

SỰ TẠO PHÔI SOMA VÀ TÁI SINH CHỒI TRE RỒNG (*DENDROCALAMUS GIGANTEUS* WALL. EX MUNRO) TỪ NUÔI CÂY LỚP MỎNG TẾ BÀO

Lê Văn Hòa¹, Nguyễn Văn Ấy¹ và Phan Thị Ánh Nguyệt²

ABSTRACT

The study on “Somatic embryogenesis and shoot regeneration of *Dendrocalamus giganteus* Wall. ex Munro from thin cell layer of micropropagated immature stem” was conducted at the lab of Plant Tissue Culture of Plant Physiology and Biochemistry Department, College of Agriculture and Applied Biology, Can Tho University, from January 2010 to April 2011. The results showed that: (i) Thin cell layer of micropropagated immature stem induced highest ratios of calli induction (81.34%) and compact calli formation (64.77%) on MS medium supplemented with NAA 2 mg/l and 2,4-D 7 mg/l after 8 weeks culture; (ii) This identified medium was also effective for calli development stages; (iii) From calli, somatic embryogenesis could initiate on MS medium supplemented with TDZ 0.01 mg/l (33.33%) after 3 weeks culture, and most of shoots grew very well.

Keywords: *Dendrocalamus giganteus* Wall. ex Munro, thin cell layer, NAA, 2,4-D, TDZ, BA, callus induction, shoot regeneration

Title: Somatic embryogenesis and shoot regeneration of the giant bamboo (*Dendrocalamus giganteus* Wall. ex Munro) from thin cell layer of micropropagated immature stem

TÓM TẮT

Nghiên cứu “Sự tạo phôi soma và tái sinh chồi tre Rồng (*Dendrocalamus giganteus* Wall. ex Munro) từ lớp mỏng tế bào của thân chồi non in vitro” đã được tiến hành tại Phòng nuôi cấy mô của Bộ môn Sinh Lý - Sinh Hoá, Khoa Nông Nghiệp & SHƯĐ, Trường Đại Học Cần Thơ, từ tháng 02/2010 đến tháng 04/2011. Kết quả đã đạt được như sau: (i) Nuôi cấy lớp mỏng tế bào của thân chồi non in vitro trên môi trường MS bổ sung NAA 2 mg/l kết hợp với 2,4-D 7 mg/l cho hiệu quả tạo mô sẹo cao (81,34%) và mô sẹo cứng chắc cao nhất (64,77%) sau 8 tuần nuôi cấy; (ii) Môi trường thích hợp cho sự sinh trưởng và phát triển của mô sẹo là môi trường MS + NAA 2 mg/l kết hợp với 2,4-D 7 mg/l; (iii) Sự tạo phôi soma (và tái sinh chồi cây tre Rồng) từ mô sẹo trên môi trường MS bổ sung TDZ 0,01 mg/l đạt được 33,33% vào thời điểm 3 tuần sau khi cấy, các chồi trong môi trường này sinh trưởng và phát triển tốt.

Từ khóa: cây tre Rồng (*Dendrocalamus giganteus* Wall. ex Munro), lớp mỏng tế bào, NAA, 2,4-D, TDZ, BA, mô sẹo, tái sinh chồi

1 MỞ ĐẦU

Trong những năm gần đây tre trở nên là cây quan trọng trong chương trình quản lý rừng vì nó sinh trưởng nhanh, có thể thay thế cho gỗ, giúp giảm phá rừng và có tiềm năng lớn trong nhiều lĩnh vực như: thực phẩm, công nghiệp giấy, sản xuất các

¹ Khoa NN & SHƯĐ, Trường Đại học Cần Thơ

² Lớp Cao học Công nghệ sinh học – Khóa 15, Viện NC&PT CNSH, Trường Đại học Cần Thơ

mặt hàng thủ công mỹ nghệ, dụng cụ thể dục thể thao, nhạc cụ, tủ giường từ thô sơ đến cao cấp và các đồ gia dụng khác. Ở nước ta tre còn được xem như là cây đã góp phần đáng kể vào công cuộc xoá đói giảm nghèo.

Hiện nay loại tre đang được chú ý là tre RỒNG (*Dendrocalamus giganteus* Wall. ex Munro) vì nó có thân to, thích nghi với nhiều vùng đất và điều kiện khí hậu khác nhau. Đây là loài tre có tiềm năng nhất để làm bột giấy và gỗ cao cấp, vì thế việc tiến hành nhân giống loại tre rồng này là rất cần thiết. Tuy nhiên, hiện nay nhân giống tre chủ yếu dựa vào các phương pháp truyền thống như hom gốc, thân ngầm, hom cành, đoạn thân khí sinh. Các phương pháp nhân giống này còn rất hạn chế vì hệ số nhân chồi thấp, cây không đồng nhất, tốn nhiều thời gian chưa đáp ứng được nhu cầu về số lượng tre giống. Kỹ thuật nuôi cấy mô đã làm một cuộc cách mạng trong nhân giống thực vật với quy mô lớn và ngày nay, những ứng dụng của nó đã được áp dụng rộng rãi trên toàn thế giới. Trong vi nhân giống phương pháp nuôi cấy lớp mỏng tế bào (thin cell layer) cho phép kiểm soát điều kiện nuôi cấy một cách dễ dàng do nồng độ hormone nội sinh của mẫu thấp. Sự phân cực của tế bào trong lớp mỏng tế bào giảm, tạo được nhiều chồi hơn, do đó hệ số nhân chồi cao hơn nhiều so với các phương pháp nhân giống truyền thống. Phương pháp này có nhiều ưu điểm hơn phương pháp nhân giống bằng nuôi cấy đốt thân có chứa chồi bên, vừa ít tổn hại đến cây mẹ, vừa có nguồn mẫu dồi dào, vừa có hệ số nhân chồi cao. Vì vậy nghiên cứu “Sự tạo phôi soma và tái sinh chồi tre RỒNG từ nuôi cấy lớp mỏng tế bào của thân chồi non *in vitro*” được tiến hành nhằm xác định môi trường nuôi cấy có nồng độ chất điều hòa sinh trưởng thích hợp để tạo phôi soma và tái sinh tre RỒNG từ nuôi cấy lớp mỏng tế bào.

2 PHƯƠNG TIỆN VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1 PHƯƠNG TIỆN

2.1.1 Địa điểm và thời gian

Thí nghiệm được thực hiện tại Phòng Nuôi cấy mô, Bộ môn Sinh Lý - Sinh Hóa, Khoa NN& SHỨD, Trường Đại học Cần Thơ, từ 02/2010 đến 04/2011.

2.1.2 Vật liệu thí nghiệm

Mẫu thí nghiệm là các thân còn non của chồi tre RỒNG *in vitro*, có chiều dài 2-3 cm (2 tuần tuổi), được nuôi cấy tại Phòng thí nghiệm Nuôi cấy mô, Bộ môn Sinh Lý - Sinh Hóa, Khoa Nông nghiệp và Sinh học Ứng dụng, Trường Đại học Cần Thơ.

2.1.3 Thiết bị và dụng cụ

Sử dụng các trang thiết bị và dụng cụ thuộc phòng Nuôi cấy mô, Bộ môn Sinh Lý-Sinh Hóa. Phòng nuôi cấy mô (âm độ 55%, nhiệt độ $26 \pm 2^\circ\text{C}$, cường độ sáng 1.000-2.000 lux, chu kỳ quang 16 giờ/ngày).

2.1.4 Hoá chất

- Khoáng đa lượng gồm các nguyên tố: N, P, K, Ca, S, Mg.
- Khoáng vi lượng gồm các nguyên tố: B, Mn, Zn, Cu, Mo, Cl, Fe.
- Các chất hữu cơ: agar, đường, nước dừa,...
- Chất điều hoà sinh trưởng thực vật: NAA, 2,4-D, TDZ.

2.2 PHƯƠNG PHÁP

Môi trường nuôi cấy là môi trường cơ bản MS (Murashige & Skoog, 1962) bổ sung: thiamin 1 mg/l; pyridoxin 1 mg/l; nicotinic acid 1 mg/l; đường 30 g/l, nước dừa 100 ml/l và agar 7,5 g/l, chất điều hoà sinh trưởng thực vật. pH = 5,8.

2.2.1 Thí nghiệm 1: Hiệu quả của môi trường MS bổ sung 2,4-D và NAA trên sự hình thành mô sẹo từ nuôi cấy lớp mỏng tế bào

Mẫu chồi được tách bỏ lớp vỏ bao bên ngoài, chọn phần non nhất, cắt lớp mỏng gần phần mắt, với độ dày khoảng 0,5-1 mm. Thí nghiệm được bố trí theo thể thức hoàn toàn ngẫu nhiên 1 nhân tố: chất điều hoà sinh trưởng (2,4-D kết hợp với NAA), với 9 nghiệm thức, 5 lần lặp lại, 2 keo/lần lặp lại, mỗi keo có 5 mẫu (lát mỏng). Các nghiệm thức được bố trí như sau:

1. MS (Đối chứng, không bổ sung chất điều hoà sinh trưởng)
2. MS +NAA 2 mg/l +2,4-D 5 mg/l
3. MS +NAA 2 mg/l +2,4-D 6 mg/l
4. MS +NAA 2 mg/l +2,4-D 7 mg/l
5. MS +NAA 2 mg/l +2,4-D 8 mg/l
6. MS +NAA 5 mg/l +2,4-D 2 mg/l
7. MS +NAA 6 mg/l +2,4-D 2 mg/l
8. MS +NAA 7 mg/l +2,4-D 2 mg/l
9. MS +NAA 8 mg/l +2,4-D 2 mg/l

Chỉ tiêu theo dõi: Tỷ lệ mẫu tạo mô sẹo và tỷ lệ mô sẹo rắn chắc vào các thời điểm 2, 4, 6, và 8 tuần sau khi cấy.

2.2.2 Thí nghiệm 2: Hiệu quả của môi trường MS bổ sung 2,4-D, NAA và TDZ lên sự phát triển cụm mô sẹo từ nuôi cấy lớp mỏng tế bào

Chọn các cụm mô sẹo (callus) rắn chắc, có màu sắc, kích thước tương đương nhau (0,3 cm) được tạo ra từ lớp mỏng tế bào của thân chồi non *in vitro* ở thí nghiệm 1 để tiến hành thí nghiệm. Thí nghiệm được bố trí theo thể thức hoàn toàn ngẫu nhiên 1 nhân tố, với 7 nghiệm thức, 4 lần lặp lại, 2 keo/lần lặp lại, mỗi keo cấy 4 mẫu mô sẹo có kích thước (5 x 5 mm). Các thí nghiệm được bố trí như sau:

1. MS (Đối chứng, không bổ sung chất điều hoà sinh trưởng)
2. MS +2,4-D 7 mg/l +NAA 2 mg/l +TDZ
3. MS +2,4-D 7 mg/l +NAA 2 mg/l +TDZ 0,04 mg/l
4. MS +2,4-D 7 mg/l +NAA 2 mg/l +TDZ 0,08 mg/l
5. MS +2,4-D 7 mg/l +NAA 2 mg/l +TDZ 0,12 mg/l
6. MS +2,4-D 7 mg/l +NAA 2 mg/l +TDZ 0,16 mg/l
7. MS +2,4-D 7 mg/l +NAA 2 mg/l +TDZ 0,20 mg/l

Chỉ tiêu theo dõi: Đặc điểm của cụm mô sẹo (màu sắc, hình dạng, cấu trúc), đường kính trung bình của mô sẹo vào các thời điểm: 2, 4, 6, 8 tuần sau khi cấy.

2.2.3 Thí nghiệm 3: Hiệu quả của môi trường MS bổ sung TDZ lên sự tạo phôi soma và tái sinh chồi của cụm mô sẹo từ nuôi cấy lớp mỏng tế bào

Chọn các cụm mô sẹo rắn chắc, có kích thước và màu sắc tương đương nhau từ thí nghiệm 2. Thí nghiệm được bố trí theo thể thức hoàn toàn ngẫu nhiên 1 nhân tố,

với 4 nghiệm thức, mỗi nghiệm thức có 3 lần lặp lại, mỗi lần lặp lại 3 keo, mỗi keo cấy 2 cụm mô sẹo có kích thước và màu sắc tương đương nhau. Thí nghiệm được bố trí như sau:

1. MS (Đối chứng, không bổ sung chất điều hòa sinh trưởng)
2. MS + TDZ 0,01 mg/l 3. MS + TDZ 0,03 mg/l 4. MS + TDZ 0,05 mg/l

Chỉ tiêu theo dõi: % cụm tạo chồi vào các thời điểm 3 tuần sau khi cấy.

Tất cả số liệu được phân tích thống kê bằng chương trình MSTATC.

3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Hiệu quả của môi trường MS bổ sung 2,4-D và NAA trên sự hình thành mô sẹo từ nuôi cấy lớp mỏng tế bào

Sự phát triển của mẫu cấy phụ thuộc rất lớn vào vị trí lấy mẫu cấy. Đối với cây tre Rong để tạo được mô sẹo thì cần cắt mẫu thành những lớp mỏng gần với mắt của thân tre. Kết quả cho thấy những lát mỏng của thân chồi non trên môi trường đối chứng không có sự phát triển cũng như không có sự biến đổi cấu trúc để hình thành mô sẹo mà các mẫu cấy này bị hóa nâu và chết dần sau 2 tuần nuôi cấy. Các nghiệm thức MS bổ sung NAA và 2,4-D đều có sự biến đổi và hình thành mô sẹo. Đầu tiên mô sẹo phát sinh ở các vị trí mép cắt của lớp mỏng và lan dần vào phía bên trong của mô thân, phần lớn mô sẹo có dạng mềm, rời rạc hoặc kết dính mềm có màu nâu vàng và không có cấu trúc rõ ràng.

3.1.1 Tỷ lệ (%) mẫu tạo mô sẹo

Kết quả ở Bảng 1 cho thấy ở thời điểm 2 tuần sau khi cấy (TSKC), tỷ lệ % mẫu tạo mô sẹo cao nhất (khoảng 25,3%) ở các nghiệm thức MS +NAA 2 mg/l +2,4-D 7 mg/l và MS +NAA 2 mg/l +2,4-D 8 mg/l và khác biệt có ý nghĩa thống kê 1% so với các nghiệm thức còn lại, trừ nghiệm thức MS +NAA 2 mg/l +2,4-D 6 mg/l (22,7%). Các nghiệm thức còn lại có tỷ lệ mẫu tạo mô sẹo biến động từ 12,0% - 17,3% và giữa các nghiệm thức này khác biệt không có ý nghĩa thống kê.

Kết quả ở Bảng 1 cũng cho thấy vào thời điểm 4 TSKC, tỷ lệ mẫu tạo mô sẹo có sự gia tăng ở các nghiệm thức. Môi trường MS có nồng độ 2,4-D 2 mg/l kết hợp với NAA với các nồng độ khác nhau cho thấy tỷ lệ tạo mô sẹo tăng khi nồng độ NAA tăng, ở nghiệm thức MS +2,4-D 2 mg/l +NAA 5 mg/l là 30,9% đến nghiệm thức MS +2,4-D 2 mg/l +NAA 6 mg/l tăng lên 40%. Tuy nhiên, khi nồng độ NAA tăng đến 7 mg/l (nghiệm thức MS +2,4-D 2 mg/l +NAA 7 mg/l) thì tỷ lệ tạo mô sẹo bị giảm xuống còn 30,9% và giảm thấp nhất ở nghiệm thức MS +2,4-D 2 mg/l +NAA 8 mg/l là 29,3%, nhưng giữa các nghiệm thức MS bổ sung 2,4-D 2 mg/l kết hợp với NAA (lần lượt là 5 mg/l, 6 mg/l và 7 mg/l) không khác biệt nhau nhưng khác biệt có ý nghĩa ở mức 1% so với nghiệm thức đối chứng. Theo Jacob (1993) sự hình thành mô sẹo là phản ứng tăng sinh hỗn loạn của mô bị thương trong điều kiện có tác nhân kích thích giúp hình thành mô sẹo. Chất điều hòa sinh trưởng là một trong những yếu tố quan trọng tác động lên quá trình này. Để cảm ứng mô sẹo từ mẫu cấy 2,4-D là loại auxin thường được bổ sung vào môi trường nuôi cấy (Ramanayake và Wanniarachchi. 2003).

Bảng 1: Hiệu quả của NAA và 2,4-D trong môi trường MS lên tỷ lệ (%) mẫu tạo mô sẹo theo thời gian

Nghiệm thức	Thời gian (tuần sau khi cấy)	
	2	4
MS (Đối chứng, không bổ sung chất điều hòa sinh trưởng)	0,0 c	0,0 f
MS +NAA 2 mg/l +2,4-D 5 mg/l	12,0 b	30,9 e
MS +NAA 2 mg/l +2,4-D 6 mg/l	12,0 b	40,0 d
MS +NAA 2 mg/l +2,4-D 7 mg/l	12,0 b	30,9 de
MS +NAA 2 mg/l +2,4-D 8 mg/l	12,0 b	29,3 e
MS +NAA 5 mg/l +2,4-D 2 mg/l	17,3 b	56,0 c
MS +NAA 6 mg/l +2,4-D 2 mg/l	22,7 a	66,7 b
MS +NAA 7 mg/l +2,4-D 2 mg/l	25,3 a	81,3 a
MS +NAA 8 mg/l +2,4-D 2 mg/l	25,3 a	70,7 b
F tính	**	**
CV (%)	36,2	11,8

*Ghi chú: Trong cùng một cột, những số có chữ theo sau giống nhau khác biệt không có ý nghĩa thống kê khi dùng phép kiểm định Duncan ở mức ý nghĩa 1%; **: khác biệt ý nghĩa thống kê ở mức 1%.*

Môi trường MS bổ sung nồng độ NAA 2 mg/l kết hợp với 2,4-D ở các nồng độ khác nhau có hiệu quả cao lên tỷ lệ tạo mô sẹo so với nghiệm đối chứng và các nghiệm thức MS +2,4-D 2 mg/l kết hợp với NAA ở các nồng độ (5 mg/l, 6 mg/l, 7 mg/l và 8 mg/l), ở mức ý nghĩa ở mức 1%. Môi trường MS bổ sung nồng độ 2,4-D càng tăng thì cho hiệu quả tạo mô sẹo càng cao, tuy nhiên càng tăng dần nồng độ 2,4-D đến mức 2,4-D 8 mg/l (nghiệm thức MS +NAA 2 mg/l + 2,4-D 8 mg/l) thì tỷ lệ tạo mô sẹo bắt đầu giảm. Tỷ lệ đạt mô sẹo trung bình cao nhất là 81,3% trên môi trường MS bổ sung NAA 2 mg/l +2,4-D 7 mg/l, khác biệt có ý nghĩa 1% so với các tất cả các nghiệm thức khác. Kết quả của thí nghiệm cho thấy môi trường MS bổ sung cố định nồng độ NAA và kết hợp với nồng độ 2,4-D tăng dần có hiệu quả trong sự phản phân hóa mô để tạo ra mô sẹo từ lớp mỏng thân chồi tre Ròng.

3.1.2 Tỷ lệ (%) mẫu tạo mô sẹo cứng chắc

Vào thời điểm 4 TSKC các mô sẹo ở các nghiệm thức thí nghiệm có kích thước hình dạng, màu sắc và cấu trúc gần giống nhau, đa số các mẫu mô sẹo được hình thành có cấu trúc kết dính lại, nhùng nước, có màu vàng nhạt. Tuy nhiên, ở thời điểm 8 TSKC, các mẫu phát sinh mô sẹo có tính chất, cấu trúc và màu sắc khác nhau, có thể là: 1- dạng mô rất xốp, màu trắng sữa và các tế bào rời rạc nhau (friable callus) hay 2- phát triển thành một khối riêng có cấu trúc rắn chắc (compact callus) hoặc 3- dạng trung gian có cấu trúc rắn chắc, xốp và mọng nước xen lẫn trong môi trường nuôi cấy. Đây chính là phản ứng tăng sinh hỗn loạn của mô bị thương trong điều kiện có tác nhân kích thích giúp hình thành mô sẹo trước khi phát triển và phân hóa.

Kết quả ở bảng 2 cho thấy các nghiệm thức đều có mẫu tạo mô sẹo rắn chắc nhưng với tỷ lệ khác nhau và khác biệt có ý nghĩa ở mức 1% so với nghiệm thức đối chứng (0%). Nghiệm thức cho tỷ lệ mô sẹo cứng chắc cao nhất là nghiệm thức MS +NAA 2 mg/l +2,4-D 6 mg/l và MS +NAA 2 mg/l +2,4-D 7 mg/l, lần lượt là

59,4% và 64,8%. Nghiệm thức cho tỷ lệ mô sẹo cứng chắc đạt thấp nhất sau 8 tuần nuôi cấy là nghiệm thức MS +2,4-D 2 mg/l +NAA 5 mg/l, 17%. Tuy nhiên, nghiệm thức MS +2,4-D 2 mg/l +NAA 6 mg/l, đạt 29,0%, lại không khác biệt ý nghĩa thống kê so với nghiệm thức 2,4-D 2 mg/l +NAA 7 mg/l, đạt 27,8%, và nghiệm thức MS +2,4-D 2 mg/l +NAA 8 mg/l, đạt 23,33%. Như vậy, kết quả của thí nghiệm cho thấy tỷ lệ mô sẹo cứng chắc tăng khi cố định nồng độ NAA ở 2 mg/l và tăng dần nồng độ 2,4-D lên từ 6 mg/l đến 7 mg/l và bắt đầu giảm ở nồng độ 2,4-D 8 mg/l. Khi nồng độ auxin cao kích thích sự tạo mô sẹo dạng rời rạc nhưng khi giảm auxin thì mô sẹo có dạng nốt và cứng chắc. Mô sẹo được tạo ra trong thí nghiệm có nhiều dạng cấu trúc khác nhau có thể là do mô phát triển trên môi trường nuôi cấy có 2,4-D là một auxin mạnh có tác dụng tốt cho quá trình phân biệt hóa. Theo Gautheret (1966) khả năng tái sinh sẽ vẫn được duy trì lâu hơn ở mô sẹo rắn chắc và sẽ mất đi ở mô sẹo rời rạc, nguyên nhân có thể do mô sẹo mất khả năng tổng hợp một số chất chủ yếu cho sự tái sinh của nó khi số lần cấy chuyên tăng lên. Tóm lại, kết quả thí nghiệm sau 8 tuần nuôi cấy cho thấy tỷ lệ tạo mô sẹo rắn chắc tốt khi kết hợp nồng độ NAA 2 mg/l và 2,4-D (6 mg/l hay 7 mg/l) và khi nồng độ 2,4-D cao gây độc, có thể ức chế sự sinh trưởng của mô sẹo.

Bảng 2: Tỷ lệ (%) mẫu tạo mô sẹo cứng chắc trong môi trường MS bổ sung 2,4-D kết hợp NAA vào thời điểm 8 tuần nuôi cấy

Nghiệm thức	8 tuần sau khi cấy
MS (Đối chứng, không bổ sung chất điều hòa sinh trưởng)	0,0 f
MS +NAA 2 mg/l +2,4-D 5 mg/l	17,0 e
MS +NAA 2 mg/l +2,4-D 6 mg/l	29,0 cd
MS +NAA 2 mg/l +2,4-D 7 mg/l	27,8 cd
MS +NAA 2 mg/l +2,4-D 8 mg/l	23,3 de
MS +NAA 5 mg/l +2,4-D 2 mg/l	36,1 bc
MS +NAA 6 mg/l +2,4-D 2 mg/l	59,4 a
MS +NAA 7 mg/l +2,4-D 2 mg/l	64,8 a
MS +NAA 8 mg/l +2,4-D 2 mg/l	43,1 b
F tính	**
CV (%)	12,9

*Ghi chú: Những số có chữ theo sau giống nhau trong cùng một cột thì không khác biệt có ý nghĩa thống kê qua phép thử Duncan; **: khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức 1%.*

3.2 Hiệu quả của môi trường MS bổ sung 2,4-D, NAA và TDZ lên sự phát triển cụm mô sẹo từ nuôi cấy lớp mỏng tế bào

3.2.1 Đường kính của mô sẹo

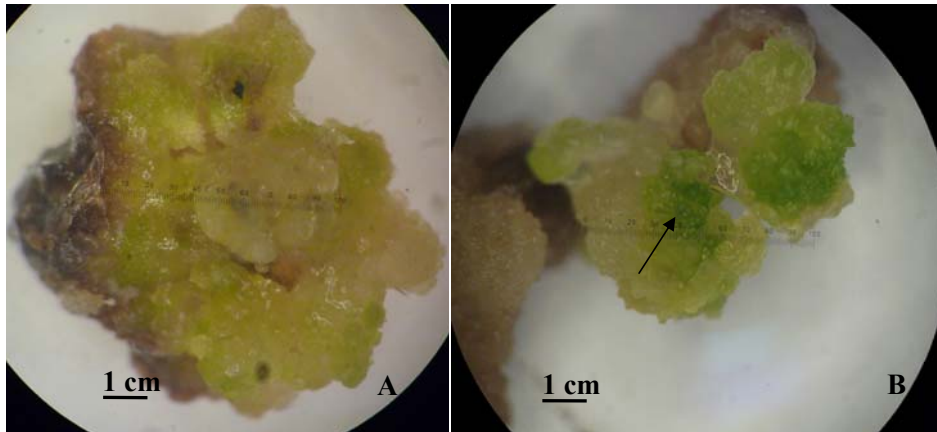
Kết quả ở Bảng 3 cho thấy đường kính trung bình của cụm mô sẹo ở các nghiệm thức có sự khác biệt ý nghĩa thống kê ở mức 5% vào thời điểm 2 và 4 TSKC, trong đó nghiệm thức có đường kính trung bình thấp nhất là ở nghiệm thức đối chứng, 0,01 cm và nghiệm thức MS +NAA 2 mg/l +2,4-D 7 mg/l, có đường kính trung bình cao nhất (lần lượt là 0,13 cm và 0,29 cm). Tuy nhiên, lại không có sự khác biệt thống kê so với các nghiệm thức còn lại. Ở thời điểm 6 và 8 TSKC nuôi cấy, đường kính trung bình của mô sẹo ở các nghiệm thức tiếp tục tăng. Ở thời điểm này nghiệm thức MS +NAA 2 mg/l +2,4-D 7 mg/l cho đường kính trung bình cao nhất (0,54 cm) và khác biệt có ý nghĩa thống kê 1% so với các nghiệm thức còn lại. Đường kính trung bình của mô sẹo thấp vẫn là nghiệm thức đối chứng,

0,01 cm. Kết quả này phù hợp với nhận định của Gautheret (1966) cho rằng mô sẹo sau khi đã hình thành nếu được tiếp tục duy trì trên môi trường có auxin thì mô sẹo sẽ tăng sinh nhanh, nhưng nếu chuyển sang môi trường có đầy đủ thành phần dinh dưỡng không có sự hiện diện của auxin thì sự tăng sinh của mô sẹo sẽ chậm lại.

Bảng 3: Đường kính trung bình (cm) của mô sẹo trong môi trường bổ sung 2,4-D, NAA và TDZ theo thời gian

Nghiệm thức	Thời gian (tuần sau khi cấy)			
	2	4	6	8
MS (Đối chứng, không bổ sung chất điều hòa sinh trưởng)	0,01 b	0,01 b	0,01 c	0,01 c
MS +2,4-D 7 mg/l +NAA 2 mg/l +TDZ	0,13 a	0,29 a	0,54 a	0,63 a
MS +2,4-D 7 mg/l +NAA 2 mg/l +TDZ 0,04 mg/l	0,10 a	0,14 ab	0,29 b	0,31 b
MS +2,4-D 7 mg/l +NAA 2 mg/l +TDZ 0,08 mg/l	0,08 a	0,17 a	0,23 b	0,27 b
MS +2,4-D 7 mg/l +NAA 2 mg/l +TDZ 0,12 mg/l	0,10 a	0,17 a	0,28 b	0,36 b
MS +2,4-D 7 mg/l +NAA 2 mg/l +TDZ 0,16 mg/l	0,08 ab	0,27 a	0,28 b	0,29 b
MS +2,4-D 7 mg/l +NAA 2 mg/l +TDZ 0,20 mg/l	0,12 a	0,21 a	0,26 b	0,26 b
F tính	*	*	**	**
CV (%)	51,14	54,30	35,80	29,17

Ghi chú: Những số có chữ theo sau giống nhau trong cùng một cột thì không khác biệt có ý nghĩa thống kê qua phép thử Duncan; *: khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức 5%; **: khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức 1%.



Hình 1: Cụm mô sẹo có dạng cứng chắc màu xanh, với nhiều tế bào hình khối cầu

(A) MS + NAA 2 mg/l + 2,4-D 7 mg/l (ở vật kính 20X)

(B) MS + NAA 2 mg/l + 2,4-D 7 mg/l + TDZ 0,04 mg/l (ở vật kính 10X)

Kết quả cũng cho thấy vào thời điểm 6 TSKC, mô sẹo có sự thay đổi về màu sắc và cấu trúc. Ban đầu mô sẹo có màu vàng sáng, rắn chắc sau đó bắt đầu chuyển sang dạng khối cầu màu vàng xanh, xen lẫn với màu trắng sáng, bề mặt trơn láng (Hình 1), nhiều nhất ở nghiệm thức MS +NAA 2 mg/l +2,4-D 7 mg/l +TDZ 0,04 mg/l, sau đó đến nghiệm thức NAA 2 mg/l +2,4-D 7 mg/l và nghiệm thức MS +NAA 2 mg/l +2,4-D 7 mg/l +TDZ 0,08 mg/l, các nghiệm thức còn lại không có xuất hiện. Cytokinin kích thích sự phân chia tế bào trong điều kiện có sự hiện diện của auxin. Teresa *et al.* (2004) chứng minh rằng khi bổ sung auxin và cytokinin

vào môi trường nuôi cấy các mô sẹo thì thu được cụm tiền chồi từ mô sẹo. Cụm tiền chồi sẽ được đưa vào môi trường ở các thí nghiệm tiếp theo nhằm phát triển hình thái, tạo ra các chồi kéo dài, có khả năng tạo rễ và phát triển thành cây hoàn chỉnh.

3.2.2 Chiều cao của cụm mô sẹo

Ở thời điểm 2 TSKC chiều cao trung bình của cụm mô sẹo ở các nghiệm thức không khác biệt về mặt thống kê (Bảng 4). Tuy nhiên, sau 4 TSKC chiều cao trung bình của cụm mô sẹo bắt đầu có sự khác biệt thống kê ở mức 5%, đường kính trung bình cao nhất ở nghiệm thức MS +NAA 2 mg/l +2,4-D 7 mg/l, 0,15 cm, khác biệt so với nghiệm thức đối chứng (0,0 cm) nhưng không khác biệt so với các nghiệm thức còn lại. Ở thời điểm 6 TSKC, nghiệm thức có chiều cao trung bình cao nhất vẫn là nghiệm thức MS + NAA 2 mg/l +2,4-D 7 mg/l, 0,25 cm, khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức 1% so với tất cả các nghiệm thức còn lại ngoại trừ nghiệm thức MS +NAA 2 mg/l +2,4-D 7 mg/l +TDZ 0,04 mg/l, 0,19 cm.

Bảng 4: Chiều cao (cm) của mô sẹo trong môi trường MS bổ sung 2,4-D, NAA và TDZ theo thời gian

Nghiệm thức	Thời gian (tuần sau khi cấy)			
	2	4	6	8
MS (Đối chứng, không bổ sung chất điều hòa sinh trưởng)	0,01	0,00 b	0,00 c	0,00 c
MS +2,4-D 7 mg/l +NAA 2 mg/l +TDZ	0,10	0,15 a	0,25 a	0,32 a
MS +2,4-D 7 mg/l +NAA 2 mg/l +TDZ 0,04 mg/l	0,02	0,08 ab	0,19 ab	0,20 ab
MS +2,4-D 7 mg/l +NAA 2 mg/l +TDZ 0,08 mg/l	0,05	0,07 ab	0,07 bc	0,18 ab
MS +2,4-D 7 mg/l +NAA 2 mg/l +TDZ 0,12 mg/l	0,07	0,09 a	0,12 bc	0,22 ab
MS +2,4-D 7 mg/l +NAA 2 mg/l +TDZ 0,16 mg/l	0,06	0,08 ab	0,09 bc	0,04 bc
MS +2,4-D 7 mg/l +NAA 2 mg/l +TDZ 0,20 mg/l	0,10	0,13 a	0,13 b	0,17 ab
F _{tính}	ns	*	**	**
CV (%)	54,17	62,10	46,46	38,69

*Ghi chú: Những số có chữ theo sau giống nhau trong cùng một cột thì không khác biệt có ý nghĩa thống kê qua phép thử Duncan; ns khác biệt không có ý nghĩa thống kê; *: khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức 5%; **: khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức 1%.*

Trung tự, vào 8 TSKC sau khi cấy mô sẹo trên môi trường MS +NAA 2 mg/l +2,4-D 7 mg/l, có đường kính trung bình cao nhất (0,32 cm) và khác biệt có ý nghĩa thống kê 1% so với nghiệm thức đối chứng, 0,0 cm, và nghiệm thức MS +NAA 2 mg/l +2,4-D 7 mg/l +TDZ 0,16 mg/l, 0,04 cm, nhưng không khác biệt so với các nghiệm thức còn lại.

3.3 Thí Nghiệm 3: Hiệu quả của môi trường MS bổ sung TDZ lên sự tạo phôi soma và tái sinh chồi của cụm mô sẹo từ nuôi cấy lớp mỏng tế bào

Kết quả thí nghiệm cho thấy, mô sẹo từ lớp mỏng tế bào của thân chồi non tre Ròng *in vitro* có sự tạo phôi và hình thành chồi. Trong thời gian đầu (1 TSKC) quan sát cho thấy ở nghiệm thức bổ sung TDZ 0,01 mg/l và ở nghiệm thức MS bổ sung TDZ 0,03 mg/l, các cụm mô sẹo đã có sự biến đổi về cấu trúc, và kết quả là chồi được hình thành (Hình 2). Trong quá trình phát triển phôi, hoạt tính của auxin giảm dần và ngược lại hoạt tính cytokinin tăng dần. Hoạt tính cytokinin tăng

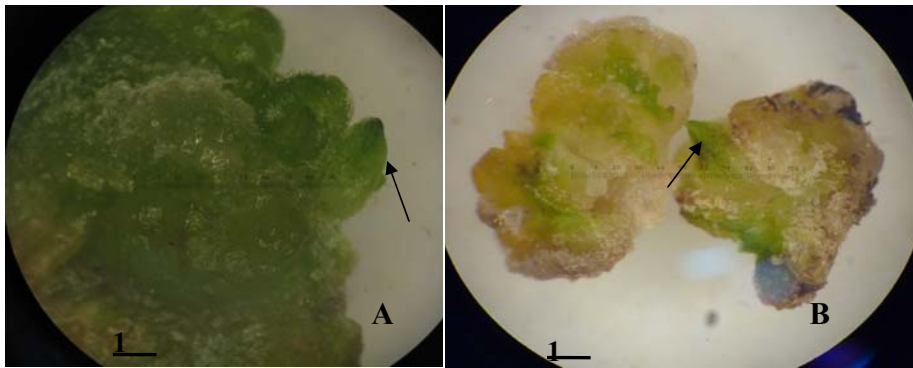
lên trong giai đoạn này là yếu tố chính điều khiển quá trình sinh mạch giúp cho sự tạo chồi.

Bảng 5: Tỷ lệ (%) mẫu chồi tái sinh trong môi trường MS bổ sung MS với nồng độ khác nhau vào thời điểm 3 tuần sau khi cấy

Nghiệm thức	3 tuần sau khi cấy
MS (Đối chứng, không bổ sung TDZ)	0,0 b
MS + TDZ 0,01 mg/l	33,3 a
MS + TDZ 0,03 mg/l	16,7 ab
MS + TDZ 0,05 mg/l	5,7 b
F _{tính}	*
CV (%)	5,4

Ghi chú: Các số liệu đã được chuyển đổi sang $\sqrt{100(x+1)}$ (với x là số liệu gốc) trước khi chạy thống kê. Những số có chữ theo sau giống nhau trong cùng một cột thì không khác biệt có ý nghĩa thống kê qua phép thử LSD; *: khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức 5%.

Việc bổ sung chất điều hòa sinh trưởng thực vật góp phần cho việc cảm ứng tế bào phân chia và phát sinh cơ quan chồi, nồng độ TDZ khác nhau có ảnh hưởng khác nhau lên sự tái sinh chồi. Qua kết quả Bảng 4 cho thấy ở thời điểm 3 TSKC các nghiệm thức có sự khác biệt ý nghĩa thống kê ở mức 5%. Trong đó, nghiệm thức MS +TDZ 0,01 mg/l cho tỷ lệ chồi tái sinh cao nhất (33,3%) nhưng lại không khác biệt so với nghiệm thức MS +TDZ 0,03 mg/l, 16,7%. Các chồi tái sinh đều sinh trưởng và phát triển tốt. Nghiệm thức đối chứng (MS không bổ sung TDZ) không có chồi sự tái sinh (0%).



Hình 2: Chồi hình thành sau 1 tuần nuôi cấy trong môi trường tái sinh chồi

(A) MS + TDZ 0,01 mg/l (ở vật kính 20X)

(B) MS + TDZ 0,03 mg/l (ở vật kính 10X)

Kết quả này phù hợp với nhận định của Murthy *et al.* (1998), TDZ là loại cytokinin có hiệu quả cao, có thể cảm ứng sự phát sinh cơ quan ở nồng độ thấp và làm giảm ưu thế chồi ngọn. TDZ là chất điều hòa sinh trưởng thực vật có tác dụng mạnh trong sự tạo chồi bất định. Ngoài ra, TDZ còn kích thích sự tổng hợp cytokinin nội sinh và ức chế sự phân hủy bởi enzyme oxy hóa cytokinin; TDZ khá bền vững trong môi trường nuôi cấy. Kết quả ở bảng 5 cũng cho thấy khi nồng độ TDZ tăng lên thì khả năng tái sinh chồi của cụm mô sẹo tre Ròng giảm xuống còn 5,67%, ở nồng độ này có thể TDZ đã gây độc cho mẫu cấy, một số mẫu đã bị biến

đổi từ màu vàng xanh chuyển dần sang màu nâu đen và chết 4 TSKC chiếm tỷ lệ cao. Điều này chứng minh rằng, trên môi trường nuôi cấy không có cytokinin thì sự tái sinh chồi từ mô sẹo rất khó xảy ra nhưng khi nồng độ cytokinin (TDZ tăng lên 0,05 mg/l) thì tỷ lệ tái sinh chồi giảm có thể do cấu trúc của mô sẹo tạo ra từ các mẫu cây ban đầu khác nhau do đó dẫn đến khả năng tái sinh chồi cũng khác nhau.

4 KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

4.1 Kết luận

Môi trường MS bổ sung NAA 2 mg/l kết hợp với 2,4-D 7 mg/l cho hiệu quả tạo mô sẹo cao (81,3%) và mô sẹo rắn chắc cao nhất (64,8%) ở thời điểm 8 tuần sau khi cấy.

Môi trường thích hợp cho sự sinh trưởng của mô sẹo là môi trường MS +NAA 2 mg/l kết hợp với 2,4-D 7 mg/l.

Sự tạo phôi soma và tái sinh chồi cây tre Ròng từ mô sẹo trên môi trường MS bổ sung TDZ 0,01 mg/l đạt tỷ lệ 33,3% sau 3 tuần nuôi cấy.

4.2 Đề nghị

Tiến hành tạo rễ cho các cụm chồi tre Ròng có nguồn gốc từ mô sẹo để tạo cây hoàn chỉnh trong giai đoạn *in vitro*.

Nghiên cứu thuần dưỡng cây con trong nhà lưới để khảo sát khả năng sinh trưởng của cây tre Ròng phát triển từ nuôi cấy lớp mỏng tế bào so với cây tre được vi nhân giống trực tiếp từ mầm ngủ.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Gautheret. 1966. Factors affecting differentiation of plant tissue grown *in vitro*, In Cell Differentiation and Morphogenesis, ed. W. Beermann, Amsterdam, North-Holland,
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures, *Physiol plant* 15, pp.473-497.
- Murthy, B.N.S., S.J. Murch and P.H. Saxena. 1998. Thidiazuron: A potent regulator of *in vitro* plant morphogenesis, *In vitro Cell Dev Biol-Plant* 34, pp.267-275.
- Ramanayake, S.M.S and W.A.V.R. Wanniarachchi. 2003. Organogenesis in callus derived from an adult giant bamboo (*Dendrocalamus giganteus* Wall. Ex Munro), *Scientia Horticulturae* 98, pp.195-200.
- Teresa, E.V., M. Alexander, A. Mejias and M. Oropeza. 2004. Plant regeneration of *Anthurium andreaeanum* cv Rubrun, *Electronic Journal of Biotechnology* 7, pp. 282-286.