

TÁI SINH CHỒI CÂY KHỔ QUUA (*Momordica charantia* L.) *In vitro* TỪ TỬ DIỆP

Lê Minh Lý¹, Triệu Phương Thảo¹ và Huỳnh Lê Anh Nhi¹

¹ Khoa Nông nghiệp & Sinh học Ứng dụng, Trường Đại học Cần Thơ

Thông tin chung:

Ngày nhận: 28/07/2014

Ngày chấp nhận: 27/04/2015

Title:

Shoot regeneration from cotyledonary sections of *Momordica charantia* L. *in vitro*

Từ khóa:

Cây khổ qua, *Momordica charantia* L., BA, kinetin, IBA, nhân chồi, tạo rễ, tái sinh chồi, tử diệp

Keywords:

Cotyledon, *Momordica charantia* L., BA, kinetin, IBA, shoot regeneration, shoot proliferation and rooting

ABSTRACT

The study was carried out to determine the effect of day-old seedlings on adventitious shoot regeneration from cotyledonary node explants and the optimum concentrations of plant growth regulators (BA, Kinetin and IBA) for shoot establishment, multiplication and rooting of *Momordica charantia* L. *in vitro*. Experiments were conducted in Laboratory of Plant Tissue Culture, Department of Plant Physiology and Biochemistry, College of Agriculture and Applied Biology, Can Tho University, from April 2013 to March 2014. The results showed that: (1) the cotyledonary sections of the seedlings at 12 days after germination (in the dark) showed a high rate of shoot regeneration (about 93.8%) after three weeks cultured on MS medium supplemented with BA 2.5 mg/L and these shoots grew very well; (2) MS medium supplemented with BA 1 mg/L + kinetin 0.2 mg/L was effective for the rapid proliferation of shoots *in vitro*; and (3) the root induction was observed on MS medium with 2 g/L activated charcoal and IBA (0-1 mg/L). The average rooting frequency was 85.4-96.9% after three weeks cultured.

TÓM TẮT

Đề tài “Tái sinh chồi cây khổ qua (*Momordica charantia* L.) *in vitro* từ tử diệp” được thực hiện nhằm tìm ra tuổi của tử diệp, nồng độ các chất điều hòa sinh trưởng (BA, kinetin và IBA) thích hợp cho sự tái sinh chồi, nhân chồi và tạo rễ cây khổ qua tái sinh từ tử diệp *in vitro*. Thí nghiệm được tiến hành tại Phòng nuôi cấy mô của Bộ môn Sinh lý - Sinh hoá, Khoa Nông nghiệp và Sinh học Ứng dụng, Trường Đại học Cần Thơ từ tháng 4/2013 đến tháng 3/2014. Kết quả thí nghiệm cho thấy: i) tử diệp từ hạt 12 ngày sau khi nảy mầm trong điều kiện tối cho tỉ lệ tái sinh chồi 93,8% sau 3 tuần nuôi cấy trên môi trường MS+BA 2,5 mg/L; ii) Môi trường MS có bổ sung BA 1 mg/L + kinetin 0,2 mg/L cho hiệu quả nhân chồi từ cây khổ qua tái sinh tốt nhất; iii) Tỉ lệ chồi tạo rễ cao (85,4-96,9%) trên môi trường MS + than hoạt tính 2 g/L +IBA 0-1 mg/L sau 3 tuần nuôi cấy.

1 GIỚI THIỆU

Cây khổ qua (*Momordica charantia* L.) là loại cây có giá trị dược liệu vô cùng quý giá, năm 1990 Liên hiệp quốc đã chọn khổ qua là một trong 6 cây thuốc trị bệnh tiêu biểu trên thế giới (Lê Thị Thanh Xuân, 2010). Khổ qua còn là một trong những loại

rau màu có giá trị kinh tế cao được trồng phổ biến ở các nước nhiệt đới và cận nhiệt đới, là một loại thực phẩm gần như không thể thiếu trong đời sống mỗi gia đình. Tuy nhiên, hầu hết các giống khổ qua đều là giống F1, thường có thời gian sinh trưởng ngắn và được trồng quanh năm nhưng nếu chỉ trồng bằng hạt thì hệ số nhân giống không cao.

Hiện nay, nhân giống vô tính bằng phương pháp *in vitro* đã và đang chứng tỏ là phương pháp có ý nghĩa cho công tác chọn tạo giống cây trồng, mang lại hiệu quả kinh tế cao. Tái sinh cây *in vitro* là bước rất quan trọng để thực hiện thành công các kỹ thuật của công nghệ sinh học trong chương trình cải thiện giống. Trong đó, tái sinh chồi từ tử diệp là một trong những phương pháp cho được hiệu quả tạo chồi cao trong nuôi cấy *in vitro*, nó không chỉ đơn thuần là chọn tạo giống thông thường mà ngay cả trong chọn tạo giống công nghệ sinh học và tạo cây chuyển gen (Yan *et al.*, 2000). Do đó, đề tài: “Tái sinh chồi cây khổ qua (*Momordica charantia* L.) *in vitro* từ tử diệp” được thực hiện nhằm tìm ra môi trường thích hợp để nhân giống cây khổ qua từ tử diệp nhằm để phục vụ cho nhu cầu sản xuất và là cơ sở cho các nghiên cứu sâu hơn.

2 PHƯƠNG TIỆN VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1 Phương tiện

Thí nghiệm được tiến hành tại phòng cây mô của Bộ môn Sinh lý-Sinh hóa, Khoa Nông nghiệp và Sinh học Ứng dụng, Trường Đại học Cần Thơ. Thời gian thực hiện từ tháng 4/2013 đến tháng 02/2014. Thí nghiệm được thực hiện trên giống khổ qua TN 166 của Công ty giống Trang Nông.

Hóa chất: javel, HgCl₂, muối khoáng đa – vi lượng (Trung Quốc), vitamin, kích thích tố BA, IBA, kinetin (MERCK),...

2.2 Phương pháp

Môi trường nền được sử dụng là môi trường MS (Murashige và Skoog, 1962) có bổ sung thêm nước dừa tươi (100 ml/L), đường (30 g/L), agar (6,8 g/L), vitamin (Thiamine, Pyridoxine, Nicotinic acid), kích thích tố (BA, IBA, kinetin),... và được điều chỉnh về pH 5,7 - 5,8 trước khi nấu. Thí

nghiệm 1 môi trường được chuẩn bị trong các bình tam giác 250 ml (khoảng 125 ml/bình) và được rót vào đĩa petri sau khi thanh trùng (20 ml/đĩa). Thí nghiệm 2 và 3 môi trường được rót 50 ml/keo đầy nắp có lỗ được lót giấy bên trong và ngoài nắp. Tất cả được hấp thanh trùng ở nhiệt độ 121⁰C, áp suất 1 atm trong 20 phút.

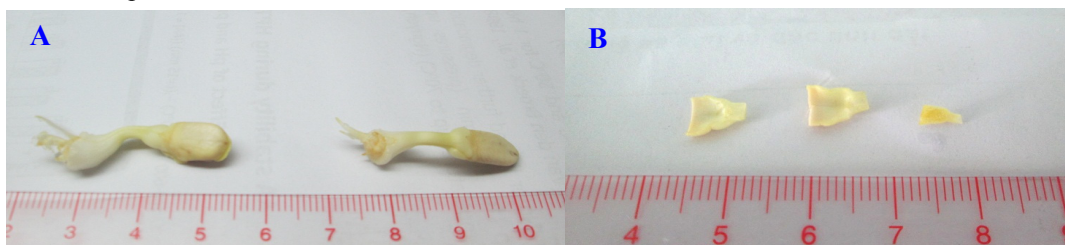
Vô trùng mẫu cây: hạt khổ qua khô ngâm hạt trong nước ấm 10 phút, rửa bằng cồn 70⁰ trong 30 giây, tiếp theo rửa lại bằng nước cất vô trùng 2-3 lần, sau đó rửa với javel nồng độ 10% trong 3 phút và rửa lại với 3-4 lần nước cất. Tiếp theo, tiến hành tách vỏ hạt rồi khử lại bằng dung dịch thủy ngân clorua (HgCl₂) 0,1% trong thời gian 5 phút và rửa lại bằng nước cất vô trùng 3-4 lần. Hạt được cấy vào môi trường MS có bổ sung BA 0,2 mg/L và để trong tối.

* Thí nghiệm 1: Ảnh hưởng của tuổi tử diệp trên sự tái sinh chồi cây khổ qua *in vitro*.

Mục tiêu: xác định tuổi tử diệp thích hợp cho sự tái sinh chồi cây khổ qua.

Vật liệu thí nghiệm: hạt khổ qua nảy mầm 8, 10, 12 và 14 ngày sau khi gieo được cắt ra làm 1/3 theo chiều ngang ứng với hai vị trí vùng gần và vùng xa tử diệp, loại bỏ vùng xa của tử diệp, cắt bỏ trục hạ diệp chỉ chừa lại khoảng 1 mm phía gần phôi. Tách đôi mảnh tử diệp và loại bỏ chồi hữu tính bên trong (Hình 1B) và cấy vào môi trường MS có bổ sung BA 2,5 mg/L.

Bố trí thí nghiệm: thí nghiệm được bố trí theo thể thức hoàn toàn ngẫu nhiên một nhân tố gồm 4 độ tuổi của tử diệp (hạt 8, 10, 12 và 14 ngày sau khi gieo), mỗi nghiệm thức có 4 lần lặp lại, mỗi lần lặp lại là 1 đĩa petri, mỗi đĩa cấy 4 mẫu.



Hình 1: Vật liệu thí nghiệm: (A) Hạt khổ qua giống Trang Nông TN 166 ở độ tuổi 12 ngày sau khi gieo và (B) hạt khổ qua được cắt để thí nghiệm

Thí nghiệm 2: Hiệu quả của BA và kinetin trên sự nhân chồi khổ qua tái sinh từ tử diệp.

Mục tiêu: tìm được nồng độ BA và kinetin thích hợp cho sự nhân chồi cây khổ qua tái sinh từ tử diệp.

Bố trí thí nghiệm: thí nghiệm được bố trí theo thừa số hai nhân tố với 4 lần lặp lại, mỗi lần lặp lại là 2 keo, mỗi keo cấy 4 mẫu.

Vật liệu thí nghiệm: chồi ngọn có chiều cao từ 1,5- 2 cm được tái sinh từ từ diệp và cấy chuyên trên môi trường MS + BA 0,2 mg/L khoảng 2 tuần trước khi bố trí thí nghiệm.

Thí nghiệm 3: Hiệu quả của IBA trên sự tạo rễ khô qua *in vitro*.

Mục tiêu: tìm được nồng độ IBA thích hợp cho sự tạo rễ khô qua *in vitro*.

Bố trí thí nghiệm: thí nghiệm được bố trí theo thể thức hoàn toàn ngẫu nhiên một nhân tố với 3 nồng độ IBA (0, 0,5 và 1 mg/L) + than hoạt tính 2 g/L.

Vật liệu thí nghiệm: chồi ngọn khô qua có chiều cao từ 1,5- 2 cm được cấy trên môi trường MS + BA 0,2 mg/L khoảng 2 tuần trước khi bố trí thí nghiệm.

Các chỉ tiêu theo dõi:

- Tỷ lệ (%) mẫu tạo chồi = số mẫu tạo chồi/ tổng số mẫu cấy, số chồi, chiều cao chồi (cm) (đo từ gốc chồi đến phần chóp ngọn cao nhất), số lá (đếm lá đã mở ra), tỉ lệ mẫu tạo rễ= số mẫu tạo rễ/ tổng số mẫu cấy, số rễ và chiều dài rễ (cm). Các số liệu được ghi nhận sau 7, 14 và 21 ngày sau khi cấy.

Các số liệu được xử lý bằng chương trình EXCEL, phân tích phương sai ANOVA và kiểm định DUNCAN bằng chương trình MSTATC.

3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Ảnh hưởng của tuổi từ diệp trên sự tái sinh chồi cây khô qua *in vitro*

3.1.1 Tỷ lệ (%) mẫu tạo chồi

Bảng 1 cho thấy ở tuần thứ ba sau khi cấy tỉ lệ tạo chồi thấp nhất ở từ diệp 8 ngày SKG (sau khi gieo) chỉ có 25,0% khác biệt thống kê ở mức ý nghĩa 1% so với các nghiệm thức còn lại, giữa ba độ tuổi 10, 12 và 14 ngày SKG khác biệt không có

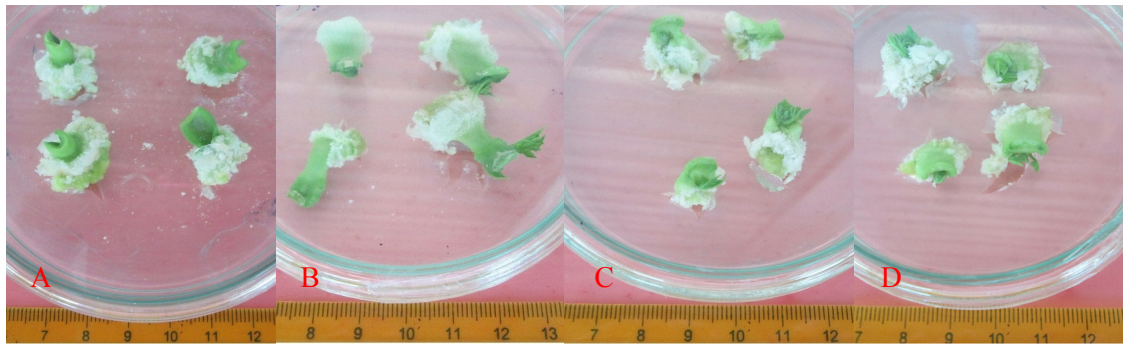
ý nghĩa thống kê, ba độ tuổi này đều cho tỉ lệ tạo chồi cao (từ 75,0% đến 93,8%). Theo Li *et al.*, (2007) trạng thái sinh lý khác nhau của mẫu cấy sẽ ảnh hưởng đến khả năng tái sinh của mẫu, vì thế tuổi của cây con sau khi gieo là chìa khóa dẫn đến thành công trong việc tái sinh *in vitro* cây khô qua từ diệp (Ma *et al.*, 2012). Trên cây khô qua giống Cufei, Li *et al.*, (2007) đã tìm ra độ tuổi thích hợp cho tỉ lệ tái sinh chồi cao là từ diệp từ hạt 9 ngày SKG. Theo Dong và Jia (1991) từ diệp còn non có hoạt tính sinh lý học tích cực và phản ứng một cách có hiệu quả đối với các chất điều hòa sinh trưởng. Tuy nhiên, Compton và Gray (1993) cho rằng từ diệp hạt quá non sẽ cho tỉ lệ sống thấp, ngược lại từ diệp hạt thành thực cho tỉ lệ sống cao nhưng tỉ lệ tái sinh thấp, chỉ có độ tuổi thích hợp mới cho hiệu quả về tỉ lệ sống cao và tái sinh cao. Qua kết quả thí nghiệm cho thấy ở tuần đầu tiên tất cả các nghiệm thức chưa có sự hình thành chồi, từ tuần thứ hai mới có sự xuất hiện chồi, tuy nhiên chồi chỉ thấy rõ và ổn định ở tuần thứ ba (Hình 2).

Bảng 1: Tỷ lệ (%) mẫu từ diệp tạo chồi, chiều cao chồi và số lá tái sinh từ từ diệp ở các độ tuổi khác nhau sau 3 tuần nuôi cấy

Tuổi từ diệp (ngày)	Tỷ lệ tạo chồi (%)	Chiều cao (cm)	Số lá
8	25,0 b	0,23	0,8
10	75,0 ab	0,75	2,1
12	93,8 a	0,63	1,8
14	81,3 a	0,65	1,5
F	**	ns	ns
CV (%)	35,60	12,90	25,02

Trong cùng 1 cột các số có chữ theo sau giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê qua phép thử Duncan; ns: không khác biệt thống kê, **: khác biệt ở mức ý nghĩa 1%. Số liệu chiều cao chồi và số lá được chuyển sang $\log(x+2)$ trước khi phân tích thống kê

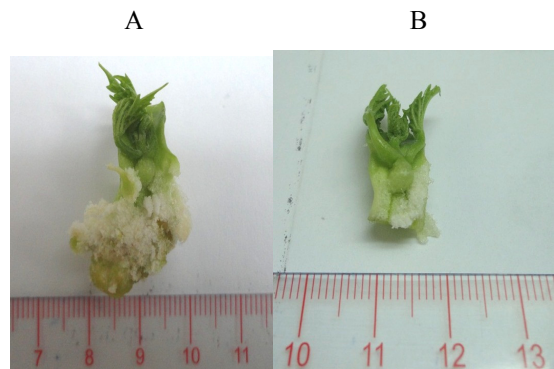
Chiều cao chồi dao động từ 0,23 cm đến 0,75 cm không có sự khác biệt thống kê giữa các độ tuổi của từ diệp (Bảng 1). Kết quả tương tự cũng được ghi nhận trên số lá, số lá biến thiên từ 0,8 đến 2,1 lá nhưng không khác biệt về mặt thống kê giữa các nghiệm thức.



Hình 2: Từ diệp tạo chồi trên môi trường có nồng độ BA 2,5 mg/L ở các độ tuổi từ diệp khác nhau sau 3 tuần nuôi cấy: (A) 8 ngày tuổi, (B) 10 ngày tuổi, (C) 12 ngày tuổi và (D) 14 ngày tuổi

Ở tất cả các nghiệm thức mô sẹo tăng trưởng quá nhiều làm hạn chế việc quan sát sự phát triển của chồi, ngoài ra có thể chính những mô sẹo này đã làm ảnh hưởng một phần đến việc hình thành chồi (Hình 3). Đồng thời qua thí nghiệm ghi nhận được tỉ lệ sống của mẫu cấy trong đĩa là 100%. Mỗi mẫu cấy chỉ hình thành một chồi, các chồi đều xuất phát từ gốc từ diệp (vùng gần phôi) đã loại bỏ phôi hữu tính (Hình 3). Kết quả tương tự với nghiên cứu của Ma *et al.* (2012) trên hệ thống tái sinh cây khố qua thì từ diệp cho kết quả tái sinh chồi tốt, ngoài ra kết quả này cũng tương đồng với kết quả ở các cây thuộc họ bầu bí dựa của nhiều tác giả như Krug *et al.* (2005) và He *et al.* (2012),... Theo Wehner (2007) do từ diệp có chức năng chủ yếu là dự trữ dinh dưỡng để nuôi phần phôi khi hạt nảy mầm nên dinh dưỡng và năng lượng cũng có xu hướng tập trung về vùng gần phôi. Qua quá trình làm thí nghiệm cũng nhận thấy rằng có những chồi tái sinh xuất hiện muộn hơn và có kích thước nhỏ hơn, đối với những chồi này khả năng để có được một cây khố qua hoàn chỉnh là rất thấp, Krug *et al.* (2005) đã khẳng định những chồi tái sinh có kích thước nhỏ và xuất hiện muộn, mặc dù có thể quan sát rõ nhưng rất khó để kéo dài và tạo cây hoàn chỉnh.

Từ kết quả thí nghiệm trên cho thấy, ở nghiệm thức hạt 12 ngày tuổi tuy có chồi cho chiều cao và số lá không bằng nghiệm thức hạt 10 ngày tuổi nhưng giữa chúng lại không khác biệt ý nghĩa thống kê. Ngoài ra, hạt 12 ngày sau khi gieo cho tỉ lệ tạo chồi là 93,8%, đồng thời qua quan sát thấy rằng nghiệm thức này có hình thái chồi sinh trưởng và phát triển tốt. Vì vậy, hạt 12 ngày tuổi có hiệu quả nhất trong sự tái sinh chồi khố qua và được sử dụng làm vật liệu tái sinh chồi cho các thí nghiệm tiếp theo.



Hình 3: Mô sẹo hình thành ở gốc từ diệp (A) và vị trí phát sinh chồi khố qua (B)

3.2 Hiệu quả của BA và kinetin trên sự nhân chồi khố qua tái sinh từ từ diệp

3.2.1 Số chồi gia tăng

Kết quả Bảng 2 cho thấy, sau 3 tuần nuôi cấy số chồi gia tăng giảm khi nồng độ BA tăng, số chồi gia tăng cao nhất ở nồng độ BA 1,0 mg/L là 1,9 chồi khác biệt thống kê ở mức ý nghĩa 1% so với nồng độ BA 2 mg/L BA là 0,84 chồi và 3,0 mg/L là 0,67 chồi. Hiệu quả của kích thích tố cytokinin là rất đa dạng, vừa có khả năng tạo chồi, nhân chồi và kéo dài chồi (Lee *et al.*, 2003) chính vì thế ở các nồng độ BA khác nhau đã kích thích các tế bào phân hóa thành chồi. Trong quá trình nhân chồi cây đậu nành Alam *et al.* (2010) cho rằng nồng độ cao của BA sẽ làm giảm số chồi cũng như chiều cao chồi. Kết quả tương tự cũng được ghi nhận ở hai mức nồng độ kinetin, số chồi gia tăng cao nhất ở nồng độ kinetin 0,2 mg/L là 1,43 chồi khác biệt thống kê ở mức ý nghĩa 1% so với nồng độ kinetin 0,5 mg/L.

Bảng 2: Số chồi khô qua gia tăng trên môi trường có nồng độ BA và kinetin khác nhau sau 3 tuần nuôi cấy

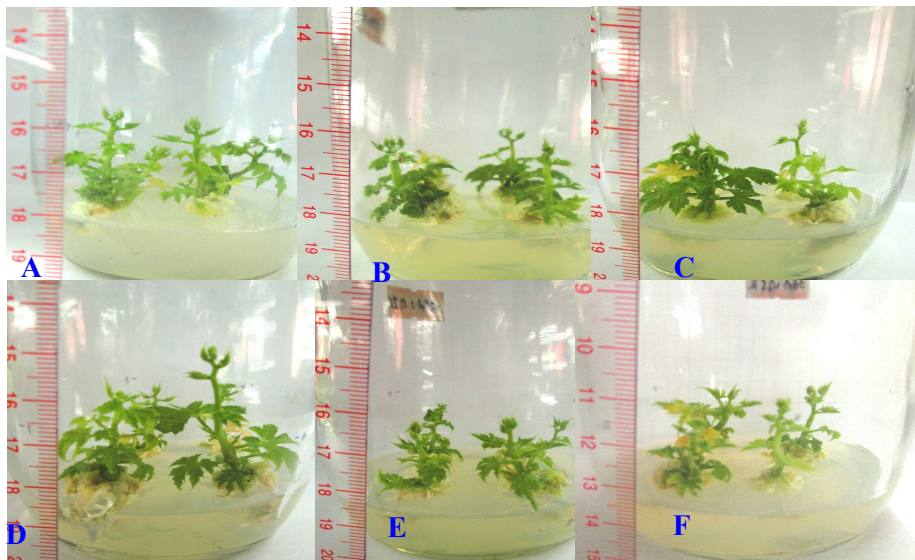
Nồng độ kinetin (mg/L)	Nồng độ BA (mg/L)			Trung bình (kinetin)
	1,0	2,0	3,0	
0,2	2,47 a	0,94 bc	0,88 c	1,43 a
0,5	1,41 b	0,75 c	0,47 c	0,88 b
Trung bình (BA)	1,94 a	0,84 b	0,67 b	
F _{BA}				**
F _{kinetin}				**
F _{BA*kinetin}				**
CV (%)				20,99

Các số có chữ theo sau giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê qua phép thử Duncan; **: khác biệt ở mức ý nghĩa 1%

Số chồi gia tăng chịu sự tương tác giữa các nồng độ BA và Kinetin, số chồi gia tăng cao nhất ở nghiệm thức BA 1,0 mg/L + kinetin 0,2 mg/L (2,47 chồi) khác biệt thống kê ở mức ý nghĩa 1% so với các nghiệm thức còn lại (Hình 4), số chồi gia tăng

thấp ở các nghiệm thức BA 3,0 mg/L + kinetin 0,5 mg/L (0,47 chồi), BA 2,0 mg/L + kinetin 0,5 mg/L (0,75 chồi) và BA 3,0 mg/L + kinetin 0,2 mg/L (0,88 chồi).

Nhìn chung, khi nồng độ cytokinin tăng thì số chồi gia tăng có xu hướng giảm. Hu và Wang (1983) cũng báo cáo rằng nồng độ cao của cytokinin sẽ làm giảm số chồi ở một số mẫu cây, kinetin cho số chồi thấp hơn BA. Kết quả cũng cho thấy số chồi đạt được trong thí nghiệm này còn thấp so với nhiều nghiên cứu nhân chồi các cây thuộc họ bầu bí dựa của nhiều tác giả. Lâm Ngọc Phương và Nguyễn Bảo Vệ (2008) báo cáo rằng nồng độ BA 0,5 mg/L + kinetin 0,5 mg/cho số chồi dưa hấu tam bội gia tăng là 7,1 chồi. Cả hai chất là BA và kinetin đều có ảnh hưởng đến số chồi gia tăng. Điều này có thể giải thích do khả năng tạo chồi còn tùy thuộc vào giống, mẫu cây,... cũng như môi trường, kỹ thuật nuôi cấy khác nhau. Theo Nguyễn Đức Lượng và Lê Thị Thủy Tiên (2002), nhu cầu về loại và nồng độ cytokinin rất khác nhau đối với một số loại cây.



Hình 4: Chồi khô qua trên môi trường có nồng độ BA và kinetin khác nhau ở thời điểm 3 tuần sau khi cấy: (A) BA 1 mg/L + kinetin 0,2 mg/L, (B) BA 2 mg/L + kinetin 0,2 mg/L, (C) BA 3 mg/L + kinetin 0,2 mg/L, (D) BA 1 mg/L + kinetin 0,5 mg/L, (E) BA 2 mg/L + kinetin 0,5 mg/L, (F) BA 3 mg/L + kinetin 0,5 mg/L

3.2.2 Chiều cao và số lá gia tăng

Chiều cao gia tăng

Bảng 3 cho thấy, ở thời điểm 3 TSKC chiều cao chồi gia tăng cao nhất ở nồng độ BA 1 mg/L là 0,86 cm khác biệt thống kê ở mức ý nghĩa 1% so với hai nồng độ còn lại, nồng độ BA 3 mg/L có

chiều cao chồi gia tăng thấp nhất là 0,40 cm. Giữa hai nồng độ kinetin thì kinetin 0,2 mg/L cho chiều cao gia tăng là 0,70 cm cao hơn kinetin 0,5 mg/L chỉ có 0,58 cm, khác biệt thống kê ở mức ý nghĩa 1%.

Bảng 3 cho thấy có sự tương tác giữa hai nồng độ BA và kinetin đến chiều cao chồi gia tăng,

thực nghiệm BA 1 mg/L + kinetin 0,2 mg/L cho chiều cao chồi gia tăng cao nhất là 1,01 cm khác biệt thống kê ở mức ý nghĩa 1% so với các thực nghiệm còn lại. Thực nghiệm BA 3 mg/L + kinetin 0,2 mg/L có chiều cao chồi gia tăng thấp là 0,36 cm. Các thực nghiệm còn lại có chiều cao gia tăng dao động từ 0,44 cm đến 0,75 cm. Điều này có thể giải thích với nồng độ cytokinin cao đã gây ức chế sự phát triển chiều cao của chồi khô qua. Nếu không có cytokinin thì tế bào đỉnh sinh trưởng sẽ phát triển bình thường, nhưng khi có sự hiện diện của cytokinin sẽ ức chế tăng trưởng chồi ngọn làm cây không sinh trưởng về chiều cao, nhưng phát sinh nhiều chồi phụ. Chính vì bị kích thích tạo chồi nên sự phát triển chiều cao chồi bị giới hạn (Nguyễn Đức Lương và Lê Thị Thủy Tiên, 2002).

Kết quả thí nghiệm cho thấy sự dụng kết hợp BA và kinetin cho chiều cao chồi tốt hơn đồng thời giảm sự tạo nhiều mô sẹo ở các mẫu cấy (Hình 4).

Bảng 3: Chiều cao chồi khô qua gia tăng (cm) trên môi trường có nồng độ BA và kinetin khác nhau sau 3 tuần nuôi cấy

Nồng độ kinetin (mg/L)	Nồng độ BA (mg/L)			Trung bình (kinetin)
	1,0	2,0	3,0	
0,2	1,01 a	0,75 b	0,36 d	0,70 a
0,5	0,71 b	0,60 bc	0,44 cd	0,58 b
Trung bình (BA)	0,86 a	0,68 b	0,40 c	
F _{BA}				**
F _{kinetin}				**
F _{BA*kinetin}				**
CV (%)				14,21

Các số có chữ theo sau giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê qua phép thử Duncan; **: khác biệt ở mức ý nghĩa 1%

Số lá

Ở 3 TSKC, Bảng 4 cho thấy số lá gia tăng cao nhất ở nồng độ BA 1 mg/L là 2,1 lá, khác biệt thống kê ở mức ý nghĩa 1% so với 2 nồng độ BA còn lại, thấp nhất vẫn là nồng độ BA 2 mg/L có 1,0 lá và BA 3 mg/L có 1,1 lá. Tuy nhiên không có sự ảnh hưởng của kinetin đến số lá gia tăng. Đồng thời cũng không có sự tương tác giữa hai nồng độ BA và kinetin đến số lá gia tăng (số lá dao động từ 1,0 lá đến 2,1 lá giữa các thực nghiệm). Bên cạnh đó, trong quá trình làm thí nghiệm nhận thấy có những thực nghiệm chồi có lá phát triển xanh, tốt, ngược lại cũng có thực nghiệm chồi xuất hiện hiện tượng lá vàng từ dưới lên.

Bảng 4: Số lá khô qua gia tăng trên môi trường có nồng độ BA và kinetin khác nhau sau 3 tuần nuôi cấy

Nồng độ kinetin (mg/L)	Nồng độ BA (mg/L)			Trung bình (kinetin)
	1,0	2,0	3,0	
0,2	2,1	1,0	1,1	1,4
0,5	2,0	1,0	1,1	1,4
Trung bình (BA)	2,1 a	1,0 b	1,1 b	
F _{BA}				**
F _{kinetin}				ns
F _{BA*kinetin}				ns
CV (%)				12,13

Các số có chữ theo sau giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê qua phép thử LSD; **: khác biệt ở mức ý nghĩa 1%, ns: không khác biệt thống kê

Tóm lại, trong giai đoạn nhân chồi khô qua có thể sử dụng môi trường MS có bổ sung BA 1 mg/L + kinetin 0,2 mg/L, trên môi trường này các chồi sinh trưởng tốt hơn về các chỉ tiêu số chồi gia tăng, số lá và chiều cao chồi so với các môi trường có nồng độ BA và kinetin cao hơn.

3.3 Hiệu quả của IBA trên sự tạo rễ khô qua in vitro

3.3.1 Tỷ lệ (%) mẫu tạo rễ, số rễ và chiều dài rễ

Kết quả Bảng 5 cho thấy, sau 4 tuần nuôi cấy tỉ lệ mẫu tạo rễ, số rễ và chiều dài rễ không có sự khác biệt thống kê giữa các thực nghiệm. Tỷ lệ mẫu tạo rễ dao động từ 85,4% ở thực nghiệm không bổ sung IBA đến 96,9% ở thực nghiệm IBA 0,5 mg/L. Ở các thực nghiệm các cây sinh trưởng tốt (Hình 5). Theo kết quả nghiên cứu của Lâm Ngọc Phương và Nguyễn Bảo Vệ (2008) trên dưa hấu tam bội cho thấy tỉ lệ chồi tạo rễ giữa các nồng độ IBA 0-2 mg/L không khác biệt thống kê, có thể sử dụng môi trường có IBA hay than hoạt tính để tạo rễ dưa hấu in vitro. Bổ sung than hoạt tính vào môi trường nuôi cấy có tác dụng khử độc, hấp thu các chất phenol. Than hoạt tính làm môi trường trở nên sẫm hơn vì vậy có thể kích thích hình thành rễ.

Bảng 5: Tỷ lệ (%) mẫu tạo rễ, số rễ và chiều dài rễ của chồi khô qua trên môi trường có nồng độ IBA khác nhau sau 4 tuần nuôi cấy

Nồng độ IBA (mg/L)	Tỷ lệ tạo rễ (%)	Số rễ	Chiều dài rễ (cm)
0	85,4	5,3	2,5
0,5	96,9	6,4	1,6
1,0	93,8	6,6	1,8
F	ns	ns	ns
CV (%)	10,74	28,18	23,12

ns: không khác biệt thống kê



Hình 5: Chồi khô qua tạo rễ trên môi trường có nồng độ IBA khác nhau ở 4 tuần sau khi cấy: (A) IBA 0 mg/L, (B) IBA 0,5 mg/L, (C) IBA 1 mg/L

Như vậy, có thể sử dụng môi trường MS+ than hoạt tính 2 g/L để tạo rễ khô qua *in vitro*, với tỉ lệ tạo rễ cao, các chồi sinh trưởng tốt.

4 KẾT LUẬN VÀ ĐỀ XUẤT

4.1 Kết luận

Từ diệp 12 ngày tuổi cho khả năng tái sinh chồi cây khô qua hiệu quả hơn từ diệp 8, 10 và 14 ngày tuổi trên môi trường MS+ BA 2,5 mg/L.

Giai đoạn nhân chồi cây khô qua, môi trường MS + BA 1 mg/L + kinetin 0,2 mg/L cho kết quả tốt, các chồi sinh trưởng tốt hơn các nghiệm thức có nồng độ BA và kinetin cao.

Giai đoạn tạo rễ cây khô qua, môi trường MS + than hoạt tính + IBA (0-1 mg/L) cho hiệu quả tạo rễ cao sau 3 tuần nuôi cấy.

4.2 Đề xuất

Thực hiện thí nghiệm nhân chồi để tìm ra môi trường thích hợp cho hệ số nhân tối ưu hơn, tiếp tục nghiên cứu giai đoạn thuần dưỡng cây khô qua để hoàn thiện quy trình nhân giống.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Alam I., S. A. Sharim, S. C. Mondal, Md.J. Alam, M. Khalekuzzaman, M. Anisuzzaman and M. F. Alam, 2010. *In vitro* micropropagation through cotyledonary node culture of castor bean. Australian Journal of Crop Science, 4(2): 81-84.
2. Compton M.E. and D.J. Gray, 1993. Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature cotyledons of watermelon, Plant Cell Report, 12: 61-65.
3. Dong J.Z and S.R. Jia, 1991. High efficiency plant regeneration from cotyledon of watermelon. Plant Cell Report, 9: 559-562.

4. He X.M., X. Peng , J. Zheng, Q. Xia, D. W. M. Leung and E. E. Liu, 2012. Efficient plant regeneration *in vitro* from cotyledon explants of chieh-qua (*Benincasa hispida* Cogn. var. chieh-qua). Science Asia, 39: 134-138.
5. Hu C. Y. and P. J. Wang, 1983. Handbook of plant cell culture, In: Evans DA, Sharp WR, Ammirato PV, Yamada Y (eds.) Meristem shoot tip and bud culture :177-227.
6. Krug M. G. Z., L. C. L. Stipp, A. P. M. Rodriguez and B.M.J. Mendes, 2005. *In vitro* organogenesis in watermelon cotyledons. Pesquisa Agropecuaria Brasileira, 40 (9):861-865.
7. Lee J. M. and M. Oda, 2003. Grafting of herbaceous vegetable and or-namental crops. Horticult Rev. 28: 61-124.
8. Li J., H. X. Li and M. Li, 2007. The System of *In Vitro* Culture and Shoot Regeneration from Cotyledon of Balsam Pear of Cuifei. Northern Hort, 10: 181-183.
9. Lê Thị Thanh Xuân, 2010. Khảo sát thành phần hóa học trong trái khô qua (mướp đắng) thuộc họ bầu bí trên địa bàn thành phố Cao Lãnh, Luận văn thạc sĩ khoa học Nông nghiệp, Đại học Đồng Tháp.
10. Ma C., Y. Tang, X. Li, J. Li, L. Wang and H. Li, 2012. *In vitro* induction of multiple buds from cotyledonary nodes of Balsam pear (*Momordica charantia* L.). African Journal of Biotechnology, 11(13):3106-3155.
11. Murashige, T. and F. Skoog, 1962. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue culture. Physiol. Plant, 15: 473-497.
12. Nguyễn Đức Lượng và Lê Thị Thủy Tiên, 2002. Công nghệ tế bào. Nhà xuất bản Đại học quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh. 376 pp.

13. Lâm Ngọc Phương và Nguyễn Bảo Vệ, 2008. Nhân giống vô tính cây dưa hấu tam bội (*Citrullus vulgaris* Schrad.). Hội nghị khoa học “Cây ăn trái quan trọng ở Đồng bằng sông Cửu Long 11/3/3008. Trường Đại học Cần Thơ. Nhà xuất bản Nông nghiệp: 433-442.
14. Yan B., M. S. Srinivasa Reddy, G. B Collins and R. D. Dinkins, 2000.

- Agrobacterium tumerfaciens*- mediated transformation of soybean [*Glycine max* (L) Merrill.] using immature zygotic cotyledon explants. Plant cell Reports, 19: 1090-1097.
15. Wehner T. C. 2007. Watermelon, Vegetables I Asteraceae, Brassicaceae, Chenopodiaceae, and Cucurbitaceae. SpringerLink-Book, Chapter 1:381-418.