

SỰ PHÁT SINH CƠ QUAN TỪ LỚP MỎNG TẾ BÀO CỦA GIỐNG ĐIỀU (*Anacardium occidentale* L.) CAO SẢN B01 NUÔI CÂY *in vitro*

Huỳnh Hữu Đức, Nguyễn Đình Sỹ, Nguyễn Thị Quỳnh
Phòng Công nghệ tế bào thực vật, Viện Sinh học Nhiệt đới

MỞ ĐẦU

Cây điều (*Anacardium occidentale* L.) là cây công nghiệp đem lại hiệu quả kinh tế cao ở một số nước thuộc vùng nhiệt đới Châu Á và Châu Phi do nhân hạt điều có giá trị cao trong xuất khẩu. Thông thường cây được nhân giống từ hạt, nhưng phương pháp này đem lại tính không đồng nhất về di truyền (Philip và Unni, 1994). Các phương pháp nhân giống vô tính truyền thống như giâm cành, ghép thường được sử dụng để nhân các dòng điều có năng suất cao, tuy nhiên hệ số nhân giống không đáp ứng nhu cầu. Do phương pháp nhân giống *in vitro* được sử dụng và thành công trên nhiều loài cây ăn trái gần với cây điều (Barghchi & Alderson, 1983; Litz và cộng sự, 1984) nên nhân giống *in vitro* cây điều có tính khả thi (Vũ Ngọc Phượng và cs, 2003).

Nuôi cây lớp mỏng tế bào là một phương pháp cho nhiều ưu thế hơn so với những phương pháp nhân giống *in vitro* truyền thống khác và được ứng dụng thành công trên nhiều loài cây khác nhau (Dương Tấn Nhựt và cs, 2003). Tuy nhiên, việc ứng dụng phương pháp nuôi cây lớp mỏng tế bào ở cây thân gỗ chưa được công bố nhiều.

Trong bài này chúng tôi trình bày một số kết quả nghiên cứu về nuôi cây lớp mỏng tế bào từ đốt thân mầm và đốt từ diệp của cây điều.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Mẫu nuôi cấy là hạt trưởng thành của giống điều cao sản B01 thu được từ vườn đầu dòng của Trung tâm Hưng Lộc (Viện Khoa học Kỹ thuật Nông nghiệp Miền Nam), Đồng Nai. Hạt điều có 2 lớp vỏ, vỏ cứng bên ngoài và vỏ lụa bên trong. Hạt được khử trùng bằng dung dịch NaOCl (Cơ sở Vân Phương, Quận 11, Tp. Hồ Chí Minh) với nồng độ 1% (w/v) trong 24 giờ, sau đó rửa lại bằng nước cất vô trùng 3 lần.

Cây mầm phát triển từ hạt nuôi cấy trên môi trường khoáng MS không có đường và vitamin sau 2 tuần được dùng làm nguyên liệu cho thí nghiệm. Lớp mỏng cắt

ngang từ 2 loại vật liệu là đốt từ diệp và đốt thân của cây mầm (có bề dày khoảng 0,3-0,5mm) được cấy trên các đĩa petri ($\Phi = 10\text{cm}$) chứa 20ml môi trường.

Môi trường nuôi cấy là môi trường MS (Murashige và Skoog, 1962) có bổ sung nước dừa 10% (v/v), adenine sulphate (Sigma Chemical Co., USA) 40mg/L, saccharose (Cty Đường Biên Hoà, Đồng Nai) 20g/L, maltose (Sigma Chemical Co., Missouri, USA) 10g/L, agar (Cty Cổ phần Đồ hộp Hạ Long, Quảng Ninh) 9g/L, than hoạt tính 3g/L. Môi trường được bổ sung các chất điều hoà sinh trưởng thực vật là 6-benzyladenine (BA), kinetin (KN) và naphthalene-1-acetic acid (NAA) ở các nồng độ khác nhau. pH của môi trường trước khi khử trùng là 5,9. Môi trường được khử trùng ở 121°C , 1 atm trong 20 phút. Phòng nuôi cấy có nhiệt độ $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$, độ ẩm $60 \pm 5\%$. Đĩa petri đựng mẫu được che tối trong 3 ngày đầu, sau đó được đặt dưới cường độ ánh sáng $40\text{-}50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ với thời gian chiếu sáng 12 giờ/ngày.

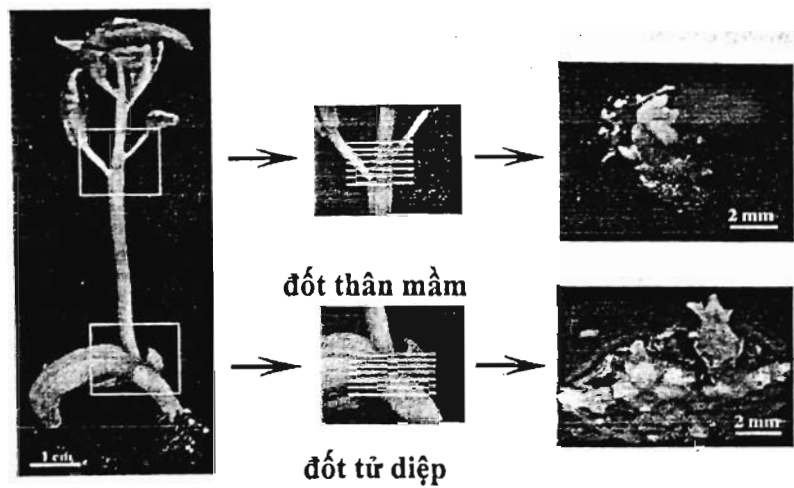
Mỗi đĩa petri có 24 mẫu cấy của mỗi loại vật liệu (đốt thân mầm hoặc đốt từ diệp). Thí nghiệm có 3 yếu tố là 3 chất điều hoà tăng trưởng thực vật, mỗi yếu tố có hai mức độ (Bảng 1). Thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên và mỗi nghiệm thức gồm 4 đĩa petri lập lại 3 lần. Số liệu được phân tích thống kê bằng phần mềm MSTATC (Đại học Michigan, Michigan, USA). Thí nghiệm được theo dõi trong 28 ngày.

Bảng 1: Mô tả thí nghiệm (chung cho 2 loại vật liệu)

Nghiệm thức	BA (mg/L)	KN (mg/L)	NAA (mg/L)
1	5	1	1
2	5	1	0,5
3	5	0	1
4	5	0	0,5
5	10	1	1
6	10	1	0,5
7	10	0	1
8	10	0	0,5

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

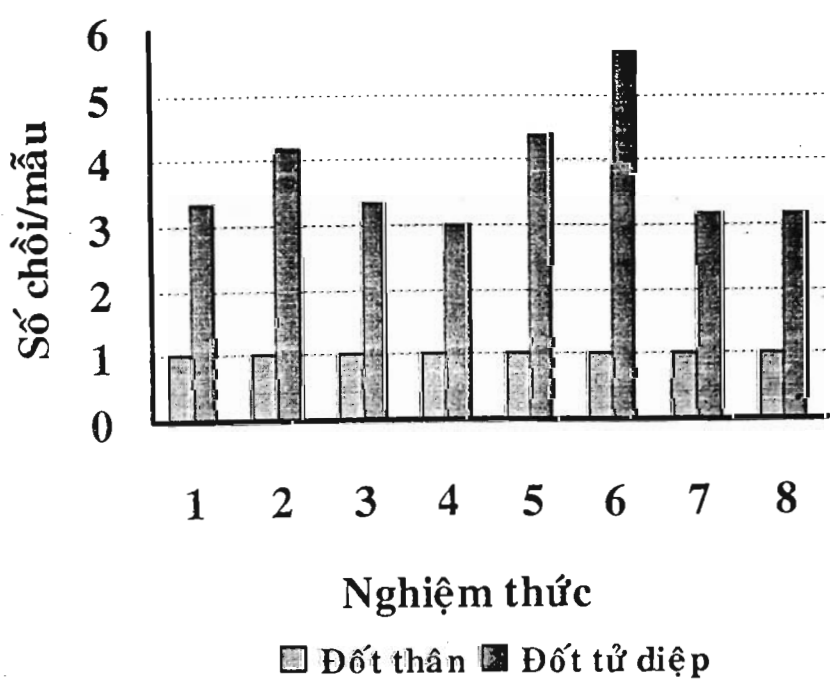
Kết quả thí nghiệm sau 28 ngày nuôi cấy cho thấy các lát mỏng ở vùng đốt thân chỉ cho một chồi còn ở vùng đốt từ diệp thì cho nhiều chồi hơn. Điều này cho thấy là do vùng sinh mô chồi hiện diện chung quanh đốt từ diệp dễ bị kích hoạt dưới tác động của chất điều hoà sinh trưởng thực vật (K. Trần Thanh Vân, 2003) (Hình 1).



Hình 1. Chồi hình thành từ lớp mỏng đốt thân mầm và đốt tử diệp sau 28 ngày.

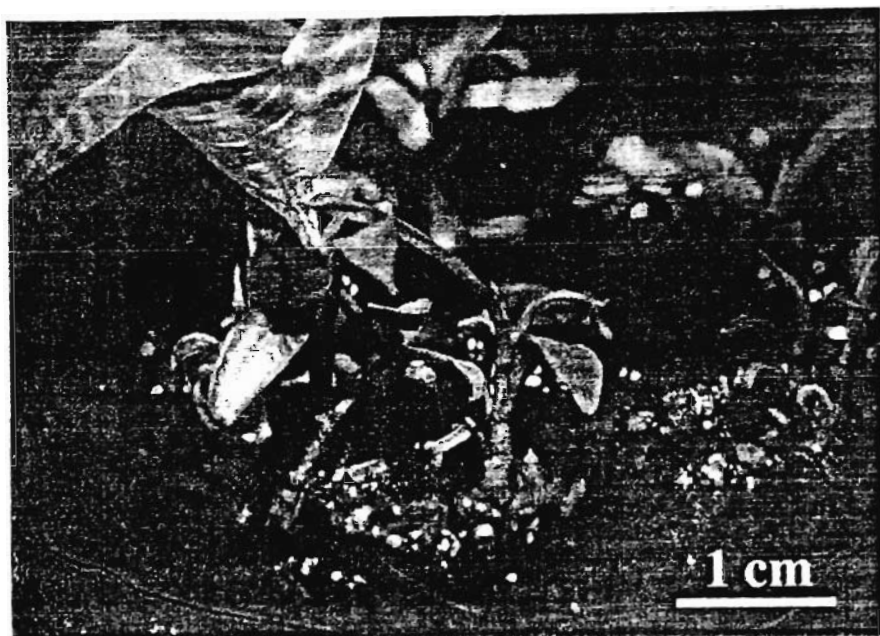
Số chồi cao nhất (5, 7 chồi) từ lớp mỏng ở đốt tử diệp thuộc nghiệm thức 6 có bổ sung 10mg/l BA, 1mg/l KN và 0,5mg/l NAA. Lớp mỏng tạo chồi thấp nhất (3 chồi) khi được nuôi trên môi trường có bổ sung 5mg/l BA và 0,5mg/l NAA.

Ảnh hưởng của BA và KN lên sự tạo chồi của lớp mỏng vùng đốt tử diệp thấy rõ nhất khi nồng độ BA 10mg/L và KN 1mg/L, trong khi ảnh hưởng của NAA không thấy rõ lắm trong thí nghiệm này. Đối với đốt thân mầm, nồng độ của các chất điều hoà sinh trưởng thực vật được sử dụng trong thí nghiệm này không đem lại sự khác biệt về số chồi hình thành ở cả 8 nghiệm thức (Hình 2).



Hình 2. Số chồi tạo thành từ lát mỏng đốt thân mầm và đốt tử diệp ở ngày thứ 28.

Các chồi hình thành từ lớp mỏng được tiếp tục cấy chuyển sang môi trường MS có bổ sung 1mg/l BA và 1mg/l KN để phát triển thành cây với số lần cấy chuyển là 2 tuần/lần. Chiều cao cây trung bình đạt 3-4cm sau 2 tháng cấy chuyển (Hình 3).



Hình 3. Cụm chồi cây điều phát triển sau 2 tháng cấy chuyển.

KẾT LUẬN

Phương pháp nuôi cấy lớp mỏng tế bào có thể được sử dụng để tạo chồi trực tiếp từ trục thượng diệp của hạt điều nảy mầm. Số chồi được tạo trực tiếp từ lớp mỏng đốt từ diệp là cao nhất khi môi trường có bổ sung 10mg/l BA, 1mg/l KN và 0,5mg/l NAA. Đối với nuôi cấy lớp mỏng của đốt thân mầm thì chồi có thể phát triển trên môi trường có BA 5mg/L và có hoặc không có kinetin và NAA. Cần tiếp tục nghiên cứu để tìm môi trường thích hợp cho sự phát triển chồi từ nuôi cấy lớp mỏng đốt thân mầm.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Barghchi M, Alderson PG (1983). In vitro production of *Pistacia* species. Acta Hort. 131, 49-60.
2. Dương Tấn Nhựt, Da Silva JAT, Bùi Văn Lệ, Kiêm Trần Thanh Vân (2003). Thin cell layer (TCL) morphogenesis as a powerful tool in woody plant and fruit crop micropropagation and biotechnology, floral genetics and genetic transformation. In: Jain SM & Ishii K (eds.) Micropropagation of woody trees and fruits, pp. 783-814, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
3. Litz RE, Knight Jr RJ, Gazit S (1984). In vitro somatic embryogenesis from *Mangifera indica* L. callus. Sci. Hort. 22, 233-240.

4. Philip VJ & Un
In: Bhaskara R:
pp.77-82, CPR
5. Trần Thanh Vâ
Bui, Tran Tha
regeneration a
Publishers, Dorc

The or (*Anacardium*

Huy

Cashew (*Anacardium*) is a profitable cash crop of several tropical countries due to the thin cell layer (TCL) approach to produce BO1 were surface s Epicotyls of seedling medium (Murashige different concentration explants affected the TCLs derived from t nodal positions of ep mg/L, respectively, w

tion of cashew for crop improvement.
Cashew Research and Development,

concept. In: Duong Tan Nhut, Van Le
) Thin cell layer culture system:
ions. pp.1-16, Kluwer Academic

Y cell layers cashew e cultivar BO1 cultured

, Nguyen Thi Quynh
Biology

profitable cash crop of several tropical
idy on the in vitro organogenesis via
was carried out for an appropriate
e scale. Mature seeds of the cultivar
(v) on the MS sugar-free medium.
CL culture and put on a modified MS
ented with BA, KN and NAA at
maltose. The TCL positions on the
nber of shoots. Shoot formation from
ion was greater than that from other
A, KN and NAA of 10, 1, and 0.5
t formation of the cultivar BO1.