

อิทธิพลของพันธุ์และเส้นกลางใบต่อการสร้างแคลลัส  
ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อใบกาแฟอาราบิก้า (*Coffea arabica* L.)

Effects of Cultivar and Midvein on Callus Formation  
of Arabica Coffee (*Coffea arabica* L.) Leaf Culture

นิธิ ไทยสันทัด<sup>1/</sup>

Nithi Thaisantad<sup>1/</sup>

**Abstract :** Leaf culture of Catimor arabica coffee was carried out to study effects of cultivars and existence of midvein on production of callus tissue. It was found that among 3 lines studied, C1669-31, Progeny90 and Populacao5; the latest showed highest rate of callus production and amount of callus whether on explants with or without midvein. Explants with midvein produced better result in amount of callus proliferation, except in Progeny90 of which no difference was found. Percentage of callus production was lower in explants with midvein than those without midvein due to higher contamination rate. Somato-embryonic development was failed to succeed. All callus turned brown and finally disintegrated without further development within 15 weeks on SS2 medium.

**บทคัดย่อ :** เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อใบที่มีและไม่มีเส้นกลางใบของกาแฟอาราบิก้าพันธุ์คาติมอร์ หมายเลข C1669-31, Progeny90 และ Populacao5 ผลการทดลองพบว่า Populacao5 สร้างแคลลัสได้เป็นปริมาณมากกว่า และจำนวน Explant ที่สร้างแคลลัสสูงกว่าอีก 2 พันธุ์ทั้งกลุ่ม Explant ที่มีและไม่มีเส้นกลางใบ กลุ่ม Explant ที่มีเส้นกลางใบ จะเกิดแคลลัสปริมาณมากกว่าและจำนวน Explant ที่สร้างแคลลัสสูงกว่ากลุ่ม Explant ที่ไม่มีเส้นกลางใบ ยกเว้นในพันธุ์ Progeny90 ซึ่งไม่แสดงความแตกต่างในด้านปริมาณแคลลัสแต่กลุ่ม Explant ที่มีเส้นกลางใบ จะมีอัตราการรอดชีวิตต่ำกว่า เนื่องจากการปนเปื้อนสูง การทดลองนี้ไม่พบการเกิดเป็นต้นใหม่ขึ้น โดยแคลลัสจะเปลี่ยน เป็นสีน้ำตาลและตายไป หลังเพาะเลี้ยงในอาหาร SS2 ได้ 15 สัปดาห์

**Index words :** กาแฟอาราบิก้า, การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ, การเพาะเลี้ยงใบ, พันธุ์, เส้นกลางใบ

Arabica coffee, *Coffea arabica* L., Tissue culture, Leaf culture, Cultivar, Mid vein

<sup>1/</sup> โครงการศูนย์วิจัยและพัฒนากาแฟบนที่สูง คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ อ.เมือง จ.เชียงใหม่ 50200

<sup>1/</sup> Highland Coffee Research and Development Centre, Faculty of Agriculture, Chiangmai University, Chiangmai 50200

## คำนำ

ปัจจุบันโครงการศูนย์วิจัยและพัฒนากาแฟบนที่สูง คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ได้ทำการคัดเลือกและส่งเสริมเผยแพร่พันธุ์กาแฟอราบิก้าที่มีลักษณะดี กล่าวคือ มีต้นเตี้ย ข้อสั้น ผลผลิตสูง ทนแล้ง มีความต้านทานต่อโรคราสนิม และโรคที่สำคัญอื่นๆ และมีคุณภาพในการคั่วดี โดยการเผยแพร่เมล็ดพันธุ์ และต้นกล้าตั้งแต่ปี พ.ศ. 2530 เป็นต้นมา พันธุ์ดังกล่าวได้แก่ พันธุ์คาติมอร์ หมายเลข LC1662, C1669-31, Progeny86, Progeny88, Progeny90, Populacao5 ฯลฯ พันธุ์เหล่านี้ยังต้องมี การพัฒนาปรับปรุงในด้านความสม่ำเสมอของผลผลิต และคุณภาพในการคั่ว (Op de Laak, 1992)

ในการปรับปรุงลักษณะต่างๆ ของกาแฟอราบิก้า นักปรับปรุงพันธุ์พืชต้องทำการผสมกลับไปยังพันธุ์พ่อแม่ (Back crossing) ซึ่งในขบวนการนี้เมื่อได้ลูกผสมชั่วที่ 1 ที่มีลักษณะตามต้องการแล้ว ปัญหาที่พบคือการเพิ่มจำนวนลูกผสมที่มีจำนวนจำกัดเหล่านั้นโดยไม่ทำให้ลักษณะที่สำคัญเปลี่ยนแปลงไป ในขั้นตอนนี้จึงได้มีการนำการ ขยายพันธุ์ โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเข้ามาช่วยเพื่อให้บรรลุวัตถุประสงค์ดังกล่าว

การขยายพันธุ์โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อได้มีการศึกษาและพบว่าสามารถนำมาใช้ได้อย่างเหมาะสม สามารถเพิ่มจำนวนต้นกาแฟเป็นปริมาณมากๆ ได้โดยที่ไม่ทำให้เกิดการกลายพันธุ์ อันเนื่องจากการกระจายตัว (Segregation) เหมือนการขยายพันธุ์ด้วยเมล็ด สามารถนำไปใช้เก็บรักษา Germplasm เป็นระยะเวลานานถึง 2 ปีโดยไม่ต้องเปลี่ยนถ่ายอาหาร (Kantha et al., 1981) การ

เพาะเลี้ยงข้อลำต้นให้เกิดหน่อใหม่ แล้วตัดหน่อไปเลี้ยงเป็นลำต้น โดยมีอัตราการเกิดต้นใหม่ได้ 2-5 ต้น/ข้อ (Custer et al., 1980; นิธิ, 2540) หรือการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่ออ่อน เช่น เนื้อเยื่อใบ หรือปล้องของกิ่งและลำต้นให้เกิดแคลลัส ซึ่งพัฒนาเป็นเอ็มบริโอและต้นใหม่ได้ต่อไป (Starisky, 1970; Herman and Hass, 1975; Sondahl and Sharp, 1977b) โดยเฉพาะการเพาะเลี้ยงใบจะมีความเหมาะสมมากกว่าวิธีการอื่น เพราะเป็นวิธีที่ใช้วัตถุดิบปริมาณน้อย ไม่ทำให้ต้นกาแฟที่ตัดมาตาย และสามารถเพิ่มจำนวนต้นกาแฟใหม่ได้ปริมาณมาก

การทดลองครั้งนี้ทำขึ้นเพื่อศึกษาความแตกต่างของพันธุ์และลักษณะที่เหมาะสมของเนื้อเยื่อใบที่นำมาเพาะเลี้ยงเพื่อให้ได้ปริมาณแคลลัสและปริมาณต้นใหม่สูงสุด จากผลการทดลองของ Sondahl and Sharp (1977b) พบว่าเนื้อเยื่อแคลลัสเกิดจากเซลล์ชั้นมีโซฟิล โดยพบว่าแคลลัสเกิดหนาแน่น เริ่มจากบริเวณเส้นใบย่อยและเส้นกลางใบ การทดลองนี้จึงได้ศึกษาอิทธิพลของเส้นกลางใบต่อปริมาณการเกิดแคลลัสของกาแฟอราบิก้า โดยทำการทดลอง ณ ห้องทดลองเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ โครงการศูนย์วิจัยและพัฒนากาแฟบนที่สูง คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ระหว่างเดือนมีนาคมถึงเดือนมิถุนายน พ.ศ.2538

## อุปกรณ์และวิธีการ

### ใช้วิธีการของ Sondahl and Sharp (1977a)

นำใบอ่อนจากข้อที่ 2-4 นับจากปลายกิ่งนอนของกาแฟพันธุ์คาติมอร์ หมายเลข C1669-31, Progeny90 และ Populacao5 อายุ 3 ปี ที่ปลูกในเรือนเพาะชำมาล้างด้วยน้ำประปาและ

น้ำยาล้างจาน ใช้สาลิซัดดูเบาๆ เพื่อกำจัดแมลง  
ฝุ่นละออง และเศษสิ่งสกปรกที่ติดมาให้สะอาด  
นำไปฆ่าเชื้อที่ผิวด้วยสารละลายคลอรีน 20%  
ผสมสารลดแรงตึงผิว Tween20 0.5 มล.ต่อลิตร  
เป็นเวลา 45 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว  
3 ครั้ง นำไปตัดในสภาพปลอดเชื้อเป็นชิ้นสี่เหลี่ยม  
ขนาด 7 X 7 มม. โดยไม่นำบริเวณขอบใบมาด้วย  
เพราะแคลลัสจะเกิดได้ดีที่บริเวณแผลที่เกิดจาก  
การตัดเท่านั้น (Sondahl et al., 1983) แบ่ง Explant  
เป็น 2 กลุ่มคือ Explant ที่มีเส้นกลางใบ และ  
Explant ที่ไม่มีเส้นกลางใบนำไปวางโดยให้  
ด้านบน ซึ่งมีสีเขียวเข้มเรียบเป็นมันสัมผัสกับ  
อาหาร อาหารที่ใช้คืออาหาร SSO ประกอบด้วย  
เกลือแร่ตามวิธีการของ Murashige and Skoog  
(1962) ความเข้มข้นครึ่งส่วน โดยในอาหาร 1 ลิตร  
เพิ่มเติมสารต่อไปนี้ L-cysteine HCl 36.7 มก. รูนผง  
(Bacto agar) 10 กรัม pH 5.8 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่  
ความดัน 15 ปอนด์ต่อตร.นิ้ว เทในจานเพตริช  
ขนาด 90 มม. หลังจากวางชิ้นใบแล้วนำไปเก็บ  
ในที่มืด อุณหภูมิ 26°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง  
หลังจากนั้นคัดเลือก explant ที่ไม่มีการปนเปื้อน  
ไม่ดำ และมีสีเขียวปกติไปเพาะเลี้ยงต่อในอาหาร  
SS1 ที่มีส่วนประกอบเหมือน SSO โดยมีการ  
ดัดแปลง กล่าวคือในอาหาร 1 ลิตร เพิ่มปริมาณ  
KNO<sub>3</sub> เป็น 2 เท่า น้ำตาลซูโครส 40 กรัม และ  
ฮอร์โมน 2 ชนิด คือ Kinetin 1.97 มก. และ NAA  
8 มก. บรรจุขวดแก้วปากกว้างขนาด 60 X 105 มม.  
หลังจากเพาะเลี้ยงไปได้ 8 สัปดาห์ย้ายลงสู่อาหาร  
SS2 ซึ่งมีส่วนประกอบเช่นเดียวกับ SS1 โดยมีการ  
ดัดแปลง กล่าวคือในอาหาร 1 ลิตร ปริมาณ  
ซูโครสลดลงเหลือ 20 กรัม Kinetin 0.4 มก. และ  
NAA 0.1 มก.

การบันทึกผลการทดลองทำโดยสังเกต

ลักษณะและอัตราการเกิดแคลลัสของ Explant  
หลังจากเพาะเลี้ยงในอาหาร SS2 ไปได้นาน 15  
สัปดาห์ อัตราการเกิดแคลลัสคือร้อยละของจำนวน  
Explant ที่สร้างแคลลัสต่อจำนวน Explant ทั้งหมด  
ที่เพาะเลี้ยง และปริมาณแคลลัสที่เกิดใช้วิธีการ  
ให้กะแนณด้วยสายตา โดยวัดจากขนาดและ  
ปริมาตรของเนื้อเยื่อแคลลัสที่เกิด ให้กะแนณเป็น 4  
ระดับ 1, 2, 3 และ 4

### ผลการทดลอง

Explant ของใบจะเกิดการเปลี่ยนแปลง  
หลังเพาะเลี้ยงในอาหารได้ประมาณ 2 สัปดาห์  
โดยสังเกต เห็นที่รอยแผลรอบๆ Explant มีการ  
ขยายตัวขึ้น ทำให้ขอบ Explant มีลักษณะเป็นคลื่น  
ต่อมาจะเห็นกลุ่มเนื้อเยื่อสีเหลืองอ่อนหรือสีขาว  
เกิดขึ้นรอบๆ Explant ประมาณ 4 สัปดาห์จะเห็น  
เป็นแคลลัสชัดเจน โดยเฉพาะที่เส้นกลางใบหรือ  
เส้นใบย่อยจะเห็นได้ชัดเจนกว่าที่ใบธรรมดา เมื่อ  
ถ่ายเนื้อเยื่อไปเพาะเลี้ยงใน อาหาร SS2 หรือเมื่อ  
แคลลัสมีอายุได้ 5 สัปดาห์ จะเห็นการเปลี่ยนแปลง  
อย่างรวดเร็ว คือจะเกิดเนื้อเยื่อแคลลัสเพิ่ม  
ปริมาณขึ้นอย่างมาก ลักษณะแคลลัสเป็นก้อน  
ค่อนข้างเรียบ เพิ่มขนาดขึ้นเป็น 1-3 เท่าของขนาด  
Explant เดิม สีของแคลลัสเป็นสีขาว สีส้ม  
หรือสีน้ำตาลอ่อน บางครั้งมีลักษณะฉ่ำน้ำ Explant  
ที่มีเส้นกลางใบรวมอยู่ด้วย จะเกิดแคลลัสเป็น  
ปริมาณมากกว่า Explant ที่ไม่มีเส้นกลางใบ  
(ภาพที่ 3) การเปลี่ยนแปลงนี้จะถึงจุดสูงสุด  
หลังจากเพาะเลี้ยง ได้นานประมาณ 6 สัปดาห์  
หลังจากนั้นก้อนแคลลัสจะมีขนาดคงที่แต่จะมีการ  
เปลี่ยนแปลงสีและลักษณะความแน่นของ  
เนื้อเยื่อ

จำนวน Explant ที่เกิดแคลลัสและปริมาณแคลลัสที่สร้าง แสดงไว้ในตารางที่ 1, ภาพที่ 1 และภาพที่ 2

ในการทดลองนี้ไม่พบการพัฒนาของแคลลัสเกิดเป็นต้นกาแฟใหม่ขึ้น โดยพบว่าหลังจากเพาะเลี้ยง ไปได้ประมาณ 8 สัปดาห์เนื้อเยื่อแคลลัสจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลถึงดำ ฉ่ำน้ำ ไม่มีการเปลี่ยนแปลงต่อไป และตายในที่สุด (ภาพที่ 4) โดยเมื่อแคลลัสตายจะสังเกตเห็นเนื้อเยื่อมีลักษณะอ่อนนุ่ม และปลดปล่อยสารสีน้ำตาลออกมา ทำให้อาหารเป็นสีน้ำตาลทั้งหมด

### วิจารณ์ผลการทดลอง

อิทธิพลของเส้นกลางใบต่อการเจริญเติบโตในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อใบกาแฟพันธุ์คาติมอร์ หมายเลข C1669-31 และ Populacao5 จะเป็นไปในทางบวก กล่าวคือ Explant ที่มี เส้นกลางใบ

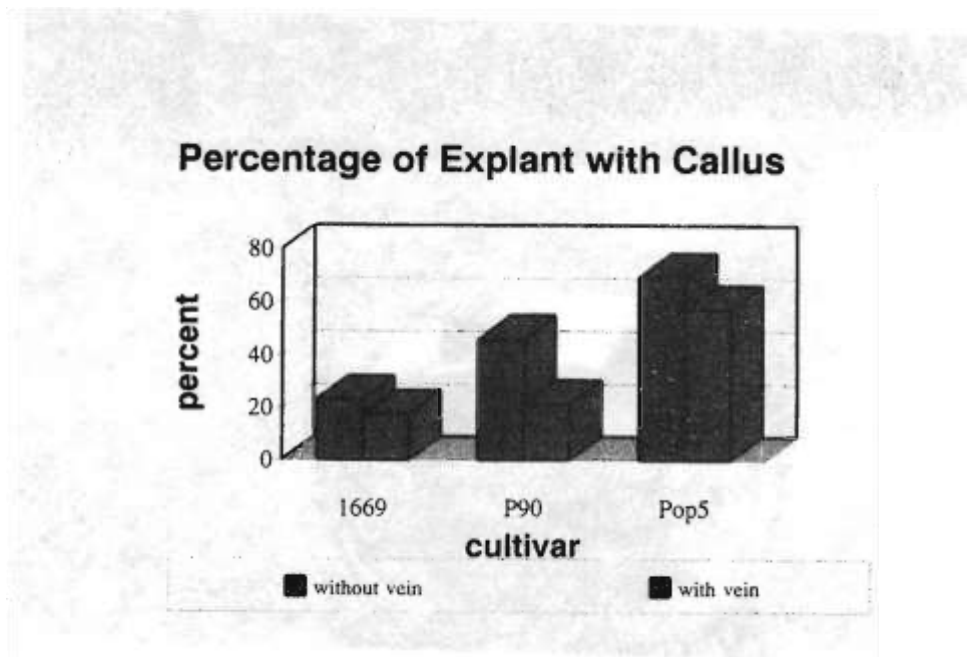
รวมอยู่อย่างน้อย 1 เส้น จะเกิดแคลลัสเป็นปริมาณมากกว่า Explant ที่ไม่มีเส้นกลางใบเป็นไปดังที่คาดไว้ ส่วนในพันธุ์ Progeny90 ไม่แสดงความแตกต่างระหว่าง Explant ที่มีและไม่มีเส้นกลางใบ อย่างไรก็ตาม Explant ที่มีเส้นกลางใบกลับไม่เหมาะที่จะนำมาใช้เพาะเลี้ยง เพราะจะมีอัตรา Explant ที่รอดชีวิตต่ำ เนื่องจากอัตราการปนเปื้อนสูง (ข้อมูลไม่ได้แสดงไว้ในตาราง) แม้ในระยะแรกๆจะไม่พบการปนเปื้อน แต่เมื่อเพาะเลี้ยงนานขึ้น จะพบเชื้อราเจริญออกมาภายหลัง อาจเป็นเพราะมีเชื้อจุลินทรีย์แอบแฝงอยู่ตามซอกเล็กๆของเส้นกลางใบ และเส้นใบย่อย หรือตามหลุมเล็กๆ ที่โคนเส้นใบย่อยที่เรียกว่า Dormatia ขากแก่การกำจัดด้วยการฟอกฆ่าเชื้อ (Sondahl *et al.*, 1983) เมื่อสภาพแวดล้อมเหมาะสมขึ้น เช่น ความชื้นเพิ่มขึ้น หรือ เนื้อเยื่อส่วนนั้นมีโอกาสในการสัมผัสอาหาร เชื้อราเหล่านี้จะเจริญออกมาในภายหลังได้ ในขณะที่ Explant ที่ไม่มีเส้นกลางใบจะสามารถฆ่าเชื้อที่ผิวได้สะอาดทั่วถึงมากกว่า

**Table 1** Callus production of leaf explants from coffee cultivars: C1669-31, Progeny90 and Populacao5 after 15-week culture on SS2.

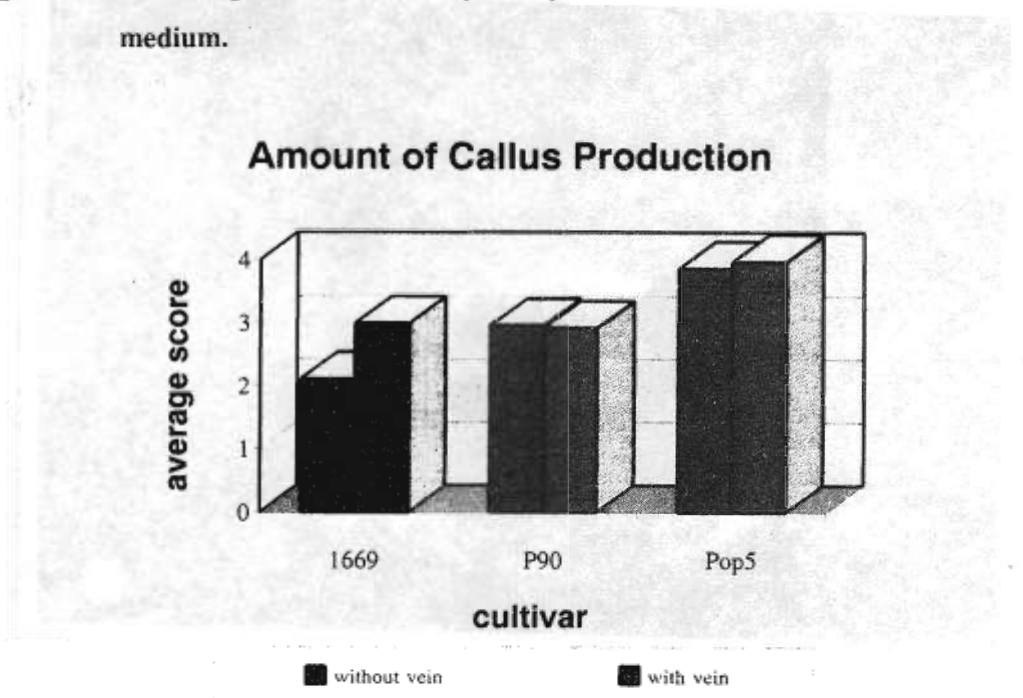
| Cultivar   | Explant without mid vein |              |       |                             | Explant with mid vein |              |       |                             |
|------------|--------------------------|--------------|-------|-----------------------------|-----------------------|--------------|-------|-----------------------------|
|            | Total explant            | Expl. callus | %     | Average callus <sup>u</sup> | Total explant         | Expl. callus | %     | Average callus <sup>u</sup> |
| C1669-31   | 69                       | 16           | 23.19 | 2.12                        | 74                    | 13           | 17.57 | 3.00                        |
| Progeny90  | 72                       | 33           | 45.83 | 2.96                        | 79                    | 17           | 21.52 | 2.92                        |
| Populacao5 | 72                       | 50           | 69.44 | 3.86                        | 75                    | 43           | 57.33 | 3.97                        |

Remark <sup>u</sup> average score of callus production according to direct observation, when

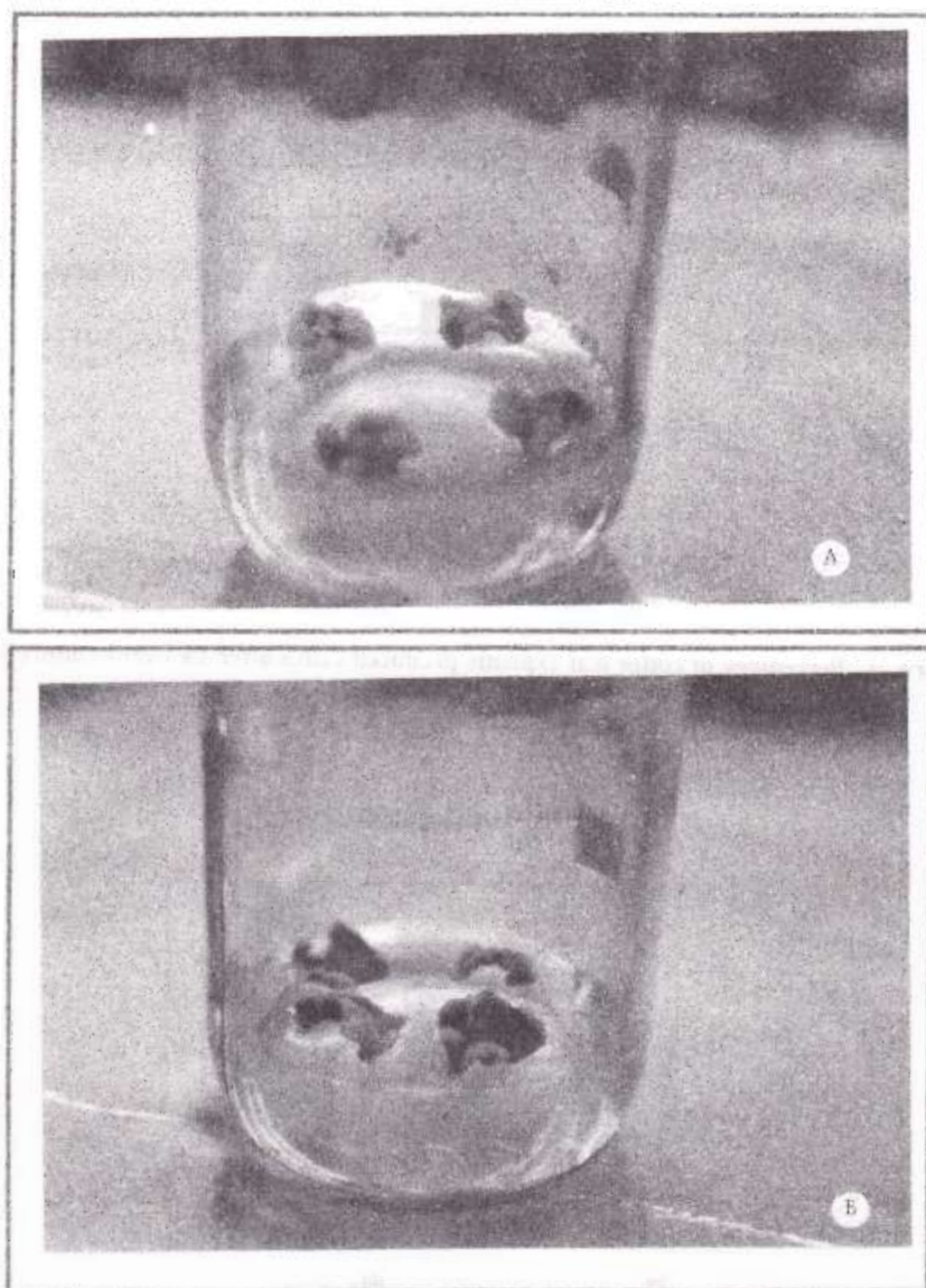
- 1 = callus started to initiate, can be seen in tiny globules around the explant
- 2 = callus produced in thin chain around the explant
- 3 = callus produced in thick chain around the explant
- 4 = callus in mass, 1-3 times of leaf volume



**Figure 1** Percentage of coffee leaf explants produced callus after 15 weeks culture on SS2 medium.

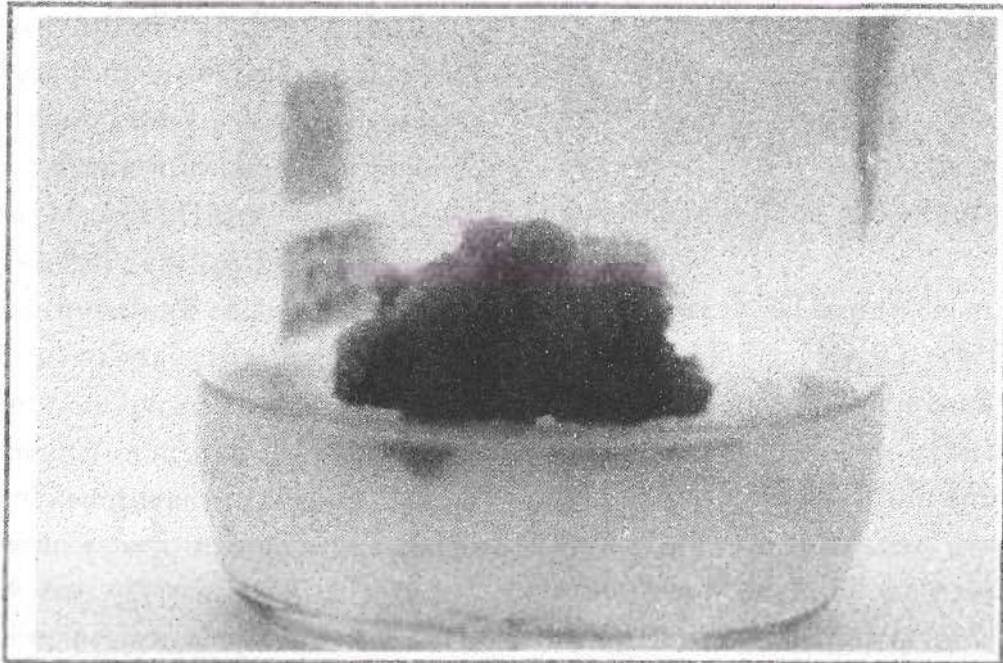


**Figure 2** Amount of callus produced on leaf explants after 15 weeks culture on SS2 medium.



**Figure 3** Callus proliferation of coffee leaf explants after 2 weeks culture on SS1 medium,  
3A: explants with midvein, 3B: without midvein.

อิทธิพลของพันธุ์และเส้นกลางใบต่อการสร้างแคลลัส  
ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อใบกาแฟอาราบิก้า (*Coffea arabica* L.)



**Figure 4** Browning of callus tissue after 15 weeks culture on SS2.

เมื่อเปรียบเทียบปริมาณการเกิดแคลลัสในกาแฟพันธุ์ต่างๆ จะเห็นว่าพันธุ์ Populacao 5 มีปริมาณการเกิดแคลลัสสูงกว่าพันธุ์ C1669-31 และ Progeny 90 ทั้งในกลุ่ม Explant ที่มีและไม่มีเส้นกลางใบ ความแตกต่างนี้อาจเกิดจากลักษณะทางพันธุกรรมของกาแฟเอง ทั้งนี้ ในรายงานของ Sondahl and Sharp (1977b) ก็ได้พบความแตกต่างในการเกิดแคลลัสของเนื้อเยื่อใบในพันธุ์ต่างๆ ของกาแฟอราบิก้าเช่นกัน

ในการทดลองนี้ไม่ได้รวมกาแฟพันธุ์ Caturra ไว้ด้วย เนื่องจากวัตถุดิบที่นำมาเพาะเลี้ยง นำมาจากต้นกล้ากาแฟที่เพาะเก็บไว้ในเรือนเพาะชำเพื่อการส่งเสริมให้เกษตรกร กาแฟพันธุ์นี้ไม่ได้มีการเพาะกล้าเก็บไว้ เนื่องจากเป็นพันธุ์ดั้งเดิมที่ไม่ต้านทานโรคราสนิม แต่จากการทดลองเพาะเลี้ยงข้อลำต้น นิธิ (2540) พบว่ากาแฟพันธุ์ Caturra มีอัตราการเจริญเติบโตในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อข้อลำต้นค่อนข้างสูง กาแฟพันธุ์ Caturra นี้เป็นพันธุ์รุ่นแม่ของพันธุ์คาติมอร์แทบทุกสายพันธุ์ ซึ่งในทางการปรับปรุงพันธุ์นิยมนำมาผสมกลับเพื่อพัฒนาคุณภาพการดื่มและทรงต้น เมื่อพบว่ากาแฟพันธุ์นี้เจริญเติบโตได้ดีในอาหารสังเคราะห์ จึงสันนิษฐานว่าจะสามารถปรับปรุงลักษณะดังกล่าวนี้ไปพร้อมกันได้ด้วย ซึ่งจะทำให้การนำวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อไปใช้เพิ่มจำนวนลูกผสมชั่วที่ 1 ในกรณีเร่งด่วนมีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น การศึกษาครั้งต่อไปจึงจำเป็นต้องรวมพันธุ์ Caturra ไว้ด้วย

Sondahl and Sharp (1977a) ได้พบการพัฒนาเป็น Somatic embryos หลังเพาะเลี้ยงในอาหาร SS1 14 สัปดาห์ และถ่ายลงสู่อาหาร SS2 เป็นเวลา 5 สัปดาห์ การที่แคลลัสไม่มีการพัฒนาเกิดเป็นต้นกาแฟต้นใหม่ขึ้นในการทดลองนี้ทำให้จำเป็นต้องมีการศึกษาปริมาณและชนิดของ Cytokinin และ Auxin ที่เหมาะสมต่อไปการที่แคลลัสมีการเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลและสารสีน้ำตาลได้แพร่ลงสู่อาหารจนทำให้สังเกตได้ว่าเมื่อเห็นอาหารเป็นสีน้ำตาล สรุปได้ว่าเนื้อเยื่อแคลลัสได้หมดความมีชีวิตไปแล้ว ลักษณะเหล่านี้แสดงให้เห็นว่าแคลลัสเกิดการออกซิเดชันของสารประกอบฟีนอลขึ้น อันอาจเกิดมาจากสาเหตุหลายประการ เช่น ความไม่เหมาะสมของสภาพอุณหภูมิ ชนิดและปริมาณของแสงหรือเกิดการชอกช้ำระหว่างการถ่ายเท เนื้อเยื่อจากอาหารหนึ่งไปอีกอาหารหนึ่ง (Sondahl et al., 1983; Starisky, 1970) ซึ่งการควบคุมปัญหาต่างๆ เหล่านี้ต้องมีการศึกษาต่อไป

### กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับงบประมาณจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ผู้ดำเนินการวิจัยขอขอบพระคุณมา ณ โอกาสนี้

## เอกสารอ้างอิง

- นิธิ ไทยสันทัต. 2540. อิทธิพลของ BA ต่อการขยายพันธุ์ โดยการเพาะเลี้ยงข้อลำต้นของกาแฟอาราบิก้า (*Coffea arabica* L.). วารสารเกษตร 12(3): 270-278
- Custer, J.B.M., G. van Ee and L.C. Buijs. 1980. Clonal propagation on *Coffea arabica* L. by nodal culture. In: Proc. IX International Colloquium of Coffee. Assoc. Scient. Intern. Coffee, London.
- Herman, F.R.P. and G.J. Haas. 1975. Clonal propagation of *Coffea arabica* L. from callus culture. Hort. Sci. 10: 588-589.
- Kartha, K.K., L.A. Mroginski, K. Pahl and N.L. Lueng. 1981. Germplasm preservation of coffee (*Coffea arabica* L.) by *in vitro* culture of shoot apical meristems. Plant Science Letters 22: 301-307.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15: 473-497.
- อิทธิพลของพันธุ์และเส้นกลางใบต่อการสร้างแคลลัสในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อใบกาแฟอาราบิก้า (*Coffea arabica* L.)
- Op de Laak, J. 1992. Arabica Coffee Cultivation and Extension Manual for the Highlands of Northern Thailand. Thanaban Printer, Chiangmai. 128 p.
- Starisky, G. 1970. Embryoid formation in callus cultures of coffee. Acta Bot. Neerl. 19: 509-514.
- Sondahl, S. and W.R. Sharp. 1977a. High frequency induction of somatic embryos in cultured leaf explants of *Coffea arabica* L. Z. Pflanzenphysiol. Bd. 81 : 395-408.
- Sondahl, S. and W.R. Sharp. 1977b. Interactions of cytokinin and auxin growth and embryogenesis in cultured leaf explants of *Coffea*. In: International Conference on Regulation of Developmental Processes of Plants, Halle, p. 180.
- 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.