## รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด

-----------------------

1. **แผนงานวิจัย** : **วิจัยและพัฒนามะพร้าว**

2. **โครงการวิจัย** : **ปรับปรุงพันธุ์มะพร้าว**

   **กิจกรรม** : การขยายพันธุ์

3. **ชื่อการทดลอง (ภาษาไทย)** : การศึกษาการเกิดโซมาติคเอ็มบริโอ (somatic embryogenesis) ของมะพร้าวกะทิจากชิ้นส่วนช่อดอกอ่อน (Immature inflorescence)

   **ชื่อการทดลอง (ภาษาอังกฤษ)** : Study somatic embryogenesis induction by Immature inflorescence as Coconut Explant

4. **คณะผู้ดำเนินงาน**

   **หัวหน้าการทดลอง** : นางปริญดา หรูนหีม ศูนย์วิจัยพืชสวนชุมพร สถาบันวิจัยพืชสวน

   **ผู้ร่วมงาน** : นางสาวประภาพร ฉันทานุมัติ ศูนย์วิจัยพืชสวนชุมพร สถาบันวิจัยพืชสวน

   : นางสาวยุพิน กสินเกษมพงษ์ สถาบันวิจัยพืชสวน

**การศึกษาการเกิดโซมาติคเอ็มบริโอ (somatic embryogenesis) ของมะพร้าวกะทิจากชิ้นส่วนช่อดอกอ่อน (Immature inflorescence)**

**Study somatic embryogenesis induction by Immature inflorescence as Coconut Explant**

**ปริญดา หรูนหีม[1] ประภาพร ฉันทานุมัติ[1] และยุพิน กสินเกษมพงษ์[2]**

---

**บทคัดย่อ**

จากศึกษาการนำชิ้นส่วนช่อดอกอ่อน โดยใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตที่ต่างกันเพื่อชักนำการเกิดไซโกติคเอ็มบริโอ โดยดำเนินการทดลองที่ศูนย์วิจัยพืชสวนชุมพร และสวนผลิตพันธุ์มะพร้าวลูกผสมคันธุลี (ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรสุราษฎร์ธานี) ระหว่างเดือนตุลาคม 2554 ถึงเดือนกันยายน 2561 วางแผนการทดลองแบบ completely randomized design (CRD) มี 10 ซ้ำ มีขนาดของหน่วยทดลอง (experimental unit) 1 ขวด มี 7 กรรมวิธี ดังนี้ กรรมวิธีที่ 1 อาหารเหลวสูตร Eeuwens (Y3) ไม่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต กรรมวิธีที่ 2 อาหารเหลวสูตร Y3 + 2,4-D อัตรา 1 มิลลิกรัมต่อลิตร กรรมวิธีที่ 3 อาหารเหลวสูตร Y3 +2,4-D อัตรา 1 มิลลิกรัมต่อลิตร + IAA อัตรา 1 มิลลิกรัมต่อลิตร กรรมวิธีที่ 4 อาหารเหลวสูตร Y3 +2,4-D อัตรา 3 มิลลิกรัมต่อลิตร กรรมวิธีที่ 5 อาหารเหลวสูตร Y3 + 2,4-D อัตรา 3 มิลลิกรัมต่อลิตร+ IAA อัตรา 1 มิลลิกรัมต่อลิตร กรรมวิธีที่ 6 อาหารเหลวสูตร Y3 + 2,4-D อัตรา 6 มิลลิกรัมต่อลิตร และกรรมวิธีที่ 7 อาหารเหลวสูตร Y3 + 2,4-D อัตรา 6 มิลลิกรัมต่อลิตร+ IAA อัตรา 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ทุกกรรมวิธีเติมผงถ่าน (activated charcoal) จากนั้นนำไปเลี้ยงในที่มืดสนิท อุณหภูมิ 25-27 องศาเซลเซียส เลี้ยงเป็นเวลา 90 วัน โดยทำการเปลี่ยนอาหาร (sub-culture) ทุกๆ 1 เดือน ทำการเก็บข้อมูลจำนวนการเกิดแคลลัส การพัฒนายอดและจำนวนยอด การเกิดราก และความยาวราก ทุกๆ 1 เดือน จากการทดลองพบว่า การใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตที่แตกต่างกัน ในทุกกรรมวิธีชิ้นส่วนของช่อดอกอ่อนไม่สามารถพัฒนาไปเป็นแคลลัสได้

**Abstract**

Study capability of immature inflorescence as coconut explant for induce somatic embryogenesis was cultured on media, different plant bioregulator dose. The experiment started at Chumphon Horticultural Research Center and Cuntuli Coconut seed garden production at Surathani Agriculture Research and Development Center during August 2011 – October 2018. The experiment was completely randomized design (CRD) 7 methods and 10 replication per methods, experiment unit is 1 bottle. Use Eeuwens (Y3) formula media in this research. Characters by methods 1 dosing has not been plant bioregulator, methods 2 2,4-D rate 1 milligrams per liter, methods 3 2,4-D rate 1 milligrams per liter + IAA 1 milligrams per liter, methods 4 2,4-D rate 3 milligrams per liter, methods 5 2,4-D rate 3 milligrams per liter + IAA 1 milligrams per lite,r methods 6 2,4-D rate 6 milligrams per liter + IAA 1 milligrams per liter and final methods 2,4-D rate 6 milligrams per liter + IAA 1 milligrams per liter methods.

All method add activated charcoal culture under darkness. Culture room temperature 25-27 degree Celsius for a period of 90 days. Sub-culture every 1 month also observed number of callus number and development of shootlets ,development and length of root. The study found that the difference plant bioregulator dose in Eeuwens media cann't induce  coconut explant by immature inflorescence induce to callus development. That showed immature inflorescence cann't use for coconut explant

---

[1] ศูนย์วิจัยพืชสวนชุมพร อ. สวี จ. ชุมพร 86130 โทร 077-556073 โทรสาร 077-556026

[2] สถาบันวิจัยพืชสวน แขวงลาดยาว เขตจตุจักร กรุงเทพฯ 10900 โทร 0-2940-5484-5 ต่อ 116 โทรสาร. 02-5614667

## คำนำ

มะพร้าวเป็นพืชในตระกูลปาล์มมีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Cocos nucifera* L. มะพร้าวเป็นพืชผสมข้าม พันธุ์แต่ละต้นจึงไม่เป็นพันธุ์แท้ อาศัยหลักทางการผสมพันธุ์ที่เป็นไปโดยธรรมชาติ ทำให้เกิดความหลากหลายสายพันธุ์ และมีลักษณะประจำพันธุ์แต่ละสายพันธุ์ที่แตกต่างกัน (จุลพันธ์, 2548) สำหรับแหล่งปลูกมะพร้าวที่สำคัญของไทยอยู่ในพื้นที่จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ ชุมพร และสุราษฎร์ธานี

มะพร้าวกะทิเป็นมะพร้าวที่นิยมบริโภคเป็นของหวาน มีเนื้อหนาฟู อ่อนนุ่ม และหวานมัน อร่อย และมีราคาสูง มะพร้าวกะทิไม่ได้จัดเป็นพันธุ์มะพร้าวพันธุ์หนึ่ง ในธรรมชาติไม่มีต้นมะพร้าวกะทิพันธุ์แท้ แต่ผลมะพร้าวกะทิจะเกิดร่วมกับผลปกติในมะพร้าวธรรมดาทั่วไปบางต้นเท่านั้น และไม่ได้เกิดจากทุกผลในต้นนั้น มะพร้าวกะทิถูกควบคุมโดยยีนเพียงคู่เดียว และลักษณะกะทิเป็นลักษณะด้อย ส่วนลักษณะธรรมดาเป็นลักษณะข่ม ต้นมะพร้าวที่ให้ลูกเป็นกะทิอยู่ในสภาพ Heterozygote (อุทัย และคณะ 2536) โดยอาหารที่สะสมในมะพร้าวกะทิมีส่วนประกอบหลักเป็นกาแลคโตแมนแนน ซึ่งเป็นคาร์โบไฮเดรต แทนที่จะเป็นน้ำมันมะพร้าว เช่นในมะพร้าวห้าวทั่วๆไป (อุทัย, 2547) ต้นมะพร้าวลูกผสมกะทิ ถ้าปลูกในที่ปลอดจากมะพร้าวพันธุ์ธรรมดา ผลผลิตที่ได้จะเป็นไปตามกฎของเมนเดล จะได้ผลมะพร้าวเป็นกะทิเพียง 25% แต่ในสภาพโดยทั่วไปที่พบต้นมะพร้าวลูกผสมกะทิจะขึ้นปะปนกับมะพร้าวธรรมดา จึงทำให้ผลผลิตจะเป็นกะทิ ในบางทลายและปริมาณผลที่เป็นกะทิจะได้ไม่ถึง 25 %

การเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอ (embryo culture) เป็นเทคนิคที่ปฏิบัติกันในหมู่นักปรับปรุงพันธุ์มาเป็นเวลานานประโยชน์ที่สำคัญคือ การช่วยเอ็มบริโอของพืชที่ผสมข้าม species หรือข้าม genus แล้วกลายเป็นหมันให้เจริญเติบโตเป็นต้นที่สมบูรณ์ ต่อมาได้นำเทคนิคนี้มาใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้อย่างแพร่หลาย ในปี 1974-1975 de Guzman ชาวฟิลิปปินส์ ได้ทำการทดลองเพาะเลี้ยงมะพร้าวกะทิ (macapuno) ได้เป็นผลสำเร็จเนื่องจากมะพร้าวกะทิ ไม่สามารถงอกได้ในธรรมชาติ เพราะเนื้อมะพร้าว (Solid endosperm) อ่อนนุ่ม และเน่าเสียเร็ว ทำให้เอ็มบริโอตายก่อนเจริญเป็นต้นและราก ในปี 2525 del Rosario และ de Guzman พบว่ามะพร้าวกะทิที่เพาะเลี้ยงโดย embryo culture เมื่อตกผลแล้วจะได้ผลตรงตามสายพันธุ์ของมะพร้าวกะทิ การใช้เทคนิค embryo rescue ของมะพร้าวกะทิ ซึ่งเป็นพันธุ์เฉพาะในประเทศฟิลิปินส์ (Blake, 1995) ประสบความสำเร็จในการเพาะเลี้ยง zygotic embryos ในห้องปฏิบัติการ

หลายแห่ง (Ashburner, 1991; Assy-Bah, 1989; Karunaratne *et al.*, 2009; Rillo และ Paloma, 1990) ทำให้เอ็มบริโอของมะพร้าวมีการเจริญเติบโตเป็นต้น. สมชาย และคณะ (2552) ประสบความสำเร็จในการทำ embryo culture กับมะพร้าวกะทิ และปัจจุบันใช้เป็นระบบการผลิตมะพร้าวกะทิพันธุ์ดีของกรมวิชาการเกษตร แต่ประสิทธิภาพการผลิตต้นกล้าที่ได้ยังต่ำ ประมาณ 20 เปอร์เซ็นต์ Sisunandar *et al.* (2017) พัฒนาเทคนิคใหม่โดยผ่าเอ็มบริโอ ทำให้ได้ต้นกล้ามะพร้าวกะทิ 2 ต้น และศึกษาขั้นตอนการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอในส่วนการออกรากของต้นอ่อนทำให้ใช้ระยะเวลาสั้นลง การเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอไม่ใช่วิธีการขยายพันธุ์ที่ทำให้ได้พืชหลายๆต้น โดยยังคงลักษณะพันธุ์เดิม (clonal propagation) แต่เทคนิคการเพาะเลี้ยง zygotic embryo เป็นประโยชน์ในการทดลองต่อยอดไปยังการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อให้เกิด somatic embryogenesis Hornung (1995) ประสบความสำเร็จในการพัฒนา somatic embryogenesis โดยเพาะเลี้ยงจากชิ้นส่วนยอดแรกเกิด (plumule) ซึ่งตัดมาจาก zygotic embryos ที่เจริญเต็มที่

การทำให้เกิด somatic embryogenesis เป็นเทคนิคที่มีศักยภาพมากในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมะพร้าว อย่างไรก็ตามปัญหาหลักของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในมะพร้าว คือการเกิดเนื้อเยื่อสีน้ำตาลเนื่องจากการตอบสนองต่อสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช (plant growth regulators หรือ PGR) เช่น auxins (2,4-Dichlorophenoxyacetic acid หรือ 2,4-D) Buffard-Morel *et al.* (1995) ประสบความสำเร็จในการชักนำให้เกิด somatic callus ในมะพร้าว จากการเพาะเนื้อเยื่อจากชิ้นส่วนใบอ่อนที่ยังไม่สังเคราะห์แสงและช่อดอกอ่อน จากนั้นจึงทำการศึกษาการเกิด embryogenesis การเพิ่มจำนวนแคลลัสต่อในอาหารที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมโดยเลือกชิ้นส่วนแคลลัสที่มีแนวโน้มจะเจริญเป็นเอ็มบริโอได้ การลดระดับความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโต (2,4-D) จะทำให้แคลลัสเจริญไปเป็นเอ็มบริโอได้ดี แต่การลดระดับความเข้มข้นลงอย่างกะทันหันจะทำให้เอ็มบริโอไม่สมบูรณ์และมีลักษณะผิดแปลกไป ส่วนมากแล้วความผิดปกติของเอ็มบริโอจะมาจากระดับสารควบคุมการเจริญเติบโตที่ใช้ไม่มีความสมดุลเช่นการเติม 6-benzyladenine (BA) ซึ่งเป็นสารควบคุมการเจริญโตแบบ exogenous cytokinin ในปี 2011 Mayra *et al.* ศึกษาการใช้ embryo ของมะพร้าวพันธุ์ Pacific Tall จากแหล่งที่มีสภาพแวดล้อมต่างกัน 2 แหล่ง มาทดสอบการชักนำการเกิดแคลลัส บนอาหาร semisolid Y3 ร่วมกับ 2,4-D ความเข้มข้น 650 µM และการใช้ Benzyl adenine (BA) ความเข้มข้น 0, 25, 100 และ 200 µM พบว่า เปอร์เซ็นต์การเกิด embryogenic callus ไม่แตกต่างกันที่ความเข้มข้นระดับต่างๆ โดย BA ที่ความเข้มข้น 100 µM จะทำให้การเกิดแคลลัสสูงสุด 50% ในระยะเวลา 150 วัน การชักนำให้เกิดยอดใหม่จากเอ็มบริโอทำได้โดยการเลี้ยงในอาหารที่ปราศจาก auxin แต่จะใช้ 1-Naphthaleneacetic acid (NAA) ในการชักนำให้เกิดราก พบว่ามีการเกิดลักษณะของการสะสมแป้งซึ่งเป็นลักษณะบ่งบอกว่าเป็นขั้วที่จะเกิดเอ็มบริโอซึ่งมีลักษณะเหมือนกันกับที่พบคัพภะการทดลองของ Buffard-Morel *et al.* (1995) ได้สรุปว่า แคลลัสที่สามารถเจริญไปเป็นเอ็มบริโอได้นั้นมีจำนวนต่ำมากเนื่องจากการเพิ่มจำนวนเกิดขึ้นน้อย การเพิ่มปริมาณ embryogenic callus จะทำให้ได้เอ็มบริโอที่ต้องการในจำนวนมากที่สามารถเจริญไปพร้อมกันได้ในเวลาเดียวกัน ดังนั้นการทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อสร้างเทคโนโลยีในการขยายพันธุ์มะพร้าวกะทิในสภาพปลอดเชื้อ เพื่อให้ได้ต้นกล้าพันธุ์มะพร้าวกะทิให้เพียงพอกับความต้องการ

## วิธีดำเนินการ

**การทดลองที่ 2.2** การศึกษาการเกิดโซมาติคเอ็มบริโอ (somatic embryogenesis) ของมะพร้าวกะทิจากชิ้นส่วนช่อดอกอ่อน (Immature inflorescence)

**<u>อุปกรณ์</u>**

1. ช่อดอกอ่อนมะพร้าวกะทิ
2. สารเคมีต่างๆ ที่ใช้ในการเตรียมอาหารสูตร Eeuwens (Y3)
3. อุปกรณ์และเครื่องมือวิทยาศาสตร์ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เช่น คีมคีบ (forcept), มีดผ่าตัด, จานเพาะเลี้ยง (Petri dish)
4. สารควบคุมการเจริญเติบโต เช่น 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), Indole-3-acetic acid (IAA)
5. โรงเรือนอนุบาล

<u>วิธีการ</u>

วางแผนการทดลองแบบ completely randomized design (CRD) มี 10 ซ้ำ มีขนาดของหน่วยทดลอง (experimental unit) 1 ขวด 7 กรรมวิธีทดลอง ได้แก่

กรรมวิธีที่ 1 ไม่มีการเติมสารควบคุมการเจริญเติบโต
กรรมวิธีที่ 2 2,4-D อัตรา 1 มิลลิกรัมต่อลิตร
กรรมวิธีที่ 3 2,4-D อัตรา 1 มิลลิกรัมต่อลิตร + IAA อัตรา 1 มิลลิกรัมต่อลิตร
กรรมวิธีที่ 4 2,4-D อัตรา 3 มิลลิกรัมต่อลิตร
กรรมวิธีที่ 5 2,4-D อัตรา 3 มิลลิกรัมต่อลิตร+ IAA อัตรา 1 มิลลิกรัมต่อลิตร
กรรมวิธีที่ 6 2,4-D อัตรา 6 มิลลิกรัมต่อลิตร
กรรมวิธีที่ 7 2,4-D อัตรา 6 มิลลิกรัมต่อลิตร+ IAA อัตรา 1 มิลลิกรัมต่อลิตร

เพาะเลี้ยงดอกอ่อนในระยะเยาว์วัย (Immature embryos) ของมะพร้าวกะทิ บนอาหารเหลวสูตร Eeuwens (Y3) (pH 5.6) ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตตามกรรมวิธีทดลอง และผงถ่าน (activated charcoal) นำไปเลี้ยงในที่มืดสนิท อุณหภูมิ 25-27 องศาเซลเซียส เลี้ยงเป็นเวลา 90 วัน โดยทำการเปลี่ยนอาหาร (sub-culture) ทุกๆ 1 เดือน

**การบันทึกข้อมูล**

1) จำนวนการเกิดแคลลัส หรือเอมบริออยด์ (ให้คะแนนระดับ 0-4)
2) การพัฒนายอดและจำนวนยอด การเกิดราก ความยาวราก
   โดยเก็บข้อมูลทุกๆ 30 วัน

ระดับคะแนนการเกิดแคลลัส ให้คะแนน ดังนี้

4 = เกิดแคลลัสมากที่สุด (81-100%)
3 = เกิดแคลลัสมาก (51-80%)
2 = เกิดแคลลัสปานกลาง (21-50%)

1 = เกิดแคลลัสน้อย (1-20%)

0 = ไม่เกิดแคลลัส

**เวลาและสถานที่**

ระยะเวลาทำการทดลอง เดือนตุลาคม 2554 – เดือนกันยายน 2561

สถานที่ทำการทดลอง ศูนย์วิจัยพืชสวนชุมพร และสวนผลิตพันธุ์มะพร้าวลูกผสมคันธุลี (ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรสุราษฎร์ธานี

**ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง**

**2. การศึกษาการเกิดโซมาติคเอ็มบริโอ (somatic embryogenesis) ของมะพร้าวกะทิจากชิ้นส่วนช่อดอกอ่อน (Immature inflorescence)**

การนำชิ้นส่วนช่อดอกอ่อน โดยใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตที่ต่างกันเพื่อชักนำการเกิดไซโกติคเอ็มบริโอ พบว่า การใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตที่แตกต่างกัน ในทุกกรรมวิธี ชิ้นส่วนของช่อดอกอ่อนไม่สามารถพัฒนาไปเป็นแคลลัสได้ จึงทำให้ให้ไม่สามารถนำแคลลัสชักนำให้เกิดไซโกติคเอ็มบริโอได้ โดยพบว่าช่อดอกอ่อนเปลี่ยนเปนสีน้ำตาลหลังจากเลี้ยงได 6 สัปดาห์ และเมื่ออายุ 8 สัปดาห์ ช่อดอกอ่อนกลายเปนสีน้ำตาลเขมในที่สุด

**ภาพที่ 2** ช่อดอกอ่อนเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลหลังจากเลี้ยง 6 สัปดาห์

**สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ**

การนำชิ้นส่วนช่อดอกอ่อนของมะพร้าวกะทิ เพื่อชักนำให้เกิดไซโกติคเอ็มบริโอ พบว่าการใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตที่แตกต่างกันไม่สามารถชักนำและพัฒนาเป็นแคลลัสได้ การใช้อาหารเหลวสูตร Eeuwens (Y3) ร่วมกับสารควบคุมการเจริญเติบโต คือ 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) และ Indole-3-acetic acid (IAA) ไม่สามารถชักนำและพัฒนาเป็นแคลลัสได้ จึงควรปรับปรุงสูตรอาหารและวิธีการเพื่อให้เหมาะสมต่อไป

## การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

1. ได้สูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดโซมาติคเอมบริโอของมะพร้าวกะทิ
2. สามารถผลิตต้นกล้าพันธุ์มะพร้าวกะทิเพียงพอกับความต้องการของเกษตรกรต่อไป

## เอกสารอ้างอิง


จุลพันธ์ เพ็ชรพิรุณ. 2548. การปรับปรุงพันธุ์และคัดเลือกพันธุ์มะพร้าวน้ำหอม. ใน รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2548. ศูนย์วิจัยพืชสวนชุมพร สถาบันวิจัยพืชสวน กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพฯ.

สมชาย วัฒนโยธิน. 2552. มะพร้าวลูกผสมกะทิ สุดยอดผลผลิตวิจัยไทย กรมวิชาการเกษตรทำได้เทคโนโลยีชาวบ้าน. น.50-58 ปีที่ 21 ฉบับที่ 549:15 กรกฎาคม 2552.

อุทัย จารณศรี, จิตติ รัตนเพียรชัย, นภดล ไกรพานนท์ และฐิติภาส ชิตโชติ. 2536. การทำสวนมะพร้าวกะทิพันธุ์แท้ขนาดใหญ่. เอกสารประกอบการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัย เกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 31. หน้า 25-31.

อุทัย จารณศรี. 2547. วิวัฒนาการการท้าสวนมะพร้าวกะทิการค้า. วารสารเครือข่ายพืชปลูกพื้นเมืองไทย. ฉบับที่ 2. หน้า 16-18.

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.

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.

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.