

Mỹ Quyền, Lê Minh Hải, Phạm Minh Hùng, Trần Vũ Can và Trần Thị Ba, 2019. Ảnh hưởng của gốc ghép mướp đến sự sinh trưởng và năng suất của mướp TS 247 tại huyện Châu Thành, tỉnh Sóc Trăng. *Tạp chí Khoa học Công nghệ Nông nghiệp Việt Nam*, 104(7): 25-30.

Shivani, R., K. Perdeep, S. Parveen, S. Amar and S.K. Upadhyay, 2015. Evaluation of different rootstocks for bacterial wilt tolerance in bell pepper [*Capsicum annuum* (L.) var. *grossum* (Sendt.)] under protected conditions. *Himachal Journal of Agricultural Research*, 41(1): 100-103.

Effect of luffa rootstock and mulching on growth and fruit yield of long luffa CN428 in Tam Binh district, Vinh Long province

To Thi Thanh Tuyen, Vo Thi Bich Thuy, Ngo Thanh Huy, Duong Nguyen Minh Tan, Tang Truong Loi, Tran Thi Ba

Abstract

The study was carried out with 2 experiments in Tam Binh district, Vinh Long province. Experiment 1 - Effect of luffa varieties used as rootstocks on growth and fruit yield of long luffa CN428. The experiment was arranged in completely randomized block design with 4 replications and 4 treatments, including: (1) Taiwan variety 01, (2) Taiwan variety 02, (3) local long fruit and (4) and control (non grafted). Results showed that the highest yield (11,0 tons/ha) was recorded at Taiwan variety 01 and the lowest yield at the control variety (non-grafting variety 4,85 tons/ha). Experiment 2 - Effect of number of rootstocks and mulching on growth and fruit yield of grafted long luffa CN428. The experiment was arranged in two factorial split-plots with 4 replications; main plot included the number of rootstocks: (1) single root grafting, (2) double root grafting, (3) triple root grafting and (4) control (non grafting); Sub-plot was mulching types including silvery-gray plastics and rice straw. The results showed that the marketable yield (7.78 tons/ha) of the single root grafting long luffa CN428 (grafted with 1 main root in the nursery) was higher than non-grafting (2.71 tons/ha); the yield of long luffa variety CN428 when mulching by plastics (5.72 tons/ha) was higher than that of mulching by straw (2.97 tons/ha). It is suggested that planting long luffa variety CN428 in Tam Binh district, Vinh Long province should use Taiwan luffa rootstock 01 combined with mulching by plastics.

Keywords: Luffa, rootstock, number of rootstocks, mulching types

Ngày nhận bài: 31/3/2021
Ngày phản biện: 18/5/2021

Người phản biện: GS.TS. Trần Khắc Thi
Ngày duyệt đăng: 04/6/2021

ẢNH HƯỞNG CỦA TDZ VÀ IAA LÊN SỰ PHÁT SINH HÌNH THÁI TỪ CÁC LỚP MỎNG TẾ BÀO CỦA LÁ, CUỐNG LÁ VÀ THÂN RỄ CÂY SÂM CAU (*Curculigo orchioides* Gaertn.) NUÔI CẤY *IN VITRO*

Nguyễn Thị Thúy Diễm¹, Huỳnh Trường Huệ¹, Nguyễn Thị Minh Châu¹, Võ Thị Xuân Tuyền¹, Nguyễn Thị Thúy Tiên¹, Huỳnh Thanh Quang¹

TÓM TẮT

Mẫu lát cắt mỏng theo chiều ngang (traverse thin cell layer - tTCL) lá, cuống lá và thân rễ của cây sâm cau *in vitro* được nuôi cấy trên môi trường MS không có và có TDZ (0,5, 1,0 mg/L) kết hợp IAA (1,5, 2,0 mg/L) nhằm khảo sát hiệu quả của TDZ và IAA lên khả năng tạo mô sẹo và chồi trực tiếp. Sau 12 tuần nuôi cấy, kết quả thu được cho thấy môi trường thích hợp tạo mô sẹo từ tTCL lá là MS bổ sung 1,0 mg/L TDZ với 1,5 mg/L IAA; cuống lá là MS có 0,5 mg/L TDZ và 1,5 mg/L IAA; thân rễ là MS có 0,5 mg/L TDZ với 2,0 mg/L IAA hoặc MS có 1,0 mg/L TDZ với 1,5 mg/L IAA. Môi trường tái sinh chồi từ tTCL mẫu lá là MS có 1,0 mg/L TDZ với 1,5 mg/L IAA; tTCL cuống lá và thân rễ là MS có 0,5 mg/L TDZ và 1,5 mg/L IAA.

Từ khóa: Sâm cau, mô sẹo, nuôi cấy lớp mỏng, phát sinh hình thái, chất điều hòa sinh trưởng

¹ Trường Đại học An Giang, Đại học Quốc gia TP. Hồ Chí Minh

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Sâm cau (*Curculigo orchioide* Gaertn.) là loài thảo được sống lâu năm có chứa nhiều hoạt chất dược liệu quý và được dùng phổ biến trong y học. Nhiều nghiên cứu cho rằng trong thân rễ sâm cau có chứa polysaccharides, glycosides, sapogenin, alkaloid, ... (Irshad *et al.*, 2006) được dùng làm thuốc chữa ho, đau lưng, trĩ, vàng da, đau bụng, lở loét (Đỗ Tất lợi và *ctv.*, 2004), chống loãng xương, làm thuốc bổ tăng cường sinh lí (Cao và *ctv.*, 2008), trị đái tháo đường, kháng khuẩn (Nagesh, 2008). Điều này cho thấy, đây là loài thảo được có giá trị cao và cần được phát triển.

Nhân giống cây sâm cau theo phương pháp truyền thống như gieo hạt thường có tỷ lệ nảy mầm thấp, với giảm thân rễ thì mỗi cây giống phải có một phần củ và phần ngọn mới đảm bảo cây có thể sống, nên hệ số nhân giống rất thấp. Vì vậy, các kết quả nghiên cứu nhân giống *in vitro* cây sâm cau từ các mẫu thân rễ, lá và chồi đỉnh đã được thực hiện và thành công (Suri *et al.*, 1999; Thomas và Jacob, 2004; Nagesh, 2008; Võ Châu Tuấn và *ctv.*, 2011; Trương Thị Bích Phượng và *ctv.*, 2018). Tuy nhiên, các ứng dụng kỹ thuật nuôi cấy lát mỏng tế bào trên đối tượng sâm cau còn rất hạn chế ở nước ta. Trong các kỹ thuật vi nhân giống thì nuôi cấy lát mỏng tế bào (Thin cell layer - TCL) là kỹ thuật 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 các tế bào trong lát mỏng tế bào giảm, tạo được nhiều chồi hơn, hệ số nhân chồi cao hơn nhiều so với các phương pháp nhân giống truyền thống (Lê Văn Hòa và *ctv.*, 2012). Bài báo này, trình bày kết quả nghiên cứu sự tạo mô sẹo và chồi từ các vật liệu nuôi cấy tTCL của lá, cuống lá và thân rễ cây sâm cau *in vitro* đạt hiệu quả cao nhằm cải tiến quy trình nhân giống loài sâm cau phục vụ cho nhu cầu dược liệu trong nước.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

- Vật liệu sử dụng là lá, cuống lá và thân rễ của các chồi sâm cau *in vitro* tái sinh từ quá trình nảy mầm của hạt sâm cau trên môi trường MS bổ sung 2 mg/L BA.

- Môi trường MS là môi trường Murashige và Skoog (1962) có bổ sung agar (8 g/L), đường (30 g/L), than hoạt tính 1 g/L. Môi trường điều chỉnh pH = 5,8.

- Điều kiện nuôi cấy *in vitro*: thời gian chiếu sáng 16 giờ/ngày, cường độ ánh sáng khoảng 2.000 lux, nhiệt độ phòng nuôi 24 ± 2°C.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Bố trí thí nghiệm

a) *Thí nghiệm 1: Khảo sát sự phát sinh hình thái từ các mẫu tTCL của lá sâm cau*

Mẫu lá sâm cau *in vitro* được cắt thành từng lát mỏng theo chiều ngang (traverse thin cell layer - tTCL) kích thước 5 mm × 5mm. Tiến hành cấy mẫu các mẫu vào môi trường MS không có và có bổ sung IAA (1,5, 2,0 mg/L) kết hợp TDZ (0,5, 1,0 mg/L).

b) *Thí nghiệm 2: Khảo sát sự phát sinh hình thái từ tTCL của cuống lá sâm cau*

Cuống lá sâm cau *in vitro* được cắt ngang tạo thành lát mỏng tTCL, mỗi đoạn cắt dài khoảng 5 mm, sau đó cấy mẫu các mẫu vào môi trường MS không có và có bổ sung IAA (1,5, 2,0 mg/L) kết hợp TDZ (0,5, 1,0 mg/L).

c) *Thí nghiệm 3: Khảo sát sự phát sinh hình thái từ tTCL của thân rễ sâm cau*

Các mẫu thân rễ sâm cau *in vitro* là phần chồi (đã loại bỏ hết lá và cuống) được cắt ngang thành các lớp mỏng có chiều dày khoảng 2 mm và được đặt vào môi trường MS không có và có bổ sung IAA (1,5, 2,0 mg/L) kết hợp TDZ (0,5, 1,0 mg/L).

Các thí nghiệm được bố trí theo thể thức hoàn toàn ngẫu nhiên, mỗi nghiệm thức 3 lần lặp lại, mỗi lần lặp lại là 5 keo, mỗi keo cấy 2 mẫu.

2.2.2. Chỉ tiêu theo dõi

Xác định tỷ lệ mẫu sống, tỷ lệ mẫu tạo mô sẹo, tỷ lệ mẫu tái sinh chồi và số chồi từ các mẫu tTCL lá, tTCL cuống lá và tTCL thân rễ sâm cau *in vitro* ở 12 tuần nuôi cấy.

2.2.3. Phân tích dữ liệu

Các số liệu thu thập được xử lý và phân tích thống kê bằng phần mềm Excel 2010 và SPSS 20.0 với phép thử Duncan để so sánh sự khác biệt giữa các nghiệm thức.

2.3. Thời gian và địa điểm nghiên cứu

Thí nghiệm được thực hiện từ tháng 01 đến tháng 6 năm 2020 tại phòng thí nghiệm Sinh lý Thực vật, Khoa Nông Nghiệp - Tài Nguyên Thiên Nhiên, Trường Đại học An Giang.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Hiệu quả của TDZ và IAA lên sự phát sinh hình thái từ tTCL lá

3.1.1. Sự phát sinh mô sẹo

Sau 12 tuần nuôi cấy, những mẫu lát mỏng tTCL lá sâm cau *in vitro* được nuôi cấy trên tất cả các môi trường đều tạo mô sẹo và đạt tỷ lệ mẫu sống cao. Các số liệu thu nhận được thể hiện qua bảng 1.

Bảng 1. Sự hình thành mô sẹo và chồi từ tTCL lá sâm cau ở 12 tuần sau khi cấy

Thí nghiệm	Chất ĐHST (mg/L)		Tỷ lệ sống (%)	Tỷ lệ tạo mô sẹo (%)	Tỷ lệ tái sinh chồi (%)	Số chồi (chồi/mẫu)
	TDZ	IAA				
A1	0	0	66,7 ^b	89,2	-	-
A2	0,5	1,5	90,0 ^a	100	51,7 ^b	1,2 ^b
A3	0,5	2,0	96,7 ^a	100	17,4 ^c	1,0 ^b
A4	1,0	1,5	96,7 ^a	100	71,7 ^a	3,3 ^a
A5	1,0	2,0	90,0 ^a	92,5	11,7 ^d	1,0 ^b
F			*	ns	**	**
CV (%)			10,2	5,7	23,4	36,7

Ghi chú: Các chữ cái theo sau giống nhau thì không khác biệt thống kê có ý nghĩa thống kê: * = khác biệt có ý nghĩa ở mức 5%, ** = khác biệt có ý nghĩa ở mức 1%, ns = khác biệt không có ý nghĩa thống kê, (-) Không ghi nhận chồi xuất hiện.

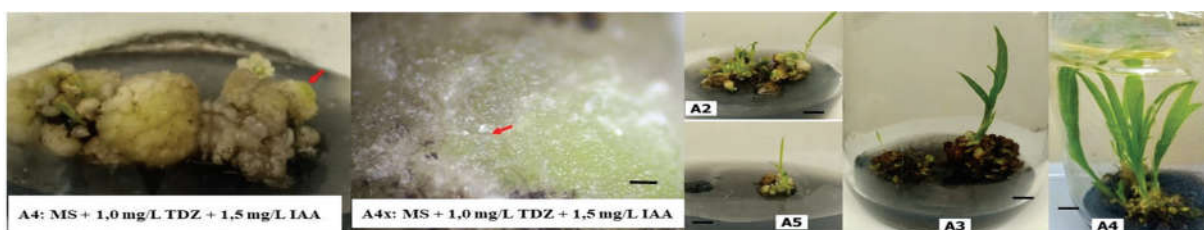
Các mẫu tTCL được nuôi cấy trên môi trường MS có bổ sung chất điều hòa sinh trưởng (CĐHST) TDZ và IAA đạt tỷ lệ sống, tỷ lệ mẫu tạo sẹo tương ứng lần lượt từ 90 - 96,97% và 92,5 - 100% cao hơn so với các mẫu nuôi cấy trên môi trường không có bổ sung CĐHST. Điều này chứng tỏ là sự kết hợp giữa TDZ và IAA ở các nồng độ khác nhau đều có hiệu quả kích thích sự hình thành mô sẹo. Kết quả này phù hợp với nhận định của George và cộng tác viên (2008), cytokinin kích thích sự phân chia tế bào với điều kiện có auxin. Trên môi trường MS không TDZ và IAA cũng có sự hình thành sẹo trên môi trường MS không TDZ và IAA nhưng tỷ lệ mẫu tạo mô sẹo thấp hơn đạt 89,17%, điều này là do các tTCL của mẫu lá đã có sẵn auxin nội sinh nên khi nuôi cấy trên môi trường MS không bổ sung chất điều hòa sinh trưởng vẫn có sự hình thành sẹo.

Trong thí nghiệm này, các mô sẹo hình thành trên môi trường MS có 1 mg/L TDZ với 1,5 mg/L IAA nhiều, phát sinh xung quanh vết cắt, lan khắp bề mặt mẫu cấy, màu vàng nhạt và tập hợp nhiều nhóm tế bào hình tròn nhỏ màu trắng có thể phát

triển thành phôi để hình thành chồi (Hình 1). Các khối mô sẹo ở thí nghiệm thức còn lại lúc đầu cũng có biểu hiện tăng sinh mô nhưng đến 12 tuần sau khi cấy chúng bắt đầu thay đổi từ màu vàng sang nâu đen. Riêng cấu trúc mô sẹo ở thí nghiệm thức A1, A2 và A5 rất rắn chắc, vì vậy khả năng phân biệt hóa của các mô sẹo trên các môi trường này rất thấp.

3.1.2. Sự tái sinh chồi

Khả năng tái sinh chồi của các mẫu tTCL lá được thể hiện ở bảng 1 cho thấy, những mẫu sống sót ở trên môi trường MS bổ sung TDZ và IAA cho hiệu quả tái sinh chồi cao hơn so với các mẫu nuôi cấy trên môi trường không có bổ sung TDZ và IAA (không tái sinh chồi). Môi trường MS bổ sung 1,0 mg/L TDZ với 1,5 mg/L IAA cho tỷ lệ mẫu tạo chồi cao nhất, chồi phát triển thành từng cụm, thân to, chất lượng chồi tốt đạt 71,7% với 3,3 chồi/mẫu. Kết quả của thí nghiệm này cao hơn kết quả nghiên cứu của Prajapati và cộng tác viên (2003), khi nuôi cấy các mảnh lá sâm cau (10 mm) trên môi trường MS bổ sung 0,2 mg/L BAP cho số chồi tái sinh chỉ đạt tối đa là 1,44 chồi/mẫu.



Hình 1. Sự phát sinh hình thái mô sẹo và chồi từ tTCL lá sâm cau ở 12 tuần sau khi cấy

Ghi chú: A4x: Khối mô sẹo được quan sát dưới kính hiển vi soi nổi.

Kết quả thí nghiệm cho thấy, khi tăng nồng độ TDZ từ 0,5 mg/L đến 1 mg/L kết hợp 1,5 mg/L IAA thì sự tái sinh chồi tăng (tương ứng 1,2 và 3,3 chồi/mẫu), tuy nhiên khi nồng độ IAA tăng lên 2 mg/L thì sự tái sinh chồi lại giảm xuống còn 1 chồi/mẫu. Điều này cho thấy, nồng độ TDZ kết hợp IAA ở nồng độ 1,5 mg/L thì kích thích tái sinh chồi, nhưng khi nồng độ IAA tăng 2 mg/L thì ức chế sự tái sinh chồi. Kết quả này phù hợp với nhận định của Gaspar và cộng tác viên (1996), IAA ở nồng độ cao làm giảm hoạt tính của TDZ gây ức chế sự tái sinh chồi của mẫu cấy.

3.2. Hiệu quả của TDZ và IAA lên sự phát sinh hình thái từ tTCL cuống lá

3.2.1. Sự phát sinh mô sẹo

Việc bổ sung TDZ và IAA vào môi trường nuôi cấy các mẫu tTCL cuống lá sâm cau có ảnh hưởng đến quá trình sống sót và hình thành mô sẹo của các mẫu sau 12 tuần nuôi cấy (Bảng 2). Các mẫu sống sót thu được ở môi trường MS không bổ sung TDZ và IAA (23,3%) thấp hơn so với môi trường có TDZ với IAA (26,7 - 60%). Nhìn chung, tỷ lệ sống của các mẫu tTCL cuống lá ở các môi trường nuôi cấy không cao, chỉ đạt tối đa là 60% trên môi trường MS có bổ sung 0,5 mg/L TDZ với 1,5 mg/L IAA.

Bảng 2. Sự hình thành mô sẹo và chồi từ tTCL cuống lá sâm cau ở 12 tuần sau khi cấy

Thí nghiệm	CĐHST (mg/L)		Tỷ lệ sống (%)	Tỷ lệ tạo mô sẹo (%)	Tỷ lệ tạo chồi (%)	Số chồi (chồi/mẫu)
	TDZ	IAA				
B1	0	0	23,3 ^b	100	-	-
B2	0,5	1,5	60,0 ^a	100	67,0 ^a	2,3 ^a
B3	0,5	2,0	26,7 ^b	88,9	-	-
B4	1,0	1,5	33,3 ^b	100	30,3 ^b	1,0 ^b
B5	1,0	2,0	40,0 ^b	100	-	-
F			*	ns	**	**
CV (%)			29,9	11,6	28,2	25,5

Ghi chú: Các chữ cái theo sau giống nhau thì không khác biệt thống kê có ý nghĩa thống kê: ** = khác biệt có ý nghĩa ở mức 1%; * = khác biệt có ý nghĩa ở mức 5%, ns = khác biệt không có ý nghĩa thống kê, (-): Không ghi nhận chồi xuất hiện.

Sự phát sinh mô sẹo của mẫu tTCL cuống lá sâm cau ở bảng 2 cho thấy, tất cả các mẫu sống sót được trên các môi trường MS có hay không có bổ sung TDZ và IAA đều phát sinh hình thái chủ yếu mô sẹo, tỷ lệ tạo mô sẹo đạt 88,9 - 100%, trong đó tỷ lệ mẫu hình thành mô sẹo đạt cao nhất ở thí nghiệm B1, B2, B4 và B5 (đạt 100%). Các mô sẹo từ tTCL cuống lá ở thí nghiệm B2 và B4 mềm, màu vàng nhạt, tập hợp nhiều khối tròn nhỏ và có khả năng biệt hóa thành chồi ở 12 tuần sau khi cấy. Ngoài ra một số mô sẹo ở thí nghiệm B1, B3, B5 có màu xanh nhạt, chắc, tăng sinh nhanh và không có khả năng biệt hóa chồi (Hình 2). Qua kết quả thí nghiệm cho thấy, tTCL cuống lá khi được nuôi cấy đều có sự phân phân hóa của các tế bào nhu mô ở vết cắt, đóng vai trò như tế bào sinh phân chia mảnh liệt tạo khối mô sẹo. Sự phân chia tế bào ở phần cuống lá tương đối hẹp nên khối mô sẹo tạo ra không lớn. Mẫu cấy ở thí nghiệm B1 cũng xuất hiện mô sẹo là do trong mô cuống lá cắt rời có chứa hàm lượng auxin nội sinh. Theo Nguyễn Đức Lượng và Lê Thị Thủy Tiên (2002), auxin kích thích sự tạo mô sẹo,

đồng thời sự kết hợp của auxin và cytokinin tăng cường cảm ứng mô sẹo.

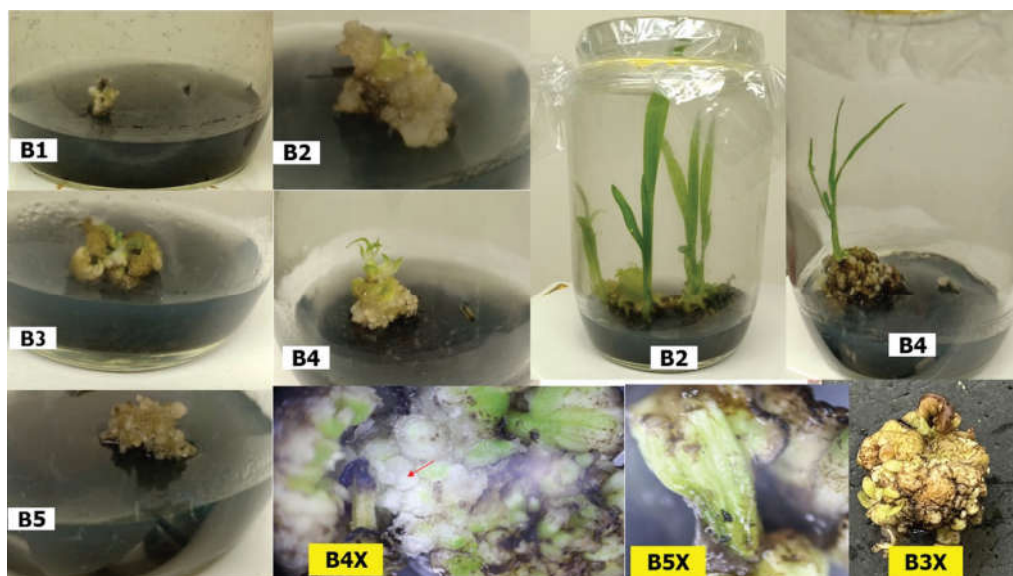
3.2.2. Sự tái sinh chồi

Khả năng tái sinh chồi của các mẫu tTCL cuống lá được thể hiện ở bảng 2 cho thấy, việc bổ sung TDZ và IAA ở các nồng độ khác nhau vào môi trường nuôi cấy có ảnh hưởng đến sự tạo chồi. Các mẫu từ tTCL cuống lá ở môi trường MS có bổ sung TDZ ở nồng độ 0,5; 1,0 mg/L kết hợp 1,5 mg/L IAA có sự tái sinh chồi (Hình 2). Trong đó, thí nghiệm có bổ sung 0,5 mg/L TDZ với 1,5 mg/L IAA (B2) đạt tỷ lệ mẫu tái sinh chồi cao nhất và thấp nhất là thí nghiệm B1, B3, B5 không xuất hiện chồi.

Kết quả thí nghiệm cho thấy, khi bổ sung nồng độ IAA 1,5 mg/L với TDZ 0,5 mg/L thì mẫu tái sinh chồi tăng lên đạt 67,9% với 2,3 chồi/mẫu, nhưng khi tăng TDZ lên 1 mg/L thì mẫu chỉ tái sinh chồi 30,3% với 1 chồi/mẫu. Trên môi trường MS có bổ sung nồng độ IAA 2,0 mg/L với TDZ ở nồng độ 0,5; 1,0 mg/L không có hiệu quả tạo chồi, điều này là do IAA ở nồng độ cao kìm hãm hoạt động của TDZ gây

ức chế quá trình tái sinh chồi từ mẫu cấy. Như vậy các mẫu tTCL cuống lá sâm cau được nuôi cấy trên môi trường MS có bổ sung TDZ kết hợp IAA ở nồng

độ thấp cho hiệu quả phát sinh hình thái chồi hoặc mô sẹo cao hơn so với khi sử dụng TDZ và IAA ở nồng độ cao.



Hình 2. Sự phát sinh hình thái từ tTCL cuống lá sâm cau ở 12 tuần sau khi cấy

Ghi chú: B1, B2, B3, B4: mô sẹo xộp và chồi trên các môi trường nuôi cấy; B3x: mô sẹo đặc; B4x, B5x: Cấu trúc mô sẹo trên môi trường B3, B4, B5 quan sát dưới kính hiển vi soi nổi.

3.3. Hiệu quả của TDZ và IAA lên sự phát sinh hình thái từ tTCL thân rễ sâm cau

3.3.1. Sự phát sinh mô sẹo

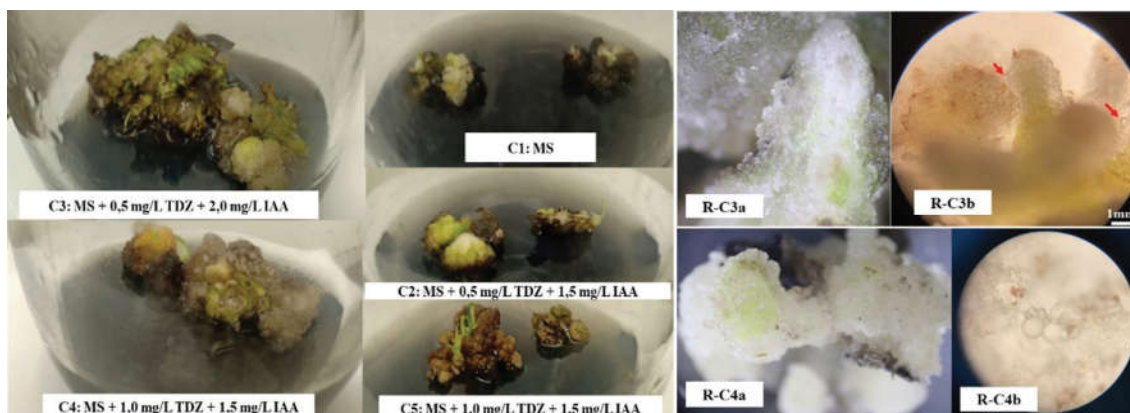
Sau 12 tuần nuôi cấy, các mẫu tTCL thân rễ sâm cau *in vitro* được nuôi cấy trên môi trường MS có và không có bổ sung TDZ và IAA đều đạt tỷ lệ sống cao từ 83,3 - 100% (Bảng 3). Trong đó, nghiệm thức C2, C3 và C4 vẫn đạt tỷ lệ mẫu sống cao nhất từ 96,7 - 100%. Nghiệm thức C5 đạt tỷ lệ mẫu sống thấp nhất 83,3%.

Những mẫu tTCL thân rễ sâm cau còn sống sót trên các môi trường nuôi cấy đều phát sinh hình thái tạo mô sẹo (Hình 3). Tỷ lệ mô sẹo tạo ra nhiều nhất ở nghiệm thức C3 đạt 100%. Nghiệm thức C5 đạt tỷ lệ mô sẹo thấp là 67,6%. Kết quả cho thấy, TDZ ở nồng độ 0,5 mg/L TDZ kết hợp 1,5; 2,0 mg/L IAA cho tỷ lệ mô sẹo tăng từ 80% lên 100%. Tuy nhiên, khi tăng nồng độ TDZ lên 1,0 mg/L thì tỷ lệ mẫu tạo mô sẹo giảm từ 93,3% xuống còn 67,6%, nhiều mẫu không có khả năng tạo mô sẹo, bị hóa đen và chết.

Bảng 3. Sự hình thành mô sẹo và chồi từ tTCL thân rễ sâm cau ở 12 tuần sau khi cấy

Nghiệm thức	Chất ĐHST (mg/L)		Tỷ lệ sống (%)	Tỷ lệ tạo mô sẹo (%)	Tỷ lệ tái sinh chồi (%)	Số chồi (chồi/mẫu)
	TDZ	IAA				
C1	0	0	90,0 ^{ab}	78,4 ^{bc}	45,6 ^c	1,4 ^c
C2	0,5	1,5	100 ^a	80,0 ^{bc}	83,3 ^a	3,4 ^a
C3	0,5	2	96,7 ^a	100 ^a	69,3 ^{ab}	2,0 ^b
C4	1,0	1,5	100 ^a	93,3 ^{ab}	60,0 ^{bc}	1,6 ^{bc}
C5	1,0	2	83,3 ^b	67,6 ^c	55,6 ^{bc}	1,5 ^{bc}
F			*	*	*	**
CV (%)			6,1	12,4	17,0	14,8

Ghi chú: Các chữ cái theo sau giống nhau thì không khác biệt thống kê có ý nghĩa thống kê: *= khác biệt có ý nghĩa ở mức 5%, **= khác biệt có ý nghĩa ở mức 1%.



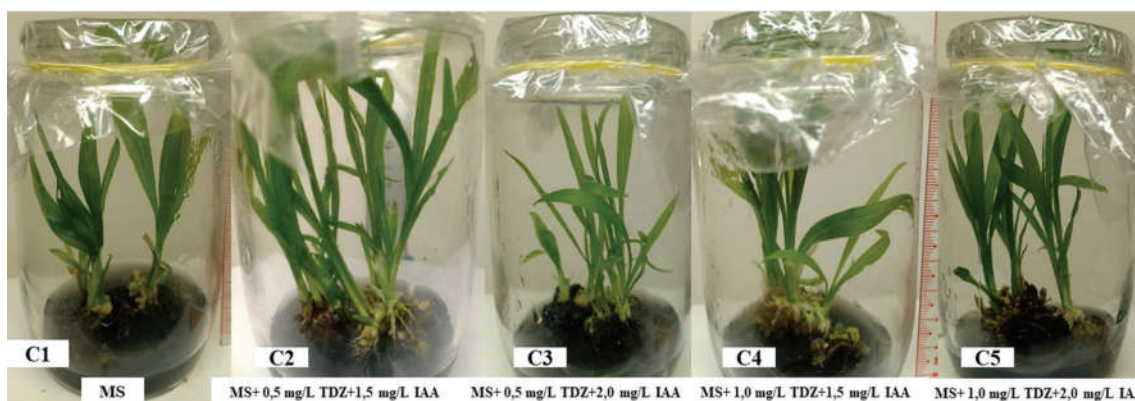
Hình 3. Hình thái của mô sẹo từ tTCL thân rễ sâm cau ở 12 tuần sau khi cấy

Ghi chú: C1, C2, C3, C4, C5: Cấu trúc hình thái mô sẹo; R- C3a, R-C4a: Khối mô sẹo trên môi trường C3, C4 quan sát dưới kính hiển vi soi nổi; Cấu trúc giải phẫu của lát cắt ngang của mô sẹo trên môi trường C3, C4 quan sát dưới kính hiển vi quang học vật kính X10 (R-C3b) và X40 (R-C4b).

Sự biến đổi của khối mô sẹo từ tTCL thân rễ cho thấy, các khối mô sẹo hình thành ở nghiệm thức C1 và C2 có biểu hiện tăng sinh chậm, xung quanh khối mô hóa nâu đen, ở giữa xuất hiện nhiều nhóm tế bào màu vàng nhạt và trắng, sần sùi, có khả năng biệt hóa chồi. Mô sẹo ở nghiệm thức C5 có dạng mềm, màu nâu đen, tăng sinh chậm, sẹo xuất hiện lan dần trên bề mặt mẫu cấy, có sự xuất hiện chồi ở vị trí vết cắt, tuy nhiên khả năng phân biệt hóa của các mô sẹo này rất thấp. Khối mô sẹo ở nghiệm thức C3 và C4 tăng sinh mạnh, mềm, sần sùi, có màu vàng nhạt và trắng phát sinh xung quanh vết cắt và lan dần ra bề mặt môi trường, phía dưới khối mô còn có sự phát sinh rễ. Quan sát cấu trúc hình thái khối mô sẹo màu trắng cho thấy bề mặt khối mô sần sùi, tập hợp rất nhiều tế bào hình tròn nhỏ màu trắng có khả năng phát sinh phôi (Hình 3).

3.3.2. Sự tái sinh chồi

Sau 12 tuần nuôi cấy, hầu hết những mẫu tTCL thân rễ còn sống sót đều phát sinh hình thái chồi trên các môi trường nuôi cấy có và không có bổ sung TDZ và IAA (Bảng 4). Tỷ lệ mẫu tạo chồi đạt được cao nhất ở nghiệm thức C2 (83,3% với 3,4 chồi/mẫu). Nghiệm thức đạt tỷ lệ tạo chồi thấp nhất là nghiệm thức C1 đạt 45,7% với 1,4 chồi/mẫu. Theo Vũ Văn Vụ và cộng tác viên (2007), cytokinin được tổng hợp nhiều ở rễ, hoạt hóa sự phân chia tế bào hình thành chồi bất định, vì vậy các mẫu tTCL từ thân rễ sâm cau có thể chứa một hàm lượng cytokinin nội sinh nhất định nên khi nuôi cấy trên môi trường không có chất điều hòa sinh trưởng đã kích thích quá trình tái sinh chồi.



Hình 4. Sự hình thành chồi từ tTCL thân rễ sâm cau ở 12 tuần sau khi cấy trên môi trường khác nhau

Ghi chú: C1: MS; C2: MS + 0,5 mg/L TDZ + 1,5 mg/L IAA; C3: MS + 0,5 mg/L TDZ + 2,0 mg/L IAA; C4: MS + 1,0 mg/L TDZ + 1,5 mg/L IAA; C5: MS + 1,0 mg/L TDZ + 2,0 mg/L IAA.

Kết quả thí nghiệm cho thấy TDZ và IAA có hiệu quả trong sự gia tăng số chồi. Khả năng tái sinh chồi ở các nghiệm thức có TDZ và IAA cao hơn so với nghiệm thức đối chứng. Khi TDZ ở nồng độ 0,5 mg/L kết hợp với IAA 1,5 và 2,0 mg/L cho hiệu quả tạo chồi giảm từ 3,4 chồi/mẫu cấy xuống còn

2,0 chồi/mẫu cấy. Khi tăng thêm nồng độ TDZ lên 1,0 mg/L kết hợp với IAA ở nồng độ 1,5; 2,0 mg/L thì khả năng tái sinh chồi tiếp tục giảm. Điều này cho thấy nồng độ TDZ cao gây ức chế quá trình tái sinh chồi từ mẫu cấy tTCL thân rễ sâm cau, do đó làm giảm sự gia tăng số chồi trong môi trường nuôi cấy. Theo một số kết quả nghiên cứu trước đây cho thấy, ở nồng độ BAP khác nhau cũng kích thích khả năng tái sinh chồi từ thân rễ sâm cau, tuy nhiên số chồi tái sinh không cao chỉ từ 1,0 - 2,65 chồi/mẫu cấy (Shende *et al.*, 2012, Trương Thị Bích Phượng và *ctv.*, 2018).

Việc sử dụng các mẫu tTCL từ các cây *in vitro* làm nguồn vật liệu ban đầu để tạo khả năng phát sinh hình thái mô sẹo hoặc chồi đã được một số tác giả nghiên cứu trên nhiều đối tượng cây trồng. Tuy nhiên, đối với cây sâm cau và cũng như các loài thuộc họ Hypoxidaceae, vẫn chưa thấy nghiên cứu nào công bố về sử dụng kỹ thuật nuôi cấy lát mỏng trong vi nhân giống. Theo Teixeira và Tanaka (2006), các yếu tố nội sinh thường ảnh hưởng không lớn trong hệ thống TCL, đặc tính mỏng của mẫu cấy đóng vai trò quan trọng trong quá trình đáp ứng với các tác nhân ngoại sinh như CĐHST, chất dinh dưỡng. Nguyễn Bảo Triệu và cộng tác viên (2012) khi nuôi cấy cuống lá và thân củ cây sâm ngọc linh (cắt lát mỏng kích thước 1,0 - 1,5 mm) trên môi trường MS bổ sung 1 mg/L 2,4-D với 0,2 mg/L TDZ cho thấy có sự hình thành mô sẹo cao nhất đạt tỷ lệ 79,8%. Vũ Xuân Dương và cộng tác viên (2019) sử dụng MS bổ sung 0,5 mg/L TDZ và 3 mg/L 2,4-D để tạo mô sẹo từ lát cắt chồi cây *Alpinia coriandriodora* D. Fang (0,5 - 1 mm) đạt tỷ lệ tạo mô sẹo 75,56%.

Trong nghiên cứu này, sử dụng các tTCL lá (5 × 5 mm), cuống lá (5 mm), thân rễ (2 mm) từ cây sâm cau *in vitro* cho thấy các mẫu tTCL lá đạt tỷ lệ mẫu sống, tỷ lệ hình thành mô sẹo cao và chất lượng mô sẹo tốt (96,7% và 100%) khi sử dụng 1,5 mg/L IAA với 1,0 mg/L TDZ; tiếp theo là mẫu tTCL thân rễ khi sử dụng 0,5 mg/L TDZ với 2,0 mg/L IAA hoặc 1,0 mg/L TDZ với 1,5 mg/L IAA cho tỷ lệ mẫu sống và tỷ lệ mẫu tạo mô sẹo đạt tương ứng lần lượt là 96,7% và 100%; 100% và 93,3%; tỷ lệ mẫu sống và tỷ lệ mẫu tạo mô sẹo đạt thấp nhất là ở các mẫu tTCL cuống lá nuôi cấy trên môi trường MS có 1,5 mg/L

IAA với 0,5 mg/L TDZ (60% và 100%). Đối với sự phát sinh hình thái chồi cho thấy, mẫu tTCL thân rễ đạt tỷ lệ tạo chồi và số chồi cao nhất (với 83,3%; 3,4 chồi/mẫu) khi sử dụng 0,5 mg/L TDZ với 1,5 mg/L IAA; tiếp theo là mẫu tTCL lá được nuôi trên môi trường MS có 1 mg/L TDZ và 1,5 mg/L IAA cho tỷ lệ mẫu tạo chồi đạt 71,7% với 3,3 chồi/mẫu, tỷ lệ tạo chồi đạt thấp nhất là mẫu tTCL cuống lá khi sử dụng 0,5 mg/L TDZ với 1,5 mg/L IAA (67% với 2,3 chồi/mẫu). Như vậy, trong ba nguồn mẫu sử dụng, nguồn mẫu tTCL lá được nuôi cấy trên MS có 1,0 mg/L TDZ với 1,5 mg/L IAA cho khả năng phát sinh mô sẹo tốt nhất. Mẫu tTCL thân rễ được nuôi cấy trên môi trường MS bổ sung 0,5 mg/L TDZ và 1,5 mg/L IAA đạt hiệu quả tái sinh chồi trực tiếp cao nhất. Tùy theo mục đích nghiên cứu sự phát sinh hình thái mô sẹo hoặc tái sinh chồi trực tiếp mà lựa chọn nguồn mẫu cấy là tTCL lá hoặc tTCL thân rễ và môi trường nuôi cấy cho phù hợp.

IV. KẾT LUẬN

Qua kết quả nghiên cứu đã xác định được các môi trường nuôi cấy thích hợp cho sự phát sinh hình thái mô sẹo hay chồi trực tiếp bằng phương pháp nuôi cấy lát mỏng từ các bộ phận lá, cuống lá thân rễ của cây sâm cau *in vitro*. Môi trường thích hợp để hình thành mô sẹo từ tTCL lá sâm cau là MS bổ sung 1,0 mg/L TDZ kết hợp 1,5 mg/L IAA; tTCL cuống lá là MS bổ sung 0,5 mg/L TDZ và 1,5 mg/L IAA; tTCL thân rễ là MS bổ sung 0,5 mg/L TDZ kết hợp 2,0 mg/L IAA và MS bổ sung 1,0 mg/L TDZ kết hợp 1,5 mg/L IAA. Môi trường nuôi cấy cho hiệu quả phát sinh chồi từ tTCL lá là MS bổ sung 1,0 mg/L TDZ kết hợp 1,5 mg/L; từ tTCL cuống lá và tTCL thân rễ là MS bổ sung 0,5 mg/L TDZ và 1,5 mg/L IAA.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Đỗ Tất lợi**, 2004. *Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam*. Nhà xuất bản Y Học, Hà Nội: 1274 trang.
- Lê Văn Hòa, Nguyễn Văn Ấy, Phan Thị Ánh Nguyệt**, 2012. Sự tạo phôi soma và tái sinh chồi tre rồng (*Dendrocalamus giganteus* wall. Ex munro) từ nuôi cấy lớp mỏng tế bào. *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, 21b: 68-77.
- Nguyễn Bảo Triệu, Nguyễn Thanh Tùng, Trương Thị Bích Phượng**, 2013. Nuôi cấy *in vitro* sâm ngọc linh (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.). *Tạp chí khoa học, Đại học Huế*, 79(1): 161-173.
- Nguyễn Đức Lượng và Lê Thị Thủy Tiên**, 2002. *Công nghệ tế bào*. Nhà xuất bản Giáo dục, Hồ Chí Minh: 376 trang.

- Trương Thị Bích Phượng, Đỗ Thị Hoa Thắm, Bùi Lê Thanh Nhân, Nguyễn Đức Tuấn**, 2018. Nghiên cứu tạo chồi *in vitro* cây sâm cau (*Curculigo orchoides* Gaertn.) Ở Thừa Thiên Huế. *Tạp chí Y Dược học*, 8(1): 37-46.
- Võ Châu Tuấn, Nguyễn Thị Út, Trần Quang Dẫn**, 2011. Nhân giống *in vitro* cây sâm cau (*Curculigo orchoides* Gaertn.) - Một loài cây thuốc quý. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Đại học Đà Nẵng*, 6(47): 163-169.
- Vũ Văn Vự, Vũ Thanh Tâm, Hoàng Minh Tấn**, 2007. *Sinh lý học thực vật*. Nhà xuất bản giáo dục, Hà Nội: 253 trang.
- Cao, D.P., Y.N. Zheng, T. Han, H. Zhang and K. Rahman**, 2008. *Curculigo orchoides*, a traditional chinese medicinal plant, prevents bone loss in ariectomized rats. *Maturitas*, 59(4): 373-80.
- Gaspar, T., C. Kevers, C. Penel, H. Greppin, D.M. Reid and T.A. Thrope**, 1996. Plant hormones and plant growth regulators in plant tissue culture. *In vitro Cell Dev. Biol. Plant*, 32: 272-289.
- George, E.F, M.A Hall and J.D. Klerk**, 2008. *Plant propagation by tissue culture, Volume 1: The Background*. New York: Springer: 65-75.
- Irshad, S., J. Singh, S.P. Jain and S.P.S Khanuja**, 2006. *Curculigo orchoides* Gaertn. (Kali Musali): An endangered medicinal plant of commercial value. *Natural Product Radiance*, 5(5): 369-372.
- Murashige, T. And F. Skoog**, 1962. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue culture. *Plant Physiology*, 15: 473-497.
- Nagesh, K.S.**, 2008. High Frequency Multiple Shoot Induction of *Curculigo orchoides* Gaertn. *Shoot Tip V/S Rhizome Disc. Taiwallia*, 53(3): 242-247.
- Prajapati, H.A., S.R. Mehta, D.H. Patel and R.B. Subramanian**, 2003. Direct *in vitro* regeneration of *Curculigo orchoides* Gaertn, an endangered anticarcinogenic herb. *Current Science*, 84(6): 747-749.
- Shende, C.B., V.S. Undal, U.S. Chaudhari**, 2012. *In vitro* propagation of *Curculigo orchoides* from rhizome bud. *Journal of Agricultural Technology*, 8(1): 353-362.
- Suri, S.S., S. Jain and K.G. Ramawat**, 1999. Plantlet regeneration and bulbil formation *in vitro* from leaf and stem explants of *Curculigo orchoides*, an endangered medicinal plant. *Sci. Hortic.*, 79(1-2): 127-134.
- Teixeira da Silva, J. A and M. Tanaka**, 2006. Multiple Regeneration Pathways via thin cell layers in *Hybrid Cymbidium* (Orchidaceae). *J. Plant Growth Regul.*, 25(3): 203-210.
- Thomas, T.D and A. Jacob**, 2004. Direct Somatic Embryogenesis of *Curculigo orchoides* Gaertn, an Endangered Medicinal Herb. *Journal of Plant Biotechnology*, 6(3): 193-198.
- Vũ Xuân Dương, Đặng Trọng Lương, Đỗ Tuấn Khiêm, Phạm Thanh Loan, Trịnh Thị Thanh Hương**, 2019. Ứng dụng kỹ thuật nuôi cấy lớp mỏng trong nhân nhanh *in vitro* cây riềng bản địa Bắc Kạn. *Tạp chí Khoa học Công nghệ Nông nghiệp Việt Nam*, 3(100): 29-36.

Effect of TDZ and IAA on morphogenesis from thin cell layer of leaf, petiole and rhizome of *Curculigo orchoides* in vitro

Nguyễn Thị Thụy Diem, Huỳnh Trương Hue, Nguyễn Thị Minh Châu,
Vo Thị Xuan Tuyen, Nguyễn Thị Thụy Tiên, Huỳnh Thanh Quang

Abstract

The traverse thin cell layer (tTCL) of leaf, petiole and rhizomes of *C. orchoides* Gaertn. *in vitro* was cultured on MS medium without or with TDZ (0.5; 1.0 mg/L) combined with IAA (1.5; 2.0 mg/L) to investigate their ability to produce callus and direct shoots. After 12 weeks of culture, the results showed that appropriate medium to generate callus from tTCL of leaf was MS supplemented with 1.0 mg/L TDZ and 1.5 mg/L IAA; tTCL of petioles was MS with 0.5 mg/L TDZ and 1.5 mg/L IAA; from tTCL of rhizome was MS with 0.5 mg/L TDZ and 2.0 mg/L IAA or MS with 1.0 mg/L TDZ and 1.5 mg/L IAA. The medium for shoot regeneration from tTCL of leaf was MS supplemented with 1.0 mg/L TDZ and 1.5 mg/L IAA; from tTCL of petioles and rhizome on the MS supplemented with 0.5 mg/L TDZ and 1.5 mg/L IAA.

Keywords: *Curculigo orchoides* Gaertn., callus, morphogenesis, thin cell layer, plant growth regulator

Ngày nhận bài: 19/4/2021
Ngày phản biện: 12/5/2021

Người phản biện: PGS. TS. Nguyễn Xuân Cảnh
Ngày duyệt đăng: 04/6/2021

DIỄN BIẾN ĐỘ LẠNH (CU) TRONG MỐI QUAN HỆ VỚI PHÁT TRIỂN CÂY ĂN QUẢ ÔN ĐỚI Ở MỘT SỐ TỈNH MIỀN NÚI PHÍA BẮC VIỆT NAM

Vũ Mạnh Hải¹, Bùi Quang Đăng¹, Lê Quốc Thanh², Đào Thế Anh¹,
Nguyễn Doãn Hùng², Nguyễn Ngọc Mai³, Đỗ Thị Thu Hương³, Hà Quang Thường⁵,
Hà Mạnh Phong⁵, Trần Văn Luyện⁶, Vũ Văn Khánh³, Lê Thị Mỹ Hà⁴,
Nguyễn Thị Hiền⁴, Đỗ Hải Long³, Lương Thị Huyền⁴

TÓM TẮT

Bài báo tiến hành nghiên cứu tác động của điều kiện thời tiết trong bối cảnh biến đổi khí hậu toàn cầu với trọng tâm là giá trị độ lạnh hàng năm đến sản xuất cây ăn quả ôn đới vùng miền núi phía Bắc Việt Nam. Nghiên cứu thực hiện dưới dạng điều tra cơ bản sử dụng phương pháp chồng ghép các bản đồ thích nghi cùng với các kỹ thuật đánh giá nông thôn có sự tham gia của người dân (PRA), phỏng vấn người thạo tin (KIP), hệ thống thông tin địa lý (GIS). Kết quả phân tích cho thấy: Giá trị độ lạnh tính theo năm trong hai thập kỷ gần đây thay đổi không đáng kể, liên quan mật thiết đến hiện trạng phân bố cây ăn quả ôn đới ở các tỉnh miền núi phía Bắc và đây cũng chính là yếu tố cơ bản để hoạch định chiến lược phát triển cho từng địa phương.

Từ khóa: Cây ăn quả ôn đới, độ lạnh, miền núi phía Bắc Việt Nam

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Phát triển cây ăn quả ôn đới ở Việt Nam, trước hết là vùng núi phía Bắc với 31% tổng diện tích nhưng chỉ chiếm 9,6% tổng GDP cả nước là một hướng đi đúng đắn và tất yếu, ngoài ý nghĩa góp phần xóa đói giảm nghèo, nâng cao đời sống cho người dân vùng khó khăn, vấn đề an toàn thực phẩm và giảm nhập khẩu (đặc biệt là từ Trung Quốc) cũng là một sự đóng góp rất quan trọng, gián tiếp nâng cao kim ngạch xuất khẩu sản phẩm quả vốn rất có lợi thế cạnh tranh.

Cây ăn quả ôn đới nói chung và các chủng loại hồng, lê, đào, mận, nói riêng cần phải có một khoảng thời gian trong năm có độ lạnh nhất định để phân hoá mầm hoa, ra hoa và kết quả. Cũng chính vì vậy cây ăn quả ôn đới phân bố tập trung vào các nước có vĩ độ cao, chủ yếu ở châu Âu, châu Mỹ và vùng Đông Bắc Á... Trên thực tế, phần lớn những giống thích hợp cho vùng ôn đới thường có yêu cầu rất cao về độ lạnh hữu hiệu (gọi tắt là độ lạnh) (Chilling Units, viết tắt là CU), chẳng hạn các giống đào thường yêu cầu độ lạnh trong khoảng 600 - 1.000 CU, các giống mận từ 800 - 1.200 CU (Gyuró, 1990), do vậy các tiến bộ về giống, kỹ thuật canh tác khó áp dụng cho vùng núi có khí hậu á nhiệt đới ở các nước Đông Nam Á, trong đó có Việt Nam.

Mức độ lạnh cần thiết để cây có thể phân hoá mầm hoa là đặc tính di truyền của giống và nhìn

chung, phần lớn các giống cây ăn quả ôn đới có yêu cầu ngưỡng nhiệt độ hữu hiệu để phân hóa hoa nằm ở hai cực 0°C và 15°C, nghĩa là ở điều kiện nhiệt độ dưới 0°C hoặc trên 15°C, cây trồng không có khả năng phân hóa mầm hoa (George *et al.*, 1998). Trong phạm vi một vùng, sự chênh lệch nhiệt độ chủ yếu do có sự khác biệt về độ cao, dưới thung lũng thấp thường có đơn vị lạnh CU cao hơn sườn và đỉnh đồi do luồng khí lạnh đọng lại, nên có thể trồng được những giống có yêu cầu độ lạnh cao hơn, chất lượng quả tốt hơn. Sử dụng thiết bị đo nhiệt độ “Tiny Talk” cùng với phần mềm, thu thập số liệu khí tượng để xác định đơn vị lạnh (CU) chính xác cho từng tiểu vùng khí hậu, thậm chí ngay trong cùng một thung lũng nhỏ, để từ đó có thể xác định được những giống thích hợp với từng điều kiện nhiệt độ cụ thể (Campbell *et al.*, 1998).

Dựa vào các cách tính độ lạnh của Udal hoặc Dynamic và đặc biệt là công thức được đơn giản hóa của George-Nissen về sau xây dựng thành phần mềm chuyên biệt, chúng ta có thể tính toán được số đơn vị lạnh (CU) của một vùng, giúp cho việc sử dụng giống bản địa hoặc nhập nội chủ động và có hiệu quả. Đây cũng chính là lý do chúng tôi tiến hành nghiên cứu sự biến động của giá trị độ lạnh trong hai thập kỷ gần đây trong mối tương quan đến sự phân bố và tiềm năng phát triển cây ăn quả ôn đới ở vùng miền núi phía Bắc Việt Nam.

¹ Viện Khoa học Nông nghiệp Việt Nam; ² Trung tâm Khuyến nông Quốc gia

³ Trung tâm Chuyển giao Công nghệ và Khuyến nông; ⁴ Viện Nghiên cứu Rau quả

⁵ Viện KHKT Nông lâm nghiệp miền núi phía Bắc; ⁶ Trung tâm Tài nguyên Thực vật

⁷ Viện Di truyền Nông nghiệp