NGHIÊN CỨU MỘT SỐ YẾU TỐ NUÔI CẤY *IN VITRO* ẢNH HƯỞNG TỚI QUÁ TRÌNH NẢY MẦM PHÔI DỪA SÁP

Võ Minh Hải[1], Phạm Thị Phương Thuý[2], Trần Thị Thảo Đang[2]
Lê Vĩnh Thúc[3], Nguyễn Bảo Toàn[4]

TÓM TẮT

Dừa sáp là một giống dừa đột biến tự nhiên, có đặc tính khác với dừa thường là phôi dừa sáp không nảy mầm trong điều kiện bình thường mà chỉ nảy mầm trong môi trường *in vitro*. Nhằm nâng cao tỷ lệ nảy mầm phôi dừa sáp đã tiến hành 6 thí nghiệm nghiên cứu các yếu tố ảnh hưởng đến tỷ lệ nảy mầm phôi dừa sáp. Kết quả nghiên cứu đã xác định, môi trường Y3 cải tiến (Y3 chuẩn bổ sung 0,2 ppm NAA và 2 ppm BAP) cho tỷ lệ nảy mầm tốt nhất đạt 88,9%, dừa sáp cho tỷ lệ nảy mầm tốt nhất từ 12,5 - 13 tháng tuổi, phôi dừa nuôi trong điều kiện tối hoàn toàn (0 lux) cho hiệu quả tốt hơn chiếu sáng. Môi trường Y3 cải tiến không bổ sung agar (môi trường lỏng) giúp phôi nảy mầm nhanh hơn bắt đầu từ tuần thứ 3 và đối với các phôi không nảy mầm sau 30 - 45 nuôi phôi trong môi trường Y3 cải tiến, khi tiếp tục áp dụng kỹ thuật cắt màng phôi giúp các phôi tiếp tục nảy mầm thêm 66,7%. Khuyến nghị ứng dụng kết quả nghiên cứu này vào trong sản xuất cây giống dừa Sáp cấy phôi tại Việt Nam.

Từ khóa: *Phôi dừa sáp, tỷ lệ nảy mầm phôi dừa Sáp, yếu tố ảnh hưởng.*

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Dừa sáp là một giống dừa đột biến tự nhiên với nội nhũ rắn tăng sinh quá mức, được phát hiện ở Laguna, Philippines và ở Java, Indonesia (Copeland, 1931), nội nhũ rắn rất dày và mịn gần như lấp đầy toàn bộ khoảng trống trong trái, thường có ít hoặc không có nước bên trong (Gonzales, 1914). Do dừa sáp có kiểu gen đồng hợp tử lặn (mm) không tồn tại trong tự nhiên và phải được nuôi cấy thông qua nuôi cấy mô (De Guzman *et al.*, 1964 và De Guzman and Manuel, 1977). Công nghệ nuôi cấy phôi được De Guzman phát triển thành công vào những năm 1960 sau một thập kỷ thử nghiệm (De Guzman *et al.*, 1964). Công nghệ De Guzman đã được cải tiến tại Trung tâm Nghiên cứu Dừa của Philippines (De Guzman và Manuel, 1977) và mở đường cho việc sản xuất thương mại cây giống phôi ở Philippines (Rillo, 1999). Ở Sri Lanka, các nhà khoa học đã nhân giống dừa sáp bằng phương pháp nuôi cấy phôi cho thấy tỷ lệ phôi chuyển đổi sang cây con là khá thấp, chỉ có khoảng 10 - 20% phôi được chuyển thành cây con (Deva Kumar *et al.,* 2014). Ở Việt Nam, giai đoạn 2001-2005, tỷ lệ thành công của quy trình nuôi cấy phôi đạt 19,2%, thời gian phát triển hoàn thiện từ phôi hữu tính thành cây đủ tiêu chuẩn xuất vườn là 24 tháng (Trần Thị Ngọc Thảo, 2010). Năm 2010 – 2014, Viện Nghiên cứu Dầu và cây có dầu tiếp tục nghiên cứu cải tiến qui trình công nghệ nuôi cấy phôi ở giai đoạn phòng thí nghiệm và vườn ươm nhằm gia tăng tỷ lệ thành công qui trình đạt 47,3%, thời gian phát triển hoàn thiện từ phôi thành cây đủ tiêu chuẩn xuất vườn là 12 – 14 tháng (Ngô Thị Kiều Dương, 2013). Theo Eeuwens (1976) và Rillo và Paloma (1992) phôi dừa sáp có thể phát triển tốt trong môi trường Y3 mà không bổ sung chất điều hòa sinh trưởng thực vật. Một nghiên cứu khác ở Việt Nam cũng cho kết quả tương tự (Trương Quốc Ánh và ctv., 2012). Bên cạnh đó, nghiên cứu của Erlinda (1997) cho thấy có thể rút ngắn thời gian nảy mầm của phôi xuống còn 3 tuần. Thí nghiệm được thực hiện nhằm *"Nghiên cứu một số yếu tố nuôi cấy in vitro ảnh hưởng tới quá trình nảy mầm phôi dừa Sáp".*

2. PHƯƠNG TIỆN VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Phương tiện và điều kiện thí nghiệm

2.1.1. Địa điểm nghiên cứu

Thí nghiệm được bố trí trong phòng thí nghiệm với nhiệt độ phòng 28 ± 2^0C. Ánh sáng 0 lux (che tối) cho giai đoạn phôi nảy mầm và chiếu sáng với cường độ 2.000 – 2.500 lux giai đoạn tạo rễ và phát triển thân lá trước khi ra vườn ươm.

2.1.2. Chuẩn bị phôi dừa Sáp thí nghiệm

Thí nghiệm 2 phôi dừa có độ tuổi 11-13 tháng (tính từ lúc đậu trái đến thu hoạch), các nghiệm thức

[1] NCS Khoa học cây trồng khóa 2017, Khoa Nông nghiệp, Trường Đại học Cần Thơ
[2] Khoa Nông nghiệp – Thủy sản, Trường Đại học Trà Vinh
[3] Khoa Nông nghiệp, Trường Đại học Cần Thơ
[4] Hội Sinh vật cảnh thành phố Cần Thơ
Email: haitvu@gmail.com

còn lại (thí nghiệm 1, 3, 4, 5) phôi dừa có độ tuổi từ 12,5 -13 tháng được lấy ra khỏi trái bằng máy khoan sử dụng mũi khoan kính đường kính 27 mm. Phôi sau khi lấy khỏi trái có lớp cơm dừa bao xung quanh và phần gáo dừa bên trên sẽ được cho vào beaker (cốc) thủy tinh đã được khử trùng sạch. Giai đoạn tách vỏ dừa, khoan lấy phôi được thực hiện trong điều kiện phòng thí nghiệm thông thường. Phôi dừa đựng trong beaker sau tách khỏi trái được mang vào tủ cấy vô trùng. Khử trùng phôi dừa bằng cách cho cồn 70% vào beaker chứa phôi dừa sao cho cồn 70% ngập tất cả các phôi. Thời gian khử trùng 15 phút. Rót phần cồn sau khử trùng vào cốc khác. Dùng nhíp y tế gắp phôi dừa ra đĩa petri vô trùng, dùng dao mổ tách bỏ phần gáo dừa và cơm dừa bao quanh phôi, cho phôi vào ống nghiệm chứa môi trường thí nghiệm đã được hấp khử trùng trước đó.

2.1.3. Môi trường nuôi cấy phôi

Bao gồm các môi trường thí nghiệm có bổ sung 60 g/l succrose, 1 g/l than hoạt tính, điều chỉnh ở pH = 5,6, ống nghiệm chứa 25 ml môi trường và mang hấp khử trùng ở nhiệt độ 121^{0}C thời gian 20 phút.

- Công thức tính tỷ lệ nảy mầm:

$$\%\ \text{phôi nảy mầm} = \frac{\text{tổng phôi nảy mầm}}{\text{tổng phôi thí nghiệm}}$$

2.2. Phương pháp thí nghiệm

- *Thí nghiệm 1:* Ảnh hưởng của các loại môi trường đến tỷ lệ nảy mầm phôi dừa Sáp.

Thí nghiệm được bố trí theo thể thức hoàn toàn ngẫu nhiên gồm 5 nghiệm thức, 3 lần lặp lại với mỗi lần lặp lại là 3 phôi.

Nghiệm thức (NT) 1 (đối chứng): Môi trường Y3 chuẩn.

NT 2: Môi trường Y3 chuẩn + 2 mg/l BAP + 0,2 mg/l NAA (Y3 cải tiến).

NT 3: Môi trường MS.

NT 4: Môi trường MS cải tiến.

NT 5: Môi trường VW (Vacin và Went, 1949).

Bảng 1. Thành phần môi trường thí nghiệm

Thành phần môi trường		Nồng độ (mg/l)			
		Y3 chuẩn (Eeuwens, 1976)	MS	MS cải tiến	VW (Vacin và Went, 1949)
Đa lượng	NH_4Cl	535			
	NH_4NO_3	-	1.650	-	-
	$(NH_4)_2SO_4$	-	-	493	500
	KNO_3	2.020	1.900	530	524
	$MgSO_4,7H_2O$	247	180,5	247	122
	$CaCl_2.2H_2O$	294	332	-	-
	$Ca(PO_4)_2$	-	-	201,6	-
	$Ca(NO_3)_2$	-	-	-	200
	KCl	1.492	-	-	-
	$NaH_2PO_4.2H_2O$	312	-	-	-
	KH_2PO_4	-	170	250,4	250
Vi lượng	KI	8,3	0,83	0,83	0,83
	H_3BO_3	3,1	6,2	6,18	6,2
	$MnSO_4.7H_2O$	11,2	16,9	-	-
	$MnSO_4.4H_2O$	-	-	30,3	16,9
	$ZnSO_4.7H_2O$	7,2	8,6	7,01	8,6
	$CuCl_2.5H_2O$	0,25	0,025	0,25	-
	$CuSO_4.5H_2O$	-	-	-	0,025
	$CoCl_2.6H_2O$	0,24	,025	-	0,025
	$Co(NO_2)_2$	-	-	0,02	-
	$Na_2MoO_4.2H_2O$	0,24	0,25	-	0,25
	$NiCl.6H_2O$	0,024	-	-	-
	$(NH4)_2M_2O_7.4H_2O$	-	-	0,41	-

Vitamins và Amino acid	Pyridoxine HCl	0,05	0,5	0,5	0,5
	Thiamine HCl	0,05	0,1	0,1	0,1
	Nicotinic acid	0,05	5,05	5,05	5,05
	Ca-D-pantothenate	0,05	-	-	-
	Biotin	0,05	-	-	-
	Inositol	100	100	100	100
	Folic acid	0,05	-	-	-
	Glycine	1	2	2	2
Fe-EDTA	$FeSO_4.7H_2O$	41,7	27,8	27,8	27,8
	Na_2EDTA	55,8	37,2	37,2	37,2

Chỉ tiêu theo dõi: Tỉ lệ nảy mầm của các phôi sau 1, 2, 3, 4 và 5 tuần nuôi phôi.

- *Thí nghiệm 2:* Ảnh hưởng của tuổi dừa thu hoạch đến tỷ lệ nảy mầm phôi dừa Sáp.

Thí nghiệm được bố trí theo thể thức hoàn toàn ngẫu nhiên gồm 5 nghiệm thức, 3 lần lặp lại với mỗi lần lặp lại là 5 phôi.

NT 1: Dừa được hái khi 11 tháng tuổi.

NT 2: Dừa được hái khi 11,5 tháng tuổi.

NT 3: Dừa được hái khi 12 tháng tuổi.

NT 4: Dừa được hái khi 12,5 tháng tuổi.

NT 5: Dừa được hái khi 13 tháng tuổi

Chuẩn bị môi trường nuôi cấy cho các nghiệm thức: Là môi trường Y3 cải tiến được trình bày ở thí nghiệm 1.

Chỉ tiêu theo dõi: Tỉ lệ nảy mầm của các phôi dừa sau 1, 2, 3, 4 và 5 tuần nuôi phôi.

- *Thí nghiệm 3:* Ảnh hưởng của ánh sáng lên độ nảy mầm của phôi dừa.

Thí nghiệm được bố trí theo thể thức hoàn toàn ngẫu nhiên gồm 2 nghiệm thức, 3 lần lặp lại với mỗi lần lặp lại là 7 mầm.

- NT 1: Phôi dừa nuôi trong phòng có chiếu sáng với cường độ 2.000 - 2.500 lux.

- NT 2: Phôi dừa nuôi trong điều kiện tối hoàn toàn (0 lux).

Chuẩn bị môi trường nuôi cấy cho các nghiệm thức: Là môi trường Y3 cải tiến được trình bày ở thí nghiệm 1.

Chỉ tiêu theo dõi: Tỉ lệ nảy mầm của các phôi sau 1, 2, 3, 4 và 5 tuần nuôi phôi.

- *Thí nghiệm 4:* Ảnh hưởng của dạng môi trường lên tỉ lệ nảy mầm của phôi dừa sáp.

Thí nghiệm được bố trí theo thể thức hoàn toàn ngẫu nhiên gồm 2 nghiệm thức, 3 lần lặp lại với mỗi lần lặp lại là 6 phôi trên môi trường Y3 cải tiến với 2 dạng.

NT 1: Môi trường lỏng.

NT 2: Môi trường đặc.

Chuẩn bị môi trường nuôi cấy cho các nghiệm thức: môi trường Y3 cải tiến được trình bày ở thí nghiệm 1 và nghiệm thức 2: Môi trường nghiệm thức 2 có bổ sung 6 gam agar/lít môi trường.

Chỉ tiêu theo dõi: Tỉ lệ nảy mầm của các phôi sau 1, 2, 3, 4 và 5 tuần nuôi phôi.

- *Thí nghiệm 5:* Ảnh hưởng của nồng độ chất điều hòa sinh trưởng (BAP: Benzylaminopurine) lên tỷ lệ nảy mầm của phôi dừa Sáp.

Bố trí thí nghiệm: Thí nghiệm được bố trí theo thể thức hoàn toàn ngẫu nhiên 1 nhân tố (BAP: Benzylaminopurine) gồm 4 nghiệm thức, 3 lần lặp lại với mỗi lần lặp lại là 6 phôi được cấy vào mỗi ống nghiệm chứa nồng độ BAP tương ứng với các nghiệm thức sau:

NT 1 (Đối chứng): Y3 chuẩn + 0,2 ppm NAA.

NT 2 (Y3 cải tiến): Y3 chuẩn + 2 ppm BAP + 0,2 ppm NAA.

NT 3: Y3 chuẩn + 5 ppm BAP + 0,2 ppm NAA.

NT 4: Y3 chuẩn + 10 ppm BAP + 0,2 ppm NAA.

Chuẩn bị môi trường nuôi cấy cho các nghiệm thức: Là môi trường Y3 chuẩn và NAA được trình bày ở thí nghiệm 1 kết hợp bổ sung BAP theo các nồng độ thí nghiệm.

Chỉ tiêu theo dõi: Tỉ lệ nảy mầm của các phôi sau: 1, 2, 3, 4 và 5 tuần nuôi phôi.

- *Thí nghiệm 6:* Ảnh hưởng của tách màng bao phôi lên tỷ lệ nảy mầm của phôi dừa Sáp.

Bố trí thí nghiệm: Thí nghiệm được bố trí theo thể thức khối hoàn toàn ngẫu nhiên gồm 5 nghiệm thức, 3 lần lặp lại với mỗi lần lặp lại là 5 phôi.

NT 1: Môi trường Y3 cải tiến (đối chứng).

NT 2: Môi trường Y3 cải tiến + cắt màng bao phôi.

NT 3: Môi trường Y3 cải tiến + 1 ppm Kinetin.

NT 4: Môi trường Y3 cải tiến + 2 ppm Kinetin.

NT 5: Môi trường Y3 cải tiến + 3 ppm Kinetin.

Chuẩn bị mẫu thí nghiệm: mẫu thí nghiệm là các phôi đã nuôi được 6 tuần trong môi trường Y3 cải tiến nhưng chưa nảy mầm.

Chuẩn bị môi trường nuôi cấy cho các nghiệm thức: Là môi trường Y3 cải tiến (môi trường đặc) được trình bày ở thí nghiệm 1 được bổ sung vào môi trường tương ứng nồng độ với nghiệm thức 3, 4 và 5.

Chỉ tiêu theo dõi: Tỷ lệ (%) phôi nảy mầm sau 1, 2, 3, 4, 5 tuần nuôi phôi dừa Sáp.

2.3. Phương pháp xử lý số liệu

Các chỉ tiêu theo dõi được lưu giữ và tính toán trên phần mềm Excel và phân tích thống kê bằng phần mềm Minitab version 16.

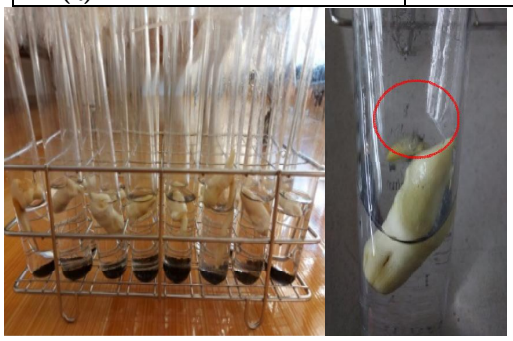
3. KẾT QUẢ THẢO LUẬN

3.1. Ảnh hưởng của các loại môi trường đến tỷ lệ nảy mầm phôi dừa Sáp

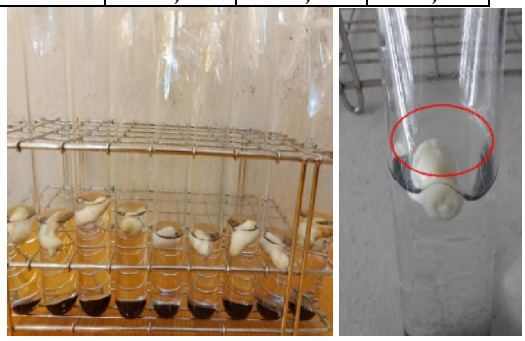
Kết quả trình bày ở bảng 2 cho thấy, sau 4 tuần thì ở môi trường Y3 chuẩn có tỷ lệ phôi dừa nảy mầm đạt 20,2% và đạt cao nhất ở tuần thứ 5 là 44,4%. Nghiệm thức có tỷ lệ nảy mầm cao nhất là NT 2 (Y3 cải tiến), có 55,6% phôi nảy mầm sau 3 tuần và đạt cao nhất là 88,9% ở tuần thứ 5. Các phôi nảy mầm thường có đặc điểm là phôi lớn nhanh, nhẵn và có đỉnh sinh trưởng thường có màu ửng hồng ở đầu phôi. Riêng 3 nghiệm thức còn lại, phôi có dấu hiện không phát triển, ở đầu phôi có vết đen và không nảy mầm đến tuần thứ 5.

Bảng 2. Tỷ lệ nảy mầm phôi dừa Sáp

Nghiệm thức	Tỷ lệ nảy mầm (%)				
	Sau 1 tuần	Sau 2 tuần	Sau 3 tuần	Sau 4 tuần	Sau 5 tuần
NT 1: Môi trường Y3 chuẩn	0	0	20,2b	33,3b	44,4b
NT 2: Môi trường Y3 cải tiến	0	0	55,6a	88,9a	88,9a
NT 3: Môi trường MS	0	0	0 c	0 c	0 c
NT 4: Môi trường MS cải tiến	0	0	0 c	0 c	0 c
NT 5: Môi trường VW	0	0	0 c	0 c	0 c
CV(%)			19,3	18,4	18,4



Hình 1. Sự hình thành mầm phôi ở nghiệm thức 2 (môi trường Y3 cải tiến) sau 5 tuần



Hình 2. Các phôi không nảy mầm ở nghiệm thức 4 (MS cải tiến) sau 5 tuần

Kết quả nghiên cứu này cho thấy, việc bổ sung thêm 2 ppm BAP và 0,2 ppm NAA làm tăng tỷ lệ nảy mầm lên gấp đôi và có khác biệt có ý nghĩa thống kê.

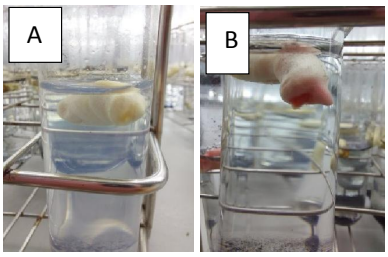
3.2. Ảnh hưởng của tuổi dừa thu hoạch đến tỷ lệ nảy mầm phôi dừa Sáp

Kết quả ở bảng 3 cho thấy, nghiệm thức 4 và 5 (12,5 và 13 tháng tuổi) có tỷ lệ nảy mầm cao nhất đạt 86,7%. Tuy nhiên, nghiệm thức 5 có tỷ lệ nhiễm nấm bệnh cao nhất lên đến 13,3%. Ở giai đoạn tuổi dừa này, khi vỏ trái đã già và chuyển sang màu nâu sẫm thì cuống trái đã rụng và đen lại có sự xâm nhập của nấm nên tỷ lệ nhiễm khá cao. Qua đó cho thấy, trái chọn vô mẫu có độ tuổi 12,5 tháng là thích hợp nhất so với kết quả của Trương Quốc Ánh *và ctv.* (2012) 12 tháng tuổi.

Bảng 3. Ảnh hưởng của tuổi dừa thu hoạch đến tỷ lệ nảy mầm phôi dừa Sáp

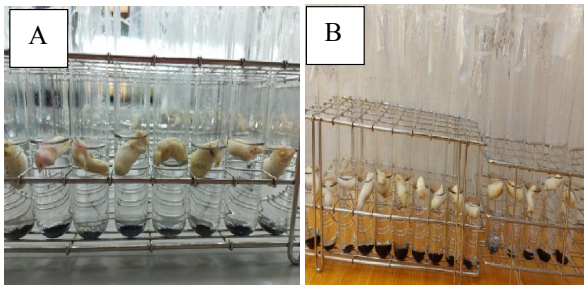
Nghiệm thức	Tỷ lệ nảy mầm (%)				
	Sau 1 tuần	Sau 2 tuần	Sau 3 tuần	Sau 4 tuần	Sau 5 tuần
NT 1: Dừa được hái khi 11 tháng tuổi	0	0	$33,3^{c}$	40^{c}	40^{b}
NT 2: Dừa được hái khi 11,5 tháng tuổi	0	0	40^{b}	$53,3^{b}$	$53,3^{ab}$
NT 3: Dừa được hái khi 12 tháng tuổi	0	0	40^{b}	$53,3^{b}$	$66,7^{ab}$
NT 4: Dừa được hái khi 12,5 tháng tuổi	0	0	$73,3^{a}$	$73,3^{ab}$	$86,7^{a}$
NT 5: Dừa được hái khi 13 tháng tuổi	0	0	$66,7^{ab}$	80^{a}	$86,7^{a}$
CV(%)			14,5	22,3	20,8

Trong khi nghiên cứu của chúng tôi sử dụng trái 12-12,5 tháng tuổi, tỷ lệ trái sử dụng để lấy phôi đạt trên 85%.



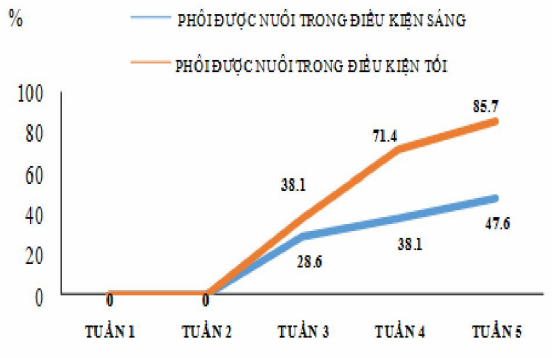
Hình 3. Phôi nảy mầm ở cả 2 nghiệm thức 4 (dừa 12,5 tháng tuổi) và 5 (dừa 13 tháng tuổi) nhưng tỷ lệ nhiễm nấm bệnh ở nghiệm thức 5 khá cao (A)

3.3. Ảnh hưởng của ánh sáng lên độ nảy mầm của phôi dừa



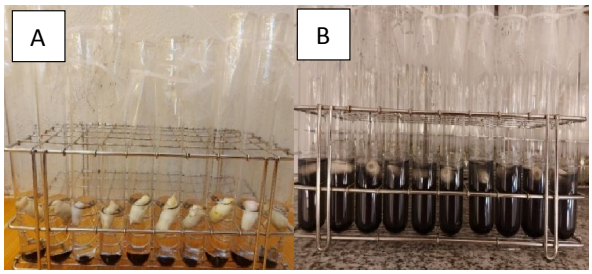
Hình 4. Tỷ lệ nảy mầm của các phôi được nuôi trong điều kiện tối hoàn toàn (A) cao hơn so với các phôi được nuôi có chiếu sáng (B)

Kết quả ở hình 5 cho thấy, các phôi bắt đầu nảy mầm ở tuần thứ 3 sau khi cấy ở tỷ lệ 28,6%, đối với nghiệm thức có chiếu sáng và 38,1% đối với nghiệm thức không chiếu sáng (tối), đến tuần thứ 4, nghiệm thức chiếu sáng đạt 38,1% và không chiếu sáng đạt 71,4%. Ở tuần thứ 5, nghiệm thức chiếu sáng đạt 47,6% và không chiếu sáng đạt 85,7%. Qua kết quả cho thấy, phôi dừa sáp thích hợp nảy mầm trong điều kiện bóng tối đạt 85,7% sau 5 tuần và có khác biệt có ý nghĩa thống kê so với chiếu đèn phôi nảy mầm chỉ đạt 47,6% và có khác biệt ý nghĩa thống kê với t = 0,035.



Hình 5. Ảnh hưởng của ánh sáng đến sự nảy mầm của phôi dừa sáp

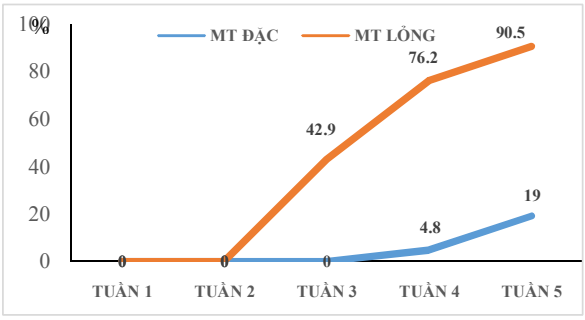
3.4. Ảnh hưởng của dạng môi trường lên tỉ lệ nảy mầm của phôi dừa sáp



Hình 6. Tỷ lệ nảy mầm của phôi dừa sáp trong môi trường lỏng cao hơn so với môi trường đặc (A. Nghiệm thức 1; B. Nghiệm thức 2)

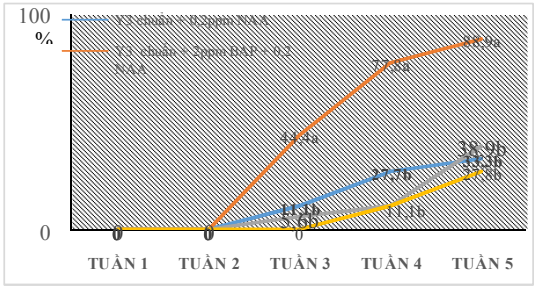
Từ kết quả nghiên cứu cho thấy môi trường lỏng thích hợp cho giai đoạn tiền nảy mầm của phôi dừa sáp với tỷ lệ nảy mầm đạt 90% trong khi đó môi trường đặc chỉ đạt 19% và có khác biệt ý nghĩa thống kê với t = -0,620. Kết quả này phù hợp với các nghiên cứu trước đó (Hình 7).

Môi trường lỏng đã được sửa đổi từ môi trường nảy mầm dạng đặc bằng cách loại trừ chất keo (Assy Bah, 1986).

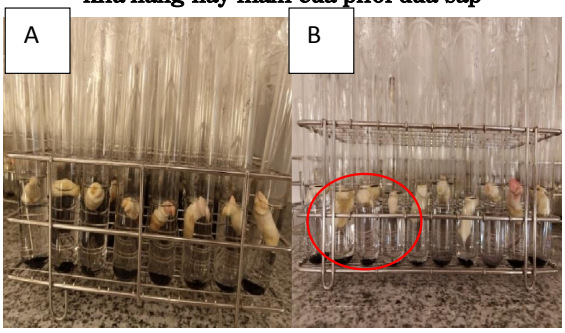


Hình 7. Ảnh hưởng của dạng môi trường lên khả năng nảy mầm của phôi dừa sáp

3.5. Ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng (BAP: Benzylaminopurine) lên khả năng nảy mầm của phôi



Hình 8. Ảnh hưởng của chất điều hoà sinh trưởng lên khả năng nảy mầm của phôi dừa sáp

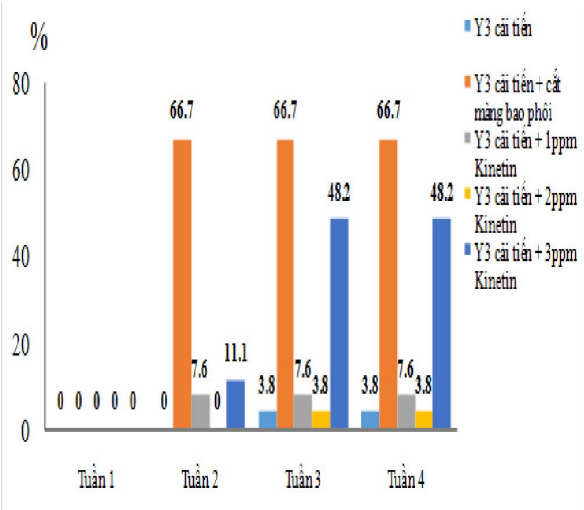


Hình 9. Sự hình thành chồi ở nghiệm thức 2 (Y3 chuẩn + 2 ppm BAP + 0,2 ppm NAA) (A) và không hình thành chồi ở nghiệm thức 4 (Y3 chuẩn + 10 ppm BAP + 0,2 ppm NAA) (B)

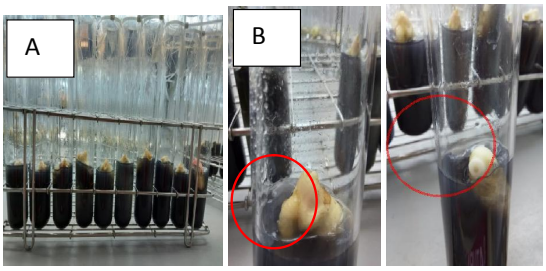
Kết quả nghiên cứu được trình bày ở hình 8 cho thấy, nghiệm thức Y3 + 2 ppm BAP giai đoạn hình thành chồi cho hiệu quả tốt nhất đạt 88,9% và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với các nghiệm thức còn lại. Trong khi đó, một nghiên cứu khác của Trương Quốc Ánh (2012) cho thấy nồng độ BAP thích hợp cho giai đoạn này là 0,5 ppm.

3.6. Ảnh hưởng của tách màng bao phôi lên tỷ lệ nảy mầm của phôi dừa sáp

Kết quả trình bày ở hình 10 cho thấy, sau 1 tuần quan sát, các phôi đều chưa có dấu hiệu nảy mầm cho đến tuần thứ 2, nghiệm thức 2 (tách màng bao phôi) có tỉ lệ nảy mầm cao nhất đạt 66,67% và duy trì đến tuần thứ 4 mà không có thêm phôi nảy mầm. Ở nghiệm thức 3 (Y3 cải tiến + 1 ppm Kinetin), chỉ có 7,55% phôi nảy mầm và duy trì cho đến hết 4 tuần. Nghiệm thức 4 (Y3 cải tiến + 2 ppm Kinetin), tỉ lệ nảy mầm rất thấp chỉ đạt 3,78% và nảy mầm sau 3 tuần. Nghiệm thức 5 (Y3 cải tiến + 3 ppm Kinetin) có tỉ lệ nảy mầm cao, 48,2% sau 4 tuần. Riêng nghiệm thức đối chứng không có phôi nảy mầm sau 4 tuần.



Hình 10. Biểu đồ tỉ lệ nảy chồi của các nghiệm thức qua các tuần thí nghiệm



Hình 11. Sự hình thành chồi của nghiệm thức 2 (Y3 cải tiến + cắt màng bao phôi) (A,B) và phôi không hình thành chồi ở nghiệm thức 4 (Y3 cải tiến + 1 ppm Kinetin)

Theo Cueto *et al.* (2012) các phôi sau 2 – 3 tháng không nảy mầm thì tách màng bao phôi để phôi phát triển tốt hơn. Tuy có độ nảy mầm cao nhưng ở nghiệm thức 2 (Y3 cải tiến kết hợp với cắt màng bao

phôi) có tỷ lệ nhiễm cao nhất trong các nghiệm thức 11,11% và các nghiệm thức còn lại không có phôi nào nhiễm.

4. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

4.1. Kết luận

Kết quả nghiên cứu đã xác định, môi trường Y3 cải tiến (Y3 chuẩn bổ sung 0,2 ppm NAA và 2 ppm BAP) cho tỷ lệ nảy mầm tốt nhất đạt 88,9% ở phôi dừa sáp 12,5 - 13 tháng tuổi; phôi dừa nuôi trong điều kiện tối hoàn toàn (0 lux) cho hiệu quả tốt hơn chiếu sáng.

Môi trường Y3 cải tiến không bổ sung agar (môi trường lỏng) giúp phôi nảy mầm nhanh hơn bắt đầu từ tuần thứ 3 và đối với các phôi không nảy mầm sau 30 - 45 nuôi phôi trong môi trường Y3 cải tiến, khi tiếp tục áp dụng kỹ thuật cắt màng phôi giúp các phôi tiếp tục nảy mầm thêm 66,7%.

4.2. Kiến nghị

Tiếp tục nghiên cứu các yếu tố nuôi cấy *invitro* ảnh hưởng khả năng tạo rễ, lá thứ cấp, thời gian và quy trình thuần dưỡng khi chuyển cây ra vườn ươm.

Khuyến nghị ứng dụng kết quả nghiên cứu này vào trong sản xuất cây giống dừa sáp cấy phôi tại Việt Nam.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Ngô Thị Kiều Dương, 2013. Báo cáo kết quả thực hiện nhiệm vụ "Khai thác và phát triển nguồn gen cây dừa".

2. Assy – Bah, B., 1986. *In vitro* culture of coconut zygotic embryos. *Oléagineux 47, 321-328.*

3. Cueto, C.A., V.B. Johnson, F. Engelmann, A. Kembu, J.L. Konan, M. Kouassi Kan, R.L. Rivera, V. Vidhanaarachchi, R. Bourdeix, and S.F. Weise, 2012. Technical guidelines for the safe movement and duplication of Coconut (Cocos nucifera L.) germplasm using embryo culture transfer protocols. Cogent; Bioversity International, Mintpellier, France. pp: 37.

4. Copeland, E.B., 1931. The Coconut (3rd ed.). Lodon: Macmillian and Company.

5. De Guzman, E.V. and G.C. Manuel, 1977. Improved root growth in embryo and seedlings culture of coconut 'Makapuno' by the incorporation of charcoal in the growth medium. *PJCS*: 11, 35–39.

6. De Guzman, E.V., and A.G. Del Rosario, 1964. The growth and development in soil of makapuno seedlings cultured *in vitro*. National Research Council of the Philippines, Research Bulletin 29:1-16.

7. Deva Kumar, K., R. K. Gautam, A. Sharma and S. Dam Roy, 2014. High frequency occurrence of soft endosperm mutant Macapuno coconuts in Andaman Islands and their embryo culture. In: *Indian Journal of Genetics and Plant Breeding* 74(4):532-535.

8. 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*. *Physiol. Plant.,* 36:23-28

9. Erlinda P. Rillo, 1997. PCA embryo culture technique in mass production of Makapuno coconut.

10. Gonzales, B. 1914. The Makapuno coconut. Philipp. Agric. For.3, 31–32.

11. International Coconut Genebank for Latin America and the Caribbean.

12. Kennedy Mkumbo, Salustia Tembo and Reminister Marealle. 1997. Status of research on coconut embryo culture and acclimatization techniques in Tanzania.

13. RilIo, E.P., and Paloma, M.B.F. 1992a. In vitro culture of macapuno coconut embryos. Coconuts Today, June, 90-101.

14. Rillo, E.P. and Paloma. M.B.F. 1992b. *In vitro* culture of Macapuno coconut embryos. *Coconuts Today*, 9, 90-108.

15. Rillo, E.P., 1999. Coconut embryo culture. In Current Advances in Coconut Biotechnology; Oropeza, C., Verdeil, J.L., Ashburner, G.R., Cardeña, R., Santamaría, J.M., Eds.; Springer: Dordrecht, The Netherlands, pp. 279–288. ISBN 978-94-015-9283-3.

STUDYING SOME *IN VITRO* CULTURE FACTORS AFFECTING THE GERMINATION OF COCONUT SAP EMBRYOS

Vo Minh Hai, Pham Thi Phuong Thuy, Tran Thi Thao Dang,
Le Vinh Thuc, Nguyen Bao Toan

Summary

Sap coconut is a naturally mutation coconut variety, which has different characteristics from normal coconut, Sap coconut embryos do not germinate in natural environment but germinate in *invitro* medium only. In order to improve the germination rate of Sap coconut embryos, the thesis had conducted 6 experiments to study the factors affecting the germination rate of Sap coconut embryos. The research results had identified, improved Y3 medium (Y3 were added 0.2 ppm NAA and 2 ppm BAP) for the best germination rate reached 88.9%, Sap coconut fruits had age from 12.5 to 13 months gives the best germination rate, Sap coconut embryos were reared in complete darkness (0 lux) for germination rate higher than in the light condition. Improved Y3 medium without agar (liquid medium) helped embryos germinated at 3th week sooner than semi-solid medium and for embryos that did not germinate after 30 - 45 days after reared in improved Y3 medium, continuing to apply the cutting technology of the sheet cap cover the shoot tip helped the embryos to germinate an additional 66.7%. Recommendation to apply this research result to embryo cultured Sap coconut seedling production in Vietnam.

Keywords: *Sap coconut, intestinal thick coconut, cream coconut, embryo cultured Sap coconut.*

Người phản biện: PGS.TS. Nguyễn Văn Đồng

Ngày nhận bài: 02/6/2020

Ngày thông qua phản biện: 3/7/2020

Ngày duyệt đăng: 10/7/2020