

VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

VIỆN SINH HỌC NHIỆT ĐỚI

*BÁO CÁO NGHIỆM THU ĐỀ TÀI*

NHÂN NHANH MỘT SỐ DÒNG ĐIỀU (*Anacardium  
occidentale* L.) CAO SẢN BẰNG PHƯƠNG PHÁP  
NUÔI CẤY QUANG TỰ DƯỠNG VÀ LỚP MỎNG TỪ  
CÀNH NON VÀ CÂY MẦM

*Thuộc Đề tài :* Nghiên cứu sử dụng công nghệ tế bào và kỹ thuật chỉ thị  
phân tử phục vụ chọn giống cây trồng

Mã số: KC.04.08

Đơn vị thực hiện: Phòng Công nghệ tế bào thực vật  
Chủ nhiệm đề tài: NGUYỄN THỊ QUỲNH

# NHÂN NHANH MỘT SỐ DÒNG ĐIỀU (*Anacardium occidentale* L.) CAO SẢN BẰNG PHƯƠNG PHÁP NUÔI CẤY QUANG TỰ DƯỠNG VÀ LỚP MỎNG TỪ CÀNH NON VÀ THÂN MẦM

Nguyễn Thị Quỳnh, Huỳnh Hữu Đức, Nguyễn Đình Sỹ,  
Thái Xuân Du, Nguyễn Minh Tuấn

*Phòng Công nghệ tế bào thực vật, Viện Sinh học nhiệt đới*

## 1. Mở đầu

Cây điều, *Anacardium occidentale* L., là một cây thân gỗ mang lại lợi nhuận cao ở nhiều nước vùng nhiệt đới thuộc Châu Phi, Châu Á và Châu Mỹ La tinh trong đó có Việt Nam do nhân hạt điều có giá trị xuất khẩu. Số nước nhập khẩu nhân hạt điều của Việt Nam đã tăng từ 16 nước năm 1997 lên 23 nước năm 2003. Việt Nam là nước sản xuất hạt điều lớn thứ hai ở Châu Á sau Ấn Độ, với tổng sản lượng trong năm 2003 là 300.000 tấn hạt tươi trên diện tích khoảng 300.000 ha. Để đạt được diện tích trồng điều 500.000 ha trong cả nước đến năm 2010 thì phải cần thêm một lượng giống khoảng 25 triệu cây.

Thông thường cây được nhân giống từ hạt, nhưng phương pháp này không đem lại nhiều hiệu quả về mặt chất lượng vì điều là cây dị hợp tử nên tính không đồng nhất về di truyền cao (Philip và Unni, 1984). Các phương pháp nhân giống vô tính như ghép cành đã được sử dụng để nhân các dòng chọn lọc có năng suất cao, tuy nhiên hệ số nhân giống không đáp ứng đủ nhu cầu. Phương pháp nhân giống *in vitro* đã thành công trên nhiều loại cây ăn trái trong đó có nhiều giống cây gần với cây điều (Barghchi & Alderson, 1983; Litz và cộng sự, 1984). Một số tác giả đã đưa ra phương pháp nuôi cấy cụm chồi hay đoạn thân mầm (Leva & Falcone, 1990; Das và cộng sự, 1996), tuy nhiên giống như một số loài khác cùng họ, cây điều là cây khó nhân giống *in vitro* do khả năng sống sót kém, tỷ lệ tạo chồi hay kéo dài lông thân thấp (Boggetti và cộng sự, 1999). Ngoài ra khả năng tạo rễ và tỷ lệ sống của cây cấy mô thấp ở giai đoạn *ex vitro* cũng đã hạn chế khả năng ứng dụng phương pháp vi nhân giống đối với cây điều. Phương pháp nuôi cấy lớp mỏng tế bào đã có nhiều hiệu quả đối với một số cây thân gỗ (Dương Tấn Nhựt và cộng sự, 2003). Các lát mỏng của gân lá măng cắt cho tỷ lệ hình thành chồi cao hơn nhiều lần so với nuôi cấy nguyên mảnh lá (Goh và cộng sự, 1994). Cho đến nay chưa có tài liệu nào trên thế giới công bố về nuôi cấy tạo cây hoàn chỉnh từ lớp mỏng cây điều.

Kỹ thuật nhân giống cây cấy mô hiện vẫn chưa đáp ứng được yêu cầu của người trồng trọt vì một số nguyên nhân chính như giá thành cây cấy mô cao, cây có chất lượng kém, tỷ lệ sống thấp, tốn nhiều công chăm sóc, v.v. Phương pháp vi nhân giống quang tự dưỡng (không sử dụng đường, vitamin và hạn chế sử dụng các chất điều hòa tăng trưởng thực vật trong môi trường nhân giống) gần đây được biết đến như một phương pháp mới nhằm thúc đẩy sự tăng trưởng của cây nuôi cấy *in vitro*, rút ngắn thời gian nuôi cấy và hạ chi phí trong quá trình nuôi cấy (Kozai, 1991). Phương pháp này chú trọng đến các yếu tố ảnh hưởng đến sự phát triển cây con trong bình nuôi cấy (cường độ ánh sáng, thời lượng chiếu sáng, thành phần không khí, ẩm độ, nhiệt độ, sự khuếch tán khí hòa tan và tốc độ luân chuyển của không khí trong bình nuôi cấy, v.v.) thay vì chỉ nghiên cứu thành phần hóa học của môi trường nuôi cấy như nồng độ đường, muối khoáng, vitamin hay các chất điều hòa sinh trưởng thực vật. Đặc điểm chính của phương pháp này dựa trên cơ sở là trong tự nhiên tất cả các cây xanh chứa diệp lục tố đều có khả năng tự quang hợp để tồn tại và phát triển, vì vậy cây trong bình nuôi cấy cần được tạo điều kiện để có thể sử dụng tối đa khí CO<sub>2</sub> có sẵn trong không khí làm nguồn carbon chính cho quá trình tăng trưởng và phát triển của cây. Phương pháp mới này khi áp dụng trong điều kiện tối ưu có thể sản xuất cây

cây mô đạt chất lượng cao với chi phí được tính chỉ bằng 1/2 lần so với chi phí sản xuất theo phương pháp vi nhân giống truyền thống hiện nay (Xiao và các cộng sự, 2000). Công nghệ quang tự dưỡng hiện đang được nhiều phòng thí nghiệm nuôi cấy mô và các công ty sản xuất cây cấy mô trên thế giới tại Nhật Bản, Trung Quốc, Hàn Quốc, Mỹ, Hà Lan, v.v., quan tâm vì ngoài ý nghĩa làm gia tăng khả năng quang hợp của cây cấy mô, phương pháp này còn có ý nghĩa về khía cạnh làm sạch môi trường do sự hấp thu  $\text{CO}_2$  trong không khí của cây cấy mô được gia tăng.

Trong bài này việc nuôi cấy lớp mỏng tế bào từ thân mầm phát triển từ hạt trưởng thành và từ lông thân của cây trưởng thành đã được nghiên cứu đồng thời với việc nghiên cứu ứng dụng phương pháp nuôi cấy quang tự dưỡng trong giai đoạn nhân giống nhằm mục đích tìm ra những phương pháp vi nhân giống hữu hiệu có thể ứng dụng vào việc nhân nhanh các dòng điều cao sản đã được tuyển chọn.

## 2. Vật liệu và phương pháp

### 2.1. Nuôi cấy lớp mỏng của cây mầm từ hạt trưởng thành

Nguyên liệu dùng trong nghiên cứu là hạt trưởng thành của hai giống điều cao sản BO1 và PN1 trồng tại vườn điều giống của Trung tâm Hưng Lộc (thuộc Viện Khoa học Kỹ thuật Nông nghiệp Miền Nam) tỉnh Đồng Nai.

Hạt điều có hình dạng rất giống quả thận. Hạt điều trưởng thành khi chín có màu nâu xám hoặc màu xám hồng tùy cây, với chiều dài 2,6-3,1 cm, chiều rộng 2,0-2,3 cm và dày 1,2-1,7 cm. Cắt đôi một hạt điều chín ta sẽ thấy có ba phần rõ rệt. Phần ngoài là lớp vỏ cứng, phần giữa là lớp vỏ lụa, phần trong cùng dưới lớp vỏ lụa là nhân hạt điều (Hình 1a).

Phương pháp khử trùng vỏ ngoài và vỏ lụa của hạt được thực hiện theo các bước sau:

- Hạt thu thập từ vườn đầu dòng về được rửa bằng xà bông dưới vòi nước máy và đem phơi khô hột dưới ánh nắng tự nhiên 1 ngày.
- Ngâm hạt trong dung dịch javel  $\text{NaOCl}$  (sản phẩm thương mại của cơ sở Văn Phương, Q. 11, Tp Hồ Chí Minh) 1 ngày với nồng độ 1% (W/V) trong 24 giờ để khử trùng vỏ ngoài.
- Sau đó khử trùng vỏ lụa bằng javel nồng độ 1% (W/V) trong 20 phút. Rửa sạch bằng nước cất vô trùng và bóc vỏ lụa trong tủ cấy vô trùng.

Hạt được đặt trên môi trường nuôi cấy có thành phần khoáng MS (Murashige & Skoog, 1962) không có đường và vitamin. Sau hai tuần nuôi cấy, phần thân của cây mầm gồm đốt thân mầm và đốt tử diệp sẽ được sử dụng làm nguyên liệu ban đầu của thí nghiệm nuôi cấy lớp mỏng (Hình 1b).

Lớp mỏng có bề dày từ 0,3-0,5 mm được cấy vào đĩa Petri ( $\phi = 9$  cm) chứa môi trường nuôi cấy. Mẫu được đặt trong tối 3 ngày, sau đó chuyển sang điều kiện ánh sáng đèn huỳnh quang (Công ty Điện Quang, Tp. Hồ Chí Minh) với cường độ  $50-55 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (đo bằng sensor do Công ty Advantest, Tokyo, Nhật Bản, sản xuất). Môi trường nuôi cấy gồm khoáng MS có bổ sung nước dừa 10% (V/V), adenine sulphate (Công ty Sigma Chemical, Missouri, USA) 40 mg/l, đường saccharose thương mại (Công ty Đường Biên Hoà, Đồng Nai) 20 g/l, maltose (Công ty Sigma Chemical, Missouri, USA) 10 g/l, agar (Công ty cổ phần Hạ Long, Quảng Ninh) 8 g/l, than hoạt tính  $\leq 1$  các chất điều hòa sinh trưởng thực vật như 6-benzyladenine (BA), kinetin (KN) và naphthalene-1-acetic acid (NAA). Môi trường được khử trùng ở  $121^\circ\text{C}$ , 1 atm trong 20 phút. pH = 5.9 trước khi khử trùng. Phòng nuôi cấy có nhiệt độ  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , thời gian chiếu sáng 12 giờ/ngày, độ ẩm phòng  $60 \pm 5\%$ .

Mỗi đĩa Petri có 24 mẫu cấy của một loại vật liệu (đốt thân mầm hoặc đốt tử diệp). Thí nghiệm có ba yếu tố là ba chất điều hòa sinh trưởng thực vật mỗi yếu tố có hai mức độ. Thí nghiệm có 8 nghiệm thức được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên với 3 lần lặp lại (Bảng 1). Số liệu được phân tích thống kê bằng phần mềm MSTATC (Đại học Michigan, Mỹ).

Bảng 1. Mô tả thí nghiệm dùng cho nuôi cấy lớp mỏng của cả hai loại mẫu cây đốt thân nằm và đốt tử diệt

| 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        |

## 2.2. Nuôi cấy lớp mỏng từ cành non

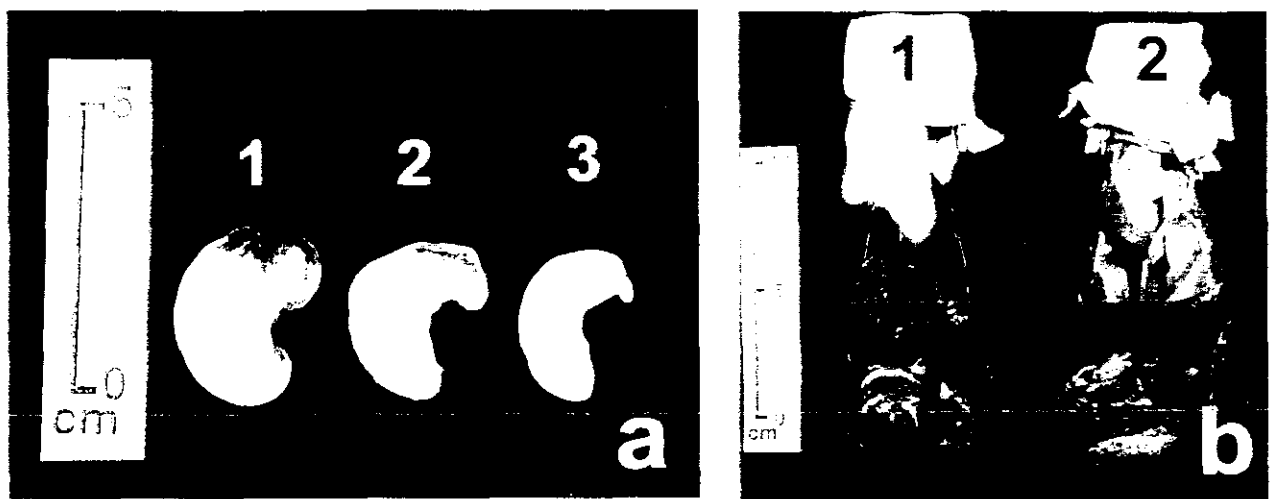
Cành non từ các cây điều ghép ba tháng tuổi hoặc từ cây mầm 40-60 ngày tuổi nuôi trong vườn ươm của hai dòng điều cao sản BO1 và PN1 được dùng làm nguyên liệu ban đầu. Mẫu được ngâm trong xà phòng trong 5 phút sau đó rửa sạch dưới vòi nước chảy và tiếp tục ngâm trong dung dịch có  $\text{CuSO}_4$  (5 g/L) trong 5 phút. Mẫu được rửa sạch và đưa vào tủ cấy vô trùng. Khâu khử trùng bề mặt được tiếp tục bằng cách rửa mẫu trong cồn 70% trong 1 phút, sau đó ngâm mẫu trong nước Javel (Cơ sở Văn Phương, Q.11, Tp. Hồ Chí Minh) với nồng độ 0,5% (W/V) trong 40 phút. Mẫu được rửa nước cất vô trùng 3 lần và tiếp tục ngâm trong acid acetic 5% (V/V) trong 30 phút trước khi đưa vào môi trường nuôi cấy.

Môi trường nuôi cấy bao gồm khoáng đa lượng và vi lượng MS có bổ xung nước dừa 10% (V/V), đường saccharose 30 g/L, than hoạt tính 5 g/L và agar (Công ty cổ phần Hạ Long, Hải Phòng) với nồng độ 8 g/L. Mẫu được nuôi cấy trong bình tam giác 300 mL có chứa 70 ml môi trường. Môi trường được khử trùng ở 121 °C, 1 atm trong 20 phút. pH = 5,9 trước khi khử trùng.

Sau hai tuần nuôi cấy, những mẫu không nhiễm sẽ được sử dụng trong nuôi cấy lớp mỏng tế bào. Chọn phần giữa đốt thứ hai và ba tính từ ngọn của cành điều non làm nguyên liệu. Lớp tế bào có bề dày trung bình 0,2-0,3 mm được cắt rời từ các đoạn cành đã chọn và đặt trên môi trường khoáng MS có bổ xung nước dừa 10% (V/V), đường saccharose 30 g/L, maltose 5 g/L, than hoạt tính 5 g/L và agar 8 g/L. Thí nghiệm gồm 4 nghiệm thức với môi trường được bổ xung các chất điều hoà tăng trưởng khác nhau:  $\text{N}^6$ -benzyladenine (BA), kinetin (KN), Thidiazuron (TDZ), 2,4-D (Bảng 2). Mỗi nghiệm thức có 30 mẫu cho mỗi loại cành non, được lặp lại 3 lần. Sau 7 ngày nuôi trong tối ở nhiệt độ  $25 \pm 2$  °C, ẩm độ tương đối  $60 \pm 5$  %, mẫu được chuyển đến kệ có cường độ ánh sáng trung bình 40-50  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  với thời gian chiếu sáng 12 giờ/ngày.

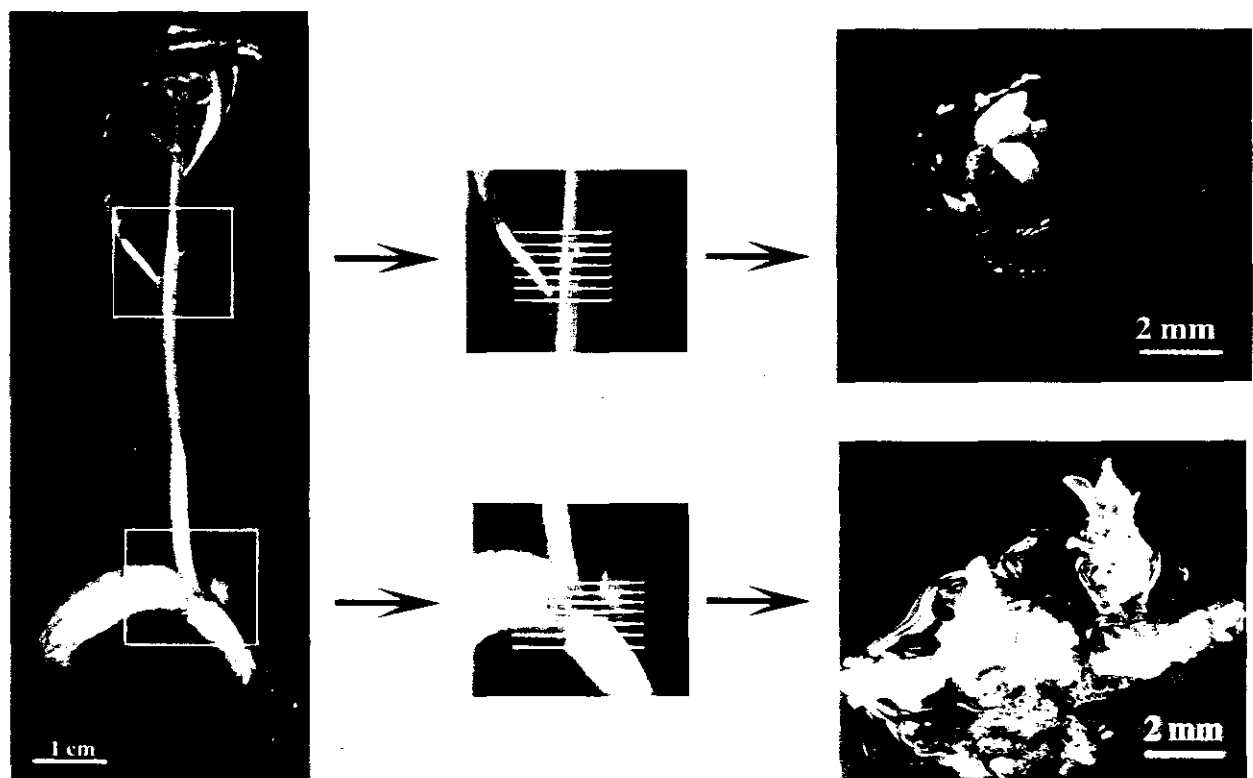
Bảng 2. Mô tả thí nghiệm

| Nghiệm thức   | BA (mg/L) | Kn (mg/L) | TDZ (mg/L) | 2,4-D (mg/L) |
|---------------|-----------|-----------|------------|--------------|
| 1 (Đối chứng) | 0         | 0         | 0          | 0            |
| 2             | 5         | 0,5       | 0          | 0            |
| 3             | 0         | 0         | 1          | 0            |
| 4             | 0         | 0         | 0,5        | 0            |
| 5             | 0         | 0,5       | 0          | 0,5          |



Hình 1a. Hạt điều trưởng thành (1) còn nguyên vỏ cứng, (2) đã bóc lớp vỏ cứng (3) đã bóc vỏ lụa.

Hình 1b. Cây mầm (1) 7 ngày tuổi, (2) 14 ngày tuổi.



Hình 2. Sự tạo chồi cây điều *in vitro* từ nuôi cấy lớp mỏng đốt thân và đốt tử diệp của cây mầm ngày thứ 14

### 2.3. Nuôi cấy quang tự dưỡng

Chồi cây điều in vitro từ nuôi cấy lớp mỏng và thân mầm được dùng làm nguyên liệu nuôi cấy quang tự dưỡng. Chồi được cắt thành nhiều đốt có chiều dài trung bình 2 cm mang 1 hoặc 2 lá. Các đốt được cấy trên môi trường khoáng MS với đa lượng 1/2, có bổ sung đường saccharose (30g/L) và vitamin MS, hoặc không có đường, vitamin và chất điều hòa sinh trưởng thực vật. Giá thể của môi trường nuôi cấy là agar (Công ty cổ phần Hạ Long, Hải Phòng) 7 g/L hoặc 7,5 g/L khi môi trường có bổ sung thêm than hoạt tính 2 g/L. Môi trường có pH = 5,9 trước khi khử trùng. Bình nuôi cấy có dung tích 350 mL được bịt nút cao su (nuôi cấy trên môi trường có đường) hoặc nút giấy khi nuôi trong điều kiện quang tự dưỡng (môi trường không đường và vitamin). Cây được đặt dưới ánh sáng đèn huỳnh quang với cường độ ánh sáng  $70-90 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Nhiệt độ phòng nuôi cấy được giữ ở  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  với ẩm độ tương đối  $60 \pm 5\%$ . Thời gian chiếu sáng 12 giờ/ngày. Mỗi nghiệm thức thí nghiệm gồm 30 đốt, được lặp lại ba lần. Số liệu thí nghiệm được xử lý thống kê bằng phần mềm MSTATC (Đại học Michigan, Mỹ).

## 3. Kết quả và thảo luận

### 3.1. Nuôi cấy lớp mỏng của cây mầm từ hạt trưởng thành

#### 3.1.1. Ảnh hưởng của các chất điều hòa sinh trưởng thực vật lên sự tạo chồi từ đốt thân mầm

**Bảng 3.** Ảnh hưởng của các chất điều hòa sinh trưởng thực vật lên tỷ lệ mẫu sống, tạo chồi và số chồi từ nuôi cấy lớp mỏng đốt thân mầm sau 14 và 28 ngày nuôi cấy.

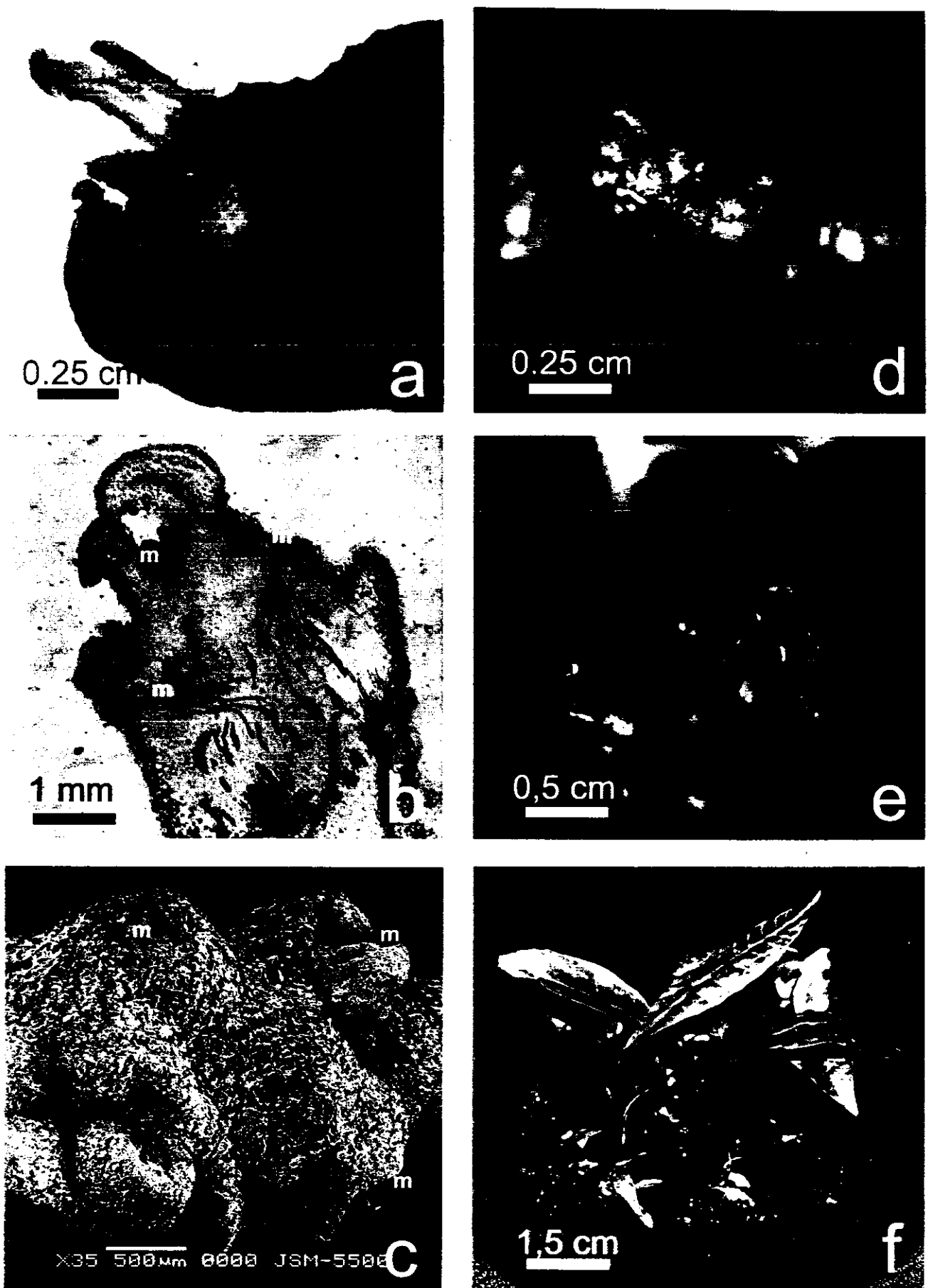
| Nghiệm thức <sup>z</sup> | % Mẫu sống sót ngày 14 | % Mẫu tạo chồi ngày 28 | Số chồi/mẫu cấy |
|--------------------------|------------------------|------------------------|-----------------|
| 1                        | $21,67 \pm 2,9^y$      | $18,33 \pm 2,9$        | 1               |
| 2                        | $20,00 \pm 5,0$        | $16,67 \pm 2,9$        | 1               |
| 3                        | $18,33 \pm 2,9$        | $10,03 \pm 5,0$        | 1               |
| 4                        | $23,33 \pm 7,6$        | $16,67 \pm 2,9$        | 1               |
| 5                        | $25,00 \pm 5,0$        | $21,67 \pm 2,9$        | 1               |
| 6                        | $21,67 \pm 2,9$        | $16,67 \pm 5,8$        | 1               |
| 7                        | $30,00 \pm 5,0$        | $18,33 \pm 5,8$        | 1               |
| 8                        | $31,67 \pm 2,9$        | $23,33 \pm 7,6$        | 1               |

<sup>z</sup> Thành phần chất điều hòa sinh trưởng sử dụng trong mỗi nghiệm thức xem Bảng 1.

<sup>y</sup> Trị số trung bình  $\pm$  độ lệch chuẩn

Không có sự khác biệt đáng kể về mặt thống kê về số lượng mẫu sống sót ngày thứ 14 và số mẫu tạo chồi ngày thứ 28 giữa các nghiệm thức có bổ sung BA 5 mg/L và KN 1 mg/L. Tuy nhiên có sự gia tăng % mẫu còn sống ở ngày 14 khi BA tăng lên 10 mg/L trong môi trường nuôi cấy, tuy nhiên số mẫu tạo chồi giữa các nghiệm thức không có sự khác biệt về mặt thống kê. Sự hiện diện của KN với nồng độ 1 mg/L làm giảm khả năng sống sót của mẫu (Bảng 3). Không có sự khác biệt về số chồi hình thành trên mỗi mẫu cấy là đốt thân mầm ở tất cả các nghiệm thức nuôi cấy (Hình 2).

#### 3.1.1. Ảnh hưởng của các chất điều hòa sinh trưởng thực vật lên sự tạo chồi từ đốt tử diệp



Hình 3. Sự phát triển chồi cây diên từ nuôi cấy lớp mỏng phần thực (a) cắt ngang; (b) cắt dọc sau 7 ngày nuôi cấy, (c) lớp mỏng quan sát dưới kính hiển vi điện tử quét sau 10 ngày nuôi cấy, chồi phát triển (d) ngày thứ 14, (e) ngày thứ 42, (f) ngày thứ 70. (m) -Vùng mô phân sinh chồi.

**Bảng 4.** Ảnh hưởng của các chất điều hòa sinh trưởng thực vật lên tỷ lệ mẫu sống, tạo chồi và số chồi từ nuôi cấy lớp mỏng đốt tử diệt sau 14 và 28 ngày nuôi cấy.

| Nghiệm thức <sup>z</sup> | % Mẫu sống sót ngày 14    | % Mẫu tạo chồi ngày 28 | Số chồi/mẫu cấy |
|--------------------------|---------------------------|------------------------|-----------------|
| 1                        | 11,11 ± 0,96 <sup>y</sup> | 5,00 ± 0,00            | 3,33 ± 1,53     |
| 2                        | 11,67 ± 1,67              | 5,00 ± 0,00            | 4,17 ± 0,76     |
| 3                        | 16,00 ± 1,67              | 5,00 ± 0,00            | 3,33 ± 0,58     |
| 4                        | 9,44 ± 0,96               | 6,67 ± 2,89            | 3,00 ± 1,00     |
| 5                        | 16,67 ± 1,67              | 15,00 ± 5,00           | 5,67 ± 0,34     |
| 6                        | 21,67 ± 1,67              | 11,67 ± 2,89           | 4,39 ± 0,67     |
| 7                        | 17,78 ± 0,96              | 6,67 ± 2,89            | 3,17 ± 1,04     |
| 8                        | 16,67 ± 1,67              | 6,67 ± 2,89            | 3,17 ± 1,04     |

<sup>z</sup> Thành phần chất điều hoà sinh trưởng sử dụng trong mỗi nghiệm thức xem Bảng 1.

<sup>y</sup> Trị số trung bình ± độ lệch chuẩn

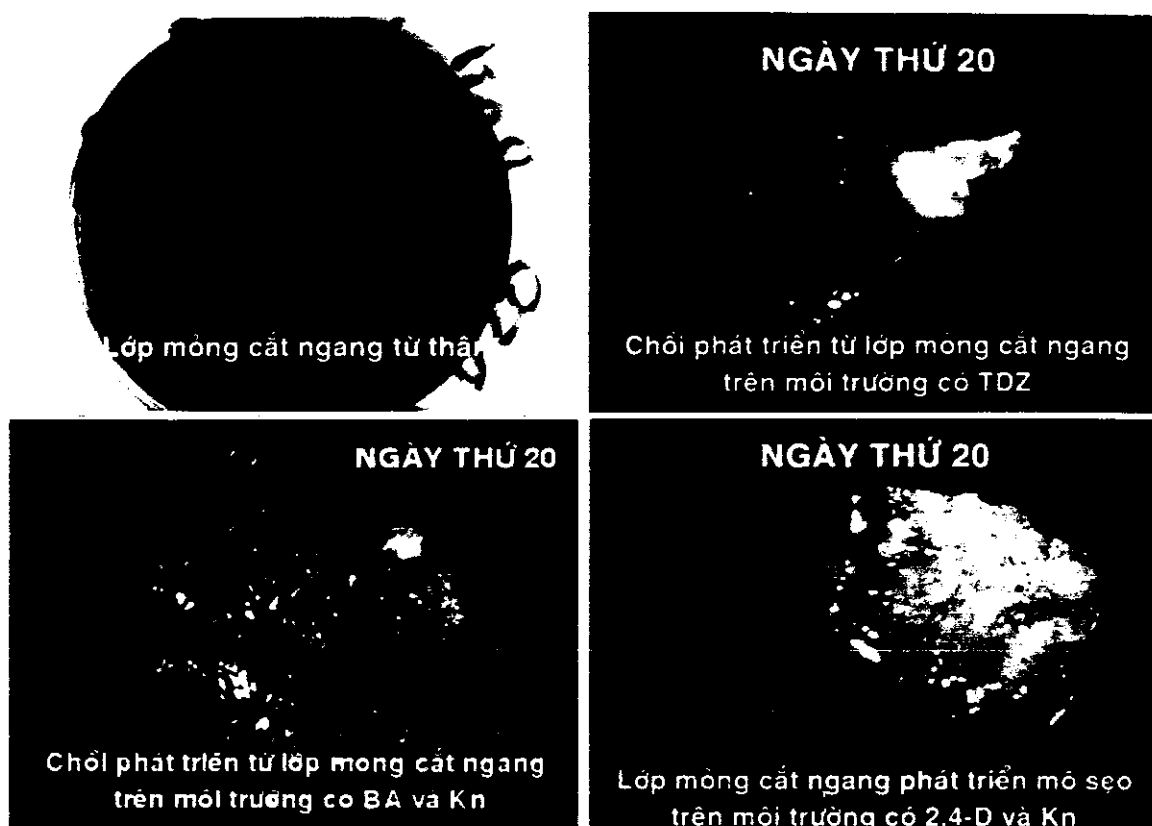
Ảnh hưởng của BA lên sự tạo chồi cây điều của lớp mỏng đốt tử diệt rõ rệt hơn nồng độ được gia tăng lên 10 mg/L. Số lượng mẫu tạo chồi cao nhất khi môi trường có bổ sung KN 1 mg/L, tuy nhiên không có sự khác biệt đáng kể giữa các nghiệm thức có NAA 1 hoặc 0,5 mg/L. Số chồi xuất hiện trên mỗi mẫu cấy cao nhất trên môi trường có bổ sung BA 10 mg/L, KN 1 mg/L và NAA 0,5 mg/L. Số chồi/mẫu thấp nhất trên môi trường có BA 5 mg/L và NAA 1mg/L.

Mẫu cấy là lớp mỏng từ đốt tử diệt cho số chồi tạo thành cao hơn từ đốt thân mầm (Hình 2). Điều này có thể do vùng sinh mô chồi hiện diện chung quanh mắt tử diệt dễ bị kích hoạt (K. Trần Thanh Vân, 2003). Quan sát các phẫu thức cắt lớp mỏng theo mặt cắt ngang hay dọc ở ngày nuôi cấy thứ 7, chúng ta dễ dàng nhận thấy đây là các chồi phát sinh trực tiếp không qua giai đoạn tạo mô sẹo (Hình 3a & 3b). Các tế bào sinh mô tạo chồi có nhân to, tế bào chất ăn màu phẩm nhuộm đậm xuất hiện từ vùng nhu mô vỏ hoặc tượng tầng phát sinh libe mộc, đồng thời với sự hình thành bó mạch xuất phát từ bó mạch của thân mầm đến các vùng chồi mới hình thành (Hình 3b). Sử dụng kính hiển vi điện tử quét, chúng ta cũng quan sát thấy nhiều đỉnh chồi xuất hiện trên bề mặt lớp mỏng ở ngày nuôi cấy thứ 10 (Hình 3c). Các chồi tiếp tục phát triển trên môi trường nếu được cấy chuyển thường xuyên 2 tuần/lần và thành chồi cao từ 3-4 cm sau 2 tháng nuôi cấy (Hình 3d, 3e & 3f).

### 3.2. Nuôi cấy lớp mỏng từ cành non

Khi nuôi cấy cành non của cây điều ghép, tất cả mẫu nuôi cấy ở các nghiệm thức đều không có phản ứng sau 10 ngày nuôi cấy và giữ nguyên tình trạng khi được chuyển sang môi trường mới. Phần biểu bì và vùng libe mộc bị hóa nâu dần theo thời gian nuôi cấy cho đến ngày thứ 45.

Sau 10 ngày nuôi cấy, các mẫu nuôi cấy từ cành non của thân mầm ở nghiệm thức đối chứng không có biểu hiện của tầng trưởng ngoại trừ sự hóa nâu của lớp tế bào biểu bì. Trong khi đó ở các nghiệm thức có chất điều hòa tăng trưởng (TDZ hay BA và KN) một số mẫu cấy có phần tế bào biểu bì phồng lên và còn giữ màu xanh. Tỷ lệ số mẫu cấy có phản ứng với môi trường nuôi cấy là 40% trên môi trường có TDZ 1mg/L, 20% trên môi trường có BA 5 mg/L và KN 0,5 mg/L. Trên môi trường có TDZ 0,5 mg/L, số mẫu có phản ứng chỉ chiếm 10% trên tổng số mẫu nuôi cấy. Khi nuôi cấy trên môi trường có bổ xung thêm 2,4-D 0,5 mg/L và KN 0,5 mg/L, lớp nhu mô vỏ và biểu bì ở đa số mẫu cấy có phản ứng phình lên để tạo mô sẹo. Sau 10 ngày trên môi trường nuôi cấy ban đầu, có dấu hiệu tích tụ phenol trong môi trường nơi đặt mẫu cấy, vì vậy toàn bộ các mẫu được chuyển sang môi trường mới giống môi trường nuôi cấy ban đầu. Vào ngày thứ 20, trên môi trường có bổ xung 2,4-D và KN, sự hình thành mô sẹo đã rõ nét hơn trên 60 % mẫu nuôi cấy. Tuy nhiên



**Hình 4** Ảnh hưởng của BA, kinetin, TDZ và 2,4-D lên sự phát triển chồi của lớp mỏng cành non



**Hình 5.** Sự phát triển chồi nách (a) sau 10 ngày và (b) chồi ngọn sau 30 ngày của giống điều BO1 trong điều kiện nuôi cấy quang tự dưỡng.

không có chồi nào được hình thành trên môi trường này sau 45 ngày nuôi cấy. Trái lại, sau khi được cấy chuyển sang môi trường mới, 50% số mẫu có lớp biểu bì phồng lên ở nghiệm thức có TDZ 1 mg/L đã hình thành chồi với một hai phác thể lá sơ khởi vào ngày thứ 20 (Hình 4). Các chồi này tiếp tục tăng trưởng kích thước nhưng không gia tăng số lượng cho đến ngày kết thúc thí nghiệm (ngày thứ 45). Không có chồi nào được quan sát thấy trên môi trường có bổ xung TDZ 0,5 mg/L. Năm mươi phần trăm số mẫu nuôi cấy trên môi trường có BA và KN đã hình thành các thể giống như chồi khi quan sát ở ngày thứ 20 (Hình 4), nhưng các thể chồi này không thể phát triển thành chồi mang lá như trường hợp các mẫu cấy trên môi trường có TDZ khi quan sát ở ngày thứ 45 (Hình 4).

Khi quan sát các mẫu cấy ở các nghiệm thức có sự hình thành chồi trực tiếp hay thể chồi, tốc độ tăng trưởng chậm dần từ ngày 20 đến ngày 45. Điều này có thể do phenol từ các mẫu nuôi cấy (dọc theo hệ thống bó mạch bên trong thân cây điều có hệ thống ống tiết chứa các hợp chất phenol) được tiết và tích lũy trong môi trường nuôi cấy và trở thành chất cản tăng trưởng, đồng thời nồng độ than hoạt tính cao (5 g/L) trong môi trường có thể vừa hấp phụ phenol lẫn cytokinin khiến cho sự tăng trưởng của thực vật được nuôi cấy bị suy giảm. Ngoài ra, sự không thành công của việc nuôi cấy cành non còn một phần do mẫu cấy là đoạn thân đã hoàn toàn biệt hóa nên việc thể hiện tính toàn thể của tế bào nuôi cấy sẽ có nhiều khó khăn.

### 3.3. Nuôi cấy quang tự dưỡng

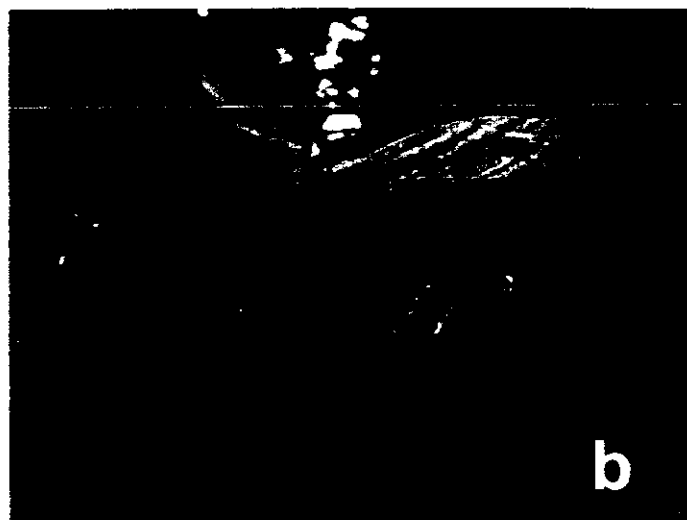
**Bảng 5.** Ảnh hưởng của sự hiện diện đường và vitamin đến sự gia tăng trọng lượng tươi (GTILT), chiều cao cây (CC), số lá mở (SLM) và phần trăm ra rễ (% RR) của cây điều in vitro ngày thứ 60.

| Nghiệm thức        | Sucrose (g/L) | GTILT (mg)                | CC (cm)   | SLM   | % RR    |
|--------------------|---------------|---------------------------|-----------|-------|---------|
| 1                  | 20            | 350,5 ± 65,2 <sup>y</sup> | 3,2 ± 1,5 | 6 ± 2 | 35 ± 12 |
| 2                  | 0             | 410,0 ± 70,5              | 5,2 ± 0,5 | 9 ± 4 | 65 ± 15 |
| ANOVA <sup>z</sup> |               | NS                        | *         | NS    | **      |

<sup>z</sup> NS, \*, \*\*: không khác biệt hoặc khác biệt có ý nghĩa ở mức  $p \leq 0,05$  và  $0,01$ .

<sup>y</sup> Trị số trung bình ± độ lệch chuẩn.

Không có sự khác biệt về mặt thống kê ở hai chỉ tiêu gia tăng trọng lượng tươi và số lá mở giữa hai nghiệm thức nuôi cấy (môi trường có đường, có vitamin và môi trường không đường, không vitamin), mặc dù gia tăng trọng lượng tươi và số lá mở của cây điều in vitro trong điều kiện quang tự dưỡng có phần lớn hơn (Bảng 5). Cây điều in vitro đã tăng trưởng chiều cao tốt hơn trong điều kiện nuôi cấy quang tự dưỡng, đồng thời với sự tạo rễ nhanh hơn (dựa trên % ra rễ) đã giúp cho cây tăng trưởng tốt hơn. Số lá lớn hơn trong nghiệm thức không đường còn chứng minh là điều kiện quang tự dưỡng đã làm tăng khả năng hoạt động của bộ máy quang hợp (lá cây) giúp cho cây hấp thu CO<sub>2</sub> là nguồn carbon duy nhất trong điều kiện nuôi cấy không đường và vitamin. Việc sử dụng nút giấy thay thế nút cao su trong điều kiện nuôi cấy không đường đã làm tăng độ thoáng khí trong bình nuôi cấy, giảm bớt độ ẩm trong bình (giảm hiện tượng thủy tinh thể), làm gia tăng sự thoát hơi nước của thực vật cấy mô dẫn đến sự hấp thu các chất khoáng và nước nhiều hơn trong môi trường nuôi cấy. Đồng thời sự thoáng khí của bình nuôi cấy còn giúp giải phóng bớt lượng khí ethylene tạo ra trong quá trình tăng trưởng của thực vật và gây ức chế sự tăng trưởng của thực vật nuôi cấy in vitro. Nguyễn Thị Quỳnh và cộng sự (2002) cũng có những kết quả tương tự khi nhân giống cây *Paulownia* trên môi trường không đường và vitamin trong bình tam giác dùng nắp đáy là nút giấy.



**Hình 6.** Chồi (a) từ phương pháp cắt đoạn và (b) từ phương pháp nuôi cấy lớp mỏng của giống PN1 sau 30 ngày tăng trưởng trong điều kiện nuôi cấy quang tự dưỡng.



**Hình 7.** (a) Cây *in vitro* giống BO1 ngày thứ 60, (b) Cây ra bầu đất ngày thứ 7.

Các cây điều in vitro có rễ được đưa ra bầu đất ở vườn ươm, tuy nhiên khả năng sống sót sau một tháng còn rất thấp và không có cây nào còn sống sau 2 tháng ở vườn ươm. Nguyên nhân chính do hệ thống rễ từ nuôi cấy in vitro chưa phù hợp cho cây phát triển trong giai đoạn ex vitro, vì rễ dài nhưng thiếu phát triển rễ phụ, đồng thời rễ bị hóa nâu, giòn và dễ gãy nên khó đưa vào bầu đất.

#### 4. Kết luận và đề nghị

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. Môi trường nuôi cấy với thành phần khoáng MS có bổ xung BA 10 mg/L, KN 1 mg/L và NAA 0,5 mg/L là tốt nhất cho sự tạo chồi từ nuôi cấy lớp mỏng của đốt từ diệp. Đối với đốt thân mầm thì không cần sự hiện diện của kinetin. Cũng cần nghiên cứu về sự tạo phôi soma từ nuôi cấy lớp mỏng thân mầm, cành non và lá.

Tổ hợp chất điều hoà tăng trưởng thực vật dùng trong nghiên cứu này chưa thích hợp để tạo chồi từ các lớp mỏng của cành non và cần phải nghiên cứu thêm.

Cây điều in vitro đã tăng trưởng tốt trong điều kiện nuôi cấy quang tự dưỡng (môi trường không đường và vitamin). Cần tìm hiểu thêm về các điều kiện ánh sáng, nồng độ CO<sub>2</sub>, và giá thể nuôi cấy tác động lên sự tăng trưởng cũng như tạo rễ của cây cấy mô để hoàn thiện quy trình nhân giống và có thể ứng dụng trong điều kiện sản xuất.

- Đề tài nhận được tài trợ của Bộ Khoa học và Công nghệ, Chương trình KC 04-08.

#### 6. Tài liệu tham khảo

- Barghchi M, Alderson PG (1983) In vitro production of *Pistacia* species. Acta Hort. 131, 49-60.
- Boggetti B, Jasik J, Mantell S (1999) In vitro multiplication of cashew (*Anacardium occidentale* L.) using shoot node explants of glasshouse-raised plants. Plant Cell Rep. 18, 456-461.
- 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.
- Das S, Jha TB, Jha S (1996) In vitro propagation of cashewnut. Plant Cell Rep. 15, 615-619.
- Goh C-J, Lakshmanan P, Loh C-S (1994) High frequency direct shoot bud regeneration from excised leaves of mangosteen (*Garcinia mangostana* L.). Plant Sci. 101, 173-180.
- Kozai T (1991) Micropropagation under photoautotrophic conditions. In: Debergh PC and Zimmerman RH (eds) Micropropagation, Technology and Application, pp. 447-469, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Leva AR, Falcone AM (1990) Propagation and organogenesis in vitro of *Anacardium occidentale* L. Acta Hort. 280, 143-145.
- Litz RE, Knight Jr RJ, Gazit S (1984) In vitro somatic embryogenesis from *Mangifera indica* L. callus. Sci. Hort. 22, 233-240.
- Nguyễn Thị Quỳnh, Nguyễn Thị Kim Linh, Đoàn Thị Ái Thuyền, Thái Xuân Du. 2002. Effects of nutrient concentration and ventilation condition of the culture vessel on the growth of Paulownia (*Paulownia fortunei*) cultured in vitro. Advan. Nat. Sci. Vol.3 (3): 281-287.

- Philip VJ & Unni PN (1984) In vitro propagation of cashew for crop improvement. *In*: Bhaskara Rao EVV & Khan HH (eds.) *Cashew Research and Development*, pp. 77-82, CPCRI, Kasargod, India.
- Trần Thanh Văn K (2003) Thin cell layer concept. *In*: Duong Tan Nhut, Van Le B, Tran Thanh Van K, Thorpe T (eds.) *Thin cell layer culture system: regeneration and transformation applications*, pp. 1-16, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.