

HIỆU QUẢ CỦA BENZYL ADENIN (BA), INDOLE BUTYRIC ACID (IBA) VÀ THAN HOẠT TÍNH TRÊN SỰ TẠO CHỒI VÀ RA RỄ CỦA CÂY DƯA HẦU TAM BỘI (*CITRULLUS VULGARIS* SCHRAD.) *IN VITRO*

Trần Thanh Truyên¹, Lâm Ngọc Phương¹ và Ngô Phương Ngọc¹

¹ Khoa Nông nghiệp & Sinh học Ứng dụng, Trường Đại học Cần Thơ

Thông tin chung:

Ngày nhận: 26/9/2014

Ngày chấp nhận: 07/11/2014

Title:

Effects of 6-benzyladenine (BA), indole-3-butyric acid (IBA) and activated charcoal on in vitro shoot and root formation of triploid watermelon (*Citrullus vulgaris* Schrad.)

Từ khóa:

BA, *Citrullus vulgaris* Schrad., dưa hấu tam bội, IBA, *in vitro*, nhân chồi, than hoạt tính, tạo rễ

Keywords:

Activated charcoal, BA, *Citrullus vulgaris* Schrad., IBA, triploid watermelon, shoot multiplication, rooting

ABSTRACT

The purpose of this study was to find out the suitable concentration of plant growth regulators and activated charcoal for shoot multiplication and rooting for triploid watermelon of Tri P1 line. The experiment was arranged in a randomized complete design with 10 treatments and 5 replicates, each replicate was equal 20 plants. The results showed that MS medium supplemented only BA at 1.0 mg/L have the highest shoot regeneration in triploid watermelon Tri P1 after 3 weeks of culture. The suitable medium was MS with concentrations of 1.0 mg/L BA for number of healthy shoots, hyperhydricity may be limited. At the same time, number of leaves, shoot length well were achieved on the medium supplemented with 1.0 mg/L BA and 2.0 g/L activated carbon after 3 weeks of culture. The number of roots, root length, number of leaves, and shoot length of triploid watermelon plantlets were best recorded in medium supplemented with 0.5 mg/L IBA and 2.0 g/L activated charcoal.

TÓM TẮT

Mục đích của nghiên cứu là tìm ra nồng độ chất điều hòa sinh trưởng và than hoạt tính thích hợp cho việc nhân chồi và tạo rễ cho dòng dưa hấu tam bội Tri P1. Thí nghiệm được bố trí theo thể thức hoàn toàn ngẫu nhiên với 5 lần lặp lại, mỗi lần lặp lại 4 mẫu. Kết quả thí nghiệm cho thấy môi trường MS chỉ bổ sung nồng độ BA 1,0 mg/L cho hiệu quả tái sinh chồi dưa hấu tam bội Tri P1 cao nhất sau 3 tuần nuôi cấy. Môi trường thích hợp cho việc nhân chồi dưa hấu tam bội là môi trường MS bổ sung BA nồng độ 1,0 mg/L cho số chồi khỏe, hạn chế bị thủy tinh thể. Đồng thời, nồng độ BA 1,0 mg/L cùng than hoạt tính 2,0 g/L cho số lá, chiều cao cây tốt sau 3 tuần nuôi cấy. Số rễ, chiều dài rễ cũng như số lá và chiều cao cây dưa hấu tam bội tốt nhất được ghi nhận ở môi trường bổ sung IBA 0,5 mg/L và than hoạt tính 2,0 g/L.

1 GIỚI THIỆU

Nuôi cấy mô thực vật là công cụ đắc lực để nhân nhanh dòng của đa số các cây thân thảo, làm giảm giá thành các cây lai F1. Trên thế giới đã có nhiều thành công trong nghiên cứu về vi nhân giống cây dưa hấu *in vitro* (Adelberg và *ctv.*, 1997;

Compton và *ctv.*, 2004). Phương pháp này khắc phục được những hạn chế về sản xuất hạt giống hàng năm, năng suất lại thấp, giá thành cao, hạt nảy mầm lại kém, cây con yếu. Nhân chồi và tạo rễ là hai giai đoạn quyết định số lượng chồi và tạo thành cây hoàn chỉnh của kỹ thuật vi nhân giống. Trong

môi trường nhân chồi và tạo rễ thì chất điều hòa sinh trưởng BA và IBA thường được sử dụng. Ngoài ra, trong môi trường nuôi cấy mô, theo một số thí nghiệm cho thấy than hoạt tính được bổ sung vào để trung tính hóa ảnh hưởng ức chế và gây độc của các chất phenol. Than hoạt tính có tác dụng khử độc, kích thích sự tăng trưởng. Khả năng kích thích sự tăng trưởng của tế bào mô thực vật là do than hoạt tính kết hợp với các hợp chất phenol độc do mô tiết ra trong suốt thời gian nuôi cấy. Than hấp thu các hợp chất ức chế sự phát triển của cây, hấp thu các hợp chất hữu cơ, tăng khả năng hình thành phôi và tăng việc hình thành rễ (George, 1993). Mục đích của nghiên cứu là tìm nồng độ chất điều hòa sinh trưởng và than hoạt tính thích hợp cho việc nhân chồi và tạo rễ cho dòng dưa hấu tam bội Tri P1.

2 PHƯƠNG TIỆN VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1 Vật liệu

Các hạt lai dưa hấu tam bội Tri P1 được tạo thành từ các trái lai ngoài đồng giữa cây mẹ tứ bội dòng TPT và phân cây cha nhị bội Thành Long do phòng thí nghiệm cây mô thuộc Bộ môn Sinh lý-Sinh hóa cung cấp.

2.2 Phương pháp

Các hạt dưa hấu tam bội Tri P1 được vô trùng theo Lâm Ngọc Phương và Nguyễn Bảo Vệ (2006) trước khi được cấy vào môi trường cơ bản MS (Murashige và Skoog, 1962). Nghiên cứu gồm 2 thí nghiệm được bố trí theo thể thức hoàn toàn ngẫu nhiên hai nhân tố.

Thí nghiệm 1: Hiệu quả của BA và than hoạt tính trên sự nhân chồi và sinh trưởng của dòng/giống dưa hấu tam bội Tri P1

Thí nghiệm có 8 nghiệm thức gồm 4 mức nồng độ BA (0; 0,5; 1 và 2 mg/L) và hai hàm lượng than hoạt tính (0 và 2 g/L). Mỗi nghiệm thức có 3 lần lặp lại, mỗi lần lặp lại 2 keo, mỗi keo cấy 4 mẫu.

Chỉ tiêu theo dõi: Số chồi gia tăng, số lá gia tăng, chiều cao gia tăng (cm).

Thí nghiệm 2: Hiệu quả của IBA và than hoạt tính lên sự tạo rễ và phát triển của dưa hấu tam bội Tri P1

Thí nghiệm có 10 nghiệm thức gồm 5 mức nồng độ IBA (0; 0,2; 0,5; 1 và 2 mg/L) và hai hàm lượng than hoạt tính (0 và 2 g/L). Mỗi nghiệm thức có 3 lần lặp lại, mỗi lần lặp lại 2 keo, mỗi keo cấy 4 mẫu.

Chỉ tiêu theo dõi: Tỷ lệ ra rễ (%), số rễ, chiều dài rễ (cm), chiều cao, số lá.

Môi trường nuôi cấy là môi trường cơ bản theo công thức của Murashige và Skoog, 1962 (MS) có bổ sung các vitamin (thiamin, pyridoxin, nicotinic) 1 mg/L, myo-inositol 0,1 g/L, agar 7 g/L, đường sucrose 30 g/L, nước dừa 100 ml/l và chất điều hòa sinh trưởng BA, IBA. Tùy theo từng thí nghiệm mà bổ sung chất điều hòa sinh trưởng ở các nồng độ khác nhau. pH môi trường được điều chỉnh về 5,8 trước khi nấu. Môi trường được rót 50 mL vào keo cấy nắp có lỗ và hấp thanh trùng ở nhiệt độ 121°C, áp suất 1 atm. trong 20 phút.

Các số liệu được thu thập, xử lý thống kê và phân tích phương sai bằng phần mềm SPSS 16.0, kiểm định Duncan ở mức ý nghĩa 1% và 5%.

3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Hiệu quả của BA và than hoạt tính trên sự nhân chồi và sinh trưởng của dòng/giống dưa hấu tam bội Tri P1

Số chồi gia tăng

Bảng 1 cho thấy nồng độ BA trong môi trường nuôi cấy có ảnh hưởng đến số chồi gia tăng của dưa hấu tam bội 3 TSKC. Cụ thể ở nồng độ BA 2 mg/L cho 2,9 chồi khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức 1% so với đối chứng và nồng độ BA 0,5 mg/L cho (1,4 – 2,6 chồi) nhưng không khác biệt so với nồng độ BA 1,0 mg /L cho 2,8 chồi. Than hoạt tính đã ảnh hưởng đến hệ số nhân chồi. Môi trường không bổ sung than trung bình đạt 2,6 chồi khác biệt thống kê ở mức 1% so với môi trường có bổ sung than trung bình đạt 2,3 chồi.

Có sự tương tác giữa nồng độ BA và than đến số chồi gia tăng ở mức ý nghĩa 1%. Cụ thể nghiệm thức BA 2 mg/L - không than cho số chồi cao nhất (3,3 chồi) khác biệt thống kê so với các nghiệm thức còn lại nhưng không khác biệt so với nghiệm thức BA 1,0 mg /L - không than (2,6 chồi). Ngoài ra, nghiệm thức không bổ sung than cho số chồi thấp nhất 1,2 chồi.

Bảng 1: Số chồi gia tăng (cm) chồi dưa hấu Tri P1 3TSKC

BA (mg/L) (B)	Than (2 g/l) (A)		Trung bình (B)
	Không	Có	
0,0	1,2e	1,5d	1,4c
0,5	2,7bc	2,4c	2,6b
1,0	3,0ab	2,6c	2,8a
2,0	3,3 a	2,5c	2,9a
Trung bình (A)	2,6a	2,3b	

Ghi chú: Các số có chữ theo sau giống nhau thì không khác biệt có ý nghĩa thống kê theo kiểm định Duncan 5%

Như vậy, nhìn chung môi trường có bổ sung than cho hệ số nhân chồi giảm. Điều này có thể do

than hoạt tính có khả năng hấp thu các hợp chất ức chế, nhưng cũng đồng thời hấp thu các hợp chất hữu cơ, chất điều hòa sinh trưởng trong môi trường nuôi cấy (George, 1993).

Trong vi nhân giống dưa hấu tứ bội và nhị bội, môi trường MS bổ sung BA nồng độ 1 mg/L có hiệu quả cao cho việc hình thành chồi (Kapiel và ctv., 2004). Tuy nhiên, số chồi đạt được còn thấp so với nhiều báo cáo nhân chồi dưa hấu (Compton và ctv., 1992) (5-11 chồi); Lâm Ngọc Phương và Nguyễn Bảo Vệ (2006) (6-8 chồi). Mặc dù, nghiệm thức 2 mg BA/L cho số chồi nhiều nhất, nhưng đa số chồi là những chồi búp. Việc sử dụng BA ở nồng độ cao để nhân chồi đã được các nhà khoa học khuyến cáo về các rối loạn hình thái cơ quan, như tạo nhiều cành, chồi tụ hợp, hình thành các dạng lá và cuống thay đổi... thường do ảnh hưởng liều lượng cao của hóa chất thêm vào môi trường (Lâm Ngọc Phương và Nguyễn Bảo Vệ, 2006). Trong các thí nghiệm đầu tiên trên dưa hấu tam bội nồng độ BA 5 mg/L xuất hiện chồi bất thường (Lâm Ngọc Phương và Nguyễn Bảo Vệ, 2006).

Số lá gia tăng

Bảng 2 cho thấy than hoạt tính có ảnh hưởng đến số lá gia tăng 3 TSKC của dưa hấu tam bội Tri P1 khác biệt 1% so với môi trường không than. Môi trường có than cho 4,6 lá so với môi trường không bổ sung than là 3,6 lá. Ngoài ra, trong môi trường có than số lá gia tăng xanh, to hơn so với môi trường không bổ sung than. Nồng độ BA cũng ảnh hưởng đến số lá gia tăng. Số lá cao nhất ở nồng độ BA 0,5 mg/L (4,4 lá), khác biệt thống kê ở mức ý nghĩa 1% so với BA 2 mg/L (3,9 lá) nhưng không khác biệt so với đối chứng. Điều này có nghĩa là khi tăng nồng độ BA (0,5 – 2 mg BA/L) không làm tăng số lá. Không có sự tương tác giữa nồng độ BA và than lên sự hình thành số lá gia tăng. Kết quả của Nguyễn Ngọc Vũ (2008), cho thấy dưa hấu Sugar Baby với số lá tăng nhiều nhất trên môi trường không bổ sung BA.

Bảng 2: Số lá gia tăng của dưa hấu tứ bội 3TSKC

BA (mg/l) (B)	Than (2 g/l) (A)		Trung bình (B)
	Không	Có	
0,0	3,6	4,9	4,3a
0,5	4,0	4,9	4,4a
1,0	3,9	4,4	4,2ab
2,0	3,6	4,1	3,9b
Trung bình (A)	3,8b	4,6a	

Ghi chú: Các số có chữ theo sau giống nhau thì không khác biệt có ý nghĩa thống kê theo kiểm định Duncan 5%

Chiều cao gia tăng

Theo Bảng 3 than hoạt tính không ảnh hưởng đến chiều cao 3 (TSKC) của dưa hấu tam bội T3PT. Cụ thể ở mức đối chứng cho chiều cao gia tăng nhiều nhất (1,4 cm) khác biệt thống kê 1% so với những môi trường có bổ sung nồng độ BA (0,5 – 2 mg BA/L). Bên cạnh đó môi trường có nồng độ BA 2 mg/L cho chiều cao gia tăng thấp nhất (0,94 cm). Điều này có nghĩa là khi tăng nồng độ BA thì chiều cao giảm. Kết quả này cũng được ghi nhận trước đó khi có mặt chất điều hòa sinh trưởng chiều cao chồi dưa hấu bị hạn chế (George, 1993).

Bảng 3: Chiều cao chồi gia tăng (cm) của dưa hấu tam bội Tri P1 3 TSKC

BA (mg/L) (B)	Than (2 g/L) (A)		Trung bình (B)
	Không	Có	
0,0	1,38	1,43	1,40a
0,5	1,00	1,23	1,11a
1,0	1,10	1,10	1,10a
2,0	0,93	0,96	0,94b
Trung bình (A)	1,10	1,18	

Ghi chú: Các số có chữ theo sau giống nhau thì không khác biệt có ý nghĩa thống kê theo kiểm định Duncan 5%

Nhìn chung, nồng độ BA 1 mg/L thích hợp để nhân chồi dưa hấu tam bội Tri P1. Thời điểm này, BA ngoại sinh đã có tác dụng lên việc tạo chồi, kích thích chồi bên nên mẫu cây dần xuất hiện những chồi nhỏ sau đó phát triển lá. Tuy nhiên, việc kích thích chồi của BA không nhiều vì cây đang trong giai đoạn trẻ hóa nên ở môi trường không bổ sung BA chiều cao và số lá nhiều hơn.

3.2 Hiệu quả của IBA và than hoạt tính lên sự tạo rễ và phát triển của dưa hấu tam bội Tri P1

Tỉ lệ ra rễ

Kết quả Bảng 4 cho thấy ở tất cả các chồi dưa ở các nghiệm thức đều có sự ra rễ với các mức độ khác nhau. Khả năng ra rễ có tương quan với sự hiện diện của than cũng như hàm lượng IBA. Tất cả các nghiệm thức có than đều cho phần trăm tạo rễ rất cao. Trong khi đó ở nghiệm thức không than kết hợp với IBA (0 - 0,2 mg/L) cho tỷ lệ ra rễ rất thấp (dưới 50%). Than hoạt tính có lợi cho sự tăng trưởng do các đặc tính sần như màu đen sẽ làm môi trường “tối” nên tạo điều kiện nuôi cấy tương tự như trong đất giúp rễ dễ dàng phát triển và hấp thu được các chất dinh dưỡng trong môi trường nuôi cấy (Pan & Staden, 1998).

Bảng 4: Tỷ lệ (%) chồi tạo rễ của dưa hấu tam bội Tri P1 3 TSKC trên các môi trường có IBA và than hoạt tính khác nhau

Nồng độ IBA (mg/L)	Hàm lượng than (g/L)		Trung bình
	0	2	
0	65 bc	100 a	82,5 ab
0,2	45 c	95 a	70,0 b
0,5	85 ab	100 a	92,5 a
1	90 a	100 a	95,0 a
2	85 ab	100 a	92,5 a
Trung bình	74 b	99 a	

Ghi chú: Các số có chữ theo sau giống nhau thì không khác biệt có ý nghĩa thống kê theo kiểm định Duncan 5%

Số rễ

Kết quả Bảng 5 cho thấy có sự khác biệt có ý nghĩa về số rễ giữa các nồng độ có nồng độ IBA từ 0,5 đến 2 mg/L và nghiệm thức 0; 0,2 mg/L. Ở cả hai nồng độ than và nồng độ IBA đều khác biệt có ý nghĩa thống kê. Số rễ ở môi trường có than (2 g/L) cao hơn với 6,4 rễ so với môi trường không than là 3,2 rễ, khác biệt có ý nghĩa ở mức 5%.

Bảng 5: Số rễ/mẫu cây 3 TSKC trên các môi trường có IBA và than hoạt tính khác nhau

Nồng độ IBA (mg/l)	Hàm lượng than (g/L)		Trung bình
	0	2	
0	1,6 e	6,0 abc	3,8 b
0,2	1,9 e	5,2 bcd	3,5 b
0,5	4,5 cd	7,2 a	5,8 a
1	4,3 cd	7,5 a	5,9 a
2	3,8 d	6,3 ab	5,1 a
Trung bình	3,2 b	6,4 a	

Ghi chú: Các số có chữ theo sau giống nhau thì không khác biệt có ý nghĩa thống kê theo kiểm định Duncan 5%

Chiều dài rễ

Bảng 6 cho thấy chiều dài rễ có sự khác biệt rõ rệt giữa các môi trường có than 6,61 cm và không than 2,08 cm, cũng như ở nồng độ IBA cao (0,5; 1; 2 mg/L) và IBA thấp. Kết quả trên phù hợp với nhiều kết quả ra rễ in vitro.

Như vậy, ở chỉ tiêu ra rễ có sự khác biệt rõ rệt giữa các nghiệm thức có than và không than, cũng như giữa các nghiệm thức có nồng độ IBA cao và IBA thấp và sự khác biệt này có ý nghĩa thống kê. Cho nên trong môi trường có than dù ở nồng độ IBA nào thì số rễ và chiều dài rễ vẫn khác biệt so với không có than. Tương tự, ở môi trường có IBA cao (0,5; 1; 2 mg/L) cũng có số rễ, chiều dài rễ khác biệt ý nghĩa so với các nồng độ IBA thấp cho dù có than hay không.

Bảng 6: Chiều dài rễ (cm) dưa hấu tam bội Tri P1 3 TSKC trên các môi trường có IBA và than hoạt tính khác nhau

Nồng độ IBA (mg/l)	Hàm lượng than (g/L)		Trung bình
	0	2	
0	0,94 c	6,31 a	3,62 b
0,2	1,46 bc	5,75 a	3,60 b
0,5	2,42 bc	6,46 a	4,44 ab
1	2,75 b	7,36 a	5,05 a
2	2,87 b	7,16 a	5,01 a
Trung bình	2,08 b	6,61 a	4,35

Ghi chú: Các số có chữ theo sau giống nhau thì không khác biệt có ý nghĩa thống kê theo kiểm định Duncan 5%

Chiều cao

Chiều cao các mẫu cây tăng nhanh sau khi cấy, có sự khác biệt rõ giữa môi trường có than 4,53 cm và không than (3,35 cm). Tuy nhiên, nồng độ IBA cao khác biệt không ý nghĩa về chiều cao so với nồng độ thấp ở 3 tuần sau khi cấy (Bảng 7).

Có sự tương tác giữa nồng độ IBA và than hoạt tính. Nồng độ IBA 0,5 mg/L+ than cho chiều chồi tăng tốt nhất (Bảng 7).

Bảng 7: Chiều cao chồi gia tăng (cm) 3 TSKC trên các môi trường có IBA và than hoạt tính khác nhau

Nồng độ IBA (mg/l)	Hàm lượng than (g/l)		Trung bình
	0	2	
0	2,60 d	3,80 abcd	3,20
0,2	3,62 abcd	4,92 ab	4,27
0,5	3,01 cd	5,12 a	4,06
1	4,29 abcd	4,18 abcd	4,24
2	3,23 bcd	4,64 abc	3,93
Trung bình	3,35 b	4,53 a	3,94

Ghi chú: Các số có chữ theo sau giống nhau thì không khác biệt có ý nghĩa thống kê theo kiểm định Duncan 5%

Số lá

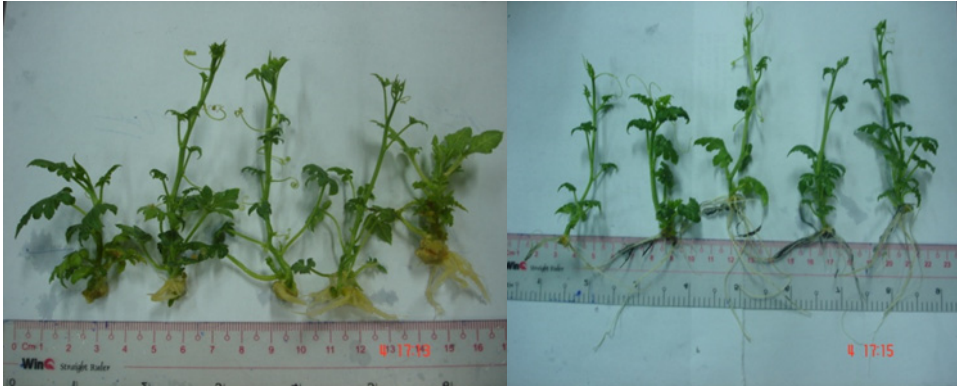
Bảng 8: Số lá dưa hấu tam bội gia tăng sau 3 TSKC trên môi trường có IBA và than hoạt tính khác nhau

Nồng độ IBA (mg/l)	Hàm lượng than (g/L)		Trung bình
	0	2	
0	5,2 ab	3,8 b	4,5 b
0,2	6,1 ab	5,6 ab	5,9 ab
0,5	5,5 ab	6,4 a	5,9 ab
1	7,0 a	5,8 ab	6,4 a
2	5,3 ab	5,5 ab	5,4 ab
Trung bình	5,8	5,4	5,6

Ghi chú: Các số có chữ theo sau giống nhau thì không khác biệt có ý nghĩa thống kê theo kiểm định Duncan 5%

Sau 3 tuần nuôi cấy, Bảng 8 cho thấy số lá ở môi trường có than và không than không khác biệt

thống kê. Nồng độ IBA 0,5 mg/L cho số lá tăng tốt nhất là 6,4 lá.



Hình 1: Sự tạo rễ của chồi dưa hấu tam bội Tri PI 3TSKC trên các môi trường có các nồng độ IBA, không than (A) và có than (B)

4 KẾT LUẬN

Môi trường MS bổ sung nồng độ BA 1,0 mg/l thích hợp cho việc nhân chồi dưa hấu tam bội, số chồi khỏe, không bị thủy tinh thể. Đồng thời, nồng độ BA 1,0 mg/L cùng than hoạt tính 2,0 g/L cho số lá, chiều cao cây tốt sau 3 tuần nuôi cấy. Môi trường bổ sung IBA 0,5 mg/L và than hoạt tính 2,0 g/L thích hợp cho việc ra rễ với số rễ, chiều dài rễ cũng như số lá và chiều cao cây dưa hấu tam bội tốt nhất.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Adelberg J. W., Zhang X. P. and Rhodes B. B. (1997), "Micropropagation of *Citrullus lanatus* (Thumb.) Matsum and Nakai (watermelon)", *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, Vol. 39, High-Tech and Micropropagation V (ed. By Y.P.S. Bajaj) Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
2. Compton M.E. Gray D. J. and Gaba V. P. (2004), "Use of tissue culture and biotechnology for the genetic improvement of watermelon", *Plant Cell Tiss., Organ Cult.*, 77, pp. 231-243.
3. George E. F. (1993), *Plant propagation by tissue culture*, Part 1 and 2. Edington, Wilts, England, Exegetics Ltd. 1361p.
4. Lâm Ngọc Phương và Nguyễn Bảo Vệ (2006), Ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng thực vật IBA, BA và than hoạt tính đến sự tạo rễ của chồi dưa hấu tam bội in vitro (*Citrullus vulgaris* Schrad.). *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn*, kỳ 2, tháng 1/2006, trang 39-44.
5. Murashige T. & Skoog F. (1962), "A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures", *Plant Physiol*, 15, pp. 473- 497.
6. Nguyễn Ngọc Vũ (2008), Hiệu quả của auxin, cytokinin và than hoạt tính lên sự tạo chồi và ra rễ dưa hấu Thành Long và Sugar Baby in vitro. Luận văn tốt nghiệp đại học. Tủ sách Đại Học Cần Thơ. Cần Thơ.
7. Pan M. J. & Staden V. J. (1998), The use of charcoal in in vitro culture: review. *J. Plant Grow. Reg.*, 26: 155-163.
8. Kapiel T., Nasr M. I., Ibrahim I. A. and Habit H. M. (2004), *Micropropagation of Watermelon*, Kitchen Culture Kits, Inc.