ศึกษาเทคโนโลยีการเก็บรักษาเชื้อพันธุกรรมมะพร้าวในสภาพเยือกแข็ง

Research on technology of cryopreservation of aromatic coconut germplasm

อรทัย ธนัญชัย[1] สุภาภรณ์ สาชาติ[2] หยกทิพย์ สุดารีย์[1] ปาริฉัตร สังข์สะอาด[3]

[1] ศูนย์วิจัยพืชสวนชุมพร อ.สวี จ.ชุมพร 86130 [2] สถาบันวิจัยพืชสวน กรมวิชาการเกษตร ถนนพหลโยธิน แขวงลาดยาว เขตจตุจักร กรุงเทพฯ 10900 [3] สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร อ.ธัญบุรี จ.ปทุมธานี 12110

บทคัดย่อ

การศึกษาเทคโนโลยีการเก็บรักษาเชื้อพันธุกรรมมะพร้าวกลุ่มต้นเตี้ยพื้นเมืองของไทยในสภาพเยือกแข็ง มี 2 ขั้นตอน ขั้นตอนแรกเป็นการเพาะเลี้ยงต้นอ่อน (embryo) พบว่า มะพร้าวพันธุ์พวงร้อย น้ำหวาน ปะทิว และทุ่งเคล็ด เกิดยอดและรากระหว่าง 70–80 เปอร์เซ็นต์ ส่วนพันธุ์น้ำหอมและหมูสีเหลืองเกิดยอดและราก 45 และ 25 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ความยาวยอดอยู่ระหว่าง 1.61–2.21 เซนติเมตร การพัฒนาเป็นต้นกล้าหลังการเลี้ยงในอาหารสูตร Y3 ในที่สว่าง 10 เดือน พบว่า พวงร้อย มีการพัฒนาเป็นต้นกล้าสูงที่สุด 74.29 เปอร์เซ็นต์ ส่วนเหลือเกิดต้นกล้าน้อยว่า 50 เปอร์เซ็นต์ ส่วนขั้นตอนที่ 2 เป็นการปรับสภาพต้นอ่อนก่อนเก็บรักษาในสภาพเยือกแข็ง พบว่า ต้นอ่อนที่ปรับสภาพโดยทำให้คายน้ำ เมื่อนำกลับมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร Y3 ในที่มืด สามารถพัฒนาเป็นยอดและรากหลังเลี้ยงนาน 2 เดือน แต่มีการเจริญเติบโตช้ากว่าเอ็มบริโอที่ไม่ผ่านการปรับสภาพให้คายน้ำ ซึ่งสามารถชะลอการเจริญเติบโตได้นานถึง 3–4 เดือน การปรับสภาพต้นอ่อนโดยทำให้คายน้ำที่เหมาะสมสำหรับพันธุ์ พวงร้อย น้ำหวาน และน้ำหอม คือ 19 ชั่วโมง ส่วนพันธุ์ปะทิว ทุ่งเคล็ด และหมูสีเหลือง คือ 24 ชั่วโมง

บทนำ

การอนุรักษ์พันธุกรรมพืชในในสภาพปลอดเชื้อ โดยเฉพาะในสภาพเยือกแข็ง (Cryopreservation) เป็นวิธีการเก็บรักษาเชื้อพันธุ์ให้เก็บไว้ได้นาน ประหยัดพื้นที่ แรงงาน มีความเสี่ยงน้อยต่อการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมและการสูญพันธุ์ Cryopreservation) ได้สำเร็จในพืชหลายชนิด โดยเฉพาะพืชสวนที่ส่วนใหญ่มีเมล็ดประเภท recalcitrant seed เช่น พืชตระกูลส้ม (Sakai *et al.* 1990; Perez *et al.*, 1997), ส้มเปลือกหนา (Conzalez-Arnao *et al.*, 1998), แอปเปิ้ล (Zhao *et al.*, 1999), มะม่วง (Ara *et al.*, 1999), อัลมอน (Channuntapipat *et al.*, 2000) และมะพร้าว (Assy-Bah and Engelmann, 1992; Kumaunang *et al.*, 2002) เป็นต้น

มะพร้าวเป็นพืชอุตสาหกรรมที่สำคัญทั้งในแง่ของการเป็นพืชอาหารและพลังงาน การอนุรักษ์เชื้อพันธุ์มะพร้าวในปัจจุบันเป็นการเก็บรักษาไว้ในแปลงรวบรวมพันธุ์ในสภาพธรรมชาติเท่านั้น ซึ่งไม่สามารถควบคุมสภาพแวดล้อมได้ ต้องใช้พื้นที่และแรงงานในการดูแลจัดการมาก สิ้นเปลืองค่าใช้จ่ายสูง และเสี่ยงต่อการสูญจากโรคแมลงระบาดและภัยธรรมชาติอื่น ๆ ดังนั้นจึงมีความจำเป็นเร่งด่วนที่จะต้องมีการศึกษาหาเทคโนโลยีในการเก็บรักษาเชื้อพันธุ์ให้เก็บไว้ได้นาน ประหยัดพื้นที่ แรงงาน มีความเสี่ยงน้อยต่อการสูญพันธุ์ และพร้อมสำหรับการจะนำไปปลูกหรือใช้ประโยชน์อื่น ๆ

อุปกรณ์และวิธีการ

ผลมะพร้าวกลุ่มต้นเตี้ย จำนวน 6 สายพันธุ์ (น้ำหอม น้ำหวาน ทุ่งเคล็ด ปะทิว หมูสีเหลือง และพวงร้อย)

ขั้นตอนที่ 1 การเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอมะพร้าว

คัดเลือกต้น และเตรียมชิ้นส่วนพืชที่จะเพาะเลี้ยง โดยใช้เอ็มบริโอที่อายุ 10 เดือน ปอกเปลือกมะพร้าวออก ใช้มีดเปิดกะลามะพร้าว ใช้อุปกรณ์คว้านเนื้อมะพร้าวกะทิรอบเอ็มบริโอให้เป็นรูปสี่เหลี่ยม หลังจากนั้นนำเอ็มบริโอไปฟอกฆ่าเชื้อด้วยแอลกอฮอล์ 70 % ตามด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรท์ 10 % และล้างด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง และเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร Y3 เติมผงถ่านปริมาณ 2 g/L โดยนำไปวางบนชั้นในที่มืด ที่ห้องอุณหภูมิ 25±2 °C หลังจากนั้นเปลี่ยนอาหาร (sub-culture) นำเอ็มบริโอที่พัฒนาเลี้ยงในห้องที่มีแสงสว่างบนอาหารเหลวทุกเดือน

ขั้นตอนที่ 2 การเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว (Cryopreservation)

การปรับสภาพ นำเอ็มบริโอวางบนจานแก้วเลี้ยงเชื้อและให้ชิ้นส่วนคายน้ำด้วยลมในตู้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นเวลา 4 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง และย้ายวางบนจานแก้วเลี้ยงเชื้อที่มีสารละลายกลูโคส 600 g/L และกลีเซอรอล 15% และทิ้งให้ชิ้นส่วนคายน้ำ 11–20 ชั่วโมง นำไปเก็บไว้ใน cryotube และนำไปเก็บไว้ในถังไนโตรเจนเหลวเป็นเวลา 24 ชม. หลังจากนั้นนำมา thaw up โดยจุ่มในน้ำร้อน 40 °C 2 นาที นำไปเพาะในอาหารเหลว Y3 และนำไปเพาะเลี้ยงที่ห้องอุณหภูมิ 25±2 °C ให้แสง 9 ชม.ต่อวัน

ขั้นตอนที่ 3 การวัดปริมาณน้ำ (Water content measurement)

ตรวจสอบปริมาณน้ำในเอ็มบริโอ เป็นน้ำหนักสดเริ่มต้นและในระหว่างการปรับสภาพ โดยวัดน้ำหนักสดในชุดเอ็มบริโอ 10 ชิ้นส่วน ก่อนทำการปรับสภาพและหลังทำแห้ง ที่ระยะเวลา 0, 15, 17, 19 และ 24 ชั่วโมง และหลังจาก 24 ชั่วโมงนำไปอบให้แห้งด้วยเตาอบที่ 102 °C

Figure 5 Steps for preparing and the conditions were to dehydrate the embryos before storage in liquid nitrogen. (Cryopreservation)

ผลการทดลองและวิจารณ์

ขั้นตอนที่ 1 การเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอมะพร้าว

การเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอมะพร้าวน้ำหอมกลุ่มต้นเตี้ย จำนวน 6 สายพันธุ์ พบว่า มะพร้าวสายพันธุ์พวงร้อยมีขนาดความยาวเฉลี่ยของเอ็มบริโอสูงที่สุด คือ 1.04 ซม. รองลงมาคือ น้ำหวานน้ำหอม ทุ่งเคล็ด ปะทิว และหมูสีเหลือง มีขนาดความยาวเฉลี่ยของเอ็มบริโอ 0.84, 0.79, 0.71, 0.70 และ 0.69 ซม. ตามลำดับ (ภาพที่ 1) หลังนำเอ็มบริโอเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร Y3 ในที่มืดนาน 2 เดือน พบว่า เอ็มบริโอของมะพร้าวน้ำหอมสายพันธุ์พวงร้อย ปะทิว ทุ่งเคล็ด และน้ำหวาน มีการพัฒนาเป็นรากและยอดมากกว่า 50% ส่วนเอ็มบริโอของมะพร้าวสายพันธุ์น้ำหอม และหมูสีเหลือง มีการพัฒนาเป็นยอดและรากต่ำกว่า 50%(ตารางที่ 1) หลังนำเอ็มบริโอเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร Y3 ในที่มืดนาน 2 เดือน พบว่า มะพร้าวสายพันธุ์พวงร้อยมีความยาวยอดเฉลี่ยสูงที่สุด คือ 2.05 ซม. รองลงมา คือ หมูสีเหลือง น้ำหวาน น้ำหอม ทุ่งเคล็ด และปะทิว มีความยาวยอดเฉลี่ย 1.96, 1.76, 1.64, 1.63 และ 1.57 ซม. ตามลำดับ (ตารางที่ 1) 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% ในขณะที่ ทุ่งเคล็ด น้ำหอม น้ำหวาน และหมูสีเหลือง พบการพัฒนาเป็นต้นกล้าต่ำกว่า 50% (ตารางที่ 1 และภาพที่ 4) จากการศึกษาการพัฒนาเป็นต้นกล้าของมะพร้าวกลุ่มต้นเตี้ย 6 พันธุ์ เบื้องต้นมะพร้าวพันธุ์น้ำหวาน น้ำหอม ปะทิว ทุ่งเคล็ด และหมูสีเหลือง พบการพัฒนาเป็นต้นกล้าต่ำกว่า 50% อาจต้องมีการปรับสูตรอาหารให้เหมาะสมในขั้นตอนเพาะเลี้ยงในที่มืดและในที่สว่าง ซึ่งการเพิ่มฮอร์โมนจะช่วยให้การเกิดยอดและรากได้ดีกว่าการไม่เติมฮอร์โมน

ขั้นตอนที่ 2 การเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว (Cryopreservation)

การปรับสภาพ นำเอ็มบริโอวางบนจานแก้วเลี้ยงเชื้อและให้ชิ้นส่วนคายน้ำด้วยลมในตู้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นเวลา 4 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง และย้ายวางบนจานแก้วเลี้ยงเชื้อที่มีสารละลายกลูโคส และกลีเซอรอล ทิ้งให้ชิ้นส่วนคายน้ำ 11 13 15 และ 20 ชั่วโมง เมื่อครบตามกำหนดเวลานำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร Y3 (–LN : ไม่เก็บในไนโตรเจนเหลว) และนำไปเก็บไว้ใน cryotube และนำไปเก็บไว้ในถังไนโตรเจนเหลวเป็นเวลา 24 ชม. (+LN) หลังจากนั้นนำมา thaw up โดยจุ่มในน้ำร้อน 40°C 2 นาที นำไปเพาะในอาหารสูตร Y3 และนำไปเพาะเลี้ยงที่ห้องอุณหภูมิ 25 ± 2 °C (ภาพที่ 5) จากการปรับสภาพเอ็มบริโอและนำเอ็มบริโอมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร Y3 ของมะพร้าวกลุ่มต้นเตี้ย 6 สายพันธุ์ เอ็มบริโอที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร Y3 ในที่มืด สามารพัฒนาเป็นยอดและรากได้เมื่อเลี้ยงบนอาหารเป็นเวลา 2 เดือน แต่การเจริญเติบโตช้ากว่าเอ็มบริโอที่ไม่ผ่านการปรับสภาพให้คายน้ำ เมื่อเอ็มบริโอพัฒนาเป็นต้นกล้า จึงทำการเปลี่ยนอาหารและย้ายออกที่สว่างให้แสง 9 ชั่วโมงต่อวัน เอ็มบริโอที่ผ่านการปรับสภาพอายุ 6 เดือน (ภาพที่ 6) ซึ่งการปรับสภาพเอ็มบริโอโดยไม่แช่ลงในไนโตรเจนเหลวสามารถชะลอการการเจริญเติบโตได้ถึง 3–4 เดือน สำหรับเอ็มบริโอที่ผ่านการปรับสภาพและเก็บรักษาในถังไนโตรเจนเหลวเป็นเวลา 24 ชม. (+LN) เมื่อนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร Y3 ของมะพร้าวกลุ่มต้นเตี้ยทั้ง 6 สายพันธุ์ เป็นเวลา 6 เดือน เอ็มบริโอมีการขยายขนาดเพียงเล็กน้อย แต่ไม่มีการพัฒนาเป็นยอดและราก (ภาพที่ 7) จากการทดลองข้างต้นจึงต้องทำการศึกษาต่อไป ในปี 2567 การเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว การนำไปเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว และนำออกมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร Y3 เป็นเวลา 6 เดือน เอ็มบริโอยังไม่มีการพัฒนาจึงอาจต้องการการปรับเทคนิคและสูตรอาหารเพื่อกระตุ้นการพัฒนาของเอ็มบริโอต่อไป

ขั้นตอนที่ 3 การวัดปริมาณน้ำ (Water content measurement)

ได้ตรวจสอบปริมาณน้ำในเอ็มบริโอ 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) เนื่องจากหลักสำคัญของวิธีที่การเก็บรักษาพันธุกรรมพืชในสภาพเยือกแข็งต้องป้องกันไม่ให้เซลล์กลายเป็นผลึกน้ำแข็ง ซึ่งเป็นอันตรายแก่เซลล์ วิธีป้องกันไม่ให้เซลล์กลายเป็นผลึกน้ำแข็ง เพื่อให้สามารถเก็บรักษาเชื้อพันธุ์พืชในรูปของเซลล์เนื้อเยื่อในไนโตรเจนเหลว คือ การลดปริมาณน้ำภายในเซลล์ให้เหลือน้อยที่สุด

Table 1 Number of embryos start, Average embryo length, Number of embryos develop to seedlings on Y3 medium and average shoot length of the six varieties of aromatic dwarf coconuts after growing them in the dark for 2 months

Coconut dwarf varieties	Average embryo length (centimeters)	Embryos develop to seedlings on Y3 medium in dark 2 months (percent)	Average shoot length 2 months (centimeters)	Embryos develop to seedlings in bright light for 8 months (percent)
Phuang Roi green dwarf	1.04	73.68	2.05	68.42
Nam Whan green dwarf	0.84	51.92	1.76	34.62
Aromatic green dwarf	0.79	43.33	1.64	35.00
Pathiu green dwarf	0.70	72.00	1.57	58.00
Thung Khled green dwarf	0.71	63.64	1.63	47.27
Thai yellow dwarf	0.69	30.00	1.96	28.33

Table 2 Average embryo weight of the six varieties of aromatic dwarf coconuts of period

Coconut dwarf varieties	period pretreatment (hours)				
	0	15	17	19	24
Phuang Roi green dwarf	81.92	40.16	41.60	36.26	37.85
Nam Whan green dwarf	74.49	37.41	36.90	34.16	34.77
Aromatic green dwarf	79.58	34.67	36.85	34.32	35.77
Pathiu green dwarf	70.46	31.16	30.51	30.57	27.98
Thung Khled green dwarf	80.04	59.69	33.08	33.01	31.91
Thai yellow dwarf	73.14	34.27	33.99	33.00	32.86

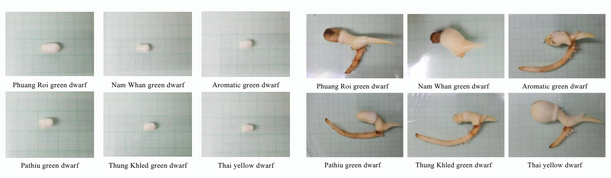

Figure 1 Characteristic of embryo six varieties of aromatic dwarf coconuts

Figure 2 Characteristic of embryo six varieties of aromatic dwarf coconuts cultured on a Y3 medium in the dark 2 months

Figure 3 Characteristic of seedlings six varieties of aromatic dwarf coconuts cultured on a Y3 medium in in bright light 2 months (seedlings age 2 months)

Figure 4 The development of seedlings of six varieties of dwarf coconuts after growing them in liquid Y3 medium in bright light for 8 months (seedlings age 10 months)

Figure 6 Conditioned embryos were pneumatically dehydrated in a tissue incubator for 4 h at room temperature. and soaked in the solution until the pieces dehydrated for 11, 13, 15, and 20 hours of six varieties of dwarf coconuts. (age 6 months)

Figure 7 Conditioned embryo and storage in liquid nitrogen (Cryopreservation) (age 6 months)

สรุปผลการทดลอง

ขั้นตอนที่ 1 การเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอมะพร้าวน้ำหอมกลุ่มต้นเตี้ย จำนวน 6 สายพันธุ์ ได้แก่ น้ำหอม น้ำหวาน ทุ่งเคล็ด ปะทิว หมูสีเหลือง และพวงร้อย พบว่า การพัฒนาเป็นต้นกล้าของมะพร้าวกลุ่มต้นเตี้ย 6 พันธุ์ หลังจากการเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร Y3 ในที่สว่าง 8 เดือน (อายุ 10 เดือน) มะพร้าวสายพันธุ์ปะทิว พวงร้อย และทุ่งเคล็ด มีการพัฒนาเป็นต้นกล้าสูงกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ ส่วนมะพร้าวสายพันธุ์น้ำหวาน น้ำหอม และหมูสีเหลือง พบการพัฒนาเป็นต้นกล้าต่ำกว่า 50 เปอร์เซ็นต์

สำหรับขั้นตอนที่ 2 การเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว (Cryopreservation) พบว่า การปรับสภาพโดยให้เอ็มบริโอคายน้ำและนำเอ็มบริโอมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร Y3 ในที่มืด สามารพัฒนาเป็นยอดและรากได้เมื่อเลี้ยงบนอาหารเป็นเวลา 2 เดือน แต่การเจริญเติบโตช้ากว่าเอ็มบริโอที่ไม่ผ่านการปรับสภาพให้คายน้ำ เอ็มบริโอที่ผ่านการปรับสภาพอายุ 6 เดือน ซึ่งการปรับสภาพเอ็มบริโอโดยไม่แช่ลงในไนโตรเจนเหลวสามารถชะลอการการเจริญเติบโตได้ถึง 3–4 เดือน สำหรับเอ็มบริโอที่ปรับสภาพและแช่ลงในไนโตรเจนเหลวควรมีการศึกษาเทคนิควิธีการกระตุ้นให้เกิดยอดและรากต่อไป

ส่วนขั้นตอนที่ 3 การวัดปริมาณน้ำ (Water content measurement) ปริมาณน้ำในเอ็มบริโอ เป็นน้ำหนักสดเริ่มต้นและในระหว่างการปรับสภาพ โดยวัดน้ำหนักสดในชุดเอ็มบริโอ 10 ชิ้นส่วน ก่อนทำการปรับสภาพและหลังทำแห้ง ที่ระยะเวลา 0, 15, 17, 19 และ 24 ชั่วโมง และหลังจาก 24 ชั่วโมงนำไปอบให้แห้งด้วยเตาอบที่ 102 °C พบว่า ระยะเวลา pretreatment ที่เหมาะสม ของพันธุ์ พวงร้อย น้ำหวาน และน้ำหอม คือ 19 ชั่วโมง พันธุ์ปะทิว ทุ่งเคล็ด และหมูสีเหลือง ระยะเวลา pretreatment ที่เหมาะสม คือ 24 ชั่วโมง

คำขอบคุณ

โครงการวิจัยและพัฒนาวิธีการชักนำรากและวัสดุปลูกสำหรับต้นมะพร้าวน้ำหอมที่ได้จากการ เพาะเลี้ยงเอ็มบริโอ เป็นโครงการภายใต้แผนการวิจัยและพัฒนามะพร้าวเพื่อเพิ่มมูลค่าทางการเกษตรและอุตสาหกรรมอย่างยั่งยืน ขอขอบคุณนางสุภัทรา เลิศวัฒนาเกียรติ ผู้เชี่ยวชาญด้านไม้ผล สถาบันวิจัยพืชสวน ที่ปรึกษาโครงการ นายเกริกชัย ธนรักษ์ ข้าราชการบำนาญ ที่ให้คำปรึกษาในการปฏิบัติงานด้วยดีเสมอมา เจ้าหน้าที่ของสถาบันวิจัยพืชสวน สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ ศูนย์วิจัยพืชสวนชุมพร ที่มีส่วนร่วมในการปฏิบัติงานวิจัยและให้การช่วยเหลือจนงานวิจัย ลุล่วงไปด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

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.

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.

Conzalez-Arnao, M.T., F. Engelmann, C. Urra, M. Morenza and A. Rios 1998. Cryopreservation of citrus apices using the encapsulation–dehydration technique. Cryo-Lctters 19: 177–182.

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. Physiologia Plantarum. 36(1): 23–28.

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.

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.

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.