

ผลของตำแหน่งชิ้นส่วนใบต่อการชักนำแคลลัสในกาแฟโรบัสต้าพันธุ์ชุมพร 2
Effects of Leaf Segment Positions on Callus Induction
in Robusta Coffee (*Coffea canephora*) cv. Chumphon 2

จักรกริช อนันตสรณ์* ศรีฐิสพล หนูพรหม และนรากร ตรีเดชา

Jackrit Anantasarn*, Karistsapol Nooprom and Narakorn Treedecha

คณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา สงขลา 90000

Faculty of Agricultural Technology, Songkhla Rajabhat University, Songkhla, Thailand 90000

*Corresponding author: Jackrit.an@skru.ac.th

*ORCID iD: <https://orcid.org/0009-0006-7047-8028>

Received: January 21, 2025

Revised: February 12, 2026

Accepted: March 11, 2026

Abstract

Callus induction from leaf explants is a crucial step in coffee tissue culture for rapid and efficient mass propagation of seedlings. This research aimed to study factors affecting callus induction from leaves of Robusta coffee (*Coffea canephora*) cv. Chumphon 2, a popular variety in southern Thailand. The study examined three sequential experiments to test: (1) the effects of explant origin on sterility and callus formation; (2) the effects of leaf segment position and culture medium; and (3) the effects of leaf incisions on callus development. Young leaves from the 2nd – 3rd pairs from the shoot apex were collected from four sources: farmers' fields in Khlong Hoi Khong district, Songkhla province; experimental plots; a greenhouse and a controlled environment room at Songkhla Rajabhat University. Each leaf was divided into three segments (base, middle, and apex), sterilized with 1.2% sodium hypochlorite for 20 minutes, then cultured on NPCM medium (containing 1/2MS modified salts, 0.5 mg L⁻¹ 2,4-D, and 1 mg L⁻¹ 2ip) and C medium (containing 1/2MS salts, 0.5 mg L⁻¹ 2,4-D, 2 mg L⁻¹ 2ip and 1 mg L⁻¹ IBA) under dark conditions for four weeks followed by light conditions for six weeks, combined with leaf incisions to increase surface area. The results Results showed that leaves from the control environment room had the highest rates of sterility and callus formation (95 and 90%, respectively). Leaf base segments cultured on NPCM medium produced the best quality callus in terms of morphological characteristics, number of initiation sites (5.3 sites per explant), and diameter (3.8 mm). Incisions on both dorsal and ventral leaf surfaces promoted high-quality callus formation with a compact texture and dark green

color (100%), suitable for further development into organs or somatic embryos. These findings can be applied to enhance the production of high-quality callus for commercial propagation of *Coffea canephora* cv. Chumphon 2.

Keywords: Coffee tissue culture, *Coffea canephora*, Chumphon 2, callus induction, leaf wounding

บทคัดย่อ

การชักนำแคลลัสจากชิ้นส่วนใบเป็นขั้นตอนสำคัญในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกาแฟเพื่อการขยายพันธุ์ต้นกล้าจำนวนมากอย่างรวดเร็วและมีประสิทธิภาพงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการชักนำแคลลัสจากใบกาแฟโรบัสต้า (*Coffea canephora*) พันธุ์ชุมพร 2 ซึ่งเป็นพันธุ์ที่นิยมปลูกในภาคใต้ของประเทศไทย การศึกษาประกอบด้วย 3 การทดลองต่อเนื่อง ได้แก่ (1) ผลของแหล่งที่มาของชิ้นส่วนพืชต่อการฟอกฆ่าเชื้อและการชักนำแคลลัส (2) ผลของตำแหน่งชิ้นส่วนใบและสูตรอาหารเพาะเลี้ยง และ (3) ผลของการกรีดใบต่อการพัฒนาของแคลลัส โดยเก็บรวบรวมใบอ่อนคู่ที่ 2-3 จากยอดของต้นกาแฟจาก 4 แหล่ง ได้แก่ แปลงเกษตรกรในอำเภอคลองหอยโข่ง จังหวัดสงขลา แปลงสาธิต โรงเรียน และห้องควบคุมสภาพแวดล้อม มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา นำใบมาตัดแบ่งเป็น 3 ส่วน (โคนใบ กลางใบ และปลายใบ) ฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรต์ความเข้มข้น 1.2% เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร NPCM (ประกอบด้วยเกลือ 1/2MS ดัดแปลง, 2,4-D 0.5 มก./ล. และ 2ip 1 มก./ล.) และสูตร C (ประกอบด้วยเกลือ 1/2MS, 2,4-D 0.5 มก./ล. 2ip 2 มก./ล. และ IBA 1 มก./ล.) ในที่มีด 4 สัปดาห์ ตามด้วยสภาวะที่มีแสง 6 สัปดาห์ ร่วมกับการกรีดใบเพื่อเพิ่มพื้นที่ผิวสัมผัส ผลการทดลองพบว่า ใบจากห้องควบคุมสภาพแวดล้อมมีอัตราความปลอดเชื้อและการเกิดแคลลัสสูงที่สุด (ร้อยละ 95 และ 90 ตามลำดับ) ชิ้นส่วนโคนใบที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร NPCM ให้แคลลัสที่มีคุณภาพดีที่สุดในด้านลักษณะทางสัณฐานวิทยา มีจำนวนตำแหน่งการเกิดแคลลัสเฉลี่ย

5.3 ตำแหน่งต่อชิ้นส่วน และมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3.8 มม. การกรีดใบทั้งด้านหลังใบและท้องใบช่วยส่งเสริมการเกิดแคลลัสคุณภาพสูงที่มีเนื้อสัมผัสแน่นและมีสีเขียวเข้ม (ร้อยละ 100) ซึ่งเหมาะสมสำหรับการพัฒนาต่อเป็นอวัยวะหรือโซมาติกเอ็มบริโอ องค์ความรู้ที่ได้สามารถนำไปประยุกต์ใช้เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตแคลลัสคุณภาพสูง สำหรับการขยายพันธุ์กาแฟโรบัสต้าพันธุ์ชุมพร 2 ในเชิงพาณิชย์ต่อไป

คำสำคัญ: การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกาแฟ กาแฟโรบัสต้า พันธุ์ชุมพร 2 การชักนำแคลลัส การสร้างผลใบ

บทนำ

กาแฟโรบัสต้า (*Coffea canephora* Pierre ex A. Froehner) พันธุ์ชุมพร 2 เป็นพันธุ์ที่ได้รับความนิยมอย่างแพร่หลายในพื้นที่เพาะปลูกภาคใต้ของประเทศไทย เนื่องจากมีศักยภาพในการปรับตัวต่อสภาพภูมิอากาศและให้ผลผลิตสูง งานวิจัยด้านการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกาแฟที่ผ่านมาส่วนใหญ่นำมาใช้ในการชักนำเอ็มบริโอจากเนื้อเยื่อทั่วไปในกาแฟอราบิกาและพันธุ์อื่น ๆ (Maruka *et al.*, 2023a) ซึ่งกระบวนการดังกล่าวต้องอาศัยการชักนำแคลลัสเป็นเนื้อเยื่อตั้งต้น ความสำเร็จของการชักนำแคลลัสจากใบกาแฟโรบัสต้าพันธุ์ชุมพร 2 ขึ้นอยู่กับสภาพสรีรวิทยาของต้นแม่พันธุ์ โดยเฉพาะระดับฮอร์โมนภายในและอัตรา การปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ ซึ่งความสัมพันธ์ระหว่างแหล่งที่มาของชิ้นส่วนพืชกับประสิทธิภาพการเกิดแคลลัสนี้ยังจำกัด

การชักนำแคลลัสจากใบเป็นเทคนิคสำคัญที่ช่วยให้สามารถผลิตเนื้อเยื่อคุณภาพสูงได้ในปริมาณมาก และอนุรักษ์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของกาแฟความสำเร็จของกระบวนการนี้ขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายประการ ได้แก่ แหล่งที่มาของเนื้อเยื่อ สภาพสรีรวิทยาของต้นพันธุ์ ตำแหน่งของชิ้นส่วนใบ องค์ประกอบของสูตรอาหาร และวิธีการเตรียมชิ้นส่วนใบ รวมถึงการสร้างบาดแผลบนใบเพื่อเพิ่มพื้นที่สัมผัสกับอาหารเพาะเลี้ยง (Santana-Buzzy *et al.*, 2007; Campos *et al.*, 2017; Darwesh *et al.*, 2024) งานวิจัยหลายฉบับระบุว่า การเลือกใช้ตำแหน่งใบที่เหมาะสม เช่น โคนใบที่มีเนื้อเยื่อเจริญ สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการชักนำแคลลัสได้ดีกว่าตำแหน่งอื่น (Campos *et al.*, 2017; Maruka *et al.*, 2023b) นอกจากนี้ สูตรอาหารเพาะเลี้ยงที่มีองค์ประกอบของสารควบคุมการเจริญเติบโต เช่น 2,4-D และ Zip ในอัตราส่วนที่เหมาะสม เช่น สูตร NPCM หรือสูตร C มีผลอย่างมีนัยสำคัญต่อคุณภาพและปริมาณของแคลลัสที่เกิดขึ้น (Ibrahim *et al.*, 2024; Pádua *et al.*, 2014) การเพิ่มพื้นที่ผิวสัมผัสของชิ้นส่วนใบด้วยการกรีดแผลยังช่วยกระตุ้นการชักนำแคลลัสได้เพิ่มขึ้นร้อยละ 25–30 เมื่อเปรียบเทียบกับชิ้นส่วนที่ไม่ได้รับการกรีด (Ikeuchi *et al.*, 2017; Tunjung *et al.*, 2021)

แม้ว่าจะมีรายงานการศึกษาในกาแฟพันธุ์อื่นที่แสดงอัตราความสำเร็จในการชักนำแคลลัสอยู่ในช่วงร้อยละ 55–90 แต่สำหรับกาแฟโรบัสต้าพันธุ์ชุมพร 2 ยังขาดข้อมูลเชิงลึกเกี่ยวกับประสิทธิภาพของปัจจัยเหล่านี้ในบริบทของพื้นที่เพาะปลูกที่แตกต่างกัน สมมติฐานของงานวิจัยนี้จึงตั้งอยู่บนพื้นฐานว่า ปัจจัยด้านแหล่งที่มาของใบ ตำแหน่งชิ้นส่วนใบ สูตรอาหารเพาะเลี้ยง และการกรีดใบ จะส่งผลต่ออัตราการรอดเชื้อจุลินทรีย์และประสิทธิภาพการชักนำแคลลัสของกาแฟโรบัสต้าพันธุ์ชุมพร 2 ดังนั้น งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ของใบกาแฟจากแหล่งที่มาต่าง ๆ ศึกษาอิทธิพลของตำแหน่งชิ้นส่วนใบ

ต่อการชักนำแคลลัส ทดสอบสูตรอาหารเพาะเลี้ยงที่มีรายงานจากการศึกษาก่อนหน้าต่อคุณภาพและปริมาณของแคลลัสที่เกิดขึ้น และวิเคราะห์ผลของการเพิ่มพื้นที่ผิวสัมผัสของชิ้นส่วนใบด้วยเทคนิคการกรีดต่อประสิทธิภาพการเกิดแคลลัส เพื่อพัฒนาแนวทางการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกาแฟโรบัสต้าพันธุ์ชุมพร 2 ให้มีประสิทธิภาพสูง และประยุกต์ใช้ในการขยายพันธุ์เชิงพาณิชย์ต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

การเตรียมตัวอย่างพืช คัดเลือกใบอ่อนคู่ที่ 2–3 จากยอดกาแฟโรบัสต้าพันธุ์ชุมพร 2 ที่มีอายุระหว่าง 8–12 เดือน จากต้นพันธุ์ในแปลงเกษตรกร แปลงสาธิตโรงเรียน และห้องควบคุมสภาพแวดล้อม เพื่อเปรียบเทียบผลของแหล่งที่มาต่อการรอดเชื้อและการชักนำแคลลัสเลือกใบอ่อน ขนาด 10–15 ซม. ทำความสะอาดเบื้องต้นด้วยน้ำยาล้างจาน 1–2 ครั้ง จากนั้นล้างด้วยน้ำไหล 30 วินาทีต่อใบ แล้วตัดแต่งชิ้นส่วนใบขนาด 5×2 ซม. โดยวางตำแหน่งให้เส้นกลางใบอยู่ตรงกลาง ชิ้นส่วนใบถูกพอกฆ่าเชื้อในสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรด์ 1.2% ที่เติม Tween-20 2 หยด /100 มล. เป็นเวลา 20 นาทีด้วยการเขย่าเบา ๆ จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง ตัดเป็นชิ้นส่วนขนาด 1×1 ซม. โดยให้เส้นกลางใบอยู่ตรงกลางชิ้นส่วน แล้ววางชิ้นส่วนใบลงบนอาหารแข็งที่เตรียมไว้สำหรับการเพาะเลี้ยง

การวางแผนการทดลอง

การวิจัยแบ่งเป็น 3 ขั้นตอนแยกกัน โดยใช้ผลที่ดีที่สุดในการทดลองถัดไป ได้แก่

(1) ทดสอบสภาพความปลอดเชื้อจุลินทรีย์และการพัฒนาของเนื้อเยื่อพืชจากใบกาแฟโรบัสต้าพันธุ์ชุมพร 2 ของต้นกาแฟจากสภาพแวดล้อมต่างกัน วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (CRD) จำนวน 4 กรรมวิธี จำนวน 25 ชิ้นส่วนต่อกรรมวิธี 3 ซ้ำ คือ ต้นกาแฟแปลงเกษตรกร

อำเภอคลองหอยโข่ง จังหวัดสงขลา แปลงสาธิต โรงเรือน และห้องควบคุมสภาพแวดล้อม (ความเข้มแสง 1,000 ลักซ์ เป็นเวลา 10 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$) ของ คณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา ขึ้นส่วนใบถ่วงแสงเลี้ยงบนอาหาร NPCM 1/2MS + 2,4-D 0.5 มก./ล. + 2ip 1 มก./ล.) บนชั้นไฟเป็นเวลา 4 สัปดาห์ แล้วบันทึกผลเปอร์เซ็นต์การปลดเชื้อและการเกิดแคลลัส

(2) ทดสอบตำแหน่งของชิ้นใบและสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำแคลลัส วางแผนการทดลองแบบ Split-plot in CRD โดยให้สูตรอาหารเป็นปัจจัยหลัก และตำแหน่งชิ้นส่วนใบเป็นปัจจัยรอง จำนวน 6 กรรมวิธี (2 สูตรอาหาร $\times$ 3 ตำแหน่ง) จำนวน 25 ชิ้นส่วนต่อกรรมวิธี ซ้ำ 3 ครั้ง โดยใช้ใบจากแหล่งที่เหมาะสมจาก (1) แบ่งใบออกเป็น 3 ส่วน ตามแนวเส้นกลางใบ ได้แก่ ปลายใบ (apex) กลางใบ (middle) และโคนใบ (base) (Figure 1) วางเลี้ยงบนอาหารชักนำแคลลัส 2 สูตร ได้แก่ NPCM (ธาตุอาหารดัดแปลงสูตร 1/2MS + 2,4-D 0.5 มก./ล. + 2ip 1 มก./ล.) (Samson *et al.*, 2006) และสูตร C (ธาตุอาหารสูตร 1/2MS + 2,4-D 0.5 มก./ล. + 2ip 2 มก./ล. + IBA 1 มก./ล.) (Tajetdini *et al.*, 2023) เป็นเวลา 6 สัปดาห์ แล้วบันทึกจำนวนตำแหน่งที่เกิดแคลลัส และขนาดก้อนแคลลัสในตำแหน่งต่าง ๆ ของชิ้นส่วนใบ (รอบเส้นกลางใบ โคนใบ ปลายใบ ขอบใบ ฯลฯ) (Figure 2) และชั่งน้ำหนักสด

(3) ทดสอบการเพิ่มพื้นที่ผิวสัมผัสอาหารบน ชิ้นส่วนด้วยการกรีด วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (CRD) จำนวน 4 กรรมวิธี จำนวน 25 ชิ้นส่วนต่อกรรมวิธี 3 ซ้ำ คือ ด้วยการสร้างบาดแผลตามยาวของใบเล็กไม่เกิน 0.5 มม. ด้วยปลายมีด 4 ลักษณะ คือ ไม่กรีด (ชุดควบคุม) กรีดท้องใบ กรีดหลังใบ และกรีดทั้งท้อง-หลังใบ โดยใช้ ชิ้นส่วนใบในตำแหน่งและสูตรอาหารเพาะเลี้ยงที่เหมาะสม จาก (2) วางเลี้ยงบนชั้นวางและย้ายเลี้ยงทุก 5 สัปดาห์ จำนวน 2 ครั้ง ภาชนะอาหารที่บรรจุชิ้นส่วนใบวาง เลี้ยงบนชั้นวางในที่มีด 4 สัปดาห์ จากนั้นย้ายไปเลี้ยงต่อบนชั้นไฟโดยให้แสงหลอดฟลูออเรสเซนต์ ความเข้มแสง 1,000 ลักซ์ เป็นเวลา 10 ชั่วโมงต่อวัน ควบคุมอุณหภูมิ $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ตลอดการทดลองจนครบ 10 สัปดาห์ แล้วบันทึก ลักษณะแคลลัส (เนื้อสัมผัส สี) รวมถึงลักษณะของชิ้นส่วน เนื้อเยื่อใบเดิม

การวิเคราะห์ผล ผลของสภาพแวดล้อมต่อการ ฆ่าเชื้อและการเกิดแคลลัส (1) วิเคราะห์ด้วย One-way ANOVA ผลของตำแหน่งชิ้นส่วนใบและสูตรอาหาร (2) วิเคราะห์ด้วย 2-way ANOVA โดยให้สูตรอาหารเป็น ปัจจัยหลัก ตำแหน่งใบเป็นปัจจัยรอง ผลของการกรีดใบ (3) วิเคราะห์ด้วย One-way ANOVA หากพบความ แตกต่างมีนัยสำคัญ ใช้ DMRT เปรียบเทียบค่าเฉลี่ย ด้วยโปรแกรม SPSS

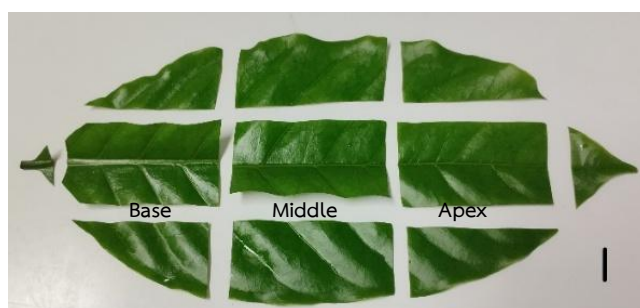


Figure 1 Segment of leaf explants: base, middle and apex (scale bar = 1 cm)

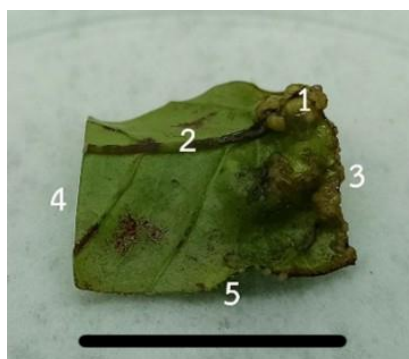


Figure 2 A surface-sterilized leaf explant of *Coffea canephora* cv. Chumphon 2 used for callus induction experiments. Indicated positions; (1) proximal midrib, (2) midrib, (3) basal cut edge, (4) apical cut edge, and (5) lateral cut edge. (scale bar = 1 cm)

ผลการวิจัย

ผลการวิจัยแบ่งออกเป็นตอนตามลำดับการทดลอง ได้ดังนี้

ผลการฟอกฆ่าเชื้อจุลินทรีย์และพัฒนาของเนื้อเยื่อใบกาแฟจากสภาพแวดล้อมแตกต่างกัน

การศึกษาเปรียบเทียบผลของแหล่งที่มาของชิ้นส่วนพืชที่มีต่อประสิทธิภาพการฟอกฆ่าเชื้อและการเกิดแคลลัส โดยเก็บตัวอย่างใบอ่อนจากต้นพันธุ์ในสภาพแวดล้อมต่างกันจากแหล่งปลูกสองแห่ง ได้แก่ แปลงเกษตรกรในอำเภอคลองหอยโข่ง จังหวัดสงขลา และมหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา จากนั้นนำมาฟอกฆ่าเชื้อจุลินทรีย์แล้วนำมาฟอกฆ่าเชื้อและติดตามผลเป็นเวลา 4 สัปดาห์ (Table 1) ผลการทดลองพบว่า สภาพแวดล้อมของแหล่งปลูกมีผลอย่างมีนัยสำคัญต่อระดับการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ โดยชิ้นส่วนใบจากสภาพธรรมชาติในแปลงเกษตรกรมีอัตราการปลอดเชื้อต่ำที่สุดเพียง ร้อยละ 15 ซึ่งสอดคล้องกับใบจากแปลงสาธิตที่มีการปนเปื้อนสูง

เช่นกัน ในทางตรงกันข้าม ชิ้นส่วนใบจากต้นกล้าที่เลี้ยงในระบบปิด (control condition) มีอัตราการปลอดเชื้อสูงสุดถึง ร้อยละ 95 แสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์ชัดเจนระหว่างแหล่งที่มาของเนื้อเยื่อและอัตราการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ โดยเนื้อเยื่อใบจากต้นที่เปิดสัมผัสกับสภาพแวดล้อมธรรมชาติ (ทั้งแปลงเกษตรกรและแปลงสาธิต) มีอัตราการปนเปื้อนสูงกว่า นอกจากนี้ แหล่งที่มาของชิ้นส่วนพืชยังส่งผลโดยตรงต่อศักยภาพการชักนำแคลลัส โดยใบจากระบบปิดมีอัตราการเกิดแคลลัสสูงสุด (ร้อยละ 90) ในขณะที่ใบจากแปลงเกษตรกรมีอัตราต่ำที่สุด (ร้อยละ 33) ทั้งนี้ พบว่าชิ้นส่วนที่ไม่สามารถพัฒนาเป็นแคลลัสจะเกิดสีน้ำตาลเข้มจากการหลั่งสารประกอบฟีนอลิก (phenolic compounds) ในปริมาณมากและตายในที่สุด ปรากฏการณ์นี้บ่งชี้ให้เห็นถึงความสำคัญของการคัดเลือกแม่พันธุ์จากสภาพแวดล้อมที่สะอาด (clean culture) เพื่อลดความเสี่ยงจากการปนเปื้อนและการเกิดสารสีน้ำตาล ซึ่งเป็นปัจจัยจำกัดสำคัญในความสำเร็จของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

Table 1 Effect of explant origins on levels of sterilization and callus induction of *Coffea canephora* cv. Chumphon 2

Source of Explant	Sterility percentage	Callus induction percentage
Control condition*	95±3a	90±5a
Field at SKRU*	90±4a	80±6ab
Nursery at SKRU*	80±6b	55±7b
Agriculture Area**	15±4c	33±5c
F-value	98.75	76.42
CV (%)	8.32	12.64

*Songkhla Rajabhat university, Muang Songkhla, Songkhla province; ** Khlong Hoi Khong, Songkhla province

Means±SEM within the same column followed by different letters (a, b, c) are significantly different at $p<0.05$ according to DMRT.

ผลของตำแหน่งชิ้นส่วนใบและสูตรอาหารต่อการชักนำแคลลัส

การศึกษาได้ดำเนินการฟอกฆ่าเชื้อจุลินทรีย์บนใบกาแฟที่เก็บจากต้นกาแฟที่เพาะปลูกภายใต้สภาวะควบคุมในโรงเรือนปิด จากนั้นทำการแบ่งเนื้อเยื่อออกเป็นสามส่วน ประกอบด้วย ส่วนโคนใบ กลางใบ และปลายใบ ก่อนนำไปเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ 2 สูตร คือ NPCM และ C เป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์ ผลการศึกษา (Table 2) พบว่าเมื่อพิจารณาปัจจัยด้านสูตรอาหาร (A) ต่อการเกิดแคลลัสบนชิ้นส่วนเพาะเลี้ยง สูตรอาหาร NPCM มีประสิทธิภาพในการส่งเสริมการเกิดแคลลัสสูงกว่าสูตรอาหาร C อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในด้านขนาดของแคลลัส อย่างไรก็ตาม สูตรอาหารไม่มีผลต่อจำนวนจุดกำเนิดแคลลัส โดยพบค่าเฉลี่ย 4.8–5.1 จุดต่อชิ้นส่วน เมื่อวิเคราะห์เฉพาะปัจจัยตำแหน่งชิ้นส่วนใบที่นำมาเพาะเลี้ยง (B) ต่อการเกิดแคลลัส พบว่าขนาดของแคลลัสที่เกิดบนชิ้นส่วนใบที่ได้จากบริเวณโคน (base) มีขนาดใหญ่กว่าชิ้นส่วนจากกลาง (middle) และปลายใบ (apex) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ การวิเคราะห์ปฏิสัมพันธ์ระหว่างสูตรอาหารและตำแหน่งชิ้นส่วนใบที่นำมาเพาะเลี้ยง (A × B) แสดงให้เห็นว่ามีนัยสำคัญทางสถิติของขนาดแคลลัสที่เกิดเฉพาะบริเวณแกนใบ (midrib)

และโคนเส้นกลางใบ (proximal-midrib) เท่านั้น โดยชิ้นส่วนจากตำแหน่งโคนใบที่เพาะเลี้ยงในอาหารทั้งสองสูตรเกิดแคลลัสที่มีขนาดใหญ่ที่สุด แต่ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญในด้านจำนวนจุดเริ่มต้นการเกิดแคลลัส ทั้งนี้ จุดกำเนิดแคลลัสพบมากบริเวณเส้นกลางใบและฐานของเส้นกลางใบซึ่งเป็นบริเวณที่มีเนื้อเยื่อต่อลำเลียง ในขณะที่บริเวณรอยตัดที่ขอบใบทั้งด้านโคนและปลายใบนั้น แคลลัสมีการพัฒนาที่ช้าและมีขนาดเล็ก สำหรับบริเวณขอบใบที่ไม่มีรอยตัดพบการพัฒนาของแคลลัสน้อยที่สุดอย่างมีนัยสำคัญ

ภายหลังจากการเพาะเลี้ยงแคลลัสในที่มืดเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ และได้รับการกระตุ้นด้วยแสง (Figure 3) พบว่าแคลลัสมีการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางสัณฐานวิทยาจากสีขาวใสเป็นสีเหลืองอ่อนอมเขียว และพัฒนาเป็นสีเขียวเข้มขึ้นตามระยะเวลาการเพาะเลี้ยง โดยมีลักษณะเนื้อเยื่อที่แข็งและแผ่กระจายออกจากเนื้อเยื่อใบไปตามผิวหน้าอาหารแข็งหรือบริเวณแกนใบ นอกจากนี้ ยังพบการพัฒนาของแคลลัสขนาดเล็กที่มีลักษณะสีขาวและมีความฟู ทั้งนี้ แคลลัสส่วนใหญ่มีการเจริญเติบโตด้านท้องใบ (abaxial) ที่สัมผัสกับผิวอาหารมากกว่าด้านหลังใบ (adaxial) ในระหว่างการเพาะเลี้ยง มีการสังเกตเห็นการสะสมสารประกอบฟีนอลิกสีน้ำตาล

และเนื้อเยื่อชิ้นส่วนเดิมมีการเปลี่ยนแปลงเป็นสีน้ำตาลคล้ำจนถึงดำและเกิดการตาย อย่างไรก็ตาม แคลลัสยังคงมีการเจริญเติบโตอย่างต่อเนื่อง จึงมีความจำเป็นต้องแยกแคลลัสออกจากชิ้นส่วนเดิมเพื่อป้องกันผลกระทบจากการเสื่อมสภาพของเนื้อเยื่อใบและการแพร่กระจายของสารประกอบฟีนอลิกในอาหารเพาะเลี้ยงหลังเสร็จสิ้นการ

ชักนำแคลลัส ดังนั้นกล่าวได้ว่า ตำแหน่งที่มีประสิทธิภาพสูงสุดสำหรับการชักนำแคลลัสในใบกาแฟ คือ บริเวณโคนใบที่มีเส้นกลางใบ (base) โดยเฉพาะบริเวณส่วนฐานและแกนใบ (proximal-midrib, midrib) ซึ่งมีศักยภาพในการชักนำแคลลัสได้สูงทั้งในด้านจำนวนและขนาดของแคลลัส โดยเฉพาะเมื่อเพาะเลี้ยงในสูตรอาหาร NPCM

Table 2 Effects of culture medium and leaf position on callus induction in *Coffea canephora* cv. Chumphon 2 after 6 weeks of culture

	Number of calli per explant	Callus size (mm)				
		Proximal- midrib	Midrib	Basal cut edge	Apical cut edge	Lateral cut edge
Medium (A)						
C (1)	4.9±0.2	2.0±0.2b	2.0±0.2b	1.6±0.1b	1.3±0.1b	1.2±0.1b
NPCM (2)	5.1±0.3	2.9±0.3a	2.8±0.3a	2.1±0.2a	1.6±0.1a	1.6±0.1a
Leaf position (B)						
Base (1)	5.1±0.4	2.6±0.2a	3.1±0.3a	2.2±0.2a	1.8±0.1a	1.7±0.1a
Middle (2)	5.0±0.2	1.9±0.2c	1.9±0.2c	1.5±0.1c	1.1±0.1c	1.0±0.0c
Apex (3)	4.8±0.2	2.1±0.2b	2.1±0.3b	1.7±0.2b	1.3±0.1b	1.2±0.1b
Medium x Leaf position (A x B)						
1x1	4.9±0.5	2.1±0.2bc	2.6±0.3a	1.9±0.2	1.8±0.16	1.6±0.1
1x2	5.1±0.1	2.0±0.2bc	2.0±0.3b	1.6±0.2	1.2±0.1	1.1±0.1
1x3	4.6±0.2	1.6±0.1c	1.4±0.1c	1.4±0.1	1.1±0.1	1.1±0.1
2x1	5.3±0.6	3.2±0.3a	3.8±0.4a	2.5±0.2	1.9±0.2	1.9±0.2
2x2	4.8±0.5	1.7±0.1c	1.7±0.2bc	1.3±0.1	1.0±0.0	1.0±0.0
2x3	5.2±0.5	2.6±0.4a	2.6±0.4ab	2.2±0.3	1.5±0.2	1.4±0.2
F-value						
A	0.8ns	8.8*	4.6*	7.3*	4.3*	7.7*
B	1.7ns	3.7*	5.3*	3.9*	12.5*	8.4*
A x B	2.1ns	4.1*	3.5*	2.8ns	1.9ns	1.8ns
CV (%)	18.4	22.2	24.8	19.4	16.8	15.9

Mean values ± standard error (SE) within the same column followed by different superscript letters (a, b) indicate significant differences ($p < 0.05$) according to Duncan's Multiple Range Test; ns = not statistically significant; * = $p < 0.05$.

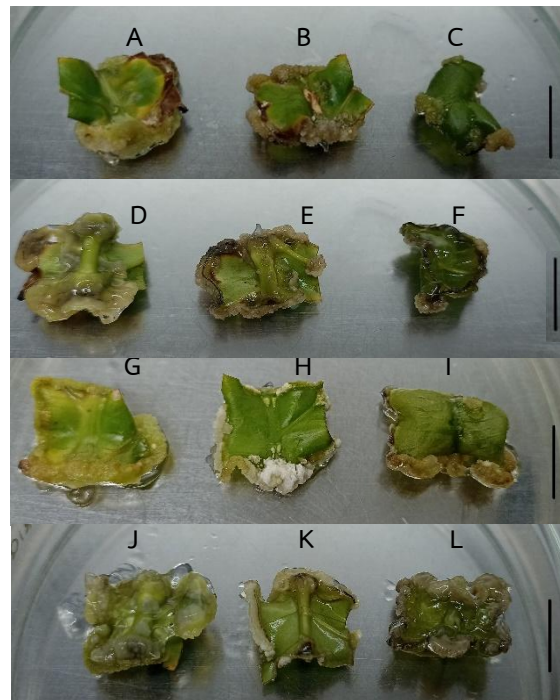


Figure 3 Callus formation on *Coffea canephora* cv. Chomphon 2 leaf explants after six weeks. Panels show explants cultured on C medium (A-F) or NPCM medium (G-L). The explants, taken from the base, middle, and apex of the leaf (left to right in each row), were oriented with either their adaxial side (A-C, G-I) or abaxial side (D-F, J-L) in contact with the medium. (scale bars = 1 cm)

ผลของการเพิ่มพื้นที่ผิวสัมผัสของอาหารบนชิ้นส่วนใบ โดยการกรีดเพื่อสร้างแผล

ในการวิจัยนี้ใช้ชิ้นส่วนโคนใบของต้นกาแฟที่เพาะเลี้ยงในระบบโรงเรือนปิดและผ่านกระบวนการพอกฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ จากนั้นตัดให้มีขนาด 1×1 ซม. โดยให้มีแกนใบอยู่ตรงกลาง และทำการเพิ่มพื้นที่ผิวสัมผัสของอาหารโดยการกรีดตามยาวในตำแหน่งที่แตกต่างกันบนชิ้นส่วนใบ แล้วนำไปเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร NPCM เป็นระยะเวลา 10 สัปดาห์ ผลการทดลองพบว่า จำนวนและน้ำหนักสดของแคลลัสที่เกิดขึ้นมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Table 3) การกรีดใบเพียงด้านเดียวไม่แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับชิ้นส่วนใบที่ไม่ถูกกรีด อย่างไรก็ตาม การกรีดทั้งสอง

ด้าน (ด้านหลังใบและท้องใบ) กระตุ้นการเกิดแคลลัสได้มีประสิทธิภาพมากขึ้น โดยพบว่า น้ำหนักเฉลี่ยของแคลลัสอยู่ที่ 0.85 กรัมต่อชิ้นส่วน และจำนวนจุดที่เกิดแคลลัสเฉลี่ยที่ 4.5 จุดต่อชิ้นส่วน ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นอกจากนี้ ในกรณีของขอบใบ (apical cut edge) พบว่าการกรีดทั้งสองด้าน (both) ช่วยกระตุ้นให้เกิดแคลลัสที่มีขนาดใหญ่ที่สุด ซึ่งสูงกว่าชิ้นส่วนที่กรีดเพียงด้านเดียวหรือไม่กรีดเลยอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยบริเวณที่มีแนวโน้มเกิดแคลลัสได้ดี ได้แก่ บริเวณรอบและฐานของแกนใบ ซึ่งให้ผลดีกว่าบริเวณโคน ปลาย และขอบใบ

ลักษณะของแคลลัสที่เกิดขึ้นมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญตามรูปแบบการกรีดชิ้นส่วนใบกาแฟ

(Table 4) โดยชิ้นส่วนใบที่ได้รับการกรีดทั้งสองด้าน สามารถพัฒนาเนื้อเยื่อได้ดีที่สุด เมื่อเพาะเลี้ยงในชั้นไฟ พบว่า แคลลัสที่เกิดขึ้นมีลักษณะเป็นก้อนแข็ง สีเขียวเข้ม (100%) มีการแบ่งเซลล์กระจายไปทั่วผิวของอาหาร และเริ่มพัฒนาเป็นชั้นเนื้อเยื่อที่เรียงตัวกัน เกิดเป็นตุ่มเนื้อเยื่อ และบางส่วนพัฒนาเป็นราก ทั้งนี้ ไม่พบแคลลัสที่ไม่มี รงควัสดุหรือมีอาการเนื่อตาย สำหรับชิ้นส่วนใบที่กรีดเฉพาะ ด้านหลังใบ พบการพัฒนาเนื้อเยื่อในลักษณะเดียวกันกับการกรีดทั้งสองด้าน แต่มีการพัฒนาช้ากว่าเล็กน้อย โดย ก้อนเซลล์มีสีเขียวเข้มเล็กน้อย (ประมาณ 7%) อย่างไรก็ตาม มีการเกิดเนื้อเยื่อใหม่ขึ้นมาทดแทน โดยเฉพาะบริเวณ

แผลกรีดด้านหลังใบ ซึ่งมีการแบ่งตัวของเนื้อเยื่อใกล้เคียง เกิดเป็นตุ่มลักษณะคล้ายราก ในทางตรงกันข้าม ชิ้นส่วน ใบที่ไม่ได้รับการกรีดหรือกรีดเฉพาะด้านท้องใบ จะให้ แคลลัสที่มีลักษณะนุ่ม ฉ่ำน้ำ ไม่แข็ง สีออกน้ำตาลใส และแผ่กระจายบนผิวอาหารโดยไม่เกิดเป็นชั้นเนื้อเยื่อ ไม่ ปรากฏการสร้างตุ่มหรือราก และให้แคลลัสสีเขียวใน อัตราที่ต่ำกว่า (60%) ทั้งยังพบว่าการสร้างรงควัสดุ เกิดขึ้นช้ากว่า จากผลการทดลองพบว่า การกรีดด้านหลัง ใบสามารถเพิ่มโอกาสในการสร้างเนื้อเยื่อใหม่ และลดการ ตายของเนื้อเยื่อตั้งต้นได้ โดยสังเกตจากปริมาณแคลลัส สีน้ำตาลเข้มที่ลดลง (Figure 4c และ 4d)

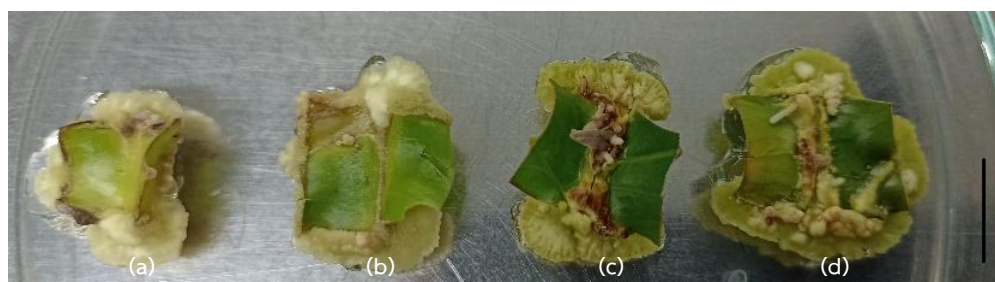


Figure 4 Wound effects on callus induction characteristics in *Coffea canephora* cv. Chomphon 2 after 10 weeks of culture; (a) no wound, (b) adaxial, (c) abaxial and (d) both (scale bar = 1 cm)

Table 3 Effects of leaf wounding on callus induction and development in *Coffea canephora* cv. Chumphon 2 after 10 weeks of culture on NPCM medium

Wounding position	Fresh weight (g)	Number of calli per explant	Callus size (mm)				
			Proximal midrib	Midrib	Basal cut edge	Apical cut edge	Lateral cut edge
No wound	0.55±0.17b	2.9±0.3b	3.3±0.2	3.0±0.4	2.3±0.3	2.4±0.3	1.5±0.2b
Adaxial	0.54±0.19b	3.2±0.5b	3.0±0.3	2.8±0.7	2.3±0.25	2.1±0.2	1.4±0.2b
Abaxial	0.60±0.11b	2.5±0.1b	3.4±0.3	3.6±0.4	3.00±0.2	2.6±0.3	1.8±0.2b
Both	0.85±0.21a	4.5±0.4a	3.3±0.4	3.7±0.3	3.00±0.5	2.9±0.4	2.4±0.3a
F-value	6.3*	5.9*	0.3ns	0.9ns	0.58ns	1.2ns	4.4*
CV (%)	37.65	41.9	35.5	38.0	43.9	41.3	41.8

Mean values ± standard error (SE) within the same column followed by different superscript letters (a, b) indicate significant differences ($p < 0.05$) according to Duncan's Multiple Range Test; ns = not statistically significant

Table 4 Wound effects on callus induction characteristics in *Coffea canephora* cv. Chomphon 2 after 10 weeks of culture in NPCM

Wound	Callus color (%)			Characteristic texture
	Green	Brown	Dark	
No wound	58	21	21	Compact Callus, spread float on medium
Adaxial	60	0	40	Friable Callus, spread float on medium and explant.
Abaxial	93	0	7	Dark Green and Compact Callus, spread float on medium, root bud was induced at abaxial leaf explant
Both	100	0	0	Dark Green and Compact Callus, spread float on medium, root bud was induced at abaxial leaf explant

วิจารณ์ผลการวิจัย

การศึกษาการชักนำแคลลัสจากชิ้นส่วนใบกาแฟโรบัสต้าพันธุ์ชุมพร 2 แสดงให้เห็นว่า ปัจจัยแวดล้อมของต้นพันธุ์ ตำแหน่งชิ้นส่วนใบ สูตรอาหาร และการกรีดใบมีผลต่อประสิทธิภาพการชักนำแคลลัสอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งสอดคล้องกับแนวคิดว่าความสำเร็จในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกาแฟขึ้นอยู่กับหลายปัจจัยที่ต้องพิจารณาร่วมกัน

แหล่งที่มาของชิ้นส่วนใบมีผลโดยตรงต่อความสำเร็จในการฟอกฆ่าเชื้อและการชักนำแคลลัส โดยพบว่าใบจากต้นกล้าที่เลี้ยงในระบบปิดมีอัตราการรอดเชื้อจุลินทรีย์และการเกิดแคลลัสสูงที่สุด (ร้อยละ 95 และ 90 ตามลำดับ) เนื่องจากต้นกล้าในระบบปิดมีการสัมผัสกับเชื้อจุลินทรีย์ในธรรมชาติน้อยกว่า ทำให้มีการสะสมเชื้อภายในเนื้อเยื่อต่ำ สอดคล้องกับรายงานของ Santos *et al.* (2015) ที่พบว่าต้นกาแฟในสภาพธรรมชาติมีการสะสมเชื้อจุลินทรีย์ภายในชั้นเนื้อเยื่อสูง ซึ่งแม้ไม่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตในธรรมชาติ แต่ทำให้การฟอกฆ่าเชื้อทำได้ยากเมื่อนำมาเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ นอกจากนี้ Darwesh *et al.* (2024) ยังรายงานว่าการควบคุมสภาพแวดล้อมตั้งแต่เป็นต้นกล้าช่วยเพิ่มความสำเร็จในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อได้อย่างมีนัยสำคัญ ดังนั้น การนำต้นกาแฟจากแปลงเกษตรกรมาเลี้ยงใน

สภาพแวดล้อมควบคุมก่อนเริ่มต้นเตรียมชิ้นส่วนเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ จึงเป็นแนวทางที่เหมาะสมเพื่อเพิ่มโอกาสความสำเร็จ (Valdés *et al.*, 2021)

ตำแหน่งของชิ้นส่วนใบมีผลต่อประสิทธิภาพการชักนำแคลลัสอย่างชัดเจน โดยชิ้นส่วนโคนใบ (base) ให้ผลการชักนำแคลลัสดีที่สุดในด้านจำนวนและขนาด โดยเฉพาะบริเวณฐานและเส้นกลางใบ (base-midrib, midrib) เนื่องจากบริเวณนี้ประกอบด้วยเนื้อเยื่อเจริญท่อลำเลียงที่มีเซลล์อายุน้อยและยังไม่เปลี่ยนแปลงไปทำหน้าที่เฉพาะมาก ทำให้มีศักยภาพในการพัฒนาเป็นแคลลัสสูง (Asghari *et al.*, 2012) ผลการศึกษานี้สอดคล้องกับงานวิจัยในกาแฟอราบิกา (Maruka *et al.*, 2023b; Munawarti *et al.*, 2024) ที่พบว่าตำแหน่งโคนใบให้ผลการชักนำแคลลัสดีที่สุด นอกจากนี้ยังสอดคล้องกับการศึกษาในพืชอื่น ๆ เช่น กระเทียม (Zuldin *et al.*, 2013) กระเทียม (Li *et al.*, 2019) เป็นต้น ที่พบว่าการเลือกตำแหน่งชิ้นส่วนใบที่มีเซลล์อายุน้อยจะส่งผลให้ประสิทธิภาพการชักนำแคลลัสสูงขึ้น

สูตรอาหารเป็นอีกปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการชักนำแคลลัส โดยพบว่าอาหารสูตร NPCM ให้ผลการชักนำแคลลัสดีกว่าสูตร C ทั้งในด้านขนาดและคุณภาพของแคลลัส โดยเฉพาะเมื่อใช้ร่วมกับชิ้นส่วนโคนใบ ซึ่งให้ขนาดแคลลัสสูงสุด 3.8 มม. ความแตกต่างนี้อาจ

เนื่องจากจากสูตร NPCM มีองค์ประกอบของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมกว่า โดยเฉพาะอัตราส่วนระหว่างออกซินและไซโตไคนิน ซึ่งมีผลโดยตรงต่อการชักนำแคลลัสในกาแฟ (Campos *et al.*, 2017) ผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า การเลือกสูตรอาหารที่เหมาะสมร่วมกับการเลือกตำแหน่งชิ้นส่วนใบที่เหมาะสม สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการชักนำแคลลัสได้อย่างมีนัยสำคัญ

การเพิ่มพื้นที่ผิวสัมผัสด้วยการกรีดใบเป็นเทคนิคที่ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการชักนำแคลลัสได้อย่างชัดเจน โดยพบว่ากรีดทั้งด้านหลังใบและท้องใบให้ผลดีที่สุดทั้งในด้านน้ำหนักสด (0.85 กรัม) และจำนวนแคลลัส (4.5 ตำแหน่ง/ชิ้นส่วน) นอกจากนี้ยังส่งผลต่อคุณภาพของแคลลัสด้วย โดยแคลลัสที่ได้จากการกรีดทั้งสองด้านมีลักษณะเป็นก้อนแข็ง สีเขียวเข้มและมีการพัฒนาเป็นตุ่มรากได้ การกรีดใบช่วยเพิ่มพื้นที่สัมผัสกับอาหารและอากาศ ทำให้เนื้อเยื่อได้รับสารอาหารและออกซิเจนดีขึ้น ส่งผลให้เซลล์มีชีวิตอยู่ได้นานและพัฒนาเป็นแคลลัสได้ดี (Tunjung *et al.*, 2021) ผลการศึกษานี้สอดคล้องกับงานวิจัยใน *Arabidopsis thaliana* (Ikeuchi *et al.*, 2017) ที่พบว่าการสร้างบาดแผลกระตุ้นให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางฮอโมนและการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการพัฒนาแคลลัส รวมถึงการศึกษาในพืชอื่น ๆ เช่น มะเขือเทศ (Yaroshko *et al.*, 2023) ที่พบว่าการกรีดใบช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการชักนำแคลลัสได้

ลักษณะของแคลลัสที่ได้จากการศึกษานี้มีความหลากหลาย ซึ่งเป็นผลมาจากความแตกต่างของเซลล์ต้นกำเนิดและสภาวะการเพาะเลี้ยง โดยพบแคลลัสสองลักษณะหลัก คือ แคลลัสเนื้อละเอียดนิ่มฟู ฉ่ำน้ำ สีถึงขาว ซึ่งไม่เปลี่ยนสีเมื่อได้รับแสง และแคลลัสก้อนแข็ง แผ่นเป็นแผ่นไปตามผิวอาหาร เริ่มเกิดเป็นสีเขียวจนถึงน้ำตาลอ่อนในที่มืด และเปลี่ยนเป็นสีเขียวเข้มเมื่อได้รับแสง แคลลัสประเภทแรกมีองค์ประกอบภายในเป็นไซโทพลาสซึมน้อยและมีแวคิวโอลมาก ทำให้ไม่เหมาะสมต่อการพัฒนาต่อ ส่วนแคลลัสประเภทที่สองมีลักษณะเป็นก้อนแข็งเล็ก ๆ ทรงกลม สีขาวนวลถึงน้ำตาล ซึ่งมีศักยภาพ

ในการพัฒนาต่อเป็นอวัยวะหรือเอ็มบริโอได้ (Carsono *et al.*, 2021; Ibrahim *et al.*, 2024) ลักษณะแคลลัสที่แตกต่างกันนี้สอดคล้องกับรายงานในกาแฟอราบิกา (Pádua *et al.*, 2014; Maruka *et al.*, 2023b) ที่พบความหลากหลายของแคลลัสจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อใบเช่นกัน

ปัญหาสำคัญในการชักนำแคลลัสกาแฟ คือ การสร้างสารฟีนอลิก ซึ่งเกิดจากความเครียดของเซลล์เมื่อได้รับการฟอกฆ่าเชื้อ ทำให้เนื้อเยื่อตายหรือปล่อยสารลงในอาหารเลี้ยง (Pristiana, 2017; Setiawan *et al.*, 2020) การศึกษานี้พบว่า การกรีดใบช่วยลดการเกิดสารสีน้ำตาลได้ โดยเฉพาะการกรีดด้านหลังใบหรือกรีดทั้งสองด้าน ซึ่งช่วยให้เนื้อเยื่อใบเดิมดำรงชีวิตอยู่ได้นานขึ้น ไม่ปรากฏเซลล์ตาย ส่งผลให้ไม่เกิดแคลลัสสีดำ (Teshome and Feyissa, 2015; Ikeuchi *et al.*, 2017) นอกจากนี้ ยังพบว่าชิ้นส่วนใบจากต้นอายุน้อยในระบบปิด มีการสร้างสารสีน้ำตาลน้อยกว่าชิ้นส่วนจากต้นในแปลงเกษตรกร ซึ่งอาจเป็นผลมาจากการสะสมสารประกอบฟีนอลิกที่น้อยกว่าในต้นกาแฟ

สรุปผลการวิจัย

การศึกษานี้ชี้ให้เห็นว่าความสำเร็จในการชักนำแคลลัสคุณภาพสูงในกาแฟโรบัสต้าพันธุ์ชุมพร 2 ขึ้นอยู่กับการบูรณาการปัจจัยหลักร่วมกัน โดยพบว่า (1) แหล่งต้นพันธุ์ จากระบบโรงเรือนควบคุมสภาพแวดล้อมให้ผลดีที่สุด โดยลดอัตราการปนเปื้อนและเพิ่มอัตราการเกิดแคลลัสได้อย่างมีนัยสำคัญ (2) ชิ้นส่วนโคนใบเป็นตำแหน่งที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการชักนำแคลลัส และ (3) สูตรอาหาร NPCM ร่วมกับการกรีดใบทั้งสองด้านเป็นกรรมวิธีที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการชักนำแคลลัสที่มีลักษณะเนื้อแน่น สีเขียวเข้ม ซึ่งมีศักยภาพในการพัฒนาเป็นโซมาติกเอ็มบริโอได้ดีที่สุด องค์ความรู้นี้สามารถนำไปประยุกต์ใช้เป็นต้นแบบกระบวนการผลิตแคลลัส เพื่อการขยายพันธุ์กาแฟโรบัสต้าในเชิงพาณิชย์ต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณทุนสนับสนุนงานวิจัยจากกองทุนส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม ปีงบประมาณ พ.ศ. 2567 คณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา ให้การสนับสนุนอุปกรณ์ ครุภัณฑ์และสถานที่ทำวิจัย และขอขอบคุณเกษตรกร ตำบลทุ่งลาน อำเภอคลองหอยโข่ง จังหวัดสงขลา ที่สนับสนุนตัวอย่างกาแฟโรบัสต้าชุมพร 2 ในการทำวิจัยครั้งนี้จนสำเร็จเรียบร้อยด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

- Asghari, F., B. Hossieni, A. Hassani and H. Shirzad. 2012. Effect of explant source and different hormonal combinations on direct regeneration of basil plants (*Ocimum basilicum* L.). **Australian Journal of Agricultural Engineering** 3: 12–17.
- Campos, J., C.A. Souza, J.F. Rocha and M.C. Espindula. 2017. Leaf anatomy and its role in callus formation of *Coffea arabica*. **Scientia Agricola** 74(6): 501–508. <https://doi.org/10.1590/1678-992x-2016-0123>
- Carsono, N., A. Purwanto, A. Rachmadi, A. Wahyudin and M. Setiawati. 2021. Callus induction and regeneration of rice (*Oryza sativa* L.) varieties under different 2,4-D concentrations and explant sources. **Biodiversitas** 22(5): 2618–2625. <https://doi.org/3057/biodiv/d220520>
- Darwesh, R., M. Gawad, K. Ashebre and M. Abdelzaher. 2024. Optimization of closed-system cultivation for coffee micropropagation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 156(1): 89–101. <https://doi.org/10.1007/s11240-023-02635-0>
- Ibrahim, R., S. Hosny, A. Amer and W. Vendrame. 2024. Somatic embryogenesis from leaf-derived callus of *Coffea arabica*. **Plant Cell Reports** 43(1): 45–55. <https://doi.org/10.1007/s00299-023-03114-4>
- Ikeuchi, M., Y. Ogawa, A. Iwase and K. Sugimoto. 2017. Plant regeneration: cellular origins and molecular mechanisms. **Development** 144(9): 1442–1451. <https://doi.org/10.1242/dev.134668>
- Li, J., D. Zhang, K. Ouyang and X. Chen. 2019. High frequency plant regeneration from leaf culture of *Neolamarckia cadamba*. **Plant Biotechnology** 36(1): 13–19. <https://doi.org/10.5511/plantbiotechnology.18.1119a>
- Maruka, R.A.R., M. Ananda, E. Yuniati and A.P. Paserang. 2023a. Strategy propagation of *Coffea arabica* L. by tissue culture techniques. pp. 205–208. *In Proceedings of the 2nd International Interdisciplinary Conference on Environmental Sciences and Sustainable Developments 2022 Environment and Sustainable Development (IICESD-ESD 2022)*. Palu: Universitas Tadulako.

- Maruka, R., B. Daryono, Y.T.M. Astuti and E. Semiarti. 2023b. Comparative study of callus induction in *Coffea arabica* cultivars. **Plant Biotechnology** 40(2): 89–97. <https://doi.org/10.5511/plantbiotechnology.23.0427a>
- Munawarti, A., R L Nurhury, R. Arimarsetiowati, E. Prastowo and L. Hakim. 2024. Induction and multiplication of callus of AS2K clones *Coffea arabica* L. through 2,4-D and BAP combination. **Earth and Environmental Science** 1356(2024): 012035. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/1356/1/012035>
- Pádua, M.S., L.V. Paiva, C.R.G. Labory, E. Alves and V.C. Stein. 2014. Induction and characterization of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) pro-embryogenic masses. **Anais da Academia Brasileira de Ciências** 86(4): 1563–1572. <https://doi.org/10.1590/0001-3765201420130181>
- Pristiana, D. 2017. Aktivitas antioksidan dan kadar fenol berbagai ekstrak daun kopi (*Coffea* sp.): Potensi aplikasi bahan alami untuk fortifikasi pangan. **Jurnal Aplikasi Teknologi Pangan** 6(2): 89–92. <https://doi.org/10.17728/jatp.205>
- Samson, N., C. Campa, L. Gal, M. Noirot, G. Thomas, T.S. Lokeswari and A. De Kochko. 2006. Effect of primary culture medium composition on high-frequency somatic embryogenesis in different *Coffea* species. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 86: 37–45. <https://doi.org/10.1007/s11240-006-9094-2>
- Santana-Buzzy, N., R. Rojas-Herrera, R.M. Galaz-Ávalos and V.M. Loyola-Vargas. 2007. Advances in coffee tissue culture and its practical applications. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant** 43(6): 507–520. <https://doi.org/10.1007/s11627-007-9074-1>
- Santos, M.R.A., C.A. de Souza, J.F. da Rocha, L.V. de Araujo and M.C. Espindula. 2015. Comparison of economic efficiency between *in vitro* and field methods for vegetative propagation of *Coffea canephora*. **Australian Journal of Basic and Applied Sciences** 9(20): 1–7.
- Setiawan, A., M. Rahmah, H. Trisnia and A. Jamsari. 2020. Browning suppression in coffee callus using ascorbic acid. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 141(2): 321–329. <https://doi.org/10.1007/s11240-020-01887-2>
- Tajetdini, F., M. Talebi, R. Naderi and D. Hassani. 2023. Effect of growth regulators on callus induction and plant regeneration from leaf explants of *Coffea arabica* L. cultivars. **Scientific Reports** 13(1): 6782. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-33814-8>
- Teshome, S. and T. Feyissa. 2015. *In vitro* callus induction and shoot regeneration from leaf explants of *Glinus lotoides* (L.)- an important medicinal plant. **American Journal of Plant Sciences** 6(9): 1329–1340. <https://doi.org/10.4236/ajps.2015.69132>

- Tunjung, W.A.S., A.F. Widyasari, A. Iskandar, A.J. Nurulita, A.B. Sasongko, A. Indrianto and Maryani. 2021. Effect of 2,4-D and BAP on morphological characters and genetic stability of kaffir lime (*Citrus hystrix* DC.) callus cultures among generations. **Chiang Mai University Journal of Natural Sciences** 20(3): 1–14. <https://doi.org/10.12982/cmujns.2021.067>
- Valdés, Y.C., M.R. Shukla, M.E.G. Vega and P.K. Saxena. 2021. Improved conservation of coffee (*Coffea arabica* L.) germplasm via micropropagation and cryopreservation. **Agronomy** 11(9): 1861. <https://doi.org/10.3390/agronomy11091861>
- Yaroshko, O., T. Pasternak, E. Larriba and J.M. Pérez-Pérez. 2023. Optimization of callus induction and shoot regeneration from tomato cotyledon explants. **Plants** 12(16): 2942. <https://doi.org/10.3390/plants12162942>
- Zuldin, N.N.M., I.M. Said, N.M. Noo, Z. Zainal, C.J. Kiat and I. Ismail. 2013. Induction and analysis of the alkaloid mitragynine content of a *Mitragyna speciosa* suspension culture system upon elicitation and precursor feeding. **The Scientific World Journal** 2013: 209434. <https://doi.org/10.1155/2013/209434>