



เมล็ดเทียม: หลักการพื้นฐาน และการประยุกต์ใช้ Synthetic Seeds: Basic Principles and Applications

ปิยะพร แสงสุข¹

บทคัดย่อ

เทคโนโลยีการหุ้มเมล็ดเทียมเป็นงานวิจัยด้านเทคโนโลยีชีวภาพที่น่าสนใจและมีการศึกษาอย่างกว้างขวาง เนื่องจากมีการนำเมล็ดเทียมมาใช้ในการอนุรักษ์และการขนย้ายเนื้อเยื่อพืชที่มีความสำคัญเชิงพาณิชย์และมีความสำคัญทางเศรษฐกิจ การผลิตเมล็ดเทียมทำได้โดยการหุ้มโซมาติกเอ็มบริโอ (somatic embryo) ตายอดตาข้าง โปรโตคอร์มหรือเนื้อเยื่อเจริญส่วนอื่น ๆ ด้วยเอนโดสเปิร์มเทียมและเปลือกหุ้มเมล็ดเทียมเพื่อให้เกิดเป็นพืชต้นใหม่ทำให้ลดค่าใช้จ่ายที่เกิดจากการผลิตต้นพืชในเชิงการค้าหรือลดค่าขนส่ง ในปัจจุบันได้นำพืชลูกผสม (hybrid plant) พืชดัดแปลงพันธุกรรม (transgenic plant) พืชใกล้สูญพันธุ์ พืชเศรษฐกิจ พืชหายาก วัชพืช ไม้ผลและพืชสมุนไพรมาทำเมล็ดเทียม ดังนั้นในบทความนี้ได้เสนอหลักการพื้นฐาน และการประยุกต์ใช้เมล็ดเทียมด้วย

ABSTRACT

Encapsulation technology is interesting research in biotechnology and widely studies due to synthetic seeds were use in conservation and delivery of tissue cultured plants in commercial and economic importance. Synthetic seeds were produced by encapsulating somatic embryos, shoot buds, axillary buds, protocorms or any other meristematic tissue with artificial endosperm and artificial seed coat to produce a new plant for reduce cost or delivery. Recently, hybrid plants, transgenic plants, endanger plants, economic plants, rare plants, cereals, fruits and medicinal plants were used for synthetic seeds. Therefore, this review provides both basic principles and applications of synthetic seeds.

คำสำคัญ: เมล็ดเทียม การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช โซมาติกเอ็มบริโอ

Keywords: Synthetic seeds, Plant tissue culture, Somatic embryo

¹ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม อ.กันทรวิชัย จ.มหาสารคาม 44150

E-mail: pcornukaempferia@yahoo.com

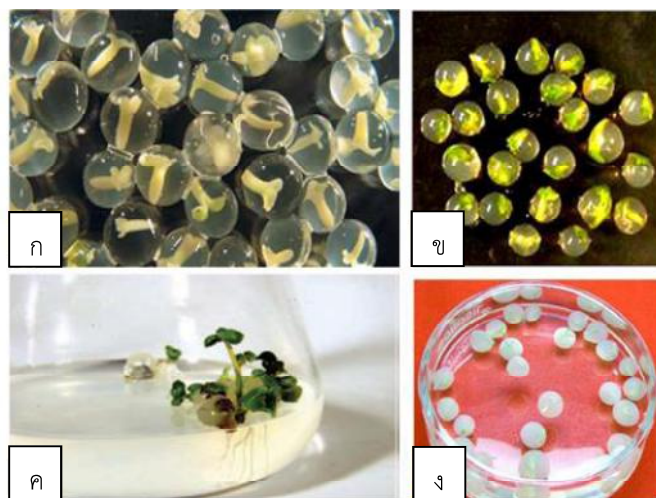
บทนำ

เทคโนโลยีการผลิตเมล็ดเทียมได้ถูกพัฒนาขึ้นจากแนวคิดของ Murashige เมื่อปี ค.ศ. 1977 เนื่องจากปัญหาในการขยายพันธุ์พืชบางชนิด ได้แก่ เมล็ดมีขนาดเล็ก อาหารในเมล็ดสะสมไม่เพียงพอต่อการงอก พืชบางชนิดเมล็ดมีอัตราการงอกต่ำอาจจะเป็นเนื่องจากมีสิ่งท่อน้ำหรือปกคลุมเมล็ด และพืชบางชนิดไม่มีเมล็ด (Saiprasad, 2001) จากปัญหาดังกล่าวทำให้นักวิทยาศาสตร์ได้พัฒนาเทคโนโลยีการผลิตเมล็ดเทียมขึ้น งานวิจัยชิ้นแรกที่ได้พัฒนาการผลิตเมล็ดเทียมขึ้นโดย Kitto and Janick (1982) นำโซมาติกเอ็มบริโอของแครอทมาหุ้มด้วย Polyoxyethylene glycol ต่อมา Redenbaugh et al. (1984) ได้ประสบความสำเร็จในการผลิตเมล็ดเทียมของอัลฟาลฟา (Alfalfa) โดยนำโซมาติกเอ็มบริโอมาหุ้มด้วย alginate ในช่วงแรก ๆ ของการผลิตเมล็ดเทียมใช้เฉพาะโซมาติกเอ็มบริโอมาผลิตเมล็ดเทียม ต่อมาได้มีการนำปลายยอด (shoot tip) เอ็มบริโอเจนิคแคลลัส (embryogenic callus) ตาข้าง (axillary bud) และเนื้อเยื่อเจริญอื่น ๆ มาใช้ในการผลิตเมล็ดเทียมทั้งนี้เนื่องจากไม่สามารถชักนำให้เกิดโซมาติก

เอ็มบริโอได้ในพืชบางชนิดหรือบางครั้งได้โซมาติกเอ็มบริโอที่ไม่เหมือนกัน ทำให้ต่อมามีนักวิจัยหลายกลุ่มได้พยายามสังเคราะห์เมล็ดเทียมขึ้นในพืชหลาย ๆ ชนิดทั้งธัญพืช ไม้ผล ผัก ไม้ประดับ พืชสมุนไพร และกล้วยไม้ เป็นต้น

1. เมล็ดเทียม คืออะไร

ถ้าเอ่ยถึงเมล็ดเทียมหลายคนอาจจะเคยได้ยินมาบ้าง คำว่า “เมล็ดเทียม” (artificial seeds, synseeds หรือ synthetic seeds) คือเมล็ดที่ไม่ใช่เมล็ดพืชจริง ๆ เป็นเมล็ดพืชที่ไม่ได้เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติแต่เกิดขึ้นมาจากกระบวนการทางวิทยาศาสตร์โดยการนำเอาชิ้นส่วนของพืช (explants) ได้แก่ โซมาติกเอ็มบริโอ ปลายยอด ตา ขั้วและโปรโตคอร์ม (protocorm) มาเคลือบด้วยสารที่มีลักษณะคล้ายเจล เช่น alginate เพื่อสร้างแคปซูลขึ้นมาห่อหุ้มล้อมรอบชิ้นส่วนพืชได้เองภายใต้สภาวะอุณหภูมิห้องและเติมสารที่เป็นแหล่งของอาหารเคลือบก่อนที่จะนำไปเคลือบเพิ่มอีกหนึ่งชั้นด้วยเปลือกหุ้มเมล็ดเทียม (artificial seed coat) แล้วทำให้เมล็ดเทียมงอกเป็นต้น (รูปที่ 1) (Harikrishna and Ong, 2002)



รูปที่ 1 ชิ้นส่วนต่าง ๆ ของพืชที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแล้วนำมาทำเมล็ดเทียม

ก. โขมาติกเอ็มบริโอระยะทอริปีโดของ *Eleutherococcus senticosus* ที่เคลือบด้วย Sodium alginate (ที่มา: Jung et al., 2004)

ข. ปลายยอดของฝรั่ง (*Psidium guajava* L.) ที่เคลือบด้วย Calcium alginate หลังจากเพาะเลี้ยง 1-2 สัปดาห์ (ที่มา: Rai et al., 2008)

ค. ตาข้างของ *Rhodiola Kirilowii* ที่นำมาทำเมล็ดเทียม (ที่มา: Zych et al., 2005)

ง. โปรโตคอร์มของกล้วยไม้ *Flickingeria nodosa* (Dalz.) Seidenf ที่เคลือบด้วย Sodium alginate (ที่มา: Nagananda et al., 2011)

2. หลักเกณฑ์ในการคัดเลือกพืชเพื่อผลิตเมล็ดเทียม

1) เป็นพืชที่มีความสามารถในการเกิดอวัยวะ (organogenesis) หรือโคมาทิกเอ็มบริโอ (somatic embryogenesis) ได้ดี จำนวนมากและปริมาณสูงเมื่อนำมาเพาะเลี้ยงในหลอดทดลอง

2) เป็นพืชที่มีความต้องการทางการค้าสูง เช่น เมล็ดจริงมีราคาสูงทั้งนี้อาจเนื่องมาจากปัญหาจากการผสมพันธุ์ความไม่เสถียรของยีน หรือต้นทุนในการผลิตสูง (Redenbaugh et al., 1987)

3) เป็นพืชหายาก พืชใกล้สูญพันธุ์ พืชสมุนไพร หรือพืชเศรษฐกิจ

3. ชนิดของเมล็ดเทียม มี 2 ชนิดดังนี้

1) Hydrated synthetic seeds คือเมล็ดเทียมที่ประกอบด้วยไฮโดรเจล (hydrogel) หุ้มเมล็ดเทียม (ตารางที่ 1) สารที่เป็นไฮโดรเจล เช่น sodium alginate, potassium alginate, carrageenan, sodium alginate และ gelatin, carboxymethyl cellulose หรือ sodium pectate (Redenbaugh et al., 1984; Rai et al., 2009) แต่อย่างไรก็ตามสารพวก alginate เป็นสารที่นิยมนำมาหุ้มเมล็ดเทียมมากที่สุด

2) Desiccated synthetic seeds คือเมล็ดเทียมแห้ง โดยการให้น้ำระเหยออกไป พืชที่นำมาทำเมล็ดเทียมโดยวิธีนี้เมล็ดมีการพักตัวและเมล็ดต้องมีความทนทานสูง (Kitto and Janik, 1985)

ตารางที่ 1 ชนิดของสารที่นิยมนำมาทำไฮโดรเจลหุ้มเมล็ดเทียม (ที่มา: Krishnapilly, 2002)

ชนิดของสารที่เป็นไฮโดรเจล	ความเข้มข้น (w/v)
Sodium alginate	0.5-5.0
Potassium alginate	0.5-5.0
Sodium alginate and gelatin	2.0-5.0
Carrageenan and locust	0.2-0.8
Bean gum	0.4-1.0
Carrageenan	3.0
Agar	0.5
Gelrite	0.25
Guar gum	2.0

ตารางที่ 1 ชนิดของสารที่นิยมนำมาทำไฮโดรเจลหุ้มเมล็ดเทียม (ที่มา: Krishnapilly, 2002) (ต่อ)

ชนิดของสารที่เป็นไฮโดรเจล	ความเข้มข้น (w/v)
Tragacanth gum	2.5
Sodium pectate	2.0
Carboxymethyl cellulose	2.5

4. ความแตกต่างระหว่างเมล็ดเทียมและเมล็ดจริง

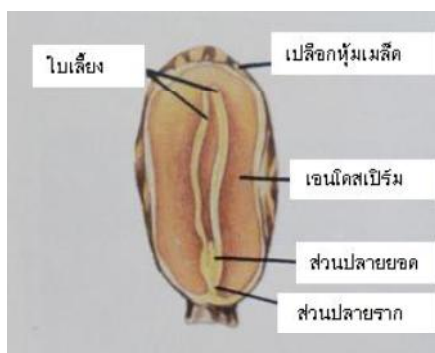
เมล็ดจริง (true seeds) คือออวุล (ovule) ที่เจริญพัฒนาขึ้นมาหลังจากการปฏิสนธิ (fertilization) ภายในประกอบด้วยเอ็มบริโอตามปกติจะมีเพียง 1 เอ็มบริโอ ภายในเมล็ด 1 เมล็ด มีเนื้อเยื่อที่ทำหน้าที่เก็บสะสมอาหารเรียก เอนโดสเปิร์ม (endosperm) ซึ่งใช้ในการเจริญเติบโตระยะแรกของเอ็มบริโอไปเป็นต้นกล้าทั้งเอ็มบริโอและเอนโดสเปิร์ม อยู่ภายในเปลือกเมล็ด (ชุมพล, 2551)

โครงสร้างของเมล็ดจริง ประกอบด้วยส่วนสำคัญ 2 ส่วน ได้แก่

1. เอ็มบริโอ เกิดจากการปฏิสนธิระหว่างเซลล์ไข่และเซลล์สเปิร์มได้เป็นไซโกต (zygote) จากนั้นไซโกตจะเกิดการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสจาก 1

เซลล์ ได้เป็น 2 เซลล์ เซลล์ที่อยู่ด้านบนจะแบ่งตัวได้เป็นเอ็มบริโอระยะต่าง ๆ เริ่มจากระยะที่เป็นก้อนกลม (globular) ระยะรูปหัวใจ (heart) ระยะทอร์ปิโด (torpedo) และระยะที่เอ็มบริโอเจริญเต็มที่ ส่วนอีก 1 เซลล์ที่อยู่ด้านล่างของไซโกตจะเจริญเป็น suspensor เพื่อนำอาหารจากเอนโดสเปิร์มมาให้เอ็มบริโอ เอนโดสเปิร์มเกิดจากเซลล์สเปิร์มอีก 1 ตัว ผสมกับเซลล์แม่ของเอนโดสเปิร์ม (endosperm mother cell) อีกตัวหนึ่ง มีหน้าที่เก็บสะสมอาหารไว้ในเมล็ด อาหารที่สะสมเป็นพวกคาร์โบไฮเดรต โปรตีน ไขมัน และอื่น ๆ

2. เปลือกหุ้มเมล็ด เป็นส่วนที่อยู่นอกสุดของเมล็ด เจริญมาจากผนังออวุล (integument) ทำหน้าที่ป้องกันอันตรายให้กับเนื้อเยื่อที่อยู่ภายในเมล็ดและป้องกันการคายน้ำ (รูปที่ 2)



รูปที่ 2 โครงสร้างเมล็ดจริง (ที่มา: ดัดแปลงจาก Moore et al., 1995)

โครงสร้างเมล็ดเทียม ประกอบด้วยส่วนประกอบสำคัญ 4 ส่วนได้แก่

1. ชิ้นส่วนพืชเดี่ยว ๆ (single explants) เป็นชิ้นส่วนพืชที่ถูกนำมาเคลือบด้วยแคปซูล และเป็น

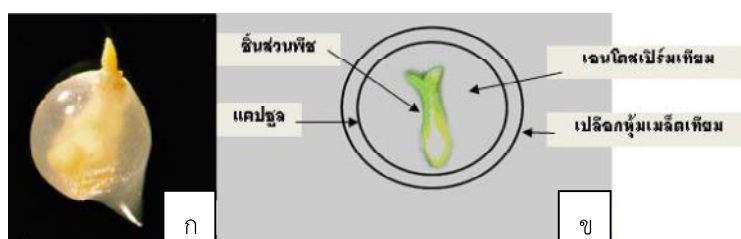
ส่วนเดียวในเมล็ดเทียมที่ยังมีชีวิตอยู่ ขึ้นส่วนพืชที่นิยมนำมาทำเมล็ดเทียมได้แก่โซมาติกเอ็มบริโอ โดยจะใช้เพียง 1 ขึ้นส่วนในการสร้างเมล็ดเทียม 1 เมล็ด ทำหน้าที่เหมือนไซโกติกเอ็มบริโอที่อยู่ในเมล็ดจริง เมื่อนำเมล็ดเทียมไปปลูกขึ้นส่วนพืชจะงอกเป็นยอดและราก โผล่ออกมาจากแคปซูลเจริญเป็นต้นพืชต่อไป

โซมาติกเอ็มบริโอ คือ เอ็มบริโอที่เกิดมาจากเซลล์โซมาติก (somatic cell) ของต้นพืช เช่น จากใบเลี้ยง ขั้ว ปล้อง ลำต้น และราก เมื่อนำอวัยวะต่าง ๆ เหล่านี้มาเพาะเลี้ยงในหลอดทดลองแล้วเกิดเป็นเอ็มบริโอที่อยู่ในหลอดทดลองจึงเรียกว่า โซมาติกเอ็มบริโอ เพื่อให้แตกต่างจากเอ็มบริโอที่เกิดในสภาพธรรมชาติซึ่งเกิดจากการปฏิสนธิระหว่างเซลล์ไข่และเซลล์สเปิร์ม การเจริญของโซมาติกเอ็มบริโอมีระยะพัฒนาการเริ่มจากระยะรูปร่างกลม ระยะรูปหัวใจ ระยะทอริโด และระยะที่เอ็มบริโอเจริญเต็มที่ แต่ระยะที่เหมาะสมในการนำมาทำเมล็ดเทียมคือ ระยะทอริโด

2. แคปซูล (capsule) คือส่วนที่จะนำมาห่อหุ้มขึ้นส่วนพืชเอาไว้ เป็นส่วนที่ทำให้เกิดโครงรูปของเมล็ดเทียม โดยทำให้เกิดเป็นรูปร่างกลมหรือค่อนข้างกลม โดยใช้สารที่มีความเหมาะสมเช่น alginate มาเคลือบ หน้าที่ของแคปซูลคือป้องกันอันตรายให้กับขึ้นส่วนพืช

3. เอนโดสเปิร์มเทียม (artificial endosperm) ทำหน้าที่ให้อาหารแก่ขึ้นส่วนพืชเพื่อใช้ในการเจริญเติบโต จึงเปรียบได้กับเอนโดสเปิร์มของเมล็ดจริง ส่วนใหญ่เอนโดสเปิร์มเทียมเป็นธาตุอาหารหลัก ธาตุอาหารรอง น้ำตาล วิตามิน กรดอะมิโน และสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เติมลงไปในสารที่มีลักษณะคล้ายเจลก่อนจะนำไปเคลือบขึ้นส่วนพืชเดียว ๆ

4. เปลือกหุ้มเมล็ดเทียม (artificial seed coat) ทำหน้าที่ป้องกันอันตรายให้กับขึ้นส่วนพืช ทำหน้าที่คล้ายกับเปลือกหุ้มเมล็ดจริง นอกจากนี้ยังทำหน้าที่เป็นทางผ่านของน้ำ อาหาร และอากาศ (รูปที่ 3)



รูปที่ 3 เมล็ดเทียม

ก. ลักษณะของเมล็ดเทียมขิง (*Zingiber officinale* Rosc.) (ที่มา: Sundararaj et al., 2010)

ข. ภาพจำลองเมล็ดเทียม

5. คุณสมบัติของเมล็ดเทียม

5.1 คุณสมบัติของขึ้นส่วนพืชที่เหมาะสมในการทำเมล็ดเทียม

1) เป็นขึ้นส่วนพืชที่ยังคงมีชีวิตอยู่ มีความสมบูรณ์และแข็งแรงของเนื้อเยื่อ

2) มีอายุที่เหมาะสม ไม่อ่อนหรือแก่จนเกินไป เพราะถ้าขึ้นส่วนพืชมีอายุน้อยเกินไปทำให้ไม่สามารถเจริญเป็นต้นพืชใหม่ เพราะยังสร้างอวัยวะต่าง ๆ ที่เป็นส่วนประกอบของต้นพืชไม่ครบถ้วน แต่ถ้าเป็นขึ้นส่วนพืชที่อายุมากจะได้ต้นพืชที่คุณภาพไม่ดี เนื่องจากการสร้างอวัยวะต่าง ๆ ครบถ้วนแล้ว

สำหรับระยะที่เหมาะสมของโซมาติกเอ็มบริโอในการนำมาทำเป็นเมล็ดเทียมคือ ระยะทอริบโด เนื่องจากเป็นระยะที่ยังไม่เติบโตเต็มที่ นอกจากนี้ยังเป็นระยะที่เริ่มมีการเจริญเป็นยอดและราก (Sorvari et al., 1997)

3) มีขนาดที่เหมาะสม คือขนาดไม่เล็กหรือใหญ่เกินไป เพราะถ้าชิ้นส่วนพืชมีขนาดเล็กเกินไป อาจทำให้เกิดการสูญเสียตัวอย่างรวดเร็วและแห้งตายเมื่อนำไปเคลือบด้วยแคปซูล แต่ถ้าชิ้นส่วนพืชมีขนาดใหญ่เกินไป อาหารในเมล็ดเทียมอาจไม่เพียงพอสำหรับการเจริญของเมล็ดเทียม เช่น Rai et al. (2008) ใช้ปลายยอดของฝรั่ง (*Psidium guajava*) ขนาด 3-5 มม. ในการทำเมล็ดเทียม Naik and Chand (2006) ใช้ข้อของ *Punica granatum* ขนาด 3-6 มม. ในการทำเมล็ดเทียม

5.2 คุณสมบัติของแคปซูล

1) ป้องกันอันตรายให้กับชิ้นส่วนพืชที่อยู่ภายในแคปซูล

2) ให้ออกซิเจนผ่านเข้าไปภายในแคปซูลเพื่อให้ชิ้นส่วนพืชได้รับออกซิเจนมากพอสำหรับการหายใจ

3) มีความแข็งแรง ทนทาน แต่ขณะเดียวกันต้องมีความอ่อนนุ่มพอที่จะให้ยอดและรากงอกออกมาจากเมล็ดเทียมได้

4) ต้องไม่เป็นพิษต่อชิ้นส่วนพืช

5) ป้องกันไม่ให้ชิ้นส่วนพืชเกิดการสูญเสียน้ำมากจนกระทั่งเหี่ยวหรือทำให้สูญเสียความมีชีวิตสามารถบรรจุธาตุอาหารต่าง ๆ สารควบคุมการเจริญเติบโตพืช เก็บไว้ในแคปซูล โดยไม่ทำให้สารต่าง ๆ ออกมาภายนอกแคปซูล

6) สามารถส่งเสริมให้ชิ้นส่วนพืชเกิดการงอกและการเจริญเติบโตเป็นต้นพืชได้จำนวนมาก

7) ทำให้สามารถเก็บรักษาเมล็ดเทียมได้ระยะเวลายาวนานในสภาพที่มีชีวิต

8) สารที่ใช้ในการสร้างแคปซูลควรเป็นสารที่มีความเสถียร ไม่ทำปฏิกิริยากับสารต่าง ๆ ที่เติมลงไป

9) เป็นสารที่สามารถสร้างแคปซูลให้เกิดขึ้นได้เองโดยไม่ต้องใช้แม่พิมพ์ในการเกิดเป็นรูปร่างของแคปซูล

10) ในการสร้างแคปซูลไม่ต้องอาศัยความร้อนในขั้นตอนของวิธีการเคลือบ เพราะความร้อนจะทำให้เกิดความเสียหายแก่ชิ้นส่วนพืชได้

5.3 คุณสมบัติของเอนโดสเปิร์มเทียม

เนื่องจากเอนโดสเปิร์มเทียมเป็นอาหารสำหรับเลี้ยงเมล็ดเทียม ดังนั้นส่วนประกอบของเอนโดสเปิร์มเทียมคืออาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อนั่นเองเพียงแต่ไม่มีการเติมวุ้นลงไปในการอาหารดังกล่าวประกอบด้วยสารต่าง ๆ ดังนี้

1) สารอนินทรีย์ (inorganic nutrients) แบ่งเป็น 2 ประเภทคือ

1.1) ธาตุอาหารหลัก (macro nutrients) คือ ธาตุอาหารที่พืชมีความต้องการปริมาณมาก ได้แก่ C, H, O, N, P, K, Ca, Mg และ S

1.2) ธาตุอาหารรอง (micro nutrients) คือ ธาตุอาหารที่พืชมีความต้องการปริมาณน้อย ได้แก่ Fe, Mn, Zn, Cu, Mo, Cl และ B

2) สารอินทรีย์ (organic nutrients) แบ่งได้เป็น

2.1) แหล่งคาร์บอน คือสารที่เป็นแหล่งคาร์โบไฮเดรต ได้แก่ น้ำตาลชนิดต่าง ๆ เช่น น้ำตาลซูโครส กลูโคส ฟรุคโตส เป็นต้น

2.2) วิตามิน ได้แก่ thiamine HCl (vitamin B1), nicotinic acid (vitamin B3) และ pyridoxine HCl (vitamin B6)

2.3) กรดอะมิโน เช่น ไกลซีน และกลูตามีน

3) ฮอร์โมนพืชหรือสารควบคุมการเจริญเติบโตพืช

เป็นสารที่สร้างขึ้นที่ส่วนหนึ่งส่วนใดในพืชหรือสารที่มนุษย์สังเคราะห์ขึ้นใช้ในห้วงปฏิบัติการแล้วมีผลต่อการควบคุมการเจริญเติบโตพืช ปริมาณที่ทำให้มีการตอบสนองต่อพืชมักมีปริมาณน้อยหรือต่ำ เช่น ฮอร์โมนในกลุ่มออกซิน ได้แก่ 3-indoleacetic acid (IAA), 3-indolebutyric acid (IBA), naphthalene acetic acid (NAA), naphthoxy acetic acid (NOA), p-CPA (para-chlorophenoxy acetic acid), 2,4-dichlorophenoxy acetic acid (2,4-D), 2,4,5-trichlorophenoxy acetic acid (2,4,5-T) ฮอร์โมนในกลุ่มไซโทไคนิน ได้แก่ BA (benzyladenine) หรือ benzyl aminopurine (BAP), kinetin (6-furfurylamino purine), zeatin, 2iP (N6-isopentenyl adenine), TBA (tetrahydropyranyl benzyladenine), thidiazuron (N, phenyl-N'-1,2,3 thidiazole-5-yl urea; TDZ) ฮอร์โมนในกลุ่มจิบเบอเรลลิน ได้แก่ GA₃ (gibberellic acid)

4) อาหารเสริม (growth supplement) ได้แก่ น้ำมะพร้าว สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract) สารสกัดจากมอลท์ (malt extract) น้ำมะเขือเทศ ดังนั้นคุณสมบัติของเอนโดสเปิร์มเทียมจึงแตกต่างกันไปโดยขึ้นอยู่กับสูตรอาหารและความเข้มข้นในอาหาร

5.4 คุณสมบัติของเปลือกหุ้มเมล็ดเทียม

1) สามารถป้องกันอันตรายให้แก่เมล็ดเทียมโดยเพิ่มความแข็งแรงให้กับแคปซูล

2) สามารถให้อากาศผ่านเปลือกหุ้มเมล็ดเทียมเข้าไปในแคปซูลเพื่อให้ชั้นส่วนพืชหายใจได้

3) สามารถป้องกันการคายน้ำของชั้นส่วนพืช

4) สามารถป้องกันการสูญเสียของธาตุอาหารที่เกิดจากการแพร่ออกไปทางผิวของแคปซูล

5) ยอมให้ชั้นส่วนพืชงอกออกมาจากเมล็ดเทียมเป็นยอดและรากได้เมื่อนำไปปลูก

6) ไม่เป็นพิษต่อชั้นส่วนพืช

7) ทำให้เกิดความสะดวกในการใช้งานขนส่งหรือการปลูก

8) ป้องกันไม่ให้เกิดความเหนียวเป็นกาวที่ผิวของแคปซูล

9) ทำให้สามารถเก็บรักษาเมล็ดเทียมได้เป็นระยะเวลายาวนาน โดยที่ชั้นส่วนพืชยังคงรักษาความมีชีวิตไว้ได้

10) สารที่ใช้เคลือบเป็นเปลือกหุ้มเมล็ดเทียมต้องมีความเสถียรโดยไม่ทำปฏิกิริยาทางเคมีกับสารชนิดต่าง ๆ

6. หลักการพื้นฐานในการสร้างเมล็ดเทียม

1. การคัดเลือกพืช โดยคัดเลือกพืชที่มีลักษณะตามที่ต้องการ ได้แก่ พืชลูกผสมหรือพืชดัดแปลงพันธุกรรม

2. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ โดยการนำชั้นส่วนพืชมาเพาะเลี้ยงเพื่อชักนำให้เกิดไซมาติกเอ็มบริโอหรือเนื้อเยื่อเจริญอื่น ๆ

3. การคัดเลือกชั้นส่วนพืช โดยการคัดเลือกไซมาติกเอ็มบริโอหรือเนื้อเยื่อเจริญอื่น ๆ ที่เหมาะสมที่ยังมีชีวิตอยู่ ขนาดเท่า ๆ กัน มีความสมบูรณ์และแข็งแรง

4. การแยกชั้นส่วนพืชให้เป็นชิ้นเดี่ยว ๆ โดยการนำชั้นส่วนพืชที่คัดเลือกแล้วมาทำการแยกให้เป็นชิ้นเดี่ยว ๆ

5. การเคลื่อนชิ้นส่วนพืชด้วยแคปซูล โดย
การนำชิ้นส่วนพืชเดี่ยว ๆ มาเคลือบด้วยไฮโดรเจล

6. การเคลื่อนชิ้นส่วนพืชด้วยเอนโดสเปิร์ม
เทียม โดยนำแคปซูลมาเคลือบด้วยสารที่เป็นแหล่งของ
อาหารเพื่อเลี้ยงชิ้นส่วนพืช

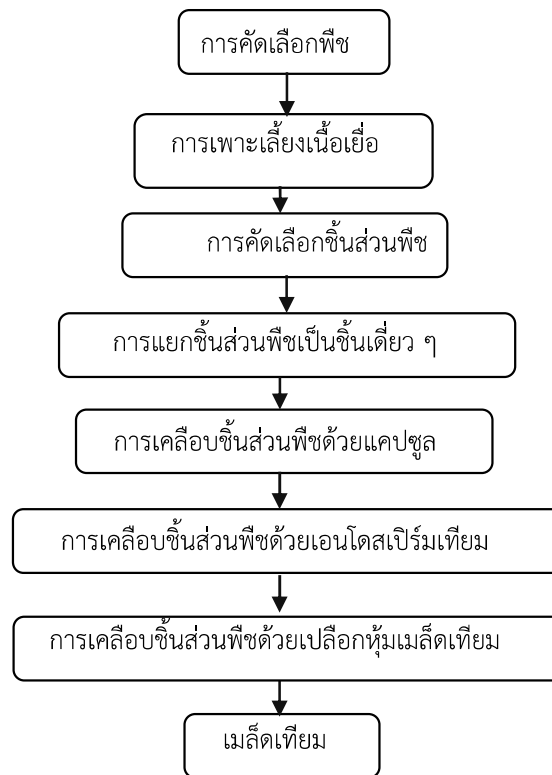
7. การเคลื่อนชิ้นส่วนพืชด้วยเปลือกหุ้มเมล็ด
เทียม โดยนำแคปซูลมาเคลือบเพิ่มอีกหนึ่งชั้นด้วยสาร
ที่ช่วยป้องกันความเหนียวที่ผิวนอกและป้องกันการ
แห้งของแคปซูลเมื่อสัมผัสกับอากาศ (รูปที่ 4)

จากข้อมูลดังกล่าวข้างต้นนำมาเขียนเป็น
แผนภาพขบวนการผลิตเมล็ดเทียม (รูปที่ 5)



รูปที่ 4 กระบวนการผลิตเมล็ดเทียมของ *Simmondsia chinensis* (ที่มา: Kumar et al., 2010)

- ก. การชักนำให้เกิดยอดจำนวนมากจากชิ้นส่วนของข้อ
- ข. ปลายยอดที่นำมาหุ้มด้วย calcium alginate
- ค. ต้นที่งอกจากปลายยอดที่ถูกหุ้มด้วย calcium alginate
- ง. ต้น (s) และราก (r) ที่งอกจากปลายยอดที่ถูกหุ้มด้วย calcium alginate
- จ. การย้ายต้น *S. chinensis* จากเมล็ดเทียมออกปลูก



รูปที่ 5 แผนภาพกระบวนการผลิตเมล็ดเทียม (ที่มา: ดัดแปลงจาก Redenbaugh et al., 1987)

7. การประยุกต์ใช้ประโยชน์จากเมล็ดเทียม

1) ใช้ในการขยายพันธุ์พืชหายาก พืชใกล้สูญพันธุ์ พืชลูกผสมหายาก พืชที่มีจีโนไทป์ที่ดี พืชดัดแปลงพันธุกรรม พืชที่ใช้ในการเพาะปลูก ธัญพืช ไม้ผล พืชสมุนไพร และพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจที่เมล็ดมีราคาแพงและไม่เพียงพอ (Mandal et al., 2000)

2) การผลิตเมล็ดพันธุ์พืชลูกผสม เช่น ผัก ธัญพืช พืชอาหารสัตว์ หรือพืชที่มีความสำคัญทางการค้าหรือพืชที่มีต้นทุนในการผลิตแบบดั้งเดิมสูง การนำเมล็ดพันธุ์มาผลิตเมล็ดเทียมอาจจะเป็นอีกหนึ่งทางเลือกเพื่อลดต้นทุนในการผลิต (Rao et al., 1998)

3) ง่ายในการดูแลรักษาเนื่องจากเมล็ดเทียมมีขนาดเล็กและอยู่ในแคปซูล ทำให้พืชที่ได้มีพันธุกรรมที่

เหมือนเดิมและย้ายปลูกในแปลงหรือเรือนเพาะชำได้โดยตรง (Maruyama et al., 1997)

4) เมล็ดเทียมมีชีวิตอยู่ได้ตลอดทั้งปี ในขณะที่ไม้ยืนต้นส่วนใหญ่เมล็ดมีอายุได้ 1 เดือน (Bapat and Mhatre, 2005)

5) ใช้ในการแลกเปลี่ยนพันธุ์พืช

6) ใช้อนุรักษ์พันธุกรรมพืชที่ปลอดภัยจากเชื้อโรคทั้งในระยะสั้นและระยะยาว การอนุรักษ์พันธุกรรมพืชในระยะสั้นมีจุดมุ่งหมายเพื่อให้เมล็ดมีการเจริญเติบโตช้าลงโดยการดัดแปลงสภาพแวดล้อมหรือสภาวะอาหาร ได้แก่

6.1) ลดอุณหภูมิหรือลดความเข้มข้นแสง

6.2) ใช้สารที่ชะลอการเจริญเติบโต

เช่น abscisic acid (ABA)

6.3) ใช้อาหารที่ทำให้เจริญเติบโตน้อยที่สุด โดยการปรับเปลี่ยนความเข้มข้นของธาตุอาหารหรือน้ำตาลซูโครส

6.4) ใช้สารควบคุมแรงดันออสโมติก เช่น mannitol, sorbitol หรือน้ำตาลซูโครสความเข้มข้นสูง

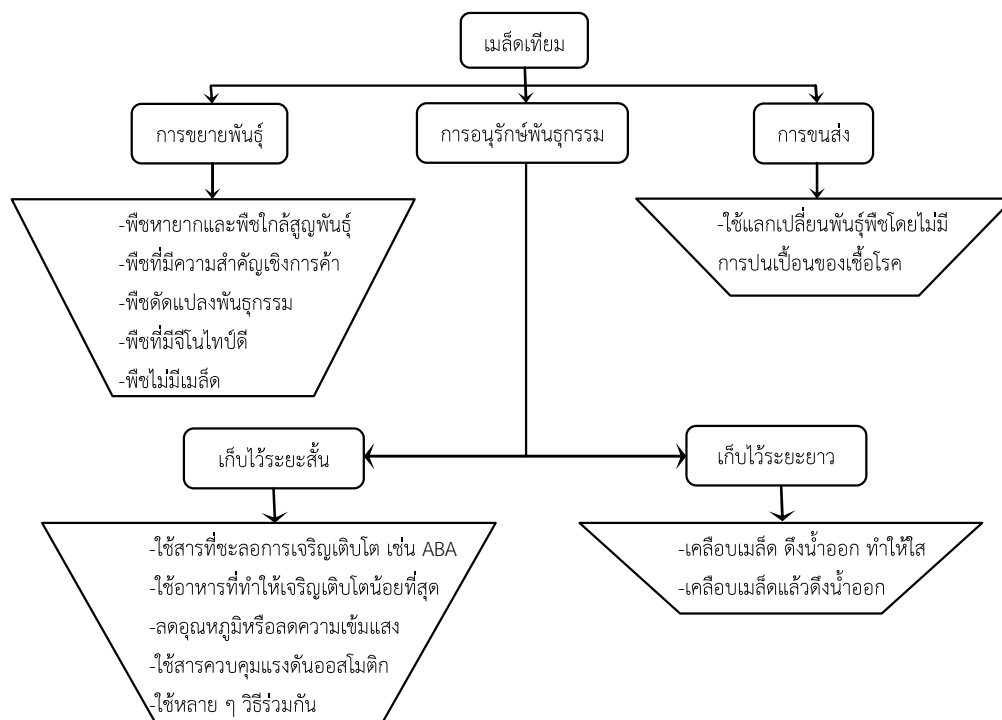
6.5) ใช้หลาย ๆ วิธีร่วมกัน

การเก็บเมล็ดเทียมในระยะยาวทำได้โดยการเก็บเมล็ดที่อุณหภูมิต่ำกว่าปกติ (cryopreservation) โดยใช้ไนโตรเจนเหลวที่อุณหภูมิ -196°C ซึ่งที่อุณหภูมินี้การแบ่งเซลล์และขบวนการเมแทบอลิซึมของเซลล์จะหยุดชั่วคราวและสามารถเก็บเมล็ดไว้ได้นานโดยไม่จำกัดระยะเวลา (Engleman, 1997) ในปัจจุบันการเก็บเมล็ดเทียมที่อุณหภูมิต่ำได้ถูกพัฒนาไปมาก มีวิธีการทำได้ 2 วิธี คือ วิธีการเคลือบและดึงน้ำออก (encapsulation-dehydration) ทำได้โดยการนำชิ้นส่วนพีชมาเคลือบด้วย alginate ทำให้เจริญเติบโต

ในอาหารเหลวที่มีน้ำตาลซูโครส 1-7 วัน ปล่อยให้แห้งในตู้ปลอดเชื้อหรือด้วย silica gel แล้วทำให้แข็งตัวอย่างรวดเร็ว (Engleman, 2003) ซึ่งวิธีการนี้ได้นำมาใช้ในพืชหลายชนิด เช่น แอปเปิ้ล สตรอเบอร์รี่ และมะนาว วิธีที่สองคือวิธีการเคลือบและทำให้ใส (encapsulation-vitrification) เป็นวิธีที่ผสมผสานระหว่างวิธีการเคลือบ-ดึงน้ำออก และทำให้ใส ทำได้โดยการนำชิ้นส่วนพีชมาเคลือบด้วย alginate แล้วนำมาแช่ใน cryoprotective substance ดึงน้ำออกด้วยสารที่ทำให้ใส แล้วทำให้แข็งตัว เช่น มันฝรั่ง และสตรอเบอร์รี่

เมื่อนำข้อมูลที่ได้มาเขียนเป็นรูปภาพแสดงการประยุกต์ใช้ประโยชน์ของเมล็ดเทียมได้ดังรูปที่ 6

จากประโยชน์ของเมล็ดเทียมที่กล่าวมาทำให้ในปัจจุบันมีนักวิจัยได้ผลิตเมล็ดเทียมขึ้นในพืชหลายชนิด (ตารางที่ 2)



รูปที่ 6 แผนภาพการประยุกต์ใช้ประโยชน์จากการผลิตเมล็ดเทียม (ที่มา: Rai et al., 2009)

ตารางที่ 2 รายชื่อพืชที่ผลิตเมล็ดเทียม

ชื่อวิทยาศาสตร์	ชิ้นส่วนพืชที่นำมาทำเมล็ดเทียม	อ้างอิง
<i>Acaceae</i> sp.	ตายอด ตาข้าง	Nor Asmah et al. (2011)
<i>Actinidia deliciosa</i> (Kiwifruit)	ตายอด	Piccioni and Standardi (1995)
<i>Arachis hypogaea</i> (Groundnut)	โสมาดิกเอ็มบริโอ	Padmaja et al. (1995)
<i>Asparagus cooperi</i>	โสมาดิกเอ็มบริโอ	Ghosh and Sen (1994)
<i>Betula pendula</i> (Birch)	ตายอด	Piccioni and Standardi (1995)
<i>Brassica campestris</i> (Mustard)	ตายอด	Arya et al. (1998)
<i>Camellia japonica</i> L.	โสมาดิกเอ็มบริโอ	Janeiro et al. (1997)
<i>Crataegus oxyacantha</i> (Hawthorn)	ตายอด	Piccioni and Standardi (1995)
<i>Cymbidium giganteum</i> (Orchid)	โปรโตคอร์ม	Corrie and Tandon (1993)
<i>Daucus carota</i> (Carrot)	โสมาดิกเอ็มบริโอ	Kitto and Janick (1985)
<i>Dendrobium wardianum</i> (Orchid)	โปรโตคอร์ม	Sharma et al. (1992)
<i>Eleusine coracana</i> Gaertn. (Finger millet)	โสมาดิกเอ็มบริโอ	George and Eapen (1995)
<i>Eucalyptus citriodora</i> (Eucalyptus)	โสมาดิกเอ็มบริโอ	Muralidharan and Mascarenhas (1995)
<i>Geodorum densiflorum</i> (Lam) Schltr. (Orchid)	โปรโตคอร์ม	Datta et al. (1999)
<i>Malus pumila</i> Mill. (Apple rootstock M.26)	ตายอด	Piccioni (1997)
<i>Mangifera indica</i> L. (Mango cv. Amrapali)	โสมาดิกเอ็มบริโอ	Ara et al. (2000)
<i>Medicago sativa</i> (Alfalfa)	โสมาดิกเอ็มบริโอ	Redenbaugh et al. (1984)
<i>Musa</i> (Banana cv. Basrai)	ตายอด	Ganapathi et al. (1992)
<i>Pelargonium domesticum</i> (Regal geranium)	โสมาดิกเอ็มบริโอ	Marsolais et al. (1991)
<i>Phaius tankervilleae</i> (Orchid)	โปรโตคอร์ม	Malemngaba et al. (1996)
<i>Picea abies</i> (Norway spruce)	โสมาดิกเอ็มบริโอ	Gupta et al. (1987)
<i>Picea glauca</i> (White spruce)	โสมาดิกเอ็มบริโอ	Attree et al. (1994)
<i>Pinus taeda</i>	โสมาดิกเอ็มบริโอ	Gupta et al. (1987)
<i>Pistacia vera</i> L. (Pistachio)	โสมาดิกเอ็มบริโอ	Onay et al. (1996)
<i>Psidium guajava</i> (Guava)	ปลายยอด	Rai et al. (2008)
<i>Rubus idaeus</i> L. (Raspberry)	ตายอด	Piccioni and Standardi (1995)
<i>Santalum album</i> (Sandalwood)	โสมาดิกเอ็มบริโอ	Bapat and Rao (1992)
<i>Solanum melongena</i> (Eggplant)	โสมาดิกเอ็มบริโอ	Lakshmana Rao and Singh (1991)
<i>Spathoglottis plicata</i> (Orchid)	โปรโตคอร์ม	Singh (1991)
<i>Vitis vinifera</i> (Grape)	โสมาดิกเอ็มบริโอ	Gray and Purohit (1991)
<i>Zingiber officinale</i> Rosc. (Ginger)	ตายอด	Sharma et al. (1994)

8. ข้อจำกัดของเมล็ดเทียม

ถึงแม้ว่าจะมีนักวิจัยหลายท่านที่สามารถขยายพันธุ์พืชโดยใช้เทคโนโลยีการผลิตเมล็ดเทียม แต่เทคนิคทางด้านนี้ยังมีข้อจำกัดดังนี้

1) การทำให้เมล็ดเทียมงอกเป็นต้นใหม่ในพืช

บางชนิดทำได้ยาก

2) พัฒนาการของโสมาดิกเอ็มบริโอมีความ

ผิดปกติเมื่อนำมาหุ้มเมล็ดเทียม

3) ความไม่สมบูรณ์ของโซมาติกเอ็มบริโอทำให้มีปัญหาในการงอกและการเจริญเป็นต้นอ่อน

4) อัตราในการเปลี่ยนโซมาติกเอ็มบริโอหรือชิ้นส่วนพืชอื่น ๆ ที่นำมาทำเมล็ดเทียมเป็นต้นอ่อนมีข้อจำกัดเนื่องจากคุณภาพของเมล็ดเทียม (Ara et al., 2000)

บทสรุป

ถึงแม้ว่าเทคโนโลยีการผลิตเมล็ดเทียมจะมีศักยภาพในการเก็บรักษาพันธุกรรมพืชและการขนย้ายพืชในหลอดทดลองได้ แต่อย่างไรก็ตามในอนาคตควรจะหาเทคโนโลยีที่เหมาะสมที่สามารถนำเมล็ดเทียมไปประยุกต์ใช้ในระดับอุตสาหกรรมเพื่อเพิ่มมูลค่าได้ ซึ่งในความเป็นจริงการย้ายเมล็ดเทียมลงปลูกในดินยังมีข้อจำกัด เนื่องจากเมล็ดเทียมเกิดการแห้งเมื่อย้ายปลูกในสภาพแวดล้อมตามธรรมชาติ ดังนั้นการหุ้มเมล็ดเทียมด้วยสารที่มีความสามารถในการเก็บรักษาความชื้นในเมล็ดได้เป็นเวลานานน่าจะเป็นวิธีที่จะป้องกันและเปลี่ยนหน่ออ่อนที่อยู่ในหลอดทดลองให้เป็นต้นอ่อน ดังนั้นการศึกษาการผลิตเมล็ดเทียมอย่างครบวงจร เริ่มจากการคัดเลือกชิ้นส่วนพืชที่เหมาะสม การหุ้มเมล็ดเทียม การทำให้เมล็ดเทียมงอกเป็นต้น และการทำให้เมล็ดเทียมย้ายออกปลูกแล้วมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตที่สูงมากขึ้นจะส่งเสริมให้เทคโนโลยีการผลิตเมล็ดเทียมก้าวหน้ามากขึ้น

กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณ รศ.บุญยืน กิจวิจารณ์ ที่ได้ให้ความรู้และประสิทธิภาพวิชาการเฉพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชแก่ผู้เขียน และขอขอบพระคุณผู้ทรงคุณวุฒิที่ได้กรุณาแก้ไข ปรับปรุงบทความวิชาการนี้ให้มีความสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น ขอขอบคุณผู้เขียนบทความวิจัย บทความวิชาการ หนังสือทุกเล่มที่ใช้อ้างอิงในครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

- ชุมพล คุณวาสี. (2551) สันฐานวิทยาเบื้องต้นในการระบุชื่อวงศ์พืชดอกสามัญ. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. หน้า 89.
- Ara, H., Jaiswal, U. and Jaiswal, V.S. (2000). Synthetic seed: Prospects and limitations. *Current Science* 78(12): 1438–1444.
- Arya, K.R., Beg, M.U. and Kukreja, A.K. (1998). Artificial seeds. *Indian Journal Experimental Biology* 36: 1161–1164.
- Attree, S.M., Pomeroy, M.K. and Fowke, L.C. (1994). Production of vigorous, desiccation tolerant white spruce (*Picea glauca* [Moench.] Voss.) synthetic seeds in a bioreactor. *Plant Cell Report* 13: 601–606.
- Bapat, V.A. and Mhatre, M. (2005). In: Jain, S.M., Gupta, P.K.(Eds.). Protocol for somatic embryogenesis in woody plants. Dordrecht, The Netherlands: Springer. pp. 539–552.
- Bapat, V.A. and Rao, P.S. (1992). Plantlet regeneration from encapsulated and non-encapsulated desiccated somatic embryos of forest tree: sandalwood (*Santalum album* L.). *Journal Plant Biochemistry and Biotechnology* 1: 109–113.
- Corrie, S. and Tandon, P. (1993). Propagation of *Cymbidium giganteum* Wall. through high frequency conversion of

- encapsulated protocorms under *in vivo* and *in vitro* conditions. Indian Journal Experimental Biology 31: 61–64.
- Datta, K.B., Kanjilal, B. and Sarker, D. (1999). Artificial seed technology: Development of a protocol in *Geodorum densiflorum* (Lam) Schltr.-an endangered orchid. Current Science 76: 1142–1145.
- Engelmann, F. (1997). In: Ford-Lloyd, B.V., Newbury, J.H., Callow, J.A. (Eds.). Biotechnology and plant genetic resources: conservation and use. Wallingford: CABI. pp. 119–162.
- Engleman, F. (2003). In: Chaudhury R, Pandey R, Malik SK, Bhag Mal, Eds.. *In vitro* conservation and cryopreservation of tropical fruit species. New Delhi: IPGRI Office for South Asia and NBPGR. pp. 163-174.
- Ganapathi, T. R., Suprasanna, P., Bapat, V.A. and Rao, P.S. (1992). Propagation of banana through encapsulated shoot tips. Plant Cell Report. 11: 571–575.
- George, L. and Eapen, S. (1995). Encapsulation of somatic embryos of Finger millet *Eleusine coracana* Gaertn. Indian Journal Experimental Biology 33: 291–293.
- Ghosh, B. and Sen, S. (1994). Plant regeneration from alginate encapsulated somatic embryos of *Asparagus cooperi* baker. Plant Cell Report 13: 381–385.
- Gray, D. J. and Purohit, A. (1991). Somatic embryogenesis and development of synthetic seed technology. Critical Reviews in Plant Science 10: 33–61.
- Gupta, P. K., Shaw, D. and Durzan, D. J. (1987). In: Durzan, D. J., Bonga, J. M. (Eds.). Cell and Tissue Culture in Forestry. Dordrecht : Martinus Nijhoff Publishers. pp. 101–108.
- Gupta, S. and Mandal, B.B. (2003). In: Chaudhury, R., Pandey, R., Malik, S.K., Bhag Mal, (Eds.). *In vitro* conservation and cryopreservation of tropical fruit species. NewDelhi: IPGRI Office for South Asia and NBPGR. pp. 71–80.
- Harikrishna, K. and Ong, C.H. (2002). In: Krishnapillay, B. (Eds.). Basic principles of biotechnology and their application in forestry. APAFRI. pp. 87-91.
- Janeiro, L. V., Ballester, A. and Vieitez, A. M. (1997). *In vitro* response of encapsulated somatic embryo of *camellia*. Plant Cell Tissue and Organ Culture 51: 119–125.
- Jung, S. J., Yoon, E. S., Jeong, J. H. and Choi, Y. E. (2004). Enhanced post-germinative growth of encapsulated somatic embryos of *Siberian ginseng* by carbohydrate addition to the

- encapsulation matrix. Plant Cell Report 23: 365–370.
- Kitto, S.L. and Janick, J. (1982). Polyox as an artificial seed coat for a sexual embryos. Horticultural Science 17: 448.
- Kitto, S.L. and Janick, J. (1985). Production of synthetic seeds by encapsulating asexual embryos of carrot. Journal of the American Society for Horticultural Science 110: 277–282.
- Krishnapilly, B. (2002). Basic principles of biotechnology and their application in forestry. Asia Pacific Association of Forestry Research Institutions. Kuala Lumpur, Malaysia. pp. 171.
- Kumar, S., Rai, M.K. and Singh, N. (2010). Alginate-encapsulation of shoot tips of jojoba [*Simmondsia chinensis* (Link) Schneider] for germplasm exchange and distribution. Physiology and Molecular Biology of Plants 16(4): 379–382.
- Lakshmana Rao, P.V. and Singh, B. (1991). Plantlet regeneration from encapsulated somatic embryos of hybrid *Solanum melongena* L.: Plant Cell Report 10: 7–11.
- Malemngaba, H., Roy, B. K., Bhattacharya, S. and Deka, P. C. (1996). Artificial seed technology: Development of a protocol in *Geodorum densiflorum* (Lam) Schltr.–an endangered orchid. Indian Journal Experimental Biology 34: 801–805.
- Mandal, J., Pattnaik, S. and Chand, P. K. (2000). Alginate encapsulation of axillary buds of *Ocimum americanum* L. (hoary basil), *O. basilicum* L. (sweet basil), *O. gratissimum* L. (shrubby basil), and *O. sanctum* (sacred basil). In Vitro Cellular and Developmental Biology Plant 36: 287–292.
- Marsolais, A.A., Wilson, D.P.M., Tsujita, M.J. and Senaratna, T. (1991). Somatic embryogenesis and artificial seed production in zonal (*Pelargonium x hortorum*) and regal (*Pelargonium x domesticum*) geranium. Canadian Journal of Botany 69: 1188–1193.
- Maruyama, E., Kinoshita, I., Ishii, K., Shigenag, H., Ohba, K. and Saito, A. (1997). Alginate-encapsulation technology for the propagation of the tropical forest trees: *Cedrella odorela*, *Guazuma crinita*, *Jacaranda mimosaeifolia* D. Don. Silvae Genetica 46: 17–23.
- Moore, R., Clark, W.D. and Stern, K.R. (1995). Botany. USA: Wm.C.Brown Publishers. pp. 824.
- Muralidharan, E.M. and Mascarenhas, A.F. (1995). In: Jain, S., Gupta, P., Newton, R. (Eds.). Somatic Embryogenesis in Woody Plants. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers. pp. 101–108.

- Murashige, T. (1977). Plant cell and organ cultures as horticultural practices. *Acta Horticulturae* 78: 17-30.
- Nagananda, G.S., Satishchandra, N. and Rajath, S. (2011). Regeneration of encapsulated protocorm like bodies of medicinally important vulnerable orchid *Flickingeria nodosa* (Dalz.) Seidenf. *International Journal of Botany* 7(4): 310-313.
- Naik, S.K. and Chand, P.K. (2006). Nutrient-alginate encapsulation of *in vitro* nodal segments of pomegranate (*Punica granatum* L.) for germplasm distribution and exchange. *Scientia Horticulturae* 108: 247-252.
- Nor Asmah, N., Nor Hasnida, H., Nashatul Zaimah, N.A., Noraliza, A. and Nadiyah Salmi, N. (2011). Synthetic seed technology for encapsulation and regrowth of *in vitro*-derived *Acacia* hybrid shoot and axillary buds. *African Journal of Biotechnology* 10(40): 7820-7824.
- Onay, A., Jeffree, C.E. and Yeoman, M.M. (1996). Plant regeneration from encapsulated embryoids and an embryogenic mass of Pistachio. *Plant Cell Report* 15: 723-726.
- Padmaja, G., Reddy, L.R. and Reddy, G.M. (1995). Plant regeneration from synthetic seeds of groundnut, *Arachis hypogaea* L. *Indian Journal Experimental Biology* 33: 967-971.
- Piccioni, E. (1997). Plantlets from encapsulated micropropagated bud of M. 26 apple root stock. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 47: 255-260.
- Piccioni, E. and Standardi, A. (1995). Efficient plant retrieval from alginate-encapsulated vegetative bud of mature mulberry trees. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 42: 221-226.
- Rai, M.K., Asthana, P., Kant Singh, S., Jaiswal, V.S. and Jaiswal, U. (2009). The encapsulation technology in fruit plants-a review. *Biotechnology Advances* 27: 671-679.
- Rai, M.K., Jaiswal, V.S. and Jaiswal, U. (2008). Encapsulation of shoot tips of guava (*Psidium guajava* L.) for a short-term storage and germplasm exchange. *Scientia Horticulturae* 118: 33-38.
- Rao, P.S., Suprasanna, P., Ganapathi, T.R. and Bapat, V.A. (1998). In: Srivastava, P.V (Eds.). *Plant tissue culture and molecular biology*. India : Narosa. pp. 607-19.
- Redenbaugh, K., Nichol, J., Kossler, M.E. and Paasch, B. (1984). Encapsulation of somatic embryos for artificial seedproduction. *In vitro*. 20: 256-257.
- Redenbaugh, K., Slade, D., Viss, P.R. and Fujii, J.A. (1987). Encapsulation of somatic

- embryos in synthetic seed coats. Horticultural Science 22: 803–809.
- Saiprasad, G.V.S. (2001). Artificial seeds and their application. Resonance. pp. 39–47.
- Sharma, A., Tandon, P. and Kumar, A. (1992). Regeneration of plantlets from encapsulated *Dendrobium protocorms*. Indian Journal Experimental Biology 30: 747–748.
- Sharma, T.R., Singh, B.M. and Chauhan, R.S. (1994). Production of disease free encapsulated buds of *Zingiber officinale*. Plant Cell Report. 13: 300–302.
- Singh, F. (1991). Encapsulation of *Spathoglottis plicata* protocorms. Lindleyana. 6: 61–64.
- Sorvari, S., Toldi, O., Ahanen, K., Viinamaki, T. Hakonen, T. and Tahvonen, R. (1997). Using polysaccharides and galactomannans as gelling agents in capsule formation of artificial seeds. Journal of the American Society for Horticultural Science 122(6): 878–883.
- Sundararaj, S.G., Agrawal, A. and Rishi, K. (2010). Encapsulation for in vitro short-term storage and exchange of ginger (*Zingiber officinale* Rosc.) germplasm. Scientia Horticulturae 125: 761–766.
- Zych, M., Furmanowa, M., Krajewska-patan, A., Łowicka, A., Dreger, M. and Mendlewska, S. (2005). Micropropagation of *Rhodiola Kirilowii* plants using encapsulated axillary buds and callus. Acta Biologica cracoviensia Series Botanica 47(2): 83–87.

