NGHIÊN CỨU NHÂN NHANH *IN - VITRO* CÂY CÓI BÔNG NÂU (*CYPERUS CORYMBOSUS* LAM.)

Study on Micropropagation of *Cyperus corymbosus* Lam.

Nguyễn Thị Phương Thảo[1], Nguyễn Thị Thủy[1], Nông Thị Huệ[1], Vũ Thị Uyên[1], Nguyễn Tất Cảnh[2]

[1]Khoa Công nghệ sinh học, Trường Đại học Nông nghiệp Hà Nội
[2]Khoa Nông học, Trường Đại học Nông nghiệp Hà Nội
Địa chỉ email tác giả liên lạc*: thaohau@yahoo.com*
Ngày gửi đăng: 23.12.2010; Ngày chấp nhận: 12.04.2011

TÓM TẮT

Nghiên cứu này được tiến hành nhằm xây dựng một quy trình nhân nhanh *in vitro* từ đoạn thân ngầm mang mắt ngủ giống cói bông nâu (*Cyperus corymbosus* Lam.). Kết quả đã xác định được chế độ khử trùng của giống cói bông nâu là $HgCl_2$ 0,1% trong thời gian 13 phút, cho 42,33% mẫu sống và tái sinh. Môi trường tối ưu để khởi động mẫu là MS có bổ sung 1,5 ppm BA cho trung bình 1,86 chồi/mẫu sau 4 tuần nuôi cấy, chiều cao trung bình của chồi là 3,67cm. Hệ số nhân chồi đạt cao nhất (2,24 lần sau 4 tuần), chiều cao trung bình chồi 2,86 cm trên môi trường MS chứa 1,5 ppm BA và 0,25 ppm IBA. Than hoạt tính có tác dụng tốt trong việc tạo rễ cho chồi *in vitro* ở nồng độ 1g/l, tỷ lệ ra rễ đạt 100%, số rễ trung bình đạt 5,98 rễ, dài rễ 3,77 cm. Kiểu nuôi cấy lỏng lắc thích hợp cho nhân chồi *in vitro*, hệ số nhân chồi cao nhất so với các kiểu nuôi cấy khác (đặc, lỏng, đặc - lỏng, bán lỏng) đạt 2,81 lần. Các cây *in vitro* hoàn chỉnh được đưa ra thích nghi với điều kiện *in vivo* trên giá thể bùn, tỷ lệ cây sống sót đạt 100% sau 4 tuần, cây sinh trưởng và phát triển khỏe mạnh.

Từ khoá: Benzyl adenine (BA), cói, *Cyperus*, kinetin; nhân giống vô tính *in-vitro*, than hoạt tính, α - NAA.

SUMMARY

This study was conducted in order to establish a protocol for rapid propagation of *Cyperus corymbosus* Lam. from dormant-bud stem. The results indicated that suitable sterilization time of *Cyperus corymbosus* Lam. with $HgCl_2$ 0.1% was 13 minutes. MS medium containing 1.5 ppm BA and 30 g/l sucrose was found to be the most suitable for in vitro shoot regeneration, the rate of regenerated shoots was 1,86 shoots/explant after 4 weeks. The highest rate of shoot propagation was 2.24 times/4 weeks, the average height of shoot was 2,86 cm on MS medium adding 1.5 ppm BA and 0,25 ppm IBA. Addition of 1g/l activated charcoal was positive for root formation with 5,98 roots/shoot and the average height of root was 3.77 cm. Liquid shaking culture was proved to be most suitable for shoot multiplication and the rate of shoot propagation was the highest among all other culture methods including agar medium, agar – liquid medium, semiagar medium, liquid medium with 2.81 times after 4 weeks. Well – rooted plantlets were successfully transplanted to mud-based substrate, the rate of plant survival was 100% and the plantlets developed well.

Key words: Benzyl adenine (BA); charcoal, *Cyperus*, kinetin; micropropagation, α – NAA.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Giống cói cổ khoang bông nâu (*Cyperus corymbosus* Lam.) cùng với cói cổ khoang bông trắng (*Cyperus tagetiformis* Lam.) là hai giống cói trồng phổ biến ở các tỉnh phía Bắc từ Quảng Ninh đến Thanh Hoá và dọc

ven biển các tỉnh Nam Trung Bộ. Giống cói cổ khoang bông nâu có thân to, hơi vàng, hoa nâu, dáng mọc đứng, cứng cây, đẻ yếu, sợi chắc song không trắng, chiều cao khoảng 1,4 - 1,8 m. Do được trồng bằng cách nhân vô tính nhiều năm, cói cổ khoang bông nâu có nhiều hạn chế về năng suất và phẩm chất. Trong các phương pháp nhân giống vô tính, nhân giống qua nuôi cấy mô đã chứng tỏ có nhiều ưu điểm so với các phương pháp truyền thống như tạo được cây giống đồng đều, sạch bệnh, đặc biệt trạng thái sinh lý liên quan đến sinh trưởng của cây *in vitro* có thể được cải thiện đáng kể do hiện tượng 'trẻ hóa' được cảm ứng trong quá trình nuôi cấy. Các nghiên cứu nhân giống các loài cói thuộc họ *Cyperaceae* thông qua nuôi cấy *in vitro* đã được tiến hành bởi một số tác giả trên thế giới như : *Cyperus rotundus* L. (Smith, 1968; Fisher, 1977); *Caustis dioica* (Rossetto và cs., 1992), *Juncus effusus* L. (Rogers và cs., 2000), Wang và cs. (2004); Wang và cs. (2005); Bennazir và cs. (2009). Việc nghiên cứu về nhân *in vitro* trên loài *Cyperus corymbosus* Lam. còn chưa được tiến hành trên thế giới cũng như ở Việt Nam. Nghiên cứu này được thực hiện nhằm góp phần xây dựng qui trình nhân giống cói cổ khoang bông nâu có hệ số nhân giống cao, chất lượng cây giống được cải thiện đồng thời làm cơ sở bước đầu cho việc cho công tác bảo tồn nguồn gen và chọn tạo giống.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

Cây cói cổ khoang bông nâu (*Cyperus corymbosus* Lam.) được cung cấp từ Nông trường Bình Minh, Kim Sơn, Ninh Bình.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Phương pháp khử trùng mẫu: Đoạn thân ngầm mang mầm ngủ khỏe lấy từ những cụm cói sinh trưởng phát triển tốt được làm sạch bùn đất dưới vòi nước, bóc tách phần bẹ lá bao quanh mắt ngủ, cắt bớt phần thân để lại đoạn chứa mắt ngủ dài khoảng 3 - 5 cm, ngâm trong xà phòng 30 phút sau đó rửa sạch dưới vòi nước và đưa vào buồng cấy vô trùng. Mẫu cấy sau xử lý ở trên tiếp tục được ngâm trong cồn 70^0 trong vòng 30 giây, rửa bằng nước cất vô trùng 1 lần sau đó tiến hành khử trùng với $HgCl_2$ 0,1% trong 13 phút, rửa mẫu bằng nước cất vô trùng 4 lần.

Môi trường nuôi cấy: Tất cả các thí nghiệm sử dụng môi trường MS cơ bản có bổ sung sucrose, các chất điều tiết sinh trưởng ở các nồng độ khác nhau tuỳ từng thí nghiệm, pH điều chỉnh ở 5,7.

- Các loại môi trường sử dụng trong thí nghiệm ảnh hưởng của kiểu nuôi cấy:

Môi trường đặc: có bổ sung 7 g/l agar.

Môi trường bán lỏng: có bổ sung 1/2 lượng agar so với môi trường đặc.

Môi trường lỏng: không bổ sung agar.

Môi trường đặc lỏng: 7 g/l agar tạo môi trường ở lớp dưới bình nuôi cấy, môi trường lỏng ở lớp trên.

Môi trường lỏng lắc: không bổ sung agar, được đặt trên máy lắc với tốc độ 100 vòng/phút.

- Điều kiện nuôi cấy: Nhiệt độ 22 – 27^0C; cường độ ánh sáng 2000 lux; thời gian chiếu sáng 16 giờ sáng/ 8 giờ tối.

- Bố trí thí nghiệm: Thí nghiệm được nhắc lại 3 lần, mỗi lần 10 bình, mỗi bình 3 mẫu. Số liệu thí nghiệm được xử lý trên phần mềm IRRISTAT 4.0 và Excel.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Nghiên cứu tạo vật liệu khởi đầu *in vitro*

3.1.1. Nghiên cứu chế độ khử trùng mẫu cấy

Đoạn thân ngầm mang mầm ngủ được sử dụng làm nguồn mẫu cho thí nghiệm khử trùng. Kết quả khử trùng với dung dịch thủy ngân clorua ($HgCl_2$) 0,1% với thời gian khử trùng là 5 phút, 7 phút, 10 phút, 13 phút, 16 phút cho thấy tỷ lệ mẫu nhiễm tỷ lệ thuận với thời gian khử trùng (Bảng 1).

Bảng 1. Kết quả khử trùng đoạn thân ngầm mang mầm ngủ bằng dung dịch $HgCl_2$ 0,1% (sau 4 tuần nuôi cấy)

Chỉ tiêu / Công thức	Thời gian khử trùng (phút)	Tỷ lệ sống, sạch (%)	Tỷ lệ mẫu nhiễm (%)	Tỷ lệ mẫu chết (%)
Đối chứng	0	0,00	100,00	0,00
1	5	14,29	85,71	0,00
2	7	23,80	76,19	0,00
3	10	33,33	66,67	0,00
4	13	42,86	52,38	4,76
5	16	38,10	38,10	23,81

Ghi chú : Nền môi trường : MS + 30g/l đường + 7g/l agar, pH : 5,7, CT : Công thức

Khi kéo dài thời gian khử trùng thì tỷ lệ chết tăng lên. Khi tăng thời gian khử trùng lên 16 phút, tỷ lệ nhiễm giảm (38,10%), nhưng tỷ lệ chết lên 23,81%, kết quả tỷ lệ mẫu sống, sạch chỉ đạt 38,09%. Với thời gian khử trùng 13 phút thì tỷ lệ nhiễm là 52,38% và tỷ lệ mẫu chết nhỏ (4,76%) nên tỷ lệ mẫu sống, sạch cao 42,86%. Như vậy, việc khử trùng nguồn mẫu là đoạn thân ngâm mang mầm ngủ cói rất khó khăn, các công thức khử trùng cho tỷ lệ mẫu nhiễm cao, do đó tìm ra một phương pháp khử trùng hiệu quả hơn là công việc vô cùng cần thiết. Trong các công thức khử trùng trên, công thức khử trùng bằng $HgCl_2$ 0,1% trong 13 phút được sử dụng, cho tỷ lệ mẫu sạch và tái sinh cao nhất đạt 42,86%.

3.1.2. Nghiên cứu ảnh hưởng của BA, KI đến sự tái sinh chồi từ đoạn thân ngầm mang mầm ngủ của Cói Nhật

Trong nghiên cứu tái sinh chồi, cytokinin có vai trò quan trọng trong phân chia tế bào và kích thích sự hình thành chồii. Vì thế các đoạn thân ngầm mang mầm ngủ của cói bông nâu sau khi được khử trùng theo công thức tối ưu ở thí nghiệm 1 (13 phút) sẽ được khảo sát sự tái sinh chồi trên các môi trường có bổ sung BA, KI với nồng độ thay đổi từ 0,5 – 2 ppm nhằm tạo vật liệu khởi đầu cho giai đoạn nhân nhanh chồi. (Bảng 2a và Bảng 2b). Kết quả chỉ ra trong môi trường có bổ sung BA, KI, số chồi tái sinh trên mẫu cấy tăng cùng với sự tăng nồng độ của các chất điều tiết sinh trưởng và luôn cao hơn so với đối chứng tương ứng 0,67 và 0,59 chồi/mẫu sau 4 tuần. Ở nồng độ 1,5 ppm BA và 1,5 ppm KI cho số chồi tái sinh cao nhất 1,86 và 1,14 chồi/mẫu cấy/4 tuần. Tuy nhiên, trên môi trường bổ sung KI các chồi bật chậm, phát triển kém trong khi đó trên môi trường có bổ sung BA các chồi mập, sinh trưởng khỏe, lá xanh hơn. Khi tiếp tục tăng nồng độ BA, KI lên 2 ppm thì hiện tượng số chồi tái sinh giảm, chồi chủ yếu phát triển về chiều cao và số lá. Như vậy nồng độ cao của cytokinin không thích hợp cho sự tái sinh chồi của giống cói bông nâu. Như vậy công thức 1,5 ppm BA được sử dụng để khởi động sự tái sinh chồi ở cói bông nâu.

Kết quả nghiên cứu này thu được hoàn toàn phù hợp với kết quả của các nghiên cứu trước đó (Samar và cs., 2000; Rogers và cs., 2003; Wang và cs., (2004); Bennazir và cs., 2009) cho rằng việc bổ sung BA vào môi trường nuôi cấy sẽ thúc đẩy sự tái sinh chồi cói. Theo Samar và cs. (2000), khi sử dụng BA, kinetin và 2iP để cảm ứng tái sinh chồi trên giống *Juncus effusus* L. thì BA cảm ứng cho tần số tái sinh cao nhất đạt 88%. Bennazir và cs. (2009) tiến hành trên giống cói *Cyperus pangorei* đã báo cáo rằng trên môi trường chứa BA hoặc kinetin hoặc zeatin ở nồng độ 10M thì BA cho số mẫu tái sinh cao nhất 10 chồi/mẫu, trong khi đó kinetin hay zeatin chỉ cho duy nhất một chồi hình thành. Nguyễn Thị Ngọc Huyền (2010) tiến hành thí nghiệm trên giống cói bông trắng (*Cyperus tagetiformis* Lam.) cũng được kết quả tương tự, ở nồng độ 1,5 mg/l BA cho hệ số tái sinh cao nhất, đạt 2,08 chồi/ mẫu sau 4 tuần nuôi cấy.

Bảng 2a. Ảnh hưởng của BA đến khả năng tái sinh chồi cói từ đoạn thân ngầm mang mầm ngủ (sau 4 tuần nuôi cấy)

Công thức	BA (ppm)	Số chồi tái sinh TB/mẫu cấy (chồi)	Chiều cao TB/chồi (cm)	Số lá TB/chồi (lá)
Đối chứng	0	0,67	2,81	2,29
1	0,5	1,10	3,34	2,55
2	1,0	1,27	3,44	2,41
3	1,5	1,86	3,67	2,68
4	2,0	0,98	3,98	2,85
LSD 5%		0,10		
CV%		4,8		

Ghi chú: Nền môi trường: MS + 30 g/l đường + 7 g/l agar, pH 5,7, ppm mg/l, TB: Trung bình

Bảng 2b. Ảnh hưởng của Kinetin đến khả năng tái sinh chồi cói từ đoạn thân ngầm mang mầm ngủ (sau 4 tuần theo dõi)

Công thức	Kinetin (ppm)	Số chồi tái sinh TB/mẫu cấy (chồi)	Chiều cao TB/chồi (cm)	Số lá TB/chồi (lá)
Đối chứng	0,0	0,59	2,86	2,36
1	0,5	0,77	3,07	2,30
2	1,0	0,96	3,14	2,40
3	1,5	1,14	3,97	2,41
4	2,0	0,97	4,37	2,91
LSD 5%		0,06		
CV%		3,8		

Ghi chú : Nền môi trường : MS + 30g/l đường + 7g/l agar, pH : 5,7, ppm :mg/l, TB : Trung bình

3.2. Nghiên cứu nhân nhanh chồi *in vitro*

Trong nuôi cấy mô tế bào thực vật, khi sử dụng phối hợp giữa cytokinin và auxin với nồng độ và tỷ lệ thích hợp thì không những làm tăng hệ số nhân chồi mà còn có ảnh hưởng tích cực đến sinh trưởng của chồi. Trên cơ sở đó, thí nghiệm nhân nhanh chồi *in vitro* của giống cói bông nâu sử dụng nồng độ 1,5 ppm BA tổ hợp với α- NAA và IBA ở các nồng độ từ 0 - 0,5 ppm được tiến hành.

3.2.1. Nghiên cứu ảnh hưởng của tổ hợp BA và α- NAA đến khả năng nhân nhanh chồi cói

Bảng 3 cho thấy, việc bổ sung α- NAA vào môi trường nuôi cấy tỏ ra không có hiệu quả trong quá trình nhân nhanh chồi cói bông nâu. Khi kết hợp giữa BA và α- NAA, ở công thức cho hệ số nhân chồi cao nhất 1,5 ppm BA và 0,25 ppm α-NAA, chỉ đạt 1,35 lần, chiều cao tương ứng 3,34 cm sau 4 tuần nuôi cấy. Kết quả này hoàn toàn khác so với các nghiên cứu trước. Nguyễn Thị Ngọc Huyền (2010) thí nghiệm trên giống cói bông trắng (*Cyperus tagetiformis* Lam.) và cói Nhật (*Juncus effusus* L.) đã chỉ ra sự nhân nhanh chồi cói tốt trên môi trường có tổ hợp giữa cytokinin và α- NAA với hệ số nhân tương ứng là 3,3 lần và 6,31 sau 4 tuần, chiều cao trung bình đạt 4,35 và 5,46 cm, chồi tạo thành mập, sinh trưởng khỏe. Vì vậy với mục đích tăng hệ số nhân chồi cói, một thử nghiệm kết hợp giữa BA và IBA vào môi trường nuôi cấy đã được tiến hành để khảo sát sự nhân chồi của giống cói này.

Bảng 3. Ảnh hưởng của tổ hợp BA và α- NAA đến khả năng nhân nhanh chồi cói (sau 4 tuần nuôi cấy)

Công thức	BA (ppm)	α-NAA (ppm)	Hệ số nhân chồi (lần)	Chiều cao TB chồi (cm)	Số lá TB/chồi (lá)
Đối chứng	0	0	0,62	2,91	2,23
2	1,5	0,1	0,86	3,24	2,33
3	1,5	0,25	1,35	3,34	2,41
4	1,5	0,5	1,10	3,65	2,54
	LSD 5%		0,07		
	CV%		3,70		

Ghi chú: Nền môi trường: MS + 30 g/l đường + 7 g/l agar, pH 5,7, ppm mg/l, TB: Trung bình

Bảng 4. Ảnh hưởng của tổ hợp BA và IBA đến khả năng nhân nhanh chồi cói bông nâu (sau 4 tuần nuôi cấy)

Công thức	BA ()	IBA (ppm)	Hệ số nhân chồi (lần/mẫu cấy)	Chiều cao TB chồi (cm)	Số lá TB/chồi (lá)
Đối chứng	0	0	0,86	3,01	2,34
1	1,5	0,1	1,24	2,94	2,15
2	1,5	0,25	2,24	2,86	1,94
3	1,5	0,5	1,94	2,73	2,29
	LSD 5%		0,14		
	CV%		4,2		

Ghi chú: Nền môi trường: MS + 30 g/l đường + 7 g/l agar, pH 5,7, ppm: mg/l, TB: Trung bình

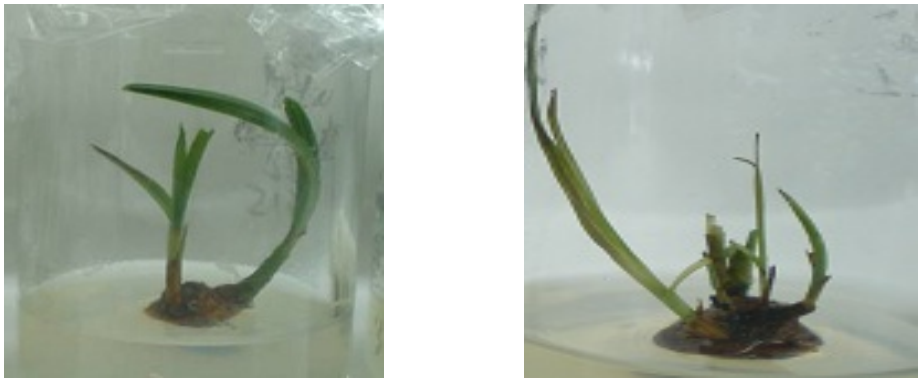
3.2.2. Nghiên cứu ảnh hưởng của tổ hợp BA và IBA đến khả năng nhân nhanh chồi cói

Số liệu bảng 4 cho thấy, việc bổ sung IBA vào môi trường nuôi cấy có tác dụng khá tốt đối với sự nhân nhanh chồi của giống cói bông nâu, hệ số nhân chồi đã tăng đáng kể so với việc bổ sung α-NAA. Hệ số nhân chồi đạt cao nhất 2,24 lần sau 4 tuần trên môi trường có bổ sung 1,5 ppm BA và 0,25 ppm IBA, hệ số này cao gấp 2,6 lần so với đối chứng (0,86 lần). Khi tăng nồng độ IBA lên 0,5 ppm thì hệ số nhân giảm xuống còn 1,94 lần (Bảng 5). Như vậy nồng độ IBA cao không thích hợp cho sự nhân chồi ở cói bông nâu. Kết quả thu được phù hợp với nghiên cứu của Rosetto và cs. (1992) trên *Cautis dioica,* đó là trên môi trường có bổ sung 2 µM BA và 1 µM IBA là tối ưu cho quá trình nhân nhanh từ nguồn vật liệu khởi đầu là đỉnh sinh trưởng.

Như vậy sự phối hợp giữa 1,5 ppm BA và 0,25 ppm mang lại hiệu quả tốt cho sự nhân chồi ở cói bông nâu, các chồi tạo ra đều sinh trưởng khỏe (Hình 1). Tuy nhiên, hệ số nhân chồi của cói bông nâu vẫn còn khá thấp và cần tiếp tục được cải tiến.

3.2.3. Ảnh hưởng của than hoạt tính đến sự sinh trưởng phát triển của chồi cói

Sarma và cs. (2000) cho rằng than hoạt tính bổ sung vào môi trường nuôi cấy làm tăng tỷ lệ ra rễ, sự sinh trưởng của chồi đồng thời khử được sự hoá nâu của mẫu. Trong quá trình nuôi cấy cói bông nâu đã quan sát được hiện tượng môi trường bị hóa nâu và sự sinh trưởng phát triển chồi cói giảm do các sản phẩm trao đổi chất ở cói được tiết vào môi trường. Để khắc phục hiện tượng trên, thí nghiệm nghiên cứu ảnh hưởng của than hoạt tính đến sự sinh trưởng phát triển của chồi cói đã được tiến hành (Bảng 5). Nền môi trường 1,5 ppm BA và 0,25 ppm IBA được sử dụng.



A B

Hình 1. Chồi cói bông nâu trên các môi trường khác nhau

(A) Môi trường khởi động chồi MS +1,5 mg/l BA

(B) Môi trường nhân nhanh chồi MS + 1,5 mg/l BA

Bảng 5. Ảnh hưởng của than hoạt tính đến sự sinh trưởng phát triển của chồi cói (sau 6 tuần nuôi cấy)

Công thức	BA (ppm)	IBA (ppm)	Than hoạt tính (g/l)	Hệ số nhân chồi (lần)	Chiều cao TB/chồi (cm)	Số lá TB/chồi (lá)
Đối chứng	1,5	0,25	0	2,19	2,98	2,15
1	1,5	0,25	1	2,34	3,15	2,3
2	1,5	0,25	2	2,48	3,07	2,47
LSD 5%				0,17		
CV%				3,50		

Ghi chú : Nền môi trường : MS + 30 g/l đường + 7 g/l agar, pH 5,7, ppm: mg/l, TB: Trung bình

Than hoạt tính tỏ ra có tác dụng tốt đối với sự nhân chồi của cói bông nâu, các chồi phát triển mập hơn với lá có mầu xanh đậm. Khi bổ sung than hoạt tính vào môi trường nuôi cấy hệ số nhân chồi đều cao hơn so với đối chứng (không bổ sung than hoạt tính). Kết quả chỉ ra khi bổ sung 1g/l than hoạt tính hệ số nhân đạt 2,34 lần, khi tăng nồng độ than hoạt tính lên 2 g/l hệ số nhân đạt cao nhất 2,48 lần, trong khi môi trường không bổ sung than hoạt tính hệ số nhân chỉ đạt 2,19 lần. Như vậy than hoạt tính không những kích thích sự nhân chồi mà còn có tác dụng tốt đối với sự phát triển của chồi.

3.2.4. Nghiên cứu ảnh hưởng của kiểu nuôi cấy đến sinh trưởng phát triển của chồi cói

Trong nuôi cấy mô, sự sinh trưởng phát triển của cây không chỉ chịu ảnh hưởng của dinh dưỡng, ánh sáng, nhiệt độ mà còn chịu ảnh hưởng bởi nhiều yếu tố khác trong đó kiểu nuôi cấy là một nhân tố có ảnh hưởng lớn đến sự sinh trưởng, phát triển của cây *in vitro* đặc biệt là hệ số nhân chồi (Bảng 6). Nhằm tìm hiểu ảnh hưởng của các kiểu nuôi cấy khác nhau đến sinh trưởng phát triển của chồi cói, các chồi cói đơn được tách ra và nuôi cấy trên môi trường nhân nhanh cho hệ số nhân cao nhất là MS bổ sung 1,5 ppm BA, 0,25 ppm IBA, 2 g/l THT và bổ sung agar với nồng độ khác nhau để tạo các dạng môi trường đặc (bổ sung 7g/l agar), lỏng (không bổ sung agar), đặc lỏng (7 g/l agar tạo môi trường đặc phía dưới bình nuôi cấy, môi trường lỏng ở phía trên); bán lỏng (3,5 g/l agar) và lỏng lắc (không bổ sung agar và sử dụng máy lắc 100 vòng/phút).

Bảng 6. Ảnh hưởng của điều kiện nuôi cấy sự sinh trưởng, phát triển và hệ số nhân chồi (sau 4 tuần nuôi cấy)

Công thức	Kiểu môi trường	Hệ số nhân chồi (lần)	Chiều cao TB/chồi (cm)	Số lá TB/chồi (lá)
1	Đặc	2,32	2,82	1,91
2	Đặc- lỏng	2,35	2,81	2,05
3	Lỏng	2,48	2,91	2,12
4	Bán lỏng	2,60	2,89	2,1
5	Lỏng lắc	2,81	2,95	2,17
LCD 5%		0,20		
CV%		4,30		

Ghi chú : Nền môi trường : MS + 30 g/l đường, pH 5,7, CT: Công thức, TB: Trung bình

Bảng 7a. Ảnh hưởng của than hoạt tính đến khả năng ra rễ của giống cói bông nâu (sau 4 tuần cấy)

Than hoạt tính (g/l)	Số rễ TB/mẫu (cái)	Chiều dài TB (cm)	Mầu sắc
0	5,41	3,46	Nâu nhạt
1	5,98	3,77	Nâu nhạt+ lông hút
2	5,35	2,69	Nâu nhạt+ lông hút
3	5,26	2,63	Nâu
4	5,22	2,57	Nâu
LSD5%	0,17		
CV%	1,70		

Ghi chú : Nền môi trường : MS + 30g/l đường, pH : 5,7, TB : Trung bình, 7 g/l, THT : than hoạt tính

Bảng 7b. Ảnh hưởng của α-NAA đến khả năng ra rễ của giống cói bông nâu (sau 4 tuần cấy)

Nồng độ α-NAA (ppm)	Số rễ TB/mẫu (cái)	Chiều dài TB (cm)	Mầu sắc
0	6,31	3,46	Nâu nhạt
0,1	5,57	1,67	Nâu nhạt
0,25	5,37	1,56	Nâu đen
0,5	4,37	1,30	Nâu đen
1	3,42	0,97	Nâu đen
LSD 5%	0,18		
CV%	2,00		

Ghi chú : Nền môi trường : MS + 30 g/l đường, pH 5,7, TB: Trung bình, 7 g/l, THT: than hoạt tính

Kết quả ở bảng 6 cho thấy các kiểu nuôi cấy khác nhau có ảnh hưởng khác nhau đến sự sinh trưởng và phát triển của chồi cói đặc biệt là hệ số nhân chồi. Trên môi trường đặc, sự hình thành chồi diễn ra chậm hơn so với nuôi cấy trên các kiểu môi trường khác (2,32 lần sau 4 tuần nuôi cấy), trên các môi trường đặc lỏng, lỏng, bán lỏng, lỏng lắc, hệ số nhân chồi tăng dần, trong đó chồi đơn được nuôi cấy trên môi trường lỏng lắc cho hệ số nhân cao nhất đạt 2,81 lần sau 4 tuần nuôi cấy, các chồi phát triển mạnh, chất lượng chồi tốt, chồi xanh, mập mạp. So sánh hệ số nhân *in vitro* của cây cói bông nâu với các đối tượng khác thì hệ số nhân của cây cói còn thấp, tuy nhiên đây là một đối tượng mới vì vậy cần phải tiếp tục nghiên cứu nhằm mục đích tăng hệ số nhân.

3.3. Nghiên cứu tạo rễ cho chồi *in vitro*

Ra rễ là khâu cuối cùng trong quá trình nhân giống *in vitro* nhằm giúp cây *in vitro* thích nghi tốt hơn ngoài vườn ươm và trong điều kiện sản xuất. Để tạo rễ cho các chồi *in vitro*, 2 chất kích thích ra rễ là NAA và than hoạt tính (THT) được bổ sung vào môi trường cơ bản là MS+ 30 g/l đường+ 7 g/l agar (Bảng 7a và 7b).

Số liệu bảng 7a và 7b cho thấy, than hoạt tính tỏ ra có hiệu quả hơn đối với sự ra rễ của cói bông nâu cả về số lượng rễ trung bình trên mẫu, về chiều dài và chất lượng của rễ (Hình 2). Khi bổ sung 1 g/l THT vào môi trường nuôi cấy chồi có khả năng hình thành rễ tốt nhất với số rễ trung bình trên mẫu đạt 5,98 rễ, chiều dài trung bình rễ là 3,77 đồng thời rễ hình thành có màu nâu nhạt và có nhiều lông hút. Theo đánh giá cảm quan thì những rễ này sẽ giúp cây thích nghi nhanh ngoài điều kiện tự nhiên. Trong khi đó khi tăng hàm lượng THT lên 2, 3, 4 g/l đều làm cho số rễ trung bình hình thành trên mẫu giảm, chiều dài trung bình trên rễ giảm và rễ hình thành có màu nâu ít hoặc không hình thành lông hút.

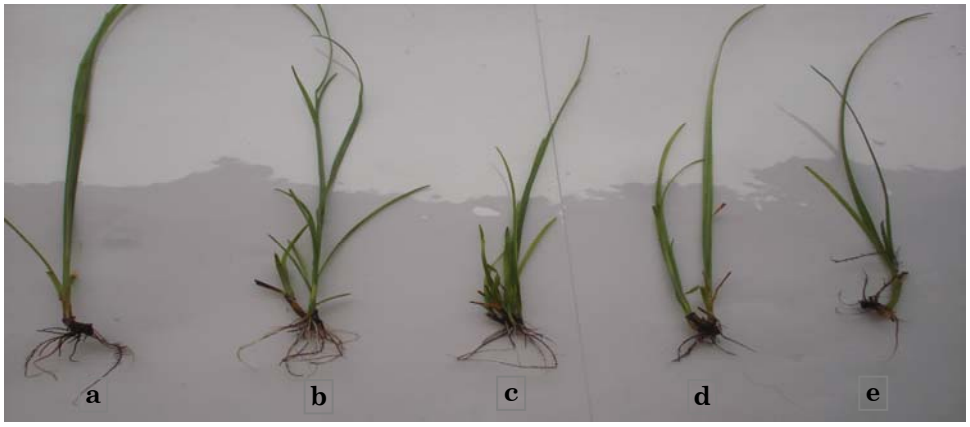
Trái với than hoạt tính, việc bổ sung α-NAA vào môi trường nuôi cấy làm giảm khả năng hình thành rễ. Công thức đối chứng không bổ sung α-NAA cho khả năng hình thành rễ tốt nhất với số rễ trung bình trên mẫu là 6,31 rễ, chiều dài trung bình rễ là 3,46 cm, rễ hình thành có màu nâu nhạt, rễ ngắn, điều này có thể sẽ gây khó khăn khi đưa ra trồng ngoài vườn ươm. Như vậy việc bổ sung α-NAA vào môi trường là không cần thiết cho sự hình thành chồi cói bông nâu. Kết quả này đúng với nhận định của Rosetto và cs. (1992) khi nghiên cứu khả năng ra rễ của chồi *Cautis dioica*, cho rằng khả năng cảm ứng hình thành rễ của α-NAA thấp và cho chất lượng chồi kém.

Môi trường bổ sung 1 g/l than hoạt tính được sử dụng làm công thức tốt nhất đối với sự ra rễ của cói bông nâu, với số rễ trung bình trên mẫu đạt 5,98 rễ, chiều dài trung bình rễ là 3,77 cm rễ tạo ra có nhiều lông hút.

3.4. Thích nghi cây ngoài vườn ươm

Trước khi đưa cây vào điều kiện sản xuất việc thích nghi cây trong vườn ươm để đảm bảo tỷ lệ sống cao, cây sinh trưởng và phát triển tốt là một khâu quan trọng. Cây cói có chiều cao trên 5 cm, rễ được rửa sạch agar, loại bỏ rễ đen; các chồi có chiều cao trên 10 cm được cắt bớt phần lá và trồng trực tiếp trên các giá thể khác nhau, đặt trong nhà lưới che bớt 50% ánh sáng, chế độ tưới 2 lần/ngày.

Ba loại giá thể sử dụng để thử nghiệm việc thích nghi cây cói bông nâu ngoài vườn ươm (Hình 3): (1) Trấu hun, (2) Bùn, (3) Trấu hun: cát: sơ dừa với tỷ lệ 1:1:1. Kết quả sau 4 tuần tỷ lệ cây sống đạt 100% trên tất cả các loại giá thể, tuy nhiên trên giá thể bùn, cây sinh trưởng phát triển mạnh nhất.



Hình 2. Sự ra rễ của cói bông nâu trên các môi trường khác nhau

(a) MS ; (b) MS + 1 g/l THT; (c) MS + 2 g/l THT; (d) MS + 3 g/l THT; (e) MS + 4 g/l THT

A B C

Hình 3. Thích ứng cói bông nâu trên các giá thể khác nhau

(A) Trấu hun ; (B) Trấu hun: cát: sơ dừa (1:1:1); (C) Bùn

4. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

Có thể khử trùng đoạn thân ngầm mang mầm ngủ cói bông nâu bằng dung dịch $HgCl_2$ 0,1% trong thời gian 13 phút, cho tỷ lệ mẫu sống sạch cao nhất đạt 42,33%.

Môi trường nuôi cấy khởi động tốt nhất đoạn thân ngầm mang mầm ngủ cói bông là: MS + 1,5 ppm BA + 30 g/l đường + 6,5 g/l agar, số chồi tái sinh đạt cao nhất 1,86 chồi/mẫu sau 4 tuần nuôi cấy, chiều cao trung bình của chồi là 8,86 cm.

Môi trường thích hợp cho nhân nhanh chồi là MS + 1,5 ppm BA + 0,25 ppm IBA + 30 g/l đường + 7 g/l agar, cho hệ số nhân chồi là 2,24 lần/mẫu cấy/4 tuần và chiều cao trung bình chồi đạt 2,86 cm. Kiểu nuôi cấy tốt nhất cho sự sinh trưởng, phát triển của chồi cói và cho hệ số nhân chồi cao nhất là nuôi cấy lỏng lắc cho hệ số nhân chồi là 2,76 lần/mẫu cấy/4 tuần, chiều cao chồi đạt 2,96 cm. Trong quá trình nhân nhanh khi bổ sung than hoạt tính có tác dụng tăng hệ số nhân hạn chế hiện tượng mẫu bị còi cọc do độc tố trong mẫu tiết ra.

Than hoạt tính có tác dụng tốt trong việc tạo rễ cho chồi *in vitro* ở nồng độ 1g/l. Tỷ lệ ra rễ đạt 100%, số rễ trung bình đạt 5,98 rễ/chồi, dài rễ 3,77 cm.

Giá thể thích hợp nhất để thích nghi cây trong vườn ươm là giá thể bùn, cho 100% cây sống sót sau 4 tuần.

Lời cảm ơn

Nghiên cứu này được thực hiện với sự hỗ trợ kinh phí từ đề tài độc lập cấp nhà nước, mã số ĐTĐL.2008/32 (giai đoạn 2008-2010).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Benazir J. F., Mathithumilan B., Ravichandran P., Jochebed Vinodhini, Suganthi R., Manimekalai V (2009). *In Vitro* Regeneration of Mat Sedge (*Cyperus pangorei* Rottb). *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, 2009, Volume : 18 (2), p 209 – 215.

Fisher J.B. (1977). Callus, cell suspensions and organogenesis in tissue cultures of purple nutsedge (*Cyperus rotundus*). *Bot Gaz* 138:291–297.

Nguyễn Thị Ngọc Huyền (2010). Nghiên cứu nhân giống và xây dựng hệ thống tái sinh ở cây cói. Luận văn thạc sỹ, Trường Đại học Nông nghiệp Hà Nội.

Rosetto M, Dixon KW, Meney KA, Bunn E (1992). *In vitro* propagation of Chinese puzzle (Caustis dioica Cyperaceae) – a commercial sedge species from Western Australia. *Plant Cell Tissue organ Cult* 30:65–67.

Smith DL (1968). The growth of shoot apices and inflorescences of Carex flacca

Schreb. in an aseptic culture. Ann Bot 32:361–370.

Suzanne M. D. Rogers (2003). Tissue Culture and Wetland Rstablishment of the Freshwater Monocots Carex, Juncus, Scirpus, and Typha. *In vitro* Cellular & Developmental Biology. *Plant*, Vol. 39, No. 1, pp. 1-5.

Wang J., M. Seliskar Denise and L. Gallagher John (2005). Tissue Culture and Plant Regeneration of the Salt Marsh Monocots Juncus roemerianus and Juncus gerardi. *In vitro* Cellular & Developmental Biology. *Plant*, Vol. 41, No. 3, pp. 274 -280.

Wang J., D.M. Seliskar, J.L. Gallagher (2004). Plant regeneration via somatic embryogenesis in the brackish wetland monocot Scirpus robustus. Aquatic Botany 79: 163–174.