

KHẢ NĂNG TÁI SINH IN VITRO CỦA MỘT SỐ GIỐNG DƯA CHUỘT (*Cucumis sativus* L.)

Nguyễn Tiến Dũng¹, Lê Thị Trang¹, Lê Văn Hiền¹, Nguyễn Thị Tinh¹, Vũ Phong Lâm², Ngô Xuân Bình¹

¹ Trường Đại học Nông lâm Thái Nguyên

² Trường Đại học Tây Bắc

TÓM TẮT

Năm giống dưa chuột bao gồm Đại địa, NINJA 179, CUC 71, TN 020, VL-103 được nghiên cứu khả năng tái sinh *in vitro* bằng phương pháp nuôi cấy nốt lá mầm. Cây này mầm sau 5 ngày nuôi được cắt bỏ phần trụ dưới, lựa chọn lá mầm cho nuôi cấy tái sinh chồi trên môi trường MS bổ sung BAP ở các nồng độ khác nhau (từ 0,5 đến 2,0mg/l). Sau 5 tuần tái sinh, chồi mầm được cấy chuyển sang môi trường kéo dài chồi và ra rễ MS + 1,5mg IBA/l kết hợp với GA₃ ở các nồng độ 0,5, 1,0, 1,5 và 2,0mg/l. Kết quả thu được cho thấy, tỷ lệ tái sinh chồi ở các giống dưa chuột thích hợp nhất ở nồng độ 1,5mg BAP/l, tỷ lệ tái sinh dao động từ 90,16 đến 91,80%, số chồi/mẫu từ 2,09 đến 2,55 chồi. Chiều dài chồi, số rễ trung bình/cây và chiều dài rễ thu được tốt nhất khi bổ sung kết hợp 1,5mg IBA/l với 1,0mg GA₃/l.

Từ khóa: Dưa chuột, tái sinh, *in vitro*, BAP (6-Benzylaminopurine), GA (Gibberellic acid)

ĐẶT VẤN ĐỀ

Dưa chuột (*Cucumis sativus* L.) là cây trồng phổ biến trong họ bầu bí *Cucurbitaceae*, có nguồn gốc ở vùng nhiệt đới ẩm thuộc nam Châu Á. Trong quả dưa chuột chứa nhiều thành phần dinh dưỡng quan trọng như: protit, glucid, canxi, vitamins và được nhiều người ưa thích. Tuy nhiên, trong quá trình sinh trưởng cây dễ bị tác động bởi một số đối tượng gây hại như nấm, virus đốm vòng, virus gây khảm xanh nên tới năng suất và chất lượng quả luôn bị ảnh hưởng (Taber và cs., 1998). Do vậy, việc chọn tạo các giống dưa kháng bệnh luôn được các nhà khoa học chú ý (Gaba và cs., 2004). Phương pháp chủ yếu trong chọn tạo giống dưa chuột là lai hữu tính giữa hai loài với nhau để tạo ra loài mới. Tuy nhiên phương pháp này thường khó thu được các tính trạng như mong muốn, mất khá tốn thời gian và gặp trở ngại khi lai các loài xa nhau về mặt di truyền nên khó thành công (Esquinas Alcazar và Gulick, 1983). Việc ứng dụng công nghệ sinh học trong chọn tạo giống cho phép tạo ra các tính trạng mong muốn trên cây trồng (Gaba và cs., 2004). Ở dưa chuột, để tạo ra cây dưa chuyển gen đòi hỏi phải xác định được phương pháp tái sinh hiệu quả (Mohiuddin et al., 1997). Nhiều nhà khoa học đã tập trung xây dựng quy trình tái sinh ở dưa chuột với các kỹ thuật khác nhau (Malepszy, 1988); nghiên cứu ảnh hưởng của các loại mẫu nuôi cấy như lá mầm (Kim và cs., 1983), trụ dưới lá mầm (Selvaraj và cs., 2006) hay tái sinh cây thông qua phôi vô tính (Chee, 1990). Cùng với đó, quy trình chuyển gen cũng được nghiên cứu và ứng dụng (Vasudevan và cs. 2007). Trong phạm vi bài báo chúng tôi trình bày khả năng tái sinh *in vitro* của một số giống dưa chuột. Kết quả này làm tiền đề cho các nghiên cứu chuyển gen trên cây dưa chuột ở Việt Nam.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu

Thí nghiệm sử dụng 5 giống dưa chuột trồng phổ biến ở Việt Nam được cung cấp bởi Công ty Giống cây trồng Thái Nguyên, bao gồm các giống: Đại địa, NINJA 179, CUC 71, TN 020, VL-103. Hóa chất sử dụng cho nuôi cấy của hãng Merk và Sigma.

Phương pháp

Khử trùng hạt và nuôi cấy nảy mầm

Trước khi nuôi cấy nảy mầm hạt được khử trùng như sau: Đưa hạt vào ống falcon thể tích 50ml, bổ sung 30ml cồn 70% lắc khử trùng trong thời gian 1 phút. Sau đó tiếp tục khử trùng bằng viên khử trùng Aquatabs 425mg/l trong 10 phút, sau cùng, rửa sạch hạt bằng nước cất vô trùng 2-3 lần. Đưa hạt ra đĩa petri, dùng dao cắt 5-11 lát bỏ vỏ lụa và nước cây nảy mầm trên môi trường MS có bổ sung 7g agar/l, được điều chỉnh pH = 5.7 trước khi khử trùng 15 phút ở 121°C. Mỗi đĩa petri kích thước (15x90) nuôi cấy 6-8 hạt dưới ánh sáng đèn 16h/ngày, nhiệt độ phòng 25°C±2.

Tái sinh chồi

Sau 5 ngày nảy mầm, cắt bỏ phần trụ dưới lá mầm, dùng dao tách phần lá mầm làm hai (mỗi bên chứa một nửa chồi đỉnh). Lá mầm được nuôi cấy trên môi trường tái sinh chồi MS bổ sung BAP ở các nồng độ khác nhau (0,5; 1,0; 1,5; 2,0mg/l). Mỗi đĩa petri nuôi cấy 5 mẫu, mỗi công thức lặp lại 3 lần, 60 mẫu/lần. Nuôi cấy tái sinh chồi dưới ánh sáng đèn 16h/ngày, 25°C±2. Sau 5 tuần nuôi cấy tiến hành thống kê số mẫu tạo chồi, số chồi/mẫu.

Kéo dài chồi và tái sinh rễ

Chồi mầm tái sinh được cấy chuyển sang môi trường MS + 1,5mg IBA/l bổ sung thêm GA₃ ở các nồng độ khác nhau (0,5; 1,0; 1,5; 2,0mg/l) để kéo dài chồi và tái sinh rễ. Mẫu được nuôi cấy riêng rẽ trong bình trụ 100ml, thời gian chiếu sáng 16h/ngày ở nhiệt độ 25°C±2. Mỗi công thức thí nghiệm lặp lại 3 lần, theo dõi 20 mẫu/lần lặp lại. Sau 3 tuần kể từ khi rễ xuất hiện tiến hành đưa cây ra ngoài trồng trong nhà kính.

Phương pháp xử lý số liệu

Số liệu được thống kê theo các lần nhắc lại (3 lần) và được xử lý thống kê bằng phần mềm SAS.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Ảnh hưởng của BAP đến khả năng tái sinh chồi từ lá mầm

Kết quả ở Bảng 1 cho thấy tỷ lệ chồi tái sinh ở các giống dưa có sự khác biệt đáng kể khi bổ sung BAP ở các nồng độ khác nhau (0,5-2,0mg/l). Nhìn chung, ở nồng độ BAP 1,0mg/l cho tỷ lệ tái sinh cao ở 4 giống Đại địa, NINJA179, CUC71, TN020, lần lượt đạt 90,16%, 90,32%, 91,80%, 90,16% với hệ số phát sinh chồi (chồi/mẫu) tương ứng 2,33, 2,09, 2,23, 2,19 chồi/mẫu. Giống VL 103 có tỷ lệ tái sinh chồi và HSPS chồi cao nhất ở nồng độ BAP 1,5mg/l (91,62%; 2,67 chồi/mẫu). Khi bổ sung BAP với nồng độ cao hơn 1,5mg/l hoặc thấp hơn 0,5mg/l, tỷ lệ mẫu tái sinh chồi và hệ số tái sinh chồi có xu hướng giảm xuống (Bảng 1). Ảnh hưởng của BAP đến khả năng tái sinh chồi thống qua lá mầm ở dưa chuột đã được báo cáo (Rhonda và William, 1990; Ugandha và cs., 2011). Các báo cáo đều cho thấy khả năng tái sinh chồi thay đổi đáng kể khi bổ sung BAP với nồng độ khác nhau. Ugandhar và cs. (2011) nhận thấy nồng độ BAP 3mg/l cho kết quả tái sinh và hệ số tái sinh chồi tốt nhất (65% và 3,0 chồi/mẫu) ở giống dưa chuột Ấn Độ, tỷ lệ này giảm xuống 50% và 48% khi tăng nồng độ BAP lên 4 và 5mg/l; trước đó, Rhonda và William (1990) thí nghiệm trên giống dưa chuột Australia chỉ ra rằng nồng độ BAP 0,5mg/l cho tỷ lệ tái sinh chồi cao nhất (100%), tỷ lệ chồi/mẫu đạt 3,2 và giảm xuống 50% khi tăng BAP lên 2mg/l. Điều này cho thấy mối liên hệ giữa nồng độ BAP và giống (kiểu gen) là rất lớn (Trulson và cs., 1986). Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cho thấy BAP 1,0mg/l là thích hợp cho khả năng tái sinh chồi ở dưa chuột.

Bảng 1. Ảnh hưởng của BAP đến khả năng tái sinh chồi từ lá mầm

BAP (mg/l)	Đại Địa		NINJA 179		CUC71		TN 020		VL-103	
	Tỷ lệ tái sinh	Số chồi/mẫu	Tỷ lệ tái sinh	Số chồi/mẫu	Tỷ lệ tái sinh	Số chồi/mẫu	Tỷ lệ tái sinh	Số chồi/mẫu	Tỷ lệ tái sinh	Số chồi/mẫu
0,0	72,00	1,25 ^c	76,03	1,6 ^b	76,3	1,33 ^c	73,17	1,46 ^c	76,33	1,62 ^b
0,5	83,33	1,48 ^c	83,33	1,42 ^b	78,88	1,27 ^c	85,65	1,95 ^b	87,40	2,08 ^b
1,0	90,16	2,33 ^a	90,32	2,09 ^a	91,80	2,23 ^a	90,16	2,19 ^a	90,33	2,55 ^b
1,5	87,44	2,14 ^b	87,02	1,89 ^b	90,06	2,19 ^b	77,48	1,84 ^b	91,62	2,67 ^a
2,0	84,33	1,98 ^b	83,77	1,62 ^b	81,58	2,15 ^c	79,60	1,96 ^c	81,66	1,63 ^b

(Chữ cái a, b, c, d thể hiện mức phân hạng trong so sánh Duncan)

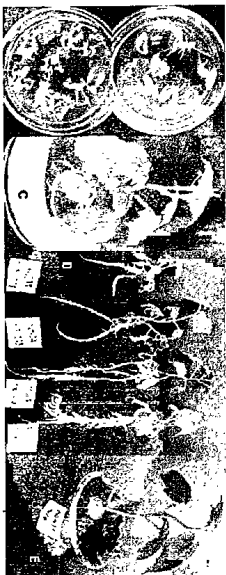
Ảnh hưởng của GA₃ đến khả năng kéo dài chồi và tái sinh rễ

Chồi mầm sau khi xuất hiện được cấy chuyển sang môi trường kéo dài chồi ở các nồng độ GA₃ khác nhau. Kết quả ở bảng 2 cho thấy, GA₃ có ảnh hưởng rõ rệt đến khả năng kéo dài chồi ở các giống dưa chuột. Hiệu quả kéo dài chồi tốt nhất khi bổ sung GA₃ 1,0mg/l vào môi trường nuôi cấy, chiều dài chồi tăng thêm khoảng từ 2-4cm so với công thức đối chứng (GA₃ 0mg/l). Ở nồng độ GA₃ cao hoặc thấp hơn 1,0mg/l chiều dài chồi có xu hướng giảm ở hầu hết các giống dưa nghiên cứu. Cũng ở nồng độ 1,0mg/l số rễ trung bình/cây và chiều dài rễ tốt hơn các công thức khác (Bảng 2). Selvaraj và cộng sự (2006) đã tăng chiều dài chồi từ 1,5cm lên 5,3cm sau 3 tuần nuôi cấy trên môi trường có chứa GA₃ 1,75 µM kết hợp IBA 7,36 µM để kích thích ra rễ ở giống Poinsett76. Ở thí nghiệm khác, GA₃ 1.44 µM được bổ sung kết hợp với 4,44µM BA đã làm tăng chiều dài chồi từ 1,0 lên 7,8cm (Selvaraj và cs. 2007). Điều này chứng tỏ sự kết hợp giữa GA₃ và BA ở nồng độ nhất định cho hiệu quả kéo dài chồi tốt hơn sử dụng đơn lẻ. Ugandhar và cộng sự (2011) cho rằng khả năng phát sinh chồi tốt nhất khi kết hợp IAA 0,5mg/l với BAP 3,0mg/l; tỷ lệ ra rễ cao ở môi trường MS có chứa 1,0mg/l IAA. Ở thí nghiệm này chúng tôi bổ sung GA₃ với các nồng độ khác nhau vào môi trường MS có chứa 1,5mg/l BA để kéo dài chồi và kích thích ra rễ. Kết quả thu được cho thấy GA₃ ở nồng độ 1,0mg/l kết hợp 1,5mg/l BA cho hiệu quả kéo dài chồi và tái sinh rễ tốt nhất ở các giống dưa nghiên cứu.

Bảng 2. Kết quả ảnh hưởng của GA₃ đến khả năng phát sinh và phát triển của rễ

Ga ₂ (mol)	Dai Dia			NINJA 179			CUC71			TN 020			VL-103		
	Chiều dài chổi	Số dài rế	Chiều dài rế chổi	Số dài rế	Chiều dài rế chổi	Số dài rế	Chiều dài rế chổi	Số dài rế	Chiều dài rế chổi	Số dài rế	Chiều dài rế chổi	Số dài rế	Chiều dài rế chổi	Số dài rế	Chiều dài rế chổi
0,0	1,36 ^a	1,36	3,52 ^a	2,10 ^b	1,17	5,13 ^a	2,05 ^a	1,18	4,73 ^a	2,50 ^a	1,02	5,21 ^a	2,4 ^a	0,90	6,15 ^d
0,5	3,00 ^c	1,64	7,38 ^b	3,05 ^b	1,66	7,99 ^b	2,95 ^b	1,74	6,52 ^c	2,89 ^b	1,46	6,78 ^c	3,45 ^b	1,34	6,96 ^c
1,0	4,04 ^d	2,02	8,94 ^c	4,00 ^c	2,10	10,23 ^c	4,97 ^c	2,03	11,51 ^d	5,40 ^c	1,75	10,91 ^d	6,57 ^c	1,55	12,63 ^d
1,5	4,58 ^e	1,97	7,19 ^c	4,29 ^c	1,65	10,05 ^c	3,26 ^c	1,82	10,37 ^c	3,89 ^c	1,90	7,33 ^c	4,68 ^c	1,78	7,69 ^c
2,0	2,90 ^a	1,63	6,53 ^a	2,57 ^b	1,25	5,53 ^a	2,07 ^a	1,48	7,94 ^a	2,89 ^a	1,25	5,92 ^a	3,0 ^a	0,95	3,57 ^a

(Chữ cái a, b, c, d thể hiện mức phân hạng trong so sánh Duncan)



Hình 1. Các giai đoạn nuôi cấy tế bào sinh in vitro ở dưa chuột

A: Mẫu cấy nấm sau 5 ngày. B- Tái sinh chồi trên môi trường 1,5mgBAP%. C và D- Kéo dài chồi và tạo rễ trên môi trường 1,5mgBAI + 1,0mgGA₃. E- Cây trong lòng đất.

KẾT LUẬN

Kết quả nghiên cứu khả năng tái sinh in vitro của một số giống dưa chuột cho thấy tỷ lệ tái sinh chồi tương đối khác nhau giữa các giống khi được nuôi cấy trên cùng môi trường BAP và GA₃ có ảnh hưởng lớn đến khả năng tái sinh và kéo dài chồi ở dưa chuột. Khả năng tái sinh tốt nhất khi nuôi cấy trên môi trường MS bổ sung 1,0mgBAP/l, tỷ lệ tái sinh từ 90,16 đến 91,80% sau 5 tuần nuôi cấy. Khả năng kéo dài chồi và tái sinh rễ tốt nhất khi môi trường có sự kết hợp 1,5mgIBA/l với 1,0mgGA₃/l. Kết quả nghiên cứu góp phần tối ưu quy trình tái sinh in vitro và ứng dụng cho nghiên cứu chuyển gen ở cây dưa chuột.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Chee P.P. (1990) High frequency somatic embryogenesis and recovery of fertile cucumber plants. *Sci. Hortic.* 25, 792–793.
- Esquinas A.J.T., Gulick P.J. (1983) *Genetic Resources of Cucurbitaceae*. IBPGR, Rome. 12-18
- Gaba V., Zelcer A., Gal On A., (2004) *Cucurbit Biotechnology—the importance of virus resistance*. *In Vitro Cell Dev. Biol. Plant.* 40, 346–358.
- Kim S.G., Chang J.R., Cha H.C., Lee K.W. (1988) Callus growth and plant regeneration in diverse cultures of cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 12, 67–74
- Malepszy S. (1988) *Cucumber (Cucumis sativus L.)*. In: Bajaj, Y.P.S. (Ed.), *Biotechnology in Agriculture and Forestry*. Springer-Verlag, Berlin, pp.276–293
- Mohiuddin A.K.M., Chowdhury M.K.U., Zaliha T., Abdullah Z.C., Naps S. (1997) Influence of silver nitrate (ethylene inhibitor) on cucumber in vitro shoot regeneration. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 51, 75–78
- Selvaraj N., Vasudevan A., Manickavasagam M., Kasthurirengan S., Ganapathi A. (2006) *In vitro organogenesis and plant formation in cucumber*. *Biologia Plantarum* 50 (1): 123–126.
- Selvaraj N., Vasudevan A., Manickavasagam M., Kasthurirengan S., Ganapathi A. (2007) High frequency shoot regeneration from cotyledon explants of cucumber via organogenesis. *Scientia Horticulturae* 112, 2–8
- Tabel Y., Kikade S., Nishizawa Y., Kikuchi N., Kayano T., Hibi T., Akutsu K. (1998) Transgenic cucumber plants harboring a rice chitinase gene exhibit enhanced resistance to grey mold (*Botrytis cinerea*). *Plant Cell Rep.* 17, 159–164.
- Trulso A.J., Shalhin E.A. (1986) *In vitro plant generation in the genus Cucumis*. *Plant Sci.* 47, 35–43. Trulso, A.J., Simpson, R.B., Shalhin E.A. (1986) *In vitro plant generation in the genus Cucumis*. *Plant Sci.* 47, 35–43.
- Uaman M., Hussain Z. and Fatima B. (2011) Somatic embryogenesis and Shoot regeneration induced in cucumber leaves, *Pak. J. Bot.*, 43(2): 1283–1293
- Vasudevan A., Selvaraj N., Ganapathi A. and C.W. Choi (2007) *Agrobacterium-mediated Genetic Transformation in Cucumber (Cucumis sativus L.)*, *American Journal of Biotechnology and Biochemistry* 3 (1): 24–32

IN VITRO PLANT REGENERATION CAPACITY OF CUCUMBER (*Cucumis sativus* L.)

Nguyen Tien Dung¹, Le Thi Trang¹, La Van Hien¹, Nguyen Thi Tinh¹, Vu Phong Lam², Ngo Xuan Binh^{1*}

¹ Faculty of Biotechnology and Food technology – Thai Nguyen university of Agriculture and Forestry

² Tay Bac university

SUMMARY

Five cucumber cultivars, Đại địa, NINJA 179, CUC 71, TN 020, VL-103, were examined the *in vitro* plant regeneration capacity through cotyledonary node 5 old-day-seedlings were cut off the hypocotyl, the cotyledonary part was divided into two equal sections that then were cultured in the MS medium containing BAP with difference concentrations (0.5, 1.0, 1.5 and 2.0mg/l). After 5 weeks of culturing, buds were transferred to the shoot elongation and rooting medium that supplemented combination of 1.5mgIBA and GA₃ with difference concentrations (0.5, 1.0, 1.5 and 2.0mg/l). The results showed that, the highest frequency of bud regeneration, 90.16 to 91.80%, was obtained when medium was supplemented 1.0mgBAP/l, the number of buds was 2.69 to 2.55 buds per explant. The MS medium was added 1.5mgIBA/l and 1.0mgGA₃/l together was the best for shoot elongation and rooting of cucumber.

Keywords: Cucumber, shoot regeneration, in vitro, BAP (6-Benzylaminopurine), GA (Gibberellic acid)

* Corresponding author: Tel: 0979736586, email: ngobinh2000@yahoo.com