

XÂY DỰNG QUY TRÌNH TẠO CỦ *IN VITRO* DÒNG LAI HOA LAY ƠN

Nguyễn Thị Hồng Nhung¹, Bùi Thi Hồng¹, Đặng Văn Đông¹

TÓM TẮT

Hoa lay ơn là cây sinh sản hữu tính và có khả năng nhân giống vô tính. Nhân giống *in vitro* góp phần tạo ra số lượng lớn củ con lay ơn đồng đều, sạch bệnh. Nghiên cứu được thực hiện trên dòng lai J11, thí nghiệm bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên 3 lần lặp lại. Mẫu củ giống được khử trùng tốt nhất với NaDCC 1% trong thời gian 15 phút, tỷ lệ mẫu tái sinh đạt cao 76,7%. Tổ hợp môi trường 2 mg/l BAP + 0,25 mg/l α -NAA thích hợp cho nhân nhanh chồi, 80% mẫu cấy phát sinh chồi, số chồi hình thành đạt 4,8 chồi. Các chồi đơn hình thành củ con với tỷ lệ cao trên môi trường bổ sung 50 g/l đường + 1 mg/l IBA để điều kiện ánh sáng 16 giờ sáng/8 giờ tối, trọng lượng củ trung bình đạt 0,96 g, đường kính củ đạt 0,93 cm.

Từ khóa: Dòng, giống mới, lay ơn, nhân giống *in vitro*, tạo củ

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Hoa lay ơn (*Gladiolus* sp.) là một loài hoa đẹp, bền, màu sắc phong phú, cành gọn nhẹ dễ vận chuyển đi xa. Về diện tích và sản lượng hoa cắt trên

thế giới, hoa lay ơn xếp vị trí thứ 5 sau tulip (*Tulipa* spp.), lily (*Lilium* spp.), lan Nam Phi (*Freesia* spp.) và lan huệ (*Hippeastrum* spp.) (Kanika Malik and Krishan Pal, 2015). Ở một số quốc gia như Ấn Độ,

¹ Viện Nghiên cứu Rau quả

Brazil và Argentina, hoa lay ơn luôn đứng đầu về diện tích trồng và xuất khẩu (Buschman, 2005). Ở Việt Nam, hoa lay ơn rất được ưa chuộng (sản lượng chỉ đứng sau hoa cúc và hoa hồng) và là loại hoa có tiềm năng xuất khẩu cao. Hoa lay ơn được trồng từ rất lâu đời và đã hình thành nhiều vùng sản xuất lớn như Hải Phòng, Quảng Ninh, Bắc Giang, Sơn La, Phú Yên và Đà Lạt. Hiện nay diện tích trồng hoa lay ơn chiếm 14% tổng diện tích trồng hoa cả nước (Đặng Văn Đông, 2014).

Các nghiên cứu về quy trình trồng, chăm sóc hoa lay ơn đã được tiến hành và cải tiến rất nhiều về chất lượng hoa cắt. Tuy nhiên vấn đề gặp phải hiện nay là nguồn giống củ lay ơn không đảm bảo. Giống hoa lay ơn được nhân giống vô tính từ củ, củ con tạo ra không đồng đều, hư hỏng do nấm bệnh, số lượng củ con tạo ra phụ thuộc vào giống và môi trường nhiều. Hơn nữa, củ giống lay ơn yêu cầu phá ngủ sau mỗi thời kỳ sinh trưởng, do vậy, thời gian nhân giống *in vitro* thường kéo dài 2 - 3 năm. Trong khi đó, củ con *in vitro* có kích thước đồng đều, sạch bệnh, sinh trưởng nhanh rút ngắn thời gian nhân giống từ 1 - 2 năm để tạo ra củ thương mại.

Giai đoạn 2014 - 2016, Viện Nghiên cứu Rau quả đã lai tạo ra được nhiều dòng lai hoa lay ơn mới, các dòng lay ơn này đang cần được nhân nhanh để sớm đưa ra ngoài sản xuất.

Nghiên cứu này được thực hiện nhằm tìm ra các yếu tố tối ưu cho quá trình nhân nhanh củ *in vitro* của dòng lai hoa lay ơn J11 mới được tạo ra.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Vật liệu nghiên cứu: Củ con có đường kính 1 - 1,5 cm của dòng lai hoa lay ơn J11.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

- Khử trùng mẫu cấy: Mất ngủ được cắt với kích thước 0,5 - 1 cm và rửa nhiều lần bằng nước sạch. Ngâm ngập mẫu trong nước xà phòng loãng 5 - 7 phút, rửa sạch dưới vòi nước chảy và tráng lại bằng nước cất. Sau đó mẫu được rửa lại bằng nước cất vô trùng rồi rửa bằng cồn 70% trong 30 giây, tiếp đó khử trùng bằng dung dịch khử trùng ở các nồng độ và thời gian khác nhau, vừa ngâm vừa lắc sau đó tráng lại 3 - 4 lần bằng nước vô trùng.

- Bố trí thí nghiệm: Thí nghiệm được bố trí theo hoàn toàn ngẫu nhiên, 3 lần lặp lại.

Các thí nghiệm được tiến hành trong điều kiện ánh sáng, nhiệt độ, độ ẩm ổn định: Cường độ chiếu sáng khoảng 2000 - 3000 lux, thời gian chiếu sáng 16

giờ sáng/8 giờ tối, nhiệt độ phòng khoảng 25 - 26°C, độ ẩm từ 70 - 75%.

Môi trường được điều chỉnh pH = 5,7 trước khi hấp khử trùng ở 121°C trong 20 phút; 1,0 atm.

+ Thí nghiệm 1: Xác định hóa chất khử trùng phù hợp nhất cho mẫu cấy: sử dụng H₂O₂ 10%, Javen 5,7%, NaDCC 1% (sodium dichloroisocyanurate 1%) trong 5 - 15 phút. Môi trường vào mẫu: MS + 1 mg/l BAP + 30 g/l đường + 6,0 g/l agar.

+ Thí nghiệm 2: Xác định môi trường thích hợp cho giai đoạn nhân nhanh: sử dụng tổ hợp BAP (1 - 2 - 3 mg/l) và α -NAA (0,25 - 0,5 - 0,75 mg/l).

+ Thí nghiệm 3: Xác định chế độ chiếu sáng đến khả năng tạo củ và chất lượng củ: CT1: 16 giờ sáng/8 giờ tối, CT2: Tối hoàn toàn, CT3: 16 giờ sáng/8 giờ tối trong 4 tuần, tối hoàn toàn, CT4: Tối hoàn toàn trong 4 tuần, 16 giờ sáng/8 giờ tối, Môi trường: MS + 70 g/l Sucrose + 1 mg/l IBA.

+ Thí nghiệm 4: Xác định hàm lượng đường bổ sung đến khả năng tạo củ và chất lượng củ hoa lay ơn tạo ra: sử dụng đường sucrose (30 - 50 - 70 - 90 - 110 g/l).

Mỗi công thức 15 bình tam giác, cấy 10 chồi đơn/bình.

- Các chỉ tiêu theo dõi:

+ Giai đoạn khởi động mẫu: Tỷ lệ mẫu nhiễm (%), tỷ lệ tái sinh (%), tỷ lệ mẫu hóa nâu (%), tỷ lệ mẫu không phản ứng (%).

+ Giai đoạn nhân nhanh: Thời gian phát sinh chồi (ngày), tỷ lệ tạo chồi (%), số chồi/mẫu (chồi), đường kính chồi (cm).

+ Giai đoạn tạo củ: Tỷ lệ mẫu tạo củ (%), đường kính củ (cm), trọng lượng củ (g).

- Xử lý số liệu: Số liệu được xử lý bằng phần mềm Minitab 16 và Excel 2013.

2.3. Thời gian và địa điểm nghiên cứu

Nghiên cứu được thực hiện từ tháng 7/2016 - 3/2017 tại Trung tâm Nghiên cứu và Phát triển Hoa, Cây cảnh - Viện Nghiên cứu Rau quả.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Xác định hóa chất khử trùng phù hợp nhất cho mẫu cấy

Trong quá trình nuôi cấy *in vitro*, mẫu cấy vô trùng là điều kiện bắt buộc, quyết định thành công của thí nghiệm. Việc khử trùng phải đảm bảo tỷ lệ nhiễm thấp, tỷ lệ mẫu tái sinh cao, mô tồn tại và phát triển tốt. Ở thí nghiệm này, vật liệu là củ nhỏ với

đường kính từ 1 - 1,5 cm, sử dụng 3 loại hóa chất ở các mức thời gian khác nhau. Kết quả thí nghiệm thu được thể hiện ở bảng 1.

Bảng 1. Ảnh hưởng của hóa chất khử trùng mẫu dòng lai J11 sau 4 tuần

CTTN	Tỷ lệ mẫu nhiễm (%)	Tỷ lệ mẫu hóa nâu (%)	Tỷ lệ mẫu không phản ứng (%)	Tỷ lệ mẫu tái sinh (%)
CT1	10,0	20,0	6,7	63,3
CT2	23,3	33,3	10,0	33,3
CT3	16,7	20,0	16,7	46,7
CT4	13,3	10,0	26,7	50,0
CT5	6,7	13,3	3,3	76,7

Ghi chú: Môi trường nền MS + 3% Sucrose + 1 mg/l BA. CT1: H₂O₂ 10% lần 1 trong 10 phút, lần 2 trong 5 phút, CT2: H₂O₂ 10% trong thời gian 10 phút, CT3: H₂O₂ 10% trong thời gian 15 phút, CT4: Javen 5,7% trong thời gian 15 phút, CT5: NaDCC 1% trong thời gian 15 phút.

Tỷ lệ mẫu bị nhiễm ở tất cả các công thức tương đối thấp từ 6,7 - 23,3%. Sử dụng hoạt chất NADCC 1% có tỷ lệ mẫu bị nhiễm ở mức thấp nhất, tiếp đến là sử dụng H₂O₂ 10% khử trùng kép trong thời gian 15 phút.

Đối với cùng một hoạt chất khử trùng H₂O₂ 10%, khi tăng thời gian khử trùng thì tỷ lệ mẫu nhiễm và tỷ lệ mẫu hóa nâu giảm xuống đáng kể.

Đối với CT1 và CT3 ở cùng một thời gian xử lý 15 phút, hiệu quả làm sạch mẫu của CT1 (khử trùng kép) tốt hơn với tỷ lệ mẫu không phản ứng thấp 6,7%. Trong khi đó ở CT3 thời gian mẫu ngâm liên tục kéo dài làm cho hóa chất khử trùng thẩm thấu vào trong gây chết mẫu đạt 16,7%.

Sử dụng Javen 5,7% trong 15 phút có tác dụng khử trùng bề mặt khá tốt, tỷ lệ mẫu nhiễm và hóa nâu tương ứng là 13,3% và 10%. Tuy nhiên số mẫu không có khả năng tái sinh lại cao nhất 26,7%.

Như vậy, khử trùng mẫu cấy với NADCC 1% trong 15 phút cho tỷ lệ mẫu tái sinh cao nhất 76,7%, tỷ lệ mẫu nhiễm thấp 6,7%.

3.2. Xác định môi trường thích hợp cho giai đoạn nhân nhanh

Với mục đích tạo cụm chồi từ mắt ngủ, việc cảm ứng ngủ nghỉ đóng vai trò rất quan trọng. Nhiều nghiên cứu cho thấy các chất điều tiết sinh trưởng là nhân tố thiết yếu trong cảm ứng ngủ nghỉ. Mối tương tác giữa auxin và cytokinin đối với sự hình thành chồi lay ơn được tiến hành giữa tỷ lệ BA và α -NAA khác nhau.

Bảng 2. Ảnh hưởng của tổ hợp BA/ α -NAA đến khả năng nhân nhanh chồi hoa lay ơn (sau 6 tuần)

CTTN	Thời gian phát sinh chồi (ngày)	Tỷ lệ mẫu hình thành chồi (%)	Tỷ lệ biến dị (%)	Số chồi/mẫu (chồi)	Đường kính chồi (cm)	Hình thái
CT1	13,2	83,3	0,0	3,3 ± 0,84e	0,26 ± 0,01a	Chồi mập, màu xanh đậm
CT2	16,5	66,7	6,7	2,1 ± 1,04fg	0,22 ± 0,02a	Chồi trung bình, màu xanh nhạt
CT3	23,5	43,3	16,7	1,2 ± 0,89gh	0,14 ± 0,02c	Chồi nhỏ, màu xanh nhạt
CT4	12,6	80,0	0,0	4,8 ± 1,21d	0,25 ± 0,02a	Chồi mập, màu xanh đậm
CT5	16,9	70,0	0,0	6,1 ± 1,01c	0,19 ± 0,02b	Chồi nhỏ, màu xanh đậm
CT6	17,1	56,7	23,3	2,7 ± 1,24ef	0,14 ± 0,01c	Chồi nhỏ, màu xanh nhạt, xuất hiện biến dị dạng lá
CT7	12,7	70,0	13,3	19,3 ± 2,2a	0,12 ± 0,02c	Chồi nhỏ, yếu, màu trắng xanh
CT8	15,4	43,3	26,7	12,1 ± 1,98b	0,12 ± 0,01c	Chồi nhỏ, yếu, màu trắng xanh
CT9	19,5	36,7	43,3	0,8 ± 0,67h	0,11 ± 0,01c	Chồi nhỏ, yếu, màu trắng xanh, xuất hiện biến dị dạng lá và callus
CV (%)				6,1	8,6	
LSD _{0,05}				1,21	0,03	

Ghi chú: CT1: MS + 1mg/l BA + 0,25mg/l α -NAA; CT2: MS + 1mg/l BA + 0,5mg/l α -NAA; CT3: MS + 1mg/l BA + 0,75mg/l α -NAA; CT4: MS + 2mg/l BA + 0,25mg/l α -NAA; CT5: MS + 2mg/l BA + 0,5mg/l α -NAA; CT6: MS + 2mg/l BA + 0,75mg/l α -NAA; CT7: MS + 3mg/l BA + 0,25mg/l α -NAA; CT8: MS + 3mg/l BA + 0,5mg/l α -NAA; CT9: MS + 3mg/l BA + 0,75mg/l α -NAA.

Thời gian phát sinh chồi rất sớm ở CT1, CT4 và CT7 là 12,6 - 12,7 - 13,2 ngày, dài nhất ở CT3 là 23,5 ngày, các công thức còn lại dao động từ 15,4 - 19,5 ngày. Ở cùng nồng độ BA, thời gian phát sinh chồi dài hơn khi tăng nồng độ NAA. Mặt khác ở các công thức BA khác nhau cần thời gian tương đương nhau để hình thành chồi.

Tỷ lệ phát sinh chồi ở các công thức có nồng độ BA từ 1 - 2 mg/l là khá cao khoảng 43,3 - 83,3%. Tuy nhiên tăng nồng độ NAA thì tỷ lệ này giảm dần, xuất hiện nhiều biến dị dạng lá và callus. Cụ thể CT1, CT2, CT3 (cùng nồng độ BA và tăng NAA) có tỷ lệ hình thành chồi là 83,8; 66,7; 43,3% và tỷ lệ biến dị tương ứng là 0; 6,7; 16,7%. Như vậy nồng độ auxin α NAA thấp cho kết quả tạo chồi từ mắt ngủ cao hơn.

Số chồi/mẫu nhiều nhất ở CT7 là 19,3 chồi. Hàm lượng BA cao kích thích mẫu phát sinh nhiều chồi nhưng chồi nhỏ, đường kính chồi 0,12 cm, yếu, màu trắng xanh. Đồng thời tăng cả lượng NAA làm cho mẫu cấy phát sinh nhiều thể không định hình (callus), không hình thành chồi hoặc số lượng ít.

Xét về chất lượng chồi thì CT1 và CT4 ở mức tương đương nhau: Chồi xanh, mập, đường kính 0,25 - 0,26 cm. Tuy nhiên số chồi phát sinh ở CT4

nhiều hơn CT3 tương ứng là 4,8 và 3,3 chồi.

Như vậy công thức tốt nhất cho sự tạo chồi từ mắt ngủ là: MS + 3% sucrose + 2 mg/l BA + 0,25 mg/l α NAA. Với tỷ lệ mẫu tạo chồi là 80%, số chồi/mẫu là 4,8 chồi.

3.3. Nghiên cứu ảnh hưởng của chế độ chiếu sáng đến khả năng tạo củ và chất lượng củ

Cường độ chiếu sáng ảnh hưởng nhiều tới khả năng hình thành củ, lượng ánh sáng khác nhau tác động kích thước và trọng lượng củ khác nhau. Năm 1981, Shillo và Halevy đã đưa ra kết luận: Đối với lay ơ thì sự phát triển của hoa và củ chịu ảnh hưởng mạnh mẽ của quang chu kỳ, điều kiện ngày ngắn là nguyên nhân làm giảm kích thước và trọng lượng củ. Còn trong nhân giống *in vitro* thì Steinitz và cộng tác viên (1991) lại chỉ ra rằng phản ứng tạo củ trong điều kiện chiếu sáng và trong tối là như nhau. Tuy nhiên theo các kết quả mà Dantu và Bhojwani (1995) đưa ra là điều kiện tối đã ức chế sự hình thành củ, khi chiếu sáng không những kích thích chồi phát triển mà còn hình thành củ. Vì vậy thí nghiệm xác định chế độ chiếu sáng thích hợp để tạo củ lay ơ *in vitro* được tiến hành.

Bảng 3. Ảnh hưởng của chế độ chiếu sáng đến khả năng tạo củ từ chồi đơn hoa lay ơ (sau 6 tuần)

CTTN	Tỷ lệ mẫu tạo củ (%)				Trọng lượng củ (g)	Đường kính củ (cm)
	3 tuần	4 tuần	5 tuần	6 tuần		
CT1	56,7	66,7	76,7	93,3	0,77 ± 0,09a	0,81 ± 0,08a
CT2	23,3	36,7	50,0	53,3	0,34 ± 0,07d	0,45 ± 0,07d
CT3	53,3	63,3	70,0	83,3	0,61 ± 0,11b	0,62 ± 0,06b
CT4	33,3	43,3	66,7	76,7	0,45 ± 0,06c	0,51 ± 0,08c
CV (%)					5,9	3,1
LSD _{0,05}					0,07	0,04

Ghi chú: CT1: 16 giờ sáng/8 giờ tối, CT2: Tối hoàn toàn, CT3: 16 giờ sáng/8 giờ tối trong 4 tuần, tối hoàn toàn, CT4: Tối hoàn toàn trong 4 tuần, 16 giờ sáng/8 giờ tối. Bảng 1, 4: Những chữ cái khác nhau trong cùng một cột biểu hiện sự khác nhau có ý nghĩa thông kê ở mức xác suất 0,05.

Chế độ chiếu sáng khác nhau ảnh hưởng tới tỷ lệ mẫu tạo củ và chất lượng củ khác nhau. Trong tất cả các công thức, chồi hoa lay ơ sau khi để ngoài sáng trước cho tỷ lệ mẫu tạo củ khá cao từ 53,3 - 56,7%. Nguyên nhân là để ngoài sáng với cường độ ánh sáng mạnh giúp chồi có thể quang hợp, sinh trưởng nhanh, bộ rễ sớm phát triển, từ đó hình thành củ vì sau giai đoạn hình thành rễ là đến giai đoạn phát sinh củ.

Điều kiện nuôi cấy tối hoàn toàn có tỷ lệ mẫu hình thành củ thấp nhất 23,3% sau 3 tuần và chỉ được 53,3% sau 6 tuần. Củ con tạo ra nhỏ trọng lượng đạt 0,34 g, đường kính củ 0,45 cm.

Về chất lượng củ con tạo ra, công thức có chiếu sáng trước có trọng lượng và đường kính củ lớn hơn. Cụ thể, trọng lượng củ con của CT1 và CT3 là 0,77; 0,61 g; đường kính củ tương ứng là 0,81; 0,62 cm. Trong khi đó công thức để tối có trọng lượng củ tương ứng là 0,34; 0,45 g và đường kính củ là 0,45; 0,51 cm.

Như vậy, sau khi hình thành củ cây lay ơ *in vitro* vẫn cần ánh sáng để tổng hợp dinh dưỡng nuôi củ lớn hơn. Chế độ chiếu sáng thích hợp nhất tạo củ hoa lay ơ là 16 giờ sáng/8 giờ tối. Cho tỷ lệ tạo củ là 93,3%; trọng lượng củ đạt 0,77 g; đường kính củ đạt 0,81 cm.

