บทที่ 2

การตรวจเอกสาร

เทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชในประเทศไทยเริ่มขึ้นครั้งแรกที่ภาควิชาพฤกษศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ตั้งแต่ปีพุทธศักราช 2509 (โครงการพัฒนาข่ายงานด้านเทคโนโลยีชีวภาพ การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช, 2530) ถือเป็นโครงการที่เริ่มต้นกระตุ้นให้ผู้สนใจวิทยาการด้านนี้อย่างจริงจังทั้งภาครัฐและเอกชน ซึ่งในปัจจุบันเทคโนโลยีการเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชได้เจริญก้าวหน้าอย่างมาก มีการตื่นตัวกันอย่างกว้างขวางทั้งในต่างประเทศและในประเทศไทย ดังจะเห็นได้จากผลงานวิจัยเพื่อหาความรู้และเทคนิคใหม่ ๆ ที่กำลังศึกษาค้นคว้าในสถาบันต่าง ๆ ตลอดจนการจัดตั้งบริษัทเกี่ยวกับเรื่องนี้โดยเฉพาะทั้งขนาดเล็กและขนาดใหญ่ นักวิทยาศาสตร์ให้ความสนใจเทคโนโลยีการเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเป็นอย่างมาก เพราะเทคโนโลยีนี้สามารถนำมาประยุกต์ใช้ให้เกิดประโยชน์ได้อย่างกว้างขวาง โดยเฉพาะอย่างยิ่งในด้านการปรับปรุงพันธุ์และการขยายพันธุ์พืชเพื่อพัฒนาพืชพันธุ์ใหม่ ๆ ให้มีปริมาณมากขึ้น สามารถนำผลผลิตไปใช้ในเชิงพาณิชย์ และนำรายได้มาสู่ประเทศเป็นจำนวนมาก ซึ่งนับว่าประสบผลสำเร็จอย่างสูงในพืชกล้วยไม้ และไม้ประดับบางชนิดที่มีราคาต่อหน่วยสูง การขยายพันธุ์พืชในเชิงการค้าด้วยเทคนิคการเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชจึงมีข้อจำกัดอยู่ในกลุ่มพืชที่มีราคาสูงมาก (มนทกานติ, 2531)

การขยายพันธุ์พืชแบบไม่อาศัยเพศ เป็นสิ่งจำเป็นมากในพืชบางชนิด โดยเฉพาะพืชที่ขยายพันธุ์ด้วยเมล็ดแล้วมีความผันแปร (variation) สูงหรือในพืชบางกลุ่มที่เพศของพืชมีความสัมพันธ์กับผลผลิต ตัวอย่างเช่น มะละกอต้นกระเทย และต้นตัวเมียเท่านั้นที่ให้ผลผลิตสูง หรือในพืชพวกหน่อไม้ฝรั่งต้นที่ให้ผลผลิตสูงคือ ต้นตัวผู้ ในกรณีดังกล่าวนี้หากขยายพันธุ์ด้วยเมล็ดพันธุ์จะไม่สามารถทำนายได้เลยว่าผลผลิตจะเป็นอย่างไร การขยายพันธุ์ของพืชบางชนิดก็ทำได้ยากและเสียค่าใช้จ่ายสูง โดยเฉพาะในพวกธัญพืช นอกจากนี้ยังมีปัจจัยอื่น ๆ อีกมากมายอันเป็นอุปสรรคต่อการขยายพันธุ์พืชเช่น ขนาดของต้นแม่พันธุ์ การกลายพันธุ์ของพืชที่ขยายพันธุ์ด้วยเมล็ด และในบางครั้งยังพบว่าพันธุ์พืชใหม่ ๆ เนื่องมาจากความไม่แน่นอนของการแบ่งเซลล์ ทำให้ไม่ได้ลักษณะตามต้องการอย่างสม่ำเสมอ (Redenbaugh และคณะ, 1986; Fujii และคณะ, 2987 และ มนทกานติ, 2531) เพื่อแก้ปัญหาต่าง ๆ เหล่านี้ นักวิทยาศาสตร์ได้นำเทคนิคการเลี้ยงเนื้อเยื่อจากส่วนต่างๆของพืชเพื่อเพิ่มปริมาณโดยที่ลักษณะทางพันธุกรรมไม่เปลี่ยนแปลง นั่นคือ เทคนิคการ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ผลิตเมล็ดพืชเทียม (artificial seeds หรือ synthetic seeds) พืชเพื่อเพิ่มปริมาณโดยที่ลักษณะทางพันธุกรรมไม่เปลี่ยนแปลง ซึ่งจัดเป็นวิวัฒนาการใหม่ในการขยายพันธุ์พืชด้วยเทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่สามารถผลิตได้ในปริมาณมากในระยะเวลา และพื้นที่อันจำกัด และมีต้นทุนในการผลิตต่อหน่วยต่ำ จึงสามารถนำไปใช้กับพืชที่มีราคาต่อหน่วยต่ำได้ (Redenbaugh และคณะ, 1986 และ Gray, 1987)

การกำเนิดคัพภะ (embryogenesis) หมายถึง กระบวนการพัฒนาของคัพภะที่เกิดขึ้นในพืช ซึ่งเกิดได้สองแนวทาง คือ

เกิดจากไข่ที่ได้รับการผสม (fertilized egg) แล้วเจริญเป็นไซโกต (zygote) ก่อนจะพัฒนาไปเป็นคัพภะที่เรียกว่า zygotic embryos และมีโครโมโซม 2n (diploid)

เกิดจากไข่ที่ไม่ได้รับการผสม (unfertilized egg) หรือจากเซลล์หรือเนื้อเยื่ออื่น ๆ คัพภะในกรณีนี้มักเรียกว่า non- zygotic embryos (รังสฤษฎ์, 2541)

พัฒนาการดังกล่าวมานี้ โดยเฉพาะการเกิดเอมบริโอมิได้ถูกจำกัดเฉพาะในกรณีนี้เท่านั้น ทั้งนี้เพราะเทคโนโลยีการเลี้ยงเนื้อเยื่อจากส่วนต่าง ๆ ของพืชมีการพัฒนามากขึ้นโดยเฉพาะการเลี้ยง เนื้อเยื่อจากส่วนของพืชที่กำลังเจริญเช่น เนื้อเยื่อเจริญ ใบอ่อน หรือ ส่วนต่าง ๆ ของต้นกล้าพืชบนอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ผสมสารควบคุมการเจริญของพืช และปรับสภาพแวดล้อมให้เหมาะสม เช่น แสง อุณหภูมิ และวิธีการเลี้ยง การเพาะเลี้ยงคัพภะ (embryo culture) หมายถึง การนำคัพภะที่เกิดจากต้นพืชในสภาพธรรมชาติในถุงรังไข่ (embryo sac) มาเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ในสภาพที่ปลอดเชื้อ เพื่อชักนำให้เกิดเป็นต้นพืชโดยตรงหรือโดยผ่านการเป็นแคลลัสเสียก่อน ทำให้ชิ้นส่วนของพืชมีลักษณะการพัฒนาเป็นไปในลักษณะทิศทางเดียวกับพัฒนาการของต้นอ่อนภายในเมล็ดทุกประการ เรียกการเกิดเอมบริโอจากการเลี้ยงเนื้อเยื่อในหลอดแก้วนี้ว่า " โซเมติคเอมบริโอ " หรือ " เอมบริออยด์ " และเรียกกระบวนการพัฒนาของเอมบริโอโดยไม่อาศัยเพศในหลอดแก้วนี้ว่า " Somatic embryogenesis " (Steward และคณะ, 1958; Bajaj และ Zbell, 1979; Kohlenbach, 1977, และ Vajrabhaya, 1988)

ในปี ค.ศ. 1902 Haberlandt นักวิทยาศาสตร์ชาวเยอรมันได้ทดลองเลี้ยงเซลล์พืชบนอาหารสังเคราะห์ในสภาพปลอดเชื้อ เพื่อศึกษาถึงความสามารถของส่วนต่าง ๆ ของพืชว่าจะมีการเจริญเติบโตได้หรือไม่เพียงใด แม้ว่างานการทดลองในครั้งนั้นจะไม่ประสบความสำเร็จเท่าที่ควร แต่ก็เกิดแนวความคิดในเรื่อง " Totipotency " ที่ว่าเซลล์ของพืชมีความสามารถที่จะเจริญกลับมาเป็นต้นพืชใหม่ที่สมบูรณ์ได้ จากแนวความคิดนี้ได้มีผู้นำเอาไปศึกษาทดลองอย่างกว้างขวางในเวลาต่อมา (Vajrabhaya, 1988)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อข้าวโพด

ได้มีการศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อข้าวโพดเป็นเวลาเกือบ 30 ปีแล้ว โดยใช้ชิ้นส่วนต่างๆ ของข้าวโพด เช่น ส่วนของเอ็นโดสเปิร์ม ปลายราก ช่อดอกอ่อน ละอองเรณู อับละอองเรณู ดัพภะแก่ และดัพภะอ่อน เป็นต้น พบว่าแต่ละส่วนที่นำมาเลี้ยงประสบความสำเร็จมากน้อยแตกต่างกัน (Green และ Phillips, 1975; Wang, 1987; Pareddy และ Petolino, 1990) ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับปัจจัยที่สำคัญ คือ พันธุกรรมของพืชและชนิดของเนื้อเยื่อที่นำมาเลี้ยง สารอาหารและสารควบคุมการเจริญเติบโต และสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชในพืชต้นเดียวกันการใช้เนื้อเยื่อจากส่วนที่ต่างกันมีการตอบสนองต่ออาหาร และสภาพแวดล้อมที่ใช้เลี้ยงแตกต่างกันด้วย ทั้งนี้เนื่องจากความแตกต่างของชนิด และระดับฮอร์โมนภายในเนื้อเยื่อที่นำมาเลี้ยง (ไพบูลย์, 2524) ดังนั้น การที่จะประสบความสำเร็จในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อข้าวโพดโดยการชักนำเนื้อเยื่อเลี้ยงให้เกิดแคลลัสที่สามารถพัฒนาไปเป็นต้นได้ขึ้นอยู่กับปัจจัยที่สำคัญ ดังนี้

ปัจจัยภายในเนื้อเยื่อพืช (internal factor) ได้แก่ ลักษณะต่างๆ ของเนื้อเยื่อที่นำมาเลี้ยง เช่น ชิ้นส่วนของพืชที่นำมาเลี้ยง และองค์ประกอบต่าง ๆ ของเนื้อเยื่อพืชและพันธุกรรมของพืช (Gamborg และ Wetter, 1975 และ Sunderland และ Dunwell, 1977)

ปัจจัยภายนอก (external factor) หมายถึงปัจจัยต่างๆ ของสภาพแวดล้อมในการเลี้ยงเนื้อเยื่อ เช่น องค์ประกอบของอาหารที่ใช้ในการเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช (Sunderland และ Dunwell, 1977) สภาพความเป็นกรดเป็นด่างของอาหาร (Stuart และ Street, 1969) อุณหภูมิและแสงที่ใช้ในการเลี้ยงเนื้อเยื่อ (Sunderland, 1977) เป็นต้น ซึ่งมีรายละเอียดต่าง ๆ ดังนี้

<u>พันธุกรรมและชิ้นส่วนของพืช</u>

ในระยะแรก ๆ นักวิทยาศาสตร์เพาะเลี้ยงเอ็นโดสเปิร์มอ่อนของข้าวโพดได้ และประสบความสำเร็จในการชักนำให้เกิดแคลลัส (Straus และ La Rue, 1954; Straus, 1960) แต่พบว่าการเกิดและการเติบโตของแคลลัสจากชิ้นส่วนเอ็นโดสเปิร์มยังจำกัด ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับลักษณะทางพันธุกรรมของเนื้อเยื่อข้าวโพด ต่อมา Mascarenhas และคณะ (1975) ได้ทำการศึกษาการเลี้ยงเนื้อเยื่อจากส่วนต่าง ๆ ของต้นอ่อนข้าวโพด พบว่า ส่วนของข้อสามารถชักนำให้เกิดแคลลัส และมีการเติบโตของแคลลัสแต่ไม่สามารถทำให้เกิดต้นใหม่ได้ ส่วน Sheridan (1975) ศึกษาการเลี้ยงดัพภะของข้าวโพดในพันธุ์ W23 และ M24 เขาพบว่าสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ ผลการวิจัยในประเทศไทย ทะนง (2525) ศึกษาพบว่าในพันธุ์ Super Sweet และ พันธุ์สุวรรณ 1 เมื่อเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อข้อและปลายรากสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ส่วนเนื้อเยื่อจากแผ่นใบและกาบใบที่ยังม้วนอยู่ไม่สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การศึกษาการเพาะเลี้ยงคัพภะข้าวโพดเป็นวิธีหนึ่งที่จะได้พืชที่มีระยะพักตัวยาวนาน เมล็ดที่ไม่งอกภายในใต้สภาพปกติ และเมล็ดที่ไม่สามารถมีชีวิตอยู่ได้ (นิตย์ศรี, 2528) นอกจากนี้ Cure และ Mott (1978) พบว่า การใช้ส่วนของคัพภะเพื่อชักนำให้เกิดแคลลัสจะอยู่ในสภาพที่วิกฤต เนื่องจาก คัพภะเป็นส่วนที่รวมส่วนประกอบต่างๆ ของการที่จะเจริญเติบโตเป็นต้นพืชและจะแสดงความผันแปรทางลักษณะภายนอกออกมาได้มาก โดยที่ลักษณะความผันแปรนี้จะเกิดขึ้นในระหว่างที่เซลล์ยังไม่รวมเป็นกลุ่มเซลล์ ส่วนแคลลัสที่เกิดจากส่วนของคัพภะจะถูกชักนำให้ผ่านระยะที่เป็น unorganized ในพวกธัญพืชแคลลัสที่เกิดขึ้นจะมีความสัมพันธ์กับการเจริญเติบโตเป็นต้นพืช ซึ่งได้มีการศึกษาการเลี้ยงคัพภะอ่อนและคัพภะแก่ของข้าวโพด พบว่า การชักนำให้เกิดแคลลัสนั้นขึ้นอยู่กับพันธุกรรมของข้าวโพด ซึ่งข้าวโพดพันธุ์ลูกผสมเดี่ยวและพันธุ์แท้เกิดแคลลัสได้ 70 เปอร์เซ็นต์ และ 40 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (Green และคณะ, 1974; Sheridan, 1975) นอกจากนี้ Vasil และ คณะ (1983, 1984) ทดลองเลี้ยงคัพภะอ่อนของข้าวโพด 12 พันธุ์ พบว่า มีเพียง 5 พันธุ์ ที่ชักนำให้เกิดแคลลัสได้และเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสมีเพียง 5-15 เปอร์เซ็นต์ กอบเกียรติ (2532) พบว่า การใช้คัพภะอ่อนที่มีอายุ 20 วันหลังการถ่ายละอองเรณูในพันธุ์สุวรรณ 1 สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ และนิตย์ศรี และคณะ 2536 ได้รายงานถึงการชักนำให้เกิดเป็นต้นจากการเลี้ยงคัพภะอ่อนของข้าวโพด โดยใช้เชื้อพันธุกรรมที่มีอยู่ในประเทศไทยจากพันธุ์แท้ 14 พันธุ์พบว่ามีจำนวน 7 พันธุ์ที่สามารถชักนำให้เกิดเป็นต้นได้ นอกจากนี้กมลพรรณ และคณะ (2534) รายงานว่าการเลี้ยงคัพภะอ่อนในพันธุ์สุวรรณ 1, สุวรรณ 2 และ สุวรรณ 3 แคลลัสจะสามารถชักนำให้เกิดเป็นต้นใหม่ได้ ในการศึกษาของ Duncan และคณะ (1985) พบว่า แคลลัสจากคัพภะอ่อนของพันธุ์แท้สามารถชักนำให้เกิดเป็นต้นใหม่ได้ แต่ในพันธุ์ลูกผสมแคลลัสไม่สามารถชักนำให้เกิดเป็นต้นใหม่ได้ ส่วนการเลี้ยงคัพภะแก่โดย Wang (1987) พบว่า แคลลัสจากข้าวโพดพันธุ์แท้สามารถชักนำให้เกิดเป็นต้นใหม่ได้ 4-5 เปอร์เซ็นต์เท่านั้น

<u>สารอาหารและสารควบคุมการเจริญเติบโต</u>

จากการที่ได้มีการทดลองศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อข้าวโพดมาเป็นเวลานานมากกว่า 30 ปีนับตั้งแต่ปี ค.ศ. 1954 โดย Straus และคณะ จนปัจจุบันพบว่าการเลือกชนิดของอาหารที่จะนำมาใช้เพาะเลี้ยงคัพภะยังเป็นปัจจัยสำคัญ และคัพภะจะเจริญเติบโตได้ดีในอาหารที่มีเกลืออนินทรีย์ และมีน้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งที่ให้คาร์บอนหรือแหล่งพลังงาน แต่คัพภะที่มีอายุน้อย ๆ มีความต้องการอาหารเสริมในอัตราส่วนแตกต่างกัน เช่น วิตามิน กรดอะมิโน ฮอร์โมน ที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโต และน้ำมะพร้าว เป็นต้น (นิตย์ศรี, 2528) และ Sheridan (1975) พบว่า น้ำตาลซูโครสเป็นคาร์โบไฮเดรตที่มีผลต่อการชักนำคัพภะข้าวโพดให้เกิดแคลลัส และการเจริญเติบโต

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ของแคลลัสดีกว่าน้ำตาลชนิดอื่น ๆ โดยที่ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชคาร์โบไฮเดรตเป็นแหล่งให้คาร์บอนหรือพลังงานเพื่อการเจริญเติบโตของพืช (Collins และ Grosser, 1984) นอกจากนี้ ทนง (2525); อังคณา (2528) ได้ศึกษาพบว่า สูตรอาหารที่เหมาะสมในการเลี้ยงเนื้อเยื่อ และปลายรากของข้าวโพดพันธุ์ซุปเปอร์สวีท และพันธุ์สุวรรณ 1 คือ สูตรอาหาร MS (1962) ที่มี 2, 4-D 1-3 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่วนเนื้อเยื่อจากแผ่นใบและกาบใบที่ยังม้วนอยู่ไม่สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ และ Pareddy และ Petolino (1990) เลี้ยงเนื้อเยื่อของช่อดอกในอาหาร MS (1962) ที่มี 2, 4-D 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ร่วมกับแอล-โพรลีน 24 มิลลิโมล และ เคซีนไฮโดรไลเซส 100 มิลลิกรัมต่อลิตรสามารถชักนำให้เกิดแคลลัส และเลี้ยงแคลลัสในอาหารสูตร MS ที่ปราศจากฮอร์โมนสามารถเติบโตเป็นต้นใหม่ได้

ในการศึกษาการเลี้ยงคัพภะของข้าวโพด ทั้งการเลี้ยงคัพภะอ่อนและคัพภะแก่ กอบเกียรติ (2532) พบว่า การเลี้ยงคัพภะอ่อนของข้าวโพดพันธุ์สุวรรณ 1 เมื่อเลี้ยงด้วยอาหารสูตร MS ที่มี 2, 4-D 2.0-4.0 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 2-4 เปอร์เซ็นต์ สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ดี นอกจากนี้ กมลพรรณ และคณะ (2534) พบว่า การเลี้ยงคัพภะอ่อนนของข้าวโพดบนอาหารสูตร N_6 ที่มี 2, 4-D 2 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมด้วยน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ และแอล-โพรลีน 20 มิลลิโมลสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสซึ่งเติบโตเป็นต้นใหม่ได้เมื่อเลี้ยงบนอาหารสูตร N6 ที่มี 2, 4 -D แต่ในการเลี้ยงคัพภะอ่อนของข้าวโพดอายุของคัพภะที่นำมาเพาะเลี้ยงนับว่ามีความสำคัญมากต่อการชักนำให้เกิดแคลลัส โดยที่ Green และ Phillips (1975) รายงานว่าการเลี้ยงคัพภะที่อายุต่าง ๆ กันของข้าวโพด ช่วงอายุคัพภะ 16-20 วันหลังการถ่ายละอองเป็นช่วงที่สามารถชักนำให้คัพภะอ่อนเกิดแคลลัสได้ดีเมื่อเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่มีไกลซีน 7.7 มิลลิกรัมต่อลิตร เอสพาราจีน 1.98 มิลลิกรัมต่อลิตร ไนอาซีน 1.3 มิลลิกรัมต่อลิตร ไทอามีน 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร ไพริดอกซิน 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร แคลเซียมแพนโททีเนต 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร 2, 4- D 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครส 2 เปอร์เซ็นต์ และแคลลัสของคัพภะสามารถเจริญเป็นต้นที่สมบูรณ์เมื่อเลี้ยงบนอาหาร MS ที่ไม่มี 2, 4 - D

Vasil และคณะ (1983; 1984) รายงานว่า 2, 4 - D เป็นออกซินที่ให้ผลดีที่สุดต่อการชักนำให้คัพภะของข้าวโพดเกิดแคลลัสเมื่อเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่มี 2, 4 - D 0.5-0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครส 6-12 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ Vasil และคณะ (1983; 1984) พบว่า การเลี้ยงคัพภะอ่อนของข้าวโพดบนอาหารสูตร MS ที่มี 2, 4 - D 0.5 –1 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 6 เปอร์เซ็นต์ และน้ำมะพร้าว 5 เปอร์เซ็นต์ สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสและแคลลัสเกิด morphogenesis เมื่อเลี้ยงบนอาหารที่มี 2, 4-D 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เคซีนไฮโดรไลเซต 500 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครส 2 เปอร์เซ็นต์ โดยแคลลัสบางส่วนเจริญเป็นต้นพืชได้ เมื่อเลี้ยงบน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

อาหารสูตร MS ที่ไม่มี 2, 4-D Imbrie-Milligan และคณะ (1987) ได้ศึกษาการชักนำคัพภะอ่อนข้าวโพดให้เกิดแคลลัสที่มีความสามารถเจริญ และพัฒนาเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์ และพบว่าองค์ประกอบของอาหารมีความสำคัญเช่นกัน โดยพบว่าอาหารสูตรดัดแปลงของ MS ที่มี 2, 4-D 2 มิลลิกรัมต่อลิตร มายโออินโนซิตอล 100 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครส 2 เปอร์เซ็นต์ สามารถชักนำให้คัพภะเกิดแคลลัสที่เจริญเป็นต้นได้ดีในข้าวโพดพันธุ์ A188 โดยที่ Armstrong และ Green (1985) รายงานว่า โพรลีนที่ความเข้มข้นเหมาะสมมีผลส่งเสริมการชักนำ และเจริญเติบโตของแคลลัสข้าวโพดให้เป็นต้นพืชได้ ในทำนองเดียวกัน Pareddy และ Petolino (1990) รายงานว่า การใส่แอล-โพรลีนในอาหารสูตร MS และ N6 ปริมาณ 12-24 มิลลิโมลมีผลตอบสนองต่อการเกิดแคลลัสชนิด embryogenic เพิ่มขึ้น กมลพรรณ และคณะ (2534) ได้เลี้ยงคัพภะอ่อนของข้าวโพดเพื่อชักนำให้เกิดแคลลัสและต้นใหม่ได้โดยเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร N6 ที่มี 2, 4-D 2 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 2 เปอร์เซ็นต์ และแอล-โพรลีน 20 มิลลิโมล ส่วนการเลี้ยงคัพภะแก่ของข้าวโพด Wang (1987) รายงานว่าคัพภะแก่ของข้าวโพดพันธุ์ Mo17 สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ดีบนอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วย อินโนซิตอล 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ไทอามีน 1 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 2 เปอร์เซ็นต์ และ 2, 4-D 1.0-2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร MS ร่วมกับไคแคมบา 2 มิลลิกรัมต่อลิตร แอล-โพรลีน 25 มิลลิโมล และเคซีนไฮโดรไลเซต 100 มิลลิกรัมต่อลิตร และคัพภะสามารถชักนำให้เกิดเป็นต้นได้ 4-5 เปอร์เซ็นต์ บนอาหารสูตร MS ที่ไม่มี 2, 4-D ในพันธุ์แท้ B73 และ Mo17

<u>สภาพแวดล้อมในการเพาะเลี้ยง</u>

ในการศึกษาผลของแสงและอุณหภูมิที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อข้าวโพดนักวิจัยส่วนใหญ่ (Green และคณะ, 1974; Vasil และคณะ, 1983; และ Fahey และคณะ, 1986)รายงานว่า ในการเลี้ยงคัพภะของข้าวโพดในสภาพมืดช่วงเริ่มต้นจะสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ดีขณะที่ ทะนง (2525) และอังคณา (2528) พบว่า แสงมีผลต่อปริมาณแคลลัสที่เกิดขึ้น และการเลี้ยงส่วนต่าง ๆ ของต้นอ่อนข้าวโพดในสภาพได้รับแสงตลอดเวลาเปรียบเทียบกับการเลี้ยงในสภาพมืดตลอดเวลาส่งผลทำให้ปริมาณแคลลัสที่เกิดขึ้นแตกต่างกัน แต่แสงมีผลต่อกระบวนการเกิด morphogenesis ซึ่งชักนำให้แคลลัสมีการเจริญเป็นต้นใหม่ที่สมบูรณ์ โดยในช่วงการได้รับแสง 16 ชั่วโมง สลับกับช่วงมืด 8 ชั่งโมง อุณหภูมิ 25-28 องศาเซลเซียส จะมีความเหมาะสมในการเลี้ยงเนื้อเยื่อข้าวโพด (Green และ คณะ, 1974; Sheridan, 1975; Vassil และคณะ, 1983; Fahey และคณะ, 1986)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชนิดของแคลลัสที่สามารถชักนำให้เกิดต้น

ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อข้าวโพดการชักนำให้เกิดแคลลัสที่มีความสามารถที่จะเจริญ และพัฒนาไปเป็นต้นใหม่ได้นั้น ปรากฏว่าชนิดของแคลลัสที่เกิดขึ้นมีอยู่ 2 ชนิดคือ compact callus และ friable callus โดยแคลลัสที่สามารถชักนำให้เกิดเป็นต้นใหม่นั้น มีลักษณะเป็น compact callus ที่ประกอบด้วยแคลลัสชนิด embryogenic และ non-embryogenic แคลลัสชนิดนี้มีการเจริญเติบโตอย่างช้า ๆ ส่วน friable callus จะมีลักษณะการเจริญเติบโตที่เร็วสามารถเปลี่ยนเป็น compact callus ได้เมื่อเพาะเลี้ยงในสภาพที่เหมาะสมซึ่ง Lu และคณะ (1982) ได้ศึกษาการชักนำแคลลัสให้เกิดเป็นต้นใหม่ของข้าวโพดจากแคลลัสที่เป็น somatic embryo พบว่า ลักษณะของแคลลัสที่สามารถเกิดเป็นต้นใหม่ได้นั้นแคลลัสจะมีลักษณะรวมตัวกันแน่นมีสีเหลือง รูปร่างเป็นแบบ irregular shape ส่วนลักษณะแคลลัสที่เป็นแบบ granular มีลักษณะโปร่งใส หรือสีคล้ำ จะไม่สามารถชักนำให้เกิดต้นใหม่ได้ นอกจากนี้ Hodges และคณะ (1985) ได้รายงานเกี่ยวกับชนิดของแคลลัสจากการเลี้ยงคัพภะอ่อนของข้าวโพดว่ามี 2 Type คือ Type I และ Type II โดย Type I จะมีลักษณะเป็นแคลลัสที่ได้จากส่วน scutellum ของคัพภะอ่อนในช่วง 2-3 สัปดาห์แรกจะเกิดเป็น embryogenic callus เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีเกลือของอาหารสูตร N6 หรือ MS และมีอายุสั้นหลังจาก 3-6 เดือน ความสามารถในการชักนำให้เกิดเป็นต้นจะลดลงโดยที่การเกิด somatic embryogenesis และเกิดเป็นต้นใหม่ของแคลลัส Type I นี้จะควบคุมด้วยยีน ส่วนลักษณะของแคลลัส Type II เป็นแคลลัสที่ได้มาจาก Type I ที่มีลักษณะเป็นเอกลักษณ์ คือเติบโตได้เร็ว มีลักษณะ friable และจะเป็น embryogenic ส่วนมากมีอายุยาวหลังจาก 1 ปี ยังคงความสามารถในการชักนำให้เกิดเป็นต้นได้ และใช้ในการเลี้ยงเซลล์แขวนลอย Pareddy และ Petolino (1990) พบว่า การเพาะเลี้ยงช่อดอกอ่อนแคลลัสที่ได้จะประกอบด้วยแคลลัสที่เป็น embryogenic และ non–embryogenic และแคลลัสชนิด embryogenic มีลักษณะเกาะกันแน่น และมีสีขาว ส่วนลักษณะของ non-embryogenic มีลักษณะอ่อนนิ่มเป็นกลุ่ม ๆ โปร่งใสโดยลักษณะของแคลลัสแบบ embryogenic สามารถที่ชักนำให้เกิดต้นใหม่ได้ และจากการศึกษาการเลี้ยงคัพภะของข้าวโพด อังคณา (2528) รายงานว่าการเลี้ยงคัพภะสามารถชักนำให้เกิดเป็นพืชได้ ส่วนการเลี้ยงส่วนต่างๆของต้นกล้าจะทำให้ได้ friable callus ความสามารถของการเกิดเป็น compact callus และ friable นี้มีสาเหตุเนื่องจากความแตกต่างของชนิด และปริมาณสารควบคุมการเจริญเติบโตที่อยู่ในเนื้อเยื่อเมื่อเริ่มต้นของการเพาะเลี้ยงโดยพบว่าคัพภะเป็นส่วนที่มีฮอร์โมนอยู่มากกว่าส่วนอื่น (Leopold และKriedeman, 1975)

Green และ Phillips (1975) ได้ทำการเพาะเลี้ยง immature embryo แล้วชักนำให้เป็นต้นได้สำเร็จเป็นครั้งแรก และนำต้นข้าวโพดที่ได้ไปปลูกในแปลงพบว่าประมาณ 10-15 % ของต้นพืชที่ได้สามารถเจริญเติบโตอย่างปกติ จากการศึกษาพบว่าเมื่อเพาะเลี้ยง immature embryo แล้วชักนำ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ต้นข้าวโพดนั้นผ่านกระบวนการ somatic embryogenesis แต่ทำสำเร็จเฉพาะบางสายพันธุ์เท่านั้น การเพาะเลี้ยง immature embryo จะมี embryogenic callus เกิดขึ้นซึ่งแบ่งได้เป็น 2 ชนิด คือ Type I callus มีลักษณะแน่นสีใส และการเจริญเติบโตค่อนข้างช้า ส่วน Type II callus มีลักษณะร่วน คือมีการเจริญเติบโตเร็วที่พัฒนาเป็น somatic embryo (Tomes และ Smith, 1985) ในปี ค.ศ. 1991 Songstad และคณะ นำเอา immature embryo ของสายพันธุ์แท้ของข้าวโพดลูกผสมมาเพาะเลี้ยงในสูตรอาหาร N6 medium สูตรดัดแปลง พบว่า ถ้าเติม $AgNO_3$ ลงไปในอาหารจะส่งเสริมการเกิด Type II callus ให้มากขึ้น

ต่อมา Tuberosa และ Landi (1993) รายงานว่า สามารถกระตุ้น immature embryos ของข้าวโพดลูกผสม 5 สายพันธุ์ให้พัฒนาเป็นแคลลัสได้ โดยการเลี้ยงบนอาหารสูตร N6 ที่เติม 2,4-D 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ L- Proline 25 mM/I ในขณะเดียวกัน Bates (1993) พบว่า สายพันธุ์ข้าวโพดและชนิดของอาหารมีผลต่อการพัฒนาของคัพภะอ่อนที่มีอายุ 9-18 วันไปเป็นแคลลัส โดยข้าวโพดสายพันธุ์ B73, Mo17, N28, W64 A และ A632 มีการพัฒนาเป็นแคลลัสได้ดีเมื่อเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ในขณะที่ข้าวโพดพันธุ์ B37 และ M14 นั้นมีการพัฒนาเป็นแคลลัสได้ดีต่อเมื่อเลี้ยงบนอาหารสูตร N6 ในปี 1989 Vain และ Flament ได้รายงานว่าการเติม $AgNO_3$ ลงในอาหาร MS สามารถกระตุ้นให้แคลลัสของข้าวโพดเกิดเป็นแคลลัสแบบ embryogenic เพิ่มขึ้นและยังพบว่า $AgNO_3$ ยังสามารถเพิ่มเปอร์เซ็นต์การพัฒนาเป็นต้นได้อีกด้วย ต่อมา Songstad และคณะ (1991) กล่าวว่าการปลดปล่อย เอทธิลีนของแคลลัสข้าวโพดจะเพิ่มขึ้นตามอายุของการเลี้ยงภายใน 5-10 วัน และระดับเอทธิลีนที่สูงขึ้นนี้ส่งผลให้ปริมาณต้นที่ผลิตได้ลดลง ซึ่ง $AgNO_3$ สามารถยับยั้งผลของเอทธิลีนได้ ทำให้สามารถผลิตต้นข้าวโพดเพิ่มขึ้นถึง 12 เท่าโดยไม่ส่งผลกระทบต่อการผลิตแคลลัส ในปี 1997 Carvalho *et. al.* รายงานว่าเมื่อเติม $AgNO_3$ 88 μM ลงในอาหาร N6 ซึ่งประกอบด้วย Dicamba 30 μM สามารถเพิ่มเปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสแบบ embryogenic ได้ดีกว่าการไม่เติม $AgNO_3$ ลงในอาหารอีกทั้งแคลลัสนั้นสามารถชักนำให้เกิดต้นได้มากกว่าอีกด้วย

ในการเก็บรักษาแคลลัสของข้าวโพดที่ได้ Swedlund และ Locy (1994) รายงานว่าแหล่งอาหารที่มีน้ำตาล sucrose เป็นองค์ประกอบแคลลัสมีการพัฒนา 2 แบบ คือ แบบ embryogenic และแบบ non-embryogenic ในขณะที่แคลลัสที่เลี้ยงบนอาหารที่มีน้ำตาล sorbital เป็นองค์ประกอบนั้นแคลลัสมีการพัฒนาเป็นแบบ embryogenic เพียงลักษณะเดียวเท่านั้น นอกจากนี้ยังพบว่าแคลลัสที่เลี้ยงบนอาหารที่มีน้ำตาล sorbital สามารถชักนำให้เกิดต้นได้มากกว่าแคลลัสที่เลี้ยงบนอาหารที่มีน้ำตาล sucrose นอกจากนี้แล้วยังมีการใช้น้ำตาล manitol ช่วยรักษาความสามารถของแคลลัสในการเกิด embryo ได้มากกว่าการเกิดการพัฒนาไปเป็นราก (rhizogenic callus)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เมล็ดพืชเทียม (synthetic seeds)

การผลิตโซมาติคเอมบริโอ (somatic embryos) หรือเอมบริออยด์ (embryoids) จำนวนมากในสภาพปลอดเชื้อ และจากความพยายามในการนำเอมบริออยด์ดังกล่าวออกมาเพาะปลูกในสภาพธรรมชาตินอกห้องปฏิบัติการ โดยยังคงดำรงความมีชีวิต สามารถเจริญ และพัฒนาไปเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์ได้ ส่งผลให้เกิดแนวความคิดในการผลิตเมล็ดพืชเทียม (synthetic seeds)

ข้อได้เปรียบที่สำคัญของเทคโนโลยีการผลิตเมล็ดพืชเทียม คือ สามารถที่ผลิตเมล็ดพันธุ์เทียมได้ในปริมาณมาก ๆ และต้นทุนในการผลิตต่ำ ดังนั้น การยอมรับเทคโนโลยีนี้จึงขึ้นอยู่กับคุณค่าและความสำคัญของพืชที่จะขยายพันธุ์ และมูลค่าของผลิตภัณฑ์คู่แข่ง นอกจากนี้การใช้ประโยชน์ของเมล็ดพืชเทียมยังขึ้นอยู่กับความก้าวหน้าของวิทยาการทางพืช ระบบการขนส่ง และการเผยแผ่สู่เกษตรกรรวมทั้งการพัฒนาสายพันธุ์พืชที่มีลักษณะดีเด่นโดยเทคนิคทางพันธุวิศวกรรม (Redenbaugh และคณะ, 1986 และFujii และคณะ, 1987)

เมล็ดพืชเทียมมีลักษณะทางสรีรวิทยา และองค์ประกอบทางเคมีแตกต่างจากเมล็ดพืชจริงตามธรรมชาติ (true seeds) เนื่องจาก เมล็ดพืชเทียมเกิดจากการนำโซเมติคเอมบริโอ (somatic embryo) หรือเอมบริออยต์ (embryoid) ที่ได้จากการเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมาเคลือบด้วยอัลจิเนต เจล (alginate gel) โดยที่หลักการของเมล็ดพืชเทียมมีองค์ประกอบสำคัญ 3 ส่วน ได้แก่ เอมบริออยด์ ซึ่งได้มาจากการเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชทำหน้าที่แทนเอมบริโอในเมล็ดพืชจริงตามธรรมชาติ เอนโดสเปิร์มเทียม หรืออาหารสะสมสังเคราะห์ (artificial endosperm) ที่สังเคราะห์ขึ้นเพื่อทำหน้าที่แทนเอนโดสเปิร์ม (endosperm) ของเมล็ดเพื่อเป็นอาหารสะสมสำหรับเอมบริออยด์ในระยะที่เริ่มมีการงอก เปลือกหุ้มเมล็ดพืชเทียม (artficial seed coat) ทำหน้าที่แทนเปลือกหุ้มเมล็ด ป้องกันอันตรายให้กับเมล็ดพืชเทียมจากสภาวะแวดล้อมภายนอก ระหว่างการเก็บรักษา และการขนย้าย ซึ่งประกอบด้วยแร่ธาตุอาหาร สารควบคุมการเจริญเติบโต และองค์ประกอบอื่นๆ ที่จำเป็นต่อการงอก และการเจริญพัฒนาของต้นอ่อน (Redenbaugh และคณะ, 1987) ซึ่งอาจทำได้โดยการเติมผงถ่าน (activated charcoal) ยาป้องกันกำจัดเชื้อรา และแบคทีเรีย ยาป้องกันศัตรูพืช จุลินทรีย์พวกไมคอร์ไรซ่า (mycorrhizas) และปุ๋ย ที่จำเป็นบางชนิดลงในสารเคลือบอาจช่วยให้เมล็ดพืชเทียมมีความสามารถในการรอดชีวิตสูงขึ้นเมื่อปลูกลงแปลง และมีการเจริญเติบโตที่แข็งแรงเพิ่มขึ้น (Senaratna, 1992; Toruan–Mathius and Sumaryono, 1995) (Fujii และคณะ, 1987)

สำหรับสารที่ใช้ห่อหุ้มเมล็ดพืชเทียมนั้น พบว่า เอมบริโอสามารถเจริญไปเป็นต้นพืชได้ดีในแคลเซียมอัลจิเนต (calcium alginate) ที่สามารถละลายได้ดีในอุณหภูมิห้อง ไม่ต้องใช้ความร้อนในการสารเจล มีผลกระทบต่อเอมบริออยด์น้อย และราคาถูก ดังนั้น โซเดียมอัลจิเนตจึงมีความเหมาะสมในการใช้เคลือบโซเมติคเอมบริโอเพื่อใช้ในการผลิตเมล็ดพืชเทียม (Redenbaugh และ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

คณะ, 1986, 1987) การใช้สารอัลจิเนตที่ระดับความเข้มข้น 1, 2 และ 3 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตรจะทำให้โซเมติคเอมบริโอมีความงอก และความมีชีวิตสูง อย่างไรก็ตามพบว่า การใช้อัลจิเนตที่ระดับความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตรจะมีผลต่อการสร้างแคปซูลที่อ่อนเกินไป ซึ่งทำให้การเคลื่อนย้ายได้ยาก ขณะที่ขนาดของแคปซูลสามารถควบคุมได้โดยความหนืดของสารโซเดียมอัลจิเนต และขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของปลายหลอดที่ใช้หยดโซมาติคเอมบริโอ นอกจากนี้ยังพบว่าโซเดียมอัลจิเนตยังมีคุณสมบัติที่ยอมให้ความชื้น และอากาศผ่านเข้าออกได้ เพื่อช่วยให้กระบวนการงอกของเมล็ดพืชเทียมเป็นไปตามปกติ และช่วยลดแรงตึงผิวของแคปซูลเพื่อช่วยในการใช้เครื่องมือในการจัดการปลูกได้ (Redenbaugh และคณะ, 1988)

อย่างไรก็ตามแม้ว่ากระบวนการเปลี่ยนแปลงในด้านสัณฐานวิทยาของโซมาติคเอมบริโอในสภาพห้องปฏิบัติการจะมีลักษณะคล้ายไซโกติคเอมบริโอ (zygotic embryos) ในสภาพธรรมชาติ แต่ทั้งนี้โซมาติคเอมบริโอเมื่อผ่านระยะการพัฒนาจะเกิดการงอกโดยที่ไม่มีระยะการ พักตัว ทำให้ไม่สามารถเก็บรักษาเมล็ดพืชเทียมได้ในเวลานานถือว่าเป็นปัญหาที่สำคัญทางเทคนิคของการผลิตเมล็ดพืชเทียมเพื่อการประยุกต์ใช้ประโยชน์อย่างแท้จริง ข้อสันนิษฐานว่าโซมาตริคเอมบริโอที่ผ่านการทำแห้งด้วยการดึงน้ำออกสามารถชักนำให้เกิดการพักตัวได้ แต่อัตราความมีชีวิตของโซมาติคเอมบริโอที่ผ่านการดึงน้ำออกยังอยู่ในระดับที่ต่ำมาก ปัญหาที่สำคัญ คือ โซมาติคเอมบริโอขาดคุณสมบัติความต้านทานต่อการดึงน้ำ (desiccation tolerance) (Kamada และ Harada, 1979)

การใช้น้ำตาลซูโครสความเข้มข้นสูงมีความสำคัญอย่างยิ่งต่อความมีชีวิตรอดของเนื้อเยื่อพืช เนื่องจาก น้ำตาลซูโครสเป็นสารที่ป้องกันเนื้อเยื่อพืชที่มีผลต่อความดันออสโมติคของเซลล์ (osmotic potential) โดยเมื่อมีการดึงน้ำออกจากเซลล์จะทำให้เซลล์ของโซมาติคเอมบริโอไม่เกิดความเสียหายขณะเกิดการดึงน้ำออกและอุณหภูมิต่ำ (Engelmann, 1991) การศึกษาระดับความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครส และระยะเวลาในการเลี้ยงก้อนอัลจิเนตบนอาหารที่มีความเข้มข้นน้ำตาลซูโครสที่เหมาะสมจึงมีความจำเป็น นอกจากนี้ระยะเวลาการดึงน้ำออกยังมีผลต่อความมีชีวิตของเมล็ดพืชเทียมเช่นกัน (Towill, 1995) Matsumoto และคณะ (1995) ได้รายงานว่าการทำเมล็ดกล้วยเทียมโดยการนำปลายยอดของกล้วยพันธุ์ Nanicao ที่แยกได้จากต้นที่มีหลายยอดมาเคลือบด้วยสารอัลจิเนตที่มีแร่ธาตุ และวิตามินสูตร MS (1962) และน้ำตาลซูโครสหลายระดับความเข้มข้นแล้วนำเมล็ดเทียมที่ได้เก็บรักษาไว้ในที่มืดที่ 25 องศาเซลเซียส นาน 1 เดือน แล้วนำออกเลี้ยงบนอาหารสูตร MS (2962) ดัดแปลงความเข้มข้นครึ่งหนึ่งส่วนที่มีหรือไม่มีน้ำตาลซูโครส 2 เปอร์เซ็นต์ พบว่า เมล็ดเทียมที่มีน้ำตาลซูโครสในสารเคลือบตั้งต่ 6 เปอร์เซ็นต์ขึ้นไปสามารถงอกเจริญบนอาหารที่ไม่มีน้ำตาลซูโครสได้ แต่ถ้าหากน้ำตาลซูโครสในสารเคลือบต่ำกว่านี้ เมล็ดเทียมจำเป็นต้องได้รับน้ำตาลซูโครสจากอาหารสำหรับการเจริญเติบโต

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สำหรับการผลิตเมล็ดเทียมแบบแห้งซึ่งเหมือนกับเมล็ดจริงในด้านรูปร่างและหน้าที่มากกว่าเมล็ดเทียมที่ชุ่มน้ำนั้น Kitto และ Janick (1985a) ได้รายงานการผลิตเมล็ดเทียมของแครอท โดยนำเอาสารแขวนลอยของเอมบริออยด์มาผสมกับสารละลาย Polyox WSR–N 750 เข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ ในปริมาตรที่เท่ากันจากนั้นนำเอาสารผสมนี้ขนาด 0.2 มล หยดลงบนแผ่น teflon ซึ่งต่อมาหยดนี้จะแห้งเป็นแผ่นบางโดยมีสารแขวนลอยของเอมบริออยด์ฝังตัวอยู่ภายใน Polyox เมื่อนำเอาเมล็ดเทียมที่เป็นแผ่นบางนี้ไปทำให้ละลายใน embryogenic medium และเลี้ยงสารแขวนลอยของเอมบริออยด์ที่มีการทำให้น้ำกลับคืน (rehydrated) บนกระดาษกรองที่ใช้พยุงเหนืออาหารในจานรอง นาน 2-3 สัปดาห์ พบว่า เมล็ดเทียมที่ดึงน้ำออกจนแห้งนั้นเอมบริออยด์มีชีวิตรอดได้เพียง 3 เปอร์เซ็นต์เท่านั้น ขณะที่เอมบริออยด์ที่ไม่ได้เคลือบไม่สามารถรอดชีวิตได้เลย การให้ ABA (abscisic acid) 1 μM ในช่วงวันที่ 14 ของระยะการชักนำให้เกิดเอมบริออยด์ สามารถช่วยให้เอมบริออยด์ที่เคลือบมีชีวิตรอดได้ถึง 40 เปอร์เซ็นต์ และจากการชักนำให้เอมบริออยด์เกิดความแกร่ง (hardened) โดยการใช้น้ำตาลซูโครสความเข้มข้นสูง (12 เปอร์เซ็นต์) การเพิ่มความหนาแน่นของเอมบริออยด์ที่นำไปเคลือบ (0.8 ก/25 มล) หรือการใช้อุณหภูมิต่ำ 4 องศาเซลเซียสที่ 3 วันสุดท้ายของระยะการชักนำให้เกิดเอมบริออยด์ โดยใช้ร่วมหรือไม่ร่วมกับ ABA 1 μM จากนั้นจึงเคลือบหรือไม่เคลือบด้วย Polyox และนำไปทำให้แห้งจนน้ำหนักคงที่ ซึ่งพบว่า เอมบริออยด์ที่ไม่เคลือบไม่สามารถรอดชีวิตได้เลย การชักนำให้เกิดความแกร่งในทุกกรรมวิธี ช่วยให้เอมบริออยด์มีชีวิตรอดได้เพิ่มขึ้น แต่ความมีชีวิตของเอมบริออยด์ที่ได้รับ ABA ร่วมกับการชักนำให้เกิดความแกร่งทั้ง 3 วิธี จะต่ำ และการเคลือบเอมบริออยด์ที่ได้รับ ABA และอุณหภูมิต่ำสามารถคงความมีชีวิตอยู่ได้หลังการเก็บรักษาที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 16 วัน (Kitto และ Janick, 1985b) ในปี 1993 Takahata และคณะ ได้ชี้ให้เห็นถึงความสำคัญของ ABA ในการชักนำให้เกิดความทนทานต่อการสูญเสียน้ำของเอมบริออยด์ที่ได้จากไมโครสปอร์ของบร็อคโคลี โดยพบว่า ความมีชีวิตของเอมบริออยด์หลังการดึงน้ำออกจนเหลือประมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ นั้นขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของ ABA ที่ได้รับและระยะการพัฒนาของเอมบริออยด์เอง โดยเอมบริออยด์ในระยะที่มีใบเลี้ยง (cotyledonary stage) สามารถทนทานต่อการสูญเสียน้ำได้มากที่สุดเมื่อได้รับ ABA 100 μM ซึ่งเจริญเป็นต้นได้ 27-48 เปอร์เซ็นต์ และยังสามารถเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องได้นาน 3 เดือน โดยไม่สูญเสียความงอก ส่วนเอมบริออยด์ที่ไม่ได้รับหรือได้รับ ABA 1 μM หรือเป็นเอมบริออยด์ที่ยังอยู่ในระยะการพัฒนาขั้นต้น ๆ ไม่สามารถมีชีวิตรอดได้หลังการดึงน้ำออก และพบว่าการได้รับ ABA นาน 1 วัน ให้ผลที่ไม่แตกต่างจากการได้รับนาน 7 วันซึ่งเจริญเป็นต้นได้ 27-48 เปอร์เซ็นต์ และยังสามารถเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องได้นาน 3 เดือน โดยไม่สูญเสียความงอก Brown และคณะ (1993) ก็พบว่า ABA ความเข้มข้น 100 μM สามารถชักนำให้เอมบริออยด์ที่ได้จาก ไมโครสปอร์ของ rapeseed (*Brassica*

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

napus) เกิดความทนทานต่อการสูญเสียน้ำขึ้นได้หลังจากการดึงน้ำออกอย่างช้า ๆ นานกว่า 6 วัน จนระดับน้ำลดเหลือต่ำกว่า 20 เปอร์เซ็นต์ โดยเอมบริออยด์ของ rapeseed จำนวน 5 พันธุ์ ยังคงความมีชีวิตอยู่ได้ 88-100 เปอร์เซ็นต์ หลังการเก็บรักษานาน 1 สัปดาห์ ซึ่งการตอบสนองนี้ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของ ABA ในอาหารเพาะเลี้ยงและระยะเวลาที่เอมบริออยด์ได้รับ ABA โดยการได้รับ ABA นาน 5-7 วัน ทำให้เอมบริออยด์มีอัตราการรอดชีวิตสูงสุด และเอมบริออยด์ที่มีขนาดใหญ่กว่า 1,000 μM และมีอายุ 17-20 วัน ตอบสนองต่อ ABA ได้ดีที่สุด

ส่วนการเก็บรักษาเมล็ดเทียมของแครอทนั้น Liu และคณะ (1992) ได้นำเอาเอมบริออยด์ระยะตอร์ปิโดมาเคลือบด้วยสารอัลจิเนต แล้วนำไปเก็บรักษาไว้ในจานรองที่ปิดสนิทด้วยพาราฟิล์ม ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 2 เดือน ซึ่งเมล็ดเทียมที่เก็บสามารถงอกได้ทั้งหมด แต่การงอกจะถูกยับยั้งเมื่อนำเมล็ดเทียมไปดึงน้ำออกภายใต้แรงลมในตู้ปลอดเชื้อจนมีการสูญเสียน้ำออกไปมากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ การให้ ABA 0.13 มก/ล นาน 10 วัน ก่อนการเคลือบ ช่วยให้เมล็ดเทียมที่ดึงน้ำงอกมากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเก็บรักษาที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 วัน สามารถงอกได้ 68 เปอร์เซ็นต์ Machii (1993) ก็พบว่า การเคลือบตาพิเศษที่ได้จากการนำขึ้นจากการเลี้ยงใบอ่อนของหม่อนในสารอัลจิเนตที่มีแร่ธาตุอาหาร และฮอร์โมนที่แตกต่างกัน เมล็ดเทียมจะมีการเจริญเติบโตที่ดีเมื่อสารเคลือบมีแร่ธาตุอาหารสูตร MS (1962) เป็นองค์ประกอบ ในขณะที่การใช้น้ำแทนแร่ธาตุอาหารดังกล่าว เมล็ดเทียมยังมีการเจริญเติบโตที่ดีกว่าตาพิเศษที่ไม่ได้เคลือบส่วนการเก็บรักษาเมล็ดเทียมในอาหารเหลวสูตร MS (1962) ที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 30 และ 80 วัน เมล็ดเทียมยังคงสามารถงอกและพัฒนาได้ถึง 100 เปอร์เซ็นต์ แต่การเก็บรักษาเมล็ดเทียมไว้ในน้ำที่อุณหภูมิเดียวกัน นานเท่ากัน เมล็ดเทียมมีอัตราการงอกที่ต่ำมาก Lecouteux และคณะ (1994) ได้ศึกษาผลของน้ำตาลซูโครสต่อการเก็บรักษาเอมบริออยด์ของแครอทที่สูญเสียน้ำ โดยการนำเอาเอมบริออยด์มาเลี้ยงบน อาหารที่มีน้ำตาลซูโครส 0.2–1.0 โมล ที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 7 วัน ก่อนนำไปดึงน้ำออก และเก็บรักษาในที่มืดที่มีความชื้นสัมพันธ์ 45 เปอร์เซ็นต์ นานกว่า 36 สัปดาห์ เมื่อนำมาดึงน้ำกลับคืนโดยวางเลี้ยงบนอาหารสูตรมาตรฐานที่อุณหภูมิห้อง พบว่า เอมบริออยด์ที่ผ่านการเลี้ยงบนอาหารที่มีน้ำตาลซูโครส 0.2-0.4 โมล สามารถทนทานต่อการสูญเสียน้ำและการเก็บรักษานาน 36 สัปดาห์ ได้โดยมีการงอกและเจริญเป็นต้นที่ปกติ

ถึงแม้ว่าเทคโนโลยีการผลิตเมล็ดพืชเทียมจะมีความสำเร็จอย่างสูงแต่ยังประสบปัญหาบางประการ โดยเฉพาะการนำเมล็ดพืชเทียมไปปลูกในสภาพธรรมชาติ ทั้งนี้เนื่องจากเกิดการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ในอัตราสูง แนวทางการแก้ปัญหาโดยการผสมสารปฏิชีวนะลงในอาหารสะสมสังเคราะห์เพื่อลดการปนเปื้อนนั้นเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพของเมล็ดพืชเทียม ทั่วไปการป้องกันการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมักใช้สารเบนโนมิล (bennomyl) เบน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

โนมิลเป็นสารกำจัดเชื้อราประเภทดูดซึม มีชื่อทางการค้าว่า benlate มีชื่อทางเคมีว่า methy 1-1-(buty1 carbamy 1)-2-benzimidazole-carbamate มีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อราจัดอยู่ในพวก benzimidazole มีสูตรโมเลกุล $C_{14}H_{18}N_4O_3$ น้ำหนักโมเลกุล 290.2 ลักษณะทางกายภาพเป็นผลึกสีขาว มีกลิ่นเล็กน้อย มีความสามารถในการละลายที่ 25 องสาเซลเซียส (Clemons และ Sisler, 1969; Edgington และคณะ, 1979) ศิริลักษณ์ และมนทกานติ (2531) ศึกษาผลของเบนโนมิลต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา 3 ชนิด คือ *Fusarium* sp,. *Aspergillus* sp. และ *Penicillium* sp. ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมและไม่เติมเบนโนมิล ได้ผลแตกต่างกันดังนี้ *Penicillium* sp. ไวต่อสารเบนโนมิลมากที่สุด คือ เบนโนมิลความเข้มข้นเพียง 5 มิลลิกรัมต่อลิตรสามารถยับยั้งการเจริญได้ สำหรับ *Aspergillus* sp. มีความต้านทานต่อเบนโนมิลค่อนข้างสูงคือต้องใช้ เบนโนมิล ความเข้มข้นถึง 80 มิลลิกรัมต่อลิตรจึงจะมีผลต่อการยับยั้งการเจริญของเนื้อเยื่อที่เลี้ยงในหลอดแก้ว Yang (1976) ได้ทดลองเลี้ยงเนื้อเยื่อ *Asparagus officinalis* Linn. ในอาหารสูตรดัดแปลงจาก Murshige and Skoog (1962) โดยการเติมเบนโนมิลความเข้มข้นต่าง ๆ ลงในอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อ พบว่า เบนโนมิลจะมีผลต่อการกระตุ้นการพัฒนาของยอดและราก โดยเฉพาะความเข้มข้นของเบนโนมิลต่ำ ๆ ประมาณ 100-250 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำให้เกิดการเจริญเติบโตแบบผิดปรกติ คือ มียอดที่อวบมากยิ่งขึ้นแต่จะมีผลไปยับยั้งการสร้างรากของหน่อไม้ฝรั่ง

เมื่อนำเนื้อเยื่อส่วนยอดของหน่อไม้ที่เจริญในเบนโนมิลความเข้มข้นต่าง ๆ มาศึกษาเนื้อเยื่อวิทยา โดยวิธีตัด section ตามยาวและตามขวาง พบว่า เนื้อเยื่อของยอดที่เลี้ยงในอาหารที่เติมเบนโนมิลกับเนื้อเยื่อของยอดที่เลี้ยงในอาหารควบคุมมีความแตกต่างกันทั้งทางด้านโครงสร้างของเซลล์ และจำนวนของเซลล์ โดยที่หน่อไม้ฝรั่งที่เลี้ยงในอาหารควบคุมจะมีเนื้อเยื่อเจริญที่ล้อมรอบชั้น endodermis ไม่ค่อยแบ่งตัวมากนักเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ของยอดที่เลี้ยงในอาหารที่เติมเบนโนมิลซึ่งพบว่าจะแบ่งตัวมากกว่าและจำนวนเซลล์ในชั้น cortex และ pith ของเซลล์ที่เลี้ยงในอาหารที่เติมเบนโนมิลจะมีจำนวนเพิ่มขึ้น นั่นแสดงว่าการเพิ่มขนาดของยอดที่เกิดจากการใส่เบนโนมิลในอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นผลเนื่องมาจากการขยายขนาดของเซลล์ในชั้น cortex, phloem และ xylem นั่นเอง

Hauptmann และคณะ (1985) ได้ศึกษาผลของเบนโนมิลที่ใช้ในการเลี้ยงเพาะเลี้ยงเซลล์และ โปรโตพลาสต์ พบว่า เบนโนมิลที่มีความเข้มข้น 6.25-50 มิลลิกรัมต่อลิตร ถ้าละลายด้วยการนึ่งอัดความดันหรือต้ม เบนโนมิลจะถูก hydrolized ไปเป็น MBC (methy 1-2-benzimidazole carbamate) ซึ่ง MBC จะมีผลในการยับยั้งการเจริญของเซลล์พืช เช่น *Daucu carota* และ *Nicotana tabacum* เมื่อผสมในอาหารสำหรับเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ หรือผสมลงในดินที่ใช้ในการเพาะปลูกเพื่อเพิ่มความมีชีวิตของเมล็ดพืชเทียมระหว่างการงอก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved