NGHIÊN CỨU NHÂN GIỐNG HOA CẨM CHƯỚNG BẰNG KỸ THUẬT NUÔI CẤY *In Vitro*

Nguyễn Thị Thu Hằng[1]

TÓM TẮT

Đã hoàn thiện được quy trình nhân giống cây hoa Cẩm chướng bằng kỹ thuật nuôi cấy *in vitro*. Vật liệu nuôi cấy khởi đầu là chồi đỉnh và chồi nách của cây Cẩm chướng. Mẫu cấy được khử trùng 2 lần bằng dung dịch $HgCl_2$ 0,1% (mỗi lần 5 phút). Tỷ lệ mẫu sạch *in vitro* có khả năng tái sinh đạt 44,44% sau 2 - 4 tuần. Chồi non vô trùng tái sinh từ mẫu cấy có 3 - 6 đốt lá được cắt thành những đoạn thân chồi, kích thước 1,0 – 2,0cm, mang chồi nách, và được nuôi cấy trên môi trường kích thích nhân nhanh và tăng trưởng chồi (MS + 0,05mg/l BAP + 0,1mg/l Kinetin + 0,1mg/l NAA + 30g/l sucrose), cho tỷ lệ mẫu tạo cụm chồi đạt 100%, hệ số nhân nhanh chồi đạt 3,4 lần, chiều cao trung bình của chồi là 4,13cm sau 4 tuần nuôi. Môi trường kích thích chồi tạo rễ tốt nhất là môi trường MS + 0,1mg/l IBA + 20g/l sucrose, tỷ lệ chồi tạo rễ đạt 100%, số rễ trung bình/chồi đạt 4,5 rễ, chất lượng rễ tốt.

Từ khóa: ***Cẩm chướng, chất điều hòa sinh trưởng, mẫu cấy, nhân giống, nuôi cấy in vitro .***

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Cẩm chướng (*Dianthus caryophyllus* L.) là một trong những loài hoa cắt cành phổ biến cho năng suất và giá trị kinh tế cao, có nguồn gốc từ Địa Trung Hải và chuyển vào Việt Nam từ nửa đầu thế kỷ 20. Hoa Cẩm chướng luôn được thị trường ưa chuộng bởi sự đa dạng về màu sắc, tươi lâu, thuận lợi cho bảo quản và vận chuyển xa.

Ở Việt Nam, để nhân giống hoa Cẩm chướng, phương pháp được sử dụng chủ yếu hiện nay là nhân giống sinh dưỡng như giâm hom, cắt cành. Việc ứng dụng kỹ thuật nuôi cấy *in vitro* trong nhân giống nhiều loài hoa Cẩm chướng hiện cũng được nhiều cơ sở nghiên cứu và sản xuất quan tâm. Ưu điểm nổi bật của kỹ thuật nhân giống bằng nuôi cấy *in vitro* so với các phương pháp nhân giống sinh dưỡng khác là cây con được tạo ra với số lượng lớn, đồng nhất về kiểu hình, chất lượng đảm bảo, sạch bệnh, giá thành phù hợp và không phụ thuộc vào yếu tố thời tiết.

Để tạo cơ sở cho những nghiên cứu tiếp theo về tạo giống hoa Cẩm chướng mới bằng ứng dụng công nghệ gây đột biến *in vitro,* tại Trung tâm Giống & CNSH, trường Đại học Lâm nghiệp, nghiên cứu xây dựng quy trình nhân giống *in vitro* cho loài Cẩm chướng đã được tiến hành.

[1]**ThS. Trường Đại học Lâm nghiệp**

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Vật liệu

Chồi đỉnh và chồi nách của cây hoa Cẩm chướng.

2. Phương pháp

Thí nghiệm được bố trí ngẫu nhiên, 3 lần lặp lại, mỗi lần lặp lại cấy trong 5 bình thủy tinh dung tích 200 - 250ml.

Khử trùng mẫu: chồi đỉnh và chồi nách của cây Cẩm chướng ngoài tự nhiên được khử trùng sơ bộ bằng ethanol 70% trong 1 phút, sau đó khử trùng bằng $HgCl_2$ 0,1% một hoặc hai lần, trong các khoảng thời gian khác nhau. Sau khi khử trùng, mẫu được cấy trên môi trường nuôi cấy khởi đầu: Môi trường MS + 0,3mg/l Kinetin + 0,1mg/l NAA + 20g/l sucrose.

Nhân nhanh và kích thích tăng trưởng chồi: Sau 2 - 3 tuần nuôi cấy khởi đầu, chồi non vô trùng nảy mầm từ nách lá của mẫu cấy (có chiều cao 2 – 4cm) được cắt thành những đoạn có kích thước 1 – 2cm mang chồi nách và nuôi cấy trên môi trường nhân nhanh và kích thích tăng trưởng chồi. Giai đoạn nuôi cấy này sử dụng môi trường cơ bản MS bổ sung 30g/l sucrose + chất điều hòa sinh trưởng khác nhau với các nồng độ khác nhau.

Kích thích chồi ra rễ tạo cây con hoàn chỉnh: Các chồi mới tái sinh trên môi trường nhân nhanh và kích thích tăng trưởng chồi được cấy chuyển sang môi trường tạo rễ là môi trường MS không bổ sung chất điều hòa sinh trưởng hoặc có bổ sung một trong hai loại chất điều hòa sinh trưởng là NAA hoặc IBA với các nồng độ khác nhau.

Môi trường nuôi cấy được điều chỉnh đến pH 5,6 - 5,8, bổ sung 7g/l agar, khử trùng ở 121^0C, áp suất 1atm trong 15 phút.

Điều kiện nuôi cấy: Nhiệt độ 25 ± 2^0C; cường độ ánh sáng 3000 lux; thời gian chiếu sáng: 16 giờ/ngày.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

1. Khử trùng mẫu nuôi cấy

Đoạn thân, đoạn cành non lấy từ cây Cẩm chướng ngoài tự nhiên được sử dụng làm vật liệu cho nuôi cấy khởi đầu. Mẫu được khử trùng bằng $HgCl_2$ 0,1% một hoặc hai lần.

Kết quả nhận được cho thấy việc khử trùng mẫu bằng $HgCl_2$ 0,1% một lần trong thời gian 5 phút có tỷ lệ mẫu nhiễm rất cao, mẫu cấy không có khả năng tái sinh.

Các công thức khử trùng mẫu bằng $HgCl_2$ 0,1% hai lần (lần 1: 5 phút; lần 2: 3 - 15 phút) cho kết quả khả quan hơn với tỷ lệ mẫu sạch có khả năng tái sinh đạt từ 16,36% – 44,44%.

Công thức khử trùng mẫu Cẩm chướng hiệu quả nhất là sử dụng $HgCl_2$ 0,1% để khử trùng trong 2 lần, mỗi lần 5 phút cho tỷ lệ mẫu vô trùng nảy mầm cao nhất, đạt 44,44% sau 2 - 3 tuần nuôi cấy (Bảng 01).

Chồi non vô trùng nảy mầm từ mẫu cấy có đặc điểm thân chồi mập, lá xanh non, có 2 - 6 đốt lá được sử dụng làm nguyên liệu cho thí nghiệm tiếp theo.

Bảng 01. ***Ảnh hưởng của thời gian và số lần xử lý bằng $HgCl_2$ 0,1% đến tỷ lệ mẫu vô trùng và mẫu sạch tái sinh***

CTTN	Chất khử trùng $HgCl_2$ 0,1%		Tỷ lệ mẫu sạch có khả năng tái sinh (%)
	Lần 1 (phút)	Lần 2 (phút)	
CT1	5	0	0,00
CT2	5	3	16,36
CT3	5	5	44,44
CT4	5	10	40,48
CT5	5	15	21,82

2. Ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng đến khả năng nhân nhanh và kích thích tăng trưởng chồi

Kết quả thí nghiệm cho thấy, ở công thức CT1 - không bổ sung chất điều hòa sinh trưởng – có 86,7% mẫu tái sinh chồi. Tuy nhiên, mỗi mẫu chỉ tái sinh một chồi với chiều cao hạn chế (2,16cm) và hầu hết các chồi đều phát sinh rễ. Tất cả các công thức bổ sung chất điều hòa sinh trưởng đều có hiệu quả kích thích tạo đa chồi và thúc đẩy kéo dài chồi.

Khi chỉ bổ sung BAP với dải nồng độ 0,025 - 0,5mg/l, hoặc bổ sung phối hợp 0,025 - 0,5mg/l BAP với 0,1mg/l Kinetin + 0,1mg/l NAA, cho tỷ lệ mẫu tái sinh chồi rất cao, đạt 91,1% - 100%. Hiệu quả nhân nhanh chồi và kích thích tăng trưởng chồi rất khác nhau ở các công thức khác nhau. Đặc biệt, chỉ tiêu chất lượng chồi phụ thuộc nhiều vào nồng độ BAP trong môi trường nuôi cấy. Môi trường có BAP với nồng độ 0,3 – 0,5mg/l cho hệ số nhân chồi cao (4,2 – 6,31 lần), nhưng các chồi tái sinh

trên môi trường này lại có chất lượng thấp với chiều cao hạn chế, xuất hiện mô sẹo dưới gốc, thân và lá mọng nước (màu xanh trong). Các môi trường bổ sung BAP với nồng độ 0,025 – 0,1mg/l, kết hợp với 0,1mg/l Kinetin + 0,1mg/l NAA cho hiệu quả nhân nhanh chồi thấp (1,04 – 3,62 lần), nhưng chất lượng chồi tốt với kiểu hình bình thường, thân chồi dài, lá xanh non và khi cấy chuyển chồi trên các môi trường này sang môi trường tạo rễ thì hiệu quả kích thích ra rễ rất cao.

Công thức môi trường cho hệ số nhân chồi cao (3,4 lần) và chất lượng chồi tốt (chồi mập, chiều cao trung bình 4,13cm, kiểu hình bình thường) là môi trường bổ sung 0,05mg/l BAP + 0,1mg/l Kinetin + 0,1mg/l NAA. Trên môi trường này, cây Cẩm chướng được nhân nhanh tạo số lượng lớn chồi *in vitro* có chất lượng tốt (Bảng 02).

Bảng 02. ***Ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng đến khả năng nhân nhanh và kích thích tăng trưởng chồi (sau 4 tuần)***

CTTN	Chất ĐHST			Tỷ lệ mẫu tái sinh chồi (%)	Hệ số nhân chồi (lần)	Chiều cao TB của chồi (cm)	Chất lượng chồi
	BAP (mg/l)	Kinetin (mg/l)	NAA (mg/l)				
CT1	-	-	-	86,7	1,00	2,16	Chồi mập, lá xanh non
CT2	0,025	-	-	91,1	1,04	4,20	Chồi mập, lá xanh non
CT3	0,05	-	-	100	2,10	4,33	Chồi mập, lá xanh non
CT4	0,1	-	-	100	3,00	3,17	Chồi mảnh
CT5	0,3	-	-	100	4,20	1,87	Mọng nước, xanh trong
CT6	0,5	-	-	100	5,96	1,13	Mọng nước, xanh trong
CT7	0,025	0,1	0,1	95,6	2,79	4,30	Chồi mập, lá xanh non
CT8	0,05	0,1	0,1	100	3,40	4,13	Chồi mập, lá xanh non
CT9	0,1	0,1	0,1	100	3,62	3,80	Chồi mảnh
CT10	0,3	0,1	0,1	100	4,89	2,10	Mọng nước, xanh trong
CT11	0,5	0,1	0,1	100	6,31	1,93	Mọng nước, xanh trong

3. Ảnh hưởng của NAA, IBA đến khả năng tạo rễ cho chồi

Trong thí nghiệm này, các chồi tái sinh trên môi trường nhân nhanh và kích thích tăng trưởng được cắt thành từng đoạn: những đoạn thân mang chồi đỉnh với chiều cao 2 – 3cm được cấy chuyển sang môi trường tạo rễ (môi trường MS không bổ sung chất điều hòa sinh trưởng hoặc bổ sung một trong hai loại chất điều hòa sinh trưởng là NAA hoặc IBA ở các nồng độ khác nhau); các đoạn thân không chứa chồi đỉnh, chỉ có các nách lá được cấy chuyển sang môi trường nhân nhanh để tiếp tục quay vòng ở giai đoạn nhân nhanh và kích thích tăng trưởng chồi.

Kết quả nghiên cứu (Bảng 03) cho thấy Cẩm Chướng là loài cây có khả năng cảm ứng tạo rễ rất tốt, vì ngay cả khi không cần bổ sung chất điều hòa sinh trưởng chồi *in vitro* vẫn tạo rễ (100% chồi ra rễ, số rễ TB/chồi đạt 4,0 rễ, rễ mập và trắng).

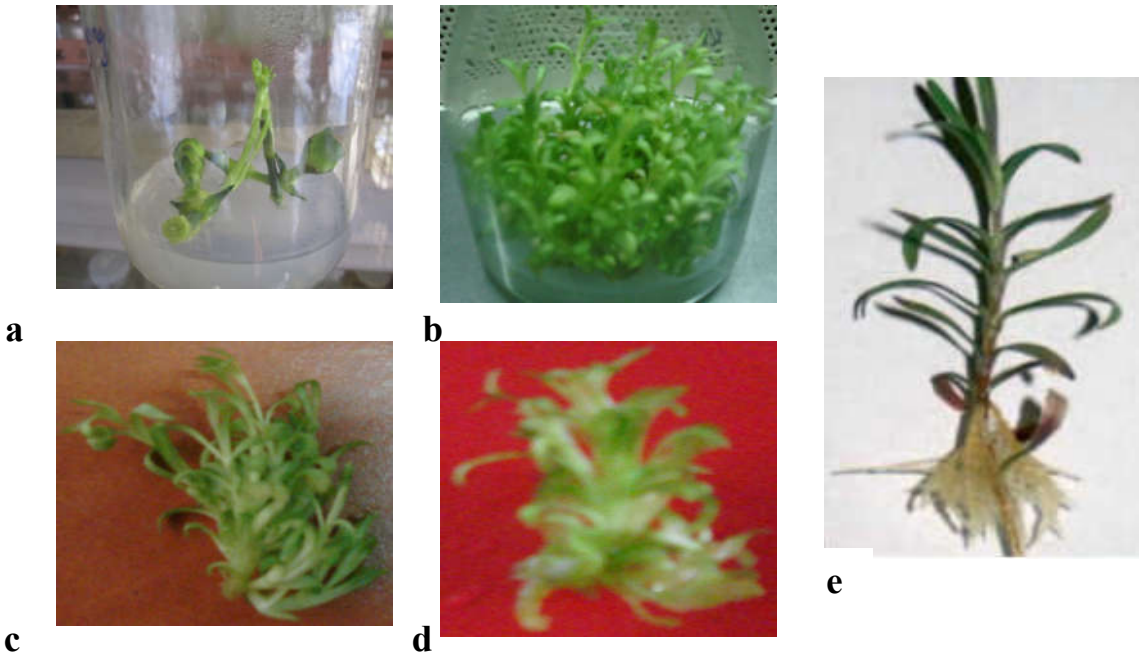
Công thức môi trường cho hiệu quả tạo rễ cao nhất là MS + 0,1mg/l IBA + 20g/l sucrose: 100% chồi tạo rễ, số rễ TB/chồi đạt 4,5 rễ, chất lượng rễ và thân cây tốt (rễ mập, thân cây mập, cứng cáp).

Các công thức thí nghiệm bổ sung NAA

hoặc IBA ở nồng độ 0,25mg/l hoặc 0,5mg/l cho kết quả tạo rễ kém và có hiện tượng tạo mô sẹo dưới gốc chồi. Cây hoàn chỉnh trên các công thức môi trường này có rễ mảnh, thân cây mảnh, yếu ớt.

Bảng 03. ***Ảnh hưởng của NAA, IBA đến khả năng tạo rễ cho chồi (sau 4 tuần)***

CTTN	NAA (mg/l)	IBA (mg/l)	Tỷ lệ chồi tạo rễ (%)	Số rễ TB/chồi (rễ)	Chiều dài rễ (cm)	Chất lượng rễ, thân cây
CT1	-	-	100	4,0	2,8	Rễ mập, trắng, nhiều lông hút; thân cây mập
CT2	0,1	-	100	4,2	3,4	Rễ mập, trắng, nhiều lông hút; thân cây mập
CT3	0,25	-	100	4,7	3,5	Rễ mảnh, trắng, nhiều lông hút; thân cây mảnh
CT4	0,5	-	96,4	3,6	2,7	Rễ mảnh, trắng, nhiều lông hút; thân cây mảnh
CT5	-	0,1	100	4,5	3,2	Rễ mập, trắng, nhiều lông hút; thân cây mập
CT6	-	0,25	100	4,8	3	Rễ mảnh, trắng, nhiều lông hút; thân cây mảnh
CT7	-	0,5	98,8	3,9	3,0	Rễ mảnh, trắng, nhiều lông hút; thân cây mảnh



Hình 01. ***Một số hình ảnh về kết quả nghiên cứu***

a: Mẫu vô trùng nảy mầm từ vật liệu nuôi cấy; b: Bình cây in vitro giai đoạn nhân nhanh và kích thích tăng trưởng chồi; c: Cụm chồi có kiểu hình bình thường; d: Cụm chồi mọng nước (bị thủy tinh hóa); e: Cây Cẩm chướng hoàn chỉnh.

IV. KẾT LUẬN

Đã xây dựng thành công quy trình vi nhân giống cây Cẩm chướng (*Dianthus caryophyllus* L.) với hiệu suất nhân giống cao: Vật liệu khởi đầu cho nuôi cấy là mẫu chồi đỉnh và chồi nách lấy từ cây ngoài tự nhiên; Công thức khử trùng mẫu thích hợp: vô trùng bề mặt bằng ethanol 70% trong 1 phút, khử trùng bằng $HgCl_2$ 0,1% 2 lần, mỗi lần 5 phút; Môi trường nuôi cấy khởi đầu: MS + 0,3mg/l Kinetin + 0,1mg/l NAA + 20g/l sucrose; Môi trường thích hợp cho nhân nhanh và kích thích tăng trưởng chồi: MS + 0,05mg/l BAP + 0,1mg/l Kinetin + 0,1mg/l NAA + 30g/l sucrose; Môi trường tạo rễ: MS + 0,1mg/l IBA + 20g/l sucrose.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Gamborg O., Miller R. and Ojima K. (1968). Nutrient requirements of suspension cultures of soybeen root cells. *Exp. Cell. Res*, 50: 105-116.
2. Nguyễn Quang Thạch, Nguyễn Thi Lý Anh, Nguyễn Thị Phương (2005). Giáo trình công nghệ sinh học nông nghiệp. *NXB Nông nghiệp*.
3. Mahdiyeh Kharrazi et al. (2011). *In vitro* culture of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) focusing on the problem of vitrification. *J. Biol. Eviron. Scl*., 5 (13): 1-6.
4. Murashige T. and Skoog F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant*, 15: 473-497.
5. Ljiljana Radojevic et al. (2010). *In vitro* propagation of *Dianthus ciliatus* ssp. *Dalmaticus* and *D. giganteus* ssp. *Croaticus* (Caryophyllaceae) from stem segment cultures. *Botanica Serbia*, 34 (2): 153-161.

PROPAGATION OF *DIANTHUS CARYOPHYLLUS* L. BY *IN VITRO* CULTURE TECHNIQUE

Nguyen Thi Thu Hang

SUMMARY

An *in vitro* propagation of the ornamental plant, *Dianthus caryophyllus* L., (Caryophyllaceae) has been established. Shoot tips and nodal segments were used as explants in cultivation. The explants were sterilized twice with 0.1% $HgCl_2$ solution, 5 min each time, washed thoroughly with sterile distilled water and were placed on solid culture medium. After 2-3 weeks, induction of bud sprout was obtained. Then, young shoot were cut into body explants of 1 – 2 cm in length and cultured on MS medium supplemented with 0.05mg/l BAP + 0.1mg/l Kinetine + 0.1mg/l NAA for shoot elongation and micropropagation. Root induction was obtained when the shoots were cultured on MS supplemented with 0,1mg/l IBA.

Keywords*: Dianthus caryophyllus L., explants, growth regulators, in vitro culture, propagation.*

***Người phản biện*: TS. Hà Văn Huân**