บทที่ 2

ตรวจเอกสาร

เมล็ดสังเคราะห์ (synthetic seeds)

เมล็ดสังเคราะห์ (synthetic seeds or artificial seeds) เป็นการขยายพันธุ์พืชแบบไม่อาศัยเพศ โดยอาศัยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ในการเลี้ยงเซลล์ร่างกาย (somatic cell) ผ่านกระบวนการโซมาติกเอมบริโอเจเนซีส (somatic embryogenesis) ให้พัฒนาไปเป็นโซมาติกเอมบริโอ (somatic embryos or embryoids) โดยไม่ผ่านกระบวนการ fertilization ของเซลล์สืบพันธุ์ตามธรรมชาติ ในการผลิตเมล็ดสังเคราะห์จะนำเอาโซมาติกเอมบริโอมาทำการเคลือบ (encapsulation) ด้วยสารที่ทำให้เกิดเจล พวกอัลจิเนต (alginate) หรือสารอื่นๆ เพื่อทำหน้าที่เป็นเปลือกหุ้มเมล็ดสังเคราะห์ ป้องกันอันตรายให้แก่เอมบริโอเหมือนในเมล็ดจริง และเป็นแหล่งของอาหารสะสมเทียม (Redenbaugh *et al.*, 1987; Gray and Purohit, 1992) นอกจากนี้แล้วยังหมายรวมถึงการนำเอาชิ้นส่วนอื่นๆ ที่ไม่ใช่โซมาติกเอมบริโอ แต่เป็นชิ้นส่วนของพืชที่สามารถเจริญเติบโตเป็นพืชต้นใหม่ได้ เช่น ปลายยอด ปลายราก ตาข้าง และแคลลัส สามารถนำมาเคลือบด้วยสารที่ทำให้เกิดเจล และมีลักษณะคล้ายเมล็ดจริง

เมล็ดสังเคราะห์มีความเหมาะสมในการผลิตที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของพืชหลายชนิด เช่น พืชในกลุ่มไม้ดอกไม้ประดับ พืชผัก ไม้ผล สน พืชอาหารสัตว์ ถั่วเหลือง และธัญพืชลูกผสมชนิดต่างๆ (Gray and Purohit, 1992) เนื่องจากสามารถผลิตได้จำนวนมากภายในระยะเวลาอันสั้น สามารถผลิตได้ทั้งปี ช่วยย่นระยะเวลาในการผลิตเมล็ดพันธุ์ ลดการใช้แรงงานและพื้นที่ในการผลิตเมล็ดพันธุ์ รวมทั้งพืชที่ปลูกจากเมล็ดสังเคราะห์ที่ผลิตได้จะมีลักษณะเหมือนต้นแม่ทุกประการเนื่องจากเป็นการขยายพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ เมล็ดสังเคราะห์จะมีความสม่ำเสมอของขนาด และคุณภาพ รวมทั้งยังปราศจากเชื้อจุลินทรีย์ต่างๆ (pathogen free) และยังสามารถนำมาประยุกต์ใช้สำหรับการเก็บรักษาเชื้อพันธุกรรมพืช (germplasm collection) ที่มีความสำคัญได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Redenbaugh, 1993)

เอมบริโอสามารถเจริญได้ตามสภาวะปกติในธรรมชาติ หรือเจริญโดยการควบคุม และปรับสภาพแวดล้อมให้เหมาะสมในหลอดแก้วซึ่งสามารถแบ่งได้เป็น 2 ประเภทดังนี้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1. Zygotic embryo คือ เอมบริโอที่เจริญจากไซโกต (zygote) ซึ่งเกิดจากนิวเคลียสของละอองเกสรตัวผู้ 2 นิวเคลียส เคลื่อนที่เข้าไปผสมพันธุ์ในถุงเอมบริโอ (embryo sac) โดยที่สเปิร์มนิวเคลียส 1 นิวเคลียส จะเข้าผสมกับเซลไข่ (egg cell) เกิดเป็นไซโกตที่ต่อมาจะเจริญเป็นเอมบริโอหรือต้นอ่อนที่ประกอบด้วย ยอดอ่อน (plumule) ต้นอ่อน (caulicle) และรากอ่อน (radicle) ส่วนสเปิร์มนิวเคลียสอีก 1 นิวเคลียส จะเข้าผสมกับโพลานิวเคลียส (polar nucleus) เกิดเป็นเซลล์ที่จะเจริญไปเป็นเอนโดสเปอร์ม (endosperm) ซึ่งเป็นอาหารของเอมบริโอในขณะที่มีการเจริญเติบโตหรือในขณะที่เมล็ดกำลังงอก

2. Non-zygotic embryo คือ เอมบริโอที่เจริญมาจากเซลล์อื่นๆ 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)

สำหรับกระบวนการพัฒนาของ somatic embryo ในหลอดแก้วเรียกว่า somatic embryogenesis ซึ่งในพืชชั้นสูงเริ่มมีการศึกษาเป็นครั้งแรกโดย Steward และคณะ (1958) โดยนำส่วนของโฟเอมที่ตัดจากหัวแครอทมาเลี้ยงเซลล์แบบแขวนลอย (suspension culture) ในอาหารเหลวสูตรพื้นฐานของ White (1934) โดยเติมน้ำมะพร้าว และ 2, 4-D (2, 4-dichlorophenoxyacetic acid) ได้ต้นใหม่ที่มีสีเขียวของแครอทที่พัฒนาจากเอมบริโอระยะ torpedo ซึ่งเจริญจากกลุ่มเซลล์ในการเลี้ยงเซลล์แบบแขวนลอย ในขณะเดียวกัน Reinert (1958) ได้แสดงให้เห็นว่าต้นพืชใหม่ที่เกิดจากแคลลัสของแครอทมีรูปแบบการพัฒนาคล้ายกับ zygotic embryo จนกระทั่งปัจจุบันพบว่ามีพืชอื่นๆอีกหลายชนิดที่สามารถชักนำให้เกิด 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 เป็นกระบวนการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อไปเป็นต้นอ่อนของพืชที่มีทั้งส่วนยอดและรากอ่อนที่สมบูรณ์โดยมีแหล่งกำเนิดเดียวกัน เป็นการเจริญใน 2 ทิศทาง (bipolar) การพัฒนาแบบนี้จะคล้ายกับ zygotic embryogenesis คือมีระยะที่กลุ่มเซลล์มีรูปร่างแบบ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

globular shape, heart shape และ torpedo shape สุดท้ายจะได้ต้นพืชที่สมบูรณ์แบบ (Steward and Mapes, 1971; Kohlenbach, 1977; Vajrabhaya, 1988) ในขณะที่ organogenesis เป็นกระบวนการพัฒนาของเนื้อเยื่อไปเป็นส่วนหนึ่งส่วนใดของพืช โดยมีการเจริญเติบโตในทิศทางเดียว (unipolar)

Somatic embryogenesis สามารถเกิดได้ 2 แนวทางด้วยกันคือ

1. เกิดโดยตรง (direct somatic embryogenesis) somatic embryo จะเกิดขึ้นจากเซลล์ของชิ้นพืช (explant) ที่นำมาเลี้ยงโดยตรง โดยไม่ผ่านกระบวนการสร้างแคลลัส
2. เกิดโดยทางอ้อม (indirect somatic embryogenesis) somatic embryo จะเกิดขึ้นได้นั้นจะต้องผ่านกระบวนการสร้างแคลลัสมาก่อน แล้วจึงพัฒนาไปเป็น somatic embryo

จากการศึกษาลักษณะการเกิดแคลลัส และการเจริญของเนื้อเยื่อในการเลี้ยงเซลล์แขวนลอยของแครอท พบว่าประกอบด้วยเซลล์ 2 ชนิดคือ

1. เซลล์ที่มีขนาดใหญ่และมี vacuole ใหญ่ โดยปกติขาดความสามารถในการพัฒนาไปเป็นอวัยวะหรือ somatic embryo ส่วนมากกระจายอย่างเป็นอิสระในอาหารเลี้ยงเชื้อ

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 ที่อ่อนไปเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ไม่มีออกซิน (auxin) พบว่าสามารถชักนำให้เกิดเอมบริโอได้ และหากแยกกลุ่มเซลล์นี้ออกเป็นเซลล์เดี่ยวก็สามารถชักนำให้เกิดเอมบริโอได้เป็นจำนวนมากเช่นกัน

ปัจจัยที่มีผลต่อการเกิด somatic embryogenesis

1. ปัจจัยภายในเนื้อเยื่อพืช ได้แก่ ลักษณะของเนื้อเยื่อพืชที่นำมาเลี้ยง เช่น พันธุกรรมของพืช องค์ประกอบต่างๆของเนื้อเยื่อพืช (Gamborg, 1975) และชนิดของส่วนของพืชที่นำมาเลี้ยง ในแครอทพบว่าทุกส่วนของพืชสามารถนำมาชักนำให้เกิด somatic embryo ได้ เช่น ส่วนไฮโปคอทิล (ส่วนใต้ใบเลี้ยง) ส่วนของรากอ่อน และก้านใบ เป็นต้น และจากการศึกษาของ ชัยวัฒน์ (2535) ในแครอท พบว่า แคลลัสที่เจริญมาจากแคมเบียม และลำต้นส่วนใต้ใบแท้ของต้นอ่อน สามารถชักนำให้เกิด somatic embryo ได้ดีที่สุด ส่วนแคลลัสที่ชักนำจากส่วนก้านใบ และต้นกล้าของแครอทชักนำให้เกิด somatic embryo ได้ไม่ดีนัก ส่วนในยาสูบพบว่าแคลลัสที่ชักนำจากส่วนลำต้น และใบเป็นแคลลัสที่ชักนำให้เกิด somatic embryo ได้ดีที่สุด นอกจากนี้ยังพบว่าการนำส่วนของพืชมาเลี้ยงเนื้อเยื่อจะให้ผลดีหรือไม่นั้นอาจขึ้นกับตำแหน่งของพืชที่สัมผัสอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อด้วย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2. ปัจจัยภายนอกซึ่งแยกได้เป็น ปัจจัยทางเคมี และปัจจัยทางกายภาพได้ดังนี้

2.1 ปัจจัยทางเคมี

จากการศึกษาพบว่า somatic embryo สามารถเจริญได้ดีในอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อหลายชนิด เช่น White (White, 1963) B_5 (Gamborg *et al.* 1968) SH (Sshenk and Hildebrandt, 1972) และ MS (Murashige and Skoog, 1962) อาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร B_5, SH และ MS ถูกจัดเป็นอาหารที่มีความเข้มข้นของเกลืออนินทรีย์สูง โดยเฉพาะสูตร MS มีความเข้มข้นของเกลืออนินทรีย์สูงกว่าอาหารของ White ถึง 10 เท่า จากการศึกษาของ Evan, Flick และ Jensen (1981) พบว่า 70% ของพืชที่นำมาชักนำให้เกิด somatic embryo มักจะเลี้ยงในอาหารสูตร MS หรือ MS ที่ปรับปรุงแล้ว (modified MS) (Ammirato, 1983)

สำหรับสารควบคุมการเจริญของพืชที่มีบทบาทในการชักนำให้เกิด somatic 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)

นอกจากออกซินแล้วยังมีธาตุที่จำเป็นและมีผลต่อการชักนำให้เกิด somatic embryo อย่างมาก ได้แก่ ไนโตรเจน ซึ่ง Halperin และ Wetherell (1965) รายงานว่าในการเลี้ยงแครอทป่าซึ่งเจริญจากส่วนของก้านใบ เอมบริโอจะมีการเจริญเมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อซึ่งมี reduced nitrogen โดยแคลลัสที่เจริญบนอาหารที่มี KNO_3 ซึ่งเป็นแหล่งไนโตรเจนเพียงแหล่งเดียวจะไม่สามารถชักนำให้เกิดเอมบริโอได้ถึงแม้จะย้ายไปเลี้ยงในอาหารที่ไม่เติมออกซิเจน อย่างไรก็ตามการเติมไนโตรเจน (5 mM/l) ในรูปของ NH_4Cl ในอาหารที่มี KNO_3 55 mM/l จะชักนำให้เกิดการเจริญของเอมบริโอ นอกจากนี้ยังแสดงให้เห็นว่าการมี reduced nitrogen จะมีผลเฉพาะในสูตรอาหารที่ชักนำให้เกิดแคลลัสเท่านั้น ดังนั้นถ้าแคลลัสเกิดบนอาหารที่มี KNO_3 และ NH_4Cl ก็จะสร้างเอมบริโอได้ โดยในสูตรอาหารชักนำให้เกิด somatic embryo จะมี หรือไม่มี NH_4Cl ก็ได้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Reinert *et al.* (1967) แสดงให้เห็นว่าการเลี้ยงแครอทบ้าน (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 ได้ดีเมื่อเทียบกับการใช้ 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^+ บางครั้งในการเลี้ยงเนื้อเยื่ออาจจะเติมสารอินทรีย์บางชนิดลงไปเพื่อช่วยเพิ่มปริมาณไนเตรท เช่น caseinhydrolysate, glutamine และ alanine (Wetherell and Dougall, 1976)

Brown *et al.* (1976) รายงานว่าการใช้ potassium ion (20 mM/l) มีความจำเป็นในการเกิด embryogenesis ของแครอทป่า

สำหรับในส่วนของการใช้ไซโตไคนิน (cytokinin) จะไม่มีบทบาทในการชักนำให้เกิด somatic embryogenesis แต่จะมีผลในการแบ่งเซลล์ การขยายขนาดของแคลลัสและการเจริญเติบโตของเอมบริโอไปเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์ (Arora and Singh, 1978; Fujimura and Komamine, 1980; Chen, *et al.* 1987) โดยนิยมใช้ไซโตไคนินในรูปของ zeatin มากกว่า kinetin และ BA (Fujimura and Komamine, 1975)

มีรายงานว่า IAA และ GA_3 จะยับยั้งการเกิด embryogenesis ได้ในพืชบางชนิด (นพดล, 2537)

2.2 ปัจจัยทางกายภาพ

ปัจจัยทางกายภาพที่มีผลต่อ somatic embryogenesis ได้แก่ อุณหภูมิ ความเข้มแสง ช่วงแสง ก๊าซ ความเร็ว หรือจำนวนรอบต่อนาทีของเครื่องเขย่า ความหนาแน่นของ somatic embryo ที่เหมาะสม ซึ่งจะให้ผลที่แตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของพืช และระยะการเจริญ เช่น ในแครอทความเข้มแสงเพียงเล็กน้อยก็สามารถชักนำให้เกิดเอมบริโอได้ดี (Ammirato and Steward, 1971) ในขณะที่ยาสูบ (*Nicotiana tabacum*) ต้องการความเข้มแสงสูงมากในการชักนำให้เกิดเอมบริโอ (Haccius, 1978)

เอมบริโอสามารถเจริญเป็นต้นได้เมื่อใช้ alginate, alginate ผสม gelatin และ carrageenan กับ locust bean gum แต่จากคุณสมบัติของ sodium alginate ในการเป็น gelatin สามารถละลายได้ที่อุณหภูมิห้อง โดยไม่ต้องใช้ความร้อนในการสร้างเจล ไม่เป็นพิษกับพืช และราคาถูก ดังนั้น sodium

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

alginate จึงมีความเหมาะสมในการผลิตเมล็ดพืชสังเคราะห์ (Redenbeugh *et al.*, 1986; Redenbaugh *et al.*, 1987)

เมื่อนำ somatic embryo ผสมกับ sodium alginate แล้วหยดลงใน di- หรือ trivalent metal salt ที่เหมาะสม เช่น calcium nitrate พบว่าจะเกิดปฏิกิริยาขึ้นทันที และสมบูรณ์ภายใน 30 นาที (Redenbaugh *et al.*, 1991) โดย metal cation จะสร้างพันธะอิออนระหว่าง carboxylic acid group บนโมเลกุล guluronic acid ของ alginate ซึ่ง alginate ที่มี guluronic acid มาก จะสร้างแคปซูลที่แข็งกว่า alginate ที่มี mannuronic acid โดย sodium alginate เมื่อทำให้อยู่ในรูปสารละลายยังคงเสถียรที่อุณหภูมิห้อง ซึ่งไม่ต้องการความร้อนในการสร้างเจล และเกิด complexation ทันทีเมื่อสัมผัสกับ metal cation ความแข็งของแคปซูลขึ้นอยู่กับอัตราส่วนของ guluronic acid ต่อ mannuronic acid, cation และเวลาที่ใช้ในการเกิด complex อย่างไรก็ตามความเข้มข้นของ alginic acid มีผลต่ออัตราการงอกของเมล็ดพืชเทียมซึ่งเนื่องมาจากความแข็งแรงของแคปซูล Fourre และคณะ (1991) พบว่า sodium alginate 4 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร จะยับยั้งการงอกของ somatic embryo ในขณะที่ การใช้ alginate ความเข้มข้น 1, 2 และ 3 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตรทำให้อัตราการงอกของ somatic embryo สูงมาก อย่างไรก็ตามความเข้มข้นของ alginate ที่มี 1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตรจะสร้างแคปซูลที่อ่อนเกินไป และทำให้ขนส่งได้ยาก ขนาดของแคปซูลสามารถควบคุมได้โดยความหนืด (viscosity) ของ sodium alginate และเส้นผ่าศูนย์กลางภายในของปลายหลอดหยด (Redenbaugh *et al.*, 1988)

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

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

ถึงแม้ว่ากระบวนการเปลี่ยนแปลงทางด้านสัณฐานวิทยาของ somatic embryo ในหลอดแก้วจะคล้ายกับ zygotic embryo ในสภาพธรรมชาติ คือมีระยะที่ถุงเซลล์มีรูปร่างเป็น globular shape, heart shape และ torpedo shape แต่ somatic embryo จะแตกต่างจาก zygotic

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

embryo คือ เมื่อผ่านระยะเหล่านี้ก็จะงอกโดยไม่มีระยะพักตัว ทำให้ไม่สามารถเก็บไว้ได้ ซึ่งเป็นปัญหาสำคัญของเทคนิคการผลิตเมล็ดพืชสังเคราะห์ในการนำไปใช้ประโยชน์ได้อย่างแท้จริง Kitto และ Janick (1985a, 1985b) ได้ศึกษาการหุ้ม somatic embryo clump ของแครอทด้วยสารละลาย polyethylene oxide (polyox WSR-N750) แล้วทำให้แห้งเพื่อจะเก็บรักษาและขนส่งได้ง่าย แต่พบว่ามี somatic embryo จำนวนมากอยู่ใน buffer อันเดียวกัน จะมีอัตราการรอดชีวิตต่ำมาก แสดงให้เห็นว่าไม่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้เมื่อเทียบกับเมล็ดธรรมชาติ ต่อมาในปี 1987 Gray ได้ศึกษาการทำ somatic embryo ใน orchard grass (*Dactylis glomerata* L.) ให้แห้ง โดยมีปริมาณน้ำ 13 เปอร์เซ็นต์ และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 21 วัน พบว่ามีเปอร์เซ็นต์การงอกเพียง 4 เปอร์เซ็นต์ โดยสามารถเจริญเป็นต้นได้ และกล่าวว่าในระหว่างการทำแห้ง somatic embryo จะลดขนาดลง มีสีค่อนข้างเหลือง ขาดง่าย และเซลล์ผนังชั้นนอกจะยุบลง ซึ่งคาดว่าเอมบริโอที่ถูกทำให้แห้งอาจอยู่ในระยะพักตัว อย่างไรก็ตามอัตราการรอดชีวิตของ somatic embryo ที่ทำให้แห้งยังต่ำมาก ปัญหาสำคัญคือการขาด 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 ในทางตรงกันข้ามได้แสดงให้เห็นว่า somatic embryo มีระดับ ABA ต่ำ (Kamada and Harada, 1981) นอกจากนี้ยังแสดงให้เห็นว่าใน zygotic embryo ABA จะสร้างขึ้นใน maternal tissue หรือ endosperm และถูกส่งไปยังเอมบริโอ (Dure, 1975) ต่อมา Senaratna *et al.* (1990b) ได้รายงานว่าสามารถเพิ่มอัตราการรอดชีวิตของ somatic embryo ใน Alfalfa ที่ทำให้แห้งได้โดยการเติม ABA ในอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อ ก่อนนำไปทำให้แห้งเพื่อใช้แทนเมล็ดพืชจริง อย่างไรก็ตาม somatic embryo ที่ไม่มีสิ่งห่อหุ้ม จะไม่สามารถใช้ประโยชน์ได้เหมือนเมล็ดธรรมชาติ ยิ่งกว่านั้นยังขาดแหล่งอาหารที่จำเป็นในการเจริญหลังการงอกแล้ว จากงานวิจัยเหล่านี้คาดว่าเอมบริโอที่ถูกหุ้มแล้วสามารถทำให้แห้งเพื่อจะสร้างเมล็ดพืชสังเคราะห์แบบแห้งได้

เมล็ดสังเคราะห์แบ่งออกได้ 2 แบบ คือ เมล็ดสังเคราะห์แบบชื้น (hydrated synthetic seed) และเมล็ดสังเคราะห์แบบแห้ง (desiccated synthetic seed) (Redenbaugh, 1993) โดยเริ่มมีการศึกษาการผลิตเมล็ดสังเคราะห์แบบชื้น เป็นการศึกษาหาชนิดของสารเคลือบที่เหมาะสมสำหรับเป็นเปลือกหุ้มเมล็ดสังเคราะห์ โดยมีการนำเอาสารชนิดต่างๆ มาทดลองใช้ เช่น สารอัลจิเนต วุ้น อกาโรส และเจลลาติน ซึ่งพบว่าสารอัลจิเนตมีความเหมาะสมมากที่สุดในแง่ของการเกิดเป็นแคปซูล และความมีชีวิตของโซมาติกเอมบริโอที่บรรจุอยู่ภายใน (Redenbaugh *et al.*, 1987)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เมล็ดสังเคราะห์แบบชั้นมีข้อด้อยหลายประการ คือ เมล็ดสังเคราะห์แบบชั้นจำเป็นต้องเก็บรักษาในสภาพอุณหภูมิต่ำ ซึ่งทำให้ยากต่อการเก็บรักษา และมีระยะเวลาในการเก็บรักษาที่สั้น รวมทั้งมีอัตราการงอกเป็นต้นพืช (conversion rate) ที่ต่ำมาก ภายในเจลชุ่มน้ำ (hydrogel) จะมีการหายใจของโซมาติกเอมบริโอที่อยู่ภายใน และแห้งได้อย่างรวดเร็ว (Redenbaugh *et al.*, 1987) ปัญหาการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์เนื่องจากในเจลที่ทำหน้าที่เป็นเปลือกหุ้มเมล็ดนั้น ประกอบด้วยน้ำตาลซูโครสที่เป็นแหล่งอาหารของเชื้อจุลินทรีย์ต่างๆ ได้ดี และเกิดการงอกแบบ precocious germination (การงอกของโซมาติกเอมบริโอที่เกิดจากความชื้นในเจลที่หุ้ม โดยไม่ได้รับน้ำจากภายนอก) เมล็ดสังเคราะห์จะมีเปลือกหุ้มของเมล็ดที่อ่อนไม่คงตัวเหมือนกับของเมล็ดจริง และผิวมีรูพรุนมากมายทำให้แร่ธาตุที่ละลายน้ำได้ถูกชะล้างออกไปอย่างรวดเร็วก่อนที่รากและยอดจะโผล่ออกมา (Liu *et al.*, 1992)

การชักนำให้เกิดความทนทานต่อการสูญเสียน้ำ (desiccation tolerance) ของโซมาติกเอมบริโอ

การดึงน้ำ (dehydrate) ออกจากโซมาติกเอมบริโอนั้นพบว่าโซมาติกเอมบริโอจะมีขนาดเล็กลง มีสีค่อนข้างเหลือง ขาดง่าย และเซลล์ผนังชั้นนอกจะยุบลง ซึ่งคาดว่าเอมบริโอที่ถูกดึงน้ำออกอาจจะอยู่ในระยะพักตัว อย่างไรก็ตามอัตราการรอดชีวิตของโซมาติกเอมบริโอที่ทำให้แห้งยังต่ำมาก ปัญหาที่สำคัญคือการขาดความทนทานต่อการสูญเสียน้ำ ซึ่งอาจเนื่องจากการขาดการสังเคราะห์ ABA โดยโซมาติกเอมบริโอเอง ซึ่งในเมล็ดที่กำลังเจริญระดับของ ABA ภายในเมล็ดจะเพิ่มขึ้นชั่วคราวก่อนหรือหลังการเกิดการแห้งของเมล็ด (King, 1976; Suzuki *et al.*, 1981)

ลักษณะที่สำคัญของโซมาติกเอมบริโอคือมีการเจริญและการพัฒนาไปเป็นต้นกล้าโดยไม่มีสภาวะเงียบหรือสภาวะพักตัว (quiescent state) เหมือนในเมล็ดพวก orthodox และมีความแข็งแรงน้อยกว่าไซโกติกเอมบริโอ (zygotic embryos) ในเมล็ดธรรมชาติ (Gray, 1987) ทำให้ยากต่อการเก็บรักษาเป็นระยะเวลานาน รวมทั้งสารที่นำมาเคลือบเมล็ดสังเคราะห์ไม่สามารถป้องกันลักษณะการงอกแบบ precocious germination ของโซมาติกเอมบริโอ ที่อยู่ภายในเมล็ดสังเคราะห์ก่อนที่จะนำไปปลูกได้ ซึ่งการเกิด precocious germination ในระหว่างระยะสุดท้ายของการพัฒนาของโซมาติกเอมบริโอ จะทำให้เกิดการตายของโซมาติกเอมบริโอขึ้นในระหว่างการระเหยน้ำออก (Redenbaugh, 1993)

การชักนำให้เกิดการทนทานต่อการสูญเสียน้ำ (desiccation tolerance) ของโซมาติกเอมบริโอก่อนที่จะนำไปดึงน้ำออก (dehydration) เพื่อใช้ผลิตเป็นเมล็ดสังเคราะห์แบบแห้ง เป็นวิธีการที่เหมาะสมสำหรับเทคโนโลยีเมล็ดสังเคราะห์ เนื่องจากว่าโซมาติกเอมบริโอจะอยู่ในสภาวะเงียบ (quiescent state) คล้ายกับเมล็ดจริง (orthodox seed) ซึ่งสามารถกระทำได้โดยการระเหยน้ำ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ออกจากโซมาติกเอมบริโอให้มีความชื้น (moisture content) เหลือประมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ สามารถยืดอายุการเก็บรักษาเมล็ดสังเคราะห์ให้ยาวนานออกไป (Senaratna *et al.*, 1989) และยังนำไปใช้ในการเก็บรักษาเชื้อพันธุ์พืช (germplasm collection) ที่มีคุณค่าได้ (Gray and Purohit, 1992) ปัจจัยสำคัญที่จะทำการระเหยน้ำออกจากโซมาติกเอมบริโอประสบความสำเร็จคือการชักนำให้โซมาติกเอมบริโอมีความทนทานต่อการสูญเสียน้ำ

มีรายงานการศึกษาเรื่องการชักนำให้เกิดความทนทานต่อการสูญเสียน้ำในโซมาติกเอมบริโอของพืชหลายชนิด ได้แก่ องุ่น (Gray 1989), ถั่วลิสง (Senaratna *et al.*, 1989, 1990; Anandarajah and McKersie, 1990), rapeseed (Brown *et al.*, 1993; Anandarajah *et al.*, 1991), บรอคเคอรี่ (Takahata *et al.*, 1992), แครอท (Timbert *et al.*, 1996: Lecouteux *et al.*, 1994; Iida *et al.*, 1992; Teteroo *et al.*, 1995; Liu *et al.*, 1992; Kitto & Janick, 1985), สพรูส (Robert *et al.*, 1990; Attree *et al.*, 1991), เซลเลอรี่ (Kim and Janick, 1990), geranium (Marsolais *et al.*, 1991), ถั่วเหลือง (Obendorf and Slawinska, 1986) และ อ้อย (Naeves *et al.*, 2001)

การชักนำให้เกิดความทนทานต่อการสูญเสียน้ำของโซมาติกเอมบริโอกระทำได้โดยการใช้สารเคมีและการชักนำให้เกิดสภาวะเครียดแก่โซมาติกเอมบริโอ ได้แก่ ABA (Senaratna *et al.*, 1989, 1990; Timbert *et al.*, 1996) การใช้น้ำตาลซูโครสความเข้มข้นสูง การเติม proline ในอาหารที่ใช้เลี้ยง (Kim and Janic 1991) การใช้อุณหภูมิต่ำ (chilling) (Kitto and Janick 1985; Anandarajah *et al.*, 1991) การใช้สาร Triazoles, nutrient deprivation (Senaratna *et al.*, 1989) ซึ่งการใช้สภาพเครียดเช่นการใช้อุณหภูมิสูง หรืออาหารที่มีความเข้มข้นสูง (osmotic shock) โดยการเพิ่มความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสจะไปมีผลทำให้ระดับของ ABA ที่อยู่ในโซมาติกเอมบริโอเพิ่มขึ้น (Skriver and Mundy, 1990) ความทนทานต่อการสูญเสียน้ำของโซมาติกเอมบริโอวัดได้จากความสามารถของโซมาติกเอมบริโอในการเจริญเป็นต้น ภายหลังจากทำการเก็บรักษาที่สภาพความชื้นต่ำ (10 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับเมล็ดแห้ง) ที่ระดับอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 อาทิตย์ (Gray, 1989)

Kintzios *et al.* (2000) พบว่ารูปแบบของเมล็ดสังเคราะห์มีทั้งแบบแห้ง (desiccated synthetic seeds) และแบบชื้น (hydrogel synthetic seeds) (Redenbaugh, 1993) แต่พบว่าเมล็ดสังเคราะห์แบบชื้นนั้นมีปัญหาหลายประการ อันดับแรก เมล็ดสังเคราะห์แบบชื้นจะต้องเก็บในสภาพปลอดเชื้อ (aseptic state) เนื่องจากในเจลจะมีส่วนของอาหารและน้ำซึ่งเป็นอาหารอย่างดีของเชื้อจุลินทรีย์ต่างๆ รวมทั้งเมล็ดสังเคราะห์แบบชื้นยังเกิดการงอกขึ้นได้เองโดยที่ไม่ได้รับความชื้นจากภายนอก และการที่เจลมีลักษณะไม่แข็งแรงเหมือนกับเมล็ดจริงในธรรมชาติ (true seeds) และเก็บรักษาได้ไม่นาน (Jang *et al*, 1992) รวมทั้งการเก็บรักษาจำเป็นต้องเก็บในอุณหภูมิต่ำซึ่งต้องใช้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

อุปกรณ์เฉพาะที่ยุ่งยากต่อเกษตรกร ทำให้การจัดการทำได้ไม่สะดวก ต้องใช้ความระมัดระวังสูง เป็นปัญหาในการขนส่งเมล็ดสังเคราะห์จากแหล่งผลิตไปยังแปลงปลูกของเกษตรกร

เมล็ดสังเคราะห์แบบแห้งจะทำให้เอมบริโอที่อยู่ข้างในมีการพักตัวหรืออยู่ในสภาวะเงียบคล้ายกับเมล็ดพวก orthodox (Gray *et al.*, 1989; Janick *et al.*, 1989; Kito amd Janick., 1985) โดยการระเหยน้ำออกให้เหลือความชื้นประมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ ทำให้สามารถยืดอายุการเก็บรักษาได้ยาวนานขึ้น และมีประโยชน์ต่อการเก็บรักษาเชื้อพันธุ์พืช เป็นอย่างมาก (Senaratna *et al*, 1989) Senaratna (1990) พบว่าโซมาติกเอมบริโอของถั่วอัลฟัลฟา (alfalfa) ที่ผ่านการดึงน้ำออก จะให้ต้นกล้าที่มีความแข็งแรงกว่าโซมาติกเอมบริโอที่ไม่ผ่านการดึงน้ำออก

การชักนำให้โซมาติกเอมบริโอทนทานต่อการสูญเสียน้ำ (desiccation tolerance) ทำได้หลายวิธีทั้งจากใช้สารเคมี และการทำให้เกิดความเครียดทางกายภาพ (physical stress) แก่โซมาติกเอมบริโอที่กำลังพัฒนา เช่น การใช้ abscisic acid, proline, triazoles, การเพิ่มความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสในอาหาร การใช้อุณหภูมิสูง (thermal shock) และการใช้ความเย็น (Redenbaugh, 1993)

ในการผลิตเมล็ดสังเคราะห์แบบแห้งของพืชตระกูล *Brassica* ที่ได้รับ ABA เพื่อชักนำให้เกิดความทนทานต่อการสูญเสียน้ำก่อนที่จะนำไปทำการระเหยน้ำออก พบว่าสามารถเก็บรักษาเมล็ดสังเคราะห์ได้ถึง 6 เดือนโดยไม่ต้องทำการควบคุมอุณหภูมิและความชื้นในระหว่างการเก็บรักษา และยังสามารถงอกได้ในวัสดุเพาะที่เป็นดิน รวมทั้งมีลักษณะของต้นกล้าที่ปกติเมื่อเทียบกับโซมาติกเอมบริโอที่ได้จากเมล็ดที่ไม่ผ่านการระเหยน้ำออก (Takahata *et al.*, 1992) ซึ่ง ABA มีผลต่อการพัฒนาของโซมาติกเอมบริโอในการที่จะป้องกันการเกิด precocious germination ชักนำให้เกิดการทนทานต่อการสูญเสียน้ำ และทำให้เกิดการเสื่อมสภาพของคลอโรฟิลล์เพื่อลดการสร้างออกซิเจนให้น้อยลง (Elstner, 1982)

การชักนำให้เกิดการทนทานต่อการสูญเสียน้ำของโซมาติกเอมบริโอที่เกิดจากการเลี้ยงไมโครสปอร์ของ rape seed (*Brassica napus*) พบว่าการใช้ ABA ความเข้มข้น 100 μM สามารถชักนำให้เกิดความทนทานต่อการสูญเสียน้ำได้ หลังจากการระเหยน้ำออกอย่างช้าๆ เป็นเวลา 6 วัน จนระดับความชื้นต่ำกว่า 20 เปอร์เซ็นต์ พบว่าความมีชีวิตของโซมาติกเอมบริโอของ rapeseed จำนวน 5 พันธุ์ อยู่ระหว่าง 88-100 เปอร์เซ็นต์ ภายหลังจากการเก็บรักษาเป็นเวลา 1 สัปดาห์ ขึ้นอยู่กับความเข้มข้น และระยะเวลาที่โซมาติกเอมบริโอได้รับ ABA พบว่าการได้รับ ABA นาน 5-7 วัน ทำให้โซมาติกเอมบริโอมีอัตราการรอดชีวิตสูงสุด และโซมาติกเอมบริโอที่มีขนาดใหญ่กว่า 1,000 μM และมีอายุ 17-20 วัน จะมีการตอบสนองต่อ ABA ได้ดีที่สุด (Brown *et al.*, 1993)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

กระบวนการโซมาติกเอมบริโอเจเนซีสในพริกหวาน

พริกหวาน (*Capsicum annuum* L.) เป็นพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจชนิดหนึ่งที่ใช้บริโภคในหลายๆ รูปแบบทั่วโลก โดยเฉพาะในการใช้ประกอบอาหารเพื่อเพิ่มรสชาติ และสีสรรให้อาหารน่ารับประทานยิ่งขึ้น รวมทั้งยังอุดมไปด้วยวิตามินเอ วิตามินซี และแคลเซียม เมล็ดพันธุ์ลูกผสม (F1 hybrid) ของพริกหวานมีราคาแพงมากและยังผลิตได้ยาก เนื่องจากประสบปัญหาในเรื่องของการผสมตัวเองไม่ได้ (interspecific incompatability) และลูกผสม (F1 hybrid) ที่ได้จะเป็นหมัน (sterility) (Herini and Lakshmi, 1993) รวมทั้งในการผลิตเมล็ดพันธุ์ลูกผสมของพริกหวานยังต้องการลักษณะที่เฉพาะเจาะจงในการเจริญเติบโต เนื่องจากในการผลิตเมล็ดพันธุ์ของพริกหวานต้องการอุณหภูมิต่ำประมาณ 7 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณนาน 2 เดือน จึงจะออกดอกได้ ทำให้การผลิตเมล็ดพันธุ์ลูกผสมของพริกหวานทำได้เฉพาะพื้นที่และในช่วงเวลาที่มีอากาศหนาวเย็นเพียงพอเท่านั้น แต่ปัญหาเหล่านี้สามารถแก้ไขได้โดยการนำเทคนิคเมล็ดสังเคราะห์มาใช้ในการผลิตเมล็ดพันธุ์

สำหรับพริกหวานมีการชักนำให้เกิดการพัฒนาให้เกิดโซมาติกเอมบริโอผ่านกระบวนการ direct somatic embryogenesis ได้สำเร็จในปี 1996 โดยใช้ส่วนของโซมาติกเอมบริโอที่ยังไม่แก่ซึ่งพัฒนาจากเซลล์สืบพันธุ์ (immature somatic embryos) พบว่าความเข้มข้นของซูโครสเป็นปัจจัยที่สำคัญในการชักนำให้เกิดขบวนการ embryogenesis (Binzel *et al*, 1996) สำหรับการผลิตเมล็ดสังเคราะห์ของพริกนั้น ในปี 1995 Buyukalaca และ Mavituna ได้รายงานถึงความสำเร็จในการผลิตเมล็ดสังเคราะห์โดยการเลี้ยงเอมบริโอจากเมล็ดในอาหารสูตร MS (Murashige and Skoog, 1962) ที่เติมซูโครสความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ เพื่อชักนำให้เกิดการพัฒนาไปเป็นโซมาติกเอมบริโอ แล้วจึงนำไปเคลือบสารละลายของ sodium alginate ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ และ calcium chloride 75 mM ซึ่งจะได้ลักษณะของเมล็ดเทียมที่มีความแข็งแรงและรูปร่างเหมาะสม รวมทั้งมีการพัฒนาของโซมาติกเอมบริโอไปเป็นต้นพืชถึง 80 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเพาะเมล็ดทันทีหลังจากเคลือบเมล็ดสังเคราะห์เสร็จเรียบร้อยแล้ว

ในการพัฒนาของโซมาติกเอมบริโอ สามารถพัฒนาจากแคลลัส (indirect somatic embryogenesis) และพัฒนาโดยไม่ผ่านการสร้างแคลลัส (direct somatic embryogenesis) (Williams and Maheswaran,. 1986) สำหรับการชักนำให้เกิดการพัฒนาของโซมาติกเอมบริโอของพริกหวานผ่านกระบวนการ indirect somatic embryogenesis มีรายงานครั้งแรกโดย (Buyukalaca and Mavituna, 1995) โดยการนำไซโกติกเอมบริโอจากเมล็ดพันธุ์พริกหวาน (*Capsicum annuum* var.Ace) เลี้ยงในอาหารพื้นฐานสูตร MS (Murashige and Skoog, 1962) ที่เติม 2,4-D 3 มก./ล. เพื่อให้เกิดการพัฒนาไปเป็นเอมบริโอเจนิกแคลลัส (embryogenic callus) แล้วจึงนำไปเลี้ยงในอาหาร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เหลวพื้นฐานสูตร MS ที่เติม 2, 4-D 1 มก./ล. เพื่อเพิ่มปริมาณเอมบริโอเจนิกเซลล์ หลังจากนั้นจึงทำการย้ายไปเลี้ยงในอาหารที่เติม potassium citrate และอาหารสูตรชักนำให้เกิดโซมาติกเอมบริโอ ซึ่งทำการเติม L-Proline 6 ก. และลดความเข้มข้นของแอมโมเนียมเหลือ 10 μM ตามลำดับ การเติม ABA ความเข้มข้น 1.89 μM ในอาหารกึ่งแข็งสูตร MS สามารถชักนำให้โซมาติกเอมบริโอแก่ และสามารถเจริญเป็นต้นพืชได้สูงถึง 97 เปอร์เซ็นต์ เมื่อนำโซมาติกเอมบริโอมาเพาะเลี้ยงในอาหารกึ่งแข็ง MS โดยไม่ผ่านการลดความชื้นเมล็ดสังเคราะห์ ทั้งสภาพการเลี้ยงใน และนอกหลอดทดลอง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved