

NGHIÊN CỨU NHÂN NHANH *IN VITRO* CỎI BÔNG TRẮNG *CYPERUS TAGETIFORMIS* LAM.

Study on Micropropagation of *Cyperus tagetiformis* Lam

Nguyễn Thị Phương Thảo¹, Nguyễn Thị Thủy¹, Ngọc Thị Thanh Huyền¹,
Nông Thị Huệ¹, Nguyễn Tất Cảnh²

¹Khoa Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Nông nghiệp Hà Nội

²Khoa Nông học, Trường Đại học Nông nghiệp Hà Nội

Địa chỉ email tác giả liên lạc: nthue86sh@gmail.com

Ngày gửi đăng: 23.12.2010; Ngày chấp nhận: 08.3.2011

TÓM TẮT

Nghiên cứu này được tiến hành trên giống cỏi bông trắng (*Cyperus tagetiformis* Lam) nhằm xây dựng một quy trình nhân nhanh *in vitro* từ đoạn thân ngầm mang mắt ngủ cây cỏi. Kết quả đã xác định được chế độ khử trùng đoạn thân ngầm mang mắt ngủ giống cỏi bông trắng là $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ 5% trong thời gian 15 phút, cho 100% mẫu sống và tái sinh. Môi trường thích hợp nhất để khởi động mẫu là MS + 1,5 mg/l BA + 30 g/l đường. Chồi cỏi bông trắng nhân tốt nhất trên môi trường MS + 1,5 mg/l Ki + 0,5 mg/l α -NAA. Than hoạt tính có tác dụng tốt trong việc tạo rễ cho chồi *in vitro* ở nồng độ 1 mg/l.

Từ khoá: Benzyl adenine (BA); carex, cỏi, *Cyperus*, kinetin; nhân giống vô tính *in vitro*, than hoạt tính, α -NAA.

SUMMARY

This study was carried out to establish a protocol for rapid propagation of *Cyperus tagetiformis* Lam using underground stems with dormant buds. The optimal sterilization time was 15 minutes in $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ 5%, resulting in 100% survival and plant regeneration. The most suitable medium to initiate culture from explants was MS medium added with 1.5 mg/l BA plus + 30 g/l sugar. The highest shoot induction rate was highest on MS medium with addition of 1.5 mg/l Ki and 0.5 mg/l α -NAA. On the other hand, root induction was highest on MS medium containing 1 mg/l of activated charcoal.

Key words: Benzyl adenine (BA); carex; charcoal, *Cyperus*, kinetin, micropropagation, α - NAA.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Cây cỏi (thuộc chi *Cyperus* L.) không những có khả năng cải tạo đất mà còn được sử dụng để sản xuất nhiều mặt hàng thủ công mỹ nghệ như chiếu, thảm, dép, mũ... Cây cỏi thích nghi với nhiều loại đất, đặc biệt là vùng đất mặn nên cây cỏi hiện đang được phát triển rất mạnh ở các vùng ven biển của Việt Nam.

Trong các giống cỏi hiện có ở Việt Nam, giống cỏi Cỏi khoang bông trắng (*Cyperus tagetiformis* Lam.) có nhiều phẩm chất tốt cho chế biến các mặt hàng thủ công như: tiem cỏi dài, thân tương đối tròn, to, sợi chắc, trắng và bền. Để cung cấp giống cỏi này cho các vùng sản xuất, phương pháp nhân giống được áp dụng phổ biến hiện nay là nhân giống vô tính bằng thân ngầm.

trong xà phòng 30 phút sau đó rửa sạch dưới vòi nước và đưa vào buồng cấy vô trùng. Trong buồng cấy vô trùng, tráng mẫu cấy qua 1 lần bằng nước cất vô trùng trước khi xử lý với ethanol 70°C trong 30 giây và tráng lại một lần bằng nước cất vô trùng. Sau đó, các mẫu cấy được ngâm trong dung dịch $HgCl_2$ 0,1% và $Ca(OCl)_2$ 5% trong các khoảng thời gian khác nhau.

Môi trường nuôi cấy

Nghiên cứu sử dụng môi trường MS cơ bản có bổ sung 30 g/l đường, 6,5 g/l agar, các chất điều tiết sinh trưởng BA, α - NAA, Kinetin, IBA và than hoạt tính tùy mục đích thí nghiệm, pH = 5,7.

Điều kiện nuôi cấy

Nhiệt độ 24°C, cường độ chiếu sáng 2000 - 2500 lux, thời gian chiếu sáng 16h/ngày.

Phương pháp bố trí thí nghiệm

Thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên, mỗi công thức 3 lần lặp lại, mỗi lần lặp lại 9 - 15 bình. Số liệu được xử lý bằng phần mềm Excel và IRRISTAT 4.0.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Nghiên cứu tạo vật liệu khởi đầu

$HgCl_2$ và $Ca(OCl)_2$ là hai chất khử trùng được sử dụng phổ biến hiện nay. Tuy nhiên, chế độ khử trùng thích hợp cho các đối tượng khác nhau là hoàn toàn khác nhau. Hiệu quả khử trùng của $HgCl_2$ và $Ca(OCl)_2$ đối với đoạn thân mang mầm ngủ cây cói bông trắng cho ở bảng 1 và bảng 2.

Có thể thấy, cả $HgCl_2$ 0,1% và $Ca(OCl)_2$ 5% đều cho hiệu quả khử trùng mẫu cao. Tỷ lệ mầm nhiễm giảm khi thời gian khử trùng tăng cả khi sử dụng $HgCl_2$ 0,1% và $Ca(OCl)_2$ 5%. Tuy nhiên yêu cầu của giai đoạn khử trùng là cho tỷ lệ mầm nhiễm thấp, đồng thời tỷ lệ tái sinh cao, mầm sinh trưởng phát triển khỏe mạnh. Chính vì vậy chế độ khử trùng bằng $Ca(OCl)_2$ 5% trong 15 phút khi có 100% mầm sạch và tái sinh đã được lựa chọn để tạo vật liệu khởi đầu.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

Cây cói cổ khoang bông trắng *Cyperus tagetiformis* Lam được thu thập từ huyện Nga Sơn - Thanh Hóa.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Phương pháp khử trùng

Đoạn thân ngâm mang mầm ngủ sinh trưởng phát triển tốt được làm sạch bùn đất dưới vòi nước, bóc tách phần bẹ lá bao quanh mầm ngủ, cắt bớt phần thân để lại đoạn chứa mầm ngủ dài khoảng 3 - 5 cm, ngâm

Bảng 1. Ảnh hưởng của chế độ khử trùng bằng thủy ngân clorua ($HgCl_2$ 0,1%) đến hiệu quả khử trùng đoạn thân ngầm mang mầm ngủ

Thời gian khử trùng (phút)	Tỷ lệ mẫu nhiễm (%)	Tỷ lệ sạch (%)	
		Tỷ lệ mẫu tái sinh (%)	Tỷ lệ mẫu chết (%)
0	100,00	0,00	0,00
5	46,67	46,56	6,77
7	40,00	50,33	9,67
10	20,00	66,67	13,33
13	13,33	60,00	26,67
15	13,33	53,33	33,34

Ghi chú : Nền môi trường : MS + 30 g/l đường + 6,5 g/l agar , pH = 5,7

Bảng 2. Ảnh hưởng của chế độ khử trùng bằng $Ca(OCl)_2$ đến hiệu quả khử trùng đoạn thân ngầm mang mầm ngủ

Thời gian khử trùng (phút)	Tỷ lệ mẫu nhiễm (%)	Tỷ lệ mẫu sạch (%)	
		Tỷ lệ mẫu tái sinh (%)	Tỷ lệ mẫu chết (%)
0	100,00	0,00	0,00
10	8,33	33,33	58,34
15	0,00	100,00	0,00
20	0,00	33,33	66,67

Ghi chú : Nền môi trường : MS + 30 g/l đường + 6,5 g/l agar , pH = 5,7

3.2. Ảnh hưởng của BA và Kinetin (Ki) đến khả năng phát sinh chồi từ đoạn thân ngầm mang mầm ngủ

Theo Sakakibara (2006), cytokinin có vai trò quan trọng trong kích thích phân chia tế bào và kích thích sự hình thành chồi. Bảng 3 trình bày kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của BA và Ki khi bổ sung vào môi trường cơ bản MS + 30 g/l đường đến khả năng tạo chồi từ đoạn thân ngầm mang mầm ngủ giống cói bông trắng.

So với đối chứng, việc bổ sung đơn chất BA và Ki đều cho hiệu quả khởi động đoạn thân ngầm mang mầm ngủ tốt hơn. Khi tăng nồng độ Ki và BA từ 0 - 3 mg/l số chồi trung

bình trên mẫu tương ứng tăng từ 1 - 1,73 chồi và 1,09- 2,08 chồi đồng thời chiều cao chồi tăng từ 3,71 - 8,59 cm và 7,79 - 8,86 cm. Trên môi trường bổ sung BA và Ki mầm ngủ bật chồi nhanh hơn, chồi tạo thành mập, màu xanh đậm. Trong khi đó trên môi trường MS chồi tạo thành có màu xanh nhạt, thời gian mẫu bật chồi lâu hơn.

Hiệu quả khởi động đoạn thân ngầm mang mầm ngủ đạt được cao nhất trên môi trường có bổ sung 1,5 mg/l BA và 1,5 mg/l Ki. Tuy nhiên, BA có tác động mạnh hơn Ki trong việc kích thích mầm ngủ bật chồi, cho số chồi trung bình trên mẫu cao nhất 2,08 và 1,73 chồi khi BA và Ki ở nồng độ 1,5 mg/l.

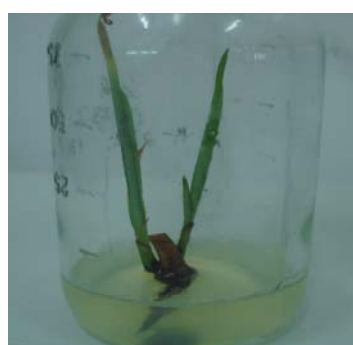
Bảng 3. Ảnh hưởng của kinetin (Ki) và BA đến khả năng tạo chồi từ đoạn thân ngầm mang mầm (sau 3 tuần nuôi cấy)

Ki (mg/l)	Số chồi/ mẫu (chồi)	Chiều cao chồi (cm)	BA (mg/l)	Số chồi/ mẫu (chồi)	Chiều cao chồi (cm)
0	1,00	3,71	0,00	1,09	3,71
0,5	1,00	7,80	0,50	1,24	7,79
1	1,40	8,30	1,00	1,47	8,42
1,5	1,73	8,59	1,50	2,08	8,86
2	1,47	8,15	2,00	1,60	8,38
2,5	1,47	7,89	2,50	1,53	8,33
3	1,40	7,70	3,00	1,46	8,08
LSD	0,40			0,29	
CV%	1,6			1,1	

Ghi chú : Nền môi trường : MS + 30 g/l đường + 6,5 g/l agar, pH = 5,7



A



B

Hình 1. Sự tạo chồi từ thân ngầm của Cỏ Bông trắng trên các môi trường khác nhau

(A) Môi trường MS + 1,5 mg/l BA; (B) Môi trường MS + 1,5 mg/l Kinetin

3.3. Nghiên cứu nhân nhanh chồi cỏ bông trắng

Hiệu quả của một qui trình nhân giống *in vitro* thể hiện bằng hệ số nhân giống. Trong quá trình nhân giống *in vitro* sự phối hợp giữa auxin và cytokinin ở một nồng độ và tỷ lệ thích hợp có tác động tốt tới sự hình thành chồi và chất lượng chồi tạo thành. Vì thế BA, Ki ở nồng độ 1,5 mg/l (cho hiệu quả khởi động mầm tốt nhất) đã được sử dụng kết hợp với α -NAA, IBA để nghiên cứu khả năng nhân nhanh của chồi cỏ bông trắng (Bảng 4).

Kết quả bảng 4 cho thấy, ở mức sai khác nhỏ nhất có ý nghĩa LSD 5% tất cả các công thức có bổ sung kết hợp BA và IBA, Ki và IBA đều cho hệ số nhân và chiều cao chồi cao

hơn so với đối chứng không bổ sung IBA. Đặc biệt là các công thức có bổ sung 1,5 mg/l BA + 0,5 mg/l IBA và 1,5 mg/l Ki + 0,25 mg/l IBA cho hệ số nhân chồi cao nhất tương ứng là 4,14 và 3,08 (chồi/mẫu), đồng thời chiều cao trung bình tương ứng là 2,19 cm và 2,84 cm. Tuy nhiên, các chồi tạo thành có màu xanh nhạt hơn và theo đánh giá cảm quan những chồi này có chất lượng thấp hơn so với đối chứng. Điều này sẽ ảnh hưởng đến quá trình tạo cây hoàn chỉnh và đưa cây ra vườn ươm ở giai đoạn tiếp theo. Do đó, việc tìm ra một môi trường vừa cho hệ số nhân giống cao đồng thời chồi tạo thành có chất lượng tốt là vô cùng quan trọng.

Bảng 4. Ảnh hưởng của tổ hợp BA và IBA tới khả năng nhân nhanh của chồi côi bông trắng (sau 4 tuần nuôi cấy)

BA (mg/l)	IBA (mg/l)	Hệ số nhân chồi (lần)	Chiều cao chồi (cm)	Ki (mg/l)	IBA (mg/l)	Hệ số nhân chồi (lần)	Chiều cao chồi (cm)
1,5	0,00	1,04	1,21	1,5	0,00	1,21	1,28
1,5	0,10	2,00	3,33	1,5	0,10	2,76	2,35
1,5	0,25	2,11	2,61	1,5	0,25	3,08	2,84
1,5	0,50	4,14	2,19	1,5	0,50	3,47	3,77
1,5	1,00	2,83	2,94	1,5	1,00	2,91	3,15
	LSD	0,11				0,34	
	CV%	2,6				0,7	

Ghi chú : Nền môi trường : MS + 30 g/l đường + 6,5 g/l agar , pH= 5,7

Bảng 5. Ảnh hưởng của tổ hợp BA và kinetin với α -NAA tới khả năng nhân nhanh chồi côi bông trắng (sau 4 tuần nuôi cấy)

BA (mg/l)	α -NAA (mg/l)	Hệ số nhân chồi (lần)	Chiều cao chồi (cm)	Ki (mg/l)	α -NAA (mg/l)	Hệ số nhân chồi (lần)	Chiều cao chồi (cm)
1,5	0,00	1,04	1,21	1,5	0,00	1,21	1,28
1,5	0,10	1,71	1,53	1,5	0,10	2,17	2,11
1,5	0,25	2,05	1,73	1,5	0,25	2,70	2,93
1,5	0,50	1,80	1,16	1,5	0,50	3,30	4,35
1,5	1,00	1,20	1,16	1,5	1,00	2,50	3,12
	LSD	0,16				0,51	
	CV%	0,6				0,5	

Ghi chú : Nền môi trường : MS + 30 g/l đường + 6,5 g/l agar, pH = 5,7

Việc bổ sung kết hợp giữa BA và -NAA, Ki và -NAA trong môi trường nuôi cấy cũng cho hiệu quả nhân nhanh tốt hơn so với đối chứng. Không những hệ số nhân chồi và chiều cao chồi tăng mà chất lượng chồi cũng cao hơn. Các chồi tạo ra có màu xanh đậm, khỏe mạnh. Đặc biệt trên hai môi trường MS + 1,5 mg/l BA + 0,25 mg/l α -NAA và MS + 1,5 mg/l Ki + 0,5 mg/l α -NAA cho hệ số nhân chồi cao nhất, tương ứng 2,05 và 3,3. Dựa vào tiêu chí hệ số nhân chồi và chất lượng chồi tạo thành, môi trường MS + 1,5 mg/l Ki + 0,5 mg/l α -NAA sẽ được sử dụng để nhân nhanh chồi côi bông trắng.

Kết quả nghiên cứu của Maurizio Rosetto và cs. (1992) trên *Cautis dioica* đã

cho thấy có sự phản ứng khác nhau của giống với các chất điều tiết sinh trưởng trong quá trình nhân nhanh: từ vật liệu khởi đầu là đỉnh sinh trưởng của giống *Cautis dioica* hệ số nhân giống đạt cao nhất trên môi trường có bổ sung 2M BA và 1 M IBA. Trong khi đó, khả năng tạo chồi từ callus có khả năng phát sinh phôi của *Scirpus* tốt nhất trên môi trường MS có bổ sung 3 mg/l BA *robustus* (Wang và cs., 2004).

3.4. Nghiên cứu tạo rễ cho chồi *in vitro*

Các chồi sau giai đoạn nhân nhanh đạt tiêu chuẩn về chiều cao sẽ được chuyển sang môi trường ra rễ để hoàn thiện quá trình nhân giống *in vitro*. Hai chất cảm ứng ra rễ được sử dụng là than hoạt tính và α -NAA.

Bảng 6. Ảnh hưởng của α -NAA và than hoạt tính (THT) tới khả năng ra rễ của chồi cỏ bông trắng (sau 4 tuần nuôi cấy)

	Nồng độ (mg/l)	% Ra rễ	Số rễ trung bình/ mẫu	Chiều dài trung bình rễ/ mẫu (cm)
ĐC	0	100	6,56	3,25
	0,1	100	7,35	3,76
	0,25	100	6,31	3,54
	0,5	100	5,58	3,33
	1	100	5,16	3,68
THT	1000	100	7,85	5,77
	2000	100	7,35	5,37
	3000	100	7,07	5,24
	4000	100	6,42	4,5

Ghi chú : Nền môi trường : MS + 30 g/l đường + 6,5 g/l agar, pH = 5,7

α -NAA ở một nồng độ thích hợp có ảnh hưởng tốt đến hiệu quả kích thích hình thành rễ. Khi bổ sung α -NAA ở nồng độ thấp 0,1 mg/l cho số rễ trung bình cao nhất là 7,35, chiều dài rễ đạt 3,76 cm cao hơn đối chứng. Tuy nhiên, khi tăng nồng độ α -NAA lên 0,25 - 1 mg/l thì số rễ trung bình trên mẫu ít hơn so với đối chứng. Điều này có thể giải thích là trong chồi cỏ đã tự sản sinh ra hormone nội sinh nên việc tăng nồng độ α -NAA lớn hơn 0,1 mg/l sẽ làm mất cân bằng hormone nội sinh của cây dẫn đến số rễ hình thành trên chồi giảm.

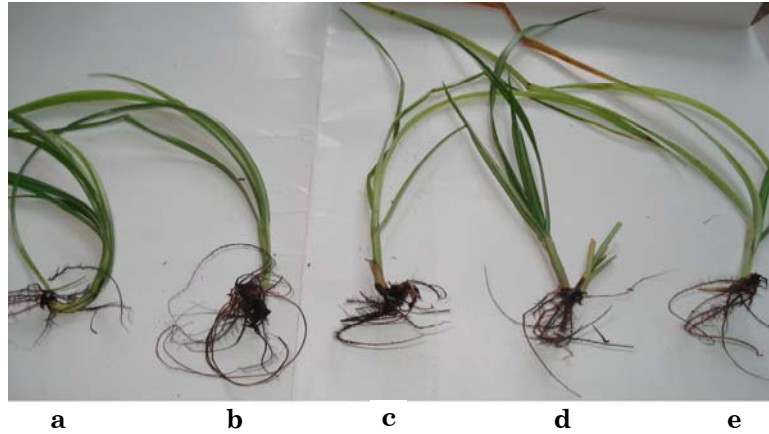
Trong khi đó, bổ sung than hoạt tính vào môi trường tạo rễ với hàm lượng từ 1 - 4 g/l đã kích thích số rễ tăng hơn đối chứng, rễ tạo thành có màu nâu nhạt, nhiều nông hút đồng thời chồi cỏ trở nên cứng danh. Những chồi này sẽ có khả năng thích nghi tốt hơn ngoài điều kiện tự nhiên. Lượng than hoạt tính cho tỷ lệ hình thành rễ tốt nhất là 1 g/l, với 100% chồi tạo rễ, đạt trung bình 7,85 rễ/chồi và chiều dài trung bình rễ 5,77 cm. Như vậy môi trường MS + 30 g/l đường + 1 g/l THT tỏ ra là môi trường tốt nhất để cảm ứng chồi cỏ *in vitro* hình thành rễ.

Maurizio Rosetto và cs. (1992) đã nghiên cứu khả năng ra rễ của chồi *Cautis*

dioica trên nền môi trường MS có bổ sung α -NAA và IBA và kết luận IBA có khả năng cảm ứng hình thành rễ tốt nhất trong khi khả năng cảm ứng hình thành rễ của α -NAA thấp và cho chất lượng chồi kém hơn. Điều này chứng tỏ các chất điều tiết sinh trưởng có tác động khác nhau đối với khả năng hình thành rễ của các giống khác nhau đồng thời ảnh hưởng đến chất lượng của cây *in vitro* tạo thành. Do đó việc lựa chọn chất kích thích ra rễ cần phải được lựa chọn cho phù hợp với từng giống, loài để kích thích hình thành rễ tốt, cho cây con khỏe mạnh đồng thời phải phù hợp với từng điều kiện sản xuất.

3.5. Thích nghi cây ngoài vườn ươm

Trước khi đưa cây vào điều kiện sản xuất việc thích nghi cây trong vườn ươm để đảm bảo tỷ lệ sống cao, cây sinh trưởng và phát triển tốt là một khâu quan trọng. Ba loại giá thể sử dụng để thử nghiệm thích nghi cây cỏ ngoài vườn ươm: 1. Trấu hun, 2. Bùn, 3: Trấu hun: cát: sơ dừa với tỷ lệ 1:1:1. Kết quả cho thấy, sau 4 tuần đưa ra vườn ươm, tỷ lệ cây sống đạt 100% trên tất cả các loại giá thể, nhưng cây sinh trưởng phát triển mạnh nhất trên giá thể bùn.



Hình 2. Sự ra rễ của cỏ bông trắng trên các môi trường khác nhau

(a) MS; (b) MS + 1 g/l THT; (c) MS + 2 g/l THT;
(d) MS + 3 g/l THT; (e) MS + 4 g/l THT

4. KẾT LUẬN

Chế độ khử trùng đoạn thân ngầm mang mầm ngủ giống cỏ bông trắng là khử trùng bằng $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ 5% trong thời gian 15 phút, cho 100% mẫu sống, sạch và tái sinh.

Môi trường thích hợp nhất để khởi động mẫu là MS + 1,5 mg/l BA + 30 g/l đường, cho trung bình 2,08 chồi/ mẫu sau 3 tuần nuôi cấy, chiều cao trung bình của chồi là 8,86cm.

Chồi cỏ bông trắng nhân tốt nhất trên môi trường MS + 1,5 mg/l Ki + 0,5 mg/l α -NAA với hệ số nhân là 3,3 lần sau 4 tuần, chiều cao trung bình đạt 4,35 cm, chồi tạo thành có màu xanh đậm.

Than hoạt tính có tác dụng tốt trong việc tạo rễ cho chồi *in vitro* ở nồng độ 1 mg/l. Tỷ lệ ra rễ đạt 100%, số rễ trung bình đạt 7,85 rễ.

Giá thể thích hợp nhất để thích nghi cây trong vườn ươm là giá thể bùn.

Lời cảm ơn

Nghiên cứu này được thực hiện với sự hỗ trợ kinh phí từ đề tài độc lập cấp Nhà nước, mã số ĐTDL.2008/32 (giai đoạn 2008-2010).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Benazir J. F., B. Mathithumilan, P. Ravichandran, Jochebed Vinodhini, R. Suganthi, V.Manimekalai (2009). *In vitro* Regeneration of Mat Sedge (*Cyperus pangorei* Rottb). *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, Volume : 18 (2), p 209 – 215.
- Maurizio R., W. Kingsley Dixon, A. Kathy, Menev & Eric Bunn (1992). *In vitro* propagation of Chinese Puzzle (*Caustis dioica* Cyperaceae)-a commercial sedge species from Western Australia.
- Sakakibara H. CYTOKININS: Activity, Biosynthesis, and Translocation (2006). *Annu. Rev. Plant Biol.* 57:431–49.
- Suzanne M., D. Rogers (2003). Tissue Culture and Wetland Establishment of the Freshwater Monocots *Carex*, *Juncus*, *Scirpus*, and *Typha*. *In vitro Cellular & Developmental Biology. Plant*, 39, No. 1 (Jan. - Feb., 2003), pp. 1-5.
- Wang J., D.M. Seliskar, Gallagher J.L. (2004). Plant regeneration via somatic embryogenesis in the brackish wetland monocot *Scirpus robustus*. *Aquatic Botany* 79: 163–174.
- Wang J., M. Denise, Seliskar and J. L. Gallagher (2005). Tissue Culture and Plant Regeneration of the Salt Marsh Monocots *Juncus roemerianus* and *Juncus*

gerardi. *In vitro* Cellular &
Developmental Biology. *Plant*, Vol. 41, No.
3. 274-280.