่ายีนเหล่านี้ระบุรหัสซิสเตอีนซินเตสต่างไอโซฟอร์ม และต่างถูกควบคุมโดยปริมาณกำมะถัน ไนโตรเจน และแสง

Koprivova และคณะ (2000) ศึกษาการดูดซับซัลเฟตของ *A. thaliana* โดยการติดฉลากซัลเฟตด้วย ^{35}S และรายงานว่า การเติมโอ-แอซีทิล-แอล-เซอรีน ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ของเซอรีนแอซีทิลแทรนส์เฟอเรสให้กับ *A. thaliana* ที่เจริญในภาวะขาดไนโตรเจน ทำให้กรดอะมิโนซิสเตอีนที่ติดฉลากด้วย ^{35}S เพิ่มขึ้น นอกจากนี้ยังมีผลให้ปริมาณ mRNA ของเอพีเอสรีดักเตส ทั้ง 3 ไอโซฟอร์ม ซัลไฟต์รีดักเตส ซีสเตอีนซินเตสและเซอรีนแอซีทิลแทรนส์เฟอเรสเพิ่มมากขึ้น จึงสรุปว่าโอ-แอซีทิล-แอล-เซอรีนควบคุมกระบวนการ sulfate assimilation ที่ระดับการถอดรหัส (transcriptional level)

Harms และคณะ (2000) ถ่ายโอนยีนระบุรหัสเซอรีนแอซีทิลแทรนส์เฟอเรสของ *E.coli* เข้าสู่มันฝรั่ง มันฝรั่งแปลงพันธุ์ที่ได้มีการสะสม mRNA ของเซอรีนแอซีทิลแทรนส์เฟอเรสในปริมาณสูง และปริมาณกรดอะมิโนซิสเตอีนที่เพิ่มขึ้นไม่ไปยับยั้งแบบย้อนกลับต่อกิจกรรมของซิสเตอีนซินเตส

Urano และคณะ (2000) รายงานผลการโคลนคอมพลีเมนทารีดีเอ็นเอ ซึ่งระบุรหัสเซอรีนแอซีทิลแทรนส์เฟอเรส และซิสเตอีนซินเตสจากต้น *Allium tuberosum* (Chinese chive) ซึ่งพืชในสกุล *Allium* นี้มีความสามารถในการสะสมสารเมตาโบไลต์ซึ่งมีสารประกอบซัลเฟอร์ที่สังเคราะห์มาจากกรดอะมิโนซิสเตอีนในปริมาณสูง คอมพลีเมนทารีดีเอ็นเอซึ่งระบุรหัสเซอรีนแอซีทิลแทรนส์เฟอเรสแปลรหัสเป็นกรดอะมิโนได้ 289 ตัว สามารถแสดงออกใน *E. coli* สายพันธุ์กลายซึ่งยีน *cys*E ซึ่งระบุรหัสเซอรีนแอซีทิลแทรนส์เฟอเรสไม่สามารถแสดงออก ส่วนคอมพลีเมนทารีดีเอ็นเอซึ่งระบุรหัสซิสเตอีนซินเตสแปลรหัสเป็นกรดอะมิโนได้ 325 ตัว สามารถแสดงออกใน *E. coli* สายพันธุ์กลายที่ยีนระบุรหัสซิสเตอีนซินเตสไม่สามารถแสดงออก โดยทำให้ *E. coli* สายพันธุ์กลายข้างต้นสามารถเจริญบนอาหารที่ไม่เติมกรดอะมิโนซิสเตอีนได้ จากข้อมูลลำดับกรดอะมิโนที่ทำนายจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของคอมพลีเมนทารีดีเอ็นเอพบว่าเป็นไอโซฟอร์มที่อยู่ในไซโตพลาสซึม ผลการวิเคราะห์โดยวิธี Northern hybridization พบว่ายีนทั้งคู่ถอดรหัสในปริมาณที่เกือบเท่ากันในใบ ราก และต้นกล้าของ *A. tuberosum* กิจกรรมของเซอรีนแอซีทิลแทรนส์เฟอเรสซึ่งแปลรหัสจากคอมพลีเมนทารีดีเอ็นเอที่โคลนได้ถูกยับยั้งโดย แอล-ซิสเตอีน แต่ความไวต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับพืชอื่น ๆ ที่เคยมีผู้รายงานไว้ กล่าวคือแอล-ซิสเตอีน 48.7 ไมโครโมลาร์ จึงจะสามารถยับยั้ง 50 เปอร์เซ็นต์ ของกิจกรรมของเซอรีนแอซีทิลแทรนส์เฟอเรสของ *A. tuberosum* (IC_{50} เท่ากับ 48.7 ไมโครโมลาร์) ในขณะที่พืชชนิดอื่นๆ มีค่า IC_{50} ประมาณ 5 ไมโครโมลาร์เท่านั้น กิจกรรมของซิสเตอีนซินเตสไม่ถูกยับยั้งโดยกรดอะมิโนซิสเตอีนแม้ว่าจะมีปริมาณกรดอะมิโนซิสเตอีนมากกว่า 100 ไมโครโมลาร์ ผู้วิจัยสรุปว่าการที่เซลล์ของ *A. tuberosum* มีปริมาณกรดอะมิโนซิสเตอีนมากกว่าในเซลล์ของ *A. thaliana* และต้นยาสูบหลายเท่านั้นเป็นเพราะเซอรีนแอซีทิลแทรนส์เฟอเรสของ *A. tuberosum* มีความไวต่ำต่อการถูกยับยั้งกิจกรรมโดยกรดอะมิโนซิสเตอีน

อังคณา โพธิ์ไกร (2545) รายงานว่าผักบุ้ง (*Ipomoea aquatica*) แปลงพันธุ์ที่มียีนระบุรหัสซิสเตอีนซินเตสจากข้าวจ้าว *Oryza sativa* (ยีน *rcs*1) สามารถดูดซับซัลเฟตได้มากกว่าผักบุ้งพันธุ์เดิม 2 เท่า

การปรับปรุงพันธุ์พืชโดยวิธีทางพันธุวิศวกรรมอาจทำโดยการถ่ายโอนยีนโดยตรง เช่น วิธีอิเล็กโทรพอเรชัน (Electroporation) วิธีการใช้เข็มฉีด (Microinjection) หรือวิธีการใช้เครื่องยิง (Microprojectile bombardment) และทำการถ่ายโอนยีนโดยวิธีการใช้ *Agrobacterium* ซึ่งวิธีการใช้ *Agrobacterium* นี้ ใช้ได้ผลดีกับพืชใบเลี้ยงคู่ (dicotyledons) และเป็นวิธีที่นิยมใช้มากที่สุด *Agrobacterium tumefaciens* เป็นแบคทีเรียแกรมลบอาศัยอยู่ในดิน สามารถเข้าสู่เซลล์พืชได้ทางบาดแผล ทำให้พืชมีลักษณะเป็นปุ่มปม เรียกว่า Crown gall disease (Sahi และคณะ, 1994) ทั้งนี้เพราะ *A. tumefaciens* สามารถถ่ายโอนยีนส่วน T-DNA จาก Ti plasmid เข้าสู่โครโมโซมของพืช ยีนส่วน T-DNA มียีนระบุรหัสโปรตีนในกระบวนการสังเคราะห์ฮอร์โมนพืชชนิดออกซิน (auxins) และ ไซโตไคนิน (cytokinins) จึงทำให้เซลล์พืชแบ่งตัวรวดเร็วและไม่จำกัด เกิดเป็นปุ่มปมหรือก้อนเนื้องอก หลักการถ่ายโอนยีนเข้าสู่เซลล์พืชโดยวิธีการใช้ *Agrobacterium* ทำโดยการกำจัดยีน ระบุรหัสฮอร์โมนพืชออกจากยีนส่วน T-DNA แล้วนำยีนที่ต้องการถ่ายโอนเข้ามาสอดแทรกแทน เมื่อยีนส่วน T-DNA สอดแทรกเข้าไปในโครโมโซมของพืช ยีนที่ต้องการถ่ายโอนก็จะถูกนำเข้าไปด้วย James และคณะ (1993) รายงานว่าอะซิโตไซริงโอน (acetosyringone) สามารถเร่งการถ่ายโอนยีนเข้าสู่เซลล์พืชโดยวิธีการใช้ *A. tumefaciens*

Hood และคณะ (1986) ได้สร้างพลาสมิดชนิดไบนารีประกอบด้วย พลาสมิดสำหรับสร้างเป็นพลาสมิดซึ่งมียีนส่วน T-DNA และในบริเวณยีนส่วน T-DNA มียีนต้านต่อสารปฏิชีวนะและพลาสมิดดัดแปลง Ti ซึ่งมีกลุ่มยีน *vir* เรียกพลาสมิดชนิดนี้ว่า pEHA101 และเรียก *A. tumefaciens* ที่มีพลาสมิด pEHA101 นี้ว่า *A. tumefaciens* EHA101 ต่อมา Kimura และคณะ (1993) ได้สร้างพลาสมิด pBIH1-IG(SX) ซึ่งเป็นพลาสมิดชนิดไบนารีชนิดที่มียีนส่วน T-DNA และมียีนต้านสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินและกานามัยซินอยู่ในบริเวณ T–DNA พลาสมิดที่สร้างจาก pBIH1-IG(SX) เมื่อนำมาถ่ายโอนเข้าสู่ *A. tumefaciens* EHA101 พบว่าทรานสฟอร์แมนท์ *A. tumefaciens* EHA101 ที่ได้มีประสิทธิภาพในการถ่ายโอนยีนสอดแทรกบนพลาสมิดเข้าสู่โครโมโซมของ *A. thaliana* และข้าวสูง (Hiei และคณะ, 1994)

Akaracharanya และคณะ (2001) ศึกษาการงอกใหม่ของต้นอ่อน (shoot regeneration) ของผักบุ้งจีน พบว่าบริเวณโคนใบพร้อมก้านใบของใบเลี้ยง (cotyledon explants) สามารถงอกเป็นต้นใหม่ได้ในปริมาณสูงถึง 75 เปอร์เซ็นต์ เมื่อใช้ต้นอ่อนอายุ 7 วัน และใช้ไธเดียซูรอน (Thidiazuron) ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ ในการเร่งการพัฒนาเป็นต้นอ่อน ต้นอ่อนของผักบุ้งจีนที่ได้สามารถงอกรากได้เองโดยไม่จำเป็นต้องใช้สารเร่งการงอกราก งานวิจัยนี้จะใช้ *Agrobacterium tumefaciens* EHA101 ถ่ายโอนยีนเข้า cotyledon explants ของผักบุ้งจีน