

บทที่ 5

อิทธิพลของสารปฏิชีวนะต่อการเจริญของแคลลัสและต้นอ่อนอ้อย

1. บทนำ

การศึกษาอิทธิพลของสารปฏิชีวนะต่อการเจริญของแคลลัสและต้นอ่อนอ้อย เป็นการศึกษเบื้องต้นของการส่งถ่ายยีนสู่อ้อยเนื่องจากการในการส่งถ่ายยีนที่สนใจนั้นนิยมใช้ยีนคัดเลือก (selectable marker gene) เป็นยีนที่ต้านทานต่อสารปฏิชีวนะ เหตุผลคือ เพื่อใช้ในการคัดเลือกเนื้อเยื่อที่ได้รับยีนออกจากกลุ่มของเนื้อเยื่อที่ไม่ได้รับยีนที่ส่งถ่ายเข้าไป ดังนั้นในการศึกษาการส่งถ่ายยีน chitinase สู่อ้อยโดยใช้ *Agrobacterium* สายพันธุ์ LBA4404 (pCambia 1305.1) ซึ่งมียีน *hpt* เป็นยีนเครื่องหมายซึ่งแสดงความต้านทานต่อสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน ส่วน *Agrobacterium* สายพันธุ์ LBA4404 (PBI 121) จะประกอบด้วยยีน *nptII* เป็นยีนเครื่องหมายซึ่งแสดงความต้านทานต่อสารปฏิชีวนะกานามัยซิน จึงจำเป็นต้องหาความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินและกานามัยซินที่เหมาะสม ในการคัดเลือกเนื้อเยื่ออ้อยที่ได้รับการส่งถ่ายยีน โดยความเข้มข้นที่เหมาะสมนี้เนื้อเยื่ออ้อยที่ไม่ได้รับการส่งถ่ายยีน ไม่สามารถเจริญเติบโตได้ นอกจากนี้ในการส่งถ่ายยีนโดยใช้ *Agrobacterium* ต้องมีการกำจัด *Agrobacterium* ออกจากเนื้อเยื่ออ้อยภายหลังการส่งถ่ายยีน ดังนั้นต้องศึกษาหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของซีโฟแทกซิม เพื่อกำจัด *Agrobacterium* อย่างมีประสิทธิภาพและไม่เป็นอันตรายต่อเนื้อเยื่ออ้อย

2. อุปกรณ์และวิธีการ

การทดลองที่ 1 อิทธิพลของสารปฏิชีวนะซีโฟแทกซิมต่อการเจริญของแคลลัสและต้นอ่อนอ้อยพันธุ์ Phil 66-07

นำแคลลัสของอ้อยขนาดประมาณ 3 มิลลิเมตร และต้นอ่อนที่มีความสูงประมาณ 5 มิลลิเมตร มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรที่ชักนำให้เกิดแคลลัส ที่เติมซีโฟแทกซิมความเข้มข้น 0, 200, 300, 400, 500 และ 600 มก./ล. และอาหารสูตรที่ชักนำให้เกิดต้นอ่อน ที่เติมซีโฟแทกซิมความเข้มข้น 0, 200, 300, 400, 500, 600 และ 700 มก./ล. นำไปเพาะเลี้ยงในสภาพที่มีแสง 16 ชั่วโมง/วัน ความเข้มแสง $40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 สัปดาห์ บันทึกการทดลองโดยสังเกตการณ์เจริญเติบโตและการเปลี่ยนแปลงของแคลลัสและต้นอ่อนอ้อย เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของแคลลัส และ ต้นอ่อนอ้อย

**การทดลองที่ 2 อิทธิพลของสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินต่อการเจริญของแคลลัสและ
ต้นอ่อนอ้อยพันธุ์ Phil 66-07**

นำแคลลัสของอ้อยขนาดประมาณ 3 มิลลิเมตร มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรที่ชักนำให้เกิดแคลลัสที่เติมไฮโกรมัยซินความเข้มข้น 0, 5, 15, 25, 35, 45, 55 และ 65 มก./ล. และอาหารสูตรที่ชักนำให้เกิดต้นอ่อนที่เติมไฮโกรมัยซินความเข้มข้น 0, 10, 25, 50, 75 และ 100 มก./ล. นำไปเพาะเลี้ยงในสภาพที่มีแสง 16 ชั่วโมง/วัน ความเข้มแสง $40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ อุณหภูมิ $25 \pm 2^\circ\text{C}$ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ บันทึกการทดลองโดยสังเกตการเจริญเติบโตและการเปลี่ยนแปลงของแคลลัสและต้นอ่อนอ้อย เพอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของแคลลัสและต้นอ่อนอ้อย

**การทดลองที่ 3 อิทธิพลของสารปฏิชีวนะซีโฟแทกซิมต่อการเจริญของแคลลัสและ
ต้นอ่อนอ้อยพันธุ์มิตรผล 99-94**

นำแคลลัสของอ้อยขนาดประมาณ 3 มิลลิเมตร มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรที่ชักนำให้เกิดแคลลัส ที่เติมซีโฟแทกซิมความเข้มข้น 0, 100, 200, 300, 400, 500, 600 และ 700 มก./ล. และอาหารสูตรที่ชักนำให้เกิดต้นอ่อน ที่เติมซีโฟแทกซิมความเข้มข้น 0, 200, 300, 400, 500, 600, 700 และ 800 มก./ล. นำไปเพาะเลี้ยงในสภาพที่มีแสง 16 ชั่วโมง/วัน ความเข้มแสง $40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ อุณหภูมิ $25 \pm 2^\circ\text{C}$ องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 สัปดาห์ บันทึกการทดลองโดยสังเกตการเจริญเติบโตและการเปลี่ยนแปลงของแคลลัสและต้นอ่อนอ้อย เพอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของแคลลัสและต้นอ่อนอ้อย

**การทดลองที่ 4 อิทธิพลของสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินต่อการเจริญของแคลลัสและ
ต้นอ้อยพันธุ์มิตรผล 99-94**

นำแคลลัสของอ้อยขนาดประมาณ 3 มิลลิเมตร มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรที่ชักนำให้เกิดแคลลัสที่เติมไฮโกรมัยซินความเข้มข้น 0, 5, 10, 20, 30, 40, 50 และ 60 มก./ล. นำไปเพาะเลี้ยงในสภาพที่มีแสง 16 ชั่วโมง/วัน ความเข้มแสง $40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ อุณหภูมิ $25 \pm 2^\circ\text{C}$ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ บันทึกการทดลองโดยสังเกตการเจริญเติบโตและการเปลี่ยนแปลงของแคลลัสและต้นอ่อนอ้อย เพอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของแคลลัสและต้นอ่อนอ้อย

**การทดลองที่ 5 อิทธิพลของสารปฏิชีวนะกานามัยซินต่อการเจริญของแคลลัสและต้น
อ้อยพันธุ์มิตรผล 99-94**

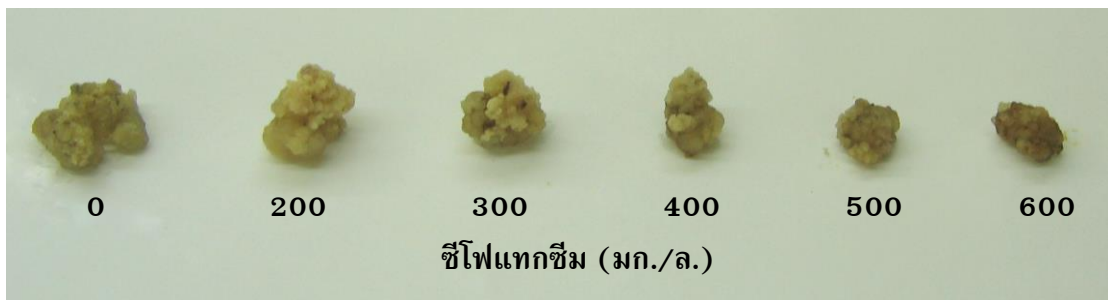
นำแคลลัสของอ้อยขนาดประมาณ 3 มิลลิเมตร มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรที่ชักนำให้เกิดแคลลัสที่เติมกานามัยซินความเข้มข้น 0, 250, 500, 750, 1,000, 1,250 และ 1,500 มก./ล. นำไปเพาะเลี้ยงในสภาพที่มีแสง 16 ชั่วโมง/วัน ความเข้มแสง $40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ อุณหภูมิ $25 \pm 2^\circ\text{C}$ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ บันทึกการทดลองโดยสังเกตการเจริญเติบโตและการเปลี่ยนแปลงของแคลลัสและต้นอ่อนอ้อย เพอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของแคลลัสและต้นอ่อนอ้อย

3. ผลการทดลอง

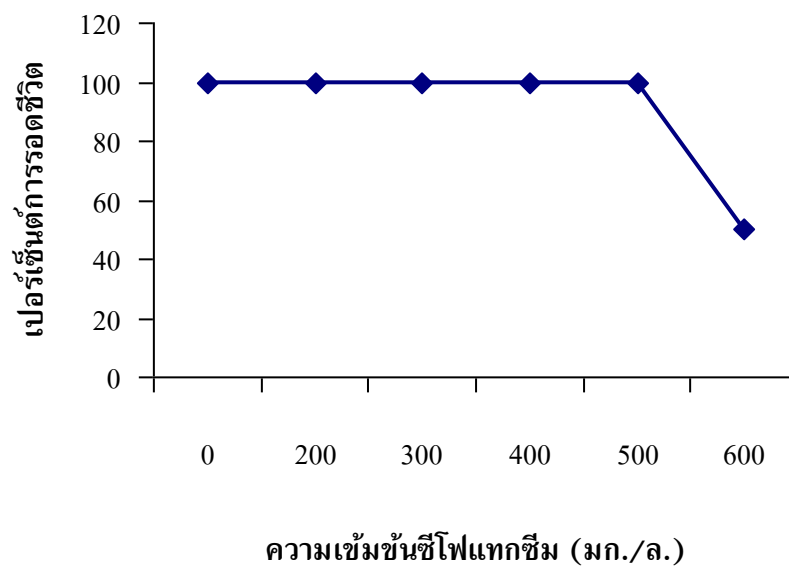
ผลการทดลองที่ 1 อิทธิพลของสารปฏิชีวนะซีโฟแทกซิมต่อการเจริญของแคลลัส และต้นอ่อนอ้อยพันธุ์ Phil 66-07

จากการเพาะเลี้ยงแคลลัสอ้อยพันธุ์ Phil 66-07 บนอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติม 2,4-D 3 มก./ล. ร่วมกับ น้ำมะพร้าว 15% ที่มีซีโฟแทกซิมความเข้มข้น 0, 200, 300, 400, 500 และ 600 มก./ล. พบว่า แคลลัสที่เลี้ยงบนสูตรอาหารที่เติมซีโฟแทกซิมที่ความเข้มข้น 0, 200, 300, 400 และ 500 มก./ล.. แคลลัสอ้อยมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต 100% ลักษณะแคลลัสมีสีเหลือง สามารถเจริญเติบโต และมีการขยายขนาด ส่วนแคลลัสที่เลี้ยงบนสูตรอาหารที่เติมซีโฟแทกซิมความเข้มข้น 600 มก./ล. มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต 50% แคลลัสบางส่วนมีการเปลี่ยนจากสีเหลืองเป็นสีน้ำตาล (ภาพที่ 21 และ 22)

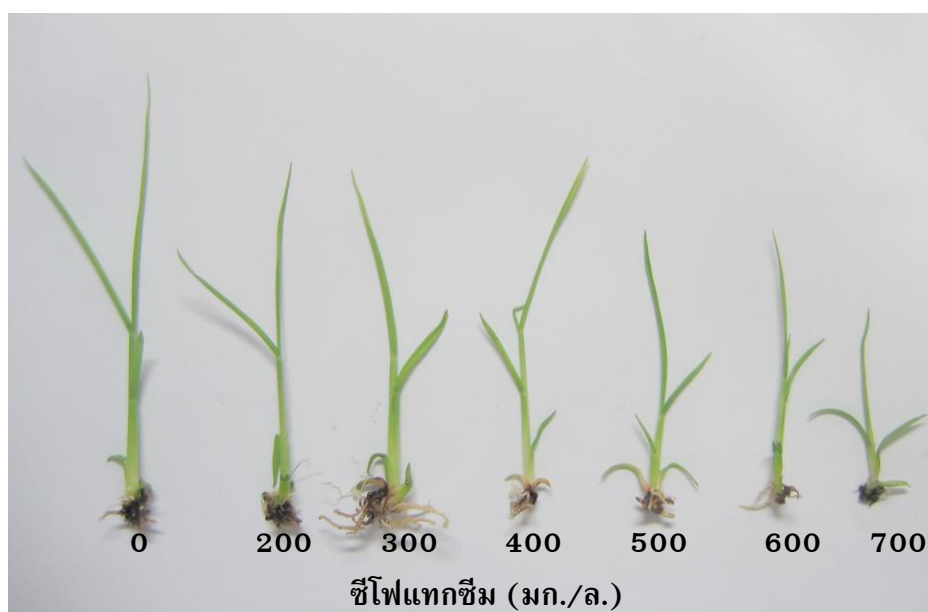
จากการเพาะเลี้ยงต้นอ่อนอ้อยพันธุ์ Phil 66-07 บนอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติม BA 1 มก./ล. ร่วมกับ IBA 0.5 มก./ล. ที่มีซีโฟแทกซิมความเข้มข้น 0, 200, 300, 400, 500, 600 และ 700 มก./ล. พบว่า ต้นอ่อนสามารถเจริญเติบโตได้บนสูตรอาหารที่เติมซีโฟแทกซิมที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยต้นอ่อนมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต 100% ต้นอ่อนมีการเจริญเติบโต มีสีเขียว มีความสูงเพิ่มขึ้น (ภาพที่ 23 และ 24)



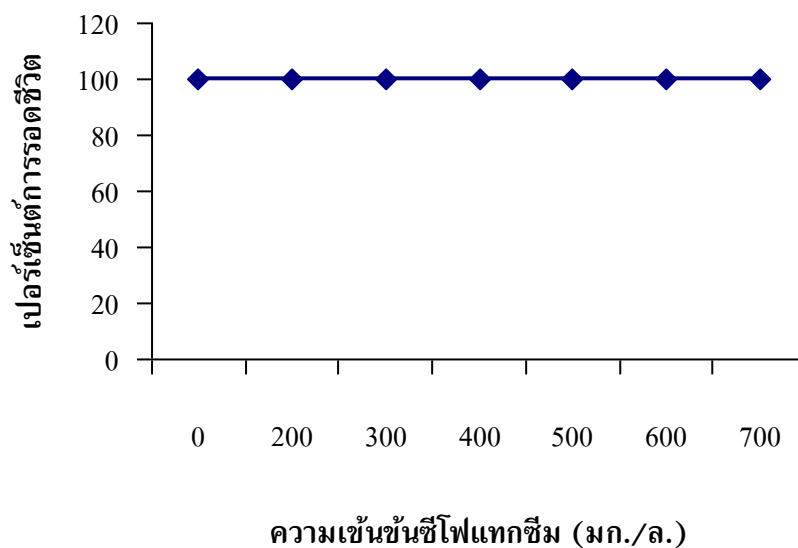
ภาพที่ 21 ลักษณะแคลลัสอ้อยพันธุ์ Phil 66-07 ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติม 2,4-D 3 มก./ล. ร่วมกับ น้ำมะพร้าว 15% ที่มีซีโฟแทกซิมความเข้มข้น 0, 200, 300, 400, 500 และ 600 มก./ล. เป็นเวลา 4 สัปดาห์



ภาพที่ 22 เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของแคลลัสอ้อยพันธุ์ Phil 66-07 ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติม 2,4-D 3 มก./ล. ร่วมกับ น้ำมะพร้าว 15% ที่มีซีโฟแทกซิม ความเข้มข้น 0, 200, 300, 400, 500 และ 600 มก./ล. เป็นเวลา 4 สัปดาห์



ภาพที่ 23 ลักษณะต้นอ้อยพันธุ์ Phil 66-07 ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติม BA 1 มก./ล. ร่วมกับ IBA 0.5 มก./ล. ที่มีซีโฟแทกซิมความเข้มข้น 0, 200, 300, 400, 500, 600 และ 700 มก./ล. เป็นเวลา 4 สัปดาห์



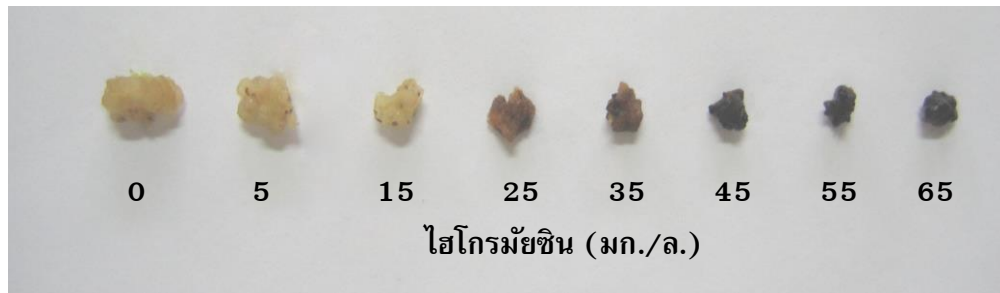
ภาพที่ 24 เปอร์เซนต์การรอดชีวิตของต้นอ่อนอ้อยพันธุ์ Phil 66-07 ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติม BA 1 มก./ล. ร่วมกับ IBA 0.5 มก./ล. ที่มีซีโฟแทกซึม ความเข้มข้น 0, 200, 300, 400, 500, 600 และ 700 มก./ล. เป็นเวลา 4 สัปดาห์

ผลการทดลองที่ 2 การศึกษาความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินที่สามารถยับยั้งการเจริญของแคลลัส และต้นอ่อนอ้อยพันธุ์ Phil 66-07

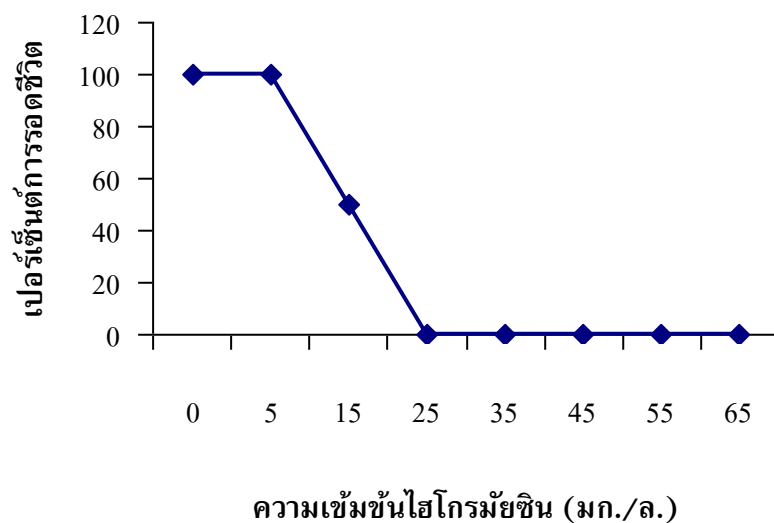
จากการเพาะเลี้ยงแคลลัสอ้อยพันธุ์ Phil 66-07 บนอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติม 2,4-D 3 มก./ล. ร่วมกับ น้ำมะพร้าว 15% ที่มีไฮโกรมัยซินความเข้มข้น 0, 5, 15, 25, 35, 45, 55 และ 65 มก./ล. พบว่า แคลลัสที่เลี้ยงบนสูตรอาหารที่เติมไฮโกรมัยซินที่ความเข้มข้น 0 และ 5 มก./ล. แคลลัสอ้อยมีเปอร์เซนต์การรอดชีวิต 100% ลักษณะแคลลัสมีสีเหลือง สามารถเจริญเติบโต และมีการขยายขนาด ส่วนแคลลัสที่เลี้ยงบนสูตรอาหารที่เติมไฮโกรมัยซินความเข้มข้น 15 มก./ล. มีเปอร์เซนต์การรอดชีวิต 50% แคลลัสบางส่วนมีการเปลี่ยนจากสีเหลืองเป็นสีน้ำตาล สำหรับแคลลัสที่เลี้ยงบนสูตรอาหารที่เติมไฮโกรมัยซิน ความเข้มข้น 25, 35, 45, 55 และ 65 มก./ล. ไม่มีการรอดชีวิต แคลลัสมีการเปลี่ยนจากสีเหลืองเป็นสีน้ำตาลและตายในที่สุด (ภาพที่ 25 และ 26)

จากการเพาะเลี้ยงต้นอ่อนอ้อยพันธุ์ Phil 66-07 บนอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติม BA 1 มก./ล. ร่วมกับ IBA 0.5 มก./ล. ที่มีไฮโกรมัยซินความเข้มข้น 0, 10, 25, 50, 75 และ 100 มก./ล. พบว่า ต้นอ่อนที่เลี้ยงบนสูตรอาหารที่เติมไฮโกรมัยซินที่ความเข้มข้น 0, 10 มก./ล. ต้นอ่อนอ้อยมี เปอร์เซนต์การรอดชีวิต 100% ต้นอ่อนมีการเจริญเติบโต มีสีเขียว ความสูงเพิ่มขึ้น ส่วนต้นอ่อนที่เลี้ยงบนสูตรอาหารที่เติมไฮโกรมัยซินความเข้มข้น 25 มก./ล. มีเปอร์เซนต์การ

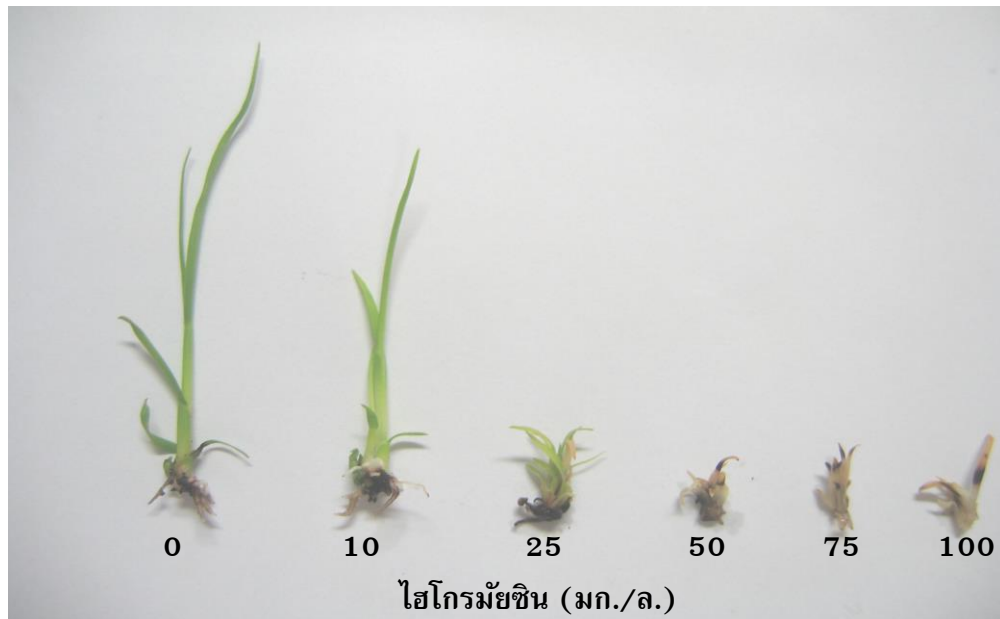
รอดชีวิต 50 % ใบอ่อนบางส่วนมีการเปลี่ยนแปลงจากสีเขียวเป็นสีน้ำตาล สำหรับแคลลัสที่เลี้ยงบนสูตรอาหารที่เติมไฮโกรมัยซิน ความเข้มข้น 50, 75 และ 100 มก./ล. ไม่พบการรอดชีวิตของ ต้นอ่อน ใบอ่อนมีการเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีน้ำตาลและตายในที่สุด (ภาพที่ 27 และ 28)



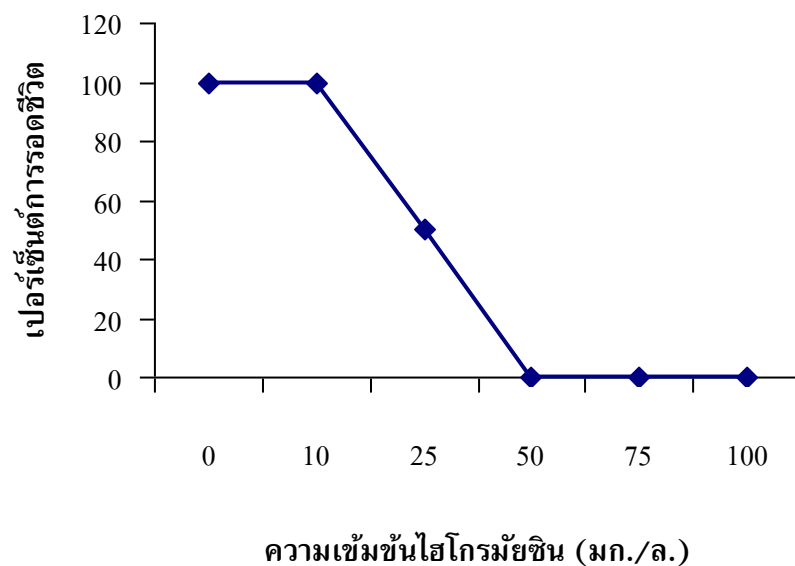
ภาพที่ 25 ลักษณะแคลลัสอ้อยพันธุ์ Phil 66-07 ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติม เติม 2,4-D 3 มก./ล. ร่วมกับ น้ำมะพร้าว 15% ไฮโกรมัยซินความเข้มข้น 0, 5, 15, 25, 35, 45, 55 และ 65 มก./ล. เป็นเวลา 4 สัปดาห์



ภาพที่ 26 เปอร์เซนต์การรอดชีวิตของแคลลัสอ้อยพันธุ์ Phil 66-07 ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติม 2,4-D 3 มก./ล. ร่วมกับ น้ำมะพร้าว 15% ที่มีไฮโกรมัยซินความเข้มข้น 0, 5, 15, 25, 35, 45, 55 และ 65 มก./ล. เป็นเวลา 4 สัปดาห์



ภาพที่ 27 ลักษณะต้นอ่อนอ้อยพันธุ์ Phil 66-07 ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติม BA 1 มก./ล. ร่วมกับ IBA 0.5 มก./ล. ที่มีไฮโกรมัยซินความเข้มข้น 0, 10, 25, 50, 75 และ 100 มก./ล. เป็นเวลา 4 สัปดาห์



ภาพที่ 28 เปอร์เซนต์การรอดชีวิตของต้นอ่อนอ้อยพันธุ์ Phil 66-07 ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติม BA 1 มก./ล. ร่วมกับ IBA 0.5 มก./ล. ที่มีไฮโกรมัยซินความเข้มข้น 0, 10, 25, 50, 75 และ 100 มก./ล. เป็นเวลา 4 สัปดาห์

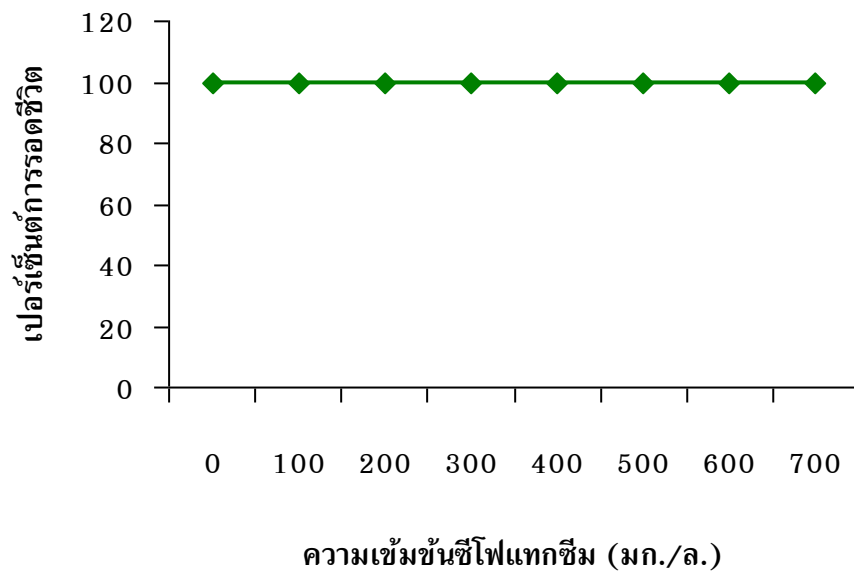
ผลการทดลองที่ 3 อิทธิพลของสารปฏิชีวนะซีโฟแทกซิมต่อการเจริญของแคลลัส และต้นอ่อนอ้อยพันธุ์มิตรผล 99-94

จากการเพาะเลี้ยงแคลลัสอ้อยพันธุ์มิตรผล 99-94 บนอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติม 2,4-D 3 มก./ล. ร่วมกับ น้ำมะพร้าว 10% ที่มีซีโฟแทกซิมความเข้มข้น 0, 100, 200, 300, 400, 500, 600 และ 700 มก./ล. พบว่า แคลลัสที่เลี้ยงบนสูตรอาหารที่เติมซีโฟแทกซิมที่ความเข้มข้น 0, 100, 200, 300, 400, 500 และ 600 มก./ล. แคลลัสอ้อยมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต 100% ลักษณะแคลลัสมีสีเหลือง สามารถเจริญเติบโต และมีการขยายขนาด ส่วนแคลลัสที่เลี้ยงบนสูตรอาหารที่เติมซีโฟแทกซิมความเข้มข้น 700 มก./ล. มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต 100% แต่แคลลัสไม่เจริญเติบโต และไม่มีการขยายขนาด (ภาพที่ 29 และ 30)

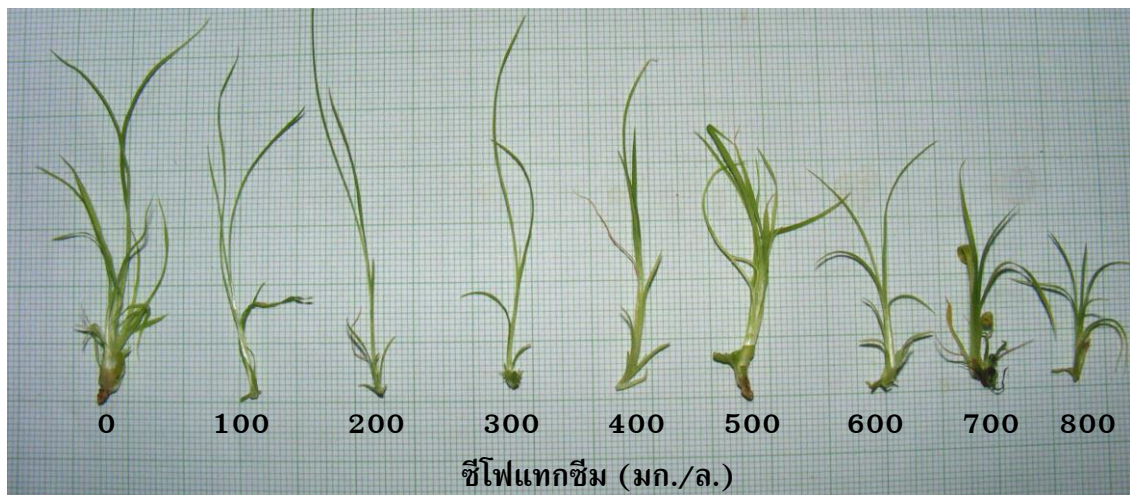
จากการเพาะเลี้ยงต้นอ่อนอ้อยพันธุ์มิตรผล 99-94 บนอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติม BA 3 มก./ล. ร่วมกับ IBA 0.5 มก./ล. ที่มีซีโฟแทกซิมความเข้มข้น 0, 100, 200, 300, 400, 500, 600 และ 700 มก./ล. พบว่า ต้นอ่อนที่เลี้ยงบนสูตรอาหารที่เติมซีโฟแทกซิมความเข้มข้น 0, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700 และ 800 มก./ล. ต้นอ่อนอ้อยมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต 100% เมื่อพิจารณาในด้านการเจริญเติบโตของต้น พบว่า ต้นอ่อนที่เลี้ยงบนสูตรอาหารที่เติมซีโฟแทกซิมความเข้มข้น 100, 200, 300, 400 มก./ล. ต้นอ่อนมีการเจริญเติบโต มีสีเขียว และความสูงเพิ่มขึ้นปกติ เมื่อเปรียบเทียบกับต้นอ่อนที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่ไม่เติมซีโฟแทกซิม ส่วนต้นอ่อนที่เลี้ยงบนสูตรอาหารที่ซีโฟแทกซิมความเข้มข้น 500, 600, 700 และ 800 มก./ล. ต้นอ่อนมีการเจริญเติบโตช้า โดยมีความสูงลดลงเมื่อความเข้มข้นของซีโฟแทกซิมเพิ่มขึ้น (ภาพที่ 31 และ 32)



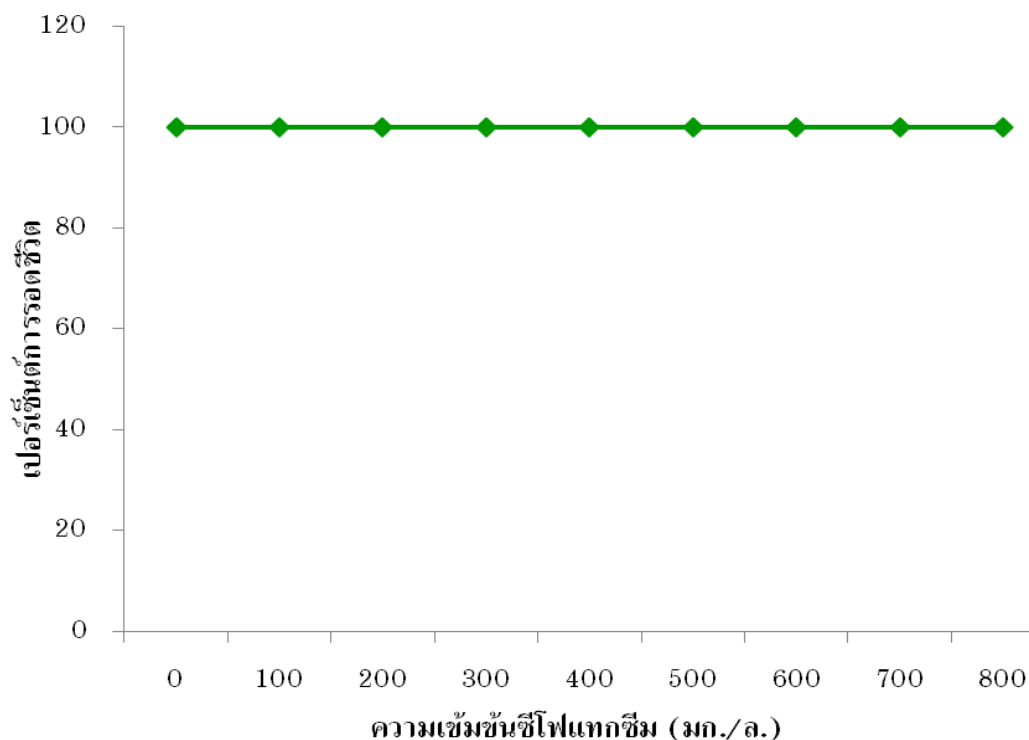
ภาพที่ 29 ลักษณะแคลลัสอ้อยพันธุ์มิตรผล 99-94 ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติม 2,4-D 3 มก./ล. ร่วมกับ น้ำมะพร้าว 10% ที่มีซีโฟแทกซิมความเข้มข้น 0, 100, 200, 300, 400, 500, 600 และ 700 มก./ล. เป็นเวลา 4 สัปดาห์



ภาพที่ 30 เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของแคลลส์อ้อยพันธุ์มิตรผล 99-94 ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติม 2,4-D 3 มก./ล. ร่วมกับ น้ำมะพร้าว 10% ที่มีซีโฟแทกซีมความเข้มข้น 0, 100, 200, 300, 400, 500, 600 และ 700 มก./ล. เป็นเวลา 4 สัปดาห์



ภาพที่ 31 ลักษณะต้นอ่อนอ้อยพันธุ์มิตรผล 99-94 ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติม BA 3 มก./ล. ร่วมกับ IBA 0.5 มก./ล. ที่มีซีโฟแทกซีมความเข้มข้น 0, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700 และ 800 มก./ล. เป็นเวลา 4 สัปดาห์



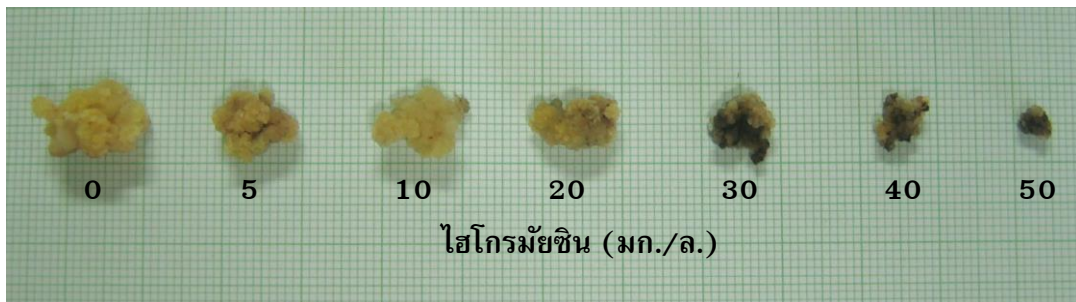
ภาพที่ 32 เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของต้นอ้อยพันธุ์มิตรผล 99-94 ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติม BA 3 มก./ล. ร่วมกับ IBA 0.5 มก./ล. ที่มีซีโฟแทกซึมความเข้มข้น 0, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700 และ 800 มก./ล. เป็นเวลา 4 สัปดาห์

ผลการทดลองที่ 4 อิทธิพลของสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินต่อการเจริญของแคลลัส และต้นอ่อนอ้อยพันธุ์มิตรผล 99-94

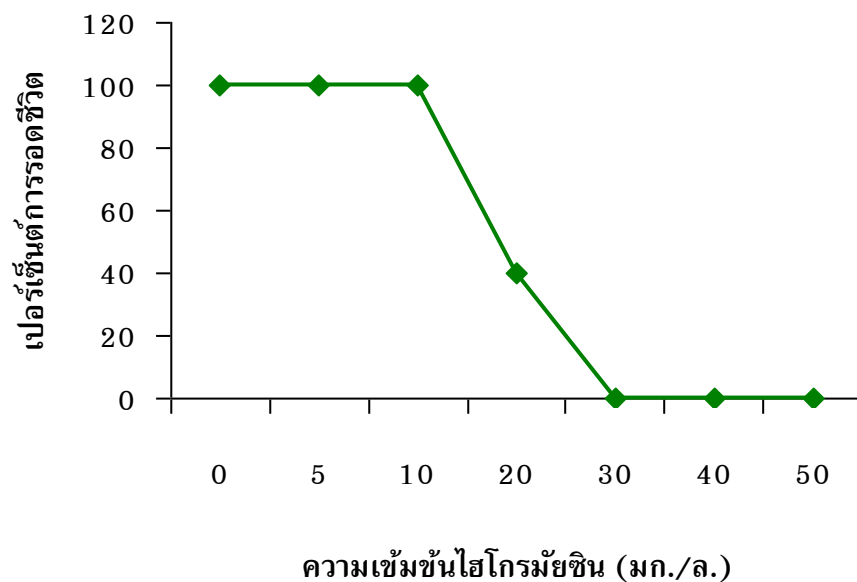
จากการเพาะเลี้ยงแคลลัสอ้อยพันธุ์มิตรผล 99-94 บนอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติม 2,4-D 3 มก./ล. ร่วมกับ น้ำมะพร้าว 10% ที่มีไฮโกรมัยซินความเข้มข้น 0, 5, 10, 20, 30, 40 และ 50 มก./ล. พบว่า แคลลัสที่เลี้ยงบนสูตรอาหารที่เติมไฮโกรมัยซินที่ความเข้มข้น 0, 5 และ 10 มก./ล. แคลลัสอ้อยมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต 100% ลักษณะแคลลัสมีสีเหลือง สามารถเจริญเติบโตและมีการขยายขนาด ส่วนแคลลัสที่เลี้ยงบนสูตรอาหารที่เติมไฮโกรมัยซินความเข้มข้น 20 มก./ล. มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต 40% แคลลัสบางส่วนมีการเปลี่ยนจากสีเหลืองเป็นสีน้ำตาล สำหรับแคลลัสที่เลี้ยงบนสูตรอาหารที่เติมไฮโกรมัยซินความเข้มข้น 30, 40 และ 50 ไม่มีการรอดชีวิต แคลลัสมีการเปลี่ยนจากสีเหลืองเป็นสีน้ำตาลและตายในที่สุด (ภาพที่ 33 และ 34)

จากการเพาะเลี้ยงต้นอ่อนอ้อยพันธุ์มิตรผล 99-94 บนอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติม BA 3 มก./ล. ร่วมกับ IBA 0.5 มก./ล. ที่มีไฮโกรมัยซินความเข้มข้น 0, 5, 10, 20, 30, 40 และ 50 มก./ล. พบว่าต้นอ่อนที่เลี้ยงบนสูตรอาหารที่เติมไฮโกรมัยซินที่ความเข้มข้น 0, 5, 10 และ 20 มก./ล. ต้นอ่อนอ้อยมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต 100% ส่วนต้นอ่อนที่เลี้ยงบนสูตรอาหารที่

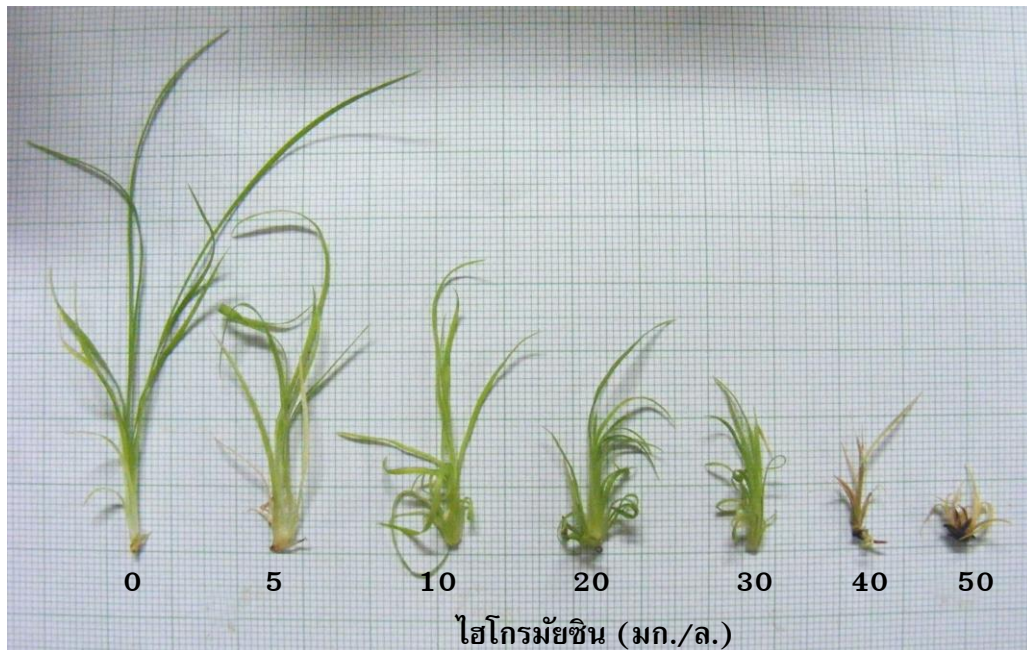
เติมไฮโครมัยซินความเข้มข้น 30 มก./ล. มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต 60 % ใบอ่อนบางส่วนมีการเปลี่ยนแปลงจากสีเขียวเป็นสีน้ำตาล สำหรับต้นอ่อนอ้อยที่เลี้ยงบนสูตรอาหารที่เติมไฮโครมัยซินความเข้มข้น 40 และ 50 มก./ล. ไม่มีการรอดชีวิต ใบอ่อนเปลี่ยนสีจากสีเขียวเป็นสีน้ำตาลและตายในที่สุด (ภาพที่ 35 และ 36)



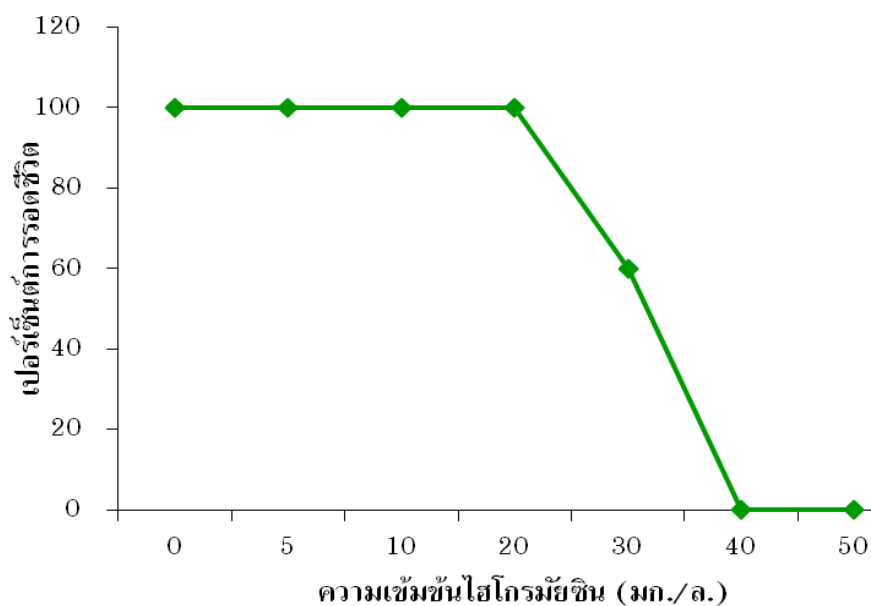
ภาพที่ 33 ลักษณะแคลลส์อ้อยพันธุ์มิตรผล 99-94 ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติม 2,4-D 3 มก./ล. ร่วมกับ น้ำมะพร้าว 10% ไฮโครมัยซินความเข้มข้น 0, 5, 10, 20, 30, 40 และ 50 มก./ล. เป็นเวลา 4 สัปดาห์



ภาพที่ 34 เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของแคลลส์อ้อยพันธุ์มิตรผล 99-94 ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติม 2,4-D 3 มก./ล. ร่วมกับ น้ำมะพร้าว 10% ที่เติมไฮโครมัยซินความเข้มข้น 0, 5, 10, 20, 30, 40 และ 50 มก./ล. เป็นเวลา 4 สัปดาห์



ภาพที่ 35 ลักษณะต้นอ่อนอ้อยพันธุ์มิตรผล 99-94 ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติม BA 3 มก./ล. ร่วมกับ IBA 0.5 มก./ล. ที่เติมไฮโครมัยซินความเข้มข้น 0, 5, 10, 20, 30, 40 และ 50 มก./ล. เป็นเวลา 4 สัปดาห์

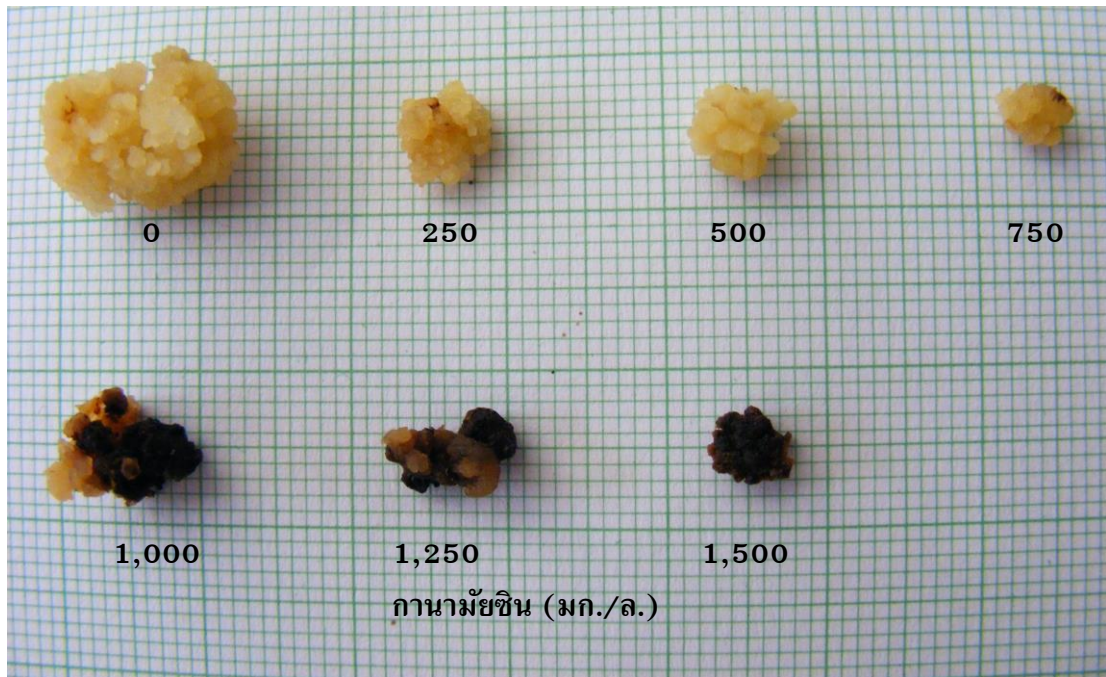


ภาพที่ 36 เปอร์เซนต์การรอดชีวิตของต้นอ่อนอ้อยพันธุ์มิตรผล 99-94 ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติม 2,4-D 3 มก./ล. ร่วมกับ น้ำมะพร้าว 10% ที่เติมไฮโครมัยซินความเข้มข้น 0, 5, 10, 20, 30, 40 และ 50 มก./ล. เป็นเวลา 4 สัปดาห์

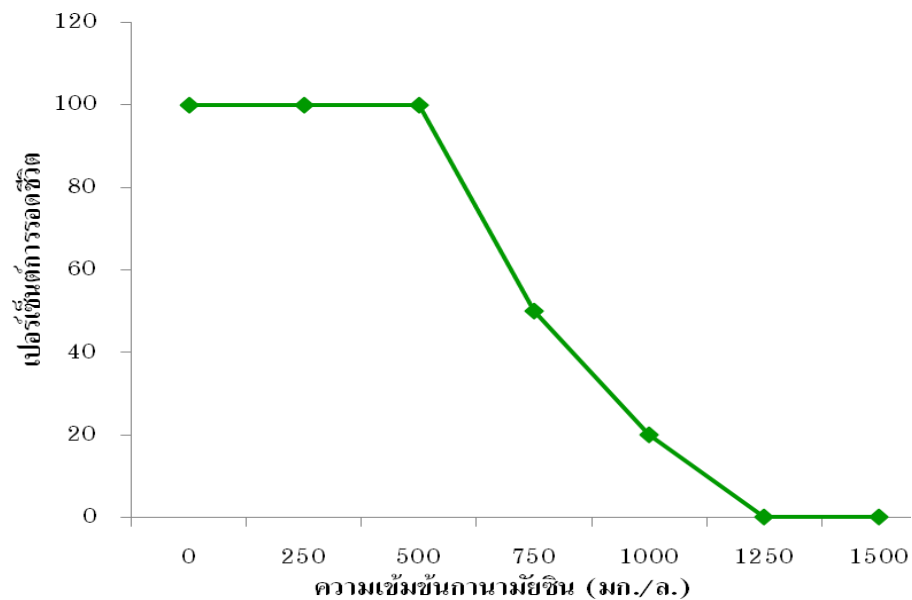
**ผลการทดลองที่ 5 อิทธิพลของสารปฏิชีวนะกานามัยซินต่อการเจริญของแคลลัสและ
ต้นอ่อนอ้อยพันธุ์มิตรผล 99-94**

จากการเพาะเลี้ยงแคลลัสอ้อยพันธุ์มิตรผล 99-94 บนอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติม 2,4-D 3 มก./ล. ร่วมกับ น้ำมะพร้าว 10% ที่มีกานามัยซินความเข้มข้น 0, 250, 500, 750, 1,000, 1,250 และ 1,500 มก./ล. พบว่า แคลลัสที่เลี้ยงบนสูตรอาหารที่เติมกานามัยซินความเข้มข้น 0, 250 และ 500 มก./ล. แคลลัสอ้อยมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต 100% ลักษณะแคลลัสมีสีเหลือง สามารถเจริญเติบโตและมีการขยายขนาด ส่วนแคลลัสที่เลี้ยงบนสูตรอาหารที่เติมกานามัยซินความเข้มข้น 750 และ 1,000 มก./ล. มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต 50% และ 20% ตามลำดับ แคลลัสบางส่วนมีการเปลี่ยนจากสีเหลืองเป็นสีน้ำตาล ส่วนแคลลัสที่เลี้ยงบนสูตรอาหารที่เติมกานามัยซินความเข้มข้น 1,250 มก./ล. และ 1,500 มก./ล. ไม่มีการรอดชีวิต แคลลัสเปลี่ยนสีจากสีเหลืองเป็นสีน้ำตาลและตายในที่สุด (ภาพที่ 37 และ 38)

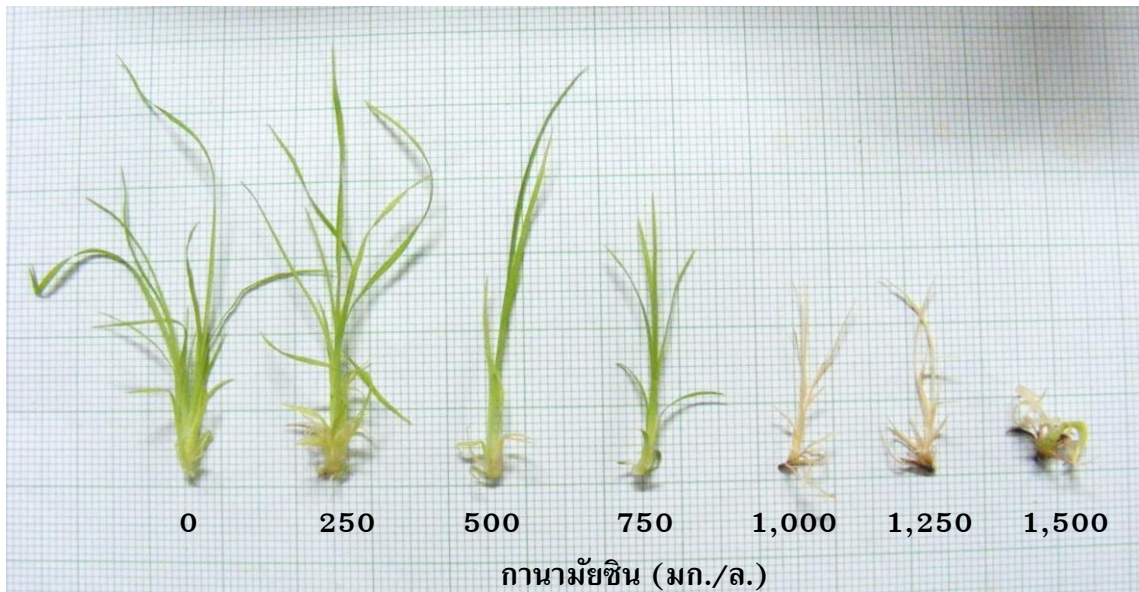
จากการเพาะเลี้ยงต้นอ่อนอ้อยพันธุ์มิตรผล 99-94 บนอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติม BA 3 มก./ล. ร่วมกับ IBA 0.5 มก./ล. ที่มีกานามัยซินความเข้มข้น 0, 250, 500, 750, 1,000, 1,250 และ 1,500 มก./ล. พบว่า ต้นอ่อนที่เลี้ยงบนสูตรอาหารที่กานามัยซินความเข้มข้น 0, 250, 500 และ 750 มก./ล. ต้นอ่อนอ้อยมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต 100% ส่วนต้นอ่อนที่เลี้ยงบนสูตรอาหารที่เติมกานามัยซินความเข้มข้น 1,000 และ 1,250 มก./ล. มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต 60% และ 30 % ตามลำดับ ใบอ่อนมีการเปลี่ยนแปลงจากสีเขียวเป็นสีน้ำตาล สำหรับต้นอ้อยที่เลี้ยงบนสูตรอาหารที่เติมกานามัยซินความเข้มข้น 1,500 มก./ล. ไม่มีการรอดชีวิต ใบอ่อนเปลี่ยนสีจากสีเขียวเป็นสีน้ำตาลและตายในที่สุด (ภาพที่ 39 และ 40)



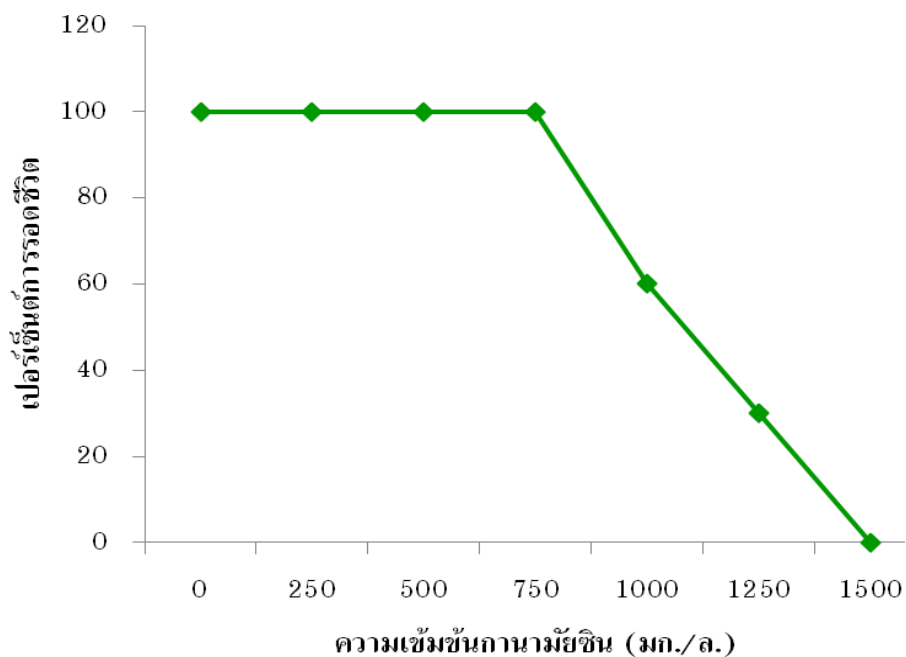
ภาพที่ 37 ลักษณะแคลลส์อ้อยพันธุ์มิตรผล 99-94 ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติม 2,4-D 3 มก./ล. ร่วมกับ น้ำมะพร้าว 10% ที่เติมกานามัยซินความเข้มข้น 0, 250, 500, 750, 1,000, 1,250 และ 1,500 มก./ล. เป็นเวลา 4 สัปดาห์



ภาพที่ 38 เปอร์เซนต์การรอดชีวิตของแคลลส์อ้อยพันธุ์มิตรผล 99-94 ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติม 2,4-D 3 มก./ล. ร่วมกับ น้ำมะพร้าว 10% ที่เติมกานามัยซินความเข้มข้น 0, 250, 500, 750, 1,000, 1,250 และ 1,500 มก./ล. เป็นเวลา 4 สัปดาห์



ภาพที่ 39 ลักษณะต้นอ่อนอ้อยพันธุ์มิตรผล 99-94 ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติม BA 3 มก./ล. ร่วมกับ IBA 0.5 มก./ล. ที่เติมกานามัยซินความเข้มข้น 0, 250, 500, 750, 1,000, 1,250 และ 1,500 มก./ล. เป็นเวลา 4 สัปดาห์



ภาพที่ 40 เปอร์เซนต์การรอดชีวิตของต้นอ่อนอ้อยพันธุ์มิตรผล 99-94 ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ดัดแปลงที่เติม BA 3 มก./ล. ร่วมกับ IBA 0.5 มก./ล. ที่เติมกานามัยซินความเข้มข้น 0, 250, 500, 750, 1,000, 1,250 และ 1,500 มก./ล. เป็นเวลา 4 สัปดาห์

4. สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากการศึกษาอิทธิพลของสารปฏิชีวนะซีโฟแทกซิมต่อการเจริญของแคลลัสและต้นอ่อนอ้อยพันธุ์ Phil 66-07 และพันธุ์มิตรผล 99-94 พบว่า แคลลัสอ้อยพันธุ์ Phil 66-07 ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรที่มีซีโฟแทกซิม 100, 200, 300, 400 และ 500 มก./ล. สามารถเจริญเติบโตได้ โดยมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต 100% เมื่อเปรียบเทียบกับแคลลัสอ้อยที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรที่ไม่เติมซีโฟแทกซิม แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของซีโฟแทกซิมเป็น 600 มก./ล. พบว่า แคลลัสอ้อยมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตลดลงเป็น 50% สำหรับแคลลัสอ้อยพันธุ์มิตรผล 99-94 ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรที่มีซีโฟแทกซิม 100, 200, 300, 400, 500, 600 และ 700 มก./ล. สามารถเจริญเติบโตได้ โดยมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต 100% และจากการเพาะเลี้ยงต้นอ่อนอ้อยทั้ง 2 สายพันธุ์บนสูตรอาหารที่เติมซีโฟแทกซิมความเข้มข้นต่างๆ กันพบว่า ความเข้มข้นสูงสุดของซีโฟแทกซิมที่ต้นอ่อนอ้อยพันธุ์ Phil 66-07 และพันธุ์มิตรผล 99-94 สามารถเจริญเติบโตได้ มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต 100% คือความเข้มข้นของซีโฟแทกซิม 700 และ 800 มก./ล. ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่าที่ระดับความเข้มข้นของซีโฟแทกซิม 500 มก./ล. สามารถทำให้ต้นอ่อนอ้อยทั้ง 2 สายพันธุ์ มีการเจริญเติบโตช้าลง ซึ่งสังเกตได้จากความสูงของต้นอ่อน สอดคล้องกับ Enriquez-Obregon *et al.* (1998) รายงานว่า ความเข้มข้นของซีโฟแทกซิม 500 มก./ล. เป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สามารถยับยั้งการเจริญของ *Agrobacterium* และทำให้แคลลัสอ้อยสามารถเจริญและพัฒนาเป็นต้นอ่อนได้ต่อไป Manickavasagum *et al.* (2004) กล่าวว่า ความเข้มข้นของซีโฟแทกซิม 500 มก./ล. เป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สามารถยับยั้งการเจริญของ *Agrobacterium* และทำให้เนื้อเยื่อเจริญบริเวณตาข้างอ้อยสามารถเจริญและพัฒนาเป็นต้นอ่อนได้

ไฮโกรมัยซินผลิตจากแบคทีเรีย *Streptomyces hygroscopicus* เป็นสารปฏิชีวนะที่มีประสิทธิภาพสูงในการกำจัดแบคทีเรียและฟังไจ เนื่องจากไปยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีน (Lin *et al.*, 1996) นอกจากจะใช้ในการกำจัดแบคทีเรียแล้ว ยังใช้คัดเลือกเนื้อเยื่อที่ผ่านการส่งถ่ายยีนจากการศึกษาอิทธิพลของสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินต่อการเจริญของแคลลัสและต้นอ่อนอ้อย พบว่า ไฮโกรมัยซินมีผลยับยั้งการเจริญของแคลลัสและต้นอ่อนอ้อยในปริมาณความเข้มข้นที่แตกต่างกัน โดยแคลลัสมีการตอบสนองต่อไฮโกรมัยซินในความเข้มข้นที่ต่ำกว่าต้นอ่อน อาจเนื่องมาจากแคลลัสเป็นเซลล์ที่ยังอ่อนและยังเจริญไม่เต็มที่ โดยระดับความเข้มข้นของไฮโกรมัยซินต่ำที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของแคลลัสอ้อยพันธุ์ Phil 66-07 และพันธุ์มิตรผล 99-94 ได้คือ 25 และ 30 มก./ล. ตามลำดับ สำหรับต้นอ่อนอ้อยพันธุ์ Phil 66-07 นั้นความเข้มข้นของไฮโกรมัยซินต่ำที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของต้นอ่อนอ้อยได้ทั้งหมด คือ 50 มก./ล. ซึ่งความเข้มข้นดังกล่าวเป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมที่ใช้คัดเลือกแคลลัสและต้นอ่อนอ้อยที่ได้รับการถ่ายยีนออกจากแคลลัสและต้นอ่อนอ้อยที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน เนื่องจากการทดลองนี้ใช้ *hpt* เป็นยีนเครื่องหมายในการคัดเลือกอ้อยตัดแปลงพันธุกรรม ซึ่งแคลลัสและต้นอ่อนอ้อยที่ได้รับการยีน

ดังกล่าวจะแสดงความต้านทานต่อไฮโกรมัยซินนี้ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Arencibia *et al.* (1998) พบว่า ความเข้มข้นของไฮโกรมัยซิน 25 มก./ล. เป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมในการคัดเลือกแคลลัสอ้อยที่ได้รับการส่งถ่ายยีนออกจากแคลลัสและต้นอ่อนอ้อยที่ไม่ได้รับการส่งถ่ายยีน Datta (1999) รายงานการส่งถ่ายยีนสู่พืชหลายชนิด พบว่า การเติมสารปฏิชีวนะในอาหารเพื่อใช้คัดเลือกพืชที่ได้รับการส่งถ่ายยีน เป็นวิธีที่เหมาะสม และยังพบว่าไฮโกรมัยซินเป็นสารปฏิชีวนะที่มีประสิทธิภาพและเหมาะสมในการคัดเลือกเนื้อเยื่อตัดแปรพันธุ์กรรมของพืช โดยไม่ทำให้พืชมีลักษณะผิดปกติเช่น เกิดลักษณะต้นเผือก (albino) หรือทำให้ต้นพืชนั้นเป็นหมัน (Ayres and Park, 1994 อ้างใน เกศสุคนธ์ มณีวรรณ, 2548) ในการส่งถ่ายยีนสู่อ้อย โดยบ่มแคลลัสอ้อยร่วมกับ เชื้อ *A. tumefaciens* จึงมีความจำเป็นที่จะต้องกำจัดเชื้อ *A. tumefaciens* เพื่อไม่ให้แคลลัสอ้อยได้รับอันตราย ซึ่งการกำจัดเชื้อดังกล่าว จำเป็นต้องใช้สารปฏิชีวนะ เช่น cefotaxime, carbenecillin และ timentin (Bottinger *et al.*, 2001; Sunikumar and Rathore, 2001; Cheng *et al.*, 1996) โดยพืชต่างชนิดกันจะใช้ปริมาณสารปฏิชีวนะแตกต่างกัน เนื่องจากมีความแตกต่างกันระหว่างชนิดของเนื้อเยื่อและชนิดของพืช ที่สามารถทนทานต่อปริมาณของสารปฏิชีวนะนั้นๆ (Choi *et al.*, 1994 อ้างใน สุนทิตพิย์ บุนนาคและ เนริสา คุณประทุม, 2540) ปัจจุบันมีการใช้ซีโฟแทกซิมอย่างกว้างขวาง โดยใช้ในปริมาณ 200–500 มก./ล. (Gama *et al.*, 1996; Pipatpanukul *et al.*, 2004) ซีโฟแทกซิมสามารถกำจัด *Agrobacterium* ได้โดยขัดขวางกระบวนการสังเคราะห์ เพปทิโดไกลแคน (peptidoglycan) ซึ่งเป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์แบคทีเรีย ซึ่งซีโฟแทกซิมจะไปจับกับเอนไซม์ transpeptidase ส่งผลให้เอนไซม์ไม่สามารถทำงานได้ ทำให้การเชื่อมต่อของสายเพปทิโดไกลแคนไม่สามารถเกิดขึ้นได้ (วิลาวลย์ เจริญวิระตระกูล, 2533; Teixeira da Silva and Fukai, 2001) ดังนั้นในการเลือกใช้ซีโฟแทกซิมกำจัด *Agrobacterium* จะต้องเลือกความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สามารถกำจัด *Agrobacterium* ได้และไม่ส่งผลกระทบต่อเนื้อเยื่อพืช

จากการศึกษาอิทธิพลของสารปฏิชีวนะกานามัยซินต่อการเจริญของแคลลัสและต้นอ่อนอ้อยพันธุ์มูมิตรผล 99-94 พบว่ากานามัยซินมีผลยับยั้งการเจริญของแคลลัสและต้นอ่อนอ้อยในปริมาณความเข้มข้นที่แตกต่างกัน โดยต้นอ่อนสามารถเจริญเติบโตได้ในอาหารที่เติมกานามัยซินที่ระดับความเข้มข้นที่สูงกว่าแคลลัส โดยแคลลัสที่เลี้ยงบนสูตรอาหารที่เติมกานามัยซินความเข้มข้น 750 และ 1,000 มก./ล. มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตลดลงเป็น 50% และ 20% ตามลำดับ ส่วนต้นอ่อนที่เลี้ยงบนสูตรอาหารที่เติมกานามัยซินความเข้มข้น 1,000 มก./ล. และ 1,250 มก./ล. มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตลดลงเป็น 60% และ 30 % ตามลำดับ โดยระดับความเข้มข้นของกานามัยซินต่ำที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของแคลลัสและต้นอ่อนอ้อยพันธุ์ได้ทั้งหมดคือ 1,250 มก./ล. และ 1,500 มก./ล. ตามลำดับ