การพัฒนาการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอสายพันธุ์มะพร้าวน้ำหอมสีเขียว และการพัฒนาแคลลัสและการพัฒนายอดจากชิ้นส่วนแคลลัสในสภาพปลอดเชื้อ

โครงการประเมินศักยภาพการขยายพันธุ์เชื้อพันธุกรรมสายพันธุ์มะพร้าวน้ำหอมสีเขียวในสภาพปลอดเชื้อ

ศูนย์วิจัยพืชสวนชุมพร สถาบันวิจัยพืชสวน

กรมวิชาการเกษตร

การพัฒนาการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอสายพันธุ์มะพร้าวน้ำหอมสีเขียว และการพัฒนาแคลลัสและการพัฒนายอดจากชิ้นส่วนแคลลัสในสภาพปลอดเชื้อ

นางสุภาภรณ์ สาชาติ และนางสาวอรทัย ธนัญชัย

บทคัดย่อ

โครงการประเมินศักยภาพการขยายพันธุ์เชื้อพันธุกรรมสายพันธุ์มะพร้าวน้ำหอมสีเขียวในสภาพปลอดเชื้อ มีวัตถุประสงค์เพื่อ ศึกษาและพัฒนาเทคนิคการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอเพื่อเพิ่มปริมาณต้นสายพันธุ์มะพร้าวน้ำหอมสีเขียว และเพื่อศึกษาเทคโนโลยีการขยายพันธุ์สายพันธุ์มะพร้าวน้ำหอมสีเขียว โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ somatic embryogenesis ในปี 2566 **การพัฒนาการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอสายพันธุ์มะพร้าวน้ำหอมสีเขียว** โดยการชักนำให้คัพภะเกิดรากแรกเกิดและเกิดยอด กับผลมะพร้าวอายุ 10 เดือน เลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร Y3 (Eeuwens, 1976) ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต และที่เติม GA ความเข้มข้น 5, 10 และ 15 µM หรือที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 0.5, 1.0 และ 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ในที่มืดนาน 2 เดือน พบว่า อาหารสูตร Y3 ที่เติม GA ความเข้มข้น 15 µM และ 10 µM ให้ความยาวยอดเฉลี่ยสูงที่สุดเท่ากับ 3.59 และ 3.08 เซนติเมตร ตามลำดับ และมีจำนวนรากแรกเกิดไม่แตกต่างกัน และเมื่อนำมาเลี้ยงต่อบนอาหารแข็งสูตร Y3 ในที่สว่างเป็นเวลา 3 เดือน พบว่า ต้นอ่อนที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอบนอาหารแข็งสูตร Y3 ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้จำนวนรากเฉลี่ยสูงที่สุด 6 ราก สำหรับการชักนำให้เกิดรากแขนงกับต้นอ่อนที่มีอายุ 4-5 เดือน และมีใบ 1-2 ใบ โดยเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร Y3 ที่เติม IBA ความเข้มข้น 0, 0.1, 1 และ 10 µM ในที่สว่าง พบว่า เมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน ต้นอ่อนที่เลี้ยงในอาหารเหลวสูตร Y3 ที่เติม IBA ความเข้มข้น 10 µM มีจำนวนรากเฉลี่ยสูงที่สุด คือ 0.82 ราก (นับจากสภาพในขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ)

สำหรับ**การขยายพันธุ์มะพร้าวสายพันธุ์มะพร้าวน้ำหอมสีเขียว ด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ somatic embryogenesis** จากการศึกษาผลของอาหารและสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการเกิดแคลลัสจากชิ้นส่วนเอ็มบริโอ พบว่า เอ็มบริโอที่วางบนอาหารสูตร Y3 ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 100-400 µM เกิดแคลลัสแบบ friable callus เมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 14 สัปดาห์ สัปดาห์ ส่วนการเกิดยอดจากแคลลัส พบว่า เกิดแคลลัสแบบ compact callus มีการขยายขนาดเพิ่มขึ้น และบริเวณชิ้นส่วนที่เป็นรอยตัดสัมผัสกับอาหารเพาะเลี้ยงเกิดสีน้ำตาล ส่วนแคลลัสแบบ friable callus ซึ่งมีลักษณะขยายขนาดและยืดยาวเป็นเส้นคล้ายราก การเกิดอาการ browning จะเป็นมากขึ้นในสัปดาห์ต่อ ๆ มา ส่งผลให้ชิ้นส่วนตาย และชิ้นส่วนแคลลัสที่วางบนสูตรอาหาร Y3 ร่วมกับ 2,4-D ความเข้มข้น 9 µM และ BA ความเข้มข้น 300 µM พบแคลลัสบางส่วนสามารถเจริญต่อได้

คำสำคัญ : เพาะเลี้ยงเอ็มบริโอ การเกิดโซมาติคเอ็มบริโอ สายพันธุ์มะพร้าวน้ำหอมสีเขียว ระบบการขยายพันธุ์

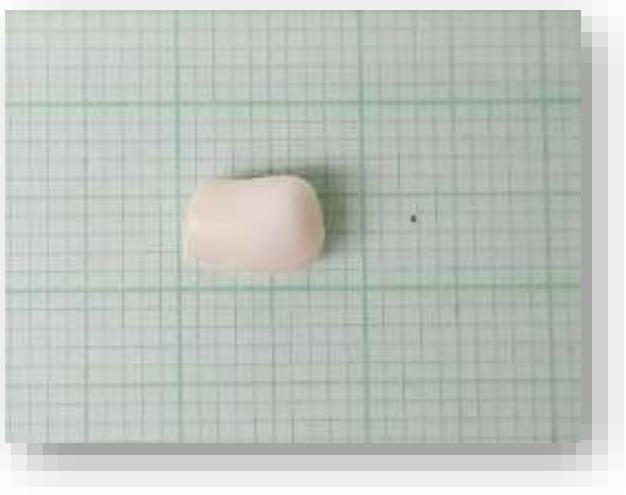
ผลการศึกษา

ผลการดำเนินงานของโครงการ

<u>การทดลองที่ 1</u> พัฒนาการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอสายพันธุ์มะพร้าวน้ำหอมสีเขียว

ขั้นตอนที่ 1.1 การชักนำให้คัพภะเกิดรากแรกเกิด และเกิดยอด

ในปี 2566 ได้ชักนำให้คัพภะ (เอ็มบริโอ) จากผลมะพร้าวน้ำหอมสีเขียวที่อายุผล 10 เดือน (ภาพที่ 1) **เกิดรากแรกเกิดและเกิดยอด** โดยเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร Y3 (Eeuwens, 1976) และสูตร Y3 (Eeuwens, 1976) ที่เติม GA ความเข้มข้น 5, 10 และ 15 µM หรือเติม 2,4-D ความเข้มข้น 0.5, 1.0 และ 1.5 ppm ในที่มืดนาน 2 เดือน พบว่า สูตรอาหารทั้ง 7 กรรมวิธี มีผลต่อความยาวยอดที่แตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญ 0.01 โดยอาหารสูตรที่ให้ความยาวยอดเฉลี่ยสูงที่สุดได้แก่ Y3 ที่เติม GA 15 µM และ 10 µM ซึ่งให้ความยาวยอดเฉลี่ย 3.59 และ 3.08 เซนติเมตร ตามลำดับ (ตารางที่ 1 และตารางที่ 2) ในขณะที่จำนวนรากแรกเกิดที่ได้เฉลี่ยทุกกรรมวิธี คือ 1 ราก ไม่แตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 และเมื่อนำมาเลี้ยงต่อบนอาหารแข็งสูตร Y3 ในที่สว่างเป็นเวลา 3 เดือน พบว่า ต้นอ่อนที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอบนอาหารแข็งสูตร Y3 ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้จำนวนรากเฉลี่ยสูงที่สุด 6 ราก ซึ่งมีแตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญ 0.01 **สำหรับการชักนำให้เกิดรากแขนง** นำต้นอ่อนที่มีอายุ 4-5 เดือน และมีใบ 1-2 ใบ จากขั้นตอนที่ 1 นำมาเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร Y3 ที่เติม IBA ความเข้มข้น 0, 0.1, 1 และ 10 µM ในที่สว่าง เป็นเวลา 3 เดือน พบว่า เมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน ต้นอ่อนที่เลี้ยงในอาหารเหลวสูตร Y3 ที่เติม IBA ความเข้มข้น 10 µM มีจำนวนรากหลักเฉลี่ยสูงที่สุด คือ 0.82 ราก โดยนับจากสภาพในขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ และอยู่ระหว่างเก็บบันทึกข้อมูลให้ครบ 3 เดือน (ตารางที่ 1 และภาพที่ 2 และ 3)



ภาพที่ 1 ลักษณะของเอ็มบริโอมะพร้าวน้ำหอมสีเขียวจากผลมะพร้าวน้ำหอมสีเขียวที่อายุผล 10 เดือน

ตารางที่ 1 ค่าเฉลี่ยของความยาวยอดและจำนวนรากของเอ็มบริโอมะพร้าวน้ำหอมสีเขียวที่เลี้ยงในอาหารสูตรต่าง ๆ ในที่มืดและในที่สว่าง

สูตรอาหาร	เลี้ยงในที่มืด		เลี้ยงในที่สว่าง
	ความยาวยอดเฉลี่ย[1/]	จำนวนรากเฉลี่ย	จำนวนรากเฉลี่ย[1/]
Y3 Eeuwens	1.99[b]	1.00	3.67[bc]
Y3+GA 5 µM	2.3[b]	1.00	2.56[c]
Y3+GA 10 µM	**3.08[a]**	1.00	4.78[ab]
Y3+GA 15 µM	**3.59[a]**	1.11	2.11[c]
Y3+2,4-D 0.5 ppm	1.88[b]	1.22	3.89[bc]
Y3+2,4-D 1.0 ppm	1.74[b]	1.11	3.67[bc]
Y3+2,4-D 1.5 ppm	1.97[b]	1.13	**6[a]**
C.V. (%)	31.40	43.10	49.80

[1/] ตัวเลขที่ตามด้วยอักษรที่เหมือนกัน ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์ โดยวิธี DMRT

Y3 Eeuwens

Y3 + GA 5 µM

Y3 + GA 10 µM

Y3 + GA 15 µM

Y3 + 2,4 D 0.5 ppr

Y3 + 2,4 D 1 ppm

Y3 + 2,4 D 1.5 ppr

ภาพที่ 2 ลักษณะของเอ็มบริโอมะพร้าวน้ำหอมสีเขียวที่เลี้ยงในสูตรอาหารต่าง ๆ ในที่มืดเป็นเวลา 2 เดือน

Y3 (Eeuwens, 1976)

Y3 + GA 5 µM

Y3 + GA 10 µM

Y3 + GA 15 µM

Y3 + 2,4 D 0.5 ppm

Y3 + 2,4 D 1.0 ppm

Y3 + 2,4 D 1.5 ppm

ภาพที่ 3 ลักษณะของเอ็มบริโอมะพร้าวน้ำหอมสีเขียวที่เลี้ยงในอาหารแข็งสูตร Y3 (Eeuwens, 1976) ในที่สว่างนาน 2 เดือน

ขั้นตอนที่ 1.2 การชักนำให้เกิดรากแขนง

นำต้นอ่อนที่มีอายุ 4-5 เดือน และมีใบ 1-2 ใบ จากขั้นตอนที่ 1 ตัดจาวและรากออก เลี้ยงในอาหารเหลวสูตร Y3 ที่เติม IBA ความเข้มข้น 0, 0.1, 1 และ 10 µM ในที่สว่าง ขณะนี้ได้เลี้ยงต้นอ่อนในอาหารตามกรรมวิธีดังกล่าวเป็นเวลา 1 เดือน เก็บบันทึกข้อมูล พบว่า ต้นอ่อนที่เลี้ยงในอาหารเหลวสูตร Y3 ที่เติม IBA ความเข้มข้น 10 µM มีจำนวนรากเฉลี่ยสูงที่สุด คือ 0.82 ราก นับจากสภาพในขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (ตารางที่ 2) และจะเลี้ยงต้นอ่อนในอาหารตามกรรมวิธีให้ครบ 3 เดือน จึงจะนำต้นอ่อนออกอนุบาล พร้อมการบันทึกผลจำนวนราก และอัตราการรอดตายภายหลังออกอนุบาลนาน 2-3 เดือน

ตารางที่ 2 จำนวนรากเฉลี่ยของเอ็มบริโอมะพร้าวน้ำหอมสีเขียวที่เลี้ยงในอาหารสูตร Y3 และ Y3 ที่เติม IBA ความเข้มข้นต่าง ๆ ในที่สว่างนาน 1 เดือน

สูตรอาหาร	จำนวนรากหลักเฉลี่ย
Y3 Eeuwens	0.1
Y3 + IBA 0.1 µM	0.22
Y3 + IBA 1.0 µM	0.38
Y3 + IBA 10 µM	0.82

<u>การทดลองที่ 2</u> การขยายพันธุ์มะพร้าวสายพันธุ์มะพร้าวน้ำหอมสีเขียว ด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ somatic embryogenesis

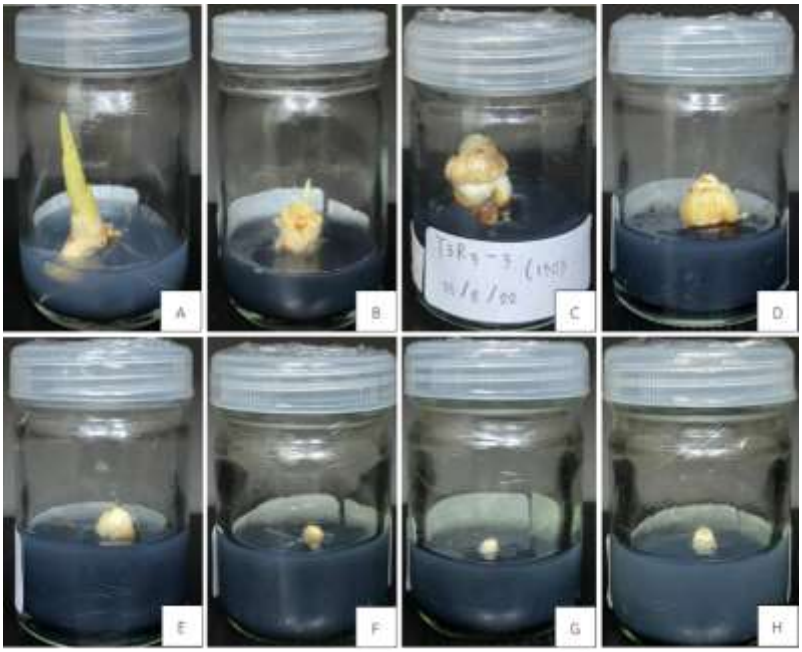
ขั้นตอนที่ 2.1 ศึกษาผลของอาหารและสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการเกิดแคลลัสจากชิ้นส่วนเอ็มบริโอของมะพร้าวสายพันธุ์มะพร้าวน้ำหอมสีเขียว

ปี 2565 จากการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอที่อายุ 10 เดือน บนอาหารแข็งสูตร Y3 (Eeuwens, 1976) ที่เติม 2,4 D ความเข้มข้น 0, 100, 200, 300, 400, 500, 600 และ 700 µM เลี้ยงในที่มืดนาน 2 เดือน หลังจากนั้นตัดจาวทิ้งและเลี้ยงในอาหารสูตรเดิม วางในที่มืด นาน 6 เดือน บันทึกผล การปนเปื้อนของเชื้อรา และแบคทีเรีย การพัฒนาแคลลัสจากเอ็มบริโอในห้องสภาพปลอดเชื้อ พบว่า เอ็มบริโอของมะพร้าวน้ำหอมสีเขียวเริ่มดำเนินการเพาะเลี้ยงครั้งที่ 1 (ภาพที่ 4) จำนวน 120 ชิ้น หลังจากเพาะเลี้ยง 4 สัปดาห์ เอ็มบริโอที่วางบนอาหารสูตร Y3 (Control) เริ่มมีการพัฒนาส่วนยอดและราก หลังจากเพาะเลี้ยง 8 สัปดาห์ เอ็มบริโอที่วางบนอาหารสูตร Y3 ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 200 และ 300 µM เอ็มบริโอเกิดแคลลัสแบบ friable callus หลังจากเพาะเลี้ยง 14 สัปดาห์ เอ็มบริโอที่วางบนอาหารสูตร Y3 ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 100-400 µM เอ็มบริโอเกิดแคลลัสแบบ friable callus และเอ็มบริโอที่วางบนอาหารสูตร Y3 ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 500-700 µM เอ็มบริโอมีขนาดไม่แตกต่างกับขนาดเริ่มดำเนินการและพบการปนเปื้อน 46.67 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 5-6) จึงเริ่มดำเนินการเพาะเลี้ยงครั้งที่ 2 จำนวน 144 ชิ้น พบการปนเปื้อนของเชื้อราและแบคทีเรีย จำนวน 15 ชิ้น คิดเป็น 10.42 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 3) ลักษณะเอ็มบริโอมีการขยายขนาดในทุกกรรมวิธี เอ็มบริโอที่วางบนอาหารสูตร Y3 ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 100-400 µM เกิดแคลลัสแบบ friable callus แนวโน้มเดียวกับการทดลองครั้งที่ 1 จากนั้นคัดเลือกเฉพาะกรรมวิธีที่เอ็มบริโอเกิดแคลลัส เพื่อเพิ่มปริมาณแคลลัส ไปดำเนินการทดลองในขั้นตอนที่ 2

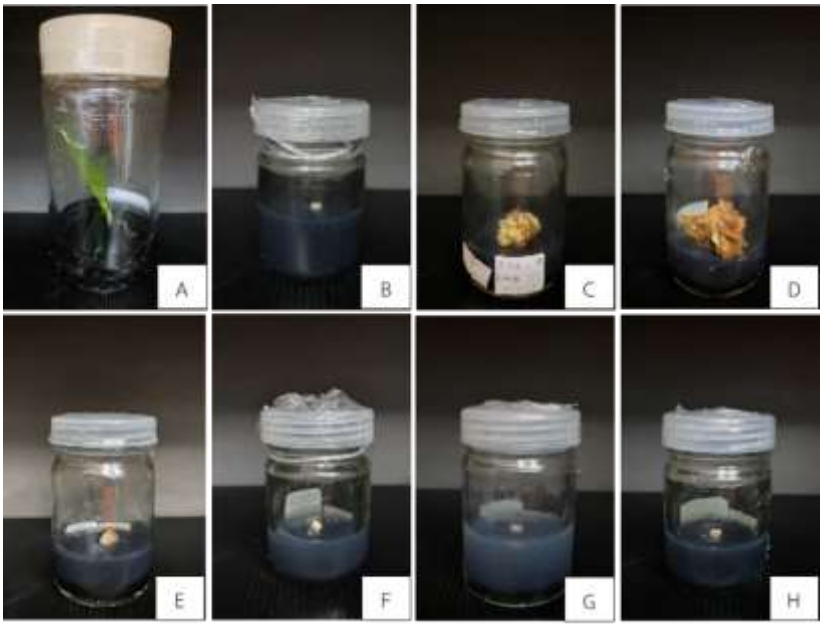
ตารางที่ 3 จำนวนเอ็มบริโอเริ่มต้น จำนวนเอ็มบริโอปนเปื้อน และจำนวนเอ็มบริโอคงเหลือ แต่ละกรรมวิธี ภายหลังการเพาะเลี้ยง 3 สัปดาห์

สูตรอาหาร	จำนวนเอ็มบริโอ (ชิ้น)		
	จำนวนเริ่มต้น	การปนเปื้อน	จำนวนคงเหลือ
Y3 (Control)	18	0	18
Y3 + 2,4-D ความเข้มข้น 100 µM	18	3	15
Y3 + 2,4-D ความเข้มข้น 200 µM	18	2	16
Y3 + 2,4-D ความเข้มข้น 300 µM	18	3	15
Y3 + 2,4-D ความเข้มข้น 400 µM	18	4	14
Y3 + 2,4-D ความเข้มข้น 500 µM	18	1	17
Y3 + 2,4-D ความเข้มข้น 600 µM	18	0	18
Y3 + 2,4-D ความเข้มข้น 700 µM	18	2	16
รวม	**144**	**15**	**129**

ภาพที่ 4 ลักษณะของเอ็มบริโอมะพร้าวน้ำหอมสีเขียวเริ่มดำเนินการ



ภาพที่ 5 ลักษณะเอ็มบริโอมะพร้าวน้ำหอมสีเขียวที่เพาะเลี้ยง 14 สัปดาห์ บนกรรมวิธีต่าง ๆ Y3 (Control) (A) Y3 + 2,4-D 100 µM (B) Y3 + 2,4-D 200 µM (C) Y3 + 2,4-D 300 µM (D) Y3 + 2,4-D 400 µM (E) Y3 + 2,4-D 500 µM (F) Y3 + 2,4-D 600 µM (G) Y3 + 2,4-D 700 µM (H)



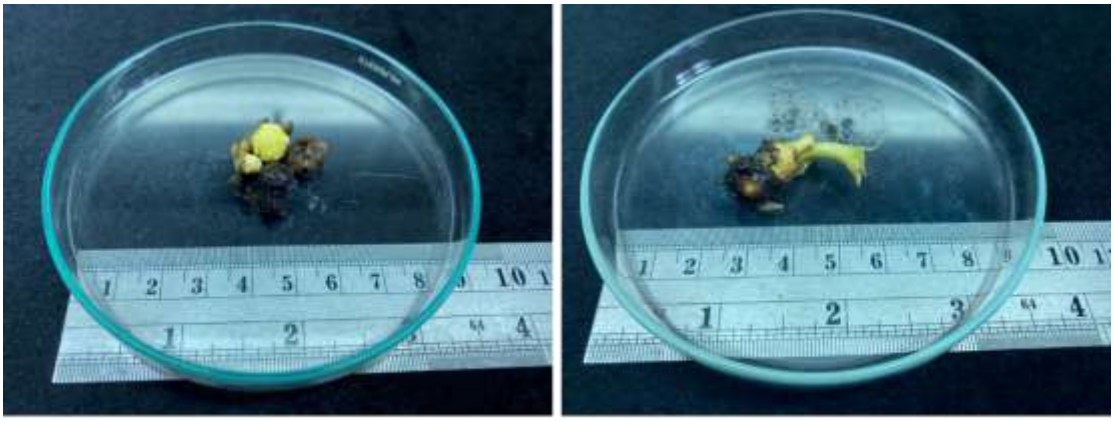
ภาพที่ 6 ลักษณะเอ็มบริโอมะพร้าวน้ำหอมสีเขียวที่เพาะเลี้ยง 26 สัปดาห์ บนกรรมวิธีต่าง ๆ Y3 (Control) (A) Y3 + 2,4-D 100 µM (B) Y3 + 2,4-D 200 µM (C) Y3 + 2,4-D 300 µM (D) Y3 + 2,4-D 400 µM (E)Y3 + 2,4-D 500 µM (F) Y3 + 2,4-D 600 µM (G) Y3 + 2,4-D 700 µM (H)

ขั้นตอนที่ 2.2 ศึกษาผลของอาหารและสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการเกิดยอด (somatic embryogenesis) จากแคลลัส

ปี 2566 นำแคลลัสจากขั้นตอนที่ 2.1 ขนาด 1 กรัม เลี้ยงในสูตรอาหารตามกรรมวิธีทดลอง นำไปเลี้ยงในที่มืดต่อจนกระทั่งแคลลัสมีการพัฒนาเป็นยอด จึงนำมาเลี้ยงในที่มีแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิ 25 °C วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Complete Randomized Design ; CRD) ประกอบด้วย 13 กรรมวิธี จำนวน 3 ซ้ำ ซ้ำละ 3 ขวด (1 แคลลัส/ขวด) พบว่า เมื่อเลี้ยงแคลลัสบนสูตรอาหารชักนำยอด เป็นเวลา 4 สัปดาห์ แคลลัสแบบ compact callus มีการขยายขนาดเพิ่มขึ้นและบริเวณชิ้นส่วนที่เป็นรอยตัดสัมผัสกับอาหารเพาะเลี้ยงเกิดสีน้ำตาล (browning) ส่วนแคลลัสแบบ friable callus ซึ่งมีลักษณะขยายขนาดและยืดยาวเป็นเส้นคล้ายราก (ภาพที่ 7) ทำการเปลี่ยนอาหารทุก ๆ 4 สัปดาห์ การเกิดอาการ browning จะเป็นมากขึ้นในสัปดาห์ต่อ ๆ มา ชิ้นส่วนจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล และอาหารรอบ ๆ ชิ้นส่วนจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลขยายบริเวณกว้างขึ้น ซึ่งส่งผลให้ชิ้นส่วนตาย (ภาพที่ 8) และจากการศึกษาการชักนำแคลลัสให้เกิด somatic embryo ชิ้นส่วนแคลลัสที่วางบนสูตรอาหาร Y3 ร่วมกับ 2,4-D ความเข้มข้น 9 µM และ BA ความเข้มข้น 300 µM ชิ้นส่วนจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลแต่แคลลัสบางส่วนสามารถเจริญต่อได้ และชิ้นส่วนแคลลัสที่วางบนสูตรอาหาร Y3 ร่วมกับ 2,4-D ความเข้มข้น 3 µM และ BA ความเข้มข้น 100 µM เกิดลักษณะเป็นยอด คาดว่า ในขั้นตอนที่ศึกษาผลของอาหารและสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการเกิดแคลลัสจากชิ้นส่วนเอ็มบริโอ ความเข้มข้นของ 2,4-D อาจมีปริมาณน้อย ส่งผลให้เซลล์บริแวณปลายยอดยังสามารถพัฒนาเป็นยอดต่อได้เมื่อลดความเข้มข้น 2,4-D ลง ในขั้นตอนการศึกษาผลของอาหารและสารควบคุมการเจริญเติบโตต่อการเกิดยอด (ภาพที่ 9)

ภาพที่ 7 ลักษณะแคลลัสเมื่อเลี้ยงบนสูตรอาหารและสารควบคุมการเจริญเติบโตสูตรชักนำยอดและราก (4 สัปดาห์)

ภาพที่ 8 ลักษณะแคลลัสเกิดอาการ browning เมื่อเลี้ยงบนสูตรอาหารและสารควบคุมการเจริญเติบโตสูตรชักนำยอดและราก (24 สัปดาห์)



กรรมวิธีที่ 10 สูตรอาหาร Y3 + 2,4-D ความเข้มข้น 9 µM + BA ความเข้มข้น 300 µM

กรรมวิธีที่ 2 สูตรอาหาร Y3 + 2,4-D ความเข้มข้น 3 µM + BA ความเข้มข้น 100 µM

ภาพที่ 9 ลักษณะแคลลัสแบบ compact callus และการเกิดยอดบนสูตรอาหารชักนำการเกิดยอด

เอกสารอ้างอิง

สมชาย วัฒนโยธิน. 2546. มะพร้าว ใน เอกสารวิชาการเรื่อง เทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสวน กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ หน้า 132-138.

สมชาย วัฒนโยธิน. 2549. การปลูกมะพร้าว. น. 1-36 ใน เอกสารวิชาการเทคโนโลยีการผลิตมะพร้าวน้ำหอม ศูนย์วิจัยระบบนิเวศเกษตร สถาบันค้นคว้าและพัฒนาระบบนิเวศเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ร่วมกับสำนักงานเกษตรจังหวัดสมุทรสาคร.

Ashburner, G. R., Thompson, W. K., Maheswaran, G., and J. M. Burch. 1991. The effect of solid and liquid phase in the basal medium of coconut (Cocos nucifera L.) embryo cultures. Oléagineux, 46(4): 149-152.

Assy-Bah, B., Durand-Gasselin, T., Engelmann, F., and C. Pannetier. 1989. The in vitro culture of coconut (Cocos nucifera L.) zygotic embryos. Revised and simplified method for obtaining coconut plantlets suitable for transfer to the field. Oléagineux, 44: 515-523.

Blake, J. 1995. A brief history of coconut tissue culture. In Lethal Yellowing: Research and Practical Aspects (pp. 195-201). Springer Netherlands.

Buffard-Morel, J., Verdeil, J. L., Dussert, S., Magnaval, C., Huet, C., and F. Grosdemange. 1995. Initiation of somatic embryogenesis in coconut (Cocos nucifera L.). In Lethal yellowing: research and practical aspects (pp. 217-223). Springer Netherlands.

Ebert, A., and H. F. Taylor. 1990. Assessment of the changes of 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid concentrations in plant tissue culture media in the presence of activated charcoal. Plant Cell, Tissue, and Organ Culture. 20(3): 165-172.

Eeuwens, C. J. 1976. Mineral requirements for growth and callus initiation of tissue explants excised from mature coconut palms (Cocos nucifera) and cultured in vitro. PhysiologiaPlantarum. 36(1): 23-28.

Fernando, S. C., Verdeil, J.L., Hocher, V., Weerakoon, L.K. and K. Hirimburegama. 2003. Histological analysis of plant regeneration from plumule explants of Cocos nucifera L., Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 72: 281-284.

Fernando, S. C., Weerakoon, L. K., and T. R. Gunathilake. 2004. Micropropagation of coconut through plumule culture. In Cocos. 16: 1-10.

Jean, L.V., Christien, H., Frédérique, G. and B.M. Jacqueline. 1994. Plant regeneration from cultured immature inflorescences of coconut (Cocos nucifera L.): evidence for somatic embryogenesis. Plant Cell Report. 13: 218-221.

Hornung, R. 1995. Initiation of callogenesis in coconut palm (Cocos nucifera L.). In Lethal Yellowing: Research and Practical Aspects (pp. 203-215). Springer Netherlands.

Karunaratne, S., Kurukulaarachchi, C., and C. Gamage, 2009. A Report on the Culture of Embryos of Dwarf Coconut, Cocos nucifera L var nana In vitro. In Cocos (Vol. 3). Coconut Research Institute of Sri Lanka.

Mayra, I., Montero-Cortés., José. L., Chan-Rodríguez, Ivan Cordova-Lara, Carlos Oropeza-Salinand Luis Sáenz-Carbonell. 2011. Addition of benzyladenine to coconut explants cultured In vitro improves the formation of somatic embryos and their germination. Agrociencia. 45: 663-673.

Perera, P. I., Vidhanaarachchi, V. R. M., Gunathilake, T. R., Yakandawala, D. M. D., Hocher, V., Verdeil, J. L., and L. K. Weerakoon. 2009. Effect of plant growth regulators on ovary culture of coconut (Cocos nucifera L.). Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 99: 73-81.

Perez-Nunez, M. T., Chan, J. L., Saenz, L., González, T., Verdeil, J. L., andC.Oropeza.2006. Improved somatic embryogenesis from (Cocos nucifera L.) plumule explants.In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant. 42(1): 37-43.

Rillo,E. P. andM. B. F. Paloma. 1990. Comparison of three media formulations for in vitro culture of coconut embryos.Oleagineux, 45(7): 319-323.

Sisunandar, S., Alkhikmah, A., Husin, A. and Suyadi, A. 2015. Embryo Incision as a New Technique for Double Seedling Production of Indonesian Elite Coconut Type “Kopyor”. Journal of Mathematical and Fundamental Sciences. 47(3), 252-260.

Wazir, S.K.S. 1997. Technologies on environment–friendly young tender coconuts, In: Proc. Cocotech Meet., APCC (Ed.), Manila, Philipp. pp. 34-42.