

การเพิ่มปริมาณโซมาติกเอ็มบริโอและการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ของกาแฟโรบัสต้าพันธุ์พื้นเมือง

Proliferation of somatic embryo and plantlet regeneration of indigenous robusta coffee

พรนภา แป้นไทย¹ สุรรัตน์ เย็นซ้อน^{1*} และ สมปอง เตชะโต¹

Pornnapa Panthai¹, Sureerat Yenchon^{1*} and Sompong Te-chato¹

¹ สาขาวิชานวัตกรรมและการจัดการ (พืชศาสตร์) คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ 90110

¹ Agricultural Innovation and Management Division, Faculty of Natural Resources, Prince of Songkla University, 90110

บทคัดย่อ: กาแฟโรบัสต้าจัดเป็นพืชเศรษฐกิจที่มีความสำคัญของไทย ปัจจุบันมีการนำเทคนิคเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมาช่วยในการเพิ่มจำนวนต้นพันธุ์กาแฟโรบัสต้าผ่านกระบวนการเอ็มบริโอเจเนซิส อย่างไรก็ตามกาแฟโรบัสต้าพันธุ์พื้นเมืองยังคงมีการเพิ่มปริมาณได้น้อย จึงได้ศึกษาการเพิ่มประสิทธิภาพในการเพิ่มปริมาณและการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ของโซมาติกเอ็มบริโอ โดยศึกษาจำนวนโซมาติกเริ่มต้นและชนิดของออกซิน โดยเพาะเลี้ยงโซมาติกเอ็มบริโอระยะรูปกลมจำนวนเริ่มต้น 10, 20 และ 30 เอ็มบริโอ ในอาหารเหลวสูตร Murashige and Skoog (MS) เติม 6-benzyladenine (BA) ความเข้มข้น 2 มก./ล. ร่วมกับออกซินต่างชนิดกัน ได้แก่ Indole-3-butyric acid (IBA) หรือ 2,4-dichlorophenoxy acetic acid (2,4-D) ความเข้มข้น 0.50 มก./ล. เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 สัปดาห์ พบว่า จำนวนโซมาติกเอ็มบริโอเริ่มต้น 30 เอ็มบริโอที่เพาะเลี้ยงใน IBA ส่งเสริมการเพิ่มจำนวนโซมาติกเอ็มบริโอระยะ torpedo สูงสุด 20.67 เอ็มบริโอ จากนั้นนำโซมาติกเอ็มบริโอในระยะ torpedo ไปเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งหรืออาหารเหลวที่เติม BA ความเข้มข้น 2 มก./ล. ร่วมกับการไม่เติมหรือเติม gibberellic acids (GA₃) ความเข้มข้น 0.50 มก./ล. พบว่า การเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวร่วมกับการเติม GA₃ ความเข้มข้น 0.50 มก./ล. ส่งเสริมการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่สูงสุด โดยให้อัตราการรอดชีวิต 100 เปอร์เซ็นต์ อัตราการงอก 90 เปอร์เซ็นต์ ความสูงต้น 0.59 ซม. และจำนวนใบเลี้ยง 1.95 ใบ หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์

คำสำคัญ: โซมาติกเอ็มบริโอ; ออกซิน; กาแฟโรบัสต้า; การพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่

ABSTRACT: Robusta coffee is an important commercial crop of Thailand. Currently, tissue culture techniques are used to propagate Robusta coffee through embryogenesis. However, somatic embryo induction of indigenous Robusta coffee is still limited. Thus, this study aimed to enhance the proliferation and germination of the somatic embryos. Initial inoculum of somatic embryos and types of auxin was studied by culturing somatic embryos at globular stage at 10, 20 and 30 embryos in liquid MS medium supplemented with 2 mg/L BA in combination with different types of auxin (IBA or 2,4-D) at a concentration of 0.50 mg/L for 6 weeks. The results showed that 30 embryos were cultured in IBA gave the highest number of somatic embryos at torpedo stage at 20.67 embryos. After that, somatic embryos at torpedo stage were transferred to solid or liquid MS medium supplemented with 2 mg/L BA without or with 0.50 mg/L GA₃. The results showed that liquid medium with 0.50 mg/L GA₃ gave the best result in plant regeneration in terms of survival rate at 100%, germination rate at 90%, plant height at 0.59 cm and number of cotyledon leaves at 1.95 leaves after culture for 4 weeks.

Keywords: Somatic embryo; auxin; robusta coffee; plant regeneration

* Corresponding author: sureerat.y@psu.ac.th

บทนำ

กาแฟโรบัสต้า (*Coffea canephora* Pierre ex Froehner) จัดเป็นกาแฟที่ปลูกมากเป็นอันดับสองรองจากอะราบิก้า (กรมวิชาการเกษตร, 2557) นิยมปลูกมากทางภาคใต้ของไทย ซึ่งถือได้ว่าเป็นพืชเศรษฐกิจที่มีความสำคัญของภาคใต้เช่นเดียวกับยางพารา และปาล์มน้ำมัน โดยกาแฟโรบัสต้าสามารถนำมาแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ได้หลากหลายชนิด เช่น กาแฟคั่ว บด กาแฟสำเร็จรูปบรรจุกระป๋อง อย่างไรก็ตามเกษตรกรมีข้อจำกัดในการขยายพันธุ์ เนื่องจากกาแฟโรบัสต้าเป็นพืชผสมข้าม หากใช้วิธีการขยายพันธุ์โดยการเพาะเมล็ด นอกจากจะใช้ระยะเวลานาน ยังส่งผลให้เกิดความแปรปรวนทางพันธุกรรม ซึ่งส่งผลต่อการควบคุมปริมาณและคุณภาพของผลผลิต ในปัจจุบันจึงมีการนำเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมาช่วยในการขยายพันธุ์และปรับปรุงพันธุ์พืชมากขึ้น เนื่องจากวิธีการดังกล่าวสามารถผลิตต้นพันธุ์ที่ตรงตามพันธุ์จำนวนมากภายในระยะเวลาอันสั้น (ยุพิน, 2546) อย่างไรก็ตามข้อจำกัดอย่างหนึ่งของการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ผ่านกระบวนการเอ็มบริโอเจนิซิสคือ พันธุกรรม ซึ่งหมายถึงถึงพันธุ์พื้นเมืองของแต่ละท้องถิ่น อาจมีความแตกต่างทางพันธุกรรม ซึ่งส่งผลให้ต้องมีการศึกษาสูตรอาหารและวิธีการที่เหมาะสมกับแต่ละสายพันธุ์ ซึ่งจากการรายงานการศึกษาพบว่า การเพิ่มจำนวนต้นพันธุ์กาแฟโดยการชักนำโซมาติกเอ็มบริโอของกาแฟยังมีข้อจำกัดด้านการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ซึ่งต้องใช้ระยะเวลานาน มีรายงานการใช้ฮอร์โมนในกลุ่มจิบเบอเรลลิน เช่น GA_3 ซึ่งมีคุณสมบัติในการขยายขนาดของเซลล์และการยืดตัวของลำต้น มาใช้ในการเพิ่มการยืดยาวของลำต้น Ahmed et al. (2013) ศึกษาการชักนำการงอกของโซมาติกเอ็มบริโอของกาแฟอะราบิก้า หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 10 สัปดาห์พบว่า อาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลวสูตร MS เติม BAP ความเข้มข้น 2 มก./ล. ร่วมกับ GA_3 ความเข้มข้น 0.50 มก./ล. สามารถชักนำให้เกิดการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่สูงสุด 14 ต้น และความยาวยอดสูงสุด 1.40 ซม. ดังนั้นการวิจัยครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการเพิ่มปริมาณโซมาติกเอ็มบริโอและการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ของกาแฟโรบัสต้าในหลอดทดลอง เพื่อเป็นแนวทางในการขยายพันธุ์กาแฟโรบัสต้าพันธุ์พื้นเมืองให้เพียงพอกับความต้องการของเกษตรกร

วิธีการศึกษา

การทดลองที่ 1 ผลของจำนวนชิ้นส่วนเริ่มต้นและชนิดของออกซินต่อการเพิ่มปริมาณโซมาติกเอ็มบริโอ

นำโซมาติกเอ็มบริโอในระยะรูปกลมจากเซลล์ชั้นเพนชันของกาแฟโรบัสต้าพันธุ์ท่าชะจากอาหารเหลวสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต จำนวน 10, 20 และ 30 โซมาติกเอ็มบริโอ เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS ที่เติม BA ที่ระดับความเข้มข้น 2 มก./ล. ร่วมกับ IBA หรือ 2,4-D ที่ระดับความเข้มข้น 0.50 มก./ล. น้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ ปรับ pH เป็น 5.70 เพาะเลี้ยงในขวดรูปชมพู่ บรรจุอาหาร 25 มล. วางเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 100-120 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 26 ± 2 องศาเซลเซียส ภายใต้การให้แสงฟลูออเรสเซนต์ 10 ชั่วโมงต่อวัน วัดความเข้มแสงด้วยเครื่อง PAR meter ที่ความเข้มแสง 20 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที วางเลี้ยงเป็นเวลา 6 สัปดาห์ บันทึกจำนวนและลักษณะโซมาติกเอ็มบริโอ เปรียบเทียบกันในแต่ละจำนวนชิ้นส่วนโซมาติกเอ็มบริโอเริ่มต้นและชนิดของออกซิน โดยวางแผนการทดลองแบบ 3x2 factorials in completely randomized design (CRD) มี 2 ปัจจัย คือ จำนวนชิ้นส่วนโซมาติกเอ็มบริโอเริ่มต้นมี 3 ระดับ และชนิดของออกซินมี 2 ระดับ วิเคราะห์ความแปรปรวนโดยวิธี Analysis of variance (ANOVA) เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยใช้วิธี Duncan's multiple range test (DMRT) แต่ละสิ่งทดลองทำ 3 ซ้ำ ๆ ละ 3 พลาสก์ เปรียบเทียบกันในแต่ละจำนวนชิ้นส่วนโซมาติกเอ็มบริโอเริ่มต้นและชนิดของออกซิน คัดเลือกชนิดของออกซินที่ส่งเสริมการพัฒนาเป็นโซมาติกเอ็มบริโอในระยะตอริปิโตเพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

การทดลองที่ 2 ผลของ GA_3 และชนิดของอาหารต่อการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่

นำโซมาติกเอ็มบริโอของกาแฟโรบัสต้าพันธุ์ท่าชะในระยะตอริปิโตที่ได้จากการทดลองที่ 1 มาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งหรืออาหารเหลวสูตร MS เติม BA ความเข้มข้น 2 มก./ล. เปรียบเทียบระหว่างการไม่เติมหรือเติม GA_3 ความเข้มข้น 0.50 มก./ล. น้ำตาลซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ ปรับ pH เป็น 5.7 สำหรับอาหารแข็งเติมผงวุ้น 0.60 เปอร์เซ็นต์ วางเลี้ยงที่อุณหภูมิ 26 ± 2 องศาเซลเซียส ภายใต้การให้แสง 10 ชั่วโมงต่อวัน วัดความเข้มแสงด้วยเครื่อง PAR meter ที่ความเข้มแสง 20 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที วางเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ บันทึกอัตราการรอดชีวิต อัตราการงอก และการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ โดยวางแผนการทดลองแบบ 2x2 factorials

in CRD มี 2 ปัจจัย คือ ความเข้มข้นของ GA₃ มี 2 ระดับ และชนิดของอาหารมี 2 ระดับ วิเคราะห์ความแปรปรวนโดยวิธี ANOVA และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยใช้วิธี DMRT แต่ละสิ่งทดลองทำ 3 ซ้ำ ๆ ละ 3 งานเพาะเลี้ยง

ผลการศึกษาและวิจารณ์

การทดลองที่ 1 ผลของจำนวนชิ้นส่วนโซมาติกเอ็มบริโอเริ่มต้นและชนิดของออกซินต่อการเพิ่มจำนวนโซมาติกเอ็มบริโอ

จำนวนชิ้นส่วนโซมาติกเอ็มบริโอเริ่มต้นที่เพิ่มมากขึ้น ส่งผลให้อัตราการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอเฉลี่ยเพิ่มสูงขึ้น เนื่องจากโซมาติกเอ็มบริโอมีการพัฒนา และเพิ่มจำนวนอยู่ตลอดเวลา หลังจากเพาะเลี้ยงโซมาติกเอ็มบริโอเป็นเวลา 6 สัปดาห์พบว่า จำนวนชิ้นส่วนโซมาติกเอ็มบริโอเริ่มต้น 30 เอ็มบริโอ ให้จำนวนโซมาติกเอ็มบริโอระยะรูปกลมและระยะตอริปโตเฉลี่ยสูงสุด 74.67 และ 10.33 เอ็มบริโอ ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($P < 0.01$) กับจำนวนชิ้นส่วนโซมาติกเอ็มบริโอเริ่มต้น 10 เอ็มบริโอ ซึ่งให้จำนวนโซมาติกเอ็มบริโอระยะรูปกลมและระยะตอริปโตเฉลี่ย 25.83 และ 1 เอ็มบริโอ สอดคล้องกับรายงานของ Carvalho และ Curtis (1999) ศึกษาขนาดของชิ้นส่วนเริ่มต้นต่อการเติบโตของเซลล์ *Hyoscyamus muticus* โดยรายงานว่ ขนาดชิ้นส่วนเริ่มต้นที่เพิ่มสูงขึ้น ส่งผลให้การเติบโตของเซลล์เพิ่มสูงขึ้นด้วย Wang et al. (2019) ศึกษาผลของชิ้นส่วนเริ่มต้นต่ออัตราการเพิ่มปริมาณของหน่วว โดยรายงานว่ ชิ้นส่วนเริ่มต้น 1 กรัมให้อัตราการเพิ่มปริมาณและน้ำหนกสดสูงสุด เช่นเดียวกับ Thanh et al. (2004) ศึกษาผลของขนาดชิ้นส่วนเริ่มต้นต่อการเติบโตและการสร้างสารซาโปนินของโสม โดยรายงานว่ ชิ้นส่วนเริ่มต้นที่มีน้ำหนกสด 60 กรัมต่อลิตร มีความเหมาะสมต่อการสร้างสารซาโปนินได้ดีที่สุด ด้านชนิดของออกซินพบว่า 2,4-D ให้จำนวนโซมาติกเอ็มบริโอในระยะรูปกลมเฉลี่ยสูงสุด 62.22 เอ็มบริโอ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($P < 0.01$) กับ IBA จากการทดลองพบว่า จำนวนโซมาติกเอ็มบริโอเริ่มต้น 30 เอ็มบริโอ เพาะเลี้ยงในอาหารที่เติม 2,4-D ให้จำนวนโซมาติกเอ็มบริโอระยะรูปกลม 87 เอ็มบริโอ (Table 1) สอดคล้องกับรายงานของ Elmeer และ Hennerty (2008) ที่ศึกษาผลของ 2,4-D ต่อการชักนำโซมาติกเอ็มบริโอของแตงกวา โดยรายงานว่ การใช้ 2,4-D เพียงอย่างเดียวสามารถชักนำให้เกิดโซมาติกเอ็มบริโอได้สูงสุด ด้านลักษณะของโซมาติกเอ็มบริโอที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่เติม 2,4-Dพบว่า โซมาติกเอ็มบริโอมีลักษณะสีขาวขุ่นเป็นผงเล็ก ๆ จำนวนมาก นอกจากนี้ยังพบลักษณะที่ผิดปกติที่แตกต่างจากโซมาติกเอ็มบริโอที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่เติม IBA คือโซมาติกเอ็มบริโอเกิดการบวมเป็นสีขาวขุ่น มีโครงสร้างคล้าย ๆ ฟองน้ำรอบ ๆ โซมาติกเอ็มบริโอเดิม เนื่องจาก 2,4-D เป็นฮอร์โมนในกลุ่มออกซินที่มีความสามารถในการชักนำให้เกิดความแปรปรวนทางพันธุกรรม และความผิดปกติของโซมาติกเอ็มบริโอ ดังนั้นการเพาะเลี้ยงโซมาติกเอ็มบริโอใน 2,4-D เป็นระยะเวลานาน จึงส่งผลให้เกิดความผิดปกติต่อโซมาติกเอ็มบริโอได้

ด้านจำนวนโซมาติกเอ็มบริโอระยะตอริปโตพบว่า จำนวนโซมาติกเอ็มบริโอที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่เติม IBA ให้จำนวนโซมาติกเอ็มบริโอระยะตอริปโตเฉลี่ยสูงสุด 10.78 เอ็มบริโอ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($P < 0.01$) กับ 2,4-D ซึ่งไม่เกิดการพัฒนาเป็นโซมาติกเอ็มบริโอในระยะตอริปโต จากการทดลองพบว่า จำนวนโซมาติกเอ็มบริโอเริ่มต้น 30 เอ็มบริโอ เพาะเลี้ยงในอาหารที่เติม IBA ให้จำนวนโซมาติกเอ็มบริโอระยะตอริปโต 20.67 เอ็มบริโอ (Table 1) สอดคล้องกับรายงานของ Santos et al. (2015) ที่ศึกษาการขยายพันธุ์ของกาแฟโรบัสต้าในหลอดทดลอง โดยรายงานว่ ชิ้นส่วนใบกาแฟโรบัสต้าที่วางเลี้ยงบนอาหารสูตร Pre Culture Medium (PCM) ที่มีองค์ประกอบของ IBA ในหลอดทดลองให้จำนวนโซมาติกเอ็มบริโอ 14.50 เอ็มบริโอ ทั้งนี้เนื่องจาก IBA มีคุณสมบัติในการกระตุ้นการแบ่งเซลล์ของเนื้อเยื่อเจริญ จึงส่งผลให้พืชมีการเจริญเติบโตทางลำต้น การยึดตัวของเซลล์เพิ่มสูงขึ้น

Table 1 Effects of initial inoculum of somatic embryos and types of auxin on number of globular and torpedo stage cultured in liquid MS medium supplemented with 2 mg/L BA for 6 weeks.

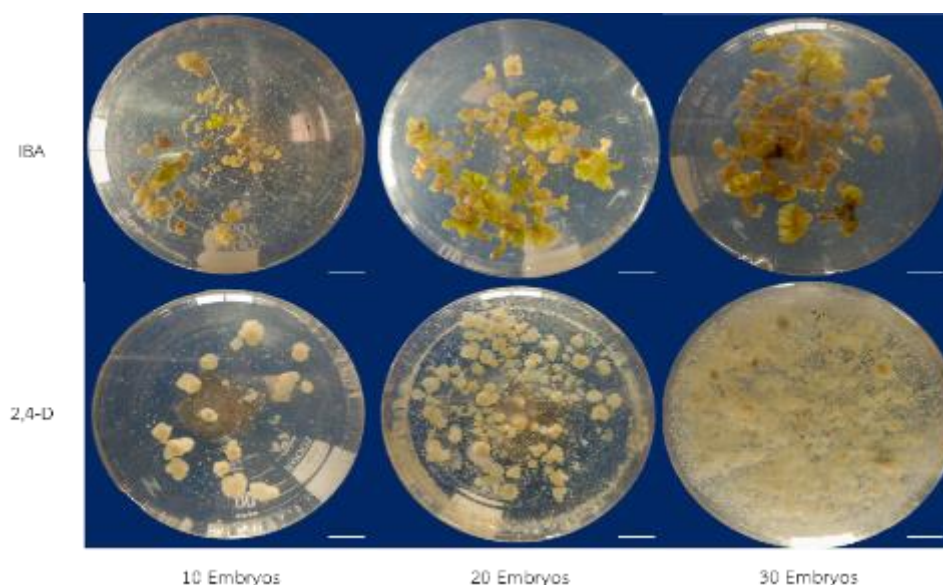
Initial inoculum (embryos) (A)	Globular (embryos/flask) (B)		Mean	Torpedo (embryos/flask)		Mean
	IBA	2,4-D		IBA	2,4-D	
10	22.00±6.35c (2.20)	29.67±6.33c (2.96)	25.83±4.36C	2.00±0.00c (2.00)	0.00±0.00d (0.00)	1.00±0.45C
20	31.33±3.84c (1.57)	70.00±6.81b (3.50)	50.67±9.33B	9.67±0.33b (0.45)	0.00±0.00d (0.00)	4.83±2.17B
30	62.33±3.18b (2.08)	87.00±5.51a (2.90)	74.67±6.21A	20.67±0.33a (0.69)	0.00±0.00d (0.00)	10.33±4.62A
Mean	38.56±6.53B	62.22±9.06A		10.78±2.71A	0.00±0.00B	
F-test						
Initial inoculum (A)	**			**		
Auxin (B)	**			**		
A x B	*			**		
C.V. (%)	18.93			6.19		

() The number of somatic embryo enrichment times compared with the initial inoculum.

* = significant difference at $P < 0.05$ level according to DMRT.

** = significant difference at $P < 0.01$ level according to DMRT.

Means followed by the same letter within each column are not significantly different according to DMRT.

**Figure 1** Characteristics of somatic embryo of robusta coffee cv. 'Tha Sae' cultured in liquid MS medium supplemented with 2 mg/L BA in combination with 0.50 mg/L IBA or 2,4-D for 6 weeks (bar= 0.50 cm).

การทดลองที่ 2 ผลของ GA₃ และชนิดของอาหารต่อการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่

จากการวางเลี้ยงโซมาติกเอ็มบริโอระยะตอริบิโบนอาหารแข็งและอาหารเหลวสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 2 มก./ล. เพื่อเปรียบเทียบระหว่างความเข้มข้นของ GA₃ และชนิดของอาหาร หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์พบว่า การเติม GA₃ ความเข้มข้น 0.50 มก./ล. ส่งผลให้อัตราการรอดชีวิตและอัตราการงอกเฉลี่ยสูงสุด 90 และ 77.77 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับที่ไม่เติม GA₃ เมื่อพิจารณาชนิดของอาหารพบว่า การวางเลี้ยงโซมาติกเอ็มบริโบนอาหารต่างชนิดกันส่งผลต่ออัตราการรอดชีวิตของโซมาติกเอ็มบริโอที่ต่างกัน โดยโซมาติกเอ็มบริโอที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวให้อัตราการรอดชีวิตเฉลี่ยสูงสุด 100 เปอร์เซ็นต์ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (P<0.01) กับโซมาติกเอ็มบริโอที่วางเลี้ยงบนอาหารแข็ง ซึ่งให้อัตราการรอดชีวิตเฉลี่ย 76.10 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่โซมาติกเอ็มบริโอที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวให้อัตราการงอกเฉลี่ยสูงสุด 86.10 เปอร์เซ็นต์ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (P<0.01) กับโซมาติกเอ็มบริโอที่วางเลี้ยงบนอาหารแข็ง ซึ่งให้อัตราการงอกเฉลี่ย 66.10 เปอร์เซ็นต์ ไม่มีปฏิสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ GA₃ และชนิดของอาหาร (Table 2) ในขณะที่ Chen et al. (2010) ศึกษาผลของ GA₃ ต่อการพัฒนาของโซมาติกเอ็มบริโอ *Schisandra chinensis* โดยรายงานว่โซมาติกเอ็มบริโอที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร 1/3 MS ไม่เติม GA₃ ให้อัตราการรอดชีวิตสูงสุด 22.90 เปอร์เซ็นต์ ไม่แตกต่างกับโซมาติกเอ็มบริโอที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่เติม GA₃ ความเข้มข้น 0.50 มก./ล. ซึ่งให้อัตราการรอดชีวิต 19.10 เปอร์เซ็นต์

Table 2 Effects of GA₃ and types of medium on survival rate and germination rate on MS medium with 2 mg/L BA for 4 weeks.

GA ₃ (mg/L) (A)	Survival rate (%) (B)		Mean	Germination rate (%) (B)		Mean
	Solid	Liquid		Solid	Liquid	
0.00	72.21±4.85	100.00±0.00	86.12±6.58	66.67±6.93	82.20±5.88	74.43±5.35
0.50	80.00±1.91	100.00±0.00	90.00±4.55	65.53±3.99	90.00±0.00	77.77±5.76
Mean	76.10±2.91B	100.00±0.00A		66.10±3.59B	86.10±3.15A	
F-test						
GA ₃ (A)	ns			ns		
medium (B)	**			**		
A x B	ns			ns		
C.V. (%)	5.13			11.30		

ns = non-significant difference.

** = significant difference at P<0.01 level according to DMRT.

Means followed by the same letter within each column are not significantly different according to DMRT.

GA₃ จัดเป็นฮอร์โมนพืชกลุ่มจิบเบอเรลลินที่มีคุณสมบัติในการขยายตัวของเซลล์และยืดยาวของลำต้น ส่งผลให้พืชมีความยาวปล้องเพิ่มสูงขึ้นและลำต้นยืดยาวขึ้น (สมบุญ, 2536) เมื่อพิจารณาความสูงต้นพบว่า การเติม GA₃ ส่งผลให้ความสูงต้นเพิ่มสูงขึ้น โดยโซมาติกเอ็มบริโอที่วางเลี้ยงในอาหารที่เติม GA₃ ให้ความสูงต้นเฉลี่ยสูงสุด 0.55 ซม. แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (P<0.01) กับโซมาติกเอ็มบริโอที่วางเลี้ยงบนอาหารแข็งซึ่งให้ความสูงต้น 0.41 ซม. เมื่อพิจารณาชนิดของอาหารพบว่า โซมาติกเอ็มบริโอที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวให้ความสูงต้นเฉลี่ยสูงสุด 0.49 ซม. ไม่มีความแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับโซมาติกเอ็มบริโอที่วางเลี้ยงบนอาหารแข็ง ซึ่งให้ความสูงต้นเฉลี่ย 0.47 ซม. เมื่อพิจารณาปฏิสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ GA₃ และชนิดของอาหารพบว่า โซมาติกเอ็มบริโอที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวเติม GA₃ ความเข้มข้น 0.50 มก./ล. ให้ความสูงต้น 0.59 ซม. อย่างไรก็ตามเมื่อวิเคราะห์ผลทางสถิติ พบว่า ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (Table 3)

ด้านจำนวนใบเลี้ยงพบว่า GA_3 ส่งผลให้มีการพัฒนาเป็นใบเพิ่มสูงขึ้น โดยโซมาติกเอ็มบริโอที่วางเลี้ยงในอาหารที่เติม GA_3 ให้จำนวนใบเลี้ยงเฉลี่ยสูงสุด 1.75 ใบ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) กับโซมาติกเอ็มบริโอที่วางเลี้ยงในอาหารแข็ง ซึ่งให้จำนวนใบเลี้ยง 1.44 ใบ เมื่อพิจารณาชนิดของอาหาร พบว่า โซมาติกเอ็มบริโอที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวให้จำนวนใบเลี้ยงเฉลี่ยสูงสุด 1.83 ใบ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($P<0.01$) กับโซมาติกเอ็มบริโอที่วางเลี้ยงในอาหารแข็ง ซึ่งให้จำนวนใบเลี้ยงเฉลี่ย 1.37 ใบ เมื่อพิจารณาปฏิสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ GA_3 และชนิดของอาหารพบว่า โซมาติกเอ็มบริโอที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวที่เติม GA_3 ความเข้มข้น 0.50 มก./ล. ให้จำนวนใบเลี้ยง 1.95 ใบ อย่างไรก็ตามเมื่อวิเคราะห์ผลทางสถิติพบว่า ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (Table 3) สอดคล้องกับรายงานของ Habas et al. (2019) ศึกษาการเพิ่มจำนวนยอดในพืชเนื้อเยื่อ โดยรายงานว่ายอดที่วางเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม GA_3 ความเข้มข้น 0.20 มก./ล. ให้จำนวนใบสูงสุด 23 ใบต่อยอด เช่นเดียวกับ Gonbad et al. (2014) ศึกษาการใช้ไซโตไคนินร่วมกับ GA_3 ต่อการเพิ่มปริมาณ และการยืดยาวของยอดชาโคลน Iran 100 โดยรายงานว่า การใช้ BAP ร่วมกับ GA_3 ส่งเสริมการเพิ่มปริมาณและการยืดยาวของยอดได้ดี ทั้งนี้เนื่องจาก GA_3 มีคุณสมบัติในการกระตุ้นการแบ่งเซลล์ของพืช ส่งผลให้พืชเกิดการแบ่งเซลล์เพิ่มสูงขึ้น นำไปสู่การขยายขนาดที่เพิ่มสูงขึ้น

Table 3 Effects of GA_3 and types of medium on plant height and number of leaf culture on MS medium with 2 mg/L BA for 4 weeks.

GA_3 (mg/L) (A)	Plant height (cm) (B)		Mean	No. of cotyledon (leaves) (B)		Mean
	Solid	Liquid		Solid	Liquid	
0.00	0.41±0.00	0.41±0.00	0.41±0.00B	1.18±0.11	1.70±0.14	1.44±0.14B
0.50	0.51±0.00	0.59±0.08	0.55±0.03A	1.55±0.07	1.95±0.08	1.75±0.10A
Mean	0.47±0.02	0.49±0.05		1.37±0.10B	1.83±0.92A	
F-test						
GA_3 (A)		**			*	
medium (B)		ns			**	
A x B		ns			ns	
C.V. (%)		13.61			11.40	

ns = non-significant difference.

* = significant difference at $P<0.05$ level according to DMRT.

** = significant difference at $P<0.01$ level according to DMRT.

Means followed by the same letter within each column are not significantly different according to DMRT.

ด้านลักษณะของพืชพบว่า การเติม GA_3 ส่งผลให้พืชเกิดการยืดยาวของลำต้นและใบที่แตกต่างจากพืชที่เพาะเลี้ยงโดยไม่ได้รับ GA_3 โดยพืชที่ได้รับ GA_3 ทั้งในอาหารแข็งและอาหารเหลวมีการยืดยาวของยอด ลำต้นและใบที่เพิ่มสูงขึ้น ใบมีลักษณะเรียวยาว ใบมีขนาดเล็กกว่าพืชที่ไม่ได้รับ GA_3 อย่างไรก็ตามจะเห็นได้ว่า พืชที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวมีการยืดยาวของลำต้นและใบสูงกว่าพืชที่วางเลี้ยงบนอาหารแข็ง (Figure 2) เช่นเดียวกับผลการทดลองในต้นหนอนตายหายากของนิตยา และสุภาพร (2559) ศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตและชนิดของอาหารเหลวต่อการพัฒนาของต้นหนอนตายหายาก โดยรายงานว่า การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนข้อในอาหารเหลวสูตร ½ MS สามารถชักนำการสร้างยอดของต้นหนอนตายหายากได้สูงกว่าที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง MS ทั้งนี้เป็นผลมาจากการที่พืชที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวมีพื้นที่ผิวสัมผัสกับอาหารมากกว่าชิ้นส่วนข้อที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งจึงส่งเสริมต่อการเกิดยอดและความยาวยอดสูงกว่าอาหารแข็ง

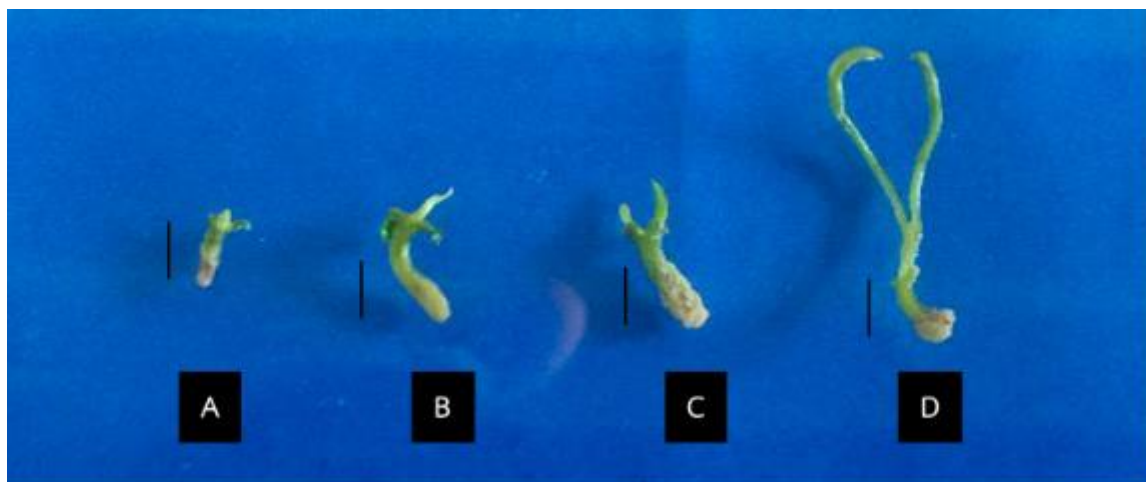


Figure 2 Characteristics of plantlet regeneration of Robusta coffee cv. 'Tha Sae' cultured on MS medium with 2 mg/L BA for 4 weeks (bar=0.50 cm).

A : Solid + 0.00 mg/L GA_3 B : Solid + 0.50 mg/L GA_3
C : Liquid + 0.00 mg/L GA_3 D : Liquid + 0.50 mg/L GA_3

สรุป

จำนวนโคมاتิคเอ็มบริโอเริ่มต้นและชนิดของออกซินที่ต่างกัน ส่งผลต่อการเพิ่มจำนวนของโคมاتิคเอ็มบริโอต่างกัน โดยจำนวนโคมاتิคเอ็มบริโอเริ่มต้น 30 เอ็มบริโอ เลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 2 มก./ล. ร่วมกับ IBA ความเข้มข้น 0.50 มก./ล. เป็นเวลา 6 สัปดาห์ ส่งเสริมการพัฒนาของโคมاتิคเอ็มบริโอในระยะต่าง ๆ ทั้งระยะรูปกลมและระยะตอปีโตสูงกว่าอาหารที่เติม 2,4-D โคมاتิคเอ็มบริโอมีลักษณะเป็นแท่งสีเหลือง เกิดการพัฒนาเป็นส่วนยอดและรากได้ดี โดยไม่พบความผิดปกติที่เกิดกับโคมاتิคเอ็มบริโอ เมื่อย้ายโคมاتิคเอ็มบริโอระยะตอปีโตไปวางเลี้ยงบนอาหารแข็ง และในอาหารเหลวที่ไม่เติมหรือเติม GA_3 ความเข้มข้น 0.50 มก./ล. พบว่า โคมاتิคเอ็มบริโอที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวที่เติม GA_3 ความเข้มข้น 0.50 มก./ล. ให้อัตราการรอดชีวิต อัตราการงอก ความสูงต้นและจำนวนใบสูงกว่าชุดการทดลองอื่น

คำขอบคุณ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากกองทุนส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม (กองทุนส่งเสริม ววน.) และมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ สัญญาเลขที่ NAT6505025M รหัสโครงการ NAT6505025c และศูนย์วิจัยความเป็นเลิศเทคโนโลยีชีวภาพเกษตรและทรัพยากรธรรมชาติระยะที่ 3 คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

เอกสารอ้างอิง

กรมวิชาการเกษตร. 2557. การเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตกาแฟ. กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย จำกัด.
นิตยา สุวรรณ และสุภาพร ภัสสร. 2559. ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตและชนิดของอาหารสูตร MS ต่อการเจริญเติบโตและการพัฒนาของต้นหนอนตายหายาก. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. 24: 64-75.
ยุพิน กลิ่นเกษมพงษ์. 2546. การขยายพันธุ์กาแฟ. ใน: เอกสารทางวิชาการการขยายพันธุ์กาแฟโรบัสต้าโดยวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ. (ยุพิน กลิ่นเกษมพงษ์), หน้า 5-8. ชุมพร: ศูนย์วิจัยพืชสวนชุมพร สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรที่ 7 กรมวิชาการเกษตร.
สมบุญ เตชะภิญญาวัฒน์. 2536. สรีรวิทยาของพืช. กรุงเทพฯ: ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

- Ahmed, W., T. Feyissa, and T. Disasa. 2013. Somatic embryogenesis of a coffee (*Coffea arabica* L.) hybrid using leaf explants. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology*. 88: 469-475.
- Carvalho, E.B., and W.R. Curtis. 1999. The effect of inoculum size on the growth of cell and root cultures of *Hyoscyamus muticus*: implications for reactor inoculation. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. 4: 287-293.
- Chen, A.H., J.L. Yang, Y.D. Niu, C.P. Yang, G.F. Liu, C.Y. Yu, and C.H. Li. 2010. High- frequency somatic embryogenesis from germinated zygotic embryos of *Schisandra chinensis* and evaluation of the effects of medium strength, sucrose GA₃, and BA on somatic embryo development. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 102: 357-364.
- Elmeer, K.M.S., and M.J. Hennerty. 2008. Observations on the combined effects of light, NAA and 2,4-D on somatic embryogenesis of cucumber (*Cucumis sativus*) hybrids. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 95: 381-384.
- Gonbad, R.A., U.R. Sinniah, M.A. Aziz, and R. Mohamad. 2014. Influence of cytokinins in combination GA₃ on shoot multiplication and elongation of tea clone Iran 100 (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze). *The Scientific World Journal*. 2014: 1-9.
- Habas, R.R., M. Turker, and F.A. Ozdemir. 2019. *In vitro* multiple shoot regeneration from *Petunia hybrida*. *Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology*. 7: 1554-1560.
- Santos, M.R.A., C.A. Souza, J.F. Rocha, L.V. 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: 1-7.
- Thanh, N.T., H.N. Murthy, K. Yu, C.S. Jeong, E. Hahn, and K. Paek. 2004. Effect of inoculum size on biomass accumulation and ginsenoside production by large-scale cell suspension cultures of *Penax ginseng*. *Journal of Plant Biotechnology*. 6: 265-268.
- Wang, G., C. Xu, S. Yan, and B. Xu. 2019. An efficient somatic embryo liquid culture system for potential use in large-scale and synchronic production of *Anthurium andraeanum* seedlings. *Frontiers in Plant Science*. 10: 1-9.