

NGHIÊN CỨU PHƯƠNG PHÁP KHỬ TRÙNG MẦM CHỐI TỪ CÂY TRƯỞNG THÀNH CỦA MỘT SỐ GIỐNG ĐIỀU (*Anacardium occidentale* L.) CAO SẢN

Nguyễn Đình Sỹ, Nguyễn Thị Quỳnh, Nguyễn Thị Vân Thùy, Huỳnh Hữu Đức
Viện Sinh học Nhiệt đới Tp.HCM

(Bài nhận ngày 11 tháng 02 năm 2007, hoàn chỉnh sửa chữa ngày 31 tháng 10 năm 2007)

TÓM TẮT: Chất khử trùng javel (NaOCl) đã được sử dụng để khử trùng mầm chối lấy từ vườn điều đầu dòng tại Hưng Lộc – Đồng Nai. Các nồng độ và thời gian khác nhau đã được khảo sát trong mùa mưa, các mẫu khử trùng có tỷ lệ nhiễm 100% sau 6 ngày nuôi cấy ở tất cả các nồng độ javel đã được sử dụng: 20, 30, 40% (v/v). Sự khử trùng chỉ đạt hiệu quả vào mùa khô khi cây đầu dòng được xử lý bằng dung dịch bordeaux 1 lần/tuần trước khi lấy mẫu. Tỷ lệ nhiễm thấp nhất (27%) và tỷ lệ sống cao nhất (63%) khi cành non phát triển trong mùa khô, thu nhận sau 30 ngày hình thành được xử lý với NaOCl 30% (v/v), thời gian 40 phút. Trên nhiều giống điều cao sản khác nhau, PN1, LG, TL6/3, MH5, được trồng trong cùng điều kiện sinh thái, khả năng khử trùng tạo mẫu vô trùng là khác nhau.

1. MỞ ĐẦU

Cây điều (*Anacardium occidentale* L.) thuộc họ Anacardiaceae. Ở nước ta, cùng với những cây công nghiệp khác như cà phê, cao su, tiêu, điều được đánh giá là một cây công nghiệp đóng vai trò quan trọng và mang lại nhiều lợi ích kinh tế. Sau 25 năm phát triển, theo hiệp hội Điều Việt Nam, diện tích trồng điều trong năm 2005 là 350.000 hecta, năng suất bình quân 1,0 - 1,1 tấn/hecta. Sản lượng khoảng 300.000 - 350.000 tấn, kim ngạch xuất khẩu đạt 490 triệu USD (VINACAS, 2006).

Cùng với sự gia tăng nhanh chóng về diện tích trồng và sản lượng hạt, nhu cầu về số lượng cây giống đồng nhất có chất lượng tốt là rất cần thiết hiện nay. Trong tự nhiên, điều là cây thu phần chồi, do đó, cây điều có sự phân ly khi sử dụng hạt để nhân giống (Philip và cs. 1984). Bằng phương pháp nuôi cấy mô thực vật, chúng ta có thể tạo được một số lượng lớn cây giống trong thời gian ngắn, giải quyết phần nào nhu cầu giống hiện nay.

Trên thế giới, việc nghiên cứu khử trùng cành non đã được nhiều tác giả nghiên cứu và gặp nhiều khó khăn. Das và cs. (1996) chỉ thu nhận được 3-25% mẫu sống sót khi khử trùng cành non, các mẫu này cũng hóa nâu và chết sau đó 10-20 ngày. Thimmappaiah và cs. (2002) lựa chọn mẫu theo mùa khác nhau trong năm và cho kết quả là trong mùa khô tỷ lệ nhiễm thấp hơn là mùa mưa. Trong bài này chúng tôi khảo sát việc khử trùng cành non của một số giống điều và đưa vào nuôi cấy *in vitro*.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Cành điều non được thu nhận từ cây mẹ trưởng thành tại Trung tâm khảo nghiệm Hưng Lộc-Đồng Nai.

2.1 Khảo sát ảnh hưởng của NaOCl ở nồng độ và thời gian khác nhau lên khả năng khử trùng mầm chồi cây điều giống TL11/2 trong mùa mưa

Cành non được thu nhận vào tháng 10 với thời gian hình thành và phát triển 70 ± 3 ngày, dài 25 ± 2 cm, mang 15 ± 2 lá (ảnh 1).

Mẫu được cắt bỏ lá và ngâm trong thuốc chống nấm DITAN M45 (250 mg/L), thời gian 60 phút. Phần giữa của mẫu mang 3-4 chồi ngủ được chọn và lặt trong dung dịch NaOCl (cơ sở sản xuất javel Vân Phương, Tp. Hồ Chí Minh) với thời gian và nồng độ theo bảng 1. Sau đó, rửa sạch mẫu bằng nước cất vô trùng 3 lần trong tủ cấy vô trùng, cắt mẫu thành những đốt chỉ mang một chồi ngủ và cấy chúng lên môi trường gồm khoáng MS (Murashige và Skoog, 1962), vitamin Morel (1979), đường saccharose 10 g/L, than hoạt tính 2 g/L, agar (Cty. Cổ phần Đồ hộp Hạ Long, Quảng Ninh) 8 g/L. Môi trường (20 mL) được chứa trong bình nước biển ($V = 100$ mL) và được khử trùng ở 121°C trong 17 phút. pH của môi trường được điều chỉnh ở 5,9 bằng KOH 1N và HCl 1N trước khi khử trùng. Mầm chồi được nuôi trong tối 3 ngày đầu, sau đó được chuyển sang chế độ có cường độ ánh sáng $35 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, thời gian chiếu sáng 12 giờ/ngày, nhiệt độ phòng $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$, độ ẩm phòng $60 \pm 5\%$.

Bảng 1. Mô tả thí nghiệm

Nghiệm thức	Nồng độ NaOCl (v/v, %)	Khử trùng javel (phút)
Javel 20%, 20 phút	20	20
Javel 20%, 30 phút	20	30
Javel 20%, 40 phút	20	40
Javel 30%, 20 phút	30	20
Javel 30%, 30 phút	30	30
Javel 30%, 40 phút	30	40
Javel 40%, 20 phút	40	20
Javel 40%, 30 phút	40	30
Javel 40%, 40 phút	40	40

Thí nghiệm có 9 nghiệm thức được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên với 2 yếu tố. Mỗi nghiệm thức có 10 bình, được lặp lại 3 lần, mỗi bình cấy 1 mẫu. Chỉ tiêu theo dõi gồm tỷ lệ nhiễm, tỷ lệ sống sau 3 và 6 ngày nuôi cấy.

2.2 Khảo sát ảnh hưởng của NaOCl ở các nồng độ và thời gian khác nhau tác động lên khả năng khử trùng mầm chồi cây điều giống TL11/2 trong mùa khô

Mẫu là mầm chồi được thu nhận vào tháng 3 với thời gian hình thành và phát triển 30 ± 3 ngày, dài 20 ± 2 cm, mang 9 ± 2 lá (ảnh 2). Cành non phát triển từ cây mẹ được phun dung dịch Bordeaux 1 lần/tuần. Cây mẹ được phun dung dịch Bordeaux trước khi cắt cành 2 ngày.

Phần giữa của mầm chồi mang 3-4 chồi ngủ được chọn và lặt trong dung dịch NaOCl với thời gian và nồng độ theo bảng 2, sau đó, rửa sạch mẫu bằng nước cất vô trùng 3 lần trong tủ cấy vô trùng. Mẫu được cắt thành những đốt chỉ mang một chồi ngủ và được cấy chúng lên môi trường. Thành phần môi trường và điều kiện nuôi cấy tương tự thí nghiệm khảo sát trong mùa mưa.

Bảng 2. Mô tả thí nghiệm

Nghiệm thức	Nồng độ NaOCl (v/v,%)	Khử trùng javel (phút)
Javel 20%, 20 phút	20	20
Javel 20%, 40 phút	20	40
Javel 30%, 20 phút	30	20
Javel 30%, 40 phút	30	40

Thí nghiệm có 4 nghiệm thức được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên với 2 yếu tố. Mỗi nghiệm thức 10 bình, được lặp lại 3 lần, mỗi bình cấy 1 mẫu. Chỉ tiêu theo dõi gồm tỷ lệ nhiễm, tỷ lệ sống sau 3 và 6 ngày nuôi cấy.

2.3 Khảo sát sự tác động của NaOCl lên khả năng khử trùng mầm chồi của các giống điều cao sản khác nhau

Mầm chồi, điều kiện nuôi cấy và thành phần môi trường tương tự như thí nghiệm khảo sát trong mùa khô

Mầm chồi được thu nhận trên 4 giống điều cao sản: PN1, LG, TL6/3, MH5

Mẫu được lắc trong dung dịch NaOCl nồng độ 30% (v/v), thời gian 40 phút.

Thí nghiệm có 4 nghiệm thức được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên với 1 yếu tố. Mỗi nghiệm thức có 10 bình, được lặp lại 3 lần, mỗi bình cấy 1 mẫu. Chỉ tiêu theo dõi gồm tỷ lệ nhiễm, tỷ lệ sống sau 10 ngày nuôi cấy.

Số liệu được phân tích thống kê bằng phần mềm MSTATC (Đại học Michigan, USA)

3. KẾT QUẢ

3.1 Ảnh hưởng của NaOCl ở nồng độ và thời gian khác nhau lên khả năng khử trùng mầm chồi cây điều trong mùa mưa

Bảng 3. Ảnh hưởng của NaOCl lên tỷ lệ sống và tỷ lệ nhiễm của mầm chồi cây điều

Nghiệm thức	Ngày thứ 3		Ngày thứ 6	
	Tỷ lệ nhiễm (%)	Tỷ lệ sống (%)	Tỷ lệ nhiễm (%)	Tỷ lệ sống (%)
Javel 20%, 20 phút	57 ^{cy}	20 ^c	100	0
Javel 20%, 30 phút	80 ^{ab}	13 ^b	100	0
Javel 20%, 40 phút	71 ^b	17 ^c	100	0
Javel 30%, 20 phút	90 ^a	7 ^{ab}	100	0
Javel 30%, 30 phút	100 ^a	0 ^a	100	0
Javel 30%, 40 phút	57 ^c	23 ^c	100	0
Javel 40%, 20 phút	80 ^{ab}	3 ^a	100	0
Javel 40%, 30 phút	61 ^c	10 ^b	100	0
Javel 40%, 40 phút	72 ^b	10 ^b	100	0
ANOVA ^z Nồng độ x Thời gian	*	*	NS	NS

^z*, NS: khác biệt có ý nghĩa ở mức P ≤ 0,05 hoặc không có sự khác biệt.

^y Các trị số có các chữ cái giống nhau trên cùng một cột không có sự khác biệt theo trắc nghiệm phân hạng LSD

Vào mùa mưa, độ ẩm trong không khí cao rất thích hợp cho các loại nấm, khuẩn gây bệnh phát triển, do đó, cây điều phát triển trong điều kiện tự nhiên cũng dễ dàng bị nhiễm nấm bệnh. Kết quả thu nhận cho thấy việc khử trùng cành non trong thí nghiệm này là không hiệu quả. Tỷ lệ nhiễm là 100% trong tất cả các nghiệm thức được khảo sát ở ngày thứ 6.

3.2 Ảnh hưởng của NaOCl ở các nồng độ và thời gian khác nhau lên khả năng khử trùng mầm chồi cây điều giống TL 11/2 trong mùa khô

Bảng 4. Ảnh hưởng của NaOCl lên tỷ lệ sống và tỷ lệ nhiễm của mầm chồi cây điều

Nghiệm thức	Ngày thứ 3		Ngày thứ 6	
	Tỷ lệ nhiễm (%)	Tỷ lệ sống (%)	Tỷ lệ nhiễm (%)	Tỷ lệ sống (%)
Javel 20%, 20 phút	17 ^{aby}	83 ^{ab}	67	27
Javel 20%, 40 phút	30 ^a	70 ^b	47	43
Javel 30%, 20 phút	13 ^b	87 ^a	43	43
Javel 30%, 40 phút	13 ^b	87 ^a	27	63
ANOVA ^z Nồng độ x Thời gian	**	*	NS	NS

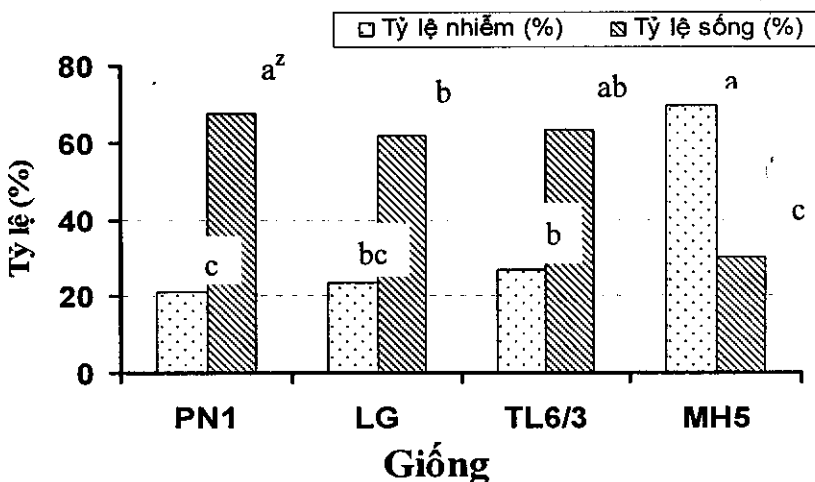
^z**, *, NS: khác biệt có ý nghĩa ở mức $P \leq 0,01$ hoặc $P \leq 0,05$ hoặc không có sự khác biệt.

^y Các trị số có các chữ cái giống nhau trên cùng một cột không có sự khác biệt theo trắc nghiệm phân hạng LSD

Ở thí nghiệm này, việc khảo sát sự khử trùng trong mùa khô đã mang lại hiệu quả. Mẫu có tỷ lệ nhiễm thấp nhất (27%) khi sử dụng javel ở nồng độ 30% trong thời gian 40 phút. Các mẫu sạch đã phát triển tốt và có khả năng bật chồi (ảnh 3). Trong mùa khô, độ ẩm trong không khí thấp, do đó, hạn chế sự phát triển cũng như xâm nhập của nấm bệnh vào cây điều mẹ ở điều kiện tự nhiên. Đồng thời cây mẹ được phun thuốc phòng trừ nấm định kỳ để hạn chế sự xâm nhập của nấm bệnh vào mô cây mẹ. Thimmappaiah và cs. (2002) cũng có nhận xét tương tự về việc khử trùng mầm chồi ở điều kiện khí hậu khác nhau.

Khi quan sát phẫu thức cắt ngang tại vị trí chồi ngủ, chúng tôi thấy có sự hiện diện rất nhiều lớp lông che chở (ảnh 4), do đó, việc khử trùng mầm chồi gặp khó khăn nếu nấm bệnh đã hiện diện ở vị trí chồi ngủ.

3.3 Sự tác động của NaOCl lên khả năng khử trùng mầm chồi của các giống điều cao sản khác nhau



Hình 1. Ảnh hưởng của NaOCl lên tỷ lệ nhiễm và tỷ lệ sống trên các giống khác nhau của mầm chồi cây điều ở ngày thứ 10.

² Các chữ cái giống nhau trên cùng chỉ tiêu không có sự khác biệt theo trắc nghiệm phân hạng LSD

Khi phân tích thống kê nhận thấy rằng, tỷ lệ sống và tỷ lệ nhiễm của mầm chồi ở các giống điều cao sản khác nhau khi được khử trùng ở cùng một nồng độ và thời gian là có sự khác biệt. Giống MH5 có tỷ lệ nhiễm cao nhất (69,6%) trong khi các giống điều khác cho tỷ lệ nhiễm thấp PN1 (20,9%), LG (23,5%), TL6/3 (27%). Trong một vườn giống đầu dòng, tại mỗi vị trí khác nhau, điều kiện sinh thái là khác nhau, do đó, tác động đến cây điều mẹ được trồng tại vị trí đó. Phải chăng mầm chồi được thu nhận từ cây mẹ khác nhau có tỷ lệ mang mầm bệnh khác nhau, điều này làm cho kết quả khử trùng có sự khác biệt.

4. KẾT LUẬN

- Sự khử trùng cành non chỉ hiệu quả trong mùa khô với cây mẹ được xử lý (phun dung dịch Bordeaux).
- NaOCl ở nồng độ 30% (v/v), thời gian 40 phút thích hợp cho việc khử trùng mầm chồi.
- Trên các giống điều cao sản khác nhau, hiệu quả của việc khử trùng là khác nhau.

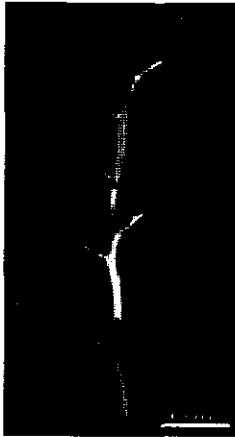
STUDY ON THE STERILIZATION OF YOUNG SHOOTS OF CASHEW (*Anacardium occidentale* L.) ELITE CULTIVARS

Nguyen Dinh Sy, Nguyen Thi Quynh, Nguyen Thi Van Thuy, Huynh Huu Duc
Institute of Tropical Biology HoChiMinhcity

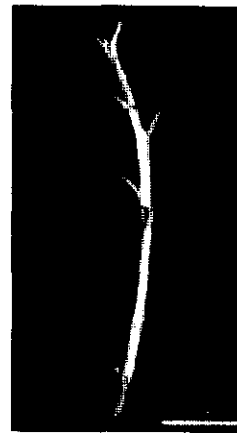
ABSTRACT: Commercialized sodium hypochlorite (NaOCl) was used to sterilize young shoots of cashew cultivars selected from the Hung Loc Center, Dong Nai province. In the rainy season, all shoots were contaminated and died after 6 days of culture with whatever concentrations of NaOCl and duration applied. In the dry season, young shoots were selected from the pretreated cashew trees. The contamination rate was 27% and survival rate was 63% for the TL11/2 cultivar when these shoots were sterilized by 30% NaOCl for 40 minutes. There is a variation of contamination rates among cashew elite cultivars (PN1, LG, TL6/3, MH5).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

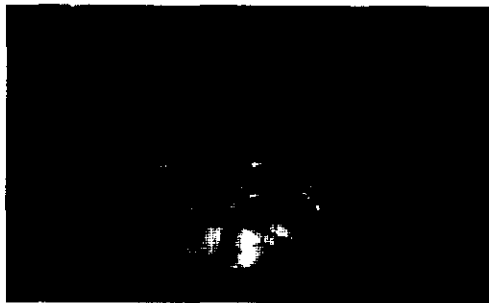
- [1]. Das S, Jha T.B, Jha S, *In vitro propagation of cashewnut*, Plant Cell Rep. 15, 615-619, (1996)
- [2]. Hiệp hội cây điều Việt Nam (VINACAS) Báo cáo tổng kết hoạt động của hiệp hội cây Điều Việt Nam nhiệm kỳ V <http://www.vinacas.com.vn>, (2006).
- [3]. Murashige T, Skoog F, *A revised medium for a rapid growth an assay with tobacco tissue culture*, Physiology Plants, 15, 473-497, (1962)
- [4]. Philip V.J, Unni P.N, *In vitro propagation of cashew for crop improvement*. In: Bhaskara Rao EVV, Khan HH (eds.) Cashew research and development. CPCRI, Kasargod, 77-82 (1984)
- [5]. Thimmappaiah, Shirly R.A, Sadhana P.H, *In vitro propagation of cashew from young trees*, In vitro Cell. Dev. Biol. -Plant. 38, 152-156 (2002)



Ảnh 1. Mẫu thí nghiệm mùa mưa



Ảnh 2. Mẫu thí nghiệm mùa khô



Ảnh 3. Chồi điều phát triển từ chồi ngủ cành non sau 45 ngày nuôi cấy



- Lông che chở
- Phác thể lá
- Chồi ngủ

Ảnh 4. Cấu tạo giải phẫu thân điều cắt ngang tại vị trí chồi ngủ (x100)