

ศึกษาและพัฒนาระบบการขยายพันธุ์กล้ากาแฟพันธุ์ใหม่โดยการใช้ระบบการเพาะเลี้ยง TIBs และ Somatic Embryogenesis

ประภาพร ฉันทานุมัติ ไพรัตน์ ช่วยเต็ม อรทัย ธัญชัย และยุพิน กลินเกษมพงษ์

บทคัดย่อ

การขยายพันธุ์กาแฟโรบัสต้าซึ่งเป็นพืชผสมข้ามให้ได้ปริมาณมากในเวลาที่สุดเร็ว การขยายพันธุ์ด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อด้วยวิธี Somatic embryogenesis เป็นวิธีหนึ่งที่น่าสนใจโดยศูนย์วิจัยพืชสวนชุมพร ในขั้นตอน *in vitro* pregermination การเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวด้วยระบบ TIBs ในกาแฟ โรบัสต้าสายพันธุ์แนะนำ ได้มีการศึกษาเพื่อหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการให้อาหารในแต่ละสายพันธุ์ดังกล่าว โดยทำการทดลองในกาแฟโรบัสต้าสายพันธุ์แนะนำคือ ชุมพร 2 ชุมพร 4 และชุมพร 5 โดยมี 2 กรรมวิธีคือ ระยะเวลาในการให้อาหารครั้งละ 5 และ 10 นาที จำนวน 2 ครั้งต่อวัน ผลการทดลองพบว่า ระยะเวลาในการให้อาหาร 10 นาทีต่อครั้งจำนวน 2 ครั้งต่อวัน จำนวนต้นอ่อนที่ได้ต่อน้ำหนักของ *Torpedo embryos* เริ่มต้น สูงกว่าให้อาหารครั้งละ 5 นาที ในกาแฟโรบัสต้า สายพันธุ์ ชุมพร 2 และ 4 ส่วนกาแฟโรบัสต้าชุมพร 5 นั้น *Torpedo embryos* ไม่เพียงพอในการทดลองได้ผลการทดลองเพียงการให้อาหารเป็นเวลา 5 นาที ซึ่งพบว่า จำนวนต้นอ่อนต่อน้ำหนัก *Torpedo embryos* เริ่มต้นใกล้เคียงกับ กาแฟโรบัสต้าสายพันธุ์ชุมพร 2

บทนำ

กาแฟโรบัสต้าเป็นพืชที่มีการผสมเกสรแบบผสมข้าม (cross-pollination) การขยายพันธุ์ปกติจะใช้วิธีการปักชำ หรือเสียบยอดเพื่อให้ตรงตามพันธุ์เดิมมากที่สุด ซึ่งการขยายพันธุ์วิธีดังกล่าวจำเป็นต้องมีต้นแม่พันธุ์จำนวนมากเพื่อใช้ในการขยายพันธุ์ในปริมาณมาก ดังนั้นหากต้องการผลิตพันธุ์ให้ได้ปริมาณมากและตรงตามพันธุ์ที่กำหนดในเวลาจำกัด การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากเซลล์ร่างกายให้พัฒนาจนเป็นต้นอ่อนหรือตัวอ่อนโดยไม่มีเซลล์มารดาเกี่ยวข้อง (somatic embryogenesis) จึงเป็นทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจในการขยายพันธุ์กาแฟโรบัสต้าในปัจจุบัน การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อด้วยวิธี somatic embryogenesis เป็นการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ต้นอ่อนที่ได้จะมีพันธุกรรมเหมือนต้นแม่ทุกประการ และยังมีระบบรากที่เหมือนรากแก้ว ทำให้ได้ต้นกล้าที่มีความแข็งแรงเหมือนต้นกล้าที่ได้จากการเพาะเมล็ด นอกจากนี้ ในการขยายพันธุ์กาแฟโรบัสต้าด้วยวิธี somatic embryogenesis ได้มีการนำเอา ระบบการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในอาหารเหลวด้วยระบบ TIBs (Temporary immersion Bioreactor system) มาใช้ในขั้นตอนการชักนำให้เกิดต้นอ่อนในสภาพปลอดเชื้อเพื่อลดเวลา แรงงาน และต้นทุนอาหาร ในการเพาะเลี้ยง แต่เนื่องจากการผลิตกล้ากาแฟโรบัสต้า ไม่สามารถผลิตกล้ากาแฟโรบัสต้าเพียงสายพันธุ์เดียวได้ ทำให้ต้องทำการผลิตกล้ากาแฟโรบัสต้าหลายสายพันธุ์ เพื่อให้จำหน่ายให้แก่เกษตรกร ศูนย์วิจัยพืชสวนชุมพร จะผลิตกล้ากาแฟโรบัสต้าพันธุ์แนะนำจำนวน 3 สายพันธุ์ ซึ่งในการผลิตกล้ากาแฟโรบัสต้าแต่ละสายพันธุ์ มีเทคนิคและวิธีการที่แตกต่างกัน ดังนั้น จึงควรทำการศึกษาถึงเทคนิควิธีในการขยายพันธุ์กาแฟโรบัสต้าแต่ละสายพันธุ์ ด้วยวิธี somatic embryogenesis ในอาหารเหลวด้วยระบบ TIBs เพื่อให้การขยายพันธุ์กาแฟโรบัสต้าโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อให้ ต้นกล้าที่มีความแข็งแรง ตรงตามพันธุ์ และมีจำนวนเพียงพอต่อความต้องการของเกษตรกร

วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาถึงเทคนิควิธีการขยายพันธุ์กาแฟโรบัสต้าพันธุ์แนะนำใหม่ โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อด้วยวิธี Somatic embryogenesis ในอาหารเหลวด้วยระบบ TIBs

อุปกรณ์

1. ต้นอ่อนรูปตอปีโด (torpedo embryos) ของกาแฟโรบัสต้าทั้งสามสายพันธุ์คือ ชุมพร 2 ชุมพร 4 และ ชุมพร 5
2. ระบบ Temporary Immersion Bioreactor system (TIBs) แบบใช้ปั๊มอากาศ (Ducos *et. al.*, 2007, ประภาพรและยุพิน, 2551)
3. อาหารเหลวสูตร MS สำหรับเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกาแฟ
4. อุปกรณ์และเครื่องมือต่างๆที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

วิธีการ

1. อาหารเหลวสำหรับเพาะเลี้ยงกาแฟโรบัสต้าในขั้นตอน *In vitro* pregermination (macro MS, micro MS, vitamin Gamborg, BAP 1 มิลลิกรัม และน้ำตาล 30 กรัม pH 5.6) ใช้อาหาร 1 ลิตรต่อ 1 ระบบ TIBs ประกอบด้วยขวดบรรจุอาหารและขวดบรรจุชิ้นส่วนพืช เข้าด้วยกัน นำระบบ TIBs มาเชื่อมต่อด้วยเครื่องนึ่งฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำแรงดันสูง ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 25 นาที จากนั้นทิ้งไว้ในห้องเลี้ยงเนื้อเยื่อ โดยต่อกับระบบการอาหารและให้อาหารทำงานปกติ 2 สัปดาห์เพื่อสังเกตว่ามีการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์หรือไม่
2. ผลิต torpedo embryos ของกาแฟโรบัสต้าแต่ละสายพันธุ์ โดยเฉพาะสายพันธุ์แนะนำ ใหม่คือ ชุมพร 2 ชุมพร 4 และ ชุมพร 5 เพื่อให้เพียงพอต่อการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวด้วย ระบบ TIBs
3. ศึกษาถึง ความหนาแน่นของ torpedo embryos ของกาแฟโรบัสต้าแต่ละสายพันธุ์ ที่มีความเหมาะสมกับการชักนำให้พัฒนาเป็นต้นอ่อนในสภาพปลอดเชื้อ ในอาหารเหลวด้วยระบบ TIBs
4. ศึกษาถึงระยะเวลาและจำนวนการให้อาหาร ที่มีความเหมาะสมกับการชักนำให้พัฒนาเป็นต้นอ่อนในสภาพปลอดเชื้อ ในอาหารเหลวด้วยระบบ TIBs ของกาแฟโรบัสต้าแต่ละสายพันธุ์

สถานที่และระยะเวลาทำการทดลอง

ดำเนินการทดลองตั้งแต่ กันยายน 2555 ถึง กันยายน 2558 ณ ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ศูนย์วิจัยพืชสวนชุมพร สถาบันวิจัยพืชสวน

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากการผลการทดลองพบว่าเมื่อเพาะเลี้ยง Torpedo embryos ของกาแฟโรบัสต้าสายพันธุ์ชุมพร 2 เป็นเวลา 16 สัปดาห์ ในอาหารเหลว โดยมีการให้อาหารครั้งละ 10 นาที จำนวน 2 ครั้งต่อวัน จำนวนต้นอ่อนที่พร้อมย้ายปลูกที่ได้ เมื่อคำนวณกลับไป น้ำหนักของ Torpedo embryos เริ่มต้น ได้จำนวนต้นอ่อน 43.7 ต้น ซึ่งสูงกว่า ที่การให้อาหาร 5 นาทีต่อครั้ง ที่ได้จำนวนต้น 36.7 ต้น (ตารางที่ 1) ทั้งนี้ อาจเกิดจากการที่ให้อาหารนานขึ้น ทำให้มีการถ่ายเทอากาศเสียเช่น เอทิลีน ที่เป็นผลเสียต่อต้นอ่อน ออกไป โดยในการให้อาหารนั้นจะไม่ใช้แรงดันลมที่แรง

เกินไป แรงดันลมที่ใช้จะเป็นแรงดันที่เพียงพอให้อาหารเหลวขึ้นมาถึงต้นพีชเท่านั้น ทำให้การให้อาหารนานขึ้นกับกาแฟสายพันธุ์นี้ จำนวนต้นต่อน้ำหนักของ Torpedo embryos มากกว่า เมื่อพิจารณาถึงน้ำหนักต้นอ่อนที่ได้พบว่าต้นอ่อนที่ได้จากการให้อาหาร 10 นาทีต่อครั้ง มีน้ำหนักต่อต้นที่ 0.032 กรัม ซึ่งมีน้ำหนักน้อยกว่าต้นอ่อนที่ได้จากการให้อาหารที่ 5 นาทีที่มีน้ำหนักต่อต้นที่ 0.039 กรัม ซึ่งอาจจะเนื่องมาจากน้ำหนัก Torpedo embryos เริ่มต้นมีจำนวนที่มากกว่าทำให้ความหนาแน่นสูงกว่า

ตารางที่ 1 ผลของระยะเวลาในการให้อาหารต่อการพัฒนาเป็นต้นอ่อน (embryos) ของต้นอ่อนรูปตอปีโด (torpedo embryos) ของกาแฟโรบัสต้าสายพันธุ์ ซุมพร 2 เมื่อเพาะเลี้ยงในระบบ TIBs เป็นเวลา 16 สัปดาห์

| ระยะเวลาในการให้อาหาร (นาที) | นน. torpedo embryos (กรัม) | embryos | | | | |
|------------------------------|----------------------------|------------|-----------------|-------------------|-------------|--|
| | | นน. (กรัม) | จำนวนต้นต่อกรัม | นน. ต่อต้น (กรัม) | จำนวนต้นรวม | จำนวนต้นต่อ นน. 1 กรัม torpedo embryos (ต้น) |
| 5 | 51.5 | 78.4 | 25 | 0.04 | 1,960 | 38 |
| | 53 | 70.0 | 26 | 0.038 | 1,820 | 34 |
| | 54 | 81.2 | 25 | 0.04 | 2,030 | 38 |
| เฉลี่ย | 52.8 | 76.5 | 25.3 | 0.039 | 1937 | 36.7 |
| 10 | 60.8 | 99.4 | 31 | 0.032 | 3,081 | 51 |
| | 57.0 | 104.2 | 29 | 0.035 | 1,653 | 29 |
| | 59.4 | 94.8 | 32 | 0.031 | 3,034 | 51 |
| เฉลี่ย | 59.1 | 86.1 | 30.7 | 0.032 | 2589 | 43.7 |

สำหรับกาแฟสายพันธุ์ ซุมพร 4 นั้น จำนวนต้นอ่อนที่ได้จากการให้อาหารเป็นเวลา 10 นาทีต่อครั้งจำนวน 2 ครั้งต่อวัน ก็มีแนวโน้มเดียวกับกาแฟโรบัสต้าสายพันธุ์ซุมพร 2 คือให้จำนวน ต้นอ่อน 67.7 ต้นต่อ 1 กรัม Torpedo embryos ซึ่งมากกว่าการให้อาหารที่ 5 นาที ที่ได้จำนวนต้นอ่อน 57.6 ต้นต่อ 1 กรัม Torpedo embryos และเมื่อพิจารณาน้ำหนักต่อต้นอ่อน พบว่า ต้นอ่อนที่ได้จากการให้อาหาร 5 นาทีมีน้ำหนักต่อต้น ที่ 0.029 กรัม ซึ่งน้อยกว่าต้นอ่อนที่ได้จากการให้อาหาร 10 นาที ซึ่งมีน้ำหนักต่อต้นที่ 0.036 กรัม ซึ่งน่าจะเป็นผลมาจากระยะเวลาในการให้อาหารที่นานขึ้น เพราะน้ำหนักของ Torpedo embryos เริ่มต้นทั้งสองระยะเวลา ไม่แตกต่างกันเท่าไร (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 ผลของระยะเวลาในการให้อาหารต่อการพัฒนาเป็นต้นอ่อน (embryos) ของต้นอ่อนรูปตอปีโด (torpedo embryos) ของกาแฟโรบัสต้าสายพันธุ์ ซุมพร 4 เมื่อเพาะเลี้ยงในระบบ TIBs เป็นเวลา 16 สัปดาห์

| ระยะเวลาในการให้อาหาร (นาทีก) | นน. torpedo embryos (กรัม) | embryos | | | | |
|-------------------------------|----------------------------|------------|-----------------|-------------------|-------------|--|
| | | นน. (กรัม) | จำนวนต้นต่อกรัม | นน. ต่อต้น (กรัม) | จำนวนต้นรวม | จำนวนต้นต่อ นน. 1 กรัม torpedo embryos (ต้น) |
| 5 | 54 | 85.0 | 30 | 0.033 | 2,250 | 47 |
| | 52 | 93.0 | 38 | 0.026 | 3,534 | 68 |
| | 57 | 95.0 | 35 | 0.029 | 3,325 | 58 |
| เฉลี่ย | 54.3 | 91 | 34.3 | 0.029 | 3,036 | 57.6 |
| 10 | 54 | 82.0 | 30 | 0.033 | 2,460 | 46 |
| | 56 | 159.7 | 25 | 0.040 | 3,975 | 71 |
| | 58 | 179.0 | 28 | 0.035 | 5,012 | 86 |
| เฉลี่ย | 56 | 140.2 | 27.6 | 0.036 | 3,818 | 67.7 |

ในส่วนของกาแฟโรบัสต์สายพันธุ์ ชุมพร 5 นั้น เป็นสายพันธุ์กาแฟที่ไม่ค่อยมีการผลิตแคลลัส ทำให้ไม่มี **Torpedo embryos** มาใช้ในการทดลองมากนัก และแคลลัสที่ได้ มีคุณภาพไม่ค่อยดี เท่าใดนัก ทำให้ไม่สามารถทดลองในกรรมวิธีให้อาหารครั้งละ 10 นาทีกได้ และผลของการให้อาหาร ครั้งละ 5 นาทีกนั้นพบว่า จำนวนของต้นอ่อนที่ได้ต่อนาน้ำเริ่มต้นของ **Torpedo embryos** ใกล้เคียงกับกาแฟโรบัสต์สายพันธุ์ชุมพร 2 คืออยู่ที่ 35.7 ต้นต่อกรัม **Torpedo embryos**

ตารางที่ 3 ผลของระยะเวลาในการให้อาหารต่อการพัฒนาเป็นต้นอ่อน (embryos) ของต้นอ่อนรูปตอปีโต (torpedo embryos) ของกาแฟโรบัสต์สายพันธุ์ ชุมพร 5 เมื่อเพาะเลี้ยงในระบบ TIBs เป็นเวลา 16 สัปดาห์

| ระยะเวลาในการให้อาหาร (นาทีก) | นน. torpedo embryos (กรัม) | embryos | | | | |
|-------------------------------|----------------------------|------------|-----------------|-------------------|-------------|--|
| | | นน. (กรัม) | จำนวนต้นต่อกรัม | นน. ต่อต้น (กรัม) | จำนวนต้นรวม | จำนวนต้นต่อ นน. 1 กรัม torpedo embryos (ต้น) |
| 5 | 28.2 | 33.6 | 24 | 0.042 | 806 | 29 |
| | 24.5 | 42.5 | 25 | 0.040 | 1,062 | 43 |
| | 29 | 40.2 | 25 | 0.040 | 1,005 | 35 |
| เฉลี่ย | 27.2 | 38.8 | 24.7 | 0.04 | 957.7 | 35.7 |

สรุปผลการทดลอง

การขยายพันธุ์กาแฟโรบัสต์โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อด้วยวิธี somatic embryogenesis ในอาหารเหลว ด้วยระบบ TIBs ในขั้นตอน *in vitro* pregermination นั้น ระยะเวลาที่เหมาะสมในการให้อาหารคือ 10 นาทีก ต่อครั้ง จำนวน 2 ครั้งต่อวัน โดยสายพันธุ์ ชุมพร 2 และ ชุมพร 4 ใส่ **Torpedo embryos** ไม่เกิน 60 กรัมต่ออาหารเหลว 1.5 ลิตร จะได้ต้นอ่อนที่ 3 – 4,000 ต้น ต่อการเพาะเลี้ยง 1 ระบบ TIBs

เอกสารอ้างอิง

ประภาพร ฉันทานุมัติและยุพิน กลินเกษมพงษ์. 2551. การผลิตกล้ากาแฟโรบัสต์จากวิธี Somatic

Embryogenesis ในระบบ Temporary Immersion Bioreactor. การประชุมวิชาการพืชสวนแห่งชาติ ครั้งที่ 7 พฤษภาคม 2551.

Ducos, JP., C. Lambot, and V. Petiard. 2007. Bioreactor for Coffee Mass Propagation by Somatic Embryogenesis. International Journal of Plant Developmental Biology.1(1). pp.1 -12.