นิพนธ์ต้นฉบับ

ผลของสารปฏิชีวนะซีโฟทาซิม และคานามัยซินต่อการสร้างแคลลัส และพัฒนาการเป็นพืชต้นใหม่จากใบและแคลลัสมังคุด

สมปอง เตชะโต[1] วิทูล ไชยภักดี [2] และ เริ่มอรุณ รักเผือก[2]

Abstract

Te-chato, S., Chaiparkdee, W. and Rugpheug, R.

Effect of antibiotic cefotaxime and kanamycin on callus formation and plantlet regeneration from leaves and callus of mangosteen

Songklanakarin J. Sci. Technol., 2002, 24(4) : 561-568

In order to get rid of contamination from *Agrobacterium tumefaciens*, the bacterium employed in gene transformation, various kinds and concentrations of antibiotics were added singly or in combinations. In this investigation, concentrations of cefotaxime and kanamycin were examined for callus formation and regenerability from leaves and callus. The results showed that cefotaxime at the concentration of up to 300 mg/l gave a non-significant difference in callus formation. In the case of direct shoot bud formation,

Department of Plant Science, Faculty of Natural Resources, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla 90112 Thailand.

[1]Ph.D. (Plant Cell Technology) รองศาสตราจารย์ [2]วท.ม. (พืชศาสตร์) ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา 90112

Corresponding e-mail : tesompon@ratree.psu.ac.th

รับต้นฉบับ 29 มีนาคม 2545 รับลงพิมพ์ 28 พฤษภาคม 2545

concentration over 100 mg/l drastically reduced percentage of leaf-forming shoot buds. The calli which were cultured continuously in 300 mg/l cefotaxime-containing medium for 6 passages gave callus forming shoot buds of 35%. Higher concentration of cefotaxime drastically decreased bud formation. In the case of kanamycin, callus could be induced and maintained in the medium supplemented with a lower concentration than cefotaxime. However, the callus could not be maintained after 3 subculturings.

Key words : mangosteen, cefotaxime, kanamycin, callus formation, plantlet regeneration

บทคัดย่อ

สมปอง เตชะโต วิทูล ไชยภักดี และ เริ่มอรุณ รักเผือก

ผลของสารปฏิชีวนะซีโฟทาซิม และคานามัยซินต่อการสร้างแคลลัสและพัฒนาการเป็นพืชต้นใหม่จากใบและแคลลัสมังคุด

ว. สงขลานครินทร์ วทท. 2545 24(4) : 561-568

เพื่อป้องกันกำจัดเชื้ออะโกรแบคทีเรีย (*Agrobacterium tumefaciens*) ซึ่งนิยมใช้เป็นตัวกลางในการปลูกถ่ายยีน มักใช้สารปฏิชีวนะชนิดและความเข้มข้นต่าง ๆ เดี่ยว ๆ หรือใช่ร่วมกัน ในการศึกษานี้ได้ทดสอบสารปฏิชีวนะซีโฟทาซิมและคานามัยซินความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อความสามารถในการสร้างแคลลัส และการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่จากใบ และแคลลัส ผลการศึกษา พบว่า ซีโฟทาซิมความเข้มข้นสูงถึง 300 มก./ล. ให้ผลการส้างแคลลัสไม่มีความแตกต่างทางสถิติกับหน่วยทดลองเปรียบเทียบ ในกรณีการชักนำยอดโดยตรงจากใบอ่อนนั้น พบว่า ความเข้มข้นที่สูงกว่า 100 มก./ล. ส่งผลให้การสร้างยอดลดลงมาก สำหรับแคลลัสที่เลี้ยงในอาหารเติมซีโฟทาซิมความเข้มข้น 300 มก./ล. อย่างต่อเนื่องเป็นเวลา 6 ครั้งการย้ายเลี้ยง ให้การสร้างยอดลดลงเหลือเพียง 35% ความเข้มข้นที่สูงกว่านี้ทำให้การสร้างยอดลดลงอย่างรุนแรง สำหรับการศึกษาความต้านทานต่อคานามัยซินนั้นพบว่า ทั้งแคลลัสและใบ ทนทานต่อคานามัยซินความเข้มข้นที่ต่ำกว่าซีโฟทาซิม อย่างไรก็ตามที่ความเข้มข้นต่ำก็ไม่สามารถดูแลรักษาแคลลัสเป็นเวลานานกว่า 3 ครั้งการย้ายเลี้ยง

การใช้สารปฏิชีวนะร่วมกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อนั้นมีวัตถุประสงค์ที่สำคัญ 3 ประการด้วยกันคือ ป้องกันการปนเปื้อน ช่วยกระตุ้นการเกิดสัณฐานในเนื้อเยื่อพืช และใช้เป็นเครื่องหมายในการคัดเลือก (สมปอง, 2530) สารปฏิชีวนะที่นิยมใช้ในการเพาะเลี้ยงแต่ละกลุ่มมีความจำเพาะและ แตกต่างกันบ้างเล็กน้อย โดยทั่วไปแล้วสารปฏิชีวนะระดับความเข้มข้นต่ำส่งเสริมการแบ่งเซลล์จากชิ้นส่วนที่เพาะเลี้ยงรวมทั้งแคลลัส นอกจากนี้ยังส่งเสริมการพัฒนาของต้นอ่อนโดยกระบวนการเอ็มบริโอเจนีซีส (Owens, 1979)

ปัจจุบันเทคโนโลยีชีวภาพการปลูกถ่ายยีนเข้ามามีบทบาทต่อการปรับปรุงพันธุ์พืชมาก โดยเฉพาะการปลูกถ่ายยีนผ่านอะโกรแบคทีเรีย เมื่อใช้แบคทีเรียปลูกถ่ายให้กับชิ้นส่วน หรือเซลล์พืชแล้วมีความจำเป็นต้องกำจัดอะโกรแบคทีเรียส่วนเกินออก มิฉะนั้นมีผลยับยั้งการพัฒนาของชิ้นส่วนและเซลล์ที่เพาะเลี้ยง Shackelford และ Chlan (1996) ศึกษาผลของสารปฏิชีวนะ 10 ชนิดต่อความสามารถในการกำจัดเชื้อ *Agrobacterium tumefaciens* สายเชื้อ EHA101 และ LBA4404 หลังการปลูกถ่ายยีน พบว่าซีโฟทาซิมมีประสิทธิภาพสูงสุดในการกำจัดเชื้อ LBA4404 ในขณะที่โมซาแลคแทมกำจัดเชื้อ EHA101 ได้ดีที่สุด ความเข้มข้นที่เหมาะสมนั้นอยู่ในช่วง 100-200 มก./ล. และเมื่อเขาทดสอบผลของสารปฏิชีวนะทั้งสองต่อการสร้างแคลลัสยาสูบ พบว่าระดับความเข้มข้นดังกล่าวให้ผลไม่แตกต่างกับการไม่ใช้ และไม่มีผลต่อการพัฒนาของแคลลัสไปเป็นพืชต้นใหม่ Hammerschlag และ

คณะ (1997) รายงานการใช้สารปฏิชีวนะชนิดต่างๆ เดี่ยวๆ หรือร่วมกันในช่วงเวลา 52 วัน ในสภาพความเป็นกรด (pH 3.0) เพื่อกำจัดสายเชื้อต่างๆ ของอะโกรแบคทีเรีย (*Agrobacterium tumefaciens*) และผลต่อการพัฒนาของยอดจากชิ้นส่วนแอปเปิ้ลพันธุ์โรแยลกาลา (*Malus domestica* (*M. pumila*) ว่าสารปฏิชีวนะทั้งหมดไม่สามารถกำจัดเชื้อจากชิ้นส่วนที่เลี้ยงได้ 100% นอกจากนี้ ยังพบว่า การให้สารในระยะสั้นภายใต้ระบบสูญญากาศให้ผลเช่นเดียวกัน แต่สารปฏิชีวนะที่ทดสอบไม่มีผลต่อความสามารถในการสร้างยอด Yepes และ Aldwinckle (1994) ศึกษาผลของสารปฏิชีวนะต่อการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่จากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบของแอปเปิ้ลพันธุ์ที่ใช้เป็นต้นตอจำนวนมาก พบว่า ซีโฟทาซิมเข้มข้น 250 มก./ล. ส่งเสริมการสร้างยอด ในขณะที่คาเบนิซิลินเข้มข้น 500 มก./ล. ส่งเสริมการสร้างแคลลัส ยับยั้งการสร้างยอด สารปฏิชีวนะทั้งสองชนิดใช้กันทั่วไปในการกำจัดอะโกรแบคทีเรียเพื่อปลูกถ่ายยีนแอปเปิ้ล ส่วนคานามัยซินซึ่งนิยมใช้เพื่อการคัดเลือกมีผลยับยั้งการสร้างยอดอย่างรุนแรง นอกจากนี้ยังศึกษาผลของสารปฏิชีวนะทั้ง 3 ชนิดข้างต้นต่อการพัฒนา การเพาะเลี้ยงปลายยอด พบว่า ซีโฟทาซิม 250 มก./ล. ส่งเสริมการพัฒนาของยอด เมื่อเพิ่มความเข้มข้นเป็น 500 มก./ล. ทำให้ยอดที่พัฒนาผิดปกติ ส่วนการใช้คาเบนิซิลิน 500 มก./ล. เพียงลำพังหรือใช่ร่วมกับซีโฟทาซิม 200 มก./ล. ยับยั้งการสร้างยอด และการพัฒนาของใบ นอกจากนี้ยังส่งเสริมการสร้างแคลลัสและสารประกอบฟีโนล คานามัยซินเข้มข้น 50 มก./ล. ทำให้เกิดอาการเป็นพิษของใบอย่างไรก็ตามความสามารถในการทนทานต่อสารปฏิชีวนะนั้นขึ้นอยู่กับพันธุ์ และชิ้นส่วนพืชที่เลี้ยง Lowe และคณะ (1993) ทดสอบการใช้ซีโฟทาซิมความเข้มข้นต่างๆ เพื่อกำจัดเชื้ออะโกรแบคทีเรียหลังการปลูกถ่ายยีนให้กับชิ้นส่วนลำต้นเบญจมาศ และพบว่าชิ้นส่วนลำต้นทนทานต่อซีโฟทาซิมสูงถึง 500 มก./ล.

ในบทความนี้เป็นการศึกษาการตรวจสอบการทนทานต่อสารปฏิชีนะซีโฟทาซิม และคานามัยซินจากการเพาะเลี้ยงใบ และแคลลัสมังคุดเพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการปลูกถ่ายยีนให้กับมังคุดผ่านอะโกรแบคทีเรียเพื่อปรับปรุงพันธุ์มังคุด ซึ่งไม่สามารถปรับปรุงพันธุ์โดยวิธีการมาตรฐานได้สำเร็จ

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

วัสดุพืช

ในการศึกษานี้ใช้ยอดรวมมังคุด ซึ่งพัฒนาจากแคลลัสที่ชักนำจากใบ วางเลี้ยงในขวดทดลองบนอาหาร 2 ชั้น ชั้นล่างเป็นอาหารวุ้น สูตร WPM เติม โพลีไวนิลไพโรลิโดน (PVP) ความเข้มข้น 500 มก./ล. น้ำตาลซูโครส 3% วุ้นเจลไรท์ 0.20% BA ความเข้มข้น 0.1 มก./ล. ชั้นบน คือ อาหารเหลวสูตร $^1/_2$ MS เติมน้ำตาลซูโครส 3% BA ความเข้มข้น 0.03 มก./ล. NAA ความเข้มข้น 0.06 มก./ล. และ PVP ความเข้มข้น 500 มก./ล. เพื่อส่งเสริมการยืดยาวของยอด วางเลี้ยงภายใต้ความเข้มแสง 2,800 ลักซ์ อุณหภูมิ 262 ^oC ให้แสง 14 ชั่วโมง เป็นระยะเวลา 3 ปี โดยย้ายเลี้ยงเดือนละครั้ง

สูตรอาหารและวิธีการเตรียม

สูตรอาหารที่ใช้ในการศึกษามีอยู่ด้วยกันหลายสูตร สามารถแยกเป็น 2 กลุ่ม คือ

1. สูตรอาหารชักนำยอดโดยผ่านการสร้างแคลลัส

1.1 สูตรอาหารชักนำแคลลัสจากใบอ่อน อาหารแข็งและอาหารเหลวสูตรพื้นฐาน มูราชิกและสกุค (MS) เติม BA 0.5 มก./ล. ไธไดอะซูรอน (TDZ) 0.5 มก./ล. น้ำตาลซูโครส 3% PVP 500 มก./ล. และไฟตาเจล 0.15%

1.2 สูตรอาหารชักนำจุดกำเนิดตายอด อาหารสูตร WPM เติม BA 0.1 มก./ล. น้ำตาลซูโครส 3% PVP 500 มก./ล. และไฟตาเจล 0.25%

2. สูตรอาหารแข็งชักนำยอดโดยตรงจากใบ อาหารแข็งสูตร WPM เติมน้ำตาลซูโครส 3% BA 5 มก./ล. และวุ้นไฟตาเจล 0.25%

สูตรอาหารทั้งหมดปรับความเป็นกรด-ด่าง 5.7 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 1.05 กก./ตร.ซม. อุณหภูมิ 121 ^oC เป็นเวลา 15 นาที ในกรณีที่มีการทดสอบความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะซีโฟทาซิม และคานามัยซิน เตรียมสารละลายของสารปฏิชีวนะความเข้มข้นสูง 10,000 มก./ล. แล้วทำให้ปลอดเชื้อโดยการกรองผ่านแผ่นกรองมิลลิพอร์ขนาดช่อง 0.45 ไมครอน จากนั้นดูดใส่ในอาหารในขณะที่

ยังอุ่นอยู่ ปริมาตรของสารที่เติมปรับให้ได้ความเข้มข้นตามที่ต้องการ แบ่งถ่ายใส่ภาชนะที่ต้องการเลี้ยงต่อไป

1. การศึกษาความเข้มข้นของซีโฟทาซิมต่อการสร้างแคลลัสและการสร้างยอดจากใบอ่อน

ตัดใบอ่อนสีแดงทั้งใบจากยอดรวมซึ่งวางเลี้ยงในอาหาร 2 ชั้น ไปเลี้ยงบนอาหารสูตร 1.1 หรือ สูตร 2 (ในกรณีการชักนำยอดโดยตรงจากใบ) เติมซีโฟทาซิมเข้มข้น 0, 50, 100, 200, 400 มก./ล. วางเลี้ยงภายใต้สภาพความเข้มแสง 2,500 ลักซ์ 14 ชั่วโมง/วัน อุณหภูมิ 262 °C หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน ทำการบันทึกผลการสร้างแคลลัส และ การสร้างยอดโดยตรงจากใบที่เพาะเลี้ยง ย้ายแคลลัสที่ชักนำได้ไปเลี้ยงบนอาหารใหม่สูตรเดิม (สูตร 1.1) เดือนละครั้ง เป็นเวลา 2 เดือน ส่วนใบที่สร้างยอดย้ายไปเลี้ยงในอาหารสูตรเลี้ยงไม้เนื้อแข็ง (WPM) ลดความเข้มข้นของ BA ลงเหลือ 0.1 มก./ล. เปรียบเทียบการสร้างแคลลัสและยอดในแต่ละหน่วยทดลองโดยใช้แผนการทดลองแบบสุ่มตลอด เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT แต่ละความเข้มข้นของซีโฟทาซิมทำ 3 ซ้ำ แต่ละซ้ำประกอบด้วยจานเพาะเลี้ยงที่เลี้ยงใบจำนวน 20 ใบ

2. ผลของซีโฟทาซิมต่อการสร้างยอดจากโนดูลาแคลลัส

ในการศึกษานี้ใช้แคลลัสที่ชักนำจากใบอ่อนสีแดงมังคุดบนอาหารสูตรชักนำแคลลัส ซึ่งเป็นสูตร MS เติมน้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 3% PVP 500 มก./ล. BA 0.5 มก./ล. TDZ 0.5 มก./ล. (สูตร 1.1) เพิ่มปริมาณแคลลัสที่ชักนำได้ในอาหารสูตรเดิม 3 ครั้ง (ย้ายเลี้ยง 3 สัปดาห์/ครั้ง) เป็นเวลา 9 สัปดาห์ จึงย้ายไปเลี้ยงในอาหารใหม่สูตรเดิมเติมซีโฟทาซิมเข้มข้น 0, 50, 100, 200, 300, 400 และ 500 มก./ล. สูตรอาหารดังกล่าวทำให้แข็งโดยวุ้นไฟตาเจล 0.15% หลังจากเพาะเลี้ยงใบเป็นเวลา 3 สัปดาห์ ย้ายแคลลัสที่ชักนำได้ไปเลี้ยงในอาหารใหม่สูตรเดิม ดูแลแคลลัสในอาหารสูตรนี้ในสภาพที่เติมสารปฏิชีวนะซีโฟทาซิมเป็นเวลา 12 สัปดาห์ (ย้ายเลี้ยงทุก 3 สัปดาห์) เมื่อโนดูลาแคลลัสพัฒนาให้เห็นย้ายแคลลัสไปเลี้ยงในอาหารสูตรชักนำการสร้างตายอดซึ่งเป็นอาหารเลี้ยงไม้เนื้อแข็ง (WPM) เติมน้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 3% PVP 500 มก./ล. BA 0.1 มก./ล. (สูตร 1.2) และซีโฟทาซิม 6 ระดับความเข้มข้นข้างต้น เติมวุ้นไฟต้าเจล 0.25% เพาะเลี้ยงภายใต้การให้แสงความเข้ม 1,800 ลักซ์ เวลาที่ได้รับแสง 14 ชั่วโมง อุณหภูมิ 25±1 °C หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 สัปดาห์ (โดยย้ายเลี้ยงทุก 3 สัปดาห์) ตรวจสอบการรอดชีวิตของแคลลัส และความสามารถในการสร้างตายอดบนอาหารชักนำตายอด ในทำนองเดียวกับแคลลัสที่เลี้ยงในอาหารเพิ่มปริมาณแคลลัสหลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 12 สัปดาห์ ตรวจสอบการรอดชีวิตเปรียบเทียบกันในแต่ละความเข้มข้นของซีโฟทาซิมโดยใช้แผนการทดลองแบบสุ่มตลอด วิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยใช้ Duncan's multiple range test (DMRT)

3. ผลของคานามัยซินต่อการสร้างแคลลัส และพัฒนาการเป็นพืชต้นใหม่

ตัดแยกใบอ่อนจากกลุ่มยอดรวมที่ดูแลในอาหารสองชั้น และแคลลัสที่ดูแลรักษาในอาหารชักนำแคลลัส (สูตร 1.1) ไปวางเลี้ยงบนอาหารสูตรเดิม เติมคานามัยซินเข้มข้น 0, 50, 100, 150, 200 และ 250 มก./ล. และเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 สัปดาห์ จึงย้ายไปเลี้ยงในอาหารใหม่สูตรเดิม 3 ครั้ง เมื่อสิ้นสุดเวลาการเลี้ยง ตรวจผลความสามารถในการสร้างแคลลัส และความมีชีวิตของแคลลัส ตลอดจนความสามาถในการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่เปรียบเทียบกันในแต่ละความเข้มข้นของคานามัยซินโดยใช้แผนการทดลองแบบสุ่มตลอด

ผลและวิจารณ์

1. การศึกษาความเข้มข้นของซีโฟทาซิมต่อการสร้างแคลลัสและยอดจากใบอ่อน

จากการศึกษาการใช้ใบอ่อนสีแดงทั้งใบมาวางเลี้ยงบนอาหารชักนำการสร้างแคลลัส สูตรที่ 1.1 เติมซีโฟทาซิมเข้มข้น 0, 50, 100, 200 และ 400 มก./ล. เป็นเวลา 3 สัปดาห์ พบว่า ใบที่วางเลี้ยงในอาหารที่ไม่เติมซีโฟทาซิมสามารถสร้างแคลลัสได้สูงที่สุด 95% ไม่แตกต่างทางสถิติกับการเติมซีโฟทาซิม 50, 100 และ 200 มก./ล. ซึ่งสร้างแคลลัสได้ 87, 87 และ 82% ตามลำดับ ในขณะที่แคลลัสที่ได้จากการวางเลี้ยงใบบนอาหารที่เติมซีโฟทาซิม 400 มก./ล. ให้การสร้างแคลลัสต่ำสุด 67% มีความแตกต่างทางสิถิติกับหน่วยทดลองอื่น (Table 1) ลักษณะ

Table 1. Effect of cefotaxime at various concentrations in MS medium supplemented with 0.5 mg/l BA and 0.5 mg/l TDZ on percentage of leaf forming callus and number of brown leaves.

cefotaxime (mg/l)	leaf forming callus (%) week 3	week 6	number of brown leaves
0	100	95a	1
50	100	87ab	5
100	100	87ab	5
200	100	82ab	8
300	100	80ab	7
400	97.5	67b	10
F-test	**ns**	*****	
C.V. (%)		**10.16**	

ns: no significant difference ; * significant difference at P<0.05
Means not sharing common letter within columns differ significantly by DMRT.

ของแคลลัสที่ได้ในอาหารเติมซีโฟทาซิม 0, 50, และ 100 มก./ล. มีลักษณะเหมือนกันมีสีเขียวอมเหลือง เป็นแคลลัสชนิดที่เกาะตัวกันแน่น แต่ใบที่วางเลี้ยงบนอาหารที่เติมซีโฟทาซิมได้จากความเข้มข้น 200 และ 400 มก./ล. มีอาการใบไหม้มากกว่าที่ระดับความเข้มข้นอื่นๆ หลังจากย้ายใบไปเลี้ยงในอาหารสูตร 1.2 เติมซีโฟทาซิมความเข้มข้นระดับต่างๆ เพื่อชักนำการสร้างยอด พบว่ามีการพัฒนาช้าและได้ยอดเพียง 3 และ 1% ในอาหารเติมซีโฟทาซิม 200 และ 400 มก./ล. ตามลำดับ และยอดที่ได้มีลักษณะไม่สมบูรณ์แสดงอาการแคระแกรน ส่วนแคลลัสที่ได้จากการเลี้ยงในอาหารที่เติมซีโฟทาซิมความเข้มข้นอื่นๆ สามารถพัฒนาไปเป็นยอดได้ไม่แตกต่างกัน

สำหรับการศึกษาการใช้ใบอ่อนสีแดงทั้งใบไปเพาะเลี้ยงบนอาหารชักนำการสร้างยอดโดยตรงจากใบ (สูตรที่ 2) เติมซีโฟทาซิมเข้มข้น 0, 50, 100, 200 และ 400 มก./ล. เป็นเวลา 1 เดือน พบว่าใบที่วางเลี้ยงบนอาหารที่เติมซีโฟทาซิมเข้มข้น 50 มก./ล. ให้การสร้างยอดได้สูงสุด 38% รองลงมาคือ ใบซึ่งเพาะเลี้ยงบนอาหารที่ไม่เติมซีโฟทาซิม และเติมซีโฟทาซิม 100 มก./ล. ซึ่งสร้างยอดได้ 35 และ 32% ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ในขณะยอดที่ได้จากการวางเลี้ยงบนอาหารที่เติมซีโฟทาซิม 200 และ 400 มก./ล. สร้างยอดได้ 20 และ 22% ตามลำดับ มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่งกับหน่วยทดลองอื่นๆ และ พบว่า ใบที่วางเลี้ยงบนอาหารที่เติมซีโฟทาซิมเข้มข้น 200 และ 400 มก./ล. แสดงอาการไหม้สูงกว่าที่ระดับความเข้มข้นอื่นๆ (Table 2) อย่างไรก็ตามจำนวนยอดที่สร้างในอาหารเติมซีโฟทาซิมเข้มข้นทุกระดับความเข้มข้นมีประมาณ 1-4 ยอดต่อใบ ไม่แตกต่างกัน และมีใบบางส่วนที่มีการพัฒนาการของจุดกำเนิดตายอดช้า เมื่อมองดูด้วยสายตามีลักษณะเหมือนการสร้างแคลลัสแต่เมื่อดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอกำลังขยาย 6.25 เท่า พบว่ากลุ่มเซลล์ดังกล่าวเป็นจุดกำเนิดตายอดซึ่งหลังจากย้ายเลี้ยงต่อไปพบว่า กลุ่มเซลล์ดังกล่าวมีการพัฒนาไปเป็นยอดได้

2. ผลของซีโฟทาซิมต่อการสร้างยอดจากโนดูลาแคลลัส

ผลการเลี้ยงแคลลัสที่ชักนำจากใบอ่อนมังคุดในอาหารเติมซีโฟทาซิมความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 6 สัปดาห์ พบว่าซีโฟทาซิมความเข้มข้นตั้งแต่ 50 ถึง 400 มก./ล. ไม่มีผลในการยับยั้งการพัฒนาของแคลลัส แคลลัสมีชีวิตรอด 100% ในสัปดาห์ที่ 3 หลังการเลี้ยง ในขณะที่ความเข้มข้น 400 มก./ล. ส่งผลให้มีการตายของแคลลัสเพียงเล็กน้อย (2.5%) ไม่มีความแตกต่างทางสถิติกับหน่วยทดลองเปรียบเทียบ ในทำนองเดียวกับการย้ายเลี้ยงครั้งที่

Table 2. Effect of cefotaxime at various concentrations in WPM supplemented with 5 mg/l BA on direct shoot bud formation.

Cefotaxime (mg/l)	leaf forming callus (%)	leaf forming shoot (%)	number of brown leaf
0	1	35a	2
50	2	38a	5
100	1	32ab	4
200	1	20b	8
300	1	20b	10
400	1	22b	11
F-test		**	
C.V. (%)		**13.67**	

**** significant difference at P<0.01**
Means not sharing common letter within columns differ significantly by DMRT.

2 ในอาหารสูตรเดิมซึ่งเพาะเลี้ยงต่อมาอีกเป็นเวลา 3 สัปดาห์ พบว่า การรอดชีวิตของแคลลัสยังคงไม่เปลี่ยนแปลง อย่างไรก็ตามเมื่อย้ายแคลลัสไปในอาหารชักนำตายอด (สูตร 1.2) และเลี้ยงต่อมาเป็นเวลา 6 สัปดาห์ พบว่า การตายของแคลลัสเพิ่มมากขึ้น ความเข้มข้น 50-400 มก./ล. ให้การรอดชีวิตของแคลลัสในช่วง 95 ถึง 82.5% ไม่แตกต่างกันทางสถิติ เมื่อพิจารณาความสามารถในการสร้างยอดจากแคลลัส พบว่า ลดลงจาก 35% เป็น 7.5% แตกต่างกันทางสถิติอย่างชัดเจน ดังนั้นความเข้มข้นของซีโฟทาซิมที่เหมาะสมต่อการใช้กำจัดเชื้อในการปลูกถ่ายยีนให้กับแคลลัสมังคุดโดยไม่มีผลต่อการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ คือ 300 มก./ล. (Figure 1)

3. ผลของคานามัยซินต่อการสร้างแคลลัส และพัฒนาการเป็นพืชต้นใหม่

คานามัยซินมีผลต่อการสร้างแคลลัส และความมีชีวิตของแคลลัสในระดับสูงกว่าซีโฟทาซิม การใช้ความเข้มข้นสูงขึ้นส่งผลให้ความสามารถดังกล่าวลดลง ในการย้ายเลี้ยงครั้งแรกนั้น พบว่า ความเข้มข้นสูงกว่า 200 มก./ล. ส่งผลให้การสร้างแคลลัส และความมีชีวิตของแคลลัสลดลงมากกว่า 50% ในการย้ายเลี้ยงครั้งถัดมาในอาหารเติมคามัยซินส่งผลให้ความมีชีวิตของแคลลัสลดลง เมื่อย้ายแคลลัสไปเลี้ยงในอาหารสูตรเดิมเติมคานามัยซินครั้งที่ 4 พบว่า แคลลัสตายหมดในทุกหน่วยการทดลอง ดังนั้นแคลลัสมังคุดไม่สามารถดูแลรักษาได้เป็นเวลานานกว่า 3 ครั้ง การย้ายเลี้ยง หรือ 4 เดือน (Figure 2)

ดังได้กล่าวข้างต้นแล้วว่าสารปฏิชีวนะมีผลต่อการพัฒนาของชิ้นส่วนพืชแตกต่างกัน ทั้งนี้ขึ้นกับชนิดของสารปฏิชีวนะเอง พันธุ์พืช ตลอดจนชิ้นส่วนพืชที่นำมาเลี้ยง ในการศึกษานี้พบว่าแคลลัส มีความสามารถทนทานต่อซีโฟทาซิมได้สูงกว่าชิ้นส่วนใบ การเพิ่มความเข้มข้นของซีโฟทาซิมสูงขึ้นจนถึง 50 มก./ล. ส่งเสริมการสร้างยอดให้สูงกว่าหน่วยทดลองเปรียบเทียบ ในขณะที่การเพิ่มความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะเป็น 100 มก./ล. ส่งผลให้การสร้างยอดจากใบลดลง สารปฏิชีวนะที่นิยมใช้ในการกำจัดเชื้อเพื่อปลูกถ่ายยีนทั้งในพืชผัก ไม้ดอก และไม้ผล คือซีโฟทาซิม ความเข้มข้นที่ใช้อยู่ในช่วง 200-500 มก./ล. ทั้งนี้เพราะ สารดังกล่าวมีประสิทธิภาพในการกำจัดเชื้อได้ดีและไม่มีผลต่อการพัฒนาไปเป็นพืชต้นใหม่ หรือมีก็น้อยกว่าสารอื่นๆ (Tao *et al*., 1997; Hammerschlag *et al*., 1997; Koivu *et al*., 1995; Furini *et al*., 1994; Yepes and Aldwickle, 1994) สำหรับพืชที่ไม่สามารถใช้สารปฏิชีวนะตัวนี้ได้ผลเนื่องจากมีผลไปยับยั้งการเจริญและการพัฒนาของแคลลัสและชิ้นส่วนที่ปลูกถ่ายดังนั้นจึง

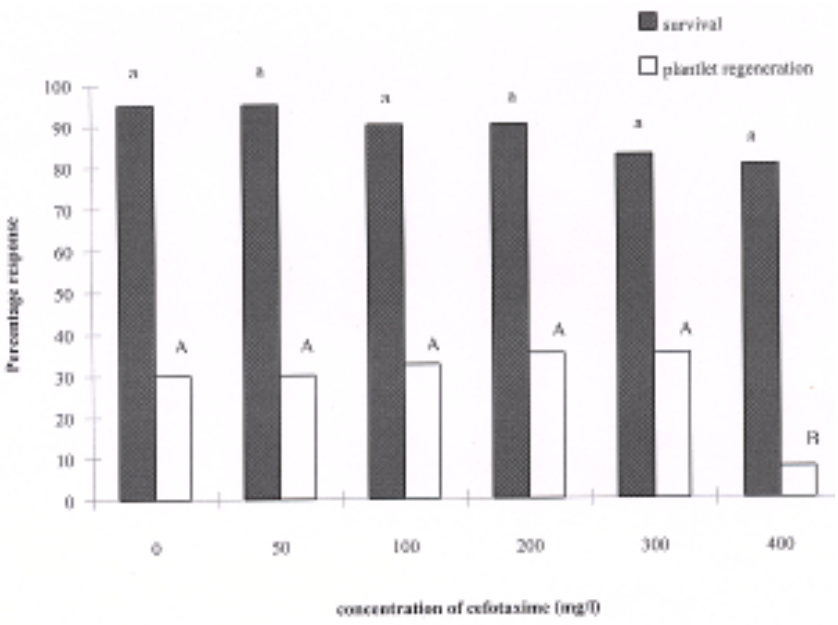

Figure 1. Effect of cefotaxime on survival percentage and plantlet regeneration from nodular callus after 6 passages of culture. Percentages of survival or of plantlet regeneration not sharing common letter differ significantly by DMRT.

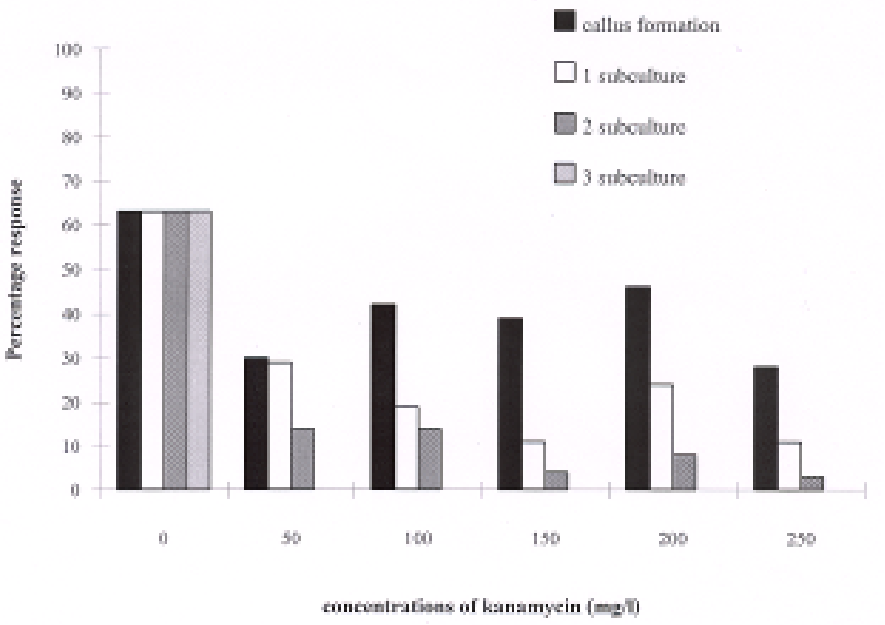

Figure 2. Effect of kanamycin on leaf-forming callus and survival percentage of callus after various subcultures.

จำเป็นต้องใช้สารปฏิชีวนะตัวอื่นแทน สารปฏิชีวนะตัวอื่นที่ใช้ได้ผลรองมาคือคาเบนิซิลิน ความเข้มข้นที่ใช้อยู่ในช่วงเดียวกัน พืชที่ประสบความสำเร็จในการกำจัดเชื้อด้วยคาเบนิซิลิน เช่น กะหล่ำปลี (Cai *et al*., 1997) มันฝรั่ง (Park *et al*., 1995; Koivu *et al*., 1995) ปัจจุบันมีรายงานการใช้สารปฏิชีวนะซีฟาเล็กซิน (ceff 250) ที่เป็นอนุพันธุ์ของซีโฟทาซิมว่ามีราคาถูก กำจัดเชื้อได้ดี และเพิ่มประสิทธิภาพในการปลูกถ่ายยีนได้สูงกว่าซีโฟทาซิม (Sultana and Ahuja, 1993) อย่างไรก็ตามในการศึกษานี้ไม่ได้ทดสอบประสิทธิภาพของสารปฏิชีวนะตัวอื่น ดังนั้นในการศึกษาครั้งต่อไปควรมีการทดสอบผลของสารปฏิชีวนะตัวอื่นด้วย เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการกำจัดเชื้อ และการปลูกถ่ายยีน

เอกสารอ้างอิง

สมปอง เตชะโต. 2530. การใช้ปฏิชีวนสารในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ. ว. สงขลานครินทร์ ฉบับวทท. 9:533-535

Cai, X.N., She, J.M., Zhu, Z., Zhu, W.M., Yuan, X.H. and Su, X.J. 1997. Establishment of an Agrobacterium-mediated genetic transformation system for common chinese cabbage (*Brassica chinensis*). Jiangsu J. Agri. Sci. 13:110-114.

Furini, A., Koncz, C., Salamini, F. and Bartels, D. 1994. Agobacterium-mediated transformation of the desiccation-tolerant plant *Craterostigma plantagineum*. Plant Cell Rep. 14:102-106.

Hammerschlag, F.A., Zimmerman, R.H., Yadava, U.L., Hunsucker, S. and Gercheve, P. 1997. Effect of antibiotics and exposure to an acidified medium on the elimination of *Agrobacterium tumefaciens* from apple leaf explants and on shoot regeneration. J. Am. Soc. Horti. Sci. 122: 758-763.

Koivu, K., Valkonen, J.P.T., Suomaa, S., Tavazza, R. and Pehu, E. 1995. *Agrobacterium tumefiens*-mediated transformation of *Solanum brevidens* and *S. tuberosum* cv. Pito. Acta-Agric. 45:78-87.

Lowe, J. M., Davey, M. R., Power, J. B. and Bluny, K. S. 1993. A study on some factors affecting *Agrobacterium* transformation and plant regeneration of *Dendranthema grandiflora* Tzvelev (syn *Chrysanthemum morifolium* Ramat.). Plant Cell, Tis. and Org. Cult. 33:171-180.

Owens, L.D. 1979. Kanamycin promotes morphogenesis of plant tissue. Plant Sci. Lett. 16:225-230.

Park, Y.D., Ronis, D.H., Boe, A.A. and Cheng, Z.M. 1995. Plant regeneration from leaf tissues of four North Dakota genotypes of potato (*Solanum tuberosum* L.). Am. Potato J. 72:329-338.

Shackelford, N. J. and Chlan, C. A. 1996. Identification of antibiotics that are effective in eliminating *Agrobacterium tumefaciens*. Plant Mol. Biol. Rep. 14:50-57.

Sultana, A. and Ahuja, P.S. 1993. Cephalexin-a better alternative to cefotaxime in plant genetic transformation experiments. Indian J. Expt. Bot. 31:540-543.

Tao, R., Dandekar, A.M., Uratsu, S.L., Vial, P.V. and Tebbets, J.S. 1997. Engineering genetic resistance against insects in Japanese ersimmon using the *cry*A9c) gene of *Bacillus thuringiensis*. J. Am. Soc. Horti. Sci. 122:764-771.

Te-chato, S. and Lim, M. 2000. Improvement of mangosteen propagation through meristematic nodular callus formation from *in vitro*-derived leaf explants. Scientia Hort. 86:291-298.

Yepes, L.M. and Aldwinckle, H.S. 1994. Factors that affect leaf regeneration efficiency in apple, and the effect of antibiotics in morphogenesis. Plant Cell, Tis. and Org. Cult. 37:257-269.