

DOI:10.22144/ctu.jvn.2021.046

## NGHIÊN CỨU ẢNH HƯỞNG CỦA MỘT SỐ YẾU TỐ NUÔI CẤY *in-vitro* ĐẾN QUÁ TRÌNH TẠO RỄ CÂY DỪA SÁP (MAKAPUNO COCONUT) CÂY PHÔI

Võ Minh Hải<sup>1\*</sup>, Phạm Thị Phương Thuý<sup>2</sup>, Lê Vĩnh Thúc<sup>3</sup> và Nguyễn Bảo Toàn<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Nghiên cứu sinh khoa học cây trồng khóa 2017, Khoa Nông nghiệp, Trường Đại học Cần Thơ

<sup>2</sup>Khoa Nông nghiệp – Thủy sản, Trường Đại học Trà Vinh

<sup>3</sup>Khoa Nông nghiệp, Trường Đại học Cần Thơ

<sup>4</sup>Hội Sinh vật cảnh, Thành phố Cần Thơ

\*Người chịu trách nhiệm về bài viết: Võ Minh Hải (email: haitvu@gmail.com)

### Thông tin chung:

Ngày nhận bài: 21/10/2020

Ngày nhận bài sửa: 07/01/2021

Ngày duyệt đăng: 28/04/2021

### Title:

Studying some *in-vitro* culture factors affecting the rooting of coconut sap (Makapuno coconut) embryos

### Từ khóa:

Cây phôi, rễ dừa sáp *in-vitro*, yếu tố ảnh hưởng

### Keywords:

Embryo cultured, rooting of sap coconut *in-vitro*, effectuation factors

### ABSTRACT

In order to create seedlings with a perfect developed root system by the cultured embryo sap coconut micropropagation, 5 experiments of the research were carried out basic on the factors affecting the rooting rate of embryo sap coconut. The results determined that at the root stage, the modified Y3 medium was supplemented with sucrose 40 g/L and agar 5g/L was more suitable than others. All germinating embryos had root length less than 5 cm after 4-month culture, they were transplanted to the modified Y3 medium + IAA 3 mg/L was best results. For non-submerged embryos (the root out of the medium), two methods were carried out: adding modified Y3 medium supplemented with NAA 3 mg/L or root cutting + modified Y3 medium + NAA 3 mg/L. However, the method of cutting roots takes more time for the tree to qualify. It is recommended to apply the results of this research for embryo cultured Sap coconut seedling production in Vietnam.

### TÓM TẮT

Nhằm tạo được cây con có hệ thống rễ phát triển hoàn thiện trong phương pháp nhân giống dừa sáp từ phôi, đề tài đã tiến hành 5 thí nghiệm nghiên cứu các yếu tố ảnh hưởng đến tỷ lệ tạo rễ của cây dừa sáp cấy phôi. Kết quả nghiên cứu đã xác định ở giai đoạn tạo rễ, môi trường Y3 cải tiến kết hợp với 40 g/L đường và sử dụng 5g agar/L là thích hợp cho cây dừa sáp cấy phôi phát triển. Đối với các cây phôi sau 4 tháng nhưng chiều dài rễ nhỏ hơn 5 cm thì sử dụng môi trường Y3 cải tiến + 3 mg/L IAA là thích hợp nhất. Đối với các cây phôi không ngập trong môi trường, áp dụng 2 phương pháp: bổ sung thêm môi trường Y3 cải tiến + 3 mg/L NAA hoặc cắt rễ + môi trường Y3 cải tiến + 3 mg/L NAA, cả hai thí nghiệm cho kết quả tốt. Tuy nhiên, phương pháp cắt rễ phải tốn nhiều thời gian hơn để cây đủ tiêu chuẩn chuyển sang giai đoạn vườn ươm. Khuyến nghị ứng dụng kết quả nghiên cứu này vào trong quy trình sản xuất cây giống dừa sáp cấy phôi tại Việt Nam.

### 1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Một cây dừa sáp (Makapuno coconut) có kiểu gen đồng hợp tư lặn (mm) thực chất không tồn tại tự

nhiên và thường được nuôi cấy thông qua nuôi cấy mô (De Guzman *et al.*, 1964; De Guzman & Manuel, 1977). Thông thường, có 25% khả năng sản

xuất trái dừa sáp nếu trái được lấy từ cây mẹ mang dừa sáp (Cedo et al., 1984; Islam et al., 2013;) nhưng tỉ lệ trái có sáp có thể tăng lên 85% (dao động từ 50 đến dưới 100%) nếu chúng được thu hoạch từ cây dừa sáp được nhân bằng phương pháp giải cứu phôi (De Guzman et al., 1964; De Guzman & Manuel, 1977). Trái dừa sáp có giá trị dinh dưỡng và kinh tế cao hơn dừa thường 10 – 20 lần (Phạm Thị Phương Thúy và ctv, 2016). Theo Balasubramanian et al. (1976), hàm lượng galactomannans trong dừa sáp cao gấp 5 lần so với dừa bình thường. Theo Areza-Ubaldo et al. (2003), chiết xuất được galactomanan từ dừa sáp là nguyên liệu cho rất nhiều ngành công nghiệp chế biến thực phẩm (màng bao thực phẩm), dược phẩm (màng bao thuốc, gạc bao vết thương, thành phần trong các gel agarose, polyacrylamide) và mỹ phẩm.

Công nghệ nuôi cấy phôi được De Guzman phát triển thành công vào những năm 1960 sau một thập kỷ thử nghiệm (De Guzman et al., 1964). Công nghệ de Guzman đã được cải tiến tại Trung tâm nghiên cứu dừa của Cơ quan Dừa Philippines (De Guzman & Manuel, 1977) và mở đường cho việc sản xuất thương mại cây giống phôi ở Philippines (Rillo, 1999). Tuy nhiên, đến nay tỷ lệ thành công thấp do các nguyên nhân sau: 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) và khả năng thích nghi ở vườn ươm thấp. Trong đó, có khoảng từ 15 – 20% phôi nảy mầm yếu và 13 -17% cây có rễ phát triển kém trong giai đoạn phòng thí nghiệm (Ngô Thị Kiều Dương, 2013). Có nhiều nghiên cứu đã chứng minh rằng sử dụng các chất kích thích sinh trưởng thực vật (nhóm auxin, cytokinin) ở các nồng độ khác nhau sẽ cho ra hiệu quả khác nhau trong việc kích thích ra rễ (Nwite et al., 2017). Vì vậy, nghiên cứu sự phát triển của những cây phôi có bộ rễ phát triển kém nhằm nâng cao tỷ lệ thành công quy trình nhân giống dừa sáp bằng phương pháp nuôi cấy phôi là cần thiết.

## 2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Phương tiện và điều kiện thí nghiệm

– Địa điểm nghiên cứu: thí nghiệm được bố trí trong phòng thí nghiệm với nhiệt độ phòng  $28 \pm 2^\circ\text{C}$ . Che tối cho giai đoạn phôi nảy mầm và chiếu sáng với cường độ 2.000 – 2.500 lux giai đoạn tạo rễ và phát triển thân lá trước khi ra vườn ươm.

– Phôi dừa sáp thí nghiệm: chọn trái dừa có độ tuổi từ 12,5 -13 tháng (tính từ lúc đậu trái đến thu hoạch), phôi được lấy ra khỏi trái bằng máy khoan

sử dụng mũi khoan kính đường kính 27 mm. Phôi sau khi lấy khỏi trái có lớp cơm dừa bao xung quanh và phần gáo dừa bên trên sẽ được cho vào beaker (cốc) thủy tinh đã được khử trùng sạch. Giai đoạn tách vỏ dừa, khoan lấy phôi được thực hiện điều kiện phòng thí nghiệm thông thường. Phôi dừa đựng trong beaker sau tách khỏi trái được mang vào tủ cấy vô trùng. Khử trùng phôi dừa bằng cồn 70%. Thời gian khử trùng 15 phút. Rót phần cồn sau khử trùng vào cốc khác. Dùng nhíp y tế gấp phôi dừa ra đĩa petri vô trùng, dùng dao mổ y tế tách bỏ phần gáo dừa và cơm dừa bao quanh phôi, cho phôi cho vào ống nghiệm (kích thước: 2,5cm x 180 cm, bịt kính bằng bọc kính đã tuyệt trùng) chứa môi trường cấy phôi đã được hấp khử trùng trước đó. Sau khoảng 1 tháng các phôi nảy mầm sẽ được chọn để tiến hành bố trí thí nghiệm.

– Môi trường nuôi cấy phôi giai tạo rễ: Sử dụng môi trường Y3 cải tiến, bổ sung 40 g/L sucrose, 1g/l than hoạt tính, điều chỉnh ở pH = 5,6, chai thủy tinh cổ cao thể tích 750 ml chứa 250 ml môi trường và mang hấp khử trùng ở nhiệt độ  $121^\circ\text{C}$  thời gian 20 phút.

### 2.2. Phương pháp

– **Thí nghiệm 1:** Ảnh hưởng của hàm lượng đường sucrose lên khả năng phát triển cây phôi dừa sáp giai đoạn tạo rễ *in-vitro*

Các cây phôi được tách cho vào môi trường Y3 cải tiến bổ sung lượng đường khác nhau vào trong môi trường Y3 cải tiến. Thí nghiệm được bố trí thể thức hoàn toàn ngẫu nhiên gồm 4 nghiệm thức, 5 lần lặp lại với mỗi lần lặp lại là 3 mầm.

Nghiệm thức 1: 20 g đường/L môi trường

Nghiệm thức 2: 40 g đường/L môi trường

Nghiệm thức 3: 60 g đường/L môi trường

Nghiệm thức 4: 80 g đường/L môi trường

– **Thí nghiệm 2:** Ảnh hưởng của hàm lượng agar lên khả năng phát triển cây phôi dừa sáp giai đoạn tạo rễ *in-vitro*

Các cây phôi ở giai đoạn 2 được tách cho vào môi trường Y3 cải tiến bổ sung lượng agar với các nồng độ khác nhau vào trong môi trường Y3 cải tiến. Thí nghiệm được bố trí thể thức hoàn toàn ngẫu nhiên gồm 4 nghiệm thức, 5 lần lặp lại với mỗi lần lặp lại là 3 mầm, được nuôi trong ống nghiệm.

Nghiệm thức 1: 0 g agar/L môi trường (đối chứng)

Nghiệm thức 2: 5 g agar/L môi trường

Nghiệm thức 3: 7 g agar/L môi trường

Nghiệm thức 4: 10 g agar/L môi trường

**Thí nghiệm 3:** Ảnh hưởng của nồng độ chất điều hòa sinh trưởng đến sự ra rễ của cây dừa sáp *in-vitro*

Các cây phôi được tách cho vào môi trường Y3 cải tiến, bổ sung NAA (đối chứng) và nghiên cứu bổ sung thêm chất IAA với các nồng độ khác nhau vào trong môi trường Y3 cải tiến. Thí nghiệm được bố trí khối hoàn toàn ngẫu nhiên gồm 6 nghiệm thức, 5 lần lặp lại với mỗi lần lặp lại là 1 mầm.

Nghiệm thức 1: 2 mg/L NAA (đối chứng)

Nghiệm thức 2: 1 mg/L IAA

Nghiệm thức 3: 2 mg/L IAA

Nghiệm thức 4: 3 mg/L IAA

Nghiệm thức 5: 4 mg/L IAA

Nghiệm thức 6: 5 mg/L IAA

**Thí nghiệm 4:** Nghiên cứu bổ sung môi trường kích thích ra rễ, tạo lá khi cây phôi không ngập trong môi trường

Đối với các cây phôi có chiều dài rễ vượt trội, khiến cây phôi không ngập trong môi trường và lá không phát triển, các cây phôi sẽ được bổ sung thêm môi trường dạng lỏng với các nồng độ NAA khác nhau vào trong môi trường Y3 cải tiến. Thí nghiệm được bố trí thể thức hoàn toàn ngẫu nhiên gồm 5 nghiệm thức, 5 lần lặp lại với mỗi lần lặp lại là 4 mầm.

Nghiệm thức 1: Không bổ sung môi trường (Đối chứng)

Nghiệm thức 2: 2 mg/L NAA

Nghiệm thức 3: 3 mg/L NAA

Nghiệm thức 4: 4 mg/L NAA

Nghiệm thức 5: 5 mg/L NAA

**Thí nghiệm 5:** Nghiên cứu cắt rễ và cấy lại cho môi trường ngập rễ để kích thích ra rễ, lá khi cây phôi không ngập trong môi trường

Đối với các cây phôi ở giai đoạn 2 có chiều dài rễ vượt trội, phôi không ngập trong môi trường và lá không phát triển, cây được lấy ra khỏi chai cắt rễ và cấy vào môi trường thí nghiệm. Thí nghiệm được bố trí thể thức hoàn toàn ngẫu nhiên gồm 5 nghiệm thức, 5 lần lặp lại với mỗi lần lặp lại là 4 mầm.

Nghiệm thức 1: Không cắt rễ (Đối chứng)

Nghiệm thức 2: Cắt rễ + 2 mg/L NAA

Nghiệm thức 3: Cắt rễ + 3 mg/L NAA

Nghiệm thức 4: Cắt rễ + 4 mg/L NAA

Nghiệm thức 5: Cắt rễ + 5 mg/L NAA

### 2.3. Chỉ tiêu theo dõi

Các thí nghiệm đều lấy các chỉ tiêu giống nhau: chiều dài rễ chính, số lượng rễ thứ cấp, rễ bên, chiều cao cây và số lá sau 3 tháng bố trí thí nghiệm.

### 2.4. Phương pháp xử lý số liệu

Các chỉ tiêu được theo dõi ghi nhận và tính toán trên phần mềm excel và phân tích thống kê bằng phần mềm Minitab version 16.

## 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### 3.1. Ảnh hưởng của hàm lượng đường sucrose lên khả năng phát triển cây phôi dừa sáp giai đoạn tạo rễ *in-vitro*

Theo Hew and Yong (1997), đường cung cấp carbohydrate là thành phần quan trọng đối với sự sinh trưởng và phát triển của thực vật *in-vitro*. Tuy nhiên, đường ở nồng độ cao, có thể độc hại và có thể ức chế sự sinh trưởng và phát triển của cây con (Silva, 2004). Kết quả thí nghiệm được trình bày ở Bảng 1 cho thấy sử dụng môi trường Y3 cải tiến kết hợp với 40 g đường/lít cho hiệu quả tốt nhất với chiều dài rễ chính là 12,6 cm, có trung bình 3,5 rễ thứ cấp, 3,6 lá và chiều cao cây đạt 25,1 cm sau khi cấy đạt chuẩn ra vườn ươm (có ít nhất 3 lá mới; có rễ thứ cấp, theo Nguyễn Thị Bích Hồng và ctv. (2014). Khi tăng liều lượng đường, chiều dài rễ chính, số lượng rễ thứ cấp, số lá, chiều cao cây đều có xu hướng giảm và phù hợp với nghiên cứu của Novero et al. (2010).

Đối với số lượng rễ bên, nghiệm thức 2 (40 g đường/L môi trường) và nghiệm thức 3 (60 g đường/L môi trường) đều có số lượng rễ bên đạt trên 100% các cây ở nghiệm thức có trên 10 rễ (Bảng 2). So với nghiên cứu của Trương Quốc Ánh và ctv. (2012), lượng đường sử dụng trong nghiên cứu này ít hơn 20 g/L môi trường. Ngoài ra, Trương Quốc Ánh và ctv. (2012) cho rằng sử dụng lượng đường là 60 g/L ở giai đoạn tạo rễ nhưng chiều cao cây chỉ đạt 9,57 cm.

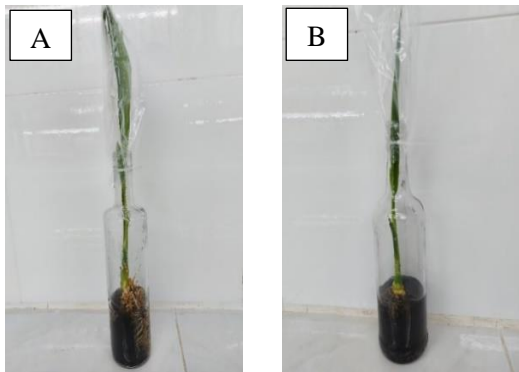
**Bảng 1. Ảnh hưởng của hàm lượng đường lên khả năng phát triển cây phôi dừa sáp giai đoạn *in-vitro* giai đoạn tạo rễ**

Nghiệm thức	Chiều dài rễ chính (cm)	Số lượng rễ thứ cấp	Số lá	Chiều cao cây (cm)
Y3 cải tiến + 20 g đường/L môi trường	5,1 <sup>c</sup> ± 0,7	0,1 <sup>c</sup> ± 0,3	2,0 <sup>b</sup> ± 0,4	7,7 <sup>c</sup> ± 0,8
Y3 cải tiến + 40 g đường/L môi trường	12,6 <sup>a</sup> ± 1,6	3,5 <sup>a</sup> ± 1,1	3,6 <sup>a</sup> ± 0,7	25,1 <sup>a</sup> ± 7,0
Y3 cải tiến + 60 g đường/L môi trường	12,3 <sup>a</sup> ± 1,5	3,1 <sup>a</sup> ± 0,9	3,3 <sup>a</sup> ± 0,7	23,6 <sup>a</sup> ± 5,0
Y3 cải tiến + 80 g đường/L môi trường	8,2 <sup>b</sup> ± 0,8	1,3 <sup>b</sup> ± 0,6	1,4 <sup>c</sup> ± 0,5	19,8 <sup>b</sup> ± 4,5
CV (%)	20,8	16,0	36,0	38,2

Ghi chú: - các ký tự a, b, c và d để so sánh thống kê giữa các nghiệm thức, hai giá trị có cùng ít nhất 1 ký tự giống nhau thì không khác biệt thống kê ở mức ý nghĩa P=0.05

**Bảng 2. Ảnh hưởng của hàm lượng đường sucrose lên số lượng rễ bên của cây dừa Sáp *in-vitro* trong môi trường Y3 cải tiến**

Nghiệm thức	Phần trăm rễ bên (%)		
	Dưới 5 rễ	Từ 5 – 10 rễ	Trên 10 rễ
Y3 cải tiến + 20 g đường/L môi trường	86,7	13,3	0
Y3 cải tiến + 40 g đường/L môi trường	0	0	100
Y3 cải tiến + 60 g đường/L môi trường	0	0	100
Y3 cải tiến + 80 g đường/L môi trường	73,3	20	6,7



**Hình 1. Cây dừa trong môi trường Y3 cải tiến: 40 g đường/L (A) so với 60 g đường/L (B)**

**3.2. Ảnh hưởng của hàm lượng agar lên khả năng phát triển cây phôi dừa sáp giai đoạn tạo rễ *in-vitro***

Đối với nuôi cấy tĩnh, nếu sử dụng môi trường lỏng, mô có thể bị chìm và sẽ chết vì thiếu oxy, rễ kém phát triển khi cây không được cố định và môi trường xung quanh rễ không ổn định. Để tránh tình trạng này, môi trường nuôi cấy được làm đặc lại bằng agar và mô được cấy trên bề mặt của môi trường. Agar thường được sử dụng ở nồng độ 6 g đến 10 g (Trần Văn Minh, 2017). Bảng 3 cho thấy lượng agar thích hợp cho cây dừa Sáp cấy phôi giai đoạn tạo rễ là 5 g/L môi trường cho chiều dài rễ chính là 13 cm, số lượng rễ thứ cấp là 3,7 rễ, số lá trung bình là 2,9 lá, chiều cao cây trung bình là 27,5 cm.

**Bảng 3. Ảnh hưởng của hàm lượng agar lên khả năng phát triển cây phôi dừa sáp giai đoạn *in-vitro***

Nghiệm thức	Chiều dài rễ chính (cm)	Số lượng rễ thứ cấp	Số lá	Chiều cao cây (cm)
Y3 cải tiến (0 g agar/L môi trường, Đối chứng)	5,5 <sup>d</sup> ± 1,1	1,4 <sup>b</sup> ± 0,6	1,3 <sup>c</sup> ± 0,5	11,4 <sup>b</sup> ± 2,5
Y3 cải tiến + 5 g agar/L môi trường	13,0 <sup>a</sup> ± 1,2	3,7 <sup>a</sup> ± 0,9	2,9 <sup>a</sup> ± 0,6	27,5 <sup>a</sup> ± 5,7
Y3 cải tiến + 7 g agar/L môi trường	10,5 <sup>b</sup> ± 1,1	1,5 <sup>b</sup> ± 0,6	2,1 <sup>ab</sup> ± 0,6	26,0 <sup>a</sup> ± 6,7
Y3 cải tiến + 10 g agar/L môi trường	6,9 <sup>b</sup> ± 1,0	1,2 <sup>b</sup> ± 0,6	1,5 <sup>c</sup> ± 0,5	24,0 <sup>a</sup> ± 6,9
CV (%)	34,4	30,0	20,0	30,4

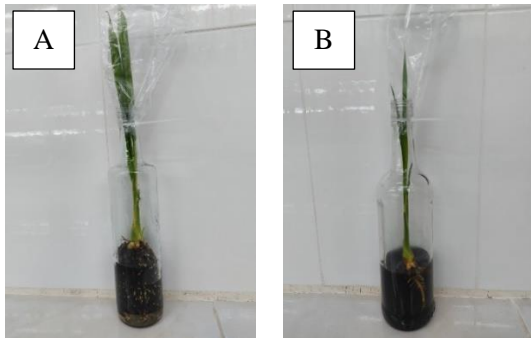
Ghi chú: - các ký tự a, b, c và d để so sánh thống kê giữa các nghiệm thức, hai giá trị có cùng ít nhất 1 ký tự giống nhau thì không khác biệt thống kê ở mức ý nghĩa P=0.05

Bảng 4 cho thấy nghiệm thức 2 (5 g agar/L môi trường) đạt 100% số cây có rễ bên trên 10 rễ và đạt

tiêu chuẩn ra vườn ươm. Trong khi đó, Muhammed et al. (2013) sử dụng 8 g/L agar cho giai đoạn này.

**Bảng 4. Ảnh hưởng của hàm lượng agar lên khả năng tạo rễ cây phôi dừa sấp giai đoạn *in-vitro***

Nghiệm thức	Dưới 5 rễ	Từ 5 – 10 rễ	Trên 10 rễ
Y3 cải tiến + 3 g agar/L môi trường	80	20	0
Y3 cải tiến + 5 g agar/L môi trường	0	0	100
Y3 cải tiến + 7 g agar/L môi trường	0	73,3	26,7
Y3 cải tiến + 10 g agar/L môi trường	53,3	40	6,7



**Hình 2. Cây dừa *in-vitro* phát triển trong môi trường Y3 cải tiến 5 g agar/L (A) và 10 g agar/L (B)**

**3.3. Ảnh hưởng của nồng độ chất điều hòa sinh trưởng đến sự ra rễ của cây dừa sấp *in-vitro***

Nghiên cứu của Nwite et al. (2017) trên dừa thường, bổ sung NAA 1,0 -1,5 mg/L trong môi trường tạo rễ là thích hợp. Trong khi đó, nghiên cứu của nhóm tác giả đối với các cây sau 4 tháng nhưng chiều dài rễ nhỏ hơn 5 cm sử dụng Y3 cải tiến + 3 mg/L IAA (Nghiệm thức 4: 3 mg/L IAA) là thích hợp với chiều dài rễ chính là 13,6 cm, số lượng rễ thứ cấp là 3,3 rễ, có 2,6 lá và chiều cao cây 22,7 cm đều cao hơn và khác biệt với các nghiệm thức còn lại (Bảng 5). Nguyên nhân có thể do nhóm nghiên cứu thực hiện trên dừa sấp còn Nwite et al. (2017) nghiên cứu trên cây dừa thường.

**Bảng 5. Nghiên cứu nồng độ chất điều hòa sinh trưởng kích thích ra rễ đối với các cây phôi sau 4 tháng nhưng chiều dài rễ nhỏ hơn 5 cm**

Nghiệm thức	Chiều dài rễ chính (cm)	Số lượng rễ thứ cấp	Số lá	Chiều cao cây (cm)
Y3 cải tiến + 2 mg/L NAA (đối chứng)	4,5 <sup>d</sup> ± 0,6	1,0 <sup>c</sup> ± 0,0	1,5 <sup>c</sup> ± 0,5	14,5 <sup>d</sup> ± 2,5
Y3 cải tiến + 1 mg/L IAA	5,4 <sup>cd</sup> ± 1,4	1,0 <sup>c</sup> ± 0,0	1,5 <sup>c</sup> ± 0,5	16,4 <sup>c</sup> ± 2,1
Y3 cải tiến + 2 mg/L IAA	6,1 <sup>c</sup> ± 1,3	1,3 <sup>c</sup> ± 0,6	1,6 <sup>c</sup> ± 0,5	19,8 <sup>b</sup> ± 1,9
Y3 cải tiến + 3 mg/L IAA	13,6 <sup>b</sup> ± 1,7	3,3 <sup>c</sup> ± 1,0	2,6 <sup>a</sup> ± 0,5	22,7 <sup>a</sup> ± 2,7
Y3 cải tiến + 4 mg/L IAA	12,7 <sup>b</sup> ± 1,3	2,3 <sup>c</sup> ± 0,7	2,3 <sup>ab</sup> ± 0,6	20,12 <sup>b</sup> ± 2,8
Y3 cải tiến + 5 mg/L IAA	12,3 <sup>b</sup> ± 2,1	2,2 <sup>b</sup> ± 0,9	2,1 <sup>b</sup> ± 0,7	16,8 <sup>c</sup> ± 1,4
CV (%)	28,6	25,7	17,4	26,5

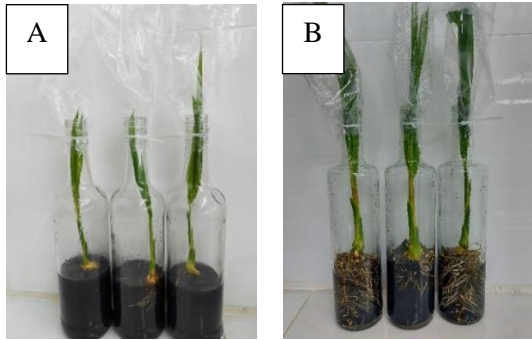
Ghi chú: - các ký tự a, b, c và d để so sánh thống kê giữa các nghiệm thức, hai giá trị có cùng ít nhất 1 ký tự giống nhau thì không khác biệt thống kê ở mức ý nghĩa P=0.05

Bảng 6 cho thấy nghiệm thức 4 có số lượng rễ bên cao nhất với 86,7% cây có số lượng rễ bên trên 10 và 13,3% cây có từ 5 đến 10 rễ, kể đến là nghiệm

thức 5 với 73,3% cây có rễ bên trên 10 rễ. nghiệm thức có số lượng rễ bên thấp nhất là nghiệm thức 1 với 73,3% cây có rễ bên thấp hơn 5 và chỉ có 26,7% cây có rễ bên từ 5 đến 10.

**Bảng 6. Ảnh hưởng của nồng độ chất điều hòa sinh trưởng đến sự tạo rễ bên của cây dừa sấp *in-vitro***

Nghiệm thức	Dưới 5 rễ	Từ 5 – 10 rễ	Trên 10 rễ
Y3 cải tiến + 2 mg/L NAA (đối chứng)	73,3	26,7	0
Y3 cải tiến + 1 mg/L IAA	60	26,7	13,3
Y3 cải tiến + 2 mg/L IAA	53,3	33,4	13,3
Y3 cải tiến + 3 mg/L IAA	0	13,3	86,7
Y3 cải tiến + 4 mg/L IAA	0	26,7	73,3
Y3 cải tiến + 5 mg/L IAA	20	60	20



**Hình 3. Cây ở nghiệm thức đối chứng (A) và nghiệm thức Y3 cải tiến + 3 mg/L IAA (B)**

**3.4. Nghiên cứu bổ sung môi trường kích thích ra rễ, tạo lá khi cây phôi không ngập trong môi trường**

Bảng 7 cho thấy khi phôi không ngập trong môi trường thì cây sẽ phát triển lá chậm, nhiều trường hợp cây không phát triển lá. Cụ thể, ở nghiệm thức không bổ sung môi trường chiều dài rễ vẫn không thay đổi từ trước đến sau thí nghiệm là 10,4 cm, số lượng rễ thứ cấp thấp chỉ khoảng 1,4 rễ, gần như không tạo được lá và chiều cao cây khá thấp 6,5 cm. Ở nghiệm thức tối ưu 3 mg/L NAA, cây có chiều dài rễ 14,7 cm, số lượng rễ thứ cấp nhiều 4,7 rễ, tạo được gần 3 lá, và chiều cao cây đạt 28,9 cm.

**Bảng 7. Kết quả bổ sung môi trường kích thích ra rễ, tạo lá khi cây phôi không ngập trong môi trường ảnh hưởng đến sự ra rễ, lá và cao cây của cây dừa Sáp *in-vitro***

Nghiệm thức	Chiều dài rễ chính (cm)	Số lượng rễ thứ cấp	Số lá	Chiều cao cây (cm)
Y3 cải tiến (không bổ sung môi trường, đối chứng)	10,4 <sup>c</sup> ± 1,1	1,4 <sup>d</sup> ± 0,7	0,3 <sup>c</sup> ± 0,5	6,5 <sup>d</sup> ± 1,0
Y3 cải tiến + 2 mg/L NAA	12,7 <sup>b</sup> ± 1,1	3,7 <sup>b</sup> ± 0,9	2,3 <sup>b</sup> ± 0,6	25,1 <sup>c</sup> ± 3,9
Y3 cải tiến + 3 mg/L NAA	14,7 <sup>a</sup> ± 1,1	4,7 <sup>a</sup> ± 1,2	2,9 <sup>a</sup> ± 0,6	28,9 <sup>a</sup> ± 3,1
Y3 cải tiến + 4 mg/L NAA	13,6 <sup>b</sup> ± 1,0	2,8 <sup>c</sup> ± 1,0	2,5 <sup>b</sup> ± 0,6	27,4 <sup>ab</sup> ± 1,9
Y3 cải tiến + 5 mg/L NAA	12,9 <sup>b</sup> ± 1,8	2,7 <sup>c</sup> ± 0,9	2,3 <sup>b</sup> ± 0,5	25,8 <sup>bc</sup> ± 2,9
CV (%)	13,9	24,7	13,5	29,6

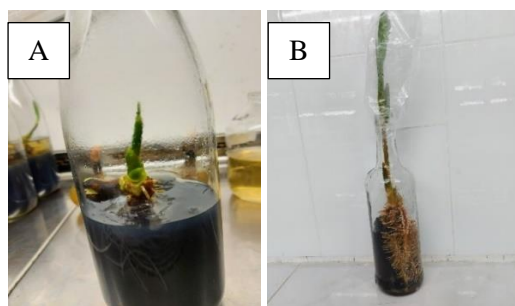
Ghi chú: - các ký tự a, b, c và d để so sánh thống kê giữa các nghiệm thức, hai giá trị có cùng ít nhất 1 ký tự giống nhau thì không khác biệt thống kê ở mức ý nghĩa P=0.05

Bảng 8 cho thấy nghiệm thức 3 có số rễ bên trên 10 là 100%, kể đến là nghiệm thức 4, 5 và 6 với tỷ lệ lần lượt là 66,6%, 60% và 53,3%. Trong khi nghiệm thức 1 số cây có rễ bên dưới 5 chiếm 86,7%.

Qua đó, chứng minh được hiệu quả của phương pháp bổ sung môi trường cho cây dừa sáp *in-vitro* khi rễ không ngập trong môi trường. Tuy nhiên, cần bổ sung môi trường sớm để cây phát triển tốt nhất.

**Bảng 8. Kết quả bổ sung môi trường kích thích ra rễ, tạo lá khi cây phôi không ngập trong môi trường ảnh hưởng đến sự ra rễ bên của cây dừa Sáp *in-vitro***

Nghiệm thức	Dưới 5 rễ	Từ 5 – 10 rễ	Trên 10 rễ
Y3 cải tiến (đối chứng)	86,7	13,3	0
Y3 cải tiến + 2 mg/L NAA	0	46,7	53,3
Y3 cải tiến + 3 mg/L NAA	0	0	100
Y3 cải tiến + 4 mg/L NAA	6,7	26,7	66,6
Y3 cải tiến + 5 mg/L NAA	0	40	60



**Hình 4. Cây dừa được bổ sung môi trường Y3 cải tiến + 3 mg/L NAA (B) phát triển tốt hơn hẳn so với nghiệm thức đối chứng (A)**

**3.5. Nghiên cứu cắt rễ để kích thích ra rễ, lá đối với các cây phôi không ngập trong môi trường**

Như nói ở trên, khi phôi không ngập trong môi trường thì cây sẽ phát triển lá chậm. Nghiên cứu cho thấy khi cây phôi không còn ngập trong môi trường, tiến hành lấy cây ra khỏi môi trường, cắt rễ sau đó cấy lại vào môi trường Y3 cải tiến kết hợp 3 mg/L NAA cho kết quả tốt nhất và khác biệt với các nghiệm thức còn lại với chiều dài rễ chính 13,6 cm, số lượng rễ thứ cấp là 3,7 rễ, đạt khoảng 3 lá, chiều cao cây đạt 28,2 cm (Bảng 10).

**Bảng 10. Kết quả cắt rễ và cấy lại cho môi trường ngập rễ ảnh hưởng đến sự ra rễ, lá và cao cây của cây dừa sấp *in-vitro***

Nghiệm thức	Chiều dài rễ chính (cm)	Số lượng rễ thứ cấp	Số lá	Chiều cao cây (cm)
Không cắt rễ (ĐỐI CHỨNG)	10,1 <sup>d</sup> ± 1,0	1,2 <sup>c</sup> ± 0,6	0,5 <sup>c</sup> ± 0,5	5,9 <sup>d</sup> ± 0,7
Cắt rễ + 2 mg/L NAA	11,6 <sup>c</sup> ± 0,9	2,7 <sup>b</sup> ± 0,7	2,2 <sup>b</sup> ± 1,4	22,3 <sup>c</sup> ± 2,9
Cắt rễ + 3 mg/L NAA	14,4 <sup>a</sup> ± 1,3	3,7 <sup>a</sup> ± 1,2	3,3 <sup>a</sup> ± 0,7	28,2 <sup>a</sup> ± 2,6
Cắt rễ + 4 mg/L NAA	12,8 <sup>b</sup> ± 1,6	3,2 <sup>bc</sup> ± 1,0	2,4 <sup>b</sup> ± 0,6	27,4 <sup>ab</sup> ± 1,9
Cắt rễ + 5 mg/L NAA	11,8 <sup>c</sup> ± 1,1	3,1 <sup>bc</sup> ± 0,9	2,1 <sup>b</sup> ± 0,7	26,3 <sup>b</sup> ± 2,1
CV (%)	16,7	18,9	17,3	26,3

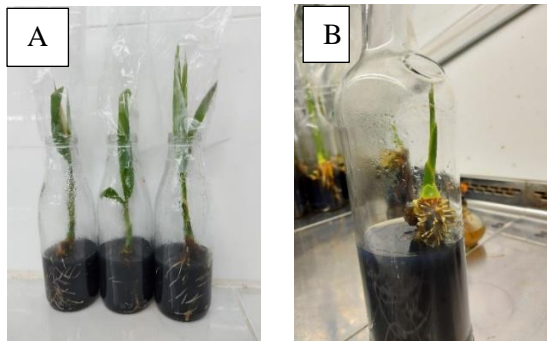
Ghi chú: - các ký tự a, b, c và d để so sánh thống kê giữa các nghiệm thức, hai giá trị có cùng ít nhất 1 ký tự giống nhau thì không khác biệt thống kê ở mức ý nghĩa P=0.05

Bảng 11 cho thấy 100% số cây có số lượng rễ bên trên 10 rễ khi cây đủ tiêu chuẩn ra vườn ươm.

Trong khi đó, ở nghiệm thức không tác động (đối chứng), chiều cao cây rất thấp khoảng 6 cm và không tạo được lá.

**Bảng 11. Kết quả cắt rễ và cấy lại cho môi trường ngập rễ ảnh hưởng đến số lượng rễ bên của cây dừa sấp *in-vitro***

Nghiệm thức	Dưới 5 rễ	Từ 5 – 10 rễ	Trên 10 rễ
Không cắt rễ (ĐỐI CHỨNG)	86,7	13,3	0
Cắt rễ + 2 mg/L NAA	0	13,3	86,7
Cắt rễ + 3 mg/L NAA	0	0	100
Cắt rễ + 4 mg/L NAA	0	6,7	93,3
Cắt rễ + 5 mg/L NAA	0	20	80



**Hình 5. Cây ở nghiệm thức Cắt rễ và cấy vào môi trường Y3 cải tiến + 3 mg/L NAA (A) so với nghiệm thức đối chứng (B)**

#### 4. KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

##### 4.1. Kết luận

Kết quả nghiên cứu cho thấy ở giai đoạn tạo rễ, môi trường Y3 cải tiến kết hợp với 40 g/L đường và 5 g/L agar là thích hợp cho cây dừa sấp cấy phôi phát triển.

Đối với các cây phôi 4 tháng tuổi có chiều dài rễ nhỏ hơn 5 cm thì tiếp tục cấy chuyển vào môi trường Y3 cải tiến với nồng độ 3 mg/L IAA là thích hợp. Đối với các cây phôi có gốc rễ nhô cao hơn môi trường thì có 2 phương pháp: bổ sung thêm môi

trường Y3 cải tiến + 3 mg/L NAA đến khi ngập cỏ rễ và cắt rễ + môi trường Y3 cải tiến + 3 mg/L NAA. Tuy nhiên phương pháp cắt rễ sẽ kéo dài thời gian hơn để cây đủ tiêu chuẩn ra cây.

##### 4.2. Kiến nghị

Tiếp tục theo dõi sự sinh trưởng và phát triển cây giống dừa sấp cấy phôi giai đoạn thuần dưỡng nhằm hoàn thiện quy trình nhân giống dừa sấp bằng phương pháp cấy phôi.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

Areza-Ubaldo, M. B. B., Rillo, E. P., Cueto, C. A., & Banao, G. (2003). Application of the improved embryo culture protocol of commercial production of Makapuno seedlings. *Philippine Journal of Science*, 132(1), 1-12.

Balasubramanian, K., Sothary, R. D., & Hoover, A. A. (1976). Polysaccharide of the kernel of maturing and matured coconut *J. Food Sci.*, 41, 1370-73

Cedo, M. L. O., de Guzman, E. V., & Rimando, T. G. (1984). Controlled pollination of embryo-cultured makapuno coconut (*Cocos nucifera* L.). *Philippine Agriculture*, 67, 100-104.

De Guzman, E.V. & Manuel, G. C. (1977). Improved root growth in embryo and seedlings culture of coconut 'Makapuno' by the

- incorporation of charcoal in the growth medium. *PJCS*, 11, 35–39.
- De Guzman, E.V., and Del Rosario, A. G. (1964). The growth and development in soil of makapuno seedlings cultured *in-vitro*. *National Research Council of the Philippines, Research Bulletin*, 29, 1-16.
- Hew, C. S., and Yong, J. W. H. (1997). The physiology of tropical orchids in relation to the industry. *World Scientific, Singapore*.
- Islam, M. N., Azad, A. K., Namuco, L. O., Borromeo, T. H., Cedo, M. L. O., & Aguilar, E. A. (2013). Morphometric characterization and diversity analysis of a makapuno coconut population in U.P. Los Banos, *Pakistan Journal of Agricultural Research*, 26, 254-264.
- Muhammed, N., Nyamota, R., Hashim, S., & Malinga, J. N. (2013). Zygotic embryo in vitro culture of *Cocos nucifera* L.(sv. East African Tall variety) in the coastal lowlands of Kenya. *African Journal of Biotechnology*, 12(22), 3435-3440.
- Ngô Thị Kiều Dương. (2013). Báo cáo kết quả thực hiện Nhiệm vụ “Khai thác và phát triển nguồn gen cây dừa”. Bộ Công Thương, Việt Nam.
- Nguyễn Thị Bích Hồng, Ngô Thị Kiều Dương, Nguyễn Thị Mai Phương & Phạm Phú Thịnh. (2014). *Nhân giống dừa sáp bằng kỹ thuật nuôi cấy phôi*. <http://hiephoiduabentre.com.vn/index.php?Module=Content&Action=view&id=4633&Itemid=2>
- Novero, A., Delima, A. G., Acaso, J., & Baltores, L. M. (2010). The Influence of Osmotic Concentration of Media on the Growth of Sago Palm (*Metroxylon sagu* Rottb.) in vitro'. *Australian Journal of Crop Science*, 4(6), 453-456.
- Nwite, P. A., Ikhajiagbe, B., & Owoicho, I. (2017). Germination response of coconut (*Cocos nucifera* L.) zygotic embryo. *Journal of Applied Sciences and Environmental Management*, 21(6), 1019-1021.
- Phạm Thị Phương Thúy, Lê Trúc Linh, Đoàn Văn Hậu & Nguyễn Ngọc Trai. (2016). Báo cáo tổng kết đề tài “Nhân giống dừa sáp bằng phương pháp nuôi cấy phôi tại tỉnh Trà Vinh”.
- Rillo, E. P. (1999). Coconut embryo culture. In Oropeza, C., Verdeil, J.L., Ashburner, G.R., Cardeña, R., & Santamaria, J.M., (Eds.), *Current Advances in Coconut Biotechnology* (pp. 279-288). Springer, Dordrecht.
- Silva, J. A. (2004). The effect of carbon source on in vitro organogenesis of chrysanthemum thin cell layers. *Bragantia*, 63(2), 165-177.
- Trần Văn Minh. (2017). *Giáo trình Nuôi cấy mô tế bào thực vật*. <http://www.ebook.edu.vn>
- Trương Quốc Ánh, Lương Thế Minh, Trương Thị Tú Anh & Trương Vĩnh Hải. (2012). Nhân giống In-vitro cây dừa sáp (Makapuno coconut). *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển nông thôn*, 20, 12-18.