



Australian Government

Australian Centre for
International Agricultural Research

Final report

Hoạt động nghiên cứu và phát triển quy mô nhỏ

SPA	Xây dựng quy trình nuôi cấy phôi mầm và kỹ thuật ghép phôi phục vụ công tác di chuyển nguồn gen và sản xuất cây con các giống dưa chất lượng cao
Ngày xuất bản:	Tháng 8 năm 2008
Tác giả:	Tiến sỹ Stephen W. Adkins Khoa Khoa học về Đất, Cây trồng và Lương thực - Đại học Queensland
Đồng tác giả Cộng tác viên Cơ quan phối hợp	Bà Erlinda Rillo Ông Osmundo Orense Trung tâm nghiên cứu dưa Albay - Philippin
Phê chuẩn :	Les Baxter
Dự án số:	FR2008-19a [HORT/2006/006]
Số đăng ký:	978 1 921434 78 5
Nhà xuất bản:	ACIAR GPO Box 1571 Canberra ACT 2601 Australia

Tài liệu này được xuất bản bởi ACIAR ABN 34 864 955 427. Chúng tôi đã hết sức chú ý để đảm bảo sự chính xác của thông tin trong ấn phẩm này. Tuy nhiên, ACIAR không chịu trách nhiệm về sự chính xác và đầy đủ của các thông tin hoặc các ý kiến nêu trong tài liệu này. Quý vị nên nêu ra các yêu cầu của chính mình trước khi đưa ra các quyết định liên quan đến lợi ích của quý vị. © Tác phẩm này đã được cấp bản quyền Liên bang Úc năm 2008. Về lâu dài, bất kể ai sử dụng phải được sự cho phép theo Luật Bản Quyền 1968, không được sao chép bất cứ phần nào của Quy trình nếu chưa được Liên bang cho phép bằng văn bản. Các yêu cầu và kiến nghị liên quan đến sử dụng Bản quyền sản phẩm, nên gửi đến Tổng cục Quản lý về Bản quyền của Liên bang - Robert Garran Offices, National Circuit, Barton ACT 2600 hoặc cung cấp thông tin theo địa chỉ <http://www.ag.gov.au/cca>.

Nội dung:

1	Lời cảm ơn	3
2	Tóm tắt.....	3
3	Giới thiệu tổng quan.....	4
4	Quy trình nuôi cấy phôi mầm	5
5	Phát triển kỹ thuật ghép phôi mầm	5
6	Những vấn đề nảy sinh và lợi ích đạt được	9
7	Kết luận và Khuyến nghị.....	11
8	Tài liệu tham khảo.....	12
9	Phụ lục.....	13
	Phụ lục 1: Cẩm nang nuôi cấy phôi mầm	13
1	Giới thiệu.....	14
2	Mục tiêu	15
3	Nguyên vật liệu, trang thiết bị và cơ sở vật vật chất	15
3.1	Giống.....	15
3.2	Trang thiết bị	15
3.3	Môi trường và hóa chất nuôi cấy	16
3.4	Điều kiện nuôi cấy.....	17
4	Các bước tiến hành	17
4.1	Công tác chuẩn bị, hóa chất và môi trường nuôi cấy	17
4.2	Chuẩn bị vật liệu nuôi cấy	17
4.3	Quy trình.....	18
5	Quan sát	21
6	Kết quả.....	22
7	Ứng dụng với các giống dưa đột biến	22
8	Vấn đề an toàn.....	23
9	Tài liệu tham khảo	23
10	Sơ đồ quy trình.....	24

1 Lời cảm ơn

Tất cả các thành viên của dự án do ACIAR tài trợ về nuôi cấy mô dừa phục vụ nhân giống vô tính và trao đổi nguồn gen an toàn (HORT/1998/061- CS/1998/061 trước đây) được ghi nhận đã đóng góp vào bản thảo quy trình nuôi cấy phôi mầm dừa. Các chuyên gia này công tác tại Viện Dừa Cacao, PNG (Tiến sỹ Mathias Faure và Alfred Kembu), Viện nghiên cứu Dừa và cây thân cọ Indonesia, Indonesia (Tiến sỹ Hengky Novatianto và Bà Nurhaini Mashud), Viện Cây tinh dầu, Việt Nam (Bà Vũ Thị Mỹ Liên), Trường Đại học Tổng hợp Philippin ở Los Banos, Viện Giống cây trồng, Philippin (Tiến sỹ Pablito Magdalita, Tiến sỹ Olivia Damasco). Đặc biệt, ghi nhận những đóng góp quan trọng của Tiến sỹ Yohannes Samosir, Đại học Queensland, cho dự án nghiên cứu về cây dừa trước đây và hiện tại.

2 Tóm tắt

Việc tái trồng lại (trẻ hóa) các cây dừa già ở khu vực Châu Á Thái Bình Dương hiện nay đang là mối quan tâm lớn đối với các quốc gia sản xuất dừa. Việc trồng lại đòi hỏi phải thu thập và chia sẻ nguồn gen dừa hiện có giữa các vùng hoặc tạo ra các loại giống mới có chất lượng cao và có thể thích nghi với điều kiện ở từng địa phương. Công tác thu thập và phân phối nguồn gen dừa được tiến hành dựa trên kỹ thuật nuôi cấy phôi để tránh việc vận chuyển các trái cây lớn và cũng hạn chế được nguy cơ lây lan sâu hại và bệnh hại có nguồn gốc từ quả. Tuy nhiên, cách thức nuôi cấy phôi mầm dừa hiện nay chưa có hiệu quả cao. Do vậy cần phải có phương pháp nuôi cấy phôi mầm mới ưu việt hơn. Phương pháp mới này cũng được mong đợi để hỗ trợ sản xuất các giống dừa có mùi thơm, giá trị cao được công nhận gần đây và các giống dừa nổi tiếng như Kopyor và Makapuno.

Thông qua sự hỗ trợ của ACIAR, một phương pháp kỹ thuật nuôi cấy phôi mầm dừa mới đã ra đời và phát triển (Dự án HORT/1998/061 - CS/1998/061 trước đây). Mục đích của dự án này nhằm đưa ra một bản thảo quy trình thực hiện kỹ thuật mới này. Mục tiêu thứ hai của dự án này là nhằm phát triển một kỹ thuật ghép phôi mầm để có thể sản xuất ra cây giống các loại dừa có giá trị cao một cách nhanh nhất.

Kết quả từ Dự án ACIAR trước đó (HORT/1998/061 - CS/1998/061 trước kia) đã được thu thập và tổng hợp lại để xây dựng một bản thảo quy trình nuôi cấy phôi mầm mới. Bản thảo quy trình này đã trải qua một loạt các bước điều chỉnh cho phù hợp với quan điểm của các đối tác liên quan trong dự án ban đầu. Hiện nay, bản sửa đổi cuối cùng của quy trình này đã được ACIAR chuẩn bị sẵn sàng cho việc xuất bản bằng ba loại ngôn ngữ khác nhau (tiếng Anh, tiếng Indonesia và tiếng Việt). Quy trình này cũng sẽ được sử dụng trong nhiều phòng thí nghiệm trong đó có các phòng thí nghiệm thuộc các ngân hàng gen dừa quốc tế nằm trong mạng lưới gen di truyền dừa (COGENT) được đặt ở năm khu vực sản xuất dừa chính của thế giới.

Hợp phần thứ 2 của dự án hiện tại liên quan đến sự cải tiến kỹ thuật ghép phôi để có thể sản xuất nhanh cây giống của các loại dừa chất lượng cao. Hợp phần này của dự án được thực hiện ở Trung tâm nghiên cứu Albay (ARC) của Cơ quan quản lý Dừa Phillipines (PCA) và cũng liên quan đến việc sử dụng trang thiết bị phòng thí nghiệm và tập huấn cán bộ ở Đại học Queensland.

Một số thí nghiệm được thực hiện ở ARC với sự nỗ lực cố gắng để cải tiến kỹ thuật ghép phôi mầm đã được xây dựng trước đó. Tuy nhiên, chưa có sự cải tiến nào đạt kết quả trong việc làm nảy mầm bất cứ hạt ghép nào. Điều này, nói lên sự thật rằng các trái cây sẵn có để dùng vào việc ghép chỉ là loại có chất lượng kém. Chất lượng trái cây đã bị giảm đáng kể do một loạt các trận bão lớn đổ bộ vào khu vực trong quá trình thực hiện công trình nghiên cứu này. Hiện nay công việc cải tiến kỹ thuật đang được triển khai trên các trái cây có chất lượng cao.

Đối tượng hưởng lợi chính của dự án là các đối tác dự án người Philippin (ARC). Năng lực, khả năng thực thi nghiên cứu về cây dừa của Trung tâm đã được tăng cường, cho phép công việc hiện nay có thể tiếp tục với một phần tài trợ nhỏ của quốc gia sau khi dự án hiện tại kết thúc. Đó là một cơ hội để Trung tâm phát huy những kết quả của dự án, đặc biệt là đưa việc nuôi cấy phôi mầm lên một giai đoạn phát triển tiếp theo, ví dụ: phát triển thành hàng hóa. Một nghiên cứu sản xuất thí điểm sẽ cần được thực hiện để tăng cường quy mô áp dụng, đặc biệt đối với các giống dừa chất lượng cao, như các giống dừa thơm Kopyor và Makapuno. Cùng thời gian này, năng lực của quốc gia đối tác cũng sẽ được cải thiện đáng kể khi một nguồn gen chung về các giống dừa này được thiết lập ở đó. Sau đó, Trung tâm có thể tổ chức triển lãm giới thiệu với các nhà đầu tư cá nhân và các chủ trang trại dừa về khả năng sinh lợi của biện pháp kỹ thuật này. Dự án thí điểm này sẽ tăng cường khả năng của dự án hiện tại (và các dự án khác do ACIAR tài trợ trước đây) với một tác động lớn hơn và có kết quả nhanh hơn.

3 Giới thiệu tổng quan

Dừa (*Cocos nucifera* L.) là loài quan trọng nhất trong nhóm thân cọ ở vùng khí hậu nhiệt đới nóng ẩm. Hơn 12 triệu ha dừa được trồng ở 90 quốc gia, phần nhiều ở vùng Châu Á Thái Bình Dương. Philippin có 3,2 triệu ha dừa ở các trang trại, là quốc gia sản xuất dừa lớn thứ hai thế giới (đứng đầu là Indonesia, 3,8 triệu ha). Loại cây này được trồng bởi hơn 50 triệu nông hộ trên toàn thế giới. Dừa được coi như là loại cây hữu ích của cuộc sống bởi vì có rất nhiều sản phẩm được sản xuất từ dừa và được sử dụng phổ biến trong cộng đồng địa phương. Ngoài các sản phẩm truyền thống từ dừa như: dầu dừa và cùi dừa, dừa có thể được sử dụng để sản xuất các sản phẩm thực ăn đa dạng và nhiều sản phẩm tiêu dùng (không phải là thức ăn) thân thiện với môi trường, các sản phẩm này có thể được tiêu dùng trong nước hoặc xuất khẩu. Ở một số quốc gia Thái Bình Dương, các sản phẩm từ cây dừa còn là nguồn duy nhất mang ngoại tệ về cho đất nước. Dừa cũng được coi là một yếu tố giúp ổn định các hệ thống nông nghiệp nơi đất đai xấu và môi trường tự nhiên không được thuận lợi, chẳng hạn như ở những khu vực ven biển.

Rất tiếc, năng suất dừa thế giới đã bị giảm trong nhiều thập kỷ vừa qua và gần 2/3 trang trại hiện nay đã qua thời kỳ thịnh vượng của mình và cần phải được thay thế bằng các loại giống mới phù hợp với điều kiện của từng địa phương, có sản lượng và chất lượng cao hơn. Việc này đòi hỏi sự ra đời của một loạt các chương trình sản xuất dừa giống chất lượng cao dựa vào tình trạng sẵn có của nguồn gen dừa thích hợp. Hiện nay, công tác thu thập và vận chuyển gen dừa được bảo đảm bằng việc sử dụng một kỹ thuật cấy ghép phôi mầm vì vận chuyển trái cây công kênh là không thực tế và không đảm bảo an toàn trong việc phòng chống mầm bệnh lây lan.

Thành công của kỹ thuật nuôi cấy phôi mầm hiện tại trên một loạt các giống dừa được xem là chưa đáng tin cậy. Do vậy, một phương pháp mới đã được phát triển (Dự án HORT/1998/061 do ACIAR tài trợ), với sự tham gia của các chuyên gia từ các nước Úc, Indonesia, Philippin, PNG và Việt Nam. Phương pháp mới này có hiệu quả hơn với khả năng tạo ra các giống cây con khỏe, chất lượng hơn, với tỷ lệ trồng sống ở trong đất ở mức cao. Phương pháp này cũng được ứng dụng để sản xuất cây giống từ các loại dừa chất lượng cao (đó là Makapuno, Kopyor và Aromatic), có giá trị kinh tế cao. Tuy vậy, hiện nay, phương pháp này chưa được ứng dụng rộng rãi với tất cả các quốc gia sản xuất dừa.

Kết quả quan trọng khác của dự án trước đây (Dự án HORT/1998/061 do ACIAR tài trợ) là công trình đi đầu trong việc thực hiện ghép phôi mầm. Với kỹ thuật đó, có thể cho phép đưa vào để thay thế các nhân quả mẹ bằng các phôi riêng biệt khác và chăm sóc thành những cây mầm giống khỏe mạnh. Tuy nhiên, tỷ lệ thành công của phương pháp này khi thực hiện lần đầu tiên ở Brisbane còn thấp. Điều này, chứng tỏ sự thật rằng các trái dừa có sẵn ở các siêu thị chỉ là loại có chất lượng kém và chỉ thu được kết quả tốt hơn nếu chúng ta sử dụng những trái dừa vừa mới thu hoạch ở các quốc gia sản xuất dừa. Một khi hoàn tất và triển khai ứng dụng kỹ thuật mới này có thể thay thế cho biện pháp nuôi cấy phôi được đánh giá là mất thời gian và tốn kém khi thực thi.

Một dự án mới do ACIAR tài trợ (HORT/2006/006) để triển khai, phát triển các kết quả của công trình nghiên cứu trước đó. Một cẩm nang về quy trình nuôi cấy phôi mầm mới đã được biên soạn bằng ba ngôn ngữ khác nhau (tiếng Anh, tiếng Indonesia và tiếng Việt) do ACIAR xuất bản và phân phối. Ngoài ra, dự án mới này còn thực hiện những nghiên cứu chuyên sâu hơn, sử dụng những giống dừa trồng ở địa phương và vừa mới được thu hoạch ở Philippin để nâng cấp, cải tiến kỹ thuật ghép phôi mầm dừa. Báo cáo này nhấn mạnh đến các kết quả đạt được từ hai nỗ lực mới trên.

4 Quy trình nuôi cấy phôi mầm

Các thông tin đưa ra trong suốt quá trình thực hiện của dự án trước đó (HORT/1998/061) đã được thu thập và tổng hợp lại trong bản thảo quy trình do ACIAR xuất bản như là một báo cáo kỹ thuật. Bản thảo này đã được sự tham gia đóng góp ý kiến và chỉnh sửa của tất cả những nhà nghiên cứu có liên quan đến dự án trước đó. Bản sửa đổi cuối cùng của bản thảo quy trình (Phụ lục 1) đã sẵn sàng được xuất bản bằng tiếng Anh, được biên dịch, xuất bản bằng các tiếng Indonesia và tiếng Việt và sẽ được phát hành, phân phối bởi ACIAR.

5 Phát triển kỹ thuật ghép phôi mầm

Phần này của dự án, bao gồm các nội dung công việc sau: 1) Xây dựng năng lực; 2) Đào tạo; và 3) Thí nghiệm để cải tiến, nâng cấp quy trình ghép phôi mầm.

Hợp phần xây dựng năng lực bao gồm việc đặt mua thiết bị, dụng cụ để triển khai thực hiện quy trình ghép phôi mầm (Hình 1 đến 3), hàng hóa (thiết bị, dụng cụ) được gửi tới ARC ở Philippin và thuê một trợ lý nghiên cứu để giúp thực hiện hợp phần nghiên cứu của dự án cũng ở ARC – Philippin.



Hình 1 a) Bàn khoan tạo lỗ có giá đỡ quả dừa; b) Máy hút bụi cầm tay



Hình 2. Phòng thí nghiệm ghép phôi mầm
a) Phòng chuẩn bị; b) Phòng sạch



Hình 3. Vị trí trong vườn ươm là nơi bảo quản, nuôi dưỡng mầm ghép

Trong khuôn khổ hợp phần đào tạo, ông Osmundo Oerense, một nhà khoa học cấp cao của ARC đã tham gia một chuyến thăm quan học tập 10 ngày (từ ngày 2 -12 tháng 10 năm 2006) ở Đại học Queensland (UQ) tìm hiểu thêm về kỹ thuật ghép phôi mầm. Như đã đề cập ở phần đầu, đây là một phương pháp mới, thực hiện lần đầu ở Đại học Queensland trong suốt quá trình triển khai dự án trước đó (HORT/1998/061) và có khả năng thay thế kỹ thuật nuôi cấy phôi ở trong các phòng thí nghiệm không thể thực hiện việc nuôi cấy mô.

Hợp phần thí nghiệm (tháng 8/2006 đến tháng 12/2007) được thực hiện ở ARC để cải tiến kỹ thuật ghép phôi mầm. Đầu tiên, một nghiên cứu sơ bộ được tiến hành để so sánh tỉ lệ nảy mầm của các quả dừa để vỏ (quả còn nguyên vẹn, như vẫn thường sử dụng trong vườn ươm dừa giống) với các quả dừa tách vỏ. Kết quả nghiên cứu cho thấy rằng hai loại quả dừa nêu trên cho tỷ lệ nảy mầm gần giống nhau, theo thứ tự lần lượt là 20% và 16%. Các tỷ lệ này là quá thấp khi so sánh với việc thực hiện cho nảy mầm một cách bình thường ở ARC (75 đến 85%). Tỷ lệ nảy mầm thấp này là do chất lượng quả xấu – đó là những quả còn sót lại từ vụ thu hoạch dừa sau khi bị những trận bão lớn đổ bộ vào khu vực tàn phá trong các năm 2006 và 2007.

Một nghiên cứu thứ hai được thực hiện để thiết lập những bước thực hành cơ bản cho việc ghép và ươm nuôi hạt ghép. Mục đích là để tận dụng các thiết bị mới của ARC cùng với những bài học kỹ thuật thu được gần đây nhất ở UQ. Đầu tiên, một số quả giống Laguna Tall còn lại sau vụ thu hoạch bị ảnh hưởng của bão đã được sử dụng để thực hành kỹ thuật ghép phôi đã được tách. Để làm việc này, một dung dịch chất tẩy trắng thương mại đậm đặc, chứa 5,25% NaOCl được phun lên trên phần vỏ hạt quả mẹ (dùng một lọ rửa) từ 30 đến 60 phút (hình 4). Sau công đoạn xử lý này, dùng nước máy vô trùng để rửa sạch chất tẩy trắng (hình 5) và để cho hạt khô ráo. Sau đó, tách rời miếng cắt hình tròn dạng đĩa ở vỏ hạt (lớp gáo dừa), để lộ ra lớp vỏ phía dưới (hình 6). Lớp vỏ bên trong phần gáo dừa, gồm một phần mỏng của nội nhũ được lạng nhẹ nhàng bằng dao mổ để lộ lớp phôi mầm gốc ra (hình 7). Sau đó, sử dụng một lưỡi dao mổ (đã được uốn cong ở phía đầu để tiện cho việc tách rời phôi mầm) lấy phôi mầm gốc ra (hình 8). Sử dụng cùng lưỡi dao tương tự, để mở rộng hoặc đào sâu thêm (phần phôi mầm) trên hạt quả gốc nếu cần để tạo một lỗ tròn phù hợp, khớp với phôi mầm ngoại sẽ được ghép vào. Sau khi đặt phôi mầm ngoại vào (hình 9), miếng vỏ mỏng bên trong được đặt trở lại vị trí cũ để che phủ phần phôi mầm mới vừa đưa vào (hình 10). Bôi, phết keo (sơn móng tay) trước khi đặt phần vỏ hình đĩa tròn trở lại vị trí ban đầu (hình 11). Sau đó, bôi phết thêm keo để bịt kín khe hở giữa vỏ hạt (gáo dừa) và miếng chóp vỏ vừa được gắn lại (hình 12). Lớp keo gắn cần phải để qua đêm cho khô hẳn trước khi đem các hạt đã được cấy ghép phôi mầm mới đi ươm trồng ở vườn ươm trong ngày hôm sau.

Đặt hạt nằm theo phương thẳng đứng trong giá thể được tưới ẩm (hỗn hợp đất và xơ dừa), lưu ý phần vỏ hạt được gắn keo phải nằm ở bên trên bề mặt giá thể ươm (hình 13). Phun thuốc trừ sâu và thuốc trừ nấm lên trên bề mặt hạt và giá thể ươm ngay sau khi ươm và sau đó phun định kỳ mỗi tuần một lần. Luống ươm phải được bảo vệ, che chắn, hạn chế nước

mưa và ánh nắng mặt trời chiếu trực tiếp. Tưới nước thường xuyên để duy trì độ ẩm của giá thể ươm.



Hình 4 . Khử trùng hạt



Hình 5. Rửa lại bằng nước vô trùng



Hình 6. Tách rời phần chóp của vỏ hạt (vỏ gáo dừa) ra ngoài



Hình 7. Lạng lấy lớp màng mỏng để lộ ra lớp phôi mầm sẽ được thay thế bằng phôi mầm ngoài



Hình 8. Tách lấy phần phôi mầm cần thay thế ra ngoài.



Hình 9. Ghép phôi mầm ngoài vào vị trí phôi mầm gốc vừa lấy ra.



Hình 10. Đặt miếng màng mỏng trở lại vị trí ban đầu để che phủ phôi mầm vừa ghép



Hình 11. Bôi, phết keo vào rìa vết khoan của vỏ hạt



Hình 12. Gắn keo bịt kín chỗ hở giữa vỏ và miếng chóp vỏ



Hình 13. Ươm các hạt đã được ghép phôi mầm mới

Trong một nghiên cứu khác, một phương pháp cấy ghép phôi mầm thứ hai (ghép một miếng nội nhũ có chứa phôi còn nguyên vẹn) được đưa vào áp dụng thử trên cùng một giống dừa. Các quy trình khử trùng, gắn keo và ươm hạt tương tự được áp dụng trong suốt các bước ghép. Tuy nhiên lần này, toàn bộ phần lõi của nội nhũ được tách lấy ra từ các hạt gốc và hạt thay thế bằng cách sử dụng một cái khoan tạo lỗ dạng nút chai (đường kính trong 2cm; Hình 14). Sau đó, miếng nội nhũ và phôi mầm ngoại được cấy ghép vào hạt mẹ và gắn kín các kẽ hở bằng keo như mô tả ở phần trước (Hình 15).



Hình 14. Dùng khoan lỗ dạng nút chai để tách lấy phôi mầm hình đĩa tròn



Hình 15. Ghép đĩa phôi mầm ngoại vào phần lỗ khoan của hạt mẹ

Để kiểm tra xem liệu phản ứng nảy mầm của các hạt ghép sau đó có phải do phương pháp kỹ thuật đã được sử dụng hay không, những hạt còn nguyên và các hạt được thao tác xử lý vỏ hạt (cát, khử trùng, tách, di dời, đặt lại vị trí ban đầu và bịt kín các khe hở) cũng được đưa vào ươm trong cùng giá thể để làm đối chứng.

Tuy nhiên, sau nhiều tháng ghép, không thấy có hiện tượng nảy mầm. Tương tự như vậy, cũng không thấy có dấu hiệu nhiễm bệnh hoặc kiến phá hại được ghi nhận ở các hạt ghép. Hầu hết các hạt ghép vẫn còn sống.

Sau đó, một phương pháp cải tiến kỹ thuật ghép phôi mầm đã được thử nghiệm. Phương pháp này bao gồm việc cải tiến công đoạn khử trùng ở bề mặt hạt. Hạt sau khi cắt được đảo ngược và đặt vào trong một cái cốc đựng dung dịch tẩy trắng thương mại (sao cho phần hạt bị cắt ra được nhúng ngập hoàn toàn trong dung dịch khử trùng). Chất tẩy trắng thương mại được xử lý ở nhiều nồng độ khác nhau với thời gian xử lý khác nhau nhằm tìm ra nồng độ và thời gian xử lý tốt nhất để khử trùng bề mặt của vỏ hạt. Kết quả thăm dò cho thấy sử dụng chất tẩy trắng ở nồng độ 40% (v/v) trong một giờ là biện pháp khử trùng hiệu quả nhất. Quy trình này sau đó đã được sử dụng trong tất cả các thí nghiệm tiếp theo.

Nguyên nhân thất bại trong việc nảy mầm của hạt đã được cấy ghép phôi ngoại được cho là do thiếu sự phát triển (giãn nở) của phôi mầm trong giai đoạn đầu của quá trình nảy mầm. Điều này có lẽ là hậu quả của việc kết nối kém giữa phôi mầm ngoại với nội nhũ của hạt mẹ. Một thí nghiệm ghép phôi mầm đã được nuôi cấy và phát triển trong môi trường nhân tạo vào các hạt mẹ đã được tiến hành. Để thực hiện việc này, người ta dùng biện pháp kỹ thuật đã được áp dụng trong quy trình nuôi cấy phôi mầm mới (xem Phụ lục 1) để tách và khử trùng bề mặt các phôi mầm từ các hạt đã trưởng thành. Sau đó, các phôi mầm được nuôi trong môi trường Y3 đã cải biến (xem Phụ lục 1) từ 3 đến 5 ngày trước khi được ghép vào hạt mẹ. Môi trường nuôi cấy tương tự cũng được sử dụng như một "môi trường làm đầy" để lấp đầy khoảng trống giữa phần lỗ khoan và phôi mầm mới sau khi gắn lại. Các hạt đã được ghép phôi mầm mới sau đó được ươm trong vườn ươm như mô tả ở phần trên. Tuy nhiên, như đã đề cập ở phần trước, không thấy hiện tượng nảy mầm từ các hạt này. Một thí nghiệm y hệt được tái thực hiện nhưng lần này sử dụng môi trường MS rắn (Murashige và Skoog, 1962), tuy nhiên các hạt được ghép phôi mầm mới vẫn không nảy mầm.

Sau đó, một ý tưởng được đưa ra rằng cần bổ sung vào môi trường nuôi cấy một hợp chất điều hòa tăng trưởng cây trồng để thúc đẩy sự nảy mầm của các phôi mầm ghép. Một thí nghiệm đã được tiến hành, bổ sung 0,0 hoặc 0,1 ppm BAP và 0,00; 0,05 hoặc 0,10 ppm NAA vào môi trường Y3, ở đó các phôi mầm riêng biệt được nuôi từ 3 đến 5 ngày. Sau đó, các phôi mầm được ghép vào các hạt mẹ. Lại một lần nữa, kết quả cho thấy các hạt được ghép phôi mầm đã không nảy mầm trong vườn ươm.

Như đã trình bày ở phần trước, những hạt còn nguyên vẹn (và chưa được ghép) được ươm làm đối chứng cũng đã nảy mầm ở một tỷ lệ thấp hơn nhiều (16 đến 53%) so với tỷ lệ nảy mầm bình thường ở ARC (85 %), chứng tỏ chất lượng của trái cây xấu.

6 Những vấn đề nảy sinh và lợi ích đạt được:

Ở dự án trước đây (HORT/1998/061), thành công của kỹ thuật ghép phôi mầm thấp nhưng cũng mang lại những đóng góp đáng kể. Tỷ lệ thành công thấp được đánh giá là do trái cây ở siêu thị kém chất lượng, cả về nguồn hạt lấy phôi mầm mới lẫn nguồn hạt mẹ. Các hạt được nhập khẩu từ các quốc gia sản xuất dứa, qua một dây chuyền trao đổi thương mại đi vào các siêu thị phải mất nhiều tuần lễ. Mặt khác, kỹ thuật cấy ghép vẫn còn đang ở trình độ rất căn bản. Do đó, nhiều khía cạnh của phương pháp kỹ thuật này vẫn cần được điều chỉnh lại. Việc sử dụng các hạt có chất lượng xấu trong dự án hiện tại có thể cũng là nguyên nhân góp phần vào thất bại của kỹ thuật cấy ghép phôi mầm.

Các hạt sắn có thể sử dụng được lấy từ các cây bị tàn phá nghiêm trọng bởi một loạt các trận bão mạnh (hình 16 và 17) và đó là nguyên liệu tốt nhất có thể kiếm được vào thời điểm đó.



Hình 16. Dừa bị tàn phá bởi bão lớn Reming



Hình 17. Cơ sở vật chất nuôi cấy mô dừa bị phá hủy do bão lớn Reming: a) Nhà thí nghiệm; b) Nhà kính / Phòng giữ độ ẩm; c) Vườn ươm.

Một số thí nghiệm đã được lên kế hoạch để giúp phát triển kỹ thuật ghép đã không thực hiện được do thiếu nguồn trái dừa sắn có. Các thí nghiệm chưa được thực hiện này bao gồm: tuổi của trái dừa (cả về nguồn phôi mầm cũng như các hạt mẹ), điều kiện bảo quản hạt sau khi thu hoạch và trước khi sử dụng, và khả năng thành công khi áp dụng phương pháp này trên các giống khác nhau.

Cho dù các phôi mầm được cấy ghép không nảy mầm, nhưng những lợi ích đạt được trong suốt quá trình dự án, đặc biệt trong lĩnh vực nâng cao năng lực và đào tạo ở ARC là rất đáng kể. Việc đào tạo các thành viên dự án ở UQ và đầu tư cơ sở vật chất ở ARC đã cho phép họ có thể tiếp tục công việc sau khi kết thúc dự án (tháng 12/2007). Sự mở rộng của dự án sẽ được thực hiện vào thời gian khi mà nguồn trái có chất lượng được cung cấp đầy đủ để đảm bảo cho việc nghiên cứu.

Bản thảo quy trình nuôi cấy phôi mầm hiện nay đã được ACIAR sẵn sàng xuất bản (Phụ lục 1). Quy trình này đã được biên soạn sau khi lấy ý kiến rộng rãi của những người có liên quan đến dự án ACIAR trước đây. Cần lưu ý rằng mạng lưới các trạm, trung tâm nghiên cứu dừa (ICOPRI - Indonesia, Trạm nghiên cứu Madang - PNG, Trung tâm nghiên cứu Albay - Philippin và OPI – Việt Nam) vẫn tồn tại và hoạt động tốt. Mặc dù các đối tác, ngoại trừ Philippin, đã không được hưởng lợi trực tiếp từ dự án, nhưng việc cho ra đời cuốn cẩm nang về phương pháp nuôi cấy phôi mầm sẽ có ích cho họ. Cẩm nang này sẽ hữu ích không chỉ với việc hỗ trợ các hoạt động liên quan đến chuyển gen mà còn giúp sản xuất các giống dừa có giá trị cao như Kopyor, Makapuno và các giống dừa có mùi thơm với số lượng lớn.

7 Kết luận và khuyến nghị

Việc trao đổi thông tin và quan điểm giữa các đối tác liên quan trong dự án trước (HORT/1998/061) được khuyến khích trong suốt quá trình thực hiện dự án hiện tại và hoạt động đó rất có ích đối với việc xây dựng và chỉnh sửa cẩm nang nuôi cấy phôi mầm mới này. Hiện nay, cẩm nang này đã sẵn sàng để được xuất bản bằng 3 ngôn ngữ khác nhau (tiếng Anh, tiếng Indonesia và tiếng Việt). Các đối tác có thể tham gia biên dịch và phân phối tài liệu sau này trong quá trình hoàn thành cẩm nang.

Một khả năng mới để tiến hành công việc nuôi cấy và ghép phôi mầm được thiết lập ở ARC. Điều này đạt được từ việc tiến hành một khóa tập huấn ở Đại học Queensland, việc nâng cấp các trang thiết bị nuôi cấy mô ở ARC, và việc duy trì liên tục công tác đào tạo chuyên môn cho một trợ lý địa phương ở ARC.

Tại ARC, một số thí nghiệm đã được tiến hành trong một sự nỗ lực cố gắng để cải tiến kỹ thuật ghép phôi mầm. Tuy nhiên, cho đến giờ, các hạt được ghép phôi mầm ngoại vẫn không nảy mầm. Các hạt được sử dụng trong các thí nghiệm này là những hạt còn sót lại sau một loạt các trận bão lớn đã đổ bộ vào khu vực, tàn phá hàng loạt cây dừa cùng cơ sở vật chất ở ARC trong suốt thời gian thực hiện dự án này. Chất lượng hạt xấu sẽ góp phần khiến các phôi mầm ghép khó nảy mầm. Một số thí nghiệm trong kế hoạch đã không đem lại kết quả do thiếu nguồn nguyên liệu quả để nghiên cứu.

Trong tương lai, một số nghiên cứu cơ bản cần được triển khai để xây dựng kỹ thuật ghép phôi mầm một cách sâu rộng hơn. Các nghiên cứu này nên tập trung vào việc cấy ghép phôi mầm đã được tách ra (tốt hơn việc cấy ghép cả miếng nội nhũ trong đó có phôi mầm) bởi vì đây là biện pháp có khả năng thành công lớn nhất. Mặt khác, cũng nên nghiên cứu các phản ứng sinh lý của phôi mầm được tách ra để cấy ghép như: khả năng hấp thụ nước, những thay đổi ở vị trí gắn kết giữa phôi mầm ngoại và nội nhũ, quá trình tập trung thức ăn và vận chuyển tới phôi mầm. Khả năng tương thích của nội nhũ với phôi mầm ngoại về kiểu gen, độ tuổi, và xử lý trước bảo quản.

Hai dự án (dự án hiện tại và dự án trước đó - HORT/1998/061) đã đem lại nhiều kiến thức và nâng cao năng lực cho các nhóm nghiên cứu về cây dừa ở Indonesia, Philippin, PNG và Việt Nam. Cẩm nang về quy trình nuôi cấy phôi mới hiện nay đã sẵn sàng để đóng vai trò như một tài liệu tham khảo tổng hợp cho các nhóm nghiên cứu này. Các kết quả tích cực của việc nghiên cứu về nuôi cấy phôi cho đến bây giờ đã cho phép các nhóm nghiên cứu dừa chuyển sang giai đoạn phát triển kế tiếp – thương mại hóa công nghệ. Do đó, một dự án sản xuất thí điểm cần được xây dựng ở các quốc gia sản xuất dừa để triển khai áp dụng rộng rãi kỹ thuật mới này và chứng minh có thể sản xuất với quy mô lớn các giống dừa chất lượng cao (Kopyor, Makapuno và dừa có mùi thơm). Việc thiết lập một quỹ gen chung (một bộ sưu tập gen) các giống dừa này và các giống dừa hữu ích khác cần được triển khai vào những năm đầu của một dự án như vậy và việc này sẽ giúp đẩy nhanh việc thương mại hóa sản phẩm. Khả năng lai giống giữa dừa Kopyor hoặc Makapuno với các loại dừa thơm cũng nên được khảo sát kỹ trước khi quy trình nuôi cấy phôi mầm mới được ứng dụng để nhanh chóng nhân ra hàng loạt các cây con dừa giống lai mới. Thành công trong việc sản xuất các cây dừa giống Makapuno ở quy mô lớn bằng cách nuôi cấy phôi mầm có thể đã được nhìn thấy ở Philippin, và thành công này nên được ứng dụng để đưa ra cái nhìn sâu sắc hơn trong việc nâng cấp phạm vi áp dụng phương pháp kỹ thuật mới này lên mức thương mại. Ngoài ra, cần tiến hành thêm một số hoạt động nghiên cứu để hoàn thiện quy trình. Việc này chắc chắn cần có sự tham gia của nhóm nghiên cứu có kinh nghiệm đến từ Úc. Các công ty sản xuất tư nhân và nông dân cần được khuyến khích tham gia vào dự án ngay từ giai đoạn ban đầu. Tuy nhiên, trừ khi một dự án thí điểm được bắt đầu triển khai để chứng minh tiềm năng thương mại thì khả năng tác động của hai dự án này (và một số dự án có liên quan khác của ACIAR trước đó) tới nông dân và các hộ sản xuất nhỏ khác ở các quốc gia sản xuất dừa sẽ vẫn tiếp tục ở mức thấp. Những ảnh hưởng ở mức độ thấp của các dự án dừa do ACIAR tài trợ đã được đề cập đến ở tài liệu khác (xem Samosir và cs. 2006).

Các tác động khác của phương pháp nuôi cấy phôi mầm thuộc dự án hiện tại sẽ tùy thuộc vào việc di chuyển nguồn gen dừa giữa các phòng thí nghiệm, ở cả cấp độ quốc gia và quốc tế. Do vậy, cẩm nang về quy trình nuôi cấy phôi mầm cần được cung cấp

cho tất cả những đối tượng có tiềm năng sử dụng kỹ thuật này do ACIAR cung cấp. Các đối tượng này bao gồm cả Mạng lưới Quỹ Gen Dừa Quốc tế (COGENT) - đang thành lập một Ngân hàng Gen Dừa Quốc tế để bảo tồn nguồn gen dừa khắp thế giới và cung cấp cho các quốc gia có quan tâm. Thông qua các hội thảo, các nhóm phát triển công nghệ phôi mới trên cần đẩy mạnh việc quảng bá và phổ biến kỹ thuật nuôi cấy phôi mầm mới này.

8 Tài liệu tham khảo

Samosir Y M S, Foale M and Adkins S W (2006) Australian involvement in coconut research and development. In: Adkins S W, Foale M and Samosir Y M S (eds) Coconut revival: new possibilities for the tree of life. Proceedings of the International Coconut Forum, Cairns, Australia, 22-24 November 2005. p. 36-42.

Murashige T and Skoog F (1962) A revised media for rapid growth and bioassays with tobacco cultures. *Physiology Plantarum* 15:473-497.

9 Phụ lục

Phụ lục 1: Cẩm nang nuôi cấy phôi mầm

Quy trình nuôi cấy phôi mầm dừa mới nhằm bảo tồn và sản xuất cây giống chất lượng cao

Yohannes M S Samosir
Nurhaini Mashud
Hengky Novarianto
Vũ Thị Mỹ Liên
Erlinda Rillo
Pablito Magdalita
Olivia Damasco
Alfred Kembu
Mathias G Faure
Stephen W Adkins

Trung tâm Nghiên cứu Nông nghiệp Quốc tế Úc
Canberra
2008

1 Giới thiệu

Dừa (*Cocos nucifera* L.) được đánh giá là cây thân cận nhiệt đới quan trọng nhất, tuy nhiên người sản xuất loại cây trồng này vẫn phải đối mặt với tình trạng năng suất thấp và ngày một giảm sút. Hầu hết người sản xuất đang làm chủ những cây dừa già trồng cách đây nhiều năm và chưa được chọn lọc. Các trang trại dừa già này cần được trồng mới lại bằng các giống mới có khả năng kháng bệnh và có năng suất cao hơn. Vì vậy, điều cần thiết là phải phát triển những giống dừa mới đã được cải tạo và thích nghi với điều kiện ở các địa phương. Điều này có thể thực hiện được nếu tận dụng nguồn gen dừa phong phú sẵn có ở khắp các khu vực khác nhau trên thế giới. Tuy nhiên, do một số nhân tố, bao gồm thiên tai, hạn hán và thu hẹp đất trồng do quá trình đô thị hóa và các nhu cầu nông nghiệp khác, nguồn gen dừa có giá trị này đang bị giảm đi nhanh chóng.

Trong thập kỷ vừa qua, Mạng Quỹ gen dừa – Viện Quỹ gen thực vật Quốc tế (COGENT-IPGRI) đã cố gắng tài trợ vốn và thiết lập một ngân hàng bảo tồn nguồn gen dừa Quốc tế ở nhiều nơi (ICG). Mạng lưới các điểm bảo tồn này, trong đó nhiều nơi đã đi vào hoạt động, nằm trong 5 khu vực của COGENT là: Đông Nam và Đông Á, Nam Á, Nam Thái Bình Dương, Châu Phi, Ấn Độ Dương, Châu Mỹ La Tinh và vùng Caribe. Mạng lưới ngân hàng gen dừa này sẽ là nơi lưu giữ phần lớn nguồn gen dừa của thế giới và bảo vệ chúng cho việc sử dụng trong tương lai của ngành công nghiệp dừa.

Để hỗ trợ việc thành lập các ngân hàng bảo tồn gen này cho hệ thống ICG hoặc cho các nơi có sưu tập nguồn gen dừa và có các chương trình xây dựng khác đòi hỏi phải có một cơ chế đáng tin cậy và an toàn cho việc thu thập, vận chuyển và tái thiết lập nguồn gen dừa. Công đoạn thu thập và vận chuyển toàn bộ trái dừa rõ ràng là không thực tế do kích cỡ của chúng và thực tế là vận chuyển các trái cây chưa làm sạch không an toàn về mặt kiểm dịch thực vật.

Với những lý do trên, việc thu thập nguồn gen dừa bằng phôi mầm riêng biệt hoặc những miếng mô nội nhũ nhỏ có chứa phôi mầm và sau đó di chuyển chúng như trong trường hợp nuôi cấy *trong ống nghiệm (in vitro)* đã trở thành một biện pháp mang tính thực tế hơn nhiều trong công đoạn vận chuyển gen dừa. Phôi mầm từ các hạt điển hình nhẹ hơn 10.000 lần so với những quả nguyên vẹn mà từ đó chúng được tách ra (Harries 1982) – và không mang nguồn bệnh nào đã được biết tới.

Việc nuôi cấy *in vitro* các phôi mầm hợp tử (zygotic) dừa đã thành công trong rất nhiều trường hợp (De Guzman và Del Rosario 1974; Assy Bah 1986; Rillo và Paloma 1992a; Samosir và cs. 1999). Các phương pháp này cũng có ích đối với việc giữ lại phôi mầm từ các loại hình dừa đột biến, có giá trị cao (ví dụ Makapuno, Kopyor) nhưng mô nội nhũ của chúng lại giống như thạch và không chức năng (Rillo và Paloma 1992b), và tạo ra các cây giống từ chúng. Phương pháp này cũng có thể được áp dụng trong việc chọn lựa *in vitro* các tính trạng cây trồng khác nhau. (Ví dụ: Khả năng chịu hạn; Karunaratne và cs., 1991) và bảo quản gen dừa ở nhiệt độ thấp (Assy-Bah và Engelmann 1992; Sisunandar và cs., 2005).

Cho đến nay, kỹ thuật nuôi cấy phôi mầm dừa tiêu chuẩn quốc tế đã được sử dụng để lập ra các bộ sưu tập nguồn gen dừa và sản xuất các cây giống chất lượng cao từ loại hình dừa đột biến. Được biết đến dưới cái tên “Kỹ thuật nuôi cấy phôi mầm lai” (Batugal 2002), phương pháp này đã được sử dụng để sản xuất cây giống dừa ở những nơi phôi mầm của chúng được gửi đến sau các thương vụ trao đổi quốc tế. Mặc dù, sử dụng quy trình này cho tỷ lệ nảy mầm trong ống nghiệm cao (Engelmann và Batugal 2002), nhưng có sự khác biệt lớn ở kết quả giữa các phòng thí nghiệm và điều này làm quy trình kém hiệu quả và thiếu độ tin cậy.

Nhiều khía cạnh về mặt sinh lý của cây non phát triển trong quá trình nuôi cấy *in vitro* là chưa tối ưu và chính điều này được cho là góp phần làm giảm thấp tỷ lệ thích nghi với khí hậu và sự phát triển của cây non sau khi đưa ra ngoài môi trường nuôi cấy. Các đặc điểm sinh lý của cây con có khả năng chịu ảnh hưởng bởi kỹ thuật là sự phát triển của bộ rễ, khả năng quang hợp và tính miễn cảm với bệnh.

Quy trình phát triển gần đây nhất đã quan tâm đến những vấn đề này và những vấn đề khác có thể gặp phải trong quá trình phát triển của cây con với sự tham gia của một nhóm các nhà khoa học đến từ nhiều quốc gia khác nhau (Úc, Indonesia, PNG, Philippin và Việt Nam) trong một thời gian hơn 3 năm. Một số cải tiến đáng kể đã được thực hiện từ quy trình này có thể được sử dụng cả cho việc vận chuyển gen dứa, tái thiết lập và sản xuất các cây giống dứa đột biến chất lượng cao, như các giống dứa Makapuno và Kopyor.

2. MỤC TIÊU

Mục tiêu của công việc được thực hiện để cho ra cẩm nang này là nhằm phát triển Quy trình kỹ thuật mới được cải tiến với các nội dung sau:

- Tách và vận chuyển phôi mầm dứa;
- Khởi đầu nuôi cấy in vitro phôi mầm dứa;
- Chăm sóc nuôi dưỡng phôi mầm dứa cho đến khi có thể đưa cây con trồng vào đất;
- Thuần hóa cây giống dứa con được tạo ra từ phương pháp này;
- Sự trưởng thành của cây giống trên đất trong vườn ươm.

3. NGUYÊN VẬT LIỆU, TRANG THIẾT BỊ VÀ CƠ SỞ VẬT CHẤT

3.1 Giống:

Chọn những quả giống có độ tuổi thích hợp (các quả có độ tuổi từ 10 đến 11 tháng sau khi thụ phấn) là một yếu tố quan trọng có thể giúp cho ra tỷ lệ cây giống cao nhất. Ở giai đoạn phôi 10-11 tháng tuổi vỏ quả bắt đầu chuyển sang màu nâu (Hình 1). Nguyên tắc cơ bản có thể áp dụng khi đi thu thập nguồn giống là chọn để thu hái những buồng dứa đã có ít nhất 1 quả chuyển sang màu nâu. Cũng cần phải áp dụng cả các tiêu chí chọn quả khác, đặc biệt là đối với các công việc liên quan đến sức khỏe quả và chỉ nên sử dụng những quả có chất lượng tốt nhất để tách lấy phôi mầm giống. Tuy nhiên, cũng không nên bỏ đi những quả mà khi lắc không nghe tiếng ọc ạch của nước bên trong. Bước chọn lọc này thường được áp dụng trong vườn ươm khi chọn quả giống cho nảy mầm nhưng không có ý nghĩa trên đồng ruộng. Quả được thu hái ở độ tuổi 10-11 tháng chưa chắc đã gây ra âm thanh khi lắc bởi vì khoang chứa của chúng vẫn đầy nước.

Thời gian từ khi thu hoạch quả tới khi tách lấy phôi mầm và cấy vào môi trường nuôi cấy mô càng ngắn càng tốt. Khi quả giống được thu thập từ những vùng xa, nên dự phòng số lượng phôi mầm cao hơn nhu cầu 20% nhằm bù lại những phôi mầm mất khả năng sống trong quá trình vận chuyển đến phòng thí nghiệm. Trong bước vận chuyển này, những phôi mầm có thể được di chuyển trong tình trạng vẫn gắn với ống hay miếng nội nhũ (Rillo và Paloma 1992), hoặc để phôi mầm trần như khi vừa mới tách ra (Ashburner và cs. 1995; Samosir và cs. 1999).

3.2 Trang thiết bị

Cơ sở vật chất và trang thiết bị cơ bản cần cho các bước nuôi cấy mô bao gồm: một phòng cấy, một tủ cấy, một nồi hấp, một bộ dụng cụ dùng để cắt, chai lọ nuôi cấy và các loại môi trường khác nhau. Cần phải có một cái khoan tạo lỗ kiểu nút chai (đường kính cỡ 10mm hay lớn hơn, Hình 2) để tách lấy miếng nội nhũ (có chứa phôi mầm) từ hạt. Nếu không có sẵn khoan tạo lỗ hình nút chai, có thể thay thế bằng một ống kim loại sắc có thể được đóng vào nội nhũ bằng búa gỗ.

Lọ nuôi cấy bằng polycarbonate (đường kính 2,5 cm và chiều cao 8 cm, Hình 3a) thường

được sử dụng cho giai đoạn nảy mầm và duy trì cây con ở giai đoạn đầu cho đến khi cây có ít nhất 1 lá xòe. Các lọ cỡ lớn hơn được sử dụng ở các bước tiếp theo khi cây con trong giai đoạn phát triển (Hình 3b). Một bộ gồm 2 lọ úp miệng vào nhau (Hình 3c) được sử dụng cho thời kỳ cây con phát triển cao nhất. Có thể thay thế lọ nuôi cấy phía trên bằng túi polyetylen trong suốt (có thể hấp khử trùng được) chụp lên trên lọ phía dưới (Hình 3d).

Hệ thống cung cấp môi trường CO₂ được sử dụng như là một cải tiến quan trọng so với phương pháp truyền thống sử dụng bao ni-lon úp ngược. Hệ thống cung cấp CO₂ có thể được xây dựng bằng nhiều cách khác nhau, tuy nhiên một cách rất hiệu quả là dùng các tấm nhựa trong suốt (dày 0,6 cm) dán ghép lại với nhau.

Bước tiếp sau của quy trình cung cấp khí CO₂ là thuần hóa cây con. Để làm được điều này cần sử dụng một hộp vi khí hậu để hoàn thành quá trình làm cứng cây trong nhà lưới trước khi trồng cây con ra đất trong điều kiện nhà lưới. Hộp vi khí hậu tạo độ ẩm khá cao xung quanh cây con hỗ trợ cây con phát triển đồng thời cung cấp không gian phía trên cho sự phát triển chiều cao. Hộp được làm bằng khung gỗ quay xung quanh bằng các tấm nhựa trong suốt và khoét 4 lỗ (đường kính mỗi lỗ 10cm, mỗi mặt bên 2 lỗ). Bốn lỗ này cung cấp các khoảng hở để cây con tiếp xúc dần với điều kiện tự nhiên trong nhà lưới và vì vậy góp phần vào quá trình làm cây cứng cáp. Kích thước của một hộp điển hình là 100cm dài, 22cm rộng và 30cm cao. Hộp được đặt trên cao bên trong –nhà lưới để có thể tiếp nhận được ánh sáng mặt trời. Hộp lớn hơn hay làm bằng nhựa trong suốt (Hình 5b) có thể được sử dụng nếu số lượng cây con lớn. Các tấm nhựa phủ trên hộp hoặc lều có thể được tháo dỡ dễ dàng để chăm sóc cây con như tưới nước hay phòng trừ sâu hại.

3.3 Môi trường và hóa chất nuôi cấy

Công thức môi trường được xây dựng cho việc nuôi cấy phôi mầm dừa (Bảng 1) dựa vào các khoáng chất Y3 (Eeuwens 1976) với sự điều chỉnh lượng sắt và các vitamin.

Bảng 1. Thành phần và công thức môi trường nuôi cấy phôi mầm dừa

Hợp chất	Công thức hoá học	Hàm lượng (mg/L)
Các chất dinh dưỡng đa lượng (Y3)		
Potassium Nitrate	KNO ₃	2020,00
Potassium Chloride	KCl	1492,00
Ammonium Chloride	NH ₄ Cl	535,00
Sodium dihydrogent Ortho-Phosphate	NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O	312,00
Calcium Chloride	CaCl ₂ .2H ₂ O	294,00
Magnesium Sulphate	MgSO ₄ .7H ₂ O	247,00
Các chất dinh dưỡng vi lượng (Y3)		
Manganese Sulphate	MnSO ₄ .4H ₂ O	11,20
Potassium Iodide	KI	8,03
Zinc Sulphate	ZnSO ₄ .7H ₂ O	7,20
Boric acid	H ₃ BO ₃	3,10
Cupric Sulphate	CuSO ₄ .5H ₂ O	0,25
Cobalt Chloride	CoCl ₂ .6H ₂ O	0,24
Sodium Molybdate	NaMoO ₄ .H ₂ O	0,24
Nickel Chloride	NiCl ₂ .6H ₂ O	0,024
Ferrous Sulphate ¹⁾	Fe ₂ SO ₄ .7H ₂ O	41,70
Disodium Ethylene diamine tetra-acetic acid ¹⁾	Na ₂ EDTA	55,80
Vitamins và Amino Acid (UPLB + ARC)		
Pyridoxine HCl (Vitamin B ₆)	C ₈ H ₁₁ NO ₃ .HCl	0,05
Thiamine HCl (Vitamin B ₁)	C ₁₂ H ₁₇ ClN ₄ OS.HCl	0,05

Nicotinic acid (Vitamin B ₃)	C ₆ H ₅ NO ₂	0,05
Calcium –D-pantothenate (Vitamin B ₅)	(C ₉ H ₁₆ NO ₅) ₂ Ca	0,05
Biotin (Vitamin H)	C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₃ S	0,05
Folic acid (Vitamin B _c , Vitamin M)	C ₁₉ H ₁₉ N ₇ O ₆	0,05
Glycine	C ₂ H ₅ NO ₂	1,00
Các chất khác		
Abscisic acid (ABA) ²⁾	C ₁₅ H ₂₀ O ₄	0,25
α-Naphththaleneacetic acid (NAA) ³⁾	C ₁₂ H ₁₀ O ₂	18,60
Sucrose ⁴⁾	C ₆ H ₂₂ O ₁₁	60,00 45,00 25,00
Agar (chỉ áp dụng cho cấy truyền lần 1 và 2) ⁵⁾		7,00
Than hoạt tính ⁶⁾		1,00
pH		5,60

¹⁾ Dung dịch Iron chelate mẹ được chuẩn bị sẵn trong các lọ riêng biệt;

²⁾ ABA đã lọc khử trùng được thêm vào môi trường nuôi cấy để thúc đẩy sự nảy mầm;

³⁾ NAA chỉ được sử dụng trong 1 tháng để thúc đẩy khả năng hình thành và phát triển rễ

⁴⁾ Có thể sử dụng đường Sucrose tiêu chuẩn thấp. Hàm lượng 60 mg/L được sử dụng từ khi bắt đầu cấy ghép đến khi chồi và rễ phát triển (3 - 4 tháng đầu tiên) sau đó 45 mg/L được sử dụng trước khi hàm lượng 25 mg/L được áp dụng cho 2 lần cấy truyền cuối cùng.

⁵⁾ Ở những bước cấy truyền tiếp theo nên sử dụng môi trường lỏng

⁶⁾ Dùng than hoạt tính đã được rửa sạch bằng acid. Nên sử dụng cùng 1 nhãn hiệu trong suốt quá trình nuôi cấy để cho kết quả ổn định.

3.4 Điều kiện nuôi cấy

Để phát triển tốt nhất, các phôi mầm phải được nuôi ở nhiệt độ 28 - 30 °C trong điều kiện chiếu sáng (40 μmol m⁻² s⁻¹), theo chu kỳ 14 giờ chiếu sáng, 10 giờ tối. Để tăng khả năng phát triển của cây con, có thể tăng cường ánh sáng đỏ (dải ánh sáng 660 nm). Nên áp dụng cường độ ánh sáng cao hơn (90 μmol m⁻² s⁻¹) khi cây mầm phát triển dưới điều kiện quang tự dưỡng (xem phần 4.3.3).

4 CÁC BƯỚC TIẾN HÀNH

4.1 Công tác chuẩn bị, hóa chất và môi trường nuôi cấy

Các quy trình chung áp dụng cho việc chuẩn bị dung dịch mẹ và môi trường nuôi cấy, vui lòng tham khảo tài liệu về nuôi cấy mô chuẩn (ví dụ George 1993). Cần tách riêng dung dịch mẹ của sáu loại muối đa lượng (mỗi loại bằng 10 x nồng độ cần dùng) để tránh tình trạng kết tủa. Các hợp chất vi lượng, ngoại trừ sắt, có thể dễ dàng lưu giữ dưới dạng dung dịch mẹ bằng 100 x nồng độ cần sử dụng.

Để có kết quả ổn định nhất, sử dụng môi trường lỏng (10mL) để trong ống nghiệm (loại 25 x 150 mm) cho giai đoạn nuôi cấy đầu tiên, tiếp theo dùng 15mL môi trường rắn và sau đó 80mL môi trường lỏng cho bước cấy truyền cuối cùng vào lọ lớn hơn (xem phần 3.2). Trong tất cả các bước, môi trường phải được khuấy lắc để phân phối đều lượng than hoạt tính (đã được rửa sạch bằng axit, tiêu chuẩn dùng trong nuôi cấy tế bào) trong khi pha chế.

4.2 Chuẩn bị vật liệu nuôi cấy

1. Các hạt đã bỏ vỏ ngoài được tách ra và sử dụng một chiếc khoan tạo lỗ có hình nút chai đã được khử trùng bề mặt để tách lấy một phần của nội nhũ có chứa phôi mầm (nội nhũ hình trụ).
2. Các nội nhũ hình trụ vừa tách ra được đặt vào một cái lọ sạch có chứa nước dứa

tươi hay nước vô trùng như một môi trường lưu giữ phôi.

3. Trong phòng thí nghiệm, các nội nhũ hình trụ được rửa bằng nước sạch và được nhúng vào dung dịch Ethanol 95% trong vòng 30 giây.
4. Sau đó, dùng chất tẩy trắng thương mại còn mới, đậm đặc (thông thường chứa 42 g L⁻¹ sodium hypochlorite) để khử trùng bề mặt các nội nhũ hình trụ trong khoảng 20 phút.
5. Sau đó, chúng được rửa lại 3 lần bằng nước vô trùng trong phòng sạch hay trong tủ cấy nhằm làm giảm tới mức tối thiểu khả năng bị vi sinh vật xâm nhập.
6. Để vận chuyển, các miếng phôi mầm đã khử trùng được đặt vào túi ni-lon vô trùng có miếng bông đã thấm nước vô trùng. Túi được đặt trong một hộp xốp hoặc hộp điều chỉnh nhiệt độ.
7. Để hạn chế sự suy giảm chất lượng của phôi mầm trong quá trình vận chuyển, làm mát phôi mầm bằng một ít nước đá cục đặt xung quanh túi chứa phôi và chèn thêm một ít bông thấm nước vào bên trong hộp.
8. Phải thường xuyên kiểm tra và thay đá khi cần thiết trong quá trình vận chuyển phôi mầm về phòng thí nghiệm. Không cần thiết phải dùng đá nếu sử dụng tủ lạnh loại xách tay chạy bằng nguồn điện của xe.
9. Một phương pháp vận chuyển gen khác là cất lấy phần phôi mầm từ các nội nhũ hình trụ ngay tại khu vực khai thác và chỉ vận chuyển phần phôi mầm về phòng thí nghiệm. Ngay khi phần phôi mầm được tách ra, chúng phải được khử trùng bề mặt bằng chất tẩy trắng thương mại (10% trong vòng 1 phút), sau đó rửa lại 3 lần bằng nước vô trùng và đặt vào trong những tuýp chứa acid Ascorbic vô trùng (10mL với hàm lượng 1mg L⁻¹). Các tuýp này được đặt trong những thùng xốp chứa nước đá cục hay tủ lạnh loại xách tay như đã mô tả ở trên.
10. Phôi phải được chuyển về phòng thí nghiệm trong thời gian ngắn nhất, không được quá 4 ngày tính cả thời gian thu và xử lý mẫu.

4.3 QUY TRÌNH

Những giai đoạn thực hiện việc cấy ghép dưới đây được mô tả tóm tắt bằng sơ đồ trên một tờ áp phích khổ A₃ và các tờ áp phích này nên được treo trong phòng thí nghiệm để mọi người có thể dễ dàng tham khảo.

4.3.1 Giai đoạn 1 - khởi động quy trình cấy ghép

1. Trong trường hợp sử dụng các nội nhũ chứa phôi hình trụ được vận chuyển, ngay khi phôi mầm giống được chuyển đến phòng thí nghiệm, chúng phải được khử trùng bề mặt và rửa lại bằng nước vô trùng (bước 3 và 4, phần 4.2).
2. Làm việc tại tủ cấy, các phôi mầm được cất ra từ các miếng nội nhũ hình trụ và đặt vào các đĩa Petri vô trùng.
3. Trong trường hợp phôi mầm đã tách ra được vận chuyển về, ngay khi đưa đến phòng thí nghiệm, chúng phải được chuyển vào bình vô trùng và rửa bằng nước vô trùng 3 lần, sau đó chuyển sang đĩa Petri vô trùng.
4. Làm việc tại tủ cấy, phôi mầm từ cả 2 phương pháp vận chuyển trên đều được khử trùng bằng dung dịch chất tẩy trắng thương mại 10% trong vòng 1 phút và rửa lại bằng nước cất vô trùng 3 lần.
5. Phôi mầm được chuyển sang đĩa Petri vô trùng có lót giấy thấm để hút hết những phần nước còn lại bám trên bề mặt phôi mầm.

6. Sau đó, từng phôi mầm một được cấy vào các ống nghiệm chứa môi trường lỏng có bổ sung thêm ABA (nồng độ $0,25 \text{ mg L}^{-1}$). ABA giúp quá trình nảy mầm diễn ra đồng đều nhất là khi các phôi mầm từ các quả giống có độ tuổi khác nhau. Nếu cần thiết, có thể thêm vào GA3 $10\mu\text{M}$ thay thế chất ABA nếu đối tượng là các giống có tỉ lệ nảy mầm thấp.
7. Các phôi mầm trong môi trường lỏng sau đó được nuôi trong bóng tối 1 tháng.
8. Sau thời gian này, giác mút của phôi mầm (khi phát triển đủ lớn gây cản trở việc cấy truyền) có thể được lấy ra hoặc để lại tùy thuộc người thực hiện. Phần còn lại được cấy truyền sang môi trường rắn (cùng loại môi trường nhưng có bổ sung 2% Agar và không có ABA) và tiếp tục cấy truyền hàng tháng cho đến khi chúng có cả chồi và rễ (trong một số trường hợp rễ có thể không hình thành).
9. Cây con sau đó được nuôi dưỡng trong điều kiện chiếu sáng (xem phần 3.4) khi chồi dài ít nhất 1 cm.
10. Loại bỏ tất cả những phôi không nảy mầm được sau thời gian 12 tuần nuôi cấy.

4.3.2 Giai đoạn 2 – Giai đoạn đầu phát triển của cây mầm (đến khi có 1 lá)

1. Các cây con được cấy truyền vào môi trường lỏng có cùng công thức nhưng thêm vào $100\mu\text{M}$ NAA (để kích thích sự hình thành và phát triển rễ).
2. Sau một tháng được nuôi dưỡng trong môi trường kích thích tăng trưởng rễ, cây con được cấy vào môi trường lỏng không có NAA.
3. Sau đó, cây con tiếp tục được cấy truyền hàng tháng sang môi trường mới cho đến khi có một lá thì cấy chuyển sang môi trường nuôi cấy phôi mầm thông thường hoặc chuyển ra điều kiện quang tự dưỡng (nếu điều kiện trang thiết bị cho phép) (phần 4.3.3).

4.3.3 Giai đoạn 3 – Giai đoạn phát triển sau của cây mầm (đến khi có 3 lá)

Nuôi cấy phôi mầm theo phương pháp truyền thống:

1. Để tiết kiệm môi trường nuôi cấy, tiếp tục cấy truyền cây con hàng tháng vào các ống nghiệm dài chứa môi trường lỏng mới.
2. Khi cây mầm đã xuất hiện 2 lá và lớp rễ thứ cấp được hình thành từ rễ sơ cấp, các cây mầm được chuyển sang các lọ lớn hơn (xem phần 3.2) và cần mở rộng không gian phía trên bằng các túi nilon trong suốt để cây có thể phát triển bình thường.
3. Ở lần cấy truyền cuối cùng, có thể cần phải tỉa bớt rễ để đảm bảo phần chồi và rễ đều tiếp xúc được với dưỡng chất, nếu không, rễ sẽ đẩy phần chồi lên cao làm giảm khả năng tiếp xúc với môi trường khiến cho cây mầm phát triển không tốt. Có thể sử dụng vật liệu sẵn có ở địa phương như xơ dừa (đã khử trùng) trong thành phần môi trường để kích thích sự phát triển của rễ mà không làm ảnh hưởng đến việc tiếp xúc với dưỡng chất của phần chồi.
4. Khi cây mầm đã có 3 đến 4 lá và bộ rễ đã phát triển có các rễ thứ sinh và rễ con, chúng sẽ được đưa ra trồng trong các chậu. Tổng cộng thời gian cho cả quy trình cấy ghép có thể lên tới một năm hoặc lâu hơn.

Quang tự dưỡng bằng phương pháp làm giàu môi trường CO₂

Thay cho phương pháp truyền thống nêu trên, khi cây giống đã có ít nhất 1 lá xòe, có thể chuyển chúng vào nuôi dưỡng trong hệ thống môi trường quang tự dưỡng đã được làm giàu CO₂ (tham khảo hình 4). Môi trường dinh dưỡng sử dụng trong hệ thống này là các chất khoáng Y₃, có bổ sung Fe-EDTA nhưng không có đường Sucrose.

1. Các cây con, đặc biệt là rễ, được rửa sạch cẩn thận bằng nước máy;
2. Sau đó, cây con được đưa vào trong dung dịch thuốc trừ nấm Benlate™ (2 g/L) trong 15 phút;
3. Sau đó chuyển vào cốc dung tích 100 ml chứa 10g vermiculite, hay xơ dừa đã khử trùng và ngâm ướp khoáng chất Y₃;
4. Cốc chứa cây mầm này được đặt vào một lọ lớn hơn, 500 ml, có chứa 40 ml môi trường nuôi cấy có các khoáng chất Y₃;
5. Các lọ không đậy nắp, được đặt vào bên trong hộp nuôi cấy CO₂;
6. Hộp này sau đó sẽ được phun khí CO₂ dưới dạng sương mù (1600 ppm) trong cả giai đoạn chiếu sáng của chu kỳ quang hợp và giai đoạn tối với không khí môi trường xung quanh.
7. Thêm chất khoáng Y₃ vào lọ nếu cần (thường mỗi tuần 1 lần) và thay dung dịch khoáng Y₃ hoàn toàn sau mỗi tháng.

4.3.4 Giai đoạn 4. Thuận hóa và chăm sóc cây con trước khi đưa ra vườn ươm

Nuôi cấy phôi mầm theo phương pháp truyền thống:

1. Lọ chứa cây con được mang ra khỏi phòng thí nghiệm và đưa vào nhà lưới trong vòng 1 tuần để cây mầm được cứng cáp hơn.
2. Sau 1 tuần trong nhà lưới, cây con được lấy ra khỏi chai lọ và được rửa bằng nước máy.
3. Các cây con được nhúng vào dung dịch diệt nấm Benlate™ (nồng độ 2g/L) trong 15 phút sau đó trồng từng cây con vào túi bầu có chứa giá thể được khử trùng sạch (bao gồm đất vườn và bột xơ dừa theo tỉ lệ 1:1), và tưới đẫm nước.
4. Các cây con được đặt vào một chiếc hộp vi khí hậu (Hình 5) có mái che từ 3 đến 4 tuần hoặc cho đến khi các cây con đã hồi phục sau một thời gian trong môi trường nuôi cấy *in vitro*.
5. Sau thời kỳ này, cây con được cho tiếp xúc dần dần với điều kiện môi trường nhà lưới bằng cách mở dần từng phần tấm nhựa phủ bên trên hộp chứa cây con.
6. Sau đó, cây con được để lộ hẳn ra để tiếp xúc hoàn toàn với môi trường nhà lưới trong khoảng 1 đến 2 tuần.
7. Cây con phải được tưới nước theo yêu cầu và bón phân bón lá dưới dạng dung dịch pha loãng mỗi tuần .
8. Cây con sau đó được tiếp tục chăm sóc trong điều kiện vườn ươm dừa thông thường, bao gồm cả việc phòng trừ sâu bệnh cho đến khi chúng có thể được đưa ra trồng trên vườn.

Nuôi cây phôi mầm theo phương pháp quang tự dưỡng trong môi trường giàu CO₂.

Khi cây con ở giai đoạn đã có từ 3 đến 4 lá xòe (thường là sau 2 đến 3 tháng phát triển trong môi trường đã được làm giàu CO₂), chúng sẵn sàng để được chuyển vào nuôi trong vườn ươm.

1. Khi cây con ở giai đoạn đã có từ 3 đến 4 lá xòe thì ngừng việc phun sương CO₂ và cho cây con tiếp xúc từ từ với môi trường tự nhiên bên ngoài bằng cách mở một phần nắp đậy phía trên thùng CO₂ trong 2 tuần.
2. Bổ sung thêm khoáng chất Y3 vào các lọ nuôi cây nếu cần.
3. Sau 2 tuần, cây con được chuyển ra nhà lưới và trồng vào túi bầu màu đen có chứa giá thể đã khử trùng.
4. Sử dụng phân bón dạng tan chậm và dung dịch phân bón lá loãng tưới cây con hàng tuần trong tháng đầu tiên.
5. Tưới nước cho cây nếu cần thiết và áp dụng biện pháp phòng trừ sâu bệnh thích hợp.

4.3.5 Giai đoạn 5. Chuyển cây con vào vườn ươm

Sau 3 tháng được thuần hóa trong điều kiện có mái che, cây con đã sẵn sàng để được chuyển vào chăm sóc trong vườn ươm.

1. Cây con được trồng vào các túi polyetylen lớn hơn có chứa hỗn hợp bột xơ dừa và đất (không cần qua khử trùng).
2. Sau đó, các túi cây con được đưa vào vườn ươm trong điều kiện được che bóng.
3. Cây con được quản lý, chăm sóc, tưới nước, bón phân và phòng trừ sâu bệnh như trong các vườn ươm dừa giống thông thường.
4. Sau 3 đến 5 tháng trong vườn ươm, khi cây con có 4 - 6 lá với ít nhất một trong số đó có lá chết, các cây giống được chuyển đến vườn trồng và được chăm sóc theo quy trình trồng cây thông thường.

5 QUAN SÁT

Phôi mầm dừa thường được gắn chặt trong phần nội nhũ rắn, ngay dưới phần nắp (chỗ cửa gáo dừa) hay còn gọi là “mắt mềm”, trong phần vỏ quả trong. Cần tránh làm tổn thương các phôi mầm dừa trong suốt quá trình tách gỡ phôi, những phôi mầm bị tổn thương phải được loại bỏ.

Một số phôi mầm sẽ nảy mầm ngay trong tháng đầu tiên được nuôi cấy. Các phôi đã nảy mầm phải được cấy truyền vào môi trường đặc một cách cẩn thận sao cho đúng hướng, với phần rễ và phần chồi phát triển theo đúng trật tự.

Phần rễ có thể phát triển làm bật cây con lên khỏi bề mặt môi trường, do đó có thể phải tỉa bớt rễ. Tuy nhiên, không cần tỉa rễ nếu cây con được nuôi cấy bằng phương pháp quang tự dưỡng vì trong điều kiện này, vermiculite được sử dụng như một giá thể hỗ trợ. Trong môi trường có vermiculite, bộ rễ phát triển tốt và không thấy có hiện tượng đẩy cây lên khỏi bề mặt môi trường.

Phải kiên quyết loại trừ triệt để tất cả các vi sinh vật có khả năng gây tạp, phòng tránh sự lẫn tạp chéo từ cây mầm này sang cây mầm khác trong suốt quy trình cấy ghép. Giữ vệ sinh sạch sẽ, tổ chức công việc có hiệu quả và khử trùng theo đúng quy định đối với tất cả các vật liệu và dụng cụ để giảm thiểu nguy cơ lẫn tạp.

Đối với một số trường hợp khác, các phôi mầm và cây con có thể phát triển không bình thường. Chúng có thể bao gồm các mô bị thừa nước hoặc phôi mầm phát triển còi cọc.

Hầu hết các trường hợp phát triển bất thường này là không khắc phục được, vì thế những phôi này phải được loại bỏ. Ngoài ra, những phôi không nảy mầm được sau 12 tuần cấy ghép cũng cần phải loại bỏ khỏi quy trình để dành nguồn dinh dưỡng cho những phôi mầm phát triển mạnh khỏe.

6 KẾT QUẢ

Tùy thuộc vào kiểu gen dừa được nuôi cấy, tỉ lệ nảy mầm trong ống nghiệm vào khoảng 60-85%. Đến khi thuần hóa thành công cây con ước tính có khoảng 10% cây con nữa bị hư hỏng qua các bước nuôi cấy, không tính một số cây con bị nhiễm vi sinh vật do kỹ thuật khử trùng kém trong giai đoạn đầu của quy trình. Một phần thiệt hại nhỏ nữa cũng có thể xảy ra trong thời kỳ phát triển của cây con trên đất ở vườn ươm có mái che. Tỉ lệ thành công của hệ thống mới này được cải thiện nhiều hơn so với hệ thống nuôi cấy phôi mầm lai và có thể áp dụng trên phạm vi rộng hơn với nhiều giống dừa khác nhau.

Việc ứng dụng phương pháp nuôi cấy mầm trong môi trường giàu khí CO₂ cũng đã được chứng minh làm giảm đáng kể tỉ lệ thất thoát cây giống qua các bước thuần hóa cây con. Ngoài ra, thời gian nuôi dưỡng cây giống trong điều kiện *in vitro* có thể được giảm đáng kể (từ 1 năm theo phương pháp lai ghép EC cũ xuống còn khoảng 4 tháng theo quy trình mới). Khi các cây giống bắt đầu có lá xòe, chúng đã có thể được đưa vào nuôi dưỡng trong môi trường quang tự dưỡng với hệ thống làm giàu CO₂. Các bước này có thể chỉ cần thêm 2 tháng trước khi các cây con sẵn sàng cho giai đoạn được thuần hóa và chuyển vào chăm sóc trong nhà lưới.

Tuy nhiên, các bước quang tự dưỡng đòi hỏi thêm thiết bị, vật liệu và người vận hành phải có kỹ năng nhất định. Tuy vậy, các chi phí cho trang thiết bị gia tăng này có thể được bù lại từ việc tiết kiệm được môi trường nuôi cấy và số cây giống tốt thu được nhiều hơn ở cuối quy trình.

7 ỨNG DỤNG VỚI CÁC GIỐNG DỪA ĐỘT BIẾN

Một phần đáng kể của công trình nghiên cứu thực hiện ở Trạm Nghiên Cứu Albay thuộc Cơ quan Chuyên trách về dừa của Philippin (PCA) (Hình 6) và ở Trường Đại học Queensland (UQ) nhằm phát triển quy trình nuôi cấy mới đã được tiến hành trên giống dừa Laguna Tall cũng là loại đã sinh ra giống dừa đột biến Makapuno. Các loại vật liệu khác sử dụng trong nghiên cứu gồm các giống dừa Malayan Yellow Dwarf (MYD), Nias Yellow Dwarf, Mapanget Tall, Bali Tall, PNG Brown Dwarf và các giống dừa thơm của Việt Nam. Đối với các giống dừa thơm, sử dụng 2 mg/L IBA thay cho NAA (xem Bảng 1) để kích thích sự phát triển của rễ. Trong trường hợp này, IBA được sử dụng trong suốt quá trình cấy truyền cho đến khi lá đầu tiên hình thành. Trong hầu hết các nghiên cứu, chất MYD được sử dụng như là một vật liệu chuẩn (đối chứng). Cho tới nay, chưa có một đánh giá toàn diện nào về hiệu quả của quy trình mới áp dụng cho các loại dừa đột biến như: Makapuno và Kopyor. Tuy nhiên, từ các kết quả đạt được và thực tế là các phôi mầm dừa đột biến đã có phản ứng tương tự trong môi trường nuôi cấy *in vitro* như các phôi mầm dừa thông thường. Do đó, quy trình mới được coi là có thể áp dụng cho tất cả các giống dừa, bao gồm cả các giống dừa đột biến. Đề nghị tăng cường thêm phạm vi nghiên cứu để quy trình mới này đạt hiệu quả và giá trị kinh tế cao hơn.

8 VẤN ĐỀ VỀ AN TOÀN

Các bước được mô tả trong cẩm nang này phải được thực hiện theo những tiêu chuẩn an toàn phù hợp được quy định khi vận hành phòng thí nghiệm – nơi công trình nghiên cứu được thực hiện. Ngoài ra, phải thật cẩn trọng khi lắp đặt và sử dụng hệ thống làm giàu khí CO₂. Hệ thống làm giàu khí CO₂ đã được sử dụng ở vườn ươm trong nhiều thập kỷ và gần đây trong các phòng thí nghiệm nuôi cấy mô. Hệ thống làm giàu CO₂ được xây dựng để ứng dụng trong việc cấy ghép phôi mầm dừa là tốt nhất, được coi như một hệ thống khép kín. Khi sử dụng hệ thống này, khí CO₂ vẫn có thể rò rỉ ra từ thiết bị và tích tụ lại trong phòng nuôi cấy. Do đó, phải thường xuyên kiểm tra hệ thống ống dẫn và các chỗ nối để giảm thiểu sự rò rỉ này. Hàm lượng CO₂ tối đa cho phép tích tụ lại trong một tòa nhà theo tiêu chuẩn phòng thí nghiệm của Úc là 5.000 ppm. Mặc dù, bản thân chất khí này là không độc nhưng nó có thể gây ra hiện tượng thiếu O₂ và gây ngạt. Do đó, cần phải lắp một máy đo nồng độ CO₂ trong phòng nuôi cấy và xử lý khi nồng độ khí CO₂ vượt quá mức cho phép.

9 TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Ashburner GR, Faure MG, Franz PR, Tomlinson DR, Pulo P, Burch JM and Thompson WK (1994) Coconut embryo culture for remote locations. *In*: Ashburner GR and Faure MG (eds) Termination report: ACIAR Project No. 9025 Coconut improvement (pp 25-28). Institute for Horticultural Development. Victoria, Australia.
- Ashburner GR, Faure MG, Tomlinson DR and Thompson WK (1995) A guide to the zygotic embryo culture of coconut palms (*Cocos nucifera* L.). ACIAR Technical Reports No. 36. ACIAR, Canberra.
- Assy Bah B (1986) Culture in vitro d'embryos zygotiques de cocotiers. *Oléagineux* 41:321-328.
- Assy-Bah B and Engelmann F (1992) Cryopreservation of immature embryos of coconut (*Cocos nucifera* L.). *Cryo Letters* 13:67-74.
- De Guzman EV and Del Rosario AG (1974) The growth and development in soil of makapuno seedlings cultured *in vitro*. National Research Council of the Philippines, Research Bulletin 29:1-16.
- Eeuwens C J (1976) Mineral requirements for growth and callus initiation of tissue explants excised from mature coconut palms (*Cocos nucifera* L.) and cultured in vitro. *Physiologia Plantarum* 36:23-28.
- Engelmann F and Batugal P (2002) Background on the development and implementation of the coconut embryo *in vitro* culture project. *In*: Engelmann F, Batugal P and Oliver JT (eds) Coconut embryo *in vitro* culture part II. IPGRI-APO, Serdang. 1-4.
- George EF (1993) Plant propagation by tissue culture, Part 1, The technology. 2nd edition. Exegetics, Edington.
- Harries HC (1982) Coconut genetic resources and the plant breeder: some new approaches to collection, use and storage. *In*: Singh RB and Chomchalow N (eds) Genetic resources and the plant breeder. International Board for Plant Genetic Resources, Bangkok. 113-118.
- Karunaratne S, Santha S and Kovoov A (1991) An in vitro assay for drought-tolerant coconut germplasm. *Euphytica* 53(1):25-30.
- Rillo EP and Paloma MBF (1992a) Storage and transport of zygotic embryos of *Cocos nucifera* L. for in vitro culture. *Plant Genetic Resources Newsletter* 86:1-4.
- Rillo EP and Paloma MBF (1992b) In vitro culture of Macapuno coconut embryos. *Coconuts Today* 9:90-108.
- Samosir YMS, Godwin ID and Adkins SW (1999) Culturability of coconut embryos following cold incubation: A technique for germplasm collection in remote sites. *Australian Journal of Botany* 47:69-75.
- Sisunandar, Samosir YMS and Adkins S (2005) Desiccation of coconut embryo for cryopreservation. Poster presented at 8th International Seed Conference, Brisbane, 8-13 May 2005.

10 SƠ ĐỒ QUY TRÌNH





Hình 1. Giai đoạn quả phát triển lý tưởng nhất cho việc tách và nuôi cấy phôi là khi vỏ một số quả trong buồng dừa mới chuyển sang màu nâu, tuổi quả vào khoảng 10-11 tháng sau khi thụ phấn.



Hình 2. Dụng cụ khoan lấy miếng nội nhũ hình trụ chứa phôi mầm ra khỏi hạt giống.



(a)

(b)

(c)

(d)

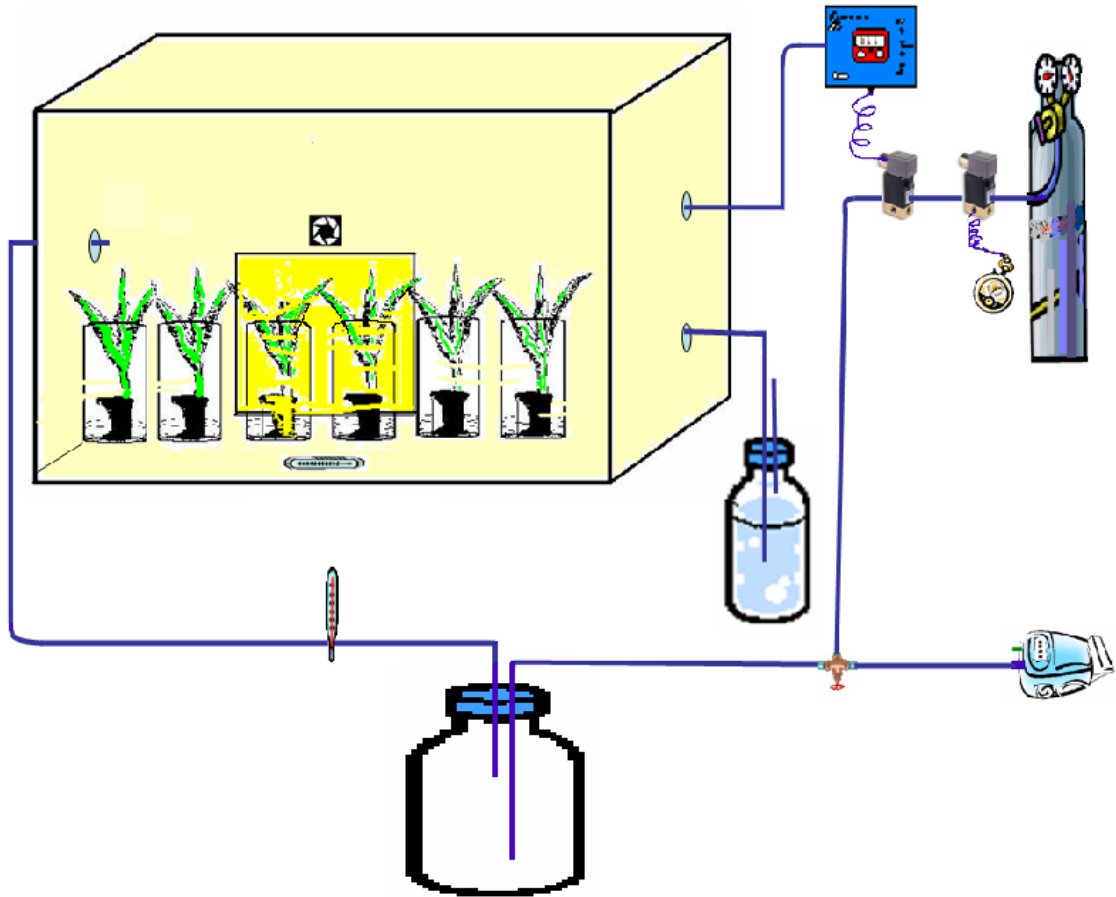
Hình 3. Các loại lọ khác nhau sử dụng trong nuôi cấy phôi mầm dừa.

(a) lọ nhựa polycarbonate (đường kính 2,5cm và chiều cao 8cm) thường được sử dụng trong bước cấy ghép đầu tiên cho đến khi ít nhất có một lá xòe.

(b) lọ kích thước lớn hơn được sử dụng cho các bước cấy truyền trong quá trình phát triển của cây con.

(c) Hệ thống 2 lọ úp vào nhau được sử dụng khi cây con phát triển lớn nhất.

(d) Có thể thay thế lọ nhựa ở tầng thứ 2 trong hình (c) bằng túi nhựa polyetylen trong suốt chụp vào bên trên lọ nuôi cấy.



Hình 4. Hệ thống làm giàu môi trường CO_2 áp dụng trong việc nuôi cấy phiê mầm dừa. Không gian kín được tạo ra bằng nhiều tấm Acrylic (dày 6mm, dài 1100mm, rộng 500mm, cao 400mm) trong suốt ghép lại với nhau. Khí CO_2 nguyên chất được bơm vào và trộn với không khí xung quanh (trong một chai Schott 2L) trước khi chuyển vào tủ chứa các lọ cây mầm bằng các ống Silicon (đường kính trong 4mm). Mật độ CO_2 trong thùng phải được duy trì ở mức $1600 \mu\text{mol/mol}$ bằng thiết bị kiểm tra CO_2 .



Hình 5. Hộp vi khí hậu (a) được sử dụng cho việc thuần hóa cây con trước khi chúng được đưa ra trồng vào đất trong vườn ươm. Hộp lớn hơn hay lều (b) được sử dụng khi có số lượng lớn cây mầm. Lều này phải được lắp hệ thống phun sương tự động và quạt thông gió.



Hình 6. Ứng dụng kỹ thuật nuôi cấy mô mới vào việc sản xuất với số lượng lớn cây giống dứa Makapuno đột biến, có giá trị kinh tế cao.