

## NHÂN NHANH GIỐNG DỨA ĐÀI NÔNG 4 BẰNG KỸ THUẬT NUÔI CẤY MÔ

### Rapid multiplication of Tai-nung 4 pineapple variety by means of tissue culture

Nguyễn Quang Thạch<sup>1</sup>, Đinh Trường Sơn<sup>1</sup>, Nguyễn Thị Hương<sup>1</sup>

#### SUMMARY

The tissue culture technique was applied for rapid multiplication of Tai-nung 4 pineapple, a Taiwanese pineapple variety of good quality. The thin layers of the shoot tip were cultured on the MS medium supplemented with 2.5% saccharose, 6.5g agar/l, 0.6 ppm of 2,4 D and 0.05ppm kinetin. The percentage of regenerated plants obtained on this medium was 65.2% after 30 days of culture with a rate of regeneration being 4.5 shoots per each thin layer. The medium for rapid shoot multiplication consisted of MS + 2.5% saccharose + 6.5 g agar/l + 0.05 ppm NAA + 0.05 ppm IBA + 1 ppm BA. The shoot multiplication rate on this medium was 7.7 shoots/6 weeks. Use of apical shoot dormancy breaking technique enhanced the rate of multiplication. The multiplication rate was 23.74 times/subculture. The optimal medium for rooting was MS + 2.5% saccharose + 6.5 g agar/l + 0.05 ppm IAA. On this medium, 100% of the shoots rooted after 25 days of culture. The optimal substrate for acclimatization was burnt rice husk plus sand at a ratio of 2:1.

**Keywords:** Pineapple, Propagation, Tai-nung 4, tissue culture

#### 1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Theo chủ trương của Bộ Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn đến năm 2010 diện tích trồng dứa chỉ riêng giống Cayenne của Việt Nam sẽ là 20.000 ha (Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn, 1999), tuy nhiên diện tích trồng chỉ đạt gần 3.227ha (Cục Khuyến Nông và Khuyến Lâm, 2002). Vì vậy, nghiên cứu xây dựng công nghệ nhân giống dứa là vấn đề cần giải quyết hàng đầu trong việc phát triển trồng dứa hiện nay của Việt Nam. Bên cạnh phương pháp nhân giống thông thường, phương pháp nuôi cấy mô ứng dụng trong nhân giống (T.Murashige, 1974) và đặc biệt trên cây dứa Cayen đã được rất nhiều tác giả quan tâm và đã xây dựng thành công quy trình nhân giống dứa Cayen bằng kỹ thuật nuôi cấy

mô (Nguyễn Thị Nhấn và cộng sự 1995, Nguyễn Quang Thạch và cộng sự, 2001).

Dứa Đài Nông 4, một giống dứa quý do Viện Nghiên cứu Gia Nghĩa Đài Loan chọn tạo, là giống dứa ăn tươi có giá trị nhất, vỏ quả rất dễ tách, khi ăn không cần gọt vỏ, khía mắt nên được người tiêu dùng ưa chuộng. Ở Việt Nam, giống dứa này chưa được trồng nhiều và bước đầu được khảo nghiệm bởi một số cơ quan như: Trường Đại học Cần Thơ, Đại học Nông nghiệp I Hà Nội. Để xây dựng qui trình nhân nhanh giống dứa Đài Nông 4, chúng tôi đã tiến hành nghiên cứu nhân nhanh giống dứa Đài Nông 4 bằng kỹ thuật nuôi cấy mô.

#### 2. VẬT LIỆU, PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. **Vật liệu nghiên cứu:** Giống dứa Đài Nông 4 có nguồn gốc Đài Loan

2.2. **Phương pháp nghiên cứu**

<sup>1</sup> Viện Sinh học Nông nghiệp, Trường ĐHNHI

Sử dụng phương pháp nghiên cứu nuôi cấy mô hiện hành.

Thí nghiệm được bố trí ngẫu nhiên, 3 lần lặp lại, mỗi công thức 30 cá thể.

Các chỉ tiêu thí nghiệm được quan sát thường xuyên với 5 –10 ngày 1 lần (tuỳ theo yêu cầu của thí nghiệm)

Cây dứa nuôi cấy mô có khối lượng 1g được tiến hành nghiên cứu ở giai đoạn vườn ươm.

Số liệu được xử lý thống kê sinh học theo chương trình IRRISTAT

### 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

#### 3.1. Giai đoạn tạo nguồn mẫu ban đầu

##### 3.1.1. Tạo vật liệu khởi đầu bằng kỹ thuật nuôi cấy chồi đỉnh và mắt ngủ

Kết quả nghiên cứu ở bảng 1 cho thấy:

Thời gian khử trùng càng dài thì tỷ lệ mẫu nhiễm càng giảm nhưng tỷ lệ mẫu chết càng tăng. Chế độ khử trùng cho tỷ lệ mẫu sạch tái

sinh tốt nhất là: khử trùng lần đầu trong thời gian 5 phút sau đó khử trùng lần hai trong thời gian 1 phút. Chế độ này cho tỷ lệ mẫu sạch tái sinh đạt cao nhất (37,07%).

##### 3.1.2. Thí nghiệm tái sinh chồi bằng kỹ thuật cắt lớp mỏng tế bào

Ứng dụng kỹ thuật nuôi cấy lớp mỏng tế bào thực vật đã được nhiều tác giả nghiên cứu thành công. Bằng phương pháp này có thể thúc đẩy sự tái sinh chồi góp phần tăng nhanh hệ số nhân giống in vitro (Duong Tan Nhut, Jaime A. Teixeira da Silva, 2001).

##### Ảnh hưởng của vị trí cắt đến khả năng phát sinh hình thái của lớp mỏng tế bào

Qua bảng 2 ta thấy:

Có sự khác nhau rất rõ rệt về khả năng tái sinh chồi từ các vị trí cắt của lớp mỏng. Khả năng tái sinh chồi càng cao khi các lớp mỏng được cắt gần về phía đỉnh ngọn.

Sau 30 ngày nuôi cấy, khả năng phát sinh hình thái của lớp mỏng tế bào tốt nhất ở vị trí

Bảng 1. Ảnh hưởng của chế độ khử trùng đến khả năng phát sinh hình thái của mẫu cấy

Công thức	Chế độ khử trùng	Tỷ lệ mẫu nhiễm (%)	Tỷ lệ mẫu sạch phát sinh hình thái (%)	Tỷ lệ mẫu sạch chết (%)
1(Đ/C)	5 phút	30,98	31,00	38,02
2	Lần 1: 1 phút; Lần 2: 1 phút	100	0,00	0,00
3	Lần 1: 2 phút; Lần 2: 1 phút	69,42	20,50	10,08
4	Lần 1: 3 phút; Lần 2: 1 phút	50,03	24,83	25,14
5	Lần 1: 4 phút; Lần 2: 1 phút	32,87	37,07	30,06
6	Lần 1: 5 phút; Lần 2: 1 phút	22,50	25,50	52,46

Bảng 2. Ảnh hưởng của vị trí cắt đến khả năng phát sinh hình thái của lớp mỏng tế bào

Vị trí cắt	Tỷ lệ lát cắt tái sinh theo thời gian (%)					Tỷ lệ phát sinh chồi (%)
	10 ngày	15 ngày	20 ngày	25 ngày	30 ngày	
Gốc	0,00	4,54	9,08	18,21	22,71	100
Thân	8,69	13,04	21,73	34,75	52,22	100
Ngọn	19,04	33,34	57,14	71,42	95,24	100
CV (%)					2,7	
LSD (5%)					3,11	

Bảng 3. Ảnh hưởng của kích thước lớp mỏng tế bào đến khả năng phát sinh hình thái của mô nuôi cấy

Kích thước (mm)	Tỷ lệ lát tái sinh theo thời gian (%)					Tỷ lệ phát sinh chồi (%)	Số chồi/lát (30 ngày)
	10 ngày	15 ngày	20 ngày	25 ngày	30 ngày		
0,1	0,00	0,00	0,00	1,53	3,07	100,00	1,72
0,3	14,28	23,80	28,57	33,42	41,95	100,00	2,96
0,5	21,73	34,78	43,47	52,17	65,20	100,00	4,50
0,7	12,25	16,68	20,83	25,06	33,21	100,00	2,50
0,9	3,71	7,42	11,19	14,19	18,70	100,00	1,47
1,1	0,00	0,0	3,84	7,82	11,84	100,00	1,36

ngọn (95,24%), tiếp theo là thân (52,22%) và kém nhất là ở gốc (22,71%). Điều này chứng tỏ khả năng phân hoá và phản phân hoá của tế bào xảy ra thuận lợi hơn ở phần mô non.

**Ảnh hưởng của kích thước lớp mỏng tế bào đến khả năng phát sinh hình thái của mô nuôi cấy**

Kích thước (độ dày) của lát mỏng có ảnh hưởng rất lớn đến khả năng tái sinh chồi của lớp mỏng. Lớp mỏng có kích thước lớn (lớn hơn 0,7cm) và nhỏ (nhỏ hơn 0,5cm) đều cho khả năng tái sinh chồi thấp. Ở kích thước 0,5mm, khả năng phát sinh hình thái của lát mỏng đạt cao nhất (65,20%), chồi hình thành trên 1 lát cắt là lớn nhất (4,5 chồi/ lát). Điều

này có ý nghĩa quan trọng là chúng ta sẽ có được một số lượng mẫu lớn trong thời gian ngắn phục vụ cho giai đoạn nhân nhanh tiếp theo (Bảng 3).

**Ảnh hưởng của chất điều tiết sinh trưởng tới khả năng phát sinh hình thái của lớp mỏng tế bào**

Kết quả bảng 4 cho ta thấy:

Benzyl adenin (BA) có tác dụng kích thích quá trình tái sinh và sự hình thành chồi của lát mỏng tế bào mạnh hơn so với kinetin. Tỷ lệ lát mỏng tái sinh và số chồi trung bình ở công thức 2 (có bổ sung 0,1mg/lít BA) đạt 53,60% và 2,98 chồi/lát so với 49,20% và 2,16 chồi/lát ở công thức 3 (có bổ sung 0,1mg/lít kinetin).

Bảng 4. Ảnh hưởng của chất điều tiết sinh trưởng tới khả năng phát sinh hình thái của lớp mỏng tế bào (sau 30 ngày)

Công thức	Nồng độ chất điều tiết sinh trưởng (ppm)			Chiều cao chồi (cm)	Tỷ lệ lát tái sinh (%)	Số chồi/lát (chồi)
	2,4D	BA	Kinetin			
1 Đ/c)	0,0	0,0	0,0	1,35	40,20	1,97
2	0,5	0,1	0,0	0,92	53,60	2,98
3	0,5	0,0	0,1	0,78	49,20	2,16
4	0,5	0,1	0,1	1,55	53,30	3,46
5	0,5	0,1	0,2	0,70	37,40	2,19
6	0,5	0,2	0,0	0,54	46,50	1,78
7	0,5	0,0	0,2	0,35	42,53	1,39
8	0,5	0,2	0,1	0,46	46,80	1,14
9	0,5	0,2	0,2	0,50	47,72	1,22

**Bảng 5.** Ảnh hưởng của chất điều tiết sinh trưởng đến khả năng nhân nhanh chồi (sau 6 tuần)

Công thức	Nồng độ chất điều tiết sinh trưởng			Hệ số nhân (gram)	K/lượng chồi (gram)
	$\alpha$ NAA	IBA	BA		
1	0,00	0,00	0,00	1,22	0,45
2	0,10	0,00	0,50	3,12	0,31
3	0,10	0,00	1,00	5,60	0,22
4	0,00	0,10	0,50	3,94	0,26
5	0,00	0,10	1,00	6,15	0,54
6	0,05	0,05	0,50	4,87	0,25
7	0,05	0,05	1,00	7,67	0,11
CV (%)				1,1	3,8

Môi trường thích hợp cho giai đoạn tái sinh chồi từ lớp mỏng tế bào là MS + 2,5% đường + 6,5g aga + 0,5ppm 2,4D + 0,1ppm BA + 0,1ppm kinetin. Trên môi trường này tỷ lệ tái sinh cao (53,3%) và đạt 3,46 chồi/lát mỏng.

### 3.2. Giai đoạn nhân nhanh

#### 3.2.1. Ảnh hưởng của chất điều tiết sinh trưởng đến khả năng nhân nhanh chồi

Kết quả trên bảng 5 cho thấy:

Chất điều tiết sinh trưởng có tác dụng xúc tiến quá trình nhân nhanh chồi trong môi trường nuôi cấy, hệ số nhân chồi đều tăng so với đối chứng (từ 3,12 lần đến 7,67 lần).

Môi trường thích hợp cho sự phát sinh chồi là MS + 2,5% đường + 6,5g aga + 0,05ppm  $\alpha$ NAA + 0,05ppm IBA + 1ppm BA hoặc MS + 2,5% đường + 6,5g aga + 0,1ppm IBA + 1ppm BA. Môi trường này cho hệ số nhân chồi cao (7,67 lần và 6,15 lần), gấp 1,04 đến 6,2 lần so với các công thức khác.

#### 3.2.2. Ảnh hưởng của các phương pháp khác nhau đến khả năng nhân nhanh chồi

Kỹ thuật phá đỉnh sinh trưởng đã thúc đẩy khả năng đẻ chồi, tăng hệ số nhân ở giai đoạn nhân nhanh. Hệ số nhân chồi bằng phương pháp phá đỉnh sinh trưởng cao gấp 5,6 lần so với phương pháp nhân chồi đơn và cao gấp 2,1 lần so với phương pháp nhân nhanh cụm chồi (Bảng 6).

### 3.3. Giai đoạn tạo cây hoàn chỉnh

Kết quả bảng 7 cho thấy:

Trong quá trình sinh trưởng, chồi dưa có khả năng tự hình thành rễ, nhưng tỷ lệ ra rễ không cao (đạt tỷ lệ 47,14%) và số rễ chỉ đạt 1,2 rễ/cây (sau 30 ngày nuôi cấy).

IAA có hiệu quả cho quá trình ra rễ của chồi dưa hơn  $\alpha$ NAA.

Môi trường tối ưu cho sự phân hoá mầm rễ là MS + 2,5% đường sacaro + 6,5g aga + 0,5 ppmIAA.

**Bảng 6.** Ảnh hưởng các phương pháp khác nhau đến khả năng nhân nhanh chồi

Phương pháp	Hệ số nhân (chồi/6 tuần)	Khối lượng chồi (gram)	Chiều cao chồi (cm)
Chồi riêng rẽ (chồi đơn)	4,17	0,50	3,26
Cụm chồi	11,25	0,35	2,35
Chồi được phá đỉnh sinh trưởng	23,74	0,32	2,98

Bảng 7. Ảnh hưởng của auxin tới quá trình ra rễ của chồi dứa trong nuôi cấy in vitro

Công thức	Chất ĐTST (ppm)		Tỷ lệ ra rễ theo thời gian (%)					Số rễ TB/cây (sau 30 ngày)	Độ dài rễ TB/cây (sau 30 ngày)
	$\alpha$ NAA	IAA	10 ngày	15 ngày	20 ngày	25 ngày	30 ngày		
1	0,00	0,0	0,0	14,25	27,56	38,45	47,14	1,20	0,27
2	0,5	0,0	24,29	45,52	71,42	85,79	100,0	1,85	0,75
3	0,0	0,5	85,71	100,0	100,0	100,0	100,0	4,19	2,77
4	0,5	0,5	59,42	70,12	86,09	100,0	100,0	2,70	1,49
5	0,5	1,0	71,45	89,12	100,0	100,0	100,0	3,50	1,80
6	1,0	0,5	42,85	52,14	74,82	100,0	100,0	2,15	1,20

Bảng 8. Ảnh hưởng của giá thể đến sự sinh trưởng, phát triển của cây dứa nuôi cấy mô (sau 8 tuần)

Công thức	Tỷ lệ sống (%)	Số lá mới ra (lá/cây)	Tăng trưởng chiều rộng lá (cm/cây)	Tăng trưởng chiều cao cây (cm/cây)	Tăng trưởng khối lượng cây (g/cây)	Tăng trưởng diện tích lá (cm <sup>2</sup> /cây)
1: Trấu hun (Đ/C)	97,63	9,18	1,28	5,80	4,04	189,36
2: Cát + trấu hun (1:2)	98,85	9,86	1,48	6,07	4,34	198,57
3: Cát + trấu hun + Bokashi 1 (1:1:1)	90,53	8,20	1,14	5,46	3,42	186,33
4: Cát + trấu hun + Bokashi 2 (1:1:1)	89,76	7,17	1,09	4,73	2,95	112,72
5: Cát + trấu hun + Bokashi 6 (1:1:1)	66,67	4,01	0,34	1,09	0,96	22,93
LSD(5%)		0,21	0,02	0,10	0,04	1,61
CV(%)		2,8	2,0	2,3	1,3	1,1

### 3.4. Giai đoạn vườn ươm

Nghiên cứu giai đoạn sau in vitro cho cây dứa ở vườn ươm là một khâu không thể thiếu trong quy trình nhân giống, điều này đã được rất nhiều tác giả khẳng định (Nguyễn Quang Thạch, Nguyễn Thị Nhân, Nguyễn Khắc Thái Sơn, Đinh Trường Sơn, 2001).

#### Thời vụ ra cây

Kết quả nghiên cứu bước đầu xác định: có thể ra cây dứa cấy mô liên tục từ giai đoạn tháng 3 đến tháng 9. Trong đó, ra cây vào cuối vụ xuân (tháng 3 – 4) tỏ ra hiệu quả nhất. Ra cây vào thời vụ này cho phép thu được cây giống vào tháng 10 (khoảng 80gram).

Kết quả bảng 8 cho thấy:

- Sự sinh trưởng, phát triển của cây dứa cấy mô có liên quan rất chặt chẽ đến giá thể ra cây.
- Giá thể tốt nhất cho cây dứa cấy mô ngoài vườn ươm là giá thể thể cát + trấu hun (tỷ lệ 1:2).
- Bổ sung phân bón bokashi (công thức 3; 4; 5) đã làm sức sinh trưởng cũng như tỷ lệ sống của cây giảm đi khá rõ rệt. Điều này có thể do phân bón nên chưa cần thiết đối với cây dứa cấy mô ở giai đoạn đầu tiên sau khi ra cây hoặc có thể bổ sung phân bón bokashi đã làm ảnh hưởng tới đặc tính lý hoá của giá thể từ đó ức chế khả

năng sinh trưởng của cây dứa khi mới đưa ra vườn ươm.

#### 4. KẾT LUẬN

Với chế độ khử trùng kép (lần 1: 4 phút, lần 2: 1 phút) bằng  $HgCl_2$  0,1% cho tỷ lệ mẫu sạch phát sinh hình thái đạt cao nhất 37,07%

Lớp mỏng tế bào được cắt ở kích thước 0,5mm tại vị trí ngọn cho tỷ lệ mẫu tái sinh đạt cao nhất là 65,20%, và 4,5 chồi/lát mỏng.

Môi trường thích hợp cho quá trình nuôi cấy lớp mỏng tế bào là MS + 2,5% đường + 6,5g aga + 0,5ppm 2,4D + 0,05ppm kinetin (tỷ lệ tái sinh chồi đạt cao nhất 65,2%)

Môi trường thích hợp cho quá trình nhân nhanh là MS + 2,5% đường sacaro + 6,5g aga + 0,05ppm  $\alpha$ NAA + 0,05ppm IBA + 1ppmBA (hệ số nhân chồi đạt cao nhất 7,67 lần)

Môi trường thích hợp cho sự phân hoá mầm rễ là MS + 2,5% đường + 6,5g aga + 0,5ppm IAA cho tỷ lệ ra rễ đạt 100% sau 15 ngày nuôi cấy

Kỹ thuật phá đỉnh sinh trưởng thúc đẩy khả năng đẻ chồi, hệ số nhân chồi đạt 23,74lần/ 1 lần cấy chuyển, cao gấp 5,6 lần so với phương pháp nhân chồi đơn và cao gấp 2,1 lần so với phương pháp nhân nhanh cụm chồi.

Giá thể thích hợp cho cây dứa cấy mô ở giai đoạn vườn ươm là trấu hun + cát (2:1) hoặc trấu hun.

#### Tài liệu tham khảo

- Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn (1999). *Đề án phát triển sản xuất dứa giai đoạn 1999 – 2010*. 16 trang.
- Cục Khuyến Nông và Khuyến Lâm (2002). Báo cáo kết quả nhập - nhân trồng dứa cayen, 3 trang.
- Nguyễn Thị Nhân, Nguyễn Quang Thạch (1995). “Kết quả nghiên cứu nhân nhanh in vitro giống dứa Cayen Phú Hộ”. *Di truyền học và ứng dụng*, 2/1995, trang 22 – 26.
- Nguyễn Khắc Thái Sơn, Nguyễn Quang Thạch (2000). “Kết quả nghiên cứu, ứng dụng kỹ thuật thủy canh cải tiến vào công đoạn sau nuôi cấy in vitro đối với cây dứa”. *Nông nghiệp và Công nghiệp thực phẩm*, số3/ 2000, trang 125 – 127.
- Duong Tan Nhut, Jaime A. Teixeira da Silva et al (2001). “Thin cell layer technology in fruit crop regeneration”, Thin cell layer culture system regeneration and transformation application, page 420 – 439.
- Nguyen Quang Thach, Nguyen Khac Thai Son, Nguyen Thi Nhan and Dinh Truong Son (2001). “Improving micropropagation technology on pineapple (Cayenne) by using thin cell layers, apical dominance breaking and hydroponic method”, Proceeding of International workshop on Biology, Hanoi-Vietnam 2-5 July 2001, page 392-396.
- T.Murashige (1974). “Plant propagation through tissue cultures”, *Ann. Rev. Plant Physiol.*25, page135–166.