

ศึกษาและพัฒนาระบบการขยายพันธุ์กล้ากาแฟพันธุ์ใหม่โดยใช้ระบบการเพาะเลี้ยง TIBs และ Somatic Embryogenesis

ประภาพร ฉันทานุมัติ^{๑/} ไพรัตน์ ช่วยเต็ม^{๑/} อรทัย ธนัญชัย^{๑/} ยุพิน กลิ่นเกษมพงษ์^{๒/}

บทคัดย่อ

การขยายพันธุ์กาแฟโรบัสต้าซึ่งเป็นพืชผสมข้ามให้ได้ปริมาณมากในเวลาที่สุดเร็ว การขยายพันธุ์ด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อด้วยวิธี Somatic embryogenesis เป็นวิธีหนึ่งที่น่าสนใจโดยศูนย์วิจัยพืชสวนชุมพร ในขั้นตอน *in vitro* pregermination การเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวด้วยระบบ TIBs ในกาแฟ โรบัสต้าสายพันธุ์แนะนำ ได้มีการศึกษาเพื่อหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการให้อาหารในแต่ละสายพันธุ์ดังกล่าว โดยทำการทดลองในกาแฟโรบัสต้าสายพันธุ์แนะนำคือ ชุมพร ๒ ชุมพร ๔ และชุมพร ๕ โดยมี ๒ กรรมวิธีคือ ระยะเวลาในการให้อาหารครั้งละ ๕ และ ๑๐ นาที จำนวน ๒ ครั้งต่อวัน ผลการทดลองพบว่า ระยะเวลาในการให้อาหาร ๑๐ นาทีต่อครั้งจำนวน ๒ ครั้งต่อวัน จำนวนต้นอ่อนที่ได้ต่อน้ำหนักของ **Torpedo embryos** เริ่มต้น สูงกว่าให้อาหารครั้งละ ๕ นาที ในกาแฟโรบัสต้า สายพันธุ์ ชุมพร ๒ และ ๔ ส่วนกาแฟโรบัสต้าชุมพร ๕ นั้น **Torpedo embryos** ไม่เพียงพอในการทดลอง ได้ผลการทดลองเพียงการให้อาหารเป็นเวลา ๕ นาที ซึ่งพบว่า จำนวนต้นอ่อนต่อน้ำหนัก **Torpedo embryos** เริ่มต้นใกล้เคียงกับ กาแฟโรบัสต้าสายพันธุ์ชุมพร ๒

บทนำ

กาแฟโรบัสต้าเป็นพืชที่มีการผสมเกสรแบบผสมข้าม (cross-pollination) การขยายพันธุ์ปกติจะใช้วิธีการปักชำ หรือเสียบยอดเพื่อให้ตรงตามพันธุ์เดิมมากที่สุด ซึ่งการขยายพันธุ์วิธีดังกล่าวจำเป็นต้องมีต้นแม่พันธุ์จำนวนมากเพื่อใช้ในการขยายพันธุ์ในปริมาณมาก ดังนั้นหากต้องการผลิตพันธุ์ให้ได้ปริมาณมากและตรงตามพันธุ์ที่กำหนดในเวลาจำกัด การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากเซลล์ร่างกายให้พัฒนาจนเป็นต้นอ่อนหรือตัวอ่อนโดยไม่มีเซลล์พันธุ์กรรมมาเกี่ยวข้อง (somatic embryogenesis) จึงเป็นทางเลือกหนึ่งที่ได้นำมาใช้ในการขยายพันธุ์กาแฟโรบัสต้าในปัจจุบัน การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อด้วยวิธี somatic embryogenesis เป็นการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ต้นอ่อนที่ได้จะมีพันธุกรรมเหมือนต้นแม่ทุกประการ และยังมีระบบรากที่เสถียรรากแก้ว ทำให้ได้ต้นกล้าที่มีความแข็งแรงเหมือนต้นกล้าที่ได้จากการเพาะเมล็ด นอกจากนี้ ในการขยายพันธุ์กาแฟโรบัสต้าด้วยวิธี somatic embryogenesis ได้มีการนำเอา ระบบการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในอาหารเหลวด้วยระบบ TIBs (Temporary immersion Bioreactor system) มาใช้ในขั้นตอนการชักนำให้เกิดต้นอ่อนในสภาพปลอดเชื้อเพื่อลดเวลา แรงงาน และต้นทุนอาหาร ในการเพาะเลี้ยง แต่เนื่องจากการผลิตกล้ากาแฟโรบัสต้า ไม่สามารถผลิตกล้ากาแฟโรบัสต้าเพียงสายพันธุ์เดียวได้ ทำให้ต้องทำการผลิตกล้ากาแฟโรบัสต้าหลายสายพันธุ์ เพื่อให้จำหน่ายให้เกษตรกร ศูนย์วิจัยพืชสวนชุมพร จะผลิตกล้ากาแฟโรบัสต้าพันธุ์แนะนำจำนวน ๓ สายพันธุ์ ซึ่งในการผลิตกล้ากาแฟโรบัสต้าแต่ละสายพันธุ์ มีเทคนิคและวิธีการที่แตกต่างกัน ดังนั้น จึงควรทำการศึกษาถึงเทคนิควิธีในการขยายพันธุ์กาแฟโรบัสต้าแต่ละสายพันธุ์ ด้วยวิธี somatic embryogenesis ในอาหารเหลวด้วยระบบ TIBs เพื่อให้การขยายพันธุ์กาแฟโรบัสต้าโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อให้ได้ต้นกล้าที่มีความแข็งแรง ตรงตามพันธุ์ และมีจำนวนเพียงพอต่อความต้องการของเกษตรกร

^{๑/} ศูนย์วิจัยพืชสวนชุมพร

^{๒/} สถาบันวิจัยพืชสวน

วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาถึงเทคนิควิธีการขยายพันธุ์กาแฟโรบัสต้าพันธุ์แนะนำใหม่ โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อด้วยวิธี Somatic embryogenesis ในอาหารเหลวด้วยระบบ TIBs

อุปกรณ์

๑. ต้นอ่อนรูปตอปีโต (torpedo embryos) ของกาแฟโรบัสต้าทั้งสามสายพันธุ์คือ ชุมพร ๒ ชุมพร ๔ และชุมพร ๕
๒. ระบบ Temporary Immersion Bioreactor system (TIBs) แบบใช้ปั๊มอากาศ (Ducos *et. al.*, ๒๐๐๗, ประภาพรและยุพิน, ๒๕๕๑)
๓. อาหารเหลวสูตร MS สำหรับเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกาแฟ
๔. อุปกรณ์และเครื่องมือต่างๆที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

วิธีการ

๑. อาหารเหลวสำหรับเพาะเลี้ยงกาแฟโรบัสต้าในขั้นตอน *In vitro* pregermination (macro MS, micro MS, vitamin Gamborg, BAP ๑ มิลลิกรัม และน้ำตาล ๓๐ กรัม pH ๕.๖) ใช้อาหาร ๑ ลิตรต่อ ๑ ระบบ TIBs ประกอบขวดบรรจุอาหารและขวดบรรจุชิ้นส่วนพืช เข้าด้วยกัน นำระบบ TIBs ฆ่าเชื้อด้วย

เครื่องหนึ่งฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำแรงดันสูง ที่อุณหภูมิ ๑๒๑ องศาเซลเซียส ความดัน ๑.๕ ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน ๒๕ นาที จากนั้นทิ้งไว้ในห้องเลี้ยงเนื้อเยื่อ โดยต่อกับระบบการอาหารและให้อาหารทำงานปกติ ๒ สัปดาห์เพื่อสังเกตว่ามีการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์หรือไม่

๒. ผลิต torpedo embryos ของกาแฟโรบัสต้าแต่ละสายพันธุ์ โดยเฉพาะสายพันธุ์แนะนำ ใหม่คือ ชุมพร ๒ ชุมพร ๔ และ ชุมพร ๕ เพื่อให้เพียงพอต่อการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวด้วย ระบบ TIBs
๓. ศึกษาถึง ความหนาแน่นของ torpedo embryos ของกาแฟโรบัสต้าแต่ละสายพันธุ์ ที่มีความเหมาะสมกับการชักนำให้พัฒนาเป็นต้นอ่อนในสภาพปลอดเชื้อ ในอาหารเหลวด้วยระบบ TIBs
๔. ศึกษาถึงระยะเวลาและจำนวนการให้อาหาร ที่มีความเหมาะสมกับการชักนำให้พัฒนาเป็นต้นอ่อนในสภาพปลอดเชื้อ ในอาหารเหลวด้วยระบบ TIBs ของกาแฟโรบัสต้าแต่ละสายพันธุ์

สถานที่และระยะเวลาทำการทดลอง

ดำเนินการทดลองตั้งแต่ กันยายน ๒๕๕๕ ถึง กันยายน ๒๕๕๘ ณ ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ศูนย์วิจัยพืชสวนชุมพร สถาบันวิจัยพืชสวน

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากการผลการทดลองพบว่าเมื่อเพาะเลี้ยง Torpedo embryos ของกาแฟโรบัสต้าสายพันธุ์ชุมพร ๒ เป็นเวลา ๑๖ สัปดาห์ ในอาหารเหลว โดยมีการให้อาหารครั้งละ ๑๐ นาที จำนวน ๒ ครั้งต่อวัน จำนวนต้นอ่อนที่พร้อมย้ายปลูกที่ได้ เมื่อดำเนินการกลับไป น้ำหนักของ Torpedo embryos เริ่มต้น ได้จำนวนต้นอ่อน ๔๓.๗ ต้น ซึ่งสูงกว่าที่การให้อาหาร ๕ นาทีต่อครั้ง ที่ได้จำนวนต้น ๓๖.๗ ต้น (ตารางที่ ๑) ทั้งนี้ อาจเกิดจากการที่ให้อาหารนานขึ้น ทำให้มีการถ่ายเทอากาศเสียเช่น เอทิลีน ที่เป็นผลเสียต่อต้นอ่อน ออกไป โดยในการให้อาหารนั้นจะไม่ใช้แรงดันลมที่แรงเกินไป แรงดันลมที่ใช้จะเป็นแรงดันที่เพียงพอให้อาหารเหลวขึ้นมาถึงต้นพืชเท่านั้น ทำให้การให้อาหารนานขึ้นกับกาแฟสายพันธุ์นี้ จำนวนต้นต่อน้ำหนักของ Torpedo embryos มากกว่า เมื่อพิจารณาถึงน้ำหนักต้นอ่อนที่ได้พบว่า ต้นอ่อนที่ได้จากการให้อาหาร ๑๐ นาทีต่อครั้ง มีน้ำหนักต่อต้นที่ ๐.๐๓๒ กรัม ซึ่งมีน้ำหนักน้อยกว่าต้นอ่อนที่ได้จากการให้อาหารที่ ๕ นาทีที่มีน้ำหนักต่อต้นที่ ๐.๐๓๙ กรัม ซึ่งอาจจะเนื่องมาจากน้ำหนัก Torpedo embryos เริ่มต้นมีจำนวนที่มากกว่าทำให้ความหนาแน่นสูงกว่า

ตารางที่ ๑ ผลของระยะเวลาในการให้อาหารต่อการพัฒนาเป็นต้นอ่อน (embryos) ของต้นอ่อนรูปตอปีโต (torpedo embryos) ของกาแฟโรบัสต้าสายพันธุ์ ชุมพร ๒ เมื่อเพาะเลี้ยงในระบบ TIBs เป็นเวลา ๑๖ สัปดาห์

ระยะเวลาในการให้อาหาร (นาที)	น.น. torpedo embryos (กรัม)	embryos				
		น.น. (กรัม)	จำนวนต้นต่อกรัม	น.น. ต่อต้น (กรัม)	จำนวนต้นรวม	จำนวนต้นต่อ น.น. ๑ กรัม torpedo embryos (ต้น)
๕	๕๑.๕	๗๘.๔	๒๕	๐.๐๔	๑,๙๖๐	๓๘
	๕๓	๗๐.๐	๒๖	๐.๐๓๘	๑,๘๒๐	๓๔
	๕๔	๘๑.๒	๒๕	๐.๐๔	๒,๐๓๐	๓๘
เฉลี่ย	๕๒.๘	๗๖.๕	๒๕.๓	๐.๐๓๙	๑,๙๓๗	๓๖.๗
๑๐	๖๐.๘	๙๙.๔	๓๑	๐.๐๓๒	๓,๐๘๑	๕๑
	๕๗.๐	๑๐๔.๒	๒๙	๐.๐๓๕	๑,๖๕๓	๒๙
	๕๙.๔	๙๔.๘	๓๒	๐.๐๓๑	๓,๐๓๔	๕๑
เฉลี่ย	๕๙.๑	๘๖.๑	๓๐.๗	๐.๐๓๒	๒,๕๘๙	๔๓.๗

สำหรับกาแฟสายพันธุ์ ชุมพร ๔ นั้น จำนวนต้นอ่อนที่ได้จากการให้อาหารเป็นเวลา ๑๐ นาทีต่อครั้ง จำนวน ๒ ครั้งต่อวัน ก็มีแนวโน้มเดียวกับกาแฟโรบัสต้าสายพันธุ์ชุมพร ๒ คือให้จำนวน ต้นอ่อน ๖๗.๗ ต้นต่อ ๑ กรัม Torpedo embryos ซึ่งมากกว่าการให้อาหารที่ ๕ นาที ที่ได้จำนวนต้นอ่อน ๕๗.๖ ต้นต่อ ๑ กรัม

Torpedo embryos และเมื่อพิจารณาน้ำหนักต่อต้นอ่อน พบว่า ต้นอ่อนที่ได้จากการให้อาหาร ๕ นาทีมี น้ำหนักต่อต้น ที่ ๐.๐๒๙ กรัม ซึ่งน้อยกว่าต้นอ่อนที่ได้จากการให้อาหาร ๑๐ นาที ซึ่งมีน้ำหนักต่อต้นที่ ๐.๐๓๖ กรัม ซึ่งน่าจะเป็นผลมาจากระยะเวลาในการให้อาหารที่นานขึ้น เพราะน้ำหนักของ Torpedo embryos เริ่มต้น ทั้งสองระยะเวลา ไม่แตกต่างกันเท่าไร (ตารางที่ ๒)

ตารางที่ ๒ ผลของระยะเวลาในการให้อาหารต่อการพัฒนาเป็นต้นอ่อน (embryos) ของต้นอ่อนรูปตอปีโด (torpedo embryos) ของกาแพโรบัสต์สายพันธุ์ ชุมพร ๔ เมื่อเพาะเลี้ยงในระบบ TIBs เป็นเวลา ๑๖ สัปดาห์

ระยะเวลาในการให้อาหาร (นาที)	นน. torpedo embryos (กรัม)	embryos				
		นน. (กรัม)	จำนวนต้นต่อกรัม	นน. ต่อต้น (กรัม)	จำนวนต้นรวม	จำนวนต้นต่อ นน. ๑ กรัม torpedo embryos (ต้น)
๕	๕๔	๘๕.๐	๓๐	๐.๐๓๓	๒,๒๕๐	๔๗
	๕๒	๙๓.๐	๓๘	๐.๐๒๖	๓,๕๓๔	๖๘
	๕๗	๙๕.๐	๓๕	๐.๐๒๙	๓,๓๒๕	๕๘
เฉลี่ย	๕๔.๓	๙๑	๓๔.๓	๐.๐๒๙	๓,๐๓๖	๕๗.๖
๑๐	๕๔	๘๒.๐	๓๐	๐.๐๓๓	๒,๔๖๐	๔๖
	๕๖	๑๕๙.๗	๒๕	๐.๐๔๐	๓,๙๗๕	๗๑
	๕๘	๑๗๙.๐	๒๘	๐.๐๓๕	๕,๐๑๒	๘๖
เฉลี่ย	๕๖	๑๔๐.๒	๒๗.๖	๐.๐๓๖	๓,๘๑๘	๖๗.๗

ในส่วนของกาแพโรบัสต์สายพันธุ์ ชุมพร ๕ นั้น เป็นสายพันธุ์กาแพที่ไม่ค่อยมีการผลิตแคลลัส ทำให้ไม่มี Torpedo embryos มาใช้ในการทดลองมากนัก และแคลลัสที่ได้ มีคุณภาพไม่ค่อยดี เท่าใดนัก ทำให้ไม่สามารถทดลองในกรรมวิธีให้อาหารครั้งละ ๑๐ นาทีได้ และผลของการให้อาหาร ครั้งละ ๕ นาทีนั้นพบว่า จำนวนของต้นอ่อนที่ได้ต่อน้ำหนักเริ่มต้นของ Torpedo embryos ใกล้เคียงกับกาแพโรบัสต์สายพันธุ์ชุมพร ๒ คืออยู่ที่ ๓๕.๗ ต้นต่อกรัม Torpedo embryos

ตารางที่ ๓ ผลของระยะเวลาในการให้อาหารต่อการพัฒนาเป็นต้นอ่อน (embryos) ของต้นอ่อนรูปตอปีโด (torpedo embryos) ของกาแพโรบัสต์สายพันธุ์ ชุมพร ๕ เมื่อเพาะเลี้ยงในระบบ TIBs เป็นเวลา ๑๖ สัปดาห์

ระยะเวลาในการให้อาหาร (นาที)	นน. torpedo embryos (กรัม)	embryos				
		นน. (กรัม)	จำนวนต้นต่อกรัม	นน. ต่อต้น (กรัม)	จำนวนต้นรวม	จำนวนต้นต่อ นน. ๑ กรัม torpedo embryos (ต้น)
๕	๒๘.๒	๓๓.๖	๒๔	๐.๐๔๒	๘๐๖	๒๙
	๒๔.๕	๔๒.๕	๒๕	๐.๐๔๐	๑,๐๖๒	๔๓
	๒๙	๔๐.๒	๒๕	๐.๐๔๐	๑,๐๐๕	๓๕
เฉลี่ย	๒๗.๒	๓๘.๘	๒๔.๗	๐.๐๔	๙๕๗.๗	๓๕.๗

สรุปผลการทดลอง

การขยายพันธุ์กาแพโรบัสต์โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อด้วยวิธี somatic embryogenesis ในอาหารเหลว ด้วยระบบ TIBs ในขั้นตอน *in vitro* pregermination นั้น ระยะเวลาที่เหมาะสมในการให้อาหารคือ ๑๐ นาที ต่อครั้ง จำนวน ๒ ครั้งต่อวัน โดยสายพันธุ์ ชุมพร ๒ และ ชุมพร ๔ ใส่ Torpedo embryos ไม่เกิน ๖๐ กรัมต่ออาหาร เหลว ๑.๕ ลิตร จะได้ต้นอ่อนที่ ๓ - ๔,๐๐๐ ต้น ต่อการเพาะเลี้ยง ๑ ระบบ TIBs

เอกสารอ้างอิง

- ประภาพร ฉันทานุมัติและยุพิน กลิ่นเกษมพงษ์. ๒๕๕๑. การผลิตกล้ากาแฟโรบัสต้าจากวิธี Somatic Embryogenesis ในระบบ Temporary Immersion Bioreactor. การประชุมวิชาการพืชสวนแห่งชาติ ครั้งที่ ๗ พฤษภาคม ๒๕๕๑.
- Ducos, JP., C. Lambot, and V. Petiard. ๒๐๐๗. Bioreactor for Coffee Mass Propagation by Somatic Embryogenesis. International Journal of Plant Developmental Biology.๑(๑). pp.๑ -๑๒.