

ẢNH HƯỞNG CỦA CƯỜNG ĐỘ ÁNH SÁNG VÀ HÀM LƯỢNG ĐƯỜNG SUCROSE TRONG MÔI TRƯỜNG NUÔI CÂY ĐẾN SỰ PHÁT TRIỂN CỦA CHỒI DƯA HẦU TAM BỘI *IN VITRO*

Lâm Ngọc Phương¹, Nguyễn Bảo Vệ¹ và Đỗ Thị Trang Nhã²

ABSTRACT

Objective of this study is to determine the intensity of light and the concentration of sucrose in agar gelled MS medium for shoot formation of seedless watermelon (Citrullus vulgaris Schard.) in vitro. The experiment was carried out by a factorial design in randomized complete with 3 replications and 12 treatments that were combined between three light intensities (1200, 1500 and 1800 lux) and four sucrose concentrations (0, 10, 20 and 30 g/l). Results showed that the highest efficiency of shoot formation after 4 weeks occurring in the treatment MS medium contained 30 g/l sucrose with 0.5 mg/l BA and kept at light intensity 1800 lux. These shoots, that were strong, high and had many leaves, will be a good material for a new shoot multiplication, root information and acclimatization.

Keywords: watermelon, in vitro, light intensity, sucrose concentrations

Title: Effects of light intensity and sucrose concentration in agar gelled MS medium on shoot formation of seedless watermelon (Citrullus vulgaris Schard.) in vitro

TÓM TẮT

Mục đích của nghiên cứu là xác định cường độ ánh sáng và nồng độ đường sucrose trong môi trường MS đặc cho sự phát triển của chồi dưa hầu tam bội (Citrullus vulgaris Schard.) in vitro. Thí nghiệm được bố trí theo thể thức thừa số hoàn toàn ngẫu nhiên 3 lần lặp lại với 12 nghiệm thức là tổ hợp của 3 cường độ ánh sáng (1.200, 1.500 và 1.800 lux) và 4 nồng độ đường sucrose (0, 10, 20 và 30 g/l). Kết quả cho thấy sự phát triển của chồi dưa hầu tam bội tốt nhất trong môi trường MS có chứa 30 g/l sucrose với 0,5 mg/l BA dưới cường độ ánh sáng 1.800 lux. Những chồi này phát triển rất tốt, cao và nhiều lá sẽ là vật liệu tốt để nhân chồi, ra nhiều rễ và dễ thuần dưỡng.

Từ khóa: dưa hầu, trong bình vô trùng, cường độ ánh sáng, nồng độ sucrose

1 MỞ ĐẦU

Qua các thí nghiệm nhân giống *in vitro* từ chồi đỉnh của nhiều loại cây trồng, Murashige (1974) cho rằng cường độ ánh sáng tối hảo cho giai đoạn I và II là 1.000 lux; nuôi cấy cây thân thảo, có thể sử dụng cường độ ánh sáng từ 500-10.000 lux. Tuy nhiên, trong giai đoạn khởi đầu nếu sự chiếu sáng có cường độ cao dẫn tới đen mẫu cấy. Bình thường, trong giai đoạn III, sẽ có lợi nếu gia tăng cường độ ánh sáng lên để củng cố sức mạnh và chuẩn bị cho các cây con cứng cáp trước khi chuyển ra ngoài vườn ươm. Trong giai đoạn này, cường độ ánh sáng được Murashige (1974) đề nghị là 3.000-10.000 lux và nhiều phòng thí nghiệm thấy rằng con số 40-75 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{giây}$ (tương đương 3.300-6200 lux) là thích hợp

¹ Bộ môn Khoa Học Cây Trồng, Khoa Nông Nghiệp & Sinh Học Ứng dụng

² Phòng Thí nghiệm Chuyên sâu

(Edwin, 1993). Theo Miller *et al.* (1976), cây con *Cordyline terminalis* có tỷ lệ sinh sản chồi lớn nhất khi được chiếu sáng ở 300 lux, còn trên một số loài hoa kiểng nhiệt đới nhân chồi nhanh ở ánh sáng từ 3.000-10.000 lux là thích hợp.

Trong nuôi cấy *in vitro*, mô và tế bào thực vật sống chủ yếu theo phương thức dị dưỡng, nên việc đưa đường vào môi trường nuôi cấy làm nguồn chất hữu cơ là điều bắt buộc (Lê Trần Bình *et al.*, 1997). Đường không chỉ điều hòa áp suất thẩm thấu của môi trường mà còn là nguồn cacbohydrat tốt nhất cung cấp cho mô và tế bào. Nhưng khi nồng độ đường quá cao sẽ hạn chế hiệu quả hấp thu nước của mô cây. Hai dạng đường thường gặp nhất trong nuôi cấy *in vitro* là glucose và sucrose, trong đó sucrose được sử dụng phổ biến hơn (Nguyễn Đức Lượng, 2001). Tùy theo mục đích nuôi cấy mà hàm lượng đường cho vào môi trường khác nhau, thông thường là 30-40 g/l là tương đối thích hợp cho nhiều loại cây (Vuylsteke, 1989). Các nghiên cứu trên dưa *Cucumis hystrix* (Michael *et al.*, 2001), cây dâu tây (Hyung, 1996) và cây hành (Teruyuki, 1999) đều cho thấy hàm lượng đường 30 g/l là thích hợp cho chồi phát triển tốt trong nuôi cấy *in vitro*.

Cường độ ánh sáng và hàm lượng đường trong môi trường nuôi cấy thích hợp cho sự phát triển của chồi dưa hấu Tam Bội chưa được xác định. Do đó, cần thiết phải thực hiện nghiên cứu này.

2 PHƯƠNG TIỆN VÀ PHƯƠNG PHÁP

Hạt dưa hấu tam bội được kiểm tra đồng nhất nhau về mặt di truyền bằng phương pháp điện di protein SDS-PAGE trước khi đưa vào thí nghiệm. Để có được cụm chồi dùng trong thí nghiệm, trước tiên phải tạo chồi từ hạt giống dưa hấu tam bội. Các cụm chồi ba tuần tuổi được nuôi cấy *in vitro* ở điều kiện nhiệt độ $24 \pm 2^{\circ}\text{C}$, đèn neon chiếu sáng với cường độ 1.500 lux và thời gian chiếu sáng là 12 giờ mỗi ngày. Môi trường nuôi cấy là môi trường MS (Murashige và Skoog, 1962). Sau 3 tuần, tiến hành cắt chồi đỉnh của cây dưa hấu tam bội con chuyển sang môi trường MS khác, có chất điều hòa sinh trưởng (1mg/l BA) để kích thích chúng hình thành cụm chồi. Sau 4 tuần nuôi, các chồi đơn lẻ sẽ hình thành cụm chồi, các chồi này được cấy chuyển sang bình chứa môi trường cơ bản MS thuần làm bình mẹ. Sau 2 - 3 tuần khi các chồi đã phục hồi, dùng những chồi này như nguyên liệu ban đầu để thực hiện thí nghiệm.

Thí nghiệm được bố trí theo thể thức thừa số hai nhân tố, hoàn toàn ngẫu nhiên với 4 lần lặp lại. Nhân tố thứ nhất là 4 hàm lượng đường 0, 10, 20 và 30 g/lít. Nhân tố thứ hai gồm 3 mức cường độ ánh sáng là 1200, 1500 và 1800 lux (Bảng 1). Môi trường nuôi cấy trong thí nghiệm là môi trường MS nên có bổ sung 0,5 mg/l BA. Tổng cộng có 12 nghiệm thức (Bảng 1), mỗi lặp lại là một keo, mỗi keo có 4 mẫu cấy. Ánh sáng đèn neon và đường sucrose được dùng trong thí nghiệm.

Bảng 1: Các nghiệm thức (NT) của thí nghiệm

Đường (g/l)	Cường độ ánh sáng (lux)		
	1200	1500	1800
0	NT 1	NT 2	NT 3
10	NT 4	NT 5	NT 6
20	NT 7	NT 8	NT 9
30	NT 10	NT 11	NT 12

3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Số chồi dưa hấu tam bội hiện diện sau khi cấy 4 tuần

Kết quả ở Bảng 2 cho thấy khi gia tăng hàm lượng đường của môi trường MS thì số chồi được nhân lên sau 4 tuần nuôi cấy cũng tăng theo. Số chồi đạt cao nhất trung bình là 8,5 chồi ở những nghiệm thức chứa 30 g/l đường, và khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức 1% so với nghiệm thức đối chứng (3,8 chồi) và các nghiệm thức còn lại. Số chồi ở nghiệm thức 20 g/l đường (5,8 chồi) không khác biệt với nghiệm thức có 10 g/l đường nhưng khác biệt có ý nghĩa thống kê 1% so với nghiệm thức đối chứng. Tuy nhiên, số chồi ở nghiệm thức có 10 g/l đường và đối chứng không khác biệt nhau qua thống kê.

Kết quả này còn cho thấy có sự khác biệt thống kê về số chồi ở tất cả các nghiệm thức. Số chồi đạt cao nhất ở nghiệm thức 30 g/l đường + 1800 lux ánh sáng (9 chồi), không khác biệt với hai nghiệm thức 30 g/l đường + 1200 lux ánh sáng (8,9 chồi) và 30 g/l đường + 1.500 lux ánh sáng (7,5 chồi), nhưng khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức 5% so với các nghiệm thức còn lại.

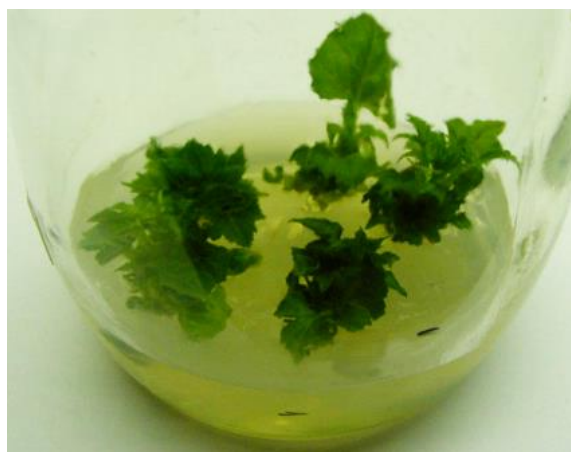
Bảng 2: Số chồi dưa hấu tam bội sau 4 tuần nuôi cấy dưới sự ảnh hưởng của nồng độ đường và cường độ ánh sáng khác nhau

Đường (g/l)	Cường độ ánh sáng (lux)			Trung bình
	1200	1500	1800	
0	3,7 de	4,2 cde	3,6 e	3,8 c
10	4,6 cde	5,5 bcde	4,5 cde	4,9 bc
20	5,8 bcd	6,0 bc	5,7 bcd	5,8 b
30	8,9 a	7,5 ab	9,0 a	8,5 a
Trung bình	5,7	5,8	5,7	5,7
F (nghiệm thức)			**	
F (đường)			**	
F (ánh sáng)			ns	
F (đường x ánh sáng)			ns	
CV (%)			21,9	

** : Khác biệt ở mức ý nghĩa thống kê 1%

ns: Không khác biệt ý nghĩa thống kê

Các chữ theo sau các giá trị giống nhau thì không khác nhau ở mức ý nghĩa thống kê



Hình 1: Chồi dưa hấu tam bội phát triển trên môi trường MS có 30 g/l đường

Như vậy, khi bổ sung 30 g/l đường vào môi trường MS cho số chồi dưa hấu tam bội gia tăng cao nhất (Hình 1). Điều này chứng tỏ đường có ảnh hưởng rất lớn đến quá trình tạo chồi của dưa hấu tam bội trong nuôi cấy mô. Vì nguồn cung cấp carbon chính cho sự hình thành và phát triển của chồi là đường được cho vào trong môi trường nuôi cấy (Lê Trần Bình *et al.*, 1997). Ngoài ra, đường còn điều hòa áp suất thẩm thấu của môi trường giúp chồi non hấp thu tốt chất dinh dưỡng trong môi trường nhân tạo (Nguyễn Đức Lượng, 2001).

Ở các nghiệm thức với 3 mức ánh sáng khác nhau (1.200, 1.500 và 1.800 lux), có số chồi gia tăng trung bình là 5,7 chồi sau 4 tuần nuôi cấy không khác nhau qua thống kê ở mức ý nghĩa 1%. Nhìn chung, cường độ ánh sáng từ 1200 – 1800 lux không gây ảnh hưởng đến sự gia tăng số chồi dưa hấu tam bội *in vitro* sau 4 tuần nuôi cấy.

Đối với một số mô nuôi cấy, sự quang hợp không phải là một hoạt động cần thiết, vì năng lượng cung cấp cho sự phát triển của cây dưới dạng glucose hay saccharose. Tuy nhiên, sự quang hợp không bị hủy bỏ mà giảm mạnh vì sự hiện diện của đường trong nuôi cấy. Murashige (1974), qua nhiều thí nghiệm nhân chồi của nhiều loại cây trồng, đã đề nghị ánh sáng tối hảo cho giai đoạn này là khoảng 1.000 lux.

3.2 Chiều cao của cụm chồi dưa hấu tam bội sau khi cấy 4 tuần

Số liệu ở Bảng 3 cho thấy chiều cao chồi đạt cao nhất là 2,61 cm ở các nghiệm thức có 30 g/l đường khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức 1% so với các nghiệm thức còn lại. Các nghiệm thức có 0, 10, 20 g/l đường có chiều cao lần lượt là 1,79; 2,04 và 2 cm thì không khác biệt nhau có ý nghĩa thống kê.

Bảng 3: Chiều cao (mm) của chồi dưa hấu tam bội sau 4 tuần nuôi cấy dưới ảnh hưởng của nồng độ đường và cường độ ánh sáng khác nhau

Đường (g)	Cường độ ánh sáng (lux)			Trung bình
	1200	1500	1800	
0	1,75 c	1,74 c	1,87 c	1,79 b
10	2,03 c	2,08 c	2,01 c	2,04 b
20	2,09 c	1,84 c	2,08 c	2,00 b
30	2,14 bc	2,70 ab	3,00 a	2,61 a
Trung bình	2,00	2,09	2,24	2,11
F (nghiệm thức)				**
F (đường)				**
F (ánh sáng)				ns
F (đường x ánh sáng)				ns
CV (%)				16,5

** : Khác biệt ở mức ý nghĩa thống kê 1%

ns : Không khác biệt ý nghĩa thống kê

Các chữ theo sau các giá trị giống nhau thì không khác nhau ở mức ý nghĩa thống kê

Như vậy, khi bổ sung 30 g/l đường vào môi trường MS cho chiều cao chồi dưa hấu tam bội gia tăng cao nhất. So sánh các nghiệm thức cho thấy chiều cao chồi đạt cao nhất ở nghiệm thức 30 g/l đường + 1.800 lux ánh sáng (3 cm), không khác biệt với nghiệm thức 30 g/l đường + 1.500 lux ánh sáng (2,70 cm), nhưng khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức 1% với các nghiệm thức còn lại. Điều này cho thấy, ở mức

đường cao và ánh sáng từ 1.500-1.800 lux ảnh hưởng đến sự phát triển chiều cao của chồi dưa hấu tam bội *in vitro*.

Quan sát những chồi trong môi trường được cung cấp 30 g/l đường + 1.800 lux có một số chồi phát triển rất cao với lóng thân vươn dài (Hình 2). Điều này cho thấy đường như ánh sáng không tương quan đến quá trình sinh trưởng của chồi dưa hấu tam bội *in vitro*, nhưng ánh sáng thì cần thiết để điều hòa quá trình tạo hình dạng cho chồi (Edwin, 1993).



Hình 2: Sự phát triển của chồi dưa hấu tam bội sau 3 tuần nuôi cấy trong môi trường có 30g/l đường + 1.800 lux ánh sáng

3.3 Số lá của chồi dưa hấu tam bội sau khi cấy 4 tuần

Qua kết quả ở Bảng 4 cho thấy có sự khác biệt thống kê về số lá ở tất cả các nghiệm thức. Số lá đạt cao nhất ở những nghiệm thức có 30 g/l đường (16,7 lá) khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức 1% so với các nghiệm thức không có đường cho số lá thấp nhất (6,9 lá) và các nghiệm thức còn lại. Số lá ở nghiệm thức 20 g/l đường là 11,3 lá không khác biệt qua thống kê với các nghiệm thức có 10 g/l đường (9,9 lá) nhưng khác biệt ở mức ý nghĩa 1% so với nghiệm thức đối chứng (Hình 3).

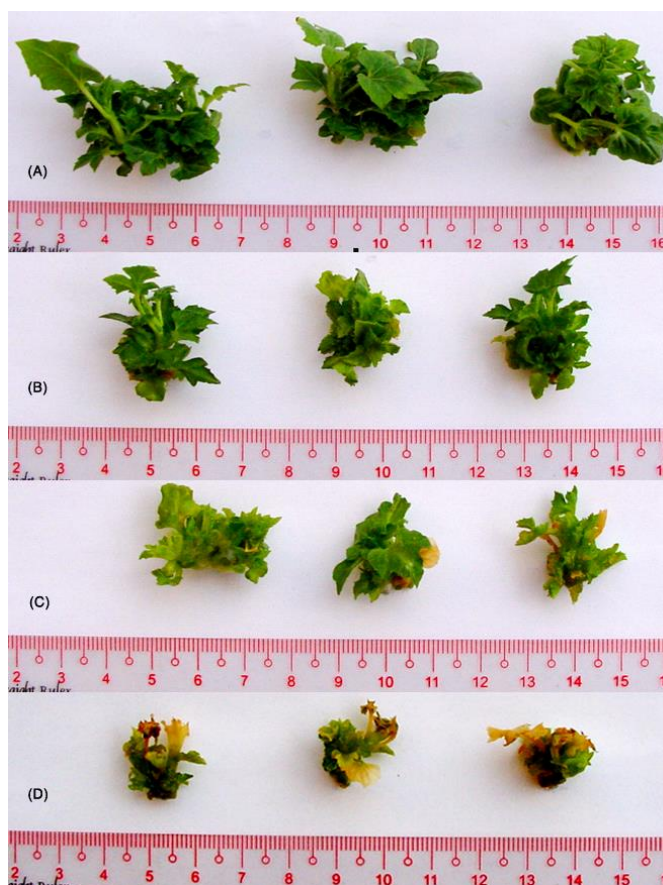
Bảng 4: Số lá của chồi dưa hấu tam bội sau 4 tuần nuôi cấy dưới ảnh hưởng của nồng độ đường và cường độ ánh sáng

Đường (g/l)	Cường độ ánh sáng (lux)			Trung bình
	1200	1500	1800	
0	7,9 def	7,0 ef	5,9 f	6,9 c
10	11,3 cd	8,4 cdef	9,1cde	9,9 b
20	10,2 cde	11,7 c	12,0 bc	11,3 b
30	15,2 ab	16,6 a	18,2 a	16,7a
TB	11,1	10,9	11,5	11,2
F (nghiệm thức)				**
F(đường)				**
F(ánh sáng)				ns
F (đường x ánh sáng)				ns
CV (%)				20,4

***: Khác biệt ở mức ý nghĩa thống kê 1%*

ns: Không khác biệt ý nghĩa thống kê

Các chữ theo sau các giá trị giống nhau thì không khác nhau ở mức ý nghĩa thống kê



Hình 3: Các cụm chồi dưa hấu tam bội phát triển trong môi trường có nồng độ đường khác nhau sau 4 tuần nuôi cấy (A) có 30 g/l đường (B) có 20 g/l đường (C) có 10 g/l đường (D) không có đường

Ở các nghiệm thức với 3 mức ánh sáng khác nhau (1.200, 1.500 và 1.800 lux), có số lá gia tăng trung bình là 11,2 lá sau 4 tuần nuôi cấy không khác nhau qua thống kê ở mức ý nghĩa 1%. Điều này cho thấy cường độ ánh sáng từ 1.200 – 1.800 lux không gây ảnh hưởng đến sự phát triển số lá của chồi dưa hấu tam bội in vitro sau 4 tuần nuôi cấy.

Kết quả thí nghiệm trên cho thấy, giữa 4 mức độ đường được sử dụng trong thí nghiệm thì hàm lượng đường 30 g/l là thích hợp nhất cho sự sinh trưởng và phát triển của chồi dưa hấu tam bội in vitro. Ở nồng độ đường này các chồi đạt mật số chồi hữu hiệu cao sau 4 tuần nuôi cấy. Chồi cao, mập, mạnh khỏe có nhiều lá, thích hợp cho cấy truyền tiếp để nhân thêm chồi hay sử dụng để tái sinh cây (Hình 3).

Ngoài ra, để cho chồi dưa hấu tam bội có lóng thân phát triển tốt thì nên sử dụng cường độ ánh sáng là 1.800 lux trong nuôi cấy in vitro (Hình 4a và 4b).

3.4 Trọng lượng của cụm chồi dưa hấu tam bội sau khi cấy 4 tuần

Kết quả ở Bảng 5 cho thấy nghiệm thức có 30 g/l đường cho trọng lượng tươi tăng cao nhất trung bình là 1,1 g không khác biệt thống kê so với nghiệm thức có 20 g/l đường nhưng khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức 1% so với nghiệm thức có 10 g/l đường và nghiệm thức đối chứng có trọng lượng chồi thấp nhất (0,5 g). Mặt khác, ở các nghiệm thức có 0 g/l đường, 10 g/l đường và 20 g/l đường có trọng lượng tươi lần lượt là 0,5; 0,6 và 0,7 g thì không khác biệt nhau ở mức ý nghĩa thống kê 1%.

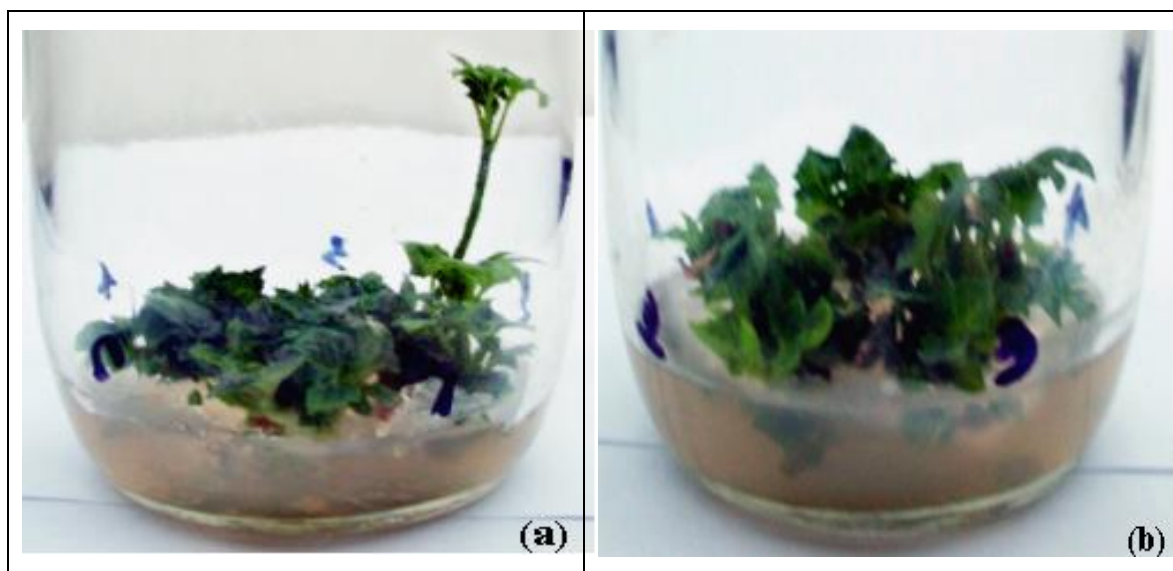
Bảng 5: Trọng lượng (g) của chồi dưa hấu tam bội sau 4 tuần nuôi cấy dưới ảnh hưởng của lượng đường và cường độ ánh sáng khác nhau

Đường (g/l)	Cường độ ánh sáng (lux)			Trung bình
	1200	1500	1800	
0	0,5 bc	0,4 c	0,5 bc	0,5 b
10	0,7 bc	0,6 bc	0,5 bc	0,6 b
20	0,6 bc	0,6 bc	0,7 bc	0,7 ab
30	0,8 b	1,2 a	1,3 a	1,1 a
Trung bình	0,6	0,7	0,7	0,6
F (nghiệm thức)			**	
F (đường)			**	
F (ánh sáng)			ns	
F (đường x ánh sáng)			ns	
CV (%)			29,7	

** : Khác biệt ở mức ý nghĩa thống kê 1%

ns : Không khác biệt ý nghĩa thống kê

Các chữ theo sau các giá trị giống nhau thì không khác nhau ở mức ý nghĩa thống kê



Hình 4: Chồi dưa hấu tam bội phát triển trong môi trường MS có 30 g/l đường dưới cường độ ánh sáng: (a) 1.800 lux và (b) 1.500 lux

Đối với từng nghiệm thức, trọng lượng chồi đạt cao nhất ở hai nghiệm thức 30 g/l đường ở cường độ ánh sáng 1.500 và 1.800 lux lần lượt là 1,3 và 1,2 g, khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức 1% so với các nghiệm thức còn lại. Giữa các nghiệm thức 0, 10 và 20 g/l đường kết hợp với 3 cường độ ánh sáng 1.200, 1.500 và 1.800

lux có trọng lượng chồi gia tăng từ 0,4 đến 0,7 g khác biệt nhau không có ý nghĩa thống kê. Như vậy, nghiệm thức có bổ sung 30 g/l đường vào môi trường MS với cường độ ánh sáng 1.500 – 1.800 lux cho trọng lượng chồi dưa hấu tam bội gia tăng cao nhất. Điều này khẳng định một lần nữa vai trò quan trọng của đường trong nhân chồi dưa hấu tam bội *in vitro* vì đường là nguồn carbohydrat để tế bào thực vật tổng hợp chất hữu cơ giúp tế bào phân chia và gia tăng sinh khối.

4 KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

Sự phát triển của chồi dưa hấu tam bội tốt nhất (8,5 chồi) trong môi trường MS có 30 g/l sucrose với cường độ chiếu sáng 1.800 lux. Nghiệm thức này cũng cho số lá, chiều cao và trọng lượng tươi đạt cao nhất.

Đề nghị sử dụng 30 g/l sucrose với ánh sáng từ 1.800 lux thích hợp cho chồi dưa hấu tam bội *in vitro*; chồi cao, mập, khỏe có nhiều lá thích hợp cho chu kỳ nhân mới hay cho giai đoạn ra rễ và thuần dưỡng.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Edwin F. G. 1993. Plant Propagation by Tissue Culture, Exegetics Limited, Part 2.
- Hyung N. I. 1996. Effects of Plant Growth Regulator, MS, Salts and Sucrose on Shoot Multiplication in Strawberry. The Industrial Science Researches vol,4 pp 113-121.
- Lê Trần Bình, Hồ Hữu Nhị và Lê Thị Muội. 1997. Công nghệ sinh học thực vật trong cải tiến giống cây trồng. Nhà xuất bản Nông Nghiệp Hà Nội.
- Miller A. R. and H. R. Owen. 1996. Haploid Plant Regeneration from Anther Culture of Three North American Cultivars of Strawberry (*Fragaria x Ananassa* Duch.). Plant-cell-rep Vol.15 (12): 905-909.
- Murashige T. 1974. Plant Propagation though Tissue Culture. Ann. Rev. Plant Physiol. 25, 135-166.
- Nguyễn Bảo Toàn. 2004. Giáo trình Nuôi Cây Mô và Tế Bào Thực Vật. Bộ môn Khoa Học Cây Trồng, Khoa Nông Nghiệp, Trường Đại Học Cần Thơ.
- Nguyễn Đức Lượng. 2001. Công Nghệ Sinh Học. Nhà xuất bản Đại Học Quốc Gia Thành Phố Hồ Chí Minh.
- Teruyuki N. 1999. Effect of Sugar Concentration on Bulbil Formation In vitro and on Growth after Acclimatization in *Narcissus tazetta* L. var. *chinensis* Roem, J. Shita, Vol.11 (1):16-21.
- Vuylsteke D. R. 1989. Shoot Tip Culture for The Propagation, Conservation and Exchange of Musa Germplasm, International Board for Plant Genetic Resources.