

# TẠO CÂY DƯA HẦU TỨ BỘI BẰNG XỬ LÝ COLCHICINE IN VITRO

Lâm Ngọc Phương và Nguyễn Kim Hằng<sup>1</sup>

## ABSTRACT

*Development of seedless hybrids has be 4 stages: a) choice of diploid lines, b) production of tetraploid plants, c) tetraploid line development, and d) hybrid production and testing. Seedless cultivars are produced by crossing a tetraploid (4X=44) inbred line as the female parent with a diploid (2X=22) inbred line as the male parent of the hybrid. The reciprocal cross (diploid female parent) does not produce seeds. The hybrid is a triploid (3X=33), and is female and male sterile. Generally tetraploids are developed by treating mutagens to diploid seedlings both at in vivo and in vitro conditions. The purpose of this study is to develop tetraploid watermelon lines to breed triploid watermelon. Results showed that the treatment that in vitro colchicine treatments proved to be successful: 10% tetraploids. The treatment that was applied 0.025% colchicine for 6 days was the most effective. The ploidy level of the colchicine-treated individuals was analysed by flow cytometry. The resulting plants were then transplanted to the nethouse and to the field.*

**Keywords:** *Citrullus vulgaris Schrad., tetraploid, triploid seedless, in vitro culture, colchicine, flow cytometry*

**Title:** *Effect of colchicine on the production of tetraploid watermelon (Citrullus vulgaris Schrad.) in vitro*

## TÓM TẮT

*Phát triển cây lai không hạt gồm có 4 giai đoạn: 1) chọn dòng nhị bội, 2) sản xuất cây tứ bội, 3) phát triển dòng tứ bội và 4) sản xuất cây lai tam bội. Dưa hấu không hạt được tạo thành do lai giữa cây dưa hấu tứ bội (4X=44) làm mẹ và cây nhị bội (2X=22) làm cha. Kết quả cho được cây lai tam bội (3X=33) và là cây cái, đực bất thụ. Trong tự nhiên, cây dưa hấu tứ bội không hiện diện. Thông thường, cây tứ bội được phát triển bởi xử lý đột biến cây con nhị bội trong điều kiện vườn ươm hoặc nuôi cấy mô. Nghiên cứu được thực hiện nhằm phát triển những dòng dưa hấu tứ bội để tạo giống dưa hấu tam bội. Kết quả nghiên cứu cho thấy xử lý colchicine nồng độ 0,025% trong thời gian 6 ngày cho tỷ lệ cây tứ bội cao nhất là 10%. Mức bội thể của các cây này được phân tích bằng máy tế bào học "Flow cytometry". Sau đó, chúng được chuyển ra trồng nơi vườn ươm và đồng ruộng.*

**Từ khóa:** *Dưa hấu (Citrullus vulgaris Schrad.), tứ bội, tam bội không hạt, nuôi cấy in vitro, colchicine, flow cytometry*

## 1 MỞ ĐẦU

Dưa hấu là loại trái cây rất được ưa thích ở Việt Nam cũng như ở nhiều nước trên thế giới. Dưa hấu ăn rất ngon nhưng lại có quá nhiều hạt nên dưa hấu không hạt được nhiều người ưa chuộng. Dưa hấu không hạt đã được lai tạo thành công và trồng rộng rãi ở Mỹ từ hơn 40 năm trước và ngày càng trở nên phổ biến hơn so với dưa hấu có hạt. Hiện nay, có rất nhiều giống dưa hấu không hạt đã được lai tạo ra

<sup>1</sup> Khoa Nông Nghiệp & Sinh học Ứng dụng, Trường Đại học Cần Thơ

với hình dạng, màu sắc và hương vị khác nhau để đáp ứng với nhu cầu của người tiêu dùng. Dưa hấu không hạt là một phần của chiến lược sản xuất dưa đã có từ lâu ở thị trường, đem lại lợi tức cao hơn so với dưa hấu có hạt.

Các giống dưa hấu không hạt được tạo thành do lai giữa cây mẹ tứ bội (tetraploid,  $4n = 44$ ) với cây cha nhị bội (diploid,  $2n = 22$ ). Từ năm 1939, Kihara đã nghiên cứu cây dưa hấu không hạt và đã đưa ra thị trường cây lai tam bội sau 12 năm. Tuy nhiên, đến nay giống dưa hấu không hạt vẫn cần phải được cải thiện không ngừng để thương mại hóa và mở rộng nhanh thị trường. Cây dưa hấu cha mẹ tứ bội được tạo thành bằng cách xử lý cây con nhị bội với colchicine nơi vườn ươm (Andrus *et al.*, 1971). Ngày nay, nhờ vào sự phát triển của kỹ thuật nuôi cấy mô, việc xử lý colchicine để tạo cây đa bội đã được tiến hành bằng nuôi cấy “in vitro” (Hasnain *et al.*, 2003).

Đề tài “*Tạo cây dưa hấu tứ bội bằng xử lý colchicine in vitro*” được thực hiện nhằm tìm nồng độ xử lý colchicine thích hợp để tạo cây dưa hấu tứ bội in vitro, làm nguồn cây mẹ cho công tác lai tạo cây dưa hấu tam bội không hạt.

## 2 PHƯƠNG TIỆN VÀ PHƯƠNG PHÁP

### 2.1 Nguyên liệu

Giống dưa hấu nhị bội (Sugar Baby) nhập từ Mỹ, có dạng trái tròn, trọng lượng trung bình 3-5 kg, vỏ màu xanh đen, ruột đỏ, thời gian sinh trưởng 65-70 ngày, là giống thụ phấn tự do.

Hạt dưa hấu được vô trùng với dung dịch chlorin 8% trong 5 phút, rửa với nước cất 2 lần trước khi tiến hành lột vỏ; sau đó, được khử nhanh với thủy ngân clorua 1‰ trong 5 phút và rửa lại với nước cất 3 lần. Tiếp theo, cấy các hạt vào môi trường MS không chất điều hòa sinh trưởng được chuẩn bị sẵn. Sau cùng, các keo chứa hạt được cho vào tủ tối trong 3 ngày, trước khi đặt dưới ánh sáng.

Môi trường được dùng để chuyển mẫu sau khi được xử lý là môi trường Murashige & Skoog (1962) có bổ sung đường sucrose (30 g/l), agar (7 g/l); nước dừa (5%); vitamin (1 mg/l), myo-inositol (100 mg/l). Chất điều hòa sinh trưởng (BA) được thêm vào tùy theo thí nghiệm; có pH là 5,8; môi trường được cho vào keo, hấp khử trùng ở nhiệt độ 121°C và áp suất 1atm. trong thời gian 20 phút. Hóa chất colchicine có xuất xứ từ Đức (Merck).

Thí nghiệm được thực hiện tại bộ môn Sinh lý - Sinh hóa, Khoa Nông Nghiệp và Sinh học Ứng dụng, Trường Đại học Cần Thơ.

### 2.2 Phương pháp

Cây con 3 ngày tuổi in vitro được cắt bỏ 1/3 tử diệp và phần gốc, giữ lấy trục hạ diệp dài 1 cm và cấy vào môi trường MS trên có hoặc không bổ sung BA 1 mg/l, sau đó một ngày các mẫu này được xử lý với colchicine. Colchicine được pha với nước cất và lọc vô trùng bằng màng lọc Millipor (0,22  $\mu$ m) nơi tủ cấy vô trùng.

Thí nghiệm 1, bố trí theo thể thức hoàn toàn ngẫu nhiên 1 nhân tố gồm 6 nghiệm thức tương ứng với 3 nồng độ colchicine 0,0; 0,01 và 0,05% có hoặc không có bổ

sung BA 1 mg/l trong thời gian xử lý là 4 ngày, 4 lần lặp lại, mỗi lần lặp lại là 2 keo, mỗi keo cấy 5 mẫu.

Thí nghiệm 2, bố trí theo thể thức thừa số hai nhân tố là 3 nồng độ colchicine (0,0; 0,01 và 0,025%) và 2 thời gian xử lý (4 và 6 ngày) gồm 6 nghiệm thức, 8 lần lặp lại, mỗi lần lặp lại 1 keo, mỗi keo 5 mẫu tương ứng với 5 hạt, trong môi trường có bổ sung BA 1 mg/l.

Mẫu hạt sau xử lý được cấy vào môi trường mới có BA 0,5 mg/l, đặt trong điều kiện chiếu sáng là 14 giờ, cường độ 1.500 lux, nhiệt độ phòng từ  $26 \pm 2^{\circ}C$ .

Theo dõi các chỉ tiêu mỗi tuần:

- Tỷ lệ sống (%), số chồi gia tăng, chiều cao gia tăng (cm), số lá gia tăng, trọng lượng tươi, tỷ lệ chồi có hình thái tứ bội.
- Mật số khí khổng trên lá (số tế bào/ đơn vị diện tích), chọn mẫu lá trong môi trường có phiến dày, lá to, màu xanh đậm hơn so với lá của cây đối chứng, nhỏ một giọt collodion, thoa mỏng, để cho khô, tiến hành tách lớp biểu bì mặt lá, quan sát dưới kính hiển vi 10 x 40, đếm mật số tế bào khổng ở thị trường (đường kính vật kính 440  $\mu$ m). Lặp lại 3 lần trên 3 vùng thị trường khác nhau của một mẫu tương ứng 1 lá.

Xác định cây đa bội bằng máy “Flow cytometry” (Muhammad và Sung, 2005): Chọn những cây xử lý (3 tuần sau khi cấy chuyên) từ 4 nghiệm thức xử lý colchicine (mỗi nghiệm thức hai mẫu) có những đặc điểm thân to, lá dày hơn, phiến lá rộng, màu xanh đậm hơn cây lưỡng bội tương ứng và mẫu đối chứng. Máy “flow cytometry”, sử dụng PA-1 (Partec, Germany). Mẫu lá dưa hấu *in vitro* có diện tích 0,5 cm<sup>2</sup> được cắt nhỏ, chứa vào đĩa petri nhựa, thêm vào 2 ml dung dịch trích DNA (solution A of the High Resolution Kit for Plant DNA, Partec) trong 5 phút, sau đó dung dịch được lọc qua màng lọc nylon 30  $\mu$ m. Cây 2n được đo trước để có “peak” chuẩn và theo lập trình “peak” chuẩn này xuất hiện ở vị trí 100.

Phân tích số liệu: Các số liệu thí nghiệm được xử lý bằng phần mềm thống kê MSTATC. Phân tích phương sai (ANOVA), so sánh các giá trị trung bình bằng phương pháp kiểm định LSD hoặc Duncan ở mức ý nghĩa 5% hoặc 1%.

### 3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

#### 3.1 Hiệu quả của colchicine và BA trên sự tạo thành cây dưa hấu tứ bội

##### 3.1.1 Tỷ lệ sống

Bảng 1 cho thấy, cây tỷ lệ sống của mẫu cấy ở các nghiệm thức không thay đổi nhiều sau 2-4 tuần nuôi cấy, giữa các nghiệm thức không khác biệt nhau có ý nghĩa thống kê, vào 4 tuần sau khi nuôi cấy tỷ lệ sống biến thiên từ 93,3 % đến 98,7%. Kết quả này phù hợp với nghiên cứu xử lý colchicine của Gu *et al.* (2005) trên cây *Z. jujuba*.

**Bảng 1: Tỷ lệ sống (%) và số chồi của mẫu dưa hấu xử lý colchicine sau 2 - 4 tuần nuôi trong môi trường có hoặc không có BA**

| Nghiệm thức           | Tỷ lệ sống (%) |        | Số chồi |        |
|-----------------------|----------------|--------|---------|--------|
|                       | Tuần 2         | Tuần 4 | Tuần 2  | Tuần 4 |
| 0,00% col             | 97,4           | 97,4   | 2,8     | 4,2 ab |
| 0,01% col             | 95,9           | 93,3   | 2,6     | 3,7 bc |
| 0,05% col             | 98,7           | 94,7   | 1,8     | 2,6 c  |
| 0,00% col + 1 mg/l BA | 96,1           | 96,1   | 3,2     | 5,4 a  |
| 0,01% col + 1 mg/l BA | 98,7           | 98,7   | 3,3     | 5,3 a  |
| 0,05% col + 1 mg/l BA | 98,7           | 98,7   | 2,0     | 3,2 c  |
| Mức ý nghĩa           | ns             | ns     | ns      | *      |
| CV (%)                | 4,94           | 5,51   | 37,27   | 9,67   |

Ghi chú: col: colchicine; ns: khác biệt không có ý nghĩa thống kê; \*: khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức 5%

### 3.1.2 Số chồi

Kết quả bảng 1 cũng cho thấy sau 2 tuần nuôi cấy số chồi của mẫu cấy ở các nghiệm thức biến thiên từ 1,8-3,2 chồi. Tuy nhiên, sự khác biệt này không có ý nghĩa thống kê. Đến 4 tuần sau khi cấy, nghiệm thức có hay không xử lý colchicine 0,01% nhưng có bổ sung BA trong cho số chồi cao nhất là 5,3 -5,4 chồi, khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức 5% so với 2 nghiệm thức xử lý colchicine 0,01% và 0,05% không bổ sung BA là 3,7 và 2,6 chồi và nghiệm thức xử lý colchicine 0,05% bổ sung BA là 3,2 chồi (Hình 1).

### 3.1.3 Chiều cao

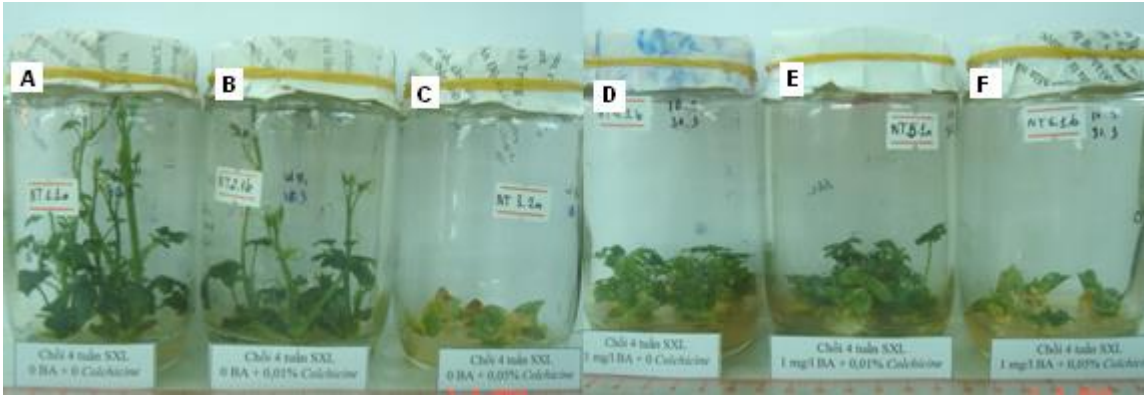
Kết quả bảng 2 cho thấy sau 2 tuần nuôi cấy chiều cao của chồi dưa cao nhất ở nghiệm thức đối chứng 3,09 cm, khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức 1% so với các nghiệm thức còn lại; chiều cao thấp nhất ở nghiệm thức xử lý colchicine 0,01% là 0,9 cm khác biệt không có ý nghĩa so với nghiệm thức xử lý 0,05% có bổ sung BA là 0,95 cm và nghiệm thức xử lý 0,01% có bổ sung BA là 1,62 cm.

Đến 4 tuần sau khi nuôi cấy chiều cao của chồi dưa vẫn cao nhất ở các nghiệm thức đối chứng không xử lý và không bổ sung BA là 5,73 cm, khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức 1% so với các nghiệm thức còn lại. Nghiệm thức xử lý colchicine 0,05% có bổ sung BA có chiều cao thấp nhất là 1,45 cm (Hình 1).

**Bảng 2: Chiều cao (cm) và số lá cây dưa hấu xử lý colchicine trong môi trường nuôi cấy có hoặc không có BA sau 2 - 4 tuần**

| Nghiệm thức           | Chiều cao (cm) |         | Số lá  |        |
|-----------------------|----------------|---------|--------|--------|
|                       | Tuần 2         | Tuần 4  | Tuần 2 | Tuần 4 |
| 0,00% col             | 3,09 a         | 5,73 a  | 3,6 a  | 5,1 a  |
| 0,01% col             | 1,93 b         | 3,67 b  | 2,5 ab | 3,1 ab |
| 0,05% col             | 0,90 c         | 1,95 c  | 1,1 b  | 1,5 b  |
| 0,00% col + 1 mg/l BA | 1,97 b         | 2,87 bc | 2,9 a  | 3,8 a  |
| 0,01% col + 1 mg/l BA | 1,62 bc        | 2,82 bc | 2,2 ab | 3,3 ab |
| 0,05% col + 1 mg/l BA | 0,95 c         | 1,45 c  | 1,1 b  | 1,5 b  |
| Mức ý nghĩa           | **             | **      | **     | **     |
| CV (%)                | 25,54          | 32,26   | 33,33  | 31,35  |

Ghi chú: col: colchicine; những số có chữ theo sau giống nhau thì không khác biệt có ý nghĩa thống kê; \*\*: khác biệt ý nghĩa thống kê ở mức 1%



**Hình 1: Chồi dưa hấu trong môi trường nuôi cấy 4 tuần sau xử lý**

A) Đối chứng, B) 0,01% colchicine, C) 0,05% colchicine, D) 0% colchicine + 1 mg/l BA,  
 E) 0,01% colchicine + 1 mg/l BA, F) 0,05% colchicine + 1 mg/l BA

**3.1.4 Số lá**

Kết quả bảng 2 cũng cho thấy sau 2 tuần nuôi cấy số lá trên chồi dưa cao nhất ở nghiệm thức không xử lý colchicine và không bổ sung BA là 3,6 cm, khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức 1% so với các nghiệm thức xử lý colchicine 0,05% có hay không có bổ sung BA là 1,1 lá, nhưng khác biệt không có ý nghĩa so với nghiệm thức không xử lý colchicine có bổ sung BA là 2,9 chồi.

Đến 4 tuần sau khi nuôi cấy số lá của chồi dưa vẫn cao nhất ở các nghiệm thức đối chứng không xử lý và không bổ sung BA là 5,1 khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức 1% so với các nghiệm thức xử lý colchicine 0,05% có hay không có bổ sung BA là 1,5 lá, nhưng khác biệt không có ý nghĩa so với nghiệm thức không xử lý colchicine và bổ sung BA là 3,8 lá (Hình 1).

**3.1.5 Tỷ lệ chồi có hình thái tứ bội**

Bảng 3 cho thấy chồi có hình thái tứ bội cao nhất ở nghiệm thức xử lý colchicine 0,05% là 22,5%, khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức 5% so với nghiệm thức xử lý colchicine 0,01% (0%). Tuy nhiên, có lẽ do nồng độ xử lý này cao nên sự sinh trưởng của chồi rất chậm (Hình 1).

**Bảng 3: Tỷ lệ (%) chồi có hình thái tứ bội sau 4 tuần xử lý colchicine và số khí khổng**

| Nghiệm thức           | Tỷ lệ (%) chồi có hình thái tứ bội | Số khí khổng (/mm <sup>2</sup> ) |
|-----------------------|------------------------------------|----------------------------------|
| 0,00% col             | 0,00 b                             | 327 a                            |
| 0,01% col             | 0,00 b                             | 259 abc                          |
| 0,05% col             | 22,50 a                            | 204 bc                           |
| 0,00% col + 1 mg/l BA | 0,00 b                             | 318 a                            |
| 0,01% col + 1 mg/l BA | 0,00 b                             | 296 ab                           |
| 0,05% col + 1 mg/l BA | 22,50 a                            | 189 c                            |
| Mức ý nghĩa           | *                                  | *                                |
| CV (%)                | 47,54                              | 18,74                            |

Ghi chú: col: colchicine; những số có chữ theo sau giống nhau thì không khác biệt có ý nghĩa thống kê; \*: khác biệt ý nghĩa thống kê ở mức 5%

### 3.1.6 Số khí khẩu

Nghiệm thức xử lý colchicine 0,05% có bổ sung BA có số khí khẩu trên mm<sup>2</sup> lá thấp nhất là 189 khẩu, khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức 5% so với nghiệm thức không xử lý và xử lý colchicine 0,01% có bổ sung BA là 327 và 296 khẩu.

Tóm lại, kết quả thí nghiệm trên cho thấy xử lý colchicine 0,05% có bổ sung BA 1mg/l cho được tỉ lệ cây có hình thái tứ bội khác biệt có ý nghĩa so với đối chứng và nồng độ 0,01%; Tuy nhiên, kết quả này có hạn chế về sinh trưởng của cây nên cần nghiên cứu tiếp ở nồng độ xử lý thấp hơn.

## 3.2 Hiệu quả của colchicine và thời gian xử lý trên sự tạo thành cây dưa hấu tứ bội

### 3.2.1 Tỷ lệ sống

Bảng 4 cho thấy, sau một tuần nuôi cấy tỷ lệ sống (%) của mẫu cây biến thiên từ 97,9% ở các nghiệm thức xử lý colchicine đến 100% ở nghiệm thức đối chứng, nhưng sự khác biệt này không có ý nghĩa thống kê. Đến 2 tuần sau, tỷ lệ sống của mẫu cây đối chứng đạt 100%, ở nồng độ 0,025% đạt 82,4%, khác biệt nhau có ý nghĩa thống kê ở mức 5% nhưng không khác biệt so với nồng độ 0,01% đạt 93,1%. Giữa đối chứng và nồng độ 0,01% không khác biệt nhau.

**Bảng 4: Tỷ lệ sống (%) của mẫu cây sau 1-3 tuần xử lý colchicine ở các nồng độ và thời gian khác nhau**

| Nghiệm thức<br>(nồng độ x thời gian) | Tỷ lệ (%) mẫu sống |         |         |
|--------------------------------------|--------------------|---------|---------|
|                                      | Tuần 1             | Tuần 2  | Tuần 3  |
| 0,00% 4 ngày                         | 100                | 100 a   | 100 a   |
| 0,00% 6 ngày                         | 100                | 100 a   | 100 a   |
| 0,01% 4 ngày                         | 97,9               | 93,1 ab | 87,9 ab |
| 0,025% 4 ngày                        | 97,9               | 82,4 b  | 79,3 b  |
| 0,01% 6 ngày                         | 97,9               | 93,1 ab | 87,9 ab |
| 0,025% 6 ngày                        | 97,9               | 82,4 b  | 79,3 b  |
| Mức ý nghĩa                          | ns                 | *       | **      |

Những số có chữ theo sau giống nhau thì không khác biệt có ý nghĩa thống kê; ns: khác biệt không có ý nghĩa thống kê; \*: khác biệt ý nghĩa thống kê ở mức 5%; \*\*: khác biệt ý nghĩa thống kê ở mức 1%

Đến 3 tuần, nồng độ xử lý 0,025% có tỷ lệ sống là 79,3%, khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức 1% so với đối chứng là 100%, nhưng khác biệt không có ý nghĩa thống kê so với 0,01% colchicine (87,95%). Giữa đối chứng và nồng độ xử lý 0,01% không khác biệt nhau. Qua ba tuần khảo sát, thời gian xử lý không ảnh hưởng đến tỷ lệ sống cũng như không có sự tương tác giữa nồng độ colchicine và thời gian xử lý lên tỷ lệ sống của chồi dưa hấu.

### 3.2.2 Số chồi

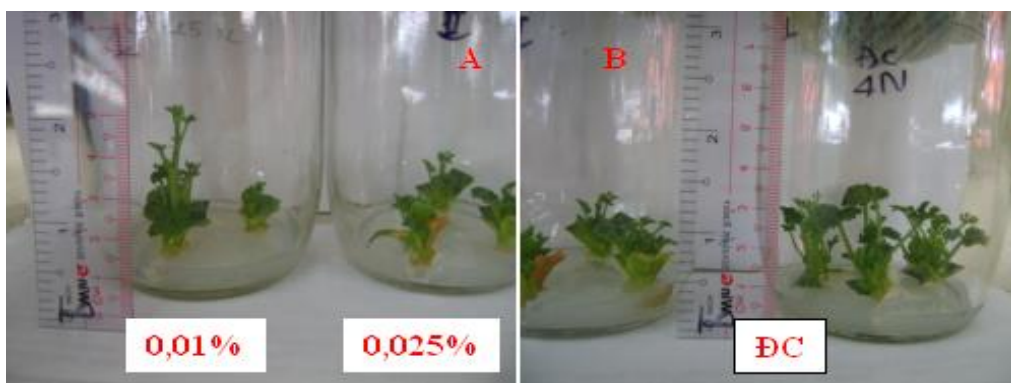
Kết quả bảng 5 cho thấy sau ba tuần nuôi cấy nồng độ colchicine có ảnh hưởng đến số chồi gia tăng, nồng độ colchicine 0,01% có số chồi gia tăng cao nhất là 3,8 (Hình 1), khác biệt có ý nghĩa thống kê ở 1% so với đối chứng (3,1 chồi) và ở nồng độ 0,025% (2,5 chồi). Nồng độ 0,025% có số chồi gia tăng khác biệt không có ý nghĩa so với đối chứng. Thời gian xử lý không ảnh hưởng đến số chồi gia

tăng. Không có sự tương tác giữa nồng độ colchicine và thời gian xử lý trong số chồi gia tăng.

**Bảng 5: Số chồi gia tăng (chồi/mẫu) của cây dưa hấu xử lý colchicine ở các nồng độ và thời gian khác nhau sau ba tuần nuôi cấy**

| Nồng độ colchicine (%)     | Thời gian (ngày) |       | Trung bình (colchicine) |
|----------------------------|------------------|-------|-------------------------|
|                            | 4                | 6     |                         |
| 0,00                       | 2,9              | 3,2   | 3,1 b                   |
| 0,01                       | 3,7              | 3,9   | 3,8 a                   |
| 0,025                      | 2,6              | 2,4   | 2,5 b                   |
| Trung bình (thời gian)     | 3,1              | 3,2   |                         |
| F (colchicine)             |                  | **    |                         |
| F (thời gian)              |                  | ns    |                         |
| F (colchicine x thời gian) |                  | ns    |                         |
| CV (%)                     |                  | 19,81 |                         |

Những số có chữ theo sau giống nhau thì không khác biệt có ý nghĩa thống kê; ns: khác biệt không có ý nghĩa thống kê; \*\*: khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức 1%



**Hình 2: Chồi dưa hấu phát triển sau 3 tuần nuôi cấy có xử lý colchicine (A) và đối chứng (B)**

### 3.2.3 Chiều cao chồi

Bảng 6 cho thấy, sau ba tuần nuôi cấy nồng độ colchicine cũng như thời gian xử lý không ảnh hưởng đến chiều cao gia tăng của chồi. Có sự tương tác giữa nồng độ colchicine và thời gian xử lý trên chiều cao gia tăng của chồi dưa hấu, nồng độ colchicine 0,01% cùng 6 ngày xử lý cho chiều cao gia tăng cao nhất là 1,7cm, khác biệt có ý nghĩa so với các nghiệm thức còn lại.

**Bảng 6: Chiều cao gia tăng (cm) của chồi dưa hấu xử lý colchicine sau 3 tuần nuôi cấy**

| Nồng độ colchicine (%)     | Thời gian (ngày) |       | Trung bình (colchicine) |
|----------------------------|------------------|-------|-------------------------|
|                            | 4                | 6     |                         |
| 0,00                       | 1,0 b            | 1,3 b | 1,2                     |
| 0,01                       | 1,1 b            | 1,7 a | 1,4                     |
| 0,025                      | 1,3 b            | 1,2 b | 1,2                     |
| Trung bình (thời gian)     | 1,1              | 1,4   |                         |
| F (colchicine)             |                  | ns    |                         |
| F (thời gian)              |                  | ns    |                         |
| F (colchicine x thời gian) |                  | *     |                         |
| CV (%)                     |                  | 29,23 |                         |

Những số có chữ theo sau giống nhau thì không khác biệt có ý nghĩa thống kê; ns: khác biệt không có ý nghĩa thống kê; \*: khác biệt ý nghĩa thống kê ở mức 5%

### 3.2.4 Số lá

Bảng 7 cho thấy sau ba tuần nuôi cấy, có sự ảnh hưởng của nồng độ colchicine lên sự gia tăng số lá của cụm chồi.

**Bảng 7: Số lá gia tăng (lá/cụm chồi) trên mẫu chồi dưa hấu xử lý colchicin ở các nồng độ và thời gian khác nhau sau ba tuần nuôi cấy**

| Nồng độ colchicine (%)     | Thời gian (ngày) |        | Trung bình (colchicine) |
|----------------------------|------------------|--------|-------------------------|
|                            | 4                | 6      |                         |
| 0,00                       | 4,4 cd           | 4,3 cd | 4,3 b                   |
| 0,01                       | 5,9 b            | 7,1 a  | 6,5 a                   |
| 0,025                      | 4,8 bc           | 3,4 d  | 4,1 b                   |
| Trung bình (thời gian)     | 5,0              | 4,9    |                         |
| F (colchicine)             |                  | **     |                         |
| F (thời gian)              |                  | ns     |                         |
| F (colchicine x thời gian) |                  | *      |                         |
| CV (%)                     |                  | 24,05  |                         |

Những số có chữ theo sau giống nhau thì không khác biệt có ý nghĩa thống kê; \* khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức 5%; \*\* khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức 1%; ns: khác biệt không có ý nghĩa thống kê

Ở nồng độ colchicine 0,01% cho số lá 6,5 lá/cụm chồi khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức 1% so với đối chứng là 4,3 lá/cụm và nồng độ colchicine 0,025% là 4,1 lá/cụm chồi). Số lá gia tăng ở nồng độ colchicine 0,025% và đối chứng khác biệt nhau không có ý nghĩa.

Số lá gia tăng không bị ảnh hưởng bởi thời gian xử lý nhưng chịu sự ảnh hưởng tương tác giữa nồng độ colchicine và thời gian xử lý. Số lá gia tăng cao nhất là 7,1 lá/cụm chồi ở nghiệm thức xử lý colchicine 0,01% trong thời gian 6 ngày, khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức 5% so với các nghiệm thức còn lại (Bảng 7).

Nhìn chung, xử lý colchicine ở nồng độ 0,01% tỏ ra thuận lợi cho sự tăng trưởng chiều cao và số lá của dưa hấu (Hình 2). Kết quả sinh trưởng này cũng tương tự kết quả nghiên cứu của Ngô Thị Nhàn (2008).

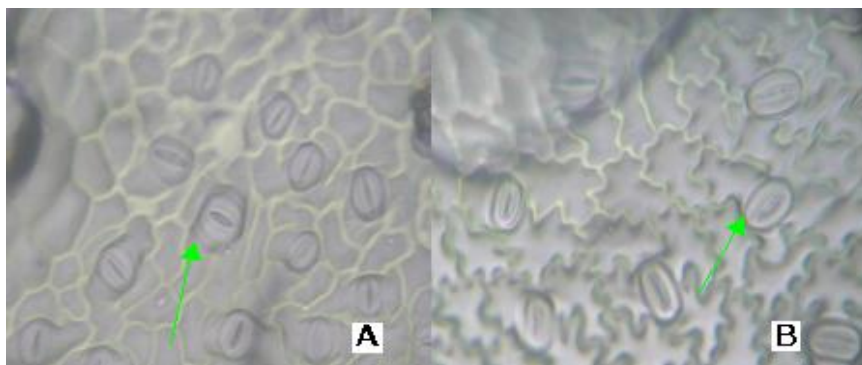
### 3.2.5 Số khí khổng

Bảng 8 cho thấy số khí khổng trên một đơn vị diện tích lá ở cây dưa hấu tứ bội là 220 cái/mm<sup>2</sup>, thấp hơn phân nửa so với số khí khổng ở cây nhị bội là 456 cái/mm<sup>2</sup> (Hình 3). Theo Ngô Thị Nhàn (2008), số khí khổng ở mặt dưới lá cây dưa hấu nhị bội là 327 và cây có hình thái tứ bội là 189; còn theo Gu *et al.* (2005), cây *Z. jujuba* Mill. số khí khổng ở cây nhị bội là 816,1 so với cây tứ bội là 497,7.

**Bảng 8: Số khí khổng mặt dưới của lá cây dưa hấu xử lý colchicine**

| Cây dưa hấu | Số khí khổng (/mm <sup>2</sup> ) |
|-------------|----------------------------------|
| 2n          | 456 ± 59,7                       |
| 4n          | 220 ± 66,8                       |





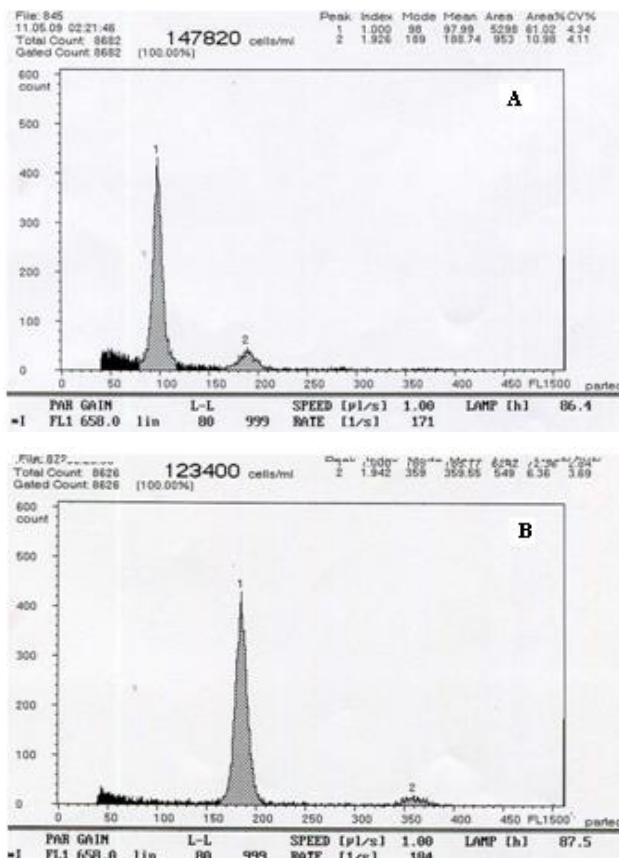
Hình 3: Khí khẩu của cây dưa hấu nhị bội (A) và tứ bội (B) ở 400X

### 3.2.6 Phân tích tế bào học

Kết quả hình 4 cho thấy biểu đồ phân tích tế bào học bằng luồng “flow cytometry” của cây dưa hấu 2n và các cây xử lý colchicine được tuyển chọn và đếm số khí khẩu.

Mẫu dưa hấu đối chứng (2n) cho “peak” 1 ở vạch 100 (Hình 4A) so với cây tứ bội (4n) cho “peak” 1 ở vạch 200 tương ứng với mức bội thể 4n (Hình 4B).

Kết quả phân tích đã tìm được 4 cây tứ bội, chiếm tỉ lệ 10% số cây thuộc nghiệm thức xử lý colchicine 0,025% trong thời gian 6 ngày.



Hình 4: Biểu đồ phân tích tế bào học “flow cytometry” của cây dưa hấu 2n (A) và 4n (B)

### 3.2.7 Sinh trưởng in vivo của cây dưa hấu tứ bội

Các cây dưa hấu tứ bội được xác định bằng “Flow cytometry” được nhân hệ số và tạo rễ theo qui trình nhân giống vô tính cây dưa hấu tam bội của Lâm Ngọc

Phuong (2003, 2008) trước khi thuần dưỡng nơi vườn ươm và trồng ngoài đồng. Ghi nhận sự sinh trưởng và phát triển của các cây dưa hấu này cho thấy chúng rất mạnh khỏe, có thân, lá, hoa to lớn, khác biệt so với cây nhị bội (Hình 5).



**Hình 5: Sinh trưởng ngoài đồng của cây dưa hấu tứ bội (4n) được tạo thành bằng colchicine (A) có lá (B) và hoa đực (CD) to lớn hơn so với đối chứng (2n)**

## 4 KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

### 4.1 Kết luận

Nghiên cứu tạo cây dưa hấu tứ bội bằng xử lý cây nhị bội in vitro với colchicine cho thấy:

- Nồng độ colchicine cao (0,05%) đã hạn chế sự sinh trưởng của chồi dưa hấu.
- Nồng độ colchicine 0,05% có bổ sung BA 1 mg/l cho được tỉ lệ cây có hình thái tứ bội cao nhất (22,5%).
- Nồng độ colchicine 0,025% cùng thời gian xử lý 6 ngày cho hiệu quả tạo cây tứ bội cao nhất, đạt tỷ lệ 10%.
- Các dòng dưa hấu tứ bội trồng ngoài đồng có sự sinh trưởng phát triển mạnh hơn cây nhị bội, khác biệt về hình thái, kích thước lá hoa.

### 4.2 Đề nghị

Sử dụng colchicine 0,025% cùng thời gian xử lý 6 ngày để tạo cây dưa hấu tứ bội in vitro.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Andrus, C.F., Seshadri V.S. and Grimball P.C.,1971. *Production of seedless watermelons*, USDA Tech. Bul. 1425.
- Gu, X. F., AF. Yang, H. Meng, JR. Zhang, 2005. In vitro induction of tetraploid plants from diploid *Zizyphus jujuba* Mill. cv. Zhanhua. *Plant Cell Rep*, (24): 671–676.
- Hasnain Raza, M. Jafar Jaskani, M. Mumtaz Khan and T. A. Malik. (2003). In vitro induction of polyploids in watermelon and estimation based on DNA content. *International Journal of Agriculture & Biology*, 05(3): 298–302.
- Kihara, H. (1951). *Triploid watermelons*. Proc. Amer. Soc. Hort. Sci., 58: 217-230.

- Lâm Ngọc Phương, 2003. Nhân giống cây dưa hấu tam bội (*Citrullus vulgaris* Schrad.) *in vitro*. Báo cáo Khoa học Hội nghị Công nghệ Sinh học toàn quốc. Nxb Khoa học Kỹ thuật Hà Nội. Trang 791-794.
- Lâm Ngọc Phương và Nguyễn Bảo Vệ, 2008. Nhân giống cây dưa hấu tam bội (*Citrullus vulgaris* Schrad.). Hội nghị Khoa học “Cây ăn trái quan trọng ở Đồng Bằng Sông Cửu Long”. Chương trình VLIR-IUC CTU, đề án R2 ”Cây Ăn Trái”. Đại học Cần Thơ. Nxb Nông Nghiệp. Trang 433-442.
- Muhammad, J. J. and Sung W.K. (2005). Flow cytometry of DNA contents of colchicine treated Watermelon as a ploidy screening method at M1 stage. *Pak. J. Bot.*, 37(3): 685-696.
- Murashige T. & Skoog F.,1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures”, *Plant Physiol*, 15, pp. 473- 497.
- Ngô Thị Nhàn, 2008. Hiệu quả của colchicine lên sự sinh trưởng và phát triển của cây dưa hấu nhị bội (*Citrullus vulgaris* Schrad.) *in vitro*”. Luận văn tốt nghiệp kỹ sư ngành Trồng Trọt. Khoa Nông Nghiệp & SHUD. Trường Đại học Cần Thơ.
- Phạm Việt Khoa, 2009. Hiệu quả của colchicine đến sự tạo thành cây dưa hấu tứ bội. Luận văn tốt nghiệp cử nhân ngành Công nghệ Sinh học. Khoa Khoa học. Trường Đại học Cần Thơ.