

KHẢO SÁT MỘT SỐ MÔI TRƯỜNG RA HOA *IN VITRO* Ở THUỐC LÁ (*NICOTIANA TABACUM* L.CV SAMSUN)

NGUYỄN NHƯ HOA*, BÙI VĂN LỆ**

TÓM TẮT

Khả năng hình thành hoa in vitro của mẫu cây phụ thuộc vào nhiều yếu tố; trong đó, dinh dưỡng là yếu tố có vai trò khá quan trọng. Cảm ứng ra hoa in vitro ở lát cắt biểu bì thuốc lá Nicotiana tabacum L.cv Samsun cho thấy paclobutrazol là yếu tố có khả năng kích thích cảm ứng ra hoa in vitro ở cây thuốc lá, việc tăng KH_2PO_4 hoặc giảm Fe trong MS đều không có khả năng cảm ứng ra hoa in vitro ở cây thuốc lá.

Từ khóa: *Nicotiana tabacum* L.cv Samsun, ra hoa invitro, paclobutrazol.

ABSTRACT

*A research on some environments for In vitro flowering in tobacco
(Nicotiana tabacum L.cv Samsun)*

The in vitro flowering of the transplanted depends on many factors, among which nutritional factors play an important role. The in vitro flowering reaction of thin cell layers epidermal tobacco Nicotiana tabacum L.cv Samsun shows that paclobutrazol can stimulate in vitro flowering in tobacco, whereas increasing KH_2PO_4 or reducing Fe in MS inhibit this process.

Keywords: *Nicotiana tabacum* L.cv Samsun, in vitro flowering, paclobutrazol.

1. Mở đầu

Sự ra hoa (flowering) là bước chuyển quan trọng trong đời sống thực vật, được kiểm soát bởi rất nhiều các yếu tố nội sinh và ngoại sinh. Trong các yếu tố ngoại sinh, dinh dưỡng là yếu tố có vai trò quan trọng trong cảm ứng ra hoa, trong số đó phải kể đến một số hợp chất chứa kali, phospho, nitơ, các chất điều hòa sinh trưởng thực vật...

Hiện nay, cảm ứng ra hoa trong điều kiện *in vitro* là mảng nghiên cứu thu hút sự chú ý của nhiều nhà khoa học nhằm có cái nhìn rõ hơn về hiện tượng ra hoa ở thực vật bậc cao cũng như các ứng dụng của nó. Nguyên liệu để cảm ứng ra hoa trong điều kiện *in vitro* cũng rất đa dạng như hạt, cây con, cây *in vitro*, mô phân sinh ngọn, cơ quan hoa...

Mục đích của việc áp dụng kỹ thuật nuôi cấy *in vitro* thường là để tạo ra các mô hình nghiên cứu hay sản phẩm thương mại. Tuy nhiên, trong các nghiên cứu hiện nay,

* ThS, Trường Đại học Sư phạm TPHCM

** PGS TS, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG TPHCM

hoa *in vitro* thường không hoàn toàn giống hoa trong điều kiện tự nhiên về hình dạng, màu sắc, kích thước, khả năng thụ phấn...

Cây thuốc lá là cây công nghiệp ngắn ngày, có giá trị kinh tế cao. Ngoài ra, thuốc lá còn có chu trình sinh trưởng, phát triển ngắn, sinh sản nhanh với số lượng lớn, thường được dùng làm mô hình cho các nghiên cứu khoa học.

Do đó, mục đích của nghiên cứu “**Khảo sát một số môi trường ra hoa *in vitro* ở thuốc lá (*Nicotiana tabacum* L.cv Samsun)**” là tìm ra môi trường thích hợp cho sự ra hoa *in vitro* hoàn chỉnh ở cây thuốc lá *Nicotiana tabacum* L.cv Samsun từ lát cắt biểu bì cuống hoa, tạo nguyên liệu cho các nghiên cứu sinh lí, di truyền sâu hơn.

2. Vật liệu, phương pháp

2.1. Đối tượng, vật liệu

2.1.1. Đối tượng

Cây thuốc lá *Nicotiana tabacum* L.cv Samsun từ Phòng Thí nghiệm Công nghệ Sinh học Thực vật, Khoa Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên.

2.1.2. Vật liệu

Để tìm ra môi trường thích hợp cho sự ra hoa *in vitro* ở cây thuốc lá, chúng tôi sử dụng các vật liệu sau:

- Cây thuốc lá *in vitro* cấy truyền sau 2 – 3 tuần được trồng ra vườn từ 8 – 10 tuần thì bắt đầu ra hoa. Dùng trục phụ phát hoa khử trùng, lấy phần biểu bì, đem nuôi trong các môi trường khảo sát.

- Môi trường khảo sát ra hoa *in vitro* của cây thuốc lá: môi trường MS* (Murashige và Skoog 1962) [7]) thay đường sucrose thành glucose có bổ sung thêm Benzyladenine (BA) (0,5 μ M) và α -Naphthaleacetic acid (NAA) (0,5 μ M)

- Tùy theo mục đích thí nghiệm môi trường được bổ sung thêm: Paclobutrazol (PBZ) (2S,3S)-1-(4-chlorophenyl)-4,4-dimethyl-2-(1,2,4-triazol-1-yl)pentan-3-ol)

Fe-EDTA

KH₂PO₄

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Nhằm xác định môi trường thích hợp cảm ứng ra hoa hoàn chỉnh *in vitro*, chúng tôi tiến hành theo dõi tỉ lệ mẫu ra hoa ở mỗi nghiệm thức sau 60 ngày.

- Mẫu cây: lát cắt dọc (chủ yếu là phần biểu bì) của trục phụ phát hoa đã được khử trùng.

- Bố trí thí nghiệm: thí nghiệm gồm 18 nghiệm thức, mỗi nghiệm thức lặp lại 3 lần, mỗi lần 10 mẫu.

- Quy trình khử mẫu:

Trục phát hoa
 ↓
 Rửa sạch bằng nước
 ↓
 Lau lại bằng cồn 70⁰
 ↓
 Lắc trong nước tẩy rửa pha loãng, ngâm 5 – 10 phút
 ↓
 Rửa sạch bằng nước cất
 ↓
 Lắc lại bằng nước cất vô trùng
 ↓
 Lắc cồn 70⁰ trong 30 giây – 1 phút (tủ cấy)
 ↓
 Lắc Javel 10 – 15 phút (tủ cấy)
 ↓
 Rửa sạch Javel bằng nước cất vô trùng (5 – 6 lần) (tủ cấy)

- Các môi trường đã khảo sát:

Bảng 1. Bảng quy ước môi trường bổ sung PBZ

STT	Môi trường gốc	Nồng độ PBZ bổ sung (mg/l)	Kí hiệu
1	MS* + BA (0,5µM) + NAA (0,5µM)	0	P ₀
2	MS* + BA (0,5µM) + NAA (0,5µM)	0,5	P ₁
3	MS* + BA (0,5µM) + NAA (0,5µM)	1,0	P ₂
4	MS* + BA (0,5µM) + NAA (0,5µM)	1,5	P ₃
5	MS* + BA (0,5µM) + NAA (0,5µM)	2,0	P ₄

Bảng 2. Bảng quy ước môi trường giảm Fe

STT	Môi trường gốc	Lượng Fe trong MS (%)	Kí hiệu
1	MS*+ BA (0,5µM) + NAA (0,5µM)	10	F ₁
2	MS*+ BA (0,5µM) + NAA (0,5µM)	20	F ₂
3	MS*+ BA (0,5µM) + NAA (0,5µM)	30	F ₃
4	MS*+ BA (0,5µM) + NAA (0,5µM)	40	F ₄
5	MS*+ BA (0,5µM) + NAA (0,5µM)	50	F ₅
6	MS*+ BA (0,5µM) + NAA (0,5µM)	75	F ₆

Bảng 3. Bảng quy ước môi trường bổ sung KH₂PO₄

STT	Môi trường gốc	Nồng độ KH ₂ PO ₄ bổ sung (% MS)	Kí hiệu
1	MS* + BA (0,5µM) + NAA (0,5µM)	10	K ₁
2	MS* + BA (0,5µM) + NAA (0,5µM)	20	K ₂
3	MS* + BA (0,5µM) + NAA (0,5µM)	25	K ₃
4	MS* + BA (0,5µM) + NAA (0,5µM)	50	K ₄

Bảng 4. Bảng quy ước môi trường bổ sung KH₂PO₄, PBZ

STT	Môi trường gốc	KH ₂ PO ₄ bổ sung (% MS)	PBZ bổ sung (mg/l)	Kí hiệu
1	MS* + BA (0,5µM) + NAA (0,5µM)	10	1,0	K ₁ P ₂
2	MS* + BA (0,5µM) + NAA (0,5µM)	20	1,0	K ₂ P ₂
3	MS* + BA (0,5µM) + NAA (0,5µM)	25	1,0	K ₃ P ₂

3. Kết quả, thảo luận

3.1. Khảo sát ảnh hưởng của PBZ lên sự ra hoa in vitro ở cây thuốc lá

Bảng 5. Ảnh hưởng của PBZ đến sự ra hoa in vitro thuốc lá *Nicotiana tabacum* L.cv Samsun sau 60 ngày nuôi cấy

Môi trường	Hàm lượng PBZ (mg/l)	Tỉ lệ ra hoa sau 60 ngày (%)
P ₀	0	30 ± 8,59
P ₁	0,5	33,33 ± 8,59
P ₂	1	73,33 ± 8,59
P ₃	1,5	36,67 ± 8,59
P ₄	2	30 ± 8,59

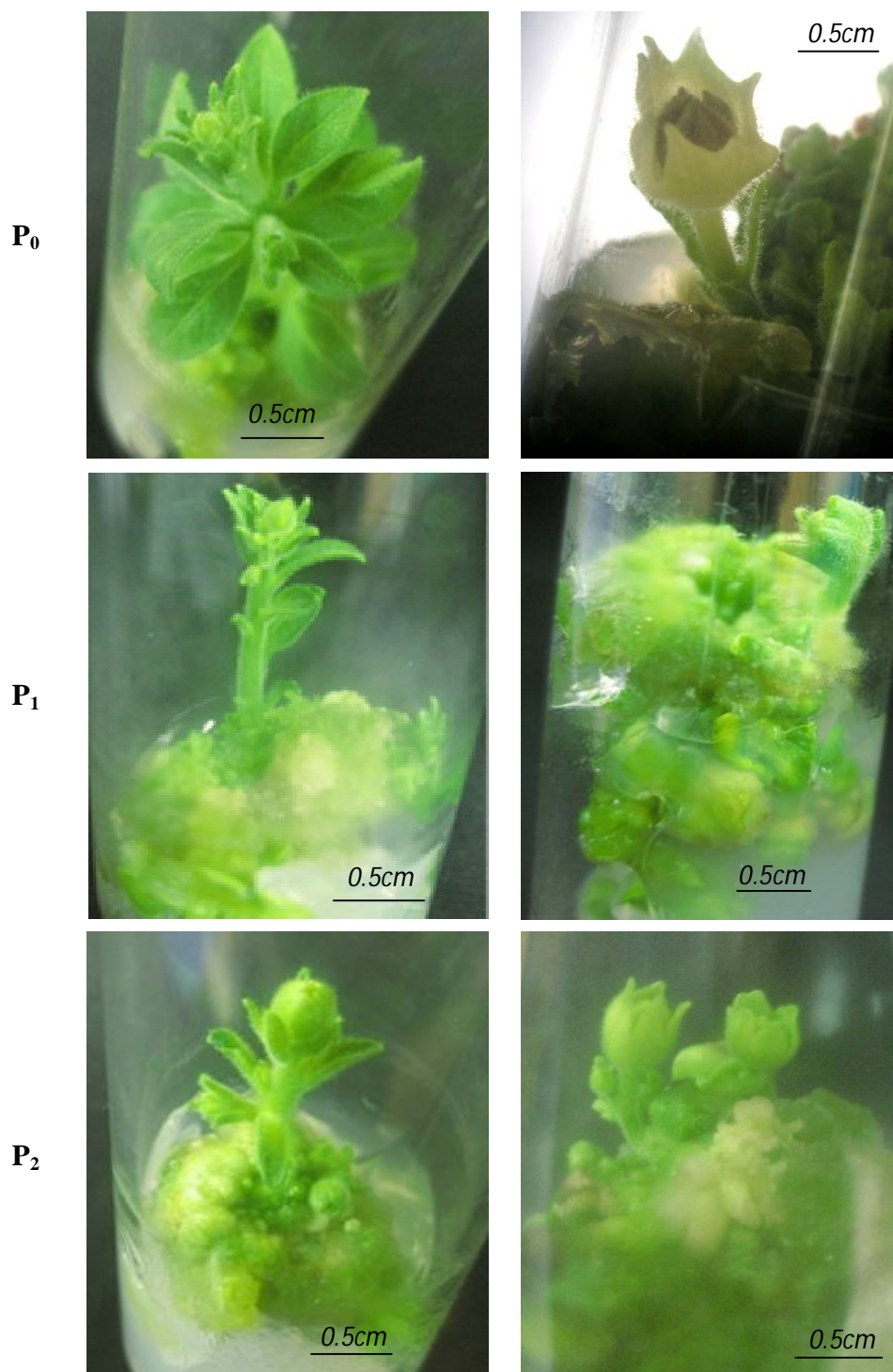
Kết quả khảo sát ảnh hưởng của PBZ cho thấy các môi trường trong thí nghiệm này đều có khả năng kích thích sự ra hoa *in vitro* ở cây thuốc lá và khả năng kích thích có phụ thuộc vào nồng độ PBZ sử dụng. Sau 60 ngày, tỉ lệ hoa xuất hiện tăng khi tăng nồng độ PBZ (0,5 – 1 mg/l) và môi trường cho tỉ lệ ra hoa cao nhất (73,33%) là P2 (MS + BA (0,5 µM) + NAA (0,5 µM) + PBZ (1,0 mg/l)). Sau đó, khi tiếp tục tăng nồng độ PBZ (1,5 – 2 mg/l) thì tỉ lệ mẫu ra hoa lại giảm. Hoa *in vitro* trên các môi trường cảm ứng này có hoa mọc trực tiếp từ mô sẹo, hoa mọc ra từ chồi. Có nhiều dạng hoa, hoa có thể thiếu một vài bộ phận, kích thước hoa nhỏ hơn hoa *ex vitro*. Các hoa mọc trực tiếp từ mô sẹo thường có hình thái bất thường hơn so với hoa mọc từ chồi. Ở các nghiệm thức khác nhau đều xuất hiện các dạng hoa này, tuy nhiên, tỉ lệ hoa có hình dạng tương đối bình thường ở nghiệm thức P₂ (46,67%) cao hơn các nghiệm thức khác.

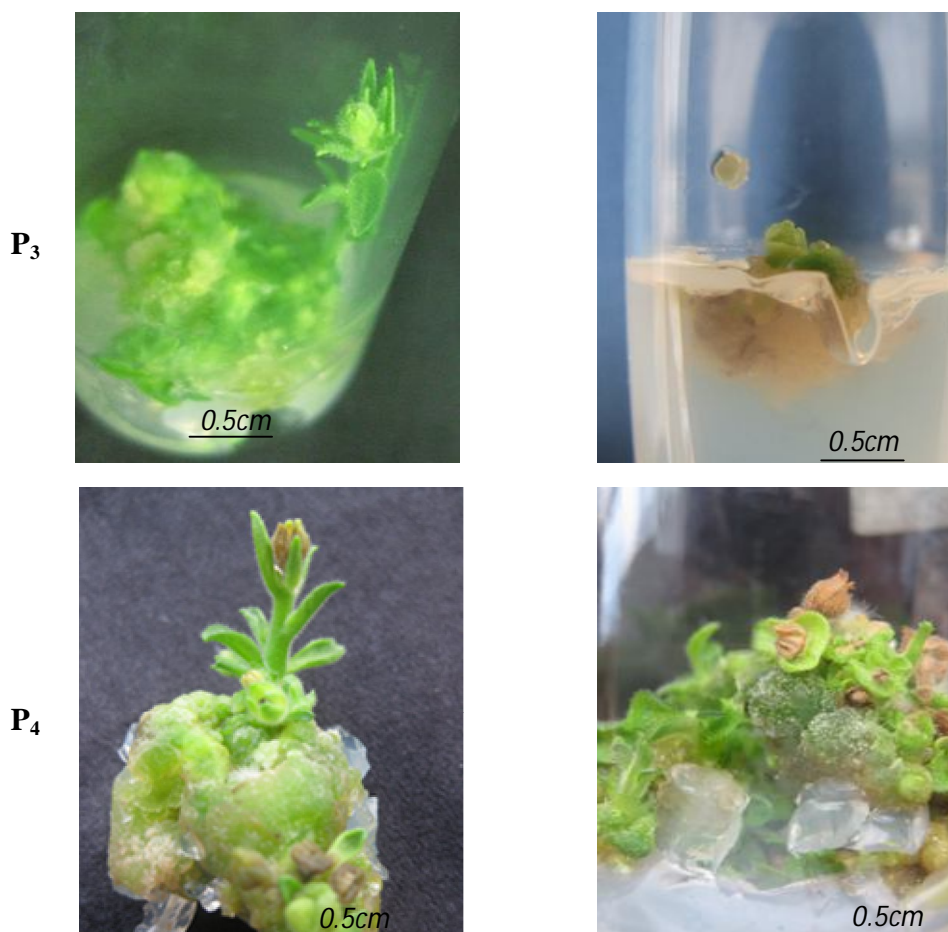
Bảng 6. Tỉ lệ mẫu ra hoa bình thường trên cây thuốc lá *Nicotiana tabacum* L.cv Samsun ở các nghiệm thức bổ sung PBZ sau 60 ngày nuôi cấy

Môi trường	Hàm lượng PBZ (mg/l)	Tỉ lệ mẫu ra hoa bình thường sau 60 ngày (%)
P ₀	0	13,33 ± 6,31
P ₁	0,5	6,67 ± 4,63
P ₂	1	46,67 ± 9,26
P ₃	1.5	6,67 ± 4,63
P ₄	2	16,67 ± 6,92

PBZ có tác dụng chặn con đường sinh tổng hợp gibberellin do nó ức chế sự oxy hóa kaurene thành acid kaurenoic, ức chế gibberellin, ngăn cản quá trình phân hủy acid abscisic. Chính vì vậy nó làm giảm tốc độ phân chia của tế bào, giảm chiều cao cây, khiến cây bị lão hóa nhanh hơn (Christo và cộng sự 1995) [3]. PBZ còn tăng cường quá trình quang hợp, làm tăng lượng carbohydrate, tăng lượng N, P, Ca, Mg của lá từ đó thúc đẩy sự tăng trưởng của hoa giúp tăng số lượng, chất lượng hoa (Fatma và cộng sự 2007). [6]

Ngoài ra, các thí nghiệm trên *Saposhnikovia divaricata*, *Euphorbia millii* cho thấy liều lượng PBZ đóng vai trò quan trọng trong việc kích thích ra hoa *in vitro* [8,4]. Nếu bổ sung PBZ với nồng độ quá cao có thể dẫn đến ức chế sự hình thành hoa *in vitro*, ức chế tăng trưởng, thậm chí làm chết cả cây *in vitro*. Với nồng độ thích hợp, tỉ lệ cảm ứng ra hoa có thể đạt đến 100% ở cây xương rồng Bát tiên *Euphorbia millii* – MS bổ sung 6 mg/l PBZ; tuy nhiên, các cây này sẽ bị ức chế tăng trưởng nếu nồng độ sử dụng là 8 mg/lPBZ [8]. Như vậy, PBZ có vai trò trong việc kích thích ra hoa *in vitro* ở thuốc lá. Mỗi đối tượng có giới hạn nồng độ PBZ liên quan đến sự ra hoa *in vitro* riêng, với thuốc lá nồng độ PBZ bổ sung thích hợp có lẽ là trong khoảng 1 mg/l. Thí nghiệm cho thấy ở nồng độ này hoa *in vitro* tốt hơn về cả số lượng lẫn chất lượng, tỉ lệ ra hoa cao hơn, số hoa có dạng bình thường cũng nhiều hơn.





Hình 1. Các dạng hoa thuốc lá *Nicotiana tabacum* L.cv Samsun in vitro trên các môi trường P₀, P₁, P₂, P₃, P₄ sau 60 ngày nuôi cấy

3.2. Khảo sát ảnh hưởng của Fe lên sự ra hoa in vitro ở cây thuốc lá

Bảng 7. Ảnh hưởng của Fe đến sự ra hoa in vitro thuốc lá *Nicotiana tabacum* L.cv Samsun sau 60 ngày nuôi cấy

Môi trường	Hàm lượng Fe trong MS (%)	Tỉ lệ ra hoa sau 60 ngày (%)
F ₁	10	0
F ₂	20	0
F ₃	30	0
F ₄	40	0
F ₅	50	0
F ₆	75	0
P ₀	100	30 ± 8,59

Sau 60 ngày thí nghiệm, 100% mẫu cây trên tất cả các môi trường cảm ứng giảm Fe đều không ra hoa, không xuất hiện chồi. Ở mỗi lần lặp lại, kết quả thu được khá đồng đều, khác nhau giữa các lần lặp lại chỉ là mô sẹo thu được lớn hay nhỏ.

Chất sắt dường như cần thiết cho sự cảm ứng quang kì và không cần thiết cho quá trình ra hoa tiếp theo như trong sự trao đổi chất thông thường. Sự thiếu sắt cũng ngăn cản hoặc làm xáo trộn lớn sự khởi phát hoa trên cây *Xanthium* trong lúc các yếu tố khác thì ít cần thiết hơn. Tuy nhiên, cách mà nguyên tố sắt can thiệp vào sự cảm ứng thì chưa được biết (Trần Văn Hâu, 2009) [1]. Như vậy, trong trường hợp cây thuốc lá, thiếu sắt cũng ảnh hưởng nghiêm trọng đến sự ra hoa *in vitro*, ngăn chặn sự khởi phát chồi và hoa *in vitro*.

3.3. Khảo sát ảnh hưởng của P, K lên sự ra hoa in vitro ở cây thuốc lá

Bảng 8. Ảnh hưởng của P, K đến sự ra hoa in vitro thuốc lá *Nicotiana tabacum* L.cv Samsun sau 60 ngày nuôi cấy

Môi trường	Hàm lượng KH ₂ PO ₄ bổ sung (%MS)	Tỉ lệ ra hoa sau 60 ngày (%)	Tỉ lệ ra chồi sau 60 ngày (%)
P ₀	0	30 ± 8,59	77,33 ± 3,43
K ₁	10	0	36,67 ± 8,95
K ₂	20	0	46,67 ± 9,26
K ₃	25	0	56,67 ± 9,20
K ₄	50	0	16,67 ± 6,92

Sau 60 ngày thí nghiệm, 100% mẫu cây trên tất cả các môi trường cảm ứng đều không ra hoa, một số mẫu có xuất hiện chồi. Một số chồi có hiện tượng thùy tinh ở lá.

Nghiệm thức K₁, K₂, K₃ có tỉ lệ chồi xuất hiện nhiều hơn nhưng trong thời gian quan sát chưa thấy xuất hiện hoa, vì vậy nồng độ KH₂PO₄ 10%, 20%, 25% được chọn để kết hợp với PBZ trong thí nghiệm tiếp theo.

Trong một số trường hợp, khi tăng nồng độ P, K trong môi trường nuôi cấy giúp thúc đẩy sự ra hoa *in vitro* xảy ra thuận lợi hơn. Các nghiên cứu trên nhân sâm *Panax ginseng* (Chang và Hsing, 1980) [2], cà chua *Lycopersicon esculentum* Mill. (Dielen và cộng sự, 2001) [5] chứng minh rằng bổ sung BA, cất rễ và tăng hàm lượng phosphor, kali trong môi trường nuôi cấy thúc đẩy sự ra hoa *in vitro* xảy ra nhanh hơn. Hay ở cây táo, số hoa trên cây có tương quan tuyến tính với hàm lượng P, K trong lá. Hay ở giống xoài Dashehari, lượng P, K trong chồi cao rất thích hợp cho sự khởi phát hoa (Trần Văn Hâu, 2009). [1]

Dù việc tăng nồng độ P, K trong môi trường nuôi cấy có tác động tích cực đến sự ra hoa của nhiều đối tượng thực vật, nhưng ở thuốc lá, theo kết quả thu được việc điều chỉnh này không cho thấy tác dụng kích thích mà còn ức chế sự ra hoa *in vitro*.

3.4. Khảo sát ảnh hưởng của PBZ, P, K lên sự ra hoa *in vitro* ở cây thuốc lá

Bảng 9. Ảnh hưởng của PBZ, P, K đến sự ra hoa *in vitro* cây thuốc lá *Nicotiana tabacum* L.cv Samsun sau 60 ngày nuôi cấy

Môi trường	Hàm lượng KH_2PO_4 bổ sung (%MS)	Hàm lượng PBZ bổ sung (mg/l)	Tỉ lệ ra hoa sau 60 ngày (%)
P ₀	0	0	30 ± 8,59
K ₁ P ₂	10	1,0	0
K ₂ P ₂	20	1,0	0
K ₃ P ₂	25	1,0	0

Sau 60 ngày thí nghiệm, 100% mẫu cấy trên tất cả các môi trường cảm ứng đều không ra hoa, một số mẫu có xuất hiện chồi. Kết quả này cho thấy tương tự như thí nghiệm trên P, K không có tác dụng kích thích sự ra hoa *in vitro* ở thuốc lá.

4. Kết luận, kiến nghị

PBZ là yếu tố có khả năng kích thích cảm ứng ra hoa *in vitro* ở cây thuốc lá. Sau 60 ngày, môi trường cho tỉ lệ ra hoa cao nhất (73,33%) là P2 (MS* + BA (0,5 μM) + NAA (0,5 μM) + PBZ (1,0 mg/l)).

Việc tăng hàm lượng KH_2PO_4 hoặc giảm hàm lượng Fe đều không có khả năng cảm ứng ra hoa *in vitro* ở cây thuốc lá.

Nên tiếp tục khảo sát ảnh hưởng của các yếu tố khác như ánh sáng, giá thể, tăng hàm lượng sắt, đồng... và ảnh hưởng của việc tương tác giữa các yếu tố đến sự cảm ứng ra hoa *in vitro* ở cây thuốc lá.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Trần Văn Hậu (2009), *Giáo trình xử lý ra hoa cây ăn trái*, Nxb Đại học Quốc gia TP HCM.
2. Chang, W.C., Hsing, Y.I. (1980), *In vitro flowering of embryoids derived from mature root callus of ginseng (Panax ginseng)*, Nature, 284, pp.341-342.

3. Christo, C., Tsvetkov, I. and Kovachev, V. (1995), *Use of paclobutrazol to control vegetative growth and improve fruiting efficiency of grapevines (Vitis vinifera L.)*, Plant physiol, 21 (4), pp.64-71.
4. Dewir, Y.H. (2006), *The effects of paclobutrazol, light emitting diodes (LEDs) and sucrose on flowering of Euphorbia millii plantlets in vitro*, European journal of horticultural science, 71(6), pp.240-244.
5. Dielen, V. (2001), *In vitro control of floral transition in tomato (Lycopersicon esculentum Mill.), the model of autonomously flowering plant, using the late flowering uniflora mutant*, Journal of experimental botany, 52, pp.715-723.
6. Fatma, E.M. (2007), *Some studies on the effects of putrescine and paclobutrazol on the growth and chemical composition of Bougainvillea glabra L. at Nubaria*, American-Eurasian J. Agric and Environ. Sci., 2(5), pp.552-558.
7. Murashige, T. and Skoog, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures., Physiologia plantarum, 15, pp.473 – 497.
8. Qi Q., Xing, F.W., Xiao, Y.P. and Chen, H.F. (2009), *Somatic embryogenesis and in vitro flowering in Saposhnikovia divaricata J.*, Plant Growth Regul, 28, pp.81 – 86.

(Ngày Tòa soạn nhận được bài: 16-7-2013; ngày phản biện đánh giá: 18-8-2013;
ngày chấp nhận đăng: 30-8-2013)