

NGHIÊN CỨU TÁI SINH CÂY TỪ MẪU CUỐNG LÁ TRONG ĐIỀU KIỆN *IN VITRO* Ở KIM PHÁT TÀI

LÊ VĂN TƯỜNG HUÂN, LÊ THỊ TRANG
Trường Đại học Khoa học, Đại học Huế

Ngày nay, cùng với sự phát triển của kinh tế-xã hội, nhu cầu sử dụng cây cảnh của con người ngày càng tăng nhanh. Nhiều loài cây được con người sử dụng với nhiều mục đích trang trí khác nhau. Kim phát tài (*Zamioculcas zamiifolia* (Lodd.) Engl.) thuộc họ Araceae là một trong những loài cây cảnh đang được ưa chuộng hiện nay. Cây có nguồn gốc từ Đông Phi, rất được ưa chuộng trong trang trí nội thất văn phòng. Cây mọc thành bụi. Lá kép lông chim, lá chét mọc đối, phiến lá màu xanh bóng. Thân phình to mọng nước ở gốc, cây ưa bóng và không ưa tưới quá nhiều nước, chịu được khô hạn (Chen và Henny, 2003).

Kim phát tài đã được nhập vào nước ta và được trồng nhiều chủ yếu ở miền Nam phục vụ cho nhu cầu của thị trường trong nước và xuất khẩu. Kim phát tài được nhân giống chủ yếu bằng cách tách bụi. 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. 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.

Phương pháp nuôi cấy mô *in vitro* là phương pháp hữu hiệu nhất hiện nay có thể giải quyết được những khó khăn trên. Phương pháp này cho phép tạo ra một số lượng cây giống lớn, đồng nhất trong thời gian ngắn. Do đó, đem lại hiệu quả thiết thực trong việc nâng cao chất lượng cây giống và giảm giá thành. Đây là một phương pháp tiên tiến đã được ứng dụng thành công trên thế giới và ở Việt Nam, đem lại hiệu quả kinh tế cao cho hàng loạt cây trồng khác nhau.

Xuất phát từ những vấn đề nêu trên, chúng tôi đã tiến hành nghiên cứu điều kiện khử trùng mẫu vật nuôi cấy lấy ngoài điều kiện tự nhiên và tái sinh cây từ mẫu cuống lá trong điều kiện *in vitro* ở Kim phát tài (*Zamioculcas zamiifolia* (Lodd.) Engl.) nhằm xây dựng quy trình nhân giống *in vitro* cây Kim phát tài phục vụ cho nhu cầu phát triển sản xuất loài cây cảnh có giá trị kinh tế này.

I. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Đối tượng nghiên cứu:

Đối tượng nghiên cứu là cây Kim phát tài (*Zamioculcas zamiifolia* (Lodd.) Engl.) thuộc chi *Zamioculcas*, họ Araceae.

2. Phương pháp nghiên cứu

2.1. Môi trường và điều kiện nuôi cấy

Môi trường cơ bản dùng để nuôi cấy là môi trường MS (Murashige và Skoog, 1962) có bổ sung các chất điều hòa sinh trưởng (ĐHST) 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 bình thủy tinh chứa môi trường, đặt trong phòng nuôi cấy có nhiệt độ 25±2 °C, cường độ ánh sáng là 2000-3000 lux, thời gian chiếu sáng 16 giờ/ngày.

2.2. Nghiên cứu hiệu quả của các điều kiện khử trùng

Cuống lá chết của cây Kim phát tài được cho vào cốc, rửa sạch dưới vòi nước máy và sau đó rửa với nước xà phòng loãng. Rửa sạch xà phòng dưới vòi nước máy rồi tráng qua bằng nước cất vô trùng. Khử trùng mẫu bằng cách lắc mẫu trong cồn 70% trong 30 giây sau đó trong dung dịch HgCl₂ 0,1% từ 15-25 phút.

Sau khi lắc với dung dịch khử trùng, mẫu được rửa lại bằng nước cất vô trùng nhiều lần.

Các mẫu được cấy trên giấy thấm vô trùng rồi cấy lên các môi trường nghiên cứu. Tỷ lệ mẫu nhiễm, tỷ lệ mẫu sống, tỷ lệ mẫu chết được xác định sau 5 tuần nuôi cấy.

2.3. Nghiên cứu khả năng tái sinh cây từ mẫu cuống lá chết trong điều kiện *in vitro*

Các mẫu cuống lá chết có kích thước khoảng 0,7 cm được cấy lên môi trường cơ bản MS có 3% sucrose, 0,8% agar và bổ sung N⁶-Benzyl adenine (BA) với các nồng độ từ 1-7 mg/l kết hợp với 0,1 mg/l α -Naphthalene acetic acid (NAA) để thăm dò khả năng tái sinh cây từ mẫu cuống lá chết cây Kim phát tài trong điều kiện *in vitro*. Số liệu được thu sau 3 tháng nuôi cấy trên các mẫu sống.

2.4. 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 ($p < 0,05$), sử dụng phần mềm SPSS 16.0 (SPSS Inc. Headquarters, United States).

II. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

1. Nghiên cứu hiệu quả của điều kiện khử trùng

Hiệu quả của thời gian khử trùng mẫu bằng dung dịch HgCl₂ 0,1% được đánh giá thông qua tỷ lệ mẫu nhiễm, tỷ lệ mẫu sống và tỷ lệ mẫu chết sau 5 tuần theo dõi. Kết quả được trình bày ở bảng 1.

Bảng 1

Ảnh hưởng của thời gian khử trùng mẫu bằng dung dịch HgCl₂ 0,1% sau 5 tuần nuôi cấy

Thời gian khử trùng (phút)	Tỷ lệ mẫu sống (%)	Tỷ lệ mẫu nhiễm (%)	Tỷ lệ mẫu chết (%)
15	26,07	72,60	1,33
17	31,40	65,67	2,93
20	43,20	48,40	8,40
23	64,53	22,07	13,40
25	54,76	17,04	28,20

Kết quả nghiên cứu cho thấy: Thời gian khử trùng ảnh hưởng lớn đến tỷ lệ mẫu sống. Khi tăng thời gian khử trùng từ 15-25 phút thì tỷ lệ mẫu nhiễm giảm đồng thời tỷ lệ mẫu chết tăng. Cụ thể, tỷ lệ mẫu nhiễm giảm từ 72,6% ở thời gian 15 phút xuống còn 17,04% ở thời gian khử trùng 25 phút. Ở thời gian là 15 và 17 phút, tỷ lệ mẫu chết còn thấp nhưng đến thời gian 20 phút thì tỷ lệ mẫu chết bắt đầu tăng cao. Tỷ lệ mẫu chết tăng nhanh khi tăng thời gian khử trùng từ 23 lên 25 phút.

Khi thời gian khử trùng tăng từ 15 đến 23 phút thì tỷ lệ mẫu sống tăng từ 26,07% lên 64,53%. Tuy nhiên, nếu tiếp tục tăng thời gian khử trùng lên đến 25 phút thì tỷ lệ mẫu sống giảm xuống còn 54,76%.

Vậy, khử trùng mẫu bằng dung dịch $HgCl_2$ 0,1% trong thời gian 23 phút là thích hợp nhất trong khoảng thời gian thăm dò, cho tỷ lệ mẫu sống đạt 64,53%.

2. Nghiên cứu khả năng tái sinh cây từ mẫu cuống lá chết trong điều kiện *in vitro*

Mẫu cuống lá chết được cấy lên môi trường MS có bổ sung BA ở các nồng độ khác nhau kết hợp với 0,1 mg/l NAA để nghiên cứu khả năng tái sinh cây. Sau 2 tuần nuôi cấy, thấy bắt đầu có hiện tượng cảm ứng. Sau 1 tháng rưỡi, các mẫu có hiện tượng tạo chồi. Sau 2 tháng nuôi cấy, chồi nhú lên. Sau đó, số chồi ở các mẫu cấy tiếp tục tăng. Kết quả thu sau 3 tháng nuôi cấy được trình bày ở bảng 2.

Bảng 2

Ảnh hưởng của BA và NAA lên khả năng tái sinh cây từ mẫu cuống lá chết cây Kim phát tài sau 3 tháng nuôi cấy

Chất ĐHST (mg/l)		Tỷ lệ mẫu tạo chồi (%)	Số chồi TB/mẫu	Chiều cao TB của chồi (mm)
BA	NAA			
0	0	-	-	-
1	0,1	100	4,25 ^b	2,83 ^a
2	0,1	100	4,35 ^b	2,47 ^b
3	0,1	100	4,58 ^{ab}	2,39 ^b
4	0,1	100	4,85 ^a	1,97 ^c
5	0,1	92,0	4,63 ^{ab}	2,10 ^{bc}
6	0,1	83,3	4,60 ^{ab}	2,18 ^{bc}
7	0,1	80,0	3,50 ^c	1,52 ^d

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

Kết quả nghiên cứu cho thấy, tất cả các môi trường có bổ sung BA nồng độ từ 1 mg/l đến 7 mg/l kết hợp với 0,1 mg/l NAA đều có xu hướng làm tái sinh chồi trực tiếp từ mẫu cuống lá của cây kim phát tài. Riêng môi trường MS không bổ sung chất ĐHST, không có sự tạo chồi.

Cụ thể, ở môi trường có bổ sung 1 mg/l BA kết hợp với 0,1 mg/l NAA, tỷ lệ mẫu tạo chồi đạt 100%, số lượng chồi trung bình phát sinh trên một mẫu đạt 4,25 chồi. Chồi tạo thành có màu từ xanh nhạt đến xanh đậm, dạng búp măng (Hình 1).

Trên môi trường có bổ sung 2 mg/l BA kết hợp với 0,1 mg/l NAA, tỷ lệ mẫu tạo chồi đạt 100%, số lượng chồi trung bình phát sinh trên một mẫu đạt 4,35 chồi. Chồi tạo thành màu xanh đậm, dạng búp măng.

Môi trường bổ sung 3 mg/l BA kết hợp với 0,1 mg/l NAA có tỷ lệ mẫu tạo chồi đạt 100%, số lượng chồi trung bình phát sinh trên một mẫu đạt 4,58 chồi. Chồi tạo thành màu xanh đậm, dạng búp măng (Hình 2).

Ở môi trường có bổ sung 4 mg/l BA kết hợp với 0,1 mg/l NAA, tỷ lệ mẫu tạo chồi đạt 100%. Số lượng chồi trung bình phát sinh trên một mẫu đạt cao nhất với 4,85 chồi. Chồi tạo thành phần lớn có màu xanh đậm (Hình 3).

Môi trường bổ sung 5 và 6 mg/l BA kết hợp 0,1 mg/l NAA có tỷ lệ mẫu tạo chồi giảm so với các môi trường trước, chỉ đạt lần lượt 92% và 83,3 %. Số lượng chồi trung bình phát sinh trên một mẫu cũng giảm, đạt lần lượt 4,63 và 4,6 chồi. Chồi tạo thành có màu xanh đậm, dạng búp măng.

Trên môi trường có 7 mg/l BA kết hợp 0,1 mg/l NAA, tỷ lệ tạo chồi thấp nhất, đạt 80%. Số lượng chồi trung bình phát sinh trên một mẫu đạt 3,5 chồi. Chồi tạo thành có kích thước nhỏ, màu xanh (Hình 4).

Nhìn chung, khả năng tạo chồi từ mẫu cuống lá chết của cây kim phát tài trong điều kiện *in vitro* trên các môi trường có bổ sung BA kết hợp với NAA là cao. Khi nồng độ BA tăng từ 1-4 mg/l kết hợp với 0,1 mg/l NAA, 100% mẫu phát sinh chồi và số chồi trung bình tạo thành trên mẫu cây tăng dần, đạt cao nhất ở môi trường có bổ sung 4 mg/l BA kết hợp với 0,1 mg/l NAA. Tuy nhiên, khi nồng độ BA tăng cao hơn (5-7 mg/l) thì khả năng tạo chồi giảm, tỷ lệ mẫu phát sinh chồi cũng như số lượng chồi trung bình tạo thành trên mẫu cây đều giảm dần. Giữa các môi trường, mức chênh lệch về chiều cao chồi là không lớn. Một số chồi tạo thành tạo rễ.

Vậy, môi trường hiệu quả nhất trong tái sinh cây từ mẫu cuống lá chết của cây kim phát tài là môi trường có bổ sung 4 mg/l BA kết hợp với 0,1 mg/l NAA.



Hình 1: Tái sinh cây từ mẫu cuống lá chết trên môi trường có bổ sung 1 mg/l BA kết hợp với 0.1 mg/l NAA sau 3 tháng nuôi cấy



Hình 2: Tái sinh cây từ mẫu cuống lá chết trên môi trường có bổ sung 3 mg/l BA kết hợp với 0.1 mg/l NAA sau 3 tháng nuôi cấy



Hình 3: Tái sinh cây từ mẫu cuống lá chết trên môi trường có bổ sung 4 mg/l BA kết hợp với 0.1 mg/l NAA sau 3 tháng nuôi cấy



Hình 4: Tái sinh cây từ mẫu cuống lá chết trên môi trường có bổ sung 7 mg/l BA kết hợp với 0.1 mg/l NAA sau 3 tháng nuôi cấy

Nghiên cứu tái sinh cây trong điều kiện *in vitro*, hay nghiên cứu nhân giống *in vitro* đã được thực hiện ở một số loài hoa, cây cảnh thuộc họ Araceae. Geier (1987) đã nghiên cứu ảnh hưởng của một số yếu tố đến sự tái sinh cây từ mảnh lá *Anthurium scherzerianum*. Harb và đồng tác giả (2010) đã nghiên cứu vi nhân giống *Anthurium andraeanum* từ đỉnh chồi. Tái sinh chồi trực tiếp từ mẫu lát mỏng của *Anthurium andraeanum* trên môi trường có bổ sung BA, Kinetin và Indole-3-acetic acid đã được thực hiện bởi Martin và đồng tác giả (2003). Xu và đồng tác giả (2005) đã phát sinh phôi soma trực tiếp và tái sinh cây từ mẫu lá của *Epipremnum aureum* ‘Golden Pothos’ khi sử dụng N-(2-chloro-4-pyridyl)-N¹-phenyl-lurea (CPPU) hay N-phenyl-N¹-1,2,3-thiadiazol-5-ylurea (TDZ) và NAA. Kết quả nghiên cứu tái sinh cây Kim phát tài (*Zamioculcas zamiifolia*) trực tiếp từ cuống lá chết trên môi trường MS có bổ sung BA và NAA của chúng tôi bổ sung thêm kỹ thuật nhân giống cho một loài cây cảnh của họ này.

III. KẾT LUẬN

Qua quá trình nghiên cứu, chúng tôi rút ra một số kết luận sau:

Khử trùng mẫu Kim phát tài lấy ngoài điều kiện tự nhiên bằng dung dịch HgCl₂ 0,1% trong thời gian 23 phút là thích hợp nhất trong các khoảng thời gian thăm dò, cho tỷ lệ mẫu sống đạt 64,53%.

Môi trường MS có 3% sucrose, 0,8% agar và bổ sung 4 mg/l BA kết hợp với 0,1 mg/l NAA là môi trường tốt nhất cho tái sinh cây từ mẫu cuống lá chết của cây Kim phát tài trong điều kiện *in vitro*.

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. **Harb, E. M., B. T. Neveen, M. W. Bothaina, A. E. Mamdough, A. O. Gamal**, 2010. Journal of Applied Sciences Research, 6(8): 927-931.
4. **Martin K.P., Joseph D., Madassery J., Philip V.J.**, 2003. In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant 39 (5): 500-504.
5. **Murashige, T., F. Skoog**, 1962. Physiologia Plantarum, 15 (3): 473-497.
6. **Xu, T., L. Zhang, X. Sun, K. Tang**, 2005. ACTA Biologica Cracoviensia Series Botanica, 47(2): 27-32.

IN VITRO PLANT PROPAGATION FROM PETIOLE OF *Zamioculcas zamiifolia* (Lodd.) Engl.

LE VAN TUONG HUAN, LE THI TRANG

SUMMARY

The optimal sterilizing condition for *in vitro* propagation of *Zamioculcas zamiifolia* was using HgCl₂ 0,1% solution in 23 minutes. Petiole explants (0,7 cm) were cultured on MS medium containing 3% sucrose, 0,8% agar and N⁶-Benzyl adenin (BA) at different concentrations combined with 0,1 mg/l α-Naphthalene acetic acid (NAA). Among examined media, the MS medium supplemented with 4 mg/l BA and 0,1 mg/l NAA was the best for plant propagation from petiole explants.