

## NGHIÊN CỨU TẠO CÂY DƯA CHUỘT VÀ ỚT ĐƠN BỘI BẰNG KỸ THUẬT NUÔI CẤY BAO PHẦN IN VITRO

Trần Khắc Thi<sup>1</sup>, Đoàn Thị Thùy Vân<sup>2</sup>, Đặng Thu Hoà<sup>2</sup>,  
Phạm Thị Thanh Thìn<sup>2</sup>, Đặng Thị Mai<sup>2</sup>,  
Chu Thị Lan Hương<sup>2</sup>, Lê Thanh Nhuận<sup>2</sup>

### TÓM TẮT

Nuôi cấy bao phần là quá trình sử dụng bao phần để nuôi cấy in vitro nhằm tạo ra những cây đơn bội kép làm vật liệu cho chọn dòng thuần. Kết quả nghiên cứu trên đối tượng rau ăn quả (dưa chuột, ớt) bằng kỹ thuật nuôi cấy bao phần in vitro cho thấy: môi trường có thành phần khoáng thích hợp cho nuôi cấy bao phần dưa chuột và ớt là MS (Miashige & Skoog, 1962). Bổ sung tổ hợp 1,5 mg/l 2,4D và 1,0 mg/l kinetin vào môi trường nuôi cấy bao phần cây dưa chuột đã cho tỷ lệ tạo callus đạt 84,98%. Bổ sung tổ hợp 1 mg/l BAP và 4 mg/l αNAA vào môi trường nuôi cấy bao phần cây ớt đã cho tỷ lệ tạo callus đạt 70,8%. Môi trường tái sinh cây hiệu quả đối với callus cây dưa chuột là MS bổ sung tổ hợp 0,03 mg/l TDZ và 1,0 mg/l BAP và với cây ớt là MS bổ sung 1,0 mg/l GA3 + 0,02 mg/l TDZ. Việc xử lý chồi đơn bội bằng conchixium để tạo cây lưỡng bội thích hợp nhất ở nồng độ 0,4% trong thời gian 6 giờ đối với cây dưa chuột và 12 giờ đối với cây ớt.

Từ khoá: Bao phần, thể sần dưa chuột, thể sần ớt, dưa chuột, nuôi cấy trong ống nghiệm, ớt.

### I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Kỹ thuật tạo cây đơn bội in vitro thông qua việc kích thích tiêu bào tử phát triển thành cây khi nuôi cấy bao phần và hạt phần cho phép nhanh chóng tạo ra hàng loạt cây đơn bội và thông qua sự đa bội hoá cây đơn bội để thu được các dạng đồng hợp tử tuyệt đối. Vật liệu ban đầu cho quá trình nuôi cấy in vitro (trong ống nghiệm) tạo cây đơn bội thường là: bao phần, hạt phần tách rời, noãn chưa thụ tinh.

Trong nuôi cấy bao phần tùy theo mỗi loại cây trồng mà thu được tỷ lệ cây đơn bội và nhị bội khác nhau, trong một vài trường hợp có thể thu được cây có mức độ bội thể cao hơn (Chu, 1982) [3]. Các bao phần dùng để nuôi cấy thường được lấy từ các cây của quần thể F1 nhằm tạo ra sự đa dạng di truyền tối đa trong quần thể những cây đơn bội được tạo thành, sau khi lưỡng bội hoá sẽ trở thành cây lưỡng bội thuần chủng, từ các cây này sẽ tạo thành quần thể các dòng thuần, qua đánh giá chọn lọc và cho ra giống mới (Singsit và CS, 1990) [9].

Đối với cây ớt, đã có nhiều tác giả nghiên cứu nuôi cấy bao phần của nhiều dòng ớt khác nhau. Moonza Kim và cộng sự (2004) đã nghiên cứu nuôi cấy bao phần của giống *Capsicum annuum* L trên

môi trường MS chứa 0,1 mg/l αNAA và 0,1 mg/l kinetin [8].

González-García, Juvencio (2004), khi nuôi cấy hạt phần ớt của 60 cặp lai giữa loài phụ và giống địa phương, đã kết luận rằng sự phát sinh phôi từ tiêu bào tử tốt nhất trên môi trường có 0,3 mg/l BA và 2 mg/l IAA [4].

Đối với các cây trong họ bầu bí kỹ thuật nuôi cấy bao phần để tạo cây đơn bội cũng được nhiều nhà khoa học quan tâm, tuy nhiên dòng đơn bội kép được tạo ra thông qua nuôi cấy bao phần còn nhiều hạn chế [1]. Những yếu tố như đặc tính di truyền, điều kiện trồng của cây mẹ, giai đoạn phát triển của tiêu bào tử, xử lý nụ hoa trước khi nuôi cấy, môi trường và điều kiện nuôi cấy có ảnh hưởng đến kết quả của quá trình nuôi cấy bao phần [2]. Năm 1974, Eun J. S. và cộng sự khi nuôi cấy bao phần dưa chuột đã phát hiện calus (thể sần, thể chai) phát triển từ bao phần sau khi nuôi cấy 7 ngày trên môi trường có bổ sung 2,4 D và sau 30 ngày rễ và chồi sẽ xuất hiện [6]. Theo Lazarte và Sasser (1982) bao phần dưa chuột tạo callus trên môi trường cơ bản MS. Phôi phát triển thành cây con trên môi trường Nitsch and Nitsch đặc có chứa 20 g/lit raffinose [7]. Khi nghiên cứu các yếu tố ảnh hưởng đến kết quả nuôi cấy bao phần dưa chuột, Suprunova và Shmykova đã nuôi cấy 10 giống nhưng chỉ có giống Gordion có thể tạo cây đơn bội từ nuôi cấy bao

<sup>1</sup>PGS.TS. Viện Nghiên cứu Rau quả

<sup>2</sup>Viện Nghiên cứu Rau quả

phần. Trong số những chất điều tiết sinh trưởng được nghiên cứu, thidiazuron (TDZ) là tốt nhất cho sự cảm ứng của bao phấn với nồng độ tối ưu nhất là 0,02 mg/l [10]. Năm 2002, Ashok Kumar và cộng sự đã tiến hành thí nghiệm trên hai giống dưa chuột Calypso và Green Long cho thấy bao phấn dưa chuột của cả hai giống đều thích hợp cho sự tái sinh phôi, đã thu được 21 cây giống Calypso và 17 cây giống Green Long là đơn bội [1].

Tại Trung Quốc năm 2007, Hui Song và cộng sự cũng nghiên cứu 20 kiểu gen của cây dưa chuột thì chỉ có 16 kiểu gen tạo được callus. Môi trường tốt nhất cho sự phát sinh callus là môi trường MS có bổ sung 4,44 M BA, 2,26 M 2, 4-D, 4,64 M KIN, 3% sucroza và 0,8% aga (thạch). Môi trường cho sự phát sinh phôi là MS có bổ sung 0,54 M NAA, 13,32 M BA, 3% sucroza và 0,8% aga. Môi trường cho sự tái sinh cây là MS bổ sung 2,22 M BA, 6% sucroza và 1,2% aga [ 5].

**II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU**

**1. Vật liệu nghiên cứu**

Bao phấn nuôi cấy thu từ các con lai F1 của giống (dưa chuột Valaspik có nguồn gốc từ Mỹ, có trên 85% hoa cái (gynoecious), hoa mọc chùm và tạo quả không qua thụ phấn (partenocarpic) và giống ớt Hotchili có nguồn gốc từ Hàn Quốc, cây sinh trưởng khoẻ, được trồng đại trà ở các vùng chuyên canh ớt, thời gian sinh trưởng 145-150 ngày, năng suất trên 22 tấn/ha. Trồng tại khu nhà lưới - Viện Nghiên cứu Rau quả.

**2. Phương pháp nghiên cứu**

*a. Phương pháp lấy mẫu*

- Chọn các nụ hoa khi chiều dài lá đài bằng chiều dài cánh hoa, lấy mẫu vào buổi sáng, sau đó làm sạch sơ bộ bằng cồn 70° và được khử trùng bằng H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 40%. Sau khi khử trùng, nụ hoa được thấm khô và tách các bao phấn cây trên môi trường thí nghiệm có thành phần khoáng cơ bản MS có bổ sung chất điều tiết thuộc nhóm auxin.

*b. Phương pháp bố trí thí nghiệm*

Các thí nghiệm được bố trí ngẫu nhiên, lặp lại 3 lần, mỗi lần lặp lại 10 đĩa, cấy 30 bao phấn /1 đĩa petri. Các thí nghiệm tái sinh cây 5 callus/1 bình tam giác 250 ml, mỗi lần lặp 10 bình.

Các thí nghiệm về cây cấy 5 cây/1 bình tam giác 250 ml, mỗi lần lặp 3 bình.

*c. Điều kiện nuôi cấy*

- Nuôi cấy tạo mô sẹo phải trong điều kiện tối hoàn toàn.

- Khi tái sinh cây cần nhiệt độ 25°C, ánh sáng 2000 – 2500 lux, 16 giờ/ngày.

*d. Các chỉ tiêu theo dõi*

- Tỷ lệ bao phấn sống (%); Tỷ lệ bao phấn tạo callus (%); Tỷ lệ callus màu vàng (%); Tỷ lệ mẫu tái sinh cây (%); Tỷ lệ mẫu tái sinh có màu xanh (%); Số chồi sống sót và số chồi nhị bội.

2.4. Phương pháp xử lý số liệu: theo chương trình xử lý số liệu IRISTART.

**III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN**

**1. Nghiên cứu ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy đến khả năng tạo callus từ nuôi cấy in vitro bao phấn dưa chuột, ớt**

Kết quả về tỷ lệ tái sinh callus từ nuôi cấy bao phấn trên các môi trường dinh dưỡng MS, B5 và N6 được ghi nhận trong bảng 1 và 2.

**Bảng 1. Ảnh hưởng của môi trường dinh dưỡng cơ bản đến hiệu quả tạo callus từ nuôi cấy in vitro bao phấn dưa chuột**

STT	Môi trường	Tỷ lệ bao phấn sống (%)	Tỷ lệ bao phấn tạo callus (%)	Tỷ lệ callus màu vàng (%)
1	MS	74,83	28,83 c	28,84
2	B5	22,67	13,17 b	27,81
3	N6	15,67	9,33 a	23,31
	CV,%		2,99	

**Bảng 2. Ảnh hưởng của môi trường dinh dưỡng cơ bản đến hiệu quả tạo callus từ nuôi cấy in vitro bao phấn ớt**

TT	Môi trường	Số bao phấn cấy	Số bao phấn sống	Tỷ lệ bao phấn sống (%)
1	MS	600	207	35,00
2	B5	600	97	16,17
3	N6	600	62	10,30

Kết quả cho thấy:

- Đối với cây dưa chuột, tỷ lệ tạo callus màu vàng đạt cao nhất khi nuôi cấy trên môi trường MS là 28,84% và thấp nhất trên môi trường N6 là 23,31%.

- Với cây ớt, tỷ lệ tạo callus màu xanh đạt cao nhất khi nuôi cấy trên môi trường MS là 35% và thấp nhất trên môi trường N6 là 10,30%. Vì vậy, khi nuôi cấy bao phấn cho các thí nghiệm tiếp theo, trong nghiên cứu này đã sử dụng môi trường nuôi cấy MS.

Để tăng tỷ lệ tái sinh callus từ nuôi cấy bao phấn, việc bổ sung chất điều tiết sinh trưởng thuộc nhóm auxin ( $\alpha$ NAA và 2,4D) và nhóm xytokinin (kinetin và BAP) là rất cần thiết. Kết quả được ghi nhận ở bảng 3 và 4.

**Bảng 3: Ảnh hưởng của tổ hợp 2,4D + Kinetin đến hiệu quả tạo callus bao phấn dưa chuột (sau 6 tuần)**

TT	CTTN	Tỷ lệ bao phấn sống (%)	Tỷ lệ bao phấn tạo callus (%)	Tỷ lệ callus màu vàng (%)
1	Đ/C	82,53	50,83 a	75,05
2	1,5mg/l 2,4D + 0,5mg/l KI	85,67	55,72 b	81,07
3	1,5mg/l 2,4D + 1,0mg/l KI	87,33	69,17 d	84,98
4	1,5mg/l 2,4D + 1,5mg/l KI	86,50	64,28 c	77,06
5	1,5mg/l 2,4D + 2,0mg/l KI	81,50	57,17 b	72,67
	CV%		3,43	

**Bảng 4: Ảnh hưởng của tổ hợp BAP +  $\alpha$ NAA đến khả năng tạo callus từ bao phấn ớt (sau 6 tuần nuôi cấy)**

TT	CTTN	Số bao phấn cây	Số bao phấn tạo callus hữu hiệu	Tỷ lệ callus hữu hiệu (%)
1	ĐC	600	415	69,2
2	1,0mg/l BAP + 1,0mg/l $\alpha$ NAA	600	213	35,5
3	1,0mg/l BAP + 1,5mg/l $\alpha$ NAA	600	251	41,8
4	1,0mg/l BAP + 2,0mg/l $\alpha$ NAA	600	302	50,3
5	1,0mg/l BAP + 2,5mg/l $\alpha$ NAA	600	327	54,5
6	1,0mg/l BAP + 3,0mg/l $\alpha$ NAA	600	400	66,7
7	1,0mg/l BAP + 3,5mg/l $\alpha$ NAA	600	423	70,5
8	1,0mg/l BAP + 4,0mg/l $\alpha$ NAA	600	569	94,8
9	1,0mg/l BAP + 4,5mg/l $\alpha$ NAA	600	425	70,8
10	1,0mg/l BAP + 5,0mg/l $\alpha$ NAA	600	376	62,7

Kết quả cho thấy: Với cây dưa chuột, tỷ lệ bao phấn tạo callus cao nhất đạt 69,17% và callus màu

vàng cao nhất đạt 84,98% trên công thức môi trường là MS bổ sung 1,5 mg/l 2,4D +1,0 mg/l KI.

Với cây ớt, tỷ lệ callus hữu hiệu cao nhất đạt 94,8% trên công thức môi trường là MS bổ sung 1 mg/l BAP và 4 mg/l  $\alpha$ NAA.

**2. Ảnh hưởng của các chất điều tiết sinh trưởng đến sự tái sinh cây từ callus**

**Bảng 5: Ảnh hưởng của TDZ + BAP đến khả năng tái sinh cây từ callus của bao phấn dưa chuột (sau 6 tuần)**

STT	CTTN	Tỷ lệ mẫu tái sinh (%)	Tỷ lệ mẫu tái sinh cây (%)	Tỷ lệ cây xanh (%)
1	ĐC	0,00 a	0,00	0,00
2	0,02mg/l TDZ+0,5mg/l BAP	12,89 b	37,89	41,07
3	0,02mg/l TDZ+1,0mg/l BAP	20,22 d	49,53	40,00
4	0,02mg/l TDZ+1,5mg/l BAP	27,33 f	52,85	49,21
5	0,02mg/l TDZ+2,0mg/l BAP	23,11 e	39,41	41,39
6	0,03mg/l TDZ+0,5mg/l BAP	33,56 g	51,01	53,28
7	0,03mg/l TDZ+ 1,0mg/l BAP	41,33 i	74,75	74,91
8	0,03mg/l TDZ+1,5mg/l BAP	47,56 j	51,42	62,85
9	0,03mg/l TDZ+2,0mg/l BAP	36,67 h	47,50	61,61
10	0,04mg/l TDZ+0,5mg/l BAP	32,89 g	39,86	42,37
11	0,04mg/l TDZ+1,0mg/l BAP	24,44 e	34,56	39,53
12	0,04mg/l TDZ+1,5mg/l BAP	20,44 d	22,93	38,69
13	0,04mg/l TDZ+2,0mg/l BAP	16,67 c	17,31	23,33
	CV.%	2,9		

