

NÂNG CAO HỆ SỐ NHÂN GIỐNG *IN VITRO* VÀ KHẢO SÁT QUÁ TRÌNH THÍCH NGHI NGOÀI VƯỜN ƯƠM GIỐNG CHUỐI LABA (*MUSA SP.*)

Hồ Thanh Tâm^{1,2*}, Trần Thị Nhung³, Hoàng Thị Như Phương³, Nguyễn Thị Kim Cúc⁴, Lê Thành Đô^{1,2}

¹ Viện Sáng kiến Sức khỏe Toàn cầu, Trường Đại học Duy Tân, Đà Nẵng

² Khoa Dược, Trường Đại học Duy Tân, Đà Nẵng

³ Khoa Sinh học, Trường Đại học Đà Lạt, Lâm Đồng

⁴ Phòng thí nghiệm tế bào, Viện Công nghệ Sinh học, Đại học Huế

TÓM TẮT

Công nghệ sinh học trong nhân giống thực vật *in vitro* đã tạo nên một cuộc cách mạng trong việc tăng năng suất, chất lượng cây trồng. Bằng phương pháp nhân giống *in vitro* người ta có thể tạo ra số lượng lớn cây giống có chất lượng, đồng nhất về mặt di truyền, cũng như có thể phục tráng được những giống cây trồng đang bị thoái hóa. Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành khảo sát ảnh hưởng của các chất điều hòa sinh trưởng đến khả năng tạo chồi và nhân nhanh của của giống chuối Laba, một giống chuối đặc sản của tỉnh Lâm Đồng. Kết quả cho thấy, môi trường MS bổ sung 2,5 mg/L BA kết hợp 0,2 mg/L NAA cho hiệu quả 100% số mẫu phát sinh chồi với số lượng trung bình 7,25 chồi/mẫu sau 10 tuần nuôi cấy. Ở các giai đoạn tiếp theo, môi trường nuôi cấy có bổ sung 2,5 mg/L BA cho hiệu quả nhân chồi cao nhất với số lượng trung bình 8,9 chồi/mẫu và chiều cao chồi trung bình đạt 3,76 cm/chồi. Môi trường bổ sung 0,2 mg/L NAA thích hợp cho quá trình ra rễ *in vitro* của chuối Laba. Những cây chuối *in vitro* sinh và phát triển tốt ở điều kiện vườn ươm khi được trồng trên giá thể có bổ sung tro, trấu và phân bò đã được xử lý (1:1:1) với tỉ lệ sống đạt 100% và trọng lượng tươi cây đạt 5,06 g sau 30 ngày. Kết quả nghiên cứu này cung cấp một quy trình nhân giống *in vitro* hoàn chỉnh giống chuối Laba, nhằm tạo ra số lượng lớn cây giống chất lượng phục vụ cho công tác trồng trọt giống chuối quý này trên diện rộng.

Từ khóa: Chồi, chuối Laba, *Musa Sp.*, nhân giống vô tính, nhân nhanh.

MỞ ĐẦU

Chuối (*Musa sp.*) là một loại cây trồng phổ biến trên thế giới cũng như Việt Nam, đây là một trong các loại trái cây được sử dụng rộng rãi nhất và có giá trị cao về mặt kinh tế cũng như về mặt dinh dưỡng và giá trị y học. Theo thống kê của Tổ chức Nông lương Liên hợp quốc (FAO), xuất khẩu chuối trên thế giới có giá trị tổng cộng 15,6 tỷ USD trong năm 2019. Chuối đứng thứ tư trong số các loại cây lương thực quan trọng nhất thế giới sau lúa, lúa mì và ngô (Agrawa *et al.*, 2004; Safarpour *et al.*, 2017). Chúng được trồng phổ biến ở các quốc gia nhiệt đới và cận nhiệt đới trên toàn thế giới, với sản lượng hàng năm xấp xỉ 70 triệu tấn (Darvari *et al.*, 2010; Safarpour *et al.*, 2017). Tại một số nước, chuối được trồng theo một quy trình khép kín hiện đại từ khâu nhân giống đến chế biến bảo quản sau thu hoạch, đảm bảo năng suất và chất lượng quả.

Tại Việt Nam, chuối được trồng khắp từ Bắc vào Nam với diện tích vào khoảng 100 ngàn ha và sản lượng khoảng trên 1,2 triệu tấn/năm (Giáp *et al.*, 2012; Mai *et al.*, 2015). Tuy nhiên, do kỹ thuật canh tác còn thấp nên khả năng xuất khẩu mặt hàng này còn nhiều hạn chế. Cây chuối chỉ là cây trồng phụ chủ yếu tận dụng đất trống trong vườn, rẫy, chưa mang tính chất sản xuất hàng hóa; chưa áp dụng khoa học kỹ thuật để trồng và chăm sóc dẫn đến nhiều sâu bệnh, năng suất thấp; chưa có công nghệ bảo quản và chế biến sau thu hoạch nên hình thức và chất lượng thấp (Giáp *et al.*, 2012; Mai *et al.*, 2015). Hiện nay, với tiềm năng phát triển kinh tế to lớn, nhiều địa phương chọn chuối làm một trong những cây trồng chủ lực trong phát triển nông nghiệp (Mai *et al.*, 2015). Trong đó, chuối Laba hay còn gọi là chuối Tiến Vua được biết đến như một đặc sản riêng làm nên thương hiệu riêng của tỉnh Lâm Đồng. Mặc dù vậy, nguồn giống của chuối Laba đang bị thoái hóa dần do ít được quan tâm trong khâu chọn lọc, nhân giống, dẫn đến năng suất, chất lượng giảm (Giáp *et al.*, 2012). Do đó, việc nâng cao chất lượng nguồn cây giống cũng như tăng hệ số nhân nhanh nhằm tạo ra số lượng cây giống lớn, chất lượng là một vấn đề cần thiết.

Hiện nay, đã có nhiều nghiên cứu về việc áp dụng thành tựu khoa học kỹ thuật trong nhân giống *in vitro* cây chuối nhằm tăng nhanh hệ số nhân giống và tạo ra nguồn cây giống có chất lượng (Darvari *et al.*, 2010; Safarpour *et al.*, 2017; Bello-Bello *et al.*, 2019). Những nghiên cứu về vi nhân giống cây chuối từ các nguồn mẫu khác nhau như đỉnh sinh trưởng, chồi đỉnh và những nghiên cứu nhằm cải tiến quy trình nhân giống của loài cây này đã được báo cáo (Phượng *et al.*, 2009; Giáp *et al.*, 2012; Safarpour *et al.*, 2017). Tuy nhiên, những nghiên cứu về việc sử dụng hoa chuối như một nguồn vật liệu để nhân giống *in vitro* còn rất hạn chế, đặc biệt là đối với chuối Laba. Do đó, nghiên cứu này được thực hiện nhằm tái sinh và tăng hệ số nhân giống của giống chuối Laba từ nguồn mẫu hoa chuối. Đồng thời hoàn thiện quy trình nhân giống, tạo ra những cây con có chất lượng cao phục vụ công tác nhân giống, bảo tồn và phát triển loại cây đặc sản này.

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Nguồn mẫu

Nguồn mẫu sử dụng là các bắp chuối được thu từ những cây chuối khỏe mạnh, không sâu bệnh tại trang trại trồng chuối ở huyện Đức Trọng, tỉnh Lâm Đồng. Bắp chuối sau khi thu về phòng thí nghiệm được tách lấy phần lõi có chiều dài khoảng 5 cm. Sau đó, ngâm và lắc đều trong dung dịch nước rửa chén (hiệu Sunlight) đã pha loãng nhằm giúp loại bỏ bụi bẩn bám vào mẫu. Mẫu được khử trùng bằng cồn 70° trong 30 giây và nước Javel (2%) trong 10 phút, rửa lại 3 lần bằng nước vô trùng. Sau khi khử trùng, mẫu được tách bỏ các lớp bên ngoài và cắt thành 2 mẫu nhỏ và cấy vào môi trường tái sinh chồi.

Môi trường và điều kiện nuôi cấy

Các mẫu thí nghiệm được nuôi cấy trong các chai thủy tinh 350 mL chứa 100 mL môi trường MS (Murashige, Skoog, 1962) có bổ sung 30 g/L sucrose, 6 g/L agar và các thành phần khảo sát trong nghiên cứu. Môi trường được điều chỉnh về pH trong khoảng 5,7 – 5,8, trước khi hấp khử trùng ở nhiệt độ 121°C, áp suất 1 atm trong 15 phút. Các thí nghiệm được đặt ở điều kiện chiếu sáng 16h/ngày, cường độ chiếu sáng 30-40 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$. Nhiệt độ $25 \pm 1^\circ\text{C}$.

Khảo sát ảnh hưởng của nồng độ BA kết hợp NAA lên khả năng bật chồi trực tiếp từ mẫu cấy

Các mẫu được cấy vào môi trường MS có bổ sung nồng độ NAA (0,2 mg/L) kết hợp với nồng độ BA thay đổi (0 - 4,5 mg/L) để xác định môi trường thích hợp khả năng phát sinh hình thái, bật chồi trực tiếp của mẫu. Mỗi nghiệm thức được bố trí với 3 lần lặp lại, mỗi lần 10 bình, mỗi bình cấy 3 mẫu. Kết quả được thu nhận và phân tích sau 10 tuần nuôi cấy.

Khảo sát ảnh hưởng của nồng độ BA lên khả năng nhân nhanh của chồi

Cụm chồi có từ 3 - 5 chồi đều nhau ở thí nghiệm trước được sử dụng làm nguồn mẫu cho thí nghiệm này. Mẫu được cấy vào môi trường MS có nồng độ BA thay đổi (0 - 4,5 mg/L) để đánh giá khả năng nhân nhanh của chuối Laba. Mỗi nghiệm thức được bố trí với 3 lần lặp lại, mỗi lần 10 bình, mỗi bình cấy 5 mẫu. Kết quả được thu nhận và đánh giá sau 6 tuần nuôi cấy.

Khảo sát ảnh hưởng của nồng độ NAA lên khả năng ra rễ tạo cây hoàn chỉnh

Để tìm ra môi trường tối ưu cho sự ra rễ tạo cây con hoàn chỉnh, các chồi có chiều cao từ 4 - 5 cm, có từ 2 - 3 lá thu được ở thí nghiệm trước được tách riêng và cấy vào môi trường MS bổ sung NAA có nồng độ thay đổi từ 0 - 0,5 mg/L trong 2 tuần. Mỗi nghiệm thức được bố trí với 3 lần lặp lại, mỗi lần 10 bình, mỗi bình cấy 5 mẫu.

Khảo sát ảnh hưởng của giá thể lên khả năng sống sót và sinh trưởng của cây con ngoài vườn ươm

Thích nghi ngoài vườn ươm là một trong những giai đoạn quan trọng nhất để hoàn thiện quy trình vi nhân giống hoàn chỉnh, thu được số lượng cây con nhiều và khỏe mạnh. Ở thí nghiệm này, các cây *in vitro* hoàn chỉnh thu được từ thí nghiệm ra rễ có chiều cao từ 5 - 7 cm, 4 - 6 lá non, trọng lượng tươi ~ 1 g, 5 - 8 rễ được lựa chọn để chuyển ra vườn ươm. Các cây con hoàn chỉnh được rửa sạch agar bám trên rễ, loại bỏ lá già dưới gốc và trồng vào các chậu nhựa có kích thước 7x10 cm chứa các loại giá thể khác nhau. Các loại giá thể sử dụng là xơ dừa; xơ dừa : đất đen (1:1); tro : vỏ trấu : phân bò đã xử lý (1:1:1). Mỗi nghiệm thức được bố trí với 3 lần lặp lại, mỗi lần 30 chậu, mỗi chậu trồng 1 cây. Sau khi ra vườn được 4 tuần, chuyển cây con vào bầu đất (15x25 cm) có giá thể là tro : trấu : phân bò đã xử lý : đất đen (1:1:1:1). Các thí nghiệm được trồng tại vườn ươm với điều kiện tương tự nhau và tương đối thuận lợi cho sinh phát triển của cây con. Nhiệt độ $25^\circ\text{C} \pm 5^\circ\text{C}$, độ ẩm 80 - 90%, ánh sáng nhẹ. Tưới phun sương 2 lần/ngày và tiếp tục theo dõi một số chỉ tiêu về sự phát triển của cây trong 4 tuần tiếp theo.

Xử lý và thống kê số liệu

Các chỉ tiêu theo dõi bao gồm tỉ lệ phát sinh chồi, số chồi, số lá hình thành, chiều cao trung bình, số lượng rễ, trọng lượng tươi của chồi. Các thí nghiệm được lặp lại ba lần, thống kê và phân hạng bằng phần mềm SPSS 16.0 theo phương pháp Duncan ở mức ý nghĩa 0,05.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Ảnh hưởng của nồng độ BA kết hợp NAA lên khả năng bật chồi trực tiếp từ mẫu cấy

Kết quả thu được sau 10 tuần nuôi cấy được trình bày ở Bảng 1 và Hình 1 (A,B,C) cho thấy, ở nồng độ BA 2,5 mg/L kết hợp với 0,2 mg/L NAA cho kết quả tái sinh chồi trực tiếp từ mẫu cấy tốt nhất. Tại nghiệm thức này, tỉ lệ mẫu phát sinh chồi đạt 100% và đạt trung bình 7,25 chồi/mẫu. Những chồi tái sinh ở nghiệm thức này có độ đồng đều rất cao, chồi tương đối mập mạp, có 2 - 3 lá, phát triển tốt (Hình 1C). Trong khi đó, ở các nghiệm thức khác tỉ lệ phát sinh chồi đều thấp, số chồi/mẫu vẫn chưa nhiều và độ đồng đều chưa cao, đồng thời nhiều mẫu bị hóa đen và chết. Có thể nhận thấy trên môi trường đối chứng không bổ sung chất điều hòa sinh trưởng, các mẫu đều hóa vàng sau đó chuyển sang đen và chết sau 3-4 tuần nuôi cấy. Chứng tỏ trên môi trường không chứa chất điều hòa sinh trưởng thì không thể kích thích mẫu bật chồi.

Bảng 1. Ảnh hưởng của BA kết hợp NAA lên khả năng bật chồi trực tiếp của mẫu chuối Laba

BA (mg/L)	NAA (mg/L)	Tỷ lệ phát sinh chồi (%)	Số chồi/mẫu
0	0	0	0 e ^z
0,5	0,2	20	0,55 ± 0,29 d
1,5	0,2	75	2,90 ± 0,74 c
2,5	0,2	100	7,25 ± 0,30 a
3,5	0,2	100	5,55 ± 0,46 b
4,5	0,2	90	4,21 ± 0,72 bc

^z Các chữ cái a,b,c... thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa ở mức tin cậy P = 0,05 theo phương pháp Duncan.

Trong nhân giống *in vitro*, cytokinin và auxin là hai nhóm chất điều hòa sinh trưởng thực vật quan trọng ảnh hưởng đến sự phân chia tế bào, thay đổi ưu thế ngọn và phân hóa chồi, cũng như kích thích hình thành rễ trong quá trình phát sinh hình thái thực vật (Darvari *et al.*, 2010; Jafari *et al.*, 2011; Giáp *et al.*, 2012). Trong nghiên cứu của chúng tôi, sự kết hợp giữa BA và NAA là thích hợp cho sự tái sinh chồi từ nguồn mẫu hoa chuối của giống chuối Laba. Kết quả này tương đồng với nghiên cứu của Harirah và Khalid (2006), đã tiến hành tạo chồi trực tiếp từ cụm hoa chuối đực giống chuối *Musa acuminata* cv. Berangan. Trung bình 8-13 chồi được tạo thành trên môi trường kết hợp 3,5 mg/L BA và 0,2 mg/L NAA (Harirah, Khalid, 2006). Trong khi đó, nghiên cứu của Phương và đồng tác giả (2009) cho thấy, môi trường MS có bổ sung 5 mg/L BA, 0,5 mg/L IAA kết hợp với tyrosine và adenin sulfate thích hợp cho khả năng tái sinh chồi từ nuôi cấy đỉnh sinh trưởng giống chuối *Cavendish* sp.

Ảnh hưởng của nồng độ BA lên khả năng nhân nhanh của chồi

Ảnh hưởng của nồng độ BA lên khả năng nhân nhanh của chồi chuối Laba được trình bày ở Bảng 2 và Hình 1D. Kết quả cho thấy, BA có tác dụng quyết định đến hệ số nhân chồi của chuối Laba. Số chồi hình thành tăng dần khi nồng độ BA tăng. Tuy nhiên, khi nồng độ BA tăng cao (trên 3,5 mg/L) thì số lượng chồi hình thành bắt đầu giảm và sự đồng đều của chồi không cao. Hiệu quả nhân chồi tốt nhất được ghi nhận ở nồng độ BA 2,5 mg/L. Tại nghiệm thức này, số chồi trung bình được tạo thành là 8,9 chồi/mẫu, chiều cao trung bình 3,6 cm/chồi; chồi to, khỏe, mập mạp, mỗi chồi có trung bình 3 - 4 lá, lá dài, xanh và độ đồng đều của các chồi rất cao (Hình 1D). Ở môi trường đối chứng không bổ sung chất điều hòa sinh trưởng, mẫu hầu như không có khả năng nhân chồi.

Việc bổ sung BA vào môi trường nuôi cấy được ghi nhận là rất cần thiết cho giai đoạn nhân nhanh chuối *in vitro* (Jafari *et al.*, 2011; Safarpour *et al.*, 2017). Bổ sung 3 mg/L BA được ghi nhận cho hệ số nhân chồi cao nhất và chất lượng chồi tốt nhất ở giống chuối tiêu Hồng (Mai và đồng tác giả, 2015). Cũng trên chuối Laba, Giáp và đồng tác giả (2012) báo cáo rằng ở nồng độ BA là 5 mg/L có số lượng chồi hình thành, số lá và trọng lượng tươi đều đạt cao nhất so với các nồng độ BA khác cùng khảo sát (4,64 chồi/mẫu, 10,00 lá/mẫu và 1,19 g/mẫu). Trong nghiên cứu của chúng tôi, nồng độ 2,5 mg/L BA cho hiệu quả nhân chồi tốt nhất. Sự khác nhau này có thể do ảnh hưởng từ nguồn gốc của mẫu cấy, trong khi chúng tôi sử dụng nguồn mẫu từ hoa chuối đực, nghiên cứu của Giáp và đồng tác giả (2012) sử dụng phương pháp truyền thống từ các chồi chuối (đỉnh sinh trưởng).

Bảng 2 Ảnh hưởng của BA lên khả năng nhân nhanh của chồi của chuối Laba

BA(mg/L)	Số chồi/mẫu	Chiều cao chồi (cm)	Hình thái
0	3,20 ± 0,16 ^{cd}	0,79 ± 0,09 ^d	Chồi nhỏ, yếu
0,5	4,60 ± 0,36 ^c	2,19 ± 0,20 ^{bc}	Chồi nhỏ, ít
1,5	6,15 ± 0,34 ^b	2,73 ± 0,17 ^b	Chồi nhiều, xanh, mập mạp
2,5	8,90 ± 0,24 ^a	3,76 ± 0,12 ^a	Chồi nhiều, xanh, mập mạp
3,5	6,35 ± 0,29 ^b	2,78 ± 0,19 ^b	Chồi ngắn, xanh, mập mạp
4,5	5,95 ± 0,26 ^{bc}	2,56 ± 0,16 ^b	Chồi ngắn, xanh nhạt

Các chữ cái a,b,c... thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa ở mức tin cậy P = 0,05 theo phương pháp Duncan.

Ảnh hưởng của nồng độ NAA lên khả năng ra rễ tạo cây hoàn chỉnh

Auxin là một chất điều hòa sinh trưởng có ảnh hưởng rất lớn đến sự hình thành rễ trong điều kiện *in vitro* và mỗi loài cây sẽ cảm ứng với các loại auxin khác nhau ở nồng độ khác nhau. Các nghiên cứu trước đây đã cho thấy NAA là auxin phù hợp cho quá trình kích thích hình thành rễ *in vitro* của nhiều loại chuối (Safarpour *et al.*, 2017; Phương *et al.*, 2018; Mai *et al.*, 2015). Trong nghiên cứu này, nồng độ NAA khác nhau đã được chúng tôi sử dụng để khảo sát ảnh hưởng của auxin đến quá trình hình thành rễ tạo cây hoàn chỉnh của giống chuối Laba. Kết

qua ở Bảng 3 cho thấy, tất cả các nghiệm thức đều có khả năng kích thích tạo rễ sau 2 tuần nuôi cấy (100%). Ở những nghiệm thức khác nhau thì số rễ và chiều dài rễ cũng khác nhau. Ở môi trường nuôi cấy bổ sung 0,2 mg/L NAA cho hiệu quả tạo rễ tốt nhất, số lượng rễ hình thành nhiều nhất, trung bình 6,35 rễ và chiều dài đạt 4,2 cm. Ở nghiệm thức này số rễ thành đều to, khỏe, nhiều lông hút, có độ đồng đều cao, mật độ phân bố của rễ phân bố đều trên gốc thân (Hình 1E). Những cây ở nghiệm thức này được sử dụng để tiến hành khảo sát quá trình ra vườn.

Trong quá trình nghiên cứu sự ra rễ của chuối nuôi cấy *in vitro*, nồng độ NAA thấp cho hiệu quả tạo rễ tốt hơn. Nghiên cứu của Mai và đồng tác giả (2015) cũng cho thấy, khả năng ra rễ của giống chuối tiêu Hồng đạt hiệu quả cao nhất ở nồng độ NAA từ 0,2 - 0,4 mg/L. Các rễ thu được mập, trắng và nhiều lông hút. Kết quả từ bảng 3 cũng cho thấy, chuối Laba có thể ra rễ ngay trên môi trường nuôi cấy không bổ sung NAA, tuy nhiên số lượng rễ thấp, rễ mỏng và không đồng đều. Kết quả tương tự cũng được ghi nhận bởi Mai và đồng tác giả (2015) trên giống chuối tiêu Hồng, Phương và đồng tác giả (2018) trên giống chuối sáp. Điều này chứng tỏ rằng các giống chuối có khả năng sinh tổng hợp auxin nội sinh khá cao được hình thành trong quá trình phát triển chồi.

Bảng 3. Ảnh hưởng của NAA lên khả năng ra rễ tạo cây hoàn chỉnh chuối Laba

NAA (mg/L)	Tỉ lệ hình thành rễ (%)	Số rễ	Chiều dài rễ (cm)	Hình thái rễ
0	100	2,40 ± 0,36 ^d	1,82 ± 0,40 ^d	Rễ ít, mỏng
0,1	100	4,10 ± 0,41 ^e	3,07 ± 0,22 ^{bc}	Rễ mỏng
0,2	100	6,35 ± 0,38 ^a	4,20 ± 0,26 ^a	Rễ dài to, mập nhiều lông hút
0,3	100	5,37 ± 0,33 ^b	3,35 ± 0,31 ^b	Rễ dài to, mập, nhiều lông hút
0,4	100	4,95 ± 0,42 ^c	3,23 ± 0,32 ^b	Rễ ngắn, mập
0,5	100	4,40 ± 0,23 ^c	3,19 ± 0,33 ^b	Rễ ngắn, ít lông hút

Các chữ cái a,b,c... thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa ở mức tin cậy P = 0,05 theo phương pháp Duncan.

Ảnh hưởng của giá thể nuôi cấy lên khả năng sống sót và sinh trưởng của cây con ngoài vườn ươm

Thích nghi cây ngoài vườn ươm là giai đoạn khó khăn nhất để hoàn thiện quy trình nhân giống *in vitro* các loại cây trồng. Các cây nuôi cấy mô có điều kiện ổn định về dinh dưỡng, ánh sáng, độ ẩm, nhiệt độ, ... nên khi chuyển ra vườn ươm với các điều kiện tự nhiên như ánh sáng mạnh, độ ẩm thấp, nhiệt độ cao sẽ dễ làm cây con mất nước, héo và chết. Để tăng khả năng sống sót của chuối Laba ngoài vườn ươm, cây con được mang ra vườn ươm 1 tuần để cây thích nghi dần với điều kiện môi trường và mờ nắp bình nuôi cấy 2 ngày để giảm độ ẩm tương đối trong bình, tăng cường trao đổi khí nhằm giúp cây thích nghi với điều kiện mới trước khi trồng vào các loại giá thể khác nhau.

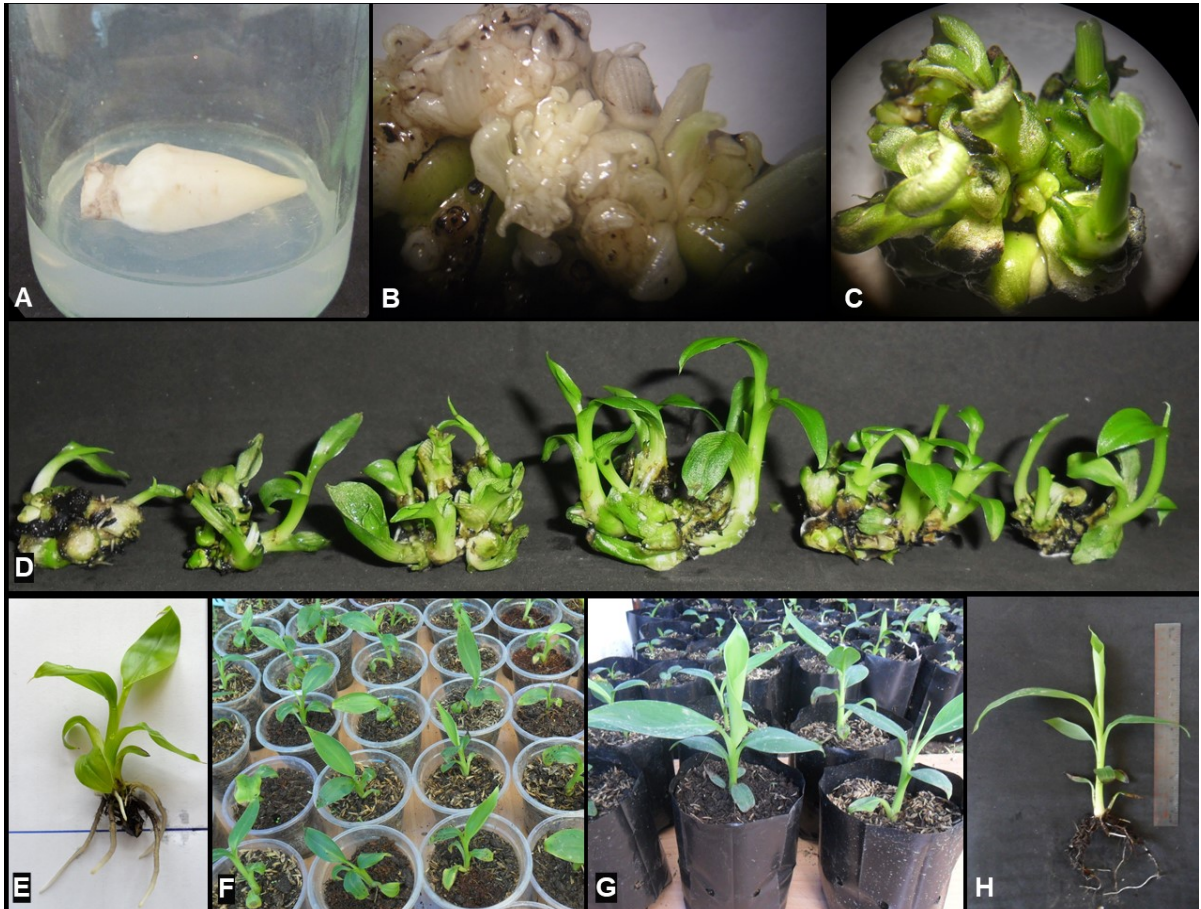
Kết quả ở Bảng 4 và Hình 1 (F,G,H) cho thấy, cây chuối Laba thích nghi tốt với điều kiện khi ra vườn ươm khi tỷ lệ sống trên các giá thể đều rất cao (trên 90%). Sau 1 tuần, cây bắt đầu thích nghi với môi trường, sang tuần thứ 2, cây bắt đầu phát triển, có thể nhận thấy sự khác biệt rõ rệt trên những giá thể khác nhau. Sau 30 ngày, cây trồng trên giá thể xơ dừa, đất đen theo tỷ lệ 1:1 phát triển tốt hơn cây chỉ trồng trên giá thể xơ dừa. Tuy nhiên, kết quả tốt nhất được ghi nhận trên giá thể tro, trấu và phân bò đã được xử lý theo tỷ lệ 1:1:1 khi tỷ lệ sống đạt 100% và cây con có sự phát triển mạnh về thân, lá. Lúc này, cây con đã hoàn thiện bộ rễ mới và bước sang giai đoạn phát triển khi chúng đã ổn định và thích nghi được với môi trường, cây con đã có khả năng quang hợp và trao đổi chất tốt. Rễ phát triển mạnh và có khả năng hút nước cũng như chất dinh dưỡng tốt. Trong giai đoạn này, cây chuối con hình thành thêm từ 2 - 3 lá mới, chiều cao cây, chiều dài lá và trọng lượng tươi tăng đáng kể, biểu hiện rõ rệt có thể quan sát được bằng mắt thường (Bảng 4). Trên giá thể xơ dừa, do không được cung cấp dinh dưỡng nên cây phát triển kém nhất; giá thể đất đen, xơ dừa tỷ lệ 1:1 cho kết quả tốt hơn khi chiều cao cây, số lá và trọng lượng tươi tăng nhanh. Trên hai giá thể này khả năng giữ nước cao, và có điều kiện thuận lợi cho vi khuẩn, nấm phát triển gây úng, thối gốc chuối làm giảm tỉ lệ sống và khả năng thích nghi và phát triển của cây con. Phương và đồng tác giả (2018) cũng chỉ ra rằng đất sạch, xơ dừa không phù hợp cho giai đoạn đầu của ra vườn ươm của cây chuối nuôi cấy mô bởi khả năng giữ nước cao dễ gây thối gốc và rễ cây. Nghiên cứu này còn cho thấy chất tanin có trong xơ dừa cũng ảnh hưởng đến sự tăng trưởng của bộ rễ (Phương và đồng tác giả, 2018). Trong nghiên cứu của chúng tôi, cây con phát triển tốt nhất trên giá thể tro, trấu và phân bò đã xử lý (1:1:1). Trên giá thể này cây phát triển mạnh mẽ chiều cao đạt 10,88 cm, tăng 3 - 4 cm và mọc thêm 3 - 4 lá mới, gia tăng nhanh về kích thước so với lúc mới trồng; trọng lượng tươi của cây đạt 5,06 g, tăng hơn 5 lần so với lúc cây con mới ra vườn (Bảng 4). Cũng trên giá thể này, bộ rễ của cây cũng phát triển mạnh, số rễ và chiều dài rễ tăng rất nhanh, có rất nhiều rễ con; điều này giúp cho cây có khả năng quang hợp, hút nước và dinh dưỡng tốt. Bên cạnh đó, giá thể này được cung cấp dinh dưỡng, có khả năng giữ ẩm và thoát nước tốt nên cây chuối Laba trồng trên giá thể này phát triển vượt trội so với các giá thể còn lại. Việc bổ sung phân chuồng vào giá thể nuôi cấy cũng cho thấy hiệu quả tăng trưởng tốt trên giống chuối tiêu Hồng (Mai *et al.*, 2015).

Sau 30 ngày, cây con được chuyển vô bầu đất (tro, trấu, phân bò đã xử lý, đất đen theo tỷ lệ 1:1:1:1) (Hình 1G,H). Sau 1 tháng vô bầu đất, cây con đã cao gần 30 cm, có 6 - 8 lá, chiều dài lá đạt 12 cm và rộng hơn 6 cm. Bộ rễ cây phát triển mạnh mẽ. Lúc này, trọng lượng tươi của cây cũng tăng vượt trội, đạt trên 12 g, đường kính thân đạt 1 cm. Lúc này cây đã gần đạt được kích thước cần thiết để mang ra trồng.

Bảng 4. Khả năng sống sót và phát triển của cây ngoài vườn ươm

Giá thể	Tỷ lệ sống (%)	15 ngày			30 ngày		
		Chiều cao cây (cm)			Chiều cao cây (cm)		
		Số lá	Chiều cao cây (cm)	Trọng lượng tươi (g)	Số lá	Chiều cao cây (cm)	Trọng lượng tươi (g)
Xơ dừa	90	4,00 ^b	5,99 ^{bc}	1,21 ^{ab}	4,70 ^b	6,52 ^c	1,52 ^c
Xơ dừa + đất đen	95	4,20 ^b	6,31 ^b	1,34 ^b	5,35 ^{ab}	7,65 ^b	3,03 ^b
Tro + trấu + phân bò đã xử lý	100	5,20 ^a	7,21 ^a	2,11 ^a	5,95 ^a	10,88 ^a	5,06 ^a

Các chữ cái a,b,c... thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa ở mức tin cậy P = 0,05 theo phương pháp Duncan.



Hình 1. Quy trình nhân giống *in vitro* chuối Laba

Nguồn mẫu nuôi cấy (A); Sự phát sinh chồi chuối Laba sau 4 tuần nuôi cấy (B) và 10 tuần nuôi cấy (C); Giai đoạn nhân nhanh (D); Cây con *in vitro* hoàn chỉnh trước khi đưa ra vườn ươm (E); Cây chuối sau 30 ngày ra vườn ươm (F); Cây chuối sau 30 ngày vô bầu đất (G); Hình thái cây chuối con sau 30 ngày trồng vào bầu đất (H).

KẾT LUẬN

Môi trường MS bổ sung 2,5 mg/L BA kết hợp với 0,2 mg/L NAA thích hợp cho khả năng tái sinh chồi trực tiếp từ mỗi cây. Các chồi được nhân nhanh trên môi trường nuôi cấy có bổ sung 2,5 mg/L BA. Môi trường có bổ sung 0,2 mg/L NAA để phù hợp để kích thích ra rễ tạo cây hoàn chỉnh trước khi đưa ra vườn ươm. Giá thể phối trộn theo tỷ lệ 1:1:1 giữa tro, trấu và phân chuồng thích hợp cho cây con thích nghi và sinh trưởng tốt ngoài vườn ươm. Sau 2 tháng, cây con sinh trưởng và phát triển tốt, đủ điều kiện để trồng ngoài đồng ruộng. Nghiên cứu này đã thành công trong việc thiết lập một quy trình vi nhân giống hoàn chỉnh cây chuối Laba từ nguồn mẫu hoa chuối được, góp phần bổ sung một nguồn vật liệu mới vào nhân giống *in vitro* của giống chuối này. Kết quả nghiên cứu có thể được sử dụng để nhân giống rộng rãi giống chuối Laba, tạo nguồn cây giống số lượng lớn chất lượng và ổn định về mặt di truyền, phục vụ công tác trồng trọt trên quy mô lớn giống chuối quý hiếm này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Agrawal A, Swennen R, Panis B (2004) A comparison of four methods for cryopreservation of meristems in banana (*Musa* spp.) *Cryo Lett* 25:101-110.
- Bello-Bello JJ, Cruz-Cruz CA, Pérez-Guerra JC (2019) A new temporary immersion system for commercial micropropagation of banana (*Musa* AAA cv. Grand Naine). *In Vitro Cell Dev Biol-Plant* 55: 313-320.
- Darvari FM, Sariah M, Puad MP, Maziah M (2010). Micropropagation of some Malaysian banana and plantain (*Musa* sp.) cultivars using male flowers. *Afri J Biotechnol* 9 (16): 2360-2366.
- Đặng Thị Mai, Trịnh Thị Nhất Chung (2015). Vai trò của chất điều tiết sinh trưởng, ánh sáng và giá thể trong nhân giống *in vitro* chuối tiêu Hồng. *Kết quả nghiên cứu khoa học và chuyển giao công nghệ về rau, quả, hoa – cây cảnh giai đoạn 2011-2015*. Viện Nghiên cứu Rau Quả, Viện Khoa học Nông nghiệp Việt Nam, tr. 50-59.
- Đỗ Năng Giáp, Phạm Ngọc Vinh, Trần Trọng Tuấn, Nguyễn Thị Huyền Trang, Phạm Ngô Anh Thư, Thái Xuân Du (2012). Tăng hệ số nhân nhanh chồi chuối Laba (*Musa* sp.) nuôi cấy *in vitro* bằng cách sử dụng ánh sáng, myo-inositol và Adenin sulphate. *Tạp chí Sinh học* 34 (3SE): 180-187.
- Harirah AA, Khalid N (2006). Direct regeneration and rapid assessment of male inflorescence derived plant of *Musa acuminata* cv. Berangan. *Asia Pacific J Mol Biol Biotechnol* 14 (1):11-17.
- Jafari N, Othman RY, Khalid N (2011). Effect of benzylaminopurine (BAP) pulsing on *in vitro* shoot multiplication of *Musa acuminata* (banana) cv. Berangan. *Afr J Biotechnol* 10:2446-2450.
- Murashige T, Skoog F (1962). A revised medium for rapid growth and Bio-assays with tobacco tissue cultures. *Phys Plant* 15: 473-497.
- Safarpour M, Sinniah UR, Subramaniam S, Swamy MK (2017). A novel technique for *Musa acuminata* Colla 'Grand Naine' (AAA) micropropagation through transverse sectioning of the shoot apex. *In Vitro Cell Dev Biol-Plant* 53: 226-238.
- Vũ Ngọc Phượng, Hoàng Thị Phòng, Thái Xuân Du, Trịnh Mạnh Dũng (2009). Nhân giống *in vitro* cây chuối (*Cavendish* sp.) trên quy mô công nghiệp. *Báo cáo khoa học, Hội nghị Công nghệ Sinh học toàn quốc*, tr 319-332.
- Vũ Thị Bạch Phương, Triệu Thị Yến Nhi, Dương Công Kiên, Quách Ngô Diễm Phương (2018). Khảo sát quy trình vi nhân giống cây chuối sập (*Musa balbasiana* nhóm BBB). *Tạp chí Phát triển khoa học và công nghệ* 2(3): 23-29.

ENHANCED *IN VITRO* MULTIPLICATION AND ACCLIMATIZATION OF LABA BANANA (*MUSA* SP.) FROM MALE INFLORESCENCE EXPLANTS

Ho Thanh Tam^{1,2*}, Tran Thi Nhung³, Hoang Thi Nhu Phuong³, Nguyen Thi Kim Cuc⁴, Le Thanh Do^{1,2}

¹ Institute of Global Health Innovations, Duy Tan University, Da Nang

² Faculty of Pharmacy, Duy Tan University, Da Nang

³ Faculty of Biology, Da Lat University, Lam Dong

⁴ Laboratory of Cell, Institute of Biotechnology, Hue University

SUMMARY

Advance in plant biotechnology has created a revolution in increasing productivity and quality of plants. Micropropagation has achieved to restore of many rare and dangerous plant species. In particular, bananas (*Musa* sp.) are a popular crop in the world and also in Viet Nam. This plant is one of the most widely used fruit and has high economic value as well as nutritional and medical value. In this study, we investigated the effect of plant growth regulators on ability of the regeneration and multiplication of Laba bananas from male inflorescence explants. The results showed that MS medium supplemented with 2.5 mg/L BA combine with 0.2 mg/L NAA was suitable for shoot regeneration after 10-weeks of culture (100% regenerated rate, 7.25 shoots/explant). In the subsequent stage, the higher shoot multiplication rate was observed at MS medium supplemented with 2.5 mg/L BA with 8.9 shoots/explants and 3.76 cm in shoot length. An addition of 0.2 mg/L NAA to culture medium was obtained the best root induction in Laba banana. In acclimatization, 100% survival rate was observed in the substrates containing ash, rice husk and compost in equal proportion after 30 days acclimatized. This study was successful to establish an *in vitro* propagation process for Laba banana variety, aiming to increase a large number of quality seedlings for this precious banana to the growth of a fields cultivations.

Key words: *Musa* sp., Laba banana, micropropagation, shoot, shoot multiplication.

* Author for correspondence: Tel: +84-909840709. Email: hothanhtam2@duytan.edu.vn