

NGHIÊN CỨU NHÂN NHANH *IN VITRO* CÂY DƯA HẦU (*CITRULLUS LANATUS*)

Study on Micropropagation of *Citrullus Lanatus*

Nguyễn Thị Phương Thảo¹, Ninh Thị Thảo¹, Vũ Thị Hà²

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

²Viện Cây lương thực và Cây thực phẩm

Địa chỉ email tác giả liên hệ: npthao@hua.edu.vn

Ngày gửi đăng: 04.03.2010; Ngày chấp nhận: 16.03.2010

TÓM TẮT

Nghiên cứu tiến hành nhằm xây dựng một quy trình nhân nhanh *in vitro* đơn giản và hiệu quả từ chồi đỉnh và lá mầm cây dưa hấu (*Citrullus lanatus*). Sau khi gieo 7 - 14 ngày trên môi trường MS, hạt dưa hấu nảy mầm, chồi đỉnh và lá mầm được chuyển sang nuôi cấy trên môi trường MS có chứa BA và kinetin ở các nồng độ khác nhau (0,0; 0,5; 1,0; 1,5 và 2,0 mg/l) trong 4 tuần. Phần gần cuống lá mầm có khả năng tạo chồi cao hơn phần ngọn lá, đạt 25% mẫu tạo chồi và 1,3 chồi/mẫu trên môi trường bổ sung 0,5 mg/l BA. Hệ số nhân chồi từ chồi đỉnh đạt cao nhất (15,5 chồi/mẫu) trên môi trường chứa 1 mg/l BA. Các chồi có chiều cao 2 - 5 cm được sử dụng để ra rễ *in vitro*. Tỷ lệ chồi ra rễ (100%) và số rễ/chồi (18,4) đạt được cao nhất trên môi trường chứa 0,5 mg/l α - NAA. Các cây *in vitro* hoàn chỉnh được đưa ra vườn ươm trên giá thể cát và trấu hun với tỷ lệ 1:1 (v/v), tỷ lệ cây sống sót là 80 - 90%.

Từ khoá: BA, *Citrullus lanatus*, dưa hấu, kinetin, nhân giống vô tính *in vitro*, α - NAA.

SUMMARY

This study was conducted in order to establish a simple and effective protocol for rapid propagation of watermelon (*Citrullus lanatus*). Cotyledon and shoot tip explants excised from 7 - 14 day old seedlings were cultured on solidified MS media containing different concentration of BA at 0,0; 0,5; 1,0; 1,5 & 2,0 mg/l and kinetin at 0,0; 0,5; 1,0; 1,5 & 2,0 mg/l for 4 weeks. The proximal region of cotyledon has higher organogenesis ability than the distal region. The rate of regenerated shoots from proximal segments was 25% and 1.3 shoots/explant on MS medium supplemented with 0.5 mg/l BA. The optimal medium for shoot proliferation from shoot tips was MS contained 1.0 mg/l BA. On this medium, the highest rate of shoot propagation was 15.5 shoots/explant after 4 weeks. Adding 0.5 mg/l α - NAA in MS medium promoted the root induction of the shoots with the rooting rate of 100% and 18.4 roots/shoot. Rooted plants were acclimatised in 1:1 (v/v) sand: rice husk substrate and the frequency of survival was 80 - 90%.

Key words: BA, *Citrullus lanatus*, kinetin, micropropagation, watermelon, α - NAA.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Dưa hấu (*Citrullus lanatus*) là cây có hàm lượng các chất dinh dưỡng và giá trị kinh tế cao. Lượng đường tổng số trong thịt quả dưa dẫu dao động từ 5 - 10%, lượng kali khoảng 0,22%, natri 0,016%, canxi 0,022%. Đặc biệt dưa hấu chứa hàm lượng vitamin A, C rất cao, nhiều hơn 40% so với trong quả cà chua. Mặc dù có giá trị dinh dưỡng cũng như giá trị kinh tế cao, nhưng tình hình sản xuất

dưa hấu hiện nay ở nước ta vẫn còn hạn chế về diện tích trồng và năng suất, chưa đáp ứng được nhu cầu của thị trường. Nguyên nhân dẫn đến tình trạng trên là do dưa hấu bị rất nhiều loại bệnh gây hại ảnh hưởng đến sản xuất và chất lượng dưa. Ngoài ra, việc cung cấp giống không chủ động khiến các giống dưa thương mại trên thị trường hiện nay hầu hết đều là các giống lai F1 nhập từ nước ngoài, làm tăng chi phí sản xuất.

Do vậy một quy trình nhân nhanh *in vitro* cây dưa hấu hoàn chỉnh sẽ có ý nghĩa vô cùng quan trọng trong công tác nhân và chọn tạo giống dưa hấu. Đây là công cụ đắc lực để nhân nhanh nguồn vật liệu khởi đầu, góp phần chủ động cung cấp nguồn giống có chất lượng cao, sạch bệnh, đồng đều với số lượng lớn cho sản xuất trên quy mô lớn. Hơn nữa, nó còn là cơ sở để áp dụng các kỹ thuật của công nghệ sinh học trong chọn tạo giống dưa hấu như phương pháp chuyển gen, phương pháp gây đột biến *in vitro*,...

Trên thế giới đã có rất nhiều nghiên cứu xây dựng quy trình nhân nhanh *in vitro* cây dưa hấu (Srivastava và cs., 1989; Compton & Gray, 1993). Quy trình này gồm 3 giai đoạn (Dong & Jia, 1991): giai đoạn tái sinh tạo chồi từ chồi đỉnh, sử dụng môi trường có chứa cytokinin (Compton & Gray, 1993); giai đoạn nhân nhanh các chồi thu được trên môi trường có nồng độ cytokinin thấp (Dong & Jia, 1991); và giai đoạn ra rễ, sử dụng môi trường có chứa auxin (Compton & Gray, 1994; Dabauza và cs., 1997). Tuy nhiên, ở Việt Nam phương pháp nhân giống *in vitro* cây dưa hấu chưa được quan tâm nghiên cứu nhiều. Nghiên cứu này được thực hiện với mục đích xây dựng quy trình nhân nhanh *in vitro* cây dưa hấu thông qua chồi đỉnh và lá mầm làm cơ sở cho việc nhân nhanh nguồn vật liệu khởi đầu và áp dụng trong công tác chọn tạo giống dưa hấu bằng các kỹ thuật của công nghệ sinh học.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng và vật liệu nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu là giống dưa hấu Hắc Mỹ Nhân VL54. Đây là một giống lai F1, hạt màu đen nâu, quả dài, sọc vằn xanh đậm, ruột đỏ, chất lượng tốt. Giống này đang được trồng phổ biến ở một số tỉnh thuộc vùng đồng bằng sông Hồng và rất được người dân ưa chuộng.

Vật liệu nghiên cứu: Hạt giống có nguồn gốc từ Thái Lan.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phương pháp xử lý và khử trùng hạt

Hạt dưa hấu được khử trùng bề mặt và ngâm trong nước sạch 1 giờ. Hạt được bóc vỏ trước khi đưa vào khử trùng trong buồng cấy vô trùng. Sau đó ngâm phôi hạt trong các dung dịch khử trùng (NaClO, HgCl₂) với nồng độ và thời gian thích hợp. Rửa lại phôi hạt 3 lần bằng nước cất vô trùng và cấy vào môi trường MS. Hạt nảy mầm sau 7-14 ngày, các lá mầm và chồi đỉnh tạo ra được sử dụng cho các thí nghiệm tiếp theo.

2.2.2. Phương pháp cắt và nuôi cấy lá mầm

Trước hết dùng dao sắc cắt 2 lá mầm ra khỏi cây con. Sau đó cắt viền xung quanh lá, khía nhẹ bề mặt lá và cắt lá mầm thành 4 phần chia đôi theo chiều ngang và chiều dọc lá sẽ được 2 phần ngọn lá và 2 phần gần cuống lá. Cấy các phần này vào môi trường có chứa BA và kinetin ở các nồng độ khác nhau (0,0; 0,5; 1,0; 1,5 và 2,0 mg/l) để cảm ứng tạo chồi.

2.2.3. Phương pháp tách và nuôi cấy chồi đỉnh

Sau khi cắt lá mầm và phân thân giả phía dưới chỉ để lại thân giả dài 1 - 1,5 cm, đó chính là chồi đỉnh. Chồi đỉnh sẽ được cấy vào môi trường chứa BA để nhân nhanh chồi.

2.2.4. Tiêu chuẩn chồi để ra rễ *in vitro*

Các chồi thu được từ nuôi cấy lá mầm và nhân nhanh chồi đỉnh cao 2 - 5 cm, thân mập, lá xanh tốt sẽ được chuyển qua môi trường ra rễ chứa α -NAA và than hoạt tính.

Tất cả các thí nghiệm đều sử dụng môi trường cơ bản MS bổ sung 30g/l saccarose, 6,5g/l agar và các chất điều tiết sinh trưởng, pH môi trường được chỉnh về 5,7 trước khi được hấp vô trùng ở 121°C, 1,5 atm trong 20 phút. Quá trình nuôi cấy được tiến hành ở nhiệt độ 24°C, cường độ ánh sáng 2000lux, thời gian chiếu sáng 16 giờ/ ngày.

Các thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên, mỗi thí nghiệm lặp lại 3 lần, mỗi lần 21 mẫu.

Các chỉ tiêu theo dõi định kỳ 5 - 7 ngày/lần tùy từng thí nghiệm, bao gồm tỷ lệ hạt sạch (%), tỷ lệ hạt nảy mầm (%), tỷ lệ hạt hình thành cây hoàn chỉnh (%), tỷ lệ mẫu tạo chồi (%), số chồi/mẫu (chồi), hệ số nhân chồi (chồi/mẫu), chiều cao chồi (cm), tỷ lệ ra rễ (%), số rễ trung bình (rễ), chiều dài rễ (cm).

Các số liệu thu được được xử lý bằng chương trình thống kê sinh học IRRISTAT 5.0 và Excel.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Ảnh hưởng của chế độ khử trùng đến tỷ lệ hạt nảy mầm

Có thể thấy, NaOCl và HgCl₂ đều cho hiệu quả khử trùng hạt dưa hầu cao, cho tỷ lệ hạt sạch dao động từ 76,9% đến 100%. Khi khử trùng bằng HgCl₂ 0,1% trong 20 phút, tỷ lệ hạt sạch đạt cao nhất (100%), nhưng chỉ có 75,7% hạt nảy mầm và chỉ 35% hạt nảy mầm hình thành cây hoàn chỉnh. Trong khi đó, đây là 2 chỉ tiêu có ý nghĩa nhất trong việc tạo vật liệu khởi đầu. Do vậy trong 4 chế độ khử trùng, nghiên cứu này lựa chọn chế độ khử trùng bằng NaClO 1% trong 20 phút khi có tới 90,5% hạt sạch nảy mầm và tạo cây hoàn chỉnh, đạt chất lượng tốt phục vụ cho các thí nghiệm tiếp theo (Bảng 1).

3.2. Nghiên cứu khả năng phát sinh chồi bất định từ lá mầm

Với mục đích nhân nhanh để tạo ra một số lượng lớn chồi, ngoài chồi đỉnh, nghiên cứu đã sử dụng lá mầm để cảm ứng tạo chồi nhằm tận dụng nguồn vật liệu sẵn có.

Quan sát mẫu cấy cho thấy, sau 1 tuần nuôi cấy mẫu bắt đầu phồng to, dày ra do có sự hấp thụ nước. Sau 1 tuần nuôi cấy, callus và những cấu trúc tròn nhỏ, xuất hiện đều trên mép lá. Sau 2 tuần thì chồi bắt đầu hình thành từ các cấu trúc tròn nhỏ mà không phải từ callus và sau 3 - 4 tuần cụm chồi hình thành. Như vậy các cấu trúc tròn nhỏ chính là các thể tiền chồi. Tỷ lệ mẫu tạo

callus dao động từ 95,8 - 100%, kích thước các callus tăng mạnh từ tuần thứ hai trở đi và phần lớn là callus vàng, xốp và bở.

Kết quả ở bảng 1 cho thấy, BA có ảnh hưởng quyết định đến sự tạo chồi từ lá mầm. Khi không bổ sung BA vào môi trường nuôi cấy, mặc dù 100% mẫu lá vẫn xanh nhưng lại không có mẫu nào phản ứng tạo chồi và callus. Ảnh hưởng của BA đến sự tạo chồi của phần gân cuống lá và phần ngọn lá mầm là hoàn toàn khác nhau. Đối với mẫu cấy là phần gân cuống lá mầm, tỷ lệ mẫu tạo chồi dao động từ 12,5 - 15%, trong khi đó gần như không có sự sai khác về số chồi/mẫu và chiều cao chồi giữa các công thức. Với mục đích nhân nhanh, tạo ra số chồi lớn thì nồng độ 0,5 mg/l BA là thích hợp hơn cả để cảm ứng tạo chồi từ phần gân cuống lá mầm, với 25% mẫu tạo chồi và đạt 1,3 chồi/mẫu. Trên phần ngọn lá mầm, BA cũng có ảnh hưởng với xu hướng tương tự. Tỷ lệ mẫu tạo chồi đạt cao nhất (12,5%) trên môi trường có chứa 2 mg/l BA. Ở nồng độ 1,5 mg/l BA, 100% mẫu ngọn lá mầm tạo callus mà không tạo chồi. Điều này có thể giải thích do khi bổ sung BA ở nồng độ 1,5 mg/l làm cho tỷ lệ giữa cytokinin và auxin (nội sinh và ngoại sinh) đạt mức cân bằng thích hợp cho việc tạo callus.

Ảnh hưởng của BA đến sự phát sinh chồi bất định từ lá mầm cây dưa hầu đã được chứng minh ở nhiều nghiên cứu trước đó. Han và cs., (2004) cho rằng, BA là nhân tố quan trọng nhất quyết định đến sự hình thành chồi bất định từ lá mầm họ bầu bí. Kết luận tương tự cũng được Sarowa và cs., (2003) đưa ra sau khi làm thí nghiệm trên giống dưa hầu *Cucurbita*. Vedat Pirinc và cs., (2003) cảm ứng tạo chồi từ lá mầm *Citrullus lanatus cv. "Surme"* trên môi trường bổ sung BA và kinetin thì số chồi/mẫu cấy tạo ra trên môi trường chứa BA cao gấp 1,5 lần so với trên môi trường chứa Kinetin. Trong nghiên cứu của Tarek và cs., (2008) trên hai giống dưa hầu nhị bội SA100 và SA101, số chồi/mẫu thu được cao nhất (5 chồi) từ lá mầm trên môi trường chứa 10 M BA.

Bảng 1. Ảnh hưởng của chế độ khử trùng đến tỷ lệ hạt nảy mầm

Chất khử trùng	Nồng độ (%)	Thời gian khử trùng (phút)	Tỷ lệ hạt sạch (%)	Tỷ lệ hạt nảy mầm (%)	Tỷ lệ hạt hình thành cây hoàn chỉnh (%)	Chiều cao cây (cm)
Javen (NaClO)	1	20	95,1	90,5	100,0	4,1
Javen (NaClO)	3	10	76,9	85,6	95,0	3,9
HgCl ₂	0,1	10	95,7	80,0	55,0	2,2
HgCl ₂	0,1	20	100,0	75,7	35,0	1,7
CV (%)						5,8
LSD _{0,05}						0,3

Chú thích: + Cây hoàn chỉnh là cây có thân giả và đỉnh sinh trưởng vươn cao, lá mầm trái, có màu xanh.
 + Cây không hoàn chỉnh là cây chỉ hình thành 2 lá mầm méo mó, lá màu xanh vàng, thân giả và đỉnh sinh trưởng không phát triển, cây không có rễ.

Bảng 2. Ảnh hưởng của BA tới sự phát sinh chồi bất định từ phần gân cuống lá mầm và phần ngọn lá mầm sau 4 tuần nuôi cấy

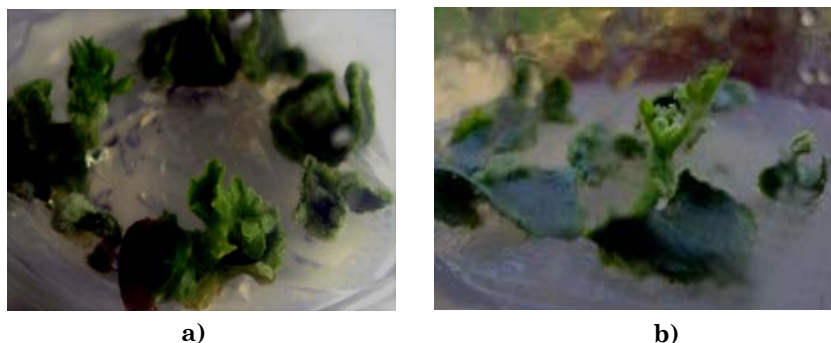
Loại mẫu	BA (ppm)	Tỷ lệ mẫu tạo callus (%)	Tỷ lệ mẫu tạo chồi (%)	Số chồi/mẫu (chồi)	Chiều cao chồi (cm)
Phần gân cuống lá mầm	0	0,0	0,0	-	-
	0,5	100,0	25,0	1,3	2,5
	1,0	95,8	25,0	1,2	3,0
	1,5	100,0	12,5	1,3	2,5
	2,0	100,0	16,7	1,2	2,0
Phần ngọn lá mầm	0	0,0	0,0	-	-
	0,5	100,0	4,2	1,0	2,3
	1,0	95,8	8,3	1,0	2,8
	1,5	100,0	0,0	-	-
	2,0	100,0	12,5	1,0	2,0

Như đã trình bày ở trên, khả năng tạo chồi bất định của lá mầm dưa hấu có sự khác nhau giữa phần ngọn và phần gân cuống lá trên cùng một lá. Bảng 2 và hình 1 sẽ cho thấy rõ điều này hơn.

Trong quá trình nuôi cấy, chúng tôi nhận thấy, ở phần ngọn lá có ít cấu trúc tròn nhỏ (thể tiền chồi) xuất hiện và xuất hiện chậm hơn so với phần gân cuống lá. Điều này chứng tỏ, tuy trên cùng một lá nhưng ở những vị trí khác nhau có thể cho những phản ứng khác nhau trên cùng một môi trường và điều kiện nuôi cấy. Đối với phần ngọn lá mầm chỉ 6,3% mẫu tạo chồi và đạt 0,8 chồi/mẫu. Trong khi đó, phần gân cuống lá cho tỷ lệ mẫu tạo chồi cao hơn gấp 3 lần (19,8%) và số chồi/mẫu cao hơn 1,5 lần (1,3 chồi/mẫu).

Theo kết quả nghiên cứu của Choi và cs. (1994); Compton (2000); Ananthkrishman và cs. (2003), các tế bào khả biến cho sự hình thành chồi bất định ở lá mầm họ bầu bí thường tập trung ở một vùng nhất định. Đối với dưa hấu, các tế bào này tập trung chủ yếu ở phần gân cuống lá mầm (Compton & Gray, 1993), do vậy hầu hết các chồi bất định đều hình thành ở phần gân cuống lá (Compton, 2000). Maria Graziela Zagatto Krug và cs. (2003) đã chứng minh sự tạo chồi bất định của mẫu lá giống dưa hấu *Crimson Sweet* từ phần gân cuống lá cao hơn từ phần ngọn lá rất nhiều.

Qua kết quả thí nghiệm trên, có thể kết luận rằng sự phát sinh chồi dưa hấu từ lá là rất phân cực, chồi phát sinh chủ yếu từ phần gân cuống lá.



Hình 1. Sự phát sinh chồi bất định từ phần gân cuống lá mầm trên môi trường MS + 0,5 mg/l BA (a) và từ phần ngọn lá mầm trên môi trường MS + 2 mg/l BA (b) sau 4 tuần nuôi cấy

3.3. Sự nhân chồi từ chồi đỉnh

Kết quả về ảnh hưởng của BA tới sự nhân nhanh chồi từ chồi đỉnh dưa hấu sau 4 tuần nuôi cấy được thể hiện trong bảng 3.

Sự có mặt của BA trong môi trường nuôi cấy đã làm tăng tỷ lệ mẫu tạo chồi và hệ số nhân chồi. Tất cả các công thức có bổ sung BA đều cho tỷ lệ mẫu bật chồi là 100%, trong khi tỷ lệ này ở công thức đối chứng là 90%. Quan trọng hơn cả là BA đã làm tăng đáng kể hệ số nhân chồi và chất lượng chồi. Trên môi trường MS, hệ số nhân chỉ đạt được 3,8 chồi/mẫu, các chồi tạo ra mảnh và quá cao, không thuận lợi cho quá trình nhân về sau. Trên môi trường chứa BA, hệ số nhân dao động từ 6,4 - 15,5 chồi/mẫu (cao hơn đối chứng từ 1,7 - 4,1 lần). Các chồi tạo ra phát triển mạnh, chồi mập và cao vừa phải, có màu xanh tự nhiên, đáp ứng được yêu cầu chất lượng cho quá trình nhân nhanh cũng như tạo cây *in vitro* hoàn chỉnh. Trong các công thức trên, công thức bổ sung 1mg/l BA cho hiệu quả nhân nhanh cao nhất, với hệ số nhân 15,5 chồi/mẫu.

Bên cạnh BA, kinetin cũng là một cytokinin được sử dụng khá phổ biến để nhân nhanh chồi dưa hấu (Michael và cs., 1993; Vedat và cs., 2003) (Bảng 4).

Kinetin cũng có tác dụng nhân nhanh chồi, tuy nhiên sự sai khác giữa các công thức là không rõ ràng. Hệ số nhân chồi đạt được cao nhất trên môi trường chứa 1 mg/l (5,4 chồi/mẫu). Hệ số này thấp hơn 3 lần so với hệ số đạt được khi sử dụng BA để nhân nhanh (15,5 chồi/mẫu). Do vậy môi trường chứa 1 mg/l BA là môi trường nhân nhanh thích hợp nhất đối với chồi đỉnh dưa hấu.

Kết quả mà nghiên cứu này thu được cũng hoàn toàn phù hợp với kết quả của các nghiên cứu trước đó. Năm 1993, Michael và cs., sử dụng BA, kinetin và TDZ để cảm ứng nhân nhanh chồi từ chồi đỉnh một số giống dưa hấu nhị bội và tứ bội. Hệ số nhân đạt được cao nhất ở nồng độ 1M BA, hệ số này dao động từ 2,7 - 11,7 chồi/mẫu sau 4 tuần nuôi cấy tùy thuộc vào từng giống. Mặt khác, hệ số nhân ở nồng độ 1M BA cao gấp 1,5 - 2,8 lần so với công thức chứa kinetin và TDZ tốt nhất. Theo kết quả của Tarek và cs. (2008), hệ số nhân từ chồi đỉnh của 2 giống dưa hấu nhị bội SA100 và SA101 đạt được cao nhất khi bổ sung vào môi trường 10uM BA (đối với giống SA100) và 4,4uM BA (giống SA101) với hệ số nhân đạt được lần lượt là 28 và 23 chồi/mẫu sau 3 tuần nuôi cấy.

Bảng 3. Ảnh hưởng của BA tới sự nhân nhanh chồi từ chồi đỉnh

BA (mg/l)	Tỷ lệ mẫu tạo chồi (%)	Hệ số nhân chồi (chồi/mẫu)	Chiều cao chồi (cm)
0	90,0	3,8	7,1
0,5	100,0	14,7	6,0
1,0	100,0	15,5	3,4
1,5	100,0	8,6	2,7
2,0	100,0	6,4	2,4
CV (%)		5,5	3,6
LSD _{0,05}		1,0	0,2

Bảng 4. Ảnh hưởng của kinetin đến khả năng nhân nhanh chồi từ chồi đỉnh

Kinetin (ppm)	Tỷ lệ mẫu tạo chồi (%)	Hệ số nhân chồi (chồi/mẫu)	Chiều cao chồi (cm)
0	90,0	3,8	7,1
0,5	100,0	5,3	9,4
1,0	100,0	5,4	7,7
1,5	100,0	5,1	7,2
2,0	100,0	4,6	4,8
CV (%)		4,0	4,6
LSD _{0,05}		0,3	0,7

3.4. Tạo rễ cho chồi *in vitro*

Để cảm ứng tạo rễ, các chồi dưa hấu thường được chuyển từ môi trường nhân nhanh qua môi trường không chứa chất điều tiết sinh trưởng hoặc chứa chất điều tiết sinh trưởng thuộc nhóm auxin (Krug và cs., 2005; Pirinc và cs., 2003).

Trong nghiên cứu này, ngoài việc sử dụng α - NAA là một chất điều tiết sinh trưởng thuộc nhóm auxin, chúng tôi còn sử dụng than hoạt tính để cảm ứng tạo rễ cho chồi dưa hấu do than hoạt tính ngoài tác dụng kích thích sự ra rễ còn có khả năng cải thiện chất lượng bộ rễ (Bảng 5).

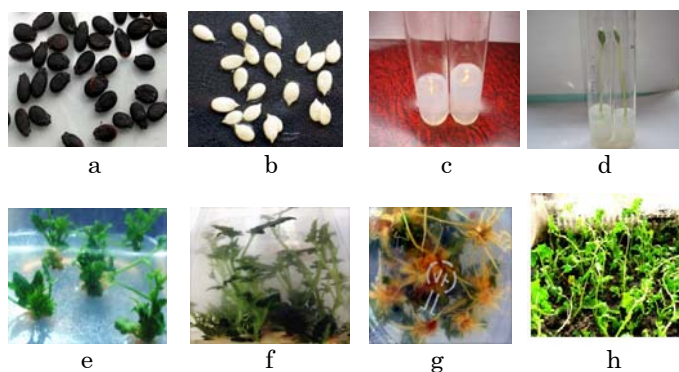
Chồi dưa hấu có thể hình thành rễ ngay trên môi trường MS với tỷ lệ chồi tạo rễ là 88,9% và đạt 4,1 rễ/cây. Tuy nhiên, rễ tạo ra dài, mảnh và ít lông hút, do đó có thể ảnh hưởng tới sức sống của cây khi đưa ra ngoài

vườn ươm. Khi bổ sung than hoạt tính vào môi trường nuôi cấy, chất lượng rễ đã được cải thiện rõ rệt, rễ mập và nhiều lông hút hơn. Tuy nhiên số rễ/chồi và chiều dài rễ lại thấp hơn so với công thức đối chứng. α -NAA tỏ ra rất thích hợp trong việc kích thích chồi dưa hấu tạo rễ với 100% số mẫu tạo rễ, số lượng rễ/chồi rất lớn, dao động từ 15,3 đến 18,4 rễ/chồi đồng thời các rễ mập, chiều dài vừa phải và có rất nhiều lông hút. Đây là những điều kiện thuận lợi để chuyển cây ra thích nghi ngoài vườn ươm.

Trong thí nghiệm tạo rễ cho chồi dưa hấu *Citrullus lanatus* cv. "Surme", Pirinc và cs. (2003) cũng sử dụng α -NAA làm chất cảm ứng tạo rễ nhưng với nồng độ cao hơn là 1, 2 và 4 mg/l. Nhóm tác giả đã kết luận ở nồng độ 1 mg/l α -NAA, tỷ lệ chồi tạo rễ đạt cao nhất là 70%.

Bảng 5. Ảnh hưởng của than hoạt tính và α -NAA tới sự hình thành rễ từ chồi dưa hấu

	Nồng độ (mg/l)	Tỷ lệ mẫu tạo rễ (%)	Số rễ/chồi (rễ)	Chiều dài rễ (cm)
Đối chứng	0	88,9	4,1	3,9
Than hoạt tính	500	100,0	3,8	2,2
	1000	86,7	2,6	2,9
α -NAA	0,25	100,0	15,3	1,9
	0,5	100,0	18,4	1,7



Hình 2. Quy trình nhân nhanh *in vitro* cây dưa hấu

- Hạt dưa hấu Hắc Mỹ Nhân VL 54
- Phôi hạt sau khi bóc vỏ
- Hạt đã khử trùng và cấy trên môi trường MS
- Hạt dưa hấu nảy mầm sau 7 ngày
- f) Nhân nhanh chồi đỉnh trên môi trường MS + 1mg/l sau 2 tuần và sau 4 tuần nuôi cấy
- g) Chồi dưa hấu ra rễ trên môi trường MS + 1mg/l IBA
- h) Cây dưa hấu 2 tuần ngoài vườn ươm trên giá thể cát: trấu hun theo tỷ lệ 1:1 (v/v)

3.5. Thich nghi cây ra vườn ươm

Sau khi thu được cây có rễ hoàn chỉnh, cây được đưa ra vườn ươm trên giá thể cát và trấu hun với tỷ lệ 1:1 (v/v). Sau khi trồng, cây được tưới 1 giờ/lần dưới dạng phun mù, đảm bảo độ ẩm giá thể là 70 - 80%, độ ẩm không khí 90 - 100%. Tỷ lệ cây sống sau 4 tuần chuyển ra vườn ươm đạt 80 - 90%, cây sinh trưởng phát triển khoẻ mạnh.

4. KẾT LUẬN

Chế độ khử trùng thích hợp đối với phôi hạt dưa hấu là sử dụng NaOCl 1% và trong

20 phút, 90,5% hạt sống sót và nảy mầm. Lá mầm dưa hấu có khả năng phát sinh chồi bất định, khả năng tạo chồi của phần gân cuống lá cao hơn phần ngọn lá mầm. Trên môi trường bổ sung 0,5 mg/l BA, 25% mẫu gốc lá mầm tạo chồi và đạt 1,3 chồi/mẫu. Hệ số nhân chồi từ chồi đỉnh đạt được cao nhất là 15,5 chồi/mẫu trên môi trường MS chứa 1mg/l BA. Môi trường thích hợp để kích thích chồi dưa hấu tạo rễ có bổ sung 0,5 mg/l α - NAA. Giá thể tiếp nhận cây *in vitro* thích hợp là cát và trấu hun theo tỷ lệ 1:1 (v/v), cho tỷ lệ cây sống 80 - 90%.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Ananthakrishnan G., Xia X., Elman C., Singer S., Paris H.S., Galon A., Gaba V. (2003). Shoot production in squash (*Cucurbita pepo*) by *in vitro* organogenesis. *Plant Cell Report*, 21, pp.739-746.
- Compton M.E. (2000). Interaction between explant size and cultivar affects shoot organogenic competence of watermelon cotyledons. *Hort Science*, 35, pp.749-750.
- Compton M.E., Gray D.J. (1994). Adventitious shoot organogenesis and plant regeneration from cotyledons of tetraploid watermelon. *Hort Science*, 29 (3), pp. 211-213.
- Compton M.E., Gray D.J., Elmstrom G.W. (1993). A simple protocol for micropropagating diploid and tetraploid watermelon using shoot-tip explant. *Plant cell tissue organ cult.*, 33, pp.211-247.
- Daubauza M., Bordas M., Salvador A., Roig L.A. (1997). Plant regeneration and *Agrobacterium*-mediated transformation of cotyledon explants of *Citrullus colocynthis* (L.) Schrad. *Plant Cell Reports*, 16, pp.888-982.
- Dong J.Z. & Jia S.R. (1991). High efficiency plant regeneration from cotyledons of watermelon (*Citrullus vulgaris* Schrad.). *Plant Cell Rep.*, 9, pp.559-562.
- Han J.S., Oh D.G., Mok I.G., Kim C.K. (2004). Efficient plant regeneration from cotyledon explants of bottle gourd (*Legenaria siceraria* Standl.). *Plant Cell Rep*, 23: 291-296.
- Krug M.G.Z., Stipp L.C.L., Rodriguez A.P.M. & Mendes B.M.J. (2005). *In vitro* Organogenesis in Watermelon cotyledons. *Pesp agropec. Bras.Brasilia*, 40, 9, pp. 861 – 865.
- Pirinc V., Onay A., Yildirim H., Adiyaman F., Isikalan C. & Basaran D. (2003). Adventitious shoot organogenesis and plant regeneration from cotyledons of diploid Diyarbakir watermelon (*Citrullus lanatus* cv. "Surme"). *Turk 5 biol*, 7, 101 - 105.
- Srivastava D.R., Andrianov V.M., Piruzian E.S. (1989). Tissue Culture and plant regeneration of watermelon (*Citrullus vulgaris* Schrad. cv. Melitopolski). *Plant Cell Rep*, 8, pp.300-302.
- Sarowar S., Oh H.Y., Hyung N.I., Min B.W., Harn C.H., Yang S.K., Oh S.H., Shin J.S. (2003). *In vitro* micropropagation of a *Cucurbita* interspecific hybrid cultivar a root stock plant. *Plant Cell Tiss Org Cult.*, 75: 179-182
- Tarek A.S., Soliman A.O., Yousry A.B. (2008). *In vitro* propagation of two triploid hybrids of watermelon through adventitious shoot organogenesis and shoot tip culture. *Acta Biologica Szegediensis*, Volume 52(1): 27-31.