

# ẢNH HƯỞNG CỦA CÁC CHẤT KÍCH THÍCH SINH TRƯỞNG THỰC VẬT ĐẾN NHÂN GIỐNG *IN VITRO* CÂY CÁT TƯỜNG (*Eustoma grandiflorum*) TẠI TRƯỜNG ĐẠI HỌC KIÊN GIANG

Nguyễn Thị Thu Hậu<sup>1</sup>, Chương Thị Hoài Thương<sup>1</sup>

## TÓM TẮT

Cát tường (*Eustoma grandiflorum* (RAF.) Shinn) cây thuộc họ long đởm (*Gentianaceae*). Hạt Cát tường có kích thước nhỏ và tỷ lệ nảy mầm thấp. Do vậy, quá trình nhân giống *in vitro* loài cây này đã và đang được nhiều nhà khoa học trên thế giới triển khai. Để nhân giống *in vitro* cây Cát tường tại Việt Nam, các thí nghiệm về ảnh hưởng của chất khử trùng khi tạo mẫu sạch và nồng độ chất kích thích sinh trưởng thực vật lên quá trình hình thành callus, tạo chồi và ra rễ trong điều kiện nuôi cấy *in vitro* đã được triển khai. Kết quả thí nghiệm chỉ ra rằng, khi sử dụng chất khử trùng là Javel (nồng độ 50%) trong thời gian 8 phút cho tỷ lệ mẫu sạch cao nhất (86,11%) đồng thời trên môi trường MS có bổ sung 0,7-0,9 mg/L 2,4 D kết hợp 0,1 mg/L NAA, 30 g/l sucrose, là thích hợp cho quá trình hình thành callus (98,67-100%). Mặt khác, trên môi trường MS có bổ sung 0,6 mg/L BA hay 0,6 mg/L Kn cho tỷ lệ nhân chồi Cát tường *in vitro* là 100% hình thành chồi. Trên môi trường MS có bổ sung 1 mg/l IBA cho kết quả quá trình ra rễ cây Cát tường *in vitro* là 71,11 %, chiều dài rễ 8,14 cm.

**Từ khóa:** Cát tường, callus, chất kích thích sinh trưởng thực vật, *in vitro*.

## 1. GIỚI THIỆU

Cây hoa Cát tường (*Eustoma grandiflorum* (RAF.) Shinn) là hoa cát cánh tiêu thụ nhiều nhất thế giới thế giới [1]. Hạt Cát tường có tỷ lệ nảy mầm thấp, giá thành cao. Do đó, trên thế giới đã có nhiều nghiên cứu nhân giống *in vitro* cây Cát tường [2-4]. Mục tiêu nghiên cứu này là xây dựng quy trình nhân giống cây hoa Cát tường đã trồng thích nghi với điều kiện khí hậu và thổ nhưỡng tại Trường Đại học Kiên Giang nhằm cung cấp cây giống thích hợp trồng tại Kiên Giang nơi có khí hậu khác biệt (nhiệt độ cao, đất nhiễm mặn và phèn).

Thông thường hoa Cát tường được nhân giống bằng kỹ thuật giâm cành (hom) hoặc trồng từ hạt. Tuy nhiên, các phương pháp này cho hệ số nhân giống thấp. Bên cạnh đó, với kỹ thuật trồng bằng hạt gặp nhiều khó khăn do hạt cây hoa Cát tường có kích thước rất nhỏ (19.000 hạt/g) [5] cho tỷ lệ nảy mầm tương đối thấp 34 - 39% [6]. Mặt khác, nhân giống *in vitro* là phương pháp công nghệ sinh học tiên tiến trong nhân giống thực vật với quy mô lớn, năng suất

cao, giống đồng loạt, sạch bệnh đặc biệt là những giống quý hiếm có nguy cơ tuyệt chủng [5, 6].

Mẫu cấy cây hoa Cát tường được nhiều tác giả sử dụng nhiều đó là đỉnh sinh trưởng, chồi nách, chồi ngọn, lá, thân và cả nụ hoa [2, 7, 9]. Các chất sử dụng để khử trùng mẫu cấy hầu hết đã nghiên cứu là Javel nồng độ 20%, trong thời gian 25 phút [2], natri hypochlorite, nồng độ 1% trong thời gian 15 phút [7], thủy ngân clorua, nồng độ 0,01% trong thời gian 5 phút [9].

Ngoài ra, các tác giả trước đây đã nghiên cứu thành công quá trình hình thành callus cây Cát tường trên môi trường B5 có bổ sung 1,5 mg/L NAA [10, 11]. Mặt khác, trên môi trường MS bổ sung 3 mg/L TDZ kết hợp với 0,3 mg/L NAA [8] hay trên môi trường MS có bổ sung 0,5 mg/L BA kết hợp với 0,2 mg/L NAA [4] là những môi trường thành công khi hình thành callus cây hoa Cát tường.

Để đáp ứng nhu cầu thực tế về cây giống và khắc phục những nhược điểm của phương pháp nhân giống truyền thống, nhóm nghiên cứu tiến hành nghiên cứu xây dựng quá trình nhân giống cây Cát tường tại Trường Đại học Kiên Giang chưa được thực hiện ở các nghiên cứu trước đây.

<sup>1</sup> Khoa Nông nghiệp và Phát triển nông thôn, Trường Đại học Kiên Giang  
Email: ntthau@vnkgu.edu.vn

**2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP****2.1. Vật liệu**

Mẫu cấy được sử dụng trong nghiên cứu này là các đỉnh chồi (30 đỉnh chồi/nghiệm thức). Cây Cát tường (*Eustoma grandiflorum* (RAF.) Shinn) nhập từ Công ty Phương Đông, Đà Lạt và được trồng thuần dưỡng trong nhà lưới Trường Đại học Kiên Giang sau 16 tuần (lúc thu mẫu cây hoa Cát tường đã bắt đầu xuất hiện nụ hoa), cây không có biểu hiện bệnh, sinh trưởng và phát triển tốt.

Mẫu được làm sạch sơ bộ bên ngoài bằng nước máy sau đó ngâm mẫu bằng nước rửa chén pha với nước máy tỷ lệ 1:3 trong thời gian 15 phút cuối cùng rửa lại bằng nước sạch rồi tiến hành vô trùng trong tủ cấy. Mẫu cấy được khử trùng bằng dung dịch Javel nồng độ 50% ở các mốc thời gian khác nhau và rửa lại mẫu bằng nước vô trùng.

Mẫu cấy sau khi khử trùng được nuôi cấy trên môi trường MS (Murashige, Skoog, 1962) có bổ sung BA (Benzyladenine, Merck, Đức), 30 g/l sucrose (Công ty Cổ phần Đường Biên Hòa, Việt Nam), 8 g/L agar (Việt Nam), pH = 5,8. Các chồi thu được từ giai đoạn này được sử dụng làm vật liệu ban đầu cho các thí nghiệm của các nghiên cứu tiếp theo.

**2.2. Môi trường và điều kiện nuôi cấy**

Môi trường được sử dụng trong tất cả các thí nghiệm là môi trường MS có bổ sung 30 g/L sucrose, 8 g/L agar, pH = 5,8 và các chất điều hòa sinh trưởng khác nhau.

Điều kiện nuôi cấy *in vitro*: thời gian chiếu sáng 8 giờ/ngày, cường độ chiếu sáng 2.500 - 3.000 lux, nhiệt độ  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , độ ẩm khoảng 75 - 80%.

**2.3. Phương pháp nuôi cấy****2.3.1. Ảnh hưởng của thời gian đến khả năng hình thành mẫu sạch và cho tỷ lệ mẫu sống cao**

Thí nghiệm được thực hiện theo quy trình khử trùng mẫu của Winnato và cs. (2015) có hiệu chỉnh để phù hợp với điều kiện tự nhiên và trang thiết bị của Trường Đại học Kiên Giang [12]. Mẫu đỉnh chồi (kích thước  $1 \times 1$  cm, số lượng 30 đỉnh chồi/nghiệm thức) của cây Cát tường được rửa sạch bằng nước máy sau đó ngâm mẫu bằng nước rửa chén pha với nước máy tỷ lệ 1:3 trong thời gian 15 phút, cuối cùng mẫu được rửa lại bằng nước máy trong vòng 45 phút. Mẫu sau khi được rửa sạch được đưa vào tủ cấy vô trùng và khử trùng bằng Javel nồng độ 50% trong

thời gian 6, 8, 10, 12 phút. Mẫu sau khi khử trùng được cấy trên môi trường MS có bổ sung 30g/l đường sucrose, 7,5 g/l agar. Sau 21 ngày nuôi cấy các mẫu được lấy ra ngoài để tính tỷ lệ (%) mẫu nhiễm, mẫu chết và mẫu sống.

**2.3.2. Ảnh hưởng của nồng độ 2,4D đến quá trình hình thành callus cây hoa Cát tường tại Trường Đại học Kiên Giang**

Thí nghiệm được thực hiện theo Akbari và cs. (2014) và Winnato và cs. (2015) có hiệu chỉnh [12, 13]. Lá *in vitro* cây Cát tường vô trùng, cắt lá (kích thước 5 mm  $\times$  5 mm, số lượng 30 mẫu/nghiệm thức) được cấy chuyển vào môi trường khoáng MS có bổ sung 30 g/L đường sucrose, 7,5 g/L agar và bổ sung 2,4D nồng độ thay đổi từ 0; 0,3; 0,5; 0,7; 0,9 mg/L. Sau 28 ngày nuôi cấy các mẫu được lấy ra ngoài để tính tỷ lệ phần trăm mẫu tạo callus.

**2.3.3. Ảnh hưởng của BA và KN kết hợp với NAA lên khả năng hình thành chồi cây Cát tường *in vitro***

Thí nghiệm được thực hiện theo Mai Thị Hồng và cs. (2018) có hiệu chỉnh [14]. Mẫu callus *in vitro* cây Cát tường (kích thước 1 x 1 cm, số lượng là 30 mẫu/nghiệm thức) được cấy chuyển vào môi trường MS có bổ sung BA và KN (6-furfuryladenine) kết hợp với 0,1 mg/l NAA (naphthalene acetic acid, Merck, Đức) ở các nồng độ: 0,3; 0,4; 0,5; 0,6 mg/L. Sau 28 ngày nuôi cấy, chỉ tiêu theo dõi là tỷ lệ đột thân *in vitro* hình thành chồi, số chồi/mẫu và chiều cao chồi.

**2.3.4. Ảnh hưởng của IBA lên khả năng ra rễ cây Cát tường *in vitro***

Chồi thu được từ thí nghiệm 3 có chiều dài 2 cm, mang 2 đốt thân và 2 cặp lá, số lượng 30 chồi/nghiệm thức được sử dụng làm nguyên liệu cho quá trình ra rễ tạo cây hoàn chỉnh. Các chồi cây Cát tường được nuôi cấy trên môi trường MS có bổ sung IBA (indole-3-butyric acid, Merck, Đức) ở các nồng độ: 0,00; 0,25; 0,50; 0,75; 1,00 mg/L. Sau 28 ngày nuôi cấy, các chỉ tiêu theo dõi là tỷ lệ ra rễ, số rễ/cây, chiều dài rễ.

**2.4. Phân tích và xử lý số liệu**

Kết quả thực nghiệm được nhập liệu bằng Microsoft Excel và phân tích bằng phần mềm MSTATC để phân tích phương sai ANOVA, hệ số biến động (CV) và so sánh trung bình các nghiệm thức bằng kiểm định LSD (0,05%).

### 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

#### 3.1. Ảnh hưởng của Javel 50% đến khả năng khử trùng mẫu cây Cát tường

Sau 21 ngày nuôi cấy tỷ lệ (%) mẫu sống, tỷ lệ (%) chết, tỷ lệ (%) nhiễm được thể hiện qua bảng 1.

**Bảng 1. Ảnh hưởng của Javel 50% đến khả năng khử trùng mẫu cây Cát tường ở các mốc thời gian khác nhau tại Trường Đại học Kiên Giang**

| Thời gian (phút) | Tỷ lệ mẫu nhiễm (%) | Tỷ lệ mẫu chết (%) | Tỷ lệ mẫu sống (%) |
|------------------|---------------------|--------------------|--------------------|
| 0                | 100,00 <sup>a</sup> | 0,00 <sup>d</sup>  | 0,00 <sup>c</sup>  |
| 6                | 83,33 <sup>b</sup>  | 1,39 <sup>cd</sup> | 15,28 <sup>c</sup> |
| 8                | 8,33 <sup>c</sup>   | 5,56 <sup>c</sup>  | 86,11 <sup>a</sup> |
| 10               | 1,39 <sup>d</sup>   | 55,56 <sup>b</sup> | 43,05 <sup>b</sup> |
| 12               | 0,00 <sup>d</sup>   | 91,67 <sup>a</sup> | 8,33 <sup>d</sup>  |
| CV%              | 7,37                | 8,54               | 12,19              |

(Ghi chú: Các mẫu tự khác nhau (a, b, c, d, e) biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa với  $P = 0,05$  bằng phép thử LSD; CV% - độ biến động)

Nhiều nghiên cứu trước đây của nhiều tác giả đã sử dụng mẫu cây Cát tường là đỉnh sinh trưởng, chồi nách, chồi ngọn, lá, thân và cả nụ hoa [2, 7, 9]. Trong nghiên cứu này, để có được mẫu cấy, sạch bệnh và thời gian xây dựng quy trình ngắn nên nhóm

nghiên cứu chọn đỉnh chồi làm mẫu cấy để khử trùng. Mẫu từ cây Cát tường đang được trồng thương phẩm trong nhà lưới tại Trường Đại học Kiên Giang. Sử dụng Javel nồng độ 50% để khử trùng mẫu cho nhiều ưu điểm hơn so với khi sử dụng các hóa chất khử trùng có tính chất độc và có khả năng gây biến dị cao như thủy ngân clorua [9] hoặc natri hypoclorite [7]. Kết quả từ bảng 1 cho thấy, khi khử trùng đỉnh chồi cây Cát tường bằng Javel nồng độ 50% ở các mốc thời gian khác nhau cho kết quả không giống nhau. Khi không sử dụng chất khử trùng mẫu cấy bị nhiễm 100%, tỷ lệ mẫu bị nhiễm giảm đi rõ rệt khi sử dụng chất khử trùng là Javel 50% và tỷ lệ mẫu nhiễm giảm khi mốc thời gian tăng dần từ 6-12 phút. Tỷ lệ (%) mẫu sống cao nhất ở mốc thời gian là 8 phút đạt 86,11% và tỷ lệ mẫu sống giảm khi mốc thời gian ngắn hoặc dài hơn 8 phút. Đồng thời, ở mốc thời gian lớn hơn 8 phút thì tỷ lệ mẫu nhiễm giảm nhưng tỷ lệ mẫu chết lại tăng.

#### 3.2. Ảnh hưởng của nồng độ 2,4-D đến quá trình hình thành callus cây hoa Cát tường

Sử dụng lá non của cây hoa Cát tường *in vitro* để làm mẫu tạo callus vì diện tích tiếp xúc với môi trường cao, các tế bào còn non dễ dàng phát sinh callus hơn so với các bộ phận khác.

**Bảng 2. Ảnh hưởng của nồng độ 2,4-D đến quá trình hình thành callus cây hoa Cát tường tại Trường Đại học Kiên Giang**

| Nồng độ 2,4-D (mg/L) | Tỷ lệ tạo callus (%) | Hình thái callus/khả năng tái sinh chồi                           |
|----------------------|----------------------|-------------------------------------------------------------------|
| 0,0                  | 0,00 <sup>d</sup>    | Callus không hình thành/không có khả năng tái sinh chồi           |
| 0,3                  | 74,67 <sup>c</sup>   | Callus màu trắng đục, cứng/khả năng tái sinh chồi kém             |
| 0,5                  | 89,33 <sup>b</sup>   | Callus màu trắng đục, cứng/khả năng tái sinh chồi kém             |
| 0,7                  | 98,67 <sup>a</sup>   | Callus màu vàng chanh, xốp vừa phải/khả năng tái sinh chồi cao    |
| 0,9                  | 100,00 <sup>a</sup>  | Callus màu xanh, mọng nước, xốp/khả năng tái sinh chồi trung bình |
| CV%                  | 3,49                 |                                                                   |

(Ghi chú: Các mẫu tự khác nhau (a, b, c, d) biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa với  $P = 0,05$  bằng phép thử LSD; CV% - độ biến động)

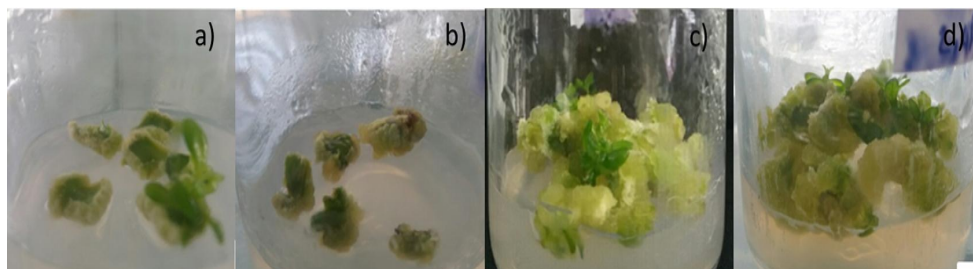
Sau 28 ngày nuôi cấy, tỷ lệ mẫu tạo callus cao nhất trên môi trường MS có bổ sung 0,9 mg/L 2,4D nhưng mẫu callus ở nghiệm thức này bị mọng nước (Hình 1d). Sau 2 tuần nuôi cấy mẫu bắt đầu cảm ứng hình thành callus xung quanh rìa lá, ngay vết cắt. Ứng với mỗi nồng độ của 2,4-D khác nhau thì khả

năng tạo callus cũng khác nhau. Sau 4 tuần nuôi cấy, giữa các nghiệm thức đã có sự chênh lệch về tốc độ và tỷ lệ hình thành callus. Tỷ lệ hình thành và tốc độ phát triển của callus tỷ lệ thuận với mức tăng nồng độ 2,4-D. Tuy nhiên, nồng độ 2,4-D càng cao cho tỷ lệ callus xốp càng nhiều (Hình 1d). Tỷ lệ hình thành

callus cao nhất (100%) trong môi trường MS bổ sung 0,9 mg/l 2,4-D; kết quả này cao hơn nghiên cứu trước đây của Trần Thị Ngọc Lan (2016) [15], đã sử dụng 2,4-D với nồng độ 0,5 mg/l cho tỷ lệ hình thành callus đạt 100%. Bên cạnh đó, một số nghiên cứu không sử dụng 2,4-D cho mục đích cảm ứng mẫu tạo callus ở cây hoa Cát tường cho tỷ lệ hình thành callus thấp hơn so với kết quả của đề tài. Winarto et al. (2015) đã xác định môi trường MS bổ sung 3,0 mg/l

TDZ và 0,3 mg/l NAA cho tỷ lệ hình thành callus cao nhất (89,7%).

Hình thái của các callus được tạo thành ở các nồng độ 2,4-D cũng có sự khác biệt khá rõ rệt (Hình 1). Mô sẹo hình thành ở nồng độ 0,3 và 0,5 mg/l 2,4-D có màu trắng đục, cứng. Mô sẹo hình thành ở nồng độ 0,7 và 0,9 mg/l 2,4-D có màu xanh nhạt trong và mọng nước.



**Hình 1. Sự hình thành callus cây Cát tường trên môi trường 2,4D với nồng độ khác nhau**

(Ghi chú: a, b, c, d: lần lượt là 2,4D ở các mức nồng độ 0,3; 0,5; 0,7; 0,9 mg/L)

Như vậy, môi trường MS bổ sung 0,7 mg/l 2,4-D là tối ưu để tạo callus từ mẫu lá cây hoa Cát tường in vitro tại Trường Đại học Kiên Giang.

### 3.3. Ảnh hưởng của BA và KN kết hợp với NAA lên khả năng hình thành chồi cây Cát tường in vitro

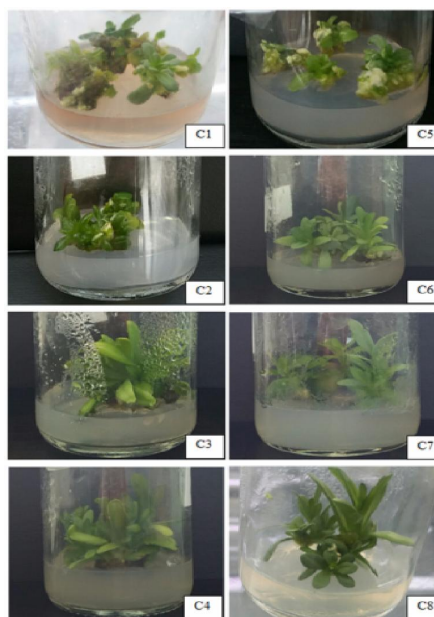
**Bảng 3. Ảnh hưởng của BA và KN kết hợp với NAA lên khả năng hình thành chồi cây Cát tường in vitro**

| Loại chất KTST | KTST (mg/l) | Tỷ lệ tạo chồi (%)  | Số chồi/mẫu (chồi) |
|----------------|-------------|---------------------|--------------------|
| BA             | 0           | 0,00 <sup>x</sup>   | 0,00               |
|                | 0,3         | 68,89 <sup>c</sup>  | 1,20 <sup>c</sup>  |
|                | 0,4         | 71,11 <sup>b</sup>  | 1,25 <sup>d</sup>  |
|                | 0,5         | 97,78 <sup>a</sup>  | 1,25 <sup>d</sup>  |
|                | 0,6         | 100,00 <sup>a</sup> | 1,60 <sup>a</sup>  |
| KN             | 0,3         | 73,33 <sup>b</sup>  | 1,25 <sup>d</sup>  |
|                | 0,4         | 84,45 <sup>ab</sup> | 1,19 <sup>c</sup>  |
|                | 0,5         | 100,00 <sup>a</sup> | 1,38 <sup>b</sup>  |
|                | 0,6         | 100,00 <sup>a</sup> | 1,56 <sup>a</sup>  |
| F              |             |                     |                    |
| CV (%)         |             | 4,81                | 7,80               |

(Ghi chú: Các mẫu tự khác nhau (a, b, c, d) biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa với  $P = 0,05$  bằng phép thử LSD; CV% - độ biến động)

Ảnh hưởng của BA và KN đến sự hình thành chồi in vitro cây Cát tường tại Trường Đại học Kiên

Giang ở các nồng độ khác nhau cũng có sự khác biệt, kết quả thể hiện qua bảng 3.

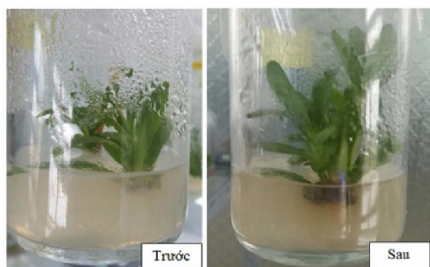


**Hình 2. Ảnh hưởng của nồng độ Ba và Kn đến sự hình thành chồi cây hoa Cát tường tại Trường Đại học Kiên Giang**

(Ghi chú: C1; C2; C3; C4 lần lượt là các mức nồng độ BA: 0,3; 0,4; 0,5; 0,6 mg/L; C5; C6; C7; C8 lần lượt là các mức nồng độ Kn: 0,3; 0,4; 0,5; 0,6 mg/L)

Kết quả từ bảng 3 cho thấy, khả năng hình thành chồi của cây Cát tường trên môi trường MS kết hợp với 0,6 mg/L BA hoặc 0,5-0,6 mg/L KN cho tỷ lệ hình thành chồi cao nhất (100%). Mặc dù ở cả 3 nghiệm thức đều cho tỷ lệ hình thành chồi là 100% nhưng khi xét về số chồi/mẫu, ở nghiệm thức sử dụng 0,5 mg/l KN chỉ có số lượng trung bình 1,38 chồi/callus khác biệt có ý nghĩa thống kê khi so với nghiệm thức sử dụng 0,6 mg/l KN có số lượng trung bình 1,56 chồi/callus và nghiệm thức 0,6 mg/L BA có số lượng trung bình là 1,6 chồi/callus.

Theo Trần Thị Ngọc Lan (2016) [15], callus các tế bào thực vật còn non chưa có khả năng tổng hợp cytokinin; vì vậy, việc bổ sung cytokinin như BA và KN là cần thiết để callus cảm ứng phát sinh chồi. Ở cả 3 nghiệm thức trên môi trường MS có bổ sung BA hoặc KN với nồng độ từ 0,5-0,6 mg/L đều cho 100% mẫu hình thành chồi điều này có sự khác biệt so với các nghiên cứu trước đây của một số tác giả. Trần Thị Ngọc Lan (2016) sử dụng môi trường MS bổ sung 0,5 mg/l BA chỉ cho tỷ lệ callus tạo chồi là 82,33%, kết quả của nhóm nghiên cứu khi sử dụng BA cũng ở nồng độ 0,5 mg/L cho kết quả 97,78% mẫu hình thành chồi và cũng ở nồng độ 0,5 mg/L nhưng khi thay BA bằng Kn thì tỷ lệ mẫu hình thành chồi tăng lên là 100% (Hình 2).



**Hình 3. Chồi Cát tường chỉ kéo dài đốt thân và hình thành lá mới mà không tạo rễ khi thiếu auxin**

Như vậy, môi trường MS bổ sung 0,6 mg/l BA hoặc 0,6 mg/l KN phù hợp cho mục đích phát sinh chồi cây hoa Cát tường từ callus. Các chồi to, khỏe, sinh trưởng và phát triển tốt được chuyển sang nuôi cấy trên môi trường không có bổ sung IBA nuôi cấy trong 6 tuần thì chồi tiếp tục sinh trưởng kéo dài đốt thân, hình thành thêm lá mới nhưng không tạo rễ (Hình 3). Sự sinh trưởng của chồi vẫn tiếp tục có thể là do sự chi phối của BA hoặc KN bên trong các chồi hấp thụ từ môi trường của thí nghiệm trước. Do đó, cần bổ sung vào môi trường một hợp chất dạng auxin (NAA, IBA, IAA) để làm giảm tỷ lệ cytokinin/auxin

mà cây hấp thụ, giúp cho chồi cảm ứng ra rễ nhanh hơn.

### 3.4. Ảnh hưởng của nồng độ IBA đến sự hình thành rễ ở cây hoa Cát tường

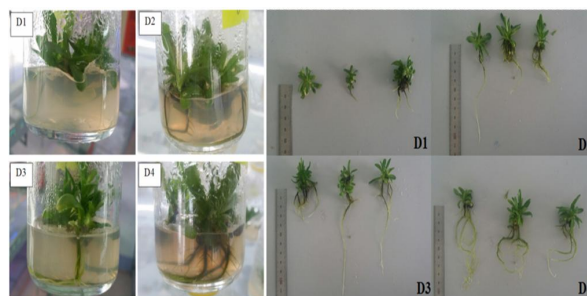
Khi chuyển chồi *in vitro* sang môi trường MS có bổ sung IBA với các nồng độ khác nhau thì chồi *in vitro* cây Cát tường hình thành rễ với các tỷ lệ khác biệt thể hiện trong bảng 4.

**Bảng 4. Ảnh hưởng của nồng độ IBA đến sự hình thành rễ ở cây hoa Cát tường tại Trường Đại học Kiên Giang**

| Nồng độ IBA (mg/l) | Tỷ lệ mẫu tạo rễ (%) | Số rễ/mẫu (cái)   | Chiều dài TB rễ (cm) |
|--------------------|----------------------|-------------------|----------------------|
| 0,00               | 0,00 <sup>c</sup>    | 0,00 <sup>c</sup> | 0,00 <sup>d</sup>    |
| 0,25               | 28,89 <sup>d</sup>   | 1,08 <sup>b</sup> | 2,21 <sup>c</sup>    |
| 0,50               | 44,45 <sup>c</sup>   | 1,25 <sup>b</sup> | 5,24 <sup>b</sup>    |
| 0,75               | 55,55 <sup>b</sup>   | 1,49 <sup>a</sup> | 5,43 <sup>b</sup>    |
| 1,00               | 71,11 <sup>a</sup>   | 1,25 <sup>b</sup> | 8,14 <sup>a</sup>    |
| CV%                | 8,60                 | 10,56             | 12,18                |

(Ghi chú: Các mẫu tự khác nhau (a, b, c, d, e) biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa với  $P = 0,05$  bằng phép thử LSD; CV% - độ biến động)

Môi trường có bổ sung 1,0 mg/L IBA cho tỷ lệ hình thành rễ cao nhất (71,11%), tỷ lệ này cao hơn kết quả nghiên cứu trước đây của Trần Thị Thủy Tiên (2010) [16], là 56% cũng trên môi trường MS bổ sung 1,0 mg/L IBA. Tuy nhiên ở nồng độ 1,5 mg/l IBA trong nghiên cứu của Uddin, S (2017) [17], cho tỷ lệ 100% chồi hình thành rễ.



**Hình 4. Ảnh hưởng của nồng độ IBA đến sự hình thành rễ ở cây hoa Cát tường tại Trường Đại học Kiên Giang**

(Ghi chú: D1; D2; D3; D4 lần lượt là các mức nồng độ IBA 0,25; 0,5; 0,75; 1,0 mg/L)

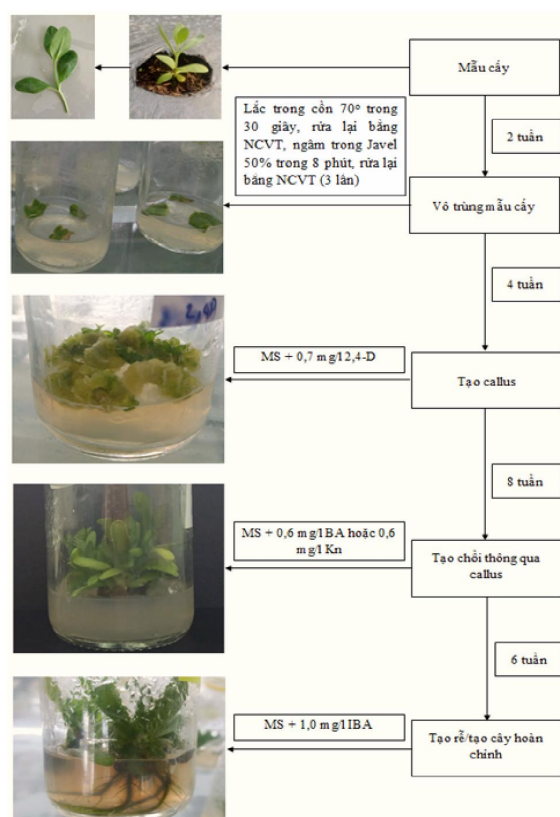
Ảnh hưởng của IBA ở các nồng độ khác nhau cũng tác động đáng kể đến chiều dài rễ cây hoa Cát tường (Hình 4). Chiều dài rễ trung bình của các



nghiệm thức tăng theo nồng độ của IBA trong khoảng nồng độ được khảo sát, dài nhất là ở nghiệm thức D4.

Hệ số nhân giống cây hoa Cát tường tại Trường Đại học Kiên Giang đạt 60,41 lần (khử trùng tạo mẫu sống đạt 86,11%, tạo callus đạt 98,67%, nhân chồi là 100% và hình thành rễ là 71,11%). Do đó, nghiên cứu cho hệ số nhân giống cao, giá thành mỗi cây giống *in vitro* giao động từ 900 đến 1100 đồng/cây (tùy nguồn hóa chất sử dụng) thấp hơn từ 900 – 1600 đồng/cây so với phương pháp nhân giống hữu tính (giao hạt).

Qua các kết quả thu được, quy trình nhân giống *in vitro* cây hoa Cát tường (*Eustoma grandiflorum*) tại Trường Đại học Kiên Giang được tóm tắt trong hình 5.



Hình 5. Quy trình nhân giống *in vitro* cây hoa Cát tường (*Eustoma grandiflorum*) Tại trường Đại học Kiên Giang

#### 4. KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

##### 4.1. Kết luận

Tỷ lệ mẫu sống cao nhất đạt 86,11% khi sử dụng chất khử trùng là Javel (nồng độ 50%) trong thời gian 8 phút. Trên môi trường MS bổ sung 0,7 mg/l 2,4-D

kết hợp 0,1 mg/l NAA có thể tạo callus từ mẫu lá cây hoa Cát tường *in vitro* (đạt 98,67-100%). Trên môi trường MS bổ sung 0,6 mg/l BA hoặc 0,6 mg/l Kn cho phép phát sinh chồi cây hoa Cát tường từ callus (100% hình thành chồi). Cây Cát tường *in vitro* có thể tái sinh hoàn chỉnh trên môi trường MS có bổ sung 1 mg/L IBA (tỷ lệ tạo rễ 71,11%, chiều dài rễ 8,14 cm). Tuy nhiên, thời gian thực hiện đề tài tương đối ngắn nên nhóm chưa nghiên cứu phần tỷ lệ cây sống ở giai đoạn *ex vitro*.

##### 4.2. Kiến nghị

Cần tiếp tục nghiên cứu ảnh hưởng của nồng độ 2,4 D > 0,9 mg/L cũng như BA, KN > 0,6 mg/L và IBA > 1mg/L ảnh hưởng đến các quá trình hình thành callus, chồi và ra rễ đồng đều cây Cát tường *in vitro*.

Cần tiến hành nghiên cứu ảnh hưởng của điều kiện môi trường và tỷ lệ phối trộn giá thể đến khả năng sống sót của cây hoa Cát tường giai đoạn *ex vitro*.

##### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bahrami, N. S., H. Zakizadeh and Y. Hamidoghli M Ghasemnezhad (2013). *Salicylic Acid Retards Petal Senescence in Cut Lisianthus (Eustoma Grandiflorum 'Miarichi Gran White') flowers. Hortic. Environ. Biotechnol*, 2013. **54**: p. 519-523.
2. Semeniyuk, P. and R. Griesbach (1987). *In vitro propagation of prairie gentian*. Plant cell, tissue and organ culture, 1987. **8**(3): p. 249-253.
3. Paek, K.-Y. and E.-j. Hahn (2000). *Cytokinins, auxins and activated charcoal affect organogenesis and anatomical characteristics of shoot-tip cultures of Lisianthus [Eustoma grandiflorum (Raf.) Shinn]*. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant, 2000. **36**(2): p. 128-132.
4. Nhut, D. T., et al. (2006). *Somatic embryogenesis induction from in vitro leaf cultures of lisianthus (Eustoma grandiflorum (Raf.) Shinn.)*. Prop. Orn. Plants, 2006. **6**(3): p. 121-7.
5. Rezaee, F., F. Ghanati and B. L. YUSEFZADEH (2012). *Micropropagation of Lisianthus (Eustoma grandiflorum L.) from different explants to flowering onset*. 2012.
6. Mahajan, A., et al. (2012). *Effect of in vivo and in vitro seed germination and performance of Lisianthus seedlings*. 2012. **69**(1): p. 136-139.

7. Damiano, C., et al. (1988). *Tissue culture and micropropagation of Lisianthus russellianus Hook.* in *III International Symposium on Growth Regulators in Ornamental Horticulture* 251. 1988.
8. Winarto, B., et al. (2015). *Leaf-derived organogenesis in vitro for mass propagation of lisianthus (Eustoma grandiflorum (Raf.) Shinn.* Emirates Journal of Food and Agriculture, 2015: p. 495-501.
9. Laishram, N., et al. (2012). *Lisianthus micro propagation.* International Journal of Agricultural Sciences, 2012. 8(2).
10. Mousavi, E., et al. (2012). *Callus induction and plant regeneration in lisianthus (Eustoma grandiflorum).* Trakia J. Sci, 2012. 10(1): p. 22-5.
11. Akbari, H., R. Pajooheshgar and N. Karimi (2014). *Evaluating the micropropagation of Lisianthus (Eustoma grandiflora L.) as an important ornamental plant.* Ind J Fund Appl Life Sci, 2014. 4: p. 596-602.
12. Winarto, B., et al. (2015). *Leaf-derived organogenesis in vitro for mass propagation of lisianthus (Eustoma grandiflorum (Raf.) Shinn.* 2015: p. 495-501.
13. Akbari, H., R. Pajooheshgar and N. Karimi (2014). *Evaluating the micropropagation of Lisianthus (Eustoma grandiflora L.) as an important ornamental plant.* 2014. 4: p. 596-602.
14. Mai Thị Hồng và cs. (2018). *Nhân nhanh giống hoa Cát tường (Eustoma grandiflorum L.) bằng kỹ thuật nuôi cấy mô.* Hội thảo khoa học công nghệ sinh học toàn quốc, 2018. 1 (2018): p. 1457 – 1462.
15. Trần Thị Ngọc Lan (2016). *Nhân giống cây Cát tường (Eustoma grandiflorum L.) qua hai con đường phát sinh phôi sinh dưỡng và phát sinh cơ quan.* Trường Đại học An Giang, Journal of Science, 2016. 11(3): p. 110 - 118.
16. Trần Thị Thủy Tiên (2010). *Hiệu quả của môi trường nuôi cấy trên sự nhân chồi và tạo rễ cây Cát tường (Eustoma grandiflorum (RAF.) Shinn.) in vitro.* Trường Đại học Cần Thơ, 2010. 54: p. trang.
17. Uddin, J. A., et al. (2017). *In vitro regeneration of Lisianthus (Eustoma grandiflorum Grise).* International Journal Of Business, Social And Scientific Research, 2017. 5(2): p. 126-135.

**EFFECT OF PLANT GROWTH REGULATOR TO THE PROCESS *IN VITRO* PROPAGATION PLANT LISIANTHUS (*Eustoma grandiflorum*) AT KIEN GIANG UNIVERSITY**

**Nguyen Thi Thu Hau<sup>1</sup>, Chuong Thi Hoai Thuong<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>*Faculty of Agriculture and Rural Development, Kien Giang University*

*Email: ntthau@vnkgu.edu.vn*

**Summary**

*Lisianthus (Eustoma grandiflorum (RAF.) Shinn)* the tree belongs to the Gentianaceae family. *Lisianthus* seeds are small in size and have low germination rate, therefore many scientists in the world have studied *in vitro* propagation procedures. The goal of the study is build a process of propagating *Lisianthus* at Kien Giang University to provide seedlings adapted to local climatic and soil conditions. We conducted the research effect of plant growth stimulant concentrations on callus formation, shoot formation and rooting in vitro culture of *lisianthus* plants. Result, when using Javel disinfectant (50% concentration) for 8 minutes, the highest clean sample rate (86.11%) at the same time on MS medium supplemented with 0.7-0.9 mg/L 2.4 D combined 0.1 mg/l NAA, 30 g/l sucrose, was suitable for callus formation (98.67-100%). Other way, on MS medium supplemented with 0.6 mg/L BA or 0.6 mg/L Kn for the highest proportion of shoots in vitro shoot buds (100% shoot formation). On MS medium supplemented with 1 mg/l IBA resulted in the highest process of in vitro rooting of Cat Tuong tree (71.11% rooting rate, root length 8.14 cm).

**Keywords:** *Callus, in vitro, Lisianthus, plant growth regulator.*

Người phản biện: PGS.TS. Nguyễn Văn Đồng

Ngày nhận bài: 15/4/2020

Ngày thông qua phản biện: 15/5/2020

Ngày duyệt đăng: 22/5/2020