บทที่ 2

การตรวจเอกสาร

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของอ้อย

เกือบทุกส่วนของลำต้นสามารถชักนำให้เกิดเป็นแคลลัสได้ เมื่อนำมาเลี้ยงในอาหารของ Murashige and Skoong (1962) ที่มี 2,4-D เช่นเนื้อเยื่อจากส่วนที่กำลังเจริญเติบโต (Reinert and Bajaj, 1977) ยอดอ่อน (apical meristem) (Heinz and Mee, 1970) เซลล์พาเรนไคมาบริเวณที่ถัดจากยอดลงมา (subapical) (Heinz *et al.*, 1969; Heinz and Mee, 1969) สวนของเบออนทมวนงออยู (spindle cluster) (บุญยืน, 2527) และส่วนของช่อดอกอ่อน (young inflorescence) (Reinert and Bajaj, 1977) แต่พบว่าเนื้อเยื่อจากใบอ่อนที่ยังม้วนงอและช่อดอกอ่อนสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้เร็ว (Heinz *et al.*, 1977; Liu, 1981) เนื่องจากใบอ่อนและช่อดอกอ่อนผลิตสารประกอบฟีนอลลิก (phenolic compound) ซึ่งเป็นอันตรายต่อเนื้อเยื่อของอ้อยที่เลี้ยงในอาหารน้อยกว่าบริเวณส่วนอื่น

Barba and Nickell (1969) เริ่มศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการสร้างเนื้อเยื่อแคลลัสและการพัฒนาของแคลลัสให้เกิดเป็นต้นและรากได้อย่างสมบูรณ์ ในปีเดียวกัน Heinz and Mee ทำการทดลองเลี้ยงเนื้อเยื่ออ้อยโดยการใช้อาหารสังเคราะห์สูตร MMS โดยเติม 2,4-D ที่มีความเข้มข้น 3 มก/ล พบว่า 2,4-D ช่วยในการสร้างเนื้อเยื่อแคลลัส แต่ไม่มีการพัฒนาไปเป็นยอดหรือราก แต่เมื่อทำการย้ายแคลลัสไปเลี้ยงในอาหารที่ไม่มี 2,4-D แคลลัสจะพัฒนาต่อไปจนได้ต้นอ้อยที่สมบูรณ์ ในการทดลองของ Liu and Chen (1974) และ Nadar and Heinz (1977) ซึ่งได้ทำการศึกษาการพัฒนาเป็นต้นอ้อยผ่านแคลลัสนั้นพบว่า อาหาร MS (1962) ที่เติม 2,4-D ความเข้นข้น 3 มก/ล จะมีการพัฒนาของแคลลัสดำเนินไปคล้ายกับการพัฒนาของเซลล์ไซโกตในเมล็ดอ้อย คือจะมีการแบ่งตัวแบบไมโตซีส และสร้างโซมาติกเอมบริโอขึ้น แต่ระดับการพัฒนาจะสิ้นสุดที่ระยะ globular stage ทำให้ได้ polyembryogenic mass เท่านั้น แต่การเลี้ยงแคลลัสบนอาหาร MS (1962) ที่ไม่มี 2,4-D จะมีการพัฒนาของ polyembryogenic mass จาก globular stage ดำเนินต่อไปจนได้ต้นและรากที่สมบูรณ์ สูตรอาหารที่ดีสำหรับการเจริญและพัฒนาไปเป็นต้นที่สมบูรณ์คือสูตรอาหารดัดแปลงของ Murashige and Skoong (1962) อย่างไรก็ดี การเลี้ยงแคลลัสในอาหารนี้มากกว่า 5 ปี ก็มีโอกาสสูญเสียความสามารถเกิดเป็นต้น (totipotency) ได้ (Barba and Nickell, 1969; Heinz *et al.*, 1977)

โดยทั่วไปสูตรอาหารที่ใช้ชักนำให้เกิดแคลลัส ใช้สูตรดัดแปลงของ Murashige and Skoong (1962) ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 3 มก/ล ใส่น้ำมะพร้าว 10-15 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร น้ำตาลซูโครส 20 ก/ล (นิด, 2527) Krishnamurthi and Tlaskal (1974) ได้ศึกษากายวิภาคของการเจริญของเนื้อเยื่อพบว่า แคลลัสอ้อยเจริญและเปลี่ยนแปลงมาจากเซลล์ท่อลำเลียงอาหาร (phloem) ของเนื้อเยื่อลำเลียงที่มีอายุน้อยในยอดและใบอ่อน เมื่อเลี้ยงชิ้นส่วนอ้อยได้ประมาณ 5-6 วัน จะเริ่มเห็นแคลลัสตามบริเวณรอยตัดของชิ้นส่วนนี้ (Liu, 1981) เมื่อแคลลัสอายุประมาณ 5-6 สัปดาห์ เซลล์ในแคลลัสรวมตัวกันแน่นขึ้นเป็น embryonic structure ซึ่งประกอบด้วย embryonic cell (Nadar *et al.*, 1978) ต่อมา embryonic cell เปลี่ยนแปลงไปเป็นตุ่มเขียว (green nodule) เล็กๆ ขนาด 1.0-1.5 มม ซึ่งประกอบด้วยจุดเจริญ (growing point) และจุดกำเนิดใบ (leaf primodia) (Liu, 1981) ระยะนี้แคลลัสมีลักษณะคล้ายถ้วย ภายใน 1 สัปดาห์ ต่อมาจะเห็นยอดเจริญออกมา เรียกระยะนี้ว่า re-differentiation และเห็นใบชัดเจนในเวลาต่อมา (Krishnamurthi and Tlaskal, 1974)

ขบวนการโซมาติกเอมบริโอเจเนซีสในอ้อย

การศึกษาถึงกระบวนการโซมาติกเอมบริโอในอ้อยมีรายงานครั้งแรกโดย Ahloowaha and Maretzki (1983) ซึ่งพบว่าขึ้นอยู่กับลักษณะทางพันธุกรรม ชิ้นส่วนพืชที่นำมาเลี้ยง องค์ประกอบของอาหาร องค์ประกอบของออกซิน กรดอะมิโน แหล่งของคาร์ไฮเดรต และ abscisic acid (ABA) (Taylor *et al.*, 1992; Liu, 1993; Zimmerman, 1993 and Brisibe *et al.*, 1994) การพัฒนาจากแคลลัสเป็นต้นอ้อยเป็นการพัฒนาจากเอมบริโอเจเนซีส และการชักนำให้เกิดโซมาติกเซลล์ต้องการออกซินในความเข้มข้นที่สูง (2,4-D 3 มก/ล) ซึ่งใกล้เคียงกับความเข้มข้นของออกซินในการพัฒนาของไซโกติกเอมบริโอของอ้อยหลังจากการปฏิสนธิในธรรมชาติ (Nadar *et al.*, 1978) เกือบทุกส่วนของลำต้นอ้อย มีความสามารถในการชักนำให้เกิดเป็นเนื้อเยื่อแคลลัสได้ (Liu, 1981) แต่มีเพียงส่วนของใบอ่อนและช่อดอกอ่อนเท่านั้น ที่มีศักยภาพในการเกิดเป็นเอมบริโอเจนิกแคลลัส แต่การใช้ส่วนของใบอ่อนมาเลี้ยงจะสะดวกกว่าเนื่องจากสามารถหาได้ตลอดทั้งปี

อาหารสำหรับใช้ชักนำให้เกิดแคลลัสนิยมใช้อาหารสูตร Murashige and Skoong (1962) หรืออาหาร N6 (Chu *et al.*, 1975) ซึ่งจะมีประสิทธิภาพด้อยกว่าอาหารสูตร MS ในการชักนำให้เกิดเอมบริโอเจนิกแคลลัส ประมาณ 40 เปอร์เซ็นต์ แต่ในทางกลับกันจะมีประสิทธิภาพในการรักษาความสามารถในการเกิดเป็นต้นได้ดีกว่า (Fitch and Moore, 1993) อาหารสำหรับใช้เพื่อชักนำให้เกิดเป็นแคลลัสและการเลี้ยงเซลล์แขวนลอยของอ้อยจะเติมทั้ง arginine 50 มก/ล (Nickell and Maretzki, 1960; Ho and Vasil, 1983a; Chen *et al.*, 1988; Taylor *et al.*, 1992) yeast extract 0.5-1

ก/ล น้ำมะพร้าว 5-10 เปอร์เซ็นต์ หรือ casein hydrolysate 500 มก/ล พบว่าการที่เติมผงถ่านกัมมันต์ 10 ก/ล จะช่วยป้องกันการการตายของเนื้อเยื่อและเซลล์เนื่องจากสารประกอบฟีนอลลิกทั้งในการเกิดเอมบริโอเจนิกแคลลัส (Ho and Vasil, 1988a; Srinivasan and Vasil 1986) และการเลี้ยงเซลล์แขวนลอยบนอาหารวุ้น (Ho and Vasil, 1988b)

Liu (1993) พบว่าช่อดอกอ่อนของอ้อยพันธุ์ 87-588, 87-693 และ 87-696 ที่ทำการเลี้ยงบนอาหารพื้นฐานสูตร MS (1962) 4 แบบ ที่มีความเข้มข้นของ 2,4-D, kinetin, BAP (benzynadenine), casein hydrolysate และ calcium pantothenate ที่ระดับต่างๆ พบว่าแคลลัสสามารถเกิดขึ้นได้จากทุกส่วนของช่อดอก อายุของช่อดอกที่นำมาเลี้ยงเป็นปัจจัยที่มีความสำคัญมากต่อความถี่ของการเกิดแคลลัส โดยในช่วงที่ช่อดอกอยู่ในระยะที่ pollen mother cell อยู่ในระยะสี่เซลล์ (tetrad) ซึ่งทั้งสามจีโนไทป์จะสามารถสร้างแคลลัสที่มีขนาดใหญ่ ความถี่ของการเกิดแคลลัสจะสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อทำการเก็บรักษาช่อดอกไว้ในสภาพอุณหภูมิต่ำ (13 $^{\circ}$C) เป็นเวลา 2 หรือ3 วัน เมื่อเทียบกับการเก็บรักษาไว้ในอุณหภูมิตามธรรมชาติ ซึ่งอาหารทั้ง 4 แบบจะให้ผลในการชักนำแคลลัสเหมือนกัน แคลลัสที่เกิดจากจีโนไทป์ 87-693 และ 87-696 บนอาหารที่เติม casein hydrolysate และ glutamine จะมีลักษณะชำน้ำ สีขาว มีเหมือก และ มีปุ่มปม ส่วนแคลลัสที่เกิดจากจีโนไทป์ 87-588 จะมีสีเหลืองใสและแน่น โดยแคลลัสทั้งหมดมีความสามารถในการเกิดเป็นต้นได้สูง (90-100 %) เมื่อทำการเปลี่ยนอาหารได้สามครั้ง และมีลักษณะทางฟีโนไทป์เหมือนกับต้นแม่

Aftab *et al.* (1996) ได้ทำการเลี้ยงเอมบริโอเจนิกแคลลัสจากส่วนของใบอ่อนของอ้อยพันธุ์ (CoL-54) พบว่าเอมบริโอเจนิกแคลลัสจะเกิดได้ดีเมื่อทำการเลี้ยงบนอาหารพื้นฐานสูตร MS (1962) ที่เติม picloram 0.5 มก/ล เลี้ยงในสภาพที่ไม่มีแสงที่อุณหภูมิ 27$\pm$1 $^{\circ}$C และเมื่อนำไปเลี้ยงผลิตเป็นเซลล์แขวนลอยสามารถเกิดเป็น homogeneous cell suspension ได้ทั้งในอาหาร MS (1962) และอาหาร AA (Muller and Grafe, 1978) ที่เติม 2,4-D 2 มก/ล casein hydrolysate 500 มก/ล เมื่อทำการเลี้ยงเอมบริโอเจนิกเซลล์ และเกิดเป็นเอมบริโอเจนิกแคลลัสได้อีกครั้งเมื่อนำมาเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติมน้ำตาลซูโครส 30 ก/ล casein hydrolysate 500 มก/ล และ 2,4-D 0.5 มก/ล ภายใน 4-6 สัปดาห์ ในสภาพที่มีแสง 16 ชั่วโมง และเกิดเป็นต้นอ้อยได้ใน 4 สัปดาห์ภายหลังจากการย้ายลงในอาหารสูตร MS ที่ไม่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต แต่เติม casein hydrolysate 500 มก/ล และ น้ำตาลซูโครส 60 ก/ล และจะเกิดรากเมื่อย้ายไปเลี้ยงในอาหารพื้นฐานกึ่งแข็งสูตร MS (1962)

Islam *et al.* (1996) ได้ทำการเลี้ยงใบอ่อนของอ้อย 4 โคลน บนอาหาร MS ที่ทำการเติมน้ำมะพร้าว 10 เปอร์เซ็นต์ และ 2,4-D ความเข้มข้น 0.5-3.0 มก/ล พบว่าจะเกิดแคลลัสภายในเวลา 7-10 วัน และเกิดโซมาติกเอมบริโอภายในเวลา 15-20 วันหลังจากทำการชักนำให้เกิดแคลลัส โคลน Isd16 ให้ความถี่ของการเกิดโซมาติกเอมบริโอเจเนซีสสูงที่สุด (78.5 เปอร์เซ็นต์) การพัฒนาของ

ยอดจะเกิดภายในเวลา 10-15 วันหลังจากย้ายแคลลัสไปยังอาหาร MS ที่เติม casein hydrolysate 200 มก/ล benzyladenine 1.0 มก/ล และ IAA 0.1 มก/ล อ้อยโคลน Isd16 ให้ความถี่ของการเกิดเป็นต้นอ้อยสูงที่สุด (87.5 เปอร์เซ็นต์) และให้จำนวนต้นต่อแคลลัสเท่ากับ 17.3 ต้นอ้อยที่ได้สามารถเกิดรากได้ในอาหารที่มีน้ำตาลซูโครส 6 เปอร์เซ็นต์ และ NAA 5.0 มก/ล และย้ายลงปลูกในดินต่อไป แคลลัสที่เลี้ยงไว้นานกว่า 2-3 เดือนจะให้ลักษณะของการกลายพันธุ์ (somaclonal variation) เกิดขึ้น

ในปีต่อมา Naik and Chikkagouda (1997) ได้ทำการเคลือบโซมาติกเอมบริโอของอ้อยพันธุ์ GSBT1 ที่ได้จากแคลลัสจากใบอ่อนและเนื้อเยื่อเจริญใต้ตายอด (sub-apical meristem) ที่เลี้ยงในอาหาร MS (1962) ที่เติม 2,4-D 3 มก/ล โดยทำการลดความเข้มของ 2,4-D ลงเหลือ 2 มก/ล และนำไปเคลือบด้วยโซเดียมอัลจิเนต (3 เปอร์เซ็นต์) ที่เติมผงถ่านกัมมันต์ (0.1 เปอร์เซ็นต์) เพื่อผลิตเป็นเมล็ดสังเคราะห์ พบว่าจะให้เปอร์เซ็นต์การงอก 94.7 เปอร์เซ็นต์ ภายในเวลา 2 สัปดาห์ บนอาหาร MS กึ่งแข็งที่เติมน้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ NAA และ BAP (benzyladenine) เมล็ดสังเคราะห์ที่ผลิตได้สามารถงอกได้ทั้งบนอาหาร MS อย่างเดียวหรือผสมกับทราย หรือบนทรายผสมกับดิน แต่สามารถงอกเป็นต้นอ้อยที่มีรากได้เฉพาะบนอาหารแข็งสูตร MS เท่านั้น

การชักนำให้เกิดโซมาติกเอมบริโอโดยตรง (direct somatic embryos) สามารถกระทำได้ โดย Aftab and Iqbal (1999) ได้ทำการเลี้ยงโซมาติกเอมบริโอของอ้อยพันธุ์ CoL-54 และ CP-43/33 จากส่วนของรอยตัดของชิ้นส่วนใบอ่อนในอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D 2 มก/ล และ casein hydrolysate 500 มก/ล ทั้งในสภาพแสง 16 ชม และแสงตลอดเวลา โซมาติกเอมบริโอของอ้อยสามารถเกิดเป็นต้นได้บนอาหารสูตร MS พื้นฐาน ทั้งในสภาพแสง 16 ชม และไม่มีแสง

Nieves *et al.* (1999) ได้ทำการเลี้ยง embryogenic callus จากส่วนของช่อดอกหรือส่วนใบของอ้อยพันธุ์ CP 52-43 บนอาหาร MS (1962) ที่เติมหรือไม่เติมผงถ่านกัมมันต์ 1 มก/ล หลังจากนั้น 21 วัน จึงทำการย้ายแอมบริโอเจนิกแคลลัสไปยังอาหารสูตรต่างๆ เพื่อศึกษาความงอกและการพัฒนา พบว่าโซมาติกเอมบริโอเจเนซิสจะเกิดได้ดีที่สุดเมื่อทำการเลี้ยงจากส่วนของช่อดอกในอาหารที่ไม่เติมผงถ่านกัมมันต์ การชักนำให้เกิดการพัฒนาไปเป็นโซมาติกเอมบริโอจะเกิดได้ดีที่สุดบนอาหารที่เติมน้ำตาลซูโครส แล้วตามด้วยมอลโตส ความงอกของโซมาติกเอมบริโอจะดีที่สุดเมื่อเพาะบนอาหารที่เติมกรดจิบเบอเรลลิก น้ำตาลซูโครส กรดกลูตามิกและอาจีนีน

เมล็ดสังเคราะห์ (Synthetic Seeds)

เมล็ดสังเคราะห์ (Synthetic seeds or Artificial seeds) เป็นการขยายพันธุ์พืชแบบไม่อาศัยเพศ โดยอาศัยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ในการเลี้ยงเซลล์ร่างกาย (somatic cell) ผ่านขบวนการโซมาติกเอมบริโอเจเนซีส (somatic embryogenesis) ให้พัฒนาไปเป็นโซมาติกเอมบริโอ (somatic embryos or embryoids) ในการผลิตเมล็ดสังเคราะห์จะนำเอาโซมาติกเอมบริโอมาทำการเคลือบ (encapsulation) ด้วยสารที่ทำให้เกิดเจล พวกอัลจิเนต (alginate) หรือสารอื่นๆ เพื่อทำหน้าที่เป็นเปลือกหุ้มเมล็ดเทียม ป้องกันอันตรายให้แก่เอมบริโอเหมือนในเมล็ดจริง และเป็นแหล่งของของอาหารสะสมเทียม (Redenbaugh *et al.*, 1987; Gray and Purohit, 1992) นอกจากนี้แล้วยังหมายรวมถึงการนำเอาชิ้นส่วนอื่นๆ ที่ไม่ใช่โซมาติกเอมบริโอ แต่เป็นชิ้นส่วนของพืชที่สามารถเจริญเติบโตได้ใหม่ (regenerate) เป็นพืชต้นใหม่ได้ เช่น ปลายยอด ปลายราก ตาข้าง และแคลลัส มาเคลือบด้วยสารที่ทำให้เกิดเจล และมีลักษณะคล้ายเมล็ดจริง

เมล็ดสังเคราะห์มีความเหมาะสมในการผลิตที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจพืชหลายชนิด เช่น พืชในกลุ่มไม้ดอกไม้ประดับ พืชผัก ไม้ผล สน พืชอาหารสัตว์ ถั่วเหลือง และธัญพืชลูกผสมชนิดต่างๆ (Gray and Purohit, 1992) เนื่องจากสามารถผลิตได้จำนวนมากภายในระยะเวลาอันสั้น สามารถผลิตได้ทั้งปี ช่วยย่นระยะเวลาในการผลิตเมล็ดพันธุ์ ลดการใช้แรงงานและพื้นที่ในการผลิตเมล็ดพันธุ์ รวมทั้งพืชที่ปลูกจากเมล็ดสังเคราะห์ที่ผลิตได้จะมีลักษณะเหมือนต้นแม่ทุกประการ เนื่องจากเป็นการขยายพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ เมล็ดสังเคราะห์จะมีความสม่ำเสมอของขนาดและคุณภาพ รวมทั้งยังปราศจากเชื้อจุลินทรีย์ต่างๆ (pathogen free) และยังสามารถนำมาประยุกต์ใช้สำหรับการเก็บรักษาเชื้อพันธุกรรมพืช (germplasm collection) ที่มีความสำคัญได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Redenbaugh, 1993)

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

เมล็ดสังเคราะห์แบบชื้นมีข้อด้อยหลายประการ คือ เมล็ดสังเคราะห์แบบชื้นจำเป็นต้องเก็บรักษาในสภาพอุณหภูมิต่ำ ซึ่งทำให้ยากต่อการเก็บรักษา และมีระยะเวลาในการเก็บรักษาที่สั้น รวมทั้งมีอัตราการงอกเป็นต้นพืช (conversion rate) ที่ต่ำมาก ภายในเจลชุ่มน้ำ(hydrogel) จะมีการ

หายใจของโซมาติกเอมบริโอที่อยู่ภายใน และแห้งได้อย่างรวดเร็ว (Redenbaugh *et al.*, 1987) ปัญหาการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์เนื่องจากในเจลที่ทำหน้าที่เป็นเปลือกหุ้มเมล็ดนั้น ประกอบด้วยน้ำตาลซูโครสที่เป็นแหล่งอาหารของเชื้อจุลินทรีย์ต่างๆ ได้ดี และเกิดการงอกแบบprecocious germination (การงอกของโซมาติกเอมบริโอที่เกิดจากความชื้นในเจลที่หุ้ม โดยไม่ได้รับน้ำจากภายนอก) เมล็ดสังเคราะห์จะมีเปลือกหุ้มของเมล็ดที่อ่อนไม่คงตัวเหมือนกับของเมล็ดจริง และผิวมีรูพรุนมากมายทำให้แร่ธาตุที่ละลายน้ำได้ถูกชะล้างออกไปอย่างรวดเร็วก่อนที่รากและยอดจะงอกโผล่ออกมา (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) เหมือนในเมล็ดพวกออโธดอกซ์ และมีความแข็งแรงน้อยกว่าไซโกติกเอมบริโอ (zygotic embryos) ในเมล็ดธรรมชาติ (Gray, 1987) ทำให้ยากต่อการเก็บรักษาเป็นระยะเวลานาน รวมทั้งสารที่นำมาเคลือบเมล็ดสังเคราะห์ไม่สามารถป้องกันลักษณะการงอกแบบ precocious germination ของ โซมาติกเอมบริโอ ที่อยู่ภายในเมล็ดสังเคราะห์ก่อนที่จะนำไปปลูกได้ ซึ่งการเกิด precocious germination ในระหว่างระยะสุดท้ายของการพัฒนาของโซมาติกเอมบริโอ จะทำให้เกิดการตายของโซมาติกเอมบริโอขึ้นในระหว่างการระเหยน้ำออก (Redenbaugh, 1993)

การชักนำให้เกิดการทนทานต่อการสูญเสียน้ำ (desiccation tolerance) ของโซมาติกเอมบริโอก่อนที่จะนำไปดึงน้ำออก (dehydration) เพื่อใช้ผลิตเป็นเมล็ดสังเคราะห์แบบแห้ง เป็นวิธีการที่เหมาะสมสำหรับเทคโนโลยีเมล็ดสังเคราะห์ เนื่องจากว่าโซมาติกเอมบริโอจะอยู่ในสภาวะเงียบ (quiescent state) คล้ายกับเมล็ดจริง (orthodox seed) ซึ่งสามารถกระทำได้โดยการระเหยน้ำ (dehydration) ออกจากโซมาติกเอมบริโอให้มีความชื้น (moisture content) เหลือประมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ สามารถยืดอายุการเก็บรักษาเมล็ดสังเคราะห์ให้ยาวนานออกไป (Senaratna *et al.*, 1989)

และยังนำไปใช้ในการเก็บรักษาเชื้อพันธุ์พืช (germplasm collection) ที่มีคุณค่าได้ (Gray and Purohit, 1992) ปัจจัยสำคัญที่จะทำการระเหยน้ำออกจากโซมาติกเอมบริโอประสบความสำเร็จคือการชักนำให้โซมาติกเอมบริโอมีความทนทานต่อการสูญเสียน้ำ

มีรายงานการศึกษาเรื่องการชักนำให้เกิดความทนทานต่อการสูญเสียน้ำในโซมาติกเอมบริโอของพืชหลายชนิด ได้แก่ grape (Gray 1989), alfalfa (Senaratna *et al.*, 1989, 1990; Anandarajah and McKersie, 1990), rapeseed (Brown *et al.*, 1993; Anandarajah *et al.*, 1991), broccoli (Takahata *et al.*, 1992), carrot (Timbert *et al.*, 1996: Lecouteux *et al.*, 1994; Iida *et al.*, 1992; Teteroo *et al.*, 1995; Liu *et al.*, 1992; Kitto & Janick, 1985), spruce (Robert *et al.*, 1990; Attree *et al.*, 1991), celery (Kim and Janick, 1990), geranium (Marsolais *et al.*, 1991), soybean (Obendorf and Slawinska, 1986) และ sugarcane (Naeves *et al.*, 2001)

การชักนำให้เกิดความทนทานต่อการสูญเสียน้ำของโซมาติกเอมบริโอกระทำได้โดยการใช้สารเคมีและการชักนำให้เกิดสภาวะเครียดแก่โซมาติกเอมบริโอ ได้แก่ ABA (Abscisic acid) (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) ซึ่งการใช้สภาพเครียด เช่นการใช้อุณหภูมิสูง หรืออาหารที่มีความเข้มข้นสูง (osmotic shock) โดยการเพิ่มความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสจะไปมีผลทำให้ระดับของ ABA ที่อยู่ในโซมาติกเอมบริโอเพิ่มขึ้น (Skriver and Mundy, 1990) ความทนทานต่อการสูญเสียน้ำของโซมาติกเอมบริโอวัดได้จากความสามารถของโซมาติกเอมบริโอในการเจริญเป็นต้น (regenerate) ภายหลังจากทำการเก็บรักษาที่สภาพความชื้นต่ำ (10 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับเมล็ดแห้ง) ที่ระดับอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 อาทิตย์ (Gray, 1989)

การชักนำให้เกิดความทนทานต่อการสูญเสียน้ำของโซมาติกเอมบริโอโดยการใช้ Abscisic acid (ABA)

ABA เป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชมีคุณสมบัติในการป้องกันการเกิด precocious germination และเพิ่มความทนทานต่อการสูญเสียน้ำของโซมาติกเอมบริโอ และกระตุ้นการพัฒนาและการแก่ (maturation) ของโซมาติกเอมบริโอ การได้รับ ABA ของโซมาติกเอมบริโอ ไม่ว่าจะได้รับโดยตรงหรือชักนำให้มีการสะสม ABA โดยการทำให้เกิดสภาพเครียดสามารถชักนำให้เกิดความทนทานต่อการสูญเสียน้ำของโซมาติกเอมบริโอได้ (Senaratna *et al.*, 1989) ซึ่งอาจเกิดจากการที่

ABA ชักนำให้ยีนแสดงออกลักษณะเฉพาะในการสร้างสารต่างๆ ที่จำเป็นสำหรับการมีชีวิตของเอมบริโอก่อนที่จะสูญเสียน้ำ(Black, 1991) และควบคุมการสะสม proline และการสร้างอาหารสะสมในเอมบริโอซึ่งมีผลต่อการสูญเสียน้ำ(Nieves *et al.*, 2001) ABA ยังทำให้เกิดการเสื่อมสภาพ (degradation or degreening) ของคลอโรฟิลล์ ซึ่งจะลดกิจกรรมในการสร้างออกซิเจนของเนื้อเยื่อที่แห้งเมื่อได้รับแสง (Elstner, 1982)

Brown *et al.* (1993) พบว่า ABA ความเข้มข้น 10 ไมโครโมล สามารถชักนำให้เอมบริออยด์ที่ได้จากไมโครสปอร์ของ rapeseed (*Brassica napus*) เกิดความทนทานต่อการสูญเสียน้ำขึ้นได้หลังจากการดึงน้ำออกอย่างช้าๆ นานกว่า6 วัน จนระดับความชื้นในเมล็ดสังเคราะห์ลดลงเหลือต่ำกว่า20 เปอร์เซ็นต์ โดยเอมบริออยด์ของ rapeseed จำนวน 5 พันธุ์ ยังคงความมีชีวิตอยู่ได้ 88-100 เปอร์เซ็นต์ หลังการเก็บรักษานาน 1 สัปดาห์ ซึ่งการตอบสนองนี้ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของ ABA โดยการได้รับ ABA นาน 5-7 วัน ทำให้เอมบริออยด์มีอัตราการรอดชีวิตสูงสุด และเอมบริออยด์ที่มีขนาดใหญ่กว่า 1,000 ไมโครโมล และมีอายุ 17-20 วัน ตอบสนองต่อ ABA ได้ดีที่สุด

Takahata *et al.* (1993) ได้ชี้ให้เห็นถึงความสำคัญของ ABA ในการชักนำให้เกิดการทนทานต่อสูญเสียน้ำของโซมาติกเอมบริโอที่ได้จากไมโครสปอร์ของบร็อคโคลี โดยพบว่าความมีชีวิตของโซมาติกเอมบริโอหลังจากการดึงน้ำออกจนเหลือประมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของ ABA ที่ได้รับและระยะการพัฒนาของโซมาติกเอมบริโอเอง โดยโซมาติกเอมบริโอในระยะที่มีใบเลี้ยง (cotyledonary stage) สามารถทนทานต่อการสูญเสียน้ำได้มากที่สุดเมื่อได้รับ ABA 100 ไมโครโมล ซึ่งเจริญเป็นต้นได้ 27-48 เปอร์เซ็นต์ และยังสามารถเก็บรักษาได้ที่อุณหภูมิห้องได้นานกว่า 3 เดือน โดยไม่สูญเสียความงอก ส่วนโซมาติกเอมบริโอที่ไม่ได้รับ ABA หรือได้รับ ABA 1 ไมโครโมล หรือโซมาติกเอมบริโอที่ยังอยู่ในระยะการพัฒนาขั้นต้นๆ ไม่สามารถมีชีวิตรอดได้หลังการระเหยน้ำออก และยังพบว่าการได้รับ ABA นาน 1 วัน ให้ผลที่ไม่แตกต่างจากการได้รับนาน 7 วัน

แต่ในการทดลองของ Ruffoni *et al.* (1993) กลับพบว่า ABA ไม่มีผลต่ออัตราการงอกของเมล็ดสังเคราะห์ของ genista (*Genista monosperma* Lam.) พันธุ์ Rabassina ซึ่งจากการนำเอาโซมาติกเอมบริโอในระยะตอร์ปิโด (torpedo stage) ไปดึงน้ำออกภายในตู้ปลอดเชื้อนาน 6 ชม จนโซมาติกเอมบริโอมีการสูญเสียน้ำออกไปกว่า70 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นจึงนำไปจุ่มลงในอาหารเหลวสูตร MS (1962) ที่มีหรือไม่มี ABA 2.5 มก/ล นาน 1 ชม แล้วจึงนำไปเคลือบด้วยสารอัลจิเนตก่อนนำไปเลี้ยงพบว่า การใช้ ABA ไม่ได้ช่วยให้เมล็ดสังเคราะห์ของพืชชนิดนี้มีอัตราการงอกที่สูงขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ดึงน้ำออก และไม่เคลือบด้วยสารอัลจิเนต

ความมีชีวิตของโซมาติกเอมบริโอของอ้อยจะเพิ่มสูงเมื่อได้รับ ABA ความเข้มข้น 3.8 มคม ก่อนนำไปเคลือบด้วยอัลจิเนตและทำการดึงน้ำออก โดย ABA จะชักนำให้มีการเพิ่มของระดับ protein, polyamine, free proline และ starch ในการตอบสนองต่อการทนทานต่อการสูญเสียน้ำ (Nieves *et al.*, 2001)

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University