

ẢNH HƯỞNG CỦA MỘT SỐ CHẤT ĐIỀU HÒA SINH TRƯỞNG LÊN KHẢ NĂNG NHÂN CHỒI *IN VITRO* CÂY DÂU TÂY (*FRAGARIA x ANANASSA L.*)

Cao Huệ Trinh, Võ Thanh Huy, Nguyễn Thị Xuân Hiền, Huỳnh Thị Anh Đài, Huỳnh Hữu Đức*

Trung tâm Công nghệ Sinh học Thành phố Hồ Chí Minh

TÓM TẮT

Dâu tây (*Fragaria x annassa*) là một loại rau ăn quả được trồng phổ biến ở nhiều quốc gia vùng ôn đới. Quả dâu tây rất được ưa chuộng trên thị trường do có chứa nhiều thành phần có lợi cho sức khỏe như vitamin, anthocyanin, acid ellagic, chất khoáng và các thành phần khác. Tuy nhiên, việc nhân giống bằng phương pháp truyền thống không đáp ứng đủ nhu cầu về cây giống cho thị trường. Ngày nay, phương pháp nhân giống bằng nuôi cấy mô tế bào thực vật có nhiều ưu điểm như tạo được cây con sạch bệnh, đồng đều, có đặc điểm di truyền như cây mẹ, nhân được số lượng lớn trong thời gian ngắn. Trong nghiên cứu này, ảnh hưởng của một số cytokinin và sự kết hợp giữa cytokinin và auxin được khảo sát nhằm cải thiện được hệ số nhân giống và chất lượng cây giống dâu tây *in vitro*. Kết quả cho thấy môi trường MS có bổ sung BA (0,7 mg/L) kết hợp với NAA (0,2 mg/L) thích hợp cho quá trình nhân nhanh chồi với 12,55 chồi/mẫu, chiều cao đạt 0,89 cm, chồi phát triển tốt, khối lượng tươi 1152,12 mg, khối lượng khô 62,1 mg. Trong khi đó môi trường bổ sung TDZ cho thấy chồi phát triển chậm xuất hiện nhiều biến dị về kiểu hình. Từ các kết quả trên cho thấy việc sử dụng BA kết hợp NAA một cách phù hợp có thể nâng cao hiệu quả nhân giống dây tây và có thể áp dụng trong sản xuất cây giống quy mô lớn.

Từ khóa: BA, Dâu tây (*Fragaria x ananassa*), NAA, TDZ, vi nhân giống.

MỞ ĐẦU

Cây dâu tây (*Fragaria x ananassa*) được trồng và phát triển nhiều nơi trên thế giới trong đó có Việt Nam. Trái dâu tây là một trong những thực phẩm tự nhiên có nhiều thành phần dinh dưỡng có lợi cho sức khỏe như vitamin, acid ellagic, chất khoáng, phenol, anthocyanin và các loại đường glucose, fructose (Diamanti *et al.*, 2012; Giampieri *et al.*, 2012). Trong những năm gần đây trồng dâu tây đã mang lại hiệu quả kinh tế cao cho người dân, ở nước ta dâu tây đang được chú trọng đầu tư tại một số vùng có điều kiện khí hậu lạnh Đà Lạt, Sa Pa, Hà Nội. Do nhu cầu về cây giống tại các vùng trồng dâu tây ngày càng tăng, nhưng số lượng và chất lượng giống chưa đáp ứng được cho người trồng vì việc nhân giống bằng phương pháp truyền thống như nhân từ nõg có hệ số nhân không cao, từ hạt thì tỷ lệ hạt nảy mầm thấp, thời gian nảy mầm chậm, chất lượng cây không đảm bảo. Để khắc phục những hạn chế này thì phương pháp nhân giống *in vitro* là công cụ hiệu quả cho phép nhân nhanh tạo ra số lượng lớn cây giống đồng nhất về mặt di truyền (Biswas *et al.*, 2009; Freddi *et al.*, 2006). Nhân giống cây dâu tây bằng phương pháp *in vitro* sẽ mang lại giá trị về kinh tế và nghiên cứu cao hơn so với sử dụng cây con từ phương pháp nhân truyền thống, đồng thời cải thiện nguồn cây giống sẽ góp phần phát triển ngành trồng dâu tây. Trong các nghiên cứu trước đây cho thấy việc nhân giống dâu tây bằng tái sinh chồi từ lá cho tỷ lệ tái sinh cây con không cao và chất lượng cây giống thấp (Roberto *et al.*, 2016). Vì vậy, trong nghiên cứu này chúng tôi đánh giá ảnh hưởng của một số cytokinin lên quá trình nhân chồi từ chồi nõg cây dâu tây *in vitro* nhằm nâng cao hiệu quả nhân giống, tạo cây đồng đều, chất lượng cây giống tốt.

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Vật liệu

Giống dâu tây (*Fragaria x ananassa*) New Zealand. Cụm chồi dâu tây *in vitro* 1,5 tháng tuổi được tái sinh từ chồi nõg, kích thước cụm chồi từ 0,7 - 1 cm

Phương pháp nhân chồi từ mẫu *in vitro*

Khảo sát ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng TDZ, BA, NAA lên quá trình nhân chồi cây dâu tây

Cụm chồi *in vitro* được cấy trên môi trường MS (Murashige và Skoog) bổ sung 0,5 g/L pepton, 0,1 g/L Myo-inositol, 30 g/L đường saccharose, 8 g/L Agar. Và có bổ sung chất điều hòa sinh trưởng TDZ (0, 0,2, 0,5, 1, 1,5 mg/L) hoặc BA (0, 0,2, 0,5, 0,7, 1 mg/L) hoặc BA (0, 0,2, 0,5, 0,7, 1 mg/L) kết hợp NAA 0,2 mg/L; pH của môi trường nuôi được điều chỉnh tại 5,8 trước khi hấp khử trùng. Thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên, mỗi nghiệm thức lặp lại 3 lần.

Điều kiện nuôi cấy

Các thí nghiệm nhân chồi được nuôi trong điều kiện 16 giờ chiếu sáng/ 8 giờ trong tối, cường độ ánh sáng 2000 ± 500 lux, độ ẩm 55 - 60%, nhiệt độ phòng nuôi 25 ± 2°C.

Chỉ tiêu theo dõi

Các chỉ tiêu như số chồi/mẫu, chiều cao chồi (cm), khối lượng tươi (mg), khối lượng khô (mg), phần trăm chất khô (%) và hình thái chồi.

Phương pháp xử lý số liệu

Số liệu được phân tích và xử lý bằng phần mềm Microsoft Excel và SAS 8.1. Sự khác biệt giữa các nghiệm thức được đánh giá bằng trắc nghiệm phân hạng LSD trong thí nghiệm sử dụng TDZ và Duncan trong thí nghiệm sử dụng BA, BA kết hợp với NAA.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

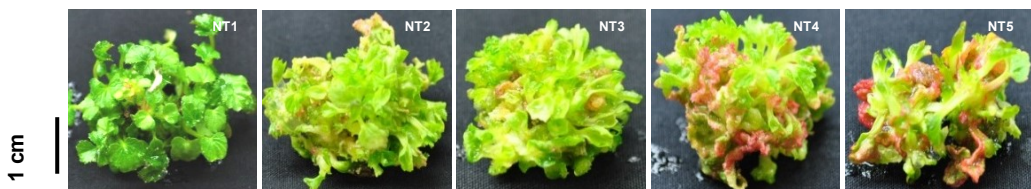
Ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng TDZ đến khả năng nhân chồi của cây dâu tây

Sau 1 tuần nuôi cấy các mẫu dâu tây đều bắt đầu cảm ứng tạo chồi mới trên tất cả các nghiệm thức, chồi nhân nhanh từ tuần thứ 2, 3, tuy nhiên từ tuần thứ 4 một số mẫu bắt đầu hóa nâu và chết. Kết quả khảo sát ảnh hưởng của TDZ lên quá trình nhân chồi cây dâu tây thể hiện ở bảng 1 và hình 1.

Bảng 1. Ảnh hưởng của TDZ đến khả năng nhân chồi của cây dâu tây sau 4 tuần nuôi cấy

TDZ (mg/L)	số chồi/mẫu	Chiều cao chồi (cm)	Khối lượng tươi (mg)	Khối lượng khô (mg)	Phần trăm chất khô (%)	Hình thái chồi
0	9,22 ^c	1,29 ^a	2214,32	89,98	4,79	lá to xanh đậm
0,2	13,33 ^a	0,91 ^b	1964,12	124,97	6,88	lá nhỏ màu xanh nhạt
0,5	11,51 ^b	0,76 ^c	1451,87	91,57	6,22	lá nhỏ màu xanh nhạt
1	11,07 ^{bc}	0,81 ^{cb}	1193,65	74,95	6,19	lá biến dạng có viền đỏ
1,5	12,11 ^{ba}	0,80 ^{cb}	1805,97	111,48	6,10	lá biến dạng có viền đỏ
CV %	24,9	22,64				
TDZ	**	**				

Ghi chú: Các chữ cái khác nhau trên cùng một cột biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê *: Khác biệt thống kê ở mức P < 0,05, **: Khác biệt về mặt thống kê ở mức P < 0,01, ns: không có sự khác biệt về mặt thống kê



Hình 1. Cụm chồi dâu tây trên môi trường MS có bổ sung TDZ sau 4 tuần nuôi cấy
 NT1: Đối chứng TDZ: 0 mg/L, NT2: TDZ 0,2 mg/L, NT3: TDZ 0,5 mg/L, NT4: TDZ 1 mg/L, NT5: TDZ 1,5 mg/L

Từ kết quả thí nghiệm cho thấy ở môi trường không bổ sung TDZ cụm chồi dâu tây tăng trưởng chậm về kích thước số chồi ít, nhưng chồi phát triển bình thường (hình 1). Khi môi trường có bổ sung TDZ cụm chồi bắt đầu tăng kích thước và cảm ứng hình thành chồi mới. Kết quả cho thấy cụm chồi ở môi trường bổ sung TDZ 0,2 mg/L cho khả năng nhân chồi cao nhất so với cụm chồi ở các nồng độ còn lại 13,33 chồi/mẫu, khối lượng tươi 1964,12 mg, khối lượng khô 124,97 mg, phần trăm chất khô (6,88%). Kết quả này tương tự với nghiên cứu của Gharbia (2016) sử dụng TDZ ở nồng độ thấp có tác dụng kích thích nhân chồi dâu tây. Tuy nhiên, sử dụng TDZ ở nồng độ cao gây ra sự biến dị về hình thái chồi dâu tây và làm giảm số chồi, chồi bị thủy tinh thể, những điều này được thấy rõ ở môi trường bổ sung 1 và 1,5 mg/L TDZ chồi và lá bị biến dạng không bình thường (hình 2). Trong thí nghiệm này cho thấy TDZ có ảnh hưởng đến cảm ứng nhân chồi dâu tây, nhưng sử dụng TDZ có thể làm biến dị chồi và lá ảnh hưởng đến khả năng tăng trưởng và tạo cây hoàn chỉnh.

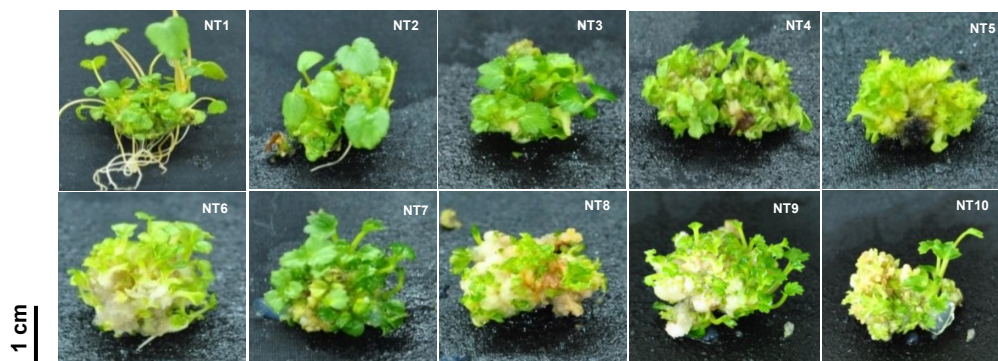
Ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng BA kết hợp với NAA lên khả năng nhân chồi của cây dâu tây

Các cụm chồi dâu tây đều tăng kích thước, có cảm ứng tạo chồi sau 1 tuần nuôi và số chồi tăng nhanh trong tuần 2, 3 và 4, kết quả được thể hiện ở bảng 2 và hình 2.

Bảng 2. Ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng BA kết hợp NAA lên khả năng nhân chồi của cây dâu tây sau 4 tuần nuôi cấy

BA (mg/L)	NAA (mg/L)	Số chồi/mẫu	Chiều cao chồi (cm)	Khối lượng tươi (mg)	Khối lượng khô (mg)	Phần Trăm chất khô (%)	Hình thái chồi
0	0	6,11 ^f	1,10 ^a	641,88	45,28	15,86	Có rễ, lá xanh đậm
0,2		7,11 ^{ef}	0,83 ^{bc}	596,82	34,93	6,86	Lá to xanh đậm
0,5		9,22 ^{cbd}	0,90 ^{ba}	695,13	45,48	7,22	Lá to xanh đậm
0,7		10,51 ^b	0,95 ^{bc}	761,97	56,90	7,23	Lá nhỏ xanh nhạt
1		8,07 ^{ed}	0,78 ^{bcd}	568,67	26,78	5,18	Lá nhỏ xanh nhạt
0	0,2	8,89 ^{cebd}	0,94 ^{ba}	1272,07	53,62	4,75	Lá to xanh nhạt, tạo mô sẹo
0,2		8,44 ^{ced}	0,64 ^d	666,48	40,20	5,95	Lá to xanh nhạt, tạo mô sẹo
0,5		10,18 ^{cb}	0,83 ^{bc}	1028,85	36,77	3,59	Lá nhỏ xanh nhạt, tạo mô sẹo.
0,7		12,55^a	0,89^{bc}	1152,12	62,10	5,71	Lá nhỏ xanh nhạt, tạo mô sẹo
1		10,11 ^{cb}	0,73 ^{cd}	707,43	36,57	5,29	Lá nhỏ xanh nhạt, tạo mô sẹo
CV%		35,97	33,67				
BA		**	**				
NAA		**	*				
BA kết hợp NAA		ns	ns				

Ghi chú: Các chữ cái khác nhau trên cùng một cột biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê *: Khác biệt thống kê ở mức $P < 0,05$, **: Khác biệt về mặt thống kê ở mức $P < 0,01$, ns: không có sự khác biệt về mặt thống kê.



Hình 2. Cụm chồi dâu tây trên môi trường MS có bổ sung BA và NAA sau 4 tuần nuôi cấy

NT1: 0,0 mg/L BA + 0,0 mg/L NAA, NT2: 0,2 mg/L BA + 0,0 mg/L NAA, NT3: 0,5 mg/L BA + 0,0 mg/L NAA, NT4: 0,7 mg/L BA + 0,0 mg/L NAA, NT5: 1 mg/L BA + 0,0 mg/L NAA, NT6: 0,0 mg/L BA + 0,2 mg/L NAA, NT7: 0,2 mg/L BA + 0,2 mg/L NAA, NT8: 0,5 mg/L BA + 0,2 mg/L NAA, NT9: 0,7 mg/L BA + 0,2 mg/L NAA, NT10: 1 mg/L BA + 0,2 mg/L NAA.

Sau 4 tuần nuôi cấy, kết quả cho thấy môi trường chỉ bổ sung BA hoặc BA kết hợp NAA đều kích thích các cụm chồi dâu tây tăng về kích thước và cảm ứng tạo chồi. Số lượng chồi ở mỗi môi trường đều tăng theo tỷ lệ thuận với nồng độ chất điều hòa sinh trưởng BA. Đối với những môi trường chỉ bổ sung BA ở các nồng độ khác nhau cho thấy số lượng chồi đạt mức cao nhất trong cụm chồi là 10,51 chồi/mẫu ở nồng độ BA = 0,7 mg/L, trong khi đó môi trường có bổ sung kết hợp giữa BA (0,7 mg/L) và NAA (0,2 mg/L) thì cho số lượng nhân chồi trong cụm chồi tốt hơn, đạt 12,55 chồi/mẫu. Tuy nhiên, khi môi trường nhân chồi có bổ sung nồng độ BA (1 mg/L) thì hệ số nhân chồi trong cụm chồi giảm, đạt 8,07 chồi/mẫu. Kết quả này cho thấy việc sử dụng môi trường bổ sung BA kết hợp với NAA cho hiệu quả nhân chồi từ cụm chồi dâu tây cao hơn so với môi trường chỉ bổ sung BA riêng lẻ. Kết quả này tương tự với nghiên cứu của Gharbia và đồng tác giả (2016) đã cho thấy việc kết hợp BA và IBA thích hợp trong quá trình nhân chồi dâu tây. Trong một nghiên cứu khác của Phạm Xuân Tùng và đồng tác giả (2009) trên giống dâu tây Angelique (dâu tây Mỹ Đá) cho kết quả sử dụng BA đơn lẻ ở 0,6 mg/L lại thích hợp hơn cho quá trình nhân chồi. Từ kết quả nghiên cứu của chúng tôi và các nghiên cứu liên quan cho thấy mỗi giống dâu tây mang đặc tính di truyền khác nhau có thể thích hợp với các điều kiện môi trường nuôi cấy có kết hợp chất điều hòa sinh trưởng hoặc sử dụng đơn lẻ tùy theo từng trường hợp cụ thể. Ngoài ra, trong nghiên cứu này, khi môi trường có bổ sung NAA còn kích thích cụm chồi dâu tây cảm ứng tạo mô sẹo, tuy nhiên, việc bổ sung NAA ở nồng độ thấp không ảnh hưởng đến chất lượng của chồi khi sử dụng cho giai đoạn tạo cây tiếp theo.

KẾT LUẬN

Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng cytokinin và kết hợp giữa cytokinin và auxin lên quá trình nhân dâu tây cho thấy môi trường MS bổ sung BA (0,7 mg/L) kết hợp NAA (0,2 mg/L) thích hợp cho

quá trình nhân chồi với 12,55 chồi/mẫu, khối lượng tươi 1152,12 mg, khối lượng khô 62,1 mg, chồi sinh trưởng phát triển tốt. Chồi được tạo ra khi chuyển sang giai đoạn tạo cây hoàn chỉnh cho thấy cây sinh trưởng và phát triển tốt.

Lời cảm ơn: Nhóm tác giả xin cảm ơn Trung tâm công nghệ sinh học Thành phố Hồ Chí Minh đã hỗ trợ kinh phí và cơ sở vật chất cho chúng tôi thực hiện nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Biswas MK, Dutt M, Roy UK, Islam R, Hossain M (2009). Development and evaluation of *in vitro* somaclonal variation in strawberry for improved horticultural traits. *Sci Hortic* 122: 409-416.
- Chien YK (2009). An effective disinfection protocol for plant regeneration from shoot tip cultures of strawberry. *AJB* 8(11): 2611-2615.
- Cordenunsi BR, Nascimento JRO, Genovese MI, Lajolo FM (2002). Influence of cultivar on quality parameters and chemical composition of strawberry fruits grown in Brazil. *J Agric Food Chem* 50: 2581-2586.
- Diamanti J, Capocasa F, Denoyes B, Petit A, Chartier P, Faedi W, (2012). Standardized method for evaluation of strawberry (*Fragaria ananassa* Duch.) germplasm collections as a genetic resource for fruit nutritional compounds. *J Food Compos Anal* 28: 170-178.
- Dương Tấn Nhật, Lê Thị Thanh Xuân, Nguyễn Hồng Vũ, Nguyễn Văn Bình, Nguyễn Minh Trí, Nguyễn Thị Thanh Hằng (2004). Cải tiến hệ thống nhân giống cây dâu tây bằng nuôi cấy trong túi nylon. *Tạp chí Công nghệ Sinh Học* 2(2): 227-234.
- Freddi H, Sandra G, Margery KD, Stephanie R, Kim L, John M, Barbara JS (2006). In vitro response of strawberry cultivars and regenerants to *Colletotrichum acutatum*. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 84: 255-261.
- Gharbia HD, Diaa AI, Mobasher SO (2016). Response of running shoot tips of strawberry (*Fragaria x ananassa*) for in vitro propagation in Kurdistan region of Iraq. *IJEAB* 1(2): 164-169.
- Giampieri F, Tulipani S, Alvarez SJM, Quiles JL, Mezzetti B, Battino M (2012). The strawberry: composition, nutritional quality, and impact on human health. *Nutrition* 28: 9-19.
- Phạm Xuân Tùng, Phạm Thị Lan (2009). Ảnh hưởng của biện pháp xử lý khử trùng mẫu và các yếu tố môi trường trong nhân nhanh giống Dâu Tây in vitro. *Tạp chí Công nghệ Sinh học* 7(3): 112-117.
- Roberto C, Silvia S, Bruno M (2016). The use of TDZ for the efficient in vitro regeneration and organogenesis of strawberry and blueberry cultivars. *Sci Hortic* 207: 117-124.
- Stefano G, Pasquale R, Marco M (1996). Long-term cell suspension culture and regeneration of the single-leafed strawberry *Fragaria vesca* monophylla. *J Sci Food Agric* 72: 196-200.

EFFECT OF PLANT GROWTH REGULATORS ON MICROPROPAGATION OF STRAWBERRY (*FRAGARIA x ANANASSA* L.)

Cao Hue Trinh, Vo Thanh Huy, Nguyen Thi Xuan Hien, Huynh Thi Anh Dai, Huynh Huu Duc*

Biotechnology center of Ho Chi Minh City

SUMMARY

Strawberry (*Fragaria x annassa*) is a popular fruit vegetable in temperate countries. Strawberry fruits are very interested in the fruit market because of their healthy contained compounds such as vitamin, anthocyanin, acid ellagic. However, strawberry seedling production through conventional propagation can not reach the farmer demands. Nowadays, micropropagation can produce seedlings obtained good properties as free-disease seedlings, uniformity, same genetic with mother plants and can create a large of seedlings in the short time. In this study, effects of cytokinins on the shoot multiplication and shoot quality were evaluated for improving the micropropagation efficiency of the strawberry. The results showed that MS medium was supplemented with BA 0.7 mg/L and NAA 0.2 mg/L suitable for shoot multiplication (12.55 shoots/explant), and the healthy microshoots were obtained at 0.89 cm height, 1152.12 mg fresh weight and 62.1 dry weight. In the medium supplemented with TDZ, the microshoots showed slow growth and abnormal phenotypes. These results indicated that using proper BA combined with NAA can improve *in vitro* shoot proliferation of the strawberry and then apply for large scale seedling production.

Keywords: BA, NAA, micropropagation, Strawberry (*Fragaria x ananassa*), TDZ.

* Author for correspondence: Tel + 84-096-713-7046; Email: huuduchuyh82@gmail.com