

ẢNH HƯỞNG CỦA MỘT SỐ TỔ HỢP NỒNG ĐỘ CHẤT ĐIỀU TIẾT SINH TRƯỞNG TỚI KHẢ NĂNG TÁI SINH IN VITRO TỪ MÔ LÁ MẦM CÀ CHUA

Đặng Thị Vân¹, Trịnh Khắc Quang¹

TÓM TẮT

Kết quả khảo sát 6 tổ hợp nồng độ khác nhau của 3 loại cytokinin, Zeatin, BAP và 2-iP phối hợp với IAA trên 3 giống cà chua FM372C, M88 và DM166 cho thấy tỉ lệ nồng độ giữa cytokinin và IAA có ảnh hưởng rõ rệt tới phát sinh hình thái từ mô lá mầm cà chua. Ở cả 3 giống cà chua, tỉ lệ phần trăm số mẫu hình thành callus ở các tổ hợp nồng độ Zeatin/IAA=4/2, 4/4, 8/5 hoặc 8/8 μM luôn cao hơn các tổ hợp có tỉ lệ nồng độ Zeatin/IAA tương ứng là 4/6 hoặc 4/8 μM . Ở ngưỡng nồng độ Zeatin/IAA = 8/5 và 8/8 μM , số lượng mẫu hình thành callus vào giai đoạn 2-3 tuần sau nuôi cấy cao hơn hẳn so với công thức có nồng độ Zeatin/IAA = 4/2 và 4/4 μM . Sau 6 tuần nuôi cấy tỉ lệ phát sinh phôi/chồi ở ngưỡng nồng độ Zeatin/IAA = 8/5 hoặc Zeatin/IAA = 8/8 cao hơn ở ngưỡng nồng độ Zeatin/IAA = 4/2 hoặc Zeatin/IAA = 4/4. Ảnh hưởng của nồng độ 2-iP và BAP tới sự hình thành callus và phát sinh phôi/chồi xảy ra không hoàn toàn giống như Zeatin. Tuy vậy, biểu hiện chung ở cả 3 loại cytokinin là nồng độ 8/5 μM luôn thể hiện ưu thế hơn các ngưỡng nồng độ còn lại. Nhìn chung, cả 3 loại cytokinin, Zeatin, BAP hoặc 2-iP phối hợp với IAA đều có thể sử dụng cho nuôi cấy mô lá mầm của 3 giống cà chua FM372C, M88 và DM166; tuy nhiên, Zeatin có hiệu quả hơn cả về khả năng hình thành callus cũng như phát sinh phôi/chồi.

Từ khóa: Cà chua, thể chai (callus), phôi/chồi, cytokinin, Zeatin, IAA.

I. BẬT VẤN ĐỀ

Cà chua (*Solanum lycopersicum*) là một trong những cây trồng quan trọng nhất trên thế giới. Hiện cà chua là đối tượng được tập trung nghiên cứu ứng dụng công nghệ sinh học vào việc cải tiến giống mà trong đó xu hướng chính hiện nay là thông qua con đường chuyển gen. Hệ thống tái sinh hiệu quả cao là điều kiện tiên quyết quyết định sự thành công của việc ứng dụng kỹ thuật chuyển gen vào các loại cây trồng. Đã có rất nhiều nghiên cứu về nuôi cấy mô cà chua được tiến hành nhưng cho tới nay quy trình tái sinh *in vitro* vẫn chưa được hoàn thiện bởi mức độ phản ứng khác nhau của các giống đối với các chất điều hòa sinh trưởng ngoại sinh (Davis và cs., 1994; Tan và cs., 1997; Moghaieb và cs., 1999; El-Bakry, 2002; Devi và cs., 2008; Jabeen và cs., 2005; Chaudhary và cs., 2007). Hầu hết các tác giả đều phải khảo sát, xác định môi trường tái sinh cho những giống được trực tiếp sử dụng làm vật liệu nghiên cứu. Có 2 nhóm chất điều tiết sinh trưởng chủ yếu gồm auxin và cytokinin được sử dụng trong nuôi cấy mô cà chua. Trong khi auxin IAA được sử dụng rất phổ biến trong nuôi cấy mô cà chua thì việc sử dụng cytokinin là rất khác nhau tùy theo từng nghiên cứu.

Dưới đây là kết quả khảo sát ảnh hưởng một số tổ hợp cytokinin, bao gồm Zeatin, 2-iP, BAP, phối hợp với auxin IAA tới khả năng hình thành callus (thể chai) và phát sinh phôi/chồi của 3 giống cà chua FM372C, M88 và DM166 là 3 giống thuộc tập đoàn cà chua của Viện Nghiên cứu Rau Quả.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Mô lá mầm của 3 giống cà chua FM372C, M88 và DM166 được sử dụng làm vật liệu nuôi cấy.

1. Chuẩn bị vật liệu

Hạt cà chua được khử trùng bằng H_2O_2 nồng độ 20% trong 6 phút, ủ hạt trong điều kiện tối ở 26-30°C cho tới khi nảy mầm rễ thì tiến hành gieo vào đĩa Petri với môi trường thạch nghiêng MSB₅ (khoảng theo Murashige Skoog, vitamin theo Gamborg). Tiếp tục đặt đĩa hạt trong điều kiện tối khoảng 16 giờ, khi hạt bắt đầu xuất hiện thân mầm thì đưa ra điều kiện phòng nuôi có quang chu kỳ 16 h chiếu sáng/8 giờ tối.

2. Các thí nghiệm

Trên nền môi trường cơ bản MSB₅+500 mg/l MES+30 g/l đường sacaroza. Tiến hành thí nghiệm với 6 công thức nồng độ khác nhau của Zeatin, 2-iP hoặc BAP phối hợp với IAA cho mỗi giống cà chua, thành phần các công thức thí nghiệm cụ thể ở bảng 1.

¹Viện Nghiên cứu Rau quả

Bảng 1: Thành phần các công thức thí nghiệm

Giống	Kí hiệu CTTN	Thí nghiệm 1 Zeatin phối hợp IAA	Thí nghiệm 2 2-iP phối hợp IAA	Thí nghiệm 3 BAP phối hợp IAA
FM372C	CT1	Zeatin 4 µM/IAA 2 µM	2-iP 4 µM/IAA 2 µM	BAP 4 µM/IAA 2 µM
	CT2	Zeatin 4 µM/IAA 4 µM	2-iP 4 µM/IAA 4 µM	BAP 4 µM/IAA 4 µM
	CT3	Zeatin 4 µM/IAA 6 µM	2-iP 4 µM/IAA 6 µM	BAP 4 µM/IAA 6 µM
	CT4	Zeatin 4 µM/IAA 8 µM	2-iP 4 µM/IAA 8 µM	BAP 4 µM/IAA 8 µM
	CT5	Zeatin 8 µM/IAA 5 µM	2-iP 8 µM/IAA 5 µM	BAP 8 µM/IAA 5 µM
	CT6	Zeatin 8 µM/IAA 8 µM	2-iP 8 µM/IAA 8 µM	BAP 8 µM/IAA 8 µM
M88	CT1	Zeatin 4 µM/IAA 2 µM	2-iP 4 µM/IAA 2 µM	BAP 4 µM/IAA 2 µM
	CT2	Zeatin 4 µM/IAA 4 µM	2-iP 4 µM/IAA 4 µM	BAP 4 µM/IAA 4 µM
	CT3	Zeatin 4 µM/IAA 6 µM	2-iP 4 µM/IAA 6 µM	BAP 4 µM/IAA 6 µM
	CT4	Zeatin 4 µM/IAA 8 µM	2-iP 4 µM/IAA 8 µM	BAP 4 µM/IAA 8 µM
	CT5	Zeatin 8 µM/IAA 5 µM	2-iP 8 µM/IAA 5 µM	BAP 8 µM/IAA 5 µM
	CT6	Zeatin 8 µM/IAA 8 µM	2-iP 8 µM/IAA 8 µM	BAP 8 µM/IAA 8 µM
DM166	CT1	Zeatin 4 µM/IAA 2 µM	2-iP 4 µM/IAA 2 µM	BAP 4 µM/IAA 2 µM
	CT2	Zeatin 4 µM/IAA 4 µM	2-iP 4 µM/IAA 4 µM	BAP 4 µM/IAA 4 µM
	CT3	Zeatin 4 µM/IAA 6 µM	2-iP 4 µM/IAA 6 µM	BAP 4 µM/IAA 6 µM
	CT4	Zeatin 4 µM/IAA 8 µM	2-iP 4 µM/IAA 8 µM	BAP 4 µM/IAA 8 µM
	CT5	Zeatin 8 µM/IAA 5 µM	2-iP 8 µM/IAA 5 µM	BAP 8 µM/IAA 5 µM
	CT6	Zeatin 8 µM/IAA 8 µM	2-iP 8 µM/IAA 8 µM	BAP 8 µM/IAA 8 µM

Ghi chú: 1 µM Zeatin=0,219 ppm; 1 µM BAP=0,225 ppm; 1 µM 2-iP=0,203 ppm; 1 µM IAA=0,175 ppm

3. Cách thức tiến hành

Tiến hành theo phương pháp nuôi cấy mô thông thường, lá mầm của cây gieo hạt được 10-12 ngày tuổi được cắt thành từng đoạn có chiều dài 0,5-0,7 cm. Cây 14-16 mẫu lá trên một đĩa petri. Mỗi công thức thí nghiệm được nhắc lại 3 lần với 30 mẫu lá/lần nhắc. Các thí nghiệm được bố trí theo kiểu khối ngẫu nhiên hoàn chỉnh trong điều kiện 16 giờ sáng/8 giờ tối, 26°C ± 1. Việc cấy chuyển được tiến hành định kỳ 2 tuần/lần.

4. Phương pháp xử lý thống kê

Kết quả thí nghiệm được xử lý theo phần mềm MSTAT-C. Phương pháp phân tích phương sai (ANOVA) một nhân tố và phép kiểm định Duncan được sử dụng để đánh giá sự sai khác giữa các công thức thí nghiệm của từng loại cytokinin trên từng giống. Sau đó công thức tốt nhất của mỗi loại cytokinin được lựa chọn để so sánh sự khác biệt ảnh hưởng giữa các cytokinin trong từng giống.

III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

1. Kết quả nghiên cứu

Kết quả thí nghiệm ảnh hưởng của tổ hợp nồng độ Zeatin và IAA tới khả năng tái sinh in vitro của mô lá mầm 3 giống cà chua FM372C, M88 và DM166 được trình bày ở bảng 2.

Xét về ảnh hưởng của 6 tổ hợp nồng độ Zeatin phối hợp IAA tới sự hình thành callus từ mô lá mầm của các giống (Bảng 2) cho thấy mô lá mầm của cả 3 giống có khả năng hình thành callus ở tất cả các ngưỡng nồng độ thí nghiệm của Zeatin phối hợp với IAA. Sau 6 tuần nuôi cấy trong môi trường có bổ sung nồng độ 4-8 µM Zeatin phối hợp với 2-8 µM IAA đạt tỉ lệ mẫu hình thành callus dao động từ 72-100%.

Tỉ lệ nồng độ Zeatin/IAA có ảnh hưởng rõ rệt tới quá trình hình thành callus. Khi tỉ lệ này ≥ 1 thì khối mô hình thành callus sớm hơn và tập trung hơn so với khi tỉ lệ Zeatin/IAA < 1 , sự khác biệt này là có ý nghĩa thống kê ở mức $P \leq 0,05$ ở tất cả các thời điểm 2, 3, 4, 6 tuần sau nuôi cấy. Sau 2 tuần tỉ lệ mẫu hình thành callus ở công thức 1, 2, 5, 6 dao động từ 18-51% trong khi ở công thức 3,4 chỉ ở mức 2-7%. Sau 4 tuần thì tỉ lệ mẫu hình thành callus ở các công thức 3, 4 của cả 3 thí nghiệm mới chỉ đạt từ 72-85%, trong khi đó ở các công thức 1, 2, 5, 6 đã đạt 98-100%. Trong

trường hợp tỉ lệ Zeatin/IAA \geq 1, ở thời điểm 4 và 6 tuần sau cấy hoàn toàn không có sự khác biệt giữa các công thức. Tuy nhiên, vào thời kỳ 2-3 tuần sau nuôi cấy tỉ lệ mẫu hình thành callus có xu hướng phân thành 2 nhóm phụ thuộc vào nồng độ chất điều tiết sinh trưởng. Ở các công thức CT1 và CT2, 4 μ M

Zeatin phối hợp 2 hoặc 4 μ M IAA, tỉ lệ mẫu hình thành callus thấp hơn hẳn ở mức P \leq 0,05 so với CT5 và CT6 với 8 μ M Zeatin phối hợp 5 hoặc 8 μ M IAA (28-28% vào 2 tuần, 55-63% vào 3 tuần ở CT1 và CT2 so với 31-51% vào 2 tuần, 100% vào 3 tuần ở CT5 và CT6).

Bảng 2: Ảnh hưởng của tổ hợp nồng độ Zeatin và IAA tới sự hình thành callus và chồi của các giống

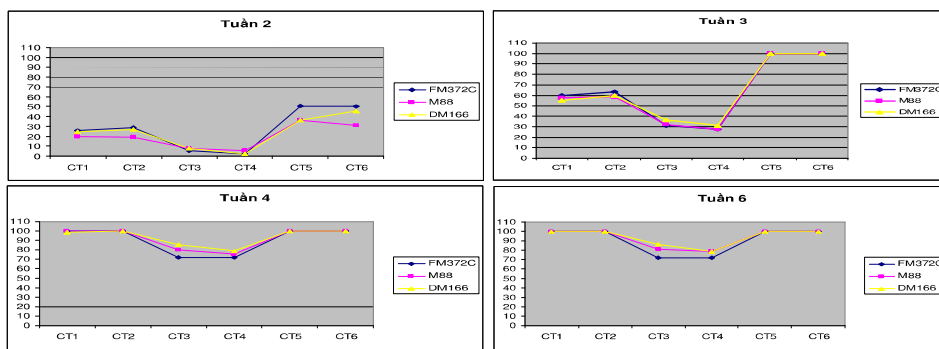
Giống/Công thức thí nghiệm	Tỉ lệ mẫu hình thành callus ở tuần sau cấy (%)				Tỉ lệ mẫu phát sinh phôi/chồi ở tuần sau cấy (%)	
	2 tuần	3 tuần	4 tuần	6 tuần	4 tuần	6 tuần
<i>FM372C</i>						
CT1: Zeatin 4 μ M/IAA 2 μ M	25,56b	60,00b	100,00a	100,00a	32,22	46,66b
CT2: Zeatin 4 μ M/IAA 4 μ M	28,88b	63,33b	100,00a	100,00a	13,33	32,22c
CT3: Zeatin 4 μ M/IAA 6 μ M	5,56c	31,11c	72,22b	72,22b	0	0d
CT4: Zeatin 4 μ M/IAA 8 μ M	2,22c	27,78c	72,22b	72,22b	0	0d
CT5: Zeatin 8 μ M/IAA 5 μ M	51,11a	100,00a	100,00a	100,00a	75,56	100,00a
CT6: Zeatin 8 μ M/IAA 8 μ M	50,00a	100,00a	100,00a	100,00a	18,88	36,66bc
<i>M88</i>						
CT1: Zeatin 4 μ M/IAA 2 μ M	20,00b	57,78b	100,00a	100,00a	23,33	45,56b
CT2: Zeatin 4 μ M/IAA 4 μ M	18,89b	58,89b	100,00a	100,00a	5,56	32,22c
CT3: Zeatin 4 μ M/IAA 6 μ M	7,78c	32,22c	80,00b	81,11b	0	0d
CT4: Zeatin 4 μ M/IAA 8 μ M	5,56c	27,78c	75,56b	78,88b	0	0d
CT5: Zeatin 8 μ M/IAA 5 μ M	36,66a	100,00a	100,00a	100,00a	68,88	100,00a
CT6: Zeatin 8 μ M/IAA 8 μ M	31,11a	100,00a	100,00a	100,00a	15,56	38,88bc
<i>DM166</i>						
CT1: Zeatin 4 μ M/IAA 2 μ M	24,44b	55,56b	98,89a	100,00a	24,44	48,88b
CT2: Zeatin 4 μ M/IAA 4 μ M	26,66b	60,00b	100,00a	100,00a	5,56	26,66c
CT3: Zeatin 4 μ M/IAA 6 μ M	7,78c	36,66c	85,56b	86,66b	0	0d
CT4: Zeatin 4 μ M/IAA 8 μ M	2,22c	31,11c	78,88b	78,88b	0	0d
CT5: Zeatin 8 μ M/IAA 5 μ M	36,66a	100,00a	100,00a	100,00a	67,78	100,00a
CT6: Zeatin 8 μ M/IAA 8 μ M	45,56a	100,00a	100,00a	100,00a	13,33	32,22c

Kết quả ở bảng 2 cho thấy tỉ lệ Zeatin/IAA không chỉ ảnh hưởng tới sự hình thành callus mà còn ảnh hưởng rõ rệt tới khả năng phát sinh phôi/chồi từ mô lá mầm của 3 giống thí nghiệm. Ở CT3, CT4 (Zeatin/IAA $<$ 1) khối mô không có khả năng phát sinh hình thành chồi sau 6 tuần nuôi cấy, trong khi ở các công thức còn lại tỉ lệ mẫu phát sinh phôi/chồi dao động từ 32-100%. Các công thức CT2, CT6 (tỉ lệ Zeatin/IAA=1) có tỉ lệ mẫu phát sinh phôi/chồi thấp hơn ở công thức CT1 và CT5 (tỉ lệ Zeatin/IAA $>$ 1), trong đó, CT5 với nồng độ 8 μ M của Zeatin phối hợp với 5 μ M IAA luôn có tỉ lệ mẫu phát sinh phôi/chồi

cao hơn hẳn so với tất cả 5 công thức còn lại ở mức P \leq 0,05.

Kết quả thí nghiệm ảnh hưởng của tổ hợp nồng độ Zeatin và IAA tới khả năng hình thành callus của mô lá mầm của 3 giống cà chua có thể biểu diễn tóm tắt trong biểu đồ ở hình 1.

Ở hình 1 dễ dàng nhận thấy quy luật diễn tiến kết quả của 3 giống thí nghiệm tương đối giống nhau. Từ số liệu ở bảng 2 và hình 1 cho thấy trong 6 công thức thí nghiệm thì CT5, có nồng độ 8 μ M của Zeatin phối hợp với 5 μ M IAA là tốt nhất cho nuôi cấy mô lá mầm của cả 3 giống cà chua.



Hình 1: Biểu đồ diễn biến giá trị tỉ lệ hình thành callus của mô lá mầm cà chua trong môi trường chứa các tổ hợp nồng độ Zeatin/IAA khác nhau. Trong đó (1a): 2 tuần sau nuôi cấy; (1b): 3 tuần sau nuôi cấy; (1c): 4 tuần sau nuôi cấy; (1d): 6 tuần sau nuôi cấy.

Kết quả thí nghiệm ảnh hưởng của tổ hợp nồng độ 2-iP và BAP phối hợp với IAA tới khả năng tái sinh *in vitro* của mô lá mầm 3 giống cà chua FM372C, M88 và DM166 được trình bày ở bảng 3 và bảng 4.

Bảng 3: Ảnh hưởng của các tổ hợp nồng độ 2-iP, BAP phối hợp IAA tới sự hình thành callus của các giống FM372C, M88 và DM166

Giống/Công thức thí nghiệm	Tỉ lệ (%) mẫu hình thành callus của tổ hợp 2-iP+IAA				Tỉ lệ (%) mẫu hình thành callus của tổ hợp BAP+IAA			
	2 tuần	3 tuần	4 tuần	6 tuần	2 tuần	3 tuần	4 tuần	6 tuần
<i>FM372C</i>								
CT 1	15,56b	46,66b	75,56ab	100,00a	21,11b	50,00ab	77,77ab	100,00a
CT 2	18,89b	42,22b	70,00b	86,66b	20,00b	46,66b	72,22b	100,00a
CT 3	1,11c	18,88c	46,66c	50,00c	0c	20,00c	48,88c	64,44b
CT 4	0c	18,88c	40,00c	45,56c	0c	17,78c	40,00c	55,56b
CT 5	41,11a	58,89a	80,00a	100,00a	43,33a	54,44ab	85,55a	100,00a
CT 6	41,11a	58,89a	71,11b	95,56a	42,22a	58,89a	76,66ab	100,00a
<i>M88</i>								
CT 1	13,33b	25,56b	43,33c	72,22b	23,33b	48,88ab	75,56ab	100,00a
CT 2	15,55b	26,66b	37,78c	66,66b	22,22b	44,44b	66,66b	100,00a
CT 3	1,11c	13,33c	23,33d	28,88c	0c	21,11c	42,22c	58,88b
CT 4	0c	7,78c	15,56d	16,66d	0c	17,78c	35,56d	52,22b
CT 5	33,33a	47,78a	71,11a	95,56a	42,22a	54,44ab	85,56a	100,00a
CT 6	34,44a	44,44a	62,22b	88,88a	36,66a	58,88a	72,22ab	100,00a
<i>DM166</i>								
CT 1	11,11b	43,33b	68,88b	100,00a	18,89b	47,78ab	75,56ab	100,00a
CT 2	14,44b	44,44b	72,22ab	84,44b	21,11b	44,44b	70,00b	100,00a
CT 3	0c	22,22c	43,33c	52,22c	0c	21,11c	46,66c	61,11b
CT 4	1,11c	17,77c	38,88c	41,11c	0c	17,78c	40,00c	57,77b
CT 5	40,00a	58,88a	80,00a	100,00a	42,22a	54,44ab	83,33a	100,00a
CT 6	36,66a	55,56a	72,22ab	87,77b	42,22a	58,88a	73,33ab	97,77a

Kết quả ở bảng 3 cho thấy: mô lá mầm của 3 giống cà chua thí nghiệm có khả năng hình thành callus ở tất cả các ngưỡng nồng độ 2-iP hoặc BAP

phối hợp với IAA. Sau 6 tuần nuôi cấy trong môi trường có 4-8 μM 2-iP phối hợp với 2-8 μM IAA mô lá mầm của 3 giống có tỉ lệ mẫu hình thành callus dao

động từ 16-100% và 52-100% trong môi trường có 4-8 μM BAP phối hợp với 2-8 μM IAA.

Tương tự như thí nghiệm phối hợp giữa Zeatin và IAA, các công thức 1, 2, 5, 6 thể hiện ưu thế hơn ở công thức 3 và 4. Số mẫu hình thành callus ở CT3 và 4 luôn ít hơn ở công thức 1, 2, 5, 6 thể hiện ở tỉ lệ phần trăm mẫu hình thành callus của công thức 3 và 4 luôn nhỏ hơn tỉ lệ phần trăm mẫu hình thành callus của công thức 1, 2, 5, 6 ở cả 2 thí nghiệm của 3 giống cà chua. Ở thời điểm 2 và 3 tuần sau cấy quy luật diễn biến tác động của các tổ hợp nồng độ 2-iP tới sự hình thành callus khá giống với Zeatin (CT5, CT6>CT1, CT2>CT3, CT4). Ở 4 và 6 tuần sau cấy, tỉ lệ mẫu hình thành callus ở tổ hợp 2-iP/IAA được phân thành nhiều mức khác nhau. Với BAP, quy luật trên chỉ đúng ở giai đoạn 2 tuần sau nuôi cấy. Từ 3-6 tuần sau nuôi cấy thì tỉ lệ mẫu nuôi cấy hình thành callus được chia thành 3 mức trở lên. Tuy vậy, điểm tương đồng nhất giữa 3 loại cytokinin là cặp nồng độ 8/5 của cytokinin/IAA luôn nằm trong nhóm có hiệu quả nhất.

Ảnh hưởng của nồng độ các chất điều tiết sinh trưởng tới sự phát sinh phôi/chồi *in vitro* từ mô lá mầm của các giống FM372C, M88 và DM166 (bảng 4) cũng tuân theo quy luật tương tự như giống khi sử dụng Zeatin phối hợp IAA. Ở công thức 3, 4 (tỉ lệ cytokinin/IAA <1) hoàn toàn không có hiện tượng phát sinh phôi/chồi sau 6 tuần nuôi cấy ở cả 2 thí nghiệm. Trong cùng 1 loại cytokinin thì ở nồng độ 8 μM cytokinin phối hợp 5 μM hoặc 4 μM cytokinin phối hợp 2 μM IAA (CT5, CT1) luôn cho tỉ lệ phát sinh phôi/chồi cao hơn ở CT2, CT6, là 2 công thức có nồng độ cytokinin và IAA bằng nhau. Sự sai khác này có ý nghĩa thống kê ở mức $P \leq 0,05$. So sánh tỉ lệ phát sinh phôi/chồi giữa CT1 (cặp nồng độ 4/2) và CT5 (cặp nồng độ 8/5) cho thấy ở CT5 (54-60%) cao hơn hẳn ở CT1 (32-37%) ở mức $P \leq 0,05$. Tuy nhiên, giữa tổ hợp 2-iP/IAA và tổ hợp BAP/IAA có sự khác biệt nhỏ trên các giống. Với tổ hợp 2-iP/IAA, giống FM372C và DM166 có quy luật CT5>CT1, CT6>CT2>CT3, CT4; ở giống M88 xảy ra theo xu hướng CT5>CT1, CT6>CT2, CT3, CT4. Ở tổ hợp BAP/IAA, cả 3 giống đều biểu hiện theo xu hướng CT5>CT1, CT6>CT2>CT3, CT4. Kết hợp bảng 3 và bảng 4 cũng cho thấy 2-iP hoặc BAP ở nồng độ 8 μM phối hợp 5 μM IAA lại thể hiện ưu thế hơn hẳn ở tất cả các trường hợp còn lại.

Bảng 4: Ảnh hưởng của các tổ hợp nồng độ 2-iP, BAP phối hợp IAA tới sự phát sinh phôi/chồi của các giống FM372C, M88 và DM166

Giống/Công thức thí nghiệm	Tỉ lệ mẫu phát sinh phôi/chồi ở tuần sau cấy (%) của các tổ hợp			
	2-iP+IAA		BAP+IAA	
	4 tuần	6 tuần	4 tuần	6 tuần
<i>FM372C</i>				
CT 1	12,22	26,66b	16,66	37,78b
CT 2	4,44	6,66c	3,33	8,88c
CT 3	0	0d	0	0e
CT 4	0	0d	0	0e
CT 5	22,22	46,66a	31,11	60,00a
CT 6	14,44	21,11b	13,33	25,56b
<i>M88</i>				
CT 1	0	11,11b	22,22	35,56b
CT 2	0	0c	7,78	15,56c
CT 3	0	0c	0	0d
CT 4	0	0c	0	0d
CT 5	20,00	25,56a	35,56	62,22a
CT 6	5,56	13,33b	21,11	30,00b
<i>DM166</i>				
CT 1	10,00	24,44b	17,78	32,22b
CT 2	2,22	7,78c	4,44	7,78c
CT 3	0	0d	0	0d
CT 4	0	0d	0	0d
CT 5	21,11	37,77a	28,88	54,44a
CT 6	15,56	24,44b	16,66	25,55b

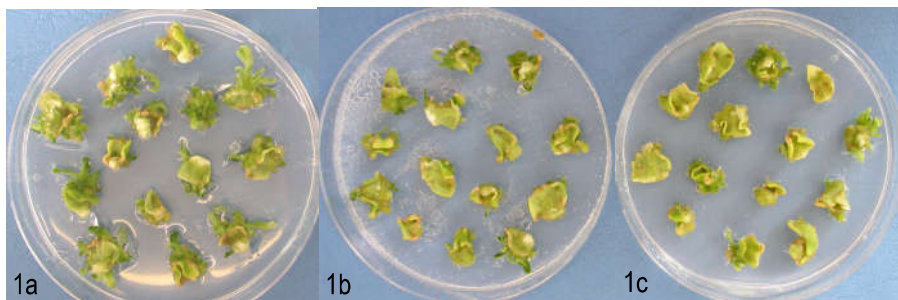
Như vậy có thể thấy rằng mô lá mầm của cả 3 giống có phản ứng tốt với 3 loại cytokinin là Zeatin: 2-iP và BAP. Đặc biệt, qua kết quả 3 thí nghiệm (bảng 2, 3, 4) có thể thấy ở cả 3 trường hợp, Zeatin, 2-iP, BAP phối hợp với IAA, thì tổ hợp có nồng độ cytokinin/IAA=8/5 luôn tốt nhất. Nhằm đánh giá xem có sự khác nhau về hiệu quả của 3 loại cytokinin đã chọn tổ hợp có ngưỡng nồng độ 8/5 này để so sánh (bảng 5).

Bảng 5 cho thấy: Tuy ở giai đoạn 2 tuần sau nuôi cấy tỉ lệ mẫu hình thành callus của 3 tổ hợp là không có sự sai khác rõ rệt, nhưng vào giai đoạn 3-4 tuần sau cấy tổ hợp Zeatin/IAA ở ngưỡng có ưu thế hơn hẳn 2 tổ hợp 2-iP/IAA và BAP/IAA ở mức $P \leq 0,05$. Tổ hợp Zeatin 8 μM /IAA 5 μM đạt 100% mẫu hình thành callus chỉ sau 3 tuần nuôi cấy; sau 6 tuần nuôi cấy ở tổ hợp này cũng đạt 100% số mẫu phát sinh phôi/chồi ở cả 3 giống, trong khi đó tổ hợp BAP 8 μM /IAA 5 μM và 2-iP 8 μM /IAA 5 μM sau 6

tuần nuôi cấy mới đạt 100% mẫu hình thành callus, 50-62% (tổ hợp BAP/IAA) và 25-46% (tổ hợp 2-đồng thời tỉ lệ mẫu phát sinh phôi/chồi lần lượt là từ iP/IAA). Điều này có thể quan sát thấy ở ảnh 1.

Bảng 5: Tỉ lệ mẫu hình thành callus và phát sinh phôi/chồi ở các tổ hợp Zeatin 8 µM/IAA 5 µM, 2-iP 8 µM/IAA 5 µM và BAP 8 µM/IAA 5 µM của 3 giống cà chua

Giống/Công thức thí nghiệm	Tỉ lệ mẫu hình thành callus ở tuần sau cấy (%)				Tỉ lệ mẫu phát sinh phôi/chồi ở tuần sau cấy (%)	
	2 tuần	3 tuần	4 tuần	6 tuần	4 tuần	6 tuần
<i>FM372C</i>						
Zeatin 8 µM/IAA 5 µM	51,11	100,00a	100,00a	100,00	75,56	100,00a
2-iP 8 µM/IAA 5 µM	41,11	58,89b	80,00b	100,00	22,22	46,66c
BAP 8 µM/IAA 5 µM	43,33	54,44b	85,55b	100,00	31,11	60,00b
<i>M88</i>						
Zeatin 8 µM/IAA 5 µM	36,66	100,00a	100,00a	100,00	68,88	100,00a
2-iP 8 µM/IAA 5 µM	33,33	47,78b	71,11c	95,56	20,00	25,56c
BAP 8 µM/IAA 5 µM	42,22	54,44b	85,56b	100,00	35,56	62,22b
<i>DM166</i>						
Zeatin 8 µM/IAA 5 µM	36,66	100,00a	100,00a	100,00	67,78	100,00a
2-iP 8 µM/IAA 5 µM	40,00	58,88b	80,00b	100,00	21,11	37,77c
BAP 8 µM/IAA 5 µM	42,22	54,44b	83,33b	100,00	28,88	54,44b



Ảnh 1: Mô lá mầm của giống FM372C sau 6 tuần nuôi cấy ở các môi trường bổ sung các tổ hợp cytokinin/IAA khác nhau. (1a): 8 µM Zeatin/5 µM IAA; (1b): 8 µM 2-iP/5 µM IAA; (1c): 8 µM BAP/5 µM IAA

2. Thảo luận

Nuôi cấy mô cà chua đã được nghiên cứu phổ biến từ lâu nhưng cho tới nay chưa có quy trình chuẩn nào được công bố do khả năng tái sinh của mô cà chua trong nuôi cấy *in vitro* phụ thuộc nhiều vào kiểu gen (Frankenberger và cs., 1981; Davis và cs., 1994; Tan và cs, 1997; Moghaieb và cs., 1999; El-Bakry, 2002; Devi và cs., 2008; Jabeen và cs., 2005). Bởi vậy, trong nghiên cứu luôn phải xác định môi trường tái sinh cây cụ thể cho nhóm giống hoặc thậm chí cho từng giống làm vật liệu. Ở nghiên cứu này dường như kiểu gen không ảnh hưởng nhiều; 3 giống thí nghiệm FM372C, M88 và DM166 có phản ứng tương tự nhau với các chất điều tiết sinh trưởng

đều có biểu hiện dễ tái sinh trong nuôi cấy mô, có phản ứng tốt với cả 3 loại cytokinin (Zeatin, BAP và 2-iP) phối hợp với IAA, đồng thời chỉ sau 6 tuần đã có tỉ lệ phát sinh phôi/chồi từ 46-100% tùy thuộc vào loại cytokinin được sử dụng.

Việc sử dụng loại chất điều tiết sinh trưởng (auxin và cytokinin) rất khác nhau tùy theo từng tác giả. Trong các loại auxin thì IAA được sử dụng rất phổ biến trong nuôi cấy mô cà chua. Bốn loại cytokinin chính thường được sử dụng trong nuôi cấy mô cà chua, bao gồm: Zeatin, BAP, kinetin và 2-iP Zeatin.

Nghiên cứu này cho thấy cả 3 loại cytokinin: Zeatin, 2-iP, BAP phối hợp IAA đều có hiệu quả cho

sự hình thành callus cũng như phát sinh phôi/chồi của 3 giống cà chua FM372C, M88 và DM166. Trong 3 loại cytokinin thì Zeatin>BAP>2-iP về cả hiệu quả tạo callus cũng như khả năng phát sinh phôi/chồi. Khác với kết quả này, nghiên cứu của Ishag và cs. (2009) lại cho thấy 2-iP dường như có hiệu quả hơn BAP. Trong nghiên cứu của Ishag, khi ở cùng nồng độ (từ 0,1-5,0 ppm) thì trong môi trường 2-iP có 90-100% mẫu nuôi cấy tạo callus hoặc phát sinh chồi, trong khi đó ở môi trường BAP tỉ lệ này dao động từ 77-85%. Điều này không ngạc nhiên bởi 2 nghiên cứu sử dụng các giống cà chua khác nhau.

Nồng độ của chất điều tiết sinh trưởng được sử dụng trong các nghiên cứu cũng rất khác nhau.

Chaudhry và cộng sự (2010) lại tìm thấy nồng độ 2,0 ppm BAP phối hợp 0,5 ppm NAA cho tỉ lệ tạo callus tốt nhất cho mô lá cà chua, sau đó callus được chuyển sang môi trường tạo chồi tốt nhất là 4 ppm BAP phối hợp 0,5 ppm IAA. Jabeen và cs. (2005) sử dụng 1 ppm Zeatin và 0,1 ppm IAA và các tác giả này thông báo không thể đạt được tỉ lệ 100% mẫu phát sinh chồi. Nghiên cứu này lại cho kết quả như sau: tổ hợp nồng độ 8 µM Zeatin/5 µM IAA (tương đương 1,75 ppm Zeatin/0,87 ppm IAA) là tổ hợp có hiệu quả nhất. Như vậy tổ hợp các cytokinin/auxin được sử dụng trong nuôi cấy mô cà chua là hết sức phong phú, có sự biến động lớn về nồng độ sử dụng tùy thuộc vào kiểu gen, loại mô nuôi cấy, tùy thuộc vào loại auxin, cytokin và tổ hợp giữa chúng.

IV. KẾT LUẬN

1. Cả 3 loại cytokinin, Zeatin: BAP và 2-iP đều có hiệu quả cho nuôi cấy mô lá mầm của 3 giống cà chua FM372C, M88 và DM166.

2. Tỉ lệ nồng độ giữa cytokinin/IAA có ảnh hưởng tới khả năng hình thành callus và phát sinh phôi chồi. Với 2 ngưỡng nồng độ (4 và 8 µM) của cytokinin phối hợp với 4 ngưỡng nồng độ IAA (bao gồm 2, 4, 6 và 8 µM) thì hiệu quả tác dụng tới sự hình thành callus và phát sinh phôi/chồi theo xu hướng “cytokinin/IAA>1”>>“cytokinin/IAA=1”>>“cytokinin/IAA<1” trên 3 giống thí nghiệm.

3. Trong 6 công thức thí nghiệm thì công thức có nồng độ 8 µM của cytokinin/5 µM IAA luôn thể hiện ưu thế hơn hẳn các công thức còn lại (4/2, 4/4, 4/6, 4/8 và 8/8 µM tương ứng của cytokinin/IAA) về cả khả năng phát sinh callus và phát sinh phôi/chồi từ mô lá mầm của cả 3 giống cà chua thí nghiệm. Đặc

biệt, Zeatin/IAA ở nồng độ 8/5 µM có hiệu quả tốt hơn hẳn BAP hoặc 2-iP. Do đó, việc sử dụng một loại môi trường tái sinh chung cho cả 3 giống FM372C, M88 và DM166 là hoàn toàn có thể.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chaudhary Z., Afroz A. and Rashid H., 2007. Effect of variety and plant growth regulators on callus proliferation and regeneration response of three tomato cultivars (*Lycopersicon esculentum*). *Pak. J. Bot.* 39(3): 857-869.
2. Chaudhry Z., Abbas S., Yasmin A., Rashid H., Ahmed H. and Anjum M. A., 2010. Tissue culture study on tomato (*Lycopersicon esculentum*) var. Money Marker. *Pak. J. Bot.* 42(1): 155-163.
3. Costa G. M., Nogueira F. T. S., Otoni W. C. and Bromonschenkel S. H., 2000. *In vitro* regeneration of processing tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) 'IPA-5' and 'IPA-6'. *Cienciae Agrotecnologia* 24: 671-678.
4. Devi M., Dhaliwal M. S., Kaur A., and Gosal S. S., 2008. Effect of growth regulators on *in vitro* morphogenetic response of tomato. *Indian J. Biotech.*, 7:526- 530.
5. El-Bakry A., 2002. Effect of genotype, growth regulators, carbon source, and pH on shoot induction and plant regeneration in tomato. *In vitro Cellular Dev. Biol. Plant* 38: 501-507.
6. Frankenberger E. A., Hasegawa P. M. and Tigchelaar E. C., 1981. Influence of environment and developmental state on the shoot forming capacity of tomato genotypes. *Pflanzenphysiol* 102: 221-232.
7. Gamborg O. L., Miller R. A., Ojima K., 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp. Cell Res.* 50: 151-158.
8. Gubis J., Lajchova Z., Farago J. and Jurekova Z., 2003. Effect of genotype and explant type on shoot regeneration in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) *in vitro*. *Czech J. Genet. Plant Breed.* 39: 9-14.
9. Hamza S. and Chupeau Y., 1993. Re-evaluation of conditions for plant regeneration and Agrobacterium-mediated transformation from tomato (*Lycopersicon esculentum*). *J. Exp. Bot.* 44: 1837-1845.
10. Ichimura K. and Oda M., 1995. Stimulation of shoot regeneration from cotyledon segments of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) by agar and its extract. *J. Japan Soc. Hortic. Sci.* 64: 135-141.

Formatted: Bullets and Numbering

11. Ishag S., Osman M. and Khalafalla M., 2009. Effect of regulators, explant and genotype on shoot egeneration in tomato (*Lycopersicon esculentum* c.v. *Ondurman*). *Int. J. Sustain. Crop Prod.* 4(6):7-13.
12. Jabeen N., Chaudhry Z., Rashid H. and Mirza B., 2005. Effect of genotype and explant type on *in vitro* shoot regeneration of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Pak. J. Bot.* 37(4): 899-903.
13. Mohamed A. N., Ismail M. R. and Mohamed H. R., 2010. *In vitro* response from cotyledon and hypocotyls explants in tomato by inducing 6-benzylaminopurine. *Afri. J. of Biotech.* 9(30): 4802-4807.
14. Murashige T., Skoog F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15: 473-497.
15. Plastira V. A. and Perdikaris A. K., 1997. Effect of genotype and explant type in regeneration frequency of tomato *in vitro*. *Acta Horti.* 231-234.
16. Ramiah M. and Rajappan K. (1996). Direct shoot regeneration from excised cotyledonary leaf of tomato. *South Indian Hort.* 44: 101-102.
17. Sheeja T. E., Mondal A. B. and Rathore R. K. S., 2004. Efficient plantlet regeneration in Tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Plant Tissue Cult.* 14(1): 45-53.
18. Tan M. M. C., Colijn-Hooymans C. M., Lindhout W. H. and Kool A. J., 1987. A comparison of shoot regeneration from protoplasts and leaf discs of different genotypes of the cultivated tomato. *Theor. Appl Genet.* 75:105-108.
19. Ye Z. B., Li H. X. and Zhou G. L., 1994. *In vitro* culture of tomato cotyledons and regenerated plants. *J. Huazhong Agric. Uni.* 13: 291-295.

EFFECT OF CONCENTRATION FROM DIFFERENT PHYTOHORMON COMBINATIONS IN TOMATO COTYLEDON CULTURE

Dang Thi Van, Trinh Khac Quang

Summary

A total of 6 different combinations between Zeatin, BAP or 2-iP and IAA were used to test their effect on callus formation and embryogenesis/shoot regeneration from cotyledons of three tomato cultivars FM372C, M88 and DM166. The ratio level of cytokinin/IAA showed significant differences in callused explants and embryogenesis/shoot regeneration. In all three cultivars, percentages of callus formation and embryo/shoot regeneration from the four combinations of Zeatin/IAA = 4/2, 4/4, 8/5 or 8/8 μM were significant higher than that from the two combinations Zeatin/IAA = 4/6, 4/8 μM . After 2-3 weeks of culture, the percentages of callused explants from the two combinations Zeatin/IAA = 8/5 and 8/8 μM were significant higher than that of the combinations Zeatin/IAA = 4/2 and 4/4 μM . After 6 weeks of culture, the percentages of embryogenesis/shoot regeneration explants from the combination Zeatin/IAA = 8/5 μM was higher than that from the combination Zeatin/IAA = 4/2 and similar was happened between the concentration 8/8 μM and 4/4 μM . Although it was not happened the same when 2-iP and BAP were used. Nevertheless, in similar with the case of Zeatin, the concentration at 8/5 μM showed the best result in both BAP/IAA and 2-iP/IAA combinations. Generally, Zeatin, BAP or 2-iP could be used, however, Zeatin presented more effective than BAP as well as 2-iP and the combination Zeatin/IAA=8/5 μM seems to be the best for *in vitro* culture of cotyledons of three experimented tomato cultivars.

Key words: *Tomato, callus, cytokinin, Zeatin, IAA, embryogenesis, shoot regeneration.*

Người phản biện: PGS.TS. Lê Huy Hàm

Ngày nhận bài: 10/2/2012

Ngày thông qua phản biện: 13/3/2012

Ngày duyệt đăng: 3/4/2012

ĐÁNH GIÁ KHẢ NĂNG KẾT HỢP VÀ TUYỂN CHỌN TỔ HỢP LAI DƯA LEO TRIỂN VỌNG CHO SẢN XUẤT Ở PHÍA NAM

Trần Kim Cương¹, Huỳnh Vũ Sơn¹

TÓM TẮT

Việc chọn tạo giống F1 trên cây dưa leo đã được Viện Cây ăn quả miền Nam thực hiện từ nhiều năm nay. Tập đoàn gồm 90 mẫu giống dưa leo đã được khảo sát kiểu hình và phân nhóm theo nguồn gốc, số lượng quả và khối lượng quả; đồng thời kết hợp với việc đánh giá khả năng kết hợp chung bằng phương pháp lai đỉnh đã chọn ra 11 dòng bố mẹ ưu tú cho lai luân giao thu được hạt của 110 THL. Các thí nghiệm so sánh các THL này được thực hiện vào các vụ: thu đông 2009 (110 THL), xuân 2010 (25 THL), hè và thu đông 2010 (5 THL). Kết quả đã tuyển chọn được THL31 có nhiều triển vọng: cho thu hoạch quả sớm, phân nhánh trung bình, hoa cái nhiều và tập trung trên thân chính, quả dạng thon dài, quả dài trung bình 16 cm, đường kính 3,8 cm, củi quả dày 0,9 – 1,0 cm, thịt quả giòn ngọt, nền vỏ quả màu xanh lá màu được thị trường ưa chuộng hiện nay. Đây là tổ hợp lai dưa leo có nhiều triển vọng cho sản xuất dưa leo hàng hóa ở các tỉnh phía Nam.

Từ khóa: Chọn tạo, dưa leo lai, lai đỉnh, khả năng kết hợp, tuyển chọn tổ hợp lai triển vọng.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Theo số liệu thống kê, hàng năm có khoảng 30 ngàn ha dưa leo được gieo trồng ở nước ta, với năng suất biến động từ 148,1 đến 180,8 tạ/ha. Diện tích trồng dưa leo ở miền Nam chiếm khoảng 2/3 tổng diện tích dưa leo của cả nước. Hầu hết diện tích trồng dưa leo ở miền Nam đều sử dụng hạt giống F1, riêng giống thuần có nguồn gốc Việt Nam chỉ có các giống như dưa leo Bà Cai, dưa leo xanh, dưa leo Phụng Tường, dưa chuột (Nguyễn Thị Ba *et al.*, 1999) được trồng quảng canh với diện tích rất nhỏ. Có rất nhiều giống dưa leo F1 trên thị trường miền Nam hiện nay và được trồng theo khu vực, phần lớn có nguồn gốc nhập nội. Việc thực hiện chương trình chọn tạo giống dưa leo trong nước hiện nay rất cần thiết và nhiều đơn vị đã tiến hành, trong đó có Viện Cây ăn quả miền Nam. Viện đã thu thập và phân lập được nhiều giống/dòng dưa leo, bắt đầu nghiên cứu đến khả năng kết hợp của tập đoàn mẫu giống này nhằm chọn lọc những dòng bố mẹ ưu tú tham gia vào các tổ hợp lai để tạo những tổ hợp có ưu thế lai cao, từ đó tuyển chọn tổ hợp lai có triển vọng phát triển thành giống phục vụ sản xuất. Dưới đây là kết quả của quá trình chọn giống này.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Vật liệu

Vật liệu bao gồm 90 mẫu giống dưa leo thu thập và phân lập được từ nhiều năm nghiên cứu của Viện Cây ăn quả miền Nam; giống dưa leo Phụng Tường được sử dụng làm vật thử, cùng với các giống dưa leo F1 trên thị trường bao gồm các giống: Èn vàng, Đồng tiền vàng, 973, L-04, 124, 226 và 001 dùng làm giống đối chứng thay đổi theo mùa vụ.

2. Phương pháp nghiên cứu

a. Khảo sát đánh giá kiểu hình nguồn vật liệu

Tập đoàn 90 mẫu giống được bố trí không lặp lại, 26 cây/mẫu giống, thí nghiệm thực hiện vào vụ xuân 2009, theo dõi trên các đặc điểm: sự sinh trưởng, phát triển, khả năng chống chịu bệnh, đặc điểm quả, năng suất và thành phần năng suất.

b. Đánh giá khả năng kết hợp chung của nguồn vật liệu chọn dòng bố mẹ

Sử dụng vật thử là giống dưa leo Phụng Tường, thực hiện phép lai đỉnh trên 89 mẫu giống. Thu hạt của tất cả các tổ hợp lai, trồng không lặp lại mỗi tổ hợp 26 cây, đánh giá dựa trên chỉ tiêu năng suất để xác định khả năng kết hợp chung của các dòng mẫu giống. Chọn lựa các dòng bố mẹ và tiến hành lai, sử dụng phương pháp lai luân giao, thực hiện vào vụ hè thu 2009.

c. Khảo sát và chọn lọc sơ bộ các tổ hợp lai

- Vụ thu đông 2009, gồm 110 tổ hợp lai, bố trí ngẫu nhiên không lặp lại, mỗi ô nghiệm thức trồng

¹Viện Cây ăn quả miền Nam