รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด

---

1. ชุดโครงการวิจัย : ที่ 32 วิจัยและพัฒนากาแฟ

2. โครงการวิจัย : ที่ 85 การปรับปรุงพันธุ์กาแฟ

กิจกรรม : ที่ 2 การปรับปรุงพันธุ์กาแฟอะราบิกา

กิจกรรมย่อย (ถ้ามี) : ที่ 2.4 การจำแนกลักษณะและประเมินคุณค่าเชื้อพันธุกรรมพืชสวน

3. ชื่อการทดลอง (ภาษาไทย) : ที่ 2.4.3 ศึกษาการขยายพันธุ์กาแฟอะราบิกา โดยวิธี somatic embryogenesis และ micro-cutting

ชื่อการทดลอง (ภาษาอังกฤษ): Trial 2.4.3 Study micropropagation protocol for Arabica coffee by somatic embryogenesis and micro-cutting

รหัสการทดลอง : 01-27-54-01-02-04-03-55

4. คณะผู้ดำเนินงาน

หัวหน้าการทดลอง : นางสาวประภาพร ฉันทานุมัติ ศูนย์วิจัยพืชสวนชุมพร

ผู้ร่วมงาน : นายไพรัตน์ ช่วยเต็ม ศูนย์วิจัยพืชสวนชุมพร

นางสาวอรทัย ธนัญชัย ศูนย์วิจัยพืชสวนชุมพร

นางสาวยุพิน กสินเกษมพงษ์ สถาบันวิจัยพืชสวน

นางสาวฉัตต์นภา ข่มอาวุธ ศูนย์วิจัยเกษตรหลวงเชียงใหม่

5. บทคัดย่อ :

การศึกษาการขยายพันธุ์กาแฟอะราบิกา โดยวิธี somatic embryogenesis และ micro-cutting วัตถุประสงค์เพื่อให้การปรับปรุงพันธุ์กาแฟอะราบิกาสามารถย่นระยะเวลาให้สั้นลง เพื่อผลิตพันธุ์กาแฟอะราบิกาให้ได้ปริมาณมากและตรงตามพันธุ์ ดำเนินการปี 2555-2558 ณ ศูนย์วิจัยพืชสวนชุมพร อ.สวี จ.ชุมพร ในกาแฟอะราบิกา 3 สายพันธุ์ได้แก่ H.528/46 ML2/10-29-65-23 (รหัส 2/8 SF H528), H.420/9 ML2/4-75-62-26 (รหัส 3/5 SF H420) และ Catimor CIFC 7963-661-36 (รหัส 2/27 SF 661-36 และ รหัส 2/32 SF 661-36) ซึ่งจะเป็นพันธุ์ที่จะเสนอขอเป็นพันธุ์แนะนำของกรมวิชาการเกษตร ผลการดำเนินงานพบว่า ได้วิธีการ

ขยายพันธุ์โดยวิธี somatic embryogenesis ใน 2 สายพันธุ์ คือ H.420/9 ML2/4-75-62-26 โดยใช้ส่วนใบอ่อนเพาะเลี้ยงเพื่อชักนำแคลลัสในอาหารแข็ง สูตรที่เหมาะสมคือ MS (MS + Vitamin Gamborg) + IAA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร +TRIA 5 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือ MS (MS + Vitamin Gamborg) + IAA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร +2,4-D 1 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาล 30 กรัมต่อลิตร pH5.6 ชักนำแคลลัสให้เกิดต้นอ่อนรูปตอปิโด ในอาหารเหลวสูตร MS+BAP 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 3 สัปดาห์ และเปลี่ยนเป็นอาหารเหลวสูตร MS เปลี่ยนอาหารทุกๆ 2 สัปดาห์ เป็นเวลา 10 สัปดาห์ วางต้นอ่อนรูปตอปิโดบนกระดาษซับที่ฆ่าเชื้อแล้ว เป็นเวลา 7 วัน ย้ายเลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็งสูตร 1/2MS + BAP 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 2 เดือน เปลี่ยนอาหารกึ่งแข็งเป็นสูตร 1/2MS เป็นเวลา 3 เดือน ได้ต้นอ่อนที่พร้อมย้ายไปอนุบาลในเรือนเพาะชำ พบว่า มีต้นอ่อนรอดตาย 90 เปอร์เซ็นต์ สามารถพัฒนาเป็นต้นพันธุ์พร้อมปลูก 63 เปอร์เซ็นต์ สำหรับ Catimor CIFC 7963-661-36 พบว่า ยังไม่สามารถชักนำใบอ่อนให้เกิดแคลลัสได้ แต่สามารถชักนำให้เกิด direct embryo ในอาหารกึ่งแข็งสูตร MS + Vitamin Gamborg + IAA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาล 30 กรัมต่อลิตร pH 5.6 เป็นเวลา 11 เดือน จากนั้นย้าย direct embryo ลงเลี้ยงในอาหารสูตรอาหารกึ่งแข็งสูตร 1/2MS + BAP 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 2 เดือน เปลี่ยนอาหารกึ่งแข็งเป็นสูตร 1/2MS เป็นเวลา 3 เดือน ได้ต้นอ่อนที่พร้อมย้ายไปอนุบาลในเรือนเพาะชำ ทั้งนี้ใน H.528/46 ML2/10-29-65-23 พบว่า ยังอยู่ในระหว่างดำเนินการเพื่อหาวิธีการที่เหมาะสมต่อไป

คำสำคัญ : กาแฟอะราบิกา, การขยายพันธุ์ในสภาพปลอดเชื้อ, สารควบคุมการเจริญเติบโต

Abstract

Study micropropagation protocol for Arabica coffee by somatic embryogenesis and micro-cutting, aims to multiply and supply large numbers of Arabica coffee to farmers engaged in coffee production because the production and distribution of hybrid coffee is difficult due to the high costs required for manual crossing and maintenance. The use of somatic embryogenesis is an effective means of propagation. Research on 2012-2015 at Chumporn Horticulture Research Center, Chumporn, Thailand in 3 cultivars of Arabica coffee; H.528/46 ML2/10-29-65-23, H.420/9 ML2/4-75-62-26 and Catimor CIFC 7963-661-36. The result found the protocol by somatic embryogenesis only in H.420/9 ML2/4-75-62-26 and Catimor CIFC 7963-661-36. The protocol for somatic embryogenesis of H.420/9 ML2/4-75-62-26 from leaf explants is described here. The highest percentage of callus induction was observed from explants cultured on Solid MS medium (MS + Vitamin Gamborg) containing 30 g/L sucrose supplemented with (2 mg/L IAA + 5 mg/L TRIA) or with (2 mg/L IAA+ 1 mg/L 2,4-D). When the embryogenic calli were transferred on Liquid MS medium (MS + Vitamin Gamborg) containing 30 g/L sucrose

supplemented with (1 mg/L BAP), these further developed into torpedo embryo after 3 week and subculture in 10 week (2 week/time). The torpedo embryo were keep on sterilize paper for 7 days after that transfer on Semi-solid half-strength MS medium containing 0.5 mg/L BAP for 2 months and obtain on Semi-solid half-strength MS medium for 3 months, these further developed into plantlet which has 2-3 of true leaves (*in vitro* pregermination). Transplant *in vitro* pregermination in greenhouse, these were achieved with 90% survival rate of *ex vitro* pregermination and 60.3% survival rate of plantlets. The protocol for somatic embryogenesis of H.420/9 ML2/4-75-62-26 from leaf explants is described here. The highest percentage of direct embryo induction was observed from explants cultured on Semi-solid MS medium (MS + Vitamin Gamborg) containing 30 g/L sucrose supplemented with (2 mg/L IAA) after 11 months. The direct embryo were transferred on Semi-solid half strength MS medium containing with 0.5 mg/L BAP for 2 months, then transferred on Semi-solid half strength MS medium for 3 months, these further developed into *in vitro* pregermination. For the protocol for somatic embryogenesis of H.528/46 ML2/10-29-65-23 was in progress.

6. คำนำ :

กาแฟ (Coffea spp.) ปัจจุบันพบว่ามีประมาณ 120 ชนิด (species) (Jean Nicolas Wintgens, 2004) สำหรับประเทศไทยมีการปลูก 2 พันธุ์หลักได้แก่ กาแฟโรบัสตา (ปลูกมากทางภาคใต้) และ กาแฟอะราบิกา (ปลูกมากทางภาคเหนือ) พันธุ์กาแฟเป็นปัจจัยการผลิตที่สำคัญซึ่งมีข้อจำกัดทั้งในด้านการให้ผลผลิตและคุณภาพ โดยเฉพาะกาแฟอะราบิกาที่เกษตรกรปลูกอยู่ทั่วไปมีความอ่อนแอต่อโรคราสนิม (Hemileia vastatrix B. & Br.) ทำให้ผลผลิตลดลงส่งผลต่อปริมาณผลผลิต จากผลการดำเนินงานวิจัยปรับปรุงพันธุ์กาแฟในปี 2532-2553 วิจัยได้พันธุ์กาแฟอะราบิกา ได้พันธุ์รับรอง จำนวน 1 พันธุ์ได้แก่ พันธุ์เชียงใหม่ 80 (ศูนย์วิจัยเกษตรหลวงเชียงใหม่, 2550) และได้คัดเลือกพันธุ์กาแฟอะราบิกาสายพันธุ์ต้านทานโรคราสนิมลูกผสมชั่วที่ 6 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 (มานพ และคณะ, 2551; มานพ หาญเทวี1, 2553) ซึ่งจะเสนอขอเป็นพันธุ์แนะนำของกรมวิชาการเกษตร

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากเซลล์ร่างกายให้พัฒนาจนเป็นต้นอ่อนหรือตัวอ่อนโดยไม่มีเซลพันธุกรรมมาเกี่ยวข้อง (somatic embrygenesis) และ micro-cutting โดยเฉพาะ Somatic embryogenesis เป็นการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ต้นอ่อนที่ได้จะมีพันธุกรรมเหมือนต้นแม่ทุกประการ และยังมีระบบรากที่เสมือนรากแก้ว ได้ต้นกล้าที่แข็งแรงเสมือนต้นกล้าที่ได้จากการเพาะเมล็ด ปัจจุบันกรมวิชาการเกษตร ได้พัฒนาวิธีการ Somatic

embryogenesis ในกาแฟโรบัสต้าจนกระทั่งสามารถผลิตกล้ากาแฟโรบัสต้าพันธุ์ดีที่ได้รับการคัดพันธุ์เพื่อกระจายกาแฟสู่เกษตรกร (ประภาพร และยุพิน, 2554) กาแฟอะราบิกาเป็นพืชที่มีการผสมเกสรแบบผสมตัวเอง ปกติขยายพันธุ์โดยวิธีเพาะเมล็ดแต่มีโอกาสที่ผสมข้ามได้ 5-10 เปอร์เซนต์ ซึ่งการขยายพันธ์วิธีดังกล่าวต้องใช้ระยะเวลานานในการปรับปรุงพันธุ์เพื่อให้ได้ลูกผสมที่ไม่มีความแปรปรวน ต้องใช้เวลาดำเนินการถึงเจ็ดรอบ (ลูกผสมชั่วที่ 7) มากกว่า 25 ปี จึงจะสามารถกระจายพันธุ์ดีให้เกษตรกรได้ ประกอบกับต้องมีต้นแม่พันธุ์จำนวนมากเพื่อใช้ในการขยายพันธุ์ในปริมาณมาก ดังนั้นหากต้องการผลิตพันธุ์ปริมาณมากและตรงตามพันธุ์ การขยายพันธุ์โดยวิธี somatic embrygenesis) และ micro-cutting จึงเป็นทางเลือกหนึ่งที่ใช้ในการขยายพันธุ์กาแฟอะราบิกา เพื่อให้การปรับปรุงพันธุ์กาแฟอะราบิกาสามารถย่นระยะเวลาให้สั้นลง เพื่อให้การผลิตกาแฟอะราบิกาของเกษตรกรมีประสิทธิภาพมากขึ้น

7. วิธีดำเนินการ :

อุปกรณ์

1. ต้นพันธุ์กาแฟอะราบิกา จำนวน 3 พันธุ์ ได้แก่ H.528/46 ML2/10-29-65-23 (รหัส 2/8 SF H528), H.420/9 ML2/4-75-62-26 (รหัส 3/5 SF H420) และ Catimor CIFC 7963-661-36 (รหัส 2/27 SF 661-36 และ รหัส 2/32 SF 661-36)
2. วัสดุและอุปกรณ์สำหรับใช้ในห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ได้แก่ วัสดุวิทยาศาสตร์ สารเคมี และ สารควบคุมการเจริญเติบโต (indole-3-acetic acid; IAA, 6-Benzylaminopurine; BAP, Triacontanol; TRIA) และกระดาษกรอง น้ำตาลทรายขาว เป็นต้น
3. วัสดุและอุปกรณ์ทางการเกษตร ได้แก่ บัวรดน้ำ ปุ๋ยทางใบ สารเคมีกำจัดแมลงและโรคพืช ป้ายชื่อ วัสดุปลูก (พีทมอสขาว และพีทมอสดำ) ตะกร้า เป็นต้น

วิธีการ

1. แบบการทดลอง : ไม่มีแบบแผนการทดลอง
2. วิธีการทดลอง
   2.1 การขยายพันธุ์ในสภาพปลอดเชื้อโดยวิธี somatic embrygenesis
      2.1 การฟอกฆ่าเชื้อ

นำใบอ่อนกาแฟอะราบิกาที่ดูแลรักษาในเรือนเพาะชำไม่น้อยกว่า 3 เดือน ล้างด้วยน้ำสบู่อ่อนๆ จากนั้นล้างในน้ำไหลให้สะอาด แช่ในเอทิลแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปแช่ในแคลเซียมไฮโปรคลอไรค์ ความเข้มข้น 40 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 40 นาที แล้วล้างน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง นำใบกาแฟมาตัดเป็นชิ้นขนาด 3x3 มิลลิเมตร

2.2 การชักนำให้เกิดแคลลัส (embryogenic callus induction)

อาหารสูตร MS (Murashige and Skoog, 1962) ที่เติม Vitamin Gamborg (Gamborg's, 1968) น้ำตาลซูโครส (sucrose) 30 กรัมต่อลิตร pH5.6 ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตตามกรรมวิธี 9 กรรมวิธี ได้แก่ กรรมวิธีที่ 1 MS (MS + Vitamin Gamborg) + IAA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร กรรมวิธีที่ 2 MS (MS + Vitamin Gamborg) + IAA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร + TRIA 5 มิลลิกรัมต่อลิตร กรรมวิธีที่ 3 MS (MS + Vitamin Gamborg) + IAA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร+TRIA 10 มิลลิกรัมต่อลิตร กรรมวิธีที่ 4 MS (MS + Vitamin Gamborg) + TRIA 5 มิลลิกรัมต่อลิตร กรรมวิธีที่ 5 MS (MS + Vitamin Gamborg) + TRIA 10 มิลลิกรัมต่อลิตร กรรมวิธีที่ 6 MS (MS + Vitamin Gamborg) + IAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร + 2,4-D 1 มิลลิกรัมต่อลิตร กรรมวิธีที่ 7 MS (MS + Vitamin Gamborg) + IAA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร + 2,4-D 1 มิลลิกรัมต่อลิตร กรรมวิธีที่ 8 MS (MS + Vitamin Gamborg) + IAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร + 2,4-D 2 มิลลิกรัมต่อลิตร กรรมวิธีที่ 9 MS (MS + Vitamin Gamborg) + IAA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร + 2,4-D 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่เติมน้ำตาลซูโครส (sucrose) 30 กรัมต่อลิตร pH5.6 แล้วเก็บไว้ในที่มืด โดยเปลี่ยนอาหารทุก 2 เดือน

2.3 การผลิตต้นอ่อนรูปตอปิโด (torpedo embryo production)

เมื่อได้แคลลัส ดำเนินการคัดเลือกแคลลัสภายใต้กล้องสเตอรีโอ โดยคัดเลือกกลุ่มแคลลัสที่มีศักยภาพคือ มีการเกาะกลุ่มกัน มีความวาว สีขาวอมเหลือง และคัดต้นอ่อนโดยตรง (direct embryos) ออกจากกลุ่มแคลลัส ชั่งน้ำหนักแคลลัสที่ 0.05 กรัม นำแคลลัสไปเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว MS+BAP 1 มิลลิกรัมต่อลิตร จำนวน 100 มิลลิลิตร เป็นเวลา 3 สัปดาห์ และเปลี่ยนเป็นอาหารเหลว MS ปริมาณ 500 มิลลิตร โดยทำการเปลี่ยนอาหารทุกๆ 2 สัปดาห์ จนกระทั่งแคลลัสพัฒนาเป็นต้นอ่อนรูปตอปิโด พร้อมบันทึกระยะเวลาในการพัฒนาในขั้นตอนนี้ ให้เลี้ยงบนเครื่องเขย่าแบบแนวนอนตลอดเวลา

2.4 การชักนำให้ต้นอ่อนรูปตอปิโดเป็นต้นอ่อนที่มีใบจริง (*In vitro* pregermination)

หลังจากได้ต้นอ่อนรูปตอปิโดแล้ว เก็บเกี่ยวต้นอ่อนรูปตอปิโดจากอาหารเหลว วางต้นอ่อนรูปตอปิโดบนกระดาษซับที่ฆ่าเชื้อแล้ว จำนวน 7 วัน เพื่อทำลายการพักตัวของต้นอ่อน จากนั้นชั่งต้นอ่อนจำนวน 1 กรัม นำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็งสูตร 1/2MS +BAP 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้แสง 14 ชมต่อวัน บันทึกระยะเวลาในการพัฒนา เปลี่ยนอาหารกึ่งแข็งเป็นสูตร 1/2MS บันทึกระยะเวลาในการพัฒนาเป็นต้นอ่อนที่มีใบจริง 2-3 คู่

2.5 การอนุบาลในเรือนเพาะชำ (*Ex vitro* pregermination)

นำต้นอ่อนที่มีใบจริง 2-3 คู่ ย้ายอนุบาลในเรือนเพาะชำโดยแบ่งเป็น 2 ขั้นตอนคือ (1) อนุบาลในตระกร้า (2) อนุบาลในถุงดำ ดังนี้

(1) การอนุบาลในตระกร้า วัสดุปลูกคือ พีทมอส (peat moss) ขาวและดำ อัตราส่วน 1:1 ผสมให้วัสดุปลูกมีความชื้นประมาณ 85 – 90 เปอร์เซ็นต์ อัดลงตระกล้าให้แน่น ใช้ปากคีบคีบต้นอ่อนทีละต้นจุ่ม

สารละลายกันรา ก่อนปลูกเรียงเป็นแถว นำตระกร้าใส่ในถุงพลาสติกใสมัดให้แน่น นำไปเก็บในอุโมงค์พลาสติกที่ควบคุมอุณหภูมิภายในไม่ให้เกิน 35 องศาเซสเซียส และพรางแสงประมาณ 40 – 60 เปอร์เซ็นต์ จนได้ต้นกล้าขนาดใหญ่ (มีใบจริง 5-6 คู่) พร้อมบันทึกเวลาที่พัฒนาการและอัตรารอดตาย

(2) การอนุบาลในถุงดำ นำต้นกล้าที่รอดจากการอนุบาลในตะกร้า และมีใบจริงประมาณ 5-6 คู่ใบ ย้ายมาอนุบาลในถุงดำเพื่อให้เจริญเติบโตพร้อมที่จะย้ายปลูกในสภาพแปลงโดยทดลองย้ายปลูกในวัสดุปลูก 2 ชนิดคือ วัสดุปลูกเก่า (ขุยมะพร้าว:หน้าดิน:ปุ๋ยคอก:ปุ๋ยหมัก อัตราส่วน 1:1:1:1) และวัสดุใหม่ (ขุยมะพร้าว:ทราย:ปุ๋ยหมักใบก้ามปู อัตราส่วน 1:1:1) และเก็บรักษาใน 2 สภาวะคือ อุโมงค์ควบคุมอุณหภูมิ และนอกอุโมงค์ควบคุมอุณหภูมิ พร้อมบันทึกเวลาที่พัฒนาการและอัตรารอดตาย

2.2 การขยายพันธุ์ในสภาพปลอดเชื้อโดยวิธี micro cutting

สำหรับกาแฟอะราบิกาที่ไม่สามารถขยายพันธุ์โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อด้วยวิธี Somatic embryogenesis ได้ จะทำการศึกษาการขยายพันธุโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อด้วยวิธี micro cutting โดยการนำตาข้างมาฟอกฆ่าเชื้อและเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS เพื่อศึกษาถึงอัตราการขยายพันธุด้วยวิธีการนี้

3. การบันทึกข้อมูล : เปอร์เซ็นต์การสร้างแคลลัส (%) ระยะเวลาในการพัฒนาจนเกิดต้น ได้แก่ แคลลัส ต้นอ่อนรูปตอปิโด ต้นอ่อนที่มีใบจริง อัตรารอดตาย

เวลาและสถานที่

ระยะเวลา : ตุลาคม 2554 – กันยายน 25568

สถานที่ : ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ และเรือนอนุบาลต้นกล้า ศูนย์วิจัยพืชสวนชุมพร

8. ผลการทดลองและวิจารณ์ (เป็นส่วนสำคัญของการทำงานวิจัย)

ดำเนินการในกาแฟอะราบิกา 3 สายพันธุ์ได้แก่ H.528/46 ML2/10-29-65-23 (รหัส 2/8 SF H528), H.420/9 ML2/4-75-62-26 (รหัส 3/5 SF H420) และ Catimor CIFC 7963-661-36 (รหัส 2/27 SF 661-36 และ รหัส 2/32 SF 661-36) ขยายพันธุ์โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อด้วยวิธี Somatic embryogenesis คือ

8.1 กาแฟอะราบิกาสายพันธุ์ H.420/9 ML2/4-75-62-26 (รหัส 3/5 SF H420) ขั้นตอนคือ

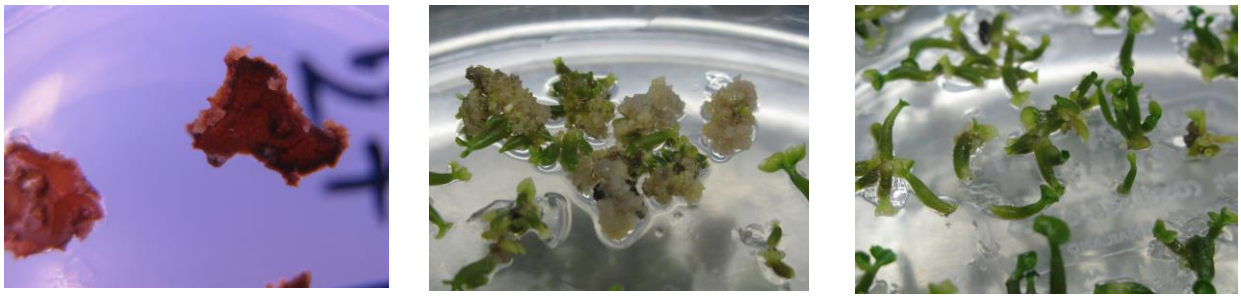
8.1.1 การฟอกฆ่าเชื้อ นำใบอ่อนกาแฟอะราบิกาที่ดูแลรักษาในเรือนเพาะชำไม่น้อยกว่า 3 เดือน ล้างด้วยน้ำสบู่อ่อนๆ จากนั้นล้างในน้ำไหลให้สะอาด แช่ในเอทิลแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปแช่ในแคลเซียมไฮโปรคลอไรค์ ความเข้มข้น 40 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 40 นาที แล้วล้างน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง นำใบกาแฟมาตัดเป็นชิ้นขนาด 3x3 มิลลิเมตร

8.1.2 การชักนำให้เกิดแคลลัส (embryogenic callus induction) พบว่า ชิ้นส่วนใบเริ่มสร้างแคลลัสในสูตรอาหารกรรมวิธี 2 คือ MS (MS + Vitamin Gamborg) + IAA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และ TRIA 5 มิลลิกรัมต่อลิตรเมื่อเพาะเลี้ยงได้ 5 เดือน (ภาพที่ 1ก 1ข, ตารางที่ 1) โดยอัตราการสร้างแคลลัสอยู่ที่ 20 เปอร์เซ็นต์ และกรรมวิธีที่ 7 คือ MS (MS + Vitamin Gamborg) + IAA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร + 2,4-D 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ในเดือนที่ 11 แต่อัตราการสร้างแคลลัสคือ 2 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 1) แคลลัสจะมีลักษณะเป็นกลุ่มเซลที่เกาะตัวกันมีสีขาว

อมเหลือง มีความมันวาวในตัวเอง โดยในส่วนแคลลัสบางส่วนนั้น มีการพัฒนาเป็นเอมบริโอโดยตรง (ภาพที่ 1ค) เรียกว่า Direct embryos ซึ่งเป็นต้นอ่อนที่ได้จากกระบวนการ Somatic embryogenesis อีกแบบหนึ่ง พบว่าการชักนำให้เกิดแคลลัสในกาแฟอะราบิกานั้น ใช้อาหารสูตร MS เป็นหลักเช่นเดียวกับกาแฟโรบัสต้า แต่ในกาแฟอะราบิกานั้นจะมีการเติมฮอร์โมนออกซิน ซึ่งในการทดลองนี้มีทั้งการใช้ TRIA (Gatica, 2008) และ 2,4-D

ตารางที่ 1 เปอร์เซ็นต์การสร้างแคลลัสของชิ้นส่วนใบอ่อนกาแฟอะราบิกาสายพันธุ์ H.420/9 ML2/4-75-62-26 (รหัส 3/5 SF H420) เมื่อเพาะเลี้ยงได้ 12 เดือน

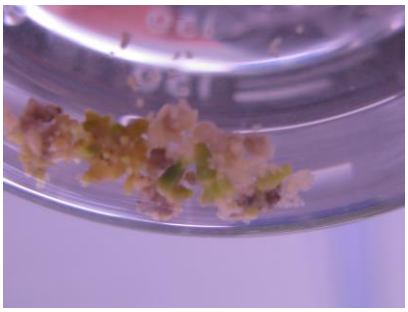
กรรมวิธีที่	จำนวนชิ้นส่วนใบ (ชิ้น)		เปอร์เซ็นต์การสร้างแคลลัส (%)
	ทั้งหมด	สร้างแคลลัส	
1:MS+IAA 2 mg/L+TRIA 0 mg/L	50	0	0
2:MS+IAA 2 mg/L+TRIA 5 mg/L	50	10	20
3:MS+IAA 2 mg/L+TRIA 10 mg/L	50	0	0
4:MS+IAA 0 mg/L+TRIA 5 mg/L	50	0	0
5:MS+IAA 0 mg/L+TRIA 10 mg/L	50	0	0
6:MS+IAA 1 mg/L+2,4-D 1 mg/L	50	0	0
7:MS+IAA 2 mg/L+2,4-D 1 mg/L	50	1	2
8:MS+IAA 1 mg/L+2,4-D 2 mg/L	50	0	0
9:MS+IAA 2 mg/L+2,4-D 2 mg/L	50	0	0



(ก) (ข) (ค)

ภาพที่ 1 ชิ้นส่วนใบที่เลี้ยงบนอาหาร MS (ก), embryogenic callus (ข), direct embryos (ค)

8.1.3 การผลิตต้นอ่อนรูปตอปิโด (torpedo embryo production) บนเครื่องเขย่าแบบแนวนอนตลอดเวลา พบว่า เมื่อได้กลุ่มแคลลัสที่มีศักยภาพ คัดเลือกแคลลัสภายใต้กล้องสเตอรีโอ ที่ยังเกาะกลุ่มกัน มีความวาว สีขาวอมเหลือง และคัดต้นอ่อนโดยตรง (direct embryos) ออกจากกลุ่มแคลลัส ชั่งน้ำหนักแคลลัสที่ 0.05 กรัม นำแคลลัสไปเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว MS+BAP 1 มิลลิกรัมต่อลิตร จำนวน 100 มิลลิตร เป็นเวลา 3 สัปดาห์ และเปลี่ยนเป็นอาหารเหลว MS จำนวน 500 มิลลิลิตร เปลี่ยนอาหารทุกๆ 2 สัปดาห์ พบว่า แคลลัสพัฒนาเป็นต้นอ่อนรูปตอปิโด ใช้เวลา 10 สัปดาห์

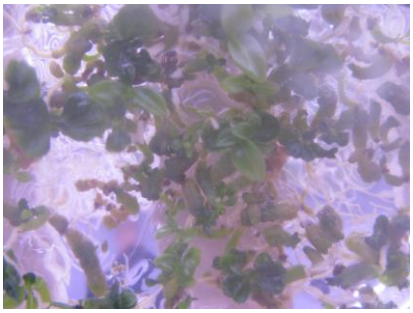


(ก)

(ข)

ภาพที่ 2 กลุ่มแคลลัสที่เลี้ยงในอาหารเหลว (ก) ต้นอ่อนรูปตอปิโดที่ได้จากการเพาะเลี้ยงแคลลัสในอาหารเหลว 10 สัปดาห์ (ข)

8.1.4 การชักนำให้ต้นอ่อนรูปตอปิโดเป็นต้นอ่อนที่มีใบจริง (*in vitro* pregermination) เมื่อเก็บเกี่ยวต้นอ่อนรูปตอปิโดจากอาหารเหลว วางต้นอ่อนรูปตอปิโดบนกระดาษซับที่ฆ่าเชื้อแล้ว จำนวน 7 วัน เพื่อทำลายการพักตัวของต้นอ่อน จากนั้นชั่งต้นอ่อนจำนวน 1 กรัมนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็งสูตร 1/2MS +BAP 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน พบว่าใช้เวลา 2 เดือน เปลี่ยนอาหารกึ่งแข็งเป็นสูตร 1/2MS พบว่าใช้เวลา 3 เดือน จะได้ต้นอ่อนที่พร้อมที่มีใบจริง 2-3 คู่ จึงจะย้ายไปอนุบาลในเรือนเพาะชำ (ภาพที่ 3)



(ก)

(ข)

ภาพที่ 3 ต้นอ่อนรูปตอปิโดที่เริ่มพัฒนาเป็นต้นอ่อนที่มีใบเลี้ยง เมื่อเพาะเลี้ยงได้ 2 เดือน (ก) ต้นอ่อนที่มีใบจริงที่พร้อมย้ายไปอนุบาลในเรือนเพาะชำ (ข)

8.1.5 การอนุบาลในเรือนเพาะชำ (*Ex vitro* pregermination) เมื่อได้ต้นอ่อนที่มีใบจริง 2-3 คู่ (ภาพที่ 3ข) ได้ย้ายไปอนุบาลในเรือนเพาะชำโดยแบ่งเป็น 2 ขั้นตอนคือ

(1) การอนุบาลในตระกร้า ผสมวัสดุปลูกโดยใช้พีทมอสขาวและดำ อัตราส่วน 1:1 ผสมให้วัสดุปลูกมีความชื้นประมาณ 85 – 90 เปอร์เซ็นต์ อัดลงในตระกล้าให้แน่น นำต้นอ่อนจุ่มสารละลายกันราก่อนปลูกเรียงเป็นแถว (ภาพที่ 4ก) นำตระกร้าใส่ในถุงพลาสติกใสมัดให้แน่น(ภาพที่ 4ข) เก็บในอุโมงค์พลาสติกที่ควบคุมอุณหภูมิภายในไม่ให้เกิน 35 องศาเซสเซียส และพรางแสงประมาณ 40 – 60 เปอร์เซ็นต์ พบว่า เมื่ออนุบาลเป็นเวลา 4 เดือน ต้นกล้าขนาดใหญ่ (มีใบจริง 5-6 คู่) มีอัตรารอดตายสูงกว่าต้นอ่อนที่มีขนาดเล็ก (มีใบจริงคู่เดียวหรือไม่มี) โดยมีอัตราการรอดตายถึง 90 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 ผลของขนาดต้นต่อการอนุบาลต้นกล้ากาแฟอราบิก้าในตระกร้า เมื่ออนุบาลเป็นเวลา 4 เดือน

ขนาดต้น	จำนวนที่ปลูก (ต้น)	จำนวนต้นรอด (ต้น)	เปอร์เซ็นต์รอด (%)
ขนาดเล็ก	134	74	55

ขนาดใหญ่	303	273	90

(ก)

(ข)

ภาพที่ 4 การย้ายปลูกต้นกล้าในตระกร้าอนุบาล (ก) รูปแบบการจัดการตระกร้าอนุบาลเพื่อนำไปเก็บในอุโมงค์เพาะเลี้ยง (ข)

(2) การอนุบาลในถุงดำ เมื่อได้ต้นกล้าที่รอดจากการอนุบาลในตะกร้า และมีใบจริงประมาณ 5-6 คู่ใบ (ภาพที่ 5) จะย้ายมาอนุบาลในถุงดำเพื่อให้เจริญเติบโตพร้อมที่จะย้ายปลูกในสภาพแปลงโดยทดลองย้ายปลูกในวัสดุปลูก 2 ชนิดคือ วัสดุปลูกเก่า (ขุยมะพร้าว:หน้าดิน:ปุ๋ยคอก:ปุ๋ยหมัก อัตราส่วน 1:1:1:1) และวัสดุปลูกใหม่ (ขุยมะพร้าว:ทราย:ปุ๋ยหมักใบก้ามปู อัตราส่วน 1:1:1) และเก็บรักษาใน 2 สภาวะคือ อุโมงค์ควบคุมอุณหภูมิ และนอกอุโมงค์ควบคุมอุณหภูมิ พบว่า วัสดุใหม่ที่อนุบาลในอุโมงค์มีอัตรารอดตายมากที่สุด แต่ต้นที่รอดตายและมีความแข็งแรงมีจำนวนคู่ใบและความสูงมากสุดคือ วัสดุเก่าที่อนุบาลในโรงเรือนปกติ (ตารางที่ 3) จากการสังเกตต้นที่รอดตายใน 4 กรรมวิธีนี้ จะพบว่าต้นกล้าที่อนุบาลในโรงเรือนปกติจะมีอัตราการตายในช่วงแรกสูงกว่าต้นที่อนุบาลในอุโมงค์ แต่เมื่อต้นกล้าตั้งตัวได้แล้วจะเจริญเติบโตได้ดีกว่าต้นกล้าที่อนุบาลในอุโมงค์อนุบาล (ภาพที่ 6)

ตารางที่ 3 ผลของการอนุบาลต้นกล้าในถุงดำในวัสดุและสภาพแวดล้อมต่างๆ เป็นเวลา 4 เดือน

กรรมวิธีที่	จำนวนต้นปลูก (ต้น)	จำนวนต้นรอดตาย (ต้น)	เปอร์เซ็นต์รอดตาย (%)	จำนวนใบจริง(คู่)	ความสูงต้น(ซม.)
1:วัสดุปลูกเก่า+อุโมงค์	33	13	39	3.3	6.8
2:วัสดุปลูกใหม่+อุโมงค์	33	21	63	4.0	7.2
3:วัสดุปลูกเก่า+โรงเรือน	33	19	57.5	11.2	7.7
4:วัสดุปลูกใหม่+โรงเรือน	33	11	33.3	7.7	7.5

หมายเหตุ วัสดุปลูกเก่า = ขุยมะพร้าว:หน้าดิน:ปุ๋ยคอก:ปุ๋ยหมัก อัตราส่วน 1:1:1:1 วัสดุปลูกเก่า = ขุยมะพร้าว:ทราย:ปุ๋ยหมักใบก้ามปู อัตราส่วน 1:1:1

ภาพที่ 5 ต้นกล้าเล็กที่พร้อมย้ายปลูกลงถุงดำ

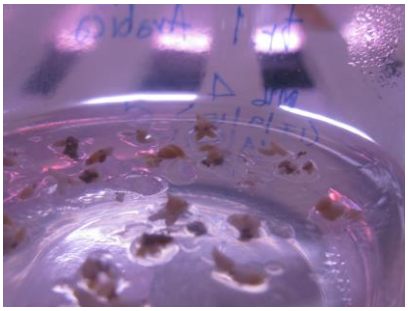
ภาพที่ 6 ต้นกล้าอายุ 4 เดือนหลังย้ายปลูกลงถุงดำ

8.2 กาแฟอะราบิกาสายพันธุ์ Catimor CIFC 7963-661-36 (รหัส 2/32 SF 661-36) ขั้นตอนคือ

8.2.1 การฟอกฆ่าเชื้อ นำใบอ่อนกาแฟอะราบิกาที่ดูแลรักษาในเรือนเพาะชำไม่น้อยกว่า 3 เดือน ล้างด้วยน้ำสบู่อ่อนๆ จากนั้นล้างในน้ำไหลให้สะอาด แช่ในเอทิลแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปแช่ในแคลเซียมไฮโปรคลอไรค์ ความเข้มข้น 40 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 40 นาที แล้วล้างน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง นำใบกาแฟมาตัดเป็นชิ้นขนาด 3x3 มิลลิเมตร

8.2.2 การชักนำให้เกิดแคลลัส (embryogenic callus induction) พบว่า ชิ้นส่วนใบเริ่มสร้างแคลลัสและมีการพัฒนาเป็นเอมบริโอโดยตรง เรียกว่า Direct embryos ซึ่งเป็นต้นอ่อนที่ได้จากกระบวนการ Somatic embryogenesis อีกแบบหนึ่งในสูตรอาหารกรรมวิธี 1 คือ MS (MS + Vitamin Gamborg) + IAA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงได้ 11 เดือน

8.2.3 การชักนำให้ต้นอ่อนเป็นต้นอ่อนที่มีใบจริง (*in vitro* pregermination) เมื่อเก็บเกี่ยวต้นอ่อนที่เป็นเอมบริโอโดยตรง เรียกว่า Direct embryos จากอาหารเหลว วางต้นอ่อนบนกระดาษซับที่ฆ่าเชื้อแล้ว จำนวน 7 วัน เพื่อทำลายการพักตัวของต้นอ่อน จากนั้นชั่งต้นอ่อนจำนวน 1 กรัมนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ให้แสง 14 ชั่วโมงต่อวัน จะได้ต้นอ่อนที่พร้อมที่มีใบจริง 2-3 คู่ จึงจะย้ายไปอนุบาลในเรือนเพาะชำ ได้ต้นอ่อนที่มีใบจริง 5-6 คู่ ทั้งหมดประมาณ 50 ต้นอ่อน



ภาพที่ 7 Direct embryos ของกาแฟอะราบิกาสายพันธุ์ Catimor CIFC 7963-661-36 (รหัส 2/32 SF 661-36)

8.3 กาแฟอะราบิกาสายพันธุ์ H.528/46 ML2/10-29-65-23 (รหัส 2/8 SF H528) ขั้นตอนคือ

8.3.1 การฟอกฆ่าเชื้อ นำใบอ่อนกาแฟอะราบิกาที่ดูแลรักษาในเรือนเพาะชำไม่น้อยกว่า 3 เดือน ล้างด้วยน้ำสบู่อ่อนๆ จากนั้นล้างในน้ำไหลให้สะอาด แช่ในเอทิลแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปแช่ในแคลเซียมไฮโปรคลอไรค์ ความเข้มข้น 40 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 40 นาที แล้วล้างน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง นำใบกาแฟมาตัดเป็นชิ้นขนาด 3x3 มิลลิเมตร

8.3.2 การชักนำให้เกิดแคลลัส (embryogenic callus induction) เมื่อนำชิ้นส่วนใบเพาะเลี้ยงในสูตรอาหาร 9 กรรมวิธี เมื่อเดือน กันยายน 2557 (ครั้งที่ 3) พบว่า ชิ้นส่วนใบยังไม่มีปฏิกิริยา

9. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ :

กาแฟอะราบิกาสายพันธุ์ H.420/9 ML2/4-75-62-26 (รหัส 3/5 SF H420) สามารถผลิตต้นกล้าจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อด้วยวิธี somatic embryogenesis และได้ต้นกล้าที่พร้อมจะปลูกทดสอบในสภาพแปลงจำนวน 100 ต้น กาแฟอะราบิกาสายพันธุ์ Catimor CIFC 7963-661-36 (รหัส 2/32 SF 661-36) สามารถผลิตต้นอ่อนที่ได้จาก Direct embryo จำนวน 50 ต้น กาแฟอะราบิก้าสายพันธุ์ H.528/46 ML2/10-29-65-23 (รหัส 2/8 SF H528) กำลังดำเนินการทดลองหาวิธีการผลิตต้นกล้าจากวิธี somatic embryogenesis

11. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์ :

ได้วิธีการขยายพันธุ์ในสภาพปลอดเชื้อโดยวิธี somatic embrygenesis เพื่อผลิตพันธุ์กาแฟอะราบิกาให้ได้ปริมาณมากและตรงตามพันธุ์ โดยเฉพาะพันธุ์ที่จะเสนอขอเป็นพันธุ์แนะนำของกรมวิชาการเกษตร

12. คำขอบคุณ (ถ้ามี) :

ข้าราชการ ลูกจ้างประจำ และพนักงานราชการศูนย์วิจัยพืชสวนชุมพร

13. 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, Kyto, 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.