

NGHIÊN CỨU TẠO CỤM CHỒI TRONG ĐIỀU KIỆN *IN VITRO* Ở CÂY HOA PĂNG-XÊ

Lê Văn Tường Huân, Phan Văn Thuận
*Trường Đại học Khoa học,
Đại học Huế*

Hoa Păng-xê, hoa bướm bướm, hoa tím ba màu (*Viola tricolor* L.) là một loài thân thảo một năm hay nhiều năm và là một loài hoa đẹp thuộc họ Hoa tím (Violaceae). Chi Hoa tím (*Viola* L.) có khoảng 500 loài, ở Việt Nam chi này có 22 loài, nhiều loài được sử dụng (Nguyễn Tiến Bản, 2003; Võ Văn Chi, 2012). Số lượng hoa Păng-xê nằm trong top 10 về số lượng hoa được bán chạy hàng năm trên thế giới. Cây hoa Păng-xê từ lâu đã được dùng làm thuốc bổ tim, trị huyết áp cao, an thần, trị kinh phong, suyễn, lợi đờm,... Cây thường dùng để chữa các bệnh lở loét, lở ngứa, nấm,... Hoa được dùng trong trường hợp chóng sung, thấp khớp, hạ huyết áp (Nguyễn Tiến Bản, 2003; Võ Văn Chi, 2012),... Đặc biệt, hoa Păng-xê chứa một số cyclotides có hoạt tính gây độc, diệt được các tế bào ung thư (Trần Việt Hưng, 2000).

Cây hoa Păng-xê có nguồn gốc từ những vùng ôn đới châu Âu và châu Á, chúng phân bố ở khắp thế giới. Hoa Păng-xê được đưa từ Pháp vào nước ta từ đầu thế kỷ XX và đã thích nghi một số nơi như: Sapa, Ba Vì, Tam Đảo và các tỉnh Tây Nguyên. Đặc biệt ở Đà Lạt với khí hậu mát mẻ thì hoa Păng-xê gần như có quanh năm và đẹp nhất vào những tháng mùa khô, trời nắng hanh, se lạnh. Mặc dù cây hoa Păng-xê đã được nhập trồng tại Đà Lạt trong những năm vừa qua nhưng số lượng giống còn ít, hình dáng cây, hoa cũng như màu sắc hoa chưa được phong phú và đa dạng. Mặt khác, tuy ngày nay nhiều giống hoa mới được nhập trồng vào Việt Nam nhưng thị trường hoa Păng-xê vẫn chưa được mở rộng và đa dạng hóa chủng loại, giá thành nhập cây giống khá cao, khó có thể sản xuất trên diện rộng. Đồng thời, khả năng tái sinh cây mới trong thời gian khá dài (Trần Việt Hưng, 2000).

Bài báo này trình bày các kết quả nghiên cứu tạo cụm chồi từ đỉnh chồi trong điều kiện *in vitro* ở cây hoa Păng-xê nhằm xây dựng quy trình nhân giống vô tính *in vitro* cây hoa Păng-xê phục vụ nhu cầu sản xuất.

I. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

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 khác nhau tùy theo mục đích của từng thí nghiệm. Nguồn carbon là đường saccharose. 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 18 phút.

Các thí nghiệm được tiến hành ở điều kiện nhiệt độ $25 \pm 2^\circ\text{C}$, cường độ ánh sáng 2000-3000 lux và thời gian chiếu sáng là 16 giờ/ngày.

2. Nghiên cứu khả năng tạo cụm chồi từ đỉnh chồi trong điều kiện *in vitro*

Nghiên cứu ảnh hưởng của 6-Furfurylaminopurine (kinetin) riêng lẻ hay phối hợp với α -Naphthaleneacetic acid (NAA) lên khả năng tạo cụm chồi in vitro từ đỉnh chồi

Đỉnh chồi (khoảng 1 cm) tách từ các chồi *in vitro* được cấy lên môi trường cơ bản MS có 3% saccharose, 0,8% agar và bổ sung kinetin với các nồng độ 0-6 mg/L riêng lẻ hay phối hợp với 0,1 mg/L NAA để thăm dò khả năng tạo chồi của mẫu. Số liệu nghiên cứu được thu sau 5 tuần nuôi cấy.

Nghiên cứu ảnh hưởng của N⁶-Benzyladenine (BA) lên khả năng tạo cụm chồi in vitro từ đỉnh chồi

Đỉnh chồi (khoảng 1 cm) tách từ các chồi *in vitro* được cấy lên môi trường cơ bản MS có 3% saccharose, 0,8% agar và bổ sung BA với các nồng độ 0-5 mg/L để thăm dò khả năng tạo chồi của mẫu. Số liệu nghiên cứu được thu sau 5 tuần nuôi cấy.

Mỗi môi trường nuôi cấy 20 mẫu. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần.

3. 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 13.0 (SPSS Inc. Headquarters, United States, 2004).

II. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

1. Nghiên cứu ảnh hưởng của kinetin lên khả năng tạo cụm chồi *in vitro* từ đỉnh chồi

Các đỉnh chồi của cây hoa Păng-xê được cấy lên môi trường có bổ sung kinetin với các nồng độ khác nhau để nghiên cứu khả năng tạo cụm chồi. Kết quả sau 5 tuần nuôi cấy được trình bày ở bảng 1.

Bảng 1

Ảnh hưởng của kinetin lên khả năng tạo cụm chồi *in vitro* từ đỉnh chồi

Nồng độ Kin (mg/L)	Tỷ lệ mẫu tạo chồi (%)	Số chồi/mẫu cấy	Chiều cao chồi (cm)
0	100,00 a	1,06 g	5,94 a
1	100,00 a	1,71 f	4,10 b
2	100,00 a	2,29 e	3,46 c
3	100,00 a	3,06 d	3,08 d
4	100,00 a	3,56 b	2,98 e
5	100,00 a	4,11 a	2,14 f
6	83,33 b	3,28 c	3,00 d

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

Qua quá trình nghiên cứu, chúng tôi nhận thấy:

Ở môi trường cơ bản MS không bổ sung kinetin, chỉ có sự phát triển cao lên của đỉnh chồi. Trên môi trường này, chiều cao trung bình của chồi là 5,94 cm. Chồi phát triển tốt, lá xanh và một số mẫu cấy tạo rễ.

Ở các môi trường có bổ sung kinetin, đều cho khả năng tạo chồi *in vitro* từ đỉnh chồi. Trong đó, trên môi trường có bổ sung 1 mg/L kinetin, khả năng tạo chồi thấp. Số lượng chồi trung bình tạo thành trên mẫu cấy là 1,71 chồi. Chiều cao trung bình của chồi là 4,10 cm. Sau 8 ngày nuôi cấy, mẫu bắt đầu xuất hiện những chồi đầu tiên. Chồi phát triển tốt, lá xanh.

Ở môi trường có bổ sung 2 mg/L kinetin, khả năng tạo chồi cao hơn. Số lượng chồi trung bình tạo thành trên mẫu cấy là 2,29 chồi. Chiều cao trung bình của chồi là 3,46 cm. Sau 7 ngày nuôi cấy, mẫu bắt đầu nảy chồi. Chồi phát triển tốt, lá xanh.

Ở môi trường có bổ sung 3 mg/L kinetin, khả năng tạo chồi tăng. Số lượng chồi trung bình tạo thành trên mẫu cấy là 3,06 chồi. Chiều cao trung bình của chồi là 3,08 cm. Sau 7 ngày nuôi

cây, mẫu bắt đầu nảy chồi. Chồi phát triển tốt, lá xanh.

Ở môi trường có bổ sung 4 mg/L kinetin, khả năng tạo chồi tiếp tục tăng. Số lượng chồi trung bình tạo thành trên mẫu cây là 3,56 chồi. Chiều cao trung bình của chồi là 2,98 cm. Sau 7 ngày nuôi cấy, mẫu bắt đầu xuất hiện những chồi đầu tiên. Chồi phát triển tốt, lá xanh.

Trên môi trường có bổ sung 5 mg/L kinetin, khả năng tạo cụm chồi tốt nhất. Số lượng chồi trung bình tạo thành nhiều nhất (4,11 chồi/mẫu), chiều cao trung bình của chồi là 2,14 cm. Chồi xuất hiện sớm. Sau 6 ngày nuôi cấy, mẫu bắt đầu nảy chồi. Chồi phát triển tốt, lá xanh (Hình 1).

Nhưng khi tăng nồng độ kinetin lên đến 6 mg/L, lại cho kết quả không tốt, khả năng tạo chồi bắt đầu giảm. Số lượng chồi trung bình tạo thành giảm xuống 3,28 chồi/mẫu, chiều cao trung bình của chồi là 3,00 cm. Chồi xuất hiện muộn, sau 9 ngày nuôi cấy mẫu bắt đầu nảy chồi. Chồi sinh trưởng không tốt, lá xanh đậm. Lúc đầu, chồi phát triển bình thường nhưng hơi chậm. Sau 20 ngày nuôi cấy, chồi phát triển chậm dần, một số chồi có dấu hiệu bất thường, lá to, quăn, lá có màu xanh lục đậm, xuất hiện hiện tượng thủy tinh hóa, một số chồi vàng và chết.

Như vậy, môi trường có bổ sung kinetin với nồng độ 5 mg/L là môi trường tốt nhất để tạo cụm chồi *in vitro* từ đỉnh chồi.

Qua kết quả nghiên cứu trên cho thấy kinetin có khả năng kích thích tạo cụm chồi *in vitro* từ đỉnh chồi Păng-xê. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi phù hợp với kết quả nghiên cứu của Atique Akbar et al. (2006) trên cây chuối (*Musa sapientum* L.), nhận thấy môi trường có bổ sung kinetin thích hợp cho việc tạo cụm chồi chuối *in vitro*.



Hình 1: Tạo cụm chồi *in vitro* từ đỉnh chồi trên môi trường có bổ sung 5 mg/L kinetin sau 5 tuần nuôi cấy

2. Nghiên cứu ảnh hưởng của kinetin phối hợp với NAA lên khả năng tạo cụm chồi *in vitro* từ đỉnh chồi

Các đỉnh chồi của cây hoa Păng-xê được cấy lên môi trường có bổ sung kinetin với các nồng độ khác nhau, phối hợp với 0,1 mg/L NAA để nghiên cứu khả năng tạo cụm chồi. Kết quả sau 5 tuần nuôi cấy được trình bày ở bảng 2.

Qua quá trình nghiên cứu, chúng tôi nhận thấy, trên tất cả các môi trường đều có sự hình thành chồi. Ở các môi trường có bổ sung kinetin khác nhau thì khả năng tạo cụm chồi khác nhau.

Ở môi trường không bổ sung chất điều hòa sinh trưởng, đỉnh chồi phát triển theo hướng kéo dài chồi, chiều cao trung bình của chồi là 5,93. Chồi phát triển tốt, lá xanh và một số chồi tạo rễ.

Ở môi trường có bổ sung 1 mg/L kinetin kết hợp với 0,1 mg/L NAA, khả năng tạo cụm chồi yếu. Số lượng chồi trung bình tạo thành trên mẫu cây là 1,94 chồi, chiều cao trung bình của chồi là 3,67 cm. Sau 8 ngày nuôi cấy, mẫu bắt đầu nảy chồi. Chồi phát triển tốt, lá xanh.

Ở môi trường có bổ sung 2 mg/L kinetin kết hợp với 0,1 mg/L NAA, khả năng tạo chồi tăng lên. Số lượng chồi trung bình tạo thành trên mẫu là 2,47 chồi, chiều cao trung bình của chồi là

3,19 cm.

Bảng 2

Ảnh hưởng của kinetin phối hợp với NAA lên khả năng tạo cụm chồi *in vitro* từ đỉnh chồi

Nồng độ		Tỷ lệ mẫu tạo chồi (%)	Số chồi/mẫu cây	Chiều cao chồi (cm)
Kinetin (mg/L)	NAA (mg/L)			
0	0	100,00 a	1,07 f	5,93 a
1	0,1	100,00 a	1,94 e	3,67 b
2	0,1	100,00 a	2,47 d	3,19 c
3	0,1	100,00 a	3,44 c	2,89 d
4	0,1	100,00 a	3,82 b	2,82 d
5	0,1	100,00 a	4,56 a	2,50 f
6	0,1	94,12 b	3,61 c	2,65 e

Ở môi trường có bổ sung 3 mg/L kinetin kết hợp với 0,1 mg/L NAA, khả năng tạo chồi lại tăng lên. Số lượng chồi trung bình tạo thành trên mẫu cây là 3,44 chồi, chiều cao trung bình của chồi là 2,89 cm. Sau 8 ngày nuôi cấy, mẫu bắt đầu nảy chồi. Chồi phát triển tốt, lá xanh.

Ở môi trường có bổ sung 4 mg/L kinetin kết hợp với 0,1 mg/L NAA, khả năng tạo chồi tiếp tục tăng. Số lượng chồi trung bình tạo thành trên mẫu cây là 3,82 chồi, chiều cao trung bình của chồi là 2,82 cm. Sau 8 ngày nuôi cấy, mẫu bắt đầu xuất hiện những chồi đầu tiên. Chồi phát triển tốt, lá xanh.

Trên môi trường có bổ sung 5 mg/L kinetin kết hợp với 0,1 mg/L NAA, khả năng tạo chồi là tốt nhất. Số lượng chồi trung bình tạo thành trên mẫu là 4,56 chồi, chiều cao trung bình của chồi là 2,50 cm. Chồi xuất hiện sớm. Sau 5 ngày nuôi cấy, mẫu bắt đầu xuất hiện những chồi đầu tiên. Chồi phát triển tốt, lá xanh (Hình 2).



Hình 2: Tạo cụm chồi *in vitro* từ đỉnh chồi trên môi trường có bổ sung 5 mg/L kinetin kết hợp 0,1 mg/L NAA sau 5 tuần nuôi cấy

Nhưng khi tiếp tục tăng nồng độ kinetin lên 6 mg/L kết hợp với 0,1 mg/L NAA lại cho kết quả không tốt, khả năng tạo chồi giảm. Số lượng chồi trung bình tạo thành trên mẫu cây là 3,61 chồi, chiều cao trung bình của chồi là 2,65 cm. Chồi xuất hiện muộn. Sau 9 ngày nuôi cấy, mẫu bắt đầu xuất hiện những chồi đầu tiên. Chồi phát triển rất chậm, một số chồi có dấu hiệu bất thường, lá to, quăn, lá có màu xanh lục đậm, xuất hiện hiện tượng thủy tinh hóa, một số chồi héo ngọn và chết.

Như vậy, ở nồng độ thích hợp kinetin kết hợp với NAA có khả năng kích thích tạo cụm chồi. Tuy nhiên, khi kinetin ở nồng độ cao (6 mg/L) lại cho kết quả không tốt, một số chồi phát triển bất thường. Kinetin ở nồng độ 5 mg/L kết hợp với 0,1 mg/L NAA là tốt nhất cho khả năng tạo cụm chồi của mẫu.

Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cho thấy kinetin kết hợp thêm với NAA ở nồng độ thấp

cho kết quả tạo cụm chồi tốt hơn.

3. Nghiên cứu ảnh hưởng của BA lên khả năng tạo cụm chồi *in vitro* từ đỉnh chồi

Các đỉnh chồi của cây hoa Păng-xê được cấy lên môi trường có bổ sung BA với các nồng độ khác nhau. Kết quả sau 5 tuần nuôi cấy được trình bày ở bảng 3.

Bảng 3

Ảnh hưởng của BA lên khả năng tạo cụm chồi *in vitro* từ đỉnh chồi

Nồng độ BA (mg/L)	Tỷ lệ mẫu tạo chồi (%)	Số chồi/mẫu cấy	Chiều cao chồi (cm)
0	100,00 a	1,11 e	6,05 a
1	100,00 a	5,87 d	2,31 b
2	100,00 a	6,73 c	2,16 b
3	100,00 a	7,33 b	1,64 c
4	100,00 a	8,07 a	1,58 c
5	86,67 b	5,67 d	2,19 b

Qua quá trình nghiên cứu, chúng tôi nhận thấy ở tất cả các môi trường đều có sự hình thành chồi. Tuy nhiên, ở các môi trường có nồng độ BA khác nhau thì khả năng tạo chồi là khác nhau. Mẫu cấy không tạo callus và chỉ có tạo rễ trên môi trường không bổ sung BA.

Ở môi trường không bổ sung BA, đỉnh chồi phát triển theo hướng kéo dài chồi. Trên môi trường này, chiều cao trung bình của chồi là 6,05 cm. Chồi phát triển tốt, lá xanh và một số mẫu cấy có tạo rễ.

Ở môi trường có bổ sung 1 mg/L BA, khả năng tạo chồi tốt, số lượng chồi trung bình tạo thành trên mẫu cấy là 5,87 chồi, chiều cao trung bình của chồi là 2,31 cm. Sau 7 ngày nuôi cấy, có sự nảy chồi. Chồi phát triển tốt, lá xanh.

Ở môi trường có bổ sung 2 mg/L BA, khả năng tạo cụm chồi tăng lên. Số lượng chồi trung bình tạo thành trên mẫu cấy là 6,73 chồi, chiều cao trung bình của chồi là 2,16 cm. Sau 7 ngày nuôi cấy, mẫu bắt đầu nảy chồi. Chồi phát triển tốt, lá xanh.

Ở môi trường có bổ sung 3 mg/L BA, khả năng tạo chồi tiếp tục tăng. Số lượng chồi trung bình tạo thành trên mẫu cấy là 7,33 chồi, chiều cao trung bình của chồi là 1,64 cm. Sau 7 ngày nuôi cấy, mẫu bắt đầu nảy chồi. Chồi phát triển tốt, lá xanh.

Môi trường có bổ sung 4 mg/L BA cho khả năng tạo chồi tốt nhất. Số lượng chồi trung bình tạo thành trên mẫu cấy đạt 8,07 chồi, chiều cao trung bình của chồi là 1,58 cm. Chồi xuất hiện sớm. Sau 5 ngày nuôi cấy, mẫu bắt đầu nảy chồi. Chồi phát triển tốt, lá xanh (Hình 3).

Nhưng khi tăng nồng độ BA lên đến 5 mg/L, khả năng tạo chồi giảm. Số lượng chồi trung bình tạo thành trên mẫu cấy chỉ còn 5,67 chồi, chiều cao trung bình của chồi là 2,19 cm. Chồi xuất hiện muộn. Sau 9 ngày nuôi cấy, mẫu mới nảy chồi, chồi phát triển chậm. Một số chồi có dấu hiệu bất thường, lá to và quăn, lá có màu xanh lục đậm, xuất hiện hiện tượng thủy tinh hóa, một số chồi vàng và chết.

Từ kết quả trên cho thấy, BA có khả năng kích thích tạo cụm chồi từ nuôi cấy đỉnh chồi rất tốt. Tuy nhiên, khi nồng độ BA cao hơn ngưỡng thích hợp (5 mg/L) thì khả năng tạo chồi lại giảm.

Như vậy, môi trường có bổ sung BA với nồng độ 4 mg/L là môi trường tốt nhất để tạo cụm chồi *in vitro* từ đỉnh chồi.

Kết quả nghiên cứu của chúng tôi tương tự kết quả nghiên cứu của một số tác giả khác. Lakshmanan (1997) khi nghiên cứu ở cây hoa trang (*Ixora coccinea* L.) thấy rằng khả năng tái sinh chồi cao nhất trên môi trường Woody Plant Medium có bổ sung 2,5 μ M BA. Moncaleán et al. (2001) đã nghiên cứu nuôi cấy đỉnh chồi cây kiwi (*Actinidia deliciosa* C. F. Liang. & A. R. Ferguson.) và nhận thấy môi trường có bổ sung BA là môi trường tối ưu để tạo cụm chồi *in vitro*.

Khi so sánh kết quả ảnh hưởng của kinetin và BA lên khả năng tạo cụm chồi *in vitro* ở cây hoa Păng-xê thì nhận thấy cả kinetin và BA đều kích thích tạo cụm chồi tốt nhưng BA cho hiệu quả cao hơn.

III. KẾT LUẬN

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

Trong các môi trường cơ bản MS có bổ sung KIN nghiên cứu, môi trường có bổ sung 5 mg/L KIN là môi trường tốt nhất cho tạo cụm chồi *in vitro* từ đỉnh chồi.

Trong các môi trường cơ bản MS có bổ sung KIN kết hợp NAA nghiên cứu, môi trường có bổ sung 5 mg/L KIN kết hợp với 0,1 mg/L NAA là tốt nhất cho tạo cụm chồi *in vitro* từ đỉnh chồi.

Trong các môi trường cơ bản MS có bổ sung BA nghiên cứu, môi trường có bổ sung 4 mg/L BA là môi trường tốt nhất cho tạo cụm chồi *in vitro* từ đỉnh chồi.

Các kết quả nghiên cứu là cơ sở cho nhân giống vô tính *in vitro* ở đối tượng này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Nguyễn Tiến Bản** (Chủ biên). 2003. Danh lục các loài thực vật Việt Nam. Nxb. Nông nghiệp. Tập 2. Trang 384-389.
2. **Võ Văn Chi**. 2012. Từ điển cây thuốc Việt Nam. Nxb. Y học. Tập 1. Trang 1080.
3. **Trần Việt Hưng**, 2000: Hoa Pensée, *Vietnamese Pharmacists Association in the USA* ([http:// www.Vphausa. Org](http://www.Vphausa.Org)).
4. **Atique Akbar M. and Shyamal Roy K.**, 2006. Effects of liquid medium on rooting and acclimation of regenerated microshoots of banana (*Musa sapientum* L.) cv. Sagar, *Plant Tissue Culture & Biotech*, 16(1): 11-18.
5. **Grodzinxki A. M. Grodzinxki D. M.** 1981. Sách tra cứu tóm tắt về sinh lý thực vật. Nxb. Khoa học và Kỹ thuật.
6. **Laskhmanam P., Lee C. L. & Goh C. J.**, 1997. An efficient *in vitro* method for mass propagation of woody ornamental *Ixora coccinea* L., *Plant Cell Reports*, 16: 572-577.



Hình 3: Tạo cụm chồi *in vitro* từ đỉnh chồi trên môi trường có bổ sung 4 mg/L BA sau 5 tuần nuôi cấy

7. **Moncaleán P., Rodrigier A. & Ternánder B.,** 2001: *In vitro* response of *Actinidia deliciosa* explants to different BA incubation periods, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 67(3): 257-266.
8. **Murashige T. and Skoog F.,** 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum*, 15(3): 473-479.

STUDY ON *IN VITRO* SHOOT PRODUCTION OF PANSY

Le Van Tuong Huan, Phan Văn Thuan

SUMMARY

Shoot tips of pansy (1cm) were cultured on MS (Murashige, Skoog, 1962) medium containing 3% sucrose; 0.8% agar; and supplemented with kinetin, α -Naphthaleneacetic acid (NAA) or N⁶-Benzyladenine (BA) to investigate *in vitro* shoot production. Among MS media supplemented with kinetin (0-6 mg/L), the medium supplemented with 5 mg/L kinetin was the best for *in vitro* shoot production from shoot tips. Among MS media supplemented with different concentrations of kinetin in combination with 0.1 mg/L NAA, the medium supplemented with 5 mg/l kinetin and 0.1 mg/L NAA was the best for *in vitro* shoot production from shoot tips. Among MS media supplemented with BA (0-5 mg/L), the medium supplemented with 4 mg/L BA was the best for *in vitro* shoot production from shoot tips. These results can be used for *in vitro* propagation of pansy.