

NGHIÊN CỨU NHÂN NHANH GIỐNG THUỘC DƯỢC TDL - 05 BẰNG PHƯƠNG PHÁP NUÔI CÂY MÔ TẾ BÀO

Trịnh Khắc Quang¹

TÓM TẮT

Kỹ thuật nuôi cấy mô tế bào được áp dụng để nhân giống thuộc dược TDL-05 tại Viện Nghiên cứu Rau Quả. Đỉnh sinh trưởng và mô thân được sử dụng làm vật liệu ban đầu cho nuôi cấy. Khử trùng bằng H₂O₂ ở nồng độ 20% trong 5 phút cho mô đỉnh sinh trưởng hoặc 7 phút cho mô thân là thời gian khử trùng tối ưu để đạt được kết quả hài hòa giữa tỉ lệ mẫu sạch và khả năng tái sinh của khối mô nuôi cấy. Cả hai loại cytokinin, BAP và kinetin đều có thể sử dụng cho nhân nhanh *in vitro* giống TDL-05. Tuy nhiên, BAP biểu hiện hiệu quả cao hơn kinetin. Nên môi trường MS, BAP ở nồng độ tối ưu (0,5 mg/l) cho hệ số nhân chồi là 3,9/4 tuần, trong khi đó nồng độ tối ưu của kinetin (1 mg/l) cho hệ số nhân 3,23/4 tuần. Chồi *in vitro* có khả năng ra rễ rất tốt ở môi trường MS không cần bổ sung auxin. Ở giai đoạn vườn ươm, sử dụng giá thể đất + trấu hun tỷ lệ 1:1 vừa đảm bảo tỉ lệ sống cao vừa thuận lợi cho cây *in vitro* của giống TDL-05 sinh trưởng, phát triển.

Từ khóa: TDL-05, nhân nhanh, *in vitro*, môi trường, BAP, kinetin.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Hoa thuộc dược (*Dahlia variabilis* Desh) có nguồn gốc từ Mehico nhập nội vào Tây Ban Nha năm 1789, phát triển ở châu Âu, qua Pháp rồi vào Việt Nam. Tên địa phương gốc là Chichipathi hay Aeocothi (Nguyễn Nghĩa Thìn, 2004). Hoa thuộc dược là một trong những loài hoa đẹp, có nhiều màu sắc, dễ trồng và ra hoa đúng vào dịp tết nguyên đán nên có giá trị kinh tế cao (Hai Quang sưu tầm). Hoa thuộc dược ngày càng được trồng rộng rãi ở Việt Nam. Tuy nhiên, việc mở rộng quy mô sản xuất cũng như việc đầu tư phát triển cây hoa thuộc dược thành mặt hàng có giá trị đang gặp phải khó khăn: Chất lượng các giống hoa thuộc dược hiện có tại Việt Nam chưa cao. Nguyên nhân chính là do nhân giống vô tính liên tục, không được phục tráng định kỳ đã làm giảm chất lượng sản phẩm (bông hoa nhỏ, cành ngắn và nhỏ,...) nên chưa đáp ứng được yêu cầu ngày càng cao về chất lượng hoa của thị trường. Các giống hoa thuộc dược ở nước ta được nhân giống chủ yếu bằng phương pháp truyền thống là giâm cành nên hệ số nhân giống thấp. Thêm vào đó, phương pháp nhân giống này còn phụ thuộc nhiều vào điều kiện thời tiết, đặc biệt trong mùa mưa điều kiện nóng ẩm gây khó khăn cho việc nhân giống cũng như lưu giữ giống trong điều kiện đồng ruộng. Hiện tại, một số giống hoa thuộc dược mới nhập nội có chất lượng tốt, ví dụ như giống thuộc dược TDL-05; giống này mới

lạ, đẹp hơn so với các giống hiện có nhưng do mới nhập nội nên số lượng cây giống còn ít. Xuất phát từ thực tế trên, việc nghiên cứu nhân nhanh giống này để phục vụ cho khảo nghiệm sản xuất và phát triển giống vào sản xuất là việc làm cần thiết. Dưới đây là kết quả nghiên cứu nhân nhanh giống hoa thuộc dược TDL-05 bằng phương pháp nuôi cấy mô tế bào do Viện Nghiên cứu Rau quả tiến hành từ tháng 11 năm 2010 đến tháng 8 năm 2011.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Vật liệu

Đỉnh sinh trưởng và đoạn thân của mầm giống hoa thuộc dược TDL-05 được chọn làm nguồn vật liệu cho các thí nghiệm. Giống hoa thuộc dược TDL-05 do Viện Nghiên cứu Rau quả tuyển chọn từ bộ giống hoa nhập nội. Kết quả khảo nghiệm ở Hưng Yên, Thái Bình và Nam Định cho thấy: giống có khả năng sinh trưởng, phát triển tốt (tỷ lệ sống > 90%, thời gian ra hoa 90 ngày), khả năng bật mầm và ra hoa cao (8-9 hoa/cây), hoa có màu sắc đỏ tươi, được thị trường ưa chuộng.

Chất khử trùng và các chất điều tiết sinh trưởng được sử dụng trong nghiên cứu bao gồm: H₂O₂, BAP, kinetin và α NAA.

2. Phương pháp nghiên cứu

Nuôi cấy mô tế bào được thực hiện qua các bước sau: Khử trùng mẫu, nuôi cấy khởi động, nhân nhanh, tạo cây hoàn chỉnh và giai đoạn vườn ươm.

¹ Viện Nghiên cứu Rau quả, Viện Khoa học Nông nghiệp Việt Nam

Sử dụng môi trường nuôi cấy cơ bản MS (Murashige và Skoog, 1962), bổ sung đường sacaroza 3% và một số chất điều tiết sinh trưởng với nồng độ khác nhau tùy theo từng thí nghiệm. Điều kiện nuôi cấy: nhiệt độ trong phòng 25-27°C, độ ẩm 70%, cường độ chiếu sáng 2500-3000 lux, thời gian chiếu sáng bảo đảm đủ 16 giờ sáng/8 giờ tối; cây con sau khi có rễ hoàn chỉnh được ra ngôi, ương trong nhà lưới có mái che.

Các thí nghiệm được bố trí ngẫu nhiên 3 lần nhắc lại, mỗi lần nhắc lại 30 mẫu. Số liệu được xử lý thống kê bằng chương trình IRRISTAT. Các thí nghiệm được tiến hành tại Phòng Nuôi cấy mô tế bào thực vật và Nhà lưới của Bộ môn Công nghệ Sinh học - Viện Nghiên cứu Rau quả từ tháng 11 năm 2010 đến tháng 8 năm 2011.

III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

1. Nghiên cứu tạo nguồn vật liệu sạch ban đầu

Bảng 1. Kết quả tác động của chất khử trùng (sau 2 tuần)

Thời gian khử trùng	Mô đỉnh sinh trưởng			Mô thân		
	Tỷ lệ mẫu nhiễm (%)	Tỷ lệ mẫu chết (%)	Tỷ lệ mẫu sạch tái sinh (%)	Tỷ lệ mẫu nhiễm (%)	Tỷ lệ mẫu chết (%)	Tỷ lệ mẫu sạch tái sinh (%)
5 phút	35,6	13,4	51,0	40,0	0,0	60,0
7 phút	7,6	41,8	50,6	8,3	5,0	86,7
10 phút	0	58,0	42,0	5,0	18,0	77,0

Kết quả ở bảng 1 cho thấy: Thời gian khử trùng càng dài thì tỷ lệ mẫu nhiễm càng thấp, nhưng tỷ lệ mẫu chết càng cao đối với cả 2 loại mẫu cấy. Tỷ lệ mẫu sạch tái sinh ở mẫu mô đỉnh đạt 51,0% trong thời gian khử trùng 5 phút và ở mẫu mô thân đạt 86,7% trong thời gian 7 phút; khử trùng mẫu cấy bằng H₂O₂ nồng độ 20%, thời gian khử trùng 5 phút đối với mô đỉnh sinh trưởng và 7 phút đối với mô thân là thích hợp.

2. Nghiên cứu nhân nhanh

Các thí nghiệm ở giai đoạn này nhằm tìm ra môi trường thích hợp nhất cho quá trình nhân nhanh chồi

Đây là bước khởi đầu quan trọng trong quy trình nhân giống bằng nuôi cấy mô tế bào. Ở giai đoạn này, đối tượng nuôi cấy được đưa từ điều kiện tự nhiên vào điều kiện vô trùng để tạo ra lượng mẫu sạch phục vụ cho các giai đoạn tiếp theo của quá trình nhân nhanh. Vì vậy, đối với tất cả các loại cây trồng thì việc xác định phương pháp khử trùng thích hợp mang ý nghĩa quyết định cho sự thành công của cả quá trình vi nhân giống (Robert N. Trigiano, Dennis J. Gray, 2000). Mục đích của giai đoạn này là tạo ra được lượng mẫu có tỷ lệ nhiễm thấp, tỷ lệ sống cao, mô phân hóa và sinh trưởng tốt. Do đó, để tạo nguồn vật liệu sạch ban đầu cho quá trình nhân nhanh giống hoa thược dược TDL-05 bằng phương pháp nuôi cấy mô tế bào đã tiến hành nghiên cứu phương pháp khử trùng đối với mô đỉnh sinh trưởng và mô thân mang mắt ngủ bằng H₂O₂ nồng độ 20% với các mức thời gian (5 phút, 7 phút, 10 phút).

của giống hoa thược dược TDL - 05. Đây là giai đoạn mang tính then chốt trong toàn bộ quá trình nhân, yêu cầu của giai đoạn này là: Tạo ra hệ số nhân giống cao; các chồi tạo ra phải đồng nhất về mặt di truyền, có sức sống tốt, tỷ lệ biến dị thấp.

Xuất phát từ những yêu cầu trên, để nhân nhanh giống hoa thược dược TDL-05, đã sử dụng phương thức tạo và nhân nhanh cụm chồi từ các chồi sạch thu được ở thí nghiệm 1. Ở giai đoạn này đã nghiên cứu ảnh hưởng của các chất điều tiết sinh trưởng thuộc nhóm cytokinin nhằm xác định môi trường thích hợp cho quá trình nhân nhanh.

Bảng 2. Ảnh hưởng của BAP đến hệ số nhân chồi (sau 4 tuần)

STT	Công thức thí nghiệm	Tỷ lệ tạo chồi (%)	Hệ số nhân (lần)	Chiều cao chồi (cm)	Số lá/chồi (lá)	Chất lượng chồi
1	MS (Đ/C)	100	1,00	4,4	10,5	++
2	MS + 0,5 mg/l BAP	100	3,90	3,4	8,4	+++
3	MS + 1,0 mg/l BAP	100	3,66	3,2	7,3	+++
4	MS + 1,5 mg/l BAP	100	3,53	3,0	6,5	++
5	MS + 2,0 mg/l BAP	100	3,30	2,7	6,1	+
	CV (%)		7,5			
	LSD (5%)		0,42			

Ghi chú: + Chất lượng chồi kém; ++ Chất lượng chồi trung bình; +++ Chất lượng chồi tốt

Kết quả ở bảng 2 cho thấy: Khi bổ sung BAP vào môi trường cho quá trình nhân nhanh của chồi thực được theo đường hướng tạo cụm chồi, thì BAP đã có tác động tốt đến quá trình tạo chồi của giống hoa

thuộc dược TDL-05, thể hiện ở chỉ tiêu hệ số nhân và chất lượng chồi. Nồng độ BAP thích hợp để bổ sung vào môi trường nhân là 0,5 mg/l cho hệ số nhân chồi cao nhất (3,9 lần/4 tuần).

Bảng 3. Ảnh hưởng của kinetin đến hệ số nhân chồi (sau 4 tuần)

STT	Công thức thí nghiệm	Tỷ lệ tạo chồi (%)	Hệ số nhân (lần)	Chiều cao chồi (cm)	Số lá/chồi (lá)	Chất lượng chồi
1	MS (Đ/C)	100	1,00	4,7	12,0	++
2	MS + 0,5 mg/l K	100	2,72	4,5	10,7	+++
3	MS + 1,0 mg/l K	100	3,23	4,5	9,6	+++
4	MS + 1,5 mg/l K	100	2,69	3,8	8,7	++
5	MS + 2,0 mg/l K	100	2,36	3,5	7,4	+
	CV (%)		3,2			
	LSD (5%)		0,167			

Ghi chú: + Chất lượng chồi kém; ++ Chất lượng chồi trung bình; +++ Chất lượng chồi tốt

Qua kết quả ở bảng 3: so với BAP thì kinetin cũng có ảnh hưởng đến hệ số nhân chồi, tuy nhiên hiệu quả của kinetin tỏ ra kém hơn so với BAP. Nồng độ kinetin thích hợp để bổ sung vào môi trường nhân là 1 mg/l cho hệ số nhân chồi cao nhất (3,23 lần/4 tuần).

Việc tạo cây hoàn chỉnh là một giai đoạn rất cần thiết trong quá trình nhân nhanh. Sau khi chồi được tạo ra với số lượng lớn trong giai đoạn nhân nhanh thì hầu như chúng chưa có rễ, do đó chồi phải được tạo rễ. Giai đoạn này làm nhiệm vụ tái tạo cây con hoàn chỉnh để chúng có thể sống và sinh trưởng tốt khi đưa cây ra vườn ươm cũng như khi đưa ra vườn sản xuất.

3. Giai đoạn tạo cây in vitro hoàn chỉnh

Bảng 4. Ảnh hưởng của αNAA đến khả năng ra rễ và sinh trưởng của chồi thực được (sau 2 tuần)

STT	Công thức thí nghiệm	Tỷ lệ ra rễ (%)	Số rễ/cây	Chiều dài rễ (cm)	Chiều cao cây (cm)	Số lá/cây (lá)
1	MS (Đ/C)	100	6,33	4,10	4,51	10,7
2	MS+0,25 mg/l αNAA	100	5,10	3,30	4,30	10,2
3	MS+0,5 mg/l αNAA	88,9	4,60	3,30	3,75	9,5
	CV(%)		8,10	7,10		
	LSD (5%)		0,86	0,50		

Kết quả ở bảng 4 cho thấy: Sự ra rễ của chồi bất định khá thuận lợi trong các môi trường nghiên cứu, cây thực được có khả năng tự ra rễ rất tốt; ngay cả trên môi trường không bổ sung αNAA tỷ lệ ra rễ đạt 100%, cũng như chất lượng rễ rất tốt thể hiện qua chỉ tiêu số rễ (6,33 rễ/cây) và chiều dài rễ (4,1 cm), trong khi đó ở công thức có bổ sung αNAA tỷ lệ ra rễ 100% nhưng chỉ tiêu số rễ (5,1 rễ/cây) và chiều dài rễ (3,3 cm) thấp hơn so với công thức không bổ sung αNAA.

Vì vậy, để tạo rễ cho chồi thực được chỉ cần chuyển chúng từ môi trường nhân sang môi trường dinh dưỡng MS không cần phải bổ sung auxin cũng đã là môi trường thích hợp cho sự ra rễ của chồi giống hoa thực được TDL-05.

4. Giai đoạn vườn ươm

Bảng 5. Ảnh hưởng của giá thể đến sinh trưởng của cây thực được in vitro (sau 4 tuần)

STT	Giá thể	Tỷ lệ sống (%)	Chiều cao cây (cm)	Số lá/cây
1	Cát	26,3	4,83	9,5
2	Trấu hun	65,8	5,07	10,4
3	Đất	43,7	5,02	10,4
4	Cát + trấu hun (1:1)	76,3	5,13	12,0
5	Đất + trấu hun (1:1)	91,4	5,15	12,1

Khi đưa cây ra khỏi ống nghiệm, có nhiều yếu tố biến động (nhiệt độ, ẩm độ, ánh sáng...) tác động. Chính vì sự thay đổi điều kiện sống đột ngột gây

không ít khó khăn cho việc ra ngôi cây *in vitro*, nên việc chuyển cây *in vitro* qua giai đoạn vườn ươm là bắt buộc để hạn chế tác nhân bất lợi và tạo cho cây thích nghi dần với điều kiện bên ngoài. Ngoài ra, mỗi loại cây cần một loại giá thể thích hợp để sống, sinh trưởng và phát triển. Kết quả ở bảng 5 cho thấy: Giá thể có ảnh hưởng rõ rệt đến tỷ lệ sống, chiều cao cây và số lá/cây thực được TDL-05 *in vitro*. Các giá thể có phối trộn cùng trấu hun tỏ ra thích hợp để ra ngôi cây *in vitro*, với các giá thể này tỷ lệ sống của cây cao (76,3-91,4%), cây sinh trưởng tốt hơn (thể hiện ở chỉ tiêu về chiều cao cây và số lá/cây). Giá thể cát không thích hợp cho việc ra ngôi cây thực được *in vitro*, có tỷ lệ cây sống thấp nhất.

IV. KẾT LUẬN

Kết quả nghiên cứu đã bổ sung cơ sở dữ liệu cho việc xây dựng quy trình nhân giống thực được lùn bằng nuôi cấy mô tế bào như sau: Chế độ khử trùng thích hợp cho mô đỉnh sinh trưởng bằng H_2O_2 nồng

độ 20% trong 5 phút và ở mẫu mô thân trong thời gian 7 phút; môi trường nhân nhanh thích hợp là môi trường MS bổ sung BAP nồng độ 0,5 mg/l cho hệ số nhân chồi là 3,9 lần/4 tuần; môi trường ra rễ thích hợp cho chồi thực được lùn là môi trường MS không bổ sung auxin; giá thể cho tỷ lệ sống cao và tốt cho sinh trưởng, phát triển của cây thực được *in vitro* là đất + trấu hun tỷ lệ 1:1

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Nguyễn Nghĩa Thìn, Đặng Thị Sỹ (2004). Hệ thống thực vật. NXB Đại học Quốc gia Hà Nội.
2. Robert N. Trigiano, Dennis J. Gray, 2000. Plant Tissue Culture Concepts and Laboratory Exercises. CRC Press LLC, p. 75-85.
3. <http://caimon.org/CaytraicM/KythuatCT/HTThuocduoc.htm> (Hai Quang sưu tầm).
4. <http://agriviet.com/nd/1082-cay-hoa-thuoc-duoc/>

IN VITRO MULTIPLICATION OF DAHLIA TDL - 05 VARIETY BY TISSUE CULTURE

Trinh Khắc Quang

Summary

Tissue culture technique was applied to propagate for a new *Dahlia* variety named TDL-05. Two types of tissues, shoot tip and stem tissues, were used as initiation materials for culture. Sterilization by H_2O_2 at concentration of 20% for 5 min or 7 min (shoot tip and stem tissues respectively) were the best period time to result in good ratio of cleaned tissues as well as the regeneration capacity of the cleaned tissues. Both of experimented cytokinins, BAP and kinetin, could be used for *in vitro* shoot multiplication of TDL-05 variety. However, BAP seemed to be more effective than kinetin. In MS medium containing the best concentration of BAP, at 0.5 mg/l, multiplication coefficient of *in vitro* shoot reached at 3.9/4 weeks; while it was 3.23/4 weeks in the best concentration, at 1 mg/l, of kinetin. All of *in vitro* shoots could induce multi-root in the MS medium without phytohormon. In nursery, a substrate containing fired rice husk and soil at the 1:1 ratio was suitable for survival as well as growth of *in vitro* plants of the *Dahlia* TDL-05 variety.

Key word: TDL-05, multiplication, *in vitro*, media, BAP, kinetin.

Người phản biện: GS.TS. Hoàng Minh Tấn

Ngày nhận bài: 4/5/2012

Ngày thông qua phản biện: 5/6/2012

Ngày duyệt đăng: 11/6/2012