



ศึกษาเทคโนโลยีการเก็บรักษาเชื้อพันธุกรรม *มะพร้าวกลุ่มต้นเตี้ย* ในสภาพเยือกแข็ง

Research on Technology of Cryopreservation of Dwarf Coconut Germplasm

นางสาวอรทัย รัตนชัย^{1*} นางสาวภรณ์ สาชาติ² ปาริฉัตร สังข์สะอาด³ และ หยกทิพย์ สุดาธิย์¹

¹ ศูนย์วิจัยพืชสวนชุมพร อ.สวี จ.ชุมพร 86130 ² สถาบันวิจัยพืชสวน กรมวิชาการเกษตร ถนนพหลโยธิน แขวงลาดยาว เขตจตุจักร กรุงเทพฯ 10900

³ สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร อ.วังน้อย จ.พระนครศรีอยุธยา 12110

Abstract

The research on technology of Cryopreservation of dwarf coconut germplasm, consisting of one experiment and three steps, was conducted from October 2021 to September 2024 at the Chumphon Horticultural Research Centre, Horticulture Research Institute, and Biotechnology Research and Development Office. The objective was to study the Cryopreservation methods for the germplasm of Thai native dwarf coconut cultivars, namely the Aromatic Green Dwarf, Nam Whan Green Dwarf, Thung Khled Green Dwarf, Pathiu Green Dwarf, Moo Sri Lueang, and Phuang Roi Green Dwarf, for sustainable breeding. In the embryo culture step, embryos aged 10 months. The results showed that Phuang Roi Green Dwarf had the highest average embryo length of 1.03 centimeters. The embryos were cultured on Y3 solid medium under dark conditions for 2 months. The results showed that the embryos of Phuang Roi Green Dwarf had the highest germination percentage (91%) and the longest average shoot length (2.06 cm). The average shoot length of the six varieties of aromatic dwarf coconut ranged from 0.68 to 1.03 centimeters.

The second step involved conditioning of dwarf coconut seedlings before cryogenic storage. The seedlings were dehydrated and regrowth on Y3 medium in the darkness (-LN). After two months, they developed shoots and roots but grew more slower than the control with dehydration-free (Steps one). Thier growth was slow growth by approximately 3-4 months. Embryos stored in liquid nitrogen (+LN) cannot develop further. The optimal dehydration time for Phuang Roi green dwarf, Nam Whan Green Dwarf, and Aromatic Green Dwarf varieties is 19 hours, while the Phathiu green dwarf, Thung Khled green

Keywords: embryo culture, embryo cryopreservation, coconut, germplasm, cryopreservation

บทนำ

ประเทศไทยเป็นผู้ส่งออกมะพร้าวอันดับ 1 มีพื้นที่ปลูกมะพร้าวเป็นอันดับ 7 ของโลก (กรมส่งเสริมการเกษตร, 2563) และด้วยสถานการณ์ปัจจุบันความนิยมการบริโภคน้ำมันมะพร้าวในรูปแบบของมะพร้าวผลสด และการแปรรูปน้ำมันมะพร้าวในผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ มีความต้องการมากขึ้น แต่ในช่วง 3 ปี ที่ผ่านมามีตลาดส่งออกของมะพร้าวลดลงอย่างต่อเนื่อง เนื่องจากประสบปัญหาภาวะแล้ง ส่งผลให้ผลผลิตที่เก็บเกี่ยวลดน้อยลงตามไปด้วย ศูนย์วิจัยพืชสวนชุมพร รับผิดชอบหลักในงานวิจัยพืชมะพร้าวทั้งด้านปรับปรุงพันธุ์ การขยายพันธุ์และเทคโนโลยีการผลิต รวมถึงงานรวบรวมและศึกษาเชื้อพันธุกรรมมะพร้าวสำหรับมะพร้าวอ่อน หรือกลุ่มพันธุ์ต้นเตี้ย (จุลพันธ์, 2549) ซึ่งเป็นการกักตุนพันธุกรรมพันธุ์มะพร้าวไว้เป็นทรัพยากรที่สำคัญของชาติและเป็นแหล่งวัตถุดิบในด้านวิจัยทางการเกษตร การอนุรักษ์พันธุกรรมพืชไว้ในสภาพปลอดเชื้อ โดยเฉพาะในสภาพเยือกแข็ง (Cryopreservation) เป็นวิธีการเก็บรักษาเชื้อพันธุ์ให้เก็บไว้ได้นาน ประหยัดพื้นที่ แรงงาน มีความเสี่ยงน้อยต่อการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมและการสูญเสีย การอนุรักษ์เชื้อพันธุ์มะพร้าวในปัจจุบันเป็นการเก็บรักษาไว้ในแปลงรวบรวมพันธุ์ในสภาพธรรมชาติเท่านั้น ซึ่งไม่สามารถควบคุมสภาพแวดล้อมได้ ต้องใช้พื้นที่และแรงงานในการดูแลจัดการมาก สิ้นเปลืองค่าใช้จ่ายสูง และเสี่ยงต่อการสูญเสียจากโรคแมลงระบาดและภัยธรรมชาติอื่น ๆ ดังนั้นจึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องมีการศึกษาหาเทคโนโลยีในการเก็บรักษาเชื้อพันธุ์ให้เก็บไว้ได้นาน ป้องกันการสูญเสีย และพร้อมสำหรับการจะนำไปใช้ประโยชน์

อุปกรณ์และวิธีการ

ขั้นตอนที่ 1 การเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอมะพร้าว

คัดเลือกต้น และเตรียมชิ้นส่วนพืชที่จะเพาะเลี้ยง โดยใช้เอ็มบริโอที่อายุ 10 เดือน ของมะพร้าวกลุ่มต้นเตี้ยทั้ง 6 สายพันธุ์ พอกยาเชื้อ และเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร Y3 (Eeuwens, 1976)



ขั้นตอนที่ 2 การเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว (Cryopreservation)

การปรับสภาพ นำเอ็มบริโอวางให้ชิ้นส่วนคายน้ำด้วยลม 4 ชั่วโมง และย้ายภาชนะที่มีน้ำตาลกลูโคส 60 % w/v และกลีเซอรอล 15 % กิ่งให้ชิ้นส่วนคายน้ำ 11-20 ชั่วโมง นำไปเก็บไว้ใน cryotube และนำไปเก็บไว้ในถังไนโตรเจนเหลวเป็นเวลา 24 ชม. หลังจากนั้นนำมา thaw up โดยจุ่มในน้ำอุณหภูมิ 40 °C 2 นาที นำไปเพาะในอาหารเหลว Y3



ขั้นตอนที่ 3 การวัดปริมาณน้ำ (Water content measurement)

ตรวจสอบปริมาณน้ำในเอ็มบริโอ เป็นน้ำหนักสดเริ่มต้นและในระหว่างการปรับสภาพ โดยวัดน้ำหนักสดก่อนทำการปรับสภาพและหลังทำแห้ง ที่ระยะเวลา 0, 15, 17, 19 และ 24 ชั่วโมง และหลังจาก 24 ชั่วโมงนำไปอบให้แห้งด้วยเตาอบที่ 102 °C



ผลการทดลอง

Table 1 The average of shoot length of the six varieties of aromatic dwarf coconuts on Y3 medium in the dark condition for 2 months Steps one.

Coconut dwarf varieties	Germination of Embryo (%)	Average of Shoot length (centimeters)
Phuang Roi green dwarf	91	2.06 ^a
Nam Whan green dwarf	86	1.74 ^a
Aromatic green dwarf	62	1.61 ^a
Pathiu green dwarf	78	1.62 ^a
Thung Khled green dwarf	77	1.57 ^a
Moo Sri Lueang	36	2.01 ^a
C.V. (%)		19.9

Mean followed by common letter are not significantly different at the 0.05 level by DMRT.

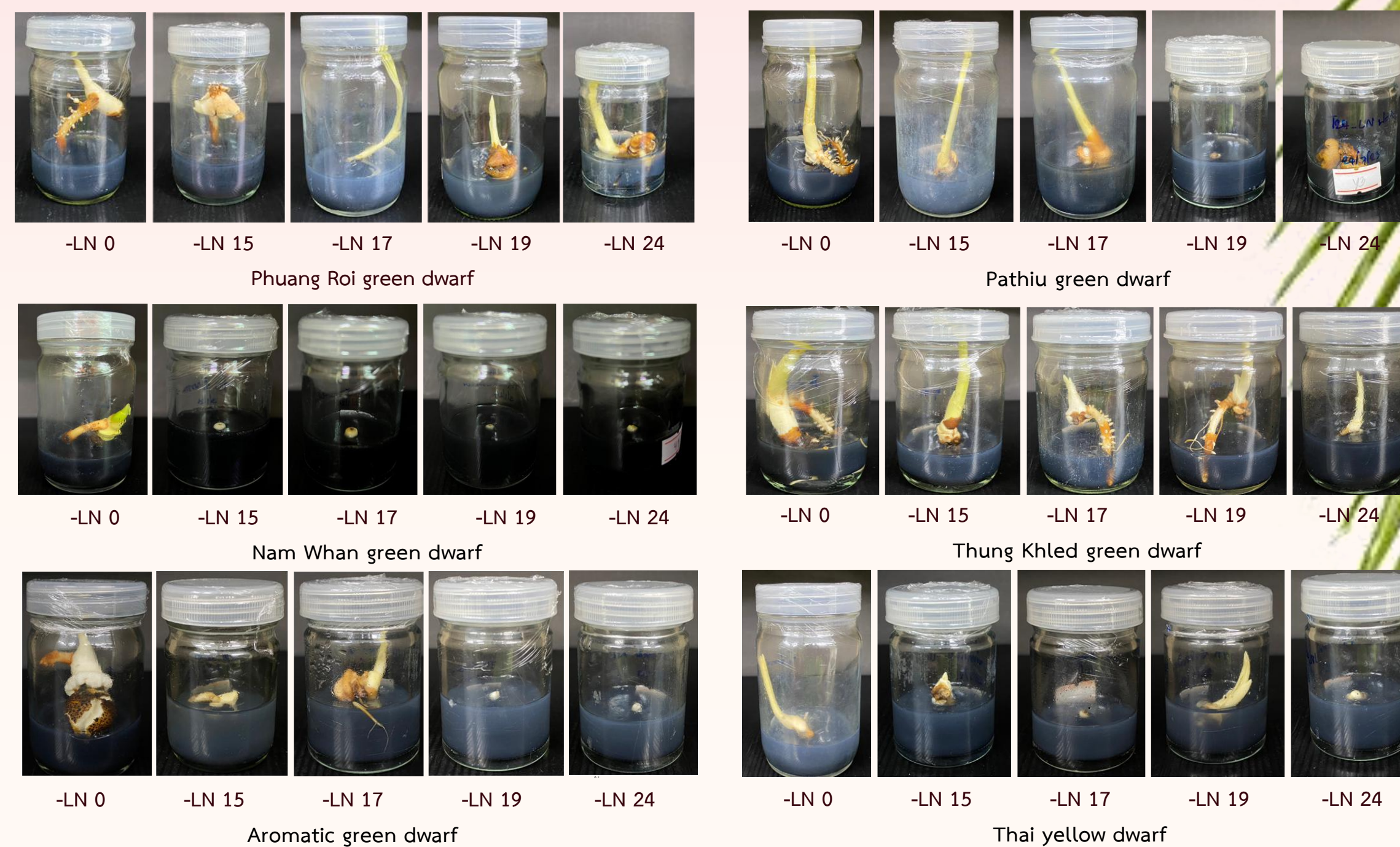


Figure 1 Conditioned embryos were pneumatically dehydrated in a tissue incubator for 4 h at room temperature, and soaked in the solution until the pieces dehydrated for 11, 13, 15, and 20 hours of six varieties of dwarf coconuts. (age 6 months) (-LN)

Table 2 Average embryo water content of the six varieties of 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
Moo Sri Lueang	73.14	34.27	33.99	33.00	32.86

สรุปและวิจารณ์ผล

การเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอมะพร้าว การเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอมะพร้าวน้ำหอมกลุ่มต้นเตี้ย จำนวน 6 สายพันธุ์ สายพันธุ์พวกนี้มีความยาวเฉลี่ยของเอ็มบริโอสูงที่สุดอยู่ที่ 1.03 เซนติเมตร มีเปอร์เซ็นต์การงอกของเอ็มบริโอสูงที่สุดที่ 91% และการพัฒนาเป็นต้นกล้าที่ 68% เนื่องด้วยลักษณะประจำพันธุ์ของมะพร้าวที่มีความแตกต่างกัน ส่งผลให้ค่าความยาวเฉลี่ยของเอ็มบริโอ เพอร์เซ็นต์การงอกของเอ็มบริโอ สอดคล้องกับ (Cueto *et al.*, 2012) ที่กล่าวว่าอายุผลของมะพร้าวจะส่งผลต่อขนาดของเอ็มบริโอ และสูตรอาหารที่เหมาะสมจะส่งผลต่อเปอร์เซ็นต์การงอกของเอ็มบริโอ อาจทำให้การขยายพันธุ์มะพร้าวสายพันธุ์ลูกผสมเพิ่มขึ้น **การเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว** มะพร้าวกลุ่มต้นเตี้ย 6 สายพันธุ์ เอ็มบริโอที่ผ่านการปรับสภาพ (-LN) สามารถชะลอการเจริญเติบโตในสภาพปลอดเชื้อได้ 3-4 เดือน ส่วนเอ็มบริโอที่ผ่านการเก็บในไนโตรเจนเหลว (+LN) เอ็มบริโอไม่สามารถพัฒนาต่อไป สำหรับเอ็มบริโอที่ผ่านการเก็บในไนโตรเจนไม่พัฒนา อาจเกิดจากการลดอุณหภูมิลงเร็วเกินไป น้ำในเซลล์จะเคลื่อนออกมาภายนอกไม่ทัน ส่งผลให้เซลล์เสียหายหรือสูญเสียชีวิตได้ ส่วนขั้นตอนการวัดปริมาณน้ำ ระยะเวลาปรับสภาพที่เหมาะสมของพันธุ์ พวกนี้ น้ำหวาน และน้ำหอม คือ 19 ชั่วโมง พันธุ์ปะกิว กุ้งเคล็ด และหมูสีเหลือง ระยะเวลาปรับสภาพ ที่เหมาะสม คือ 24 ชั่วโมง เนื่องจากหลักสำคัญของวิธีการเก็บรักษาพันธุ์กรรมพืชในสภาพเยือกแข็งต้องป้องกันไม่ให้เซลล์กลายเป็นผลึกน้ำแข็ง ซึ่งเป็นอันตรายแก่เซลล์วิธีป้องกันไม่ให้เซลล์กลายเป็นผลึกน้ำแข็ง เพื่อให้สามารถเก็บรักษาเชื้อพันธุ์พืชในรูปแบบของเซลล์เนื้อเยื่อในไนโตรเจนเหลว คือ การลดปริมาณน้ำภายในเซลล์ให้เหลือน้อยที่สุด

เอกสารอ้างอิง

กรมส่งเสริมการเกษตร. 2563. ระบบสารสนเทศการผลิตทางการเกษตร. กรมส่งเสริมการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.
สืบค้นเมื่อวันที่ 1 เมษายน 2563. จาก :http://www. production.doae.go.th.
จุลพันธ์ เพ็ชรพรรณ. 2549. มะพร้าวและการปรับปรุงพันธุ์มะพร้าวในประเทศไทย หน้า 1-100. ใน : รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2549. ศูนย์วิจัยพืชสวนชุมพร สถาบันวิจัยพืชสวน กรมวิชาการเกษตร. กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.
Cueto, C.A., Johnson, V.B., Engelmann, F., Kembu, A., Konan, J.L., Kouassi Kan, M., Rivera, R.L., Vidhanaarachchi, V., Bourdeix, R.F. and Weise, S.F. 2012. Technical Guidelines for the Safe Movement and Duplication of Coconut (*Cocos nucifera* L.) Germplasm Using Embryo Culture Transfer Protocols. COGENT: Washington, DC, USA; Bioversity International, Montpellier. France
Eeuwens, C. J. 1976. Mineral requirements for growth and callus initiation of tissue explants excised from mature coconut palms (*Cocos nucifera* L.) and cultured *in vitro*. Physiologia Plantarum. 36(1): 23-28.

คำขอบคุณ

ศึกษาเทคโนโลยีการเก็บรักษาเชื้อพันธุกรรมมะพร้าวในสภาพเยือกแข็ง เป็นโครงการภายใต้แผนการวิจัยและพัฒนามะพร้าวเพื่อเพิ่มมูลค่าทางการเกษตรและอุตสาหกรรมอย่างยั่งยืน ขอขอบคุณนางสุภัทรา เลิศวัฒนาเกียรติ ข้าราชการบำนาญ นายเกรียงชัย รัตนชัย ข้าราชการบำนาญ ที่ให้คำปรึกษาในการปฏิบัติงานด้วยดีเสมอมา รวมถึงพนักงานราชการ และเจ้าหน้าที่ของศูนย์วิจัยพืชสวนชุมพร สถาบันวิจัยพืชสวน สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ ที่มีส่วนร่วมในการปฏิบัติงานวิจัย และขอขอบคุณสำนักงานคณะกรรมการส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม (สกสว.) ที่สนับสนุนงบประมาณการวิจัยในครั้งนี้

