VIỆN KHOA HỌC NÔNG NGHIỆP VIỆT NAM
VIỆN KHOA HỌC KỸ THUẬT NÔNG NGHIỆP MIỀN NAM

BÁO CÁO TỔNG KẾT

KẾT QUẢ THỰC HIỆN ĐỀ TÀI THUỘC DỰ ÁN KHOA HỌC CÔNG NGHỆ NÔNG NGHIỆP VỐN VAY ADB

***Tên đề tài*:**

NGHIÊN CỨU ỨNG DỤNG PHƯƠNG PHÁP NUÔI CÂY PHÔI SOMA TỪ CHỒI MẦM ĐỂ NHÂN GIỐNG DỪA SÁP ĐẶC RUỘT TẠI TỈNH TRÀ VINH

Cơ quan chủ quản dự án: Bộ Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn

Cơ quan chủ trì đề tài: Viện Khoa học Kỹ thuật Nông nghiệp miền Nam

Chủ nhiệm đề tài: ThS Trương Quốc Ánh

Thời gian thực hiện đề tài: 2009 – 2011

Tp. Hồ Chí Minh, tháng 11/2012

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Cây dừa (*Cocos nucifera* L.) là một trong những cây lấy dầu đa niên chủ yếu của vùng nhiệt đới được trồng rất phổ biến ở nhiều nước, cây dừa có chu kỳ kinh tế từ 50 – 70 năm. Cây dừa từ lâu đã được xem là cây của cuộc sống (tree of life). Cây dừa có rất nhiều công dụng so với các loại cây trồng khác vì hầu hết các phần của quả dừa, lá dừa và thân dừa đều có thể sử dụng phục vụ cho nhu cầu của đời sống con người. Điều kiện tự nhiên và xã hội ở nước ta thuận lợi cho phát triển cây dừa. Dừa được trồng ở Đồng bằng Sông Hồng cho đến tận cùng phía Nam của đất nước. Đặc biệt cây dừa phát triển tốt từ Thừa Thiên - Huế trở vào Nam.

Ở Việt Nam có nhiều giống dừa, nhóm dừa lấy dầu gồm có dừa Ta, dừa Dâu, dừa Lửa, dừa Bị… ngoài việc lấy dầu từ cơm dừa, các phần phụ khác như xơ, gáo, nước dừa cũng được sử dụng để chế biến thành các sản phẩm có giá trị cao như thảm sơ dừa, than hoạt tính, thạch dừa. Ngoài các giống dừa chủ yếu nêu trên, Việt Nam còn có giống dừa đặc ruột, còn được gọi là dừa Sáp. Dừa Sáp có tên khoa học là *Makapuno coconuts* thuộc họ nhà Cau. Dừa Sáp là giống dừa đặc ruột, không có nước hoặc rất ít nước, nước dừa ở tình trạng keo, sền sệt, cơm dừa nhão như kem. Dừa Sáp có nguồn gốc từ Philippines, là hiện tượng đột biến gen của giống dừa cao Laguna, chi phối bởi một gen lặn duy nhất (Rillo và Paloma, 1992). Dừa Sáp phân bố ở Việt Nam chủ yếu ở tỉnh Trà Vinh, đặc biệt ở huyện Cầu Kè, nơi được cho là vùng đất tốt nhất để trồng dừa Sáp. Dừa Sáp được phát hiện tại Philippines nhưng do các 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.

Các loại trái dừa nói chung thường trải qua vài giai đoạn: khi dừa còn non, cơm mềm dẻo, nước ngọt, khi già thì cơm dừa cứng lại, nước nhạt dần và có thể lên men. Riêng dừa Sáp thì sau khi trải qua giai đoạn còn non với cơm dừa và nước dừa sẽ tiếp tục phát triển dày dần phần cơm dừa lên lấp gần đầy khoảng trống của gáo dừa, chỉ để lại một không gian nhỏ chính giữa với chất lỏng sệt, có mùi thơm đặc trưng. Cơm dừa dạng xốp, mềm và dẻo chứ không còn cứng như cơm dừa của các quả dừa khác. Về mặt sinh lý, dừa Sáp có cấu trúc và đặc tính giống với dừa thường. Thân cây có thể cao tới 30m , với các lá đơn xẻ thùy lông chim 1 lần, cuống và gân chính dài 4–6 m, các thùy với gân cấp 2 có thể dài 60–90 cm; lá kèm thường biến thành bẹ dạng lưới ôm lấy thân; các lá già khi rụng để lại vết sẹo trên thân.

Về đặc tính canh tác dừa phát triển tốt trên đất cát pha và có khả năng chống chịu mặn tốt cũng như ưa thích các vùng có nhiều nắng và lượng mưa từ 750–2.000 mm hàng năm. Điều này giúp dừa trở thành loại cây định cư bên các bờ biển nhiệt đới một cách tương đối dễ dàng. Dừa cần độ ẩm cao (70–80%) để có thể phát triển một cách tối ưu nhất, điều này lý giải tại sao nó rất ít khi được tìm thấy trong các khu vực có độ ẩm thấp. Ví dụ khu vực Địa Trung Hải, thậm chí cả khi các khu vực này có nhiệt độ đủ cao, dừa rất khó trồng và phát triển trong các khu vực khô cằn.

Trong một quày dừa Sáp chỉ có khoảng 25% trái đặc ruột, số còn lại bình thường. Về phương pháp nhân giống, đối với các giống dừa thường chỉ cần chọn cây mẹ khỏe mạnh, trái sai, chất lượng cơm (dừa khô), nước (dừa non) vừa ý, chờ trái già (khô) thu hái trái để giống. Đối với dừa Sáp, chỉ những trái không có sáp mới có khả năng tạo phôi, tạo mộng, mầm và tạo ra cây dừa Sáp giống; những trái có sáp không thể để giống. Do thụ phấn chéo, thế hệ cây con khó xác định về tính trạng và chất lượng trái. Do đó, muốn nhân giống dừa Sáp người ta ươm trái bình thường trên cây dừa Sáp và thế hệ tiếp theo cũng cho tỉ lệ trái đặc ruột tương đương 25%. Vì vậy, để khắc phục hạn chế này, các nhà khoa học đã nghiên cứu sản xuất ra giống dừa Sáp bằng phương pháp nuôi cấy phôi để nhân giống và gia tăng tỉ lệ trái sáp.

Dừa Sáp có giá cao gấp 10-20 lần và là cây trồng phổ biến ở các vùng nhiệt đới và là cây đem lại nguồn lợi kinh tế cao. Dừa Sáp thường chủ yếu được dùng chế biến thực phẩm (kem, bánh, kẹo) và mỹ phẩm. Dừa Sáp còn được dùng để chế biến nhiều loại nước giải khát. Cơm dừa được nạo, cho vào máy xay sinh tố đã chế sẵn sữa, đường, cà phê hoặc ca cao, cùng nước đá bào cho thức uống giải khát bùi, béo, ngọt. Dừa có độ dầu cao hơn dừa thường, mùi thơm đặc trưng hơn nên có thể trở thành đặc tính quý ứng dụng trong việc sản xuất bánh kẹo và các sản phẩm khác đem lại nguồn lợi kinh tế cao.

Dừa là một trong những loài thực vật khó nhân giống. Tuy nhiên, trước sự phát triển của khoa học kỹ thuật, phương pháp nhân giống in vitro ngày một cải thiện. Vì vậy, trước yêu cầu của thực tiễn sản xuất, 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***" hỗ trợ cho việc hoàn thiện quy trình nhân giống dừa Sáp, giúp cho công tác lai tạo và bảo tồn giống dừa Sáp hiện nay.

II. MỤC TIÊU CỦA ĐỀ TÀI

2.1 Mục tiêu tổng quát

Nhân, lưu giữ giống dừa Sáp đặc ruột có giá trị kinh tế cao đặc thù của tỉnh Trà Vinh bằng ứng dụng phương pháp nuôi cấy phôi soma để bảo tồn nguồn gen dừa quý hiếm, phục vụ mục tiêu phát triển bền vững và gia tăng thu nhập thực tế cho người trồng dừa Sáp đặc ruột trong cộng đồng tại địa phương.

2.2 Mục tiêu cụ thể

- Tạo ra cây con giống dừa Sáp bằng ứng dụng kỹ thuật nuôi cấy phôi soma từ chồi mầm thích hợp và hiệu quả.
- Xây dựng quy trình nhân giống dừa Sáp bằng ứng dụng kỹ thuật nuôi cấy phôi soma.
- Xây dựng quy trình chăm sóc cây giống dừa Sáp đặc ruột giai đoạn vườn ươm.

III. TỔNG QUAN TÌNH HÌNH NGHIÊN CỨU TRONG VÀ NGOÀI NƯỚC

3.1 Giới thiệu về cây dừa Sáp

3.1.1 Phân loại

Giới: Plantae
Lớp: Liliopsida
Bộ: Arecales
Họ: Arecaceae
Phân họ: Arecoideae
Tông: Cocoeae
Phân tông: Butinae
Chi: Cocos
Loài: Coconuts

Hình 3.1 Cây dừa Sáp

3.1.2 Nguồn gốc và sự phân bố

Dừa Sáp có nguồn gốc từ Philippines, còn gọi là Makapuno là hiện tượng đột biến gen của giống dừa cao Laguna, chi phối bởi một gen lặn duy nhất. Hiện tượng này là một hiện tượng di truyền đặc điểm (Rillo và Paloma, 1992). Dừa Sáp được nhập về Việt Nam khoảng những năm 1960 tại tỉnh Trà Vinh. Có tài liệu cho rằng loại cây cho quả dừa Sáp

đã xuất hiện ở huyện Cầu Kè vào năm 1942 do một nhà sư người Khmer sang thăm Campuchia mang về làm giống. Do đột biến gen và có thể do điều kiện thổ nhưỡng, khí hậu, thời tiết mới ở vùng đất Cầu Kè đã khiến dừa cho trái Sáp đặc biệt, trở thành một đặc sản nổi tiếng chỉ có ở Trà Vinh.

3.1.3 Vị trí của dừa Sáp trên thị trường

Dừa Sáp có giá cao gấp 10-20 lần dừa thường, từ năm 2000 trở lại đây giá dừa Sáp đã tăng cao và trở thành loại dừa có giá đắt nhất Việt Nam (chủ yếu do sản lượng cung cấp ít). Giá dừa Sáp dao động từ khoảng 100.000đ - 220.000đ/trái. Trà Vinh là tỉnh duy nhất trồng dừa Sáp chỉ có thể cung cấp khoảng 10 ngàn trái/năm. Dừa Sáp có độ dầu cao hơn dừa thường, mùi thơm đặc trưng hơn nên có thể trở thành đặc tính quý ứng dụng trong việc sản xuất bánh kẹo và các sản phẩm khác đem lại nguồn lợi kinh tế cao. Ngoài ra, như các giống dừa khác, dừa Sáp có thể sản xuất cơm dừa, thạch dừa (nata de coco), mứt dừa, kem dừa.

Bảng 2.1 Thành phần dinh dưỡng của dừa Sáp

Thành phần	Hàm lượng	Thành phần	Hàm lượng
Nước	64,8g	Canxi	58 mg
Năng lượng	194 kcal	Photpho	59 mg
Protein	2,4g	Sắt	1,4 mg
Chất béo	17,6g	Vitamin B1	0,02 mg
Xơ	5g	Vtamin B2	0,02 mg
Đường	9,5g	Vitamin B3	0,6 mg
Tro	0,7 mg	Vitamin C	8 mg

Thành phần dinh dưỡng trong 100g cơm dừa

Theo tiến sĩ Erlinda Rillo thuộc Ủy ban Dừa Philippines (PCA) nghiên cứu cho thấy rằng dừa Sáp có hàm lượng dinh dưỡng cao hơn dừa thường, đặc biệt là hàm lượng galactomannan do đó được dùng làm thực phẩm và mỹ phẩm. Ngoài ra dừa Sáp cũng có

hàm lượng các acid béo cao hơn dừa bình thường bao gồm caproic (C6), 0,61% so với 0,41% của dừa thường; capric (C10), 7,34% so với 7,21%; acid lauric (C12), 50,06% so với 47,63%; và myristic (C14), 18,36% so với 15,26%. Chính vì những giá trị dinh dưỡng và thành phần đặc biệt đó mà nhu cầu dừa Sáp đang ngày càng tăng cao ở Philippines, các công ty chế biến thực phẩm, dược phẩm, mỹ phẩm cần 1,5 triệu quả dừa Sáp mỗi năm.

3.1.4 Đặc điểm sinh học của dừa Sáp

- **Rễ**

Dừa Sáp có rễ bất định sinh ra liên tục ở phần đáy gốc thân, không có rễ cọc. Lúc mới mọc có màu trắng sau chuyển sang màu đỏ nâu. Rễ không có rễ lông hút mà chỉ có những rễ nhỏ là rễ dinh dưỡng. Những rễ này hình thành trên rễ chính và có hoạt động như rễ hô hấp, giúp cho cây trao đổi khí. Trong điều kiện ngập nước liên tục sẽ ảnh hưởng đến khả năng hô hấp của bộ rễ, làm cho cây dừa giảm sức tăng trưởng do cây dừa là cây chịu nước nhưng không chịu ngập. Rễ già sẽ chết và rễ mới phát triển liên tục. Tuần đầu tiên sau khi nảy mầm, cây dừa con sẽ mọc ra một rễ cấp 1 có chiều dài trung bình 5cm, mười ngày sau sẽ mọc ra rễ thứ hai, sau sáu tuần sẽ có trung bình 3 rễ cấp 1, với chiều dài rễ dài nhất khoảng 20cm.

Hình 3.2 Thân dừa Sáp

- **Thân**

Thân dừa Sáp mọc thẳng, không phân nhánh, chiều cao trung bình từ 15-20m. Trong giai đoạn đầu sau khi trồng, thân dừa ngắn, phát triển chậm, cho đến khi chiều ngang phát triển đầy đủ thì thân mới bắt đầu cao lên. Giai đoạn này kéo dài khoảng 4 năm tùy theo giống. Do đặc điểm này mà thân dừa cao chỉ phát triển mạnh sau 4-5 năm. Do cấu tạo của thân không có tầng sinh mô thứ cấp nên những tổn thương trên thân dừa không thể phục hồi được và đường kính thân cũng không phát triển theo thời gian nên quan sát một đoạn thân ta có thể đánh giá tình hình sinh trưởng của cây trong thời gian đó. Đồng thời thân phát triển từ đỉnh sinh trưởng (củ hủ) nên khi bị đuông tấn công cây sẽ bị chết.

- **Lá**

Một cây dừa Sáp có khoảng 30-35 tàu lá. Mỗi tàu lá dài 5-6m vào thời kỳ trưởng thành. Ở cây trưởng thành, 1 tàu lá dừa gồm 2 phần. Phần cuống lá không mang lá chét,

lồi ở mặt dưới, phẳng hay hơi lõm ở mặt trên, đáy phồng to, bám chặt vào thân và khi rụng sẽ để lại một vết sẹo trên thân. Phần mang lá chét mang trung bình 90-120 lá chét mỗi bên, không đối xứng hẳn qua sống lá mà một bên này sẽ có nhiều hơn bên kia khoảng 5-10 lá chét. Đỉnh sinh trưởng sản xuất lá liên tục, cứ một lá xuất hiện trên tán thì có thêm một chồi lá xuất hiện và một lá già rụng đi. Một cây sinh trưởng tốt mỗi năm ra ít nhất 14-16 lá (24-26 ngày/lá). Mùa khô dừa ra lá nhanh hơn so với mùa mưa. Một tàu lá dừa luôn luôn có đời sống 5 năm, từ khi tượng đến khi xuất hiện 2,5 năm và từ khi xuất hiện đến khi khô, rụng là 2,5 năm. Nếu điều kiện tự nhiên bất lợi lá sẽ ra chậm hơn, số lá ít đi chứ không rút ngắn đời sống của lá. Điều kiện dinh dưỡng và nước đầy đủ cây ra nhiều lá sẽ làm cho số lá trên tán cây nhiều hơn (35-40 tàu). Nếu gặp điều kiện bất lợi thời gian ra lá kéo dài, số lá trên tán cây sẽ ít.

- **Hoa**

Thông thường mỗi nách lá mang một phát hoa, do đó có bao nhiêu lá mới là có khả năng có bấy nhiêu phát hoa được sinh ra. Tuy nhiên, giai đoạn 15-16 tháng trước khi hoa nở (giai đoạn phân hóa nhánh gié) phát hoa dừa có thể bị thui do cây dừa bị thiếu dinh dưỡng, khô hạn hay ngập úng. Đây là một trong những nguyên nhân góp phần gây ra hiện tượng "mùa treo" ở dừa. Hoa dừa thuộc loại đơn tính, đồng chu. Số lượng hoa cái trung bình biến động từ 20-40 cái trên mỗi phát hoa. Mỗi phát hoa có thể mang trung bình từ 5-10g phấn hoa. Mỗi hoa đực chứa khoảng 272 triệu hạt phấn có kích thước rất nhỏ. Chỉ khoảng 40% hạt phấn có khả năng thụ phấn trong mỗi phát hoa. Thời gian để hoa cái đầu tiên nở đến hoa cái cuối cùng thụ phấn xong trên cùng phát hoa gọi là pha cái, kéo dài từ 5-7 ngày. Thời gian để hoa đực đầu tiên mở đến hoa đực cuối cùng mở gọi là pha đực, kéo dài khoảng 18-22 ngày. Trên giống dừa Sáp, pha đực thường xuất hiện trước rồi mới đến pha cái nên có sự lệch pha và sự thụ phấn chéo là phổ biến. Hoa dừa được thụ phấn chủ yếu nhờ gió và côn trùng, trong đó ong mật có vai trò quan trọng nhất. Việc nuôi ong trong vườn dừa làm tăng năng suất dừa đáng kể. Hiện tượng rụng trái non thường xuất hiện ở giai đoạn ba tuần sau khi đậu trái và có thể kéo dài đến tháng thứ sáu.

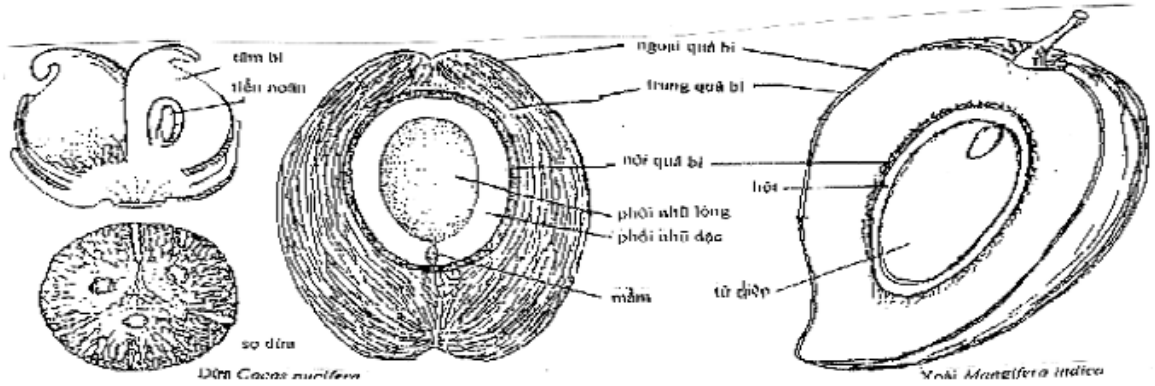
- **Trái**

Trái dừa thuộc loại quả hạch, nhân cứng. Trái gồm có ba phần là ngoại quả bì (phần vỏ bên ngoài được phủ cutin), trung quả bì (xơ dừa) và nội quả bì bao gồm gáo, nước và cơm dừa. Vỏ dừa dày từ 1- 5 cm tùy theo giống, phần cuống có thể dày đến 10 cm. Vỏ dừa bao gồm 30% là xơ dừa và 70% là bụi xơ dừa. Bụi xơ dừa có đặc tính hút và giữ ẩm cao từ

400-600% so với thể tích của chính nó. Gáo dừa có hình dạng rất khác biệt tùy theo giống, độ dày của gáo từ 3-6 mm. Bốn tháng tuổi sau khi thụ phấn, gáo dừa bắt đầu hình thành và chuyển sang màu nâu và cứng hơn khi trái được 8 tháng tuổi. Nước dừa xuất hiện từ tháng thứ ba sau khi thụ phấn và đạt được thể tích lớn nhất ở tám tháng tuổi. Cơm dừa bắt đầu hình thành 5 tháng sau khi thụ phấn, Ở những trái có sáp thì có lớp cơm màu trắng rất dày (có khi choán hết cả phần ruột) giống như sáp đèn cầy, chính giữa là chất lỏng sệt như nước cơm chắt. Không như cơm dừa bình thường, nếu còn non thì mềm và ngọt, nếu già thì cứng cạy. Cơm dừa sáp mềm và dẻo như bột quánh lại, béo và có mùi thơm đặc trưng.

- **Phôi**

Phôi dừa Sáp cũng như các trái dừa thường, chúng nằm tại vị trí 1 trong 3 mắt của trái dừa. Được bao bọc bởi một lớp vỏ dày và được nuôi dưỡng bởi toàn bộ khối nội nhũ trong gáo dừa. Bình thường khi độ chín của trái cũng như độ tuổi của trái đủ điều kiện để cho trái nảy mầm, kết hợp với yếu tố nhiệt độ, độ ẩm phôi dừa sẽ lấy chất dinh dưỡng ở khối nội nhũ và phát triển thành cây hoàn chỉnh. Nhưng ở trái dừa Sáp do đột biến mà khối nội nhũ hoàn toàn đặc quánh không như các quả dừa tự nhiên nên phôi dừa không thể phát triển thành cây hoàn chỉnh. Việc nhân giống dừa Sáp là chọn trái dừa không có sáp trên buồng dừa chứa 1 vài trái có sáp để cho nảy mầm bình thường, nhưng khi cây phát triển và ra hoa kết trái việc cây dừa này có phải là dừa sáp và cho sáp hay không là hoàn toàn ngẫu nhiên.



Hình 3.3 Vị trí phôi dừa Sáp

3.2 Nuôi cấy mô tế bào thực vật

3.2.1 Khái niệm

Nuôi cấy mô tế bào thực vật hay còn gọi là nuôi cấy *in vitro* là công cụ cần thiết trong nhiều lĩnh vực nghiên cứu cơ bản và ứng dụng của ngành công nghệ sinh học. Nhờ

áp dụng kĩ thuật nuôi cấy mô, con người đã thúc đẩy thực vật sinh sản nhanh hơn gấp nhiều lần so với tự nhiên. Do đó tạo ra hàng loạt cá thể mới giữ nguyên tính trạng di truyền của cơ thể mẹ, làm rút ngắn thời gian đưa giống mới vào sản xuất. Hơn nữa dựa vào kĩ thuật nuôi cấy mô có thể duy trì và bảo quản nhiều giống cây trồng quí hiếm để phục tráng giống.

Phương pháp nuôi cấy mô tế bào thực vật bắt đầu từ một mảnh nhỏ thực vật vô trùng được đặt trong môi trường dinh dưỡng thích hợp. Chồi mới hay mô sẹo mà mẫu cấy này sinh ra bằng sự tăng sinh được phân chia và cấy chuyền để nhân giống.

3.2.2 Ứng dụng của nuôi cấy mô tế bào thực vật

Năm 1986, một số lượng lớn cây trồng sản xuất bằng phương pháp nuôi cấy mô đã được tiêu thụ tên thị trường thương mại với hàng chục triệu dollar.

Phương pháp nuôi cấy mô thể hiện một số ưu điểm đã được ứng dụng:

- Nhân giống vô tính với tốc độ nhanh
- Tạo cây sạch bệnh và kháng bệnh
- Cảm ứng và tuyển lựa dòng đột biến
- Sản xuất cây đơn bội qua nuôi cấy túi phấn
- Lai xa
- Lai tế bào soma và tạo dòng protoplast
- Gây biến tính thực vật qua hấp thụ DNA và ngoại lai
- Cố định nitơ
- Cải thiện hiệu quả của quang tổng hợp
- Bảo quản nguồn gen quý

3.2.3 Nuôi cấy phôi

Sự ghi nhận đầu tiên về nuôi cấy phôi là công trình của Charles Bonnet ở thế kỷ XVIII, ông tách phôi Phascolus và Fagopyrum trong đất và nhận được cây nhưng là cây lùn. Từ đầu thế kỷ XX các công trình nuôi cấy phôi dần được hoàn thiện hơn. Từ các công trình nghiên cứu trước đó, Knudson (1922) đã nuôi cấy thành công phôi cây lan trong môi trường chứa đường và khám phá ra một điều là nếu thiếu đường thì phôi không thể phát triển thành protocorm. Raghavan và ctv (1976) đã công bố rằng phôi phát triển qua hai giai đoạn dị dưỡng và tự dưỡng. Ở giai đoạn dị dưỡng (tiền phôi) cần có các chất điều hòa sinh

trưởng để phát triển. Trong giai đoạn tự dưỡng, sự phát triển của phôi không cần chất điều hòa sinh trưởng. Đối với nuôi cấy phôi, như đã biết, đường đóng vai trò rất quan trọng. Trong nhiều trường hợp thì đường sucrose cho kết quả tốt hơn các loại đường khác. Ngoài ra một số chất tự nhiên như nước dừa, nước chiết malt, casein thủy phân, là những chất rất cần trong nuôi cấy phôi. Các chất kích thích sinh trưởng như GA3, auxin, cytokinine thường được sử dụng nhiều trong nuôi cấy phôi. Auxin thường dùng ở nồng độ thấp, Kinetin có vai trò đặc biệt cho sự phát triển của phôi. Các yếu tố ngoại cảnh như nhiệt độ, ánh sáng cũng ảnh hưởng đến sự phát triển của phôi nuôi cấy *in vitro*. Thông thường, phôi nuôi cấy cần nhiệt độ và ánh sáng thấp hơn phôi phát triển tự nhiên (Công nghệ nuôi cấy mô & tế bào thực vật - PGS-TSKH Lê Văn Hoàng).

Phôi soma là phôi hình thành từ các bộ phận cơ quan sinh trưởng của cây có cùng bản chất với phôi hữu tính nhưng chúng hoàn toàn không trải qua quá trình thụ tinh mà thành. Kỹ thuật nuôi cấy phôi soma ngày nay được cho là một phương pháp có khả năng nhân nhanh và tỷ lệ đồng đều của con giống đạt được rất tốt. Đối với các đối tượng có hệ số nhân chồi thấp khó tái sinh thì đây là một phương pháp phù hợp nhất với điều kiện của nước ta hiện nay.

3.3 Các yếu tố ảnh hưởng trong nuôi cấy phôi

3.3.1 Các nguyên tố đa lượng

- **Carbon**

Đường sucrose (saccharoza) là nguồn carbon chủ yếu và được sử dụng thường xuyên trong hầu hết các môi trường nuôi cấy mô, kể cả khi mẫu nuôi cấy là các chồi xanh có khả năng quang hợp. Khi khử trùng, đường sucrose bị thủy phân một phần, thuận lợi hơn cho cây hấp thụ. Trong một số trường hợp, ví dụ nuôi cấy mô cây một lá mầm, đường glucose tỏ ra tốt hơn so với sucrose. Mô thực vật có khả năng hấp thu một số đường khác như maltose, galatose, lactose, mannose, thậm chí tinh bột, nhưng các loại đường này hầu như rất ít được sử dụng trong nuôi cấy tế bào và mô thực vật.

Mô và tế bào thực vật nuôi cấy *in vitro* sống chủ yếu theo phương thức dị dưỡng, mặc dù ở nhiều trường hợp chúng có thể sống bán dị dưỡng nhờ điều kiện ánh sáng nhân tạo và lục lạp có khả năng quang hợp. Vì vậy, việc đưa vào môi trường nuôi cấy nguồn carbon hữu cơ là điều bắt buộc. Nguồn carbon thông dụng nhất đã được kiểm chứng là sucrose, nồng độ thích hợp phổ biến là 2-3%, song cũng còn phụ thuộc vào mục đích nuôi

cấy mà thay đổi có khi giảm xuống tới 0,2% (chọn dòng tế bào) và tăng lên đến 12% (cảm ứng stress nước).

Các mô và tế bào thực vật trong môi trường nuôi cấy ít có khả năng tự dưỡng và vì thế cần thiết phải bổ sung nguồn carbon bên ngoài để cung cấp năng lượng. Thậm chí các mô bắt đầu lục hóa hoặc hình thành diệp lục tố dưới các điều kiện đặc biệt trong suốt quá trình nuôi cấy đã không tự dưỡng carbon. Việc bổ sung nguồn carbon bên ngoài vào môi trường làm tăng phân chia tế bào và tái sinh các chồi xanh.

Sự thủy phân từng phần sucrose xuất hiện khi môi trường được khử trùng. Các tế bào và mô nuôi cấy đã sinh trưởng trên môi trường có sucrose được khử trùng bằng autoclave tốt hơn trên môi trường có sucrose được khử trùng bằng màng lọc (filter). Điều này cho thấy các tế bào thích hợp với nguồn dự trữ có sẵn của glucose và fructose do thủy phân sucrose khi khử trùng bằng autoclave.

3.3.2 Các nguyên tố vi lượng (Fe, B, Cl, Co, Cu, Mn, Mo, Zn...)

Các nguyên tố vô cơ cần một lượng nhỏ nhưng không thể thiếu cho sinh trưởng của mô và tế bào thực vật được gọi là các nguyên tố vi lượng. Đó là các ion: mangan (Mn), kẽm (Zn), boron (B), đồng (Cu), và molybden (Mo), coban (Co), iod (I)...

Nhu cầu của cây đối với nguyên tố vi lượng là rất thấp. Do vậy những nguyên tố này cũng có mặt trong môi trường ở các nồng độ tương ứng. Hầu hết các nguyên tố vi lượng sử dụng ở lượng mmol. Một số nguyên tố vi lượng có nhu cầu nhỏ hơn có thể thay thế dễ dàng bằng sự lẫn tạp ngẫu nhiên của chúng trong các thành phần của môi trường như agar, các chất bổ sung như nước dừa, dịch chiết nấm men (yeast extract), các muối và nước.

3.3.3 Ảnh hưởng của than hoạt tính

Bổ sung than hoạt tính vào trong môi trường nuôi cấy sẽ có lợi ích và có tác dụng khử độc. Khi bổ sung than hoạt tính vào môi trường nuôi cấy thì sẽ kích thích sự tăng trưởng và biệt hóa. Than hoạt tính nói chung ảnh hưởng: hút các hợp chất cản, hút các chất điều hòa sinh trưởng. Người ta cho rằng tác dụng cản sự tăng trưởng của mô cấy khi có sự hiện diện của than hoạt tính trong môi trường là do chúng hút chất điều hòa sinh trưởng có trong môi trường. NAA, kinetine, IAA, BAP, 2iP liên kết với than hoạt tính. Khả năng kích thích sự tăng trưởng của than hoạt tính là do nó kết hợp với các hợp chất phenol độc

tiết ra trong thời gian nuôi cấy. Than hoạt tính thường được bổ sung vào môi trường với nồng độ 0,5-3%.

3.3.4 Ảnh hưởng của Agar

Đối với nuôi cấy tĩnh, nếu sử dụng môi trường lỏng, mô có thể bị chìm và sẽ chết vì thiếu ôxy. Để tránh tình trạng này, môi trường nuôi cấy được làm đặc lại bằng agar; một loại tinh bột được chế từ rong biển và mô được cấy trên bề mặt của môi trường. Agar thường được sử dụng ở nồng độ 0,6 đến 1%.

3.3.5 Ảnh hưởng của các chất điều hòa sinh trưởng

- **Nhóm các auxin**

Môi trường nuôi cấy được bổ sung các auxin khác nhau như: 1H- indole-3-acetic acid (IAA), 1-naphthaleneacetic acid (NAA), 1H-indole-3-butyric acid (IBA), 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) và naphthoxyacetic acid (NOA). IAA là auxin tự nhiên có trong mô thực vật; còn lại NAA, IBA, 2,4-D và NOA là các auxin nhân tạo, thường thì các auxin nhân tạo có hoạt tính mạnh hơn vì do đặc điểm phân tử của chúng nên các enzyme oxy hóa auxin (auxin-oxydase) không có tác dụng. Những auxin có hiệu lực riêng biệt trong nuôi cấy tế bào thực vật là 4-chlorophenoxyacetic acid (4-CPA) hoặc p-chlorophenoxyacetic acid (PCPA), 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid (2,4,5-T), 2-methyl-4-chlorophenoxyacetic acid (MCPA), 4-amino-3,5,6-trichloropicolinic acid (picloram), và 3,6-dichloro-2-methoxybenzoic acid (dicamba).

Mặc dù, những chi tiết ở mức độ phân tử về hoạt động của auxin vẫn chưa được biết nhiều, nhưng một số nghiên cứu về di truyền và phân tử đã cung cấp những kết quả mới thú vị. Trong những năm qua, một số gen mã hóa cho các protein liên kết auxin (auxin binding proteins) đã được tạo dòng (cloning) và khảo sát các đặc điểm của chúng, và thông tin mới về gen cảm ứng auxin (auxin-induced gen) cũng đã thu được. Auxin có tác dụng hoạt hóa các ion H^+ trực tiếp hoặc gián tiếp (thông qua sự ảnh hưởng lên các enzym) làm tăng tính đàn hồi của thành tế bào, tăng tính giản nỡ của tế bào trong phản ứng với áp suất trương. Auxin cũng có ảnh hưởng ở mức độ biểu hiện gen và kích thích quá trình tạo rễ.

Auxin là nhóm chất điều hòa sinh trưởng thực vật được sử dụng thường xuyên trong nuôi cấy mô tế bào thực vật. Auxin kết hợp chặt chẽ với các thành phần khác của môi trường dinh dưỡng để kích thích sự tăng trưởng của mô sẹo, huyền phù tế bào và điều

hòa sự phát sinh hình thái. Sự áp dụng loại và nồng độ auxin trong môi trường nuôi cấy phụ thuộc vào:

- Kiểu tăng trưởng hoặc phát triển cần nghiên cứu

- Hàm lượng auxin nội sinh của mẫu cấy

- Khả năng tổng hợp auxin tự nhiên của mẫu cấy

- Sự tác động qua lại giữa auxin ngoại sinh và auxin nội sinh

Các auxin liên quan tới độ dài của thân, đốt, chồi chính, rễ. Đối với nuôi cấy mô, auxin đã được sử dụng cho việc phân chia tế bào và phân hóa rễ. Những auxin dùng rộng rãi trong nuôi cấy mô là IBA (3-indolebutiric axid), IAA (3-indole acetic axid), NAA (Napthaleneaxetic axid), 2,4-D (2,4-D-Dichlorophenoxyaxetic axid) và 2,4,5-T (Trichlorophenoxyacetic axid). Trong số các auxin, IBA và NAA chủ yếu sử dụng cho môi trường ra rễ và phối hợp với cytokinin sử dụng cho môi trường ra chồi. 2,4-D và 2,4,5-T rất có hiệu quả đối với môi trường tạo và phát triển callus. Các chất thuộc nhóm auxin có vai trò sau:

- Kích thích phân chia và kéo dài tế bào

- Chồi đỉnh cung cấp auxin gây ra ức chế sinh trưởng của chồi bên. Ưu thế chồi đỉnh làm ức chế sinh trưởng của chồi nách. Nếu ngắt bỏ chồi đỉnh sẽ dẫn đến sự phát chồi nách. Nếu thay thế vai trò của chồi đỉnh (đã bị ngắt bỏ) bằng một lớp chất keo có chứa IAA thì chồi nách vẫn bị ức chế sinh trưởng. Cơ chế ức chế của chồi đỉnh liên quan đến một chất điều hoà sinh trưởng khác là ethylene. Auxin (IAA) kích thích chồi bên sản sinh ra ethylen làm ức chế sinh trưởng của chồi đỉnh.

- IAA đóng vai trò kích thích sự phân hoá của các mô dẫn (xylem and phloem).

- Auxin kích thích sự mọc rễ ở cành giâm và kích thích sự phát sinh chồi phụ trong nuôi cấy mô.

- Auxin có các ảnh hưởng khác nhau đối với sự rụng lá, quả, sự đậu quả, sự phát triển và chín của quả, sự ra hoa trong mối quan hệ với điều kiện môi trường.

- Tạo và nhân nhanh mô sẹo (callus)

- Kích thích tạo chồi bất định (ở nồng độ thấp)

- Tạo phôi soma (2,4-D)

Nhóm các cytokinin

Các cytokinin là dẫn xuất của adenine, đây là những hormone liên quan chủ yếu đến sự phân chia tế bào, sự thay đổi ưu thế ngọn và phân hóa chồi trong nuôi cấy mô. Các cytokinin được sử dụng thường xuyên nhất là 6-benzylaminopurine (BAP) hoặc 6-benzyladenin (BA), 6-γ-γ-dimethyl-aminopurine (2-iP), N-(2-furfurylamino)-1-H-purine-6-amine (kinetin), và 6-(4-hydroxy-3-methyl-trans-2-butanylamino)purine (zeatin). Zeatin và 2-iP là các cytokinin tự nhiên, còn BA và kinetin là các cytokinin nhân tạo. Nói chung, chúng được hòa tan trong NaOH hoặc HCl loãng.

Một số hợp chất được phát hiện trong thời gian gần đây có hoạt tính giống cytokinin là N,N'-diphenylurea (DPU), thidiaziron, N-2-chloro-4-puridyl-N-phenyl urea (CPPU) và một số dẫn xuất khác của diphenyl urea.

Tỷ lệ auxin/cytokinin rất quan trọng đối với sự phát sinh hình thái (morphogensis) trong các hệ thống nuôi cấy. Đối với sự phát sinh phôi (embryogenesis), để tạo callus và rễ cần có tỷ lệ auxin/cytokinin cao, trong khi ở trường hợp ngược lại sẽ dẫn đến sự sinh sản chồi và chồi nách. Vấn đề quan trọng không kém là nồng độ của hai nhóm chất điều khiển sinh trưởng này. Chẳng hạn 2,4-D cùng với BA ở nồng độ 5,0 ppm kích thích sự tạo thành callus ở *Agrostis* nhưng nếu dùng ở nồng độ 0,1 ppm chúng sẽ kích thích tạo chồi mặc dù trong cả 2 trường hợp tỷ lệ auxin/cytokinin là bằng 1. Cơ chế hoạt động của cytokinin là chưa được biết rõ ràng mặc dù có một số kết quả về sự có mặt của các hợp chất mang hoạt tính cytokinin trong RNA vận chuyển (transfer RNA). Các cytokinin cũng có hoạt tính tổng hợp RNA, tăng hoạt tính enzyme và protein trong các mô nhất định.

Kinetin được phân lập từ chế phẩm DNA cũ hoặc nucleic acid mới sau khi khử trùng ở nhiệt độ cao hay đun sôi. Trong cơ thể sống không có kinetin tồn tại, sản phẩm này kích thích sự phát sinh chồi của cây thuốc lá nuôi cấy, nhưng nếu phối hợp xử lý cùng auxin ở tỷ lệ nồng độ thích hợp thì sẽ kích thích quá trình phân chia tế bào (do đó có tên là kinetin) ở các mô không phân hóa.

Trong tự nhiên cũng tồn tại một hormone phân bào khác, Letham là người đầu tiên đã phân lập, tinh chế và cho kết tinh thành công hormone phân bào tự nhiên đó từ nội nhũ đang ở dạng sữa của hạt ngô. Hợp chất cytokinin tự nhiên đó được gọi là zeatin (zea: ngô).

Tương tự các cytokinin khác, zeatin cũng là một dẫn xuất của adenin. Trong thực tiễn nuôi cấy mô người ta chỉ dùng zeatin trong những trường hợp đặc biệt vì giá thành rất

đắt, thường thay thế zeatin bằng kinetin hoặc một sản phẩm tổng hợp nhân tạo khác, đó là:

6-Benzylaminopurine (BAP): Hoạt lực của BAP cao hơn nhiều so với kinetin và bản thân BAP bền vững hơn zeatin dưới tác động của nhiệt độ cao. BAP có khả năng làm tăng hình thành các sản phẩm thứ cấp và tăng kích thước của tế bào ở các lá mầm, kích thích sự nảy mầm của hạt và quá trình trao đổi chất.

Cytokinin liên quan tới sự phân chia tế bào, phân hóa chồi. Trong môi trường nuôi cấy mô, cytokinin cần cho sự phân chia tế bào và phân hóa chồi từ mô sẹo hoặc từ các cơ quan, gây tạo phôi vô tính, tăng cường phát sinh chồi phụ.

Chức năng chủ yếu của các cytokinin được khái quát như sau:

- Kích thích phân chia tế bào
- Tạo và nhân callus
- Kích thích phát sinh chồi trong nuôi cấy mô
- Kích thích phát sinh chồi nách và kìm hãm ảnh hưởng ưu thế của chồi đỉnh
- Làm tăng diện tích phiến lá do kích thích sự lớn lên của tế bào
- Có thể làm tăng sự mở của khí khổng ở một số loài
- Tạo chồi bất định (ở nồng độ cao)
- Ức chế sự hình thành rễ
- Ức chế sự kéo dài chồi
- Ức chế quá trình già (hóa vàng và rụng) ở lá, kích thích tạo diệp lục

3.3.6 Ảnh hưởng của độ pH môi trường

Tế bào và mô thực vật đòi hỏi pH tối ưu cho sinh trưởng và phát triển trong nuôi cấy. Trong khi chuẩn bị môi trường, pH có thể được điều chỉnh đến giá trị cần thiết của thí nghiệm. Độ pH ảnh hưởng đến sự di chuyển của các ion và đối với hầu hết các môi trường nuôi cấy pH 5,0-6,0 trước khi khử trùng được xem là tối ưu. Độ pH cao hơn sẽ làm cho môi trường rất rắn trong khi pH thấp lại giảm khả năng đông đặc của agar. Hầu hết các môi trường nuôi cấy nghèo đệm, vì thế chúng làm dao động giá trị pH, sự giao động này có thể gây bất lợi cho thí nghiệm nuôi cấy dài ngày và sự sinh trưởng của các tế bào đơn hoặc các quần thể tế bào ở mật độ thấp.

Độ pH của môi trường dinh dưỡng ảnh hưởng trực tiếp tới quá trình thu nhận các chất dinh dưỡng từ môi trường vào tế bào. Vì vậy, đối với từng môi trường nhất định và từng trường hợp cụ thể của các loài cây phải chỉnh độ pH của môi trường về mức ổn định ban đầu. Nuôi cấy callus của nhiều loài cây, pH ban đầu thường là 5,5-6,0 sau 4 tuần nuôi cấy pH đạt được giá trị từ 6,0-6,5. Đặc biệt khi sử dụng các loại phụ gia có tính kiềm hoặc tính acid cao như amino acid, vitamin thì nhất định phải phải dùng NaOH hoặc HCl loãng để chỉnh pH môi trường về từ 5,5-6,5.

3.4 Những nghiên cứu về dừa Sáp trong và ngoài nước

3.4.1 Những nghiên cứu trong nước

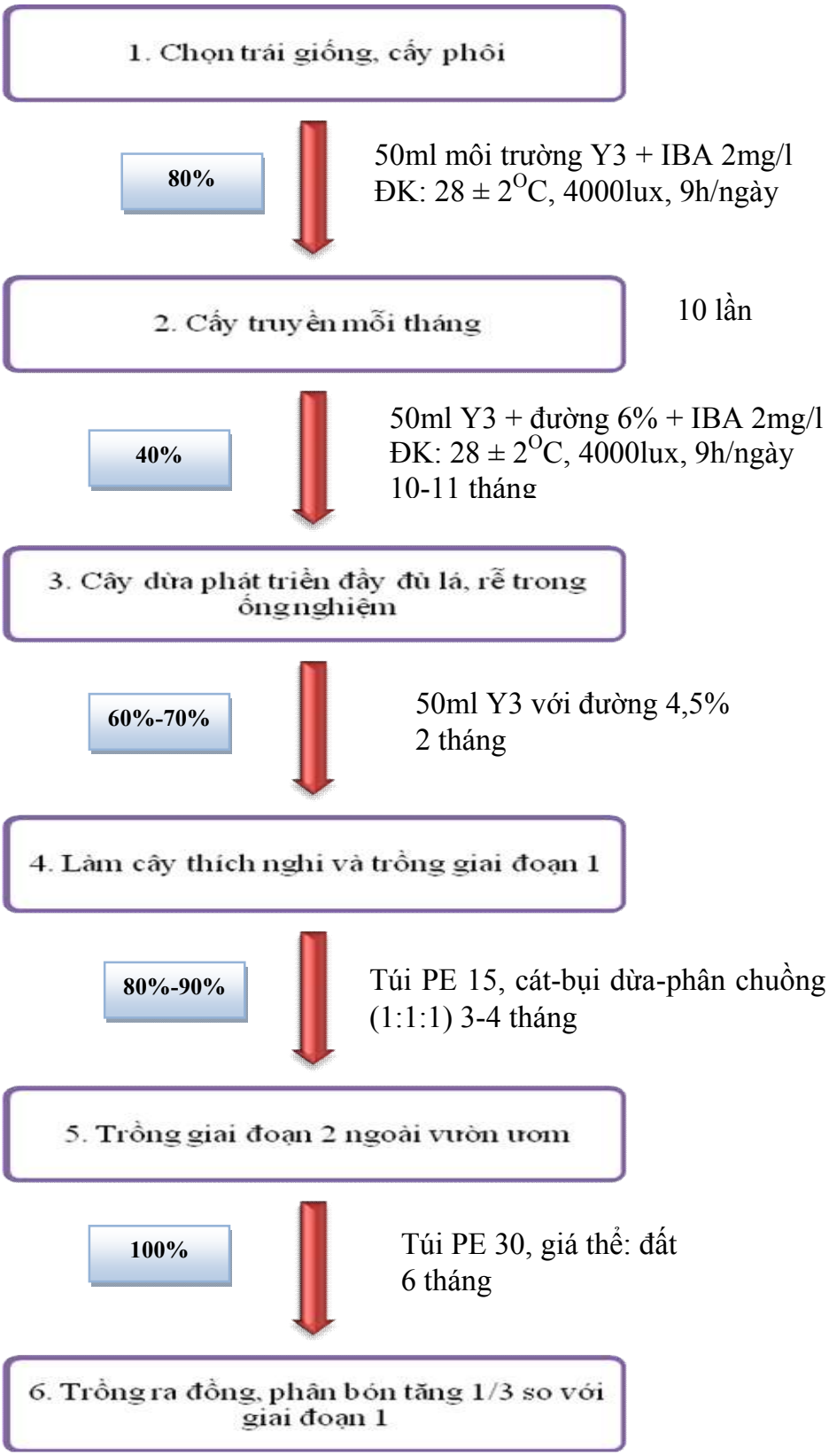
Tài nguyên di truyền thực vật vừa là một bộ phận của giống vừa là vật liệu ban đầu để lai tạo ra giống mới và là hạt nhân của đa dạng sinh học nên giữ vai trò rất quan trọng trong chiến lược phát triển nông nghiệp của mỗi quốc gia. Chính vì vậy công tác bảo tồn và lưu giữ nguồn tài nguyên di truyền thực vật là một trong những lĩnh vực ưu tiên được đầu tư. Giống dừa Sáp thuộc loại quý hiếm, là "đặc sản" của huyện Cầu Kè, tỉnh Trà Vinh có giá trị kinh tế rất cao, hiện được sử dụng để làm thức uống giải khát với mùi vị thơm đặc trưng. Đặc biệt khi vào dịp lễ hội tại địa phương thì giá một quả dừa Sáp lên đến 100.000 đồng, thậm chí lên đến 200.000 đồng/trái.

Về nuôi cấy phôi dừa đã có công trình (Nguyễn Hữu Hổ và ctv, 1993); Nguyễn Thị Hiền, 1996) nhưng chỉ thực hiện với các giống dừa địa phương có tỷ lệ nảy mầm trong tự nhiên rất cao, chưa có nghiên cứu nào thực hiện cho các giống dừa quý hiếm.

Viện Nghiên cứu Dầu và Cây có Dầu đã bước đầu thực hiện thành công việc nhân giống dừa Sáp bằng cách nuôi cấy phôi trong điều kiện *in vitro* (hình 3.4).

Giai đoạn 1, chọn trái giống khoảng 9 tháng tuổi. Ở giai đoạn này tỷ lệ trái được sử dụng để lấy phôi bị hao hụt chỉ còn khoảng 80%.

Giai đoạn 2, phôi dừa sau khi được lấy ra cùng với lớp cơm dừa được khử trùng với javen 100% trong 10-15 phút. Rửa phôi bằng nước vô trùng. Tách phôi rồi cấy vào môi trường chuẩn Y3 đặt ở phòng sáng ở nhiệt độ 28±2^{0}C, ánh sáng 4.000 lux, thời gian chiếu sáng 9h/ngày. Cấy chuyền phôi hàng tháng (10 lần/10 tháng). Kết thúc giai đoạn nuôi cấy phôi trong phòng thí nghiệm, tỷ lệ phôi sống và phát triển thành cây là khoảng 40%.



Hình 3.4 Quy trình nuôi cấy phôi dừa Sáp

Giai đoạn 3, giai đoạn thích nghi trong phòng thí nghiệm. Các cây dừa con được cấy vào môi trường Y3 và được đặt vào điều kiện phòng thí nghiệm có nhiệt độ 30^0C, ẩm độ 60% và cường độ chiếu sáng 5.000 lux. Giai đoạn này được thực hiện khoảng 1-2 tháng.

Giai đoạn 4, thích nghi vườn ươm. Cây dừa trong phòng thí nghiệm được đem ra trồng trong các túi PE 15 có pha cát, xơ dừa, phân chuồng theo tỷ lệ (1:1:1). Nuôi trồng cây dừa trong bịch PE khoảng 4 tháng. Cây sống sót từ giai đoạn này đạt 60-70%.

Giai đoạn 5, trồng ở vườn ươm. Cây sống sót ở giai đoạn này đạt 80-90%

Giai đoạn 6, trồng ra đồng. Tỷ lệ sống giai đoạn này là khoảng 95-100%

Như vậy, sau quá trình nuôi cấy phôi khoảng 12-13 tháng, tỷ lệ phôi phát triển thành cây xanh tốt ở vườn ươm đạt tiêu chuẩn trồng ra đồng là 19-20%.

Nguyên nhân dẫn đến tỷ lệ thành công thấp là do:

- Tỷ lệ phôi phát triển bất thường cao
- Tỷ lệ phôi phát triển thành cây hoàn chỉnh trong ống nghiệm đủ tiêu chuẩn đưa ra vườn ươm thấp
- Hệ thống lá và rễ nghèo nàn (lá nhỏ, phát triển chậm, bộ rễ không có hoặc có ít rễ thứ cấp)
- Khả năng thích nghi ở vườn ươm thấp

Như vậy vấn đề chính cần giải quyết trong đề tài này là phải định hướng cho phôi phát triển ngay từ khi mới đưa vào nuôi cấy và cải tạo được hệ thống chồi và rễ để nâng cao tỷ lệ nảy mầm và phát triển thành cây hoàn chỉnh có đầy đủ là và rễ trong ống nghiệm. Ngoài ra cần cải thiện tỷ lệ sống của cây dừa nuôi cấy phôi giai đoạn vườn ươm.

Viện Nghiên cứu Dầu và Cây có dầu là cơ quan tham gia thực hiện nhiệm vụ KHCN về bảo tồn và lưu giữ nguồn gen cây dừa giai đoạn 2001 – 2005 và giai đoạn 2006 – 2010, trong đó có giống dừa Sáp. Trong dự án "Phát triển sản xuất giống dừa giai đoạn 2001 – 2005" thuộc chương trình giống quốc gia (Bộ Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn), việc nghiên cứu nuôi cấy phôi dừa Sáp cũng được quan tâm. Nhóm tác giả Vũ Thị Mỹ Liên, Trần Thị Ngọc Thảo và ctv đã nghiên cứu nuôi cấy phôi dừa trong điều kiện in vitro từ năm 1999 trên 2 giống dừa là Ta xanh và Lùn vàng Mã Lai.

Từ năm 2000 đến 2001, được sự tài trợ của IPGRI-COGENT, nhóm tác giả trên đã

nghiên cứu nuôi cấy phôi dừa Sáp, dừa Ẻo trong điều kiện in vitro. Đến năm 2003-2004, nhóm tác giả trên tiếp tục nghiên cứu hoàn thiện, nâng cao quy trình nuôi cấy phôi trong phòng thí nghiệm thông qua việc tìm môi trường thích hợp cho nuôi cấy phôi dừa Sáp và dừa Dứa, nghiên cứu ảnh hưởng của thời gian ủ lạnh đến khả năng nảy mầm của phôi dừa Sáp. Thông qua Dự án Phát triển sản xuất giống dừa (giai đoạn 2001-2005) của Bộ Công Nghiệp, nhóm tác giả Vũ Thị Mỹ Liên, Trần Thị Ngọc Thảo và ctv đã nghiên cứu nuôi trồng 2 giống dừa Sáp và dừa Dứa. Tuy nhiên, cho đến nay tỷ lệ thành công vẫn chưa cao.

Để khai thác giống dừa đặc ruột có giá trị kinh tế cao của địa phương, trong quy hoạch sử dụng đất đến năm 2010, huyện Cầu Kè, tỉnh Trà Vinh đã có chủ trương tập trung đẩy mạnh cải tạo vườn dừa hiện có và khuyến khích, mở rộng diện tích trồng mới 50 ha dừa Sáp để chủ động được nguồn nguyên liệu. Cụ thể hơn, tháng 4/2005 Sở Khoa học và Công nghệ tỉnh Trà Vinh đã phê duyệt đề tài "Nghiên cứu ứng dụng kỹ thuật nhân, lưu giữ giống và xây dựng mô hình chuyên canh dừa Sáp ở huyện Cầu Kè, tỉnh Trà Vinh". Sau đó, tháng 7/2007 Sở Khoa học và Công nghệ tỉnh Trà Vinh cũng đã phê duyệt đề tài "Xây dựng và nhân rộng mô hình chuyên canh dừa Sáp tại huyện Cầu Kè, tỉnh Trà Vinh" do Phòng Nông nghiệp – Thủy sản huyện Cầu Kè chủ trì. Tuy nhiên, đề tài thực hiện chỉ ở mức nhân giống bằng phương pháp truyền thống, chú trọng đến kỹ thuật canh tác, thâm canh vườn dừa, chưa cải thiện được phương pháp nhân giống. Do đó, đề tài gặp khó khăn trong việc cải tạo giống dừa Sáp để nâng tỷ lệ trái dừa sáp trên mỗi vườn dừa.

3.4.2 Những nghiên cứu ngoài nước

Đánh giá di truyền tính trạng đặc ruột của dừa Sáp, Zuniga (1953) tiến hành thụ phấn nhân tạo, thụ phấn trợ lực và tự thụ phấn giữa các cây dừa Sáp với nhau đều thu được tỷ lệ phân ly 3:1 quả bình thường:quả đặc ruột tương ứng, từ đó đưa ra kết luận, đặc tính đặc ruột của dừa Sáp do một gen lặn quy định. Quả dừa từ cây dừa Sáp tự thụ sẽ có 3 kiểu gen: 1 MM (Quả có cơm dừa bình thường MMM); 2 Mm (Quả dừa biểu hiện có cơm dừa bình thường 1 MMm và 1 Mmm) và 1 mm (Quả có cơm dừa đặc ruột mmm). Dựa trên những nghiên cứu này, Torres và Zuniga đã đề xuất một số biện pháp cải tiến nhằm làm gia tăng tỷ lệ quả đặc ruột, đặc biệt chú trọng đến phương pháp nuôi cấy phôi.

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 ctv (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 mền, xốp và không có chức năng (Rillo và Paloma, 1992) để từ đó tạo ra những cây giống cho tỷ lệ trái sáp cao.

Philippines đã thực hiện xong chương trình phục hồi giống dừa Sáp (Makapuno) cũng như bảo tồn nguồn gen quý đặc trưng này bằng phương pháp nuôi cấy phôi (coconut embryo culture). Phôi của những trái dừa Sáp được tách ra để nuôi cấy trong môi trường nhân tạo phù hợp để phát triển thành cây. Cây dừa Sáp trồng từ kỹ thuật nuôi cấy phôi sẽ cho tỷ lệ trái đặc ruột lên đến 70% so với 20-25% của cây dừa trồng từ phương pháp nhân giống thông thường. Dừa Sáp là cây thụ phấn chéo, để thu được 100% trái đặc ruột/quày Philippine đề nghị trồng toàn cây dừa Sáp nhân từ kỹ thuật nuôi cấy phôi chung với nhau trong cùng một vườn. Đến tháng 6/2006 tỷ lệ thành công trên 50% tính từ phôi ra cây con trên đồng ruộng. Trồng dừa Sáp cấy phôi với diện tích lớn và biệt lập với các quần thể dừa xung quanh như 8 ha dừa Sáp nuôi cấy phôi được trồng ở Pilar, Sorsogon và 8 ha ở Tomas, Batangas đều cho tỷ lệ đặc ruột từ 98 – 100%.

Thái Lan không phải là quốc gia có dừa Sáp nhưng đã có những nghiên cứu về dừa Sáp từ những năm 1980. Từ những cây dừa sáp nhập từ Philippines, Thái Lan cũng đã nghiên cứu thành công kỹ thuật nuôi cấy phôi dừa Sáp và đã thành công trong việc lai tạo giữa giống dừa Sáp và giống dừa Dứa với kết quả là quả dừa lai F_1 vừa đặc ruột lại có mùi thơm đặc trưng của giống dừa Dứa, rất hấp dẫn cho khách du lịch.

Theo Eeuwens, 1978 môi trường hình thành sẹo và phát sinh phôi tốt nhất trên môi trường Y3. Theo Azpeitia và ctv (2003) hình thái sẹo tốt nhất cho quá trình cảm ứng tạo phôi là sẹo có màu trắng trong khoảng nuôi cấy 90 ngày.

Theo M. T. PEREZ-NU NEZ1 năm 2005 khi tiến hành đồng thời nghiên cứu khả năng tái tạo phôi từ thể sẹo của phôi sơ cấp và thứ cấp. Từ đó rút ra kết luận khả năng tái tạo phôi soma từ sẹo của phôi thứ cấp là tốt nhất. Đồng thời nhóm cũng chỉ ra rằng trong quá trình nhân sẹo, sẹo được nhân liên tiếp 3 lần là tối ưu nhất. Trong các mẫu được tiến hành khảo sát tạo sẹo thể "plumule" (thể mầm) được đánh giá là nguyên liệu tốt nhất (Hornung, 1995; Chan et al., 1998).

Theo Fernando và Gamage (1999), họ tiến hành đồng thời 2 phương pháp nghiên cứu về sự ảnh hưởng của ABA đến quá trình cảm ứng tạo phôi soma của dừa Sáp từ mô sẹo. Trong đó hướng nghiên cứu thứ nhất, các mô sẹo có nguồn gốc từ phôi non 7 đến 9 tháng

tuổi được tách từ quả dừa cấy vào môi trường 72 (BM 72) có bổ sung 24µM 2,4D, 2,5 đến 7,5µM ABA và 2,5g than hoạt tính nuôi cấy từ 2 đến 3 tháng trước khi nuôi cấy tái sinh. Cách thứ 2 thay vì sử dụng một nồng độ 2,4 D họ cho sử dụng 2,4 D với một nồng độ giảm dần và kèm theo đó là sự bổ sung ABA với nồng độ từ 2,5 đến 5 µM với chu kì cấy chuyền 5 tuần 1 lần. Kết quả đạt được ở hướng nghiên cứu thứ nhất có50 % số sẹo được phát sinh phôi. Ở nghiên cứu thứ 2 cho thấy kết quả tốt nhất ở chu kì giảm nồng độ từ 24 xuống 16 µM 2,4 D cho kết quả cảm ứng tạo phôi là 61,14% và 11,4 % cảm ứng chồi. Ở nồng độ 2,4D trên thì với sự bổ sung ABA ở 2 nồng độ 2,5 và 7,5 µM cho kết quả rất khác nhau. Cụ thể ở nồng độ 2,5 cho tỉ lệ cảm ứng tạo phôi là 67,4 cò tỉ lệ cảm ứng chồi là 9,4 % . Ở nồng độ 7,5 cho tỉ lệ cảm ứng phôi là 73,7% còn tỉ lệ cảm ứng chồi là 0% (Fernando S.C và ctv, 2000). Việc nghiên cứu sử dụng phối hợp giữa than hoạt tính và nồng độ bổ sung 2,4D trong nuôi cấy tạo sẹo, tác giả đã tiến hành nghiên cứu sự phối hợp riêng rẽ của 2 loại than hoạt tính ACSC loại A và B chung khác nhau về kích thước hạt (loại A nhỏ hơn loại B). Ông rút ra một kết luận loại B với kích thước hạt lớn hơn cho tỉ lệ tạo sẹo tốt hơn. Cụ thể kết quả nghiên cứu cho thấy với việc sử dung ACSC-B với sự bổ sung 250 µM cho tỉ lệ tạo sẹo từ 60 đến 70%.

Theo Montero-Cortés và các công sự, sự ảnh hưởng BA dến quả trình cảm ứng tạo phôi soma hoàn chỉnh từ sẹo phôi được nghiên cứu và công bố. Ở thí nghiệm này tác giả bố trí môi trường cảm ứng phôi hoàn chỉnh là môi trường Y3 có bổ sung 2,5 g than hoạt tính 3g gelrite, 600µM 2,4D và 4 nghiệm thức BA lần lượt là 0-50-100-200 µM BA. Kết quả thu được tốt nhất là 70% số lượng sẹo phôi được tái sinh hoàn chỉnh sau 150 ngày cấy. Đồng thời tác giả cũng đề xuất môi trường tạo sẹo là môi trường Y3 với sự bổ sung 600µM 2,4D còn môi trường cảm ứng phôi sẹo bổ sung 6µM 2,4D và 300µM BA (Mayra và ctv, 2011).

IV. NỘI DUNG, VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

4.1 Nội dung nghiên cứu

4.1.1 Nội dung 1

Điều tra, khảo sát hiện trạng, đặc điểm hình thái, tuyển chọn cây dừa mẹ cho trái, trái dừa Sáp giống để nuôi cấy.

- Xác định đặc điểm hình thái của dừa Sáp
- Tuyển chọn cây dừa mẹ để thu thập trái

- Tuyển chọn trái dừa Sáp giống từ cây mẹ để nuôi cấy phôi

4.1.2 Nội dung 2

Nhân giống dừa Sáp bằng phương pháp nuôi cấy phôi

4.1.3 Nội dung 3

Giai đoạn vườn ươm và huấn luyện cây con

4.2 Vật liệu nghiên cứu

4.2.1 Đối tượng nghiên cứu

Trái dừa sáp giống để nhân giống được chọn lọc dựa vào các yếu tố sau:

+ Quả dừa sáp chọn từ các cây mẹ đã được tuyển chọn và đánh dấu trước đó

+ Quả có kích thước trung bình và nặng cân

+ Quả được chọn đều đặn, không dị dạng và không bị sâu bệnh

4.2.2 Hóa chất dụng cụ và trang thiết bị

4.2.2.1 Hóa chất

Hóa chất nghiên cứu bao gồm:

- Khoáng đa lượng, muối trung, vi lượng, các muối hữu cơ và vitamin
- Than hoạt tính, sucrose (VN).
- Các chất điều hòa sinh trưởng
- Các chất hấp thu phenol
- Các môi trường nuôi cấy

4.2.2.2 Dụng cụ trang thiết bị

Cân phân tích, máy đo pH để hiệu chỉnh pH môi trường trước khi hấp khử trùng, Pippette có dung tích từ 10 – 1000 µl và từ 1 - 10 ml, Ống đong có dung tích 1000 ml và cốc thủy tinh từ 50 – 3000 ml, Bình định mức 25 ml, 50 ml, Đũa khuấy thủy tinh, máy khuấy từ, Máy cất nước 1 lần 8 lít/giờ, Nồi hấp khử trùng (autoclave) dung tích 40 lít và 85 lít. Tủ mát 4^0C dùng bảo quản hoá chất và dung dịch mẹ, Tủ UV khử trùng bề mặt, Tủ cấy đôi, kiểu gió thổi ngang, kích thước lỗ màng lọc 0.2 - 0.3 µm, Dụng cụ giải phẫu mô

gồm: dao, kéo, kẹp, đèn cồn, giá để dụng giải phẫu, Khay đựng mẫu cấy, giấy lót khử trùng.

4.3 Phương pháp nghiên cứu

4.3.1 Phương pháp điều tra hiện trạng, đặc điểm hình thái (trích từ Desciptors for coconut (*Cocos nucifera* L.) và Manual on Standardized Research Techniques in CoconutBreeding. IPGRI-COGENT)

4.3.2 Phương pháp nuôi cấy phôi

- Giai đoạn lấy phôi từ quả dừa.

- Giai đoạn khử trùng phôi dừa.

- Giai đoạn nảy mầm của phôi.

- Giai đoạn phát triển của phôi thành cây dừa.

- Giai đoạn thích nghi cây cấy phôi trước khi đưa ra vườn ươm.

4.3.2.1 Thu mẫu và xử lý mẫu

Dừa Sáp thu tại huyện Cầu Kè, tỉnh Trà Vinh, sau đó mang về phòng thí nghiệm. Bổ đôi trái dừa sáp ra làm hai phần theo chiều ngang, sau đó dùng dụng cụ lấy mẫu (stain steel cork borer) ấn mạnh vào phần trung tâm phía bên có vết lỏm sẽ lấy được một vùng cơm dừa chứa phôi, mẫu sau khi được lấy ra phải được bảo quản trong nước cất vô trùng. Dụng cụ lấy mẫu là một ống kim loại có hình chữ T phía trên đầu có khoan lỗ để khi mẫu bị dính vào ống thì dùng đũa thủy tinh sạch đẩy nhẹ cho mẫu rơi ra ngoài.

Hình 4.1 Dụng cụ lấy mẫu

4.3.2.2 Bên ngoài buồng cấy

Dùng stain steel cork borer tách phôi cho vào hộp nhựa có nắp đậy đã được hấp khử trùng chứa nước cất vô trùng (hình 4.1).

4.3.2.3 Bên trong buồng cấy

Hình 4.2 Tủ cấy

Rửa mẫu bằng cồn 70^o trong 3 phút. Rửa lại 3 lần bằng nước cất vô trùng (5phút/lần).

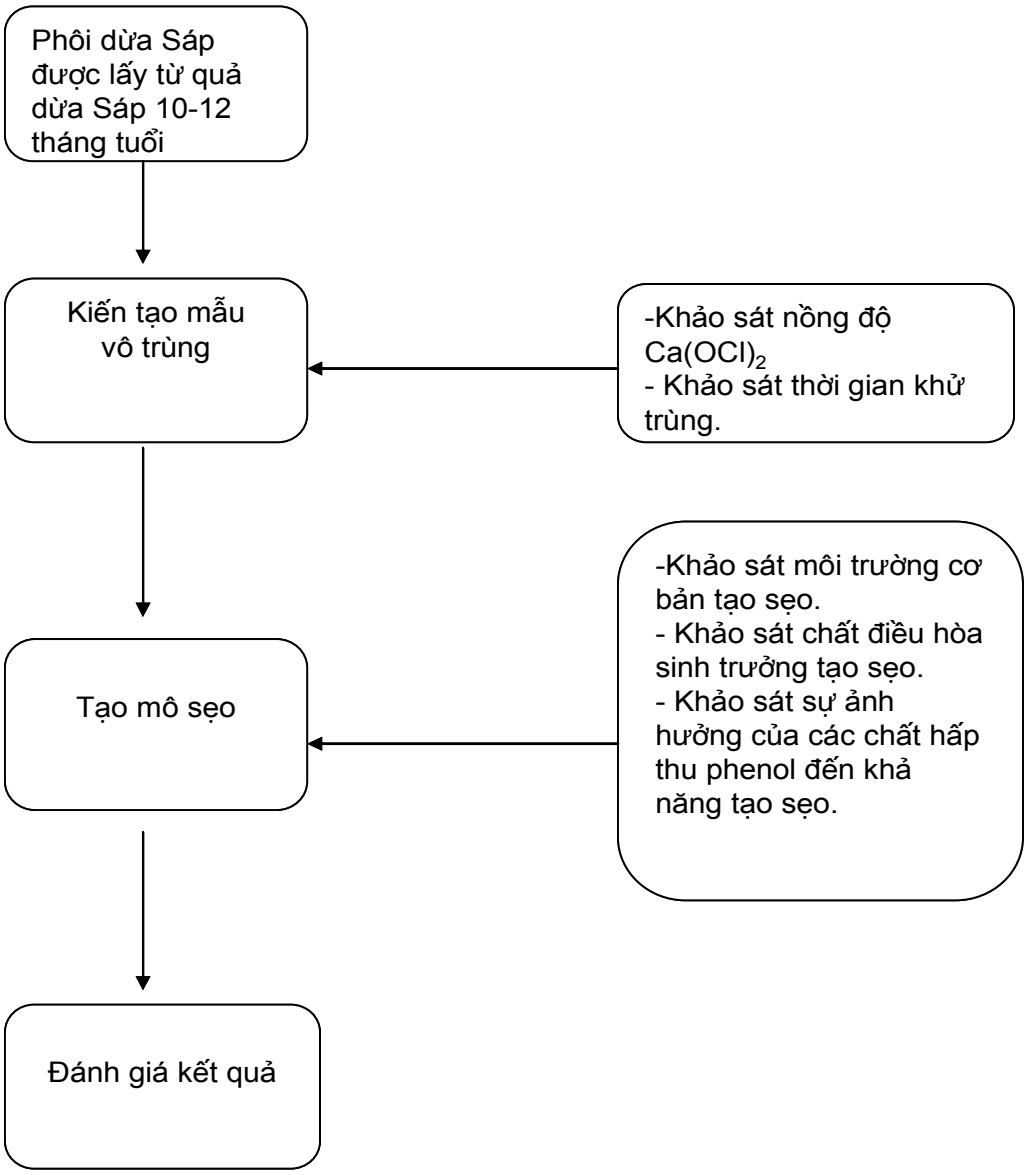
Kế đến, khử trùng phôi bằng calcium hypochlorite, rửa lặp lại 3 lần với nước cất vô trùng.

Tách lấy phôi.

Sau đó ngâm trong Calcium hypochlorite, rửa lại bằng nước cất 3 lần mỗi lần 5 phút.

Cấy vào môi trường đã chuẩn bị sẵn (hình 4.3).

Hình 4.3 Thao tác trong buồng cấy

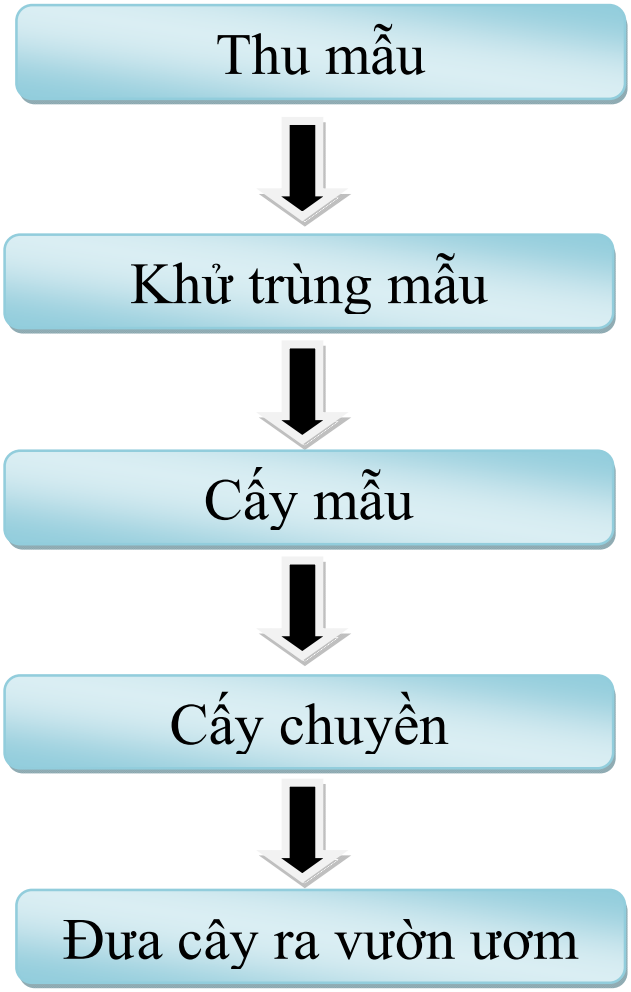


Hình 4.4 Sơ đồ nghiên cứu tạo mô sẹo

4.4 Bố trí thí nghiệm

Điều kiện phòng nuôi: ánh sáng đèn huỳnh quang, cường độ ánh sáng 4000 lux, thời gian chiếu sáng 16 giờ/ngày, nhiệt độ phòng nuôi 26^{o}C (± 2^{o}C), ẩm độ phòng 30%.

Hấp khử trùng ở nhiệt độ 121^{o}C, hấp 20 phút đối với môi trường nuôi cấy và 30 phút đối với dụng cụ.



Hình 4.5 Tiến trình nhân giống dừa Sáp nuôi cấy phôi

Các thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên 3 lần lập lại.

Số nghiệm thức (NT): 4-5 NT

Số lần lặp lại: 3

Số mẫu trên mỗi nghiệm thức: 10-20 mẫu (tùy theo thí nghiệm)

Các kết quả thí nghiệm xử lý thống kê theo phương pháp phân tính phương sai theo bảng Anova. So sánh kết quả và xếp hạng theo phương pháp Duncan. Sử dụng phần mềm xử lý thống kế MSTATC và Microsoft Excel.

Hình 4.6 Nồi hấp khử trùng

V. KẾT QUẢ THỰC HIỆN ĐỀ TÀI

5.1. Kết quả thực hiện nội dung 1. Điều tra khảo sát hiện trạng, đặc điểm hình thái, tuyển chọn cây dừa mẹ và trái dừa Sáp giống để nuôi cấy.

Điều kiện tự nhiên

Huyện Cầu Kè là huyện nông nghiệp nằm ở phía Tây của tỉnh Trà Vinh, cách thành phố Trà Vinh 41 km nằm ven sông Hậu. Phía Đông tiếp giáp với huyện Càng Long và huyện Tiểu Cần, phía Tây và Nam tiếp giáp với tỉnh Sóc Trăng qua sông Hậu, phía Bắc tiếp giáp với tỉnh Vĩnh Long. Huyện Cầu Kè có tổng diện tích tự nhiên 24.662 ha, chiếm 10,93% diện tích tự nhiên của tỉnh Trà Vinh. Do nằm xa biển Đông nên huyện ít bị ảnh hưởng của nước mặn. Diện tích đấy nông nghiệp là 20.095 ha chiếm 81,5% đất tự nhiên, trong đó đất trồng lúa 11.424 ha, đất trồng cây lâu năm 8.449 ha và 43 ha đất nuôi cá tra xuất khẩu.

Huyện Cầu Kè có khí hậu nhiệt đới gió mùa, chịu ảnh hưởng của chế độ bán nhật triều của biển Đông có 2 mùa mưa nắng rõ rệt, nước ngọt quanh năm, mạng lưới sông rạch chằng chịt. Đất đai chủ yếu là đất phù sa, tài nguyên động thực vật phong phú rất thuận lợi cho phát triển sản xuất nông nghiệp.

Điều kiện kinh tế - xã hội

Dân số huyện Cầu Kè có khoảng 130.000 dân (thống kê 2006), bao gồm dân tộc Kinh (chiếm 68,3%), Khmer (chiếm 30,9%) và Hoa. Trong đó 94% dân số sống trong nông thôn, trong độ tuổi lao động là 76.730 người chiếm 61,2% dân số toàn huyện; tỷ lệ hộ

nghèo còn 25,7%. Hằng năm có nhiều lễ hội riêng của các dân tộc, góp phần giữ gìn bản sắc văn hóa dân tộc, giao lưu văn hóa và trao đổi mua bán hàng hóa. Tốc độ tăng trưởng kinh tế hàng năm 11,88%, thu nhập bình quân đầu người GDP/người/năm đạt 6,3 triệu đồng được xem là huyện nghèo của tỉnh Trà Vinh. Cơ cấu kinh tế của huyện Cầu Kè bao gồm:

- Tỷ trọng giá trị nông nghiệp chiếm 45,95%.
- Thủy sản chiếm 5,91%.
- Tỷ trọng giá trị công nghiệp, xây dựng chiếm 14,17%.
- Tỷ trọng giá trị thương mại dịch vụ chiếm 33,30%.

Nhìn chung, nền kinh tế của huyện Cầu Kè cơ bản vẫn là nền kinh tế nông nghiệp tập trung vào 2 nghành lớn: trồng trọt và chăn nuôi gia súc. Đối với trồng trọt thì cây lúa là chủ yếu, với diện tích khoảng 31,590 ha, trong đó diện tích lúa chất lượng cao có giá trị xuất khẩu là 21.490 ha, năng suất trung bình 5,791 tấn/ha, sản lượng 182.940 tấn, đảm bảo được nguồn lương thực ổn định ở địa phương và xuất khẩu. Cây màu là 5.309 ha, một số cây màu có thu nhập cao: dưa hấu 47 triệu đồng/ha, bắp nếp 45 – 60 triệu đồng/ha, bí đao thu nhập 53 – 120 triệu đồng/ha, dưa leo thu nhập 49 – 68 triệu đồng/ha và ớt thu nhập 70 - 108 triệu đồng/ha. Toàn huyện có 383.020 cây dừa, ước sản lượng 22,9 triệu quả/năm, mang lại thu nhập bình quân 60 – 80 triệu đồng/ha/năm. Trong đó có 22.268 cây dừa Sáp (đang cho trái 3.340 cây, với giá bán bình quân 120.000 đồng/trái, mang lại thu nhập cho người trồng dừa khoảng 2.500.000 đồng/cây/năm, góp phần khá quan trọng trong phát triển kinh tế của huyện.

Điều tra hiện trạng trồng dừa Sáp

Xã Hòa Tân (xã trọng điểm trồng dừa sáp) được chọn đánh giá hiện trạng trồng dừa Sáp và chọn điểm để lấy trái cho nuôi cấy phôi. Kết quả điều tra cho thấy, diện tích đất tự nhiên của toàn xã là 2.563 ha, trong đó 2.064 ha đất nông nghiệp, 104,15 ha đất giồng cát; dân số toàn xã có 2.934 hộ với 11.833 nhân khẩu. Hộ đồng bào Khmer 1.337 hộ với 5.547 nhân khẩu chiếm 46,87% dân số toàn xã; số hộ nghèo hiện có 718 hộ, chiếm 24,23%. Đại bộ phân nhân dân sống bằng nghề nông nghiệp chiếm 95%.

Toàn xã trồng 39.700 cây dừa, sản lượng thu hoạch trên 800.000 trái. Có 10.900 cây dừa Sáp, có 1.000 cây dừa Sáp cho trái. Mật độ trung bình 180 cây/ha, trong đó số cây cho

năng suất ổn định chỉ chiếm 9,8%. Trong 100 hộ nông dân được chọn phỏng vấn cho kết quả 92 hộ là đồng bào Khmer và 8 hộ là đồng bào Kinh.

Cũng theo kết quả điều tra, diện tích trồng dừa trung bình của các hộ là 2.000–5.000m^2 (chiếm 70%), năng suất quả/cây/năm vào mùa nghịch (dừa treo) là 31 quả và vào mùa thuận (dừa mùa) là 47 quả. Kết quả khảo sát cho thấy, dừa Sáp ở Hòa Tân được trồng chủ yếu theo lối quãng canh, thiếu đầu tư chăm sóc, chỉ có 35% gia đình có bón phân, 70% hộ không có điều kiện phòng trừ sâu bệnh cho vườn dừa. Vườn dừa Sáp được trồng theo kiểu lập vườn xung quanh nhà, 90% hộ vườn dừa trồng xen. Kết quả điều tra cho thấy, 100% hộ cho rằng tỷ lệ dừa Sáp trên mỗi buồng dừa chỉ 20-30%.

Bảng 5.1 Năng suất trung bình của cây dừa Sáp

Diện tích	Tổng số hộ	Năng suất (quả/cây/năm)	
		dừa treo	dừa mùa
<2000m^2	18	27	42
2000m^2 – 5000m^2	70	30	45
>5000m^2	12	36	54

Tình hình sâu bệnh hại

Bọ cánh cứng, bọ dừa là những đối tượng gây hại chủ yếu.

Qua kết quả khảo sát thực tế cho thấy vườn dừa Sáp, xã Hòa Tân có các đặc điểm chung như sau:

- Mật độ trồng dày: 180 cây/ha gây cản trở cho quang hợp, khó áp dụng nuôi trồng xen.
- Không bón phân đều đặn và cân đối, đặc biệt là phân hữu cơ cho cây dừa.
- Năng suất thấp thu hoạch không ổn định.
- Bị sâu (đuông, kiến vương, đặc biệt là bọ cánh cứng) phá hoại.

Tóm lại: Các biện pháp canh tác dừa sáp hiện nay của bà con nông dân xã Hòa Tân, huyện Cầu Kè, Trà Vinh chủ yếu theo lối quảng canh, không đầu tư chăm sóc, khi có giá thì thu hoạch, được bao nhiêu hay bấy nhiêu, do đó thu nhập thực tế từ cây dừa không cao. Phương thức trồng dừa này không phù hợp với nền nông nghiệp sản xuất hàng hóa dựa trên thâm canh tăng năng suất và cải thiện chất lượng.

Mô tả hình thái

Theo kết quả điều tra hiện trạng và kinh nghiệm trồng dừa sáp của các hộ điều tra, không có sự khác biệt giữa cây dừa Sáp và cây dừa thường về đặc điểm hình thái như lá, thân và tàu lá. Mặc dù vậy có một số ý kiến của nông dân kinh nghiệm cho rằng màu sắc lá và độ bóng của tàu lá, cách sắp xếp của tàu lá có thể xác định được cây dừa Sáp. Theo nhận định trên, những cây dừa mang quả sáp có lá chét nhỏ hơn, số lá chét nhiều hơn và lá bóng bẩy hơn, cũng như việc sắp xếp của lá trên cây cũng khít hơn so với cây dừa thường. Tuy nhiên, kết quả kiểm chứng thông qua kinh nghiệm nhận dạng cây dừa Sáp không hoàn toàn chính xác mà theo cảm quan và do người nhận dạng biết trước được cây dừa đó mang quả Sáp chứ không nhờ vào những đặc điểm chỉ thị để nhận dạng như đã nêu trên.

Kết quả khảo sát cũng cho thấy, không thể phân biệt được quả dừa Sáp và quả dừa thường bằng cách phân biệt qua đặc điểm hình thái của quả. Cách duy nhất để phân biệt quả dừa Sáp và quả dừa thường là lắc quả dừa khi quả chín. Những người nông dân được phỏng vấn cũng có nhận xét về nhóm màu sắc của quả, theo đó, màu sắc của quả dừa Sáp chủ yếu là màu u xanh. Những năm về sau, do quá trình lai tạo tự nhiên trong quần thể (dừa là cây giao phấn), dừa Sáp xuất hiện thêm những quả màu nâu.

Thông qua đặc điểm hình thái cây và quả dừa Sáp cho thấy kết quả thu thập được phù hợp với nhận định của Ramirez và Mendoza (1998) về việc không thể phân biệt được giữa cây dừa Sáp và cây dừa thường, đồng thời ở giai đoạn trước 10 tháng tuổi cũng không thể phân biệt được quả dừa Sáp và quả thường. Tuy nhiên sau 10 tháng tuổi bằng cách lắc quả có thể phân biệt được quả dừa sáp với quả thường. Ở quả Sáp khi lắc nghe tiếng đục và nặng, trong khi ở quả bình thường khi lắc nghe âm thanh róc rách và trong.

Tuyển chọn cây dừa mẹ

Dựa trên cơ sở, xã Hòa Tân có diện tích dừa Sáp tập trung, cây mẹ được chọn để tuyển trái cho nhân giống.

Giống dừa Sáp đặc ruột thụ phấn chéo nên để cây con sau này tiếp tục cho quả Sáp, do đó cần phải chọn vườn dừa có trồng nhiều cây dừa Sáp. Nếu chỉ chọn cây mẹ giống dừa Sáp đặc ruột có năng suất cao nhưng chung quanh là các giống dừa khác không thôi thì khả năng cho quả Sáp thế hệ con sẽ không cao, thậm chí không cho quả Sáp nào. Trong điều kiện số lượng cây dừa Sáp còn ít lại được trồng phân tán cùng với các giống dừa khác nên

việc chọn một vườn dừa đặc ruột thuần là không thể, để bù đắp lại nên tuyển chọn cây mẹ và quả làm giống thật kỹ.

Do đặc tính sinh học của dừa nói chung và dừa sáp nói riêng, cây dừa có thể cho 12 – 13 buồng quả/năm, nhưng đối với dừa Sáp không phải tất cả các buồng dừa đều cho tỷ lệ 25% quả sáp /buồng mà có những buồng không mang quả sáp nào cả, hơn nữa năng suất quả/cây là một trong những tiêu chuẩn quan trọng để tuyển chọn.

Tiêu chuẩn tuyển chọn quả dừa giống để nhân

- Quả tuyển chọn phải được thu được từ các cây mẹ đã được tuyển chọn và đánh dấu trước đó.
- Chọn quả có sáp kích thước trung bình và nặng cân trên 1,7kg.
- Quả được chọn phải đều đặn, không dị dạng và bị sâu bệnh phá hại.

Kết quả điều tra đã chọn được 58 cây dừa mẹ từ 18 hộ nông dân (bảng 5.2) để lấy trái phục vụ cho việc nuôi cấy phôi. Năng suất bình quân của cây dừa Sáp đặc ruột được tuyển chọn là 73 quả/cây/năm. Số liệu phân tích đặc điểm của cây dừa mẹ đặc ruột và quả dừa được chọn cho thấy, tuổi cây dừa được chọn là trên 25 năm, tán cây phân bố đều và cây thẳng, tỷ lệ đặc ruột trung bình là 24,44% trên mỗi cây. Số buồng quả/năm trung bình là 12,56 buồng. Số liệu phân tích thành phần quả dừa cho thấy, khối lượng quả được chọn trung bình là 1705,56g, khối lượng quả không vỏ trung bình là 1033,34g, khối lượng cáo dừa đối với các quả được chọn là 305,56g (phần phụ lục).

Bảng 5.2 Danh sách các hộ có cây dừa mẹ được tuyển chọn

Stt	Họ tên chủ hộ	Địa chỉ	Số cây mẹ được chọn	Năng suất quả/cây
1	Thạch Phương	Chông nô 1	1	96
2	Thạch Thị Tha	Chông nô 1	4	78
3	Thạch Chanh	Chông nô 2	3	70
4	Thạch Sanh	Chông nô 2	5	86

5	Lâm Ninh	Chông nô 2	2	72
6	Thạch Xứng	Chông nô 2	1	82
7	Thạch Thị SaRen	Chông nô 2	1	68
8	Thạch Thị Sắc	Chông nô 2	2	74
9	Thạch Khel	Chông nô 2	5	75
10	Thạch Mương	Chông nô 2	1	79
11	Kim Yên	Chông nô 2	5	71
12	Kim Thị Hội	Chông nô 2	2	71
13	Thạch Thị sơn	Chông nô 2	6	77
14	Kim Thị Thương	Chông nô 2	1	69
15	Thạch Khum	Chông nô 2	6	73
16	Kim Yên	Chông nô 2	6	70
17	Thạch Thol	Chông nô 2	4	64
18	Thạch Nuôi	Chông nô 2	3	67
	Tổng cộng		58	1.342
	Trung bình		3,22	73

5.2. Kết quả thực hiện nội dung 2. Nhân giống dừa Sáp bằng phương pháp nuôi cấy phôi

Nhân giống dừa Sáp bằng phương pháp ươm truyền thống của nông dân có tỷ lệ quả sáp/buồng chỉ đạt 20-25%. Theo Torres (1937) và Zuniga (1953), một trong những biện pháp làm tăng tỷ lệ sáp/buồng >75% là sử dụng những cây từ nuôi cấy phôi. Từ những

thành tựu về nuôi cây phôi dừa sáp của Philippine, đề tài cũng đã nghiên cứu quy trình nuôi cấy phôi.

5.2.1 Kết quả nghiên cứu nuôi cấy phôi soma dừa Sáp

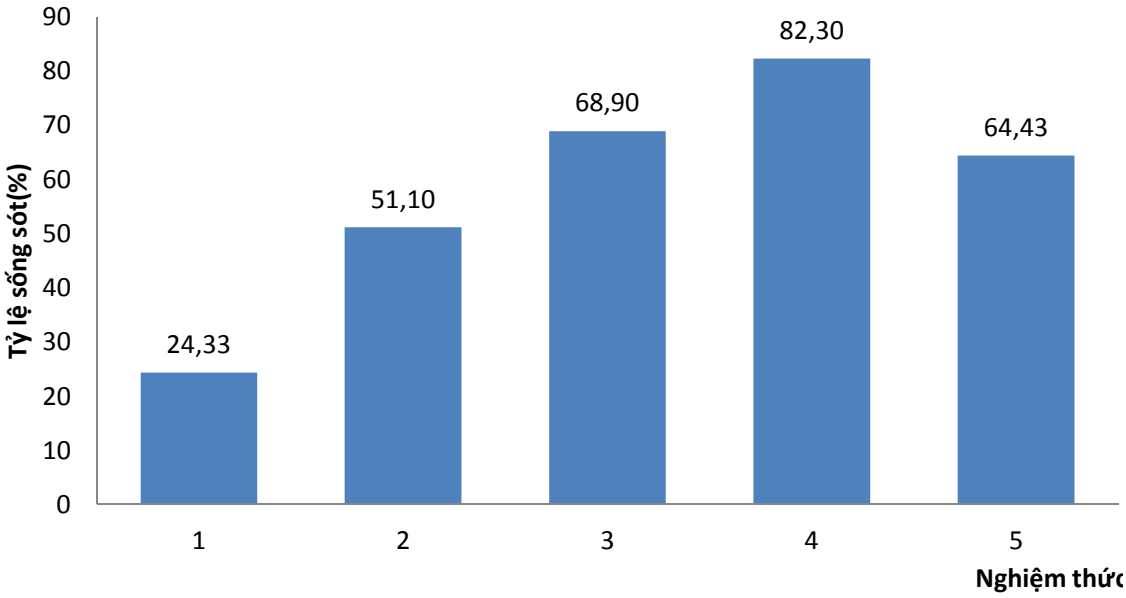
Để xác định thời gian xử lý thích hợp cho việc vô trùng mẫu phôi dừa Sáp, đánh giá khả năng tạo calus phôi cũng như đánh giá ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng lên sự hình thành calus phôi, đề tài tiến hành thực hiện các thí nghiệm

5.2.1.1 Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của thời gian xử lý calcium hypochlorite $Ca(OCl)_2$ đến việc vô trùng mẫu phôi dừa Sáp

Bảng 5.3 Kết quả xử lý calcium hypochlorite với thời gian khác nhau sau 30 ngày cấy

Nghiệm thức (NT)	Nồng độ Calcium hypochlorite (%)	Thời gian xử lý (phút)	Số mẫu sống	Tỷ lệ phôi sống (%)
1	5	5	2,43 c	24,33
2	5	10	5,11 bc	51,10
3	5	15	6,89 ab	68,90
4	**5**	**20**	**8,23 a**	**82,30**
5	5	25	6,44 ab	64,43
CV(%)			12,05	
$LSD_{0.01}$			3,98	

Kết quả thí nghiệm được trình bày trong bảng 5.3 và biểu đồ 5.1 cho thấy, xử lý calcium hypochlorite 5% trong thời gian 20 phút cho kết quả có tỷ lệ mẫu sống cao nhất là 82,3%, khác biệt có ý nghĩa so với nghiệm thức xử lý với thời gian 5 và 10 phút. Kết quả thí nghiệm ở nghiệm thức xử lý với thời gian 20 phút so với nghiệm thực xử lý ở 15 phút và 25 phút thì không khác biệt có ý nghĩa. Tuy nhiên, tỷ lệ mẫu sống có xu hướng giảm dần theo thời gian (xử lý sau 20 phút), có thể do độ độc của calcium hypochlorite ảnh hưởng đến phôi nếu xử lý ở thời gian lâu hơn 20 phút.



Biểu đồ 5.1 Ảnh hưởng của thời gian xử lý calcium hypochlorite với nồng độ 5% đến việc vô trùng mẫu phôi dừa sáp sau 30 ngày nuôi cấy

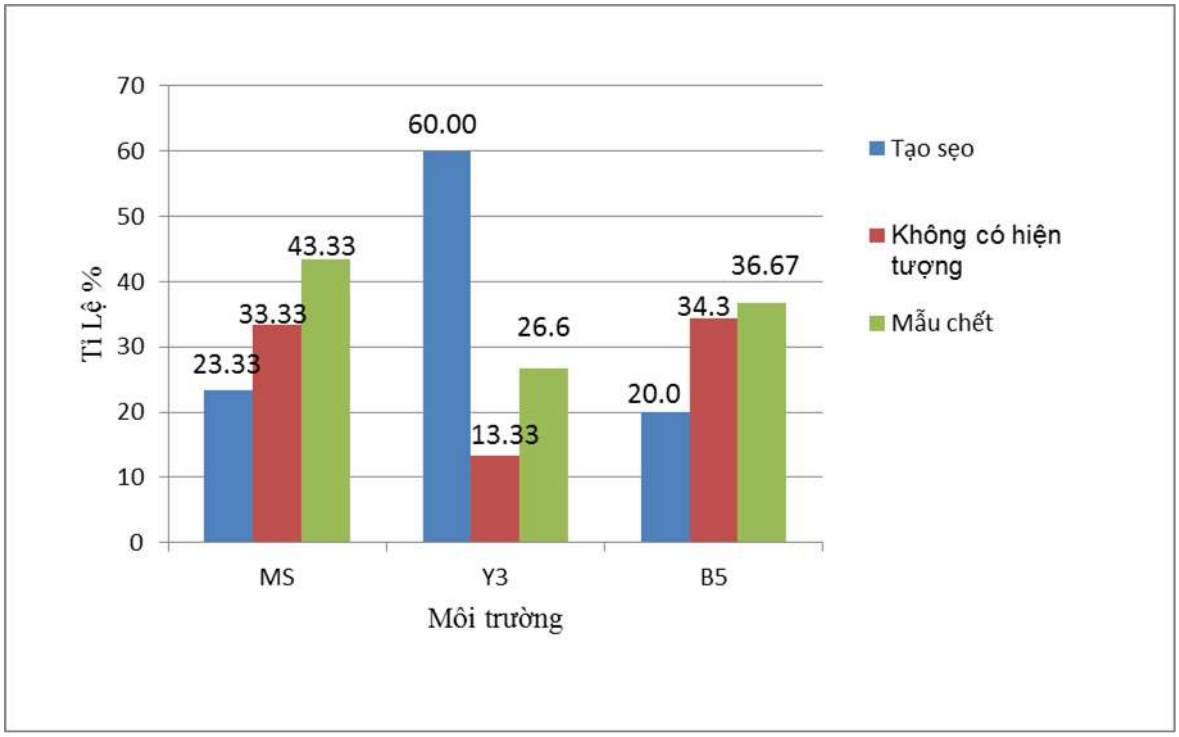
Cây dừa sáp là một loại cây rất khó khử trùng. Cây có độ nhiễm tạp rất cao, với mỗi chất khử trùng, nếu nồng độ chất khử trùng thấp, thời gian khử trùng ngắn thì tỷ lệ mẫu cấy bị nhiễm cao, nhưng chỉ cần tăng nồng độ hoặc thời gian khử trùng lên là tỷ lệ cây chết đã tăng lên một cách đáng kể, điều này chứng tỏ cây dừa sáp rất nhạy cảm với chất khử trùng. Khi khử trùng bằng calcium hypochlorite với nồng độ thấp, thời gian khử trùng ngắn tỷ lệ mẫu cấy bị nhiễm cao.

5.2.1.2 Nghiên cứu môi trường tạo mô sẹo cơ bản cho mẫu cấy phôi dừa Sáp

Việc khảo sát môi trường cơ bản tạo mô sẹo đạt hiệu quả cao nhất với môi trường Y3 với 60% số mẫu tạo mô sẹo (bảng 5.4 và biểu đồ 5.2), khác biệt có ý nghĩa so với các nghiệm thức khác. Nghiên cứu tạo mô sẹo trên cây dừa nói chung và trên cây dừa Sáp nói riêng đã được nhiều tác giả trên thế giới nghiên cứu. Đa số các kết quả thí nghiệm cho thấy các nghiên cứu tập trung vào hai môi trường Y3 và Murashige and Skoog (MS). Trong thí nghiệm này có khảo sát thêm môi trường B5- một loại môi trường khá giàu chất dinh dưỡng nhằm tạo sự so sánh và sự đa dạng cho thí nghiệm.

Bảng 5.4 Ảnh hưởng môi trường nghiên cứu đến khả năng tạo mô sẹo từ phôi dừa Sáp

NT	Môi trường	Số mô sẹo tạo thành	Tỉ lệ tạo mô sẹo (%)	Số mẫu chết	Tỉ lệ mẫu chết (%)
1	MS	2,33 b	23,33	4,33 a	44,33
2	**Y3**	**6,00 a**	**60,00**	**2,67 a**	**26,67**
3	B5	2,00 b	20,00	3,67 a	36,67
CV (%)		12,89		14,93	
$LSD_{0,01}$		2,86		2,08	



Biểu đồ 5.2 Ảnh hưởng môi trường nghiên cứu đến khả năng tạo mô sẹo từ phôi dừa Sáp.

Các kết luận từ các bài báo cáo nuôi cấy tạo sẹo từ phôi dừa Sáp của một số tác giả đã được công bố cũng cho thấy môi trường Y3 cho kết quả tốt nhất. Môi trường Y3 có thành phần khoáng phù hợp với nuôi cấy *in vitro* phôi dừa. Việc sử dụng môi trường này làm môi trường cơ bản là hợp lý. Với sự bổ sung bước đầu 2,4D (5ppm) hình thái sẹo đạt

được có màu vàng xuất hiện chủ yếu ở 2 đầu phôi. Các môi trường khảo sát khác là MS, B5 cũng cho kết quả tạo sẹo nhưng tỉ lệ không cao.

Y3 MS B

Hình 5.1 Phôi dừa sáp trên các môi trường thí nghiệm sau 2 tháng nuôi cấy

5.2.1.3 Nghiên cứu ảnh hưởng của các chất điều hòa sinh trưởng cho quá trình tạo mô sẹo

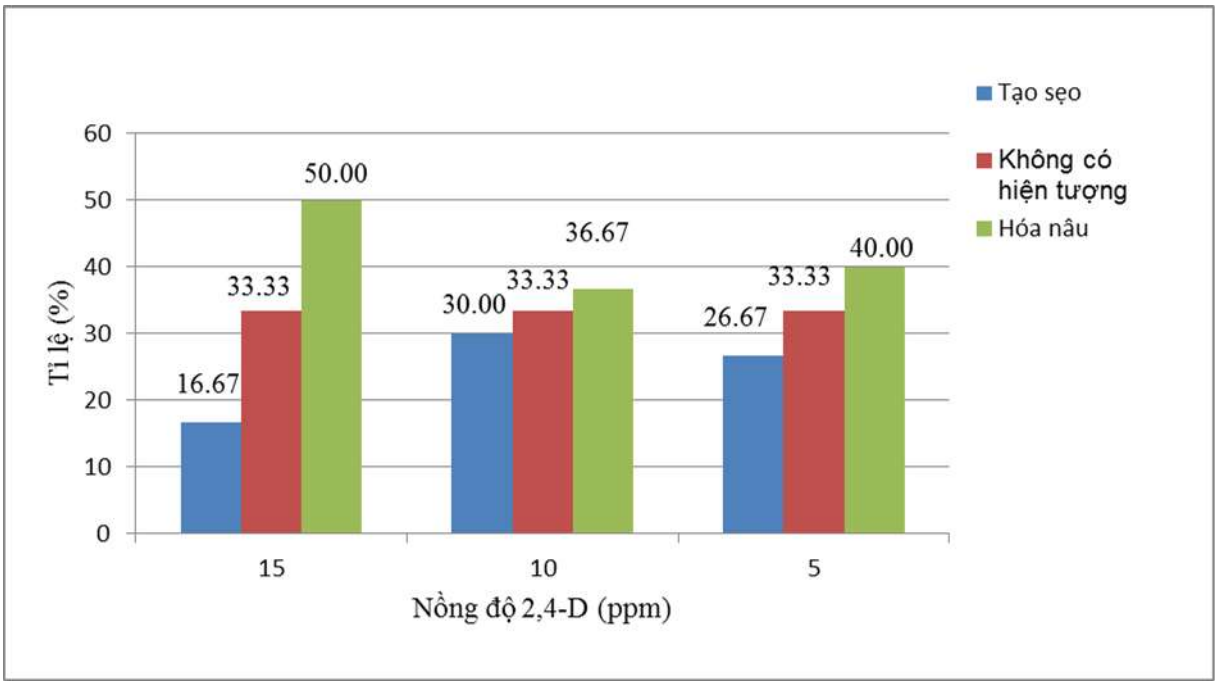
Bảng 5.5 Ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng đối với khả năng tạo mô sẹo từ phôi dừa Sáp

NT	2,4D (ppm)	BA (ppm)	NAA (ppm)	IBA (ppm)	Số sẹo tạo thành	Tỉ lệ sẹo tạo thành (%)
X1	15				1,67 cd	16,67
X2	10				3,00 bc	30,00
X3	5				2,67 bcd	26,67
X4		0,5	2.5		1,33 d	13,33
X5		**0,5**	**5**		**5,00 a**	**50,00**
X6		0,5	10		2,67 bad	26,67
X7	5	0,5			2,00 cd	20,00
X8	10	0,5			2,33 bcd	23,33
X9	15	0,5			2,67 bcd	26,67
X10		0,5		2,5	2,67 bcd	26,67

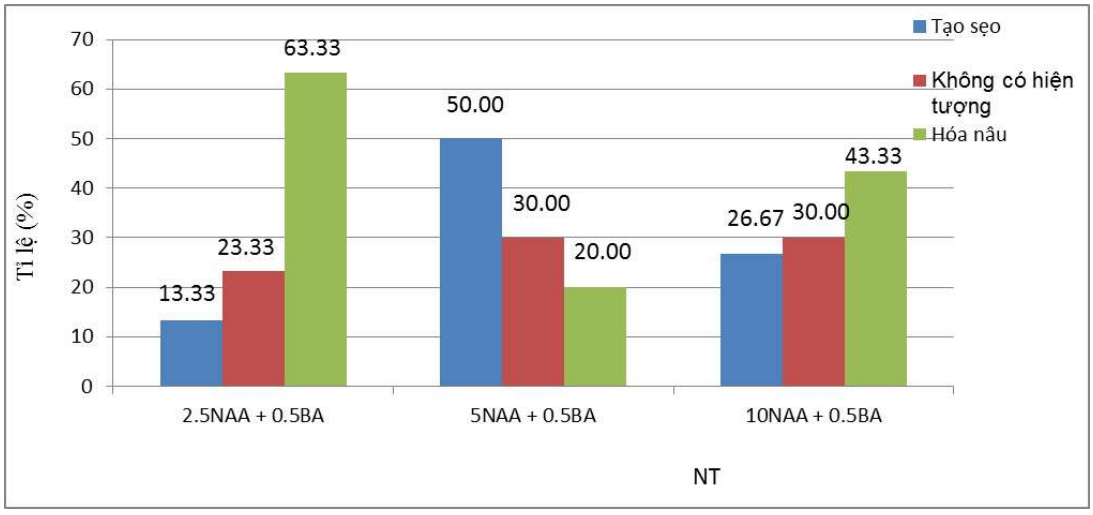
X11		0,5	5	3,00 bc	30,00
X12		**0,5**	**10**	**3,67 ab**	**36,67**
CV%				16,22	

Bảng 5.6 Ảnh hưởng các chất điều hòa sinh trưởng đối với sự hóa nâu phôi dừa Sáp

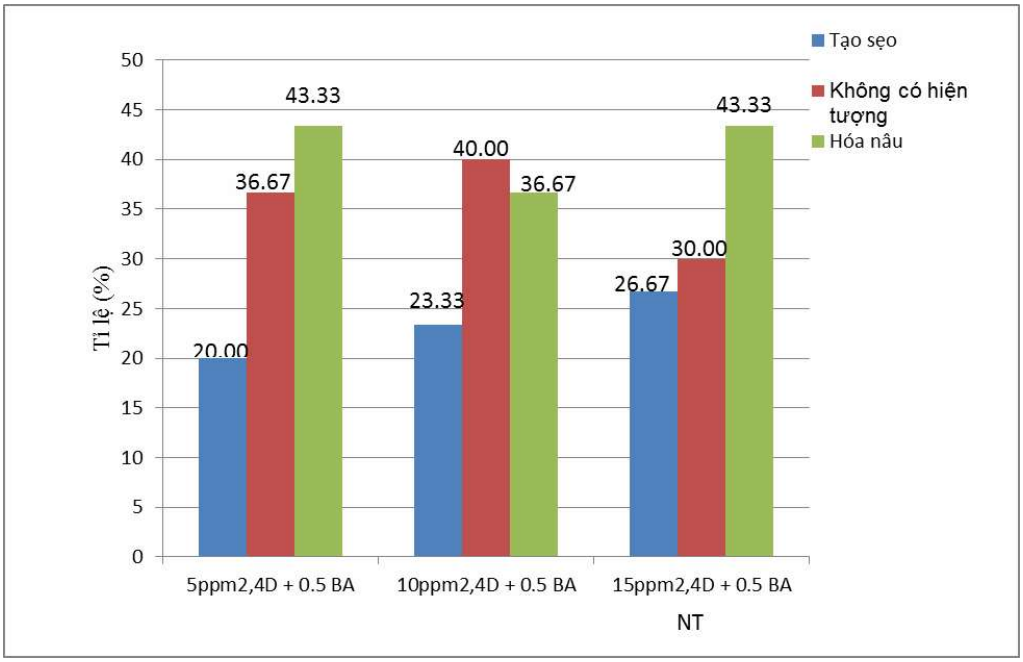
NT	2,4D (ppm)	BA (ppm)	NAA (ppm)	IBA (ppm)	Số mẫu hóa nâu	Tỉ lệ mẫu hóa nâu (%)
X1	15				5,00 ab	50,00
X2	10				3,67 bc	36,67
X3	5				4,00 abc	40,00
X4		0,5	2,5		6,33 a	63,33
X5		0,5	5		2,00 c	20,00
X6		0,5	10		4,33 abc	43,33
X7	5	0,5			4,33 abc	43,33
X8	10	0,5			3,67 bc	36,67
X9	15	0,5			4,33 abc	43,33
X10		0,5		2,5	4,33 abc	43,33
X11		0,5		5	3,00 bc	30,00
X12		0,5		10	2,67 bc	26,67
CV %					16,09	



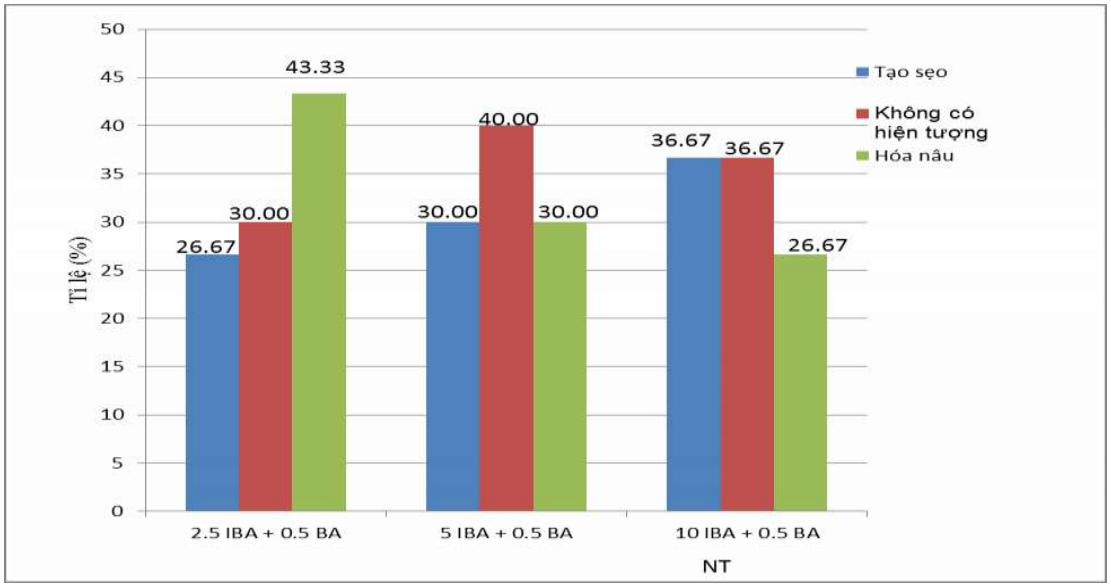
Biểu đồ 5.3 Ảnh hưởng chất điều hòa sinh trưởng 2,4D trong quá trình tạo sẹo đối với mẫu cấy phôi dừa sáp.



Biểu đồ 5.4 Ảnh hưởng chất điều hòa sinh trưởng NAA và BA trong quá trình tạo mô sẹo đối với mẫu cấy phôi dừa sáp.



Biểu đồ 5.5 Kết quả khảo sát sự bổ sung chất điều hoà sinh trưởng 2,4D và BA trong quá trình tạo sẹo với mẫu cấy phôi dừa Sáp.



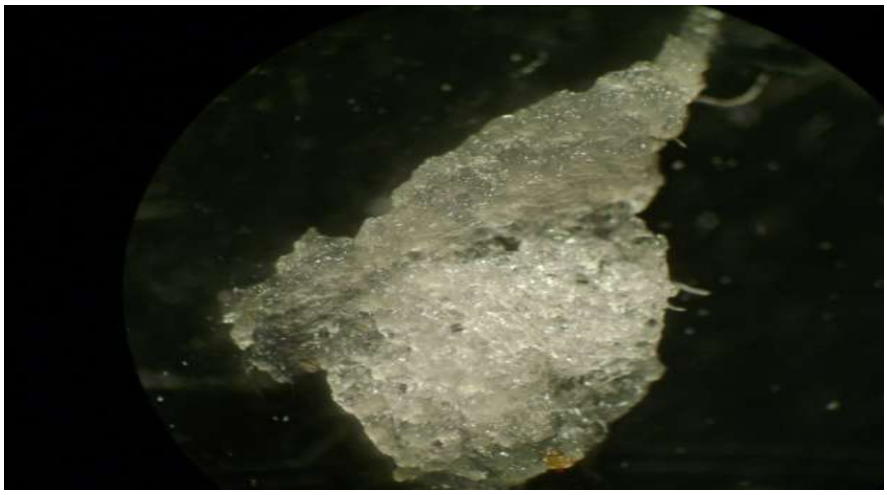
Biểu đồ 5.6 Ảnh hưởng chất điều hòa sinh trưởng IBA và BA trong quá trình tạo sẹo đối với mẫu cấy phôi dừa Sáp.

Hình 5.2 Sẹo phát sinh trên nghiệm thức X5

X9 X2

Hình 5.3 Sẹo phát sinh trên nghiệm thức X9 và X2

Hình 5.4 Mẫu sẹo đặc trưng của nghiệm thức X5 trên kính hiển vi soi nổi mức độ phóng đại 4x.



Hình 5.5 Mẫu sẹo đặc trưng trên nghiệm thức X12 được quan sát bằng kính hiển vi soi nổi 4x

Hình 5.6 Hình ảnh soi nổi của mô sẹo trên nghiệm thức X9.

Hình 5.7 Hình ảnh soi nổi của mô sẹo nghiệm thức X2.

Việc khảo sát 4 lô thí nghiệm lớn đại diện cho 4 nhóm chất điều hòa sinh trưởng (2,4D, NAA-BA, 2,4D-BA và IBA-BA) cho kết quả nhóm NAA – BA ở nghiệm thức 5ppm NAA+0.5ppm BA cho tỉ lệ tạo sẹo cao nhất (50%) màu sắc sẹo có màu vàng nhạt, mô sẹo tươi xốp có rất nhiều khoảng trống trong sinh khối (hình 5.2). Nhóm IBA – BA ở nghiệm thức 10ppm IBA + 0.5 ppmBA cho tỉ lệ tạo sẹo là 36.67% màu sẹo trắng trong tồn tại ở dạng thể chai (hình 5.5). Nhóm bổ sung 2,4-D nồng độ 5ppm cho tỉ lệ tạo sẹo là 30% cho màu sắc sẹo vàng đậm thể chai không rõ ràng có biểu hiện của sự hóa nâu (hình 5.3). Nhóm 2,4-D – BA ở nghiệm thức 15ppm2,4-D + 0.5ppm BA cho tỉ lệ tạo sẹo là 26,67% màu sắc sẹo vàng sậm có thể xốp khô và có hiện tượng hóa nâu (hình 5.6). Từ kết quả trên cho thấy sự kết hợp giữa 2 loại auxin và cytokinin là NAA và BA cho kết quả tạo sẹo tốt nhất ở phôi dừa sáp ở nồng độ 5ppm NAA + 0.5ppm BA.

Chất điều hòa sinh trưởng thường được sử dụng là 2,4- D, IBA, BA, NAA. Việc sử dụng 1 chất auxin duy nhất cho quá trình tạo sẹo thường cho kết quả mô sẹo tạo thành có hiện tượng kém phát triển, màu sắc xấu, dễ bị hóa nâu nhanh và gây khó khăn cho việc cấy chuyền. Thay vào đó việc sử dụng kết hợp nhóm chất điều hòa sinh trưởng có thể đem lại hiệu quả tốt hơn.

Sự kết hợp giữa NAA và BA cho khả năng tạo sẹo cao nhất có thể giải thích do sự kết hợp giữa nồng độ chất điều hòa sinh trưởng nội sinh và ngoại sinh kích thích sự phân chia tế bào.Theo nghiên cứu của Montero-Cortés việc sử dụng BA có sự ảnh hưởng rất lớn tới việc hình thành các cụm tế bào vô tổ chức từ các vết thương của mô cấy. Việc bổ sung BA với nồng độ nhỏ kết hợp với nồng độ auxin cao đã đạt được kết quả tốt cho mục đích tạo sẹo của thí nghiệm.

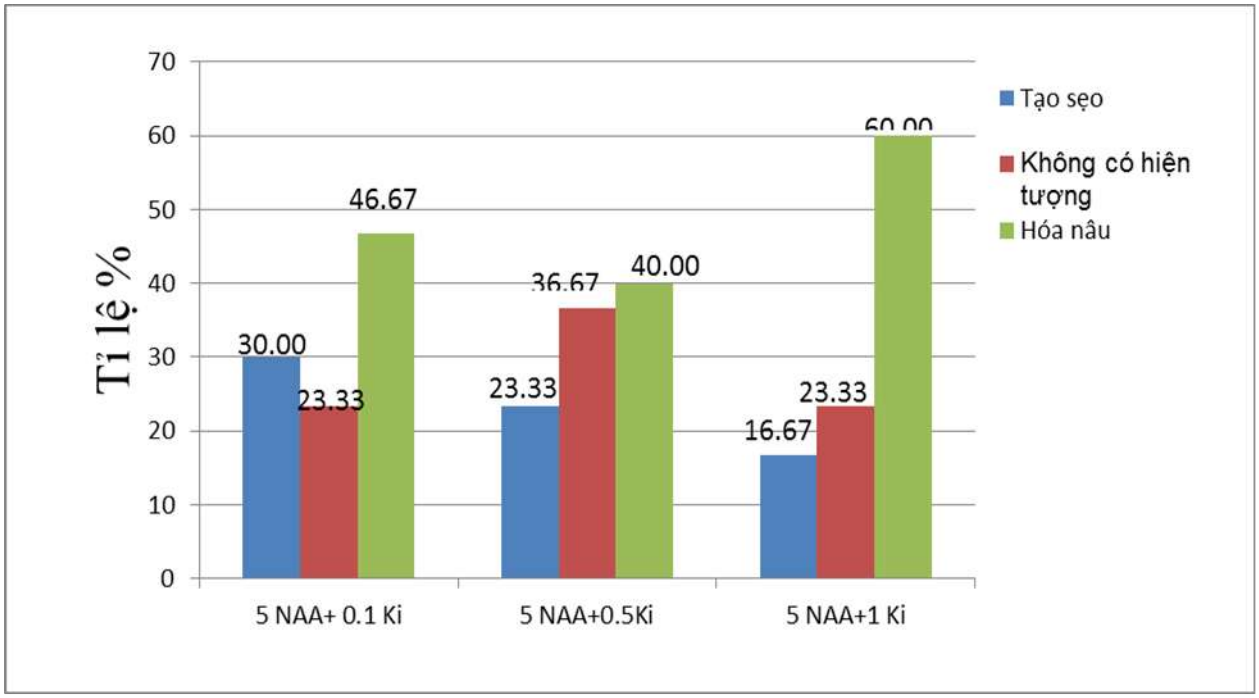
5.2.1.4 Nghiên cứu sự ảnh hưởng của Kinetin đến sự hình thành sẹo của phôi dừa Sáp

Việc nghiên cứu sơ bộ sự ảnh hưởng của Kinetin khi cho kết hợp với một loại auxin mà ở đây là NAA cho kết quả không được tốt. Việc tạo sẹo cao nhất chỉ đạt 30% ở nghiệm thức X13. Trong khi đó tỉ lệ hóa nâu lại tăng cao (60%) khi tăng nồng độ của Kinetin.

Kinetin là một chất rất quan trọng thuộc nhóm Cytokinin, sự kết hợp của Kinetin với các chất thuộc nhóm Auxin được nghiên cứu rất nhiều trong nuôi cấy mô thực vật. Nhưng ở đối tượng cây dừa nói chung và cây dừa sáp nói riêng việc nghiên cứu này còn rất hạn chế. Nhóm nghiên cứu đề xuất ra một nồng độ NAA cố định ở 5ppm và nồng độ Kinetin được khảo sát ở 3 nghiệm thức .

Bảng 5.7 Kết quả ảnh hưởng của Kinetin đến sự hình thành sẹo từ phôi dừa Sáp.

NT	Nồng độ NAA (ppm)	Nồng độ Ki (ppm)	Số sẹo tạo thành	Tỉ lệ tạo sẹo (%)	Số mẫu hoá nâu	Tỉ lệ hoá nâu (%)
X13	5	0,1	3,00 a	30,00	4,67 a	40,67
X14	5	0,5	2,33 a	23,33	4,00 a	40,00
X15	5	1,0	1,67 a	16,67	6,00 a	60,00
CV (%)			20,41		17,96	



Biểu đồ 5.7 Ảnh hưởng của Kinetin đến sự hình thành sẹo của mẫu phôi dừa sáp

Hình 5.8 Mẫu sẹo hóa nâu điển hình của nghiệm thức 5ppm NAA+1ppm Kinetin.

Sự tăng nồng độ Kinetin dẫn đến sự tăng tỉ lệ hóa nâu của mẫu thí nghiệm có thể do các hormon nội sinh của mẫu không tương thích với các hormon ngoại sinh mà ở đây cụ thể là Kinetin. Ngoài ra, có thể kinetin làm tế bào tiết ra nhiều hợp chất phenol dẫn đến hóa nâu mẫu cấy nhanh hơn.

5.2.1.5 Khảo sát ảnh hưởng của các chất hấp thu phenol đến hình thái của sẹo cấy phôi dừa Sáp

Việc khảo sát các hợp chất hấp thu phenol đã chỉ ra rằng than hoạt tính vẫn là phù hợp nhất cho sự lựa chọn để bổ sung vào môi trường nuôi cấy. Việc sử dụng các chất thay thế đều không thành công. Với việc sử dụng than hoạt tính đã cho kết quả tốt nhất lên đến 50% mẫu sẹo cấy truyền phát triển (bảng 5.8).

Trong quá trình tạo sẹo của mẫu mô thực vật hiện tượng hóa nâu của mẫu mô thực vật luôn là vấn đề thách thức trong nghiên cứu *in vitro*. Các hợp chất gây hóa nâu mô sẹo thường là các hợp chất phenol. Các hợp chất đó khi sản sinh ra làm giảm sức sống của mẫu mô thực vật gây ức chế và gây chết mẫu. Việc ngăn chặn việc đó có thể được thực hiện nhờ các phương pháp:

- Tách các phần tử phenol ra khỏi môi trường
- Bổ sung các chất khử redox (oxidation-redution) phenol vào môi trường
- Ngăn chặn sự hoạt động của enzim phenolase giảm lượng phenol có sẵn trong mẫu bằng môi trường lỏng giống môi trường rắn.

Các nồng độ của các chất thí nghiệm đều được chọn ngẫu nhiên từ một số nghiên cứu trên đối tượng khác, từ đó kết quả đạt được chưa phản ánh chính xác tác động của các

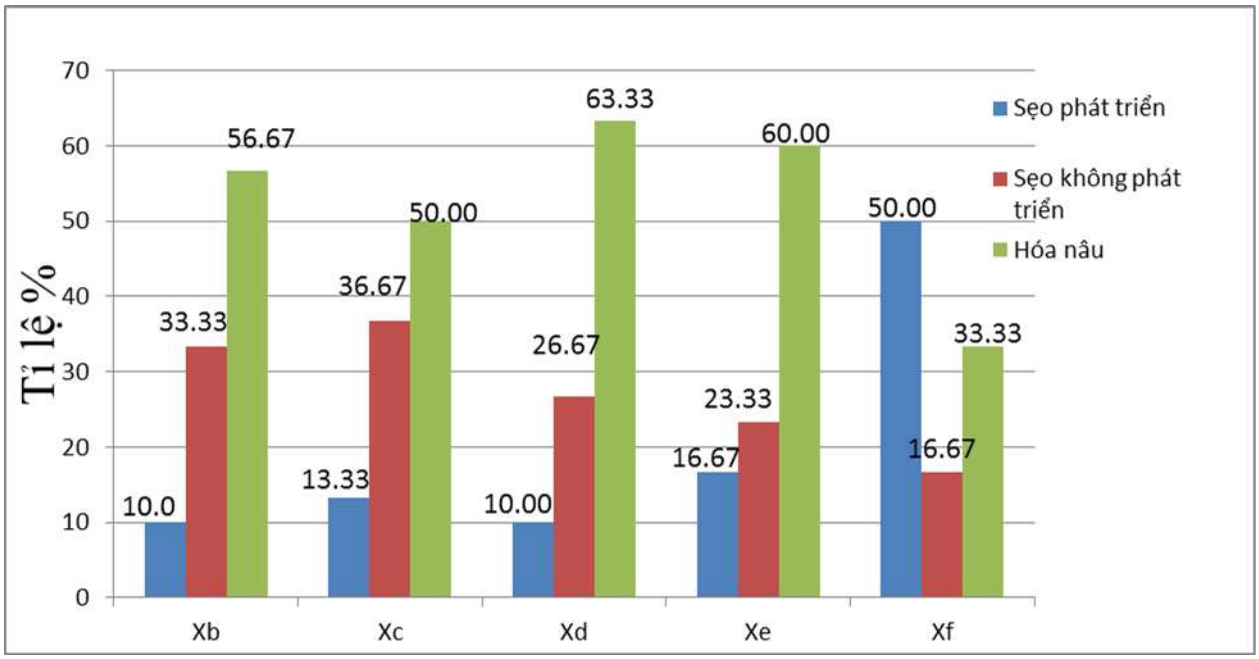
hợp chất hấp thu phenol. Nhưng bước đầu cũng đã cho thấy tác dụng nhất định mà mỗi chất tác động lên mẫu mô từ đó chúng ta cũng có những định hướng nghiên cứu cho phù hợp.

Bảng 5.8 Kết quả sự ảnh hưởng của các chất hấp thu phenol đến sự phát triển sẹo từ phôi dừa Sáp

NT	Chất hấp thu Phenol	Số sẹo phát triển	Tỉ lệ sẹo phát triển (%)
Xb	Đối chứng	1,00 b	10,00
Xc	$AgNO_3$ (10ppm)	1,33 b	13,33
Xd	Acid Ascobic (100ppm)	1,00 b	10,00
Xe	PVP (100ppm)	1,67 b	16,67
Xf	**Than hoạt tính (2.5g)**	**5,00 a**	**50,00**
CV (%)		12,82	

Bảng 5.9 Ảnh hưởng của các chất hấp thu phenol đến sự hóa nâu

NT	Chất hấp thu Phenol	Số sẹo hóa nâu	Tỉ lệ sẹo hóa nâu (%)
Xb	Đối chứng	5,67 ab	56,67
Xc	$AgNO_3$ (10ppm)	5,00 ab	50,00
Xd	Acid Ascobic (100ppm)	6,33 a	63,33
Xe	PVP (100ppm)	3,33 b	60,00
Xf	Than hoạt tính (2.5g)	6,00 a	33,33
CV (%)		26,83	



Biểu đồ 5.8 Ảnh hưởng của các chất hấp thu phenol đến hình thái của sẹo.

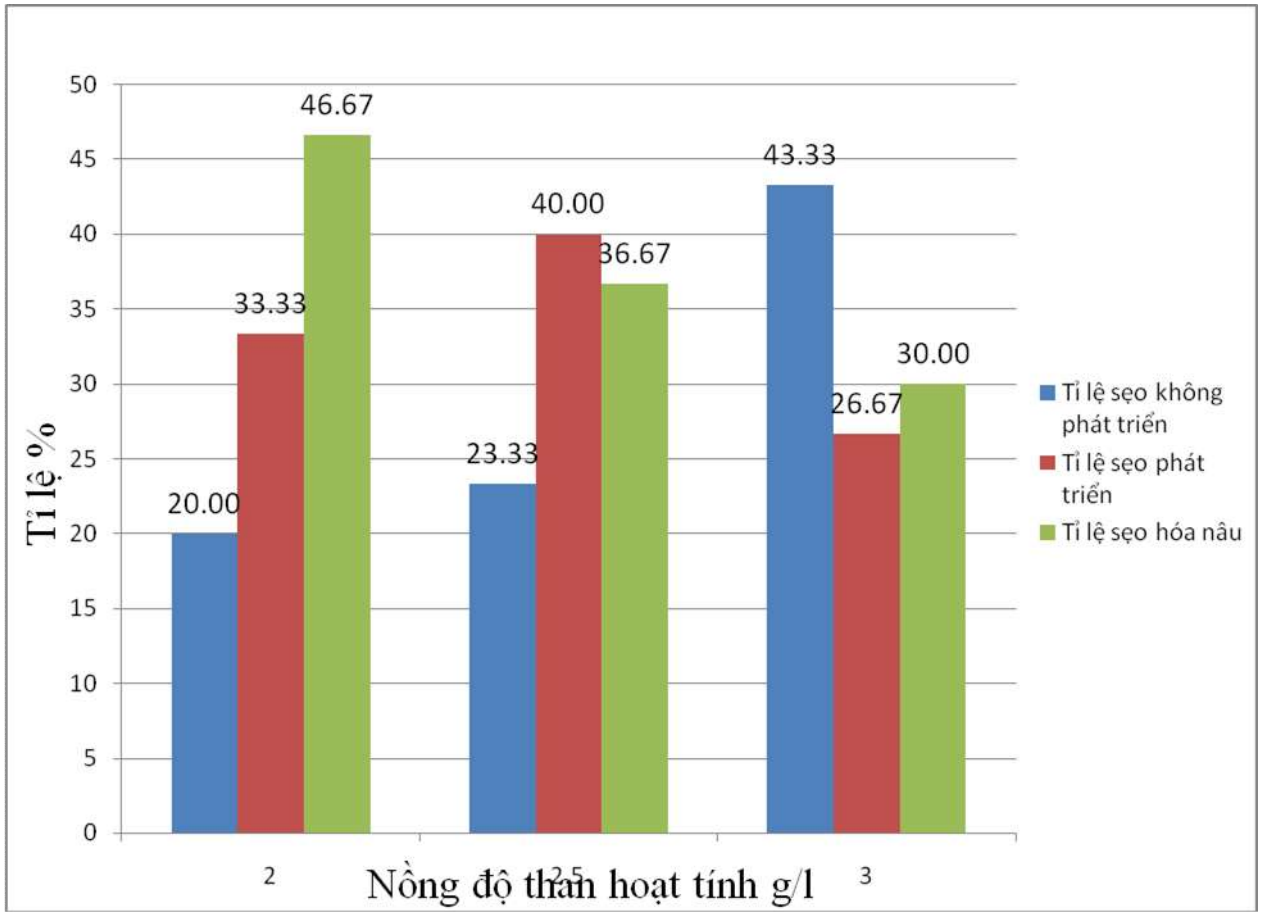
5.2.1.6 Kết quả khảo sát ảnh hưởng của than hoạt tính đến hình thái mô sẹo sau khi cấy chuyền của phôi sừa Sáp

Bảng 5.10 Kết quả sự ảnh hưởng của than hoạt tính đến sự phát triển của sẹo

NT	Nồng độ than hoạt tính (g)	Số sẹo phát triển	Tỉ lệ sẹo phát triển (%)	Số sẹo hoá nâu	Tỉ lệ sẹo hoá nâu (%)
Xa_1	2	3.33 a	33.33	4.67 a	46.67
Xa_2	2.5	4.00 a	40.00	3.67 b	36.67
Xa_3	3	2.67 a	26.67	3.00 b	30.00
CV%		17.42			

Từ bảng 5.10 và biểu đồ 5.9 ta có thể thấy ở nồng độ than hoạt tính bổ sung 2,5g/l cho kết quả tốt nhất với 40% mẫu sẹo tiếp tục phát triển, tỉ lệ mẫu không có hiện tượng là 36,67% và tỉ lệ mẫu hóa nâu là 23,33%.

Các nghiệm thức trên đều cho thấy sự tác động của than hoạt tính đến sự phát triển của sẹo là tác động 2 chiều. Nồng độ của than hoạt tính nhỏ (2g/l) tỉ lệ mẫu sống và phát triển chưa cao, điều này có thể giải thích là do sự hấp thu các hợp chất phenol chưa tốt chưa có tác dụng nhiều trong việc giảm hàm lượng phenol tiết ra môi trường xung quanh dẫn đến hệ lụy, nghiệm thức này có tỉ lệ mẫu chết nhiều nhất (46,67%). Khi tăng nồng độ lên mức cao nhất của lô thí nghiệm (3g/l) thì tỉ lệ mẫu mô sống và phát triển giảm mạnh (26,67%). Đây có thể là do sự hấp thu các hợp chất điều hòa sinh trưởng có lợi cho sự phát triển của mẫu phôi của than hoạt tính khi nồng độ của chúng tăng lên quá cao. Và ở nồng độ 2.5g/l cho kết quả tốt nhất 40% mẫu phát triển ở lần cấy chuyền kế tiếp, ở mức bổ sung than hoạt tính này là phù hợp nhất bởi lẽ than hoạt tính khi được bổ sung vào môi trường nuôi cấy hấp thu các hợp chất phenol gây độc cho sự phát triển mẫu sẹo, mặt khác chúng không làm giảm một cách tiêu cực đến nồng độ các chất điều hòa sinh trưởng mà được bổ sung.



Biểu đồ 5.9 Kết quả khảo sát sự ảnh hưởng của than hoạt tính đến hình thái mô sẹo sau khi cấy truyền của mẫu phôi dừa sáp.

5.2.2. Kết quả nghiên cứu nuôi cấy phôi hữu tính dừa Sáp

5.2.2.1 Nghiên cứu ảnh hưởng của nồng độ đường đến quá trình phát triển của phôi dừa Sáp.

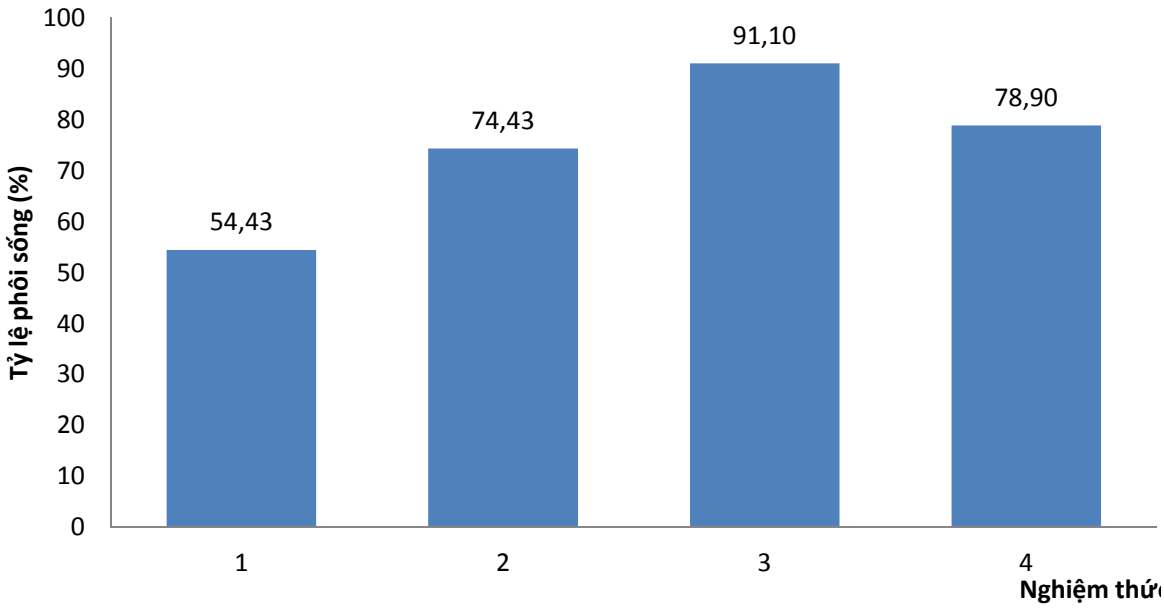
Để đánh giá ảnh hưởng của nồng độ đường đến khả năng nảy mầm và tăng trưởng của phôi, đề tài đã thực hiện thí nghiệm với các nồng độ đường khác nhau. Kết quả thu được trình bày ở bảng 5.11 và biểu đồ 5.10.

Bảng 5.11 Ảnh hưởng của nồng độ đường đến tỷ lệ sống của phôi sau 30 ngày nuôi cấy

Nghiệm thức (NT)	Đường (g/L)	Số phôi sống	Tỷ lệ phôi sống (%)
1	0	5,44 b	54,43
2	30	7,44 ab	74,43
3	**60**	**9,11 a**	**91,10**
4	90	7,89 ab	78,90
CV(%)		6,44	
$LSD_{0.01}$		3,54	

Qua kết quả thí nghiệm cho thấy ở nghiệm thức 3 với nồng độ đường 60 g/L cho tỷ lệ phôi sống cao nhất (91.10%) sau 30 ngày nuôi cấy. Ở nghiệm thức 1 không có bổ sung đường tỷ lệ phôi sống thấp nhất (54.43%) khác biệt có ý nghĩa so với các nghiệm thức khác và các phôi phát triển chậm hơn các nghiệm thức còn lại.

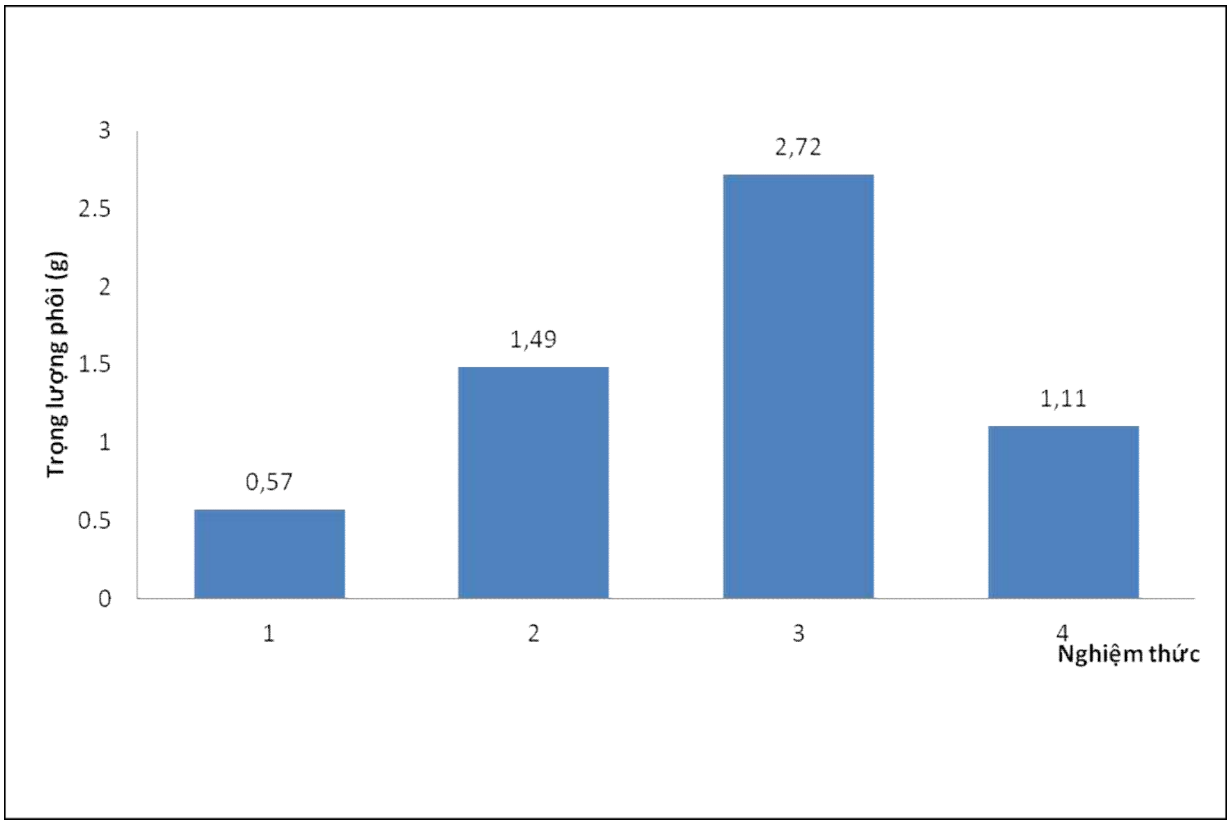
Nồng độ đường trong môi trường nuôi cấy có ảnh hưởng lớn đến sự phát triển phôi. Theo kết quả được trình bày ở bảng 5.11 cho thấy số lượng phôi sống sót tỉ lệ thuận với nồng độ đường. Tuy nhiên nếu nồng độ đường vượt hạn cũng làm tỉ lệ chết phôi tăng cao do nồng độ đường cao gây ức chế sự tạo chồi và rễ bất định.



Biểu đồ 5.10 Ảnh hưởng của nồng độ đường đến tỷ lệ sống của phôi dừa sáp sau 30 ngày nuôi cấy

Bảng 5.12 Ảnh hưởng của nồng độ đường đến trọng lượng phôi dừa sáp sau 60 ngày cấy

Nghiệm thức (NT)	Đường (g/L)	Trọng lượng phôi (g/phôi)
1	0	0,57 d
2	30	1,49 b
3	**60**	**2,72 a**
4	90	1,11 c
CV(%)		5,10
$LSD_{0.01}$		0,21



Biểu đồ 5.11 Ảnh hưởng của nồng độ đường đến trọng lượng phôi sau 60 ngày cấy

đường 0 g/L

đường 60 g/L

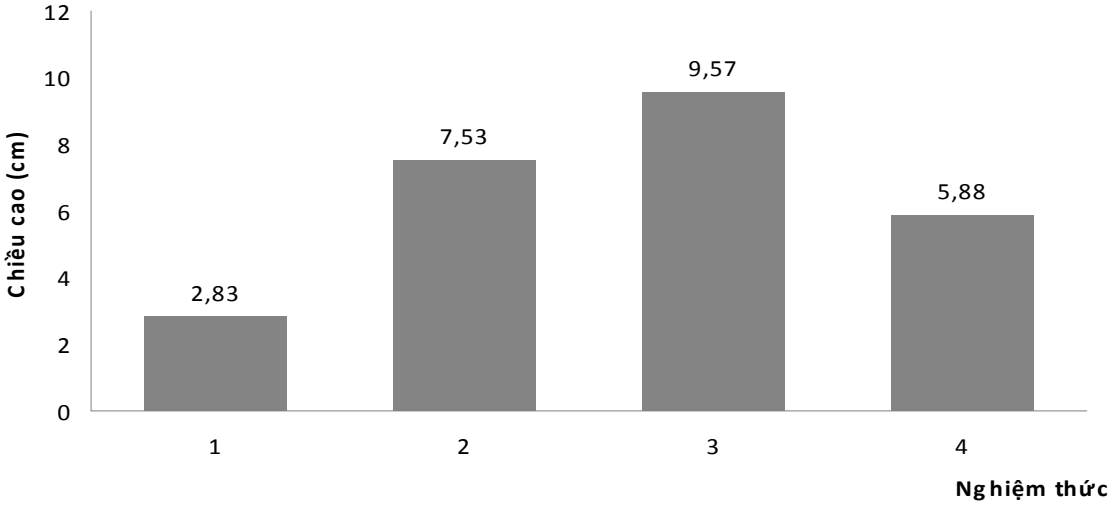
Hình 5.9 Ảnh hưởng của nồng độ đường đến quá trình phát triển của phôi dừa sáp

Thí nghiệm cũng tiến hành nhằm đánh giá ảnh hưởng của nồng độ đường đến trọng lượng của phôi dừa sáp ở giai đoạn 60 ngày sau khi nuôi cấy. Qua kết quả trình bày ở bảng 5.12, biểu đồ 5.11 và hình 5.9 cho thấy. Ở các nghiệm thức, các phôi dừa sáp được cấy trên môi trường có nồng độ đường tăng dần làm cho chỉ tiêu về sinh trưởng như kích thước, trọng lượng phôi tăng. Tuy nhiên, các chỉ tiêu tăng trưởng đến một mức nhất định. Ở nghiệm thức 3 với nồng độ đường 60 g/L, sau 60 ngày nuôi cấy, phôi dừa cho trọng

lượng cao nhất (2,72g) khác biệt rất có ý nghĩa so với các nhiệm thức còn lại. Nghiệm thức 1 có trọng lượng phôi không đạt tiêu chuẩn (0.57g).

Bảng 5.13 Ảnh hưởng của nồng độ đường đến chiều cao dừa sáp sau 150 ngày cấy

Nghiệm thức (NT)	Đường (g/L)	Chiều cao (cm)
1	0	2,83 d
2	30	7,53 b
3	**60**	**9,57 a**
4	90	5,88 c
CV(%)		3,58
$LSD_{0.01}$		0,63



Biểu đồ 5.12 Ảnh hưởng của nồng độ đường đến sự phát triển chiều cao sau 150 ngày cấy

Đường 60 g/l Đường 30 g/l Đường 90 g/l Đường 0

Hình 5.10 Ảnh hưởng của nồng độ đường đến sự phát triển chiều cao 150 ngày nuôi cấy

Nhận xét:

Dựa vào bảng trắc nghiệm phân hạng ở bảng 5.13 cho thấy, nồng độ đường có ảnh hưởng chiều cao dừa sáp nuôi cấy phôi ở giai đoạn 150 ngày sau nuôi cấy.

Ở môi trường với nồng độ đường 60 g/L cho kết quả tốt nhất (9,57cm) khác biệt rất có ý nghĩa về mặt thống kê so với các nghiệm thức khác. Chiều cao chồi thấp ở nghiệm thức không bổ sung nồng độ đường (chiều cao chỉ đạt 2,83 cm).

Kết luận:

Nồng độ đường thích hợp trong nuôi cấy dừa sáp *in vitro* là 60 g/L.

5.2.2.2 Nghiên cứu ảnh hưởng của nồng độ BA đến sự phát triển phôi dừa sáp *in vitro*

Kết quả của việc bổ sung nồng độ BA vào môi trường nuôi cấy đến sự phát triển của cây dừa sáp in vitro được trình bày ở bảng 5.14, biểu đồ 5.13, hình 5.11 và hình 5.12.

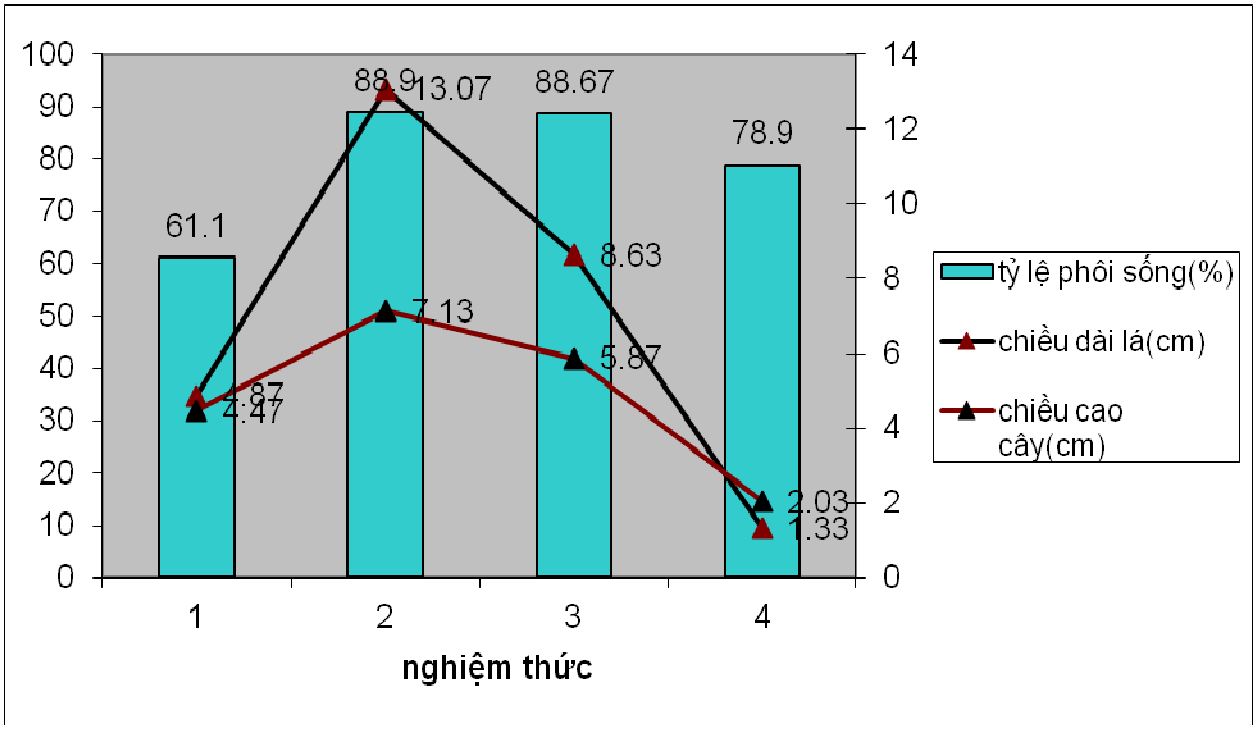
Bảng 5.14 Ảnh hưởng của nồng độ BA đến tỷ lệ phôi sống, chiều dài lá và chiều cao cây in vitro

Nghiệm thức (NT)	BA (mg/L)	Tỷ lệ phôi sống (%)	Chiều dài lá (cm)	Chiều cao cây (cm)
1	0	61,10 b	4,87 c	4,47 c
2	**0,5**	**88,90 a**	**13,07 a**	**7,13 a**
3	1	88,67 a	8,63 b	5,87 b
4	1,5	78,90 ab	1,33 d	2,03 d
CV(%)		7,14	3,61	4,15
$LSD_{0.01}$		2,31	0,69	0,55

Nhận xét:

Với mục tiêu xác định nồng độ chất điều hòa sinh trưởng BA thích hợp đến sự phát triển của phôi dừa sáp in vitro. Sau 60 ngày nuôi cấy, kết quả thí nghiệm cho thấy các nghiệm thức đều cho kết quả tốt. Sự bổ sung nồng độ BA từ 0,5 đến 1,5 mg/L có tỷ lệ phôi sống trên 78% sự khác biệt không có ý nghĩa về mặt thống kê. Chỉ khác biệt có ý nghĩa so với nghiệm thức không bổ sung BA. Tỷ lệ phôi sống của nghiệm thức 2 là 88,90%, nghiệm thức 3 là 88,67%, nghiệm thức 4 là 78,90% so với nghiệm thức không bổ sung BA (nghiệm thức 1), tỷ lệ sống chỉ đạt 61,10%. Tuy nhiên, nếu xét về tỷ lệ phôi sống và

hiệu quả sử dụng nồng độ chất BA được bổ sung vào môi trường nuôi cấy thì nồng độ BA được bổ sung là 0,5 mg/L cho hiệu quả tốt nhất.



Biểu đồ 5.13 Ảnh hưởng của nồng độ BA đến tỷ lệ phôi sống, chiều dài lá và chiều cao cây in vitro

BA 0.5 mg/L BA 1 mg/L

Hình 5.11 Ảnh hưởng của nồng độ BA đến sự phát triển lá dừa sáp *in vitro* sau 150 ngày

Dựa vào số liệu thống kê, trắc nghiệm phân hạng cho thấy môi trường nuôi cấy có bổ sung nồng độ BA = 0,5 mg/l cho kết kết quả tốt nhất đối với sự phát triển của lá 13,07

cm sau 150 ngày nuôi cấy và khác biệt rất có ý nghĩa đối với các nghiệm thức còn lại, các lá cây to bản và xanh. Đối với chiều cao cây, kết quả thí nghiệm cho thấy, trong môi trường có bổ sung BA = 0,5 mg/l cho kết quả tốt nhất đến sự phát triển của chiều cao cây (13,07cm), trong môi trường không có bổ sung BA thì cây vẫn phát triển nhưng sự phát triển chiều cao thân kém hơn môi trường có bổ sung BA. Tuy nhiên bổ sung BA quá nhiều thì sẽ ức chế đến sự phát triển của cây dừa in vitro vì BA ở nồng độ cao ức chế ưu thế của chồi ngọn.

BA 0,5 mg/L BA 0 mg/L

Hình 5.12 Ảnh hưởng của BA đến tỷ lệ phôi sống và phát triển thành cây dừa sáp *in vitro* sau 60 ngày

Kết luận:

Kích thích tố BA có tác dụng thúc đẩy sự phát triển lá của đối với cây dừa sáp nuôi cấy từ phôi trên môi trường Y3.

Có thể bổ sung vào chất điều hòa sinh trưởng BA vào trong quy trình nhân giống dừa sáp *in vitro* với nồng độ 0,5 mg/L để thúc đẩy sự phát triển của chiều cao thân và chiều dài lá để sớm có cây con hoàn chỉnh đưa ra vườn ươm.

5.2.2.3 Nghiên cứu ảnh hưởng của NAA đến quá trình hình thành và phát triển rễ cây dừa Sáp *in vitro*

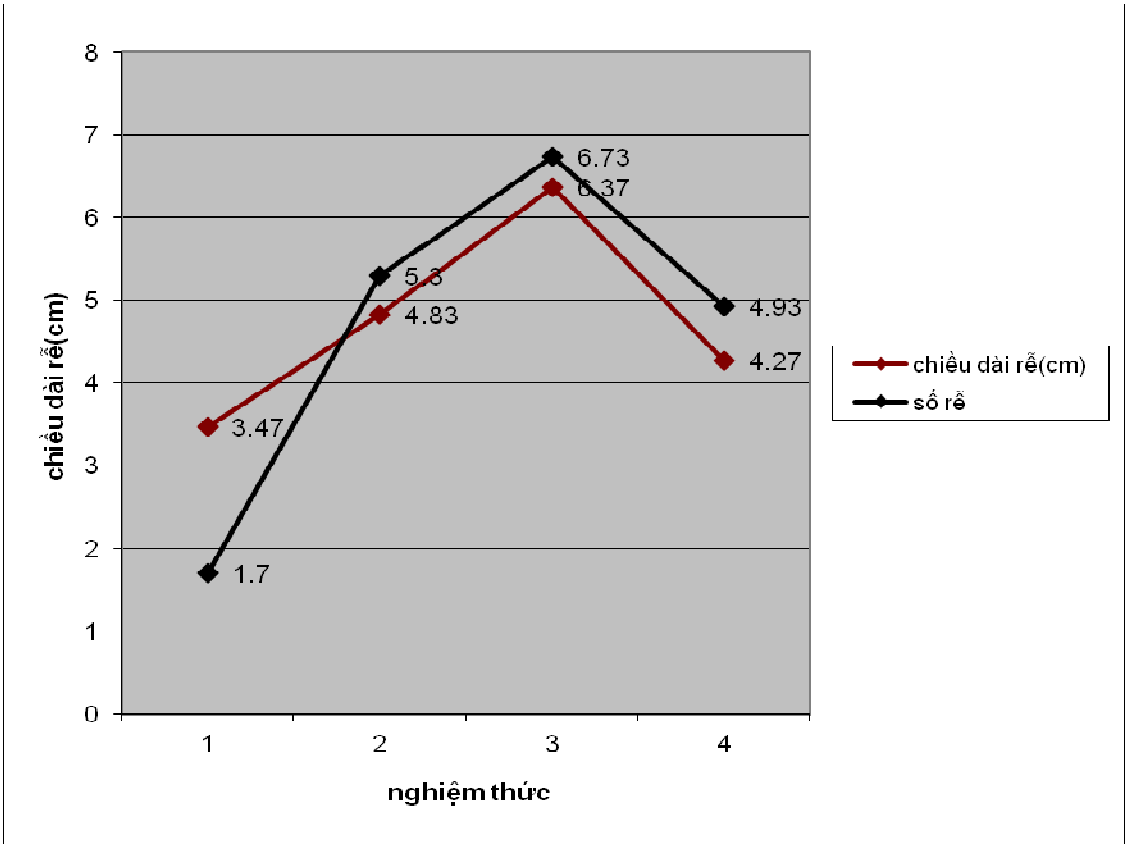
Kết quả thí nghiệm được thể hiện ở bảng 5.15 và biểu đồ 5.14

Chất điều hòa sinh trưởng NAA phù hợp cho quá trình tạo rễ cây dừa sáp. Nếu sử dụng NAA có nồng độ thích hợp thì tỷ lệ cây ra rễ cao, chiều dài rễ vừa phải, cây phát triển tốt. Qua kết quả thí nghiệm cho thấy, ở nghiệm thức 3 (nồng độ NAA = 1 mg/L) cho

số lượng rễ nhiều nhất (6,73 rễ). Ở nghiệm thức 1 không có bổ sung NAA thì số lượng rễ ít nhất(1,70 rễ). Nghiệm thức 2 và nghiệm thức 4 không có sự khác biệt. Qua quá trình ở trong tối 30 ngày phôi dừa sáp có khả năng ra rễ. Việc bổ sung NAA sau 30 ngày nuôi cấy làm cây phát triển nhanh về số lượng rễ tạo sự cân đối cho cây.

Bảng 5.15 Ảnh hưởng của nồng độ NAA đến số lượng rễ và chiều dài rễ của dừa sáp in vitro sau 150 ngày nuôi cấy.

Nghiệm thức (NT)	NAA (mg/L)	Chiều dài rễ (cm)	Số rễ/cây
1	0	3,47 d	1,70 c
2	0,5	4,83 b	5,30 b
3	**1**	**6,37 a**	**6,73 a**
4	1,5	4,27 c	4,93 b
CV(%) $LSD_{0.01}$		4,40 0,55	6,22 0,79



Biểu đồ 5.14 Ảnh hưởng của nồng độ NAA đến số lượng rễ và chiều dài rễ của dừa sáp in vitro sau 150 ngày nuôi cấy.

Kết quả thí nghiệm cũng xác định nồng độ NAA thích hợp đến chiều dài rễ dừa sáp nuôi cây phôi. Sau 150 ngày nuôi cấy giữa các nghiệm thức có sự khác biệt rất có ý nghĩa, ở nghiệm thức 3 với nồng độ NAA = 1 mg/l có chiều dài rễ dài nhất (6,37 cm). Nghiệm thức 1 cho chiều dài rễ thấp nhất (3,47 cm).

Kết luận:

Nồng độ NAA = 1 mg/l là thích hợp nhất cho sự tạo rễ trong quy trình nuôi cấy mô dừa sáp in vitro.

5.3. Nội dung 3. Giai đoạn vườn ươm và huấn luyện cây con

Sự thành công trong phương pháp nuôi cấy mô cây con, cuối cùng phụ thuộc vào tỷ lệ cây sống ở giai đoạn vườn ươm. Có nhiều nguyên nhân như: Tỷ lệ quang tổng hợp thấp, cường độ ánh sáng yếu trong phòng nuôi cấy (Lees, 1994). Kết quả đã xác định được rằng, cây nuôi cấy in vitro trong điều kiện cường độ ánh sáng được tăng cường sẽ giúp cải thiện tỷ lệ cây sống ex vitro. Dừa sáp, theo Assy-Bah et al, 1987 và Rillo, 1998, tỷ lệ sống của cây con giai đoạn ex vitro khoảng 40%. Trong suốt quá trình này, điều kiện môi trường của cây con sẽ dần thay đổi theo thời gian; điều kiện ban đầu là gắn liền với điều kiện in vitro và kết thúc là gần với điều kiện của nhà kính. Đây là một quá trình khó khăn và có liên quan đến một loạt những thay đổi: Cây phải chuyển từ điều kiện dị dưỡng sang tự dưỡng. Môi trường nuôi cấy cung cấp nhiều chất dinh dưỡng, vì vậy khả năng quang hợp cố định CO_2 của cây in vitro yếu. Khi được chuyển sang điều kiện ex vitro, cây phải tự dưỡng hoàn toàn. Trong thời gian đầu, cây phóng thích CO_2 nhiều hơn hấp thu. Chúng hô hấp rất mạnh để thích nghi với môi trường mới. Do đó sự sống sót của cây phụ thuộc vào nguồn tinh bột tích lũy trong giai đoạn nuôi cấy in vitro.

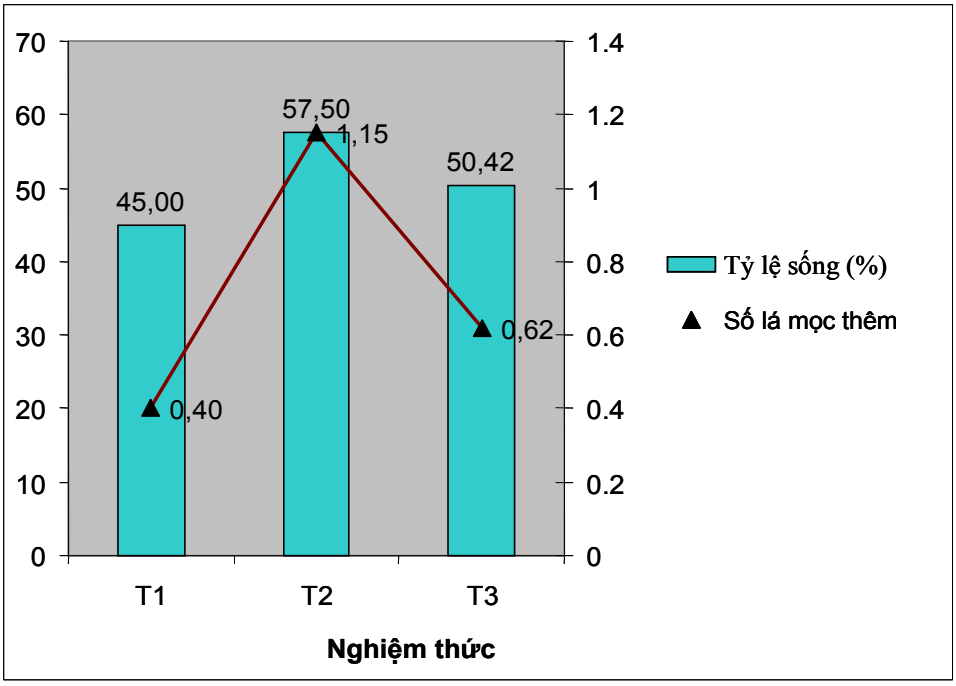
Sự thay đổi về độ ẩm cũng là yếu tố ảnh hưởng đến sức sống của cây con. Cây vi nhân giống khả năng giữ nước kém. Bởi vì, độ ẩm cao của bình nuôi cấy và cường độ ánh sáng thấp nên lá có lớp cutin kém phát triển. Theo nhiều nghiên cứu thì khí khổng của cây in vitro mở trong điều kiện tối và cả trong điều kiện stress về nước. Hiện tượng thủy tinh thể ở cây in vitro cũng làm giảm rất nhiều tỷ lệ thành công khi đưa ra vườn ươm. Đây là một hiện tượng bất thường trong quá trình phát triển. Có thể nhận thấy dễ dàng ở lá. Lá giòn, dễ gãy, màu sắc lá mờ đục, úa vàng và mọng nước. Do đó việc nghiên cứu các điều kiện in vitro và ex vitro phù hợp là cần thiết nhằm giúp tăng tỷ lệ cây sống ex vitro. Theo kết quả nghiên cứu của Dr Aurora G. Del Rosario của Phillippines (1997) chuyển cây dừa sáp nuôi cấy phôi từ bình tam giác ra nhà lưới. Khi cây ở bình tam giác được 3 – 4 lá thì

mang vào nhà lưới và huấn luyện dưới ánh sáng tự nhiên và nhiệt độ phòng Sau 2 tuần, cây được lấy ra từ bình tam giác, rửa sạch với nước để loại bỏ môi trường nuôi cấy. Sau đó dùng thuốc trừ nấm Dithane M-45 với nồng độ 2 g/L để xử lý nấm rồi cấy vào cát đã khử trùng.

5.3.1. Nghiên cứu ảnh hưởng của nhiệt độ đến tỷ lệ sống của cây dừa Sáp nuôi cấy phôi trong buồng sinh trưởng thực vật (growth chamber) sau 4 tuần

Bảng 5.16 Ảnh hưởng của nhiệt độ đến tỷ lệ sống của cây in vitro trong buồng sinh trưởng thực vật sau 4 tuần

Nghiệm thức	Nhiệt độ (^{0}C)	Ẩm độ (%)	Tỷ lệ sống (%)	Số lá mọc thêm
T1	25	80 – 90	45,00 b	0,40 b
T2	30	80 – 90	57,50 a	1,15 a
T3	35	80 – 90	50,42 b	0,62 b
CV(%)			6,58	7,59
$LSD_{0,01}$			6,04	0,38



Biểu đồ 5.15 Ảnh hưởng của nhiệt độ đến tỷ lệ sống của cây *in vitro* trong buồng sinh trưởng thực vật sau 4 tuần

Sau 4 tuần đưa vào buồng sinh trưởng thực vật, kết quả cho thấy, ở điều kiện T2, nhiệt độ 30^0C±2 với ẩm độ 80 – 90%, thì cho tỷ lệ sống của cây cao nhất 57,50% khác biệt co ý nghĩa về mặt thống kê so với các ghiệm thức còn lại, cây tăng trưởng tốt thể hiện qua số lá xanh mọc thêm.

Các cây con từ sự nuôi cấy in vitro có lớp sáp cutin trên bề mặt lá mỏng hơn nhiều so với các cây tương tự được trồng trong nhà kính hay ngoài đồng. Sự giảm lớp sáp cutin này làm làm cho cây con in vitro mất nước nhanh hơn cây bình thường và do đó gây bất lợi cho cây in vitro khi chuyển từ bình tam giác ra bầu đất. Ẩm độ cao trong các bình nuôi cây được xem là nguyên nhân chính làm giảm lớp sáp cutin. Ánh sáng thấp cũng góp phần trong sự giảm này. Một lý do khác của sự mất nước là hoạt động không hiệu quả của các khí khổng.

Mặt khác, cây con in vitro (ẩm độ 100%, nhiệt độ thấp) khi chuyển ra điều kiện ex vitro (nhiệt độ cao, ẩm độ không khí thấp), cần phải có giai đoạn thích nghi ở điều kiện nhiệt độ 30^0C±2, ẩm độ không khí cao 80 - 90% giúp cây thích nghị dần với điều kiện tự nhiên, cải thiện tỷ lệ sống của cây con ở giai đoạn vườn ươm.

5.3.2. Nghiên cứu nâng cao tỷ lệ sống của cây dừa Sáp nuôi cấy phôi giai đoạn thích nghi vườn ươm thông qua việc sử dụng thuốc bảo vệ thực vật.

Khi chuyển cây nuôi cấy phôi ra vườn ươm, cây con cần được xử lý với thuốc bảo vệ thực vật vì trong môi trường tự nhiên có rất nhiều vi khuẩn và nấm gây bệnh làm cho cây bị thối và chết.

Cây dừa Sáp nuôi cấy phôi khi đưa ra vườn ươm thường nhiễm các loại nấm bệnh như *Fusarium chlamydosporum*, *Phytophthora* sp., *Cercospora* sp. Làm thối đọt, thối rễ, đốm lá, vàng lá và làm cây chết nhanh. Vì vậy thí nghiệm sử dụng các loạt thuốc bảo vệ thực vật như Alpine, Daconil, Dithane M45, Carbendazim và benlate C xử lý cây trước khi ra vườn ươm.

Từ bảng 5.17 cho thấy, đối với dừa Sáp nuôi cấy phôi thì khi xử lý cây với các loại thuốc trừ nấm bệnh dạng lưu dẫn hay dạng tiếp xúc đều cho kết quả . Tuy nhiên, trong 5 nghiệm thức trên thì nghiệm thức 4 xử lý với loại thuốc Carbendazim cho kết quả tốt nhất, tỷ lệ cây nhiễm là thấp nhất (2,7%) và tỷ lệ cây sống cao nhất (86,5%). Vì vậy đối với cây dừa Sáp nuôi cấy phôi, trước khi đưa ra vườn ươm cần xử lý với thuốc trừ nấm

carbendazim với liều lượng 1 g/L trong thời gian 5 phút, giúp cây con khỏe, chống lại nấm bệnh từ môi trường xung quanh ở giai đoạn đầu thích nghi vườn ươm.

Bảng 5.17 Sự tăng trưởng của cây dừa Sáp nuôi cấy phôi sau khi xử lý với thuốc BVTV

Nghiệm thức	Thuốc BVTV	Tỷ lệ nhiễm (%)	Tỷ lệ Sống (%)
NT1	Alpine	7,62 b	76,38 a
NT2	Daconil	17,50 a	62,00 b
NT3	Dithane M45	9,16 ab	84,00 a
NT4	Carbendazim	2,70 bc	86,50 a
NT5	Benlate C	15,70 a	63,42 b
CV(%)		19,21	18,66
$LSD_{0,05}$		6,62	12,44

5.3.3. Nghiên cứu điều kiện nuôi trồng cây dừa Sáp nuôi cấy phôi ở vườn ươm

Để tạo độ ẩm cho nhà lưới , sau khi được che một phần ánh sáng bằng lưới giảm sáng, nhà lưới được thiết kế hệ thống phun sương.

Thí nghiệm được bố trí theo khối đầy đủ, hoàn toàn ngẫu nhiên lặp lại 4 lần, 10 cây/nghiệm thức.

- Điều kiện 1 (ĐK1): nhiệt độ $35^0C \pm 2^0C$, ẩm độ 60%

- Điều kiện 2 (ĐK2): nhiệt độ $35^0C \pm 2^0C$, ẩm độ 80-90%

- Điều kiện 3 (ĐK3): nhiệt độ $30^0C \pm 2^0C$, ẩm độ 80-90%

Sau tám tuần trồng ra vườm ươm, kết quả cho thấy ở điều kiện ĐK3 nhiệt độ $30^0C \pm 2^0C$ với ẩm độ tương đối của không khí là 80-90% thì cho tỷ lệ sống của cây là cao nhất 87,5%, cây tăng trưởng tốt nhất thể hiện qua sự gia tăng các chỉ tiêu sinh trưởng như chiều cao cây (6,80cm), chiều dài lá (6,2cm) số lá xanh mọc thêm (1 lá), chiều rộng lá (0,9cm), đường kính gốc (1cm) (bảng 5.18).

Các cây con từ sự nuôi cấy in vitro có lớp sáp cutin trên bề mặt lá mỏng hơn nhiều so với các cây tương tự được trồng trong nhà kính hay ngoài đồng. Sự giảm lớp sáp cutin

này làm cho cây con in vitro mất nước mất nước nhanh hơn cây bình thường và do đó gây bất lợi cho cây in vitro khi mới chuyển ra vườn ươm. Độ ẩm cao trong các bình nuôi cây được xem là nguyên nhân chính làm giảm lớp sáp cutin. Ánh sáng thấp cũng góp phần làm trong sự giảm này. Một lý do khác của sự mất nước là hoạt động không hiệu quả của các khí khổng.

Để thích nghi cây dừa nuôi cấy phôi, cây con cần được duy trì trong ẩm độ tương đối cao trong thời gian đầu. Cây thích nghi nhờ sự giảm dần độ ẩm tương đối trong khí quyển.

Bảng 5.18 Tỷ lệ sống và sự gia tăng một số chỉ tiêu nông sinh học của dừa Sáp nuôi cấy phôi sau tám tuần nuôi trồng ở vườn ươm

Ngiệm thức	Tỷ lệ sống (%)	Chiều cao cây (cm)	Chiều dài lá (cm)	Số lá mọc thêm (lá)	Chiều rộng lá (cm)	Điền kính gốc (cm)
ĐK1	65,00 b	6,10	6,00	0,50 b	0,43 b	0,50 b
ĐK2	77,50 ab	6,80	6,20	0,80 ab	1,00 ab	0,90 a
ĐK3	87,50 a	7,00	6,70	1,35 a	0,90 a	1,00 a
CV(%)	10,43			8,92	7,52	10,40
$LSD_{0,05}$	13,83			0,58	0,45	0,23

VI. TỔNG HỢP CÁC SẢN PHẨM ĐỀ TÀI

6.1. Các sản phẩm khoa học: *(Liệt kê các sản phẩm theo thứ tự dạng 1, 2, 3, 4 và nêu rõ chỉ tiêu chất lượng của giống, qui trinh, mô hình…)*

TT	Tên sản phẩm	Đơn vị tính	Số lượng theo kế hoạch phê duyệt	Số lượng đạt được	% đạt được so với kế hoạch	Ghi chú
1	Cây dừa Sáp giống	Cây		30	100	

2	Quy trình nuôi cấy phôi dừa Sáp	Quy trình	01	01	100	
3	Quy trình chăm sóc cây con giai đoạn vườn ươm	Quy trình	01	01	100	
4	Bài báo khoa học	Bài	02	02	100	
5	Đào tạo	Sinh viên	02	02	100	

6.2. Kết quả đào tạo/tập huấn cho cán bộ hoặc nông dân

Số TT	Số lớp	Số người/lớp	Ngày /lớp	Tổng số người			Ghi chú
				Tổng số	Nữ	Dân tộc thiểu số	

VII. ĐÁNH GIÁ TÁC ĐỘNG CỦA KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

7.1. Hiệu quả môi trường *(đánh giá tác động/ảnh hưởng của kết quả nghiên cứu đến môi trường)*

Nhân giống dừa sáp bằng phương pháp ươm truyền thống có tỷ lệ quả sáp / buồng 20 -25%. Theo Torres (1937) và Zuniga (1953), một trong những biện pháp làm tăng tỷ lệ quả sáp/buồng >75% là sử dụng những cây từ nuôi cấy phôi, đề tài bước đầu đã có những kết quả tốt như tạo được cây hoàn chỉnh từ phôi.

7.2. Hiệu quả kinh tế - xã hội *(đánh giá tác động/ảnh hưởng của nghiên cứu đến giảm nghèo, bình đẳng giới..)*

Giá trị dừa sáp rất cao so với dừa thường, dừa thường giá thành hiện nay là 5.000 đồng/trái so với dừa sáp là 140.000 đồng / trái, giá trị gấp 28 lần so với dừa thường mà vẫn không đủ cung cấp cho thị trường. Do đó, ứng dụng nuôi cấy phôi làm tăng tỷ lệ quả sáp/buồng >75% so với truyền thống 25%, sẽ tăng quả sáp từ 25 quả đến 75 quả/cây/năm.

Giá trị kinh tế trên mỗi cây / năm 25 trái x 140.000đ = 3.500.000đ (truyền thống)

75 trái x 140.000đ = 10.500.000đ (cấy phôi)

Xây dựng được vườn dừa sáp chuyên canh đạt năng suất và hiệu quả kinh tế, tạo công ăn việc làm, xóa đói giảm nghèo, tăng thu nhập, tạo điều kiện hỗ trợ công đồng dân tộc thiểu số Khmer tại địa phương.

Tham gia chuyển đổi cơ cấu nông nghiệp sang hướng sản xuất các hàng hóa có giá trị cao (dừa sáp)

Gia tăng diện tích trồng dừa sáp tại địa phương, một loại cây trồng thích nghi với các điều kiện sinh thái đặc trưng của địa phương (nhiễm phèn, nhiễm mặn, lũ lụt, hạn hán...) tạo thảm thực vật xanh, hạn chế sạt lỡ đất...

Chế biến trái dừa, đặc biệt là phần xơ dừa sẽ giúp giảm ô nhiễm, tạo ra các sản phẩm có giá trị để phục vụ nông nghiệp, công nghiệp...Số cán bộ KN, nông dân được tham gia nghiên cứu, tập huấn , tăng thu nhập hộ,tạo việc làm.

VIII TỔ CHỨC THỰC HIỆN VÀ SỬ DỤNG KINH PHÍ

8.1. Tổ chức thực hiện *(Nêu các tổ chức và cá nhân tham gia thực hiện, các hoạt động phối hợp với các tổ chức địa phương…)*

Những người thực hiện:

1. TS Nguyễn Đình Lâm
2. TS Võ Văn Long
3. Ths Nguyễn Thị Bích Hồng
4. KS Lý Hậu Giang
5. CN Phạm Thị Quỳnh Lan
6. KS Nguyễn Văn Lâm
7. KS Lương Thế Minh
8. KS Nguyễn Hữu Bình, Trạm Khuyến Nông huyện Cầu Kè, tỉnh Trà Vinh
9. Thạch Phu My, Chủ nhiệm Hợp tác xã Dừa Sáp Hòa Tân, Cầu Kè, Trà Vinh

8.2. Sử dụng kinh phí *(tổng hợp theo từng nội dung của đề tài)*

ĐV tính: 1000 đ

TT	Nội dung chi	Kinh phí theo dự toán	Kinh phí được cấp	Kinh phí đã sử dụng

1	Nội dung 1. Điều tra khảo sát hiện trạng, đặc điểm hình thái, tuyển chọn cây đầu dòng, trái đầu dòng dừa sáp	85.350	85.350	85.300
2	Nội dung 2. Nhân giống dừa Sáp bằng kỹ thuật nuôi cấy phôi	303.400	303.400	303.525
3	Xây dựng vườn ươm và huấn luyện cây con trước khi chuyển giao cho sản xuất	132.210	132.210	132.210
4	Chi khác	129.040	129.040	115.542
	Tổng số:	**650.000**	**650.000**	**636.577**

IX. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

9.1. Kết luận

- Dừa sáp ở xã Hòa Tân, huyện Cầu Kè, Trà Vinh được trồng chủ yếu theo lối quảng canh, tỷ lệ quả sáp/buồng dừa thấp <25%.

- Tổng số cây dừa sáp mẹ được tuyển chọn là 58 cây của 18 hộ tại ấp Chông nô 1 và Chông nô 2 thuộc xã Hòa Tân. Năng suất bình quân của cây dừa sáp mẹ được tuyển chọn 73 quả/cây/năm.

- Trong quá trình khử trùng mẫu, sử dụng chất khử trùng calcium hypochlorite với nồng độ 5% trong thời gian xử lý 20 phút là thích hợp nhất. Tỷ lệ sống đạt 82.3%.

- Việc khảo sát môi trường cơ bản để tiến hành các nghiên cứu tạo sẹo của mẫu phôi dừa Sáp cho kết quả tốt với môi trường Y3 (60% sẹo tạo thành).

- Nhóm chất NAA-BA với tỷ lệ 5ppm NAA + 0,5ppm BA cho kết quả tốt nhất (50% số mẫu tạo sẹo), mẫu mô sẹo tạo có màu vàng nhạt khối sẹo xốp ướt phù hợp với các nghiên cứu tiếp theo.

- Nồng độ BA thích hợp nhất trong quá trình nuôi cấy dừa sáp in vitro là 0.5 mg/L

- Nồng độ NAA thích hợp nhất trong quá trình tạo rễ cây dừa sáp in vitro là 1 mg/L

- Nồng độ đường sucrose thích hợp nhất cho sự sinh trưởng và phát triển của từ phôi dừa đến cây hoàn chỉnh là 60g/L.

- Nhiệt độ thích hợp cho cây trong buồng sinh trưởng thực là 30^0C với ẩm độ 80 – 90%.

- Sử dụng thuốc trừ nấm carbendazim cho tỷ lệ cây sống cao nhất 86,5%

- Trong điều kiện vườn ươm duy trì nhiệt độ $30^0C \pm 2^0C$ với ẩm độ tương đối của không khí là 80-90% tỷ lệ sống của cây con 87,5%.

9.2. Đề nghị

- Tuy đề tài đã cải thiện đáng kể tỷ lệ thành công của qui trình, nhưng vẫn còn tồn tại một số vấn đề cần tiếp tục nghiên cứu như: nghiên cứu sâu hơn về môi trường dinh dưỡng đảm bảo đáp ứng nhu cầu sinh trưởng của cây theo từng giai đoạn, cần có các nghiên cứu thích nghi cây trước khi chuyển giai đoạn để làm tăng hơn nữa tỷ lệ sống của cây

- Đề nghị Hội Đồng Khoa học cho nghiệm thu Đề tài

Chủ trì đề tài	**Cơ quan chủ trì**
(Họ tên, ký)	*(Họ tên, ký và đóng dấu)*

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Ambrosio Raul R. Alfiler (2001). Coconut embryo culture. Specialized training course on coconut rearch and development. 89 pgs.

Arellano, J et al, 1995. Lethal yellowing research and practical aspects.

Assy Bah, B., T. DurandGasselin, F. Engelmann and C. Pannetier,Culture in vitro d'embryons zygotiques de cocotier (Cocos nucifera L.) 1989.

Assy Bah,B.,T. Durand Gasselin and C. Pannetier, Use of zygotic embryo culture to collect germplasm of coconut (Cocos nucifera L.).Plant genetic resources newsletter,pp.71-410.

Aurora G. Del Rosario, *Status of research on coconut embryo culture and acclimatization techniques in UPLB*

Azpeitia et al, 2003. Effect of 22(S), 23(S)-homobrassinolide on somatic embryogenesis in plumule explants of Cocos nucifera culture in vitro.

Blake J et al, 1995. Somatic embryogenesis in coconut.

De Kler, G.J. – *Plant hornones in tissue culture.* Catalogue 2000-2001 Duchefa Biochemie BV, p. 19 -25.

Doyle et al, 1987. A rapid DNA isolation procedure for small amounts of leaf tissue.

Eden-Green et al, 1997. History, distribution and research on coconut lethal yellowing-like disease of palms.

Eeuwens et al, 1976. Requirements for growth and callus initiation of tissue explants excised from mature coconut palms (Cocos nucifera L.) and date (Phoenix dactylifera) palm cultured in vitro

Elida. P. Rillo (1997). Coconut embryo culture. International Symposium on Coconut Biotechnology.

Harnold et al, 1991. Cadang-cadang disease and its viroid agent.

Hornung et al, 1995. Micropropagation of Cocos nucifera L from plumule tissue excised from mature zygotic embryos.

Hornung et al, 1999. Somatic embryogenesis in coconut from immature inflorescence explants.

J.L. Chan et al, 1997. Regeneration of coconut (Cocos nucifera L.) from plumule explants through somatic embryogenesis.

Klein R.M và Klein D.T..,1974. *Phương pháp nghiên cứu thực vật.Tập II* (Nguyễn Như Thanh,Phạm Hồng Thái dịch).Nhà xuất bản khoa học kỹ thật Hà Nội

M.T.Perez Numez et al, 2007. Improved somatic embryogenesis from Cocos nucifera L. plumule explants.

Mai Xuân Lương, 2000. *Giáo trình Công nghệ Sinh học thực vật.*Trường đại học Đà lạt.

Maximova et al, 2002. Efficiency, genotype variability, and cellular origin of primary and secondary somatic embryogenesis of Theobroma cacao.

Mayra I. Montero-Cortés José L. Chan-Rodríguez, Ivan Cordova-Lara, Carlos Oropeza-Salin, Luis Sáenz-Carbonel, *Addition of benzyladenine to coconut explants cultured In vitro improves the formation of somatic embryos and their germination*-Agrociencia, 2011.

Nguyễn Văn Uyển và các tác giả.1993. *Nuôi cấy mô thực vật phục vụ công tác giống cây trồng*. Nhà xuất bản Nông Nghiệp.236 trang.

Nguyễn văn Uyển, 1989. *Các chất điều hòa sinh trưởng trong nông nghiệp*.Nhà xuất bản TP.Hồ Chí Minh

Patilo M. Magdalita et al (2004). Effect of physical, Chemical and light treatment on Germination and Growth of Tissue cultured coconuts, Institute of Plant Breeding, Philippine.

Perera et al, 1999. Identification and characterization of microsatellite loci in coconut (Cocos nucifera L.) and analysis of coconut populations in Srilanka.

Perera et al, 2000. Use of microsatellite DNA markers to investigate the level of genetic diversity and population genetic structure of coconut (Cocos nucifera L)

PGS-TS Lê Văn Hoàng,2008. *Giáo trình nuôi cấy mô & tế bào thực vật*.Đại học Đà Nẵng

Raemakers et al, 1995. Secondary somatic embryogenesis and applications in plant breeding.

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

S.C. Fernando *, C.K.A. Gamage, Abscisic acid induced somatic embryogenesis in immature embryo explants of coconut Cocos nucifera L.

S.C. Fernando, E.S. Santha and D.J.A. Hewarathna, Activated coconut shell charcoal as a component of tissue culture media of Cocos nucifera L.

Võ văn Long và ctv, 2005. Nghiên cứu ứng dụng kỹ thuật nhân, lưu giữ giống và xây dựng mô hình chuyên canh dừa Đặc ruột ở huyện Cầu Kè, tỉnh Trà Vinh.

Von Arnold et al, 2002. Developmental pathways of somatic embryogenesis.

Vũ Thị Mỹ Liên, Trần Thị Ngọc Thảo, Trương Thiện trí, nguyễn Tuấn Anh, Võ Phan Misa (2005). Kết quả công nghệ nuôi cấy phôi dừa ở Việt Nam. Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn. Số 23. Trang 135-138.

PHỤ LỤC VÀ ẢNH MINH HOẠ

Phụ lục I: QUY TRÌNH NUÔI CẤY PHÔI DỪA SÁP

1. Vật liệu

- Mẫu cấy: Phôi dừa sáp 12 tháng tuổi.

- Môi trường nuôi cấy Y3 (Eeuwens) có bổ sung các chất điều hòa sinh trưởng

2. Phương pháp tiến hành

Thành phần môi trường phát triển:(môi trường M1)

Y3 + 25% than hoạt tính + 60 g/L sucrose + 0,5 mg/L BA. pH 5.6

Thành phần môi trường tạo rễ:(môi trường M2)

Y3 + 25% than hoạt tính + 8 g/L agarose + 60 g/L sucrose + (1mg/L) NAA. pH 5,75

3. Thu mẫu xử lý mẫu và cấy mẫu

Dừa sáp thu tại xã Hòa Tân, huyện Cầu Kè, tỉnh Trà Vinh, sau đó mang về phòng thí nghiệm. Bổ đôi trái dừa sáp ra làm hai phần theo chiều ngang, sau đó dùng dụng cụ lấy mẫu (stain steel cork borer) ấn mạnh vào phần trung tâm phía bên có vết lỏm sẽ lấy được một vùng cơm dừa chứa phôi, mẫu sau khi được lấy ra phải được bảo quản trong nước cất vô trùng. Dụng cụ lấy mẫu là một ống kim loại có hình chữ T phía trên đầu có khoan lỗ để khi mẫu bị dính vào ống thì dùng đũa thủy tinh sạch đẩy nhẹ cho mẫu rơi ra ngoài.

3.1 Bên ngoài buồng cấy

Dùng stain steel cork borer tách phôi cho vào hộp nhựa có nắp đậy đã được hấp khử trùng chứa nước cất vô trùng.

3.2 Bên trong buồng cấy

Rửa mẫu bằng cồn 70^{o} trong 3 phút. Rửa lại 3 lần bằng nước cất vô trùng (5phút/lần). Kế đến, rửa phôi bằng calcium hypochlorite 5% trong 20 phút. Rửa lặp lại 3 lần với nước cất vô trùng.

Tách lấy phôi, sau đó ngâm trong calcium hypochlorite 5% trong 10 phút, rửa lại bằng nước cất 3 lần mỗi lần 5 phút, cấy vào môi trường đã chuẩn bị sẵn.

3.3 Cấy mẫu và cấy chuyền vào môi trường M1

Dùng kẹp gấp mẫu đã được khử trùng ra giấy hút vô trùng cho khô nước còn dính trên mẫu. Sau đó cấy mẫu vào môi trường M1. Đậy miệng chai bằng một lớp giấy bạc và lớp bao PE, buộc chặt lại bằng thun. Các thao tác được thực hiện trong tủ cấy vô trùng, sau mỗi thao tác phải khử trùng dụng cụ bằng cách nhúng vào cồn 96^0 và đốt trên ngọn lửa đèn cồn, trước khi tháo lớp giấy bạc và sau khi vô mẫu cũng phải hơ miệng chai chứa môi trường trên ngọn lửa đèn cồn. Cấy mẫu xong ghi ngày cấy trên nhãn chai, đem để trong buồng sinh trưởng thực vật với các điều kiện tối, nhiệt độ 25^0C, độ ẩm 70-80%.

Sau 30 ngày trong buồng sinh trưởng ở điều kiện không có ánh sáng phôi dừa được cấy chuyền tiếp tục vào môi trường M1, chai 500ml, mỗi chai chứa 40ml. Sau đó đem vào phòng nuôi cấy ở nhiệt độ 25^0C, độ ẩm 70-80%, ánh sáng đèn huỳnh quang, chiếu sáng 16 giờ/ngày với cường độ chiếu sáng 4000lux. Tiếp tục cấy chuyền sau 30 ngày

Ở giai đoạn phát triển, phôi được nuôi cấy và theo dõi trong 03 tháng

3.4 Cấy mẫu và cấy chuyền vào môi trường M2

Sau 03 tháng nuôi cấy, phôi dừa được cấy chuyền vào môi trường kích thích ra rễ, môi trường M2. Sau 30 ngày tiếp tục cấy chuyền trên môi trường M2. Mẫu kích thích ra rễ được nuôi trong điều kiện: ánh sáng đèn huỳnh quang, cường độ ánh sáng 4000 lux, thời gian chiếu sáng 16 giờ/ngày, nhiệt độ phòng nuôi 25^{o}C (± 2^{o}C), ẩm độ phòng 30%. Theo dõi sau 03 tháng

Phụ lục II: QUY TRÌNH CHUYỂN CÂY CON RA NHÀ LƯỚI

1. Vật liệu

- Cát khử trùng
- Bao PE
- Thuốc diệt nấm (Carbendazim 1g/L), IBA (1000 ppm)

2. Phương pháp tiến hành

Cây con giai đoạn 3-4 lá, cao 20-25 cm, rễ thứ cấp ra 2-3 rễ. Tiếp theo, lấy cây con từ bình ra, rửa sạch môi trường còn bám lên rễ.

Ngâm cây vào dung dịch thuốc diệt nấm carbendazim (1g/L) trong một giờ. Sau đó, tiếp tục ngâm vào dung dịch IBA trong 1 giờ

Đem cây vào túi nylon chứa cát vô trùng, sau đó lấy plastic che phủ, rồi đưa vào buồng sinh trưởng thực vật (growth chamber), nhiệt độ 30^0C, ẩm độ 80 – 90%. duy trì trong 4-6 tuần.

Đưa cây từ buồng sinh trưởng thực vật ra nhà lưới dưới ánh sáng tự nhiên trong 1 tuần, chuyển cây vào hỗn hợp đất, cát, bụi dừa với tỷ lệ 1:1:1. Duy trì 70% độ sáng, nhiệt độ duy trì 30^0C và ẩm độ 80-90%. Sau 3 tháng chuyển cây ra vườn trồng. Khuyến cáo sử dụng phân bón lá nếu cần thiết (khi cây ra lá non).

Phụ lục 3:

Bảng 1. Đặc điểm của các vườn dừa được chọn để lấy trái nhân giống

Số tt	Chủ hộ	Tuổi cây (năm)	Tỷ lệ đặc ruột (%)	Đặc điểm hình thái cây được chọn	Số buồng quả/năm
1	Thạch Phương	>25	25	Tán lá phân bố đều, cây thẳng	13
2	Thạch Thị Tha	>25	20	Tán lá phân bố đều, cây thẳng	12
3	Thạch Chanh	>25	20	Tán lá phân bố đều, cây thẳng	12
4	Thạch Sanh	>25	30	Tán lá phân bố đều, cây thẳng	13
5	Lâm Ninh	>25	25	Tán lá phân bố đều, cây thẳng	12
6	Thạch Xứng	>25	25	Tán lá phân bố đều, cây thẳng	13
7	Thạch Thị Sa Ren	>25	30	Tán lá phân bố đều, cây thẳng	13

8	Thạch Thị Sắc	>25	25	Tán lá phân bố đều, cây thẳng	13
9	Thạch Khel	>25	20	Tán lá phân bố đều, cây thẳng	12
10	Thạch Mương	>25	30	Tán lá phân bố đều, cây thẳng	13
11	Kim Yên	>25	25	Tán lá phân bố đều, cây thẳng	13
12	Kim Thị Hội	>25	20	Tán lá phân bố đều, cây thẳng	12
13	Thạch Thị sơn	>25	25	Tán lá phân bố đều, cây thẳng	12
14	Kim Thị Thương	>25	25	Tán lá phân bố đều, cây thẳng	13
15	Thạch Khum	>25	25	Tán lá phân bố đều, cây thẳng	13
16	Kim Yên	>25	30	Tán lá phân bố đều, cây thẳng	13
17	Thạch Thol	>25	20	Tán lá phân bố đều, cây thẳng	12
18	Thạch Nuôi	>25	20	Tán lá phân bố đều, cây thẳng	12
	Trung bình	>25	24,44		12,56

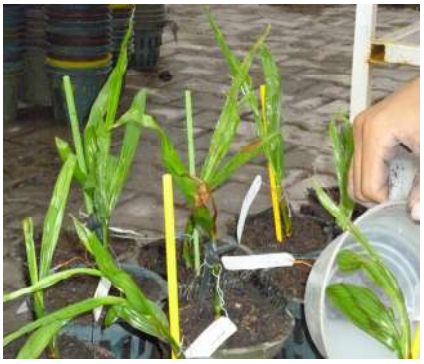
Bảng 2. Đặc điểm của các trái dừa được chọn nhân giống

Số tt	Chủ hộ	Khối lượng quả (g)	Khối lượng quả không vỏ (g)	Khối lượng gáo (g)	Đặc điểm của quả được chọn
1	Thạch Phương	1650	1100	250	Đều đặn, không dị dạng và sâu bệnh hại
2	Thạch Thị Tha	1700	1000	300	Đều đặn, không dị dạng và sâu bệnh hại
3	Thạch Chanh	1600	900	250	Đều đặn, không dị dạng và sâu bệnh hại
4	Thạch Sanh	1700	1050	350	Đều đặn, không dị dạng và sâu bệnh hại
5	Lâm Ninh	1800	1000	350	Đều đặn, không dị dạng và sâu bệnh hại
6	Thạch Xứng	1750	1050	300	Đều đặn, không dị dạng và sâu bệnh hại
7	Thạch Thị Sa Ren	1850	1100	400	Đều đặn, không dị dạng và sâu bệnh hại
8	Thạch Thị Sắc	1700	1000	350	Đều đặn, không dị dạng và sâu bệnh hại
9	Thạch Khel	1600	950	250	Đều đặn, không dị dạng và sâu bệnh hại
10	Thạch Mương	1750	1150	300	Đều đặn, không dị dạng và sâu bệnh hại
11	Kim Yên	1650	1000	250	Đều đặn, không dị

					dạng và sâu bệnh hại
12	Kim Thị Hội	1850	1150	350	Đều đặn, không dị dạng và sâu bệnh hại
13	Thạch Thị sơn	1850	1100	400	Đều đặn, không dị dạng và sâu bệnh hại
14	Kim Thị Thương	1750	1050	300	Đều đặn, không dị dạng và sâu bệnh hại
15	Thạch Khum	1550	900	250	Đều đặn, không dị dạng và sâu bệnh hại
16	Kim Yên	1600	1000	200	Đều đặn, không dị dạng và sâu bệnh hại
17	Thạch Thol	1650	1000	300	Đều đặn, không dị dạng và sâu bệnh hại
18	Thạch Nuôi	1700	1100	350	Đều đặn, không dị dạng và sâu bệnh hại
	Trung bình	1705,56	1033,33	305,56	

Cây dừa Sáp được chọn để lấy trái nuôi cấy phôi

Phôi được nuôi cấy thành công



Dừa Sáp nuôi cấy phôi được được chuyển vào chậu giai đoạn vườn ươm