

NGHIÊN CỨU SỰ HÌNH THÀNH MÔ SỢ VÀ TẾ BÀO ĐƠN CÂY GỖ GIÁNG HƯƠNG QUẢ TO (*Pterocarpus macrocarpus* Kurz)

Nguyễn Thị Kim Triển*
Trường Đại học Phú Yên

Tóm tắt

Nghiên cứu này được thực hiện nhằm khảo sát ảnh hưởng của nồng độ Javel và thời gian khử trùng, môi trường khoáng, nồng độ α -NAA và cách đặt mẫu cây đến quá trình tạo mô sẹo. Kết quả nghiên cứu cho thấy, các mẫu thân non cây giáng hương quả to được khử trùng ở nồng độ Javel (1 nước: 1 Javel) trong thời gian 4 phút sẽ cho tỷ lệ mẫu sạch cao nhất đạt 86.67%. Mẫu thân non giáng hương quả to đặt mặt cắt dọc hướng xuống dưới, mô sẹo được hình thành cao nhất 83.33% với kích thước mô sẹo 5.17 mm trên môi trường $\frac{1}{2}$ MS bổ sung 0.5 mg/l α -NAA. Tế bào đơn thu được có hình bầu dục. Nghiên cứu này sẽ là tiền đề cho các nghiên cứu về tế bào đơn giáng hương quả to sau này.

Từ khóa: *Pterocarpus macrocarpus* Kurz, mô sẹo, tế bào đơn, α -NAA

Abstract

Study on formation of Callus and single cell of *Pterocarpus Macrocarpus* (*Pterocarpus Macrocarpus* Kurz) wood

This study was conducted to investigate the effect of Javel concentration, sterilizing period, mineral environment, α -NAA concentration and plant growth medium on the process of Callus formation process. Results showed that young trunk *Pterocarpus Macrocarpus* sterilizing with Javel concentration (1 water: 1 Javel) for 4 minutes was found to increase the survival rate 86.67%. the young trunk *Pterocarpus macrocarpus* explant with the section along down on the medium induced the best callus (83.33% and 5.17 mm) with $\frac{1}{2}$ MS medium with 30g/l sucrose, 8 g/l agar and 0.5mg/l α -NAA. The obtained single cell had an ellipse shape. This research is a prerequisite for further studies on single cell of *Pterocarpus macrocarpus*.

Key word: *Pterocarpus macrocarpus* Kurz, callus, single cell, α -NAA

1. Đặt vấn đề

Giáng hương quả to (*Pterocarpus macrocarpus* Kurz) nằm trong sách đỏ Việt Nam (1996) cần được bảo tồn [1], một loài gỗ quý thuộc nhóm IIA [2], có giá trị sử dụng và giá trị kinh tế rất cao. Loài này được chọn là một trong những loài cây trồng rừng phòng hộ đầu nguồn tại tỉnh Phú Yên [4]. Bên cạnh đó, giáng hương quả to (*Pterocarpus macrocarpus* Kurz) là loài thực vật được tỉnh Phú Yên xác định là đối tượng cần được lưu trữ, bảo tồn và phát triển từ năm 2015 - 2020 [5]. Giáng hương quả to có gỗ đẹp lại có mùi thơm nên thuộc loại gỗ ngoại hạng. Gỗ cứng, vân rất đẹp, ít nứt nẻ, không bị mối mọt, đóng đồ dùng cao cấp như bàn, ghế, tủ,... nên bị khai thác rất mạnh và môi trường sống cũng bị thu hẹp nhiều. Số lượng cây bị giảm rất nhanh chóng và đang cạn kiệt [1].

Nuôi cấy mô sẹo là phương pháp thường được sử dụng ở nhiều loài thực vật nhằm tạo ra nguồn nguyên liệu cho nhiều thí nghiệm khác nhau như: khả năng phát sinh phôi tạo

* Email: kimtriendhpy@gmail.com

giống cây trồng, nuôi cấy tế bào đơn nhằm sản xuất các hợp chất sinh học thứ cấp (alkaloid, tinh dầu, kháng sinh, saponin, ...), nuôi cấy tế bào trần, ... [3, tr. 51]. Tuy nhiên ở Việt Nam, nuôi cấy mô sẹo và tế bào đơn từ thân non cây giáng hương quả to hầu như chưa được nghiên cứu. Vì vậy, trong bài báo này chúng tôi nghiên cứu sự hình thành mô sẹo và tế bào đơn từ thân non của cây gỗ quý giáng hương quả to, bước đầu góp phần trong công tác tạo giống cây *in vitro* giáng hương quả to, bảo tồn nguồn gen quý tại TP. Tuy Hoà, tỉnh Phú Yên.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu nghiên cứu

- Vật mẫu

Thân non của cây giáng hương quả to tại Núi Nhạn, TP. Tuy Hoà, tỉnh Phú Yên.

- Môi trường nuôi cấy

Môi trường khoáng: ½ MS, MS, ½ WPM, WPM [3, tr.12-16], mỗi môi trường có bổ sung 30 g/l sucrose, 8 g/l agar (hoặc không bổ sung agar đối với môi trường nuôi cấy lỏng lác) và chất kích thích sinh trưởng thực vật α -NAA (nồng độ tùy theo mục đích thí nghiệm). Môi trường được điều chỉnh pH là 5,8 trước khi hấp khử trùng ở nhiệt độ 121°C, áp suất 1 atm trong thời gian 30 phút.

- Điều kiện nuôi cấy

Các thí nghiệm được nuôi cấy trong điều kiện: thời gian chiếu sáng 16 giờ/ngày; nhiệt độ phòng 25°C, cường độ chiếu sáng 2.500 – 3.000 lux.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Khử trùng mẫu vật

Thân non của cây giáng hương quả to sau khi thu hái được rửa sạch dưới vòi nước chảy, loại bỏ các phần bị hư hỏng, rửa sạch bằng xà phòng và nước cất vô trùng. Bên trong tủ cấy lần lượt thực hiện các bước: rửa nước cất khử trùng 3 lần, lắc mẫu cây với cồn 70° trong 30 giây, tiếp tục rửa bằng nước cất khử trùng 3 lần, ngâm Javel khử trùng (với nồng độ và thời gian tùy theo mục đích thí nghiệm). Thêm 2 giọt Tween 20 vào 100 ml dung dịch khử trùng để làm tăng độ tiếp xúc chất khử trùng vào mẫu thân non giáng hương. Cuối cùng, rửa lại 5 lần bằng nước cất vô trùng.

2.2.2. Cách đo kích thước mô sẹo

Trong tủ cấy vô trùng, mô sẹo lấy ra khỏi môi trường thí nghiệm và được đo bằng thước kẹp (đã khử trùng) trên đĩa petri (đã khử trùng). Tiến hành với số lần đo $n = 30$, lặp lại 3 lần, tính trị số trung bình, độ lệch chuẩn theo phương pháp thống kê bằng Excel 2007.

2.2.3. Hệ thống nuôi cấy lỏng lác

Dung dịch huyền phù được nuôi cấy với thể tích 20 ml môi trường dinh dưỡng khoáng lỏng trong các bình serum với thể tích 125ml, đặt trên hệ thống máy lắc (Inovar 42, Mỹ) với tốc độ lắc 110 vòng/ phút.

2.2.4. Quan sát hình thái tế bào đơn của dung dịch huyền phù

Hút 10 μ l dung dịch huyền phù tế bào bằng micro pipette rồi nhỏ lên lam kính. Đặt lamelle lên giọt huyền phù. Quan sát tế bào đơn dưới kính hiển vi kỹ thuật số (DM 111, Motic) với độ phóng đại 400 lần có khả năng ghép nối máy tính.

2.2.5. Bố trí thí nghiệm

2.2.5.1. Khảo sát ảnh hưởng của nồng độ Javel và thời gian khử trùng đến hiệu quả khử trùng của mẫu thân non giáng hương quả to.

Chúng tôi khảo sát hiệu quả khử trùng của Javel với nồng độ lần lượt (2 nước: 1

Javel), (1 nước: 1 Javel), (2 nước: 3 Javel) mỗi nồng độ Javel bố trí với 5 khoảng thời gian (2 phút, 4 phút, 6 phút, 8 phút và 10 phút).

Mẫu sau khi được khử trùng, cắt đoạn mẫu thân non dài 1 cm, cấy vào môi trường WPM có bổ sung 30 g/l sucrose, 8 g/l agar.

2.2.5.2. Khảo sát ảnh hưởng của môi trường dinh dưỡng khoáng đến khả năng hình thành mô sẹo của thân non giáng hương quả to.

Chúng tôi khảo sát dấu hiệu hình thành mô sẹo trên 4 môi trường khoáng: ½WPM, WPM, ½MS, MS. Mẫu thân non *in vitro* có dấu hiệu xanh và không nhiễm được cấy vào môi trường ½WPM, WPM; ½MS; MS. Trong mỗi môi trường khoáng có bổ sung 30 g/l sucrose, 8 g/l agar.

2.2.5.3. Khảo sát ảnh hưởng của α -NAA lên sự hình thành mô sẹo từ mẫu thân non cây giáng hương quả to.

Các mẫu thân non đã khử trùng được cấy vào môi trường khoáng tốt nhất ở thí nghiệm trên có bổ sung có bổ sung 30 g/l sucrose, 8 g/l agar và α -NAA với các nồng độ khác nhau (0.0; 0.1, 0.2; 0.3; 0.4; 0.5; 0.6; 0.7; 0.8; 0.9 và 1.0 mg/l).

2.2.5.4. Khảo sát ảnh hưởng cách đặt mẫu thân non invitro lên khả năng tạo mô sẹo[3, tr.58-59].

Thân non vô trùng được cắt theo các chiều khác nhau:

- Một nửa sẽ thực hiện lát cắt ngang thân non thành hai đoạn: đặt mỗi đoạn vào môi trường tốt nhất ở các thí nghiệm trên theo hai chiều ngược nhau. Một đoạn đặt theo chiều thuận (trên - dưới) và một đoạn đặt theo chiều nghịch (dưới - trên).

- Một nửa còn lại thì thực hiện lát cắt dọc theo thân chia thành hai mảnh: một mảnh đặt vào môi trường tốt nhất ở các thí nghiệm trên cho mặt cắt hướng lên trên và một mảnh đặt cho mặt cắt tiếp xúc vào môi trường.

2.2.5.5. Khảo sát hình thái tế bào đơn của cây giáng hương quả to sau quá trình nuôi cấy lác lỏng tạo dịch huyền phù.

Cây mô sẹo vào môi trường khoáng lỏng tốt nhất ở thí nghiệm trên có bổ sung nồng độ α -NAA cảm ứng mô sẹo tốt nhất. Thí nghiệm được bố trí trên hệ thống nuôi lác lỏng.

2.2.6. Xử lý số liệu

Số mẫu trong mỗi nghiệm thức là 30 mẫu, được thực hiện 3 lần lặp lại và kết quả báo cáo là giá trị trung bình \pm độ lệch chuẩn.

Số liệu được thu thập, xử lý thống kê bằng phần mềm Microsoft Office Excel 2007.

3. Kết quả nghiên cứu và thảo luận

3.1. Ảnh hưởng của nồng độ Javel và thời gian khử trùng đến hiệu quả khử trùng của thân non giáng hương quả to (*Pterocarpus macrocarpus* Kurz)

Mẫu thân non sau khi thu hái được khử trùng Javel với nồng độ và thời gian khác nhau. Sau 1 tuần nuôi cấy, chúng tôi thu được kết quả được thể hiện ở bảng 3.1.

Bảng 3.1. Kết quả tạo mẫu vô trùng của thân non giáng hương quả to

Nồng độ Javel khử trùng	Thời gian khử trùng (phút)	Tổng mẫu	Số mẫu bị nhiễm	Số mẫu chết nâu đen	Số mẫu sạch, màu xanh	Tỷ lệ % mẫu sạch, màu xanh
2 Nước : 1 Javel	2	90	85	0	5	5.56
	4	90	74	0	16	17.78

	6	90	62	0	28	31.11
	8	90	45	3	42	46.67
	10	90	42	10	38	42.22
1 Nước : 1 Javel	2	90	48	0	42	46.67
	4	90	12	0	78	86.67
	6	90	10	5	75	83.33
	8	90	10	12	68	75.56
	10	90	5	34	51	56.67
2 Nước : 3 Javel	2	90	37	0	53	58.89
	4	90	11	16	63	70.00
	6	90	9	35	46	51.11
	8	90	6	79	5	5.56
	10	90	4	83	3	3.33

Từ kết quả ở bảng 3.1 cho thấy những đoạn thân non giáng hương quả to được xử lý bằng Javel ở các nồng độ và thời gian khác nhau sẽ cho kết quả khác nhau. Qua kết quả nghiên cứu chúng tôi kết luận, thân non giáng hương quả to khử trùng hiệu quả nhất với Javel có nồng độ (1 nước : 1 Javel) trong thời gian 4 phút, có số mẫu bị nhiễm ít 12/90; không có mẫu nâu đen và tỷ lệ mẫu sạch vẫn còn màu xanh chiếm tỷ lệ cao nhất 86.67%. Điều này có thể được giải thích như sau:

Ở nồng độ Javel thấp (2 nước : 1 Javel) tỷ lệ khử trùng tương đối thấp vì ở nồng độ này Javel chưa tiêu diệt hết vi khuẩn và nấm bám trên mẫu cây. Ở nồng độ Javel (2 nước : 3 Javel) tỷ lệ khử trùng tương đối cao, tuy nhiên số lượng mẫu nâu đen, chết lại chiếm số lượng lớn, vì ở nồng độ này đã tiêu diệt phần lớn nấm và vi khuẩn bám trên mẫu cây, bên cạnh đó đã làm tổn thương mẫu cây gây chết mẫu cây. Vì vậy, nồng độ thích hợp khử trùng mẫu thân non là Javel (1 nước : 1 Javel).

Ở cùng một nồng độ Javel, thời gian khử trùng tăng từ 2 - 10 phút thì hiệu quả khử trùng càng cao, tuy nhiên bên cạnh khử trùng thì mẫu xanh và có khả năng sinh trưởng tốt rất quan trọng. Khi khử trùng nồng độ Javel (1 nước : 1 Javel), nếu thời gian 2 phút mẫu còn xanh nhiều nhưng số mẫu nhiễm cũng nhiều vì vậy tỷ lệ % mẫu sạch, còn xanh lại ít (46.67%). Nếu thời gian tăng lên trên 6 phút thì hiệu quả khử trùng cao nhưng vì mẫu là thân non nên mẫu chết do bị đen nhiều, nhất là khi khử trùng mẫu 10 phút (mẫu đen 34/90). Vì vậy, với nồng độ Javel (1 nước : 1 Javel) thì khử trùng 4 phút là phù hợp nhất với thân non vẫn sinh trưởng tốt, đồng thời khử trùng hiệu quả nấm và vi khuẩn gây hại.

3.2. Ảnh hưởng của môi trường khoáng lên sự hình thành mô sẹo từ mẫu thân non cây giáng hương quả to (*Pterocarpus macrocarpus* Kurz)

Sau 7 ngày nuôi cấy, kết quả tỷ lệ % mẫu giáng hương quả to cảm ứng mô sẹo được trình bày ở bảng 3.2.

Bảng 3.2. Ảnh hưởng môi trường khoáng đến mẫu cây giáng hương quả to hình thành sẹo

Loại môi trường	Số mẫu thân non vô trùng	Số mẫu không hình thành mô sẹo	Số mẫu hình thành mô sẹo	Tỷ lệ % mẫu hình thành mô sẹo
½ WPM	90	88	2	2.22
WPM	90	80	10	11.11
½ MS	90	75	15	16.67
MS	90	82	8	8.89

Qua kết quả bảng 3.2, cho thấy mẫu giáng hương quả to khả năng tạo sẹo ít trên môi trường khoáng nuôi cấy cây thân gỗ (WPM) với tỷ lệ mẫu hình thành mô sẹo 11.11% và thấp nhất là môi trường ½ WPM mẫu tạo sẹo chỉ có 2.22%; ngược lại môi trường giàu dinh dưỡng MS thì với nồng độ khoáng cao cũng không phù hợp với quá trình tạo sẹo của cây giáng hương quả to. Chúng tôi nhận thấy môi trường ½ MS có tỷ lệ mẫu tạo sẹo cao nhất 16.67%. Điều này được giải thích, giáng hương quả to là cây thân gỗ nhưng để mô sẹo được hình thành thì môi trường nuôi cấy cây thân gỗ (½ WPM và WPM) lại không đáp ứng đủ lượng chất dinh dưỡng cần thiết để tạo sẹo. Ngược lại môi trường giàu chất dinh dưỡng khoáng MS lại giảm lượng hình thành mô sẹo vì lượng dinh dưỡng cao gây ức chế tạo sẹo đối với cây thân gỗ giáng hương quả to. Trong khi đó môi trường ½ MS lại cung cấp lượng dinh dưỡng phù hợp, cần thiết để mô sẹo được hình thành với tỷ lệ cao nhất. Vì vậy chúng tôi sử dụng môi trường này cho các thí nghiệm tiếp theo.

3.3. Ảnh hưởng của α -NAA lên sự hình thành mô sẹo từ mẫu thân non cây giáng hương quả to *in vitro*

Các chất điều hòa sinh trưởng thực vật là thành phần quan trọng của môi trường dinh dưỡng nuôi cấy. Trong đó, α -NAA sử dụng rất có hiệu quả trong việc tạo mô sẹo ở nhiều loài thực vật. Kết quả mẫu cấy hình thành mô sẹo giáng hương quả to được thống kê ở bảng 3.3.

Bảng 3.3. Ảnh hưởng của α -NAA lên khả năng tạo mô sẹo

Nồng độ α -NAA (mg/l)	Tổng mẫu	Số mẫu không tạo sẹo	Số mẫu tạo sẹo	Tỷ lệ% mẫu tạo sẹo
0.0	90	75	15	16.67
0.1	90	72	18	20.00
0.2	90	70	20	22.22
0.3	90	60	30	33.33
0.4	90	37	53	58.89
0.5	90	22	68	75.56
0.6	90	29	61	67.78
0.7	90	38	52	57.78
0.8	90	59	31	34.44
0.9	90	62	28	31.11
1.0	90	64	26	28.89

Sau 1 tuần cấy chuyên, các mẫu cấy bắt đầu cảm ứng hình thành mô sẹo. Mô sẹo ban đầu phân bố dọc theo vết sẹo thân non, sau đó là mô sẹo lan khắp thân non. Mỗi nồng độ của α -NAA khác nhau thì khả năng tạo mô sẹo cũng khác nhau. Sau 2 tuần nuôi cấy, các mẫu bắt đầu có sự phát triển mô sẹo với tỷ lệ tăng dần khi nồng độ α -NAA tăng từ 0.1- 0.4 mg/l với tỷ lệ 20.00% đến 58.89%, tỷ lệ mẫu tạo sẹo vượt trội là ở thí nghiệm với α -NAA 0.5 mg/l đạt 75.56%. Còn đối với công thức có nồng độ α -NAA từ 0.6 mg/l đến 1.0 mg/l thì tỷ lệ % mẫu tạo sẹo bắt đầu giảm từ 67.78% xuống 28.89%.

Ngoài ra, hình thái của các tế bào mô sẹo được tạo thành ở các nồng độ α -NAA cũng có sự khác biệt rõ rệt. Kết quả được thống kê ở bảng 3.4.

Bảng 3.4. Ảnh hưởng của α -NAA lên hình thái mô sẹo

Nồng độ α -NAA (mg/l)	Đặc điểm mô sẹo	Kích thước mô sẹo (mm)
------------------------------	-----------------	------------------------

0.0	Mẫu cây có xuất hiện một ít mô sẹo, kích thước rất nhỏ, dần hoá nâu và chết dần	1.99±0.25
0.1	Mẫu cây xuất hiện mô sẹo nhỏ, dần hoá nâu	2.01±0.17
0.2	Mẫu cây tạo mô sẹo nhỏ, màu trắng vàng, chỉ phát triển trên bề mặt thạch	3.14±0.08
0.3	Mô sẹo màu vàng sẫm, kém phát triển	3.52±0.03
0.4	Mô sẹo màu vàng hơi xanh, phát triển	3.69±0.01
0.5	Mô sẹo phát triển thành khối to, bao quanh lấy đoạn thân non, có màu xanh, mô sẹo xốp và phát triển ngay cả dưới mặt thạch	4.52±0.01
0.6	Mô sẹo tạo thành khối, có màu xanh, phát triển dọc thân	4.22±0.01
0.7	Mô sẹo có màu trắng xanh, phát triển quanh thân, mô sẹo nhỏ	3.93± 0.17
0.8	Mô sẹo có trắng xanh, phát triển thành cụm ở dọc thân	3.71±0.21
0.9	Mô sẹo có trắng đục, tạo thành khối, kém phát triển	3.29±0.24
1.0	Mô sẹo trắng đục, nâu chết dần	2.56±0.32

Kết quả ở bảng 3.4 cho thấy mô sẹo hình thành ở nồng độ α -NAA 0.5 mg/l có đặc điểm vượt trội phát triển thành khối to với kích thước cao nhất 4.52 mm, bao quanh lấy đoạn thân non, có màu xanh, mô sẹo xốp thích hợp để làm nguyên liệu cho nuôi cấy lỏng. Hình thái này của mô sẹo còn được duy trì tới 15 ngày nuôi cấy tiếp theo.



Hình 3.1. Ảnh hưởng của α -NAA (0; 0.1; 0.2; 0.3; 0.4 mg/l theo thứ tự từ trái qua phải) lên khả năng tạo mô sẹo từ mẫu thân non giáng hương quả to in vitro sau 2 tuần nuôi cấy



Hình 3.2. Ảnh hưởng của α -NAA (0.5; 0.6; 0.7; 0.8; 0.9 mg/l theo thứ tự từ trái qua phải) lên khả năng tạo mô sẹo từ mẫu thân non giáng hương quả to in vitro sau 2 tuần nuôi cấy

Từ những kết quả thu được ở trên, ta thấy môi trường $\frac{1}{2}$ MS có bổ sung 30 g/l sucrose, 8 g/l agar và 0.5 mg/l α -NAA thích hợp để tạo mô sẹo từ mẫu thân non đã khử

trùng.

3.4. Ảnh hưởng cách đặt thân non vô trùng lên khả năng tạo mô sẹo

Sau 2 tuần nuôi cấy, khả năng tạo mô sẹo và hình thái mô sẹo ở các cách đặt mẫu khác nhau được ghi nhận ở bảng 3.5. Kết quả cho thấy mẫu đặt theo chiều thuận (trên - dưới) và mẫu đặt mặt cắt dọc hướng xuống dưới có tỷ lệ tạo mô sẹo cao. Trong đó, các mẫu đặt mặt cắt dọc hướng xuống dưới môi trường nuôi cấy đạt tỷ lệ hình thành mô sẹo cao nhất 83.33% và kích thước mô sẹo trung bình đạt 5.17 mm cao nhất so với các mẫu cấy đặt các kiểu khác.

Khi tiến hành nhuộm kép và quan sát dưới kính hiển vi, mô sẹo thân non giáng hương quả to được hình thành từ vỏ trụ của thân non. Bồi lẽ, vỏ trụ là lớp ngoài cùng của trụ giữa, vỏ trụ có nguồn gốc từ mô phân sinh sơ cấp, có khả năng phân chia cho ra các mô vĩnh viễn như mô sẹo. Vì vậy, khi đặt mẫu thân non có mặt cắt dọc đặt xuống dưới môi trường thì chất dinh dưỡng, chất sinh trưởng thực vật từ môi trường tiếp xúc trực tiếp với tiết diện lớn nhất vào mẫu cấy vì vậy khả năng tạo sẹo hiệu quả nhất.

Bảng 3.5. Ảnh hưởng cách đặt thân non lên khả năng tạo mô sẹo

Cách đặt mẫu	Số lượng mẫu	Số mẫu không tạo sẹo	Số lượng mẫu tạo sẹo	Tỷ lệ % mẫu tạo sẹo	Kích thước mô sẹo	Đặc điểm mô sẹo
Đặt theo chiều thuận (trên - dưới)	90	22	68	75.56	4.52±0.01	Xanh, xốp bao quanh mẫu cấy
Đặt theo chiều nghịch (dưới - trên)	90	78	12	13.33	1.15±0.22	Vàng nhạt, phát triển kém
Đặt mặt cắt dọc hướng xuống dưới	90	15	75	83.33	5.17±0.01	Xanh, xốp phát triển tốt bao quanh mẫu cấy
Đặt mặt cắt dọc hướng lên trên	90	64	26	28.89	1.43±0.18	Vàng nhạt, phát triển kém

3.5. Quan sát hình thái tế bào đơn của cây giáng hương quả to sau quá trình nuôi cấy lác lỏng tạo dịch huyền phù.

Mô sẹo được đưa vào môi trường ($\frac{1}{2}$ MS + 0.5 mg/l α -NAA) lỏng, lắc với tốc độ 110 vòng/ phút. Sau 2 tuần nuôi cấy, chúng tôi đã hút 10 μ l dung dịch huyền phù và đưa vào kính hiển vi quan sát. Kết quả thu được hình thái của tế bào đơn tương đối giống nhau. Tế bào đa số có hình bầu dục, một số ít có hình cầu, nhiều tế bào phân chia và phát triển thành cụm tế bào.



Hình 3.3. Tế bào đơn giáng hương quả to



Hình 3.4. Tế bào vừa phân chia xong



Hình 3.5. *Cụm 4 tế bào giáng hương quả to*

4. Kết luận

Từ các kết quả thu được ở trên cho thấy, thân non giáng hương quả to thu hái từ Núi Nhạn, TP. Tuy Hòa, tỉnh Phú Yên được khử trùng với nồng độ Javel (1 nước: 1 Javel) trong thời gian 4 phút sẽ cho tỷ lệ mẫu (sạch, có màu xanh) với tỷ lệ cao nhất 86.67%.

Mẫu cây sạch có màu xanh được nuôi trên môi trường $\frac{1}{2}$ MS bổ sung 30 g/l succrose, 8g/l agar và 0.5 mg/l α -NAA với mẫu thân non đặt mặt cắt dọc hướng xuống dưới là thích hợp nhất cho sự hình thành mô sẹo từ thân non của giáng hương quả to.

Mô sẹo được nuôi lỏng lác tạo dung dịch huyền dịch phù với các tế bào đơn đa số hình bầu dục, một số ít có hình cầu.

Nghiên cứu này sẽ tạo nguồn nguyên liệu là mô sẹo để chúng tôi tiếp tục nghiên cứu quá trình phát sinh phát sinh phôi, tạo giống cây *in vitro* giáng hương quả to, đồng thời nghiên cứu sâu hơn về tế bào đơn nhằm thu được các sản phẩm thứ cấp từ cây giáng hương quả to □

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Bộ Khoa học Công nghệ và Môi trường (1996), *Sách đỏ Việt Nam phần thực vật*, Nxb Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội.
- [2] Chính phủ (2006), Nghị định số 32/2006/NĐ-CP ngày 30/3/2006 về quản lý thực vật rừng, động vật rừng nguy cấp quý hiếm.
- [3] Dương Công Kiên (2003), Nuôi cấy mô thực vật (Tập II), Nxb Đại học Quốc gia, TP. Hồ Chí Minh.
- [4] Ủy Ban Nhân Dân tỉnh Phú Yên (2014), Quyết định số 2096/QĐ-UBND ngày 24/12/2014 về việc phê duyệt Quy hoạch hệ thống rừng giống, vườn giống, vườn ươm giống cây trồng lâm nghiệp tỉnh Phú Yên đến năm 2020, tầm nhìn đến năm 2030.
- [5] Ủy Ban Nhân Dân tỉnh Phú Yên (2015), Quyết định số 528/QĐ-UBND ngày 25/3/2015 về việc phê duyệt đề án khung các nhiệm vụ bảo tồn nguồn gen cấp tỉnh giai đoạn 2015-2020.

(Ngày nhận bài: 27/04/2018; ngày phản biện: 28/05/2018; ngày nhận đăng: 01/10/2018)