



ẢNH HƯỞNG CỦA CHẤT ĐIỀU HÒA TĂNG TRƯỞNG THỰC VẬT BA VÀ NAA ĐẾN KHẢ NĂNG TẠO MÔ SẸO TỪ LÁ CÂY CÁT TƯỜNG HỒNG *IN VITRO* *Eustoma grandiflorum* (Raf.) Shinn

Lương Thị Lệ Thơ*, Nguyễn Hà Phương Thảo

Khoa Sinh học - Trường Đại học Sư phạm TP Hồ Chí Minh

Ngày nhận bài: 21-8-2018; ngày nhận bài sửa: 31-8-2018; ngày duyệt đăng: 21-9-2018

TÓM TẮT

Cát Tường hồng là loài cây hoa kiểng có giá trị thương phẩm cao nhưng khó thích nghi với môi trường tự nhiên nên việc nhân nhanh giống cây *in vitro* là cần thiết. Mô sẹo là nguyên liệu khởi đầu có khả năng biệt hóa thành rễ, chồi và phôi để tạo cây hoàn chỉnh giúp nhân nhanh giống cây. Kết quả nghiên cứu cho thấy môi trường MS có bổ sung BA 2 mg/l kết hợp với NAA 1 mg/l cho sự phát triển sẹo tốt nhất.

Từ khóa: Cát Tường hồng, mô sẹo, chất điều hòa tăng trưởng thực vật.

ABSTRACT

Effect of plant growth hormone BA and NAA on the ability to produce callus from leaf of *Eustoma grandiflorum* (Raf.) Shinn *in vitro*

Eustoma grandiflorum (Raf.) Shinn is species of high value commercial flowers but it difficult to adapt to the natural environment therefore the rapid *in vitro* multiplication is necessary. Callus is the starting material capable of differentiation into roots, shoots and embryos to create complete plants to multiply seedlings. Result indicated that MS medium supplemented with 2mg/l BA and 1 mg/l NAA for best callus growth.

Keywords: *Eustoma grandiflorum*, callus, plant growth regulators.

1. Mở đầu

Cát Tường hồng *Eustoma grandiflorum* (Raf.) Shinn là loài cây hoa kiểng mang nhiều ý nghĩa may mắn, là biểu tượng của sự viên mãn, an lành nên có giá trị thương phẩm cao. Đây là loài thực vật ôn đới, nguồn gốc từ miền Tây nước Mỹ [1].

Ở nước ta, Cát Tường hồng được sản xuất nhiều ở Đà Lạt. Tuy nhiên, việc sản xuất cây đa phần mang tính tự phát nên diện tích trồng không rộng, sản lượng và chất lượng hoa không đạt được hiệu quả như mong muốn. Bên cạnh đó, nhu cầu chơi hoa Cát Tường ngày càng tăng; vì vậy, số lượng và chất lượng hoa được sản xuất ra không đủ đáp ứng nhu cầu người tiêu dùng [1].

* Email: tholtl@hcmue.edu.vn

Mô sẹo là một đám tế bào không phân hóa, có đặc tính phân chia mạnh thường được tạo ra do những xáo trộn trong quá trình tạo cơ quan. Do đó, cây non hay những mảnh thân non của cây trưởng thành dễ cho mô sẹo trong điều kiện nuôi cấy mô [2].

Mô sẹo phát triển không theo quy luật nhưng có khả năng biệt hóa thành rễ, chồi và phôi để tạo cây hoàn chỉnh.

Do đó, trong nghiên cứu này, chúng tôi muốn tìm hiểu ảnh hưởng của chất điều hòa tăng trưởng thực vật BA và NAA đến khả năng tạo mô sẹo từ lá cây Cát Tường hồng *in vitro* *Eustoma grandiflorum* (Raf.) Shinn” nhằm góp phần nhân nhanh giống cây Cát Tường hồng đạt chất lượng và số lượng đáp ứng nhu cầu thị hiếu của người tiêu dùng.

2. Vật liệu

Các mẫu lá non được cô lập từ cây Cát Tường hồng *in vitro* 4 tuần tuổi được nuôi cấy trong ống nghiệm tại Phòng Thí nghiệm G005 - Bộ môn Sinh lí Thực vật – Trường Đại học Sư phạm TP Hồ Chí Minh.

3. Phương pháp

3.1. Tạo cây Cát Tường hồng *in vitro* từ đoạn thân mang chồi

Các đoạn thân mang chồi được cắt rời khỏi nhánh, rửa sạch dưới vòi nước và xà phòng sau đó rửa lại với nước cất. Tiếp tục lắc mẫu với cồn 90⁰ và khử trùng bằng dung dịch HgCl₂. Sau đó cấy mẫu vào các ống nghiệm chứa môi trường MS bổ sung BA 1 mg/l.

Sự nuôi cấy được thực hiện ở điều kiện chiếu sáng 2500 ± 500 lux (12 giờ/ngày), độ ẩm 60% ± 5%, nhiệt độ 22°C ± 2°C. Mỗi thí nghiệm được lặp lại 3 lần, mỗi lần 8 khúc cắt.

3.2. Khảo sát ảnh hưởng của BA và NAA riêng lẻ hay kết hợp ở các nồng độ khác nhau trên sự tạo mô sẹo từ lá cây Cát Tường hồng *in vitro*

Chọn các lá non từ mẫu cây Cát Tường hồng *in vitro* 4 tuần tuổi, cắt các đường vuông góc với gân lá. Sau đó, cấy các lá này vào môi trường MS bổ sung BA (0,5 mg/l, 1 mg/l, 1,5 mg/l, 2 mg/l và 2,5 mg/l) riêng lẻ hay phối hợp với NAA (0,5 mg/l; 1 mg/l).

Theo dõi và ghi nhận sự phát sinh mô sẹo, tỉ lệ ra sẹo, cân trọng lượng mô sẹo ở các nghiệm thức sau 2 tuần nuôi cấy.

Sự nuôi cấy được thực hiện ở điều kiện tối, độ ẩm 60% ± 5%, nhiệt độ 22°C ± 2°C. Mỗi thí nghiệm được lặp lại 3 lần, mỗi lần 5 mẫu lá *in vitro*.

3.3. Quan sát hình thái giải phẫu

Những biến đổi tế bào học trong quá trình cảm ứng tạo sẹo được theo dõi sau khi thực hiện các lát cắt bằng tay, nhuộm kép với đỏ carmin và xanh metylen và quan sát dưới kính hiển vi quang học vào ngày thứ 3, 7, 10, 14 tính từ lúc bắt đầu nuôi cấy.

3.4. Xử lí số liệu

Các số liệu được xử lí thống kê bằng chương trình Statistical Product and Services Solutions (SPSS), phiên bản 20 dùng cho Windows. Sự khác biệt có ý nghĩa ở mức xác suất p = 0.05 (p: probability) của giá trị được biểu hiện bằng các mẫu tự khác nhau.

4. Kết quả

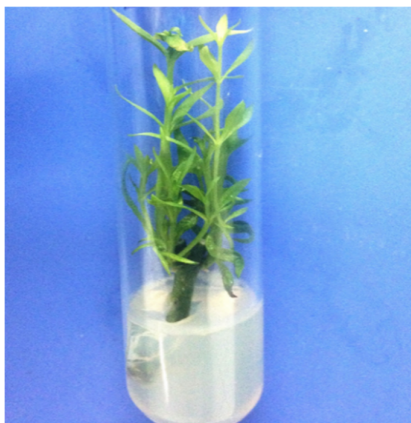
4.1. Tạo cây Cát Tường hồng *in vitro* từ đoạn thân mang chồi

Sau 4 tuần nuôi cấy trên môi trường MS có bổ sung BA 1 mg/l giúp cho sự phát triển của chồi từ đoạn thân mang chồi cây Cát Tường hồng rất tốt với số chồi và số lá non nhiều, các lá non có màu xanh tươi (Ảnh 1, Bảng 1).

Bảng 1. Ảnh hưởng của BA 1mg/l đến sự phát triển của đoạn thân mang chồi cây Cát Tường hồng *Eustoma Grandiflorum* (Raf.) Shinn

Tuần	Số chồi ; Số lá/ chồi	BA 1 mg/l
1	Số chồi	1.67 ± 0.13 ^d
	Số lá/chồi	1.58 ± 0.55 ^a
2	Số chồi	2.17 ± 0.19 ^d
	Số lá/chồi	4.5 ± 0.15 ^{cd}
3	Số chồi	2.67 ± 0.37 ^d
	Số lá/chồi	6.0 ± 0.36 ^d
4	Số chồi	2.67 ± 0.37^d
	Số lá/chồi	7.46 ± 0.37^{bd}

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



Ảnh 1. Cây Cát Tường hồng *in vitro* *Eustoma grandiflorum* (Raf.) Shinn sau 4 tuần nuôi cấy trên môi trường MS có bổ sung BA 1 mg/l

4.2. Ảnh hưởng của BA đến khả năng tạo mô sẹo từ mẫu lá cây Cát Tường hồng *in vitro*

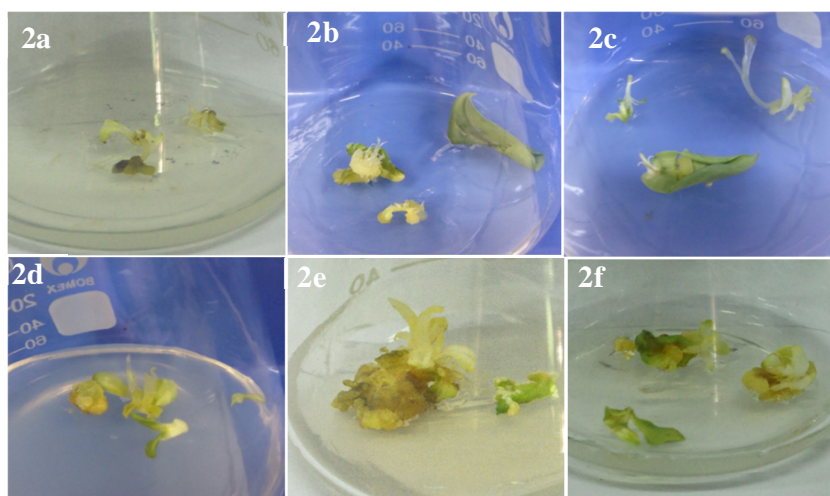
Sau 2 tuần nuôi cấy mẫu lá cây Cát Tường hồng *in vitro* trên môi trường MS, 100% mẫu cây không tạo sẹo, lá dần có màu xanh nhạt, thiếu sức sống và chết (Ảnh 2a, Bảng 2).

Trên môi trường MS có bổ sung BA riêng lẻ ở các nồng độ khác nhau (0,5 mg/l; 1 mg/l; 1,5 mg/l; 2 mg/l; 2,5 mg/l) sau 2 tuần nuôi cấy 100% mẫu cây từ lá cây Cát Tường hồng *in vitro* đều có tác dụng kích thích tạo mô sẹo nhưng sẹo phát triển chậm và nhanh bị chai ở tuần thứ 2. Ở tất cả các mẫu cây, bên cạnh việc tạo sẹo còn kích thích tạo chồi, tuy nhiên chồi phát triển yếu, có màu trắng nhạt và ngắn (Ảnh 2b, 2c, 2d, 2e, 2f, Bảng 2).

Bảng 2. Ảnh hưởng của BA đến khả năng tạo sẹo và trọng lượng mô sẹo từ mẫu lá cây Cát Tường hồng in vitro sau 2 tuần nuôi cấy

Nồng độ BA (mg/l)	Tỷ lệ tạo sẹo (%)		Trọng lượng sẹo (mg)	
	Tuần 1	Tuần 2	Tuần 1	Tuần 2
Đối chứng	0 ± 0.00 ^a	00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a
0,5	75 ± 0.08 ^b	97 ± 0.03 ^b	0.09 ± 0.02 ^b	0.09 ± 0.02 ^b
1	91 ± 0.07 ^c	95 ± 0.05 ^b	0.06 ± 0.02 ^b	0.09 ± 0.01 ^b
1,5	100 ± 0.00 ^c	100 ± 0.00 ^b	0.07 ± 0.01 ^b	0.09 ± 0.01 ^b
2	98 ± 0.02 ^c	100 ± 0.00 ^b	0.13 ± 0.01^c	0.17 ± 0.01^c
2,5	88 ± 0.06 ^{bc}	100 ± 0.00 ^b	0.06 ± 0.00 ^b	0.11 ± 0.01 ^b

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



Ảnh 2. Khả năng tạo sẹo từ mẫu lá in vitro trên môi trường MS bổ sung BA ở các nồng độ khác nhau

2a. Môi trường MS; 2b. Môi trường MS bổ sung BA 0,5 mg/l; 2c. Môi trường MS bổ sung BA 1 mg/l; 2d. Môi trường MS bổ sung BA 1,5 mg/l; 2e. Môi trường MS bổ sung BA 2 mg/l; 2f. Môi trường MS bổ sung BA 2,5 mg/l.

Độ tuổi của lá là yếu tố quan trọng có ảnh hưởng đến khả năng quang hợp và tạo sẹo [2]. Dưới tác động của cytokinin (hoặc phối hợp với auxin), quá trình phân chia tế bào dễ xảy ra những xáo trộn và dẫn đến hình thành mô sẹo [5]. Chính vì thế, các lá non khi có vết thương trên lá, bên cạnh sự tăng cường hoạt động phân chia tế bào thì quá trình xáo trộn sự phân chia rất dễ xảy ra.

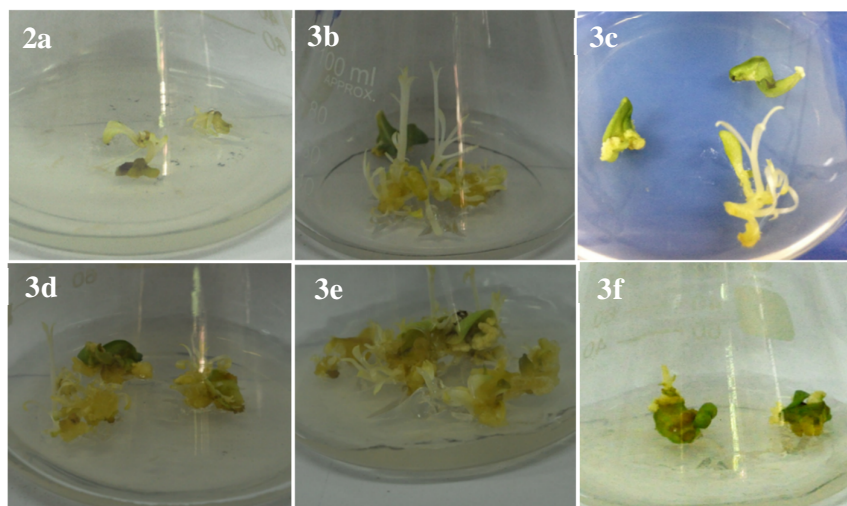
4.3. Ảnh hưởng của BA và NAA 0,5 mg/l đến khả năng tạo mô sẹo từ mẫu lá cây Cát Tường hồng in vitro

Trên môi trường MS có bổ sung BA và NAA 0,5 mg/l đều có khả năng tạo sẹo cao. Sẹo được tạo ra ngay sau 1 tuần nuôi cấy (Ảnh 3b, 3c, 3d, 3e, 3f, Bảng 3). Tuy nhiên qua theo dõi sự phát triển sẹo cũng như phát triển chồi không có sự khác biệt so với nghiệm thức ảnh hưởng của BA riêng lẻ (Bảng 2).

Bảng 3. Ảnh hưởng của NAA 0,5 mg/l phối hợp với BA đến khả năng tạo sẹo và trọng lượng mô sẹo từ mẫu lá cây Cát Tường hồng in vitro sau 2 tuần nuôi cấy

Nồng độ NAA (mg/l)	Nồng độ BA (mg/l)	Tỉ lệ tạo sẹo (%)		Trọng lượng sẹo (mg)	
		Tuần 1	Tuần 2	Tuần 1	Tuần 2
Đối chứng	Đối chứng	0 ± 0.00 ^a	0 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a
0,5	0,5	95 ± 0.03 ^b	95 ± 0.03 ^b	0.09 ± 0.01 ^{bc}	0.13 ± 0.01 ^{bc}
0,5	1	95 ± 0.03 ^b	95 ± 0.03 ^b	0.06 ± 0.00 ^b	0.09 ± 0.01 ^b
0,5	1,5	100 ± 0.00^b	100 ± 0.00^b	0.08 ± 0.01 ^c	0.11 ± 0.01 ^b
0,5	2	100 ± 0.00^b	100 ± 0.00^b	0.12 ± 0.01^b	0.16 ± 0.02^c
0,5	2,5	100 ± 0.00^b	100 ± 0.00^b	0.07 ± 0.00 ^b	0.11 ± 0.01 ^b

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



Ảnh 3. Khả năng tạo sẹo từ mẫu lá in vitro trên môi trường MS bổ sung NAA 0,5 mg/l phối hợp với BA ở các nồng độ khác nhau sau 2 tuần nuôi cấy

2a. Môi trường MS; 3b. Môi trường MS bổ sung NAA 0,5 mg/l và BA 0,5 mg/l; 3c. Môi trường MS bổ sung NAA 0,5 mg/l và BA 1 mg/l; 3d. Môi trường MS bổ sung NAA 0,5 mg/l và BA 1,5 mg/l; 3e. Môi trường MS bổ sung NAA 0,5 mg/l và BA 2 mg/l; 3f. Môi trường MS bổ sung NAA 0,5 mg/l và BA 2,5 mg/l.

4.4. Ảnh hưởng của BA và NAA 1 mg/l đến khả năng tạo mô sẹo từ mẫu lá cây Cát Tường hồng *in vitro*

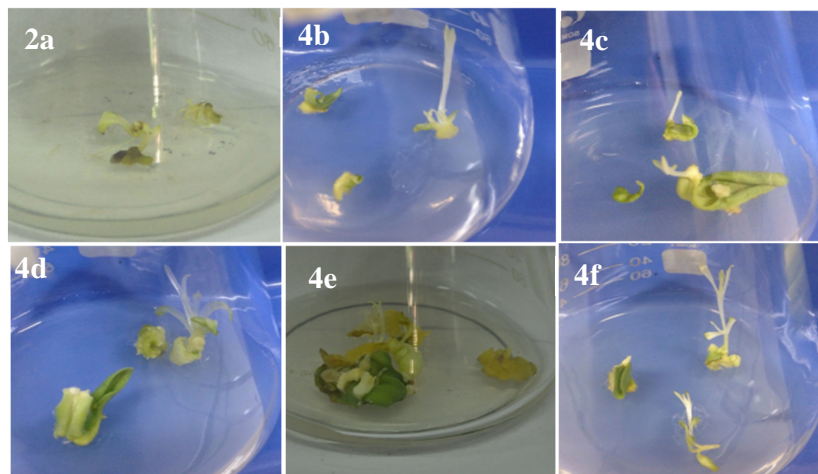
Trên môi trường MS có bổ sung BA và NAA 1 mg/l các mẫu cấy từ lá cây Cát tường hồng *in vitro* đều có khả năng ra sẹo (Bảng 4).

Đặc biệt, ở nghiệm thức môi trường MS có bổ sung BA 2 mg/l và NAA 1 mg/l cho tỉ lệ tạo sẹo cao và sẹo phát triển nhanh vì thể sẹo có trọng lượng cao nhất sau 2 tuần nuôi cấy. Sẹo có màu vàng trắng, không có dấu hiệu bị chai (Ảnh 4e, Bảng 4). Ở các nghiệm thức còn lại vẫn có sự tạo sẹo nhưng sẹo phát triển ở mức trung bình nên cho trọng lượng sẹo thấp. Bên cạnh việc tạo sẹo, các mẫu cấy đều tạo được chồi, tuy nhiên chồi có màu trắng nhạt và phát triển yếu (Ảnh 4b, 4c, 4d, 4f, Bảng 4).

Bảng 4. Ảnh hưởng của NAA 1 mg/l phối hợp với BA đến khả năng tạo mô sẹo và trọng lượng mô sẹo từ mẫu lá cây Cát Tường hồng *in vitro* sau 2 tuần nuôi cấy

Nồng độ NAA (mg/l)	Nồng độ BA (mg/l)	Tỉ lệ tạo sẹo (%)		Trọng lượng sẹo (mg)	
		Tuần 1	Tuần 2	Tuần 1	Tuần 2
Đối chứng	Đối chứng	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a
1	0,5	100 ± 0.00 ^b	100 ± 0.00 ^b	0.04 ± 0.00 ^b	0.07 ± 0.00 ^b
1	1	93 ± 0.07 ^b	93 ± 0.07 ^b	0.07 ± 0.00 ^c	0.11 ± 0.01 ^{bc}
1	1,5	97 ± 0.02 ^b	97 ± 0.02 ^b	0.09 ± 0.01 ^c	0.11 ± 0.01 ^{bc}
1	2	97 ± 0.02 ^b	97 ± 0.02 ^b	0.14 ± 0.02^d	0.18 ± 0.02^d
1	2,5	93 ± 0.04 ^b	93 ± 0.04 ^b	0.06 ± 0.01 ^{bc}	0.08 ± 0.00 ^{bc}

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



Ảnh 4. Khả năng tạo sẹo từ mẫu lá *in vitro* trên môi trường MS bổ sung NAA 1mg/l phối hợp với BA ở các nồng độ khác nhau sau 2 tuần nuôi cấy

2a. Môi trường MS; 4b. Môi trường MS có bổ sung NAA 1 mg/l và BA 0,5 mg/l; 4c. Môi trường MS có bổ sung NAA 1 mg/l và BA 1 mg/l; 4d. Môi trường MS có bổ sung NAA 1 mg/l và BA 1,5 mg/l; 4e. Môi trường MS có bổ sung NAA 1 mg/l và BA 2 mg/l; 4f. Môi trường MS có bổ sung NAA 1 mg/l và BA 2,5 mg/l.

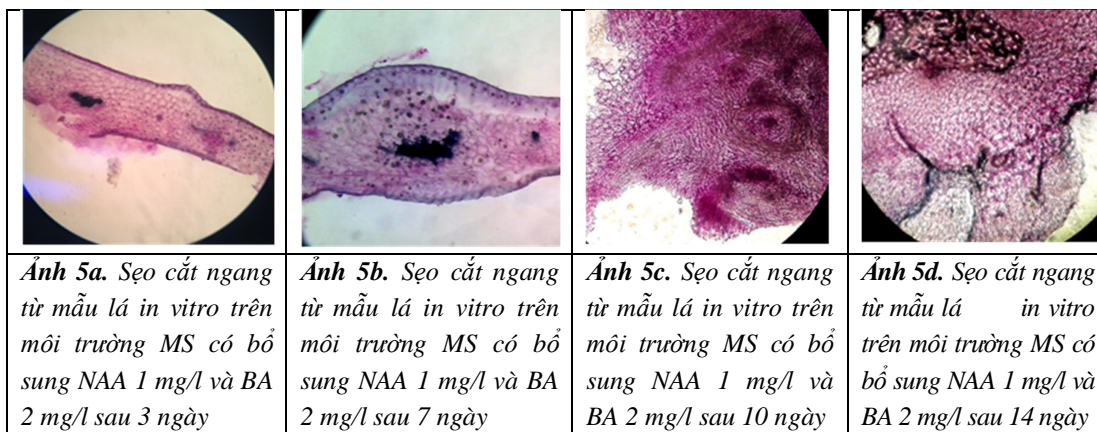
Chất điều hòa tăng trưởng thực vật đóng vai trò quan trọng trong quá trình hình thành mô sẹo, đặc biệt là auxin. Hiệu ứng của auxin tùy thuộc vào loại và nồng độ trong mô thực vật hay trong môi trường nuôi cấy [2]. Ngoài nồng độ với tỉ lệ thích hợp áp dụng trong mục đích tạo mô sẹo, phải chú ý đến sự phối hợp giữa tỉ lệ auxin và cytokinin [5]. Tỉ lệ auxin/cytokinin cao kích thích tạo rễ, trong khi tỉ lệ này thấp kích thích tạo chồi, ở mức trung gian sẽ kích thích tạo mô sẹo [5]. Điều này cũng phù hợp với môi trường MS có bổ sung NAA 1mg/l với BA (1,5 và 2 mg/l) đều thúc đẩy kích thích tạo mô sẹo và sẹo phát triển nhanh và môi trường MS có bổ sung NAA 1mg/l phối hợp BA 2,5mg/l thúc đẩy sự tạo chồi.

Cytokinin kích thích sự phân chia tế bào thúc đẩy sự phiên mã tạo mRNA, kích thích sự tổng hợp các protein và enzym đặc hiệu trong các mô xác định để tạo sẹo với điều kiện có auxin [6]. Chính vì thế ở các nghiệm thức với sự tác động riêng lẻ của BA lên khả năng tạo sẹo thì sau 2 tuần, tỉ lệ tạo sẹo cao nhưng sẹo phát triển chậm và trọng lượng sẹo thấp hơn ở nghiệm thức có sự phối hợp giữa BA và NAA.

Các chất điều hòa tăng trưởng thực vật nội sinh có nguồn gốc từ sản phẩm trung gian của chu trình đường phân và có ảnh hưởng đến khả năng tạo sẹo khi phối hợp với chất điều hòa tăng trưởng thực vật ngoại sinh [3]. Điều này cũng phù hợp với môi trường MS có bổ sung NAA 1mg/l phối hợp với BA 2mg/l cho tỉ lệ ra sẹo và trọng lượng sẹo đạt cao nhất. Có lẽ lượng auxin nội sinh trong lá nhiều nên đã ảnh hưởng đến cân bằng giữa auxin và cytokinin trong sự tạo sẹo ở nghiệm thức BA riêng lẻ và phối hợp với NAA.

4.5. Quan sát hình thái giải phẫu

Sau 2 tuần nuôi cấy, mô sẹo được giải phẫu và nhuộm kép với dung dịch đỏ carmin và xanh metylen. Kết quả giải phẫu cho thấy, mẫu lá có các khối sẹo được hình thành ngay những nơi gần với bó dẫn, ở cạnh gân chính của lá hoặc các gân bên. Xuất hiện các tế bào tiếp tuyến xếp chồng lên nhau, có tiềm năng phân sinh. Sự cảm ứng tạo sẹo rõ nhất ở các tế bào biểu bì; tuy nhiên, sự phân chia của khối tế bào không nhiều, chủ yếu thấy có sự gia tăng kích thước của tế bào nhu mô (Ảnh 5a, 5b, 5c, 5d).



5. Kết luận

Ở các nghiệm thức môi trường MS phối hợp với BA riêng lẻ hay kết hợp với NAA đều kích thích mẫu lá non cây Cát tường hồng *in vitro* tạo sẹo.

Ở môi trường MS có bổ sung BA 2 mg/l kết hợp với NAA 1 mg/l cho sự phát triển sẹo tốt nhất.

Các khối sẹo được hình thành ngay những nơi gần với bó dẫn, ở cạnh gân chính của lá hoặc các gân bên.

Tuyên bố về quyền lợi: Các tác giả xác nhận hoàn toàn không có xung đột về quyền lợi.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Vũ Thu Diễm, *Nghiên cứu đặc điểm sinh trưởng, phát triển và ảnh hưởng một số biện pháp kỹ thuật đến năng suất chất lượng hoa Cát Tường nhập nội tại Hà Nội*. Luận văn Thạc sĩ Nông nghiệp, Viện Di truyền Nông nghiệp, 2012.
- [2] Bùi Trang Việt, *Sinh lí Thực vật đại cương, phần II: Phát triển*. NXB Đại học Quốc gia TP Hồ Chí Minh, 2000.
- [3] W. G. Hopkins, "Introduction to Plant Physiology," *The University of Westher Ontario*, pp.323-350, 1995.
- [4] Dickmann D.I., "Photosynthesis and respiration by developing leaves of cottonwood (*Populus Deltoides* Baite.)," *Bot. Gaz.*, **132**, pp. 253-259, 1971.
- [5] Metzger J.D., "Hormones and reproductive development," *Plant Hormones Physiology, Biochemistry and molecular biology*. Edited by Davies P.J., Kluwer Academic Publishers Dordrech, Boston, London, pp. 617-648, 1995.
- [6] Tom K. Scot, "Auxin and root," *Ann, Rev, plant Physiol*, **23**, pp. 235-258, 1972.