

NGHIÊN CỨU TẠO CALLUS Ở CÂY CẢNH NHẬP NỘI *Zamioculcas zamiifolia* (Lodd.) Engl.

LÊ VĂN TƯỜNG HUÂN, NGUYỄN THỊ THẢO NGỌC
Trường Đại học Khoa học, Đại học Huế

Cây *Zamioculcas zamiifolia* (Lodd.) Engl. (Kim phát tài) là một trong những loài cây cảnh đang được sử dụng ngày càng rộng rãi. Kim phát tài thuộc họ Araceae, có nguồn gốc từ Đông Phi, thường được ưa chuộng trong trang trí nội thất văn phòng. Cây có hình dáng đẹp, có thể sống trong điều kiện ánh sáng thấp, chịu được khô hạn, yêu cầu dinh dưỡng thấp và ít bị sâu bệnh (Chen và Henny, 2003).

Cây Kim phát tài có tán lá xanh tươi, hình dáng lá đẹp và tạo nhã phù hợp làm cây trang trí nội thất. Do đó, cây Kim phát tài rất được ưa chuộng trên thị trường cây cảnh. Vì vậy, trong những năm gần đây, cây này đã dần chiếm được chỗ đứng trên thị trường.

Kim phát tài đã được nhập vào nước ta và được trồng nhiều phục vụ cho nhu cầu của thị trường trong nước và xuất khẩu. Từ trước tới nay, cây Kim phát tài được nhân giống chủ yếu bằng cách tách bụi hoặc giâm lá. Tuy nhiên, với phương thức nhân giống này, hệ số nhân thấp, tốn thời gian và công sức, đồng thời cây giống dễ bị nhiễm bệnh. Vì vậy, phương thức nhân giống truyền thống đã không đáp ứng được nhu cầu về cây giống cho thị trường. Do đó, việc tìm ra phương thức nhân giống mới nhằm sản xuất được lượng cây giống lớn trong thời gian ngắn là rất cần thiết. Mặt khác, Kim phát tài không có nhiều giống nên thiếu nguồn nguyên liệu di truyền cho các mục đích chọn tạo giống mới bằng các phương pháp lai tạo truyền thống.

Việc sử dụng phương pháp nuôi cấy mô tế bào là một trong những phương pháp hữu hiệu hiện nay có thể giải quyết được những khó khăn trên. Đây là một phương pháp tiên tiến đã được ứng dụng thành công trên thế giới và Việt Nam đem lại hiệu quả kinh tế cao cho hàng loạt cây trồng khác nhau.

Xuất phát từ những lý do trên, chúng tôi thực hiện đề tài “Nghiên cứu tạo callus ở cây cảnh nhập nội *Zamioculcas zamiifolia* (Lodd.) Engl.” nhằm ứng dụng trong nhân giống vô tính *in vitro* cũng như trong chọn tạo giống ở cây Kim phát tài bằng kỹ thuật nuôi cấy mô tế bào.

I. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Nguyên liệu nghiên cứu

Nguyên liệu sử dụng trong các thí nghiệm là mẫu mảnh lá và mẫu cuống lá được lấy từ lá cây Kim phát tài, tách từ các cây khỏe mạnh trồng ngoài điều kiện tự nhiên.

2. Môi trường và điều kiện nuôi cấy

Môi trường cơ bản dùng để nuôi cấy là môi trường MS (Murashige và Skoog, 1962) cơ bản có bổ sung các chất điều hòa sinh trưởng khác nhau tùy theo mục đích của từng thí nghiệm. Nguồn carbon là sucrose. Môi trường được làm đặc bằng agar, pH của môi trường được điều chỉnh đến 5,8. Môi trường nuôi cấy được khử trùng ở 121°C trong 17 phút.

Mẫu thí nghiệm được cấy trong các bình thủy tinh chứa môi trường đặt trong phòng nuôi cấy có nhiệt độ ổn định từ 25±2°C, cường độ ánh sáng là 2000-3000 lux, thời gian chiếu sáng 16 giờ/ngày.

3. Nghiên cứu khả năng tạo callus trong điều kiện in vitro

Lá cây Kim phát tài, sau khi khử trùng bằng dung dịch HgCl_2 0,1%, được cắt thành các mẫu nhỏ kích thước khoảng 1cm. Các mẫu mảnh lá và mẫu cuống lá được cấy lên môi trường cơ bản MS có 3% sucrose, 0.8% agar và bổ sung 2,4-Dichlorophenoxy acetic acid (2,4-D) có nồng độ từ 1-5 mg/L kết hợp với 0,5 mg/L N⁶-Benzyl adenin (BA) để thăm dò khả năng tạo callus của cây Kim phát tài. Số liệu được thu sau 2 tháng nuôi cấy.

4. Nghiên cứu khả năng nhân callus

Các mẫu callus có kích thước khoảng 0,3 x 0,3 cm, tách từ các callus tạo thành được cấy lên các môi trường có bổ sung các chất điều hòa sinh trưởng: 2,4-D, BA với các nồng độ và tổ hợp khác nhau để thăm dò khả năng sinh trưởng của callus. Kích thước và trọng lượng tươi của mẫu callus được xác định sau thời gian nuôi cấy 4 tuần.

5. Xử lý thống kê

Các thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên. Mỗi thí nghiệm được lặp lại 3 lần để tính trung bình mẫu. Số liệu được xử lý bằng phương pháp thống kê sinh học, phân tích Duncan's test bằng phần mềm SPSS 16.0 với mức xác suất có ý nghĩa $p < 0,05$.

II. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

1. Nghiên cứu ảnh hưởng của 2,4-D kết hợp với BA lên khả năng tạo callus của mẫu mảnh lá

Các mẫu mảnh lá của cây Kim phát tài được cấy lên môi trường MS không bổ sung chất điều hòa sinh trưởng hoặc có bổ sung 2,4-D với các nồng độ khác nhau từ 1-5 mg/L kết hợp với 0,5 mg/L BA. Kết quả sau 2 tháng nuôi cấy được trình bày ở bảng 1.

Bảng 1

Ảnh hưởng của 2,4-D kết hợp với BA lên khả năng tạo callus của mẫu mảnh lá sau hai tháng

Chất điều hòa sinh trưởng (mg/L)		Khả năng tạo callus	
2,4-D	BA	Tỷ lệ mẫu tạo callus (%)	Khả năng sinh trưởng của callus
0	0	0	-
1	0,5	100	++++
2	0,5	80	+++
3	0,5	75	+++
4	0,5	72	+++
5	0,5	56,5	++

Chú thích: - : không phát sinh callus, ++ : phát sinh callus trung bình, +++ : phát sinh callus khá, ++++ : phát sinh callus tốt

Qua quá trình nghiên cứu, chúng tôi nhận thấy ở tất cả các môi trường có bổ sung 2,4-D và BA đều có tạo callus. Tuy nhiên, ở các môi trường khác nhau thì khả năng tạo callus khác nhau. Trên môi trường không có chất điều hòa sinh trưởng, không có callus được tạo thành.

Ở môi trường có bổ sung 1 mg/L 2,4-D kết hợp với 0,5 mg/L BA, tỷ lệ mẫu tạo callus đạt 100%, khả năng sinh trưởng callus tốt. Callus tạo thành có dạng hạt, màu vàng nhạt, một số ngả xanh (Hình 1).

Môi trường có bổ sung 2 mg/L 2,4-D kết hợp với 0,5 mg/L BA cho tỷ lệ mẫu tạo callus đạt 80%, khả năng sinh trưởng của callus khá. Callus tạo thành cũng có dạng hạt màu vàng nhạt và màu vàng ngả xanh.

Ở môi trường có bổ sung 3 mg/L 2,4-D kết hợp với 0,5 mg/L BA, tỷ lệ mẫu tạo callus đạt 75%, khả năng sinh trưởng của callus khá. Callus tạo thành chủ yếu có dạng hạt, màu vàng nhạt. Một số dạng chặt, ngả xanh. Tỷ lệ mẫu tạo rễ từ callus đạt 22,2%.

Ở môi trường có bổ sung 4 mg/L 2,4-D kết hợp với 0,5 mg/L BA, tỷ lệ mẫu tạo callus đạt 72%, khả năng sinh trưởng của callus trung bình. Callus tạo thành chủ yếu có dạng hạt, màu vàng nhạt và một ít dạng chặt, màu vàng ngả xanh.

Trên môi trường có bổ sung 5 mg/L 2,4-D kết hợp với 0,5 mg/L BA, sau thời gian hai tháng, tỷ lệ mẫu tạo callus đạt 56,5%, khả năng sinh trưởng của callus trung bình. Callus có dạng chặt, vàng ngả xanh. Tỷ lệ mẫu tạo rễ từ callus đạt 30,8%.

Như vậy, môi trường tạo callus tốt đối với mẫu mảnh lá cây Kim phát tài là môi trường có bổ sung 1 mg/L 2,4-D kết hợp với 0,5 mg/L BA. Nhận thấy khi tăng nồng độ của 2,4-D kết hợp 0,5 mg/L BA thì tỷ lệ mẫu tạo callus giảm dần và khả năng sinh trưởng của callus khá. 2,4-D ở nồng độ càng cao thì ức chế khả năng tạo callus của mẫu mảnh lá.

2. Nghiên cứu ảnh hưởng của 2,4-D kết hợp với BA lên khả năng tạo callus của mẫu cuống lá

Mẫu cuống lá của cây Kim phát tài được cấy lên môi trường MS không có bổ sung chất điều hòa sinh trưởng hoặc có bổ sung 2,4-D với các nồng độ khác nhau từ 1-5 mg/L kết hợp với 0,5 mg/L BA. Kết quả sau 2 tháng nuôi cấy được trình bày ở bảng 2.

Bảng 2

Ảnh hưởng của 2,4-D kết hợp với BA lên khả năng tạo callus của mẫu cuống lá sau hai tháng

Chất điều hòa sinh trưởng (mg/L)		Khả năng tạo callus	
2,4-D	BA	Tỷ lệ mẫu tạo callus (%)	Khả năng sinh trưởng của callus
0	0	0	-
1	0,5	100	++++
2	0,5	100	++++
3	0,5	66,7	+++
4	0,5	60	++++
5	0,5	0	-

Qua quá trình nghiên cứu, chúng tôi nhận thấy ở các môi trường khác nhau thì khả năng tạo callus khác nhau. Trên môi trường không có chất điều hòa sinh trưởng, không có callus tạo thành.



Hình 1: Callus tạo thành từ mẫu mảnh lá trên môi trường có bổ sung 1 mg/L 2,4-D kết hợp 0,5 mg/L BA

Ở môi trường có bổ sung 1 mg/L 2,4-D kết hợp với 0,5 mg/L BA, tỷ lệ mẫu tạo callus đạt 100%. Khả năng sinh trưởng của callus tốt, callus tạo thành có dạng chặt, màu xanh. Ngoài ra, còn có thêm dạng callus chặt, màu trắng ngả xanh. Một vài mẫu có sự mọc rễ. Tỷ lệ mẫu tạo rễ từ callus đạt 10%.

Môi trường có bổ sung 2 mg/L 2,4-D kết hợp với 0,5 mg/L BA cho tỷ lệ mẫu tạo callus đạt 100%. Khả năng sinh trưởng của callus tốt, callus tạo thành có dạng hạt, màu vàng nhạt và dạng chặt màu vàng ngả xanh (Hình 2).



Hình 2: Callus tạo thành từ mẫu cuống lá trên môi trường có bổ sung 2 mg/L 2,4-D kết hợp 0,5 mg/L BA

Ở môi trường có bổ sung 3 mg/L 2,4-D kết hợp với 0,5 mg/L BA, tỷ lệ mẫu tạo callus đạt 66,7%. Khả năng sinh trưởng của callus khá, callus tạo thành có dạng hạt, màu vàng nhạt và dạng chặt, xanh nhạt.

Trên môi trường có bổ sung 4 mg/L 2,4-D kết hợp với 0,5 mg/L BA, tỷ lệ mẫu tạo callus đạt 60%. Khả năng sinh trưởng của callus tốt, callus tạo thành có dạng hạt nhỏ màu trắng ngả vàng và dạng chặt màu vàng ngả xanh. Tỷ lệ mẫu tạo rễ từ callus đạt 33,3%.

Ở môi trường có bổ sung 5 mg/L 2,4-D kết hợp với 0,5 mg/L BA, sau thời gian hai tháng chưa nhận thấy sự tạo callus.

Như vậy, môi trường có khả năng tạo callus tốt nhất đối với mẫu cuống lá Kim phát tài là môi trường có bổ sung 2 mg/L 2,4-D kết hợp với 0,5 mg/L BA.

3. Nghiên cứu khả năng nhân của callus

Các mẫu callus có kích thước khoảng 3 x 3 mm, tách từ callus tạo thành *in vitro*, được cấy lên các môi trường có bổ sung các chất điều hòa sinh trưởng với các nồng độ và tổ hợp khác nhau để thăm dò khả năng sinh trưởng của callus. Sau 4 tuần nuôi cấy, kết quả được trình bày ở bảng 3.

Bảng 3

Kết quả nghiên cứu khả năng sinh trưởng của callus sau 4 tuần nuôi cấy

Chất điều hòa sinh trưởng (mg/L)		Khả năng sinh trưởng của callus	
2,4-D	BA	Kích thước callus (mm)	Trọng lượng tươi của callus (mg)
1	0,5	10,9 ^b	456,8 ^b
2	0,5	10,7 ^b	411,3 ^b
2	1,0	11,7 ^a	525,5 ^a

Ghi chú: Các chữ cái khác nhau trên cùng một cột chỉ ra sự sai khác có mức ý nghĩa thống kê của trung bình mẫu với $p < 0,05$ (Duncan's test).

Ở môi trường có bổ sung 1 mg/L 2,4-D kết hợp với 0,5 mg/L BA, khả năng sinh trưởng của callus tốt, callus sau quá trình nuôi cấy có dạng hạt, màu vàng nhạt. Sau 4 tuần nuôi cấy, nhận thấy một số mẫu callus có phần nhỏ ngả xanh. Kích thước trung bình của callus sau 4 tuần nuôi cấy đạt 10,9 mm. Trọng lượng tươi trung bình của callus là 456,8 mg.

Trên môi trường có bổ sung 2 mg/L 2,4-D kết hợp với 0,5 mg/L BA, khả năng sinh trưởng của callus tốt, callus có dạng hạt, màu vàng nhạt. Kích thước trung bình của callus sau 4 tuần nuôi cấy đạt 10,7 mm và trọng lượng tươi trung bình của callus đạt 411,3 mg.

Môi trường có bổ sung 2 mg/L 2,4-D kết hợp với 1 mg/L BA cho khả năng sinh trưởng của callus rất tốt, callus có dạng hạt, màu vàng nhạt. Kích thước trung bình của callus sau 4 tuần nuôi cấy đạt 11,7 mm và trọng lượng tươi trung bình của callus là 525,5 mg (Hình 3).



Hình 3. Callus sinh trưởng trên môi trường có bổ sung 2 mg/L 2,4-D kết hợp với 1 mg/L BA

Như vậy, kết quả nghiên cứu cho thấy callus sinh trưởng tốt nhất trên môi trường có bổ sung 2 mg/L 2,4-D kết hợp với 1 mg/L BA.

Nhiều loài hoa, cây cảnh trong họ Araceae đã được nghiên cứu nhân giống *in vitro* bằng mảnh lá thông qua giai đoạn tạo callus và sau đó tái sinh cây hay phát sinh phôi, sử dụng các môi trường có bổ sung 2,4-D hay 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid (2,4,5-T) và BA hay kinetin, như ở *Anthurium andraeanum* (Kuehnle và Sugii, 1991; Kuehnle *et al.*, 1992), *Anthurium scherzerianum* (Geier, 1986; Hamidah *et al.*, 1997), *Pinellia ternate* (Xu *et al.*, 2005). Ở cây *Zamioculcas zamiifolia*, chúng tôi cũng đã tạo được callus và nhân callus trên các môi trường MS cơ bản có bổ sung 2,4-D kết hợp với BA.

III. KẾT LUẬN

Trên cơ sở các kết quả nghiên cứu thu được, chúng tôi rút ra một số kết luận sau:

- Trong các môi trường cơ bản MS có bổ sung 2,4-D kết hợp với BA, kết quả nghiên cứu sau hai tháng cho thấy môi trường có bổ sung 1 mg/L 2,4-D kết hợp với 0,5 mg/L BA là môi trường tốt nhất cho tạo callus từ mẫu mảnh lá.

- Trong các môi trường cơ bản MS có bổ sung 2,4-D kết hợp với BA, kết quả nghiên cứu sau hai tháng cho thấy môi trường có bổ sung 2 mg/L 2,4-D kết hợp với 0,5 mg/L BA là môi trường tốt nhất cho tạo callus từ mẫu cuống lá.

- Môi trường MS cơ bản có bổ sung 2 mg/L 2,4-D kết hợp với 1 mg/L BA cho khả năng nhân callus tốt nhất.

Các kết quả nghiên cứu này là cơ sở cho các nghiên cứu nhân giống vô tính *in vitro* hay chọn tạo giống thông qua callus ở cây Kim phát tài, góp phần phát triển sản xuất trên quy mô lớn phục vụ nhu cầu thị trường trong nước và xuất khẩu.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Chen, J. J., R. J. Henny**, 2003. HortTechnology, 13 (3): 458-462.
2. **Geier, T.**, 1986. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 6 (2): 115-125.
3. **Hamidah, M., A. G. A. Karim, P. Debergh**, 1997. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 48 (3): 189-193.

4. **Kuehnle, A.R., N. Sugii**, 1991. Hort Science 26 (7): 919-921.
5. **Kuehnle, A. R., F. C. Chen, N. Sugii**, 1992. Plant Cell Reports, 11 (9): 438-442.
6. **Murashige, T., F. Skoog**, 1962. Physiologia Plantarum, 15 (3): 473-497.
7. **Xu, T., L. Zhang, X. Sun, K. Tang**, 2005. ACTA Biologica Cracoviensia Series Botanica, 47(2): 27-32.

STUDY ON CALLUS PRODUCTION IN *Zamioculcas zamiifolia* (Lodd.) Engl.

LE VAN TUONG HUAN, NGUYEN THI THAO NGOC

SUMMARY

ZZ plant (*Zamioculcas zamiifolia*) is emerging as an important foliage plant for interior scaping because of its unique appearance, ability to tolerate low light levels and drought, and resistance to diseases and pests. We studied callus induction from leaflet segments and petiole segments of *Zamioculcas zamiifolia*, as well as callus proliferation. Leaflet segments or petiole segments were cultured on MS medium containing 3% sucrose, 0,8% agar and supplemented with 2,4-Dichlorophenoxy acetic acid (2,4-D) at different concentrations combined with 0,5 mg/l N⁶-Benzyl adenin (BA) to investigate callus induction from leaflet or petiole segments. Among examined media, the MS medium supplemented with 1 mg/l 2,4-D and 0,5 mg/l BA was the best for callus induction from leaflet segments, and the MS medium supplemented with 2 mg/l 2,4-D and 0,5 mg/l BA was the best for callus induction from petiole segments. Calli proliferated well on the MS medium containing 3% sucrose, 0,8% agar, supplemented with 2 mg/l 2,4-D and 1 mg/l BA.