วารสารแก่นเกษตร THAIJO

Content List Available at ThaiJo

Khon Kaen Agriculture Journal

Journal Home Page : https://li01.tci-thaijo.org/index.php/agkasetkaj

การเพิ่มปริมาณโซมาติคเอ็มบริโอและการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ของกาแฟโรบัสต้าพันธุ์พื้นเมือง

Proliferation of somatic embryo and plantlet regeneration of indigenous robusta coffee

พรนภา แป้นไทย[1] สุรีรัตน์ เย็นช้อน[1]* และ สมปอง เตชะโต[1]

Pornnapa Panthai[1], Sureerat Yenchon[1]* and Sompong Te-chato[1]

[1] สาขาวิชานวัตกรรมการเกษตรและการจัดการ (พืชศาสตร์) คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ 90110
[1] Agricultural Innovation and Management Division, Faculty of Natural Resources, Prince of Songkla University, 90110

บทคัดย่อ: กาแฟโรบัสต้าจัดเป็นพืชเศรษฐกิจที่มีความสำคัญของไทย ปัจจุบันมีการนำเทคนิคเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมาช่วยในการเพิ่มจำนวนต้นพันธุ์กาแฟโรบัสต้าผ่านกระบวนการเอ็มบริโอเจนิซิส อย่างไรก็ตามกาแฟโรบัสต้าพันธุ์พื้นเมืองยังคงมีการเพิ่มปริมาณได้น้อย จึงได้ศึกษาการเพิ่มประสิทธิภาพในการเพิ่มปริมาณและการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ของโซมาติคเอ็มบริโอ โดยศึกษาจำนวนโซมาติคเริ่มต้นและชนิดของออกซิน โดยเพาะเลี้ยงโซมาติคเอ็มบริโอระยะรูปกลมจำนวนเริ่มต้น 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 จำนวนโซมาติคเอ็มบริโอเริ่มต้น 30 เอ็มบริโอที่เพาะเลี้ยงใน IBA ส่งเสริมการเพิ่มจำนวนโซมาติคเอ็มบริโอระยะตอร์ปิโดสูงสุด 20.67 เอ็มบริโอ จากนั้นนำโซมาติคเอ็มบริโอในระยะตอร์ปิโดไปเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งหรืออาหารเหลวที่เติม BA ความเข้มข้น 2 มก./ล. ร่วมกับการไม่เติมหรือเติม gibberellic acids (GA_3) ความเข้มข้น 0.50 มก./ล. พบว่า การเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวร่วมกับการเติม GA_3 ความเข้มข้น 0.50 มก./ล. ส่งเสริมการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่สูงสุด โดยให้อัตราการรอดชีวิต 100 เปอร์เซ็นต์ อัตราการงอก 90 เปอร์เซ็นต์ ความสูงต้น 0.59 ซม. และจำนวนใบเลี้ยง 1.95 ใบ หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์

คำสำคัญ: โซมาติคเอ็มบริโอ; 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 GA_3. The results showed that liquid medium with 0.50 mg/L GA_3 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

Received: date; September 7, 2021 Accepted: date; December 16, 2021 Published: date; April 1, 2022

บทนำ

กาแฟโรบัสต้า (*Coffea canephora* Pierre ex Froehner) จัดเป็นกาแฟที่ปลูกมากเป็นอันดับสองรองจากอะราบิก้า (กรมวิชาการเกษตร, 2557) นิยมปลูกมากทางภาคใต้ของไทย ซึ่งถือได้ว่าเป็นพืชเศรษฐกิจที่มีความสำคัญของภาคใต้เช่นเดียวกับยางพาราและปาล์มน้ำมัน โดยกาแฟโรบัสต้าสามารถนำมาแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ได้หลากหลายชนิด เช่น กาแฟคั่ว บด กาแฟสำเร็จรูปบรรจุกระป๋อง อย่างไรก็ตามเกษตรกรมีข้อจำกัดในด้านการขยายพันธุ์ เนื่องจากกาแฟโรบัสต้าเป็นพืชผสมข้าม หากใช้วิธีการขยายพันธุ์โดยการเพาะเมล็ด นอกจากจะใช้ระยะเวลานาน ยังส่งผลให้เกิดความแปรปรวนทางพันธุกรรม ซึ่งส่งผลต่อการควบคุมปริมาณและคุณภาพของผลผลิต ในปัจจุบันจึงมีการนำเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมาช่วยในการขยายพันธุ์และปรับปรุงพันธุ์พืชมากยิ่งขึ้น เนื่องจากวิธีการดังกล่าวสามารถผลิตต้นพันธุ์ที่ตรงตามพันธุ์จำนวนมากภายในระยะเวลาอันสั้น (ยุพิน, 2546) อย่างไรก็ตามข้อจำกัดอย่างหนึ่งของการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ผ่านกระบวนการเอ็มบริโอเจนิซิสคือ พันธุกรรม ซึ่งหมายรวมถึงพันธุ์พื้นเมืองของแต่ละท้องถิ่น อาจมีความแตกต่างทางพันธุกรรม ซึ่งส่งผลให้ต้องมีการศึกษาสูตรอาหารและวิธีการให้เหมาะสมกับแต่ละสายพันธุ์ ซึ่งจากการรายงานการศึกษาพบว่า การเพิ่มจำนวนต้นพันธุ์กาแฟโดยการชักนำโซมาติคเอ็มบริโอของกาแฟยังมีข้อจำกัดด้านการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ซึ่งต้องใช้ระยะเวลานาน มีรายงานการใช้ฮอร์โมนในกลุ่มจิบเบอเรลลิน เช่น GA_3 ซึ่งมีคุณสมบัติในการขยายขนาดของเซลล์และการยืดตัวของลำต้น มาใช้ในการเพิ่มการยืดยาวของลำต้น Ahmed et al. (2013) ศึกษาการชักนำการงอกของโซมาติคเอ็มบริโอของกาแฟอะราบิก้า 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. ดังนั้นการวิจัยครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการเพิ่มปริมาณโซมาติคเอ็มบริโอและการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่ของกาแฟโรบัสต้าในหลอดทดลอง เพื่อเป็นแนวทางในการขยายพันธุ์กาแฟโรบัสต้าพันธุ์พื้นเมืองให้เพียงพอกับความต้องการของเกษตรกร

วิธีการศึกษา

การทดลองที่ 1 ผลของจำนวนชิ้นส่วนเริ่มต้นและชนิดออกซินต่อการเพิ่มปริมาณโซมาติคเอ็มบริโอ

นำโซมาติคเอ็มบริโอในระยะรูปกลมจากเซลล์ซัสเพนชันของกาแฟโรบัสต้าพันธุ์ท่าแซะจากอาหารเหลวสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต จำนวน 10, 20 และ 30 โซมาติคเอ็มบริโอ 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 บันทึกจำนวนและลักษณะโซมาติคเอ็มบริโอ เปรียบเทียบกันในแต่ละจำนวนชิ้นส่วนโซมาติคเอ็มบริโอเริ่มต้นและชนิดของออกซิน โดยวางแผนการทดลองแบบ 3x2 factorials in completely randomized design (CRD) มี 2 ปัจจัย คือ จำนวนชิ้นส่วนโซมาติคเอ็มบริโอเริ่มต้นมี 3 ระดับ และชนิดของออกซินมี 2 ระดับ วิเคราะห์ความแปรปรวนโดยวิธี Analysis of variance (ANOVA) เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยใช้วิธี Duncan's multiple range test (DMRT) แต่ละสิ่งทดลองทำ 3 ซ้ำ ๆ ละ 3 ฟลาสก์ เปรียบเทียบกันในแต่ละจำนวนชิ้นส่วนโซมาติคเอ็มบริโอเริ่มต้นและชนิดของออกซิน คัดเลือกชนิดของออกซินที่ส่งเสริมการพัฒนาเป็นโซมาติคเอ็มบริโอในระยะตอร์ปิโดเพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

การทดลองที่ 2 ผลของ GA_3 และชนิดของอาหารต่อการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่

นำโซมาติคเอ็มบริโอของกาแฟโรบัสต้าพันธุ์ท่าแซะในระยะตอร์ปิโดที่ได้จากการทดลองที่ 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 GA_3 มี 2 ระดับ และชนิดของอาหารมี 2 ระดับ วิเคราะห์ความแปรปรวนโดยวิธี ANOVA และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยใช้วิธี DMRT แต่ละสิ่งทดลองทำ 3 ซ้ำ ๆ ละ 3 จานเพาะเลี้ยง

ผลการศึกษาและวิจารณ์

การทดลองที่ 1 ผลของจำนวนชิ้นส่วนโซมาติคเอ็มบริโอเริ่มต้นและชนิดของออกซินต่อการเพิ่มจำนวนโซมาติคเอ็มบริโอ

จำนวนชิ้นส่วนโซมาติคเอ็มบริโอเริ่มต้นที่เพิ่มมากขึ้น ส่งผลให้อัตราการเกิดโซมาติคเอ็มบริโอเฉลี่ยเพิ่มสูงขึ้น เนื่องจากโซมาติคเอ็มบริโอมีการพัฒนา และเพิ่มจำนวนอยู่ตลอดเวลา หลังจากเพาะเลี้ยงโซมาติคเอ็มบริโอเป็นเวลา 6 สัปดาห์พบว่า จำนวนชิ้นส่วนโซมาติคเอ็มบริโอเริ่มต้น 30 เอ็มบริโอ ให้จำนวนโซมาติคเอ็มบริโอระยะรูปกลมและระยะตอร์ปิโดเฉลี่ยสูงสุด 74.67 และ 10.33 เอ็มบริโอ ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($P<0.01$) กับจำนวนชิ้นส่วนโซมาติคเอ็มบริโอเริ่มต้น 10 เอ็มบริโอ ซึ่งให้จำนวนโซมาติคเอ็มบริโอระยะรูปกลมและระยะตอร์ปิโดเฉลี่ย 25.83 และ 1 เอ็มบริโอ สอดคล้องกับรายงานของ Carvalho และ Curtis (1999) ศึกษาขนาดของชิ้นส่วนเริ่มต้นต่อการเติบโตของเซลล์ *Hyoscyamus muticus* โดยรายงานว่า ขนาดชิ้นส่วนเริ่มต้นที่เพิ่มสูงขึ้น ส่งผลให้การเติบโตของเซลล์เพิ่มสูงขึ้นด้วย Wang et al. (2019) ศึกษาผลของชิ้นส่วนเริ่มต้นต่ออัตราการเพิ่มปริมาณของหน้าวัว โดยรายงานว่าชิ้นส่วนเริ่มต้น 1 กรัม ให้อัตราการเพิ่มปริมาณและน้ำหนักสดสูงสุด เช่นเดียวกับ Thanh et al. (2004) ศึกษาผลของขนาดชิ้นส่วนเริ่มต้นต่อการเติบโตและการสร้างสารซาโปนินของโสม โดยรายงานว่าชิ้นส่วนเริ่มต้นที่มีน้ำหนักสด 60 กรัมต่อลิตร มีความเหมาะสมต่อการสร้างสารซาโปนินได้ดีที่สุด ด้านชนิดของออกซินพบว่า 2,4-D ให้จำนวนโซมาติคเอ็มบริโอในระยะรูปกลมเฉลี่ยสูงสุด 62.22 เอ็มบริโอ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($P<0.01$) กับ IBA จากการทดลองพบว่า จำนวนโซมาติคเอ็มบริโอเริ่มต้น 30 เอ็มบริโอ เพาะเลี้ยงในอาหารที่เติม 2,4-D ให้จำนวนโซมาติคเอ็มบริโอระยะรูปกลม 87 เอ็มบริโอ (**Table 1**) สอดคล้องกับรายงานของ Elmeer และ Hennerty (2008) ที่ศึกษาผลของ 2,4-D ต่อการชักนำโซมาติคเอ็มบริโอของแตงกวา โดยรายงานว่าการใช้ 2,4-D เพียงอย่างเดียวสามารถชักนำให้เกิดโซมาติคเอ็มบริโอได้สูงสุด ด้านลักษณะของโซมาติคเอ็มบริโอที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่เติม 2,4-Dพบว่า โซมาติคเอ็มบริโอมีลักษณะสีขาวขุ่นเป็นผงเล็ก ๆ จำนวนมาก นอกจากนี้ยังพบลักษณะที่ผิดปกติที่แตกต่างจากโซมาติคเอ็มบริโอที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่เติม IBA คือ โซมาติคเอ็มบริโอเกิดการบวมเป็นสีขาวขุ่น มีโครงสร้างคล้าย ๆ ฟองน้ำรอบ ๆ โซมาติคเอ็มบริโอเดิม เนื่องจาก 2,4-D เป็นฮอร์โมนในกลุ่มออกซินที่มีความสามารถในการชักนำให้เกิดความแปรปรวนทางพันธุกรรม และความผิดปกติของโซมาติคเอ็มบริโอ ดังนั้นการเพาะเลี้ยงโซมาติคเอ็มบริโอใน 2,4-D เป็นระยะเวลานาน จึงส่งผลให้เกิดความผิดปกติต่อโซมาติคเอ็มบริโอได้

ด้านจำนวนโซมาติคเอ็มบริโอระยะตอร์ปิโดพบว่า จำนวนโซมาติคเอ็มบริโอที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่เติม IBA ให้จำนวนโซมาติคเอ็มบริโอระยะตอร์ปิโดเฉลี่ยสูงสุด 10.78 เอ็มบริโอ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($P<0.01$) กับ 2,4-D ซึ่งไม่เกิดการพัฒนาเป็นโซมาติคเอ็มบริโอในระยะตอร์ปิโด จากการทดลองพบว่า จำนวนโซมาติคเอ็มบริโอเริ่มต้น 30 เอ็มบริโอ เพาะเลี้ยงในอาหารที่เติม IBA ให้จำนวนโซมาติคเอ็มบริโอระยะตอร์ปิโด 20.67 เอ็มบริโอ (**Table 1**) สอดคล้องกับรายงานของ Santos et al. (2015) ที่ศึกษาการขยายพันธุ์ของกาแฟโรบัสต้าในหลอดทดลอง โดยรายงานว่าชิ้นส่วนใบกาแฟโรบัสต้าที่วางเลี้ยงบนอาหารสูตร Pre Culture Medium (PCM) ที่มีองค์ประกอบของ IBA ในหลอดทดลองให้จำนวนโซมาติคเอ็มบริโอ 14.50 เอ็มบริโอ ทั้งนี้เนื่องจาก IBA มีคุณสมบัติในการกระตุ้นการแบ่งเซลล์ของเนื้อเยื่อเจริญ จึงส่งผลให้พืชมีการเจริญเติบโตทางลำต้น การยืดตัวของเซลล์เพิ่มสูงขึ้น

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.

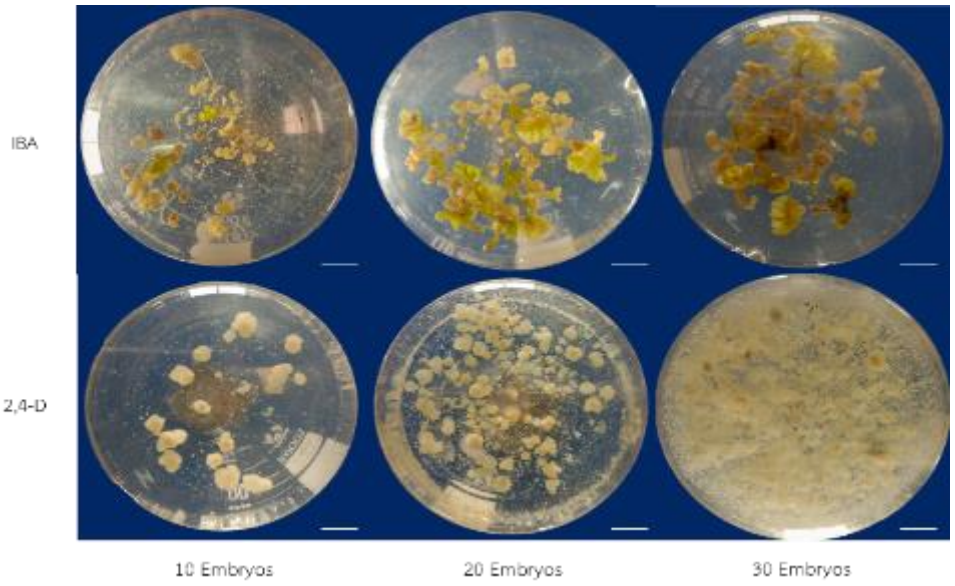

Figure 1 Characteristics of somatic embryo of robusta coffee cv. 'Tha Sae' cultured in liquid MS medium supplemented with 2 mg/L BA in combination with 0.50 mg/L IBA or 2,4-D for 6 weeks (bar= 0.50 cm).

การทดลองที่ 2 ผลของ GA_3 และชนิดของอาหารต่อการพัฒนาเป็นพืชต้นใหม่

จากการวางเลี้ยงโซมาติคเอ็มบริโอระยะตอร์ปิโดบนอาหารแข็งและอาหารเหลวสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 2 มก./ล. เพื่อเปรียบเทียบระหว่างความเข้มข้นของ GA_3 และชนิดของอาหาร หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์พบว่า การเติม GA_3 ความเข้มข้น 0.50 มก./ล. ส่งผลให้อัตราการรอดชีวิตและอัตราการงอกเฉลี่ยสูงสุด 90 และ 77.77 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับการไม่เติม GA_3 เมื่อพิจารณาชนิดของอาหารพบว่า การวางเลี้ยงโซมาติคเอ็มบริโอบนอาหารต่างชนิดกันส่งผลต่ออัตราการรอดชีวิตของโซมาติคเอ็มบริโอที่ต่างกัน โดยโซมาติคเอ็มบริโอที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวให้อัตราการรอดชีวิตเฉลี่ยสูงสุด 100 เปอร์เซ็นต์ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($P<0.01$) กับโซมาติคเอ็มบริโอที่วางเลี้ยงบนอาหารแข็ง ซึ่งให้อัตราการรอดชีวิตเฉลี่ย 76.10 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่โซมาติคเอ็มบริโอที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวให้อัตราการงอกเฉลี่ยสูงสุด 86.10 เปอร์เซ็นต์ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($P<0.01$) กับโซมาติคเอ็มบริโอที่วางเลี้ยงบนอาหารแข็ง ซึ่งให้อัตราการงอกเฉลี่ย 66.10 เปอร์เซ็นต์ ไม่มีปฏิสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ GA_3 และชนิดของอาหาร (**Table 2**) ในขณะที่ Chen et al. (2010) ศึกษาผลของ GA_3 ต่อการพัฒนาของโซมาติคเอ็มบริโอ *Schisandra chinensis* โดยรายงานว่าโซมาติคเอ็มบริโอที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร 1/3 MS ไม่เติม GA_3 ให้อัตราการรอดชีวิตสูงสุด 22.90 เปอร์เซ็นต์ ไม่แตกต่างกับโซมาติคเอ็มบริโอที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่เติม GA_3 ความเข้มข้น 0.50 มก./ล. ซึ่งให้อัตราการรอดชีวิต 19.10 เปอร์เซ็นต์

Table 2 Effects of GA_3 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.

GA_3 จัดเป็นฮอร์โมนพืชกลุ่มจิบเบอเรลลินที่มีคุณสมบัติในการขยายตัวของเซลล์และยืดยาวของลำต้น ส่งผลให้พืชมีความยาวปล้องเพิ่มสูงขึ้นและลำต้นยืดยาวขึ้น (สมบุญ, 2536) เมื่อพิจารณาความสูงต้นพบว่า การเติม GA_3 ส่งผลให้ความสูงต้นเพิ่มสูงขึ้น โดยโซมาติคเอ็มบริโอที่วางเลี้ยงในอาหารที่เติม GA_3 ให้ความสูงต้นเฉลี่ยสูงสุด 0.55 ซม. แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($P<0.01$) กับโซมาติคเอ็มบริโอที่วางเลี้ยงบนอาหารแข็งซึ่งให้ความสูงต้น 0.41 ซม. เมื่อพิจารณาชนิดของอาหารพบว่า โซมาติคเอ็มบริโอที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวให้ความสูงต้นเฉลี่ยสูงสุด 0.49 ซม. ไม่มีความแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับโซมาติคเอ็มบริโอที่วางเลี้ยงบนอาหารแข็ง ซึ่งให้ความสูงต้นเฉลี่ย 0.47 ซม. เมื่อพิจารณาปฏิสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ GA_3 และชนิดของอาหารพบว่า โซมาติคเอ็มบริโอที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวเติม GA_3 ความเข้มข้น 0.50 มก./ล. ให้ความสูงต้น 0.59 ซม. อย่างไรก็ตามเมื่อวิเคราะห์ผลทางสถิติ พบว่า ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (**Table 3**)

ด้านจำนวนใบเลี้ยงพบว่า GA_3 ส่งผลให้มีการพัฒนาเป็นใบเพิ่มสูงขึ้น โดยโซมาติคเอ็มบริโอที่วางเลี้ยงในอาหารที่เติม GA_3 ให้จำนวนใบเลี้ยงเฉลี่ยสูงสุด 1.75 ใบ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) กับโซมาติคเอ็มบริโอที่วางเลี้ยงในอาหารแข็ง ซึ่งให้จำนวนใบเลี้ยง 1.44 ใบ เมื่อพิจารณาชนิดของอาหาร พบว่า โซมาติคเอ็มบริโอที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวให้จำนวนใบเลี้ยงเฉลี่ยสูงสุด 1.83 ใบ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($P<0.01$) กับโซมาติคเอ็มบริโอที่วางเลี้ยงในอาหารแข็ง ซึ่งให้จำนวนใบเลี้ยงเฉลี่ย 1.37 ใบ เมื่อพิจารณาปฏิสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ GA_3 และชนิดของอาหารพบว่า โซมาติคเอ็มบริโอที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวที่เติม GA_3 ความเข้มข้น 0.50 มก./ล. ให้จำนวนใบเลี้ยง 1.95 ใบ อย่างไรก็ตามเมื่อวิเคราะห์ผลทางสถิติพบว่า ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (**Table 3**) สอดคล้องกับรายงานของ Habas et al. (2019) ศึกษาการเพิ่มจำนวนยอดในพิทูเนีย 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**) เช่นเดียวกับผลการทดลองในต้นหนอนตายหยากของนิตยา และสุภาพร (2559) ศึกษาผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตและชนิดของอาหารเหลวต่อการพัฒนาของต้นหนอนตายหยาก โดยรายงานว่า การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนข้อในอาหารเหลวสูตร ½ MS สามารถชักนำการสร้างยอดของต้นหนอนตายหยากได้สูงกว่าที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง MS ทั้งนี้เป็นผลมาจากชิ้นส่วนข้อที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวมีพื้นที่ผิวสัมผัสกับอาหารมากกว่าชิ้นส่วนข้อที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งจึงส่งเสริมต่อการเกิดยอดและความยาวยอดสูงกว่าอาหารแข็ง

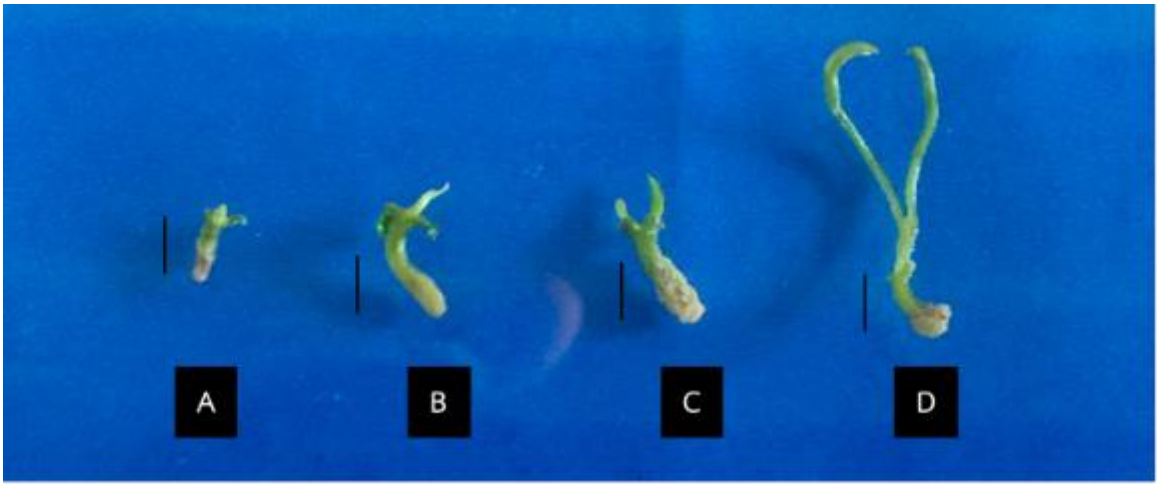

Figure 2 Characteristics of plantlet regeneration of Robusta coffee cv. 'Tha Sae' cultured on MS medium with 2 mg/L BA for 4 weeks (bar=0.50 cm).
A : Solid + 0.00 mg/L GA_3 B : Solid + 0.50 mg/L GA_3
C : Liquid + 0.00 mg/L GA_3 D : Liquid + 0.50 mg/L GA_3

สรุป

จำนวนโซมาติคเอ็มบริโอเริ่มต้นและชนิดของออกซินที่ต่างกัน ส่งผลต่อการเพิ่มจำนวนของโซมาติคเอ็มบริโอต่างกัน โดยจำนวนโซมาติคเอ็มบริโอเริ่มต้น 30 เอ็มบริโอ เลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 2 มก./ล. ร่วมกับ IBA ความเข้มข้น 0.50 มก./ล. เป็นเวลา 6 สัปดาห์ ส่งเสริมการพัฒนาของโซมาติคเอ็มบริโอในระยะต่าง ๆ ทั้งระยะรูปกลมและระยะตอร์ปิโดสูงกว่าอาหารที่เติม 2,4-D โซมาติคเอ็มบริโอมีลักษณะเป็นแท่งสีเหลือง เกิดการพัฒนาเป็นส่วนยอดและรากได้ดี โดยไม่พบความผิดปกติที่เกิดกับโซมาติคเอ็มบริโอ เมื่อย้ายโซมาติคเอ็มบริโอระยะตอร์ปิโดไปวางเลี้ยงบนอาหารแข็ง และในอาหารเหลวที่ไม่เติมหรือเติม GA_3 ความเข้มข้น 0.50 มก./ล. พบว่า โซมาติคเอ็มบริโอที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวที่เติม 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 สุขวรรณา และสุภาพร ภัสสร. 2559. ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโตและชนิดของอาหารสูตร MS ต่อการเจริญเติบโตและการพัฒนาของต้นหนอนตายหยาก. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. 24: 64-75.

ยุพิน กสินเกษมพงษ์. 2546. การขยายพันธุ์กาแฟ. ใน: เอกสารทางวิชาการการขยายพันธุ์กาแฟโรบัสต้าโดยวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ. (ยุพิน กสินเกษมพงษ์), 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 GA_3, 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 GA_3 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.