

QUÁ TRÌNH PHÁT SINH HÌNH THÁI MÔ SỢ VÀ CHỒI CỦA CÂY LONG NÃO (*Cinnamomum camphora* (L.) Sieb.) NUÔI CẤY IN VITRO

Nguyễn Thị Quý Co¹, Trần Văn Tiến¹, Võ Thị Bạch Mai², Trần Trọng Tuấn³, Nguyễn Hải Sơn^{4*}

¹Chi cục Lâm nghiệp TP.HCM; ²Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, TP.HCM;

³Viện Sinh học Nhiệt đới, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam;

⁴Trường Đại học Cửu Long, Vĩnh Long

Email*: haisown@gmail.com

Ngày gửi bài: 25.07.2014

Ngày chấp nhận: 14.10.2014

TÓM TẮT

Sự phát sinh cơ quan (chồi, rễ) là một quá trình phức tạp, chịu ảnh hưởng của nhiều yếu tố nội sinh lẫn ngoại sinh. Do đó, để tìm hiểu sự hình thành các sơ khởi, nhiều kỹ thuật đã được sử dụng như vi giải phẫu, chất ức chế, bổ sung chất điều hòa sinh trưởng thực vật ngoại sinh... Trong nghiên cứu này, chúng tôi khảo sát ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng thực vật ngoại sinh lên sự phát sinh mô sẹo, chồi và quá trình phát sinh hình thái chồi của cây long não (*Cinnamomum camphora* (L.) Sieb.). Kết quả nghiên cứu cho thấy môi trường WPM có bổ sung 2% sucrose, 0,5 mg/l NAA và 0,2 mg/l BA tốt nhất cho việc hình thành mô sẹo. Môi trường WPM bổ sung 2% sucrose và 1 mg/l BA tốt nhất cho việc nhân nhanh chồi, xét về số lượng chồi trung bình và trọng lượng tươi. Kết quả giải phẫu hình thái chồi cho thấy các tế bào nhu mô vùng vỏ là nơi bắt đầu quá trình hình thành chồi.

Từ khóa: Cây long não, chồi, mô sẹo, phát sinh hình thái, WPM.

Morphogenesis of Calli and Shoots of *Cinnamomum camphora* (L.) Sieb.

ABSTRACT

The organogenesis (shoots and roots) is a complicated process, influenced by various endogenous and exogenous factors. Therefore, to understand the formation of the initials, several techniques have been used as anatomy, inhibitors and plant growth regulators supplement. In this study, we investigated the effects of plant growth regulators on the callogenesis, shoot formation and the process of shoot morphogenesis of *Cinnamomum camphora* (L.) Sieb. The results showed that the WPM medium supplemented with 2% sucrose, 0.5 mg/l NAA and 0.2 mg/l BA was suitable for the callus formation. WPM medium supplemented with 2% sucrose and 1 mg/l BA was the excellent medium for shoot multiplication (the mean of 7.7 buds/explant and 5.57g fresh weight). Morphological anatomy of shoots showed that the cortex parenchyma cell is the position to initiate shoot formation.

Keywords: *Cinnamomum camphora* (L.) Sieb., callus, morphogenesis, WPM medium, shoot

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Sự phát sinh cơ quan (chồi, rễ...) là một quá trình hết sức phức tạp, chịu ảnh hưởng của nhiều yếu tố nội sinh lẫn ngoại sinh. Đã có rất nhiều nghiên cứu trong và ngoài nước về phát sinh mô sẹo trên nhiều loại cây khác nhau. Để tìm hiểu sự hình thành các sơ khởi, kỹ thuật đã được sử

dụng như vi giải phẫu, ức chế, bổ sung chất điều hòa sinh trưởng thực vật ngoại sinh, nuôi cấy mô và cả sinh học phân tử. Nghiên cứu đầu tiên về sự phát sinh chồi đã được White báo cáo lần đầu tiên năm 1939 trên cây thuốc lá và mở đầu cho công cuộc nghiên cứu sự phát sinh cơ quan. Quá trình phát sinh cơ quan bao gồm nhiều giai đoạn: sự phân hóa của các mô đích và hàng loạt quá trình phát triển khác nhau nhằm mục đích cuối

cùng là hình thành một chồi hoàn chỉnh. Sự phát sinh chồi đã được nghiên cứu khá kỹ trên hai đối tượng là cây thuốc lá (trên mô sẹo) và cây thông *Pinus radiata* (trên lá mầm).

Long não (*Cinnamomum camphora* (L.) Sieb.) còn gọi là Chương não, Dã hương, là loại cây thanh lọc không khí tốt, góp phần bảo vệ môi trường, thân và cành cây chắc, khó gãy... Hiện nay, tại Việt Nam, cây long não đang được ưa chuộng và đã có một số nghiên cứu về loại cây này nhưng số lượng tương đối ít. Trên thế giới, các nghiên cứu *in vitro* về cây long não chủ yếu tập trung vào việc nhân nhanh giống cây. Huang et al., (1998) đã có báo cáo về các thí nghiệm nuôi cấy *in vitro* cây long não từ các đỉnh sinh trưởng trên môi trường MS. Babu et al., (2003) đã báo cáo các kết quả ghi nhận được khi nuôi cấy *in vitro* cây long não từ đỉnh sinh trưởng và mắt giống. Azad et al., (2005) cũng đã báo cáo kết quả thí nghiệm nuôi cấy các mảnh lá mầm nhằm tạo cây long não *in vitro* trên môi trường MS bổ sung các chất điều hòa sinh trưởng thực vật.

Trong nghiên cứu này, chúng tôi tập trung nghiên cứu ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng thực vật lên khả năng phát sinh hình thái mô sẹo và chồi của cây long não.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Vật liệu

Chồi đỉnh và đốt thân cây long não 2 năm tuổi trồng tại Trạm thực nghiệm Lâm nghiệp Tân Tạo - Chi cục Lâm nghiệp thành phố Hồ Chí Minh, sau khi khử trùng được cấy vào môi trường WPM bổ sung 2% sucrose, 0,5 mg/l BA để cảm ứng tạo chồi. Sau 30 ngày, cắt những chồi *in vitro* vừa hình thành làm vật liệu cho các thí nghiệm của nghiên cứu.

2.2. Phương pháp

2.2.1. Môi trường nuôi cấy

Môi trường nuôi cấy là môi trường WPM (McCown Woody plant medium) (Lloyd and McCown, 1980) bổ sung 2% sucrose, 8 g/l agar,

điều chỉnh pH về 5,7 trước khi hấp khử trùng trong autoclave ở nhiệt độ 121°C, áp suất 1atm trong 30 phút.

2.2.2. Bố trí thí nghiệm

- Nuôi cấy tạo chồi và nhân nhanh chồi

Những chồi *in vitro* được nuôi cấy vào môi trường WPM bổ sung 2% sucrose, (0,5; 1,0; 2,5; 5,0 mg/l) BA, kết hợp với 0,5 NAA, (0,5; 1,0; 2,5; 5,0 mg/l) BA kết hợp với 0,5 IAA.

Đánh giá khả năng nhân nhanh chồi sau 60 ngày nuôi cấy, qua đó xác định môi trường thích hợp nhất cho sự nhân nhanh chồi.

- Nuôi cấy tạo mô sẹo

Các lá non tách từ chồi *in vitro* được đặt vào môi trường WPM bổ sung 2% sucrose và các chất điều hòa sinh trưởng thực vật (CĐHSTTV) như là NAA riêng rẽ (0,5 mg/l); NAA (0,5 mg/l) kết hợp với BA (0,2 mg/l); NAA (0,5 mg/l) kết hợp với 2,4D (0,2 mg/l); 2,4 D riêng rẽ (0,2 mg/l).

Đánh giá khả năng tạo mô sẹo, khối lượng tươi, khối lượng khô sau 60 ngày nuôi cấy. Đánh giá khả năng tái sinh chồi và khả năng sinh phôi của mô sẹo.

2.2.3. Giải phẫu hình thái các giai đoạn tạo chồi, cụm chồi và mô sẹo

Giải phẫu mẫu cấy tạo chồi sau 0 ngày và 30 ngày nuôi cấy trên môi trường WPM có bổ sung 2% sucrose và 0,5 mg/l BA, cụm chồi sau 60 ngày nuôi cấy trên môi trường WPM có bổ sung 2% sucrose và 1 mg/l BA; mô sẹo sau 60 ngày nuôi cấy trên môi trường WPM có bổ sung 2% sucrose và 0,5 mg/l NAA. Nhuộm các lát cắt bằng thuốc nhuộm 2 màu carmine-iod và quan sát trên kính hiển vi quang học. Ghi nhận nguồn gốc phát sinh chồi, mô sẹo.

2.2.4. Điều kiện nuôi cấy

Mẫu được nuôi cấy ở nhiệt độ $25 \pm 2^\circ\text{C}$, quang kỳ 12 giờ/ngày, cường độ chiếu sáng $45 \mu\text{mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$, độ ẩm trung bình 75 - 80 %.

2.2.5. Giải phẫu và nhuộm tế bào

Sử dụng dao lam cắt dọc phần chồi (có mô phân sinh chồi đỉnh và chồi bên) và mô sẹo sau

đó bỏ vào nước để rửa mẫu. Sử dụng dung dịch javel 10% để tẩy mẫu trong vòng 10 phút cho đến khi mẫu mất màu. Rửa lại bằng nước cất. Ngâm mẫu trong dung dịch carmine-iod khoảng 15 - 20 phút để mẫu bắt màu. Tiến hành quan sát mẫu dưới kính hiển vi quang học ở vật kính x10, x40.

2.2.6. Xử lý số liệu

Số liệu được thu thập và xử lý bằng phần mềm Microsoft Excel 2007 và SPSS 16.0, theo phương pháp Duncan (Duncan, 1955) với độ tin cậy $p \leq 0,5$.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Nuôi cấy tạo chồi

Cytokinin đóng vai trò chính trong sự thành lập chồi và cơ quan trong nuôi cấy mô, đồng thời nó còn kích thích chồi nách, phân chia tế bào, ức chế sự lão hóa lá, thành lập mô sẹo và tăng trưởng... (Nguyễn Bảo Toàn, 2004). Ngoài ra, với sự hiện diện của cytokinin còn gỡ bỏ hiện tượng ưu thế ngọn và có thể phối hợp với các chất điều hòa sinh trưởng thực vật thuộc nhóm auxin.

Sau 30 ngày, cắt những chồi vừa hình thành cấy vào môi trường WPM bổ sung 2% sucrose và các chất điều hòa sinh trưởng thực

vật. Sự nhân nhanh chồi từ mẫu ngọn chồi và đốt thân mang chồi ngủ xảy ra trong vòng 40 - 60 ngày sau khi cấy. Các chồi xuất hiện thành từng cụm và một số chồi có kích thước từ 1 - 2cm có thể tách ra khỏi cụm chồi và được sử dụng để tiếp tục nhân chồi sau này. Môi trường WPM bổ sung 1 mg/l BA tốt nhất cho việc nhân nhanh chồi (tỷ lệ hình thành chồi 96,77%), đồng thời có số chồi trung bình, trọng lượng tươi và trọng lượng khô cao nhất lần lượt là 7,70 chồi; 5,57g và 0,59g (Bảng 1).

Sự có mặt của BA đã kích thích sự hình thành chồi, các chồi non cấy vào các môi trường chỉ bổ sung BA (nghiệm thức B_{0,5}, B₁, B_{2,5}) riêng lẻ đều phát triển nhanh tạo thành cụm; ở nồng độ thấp (0,5 mg/l) thì số lượng chồi hình thành thấp (1,83 chồi/mẫu); khi nồng độ BA tăng thì khả năng tạo chồi và nhân nhanh sẽ gia tăng nhưng nếu nồng độ BA cao cũng hạn chế sự hình thành và nhân nhanh chồi, nồng độ tối ưu cho việc nhân nhanh chồi với cây long não là 1 mg/l BA. Kết quả này cũng phù hợp với báo cáo của Huang et al., (1997) khi tiến hành nuôi cấy *in vitro* cây long não. Bổ sung BA với nồng độ cao hơn, hiệu quả nhân nhanh chồi giảm, trong môi trường B_{2,5} (WPM bổ sung 2,5 mg/l BA), số lượng chồi trung bình chỉ còn 2,20 chồi/mẫu. Ở nồng độ cao 5 mg/l BA đã ức chế hình thành chồi mới, chỉ có một chồi phát triển. Babu et al.,

Bảng 1. Kết quả nhân nhanh chồi sau 60 ngày nuôi cấy trên các môi trường khác nhau.

Ký hiệu	CĐHSTTV			Tỷ lệ hình thành chồi (%)	Số lượng chồi trung bình	Trọng lượng tươi (g)	Trọng lượng khô (g)
	BA (mg/l)	NAA (mg/l)	IAA (mg/l)				
B _{0,5}	0,5	-	-	72,41	1,83e*	1,52e	0,15e
B ₁	1,0	-	-	96,77	7,70a	5,57a	0,59a
B _{2,5}	2,5	-	-	56,90	2,20d	2,44d	0,26cd
B ₅	5,0	-	-	27,66	1,00f	0,19f	0,02f
B ₁ I _{0,5}	1,0	0,5	-	74,47	4,63b	3,96b	0,43b
B _{2,5} I _{0,5}	2,5	0,5	-	53,70	1,90e	3,07cd	0,33bc
B ₅ I _{0,5}	5,0	0,5	-	26,83	1,00f	0,16f	0,02f
B ₁ N _{0,5}	1,0	-	0,5	64,41	3,47c	3,72bc	0,36bc
B _{2,5} N _{0,5}	2,5	-	0,5	50,85	1,57e	1,31e	0,17de
B ₅ N _{0,5}	5,0	-	0,5	23,08	1,00f	0,20f	0,03f

Ghi chú: Các số trung bình trong một cột mang các chữ cái khác nhau thì khác biệt có ý nghĩa ở mức $p \leq 0,05$.

(2003) cũng nhận thấy trong các môi trường có nồng độ cytokinin cao, chỉ có một chồi phát triển, không có sự hình thành cụm chồi. Điều này cũng phù hợp với nhận định của Rayle et al., (1982) là cytokinin cản sự kéo dài trong thân.

Khi bổ sung thêm NAA và IAA vào môi trường, sự có mặt của auxin đã ảnh hưởng đến sự tích lũy cytokinin, do đó hoạt tính của BA yếu hơn nên số lượng chồi cũng giảm theo. Số lượng chồi trung bình ở môi trường B_1 (WPM bổ sung 1 mg/l BA) là 7,70 chồi/mẫu trong khi ở môi trường $B_{1I_{0,5}}$ (WPM bổ sung 1 mg/l BA kết hợp 0,5 mg/l IAA) là 4,63 chồi/mẫu và môi trường $B_{1N_{0,5}}$ (WPM bổ sung 1 mg/l BA và 0,5 mg/l NAA) là 3,47 chồi/mẫu. Điều này cũng đúng với nhận định của Gaspar et al., (1996) là auxin có thể ức chế sự tích lũy cytokinin.

Tóm lại, chồi cây long não khi được nuôi cấy trên môi trường WPM có bổ sung 1 mg/l BA riêng lẻ sẽ có khả năng nhân chồi tốt nhất với trọng lượng tươi và trọng lượng khô cũng đạt cao nhất.

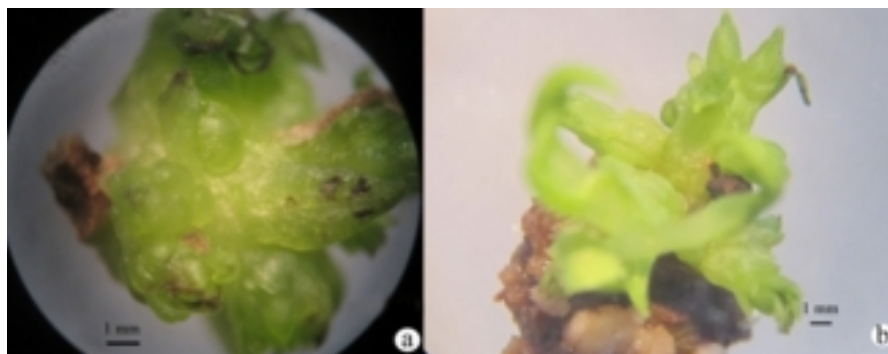
Giải phẫu hình thái chồi

Các cụm chồi sau 20 ngày, 40 ngày và 60 ngày nuôi cấy trên môi trường WPM có bổ sung 2% sucrose và 1 mg/l BA được quan sát bằng mắt thường và kính lúp. Giải phẫu mẫu cây tạo chồi sau 0 ngày và 30 ngày nuôi cấy trên môi trường WPM có bổ sung 2% sucrose và 0,5 mg/l BA, cụm chồi sau 60 ngày nuôi cấy trên môi trường WPM có bổ sung 2% sucrose và 1 mg/l BA. Có sự thay đổi về mặt mô học trong suốt quá trình hình thành chồi.

Khi quan sát bằng kính hiển vi phẫu thức ngang của mẫu cấy tạo chồi trên môi trường WPM có bổ sung BA sau những khoảng thời gian khác nhau, chúng tôi ghi nhận được các thay đổi về mặt mô học như sau: Đầu tiên, có sự phân chia mạnh của một nhóm tế bào nhu mô trong phần vỏ của thân. Nhóm tế bào này phát triển thành cụm hướng về phía vỏ tạo thành khối sinh mô (Hình 3b). Sau đó, các tế bào libe và mạch cũng phân chia nhanh chóng, các bó mạch bị đẩy dần ra hướng vỏ (Hình 3c). Tiếp theo, sơ khởi lá hình thành (Hình 3d). Biểu bì của các mẫu cấy trở thành vỏ phân sinh ngọn của sơ khởi chồi. Sau đó, các tế bào tiếp tục phân chia giúp chồi kéo dài (Hình 3 e, f; 4, 5).



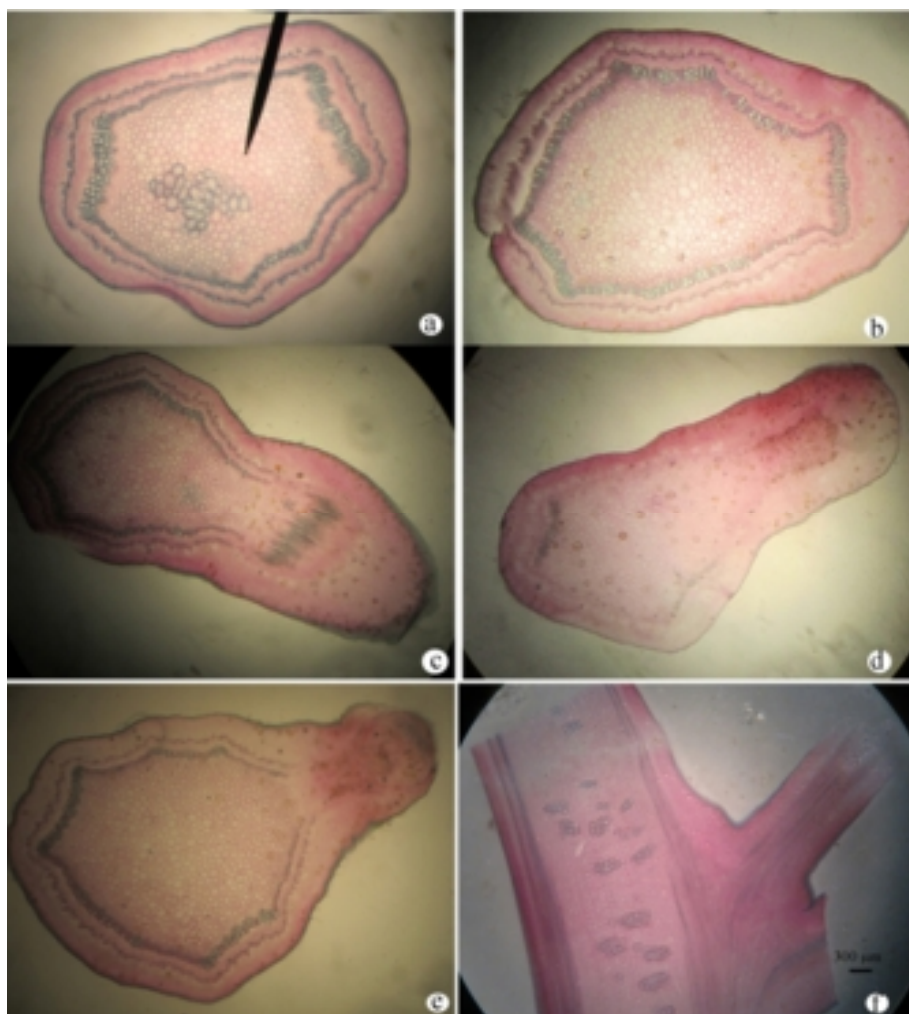
Hình 1. Cụm chồi sau 60 ngày nuôi cấy khi quan sát bằng mắt thường (môi trường WPM bổ sung 1 mg/l BA)



Hình 2. Cụm chồi được nuôi cấy trên WPM bổ sung 1 mg/l BA được quan sát trên kính lúp

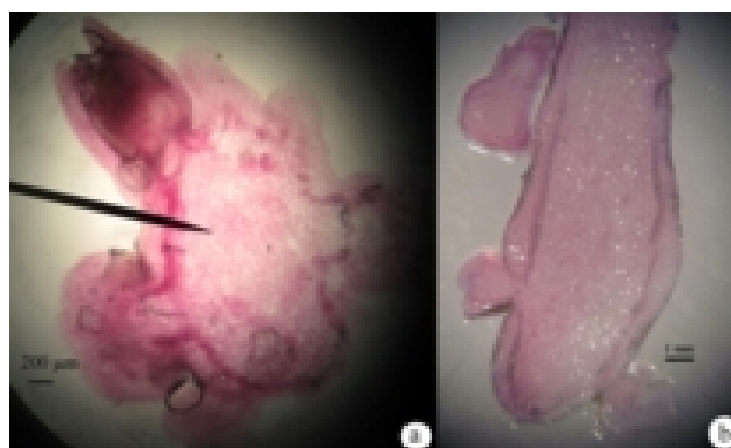
Ghi chú: a) Sau 20 ngày nuôi cấy, b) Sau 40 ngày nuôi cấy.

Quá trình phát sinh hình thái mô sẹo và chồi của cây long não (*Cinnamomum camphora* (L.) Sieb.) nuôi cấy *in vitro*



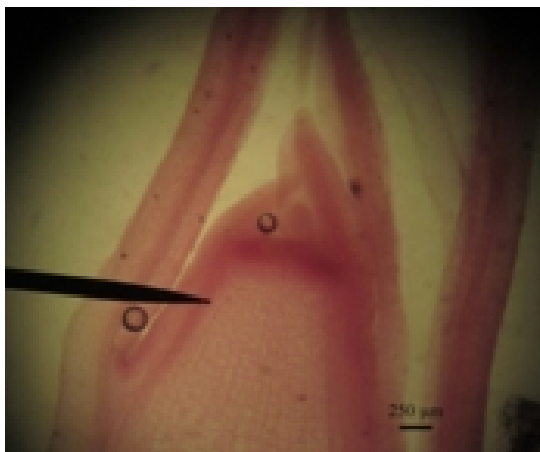
Hình 3. Các giai đoạn hình thành chồi ở cây long não

Ghi chú: a) Mẫu thân ban đầu, b) Bắt đầu hình thành chồi, c) Sự phát triển của các tế bào mô dẫn truyền, d) Sơ khởi lá hình thành, e) Chồi bắt đầu kéo dài, f) Phẫu thức dọc thân cây Long não với chồi kéo dài.



Hình 4. Cụm chồi *in vitro* sau 60 ngày nuôi cấy

Ghi chú: a) Phẫu thức ngang; b) Phẫu thức dọc.



Hình 5. Mô phân sinh chồi đỉnh gồm sơ khởi chồi và các sơ khởi lá

Như vậy, chồi mới của cây long não được hình thành từ tế bào nhu mô vỏ của thân non khi có sự hiện diện của BA với nồng độ thích hợp.

3.2. Nuôi cấy tạo mô sẹo

Mô sẹo phát triển không theo quy luật nhưng có khả năng biệt hóa thành rễ, chồi và phôi để có thể hình thành cây hoàn chỉnh. Hai điều kiện căn bản cho sự tạo mô sẹo là cây non và phần non cây trưởng thành để cho mô sẹo trong điều kiện nuôi cấy *in vitro*, dưới tác dụng của auxin (như 2,4 D hoặc NAA...) được áp dụng riêng rẽ hay phối hợp với cytokinin.

Trong thí nghiệm này, trong thời gian đầu sau 20 ngày nuôi cấy, cho thấy có hiện tượng hóa nâu; nhưng sau 40 ngày, bắt đầu có sự hình thành mô sẹo ngay tại vị trí vết thương. Sau 60 ngày, khối mô sẹo phát triển mạnh, xốp và có màu trắng ngà. Trong đó, nghiệm thức WPM bổ sung 0,5 mg/l NAA kết hợp với 0,2 mg/l BA cho

trọng lượng tươi và trọng lượng khô cao nhất lần lượt là 3,30g và 0,27g (Bảng 2) và thích hợp cho việc hình thành mô sẹo tốt nhất so với các nghiệm thức sử dụng auxin riêng lẻ hoặc không kết hợp với cytokinin.

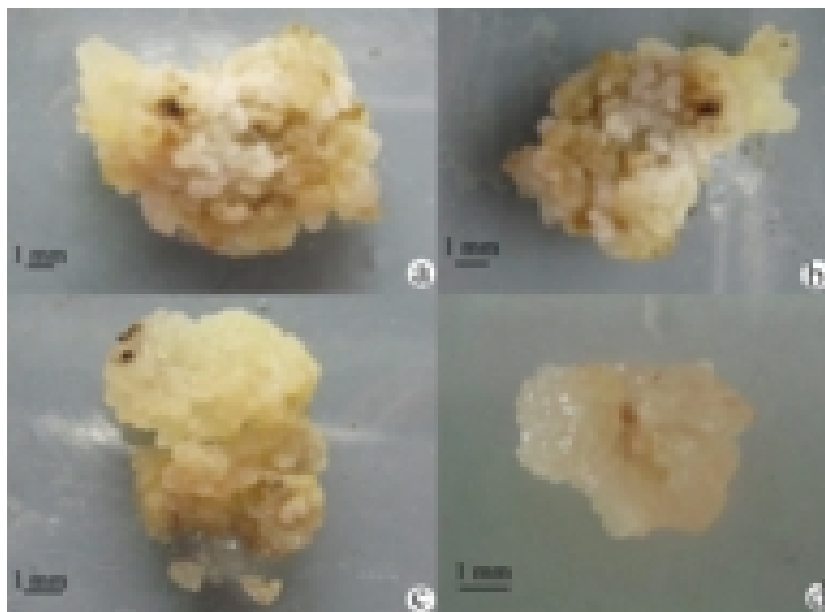
Thông thường, 2,4 D là chất có tác dụng mạnh trong việc kích thích hình thành mô sẹo, tuy nhiên với cây long não, 2,4 D không có tác dụng bằng NAA. Mô sẹo hình thành trong các môi trường WPM bổ 0,5 mg/l NAA hay môi trường WPM bổ sung 0,5 mg/l NAA và 0,2 mg/l BA có trọng lượng tươi và trọng lượng khô cao hơn. Trong trường hợp này, mô sẹo màu trắng hơi vàng, xốp, các tế bào có dạng cụm tròn, rời rạc nên có khả năng tái sinh cao hơn (Hình 6a). Khi có sự hiện diện của 2,4 D trong môi trường nuôi cấy, hiệu quả hình thành mô sẹo thấp hơn và khả năng tái sinh cũng giảm. Đặc biệt, khối mô sẹo hình thành trong môi trường WPM bổ sung 0,2 mg/l 2,4 D có trọng lượng tươi (0,66g) và trọng lượng khô thấp nhất (0,04g) (Bảng 2); đồng thời, khối mô sẹo mềm, mọng nước, màu trắng đục, các tế bào trơn láng, không hình thành cụm (Hình 6d).

Sự tạo mô sẹo phụ thuộc vào nguồn gốc mô cấy và auxin. Thông thường, 2,4 D và NAA thường được sử dụng làm nguồn auxin ngoại sinh cho sự hình thành mô sẹo ở các loài thực vật (Dixon and Gonzales, 1994; Hsia and Korbam, 1996; Morita et al., 1999). Ngoài ra, việc cảm ứng tạo mô sẹo thường đòi hỏi sự kết hợp giữa auxin và cytokinin (Bùi Trang Việt, 2000). Mẫu lá non từ chồi *in vitro* được cấy vào các môi trường có NAA; 2,4 D hầu hết đều có hiện tượng hóa nâu, có thể do tinh dầu trong lá tiết ra gây nên hiện tượng này. Tuy nhiên,

Bảng 2. Trọng lượng tươi và trọng lượng khô của mô sẹo sau 60 ngày nuôi cấy trên các môi trường khác nhau

Ký hiệu	Môi trường	Trọng lượng tươi (g)	Trọng lượng khô (g)
N _{0,5}	WPM + 0,5 mg/l NAA	2,11b	0,16b
N _{0,5} B _{0,2}	WPM + 0,5 mg/l NAA + 0,2 mg/l BA	3,30a	0,27a
N _{0,5} D _{0,2}	WPM + 0,5 mg/l NAA + 0,2 mg/l 2,4D	1,06c	0,07c
D _{0,2}	WPM + 0,2 mg/l 2,4D	0,66c	0,04c

Ghi chú: Các số trung bình trong một cột mang các chữ cái khác nhau thì khác biệt có ý nghĩa ở mức $p \leq 0,05$



Hình 6. Mô sẹo sau 60 ngày nuôi cấy trên các môi trường có các chất điều hòa sinh trưởng thực vật khác nhau

Ghi chú: a) WPM + 0,5 mg/l NAA + 0,2 mg/l BA; b) WPM + 0,5 mg/l NAA; c) WPM + 0,5 mg/l NAA + 0,2 mg/l 2,4 D; d) WPM + 0, 2 mg/l 2,4 D.

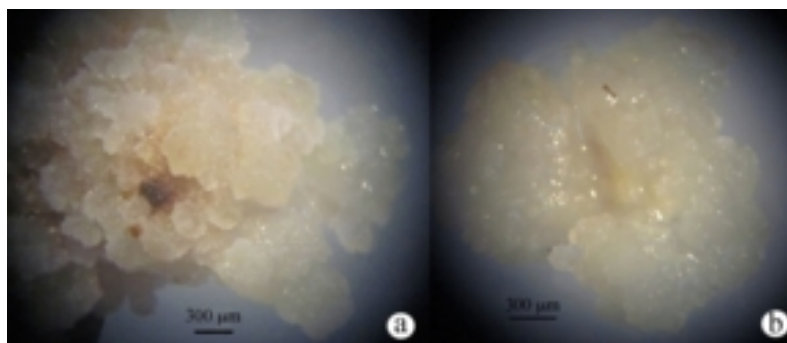
sau 40 ngày nuôi cấy, do tác động của các chất điều hòa sinh trưởng thực vật, mô sẹo bắt đầu hình thành từ vị trí vết thương, sau đó các tế bào mô sẹo phát triển mạnh tạo thành khối. Mô thực vật khi bị tổn thương luôn có khuynh hướng làm lành vết thương bằng cách phản phân hóa các tế bào để phân chia tạo các tế bào khác che lấp vùng bị tổn thương. Nhờ có chất điều hòa sinh trưởng thực vật, các tế bào này được thúc đẩy phát triển nhanh hơn.

Tóm lại, việc sử dụng auxin riêng lẻ hay kết hợp với cytokinin trong môi trường nuôi cấy có ảnh hưởng khác nhau trong quá trình cảm ứng tạo mô sẹo từ mẫu cấy lá. Sự kết hợp giữa auxin

và cytokinin trong môi trường nuôi cấy với những tỉ lệ nhất định sẽ ảnh hưởng đến quá trình tạo sẹo (Letham, 1974; Akiyashi et al., 1983) và có thể cytokinin giúp quá trình này xảy ra nhanh hơn. Vì vậy, khi kết hợp 0,5 mg/l NAA và 0,2 mg/l BA trong môi trường khoáng WPM cho hiệu quả tạo mô sẹo cao hơn, khối mô sẹo tạo ra nhiều hơn, trọng lượng tươi và trọng lượng khô cũng cao hơn.

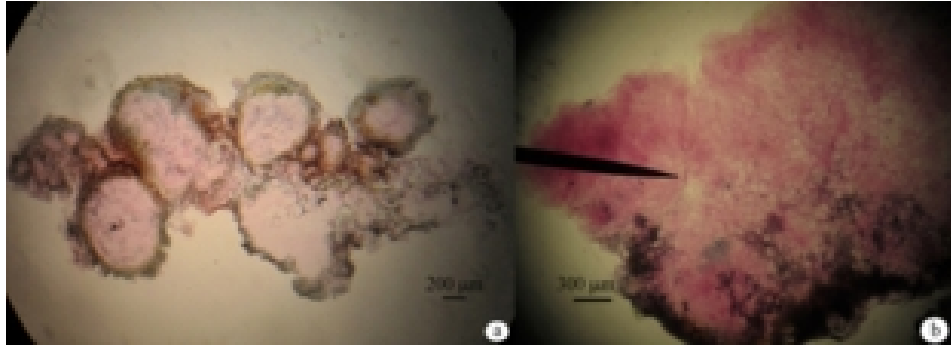
Giải phẫu hình thái mô sẹo:

Mô sẹo sau 60 ngày nuôi cấy trên các môi trường được quan sát bằng kính lúp và quan sát mẫu giải phẫu cắt ngang bằng kính hiển vi.



Hình 7. Mô sẹo quan sát trên kính lúp

Ghi chú: a) WPM + 0,5 mg/l NAA + 0,2 mg/l BA; b) WPM + 0,2 mg/l 2,4D



Hình 8. Mô sẹo trên môi trường WPM + 0,5 mg/l NAA + 0,2 mg/l BA sau 60 ngày nuôi cấy

Ghi chú: a) Phẫu thức ngang mẫu lá tạo sẹo, b) Phẫu thức ngang khối mô sẹo

Quan sát giải phẫu nhận thấy có sự phân chia mạnh của các tế bào nhu mô tại vị trí vết thương. Các tế bào này tiếp tục phân chia lộn xộn tạo thành khối mô sẹo (Hình 8). Như vậy, mẫu cấy trên môi trường có sự hiện diện của auxin và cytokinin đã giúp cho các tế bào nhu mô ngay vùng vết thương phân chia để hình thành khối mô sẹo.

4. KẾT LUẬN

Kết quả thí nghiệm cho thấy môi trường WPM bổ sung 1 mg/l BA thích hợp cho việc nhân nhanh chồi và chồi được hình thành từ vùng tế bào nhu mô vỏ. Bên cạnh đó, môi trường WPM bổ sung 0,5 mg/l NAA và 0,2 mg/l BA tốt nhất cho việc hình thành mô sẹo từ tế bào nhu mô lá non tại vị trí của vết thương.

LỜI CẢM ƠN

Nhóm tác giả xin chân thành cảm ơn Chi cục Lâm nghiệp thành phố Hồ Chí Minh đã hỗ trợ kinh phí cho nghiên cứu này

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Akiyoshi D.E., Morris R.O., Hinz R., Mischke B.S., Kosuge T., Garfinkel D.J., Gordon M.P., Nester W. (1983). Cytokinin/auxin balance in crown gall tumors is regulated by specific loci in the T-DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80: 407 - 411.
- Azad M. A. K., Yokota S., Ishiguri F., Yahara S., Yoshizawa N. (2005). Large-scale clonal propagation of *Cinnamomum camphora* (L.) nees and eberm, *Bull Utsunomiya Univ For*: 41.
- Babu K.N., Sajina A., Minoo D., John C.Z., Mini P.M., Tushar K.V., Rema J., Ravindran P.N. (2003).

- Micropropagation of camphor tree (*Cinnamomum camphora*). *Plant Cell Tiss Org Cult*, 74: 179-183.
- Bùi Trang Việt (2000). Sinh lý thực vật đại cương. Phần I: Dinh dưỡng. Nhà xuất bản Đại học Quốc gia thành phố Hồ Chí Minh.
- Dixon R.A., Gonzales R.A. (1994). *Plant Cell Culture: A Practical Approach*. 2nd ed. Oxford University Press, New York: 230.
- Duncan D.B. (1955). Multiple range and multiple F tests. *Biometrics*, 11: 1 - 42.
- Gaspar T., Kevers C., Penel C., Greppin H., Reid D. M., Thrope T. A. (1996). Plant hormones and plant growth regulators in plant tissue culture. *In vitro Cell Dev Biol Plant*, 32: 272 - 289.
- Hsia C. and Korban S.S. (1996). Organogenesis and somatic embryogenesis in callus culture of *Rosa hybrid* and *Rosa chinesis minima*. *Plant Cell Tiss Org Cult*, 44: 1 - 6.
- Huang L.C., Huang B.L., Murashige T. (1998). A micropropagation protocol for *Cinnamomum camphora*. *In vitro Cell Dev Biol Plant*, 34: 141-146.
- Letham D.S. (1974). Regulators of cell division in plant tissues XX. The cytokinins of coconut milk. *Physiol. Plant*, 32: 66 - 70.
- Lloyd G., McCown B. (1980). Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. *Int Plant Prop Soc. Proc.*, 30: 421.
- Morita M., Xing X.H., Unno H. (1999). Synchronized shoot regeneration of rice (*Oryza sativa* L.) calli on solid medium by adjustment of intracellular 2,4 D concentration. *Plant Cell Rep.*, 18: 633 - 639.
- Nguyễn Bảo Toàn (2004). Nuôi cấy mô và tế bào thực vật. Nhà xuất bản Đại học Cần Thơ, pp. 28- 32.
- Rayle D.L, Ross C.W., Robinson N. (1982). Estimation of osmotic parameters accompanying zeatin-induced growth of detached cucumber cotyledons. *Plant Physiol.*, 70: 1634 - 1636.
- White P.R. (1939). Potentially unlimited growth of excised callus in an artificial medium. *Am. J. Bot.*, 26: 59-64.