

# Quy trình nhân nhanh giống hoa chuông in vitro bằng hệ thống ngập chìm tạm thời

*Quy trình có các ưu điểm: hệ số nhân giống cao, thời gian nhân giống nhanh, chất lượng cây tốt, giá thành thấp hơn phương pháp nuôi cấy truyền thống và giúp chủ động nguồn giống phục vụ sản xuất.*

Hoa chuông (*Gloxinia speciosa*) còn có nhiều tên gọi khác nhau như: hoa tình yêu (valentine), hoa thánh, tử la lan, môm chó biển, đại nhâm đồng, hồng xiêm. Hoa có nguồn gốc từ Brazil, là một trong những loại hoa nội thất có hình dáng lạ, màu sắc đa dạng rất được ưa chuộng trên thế giới, đã được nhập nội vào nước ta. Cây có dạng thân củ, thấp cây (12-15 cm), lá hình thuôn hoặc oval, hoa có hình chuông khá to, màu sắc đa dạng, có nhiều hoa nở cùng lúc, mỗi đợt hoa nở kéo dài khoảng 20 ngày. Hoa chuông được sử dụng với nhiều mục đích khác nhau như: trang trí trong nhà, ban công, công viên, công sở... Hoa được nghiên cứu tại nhiều vùng sinh thái khác nhau trên thế giới. Tuy nhiên, đây là một giống mới được nhập nội nên số lượng cây giống còn rất ít, chưa đáp ứng được nhu cầu người chơi hoa.

Hiện nay, hoa chuông được trồng bằng hạt giống nhập từ nước ngoài hoặc từ cây nhân giống vô tính. Phương pháp trồng bằng hạt gặp khó khăn do hạt có tỷ lệ nảy mầm thấp, thời gian sinh trưởng dài (4-5 tháng). Một số người dân đã nhân giống bằng lá, củ để tạo nguồn giống. Tuy nhiên, với các phương pháp này, hệ số nhân giống khá thấp, tốn thời



*Một số hoa chuông đã nhân giống in vitro tại Trung tâm Công nghệ sinh học TP. HCM*

gian và giống nhanh thoái hóa làm hoa và lá nhỏ dần. Để khắc phục nhược điểm này, người ta đã tiến hành nghiên cứu vi nhân giống cây hoa chuông, sử dụng môi trường thạch rắn (Nguyễn Quang Thạch và ctv., Trung tâm Công nghệ sinh học TP. HCM;...). Khi nhân giống trên môi trường này đòi hỏi một số lượng lớn các bình chứa mẫu nhỏ, dễ bị nhiễm mẫu, giá thành cao, hệ số nhân mẫu thấp, tốn nhân công chuẩn bị môi trường và cấy truyền mẫu sau 4-6 tuần nuôi cấy, tỷ lệ cây con có củ thấp và rất khó để tự động hóa.

## Kỹ thuật nuôi cấy ngập chìm tạm thời

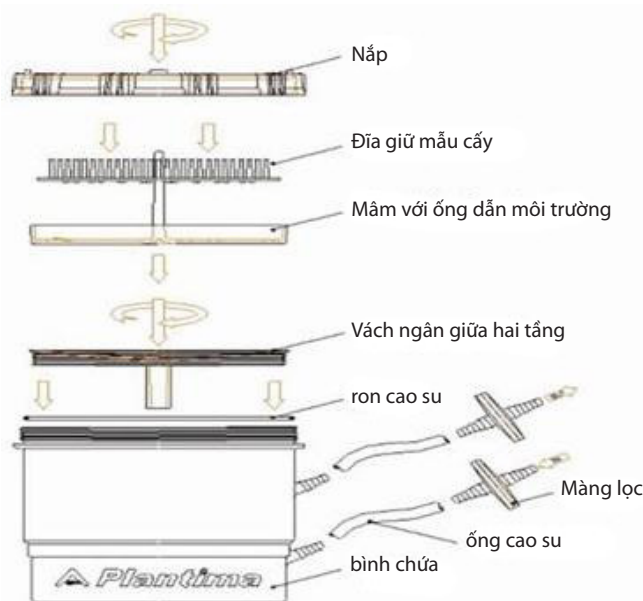
### Nguyên tắc vận hành và cấu trúc cơ bản hệ thống

Tất cả các hệ thống ngập chìm tạm thời (TIS - Temporary Immersion System) đều phải tuân theo nguyên tắc là phải có khả năng tạo ra sự ngập chìm không liên tục theo chu kỳ xác định. Các hệ thống đều có ngăn chứa môi trường riêng, có thể chung một bình chứa nhưng có hai ngăn khác nhau hay gồm một hệ thống bình chứa nối với hệ thống chứa mẫu cây bằng hệ thống ống dẫn và bơm điều khiển. Các mẫu cây thường được đặt trên những đĩa bằng nhựa polypropylen thành một cụm, giúp tiết kiệm thời gian đặt mẫu lên trên giá thể thạch như trong nuôi cấy thông thường.

### Những thành phần chính của hệ thống TIS

- Bơm hay máy nén khí tạo áp lực để đẩy môi trường từ ngăn chứa lên ngăn chứa mẫu cây và ngược lại.
- Hệ thống thời gian kế, dùng để điều khiển chu kỳ ngập.
- Hệ thống ống dẫn và van điều khiển.
- Các màng lọc thoáng khí.
- Bình nuôi cấy thường bằng nhựa polycarbonate hay thủy tinh.

Tùy theo nguyên tắc và nguyên lý để tạo ra TIS, có nhiều thiết kế hệ thống ngập khác nhau tùy theo mục đích nuôi cấy.



*Các thành phần của hệ thống Plantima (Đài Loan).*

## Các dạng hệ thống nuôi cấy TIS

- Hệ thống Tilting và hệ thống Rocker.
- Hệ thống ngập chìm hoàn toàn và cơ chế thay mới môi trường dinh dưỡng.
- Hệ thống ngập chìm một phần và cơ chế thay mới môi trường dinh dưỡng.
- Hệ thống ngập hoàn toàn, trao đổi môi trường lỏng bằng áp lực không khí và không có chức năng thay mới môi trường.

Các biến thể khác nhau của hệ thống này đã được phát triển và cung ứng rộng rãi trên thị trường, ví dụ như hệ thống RITA® (the Recipient for Automated Temporary Immersion System), hệ thống bình đôi (BIT®) và hệ thống Plantima.

Hệ thống Plantima gồm một hộp tròn lớn đường kính 16 cm, cao 14,5 cm, có ren ở giữa để gắn vách ngăn chia hộp Plantima thành hai khoang. Khoang bên dưới chứa dung dịch môi trường (cao 4 cm), khoang bên trên chứa mẫu (cao 10 cm). Hai khoang thông với nhau bởi ống dẫn môi trường. Mỗi khoang có một ống lắp phin lọc, thông với bên ngoài để trao đổi không khí. Trong khoang chứa mẫu, có mâm và ống dẫn môi trường gắn với đĩa giữ mẫu. Trên cùng có nắp đậy, gắn vào hộp Plantima bằng mối ghép ren.

Hệ thống TIS tác động tích cực lên tất cả các giai đoạn, từ nhân nhanh chồi cho tới phát sinh phôi soma trên nhiều đối tượng cây trồng khác nhau. Cây có nguồn gốc từ hệ thống nuôi cấy TIS có tỷ lệ sống sót cao, sinh trưởng khỏe mạnh trong quá trình thuần hóa ngoài vườn ươm. Thời gian ngập và số lần ngập chìm là những chỉ số chủ yếu ảnh hưởng đến sự phát triển của mẫu cấy cũng như toàn bộ quy trình vi nhân giống. Khi những chỉ số này được tối ưu hóa, sản lượng sẽ được gia tăng, quá trình kiểm soát sự phát sinh hình thái tốt hơn và còn có khả năng hạn chế tối đa hiện tượng thủy tinh thể. Đây là ưu điểm lớn nhất của hệ thống TIS so với hệ thống bioreactor thông thường.

Năm 2007, Trung tâm Công nghệ sinh học TP. HCM là đơn vị đầu tiên trong cả nước đã nhập hệ thống TIS của Đài Loan về nhân giống lan hồ điệp. Kết quả, hệ số nhân giống, tỷ lệ sống của cây con khi ra vườn ươm cao. Tiến hành nghiên cứu, ứng dụng trên nhiều loại lan và cây lá cảnh khác đều cho kết quả tốt. Từ đây, Trung tâm đã tiến hành nghiên cứu xây dựng thành công quy trình nhân nhanh giống hoa



a: bình Plantima với hệ thống điều khiển chu kỳ ngập; b: cây sinh trưởng và phát triển trong hệ thống Plantima.

chuông *in vitro* bằng hệ thống TIS, có hệ số nhân giống cao, thời gian nhân giống rút ngắn, chất lượng cây tốt, giá thành thấp hơn phương pháp nuôi cấy truyền thống và giúp chủ động nguồn giống phục vụ sản xuất.

## Quy trình nhân giống

Bao gồm tạo nguồn mẫu *in vitro* phục vụ nhân nhanh trên hệ thống TIS và nhân nhanh cây hoa chuông trên hệ thống TIS.

### Tạo nguồn mẫu *in vitro*

- Chọn cây hoa chuông ngoài vườn sinh trưởng mạnh, có các đặc tính ưu việt (ví dụ như hoa đẹp, lâu tàn), tiến hành cắt lấy đốt thân làm vật liệu nuôi cấy nhân giống.

- Khử trùng nguồn vật liệu (mẫu) sơ bộ dưới vòi nước, rửa bằng xà phòng bột loãng (1 g/l), sau đó khử trùng bằng Javen trong tủ cấy vô trùng với nồng độ Javen/nước là 1:3 (sử dụng Javen thương mại có 5% Chloride). Rửa mẫu lại bằng nước cất vô trùng 5-7 lần và cấy vào ống nghiệm có chứa môi trường MS (Murashige và Skoog).

- Lấy cuống lá của các mẫu *in vitro* sạch nấm khuẩn cấy trên môi trường MS bổ sung 1 mg/l NAA. Kết quả sau 2 tuần tạo mô sẹo.

- Lấy các mẫu sẹo trắng xếp cấy vào môi trường MS để tạo cụm chồi. Thời gian tạo cụm chồi sau 15-45 ngày nuôi cấy.

### Nhân nhanh cụm chồi trên hệ thống TIS.

- Cắt và tách các cụm chồi thành cụm chồi nhỏ cấy vào hộp Plantima chứa 250 ml MS có bổ sung 0,2 mg/l IBA hoặc không bổ sung IBA (Indol butyric acid). Sau đó, gắn vào hệ thống TIS cài đặt thông số với tần suất bơm 5 giờ/lần và thời gian ngập chìm là 3 phút cho một lần bơm để nhân chồi.

- Các chồi riêng lẻ nuôi cấy trên hệ thống TIS kết quả sau 15-20 ngày sẽ tạo cây con hoàn chỉnh có củ, đạt tiêu chuẩn ra vườn.

Quy trình nhân nhanh cụm chồi hoa chuông trên hệ thống TIS có hệ số nhân cao, bên cạnh giúp giảm chi phí sản xuất, còn rút ngắn được thời gian nuôi cấy (chỉ còn 2-4 tuần so với 5-6 tuần như truyền thống). Phương pháp này cho phép sản xuất số lượng cây con lớn, cây giống khỏe, đạt chất lượng trong thời gian ngắn, để cung cấp cho thị trường, góp phần đa dạng hóa thị trường cây hoa cảnh tại Việt Nam. Quy trình sản xuất không sử dụng hóa chất độc hại, không có rác thải thạch agar khi lấy cây ra trồng nên không gây tác động xấu cho môi trường như các phương pháp truyền thống.

Để ứng dụng TIS rộng rãi trong sản xuất cây giống, cần khảo sát kỹ lưỡng và tối ưu hóa những thông số kỹ thuật của hệ thống đối với các giai đoạn nuôi cấy của từng loại cây. Bên cạnh đó, do hiện nay các hệ thống nuôi cấy TIS đều phải nhập từ nước ngoài, nếu trong nước nghiên cứu sản xuất được sẽ góp phần giảm giá thành cho người sản xuất. □