

NHÂN GIỐNG *IN VITRO* CÂY TRE TÀU (*SINOCALAMUS LATIFLORUS*) VÀ TRE MẠNH TÔNG (*DENDROCALAMUS ASPER*)

VŨ NGỌC PHƯỢNG, PHẠM ĐỨC TRÍ,
ĐOÀN THỊ ÁI THUYỀN, TRỊNH VIỆT NGÀ,
TRẦN XUÂN DU, NGUYỄN VĂN UYÊN

Viện Sinh học nhiệt đới

Tre là nguyên liệu, nhiên liệu và thực phẩm quan trọng đối với Việt Nam cũng như nhiều nước nhiệt đới khác. Tre có đặc tính sinh học đặc biệt là sau hàng chục năm sinh trưởng và phát triển, thậm chí cả trăm năm mới ra hoa kết quả một lần nhưng sau đó bị chết hết. Vì vậy việc tái tạo giống hoặc nhân giống bằng hạt rất khó khăn. Phương pháp nhân giống truyền thống không đáp ứng được nhu cầu cây giống cho việc trồng rừng hiện nay. Việc nhân giống tre *in vitro* sẽ góp phần giải quyết tình trạng thiếu tre giống.

I. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Hai loài tre được dùng trong nghiên cứu này là tre tàu (*Sinocalamus latiflorus*) và tre mạnh tông (*Dendrocalamus asper*). Mẫu cây là hạt tre của những cây trưởng thành mọc ở rừng bảo tồn Nam Cát Tiên. Hạt được rửa sạch bằng xà phòng, sau đó khử trùng trong cồn 70⁰ và xử lý lần lượt trong hypoclorit canxi 3% trong 15 phút, HgCr₂ 0,05% trong 5 phút. Sau đó, mẫu được rửa nhiều lần bằng nước vô trùng và được đưa vào nuôi cấy.

Môi trường nuôi cấy là Murashige-Skooge 1962 (MS) [7] có bổ sung đường saccarosa 30g/l, agar 8g/l, tổ hợp các chất điều hòa sinh trưởng khác nhau (ĐHST) gồm 6-Benzyl adenin (BA); 6-Furfuro aminopurin (Kinetin-Kin); -Naphthalen axit axetic (NAA); indol butyric axit (IBA) và pH = 5,8 trước khi hấp vô trùng. Nhiệt độ trong suốt quá trình thực nghiệm là 28⁰C ± 1.

Giai đoạn tạo và nhân chồi: cường độ ánh sáng 2000 lux, thời gian chiếu sáng 8 h/ngày. Các chất ĐHST được sử dụng BA, Kin.

Giai đoạn tạo rễ: Khoáng MS được giảm còn một nửa, nồng độ đường 10 g/l. Cường độ chiếu sáng 4000 lux, thời gian chiếu sáng 16 h/ngày. Các chất ĐHST được sử dụng NAA, IBA.

Thí nghiệm được bố trí theo kiểu ngẫu nhiên, lặp lại 3 lần.

Các số liệu được ghi nhận vào ngày thứ 30 sau khi cấy.

II. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

1. Sự hình thành chồi từ hạt

Hạt có kích thước từ 1-3 mm được gieo trên môi trường khoáng MS không có chất ĐHST, mỗi lần gieo 30 hạt, lặp lại 3 lần; sau một tuần cây cao 5-7 cm. Tỷ lệ hạt nảy mầm là 50-60%, tùy mỗi đợt. Có 3-4% số cây bị bạch tạng và được loại bỏ ngay.

Cây con được tách ra và cấy trên môi trường lỏng có bổ sung các chất ĐHST: BA 1-5 mg/l và Kin 0,5-2 mg/l. Qua tài liệu và thí nghiệm, cho thấy auxin, nhất là NAA, kìm hãm sự đẻ chồi [8, 10].

Các kết quả ở bảng 1 cho thấy nồng độ BA tốt nhất cho sự hình thành chồi ở cả hai loài trong giai đoạn này là từ 2-3 mg/l. Tăng BA lên 4 mg/l, số chồi hình thành tăng nhưng chồi nhỏ đi. Ở nồng độ 5 mg/l, chồi rất bé và có tỷ lệ nhỏ mầm bị chết.

Kết hợp Kin với BA tốt hơn khi chỉ sử dụng BA. Kin giúp tăng khả năng đẻ chồi nhưng cây không bị bé. Những cụm chồi mọc trên môi trường có BA và Kin cho hệ số nhân tương đương trên môi trường có nồng độ BA cao nhất nhưng không gây chết cụm chồi.

Bảng 1

Ảnh hưởng của BA và Kinetin lên sự hình thành chồi từ hạt

BA (mg/l)	Kinetin (mg/l)	Tre tàu			Tre mạnh tông		
		Số chồi	Chiều cao (mm)	% chết	Số chồi	Chiều cao (mm)	% chết
1	0	3	55	0	5-7	20-30	0
0	1	2	50	0	1-2	25	0
1	0,5	5	50	0	8-10	15	0
2	0	7	50	0	8-10	15	0
2	1	8	45	0	10-12	15	0
0	2	4	50	0	3-5	25	0
3	0	15	30	10	15-20	15	10
3	1	17	25	10	15-20	15	10
4	0	20	15	80	17-20	10	0
4	1	20	15	80	17-20	10	0
5	0	-	-	95	20	5	0
5	1	-	-	95	20	5	0

Nếu dùng BA và Kinetin riêng rẽ thì BA gây dễ chồi tốt hơn Kinetin, nhưng chồi mọc trên môi trường có Kinetin xanh, khỏe và cao hơn chồi mọc trên môi trường có BA.

Mầm có kích thước 5-10 mm được cắt và cấy truyền sang môi trường mới tốt hơn là mầm có kích thước 25-30 mm.

2. So sánh khả năng sinh trưởng của hạt giống và vị trí mầm nhân giống

Trong cùng một môi trường như nhau, tre mạnh tông dễ chồi mạnh hơn tre tàu. Ngọn tre mạnh tông khi cắt rời và cấy trên môi trường cho cụm chồi chứa từ 12-30 chồi, trong khi đó tre tàu chỉ cho 8-10 chồi từ một ngọn.

Trường hợp lấy đốt giữa để cấy thì khả năng dễ chồi kém hơn hẳn so với đốt ngọn. Điều này quan sát cả ở tre tàu lẫn tre mạnh tông.

Bảng 2

Khả năng dễ chồi từ các đốt khác nhau

BA (mg/l)	Kinetin (mg/l)	Số chồi (tre tàu)			Số chồi (tre mạnh tông)		
		Từ ngọn	Từ đốt	Từ gốc	Từ ngọn	Từ đốt	Từ gốc
1	0	3	2	3	6	2	4
2	0	6	3	4	8	3	5
0	1	3	2	2	5	2	3
0	2	5	2	3	6	2	5
1	0,5	6	2	4	12	3	6
2	1	8	3	5	22	4	6
3	1	10	3	6	25	4	7

Khả năng đẻ chồi của ngọn tốt hơn các đọt khác cho thấy hướng lấy mẫu từ cây trưởng thành để nhân giống in vitro. Nên tiếp tục nghiên cứu theo hướng nhân giống trực tiếp từ chồi của cây trưởng thành dựa trên những kết quả nhân giống từ hạt [9]. Các kết quả trong bảng 2 gợi ý nên lấy mẫu nuôi cấy ban đầu là các ngọn cành non thì xác suất thành công cao hơn. Vấn đề giống cũng tương tự, nuôi cấy tre tàu khó hơn là tre mạnh tông.

Có thể có mối tương quan nào đó giữa nhân giống bằng chồi thân (stem bud) của cây in vitro và chồi thân của cây trưởng thành. Vì vậy nghiên cứu môi trường nhân giống chồi thân in vitro sau đó ứng dụng cho nuôi cấy ở cây trưởng thành là cần thiết. Việc lấy được hạt tre để lưu giữ nguồn gen và nhân giống là cơ hội hiếm hoi, trong khi đó việc nhân giống invitro từ một mẫu cây ban đầu kéo dài thường không tốt [3, 4].

3. Thời gian nuôi cấy và hệ số nhân

Nhận thấy hiện tượng là sau một số lần cấy truyền ban đầu, số chồi hình thành từ một cụm chồi tương đối nhiều, nhưng tốc độ nhân lại giảm dần (bảng 3).

Nồng độ chất BA lúc mới tạo cụm chồi tương đối cao từ 3-4 mg/l (bảng 1). Sau 2 lần cấy truyền, nồng độ chất ĐHST tối ưu là 2 mg/l BA + 1 mg/l Kin. Tổ hợp này có thể dùng để nhân rất nhiều thế hệ. Việc dùng BA và Kin ở nồng độ cao 4-5 mg/l không tốt vì làm chết chồi từ lần cấy truyền thứ 10 trở đi.

Tre tàu đẻ chồi kém hơn tre mạnh tông. Sau nhiều lần cấy truyền, tre tàu mất dần khả năng đẻ chồi trong khi đó tre mạnh tông lại giữ nguyên tốc độ. Bảng 3 cho thấy kết quả nhân chồi ngọn qua 10 lần cấy truyền. Các con số trong bảng biểu thị hệ số nhân, là số chồi của một cụm chồi đẻ từ 1 chồi ngọn sau 3 tuần nuôi cấy. Trường hợp cây chết không nhân chồi tiếp tục được thì trong bảng biểu thị hệ số nhân là bằng 0.

Bảng 3

Ảnh hưởng của BA và Kinetin lên sự nhân chồi qua nhiều lần cấy truyền

BA (mg/l)	Kinetin (mg/l)	Số chồi sau số lần cấy truyền							
		Lần 1		Lần 2		Lần 3		Lần 10	
		Tre tàu	Tre mạnh tông	Tre tàu	Tre mạnh tông	Tre tàu	Tre mạnh tông	Tre tàu	Tre mạnh tông
1	0,5	6	12	12	22	10	21	5	15
2	1	8	22	14	26	12	22	6	17
3	1	10	25	10	27	7	24	0	20
4	1	20	25	0	30	0	0	0	0
5	0	0	20	0	0	0	0	0	0

Điều thú vị là cây tre ra hoa trên môi trường có BA (ảnh 3). Tre tàu ra hoa ngang thân, tre mạnh tông ra hoa ở gốc. Chưa xác định chính xác các yếu tố để chủ động làm tre ra hoa in vitro [2, 5]. Có thể BA cao góp phần kích thích sự ra hoa

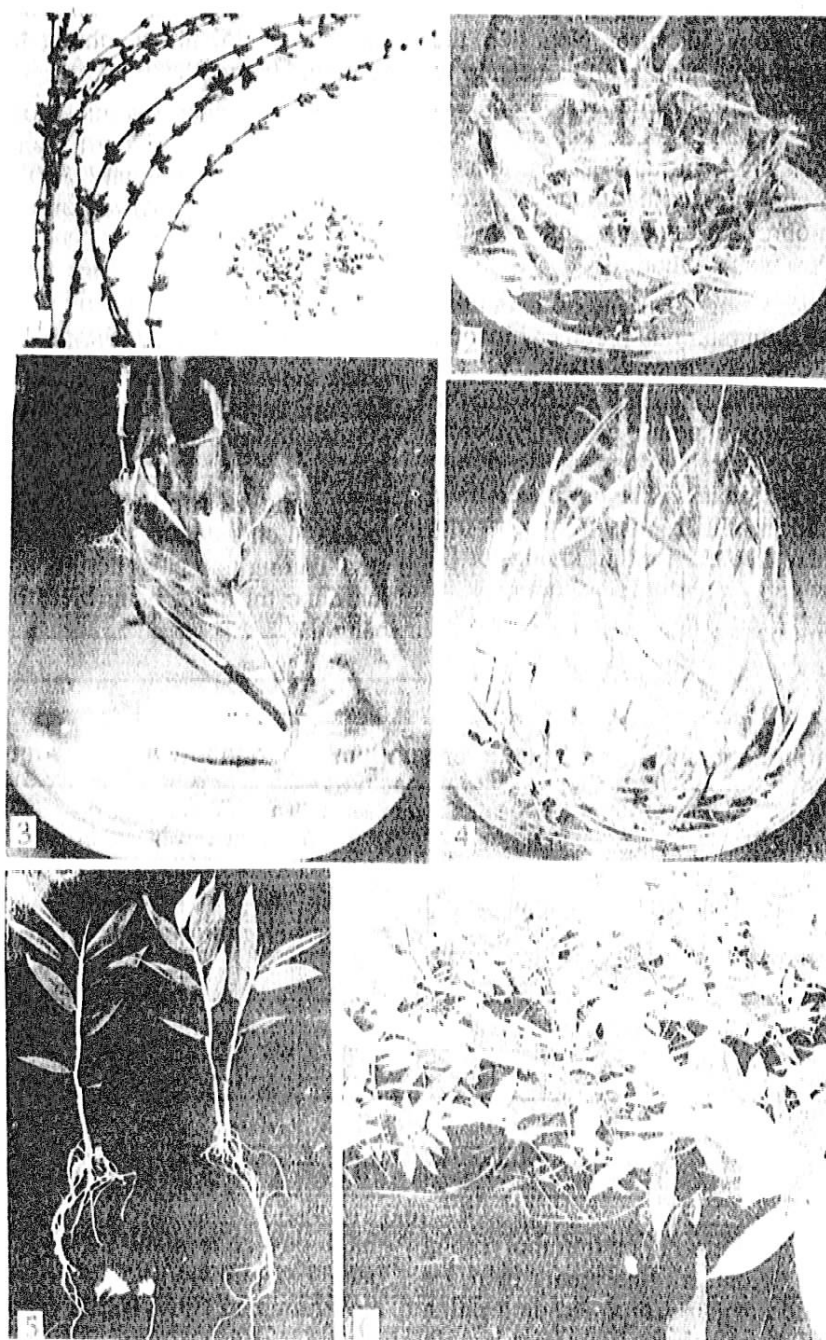
4. Tạo rễ

Trên nguyên tắc khi chuyển cây con sang môi trường có bổ sung auxin như IBA hoặc NAA và không có xytokinin, chúng sẽ phát triển

thành cây khỏe mạnh và có rễ [1]. Kết quả ở bảng 4 và ảnh 4-5 cho thấy rễ mọc tốt nhất trên môi trường có 10 mg/l IBA và tốt hơn NAA.

Nếu cấy một chồi nhỏ hoặc chồi có đọt thân vào môi trường ra rễ, cây tre sẽ sinh trưởng thành cây hoàn chỉnh và có bộ rễ khỏe mạnh. Trong khi đó, nếu cấy cây lớn hoặc cụm chồi vào môi trường ra rễ, cây sẽ ra rễ kém, do đó tỷ lệ sống sót ngoài vườn ươm cũng giảm.

Đối với tre mạnh tông, nên giữ những cụm cây cho những lần nhân giống tiếp theo. Còn đối



Ảnh 1. Hoa và hạt tre mạnh tông; 2. Chồi tre mạnh tông trên môi trường có BA 2 mg/l và Kin 1mg/l; 3. Tre tàu ra hoa trong ống nghiệm; 4. Cây tre tàu chuẩn bị cấy truyền sang môi trường tạo rễ; 5. Cây tre mạnh tông con chuẩn bị trồng vào bầu đất, 6. Cây tre mạnh tông 40 ngày tuổi trong bầu đất

với tre tàu, khả năng đâm chồi mới và hình thành rễ từ gốc thân rất kém cho nên chỉ dùng chồi ngọn để cấy sang môi trường tạo cây hoàn chỉnh. Tre tàu chỉ ra rễ trên môi trường có IBA.

Khả năng tái sinh của đốt thân tre tàu phân nào lý giải cho hệ số nhân thấp hơn so với cụm chồi tre mạnh tông trên môi trường nhân chồi có chứa BA và Kin (bảng 2 và 3).

Bảng 4

Ảnh hưởng của NAA và IBA lên sự ra rễ của cụm cây hoặc đốt tre

	Tỷ lệ ra rễ (%)		Số rễ		Chiều dài rễ (mm)	
	Tre tàu	Tre mạnh tông	Tre tàu	Tre mạnh tông	Tre tàu	Tre mạnh tông
Cụm cây + IBA 5ppm	50	80	3-5	8-10	60-80	30-50
Cụm cây + IBA 10ppm	80	100	3-5	10-15	60-80	30-50
Cụm cây + IBA 15ppm	70	90	3-5	10-15	60-80	30-50
Cụm cây + NAA 3ppm	0	15	0	3-5	60-80	30-50
Đốt thân + IBA 5ppm	5	80	3-5	3-5	60-90	40-60
Đốt thân + IBA 10ppm	10	100	3-5	3-5	60-90	40-60
Đốt thân + IBA 15ppm	8	90	3-5	3-5	60-90	40-60
Đốt thân + NAA 3ppm	0	7	0	3-5	0	30-50

Bảng 4 cho thấy tre mạnh tông ra rễ tốt hơn tre tàu. Lá tre mạnh tông lớn hơn trong khi đó thân tre tàu to hơn và thẳng hơn. Khi trồng ra đất, tre mạnh tông dễ sống hơn tre tàu (ảnh 6).

III. KẾT LUẬN

Có thể nhân giống in vitro tre mạnh tông và tre tàu theo các bước sau:

1. Tạo chồi từ hạt tốt trên môi trường MS có BA 3mg/l và Kinetin 1mg/l.
2. Nhân chồi tốt trên môi trường MS có BA 2mg/l và Kinetin 1mg/l.
3. Chồi, cây con ra rễ và sinh trưởng thành cây hoàn chỉnh tốt trên môi trường có nồng độ khoáng MS giảm 1/2 và có IBA 10mg/l.
4. Hệ số nhân giống được ước tính 3^{12} cây bầu đất/năm/1 hạt tre ban đầu.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Arya S. et al., 1999: Plant Cell Reports, 18: 879-882.
2. Chambers S. M. et al., 1999: Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 27: 45-48.
3. D'Amato F., 1986: Spontaneous mutation and somaclonal variation, (session I) Genetic variation from in vitro culture, in: Nuclear techniques and in vitro culture for plant improvement. Proceedings of symposium jointly organized by IAEA and FAO, Vienna, 19-23 August: 3-10.
4. Debergh P. C. and Zimmerman R. H., 1991: Micropropagation technology and application. Kulwer Academic Press, Dordrecht, the Netherlands.
5. John C. K and Nadgauda R. S., 1999: In vitro Cell Dev. Biol-Plant, 35: 309-315.
6. McClure F. A., 1966: Them bamboos-a fresh perspective. Haward Universit Press, Cambridge, Mass.
7. Murashig T. and Skoog F., 1962: Physiol. Plant, 15: 473.
8. Prutpongse P. and Gavnlertvatana P., 1992: Hort. Science, 27(5): 453-454.

9. Ravikumar R. et al., 1998: Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 52: 189-192. 10. Saxena S., 1990: Plant Cell Report, 9: 431-434.

MICROPROPAGATION OF TWO BAMBOO SPECIES *SINOCALAMUS LATIFLORUS* AND *DENDROCALAMUS ASPER* BY TISSUE CULTURE

VU NGOC PHUONG et al.

SUMMARY

The micropropagation of two bamboo species *Sinocalamus latiflorus* and *Dendrocalamus asper* by tissue culture includes 4 steps:

1. Multishoot induction: Young shoots from germinating seeds. Basal MS salt medium supplemented with BA 3 mg/l and Kinetin 1 mg/l.
2. Multiple shoot propagation: MS medium supplemented with BA 2 mg/l and Kinetin 1 mg/l.
3. Induction of roots and full plantlets: Half-strength MS salt medium supplemented with IBA 10 mg/l.
4. A high rate of micropropagation, 3¹² of potted plantlets per year, could be attained, using this protocol.

Ngày nhận bài: 17-3-2001