

NGHIÊN CỨU NÂNG CAO TỶ LỆ TẠO CÂY HOÀN CHỈNH *IN VITRO* TRONG QUÁ TRÌNH NUÔI CẤY PHÔI DỪA SÁP (*Makapuno coconuts*)

Nguyễn Văn Đồng¹, Đinh Thị Thu Ngân¹, Tống Thị Hương¹,

Nguyễn Hữu Kiên¹, Nguyễn Thị Hòa¹, Lê Thị Mai Hương¹,

Đinh Thị Mai Thu¹, Nguyễn Nhất Linh¹, Phạm Thị Phương Thúy²

TÓM TẮT

Dừa Sáp (*Makapuno coconuts*) là cây trồng có giá trị kinh tế cao không chỉ ở Việt Nam mà còn ở nhiều nước trên thế giới. Tình trạng sáp được kiểm soát bởi một gen lặn (*m*) ở dạng đồng hợp tử của cây dừa sáp, các phôi mang cặp gen lặn (*mm*) không thể nảy mầm trong tự nhiên. Một số nghiên cứu đã tiến hành cứu phôi dừa sáp trong điều kiện *in vitro* để tăng tỷ lệ tạo quả sáp trên cây. Tuy nhiên, tỷ lệ cứu phôi dừa sáp thành công vẫn còn thấp. Chính vì vậy, nghiên cứu này được thực hiện nhằm khắc phục hạn chế trên đồng thời nâng cao tỷ lệ cứu phôi, tạo cây *in vitro* hoàn chỉnh và rút ngắn thời gian tạo cây thông qua công nghệ nuôi cấy phôi. Cụ thể, phôi dừa Sáp được cấy trên môi trường Y3 có bổ sung 2,4,5T nồng độ 1 mg/L đạt tỷ lệ nảy mầm 91,11%. Chiều dài chồi đạt 10,90 cm sau 5 tuần nuôi cấy trên môi trường MS bổ sung GA₃ nồng độ 0,5 mg/L. Môi trường tạo rễ thứ cấp thích hợp là môi trường MS có chứa IBA nồng độ 4 mg/L. Môi trường MS có bổ sung Sitto Fopro 10-52-10 nồng độ 20 mg/L cho số lá mở hoàn chỉnh đạt 2,64 sau 15 tuần nuôi cấy; đồng thời có thể duy trì và bảo quản cây từ 3-4 tháng để cung cấp vật liệu cho nghiên cứu sau này mà không cần chuyển sang môi trường mới. Cuối cùng, thời gian tạo cây dừa Sáp hoàn chỉnh thông qua cứu phôi ở điều kiện *in vitro* đã được rút ngắn xuống chỉ còn 6-7 tháng.

Từ khóa: Kích thích sinh trưởng, dừa Sáp, phôi hữu tính, nhân vô tính.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Dừa Sáp (*Makapuno coconuts*) thuộc họ Cau, có nguồn gốc từ Philippines nhưng do đặc tính ưu việt của nó mà hiện nay dừa Sáp được trồng phổ biến ở rất nhiều nơi trên thế giới như Ấn Độ, Indonesia, Brazil và Sri Lanka... Tại Việt Nam, dừa Sáp phân bố chủ yếu ở tỉnh Trà Vinh, đặc biệt ở huyện Cầu Kè, nơi được cho là vùng đất tốt nhất để trồng dừa Sáp (Trương Quốc Ánh, 2012). Với đặc tính cơm (cùi) đặc sệt, độ dầu cao hơn dừa thường, hàm lượng dinh dưỡng cao, mùi thơm đặc trưng hơn nên dừa Sáp được dùng để chế biến thực phẩm (kem, bánh, kẹo), nước giải khát và mỹ phẩm, cho hiệu quả kinh tế gấp 10-20 lần dừa thường (Trần Nguyễn Mỹ Châu, 2019).

Dừa Sáp là hiện tượng đột biến gen của giống dừa cao Laguna, chỉ phối bởi một gen lặn duy nhất (Rillo và Paloma, 1992). Phôi dừa mang cặp gen lặn (*mm*) quy định tính trạng sáp không nảy mầm trong điều kiện tự nhiên do nội nhũ không thể hỗ trợ sự phát triển của phôi (Hengky Novariantio và cs, 2014), các cây dừa trong tự nhiên có khả năng cho quả sáp

đều là cây dị hợp (*Mn*) nên chỉ có 20-25% số quả của các cây này là quả sáp. Để khắc phục những hạn chế trên, các nhà khoa học đã nghiên cứu sản xuất ra giống dừa Sáp thông qua phương pháp nuôi cấy phôi dừa mang cặp gen lặn (*mm*). Trên thế giới, phôi dừa Sáp đã được nhiều tác giả nghiên cứu thành công từ những năm trước đây như De Guzman và Del Rosario (1964), Rillo và Paloma (1992), Samosir và cs (1999). Các nghiên cứu này nhằm mục đích lấy những phôi hữu tính của quả sáp để tạo ra những cây giống cho tỷ lệ quả sáp cao hơn (Rillo và Paloma, 1992). Tại Philippines, nhân giống dừa Sáp bằng phương pháp nuôi cấy phôi đã thực hiện thành công với tỷ lệ cây con tạo ra từ phôi đạt trên 50%, tỷ lệ quả đặc ruột trên một cây lên đến 70% (Areza Ubaldo và cs, 2003). Ở Ấn Độ, chỉ có 10-20% số phôi dừa Sáp được nuôi cấy thành công và tạo được cây con (Deva Kumar. K và cs, 2014).

Tại Việt Nam, từ năm 2001- 2005, Viện Nghiên cứu Dầu và Cây có dầu bước đầu nghiên cứu thành công nhân giống dừa Sáp bằng kỹ thuật nuôi cấy phôi trong điều kiện *in vitro*, với tỷ lệ thành công của quy trình đạt 19,2%, thời gian phát triển hoàn thiện từ phôi thành cây đủ tiêu chuẩn xuất vườn là 24 tháng. Năm 2010, Viện tiếp tục nghiên cứu cải tiến quy trình

¹ Viện Di truyền Nông nghiệp

² Trường Đại học Trà Vinh

Email: dongjircas@yahoo.com

công nghệ nuôi cấy phôi dừa Sáp ở giai đoạn phòng thí nghiệm và vườn ươm, đã gia tăng tỷ lệ thành công của quy trình đạt 37%, thời gian phát triển hoàn thiện từ phôi thành cây đủ tiêu chuẩn xuất vườn là 16 tháng (Trần Thị Ngọc Thảo, 2010). Từ năm 2010 – 2014, quy trình công nghệ nuôi cấy phôi ở giai đoạn phòng thí nghiệm tiếp tục được cải tiến nâng tỷ lệ thành công quy 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). Năm 2016, Trường Đại học Trà Vinh đã tiến hành nghiên cứu nhằm hoàn thiện quy trình nuôi cấy phôi dừa Sáp với tỷ lệ thành công của quy trình đạt 45-50% (Phạm Thị Phương Thúy và cs, 2016).

Mặc dù các nghiên cứu trên đã bước đầu thành công trong quá trình nuôi cấy phôi dừa Sáp nhưng tỷ lệ tạo cây hoàn chỉnh *in vitro* còn thấp do gặp phải các vấn đề liên quan đến: tỷ lệ nảy mầm phôi chưa cao, khả năng kéo dài chồi của phôi dừa Sáp còn chậm, số lượng rễ thứ cấp tạo ra ít, thời gian lưu giữ cây *in vitro* ngắn sẽ làm ảnh hưởng đến việc thiếu hụt cây giống cho sản xuất trên diện rộng nói chung và nguồn vật liệu *in vitro* phục vụ cho việc nhân giống vô tính cây dừa Sáp bằng các phương pháp công nghệ sinh học nói riêng. Vì vậy, nâng cao tỷ lệ tạo cây *in vitro* trong quá trình nuôi cấy phôi dừa Sáp là cần thiết nhằm tạo được cây hoàn chỉnh trong thời gian ngắn nhất và tạo nguồn vật liệu dồi dào phục vụ cho nghiên cứu nhân giống phôi dừa Sáp ở quy mô công nghiệp.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Vật liệu nghiên cứu

2.1.1. Vật liệu thực vật

Phôi dừa Sáp 10-12 tháng tuổi đã vô khuẩn do Trường Đại học Trà Vinh cung cấp.

2.1.2. Hoá chất và thiết bị nghiên cứu

Khoáng đa lượng, vi lượng dựa trên môi trường cơ bản Y3 (Eeuwens, 1976) và MS (Murashige & Skoog, 1962) được điều chỉnh pH= 5,75 ± 0,05.

Một số hóa chất khác: các chất kích thích sinh trưởng (KTST) thuộc nhóm auxin, gibberellin và cytokinin, than hoạt tính, đường sucrose, phytagel...

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Nghiên cứu ảnh hưởng của các chất kích thích sinh trưởng đến khả năng nảy mầm của phôi dừa

Các phôi dừa sạch vi sinh vật được nuôi cấy trên các môi trường sau: Y3 (đối chứng không bổ sung KTST); Y3 + 2,4,5T 1 mg/L; Y3 + GA₃ 1 mg/L; Y3 + BAP 1 mg/L; Y3 + NAA 0,5 mg/L. Các mẫu được nuôi cấy trong tủ nuôi 5 tuần ở nhiệt độ 27±1°C và không có ánh sáng.

2.2.2. Xác định nồng độ GA₃ tối ưu để kéo dài chồi cho phôi dừa đã nảy mầm

Phôi dừa nảy mầm có chiều dài mầm từ 1-1,5 cm, rễ chính từ 3-5 cm được nuôi cấy trên môi trường cơ bản MS có bổ sung GA₃ với các nồng độ khác nhau là 0; 0,2; 0,5; 0,7 và 1 mg/L để khảo sát khả năng kéo dài chồi. Các mẫu được đặt trong tủ nuôi 5 tuần ở nhiệt độ 27±1°C và chu kỳ 12 giờ sáng/12 giờ tối.

2.2.3. Xác định nồng độ IBA tối ưu để tạo rễ thứ cấp cho cây dừa *in vitro*

Các chồi dừa Sáp sau khi được nuôi cấy trên môi trường kéo dài chồi đạt chiều cao 5 cm, chiều dài rễ 2 cm được chuyển sang môi trường tạo rễ thứ cấp. Môi trường tạo rễ là môi trường MS có bổ sung IBA với các nồng độ khác nhau là 0; 1; 2; 3; 4 và 5 mg/L để đánh giá khả năng ra rễ. Các mẫu được đặt trong tủ nuôi 5 tuần ở nhiệt độ 27±1°C và chu kỳ 12 giờ sáng/12 giờ tối.

2.2.4. Xác định nồng độ tối ưu của phân bón Sitto Fopro 10-52-10 để tăng cường sức sống cho cây và kéo dài thời gian lưu mẫu

Cây dừa *in vitro* sau khi tạo rễ thứ cấp được chuyển sang môi trường MS có bổ sung phân bón Sitto Fopro 10-52-10 (Công ty SITTO, Việt Nam) với các hàm lượng 0; 10; 20; 25 và 30 mg/L. Mẫu được đặt trong tủ nuôi với điều kiện nhiệt độ 27±1°C và chu kỳ 12 giờ sáng/12 giờ tối từ 5-15 tuần.

2.3. Phương pháp xử lý số liệu

Mỗi thí nghiệm được bố trí lặp lại 3 lần, mỗi lần 15 mẫu. Số liệu được sử dụng để phân tích ý nghĩa thống kê dựa vào phương pháp phân tích một chiều của sự khác biệt (ANOVA) với sự khác nhau có ý nghĩa giữa các công thức thỏa mãn điều kiện P < 0,05 dựa vào phương pháp Duncan's multiple range test.

2.4. Các chỉ tiêu đánh giá

- Tỷ lệ nảy mầm phôi (%) = (số phôi nảy mầm/số phôi ban đầu thí nghiệm) x 100.

- Chiều dài chồi được đo từ điểm tiếp giáp với rễ đến hết chóp của chồi.

- Chiều dài rễ được đo từ điểm tiếp giáp với phần gốc của chồi đến hết chóp rễ cọc chính.

- Đếm số lượng lá mở hoàn chỉnh sau 5, 10 và 15 tuần nuôi.

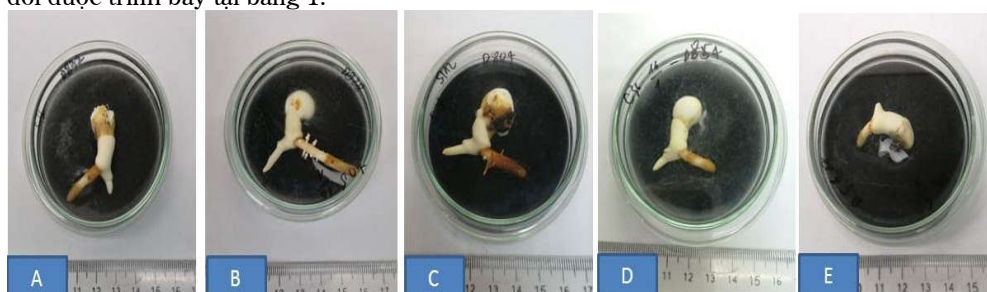
3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Ảnh hưởng của các chất kích thích sinh trưởng (KTST) đến khả năng nảy mầm của phôi dừa Sáp

Bảng 1. Ảnh hưởng của các chất kích thích sinh trưởng đến khả năng nảy mầm phôi dừa sáp

Tên MT	Số phôi/1 lần lặp lại	Tỷ lệ trung bình phôi nảy mầm (%)
Y3	15	40,00 ± 3,14 ^a
Y3 + NAA 1 mg/L	15	51,11 ± 1,81 ^b
Y3 + 2,4,5T 1 mg/L	15	91,11 ± 3,63^e
Y3 + GA ₃ 1 mg/L	15	71,11 ± 1,81 ^d
Y3 + BAP 1 mg/L	15	57,78 ± 1,81 ^c

Nghiên cứu của Đoàn Thị Thanh Thúy, 2012 đã cho thấy phôi dừa có thể nảy mầm trên môi trường Y3 không có bổ sung KTST, tuy nhiên tỷ lệ phôi sống thấp. Do vậy, trong thí nghiệm này đã sử dụng môi trường cơ bản Y3 kết hợp với một số chất KTST để cải thiện tỷ lệ cứu sống phôi của dừa Sáp (Bảng 1). Thí nghiệm được lặp lại 3 lần, mỗi lần 15 mẫu/công thức môi trường. Kết quả thí nghiệm sau 5 tuần theo dõi được trình bày tại bảng 1.



Hình 1. Ảnh hưởng của chất KTST đến khả năng nảy mầm phôi dừa sau 5 tuần nuôi cấy
(Chú thích: A. Y3+NAA; B. Y3+2,4,5T; C. Y3+GA₃; D. Y3+BAP; E. Y3 (Đối chứng không KTST))

3.2. Xác định nồng độ GA₃ tối ưu để kéo dài chồi cho phôi dừa đã nảy mầm

Sau khi xác định được môi trường nảy mầm tốt nhất cho phôi dừa Sáp, đã tiếp tục tìm kiếm môi trường kéo dài chồi tối ưu cho các phôi dừa Sáp đã nảy mầm. GA₃ được biết tới như là một trong những hormone thực vật có tác dụng đẩy mạnh sự phát triển và kéo dài các tế bào. Chính vì vậy, trong nghiên cứu này đã sử dụng GA₃ để đánh giá khả năng kéo dài chồi của cây dừa Sáp. Cụ thể, các phôi

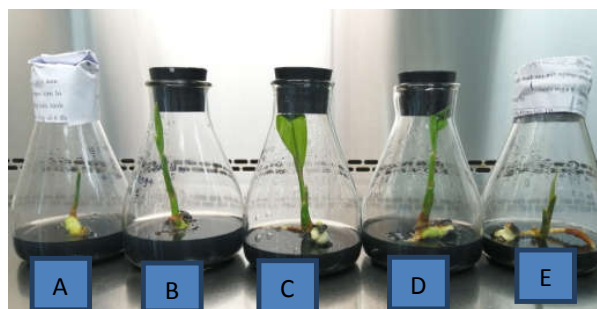
Kết quả cho thấy, tỷ lệ nảy mầm của phôi dừa Sáp nuôi cấy trên môi trường Y3 có bổ sung KTST đều đạt trên 50% cao hơn so với môi trường Y3 không bổ sung KTST. Ngoài ra, việc bổ sung KTST đã làm phát sinh đồng thời cả chồi và rễ nhanh hơn so với môi trường đối chứng không bổ sung KTST (Hình 1). Với môi trường Y3 có bổ sung 1 mg/L 2,4,5T cho tỷ lệ nảy mầm của phôi dừa Sáp đạt giá trị cao nhất là 91,11%, còn môi trường Y3 có bổ sung 1 mg/L NAA cho tỷ lệ nảy mầm đạt giá trị thấp là 51,11%. Nghiên cứu của Trương Quốc Ánh và cộng sự, 2012 đã tiến hành nhân giống *in vitro* cây dừa Sáp bằng phương pháp nuôi cấy phôi hữu tính từ 250 trái dừa sáp ban đầu thu được 235 phôi và tạo ra được 177 cây dừa sáp, đạt tỷ lệ phôi nảy mầm trên nền môi trường khoáng Y3 có chứa 1 mg/l NAA là 77,5% sau 3 tháng nuôi cấy. Sau đó, Ngô Thị Kiều Dương, 2013 đã cải tiến quy trình nhân nhanh giống dừa Sáp bằng phương pháp nuôi cấy phôi hữu tính cũng trong nền môi trường khoáng Y3, nâng tỷ lệ nảy mầm phôi lên 78% sau 2 tháng nuôi cấy.

Như vậy, nghiên cứu này của chúng tôi đã rút ngắn được thời gian nảy mầm so với các nghiên cứu trước đây và xác định được môi trường Y3 + 2,4,5T 1 mg/L là môi trường tối ưu nhất cho tỷ lệ nảy mầm phôi cao nhất đạt 91,11% sau thời gian 5 tuần.

dừa Sáp sau khi nảy mầm trên môi trường Y3 + 2,4,5T 1 mg/L sau 4 tuần có độ dài mầm và rễ đồng đều nhau được lựa chọn để cấy vào môi trường MS cơ bản có bổ sung GA₃ ở các nồng độ khác nhau 0; 0,2; 0,5; 0,7 và 1 mg/L. Các mẫu được đặt trong điều kiện nhiệt độ 27±1°C và chu kỳ sáng 12 giờ sáng/12 giờ tối trong 5 tuần. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần với 15 mẫu/công thức môi trường. Kết quả được trình bày ở bảng 2.

Bảng 2. Ảnh hưởng của GA₃ đến khả năng kéo dài chồi cho phôi dừa Sáp

Nồng độ GA ₃ (mg/L)	Số mẫu/1 lần lặp lại	Chiều dài chồi trung bình (cm)	Đặc điểm
0	15	2,06 ± 0,26 ^a	Chồi nhỏ, chưa có lá mở
0,2	15	9,24 ± 0,36 ^d	Chồi mập, xanh, lá 1 bắt đầu mở
0,5	15	10,90 ± 0,43^e	Chồi mập, lá 1 xoè rộng, xuất hiện lá thứ 2
0,7	15	7,83 ± 0,82 ^c	Chồi mập, lá 1 bắt đầu mở
1,0	15	4,48 ± 0,22 ^b	Chồi mập, chưa mở lá



Hình 2. Ảnh hưởng của GA₃ đến khả năng kéo dài chồi cho phôi dừa Sáp

(Chú thích: A. 0 mg/L; B. 0,2 mg/L; C. 0,5 mg/L; D. 0,7 mg/L; E. 1 mg/L)

Quan sát thí nghiệm sau 5 tuần nuôi cấy trên môi trường MS có bổ sung GA₃ đã nhận thấy, môi trường không bổ sung và bổ sung 1 mg/L GA₃ cho tỷ lệ kéo dài chồi thấp lần lượt là 2,06 và 4,48 cm; trong khi đó, môi trường MS có bổ sung 0,5 mg/L GA₃ giúp kéo dài chồi tốt nhất đạt 10,9 cm đồng thời chồi to khỏe hơn, lá xoè rộng hơn, xuất hiện lá thứ 2 so với các công thức môi trường khác (Bảng 2, hình 2). Nghiên cứu của Đoàn Thị Thanh Thủy (2012) chỉ ra

việc bổ sung GA₃ vào môi trường cũng giúp cho phôi dừa ta (thường) nảy mầm và kéo dài chồi tốt hơn so với môi trường không bổ sung. Trong nghiên cứu này đã chỉ ra rằng, môi trường MS có bổ sung 0,5 mg/L GA₃ giúp cho phôi dừa Sáp tăng khả năng kéo dài chồi tốt và hình thành lá tốt hơn so với các công thức môi trường khác. Do vậy, tiếp tục sử dụng môi trường MS có bổ sung 0,5 mg/L GA₃ cho thí nghiệm tiếp theo.

3.3. Xác định nồng độ IBA tối ưu trong nghiên cứu tạo bộ rễ khỏe cho cây dừa Sáp *in vitro*

Các chồi sau khi được kéo dài trên môi trường tối ưu ở thí nghiệm trước mục 3.2 có chiều dài đồng đều nhau đã được cắt bỏ một đoạn rễ sao cho đoạn rễ còn lại của cây dài khoảng 2 cm và cấy chuyển vào môi trường MS có bổ sung IBA với các nồng độ 0; 1; 2; 3; 4; 5 mg/L. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần và 15 mẫu/công thức môi trường. Mẫu cấy được nuôi ở điều kiện giống như đánh giá khả năng kéo dài chồi trong 5 tuần. Kết quả được trình bày tại bảng 3.

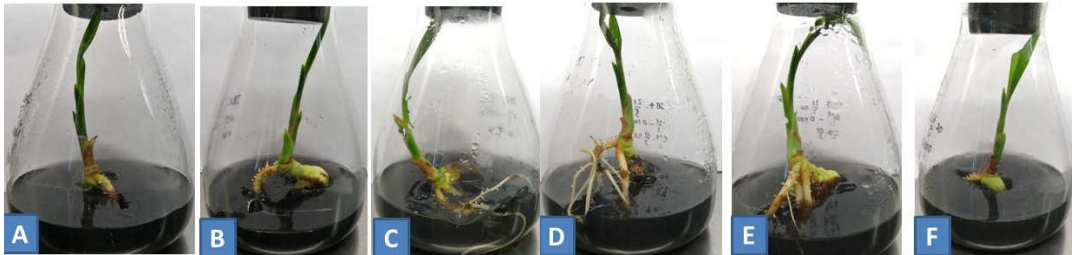
Bảng 3. Ảnh hưởng của IBA đến khả năng tạo rễ thứ cấp của cây dừa Sáp *in vitro*

Nồng độ IBA (mg/L)	Số mẫu/lần lặp lại	Chiều dài rễ chính trung bình (cm)	Số rễ thứ cấp trung bình	Đặc điểm
0	15	3,29 ± 0,14 ^a	1,27 ± 0,05 ^a	Ít rễ con, chưa có rễ con
1	15	5,59 ± 0,14 ^a	1,17 ± 0,08 ^a	Ít rễ con, rễ con ngắn
2	15	7,71 ± 0,27 ^b	1,46 ± 0,22 ^a	Ít rễ con, rễ con dài
3	15	11,26 ± 0,07 ^c	1,24 ± 0,04 ^a	Nhiều rễ con, rễ con dài
4	15	13,61 ± 0,59^d	2,63 ± 0,19^b	Nhiều rễ con, rễ con dài
5	15	10,94 ± 0,06 ^c	1,07 ± 0,05 ^a	Ít rễ con, rễ con dài

Kết quả ở bảng 3 cho thấy, khi môi trường MS có bổ sung IBA cho thấy số lượng rễ thứ cấp nhiều hơn so với không bổ sung IBA, tuy nhiên số lượng rễ tùy thuộc vào nồng độ IBA sử dụng. Cụ thể, khi môi trường có bổ sung 1 và 5 mg/L IBA thì số rễ thứ cấp chỉ đạt lần lượt là 1,17 và 1,07 trên cây; trong khi đó, với nồng độ 4 mg/L IBA cho số lượng rễ thứ cấp nhiều nhất là 2,63. Ngoài ra, các cây con được nuôi ở

môi trường MS có bổ sung 4 mg/L IBA có chiều dài rễ chính trung bình đạt giá trị cao nhất là 13,61 cm (Hình 3). Nghiên cứu của Trương Ngọc Ánh, 2012 cho thấy tỷ lệ rễ thứ cấp đạt 3-4 rễ trong môi trường có bổ sung 1 mg/L NAA, tuy nhiên chiều dài rễ chính chỉ đạt 2-3 cm trong thời gian 6 tuần. Một nghiên cứu khác của Trương Như Quỳnh, 2015 cho thấy sử dụng IBA nồng độ 0,7 mg/L cho tỷ lệ cảm

ứng tạo rễ thứ cấp là cao nhất. Trong nghiên cứu này đã chỉ ra rằng, môi trường MS có bổ sung 4 mg/L IBA cho tỷ lệ rễ thứ cấp và chiều dài rễ chính của các cây dừa Sáp là tốt và dài nhất so với các nồng độ khác



Hình 3. Ảnh hưởng của IBA đến khả năng tạo rễ của cây dừa Sáp *in vitro*

(Chú thích: A. 0 mg/L; B. 1 mg/L; C. 2 mg/L; D. 3 mg/L; E. 4 mg/L; F. 5 mg/L)

3.4. Ảnh hưởng của phân bón Sitto Fopro 10-52-10 đến sự hình thành lá của cây dừa Sáp *in vitro*

Nhằm tăng cường sức sống và khả năng sinh trưởng của cây, đã tiến hành nghiên cứu bổ sung phân bón Sitto Fopro 10-52-10 để kéo dài thời gian nuôi cấy. Các cây dừa đồng đều về chiều cao và chiều dài rễ sau khi phát sinh rễ thứ cấp ở môi trường MS có bổ sung 4 mg/L IBA 5 tuần được lựa

(Hình 3). Như vậy, đã sử dụng nồng độ IBA 4 mg/L để bổ sung vào môi trường MS cho các nghiên cứu tiếp theo.

chọn để cấy sang môi trường MS có bổ sung phân bón Sitto Fopro 10-52-10 với các nồng độ từ 0; 1; 2; 3 và 4 mg/L. Thí nghiệm được nhắc lại 3 lần và 15 cây/công thức môi trường. Các cây được nuôi ở cùng điều kiện với cảm ứng kéo dài chồi và rễ. Các lá của cây được quan sát ở các thời điểm 5, 10 và 15 tuần sau khi nuôi cấy trên môi trường. Kết quả thí nghiệm được trình bày ở bảng 4.

Bảng 4. Ảnh hưởng của phân bón Sitto Fopro 10-52-10 đến khả năng hình thành lá của cây dừa Sáp *in vitro*

Lượng phân bón (mg/L)	Số mẫu/1 lần lặp lại	Số lá mở hoàn chỉnh sau 5 tuần	Số lá mở hoàn chỉnh sau 10 tuần	Số lá mở hoàn chỉnh sau 15 tuần
0	15	0 ± 0	1,08 ± 0,04 ^a	1,41 ± 0,04 ^a
10	15	0,41 ± 0,04 ^a	1,19 ± 0,08 ^a	2,15 ± 0,02 ^b
20	15	0,92 ± 0,04 ^a	2,02 ± 0,12 ^b	2,64 ± 0,06 ^c
25	15	0,64 ± 0,06 ^a	1,56 ± 0,05 ^{ab}	2,41 ± 0,04 ^{bc}
30	15	0,41 ± 0,04 ^a	1,28 ± 0,08 ^a	2,16 ± 0,04 ^b

Từ kết quả thí nghiệm đã nhận thấy, với các môi trường MS có sử dụng phân bón Sitto Fopro 10-52-10 thì lá của cây dừa hình thành sớm hơn bình thường so với không sử dụng ở cả các thời điểm 5, 10 và 15 tuần. Cụ thể, khi môi trường có bổ sung 10 và 30 mg/L phân bón Sitto Fopro 10-52-10 cho số lá mở hoàn chỉnh đạt 2,15 và 2,16 lá và tỷ lệ số lá mở hoàn chỉnh cao nhất là 2,64 khi bổ sung 20 mg/L sau 15 tuần nuôi cấy. Đồng thời, môi trường MS khi có bổ sung 10 và 20 mg/L phân bón Sitto Fopro 10-52-10 thì lá cây dừa Sáp còn có màu xanh hơn và bộ rễ khỏe hơn do các rễ con cũng được kéo dài hơn so với đối chứng không bổ sung (Hình 4). Tuy nhiên khi tăng lượng phân bón lên 25 mg/L, 30 mg/L thì lá của các cây thí nghiệm phát triển không đồng đều, lá hơi vàng. Như vậy, qua nghiên cứu này cho thấy, môi trường MS có bổ sung 20 mg/L phân bón Sitto Fopro 10-52-10 cho hiệu quả tốt nhất.



Hình 4. Ảnh hưởng của phân bón Sitto Fopro 10-52-10 đến khả năng hình thành lá của cây dừa Sáp sau 15 tuần

(Chú thích: A. 20 mg/L; B. 0 mg/L)

Cho đến thời điểm hiện tại chưa có nghiên cứu nào về việc sử dụng phân bón Sitto Fopro 10-52-10 trong nuôi cấy *in vitro* cây dừa thường nói chung và cây dừa Sáp nói riêng. Tuy nhiên, trong nghiên cứu này, khi môi trường có bổ sung thêm phân bón này ngoài việc giúp tăng khả năng hình thành lá hoàn

chính mà còn có thể được sử dụng nhằm duy trì và bảo quản cây từ 3-4 tháng mà không cần chuyển qua môi trường dinh dưỡng mới. Điều này có thể giảm thiểu việc cây dừa phải cấy chuyển liên tục mỗi tháng 1 lần do quá trình duy trì môi trường bị thiếu hụt dinh dưỡng như nghiên cứu trước đây (Trần Thị Ngọc Thảo, 2010). Ngoài ra, nghiên cứu này đã giúp rút ngắn quá trình cấy phôi và tạo cây dừa Sáp hoàn chỉnh trong điều kiện *in vitro* chỉ còn từ 6-7 tháng so với từ 12-14 tháng của Ngô Thị Kiều Dương, 2013 trước đó.

4. KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

4.1. Kết luận

Đã xác định được phôi dừa Sáp nảy mầm tốt nhất ở môi trường Y3 + 2,4,5T 1 mg/L với tỷ lệ nảy mầm cao nhất đạt 91,11%. Sự kéo dài chồi của phôi dừa Sáp trên môi trường MS bổ sung GA₃ nồng độ 0,5 mg/L cho chồi dài trung bình tốt nhất 10,9 cm. Môi trường tối ưu cho hình thành rễ thứ cấp là MS có bổ sung IBA nồng độ 4 mg/L.

Cây dừa Sáp *in vitro* được nuôi dưỡng trong môi trường MS bổ sung Sitto Fopro 10-52-10 nồng độ 20 mg/L giúp cây tạo lá hoàn chỉnh tốt hơn đồng thời có thể giúp cho việc duy trì cây lâu hơn mà không cần phải cấy chuyển. Cây hoàn chỉnh *in vitro* có bộ rễ khoẻ hơn trước khi đưa cây ra vườn ươm. Với quy trình tối ưu đơn giản này đã rút ngắn được thời gian tạo ra cây dừa Sáp giống chỉ còn 6-7 tháng so với phương pháp truyền thống và còn đảm bảo cung cấp nguồn vật liệu dồi dào có thể phục vụ cho quá trình nuôi cấy tạo cây dừa sáp vô tính.

4.2. Kiến nghị

Cần tiếp tục nghiên cứu và đánh giá các giai đoạn đưa cây dừa Sáp hoàn chỉnh *in vitro* ra vườn ươm để đạt tỷ lệ cây sống cao nhất nhằm đáp ứng nhu cầu về mở rộng diện tích cây dừa Sáp của Việt Nam.

LỜI CẢM ƠN

Công trình được thực hiện trong khuôn khổ phối hợp thực hiện đề tài, dự án: “Nghiên cứu nhân giống dừa bằng công nghệ nuôi cấy mô tế bào và kỹ thuật thâm canh dừa trồng giống nuôi cấy mô” cùng Trường Đại học Trà Vinh, thuộc Chương trình Khoa học và Công nghệ trọng điểm cấp Bộ, số 510 ngày 15/6/2017. Mẫu phôi sạch vi sinh vật ban đầu được cung cấp bởi Trường Đại học Trà Vinh. Các thí nghiệm được tiến hành có sử dụng trang thiết bị của Phòng thí nghiệm Trọng điểm Công nghệ Tế bào Thực vật, Viện Di truyền Nông nghiệp.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Đoàn Thị Thanh Thuý, 2012. Luận văn thạc sỹ: Vai trò của các chất điều hòa tăng trưởng thực vật trong sự nảy mầm của phôi hợp tử trưởng thành của cây dừa *Cocos nucifera* L.
2. Ngô Thị Kiều Dương, 2013. Báo cáo kết quả thực hiện nhiệm vụ "Khai thác và phát triển nguồn gen cây dừa".
3. Nguyễn Thị Bích Hồng, 2008. Báo cáo tổng kết đề tài: Nghiên cứu chọn tạo một số giống dừa mới có năng suất cao, có chất lượng đáp ứng yêu cầu công nghiệp chế biến và xuất khẩu.
4. Nguyễn Thị Bích Hồng, Ngô Thị Kiều Dương, Nguyễn Thị Mai Phương, Phạm Phú Thịnh, 2014. Nhân giống dừa Sáp bằng kỹ thuật nuôi cấy phôi. Kỷ yếu Hội thảo quốc tế “Cây dừa Việt Nam- Giá trị và tiềm năng”. NXB Đại học Quốc gia TP. Hồ Chí Minh, 8/2014.
5. Nguyễn Thị Kim Loan, 2014. Tìm hiểu vai trò của cây dừa trong bảo vệ môi trường và khả năng thích ứng với biến đổi khí hậu. Kỷ yếu Hội thảo quốc tế “Cây dừa Việt Nam- Giá trị và tiềm năng”. NXB Đại học Quốc gia TP Hồ Chí Minh, 8/2014.
6. Phạm Thị Phương Thúy, Lê Trúc Linh, Đoàn Văn Hậu, Nguyễn Ngọc Trai, 2016. Báo cáo tổng kết đề tài "Nhân giống dừa Sáp bằng phương pháp nuôi cấy phôi tại tỉnh Trà Vinh".
7. Trần Nguyễn Mỹ Châu và cộng sự, 2019. Nghiên cứu chế biến một số sản phẩm từ quả dừa Sáp làm nguyên liệu phục vụ sản xuất các sản phẩm thực phẩm, mỹ phẩm. (Viện Nghiên cứu Dầu và Cây có dầu) Bộ Công thương, Việt Nam.
8. Trần Thị Ngọc Thảo, 2010. Báo cáo tổng kết đề tài: Nghiên cứu cải tiến quy trình công nghệ nhân giống dừa Sáp *makapuno* (*Cocos nucifera* L.) giai đoạn phòng thí nghiệm và vườn ươm. Bộ Công thương, Việt Nam.
9. Trương Quốc Ánh, 2012. Báo cáo tổng kết đề tài: Nghiên cứu ứng dụng phương pháp nuôi cấy phôi soma từ chồi mầm để nhân giống dừa Sáp đặc ruột tại tỉnh Trà Vinh.
10. Trương Quốc Ánh, Lương Thế Minh, Trương Thị Tú Anh, Trương Vĩnh Hải, 2012. Nhân giống *In vitro* cây dừa Sáp (*Makapuno coconut*). Tạp chí Nông nghiệp và PTNT, số 20, trang 12-18.
11. Trương Quỳnh Như, Võ Thanh Phúc, Lê Thị Thủy Tiên Trường, 2015. Khảo sát ảnh hưởng của auxin lên sự hình thành và tăng sinh của rễ bất định

dừa cạn (*Catharanthus roseus* (L.) G. Don). Tạp chí Phát triển Khoa học, tập 18, số K5, p75-86.

12. Võ Văn Long, 2007. Báo cáo tổng kết đề tài "Nghiên cứu ứng dụng kỹ thuật nhân, lưu giữ giống và xây dựng mô hình chuyên canh dừa đặc ruột ở Cầu Kè, tỉnh Trà Vinh".

13. Areza-Ubaldo, M. B. B., Rillo, E., and C. A. Pand Cueto, 2003. Application of the improved embryo culture protocol for commercial production of Makapuno seedlings. Philipp. J. Sci. 132(1):1-11, ISSN 0031-7683V.

14. 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.

15. 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.

16. Eeuwens CJ (1976). Mineral requirements for growth and callus initiation of tissue explants excised from mature coconut palms (*Cocos nucifera*) and cultured *in vitro*. *Physiol. Plant.* 36:23-28.

17. Hengky Novariant, Ismail Maskromo, Dini Dinarti and Sudarsono, 2014. Production Technology for Kopyor Coconut Seednuts and Seedlings in Indonesia. *Cord* 2014, 30 (2): 31- 40.

18. Murashige T, Skoog F (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15:473-497.

19. Rillo, EP và MBF Paloma, 1992. *In vitro* culture of Macapuno coconut embryos. *Coconuts Today* 9(1): 90-101.

20. Samosir, Y. M. S. 1999. *Optimisation of somatic embryogenesis in coconut (Cocos nucifera L.)*. PhD Thesis, The University of Queensland, Australia.

IMPROVEMENT OF COMPLETE REGENERATION RATIO OF *MAKAPUNO COCONUTS* PLANTS FROM EMBRYOS *IN VITRO* CULTURES

Nguyen Van Dong¹, Dinh Thi Thu Ngan¹, Tong Thi Huong¹,
Nguyen Huu Kien¹, Nguyen Thi Hoa¹, Le Thi Mai Huong¹,
Dinh Thi Mai Thu¹, Nguyen Nhat Linh¹, Pham Thi Phuong Thuy²

¹Agricultural Genetics Institute

²Tra Vinh University

Email: dongjircas@yahoo.com

Summary

Makapuno coconuts is a high-value crop grown in many countries on the world including Vietnam. The *macapuno* phenotype is believed to be controlled by a recessive gene (*m*) expressed as a homozygous condition in wild macapuno-bearing palms. This would explain why naturally-occurring macapuno palms bear both macapuno seeds and normal seeds, as pure macapuno palms would be impossible in the wild. A few studies have conducted to regenerate pure *Makapuno coconuts* plants from embryos *in vitro* condition for getting 100% macapuno seed yields. However, regeneration rates of pure *Makapuno coconuts* plants are still very low. Therefore, this study was carried out to overcome the above limitation for enhancing the complete regeneration rate of pure *Makapuno coconuts* plants from embryos. Results demonstrated that the Y3 medium with 1 mg/L of 2.4.5T showed the highest shoot germination rate of Macapuno embryos, while the MS medium containing 0.5 mg/L of GA₃ revealed the longest shoot length after 5 cultured-weeks. Additionally, number of later roots and length of main roots were showed higher and longer when planted on the MS medium with 4 mg/L of IBA. The MS medium supplied 20 mg/L of Sitto Fopro 10-52-10 fertilizer increased the fully opened leaves of *Makapuno coconuts* plants after 15 cultured-weeks; with that, it is possible to maintain and preserve *Makapuno coconuts* plants for 3-4 months to provide materials for future study without moving to new environments. Finally, regeneration time for complete *Makapuno coconuts* plants from embryos was reduced to only 6-7 months.

Keywords: *Embryo culture, Makapuno coconuts, phytohormone, sexual embryo.*

Người phản biện: PGS.TS. Lã Tuấn Nghĩa

Ngày nhận bài: 6/7/2020

Ngày thông qua phản biện: 7/8/2020

Ngày duyệt đăng: 14/8/2020