# ศึกษาการขยายพันธุ์กาแฟอราบิก้าลูกผสมชั่วที่ 1 โดยวิธี somatic embryogenesis และ micro-cutting

ประภาพร ฉันทานุมัติ อรทัย ธนัญชัย ไพรัตน์ ช่วยเต็ม ฉัตรนภา ข่มอาวุธ และ ยุพิน กสินเกษมพงษ์

**บทคัดย่อ**

การศึกษาการขยายพันธุ์กาแฟอะราบิกา โดยวิธี somatic embryogenesis และ micro-cutting วัตถุประสงค์เพื่อผลิตพันธุ์กาแฟอะราบิกาให้ได้ปริมาณมากและตรงตามพันธุ์ที่กำหนดในเวลาจำกัด ดำเนินการปี 2559-2561 ณ ศูนย์วิจัยพืชสวนชุมพร อ.สวี จ.ชุมพร ในกาแฟอะราบิกา 2 สายพันธุ์ได้แก่ H.528/46 ML2/10-29-65-23 (รหัส 2/8 SF H528) และ Catimor CIFC 7963-661-36 (รหัส 2/27 SF 661-36) ซึ่งจะเป็นพันธุ์ที่จะเสนอขอเป็นพันธุ์แนะนำของกรมวิชาการเกษตร ผลการดำเนินงานพบว่า ได้วิธีการขยายพันธุ์โดยวิธี somatic embryogenesis ใน 1 สายพันธุ์ คือ พันธุ์ H 528/46 ML 2/10-29-65-23 โดยใช้ส่วนใบอ่อน เพาะเลี้ยงเพื่อชักนำแคลลัสในอาหารแข็ง สูตรที่เหมาะสมคือ MS/4 + Vitamin Gamborg + IAA 5 mg/L น้ำตาล 30 กรัมต่อลิตร pH5.6 โดยชิ้นส่วนใบเริ่มสร้างแคลลัสในดือนที่ 5 ชักนำแคลลัสให้เกิดต้นอ่อนรูปตอปิโด ในอาหารเหลวสูตร MS+BAP 1 mg/L เป็นเวลา 3 สัปดาห์ และเปลี่ยนเป็นอาหารเหลวสูตร MS เปลี่ยนอาหารทุกๆ 2 สัปดาห์ เป็นเวลา 10 สัปดาห์ วางต้นอ่อนรูปตอปิโดบนกระดาษซับที่ฆ่าเชื้อแล้ว เป็นเวลา 7 วัน ย้ายเลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็งสูตร 1/2MS + BAP 0.5 mg/L เป็นเวลา 2 เดือน เปลี่ยนอาหารกึ่งแข็งเป็นสูตร 1/2MS เป็นเวลา 3 เดือน ได้ต้นอ่อนที่พร้อมย้ายไปอนุบาลในเรือนเพาะชำ สำหรับ Catimor CIFC 7963-661-36 พบว่า ยังไม่พบสูตรอาหารที่สามารถชักนำใบอ่อนให้เกิดแคลลัสได้

**บทนำ**

พันธุ์กาแฟเป็นปัจจัยการผลิตที่สำคัญ กาแฟอาราบิก้าที่เกษตรกรปลูกอยู่ทั่วไปมีความอ่อนแอต่อโรคราสนิม ทำให้ผลผลิตลดลงส่งผลต่อปริมาณผลผลิตซึ่งปกติมีปริมาณต่ำอยู่แล้วตามคุณลักษณะของพันธุ์ แม้ว่าผลการดำเนินงานวิจัยปรับปรุงพันธุ์กาแฟในช่วงปี 2549-2553 สามารถวิจัยได้พันธุ์กาแฟสายพันธุ์ดีให้พันธุ์รับรองจำนวน 1 พันธุ์ได้แก่ พันธุ์เชียงใหม่ 80 และในปี 2553 สามารถคัดเลือกพันธุ์กาแฟอาราบิก้าสายพันธุ์ต้านทานโรคราสนิมลูกผสมชั่วที่6 ในสภาพธรรมชาติ ได้จำนวน 2 สายต้น ได้แก่ พันธุ์ H 528/46 ML 2/10-29-65-23 และ H 420/9 ML 2/4-78-31-34 และคัดเลือกพันธุ์กาแฟอาราบิก้าลูกผสม HDT Derivatives กลุ่มพันธุ์ Catimor ชั่วที่ 6 จำนวน 2 สายต้น ได้แก่ H420/9 ML 1/3 KW 54 และ H 420/9 ML 2/1 KW 82 ซึ่งจะสามารถนำไปทดสอบและเปรียบเทียบเพื่อให้ได้พันธุ์ที่จะได้พันธุ์แนะนำในปี 2558 ต่อไป ซึ่งในกระบวนการปรับปรุงพันธุ์กาแฟอราบิก้าเพื่อให้ได้พันธุ์รับรองหนึ่งพันธุ์นั้น ต้องใช้เวลาดำเนินการถึงหกชั่ว ประมาณ 25 ปี เป็นอย่างน้อย จึงจะสามารถกระจายพันธุ์ดีให้เกษตรกรได้ ดังนั้น การทดลองนี้จึงจัดทำขึ้นเพื่อให้การปรับปรุงพันธุ์กาแฟอราบิก้าสามารถย่น

ระยะเวลาให้สั้นลง เพื่อให้การผลิตกาแฟอราบิก้าของเกษตรกรมีประสิทธิภาพมากขึ้น โดยการศึกษาการขยายพันธุ์กาแฟอราบิก้าด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ แบบ somatic embryogenesis และ micro-cutting ในลูกผสมชั่วที่ 1

**อุปกรณ์และวิธีการ**

**อุปกรณ์**

1. ต้นกาแฟอราบิก้าลูกผสม H.528/46 ML2/10-29-65-23 (รหัส 2/8 SF H528) และ Catimor CIFC 7963-661-36 (รหัส 2/27 SF 661-36) จากศูนย์วิจัยเกษตรหลวงเชียงใหม่
2. อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช
3. สารเคมีต่างๆ ที่ใช้ในการเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช
4. ฮอร์โมนพืช เช่น BAP IAA 2,4D Pyridoxine เป็นต้น

**แบบและวิธีการทดลอง**

ไม่มีแบบแผนการทดลอง

**วิธีการทดลอง**

1. นำใบอ่อนกาแฟอราบิก้าที่ดูแลรักษาในเรือนเพาะชำไม่น้อยกว่า 3 เดือน มาทำความสะอาดด้วยน้ำสบู่อ่อนๆ จากนั้นล้างในน้ำไหลให้สะอาด ฆ่าเชื้อด้วย การแช่ในเอทิลแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์เป็นเวลา 30 วินาที แล้วนำไปแช่ในแคลเซียมไฮโปรคลอไรค์ ความเข้มข้น 40 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 30 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง นำใบกาแฟมาตัดเป็นชิ้นขนาด 3x3 มม. แล้ววางบนอาหารสูตร MS (Macro elements 50 ml, Micro elements 0.5 ml, Vitamin Gamborg 2 ml, sucrose 30 g/L, pH5.6) ที่เติมฮอร์โมนตามกรรมวิธี แล้วเก็บไว้ในที่มืด โดยเปลี่ยนอาหารทุก 2 เดือน
2. เมื่อได้ embryogenic callus แล้วนำมาทดสอบการผลิตต้นอ่อนรูปตอปิโด (torpedo embryo) ด้วยอาหารเหลว สูตร MS
3. เมื่อได้ ต้นอ่อนรูปตอปิโดแล้ว นำมาทดสอบการพัฒนาเป็น plantlet ต่อไป
4. ในกาแฟอราบิก้าที่ไม่สามารถขยายพันธุ์โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อด้วยวิธี Somatic embryogenesis ได้ จะทำการศึกษาการขยายพันธุโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อด้วยวิธี micro cutting โดยการนำตาข้างมาฟอกฆ่าเชื้อและเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS เพื่อศึกษาถึงอัตราการขยายพันธุด้วยวิธีการนี้

**สถานที่ดำเนินงาน**

ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ และโรงเรือนอนุบาลต้นกล้า ศูนย์วิจัยพืชสวนชุมพร สถาบันวิจัยพืชสวน

**ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง**

**กาแฟอราบิก้าสายพันธุ์** H.528/46 ML2/10-29-65-23 (รหัส 2/8 SF H528)

**การชักนำให้เกิดแคลลัส (embryogenic callus induction)**

จากการทดลองการชักนำให้เกิดแคลลัสในกาแฟอราบิก้าสายพันธุ์นี้พบว่า ชิ้นส่วนใบเริ่มสร้างแคลลัส เมื่อเลี้ยงด้วยสูตรอาหารกรรมวิธี 3 (MS/4 + IAA 5 mg/L) เมื่อเพาะเลี้ยงได้ 5 เดือน โดยแคลลัสจะมีลักษณะเป็นกลุ่มเซลที่เกาะตัวกันมีสีขาวอมเหลือง มีความมันวาวในตัวเอง โดยในส่วนของแคลลัสบางส่วนนั้น มีการพัฒนาเป็นเอมบริโอโดยตรง (ภาพที่ 1ข) ซึ่งเรียกว่า Direct embryos เป็นต้นอ่อนที่ได้จากกระบวนการ Somatic embryogenesis อีกแบบหนึ่ง โดยอัตราการสร้างแคลลัส อยู่ที่ 6 เปอร์เซ็นต์ และอัตราการสร้างแคลลัสเพิ่มขึ้นเป็น 54 เปอร์เซนต์เมื่อเพาะเลี้ยงได้ 7 เดือนและเริ่มพบ Direct embryos ในเดือนที่ 5 และสามารถย้ายปลูก Direct embryos จำนวน 200 ต้น ในเดือนที่ 7 (ภาพที่ 1ก, 1ข และตารางที่ 1) และกรรมวิธีที่ 4 (IAA 2 mg/L + 2,4-D 1 mg/L) พบว่าแคลลัสจะพัฒนาเป็น Direct embryos มากกว่าเป็น embryogenic callus จากผลการทดลองนี้พบว่าการชักนำให้เกิดแคลลัสในกาแฟอราบิก้านั้น อาหารที่ใช้จะเป็นอาหารสูตร MS เป็นหลักเช่นเดียวกับกาแฟโรบัสต้า แต่ในกาแฟอราบิก้านั้นจะมีการเติมฮอร์โมนออกซิน ซึ่งในการทดลองนี้มีทั้งการใช้ IAA และ 2,4-D

**ตารางที่ 1** เปอร์เซ็นต์การสร้างแคลลัสของชิ้นส่วนใบอ่อนกาแฟอราบิก้าสายพันธุ์ H.528/46 ML2/10-29-65-23 (รหัส 2/8 SF H528) เมื่อเพาะเลี้ยงได้ 7 เดือน

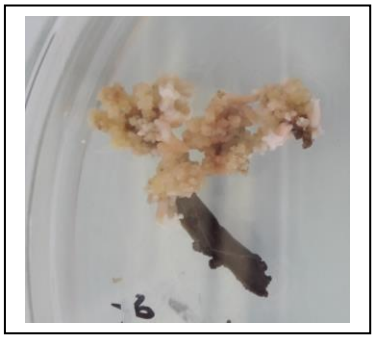
| กรรมวิธี | จำนวนชิ้นส่วนใบ (ชิ้น) | | เปอร์เซ็นต์การสร้างแคลลัส (%) |
|---|---|---|---|
| | ทั้งหมด | สร้างแคลลัส | |
| 1:MS/4 +2,4-D 5 mg/L | 50 | 0 | 0 |
| 2: MS/2 +2,4-D 5 mg/L | 50 | 1 | 3 |
| 3: MS/4 + IAA 5 mg/L | 50 | 27 | 54 |
| 4: MS/2 + IAA 5 mg/L | 50 | 3 | 6 |

**(ก)** **(ข)** **(ค)**

**ภาพที่ 1** ลักษณะแคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร MS2/4 + IAA 5 mg/L นาน 5 เดือน (ก), direct embryos (ข) และที่ย้ายอนุบาลในโรงเรือนเพาะชำเป็นเวลา 4 เดือน (ค)

**การผลิตต้นอ่อนรูปตอปิโด (torpedo embryo production)**

เมื่อหลังจากได้แคลลัสจากกรรมวิธีที่ 3 และ 4 แล้ว คัดกลุ่มแคลลัสที่มีศักยภาพ ภายใต้กล้องสเตอรีโอ คัดเลือกแคลลัสที่ยังเกาะกลุ่มกัน (ภาพที่ 2ก) มีความวาว สีขาวอมเหลือง และคัด ต้นอ่อนโดยตรง (direct embryos) ออกจากกลุ่มแคลลัส ชั่งน้ำหนักแคลลัสที่ 0.03 กรัม นำแคลลัสไปเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว MS+BAP 1 mg/L, 100 ml เป็นเวลา 3 สัปดาห์ และเปลี่ยนเป็นอาหารเหลว MS ไม่เติมฮอร์โมน 500 ml โดยทำการเปลี่ยนอาหารทุกๆ 2 สัปดาห์ ในขั้นตอนนี้ ให้เลี้ยงบนเครื่องเขย่าแบบแนวนอนตลอดเวลา จนกระทั่งแคลลัสพัฒนาเป็นต้นอ่อนรูปตอปิโด (ภาพที่ 2ข) ซึ่งใช้เวลา 10 สัปดาห์ เก็บเกี่ยวต้นอ่อนรูปตอปิโดได้จำนวน 16.20 กรัม ข้อจำกัดในขั้นตอนนี้จะต้องควบคุมไม่ให้เครื่องเขย่าหยุดทำงานเกิน 1 ชั่วโมง



**(ก)** **(ข)**

**ภาพที่ 2** กลุ่ม embryogenic callus ที่ใช้เพาะเลี้ยงต้นอ่อนรูปตอปิโด (ก) ต้นอ่อนรูปตอปิโดที่ได้จากการเพาะเลี้ยงแคลลัสในอาหารเหลว 10 สัปดาห์ (ข)

**การชักนำให้ต้นอ่อนรูปตอปิโดเป็นต้นอ่อนที่มีใบจริง (*in vitro* pregermination)**

เก็บเกี่ยวต้นอ่อนรูปตอปิโดจากอาหารเหลว ได้ต้นอ่อนรูปตอปิโดจำนวน 16.20 กรัม วางต้นอ่อนรูปตอปิโดบนกระดาษซับที่ฆ่าเชื้อแล้ว จำนวน 7 วัน เพื่อทำลายการพักตัวของต้นอ่อน จากนั้นชั่งต้นอ่อนจำนวน 1 กรัม นำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็งสูตร 1/2MS +BAP 0.5 mg/L ให้แสง 14 ชมต่อวัน เป็นเวลา 2 เดือน เปลี่ยนอาหารกึ่งแข็งเป็นสูตร 1/2MS เพาะเลี้ยงอีก 3 เดือนจะได้ต้นอ่อนที่พร้อมจะย้ายไปอนุบาล ในเรือนเพาะชำ อย่างไรก็ตามต้นอ่อนรูปตอปิโดจำนวน 16.20 กรัม ไม่สามารถพัฒนาเป็นต้นอ่อนที่มีใบจริงได้ เนื่องจาก ต้นอ่อนรูปตอปิโดไม่เจริญเติบโต เปลี่ยนเป็นสีดำ และมีกลิ่นเหม็น คาดว่า สาเหตุเกิดจากช่วงการชักนำให้เป็นต้นอ่อนรูปตอปิโดในอาหารเหลวนั้น เกิดเหตุกระแสไฟฟ้าขัดข้องเกินกว่า 2 ชั่วโมง เครื่องเขย่าหยุดการทำงานเกินกว่า 1 ชั่วโมง ทำให้การเขย่าของอาหารเหลวไม่ต่อเนื่อง เป็นเหตุให้ต้นอ่อนรูปตอปิโดที่กำลังเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วเกิดการขาดออกซิเจน การเจริญเติบโตชะงัก ถึงแม้ว่าการเก็บเกี่ยวต้นอ่อนรูปตอปิโด เมื่อครบ 10 สัปดาห์ จะไม่พบความผิดปกติของต้นอ่อนรูปตอปิโดมากนัก แต่เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งเพื่อชักนำให้เป็นต้นอ่อนที่เกิดใบจริง ต้นอ่อนเปลี่ยนเป็นสีดำและไม่เจริญเติบโต

ในขั้นตอนการชักนำให้เกิดคลลัสนั้น บางส่วนของชิ้นส่วนพืชได้พัฒนาเป็น Direct embryos (ภาพที่ 1ก,ข) ทำการรวบรวม Direct embryos จากกรรมวิธีที่ 3 และ 4 มาชักนำให้เป็นต้นอ่อนที่มีใบจริง โดยเพาะเลี้ยงในอาหารกึ่งแข็ง สูตร 1/2MS +BAP 0.5 mg/L ให้แสง 14 ชมต่อวัน เป็นเวลา 2 เดือน เปลี่ยนอาหารกึ่งแข็งเป็นสูตร 1/2MS เพาะเลี้ยงอีก 3 เดือนจะได้ต้นอ่อนที่พร้อมจะย้ายไปอนุบาล ในเรือนเพาะชำ ได้ต้นอ่อนที่มีใบจริงจำนวน 400 ต้น นำไปอนุบาลในเรือนเพาะชำ

จากการรวบรวมต้นอ่อนที่ได้จาก Direct embryos จำนวน 400 ต้น เพื่ออนุบาลให้เป็นต้นกล้าในเรือนเพาะชำ และขณะนี้ได้ย้ายไปอนุบาลที่ศูนย์วิจัยเกษตรกลวงเชียงใหม่ หลังย้ายปลูก 4 เดือน พบว่า จำนวนต้นรอด 266 ต้น คิดเป็น 66.5 %

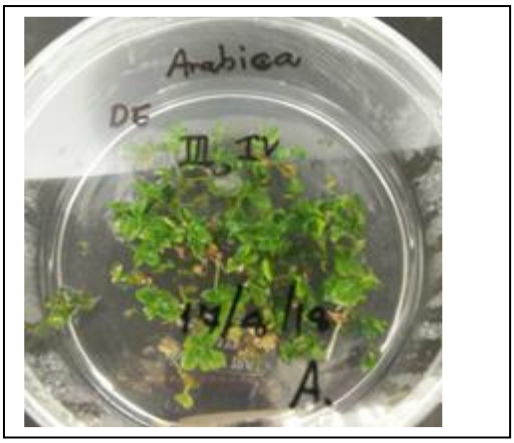
สามารถผลิตต้นอ่อนที่มีใบจริงได้จำนวน 400 ต้น เพื่ออนุบาลให้เป็นต้นกล้าในเรือนเพาะชำ และขณะนี้ได้ย้ายไปอนุบาลที่ศูนย์วิจัยเกษตรกลวงเชียงใหม่ หลังย้ายปลูก 4 เดือน พบว่า จำนวนต้นรอด 266 ต้น คิดเป็น 66.5

**การอนุบาลในเรือนเพาะชำ (*Ex vitro* pregermination)**

เมื่อได้ต้นอ่อนที่มีใบจริง 2-3 คู่ (ภาพที่ 3ข) จะย้ายไปอนุบาลในเรือนเพาะชำโดยแบ่งเป็น 2 ขั้นตอนคือ (1) อนุบาลในตระกร้า (2) อนุบาลในถุงดำ

(1) การอนุบาลในตระกร้า ผสมวัสดุปลูกโดยใช้ พีทมอส (peat moss) ขาวและดำ ในอัตราส่วน 1:1 ผสมให้วัสดุปลูกมีความชื้นประมาณ 85 – 90 เปอร์เซ็นต์ อัดลงในตระกล้าให้แน่น ใช้ปากคีบคีบต้นอ่อนทีละต้นจุมสารละลายกันราก่อนปลูกเรียงเป็นแถว (ภาพที่ 4ก) นำตระกร้าใส่ในถุงพลาสติกใสมัดให้แน่น(ภาพที่ 4ข) นำไป

เก็บในอุโมงค์พลาสติกที่ควบคุมอุณหภูมิภายในไม่ให้เกิน 35 องศาเซสเซียส และมีการพรางแสงประมาณ 40 – 60 เปอร์เซ็นต์ จากการอนุบาลต้นอ่อนที่มีใบจริงในตระกร้าเป็นเวลา 4 เดือน ณ ศูนย์วิจัยเกษตรกลวงเชียงใหม่ พบว่า ทำการย้ายอนุบาลจำนวน 400 ต้น โดยเป็นการอนุบาลคละขนาดของต้นอ่อน พบว่า จำนวนต้นรอด 266 ต้น คิดเป็น 66.5 เปอร์เซนต์



(ก) (ข)

**ภาพที่ 4** ต้นอ่อนที่มีใบจริงจากการเพาะเลี้ยงจาก direct embryos (ก) การย้ายปลูกต้นกล้าในตระกร้าอนุบาล (ข)

**อราบิก้าสายพันธุ์ 2/32 SF 661-36**

สำหรับกาแฟอราบิก้าสายพันธุ์ 2/32 SF 661-36 นั้น สูตรอาหารที่ใช้ กับสายพันธุ์อื่นยังไม่สามารถกระตุ้นให้สายพันธุ์นี้สร้างแคลลัสได้ มีเพียงปฏิกิริยาคือสร้างฟองน้ำขึ้น ดังนั้น จะต้องมีการศึกาถึงอัตราของฮอร์โมนต่างๆ เพื่อกระตุ้นให้กาแฟสายพันธ์นี้สามารถสร้างแคลลัสได้อีกต่อไป

**สรุปผลการทดลอง**

กาแฟอราบิก้าสายพันธุ์ H.528/46 ML2/10-29-65-23 (รหัส 2/8 SF H528) สามารถชักนำให้ชิ้นส่วนใบอ่อนสร้าง embryogenic callus และ direct embryos ด้วยอาหารสูตร MS/4 + IAA 5 mg/L และสามารถผลิตต้นกล้าจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อด้วยวิธี somatic embryogenesis และได้ต้นกล้าที่อนุบาลในถุงดำจำนวน 266 ต้น

**เอกสารอ้างอิง**


Barry-Etienne, D., B. Bertrand, N. Vasquez and H. Etienne. 2002. Comparision of Somatic Embryogennesis-dirived Coffee (*Coffea arabica* L.) Plantlets Regenerated *in vitro* and *ex vitro*: Morphological, Mineral and Water Characteristics. Annals of Botany 90: 77 – 85.

Berthouly, M., M. Dufour, D. Alvard, C. Carasco, L. Alemana and C. Teisson. 1995. Coffee micropropagation in liquid medium using the temporary immersion technique. In: ASIC Publishers (eds.) 16th International Scientific Colloquium on Coffee, Kyoto, Japon (pp. 514-519). Vevey, Switzerland.

Gatica, Andres M., G. Arrieta and M. Espinoza. 2008. Direct somatic embryogensis in *Coffea arabica* L. cas. Caturra and Catuai: effect of triacontanol, light condition, and medium consistency. Agronomia Costarricense 32(1): 139-147.