



ตัวทำละลายของสารสกัดจากสาหร่ายสไปรูลินา (*Spirulina maxima*) ที่เหมาะสมต่อ
การชักนำโซมาติกเอ็มบริโอของกาแฟอาราบิก้าสายพันธุ์คาติมอร์ CIFIC 7963
Optimization of solvents in *Spirulina maxima* extract on somatic embryo
induction of *Coffea arabica* cv. Catimor CIFIC 7963

นงนภัส หนูโส¹ และ นพมาศ โลกคำลือ^{1*}

¹สาขาวิชาพันธุศาสตร์ ภาควิชาวิทยาศาสตร์ คณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม 73140

*Corresponding Author, E-mail: faasnml@ku.ac.th

Received: 2 February 2019 | Revised: 14 June 2019 | Accepted: 22 October 2019

บทคัดย่อ

การวิจัยนี้ได้ศึกษาชนิดตัวทำละลายในสารสกัดจากสาหร่ายสไปรูลินา (*Spirulina maxima*) ที่เหมาะสมต่อการชักนำการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอ (somatic embryo, SE) ของกาแฟอาราบิก้าสายพันธุ์คาติมอร์ CIFIC 7963 โดยนำใบกาแฟมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร Murashige and Skoog (MS) ที่เติม 2,4-dichlorophenoxy acetic acid (2,4-D) ความเข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ และ N6-benzyladenine (BA) ความเข้มข้น 5 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับสารสกัดจากสาหร่ายสไปรูลินา (spirulina extract, SPE) ด้วยตัวทำละลายน้ำหรือเฮกเซนความเข้มข้น 3% (V/V) (SPE/น้ำ 3% หรือ SPE/เฮกเซน 3% ตามลำดับ) ในสภาวะที่ไม่มีแสงและมีอุณหภูมิเท่ากับ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ผลการวิจัยพบว่า ชิ้นส่วนใบกาแฟมีการพัฒนาเป็นแคลลัสที่มีลักษณะจับตัวกันแบบหลวม (friable callus) ได้ดีในระยะเวลา 1 เดือน เมื่อระยะเวลาผ่านไป 3 เดือน แคลลัสบางส่วนสามารถพัฒนาเป็นโซมาติกเอ็มบริโอได้บนอาหารสูตร $\frac{1}{2}$ MS ที่มีการเติม 2,4-D ความเข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ และ BA ความเข้มข้น 5 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ SPE/น้ำ 3% หรือ SPE/เฮกเซน 3% โดยมีประสิทธิภาพการชักนำ SE เท่ากับ 76.67% และ 73.33% มีจำนวนโซมาติกเอ็มบริโอต่อชิ้นใบเท่ากับ 4.35 ± 3.33 และ 4.00 ± 2.18 ตามลำดับ การทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากสาหร่ายสไปรูลินาด้วยตัวทำละลายน้ำมีอิทธิพลร่วมกับ 2,4-D และ BA ทำให้แคลลัสของกาแฟอาราบิก้าสายพันธุ์คาติมอร์ CIFIC 7963 พัฒนาเป็นโซมาติกเอ็มบริโอได้มากที่สุด

ABSTRACT

The optimization of solvents of spirulina extract (*Spirulina maxima*) for inducing somatic embryo of *Coffea arabica* cv. Catimor CIFIC 7963 was studied. The leaf explants were cultured on Murashige and Skoog (MS) medium supplemented with 1 μ M 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), 5 μ M N6-benzyladenine (BA) and the spirulina extract using distilled water (SPE/distilled water 3%) or hexane solvents at 3% (SPE/hexane 3%) (V/V) concentration. The cultures were maintained in dark condition at 25 ± 2 °C. The results showed that leaves developed into friable callus within one month. Some of the obtained calli developed into somatic embryos within 3 months. The percentages for somatic embryo induction were 76.67% (4.35 ± 3.33 somatic embryo per explant) and 73.33% (4.00 ± 2.18 somatic embryo per explant) which were obtained from the friable calli cultured on $\frac{1}{2}$ MS medium, 1

μM 2,4-D, and 5 μM BA supplemented with SPE/distilled water 3% and SPE/hexane 3%, respectively. This experiment revealed that the spirulina distilled water extract with 2,4-D and BA had influenced on *C. arabica* cv. Catimor C1FC 7963 somatic embryo development.

คำสำคัญ: กาแฟอาราบิก้า แคลลัส ชิ้นส่วนใบ สารสกัดจากสาหร่ายสไปรูลินา

Keywords: *Coffea arabica*, Callus, Leaf explant, Spirulina extract

บทนำ

กาแฟอาราบิก้า (*Coffea arabica* L.) อยู่ในวงศ์ Rubiaceae เป็นพืชเศรษฐกิจที่นิยมนำมาแปรรูปเป็นเครื่องดื่มอย่างแพร่หลายทั่วโลก เพราะมีความหอม รสชาติดี และมีปริมาณคาเฟอีนน้อย (Lashermes et al., 1999; Ibrahim et al., 2013) อีกทั้งมีการเจริญเติบโตได้ดีในเขตพื้นที่สูงเหนือระดับน้ำทะเลปานกลางประมาณ 700 เมตรขึ้นไป และมีอากาศค่อนข้างหนาว ดังนั้นกาแฟอาราบิก้าจึงเป็นหนึ่งในพืชเศรษฐกิจสำคัญที่ช่วยสร้างโอกาสทางอาชีพและรายได้ให้แก่เกษตรกรในภาคเหนือของประเทศไทย (มานพและคณะ, 2551) โดยทั่วไปเกษตรกรนิยมขยายพันธุ์ด้วยเมล็ดซึ่งเป็นการขยายพันธุ์แบบอาศัยเพศ แต่มีข้อเสียคือทำให้เกิดความแปรปรวนของลักษณะในลูกผสมสูง ในขณะที่การขยายพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศสามารถผลิตต้นกล้ากาแฟที่มีลักษณะพันธุ์กรรมคงเดิมเหมือนต้นแม่พันธุ์ได้ แต่จำนวนที่ผลิตมีไม่มากพอกับความต้องการของเกษตรกร อีกทั้งต้องใช้พื้นที่ในการเก็บต้นแม่พันธุ์ และต้องอาศัยแรงงานในการขยายพันธุ์จำนวนมาก ปัจจุบันมีการขยายพันธุ์พืชด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อผ่านกระบวนการออแกโนเจเนซิส (organogenesis) หรือเอ็มบริโอเจเนซิส (embryogenesis) สามารถเพิ่มปริมาณพันธุ์พืชหลายชนิดอย่างรวดเร็ว และได้ต้นที่ตรงตามพันธุ์ ดังนั้นจึงเป็นวิธีที่มีโอกาสในการเพิ่มปริมาณต้นกาแฟได้ (Ibrahim et al., 2013) ปัจจุบันกระบวนการเอ็มบริโอเจเนซิสนิยมเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชให้เกิดเป็นแคลลัส โดยบางส่วนของแคลลัสมีการพัฒนาลักษณะที่กำเนิดมาจากเซลล์ร่างกายเรียกว่า โซมาติกเอ็มบริโอ (somatic embryo, SE) ซึ่งแคลลัสที่สามารถพัฒนาเป็นเอ็มบริโอได้ผ่านการเปลี่ยนแปลงลักษณะนี้เรียกว่าเอ็มบริโอเจเนติกแคลลัส (embryogenic callus) (สมพร, 2552) จากงานวิจัยได้มีการศึกษาการชักนำ SE ของใบกาแฟนอาหารสูตร Murashige and Skoog (MS) ที่เติม 2,4 dichlorophenoxy acetic acid (2,4-D) ร่วมกับ thidiazuron ผลการทดลองพบว่าใบกาแฟอาราบิก้าที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม

2,4-D ความเข้มข้น 2.26 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ thidiazuron ความเข้มข้น 4.54 หรือ 9.08 ไมโครโมลาร์ สามารถชักนำ SE ได้โดยตรงจากชิ้นส่วนใบกาแฟ ส่วนอาหาร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 4.52 หรือ 9.04 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ thidiazuron ความเข้มข้น 9.08 ไมโครโมลาร์ นั้นมีการชักนำ SE แบบทางอ้อมโดยพัฒนามาจากแคลลัส (Ibrahim et al., 2013) เนื่องจากการนำชิ้นส่วนใบมาเพาะเลี้ยง สามารถชักนำ SE ได้จำนวนมาก ดังนั้นปัจจุบันการใช้ใบมาชักนำให้เกิด SE จึงมีความสำคัญ โดยมียางานวิจัยที่ได้ศึกษาสารสกัดจากสาหร่ายทะเลเพื่อชักนำการเกิด SE จากชิ้นส่วนใบของ *Lycopersicon esculentum* L. โดยใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตร่วมกับสารสกัดจากสาหร่ายทะเลเพื่อชักนำชิ้นส่วนใบพืชให้พัฒนาเป็นเอ็มบริโอเจเนติกแคลลัสที่มีลักษณะจับตัวกันแบบหลวม (friable embryogenic callus) และ SE ผลการทดลองพบว่าอาหารที่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตร่วมกับสารสกัดจาก *Caulerpa scalpelliformis* หรือ *Gracilaria corticata* ความเข้มข้น 0-25% ส่งผลต่อการพัฒนาของ SE เพิ่มขึ้นเป็นสองเท่าเทียบกับอาหารที่เติมเฉพาะสารควบคุมการเจริญเติบโต (Vinoth et al., 2014) แสดงว่าสารที่ได้จากสาหร่ายมีผลต่อการเกิดและการเจริญเติบโตของ SE

ปัจจุบันสาหร่ายสไปรูลินา (*Spirulina platensis*) หรือสาหร่ายเกลียวทอง เป็นสาหร่ายหลายเซลล์สีเขียวแกมน้ำเงิน (blue-green algae) ได้รับความสนใจในการนำมาเป็นอาหารเสริมเนื่องจากมีโปรตีน และวิตามิน รวมถึงสารฟีนอลิก (phenolics) ต่างๆ (Belay, 1997; Colla et al., 2007) นอกจากนี้ยังมีการผลิตสารกลุ่มฮอร์โมนพืช (phytohormones) เช่น indole-3-acetic acid (IAA), benzyl adenine (BA), gibberic acid (GA), abscisic acid (ABA), jasmonic acid (JA) และ methyl jasmonate (meJA) (Amin et al., 2009) โดยสาหร่ายสไปรูลินาเป็นจุลินทรีย์ในกลุ่มของไซยาโนแบคทีเรีย (cyanobacteria) ที่สามารถสังเคราะห์แสงได้ และผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่หลากหลาย ดังนั้นจึงมีงานวิจัยที่ใช้สารสกัด

จากไฮยาโนแบคทีเรียในงานด้านเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเพื่อช่วยให้มีการเจริญเติบโตดีขึ้น เช่น การชักนำการเกิดรากจากแคลลัสของข้าว และการเกิดแคลลัสของ *Sisymbrium irio* (Whitton, 1992; Manickavelu et al., 2006; Amin et al., 2009) โดย การนำสารสกัดจากไฮยาโนแบคทีเรีย (*Tolypothrix tenuis*) มา ศึกษาการชักนำแคลลัสในข้าว (*Oryza sativa* L. cv. Yeru PA) โดยเติมสารสกัดจากไฮยาโนแบคทีเรียลงในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ พบว่าแคลลัสมีการพัฒนาเป็นจุดกำเนิดของรากเป็นจำนวนมาก โดยผ่านกระบวนการออกแอกเจนซิส (Storni de Cano et al., 2003) ซึ่งแคลลัสที่ได้รับสารสกัดจากไฮยาโนแบคทีเรียมีการพัฒนาที่เกี่ยวข้องกับการสร้างรากซึ่งเป็นลักษณะเด่นของสารถุ่มออกซิน ดังนั้นสามารถนำสารสกัดจากสิ่งมีชีวิตที่อยู่ในกลุ่มของไฮยาโนแบคทีเรียมาประยุกต์เพื่อกระตุ้นให้แคลลัสพืชพัฒนาต่อไปได้ งานวิจัยนี้จึงนำสารสกัดสาหร่ายจาก *S. maxima* ด้วยตัวทำละลายน้ำและเฮกเซน มาประยุกต์ใช้ทางด้านการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกาแฟอาราบิก้า เพื่อศึกษาอิทธิพลของสารสกัดจากสาหร่ายด้วยตัวทำละลายดังกล่าวต่อการชักนำ SE จากแคลลัสของกาแฟอาราบิก้าสายพันธุ์คาติมอร์ CIFIC 7963

วิธีการดำเนินการวิจัย

การเตรียมอาหารสังเคราะห์สูตร MS เตรียมอาหารสังเคราะห์สูตร MS (Murashige and Skoog, 1962) ปริมาตร 1 ลิตร เติมน้ำ 10 g/L และน้ำตาลซูโครส 30 g/L ปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ให้อยู่ในช่วง 5.6 ± 0.01 ด้วยสารละลาย sodium hydroxide (NaOH) ความเข้มข้น 1 N หรือสารละลาย hydrochloric acid (HCl) ความเข้มข้น 1 N จากนั้นจึงฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

การสกัดสารจากสาหร่ายสไปรูลินา วิธีการสกัดสารจากสาหร่ายด้วยตัวทำละลายเฮกเซนและน้ำดัดแปลงมาจาก Sornchai et al. (2014) โดยนำสาหร่ายสไปรูลินา (*S. maxima*)แห้ง 3.5 กรัม ละลายในสารละลายเฮกเซน ปริมาตร 150 มิลลิลิตร ทำให้เซลล์แตกด้วยเครื่อง homogenizer ที่ 2000 rpm นาน 30 นาที นำไปแช่ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง และบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องนานข้ามคืน กรองสารสกัดจากสาหร่ายด้วยกระดาษกรอง whatman เบอร์ 1 ตามด้วยกระดาษกรองเมมเบรน ส่วนการสกัดสารจากสาหร่ายด้วยตัวทำละลายน้ำ

ใช้วิธีเหมือนกับการสกัดด้วยเฮกเซน แต่นำสารสกัดจากสาหร่ายไปนึ่งฆ่าเชื้อโดยใช้หม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที แขนการผ่านด้วยกระดาษกรองเมมเบรน จากนั้นนำสารสกัดจากสาหร่ายดังกล่าวมาเตรียมให้มีความเข้มข้น 3% (V/V)

การเตรียมอาหารสูตร callus induction medium (CIM) อาหารสูตร MS1 คืออาหารสูตร MS ที่มีการเติมเฮกเซนความเข้มข้น 3% (V/V) อาหารสูตร MS2 คืออาหารสูตร MS ที่เติมสารสกัดจากสาหร่ายด้วยตัวทำละลายน้ำความเข้มข้น 3% (SPE/น้ำ 3%) อาหารสูตร MS3 คืออาหารสูตร MS ที่เติมสารสกัดจากสาหร่ายด้วยตัวทำละลายเฮกเซนความเข้มข้น 3% (SPE/เฮกเซน 3%) อาหารสูตร MS4 คืออาหารสูตร MS ที่มีการเติม 2,4 dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) ความเข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ และ N6-benzylaminopurine (BA) ความเข้มข้น 5 ไมโครโมลาร์ อาหารสูตร MS5 คืออาหารสูตร MS ที่มีการเติม 2,4-D ความเข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ และ BA ความเข้มข้น 5 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับสารสกัดจากสาหร่ายด้วยตัวทำละลายน้ำความเข้มข้น 3% (SPE/น้ำ 3%) อาหารสูตร MS6 คืออาหารสูตร MS ที่มีการเติม 2,4-D ความเข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ และ BA ความเข้มข้น 5 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับสารสกัดจากสาหร่ายด้วยตัวทำละลายเฮกเซนความเข้มข้น 3% (SPE/เฮกเซน 3%)

การฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวของใบกาแฟอาราบิก้าสายพันธุ์คาติมอร์ CIFIC 7963 อายุ 2 ปี นำโคนใบกาแฟข้อที่ 2 (นับจากปลายยอดลงมา) มาล้างด้วยน้ำสะอาด จากนั้นฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลาย NaOCl ความเข้มข้น 15% (V/V) ที่มี tween 80 ประมาณ 1-2 หยด นาน 10 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้งๆ ละ 5 นาที

การวางชิ้นส่วนใบกาแฟอาราบิก้าสายพันธุ์คาติมอร์ CIFIC 7963 ลงบนอาหาร นำใบที่ผ่านการฆ่าเชื้อที่ผิวมาตัดให้มีขนาด 1x1 ตารางเซนติเมตร โดยไม่ให้มีส่วนของเส้นกลางใบและขอบใบ มาเลี้ยงบนอาหาร CIM สูตรต่างๆ โดยให้ส่วนผิวใบด้านล่าง (lower epidermis) สัมผัสกับอาหาร โดยวางชิ้นส่วนใบกาแฟจำนวน 5 ชิ้นใบ ลงบนอาหาร สูตรละ 6 ชิ้น นำไปเพาะเลี้ยงในสภาวะไม่มีแสง ที่อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส

การย้ายแคลลัสลงบนอาหารสูตร embryogenic callus induction medium (ECIM) ย้ายแคลลัสทั้งชนิด compact callus และ friable callus อายุ 1 เดือน ลงบน

อาหาร ECIM คือ half strength ของ MS ($\frac{1}{2}$ MS) ที่เติม thymine ความเข้มข้น 20 mg/L, glycine ความเข้มข้น 20 mg/L niacin ความเข้มข้น 1 mg/L mysinositol ความเข้มข้น 200 mg/L L-cysteine ความเข้มข้น 40 mg/L casein hydrolysate ความเข้มข้น 200 mg/L malt extract ความเข้มข้น 800 mg/L adenine sulfate ความเข้มข้น 60 mg/L sucrose ความเข้มข้น 30 mg/L และวันความเข้มข้น 8 mg/L จากนั้นเติม 2,4-D, BA และสารสกัดจากสาหร่าย ด้วยความเข้มข้นเท่าเดิมเหมือนอาหาร CIM

บันทึกผลการทดลอง บันทึกจำนวนชิ้นใบที่พัฒนาเป็น แคลลัส และลักษณะของแคลลัสที่มีอายุ 1 เดือน หลังจากนั้นตัด และแยก SE ที่มีอายุ 3 เดือนออกจากชิ้นใบ ผ่านไคกอลิ่ง จุลทรรศน์แบบสเตอริโอกำลังขยาย 3.5X เพื่อบันทึกจำนวน SE รวมทั้งบันทึกจำนวนรากที่สร้างมาจากแคลลัส

การวิเคราะห์ข้อมูล นำข้อมูลจำนวนของ SE และราก มาวิเคราะห์ความแตกต่างของชุดการทดลองด้วยค่าทางสถิติจาก โปรแกรม SPSS ซึ่งใช้ one-way ANOVA ที่ระดับความเชื่อมั่นที่ $P < 0.05$ (Frund and Wilson, 2003)

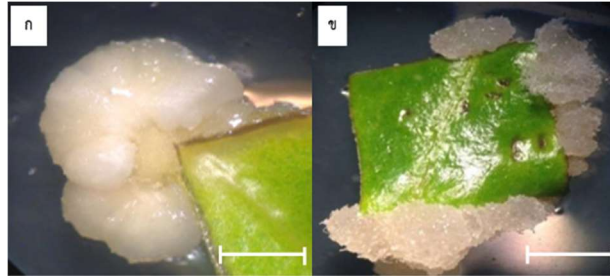
ผลการวิจัย

การศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำแคลลัส สูตรอาหารที่สามารถชักนำแคลลัสได้ดีที่สุด คือ อาหารสูตร MS4, MS5 และ MS6 โดยมีประสิทธิภาพการชักนำแคลลัสสูงสุด 100% (ตารางที่ 1) พบลักษณะและจำนวนของแคลลัส มีความแตกต่างกันใน 3 สูตรอาหาร โดยอาหารสูตร MS5 และ MS6 มี

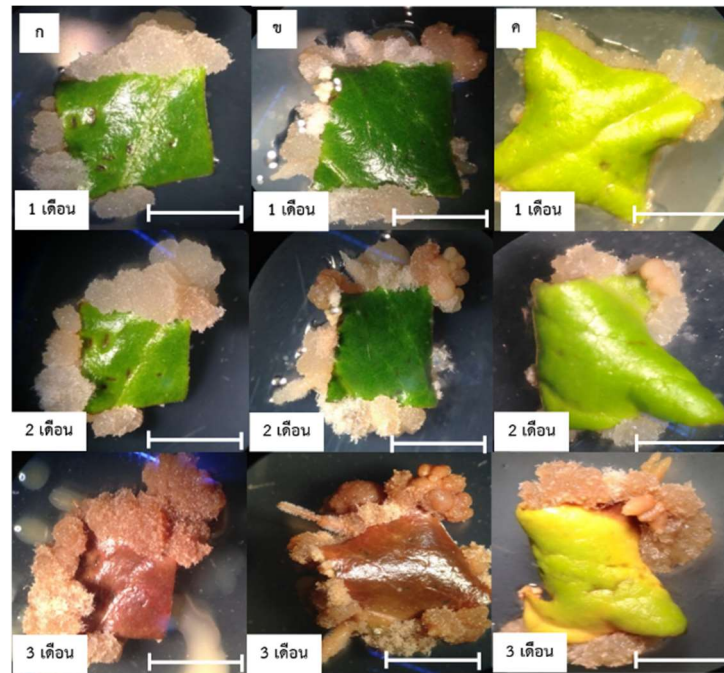
friable callus สีเหลือง มากกว่า compact callus สีขาว อย่างชัดเจน ซึ่งจำนวนและชนิดของแคลลัส จากอาหารสูตร MS4 MS5 และ MS6 พบว่ามี 127, 158 และ 53 friable calli ตามลำดับ และ 31, 35 และ 10 compact calli ตามลำดับ (ตารางที่ 1) คิดเป็นอัตราส่วน friable callus:compact callus เท่ากับ 4.1:1, 4.5:1 และ 5.3:1 ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบตัว ทำละลายของสารสกัดจากสาหร่าย พบจำนวนของ friable callus มีสูง เมื่อเติมสารสกัดจากสาหร่ายด้วยตัวทำละลายน้ำ ในขณะที่การเติมสารสกัดจากสาหร่ายด้วยตัวทำละลายเอทเธน ส่งผลให้จำนวนของ friable callus ลดลง (ตารางที่ 1) เนื่องจาก สารละลายเอทเธนมีผลต่อเซลล์พืช เพราะชั้นส่วนใบบนสูตร อาหารที่มีการเติมเอทเธนความเข้มข้น 3% (MS1) ตายภายใน 2 เดือน โดยการเกิดแคลลัสที่ทดสอบอาหาร 6 สูตร ได้แก่อาหาร สูตร MS1-MS6 นั้นพบชิ้นส่วนใบมีการพัฒนาเป็นแคลลัสได้ใน อาหารสูตร MS4, MS5 และ MS6 เท่ากับ 100% หลังจากการ เพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 1 เดือน ซึ่งแคลลัสเกิดจากบริเวณรอย แผลหรือผิวใบ มีลักษณะเป็นสีเหลืองและสีขาว สามารถแบ่งเป็น 2 ลักษณะ คือ แคลลัสที่มีลักษณะจับตัวกันแน่น (compact callus) และแคลลัสที่มีลักษณะจับตัวกันหลวม (friable callus) (รูปที่ 1) ในขณะที่อาหารสูตร MS1, MS2 และ MS3 พบชิ้นส่วน ใบไม่สามารถพัฒนาเป็นแคลลัสได้ และตายภายในระยะเวลา 2 เดือน นอกจากนี้พบลักษณะสีของแคลลัสมีการเปลี่ยนแปลงจาก เดือนที่ 1 ซึ่งแคลลัสมีลักษณะเป็นสีขาวเหลือง เมื่อเข้าสู่เดือนที่ 3 แคลลัสมีการเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเหลือง (รูปที่ 2)

ตารางที่ 1 ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D และ BA ร่วมกับสารสกัดจากสาหร่ายความเข้มข้นระดับต่างๆ ต่อการชักนำการ เกิดแคลลัสของใบกาแฟอาราบิก้าสายพันธุ์คาติมอร์ CIFIC 7963 ระยะเวลา 1 เดือน

สูตรอาหาร	n = 30 ชิ้นใบ		
	% การเกิดแคลลัส	จำนวนแคลลัส	
		compact callus	friable callus
MS1	0	-	-
MS2	0	-	-
MS3	0	-	-
MS4	100	31	127
MS5	100	35	158
MS6	100	10	53



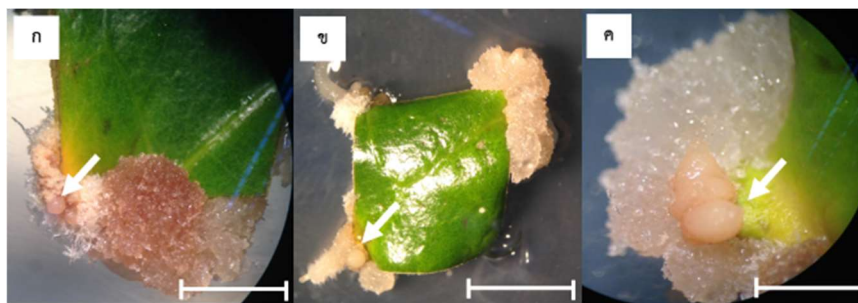
รูปที่ 1 ลักษณะของแคลลัสอายุ 1 เดือน (ก) แคลลัสที่มีลักษณะจับตัวกันแน่น (compact callus) (ข) แคลลัสที่มีลักษณะจับตัวกันหลวม (friable callus) (สเกลบาร์ = 0.1 มิลลิเมตร)



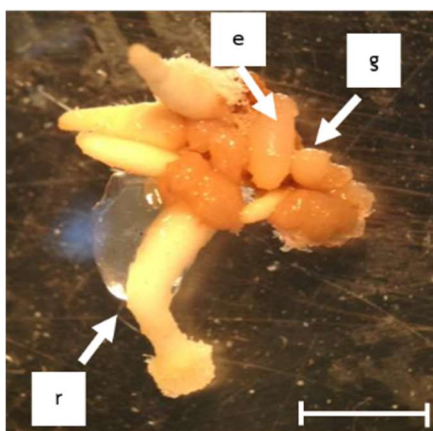
รูปที่ 2 การเปลี่ยนแปลงสีของแคลลัสจากเดือนที่ 1 ถึงเดือนที่ 3 (ก) อาหารสูตร MS4 และ 1/2MS4 (ข) อาหารสูตร MS5 และ 1/2MS5 (ค) อาหารสูตร MS6 และ 1/2MS6 (สเกลบาร์ = 0.1 มิลลิเมตร)

การศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำ โยมาติกเอ็มบริโอ (SE) นำแคลลัสทั้งชนิด compact callus และ friable callus อายุ 1 เดือน มาเพาะเลี้ยงบนอาหาร ECIM โดยเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 3 เดือน พบแคลลัสที่เพาะเลี้ยงบนทุกสูตรอาหาร มีการเจริญและพัฒนาเป็น SE (รูปที่ 3) โดย SE ที่มีรูปร่างทรงกลมก้อนเล็ก คือระยะ globular embryo และ SE ที่มีรูปร่างยาวรี คือระยะ elongate embryo (รูปที่ 4) ซึ่งสูตรอาหารที่สามารถชักนำ SE ได้ดี คืออาหารสูตร 1/2MS5 และ 1/2MS6 มีประสิทธิภาพการชักนำ SE เท่ากับ 76.67% และ

73.33% ตามลำดับ ในขณะที่อาหารสูตร 1/2MS4 มีการชักนำ SE เพียง 50% เท่านั้น (ตารางที่ 2) เมื่อเปรียบเทียบจำนวน SE พบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของสูตรอาหาร โดยอาหารสูตร 1/2MS4, 1/2MS5 และ 1/2MS6 มีปริมาณ SE เท่ากับ 41 ± 2.12 (2.73 ± 2.12 /ชิ้นใบ) 100 ± 3.33 (4.35 ± 3.33 /ชิ้นใบ) และ 88 ± 2.18 (4.00 ± 2.18 /ชิ้นใบ) ตามลำดับ และอาหารสูตร 1/2MS6 มีจำนวน SE ระยะ elongate embryo สูงขึ้นกว่าระยะ globular embryo (ตารางที่ 3)



รูปที่ 3 ผลของ 2,4-D ความเข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ และ BA ความเข้มข้น 5 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับสารสกัดจากสาหร่าย ต่อการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอ (SE) อายุ 3 เดือน (ลูกศร) (ก) อาหารสูตร 1/2MS4 (ข) อาหารสูตร 1/2MS5 (ค) อาหารสูตร 1/2MS6 (สเกลบาร์ = 0.1 มิลลิเมตร)



รูปที่ 4 ลักษณะของโซมาติกเอ็มบริโอ (SE) (ลูกศร) (g) SE ระยะ globular embryo (e) SE ระยะ elongate embryo (r) ราก (สเกลบาร์ = 0.1 มิลลิเมตร)

ตารางที่ 2 ผลของสารควบคุมการเจริญเติบโต 2,4-D และ BA ร่วมกับสารสกัดจากสาหร่ายความเข้มข้นระดับต่างๆ ต่อการชักนำการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอ (SE) จากแคลลัสของใบข้อที่ 2 ในกาแฟอาราบิก้าสายพันธุ์คาติมอร์ C1FC 7963 ระยะเวลา 3 เดือน

สูตรอาหาร	จำนวนชิ้นใบที่เกิดแคลลัส (อายุ 1 เดือน)	จำนวนชิ้นใบที่เกิด SE (อายุ 3 เดือน)	% SE induction
MS1	0	0	0
MS2	0	0	0
MS3	0	0	0
1/2MS4	30	15	50 ^c
1/2MS5	30	23	76.67 ^a
1/2MS6	30	22	73.33 ^b

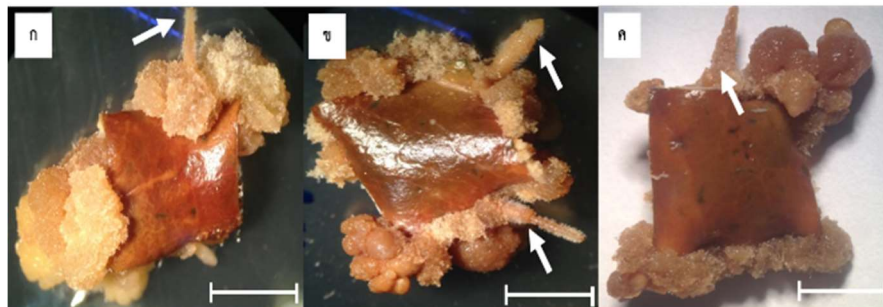
a, b, c ค่าเปรียบเทียบในแนวนอน โดยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT) ระดับความเชื่อมั่นที่ $P < 0.05$

ตารางที่ 3 โชมaticเอ็มบริโอ (SE) ระยะ globular embryo และ elongate embryo อายุ 3 เดือน บนสูตรอาหารที่มีการเติม 2,4-D ความเข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ และ BA ความเข้มข้น 5 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับสารสกัดจากสาหร่าย

สูตรอาหาร	จำนวน SE		จำนวนรวม SE	จำนวน SE/ชิ้นใบ	% SE induction
	globular embryos	elongate embryos			
½MS4	20±1.27 ^b	21±1.09 ^b	41±2.12 ^b	2.73±2.12 ^b	50.00 ^c
½MS5	50±2.41 ^{ab}	50±1.65 ^a	100±3.33 ^a	4.35±3.33 ^a	76.67 ^a
½MS6	19±0.90 ^b	69±2.07 ^a	88±2.18 ^{ab}	4.00±2.18 ^a	73.33 ^b

a, b, c, ab ค่าเปรียบเทียบในแนวดิ่ง โดยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT) ระดับความเชื่อมั่นที่ P<0.05

การเกิดราก แคลลัสอายุ 3 เดือน บนอาหาร ECIM เท่ากับ 17±1.07 ซึ่งไม่มีความแตกต่างกับอาหารสูตร ½MS4 บางส่วนมีการพัฒนาเป็นราก (รูปที่ 5) จากผลการทดลอง พบ และ ½MS5 ที่มีประสิทธิภาพการชักนำรากเท่ากับ 7±0.63 และ อาหารสูตร ½MS6 มีประสิทธิภาพในการชักนำให้เกิดรากสูงสุด 11±0.72 ตามลำดับ (ตารางที่ 4)



รูปที่ 5 การเกิดราก (ลูกศร) จากแคลลัสอายุ 3 เดือน (ก) อาหารสูตร ½MS4 (ข) อาหารสูตร ½MS5 (ค) อาหารสูตร ½MS6 (สเกล บาร์ = 0.1 มิลลิเมตร)

ตารางที่ 4 รากอายุ 3 เดือน ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร ½MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ และ BA ความเข้มข้น 5 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับสารสกัดจากสาหร่าย

สูตรอาหาร	จำนวนราก	จำนวนราก/ชิ้นใบ
½MS4	7±0.63 ^a	1.40±0.63 ^a
½MS5	11±0.72 ^a	1.38±0.72 ^a
½MS6	17±1.07 ^a	2.13±1.07 ^a

^a ค่าเปรียบเทียบในแนวดิ่ง โดยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT) ระดับความเชื่อมั่นที่ P<0.05

วิจารณ์ผลการวิจัย

การศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำแคลลัส
จากผลการทดลองพบว่าอาหารสูตร MS4, MS5 และ MS6 มีประสิทธิภาพการชักนำแคลลัสได้ดีที่สุด (100%) ซึ่งมีความสอดคล้องกับการรายงานของ Ahmed et al. (2013) ที่เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อใบกาแฟอาราบิก้า บนอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 1.0 mg/L ร่วมกับ BAP ความเข้มข้น 2.0 mg/L โดยสามารถชักนำให้เกิดแคลลัส บริเวณรอยตัด ด้วยอัตรา 96% ดังนั้นชิ้นส่วน ใบพืชจะพัฒนาเป็นแคลลัสได้ จำเป็นต้องใช้

สัดส่วนของออกซินต่อไซโตไคนินที่เหมาะสม นอกจากนั้นการเติม สารสกัดจากธรรมชาติยังส่งผลต่อการพัฒนาการของเซลล์พืช โดยมี รายงานเกี่ยวกับอิทธิพลของสารสกัดสาหร่ายจาก *S. maxima* ที่มีตัวทำละลาย ได้แก่ น้ำ เมทานอล และเฮกเซน ต่อการงอกของ เมล็ดและการเจริญเติบโตของต้นกล้าในเมล็ดถั่วเขียว (Sornchai et al., 2014) ดังนั้นการวิจัยครั้งนี้ จึงได้เปรียบเทียบตัวทำละลายระหว่างน้ำ และเฮกเซนในสารสกัดสาหร่ายจาก *S. maxima* ว่ามีผลต่อการพัฒนาของแคลลัสในกาแฟอาราบิก้า สายพันธุ์คาติมอร์ CIFIC 7963 หรือไม่ โดยพบว่าสารสกัดจาก

สาหร่ายด้วยตัวทำละลายทั้ง 2 ชนิด สามารถกระตุ้นเซลล์ให้พัฒนาเป็นแคลลัสได้ เมื่อใช้ร่วมกับ 2,4-D ความเข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ และ BA ความเข้มข้น 5 ไมโครโมลาร์ แต่มีจำนวนที่แตกต่างกัน (ตารางที่ 1) โดยเฉพาะสารสกัดจากสาหร่ายด้วยตัวทำละลายน้ำส่งผลร่วมกับ 2,4-D และ BA และชักนำให้เกิดแคลลัสมากกว่าอาหารสูตร MS4 ที่เติมเฉพาะ 2,4-D กับ BA ซึ่งตรงข้ามกับงานวิจัยของ Sornchai et al. (2014) ที่รายงานว่าสาหร่ายที่สกัดด้วยน้ำและเมทานอล มีการยับยั้งการงอกของเมล็ดถั่วเขียวได้ดีกว่าเฮกเซน เนื่องจากสารสกัดจากสาหร่ายมีสารประกอบอัลคาลอยด์ (alkaloids) ที่มีขั้วซึ่งมีผลต่อการงอกของเมล็ด ดังนั้นการงอกของเมล็ดถูกยับยั้งเท่ากับว่าพืชไม่สามารถแบ่งเซลล์เพื่อการเจริญเติบโตได้ แต่งานวิจัยของเราได้นำสารสกัดจากสาหร่ายดังกล่าวไปนึ่งด้วยความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที ซึ่งส่งผลต่อสาร อัลคาลอยด์ที่เกี่ยวข้องกับการยับยั้งการแบ่งเซลล์ โดยถูกสลายโมเลกุลให้มีขนาดเล็กจนสูญเสียสภาพการทำงาน ซึ่งสารอัลคาลอยด์แต่ละชนิดมีคุณสมบัติการทนความร้อนที่แตกต่างกัน ดังรายงานของ Mokadi et al. (2013) ที่ศึกษาอุณหภูมิในการสกัดสารอัลคาลอยด์จากพืช Goldenseal (*Hydrastis canadensis*) ได้แก่ hydrastine และ berberine พบว่าอุณหภูมิที่สูงมาก (160 และ 180 องศาเซลเซียส) ความดัน 50 บาร์ นาน 15 นาที ส่งผลให้สาร hydrastine เกิดการสลายตัวเป็นโมเลกุลเล็ก ส่วนสาหร่ายที่สกัดด้วยเฮกเซนไม่มีผลในการยับยั้งการงอกของเมล็ดถั่วเขียว เนื่องจากตัวทำละลายเฮกเซนสกัดสารประเภทไม่มีขั้วที่ไม่ส่งผลต่อการงอกของเมล็ดพืช (Sornchai et al., 2014) ดังนั้นสารสกัดจากสาหร่ายด้วยตัวทำละลายเฮกเซนยังคงส่งผลร่วมกับ 2,4-D กับ BA (MS6) ในการพัฒนาขึ้นส่วนใบกาแฟอราบิก้าให้เป็นแคลลัส แต่มีจำนวนแคลลัสน้อยกว่าอาหารสูตร MS4 และ MS5 (ตารางที่ 1) เนื่องจากเฮกเซนเป็นสารที่ไม่มีขั้วจะสกัดโปรตีน ฮอร์โมนพืช และวิตามินต่างๆ ที่ไม่มีขั้วซึ่งอาจมีชนิดและปริมาณที่แตกต่างจากการสกัดด้วยน้ำ แต่มีประโยชน์ต่อการเจริญเติบโตของเซลล์พืช ผลของสารสกัดจากสาหร่ายนอกจากช่วยชักนำการเกิดแคลลัสแล้วยังส่งผลต่อชนิดของแคลลัส โดยพบมีการชักนำ friable callus ในสัดส่วนที่มากกว่า compact callus เนื่องจากสารสกัดจากสาหร่ายมีองค์ประกอบของวิตามินซึ่งเป็น โคแฟกเตอร์ (cofactor) ของเอนไซม์ต่างๆ ที่จำเป็นสำหรับกระบวนการ

เมทาบอลิซึมภายในเซลล์พืช ดังนั้นวิตามินต่างๆ ที่พบในสารสกัดจากสาหร่าย (Amin et al., 2009) ส่งผลให้ไซโตพลาสซึมของเซลล์พืชมีความหนืดเข้มข้นขึ้น และผนังเซลล์หนา จึงทำให้เซลล์พัฒนาเป็นเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสซึ่งมีลักษณะเป็น friable callus ที่มีรูปทรงกลม (สมพร, 2552) ดังนั้นเมื่อมี friable callus สูง โอกาสจะได้ SE ก็สูงตาม

การศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำไซโตแมติกเอ็มบริโอ (SE) จากการทดลองพบประสิทธิภาพการชักนำ SE สูงสุด 76.67% เกิดบนอาหารสูตร ½MS5 โดยมีการชักนำ SE/ชิ้นใบ เท่ากับ 4.35 ± 3.33 ซึ่งอาหารที่มีการเติมสารสกัดจากสาหร่าย สามารถชักนำ SE ได้มากกว่าสูตรที่เติมเฉพาะ 2,4-D ความเข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ และ BA ความเข้มข้น 5 ไมโครโมลาร์ (½MS4) เนื่องจากสารสกัดจากสาหร่าย *S. maxima* มีชนิดของฮอร์โมนพืชและปริมาณที่ใกล้เคียงกับสารสกัดสาหร่ายจาก *S. platensis* ที่มี IAA ความเข้มข้น 53.6 µg/g, GA ความเข้มข้น 8 µg/g, BA ความเข้มข้น 6 µg/g, ABA ความเข้มข้น 0.1 µg/g, JA ความเข้มข้น 0.00126 µg/g และ MeJA ความเข้มข้น 0.0002 µg/g (Amin et al., 2009) จึงส่งผลให้แคลลัสมีลักษณะเป็นเอ็มบริโอเจนิคแคลลัสสูง และอาหารที่มีการเติมสารสกัดจากสาหร่ายมีปริมาณ IAA ที่มีบทบาทในการส่งเสริมกระตุ้นเอ็มบริโอเจนิคเซลล์ (embryogenic cell) สูง (Cooke et al., 1993) จากการย้ายแคลลัสอายุ 1 เดือน สู่อาหาร ECIM ที่มีการเติมสารสกัดจากสาหร่าย พบแคลลัสมีการพัฒนาเป็น SE ได้ดี เพราะ ABA ที่ได้จากสารสกัดสาหร่ายกระตุ้นการเกิดไซโตแมติกเอ็มบริโอเจเนซิส (somatic embryogenesis) ในพืชไม้เนื้อแข็ง (woody plant) (สมพร, 2552) เมื่อพิจารณาการเจริญเติบโตของ SE ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงแคลลัสอายุ 3 เดือน พบ SE 2 ระยะ คือ ระยะ globular embryo และ elongate embryo โดยอาหารสูตร ½MS6 ส่งผลให้จำนวน SE ระยะ elongate embryo สูงขึ้น (ตารางที่ 3) ดังนั้นจึงมีโอกาสดังกล่าวจะได้เอ็มบริโอระยะมีใบเลี้ยง (cotyledonary embryo) ในระยะเวลาสั้น เมื่อเปรียบเทียบกับผลการทดลองครั้งนี้งานวิจัยของ Ibrahim et al. (2013) พบการชักนำ SE ของกาแฟอราบิก้าจากแคลลัส ระยะ globular embryo หลังจากเพาะเลี้ยงบนอาหาร regeneration medium เป็นระยะเวลา 4 เดือน และระยะ torpedo embryo ที่เพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลานานถึง 8 เดือน ซึ่งจากผลการทดลองเลี้ยงแคลลัสของกาแฟอราบิก้าสายพันธุ์คาติมอร์ CIFIC 7963

ในอาหารที่เติมสารสกัดจากสาหร่ายในงานวิจัยครั้งนี้มีแนวโน้มในการกระตุ้นการเจริญของเอ็มบริโอ (embryo development) ภายในระยะเวลา 3 เดือน ได้ดีกว่างานวิจัยที่ผ่านมาดังกล่าว

การเกิดรากจากแคลลัส จากการทดลองพบแคลลัสอายุ 3 เดือน พัฒนาเป็นรากสูงสุด (17 ± 1.07) บนอาหารสูตร $\frac{1}{2}$ MS6 ดังนั้นเมื่อเติมสารสกัดจากสาหร่าย ร่วมกับ 2,4-D ความเข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ และ BA ความเข้มข้น 5 ไมโครโมลาร์ ส่งผลให้เกิดรากเพิ่มมากขึ้นกว่าสูตรอาหารที่มีเฉพาะ 2,4-D และ BA เนื่องจากบางแคลลัสที่สัมผัสกับอาหารมีการสะสม 2,4-D และฮอร์โมนพืชกลุ่มออกซินในสารสกัดจากสาหร่ายอยู่ตลอดเวลา จึงทำให้กลุ่มของแคลลัสดังกล่าวมีการพัฒนาเป็นรากเพิ่มมากขึ้น ดังงานวิจัยของ Liu et al. (2014) ได้ทดสอบการเพาะเลี้ยงชิ้นใบ *Arabidopsis thaliana* บนอาหารสูตร B5 ที่เติม IAA ความเข้มข้น 1, 0.1 และ 0.01 ไมโครโมลาร์ พบเซลล์รอบบาดแผลของชิ้นใบเกิดแคลลัส เกิดรากจำนวนมาก และเกิด 1 ราก ตามลำดับ ซึ่งพบว่าการใช้ในการชักนำให้เซลล์พัฒนาเป็นแคลลัสหรือรากคล้ายกัน ดังนั้นควรเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบพืชบนอาหารที่มีออกซินสูงเพื่อให้เกิดแคลลัส หลังจากนั้นลดระดับออกซินให้ต่ำลง จึงสามารถลดการเกิดรากได้ ซึ่งจากรายงานของสารสกัดสาหร่ายจาก *S. platensis* ด้วยตัวทำละลายเมทานอลความเข้มข้น 70% (V/V) ที่เป็นสารมีขั้ว พบสารสกัดจากสาหร่ายมีฮอร์โมนพืช เช่น IAA, GA, BA, ABA, JA และ MeJA โดย IAA มีปริมาณสูงกว่าชนิดอื่น (Amin et al., 2009) เมื่อมีการเติมสารสกัดจากสาหร่าย *S. maxima* ลงไปในอาหารเพาะเลี้ยง ความเข้มข้นของ ฮอร์โมนพืชแต่ละชนิดจึงมีผลต่อการสัดส่วนของฮอร์โมนต่างๆ ในเซลล์พืช ซึ่งพบว่าการใช้ตัวทำละลายน้ำและเฮกเซน ที่เป็นสารที่มีขั้วและไม่ขั้วตามลำดับ สามารถชักนำการเกิดรากเหมือนกับอาหารที่มีการเติมเฉพาะ 2,4-D กับ BA โดยไม่มีความแตกต่างกัน (ตารางที่ 4) แสดงว่าปริมาณของฮอร์โมนพืชในสารสกัดจากสาหร่าย ไม่ได้รบกวนสัดส่วนของ 2,4-D กับ BA ที่อยู่ในเซลล์พืช แต่ส่งเสริมชนิดแคลลัสและการพัฒนาของแคลลัสเป็น SE เท่านั้น (ตารางที่ 1 และ 2) เนื่องจากสารสกัดจากสาหร่ายมี ฮอร์โมนพืชบางชนิดที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการไซมาติกเอ็มบริโอเจเนซิส ดังนั้นถ้าต้องการลดจำนวนรากที่ผ่านกระบวนการออแกโนเจเนซิส ควรย้ายแคลลัสลงบนอาหารที่ไม่มี 2,4-D และลดปริมาณสารสกัดจากสาหร่าย

สรุปผลการวิจัย

สูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำ friable callus จากชิ้นส่วนของใบกาแฟอาราบิก้าสายพันธุ์คาติมอร์ CIFIC 7963 คือ อาหารสูตร MS ที่มีการเติม 2,4-D ความเข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ และ BA ความเข้มข้น 5 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับสารสกัดจากสาหร่าย *S. maxima* ด้วยตัวทำละลายน้ำ (MS5) ส่วนสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำ SE คืออาหารสูตร $\frac{1}{2}$ MS ที่มีการเติม 2,4-D ความเข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ และ BA ความเข้มข้น 5 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับสารสกัดจากสาหร่ายด้วยตัวทำละลายน้ำ และเฮกเซนความเข้มข้น 3% ($\frac{1}{2}$ MS5 หรือ $\frac{1}{2}$ MS6 ตามลำดับ) โดยมีประสิทธิภาพการชักนำการเกิดไซมาติกเอ็มบริโอ (% SE induction) เท่ากับ 76.67% และ 73.33% ตามลำดับ ดังนั้นน้ำเป็นตัวทำละลายของสารสกัดจากสาหร่าย ที่ทำให้แคลลัสมีการพัฒนาเป็น SE จำนวน 100 ± 3.33 ซึ่งมากกว่าตัวทำละลายเฮกเซน (88 ± 2.18) นอกจากนี้พบการเกิดรากจากแคลลัสบนอาหารดังกล่าว ดังนั้นการเพิ่มปริมาณ SE ในครั้งต่อไปเพื่อให้ได้จำนวนมากกว่าเดิมควรย้ายแคลลัส ลงบนอาหารสูตร $\frac{1}{2}$ MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 5 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับสารสกัดจากสาหร่ายด้วยตัวทำละลายน้ำความเข้มข้นน้อยกว่า 3% เพื่อหลีกเลี่ยงเซลล์พืชไม่ให้สะสมสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มของออกซินมากเกินไป

กิตติกรรมประกาศ

คณะวิจัยขอขอบคุณ คณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์ และสาขาวิชาพันธุศาสตร์ ภาควิชาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ผู้สนับสนุนแหล่งทุนวิจัย การใช้เครื่องมือและห้องปฏิบัติการ

เอกสารอ้างอิง

- มานพ หาญเทวี, อุทัย นพคุณวงศ์, สากล มีสุข, ประสงค์ มั่นสูง, กำพล เมืองโคมพัล, เสี่ยงม แฉ่มจำรูญ, ปิยนุช นาคะ และสุภัทรา เลิศวัฒนาเกียรติ. (2551). การปรับปรุงพันธุ์กาแฟอาราบิก้าลูกผสมสายพันธุ์ Catimor CIFIC 7963-13-28. วารสารวิชาการเกษตร 26(2): 130-145.
- สมพร ประเสริฐสูงสกุล. (2552). การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อการปรับปรุงพันธุ์พืช. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์ โฟร์เพช. หน้า 14-30.
- Ahmed, W., Feyissa, T. and Disasa, T. (2013). Somatic embryogenesis of a coffee (*Coffea arabica* L.) hybrid

- using leaf explants. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 88(4): 469-475.
- Amin, G.H., Al-Gendy, A.A., El-Ayouty, Y.M. and Abdel-Motteleb, A. (2009). Effect of *Spirulina platensis* extract on growth, phenolic compounds and antioxidant activities of *Sisymbrium irio* callus and cell suspension cultures. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences* 3(3): 2097-2110.
- Belay, A. (1997). *Spirulina platensis* (Arthrospira): Physiology, cell-biology and biotechnology, In A. Vonshak (ed.). In: Mass culture of spirulina (Arthrospira) outdoors: The Earthrise Farms experience. Taylor and Francis, London. 131-158.
- Colla, L.M., Reinehr, C.O., Reichert, C. and Costa, J.A.V. (2007). Production of biomass and nutraceutical compounds by *Spirulina platensis* under different temperature and nitrogen regimes. *Bioresource Technology* 98(7): 1489-1493.
- Cooke, T.J., Racusen, R.H. and Cohen, J.D. (1993). The role of auxin in plant embryogenesis. *The Plant Cell* 5: 1494-1495.
- Freund, J.F. and Wilson, W.J. (2003). *Statistical Methods*. Academic Press, London, UK. pp. 1-673.
- Ibrahim, M.S.D., Hartatib, Rr.S., Rubiyo, Rr.S., Purwito, A. and Sudarsono, A. (2013). Direct and indirect somatic embryogenesis on arabica coffee (*Coffea arabica*). *Indonesian Journal of Agricultural Science* 14(2): 79-86.
- Lashermes, P.M., Combes, C., Robert, J., Trouslot, P., D'Hont, A. and Anthony, F. (1999). Molecular characterisation and origin of the *Coffea arabica* L. genome. *Molecular Genetics and Genomics* 261: 259-266.
- Liu, J., Sheng, L., Xu, Y., Li, J., Yang, Z., Huang, H. and Xua, L. (2014). WOX11 and 12 are involved in the first-step cell fate transition during de Novo root organogenesis in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 26: 1081-1093.
- Manickavelu, A., Nadarajan, N., Ganesh, S.K., Ramalingam, R., Raguraman, S. and Gnanamalar, R.P. (2006). Organogenesis induction in rice callus by cyanobacterial extracellular product. *African Journal of Biotechnology* 5(5): 437-439.
- Mokgadi, J., Turner, C. and Torto, N. (2013). Pressurized hot water extraction of alkaloids in goldenseal. *American Journal of Analytical Chemistry* 4: 398-403.
- Murashige, T. and Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497.
- Ogbonda, K.H., Aminigo, R.E. and Abu, G.O. (2007). Influence of temperature and pH on biomass production and protein biosynthesis in a putative *Spirulina* sp. *Bioresource Technology* 98: 2207-221.
- Sornchai P., Saithong, N., Srichompoo, Y., Unartngam, A. and lamtham, S. (2014). Effect of *Spirulina maxima* aqueous extract on seed germination and seedling growth of mung bean, *Vigna radiata* and rice, *Oryza sativa* var. japonica. *Journal of the International Society for Southeast Asian Agricultural Sciences* 2(2): 77-84.
- Storni de Cano, M., Zaccaro, M.C., Garcí'a, I., Stella, A.M. and Zulpa de Caire, G. (2003). Enhancing rice callus regeneration by extracellular products of *Tolypothrix tenuis* (Cyanobacteria). *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 19: 29-34.
- Vinoth, S., Gurusaravanan, P. and Jayabalan, N. (2014). Optimization of somatic embryogenesis protocol in *Lycopersicon esculentum* L. using plant growth regulators and seaweed extracts. *Journal of Applied Phycology* 26: 1527-1537.
- Whitton, B. (1992). Diversity, ecology and taxonomy of the cyanobacteria, In N. Mann and N. Carr (eds.). In: *Photosynthetic prokaryotes experience*. Plenum Press, New York. 1-37.

