

XÂY DỰNG QUY TRÌNH VI NHÂN GIỐNG CÂY NGỌC HÂN (*Angelonia goyazensis* Benth)

Phạm Văn Lộc*, Nguyễn Thành Luân, Lại Đình Biên, Nguyễn Thị Liễu

Đại học Công nghiệp Thực phẩm Thành phố Hồ Chí Minh

Email*: locpv@cntp.edu.vn

Ngày gửi bài: 25.07.2014

Ngày chấp nhận: 7.10.2014

TÓM TẮT

Trong nghiên cứu này chúng tôi khảo sát quy trình vi nhân giống cây Ngọc hân (*Angelonia goyazensis* Benth), bao gồm tái sinh chồi bất định từ lá, tăng sinh chồi, tạo rễ và chuyển cây ra vườn ươm. Mẫu lá non sau khi khử trùng được nuôi cấy trên môi trường MS có bổ sung 0,2 mg/l NAA kết hợp với BA ở các nồng độ khác nhau để tái sinh chồi. Tỷ lệ tái sinh đạt 100% và số lượng chồi trên mỗi mẫu cao nhất môi trường bổ sung BA ở nồng độ 1,0 mg/l. Môi trường MS bổ sung BA 1,5 mg/l là môi trường thích hợp nhất cho tăng sinh chồi. Chồi tạo rễ hoàn chỉnh trên môi trường MS bổ sung 0,1 mg/l IBA. Cây con hoàn chỉnh được chuyển ra vườn ươm để thích nghi. Trên giá thể kết hợp giữa cát và trấu hun với tỷ lệ 1:1 có tỷ lệ sống 100%. Kết quả này có thể được sử dụng trong nhân giống cây Ngọc hân ở quy mô lớn cũng như tạo tiền đề cho những nghiên cứu tiếp theo trên đối tượng này.

Từ khóa: *Angelonia goyazensis*, BA, chồi bất định, IBA, vi nhân giống.

The Initial Protocol of Micropropagation in Angel Flower (*Angelonia goyazensis* Benth)

ABSTRACT

This study aimed to examine initial protocol of micropropagation for angel flower (*Angelonia goyazensis* Benth). Young leaves were cultured on MS medium supplemented with 0.2 mg/l NAA and BA at different concentrations for shoot induction. The most effective rate of adventitious shoot proliferation was induced on MS medium supplemented with 1.5 mg/l BA while MS medium supplemented with 0.1 mg/l IBA was suitable for *in vitro* rooting stage. *In vitro* derived plantlets were successfully established in the substrate with combination of sand: smoked rice husk in the ratio of 1:1. These results provide the basis for further studies on large-scale rapid propagation of angel flower.

Keywords: *Angelonia goyazensis*, adventitious shoot, BA, IBA, micropropagation

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Cây Ngọc hân (*Angelonia goyazensis* Benth) thuộc họ mồm sói (*Scrophulariaceae*) còn có tên gọi khác là hương dạ thảo, băng khuâng. Đây là cây có nguồn gốc từ Braxin. Ngọc hân là cây thân thảo, thân đứng, hơi phân nhánh, phủ đầy lông tuyến. Đây là cây ưa sáng, ưa ẩm, sinh trưởng nhanh. Cây nở hoa quanh năm, hương thơm có ở tất cả các bộ phận. Cây sẽ phát tán hương thơm nhiều hơn khi được tưới nước.

Trong y học người ta thu hái cành lá cây còn tươi làm nước xông hoặc sắc uống trị cảm

sốt, để thanh nhiệt giải độc. Đồng thời Ngọc hân còn được trồng làm cây cảnh ở nhiều nơi. Hiện tại cây nhân giống qua phương pháp tách bụi.

Phương pháp nhân giống cây trồng thông qua nuôi cấy *in vitro* đã được thực hiện thành công trên rất nhiều đối tượng. Tuy nhiên, hiện tại trên thế giới cũng như ở Việt Nam vẫn chưa có công bố vi nhân giống cây Ngọc hân. Do đó nghiên cứu này thực hiện nhằm xây dựng quy trình vi nhân giống Ngọc hân để cung cấp một số lượng giống lớn cho sản xuất, đồng thời tạo nguồn vật liệu *in vitro* phục vụ cho các nghiên cứu khác về đối tượng này.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Nghiên cứu sử dụng lá non cây Ngọc hân (*Angelonia goyazensis* Benth) từ vườn Thực nghiệm Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Công nghiệp Thực phẩm Thành phố Hồ Chí Minh.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Khử trùng mẫu cây

Lá cây được rửa sạch dưới vòi nước chảy, sau đó rửa với xà phòng loãng trong 15 phút, tiếp theo ngâm trong cồn 70° trong 2 phút, cuối cùng ngâm trong dung dịch Javel 40% trong thời gian 10 phút và rửa lại 5 lần với nước cất vô trùng.

2.2.2. Tái sinh chồi trực tiếp từ lá

Lá Ngọc hân sau khi khử trùng được cắt bỏ rìa và gân lá rồi cắt thành những mảnh nhỏ có kích thước khoảng 0,5cm² được cấy vào môi trường MS có bổ sung BA với các nồng độ khác nhau (0÷2,0 mg/l) kết hợp với NAA 0,2 mg/l để phát sinh chồi trực tiếp.

2.2.3. Tăng sinh chồi

Chồi bất định sau 30 ngày được chuyển sang môi trường MS có bổ sung BA với các nồng độ khác nhau (0÷2,0 mg/l) để tăng sinh chồi.

2.2.4. Tạo rễ

Sau 30 ngày nuôi cấy trên môi trường tăng sinh, chồi được chuyển sang môi trường MS có bổ sung IBA với các nồng độ khác nhau (0÷1,5 mg/l) để cảm ứng tạo rễ.

2.2.5. Chuyển cây con ra vườn ươm

Sau 30 ngày nuôi cấy trên môi trường cảm ứng tạo rễ, cây con hoàn chỉnh được chuyển vào các giá thể khác nhau (đất: trấu hun, cát, cát: trấu hun, trấu hun) để xem xét khả năng thích nghi của cây trong điều kiện vườn ươm.

2.3. Điều kiện thí nghiệm

Môi trường sử dụng trong các thí nghiệm là môi trường MS (Murashige and Skoog, 1962). pH môi trường được điều chỉnh bằng 5,8 trước

khí hấp khử trùng. Khử trùng ở 121°C, 1atm trong 20 phút. Thời gian chiếu sáng 16 giờ/ngày, nhiệt độ 25±2°C, cường độ ánh sáng 40-45 µmol.m⁻².s⁻¹. Thí nghiệm được thực hiện tại Phòng thí nghiệm Công nghệ sinh học thực vật, Đại học Công nghiệp Thực phẩm Thành phố Hồ Chí Minh.

2.4. Xử lý số liệu

Các thí nghiệm được bố trí theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên (CRD). Các số liệu thí nghiệm được phân tích thống kê bằng phần mềm Statgraphics centurion 16.1, sử dụng trắc nghiệm đa biến độ Duncan với độ tin cậy 95%.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Tái sinh chồi trực tiếp từ mẫu lá

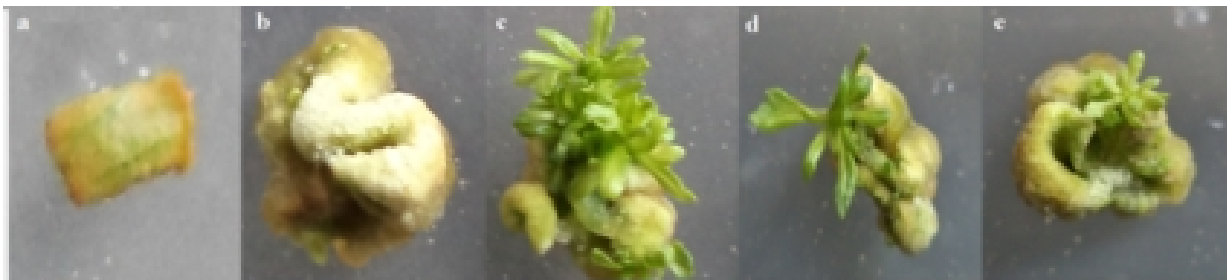
Sau 30 ngày nuôi cấy, trên môi trường không bổ sung BA mẫu cây không có khả năng tạo chồi (Bảng 1). Các môi trường có bổ sung BA, mẫu cây đều có khả năng tạo chồi trực tiếp. Điều này chứng tỏ BA có hiệu quả tái sinh chồi trực tiếp từ mẫu lá Ngọc hân. Trong các nồng độ BA, nồng độ 1,0 mg/l cho tỷ lệ tạo chồi cao nhất (100%), số chồi trên mẫu lớn nhất (5,2 chồi). Khi tăng nồng độ BA cao hơn 1,0 mg/l, tỷ lệ tạo chồi và số lượng chồi trên mỗi mẫu đều giảm xuống (Bảng 1).

Các thí nghiệm tạo chồi bất định thường cho kết quả cao khi sử dụng cytokinin ở nồng độ cao và auxin từ nồng độ thấp đến trung bình. Trong nghiên cứu của Choi et al., (2001), lá cây *Diospyros kaki* tái sinh tối ưu trên môi trường 1/2MS bổ sung 5 mg/l zeatin và 0,1 mg/l IBA. Các kết quả tương tự cũng được ghi nhận trên các đối tượng: *Licopersicon esculentum* tỷ lệ tái sinh chồi đạt 42,3% trên môi trường MS bổ sung 0,05 mg/l IAA và 4,0 mg/l BA (Zubeda và cs., 2001); *Zantedeschia albomaculata* bổ sung 2,0 mg/l BA cho kết quả 3,8 chồi/mẫu cấy, kết quả này cao hơn khi bổ sung thêm 0,5 mg/l IBA (Chang và cs., 2003). Trong nghiên cứu này, môi trường MS bổ sung 1,0 mg/l BA kết hợp với 0,2 mg/l NAA thích hợp nhất cho phát sinh sinh chồi trực tiếp từ mẫu lá Ngọc hân.

Bảng 1. Ảnh hưởng của nồng độ BA kết hợp với NAA lên tỷ lệ tạo chồi và số lượng chồi trên mỗi mẫu

Nồng độ BA (mg/l)	Nồng độ NAA (mg/l)	Tỷ lệ tạo chồi (%)	Số lượng chồi trên mẫu
0,0	0,0	-	-
0,5	0,2	51,0±3,3 ^a	1,4±0,2 ^a
1,0	0,2	100,0±0,0 ^d	5,2±0,4 ^c
1,5	0,2	70,0±2,7 ^c	2,8±0,4 ^b
2,0	0,2	61,0±4,0 ^b	2,0±0,3 ^{ab}

Ghi chú: Các chữ cái khác nhau trong cùng một cột biểu diễn mức độ sai khác có ý nghĩa ở độ tin cậy 95%



Hình 1. Phát sinh chồi từ mẫu lá sau 30 ngày nuôi cấy trên môi trường MS bổ sung BA nồng độ khác nhau

Ghi chú: a. 0 mg/l; b. 0,5 mg/l; c. 1,0 mg/l; d. 1,5 mg/l; e. 2,0 mg/l

3.2. Tăng sinh chồi

Sau 30 ngày nuôi cấy, trong môi trường không bổ sung BA mẫu cấy không phát sinh chồi mới. Chồi phát sinh rễ ở gốc. Điều này là do lượng auxin nội sinh được tạo thành ở chồi ngọn và lá di chuyển xuống dưới cảm ứng tạo rễ. Trên các môi trường có bổ sung BA, đều ghi nhận có sự tăng sinh chồi. Số lượng chồi hình thành tăng theo nồng độ BA được bổ sung. Môi trường bổ sung 1,5 mg/l BA số lượng chồi mới cao nhất

(27,0 chồi/mẫu cấy). Nếu tiếp tục tăng nồng độ BA đến 2,0 mg/l, số lượng chồi giảm xuống. Như vậy môi trường MS bổ sung BA là 1,5 mg/l thích hợp nhất cho tăng sinh chồi cây Ngọc hân.

Để tăng hệ số nhân giống người ta bổ sung BA vào môi trường nuôi cấy ở giai đoạn nhân chồi. BA đẩy nhanh sự phân chia tế bào, sự nhân chồi và sự phát triển chồi. Trong các nghiên cứu trên nhiều đối tượng khác cũng ghi nhận hiệu quả của BA trong tăng sinh chồi.

Bảng 2. Ảnh hưởng của nồng độ BA lên sự tăng sinh chồi

Nồng độ BA (mg/l)	Số lượng chồi/ mẫu	Hình thái chồi
0,0	0,0±0,0 ^a	Xuất hiện rễ ở vị trí vết cắt
0,1	2,6±0,2 ^b	Chồi to
0,5	10,2±0,7 ^c	Chồi to
1,0	21,4±0,5 ^e	Chồi thấp, nhỏ
1,5	27,0±0,4 ^f	Chồi thấp, nhỏ
2,0	14,2±0,4 ^d	Chồi to

Ghi chú: Các chữ cái khác nhau trong cùng một cột biểu diễn mức độ sai khác có ý nghĩa ở độ tin cậy 95%



Hình 2. Tăng sinh chồi sau 30 ngày nuôi cấy trên môi trường MS bổ sung BA nồng độ khác nhau

Ghi chú: a. 0 mg/l; b. 0,1 mg/l; c. 0,5 mg/l; d. 1,0 mg/l; e. 1,5 mg/l; f. 2,0 mg/l

Trong nghiên cứu của Dias et al., (2002) trên đối tượng cây *Lavandula viridis*, môi trường thích hợp nhất để tăng sinh chồi là 1/2MS bổ sung 0,15 mg/l BA. Trong nghiên cứu của Vinterhalter et al.. (2012), môi trường thích hợp nhất để tăng sinh chồi cây *Gentiana dinarica* là MS bổ sung 1,0 mg/l BA và 0,1 mg/l NAA; môi trường tăng sinh chồi cây *Isodon wightii* là 1/2MS bổ sung 1,0 mg/l BA và 0,5 mg/l GA3 theo nghiên cứu của Thirugnanasampandan et al. (2010).

3.3. Tạo rễ

Sau 30 ngày nuôi cấy, số lượng rễ, chiều dài rễ, hình thái rễ phát sinh từ chồi trên môi trường MS có bổ sung IBA được trình bày trong bảng 3.

Các môi trường có bổ sung IBA cho số lượng rễ nhiều hơn so với môi trường đối chứng. Điều này chứng tỏ IBA có hiệu quả trong phát sinh rễ cây Ngọc hân. Trong đó, số lượng rễ nhiều nhất (16,6 rễ) và chiều dài rễ lớn nhất (3,0cm) được ghi nhận trên môi trường MS có bổ sung 0,5 mg/l IBA. Nhưng môi trường cho rễ có chất lượng tốt nhất: to, khỏe, dài, số lượng rễ trên mẫu hợp lý là môi trường bổ sung 0,1mg/l IBA.

Auxin trong sự tạo rễ bất định tác động ở hai giai đoạn: giai đoạn đầu cần auxin ở nồng độ cao

để tạo sơ khởi rễ và giai đoạn sau cần auxin thấp để kéo dài rễ (Bùi Trang Việt, 2000). Các chất tổng hợp như IBA và NAA đã cho hiệu quả kích thích tạo rễ hơn cả IAA. Trong đó IBA ở nồng độ thấp (≤ 1 mg/l) thường được sử dụng trong môi trường tạo rễ *in vitro* trong giai đoạn tạo cây hoàn chỉnh. IBA ở nồng độ 0,6 mg/l được sử dụng tạo rễ cây *Metrosideros excelsa* trong nghiên cứu của Giovanni and Macerllo (2008); nồng độ 0,5 mg/l trên đối tượng cây chuối (*Musa* sp.) trong nghiên cứu của Molla et al., (2004); nồng độ 1,0 mg/l trên đối tượng cây *Desmodium gangeticum* trong nghiên cứu của Puhan and Rath (2012).

3.4. Chuyển cây con ra vườn ươm

Sau 30 ngày chuyển cây con Ngọc hân ra vườn ươm, tỷ lệ sống của cây trên các giá thể khác nhau được trình bày trong bảng 4

Kết quả ở bảng 4 cho thấy không có sự khác biệt ý nghĩa về ảnh hưởng của loại giá thể lên tỷ lệ sống của cây Ngọc hân ngoài vườn ươm. Tất cả các giá thể đều cho tỷ lệ sống cao. Tuy nhiên, hai giá thể đạt tỷ lệ cây sống 100% là đất trồng cây: trấu hun (tỷ lệ 1:1) và cát: trấu hun (tỷ lệ 1:1). Trong đó giá thể cát : trấu hun cho cây cứng cáp, rễ khỏe được đánh giá là môi trường phù hợp để chuyển cây Ngọc hân ra vườn ươm.

Bảng 3. Ảnh hưởng của nồng độ IBA lên sự hình thành rễ

Nồng độ IBA (mg/l)	Số lượng rễ/cây	Chiều dài rễ (cm)	Hình thái rễ
0,0	3,4±0,2 ^a	2,1±0,2 ^b	Rễ to, khỏe, xanh nhạt
0,1	8,4±0,7 ^b	5,0±0,3 ^d	Rễ to, khỏe và dài, xanh nhạt
0,5	18,0±0,6 ^d	3,0±0,5 ^c	Rễ nhỏ, mảnh, ngắn, màu trắng
1,0	16,6±0,5 ^d	1,6±0,2 ^{ab}	Rễ nhỏ, mảnh, ngắn, màu trắng
1,5	14,4±0,7 ^c	1,1±0,1 ^a	Rễ nhỏ, mảnh, ngắn, màu trắng

Ghi chú: Các chữ cái trong cùng một cột khác nhau biểu diễn mức độ sai khác có ý nghĩa ở độ tin cậy 95%

Bảng 4. Ảnh hưởng của giá thể lên tỷ lệ sống của cây Ngọc hân

Thành phần giá thể	Tỷ lệ sống (%)	Hình thái cây
Đất trồng cây	75,0 ± 25,0 ^a	Cây cứng, khỏe, tạo rễ mới
Đất trồng cây : Trấu hun	100,0 ± 0,0 ^a	Cây mảnh, tạo rễ mới
Cát	75,0 ± 25,0 ^a	Cây cứng, khỏe, tạo rễ mới
Cát : Trấu hun	100,0 ± 0,0 ^a	Cây cứng, khỏe, tạo rễ mới
Trấu hun	75,0 ± 25,0 ^a	Cây mảnh, tạo rễ mới

Ghi chú: Các chữ cái trong cùng một cột khác nhau biểu diễn mức độ sai khác có ý nghĩa ở độ tin cậy 95%

4. KẾT LUẬN

Trong nghiên cứu này chúng tôi đã thực hiện quy trình vi nhân giống cây Ngọc hân hoàn chỉnh từ mẫu lá. Lá được vô trùng với Javel 40%, sau đó cấy vào môi trường MS có bổ sung 1,0 mg/l BA + 0,2 mg/l NAA để phát sinh chồi. Chồi bất định sau 30 ngày được cấy chuyển sang môi trường MS có bổ sung 1,5 mg/l BA để tăng sinh chồi. Sau 30 ngày chồi được cấy chuyển sang môi trường MS có bổ sung 0,1 mg/l IBA để tạo rễ. Cây con hoàn chỉnh được trồng trên giá thể cát: trấu hun (tỷ lệ 1:1).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Chang H., Charkabarty D., Hahn E. and Paek K. (2003). Micropropagation of calla lily (*Zantedeschia albomaculata*) via *in vitro* shoot tip proliferation. *In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant*, 39(2): 129-134
- Choi J., Kim H., Lee C., Bae J., Chung Y., Shin J. and Hyung N. (2001). Efficient and simple plant regeneration via organogenesis from leaf segment cultures of persimmon (*Diospyros kaki* Thunb.). *In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant*, 37(2): 274-279.
- Dias M.C., Almeida R. and Romano A. (2002). Rapid clonal multiplication of *Lavandula viridis* L'Hér through *in vitro* axillary shoot proliferation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 68: 99-102.
- Giovanni I. and Marcello A. (2008). Micropropagation of *Metrosideros excelsa*. *In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant*, 44: 330-337
- Molla M.M.H., Dilafroza M. K., Khatun M.M., Al-amin M. and Malek M.A., (2004). *In vitro* rooting and *ex vitro* plantlet establishment of BARI banana 1 (*Musa* sp.) as influenced by different concentration of IBA (Indole 3- butyric Acid). *Asian Journal of Plant Sciences*, 3(2): 196-199.
- Murashige T. and Skoog F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Plant Physiol.*, 15: 473-497
- Puhan P. and Rath S. P. (2012). *In vitro* micropropagation of *Desmodium gangeticum* (L.) DC (Fam-Fabaceae): a medicinal legume through axillary bud multiplication. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 15(10): 477-483.
- Thirugnanasampandan R., Mahendran G. and Narmatha B. V., (2010). High frequency *in vitro* propagation of *Isodon wightii* (Benth) H. Hara. *Acta Physiol. Plant*, 32: 405-409.
- Bùi Trang Việt (2000). Sinh lý thực vật đại cương (Phần II. Phát triển). Nhà xuất bản Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh, Thành phố Hồ Chí Minh, tr. 88.
- Vinterhalter B., Milošević D., Janković T., Milojević J. and Vinterhalter D. (2012). *In vitro* propagation of *Gentiana dinarica* Beck. *Central European Journal of Biology*, 7(4): 690-697.
- Zubeda C. , Imran F., Waseem A., Hamid R., Bushra M. and Azra Q. (2001). Varietal response of *Lycopersicon esculentum* L. to callogenesis and regeneration. *Journal of biological sciences*, 1(12): 1138-1140.