

NUÔI CÂY MÔ PHÂN SINH CHỒI NGỌN CÓ NGUỒN GỐC TỪ CHỒI TRÊN CỤ HOA LOA KÈN (*Zantedeschia eliotiana* Engl.)

Đặng Thị Quỳnh Giang, Văn Thiện Bảo, Phan Ngô Hoang
Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG-HCM

TÓM TẮT: Các chồi trên củ được tách và nuôi cấy trên môi trường MS (Murashige & Skoog, 1962). Mô phân sinh chồi ngọn được cô lập từ những cây *in vitro* và tăng trưởng ổn định trên các môi trường có bổ sung các chất điều hòa tăng trưởng thực vật, trong đó số chồi mới phát sinh nhiều nhất trên môi trường MS có bổ sung BA 2mg/l và IBA 0,5mg/l. Cường độ hô hấp, hoạt tính các chất điều hòa tăng trưởng thực vật và nguồn gốc sự phát sinh chồi cũng được phân tích.

Từ khóa: chất điều hòa tăng trưởng thực vật, mô phân sinh chồi ngọn, hoa loa kèn, sự nuôi cấy *in vitro*.

1. MỞ ĐẦU

Cùng với hoa phong lan, hoa hồng và một số loài hoa khác, hoa loa kèn (còn được gọi là hoa Thủy Vu - *Zantedeschia eliotiana* Engl.) là một trong những loại hoa đẹp, giá trị kinh tế cao [3, 6]. Hiện tại, các nhà vườn nhân giống chủ yếu bằng phương pháp lưu trữ củ qua các thế hệ; một số khu vực khác, củ được nhập khẩu trực tiếp từ Hà Lan hay Nhật Bản. Tuy nhiên, phương pháp nhân giống thông thường như trên đã dẫn đến sự thoái hóa giống sau đó hoặc việc sử dụng củ giống nhập khẩu lâu dài cũng chưa phải là một giải pháp hữu hiệu đối với loại hoa này. Ngày nay, các kỹ thuật vi nhân giống theo qui mô công nghiệp bao gồm các kỹ thuật nuôi cấy khức cắt thân, mảnh lá hay từ mô phân sinh chồi ngọn đã được áp dụng trên nhiều loài hoa đẹp và có hiệu quả kinh tế như: *Lilium* sp., *Chrysanthemum* sp., *Phalenopsis* sp.,... [9, 11]. Trong bài báo này, chúng tôi trình bày khả năng ứng dụng kỹ thuật nuôi cấy mô phân sinh chồi ngọn cây hoa loa kèn trong mục đích vi nhân giống.

2. VẬT LIỆU - PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu. Các chồi này trên củ của cây hoa loa kèn *Zantedeschia eliotiana* (dòng yellow minicala) được cung cấp từ các nhà vườn tại thành phố Đà Lạt, được bảo quản ở 4°C (ảnh 1).

Phương pháp

Nuôi cấy chồi trên củ. Các chồi trên củ được cô lập, khử trùng với HgCl₂ 0,1% (20

phút) và đặt nuôi trên môi trường MS (Murashige và Skoog 1962) [8] bổ sung 10% nước dừa, sacaroz 30g/l, agar 4,5g/l. Sau khi tăng trưởng 2 tuần, các chồi này được theo dõi sự tạo cụm chồi trên môi trường MS bổ sung 10% nước dừa và các chất điều hòa tăng trưởng thực vật: BA 0,5mg/l và TDZ 0,1mg/l; IAA 0,5mg/l và TDZ 0,1mg/l hay đối chứng không có chất điều hòa tăng trưởng thực vật.

Nuôi cấy mô phân sinh chồi ngọn. Các mô phân sinh chồi ngọn (1,5x1,5x2mm) được cô lập từ các cây *in vitro* 4 tuần tuổi trên môi trường MS dưới kính hiển vi soi nổi và đặt nuôi trên các môi trường có bổ sung các chất điều hòa tăng trưởng thực vật BA, 2-iP, zeatin, IBA riêng rẽ hay phối hợp ở các nồng độ khác nhau. Theo dõi sự phát sinh chồi, tăng trưởng chiều cao của chồi theo thời gian.

Các hệ thống nuôi cấy đều chung điều kiện phòng tăng trưởng: 22 ± 2°C, 2000 ± 200lux (12/12) và ẩm độ không khí 65%.

Quan sát hình thái giải phẫu. Chồi trên củ, mô phân sinh chồi ngọn trước và sau sự nuôi cấy được quan sát hình thái và phân tích cấu trúc giải phẫu dưới kính hiển vi soi nổi hay kính hiển vi quang học sau khi cắt ngang hay cắt dọc, nhuộm hai màu (đỏ carmin và xanh iod).

Đo cường độ hô hấp. Cường độ hô hấp của các chồi từ sự nuôi cấy mô phân sinh chồi ngọn trên các môi trường được xác định bằng phương pháp áp kế Warburg ở 25°C, trong tối. Kết quả thể hiện bằng lượng O₂ hấp thu của chồi theo thời gian (μmolO₂/gTLT/giờ).

Hoạt tính các chất điều hoà tăng trưởng thực vật. Hoạt tính các chất điều hoà tăng trưởng thực vật IAA, zeatin, GA₃ và ABA của các cụm chồi phát sinh từ sự nuôi cấy mô phân sinh chồi ngọn được thực hiện nhờ sự ly trích, cô lập trên bản mỏng sắc ký Silicagel F₂₅₄ với dung môi di chuyển là Chloroform:Methanol:Acid acetic (80:15:5 theo thể tích), ở nhiệt độ là $30 \pm 2^\circ\text{C}$. Hoạt tính của các chất điều hoà tăng trưởng thực vật được xác định bằng sinh trắc nghiệm^[2, 7].

Trồng cây ra chậu. Các cây *in vitro* sau 6 tuần tăng trưởng trong ống nghiệm được chuyển trồng trong các chậu chứa hỗn hợp đất trồng và tro trấu. Theo dõi sự tăng trưởng của các cây này trong nhà lưới.

3. KẾT QUẢ - THẢO LUẬN

Sự nuôi cấy chồi nảy trên củ

Cô lập một vị trí chồi trên củ và thực hiện lát cắt dọc qua chồi, chúng tôi ghi nhận có sự hiện diện của một đỉnh sinh trưởng được bao bọc bởi vài vảy lá. Chồi đỉnh có cấu trúc nhọn, các vảy lá sắp xếp rời rạc và bắt đầu có màu xanh đậm dần, đây là trạng thái đang hoạt động của các chồi này trên củ (ảnh 2). Sau 2 tuần nuôi cấy trên môi trường MS, các chồi này biểu hiện tăng trưởng mạnh với thân, lá và bộ rễ hoàn chỉnh.

Trong trường hợp đặt cây trên các môi trường có bổ sung các chất điều hoà tăng trưởng thực vật, các chồi này có biểu hiện tăng trưởng khác biệt, số chồi mới xuất hiện dao động từ 5 - 14 chồi. Đặc biệt, trên môi trường có bổ sung BA 0,5mg/l và TDZ 0,1mg/l số chồi mới xuất hiện nhiều nhất là 14 chồi, sau 3 tuần. Nhìn chung, các chồi tăng trưởng tốt nhưng số lượng chồi trên các mẫu cây không gia tăng thêm sau đó. Do vậy, kỹ thuật nuôi cấy chồi này trên củ khó có thể áp dụng rộng rãi vì hệ số nhân thấp.

Sự nuôi cấy mô phân sinh chồi ngọn

Trước khi đặt cấy, quan sát các lát cắt dọc các mô phân sinh chồi ngọn (1,5x1,5x2mm),

đỉnh sinh trưởng và vài sơ khởi lá xung quanh, đường kính đỉnh chồi 0,5-0,8mm (ảnh 3).

Trên môi trường có bổ sung các chất điều hoà tăng trưởng thực vật khác nhau, sự tăng trưởng chồi từ mô phân sinh chồi ngọn có những biểu hiện khác biệt về số chồi mới xuất hiện cũng như sự tăng trưởng chiều cao của chồi (bảng 1).

Về hình thái, các chồi mới phát sinh từ sự nuôi cấy mô phân sinh chồi ngọn thường có phiến lá nhỏ với các bẹ lá to và dài. Sau 3 tuần nuôi cấy trên môi trường có bổ sung IBA và BA hoặc 2-IP, các mô phân sinh chồi ngọn tăng trưởng tốt hơn so với môi trường MS và các môi trường bổ sung các chất điều hoà tăng trưởng thực vật còn lại, số lượng chồi xuất hiện nhiều trên môi trường bổ sung BA 2mg/l và IBA 0,5mg/l. Trên môi trường có bổ sung Zea 2mg/l, số chồi phát sinh nhiều hơn đối chứng và sự tăng trưởng của các chồi sau đó không cao. Khi bổ sung thêm IBA 0,5mg/l vào môi trường này thì số chồi có chiều hướng giảm xuống. Về thời gian phát sinh chồi, trên môi trường có BA 2mg/l, các chồi xuất hiện sớm nhất, sau 5 ngày nuôi cấy có thể quan sát thấy các chồi dưới kính hiển vi soi nổi. Trong khi đó, trên các môi trường còn lại, các chồi hình thành từ sau ngày thứ 10 của sự nuôi cấy. Kết quả này cho thấy sự phát sinh chồi từ quá trình nuôi cấy mô phân sinh chồi ngọn chịu ảnh hưởng trực tiếp của các chất điều hoà tăng trưởng thực vật. Mặt khác, các kết quả cũng ghi nhận được bản chất khác nhau của các loại cytokinin (BA, 2-ip hay zeatin) đã tác động khác biệt trong quá trình phát sinh chồi ở cây hoa loa kèn.

Khi quan sát các lát cắt ngang qua cụm chồi cho thấy các sơ khởi chồi có nguồn gốc ngoại sinh, trên một lát cắt có thể quan sát được nhiều sơ khởi chồi cũng như các trung tâm mô phân sinh đang được hình thành với nhóm tế bào phân chia đặc sắc (ảnh 4).

Bảng 1. Sự phát triển chồi từ mô phân sinh chồi ngọn nuôi cấy trên các môi trường có bổ sung chất điều hòa khác nhau, sau 3 tuần nuôi cấy

Môi trường	Số chồi mới phát sinh	Chiều cao (cm)
MS	$0,7 \pm 0,3^a$	$1,2 \pm 0,1^{ab}$
BA 2mg/l	$2,7 \pm 0,3^{ab}$	$1,5 \pm 0,2^{abc}$
BA 2mg/l và IBA 0,5mg/l	$7,3 \pm 1,5^d$	$4,0 \pm 0,8^d$
2-iP 2,5mg/l	$5,7 \pm 0,9^{cd}$	$2,0 \pm 0,1^{bc}$
2-iP 2mg/l và IBA 0,5mg/l	$6,33 \pm 0,9^d$	$2,1 \pm 0,2^{bc}$
Zea 2mg/l	$3,7 \pm 0,7^{bc}$	$2,30 \pm 0,1^c$
Zea 2mg/l và IBA 0,5mg/l	$2,7 \pm 0,7^{ab}$	$2,2 \pm 0,2^{bc}$

Các số trung bình trong cột với các mẫu tự khác nhau thì khác biệt có ý nghĩa ở mức $p=0,05$.

Theo thời gian nuôi cấy, trên môi trường có bổ sung BA 2mg/l và IBA 0,5mg/l, ghi nhận được số chồi trong cụm chồi tăng mạnh từ tuần

thứ 4 và sau đó ổn định ở các tuần kế tiếp (ảnh 5, bảng 2). Sự gia tăng và sự ổn định số chồi phát sinh dường như có sự xuất hiện cơ chế cân bằng nội sinh trong quá trình tăng trưởng, kết quả này cũng được ghi nhận ở một vài đối tượng tương tự trong nuôi cấy [5, 10, 11].

Bảng 2. Số lượng chồi mới phát sinh từ sự nuôi cấy mô phân sinh chồi ngọn trên môi trường có bổ sung BA 2mg/l và IBA 0,5mg/l theo thời gian

Thời gian (tuần)	Số chồi mới phát sinh
3	$8,5 \pm 1,5^a$
4	$19,0 \pm 4,0^b$
5	$26,5 \pm 1,5^b$
6	$27,0 \pm 1,0^b$

Các số trung bình trong cột với các mẫu tự khác nhau thì khác biệt có ý nghĩa ở mức $p=0,05$.

Sau 6 tuần, các chồi được tách từ cụm chồi và tiếp tục tăng trưởng trên môi trường MS. Sau 1 tuần trên môi trường này, các chồi bắt đầu phát sinh rễ và tăng trưởng ổn định. Đối với sự phát sinh rễ của cây hoa loa kèn *in vitro* đường

như dễ dàng khi sự cân bằng nội sinh diễn ra và kích thích sự phát sinh (ảnh 7).

Cường độ hô hấp

Sau 3 tuần nuôi cấy, so với các chồi phát sinh trên môi trường MS, các cụm chồi trên các môi trường bổ sung BA 2mg/l và IBA 0,5mg/l có cường độ hô hấp cao nhất (bảng 3).

Bảng 3. Cường độ hô hấp của chồi phát sinh trên các môi trường khác nhau, sau 3 tuần

Nghiệm thức	Cường độ hô hấp ($\mu\text{mol O}_2/\text{g/giờ}$)
MS	$25,39 \pm 4,34^a$
BA 2mg/l	$24,82 \pm 3,16^a$
BA 2mg/l và IBA 0,5mg/l	$39,06 \pm 3,71^b$
2-iP 2mg/l và IBA 0,5mg/l	$34,20 \pm 3,60^{ab}$

Các số trung bình trong cột với các mẫu tự khác nhau thì khác biệt có ý nghĩa ở mức $p=0,05$.

Trong quá trình phát chồi, các chồi trên môi trường bổ sung BA 2mg/l và IBA 0,5mg/l có cường độ hô hấp rất cao so với các chồi trên những môi trường còn lại (bảng 3). Trong quá trình này, nhu cầu cần thiết các hợp chất liên hệ cho sự xây dựng các cấu trúc mới của chồi cũng như nhu cầu năng lượng ATP cho sự tăng trưởng của chồi mới được cung cấp từ sự hô hấp của mô và tế bào, do vậy các chồi trên môi trường có sự phát sinh chồi nhiều nhất có cường độ hô hấp mạnh là hợp lý.

Hoạt tính các chất điều hoà tăng trưởng thực vật

Bảng 4. Hoạt tính các chất điều hòa tăng trưởng thực vật của các chồi phát sinh từ mô phân sinh ngọn chồi trên các môi trường khác nhau, sau 3 tuần

Nghiệm thức	Hoạt tính chất điều hòa tăng trưởng thực vật (mg/l)			
	IAA	Zea	ABA	GA ₃
MS	$2,2 \pm 0,4$	$1,1 \pm 0,4$	$0,2 \pm 0,0$	$0,9 \pm 0,6$
BA 2mg/l	$3,1 \pm 1,5$	$0,5 \pm 0,1$	$0,1 \pm 0,0$	$1,1 \pm 0,1$
BA 2mg/l và IBA 0,5mg/l	$2,9 \pm 1,4$	$1,1 \pm 0,2$	$0,1 \pm 0,0$	$0,7 \pm 0,1$
2-iP 2mg/l và IBA 0,5mg/l	$2,7 \pm 1,3$	$0,6 \pm 0,1$	$0,1 \pm 0,0$	$1,0 \pm 0,4$

Trồng cây ra chậu

Các cây *in vitro* 6 tuần tuổi có nguồn gốc từ việc nuôi cấy mô phân sinh ngọn chồi được chuyển ra vườn, trồng vào từng chậu. Sau 3 tuần trong điều kiện trồng nhà lưới, các cây tăng trưởng tốt và tiếp tục xuất hiện thêm lá mới (ảnh 8).

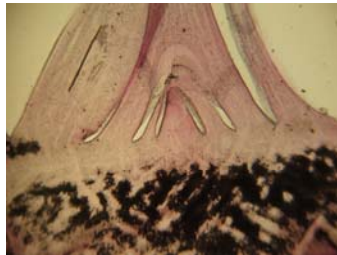
Hoạt tính IAA nội sinh khá cao trong mẫu cấy trên các môi trường, sau 3 tuần. Cùng với sự hiện diện của Zea nội sinh, hai hormon này đã kích thích quá trình phát sinh chồi. Bên cạnh đó, các chất cân bằng tăng trưởng như ABA xuất hiện ở mức thấp, đây là điều kiện thuận lợi cho sự tăng trưởng của các chồi mới (bảng 4).

Trong các môi trường nuôi cấy có bổ sung các loại cytokinin khác nhau nhưng hoạt tính zeo nội sinh không cao. Điều này cho thấy sự tăng trưởng của chồi trong điều kiện nuôi cấy *in vitro* tùy thuộc vào sự hấp thu, biến dưỡng và sau cùng là cân bằng nội sinh của các hormon tăng trưởng cho phù hợp với giai đoạn phát sinh và phát triển của thực vật [4, 9, 11].

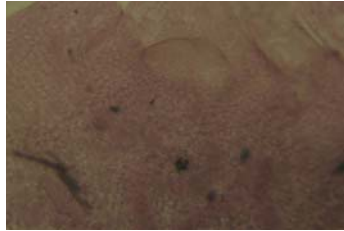
Các cây *in vitro* tăng trưởng tốt trong nhà lưới là cơ sở cho thấy các chồi phát sinh từ kỹ thuật nuôi cấy mô phân sinh chồi ngọn ở cây hoa loa kèn (*Zantedeschia elliotiana*) có khả năng ứng dụng rộng rãi trong mục đích nhân giống.



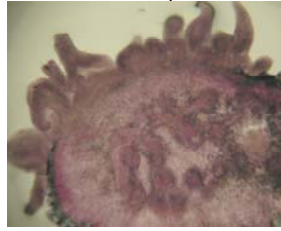
Hình 1. Chồi nảy trên củ hoa loa kèn



Hình 2. Lát cắt dọc qua chồi trên củ.



Hình 3. Lát cắt dọc qua mô phân sinh ngọn chồi của cây in vitro sau 4 tuần trên môi trường MS.



Hình 4. Lát cắt ngang qua cụm chồi phát sinh từ mô phân sinh ngọn sau 2 tuần trên môi trường MS có bổ sung BA 2mg/l và IBA 0,5mg/l.



Hình 5. Cụm chồi phát sinh từ mô phân sinh ngọn sau 2 tuần trên môi trường MS có bổ sung BA 2mg/l và IBA 0,5mg/l.



Hình 6. Các chồi mới được tách từ cụm chồi sau 4 tuần phát sinh trên môi trường MS có bổ sung BA 2mg/l và IBA 0,5mg/l.



Hình 7. Các cây con tăng trưởng sau 6 tuần trên môi trường MS.



Hình 8. Cây hoa loa kèn tăng trưởng trong chậu tại phòng thí nghiệm Sinh lý thực vật.

4. KẾT LUẬN

- Mô phân sinh ngọn từ các cây *in vitro* có khả năng phát sinh rất nhiều chồi (khoảng 26 chồi) sau 5 tuần trên môi trường có bổ sung BA 2mg/l và IBA 0,5mg/l. Các chồi phát sinh rễ sau một tuần trên môi trường MS không hormon. Các chất điều hòa tăng trưởng thực vật đóng vai trò quan trọng trong quá trình phát sinh chồi.
- Các cây có nguồn gốc từ sự nuôi cấy mô phân sinh ngọn đã tăng trưởng rất tốt trong chậu ở nhà lưới của phòng thí nghiệm.

CULTURING THE SHOOT TIP FROM TUBER SHOOTS OF CALLA LILY (*Zantedeschia eliotiana* Engl.)

Dang Thi Quynh Giang, Van Thien Bao and Phan Ngo Hoang
University of Science, VNU-HCM

ABSTRACT: Tuber shoots are excised and cultured onto MS medium (Murashige & Skoog, 1962). Shoot tips are isolated from *in vitro* plantlets and grow in a stable way on medium supplemented with different plant growth regulations; among the medium, shoot tips arise most on MS medium supplemented with 2mg/l BA and 0.5mg/l IBA. Role of endogenous hormones, respiration rate and origin of shoot formation were analysis.

Key words: plant growth regulations, shoot tips, calla lily, *in vitro* culture.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. Bùi Trang Việt, 2000. Sinh lý thực vật- Phát triển. Nxb. ĐH. Quốc gia TP. Hồ Chí Minh, 333 trang.
- [2]. Bùi Trang Việt 1992. Tìm hiểu hoạt động của các chất điều hòa tăng trưởng thực vật thiên nhiên trong hiện tượng rụng “bông” và “trái non” Tiêu (*Piper nigrum* L.). *Tập san khoa học Trường ĐH Tổng hợp TP. Hồ Chí Minh*, số 1: 155-165.
- [3]. Chang H. S., Chakrabarty D., Hahn E. J. and Paek K. Y., 2003. Micropropagation of calla lily (*Zantedeschia albomaculata*) via *in vitro* shoot tip proliferation. *In vitro Cell Dev. Biol – Plant*, Vol. 39: 129–134.
- [4]. D’Arth S. M., Simpson S. I., Seelye J. F. and Jameson P. E., 2001. Bushiness and cytokinin sensitivity in micropropagated *Zantedeschia*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, Vol. 70: 113–118.
- [5]. Gaspar T., Kevers C., Penel C., Greppin H., Reid D. M. and Thorpe T. A., 1996. Plant hormones and plant growth regulators in plant tissue culture. *In vitro Cell Dev. Biol – Plant*, Vol. 32: 272–289.
- [6]. Lê Thị Thu Vê, Đỗ Năng Vịnh và Lê Huy Hàm 1999. Nhân nhanh các giống hoa loa kèn mới. Báo cáo hội nghị công nghệ sinh học toàn quốc. Nxb Khoa học kỹ thuật, trang 889-985.
- [7]. Meidner H. 1984. *Class experiments in plant physiology*. George Allen and Uniwin, London.
- [8]. Murashige T. and Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Plant Physiology*, Vol.15: 473- 497.
- [9]. Phan Hoàng Anh, Phan Ngô Hoàng và Bùi Trang Việt 2005. Vĩ nhân giống từ vảy hành của cây Huệ trắng. *Tạp chí Phát triển và Khoa học công nghệ Đại học Quốc gia TP. Hồ Chí Minh* Vol.8(8): 43-48.
- [10]. Salisbury F.B. and Ross C.W., 1992. *Plant Physiology*. Wadsworth, Inc. (California), 682p.
- [11]. Zalewska M., Lema-Rumin’ska J., and Miler N. 2007. *In vitro* propagation using adventitious buds technique as a source of new variability in *Chrysanthemum* sp. *Scientia Horticulturae* 113: 70–73.