



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

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

(11)



2-0003880

(51) **A01H 4/00**
2022.01

(13) **Y**

(21) 2-2024-00026

(22) 28/05/2021

(67) 1-2021-03101

(45) 27/01/2025 442

(43) 25/10/2021 403

(73) Viện Di truyền Nông nghiệp (VN)

Km2, Đường Phạm Văn Đồng, Quận Từ Liêm, Thành Phố Hà Nội

(72) Nguyễn Văn Đồng (VN); Đinh Thị Thu Ngân (VN); Tống Thị Hường (VN); Nguyễn Thị Hòa (VN); Nguyễn Hữu Kiên (VN); Lê Huy Hàm (VN); Phạm Thị Phương Thúy (VN).

(54) QUY TRÌNH NHÂN NHANH IN VITRO GIỐNG DỪA SÁP (MAKAPUNO COCONUTS) THÔNG QUA GIAI ĐOẠN TẠO PHÔI VÔ TÍNH

(21) 2-2024-00026

(57) Giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình nhân nhanh *in vitro* giống cây dừa Sáp (*Makapuno coconuts*) thông qua giai đoạn tạo phôi vô tính. Quy trình nhân cây dừa Sáp thông qua giai đoạn tạo phôi vô tính gồm các bước: chọn nguyên liệu và tạo vật liệu khởi đầu; tạo mô sẹo (callus); nhân nhanh mô sẹo và tạo phôi vô tính; tái sinh chồi từ phôi vô tính; tạo cây hoàn chỉnh; đưa cây ra vườn ươm. Quy trình theo giải pháp hữu ích đã tạo được nguồn cây giống với số lượng lớn, sạch bệnh và đồng nhất về mặt di truyền, rút ngắn được thời gian nuôi cấy và tiết kiệm được chi phí sản xuất.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình nhân nhanh *in vitro* giống cây dừa Sáp (*Makapuno coconuts*) bằng phương pháp nuôi cấy mô tế bào thông qua giai đoạn tạo phôi vô tính (phôi soma) để tạo ra được nguồn cây dừa *in vitro* với số lượng lớn, sạch bệnh, đồng đều, ổn định về mặt di truyền, cho phép phát triển và chế biến các giống dừa ở quy mô công nghiệp, đáp ứng nhu cầu tiêu thụ trong nước và xuất khẩu của ngành dừa hiện nay.

Tình trạng kỹ thuật của giải pháp hữu ích

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. 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.

Dừa Sáp là hiện tượng đột biến gen của giống dừa cao Laguna, chi phối bởi một gen lặn duy nhất. 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 Novariantó 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, việc nuôi cấy phôi dừa Sáp đã được nhiều tác giả nghiên cứu thành công từ những năm trước đây như De Guzman và Del Rosario (1974), Assy Bar (1986), Rillo và Paloma (1992), Samosir và đồng tác giả (1999). Các nghiên cứu này nhằm mục đích cứu lấy những phôi hữu tính phát triển bình thường từ những quả dừa đột biến nhưng có giá trị cao như dừa Sáp, trong khi nội nhũ lại mềm, xốp và không có chức năng (Rillo và Paloma, 1992) để từ đó tạo ra những cây giống cho tỷ lệ quả sáp cao. Satharasinghe và đồng tác giả (2013) nghiên cứu về sự nhân lên và tính khác biệt của callus có nguồn gốc từ noãn dừa cho tiềm năng tạo phôi soma cao hơn. Sukendah và đồng tác giả (2016) đã đề cập đến hai phương pháp *in vitro* để tăng sản lượng cây con và cây giống dừa Kopyor là cắt bỏ phôi hợp tử (bổ sung 2,5-7,5 mg/L BAP) và tạo phôi soma (bổ sung 2,4-D ở 50-125 μ M) cấy vào môi trường rắn Eeuwens chứa 60 g/l

sucrose, than hoạt tính 2,5 g/l, tuy hình thành được phôi soma và sự phát triển tiếp theo của phôi soma, nhưng sự hình thành cây con vẫn chưa có kết quả.

Tại Việt Nam, việc chọn tạo và sản xuất giống dừa Sáp hiện nay chủ yếu ươm từ quả theo phương pháp truyền thống do người dân tự thực hiện. Gần đây, Viện Nghiên cứu Dầu và Cây có dầu đã bắt đầu nghiên cứu và thành công bước đầu trong quy trình nhân giống dừa Sáp bằng kỹ thuật nuôi cấy phôi hữu tính trong điều kiện *in vitro*, tỷ lệ thành công của quy 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). Trương Quốc Ánh và đồng tác giả (2012) đã nghiên cứu 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. Các phương pháp nhân giống này đều có hệ số nhân giống thấp, không phổ biến nhanh được các giống dừa mới, quý có giá trị sản xuất. Đặc biệt, do dừa là cây giao phấn, cho nên nhân giống theo các phương pháp này tạo ra thể hệ cây giống không đồng đều về mặt di truyền, cây giống không duy trì được các đặc tính của cây gốc ban đầu. Do đó, việc nhân giống cây dừa Sáp bằng phương pháp tạo phôi vô tính sẽ hạn chế được các nhược điểm trên và mở ra một cơ hội mới cho ngành trồng dừa của nước ta phát triển theo hướng sản xuất hàng hóa ở quy mô công nghiệp, đáp ứng nhu cầu tiêu thụ trong nước và xuất khẩu. Năm 2012, Lê Hồng Giang và đồng tác giả đã có những nghiên cứu về tạo callus từ cây dừa Sáp, kết quả cho thấy callus của lát cắt phôi giống được hình thành trên môi trường Y3 bổ sung 4mg/l NAA và 8mg/l BA đạt 8,3% sau 3 tháng nuôi trong tối nhưng mới chỉ dừng lại ở giai đoạn hình thành mô sẹo.

Bản chất kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Mục đích của giải pháp hữu ích là nhân nhanh được giống dừa Sáp. Để đạt được mục đích này, giải pháp hữu ích đề xuất quy trình nhân nhanh *in vitro* giống dừa Sáp thông qua giai đoạn tạo phôi vô tính, khắc phục được những khó khăn của phương pháp nhân giống truyền thống cũng như nuôi cấy phôi hữu tính, quy trình này bao gồm các bước:

a) Chọn nguyên liệu và tạo vật liệu khởi đầu: cây mẹ là những cây khỏe, không bị sâu bệnh được tạo ra trong quá trình cứu phôi, cho 100% quả là sáp. Chọn quả khoảng 9 tháng tuổi, tách phôi từ quả dừa và khử trùng phôi với Javen có nồng độ 80-100% trong 10-15 phút. Rửa phôi bằng nước khử trùng 4-5 lần.

Phôi non của các mẫu sống sau khi khử trùng xong được nuôi cấy trên môi trường cứu phôi để tạo chồi mầm (A1) bao gồm môi trường khoáng Y3 (Eeuwén, 1976) có bổ sung 0,5-2 mg/l 2,4,5T (2,4,5-trichlorophenoxyacetic); 50g/l đường; 2,5g/l than hoạt tính; 2,5 g/l phytigel (pH = 5,75±0,05); để trong tối, nhiệt độ 27°C;

b) Tạo mô sẹo (callus): Bộ phận lấy mẫu tạo mô sẹo là phần mô trung gian giữa chồi mầm và rễ của phôi non đã được nảy mầm *in vitro* thu được từ bước (a) sau 4 tuần nuôi cấy. Môi trường tạo mô sẹo (A2) bao gồm môi trường khoáng Y3 có bổ sung picloram 6-15 mg/L; 50g/l đường; 2,5g/l than hoạt tính; 2,5 g/l phytigel (pH = 5,75±0,05); điều kiện nuôi cấy giống như ở bước (a). Mô sẹo bắt đầu hình thành sau 12 tuần nuôi cấy;

c) Nhân nhanh mô sẹo và tạo phôi vô tính: Mô sẹo thu được từ bước (b) được nuôi cấy trên môi trường nhân nhanh để tạo được số lượng lớn mô sẹo. Môi trường nhân nhanh mô sẹo (A3) bao gồm môi trường khoáng Y3 có bổ sung 4-9 mg/l picloram; 50g/l đường; 2,5g/l than hoạt tính; 2,5 g/l phytigel (pH = 5,75±0,05); điều kiện nuôi cấy giống như ở bước (a). Cấy chuyển các khối mô sẹo sau 10 - 12 tuần nuôi cấy cho đến khi hình thành phôi vô tính (phôi soma);

d) Tái sinh chồi từ phôi vô tính: Cấy chuyển tế bào tiền phôi thu được ở bước (c) sang môi trường tái sinh chồi (A4) bao gồm môi trường cơ bản MS (Murashige & Skoog, 1962) có bổ sung lượng tối ưu các thành phần: 0,2 -1,0 mg/l GA₃ (Gibberellin acid); 50 g/l đường; 2,5g/l phytigel; 2,5 g/l than hoạt tính (A5); cường độ ánh sáng 2000 lux; chu kỳ quang 16 giờ/ ngày; nhiệt độ 27°C;

đ) Tạo cây hoàn chỉnh: Tách và cấy các chồi thu được từ bước (d) sang môi trường tạo rễ (A5) bao gồm môi trường cơ bản MS có bổ sung 0,2 -1,0 mg/l GA₃ và 0,2-0,5 mg/l IBA (Indolylbutyric acid); 50 g/l đường; 2,5g/l phytigel; 2,5 g/l than hoạt tính; cường độ ánh sáng 2000 lux; chu kỳ quang 16 giờ/ ngày; nhiệt độ 27°C;

e) Đưa cây ra vườn ươm: chuyển các bình cây dừa Sáp đã có rễ thu được ở bước (đ) ra ngoài điều kiện ánh sáng tự nhiên ở nhà lưới 5-7 ngày để cây con thích nghi dần với điều kiện tự nhiên, sau đó lấy cây ra khỏi bình, rửa sạch rễ bằng nước, nhúng rễ cây vào dung dịch CuSO₄.5H₂O (1mg/l) và cấy vào giá thể Klasmann (100% rong thủy đài).

Mô tả vắn tắt hình vẽ

Hình 1. Thể hiện hình ảnh phôi và chồi mầm phôi non dừa Sáp

Hình 2. Thể hiện hình ảnh mô sẹo, phôi vô tính dừa Sáp

Hình 3. Thể hiện hình ảnh nhân nhanh mô sẹo phôi dừa Sáp

Hình 4. Thể hiện hình ảnh chồi tái sinh từ phôi vô tính dừa Sáp

Hình 5. Thể hiện hình ảnh rễ *in vitro* cây dừa Sáp

Hình 6. Thể hiện hình ảnh cây dừa Sáp *in vitro* sinh trưởng ngoài đất

Mô tả chi tiết giải pháp hữu ích

Mẫu phôi dừa Sáp dùng trong quy trình theo giải pháp hữu ích được lấy từ quả dừa Sáp khoảng 9 tháng tuổi của cây mẹ là những cây khỏe, không bị sâu bệnh được tạo ra trong quá trình cứu phôi (100% quả là sáp) của Đại học Trà Vinh.

Môi trường khoáng sử dụng trong quy trình theo giải pháp hữu ích là môi trường Y3 (Eeuwén, 1976) và môi trường MS (Murashige và Skoog, 1962) với các thành phần khoáng đa lượng, vi lượng, vitamin đã được sử dụng rộng rãi trong nuôi cấy mô tế bào thực vật.

Bảng 1. Thành phần môi trường nuôi cấy

Môi trường	Y3 (Eeuwén, 1976)	MS (Murashige và Skoog, 1962)
<u>Khoáng đa lượng</u>	Nồng độ (mg/l)	Nồng độ (mg/l)
KNO ₃	2020	1900
CaCl ₂ .2H ₂ O	294	440
MgSO ₄ .7H ₂ O	247	370
NaH ₂ PO ₄	312	170
KCl	1492	0
NH ₄ Cl	535	0
NH ₄ NO ₃	0	1650
<u>Khoáng vi lượng</u>	Nồng độ (mg/l)	Nồng độ (g/l)
H ₃ BO ₃	3,1	6,2
MnSO ₄ .2H ₂ O	11,2	22,3
ZnSO ₄ .4H ₂ O	7,2	8,6
KI	0,83	0,83
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,24	0,25
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025	0,025
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,024	0,025
NiCl ₂ .6H ₂ O	0,0024	0
<u>Dung dịch Fe-EDTA</u>	Nồng độ (mg/l)	Nồng độ (g/l)
FeSO ₄ .7H ₂ O	55,8	27,8
Na ₂ EDTA	41,7	37,3
<u>Vitamin</u>	Nồng độ (mg/l)	Nồng độ (g/l)
Glycine	1	2
Thiamin HCl	0,5	1
Acid nicotinic	0,5	0,5
Pyridoxin HCl	0,5	0,5
Ca.D pantothenate	0,5	0
Biotin	0,5	0

Acid folic	0,5	0
<u>Khác</u>	Nồng độ (g/l)	Nồng độ (g/l)
Đường	50-60	50
Phytigel	2-3	2-3
Than hoạt tính	2-3	2-3
pH	5,75± 0,05	5,75± 0,05

Giải pháp hữu ích đề xuất quy trình nhân nhanh cây dừa Sáp thông qua giai đoạn tạo mô sẹo phôi hóa bao gồm các bước: a) Chọn nguyên liệu và tạo vật liệu khởi đầu; b) Tạo mô sẹo (callus); c) Nhân nhanh mô sẹo và tạo phôi vô tính; d) Tái sinh chồi từ phôi vô tính; đ) Tạo cây hoàn chỉnh; e) Đưa cây ra vườn ươm.

Trong bước a) Chọn nguyên liệu và tạo vật liệu khởi đầu: cây mẹ lựa chọn là những cây khỏe, không bị sâu bệnh được tạo ra trong quá trình cứu phôi cho 100% quả là sáp. Chọn quả khoảng 9 tháng tuổi, tách phôi từ quả và khử trùng phôi với Javen có nồng độ 80-100% trong 10-15 phút, rửa lại bằng nước cất vô trùng 4-5 lần. Phôi dừa Sáp sau khi khử trùng xong được nuôi cấy trên môi trường cứu phôi để tạo chồi mầm làm nguồn vật liệu cho tạo mô sẹo (Hình 1).

- Công thức môi trường nuôi cấy tạo chồi mầm: môi trường khoáng Y3 (Eeuwén, 1976) có bổ sung 0,5-2 mg/l 2,4,5T (2,4,5-trichlorophenoxyacetic); 50g/l đường; 2,5g/l than hoạt tính; 2,5 g/l phytigel và giá trị pH của môi trường nuôi cấy được chuẩn độ đến 5,75±0,05.

- Điều kiện nuôi cấy: mẫu được nuôi tối hoàn toàn trong tủ tối, nhiệt độ 27°C.

- Thời gian nuôi cấy tạo chồi mầm: 4 tuần (Hình 1).

b) Tạo mô sẹo (callus): Bộ phận lấy mẫu tạo mô sẹo là phần mô trung gian giữa chồi mầm và rễ của phôi non đã được nảy mầm *in vitro* thu được từ bước (a) sau 4 tuần nuôi cấy. Mô sẹo bắt đầu hình thành sau 12 tuần nuôi cấy (Hình 2).

- Công thức môi trường tạo mô sẹo: môi trường khoáng Y3 có bổ sung 6 -15 mg/l picloram; 50g/l đường; 2,5g/l than hoạt tính; 2,5 g/l phytigel (pH = 5,75±0,05).

- Điều kiện nuôi cấy: mẫu được nuôi tối hoàn toàn trong tủ tối, nhiệt độ 27°C.

c) Nhân nhanh mô sẹo và tạo phôi vô tính: Mô sẹo thu được từ bước (b) được nuôi cấy trên môi trường nhân nhanh để tạo được số lượng lớn mô sẹo (Hình 3).

- Môi trường nhân nhanh mô sẹo bao gồm môi trường khoáng Y3 có bổ sung 4-9 mg/l picloram; 50g/l đường; 2,5g/l than hoạt tính; 2,5 g/l phytigel (pH = 5,75±0,05);

- Điều kiện nuôi cấy: mẫu được nuôi tối hoàn toàn trong tủ tối, nhiệt độ 27°C.

- Cấy chuyển các khối mô sẹo sau 10 - 12 tuần nuôi cấy cho đến khi hình thành phôi vô tính (Hình 2).

d) Tái sinh chồi từ phôi vô tính: Cấy chuyển tế bào tiền phôi thu được ở bước (c) sang môi trường tái sinh chồi.

- Môi trường tái sinh chồi: môi trường khoáng MS (Murashige & Skoog, 1962) có bổ sung lượng tối ưu các thành phần: 0,2 -1,0 mg/L GA₃ (Gibberellin acid); 50 g/L đường; 2,5g/L phytigel; 2,5 g/L than hoạt tính (pH = 5,75±0,05).

- Điều kiện nuôi cấy: mẫu được nuôi ở tủ có cường độ ánh sáng 2000 lux; chu kỳ quang 16 giờ/ ngày; nhiệt độ 27°C.

- Thời gian nuôi cấy: sau 12 tuần các chồi được hình thành (Hình 4).

đ) Tạo cây hoàn chỉnh: Tách và cấy các chồi thu được từ bước (d) sang môi trường tạo rễ.

- Môi trường tạo rễ: môi trường khoáng MS có bổ sung 0,2 -1,0 mg/l GA₃ và 0,2-0,5 mg/l IBA (Indolylbutyric acid); 50 g/l đường; 2,5g/l phytigel; 2,5 g/l than hoạt tính (pH = 5,75±0,05).

- Điều kiện nuôi cấy: mẫu được nuôi ở tủ có cường độ ánh sáng 2000 lux; chu kỳ quang 16 giờ/ ngày; nhiệt độ 27°C.

- Thời gian nuôi cấy: sau 6 tuần tạo cây hoàn chỉnh (Hình 5).

e) Đưa cây ra vườn ươm: chuyển các bình cây dừa Sáp đã có rễ thu được ở bước (đ) ra ngoài điều kiện ánh sáng tự nhiên ở nhà lưới 5-7 ngày để cây con thích nghi dần với điều kiện tự nhiên, sau đó lấy cây ra khỏi bình, rửa sạch rễ bằng nước, nhúng rễ cây vào dung dịch CuSO₄.5H₂O (1mg/l) và cấy vào giá thể Klasmann (100% rong thủy đài). Sau 6-12 tuần sẽ thu được cây dừa Sáp giống (Hình 6).

Ví dụ thực hiện giải pháp hữu ích:

Ví dụ 1: Tạo chồi mầm

Phôi dừa Sáp sau khi được tách từ quả và khử trùng với Javen nồng độ 80-100% trong 10-15 phút, rửa lại bằng nước cất vô trùng 4-5 lần sẽ được nuôi cấy trên môi trường cứu phôi để tạo chồi mầm làm nguồn vật liệu cho tạo mô sẹo. Môi trường cứu phôi bao gồm môi trường khoáng Y3 (Eeuwén, 1976) có bổ sung 50g/l đường; 2,5g/l than hoạt tính; 2,5 g/l phytigel; pH 5,75±0,05 và các chất điều hòa sinh trưởng khác nhau. Bảng 2 trình bày các công thức điển hình nhất từ các công thức đã thử. Mỗi công thức 30 mẫu, lặp lại 3 lần. Kết quả cho thấy khi sử dụng chất điều hòa sinh trưởng bổ sung vào trong môi trường nuôi cấy, phôi dừa sẽ nảy chồi mầm đồng thời tạo rễ, tỷ lệ cứu phôi cao đạt trên 50%. Tỷ lệ cứu phôi (mẫu nảy mầm và ra rễ) khi sử dụng chất điều hòa sinh trưởng 2,4,5T nồng độ 0,5-2,0 mg/l cao nhất đạt 88,89%; chiều dài trung bình chồi và rễ tạo ra cũng dài hơn.

Bảng 2. Ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng đến khả năng tạo chồi mầm từ phôi dừa Sáp

Các chất điều hòa sinh trưởng và nồng độ (mg/l)	Số mẫu sử dụng	Số mẫu nảy mầm và ra rễ	Tỷ lệ cứu phôi (%)	Chiều dài chồi trung bình (cm)	Chiều dài rễ trung bình (cm)
NAA (0,1-0,7)	90	63	70,00	0,33±0,07	2,75±1,32
GA ₃ (0,1-0,7)	90	58	64,44	1,10±0,09	2,62±0,10
2,4,5 T (0,5-2,0)	90	80	88,89	2,34±0,07	5,54±0,65
NAA (0,1-0,7) +2,4,5 T(0,5-2,0)	90	50	55,56	0,80±0,06	4,98±0,39
GA ₃ (0,1-0,7)+ 2,4,5 T (0,5-2,0)	90	65	72,22	0,95±0,05	4,14±0,21

Từ những kết quả thu được trên đây chúng tôi chọn chất điều hòa sinh trưởng 2,4,5T nồng độ 0,5-2,0 mg/l cho mục đích cứu phôi để tạo chồi mầm làm nguồn vật liệu cho tạo mô sẹo.

Ví dụ 2: Tạo mô sẹo và phôi vô tính

Bộ phận lấy mẫu tạo mô sẹo là phần mô trung gian giữa chồi mầm và rễ của phôi non đã được nảy mầm *in vitro* thu được từ bước (a) sau 4 tuần nuôi cấy. Môi trường tạo mô sẹo bao gồm môi trường khoáng Y3 (Eeuwén, 1976) có bổ sung 50g/l đường; 2,5g/l than hoạt tính; 2,5 g/l phytigel; pH 5,75±0,05 và các chất điều hòa sinh trưởng khác nhau. Bảng 3 trình bày các công thức điển hình nhất từ các công thức đã thử. Mỗi công thức 30 mẫu, lặp lại 3 lần. Kết quả thí nghiệm cho thấy, khi sử dụng Picloram với nồng độ từ 6 – 15 mg/l cho tỷ lệ tạo mô sẹo cao nhất. Mô sẹo được nhân nhanh trên môi trường tương tự môi trường tạo mô sẹo nhưng nồng độ Picloram giảm còn 4 – 9 mg/l. Sau 10 – 12 tuần nuôi cấy, phôi vô tính bắt đầu hình thành.

Bảng 3. Ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng đến khả năng tạo mô sẹo và phôi vô tính dừa Sáp

Chất điều hòa sinh trưởng và nồng độ (mg/l)	Số mẫu mô sống	Số mẫu tạo mô sẹo	Số mẫu tạo phôi vô tính	Tỷ lệ tạo mô sẹo (%)	Tỷ lệ tạo phôi vô tính (%)
Picloram (6-15)	90	73	23	81,11	26,76
2,4 D (0,2-1,0)	90	37	10	41,11	11,11
TDZ (0,2-1,0)	90	29	7	32,22	7,78

Ví dụ 3. Tạo chồi từ phôi vô tính

Kết thúc giai nhân mô sẹo và tạo tế bào tiền phôi dừa, tế bào tiền phôi sẽ được chuyển sang môi trường tạo chồi. Mục đích của giai đoạn này là tìm môi trường phù hợp cho tạo chồi với tỷ lệ cao và chất lượng chồi đảm bảo. Môi trường tái sinh chồi bao gồm môi trường khoáng MS có bổ sung 50g/l đường; 2,5g/l than hoạt tính; 2,5 g/l phytigel; pH 5,75±0,05 và các chất điều hòa sinh trưởng khác nhau. Bảng 4 trình bày

các công thức điển hình nhất từ các công thức đã thử. Mỗi công thức 30 mẫu, lặp lại 3 lần. Kết quả nghiên cứu cho thấy khi bổ sung GA₃ nồng độ 0,2 - 1,0 mg/l cho kết quả tái sinh chồi từ phôi vô tính cao nhất, số chồi trung bình/ cụm tế bào tiền phôi đạt $4,47 \pm 0,25$ chồi. Do đó chúng tôi sử dụng GA₃ nồng độ 0,2 - 1,0 mg/l cho việc tái sinh chồi từ phôi vô tính.

Bảng 4. Ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng đến khả năng tạo chồi từ phôi vô tính

Chất điều hòa sinh trưởng và nồng độ (mg/l)	Số mẫu phôi vô tính thí nghiệm	Số mẫu phôi vô tính tạo chồi	Tỷ lệ tạo chồi (%)	Số chồi TB/ cụm phôi vô tính
BAP (0,5-1,5)	90	23	25,56	$1,07 \pm 0,09$
Kinetin (0,5-1,5)	90	25	27,78	$1,00 \pm 0,16$
GA ₃ (0,2-1,0)	90	39	43,33	$4,47 \pm 0,25$

Ví dụ 4. Tạo cây hoàn chỉnh

Các chồi dừa Sáp tái sinh từ phôi vô tính trên môi trường cảm ứng tái sinh chồi sau 8 tuần nuôi cấy có kích thước khoảng 1,5-2,0 cm được cấy chuyển sang môi trường cảm ứng ra rễ. Môi trường ra rễ bao gồm nền khoáng MS có bổ sung 50 g/l đường; 2,5g/l phytigel; 2,5 g/l than hoạt tính (pH = $5,75 \pm 0,05$) và các chất điều hòa sinh trưởng thực vật khác nhau. Trong các thí nghiệm khảo sát khả năng tạo rễ *in vitro* cây dừa sáp thì đây là các công thức điển hình (bảng 5). Mỗi công thức 30 mẫu, lặp lại 3 lần. Mẫu nuôi cấy trong điều kiện chiếu sáng 2000 lux bằng đèn huỳnh quang theo chu kỳ 16 giờ sáng/ ngày, nhiệt độ 27°C. Kết quả sau 6 tuần nuôi cấy cho thấy, môi trường bổ sung tổ hợp 0,2-1,0 mg/l GA₃ và 0,2-0,5 mg/l IBA cho tỷ lệ tạo rễ cao nhất (95,56%) và chiều dài rễ chính thu được dài nhất (13,71 cm), do đó chúng tôi sử dụng tổ hợp này cho việc tạo rễ *in vitro* chồi dừa Sáp.

Bảng 5. Ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng đến khả năng tạo rễ của chồi dừa Sáp

Chất điều hòa sinh trưởng và nồng độ (mg/l)	Số mẫu thí nghiệm	Số mẫu tạo rễ	Chiều dài rễ chính (cm)	Tỷ lệ tạo rễ (%)
IBA (0,2-0,5)	90	49	$5,26 \pm 1,26$	54,44
NAA (0,1-2)	90	36	$3,18 \pm 0,57$	40,00
GA ₃ (0,2-1,0)	90	55	$7,63 \pm 1,21$	61,11
GA ₃ (0,2-1,0)+IBA (0,2-0,5)	90	86	$13,71 \pm 0,67$	95,56
GA ₃ (0,2-1,0)+NAA (0,2-0,5)	90	61	$10,85 \pm 1,34$	67,78
IBA (0,5) + NAA (0,1-2)	90	62	$11,37 \pm 1,42$	68,89

Ví dụ 5. Đưa cây ra vườn ươm

Các cây dừa Sáp ra rễ trên môi trường cảm ứng ra rễ sau 4 tuần nuôi được đưa ra nhà lưới 5-7 ngày để cây con thích nghi dần với điều kiện tự nhiên. Sau thời gian để cây thích nghi, lấy cây ra khỏi bình, rửa sạch rễ bằng nước, nhúng rễ cây vào dung dịch $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (1mg/l) để tránh nấm khuẩn bám trên rễ và cấy vào giá thể Klasmann (100% rong thủy đài). Đặt chậu cây trong nhà lưới có mái che bằng lưới đen tránh ánh sáng mặt trời chiếu trực tiếp, tưới nước 2 lần/ ngày đảm bảo độ ẩm > 90%. Sau 6-12 tuần sẽ thu được cây dừa Sáp giống.

Hiệu quả đạt được của giải pháp hữu ích

Quy trình nhân giống *in vitro* cây dừa Sáp thông qua giai đoạn tạo phôi vô tính theo giải pháp hữu ích có thể áp dụng sản xuất được hàng loạt các cây dừa Sáp sinh trưởng nhanh, sạch bệnh, đồng nhất về mặt di truyền, cho phép phát triển và chế biến các giống dừa ở quy mô công nghiệp, đáp ứng nhu cầu tiêu thụ trong nước và xuất khẩu của ngành dừa hiện nay.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Quy trình nhân nhanh *in vitro* giống dừa Sáp thông qua giai đoạn tạo phôi vô tính gồm các bước sau:

(a) phôi non dừa Sáp (khoảng 9 tháng tuổi) sau khi được khử trùng với Javen nồng độ 80-100% trong 10-15 phút, rửa lại bằng nước khử trùng 4-5 lần được cấy chuyển lên môi trường cứu phôi để tạo chồi mầm (A1) gồm môi trường khoáng cơ bản Y3 có bổ sung một lượng tối ưu các thành phần sau: 2,4,5T, đường, phytigel, than hoạt tính, pH $5,75 \pm 0,05$, nuôi tối trong 4 tuần, nhiệt độ 27°C ;

(b) phần mô trung gian giữa chồi mầm và rễ của phôi non đã được nảy mầm *in vitro* thu được từ công đoạn (a) được cấy chuyển sang môi trường tạo mô sẹo (A2) gồm môi trường khoáng cơ bản Y3 có bổ sung một lượng tối ưu các thành phần sau: Picloram, đường, phytigel, than hoạt tính, pH $5,75 \pm 0,05$, nuôi tối trong 12 tuần, nhiệt độ 27°C ;

(c) cấy chuyển mô sẹo thu được từ bước (b) sang môi trường nhân nhanh mô sẹo (A3) gồm môi trường khoáng cơ bản Y3 có bổ sung một lượng tối ưu các thành phần sau: Picloram, đường, phytigel, than hoạt tính, pH $5,75 \pm 0,05$, cấy chuyển các khối mô sẹo sau 10 - 12 tuần nuôi cấy cho đến khi hình thành phôi vô tính (phôi soma), nhiệt độ 27°C ;

(d) cấy chuyển phôi vô tính thu được từ công đoạn (c) sang môi trường tái sinh chồi (A4) gồm môi trường cơ bản MS có bổ sung một lượng tối ưu các thành phần sau: GA₃, đường, phytigel, than hoạt tính, pH $5,75 \pm 0,05$, trong điều kiện ánh sáng 2000 lux và nhiệt độ 27°C , chiếu sáng 16 giờ/ngày trong 12 tuần;

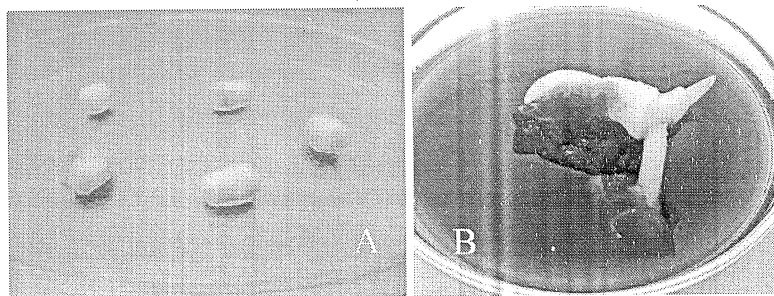
(đ) cấy chuyển chồi chưa có rễ thu được từ công đoạn (d) lên môi trường tạo rễ (A5) bao gồm môi trường cơ bản MS có bổ sung một lượng tối ưu các thành phần sau: GA₃, IBA, đường, phytigel, than hoạt tính, pH $5,75 \pm 0,05$, trong điều kiện ánh 2000 lux và nhiệt độ 27°C , chiếu sáng 16 giờ/ngày trong 6 tuần;

e) Đưa cây ra vườn ươm: chuyển các bình cây dừa Sáp đã có rễ thu được ở bước (đ) ra ngoài điều kiện ánh sáng tự nhiên ở nhà lưới 5-7 ngày, sau đó lấy cây ra khỏi bình, rửa sạch rễ bằng nước, nhúng rễ cây vào dung dịch CuSO₄.5H₂O (1mg/l) và cấy vào giá thể Klasmann (100% rong thủy đài), đặt chậu cây trong nhà lưới có mái che bằng lưới đen tránh ánh sáng mặt trời chiếu trực tiếp, tưới nước 2 lần/ ngày đảm bảo độ ẩm > 90%, sau 6-12 tuần sẽ thu được cây dừa sáp giống.

2. Quy trình theo điểm 1, trong đó hàm lượng của 2,4,5T (2,4,5-trichlorophenoxyacetic), Picloram, GA₃ (Gibberellin acid), tổ hợp GA₃ và IBA (Indolylbutyric acid), đường, than hoạt tính, phytigel được sử dụng trong các bước (a) – (đ) lần lượt là:

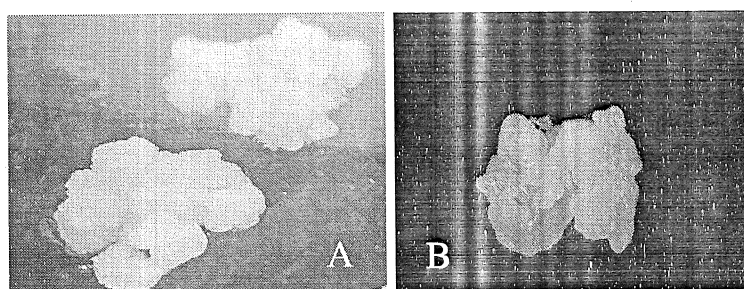
- (a) 0,5 - 2,0 mg/l 2,4,5T; 50 g/l đường; 2,5 g/l than hoạt tính; 2,5 g/l phytigel trong môi trường A1;
- (b) 6,0 – 15,0 mg/l Picloram; 50 g/l đường; 2,5 g/l than hoạt tính; 2,5 g/l phytigel trong môi trường A2;
- (c) 4,0 – 9,0 mg/l Picloram; 50 g/l đường; 2,5 g/l than hoạt tính; 2,5 g/l phytigel trong môi trường A3;
- (d) 0,2 -1,0 mg/L GA₃; 50 g/l đường; 2,5 g/l than hoạt tính; 2,5 g/l phytigel trong môi trường A4;
- (đ) 0,2 -1,0 mg/L GA₃ và 0,2-0,5 mg/L IBA; 50 g/l đường; 2,5 g/l than hoạt tính; 2,5 g/l phytigel trong môi trường A5.

1/2



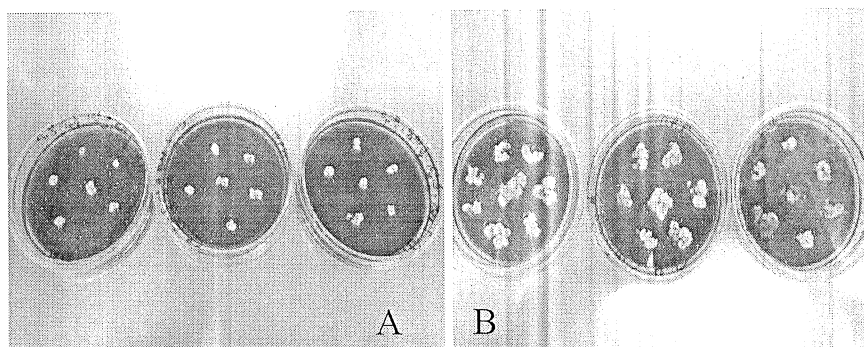
Hình 1. Phôi dừa và chồi mầm phôi non dừa Sáp

A. Phôi dừa đã khử trùng, B. Chồi mầm phôi dừa Sáp sau 4 tuần



Hình 2. Mô sẹo và Phôi vô tính dừa Sáp

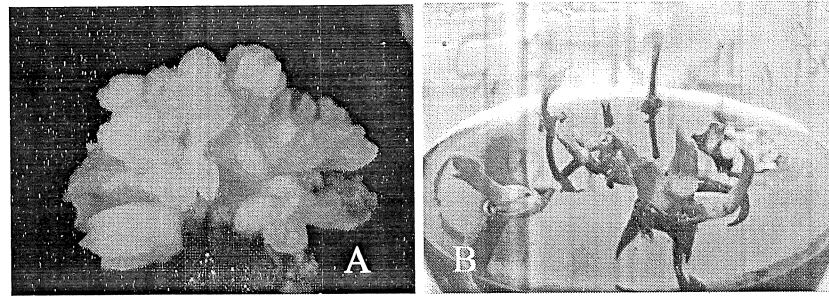
A. Mô sẹo dừa Sáp; B. Phôi vô tính dừa Sáp



Hình 3. Nhân nhanh mô sẹo phôi dừa Sáp

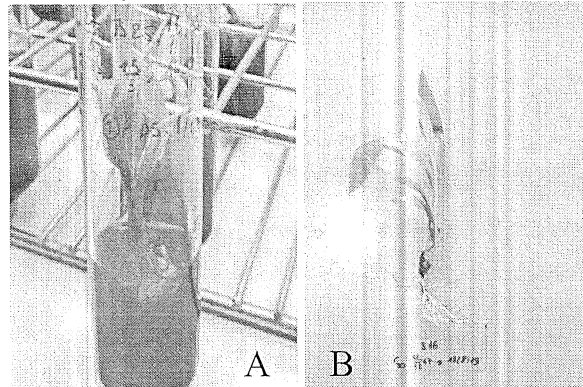
A. Sau 1 tuần nuôi cấy, B. Sau 6 tuần nuôi cấy

2/2



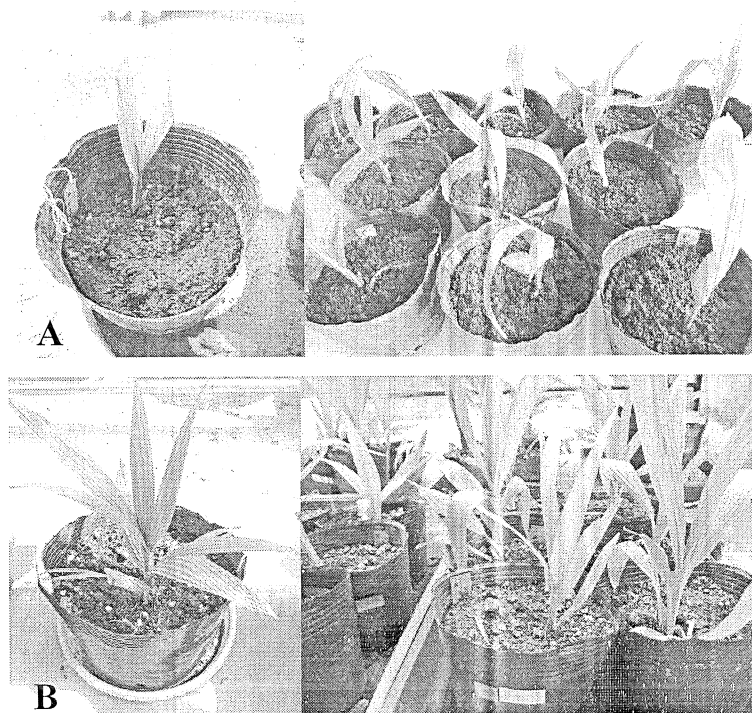
Hình 4. Chồi tái sinh từ phôi vô tính dừa

A. Cụm chồi thu được sau 12 tuần; B. Chồi thu được sau 24 tuần



Hình 5. Rễ *in vitro* cây dừa Sáp

A. Rễ thu được sau 12 tuần; B. Rễ thu được sau 21 tuần



Hình 6. Cây dừa Sáp *in vitro* sinh trưởng ngoài đất

A. Cây ngoài đất sau 6 tuần, B. Cây ngoài đất sau 12 tuần