บทที่ 1

บทนำ

เทคโนโลยีการเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชในประเทศไทยเริ่มขึ้นครั้งแรกที่ภาควิชาพฤกษศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ตั้งแต่ปีพุทธศักราช 2509 (โครงการพัฒนาช่ายงานด้านเทคโนโลยีชีวภาพการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช, 2530) ถือว่าเป็นการเริ่มต้นกระตุ้นให้มีผู้สนใจวิทยาการด้านนี้อย่างจริงจังทั้งภาครัฐบาลและเอกชน ซึ่งในปัจจุบันเทคโนโลยีการเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชได้เจริญก้าวหน้าไปเป็นอย่างมาก มีการตื่นตัวกันอย่างกว้างขวางทั้งในต่างประเทศและในประเทศไทย ดังจะเห็นได้จากผลงานวิจัยเพื่อหาความรู้และเทคนิคใหม่ ๆ ที่กำลังศึกษาค้นคว้าในสถาบันต่าง ๆ ตลอดจนการจัดตั้งบริษัทเกี่ยวกับเรื่องนี้โดยเฉพาะ ทั้งขนาดเล็กและขนาดใหญ่ นักวิทยาศาสตร์ให้ความสนใจเทคโนโลยีการเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเป็นอย่างมาก เพราะเทคโนโลยีนี้สามารถนำมาประยุกต์ใช้ให้เกิดประโยชน์ได้อย่างกว้างขวาง โดยเฉพาะอย่างยิ่งในด้านการปรับปรุงพันธุ์และการขยายพันธุ์พืช เพื่อพัฒนาพืชพันธุ์ใหม่ ๆ ให้มีปริมาณมากขึ้น สามารถนำผลผลิตไปใช้ในเชิงพาณิชย์และนำรายได้มาสู่ประเทศเป็นจำนวนมาก ซึ่งนับว่าประสบผลสำเร็จอย่างสูงในพืชพวกกล้วยไม้และไม้ประดับบางชนิดที่มีราคาต่อหน่วยสูง การขยายพันธุ์พืชในเชิงการค้าด้วยเทคนิคการเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชจึงมีข้อจำกัดอยู่ในกลุ่มพืชที่มีราคาต่อหน่วยสูง ทั้งนี้เพราะค่าใช้จ่ายในการเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเพื่อขยายพันธุ์นั้นค่อนข้างสูงมาก (มนทกานติ วัชราภัย, 2531)

การขยายพันธุ์พืชแบบไม่อาศัยเพศ เป็นสิ่งจำเป็นมากในพืชบางชนิด โดยเฉพาะพืชที่ขยายพันธุ์ด้วยเมล็ดแล้วมีความผันแปร (variation) สูง หรือในพืชบางกลุ่มที่เพศของพืชมีความสัมพันธ์กับผลผลิต ตัวอย่างเช่น มะละกอ ต้นกระเทยและต้นตัวเมียเท่านั้นที่ให้ผลผลิตสูง หรือในพืชพวกหน่อไม้ฝรั่งต้นที่ให้ผลผลิตสูงคือต้นตัวผู้ ในกรณีดังกล่าวนี้ หากขยายพันธุ์ด้วยเมล็ดจะไม่สามารถทำนายได้เลยว่าผลผลิตจะเป็นอย่างไร การขยายพันธุ์ของพืชบางชนิดก็ทำได้ยากและเสียค่าใช้จ่ายสูง โดยเฉพาะในพวกธัญพืช นอกจากนี้ยังมีปัจจัยอื่น ๆ อีกมากมายอันเป็นอุปสรรคต่อการขยายพันธุ์พืช เช่น ขนาดของต้นแม่พันธุ์ การกลายพันธุ์ของพืชที่ขยายพันธุ์ด้วยเมล็ดและในบางครั้งยังพบว่าพันธุ์พืชใหม่ ๆ หลายพันธุ์ที่ผลิตด้วยเทคนิคการเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมักจะไม่สามารถขยายพันธุ์ได้ด้วยเมล็ด เนื่องมาจากความไม่แน่นอนของการแบ่งเซลล์ ทำให้ไม่ได้ลักษณะตามต้องการโดยสม่ำเสมอ (Redenbaugh et al., 1986; Fujii et al., 1987 และ มนทกานติ วัชราภัย, 2531)

เพื่อแก้ปัญหาต่าง ๆ เหล่านี้ นักวิทยาศาสตร์ได้นำเทคนิคการเลี้ยงเนื้อเยื่อจากส่วนต่าง ๆ ของพืชเพื่อเพิ่มปริมาณโดยที่ลักษณะทางพันธุกรรมไม่เปลี่ยนแปลง นั่นคือเทคนิคการผลิตเมล็ดพืชเทียม (artificial seed หรือ synthetic seed) ซึ่งจัดเป็นวิวัฒนาการใหม่ล่าสุดในการขยายพันธุ์พืชด้วยเทคโนโลยีการเลี้ยงเนื้อเยื่อที่สามารถผลิตได้ในปริมาณที่มากมายในระยะเวลาอันจำกัด และมีต้นทุนในการผลิตต่ำ จึงสามารถนำไปใช้กับพืชที่มีราคาต่อหน่วยต่ำได้ (Redenbaugh et al., 1986 และ Gray, 1987)

เมล็ดพืชเทียมเกิดจากการนำโซเมติคเอมบริโอ (somatic embryo) หรือ เอมบริออยด์ (embryoid) ที่ได้จากการเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมาเคลือบด้วยแอลจิเนท เจล (alginate gel) โดยที่หลักการของเมล็ดพืชเทียมจะประกอบด้วยส่วนสำคัญ 3 ส่วน ได้แก่ 1. เอมบริออยด์ ซึ่งได้จากการเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชทำหน้าที่แทนเอมบริโอในเมล็ด 2. เอนโดสเปิร์มเทียม (artificial endosperm) ที่สังเคราะห์ขึ้นมาทำหน้าที่แทนเอนโดสเปิร์ม (endosperm) ของเมล็ด เพื่อให้อาหารแก่เอมบริออยด์ ในระยะที่เริ่มมีการงอกเกิดขึ้น 3. เปลือกเมล็ดพืชเทียม (artificial seed coat) ทำหน้าที่แทนเปลือกของเมล็ด ป้องกันอันตรายให้กับเมล็ดพืชเทียมจากเชื้อโรคภายนอก หรือในระหว่างการเก็บและการขนย้าย (Fujii et al., 1987)

ข้อได้เปรียบที่สำคัญของเทคโนโลยีการผลิตเมล็ดพืชเทียมก็คือ สามารถที่จะผลิตเมล็ดพันธุ์เทียมได้ในปริมาณมาก ๆ และต้นทุนในการผลิตต่ำ ดังนั้นการยอมรับเทคโนโลยีนี้จึงขึ้นอยู่กับคุณค่าความสำคัญของพืชที่จะทำการขยายพันธุ์ และมูลค่าของผลิตภัณฑ์คู่แข่ง นอกจากนี้การใช้ประโยชน์ของเมล็ดพืชเทียมยังขึ้นอยู่กับความก้าวหน้าของวิทยาการทางพืช ระบบการขนส่ง และการเผยแพร่สู่เกษตรกร รวมทั้งการพัฒนาสายพันธุ์พืชที่มีลักษณะดีเด่นโดยเทคนิคทางพันธุวิศวกรรม (Redenbaugh et al., 1986 และ Fujii et al., 1987)

เมล็ดพืชเทียมจัดเป็นเทคโนโลยีที่ปฏิวัติระบบการขยายพันธุ์พืชในทางเกษตรกรรม ในระยะ 2-3 ปีที่ผ่านมานี้ ได้มีความก้าวหน้าในการใช้เมล็ดพืชเทียมเพื่อการขยายพันธุ์พืชในเรือนเพาะชำและในแปลงทดลองของเกษตรกร อย่างไรก็ตามถึงแม้ว่าการใช้ประโยชน์จากเมล็ดพืชเทียมยังมีอนาคตอีกยาวไกล แต่การวิจัยในกระบวนการงอกของต้นอ่อน วิธีการนำไปปลูกของเมล็ดพืชเทียม จะเป็นตัวช่วยให้การขยายพันธุ์พืชที่เลือกสรรแล้วเข้าสู่ระบบการค้าได้มากยิ่งขึ้น ในบางประเทศ เช่น ประเทศญี่ปุ่น มีบริษัทที่ผลิตเมล็ดพืชเทียมออกจำหน่ายเป็นการค้าแล้ว เช่น บริษัท คิริน บริวเวอรี่ และบริษัท แพลนท์ เจนเนติก (โครงการพัฒนาข่ายงานด้านเทคโนโลยีชีวภาพการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช, 2531) แสดงว่าเทคโนโลยีนี้สามารถลดต้นทุนการผลิตให้ต่ำลงได้เป็นอย่างมาก ถึงแม้ว่าเทคโนโลยีนี้จะประสบผลสำเร็จอย่างสูง แต่เทคนิคเหล่านี้ยังคงเป็นความลับของแต่ละบริษัทอยู่ จึงมีความจำเป็นเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องศึกษาวิจัยเทคโนโลยีในการผลิตเมล็ดพืชเทียมนี้ด้วยตนเอง เพื่อสนองนโยบายของรัฐบาลในเรื่องการพึ่งพาตนเอง

ทางเศรษฐกิจและเทคโนโลยี ตามแผนพัฒนาเศรษฐกิจและสังคมแห่งชาติ ฉบับที่ 6 เพื่อที่จะได้นำความรู้ที่ได้มาช่วยพัฒนาการเกษตรของประเทศไทยต่อไปในอนาคต

วัตถุประสงค์และขอบเขตของงานวิจัย

1. ศึกษาเทคนิคการผลิตเมล็ดพืชเทียมโดยการเลี้ยงเนื้อเยื่อ เพื่อนำไปประยุกต์ใช้กับพืชที่มีปัญหาในการขยายพันธุ์ โดยเฉพาะพืชที่มีความผันแปรเนื่องจาก gene recombination หรือเมื่อต้องการพืชนั้นเพียงเพศเดียว

2. ศึกษาสภาวะแวดล้อมและสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเกิด somatic embryogenesis ของพืชทดลอง เพื่อผลิตให้ได้ปริมาณมากและมีขนาดสม่ำเสมอ

การสำรวจเอกสาร

เมล็ดเจริญจากโอวูล (ovule) ที่ได้รับการปฏิสนธิแล้ว ประกอบด้วยส่วนสำคัญ 3 ส่วน คือ เอมบริโอ (embryo) อาหารที่สะสมอยู่ภายในเมล็ด (storage food) และเปลือกหุ้มเมล็ด (seed coat) เปลือกหุ้มเมล็ดทำหน้าที่ป้องกันเมล็ดจากความแห้งแล้งและอันตรายจากภายนอกก่อนที่เมล็ดจะงอก ส่วนของเอมบริโอ คือต้นอ่อนที่เจริญเติบโตมาจากไซโกต (zygote) ซึ่งมีพัฒนาการมาจาก 1 สเปิร์มนิวเคลียส (sperm nucleus) จากหลอดของละอองเกสรตัวผู้ (pollen tube) เข้าผสมกับเซลล์ไข่ (egg cell) เกิดเป็นไซโกต ต่อมาเจริญเติบโตมาเป็นเอมบริโอหรือต้นอ่อนที่ประกอบด้วยส่วนสำคัญ 3 ส่วน คือ plumule caulicle และ radicle ส่วนสเปิร์มนิวเคลียสอีก 1 นิวเคลียส เข้าผสมกับโพลานิวเคลียส (polar nucleus) เกิดเป็นเซลล์ที่จะเจริญไปเป็นเอนโดสเปิร์ม ซึ่งเป็นอาหารของเอมบริโอในขณะที่เอมบริโอกำลังเจริญเติบโต หรือในขณะที่เมล็ดกำลังงอก

พัฒนาการดังกล่าวมานี้โดยเฉพาะการเกิดเอมบริโอมิได้ถูกจำกัดว่าจะเกิดได้เฉพาะในกรณีนี้เท่านั้น เพราะเมื่อเทคโนโลยีการเลี้ยงเนื้อเยื่อจากส่วนต่าง ๆ ของพืชพัฒนามากขึ้น โดยเฉพาะการเลี้ยงเนื้อเยื่อจากส่วนของพืชที่กำลังเจริญ เช่น เนื้อเยื่อเจริญ ใบอ่อน หรือส่วนต่าง ๆ ของต้นกล้าพืช บนอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ผสมสารควบคุมการเจริญของพืชและปรับสภาพแวดล้อมให้เหมาะสม เช่น แสง อุณหภูมิ และวิธีการเลี้ยง ก็จะทำให้ชิ้นส่วนของพืชดังกล่าวมีการพัฒนาไปเป็นกลุ่มเซลล์เริ่มต้นที่จะเจริญต่อไปเป็นเอมบริโอได้ โดยจะมีขั้นตอนในการพัฒนาการเป็นไปในทำนองเดียวกันกับพัฒนาการของต้นอ่อนภายในเมล็ดทุกประการ เราเรียกการเกิดเอมบริโอจากการเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชในหลอดแก้วนี้ว่าโซเมติคเอมบริโอ หรือเอมบริออยด์ และเรียกกระบวนการพัฒนาของเอมบริโอโดยไม่อาศัยเพศที่เลี้ยงในหลอดแก้วนี้

ว่า somatic embryogenesis (Steward, Mapes and Mears, 1958; Reinert, Bajaj and Zbell, 1977; Kohlenbach, 1977 และ Vajrabhaya, 1988)

ในปี ค.ศ. 1902 Haberlandt นักวิทยาศาสตร์ชาวเยอรมันได้ทดลองเลี้ยงเซลล์พืชบนอาหารสังเคราะห์ในสภาพปลอดเชื้อ เพื่อศึกษาถึงความสามารถของส่วนต่าง ๆ ของพืชว่าจะมีการเจริญเติบโตได้หรือไม่เพียงใด แม้ว่างานทดลองในครั้งนั้นไม่ประสบความสำเร็จเท่าที่ควร แต่ก็เกิดแนวความคิดในเรื่อง "totipotency" ที่ว่าเซลล์ของพืชมีความสามารถที่จะเจริญกลับมาเป็นต้นพืชใหม่ที่สมบูรณ์ได้ จากแนวความคิดริเริ่มนี้ได้มีผู้นำเอาไปศึกษาทดลองอย่างกว้างขวางในเวลาต่อมา (Vajrabhaya, 1988) Robbins (1922) ได้รายงานว่าเนื้อเยื่อของรากที่นำมาเลี้ยงสามารถมีชีวิตอยู่ได้แต่ไม่มีการเจริญและการแบ่งเซลล์

ในปี ค.ศ. 1934 White สามารถเลี้ยงส่วนปลายรากของมะเขือเทศให้มีการเจริญและมีการแบ่งเซลล์ในสภาพปลอดเชื้อได้เป็นผลสำเร็จ เนื่องจากพบว่ามีวิตามินบี-1 เป็นองค์ประกอบที่สำคัญต่อการเจริญ ปี 1934 Gautheret ประสบความสำเร็จในการเลี้ยงส่วนแคมเบียม (cambium) ของ Salix capraea และพืชอื่น ๆ ให้มีการเจริญบนอาหารสังเคราะห์ซึ่งประกอบด้วย Knop's solution, glucose และ cystein hydrochloride ซึ่งในเวลาต่อมา Gautherat และ White ต่างก็ได้เสนอผลงานความสำเร็จในการเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชให้มีการเจริญออกมาอีกมากมาย (Vajrabhaya, 1987)

การศึกษาเกี่ยวกับ embryogenesis ในสภาพธรรมชาติได้ศึกษากันมาหลายทศวรรษแล้ว แต่ความพยายามที่จะเลี้ยงเอมบริโอให้เกิดในหลอดแก้ว (in vitro) เกิดขึ้นโดย Steward et al., (1958) ได้นำส่วนโฟลเอ็ม (phloem) ที่ตัดจากหัวแครอท (carrot) มาเลี้ยงเซลล์แบบแขวนลอย (suspension culture) ในอาหารเหลวสูตรพื้นฐานของ White (1943) โดยเติมน้ำมะพร้าว และ 2,4-D ได้ต้นใหม่ที่มีสีเขียวของแครอทที่พัฒนามาจาก torpedo shape embryo จากกลุ่มของเซลล์ในการเลี้ยงเซลล์แบบแขวนลอย ในระยะเดียวกัน Reinert (1958) ได้แสดงให้เห็นว่าต้นพืชใหม่ที่เกิดจากแคลลัสของแครอทที่เลี้ยงบนอาหารวุ้น ซึ่งมีขนาดและรูปร่างเหมือนกับ zygotic embryo จนกระทั่งในปัจจุบันได้มีการศึกษารายละเอียดและวิธีการต่าง ๆ ในการชักนำให้เกิด somatic embryo ในพืชอื่น ๆ อีกหลายชนิด เช่น Ranunculus sceleratus (Konar and Nataraja, 1969) Asparagus officinalis (Steward et al., 1971) Apium graveolens (Williams and Collin, 1976) Nicotiana tabacum (Evan, 1981) และ Carica papaya (Chen, Wang and Maeda, 1987) โดยนักวิทยาศาสตร์ได้แสดงให้เห็นว่าภายใต้สภาวะของแคลลัสและเซลล์แขวนลอยที่ได้จากส่วนต่าง ๆ ของพืชสามารถชักนำให้เกิดราก ลำต้น และยอด ซึ่งมีโครงสร้างเหมือนเอมบริโอในเมล็ดได้ จึงเรียกเอมบริโอนี้ว่าเอมบริออยด์

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หรืออาจจะเรียกกันในชื่ออื่น เช่น accessory embryo, adventitious embryo และ supernumerary embryo ก็ได้ (Bhojwani and Razdar, 1983 และ Vajrabhaya, 1988) ซึ่งปัจจุบันพบว่ามีพืชมากกว่า 32 วงศ์ (family) 81 สกุล (genus) และ 132 ชนิด (species) ที่เราใช้ในการศึกษาทดลองเกี่ยวกับ somatic embryogenesis (Vajrabhaya, 1988)

การเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเพื่อการปรับปรุงพันธุ์และการขยายพันธุ์พืช เพื่อให้ได้พืชพันธุ์ใหม่ ๆ ที่มีลักษณะดีเด่นตามต้องการจำนวนมาก ขึ้นอยู่กับปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญของเนื้อเยื่อพืช ได้แก่

1. ปัจจัยในเนื้อเยื่อพืช (internal factor) ได้แก่ลักษณะต่าง ๆ ของเนื้อเยื่อที่นำมาเลี้ยง เช่น ชนิดของส่วนของพืชที่นำมาเลี้ยง และองค์ประกอบต่าง ๆ ของเนื้อเยื่อพืช และพันธุกรรมของพืช (Gamborg and Wetter, 1975 และ Sunderland and Dunwell, 1977)

2. ปัจจัยภายนอก (external factor) หมายถึงปัจจัยต่าง ๆ ของสภาพแวดล้อมในการเลี้ยงเนื้อเยื่อ เช่น องค์ประกอบของอาหารที่ใช้ในการเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช (Sunderland and Dunwell, 1977) สภาพความเป็นกรดเป็นด่างของอาหาร (Stuart and Street, 1969) อุณหภูมิและแสงที่ใช้ในการเลี้ยงเนื้อเยื่อ (Sunderland, 1977) เป็นต้น

นอกจากนี้ยังขึ้นอยู่กับความสามารถในการเปลี่ยนแปลงเป็นต้นใหม่ของพืช โดยอาจจะเปลี่ยนแปลงมาจากแคลลัสหรือจากเนื้อเยื่อพืชที่เลี้ยงโดยตรง (Maddock, 1985 และ Vajrabhaya, 1988) กระบวนการของการเจริญจากแคลลัสไปเป็นต้นใหม่นั้นสามารถจำแนกได้เป็น 2 แบบ คือ organogenesis และ embryogenesis โดยที่ organogenesis เป็นกระบวนการพัฒนาของเนื้อเยื่อไปเป็นส่วนหนึ่งส่วนใดของพืชโดยมีการเจริญในทิศทางเดียว (unipolar) เช่น การเกิดตายอด ใบ หรือ ราก ส่วนการพัฒนาไปเป็นต้นใหม่อีกแบบหนึ่งคือ somatic embryogenesis เป็นกระบวนการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อไปเป็นต้นพืชที่มีทั้งส่วนยอดและรากที่สมบูรณ์ โดยมีแหล่งกำเนิดเดียวกัน เป็นการเจริญใน 2 ทิศทาง (bipolar) การพัฒนาแบบนี้จะคล้ายกับ zygotic embryogenesis คือมีระยะที่กลุ่มเซลล์มีรูปร่างเป็น globular shape, heart shape และ torpedo shape สุดท้ายจะได้ต้นพืชที่สมบูรณ์ (Steward et al., 1971; Kohlenbach, 1977; Dodds and Robert, 1982 และ Vajrabhaya, 1988)

พัฒนาการของ embryogenesis นั้นสามารถเกิดขึ้นได้ 2 แนวทางด้วยกัน คือ

1. เอมบริออยด์เกิดขึ้นโดยตรงจากชิ้นส่วนของพืชที่นำมาเลี้ยงโดยไม่ผ่านกระบวนการสร้างแคลลัสจากเซลล์ เรียกว่า pre-embryogenic determined cell

2. เอมบริออยด์เกิดขึ้นโดยผ่านกระบวนการการสร้างแคลลัสจากเซลล์หรือกลุ่มเซลล์ในแคลลัสที่ได้รับการชักนำให้พัฒนาเป็นเอมบริออยด์ เรียกว่า induced-embryogenic determined cell (Shepard, Bidney and Shanin, 1980)

เอมบริออยด์หรือส่วนต่าง ๆ ที่เกิดจากการเลี้ยงเนื้อเยื่อจึงอาจจะมีกำเนิดมาจากเซลล์เดี่ยว (single cell) หรือกลุ่มเซลล์ (cell cluster) กลุ่มเล็ก ๆ ซึ่งบริเวณที่เป็นแหล่งกำเนิดดังกล่าวส่วนมากจะเป็นเซลล์ในชั้นผิว หรือใต้ชั้นผิวลงไปเล็กน้อย (Murashige and Huang, 1984) ลักษณะของเซลล์หรือกลุ่มเซลล์ที่จะพัฒนามาเป็นเอมบริออยด์เป็นเซลล์ที่มีไซโตปลาสซึมเข้มข้น มีนิวเคลียสและเม็ดแป้ง (starch granule) ขนาดใหญ่ (Fujimura and Komamine, 1979 และ Nomura and Komamine, 1985)

ปัจจัยที่มีผลต่อการเกิด somatic embryogenesis

ส่วนของพืชที่นำมาเลี้ยงเนื้อเยื่อ (explant)

จากการศึกษาการเลี้ยงเนื้อเยื่อแครอท พบว่าทุกส่วนของพืชสามารถนำมาเลี้ยง-เนื้อเยื่อและประสบผลสำเร็จในการชักนำให้เกิดเอมบริออยด์ได้เป็นอย่างดี เช่น ส่วนใต้ใบเลี้ยง (Fujimura and Komamine, 1979) ส่วนของรากอ่อน (Smith and Street, 1974) โปรโตพลาสท์ (Kameya and Uchimiya, 1972) ก้านใบ (Halperin, 1966) ก้านดอก (Halperin and Wetherell, 1964) และ รากแก้ว (Steward et al., 1958) เป็นต้น

พืชบางชนิดจะมีเพียงบางส่วนของพืชเท่านั้นที่ให้ผลดีในการเลี้ยงเนื้อเยื่อ ซึ่งส่วนมากพบในพืชใบเลี้ยงเดี่ยวโดยเฉพาะพืชในวงศ์ Graminae หรือ Poaceae พบว่าส่วนของพืชที่กำลังมีการแบ่งเซลล์อย่างมาก จะให้ผลดีในการนำมาเลี้ยงเนื้อเยื่อ การชักนำให้เกิด somatic embryo ของพืชในวงศ์นี้มักใช้ส่วนของเอมบริโอที่ยังอ่อนอยู่มาก เช่น พืชพวก Pennisetum (Vasil and Vasil, 1980)

ส่วนของพืชที่นำมาเลี้ยงเนื้อเยื่อจะให้ผลดีหรือไม่นั้นขึ้นอยู่กับผิวสัมผัสระหว่างส่วนของพืชกับผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อ ตำแหน่งของพืชที่สัมผัสอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อ สรีรวิทยาของพืชที่นำมาเลี้ยง ตลอดจนฤดูกาลในการเก็บเกี่ยวและเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชนั้น ๆ นอกจากนี้ยังพบว่าในพืชชนิดเดียวกันแต่มี genotype ที่แตกต่างกันหรือคนละสายพันธุ์ ก็ให้ผลที่แตกต่างกันในการชักนำให้เกิด somatic embryo (Steward et al.,1975)

อาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช (culture medium)

โซมาติกเอมบริโอเจริญได้ดีในอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อหลายชนิด เช่น White's medium (White, 1963) Murashige and Skoog (1962) หรือ MS Gamborg et al. (1968) หรือ B_5 และ Schenk and Hildebrandt (1972) หรือ SH เป็นต้น อาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อพวก B_5, MS และ SH นี้จัดเป็นอาหารที่มีความเข้มข้นของเกลืออนินทรีย์สูง โดยเฉพาะ MS มีความเข้มข้นของเกลืออนินทรีย์สูงกว่า White's medium ถึง 10 เท่า จากการศึกษารวบรวมของ Evan et al. (1981) รายงานว่ากว่า 70% ของพืชที่นำมาชักนำให้เกิดเอมบริออยด์ มักจะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร MS เป็นส่วนมาก

ธาตุอาหารที่จำเป็นและมีผลต่อการชักนำให้เกิดเอมบริออยด์อย่างมาก ได้แก่ ไนโตรเจน Wettherell and Daugall (1976) ได้รายงานถึงผลการเลี้ยงเนื้อเยื่อของแครอทพันธุ์ป่าในอาหารสูตรชักนำให้เกิด embryogenesis ที่เติม 10 mM NH_4Cl และ KNO_3 10-40 mM ทำให้เกิดเอมบริออยด์จำนวนมาก ซึ่ง Reinert (1967) เคยรายงานไว้ว่าในการเลี้ยงเนื้อเยื่อแครอทเพื่อชักนำให้เกิดเอมบริออยด์นั้น พืชได้รับไนโตรเจนความเข้มข้นสูงในรูปของไนเตรต (NO_3) นั่นแสดงว่าไนเตรตมีผลต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสและชักนำให้เกิดเอมบริออยด์ Halperin and Wettherell (1965) ได้แสดงให้เห็นว่าไนเตรตมีบทบาทต่อการชักนำให้เกิดแคลลัส เมื่อนำแคลลัสมาเลี้ยงในอาหารที่มี KNO_3 กับ NH_4Cl พบว่าสามารถชักนำให้เกิดเอมบริออยด์ได้ หรือนำแคลลัสมาเลี้ยงในอาหารที่มีเฉพาะ KNO_3 โดยไม่มี NH_4Cl ก็สามารถชักนำให้เกิดเอมบริออยด์ได้เป็นจำนวนมาก Reinert (1973) พบว่าในการชักนำให้เกิด somatic embryo นั้น ความเข้มข้นที่เหมาะสมของไนโตรเจนมีความสัมพันธ์โดยตรงกับความเข้มข้นของออกซิน (auxin)

บางครั้งในการเลี้ยงเนื้อเยื่ออาจจะเติมสารอินทรีย์บางชนิดลงไปเพื่อช่วยเพิ่มปริมาณไนเตรต เช่น น้ำมะพร้าว (Steward and Shantz, 1959) casien hydrolysate (Ammirato and Steward, 1971) glutamine และ alanine (Wettherell and Daugall, 1976)

Brown และคณะ (1976) รายงานว่าการใช้ potassium ion 20 mM ทำให้เกิดเอมบริออยด์ของแครอทมากขึ้น มีบางรายงานที่พบว่าจะมีตัวยับยั้งปฏิกิริยา (inhibitor) เกิดขึ้นในอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อ ซึ่งอาจจะเป็นสารยับยั้งหรือสารพิษที่เกิดจากการหลั่งหรือการสังเคราะห์จากส่วนของพืชหรือเซลล์ที่นำมาเลี้ยงเนื้อเยื่อ Fridborg et al. (1978) และ Drew (1979) ได้พิสูจน์ว่าการเติมผงถ่าน (activated charcoal) ลงในอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อชักนำ embryogenesis ได้ผลดีขึ้นสำหรับการเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชบางชนิด เช่น การเลี้ยงส่วนก้านดอกของมะละกอ เป็นต้น เพราะผงถ่านมีความสำคัญในการดูดซับสาร phenolic

compound ที่เนื้อเยื่อพืชผลิตขึ้นมา phenolic compound มีผลต่อการยับยั้งการทำงานของสารควบคุมการเจริญของพืช ซึ่งจะถูกดูดซับด้วยผงถ่าน และช่วยกระตุ้นให้เกิดเอมบริออยด์ได้ดีขึ้น

สารควบคุมการเจริญของพืช (growth regulator)

ออกซิน (auxin)

สารควบคุมการเจริญของพืชที่มีบทบาทในการชักนำให้เกิด somatic embryogenesis มากที่สุด ได้แก่ exogeneous auxin ที่มีในอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อ Reinert (1973) พบว่าในการชักนำให้เกิด somatic embryo ของแครอทนั้นต้องการออกซินในขั้นตอนการชักนำให้เกิดแคลลัส และเมื่อย้ายแคลลัสนั้นลงไปเลี้ยงในอาหารที่มีออกซินเพียงเล็กน้อยหรือไม่มีเลย จะชักนำให้เกิดเอมบริออยด์ เช่นเดียวกับการเลี้ยงเนื้อเยื่อของมะละกอ (Arora and Singh, 1978) Nomura and Komamine (1985) และ Vajrabhaya (1988) พบว่าในการศึกษาพัฒนาการของ somatic embryogenesis ขั้นตอนต่าง ๆ ของการเลี้ยงเนื้อเยื่อแครอท embryogenic callus เกิดขึ้นเมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีออกซิน (2,4-D) ต่ำประมาณ $5x10^{-7}$ M เซลล์มีการแบ่งตัวให้ proembryogenic mass (PEM.) จำนวนมาก เมื่อย้าย PEM. เหล่านี้ลงไปในอาหารที่มี 2,4-D $5x10^{-8}$ M หรือไม่มีเลย มีผลทำให้เอมบริออยด์เกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว

ไซโตไคนิน (cytokinin)

โดยปกติไซโตไคนินไม่มีบทบาทในการชักนำให้เกิด somatic embryogenesis แต่จะมีผลต่อการแบ่งเซลล์ การขยายขนาดของแคลลัส และการเจริญของเอมบริโอมาเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์ (Arora and Singh, 1978; Fujimura and Komamine, 1980 และ Chen et al., 1987) นอกจากนี้ยังพบว่าไซโตไคนินมีผลต่อการพัฒนาใบเลี้ยงของพืช (Ammirato and Steward, 1971) แต่มีบางรายงานกล่าวว่าความต้องการไซโตไคนินต่อการเกิด somatic embryogenesis มักใช้ไซโตไคนินในรูปของ zeatin มากกว่า kinetin และ BA เพราะให้ผลในบางพืช (Fujimura and Komamine, 1975)

กรดจิบเบอเรลลิค (gibberellic acid หรือ GA_3)

GA_3 มีบทบาทต่อการพัฒนาของเอมบริโอมาเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์ หรือมีบทบาทในการกระตุ้นให้เกิดรากและอวัยวะบางส่วนของพืช โดยเฉพาะการพัฒนาส่วนเอมบริโอของมะละกอ (Chen et al., 1987) แต่ GA_3 ให้ผลในด้านลบต่อการเกิด embryogenesis และ

organogenesis ของแครอทและพืชอื่น ๆ บางชนิด (Halperin, 1970 และ Vajrabhaya, 1988)

ออสโมติค โพเทนเชียล (osmotic potential)

มีการศึกษาถึงผลของออสโมติคัมที่มีต่อการพัฒนาของแคลลัสและเอมบริโอ ทำให้เราได้คำตอบเกี่ยวกับสภาพที่เหมาะสมต่อการเจริญและพัฒนาของเอมบริโอเพื่อ ให้สามารถจำลองภาวะที่คล้ายคลึงกับสารละลายภายในโอวูลของพืชชนิดนั้น ซึ่งสามารถนำไปประยุกต์ใช้กับการผลิตเมล็ดพืชเทียม เซลล์ของแครอทป่าที่เลี้ยงในอาหารที่มีออสโมติคัมชนิดต่าง ๆ ความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร เป็นเวลา 14 วัน พบว่าการเจริญในอาหารที่มีกลูโคส ฟรุกโตส และแมนโนสต่ำกว่าซูโครส และต่ำที่สุดเมื่อใช้กาแลคโตส จำนวนของเอมบริโอกับต้นพืชที่ได้จากการเลี้ยงในอาหารที่มีน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวต่ำกว่าเมื่อใช้ซูโครส แต่จำนวนของเอมบริโอต่อน้ำหนักแห้งมากกว่า ซึ่งคาดว่าช่วงของการเจริญอาจจะมีผลต่อน้ำหนักแห้งและจำนวนเอมบริโอ เมื่อทดลองวัดการเจริญในช่วง 13 ถึง 27 วัน พบว่าการเจริญคิดจากน้ำหนักแห้งมีความสัมพันธ์กับจำนวนเอมบริโอโดยจำกัดต่อออสโมติคัมที่ใช้ สัดส่วนระหว่างการเจริญและจำนวนเอมบริโอขึ้นกับชนิดของออสโมติคัม ดังนั้นออสโมติคัมอาจใช้เป็นสารเมตาโบลิซึมผ่านตัวกลาง ซึ่งสามารถสร้างได้ในอัตราที่ต่างกันจากออสโมติคัมที่ต่างกัน อัตราการเปลี่ยนออสโมติคัมไปเป็นสารตัวกลางนี้อาจจะควบคุมการเจริญและการสร้างเอมบริโอของแครอทป่า กาแลคโตสให้การเจริญต่ำและเอมบริโอน้อย คาดว่าเป็นเพราะมีการเปลี่ยนไปเป็นสารตัวกลางได้ช้า หรือเซลล์มีการปรับตัวเพื่อจะเจริญในออสโมติคัมชนิดนี้เป็นไปอย่างช้า (Ammirato and Steward, 1977 และ Verma and Dougall, 1977)

การลดค่าออสโมติคโพเทนเชียลของอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อด้วยการเติมออสโมติคัม มีผลยับยั้งการเจริญและการสร้างรงควัตถุแอนโทไซยานิน (anthocyanin) ของเอมบริโอของแครอท แต่จะช่วยให้มีการเกิดเอมบริโอและการเปลี่ยนแปลงกระบวนการสังเคราะห์สารบางชนิด เช่น กรดไขมัน และขี้ผึ้ง (wax) เป็นต้น (Ammirato, 1985)

อุปกรณ์ที่ใช้ในการเลี้ยงเนื้อเยื่อและสถานะของอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อ (culture vessels and the state of the medium)

งานวิจัยแรกที่ศึกษาเกี่ยวกับ somatic embryogenesis คือชักนำแคลลัสให้เจริญในอาหารกึ่งแข็ง และการเลี้ยงเซลล์แบบแขวนลอยในอาหารเหลว (Steward et al., 1958 และ Reinert, 1958) พบว่า somatic embryo จะสามารถเจริญได้ในสภาพอาหารทั้ง 2 แบบ จากการศึกษาพบว่าอุปกรณ์ที่ใช้ในการเลี้ยงเนื้อเยื่อโดยเฉพาะขวดแก้ว

สำหรับบรรจุอาหาร และสถานะของอาหารไม่ว่าจะเป็นอาหารวุ้นหรืออาหารเหลว มีผลต่อการเกิด somatic embryo ของพืชไม่มากนัก แต่สำหรับเอมบริออยด์ที่เจริญในอาหารเหลวใน Erlenmayer flask บนเครื่องเขย่า (shaker) นั้น ความเร็วของจำนวนรอบต่อนาทีของเครื่องเขย่ามีผลต่อการเกิดเอมบริออยด์เป็นอย่างมาก (Steward et al., 1971) Carman (1987) พบว่าเมื่อเขย่าเซลล์แขวนลอยมากยิ่งขึ้นทำให้เกิดเอมบริโอน้อยลง ทั้งนี้อาจจะขึ้นกับชนิดของพืชก็ได้

สภาพแวดล้อมในการเลี้ยงเนื้อเยื่อ (environmental condition)

แสงและอุณหภูมิ (light and temperature)

somatic embryogenesis เกิดขึ้นได้ทั้งในที่มีแสงและไม่มีแสงสว่าง การชักนำ somatic embryo ของยาสูบ (Nicotiana tabacum) พบว่าต้องการความเข้มของแสงสูงมาก (Haccius, 1987) แต่ในแครอทจะเกิดเอมบริโอได้ดีในที่มีความเข้มของแแสงเพียงเล็กน้อยเท่านั้น (Ammirato and Steward, 1971)

อุณหภูมิที่เหมาะสมมีผลอย่างมากต่อการพัฒนาของเอมบริออยด์ Nitsch (1974) ได้รายงานว่าการใช้อุณหภูมิต่ำ (cold treatment) มีผลต่อการชักนำ androgenetic embryo ของยาสูบได้ดีขึ้น โดยทั่วไปห้องเลี้ยงเนื้อเยื่อมักปรับระดับความเข้มของแสงประมาณ 1,500-3,000 ลักซ์ และมีอุณหภูมิ 23-26 องศาเซลเซียส

แกส (gas)

Tisseret and Murashige (1977) รายงานว่าเอธานอล (ethanol) และเอธีลีน (ethylene) ยับยั้งการเกิดและการพัฒนาของเอมบริออยด์ในการเลี้ยงเนื้อเยื่อของส้มและแครอท นอกจากนี้ยังพบว่าปริมาณของออกซิเจนก็มีบทบาทในการชักนำ embryogenesis เมื่อเกิด embryogenesis นั้น ระดับของออกซิเจนจะต่ำมาก แต่ในการชักนำให้เกิดแคลลัสและราก เนื้อเยื่อพืชกลับต้องการออกซิเจนในปริมาณที่สูงขึ้น ซึ่งได้ผลตรงกับรายงานของ Carman (1987) ที่ศึกษาเกี่ยวกับการชักนำเอมบริออยด์ของข้าวสาลีในอาหารเหลว

ความหนาแน่น (density)

Halperin (1967) ได้แสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์โดยตรงระหว่างความหนาแน่นของ embryogenic cell ในอาหารเหลว และอัตราการเจริญของเอมบริโอไปเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์ พบว่าถ้าความหนาแน่นของ embryogenic cell อยู่ในระดับที่พอดี คือเป็น "minimum effective density" อัตราการเกิดเอมบริออยด์จะมีมาก และพบว่าถ้าความหนาแน่นของ

เซลล์ต่ำ ช่วยให้การเกิดเอมบริออยด์ได้ขนาดสม่ำเสมอกันมากยิ่งขึ้น

ความสม่ำเสมอ (synchrony)

เอมบริออยด์ที่เกิดขึ้นมีความแตกต่างกันทั้งทางด้านรูปร่าง ขนาด และระยะของการพัฒนา ทั้งนี้เนื่องจากในขณะที่เราย้ายเนื้อเยื่อจากอาหารเดิมไปเลี้ยงในอาหารใหม่นั้น proembryogenic cell cluster ที่เกิดขึ้นในอาหารเดิมเมื่อได้รับอาหารใหม่ proembryogenic cell cluster นั้นจะพัฒนาขึ้นทั้งขนาดและรูปร่าง ในขณะเดียวกันกลุ่มเซลล์ก็แบ่งตัวให้ proembryogenic cell cluster ใหม่ ๆ ขึ้นมาเรื่อย ๆ เมื่อพัฒนามาเป็นเอมบริโอในระยะต่าง ๆ ก็มีความแตกต่างกันในเรื่องขนาดและรูปร่างของเอมบริโอด้วย ดังนั้นการหาวิธีการที่จะทำให้ได้เอมบริออยด์ที่มีขนาดสม่ำเสมอเป็นจำนวนมาก ๆ จึงจำเป็นอย่างยิ่งต่อการนำไปผลิตเป็นเมล็ดพืชเทียมหรือเพื่อการศึกษาทางชีวเคมีต่อไป (Fujimura and Komamine, 1979)

การทำให้ได้ somatic embryo ที่มีขนาดสม่ำเสมอนั้น มีวิธีที่นิยมกระทำอยู่ 2 วิธีด้วยกัน คือ

1. การกรองโดยใช้ตะแกรง (fractionation of culture cell by sieving)
2. การปั่นแยกในสารละลายที่มีความเข้มข้นแตกต่างกันเป็นลำดับ (fractionation of culture cell by discontinuous density gradient centrifugation)

การแยกเซลล์โดยอาศัยความแตกต่างของขนาดของเซลล์นั้น นิยมใช้การกรองเซลล์ด้วยตะแกรงที่มีรูขนาดต่าง ๆ โดยการให้เซลล์ไหลผ่านรูของตะแกรงขนาดต่าง ๆ ตามลำดับ (Warren and Fowler, 1977; Fujimura and Komamine, 1977 และ Kamada and Harada, 1979) Fujimura and Komamine (1979) พบว่าการใช้ตะแกรงที่เป็นแก้วนั้นไม่ได้ผลดีนัก เพราะขนาดของรูและตำแหน่งของรูอยู่ห่างกันมาก จึงแนะนำให้ใช้ตะแกรงที่เป็นสแตนเลส-สตีล หรือตะแกรงไนลอน เพราะตำแหน่งของรูจะอยู่ติดกัน ขนาดของรูสม่ำเสมอทำให้สามารถกรองได้ในปริมาณที่มากและได้ขนาดที่สม่ำเสมออีกด้วย

ถ้าโซมาติกเอมบริโอมีขนาดแตกต่างกันมากและยังมีองค์ประกอบในเซลล์แตกต่างกัน เช่น ขนาดของเม็ดแป้งต่างกัน มีแวคิวโอ (vacuole) ต่างกัน องค์ประกอบของเซลล์ที่แตกต่างกันเหล่านี้มีผลทำให้ความถ่วงจำเพาะของเซลล์แตกต่างกันด้วย เราสามารถแยกเซลล์เหล่านี้ได้โดยอาศัยความแตกต่างของความถ่วงจำเพาะของเซลล์ โดยวิธีการปั่นให้ตกตะกอนในสารละลายฟิคอลล์ (ficoll) ที่มีความเข้มข้นระหว่าง 10-18 เปอร์เซนต์โดยน้ำหนัก ปั่นแยกด้วยแรงเหวี่ยง 500 g เวลา 5 นาที โซมาติคเอมบริโอที่มีความถ่วงจำเพาะเดียวกันจะตกตะกอนแทรกอยู่ตามผิวหน้าระหว่างฟิคอลล์ความเข้มข้นต่าง ๆ (Fujimura and

Komamine, 1984 และ Nomura and Komamine, 1985)

การเลี้ยงเนื้อเยื่อหน่อไม้ฝรั่ง แครอท และยาสูบ

หน่อไม้ฝรั่ง (Asparagus officinalis Linn.)

การให้ผลผลิตที่แตกต่างกันระหว่างต้นตัวผู้และต้นตัวเมียของหน่อไม้ฝรั่ง โดยที่ต้นตัวผู้จะให้หน่อและผลผลิตมากกว่าต้นตัวเมีย แต่ต้นตัวเมียจะให้หน่อขนาดใหญ่กว่าต้นตัวผู้ เมื่อขยายพันธุ์โดยการเพาะเมล็ดจึงมีทั้งต้นตัวผู้และต้นตัวเมียเกิดขึ้น ซึ่งเป็นปัญหาสำคัญในการขยายพันธุ์หน่อไม้ฝรั่งพันธุ์ดี ในปี 1945 Loo ได้ทดลองขยายพันธุ์หน่อไม้ฝรั่งโดยการเลี้ยงเนื้อเยื่อจากปลายยอดในอาหารสังเคราะห์ พบว่า cladophyll มีอิทธิพลต่อการเจริญเติบโตของต้นด้วย จากปลายยอดเพียงยอดเดียวสามารถมีต้นได้ถึง 16 ต้น และจากการศึกษาลักษณะภายใน ปรากฏว่ายอดที่เกิดขึ้นในอาหารวุ้นที่ได้รับแสงสว่างไม่มีความแตกต่างจากยอดของต้นที่ปลูกในแปลง

Takatori, Murashige and Stillman (1968) สามารถทำให้หน่อไม้ฝรั่งเกิดแคลลัสได้ในอาหารวุ้นที่มี NAA 0.5 ppm. และน้ำมะพร้าว 15 เปอร์เซนต์ จากแคลลัสสามารถชักนำให้เกิดต้นได้โดยเติม adenine sulphate 50 ppm. ลงไปในอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อ Hasegawa, Murashige and Takatori (1975) ได้ขยายพันธุ์หน่อไม้ฝรั่งโดยใช้ปลายยอดนำไปเลี้ยงในอาหารวุ้นให้ได้รับแสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ หรือ Gro-Lux ในความเข้ม 1,000 ลักซ์ เป็นเวลา 4-10 ชั่วโมง อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส ได้ต้นจำนวนมาก รากเกิดจากแคลลัสที่ส่วนฐานของชิ้นส่วนพืชที่นำมาเลี้ยง ส่วนต้นจะเกิดจาก axillary bud ต้นที่ได้นี้ก่อนนำไปปลูกในดินต้องย้ายไปปลูกในอาหารวุ้นที่ไม่มี NAA และได้รับแสง 3,000 หรือ 1,000 ลักซ์ จากการตรวจสอบดูจำนวนโครโมโซมของต้นที่ได้จากการเลี้ยงเนื้อเยื่อโดยใช้ปลายยอดพบว่าสภาพของพืชนั้นยังเป็น diploid เท่าเดิม Yang, Hsu-Jen and Clore (1974) นำส่วนข้อของต้นตอ (stock plant) ไปเลี้ยงในอาหารวุ้นสูตร MS (1962) ที่มี NAA 0.1 ppm. และมี kinetin 0.05 ppm. ปรากฏว่าเกิดเป็นต้นที่มีราก 35 เปอร์เซนต์ ส่วนข้อที่ไม่เกิดรากนั้นสามารถชักนำให้เกิดรากได้โดยย้ายไปปลูกในอาหารวุ้นสูตร MS (1962) ที่เติม NAA 0.1 ppm. ถ้าข้อนั้นมีอายุมากกว่า 4 สัปดาห์จะเกิดรากได้มากขึ้น Yang และคณะ (1975) ได้ขยายพันธุ์หน่อไม้ฝรั่งจากต้นที่ตัดเป็นท่อน ๆ ในอาหารวุ้น พบว่าท่อนที่มีกิ่ง 3 กิ่งหรือมากกว่า สามารถงอกรากได้ดีกว่าต้นที่มีกิ่งเพียง 1 หรือ 2 กิ่ง ถ้าไม่มีกิ่งเลยจะเกิดรากได้น้อยลง

ในปี 1968 Willmar and Hellendoorn พบว่าเมื่อย้ายแคลลัสจากอาหารวุ้นสูตร Linsmaier and Skoog (1963) ที่เติม 4.5 µM 2,4-D และ 1.5 µM kinetin มา

เลี้ยงในอาหารเหลวสูตรเดิม มีเซลล์กลุ่มเล็ก ๆ พัฒนามาเป็นกลุ่มเซลล์ในระยะ globular จำนวนของ globular shape จะเพิ่มมากยิ่งขึ้นเมื่อลดความเข้มข้นของ 2,4-D ลง หรือไม่เติม 2,4-D เลย เอมบริออยด์ที่เกิดในอาหารเหลวนี้มีขนาดประมาณ 2-5 มิลลิเมตร Steward and Mapes (1971) ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของเซลล์หน่อไม้ฝรั่งที่สามารถชักนำให้เกิดแคลลัส จากแคลลัสสามารถชักนำให้เกิดรากโดยไม่มีต้น เกิดต้นโดยไม่มีรากหรือเกิดต้นที่สมบูรณ์ได้โดยเปลี่ยนองค์ประกอบของอาหารเหลวที่เลี้ยงบนเครื่องเขย่า Reuther (1983) พบว่าการเกิดเอมบริออยด์นั้นเกิดขึ้นเมื่อเอาเนื้อเยื่อไปเลี้ยงในอาหารวุ้นที่ไม่มีไซโตไคนินและออกซิน แล้วย้ายแคลลัสไปเลี้ยงในอาหารวุ้นที่ไม่มีสารควบคุมการเจริญของพืช พบว่าบริเวณของแคลลัสมีเอมบริออยด์ในระยะต่าง ๆ เจริญอยู่โดยรอบ และบางส่วนเจริญเป็นต้นแล้ว

แครอท (Daucus carota Linn.)

ความสำเร็จของ Steward และคณะ (1985) และ Reinert (1958) ในการชักนำให้เกิดต้นใหม่ของแครอทจากแคลลัส ถือว่าเป็นการพิสูจน์ทฤษฎี totipotency ให้เห็นอย่างชัดเจน ปัจจุบันแครอทจึงเป็นที่นิยมนำมาเป็นตัวอย่างในการศึกษาเทคนิคต่าง ๆ ในการเลี้ยงเนื้อเยื่อ Steward et al. (1958) เติมน้ำมะพร้าว 10 เปอร์เซนต์ ลงไปในอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อ พบว่าเกิดหน่อใหม่จำนวนมาก ต่อมาเขายังพบว่ากระบวนการ embryogenesis สามารถพัฒนาได้ดีขึ้นภายใต้สภาวะหรืออาหารที่เติมน้ำมะพร้าว Kato and Takeuchi (1963) นำส่วนของแครอทมาเลี้ยงในสูตรอาหารพื้นฐานของ White's (1943) โดยเติม 0.1 เปอร์เซนต์ difco yeast extract และ IAA 0.1 หรือ 10.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อศึกษากระบวนการเกิด organogenesis และ embryogenesis จากแคลลัส

Halperin and Wetherell (1964) สามารถชักนำเอมบริออยด์จำนวนมากจากแคลลัสที่เลี้ยงใน 2,4-D 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร และมีน้ำมะพร้าวเป็นองค์ประกอบของอาหารร่วมอยู่ด้วย ต่อมา Halperin (1964) และ Halperin and Wetherell (1965) ศึกษาการเปลี่ยนแปลงไปเป็นต้นใหม่ของเอมบริออยด์ที่ได้จากแคลลัสที่เลี้ยงในอาหารสูตรพื้นฐานของ LS (1965) โดยเติม 2,4-D พบว่า เมื่อความเข้มข้นของ 2,4-D ในอาหารมีมากกว่า 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร เฉพาะแคลลัสเท่านั้นที่เจริญได้ดี เมื่อลดความเข้มข้นของ 2,4-D ให้เหลือน้อยกว่า 0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร เอมบริออยด์พัฒนาได้อย่างรวดเร็วและมีจำนวนมากขึ้น ในขณะเดียวกัน Steward และคณะ (1964) ได้ศึกษาขั้นตอนต่าง ๆ ในการพัฒนาของเอมบริออยด์ของแครอท พบว่ามีขั้นตอนในการพัฒนาเหมือนกับ zygotic embryo ซึ่งงานวิจัยที่เกี่ยวกับ embryogenesis ในระยะต่อมามักอ้างอิงถึงอยู่เสมอ

ยาสูบ (Nicotiana rustica Linn.)

ยาสูบจัดเป็นพืชอีกชนิดหนึ่งที่นิยมใช้เป็นตัวอย่างในการศึกษาการเลี้ยงเนื้อเยื่อ เนื่องจากเนื้อเยื่อยาสูบสามารถเปลี่ยนแปลงไปเป็นต้นใหม่ได้ง่าย โดยมีการพัฒนาทั้งแบบ organogenesis และ embryogenesis แล้วแต่ว่าในสูตรอาหารนั้นเหมาะสมต่อการเกิดกระบวนการใด

Murashige and Skoog (1962) ศึกษาการชักนำให้เกิดแคลลัส โดยใช้ส่วนของใบและลำต้นของยาสูบในอาหารสังเคราะห์ที่มีทั้งเกลืออินทรีย์และอินทรีย์สารต่าง ๆ พบว่าเนื้อเยื่อยาสูบสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสและพัฒนาเป็นต้นใหม่ได้เป็นอย่างดี Linsmaier and Skoog (1965) ได้ปรับปรุงสูตรอาหารของ MS (1962) สำหรับเลี้ยงเนื้อเยื่อยาสูบให้มีการเจริญเติบโตเร็วขึ้นและให้ได้ปริมาณแคลลัสในอัตราสูง โดยพบว่า thiamine-HCl ซึ่งเป็นสารประกอบอินทรีย์ มีบทบาทสำคัญต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสได้อย่างรวดเร็ว ส่วน pyridoxine-HCl, nicotinic acid และ glycine ไม่มีบทบาทต่อการชักนำแคลลัสยาสูบ เพราะยาสูบสามารถสังเคราะห์วิตามินต่าง ๆ เหล่านี้ได้เองอย่างเพียงพอ ระดับของ thiamine-HCl ที่แคลลัสต้องการจะอยู่ในช่วง 10-500 ไมโครกรัมต่อลิตร และ myo-inositol 100 มิลลิกรัมต่อลิตร จะชักนำให้เกิดแคลลัสได้มากที่สุด นอกจากนี้ยังพบว่าถ้าต้องการให้เกิดส่วนยอดจะต้องใช้ความเข้มข้นของ kinetin สูง ๆ และความเข้มข้นของ IAA ประมาณ 16 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำให้เกิดรากได้ดีขึ้น

การเลี้ยงเซลล์แขวนลอยของยาสูบเพื่อชักนำให้เกิด somatic embryogenesis พบว่า embryogenesis ของยาสูบจะเกิดได้ง่ายถ้าชักนำโดยวิธีการเลี้ยงอับเกสร (anther culture) โดยใช้ microspore เนื้อเยื่อจะพัฒนาเป็น globular, heart และ torpedo stage เช่นเดียวกับการพัฒนาของ zygotic embryogenesis (Ammirato, 1983)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เมล็ดพืชเทียม (artificial seed)

การค้นคิดวิธีการผลิตเอมบริออยด์จำนวนมากในสภาพปลอดเชื้อ และความพยายามที่จะนำเอมบริออยด์เหล่านี้ออกจากหลอดแก้วมาปลูกในสภาพธรรมชาติ แล้วให้มีอัตราการอยู่รอดสูงสุดและสามารถเจริญเติบโตเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์ได้ในสภาพธรรมชาติภายนอก ทำให้นักวิทยาศาสตร์เกิดแนวความคิดที่จะนำเอมบริออยด์มาบรรจุไว้ในวัสดุที่ห่อหุ้มเอมบริออยด์แทนเปลือกหุ้มเมล็ด ซึ่งมีลักษณะเป็นแคปซูล (capsule) เมล็ดดังกล่าวมานี้ เรียกว่า "เมล็ดพืชเทียม" (artificial seed) ซึ่งในอนาคตอันใกล้นี้จะมีการผลิตเมล็ดพืชเทียมของพืชที่ไม่สามารถขยายพันธุ์ได้โดยใช้เมล็ด หรืออาจจะผลิตเมล็ดได้แต่สภาพแวดล้อมในการเพาะปลูกไม่เหมาะสม นอกจากนี้ยังช่วยลดต้นทุนการผลิต และลดปัญหาทางด้านด่านกักกันโรคพืช ทำให้การแลกเปลี่ยนพันธุ์พืชเป็นไปได้สะดวกขึ้น (Gray, 1988)

การนำเทคนิคการเลี้ยงเซลล์และเนื้อเยื่อพืชมาใช้ขยายพันธุ์พืชในเชิงการค้านั้น ยังคงจำกัดอยู่เฉพาะในกลุ่มพืชที่มีราคาแพง เช่น กล้วยไม้และไม้ประดับบางชนิด ดังนั้นการศึกษาเพื่อหาแนวทางการลดต้นทุนในการขยายพันธุ์พืชพวกที่มีราคาต่อหน่วยต่ำ โดยการใช้เทคโนโลยีชีวภาพการผลิตเมล็ดพืชเทียมนับว่ามีความจำเป็นเป็นอย่างมาก (ชัยวัฒน์ น่าชม และ มนทกานติ วัชราภัย, 2531; มนทกานติ วัชราภัย, 2531 และ Redenbaugh et al., 1987)

โดยปกติแล้วเมล็ดพืชเทียมมีลักษณะทางสรีรวิทยาและองค์ประกอบทางเคมีแตกต่างกับเมล็ดจริง กล่าวคือเมล็ดพืชเทียมมีรูปร่างกลมและมีเอมบริโออยู่ภายใน ดังแสดงในภาพที่ 1

ภาพที่ 1 โครงสร้างของเมล็ดพืชเทียม

สำหรับอาหารที่ใช้เลี้ยงเอมบริโอภายในเมล็ดพืชเทียมนั้นอาจจะใช้อาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อตามสูตรของ Murashige and Skoog (1962) หรืออาหารสูตรอื่น ๆ ที่เหมาะสมกับการพัฒนาเป็นเอมบริโอของพืชนั้น ๆ ก็ได้ เอนโดสเปิร์มเทียม นี้จะเป็นแหล่งอาหารเลี้ยงต้นอ่อนในเมล็ดพืชเทียมและเป็นแหล่งอาหารของต้นอ่อนที่กำลังงอกด้วย (ชัยวัฒน์ น่าชม และ มนทกานติ วัชราภัย, 2531) บางครั้งในช่วงของการงอกหรือหลังจากเพาะเมล็ดพืชเทียมแล้ว อาจจะใส่สารเร่งการเจริญของพืช เช่น น้ำปุ๋ยสูตรดัดแปลงของ Wagner and Poesch formula (WP) ตาม Bentley (1959) เพื่อช่วยให้เมล็ดพืชเทียมงอกได้ดีขึ้น สำหรับสารที่ใช้หุ้มเมล็ดพืชเทียมนั้นเป็นพวกโซเดียมอัลจีเนท (sodium alginate) เดกซ์แตรน (dextran) วุ้น (agar) อากาโรส (agarose) เจลไลต์ (gelrite) เพคติน (pectin) หรือสารอื่น ๆ แต่จากการศึกษาของ Fujii และคณะ (1987) พบว่าโซเดียม อัลจีเนทมีความเหมาะสมที่สุด ทั้งนี้เพราะโซเดียมอัลจีเนทมีผลกระทบต่อเอมบริออยด์น้อยมาก เมื่อนำมาหุ้มเอมบริออยด์แล้วจะมีคุณสมบัติในการเป็นเจลส่วนการทำเปลือกหุ้มเมล็ดทำโดยการหยดอัลจีเนทลงในสารละลายของเกลือแคลเซียม เช่น แคลเซียมคลอไรด์ หรือไนเตรท ในความเข้มข้นที่เหมาะสม แคลเซียมจะมีปฏิกิริยากับอัลจีเนทได้เป็นแคลเซียมอัลจีเนท ซึ่งมีลักษณะแข็ง ทำหน้าที่แทนเปลือกหุ้มเมล็ด นอกจากนี้ยังพบว่าเปลือกหุ้มเมล็ดพืชเทียมยังมีคุณสมบัติที่ยอมให้น้ำ ความชื้นและอากาศผ่านเข้าออกได้ เพื่อช่วยให้ขบวนการงอกของเมล็ดพืชเทียมเป็นไปตามปกติ และยังช่วยลดความตึงผิวของแคปซูลด้วย ดังนั้นเราจึงสามารถนำเมล็ดพืชเทียมนี้ไปหว่านในแปลงได้โดยตรง หรืออาจจะใช้เครื่องมือในการหว่านเมล็ดช่วยด้วยก็ได้ (Redenbaugh et al., 1986 และ 1987)

จุดสำคัญในการผลิตเมล็ดพืชเทียมได้แก่การชักนำให้เกิดเอมบริออยด์จากการเลี้ยงเนื้อเยื่อ และการคัดเลือกเอมบริออยด์ที่มีระยะพัฒนาการที่ใกล้เคียงกันหรือเหมือนกัน มีขนาดเท่า ๆ กันจำนวนมาก วิธีการที่ทำได้โดยง่ายและสะดวกก็คือการกรองแยกเอมบริออยด์ด้วยตะแกรงที่มีขนาดของรูแตกต่างกัน หรืออาจจะใช้วิธีการคัดแยกกลุ่มของเอมบริออยด์ที่มีระยะพัฒนาเหมือนกันด้วยการปั่นให้ตกตะกอนในสารละลายที่มีความเข้มข้นแตกต่างกันตามลำดับ (Komamine, 1988) แล้วนำเอมบริออยด์มาหุ้มโดยผสมเอมบริออยด์ลงในโซเดียม อัลจีเนท แล้วหยดลงในสารละลายเกลือแคลเซียม เอมบริออยด์จะถูกเคลือบด้วยแคลเซียมอัลจีเนท (calcium alginate) ซึ่งเป็นเจลที่ค่อนข้างแข็ง เมล็ดพืชเทียมที่ได้จะมีลักษณะใส มีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 5-6 มิลลิเมตร ซึ่งภายใน 1 เมล็ดพืชเทียม อาจจะประกอบไปด้วย 1, 2 หรือ 3 เอมบริออยด์ (ชัยวัฒน์ น่าชม และ มนทกานติ วัชราภัย, 2531)

มีพืชหลายชนิดที่ประสบผลสำเร็จในการนำมาผลิตเป็นเมล็ดพืชเทียม เช่น อัลฟัลฟา ผักกาด แครอท คื่นไฉ่ ข้าวโพด ฝ้าย และผักกาดหอม จากการทดสอบความงอกของเมล็ดพืชเทียมของอัลฟัลฟา พบว่าอัตราการงอกในหลอดแก้วมีประมาณ 60-90 เปอร์เซนต์ และ 30-70 เปอร์เซนต์ที่งอกในเรือนกระจก (greenhouse) และในแปลงทดลอง (Redinbaugh et al., 1987)

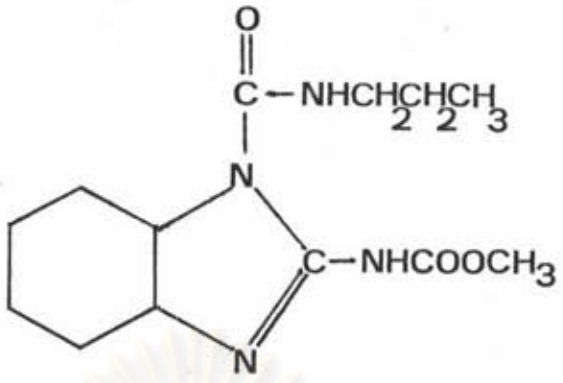
ชัยวัฒน์ น่าชม และ มนทกานติ วัชราภัย (2531) รายงานว่าในการทดสอบความงอกของเมล็ดพืชเทียมแครอท และคื่นไฉ่ ในสภาพปลอดเชื้อ เมล็ดพืชเทียมของพืชทั้ง 2 ชนิดนี้มีการงอกแทบทุกเมล็ด

Fujii และคณะ (1981) แสดงให้เห็นว่าการขยายพันธุ์พืชโดยการผลิตเมล็ดพืชเทียมนั้น ดีกว่าการขยายพันธุ์ด้วยวิธีการติดตา การต่อกิ่ง การตอน หรือการเพาะเมล็ดในเรือนกระจก รวมทั้งดีกว่าการขยายพันธุ์พืชโดยการเลี้ยงเนื้อเยื่อด้วยวิธี micropropagation โดยเฉพาะการผลิตเมล็ดพืชเทียมเป็นการค้าจะประสบผลสำเร็จอย่างมาก ทั้งนี้เพราะว่าการผลิตเมล็ดพืชเทียมมีคุณสมบัติดังนี้

1. ผลิตได้ในปริมาณมาก และผลผลิตที่ได้มีความสม่ำเสมอสูง
2. มักจะรักษาลักษณะทางพันธุกรรมไว้ได้อย่างครบถ้วน
3. สามารถนำไปปลูกขยายพันธุ์ในแปลงได้โดยตรง โดยไม่จำเป็นต้องผ่านการย้ายต้นกล้าไปปลูกอีกครั้งหนึ่ง
4. มีราคาต่อหน่วยต่ำ

ถึงแม้เทคโนโลยีการผลิตเมล็ดพืชเทียมจะประสบผลสำเร็จอย่างสูง แต่ก็เป็นธรรมดาที่ยังคงประสบปัญหาบางประการ โดยเฉพาะการนำเมล็ดพืชเทียมไปปลูกในสภาพธรรมชาติจะมีการปนเปื้อนจากเชื้อจุลินทรีย์ในอัตราสูง นักวิทยาศาสตร์จึงพยายามหาแนวทางการแก้ปัญหานี้โดยการผสมปฏิชีวนสารลงไปเพื่อป้องกันการปนเปื้อนจากเชื้อจุลินทรีย์ในเมล็ดพืชเทียม เพื่อให้การผลิตเมล็ดพืชเทียมมีประสิทธิภาพดีกว่าเมล็ดจริงในธรรมชาติ

โดยทั่วไปการป้องกันการปนเปื้อนของเชื้อราในการเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช นิยมใช้เบนโนมิล (Benomyl) ผสมลงไปในอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช หรือผสมลงในดินเพื่อปลูกพืชก็ได้ เบนโนมิลเป็นยาฆ่าเชื้อราประเภทดูดซึม มีชื่อทางการค้าว่า benlate มีชื่อทางเคมีว่า methyl-1-(butyl carbamoyl)-2-benzimidazole-carbamate มีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อรา จัดอยู่ในพวก benzimidazole มีสูตรโมเลกุล $C_{14}H_{18}N_4O_3$ น้ำหนักโมเลกุล 290.2 ลักษณะทางกายภาพเป็นผลึกสีขาว มีกลิ่นบ้างเล็กน้อย มีความสามารถในการละลายที่ 25 องศาเซลเซียส (Clemons and Sisler, 1969 และ Edgington et al., 1979) มีสูตรโครงสร้างดังนี้



ศิริลักษณ์ เอี่ยมธรรม และ มนทกานติ วัชราภัย (2531) ศึกษาผลของเบนโนมิลต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา 3 ชนิด คือ Fusarium sp. Aspergillus sp. และ Penicillium sp. ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมและไม่เติมเบนโนมิล ได้ผลแตกต่างกันดังนี้ Penicillium sp. ไวต่อสารเบนโนมิลมากที่สุด คือ เบนโนมิลความเข้มข้นเพียง 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ก็สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ ส่วน Fusarium sp. มีความไวต่อเบนโนมิลปานกลาง คือต้องใช้เบนโนมิลความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร จึงสามารถยับยั้งการเจริญได้ สำหรับ Aspergillus sp. มีความต้านทานต่อเบนโนมิลค่อนข้างสูง คือต้องใช้เบนโนมิลความเข้มข้นสูงถึง 80 มิลลิกรัมต่อลิตร จึงจะมีผลต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อราชนิดนี้ได้ ซึ่งความเข้มข้นที่สูงถึง 80 มิลลิกรัมต่อลิตรนั้นจะมีผลต่อการเจริญของเนื้อเยื่อที่เลี้ยงในหลอดแก้ว

Yang (1976) ได้ทดลองเลี้ยงเนื้อเยื่อ Asparagus officinalis Linn. ในอาหารสูตรดัดแปลงจาก Murashige and Skoog (1962) โดยเติมเบนโนมิลความเข้มข้นต่าง ๆ ลงไปในอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อ พบว่าเบนโนมิลจะมีผลต่อการกระตุ้นการพัฒนาของยอดและราก โดยเฉพาะความเข้มข้นของเบนโนมิลปริมาณต่ำ ๆ ประมาณ 10-50 มิลลิกรัมต่อลิตร จะกระตุ้นให้มีการเจริญของยอดที่แข็งแรงจำนวนมากมาย แต่ถ้าใช้ความเข้มข้นของเบนโนมิลในปริมาณที่มากขึ้นประมาณ 100-250 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำให้มีการเจริญเติบโตแบบผิดปกติ คือมียอดที่อวบมากยิ่งขึ้นแต่จะมีผลไปยับยั้งการสร้างรากของหน่อไม้ฝรั่ง

เมื่อนำเนื้อเยื่อส่วนยอดของหน่อไม้ฝรั่งที่เจริญในเบนโนมิลความเข้มข้นต่าง ๆ มาศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยา โดยวิธีตัด section ตามยาวและตามขวาง พบว่าเนื้อเยื่อของยอดที่เลี้ยงในอาหารที่เติมเบนโนมิลกับเนื้อเยื่อของยอดที่เลี้ยงในอาหารควบคุม มีความแตกต่างกันทั้งทางด้านโครงสร้างของเซลล์และจำนวนของเซลล์ โดยที่หน่อไม้ฝรั่งที่เลี้ยงในอาหารควบคุม จะมีเนื้อเยื่อเจริญที่ล้อมรอบชั้น endodermis ไม่ค่อยแบ่งตัวมากนัก เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ของ

ยอดที่เลี้ยงในอาหารที่เติมเบนโนมิลซึ่งพบว่าจะแบ่งตัวมากกว่า และจำนวนเซลล์ในชั้น cortex และ pith ของเซลล์ยอดที่เลี้ยงในอาหารที่เติมเบนโนมิลจะมีจำนวนเพิ่มขึ้น นั่นแสดงว่าการเพิ่มขนาดของยอดที่เกิดจากการใส่เบนโนมิลในอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นผลเนื่องมาจากการขยายขนาดของเซลล์ในชั้น cortex, phloem และ xylem นั่นเอง (Yang, 1976)

Hauptmann และคณะ (1985) ได้ศึกษาผลของเบนโนมิลที่ใช้ในการเลี้ยงเซลล์และโปรโตพลาสต์ พบว่าเบนโนมิลที่มีความเข้มข้น 6.25-50 มิลลิกรัมต่อลิตร ถ้าละลายด้วยการนึ่งอัดความดันหรือการต้ม เบนโนมิลจะถูก hydrolized ไปเป็น MBC (methyl-2-benzimidazole carbamate) ซึ่ง MBC จะมีผลในการยับยั้งการเจริญของ Penicillium ที่ปนเปื้อนมากับเซลล์พืชและโปรโตพลาสต์ แต่จะไม่ยับยั้งการเจริญของเซลล์พืช เช่น Daucus carota และ Nicotiana tabacum

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย

1. ได้ข้อมูลและเทคนิคการผลิตเอมบริออยด์ให้ได้ปริมาณมากและมีขนาดสม่ำเสมอ ตลอดจนข้อมูลเกี่ยวกับสภาพแวดล้อมและปัจจัยต่าง ๆ ที่มีผลต่อการเกิด somatic embryogenesis
2. ได้รู้เทคนิคการผลิตเมล็ดพืชเทียม และสามารถนำเมล็ดพืชเทียมไปใช้ในการขยายพันธุ์พืชแบบ mass propagation ได้
3. ลดต้นทุนการผลิตและการขยายพันธุ์พืชแบบ clonal propagation โดยการผลิตเมล็ดพืชเทียม
4. สามารถนำเทคนิคที่ได้จากงานวิจัยนี้ไปใช้กับการขยายพันธุ์พืชที่ไม่สามารถขยายพันธุ์ด้วยเมล็ดจริงได้ หรือพืชที่มีความผันแปรสูง เนื่องจาก gene recombination หรือพืชที่ให้ผลผลิตต่างกันเมื่อเพศของพืชต่างกัน เช่น มะละกอ และ หน่อไม้ฝรั่ง เป็นต้น

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย