

Vi nhân giống cây bẫy kẹp *Dionaea muscipula*

- Vũ Hồng Thúy Uyên
- Nguyễn Hữu Trọng
- Trần Hoàng Phúc
- Bùi Văn Lệ

Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG-HCM

(Bài nhận ngày 12 tháng 12 năm 2014, nhận đăng ngày 12 tháng 08 năm 2015)

TÓM TẮT

Quy trình vi nhân giống loài này được chúng tôi xây dựng hoàn thiện dựa trên các khảo sát trong ba giai đoạn: nhân chồi, cảm ứng tạo rễ và ra vườn ươm. Trên môi trường MS với hàm lượng khoáng đa lượng giảm đi một nửa bổ sung kinetin 0,5 mg/L cho hiệu quả nhân chồi cao nhất ($20,44 \pm 2,14$ chồi/mẫu); sử dụng NAA 0,5 mg/L giúp tạo rễ tốt nhất ($5,33 \pm 0,44$ rễ/chồi). Những cây con

hoàn chỉnh đạt kích thước 4-5 cm được chọn để bước vào giai đoạn chuyển tiếp trong 2 tuần: trồng trên giá thể gồm dớn và đá perlite tỉ lệ 1:1, đặt dưới điều kiện chiếu sáng nhân tạo, chế độ tưới 3 ngày/lần, sử dụng bọc nilon có đục lỗ để giữ độ ẩm. Sau đó, cây con được chuyển ra vườn ươm, giữ nguyên giá thể và chế độ tưới. Tỉ lệ sống sót đạt gần 100 %.

Từ khóa: *Dionaea muscipula*, cây bẫy kẹp, chất điều hòa sinh trưởng thực vật, vi nhân giống, môi trường MS.

MỞ ĐẦU

Dionaea muscipula thuộc họ Droseraceae nhưng vùng phân bố tự nhiên của chúng không rộng khắp trên thế giới như một số loài cùng họ khác mà chúng chỉ xuất hiện duy nhất ở khu vực bang Bắc Carolina, Hoa Kỳ. Chúng có hình dáng lá biến dạng thành bẫy kẹp có thể chuyển động, bắt được các loại côn trùng nhỏ nên thu hút được rất nhiều người chơi cây kiếng trên thế giới. Hiện nay không chỉ ở Mỹ mà Úc mỗi năm sản xuất hàng triệu cây và xuất khẩu đi nhiều nơi với giá từ 5-20 Đô la Mỹ (100.000 – 400.000 đồng). Ngoài ra, nghiên cứu của Pakulski và Budzianowski [4] phát hiện trong loài cây này nhiều hợp chất thứ cấp như naphthoquinone, plumbagin, ellagic acid, 3-O-methyl ellagic acid... có giá trị dược tính. Tuy nhiên, *Dionaea* khó nhân giống bằng cách truyền

thống, vì vậy việc nghiên cứu ứng dụng kỹ thuật vi nhân giống trong việc nhân nhanh cây với số lượng lớn cung cấp cho mục đích nghiên cứu và thương mại là vô cùng cần thiết. Các nghiên cứu trên đối tượng trên thế giới có Hutchinson và cộng sự [1] đã hoàn thiện quy trình vi nhân giống từ hạt trên môi trường LS (Linsmaier & Skoog), nhân chồi tốt nhất với kinetin 10 μ M + NAA 0,5 μ M, không cần bổ sung auxin để tạo rễ, NAA ức chế hoàn toàn cảm ứng tạo rễ của chồi non; và gần nhất là Jang và cộng sự [2] đã hoàn thiện quy trình vi nhân giống trên môi trường 1/3MS, nhân chồi tốt nhất với kinetin 2,3 μ M, tạo rễ tốt nhất với IBA 0,5 μ M.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Lá non cây *Dionaea muscipula* ngoài tự nhiên được khử trùng bằng cồn ethanol 70° và calcium hypochlorite 5% (khối lượng/thể tích). Chồi sau khi khử trùng được cấy sau 8 tuần trên môi trường MS (Murashige & Skoog, 1962) [3] có bổ sung kinetin là nguồn mẫu ban đầu cho các thí nghiệm. Môi trường nuôi cấy được sử dụng là MS với nồng độ khoáng đa lượng giảm đi một nửa (½MS) bổ sung 30 g/L sucrose, agar 8 g/L, than hoạt tính 0,5 g/L, pH 5,5 ± 0,1; nhiệt độ nuôi cấy 25 ± 2°C, quang kỳ 16 giờ/ngày, cường độ ánh sáng thay đổi từ 1.000 - 3.000 lux tùy vào nghiệm thức. Mỗi thí nghiệm được lặp lại 3 lần, số liệu được xử lý bằng phần mềm SAS 9.1, phân nhóm các giá trị bằng phương pháp Duncan với p = 0,05.

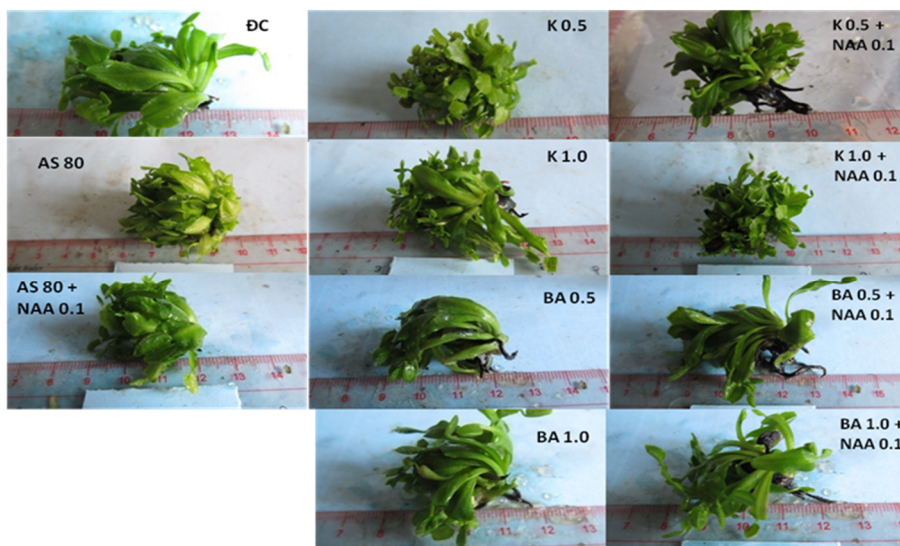
Các chồi non *in vitro* được nuôi trong 6 tuần trên môi trường chứa cytokinin (kinetin, BA, adenine sulfate) ở những nồng độ khác nhau, đồng thời có hoặc không kết hợp bổ sung NAA 0,1 mg/l. Các chồi dài 2-3 cm ở thí nghiệm trước được chuyển lên môi trường chứa auxin (IBA, NAA) ở những nồng độ khác nhau để tạo rễ, kết quả được ghi nhận sau 6 tuần nuôi cấy. Các cây non kích thước 4-5 cm, có đủ chồi, lá, rễ được bước vào giai đoạn chuyển tiếp trong 2 tuần, sau đó chuyển ra

vườn ươm, khảo sát các yếu tố về độ ẩm, giá thể để đảm bảo tỉ lệ cây con sống sót đạt cao nhất.

KẾT QUẢ VÀ BIỆN LUẬN

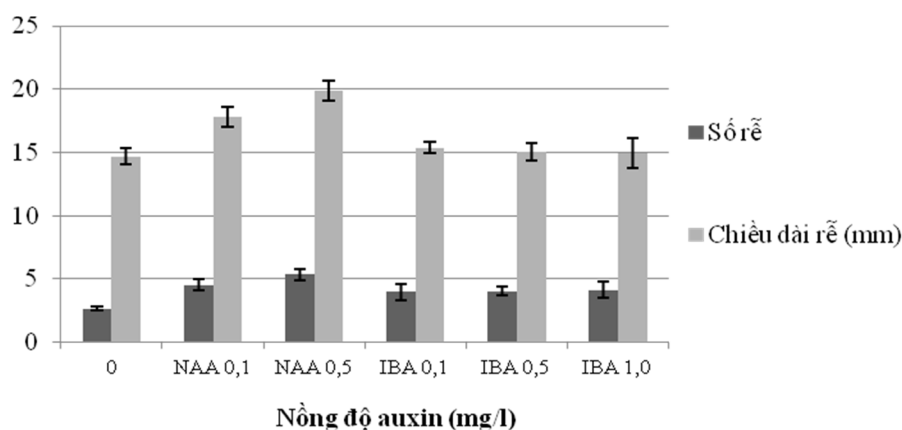
Kết quả khảo sát quá trình nhân chồi

Sau 7 ngày nuôi cấy các mẫu có bổ sung chất điều hoà sinh trưởng thực vật (CDHSTTV) bắt đầu cảm ứng tạo chồi, sau 14 ngày các mẫu đều nảy chồi, chồi phát sinh từ gốc. Với môi trường không bổ sung CDHSTTV cây nảy chồi chậm hơn, cần khoảng 10 ngày. Hệ số nhân chồi cao nhất là 20,44 ± 2,14 và chiều dài chồi là 24,54 ± 1,64 mm ở môi trường sử dụng kinetin 0,5 mg/L. Trong thí nghiệm này khi kết hợp kinetin, BA với NAA ở cùng nồng độ, BA không có tác dụng kích thích tạo chồi, kinetin cho kết quả tạo chồi tốt nhất. Adenine sulfate có tác dụng kích thích tạo chồi nhưng yếu. Kết quả nhân chồi có sự tương đồng tuy nhiên chiều dài chồi trong nghiệm thức tốt nhất chưa đạt được bằng với kết quả thí nghiệm của Jang và cộng sự thực hiện năm 2003. Điều này chứng tỏ kinetin là loại cytokinin thích hợp nhất cho quá trình nhân chồi của *Dionaea muscipula* và chồi từ nghiệm thức sử dụng kinetin 0,5 mg/L không có sự hiện diện của NAA được sử dụng làm vật liệu cho thí nghiệm tiếp theo.

Hình 1. Kết quả nhân chồi *Dionaea muscipula* sau 6 tuầnBảng 1. Sự nhân chồi của *Dionaea muscipula* trên các môi trường bổ sung cytokinin và auxin

Nồng độ CDHSTTV (mg/L)	Số chồi	Chiều cao chồi (mm)	Nồng độ CDHSTTV (mg/L)	Số chồi	Chiều cao chồi (mm)
0	9,66 ± 0,58ee	28,77 ± 1,18ab	Adenine sulfate 80	13,96 ± 1,17bcd	26,22 ± 2,26bc
Kinetin 0,5	20,44 ± 2,14a	24,54 ± 1,64cd	Adenine sulfate 80 + NAA 0,1	12,63 ± 0,40cde	25,72 ± 1,70bc
Kinetin 0,5 + NAA 0,1	15,26 ± 1,60bc	24,99 ± 2,73cd	BA 0,5	9,33 ± 0,55e	29,55 ± 0,56aa
Kinetin 1,0	16,26 ± 1,05bb	25,77 ± 1,43bc	BA 0,5 + NAA 0,1	12,48 ± 2,68cde	27,54 ± 1,23abc
Kinetin 1,0 + NAA 0,1	16,96 ± 3,42bb	22,47 ± 1,93d	BA 1,0	10,70 ± 1,65d	28,34 ± 0,68ab
			BA 1,0 + NAA 0,1	10,73 ± 2,10ee	27,32 ± 1,77abc

*Những chữ cái a, b, c... biểu thị mức phân hạng Duncan với p = 0,05

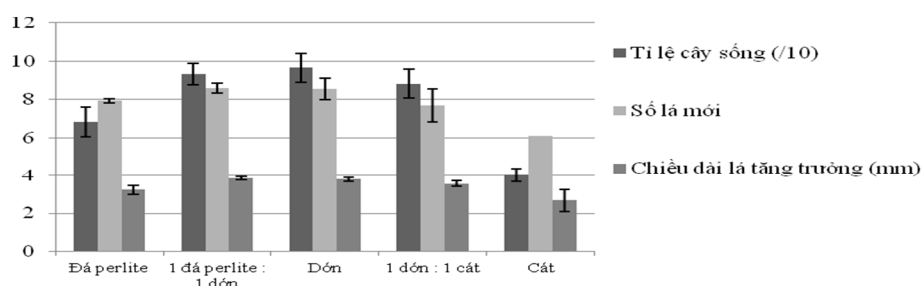
Kết quả khảo sát quá trình tạo rễHình 1. Kết quả ảnh hưởng của auxin lên sự hình thành rễ *Dionaea muscipula*

Trên môi trường $\frac{1}{2}$ MS đôi chúng, chồi vẫn có thể tạo rễ nhưng số lượng rễ ít và có kích thước ngắn. Môi trường có bổ sung IBA kích thích tạo nhiều rễ hơn nhưng chiều dài không tăng, giữa các nồng độ thí nghiệm không cho thấy sự khác biệt nhiều có thể được giải thích là do quá trình hấp khử trùng môi trường làm CĐHSTTV có độ bền nhiệt thấp như IBA giảm hoạt tính. Với môi trường bổ sung NAA, rễ to hơn, có nhiều lông tơ. Ở nồng độ NAA 0,5 mg/L thu được số rễ cao nhất $5,33 \pm 0,44$, chiều dài rễ $19,86 \pm 0,79$ cm. Kết quả này khác biệt với kết quả của Jang và cộng sự (2003) và Hutchinson (1984) - sự hình thành rễ tốt nhất trên môi trường bổ sung IBA còn NAA ức chế sự tạo rễ, điều này có thể được giải thích là do một số khác biệt về điều kiện vật lý, hóa học trong

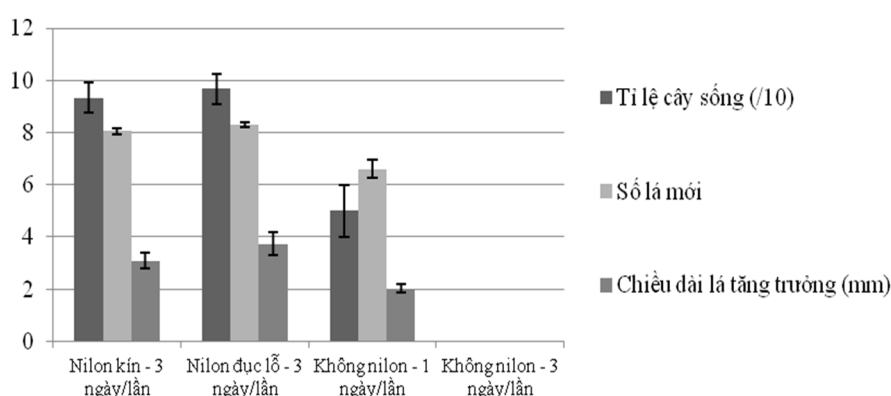
quá trình thực hiện nội dung nghiên cứu giữa các nhóm tác giả. Vì vậy, cần nhìn nhận trong điều kiện môi trường tại Việt Nam, có thể không cần phải sử dụng IBA cho quá trình ra rễ của *Dionaea muscipula* như các nghiên cứu khác trên thế giới.

Kết quả khảo sát giá thể và độ ẩm trong giai đoạn chuyển tiếp và vườn ươm

Các cây con đạt kích thước 4-5 cm từ thí nghiệm tạo rễ được chuyển vào giai đoạn chuyển tiếp tại phòng sáng trong 2 tuần trước khi được chuyển ra điều kiện vườn ươm sử dụng ánh sáng trực tiếp. Quá trình xử lý từ môi trường *in vitro* sang môi trường *ex vitro* bao gồm: rửa sạch agar, trồng vào vi nhựa trên các loại giá thể khác nhau với chế độ tưới khác nhau bằng nước máy loại bỏ clor.



Hình 2. Kết quả khảo sát loại giá thể trồng *Dionaea muscipula ex vitro* sau 4 tuần



Hình 3. Kết quả khảo sát ảnh hưởng của độ ẩm lên *Dionaea muscipula ex vitro* sau 4 tuần

Nghiệm thức sử dụng dớn và đá perlite kết hợp dớn ở chế độ tưới 3 lần/ngày cho tỉ lệ cây sống sót cao trên 90% ($9,67 \pm 0,57$ cây), số lá mới đạt $8,30 \pm 0,10$ lá và chiều dài lá tăng trưởng đạt $3,74 \pm 0,45$ mm. Điều này có thể được giải thích là do trong môi trường *in vitro*, độ ẩm rất cao nên lớp cutin của lá khá mỏng, khí khổng thường xuyên mở, cây chủ yếu sinh trưởng qua phương thức dị dưỡng nhờ hấp thu dinh dưỡng từ môi trường, quang hợp yếu. Chính vì vậy, giai đoạn chuyển tiếp cho việc chuyển cây từ *in vitro* ra *ex vitro* với sự thay đổi dần về độ ẩm, cường độ ánh sáng, loại giá thể mang ý nghĩa quan trọng trong việc giúp cây làm quen với môi trường tự nhiên có độ ẩm thấp hơn, đẩy mạnh dần bộ máy quang hợp để có thể tự dưỡng, đồng thời tăng kích thước bẫy để bắt đầu thực hiện chức năng bắt mồi. Ở đây, chính hai loại vật liệu đá và dớn có tác dụng giữ ẩm tốt cho

cây, đồng thời có độ thoáng khí nhất định giúp rễ sinh trưởng và phát triển và chế độ tưới ướt 3 ngày/lần giúp cung cấp đủ nước cho cây, kết hợp với việc sử dụng bao nylon có đục lỗ là hai nhân tố then chốt trong giai đoạn chuyển tiếp vừa giúp duy trì độ ẩm ở mức trung bình, vừa đảm bảo độ thoáng khí nhất định để cây hoàn thiện dần bộ máy quang hợp, tăng trưởng lá tốt giúp cây tăng cường khả năng sống sót và thích nghi trong điều kiện *ex vitro*. Điều này còn thể hiện rõ trong kết quả sử dụng giá thể là cát - vật liệu giữ ẩm tốt nhưng độ thoáng khí kém và chế độ với mật độ tưới thấp 3 ngày/lần, không sử dụng bao nylon đã khiến cây bị mất nước mạnh, hoặc rễ bị úng không thoát khí làm cây không kịp thích nghi và sinh trưởng kém, thậm chí chết hoàn toàn nếu không cung cấp nước liên tục.



Hình 4. Sự thay đổi kích thước và màu sắc bẫy
Hình 5. *Dionea muscipula* sau 3 tháng đưa ra nhà lưới

sau 2 tháng trồng *ex vitro* khoẻ, hoàn thiện đầy đủ chức năng tự nhiên (Hình 5).

KẾT LUẬN

Từ các kết quả thí nghiệm thu được chúng tôi đề xuất quy trình vi nhân giống cho *Dionea muscipula* như sau: nhân chồi trên môi trường $\frac{1}{2}$ MS bổ sung kinetin 0,5 mg/L trong thời gian 6-8 tuần. Khi các chồi con đủ lớn tách chúng thành các chồi riêng lẻ chuyển sang môi trường ra rễ là $\frac{1}{2}$ MS bổ sung NAA 0,5 mg/L từ 6-8 tuần. Các cây con đạt kích thước 4-5 cm được chuyển ra trồng *ex vitro* trên giá thể gồm 1 đá perlite : 1 dớn, chế độ tưới 3 ngày/lần. Trong 2 tuần đầu sử dụng ánh sáng nhân tạo, dùng bao nylon đục lỗ để giữ ẩm

Tuy nhiên, do giá thành của dớn cao hơn đá perlite, lại không thể tái sử dụng sau một thời gian trồng cây nên chúng tôi đề xuất lựa chọn hỗn hợp 1 đá perlite : 1 dớn là giá thể trồng và chế độ tưới 3 lần/ngày hoặc tương đương là phù hợp cho việc chuyển *Dionea muscipula* ra điều kiện *ex vitro*. Trong giai đoạn chuyển tiếp trong phòng sáng có nhiệt độ trong khoảng 25 °C, cây non nên được bao nylon có đục lỗ. Sau 3 tháng ra vườn ươm, gần 100 % các cây con phát triển tốt, mọc nhiều lá mới xanh mướt, bẫy to có màu hơi đỏ, rễ mọc chắc

cho cây. Sau đó mang cây ra trồng ngoài vườn ươm, giữ nguyên giá thể và chế độ tưới. Toàn bộ quy trình vì nhân giống kéo dài khoảng 6 tháng, từ một cây ban đầu có thể nhân lên hàng trăm cây,

đáp ứng số lượng cho mục đích thương mại cũng như nghiên cứu sâu hơn về sinh hoá, cải tiến giống...

Micropropagation of venus flytrap *Dionaea muscipula*

- Vu Hong Thuy Uyen
- Nguyen Huu Trong
- Tran Hoang Phuc
- Bui Van Le

University of Science, VNU-HCM

ABSTRACT

Dionaea muscipula, also known as Venus flytrap, is an endangered carnivorous plant which has origin from North and South Carolina, USA. An efficient protocol for large-scale multiplication of this species has been set up through 3 stages: shoot multiplication, root induction and moving plant to the natural environment. On the half-strength Murashige and Skoog (MS) medium, supplemented with 0.5 mg/L kinetin gave the highest shoot proliferation of 20.44 ± 2.14 shoots/explant;

adding 0.5 mg/l α - naphthaleneacetic acid (NAA) induced the best rooting 5.33 ± 0.44 roots/shoot. The 4-5 cm plantlets were then transplanted on the rooting medium including 50 % peat and 50 % perlite. In the first 14 days, they were placed in the light room with the application of an anti-transpirant film, irrigated 3 times/day and after that all moved to the garden. The rate of successful transfer process reached nearly 100 %.

Keywords: *Dionaea muscipula*, Venus flytrap, plant growth regulator, micropropagation.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. J.F. Hutchinson, *In vitro* propagation of *Dionaea muscipula* Ellis (Venus flytrap), *Scientia Horticulturae*, 22, 1, 189-194 (2008).
- [2]. G.W. Jang, K.S. Kim, R.D. Park, Micropropagation of Venus flytrap by shoot culture, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 72, 1, 95-98 (2003).
- [3]. Murashige, Toshio, F. Skoog, A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures., *Physiologia Plantarum*, 15, 3, 473-497 (1962) .
- [4]. G. Pakulski, J. Budzianowski, Ellagic acid derivatives and naphthoquinones of *Dionaea muscipula* from *in vitro* cultures, *Phytochemistry*, 41, 3, 775-778 (1996).