

ẢNH HƯỞNG CỦA MÔI TRƯỜNG DINH DƯỠNG, ĐƯỜNG SUCROSE VÀ THIDIAZURON ĐẾN KHẢ NĂNG TÁI SINH PHÔI SOMA QUA NUÔI CẤY CHỒI MẦM DỪA LÙN XIÊM XANH (*Cocos nucifera* L.f.)

Lê Hoàng Mai^{1,*}, Nguyễn Thiên Quang¹, Trần Văn Minh¹

¹Khoa Công nghệ sinh học, Trường Đại học Quốc tế,

Đại học Quốc gia thành phố Hồ Chí Minh

*Email: hoangmai.iuetv@gmail.com

TÓM TẮT

Dừa là cây trồng kinh tế quan trọng, đặc biệt dừa Xiêm Xanh được trồng phổ biến ở đồng bằng sông Cửu Long với nhu cầu sử dụng nước dừa tươi ngày càng cao. Nghiên cứu này tập trung vào ứng dụng kỹ thuật nuôi cấy phôi soma làm cơ sở nghiên cứu nhân giống dừa lùn Xiêm Xanh chất lượng, giải quyết nhu cầu cấp thiết mở rộng diện tích hiện nay. Ba yếu tố được khảo sát gồm: Ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy chồi mầm, nồng độ đường đến quá trình tạo mô sẹo phôi hóa và tác động của chất điều hòa sinh trưởng TDZ lên sự tái sinh của mô sẹo phôi hóa. Kết quả cho thấy, nuôi cấy phôi 14 ngày và sử dụng 45 g/L đường mang lại hiệu quả tạo mô sẹo phôi hóa cao. Trong quá trình tái sinh, nồng độ TDZ 25 μ M và 50 μ M cho khả năng tái sinh cao. Nghiên cứu đã bước đầu tạo và tái sinh mô sẹo phôi hóa hiệu quả cho dừa lùn Xiêm Xanh, mở ra hướng nghiên cứu nhân giống dừa tiềm năng.

Từ khóa: Dừa lùn Xiêm Xanh, chồi mầm, mô sẹo, phôi soma, cấu trúc phôi dừa, thidiazuron (TDZ).

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Dừa (*Cocos nucifera* L.f.) là một giống dừa được trồng phổ biến ở các nước nhiệt đới và cận nhiệt đới [1]. Dừa được trồng công nghiệp hoá ở ít nhất 90 quốc gia trên thế giới, là nguồn thu nhập chủ yếu cho hơn 10 triệu hộ gia đình [2, 3]. Các sản phẩm từ cây dừa có giá trị kinh tế cao, đóng vai trò quan trọng trong kinh tế và văn hoá ở nhiều nước.

Ở Việt Nam, dừa được trồng rộng rãi ở vùng ven biển và đồng bằng, đặc biệt là vùng đồng bằng sông Cửu Long. Các giống dừa ở Việt Nam được chia làm 2 nhóm là nhóm giống dừa lấy nước và nhóm giống dừa lấy dầu. Nhóm các giống lấy nước gồm: Dừa Xiêm Xanh, Xiêm lục, Xiêm lửa... và nhóm các giống lấy dầu gồm: Dừa Ta, Dâu, Dứa [4]. Dừa lùn Xiêm Xanh là giống dừa được trồng phổ biến nhất ở tỉnh Bến Tre để lấy nước uống, nổi tiếng với vị ngọt thanh và sai quả.

Hiện nay, tỉnh Bến Tre ghi nhận nhu cầu thu mua dừa Xiêm Xanh chất lượng tốt đang có xu hướng tăng mạnh với giá cao phục vụ cho nhu cầu xuất khẩu. Vì vậy, việc sản xuất giống dừa có chất lượng để mở rộng diện tích trồng mới là vô cùng quan trọng, cũng như phục tráng các vườn dừa già do năng suất dừa lùn sẽ giảm sau 20 năm [5]. Ở Việt Nam, phần lớn cây dừa con được trồng theo phương pháp truyền thống bằng việc trồng từ trái dừa, kỹ thuật này khá phổ biến nhưng tốn thời gian trong việc đợi nảy mầm từ trái, cần khoảng đất rộng để trồng và trái dùng để trồng dừa mới không thể làm gì khác [6]. Phương pháp trồng dừa truyền thống còn gặp các vấn đề tự nhiên như: Hạn hán, đất nhiễm mặn, hệ quả là số lượng cây con trồng được không nhiều, cây con kém chất lượng với năng suất thấp [7]. Hiện nay, trên thế giới, dưới sự phát triển của công nghệ sinh học, công nghệ nuôi cấy mô với nhiều kỹ

thuật hiện đại được áp dụng để tăng năng suất cũng như giúp chọn lọc và nuôi trồng giống dừa mang các đặc tính ưu việt [8].

Nuôi cấy tế bào phôi soma là kĩ thuật nhân giống thực vật hiện đại, lợi dụng tính toàn thể của tế bào thực vật để tái phân hoá các tế bào đã biệt hoá trở lại thành tế bào gốc [9]. Kĩ thuật nuôi cấy này giúp nhân giống nhanh cây trồng, tạo ra số lượng lớn các cây con đồng đều về tính trạng với nhau và với cây mẹ [10]. Nghiên cứu ứng dụng kĩ thuật nuôi cấy tế bào phôi soma đối với cây dừa đã bắt đầu từ năm 1983 [11] và có nhiều thành công nhất định.

Các kĩ thuật nuôi cấy tế bào phôi soma đã được áp dụng và thành công với cây dừa Sáp ở tỉnh Trà Vinh [12]. Tuy nhiên, hiện nay giống dừa lùn Xiêm Xanh đa phần vẫn được trồng và nhân giống theo phương pháp truyền thống. Vì vậy, trong nghiên cứu này, kĩ thuật nuôi cấy phôi soma từ tế bào chồi mầm được áp dụng để giúp nhân giống dừa lùn Xiêm Xanh.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Giống dừa lùn Xiêm Xanh được sử dụng làm nguồn vật liệu nghiên cứu. Trái dừa lùn Xiêm Xanh chọn lọc có độ chín sinh lý đạt 10 - 12 tháng tuổi (kể từ khi hoa thụ phấn thành công).

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Sự phát triển của mô sẹo phôi hoá từ chồi mầm dừa lùn Xiêm Xanh

Vị trí của phôi dừa được xác định dựa vào 3 mắt trên phần dừa đã gọt vỏ. Trái dừa đã gọt vỏ sẽ được đập ra bằng dao và phần thịt có phôi sẽ được tách ra. Vô trùng phôi dừa theo các bước: Phôi dừa được tách ra khỏi phần cơm dừa và khử khuẩn bằng 0,6% $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ và tráng lại 3 lần bằng nước cất vô trùng.

Phôi sau khi được vô trùng sẽ được đem vào môi trường vô khuẩn để tách chiết chồi mầm. Dưới kính phóng đại, chồi mầm được tách ra khỏi phôi và được cấy vào môi trường Y3 [13] có bổ sung 600 μM 2,4-D, 2,5 g/L than hoạt tính, 2,5 g/L phytigel và 30 g/L đường sucrose [14]. Chồi mầm *in vitro* được đặt trong môi trường tối ở nhiệt độ $27 \pm 2^\circ\text{C}$

trong 12 tuần. Sự phát triển của mô sẹo phôi hoá từ chồi mầm được kiểm tra mỗi 4 tuần.

2.2.2. Ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy chồi mầm và lượng đường sucrose đến khả năng tạo mô sẹo phôi hoá dừa lùn Xiêm Xanh

Phôi sau khi được vô trùng, được cấy vào môi trường nuôi cấy Y3 [13] đã được hấp khử trùng, có bổ sung 5 μM BAP, 1 g/L than hoạt tính và 2 g/L phytigel [15] và 3 nồng độ đường khác nhau (30, 45, 60 g/L). Phôi dừa *in vitro* sẽ được đặt trong môi trường tối, ở nhiệt độ $27 \pm 2^\circ\text{C}$, trong các khoảng thời gian 7, 10, 14 ngày.

Sau thời gian nuôi cấy phôi trong môi trường *in vitro*, chồi mầm được tách khỏi phôi và được nuôi cấy vào môi trường tạo mô sẹo với thành phần muối khoáng của Y3 [13] có bổ sung 600 μM 2,4-D, 2,5 g/L than hoạt tính và 2,5 g/L phytigel [14], chứa lượng đường tương ứng (30, 45, 60 g/L). Chồi mầm được đặt trong môi trường tối ở nhiệt độ $27 \pm 2^\circ\text{C}$, trong 12 tuần. Sau 12 tuần, kiểm tra và tiến hành thu dữ liệu.

2.2.3. Ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy chồi mầm và nồng độ đường sucrose trong môi trường nuôi cấy đối với khả năng tạo mô sẹo phôi hoá trong quá trình cấy truyền của dừa lùn Xiêm Xanh

Mô sẹo phôi hoá được hình thành và phát triển ở thí nghiệm trước được tách ra thành các cấu trúc nhỏ hơn và được nuôi cấy vào môi trường Y3 [13] có bổ sung 600 μM 2,4-D, 2,5 g/L than hoạt tính và 2,5 g/L phytigel với nồng độ đường tương ứng với môi trường trước đó. Mô sẹo dừa sẽ được đặt trong môi trường tối, ở nhiệt độ $27 \pm 2^\circ\text{C}$ trong 8 tuần. Quá trình này được lặp lại thêm 2 lần.

2.2.4. Ảnh hưởng của nồng độ chất điều hoà sinh trưởng TDZ lên quá trình tái sinh của mô sẹo dừa lùn Xiêm Xanh

Mô sẹo phôi hoá được cấy truyền qua môi trường nuôi cấy Y3 [13] có bổ sung 45 g/L đường, 2,5 g/L than hoạt tính và 7,5 g/L agar. Mô sẹo được nuôi trong môi trường này trong 8 tuần, trong môi trường tối, ở nhiệt độ $27 \pm 2^\circ\text{C}$. Sau đó, các mô sẹo tiếp tục được cấy truyền qua môi trường có bổ sung chất điều hoà sinh trưởng TDZ (với nồng độ: 0, 25, 50, 100, 150 μM) hoặc BAP (với nồng độ 300 μM). Bốn tuần đầu tiên, các mẫu

sẽ được đặt trong môi trường tối, sau đó sẽ được chuyển sang môi trường có ánh sáng với chu kỳ chiếu sáng là 16 tiếng sáng ($22,4 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$), 8 tiếng tối. Sau 2 tháng, các chỉ số được kiểm tra và các mẫu được cấy truyền vào môi trường mới.

2.2.5. Phương pháp xử lý số liệu

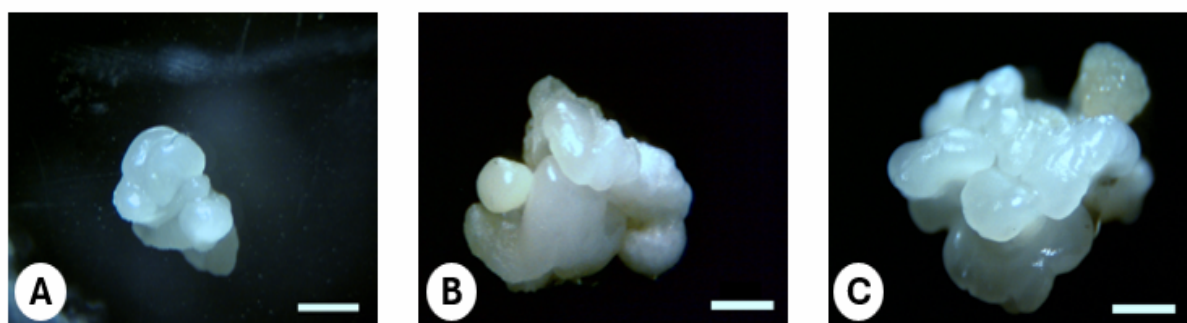
Các số liệu được thu vào cuối mỗi thời gian nuôi cấy, trước khi quá trình cấy truyền được diễn ra. Mỗi nghiệm thức sẽ có 3 lần lặp lại. Các số liệu thô thu từ thí nghiệm được xử lý và thống kê bằng phần mềm Excel và kiểm tra Tukey được thực hiện với phần mềm SPSS phiên bản 22.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

3.1. Sự phát triển của mô sẹo phôi hoá dừa lùn Xiêm Xanh

Chồi mầm được nuôi cấy trong môi trường tạo mô sẹo và sự phát triển của mô sẹo được quan sát

và thu được mỗi 4 tuần. Chồi mầm sau 4 tuần được nuôi cấy xuất hiện mô sẹo sơ cấp. Mô sẹo sơ cấp có kích thước cỡ 3 mm, phát triển từ chồi mầm, bề mặt láng và trong suốt. Hình thái này cũng được tìm thấy trong quá trình tạo mô sẹo ở dừa lùn Malay xanh [14]. Sau 8 tuần, kết quả ở hình 1B cho thấy, có sự xuất hiện của các cấu trúc hình vành tai, có màu trắng trong và bề mặt nhẵn bóng, theo Pérez- Núñez và cs (2006) [14], đây là sự hình thành của mô sẹo phôi hoá. Đến tuần thứ 12, các cấu trúc mô sẹo phôi hoá phát triển rõ ràng hơn, với kích thước to 6 - 7 mm, có hình vành tai, vẫn giữ được bề mặt nhẵn và có màu trắng trong. Các hình thái này cũng được quan sát thấy ở dừa lùn MaLay xanh trong cùng điều kiện ở ngày thứ 90 [14]. Sau 12 tuần, các cấu trúc mô sẹo phôi hoá đã hoàn thiện nhất với số lượng nhiều nhất [16]. Mốc thời gian 4, 8, 12 tuần để kiểm tra và thu mẫu ở thí nghiệm sau.



Hình 1. Sự phát triển của mô sẹo từ chồi mầm ở tuần thứ 4 (A), tuần thứ 8 (B) và tuần thứ 12 (C).
Hình thái của các cấu trúc không phải mô sẹo phôi hoá hình thành trong quá trình nuôi cấy.
Đường thẳng thể hiện 3 mm.

Nguồn: Lê Hoàng Mai (2020) [17]

3.2. Ảnh hưởng của thời gian phát triển chồi mầm đến khả năng tạo mô sẹo phôi hoá của dừa lùn Xiêm Xanh

Phôi dừa được nuôi cấy trong môi trường chứa ba nồng độ đường sucrose (30 g/L, 45 g/L và 60 g/L) trong các khoảng thời gian khác nhau (7 ngày, 10 ngày và 14 ngày), sau đó chồi mầm được tách ra và chuyển sang môi trường nuôi cấy mô sẹo. Kết quả cho thấy, quá trình nuôi cấy phôi trước khi tách chồi mầm và nồng độ đường có ảnh hưởng ý nghĩa đến khả năng tạo mô sẹo phôi hoá từ chồi mầm ở dừa lùn Xiêm Xanh.

Sau 12 tuần nuôi cấy trong tối, tất cả 8 nghiệm thức đều hình thành mô sẹo phôi hoá, trong đó nghiệm thức 7 (14 ngày - 45 g/L đường) có kết quả cao nhất, với $40,00 \pm 2,87\%$. Có 3 nghiệm thức có tỷ lệ tạo mô sẹo phôi hoá thấp và không khác biệt thống kê là nghiệm thức 1 ($16,67 \pm 4,81\%$ - thấp nhất), nghiệm thức 2 ($20,83 \pm 2,08\%$) và nghiệm thức 3 ($18,52 \pm 3,70\%$). Tuy nghiệm thức 5 và 7 có tỷ lệ tạo mô sẹo sơ cấp thấp nhất và cao nhất nhưng tỷ lệ tạo mô sẹo phôi hoá lại không sai khác về thống kê (lần lượt là $34,48 \pm 1,99\%$ và $35,35 \pm 1,01\%$) và cũng không khác biệt với nghiệm thức

6 ($36,67 \pm 1,67\%$). Các nghiệm thức từ 4 - 8 đều có tỷ lệ tạo mô sẹo phôi hoá cao hơn so với thí nghiệm không có quá trình nuôi phôi trước khi tách chiết chồi mầm [17].

Đối với giống dừa Malayan vàng lùn, 14 ngày cũng là thời gian nuôi cấy chồi mầm cho ra tỷ lệ tạo mô sẹo sơ cấp và mô sẹo phôi hoá tốt nhất [18]. Khi thử nghiệm với giống dừa Dứa, tỷ lệ mô sẹo phôi hoá cao nhất lại phát triển từ chồi mầm được nuôi cấy trước 7 ngày [19]. Trước đây, phần lớn các thử nghiệm tạo mô sẹo phôi hoá dừa từ chồi mầm đều không có bước nuôi cấy phôi trước, mà tách chồi mầm ngay sau khi khử trùng phôi [20, 14]. Nhưng theo thí nghiệm tạo mô sẹo của Rajesh và cs (2005) [21], có hơn 74% các chồi mầm từ phôi đã nuôi cấy trong môi trường 1 tháng tạo ra mô sẹo khi áp dụng lên giống dừa cao West Coast của Ấn Độ. Thí nghiệm trên giống dừa cao Hải Nam cũng chứng minh được tỷ lệ mô sẹo phôi hoá từ

chồi mầm nuôi cấy 15 ngày cao hơn so với không có quá trình nuôi cấy trước đó [22].

Ảnh hưởng của lượng đường sucrose cũng không được nghiên cứu nhiều, đường là một thành phần vô cùng thiết yếu trong quá trình nuôi cấy mô [23]. Phần lớn trong các thí nghiệm nuôi cấy mô ở dừa trước đây, môi trường nuôi cấy sẽ được cung cấp 30 g/L đường [8]. Việc tăng lượng đường trong nuôi cấy phôi soma dừa cũng được nhắc tới với các thí nghiệm thực hiện ở Mexico. Thí nghiệm tạo mô sẹo phôi hoá trên dừa lùn Malay xanh, 30 g/L đường sucrose được sử dụng trong thí nghiệm vào năm 2006 [14, 24], nhưng trong kết quả nghiên cứu vào năm 2018, với cùng các điều kiện nuôi cấy như trước, lượng đường đã tăng 50 g/L [25]. Tỷ lệ mô sẹo phôi hoá ở dừa Sáp và Dứa trên 90% ở tỉnh Trà Vinh khi sử dụng lượng đường sucrose cao 50 g/L [19].

Bảng 1. Ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy chồi mầm đến sự phát triển của mô sẹo thứ cấp và phôi hoá

STT	Nghiệm thức		Tỷ lệ hình thành mô sẹo (%)	
	Thời gian nuôi cấy chồi mầm (ngày)	Nồng độ đường sucrose (g/L)	Mô sẹo sơ cấp (%)	Mô sẹo phôi hoá (%)
1	7	45	$83,33 \pm 4,81ab$	$16,67 \pm 4,81b$
2	7	60	$83,33 \pm 2,08ab$	$20,83 \pm 2,08b$
3	10	30	$74,07 \pm 3,70b$	$18,52 \pm 3,70b$
4	10	45	$73,56 \pm 1,15b$	$34,48 \pm 1,99a$
5	10	60	$81,67 \pm 1,67ab$	$36,67 \pm 1,67a$
6	14	30	$91,92a \pm 1,01a$	$35,35 \pm 1,01a$
7	14	45	$86,67 \pm 1,67ab$	$40,00 \pm 2,87a$
8	14	60	$84,21 \pm 3,04ab$	$29,82 \pm 1,75ab$

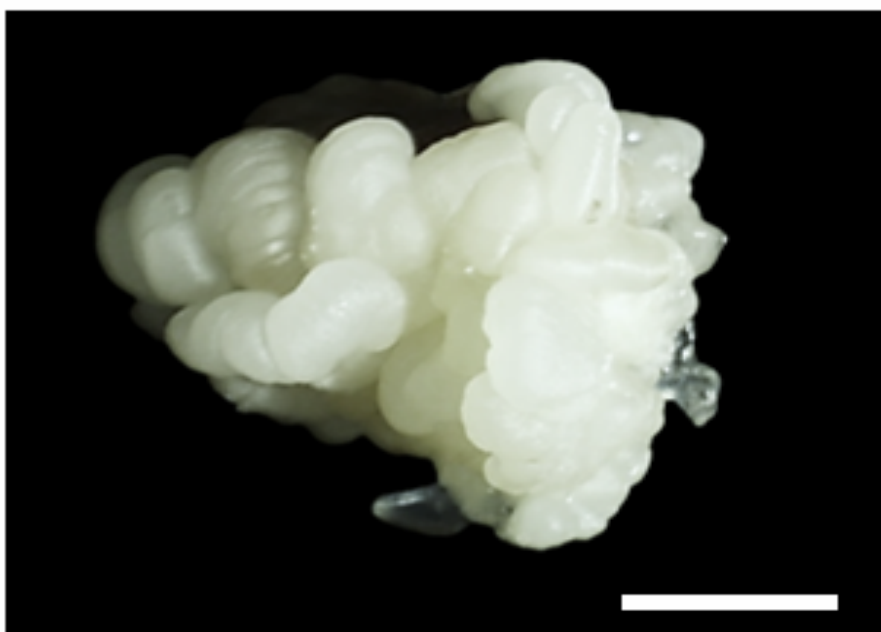
3.3. Ảnh hưởng của nồng độ đường sucrose trong môi trường nuôi cấy đến khả năng tạo mô sẹo phôi hoá thứ cấp của dừa lùn Xiêm Xanh trong quá trình cấy truyền

Sau 8 tuần nuôi cấy trong môi trường Y3 có bổ sung 600 μM 2,4-D và trong điều kiện tối, các cụm mô sẹo lớn đã hình thành và phát triển (Hình 2). Mô sẹo phôi hóa sau 8 tuần cấy truyền vẫn giữ bề ngoài trong suốt, căng đầy, với số lượng cấu trúc hình vành tai nhiều hơn so với mô sẹo ban đầu từ chồi mầm.

Tỷ lệ tạo mô sẹo phôi hóa qua các lần cấy truyền có khác nhau. Trong lần cấy truyền đầu tiên, nghiệm thức 4 có tỷ lệ tạo mô sẹo phôi hóa cao nhất, với $63,89 \pm 2,77\%$, tuy nhiên tỷ lệ này giảm dần qua các đợt cấy truyền và vào đợt cấy truyền thứ 3, tỷ lệ tạo mô sẹo phôi hóa chỉ còn $35,51 \pm 0,72\%$. Sự giảm này cũng xuất hiện với nghiệm thức 1 và qua 3 lần cấy truyền không có mô sẹo phôi hóa nào được tạo ra từ đây. Nghiệm thức 2 ở lần cấy truyền 1 có tỷ lệ tạo mô sẹo phôi hóa ở mức trung bình, với $36,67 \pm 3,33\%$, tuy nhiên sau 2 lần cấy truyền, tỷ lệ mô tăng nhanh và đạt

cao nhất với $68,18 \pm 2,62\%$ và $66,67 \pm 0,57\%$. Nghiệm thức 9, tỷ lệ tạo mô sẹo phôi hóa cũng có xu thế tăng dần qua các đợt cấy truyền. Nghiệm thức 8 có tỷ lệ tạo mô sẹo phôi hóa ổn định qua các lần cấy truyền. Các nghiệm thức còn lại có tỷ lệ tạo mô sẹo phôi hóa thay đổi không ổn định và có chiều hướng giảm.

Kết quả nghiên cứu cho thấy, 30 g/L không phù hợp trong quá trình cấy truyền mô sẹo do các nghiệm thức này đều có xu hướng giảm. Các nghiệm thức bổ sung 45 g/L và 60 g/L đường trong môi trường, tỷ lệ tạo mô sẹo có chiều hướng tăng hoặc ổn định qua các đợt cấy truyền. Điều này chứng tỏ, nồng độ đường sucrose có ảnh hưởng đến sự phát sinh mô sẹo trong giai đoạn cấy truyền mô sẹo. Ngoài ra, quá trình cấy truyền không những giúp tạo các cấu trúc mô sẹo phôi hóa to và hoàn thiện rõ hơn, mà còn giúp tăng số lượng mô sẹo và tỉ lệ tạo mô sẹo phôi hóa. Không những vậy, cấy truyền còn giúp chọn lọc các dòng mô sẹo có khả năng duy trì và phát triển môi trường có nồng độ auxin cao trong thời gian dài.



Hình 2. Mô sẹo phôi hoá phát triển 8 tuần sau quá trình cấy truyền. Đường thẳng thể hiện 3 mm

Quá trình cấy truyền mô sẹo dừa là một bước cần thiết trong quy trình tạo phôi cho dừa. Mục đích của giai đoạn cấy truyền là để giữ tính toàn

thể cho mô sẹo, cũng như cung cấp thêm dinh dưỡng để duy trì và phát triển thêm nhiều mô sẹo phôi hoá tiếp theo [14].

Bảng 2. Ảnh hưởng của số lần cấy truyền đến khả năng tạo mô sẹo phôi hoá

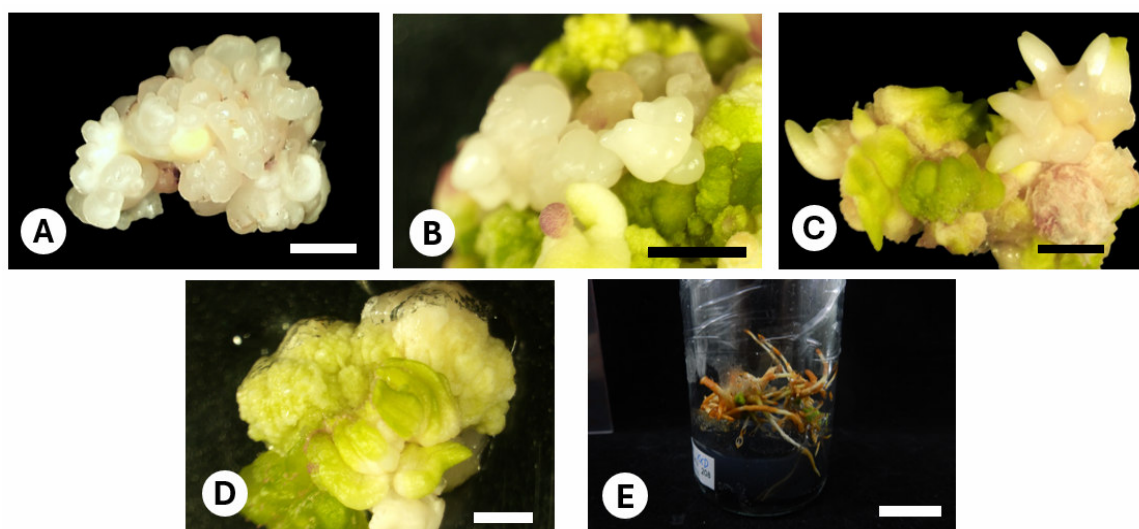
STT	Thí nghiệm		Tỷ lệ tạo mô sẹo phôi hoá (%)		
	Thời gian nuôi cấy chồi mầm (ngày)	Nồng độ đường sucrose (g/L)	Cấy truyền lần 1	Cấy truyền lần 2	Cấy truyền lần 3
1	7	30	12,28 ± 1,75f	8,33 ± 4,17e	0,00 ± 0,00g
2	7	45	36,67 ± 3,33bc	68,18 ± 2,62a	66,67 ± 0,57a
3	7	60	16,67 ± 3,33ef	50,00 ± 7,22b	19,61 ± 1,96e
4	10	30	63,89 ± 2,77a	51,61 ± 1,86b	35,51 ± 0,72c
5	10	45	42,95 ± 0,64b	20,39 ± 0,38de	24,50 ± 0,16d
6	10	60	31,43 ± 1,65cd	31,22 ± 0,42cd	46,26 ± 0,34b
7	14	30	15,32 ± 0,90ef	21,09 ± 0,68de	11,35 ± 0,24f
8	14	45	30,88 ± 0,85cd	30,85 ± 0,21cd	34,84 ± 0,13c
9	14	60	23,68 ± 1,52de	36,84 ± 1,01bc	42,82 ± 0,27b

3.4. Ảnh hưởng của nồng độ chất điều hoà sinh trưởng TDZ lên quá trình tái sinh của mô sẹo dừa lùn Xiêm Xanh

Mô sẹo phôi hoá sẽ được cấy truyền vài lần và mỗi lần kéo dài 10 - 12 tuần. Quá trình này giúp tạo ra các cụm mô sẹo to dần và khả năng tái biệt hoá tốt hơn [14]. Các cụm mô sẹo phôi hoá có kích thước gần 1 cm được cấy qua môi trường không hormone trong vòng 4 tuần. Sau 4 tuần, các cụm mẫu được đặt vào môi trường tái sinh với các nồng độ TDZ khác nhau.

Sau 2 tháng đầu tiên, các mô sẹo đã thuận thực trong môi trường tái sinh, dưới sự ảnh hưởng của chất điều hoà sinh trưởng cytokinin sẽ hình thành một số cấu trúc: Cấu trúc tiền phôi hình cầu có màu trắng đục, bề mặt trơn nhẵn

(Hình 3A) và sau đó phát triển chiều dài thành hình giọt nước (Hình 3B). Sự xuất hiện của 2 cấu trúc này cho thấy, các mẫu tế bào tái biệt hoá có cấu trúc giống phôi và sẽ có khả năng phát triển thành chồi. Tiếp theo, sau 2 tháng (tháng thứ 4), các phôi soma hình giọt nước sẽ nảy mầm dài thêm và sẽ dần chuyển sang màu xanh khi được tiếp xúc với môi trường có ánh sáng (Hình 3C). Song song với sự phát triển của phôi soma, có sự hình thành các cấu trúc không mong muốn khác như: Cấu trúc giống phổi dừa với bề mặt sần, không trơn bóng, khô cứng. Ngoài ra, rễ vô định cũng xuất hiện trong quá trình này với các cụm rễ dày đặc hình thành trực tiếp từ mô sẹo dùng để tái sinh. Sự xuất hiện của 2 hiện tượng này ảnh hưởng tới khả năng tái sinh của phôi soma.



Hình 3. Sự phát triển phôi soma của dứa lùn Xiêm Xanh Việt Nam trong môi trường tái sinh tại các thời điểm: Mới bắt đầu (A), sau 2 tháng (B) và sau 4 tháng (C). Sự hình thành của cấu trúc phôi dứa (D) và rễ bất định (E). Thanh ngang hình A, B, C, D, E biểu thị 3 mm

Bảng 3. Ảnh hưởng của TDZ đến tạo phôi soma (sau 2 tháng) và khả năng tái sinh chồi ở dứa lùn Xiêm Xanh

STT	Nghiệm thức	Tỷ lệ hình thành phôi soma (%)	Tỷ lệ phôi soma nảy mầm (%)	Tỷ lệ ra rễ bất định (%)	Tỷ lệ cấu trúc phôi dứa (%)	Tái sinh chồi*
1	300 μ M BAP	81,48 $\pm$ 2,14ab	50,62 $\pm$ 1,23ab	72,84 $\pm$ 1,23a	86,42 $\pm$ 1,23a	2/117
2	0 μ M TDZ	46,46 $\pm$ 3,84c	22,22 $\pm$ 2,22c	31,11 $\pm$ 2,22b	60,00 $\pm$ 3,85a	0
3	25 μ M TDZ	67,71 $\pm$ 1,04ab	48,96 $\pm$ 1,04ab	68,75 $\pm$ 1,08a	89,58 $\pm$ 1,04a	2/249
4	50 μ M TDZ	86,42 $\pm$ 1,23a	54,32 $\pm$ 1,23a	59,26 $\pm$ 2,14a	82,71 $\pm$ 1,23b	4/87
5	100 μ M TDZ	79,17 $\pm$ 2,08ab	64,58 $\pm$ 2,08a	70,83 $\pm$ 1,08a	77,08 $\pm$ 2,08ab	0
6	150 μ M TDZ	66,67 $\pm$ 8,33b	33,33 $\pm$ 8,33bc	66,67 $\pm$ 8,33a	91,67 $\pm$ 8,33a	0

Ghi chú: 2/117: 2 chồi tái sinh trên 117 cụm mô sẹo được nuôi cấy (khoảng 2%) sau 12 tháng; 2/249: 2 chồi tái sinh trên 249 cụm mô sẹo được nuôi cấy (khoảng 1%) sau 12 tháng; 4/87: 4 chồi tái sinh trên 87 cụm mô sẹo được nuôi cấy (khoảng 5%) sau 9 tháng.

Kết quả thu được cho thấy, TDZ có thể dùng để tái sinh phôi soma của dứa lùn Xiêm Xanh. Bảng 3 cho thấy, có sự khác biệt rõ rệt giữa các nồng độ TDZ khác nhau lên tỉ lệ hình thành phôi

soma và tỉ lệ phôi soma nảy mầm. Nghiệm thức có 50 μ M TDZ trong môi trường nuôi cấy có tỉ lệ tạo phôi soma cao nhất với 86,42%. Tỉ lệ tạo phôi soma và phôi soma nảy mầm ở 2 nghiệm thức 50 μ M và

100 μM là tốt nhất, với tỉ lệ lần lượt là 54,32% và 64,58%, cao hơn nghiệm thức đối chứng 300 μM BAP (50,62%). Nghiệm thức cho kết quả thấp nhất là nghiệm thức không có bổ sung chất điều hoà sinh trưởng, với 46,46% tỉ lệ tạo phôi soma và 22,22% phôi soma nảy mầm.

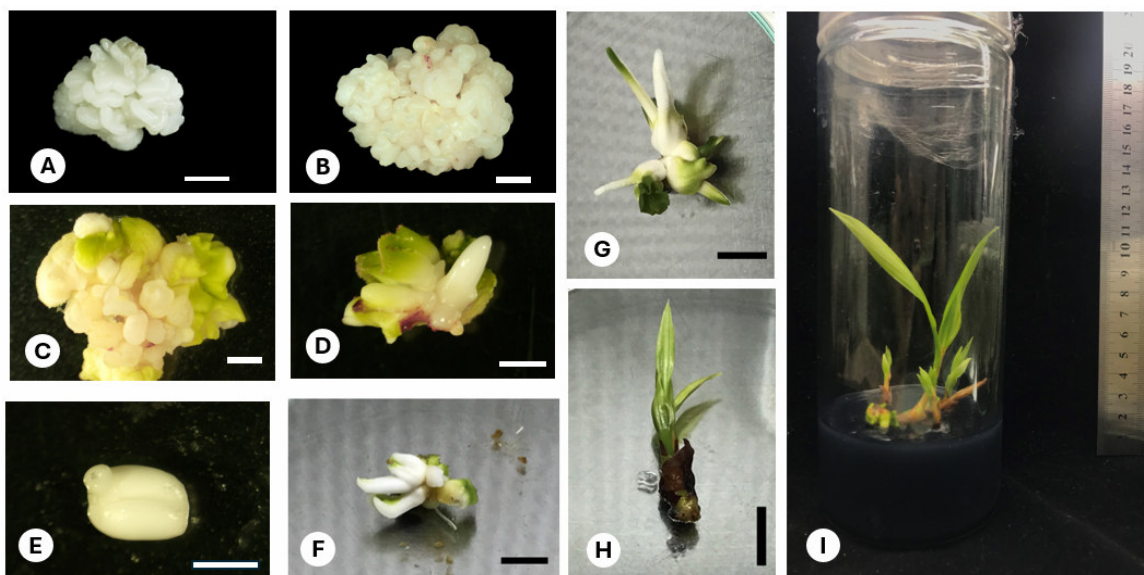
Tỷ lệ tạo phôi soma có xu hướng tăng khi lượng TDZ tăng đến ngưỡng 50 μM và sau đó giảm dần ở nghiệm thức 100 μM và 150 μM TDZ.

Tỉ lệ tạo rễ bất định và cấu trúc phôi dừa cũng rất cao. Tỷ lệ tạo rễ bất định của các nghiệm thức trừ nghiệm thức 0 TDZ không có sự khác biệt rõ ràng. Trong khi đó, hiện tượng hình thành cấu trúc phôi dừa đều trên 50%. Việc ra nhiều rễ vô định và cấu trúc phôi dừa là dấu hiệu cho thấy tế bào đã không phản ứng tín hiệu từ chất điều hoà sinh trưởng cytokinin theo hướng tạo chồi. Quan sát và thử nghiệm cho thấy, các mẫu phát triển nhiều rễ bất định hay cấu trúc phôi dừa to sẽ khó tái biệt hoá thành cấu trúc phôi soma. Điều này cho thấy, cytokinin ngoài việc tín hiệu cho tái biệt hoá thành phôi và chồi còn phát triển thành rễ và phôi dừa. Theo kết quả, trong chỉ số tạo rễ bất định, dù sự sai khác của các nghiệm thức có cytokinin là

không đáng kể, nhưng nghiệm thức với 50 μM TDZ cho ra ít rễ hơn các nghiệm thức khác. Có 4 chồi được tái sinh trên môi trường 50 μM TDZ, chồi bắt đầu phát triển từ sau 9 tháng nuôi cấy và trên 2 môi trường 25 μM TDZ, 300 μM sau khoảng thời gian 12 tháng kể từ khi bắt đầu quá trình tái sinh.

300 μM BAP được sử dụng phổ biến trong các môi trường tái sinh ở dừa [8], tuy nhiên tỉ lệ tái sinh thành công chưa cao. Chưa có nhiều nghiên cứu đề cập đến sử dụng TDZ tái sinh ở dừa, nhưng TDZ hiện nay được dùng trong các thử nghiệm phát sinh cơ quan, như tạo chồi trực tiếp từ tế bào thực vật. TDZ có hoạt tính hơn các loại cytokinin khác kể cả BAP, ngay cả khi dùng nồng độ thấp hơn [26, 27]. Kết quả trên cho thấy, tỷ lệ tạo tiền phôi và cấu trúc giọt nước ở nồng độ 100 μM TDZ tương đương với 300 μM BAP. Trước đó, vào năm 2021, TDZ đã chứng minh là có khả năng tạo chồi từ đỉnh sinh trưởng trên 3 loại dừa lùn khác nhau [28].

3.5. Quá trình kĩ thuật tạo phôi soma ở dừa lùn Xiêm Xanh



Hình 4. Quá trình phát triển của dừa từ mô sẹo đến cây con. Mô sẹo phôi hoá (A), mô sẹo được thuần thực và hình thành của phôi vô tính hình cầu (B), phôi vô tính nảy mầm thành hình chóp nón (C), phôi vô tính phát triển dài ra (D), phôi vô tính phát triển có hình thái gần giống với phôi hữu tính (E), sự phát triển của chồi sau 6 tháng (F) và sau 8 tháng (G), sự hình thành của lá thật (H), chồi trong môi trường tạo rễ (I). Thanh ngang ở hình A, B, C, D, E, F, G biểu thị 3 mm, thanh đứng ở hình H biểu thị 1 cm

Hình 4 tóm tắt lại quá trình xuyên suốt của kỹ thuật tạo phôi soma ở dừa lùn Xiêm Xanh. Mô sẹo phôi hoá được hình thành và phát triển sau 12 tuần trong môi trường Y3 có bổ sung 600 μM 2,4-D (Hình 4A). Mô sẹo được nuôi cấy trong môi trường không chất điều hoà sinh trưởng trong 4 tuần để tạo thành các tiền phôi có hình cầu màu trắng đục (Hình 4B). Trong quá trình tái sinh kéo dài từ 8 - 10 tháng, phôi soma được hình thành và phát triển, ban đầu có cấu trúc hình cầu, sau đó nảy mầm thành hình giọt nước (Hình 4D). Trong vài trường hợp, một phôi soma với hình dáng gần giống với cấu trúc phôi hữu tính tách ra ban đầu (Hình 4E). Phôi soma nảy mầm, chồi phát triển và dài ra sau 10 tháng đi kèm với sự xuất hiện của lá. Khi lá bắt đầu xuất hiện, chồi dừa con được chuyển sang môi trường chứa 5 μM BAP để kích thích phát triển chồi và tạo rễ trong 6 tháng tiếp theo (Hình 4I).

4. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

Chồi mầm dùng để tạo mô sẹo phôi hoá ở dừa lùn Xiêm Xanh khi được nuôi cấy trong môi trường nảy mầm có 45 g/L đường ở 14 ngày sẽ cho tỷ lệ tạo mô sẹo lên đến 40%. Lượng đường 45g/L giúp tạo nhiều mô sẹo phôi hoá trong quá trình cấy truyền. Chất điều hoà sinh trưởng TDZ đã chứng tỏ có khả năng tái biệt hoá mô sẹo phôi hoá của dừa với nồng độ từ 25 μM và tốt nhất ở 50 μM .

Cần có thêm các nghiên cứu để chuẩn hoá các quá trình, giúp kỹ thuật này hoàn thiện hơn.

LỜI CẢM ƠN

Cảm ơn Bộ Khoa học và Công nghệ và Chương trình nghiên cứu cây dừa (mã số ĐTĐL.CN 12/19) đã cung cấp kinh phí thực hiện đề tài.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Foale M, Harries H (2011). Farm and forestry production and marketing profile for coconut (*Cocos nucifera* L.). *Specialty Crops for Pacific Island Agroforestry*, 1 - 24. <https://www.scribd.com/document/386951912/CoconutCocos-nucifera-pdf>
2. Samosir YMS, Adkins S (2014). Improving acclimatization through the photoautotrophic culture of coconut (*Cocos nucifera*) seedlings: An

in vitro system for the efficient exchange of germplasm. *Vitro Cell Dev Biol - Plant*, 50: 493 - 501. <https://doi.org/10.1007/s11627-014-9599-z>

3. Rethinam P (2018). International scenario of coconut sector. In: Krishnakumar V, Thampan PK, Nair MA (eds) the coconut palm (*Cocos nucifera* L.) - Research and Development Perspectives. Springer Singapore, Singapore, 21 - 56. DOI: 10.1007/978-981-13-2754-4

4. Lê Thủy (2010). Đa dạng các giống dừa. <http://dost-bentre.gov.vn/tin-tuc/927/da-da%CC%A3ng-ca%CC%81c-gio%CC%81ng-du%CC%80a>. Ngày truy cập 18/02/2025.

5. India PT (2013). Asia - Pacific's "ageing" coconut trees threaten livelihoods. *Bus. Stand. India*.

6. Thái Nguyễn Quỳnh Thư, Nguyễn Đoàn Hữu Trí, Lưu Quốc Thắng (2022). *Cây dừa: Kỹ thuật nhân giống, trồng, chăm sóc và chế biến*. Nxb Nông nghiệp.

7. Silva ARA, Bezerra FML, Lacerda CF de, *et al.* (2016). Establishment of young "dwarf green" coconut plants in soil affected by salts and under water deficit. *Rev. Bras. Frutic., Jaboticabal - SP*, 38(3): e-206, 1 - 12. <https://doi.org/10.1590/0100-29452016206>

8. Nguyen QT, Bandupriya HDD, López-Villalobos A, *et al.* (2015). Tissue culture and associated biotechnological interventions for the improvement of coconut (*Cocos nucifera* L.): A review. *Planta*, 242, 1059 - 1076. <https://doi.org/10.1007/s00425-015-2362-9>

9. Von Arnold S, Sabala I, Bozhkov P, *et al.* (2002). Developmental pathways of somatic embryogenesis. *Plant Cell Tissue Organ Cult*, 69, 233 - 249. <https://doi.org/10.1023/A:1015673200621>

10. Tautorius TE, Fowke LC, Dunstan DI (1991). Somatic embryogenesis in conifers. *Can J Bot*, 69, 1873 - 1899. <https://doi.org/10.1139/b91-237>

11. Branton RL, Blake J (1983). Development of organized structures in callus derived from explants of *Cocos nucifera* L. *Ann Bot*, 52, 673 - 678. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aob.a086624>

12. Phạm Thị Phương Thúy (2017). Nghiên cứu nhân giống dừa bằng công nghệ nuôi cấy mô tế bào và kỹ thuật thâm canh dừa trồng giống nuôi cấy mô. Đề tài nghiên cứu khoa học cấp Bộ Khoa học và Công nghệ.
13. Eeuwens CJ (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. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1976.tb05022.x>
14. Pérez-Núñez MT, Chan JL, Sáenz L, *et al.* (2006). Improved somatic embryogenesis from *Cocos nucifera* L. plumule explants. *In vitro Cell. Dev. Biol. Plant*, 42, 37 - 43. <https://doi.org/10.1079/IVP2005722>
15. Tran Phuong Quynh (2019). Effects of activated charcoal and coconut water on *in vitro* growth of coconut (*Cocos nucifera* L.) zygotic embryos. Bachelor Thesis. International University - Vietnam National University HCM.
16. Osorio-Montalvo P, De-la-Peña C, Oropeza C, *et al.* (2020). A peak in global DNA methylation is a key step to initiate the somatic embryogenesis of coconut palm (*Cocos nucifera* L.). *Plant Cell Rep*, 39, 1345 - 1357. <https://doi.org/10.1007/s00299-020-02568-2>
17. Lê Hoàng Mai (2020). Effect of plumule maturity on formation of embryogenic callus in Vietnamese Xiem Xanh dwarf coconut (*Cocos nucifera* L.). Bachelor Thesis, International University - Vietnam National University HCM.
18. Nguyen Thien Quang (2018). Clonal propagation of coconut (*Cocos nucifera* L.) for elite seedling production and germplasm exchange. PhD thesis, University of Queensland.
19. Pham Nguyen Hoai Bao (2019). Effect of plumule maturity on embryogenic callus induction in Vietnamese aromatic coconut (*Cocos nucifera* L.) variety. Bachelor Thesis, International University - Vietnam National University HCM.
20. Chan JL, Sáenz L, Talavera C, *et al.* (1998). Regeneration of coconut (*Cocos nucifera* L.) from plumule explants through somatic embryogenesis. *Plant Cell Rep*, 17, 515 - 521. <https://doi.org/10.1007/s002990050434>
21. Rajesh, M.K. R E, Sajini, KK, Anitha Karun, Parthasarathy (2005). Plant regeneration through organogenesis and somatic embryogenesis from plumular explants of coconut (*Cocos nucifera* L.). *J Plant Crops*, 33, 9 - 17.
22. Mu Z, Yang S, Xu H, *et al.* (2024). The influence of maturity, storage and embryo size on Coconut callus induction success. *Forest (MDPI)*, 15(5): 764 - 776. DOI:10.3390/f15050764
23. Yaseen M, Ahmad T, Sablok G, *et al.* (2012) Review: Role of carbon sources for *in vitro* plant growth and development. *Mol. Biol. Rep*, 40(4): 1 - 13. <https://doi.org/DOI 10.1007/s11033-012-2299-z>
24. Sáenz L, Azpeitia A, Chuc-Armendariz B, *et al.* (2006). Morphological and histological changes during somatic embryo formation from coconut plumule explants. *Vitro Cell Dev Biol - Plant*, 42: 19 - 25. <https://doi.org/10.1079/IVP2005728>
25. Sáenz L, Chan JL, Narvaez M, Oropeza C (2018). Protocol for the micropropagation of coconut from plumule explants. In: Loyola-Vargas VM, Ochoa-Alejo N (eds) plant cell culture protocols. Springer New York, New York, NY, 161 - 170.
26. Capelle SC, Mok DWS, Kirchner SC, Mok MC (1983). Effects of thidiazuron on cytokinin autonomy and the metabolism of N^6 -(Δ^2 -Isopentenyl)[8- 14 C] adenosine in callus tissues of *Phaseolus lunatus* L. *Plant Physiol*, 73, 796 - 802. <https://doi.org/10.1104/pp.73.3.796>
27. Guo B, Abbasi BH, Zeb A, *et al.* (2011). Thidiazuron: A multi-dimensional plant growth regulator. *Afr J Biotechnol*, 10: 8984 - 9000. <https://doi.org/10.5897/AJB11.636>
28. Wilms H, De Bièvre D, Longin K, *et al.* (2021). Development of the first axillary *in vitro* shoot multiplication protocol for coconut palms. *Sci Rep*, 11, 18367. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-97718-1>

**EFFECT OF NUTRITIONAL MEDIA, SUCROSE AND THIDIAZURON
ON THE ABILITY OF SOMATIC EMBRYO REGENERATION THROUGH PLUMULE CULTURE
OF DWARF GREEN COCONUT**

Le Hoang Mai¹, Nguyen Thien Quang¹, Tran Van Minh¹

¹ School of Biotechnology, International University, VNU-HCM

Abstract

Coconut is an important economic crop, especially green coconut which is widely grown in the Mekong river delta with increasing demand for fresh coconut water. This study focuses on the application of somatic embryo culture technique to propagate quality green coconut, addressing the urgent need today. Three factors were investigated: the effects of shoot culture time and sugar concentration on embryogenic callus formation, and the effects of growth regulator TDZ on embryogenic callus regeneration. The results showed that 14-day embryo culture and the use of 45 g/L sugar resulted in the highest embryogenic callus formation efficiency. During regeneration, TDZ concentrations of 25 μ M and 50 μ M showed better regeneration ability than other concentrations. The study has initially created and regenerated embryogenic callus effectively for Vietnamese green coconut, opening up a potential direction for coconut breeding research.

Keywords: *Dwaft green coconut, plumule, callus, somatic embryos, Haustorium-like structures, thidiazuron (TDZ).*

Ngày nhận bài: 28/5/2025

Ngày chuyển phản biện: 6/6/2025

Ngày thông qua phản biện: 19/6/2025

Ngày duyệt đăng: 30/7/2025