



(12) **BẢN MÔ TẢ GIẢI PHÁP HỮU ÍCH THUỘC BẢNG ĐỘC QUYỀN
GIẢI PHÁP HỮU ÍCH**

(19) **Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ**

(11)



2-0003236

(51) **A01H 4/00**
2020.01

(13) **Y**

(21) 2-2019-00449

(22) 14/10/2019

(45) 25/07/2023 424

(43) 26/04/2021 397

(73) Trường Đại học Trà Vinh (VN)

Số 126 Nguyễn Thiện Thành, khóm 4, phường 5, thành phố Trà Vinh, tỉnh Trà Vinh

(72) Phạm Thị Phương Thuý (VN); Nguyễn Ngọc Trai (VN); Trương Thanh Tú (VN);
Nguyễn Hoàng Xuân Thảo (VN); Sơn Thị Thanh Nga (VN).

(54) **QUY TRÌNH NHÂN GIỐNG DỪA SÁP (COCOS NUCIFERA VAR. SAP) BẰNG
PHƯƠNG PHÁP NUÔI CẤY PHÔI HỮU TÍNH**

(57) Quy trình nhân giống dừa Sáp bằng phương pháp cấy phôi hữu tính bao gồm các bước: a) chuẩn bị nguyên liệu và tạo chồi mầm dừa Sáp; b) tạo rễ dừa Sáp; c) thích nghi ngoài vườn ươm; và d) thuần dưỡng cây dừa Sáp.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Giải pháp hữu ích đề cập đến lĩnh vực công nghệ sinh học thực vật, cụ thể là đề cập đến quy trình nuôi cấy phôi hữu tính (ECP – Embryo Culture Protocol) dừa Sáp (*Cocos nucifera* var. sap) của Việt Nam - đó là giống dừa đặc sản của tỉnh Trà Vinh Việt Nam, quy trình này có ý nghĩa rất lớn trong việc tạo giống cây dừa Sáp để trồng qui mô lớn. Cây dừa Sáp giống được tạo ra từ phương pháp nuôi cấy phôi hữu tính cho tỷ lệ trái sáp/quả cao hơn so với phương pháp nhân giống truyền thống là ươm cây giống từ các trái dừa không sáp thuộc cây dừa Sáp.

Tình trạng kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Cây dừa là một trong các cây lấy dầu quan trọng nhất thế giới phân bố rộng rãi từ vĩ độ 20 Bắc xuống tận vĩ độ 20 Nam của đường xích đạo với tổng diện tích 12,06 triệu ha được trồng tại 93 quốc gia (Nguyễn Thị Bích Hồng, 2013). Thế giới có hai nhóm dừa chính là nhóm dừa cao có đặc tính chung là thụ phấn chéo và nhóm dừa lùn có đặc tính chung là tự thụ phấn. Các giống dừa hiếm và có giá trị kinh tế cao hiện nay gồm có dừa Sáp, dừa Dứa, dừa Sọc và dừa Bung.... Trong 93 nước trồng dừa trên thế giới thì dừa Sáp được trồng ở 9 nước. Ở mỗi nước dừa Sáp có tên gọi khác nhau: Campuchia gọi là *Dong Kathi*; Ấn Độ gọi là *Thairu Thengai*; Indonesia gọi là *Kelapa Kopyor*; Malaysia gọi là *Kelapa Kopyor*; Papua New Guinea gọi là *Moon Makan*; Philippines gọi là *Makapuno*; Sri Lanka gọi là *Dikiri Pol*; Thái Lan gọi là *Maphao Kathi* và Việt Nam gọi là *dừa Sáp*. Dừa Sáp là giống dừa đột biến có cơm mềm và gần như đặc ruột. Phôi của trái dừa Sáp không nảy mầm trong điều kiện tự nhiên (Nguyễn Thị Bích Hồng, 2010). Chính vì vậy, việc nghiên cứu nhân giống dừa Sáp rất được quan tâm nghiên cứu.

Hiện nay, trên thế giới có 2 phương pháp nhân giống dừa Sáp được sử dụng phổ biến: Ươm trái và nuôi cấy phôi hữu tính. Phương pháp ươm trái là sử dụng trái không sáp trên quây dừa có trái sáp để ươm thành cây, với phương pháp này cây giống tạo ra có tỷ lệ trái sáp/quây thấp (< 25%) (Võ Văn Long, 2007). Phương pháp nuôi cấy phôi hữu

tính là sử dụng phôi hữu tính từ trái sáp, nuôi cấy trong môi trường nhân tạo, với phương pháp này cây giống tạo ra có tỷ lệ trái sáp/quả theo lý thuyết có thể đạt 100%. Với tỷ lệ trái sáp/quả cao nên có nhiều nghiên cứu quy trình nuôi cấy phôi hữu tính dừa Sáp trong và ngoài nước được thực hiện.

Từ những năm 1960, nhóm nghiên cứu của Trường Đại học Phillipines tại Los Banos do De Guzman dẫn đầu đã nghiên cứu và chứng minh được phôi dừa Sáp sau khi tách ra khỏi trái có khả năng phát triển khi được nuôi cấy *in vitro* trong môi trường White (1942) với tỷ lệ nảy mầm có thể đạt 75-95% (De Guzman et al 1964). Kỹ thuật nuôi cấy phôi đã được phát triển bởi Rillo và Paloma (1962) nhằm cải tiến môi trường nuôi cấy phôi dừa Sáp và đã chứng minh được rằng phôi dừa Sáp phát triển tốt trong môi trường Y3 (môi trường được nghiên cứu phát triển ở Anh bởi Eeuwens năm 1976 chuyên dùng cho nuôi cấy mô cây dừa) mà không bổ sung chất điều hòa sinh trưởng thực vật. Areza-Ubaldo *et al*, (2003) đã nghiên cứu cải tiến thành công quy trình nuôi cấy phôi dừa Sáp nhằm tạo ra lượng cây giống lớn phục vụ nhu cầu thương mại. Tuy nhiên, tỷ lệ cây giống/phôi được xuất vườn < 1. Năm 2003, Areza-Ubaldo tại Trung tâm nghiên cứu Dừa Phillipines đã nghiên cứu cải tiến môi trường nuôi cấy phôi hữu tính cây dừa Sáp (Areza-Ubaldo *et al*, 2003). Theo Maria Buena *et al*, (2003) tỷ lệ thành công của qui trình đạt 42% với thời gian 10-13 tháng tính từ lúc phôi được cấy vào môi trường đến khi cây phát triển hoàn chỉnh có thể đem trồng. Các nghiên cứu trong nước được thực hiện bởi nhóm tác giả thuộc Viện Nghiên cứu Dầu và Cây có dầu giai đoạn 2001-2005 về quy trình nhân giống dừa Sáp bằng kỹ thuật nuôi cấy phôi hữu tính trong điều kiện *in-vitro* cho tỷ lệ thành công của qui trình 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). Kết quả nghiên cứu nhân giống dừa Sáp bằng phương pháp nuôi cấy phôi hữu tính được báo cáo bởi Trường Quốc Ánh (2012) cho thấy tỷ lệ phôi phát triển thành cây đạt tiêu chuẩn trồng ra đồng 19-20% với thời gian nuôi cấy từ 21-23 tháng, trong đó phôi dừa được chọn từ những trái 9 tháng tuổi, phôi đưa vào môi trường tạo chồi cây chuyển 1 lần/tháng trong thời gian 10-11 tháng. Những nghiên cứu tiếp theo nhằm cải tiến và hoàn thiện quy trình nhân giống dừa Sáp bằng phương pháp nuôi cấy phôi hữu tính đã được Viện Nghiên cứu Dầu và Cây có

dầu thực hiện, đến nay tỷ lệ thành công qui trình đạt 47,3%, thời gian phát triển hoàn thiện từ phôi hữu tính thành cây đủ tiêu chuẩn xuất vườn là 12 – 14 tháng (Ngô Thị Kiều Dương, 2013). Hạn chế của những nghiên cứu được thực hiện trước đây là thời gian tạo cây giống còn dài, số lần cấy chuyển nhiều lần dẫn đến tỷ lệ mẫu bị nhiễm vi sinh vật cao nên tỷ lệ thành công của quy trình (tỷ lệ cây xuất vườn/số phôi ban đầu) thấp, chưa đáp ứng được nhu cầu cây giống dừa Sáp chất lượng cao để trồng qui mô lớn.

Bản chất kĩ thuật của giải pháp hữu ích

Mục đích của giải pháp hữu ích nhằm nghiên cứu hoàn thiện quy trình nuôi cấy phôi hữu tính dừa Sáp thông qua việc rút ngắn thời gian của quy trình nuôi cấy phôi và tăng tỷ lệ cây giống được xuất vườn/tổng số phôi ban đầu, qua đó giúp giảm giá thành cây giống.

Cụ thể là, quy trình nhân giống dừa Sáp bằng phương pháp nuôi cấy phôi hữu tính bao gồm các bước: a) chuẩn bị nguyên liệu và tạo chồi mầm dừa Sáp; b) tạo rễ dừa Sáp; c) thích nghi cây ngoài vườn ươm; và d) thuần dưỡng cây dừa Sáp.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Hình 1 thể hiện vắn tắt quy trình nhân giống cây dừa Sáp.

Hình 2 thể hiện phôi được tách khỏi trái dừa bằng máy khoan có phần gáo dừa và com dừa bao quanh (hình 2a) và được ngâm vào cồn 70% (hình 2b).

Hình 3 thể hiện chồi mầm hình thành sau 1-1,5 tháng cấy vào môi trường Y3 có bổ sung 2 mg/l BA và 0,2 mg/l NAA.

Hình 4 thể hiện phôi hình thành chồi mầm được tách bỏ màng bao chồi mầm và cấy chuyển vào môi trường tạo rễ.

Hình 5 thể hiện cây dừa Sáp nuôi cấy phôi hữu tính có độ đồng đều cao nhờ tách màng bao chồi mầm (hình 5a) và cây dừa Sáp giai đoạn đầu hình thành lá (hình 5b).

Hình 6 thể hiện cơ chất và cây dừa Sáp giai đoạn thích nghi ngoài vườn ươm, trong đó hình 6a thể hiện cơ chất; hình 6b thể hiện cây dừa Sáp đạt chuẩn ra ngôi; hình 6c thể hiện cây dừa Sáp giai đoạn thích nghi; và hình 6d thể hiện hộp nilon giữ ẩm độ cho cây.

Hình 7 thể hiện dừa Sáp cấy phôi giai đoạn thuần dưỡng 4,5-5,5 tháng tuổi, đạt chuẩn cây con (hình 7a và 7b).

Mô tả chi tiết giải pháp hữu ích

Quy trình nhân giống dừa Sáp (*Cocos nucifera* var. sap) theo giải pháp hữu ích bao gồm 4 bước từ lúc chọn trái tách phôi đến giai đoạn cây đủ tiêu chuẩn xuất vườn.

Môi trường nuôi cấy được sử dụng trong quy trình này là môi trường Y3 đã biết có thành phần như sau:

Bảng 1. Thành phần môi trường Y3:

	Thành phần môi trường	Nồng độ
		1x (mg/L)
Đa lượng	NH ₄ Cl	535
	KNO ₃	2,020
	MgSO ₄ .7H ₂ O	247
	CaCl ₂ .2H ₂ O	294
	KCl	1,492
	NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O	312
Vi lượng		1x(mg/L)
	KI	8,3
	H ₃ BO ₃	3,1
	MnSO ₄ .4H ₂ O	11,2
	ZnSO ₄ .7H ₂ O	7,2
	CuSO ₄ .5H ₂ O	0,25
	CoCl ₂ .6H ₂ O	0,24
	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,24
	NiCl ₂ .6H ₂ O	0,024
Fe-EDTA	Fe ₂ SO ₄ .7H ₂ O	41,7
	Na ₂ EDTA	55,8
Vitamin và Axit min	Pyridoxine HCl	0,05
	Thiamine HCl	0,05
	Nicotinic acid	0,05
	Ca-D-pantothenate	0,05
	Biotin	0,05
	Inositol	100
	Folic acid	0,05
	Glycine	1

Các khoáng đa lượng, vi lượng, Fe-EDTA, vitamin và axit min được pha thành dung dịch mẹ như sau:

- Các thành phần khoáng đa lượng được cân cho vào các cốc (beaker) riêng lẻ với khối lượng gấp 10 lần khối lượng ở bảng 1 (10X). Hòa tan bằng nước cất sau đó cho tất

cả các thành phần vào bình định mức 1.000 ml. Cho nước cất vào tới vạch 1.000 ml. Sau đó cho vào chai trung tính trữ tủ mát. Hút 100 ml để pha 1 lít môi trường Y3.

- Khoáng vi lượng được pha thành dung dịch mẹ với nồng độ 200X: các thành phần được cân cho vào mỗi cốc riêng lẻ với khối lượng cao gấp 200 lần khối lượng được nêu ở bảng 1. Dùng nước cất hòa tan các chất. Rót dung dịch đã hòa tan vào bình định mức 1.000 ml, thêm nước vào tới vạch định mức. Rót dung dịch mẹ vào chai trung tính 1.000 ml và trữ ở tủ mát. Hút 5 ml để pha 1 lít môi trường Y3.

- Fe-EDTA được pha thành dung dịch mẹ 20X: các thành phần Fe-EDTA ở bảng 1 được cân với khối lượng gấp 20 lần cho vào các beaker riêng. Dùng nước ấm hòa tan các chất. Rót lần lượt Na_2EDTA và $\text{Fe}_2\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ vào bình định mức 1.000 ml, thêm nước cất vừa đủ. Rót dung dịch mẹ vào chai trung tính 1000 ml và trữ ở tủ mát. Hút 50 ml để pha 1 lít môi trường Y3.

- Vitamin được pha thành dung dịch mẹ 500X: các thành phần vitamin ở bảng 1 (trừ Inositol) được cân với khối lượng gấp 500 lần cho vào cốc riêng. Hòa tan bằng nước cất. Rót các thành phần vào bình định mức 1.000 ml, thêm nước cất vừa đủ. Rót dung dịch mẹ vào chai trung tính 1.000 ml và trữ ở tủ mát. Hút 2 ml để pha 1 lít môi trường Y3. Riêng thành phần Inositol được bổ sung vào môi trường khi pha, không pha chung với các chất trong dung dịch mẹ.

Quy trình nhân giống dừa Sáp (*Cocos nucifera* var. *sap*) bằng phương pháp nuôi cấy phôi hữu tính bao gồm các bước sau:

a) Chuẩn bị nguyên liệu và tạo chồi mầm dừa Sáp:

Trái giống được chọn cấy phôi là những trái dừa Sáp. Trái có độ tuổi từ 12-12,5 tháng tuổi, đặc điểm trái dừa giai đoạn này là vỏ bên ngoài đã chuyển từ màu xanh (giai đoạn chưa già) sang màu xám, khi lắc trái dừa thì có âm thanh đục, phần gáo dừa bên trong sau có màu đen.

Trái được chọn dùng dao tách bỏ phần vỏ bên ngoài, cạo sạch sau đó đưa vào phòng lấy mẫu để tách lấy phôi. Phôi dừa được lấy ra khỏi trái bằng máy khoan sử dụng mũi khoan kính đường kính 27 mm. Trong các phương pháp lấy phôi phổ biến trước đây ở Phillipines và trong nước (Trương Quốc Ánh và cs, 2012), trái dừa được bổ đôi theo

chiều ngang, sau đó sử dụng khoan tay là ống kim loại hình trụ để khoan lấy một phần cơm dừa có chứa phôi. Tuy nhiên, hạn chế của phương pháp này là khi bỏ đôi trái dừa sẽ làm gia tăng tỷ lệ nhiễm vi sinh vật, phôi dễ dàng rơi ra khỏi phần thịt bao quanh và phần bảo vệ đỉnh phôi (gáo dừa) không được tách kèm theo phôi nên khi khử trùng, hóa chất khử trùng tiếp xúc trực tiếp mầm phôi, làm giảm tỷ lệ nảy mầm. Việc sử dụng máy khoan để tách cả phần gáo dừa và cơm dừa chứa phôi ra khỏi quả dừa sáp, sau đó khử trùng toàn bộ bằng cồn 70% đã khắc phục được các nhược điểm của các phương pháp nêu trên.

Phôi sau khi lấy khỏi trái có lớp cơm dừa bao xung quanh và phần gáo dừa bên trên sẽ được cho vào cốc (beaker) thủy tinh đã được khử trùng sạch. Công đoạn tách vỏ dừa, khoan lấy phôi được thực hiện trong điều kiện phòng thí nghiệm thông thường. Phôi dừa đựng trong cốc được mang vào tủ cấy vô trùng. Khử trùng phôi dừa bằng cách cho cồn 70% vào trong cốc chứa phôi dừa sao cho cồn ngập tất cả các phôi. Thời gian khử trùng 15 phút. Theo Trương Quốc Ánh, (2012) thì việc khử trùng phôi dừa Sáp bằng Calcium hypochlorid 5% thời gian 20 phút cho tỷ lệ mẫu sống đạt 82,3%. Việc cải tiến quy trình khử trùng trước đây (sử dụng $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ hoặc NaClO) bằng cồn 70% cho thấy hiệu quả trong việc tiết kiệm thời gian khử mẫu, giảm tỷ lệ nhiễm vi sinh vật và tăng tỷ lệ nảy mầm đạt 95%.

Sau khi khử trùng phôi, rót phần cồn sau khử trùng vào cốc khác. Dùng nhíp y tế gấp phôi dừa ra đĩa petri đã khử trùng, dùng dao mổ y tế tách bỏ phần gáo dừa và cơm dừa bao quanh phôi, sau đó cho phôi vào ống nghiệm chứa môi trường tạo chồi mầm đã được hấp khử trùng trước đó. Môi trường tạo chồi mầm là môi trường Y3 được bổ sung 2 mg/l BA, 0,2 mg/l NAA, 1 g/l than hoạt tính, 60 g/l đường saccaroza, 10% nước dừa già (theo thể tích). Môi trường được điều chỉnh pH 5,6 trước khi hấp khử trùng trong nồi hấp ở 121°C áp suất 1 atm. Mẫu sau khi cấy được đặt ở phòng nuôi cây có nhiệt độ $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$, ẩm độ 60%, ánh sáng 0 Lux (che tối hoàn toàn). Tỷ lệ phôi sống và hình thành chồi là 95%. Thời gian nuôi trong môi trường tạo chồi mầm: 1-1,5 tháng.

b) Tạo rễ dừa Sáp

Sau thời gian cấy phôi vào môi trường tạo chồi mầm từ 1-1,5 tháng hầu hết các phôi dừa Sáp ở bước a) đã hình thành chồi mầm và rễ mầm. Tuy nhiên, do màng bao phôi dừa

Sáp được cấu tạo bởi lớp cutin (da) rất dày gây khó cho chồi mầm thoát khỏi màng bao đặc biệt là đối với các phôi có sức sống kém. Vì vậy, cây nảy mầm không đồng loạt dẫn đến không đồng đều khi ra vườn ươm, khó sản xuất qui mô công nghiệp. Để khắc phục nhược điểm này, các phôi được tiến hành tách màng bao chồi mầm. Việc tách màng bao chồi mầm vừa giúp nảy mầm thuận lợi vừa giúp chồi mầm phát triển nhanh hơn. Các phôi trong ống nghiệm thu được ở bước a) được cho vào tủ cấy vô trùng, dùng nhíp gấp phôi ra đĩa petri vô trùng, dùng dao mổ y tế cắt hai bên màng bao phần chồi mầm nhô ra, tách bỏ màng bao. Dùng nhíp gấp phôi đã được tách màng bao cắm vào môi trường tạo rễ dạng đặc được hấp khử trùng chuẩn bị sẵn sao cho phần chồi mầm hướng lên phía trên phần phôi còn lại và phần rễ hướng xuống môi trường. Môi trường tạo rễ là môi trường Y3 được bổ sung 2 mg/l NAA và 0,2 mg/l BA, 1,5 g/l than hoạt tính, 40 g/l đường saccaroza, 4,5 g/l agar, 10% nước dừa già (theo thể tích). Môi trường được rót vào chai thủy tinh có thể tích 700 ml, mỗi chai chứa 250 ml môi trường. Môi trường được điều chỉnh pH=5,6 trước khi cho vào chai và hấp khử trùng trong nồi hấp 121°C áp suất 1 atm. Cây phôi sau cấy được đặt vào phòng nuôi cây có nhiệt độ $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$, ẩm độ 60% và cường độ chiếu sáng 2.000 – 2.500 Lux 16 giờ/ngày, để cây hình thành và hoàn thiện bộ rễ trước khi ra vườn ươm. Tỷ lệ phôi tạo chồi và rễ là 82%. Thời gian nuôi trong môi trường tạo rễ: 3 - 3,5 tháng.

c) Thích nghi cây ngoài vườn ươm

Cây sau khi cấy vào môi trường ra rễ thời gian 3 – 3,5 tháng, đã hình thành và hoàn thiện bộ rễ và có từ 2-3 lá sẽ được chọn để ra ngôi. Cây đủ tiêu chuẩn được mang ra thích nghi nhiệt độ và ánh sáng 15 ngày. Sau đó dùng thanh sắt để đập vỡ các chai chứa cây dừa, lấy cây ra khỏi chai, vệ sinh sạch phần môi trường bám quanh rễ cây. Sau đó dùng giấy thấm nước bao bọc xung quanh cây và phun nước giữ ẩm trong vòng 24 giờ nhằm giúp rễ cây được khô sạch thích nghi với điều kiện ẩm độ thấp của môi trường bên ngoài. Cây được trồng trong chậu nhựa PE đường kính 20 cm với cơ chất: trấu: phân bò: mùn dừa tỷ lệ: 2:1:1 (tỷ lệ thể tích) có bổ sung thêm 5-10 gam nấm Tricoderma/100kg cơ chất. Tất cả cơ chất đều phải được ủ hoai và hấp triệt trùng trước khi sử dụng. Cây được giữ ẩm trong hộp phủ nilon màu trắng mỗi hộp 20 cây nhằm giảm sự thoát hơi nước. Cây được

giữ ẩm bằng cách tưới phun sương có gắn hệ thống cảm biến để duy trì ẩm độ từ 95 - 100%, nhiệt độ: 27-29°C, ánh sáng 25-30 Klux. Sau thời gian thích nghi từ 1,5 - 2,5 tháng, những cây đã sống sẽ có lá mới hình thành. Lúc này cây được lấy ra khỏi hộp và thay chậu nhằm bổ sung cơ chất cho cây. Tỷ lệ cây phôi sống ở giai đoạn này là 85%.

d) Thuần dưỡng cây dừa Sáp

Những cây dừa Sáp cây phôi sống được sau bước 3 sẽ được tiến hành thay chậu và cung cấp dinh dưỡng để cây phát triển. Chậu được sử dụng ở giai đoạn này là chậu nhựa PE với kích thước đường kính đáy 22 cm, đường kính miệng 27 cm, chiều cao 23 cm. Cơ chất bổ sung ở giai đoạn này là trấu: phân bò: mụn dừa tỷ lệ 1:1:1 (tỷ lệ thể tích). Quá trình thay chậu được tiến hành như sau: dùng kéo cắt dọc túi nylon 2 đường đối diện nhau hướng từ trên xuống, dùng tay nhẹ nhàng tháo túi ra khỏi cây, chuyển cây đặt giữa chậu lớn cần chuyển, bổ sung cơ chất vào xung quanh cho đến khi cơ chất bổ sung cao bằng cổ rễ. Đặt cây vào khu vực chăm sóc sau thay chậu. Đảm bảo ẩm độ từ 85-90%, nhiệt độ từ 27-29°C và ánh sáng từ 35-40 Klux. Cây được bón phân hữu cơ vi sinh, DAP 18-46-0 và Kali clorua 60% K₂O, trộn đều với tỷ lệ 1:1:1 (tỷ lệ khối lượng). Thời gian bón: 15 ngày bón 1 lần, rải đều lên bề mặt cơ chất trong chậu. Liều lượng từ 5-10 gam/chậu. Cây phát triển đạt tiêu chuẩn xuất vườn (cây có từ 4-5 lá, chiều cao cây từ 40-50 cm). Tỷ lệ cây sống đạt tiêu chuẩn cây giống 95%. Thời gian thuần dưỡng: 4,5-5,5 tháng.

Ví dụ thực hiện giải pháp hữu ích

Ví dụ 1: Nhân giống dừa Sáp bằng phương pháp nuôi cây phôi hữu tính

Chọn trái dừa sáp có độ tuổi từ 12-12,5 tháng tuổi để tách lấy phôi. Sử dụng máy khoan với mũi khoan có đường kính 27 mm để tách phôi có cả phần gáo dừa và cơm dừa ra khỏi quả dừa Sáp. Sau đó, khử trùng toàn bộ phần này với cồn 70% trong 15 phút bằng cách cho cồn 70% vào cốc chứa phôi dừa sao cho cồn ngập tất cả phôi.

Tiến hành tách bỏ phần gáo dừa và cơm dừa bao quanh phôi và cấy vào ống nghiệm chứa 20 ml môi trường tạo chồi mầm là môi trường Y3 được bổ sung 2 mg/l BA, 0,2 mg/l NAA, 1 g/l than hoạt tính, 10% thể tích nước dừa già và 60 g/l đường saccharoza,

pH= 5,6. Nuôi cấy trong điều kiện tối hoàn toàn ở nhiệt độ $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$, ẩm độ 60% trong thời gian 1-1,5 tháng.

Sau thời gian nuôi cấy trong môi trường tạo chồi mầm, hầu hết các phôi đã tạo chồi mầm và rễ mầm. Tiến hành tách bỏ phần màng bao chồi mầm để giúp các phôi phát triển đồng đều và nhanh hơn, sau đó cấy phôi đã tách màng bao chồi mầm vào chai 750 ml chứa 250 ml môi trường tạo rễ đã được khử trùng. Môi trường tạo rễ là môi trường Y3 được bổ sung 2 mg/l NAA và 0,2 mg/l BA, 1,5 g/l than hoạt tính, 10% thể tích nước dừa già, 40 g/l đường saccarosa, 4,5 g/l aga, pH= 5,6, nuôi cấy ở nhiệt độ $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$, ẩm độ 60% và cường độ chiếu sáng 2.000 – 2.500 Lux, 16 giờ/ngày. Thời gian nuôi trong môi trường tạo rễ: 3 - 3,5 tháng.

Cây sau khi cấy vào môi trường ra rễ thời gian 3 – 3,5 tháng đã hình thành và hoàn thiện bộ rễ và có từ 2-3 lá sẽ được chọn để ra ngôi. Cây đủ tiêu chuẩn được mang ra thích nghi nhiệt độ và ánh sáng 15 ngày. Sau đó, cây được trồng trong bầu đất với cơ chất: trấu: phân bò: mùn dừa tỷ lệ: 2:1:1 (tỷ lệ thể tích) có bổ sung thêm 5-10 gam nấm Tricoderma/100kg cơ chất. Cây được giữ ẩm trong hộp phủ nilon màu trắng, mỗi hộp 20 cây. Cây được giữ ẩm bằng cách tưới phun sương có gắn hệ thống cảm biến để duy trì ẩm độ cho cây từ 95 -100%, nhiệt độ: $27-29^{\circ}\text{C}$, ánh sáng 25-30 Klux. Giai đoạn thích nghi ngoài vườn ươm kéo dài từ 1,5 - 2,5 tháng.

Những cây dừa Sáp cấy phôi sống được sau bước 3 sẽ được tiến hành thay chậu và cung cấp dinh dưỡng để cây phát triển. Chậu được sử dụng ở giai đoạn này là chậu nhựa PE tròn, cao 23 cm x đường kính đáy 22 cm. Cơ chất bổ sung ở giai đoạn này là trấu: phân bò: mùn dừa tỷ lệ 1:1:1 (tỷ lệ thể tích). Đảm bảo ẩm độ cho cây từ 85-90%, nhiệt độ từ $27-29^{\circ}\text{C}$ và ánh sáng từ 35-40 Klux. Cây được bón phân hữu cơ vi sinh, DAP 18-46-0 và Kali clorua 60% K_2O , trộn đều với tỷ lệ 1:1:1 (tỷ lệ khối lượng). Thời gian bón: 15 ngày bón 1 lần, rải đều lên bề mặt cơ chất trong chậu. Liều lượng từ 5-10 gam/chậu. Cây phát triển đạt tiêu chuẩn xuất vườn (cây có từ 4-5 lá, chiều cao cây từ 40-50 cm). Tỷ lệ cây sống đạt tiêu chuẩn cây giống 95%. Thời gian thuần dưỡng: 4,5-5,5 tháng.

Ví dụ 2: Nghiên cứu môi trường Y3 bổ sung 0,2 mg/l BA + 2 mg/l NAA + kết hợp tách màng bao chồi mầm (TMBM).

Trong nhân giống bằng phương pháp nuôi cấy phôi hữu tính, cây con thường phát triển không đồng đều do khả năng nảy mầm của mỗi phôi không giống nhau và chồi mầm bị bao quanh bởi màng bao phôi. Màng bao chồi mầm dừa Sáp được cấu tạo bởi lớp cutin (da) rất dày gây khó cho mầm thoát khỏi màng bao, đặc biệt là đối với các phôi có sức sống kém. Chồi mầm muốn phát triển thành cây thì mầm phải thoát ra khỏi màng bao. Độ cứng của màng bao mầm khác nhau ở từng phôi, nên thời gian mầm thoát ra khỏi màng bao là khác nhau ở mỗi phôi, điều này dẫn đến không đồng đều về chiều cao cây dừa cấy phôi ở cùng một đợt sản xuất. Các phôi sau khi cấy vào môi trường tạo chồi mầm khoảng 1-1,5 tháng đã hình thành chồi mầm, được thử nghiệm cấy vào các môi trường có hoặc không bổ sung chất điều hòa sinh trưởng, tách hoặc không tách màng bao chồi mầm để theo dõi sự nảy mầm của phôi và độ đồng đều của cây con.

Việc tách màng bao chồi mầm cho thấy hiệu quả trong việc giúp chồi phát triển so với chỉ bổ sung chất điều hòa sinh trưởng mà không tách màng bao mầm. Trong các nghiệm thức được nghiên cứu, nghiệm thức (Y3 + 0,2 mg/l BA + 2 mg/l NAA + TMBM) có 82% phôi bật chồi mầm, phát triển thân lá, chiều cao trung bình cao nhất đạt $35,4 \pm 0,15$ mm khác biệt có ý nghĩa thống kê so với đối chứng. Ngoài ra, việc tách màng bao chồi mầm cũng làm tăng tỷ lệ nảy mầm và độ đồng đều của cây dừa Sáp nuôi cấy phôi hữu tính.

Hiệu quả đạt được của giải pháp hữu ích

Quy trình nhân giống dừa Sáp bằng phương pháp nuôi cấy phôi hữu tính được nghiên cứu cải tiến của Trường Đại học Trà Vinh mang đến hiệu quả như sau:

- Tách phôi bằng máy khoan chứa cả phần gáo dừa, cơm dừa bao quanh phôi và phôi là phương pháp mới, dễ thực hiện. Phôi được tách bằng phương pháp này khử trùng đạt tỷ lệ mẫu sạch và nảy mầm cao.
- Số lần cấy chuyển rất ít (chỉ 1 lần khi chồi mầm hình thành và phôi được tách màng bao chồi mầm để cấy vào môi trường tạo rễ) nên giảm tỷ lệ mẫu nhiễm vi sinh vật,

giảm công lao động, giảm hóa chất môi trường, giảm chi phí điện nước và khấu hao thiết bị. Qua đó góp phần tăng tỷ lệ thành công của qui trình, giảm giá thành cây giống khi sản xuất qui mô công nghiệp.

- Tách màng bao chồi mầm giúp cây phát triển đồng đều và rút ngắn được thời gian nuôi cây trong phòng thí nghiệm.

- Việc chiếu sáng khi cây đã hình thành lá mà không chiếu sáng giai đoạn vào mẫu hoặc giai đoạn đầu hình thành chồi giúp tiết kiệm điện năng trong quá trình sản xuất, giảm giá thành cây giống.

- Quy trình đạt tỷ lệ thành công 63% (63 cây xuất vườn/100 phôi được đưa vào môi trường tạo chồi mầm) thời gian từ lúc đưa phôi vào môi trường tạo chồi mầm đến khi cây đạt tiêu chuẩn xuất vườn từ 10-13 tháng.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Quy trình nhân giống dừa Sáp (*Cocos nucifera* var. sap) bằng phương pháp nuôi cấy phôi hữu tính bao gồm các bước:

a) Chuẩn bị nguyên liệu và tạo chồi mầm dừa Sáp:

- chọn trái dừa Sáp có độ tuổi từ 12-12,5 tháng tuổi để tách lấy phôi đưa vào môi trường tạo chồi mầm;

- dùng máy khoan khoan lấy phần phôi chứa phần gáo dừa và cơm dừa bao quanh phôi;

- khử trùng phần phôi cùng phần gáo dừa và cơm dừa bao quanh phôi bằng cồn 70% trong thời gian 15 phút, sau đó tách lấy phôi và cấy vào ống nghiệm chứa 20 ml môi trường tạo chồi mầm, trong đó môi trường tạo chồi mầm là môi trường Y3 được bổ sung 2 mg/l BA, 0,2 mg/l NAA, 1 g/l than hoạt tính, 60 g/l đường saccaroza, 10% nước dừa già (theo thể tích), pH= 5,6, nuôi cấy trong điều kiện tối hoàn toàn ở nhiệt độ $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$, ẩm độ 60% trong thời gian 1-1,5 tháng;

b) Tạo rễ dừa Sáp:

- tách bỏ phần màng bao chồi mầm nhô ra từ các phôi thu được ở bước a);

- cấy phôi đã tách bỏ phần màng bao chồi mầm vào môi trường tạo rễ đặc là môi trường Y3 được bổ sung 2 mg/l NAA và 0,2 mg/l BA, 1,5 g/l than hoạt tính, 40 g/l đường saccaroza, 4,5 g/l agar, 10% nước dừa già (theo thể tích), pH= 5,6, nuôi cấy ở nhiệt độ $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$, ẩm độ 60% và cường độ chiếu sáng 2.000 – 2.500 Lux 16 giờ/ngày, thời gian nuôi trong môi trường tạo rễ từ 3 - 3,5 tháng;

c) Thích nghi cây ngoài vườn ươm:

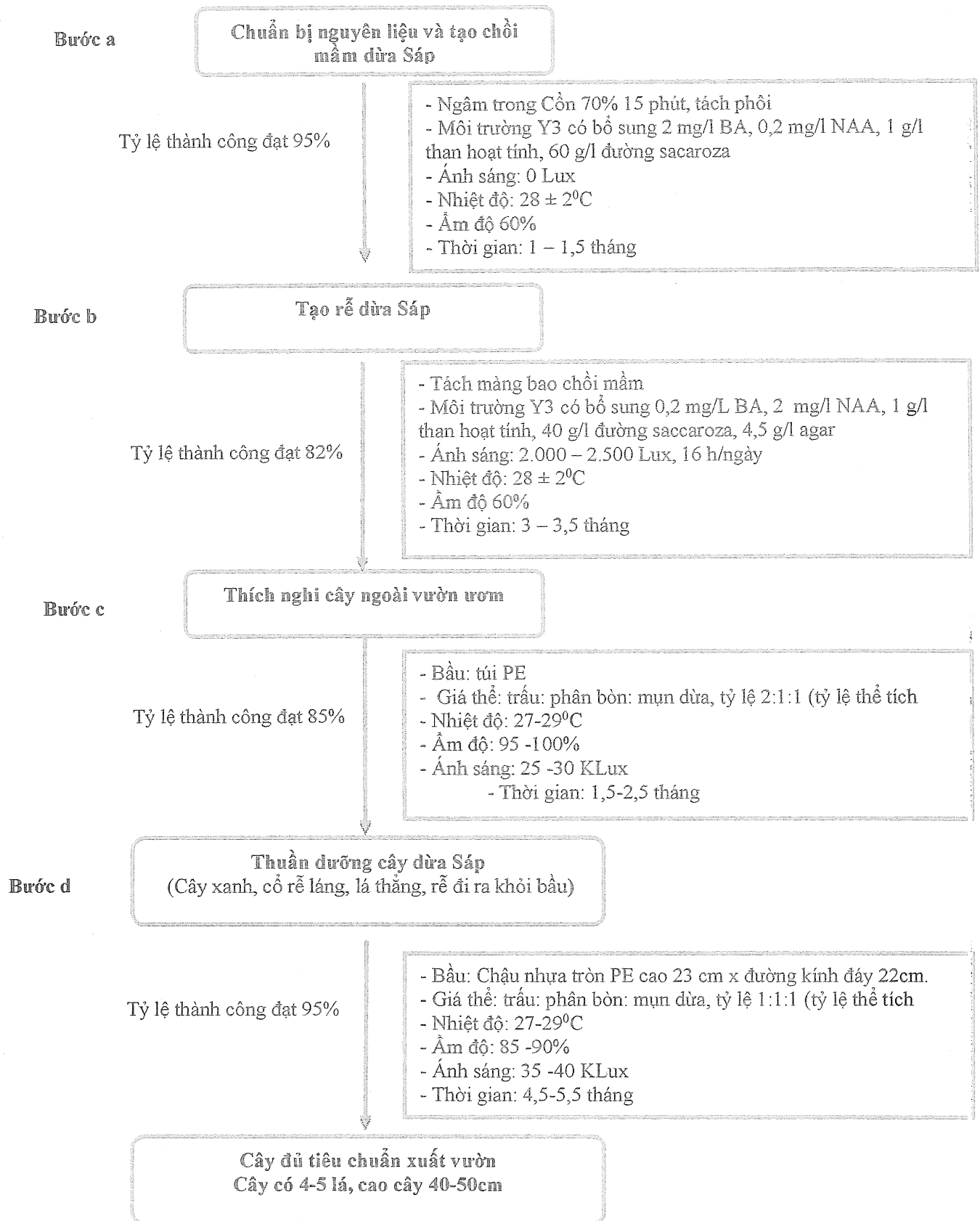
cây được trồng trong bầu đất với cơ chất bao gồm trấu: phân bò: mùn dừa theo tỷ lệ: 2:1:1 (tỷ lệ thể tích) được bổ sung thêm 5-10 gam nấm Tricoderma/100kg cơ chất; duy trì ẩm độ cho cây từ 95 -100%, nhiệt độ: $27-29^{\circ}\text{C}$, ánh sáng 25-30 Klux; thời gian thích nghi từ 1,5 - 2,5 tháng;

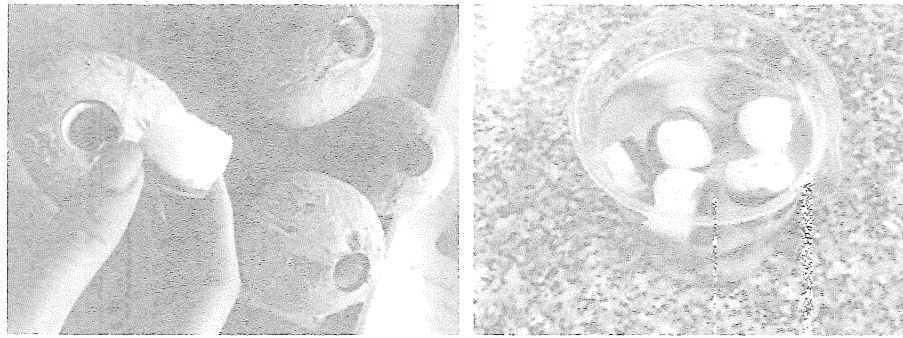
d) Thuần dưỡng cây dừa Sáp:

- thay chậu cho cây sau khi cho cây thích nghi ngoài vườn ươm với cơ chất trồng cây gồm trấu: phân bò: mụn dừa theo tỷ lệ 1:1:1 (tỷ lệ thể tích); duy trì ẩm độ cho cây từ 85-90%, nhiệt độ từ 27-29°C và ánh sáng từ 35-40 Klux; và

- bón thêm cho cây phân hữu cơ vi sinh, DAP 18-46-0 và Kali clorua 60% K_2O đã được trộn đều với tỷ lệ 1:1:1 (tỷ lệ khối lượng); thời gian bón phân: 15 ngày bón 1 lần, rải đều lên bề mặt cơ chất trong chậu với liều lượng từ 5-10 gam/chậu; thời gian thuần dưỡng cho cây từ 4,5-5,5 tháng.

Hình. 1





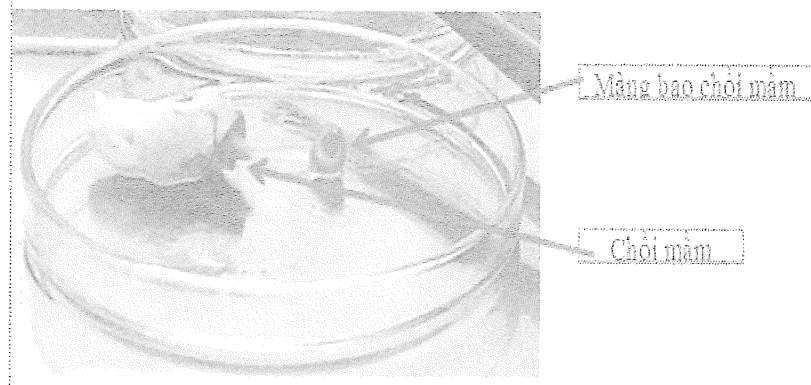
a

b

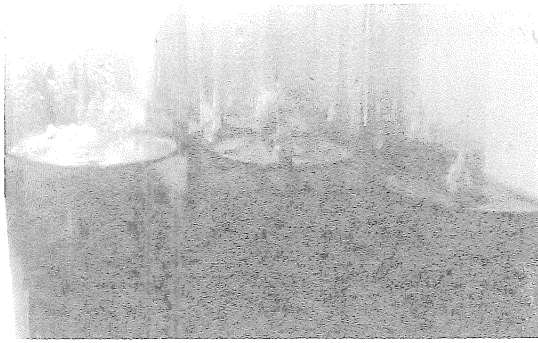
Hình 2



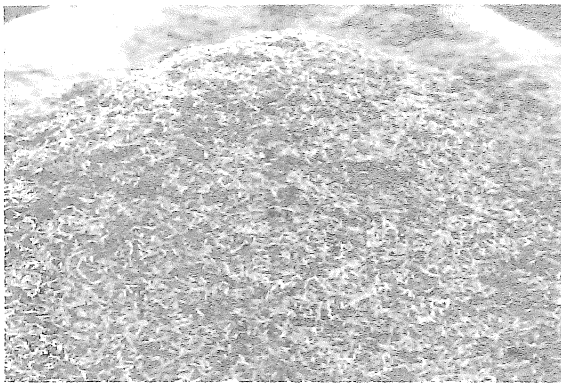
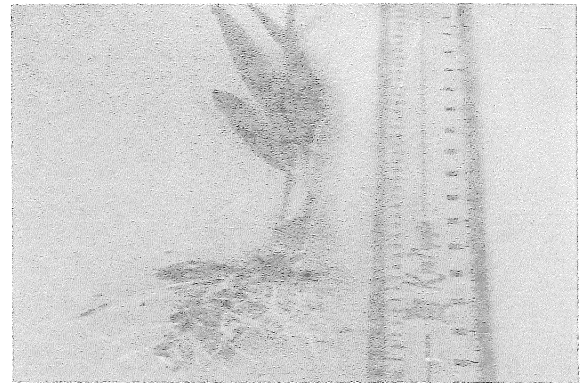
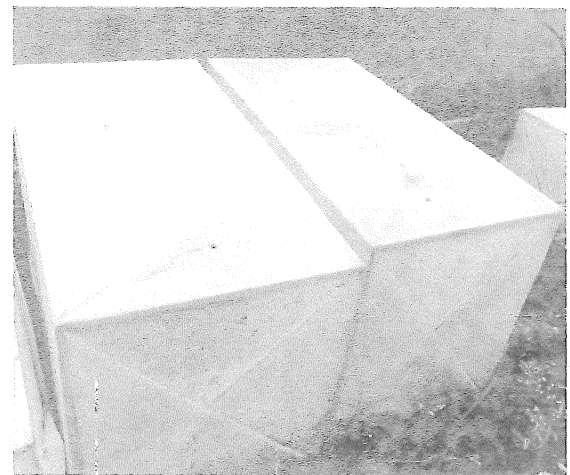
Hình 3



Hình 4

*a**b*

Hình 5

*a**b**c**d*

Hình 6

**a****b****Hình 7**