

**BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO
TRƯỜNG ĐẠI HỌC NÔNG LÂM THÀNH PHỐ HỒ CHÍ MINH
BỘ MÔN CÔNG NGHỆ SINH HỌC**

★★★★★★★★★★



LÝ THỊ LỆ

**TÁI SINH PHÔI SOMA CÂY MÍT
(*Artocarpus heterophyllus* Lam)**

Luận Văn Kỹ Sư
Chuyên Ngành: Công Nghệ Sinh Học

Thành phố Hồ Chí Minh
Tháng 9/2006

**BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO
TRƯỜNG ĐẠI HỌC NÔNG LÂM THÀNH PHỐ HỒ CHÍ MINH
BỘ MÔN CÔNG NGHỆ SINH HỌC**

★★★★★★★★★★



TÁI SINH PHÔI SOMA CÂY MÍT
(*Artocarpus heterophyllus* Lam)

Luận Văn Kỹ Sư
Chuyên Ngành: Công Nghệ Sinh Học

Giáo viên hướng dẫn
PGS TS. TRẦN VĂN MINH

Sinh viên thực hiện
LÝ THỊ LỆ
KHÓA: 2002 - 2006

Thành phố Hồ Chí Minh
Tháng 9/2006

MINISTRY OF EDUCATION AND TRAINING
NONG LAM UNIVERSITY, HCMC
FACULTY OF BIOTECHNOLOGY

★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★



**REGENERATING THE SOMATIC
EMBRYO OF *ARTOCARPUS
HETEROPHYLLUS* LAM**

**GRADUATION THESIS
MAJOR: BIOTECHNOLOGY**

Professor

PhD. TRAN VAN MINH

Student

LY THI LE

TERM: 2002 - 2006

HCMC, 09/2006

Lời cảm ơn

Em xin gửi lời cảm ơn đến quý thầy cô bộ môn Công nghệ sinh học trường đại học Nông Lâm, là những người đã truyền đạt cho em những kiến thức quý báu trong suốt bốn năm ngồi giảng đường Đại Học và đã tạo nhiều điều kiện học tập cho em.

Em xin chân thành cảm ơn TS. Trần Văn Minh đã hướng dẫn và tạo điều kiện cho em thực tập và hoàn thành tốt đề tài tốt nghiệp và em cũng rất biết ơn cô Bùi Thị Tường Thu, Th.s Trần Văn Định, chị Nguyễn Thị Kim Uyên, chị Trương Thị Hảo, cùng toàn thể nhân viên của viện và các bạn cùng thực tập ở viện.

Em xin chân thành cảm ơn PGS.TS Trần Thị Dung, trưởng bộ môn Công Nghệ Sinh Học, Đại Học Nông Lâm TP. Hồ Chí Minh đã giới thiệu em với thầy Trần Văn Minh, để tạo điều kiện cho em hoàn thành những năm học đại học của mình.

Em chân thành cảm ơn tất cả các bạn lớp Công Nghệ Sinh Học khoá 28 đã giúp đỡ em rất nhiều trong quá trình học tập và trong thời gian làm đề tài tốt nghiệp.

Sinh viên thực hiện

Lý Thị Lệ

TÓM TẮT

LÝ THỊ LỆ, Đại Học Nông Lâm TP.Hồ Chí Minh. Tháng 9/2006. “TÁI SINH PHÔI SOMA CÂY MÍT”.

Hội đồng hướng dẫn:

PGS.TS TRẦN VĂN MINH

Đề tài được thực hiện tại phòng thí nghiệm trọng điểm Quốc gia về Công nghệ tế bào thực vật phía Nam Viện Sinh học Nhiệt đới Tp. Hồ Chí Minh. Từ tháng 2 đến tháng 8/2006.

Cây mít có nhiều công dụng, có giá trị dinh dưỡng và giá trị kinh tế cao, nhưng nó chưa được sử dụng đúng tiềm năng, nguồn cung ứng cho xuất khẩu còn hạn chế. Với đề tài này, tôi mong muốn tạo nguồn giống cây mít với số lượng lớn, chất lượng đồng đều, để phục vụ cho nhu cầu sản xuất của con người.

Mẫu thí nghiệm: chồi cây mít trong PTN. Gồm 7 thí nghiệm:

- **Thí nghiệm 1:** Ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy đến phát sinh tế bào soma

Mục đích: tìm môi trường thích hợp để nuôi cấy phát sinh tế bào soma

- **Thí nghiệm 2:** Ảnh hưởng của loại mẫu nuôi cấy đến phát sinh tế bào soma

Mục đích: nhằm xác định loại mẫu cây cho tỉ lệ phát sinh tế bào soma tốt nhất

- **Thí nghiệm 3:** Ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy đến tăng sinh khối tế bào soma.

Mục đích: tìm môi trường thích hợp nhất làm tăng sinh khối tế bào soma

- **Thí nghiệm 4:** Nuôi cấy tế bào soma trên môi trường lỏng

Mục đích: tìm môi trường lỏng thích hợp nhất cho sự tăng sinh khối tế bào soma

- **Thí nghiệm 5:** Tái sinh tế bào soma

Mục đích: tìm môi trường tốt nhất cho sự phát sinh chồi.

- **Thí nghiệm 6:** Nhân chồi cây mít

Mục đích: tìm môi trường tốt nhất cho sự nhân chồi cây mít.

- **Thí nghiệm 7:** Nuôi cấy phát sinh rễ

Mục đích: xác định môi trường tốt nhất cho sự phát sinh rễ cây mít

Kết quả và thảo luận: Sử dụng phần mềm MSTATC để tính toán và phân tích số liệu

Mục lục

<i>Lời cảm ơn</i>	<i>iii</i>
<i>Tóm tắt</i>	<i>iv</i>
<i>Mục lục</i>	<i>v</i>
<i>Danh mục các hình</i>	<i>ix</i>
<i>Danh mục các bảng</i>	<i>x</i>
<i>Danh mục các chữ viết tắt</i>	<i>xi</i>
Chương 1 MỞ ĐẦU	1
1.1. Đặt vấn đề	1
1.2. Mục đích và mục tiêu	3
1.2.1. Mục đích	3
1.2.2. Mục tiêu	3
1.3. Giới hạn đề tài	3
1.4. Nội dung nghiên cứu	3
Chương 2 TỔNG QUAN	4
2.1. Giới thiệu chung về cây mít	4
2.1.1. Phân loại và nguồn gốc phân bố	4
2.1.1.1. Phân loại	4
2.1.1.2. Nguồn gốc và sự phân bố	4
2.1.2. Đặc điểm sinh học của cây mít	5
2.1.2.1. Đặc tính hình thái cây	5
2.1.2.2. Khí hậu	7
2.1.2.3. Đất trồng	7
2.1.2.4. Đặc điểm sinh trưởng và phát triển cây mít	8
2.1.2.5. Loài gây hại và bệnh tật	8

2.1.3. Đặc điểm lâm học cây mít	9
2.1.3.1. Sự trồng trọt	9
2.1.3.2. Mùa màng	9
2.1.3.3. Sản lượng	10
2.1.3.4. Thu hoạch và dự trữ	10
2.1.4. Ý nghĩa kinh tế và giá trị dinh dưỡng	10
2.1.5. Tình hình sản xuất mít ở Việt Nam và trên thế giới	13
2.2. Kỹ thuật nuôi cấy mô tế bào thực vật	14
2.2.1. Khái niệm	14
2.2.2. Ứng dụng kỹ thuật nuôi cấy mô	15
2.2.3. Vai trò các chất điều hòa sinh trưởng	14
2.2.3.1. Auxin	16
2.2.3.2. Cytokinin	17
2.2.3.3. Gibberellin	18
2.2.4. Nuôi cấy phát sinh phôi soma	19
2.2.4.1. Phôi vô tính	19
2.2.4.2. Ý nghĩa nuôi cấy mô phôi vô tính	19
2.2.4.3. Sự hình thành phôi vô tính	20
2.2.4.4. Cơ chế phát sinh phôi vô tính	20
2.2.4.5. Các loại phôi	21
2.2.4.6. Các kiểu phát sinh phôi soma	16
2.2.5. Những nhân tố ảnh hưởng đến sự hình thành phôi vô tính	22
2.2.5.1. Mẫu cấy	22
2.2.5.2. Môi trường nuôi cấy	23
2.2.5.3. Nguồn cacbohydrate	23
2.2.5.4. Chất điều hòa tăng trưởng	23
2.2.5.5. Sự tương quan giữa độ tuổi mẫu cấy và sucrose	25
2.2.5.6. Nồng độ của môi trường	25
2.2.5.7. Trạng thái vật lý của môi trường	25
2.2.5.8. Kiểu gene	25

2.2.5.9. Cường độ ánh sáng	26
2.2.6. Những vấn đề thường gặp trong quá trình phát sinh phôi	26
2.3. Nuôi cấy mô cây mít	27
Chương 3 VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP THÍ NGHIỆM	29
3.1. Vật liệu	29
3.1.1. Mẫu nuôi cấy	29
3.1.2. Thiết bị	29
3.1.3. Hoá chất	29
3.1.4. Điều kiện nuôi cấy	31
3.2. Bố trí thí nghiệm	31
3.2.1. Thí nghiệm 1: Ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy đến phát sinh tế bào soma	31
3.2.2. Thí nghiệm 2: Ảnh hưởng của loại mẫu nuôi cấy đến phát sinh tế bào soma	32
3.2.3. Thí nghiệm 3: Ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy đến tăng sinh khối tế bào soma.	32
3.2.4. Thí nghiệm 4: Nuôi cấy tế bào soma trên môi trường lỏng	33
3.2.5. Thí nghiệm 5: Tái sinh tế bào soma	34
3.2.6. Thí nghiệm 6: Nhân chồi cây mít	35
3.2.7. Thí nghiệm 7: Nuôi cấy phát sinh rễ	35
3.3. Phương pháp xử lý số liệu	36
Chương 4 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN	37
4.1. Thí nghiệm 1: Ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy đến phát sinh tế bào soma (sau 15 ngày nuôi cấy)	37
4.2. Thí nghiệm 2: Ảnh hưởng của mẫu nuôi cấy đến phát sinh tế bào soma	40
4.3. Thí nghiệm 3: Ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy đến	

cấy chuyên tế bào (trên agar)	41
4.4. Thí nghiệm 4: Nhân sinh khối tế bào soma trên môi trường lỏng	43
4.4.1. Thí nghiệm 4-1: Ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy lỏng đến tăng sinh khối tế bào soma	43
4.4.2. Thí nghiệm 4-2: Ảnh hưởng của mật độ nuôi cấy ban đầu đến khả năng tăng sinh khối tế bào soma.	44
4.5. Thí nghiệm 5: Tái sinh tế bào soma	46
4.6. Thí nghiệm 6: Nhân chồi cây mít	49
4.7. Nuôi cấy phát sinh rễ	51
Chương 5 KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ	55
5.1. Kết luận	55
5.2. Đề nghị	55
<i>Tài liệu tham khảo</i>	56

DANH MỤC CÁC HÌNH

Hình 2.1: Lá của cây mít ở 1,5 tuổi	5
Hình 2.2: Cây mít trưởng thành mang quả	6
Hình 2.3: Quả mít chín được bổ đôi	11
Hình 2.4: Các loại phôi soma.	21
Hình 4.1 Tế bào soma cây mít phát sinh trên môi trường nuôi cấy (MS+BA(1mg/l)+NAA(5mg/l)+CW(10%)+Đường(30g))	39
Hình 4.2 Tế bào soma cây mít tăng sinh khối trên môi trường nuôi cấy	42
Hình 4.3 Dịch huyền phù tế bào soma trên các môi trường và ở các mật độ tế bào nuôi cấy ban đầu khác nhau	45
Hình 4.4: Tái sinh phôi soma cây mít (sau 15 ngày nuôi cấy)	48
Hình 4.5: Nhân chồi cây mít nuôi cấy sau 30 ngày trên các môi trường	50
Hình 4.6: Cây mít <i>in vitro</i> ra rễ tốt trên môi trường kích thích ra rễ	53
Hình 4.7: Cây mít ra rễ <i>in vitro</i> được thuần hóa và ra bầu đất	54

DANH MỤC CÁC BẢNG

Bảng 3.1: Thành phần môi trường nuôi cấy phát sinh tế bào soma	31
Bảng 3.2: Loại mẫu và thành phần môi trường nuôi cấy	32
Bảng 3.3: Thành phần môi trường nuôi cấy tăng sinh khối tế bào soma	33
Bảng 3.4: Thành phần môi trường nuôi cấy lỏng	33
Bảng 3.5 Thành phần môi trường tái sinh tế bào soma	35
Bảng 3.6: Nhân chồi cây mít	35
Bảng 3.7 Thành phần môi trường nuôi cấy phát sinh rễ	36
Bảng 4.1a: Ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy đến phát sinh tế bào soma (sau 15 ngày nuôi cấy)	38
Bảng 4.1b: Thời gian phát sinh tế bào soma.	38
Bảng 4.2: Ảnh hưởng của mẫu nuôi cấy đến phát sinh tế bào soma	40
Bảng 4.3 Ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy đến cây chuyên tế bào soma.	41
Bảng 4-1.4: Ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy lỏng đến tăng sinh khối tế bào soma.	43
Bảng 4-2.4: Ảnh hưởng của mật độ nuôi cấy ban đầu đến khả năng tăng sinh khối tế bào soma.	44
Bảng 4.5: Tái sinh tế bào soma	47
Bảng 4.6: Nhân chồi cây mít	49
Bảng 4.7: Khả năng ra rễ của cây mít <i>in vitro</i>	51

DANH MỤC CÁC CHỮ VIẾT TẮT

BA	: benzyladenine
Ki	: kinetin
NAA	: α - naphthaleneneacetic acid
IAA	: indole – 3 acetic acid
IBA	: indole – 3 butyric acid
CW	: nước dừa
Suc	: đường sucrose
GA	: gibberellin
PVP	: polyvinyl pyrrolidone 4000
ctv	: cộng tác viên
MS	: Murashige & Skoog

Chương 1

MỞ ĐẦU

1.1. Đặt vấn đề

Nuôi cấy mô tế bào thực vật có ý nghĩa rất quan trọng trong phát triển công nghệ sinh học và các ứng dụng của công nghệ sinh học. Thật vậy, khi tiến hành các kỹ thuật chuyên gene tạo ra các giống cây trồng mới. Cũng như, khi tìm cách nhân nhanh các giống mới đó. Chúng ta điều cần đến kỹ thuật nuôi cấy mô tế bào thực vật. Sự phát triển của kỹ thuật này từ Hildedrandt (1902) đến nay đã đóng góp một phần quyết định vào sự thành công của công nghệ sinh học thực vật ngày nay.

Đã có nhiều tài liệu, sách giáo khoa trình bày khá đầy đủ về kỹ thuật nuôi cấy mô tế bào thực vật và các ứng dụng của nó trong vi nhân giống cây trồng. Tuy nhiên, trên từng đối tượng nuôi cấy, thành công hay thất bại còn tùy thuộc vào nhiều yếu tố: môi trường, hóa chất, thao tác, điều kiện nuôi cấy, đối tượng nuôi cấy... và đặc biệt nhất là mục đích cần đạt được của việc tiến hành nuôi cấy. Hiện nay, ứng dụng nuôi cấy mô tế bào thực vật của công nghệ thực vật thường với 2 mục tiêu:

- + Tạo ra giống mới
- + Nhân nhanh các giống đã chọn

Nhưng để hiểu cặn kẽ từng giai đoạn hình thành, tái sinh, phát triển... Những giai đoạn đó có những vấn đề gì ta cần quan tâm và nếu muốn thực hiện nuôi cấy một đối tượng nào đó để có hiệu quả hơn, thì phải cải tiến những khâu nào? Những điều kiện nào?...

Cây mít được mệnh danh là cây của người nghèo do công dụng của nó dường như hoàn hảo về mặt kinh tế và giá trị dinh dưỡng.

Mít (*Artocarpus heterophyllus* Lam) có nguồn gốc từ Ấn Độ, cây to, trái to, có nhiều công dụng: Quả mít được sử dụng rất đa dạng, có thể sử dụng cả quả non và quả già. Quả phức, to, dài 30-60cm, mặt tua tua nhiều gai ngắn. Khi chín, vỏ vẫn giữ màu xanh lục hay hơi ngả sang vàng. Thịt quả chín màu vàng nhạt, vị ngọt, rất

thơm. Quả có nhiều múi, mỗi múi có một hạt. Mít được trồng ở khắp các tỉnh nước ta từ Bắc chí Nam.

Múi mít có nhiều thành phần dinh dưỡng: trong múi mít khô có 11-15% đường, chủ yếu là fructoza và glucoza, một ít tinh dầu thơm, 1,6% protein, 1-2% muối khoáng gồm: 18 mg% canxi, 25 mg% P, 0,4 mg% Fe, 0,14 mg% caroten, 0,04 mg% vitamin B₂, 4 mg% vitamin C.

Trong hạt mít có 70% tinh bột, 5,2% protêin, 0,62% chất béo, 1,4% muối khoáng, lá mít non có thể ăn sống thay rau xanh, hay làm thuốc lợi sữa cho động vật như: bò, dê, trâu...Đọt mít có thể sắc uống chống đi lỏng do rối loạn tiêu hoá. Thân mít phơi khô dùng làm thuốc. Vỏ quả mít có thể ăn, làm dưa, làm mắm ăn...Mít có nhiều công dụng nhưng giá thành tương đối rẻ, rất phù hợp với đời sống nhân dân ta.

Nhu cầu về lương thực hiện nay cùng với sự phát triển của công nghệ sinh học, đặc biệt là lĩnh vực nuôi cấy mô tế bào thực vật phát triển, đã đặt ra mối quan hệ mà chúng ta cần phải đề cập đến.

Ở nước ta, vùng đồng bằng sông Cửu Long có điều kiện khí hậu tự nhiên, đất đai thuận lợi phát triển nhiều loại cây ăn trái có giá trị kinh tế lớn, trong đó có công nghệ chế biến nông sản, có dân cư đông đúc, thương mại phát triển, nhu cầu trái cây cho tiêu dùng nội địa và xuất khẩu lớn. Tuy nhiên, trong nhiều năm qua, cây ăn trái chưa được phát triển đúng với tiềm năng và điều kiện cho phép. Nên hầu hết các vườn cây ăn trái thường là vườn tạp, trồng nhiều loại cây trên cùng một mảnh đất, giống thoái hoá, năng suất và chất lượng thấp, hiệu quả kinh tế kém.

Cây mít là một loại cây mang dáng dấp công nghiệp. Sản phẩm, ngoài việc sử dụng cho thị trường nội địa, còn được sử dụng trong công nghiệp đồ hộp và sản phẩm sấy khô, mà thị trường hiện nay ngày càng mở rộng. Thế nhưng hiện nay không đủ hàng hoá cung ứng cho chế biến xuất khẩu. Vấn đề cần đặt ra là, ngoài việc phát triển cây mít trên những vùng đất tận dụng, mà còn phải qui hoạch phát triển các vùng trồng mít chuyên canh trên các vùng đất thích hợp.

Vì vậy công tác giống cây mít rất quan trọng trong chọn lọc và nhân giống. Cũng vì lý do đó, cây mít cần được tiến hành nghiên cứu phương pháp nhân giống nhanh theo hướng nuôi cấy *in vitro*, nhằm cung cấp một số lượng lớn cây giống cho

ngành lâm nghiệp, cung cấp một nguồn lương thực bổ sung cho nhu cầu đời sống con người. Đồng thời, tạo ra một nguồn thực phẩm phong phú, đa dạng phục vụ cho sinh hoạt hằng ngày của nhân dân và tạo ra những sản phẩm có thể xuất khẩu. Dem lại nguồn kinh tế cho việc nghiên cứu khoa học và đời sống con người trong thời đại đẩy mạnh thương mại, phát triển kinh tế, xây dựng đất nước...

Với những vấn đề cấp thiết như trên, thì đề tài “Tái sinh phôi soma cây mít” dưới sự hướng dẫn của PGS.TS Trần Văn Minh, được thực hiện tại phòng thí nghiệm trọng điểm Quốc gia về Công nghệ tế bào thực vật phía Nam Viện Sinh học Nhiệt đới Tp. Hồ Chí Minh mong rằng sẽ mang lại những định hướng mới trong việc giải quyết các vấn đề trên.

1.2. Mục đích và mục tiêu

1.2.1. Mục đích

Nghiên cứu khả năng tái sinh phôi soma cây mít.

1.2.2. Mục tiêu

Xác định môi trường phát sinh và cấy chuyển tế bào soma

Xác định môi trường lỏng để nuôi cấy dịch huyền phù tế bào soma

Xác định môi trường tái sinh phôi.

1.3. Giới hạn đề tài

Vì thời gian có hạn nên đề tài chỉ thực hiện trong phòng thí nghiệm ở giai đoạn từ phát sinh tế bào soma đến tái sinh cây hoàn chỉnh.

1.4. Nội dung nghiên cứu

Nghiên cứu ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy đến phát sinh tế bào soma

Nghiên cứu ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy đến cấy chuyển tế bào soma

Nghiên cứu nuôi cấy tế bào soma trên môi trường lỏng

Nghiên cứu tái sinh tế bào soma

Nghiên cứu sự nhân chồi cây mít

Nghiên cứu nuôi cấy phát sinh rễ

Chương 2

TỔNG QUAN

2.1. Giới thiệu chung về cây mít

2.1.1. Phân loại và nguồn gốc phân bố

2.1.1.1. Phân loại

Ngành (<i>Division</i>)	: <i>Magnoliophyta</i>
Lớp (<i>Class</i>)	: <i>Magnoliopsida</i>
Bộ (<i>Ordo</i>)	: <i>Rosales</i>
Họ (<i>Familia</i>)	: <i>Moraceae</i>
Chi (<i>Genus</i>)	: <i>Artocarpus</i>
Loài (<i>Species</i>)	: <i>Artocarpus heterophyllus</i> Lam

Ngoài ra mít còn cùng họ với *Ficus carica* và *Morus indica*. Loài *Artocarpus goomf* 50 giống, có những cây nhiệt đới quan trọng như: *A. cummunis*, *A. insica* là những cây lương thực quan trọng ở Polynesia.

Tuỳ vào cách gọi của mỗi quốc gia mà mít có tên khác nhau, cụ thể: ở Malaysia là *jak-fruit*, *jak*, *jaca*; ở Philippines là *nangka*; ở Thái Lan là *khanun*; ở Campuchia là *khnor*; ở Lào là *mak mi* hay *mai mi* và ở Việt Nam là *mít*.

2.1.1.2. Nguồn gốc và sự phân bố

Mít gốc ở Nam Ấn Độ, nơi mà độ nhiệt và lượng mưa cũng giống như ở miền Nam Việt Nam. Trồng nhiều mít nhất cũng là các nước Đông Nam Á, Thái Lan, Philippines, Ấn Độ, Bangladesh. (Trần Văn Minh, 1997)

Ở Châu Phi, nó thường được trồng ở Kenya (Đông Châu Phi), Uganda, và Zanzibar cũ. Mặc dù nó được trồng ở Hawaii trước năm 1988, nhưng nó vẫn rất hiếm ở đây và những vùng đảo Thái Bình Dương, cũng như những vùng nhiệt đới ở Mỹ và phía tây Ấn Độ. Nó cũng giới thiệu ở phía bắc Brazil vào giữa thế kỷ 19 và được phổ biến ở đây và ở Surinam.

Vào năm 1782, nó được xuất hiện ở Jamaica và khoảng 100 năm sau, cũng được nhập khẩu đến Florida từ vườn ươm của những nhà lý luận ở Srilanka.

Ở phía Nam Ấn Độ, mít là thức ăn phổ biến nhất, kể đến là xoài và chuối trong tổng số sản phẩm của những cây hằng năm. Có đến hơn 100000 cây, khoảng 14826 vùng (khoảng 26000 ha) được dùng cho việc trồng các loại cây này.

Ở Việt Nam, mít được trồng ở khắp nơi, có 2 giống mít chính: mít dai có thịt rắn chắc và mít mật có thịt mềm nhão nhiều nước. Là cây ưa sáng và ưa ẩm vừa phải, thích hợp với đất thoát nước, đất feralit vùng trung du. Ở miền Nam, còn có nhiều giống mít khác: mít tố nữ thuộc loài *A. champiden* (Lour.), quả nhỏ, lúc chín mềm và thơm hơn mít thường.

2.1.2. Đặc điểm sinh học của cây mít

2.1.2.1. Đặc tính hình thái cây

Hình dáng cây

Cây mít trồng từ hạt, ra hoa khi đạt 4-5 tuổi. Là loại cây gỗ trung bình, họ dâu tằm (*Moraceae*).

Cây có hình dáng đẹp và to lớn, cao 9 – 21 m. Nhánh nhiều, Ruột cây mềm, thường hay bọng.

Lá xanh đậm, mọc xen kẽ, bóng láng như da, có màu xanh đẹp, gân vàng, lá dài 22,5cm. Lá đơn, nguyên, hình trái xoan hay hình trứng ngược, phiến dày. Các bộ phận của cây đều có chất dính và nhựa mủ trắng.



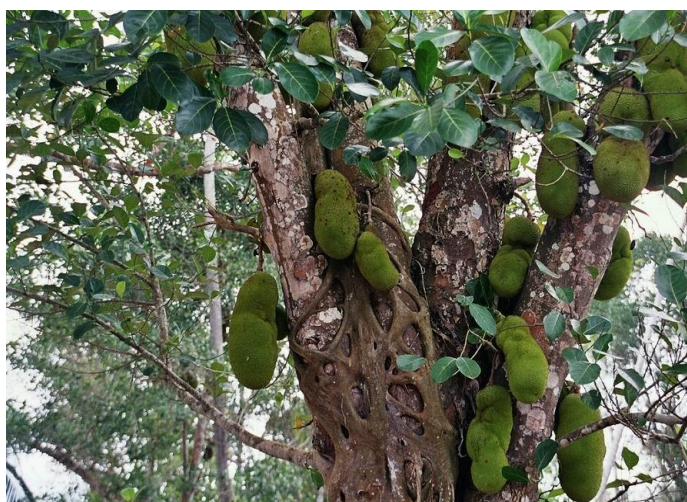
Hình 2.1: Lá của cây mít ở 1,5 tuổi

Hoa:

Hoa xuất hiện trên những cuống ngắn, thô, phân nhánh, mọc trên thân chính hoặc trên các cành lớn. Cũng có khi ở cây già, hoa ra cả trên những rễ lớn mọc trôi lên trên mặt đất. Hoa đơn tính, gồm hoa đực và hoa cái, mọc trên cùng một cây (đơn tính đồng chu). Hoa đực nhiều, không có cánh hoa, mọc chen nhau trên cùng một trục gọi là cụm hoa đực hình đuôi sóc, nhỏ, dài, bao phần nổi lên trên bề mặt cụm hoa. Hoa cái cũng sinh ra từ cụm, không có cánh, mọc sát nhau trên cùng một trục, to hơn, mỗi cụm có vài trăm hoa, nhụy chẻ đôi, nổi lên trên mặt cụm hoa. Về sau chỉ có một số hoa cái thụ phấn và phát triển thành múi mít. Các hoa khác thui đi tạo thành xơ.

Quả:

Quả mít (loại quả phức) thực chất là một cụm quả gồm nhiều quả con (có múi và hạt) dính trên một trục nạc (lõi của quả) và được bao kín bởi vỏ quả có gai (do dính các hoa dính lại mà thành). Quả cũng có thể nặng 5-10 kg. Quả khi sống vỏ màu xanh, khi chín có vỏ màu vàng và rất thơm.



Hình 2.2: Cây mít trưởng thành mang quả

Vỏ mít:

Vỏ bên ngoài là những hợp chất có màu xanh hay vàng khi chín và quả có hình nón. Phần bên trong là những “quả” (thường gọi là múi, là do bao hoa phát triển hoàn toàn) có màu vàng, thịt quả ngon, dai và ở giữa có lõi. Bên ngoài mỗi múi rất trơn, hình oval.

Hột:

Hột mít có màu nâu sáng (vỏ quả trong) được phủ bởi một màng trắng mỏng (vỏ quả ngoài). Hột dài khoảng 2-4cm và dày 1,25-2cm và bên trong có màu trắng và giòn.

Khi chín hoàn toàn sẽ có mùi rất khó chịu, giống mùi củ hành bị phân huỷ, khi mở bên trong quả sẽ có mùi của quả dứa hay chuối.

2.1.2.2. Khí hậu

Cây mít thích nghi với khí hậu nhiệt đới và cận nhiệt đới ẩm ướt, dễ dàng chịu lạnh, không chịu được hạn hán. Mít có bộ rễ gắn sâu, chống hạn tốt, nhưng muốn có sản lượng cao, chỉ nên trồng ở những vùng có lượng mưa từ 1000 mm trở lên, nếu không tưới. Ngược lại, mít chống úng, mít là cây chết trước tiên.

Ở Việt Nam từ Bắc chí Nam, đâu cũng trồng mít, trừ những vùng cao miền Bắc. Ở miền Nam, vùng Đúc Trọng cao 1000m mít sinh trưởng phát dục bình thường, nhưng chậm hơn ở vùng thấp lại có nhiều cây ăn trái có giá trị cao hơn, nên ít trồng mít. Mít tố nữ có phần ưa nóng hơn nên ít trồng ở độ cao và vĩ tuyến cao, so với mít thường.

Ở Ấn Độ, cây phát triển dưới dãy núi Himalagan và độ cao so với mực nước biển là 1500m ở phía Nam. Cây mít phát triển ở độ cao 1200m thường kém chất lượng và không thể ăn được. Cây có thể cao lên 244m ở Quảng Đông, Trung Quốc.

2.1.2.3. Đất trồng

Mít mọc sum xuê ở vùng giàu chất dinh dưỡng, độ sâu trung bình. Đất dù xấu, nhiều sỏi đá miễn là thoát nước đều có thể trồng mít, nhưng muốn cây to, sản lượng nhiều phải trồng ở đất phù sa thoát nước. Mít phát triển khá chậm và thấp ở vùng đá vôi cạn.

Ở Ấn Độ, người ta cho rằng cây mít phát triển cao và ôm trên vùng cát, thấp và mập ở vùng nhiều đá. Nếu rễ không tiếp xúc với nước thì cây sẽ không thể chịu được và có thể chết. Đã có những điển hình như Đông Triều tỉnh Hải Hưng trồng hàng trăm ha trên đất gò xấu không có sản lượng đáng kể. Mít ít sâu bệnh nguy hiểm, đặc biệt là mít tố nữ.

2.1.2.4. Đặc điểm sinh trưởng và phát triển cây mít

Người ta chưa biết rõ mít thụ phấn nhờ gió hay côn trùng. Nhưng ở Ấn Độ, thụ phấn nhân tạo có tác dụng tăng năng suất, trái lại tròn đẹp, ít múi lép, khi mít trồng nhiều, tập trung khả năng thụ phấn tăng lên.

Sự nhân giống mít thường bằng hạt vì có thể giữ được lâu hơn trước khi đem trồng. Sự nảy mầm đòi hỏi 3 đến 8 tuần nhưng sẽ được nhanh hơn nếu ngâm hạt trong nước khoảng 24 giờ. Ngâm hạt trong dung dịch 10% gibberellic acid (GA) sẽ nảy mầm hoàn toàn 100%. Thuận lợi hơn của cây trồng từ hạt đó là rễ sẽ mọc dài và mỏng manh, sẽ rất khó cho sự cấy ghép thành công. Việc cố gắng ghép cành và ghép mắt thường không thành công, mặc dù theo Ochse thì Forkert đã thay đổi công thức cho sự ghép mắt thuận lợi.

2.1.2.5. Loài gây hại và bệnh tật

Côn trùng gây hại chủ yếu ở Ấn Độ là loại sâu bướm, *Diaphania caesalis*, sâu ăn bột. *Nipaeococcus viridis*, *Pseudococcus corymbatus*, và *Ferrisia virgata*, nước bọt của rệp, *Cosmoscarta relata* và *Ceroplastes rubina*. Hầu hết, loài bọ phá hoại là *Indarbela tetraonis* và *Batocera rufomaculata*. Những loài khác trên thân và khoan vào quả, là *Margaronia caecalis*, và con mọt ngũ cốc ăn nụ màu nâu, *Ochyromera artocarpio*. Ở miền Nam Ấn Độ, ấu trùng của bọ cánh cứng có sừng dài, gồm *Apriona germarrri*; *Pterolophia discalis*, *Xenolea tomenlosa asiatica*, và *Olenecamptus bilobus* loại gây hại thân cây nghiêm trọng. Sâu bướm trên màng của lá, *Perina nuda* và *Diaphania bivitralis*, ít nghiêm trọng hơn, như rệp vùng, *Greenidea artocarpi* và *Toxoptera aurantii*; và lớn nhanh, *Pseudodendrothrips dwivarna*.

Những bệnh nghiêm trọng bao gồm bệnh chuyên màu hồng, *Pelliculana (Corticium) salmonicolor*, thân, rễ và cụm hoa đực bị mục nát, gây ra bởi *Rhizopus artocarpi*; bệnh đốm lá do *Phomopsis artocarpina*, *Colletotrichum lagenarium*, *Septoria artocarpi*, và loại nấm khác. Loài rệp vùng xám, *Pestalotia elasticola*, than mục, *Ustilana zonata*, và bị gỉ, *Uredo artocarpi*, gây ra trên cây mít ở một số vùng.

Quả được bao bên ngoài bởi cái bao giấy khi còn non để bảo vệ chúng khỏi những loài gây hại và bệnh tật.

2.1.3. Đặc điểm lâm học cây mít

2.1.3.1. Sự trồng trọt

Cây mít có thể sống ở độ cao 1000m so với mực nước biển, những nơi quá cao cây mau chết. Trồng mít bằng cách ươm hạt, cây chịu đất vườn, đất núi đá, đất cát pha. Cây chịu hạn tốt nhưng không trồng được ở điều kiện đất cát. Rễ mít rất mạnh, ăn sâu để hút nước.

Những cây trồng từ hạt được ngâm trong dung dịch GA (25-200 ppm) sẽ làm tăng sự phát triển của chồi non. Dung dịch GA dạng xịt tăng sự phát triển của rễ. Những cây còn nhỏ không nên trồng nơi chắn thả súc vật, cỏ, hươu...

Những cây trồng từ hạt phải từ 4 đến 14 năm để thích nghi, mặc dù những cây ra hoa sớm có lẽ chỉ bắt đầu chịu được khoảng 2,5 đến 3,5 năm. Ở Srilanka, cây mọc khá nhanh và đạt đến độ cao 17,5 m và đường kính thân đến 70cm trong 20 năm. Cây có thể sống đến hơn 100 năm. Tuy nhiên, sự sản xuất của cây bị giảm theo tuổi cây. Ở Thái Lan, nó được trồng thành hàng xen kẽ mỗi 10 năm, vì thế những cây 20 tuổi thường được loại bỏ khỏi vườn và được thay thế bởi một thế hệ mới. Nhu cầu phân bón của cây phải được chú ý vì những triệu chứng xấu về sự thiếu hụt mangan được quan sát ở Ấn Độ.

Sau khi thu hoạch, những cành con có thể được cắt khỏi thân hay nhánh để gây sự ra hoa cho mùa kế tiếp. Ở quận Cachar của Assam, sự sản xuất hoa cái được kích thích bằng việc sử dụng một cái rìu nhỏ, những chồi cây nổi lên từ những vết cắt, và những nhánh được cắt đi 3 đến 4 năm để duy trì sự sinh sản. Mặt khác theo những nghiên cứu của trường đại học Kalyani, miền tây Bengal, chỉ ra bằng cả vết cắt của cành cũng như sự tỉa cành không làm tăng cành chiết và sự tăng cành chiết chỉ trong năm đầu, sự sản xuất sẽ giảm trong năm thứ hai.

2.1.3.2. Mùa màng

Ở Châu Á, cây mít chín mùi chủ yếu từ tháng 3 đến tháng 6, tháng 4 đến tháng 9 hay tháng 6 đến tháng 8, tùy thuộc vào thời tiết mỗi vùng, những mùa trái vụ từ tháng 9 đến tháng 10 hay một vài loại cây ở những thời gian khác trong năm. Ở phía tây Ấn Độ, cây chín vào tháng 6, ở Florida là mùa hè.

2.1.3.3. Sản lượng

Ở Ấn Độ, sản lượng tốt nhất là 150 quả trên số cây hằng năm, tuy nhiên vài cây có thể đạt đến 250 quả và cây trưởng thành có thể sản xuất 500 quả, nhưng quả chỉ có kích thước trung bình và nhỏ.

2.1.3.4. Thu hoạch và dự trữ

Quả mít sẽ chuyển sang màu nâu và hư hỏng nhanh sau khi chín. Thử nghiệm về sự trữ lạnh chỉ ra rằng quả chín có thể giữ được trong khoảng từ 3 đến 6 tuần ở từ 52^o đến 55^oF (11,1^o-12,78^o C) và độ ẩm tương ứng từ 85 đến 95%.

2.1.4. Ý nghĩa kinh tế và giá trị dinh dưỡng

Hầu hết các thành phần của cây mít đều có giá trị sử dụng:

Lá mít non ăn sống có vị vừa chua vừa chát, thường ăn ghém với các loại cá. Lá mít già có thể nấu nước uống hằng ngày. Lá mít làm thuốc lợi sữa cho trâu, bò, và người là thức ăn của trâu, bò, dê, hươu, nai... có chất nhựa mủ màu trắng, khô rất dính có thể dùng để làm chất dính.

Quả mít được sử dụng rất đa dạng. Người ta sử dụng từ quả non cho đến quả chín. Người trồng mít thường không để mít chùm vì hai lý do: Một là, dễ bị sâu ở nơi 2-3 quả mít kề với nhau, hơn nữa ở chỗ đó thường bị lép không có múi mà chỉ có xơ mít; Hai là, mít càng ít quả thì quả càng to và ngon. Cho nên, khi mít thành quả ta hái dần các quả, hái từ quả non đến quả già và chỉ để ở mỗi chùm một số quả đẹp, tròn trịa, không sâu bọ, ở vị trí tốt cho đến chín.

Quả mít non ăn sống bằng cách thái mỏng thả vào nước để hoà tan nhựa mít. Sau khi rửa sạch nhựa, các lát mít non rất trắng, ăn giòn, có vị ngọt không chát. Ở nhiều vùng, người ta luộc chín mít non để ăn.

Quả mít già thường ăn luộc. Luộc làm mất vị chát, mất nhựa mít. Mít luộc ăn mềm và ngon. Khi luộc thường luộc cả miếng, sau khi luộc chín mới thái nhỏ để ăn như rau. Mít luộc có thể làm nộm với lạc, vừng, hoặc trộn dầu.

Quả mít non và già đều có thể muối chua thành rau chua hoặc nấu canh với các loại đậu, cá...nhờ có vị chát nên mít có tác dụng giảm tanh rất tốt.

Quả mít chín chỉ bỏ phần vỏ gai và phần lõi ở bên trong, còn lại toàn bộ đều có thể dùng làm thức ăn. Đây là loại rau có chứa chất bột và đường, có thể ăn thay cơm.

Trong quả mít, có giá trị nhất là múi mít. Múi mít ăn như các loại quả chín khác. Được sử dụng để muối mắm cái, tạo cho mắm có hương vị ngọt ngon. Múi mít chín phơi khô làm mít, ép nước ủ men làm rượu mít.

Xơ mít thực chất là các múi lép luộc ăn như rau, ép nước làm rượu, muối dưa chua (làm nhút). Nhân dân vùng Nghệ Tĩnh dùng xơ mít để muối dưa, nổi tiếng ở địa phương và chất lượng không kém gì dưa muối dùng nguyên liệu là cải, cà và một số rau khác.

Múi mít khi xanh có thể luộc ăn, khi chín thì ăn tươi. Múi mít so sánh với xoài và chuối sứ chất lượng không kém mà lại rẻ tiền hơn. Mít có nhiều calo tính trên 100g thịt (94calo), đường khá nhiều (23,7g), đạm nhiều (1,2g), nhiều chất khoáng cần thiết cho cơ thể như Canxi (12mg), lân (32mg), khá nhiều vitaminB (0,032mg) cũng là những chất cần cho người nghèo, trẻ em...



Hình 2.3: Quả mít chín được bổ đôi

Hạt mít ăn ngon, có nhiều chất đạm, chất béo. Có thể ăn luộc, ăn nướng, hoặc phơi khô đập nhỏ làm lương thực để ăn dần. Hạt mít luộc có thể giã nhỏ với các loại đậu, lạc vừng... để làm các món ăn. Nhà chùa thường làm giò hạt mít (hạt mít + lạc) để ăn chay. Hạt chiếm tỷ lệ cao trong trái mít (13%). Hạt mít giàu calo, tính trên 100g thịt (151Calo), rất giàu các chất khoáng Canxi (35mg), lân (126 mg), sắt (1,2 mg), người nghèo thường trộn hạt mít với gạo nấu cơm và không nên xem thường loại thực phẩm này, vì còn chứa nhiều chất dinh dưỡng hơn cả cơm thuần.

Gỗ mít: Gỗ mít rất tốt, có màu vàng đẹp, dùng làm nhà (cột, kèo, cửa), dụng cụ gia đình (bàn, ghế, mâm, hòm, thùng gánh nước), thùng chộp cá, làm nước mắm. Lõi cây rất chắc dùng làm vành xe....Gỗ mít, nhất là tâm gỗ các cây to, là một loại gỗ quý, không những dùng trong xây dựng, còn để làm dụng cụ, chế những đồ mỹ nghệ do thớ gỗ mềm, không nứt.

Mít có cây to, cao, sống lâu, chịu hạn, chịu nắng tốt, tán lá dày, xanh quanh năm, bóng râm có giá trị cải thiện môi trường cao, đặc biệt ở nông thôn, mùa nắng, giữa các ruộng lúa thiếu bóng cây.

Mủ có màu trắng như cao su, dùng để làm nhựa gát chim hay làm thuốc dán. Mủ nó còn để bắt ruồi, sâu bọ...

Ngoài ra, mít còn được dùng trong y học như làm thuốc bổ, thuốc chữa loét, rễ dùng làm thuốc để trị hen suyễn...

Nhược điểm: Khó xuất khẩu vì mùi thơm quá mạnh đối với những người chưa quen. Chế biến thành mít khô có thể khắc phục một phần nhược điểm này. Trái rất to (5-7kg) không kể mít tó nữ, nên vận chuyển nặng nề. Người phương Tây không thích do quen với những thực phẩm của những trái cây chia lẻ từng suất và cũng chưa quen với mùi thơm quá mạnh của mít.

Nhân dân Việt Nam có kinh nghiệm và tập quán trồng mít từ lâu đời để ăn và lấy gỗ. Mít dễ trồng, có thể trồng thuần loại hay trồng xen theo các bờ vườn đồi bậc thang, khoảng giữa các bờ trồng chè hay cây lương thực khác, gần gốc mít trồng dứa. Ở miền Bắc, mít chín vào mùa hè, còn ở miền Nam chín gần như quanh năm. Sau khi trồng 4 đến 5 năm thì thu hoạch được quả. Trung bình 24 tấn quả/ha/năm.

Thịt chiếm 25-40% trọng lượng quả. Thông thường, hạt tươi có tỉ lệ tinh bột cao, hàm lượng canxi thấp hơn, giàu vitamin B₁ và B₂.

Đặc tính độc: Burkill công bố rằng, quả mít chưa chín sẽ khó tiêu hoá. Khi chín thì hơi nhuận tràng, nếu ăn nhiều sẽ gây bệnh tiêu chảy. Hạt chín ăn khó tiêu hoá vì sự có mặt của trypsin là một chất ức chế, chất này sẽ bị phá huỷ khi đun nóng.

2.1.5. Tình hình sản xuất mít ở Việt Nam và trên thế giới

Ở những vùng đất khô, không trồng được nhiều rau, nhất là vào mùa thiếu nước, nếu biết trồng mít và sử dụng sản phẩm từ mít thì đây là một nguồn rau quý.

Nhân dân ta trồng mít để lấy quả với cách sử dụng đa dạng như đã nêu, đồng thời lấy gỗ. Gỗ mít là loại gỗ quý dùng làm nhà, đóng các đồ dùng trong nhà và làm đồ mỹ nghệ. Mít còn được dùng làm cây che phủ đất, chống sỏi mòn, cải tạo môi trường, làm đẹp cảnh quan.

Ở miền Bắc nước ta mít chín vào tháng 7,8. Khi chín quả căng phồng ra, gai giãn ra, màu vỏ quả chuyển từ xanh sang vàng, nắn thấy mềm, ngửi thấy mùi thơm. Quả mít chín tập trung trong 2-3 tháng. Cần chế biến bảo quản tốt để có mít ăn dần trong cả năm.

Gần đây sản phẩm mít được chú ý trên thị trường thế giới. Đã thấy quả mít tươi được bày bán ở thị trường châu Á và châu Âu. Múi mít cũng như cả múi lẫn hạt non đã được Thái Lan đóng hộp xuất khẩu. Mít sấy khô, bao gói bằng túi nilong được xuất sang các nước Canada, Pháp, Mỹ được khách hàng ưa chuộng.

Ở nước ta, mít có thể trồng được trên các loại đất khác nhau. Mít không đòi hỏi nhiều đối với đất và có thể trồng cả trên đồi đất cằn. Tuy vậy, để mít cho quả nhiều và có chất lượng cần đảm bảo cho cây một số điều kiện cần thiết, nhất là cần bón phân đầy đủ.

Ở các tỉnh phía Nam cần tránh trồng mít vào đầu mùa khô. Tốt nhất là trồng đầu mùa mưa, tức là vào tháng 4,5. Ở các tỉnh phía Bắc, có thể trồng mít vào tháng 3 - 4 hay các tháng 8 - 9, nhưng trồng vào tháng 3 - 4 cây dễ sống hơn.

Ở một số nơi như Đông Triều (Quảng Ninh), Quỳnh Lưu (Nghệ An) và các tỉnh Hà Bắc, Vĩnh Phú, mít được trồng thành vườn lớn, dưới dạng vườn rừng, vườn đồi. Tuy nhiên, có nhiều vấn đề về khoa học và công nghệ chưa được giải quyết. Cho nên, mít hầu như không cho quả hoặc cho quả lác đác.

Thống kê về sự ra hoa, thụ phấn chéo và nhân giống bằng hạt truyền thống, mít có hình dáng, kích thước và chất lượng trái thay đổi phụ thuộc vào canh tác và mùa. Mít được xếp vào hai nhóm trên cơ sở thịt trái: Cơm nhão (ngọt) và cơm chặt (ngọt, thơm và chắc). Những giống mít nổi tiếng được biết đến như *Rudrakshi*,

Singapore hay *Ceylon Jack*, *Khaja Allahabad* và *Matton Varikka* (Srinivasan, 1970; Rowe-Dutton, 1976; Singh, 1985, 1986) ngoài ra còn có các giống như *Hadrhiyalava*, *Bhadonha*, *Zarda* và *Bhusola* có nguồn gốc Bắc Ấn Độ (Singh, 1986).

Cây mít thường được trồng bằng hạt. Thụ phấn nhờ gió thường là phương thức phổ biến và là một phương pháp nhân giống truyền thống ở cây mít (Singh, 1961; Rowe-Dutton, 1976). Những phương pháp nhân giống là chiết, ghép và ghép áp. Cây mít là cây đơn tính cùng gốc có hoa nở không hoàn toàn. Thụ phấn ở cây mít bằng cách lai tạo truyền thống, trên cơ sở những đặc tính nông học, từ quần thể cây hạt. Giống mít như *Rudrakshi*, *Singapore Jack* và *Khaja Allahabad* là những dòng nổi tiếng được chọn lọc từ những điều kiện canh tác và khí hậu khác nhau. *Matton Varikka* được chọn lọc từ quần thể cây từ hạt ở Kerala là một giống có nhiều triển vọng (Srinivasan, 1970).

2.2. Kỹ thuật nuôi cấy mô tế bào thực vật

2.2.1. Khái niệm

Hệ thống nhân giống vô tính và nuôi cấy mô bắt đầu với một mảnh nhỏ cây trồng không bị nhiễm vi sinh vật, đặt trong môi trường dinh dưỡng. Chồi mới hay callus mà mẫu cây này tạo ra bằng sự tăng sinh được phân chia và cấy chuyên.

De Fosard (1977) phân biệt 3 loại nuôi cấy in vitro của thực vật bậc cao:

- 1) Có tổ chức (organized): bao gồm nuôi cấy hạt, phôi và cơ quan. Đặc điểm cấu trúc tổ chức của cây trồng hay cá thể cơ quan được duy trì. Nó gần giống như sự nhân giống sinh dưỡng *in vitro* bằng giâm cành, tách chiết. Nếu cấu trúc tổ chức không bị phá vỡ thì thế hệ sau giống như nguyên liệu cây trồng ban đầu.
- 2) Không tổ chức (non-organized): tế bào hay mô được tách ra từ phần có tổ chức của cây trồng bị mất tính chuyên biệt rồi được nuôi cấy, mô sẹo không tổ chức được hình thành. Nếu mô sẹo phân tán, cụm tế bào và tế bào đơn hình thành. Sự tăng trưởng vô tổ chức này được cảm ứng chủ yếu từ sự sử dụng nồng độ cao auxin hay cytokinin trong môi trường dinh dưỡng. Sự ổn định di truyền của nuôi cấy vô tổ chức thường thấp.

- 3) Có tổ chức/không tổ chức: đây là loại nuôi cấy trung gian của 2 loại trên. Tế bào trong cơ quan hay mô tách rời mất tính chuyên biệt, rồi hình thành mô hay mô sẹo bởi sự phân chia, từ đó cơ quan (rễ hay chồi) hay cả cá thể (tiền phôi hay phôi) thường phát triển nhanh chóng. Những cấu trúc có tổ chức có thể phát triển từ nuôi cấy không tổ chức hoặc thông qua kỹ thuật đặc biệt hoặc tự phát. Trong tất cả các trường hợp này, thế hệ sau thường không hoàn toàn giống nguyên liệu cấy trồng ban đầu.

Hartmann và Kester (1983) phân loại tổng quát hệ thống nhân giống vô tính và nuôi cấy mô:

Tái sinh cây con từ cơ quan dinh dưỡng:

Nuôi cấy đỉnh sinh trưởng

Vi ghép

Nuôi cấy đỉnh chồi

Nuôi cấy chồi bất định

Nuôi cấy mô và tế bào

Nuôi cấy callus

Nuôi cấy tế bào huyền phù

Nuôi cấy tế bào trần

Tái sinh cây con bởi cơ quan sinh sản:

Nuôi cấy hạt phấn

Nuôi cấy noãn

Nuôi cấy phôi

Nuôi cấy hạt

Nuôi cấy bào tử

2.2.2. Ứng dụng của kỹ thuật nuôi cấy mô

Theo Bajai (1968) một số cây trồng sản xuất qua nuôi cấy mô đã được tiêu thụ trên thị trường với giá hàng triệu dollars. Kỹ thuật nuôi cấy mô thực vật bậc cao để cải thiện cây trồng bao gồm những ứng dụng:

Nhân giống vô tính với tốc độ nhanh.

Tạo cây trồng sạch bệnh và kháng bệnh.

Cảm ứng và tuyển lựa dòng đột biến.
 Sản xuất cây đơn bội qua nuôi cấy túi phấn.
 Lai xa qua môi trường nuôi cấy phôi và noãn.
 Tạo dòng lai xa soma và lai tế bào trần (protoplast).
 Cố định nitrogen.
 Cải thiện hiệu quả quang tổng hợp.
 Bảo quản các nguồn gen (Trần Thị Dung, 2001).

2.2.3. Vai trò các chất điều hoà sinh trưởng

Những hoá chất có khả năng điều khiển được sinh trưởng và phát dục của cây trồng được gọi là chất kích thích sinh trưởng hay chất điều hoà sinh trưởng.

Với một lượng cực kỳ nhỏ, nhưng hiệu quả vô cùng to lớn trong các giai đoạn khác nhau như: sự phát sinh cơ thể, sự kích dục... Các chất điều hoà sinh trưởng là một trong những hoá chất không thể thiếu được trong đời sống thực vật. mặc dù cho đến nay, cơ chế tác dụng của nó vẫn chưa được lý giải rõ ràng.

2.2.3.1. Auxin

Lịch sử phát hiện ra auxin

Năm 1880, Darwin phát hiện ra rằng: bao lá mầm (coleoptyl) của cây họ lúa rất nhạy cảm với ánh sáng và ông cho rằng, đỉnh ngọn bao lá mầm là nơi tiếp nhận kích thích của ánh sáng.

Paal (1919) đã cắt đỉnh bao lá mầm và đặt trở lại trên chỗ cắt nhưng lệch qua một bên và để trong tối. Hiện tượng uốn cong (hướng động) xảy ra như một trường hợp chiếu sáng một chiều. Ông kết luận rằng: đỉnh ngọn đã hình thành một chất kích thích sinh trưởng nào đó và ánh sáng xác định sự phân bố của chất đó về hai phía của bao lá mầm.

Went (1928) đã đặt đỉnh ngọn tách rời của bao lá mầm đó lên các bản agar để các chất sinh trưởng nào đấy khuếch đại xuống agar, thì cũng gây ra hiện tượng sinh trưởng uốn cong như thí nghiệm của Paal. Rõ ràng, một chất sinh trưởng nào đấy được tổng hợp trong bao lá mầm, nó đã khuếch tán xuống agar và gây ra sự sinh trưởng hướng động đó. Went gọi chất đó là chất điều hoà sinh trưởng hiện nay là auxin.

Năm 1934, Kogl và ctv đã tách một chất từ dịch chiết nấm men có hoạt chất như chất sinh trưởng và Thimann (1935) cũng tách được chất này từ nấm *Rhizopus*. Người ta gọi chất đó là β - axit indolaxetic (AIA).

Tiếp đó Wightman (1977) đã phát hiện ra một hợp chất auxin là axit phenylaxetic (APA).

Ngày nay, bằng con đường hoá học, người ta đã tổng hợp được nhiều hợp chất auxin khác nhau bao gồm: IAA (Indolacetic acid), IBA (Indolbutyric acid), NAA (Naphthalene acetic acid), 2,4D (Dichlorophenoxy acetic acid) (Vũ Văn Vũ, 2000)

Vai trò của auxins

Kích thích sự giãn tế bào, phân chia tế bào (khi kết hợp với cytokinin), kích thích sự phân hoá của libe và mô gỗ.

Auxin gây ra tính hướng động của cây, kích thích sự phát triển của rễ.

Ức chế sự lớn lên của chồi bên, trì hoãn sự hoá già của lá.

Kích thích sự lớn lên các phần của hoa, làm chậm sự chín của trái.

2.2.3.2. Cytokinin

Lịch sử phát hiện ra cytokinin

Năm 1913, Haberlandt trích từ tế bào nhu mô cây cà và tế bào nhu mô khoai tây một chất có thể làm tăng sự phân chia tế bào nhu mô lõi.

Năm 1938, Bonner trích từ trái đậu một chất làm tăng trưởng tế bào của trái này và được gọi là cyto.

Năm 1954, Steward và Shantz phân tích được trong nước dừa một chất quan trọng là diphenylurea.

Năm 1955, Skoog ghi nhận khi nuôi cấy mô thuốc lá và đã chứng tỏ rằng nước dừa có sự phân bào.

Tiếp đó Miller (1959) đã chiết tách chất này. Đây cũng là chất kích thích chủ yếu trong môi trường nuôi cấy mô ở lan.

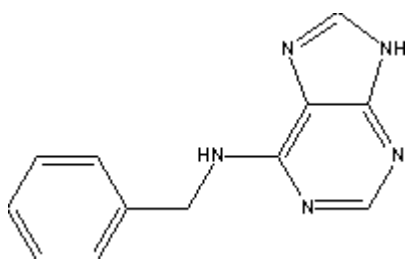
Ngày nay bằng con đường hoá học người ta đã tổng hợp nhiều loại cytokinin, cytokinin thường gặp nhất là: Kinetin (6 Furfuril aminopurin), BA (6-Benzyl aminopurine). Tuy nhiên, hiện nay nhiều nghiên cứu sử dụng TDZ (chất

điều hoà tăng trưởng thuộc nhóm cytokinin) có hoạt tính mạnh nhằm mục đích cảm ứng tạo phôi vô tính (Mai Trần Ngọc Tiếng, 2001).

Tên khoa học: N-benzyl-Adenine, N6-Benzyladenine, benzylaminopurine, N-(phenylmethyl)-1H-purin-6-amine, Benzyladenine, Cytokinin B, Purin-6-amine, N-(phenylmethyl), Verdan senescence inhibitor, 6BA.

Trọng lượng phân tử: 225.25.

Công thức cấu tạo: $C_{12}H_{11}N_5$.



Vai trò của cytokinin

Kích thích sự phân chia tế bào, hình thành hoa.

Phá vỡ trạng thái ngủ nghỉ của hạt và một số cơ quan khác.

Kích thích sự tăng cường tổng hợp ADN và ARN trong tế bào, điều tiết quá trình sinh tổng hợp protein trong tế bào

2.2.3.3. Gibberellin

lịch sử

Gibberellin là nhóm phytohormon thứ 2 được phát hiện sau auxin, từ việc nghiên cứu bệnh lý “bệnh lúa von”.

Năm 1926, Kurosawa (Nhật bản) đã thành công trong thí nghiệm gây bệnh von nhân tạo cho cây lúa và ngô.

Yabuta (1934-1938) tách được 2 chất dưới dạng tinh thể từ nấm lúa von gọi là gibberellin A và B, nhưng chưa xác định được bản chất hoá học của chúng. Năm 1955, hai nhóm nghiên cứu Anh và Mỹ phát hiện ra axit gibberlic ở cây lúa von và xác định công thức hoá học của nó ($C_{19}H_{22}O_6$).

Năm 1956, West, Phiney, Radley tách được gibberellin từ thực vật bậc cao và phát hiện trên 50 gibberellin và kí hiệu A_1, A_2, \dots, A_{52} hoặc $GA_1, GA_2, \dots, GA_{52}$, trong đó A_3 có hoạt tính mạnh nhất.

Các gibberellin khác nhau chủ yếu ở vị trí nhóm $-OH$ trong phân tử.

GA được tổng hợp ở trong phôi đang sinh trưởng, trong các cơ quan đang sinh trưởng khác nhau như lá non, rễ non, quả non...

Vai trò sinh lý

Kích thích mạnh mẽ sự sinh trưởng kéo dài của thân, sự vươn dài của lóng cây họ lúa, ảnh hưởng lên sự sinh trưởng các đột biến lùn. Sử dụng GA ngoại sinh để cây phát triển bình thường.

Kích thích sự nảy mầm của hạt và củ. Kích thích sự ra hoa, ảnh hưởng đặc trưng lên sự ra hoa là sự sinh trưởng kéo dài và nhanh chóng của cụm hoa.

Ảnh hưởng sự phân hoá giới tính: ức chế sự phát triển hoa cái và kích thích sự phát triển hoa đực.

Làm tăng kích thước của quả, tạo quả không hạt.

2.2.4. Nuôi cấy phát sinh phôi soma

2.2.4.1. Phôi vô tính

Phôi vô tính là các cá thể nhân giống (propagules) có cực tính, bắt nguồn từ các tế bào dinh dưỡng, còn gọi là tế bào soma. Chúng rất giống phôi hữu tính (zygotic embryo) ở hình thái, quá trình phát triển, và sinh lý, nhưng không phải là sản phẩm của sự thụ tinh giữa giao tử đực và giao tử cái, và vì vậy không có quá trình tái tổ hợp di truyền (genetic recombination), các phôi vô tính có nội dung di truyền giống hệt với các tế bào soma đã sinh ra nó.

2.2.4.2. Ý nghĩa nuôi cấy mô phôi vô tính

Phôi vô tính giúp cho công tác vi nhân giống và sản xuất với số lượng lớn thực vật bằng bioreactor.

Tạo hạt nhân tạo.

Là nguyên liệu cho việc chuyển gen ở thực vật.

Mở ra nhiều triển vọng mới trong công nghệ nuôi cấy tế bào.

2.2.4.3. Sự hình thành phôi vô tính

Sự hình thành phôi vô tính có thể qua 2 con đường: Trực tiếp và gián tiếp

► Phôi soma trực tiếp: Được hình thành từ một tế bào hay một nhóm tế bào mà không thông qua sự hình thành callus

► Phôi soma gián tiếp: Được hình thành chủ yếu từ callus

Có 2 bước dẫn đến sự hình thành phôi:

1) Sự biệt hóa của tế bào có khả năng phát sinh phôi.

2) Sự phát triển của những tế bào phôi mới hình thành .

Ở mỗi giai đoạn của sự hình thành phôi. Từ việc tạo mô sẹo, nhân sinh khối mô sẹo, phát sinh phôi rồi đến tái sinh phôi đều cần phải có môi trường thích hợp cho mỗi giai đoạn và quan trọng nhất trong sự phát sinh phôi là cần phải có auxin và nitrogen.

Sự phát triển của phôi đều thông qua các giai đoạn của sự hình thành phôi (như tạo phôi dạng hình cầu, trái tim và thủy lồi).

Các tế bào sinh phôi thường to, đẳng kích, có hoạt động biến dưỡng mạnh mẽ, cường độ tổng hợp ribonucleic acid rất cao, tế bào chất đậm đặc, không bào nhỏ, dễ nhận thấy, hạch nhân rất to và sậm màu, đặc biệt là các tế bào này có một lượng lớn các ribosom, ty thể, lưới nội chất nhỏ và có vách rất dày (Hmmirato,1987; Emons,1994; Raghvan,1983;Thorpe,1988).

Khác với tế bào Eukaryote, hầu hết tế bào thực vật đều có khả năng phát triển thành phôi với những điều kiện nhất định.

Phôi vô tính rất giống phôi hữu tính ở hình thái và sinh lý, nhưng không có quá trình tái tổ hợp di truyền do phôi vô tính không phải là sản phẩm của sự kết hợp giao tử đực và giao tử cái .Do đó, tất cả những cây con tái sinh bằng con đường này thì có vật chất di truyền giống hệt với các tế bào sinh dưỡng đã sinh ra chúng (Nguyễn Văn Uyển, 1992). Dựa vào đặc tính này có thể tạo ra những cá thể mới bằng các trình tự gene lạ được chèn thông qua các kỹ thuật công nghệ sinh học.

2.2.4.4. Cơ chế phát sinh phôi soma

Năm 1979 Fujimura và Komamine nhận thấy: Trong giai đoạn đầu của tiến trình phát sinh phôi trong hệ thống nuôi cấy thì quá trình phát sinh phôi trải qua 4 pha: 0; 1; 2 và 3.

Ở pha 0 những tế bào đơn (giai đoạn 0) hình thành những cụm tế bào có khả năng phát sinh phôi (giai đoạn 1) trên môi trường có auxin. Trong suốt giai đoạn này, những cụm tế bào hình thành từ những tế bào đơn có khả năng tạo phôi khi môi trường nuôi cấy không có auxin, để hình thành những cụm tế bào giai đoạn 1.

Sau đó, pha 1 xuất hiện khi cấy chuyển những cụm tế bào giai đoạn 1 qua môi trường không có auxin. Trong suốt pha 1, những cụm tế bào tăng sinh chậm và dường như không biệt hóa.

Sau pha 1, sự phân bào xuất hiện nhanh trên một phần của những cụm tế bào, dẫn đến việc hình thành những tế bào phôi hình cầu. Pha này được gọi là pha 2.

Pha tiếp theo sau, pha 3, cây con *in vitro* phát triển từ những phôi hình cầu qua phôi hình tim và phôi hình thủy lôi.

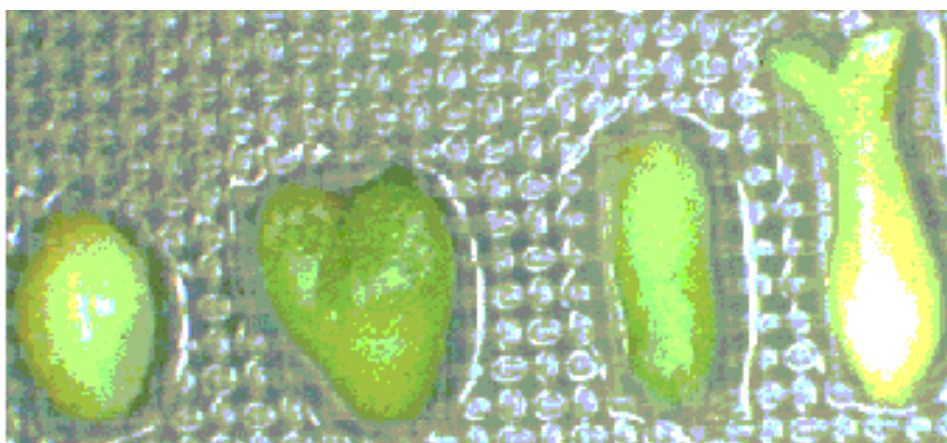
2.2.4.5. Các loại phôi

Phôi hình cầu.

Phôi hình tim.

Phôi thủy lôi.

Phôi lá mầm.



Hình cầu

Hình tim

Hình thủy lôi

Hình lá

Hình 2.4: Các loại phôi soma.

2.2.4.6. Các kiểu phát sinh phôi soma

Sự phát sinh phôi soma bất định

Các phôi vô tính có thể phát triển từ các tế bào hay các mô sẹo có liên quan của một số loài thực vật nhiệt đới. Các phôi bất định có thể được tạo trực tiếp từ tế bào đơn trên bề mặt của phôi non hoặc gián tiếp từ bề mặt của phôi non này. Phương pháp này được sử dụng trong chương trình di truyền cải tạo giống, chẳng hạn như: cứu các phôi bị chết non do lai tạo.

Sự phát sinh đa phôi vô tính

Hiện tượng này xảy ra khi nuôi cấy các noãn non của thực vật hạt trần. Các khối mô có khả năng tạo phôi cao, khi được cấy chuyển sang môi trường mới sẽ phát triển và tăng trưởng thành phôi. Mô có khả năng phát triển thành phôi có thể được phân biệt với mô không có khả năng phát triển thành phôi do màu trắng của phôi và hóa đỏ khi nhuộm bằng acetocarmine. Dưới ánh đèn tử ngoại các tế bào phôi có thể phát huỳnh quang màu xanh lá cây.

Sự phát sinh phôi soma do cảm ứng

Hiện tượng này do sự nuôi cấy lỏng các tế bào và mô sẹo sau khi các mô này chịu các xử lý đặc biệt đem lại sự cảm ứng khả năng tạo phôi. Người ta đã thực hiện nhiều nghiên cứu trên nhiều loại thực vật ở các điều kiện nuôi cấy khác nhau để quan sát khả năng tạo thành mô sẹo.

2.2.5. Những nhân tố ảnh hưởng đến sự hình thành phôi vô tính

Sự hình thành phôi soma phải trải qua một công đoạn tương đối dài và nó chịu tác động của nhiều nhân tố như: mẫu cấy, các thành phần trong môi trường nuôi cấy, thao tác, kỹ thuật trên mẫu cấy, thời gian xử lý mẫu, cường độ ánh sáng...

2.2.5.1. Mẫu cấy

Mỗi loại mẫu cấy có khả năng cảm ứng tạo phôi khác nhau. Thường những tế bào còn non có khả năng tạo phôi vô tính nhanh và tốt hơn. Tùy mục đích nuôi cấy mà chọn lựa các bộ phận, các giai đoạn phát triển của cây trồng cho phù hợp. Đối với việc nuôi cấy tạo phôi *Asparagus officinalis*, *lilium* thì chồi đỉnh, cuống lá, lông thân mầm, phôi chưa trưởng thành là thích hợp nhất, còn những bộ phận khác thì hiệu quả tạo phôi rất thấp (Hisato Kunitake 1998) hay loài một lá mầm đòi hỏi

mẫu cấy phải ở một giai đoạn cụ thể nào đó của hợp tử phôi non thì mới hình thành mô sẹo từ đó tạo phôi vô tính .

2.2.5.2. Môi trường nuôi cấy

Môi trường thích hợp nhất cho việc nuôi cấy là MS. Vì môi trường này có chứa hàm lượng nitrate và ammonia cao. Tỷ lệ giữa muối nitrat và ammonia trong môi trường rất quan trọng trong việc cảm ứng tạo phôi (Niedz,1993-1994). Khi môi trường dinh dưỡng không thích hợp, phôi non có thể ngừng sinh trưởng và có thể chết hay tạo mô sẹo không biệt hóa hay nảy mầm khi chưa chính thuận thực. Polyamine trong môi trường dinh dưỡng có hiệu quả kích thích đến việc hình thành phôi vô tính (Minocha và minocha, 1995). Ngoài ra hàm lượng các hợp chất hữu cơ khác như : nước dừa, đường, glutamine, casein, tinh chất mạch nha, photphat, amino acid...có ảnh hưởng rất lớn đến sự hình thành phôi.

2.2.5.3. Nguồn cacbohydrate

Được cung cấp chủ yếu từ Sucrose ngoài ra còn từ: galactose, lactose, maltose, glucose và fructose. Đây là nguồn cung cấp năng lượng chính cho việc nuôi cấy tế bào trong điều kiện vô trùng. Sự kết hợp những chất trên với Sucrose đã đẩy mạnh sự cảm ứng tạo phôi cũng như sự phát sinh hình thái bình thường của phôi .

2.2.5.4. Chất điều hòa tăng trưởng

Chia làm 5 nhóm: auxin, cytokinin, acid dapscisic, gibberellin, ethylen. Nó có vai trò rất quan trọng trong quá trình nuôi cấy một đối tượng nào đó. Đối với quá trình tạo phôi vô tính, nó giữ một vị trí rất quan trọng trong việc cảm ứng tạo phôi và mỗi chất điều hòa tăng trưởng thì lại có những tác dụng lên việc tạo phôi khác nhau trên những loài thực vật khác nhau, và ở những nồng độ khác nhau, điều đó cho thấy có 3 kiểu ảnh hưởng của chất điều hòa tăng trưởng đối với phôi:

- ▶ Sự hiện diện của chất điều hòa tăng trưởng là cần thiết trong tất cả các giai đoạn phát triển của phôi.
- ▶ Chất điều hòa tăng trưởng cần thiết trong giai đoạn cảm ứng, tuy nhiên, sang đến giai đoạn phát triển cao hơn thì các chất điều hòa này cần phải được loại bỏ.

► Sự hình thành phôi vô tính chỉ xuất hiện khi có sự có mặt của chất điều hòa tăng trưởng, nhưng khi phôi vô tính phát triển sau giai đoạn hình cầu thì sự có mặt của các chất điều hòa không còn tác dụng nữa .

Chất điều hòa tăng trưởng là auxin thường là 2,4-D và NAA được sử dụng hơn 50% và 25% trường hợp cảm ứng tạo phôi (Evans và cộng sự ,1983; Litz và Gray,1992). Tế bào phát sinh phôi có thể hình thành từ tế bào bình thường được nuôi cấy trên môi trường có auxin và có thể không có cytokinin. Trong trường hợp, lượng cytokinin có sẵn trong tế bào cao thường đi đôi với sự phát sinh phôi thấp như ở cây *pennisetum purpureum*, *dactylis glomerata*...(Rajasekaran etal 1987 : Wenck etal, 1988) auxin thường thúc đẩy nhanh sự phân chia tế bào và thường tạo tế bào xấp (Evans etal, 1981). Khi một tế bào hay một cụm tế bào được tách riêng biệt, sự có mặt của auxin giúp cho sự hình thành các tế bào có tính chất phân cực, sự phân cực này đi đôi với sự phân hóa tế bào (Brawley etal,1984; Nomura và Komamine, 1986; Gorst etal, 1987; Rathore, 1988; Timmers, 1989). Khi một tế bào phôi được thu nhận, sự có mặt của auxin sẽ gây tổn hại đến sự phát triển bình thường của tế bào phôi soma (Halperin và Wetherell, 1964).

Cytokinin cũng có những tác dụng tương đối lên sự hình thành phôi, nhưng nó không có những tác dụng đáng kể. Mặc dù vậy, sự kết hợp của cả auxin và cytokinin cho thấy nhiều thuận lợi để đạt được hiệu quả cảm ứng phôi tối đa trên một số loài (Cruz và cộng sự, 1990; Nishi, 1997). Tuy nhiên hiện nay, đã có nhiều nghiên cứu sử dụng TDZ, chất điều hòa tăng trưởng thuộc nhóm cytokinin, nhằm mục đích cảm ứng tạo phôi vô tính ở một số thực vật hai lá mầm (Murthy và cộng sự ,1998). Vì vậy trong những năm gần đây việc sử dụng TDZ đã trở nên phổ biến.

Môi trường không có hormone thường được sử dụng cho sự phát triển của phôi vô tính từ dạng hình cầu cho tới khi phát triển thành cây con. Đôi khi, những nồng độ thấp của hormone trong môi trường cần cho sự biểu hiện hoặc cho môi trường cần cho sự phát triển thì có thể có lợi, thậm chí là bắt buộc phải có, tùy theo loài, để kích thích sự phát triển bình thường của phôi.

Tóm lại, để cảm ứng tạo một cấu trúc lưỡng cực cần phải có tín hiệu của một loại hormone. Ngược lại, để cảm ứng tạo cơ quan thì phải có 2 tín hiệu hormone

khác nhau :Đầu tiên là tạo chồi, sau đó tạo rễ, sử dụng hai môi trường khác nhau. Để những tế bào phôi phát triển bình thường thành những cây con thì cần một môi trường khác, có hoặc không có hormone

2.2.5.5. Sự tương quan giữa độ tuổi của mẫu cấy và sucrose

Độ tuổi hay giai đoạn của mẫu cấy là một yếu tố rất quan trọng trong sự hình thành phôi. Tùy thuộc vào loại mẫu cấy cũng như giai đoạn phát triển mà sử dụng loại môi trường nuôi cấy cho phù hợp. Năm 1987 Thompson và Thorpe đã xác định ảnh hưởng của chất kích thích tăng trưởng khác nhau đến các loại mô khác nhau thì phụ thuộc nhiều vào nồng độ sucrose có trong môi trường nuôi cấy. Nồng độ sucrose cao (4-6%) được bổ sung ở giai đoạn cảm ứng và phát triển của phôi thì rất có lợi cho việc tạo phôi ở một số loài thực vật.

2.2.5.6. Nồng độ của môi trường

Hầu hết các nghiên cứu tạo phôi trên môi trường MS đều cho hiệu quả tạo phôi cao. Nồng độ môi trường càng loãng thì khả năng tạo phôi càng kém.

2.2.5.7. Trạng thái vật lý của môi trường

Sự tạo thành phôi vô tính thường được cảm ứng trên môi trường bán rắn. Tuy nhiên, trạng thái của môi trường (bán rắn hay lỏng) thì rất quan trọng trong việc duy trì và làm tăng cường sự phát triển của phôi vô tính. Sự cảm ứng tạo phôi vô tính của *Gossypium klotzschiapum* trên môi trường MS lỏng có bổ sung vitamin B, có chứa các chất điều hòa tăng trưởng cho thấy đạt hiệu quả cao (Yuqiang Sun và cộng sự, 2003) ở *Lilium longiflorum*, kết quả tương tự cũng được phát hiện. (Tripulato và cộng sự, 1997; Dương Tấn Nhựt và cộng sự, 2002)

2.2.5.8. Kiểu gene

Một vấn đề thường gặp trong cảm ứng tạo phôi nữa là sự phụ thuộc rất lớn vào loại cây trồng và kiểu gene. Kiểu gene có một ảnh hưởng to lớn trong việc cảm ứng tạo phôi của hầu hết các loài thực vật. Không phải tất cả các thực vật đều có khả năng cảm ứng tạo phôi. Đối với những cây tự thụ phấn, những giống cây khác nhau thì khả năng phát sinh phôi vô tính cũng có thể khác nhau. Đã có các thí nghiệm khác nhau tiến hành trên các loài có kiểu gene khác nhau để khảo sát khả năng hình thành phôi vô tính. Chẳng hạn như ở cây *Asparagus*, người ta đã quan sát

khả năng tạo phôi vô tính trên các giống có kiểu gene khác nhau (Hisato và Masahiro, 1998). Delbreil và Julien (1994) đã mô tả những khác biệt quan sát được từ tần suất tạo phôi từ chồi đỉnh của 12 giống *Asparagus* có các kiểu gene khác nhau. Những khác biệt về tần suất hình thành phôi ở các loài đa bội (lưỡng bội ,tứ bội) cũng đã được phát hiện (Kunitake và cộng sự, 1992). Haensch và cộng sự (1996) đã quan sát khả năng hình thành phôi vô tính và tái sinh cây ở những giống *Lilium* có kiểu gene khác nhau.

2.2.5.9. Cường độ chiếu sáng

Các nhân tố khác trong môi trường nuôi cấy như là cường độ ánh sáng cũng có ảnh hưởng đến việc cảm ứng tạo thành phôi vô tính. Các nghiên cứu cũng đã báo cáo về những ảnh hưởng khác nhau của chế độ sáng và tối. Nhìn chung, chế độ tối đã cho thấy có những ảnh hưởng tốt hơn trong giai đoạn cảm ứng. Ở một số loài thực vật sự cảm ứng cần có những điều kiện ủ trong tối. Những điều kiện trong tối có thể được tạo bằng cách bao môi trường nuôi cấy bằng những tấm nhôm mỏng hoặc đặt chúng trong hộp carton.

2.2.6. Những vấn đề thường gặp trong quá trình phát sinh phôi vô tính

Sự xuất hiện những phôi dị thường .

Các lá mầm có thể bị xoắn lại, mô phân sinh chồi có thể có hình dạng không bình thường hoặc có thể thiếu những trường hợp này cần phải có những thao tác phụ để thúc đẩy sự xuất hiện bình thường và sự phát triển của phôi bằng cách sử dụng nồng độ từ thấp đến vừa phải các chất điều hòa tăng trưởng trong môi trường.

Những thực vật được tái sinh từ nuôi cấy mô sẹo và huyền phù tế bào có thể bị biến dị về hình thái hoặc biến dị ở phần sinh dưỡng.

Một điều đáng chú ý nữa là sự phát sinh phôi vô tính và sự phát sinh cơ quan thì không loại trừ. Ví dụ, có 3 lá có thể được phát sinh từ phôi vô tính (Phillips và Collins, 1984). Tuy nhiên khi nuôi cấy trên môi trường thuận lợi cho sự phát triển chồi thì cũng tạo ra phôi vô tính. Sau đó, nuôi cấy trên môi trường thuận lợi cho sự nhân lên của chồi thì đã tạo ra nhiều cây tái sinh hơn so với khi nuôi cấy bình thường.

Vì vậy, những phương pháp cho phát sinh phôi làm tái sinh cơ quan được kết hợp để làm tối ưu hóa khả năng tái sinh cây. Thật thú vị khi trên cùng môi trường thuận lợi cho sự phát triển sinh cực chồi của những phôi vô tính cũng là môi trường thích hợp để tái sinh những hợp tử phôi lai khác loài. Từ đó cho thấy đã có một vài đặc điểm tương tự giữa phôi hợp tử và phôi vô tính .

2.3. Nuôi cấy mô cây mít

Rao et al., (1981) là người đầu tiên nuôi cấy chồi đỉnh cây mít từ cây mít đã trưởng thành. Nuôi cấy trên môi trường bán rắn MS (1962) có bổ sung IAA, NAA, và 2iP, tác giả thu được nhiều chồi khi nuôi cấy đốt thân và chồi ngọn non của cây từ hạt. Amin (1987) nuôi cấy chồi ngọn non của cây mít trưởng thành (30 tuổi) và thu được nhiều chồi phát sinh. Cụm chồi thường tạo mô sẹo ở ngay vết cắt khi môi trường nuôi cấy giàu cytokinin (Rao et al., 1981; Amin, 1987). Amin (1987) qua thực nghiệm cho thấy rằng, có 2 loại mô sẹo hình thành khi nuôi cấy chồi non của cây trưởng thành trên môi trường MS (1962). Tế bào mô sẹo xốp có cơ cấu tổ chức không nhất định và có đời sống ngắn. Tế bào mô sẹo cứng hình thành ngay vết cắt và có thể cấy truyền, khối mô sẹo này có thể tái sinh khi nuôi cấy trên môi trường có bổ sung BA và NAA. Cây mít *in vitro* tạo bộ rễ hoàn chỉnh khi nuôi cấy trên môi trường MS (1962) có bổ sung BA (0,5ppm) và NAA (0,1ppm).

Rao et al., (1981) cho biết rằng có khả năng tái sinh mô sẹo thành cây hoàn chỉnh khi mô sẹo tạo được qua nuôi cấy chồi non cây trưởng thành. Các bộ phận của mẫu nuôi cấy đều có khả năng hình thành mô sẹo (lá, chồi, rễ) nhưng mô sẹo hình thành từ thân chồi thì có hiệu suất tái sinh cao tạo thành chồi khi nuôi cấy trên môi trường MS + BA(2ppm) + IBA hay NAA(1ppm). Rahman (1987) nhận thấy rằng khi phối hợp cytokinin và auxin thì không có khả năng tái sinh mô sẹo từ nuôi cấy đốt thân, và điều này được ghi nhận trên hầu hết các vật liệu nuôi cấy. Nhưng khả năng tái sinh mô sẹo từ việc nuôi cấy chồi ngọn cây còn non (Rao et al., 1981) và cây trưởng thành (Amin, 1987) chứng minh rằng có khả năng tái sinh chồi qua nuôi cấy mô sẹo.

Nghiên cứu vận dụng đặc điểm sinh lý cây mít qua nhân giống vô tính *in vitro* hay bằng phôi vô tính chưa thành công và còn đang tiếp tục nghiên cứu và hoàn thiện.

Chương 3

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP THÍ NGHIỆM

3.1. Vật liệu

3.1.1. Mẫu nuôi cấy

Chồi cây mít *in vitro* sẵn có, được nuôi cấy trong phòng thí nghiệm.

3.1.2. Thiết bị

+ Tủ sấy, nồi hấp vô trùng, tủ lạnh, máy cất nước, pipet, ống đong....cân hóa chất, bể rửa chai lọ, dụng cụ bằng thủy tinh (chai thủy tinh, ống nghiệm....)

+ Tủ cấy vô trùng

+ Giá và bàn để môi trường

+ Môi trường

+ Các dụng cụ trong thao tác cấy: kéo, ben, ống thủy tinh, đèn cồn, đĩa nhôm đường kính 20cm, cốc...

+ Các giá có tầng để bình hoặc ống nghiệm nuôi cấy.

+ Các giá được lắp đèn ống (ánh sáng trắng) để chiếu sáng.

+ Trong phòng cần có máy móc kiểm tra chính xác: nhiệt độ, ánh sáng, độ ẩm, máy điều hòa nhiệt độ.

+ Phòng nuôi tối dùng để nuôi mô sẹo và các xử lý đặc biệt. Giống phòng sáng nhưng không có đèn, cần che bên ngoài bằng vải len hoặc bịt kín.

3.1.3. Hoá chất

+ Agar

+ Nước dừa (cw)

+ Các chất kích thích tăng trưởng: auxin, kinitine, NAA

+ Glutamine, môi trường MS, sucrose.

+ Vitamine

+ Fe-EDTA

+ Micro

+ Thành phần của môi trường MS (Murashige và Skoog, 1962):

MURASHIGE & SKOOG (1962)

Khoáng đa lượng	(mg/l)
NH_4NO_3	1650
KNO_3	1900
KH_2PO_4	170
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	440
Khoáng vi lượng	(mg/l)
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	22,300
H_3BO_3	6,200
$\text{ZnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	8,600
KI	0,830
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,250
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.025
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.025
Vitamins	(mg/l)
Glycine	2,0
Pirydoxine (B_6)	0,5
Meso-inositol	100,0
Acid nicotinic (pp)	0,5
Thiamin.HCl (B_1)	0,1
Fe-EDTA	(mg/l)
Na_2EDTA	37,3
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27,8

Để thuận tiện, môi trường nuôi cấy được pha từ các dung dịch mẹ được chuẩn bị: khoáng đa lượng (micro), khoáng vi lượng (micro), vitamin, Fe-EDTA.

Thể tích môi trường nuôi cấy: mỗi bình tam giác có chứa 50 ml môi trường được khử trùng trong nồi hấp autoclave ở nhiệt độ 120°C trong 25 phút.

3.1.4. Điều kiện nuôi cấy

Cường độ ánh sáng phòng nuôi cấy: 3000 Lux

Nhiệt độ phòng sáng: $28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$

Độ ẩm phòng sáng: 60-75%

Quang kỳ: 8 giờ chiếu sáng trong một ngày.

3.2. Bố trí thí nghiệm

Các thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên, mỗi thí nghiệm thức 3 lần lặp lại, mỗi lần cấy 3 bình.

3.2.1. Thí nghiệm 1: Ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy đến phát sinh tế bào soma

Thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên, gồm 3 thí nghiệm thức, mỗi thí nghiệm thức 3 lần lặp lại, mỗi lần lặp lại với 5 mẫu cấy. Thành phần môi trường như bảng 3.1.

Mục đích thí nghiệm này là tìm môi trường thích hợp để nuôi cấy phát sinh tế bào soma, tạo nguồn vật liệu ban đầu để sử dụng cho các thí nghiệm tiếp theo. Mẫu nuôi cấy là mẫu thân, lá, cây mít. Cách thức lấy mẫu là cắt các mẫu thân, lá với kích thước khoảng 1-1,5cm, cho vào các môi trường khác nhau, mỗi mẫu cho vào các thí nghiệm thức khác nhau. Trong thí nghiệm này có sử dụng môi trường cơ bản MS có bổ sung BA, NAA.

Bảng 3.1: Thành phần môi trường nuôi cấy phát sinh tế bào soma

Thí nghiệm thức	Thành phần môi trường				
	Khoáng	BA (mg/l)	NAA (mg/l)	CW (%)	Đường (g)
1.1	MS	1	3	10	30
1.2	MS	1	5	10	30
1.3	MS	1	1	10	30

Chỉ tiêu theo dõi sau 15 ngày.

Tỉ lệ tạo tế bào soma: (%)

Kích thước trung bình: (mm)

3.2.2. Thí nghiệm 2: Ảnh hưởng của loại mẫu nuôi cấy đến phát sinh tế bào soma

Thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên, gồm 2 nghiệm thức, mỗi nghiệm thức 3 lần lặp lại, mỗi lần lặp lại 5 mẫu cấy.

Mẫu cấy: lá, thân.

Cách thức lấy mẫu: cắt mẫu thân, lá (1-1,5cm) có sẵn trong phòng thí nghiệm, trong điều kiện vô trùng mẫu, nuôi trong môi trường nuôi cấy.

Mục đích của thí nghiệm này nhằm xác định loại mẫu cấy nào cho tỉ lệ phát sinh tế bào soma tốt nhất. Loại mẫu nào sẽ được chọn cho thí nghiệm tiếp theo. Môi trường được sử dụng cho thí nghiệm này có thành phần các chất giống với môi trường trong thí nghiệm 1.

Bảng 3.2: Loại mẫu và thành phần môi trường nuôi cấy

Nghiệm thức	Mẫu nuôi cấy	Thành phần môi trường
2.1	Lá	MS + BA (1) + NAA (5) + CW (10%) +
2.2	Thân	Đường (30 g)

Chỉ tiêu theo dõi sau 15 ngày.

Tỉ lệ tạo tế bào soma: (%)

Kích thước trung bình: (mm)

3.2.3. Thí nghiệm 3: Ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy đến tăng sinh khối tế bào soma.

Thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên, gồm 3 nghiệm thức, mỗi nghiệm thức lặp lại 3 lần, mỗi lần gồm 5 mẫu cấy.

Mẫu cấy: tế bào soma ở thí nghiệm 1.

Mục đích của thí nghiệm này là tìm môi trường thích hợp nhất làm tăng sinh khối tế bào soma đã được nuôi cấy phát sinh ở thí nghiệm 1. Môi trường được sử dụng cho thí nghiệm này có thành phần các chất kích thích sinh trưởng giống với môi trường thí nghiệm 1, nhưng nồng độ các chất này được tăng lên.

Bảng 3.3: Thành phần môi trường nuôi cấy tăng sinh khối tế bào soma

Nghiệm thức	Thành phần môi trường					
	Khoáng	BA (mg/l)	Ki (mg/l)	NAA (mg/l)	CW (%)	Đường (g)
3.1	MS	1	0	5	10	30
3.2	MS	0	0	5	10	30
3.3	MS	0	1	5	10	30

Chỉ tiêu theo dõi sau 30 ngày

Khối lượng trung bình ban đầu: (g)

Khối lượng trung bình sau khi cấy truyền: (g)

Khối lượng trung bình tăng sinh khối: (g)

3.2.4. Thí nghiệm 4: Nuôi cấy tế bào soma trên môi trường lỏng

Thành phần môi trường như bảng 3.4.

Cấy một lượng xác định (1g) vào các môi trường lỏng rồi đặt trên máy lắc, với tốc độ máy là 80 vòng/phút. Xác định môi trường nuôi cấy lỏng tốt nhất. Sau đó, tiếp tục cân các khối lượng khác nhau (1g, 2g, 3g) cấy vào môi trường tốt nhất đã được xác định, để xác định khối lượng, mật độ phát triển tốt nhất.

Bảng 3.4: Thành phần môi trường nuôi cấy lỏng

Nghiệm thức	Thành phần môi trường				
	Khoáng	BA (mg/l)	NAA (mg/l)	CW (%)	Đường (g)
4.1	MS	1	3	10	30
4.2	MS	1	5	10	30
4.3	MS	1	1	10	30

Mục đích thí nghiệm: tìm môi trường lỏng thích hợp nhất cho sự tăng sinh khối của tế bào soma

Chỉ tiêu theo dõi sau 15 ngày

Mật độ tế bào sau 15 ngày nuôi cấy: (tế bào/ml) ($\times 10^6$)

3.2.5. Thí nghiệm 5: Tái sinh tế bào soma

Mô sẹo đã được làm tăng sinh khối và có khả năng tạo nhiều chồi. Khả năng này phụ thuộc vào số lần cấy chuyển mà các chất trong mẫu không có khả năng tổng hợp trong thời gian dài (Gautheret, 1966) và sự hình thành tế bào xốp (Thorpe). Những mô sẹo cứng không có sự phát sinh phôi và phân hoá cơ quan nên được dùng làm nguyên liệu nuôi cấy tế bào đơn.

Thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên, gồm 4 nghiệm thức, mỗi nghiệm thức có 3 lần lặp lại.

Mẫu cấy: tế bào mô sẹo ở thí nghiệm 3.

Môi trường nuôi cấy ở bảng 3.5.

Bảng 3.5 Thành phần môi trường tái sinh tế bào soma

Nghiệm thức	Thành phần môi trường				
	Khoáng	BA (mg/l)	NAA (mg/l)	CW (%)	Đường (g)
5.1	MS	2,5	0,5	0	30
5.2	MS	2,5	0	0	30
5.3	MS	2,5	0,5	10	30
5.4	MS	2,5	0	10	30

Mục đích thí nghiệm: tìm môi trường tốt nhất cho sự hình thành chồi, xác định loại mẫu tốt nhất cho việc tái sinh tế bào soma.

Chỉ tiêu theo dõi sau 30 ngày

Số cụm tái sinh/ bình

Số chồi/cụm

3.2.6. Thí nghiệm 6: Nhân chồi cây mít

Mẫu sau khi tái sinh được chuyển qua môi trường thích hợp nhằm tăng số chồi trong một cụm phôi ban đầu. Mẫu còn non và chứa nhiều dinh dưỡng, có nhu mô phân sinh cho khả năng tạo chồi cao.

Thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên, gồm 3 nghiệm thức, mỗi nghiệm thức lặp lại 3 lần.

Mẫu cấy: cụm chồi tái sinh ở thí nghiệm 5.

Môi trường nuôi cấy: ở bảng 3.6

Bảng 3.6: Nhân chồi cây mít

Nghiệm thức	Thành phần môi trường					
	Khoáng	BA (mg/l)	PVP (mg)	NAA (mg/l)	CW (%)	Đường (g)
6.1	MS	3	200	0,2	10	30
6.2	MS	3	0	0	10	30
6.3	MS	3	0	0	10	30

Mục đích thí nghiệm: tìm môi trường tốt nhất cho sự nhân chồi và tạo ra những chồi tốt nhất từ mô sẹo cây mít.

Chỉ tiêu theo dõi sau 30 ngày

Số chồi trung bình/cụm

Chiều cao chồi: (mm)

3.2.7. Thí nghiệm 7: Nuôi cấy phát sinh rễ

Thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên, gồm 3 nghiệm thức, mỗi nghiệm thức lặp lại 3 lần, mỗi lần lặp lại gồm 5 mẫu cấy.

Mẫu thí nghiệm: sử dụng mẫu trong thí nghiệm 6, những chồi phát triển mạnh có chiều cao 4-6 cm, đường kính lớn, lá phát triển mới được chọn để nuôi cấy kích thích tạo rễ. Auxin cần thiết cho sự tạo rễ, thường dùng IBA hay IBA + NAA.

Môi trường nuôi cấy: như ở bảng 3.7.

Bảng 3.7 Thành phần môi trường nuôi cấy phát sinh rễ

Nghiệm thức	Thành phần môi trường					
	Khoáng	BA (mg/l)	IAA (mg/l)	IBA (mg/l)	CW (%)	Đường (g)
7.1	MS	0	1	1	10	30
7.2	MS	0	2	1	10	30
7.3	WPM	0,1	0	5	10	30

Mục đích thí nghiệm: xác định môi trường tốt nhất cho sự phát sinh rễ.

Chỉ tiêu theo dõi sau 45 ngày

Tỉ lệ phát sinh rễ:(%)

Chiều dài rễ: (mm)

3.3. Phương pháp xử lý số liệu

Kết quả

Khi xử lý thống kê số liệu của các chỉ tiêu, là sử dụng các trị trung bình của từng lần lặp lại.

Phân tích ANOVA, sau đó kiểm tra trắc nghiệm phân hạn bằng trắc nghiệm LSD hoặc trắc nghiệm Duncan's cho từng chỉ tiêu của thí nghiệm, với mức xác suất có ý nghĩa $p=0,05$ hoặc $p=0,01$. Các số liệu thể hiện trong bảng là các giá trị trung bình của 3 lần lặp lại, sau khi xử lý thống kê có được.

Số liệu thu thập được xử lý thống kê trên phần mềm MstatC, Excel

Chương 4

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

4.1. Thí nghiệm 1: Ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy đến phát sinh tế bào soma (sau 15 ngày nuôi cấy)

Nhận xét :

Từ kết quả 4.1a cho thấy

Về tỉ lệ tế bào soma: giữa các nghiệm thức có sự khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê ở mức: $P = 0,05$

Về kích thước trung bình: giữa các nghiệm thức có sự khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê với mức: $P = 0,05$

Qua bảng thời gian tạo phôi cho thấy: thời gian tạo phôi của mẫu lá sớm hơn so với mẫu thân.

Qua quá trình thí nghiệm cho thấy:

Kết quả tất cả các nghiệm thức thí nghiệm đều phát sinh tế bào soma.

Ở nghiệm thức 1.2: BA (1mg/l) + NAA (5mg/l) có tỉ lệ phát sinh tế bào soma cao nhất, tế bào soma có tốc độ phát triển nhanh nhất và kích thước cũng lớn nhất. Mô sẹo tốt, có màu vàng ngay vết cắt. Mô sẹo càng về sau càng chuyển sang màu đen.

Ở nghiệm thức 1.1: BA (1mg/l) +NAA (3mg/l) mô sẹo phát triển tương đối tốt, nhưng ít hơn nghiệm thức 1.2. Mô sẹo có màu trắng, xốp, hơi ngả vàng. Mô sẹo càng về sau cũng có màu đen.

Nghiệm thức 1.3: mô sẹo lên khá chậm và nhỏ hơn so với nghiệm thức khác.

Cytokinin là những chất mà khi kết hợp với auxin sẽ kích thích sự phân chia tế bào trong cây và khi tương tác với auxin sẽ dẫn tới sự biệt hoá các tế bào. BA thuộc nhóm cytokinin tổng hợp. Sự có mặt của cytokinin trong môi trường quyết định sự phân chia hay phân hoá của tế bào trong môi trường nuôi cấy. Tuy nhiên, hiệu quả kích thích sự phân chia tế bào này được tăng cường nếu bổ sung thêm auxin vào môi trường nuôi cấy.

Bảng 4.1a: Ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy đến phát sinh tế bào soma (sau 15 ngày nuôi cấy)

Nghiệm thức	Tỉ lệ tạo tế bào soma (%)		Kích thước trung bình (mm)	
	Lá	Thân	Lá	Thân
1.1	37,80b	43,33b	5,38b	8,5b
1.2	62,95a	73,33a	7,53a	12,33a
1.3	24,09c	30,00b	4,67b	7,17b
CV %	13,89	15,25	8,73	11,43
LSD _{0.05}	11,55	14,89	1,028	2,132

Bảng 4.1b: Thời gian phát sinh tế bào soma.

Nghiệm thức	Mẫu	Thời gian (ngày)								
		7	8	9	10	11	12	13	14	15
1.1	Lá	-	-	-	+	+	+	+	+	+
	Thân	-	-	-	-	-	+	+	+	+
1.2	Lá	-	-	-	+	+	+	+	+	+
	Thân	-	-	-	-	+	+	+	+	+
1.3	Lá	-	-	-	+	+	+	+	+	+
	Thân	-	-	-	-	-	-	+	+	+



Hình 4.1 Tế bào soma cây mít phát sinh trên môi trường nuôi cấy (MS + BA (1 mg/l) + NAA (5 mg/l) + CW (10 %) + Đường (30 g))

(A): Mẫu lá

(B): Mẫu thân

4.2. Thí nghiệm 2: Ảnh hưởng của mẫu nuôi cấy đến phát sinh tế bào soma

Nhận xét:

Từ bảng 4.2 cho thấy

Giữa các nghiệm thức có sự khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê với mức xác suất $P = 0,05$

Qua quá trình thí nghiệm nhận thấy

Mẫu thân có sự tăng nhanh về tỷ lệ và kích thước khối mô sẹo hơn so với mẫu lá.

Vậy, mẫu nuôi cấy từ thân sẽ cho kết quả nghiên cứu cao hơn so với mẫu lá. Do đó, trong những thí nghiệm tiếp theo sẽ sử dụng mẫu thân nhiều hơn.

Bảng 4.2: Ảnh hưởng của mẫu nuôi cấy đến phát sinh tế bào soma

Mẫu	Khả năng phát sinh tế bào soma	
	Tỷ lệ tạo tế bào soma (%)	Kích thước trung bình (mm)
Lá	63,33b	7,33b
Thân	73,33a	12,33a
CV %	15,00	11,33
LSD _{0,05}	13,32	1,49

4.3. Thí nghiệm 3: Ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy đến cấy chuyền tế bào (trên agar)

Sau khi mô sẹo hình thành, mô sẹo được cấy chuyền. Môi trường cấy chuyền cũng có chất sinh trưởng nhưng với nồng độ giảm hơn so với môi trường tạo phôi. Thời gian giữa 2 lần cấy chuyền là 30 ngày. Mô sẹo cấy chuyền càng nhiều lần khả năng tái sinh càng giảm.

Bảng 4.3 Ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy đến cấy chuyền tế bào soma (trên agar).

Thí nghiệm	Khối lượng trung bình ban đầu (g)		Khối lượng sau 30 ngày cấy chuyền (g)		Sinh khối tăng lên (g)	
	Lá	Thân	Lá	Thân	Lá	Thân
3.1	1,03	2,43	1,72a	2,98a	0,63a	0,54a
3.2	1,03	2,40	1,32c	2,54c	0,29b	0,28b
3.3	1,13	2,43	1,51b	2,81b	0,42b	0,40ab
	CV %		4,00	2,30	16,94	15,57
	LSD _{0,05}		0,1264	0,1264	0,1548	0,1264

Nhận xét:

Qua bảng 4.3 ta thấy:

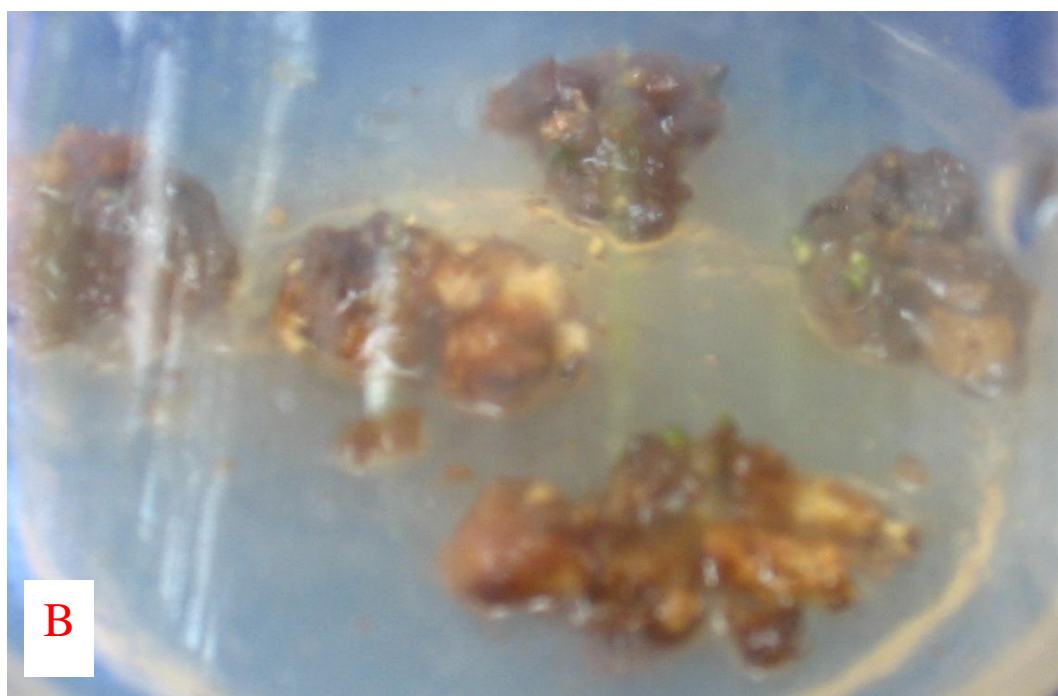
Các thí nghiệm khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê với mức xác suất $P = 0,05$

Qua quá trình thí nghiệm ta thấy:

Cả 2 mẫu lá và thân đều phát triển tốt ở thí nghiệm thứ 3.1, khối lượng tăng trưởng tế bào ở thí nghiệm thứ này là nhiều nhất.

Mô sẹo được cấy chuyền và theo dõi nhiều lần cấy chuyền tiếp theo cũng đều thu được kết quả tương tự, nhưng sau một thời gian phát triển, mô bắt đầu cứng và đen. Những mô này đã được thử nghiệm tái sinh và cấy truyền thì thấy không có khả năng tái sinh, mô cũng giảm sự phát triển khi cấy chuyền.

Kết quả thực nghiệm cho thấy, thí nghiệm thứ 3.1 với sự kết hợp của cytokinin và auxin với tỉ lệ phù hợp đã kích thích sự phát triển và biệt hoá tế bào soma.



**Hình 4.2 Tế bào soma cây mít tăng sinh khối trên môi trường nuôi cấy
(MS + BA(1mg/l) + NAA(5mg/l) + CW(10%) + Đường(30g))**

4.4. Thí nghiệm 4: Nhân sinh khối tế bào soma trên môi trường lỏng

Bản thân mỗi tế bào thực vật là một đơn vị độc lập, nó chứa đựng tất cả những thông tin di truyền đặc trưng của cơ thể từ đó sinh ra, cho nên từ mỗi tế bào có thể xây dựng lại toàn bộ cơ thể mới nhờ tính toàn thể ở thế giới thực vật. Nuôi cấy tế bào đơn là nuôi cấy dịch huyền phù chứa nhiều tế bào liên kết lại với nhau.

Mẫu nghiệm thức là mô sẹo từ thí nghiệm 3, được cấy vào dịch lỏng có chứa nồng độ chất sinh trưởng thích hợp. Sau đó đặt trên máy lắc, tốc độ 70-80 vòng/phút cho sự trao đổi khí thuận lợi. Sau một thời gian nuôi cấy, dịch huyền phù trở nên đục, màu vàng rất đậm.

4.4.1. Thí nghiệm 4-1: Ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy lỏng đến tăng sinh khối tế bào soma

Bảng 4-1.4: Ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy lỏng đến tăng sinh khối tế bào soma.

Nghiệm thức	Mật độ tế bào sau 15 ngày nuôi cấy (tế bào/ml) ($\times 10^6$)
4.1	0,34b
4.2	0,65a
4.3	0,36b
CV %	12,03
LSD _{0,05}	0,1094

Nhận xét:

Từ bảng 4-1.5 ta thấy

Giữa nghiệm thức 4.2 nghiệm thức 4.1, 4.3 có sự khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê với mức xác suất $P = 0.05$.

Giữa nghiệm thức 4.1 và 4.3 không có sự khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê $P = 0.05$.

Trong quá trình thí nghiệm cũng cho thấy

Nghiệm thức 4.2 cho kết quả tốt với mật độ tế bào là $0,657 \times 10^6$ tế bào/ml.

Nghiệm thức 4.2 có công thức môi trường tương tự như công thức 1.2, phối được cấy vào môi trường này cũng được tăng trưởng mạnh nhờ tác động thích hợp của chất kích thích sinh trưởng nên tăng trưởng rất nhanh.

Dịch huyền phù nhận được sau 15 ngày nuôi cấy có màu vàng rất đậm, đục, có nhiều tế bào bám thành bình.

4.4.2. Thí nghiệm 4-2: Ảnh hưởng của mật độ nuôi cấy ban đầu đến khả năng tăng sinh khối tế bào soma.

Bảng 4-2.4: Ảnh hưởng của mật độ nuôi cấy ban đầu đến khả năng tăng sinh khối tế bào soma.

Khối lượng	Mật độ trung bình sau 15 ngày nuôi cấy (tế bào) ($\times 10^6$)
1	2,96c
2	4,98b
3	7,77a
CV %	7,27
LSD _{0,05}	0,7608

Nhận xét:

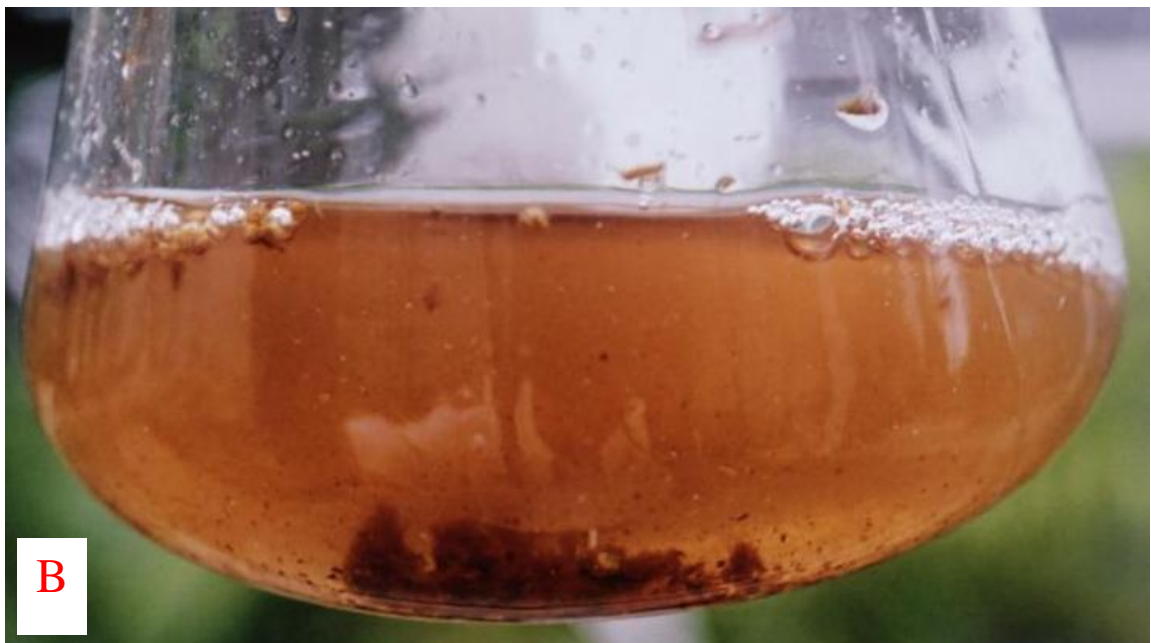
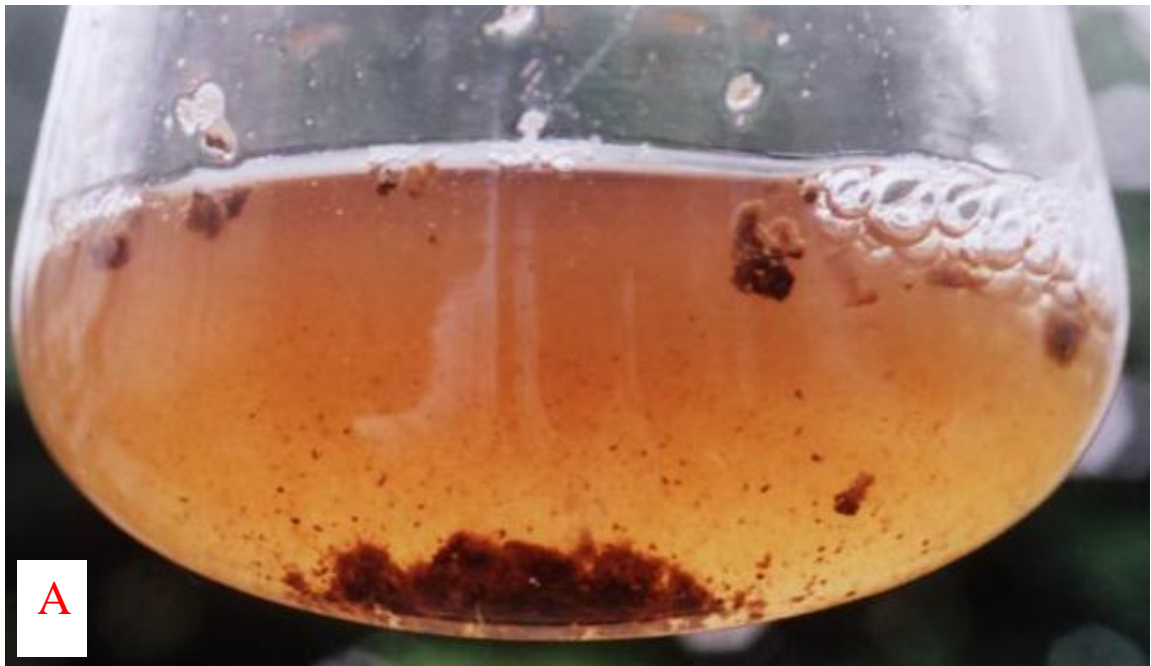
Từ bảng 4-2.5 ta thấy

Môi trường sử dụng để nuôi cấy: MS + BA (1mg/l) + NAA (5 mg/l) + CW (10%) + Đường (30g). Các nghiệm thức cho thấy có sự khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê với mức xác suất $P = 0,05$

Qua quá trình thí nghiệm cho thấy

Mật độ tế bào tăng nhanh nhất ở mật độ nuôi cấy ban đầu 3g. Dịch huyền phù thu được là dung dịch đục, màu vàng rất đậm, trên thành bình có bám rất nhiều tế bào.

Kết quả cho thấy: Mật độ nuôi cấy có ảnh hưởng đến khả năng tăng sinh khối tế bào soma. Môi trường thích hợp nhất để nuôi cấy dịch huyền phù tế bào soma là môi trường: MS + BA (1mg/l) + NAA (5 mg/l) + CW (10%) + Đường (30g).



Hình 4.3: Dịch huyền phù tế bào soma trên các môi trường và ở các mật độ tế bào nuôi cấy ban đầu khác nhau.

(A) Dịch huyền phù tế bào soma trên môi trường BA (1mg/l) + NAA (5mg/l)

(B) Dịch huyền phù tế bào soma ở mật độ 3 (g)

4.5. Thí nghiệm 5: Tái sinh tế bào soma

Mô sẹo có khả năng hình thành nhiều chồi. Khả năng này phụ thuộc vào số lần cấy chuyên mà các chất có trong mẫu không có khả năng tổng hợp trong thời gian dài (Gautheret, 1966) và sự hình thành tế bào xốp (Thorpe). Những mô sẹo cứng không có khả năng phát sinh phôi và phân hoá cơ quan nên được dùng làm nguyên liệu nuôi cấy tế bào đơn.

Qua bảng 4.5 cho thấy

Giữa các nghiệm thức có sự khác biệt rất có ý nghĩa về mặt thống kê với mức xác suất $P = 0,05$

Qua quá trình thí nghiệm cho thấy:

Tất cả các nghiệm thức đều cho khả năng tái sinh chồi.

Nếu so sánh 2 cặp nghiệm thức 5.1 và 5.3; 5.2 và 5.4, ta thấy thành phần chất sinh trưởng giống nhau nhưng chỉ khác ở sự có mặt của nước dừa. Nước dừa có tác dụng kích thích những tế bào hay mầm còn non chưa trưởng thành kích thích sự phát triển phôi. Vì vậy, nếu nghiệm thức nào không có nước dừa thì số chồi sẽ không cao.

Nghiệm thức 5.1 và 5.3 chứa chất điều hoà sinh trưởng NAA thì ở gốc của mẫu nuôi cấy có hình thành mô sẹo và chất phenol loang ra môi trường nuôi cấy nhiều dẫn đến môi trường bị đen.

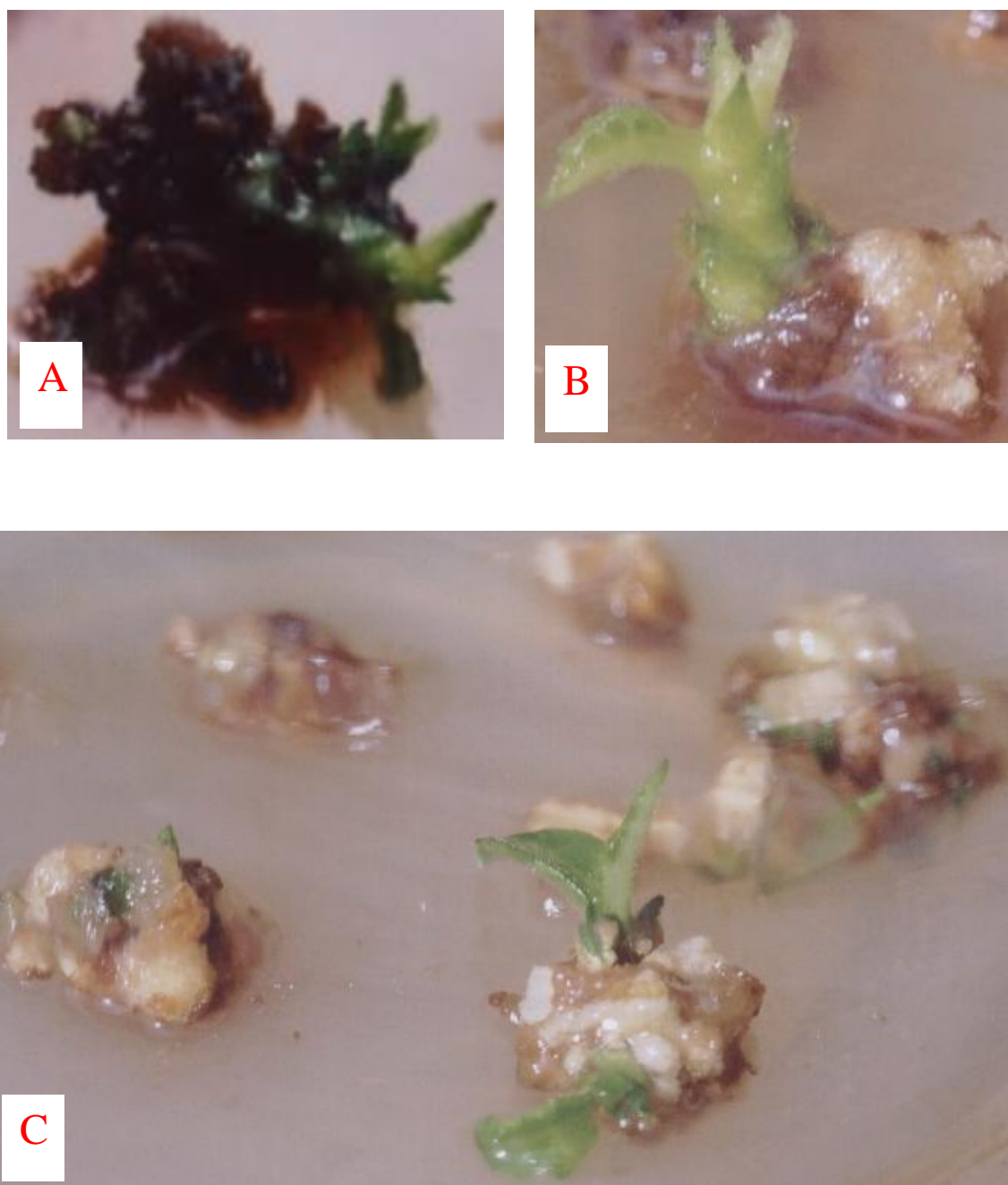
Nghiệm thức 5.2 có số chồi nhiều, nhưng vì nồng độ BA quá cao nên ức chế sự vươn cao của chồi.

Ở nghiệm thức 5.4: BA (5mg/l) số chồi phát sinh trong cụm là nhiều nhất vì nồng độ cytokinin cao nhất. Nhưng về chiều cao trung bình, thì lại thấp vì hàm lượng BA cao sẽ ức chế sự vươn cao của chồi. Đồng thời chồi phát sinh trong môi trường này rất tốt.

Xét về chiều cao thì nghiệm thức 5.3 cho chiều cao lớn nhất do sự kết hợp của các chất sinh trưởng hợp lý.

Bảng 4.5: Tái sinh tế bào soma

Nghiệm thức	Số chồi trung bình /cụm	Chiều cao trung bình chồi (mm)
5.1	3,65c	8,75a
5.2	7,57b	2,82c
5.3	4,64c	10,25a
5.4	9,46a	6,78b
CV%	8,91	13,37
LSD _{0,05}	1,062	1,799



Hình 4.4: Tái sinh phôi soma cây mít (sau 30 ngày nuôi cấy) trên
(A): Môi trường (MS + BA(2,5mg/l) + NAA(0,5mg/l) + Đường(30g))
(B): Môi trường (MS + BA(2,5mg/l) + NAA(0,5mg/l) + CW(10%) + Đường(30g))
(C): Môi trường (MS + BA(2,5mg/l) + CW(10%) + Đường(30g))

4.6. Thí nghiệm 6: Nhân chồi cây mít

Nhận xét

Qua bảng 4.6 ta thấy

Về số chồi và chiều cao: các nghiệm thức có sự khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê với mức xác suất $P = 0,05$

Qua quá trình thí nghiệm cho thấy:

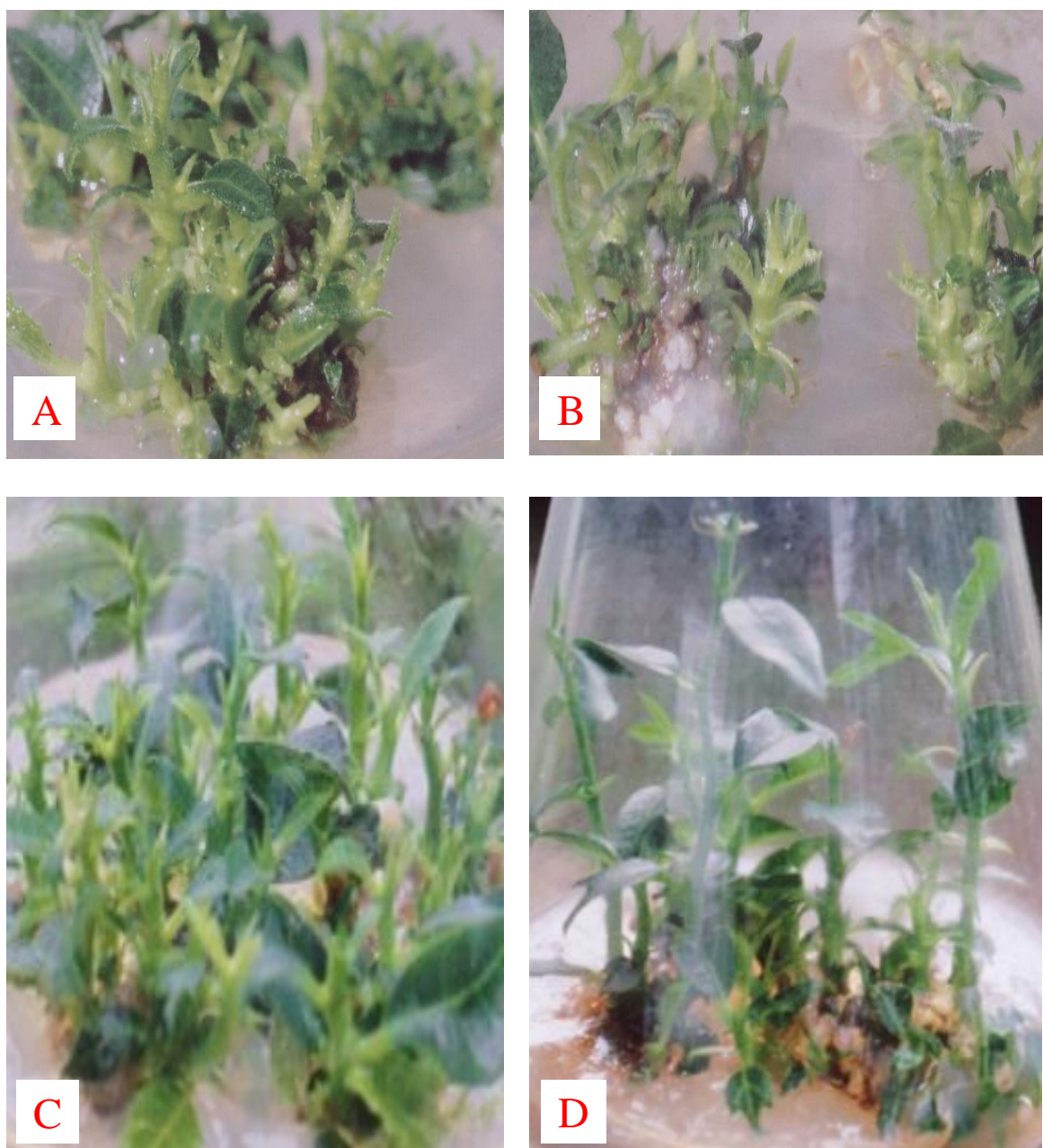
Nghiệm thức 6.1:BA (3) + NAA(0,2) + PVP có chiều cao lớn nhất và ít hiện tượng phù gốc. Đồng thời PVP là một chất thuộc loại polyamide, sẽ hấp thu phenol qua vòng hydrogen, ngăn chặn sự hoá nâu.

Nghiệm thức 6.2, BA (3) Có số chồi trung bình ít hơn so với nghiệm thức 6.3 có BA (5), nhưng chiều cao chồi lớn hơn vì nồng độ cytokinin thấp hơn.

Nghiệm thức 6.3 có hàm lượng BA cao (5mg/l) nên sẽ có số chồi tái sinh rất nhiều, nhưng lại ức chế chiều cao sự phát triển chồi. Nhưng nếu BA tiếp tục tăng nữa thì khả năng hình thành chồi mới không tăng nữa.

Bảng 4.6: Nhân chồi cây mít

Nghiệm thức	Số chồi trung bình /cây	Chiều cao trung bình (mm)
6.1	7,67b	10,18a
6.2	9,33ab	7,20b
6.3	11,13a	4,53c
CV %	10,37	12,60
LSD _{0,05}	1,998	1,733



Hình 4.5: Nhân chồi cây mít nuôi cấy sau 30 ngày trên các môi trường

(A), (B): BA (5mg/l)

(C), (D): BA (3mg/l)

4.7. Nuôi cấy phát sinh rễ

Sự tạo rễ chịu ảnh hưởng của auxin như: IBA, NAA... với tỉ lệ thích hợp.

Bảng 4.7: Khả năng ra rễ của cây mít *in vitro*

Nghiệm thức	Số rễ/cây	Chiều dài rễ (mm)
7.1	23,19a	39,17a
7.2	17,15b	31,83a
7.3	9,67c	25,50b
CV %	4,28	14,04
LSD _{0,05}	1,427	8,740

Nhận xét:

Qua bảng 4.7 ta thấy

Về số rễ/cây: giữa các nghiệm thức có sự khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê ở mức xác suất $p = 0,05$

Về chiều dài rễ: nghiệm thức 7.3 và 7.1, 7.2 có sự khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê ở mức xác suất $P = 0,05$

Giữa nghiệm thức 7.1 và 7.2 không có sự khác biệt về mặt thống kê ở mức xác suất $P = 0,05$

Qua quá trình thí nghiệm ta thấy

Kết quả ghi nhận trong 45 ngày nuôi cấy ta thấy rằng tất cả các nghiệm thức đều có khả năng phát sinh rễ.

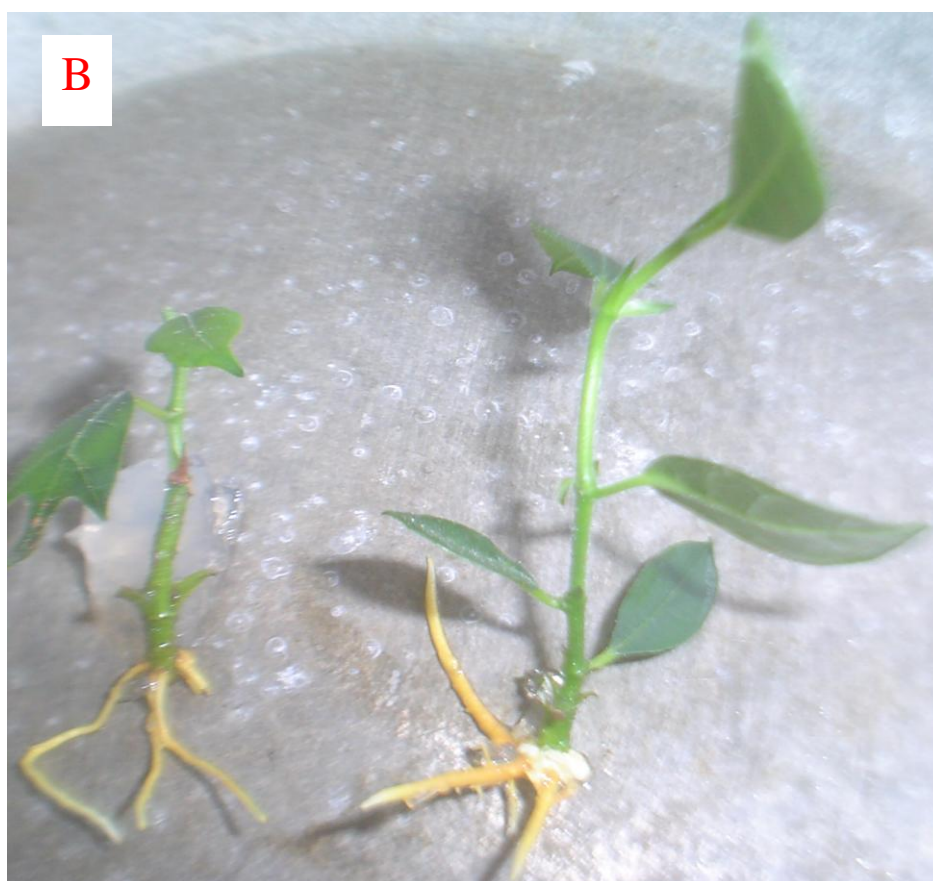
Ở nghiệm thức 7.1 có số rễ và chiều dài lớn nhất, sau đó là nghiệm thức 7.2. Trong các môi trường này rễ của cây có nhiều rễ nhỏ và một số rễ lớn hơn, rễ có màu vàng, dài, nhưng rất dễ gãy khi đem ra vườn ươm.

Còn nghiệm thức 7.3, số rễ và chiều dài rễ tuy thấp hơn các nghiệm thức kia nhưng rễ lại to hơn, có màu vàng. Đồng thời, do có chứa BA nên nghiệm thức này có hiện tượng phù gốc.

Nghiệm thức 7.3 ra rễ đồng đều hơn các nghiệm thứ khác nhưng tốc độ ra rễ chậm hơn.

Tất cả các nghiệm thức đều có bổ sung auxin, thích hợp cho sự phát sinh rễ. Nhưng ở nghiệm thức 7.3 có kết hợp giữa auxin (IBA) và cytokinin (BA) nên rễ to hơn nhưng lại không dài như các nghiệm thức còn lại.

Vì vậy, để kích thích tạo rễ cho cây mít thích hợp nhất là trên môi trường có IAA (1mg/l) + IBA (1mg/l)



Hình 4.6: Cây mít *in vitro* ra rễ tốt trên môi trường kích thích ra rễ

(A): Rễ cây mít *in vitro*

(B): Cây mít *in vitro* ra rễ hoàn chỉnh



Hình 4.7: Cây mít ra rễ *in vitro* được thuần hóa và ra bầu đất

Chương 5

KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

5.1. Kết luận

Môi trường tạo phôi tốt nhất là MS + BA (1mg/l) + NAA (5mg/l) + CW (10%) + Đường (30g).

Môi trường cấy chuyền tốt nhất MS + BA (1mg/L) + NAA (5mg/l) + CW (10%) + Đường (30g).

Môi trường nhân sinh khối lỏng tốt nhất là môi trường MS + BA (1mg/l) + NAA (5mg/l) + CW (10%) + Đường (30g).

Môi trường tái sinh tốt nhất là MS + BA (2,5mg/l) + NAA (0,5mg/l) + CW (10%) + Đường (30g).

Môi trường nhân chồi tốt nhất là MS + BA (5mg/l) + CW (10%) + Đường (30g)

Môi trường ra rễ tốt nhất là MS + IAA (1mg/l) + IBA (1mg/l) + Đường.

5.2. Đề nghị

Trong quá trình cấy phôi và tạo phôi, có hiện tượng mô sẹo bị đen làm giảm tỉ lệ tái sinh và chất lượng mô sẹo. Vì vậy, cần nghiên cứu tìm hiểu nguyên nhân và tìm cách khắc phục.

Thiết lập biểu đồ sinh trưởng của tế bào soma trong nuôi cấy lỏng để việc nhân sinh khối được tốt hơn.

Khảo sát sinh trưởng của cây mít *in vitro* ở vườn ươm.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Đường Hồng Dật, 2000. *Nghề làm vườn cây ăn quả 3 Miền* (trang 46-48).
2. TS. Trần Thị Dung, 2005. *Nuôi cấy mô tế bào thực vật, bài giảng*. Đại Học Nông Lâm TP.Hồ Chí Minh.
3. Trần Quang Hoàng, 2005. *Ảnh hưởng của các chất điều hòa sinh trưởng đến nuôi cấy in vitro của 2 giống lan Dendrobium và Cymbidium*. *Khoá luận tốt nghiệp ngành Công Nghệ Sinh Học*. Đại Học Nông Lâm TP. Hồ Chí Minh.
4. PGS.TS Trần Văn Minh, 2000. *Công nghệ sinh học thực vật*. Viện Sinh Học Nhiệt Đới TP. Hồ Chí Minh.
5. PGS.TS Trần Văn Minh, 1997, *Công nghệ sinh học cây ăn trái*. Viện Sinh Học Nhiệt Đới TP. Hồ Chí Minh.
6. Liêu Hồng Phú, 2005. *Nghiên cứu kỹ thuật phát sinh phôi soma và tạo hạt nhân tạo ở cây lan Hồ Điệp (Phalaenopsis sp)*. *Khoá Luận tốt nghiệp ngành Công Nghệ Sinh Học*. Đại Học Nông Lâm TP. Hồ Chí Minh.
7. www.Sggp.Orgorg.Vn/phongsudieutra/nam2004/thang12/30276.
8. www.Cismi.Org.vn/chamsocsuckhoecongdong/12-08-05-1.htm
9. Vi. Wikipedia.Org/Wiki/Mit
10. Hanoitv.Org.vn/tintuc/vn/detail.Asp.
11. www.vnexpress.net/vietnam/doi-song/2006/04

PHỤ LỤC

Thí nghiệm 1: Ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy đến phát sinh phôi soma

Tỉ lệ tạo tế bào soma (lá)

Bảng ANOVA

ANALYSIS OF VARIANCE TABLE

	Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Square	F-value	Prob.
Between	2	2330.510	1165.255	34.851	0.0005
Within	6	200.610	33.435		
Total	8	2531.120			

Coefficient of Variation = 13.89%

TRẮC NGHIỆM PHÂN HẠNG

Original Order	Ranked Order
Mean 1 = 37.80 B	Mean 2 = 62.95 A
Mean 2 = 62.95 A	Mean 1 = 37.80 B
Mean 3 = 24.09 C	Mean 3 = 24.09 C

Least Significant Difference Test

LSD value = 11.55 at alpha = 0.050

TN1: Tỷ lệ tạo tế bào soma (thân)

Bảng ANOVA

ANALYSIS OF VARIANCE TABLE

	Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Square	F-value	Prob.
Between	2	2955.556	1477.778	26.600	0.0010
Within	6	333.333	55.556		
Total	8	3288.889			

Coefficient of Variation = 15.25%

TRẮC NGHIỆM PHÂN HẠNG

Original Order	Ranked Order
Mean 1 = 43.33 B	Mean 2 = 73.33 A
Mean 2 = 73.33 A	Mean 1 = 43.33 B
Mean 3 = 30.00 B	Mean 3 = 30.00 B

Least Significant Difference Test

LSD value = 14.89 at alpha = 0.050

TN1: Kích thước trung bình (lá)

Bảng ANOVA

ANALYSIS OF VARIANCE TABLE

	Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Square	F-value	Prob.
Between	2	13.354	6.677	25.488	0.0012
Within	6	1.572	0.262		
Total	8	14.926			

Coefficient of Variation = 8.73%

TRẮC NGHIỆM PHÂN HẠNG

Original Order	Ranked Order
Mean 1 = 5.380 B	Mean 2 = 7.530 A
Mean 2 = 7.530 A	Mean 1 = 5.380 B
Mean 3 = 4.670 B	Mean 3 = 4.670 B

Least Significant Difference Test

LSD value = 1.028 at alpha = 0.050

TN1:Kích thước trung bình(thân)

Bảng ANOVA

ANALYSIS OF VARIANCE TABLE

	Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Square	F-value	Prob.
Between	2	43.167	21.583	18.951	0.0026
Within	6	6.833	1.139		
Total	8	50.000			

Coefficient of Variation = 11.43%

TRẮC NGHIỆM PHÂN HẠNG

Original Order	Ranked Order
Mean 1 = 8.500 B	Mean 2 = 12.33 A
Mean 2 = 12.33 A	Mean 1 = 8.500 B
Mean 3 = 7.167 B	Mean 3 = 7.167 B

Least Significant Difference Test

LSD value = 2.132 at alpha = 0.050

Thí nghiệm 2: Ảnh hưởng của mẫu nuôi cấy đến phát sinh tế bào soma

TN2: Tỷ lệ tạo tế bào soma

Bảng ANOVA

ANALYSIS OF VARIANCE TABLE

	Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Square	F-value	Prob.
Between	2	9155.556	4577.778	103.000	0.0000
Within	6	266.667	44.444		
Total	8	9422.222			

Coefficient of Variation = 15.00%**TRẮC NGHIỆM PHÂN HẠNG**

Original Order	Ranked Order
Mean 1 = 60.00 B	Mean 2 = 73.33 A
Mean 2 = 73.33 A	Mean 1 = 60.00 B
Mean 3 = 0.0000 C	Mean 3 = 0.0000 C

Least Significant Difference Test

LSD value = 13.32 at alpha = 0.050

TN2: Kích thước trung bình

Bảng ANOVA

ANALYSIS OF VARIANCE TABLE

	Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Square	F-value	Prob.
Between	2	230.889	115.444	207.800	0.0000
Within	6	3.333	0.556		
Total	8	234.222			

Coefficient of Variation = 11.37%

TRẮC NGHIỆM PHÂN HẠNG

Original Order	Ranked Order
Mean 1 = 7.333 B	Mean 2 = 12.33 A
Mean 2 = 12.33 A	Mean 1 = 7.333 B
Mean 3 = 0.0000 C	Mean 3 = 0.0000 C

Least Significant Difference Test

LSD value = 1.490 at alpha = 0.050

Thí nghiệm 3: Ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy đến cây chuyển tế bào soma

TN3: Khối lượng sau 30 ngày cấy chuyển (lá)

Bảng ANOVA**ANALYSIS OF VARIANCE TABLE**

	Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Square	F-value	Prob.
Between	2	0.248	0.124	33.651	0.0005
Within	6	0.022	0.004		
Total	8	0.270			

Coefficient of Variation = 4.00%

TRẮC NGHIỆM PHÂN HẠNG

Original Order	Ranked Order
Mean 1 = 1.720 A	Mean 1 = 1.720 A
Mean 2 = 1.320 C	Mean 3 = 1.510 B
Mean 3 = 1.510 B	Mean 2 = 1.320 C

Least Significant Difference Test

LSD value = 0.1264 at alpha = 0.050

TN3: Khối lượng sau 30 ngày cấy chuyền (thân)

Bảng ANOVA

ANALYSIS OF VARIANCE TABLE

	Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Square	F-value	Prob.
Between	2	0.295	0.148	36.320	0.0004
Within	6	0.024	0.004		
Total	8	0.320			

Coefficient of Variation = 2.30%

TRẮC NGHIỆM PHÂN HẠNG

Original Order	Ranked Order
Mean 1 = 2.980 A	Mean 1 = 2.980 A
Mean 2 = 2.540 C	Mean 3 = 2.810 B
Mean 3 = 2.810 B	Mean 2 = 2.540 C

Least Significant Difference Test

LSD value = 0.1264 at alpha = 0.050

TN3: Khối lượng trung bình tăng sinh khối(lá)

B ả ng ANOVA

ANALYSIS OF VARIANCE TABLE

	Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Square	F-value	Prob.
Between	2	0.179	0.090	15.664	0.0042
Within	6	0.034	0.006		
Total	8	0.214			

Coefficient of Variation = 16.94%

TRẮC NGHIỆM PHÂN HẠNG

Original Order	Ranked Order
Mean 1 = 0.6300 A	Mean 1 = 0.6300 A
Mean 2 = 0.2900 B	Mean 3 = 0.4200 B
Mean 3 = 0.4200 B	Mean 2 = 0.2900 B

Least Significant Difference Test

LSD value = 0.1548 at alpha = 0.050

TN3: Khối lượng trung bình tăng sinh khối (thân)

Bảng ANOVA

ANALYSIS OF VARIANCE TABLE

	Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Square	F-value	Prob.
Between	2	0.107	0.053	13.234	0.0063
Within	6	0.024	0.004		
Total	8	0.131			

Coefficient of Variation = 15.57%

TRẮC NGHIỆM PHÂN HẠNG

Original Order	Ranked Order
Mean 1 = 0.5400 A	Mean 1 = 0.5400 A
Mean 2 = 0.2800 B	Mean 3 = 0.4000 B
Mean 3 = 0.4000 B	Mean 2 = 0.2800 B

Least Significant Difference Test

LSD value = 0.1264 at alpha = 0.050

Thí nghiệm 4: Nuôi cấy tế bào soma trên môi trường lỏng

TN4: Mật độ tế bào sau 15 ngày nuôi cấy

Bảng ANOVA

ANALYSIS OF VARIANCE TABLE

	Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Square	F-value	Prob.
Between	2	0.178	0.089	30.298	0.0007
Within	6	0.018	0.003		
Total	8	0.196			

Coefficient of Variation = 12.03%

TRẮC NGHIỆM PHÂN HẠNG

Original Order	Ranked Order
Mean 1 = 0.3400 B	Mean 2 = 0.6500 A
Mean 2 = 0.6500 A	Mean 3 = 0.3600 B
Mean 3 = 0.3600 B	Mean 1 = 0.3400 B

Least Significant Difference Test

LSD value = 0.1094 at alpha = 0.050

TN4: Ảnh hưởng của mật độ cây ban đầu đến khả năng tăng sinh khối tế bào soma

TN4: Mật độ trung bình sau 15 ngày nuôi cấy

Bảng ANOVA

ANALYSIS OF VARIANCE TABLE

	Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Square	F-value	Prob.
Between	2	35.102	17.551	121.125	0.0000
Within	6	0.869	0.145		
Total	8	35.971			

Coefficient of Variation = 7.27%

TRẮC NGHIỆM PHÂN HẠNG

Original Order	Ranked Order
Mean 1 = 2.957 C	Mean 3 = 7.773 A
Mean 2 = 4.977 B	Mean 2 = 4.977 B
Mean 3 = 7.773 A	Mean 1 = 2.957 C

Least Significant Difference Test

LSD value = 0.7608 at alpha = 0.050

Thí nghiệm 5: Tái sinh tế bào soma

TN5: Số chồi trung bình/cụm

Bảng ANOVA

ANALYSIS OF VARIANCE TABLE

	Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Square	F-value	Prob.
Between	3	64.231	21.410	67.313	0.0000
Within	8	2.545	0.318		
Total	11	66.776			

Coefficient of Variation = 8.91%**TRẮC NGHIỆM PHÂN HẠNG**

Original Order	Ranked Order
Mean 1 = 3.650 C	Mean 4 = 9.460 A
Mean 2 = 7.570 B	Mean 2 = 7.570 B
Mean 3 = 4.640 C	Mean 3 = 4.640 C
Mean 4 = 9.460 A	Mean 1 = 3.650 C

Least Significant Difference Test

LSD value = 1.062 at alpha = 0.050

TN5: Chiều cao trung bình chồi

Bảng ANOVA

ANALYSIS OF VARIANCE TABLE

	Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Square	F-value	Prob.
Between	3	93.328	31.109	34.071	0.0001
Within	8	7.305	0.913		
Total	11	100.633			

Coefficient of Variation = 13.37%

TRẮC NGHIỆM PHÂN HẠNG

Original Order	Ranked Order
Mean 1 = 8.750 A	Mean 3 = 10.25 A
Mean 2 = 2.820 C	Mean 1 = 8.750 A
Mean 3 = 10.25 A	Mean 4 = 6.780 B
Mean 4 = 6.780 B	Mean 2 = 2.820 C

Least Significant Difference Test

LSD value = 1.799 at alpha = 0.050

Thí nghiệm 6: Nhân chồi cây mít**TN6: Số chồi trung bình/cây****Bảng ANOVA****ANALYSIS OF VARIANCE TABLE**

	Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Square	F-value	Prob.
Between	2	14.249	7.124	7.320	0.0246
Within	6	5.840	0.973		
Total	8	20.089			

Coefficient of Variation = 10.37%**TRẮC NGHIỆM PHÂN HẠNG**

Original Order	Ranked Order
----------------	--------------

Mean 1 = 7.667 B	Mean 3 = 11.13 A
------------------	------------------

Mean 2 = 9.333 AB	Mean 2 = 9.333 AB
-------------------	-------------------

Mean 3 = 11.13 A	Mean 1 = 7.667 B
------------------	------------------

Least Significant Difference Test

LSD value = 1.998 at alpha = 0.050

TN6: Chiều cao trung bình

Bảng ANOVA

ANALYSIS OF VARIANCE TABLE

	Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Square	F-value	Prob.
Between	2	47.876	23.938	28.259	0.0009
Within	6	5.083	0.847		
Total	8	52.959			

Coefficient of Variation = 12.60%

TRẮC NGHIỆM PHÂN HẠNG

Original Order	Ranked Order
Mean 1 = 10.18 A	Mean 1 = 10.18 A
Mean 2 = 7.200 B	Mean 2 = 7.200 B
Mean 3 = 4.530 C	Mean 3 = 4.530 C

Least Significant Difference Test

LSD value = 1.733 at alpha = 0.05

Thí nghiệm 7: Nuôi cấy phát sinh rễ

TN7: Số rễ/cây

Bảng ANOVA

ANALYSIS OF VARIANCE TABLE

	Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Square	F-value	Prob.
Between	2	275.222	137.611	270.055	0.0000
Within	6	3.057	0.510		
Total	8	278.280			

Coefficient of Variation = 4.28%**TRẮC NGHIỆM PHÂN HẠNG**

Original Order	Ranked Order
Mean 1 = 23.19 A	Mean 1 = 23.19 A
Mean 2 = 17.15 B	Mean 2 = 17.15 B
Mean 3 = 9.670 C	Mean 3 = 9.670 C

Least Significant Difference Test

LSD value = 1.427 at alpha = 0.050

TN7: Chiều dài rễ

Bảng ANOVA

ANALYSIS OF VARIANCE TABLE

	Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Square	F-value	Prob.
Between	2	418.667	209.333	10.938	0.0100
Within	6	114.833	19.139		
Total	8	533.500			

Coefficient of Variation = 14.04%

TRẮC NGHIỆM PHÂN HẠNG

Original Order	Ranked Order
Mean 1 = 39.17 A	Mean 1 = 39.17 A
Mean 2 = 31.83 A	Mean 2 = 31.83 A
Mean 3 = 22.50 B	Mean 3 = 22.50 B

Least Significant Difference Test

LSD value = 8.740 at alpha = 0.050

TÓM TẮT

LÝ THỊ LE, Đại học Nông Lâm TP. Hồ Chí Minh. Tháng 9/2006. “TÁI SINH PHÔI SOMA CÂY MÍT”.

Hội đồng hướng dẫn:

PGS.TS TRẦN VĂN MINH.

CÔ: BÙI THỊ TƯỜNG THU.

Đề tài được thực hiện từ tháng 2 đến tháng 8/2006 tại phòng thí nghiệm trọng điểm Quốc gia về Công nghệ tế bào thực vật phía Nam Viện Sinh học Nhiệt đới TP.Hồ Chí Minh.

Tiến hành thí nghiệm với mẫu cây là chồi cây mít đã được khử trùng và nuôi cấy trong phòng thí nghiệm. Gồm 7 thí nghiệm:

-Thí nghiệm 1: Ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy đến phát sinh tế bào soma

Mục đích: là tìm môi trường thích hợp để nuôi cấy phát sinh tế bào soma

-Thí nghiệm 2: Ảnh hưởng của loại mẫu nuôi cấy đến phát sinh tế bào soma

Mục đích: xác định loại mẫu cây cho tỉ lệ phát sinh tế bào soma tốt nhất

-Thí nghiệm 3: Ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy đến tăng sinh khối tế bào soma

Mục đích: tìm môi trường thích hợp nhất làm tăng sinh khối tế bào soma

-Thí nghiệm 4: Nuôi cấy tế bào soma trên môi trường lỏng

Mục đích: tìm môi trường lỏng thích hợp nhất cho sự tăng sinh khối của tế bào soma

-Thí nghiệm 5: Tái sinh tế bào soma

Mục đích: tìm môi trường tốt nhất cho sự phát sinh chồi

-Thí nghiệm 6: Nhân chồi cây mít

Mục đích: tìm môi trường tốt nhất cho sự nhân chồi

-Thí nghiệm 7: Nuôi cấy phát sinh rễ

Mục đích: xác định môi trường tốt nhất cho sự phát sinh rễ

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN:

Sử dụng phần mềm MSTATC để tính toán và phân tích số liệu

**BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO
TRƯỜNG ĐẠI HỌC NÔNG LÂM Tp. HCM
BỘ MÔN CÔNG NGHỆ SINH HỌC**

LÝ THỊ LỆ

**TÁI SINH PHÔI SOMA CÂY MÍT
(*Artocarpus heterophyllus* Lam)**

**Luận văn kỹ sư
Ngành: công nghệ sinh học**

**Tp. Hồ Chí Minh
Tháng 9/2006**

