การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสักและการทดสอบความต้านทานต่อสารปฏิชีวนะของเนื้อเยื่อสักเพื่อการถ่ายยีน

Tissue culture and antibiotic resistance determination of teak tissue for gene transformation

เยาวพรรณ สนธิกุล[1]สนธิชัย จันทร์เปรม[1,2]พีระศักดิ์ ศรีนิเวศน์[1,2]และเสริมศิริ จันทร์เปรม[1,3*]

Yaowaphan Sontikun[1], Sontichai Chanprame[1,2], Peerasak Srinives[1,2]and Sermsiri Chanprame[1,3*]

Abstract

The effects of plant clones, explant types, plant culture media, plant growth regulators and additive substances (silver nitrate and adenine sulfate) were tested to induce callus formation and shoot regeneration in 3 clones of teak. In tissue culture. It was found that leaf base tissue of teak clone 22C53 cultured on MS medium supplemented with 0.1 mg/l NAA and 0.6 mg/l BA was suitable for compact callus induction. For multiple shoots formation, teak node cultured on MS medium supplemented with 3.0 mg/l BA was the best medium that yielded an average of 5 shoots per node.

In addition, hygromycin at the concentrations of 0-20 mg/l were tested to determine the *in vitro* effects on leaf base, shoot and node explants. The results revealed that 10 mg/l hygromycin is the lowest concentration that could eliminate all non-transformed teak cells within 5 weeks. For the testing of 0-400 mg/l cefotaxime on *Agrobacterium* elimination and callus growth, the results demonstrated that the concentration of 300-400 mg/l were able to completely eliminate *Agrobacterium* with no harm on plant tissue.

Keywords: teak, micropropagation, plant growth regulator, antibiotic

---

[1] ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ.นครปฐม 73140 และ ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตรสำนักงานพัฒนาบัณฑิตศึกษาและการวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี, สกอ., กรุงเทพฯ 10900

[1] Center for Agricultural Biotechnology, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom 73140 / Center of Excellence on Agricultural Biotechnology: (AG-BIO/PERDO-CHE), Bangkok 10900, Thailand.

[2] ภาควิชาพืชไร่นา, และ [3]ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์วิทยาเขตกำแพงแสน จ. นครปฐม 73140

[2] Dept. of Agronomy, [3]Dept. of Horticulture, Fac. of Agriculture at Kamphaeng Saen, Kasetsart University, Nakhon Pathom 73140, Thailand

รับเรื่อง : กรกฎาคม 2557

* corresponding author: agrsrc@ku.ac.th

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ได้ศึกษาผลของสายต้น ชิ้นส่วนพืช สูตรอาหาร สารควบคุมการเจริญเติบโต และสารเสริม (silver nitrate และ adenine sulfate) ที่เหมาะสมกับการชักนำแคลลัส และการเพิ่มปริมาณยอดของสัก 3 สายต้น พบว่า การเพาะเลี้ยงฐานใบของสักสายต้น 22C53 บนอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 0.6 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสแบบเกาะกันแน่นได้ดีที่สุด ส่วนการชักนำให้เกิดยอดจำนวนมากจากตาข้างนั้นทำโดยเพาะเลี้ยงข้อบนอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า สามารถชักนำให้เกิดยอดได้เฉลี่ย 5 ยอดต่อข้อ

นอกจากนี้ ได้ทดสอบผลของสารปฏิชีวนะ hygromycin ความเข้มข้น 0-20 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่มีต่อการเจริญของเนื้อเยื่อฐานใบ ยอด และข้อของต้นสักในสภาพปลอดเชื้อ พบว่าอาหารที่เติม hygromycin ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นความเข้มข้นต่ำที่สุดที่สามารถกำจัดชิ้นส่วนที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนได้หมดภายใน 5 สัปดาห์ สำหรับการทดสอบสารปฏิชีวนะ cefotaxime ความเข้มข้น 0-400 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่มีผลต่อประสิทธิภาพในการกำจัดเชื้อ *Agrobacterium* และต่อการพัฒนาของเนื้อเยื่อสัก พบว่า cefotaxime ที่ความเข้มข้น 300-400 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถกำจัดเชื้อ *A. tumefaciens*ได้หมดโดยไม่เป็นอันตรายต่อเนื้อเยื่อพืช

คำนำ

สัก เป็นพืชที่สำคัญชนิดหนึ่งของประเทศไทย เนื่องจากเนื้อไม้มีสีและลวดลายที่สวยงาม เป็นลักษณะเฉพาะ อีกทั้งยังมีความแข็งแรงทนทานต่อการเข้าทำลายของแมลงและเชื้อรา จึงมีการนำไม้สักไปใช้ประโยชน์อย่างกว้างขวางทำให้มีการตัดโค่นต้นสักออกจากป่าธรรมชาติเป็นจำนวนมาก รัฐบาลจึงได้มีการรณรงค์ให้ปลูกป่าสักขึ้น แต่ปัญหาที่พบในป่าปลูก คือ ลักษณะการปลูกเป็นพืชเชิงเดี่ยวในพื้นที่กว้างทำให้มีปัญหาเรื่องโรคและแมลงเข้าทำลายต้นสัก ส่งผลให้ต้นสักเจริญได้ไม่ดี แนวทางแก้ไขวิธีหนึ่ง คือ การปรับปรุงพันธุ์เพื่อสร้างสายพันธุ์สักที่ต้านทานต่อโรคและแมลง แต่การปรับปรุงพันธุ์แบบมาตรฐาน (conventional breeding) นั้นมีข้อจำกัดหลายประการ เช่น ใช้เวลาหลายปีกว่าจะออกดอกผสมติดยาก และเมล็ดมีการงอกต่ำและไม่สม่ำเสมอ รวมทั้งในธรรมชาติมีความหลากหลายทางพันธุกรรมต่ำ (Gyves and Rugini, 2009) แนวทางหนึ่งในการแก้ไขปัญหาเหล่านี้คือ การนำวิธีการพันธุวิศวกรรมหรือการถ่ายยีนมาใช้เพื่อสร้างสายพันธุ์สักพันธุ์ดีที่ต้านทานต่อแมลงและโรค หรือมีอัตราการเจริญเติบโตสูง และให้ผลผลิตที่มีคุณภาพดี ซึ่งจะส่งผลให้เกิดการปลูกป่าสักเชิงเศรษฐกิจได้อย่างกว้างขวางมากขึ้น

การถ่ายยีนเข้าสู่พืชอย่างมีประสิทธิภาพนั้นส่วนหนึ่งเป็นผลมาจากการมีระบบการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ที่เหมาะสม การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของไม้ยืนต้นนั้นทำได้ยากกว่าไม้เนื้ออ่อน และมักมีปัญหาเกี่ยวกับการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ (regeneration) การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสักมีการรายงานโดย Gupta *et al.* (1980) ที่ได้เพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณยอดบนอาหารสูตร MS (Murashige and Skoog, 1962) เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต 6-benzylamino purine (BA) และ kinetin แล้วชักนำรากในอาหารเหลวสูตร White (White, 1963) และต่อมา Shirin *et al*. (2005) รายงานการชักนำยอดจากข้อสักในอาหารสูตร MS ที่เติม BAความเข้มข้น 2.25 มิลลิกรัมต่อลิตรและ 1-naphthalene acetic acid (NAA) ความเข้มข้น 0.19 มิลลิกรัมต่อลิตร และ Akram and Aftab (2008) รายงานว่าการใช้ thidiazuron (TDZ) ความเข้มข้น 1.76 มิลลิกรัมต่อลิตรในการชักนำให้เกิดยอดจากข้อได้ผลดี

นอกจากนี้การคัดเลือกเซลล์พืชที่ได้รับการถ่ายยีนออกจากกลุ่มเนื้อเยื่อที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนซึ่งโดยทั่วไปนิยมใช้ลักษณะต้านทานต่อสารปฏิชีวนะในการคัดเลือกโดยการถ่ายยีนเครื่องหมายคัดเลือก (selectable marker gene) ที่ควบคุมลักษณะต้านทานต่อสารปฏิชีวนะ เช่นยีน *neomycin phosphotransferaseII* (*nptII*) ซึ่งควบคุม

ลักษณะต้านทานต่อสารปฏิชีวนะ kanamycin และยีน *hygromycin phosphotransferase* (*hpt*) ซึ่งควบคุมลักษณะต้านทานต่อสารปฏิชีวนะ hygromycin เข้าไปในจีโนมพืชพร้อมกับยีนที่ต้องการ เนื้อเยื่อพืชที่ไม่ได้รับยีนดังกล่าว เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารคัดเลือกที่เติมสารปฏิชีวนะเหล่านี้จะตาย เนื่องจากสารคัดเลือกมีผลยับยั้งกระบวนการทางชีวเคมี เช่นการสังเคราะห์โปรตีนบางชนิด ส่วนเซลล์ที่ได้รับยีนที่ควบคุมลักษณะต้านทานจะยังคงรอดชีวิตอยู่ได้ (Koronfel, 1998) และ Norwati *et al*. (2007) รายงานว่า hygromycin ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถกำจัดชิ้นส่วนข้อสักที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนได้ ส่วน Widiyanto *et al*. (2009) รายงานว่า kanamycin ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถใช้ในการคัดเลือกยอดของสักที่ได้รับยีน *nptII* ได้

สำหรับการถ่ายยีนโดยใช้เชื้อ *Agrobacterium tumefaciens* นั้นในปัจจุบันมีสารปฏิชีวนะหลายชนิดที่ใช้สำหรับการกำจัดเชื้อ *A. tumefaciens* ภายหลังการถ่ายยีน ซึ่งมักเป็นสารในกลุ่ม beta-lactam เช่น cefotaxime และ carbenicillin ซึ่งมีผลในการยับยั้งการสร้างผนังเซลล์ของแบคทีเรีย โดยไม่ส่งผลหรือมีผลเล็กน้อยกับเซลล์พืช (Asbel and Levison, 2000) ทั้งนี้ความต้านทานสารปฏิชีวนะของพืชแต่ละชนิดจะแตกต่างกันไปตามสายพันธุ์ ชนิดของชิ้นส่วน และ ระยะการเจริญเติบโตของพืช (Koronfel, 1998) ดังนั้นจึงมีความจำเป็นต้องศึกษาวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและการเลือกใช้สารปฏิชีวนะที่เหมาะสม เพื่อไม่ให้เป็นอันตรายต่อเนื้อเยื่อพืชแต่สามารถกำจัดเชื้อได้หมด

ในการทดลองครั้งนี้ จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาวิธีการที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสัก เพื่อนำไปใช้ในการถ่ายยีน และทดสอบความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะ hygromycin ที่ใช้กำจัดเนื้อเยื่อสักที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน และสารปฏิชีวนะ cefotaxime ที่ใช้ในการกำจัดเชื้อ *A. tumefaciens* โดยที่ไม่เป็นอันตรายต่อเนื้อเยื่อสัก

อุปกรณ์และวิธีการ

การศึกษาผลของสายต้น ชิ้นส่วนพืช และสูตรอาหารต่อการเกิดแคลลัส

เพาะเลี้ยงฐานใบ และข้อของสักที่เพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ จำนวน 3 สายต้น คือ 26C33, 22C53 และ 16C7 บนอาหารแข็ง 4 สูตร คือ MS (Murashige and Skoog, 1962), ½ MS, WPM (Woody Plant Medium) และ SH (Schenk and Hildebrandt, 1972) โดยทุกสูตรเติม NAA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ และวุ้นผง 0.75 เปอร์เซ็นต์ ปรับ pH เป็น 5.7 เพาะเลี้ยงในสภาพมืดอุณหภูมิ 25 ± 2องศาเซลเซียส หลังการเพาะเลี้ยง 4 สัปดาห์ บันทึกเปอร์เซ็นต์ชิ้นส่วนที่สร้างแคลลัสและขนาดแคลลัส วางแผนการทดลองแบบ completely randomized design (CRD) โดยจัดสิ่งทดลองแบบ factorial จำนวน 4 ซ้ำ ใช้เนื้อเยื่อซ้ำละ 8 ชิ้นเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's multiple range test (DMRT)

การศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการเกิดแคลลัส

เพาะเลี้ยงฐานใบสักสายต้น 22C53 บนอาหารสูตร MS ที่เติม TDZ ความเข้มข้น 0.2 0.4 0.6 0.8 หรือ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือ NAA ความเข้มข้น 0.1 หรือ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 0.1 0.2 0.4 0.6 หรือ1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ทุกสูตรอาหารเติมน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ และวุ้นผง 0.75 เปอร์เซ็นต์ ปรับ pH เป็น 5.7 เพาะเลี้ยงในสภาพที่ให้แสง 55 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที 16 ชั่วโมงต่อวัน ที่อุณหภูมิ 25± 2 องศาเซลเซียส หลังการเพาะเลี้ยง 4 สัปดาห์ บันทึกเปอร์เซ็นต์ชิ้นส่วนที่สร้างแคลลัสและขนาดแคลลัส วางแผนการทดลองแบบ CRD จำนวน 4 ซ้ำ ใช้เนื้อเยื่อซ้ำละ 8 ชิ้นเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี DMRT

การชักนำให้เกิดยอดจากชิ้นส่วนข้อ

นำข้อของสักสายต้น 22C53 ในสภาพปลอดเชื้อมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 1 2 3 4 หรือ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร และศึกษาผลของการเติม silver nitrate ความเข้มข้น 1 2 3 4 หรือ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือการเติม adenine sulfate ความเข้มข้น 10 20 30 40 หรือ 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ในอาหารเพาะเลี้ยงที่เติม BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ทุกสูตรอาหารเติมน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ และวุ้นผง 0.75 เปอร์เซ็นต์ ปรับ pH เป็น 5.7 เพาะเลี้ยงในสภาพที่ให้แสง 55 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 4 สัปดาห์ โดยบันทึกจำนวนยอด และความยาวยอด วางแผนการทดลองแบบ CRD จำนวน 4 ซ้ำ ใช้เนื้อเยื่อซ้ำละ 5 ชิ้น เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT

การทดสอบความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะ hygromycin B ต่อการกำจัดเนื้อเยื่อสักที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน

เพาะเลี้ยงฐานใบบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 0.6 มิลลิกรัมต่อลิตร และเพาะเลี้ยงยอดและข้อบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยในแต่ละสูตรอาหารเติม hygromycin B (PAA, Australia) ความเข้มข้น 0 3 5 10 หรือ 20 มิลลิกรัมต่อลิตร ทุกสูตรอาหารเติมน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ และวุ้นผง 0.75 เปอร์เซ็นต์ ปรับ pH เป็น 5.7 เพาะเลี้ยงในที่ให้แสง 55 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที โดยเปลี่ยนอาหารทุก 2 สัปดาห์ เป็นเวลา 5 สัปดาห์ แล้วบันทึกผลการตายของชิ้นส่วน

การทดสอบประสิทธิภาพของสารปฏิชีวนะ cefotaxime ต่อการกำจัดเชื้อ *Agrobacterium tumefaciens*

นำยอด ข้อ และฐานใบของสักที่เพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อมาปลูกเชื้อโดยการแช่ชิ้นส่วนในเซลล์แขวนลอยเชื้อ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ EHA 105 (OD_{600}=1) ที่มีพลาสมิด pCAMBIA 1304 ปลูกเชื้อในสภาพมืดเป็นเวลา 3ชั่วโมง แล้วย้ายชิ้นส่วนไปเพาะเลี้ยงร่วม (co-cultivation) บนอาหารแข็งสูตร MS เติม acetosyringone ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ เพาะเลี้ยงในสภาพมืด เป็นเวลา 3 วัน แล้วเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนบนอาหารสูตรที่เหมาะสมกับเนื้อเยื่อแต่ละชนิด โดยแต่ละสูตรอาหารเติม cefotaxime ความเข้มข้น 0 200 250 300 หรือ 400 มิลลิกรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงในที่ให้แสง 55 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที โดยเปลี่ยนอาหารทุก 2 สัปดาห์ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ บันทึกเปอร์เซ็นต์ของชิ้นส่วนที่ปลอดเชื้อ วางแผนการทดลองแบบ CRD จำนวน 3 ซ้ำ ใช้เนื้อเยื่อซ้ำละ 8 ชิ้น

การศึกษาผลของสารปฏิชีวนะ cefotaxime ที่มีต่อการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อสัก

เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสักบนอาหารเช่นเดียวกับการทดลองที่กล่าวแล้วโดยไม่มีการปลูกเชื้อ *A. Tumefaciens* แต่ละสูตรอาหารเติม cefotaxime ความเข้มข้น 0 200 250 300 350 หรือ 400 มิลลิกรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงในที่ให้แสง 55 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที เป็นเวลา 4 สัปดาห์ บันทึกเปอร์เซ็นต์การเกิดยอด และเปอร์เซ็นต์ชิ้นส่วนที่เกิดแคลลัส วางแผนการทดลองแบบ CRD จำนวน 3 ซ้ำ ใช้เนื้อเยื่อซ้ำละ 8 ชิ้น เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT

ผลและวิจารณ์

ผลของสายต้น ชิ้นส่วนพืช และสูตรอาหารต่อการเกิดแคลลัส

จากการศึกษาสายต้น ชิ้นส่วนพืชและสูตรอาหารต่อการชักนำแคลลัสของต้นสัก 3 สายต้น พบว่าสักทั้ง 3 สายต้นมีการเกิดแคลลัสไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ โดยสายต้น 22C53 มีเปอร์เซ็นต์ชิ้นเนื้อเยื่อที่เกิดแคลลัสเฉลี่ยสูงสุด 57.68 เปอร์เซ็นต์ มีขนาดแคลลัสเฉลี่ย 2.66 มิลลิเมตร (ตารางที่ 1)

การชักนำแคลลัสจากชิ้นส่วนที่แตกต่างกันพบว่าฐานใบสร้างแคลลัสได้ดีกว่าข้อ โดยมีชิ้นเนื้อเยื่อที่เกิดแคลลัสได้สูงสุด 65.10 เปอร์เซ็นต์ มีขนาดแคลลัสเฉลี่ย 3.14 มิลลิเมตร ในขณะที่ข้อสร้างแคลลัสได้ 45.41 เปอร์เซ็นต์ และมีขนาดแคลลัสเฉลี่ย 1.84 มิลลิเมตรโดยเกิดแคลลัสที่บริเวณรอยตัดด้านฐานใบ ซึ่งเป็นแคลลัสแบบเกาะกันแน่น(compact callus) สีเหลืองอ่อน

สำหรับการชักนำแคลลัสบนสูตรอาหารที่แตกต่างกัน พบว่าการใช้อาหารสูตร MS และ SH มีเปอร์เซ็นต์ชิ้นส่วนที่เกิดแคลลัสเฉลี่ยสูงสุด ซึ่งมีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญกับสูตรอาหารอื่นๆ และแคลลัสที่ชักนำได้มีขนาดใหญ่กว่าแคลลัสจากสูตรอาหารอื่นเช่นกัน (ตารางที่ 1) โดยแคลลัสที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนบนอาหารสูตร MS มีลักษณะเป็นแคลลัสแบบเกาะกันแน่นสีเหลืองอ่อน ส่วนแคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร SH นั้นมีสีเหลืองอ่อนถึงซีดขาว มีทั้งที่เป็นแคลลัสแบบเกาะกันแน่น และที่เกาะกันแบบหลวมๆ (friable callus) ส่วนแคลลัสบนอาหารสูตร WPM ที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ มีการสร้างสารสีน้ำตาลบริเวณที่สัมผัสอาหาร เนื้อเยื่อเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลและตายในเวลา 4 สัปดาห์

ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการเกิดแคลลัส

จากการเพาะเลี้ยงฐานใบของสักสายต้น 22C53 บนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม TDZ พบว่าที่ความเข้มข้น 0.2มิลลิกรัมต่อลิตร มีเนื้อเยื่อที่เกิดแคลลัสได้สูงถึง 95.83 เปอร์เซ็นต์ มีขนาดแคลลัสเฉลี่ย 4.07 มิลลิเมตร แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นขึ้นมีผลทำให้การเกิดแคลลัสลดลง ส่วนการเพาะเลี้ยงในอาหารที่เติม NAA ร่วมกับ BA พบว่าการเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 0.6 มิลลิกรัมต่อลิตร มีเนื้อเยื่อที่เกิดแคลลัสได้สูงสุด 97.92 เปอร์เซ็นต์ มีขนาดแคลลัสเฉลี่ย 6.33 มิลลิเมตร (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 1 เปอร์เซ็นต์ชิ้นเนื้อเยื่อที่เกิดแคลลัส และขนาดแคลลัสที่ชักนำจากข้อ และฐานใบของสักสายต้น 16C7 22C53 และ 26C33 บนอาหารสูตรต่างๆ เพาะเลี้ยงในสภาพมืด เป็นเวลา 4 สัปดาห์

ปัจจัยที่ทดสอบ		ชิ้นส่วนที่เกิดแคลลัส (%)[1/]	Ø แคลลัสเฉลี่ย (มม.)[1/]
สายต้น	16C7	53.91	2.25
	22C53	57.68	2.66
	26C33	54.18	2.56
ชิ้นส่วน	ฐานใบ	65.10[a]	3.14[a]
	ข้อ	45.41[b]	1.84[b]
สูตรอาหาร	½ MS	53.97[b]	2.54[b]
	MS	75.00[a]	3.68[a]
	WPM	45.83[b]	1.94[b]
	SH	74.24[a]	3.42[a]
C.V. (%)		39.12	52.96

หมายเหตุ [1/]ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรที่เหมือนกันในแต่ละปัจจัย ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($p \leq 0.01$) เปรียบเทียบโดยวิธี DMRT

ตารางที่ 2การเกิดแคลลัสจากฐานใบของสักสายต้น 22C53 บนอาหารสูตร MS ที่เติม TDZ หรือ NAA ร่วมกับBA เพาะเลี้ยงในสภาพที่ให้แสงเป็นเวลา 4 สัปดาห์

NAA(มก./ล.)	BA(มก./ล.)	TDZ(มก./ล.)	ชิ้นส่วนที่เกิดแคลลัส (%)[1/]	Ø แคลลัสเฉลี่ย (มม.)[1/]
		0.2	95.83[a]	4.07[b]
		0.4	91.67[a]	5.40[a]
		0.6	91.67[a]	3.87[b]
		0.8	75.00[ab]	4.23[ab]
		1.0	66.67[b]	4.81[ab]
	C.V. (%)		25.39	26.87
0.1	0.1		83.33[ab]	3.63[d]
	0.2		64.58[b]	7.07[ab]
	0.4		93.75[ab]	6.17[abc]
	0.6		97.92[a]	6.33[abc]
	1.0		91.67[ab]	5.70[abcd]
1.0	0.1		91.67[ab]	4.30[cd]
	0.2		87.50[ab]	6.20[abc]
	0.4		75.00[ab]	6.90[ab]
	0.6		79.17[ab]	7.53[a]
	1.0		91.67[ab]	4.93[bcd]
	C.V. (%)		18.50	24.33

หมายเหตุ[1/]ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรที่เหมือนกันในแต่ละปัจจัย ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($p \leq 0.05$) เปรียบเทียบโดยวิธี DMRT

เมื่อเปรียบเทียบผลดังกล่าวนี้ พบว่า การชักนำแคลลัสโดยการเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม NAA ร่วมกับ BA ให้ผลดีกว่าการเติม TDZ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Widiyanto *et al*. (2005) ซึ่งพบว่าการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนสักบนอาหารสูตร WPM ร่วมกับการเติม NAA และ BA สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสแบบเกาะแน่น ซึ่งเป็นแคลลัสที่มีแนวโน้มว่าสามารถเจริญเป็นยอดได้มากกว่าการเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม TDZ

อย่างไรก็ตามจากการทดลองนี้แคลลัสที่เกิดขึ้นไม่สามารถพัฒนาไปเป็นยอดได้ โดยเมื่อเพาะเลี้ยงแคลลัสบนอาหารสูตรเดิมต่อเนื่องเป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์ แคลลัสจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลและตายในที่สุด ซึ่งในพืชหลายชนิดมีรายงานว่าถึงแม้จะชักนำให้เกิดแคลลัสชนิด compact callus ได้ แต่ไม่สามารถชักนำให้เกิดยอดจากแคลลัสได้ เช่น *Astragalus nezaketae* (Erisen *et al*., 2010) และ *Tylophora indica* (Sahai *et al*., 2010)

การชักนำให้เกิดยอดจากชิ้นส่วนข้อ

จากการเพาะเลี้ยงข้อของสักสายต้น 22C53 บนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 0-5 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าอาหารที่เติม BA ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดเฉลี่ยสูงสุด 5.2 ยอดต่อข้อ (ตารางที่ 3) แต่ลักษณะของยอดที่ได้มีความสูงไม่สม่ำเสมอกัน และมีลักษณะฉ่ำน้ำอาจเป็นผลมาจากการใช้

BA ความเข้มข้นสูง ซึ่งลักษณะนี้พบในพืชอื่นเช่นกัน (Vardja and Vardja, 2001) ในขณะที่การเพาะเลี้ยงในอาหารที่เติม BA ความเข้มข้นน้อยกว่า 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้จำนวนยอดไม่แตกต่างกันทางสถิติ แต่ยอดมีลักษณะปกติ (ภาพที่ 2)

กรณีการเกิดปัญหายอดฉ่ำน้ำนี้มีรายงานวิจัยในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกาแฟ ซึ่งพบว่าการใช้ silver nitrate ช่วยลดการฉ่ำน้ำและเพิ่มจำนวนยอดได้ (Sridevi *et al*., 2010) ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงได้ทดลองใช้ silver nitrate ที่ความเข้มข้น 1-5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อเพิ่มปริมาณยอด เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าการใช้ silver nitrate ความเข้มข้น 1 และ 2 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมกับ BA สามารถชักนำให้เกิดยอดเฉลี่ยได้สูงสุด 5.17 ยอดต่อข้อ (ตารางที่ 3) ยอดที่เกิดขึ้นจากการเพาะเลี้ยงข้อบนอาหารที่เติม silver nitrate ทุกความเข้มข้น ไม่แสดงอาการฉ่ำน้ำ แต่มีลักษณะข้อสั้นเป็นกระจุก บางยอดไม่สามารถแยกออกเป็นยอดเดี่ยวได้ มีใบใหญ่สีเขียวเข้ม และใบผิดรูปร่าง (ภาพที่ 2)

ส่วนการใช้ adenine sulfateในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชนั้น มีรายงานวิจัยที่ระบุว่า adenine sulfate ช่วยกระตุ้นการเกิดยอดได้ดีขึ้น เนื่องจาก adenine sulfate อาจทำหน้าที่คล้ายสารตั้งต้นของการสังเคราะห์สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชกลุ่มไซโตไคนิน หรืออาจไปช่วยในการส่งเสริมการสร้างไซโตไคนิน ตามธรรมชาติ จึงส่งผลไปกระตุ้นการเจริญเติบโตของเซลล์และส่งเสริมการสร้างยอดได้ (Naaz *et al*., 2014) ในการทดลองนี้จึงได้เพาะเลี้ยงข้อสักบนอาหารแข็งสูตร MS ร่วมกับการเติม BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร และเติม adenine sulfate ความเข้มข้นต่างๆ พบว่าการเติม adenine sulfate ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดเฉลี่ยสูงสุดจำนวน 5.83 ยอดต่อข้อ โดยยอดที่ได้มีความยาวเฉลี่ย 3.15 เซนติเมตร และมีลักษณะปกติ (ตารางที่ 3 และ ภาพที่ 2)

อย่างไรก็ตามจากผลการทดลองใช้ BA ร่วมกับสารเสริมคือ silver nitrate หรือ adenine sulfate พบว่าจำนวนยอดที่เกิดขึ้นจากการเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติมสารเสริมใกล้เคียงกับการเติม BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร เพียงอย่างเดียว อีกทั้งการเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม silver nitrate ยังให้ยอดที่มีลักษณะผิดปกติ ดังนั้นในการเพิ่มปริมาณยอดสักจึงควรใช้อาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร เพียงอย่างเดียว

การทดสอบความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะ hygromycin B ต่อการกำจัดเนื้อเยื่อสักที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน

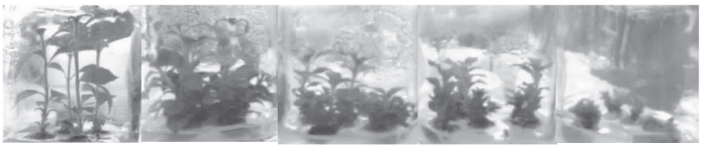
การทดสอบความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะ hygromycin ที่เหมาะสมสำหรับใช้กำจัดเนื้อเยื่อที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน โดยการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนต่างๆ ของสักบนอาหารที่เติม hygromycin พบว่าทุกความเข้มข้นที่ทดสอบส่งผลยับยั้งการเจริญของเนื้อเยื่อโดยเนื้อเยื่อเริ่มซีดขาวหรือมีสีน้ำตาล และบางส่วนตายหลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 สัปดาห์ และการตายเพิ่มสูงขึ้นในสัปดาห์ที่ 2 และ 3 และเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 5 สัปดาห์พบว่าเนื้อเยื่อสักที่เพาะเลี้ยงใน hygromycin ความเข้มข้น 10 และ 20 มิลลิกรัมต่อลิตร ตายทั้งหมด (ภาพที่ 3) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Norwati *et al*. (2007) ที่ใช้ hygromycin ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ในการคัดเลือกชิ้นส่วนข้อสักภายหลังการถ่ายยีน

การใช้ hygromycin ความเข้มข้นสูงนั้นแม้ว่าจะสามารถกำจัดเนื้อเยื่อที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนได้ดี แต่อาจส่งผลทำให้การเจริญเติบโตของพืชลดลง หรืออาจทำให้เซลล์ที่รอดชีวิตไม่สามารถพัฒนาเป็นต้นใหม่ได้ ซึ่ง Dave (1990) ได้รายงานว่า hygromycin ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถกำจัดแคลลัส sugar beet ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนได้ แต่เมื่อใช้ความเข้มข้นดังกล่าว ในการคัดเลือกภายหลังการถ่ายยีนเข้าสู่ใบเลี้ยง พบว่าแคลลัสที่เกิดขึ้นไม่สามารถพัฒนาไปเป็นยอดได้แต่การใช้สารคัดเลือกความเข้มข้นต่ำเกินไปอาจทำให้การคัดเลือกไม่มีประสิทธิภาพ เช่นชิ้นส่วนที่ไม่ได้สัมผัสสารคัดเลือกโดยตรงอาจสามารถเจริญเติบโตได้ (Christou *et al*., 1988) ดังนั้นจึงควรเลือกใช้ความเข้มข้นน้อยที่สุดที่สามารถกำจัดเนื้อเยื่อปกติได้หมด ซึ่งในกรณีของสักควรเลือกใช้ hygromycin ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร

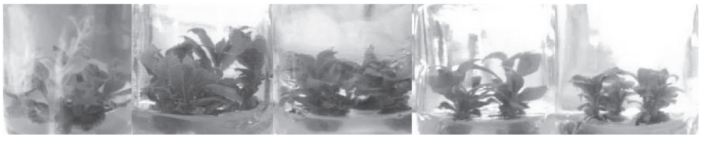
ตารางที่ 3 ผลของ BA, silver nitrate และ adenine sulfate ต่อการเกิดยอดจากข้อสัก บนอาหารแข็งสูตร MS ที่เพาะเลี้ยงในสภาพให้แสงเป็นเวลา 4 สัปดาห์

BA (มก./ล.)	silver nitrate (มก./ล.)	adenine sulfate (มก./ล.)	จำนวนยอดเฉลี่ย[1/]	ความยาวยอดเฉลี่ย(ซม.)[1/]
0			1.5[c]	2.85[a]
1.0			3.0[b]	1.58[ab]
2.0			4.5[ab]	1.5[ab]
3.0			5.0[a]	1.28[b]
5.0			5.2[a]	1.2[b]
	C.V. (%)		24.44	15.09
3.0	0		4.67	2.17[a]
	1.0		5.17	1.33[b]
	2.0		5.17	0.86[c]
	3.0		4.33	1.03[bc]
	5.0		4.67	0.89[bc]
	C.V. (%)		15.85	43.98
3.0		0	5.00[b]	3.62
		10	5.17[ab]	3.77
		20	4.83[b]	3.78
		30	5.00[b]	4.32
		50	5.83[a]	3.15
	C.V. (%)		12.53	30.06

หมายเหตุ[1/]ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันในแต่ละปัจจัยไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($p \leq 0.05$) เปรียบเทียบโดยวิธี DMRT



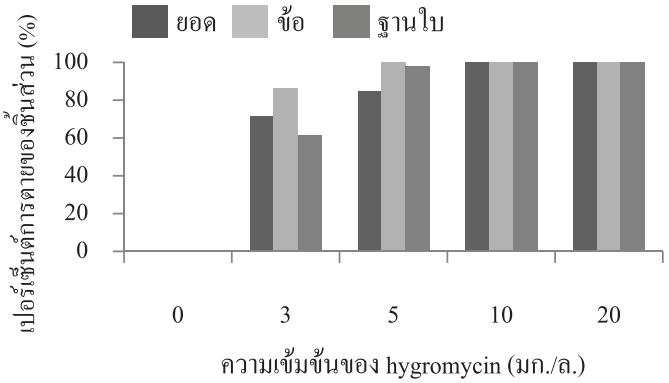
MS+ BA 0 มก./ล. 1 มก./ล. 2 มก./ล. 3 มก./ล. 5 มก./ล.



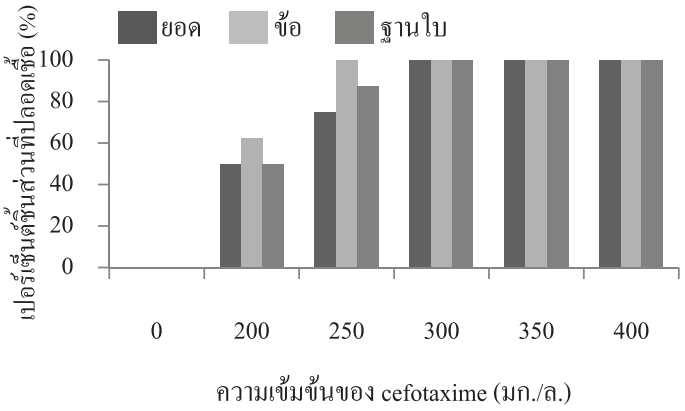
MS+BA 3 มก./ล. + SN 0 มก./ล. 1 มก./ล. 2 มก./ล. 3 มก./ล 5 มก./ล.

MS+BA 3 มก./ล. + AS 0 มก./ล. 10 มก./ล. 20 มก./ล. 30 มก./ล. 50 มก./ล.

ภาพที่ 2 ลักษณะยอดสักที่เกิดจากการเพาะเลี้ยงข้อบนอาหาร MS ที่ดัดแปลงโดยเติม BA, silver nitrate (SN) หรือ adenine sulfate (AS) ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 4 สัปดาห์



ภาพที่ 3 เปอร์เซ็นต์การตายของชิ้นส่วนสักที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม hygromycin เมื่อเพาะเลี้ยงในสภาพที่ให้แสง เปลี่ยนอาหารทุก 2 สัปดาห์ เป็นเวลา 5 สัปดาห์



ภาพที่ 4 ผลของสารปฏิชีวนะ cefotaximeในการกำจัดเชื้อ *A. tumefaciens* จากชิ้นส่วนต่างๆ ที่เพาะเลี้ยงในสภาพที่ให้แสง เป็นเวลา 4 สัปดาห์

การทดสอบผลของสารปฏิชีวนะ cefotaxime ต่อการกำจัดเชื้อ *Agrobacterium tumefaciens* และต่อการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อสัก

สารปฏิชีวนะ cefotaxime จัดอยู่ในกลุ่ม cephalosporin ออกฤทธิ์ทำลายแบคทีเรียโดยการขัดขวางการสร้างผนังเซลล์ของแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบ มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียได้ดีแม้ใช้ที่ระดับความเข้มข้นต่ำ จึงนิยมใช้ในขั้นตอนการกำจัดเชื้อหลังการถ่ายยีนโดยใช้เชื้อ *Agrobacterium* เป็นพาหะ (Mathias and Boyd, 1986)

จากการทดสอบประสิทธิภาพของสารปฏิชีวนะ cefotaxime ต่อการกำจัดเชื้อ *A. tumefaciens* บริเวณผิวของชิ้นส่วนต้นสักในงานวิจัยนี้พบว่าชิ้นส่วนที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม cefotaxime ความเข้มข้น 300 – 400 มิลลิกรัมต่อลิตรไม่พบการปนเปื้อนของเชื้อ *A. tumefaciens* บนชิ้นส่วน แต่การใช้ความเข้มข้นน้อยกว่า 300 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่ายังมีเนื้อเยื่อสักบางชิ้นปนเปื้อนเชื้อ (ภาพที่ 4)

จากการทดสอบความเข้มข้นของ cefotaxime ที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อสัก เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า ข้อสักที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่

เติม cefotaxime ทุกความเข้มข้นที่ทดสอบ สามารถสร้างยอดได้ทุกชิ้นส่วน และมีการเกิดยอดจำนวนมากกว่าการเพาะเลี้ยงบนอาหารที่ไม่เติม cefotaxime ส่วนการเพาะเลี้ยงฐานใบ พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เติม cefotaxime ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ชิ้นส่วนสามารถสร้างแคลลัสได้ทุกชิ้น และแคลลัสมีขนาดใหญ่กว่าแคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่ไม่เติม cefotaxime (ตารางที่ 4) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานในอ้อย (Mittal *et al*., 2009) ทั้งนี้อาจเนื่องจาก cefotaxime มีโครงสร้างทางเคมีคล้ายสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช หรืออาจเกิดการแตกตัวให้สารที่ไปกระตุ้นการทำงานของสารควบคุมการเจริญเติบโต ซึ่งมีผลไปช่วยส่งเสริมการสร้างแคลลัส และยอด (Mathias and Mukasa, 1987)

อย่างไรก็ตามจากการทดลองนี้ พบว่าการใช้ cefotaxime ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 350 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำให้เกิดแคลลัสลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Li *et al*. (2007) ที่พบว่าการใช้ cefotaxime ความเข้มข้นสูงมีผลยับยั้งการสร้าง somatic embryo จากชิ้นส่วนใบของ London plane tree ส่วน Yu *et al.,* (2001) พบว่าการใช้ cefotaxime ในปริมาณที่เหมาะสมสามารถส่งเสริมการเจริญของแคลลัสและการเกิด somatic embryoในมะละกอ แต่การใช้ความเข้มข้นสูง 375-500 มิลลิกรัมต่อลิตร กลับมีผลยับยั้งการเกิดแคลลัส

ดังนั้นความเข้มข้นของ cefotaxime ที่เหมาะสมในการกำจัดเชื้อ *A. tumefaciens* ออกจากเนื้อเยื่อสักจึงไม่ควรต่ำกว่า 300 มิลลิกรัมต่อลิตร เนื่องจากสามารถกำจัดเชื้อที่ผิวชิ้นส่วนได้ทั้งหมด และไม่มีผลยับยั้งการเจริญและพัฒนาของเนื้อเยื่อ ซึ่งผลดังกล่าวนี้สอดคล้องกับการถ่ายยีนในเบญจมาศโดยใช้ *A. tumefaciens* เป็นพาหะ (Teixeira da Silva and Fukai, 2001) ซึ่งใช้ cefotaxime ในการกำจัดเชื้อที่ความเข้มข้น 125 ถึง 500 มิลลิกรัมต่อลิตร

ตารางที่ 4 ผลของสารปฏิชีวนะ cefotaxime ต่อการเกิดยอดจากข้อ และการเกิดแคลลัสจากฐานใบสักเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม cefotaximeในสภาพที่ให้แสงเป็นเวลา 4 สัปดาห์

Cefotaxime (มก./ล.)	ชิ้นส่วนที่เกิดยอด (%)	จำนวนยอดเฉลี่ย (ยอด/ข้อ)	ชิ้นส่วนที่เกิดแคลลัส(%)[1/]	Ø แคลลัสเฉลี่ย (มม.)[1/]
0	100	4.92	100^{a}	5.15^{bc}
200	100	5.45	100^{a}	7.72^{a}
250	100	5.54	95.83^{a}	7.04^{ab}
300	100	5.58	91.67^{a}	7.01^{ab}
350	100	5.50	83.33^{ab}	5.32^{bc}
400	100	5.21	70.83^{b}	4.33^{c}
C.V. (%)	-	24.40	32.93	54.34

หมายเหตุ [1/]ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันในคอลัมน์เดียวกันไม่แตกต่างทางสถิติ ($p \leq 0.05$) เปรียบเทียบโดยวิธี DMRT

สรุป

การศึกษาปัจจัยต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสัก พบว่าสักทุกสายต้นที่ทดสอบมีการตอบสนองต่ออาหารเพาะเลี้ยงไม่แตกต่างกัน โดยฐานใบที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติมNAAความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมกับ BAความเข้มข้น 0.6มิลลิกรัมต่อลิตรสามารถพัฒนาเป็นแคลลัสได้ดีแต่ไม่สามารถสร้างยอดใหม่จากแคลลัสได้ ส่วนการชักนำให้เกิดยอดจำนวนมากจากข้อของสักสายต้น 22C53 พบว่า บนอาหารสูตรMS ที่เติม BA ความเข้มข้น 3.0มิลลิกรัมต่อลิตร ทำให้เกิดยอดได้ดีที่สุด

ส่วนการทดสอบสารปฏิชีวนะที่ใช้ในการถ่ายยีนนั้นพบว่าการใช้สารปฏิชีวนะ hygromycin ความเข้มข้น 10มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถกำจัดเนื้อเยื่อที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนได้หมด และจากการทดสอบสารปฏิชีวนะ cefotaxime พบว่า ที่ความเข้มข้น 300 – 400 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถกำจัด *A. tumefaciens* ออกจากเนื้อเยื่อสักได้ทั้งหมด โดยไม่มีผลยับยั้งการเจริญและพัฒนาของเนื้อเยื่อ

คำขอบคุณ

งานวิจัยนี้ ได้รับการสนับสนุนจากโครงการเครือข่ายเชิงกลยุทธ์ของสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ และจากศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร ภายใต้ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและการวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ

เอกสารอ้างอิง

Akram, M. and F. Aftab. 2008. High frequency multiple shoot formation from nodal explants of teak (*Tectona grandis* L.) induced by thidiazuron. Propagation Ornamen. Plant. 8: 72-75.

Asbel L.E. and M.E. Levison. 2000. Cephalosporins, carbapenems and monobactams. Infect. Dis. Clinic. North Amer. 14: 435-447.

Christou, P., D.E. McCabe and W.F. Swain. 1988. Stable transformation of soybean callus by DNA-coated gold particles. Plant Physiol. 87: 671-674.

Dave W. C. 1990. The effect of antibiotics on the inhibition of callus induction and plant regeneration from cotyledons of sugarbeet (*Beta vulgaris* L.). Plant Cell Rep. 9: 285-288.

Erisen, S., M. Yorgancilar, E. Atalay, M. Babaoglu and A. Duran. 2010. Callus induction and plant regeneration of the endemic *Astragalus nezaketae* in Turkey. E. J. Biotech. 13: 1-7.

Gupta, P.K., A.L. Nadgir, A.F. Mascarenhas and V. Jaganathan. 1980. Tissue culture of forest trees: clonal multiplication of *Tectona grandis* L. (teak) by tissue culture. Plant Sci. Lett. 17: 259–268.

Gyves, E.M. and E. Rugini. 2009. Teak. pp. 321-340. *In* C. Kole and T. C. Hall Jr., eds. Compendium of Transgenic Crop Plants: Transgenic Forest Tree Species. Blackwell Publishing Ltd.

Koronfel, M. 1998. Effects of the antibiotics kanamycin, cefotaxime and carbenicillin on the differentiation of flax hypocotyls. Arab J. Biotech. 1: 93-98.

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.

Mathias, R.J. and L.A. Boyd. 1986. Cefotaxime stimulates callus growth, embryogenesis and regeneration in hexaploid bread wheat (*Triticum aestivum* L. emThell). Plant Sci. 46: 217-223.

_____.and C. Mukasa. 1987. The effect of cefotaxime on the growth and regeneration of callus from four varieties of barley (*Hordeum vulgaris* L.). Plant Cell Rep. 6: 454-557.

Mittal, P., S.S. Gosal, A. Sengerand P. Kumar. 2009. Impact of cefotaxime on somatic embryo genesis and shoot regeneration in sugarcane. Physiol. Mol. Biol. Plant. 15: 257-265.

Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol Plant. 15: 473-497.

Naaz, A., A. Shahzad and A. Mohammad. 2014. Effect of adenine sulphate interaction on growth and development of shoot regeneration and inhibition of shoot tip necrosis under *in vitro* condition in adult *Syzygium cumini* L. - a multipurpose tree. Appl. Bioch. Biotech. 173: 90–102.

Norwati, A., A. Ruslan, M. Norwati and B. Norlia. 2007. A biolistic approach for the transfer and expression of *uidA* gene in nodal segments of teak (*Tectona grandis*). Asia-Pacific J. Mol. Biol. Biotech. 15: 115-120.

Sahai, A., A. Shahzad and M. Anis. 2010. High frequency plant production *via* shoot organogenesis and somatic embryogenesis from callus in *Tylophora indica*, an endangered plant species. Turk. J. Bot. 34: 11-20.

Schenk, R.U. and A.C. Hildebrandt. 1972. Medium and techniques for induction and growth monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. Can. J. Bot. 50: 199-204.

Shirin, F., P.K. Rana and A.K. Mandal. 2005. *In vitro* clonal propagation of mature *Tectona grandis* through axillary bud proliferation. J. Forest Res. 10: 465-469.

Sridevi, V., P. Giridhar, P.S. Simmi and G.A. Ravishankar. 2010. Direct shoot organo genesis on hypocotyl explants with collar region from *in vitro* seedlings of *Coffea canephora* Pierre ex. Frohner cv. C3R and *Agrobacterium tumefaciens* - mediated transformation. Plant Cell, Tiss. Organ Cult. 101: 339–347.

Teixeira da Silva, J.A. and S. Fukai. 2001. The impact of carbenicillin, cefotaxime and vancomycin on chrysanthemum and tobacco TCL morphogenesis and *Agro bacterium* growth. J. Appl. Hort. 3: 3-12.

Vardja, R. and T. Vardja. 2001. The effect of cytokinin type and concentration and the number of subculture on the multiplication rate of some decorative plants. Proc. Estonian Acad. Sci. Biol. Eco. 50: 22-32.

White, P.R. 1963. The cultivation of animal and plant cells.Ronald Press, New York. 239 p.

Widiyanto, S.N, D. Erytrina and H. Ahmania. 2005. Adventitious shoot formation on teak (*Tectona grandis* L.f.) callus cultures derived from internodal segments. Acta Hort. 692: 153-158.

_____ , A. Sukmawan, N. Haro and H. Rahmania. 2009. Transient expression of *β-glucuronidase* reporter gene in *Agrobacterium*-inoculated shoots of various teak clones. African J. Biotech. 8: 2143-2150.

Yu, T.A., S.D. Yeh and J.S. Yang. 2001. Effect of carbenicillin and cefotaxime on callus growth and somatic embryogenesis from adventitious roots of papaya. Bot. Bull. of Acad. Sin. 42: 281-286.