

NHÂN GIỐNG VÔ TÍNH CÂY SAINTPAULIA BẰNG PHƯƠNG PHÁP IN-VITRO

Phạm Tấn Trường, Võ Thị Bạch Mai
Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG-HCM

TÓM TẮT: Mục tiêu đề tài nghiên cứu nhằm tìm ra điều kiện khử trùng mẫu vật và môi trường dinh dưỡng thích hợp cho sự biến đổi tế bào và sự phát sinh hình thái cơ quan để nhân nhanh giống cây Saintpaulia bằng phương pháp in-vitro.

Kết quả nhận được cho thấy:

- Khử trùng mẫu cây với CaOCl_2 nồng độ 10% trong 10 phút và HgCl_2 nồng độ 0,1% trong 5 phút cho kết quả mẫu bị nhiễm thấp nhất.

- Mẫu cây từ phiến lá chồi được hình thành rất nhiều ở mép còn mẫu từ cuống lá cho chồi tập trung ở vùng gân.

- Môi trường MS có bổ sung 0,5 mg/l IAA + 2,5 mg/l BA tạo nhiều chồi nhất, còn môi trường MS có bổ sung 0,5 mg/l IAA thích hợp nhất cho sự ra rễ ở cây con.

Các kết quả này nhằm góp phần nhân nhanh cây Saintpaulia bằng phương pháp nuôi cấy in-vitro.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Saintpaulia là loài thực vật nở hoa trong nhà lí tưởng, dễ trồng, dễ ra hoa, hoa đẹp có màu sắc sặc sỡ thích hợp cho trang trí trong nhà, nơi bàn làm việc...

Nhằm đáp ứng việc nhân giống nhanh và kiểm soát nguồn bệnh trong cây giống chúng tôi thực hiện đề tài này nhằm mục đích nhân giống cây *Saintpaulia* bằng phương pháp nuôi cấy in-vitro.

2. VẬT LIỆU – PHƯƠNG PHÁP

2.1. Vật liệu

Lá, cuống lá cây Saintpaulia trưởng thành mang về từ vườn ươm tại Củ Chi, dùng làm vật liệu nuôi cấy.

2.2. Phương pháp

• Sự khử trùng mẫu vật

Chọn lá trưởng thành (lá thứ 6 đến lá thứ 10) của cây Saintpaulia. Cắt, rửa sạch dưới vòi nước máy, dùng gòn thấm xà phòng lau thật sạch bề mặt lá và cuống lá, lau lại bằng cồn 700, rửa sạch bằng nước cất và đem vào tủ cấy xử lý với chất khử trùng. Mẫu vật được khử trùng bằng dung dịch hypochloride calcium 7% và 10% trong các thời gian 7 phút, 10 phút và 15 phút; và dung dịch clorur thủy ngân 0,1% trong các thời gian 3 phút, 5 phút và 8 phút.

• Môi trường dùng trong nuôi cấy in-vitro:

Môi trường tạo sẹ:

Tiến hành thí nghiệm trên 5 nghiệm thức:

MS 0: Môi trường MS không bổ sung chất điều hoà sinh trưởng thực vật (ĐHSTTV).

MS 2B: Môi trường MS có bổ sung 0,5 mg/l IAA + 2,5 mg/l BA.

MS 5B: Môi trường MS có bổ sung 0,5 mg/l IAA + 5,0 mg/l BA.

MS 2D: Môi trường MS có bổ sung 0,5 mg/l IAA + 2,5 mg/l 2,4-D.

MS 5D: Môi trường MS có bổ sung 0,5 mg/l IAA + 5,0 mg/l 2,4-D.

Lá cây Saintpaulia được cắt thành nhiều mảnh nhỏ có kích thước 1 cm x 1 cm. Đặt ngửa mặt trên tiếp xúc với môi trường thí nghiệm.

Cuống lá Saintpaulia được cắt thành những đoạn ngắn 1 cm. Đặt cây nằm ngang trên môi trường thí nghiệm.

Mỗi nghiệm thức cây 10 bình, mỗi bình cây 3 mẫu, lặp lại 3 lần. ½ số bình cây đặt nuôi trong tối, ½ số bình cây còn lại được nuôi dưới ánh sáng đèn ở nhiệt độ 220C, thời gian chiếu sáng 12 giờ / ngày, cường độ chiếu sáng 2.500 lux – 2.600 lux, ẩm độ 48%.

• *Môi trường ra rễ*

Tiến hành thí nghiệm trên 4 nghiệm thức

MS 0: Môi trường MS không bổ sung chất ĐHSTTV.

MS 1: Môi trường MS + 0,5 mg/l IAA.

MS 2: Môi trường MS + 1,0 mg/l IAA.

MS 3: Môi trường MS + 4,0 mg/l IAA.

Các nghiệm thức trên là môi trường Murashige and Skoog có bổ sung vitamin MS, myo-inositol (100mg/l), đường saccharose (20 mg/l), aga, pH =5,8.

Tách các chồi con từ mẫu cây trong môi trường MS 2B (0,5 mg/l IAA + 2,5 mg/l BA) cây chuyển sang môi trường rễ.

• *Quan sát hình thái giải phẫu*

Nhuộm 2 màu son phen và lục Iod.

Phẫu thức cắt ngang cuống lá và vùng gân của phiến lá ngoài tự nhiên và trong môi trường thí nghiệm.

Quan sát lát cắt trong glycerin bằng kính hiển vi hiệu ZX-8D, ghi nhận sự thay đổi hình thái tế bào và sự phát sinh cơ quan.

• *Đo cường độ hô hấp của mẫu cây*

Tiến hành đo cường độ hô hấp của mẫu cây sau 4 tuần nuôi cấy bằng máy Warburg trong phòng tối, ở nhiệt độ 250C.

3.KẾT QUẢ

3.1.Sự khử trùng mẫu vật

Bảng 1.Kết quả khử trùng mẫu với hypochloride calcium sau 7 ngày nuôi cấy

Nồng độ	7%			10%		
Thời gian	7	10	15	7	10	15
Số mẫu cây không nhiễm	0	2	2,5	2	5	0
Tỷ lệ (%) mẫu không nhiễm	0	20	25	20	50	chết

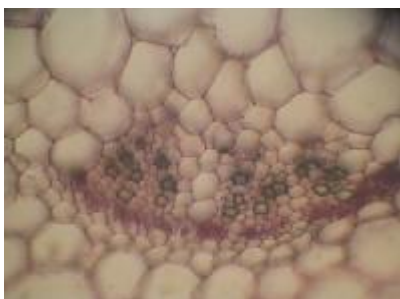
Nhận xét: Thời gian khử trùng mẫu vật với hypochloride calcium ở nồng độ 10% trong 10 phút cho kết quả mẫu không nhiễm tương đối cao.

Bảng 2.Kết quả khử trùng mẫu với chloride thủy ngân sau 7 ngày nuôi cấy

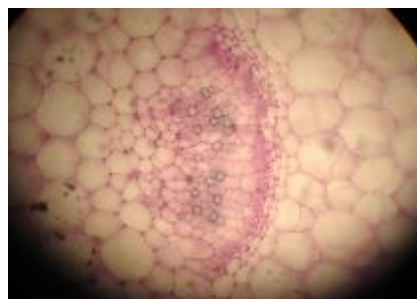
Thời gian (phút)	3	5	8
Số mẫu cây không nhiễm	2	5	Chết
Tỷ lệ (%) mẫu cây không nhiễm	20	50	0

Nhận xét: Thời gian khử trùng mẫu cây với chloride thủy ngân 0,1% trong 5 phút cho kết quả mẫu không nhiễm tương đối cao.

3.2. Quan sát hình thái giải phẫu



Hình 1. Mẫu cây cuống ngoài tự nhiên.



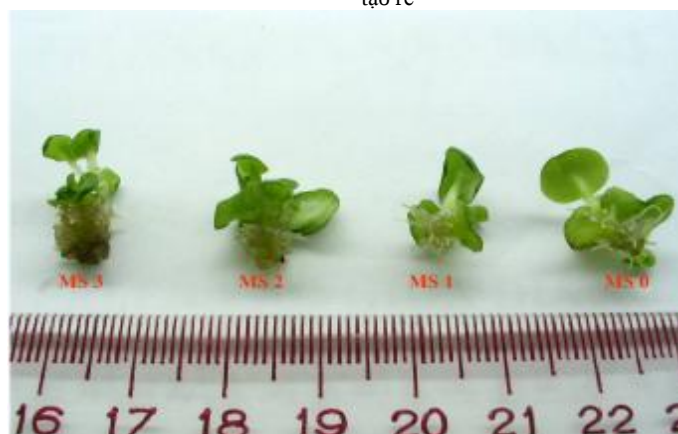
Hình 2. Mẫu cây cuống 2 tuần trong MT 2B.



Hình 3. Mẫu cây cuống 4 tuần trong MT 2B.



Hình 4. Sự phát sinh rễ sau 10 ngày nuôi cây trong MT tạo rễ



Hình 5. Cây con hoàn chỉnh

3.3. Nhận xét

Ở mẫu cây cuống lá các tế bào mô mộc tập trung thành cụm khi quan sát mẫu cây cuống ngoài tự nhiên [H.1], sau một tuần cây các tế bào nhu mô vỏ bắt đầu phân chia, mẫu cây phình to và cong lên. Ở tuần thứ hai sự phân chia ở vùng bó libe mộc và nhu mô tủy xảy ra mạnh, các tế bào nhỏ, sắp xếp lộn xộn, làm các tế bào mô mộc trở nên rải rác [H.2]. Sau 5 tuần nuôi cây đã có sự phát sinh chồi ở mẫu cây cuống lá trong khi đó ở mẫu cây phiến lá sự phát sinh chồi nhanh hơn. Các chồi con sẽ xuất hiện rễ sau 10 ngày nuôi cây trong môi trường tạo rễ.

Bảng 3. Cường độ hô hấp của mẫu cây sau 4 tuần nuôi cây ($\mu\text{O}_2/\text{gTLT}/\text{giờ}$)

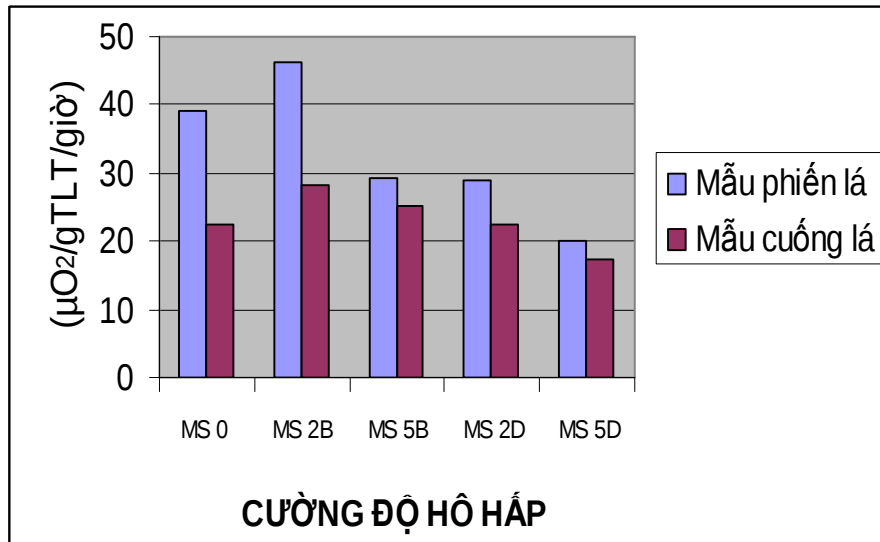
Môi trường nuôi cây	Mẫu cây phiến lá	Mẫu cây cuống lá
MS 0 (không bổ sung chất ĐHSTTV)	$39,20 \pm 1,91^c$	$22,44 \pm 3,71^b$
MS 2B (0,5 mg/l IAA + 2,5 mg/l BA)	$46,27 \pm 1,57^{*d}$	$28,23 \pm 1,39^c$
MS 5B (0,5 mg/l IAA + 5,0 mg/l BA)	$29,33 \pm 1,57^{*b}$	$25,24 \pm 3,56^b$

MS 2D (0,5 mg/l IAA + 2,5 mg/l 2,4-D)	28,87±1,89 ^{*b}	22,43±2,01 ^b
MS 5D (0,5 mg/l IAA + 5,0 mg/l 2,4-D)	20,18±1,34 ^{*a}	17,32±1,59 ^a

Nhận xét:

- Cường độ hô hấp của mẫu cây phiến lá ở nghiệm thức MS 2B cao hơn so với các nghiệm thức còn lại trong thí nghiệm. Cường độ hô hấp ở 4 nghiệm thức đều có sự sai biệt có ý nghĩa so với nghiệm thức đối chứng.

- Cường độ hô hấp của mẫu cây cuống lá ở nghiệm thức MS 2B cao hơn so với các nghiệm thức còn lại trong thí nghiệm.



Biểu đồ 1.Cường độ hô hấp của mẫu cây sau 4 tuần nuôi cấy

Bảng 4.Sự phát triển của mẫu vật trong môi trường nuôi cấy

Mẫu cây	Môi trường nuôi cấy	Nhận xét về hình thái mẫu vật
Cuống lá	MS 0 (Đối chứng)	Mẫu hóa nâu.
	MS 2B	Giai đoạn mô sẹo rất ngắn, chồi nhỏ, rất nhiều trên bề mặt và cả hai đầu mẫu cây, chồi tăng trưởng tốt.
	MS 5B	Giai đoạn mô sẹo rất ngắn, chồi lớn, nhiều trên bề mặt và cả hai đầu mẫu cây, chồi tăng trưởng tốt.
	MS 2D	Mẫu hóa nâu.
	MS 5D	Mẫu hóa nâu.
Phiến lá	MS 0 (Đối chứng)	Mẫu hóa nâu.
	MS 2B	Giai đoạn mô sẹo rất ngắn, chồi hình thành rất nhiều ở mép và vùng gân, ít hơn ở bề mặt của mẫu cây, chồi có màu xanh, cao, to, tăng trưởng tốt.
	MS 5B	Giai đoạn mô sẹo rất ngắn, chồi hình thành rất nhiều ở mép và vùng gân, ít ở bề mặt của mẫu cây, chồi có màu xanh nhạt, lùn, to, tăng trưởng chậm.
	MS 2D	Mẫu hóa nâu.
	MS 5D	Mẫu hóa nâu.
Tạo rễ	MS 0	Rễ rất ít, nhỏ nhưng mọc vươn dài, có màu trắng
	MS 1	Rễ nhiều vừa, nhỏ dài, màu trắng.
	MS 2	Rễ nhiều, mập ngắn.
	MS 3	Rễ rất nhiều nhưng rất ngắn, có nhiều lông trên rễ.

4.KẾT LUẬN

- Khử trùng mẫu cây với chloride thủy ngân 0,1% trong 5 phút và hypochloride calcium ở nồng độ 10% trong 10 phút cho kết quả mẫu không nhiễm tương đối cao.
- Môi trường MS có bổ sung 0,5 mg/l IAA + 2,5 mg/l BA cho khả năng tái sinh chồi cao nhất.
- Môi trường MS có bổ sung 0,5 mg/l IAA thích hợp cho sự ra rễ ở cây con.

VEGETATIVE MULTIPLICATION OF SAINTPAULIA BY IN-VITRO METHOD

Pham Tan Truong, Vo Thi Bach Mai
University of Natural Sciences, VNU-HCM

ABSTRACT: *The aim of the paper is to present some results in the study on the conditions of samples sterilization, appropriate nutrient solutions for the cell transformation and the organogenesis in rapid vegetative multiplication of Saintpaulia by using in-vitro culture.*

The obtained results point out that:

Sterilization with 10 % CaOCl₂ solution in 10 minutes or 0,1 % HgCl₂ solution in 5 minutes gives the least contaminated samples.

The samples from leaf form a lot of vegetative buds at the leaf border and those from petiole create vegetative buds concentrated at vein region.

Murashige and Skoog (MS) medium supplemented with IAA 0,5 mg/l and BA 2,5 mg/l is the most appropriate for bud formation whereas MS medium supplemented with IAA 0,5 mg/l is the most appropriate for root formation.

These results are profitable for the rapid in-vitro culture of Saintpaulia

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. Bilkey, PC. And Cocking, EC., *Increased plant vigor by in-vitro propagation of Saintpaulia ionantha Wendl.* From sub-epidermal tissue. Hort Science 16, (1981).
- [2]. Darbyshire, I. Gesneriaceae In H.J. Beentje & S.A. Ghazanfar, *Flora of Tropical East Africa*, African violet Society of America Website, (2006).
- [3]. Debergh, P.C. & Zimmerman, H.R. *Micropropagation: Technology and Application*. Kluwer Academic Publisher, (1991)
- [4]. Nhut D.T., Bui V.L., Tran Thanh Van K., Thorpe T., *Thin cell layer culture system*, Kluwer Academic Publisher.
- [5]. *Plant micropropagation using African violet leaves*, http://www.biotech.iastate.edu/publications/lab_protocols/AV_Micropropagation.html.
- [6]. Trần Trung Hiếu, Vũ Hồng Liên, Bùi Văn Lê, *Các chương trình sinh tạo hình thái in-vitro ở mô lá và cuống lá Saintpaulia ionantha*. Tóm tắt báo cáo Hội nghị Khoa học Khoa Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự Nhiên - ĐHQG tp.HCM, (2002).
- [7]. Võ Thị Bạch Mai, *Sự phát triển chồi và rễ*. Nhà xuất bản Đại học Quốc gia Tp. Hồ Chí Minh, (2004).