

NHÂN NHANH GIỐNG HOA HỒNG MÔN MỚI NHẬP NỘI BẰNG PHƯƠNG PHÁP NUÔI CẤY MÔ

The rapid multiplication of new exotic anthurium variety by tissue culture

Nguyễn Thị Lý Anh, Nguyễn Thị Hương, Nguyễn Thị Thanh Phương

SUMMARY

Anthurium is one of valuable flower planes on the World. Main production areas of this flower are Hawaii and The Netherlands. In Vietnam, the number of anthurium varieties is limited, therefore it is necessary to multiply new once.

The experiments were carried out on exotic anthurium variety "Tropical". Young leaf has been used for initial material. Research results show that:

- The highest callus percentage was gave on medium MS1 supplemented with 2,0ppm kinetin and 0,5ppm 2,4D.
- The best multiplicative rate has been obtained on medium MS1 + 0,1ppm IAA + 0,75 ppm kinetin. This rate was 12,5 shoots per each explant after 6 weeks.
- The medium MS1 with 0,5g active charcoal was optimal for rooting of regenerated shoots.
- Burned rice husk + humus + soil (1:1:1) was a suitable substrate for transferring of plantlets to ambient condition.

In conclusion, tissue culture technique is most successful method for anthurium propagation

Keywords: *Anthurium andreaum*, *callus*, *tissue culture*.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Hồng môn (*Anthurium andreaum*) là một loài hoa được sử dụng làm hoa cắt cành hay trồng trong chậu và là một mặt hàng quen thuộc và có giá trị kinh tế cao trên thị trường hoa thế giới. Nó được sản xuất chủ yếu ở Hà lan và Ha Oai: năm 1993, Hà lan sản xuất 37 triệu cành hoa cắt và Ha oai là 10,6 triệu cành hoa cắt. Để tạo được lượng lớn sản phẩm chất lượng cao, ở các nước này cây Hồng môn hầu hết được nhân giống *in vitro* (Matsumoto and Kuehnle, 1997).

Tuy nhiên, hoa Hồng môn lại tương đối mới lạ trên thị trường hoa Việt Nam. Chính sự đa dạng về màu sắc, kiểu dáng, thời gian sử dụng lâu dài làm cho nhu cầu về loại hoa này ngày càng tăng, việc sản xuất hoa Hồng môn càng được mở rộng nên cần một nguồn cung cấp cây giống lớn. Trong khi đó, khả năng nhân giống tự nhiên của Hồng môn rất chậm (1 năm chỉ cho 1-3 mầm/ cây). Muốn đẩy mạnh sản xuất Hồng môn ở Việt Nam trước hết cần phải nhân nhanh các giống có giá trị thương mại cao. Ở nước ta, việc nhân giống *in vitro* cây Hồng môn cũng đã được đề cập nhưng còn hạn chế ở một số giống cũ (Chu Bá Phúc và CS, 1999; Đoàn Duy Thanh và CS, 2003). Nghiên cứu này được tiến hành với mong muốn làm phong phú thêm chủng loại giống, góp phần phát triển sản xuất hoa Hồng môn.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu của đề tài là cây Hồng môn hoa đỏ đậm "Tropical" nguồn gốc từ Hà lan.

Vật liệu nuôi cấy khởi đầu là lá non của cây mẹ trồng trong nhà lưới.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Môi trường nuôi cấy được sử dụng trong các thí nghiệm là môi trường MS cải tiến (MS1): có nồng độ các muối khoáng đa lượng giảm một nửa, có bổ sung 1% đường glucoza, 2% đường saccaroza, 10% nước dừa, 0,1g/l pepton và 0,6% agar. Nồng độ của các chất điều tiết sinh trưởng thực vật trong môi trường nuôi cấy thay đổi tùy thuộc vào từng thí nghiệm.

Điều kiện nuôi cấy: nhiệt độ phòng nuôi 25 - 27°C, quang chu kỳ 16 giờ chiếu sáng/ 8 giờ tối, cường độ chiếu sáng: 2000 lux, độ ẩm phòng nuôi 70%.

Các thí nghiệm đều được bố trí ngẫu nhiên hoàn toàn, mỗi công thức thí nghiệm được nhắc lại 3 lần, mỗi lần 15-30 mẫu. Thí nghiệm được theo dõi 1 hoặc 2 tuần/lần.

Số liệu thực nghiệm được xử lý thống kê bằng chương trình IRRISTAT

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Nuôi cấy khởi đầu

Chế độ khử trùng mẫu

Mô lá non của Hồng môn đã được xử lý bằng các dung dịch NaOCl (2% Cl⁻) và HgCl₂ (0,1%) với 3 công thức thí nghiệm. Kết quả nghiên cứu cho thấy, ở các công thức thí nghiệm không có tỷ lệ mẫu chết nhưng tỷ lệ mẫu nhiễm khá cao (từ 31,9 – 70,5%). Chế độ khử trùng kép bằng NaOCl (2% Cl⁻) trong 10 phút và kết hợp với HgCl₂ (0,1%) trong 3 phút cho kết quả tốt nhất: tỷ lệ mẫu sống đạt cao nhất 61,9%.

Khả năng tái sinh callus của mẫu cấy

Bảng 1. Ảnh hưởng của chất điều tiết sinh trưởng đến khả năng tái sinh của mẫu cấy (sau 8 tuần)

Công thức	Tỷ lệ mẫu sống (%)		Tạo callus (%)		Hình thái mô nuôi cấy
	Phiến lá	Cuống lá	Phiến lá	Cuống lá	
ĐC=MSI	0	0	0	0	Mô cấy
CT1=MSI + 0,5ppmKi + 0,5ppm2,4D	97,3	100	100	50,0	phình to, sùi
CT2=MSI + 1,0ppmKi + 0,5ppm2,4D	97,6	100	100	25,0	callus ở mép
CT3=MSI + 1,5ppmKi + 0,5ppm2,4D	98,4	92,0	100	7,6	cắt.
CT4=MSI + 2,0ppmKi + 0,5ppm2,4D	100	75,0	100	0	

Ghi chú: tỷ lệ mẫu tạo callus tính theo % mẫu sống

Các nghiên cứu trước đây trên *Anthurium andreanum* (Kuehn and Sugii, 1991; Singh and Sagama, 1991) đều đã khẳng định sự tái sinh chồi từ mô lá cần phải thông qua callus. Vì vậy, nghiên cứu khả năng tái sinh callus là bắt buộc. Số liệu của bảng 2 chỉ rõ: trên môi trường không có chất điều tiết sinh trưởng, mẫu cấy không có khả năng sống và tạo callus. Tổ hợp chất điều tiết sinh trưởng có ảnh hưởng khác nhau đến tỷ lệ sống của các loại mẫu cấy. Khi môi trường có nồng độ 2,4D là 0,5ppm và được bổ sung thêm kinetin với nồng độ từ 0,5 - 2,0ppm đã làm tăng tỷ lệ sống của mẫu cấy là lá non (từ 97,3 lên 100%) nhưng lại làm giảm tỷ lệ sống của mẫu cấy là cuống lá (từ 100% xuống 75%). Toàn bộ mẫu cấy là lá non đều tái sinh callus trong khi đó mẫu cấy là cuống lá có khả năng tạo callus thấp hơn và nồng độ cao của kinetin đã có tác dụng ức chế sự tái sinh callus của cuống lá.

Khả năng tái sinh chồi từ callus sơ cấp

Tạo chồi từ callus sơ cấp (callus hình thành từ phiến và cuống lá non) là giai đoạn quyết định sự thành công của quy trình nhân nhanh in vitro. Kết quả nghiên cứu được trình bày ở bảng 3 chỉ rõ: hiệu quả tái sinh chồi trong thí nghiệm này không cao. Tuy nhiên, các nồng độ BA khác nhau ảnh hưởng khác nhau đến sự tái sinh chồi. Callus chỉ tạo chồi trên môi trường có nồng độ BA là 1,0 và 1,5ppm. Khi nồng độ BA cao hơn hay thấp hơn đều không kích thích sự tạo chồi từ mẫu cấy.

Bảng 2. Ảnh hưởng của tổ hợp BA và 2,4D đến khả năng tạo chồi (sau 16 tuần)

Công thức thí nghiệm	Tỷ lệ mẫu tạo chồi (%)	Số chồi TB/mẫu
ĐC = MS1	0	0
CT1= MS1 + 0,5 ppm BA	0	0
CT2= MS1 + 1,0 ppm BA	11,2	1,0
CT3= MS1 + 1,5 ppm BA	12,5	1,0
CT4= MS1 + 2,0 ppm BA	0	0

2. Giai đoạn nhân nhanh mẫu

Trong giai đoạn này, 3 phương pháp nhân nhanh chồi đã được nghiên cứu nhằm tìm kiếm phương pháp hiệu quả nhất để nhân nhanh chồi Hồng môn.

Nhân nhanh bằng phương pháp vi giâm cành

Các đoạn thân mang một nách lá được nuôi cấy trên các môi trường có bổ sung các tổ hợp kinetin và IAA khác nhau. Khi nhân nhanh bằng phương pháp này hệ số nhân chồi chỉ đạt từ 1,0-1,56 trong 6 tuần nuôi cấy. Bên cạnh sự bật chồi mô cấy còn tạo rễ ở các công thức ĐC, CT1, CT2 và tạo callus tại gốc chồi ở các công thức còn lại. Công thức 4 với sự bổ sung 0,1ppm IAA và 1,5ppm kinetin cho hệ số nhân chồi cao nhất và chất lượng chồi khá tốt so với các công thức khác (Bảng 4)

Bảng 3. Ảnh hưởng của chất điều tiết sinh trưởng đến hệ số nhân chồi khi nhân nhanh bằng đoạn thân (sau 6 tuần)

Công thức thí nghiệm	Hệ số nhân chồi (lần)	Sinh trưởng chồi		Tạo rễ		Tạo callus (%)
		Chiều cao (cm)	Số lá/chồi	Tỷ lệ tạo rễ (%)	Dài rễ (cm)	
ĐC=MS1	1,00e	0,6d	1,00c	13,9	0,5	0
CT1=MS1+0,1ppmIAA	1,17d	0,9c	1,00c	16,7	0,5	0
CT2=MS1+0,1ppmIAA+0,5ppmKi	1,18d	0,90c	1,09c	25,0	0,3	0
CT3=MS1+0,1ppmIAA+1,0ppmKi	1,50b	1,20b	1,20b	0	0	77,8
CT4=MS1+0,1ppmIAA+1,5ppmKi	1,56a	1,20b	1,21b	0	0	100
CT5=MS1+0,1ppmIAA+2,0ppmKi	1,21c	1,25a	1,32a	0	0	100
CV(%)	4,2	4,0	3,9			

Ghi chú: Ki. kinetin

Nhân nhanh bằng chồi đơn và cụm chồi

Bảng 4. Ảnh hưởng của chất điều tiết sinh trưởng đến hệ số nhân khi nhân nhanh chồi đơn (sau 6 tuần)

Công thức thí nghiệm	Hệ số nhân chồi (chồi)	Sinh trưởng chồi		Tạo callus (%)	Tạo rễ	
		Chiều cao (cm)	Số lá/chồi		Tỷ lệ tạo rễ %	Dài rễ (cm)
ĐC = MS1	1,00d	1,35a	2,50a	0	100	1,50
CT1=MS1+ 0,1ppmIAA	1,11c	1,25b	2,10b	0	83,3	1,50
CT2=MS1+0,1ppmIAA+0,5ppmKi	2,50b	1,25b	1,20c	25,9	25,0	1,23
CT3 =MS1 + 0,1ppmIAA + 1,0ppmKi	2,56b	1,17c	1,50c	87,6	0	0
CT4 =MS1 + 0,1ppmIAA + 1,5ppmKi	2,56b	1,13c	1,43d	100	0	0
CT5=MS1+0,1ppmIAA + 2,0ppmKi	2,72a	1,13c	1,49c	100	0	0
CV(%)	3,8	3,0	3,3			

Việc nhân nhanh bằng chồi đơn và cụm chồi (gồm 3 chồi) đã được tiến hành trên môi trường tương tự khi nhân nhanh bằng các đoạn thân mang 1 nách lá. Kết quả nghiên cứu ở bảng 5 và 6 cho thấy: cũng giống như phương pháp nhân nhanh bằng đoạn thân, khi bổ sung chất điều tiết sinh trưởng đã làm tăng hệ số nhân chồi so với đối chứng. Hệ số nhân chồi của phương pháp này cao hơn rất nhiều so với phương pháp vi giảm cành. Môi trường có bổ sung 0,1ppm IAA và 1,0ppm kinetin cho hệ số nhân chồi cao nhất, đạt 2,56 lần khi nhân chồi đơn và 5,39 lần khi nhân cụm chồi. Đồng thời, trên môi trường này chồi tái sinh cũng có chất lượng cao nhất.

Tuy nhiên, ở các công thức thí nghiệm cùng với sự tạo chồi, mẫu cấy còn hình thành callus hay rễ với tỷ lệ khác nhau. Các chồi không chỉ phát triển từ chồi nách mà còn tái sinh từ callus thứ cấp.

Bảng 5. Ảnh hưởng của chất điều tiết sinh trưởng đến hệ số nhân khi nhân nhanh cụm chồi (sau 6 tuần)

Công thức thí nghiệm	Hệ số nhân chồi (chồi)	Sinh trưởng chồi		Tạo rễ		Tạo callus (%)
		Chiều cao (cm)	Số lá/chồi	Tỷ lệ tạo rễ (%)	Dài rễ (cm)	
ĐC= MS1	2,31f	1,30b	1,40c	81,5	0,71	100
CT1=MS1+0,1ppmIAA	3,61e	1,30b	1,57b	55,6	0,40	100
CT2=MS1+0,1ppmIAA+0,5ppmK	4,20d	1,50a	1,63a	27,8	0,38	100
CT3=MS1+0,1ppmIAA+1,0ppmK	5,39a	1,53a	1,62a	27,3	0,35	100
CT4=MS1+0,1ppmIAA+1,5ppmK	5,17b	1,50a	1,63a	24,8	0,30	100
CT5=MS1+0,1ppmIAA+2,0ppmK	4,50c	1,45a	1,57b	5,56	0,25	100
CV(%)	3,4	3,5	4,7			

Nhân nhanh bằng phương pháp nuôi cấy lát mỏng mô sẹo (callus)

Bảng 6. Ảnh hưởng của chất điều tiết sinh trưởng đến hệ số nhân chồi bằng phương pháp nuôi cấy lớp mỏng (sau 6 tuần)

Công thức thí nghiệm	Tỷ lệ mẫu tạo chồi (%)	Hệ số nhân chồi (chồi/lát mỏng)	Chiều cao chồi tái sinh (cm)	Hình thái mô nuôi cấy
ĐC= MS1	100	4,3e	0,9b	Chồi khoẻ và cân đối.
CT1= MS1 + 0,1ppmIAA	100	7,0d	0,9b	
CT2=MS1 + 0,1ppmIAA + 0,25ppmKi	100	10,5c	1,0b	Nồng độ kinetin càng cao thì callus càng tăng trưởng mạnh.
CT3= MS1 + 0,1ppmIAA + 0,5ppmKi	100	11,9a	1,0b	
CT4= MS1+ 0,1ppmIAA+ 0,75ppmKi	100	12,5a	1,0b	
CT5= MS1 + 0,1ppmIAA + 1,0ppmKi	100	11,2b	1,0b	
CT6=MS1 + 0,1ppmIAA + 1,25ppmKi	100	10,4c	1,2a	
CV(%)		3,3	4,0	

Các lát mỏng (0,5 - 1,0 mm) của callus thứ cấp (hình thành từ mẫu cấy khi nhân nhanh cụm chồi) được nuôi cấy trên các môi trường có bổ sung 0,1ppm IAA và 0,25 - 1,25 ppm kinetin. Kết quả nghiên cứu trình bày ở bảng 7 đã chứng minh hiệu quả cao của phương pháp này. Trên tất cả các công thức thí nghiệm (kể cả công thức đối chứng) 100% mẫu cấy tái sinh chồi và hệ số nhân chồi phụ thuộc hàm lượng kinetin có trong môi trường nuôi cấy. Công thức cho hệ số nhân cao nhất là CT3 và CT4 (0,50 - 0,75ppm kinetin) đạt 11,9 - 12,4 chồi/mẫu cấy.

Điều đáng chú ý là tương tự như phương pháp vi giảm cành hay nhân chồi đơn và cụm chồi, trong khoảng nồng độ nghiên cứu, tổ hợp của IAA và kinetin đã dẫn đến sự phân hoá mẫu cấy theo đường hướng: hình thành chồi đồng thời với tạo rễ và tăng sinh callus.

3.3. Tạo cây hoàn chỉnh

Bảng 7. Ảnh hưởng của α NAA và than hoạt tính đến sự ra rễ của chồi (sau 6 tuần)

Công thức thí nghiệm	Tỷ lệ ra rễ (%)	Số rễ/chồi (rễ)	Chiều dài TB/rễ (cm)
ĐC = MS1	72,2	1,4	0,5
CT1=MS1 + 0,15 ppm α NAA	88,9	2,5	1,0
CT2=MS1 + 0,15 ppm α NAA	94,4	2,0	1,5
CT3=MS1 + 0,15 ppm α NAA	88,9	2,5	1,2
CT4=MS1 + 0,15 ppm α NAA	88,9	2,6	0,9
CV(%)		4,4	
LSD (0,05)		0,056	
CT5=MS1 + 0,25 g THT	94,4	2,5	1,1
CT6=MS1 + 0,50 g THT	100	3,1	1,9
CT7=MS1 + 0,75 g THT	100	1,9	2,1
CT8=MS1 + 1,00 g THT	91,7	1,8	1,5
CV(%)		4,1	
LSD (0,05)		0,045	

Ghi chú: THT : than hoạt tính

Các chồi tái sinh có chiều cao 1,0 - 1,5 cm và có 3- 4 lá đã được chuyển sang môi trường ra rễ để tạo cây hoàn chỉnh. Kết quả thí nghiệm chỉ ra rằng: các chồi tái sinh có thể ra rễ ngay trên môi trường không có bổ sung α NAA hay than hoạt tính (ĐC). Nhưng ở điều kiện này, tỷ lệ chồi tạo rễ thấp và chất lượng rễ kém. Công thức thích hợp hơn cả cho việc tạo cây hoàn chỉnh là CT6 có chứa 0,5 g/l than hoạt tính, ở công thức này 100% các chồi ra rễ với chất lượng rễ tốt nhất.

3. 4. Giai đoạn vườn ươm

Bảng 8. Ảnh hưởng của giá thể đến khả năng sống và sinh trưởng của cây in vitro (sau 6 tuần)

Công thức thí nghiệm	Tỷ lệ sống (%)	Tăng trưởng chiều cao		Tăng trưởng lá	
		Chiều cao TB (cm)	Độ tăng chiều cao(cm)	Số lá TB (lá)	Độ tăng số lá (lá)
CT1:Trấu + cát (1:1)	100	2,6 a	0,62	5,7 a	0,7
CT2:Trấu + mùn (1:2)	94,3	2,7 b	1,00	5,6 a	0,7
CT3:Trấu+mùn+đất (1:1:1)	97,1	2,6 a	0,82	5,6 a	0,7
CV(%)		7,3		6,1	

Khi đưa cây in vitro ra vườn ươm, giá thể trồng cây là một trong những yếu tố ảnh hưởng rất lớn đến tỷ lệ sống và sự sinh trưởng của cây. Trong 3 loại giá thể thử nghiệm, giá thể hợp lý hơn cho cây *in vitro* là giá thể trấu + mùn + đất (1:1:1). Trên giá thể này tỷ lệ cây sống khá cao và cây tăng trưởng chiều cao tốt. Các giá thể hầu như không ảnh hưởng đến sự ra lá có lẽ vì tốc độ ra lá rất chậm và thời gian thí nghiệm tương đối ngắn.

4. KẾT LUẬN

Đã xây dựng được quy trình nhân giống in vitro cây Hồng môn “Tropical” qua việc xác định được:

Chế độ khử trùng tốt nhất đối với mẫu lá non là khử trùng kép bằng NaOCl (2% Cl) trong 10 phút và HgCl₂ (0,1%) trong 3 phút.

Môi trường thích hợp để tái sinh callus từ phiến lá non là: MS1+2,0ppm kinetin + 0,5ppm 2,4D.

Đã tái sinh được chồi từ callus sơ cấp trên môi trường MS1+1,0 (1,5)ppm BA nhưng tỷ lệ mẫu tạo chồi thấp, chỉ đạt: 11,2 – 12,5%.

Phương pháp nuôi cấy lát mỏng callus thứ cấp (0,5 – 1,0 mm) cho hiệu quả nhân nhanh chồi cao nhất. Trên môi trường MS1 + 0,1ppm IAA + 0,75 ppm kinetin hệ số nhân đạt 12,5 chồi/lát mỏng sau 6 tuần nuôi cấy.

Môi trường phù hợp để tạo cây hoàn chỉnh là MS1 + 0,50 g THT. Trên môi trường này 100% chồi ra rễ với số rễ/cây là 3,1 và chiều dài rễ đạt 1,9cm.

Giá thể trấu+mùn+đất (1:1:1) là giá thể thích hợp để đưa cây in vitro ra vườn ươm. Trên giá thể này, sau 6 tuần tỷ lệ cây sống đạt 97,1%, chiều cao cây tăng 0,82 cm và số lá tăng 0,7 lá.

Tài liệu tham khảo

- Chu Bá Phúc, Lê Huy Hàm, Nguyễn Khánh Vân, Đỗ Năng Vịnh, 1999. “Áp dụng phương pháp nuôi cấy mô để nhân nhanh các loại Hồng môn”. Báo cáo khoa học Hội nghị công nghệ sinh học toàn quốc 1999. Nxb Khoa học và Kỹ thuật, trang: 1056-1061.
- Đoàn Duy Thanh, Nguyễn Huy Thuận, Đỗ Thanh Toàn, Đỗ Năng Vịnh, 2003.”Một số kết quả nghiên cứu tạo phôi vô tính ở cây Hồng môn”. Báo cáo khoa học Hội nghị công nghệ sinh học toàn quốc 2003. Nhà xuất bản khoa học và kỹ thuật, trang: 967-970.
- Kuehn and Sugii, 1991. “Callus induction and plantlet regeneration of Hawaiian anthuriums”. Hort.Science 26. pp: 919-921.
- Matsumoto and Kuehnle, 1997. “Micropropagation of Anthurium” In: Biotechnology in Agriculture and Forest. Vol.40. Ed. by Y.P.S. Bajaj. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York. p:14-29.
- Singh and Sagama, 1991. “Micropropagation and plant conformity in Anthurium andreanum. In: Horticulture – new technologies and application. Eds. by Prakash J., Pierik R.L.M. Kluwer Dordrecht. pp: 201-204.