

## NGHIÊN CỨU QUI TRÌNH NHÂN NHANH *IN VITRO* CÂY ĐU ĐỦ (*Carica papaya* L)

### Use of in-vitro culture for rapid propagation of papaya (*Carica papaya* L.)

Nguyễn Thị Nhân<sup>1</sup>

#### SUMMARY

For rapid propagation of *Carica papaya* L, in-vitro culture method was tried using young shoot-tips as explants. The explants were surface sterilized using 15% Ca(OCl)<sub>2</sub> for 15 minutes and 0.1% HgCl<sub>2</sub> for 3 minutes (double sterilization). The young shoot-tips were cultured on the MS medium supplemented with αNAA (0.2ppm), BA (0.5ppm) and kinetin (0.5ppm) for multiple shoot induction. After 3-4 weeks, the shoot-tips developed and formed multishoot clumps, which were then sub-cultured. The 1/2 diluted nutrients of MS medium containing 0.5g/l charcoal was used for plantlet regeneration. It was found that medium MS + αNAA (0.2ppm) + BA (0.5ppm) + coconut juice (5%) was optimal for multiplication of shoots. It was also shown that combination of soil and burnt rice husk at a ratio of 1:1 was a suitable substrate for transferring the plantlets to the greenhouse.

**Keywords:** Papaya, in vitro, culture, modified MS medium.

#### 1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Đu đủ (*Carica papaya* L.) là cây ăn quả nhiệt đới có giá trị dinh dưỡng cao, đặc biệt là vitamin A (cao gấp 10 lần so với chuối dứa và gần gấp đôi xoài). Đây là một trong những loại cây ăn quả nhanh cho thu hoạch và có sản lượng cao, năng suất có thể đạt 40-80 tấn quả/ha sau 8-10 tháng (Trần Thế Tục, Đoàn Thế Lư; 2002). Ngoài sản phẩm chính là quả, một số nước còn trồng đu đủ để lấy nhựa chiết suất papain sử dụng trong y dược và công nghệ chế biến thực phẩm (Vũ Công Hậu; 1996)

Ở nước ta, đu đủ được trồng ở tất cả các tỉnh. Tuy nhiên, cây đu đủ thường bị nhiễm bệnh virus (tỷ lệ cây bị nhiễm có khi lên tới 90%) làm cho sản lượng đu đủ bị thất thu nhiều; giống đu đủ dễ bị lẫn tạp do đó khó có thể tìm được giống đu đủ thuần, hạt đu đủ lai

phải nhập từ Đài Loan hoặc Trung Quốc (với giá thành 2500- 3000đ/1 cây con). Ngoài ra, một khó khăn đối với người sản xuất là sau khi trồng 7-8 tháng mới có thể xác định cây đu đủ là cây đực hoặc cái hoặc lưỡng tính. Vì thế năng suất và diện tích trồng đu đủ trên cả nước hiện nay đều không tăng, thậm chí còn có xu hướng giảm. Nghiên cứu này được tiến hành nhằm góp phần khắc phục những nhược điểm đã nêu trên.

#### 2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Đối tượng nghiên cứu là giống đu đủ Đài Loan được nhập qua trung tâm VAC, Trường Đại học Nông nghiệp I (ĐHNHI). Nguyên liệu sử dụng trong nhân giống là các chồi ngọn trên cây con có 3-4 tuần tuổi và đỉnh sinh trưởng của các chồi nhánh trên cây đu đủ đang cho thu quả. Các chồi được thu về, rửa sạch, khử trùng bằng hypochloric canxi (Ca(OCl)<sub>2</sub>) 5% và clorua thủy ngân (HgCl<sub>2</sub>) 0,1%, sau đó đưa vào nuôi cấy trên môi trường MS

<sup>1</sup> Khoa Nông học, Trường ĐHNHI

NGHIÊN CỨU QUI TRÌNH NHÂN NHANH *IN VITRO* CÂY ĐU ĐỦ

(Murashige – Skoog). Các phương thức khử trùng như sau:

Công thức 1: Đối chứng (rửa bằng nước vô trùng);

Công thức 2: Hypocloric canxi 5% trong thời gian 15 phút;

Công thức 3: Clorua thủy ngân 0,1% trong 3 phút;

Công thức 4: Khử trùng kép (khử trùng  $\text{Ca}(\text{OCl})_2$  trước, sau đó khử trùng tiếp bằng  $\text{HgCl}_2$ ).

Các chất điều tiết sinh trưởng (ĐTST) được sử dụng trong thí nghiệm là benzin adenin (BA), kinetin (K) thuộc nhóm xytokinin và  $\alpha\text{NAA}$  (naphtyl axetic axit) thuộc nhóm auxin, nồng độ dao động từ 0,2-1ppm tùy theo từng thí nghiệm. Ngoài ra còn bổ sung thêm nước dừa vào môi trường nuôi cấy.

Thí nghiệm được tiến hành tại bộ môn Sinh lý Thực vật khoa Nông học ĐHNHI

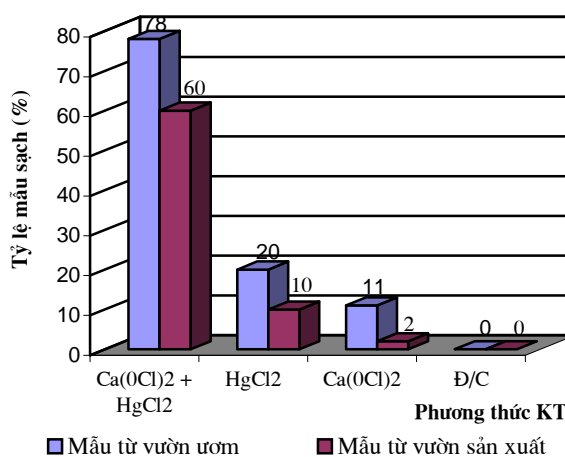
### 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

#### 3.1. Kỹ thuật tạo chồi từ mẫu cấy ban đầu

##### Khử trùng mẫu

Để làm sạch mẫu trước khi đưa vào nuôi cấy trong điều kiện vô trùng, người ta có thể sử dụng nhiều chất khử trùng khác nhau như: hypocloric canxi,  $\text{H}_2\text{O}_2$ , clorua thủy ngân... Đối với cây đu đủ, chúng tôi đã khử trùng

bằng hypocloric canxi ( $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ ) 5% và clorua thủy ngân ( $\text{HgCl}_2$ ) 0,1%. Kết quả được trình bày ở hình 1.



Hình 1. Hiệu quả của các phương thức khử trùng

Kết quả trên hình 1 cho thấy: chồi đu đủ bắt buộc phải khử trùng mẫu trước khi đưa vào nuôi cấy. Phương thức khử trùng có hiệu quả nhất là khử trùng kép (công thức 4), tỷ lệ mẫu sạch đạt 60% đối với mẫu lấy từ vườn sản xuất và 78% khi các mẫu cấy được lấy từ vườn ươm (sau 12 ngày nuôi cấy). Ở 2 công thức khử trùng đơn, tỷ lệ mẫu sạch chỉ đạt 11-20% (mẫu lấy từ vườn ươm) và 2-10% (mẫu lấy từ vườn sản xuất).

Bảng 1. Ảnh hưởng của chất điều tiết sinh trưởng đến khả năng bật mầm từ mẫu cấy

Công thức (CT)	Chất ĐTST (ppm)			Hình thức tạo chồi		Tỷ lệ tạo chồi (%)	Số chồi tb/mẫu cấy	Chiều cao chồi (cm)
	$\alpha\text{NAA}$	Kinetin	BA	Chồi	Cal-chồi			
1(đc)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	-	-
2	0,2	0,0	0,0	40	60	100	1,0	1,3
3	0,2	0,5	0,0	60	40	100	2,2	1,4
4	0,2	1,0	0,0	65	35	100	2,8	1,5
5	0,2	0,0	0,5	60	40	100	2,5	1,5
6	0,2	0,0	1,0	70	30	100	3,2	1,6
7	0,2	0,5	0,5	70	30	100	3,5	1,6

*Ảnh hưởng của chất điều tiết sinh trưởng trong quá trình tạo chồi từ mẫu cấy ban đầu*

Một trong những vai trò quan trọng của xytokinin là kích thích sự phân hoá của mô cấy theo hướng tạo chồi. Trên cơ sở đó, chúng tôi đã bổ sung vào môi trường nuôi cấy kinetin, benzin adenin (BA) với nồng độ từ 0,5 – 1,0ppm và có sự kết hợp với  $\alpha$ NAA ở nồng độ 0,2ppm. Kết quả được trình bày trên bảng 1 cho thấy: đối với cây đu đủ, chất điều tiết sinh trưởng (ĐTST) rất cần cho sự tạo chồi từ mô cấy ban đầu. Tất cả các công thức có bổ sung chất ĐTST (trừ CT1) đều cho tỷ lệ tái sinh chồi 100%, riêng các công thức có bổ sung kinetin và BA số chồi trung bình/mẫu cấy dao động từ 2,2 – 3,5. Cả 2 loại xytokinin với nồng độ 1 ppm đều cho số chồi nhiều hơn nồng độ 0,5ppm. Cũng là nồng độ 1ppm, nhưng khi sử dụng phối hợp 0,5K với 0,5BA, số chồi/ mẫu cấy đạt cao nhất (CT7).

**3.2. Kỹ thuật nhân nhanh cụm chồi**

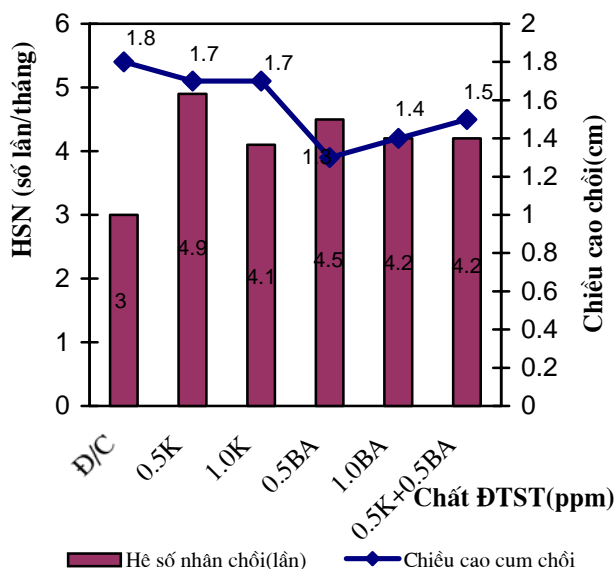
*Ảnh hưởng của kinetin và BA đến hệ số nhân chồi*

Từ kết quả trên, chúng tôi đã chọn kinetin và BA trên nền MS có nồng độ 0,2ppm  $\alpha$ NAA để tiếp tục nhân các cụm chồi thu được. Kết quả mô tả ở hình 2 cho thấy: trong giai đoạn nhân nhanh, nồng độ xytokinin thích hợp cho sự hình thành các chồi mới từ các cụm chồi cấy chuyển chỉ là 0,5ppm. Ở nồng độ này, hệ số nhân (HSN) đã đạt 4,9 với K và 4,5 lần với BA sau 4 tuần nuôi cấy. Đối với BA, tuy HSN có thấp hơn chút ít nhưng chồi mập và phát triển cân đối hơn nên chúng tôi đã chọn môi trường nhân nhanh chồi đu đủ là :

MS có 0,2ppm  $\alpha$ NAA và 0,5ppm BA

*Ảnh hưởng nước dừa (ND) trong môi trường nhân nhanh*

Do có hàm lượng dinh dưỡng cao và giàu xytokinin nên nước dừa thường được bổ sung vào môi trường và tỏ ra rất có hiệu quả với nhiều đối tượng nuôi cấy khác nhau. Trong thí nghiệm này, nước dừa được sử dụng ở nồng độ 5% trên môi trường có chất ĐTST (0,2 $\alpha$ NAA + 0,5BA) và không có chất ĐTST. Kết quả thí nghiệm cho thấy: trên môi trường có nước dừa không chỉ tăng hệ số nhân chồi mà còn tăng khả năng sinh trưởng, phát triển của chồi. Trên môi trường đặc, hệ số nhân tăng từ 2,8 lên 3,3 lần khi không có chất ĐTST và từ 3,6 lên 4,6 lần khi có chất ĐTST. Đối với môi trường lỏng, hệ số nhân cũng có diễn biến tương tự.



Hình 2. Ảnh hưởng của K và BA đến hệ số nhân chồi

NGHIÊN CỨU QUI TRÌNH NHÂN NHANH *IN VITRO* CÂY ĐU ĐỦ

Bảng 2. Ảnh hưởng của nước dừa đến HSN và sự sinh trưởng của chồi sau 4 tuần cấy chuyển

Công thức	Môi trường đặc (có agar)			Môi trường lỏng (không agar)		
	HSN (lần)	Tăng chiều cao cụm chồi (cm)	Tăng khối lượng cụm chồi (g)	HSN (lần)	Tăng chiều cao cụm chồi (cm)	Tăng khối lượng cụm chồi (g)
1. MS(đ/c)	2,8	0,7	1,98	2,7	1,4	2,10
2. MS+ND	3,3	1,1	2,78	3,2	2,1	3,49
3. MS+ĐTST	3,6	1,2	2,97	3,1	2,6	3,12
4. MS+ĐTST+ND	4,6	1,2	3,44	4,4	3,3	3,69

Khi so sánh hiệu quả của 2 trạng thái môi trường khác nhau chúng tôi nhận thấy chồi đu đủ hình thành thuận lợi hơn trên môi trường có agar. Ở môi trường này HSN luôn cao hơn môi trường lỏng ở tất cả các công thức thí nghiệm. Ngược lại, khả năng sinh trưởng của các cụm chồi lại mạnh hơn trên môi trường lỏng (hình 3).

Như vậy để nhân nhanh chồi đu đủ, chúng ta có thể sử dụng môi trường là: MS+0,2ppm  $\alpha$ NAA + 0,5ppm BA + nước dừa (5%) có agar khi cần tăng HSN và không có agar khi

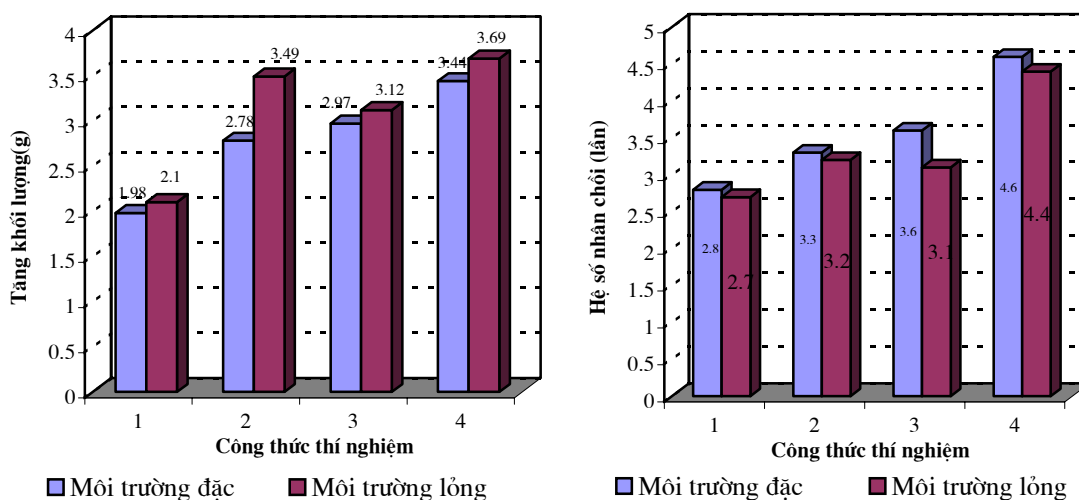
cần tăng nhanh sự sinh trưởng của chồi.

### 3.3. Giai đoạn ra rễ của chồi đu đủ *in vitro*

Ảnh hưởng của nồng độ  $\alpha$ NAA đến quá trình ra rễ của chồi đu đủ trong ống nghiệm

Vai trò đặc trưng nhất của  $\alpha$ NAA cũng như các auxin nói chung là kích thích sự ra rễ. Ở nồng độ từ 0,025 – 0,1ppm trong môi trường nuôi cấy,  $\alpha$ NAA đã có ảnh hưởng rõ tới sự ra rễ của chồi đu đủ (bảng3).

Kết quả bảng 3 cho thấy: Sự ra rễ của chồi đu đủ trong ống nghiệm thuận lợi nhất trên môi trường có  $\alpha$ NAA rất thấp



Hình 3. So sánh hiệu quả của môi trường đặc và môi trường lỏng trong giai đoạn nhân chồi

(0,025ppm). Tỷ lệ chồi ra rễ trên môi trường này đạt cao nhất trong số 4 công thức thí nghiệm (95%). Nồng độ  $\alpha$ NAA cao hơn không chỉ ức chế sự ra rễ mà còn làm giảm chất lượng bộ rễ. Đặc biệt ở nồng độ 0,1ppm tỷ lệ chồi ra rễ không chỉ giảm nhiều so với công thức tối ưu và thấp hơn cả đối chứng.

### 3.4. Ảnh hưởng của than hoạt tính và hàm lượng dinh dưỡng đến quá trình ra rễ

Khi nghiên cứu ảnh hưởng của hàm lượng dinh dưỡng chúng tôi đã bố trí thí nghiệm với 3 công thức lần lượt từ MS chuẩn đến giảm xuống còn 1/2 và 1/4 hàm lượng dinh

dưỡng chuẩn trên nền môi trường có hoặc không có than hoạt tính. Kết quả được trình bày ở bảng 4.

Như vậy, chồi đều ra rễ với tỷ lệ cao trên cả 6 công thức thí nghiệm. Tuy nhiên, khi giảm hàm lượng dinh dưỡng xuống 1/2 so với nồng độ chuẩn sự phân hoá mầm rễ nhanh hơn. Nếu có bổ sung than hoạt tính, 100% số chồi ra rễ sau 4 tuần. Về chất lượng bộ rễ cũng được đánh giá tốt hơn ở 2 công thức có hàm lượng dinh dưỡng giảm xuống 50%. Cũng trên môi trường này, hiệu quả của than hoạt tính thể hiện rõ hơn, tỷ lệ chồi ra rễ tăng nhanh và số rễ/ cây cũng tăng từ 3,5 lên 4,2 rễ.

Bảng 3. Ảnh hưởng của  $\alpha$ NAA đến quá trình ra rễ của chồi đu đủ trong ống nghiệm

CT	$\alpha$ NAA (ppm)	Tỷ lệ chồi ra rế sau khi cấy (%)			Rễ/cây( rễ sau 30 ngày)	Dài tb rễ (cm)	Chất lượng bộ rễ
		10 ngày	20 ngày	30 ngày			
1(đ/c)	0,000	27	38	71	2,9 ± 0,5	2,6 ± 0,7	TB
2	0,025	40	78	95	4,1 ± 0,4	3,1 ± 0,3	Tốt
3	0,050	19	40	66	3,2 ± 0,3	2,5 ± 0,6	TB
4	0,100	11	24	40	2,3 ± 0,6	2,7 ± 0,5	TB

Bảng 4. Ảnh hưởng của hàm lượng dinh dưỡng và than hoạt tính đến quá trình ra rễ của chồi đu đủ in vitro

CT	Môi trường	TG ra rễ (ngày)	Tỷ lệ chồi ra rế (%)					Chất lượng bộ rễ	
			1 tuần	2 tuần	3 tuần	4 tuần	5 tuần	rễ/cây	Dài(cm)
1	MS	8	6,7	26,7	42,3	76,7	93,3	1,4	1,4
2	MS+THT	8	10,2	28,0	45,1	91,3	92,7	2,5	1,6
3	1/2MS	5	16,7	36,7	54,0	96,7	100,0	3,5	2,4
4	1/2MS+THT	4	20,4	42,3	60,8	100	-	4,2	2,2
3	1/4MS	6	13,3	40,0	71,7	90,0	100,0	1,7	3,7
5	1/4MS+THT	7	12,8	43,6	72,5	93,3	100	2,2	2,9

NGHIÊN CỨU QUI TRÌNH NHÂN NHANH *IN VITRO* CÂY ĐU ĐỦ

Bảng 5. Tỷ lệ sống và khả năng sinh trưởng, phát triển của cây đu đủ *in vitro* trên các giá thể khác nhau (%)

CT	Loại giá thể	Tỷ lệ sống (%)		Chiều cao(cm)		Lá/cây(lá)	
		5 ngày	15 ngày	Ban đầu	15 ngày	Ban đầu	15 ngày
1	Đất ướt(đ/c)	91,7	73,3	2,0	3,2	4,0	6,2
2	Trấu + Cát (1:1)	91,7	66,7	2,1	3,2	4,3	6,0
3	Trấu + Đất (1:1)	93,3	80,0	2,1	3,5	4,2	6,7
4	Cát + Đất (1:1)	90,0	73,3	2,0	3,2	4,2	6,3

Từ kết quả của 2 thí nghiệm trên, chúng tôi đã chọn môi trường ra rễ là MS/2 có than hoạt tính (0,5g/lít)

**3.5. Khả năng thích ứng ban đầu của cây khi chuyển từ ống nghiệm ra vườn ươm**

Kết thúc giai đoạn nhân trong ống nghiệm, chúng tôi đã đưa cây ra vườn ươm và trồng trên 4 nền giá thể khác nhau. Tỷ lệ sống cũng như khả năng sinh trưởng, phát triển của cây sau 15 ngày được ghi lại ở bảng 5. Như vậy, giá thể trồng có ảnh hưởng đến tỷ lệ sống của cây đu đủ khi đưa từ trong ống nghiệm ra vườn ươm. Tỷ lệ rễ đạt cao nhất trên nền đất trộn với than trấu tỷ lệ 1:1(80% ở thời điểm 15 ngày sau khi trồng). Ba loại giá thể còn lại có sự sai khác không nhiều về tỷ lệ ra rễ, tuy nhiên loại giá thể ít giữ ẩm (trấu+cát) đã cho tỷ lệ sống của cây thấp nhất. Đối với chiều cao, số lá sự sai khác giữa các nền giá thể không rõ rệt.

**4. KẾT LUẬN**

Để có tỷ lệ mẫu sạch cao, khả năng bật mầm của mẫu cây tốt, phương thức khử trùng



Hình 4. Một số hình ảnh về nhân giống *in vitro* cây đu đủ

tốt nhất đối với cây đu đủ là kết hợp hypochloric canxi ( $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ ) 0,15% với clorua thủy ngân ( $\text{HgCl}_2$ ) 0,1%, sau đó đưa vào nuôi cấy trên môi trường MS có 1ppm BA hoặc 0,5ppm BA và 0,5ppm kinetin.

Khi nhân cụm chồi, môi trường thích hợp là MS có 0,2ppm  $\alpha\text{NAA}$  kết hợp với 0,5ppm

Nguyễn Thị Nhẫn

BA và có bổ sung 5% nước dừa (HSN là 4,5 và chất lượng chồi tốt).

Trong quá trình nhân cụm chồi có thể sử dụng môi trường có agar khi cần tăng nhanh tốc độ đẻ chồi (HSN cao). Ngược lại, khi cần tăng nhanh tốc độ sinh trưởng của chồi nên nuôi cấy trên môi trường không có agar (tăng chiều cao và tăng khối lượng).

Tỷ lệ chồi ra rễ cao và chất lượng bộ rễ tốt trên môi trường giảm một nửa hàm lượng dinh dưỡng của môi trường MS chuẩn có thêm 0,5g

than hoạt tính.

Cây đu đủ in vitro khi chuyển ra vườn ươm có tỷ lệ sống cao trên nền đất trộn với than trấu tỷ lệ 1:1.

#### **Tài liệu tham khảo**

Vũ Công Hậu (1996). *Cây ăn quả ở Việt Nam*.

Nxb Nông nghiệp.

Trần Thế Tục, Đoàn Thế Lư (2002). *Cây đu đủ và kỹ thuật trồng*. Nxb Lao động.