# บทที่ 1

# บทนำ

การขยายพันธุ์พืชแบบไม่อาศัยเพศเป็นสิ่งจำเป็นมากในพืชบางชนิด โดยเฉพาะกลุ่มพืชซึ่งขยายพันธุ์ด้วยเมล็ดแล้วมีความผันแปรสูง กลุ่มพืชที่เป็นหมัน หรือในบางกลุ่มที่เพศของพืชมีความสัมพันธ์กับผลผลิต ตัวอย่างเช่น มะละกอ ต้นกระเทยและต้นตัวเมียเท่านั้นที่ให้ผลผลิตสูง ในกรณีดังกล่าวนี้หากขยายพันธุ์ด้วยเมล็ดไม่สามารถทำนายได้ว่าผลผลิตจะเป็นอย่างไร การขยายพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศของพืชบางชนิดทำได้ยากและค่าใช้จ่ายสูง นอกจากนี้ยังมีปัจจัยอื่นๆอีกมากอันเป็นอุปสรรคต่อการขยายพันธุ์พืช เช่นขนาดของต้นแม่พันธุ์ ถ้ามีขนาดเล็กก็ขยายออกไปได้ปริมาณน้อย จำนวนต้นใหม่ที่ผลิตได้จึงมีราคาต่อหน่วยค่อนข้างสูง

การขยายพันธุ์โดยการเลี้ยงเนื้อเยื่อ นับเป็นเทคโนโลยีแบบใหม่ที่เข้ามามีบทบาทต่อการขยายพันธุ์พืชแบบไม่อาศัยเพศ ด้วยเทคนิคนี้สามารถขยายพันธุ์ได้ครั้งละมากๆในเวลาอันจำกัด โดยใช้ชิ้นส่วนของพืชเพียงชิ้นเดียว ในวงการกล้วยไม้หรือพืชประดับอื่นที่มีราคาแพงนิยมขยายพันธุ์ด้วยวิธีการเลี้ยงเนื้อเยื่อมาก อย่างไรก็ดีพบว่าแม้เทคนิคการเลี้ยงเนื้อเยื่อจะเป็นเทคนิคที่ดีกว่าและราคาถูกกว่าวิธีการขยายพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศวิธีเดิมที่ใช้กัน แต่ยังมีต้นทุนการผลิตสูงอยู่ ปัจจุบันพบวิธีการขยายพันธุ์วิธีใหม่เรียกว่า การผลิตเมล็ดพืชเทียม (artificial seed) ซึ่งเทคนิคหลักยังเป็นการเลี้ยงเนื้อเยื่อ แต่เทคนิคนี้พบว่าระยะเวลาของพืชที่เจริญในขวดแก้วลดลง ทำให้ผลผลิตที่ได้มีราคาต่อหน่วยต่ำลงมาก ทั้งยังมีข้อได้เปรียบในการขนส่งอีกด้วย (Redenbaugh et al., 1986 ; Fujii et al., 1987 ; ชัยวัฒน์ น่าชม 2531)

เมล็ดพืชเทียมประกอบด้วยส่วนสำคัญ 3 ส่วน ซึ่งเป็นการเลียนแบบเมล็ดที่ได้จากการผสมพันธุ์ตามธรรมชาติ ได้แก่

1. Somatic embryo หรือเอมบริออยด์ (embryoid) ซึ่งเป็นเอมบริโอที่ได้จากการเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

2. เอนโดสเปิร์มเทียม (artificial endosperm) ที่สังเคราะห์ขึ้นมาแทนเอนโดสเปิร์มของเมล็ด เพื่อให้อาหารแก่ somatic embryo ในระยะเริ่มมีการงอกเกิดขึ้น

3. เปลือกเมล็ดพืชเทียม (artificial seed coat) หน้าที่ป้องกันอันตรายให้กับเมล็ดพืชเทียมจากเชื้อโรค หรือสภาวะที่ไม่เหมาะสมในระหว่างการเก็บและขนย้าย (Fujii et al., 1987 ; Redenbaugh, Fujii and Slade, 1988)

ขบวนการพัฒนาของ somatic embryo ในหลอดแก้ว เรียกว่า somatic embryogenesis ซึ่งในพืชชั้นสูงเริ่มมีการศึกษาเป็นครั้งแรกโดย Steward, Mapes และ Mears (1958) หลังจากนั้น 20 ปี Murashige (1977) ได้เสนอแนวความคิดในการใช้ somatic embryo เพื่อผลิตเมล็ดพืชเทียม ต่อจากนั้นเทคนิคในการผลิตเมล็ดพืชเทียมได้มีการพัฒนาอีกหลายรูปแบบเพื่อสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้มากยิ่งขึ้น อย่างไรก็ดีเทคนิคการผลิตเมล็ดพืชเทียมนับเป็นเทคโนโลยีใหม่ซึ่งเริ่มมีการศึกษาและประสบความสำเร็จเมื่อไม่กี่ปีมานี้ เทคโนโลยีประเภทนี้มีผลต่อการค้าโดยตรง ดังนั้นแม้ว่านักวิทยาศาสตร์จะประสบความสำเร็จในการผลิตเมล็ดพืชเทียมในพืชหลายชนิด แต่ยังเก็บรายละเอียดของวิธีการเป็นความลับอยู่ ดังนั้นงานวิจัยครั้งนี้จึงมุ่งที่จะพัฒนาเทคนิคการผลิตเมล็ดพืชเทียมเพื่อจะสามารถเก็บรักษาให้มีระยะเวลานานขึ้น และพัฒนาการงอกของเมล็ดพืชเทียมหลังจากการเก็บรักษา เพื่อสามารถนำเมล็ดพืชเทียมไปใช้ประโยชน์ได้ดียิ่งขึ้น

**วัตถุประสงค์และขอบเขตของงานวิจัย**

1. เพื่อหาวิธีการในการเก็บเมล็ดพืชเทียมให้ได้นานขึ้น
2. พัฒนาเทคนิคการผลิตเมล็ดพืชเทียมเพื่อให้มีอัตราการงอกสูงขึ้น

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

**การสำรวจเอกสาร**

เอมบริโอสามารถเจริญได้ตามสภาวะปกติในธรรมชาติ หรือเจริญโดยการควบคุมและปรับสภาพแวดล้อมให้เหมาะสมในหลอดแก้วซึ่งสามารถแบ่งได้เป็น 2 ประเภท ดังนี้

1. Zygotic embryo คือ เอมบริโอที่เจริญจากไซโกต (zygote) ซึ่งเกิดจากนิวเคลียสของละอองเกสรตัวผู้ 2 นิวเคลียส เคลื่อนที่เข้าไปผสมพันธุ์ในถุงเอมบริโอ (embryo sac) โดยที่สเปอร์มนิวเคลียส 1 นิวเคลียส จะเข้าผสมกับเซลไข่ (egg cell) เกิดเป็นไซโกตที่ต่อมาเจริญเป็นเอมบริโอหรือต้นอ่อนที่ประกอบด้วย ยอดอ่อน(plumule) ต้นอ่อน(caulicle) และรากอ่อน (radicle) ส่วนสเปิร์มนิวเคลียสอีก 1 นิวเคลียสจะเข้าผสมกับโพลานิวเคลียส (polar nucleus) เกิดเป็นเซลล์ที่จะเจริญไปเป็นเอนโดสเปิร์ม ซึ่งเป็นอาหารของเอมบริโอในขณะที่มีการเจริญเติบโตหรือในขณะที่เมล็ดกำลังงอก

2. Non-zygotic embryo คือ เอมบริโอที่เจริญมาจากเซลล์อื่น ๆ ที่ไม่ใช่ไซโกต เช่น

- Parthenogenetic embryo คือ เอมบริโอที่เจริญมาจากเซลล์ไข่ที่ไม่ได้เกิดการปฏิสนธิ (unfertilized egg) หรือไข่ที่เกิดการปฏิสนธิแต่ไม่มี karyogamy

- Androgenetic embryo คือ เอมบริโอที่สร้างมาจาก microspore, microgametophyte หรือ sperm

- Somatic embryo (embryoid) คือ เอมบริโอที่เจริญมาจาก somatic cell ทั้งในสภาพธรรมชาติ หรือหลอดแก้ว (Kohlenbach, 1977; Bhojwani and Razdan, 1983; Vajrabhaya, 1988)

สำหรับขบวนการพัฒนาของ somatic embryo ในหลอดแก้ว เรียกว่า somatic embryogenesis ซึ่งในพืชชั้นสูงเริ่มมีการศึกษาเป็นครั้งแรกโดย Steward และคณะ (1958) โดยนำส่วนโฟลเอ็มที่ตัดจากหัวแครอทมาเลี้ยงเซลล์แบบแขวนลอย (suspension culture) ในอาหารเหลวสูตรพื้นฐานของ White (1934) โดยเติมน้ำมะพร้าว และ 2, 4-D (2,4 - dichlorophenoxyacetic acid) ได้ต้นใหม่ที่มีสีเขียวของแครอทที่พัฒนาจากเอมบริโอระยะ torpedo ซึ่งเจริญจากกลุ่มเซลล์ในการเลี้ยงเซลล์แบบแขวนลอย ในขณะเดียวกัน Reinert (1958) ได้แสดงให้เห็นว่าต้นพืชใหม่ที่เกิดจากแคลลัสของแครอทมีรูปแบบการพัฒนาคล้ายกับ zygotic embryo จนกระทั่งปัจจุบันพบว่ามีพืชอื่น ๆ อีกหลายชนิดที่สามารถชักนำให้เกิด somatic embryo ได้

Somatic embryo ที่เจริญในหลอดแก้วโดยทั่วไปเรียกว่าเอมบริออยด์(embryoid) แต่อาจจะเรียกกันในชื่ออื่น เช่น accessory embryo, adventive embryo และ supernumerary embryo ก็ได้ (Bhojwani and Razdan, 1983 ; Vajrabhaya, 1988)

Somatic embryogenesis เป็นกระบวนการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อไปเป็นต้นอ่อนของพืชที่มีทั้งส่วนยอดและรากที่สมบูรณ์โดยมีแหล่งกำเนิดเดียวกัน เป็นการเจริญใน 2 ทิศทาง

(bipolar) การพัฒนาแบบนี้จะคล้ายกับ zygotic embryogenesis คือมีระยะที่กลุ่มเซลล์มีรูปร่างแบบ globular shape, heart shape และ torpedo shape สุดท้ายจะได้ต้นพืชที่สมบูรณ์ (Steward and Mapes, 1971; Kohlenbach, 1977; Vajrabhaya, 1988) ในขณะที่ organogenesis เป็นกระบวนการพัฒนาของเนื้อเยื่อไปเป็นส่วนหนึ่งส่วนใดของพืชโดยมีการเจริญในทิศทางเดียว (unipolar)

Somatic embryogenesis สามารถเกิดได้ 2 แนวทางด้วยกัน คือ

1. เกิดโดยตรง (Direct somatic embryogenesis) somatic embryo จะเกิดขึ้นจากเซลล์ของชิ้นพืช (explant) ที่นำมาเลี้ยงโดยตรง โดยไม่ผ่านกระบวนการสร้างแคลลัส

2. เกิดโดยอ้อม (Indirect somatic embryogenesis) somatic embryo จะเกิดขึ้นโดยต้องผ่านกระบวนการสร้างแคลลัสก่อน แล้วจึงพัฒนาไปเป็น somatic embryo

จากการศึกษาลักษณะในการเกิดแคลลัส และการเจริญของเนื้อเยื่อในการเลี้ยงเซลล์แขวนลอยของแครอท พบว่าประกอบด้วยเซลล์ 2 ชนิดคือ

1. เซลล์ที่มีขนาดใหญ่ และมี vacuole ใหญ่ โดยปกติขาดความสามารถในการพัฒนาไปเป็นอวัยวะหรือ somatic embryo ส่วนมากกระจายอย่างเป็นอิสระในอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อ

2. เซลล์มีขนาดค่อนข้างเล็ก มีไซโตพลาสซึมเข้มข้น นิวเคลียสมีขนาดใหญ่เมื่อเทียบกับขนาดของเซลล์ พวกนี้มีความสามารถในการสร้างเอมบริโอได้ ซึ่ง Halperin (1966) เรียกว่า proembryonic mass โดย McWilliam, Smith และ Street (1974) เรียกว่า embryogenic clump เมื่อแยก embryogenic clump ออกจากกันเป็นกลุ่มเล็กๆ แต่ละกลุ่มขยายจำนวน และแยกไปเป็น embryogenic clump ใหม่ได้ แต่ถ้าย้ายกลุ่มของ meristemetic cell หรือ embryogenic clump ที่อ่อน ไปเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ไม่มีออกซิน (auxin) พบว่าสามารถชักนำให้เกิดเอมบริโอได้ และหากแยกกลุ่มเซลล์นี้ออกเป็นเซลล์เดี่ยวก็สามารถชักนำให้เกิดเอมบริโอได้เป็นจำนวนมากเช่นกัน

**ปัจจัยที่มีผลต่อการเกิด somatic embryogenesis**

1. ปัจจัยภายในเนื้อเยื่อพืช ได้แก่ ลักษณะของเนื้อเยื่อพืชที่นำมาเลี้ยง เช่น พันธุกรรมของพืช องค์ประกอบต่างๆของเนื้อเยื่อพืช (Gamborg, 1975) และชนิดของส่วนของพืชที่นำมาเลี้ยงในแครอทพบว่าทุกส่วนของพืชสามารถชักนำให้เกิด somatic embryo ได้เช่น ส่วนไฮโปคอทิล (ส่วนใต้ใบเลี้ยง) ส่วนของรากอ่อน โปรโตพลาสต์ และก้านใบ เป็นต้น และจากการศึกษาของชัยวัฒน์ น่าชม (2535) ในแครอทพบว่า แคลลัสที่เจริญมาจากแคมเบียม และลำต้นส่วนใต้ใบแท้ของต้นอ่อน สามารถชักนำให้เกิด somatic embryo ได้ดีที่สุด ส่วนแคลลัสที่ชักนำจากส่วนก้าน

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ใบและต้นกล้าของแครอทชักนำให้เกิด somatic embryo ได้ไม่ดีนัก ส่วนในยาสูบพบว่าแคลลัสที่ชักนำจากส่วนลำต้น และใบเป็นแคลลัสที่ชักนำให้เกิด somatic embryo ได้ดีที่สุด นอกจากนี้พบว่าการนำส่วนของพืชมาเลี้ยงเนื้อเยื่อจะให้ผลดีหรือไม่นั้นอาจขึ้นกับตำแหน่งของพืชที่สัมผัสอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อด้วย

2. ปัจจัยภายนอก ซึ่งแยกได้เป็น ปัจจัยทางเคมี และปัจจัยทางกายภาพ ดังนี้

2.1 ปัจจัยทางเคมี

จากการศึกษาพบว่า somatic embryo สามารถเจริญได้ดีในอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อหลายชนิด เช่น White (White, 1963) $B_5$ (Gamborg, Miller and Ojima, 1968) SH (Schenk and Hildebrandt, 1972) และ MS (Murashige and Skoog, 1962) อาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร $B_5$, SH และ MS ถูกจัดเป็นสูตรอาหารที่มีความเข้มข้นเกลืออนินทรีย์สูง โดยเฉพาะสูตร MS มีความเข้มข้นของเกลืออนินทรีย์สูงกว่าสูตรอาหารของ White ถึง 10 เท่า จากการศึกษาของ Evan, Flick และ Jensen (1981) พบว่า 70 % ของพืชที่นำมาชักนำให้เกิด somatic embryo มักจะเลี้ยงในอาหารสูตร MS หรือ MS ที่ปรับปรุงแล้ว (modified MS) (Ammirato, 1983)

สำหรับสารควบคุมการเจริญของพืชที่มีบทบาทในการชักนำให้เกิดsomatic embryogenesis มากที่สุด ได้แก่ ออกซินที่มีในอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อ ในการชักนำให้เกิด somatic embryo ของแครอทนั้นมีขั้นตอนการทำงาน 2 ขั้นตอน ซึ่งแต่ละขั้นตอนต้องการอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อที่แตกต่างกัน การเกิดแคลลัสต้องการอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อที่มีออกซิน เรียกอาหารแบบนี้ว่า proliferation medium ซึ่งออกซินที่ใช้กันโดยทั่วไปคือ 2,4-D และเมื่อย้ายแคลลัสลงในอาหารที่มีออกซินเพียงเล็กน้อยหรือไม่มีออกซินเลย เรียกว่า embryo development medium ก็จะชักนำให้มีการพัฒนาไปเป็น somatic embryo (Halperin and Wetherell, 1964; Reinert, 1973; Fujimura and Komamine, 1975; Kamada and Harada, 1979 ; Bhojwani and Razdan, 1983) นอกจากนี้พบว่าออกซินใน proliferation medium มีความจำเป็นสำหรับเนื้อเยื่อที่จะพัฒนาไปเป็นเอมบริโอใน embryo development medium โดยเนื้อเยื่อที่อยู่ในอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ไม่มีออกซินตลอดระยะการเจริญจะไม่ชักนำให้เกิดเอมบริโอ ดังนั้น proliferation medium จึงเสมือนว่าเป็น induction medium สำหรับ somatic embryogenesis (Sung and Okimoto, 1981)

นอกจากออกซินแล้วยังมีธาตุอาหารที่จำเป็นและมีผลต่อการชักนำให้เกิด somatic embryo อย่างมาก ได้แก่ ไนโตรเจน ซึ่ง Halperin และ Wetherell (1965) รายงานว่าในการเลี้ยงแครอทป่าซึ่งเจริญจากส่วนของก้านใบ เอมบริโอจะมีการเจริญเมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อซึ่งมี reduced nitrogen โดยแคลลัสที่เจริญบนอาหารที่มี $KNO_3$ ซึ่งเป็นแหล่งไนโตรเจนเพียงแหล่ง

เดียวจะไม่สามารถชักนำให้เกิดเอมบริโอได้ถึงแม้ว่าจะย้ายไปเลี้ยงในอาหารที่ไม่เติมออกซิน อย่างไรก็ตามการเติมไนโตรเจน (5 มิลลิโมลต่อลิตร) ในรูปของ $NH_4Cl$ ในอาหารที่มี $KNO_3$ 55 มิลลิโมลต่อลิตรจะชักนำให้เกิดการเจริญของเอมบริโอ นอกจากนี้ยังแสดงให้เห็นว่าการมี reduced nitrogen จะมีผลเฉพาะในสูตรอาหารที่ชักนำให้เกิดแคลลัสเท่านั้น ดังนั้นถ้าแคลลัสเกิดบนอาหารที่มี $KNO_3$ และ $NH_4Cl$ ก็จะสร้างเอมบริโอได้ โดยในสูตรอาหารชักนำให้เกิด somatic embryo จะมีหรือไม่มี $NH_4Cl$ ก็ได้

Reinert, Tazawa และ Semenoff (1967) แสดงให้เห็นว่าการเลี้ยงแคลลัสของแครอทบ้าน (domestic carrot) เอมบริโอสามารถพัฒนาได้แม้ว่าจะไม่มี reduced form ของไนโตรเจน โดยเลี้ยงในอาหารซึ่งมีความเข้มข้นของ $KNO_3$ สูงพอประมาณ อย่างไรก็ตามความสามารถในการทำให้เกิดเอมบริโอด้วย $KNO_3$ เพียงอย่างเดียวจะไม่สูงเท่ากับใช้ $KNO_3$ และ $NH_4Cl$ ที่รวมกันอย่างเหมาะสม และเมื่อใช้ $NH_4Cl$ เป็นแหล่งไนโตรเจนเพียงอย่างเดียวสามารถชักนำให้เกิด embryogenesis ได้ดีเมื่อเทียบกับใช้ $NH_4Cl$ รวมกับ $KNO_3$ อย่างไรก็ตามเมื่อปรับ pH ให้เท่ากับ 5.4 ถ้ามี $NH_4Cl$ เพียงอย่างเดียว pH ของอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อจะลดลงจาก 5.4 เป็น 3.5 ในเวลา 4 วัน ซึ่งจะยับยั้งการเกิด embryogenesis (Dougall and Verma, 1978) ดังนั้นโดยทั่วไปจึงใช้ $NH_4^+$ ร่วมกับ $NO_3^-$

ถึงแม้ว่าไม่มี reduced nitrogen รูปอื่นๆที่ให้ผลเหมือนกับ $NH_4^+$ บางครั้งในการเลี้ยงเนื้อเยื่ออาจจะเติมสารอินทรีย์บางชนิดลงไปเพื่อช่วยเพิ่มปริมาณไนเตรทเช่น Caseinhydrolysate, glutamine และ alanine (Wetherell and Dougall, 1976)

Brown, Wetherell และ Dougall (1976) รายงานว่าการใช้ potassium ion (20 มิลลิโมลต่อลิตร) มีความจำเป็นในการเกิด embryogenesis ของแครอทป่า

สำหรับไซโตไคนิน(cytokinin) จะไม่มีบทบาทในการชักนำให้เกิด somatic embryogenesis แต่จะมีผลต่อการแบ่งเซลล์ การขยายขนาดของแคลลัสและการเจริญของเอมบริโอไปเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์ (Arora and Singh, 1978; Fujimura and Komamine, 1980; Chen,Wang and Maeda, 1987) โดยนิยมใช้ไซโตไคนินในรูปของ zeatin มากกว่า kinetin และ BA (Fujimura and Komamine, 1975)

มีรายงานว่า IAA และ $GA_3$ จะยับยั้งการเกิด embryogenesis ได้ในพืชบางชนิด

2.2 ปัจจัยทางกายภาพ

ปัจจัยทางกายภาพที่มีผลต่อ somatic embryogenesis ได้แก่ อุณหภูมิ ความเข้มแสง ช่วงแสง ก๊าซ ความเร็วจำนวนรอบต่อนาทีของเครื่องเขย่า ความหนาแน่นของ somatic embryo ที่เหมาะสม ซึ่งจะให้ผลที่แตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของพืช และระยะการเจริญ เช่น ใน

แครอท ความเข้มแสงเพียงเล็กน้อยก็สามารถชักนำให้เกิดเอมบริโอได้ดี (Ammirato and Steward, 1971) ในขณะที่ยาสูบ (*Nicotiana tabacum*) ต้องการความเข้มแสงสูงมากในการชักนำให้เกิดเอมบริโอ (Haccius, 1978)

**เมล็ดพืชเทียม**

เมล็ดพืชเทียมเกิดจากการนำ somatic embryo ที่ได้จากการเลี้ยงเนื้อเยื่อมาแขวนลอยในอาหารที่จะทำหน้าที่เป็นเอนโดเสปิร์ม และหุ้มด้วยส่วนที่ทำหน้าที่แทนเปลือกหุ้มเมล็ด เพื่อป้องกันอันตรายและให้อาหารแก่เอมบริโอ ซึ่งเป็นการเลียนแบบเมล็ดจริงจากธรรมชาติ

ถึงแม้ว่ามีพืชหลายชนิดที่สามารถชักนำให้เกิด somatic embryo ได้แต่มีเพียงไม่กี่ชนิดที่สามารถสร้าง somatic embryo ที่มีคุณภาพสูง และสามารถเจริญเป็นต้นได้ดี ซึ่งในพืชกลุ่มที่ 1 (ตารางที่ 1) ซึ่งเป็นกลุ่มที่มีเทคโนโลยีดีมาก มีระบบ somatic embryogenesis ที่ดี แต่อย่างไรก็ตามในการผลิตเมล็ดพืชเทียมในเชิงการค้านั้นต้องคำนึงถึงราคาของเมล็ดพันธุ์ ซึ่งพืชในกลุ่มที่ 2 เป็นพืชที่มีคุณค่าทางการค้าสูง ซึ่งเป็นทางเลือกที่ดีในการนำมาผลิตเมล็ดพืชเทียม แต่พืชในกลุ่มนี้ยังขาดระบบ somatic embryogenesis ที่ดี สำหรับพืชในกลุ่มที่ 3 เป็นกลุ่มที่มีเทคโนโลยีดี และมีคุณค่าทางการค้า จึงเป็นกลุ่มที่น่าสนใจในการนำมาผลิตเป็นเมล็ดพืชเทียมมากที่สุด (Redenbaugh et al., 1991)

ในการนำ somatic embryo มาปลูกในสภาพธรรมชาติโดยตรง เอมบริโอต้องการวัสดุห่อหุ้มเพื่อป้องกันอันตรายขณะกำลังงอก และป้องกันอันตรายจากเชื้อโรคหรือสภาวะที่ไม่เหมาะสมในระหว่างการเก็บ การขนย้าย และการปลูก (Redenbaugh et al., 1986) ทำให้มีการพัฒนาเทคนิคต่างๆ เพื่อใช้เป็นวัสดุห่อหุ้ม ในปี 1979 Drew ได้เสนอความคิดในการขนส่ง somatic embryo ของแครอทโดยการใช้ fluid drilling แต่ไม่มีรายงานการใช้เทคนิคนี้ในการปลูกเอมบริโอของแครอท ต่อมาในปี 1965 Baker ได้นำ somatic embryo ของแครอทผสมใน fluid gel โดยเติมฮอร์โมน และน้ำตาล แล้วปลูกในเรือนกระจก พบว่ามีเพียง 4 เปอร์เซนต์ของเอมบริโอเท่านั้นที่รอดได้นาน 7 วัน และไม่สามารถพัฒนาไปเป็นต้นได้ (Redenbaugh, 1991)

ตารางที่ 1 ศักยภาพของพืชกลุ่มต่างๆที่สามารถนำมาผลิตเมล็ดพืชเทียม (Redenbaugh et al., 1991)

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| กลุ่มที่ 1 | กลุ่มที่มีเทคโนโลยีดีมาก (Strong technological basis) | | | |
| | Caraway | Panicum | Orchardgrass | |
| | Carrot | Pennisetum | | |
| กลุ่มที่ 2 | กลุ่มที่มีคุณค่าทางการค้าสูง (Strong commercial basis) | | | |
| | Asparagus | Garlic | Pineapple | Watermelon |
| | Begonia | Geranium | Potato | |
| | Broccoli | Gerbera daisy | Rice | |
| | Cauliflower | Ginsing | Spinach | |
| | Cucumber | Impatiens | Sugarcane | |
| | Cyclamen | Lettuce | Tobacco | |
| | Daylily | Petunia | Tomato | |
| กลุ่มที่ 3 | กลุ่มที่มีเทคโนโลยีดีและมีคุณค่าทางการค้า (Good technological and commercial basis) | | | |
| | Alfalfa | Corn | Grape | |
| | Celery | Cotton | Mango | |
| | Coffee | Date | palm | |

ในระหว่างนั้นได้มีการศึกษาวิธีต่างๆในการหุ้ม somatic embryo เพื่อผลิตเมล็ดพืชเทียม หลายวิธี เช่น การใช้ gelatin, complex coacervation และ interfacial polymerization แต่พบว่าเทคนิคที่นำมาใช้ผลิตเมล็ดพืชเทียมได้มีเพียงการใช้ gelatin เท่านั้น ส่วนวิธีอื่นๆ ต้องใช้สารเคมีซึ่งเป็นพิษต่อ somatic embryo ทำให้ไม่สามารถรอดชีวิตได้ หรือสร้างแคปซูลที่อ่อนเกินไป ไม่สะดวกในการขนส่ง ต่อจากนั้นได้มีการทดสอบ gel ชนิดต่างๆหลายชนิด เพื่อที่จะนำมาหุ้ม somatic embryo พบว่ามีหลายชนิดที่สามารถสร้างแคปซูลที่แข็งเพียงพอในขณะที่เอมบริโอยังคงรอดชีวิต (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 Gel ชนิดต่างๆที่ใช้ในการหุ้ม somatic embryo (Redenbaugh et al., 1987)

| Gel | Concentration (% w/v) | Complexing agent | Concentration (mM) |
|---|---|---|---|
| Sodium alginate | 0.5-5.0 | Calcium salts | 30-100 |
| sodium alginate | 2.0 | Calcium salts | 30-100 |
| with gelatin | 5.0 | | |
| Carrageenan with | 0.2-0.8 | Potassium or | |
| locust bean gum | 0.4-1.0 | ammonium chloride | 500 |
| Gelrite | 0.25 | Temperature lowered | |

เอมบริโอสามารถเจริญเป็นต้นได้เมื่อใช้ alginate, alginate ผสม gelatin และ carrageenan กับ locust bean gum แต่จากคุณสมบัติของ sodium alginate ในการเป็น gelatin สามารถละลายได้ที่อุณหภูมิห้อง โดยไม่ต้องใช้ความร้อนในการสร้าง gel ไม่เป็นพิษกับพืช และราคาถูก ดังนั้น sodium alginate จึงมีความเหมาะสมในการผลิตเมล็ดพืชเทียม (Redenbaugh et al., 1986; Redenbaugh et al., 1987)

เมื่อนำ somatic embryo ผสมกับ sodium alginate แล้วหยดลงใน di- หรือ trivalent metal salt ที่เหมาะสม เช่น calcium nitrate เพื่อจะสร้าง calcium alginate พบว่าจะเกิดปฏิกริยาขึ้นทันที และสมบูรณ์ภายใน 30 นาที (Redenbaugh et al., 1991) โดย metal cation จะสร้างพันธะอิออนิกระหว่าง carboxylic acid group บนโมเลกุล guluronic acid ของ alginate ซึ่ง alginate ที่มี guluronic acid มาก จะสร้างแคปซูลที่แข็งกว่า alginate ที่มี mannuronic acid โดย sodium alginate เมื่อทำให้อยู่ในรูปสารละลายยังคงเสถียรที่อุณหภูมิห้อง ซึ่งไม่ต้องการความร้อนในการสร้างเจลและเกิด complexation ทันทีเมื่อสัมผัสกับ metal cation ความแข็งของแคปซูลจะขึ้นอยู่กับอัตราส่วนของ guluronic acid ต่อ mannuronic acid, cation และเวลาที่ใช้ในการเกิด complex อย่างไรก็ตามความเข้มข้นของ alginic acid มีผลต่ออัตราการงอกของเมล็ดพืชเทียม ซึ่งเนื่องมาจากความแข็งของแคปซูล Fourre และคณะ (1991) พบว่า alginate 4 เปอร์เซนต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร จะยับยั้งการงอกของ somatic embryo ในขณะที่การใช้ alginate ความเข้มข้น 1, 2 และ 3 เปอร์เซนต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตรทำให้อัตราการงอกของ somatic embryo สูงมาก อย่างไรก็ตาม alginate ที่มีความเข้มข้น 1 เปอร์เซนต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตรจะสร้างแคปซูลที่อ่อน

เกินไป และทำให้ขนส่งได้ยาก ขนาดของแคปซูลสามารถควบคุมได้โดยความหนืด (viscosity) ของ sodium alginate และโดยเส้นผ่าศูนย์กลางภายในของปลายหลอดหยด (Redenbaugh et al., 1988)

ส่วนประกอบที่สำคัญอีกอย่างหนึ่งของการผลิตเมล็ดพืชเทียมคือเอนโดสเปอร์มเทียม ซึ่งเป็นแหล่งอาหารของต้นอ่อนที่กำลังงอก ซึ่งควรประกอบด้วย ธาตุอาหารที่จำเป็น สารควบคุมการเจริญ และส่วนประกอบอื่นๆที่จำเป็นในการงอกและเจริญเป็นต้น ซึ่งอาจใช้อาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อตามสูตรของ Murashige และ Skoog (1962) หรืออาหารสูตรอื่นๆที่เหมาะสมกับการพัฒนาไปเป็นเอมบริโอของพืชนั้นๆ

จุดสำคัญในการผลิตเมล็ดพืชเทียม นอกจากการผลิต somatic embryo ที่แข็งแรงแล้ว การคัดเลือก somatic embryo ที่มีระยะการพัฒนาใกล้เคียงกัน หรือเหมือนกัน มีขนาดเท่าๆกันจำนวนมากก็เป็นสิ่งสำคัญ วิธีการที่ทำได้ง่ายและสะดวกคือการกรองแยก somatic embryo ด้วยตะแกรงเหล็ก (Halperin, 1966; Ammirato, 1974) หรือผ้ากรองที่มีรูขนาดแตกต่างกันตามลำดับ (Komamine, 1988)

ถึงแม้ว่ากระบวนการเปลี่ยนแปลงในด้านสัณฐานวิทยาของ somatic embryo ในหลอดแก้ว จะคล้ายกับ zygotic embryo ในสภาพธรรมชาติ คือมีระยะที่กลุ่มเซลล์มีรูปร่างเป็น globular shape, heart shape และ torpedo shape แต่ somatic embryo จะแตกต่างจาก zygotic embryo คือเมื่อผ่านระยะเหล่านี้ก็จะงอกโดยไม่มีระยะพักตัว ทำให้ไม่สามารถเก็บไว้ได้ ซึ่งเป็นปัญหาที่สำคัญของเทคนิคการผลิตเมล็ดพืชเทียมในการนำไปใช้ประโยชน์ได้อย่างแท้จริง Kitto และ Janick (1985a, 1985b)ได้ศึกษาการหุ้ม somatic embryo clump ของแครอทด้วยสารละลาย polyethylene oxide (polyox WSR-N750) แล้วทำให้แห้งเพื่อจะเก็บรักษาและขนส่งได้ง่าย แต่พบว่าเมื่อมี somatic embryo จำนวนมากอยู่ใน wafer อันเดียวกัน จะมีอัตราการรอดชีวิตต่ำมาก แสดงให้เห็นว่าไม่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้เมื่อเทียบกับเมล็ดธรรมชาติ ต่อมาในปี 1987 Gray ได้ศึกษาการทำ somatic embryo ใน orchard grass *(Dactylis glomerata* L.) ให้แห้ง โดยมีปริมาณน้ำ 13 เปอร์เซนต์ และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 21 วัน พบว่ามีเปอร์เซนต์การงอกเพียง 4 เปอร์เซนต์ โดยสามารถเจริญเป็นต้นได้ และกล่าวว่าในระหว่างการทำแห้ง somatic embryo จะลดขนาดลง มีสีค่อนข้างเหลือง ขาดง่าย และเซลล์ผนังชั้นนอกจะยุบลง ซึ่งคาดว่าเอมบริโอที่ถูกทำให้แห้งอาจอยู่ในระยะพักตัว อย่างไรก็ตามอัตราการรอดชีวิตของ somatic embryo ที่ทำให้แห้งยังต่ำมาก ปัญหาที่สำคัญคือการขาด desiccation tolerance ของ somatic embryo ซึ่งอาจเนื่องจากขาดการสังเคราะห์ ABA โดย somatic embryo เอง ในเมล็ดที่กำลังเจริญ ระดับ ABA ภายใน จะเพิ่มขึ้นชั่วคราวก่อนหรือหลังการเกิด desiccation ของเมล็ด (King, 1976 ;

Suzuki et al., 1981) และพบว่า ABA มีส่วนเกี่ยวข้องในการเกิด dormancy และชักนำ desiccation tolerance ใน zygotic embryo ในทางตรงกันข้ามได้มีการแสดงให้เห็นว่า somatic embryo มีระดับ ABA ต่ำ (Kamada and Harada, 1981) นอกจากนี้ยังแสดงให้เห็นว่าใน zygotic embryo ABA จะสร้างขึ้นใน maternal tissue หรือ endosperm และถูกส่งไปยังเอมบริโอ (Dure, 1975) ต่อมา Senaratna, Mckersie และ Bowley (1990b) ได้รายงานว่าสามารถเพิ่มอัตราการรอดชีวิตของ somatic embryo ใน alfalfa ที่ทำให้แห้งได้โดยการเติม ABA ในอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อ ก่อนนำไปทำแห้งเพื่อใช้แทนเมล็ดพืชจริง อย่างไรก็ตาม somatic embryo ที่ไม่มีสิ่งห่อหุ้ม จะไม่สามารถใช้ประโยชน์ได้เหมือนเมล็ดธรรมชาติ ยิ่งกว่านั้นยังขาดแหล่งอาหารซึ่งจำเป็นในการเจริญหลังการงอกแล้ว จากงานวิจัยเหล่านี้คาดว่าเอมบริโอที่ถูกหุ้มแล้วสามารถทำให้แห้งเพื่อจะสร้างเมล็ดพืชเทียมแห้งได้

**ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ**

พัฒนาเทคนิคการผลิตเมล็ดพืชเทียมให้สามารถเก็บรักษาได้นานขึ้น โดยมีอัตราการงอกสูง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย