เทคโนโลยีการเก็บรักษาเชื้อพันธุ์มะพร้าวกลุ่มต้นเตี้ยพื้นเมืองของไทยในสภาพเยือกแข็ง

โครงการวิจัยศึกษาเทคโนโลยีการเก็บรักษาเชื้อพันธุกรรมมะพร้าวในสภาพเยือกแข็ง

ศูนย์วิจัยพืชสวนชุมพร สถาบันวิจัยพืชสวน
กรมวิชาการเกษตร

เทคโนโลยีการเก็บรักษาเชื้อพันธุ์มะพร้าวกลุ่มต้นเตี้ยพื้นเมืองของไทยในสภาพเยือกแข็ง

นางสาวอรทัย ธนัญชัย นางสุภาภรณ์ สาชาติ

บทคัดย่อ

โครงการวิจัยและพัฒนาศึกษาเทคโนโลยีการเก็บรักษาเชื้อพันธุกรรมมะพร้าวในสภาพเยือกแข็ง เริ่มต้น ตุลาคม 2564 ถึง กันยายน 2567 ดำเนินการที่ สถาบันวิจัยพืชสวน ศูนย์วิจัยพืชสวนชุมพร และสำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ เพื่อศึกษาวิธีการอนุรักษ์เชื้อพันธุ์มะพร้าวกลุ่มมะพร้าวต้นเตี้ยพันธุ์พื้นเมืองของไทยในสภาพเยือกแข็ง เพื่อการใช้ประโยชน์ด้านการปรับปรุงพันธุ์อย่างยั่งยืน การศึกษาเทคโนโลยีการเก็บรักษาเชื้อพันธุกรรมมะพร้าวกลุ่มต้นเตี้ยพื้นเมืองของไทยในสภาพเยือกแข็ง ในขั้นตอนการ**การเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอมะพร้าวกลุ่มต้นเตี้ยพื้นเมืองของไทย** สายพันธุ์พวงร้อย น้ำหวาน ปะทิว และทุ่งเคล็ด มีการพัฒนาเป็นรากและยอด 70 ถึง 80 เปอร์เซ็นต์ ส่วนเอ็มบริโอของมะพร้าวสายพันธุ์น้ำหอมและหมูสีเหลือง มีการพัฒนาเป็นยอดและราก 45 และ 25 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อวัดความยาวยอดเฉลี่ยของมะพร้าวกลุ่มต้นเตี้ย 6 พันธุ์ มีความยาวยอดอยู่ในช่วง 1.61-2.21 เซนติเมตร การพัฒนาเป็นต้นกล้าของมะพร้าวกลุ่มต้นเตี้ย 6 พันธุ์ หลังจากการเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร Y3 ในที่สว่าง 10 เดือน พบว่า มะพร้าวสายพันธุ์พวงร้อยมีการพัฒนาเป็นต้นกล้าสูงที่สุด คือ 74.29 เปอร์เซ็นต์ ส่วนมะพร้าวสายพันธุ์น้ำหวาน น้ำหอม ปะทิว ทุ่งเคล็ด และหมูสีเหลือง พบการพัฒนาเป็นต้นกล้าต่ำกว่า 50 เปอร์เซ็นต์

สำหรับการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว (Cryopreservation) พบว่า การปรับสภาพโดยให้เอ็มบริโอคายน้ำและนำเอ็มบริโอมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร Y3 ในที่มืด สามารถพัฒนาเป็นยอดและรากได้เมื่อเลี้ยงบนอาหารเป็นเวลา 2 เดือน แต่การเจริญเติบโตช้ากว่าเอ็มบริโอที่ไม่ผ่านการปรับสภาพให้คายน้ำ เอ็มบริโอที่ผ่านการปรับสภาพอายุ 6 เดือน การเจริญเติบโตใกล้เคียงกับเอ็มบริโอที่ไม่ผ่านการปรับสภาพที่อายุ 3-4 เดือน **ส่วนขั้นตอนการวัดปริมาณน้ำ (Water content measurement)** น้ำหนักหลังการปรับสภาพที่ระยะเวลา 15, 17, 19 และ 24 ชั่วโมง ไม่มีความแตกต่างกันมาก

คำสำคัญ : เพาะเลี้ยงเอ็มบริโอ การแช่แข็งตัวอ่อน มะพร้าว เชื้อพันธุกรรม การเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว

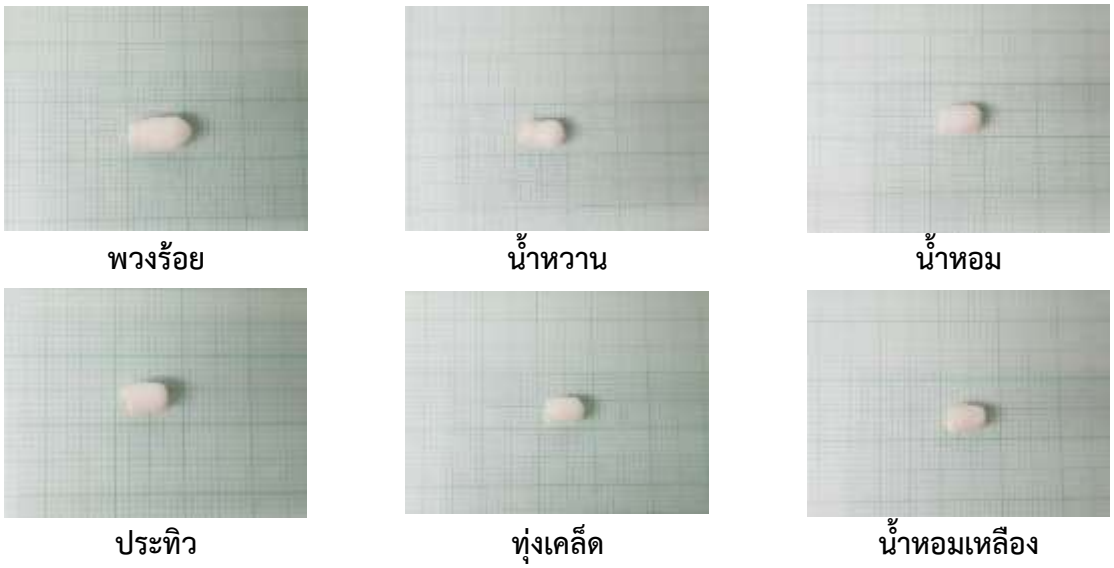
ผลการศึกษา

ผลการดำเนินงานของโครงการ

การทดลองที่ 1 ศึกษาเทคโนโลยีการเก็บรักษาเชื้อพันธุกรรมมะพร้าวกลุ่มต้นเตี้ยพื้นเมืองของไทยในสภาพเยือกแข็งขั้นตอนที่ 1 การเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอมะพร้าว

จากขั้นตอนการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอมะพร้าวน้ำหอมกลุ่มต้นเตี้ย จำนวน 6 สายพันธุ์ ได้แก่ น้ำหอม น้ำหวาน ทุ่งเคล็ด ปะทิว หมูสีเหลือง และพวงร้อย พบว่า มะพร้าวสายพันธุ์พวงร้อยมีขนาดความยาวเฉลี่ยของเอ็มบริโอสูงที่สุด คือ 1.04 เซนติเมตร รองลงมาคือ น้ำหวานน้ำหอม ทุ่งเคล็ด ประทิว และหมูสีเหลือง มีขนาดความยาวเฉลี่ยของเอ็มบริโอ 0.84, 0.79, 0.71, 0.70 และ 0.69 เซนติเมตร ตามลำดับ (ภาพที่ 1) หลังนำเอ็มบริโอเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร Y3 ในที่มืดนาน 2 เดือน พบว่า เอ็มบริโอของมะพร้าวน้ำหอมสายพันธุ์พวงร้อย ประทิว ทุ่งเคล็ด และน้ำหวาน มีการพัฒนาเป็นรากและยอดมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ ส่วนเอ็มบริโอของมะพร้าวสายพันธุ์น้ำหอม และหมูสีเหลือง มีการพัฒนาเป็นยอดและรากต่ำกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 1)

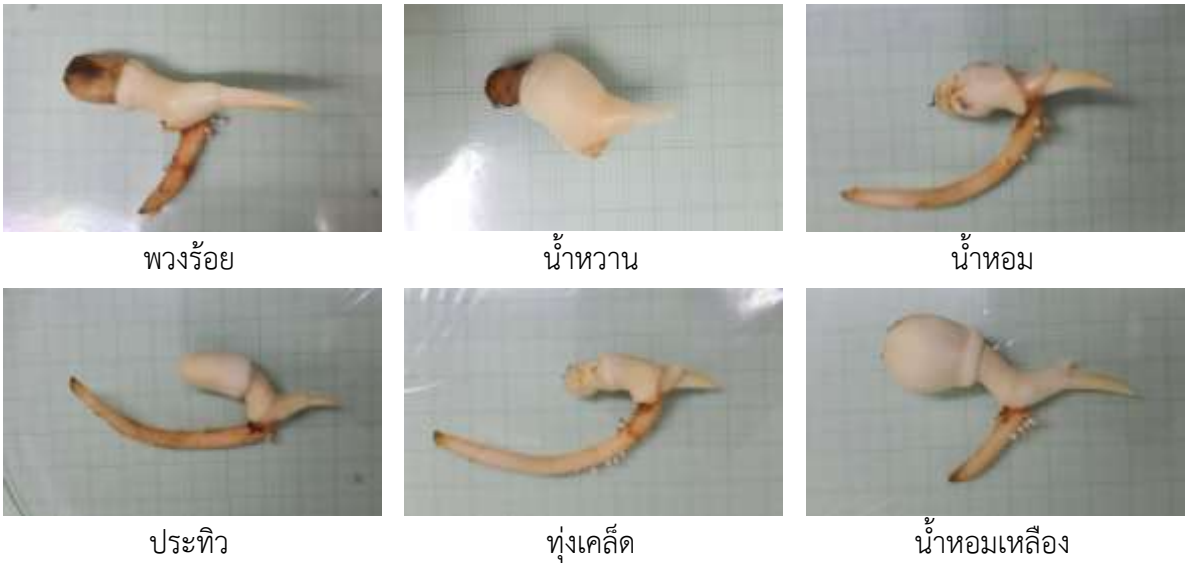
หลังนำเอ็มบริโอเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร Y3 ในที่มืดนาน 2 เดือน พบว่า มะพร้าวสายพันธุ์พวงร้อยมีความยาวยอดเฉลี่ยสูงที่สุด คือ 2.05 เซนติเมตร รองลงมา คือ หมูสีเหลือง น้ำหวาน น้ำหอม ทุ่งเคล็ด และประทิว มีความยาวยอดเฉลี่ย 1.96, 1.76, 1.64, 1.63 และ 1.57 ตามลำดับ (ตารางที่ 1)



ภาพที่ 1 ลักษณะของเอ็มบริโอมะพร้าวกลุ่มต้นเตี้ย 6 สายพันธุ์

ตารางที่ 1 จำนวนเอ็มบริโอเริ่มต้น ความยายเฉลี่ยของเอ็มบริโอ จำนวนเอ็มบริโอที่พัฒนาเป็นต้นอ่อน และความ ยาวยอดเฉลี่ยของต้นอ่อนมะพร้าวกลุ่มต้นเตี้ย 6 สายพันธุ์ หลังจากการเลี้ยงในที่มืดนาน 2 เดือน

พันธุ์มะพร้าวกลุ่มต้นเตี้ย	จำนวนเอ็มบริโอเริ่มต้น (ชิ้น)	ความยาวเฉลี่ยของเอ็มบริโอ (เซนติเมตร)	จำนวนเอ็มบริโอที่พัฒนาเป็นต้นอ่อนเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร Y3 ที่มืด		ความยาวยอดเฉลี่ย (เซนติเมตร)
			จำนวนต้น	เปอร์เซ็นต์	
พวงร้อย	57	1.04	42	73.68	2.05
น้ำหวาน	52	0.84	27	51.92	1.76
น้ำหอม	60	0.79	26	43.33	1.64
ประทิว	50	0.70	36	72.00	1.57
ทุ่งเคล็ด	55	0.71	35	63.64	1.63
หมูสีเหลือง	60	0.69	18	30.00	1.96



ภาพที่ 2 ลักษณะของเอ็มบริโอมะพร้าวกลุ่มต้นเตี้ย 6 สายพันธุ์ ที่เลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร Y3 ในที่มืดนาน 2 เดือน

หลังจากย้ายต้นอ่อนมาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร Y3 ในที่สว่างนาน 2 เดือน เมื่อต้นอ่อนมีอายุ 4 เดือน (ภาพที่ 3) และมีใบ 1-2 ใบ ตัดจาว และเปลี่ยนถ่ายอาหาร โดยเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร Y3 (Eeuwens, 1976) เพื่อให้พัฒนาเป็นต้นอ่อน/ต้นกล้า พบว่า มะพร้าวสายพันธุ์พวงร้อย และปะทิวมีเปอร์เซ็นต์การพัฒนาเป็นต้นกล้าสูงกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ ทุ่งเคล็ด น้ำหอม น้ำหวาน และหมูสีเหลือง พบการพัฒนาเป็นต้นกล้าต่ำกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 2 และภาพที่ 4)

พวงร้อย

น้ำหวาน

น้ำหอม

ประทิว

ทุ่งเคล็ด

น้ำหอมเหลือง

ภาพที่ 3 ลักษณะของเอ็มบริโอมะพร้าวกลุ่มต้นเตี้ย 6 สายพันธุ์ ที่เลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร Y3 ในที่สว่างนาน 2 เดือน (อายุ 4 เดือน)

ตารางที่ 2 จำนวนเอ็มบริโอ และการพัฒนาเป็นต้นกล้าของมะพร้าวกลุ่มต้นเตี้ย 6 พันธุ์หลังจากการเลี้ยงในที่สว่าง 8 เดือน (อายุ 12 เดือน)

พันธุ์มะพร้าวกลุ่มต้นเตี้ย	จำนวนเอ็มบริโอเริ่มต้น (ชิ้น)	จำนวนเอ็มบริโอที่พัฒนาเป็นต้นกล้าอายุ 12 เดือน (ต้น)	% การพัฒนาเป็นต้นกล้า
พวงร้อย	57	39	68.42
น้ำหวาน	52	18	34.62
น้ำหอม	60	21	35.00
ประทิว	50	29	58.00
ทุ่งเคล็ด	55	26	47.27
หมูสีเหลือง	60	17	28.33

พวงร้อย

น้ำหวาน

น้ำหอม

ประทิว

ทุ่งเคล็ด

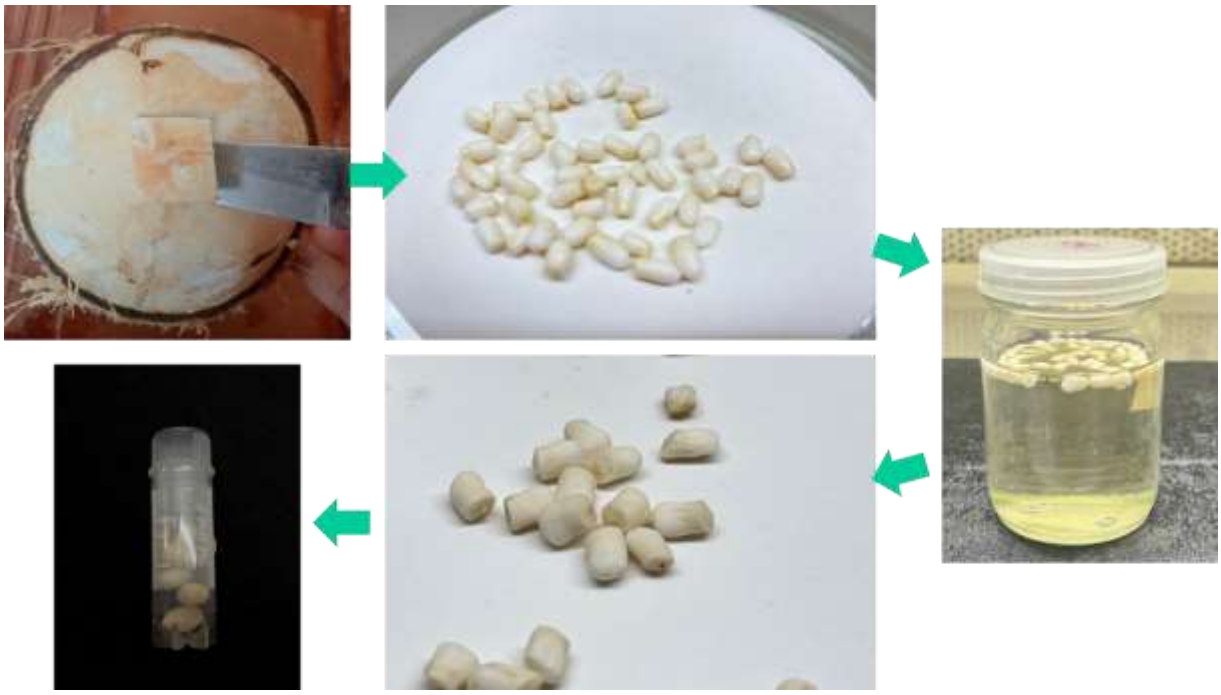
หมูสีเหลือง

ภาพที่ 4 การพัฒนาเป็นต้นกล้าของมะพร้าวกลุ่มต้นเตี้ย 6 สายพันธุ์ที่เลี้ยงบนอาหารสูตร Y3 ในที่สว่างนาน 8 เดือน (อายุ 12 เดือน)

เนื่องจากเอ็มบริโอของมะพร้าวส่วนใหญ่มีเปอร์เซ็นต์การงอกที่ต่ำ ส่งผลให้จำนวนต้นรอดตายสุทธิมีจำนวนต้นคงเหลือน้อย จึงได้ขอความอนุเคราะห์ผลพันธุ์มะพร้าวน้ำหอมทั้ง 6 สายพันธุ์ (น้ำหอม น้ำหวาน ทุ่งเคล็ด ปะทิว หมูสีเหลือง และพวงร้อย) จาก ศูนย์วิจัยพืชสวนชุมพรเพิ่มอีกสายพันธุ์ละ 20 ลูก เพื่อทำการทดลองซ้ำอีกครั้ง โดยเปลี่ยนสูตรอาหารที่เลี้ยงในที่มืด เป็นอาหารแข็งสูตร Y3 (Eeuwens, 1976) ที่เติม GA ความเข้มข้น 15 µM (อ้างอิงจากโครงการวิจัยประเมินศักยภาพการขยายพันธุ์เชื้อพันธุกรรมสายพันธุ์มะพร้าวน้ำหอมสีเขียวในสภาพปลอดเชื้อ) ขณะนี้อยู่ในขั้นตอนการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอมะพร้าวในที่มืด

ขั้นตอนที่ 2 การเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว (Cryopreservation)

การปรับสภาพ นำเอ็มบริโอวางบนจานแก้วเลี้ยงเชื้อและให้ชิ้นส่วนคายน้ำด้วยลมในตู้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นเวลา 4 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง และย้ายวางบนจานแก้วเลี้ยงเชื้อที่มีสารละลายกลูโคส 600 กรัมต่อลิตร และกลีเซอรอล 15 เปอร์เซ็นต์ และทิ้งให้ชิ้นส่วนคายน้ำ 11 13 15 และ 20 ชั่วโมง เมื่อครบตามกำหนดเวลา นำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร Y3 (-LN : ไม่เก็บในไนโตรเจนเหลว) และนำไปเก็บไว้ในcryotube และนำไปเก็บไว้ในถังไนโตรเจนเหลวเป็นเวลา 24 ชม. (+LN) หลังจากนั้นนำมา thaw up โดยจุ่มในน้ำร้อน 40 °C 2 นาที นำไปเพาะในอาหารสูตร Y3 และนำไปเพาะเลี้ยงที่ห้องอุณหภูมิ 25+ 2 °C (ภาพที่ 5)



ภาพที่ 5 ขั้นตอนการเตรียมและปรับสภาพเอ็มบริโอให้คายน้ำก่อนการเก็บรักษาในสภาพเยือกแข็ง

จากการปรับสภาพเอ็มบริโอและนำเอ็มบริโอมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร Y3 ของมะพร้าวกลุ่มต้นเตี้ย 6 สายพันธุ์ (พวงร้อย น้ำหวาน น้ำหอม ปะทิว ทุ่งเคล็ด และหมูสีเหลือง) เอ็มบริโอที่เพาะลี้ยงบนอาหาร Y3 ในที่มืด สามารพัฒนาเป็นยอดและรากได้เมื่อเลี้ยงบนอาหารเป็นเวลา 2 เดือน แต่การเจริญเติบโตช้ากว่าเอ็มบริโอที่ไม่ผ่านการปรับสภาพให้คายน้ำ เมื่อเอ็มบริโอพัฒนาเป็นต้นกล้า จึงทำการเปลี่ยนอาหารและย้ายออกที่สว่างให้แสง 9 ชั่วโมงต่อวัน เอ็มบริโอที่ผ่านการปรับสภาพอายุ 6 เดือน (ภาพที่ 6) การเจริญเติบโตใกล้เคียงกับเอ็มบริโอที่ไม่ผ่านการปรับสภาพที่อายุ 3-4 เดือน

สำหรับเอ็มบริโอที่ผ่านการปรับสภาพและเก็บรักษาในถังไนโตรเจนเหลวเป็นเวลา 24 ชม. (+LN) เมื่อนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร Y3 ของมะพร้าวกลุ่มต้นเตี้ยทั้ง 6 สายพันธุ์ เป็นเวลา 6 เดือน เอ็มบริโอมีการขยายขนาดเพียงเล็กน้อย แต่ไม่มีการพัฒนาเป็นยอดและราก (ภาพที่ 7) จากการทดลองข้างต้นจึงต้องทำการศึกษาต่อไป ในปี 2567

พวงร้อย -LN 0

พวงร้อย -LN 15

พวงร้อย -LN 17

พวงร้อย -LN 19

พวงร้อย -LN 24

น้ำหวาน -LN 0

น้ำหวาน -LN 15

น้ำหวาน -LN 17

น้ำหวาน -LN 19

น้ำหวาน -LN 24

น้ำหอม -LN 0

น้ำหอม -LN 15

น้ำหอม -LN 17

น้ำหอม -LN 19

น้ำหอม -LN 24

ปะทิว -LN 0

ปะทิว -LN 15

ปะทิว -LN 17

ปะทิว -LN 19

ปะทิว -LN 24

ภาพที่ 6 เอ็มบริโอที่ผ่านการปรับสภาพให้คายน้ำด้วยลมในตู้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นเวลา 4 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง และแช่สารละลายให้ชิ้นส่วยคายน้ำ 11 13 15 และ 20 ชั่วโมง ของมะพร้าวกลุ่มต้นเตี้ย 6 สายพันธุ์ (อายุ 6 เดือน)

ภาพที่ 7 เอ็มบริโอที่ผ่านการปรับสภาพ และเก็บรักษาในถังไนโตรเจนเหลว อายุ 6 เดือน

ขั้นตอนที่ 3 การวัดปริมาณน้ำ (Water content measurement)

ได้ทดลองเบื้องต้นตรวจสอบปริมาณน้ำในเอ็มบริโอ เป็นน้ำหนักสดเริ่มต้นและในระหว่างการปรับสภาพ โดยวัดน้ำหนักสดในชุดเอ็มบริโอ 10 ชิ้นส่วน ก่อนทำการปรับสภาพและหลังทำแห้ง ที่ระยะเวลา 0, 15, 17, 19 และ 24 ชั่วโมง และหลังจาก 24 ชั่วโมงนำไปอบให้แห้งด้วยเตาอบที่ 102 °C พบว่า ระยะเวลา pretreatment ที่เหมาะสมคือ 15 และ 17 ชั่วโมง (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 น้ำหนักเฉลี่ยเอ็มบริโอของมะพร้าวกลุ่มต้นเตี้ยทั้ง 6 สายพันธุ์ ในระยะเวลาต่างๆ

พันธุ์มะพร้าวกลุ่มต้นเตี้ย	ระยะเวลา pretreatment (ชั่วโมง)				
	0	15	17	19	24
พวงร้อย	81.92	40.16	41.60	36.26	37.85
น้ำหวาน	74.49	37.41	36.90	34.16	34.77
น้ำหอม	79.58	34.67	36.85	34.32	35.77
ประทิว	70.46	31.16	30.51	30.57	27.98
ทุ่งเคล็ด	80.04	59.69	33.08	33.01	31.91
หมูสีเหลือง	73.14	34.27	33.99	33.00	32.86

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.

Ara, H., U. Jaiswal and V.S. Jaiswal. 1999. Germination and plantlet regeneration from encapsulated somatic embryos of mango (Mangifera indica L.). Plant Cell Reports 19, 166-170.

Assy-Bah, B. and F. Engelmann. 1992. Cryopreservation of mature embryos of coconut (Cocos nucifera L.) and subsequent regeneration of plantlet. Cryo-Letters 13: 177-126.

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.

Channuntapipat, C., G. Collins, T. Bertozzi and M. Sedgley. 2000. Cryopreservation of in vitro

almond shoot tips by vitrification. J. of Hort. Sci. & Biotechnology 75 (2) 228-232.

Chin, H.F. and E.H. Roberts. 1980. Recalcitrant crop seeds. Tropical Press, Kuala Lumpur, Malaysia.

Engelmann, F. 1997. Importance of desiccation for the cryopreservation of recalcitrant seed and vegetatively propagated species. Plant Genetic Resources Newsletter 112, 9-18.

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.

Kumaunang, J., C.M. Protacio, O.P. Damasco, T.H. Borromeo and C.C. De Guzman. 2002. Cryopreservation of 'Laguna Tall' coconut (Cocos nucifera) embryos. Paper presented at the SEAMEO SEARCA 11 April 2002.

Pérez, R.M., L. Navarro and N. Duran-Vila. 1997. Cryopreservation and storage of embryogenic callus cultures of several citrus species and cultivars. Plant Cell Reports. 17, 44-49.

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.

Sakai, A., S. Kobeyashi and I. Oiyama. 1990. Cryopreservation of nucellar cells of navel orange (*Citrus sinensis* Osb. Var. brasiliensis Tanaka) by vitrification. Plant Cell Rep. 9: 30-33.

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.

Zhao, Y., Y. Wu, F. Engelmann, M. Zhou and S. Chen. 1999. Cryopreservation of apple in vitro shoot tips by the droplet freezing method. Cryo-Letters 20, 109-112.