

การเปรียบเทียบอาหารสองชนิดต่อการเจริญเติบโตและพัฒนา ของเนื้อเยื่อใบกาแฟอาราบิก้า

Comparison between 2 Types of Media on Growth and Development of Arabica Coffee Leaf Tissue

นิธิ ไทยสันทัด^๑

Nithi Thaisantad^๑

Abstract : Leaf explants of Populacao 5 arabica coffee were cultured on 2 types of media namely: Sondahl and Sharp (1977) (SS) and Kahia and Owuor (1990) (KO) with some adjustments. Rate of survival, callus production, amount of callus and embryo production during 50 days, 70 days, 8 months and 16 months were estimated. Explants cultured on KO medium showed higher rate of survival, amount of proliferating callus and rate of somato embryonic production while SS medium had lower rate of those aspects but higher deformation of somatic embryos. All survived explants produced calli on both medium. Supplement of coconut liquid endosperm did not show significant effect on development of somatic embryos.

บทคัดย่อ: การศึกษาครั้งนี้ทำการเปรียบเทียบความแตกต่างของอาหาร 2 ชนิด ได้แก่อาหารตามวิธีการของ Sondahl and Sharp (1977) (SS) และอาหารตามวิธีการของ Kahia and Owuor (1990) (KO) ที่มีการดัดแปลงต่อการเจริญและพัฒนาของเนื้อเยื่อใบกาแฟพันธุ์ Populacao 5 ทำการศึกษาความแตกต่างของอัตราการรอดชีวิต อัตราการสร้างแคลลัส ปริมาณแคลลัสที่สร้าง และจำนวนโซมาติกเอ็มบริโอที่เกิดขึ้นหลังการเพาะเลี้ยงนาน 50 วัน, 70 วัน, 8 เดือน และ 16 เดือน ชิ้นส่วนใบกาแฟที่เพาะเลี้ยงในอาหาร KO มีอัตราการรอดชีวิต ปริมาณแคลลัสและโซมาติกเอ็มบริโอสูงกว่าในอาหาร SS นอกจากนั้นอาหาร SS ยังทำให้เกิดต้นกาแฟที่มีลักษณะผิดปกติ ได้มากกว่า ส่วนอัตราการ

^๑โครงการศูนย์วิจัยและพัฒนากาแฟบนที่สูง คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ อ.เมือง จ.เชียงใหม่ 50200

^๑Highland Coffee Research and Development Centre, Faculty of Agriculture, Chiangmai University, Chiangmai 50200, Thailand

สร้างแคลลัสในอาหารทั้งสองชนิดไม่แตกต่างกัน คือชิ้นส่วนสามารถสร้างแคลลัสได้ทุกชิ้นส่วนที่รอดชีวิต การเติมน้ำมะพร้าวอ่อนลงในอาหารไม่ทำให้เกิดความแตกต่างที่เห็นได้ชัดในอาหารทั้งสองชนิด

Index words : กาแฟอราบิก้า, การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อใบ, อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ, arabica coffee, leaf culture, tissue culture medium

คำนำ

กาแฟพันธุ์คาติมอร์ (Catimor) เป็นพันธุ์กาแฟต้านทานโรคราสนิมที่ได้มาจากการผสมระหว่างพันธุ์ที่เกิดจากการกลายพันธุ์ตามธรรมชาติคือพันธุ์ไฮบริด เดอ ติมอร์ (Hibrido de Timor) กับพันธุ์คาตูรา (Caturra) เป็นเวลาหลายชั่วจนได้ลูกผสมที่เสถียร โครงการศูนย์วิจัยและพัฒนากาแฟบนที่สูง คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ได้ทำการคัดเลือกและส่งเสริมกาแฟอราบิก้าพันธุ์คาติมอร์ที่ได้รับเมล็ดจากหลายประเทศทั่วโลกอย่างต่อเนื่องมาเป็นเวลานานโดยพันธุ์ที่ผ่านการคัดเลือกแล้วเป็นพันธุ์ที่มีลักษณะทรงพุ่มเล็ก ข้อสั้น ผลผลิตสูง ทนแล้ง ทนทานต่อโรคต่างๆ และมีคุณภาพในการดื่มดี การคัดเลือกพันธุ์และการส่งเสริมได้ดำเนินการอย่างต่อเนื่องมาเป็นเวลากว่า 10 ปี ทำให้ได้พันธุ์ที่มีลักษณะดีหลายสายพันธุ์ เช่น สายพันธุ์ที่ผ่านการคัดเลือกจากโคลัมเบียและเคนยา ได้แก่ Progeny 86, Progeny 88 และ Progeny 90 พันธุ์ที่ผ่านการคัดเลือกจากโปรตุเกส เช่น Populacao 4, Populacao 5 สายพันธุ์ที่ผ่านการคัดเลือกจากบราซิลเช่น LC1662 และ C1669-31 และสายพันธุ์ที่ผ่านการคัดเลือกจากเคนยา เช่น H306 และ H528 หรือพันธุ์ที่ผ่านการคัดเลือกจากออสเตรเลียเช่น KM47, KM48 และ KM50 เป็นต้น (Op de Laak, 1992)

จากการคัดเลือกพันธุ์กาแฟคาติมอร์สายพันธุ์ต่างๆ โดยโครงการศูนย์วิจัยและพัฒนากาแฟบนที่สูง ทำให้ได้ต้นแม่ที่มีลักษณะดีตรงตามความต้องการข้างต้น นำมาขยายพันธุ์โดยใช้เมล็ด แต่อาจเป็นวิธีทำให้เกิดการกระจายตัว (segregation) ได้ รุน ปลูกผิดไปจากต้นพ่อแม่จำนวนหนึ่ง ในภายหลังเริ่มนำเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมาใช้ เนื่องจากเป็นวิธีที่สามารถเพิ่มจำนวนต้นกล้ากาแฟให้มีลักษณะเหมือนต้นพ่อแม่ทุกประการ การขยายพันธุ์ดังกล่าวใช้พื้นฐานจากการทดลองของ Kartha *et al.* (1981) ที่ทำการเพาะเลี้ยงส่วนปลายยอดกาแฟอราบิก้า พันธุ์ Caturra Rojo และพันธุ์ Catuai บนอาหาร Murashige and Skoog (1962) (MS) ที่เพิ่มเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชชนิด Benzyl adenine (BA) หรือ Zeatin ความเข้มข้น $10 \mu\text{M}$ จะได้หน่อใหม่ที่แตกออกจากปลายยอดมากกว่า 1 หน่อ (multiple shoot) ในทุกปลายยอดที่เพาะเลี้ยง การทดลองในลักษณะเดียวกันที่ได้ทำมาก่อนหน้านี้ประสบความสำเร็จในการปักชำข้อกิ่งตั้งในอาหาร (microcutting) ทำให้ดาที่ซอกใบเจริญเป็นหน่อและต้นใหม่โดยตรง (นิธิ, 2539) การเพาะเลี้ยงข้อกิ่งตั้งนี้ ใช้อาหาร MS ผสม BA ในอัตรา $10 \mu\text{M}$ ทำให้ได้หน่อใหม่ข้อละหลายหน่อสามารถตัดไปเพาะเลี้ยงเป็นต้นกาแฟต่อไป โดยบางพันธุ์เกิดหน่อใหม่ได้สูงถึง 17 ชิ้นต่อ explant ภายในเวลา 6-7 สัปดาห์ ปัญหาของการปักชำในสภาพ

ปลอดเชื้อนี้มี 3 ประการคือ (1) ความจำกัดทางปริมาณ กล่าวคือชิ้นส่วนของพืชที่นำมาเพาะเลี้ยงคือข้อกิ่งต้ง ในกาแฟต้นหนึ่งๆจะสามารถมีกิ่งต้งได้เพียง 1 กิ่งจำนวนที่สามารถเพิ่มได้จากต้นกาแฟ 1 ต้นจึงมีได้จำกัด (2) ชิ้นส่วนยอดกิ่งต้งนี้มีขนาดใหญ่และโครงสร้างซับซ้อน การฆ่าเชื้อที่ผิวให้ทั่วถึงจึงทำได้ยาก (3) อัตราการเกิดรากของชิ้นส่วนที่เกิดใหม่ค่อนข้างต่ำ จากเหตุผลที่กล่าวมานี้ การเพาะเลี้ยงข้อของกิ่งต้งจึงมีประสิทธิภาพค่อนข้างต่ำในการเพิ่มจำนวนต้นกาแฟใหม่ ดังนั้นจึงเกิดความสนใจศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อใบหรือข้อลำต้น เพื่อให้เกิดเป็นแคลลัสก่อน แล้วพัฒนาเป็นต้นกาแฟเล็กๆในภายหลัง ซึ่งมีความเหมาะสมมากกว่า เนื่องจากชิ้นส่วนที่สามารถนำมาเลี้ยงได้มีปริมาณมาก การฆ่าเชื้อทั่วถึงดีกว่า และสามารถเกิดต้นกาแฟใหม่ได้จำนวนมากกว่า

Starisky (1970) เป็นคนแรกที่ได้รายงานการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนลำต้นของกิ่งต้งของกาแฟโรบัสตา (*C. canephora* var. *robusta*) โดยใช้อาหาร Linsmaier and Skoog (1965) ทำให้เกิดโซมาติกอีมบริโอและต้นกาแฟได้ภายในเวลา 2-3 เดือนโดยไม่มีการเปลี่ยนถ่ายอาหาร หลังจากนั้นจึงมีนักวิจัยหลายท่านทำการศึกษาวิจัยเปรียบเทียบวิธีการ อาหารที่ใช้เพาะเลี้ยง พันธุ์ และชิ้นส่วนที่เหมาะสมอย่างกว้างขวาง [Sharp *et al.* (1973), Herman and Hass (1975), Sondahl and Sharp (1977), Kahia and Owuor (1990)] โดยสรุปอาจกล่าวได้ว่า อาหารที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อใบนอกจากจะมีส่วนประกอบของเกลือแร่ MS แล้ว ยังมีสารลดการเกิดออกซิเดชันของสารประกอบฟีนอล เช่น L-cysteine HCl, Thiamine HCl, น้ำตาลซูโครส

และสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชกลุ่มออกซิน (Auxins) เช่น Naphthalene acetic acid (NAA) หรือ 2, 4 Dichlorophenoxy acetic acid (2, 4-D) และกลุ่มไซโตไคนิน (Cytokinins) เช่น Benzyl adenine (BA) หรือไคเนติน (Kinetin) ในอัตราส่วนต่างๆกัน ในขั้นตอนการเพาะเลี้ยงอาจต้องใช้อาหารที่มีส่วนประกอบของสารเหล่านี้ต่างกัน 2-3 ชนิด ใช้เวลาดังแต่เริ่มเพาะจนถึงเกิดต้นกาแฟเล็กๆนาน 13-59 สัปดาห์

จากการทดลองเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อใบกาแฟที่ผ่านมา นิธิ (2540) พบว่าอาหารตามวิธีการของ Sondahl and Sharp (1977) เมื่อใช้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อใบกาแฟ สามารถทำให้เกิดแคลลัสได้ปริมาณมาก แต่ประสบปัญหาในการกระตุ้นแคลลัสให้พัฒนาเป็นต้นใหม่ โดยในระยะหลังของการทดลองพบว่าแคลลัสจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลจมน้ำและตายในที่สุด ทั้งนี้อาจเป็นเพราะสภาพแวดล้อมคือแสงและอุณหภูมิในห้องเก็บเนื้อเยื่อไม่เหมาะสมหรือเกิดจากการขนถ่ายเนื้อเยื่อจากขวดอาหารหนึ่งไปอีกรวดหนึ่งเกิดในขณะมีอุณหภูมิสูงหรือทำให้เนื้อเยื่อเกิดการบอบช้ำ การศึกษาในครั้งนี้จึงเกิดขึ้นเพื่อเปรียบเทียบการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อใบ โดยอาหารตามวิธีการของ Sondahl and Sharp (1977) และวิธีการของ Kahia and Owuor (1990) โดยพยายามกำจัดปัจจัยที่ทำให้เนื้อเยื่อหยุดการเจริญเติบโตและตายดังกล่าวมาแล้ว ออกไปให้มากที่สุด ผลจากการศึกษาครั้งนี้คาดว่า จะสามารถพบชนิดอาหารที่เหมาะสมในการนำไปใช้ขยายพันธุ์กาแฟโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อใบเพื่อนำไปใช้ในขบวนการปรับปรุงพันธุ์ในอนาคต

อุปกรณ์และวิธีการ

นำใบจากข้อที่ 2-3 นับจากปลายยอดของกาแฟพันธุ์ Populacao 5 ซึ่งเป็นพันธุ์ที่ตอบสนองต่อการเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ได้ดี (นิธิ, 2540) อายุ 3 ปี ที่ปลูกในเรือนเพาะชำโครงการศูนย์วิจัยและพัฒนากาแฟบนที่สูง คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ มาทำความสะอาดโดยล้างด้วยน้ำยาล้างจานผ่านน้ำประปาที่กำลังไหล แล้วใช้สาลิจัดดูเบาๆ เพื่อกำจัดเศษฝุ่นละอองและแมลงเล็กๆ ออกให้หมด จากนั้นฆ่าเชื้อที่ผิวด้วยการแช่สารละลายคลอโรกซ์ (คลอรีน 6.25%) 20% นาน 45 นาที แล้วล้างออกด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง นำมาตัดในสภาพปลอดเชื้อเป็นชิ้นขนาด 7X7 มม. โดยให้มีเส้นใบย่อยรวมอยู่ด้วย 1 เส้น แต่ไม่รวมขอบใบและเส้นกลางใบ แบ่งออกเป็น 2 กรรมวิธีกรรมวิธีหนึ่งเพาะเลี้ยงบนอาหาร Sondahl and Sharp (1977) (SS) อีกกรรมวิธีหนึ่งเพาะเลี้ยงบนอาหาร Kahai and Owuor (1990) (KO) ดังมีรายละเอียดดังนี้

SS0 ในอาหาร 1 ลิตรประกอบด้วยเกลือแร่ MS ความเข้มข้นครึ่งส่วน L-cysteine HCl 36.7 มก. Thiamine HCl 10 มก. Myo-inositol 100 มก. วุ้นผง (Difco Bacto agar) 10 กรัม

SS1 ในอาหาร 1 ลิตรมีส่วนประกอบเช่นเดียวกับ SS0 เพิ่มเติมโคเนติน 1.97 มก. NAA 8 มก. น้ำตาลซูโครส 40 กรัม

SS2 ในอาหาร 1 ลิตรมีส่วนประกอบเช่นเดียวกับ SS0 ยกเว้น KNO_3 ความเข้มข้นเป็น 2 เท่า เพิ่มเติมโคเนติน 0.49 มก. NAA 0.1 มก. น้ำตาลซูโครส 20 กรัม

KO0 ในอาหาร 1 ลิตรประกอบด้วยเกลือแร่ MS ความเข้มข้นครึ่งส่วน L-cysteine HCl 66 มก. Thiamine HCl 10 มก. Myo-inositol 100 มก. วุ้นผง (Difco Bacto agar) 10 กรัม

KO1 ในอาหาร 1 ลิตรมีส่วนประกอบเช่นเดียวกับ KO0 เพิ่มเติม BA 8 มก. 2,4-D 3 มก. น้ำตาลซูโครส 30 กรัม

KO2 ในอาหาร 1 ลิตรมีส่วนประกอบเช่นเดียวกับ KO0 ยกเว้น KNO_3 ความเข้มข้นเป็น 2 เท่า เพิ่มเติม BA 4 มก. 2,4-D 1 มก. น้ำตาลซูโครส 20 กรัม

KO3 ในอาหาร 1 ลิตรมีส่วนประกอบเช่นเดียวกับ KO0 ยกเว้น KNO_3 ความเข้มข้นเป็น 2 เท่า เพิ่มเติม BA 2 มก. IAA 0.8 มก. น้ำตาลซูโครส 20 กรัม

อาหารทุกชนิดปรับ pH ให้ได้ 5.8 บรรจุขวดปากกว้างขนาด 5.4 X 11 ซม. แล้วนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 psi. เป็นเวลา 20 นาที

ขั้นตอนและระยะเวลาการเพาะเลี้ยงเริ่มจากเพาะเลี้ยงบนอาหาร SS0 หรือ KO0 ในที่มีดเป็นเวลา 48 ชั่วโมงก่อน แล้วเลือกชิ้นส่วนที่ไม่มีการปนเปื้อนไม่มีการเปลี่ยนสีหรือมีอาการน้ำไปเพาะเลี้ยงในอาหารชนิดต่อไป วิธีการนี้สามารถลดความเสี่ยงจากการปนเปื้อนหรือการตายของเนื้อเยื่อได้อย่างเห็นได้ชัด (Sondahl et al., 1983) สำหรับระยะเวลาการเพาะเลี้ยงบนอาหาร SS1 หรือ KO1 ในที่ไม่มีแสง อุณหภูมิ 26°C นาน 6 สัปดาห์อาหาร SS2 หรือ KO2 นาน 8 สัปดาห์ และอาหาร SS2 หรือ KO3 ที่เพิ่มเติม น้ำมะพร้าวอ่อน 10% เปลี่ยนอาหารใหม่ทุก 8 สัปดาห์จนกว่าจะเกิดโสมติคเอมบริโอ จึงนำออกสู่แสงสว่างวันละ 12 ชั่วโมง สังเกตการเปลี่ยนแปลง

อัตราการรอดชีวิต อัตราการเกิดแคลลัส ปริมาณ
แคลลัส และอัตราการเกิดโซมาติกเอมบริโอ
สำหรับปริมาณแคลลัสที่เกิดใช้การให้คะแนน
จากการประเมิน ด้วยสายตาดังนี้ 1=เริ่มเกิดแคลลัส
สังเกตเห็นปุ่มสีขาวเล็กๆ เกิดห่างๆ รอบรอยแผล
ที่ขึ้นส่วนใบ โดยเฉพาะใกล้เส้นใบย่อย 2 =
แคลลัสเกิดมากขึ้น สังเกตเห็นเป็นแถวเต็มรอย
แผลที่เกิดจากการตัดของขึ้นใบ 3=แคลลัสเกิดเป็น
ปริมาณมาก เห็นเป็นก้อนใหญ่ปริมาณมากกว่า
ปริมาณขึ้นส่วนใบ 4=แคลลัสที่เกิดมีขนาดใหญ่
มากปริมาณมากกว่าปริมาณขึ้นส่วนใบเดิม 2-3 เท่า
เนื้อเยื่อพัฒนาดี มีลักษณะก้อนแน่น ผิวเรียบ
หรือขรุขระ

สำหรับแคลลัสที่พัฒนามากกว่าขนาด 4
ใช้วิธีวัดปริมาตรโดยวัดความกว้าง X ยาว X สูง
หน่วยเป็นลูกบาศก์เซนติเมตร เมื่อโซมาติก
เอมบริโอพัฒนาจนเกิดใบจริง ขนาดเล็ก ๆ
จึงย้ายลงในอาหารชักนำการเกิดรากตามวิธีการของ
Kantha *et al.* (1981) โดยในอาหาร 1 ลิตร
ประกอบด้วยเกลือแร่ MS ความเข้มข้นครึ่งส่วน IBA
1 มก. วุ้นผง (microbiological agar) 10 กรัม

ผลการทดลองและวิจารณ์

จากตารางที่ 1 ในเวลา 50 และ 70 วันของ
การเพาะเลี้ยง อัตราการรอดชีวิตและสร้างแคลลัส
ของขึ้นส่วนใบที่ทำการเพาะเลี้ยงในอาหารทั้งสอง
ชนิดมีอัตราค่อนข้างสูง โดยมีอัตราการรอดชีวิต
บนอาหาร SS เป็น 44.71% และ 36.47%
ส่วนบนอาหาร KO เป็น 64.86% และ 62.16% ที่เวลา
50 และ 70 วันตามลำดับ การสูญเสียขึ้น
ส่วนที่เพาะเลี้ยงเกิดจากการปนเปื้อนด้วยเชื้อรา

และแบคทีเรีย หรือเกิดการจมน้ำโดยไม่มี
การปนเปื้อน ซึ่งถ้าไม่รีบย้ายเนื้อเยื่อปกติออกจาก
ขึ้นส่วนที่ผิดปกติเหล่านี้จะทำให้เนื้อเยื่อปกติ
ที่รอดชีวิตสูญเสียไปด้วย แม้ว่าจะได้มีการกำจัด
ขึ้นส่วนที่มี การปนเปื้อนออกไปก่อนหน้า
นี้แล้วโดยการเพาะเลี้ยงในอาหาร SS0 หรือ KO0
ซึ่งช่วยได้มากแล้วก็ตาม การปนเปื้อนและการตาย
ของเนื้อเยื่อกาแฟจะมีอัตราค่อนข้างสูงอยู่แล้ว
เมื่อเทียบกับพืชอื่นๆ ดังรายงานของ Sondahl *et al.*
(1983) พบว่าการปนเปื้อนอาจสูงถึง 46% ขึ้น จาก 189
ขึ้นส่วนที่เพาะเลี้ยง หรือคิดเป็น 24% แต่หลังจาก
70 วัน ขึ้นส่วนใบทุกขึ้นที่รอดชีวิต จะสามารถ
สร้างแคลลัสได้ทั้งหมด การเกิดแคลลัสเริ่ม
สังเกตเห็นได้หลังเพาะเลี้ยงประมาณ 2 สัปดาห์
โดยเริ่มเห็นปุ่มสีขาวเล็กๆ รอบรอยแผลของขึ้นใบ
จากนั้นก็ จะเพิ่มขนาดและปริมาตรขึ้นเรื่อยๆ
แคลลัสที่เกิดบนขึ้นใบที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร KO
จะมีขนาดใหญ่กว่าบนอาหาร SS (ภาพที่ 1)
โดยเห็นได้ชัดตั้งแต่ 50 วันหลังการเพาะเลี้ยง
เป็นต้นไป นอกจากนี้อาหาร SS ยังทำให้เกิดการ
พัฒนาที่ผิดปกติกล่าวคือแคลลัสเกิดรากขึ้นโดยตรง
แต่ไม่สร้างลำต้นและใบ Starisky (1970) รายงานว่า
ลำดับขั้นการพัฒนาของแคลลัสที่ได้จากการ
เพาะเลี้ยงขึ้นส่วนของลำต้น จะเกิดเอมบริอยด์
(Embryoid) ซึ่งเป็นปุ่มกลมเล็กๆ สีขาวก่อน
จากนั้นจึงยึดตัวขึ้นเป็นแท่งยาวสีขาว (torpedo
shaped somatic embryo) แล้วจึงเกิดใบเลี้ยงคู่เล็กๆ
ที่ปลายแท่งนี้ ต่อมาจึงเกิดใบจริงและกลายเป็น
ต้นกาแฟเล็กๆ (plantlet) และเกิดรากในลำดับ
ท้ายสุด การเกิดรากก่อนเกิดโซมาติก เอมบริโอนี้
สันนิษฐานว่าความสมดุลของสารควบคุมการ
เจริญเติบโตของพืชในอาหาร SS ไม่เหมาะสม

Table 1 Rate of survival and developement of Populacao 5 coffee leaf explants cultured on 2 types of media.

Medium ^{1/}	Number of explants					Amount of callus ^{3/}	Number of	
	total	survived ^{2/}	%	callus	callus/surv.		embryos	embr/surv.
50 days								
SS1	85	38	44.71	38	1	1.57	0	0
KO1	74	48	64.86	48	1	2.47	0	0
70 days								
SS2	38	31	36.47	31	1	1.80	0	0
KO2	48	46	62.16	46	1	2.91	0	0
8 months								
SS2+	16	16	37.21	16	1	1.93	7	0.44
SS2-	13	13	30.95	13	1	2.15	7	0.54
KO3+	23	23	62.16	23	1	(7.25) ^{4/}	23	1.00
KO3-	25	18	48.65	18	1	(5.93) ^{4/}	40	2.22
16 months								
SS2+	16	1	2.33	1	1	2.00	10	10.00
SS2-	13	6	14.29	6	1	1.92	53	8.83
KO3+	23	3	8.11	3	1	(5.23) ^{4/}	90	30.00
KO3-	18	1	2.70	1	1	(8.42) ^{4/}	66	66.00

Remarks ^{1/} = existence of coconut liquid endosperm, where + with and - without

^{2/} = excluding contaminated and oxidationed explants

^{3/} = average based on scoring 1-4

^{4/} = average volume of calli in cm. x cm. x cm.

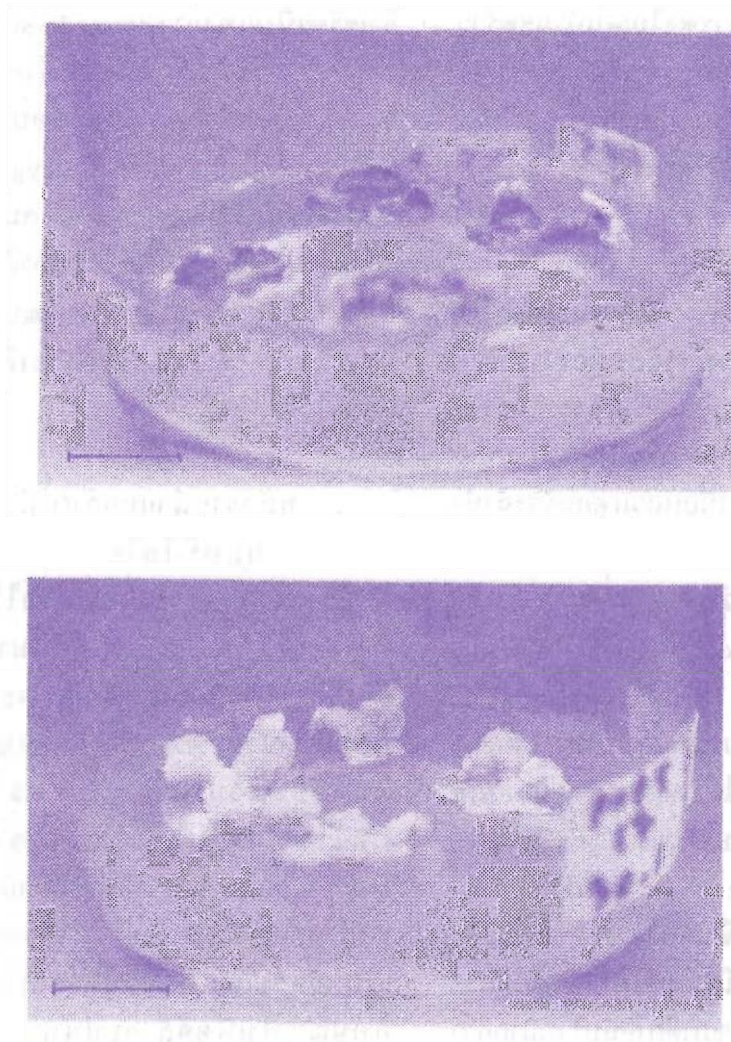


Figure 1 50-day development of Populacao 5 coffee leaf explants; on SS (above) and on KO (below) medium. B = 1 cm.

อาหาร KO ทำให้ได้ปริมาณแคลลัสและอัตราการเกิดโซมาติกเอมบริโอสูงกว่าอาหาร SS มากในทุกระยะเวลาการทดลอง ผลของการเติมน้ำมะพร้าวอ่อน 10% ลงในอาหารทั้งสองชนิดยังสรุปไม่ได้ โดยที่อาหารซึ่งไม่เติมน้ำมะพร้าวก็น่าจะเกิดโซมาติกเอมบริโอได้จำนวนมากเช่นกัน แต่เนื่องจากจำนวนแคลลัสที่รอดชีวิตมีน้อยจึงไม่อาจยืนยันผลได้ชัดเจน

ลักษณะแคลลัสที่เกิดบนอาหาร KO จะมีลักษณะเป็นก้อนใหญ่ เนื้อแน่น มีสีขาวหรือสีเหลืองขนาดใหญ่กว่าแคลลัสบนอาหาร SS 5-10 เท่า ขึ้นไปเดิมมีสีเหลืองหรือเขียว ในขณะที่แคลลัสบนอาหาร SS มีลักษณะเป็นปุ่มกลมเล็กๆ หรือเป็นก้อนใหญ่ขรุขระ เนื้อหวม ค่อนข้างล้า น้ำขึ้นไปเดิมมีสีน้ำตาล (ภาพที่ 2) จากคำบรรยายของ Sondahl *et al.* (1983) พบว่าแคลลัสที่เกิดบนอาหาร SS เป็นแบบ LFSE (Low Frequency Somatic Embryogenesis) หรือ Direct Embryogenesis ซึ่งเมื่อเกิดแคลลัสเป็นปุ่มกลมแล้ว สามารถพัฒนาเป็นโซมาติกเอมบริโอได้โดยตรง ส่วนแคลลัสบนอาหาร KO จะเป็นแบบ HFSE (High Frequency Somatic Embryogenesis) ซึ่งจะเกิดแคลลัสปริมาณมากๆ ก่อนแล้วจึงเกิดโซมาติกเอมบริโอภายหลัง การพัฒนาแบบนี้ใช้เวลามากกว่าแบบแรก แต่มักให้ผลผลิตจำนวนโซมาติกเอมบริโอมากกว่า

หลังจากเพาะเลี้ยงไปได้ 8 เดือน แคลลัสที่เป็นก้อนใหญ่มีเป็นเนื้อเยื่อหวมขรุขระหรือแคลลัสแน่นเป็นก้อนเรียบจะเริ่มพัฒนา (ภาพที่ 2) เกิดเป็นปุ่มกลมสีขาว (Embryoid) ต่อมาจึงเจริญเป็นแท่งยาว (torpedo stage) ที่ปลายมีใบเล็กๆ 2 ใบ เมื่อโคขึ้นและนำออกสู่แสงสว่าง ใบจะมีลักษณะกลมสีเขียวเหมือนใบเลี้ยงของต้นที่ได้จากการเพาะเมล็ด (Zygotic embryo) ใบคู่ต่อมาจึงมีลักษณะเรียวยาวเหมือนใบจริงระยะต่อมาจึงเกิดรากขึ้นที่ปลายลำต้นด้านตรงข้ามกับยอด สรุปขั้นตอนการพัฒนาของเนื้อเยื่อแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงใบกาแพ่แสดงไว้ในภาพที่ 3

หลังจากนำแคลลัสที่มีการพัฒนาเป็นโซมาติกเอมบริโอไปเพาะเลี้ยงในอาหารชักนำการเกิดราก ผลที่ได้แสดงไว้ในตารางที่ 2 ซึ่งพบว่าอาหาร KO ให้โซมาติกเอมบริโอที่เกิดขึ้นมีมากกว่าอาหาร SS โดยในอาหาร KO ที่ไม่เติมน้ำมะพร้าวเกิดต้นใหม่ได้สูงถึง 30 ต้นต่อชิ้นส่วน ในขณะที่อาหาร SS ที่ไม่เติมน้ำมะพร้าวเกิดต้นใหม่เพียง 10.66 ต้นต่อชิ้นส่วน นอกจากนี้ในอาหารชนิดหลังยังเกิดต้นที่ผิดปกติ กล่าวคือการพัฒนาไม่เกิดเป็นต้นกาแพ่ที่สมบูรณ์ เช่น เกิดต้นและใบเป็นสีขาว ใบไม่คลี่ออกแต่มีลักษณะเป็นพืดคล้ายรูปพัด มีโคนต้นบวมหรือบิดเบี้ยวมากกว่าในอาหาร KO

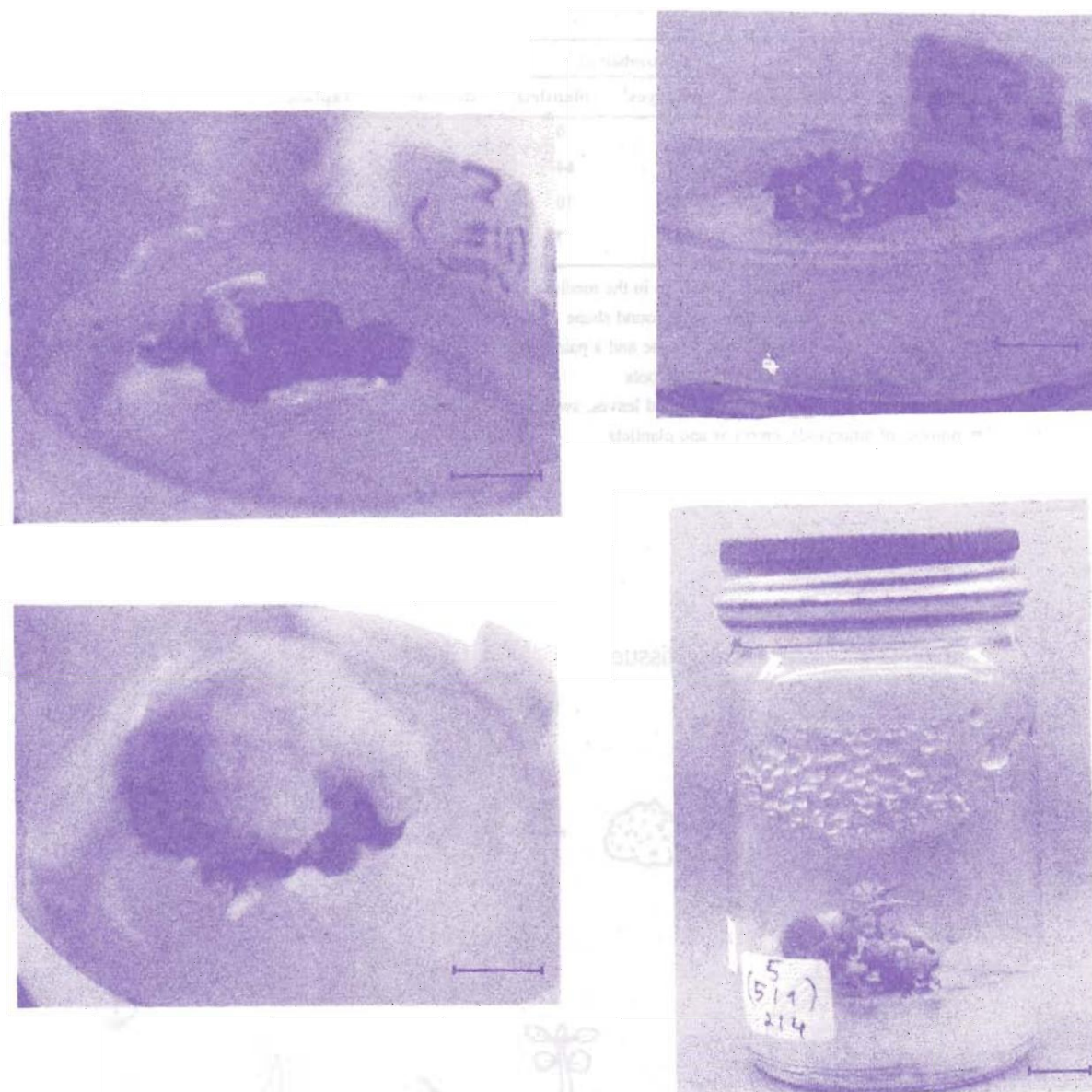


Figure 2 Different stages of development from calli of *Populacae 5* leaf explants cultured on; SS (above, left) and KO (below, left) medium. Some white, rod-shaped, somatic embryos can be seen on medium surface. Embryoid formation (above, right) indicated formation of embryos; and plantlets (below, right) occurred after 20 months. Bar = 1 cm.

Table 2 Survival and development of embryos from Populacao 5 coffee leaf explants on rooting medium at 20-month culture.

Medium ^{1/}	No. explants survived	Number of				Proliferation /explant ^{6/}
		embryoids ^{2/}	embryos ^{3/}	plantlets ^{4/}	deform ^{5/}	
SS+	1	0	0	0	0	0.00
SS-	6	0	0	64	22	10.66
KO3+	3	15	40	10	2	21.66
KO3-	1	0	23	7	2	30.00

Remarks ^{1/} = existence of coconut liquid endosperm in the medium; + with, - without
^{2/} = developed group of calli appeared in round shape
^{3/} = somatic embryos appeared in rod shape and a pair of leaf primordia
^{4/} = distinct small plants with leaves and roots
^{5/} = deformed somatic embryos, i.e. fanned leaves, swelling or distort stem
^{6/} = number of embryoids, embryos and plantlets

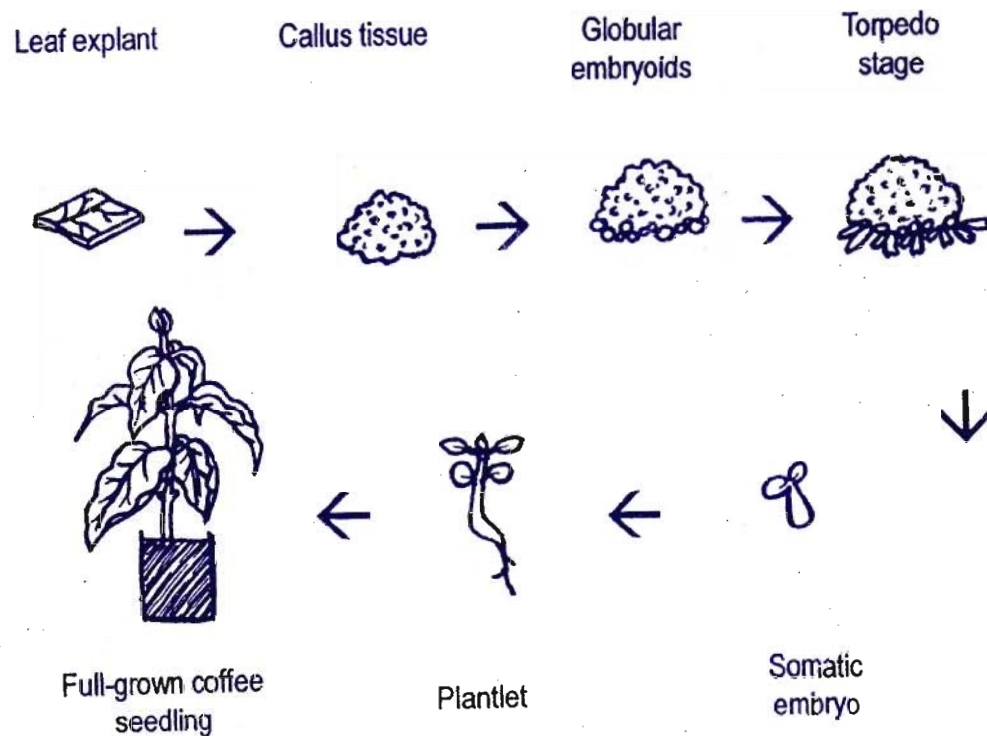


Figure 3 Stages of development from leaf culture of coffee.

สรุปผลการทดลอง

การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบของกาแฟบนอาหาร SS ทำให้อัตราการรอดชีวิตของชิ้นส่วนที่เพาะเลี้ยงต่ำกว่าการใช้อาหาร KO ในทุกช่วงเวลาดังแต่ 50 วันจนถึง 16 เดือน อัตราการเกิดแคลลัสในอาหารทั้งสองชนิดเป็น 100% เท่ากัน กล่าวคือ ชิ้นส่วนที่รอดชีวิตสามารถสร้างแคลลัสได้ทั้งหมด ปริมาณแคลลัสและอัตราการเกิดโซมาติก เอ็มบริโอในอาหาร KO สูงกว่าในอาหาร SS มาก

การเติมน้ำมะพร้าวอ่อน 10% ลงในอาหารเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนสุดท้ายไม่ทำให้เกิดความแตกต่างในการพัฒนาเป็นโซมาติกเอ็มบริโอ ความแตกต่างเกิดจากส่วนประกอบของอาหารทั้งสองชนิดมากกว่า อาหาร KO ทำให้เกิดโซมาติกเอ็มบริโอได้สูงถึง 30 เอ็มบริโอต่อชิ้นส่วนภายในเวลา 16 เดือน และยังเกิดต้นกาแฟที่ผิดปกติน้อยกว่าอีกด้วย

การศึกษานี้ต่อไปควรเป็นการศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อใบที่ใช้เวลาสั้นลง ลดขั้นตอนในการเปลี่ยนถ่ายอาหารซึ่งเป็นขั้นตอนที่ยุ่งยากและทำให้ชิ้นส่วนตายเพิ่มมากขึ้น การทำให้อัตราการรอดชีวิตและอัตราการเกิดต้นกาแฟเล็กๆ สูงขึ้นโดยการปรับปรุงอัตราส่วนของอาหาร สภาพแวดล้อมที่เพาะเลี้ยง และระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงบนอาหารชนิดต่างๆ

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับงบประมาณจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติประเภททั่วไปประจำปี 2537-38 ผู้ทำการวิจัยขอขอบพระคุณไฉฉวน โอภาส

เอกสารอ้างอิง

- นิติ ไทยสันทัด. 2539. อิทธิพลของ BA ต่อการขยายพันธุ์โดยการเพาะเลี้ยงข้อลำต้นของกาแฟอาราบิก้า (*Coffea arabica* L.). วารสารเกษตร 12 (3): 270-278.
- นิติ ไทยสันทัด. 2540. อิทธิพลของพันธุ์ และเส้นกลางใบต่อการสร้างแคลลัสในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อใบกาแฟอาราบิก้า (*Coffea arabica* L.). วารสารเกษตร 13 (1): 43-51.
- Herman, F.R.P. and G.J. Haas. 1975. Clonal propagation of *Coffea arabica* L. from callus culture. Hort. Sci. 10: 588-589.
- Kahia, J.W. and J.B.O. Owuor. 1990. *In vitro* propagation of disease resistant *Coffea arabica* L. cultivar - Ruiru 11. Kenya Coffee 55(646): 901-905.
- Kartha, K.K., K.P. Mroginski and N.L. Lueng. 1981. Germplasm preservation of coffee (*Coffea arabica* L.) by *in vitro* culture of shoot apical meristems. Plant Sci. Lett. 22: 301-307.

- Linmaier, M. and F. Skoog. 1965. Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 18: 100-127.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* 15: 473-479.
- Op de Laak, J.H.M. 1992. Arabica Coffee Cultivation and Extension Manual for the Highlands of Northern Thailand. Thanaban Printer, Chiangmai. 111p.
- Sharp, W.R., L.S. Caldas, L.C. Monaco and A. Carvalho, 1973. Production of *Coffea arabica* callus of three ploidy levels and subsequent morphogenesis. *Phyton* 31:67-74.
- Starisky, G. 1970. Embryoid formation in callus cultures of coffee. *Acta Bot. Neerl.* 19: 509-514.
- Sondahl, S. and W.R. Sharp. 1977. High frequency induction of somatic embryos in cultured leaf explants of *Coffea arabica* L. *Z. Pflanzenphysiol.* Bd. 81:(s) 395-408.
- Sondahl, S., T. Nakamura, H.P. Medina-Filho, A. Carvalho, L.C. Fazuoli and W.M. Costa. 1983. Coffee. In: *Handbook of Plant Cell Culture, Vol.1, Techniques for Propagation and Breeding.* D.A. Evans, W.R. Sharp, P.V. Ammirato and Y. Yamada (editors). Macmillan Publishing Company, New York. pp. 564-590.
-