

## NGHIÊN CỨU PHƯƠNG PHÁP TÁI SINH VÀ NHÂN CHỒI *IN VITRO* TRỰC TIẾP CHO GIỐNG DỨA MD2

Hoàng Thị Giang<sup>1</sup>, Trương Thu Lâm<sup>1</sup>, Bùi Thị Minh<sup>1</sup>,  
Nguyễn Thị Hồng Nhung<sup>1</sup>, Phùng Thị Phương Nhung<sup>1</sup>

### TÓM TẮT

Nghiên cứu này được thực hiện nhằm tối ưu phương pháp tạo chồi và nhân nhanh chồi trực tiếp từ mắt ngủ của chồi nách giống dưa MD2. Kết quả nghiên cứu cho thấy, mẫu chồi nách đạt hiệu quả khử trùng tốt nhất khi xử lý với chất diệt nấm HgCl<sub>2</sub> 0,1% trong thời gian 15 phút và cấy trên môi trường có bổ sung kháng sinh Cefotaxime 500 mg/L. Khả năng bật chồi tốt nhất trên môi trường nuôi cấy MS có bổ sung 3 mg/L BAP. Môi trường MS bổ sung BAP 3 mg/L và NAA 1 mg/L thích hợp để nhân nhanh chồi trực tiếp, với hệ số nhân chồi đạt 4,47. Môi trường tối ưu ra rễ tạo cây hoàn chỉnh là MS bổ sung 1 mg/L NAA. Nghiên cứu này sẽ là cơ sở cho các nghiên cứu hoàn thiện hệ thống vi nhân giống cho dưa MD2.

**Từ khóa:** Cây dưa (*Ananas comosus* L.), giống dưa MD2, nhân nhanh, *in vitro*

### I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Dứa chủ yếu được nhân giống bằng kỹ thuật giâm hom, tách chồi. Phương pháp nhân giống bằng hom cho hệ số nhân giống khá tốt và dễ áp dụng. Ươm giống bằng hom có thể sử dụng chồi ngọn hay chồi quả, mắt ngủ, chồi nách, chồi cuống (Medina and Garcia, 2005). Còn hạt dưa chỉ được sử dụng trong lai tạo giống do hạt khá cứng và lâu nảy mầm (Morton, 1987). Chồi nách được ưa chuộng sử dụng để nhân giống hơn các loại mẫu giống khác vì kích thước lớn hơn và thường được bẻ sau khi thu hoạch quả 1 tháng. Sau khi thu hoạch quả 2 - 3 tháng thì có thể bẻ chồi cuống. Chồi quả ít được sử dụng làm giống vì thời gian sinh trưởng dài hơn nhiều so với sử dụng giống là chồi nách và chồi cuống (Acland, 1971). Dứa có hệ số nhân chồi tương đối thấp, để cung cấp cho 1 ha dưa cần 50.000 đến 60.000 chồi giống. Do đó, các phương pháp nhân giống truyền thống khó có thể tạo ra một số lượng lớn chồi đồng đều cùng một lúc.

Phương pháp nhân giống bằng kỹ thuật nuôi cấy mô có ưu điểm vượt trội là hệ số nhân giống cao, cho ra cây con tương đối đồng đều về vật liệu di truyền, cho giống khỏe mạnh và sạch bệnh. Trên thế giới đã áp dụng quy trình nhân giống *in vitro* cho nhiều giống dưa (Radha and Mathew, 2007). Từ 30 mẫu dưa ban đầu (Drew, 1980) nhân được 1,25 triệu cây giống sau 6 - 8 tháng. Từ một mẫu chồi quả ban đầu (Zepeda and Sagawa, 1981) sản xuất được 5.000 cây sau 12 tháng. Dewald và cộng

tác viên (1988) đã nhân được 300 cây sau 1 năm từ một mắt ngủ. Điều đó cho thấy, nhân giống dưa bằng phương pháp nuôi cấy mô cho hiệu quả cao nhưng cũng phụ thuộc vào nhiều yếu tố, đặc biệt là việc lựa chọn vật liệu nuôi cấy ban đầu. Các loại mô cấy thường được sử dụng là chồi nách, chồi cuống, đỉnh chồi, hoặc mắt ngủ từ các loại chồi trên (Radha and Mathew, 2007).

Có hai phương pháp nhân dưa *in vitro* thường được áp dụng là nhân trực tiếp và nhân gián tiếp. Nhân *in vitro* trực tiếp được thực hiện thông qua việc kích thích phát triển chồi từ mắt ngủ (Khatun *et al.*, 1997; Rahman *et al.*, 2001). Roy và cộng tác viên (2000) đã xây dựng được quy trình nhân giống dưa *in vitro* quy mô công nghiệp từ mắt ngủ của chồi quả. Phương pháp nhân gián tiếp thông qua giai đoạn tạo mô sẹo và phôi vô tính (Akbar *et al.*, 2003; Sha Valli Khan *et al.*, 2002). Một số nghiên cứu cũng đã áp dụng nhân giống bằng nuôi cấy lỏng (Rahman *et al.*, 2019) hay hệ thống bioreactor (Escalona *et al.*, 1999) nhằm nâng cao hiệu suất sản xuất giống. Phương pháp nhân giống thông qua mô sẹo có thể gây ra những biến dị soma nhưng lại cho hệ số nhân cao hơn nhân trực tiếp từ mắt ngủ hoặc đỉnh chồi và có thể hình thành những biến dị có lợi cho công tác chọn tạo giống mới (Cuenca *et al.*, 2000; Vuylsteke *et al.*, 1988).

Trong số những giống dưa trồng phổ biến trên thế giới hiện nay, giống dưa MD2 (hay còn có tên là Super Sweet, Gold) được ưa chuộng nhất, với lợi thế

<sup>1</sup> Phòng thí nghiệm trọng điểm Công nghệ tế bào thực vật, Viện Di truyền Nông nghiệp

\* Tác giả liên hệ, e-mail: nuocngamos@yahoo.com

là giống lai giữa Cayenne và Queen nên tận dụng được ưu điểm của cả hai giống này: chịu hạn, năng suất cao (1,5 - 2 kg/quả), thịt màu vàng tươi, nhiều nước, rất ngọt (Brix 14%), độ chua thấp, hàm lượng vitamin C cao, thơm, giòn, mắt nông, vỏ mỏng, ít xơ, đặc biệt là khả năng bảo quản dài, không bị rám nắng (Akbar *et al.*, 2003; Amar *et al.*, 2015; Danso *et al.*, 2008). Tuy nhiên, diện tích trồng giống dưa MD2 ở Việt Nam còn rất hạn chế do nguồn giống trong nước khan hiếm. Đối với giống dưa MD2 đã có nhiều công bố quốc tế nghiên cứu quy trình nhân giống *in vitro* cho hiệu quả cao. Quy trình của Joy và cộng tác viên (2013) sản xuất được 2.400 cây từ một mẫu mô chồi nách sau 30 tháng. Áp dụng quy trình do Hamid và cộng tác viên (2013) xây dựng có thể nhân được 100 - 200 cây sau 4 đến 6 tháng.

Chính vì tiềm năng và nhu cầu thị trường của giống dưa MD2, nghiên cứu này được thực hiện nhằm bước đầu xây dựng quy trình nhân giống *in vitro* hiệu quả cho giống dưa MD2.

## II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Vật liệu nghiên cứu

Vật liệu đưa vào nuôi cấy *in vitro* là chồi nách giống dưa MD2 được thu thập từ vườn giống lưu giữ tại Nghệ An của Công ty Cổ phần Thực phẩm Nghệ An.

### 2.2. Phương pháp nghiên cứu

#### 2.2.1. Phương pháp bố trí thí nghiệm

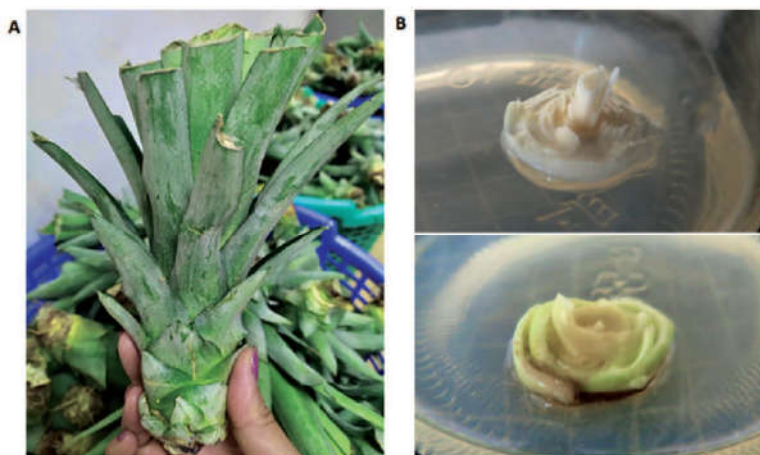
Điều kiện nuôi cấy *in vitro*: Các thí nghiệm

trong nghiên cứu này sử dụng nền môi trường cơ bản MS có bổ sung 7 g/L agar, 30 g/L đường sucrose. Mẫu cấy được nuôi trong điều kiện chiếu sáng 16 giờ sáng/8 giờ tối; nhiệt độ phòng nuôi ổn định 24 - 26°C.

Bố trí thí nghiệm: Các thí nghiệm nuôi cấy *in vitro* được tiến hành với 3 lần lặp, với 20 - 30 mẫu cấy cho mỗi công thức thí nghiệm.

**Thí nghiệm 1. Nghiên cứu phương pháp khử trùng mẫu chồi nách tạo nguồn vật liệu *in vitro*:** Các chồi nách được bóc sạch lá, rửa sạch dưới vòi nước sau đó cho vào bình thủy tinh tiến hành khử trùng mẫu trong tủ cấy vô trùng, riêng thao tác khử trùng bằng HgCl<sub>2</sub> được thực hiện trong tủ hút khí độc. Lắc nhẹ qua cồn 70 độ trong thời gian 1 - 2 phút, rồi khử trùng bằng javel 2,5% hoặc 0,1% HgCl<sub>2</sub>. Tráng bằng nước cất vô trùng nhiều lần cho đến khi sạch hóa chất. Tiến hành thí nghiệm trên 7 công thức khử trùng như sau: CT1: javel 2,5% trong 20 phút; CT2: javel 2,5% trong 30 phút; CT3: javel 2,5% trong 40 phút; CT4: HgCl<sub>2</sub> 0,1% trong 7 phút; CT5: HgCl<sub>2</sub> 0,1% trong 10 phút; CT6: HgCl<sub>2</sub> 0,1% trong 7 + 8 phút; CT7: HgCl<sub>2</sub> 0,1% trong 10 + 10 phút. Xử lý mẫu bổ sung với dung dịch thuốc diệt nấm Ridomil Gold 0,3% 30 phút và nuôi trong môi trường có bổ sung kháng sinh cefotaxime 500 mg/L. Sau khi khử trùng bổ mẫu thành miếng nhỏ dày 2 - 3 cm có chứa mắt ngủ (Hình 1), cấy vào môi trường MS (Murashige and Skoog, 1962).

Sau một tuần, tiến hành đánh giá tỷ lệ mẫu sạch bệnh, tỷ lệ mẫu sống. Tỷ lệ vào mẫu (%) = (Tỷ lệ mẫu sạch bệnh × Tỷ lệ mẫu sống) × 100.



**Hình 1.** Chồi nách sử dụng làm vật liệu nuôi cấy *in vitro*

Ghi chú: A: Vật liệu trước khi khử trùng; B: vật liệu sau khi khử trùng.

**Thí nghiệm 2. Nghiên cứu tối ưu môi trường bột chồi in vitro:** Những mẫu cấy được khử trùng thành công, vẫn còn xanh, sẽ được cắt bỏ những đoạn bị dập ở đầu vết cắt. Sau đó chuyển mẫu sang môi trường MS có chất điều tiết sinh trưởng BAP để kích thích phát sinh chồi từ mắt ngủ. Năm công thức môi trường bổ sung BAP sử dụng trong thí nghiệm gồm: CT1: 2 mg/L; CT2: 3 mg/L; CT3: 4 mg/L; CT4: 5 mg/L. Sau 4 tuần nuôi cấy tiến hành đánh giá tỷ lệ mẫu bột chồi, thời gian bắt đầu bột chồi và chất lượng chồi.

**Thí nghiệm 3. Nghiên cứu tối ưu môi trường nhân nhanh chồi trực tiếp:** Sử dụng chồi in vitro phát triển từ mắt ngủ. Tiến hành tách chồi khỏi phần thân cũ và cấy vào môi trường nhân nhanh chồi trực tiếp có bổ sung các chất điều tiết sinh trưởng BAP và NAA. Các công thức thí nghiệm bố trí như sau: CT1: 2 mg/L BAP; CT2: 3 mg/L BAP; CT3: 4 mg/L BAP; CT4: 5 mg/L BAP; CT5: 0,5 mg/L NAA + BAP (theo kết quả tốt nhất của 4 công thức đầu); CT6: 1 mg/L NAA + BAP (theo kết quả tốt nhất của 4 công thức đầu). Sau 4 tuần tiến hành đánh giá hệ số nhân chồi và chất lượng chồi.

**Thí nghiệm 4: Nghiên cứu tối ưu môi trường ra rễ tạo cây in vitro hoàn chỉnh:** Sau giai đoạn nhân nhanh chồi, tiến hành tách chồi đơn, lựa chọn các chồi in vitro đồng đều về chiều cao và cấy chuyển sang môi trường ra rễ kéo dài chồi có bổ sung NAA với các nồng độ: CT1: 0,5 mg/L; CT2: 1 mg/L; CT3: 1,5 mg/L; CT4: 2 mg/L. Sau 6 tuần tiến hành đánh giá tỷ lệ mẫu ra rễ, số rễ, chất lượng rễ và hình thái cây như chiều cao cây, số lá, chất lượng cây.

## 2.2.2. Phương pháp xử lý số liệu

Xử lý số liệu trên Excel và phân tích ANOVA bằng phần mềm IBM SPSS Statistics để kiểm định sự khác biệt giữa các công thức thí nghiệm.

## 2.3. Thời gian và địa điểm nghiên cứu

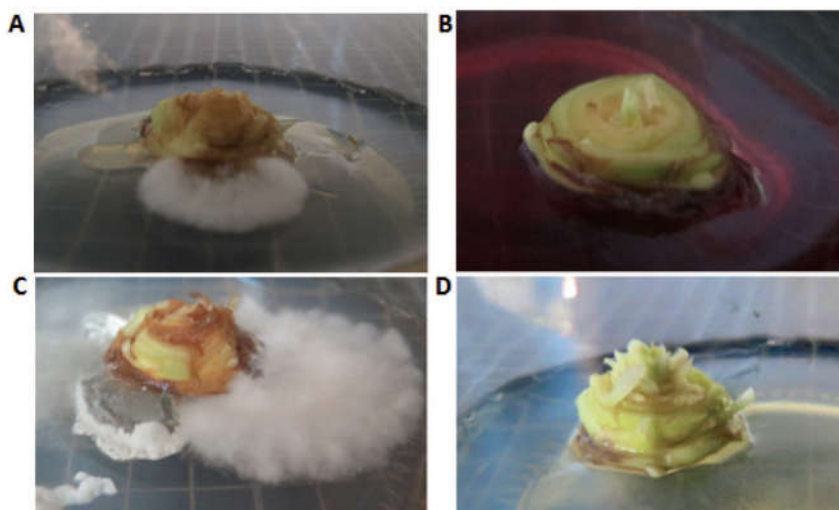
Nghiên cứu được tiến hành từ tháng 7 năm 2021 đến tháng 6 năm 2022 tại Phòng thí nghiệm trọng điểm Công nghệ tế bào thực vật, Viện Di truyền Nông nghiệp.

## III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### 3.1. Ảnh hưởng của chất khử trùng và thời gian khử trùng đến hiệu quả vào mẫu

Giai đoạn vào mẫu được đánh giá rất khó khăn do đặc tính thực vật của cây dưa, lại canh tác ngoài đồng ruộng trong thời gian dài nên mẫu chồi dưa mang nguồn nấm, vi khuẩn tiềm ẩn ở các lớp mô tế bào bên trong. Việc tăng hiệu quả vào mẫu là cơ sở quan trọng để phát triển hệ thống nhân giống quy mô công nghiệp.

Ở cả 7 công thức khử trùng nghiên cứu đều cho tỷ lệ mẫu nhiễm 100%. Sau 2 - 3 ngày khử trùng, nấm và vi khuẩn phát triển mạnh, thậm chí sau khi vào mẫu được 10 ngày một số mẫu vẫn bị nhiễm nấm (Hình 2). Vì vậy chúng tôi tiến hành xử lý thêm thuốc diệt nấm Ridomil Gold 3 g/L trong 30 phút trước khi khử trùng bằng javel hoặc  $HgCl_2$ . Các mẫu sau khi khử trùng được cấy trên môi trường có bổ sung 500 mg/L kháng sinh cefotaxime.



**Hình 2.** Mẫu dưa MD2 bị nhiễm vi sinh vật

Ghi chú: A: nấm; B: vi khuẩn; C: cả nấm và vi khuẩn; D: mẫu sạch.

Kết quả (Bảng 1) cho thấy, mẫu chồi nách dứa MD2 được khử trùng bằng dung dịch javel 2,5% trong 40 phút (CT3), dung dịch HgCl<sub>2</sub> 0,1% trong 15 phút (CT6) và 20 phút (CT7) cho tỷ lệ mẫu sạch bệnh đạt cao (trên 80%). Tuy nhiên, tỷ lệ mẫu sống

ở CT3 và CT7 thấp (lần lượt là 56,78% và 67,69%), ghi nhận CT6 cho kết quả tốt nhất, đạt trên 90%. Tỷ lệ vào mẫu ở CT6 cũng cao nhất, đạt 73,02%, có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với các công thức còn lại.

**Bảng 1.** Ảnh hưởng của chất khử trùng và thời gian khử trùng đến tỷ lệ vào mẫu chồi nách của giống dứa MD2

Công thức	Thời gian khử trùng (phút)			Cefotaxime (mg/L)	Tổng số mẫu cấy	Tỷ lệ mẫu sạch bệnh (%)	Tỷ lệ mẫu sống (%)	Tỷ lệ vào mẫu (%)
	Ridomil Gold 0,3%	Javel 2,5%	HgCl <sub>2</sub> 0,1%					
CT1	30	20	-	500	128	54,76 ± 3,45 <sup>cd</sup>	90,42 ± 3,87 <sup>a</sup>	49,14 ± 1,4 <sup>c</sup>
CT2	30	30	-	500	130	61,88 ± 1,99 <sup>c</sup>	73,41 ± 3,8 <sup>b</sup>	45,42 ± 2,84 <sup>c</sup>
CT3	30	40	-	500	128	87,56 ± 0,92 <sup>ab</sup>	56,78 ± 3,93 <sup>c</sup>	49,71 ± 3,4 <sup>c</sup>
CT4	30	-	7	500	129	53,69 ± 4,6 <sup>cd</sup>	96,08 ± 1,6 <sup>a</sup>	51,84 ± 5,19 <sup>bc</sup>
CT5	30	-	10	500	196	51,45 ± 3,39 <sup>d</sup>	94,93 ± 2,27 <sup>a</sup>	48,63 ± 2,81 <sup>c</sup>
CT6	30	-	15	500	161	80,36 ± 1,82 <sup>b</sup>	90,83 ± 2,14 <sup>a</sup>	73,02 ± 2,68 <sup>a</sup>
CT7	30	-	20	500	120	90,03 ± 1,22 <sup>a</sup>	67,69 ± 3,68 <sup>b</sup>	60,96 ± 3,47 <sup>b</sup>

Ghi chú: Trong cùng một cột, các chữ cái khác nhau thể hiện sự sai khác có ý nghĩa thống kê với  $p < 0,05$ .

### 3.2. Ảnh hưởng của nồng độ BAP đến khả năng bật chồi

Kết quả nghiên cứu cho thấy, tất cả các mẫu cấy đều phát sinh chồi, tức là tỷ lệ bật chồi đạt 100%. Các chồi hình thành đều có hình thái rõ ràng, phát triển bình thường (Hình 3). Số lượng chồi phát sinh trên một mẫu cấy phụ thuộc vào số lượng mắt

ngủ ban đầu. Đánh giá thấy sự khác biệt giữa các công thức thí nghiệm là ở thời gian bắt đầu bật chồi (Bảng 2). Ở công thức đối chứng không bổ sung BAP (CT1), chồi bắt đầu nảy sau 27,97 ngày. Ở các công thức thí nghiệm có bổ sung BAP, thời gian để bắt đầu bật chồi giảm khoảng 10 - 12 ngày.

**Bảng 2.** Ảnh hưởng của nồng độ BAP đến khả năng bật chồi giống dứa MD2

Công thức thí nghiệm	BAP (mg/L)	Tổng số mẫu cấy	Số mẫu bật chồi	Thời gian bắt đầu bật chồi (ngày)	Chất lượng chồi
CT1	0	93	93	27,97 ± 0,19 <sup>c</sup>	++
CT2	2	102	102	18,15 ± 0,16 <sup>b</sup>	++
CT3	3	90	90	16,17 ± 0,26 <sup>a</sup>	++
CT4	4	89	89	15,90 ± 0,25 <sup>a</sup>	++
CT5	5	96	96	15,63 ± 0,25 <sup>a</sup>	++

Ghi chú: “+”: chồi biến dạng, hoặc phát triển kém, hoặc có hiện tượng thủy tinh thể; “++”: hình thái chồi rõ ràng, phát triển bình thường; Trong cùng một cột, các chữ cái khác nhau thể hiện sự sai khác có ý nghĩa thống kê với  $p < 0,05$ .



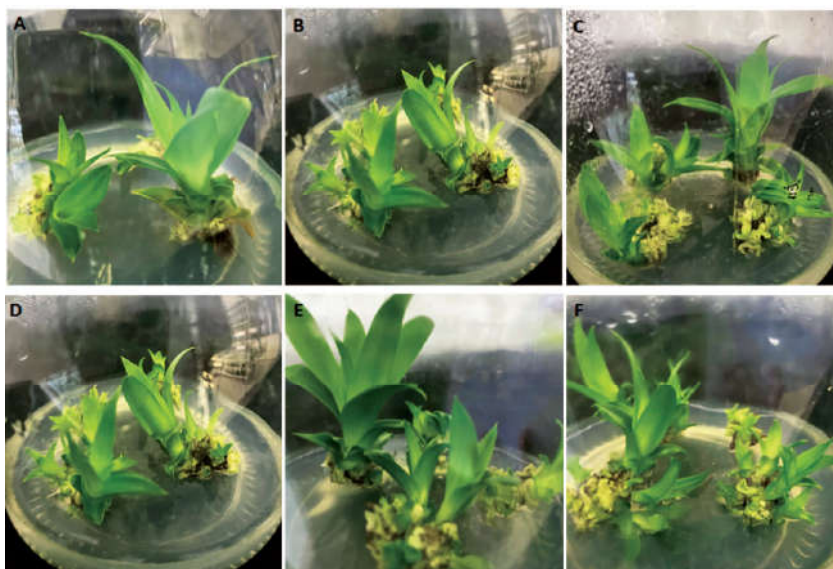
**Hình 3.** Chồi phát triển từ mắt ngủ sau 4 tuần nuôi cấy

Thời gian bắt đầu bật chồi khi bổ sung 2 mg/L BAP (CT2) là 18,15 ngày, khi bổ sung 3 mg/L BAP (CT3) là 16,17 ngày. Tuy nhiên, khi tiếp tục tăng nồng độ BAP lên 4 - 5 mg/L không thấy có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê so với CT3 về thời gian bật chồi. Bên cạnh đó, việc bổ sung nồng độ cytokinin cao trong thời gian nuôi cấy dài dễ gây ra hiện tượng biến dị (Akdemir *et al.*, 2016), cho nên trong nhân giống bằng phương pháp nuôi cấy mô thường ưu tiên bổ sung các chất điều tiết sinh trưởng ở nồng độ thấp. Như vậy, sử dụng BAP với nồng độ 3 mg/L là phù hợp nhất để bật chồi hiệu quả cho giống dưa MD2.

### 3.3. Ảnh hưởng của các chất điều tiết sinh trưởng đến hiệu quả nhân chồi trực tiếp

Nhiều nghiên cứu cho thấy, trong số các chất

điều tiết sinh trưởng phổ biến nhóm cytokinin (BAP, Kinetin) và auxin (NAA và IBA), đối với dưa MD2 sự kết hợp BAP và NAA cho hiệu quả nhân chồi trực tiếp tốt nhất (Ab Rahman *et al.*, 2021; Danso *et al.*, 2008; Hamid *et al.*, 2013). Đánh giá ảnh hưởng của các nồng độ BAP và NAA khác nhau đến hiệu quả nhân chồi trực tiếp cho thấy, chất lượng chồi ở tất cả các công thức đều có hình thái rõ ràng, phát triển bình thường (Hình 4). Kết quả tổng hợp tại bảng 3 cho thấy, ở CT1, môi trường bổ sung 2 mg/L BAP cho hệ số nhân chồi 3,04. Khi tăng nồng độ BAP lên 3 mg/L (CT2), hệ số nhân chồi tăng lên 3,67. Tuy nhiên khi tiếp tục tăng nồng độ BAP lên 4 mg/L và 5 mg/L, hệ số nhân chồi không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê so với CT2 ở nồng độ BAP 3 mg/L. Như vậy, sử dụng BAP với nồng độ 3 mg/L là tối ưu hơn cả.



Hình 4. Mẫu dưa MD2 nuôi cấy trong các công thức môi trường nhân nhanh chồi

Ghi chú: A: CT1; B: CT2; C: CT3; D: CT4; E: CT5; F: CT6.

Bảng 3. Ảnh hưởng của nồng độ BAP và NAA đến khả năng nhân nhanh trực tiếp chồi giống dưa MD2

Công thức thí nghiệm	Chất điều tiết sinh trưởng (mg/L)		Tổng số mẫu cây	Tổng số chồi	Hệ số nhân chồi	Chất lượng chồi
	BAP	NAA				
CT1	2	-	111	338	3,04 ± 0,04 <sup>d</sup>	++
CT2	3	-	115	469	3,67 ± 0,07 <sup>c</sup>	++
CT3	4	-	102	414	4,05 ± 0,04 <sup>c</sup>	++
CT4	5	-	104	418	4,02 ± 0,06 <sup>c</sup>	++
CT5	3	0,5	102	438	4,29 ± 0,05 <sup>b</sup>	++
CT6	3	1	98	437	4,47 ± 0,05 <sup>a</sup>	++

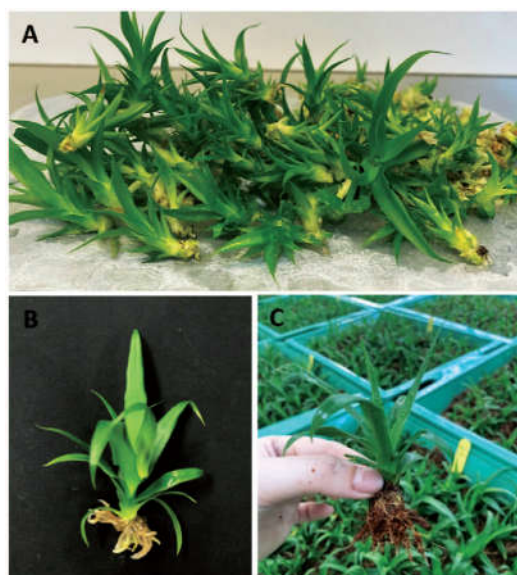
Ghi chú: "+": Chồi biến dạng, hoặc phát triển kém, hoặc có hiện tượng thủy tinh thể; "++": Hình thái chồi rõ ràng, phát triển bình thường; Trong cùng một cột, các chữ cái khác nhau thể hiện sự sai khác có ý nghĩa thống kê với  $p < 0,05$ .

Sau khi xác định được nồng độ BAP tối ưu, tiến hành thí nghiệm bổ sung thêm NAA để quan sát ảnh hưởng của NAA đến khả năng nhân nhanh chồi dứa MD2. Hai công thức thí nghiệm CT5 và CT6 có bổ sung thêm NAA đều cho hệ số nhân chồi cao hơn so với môi trường chỉ bổ sung BAP (Hình 4E, F). Trong đó, môi trường nuôi cấy có bổ sung kết hợp 3 mg/L BAP và 1 mg/L NAA (CT6) cho hệ số nhân chồi cao nhất, đạt 4,47 chồi, khác biệt có ý nghĩa thống kê so với công thức CT5. Nồng độ BAP và NAA kết hợp cũng tương tự như kết quả ghi nhận trong nghiên cứu của Hamid và cộng tác viên (2013).

### 3.3. Ảnh hưởng của nồng độ NAA đến khả năng ra rễ và tạo cây hoàn chỉnh

Không quan sát thấy sự hình thành rễ ở những chồi cấy trên môi trường MS không có NAA. Khi bổ sung NAA ở nồng độ từ 0,5 - 2 mg/L đều cho khả năng ra rễ và tạo cây hoàn chỉnh tốt, chồi mập, hình thái cây phát triển bình thường (Hình 4). Kết quả nghiên cứu cho thấy không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa các công thức về tỷ lệ cây ra

rễ (98,67 - 100%), chiều cao cây (8,05 - 8,47 cm) và số lá (10,51 - 11,05 lá) (Bảng 4).



**Hình 4.** A: Tách chồi đơn để chuyển sang môi trường ra rễ; B: cây con sau 6 tuần nuôi cấy trên môi trường ra rễ; C: cây con sau 2 tuần huấn luyện ngoài vườn ươm

**Bảng 4.** Ảnh hưởng của NAA đến khả năng ra rễ và tạo cây dứa MD2 hoàn chỉnh

Công thức thí nghiệm	NAA (mg/L)	Tổng số mẫu cấy	Tỷ lệ ra rễ (%)	Số rễ/ cây	Chiều dài rễ (cm)	Chiều cao cây (cm)	Số lá/cây
CT1	0,5	66	98,67 ± 1,33 <sup>a</sup>	11,02 ± 0,36 <sup>c</sup>	1,4 ± 0,04 <sup>a</sup>	8,05 ± 0,14 <sup>a</sup>	11,04 ± 0,2 <sup>a</sup>
CT2	1	69	100 ± 0 <sup>a</sup>	15,57 ± 0,57 <sup>b</sup>	1,18 ± 0,06 <sup>b</sup>	8,39 ± 0,14 <sup>a</sup>	11,05 ± 0,27 <sup>a</sup>
CT3	1,5	60	100 ± 0 <sup>a</sup>	17,86 ± 0,68 <sup>a</sup>	0,94 ± 0,04 <sup>c</sup>	8,47 ± 0,13 <sup>a</sup>	11,04 ± 0,2 <sup>a</sup>
CT4	2	63	100 ± 0 <sup>a</sup>	19,28 ± 0,96 <sup>a</sup>	0,66 ± 0,04 <sup>d</sup>	8,07 ± 0,14 <sup>a</sup>	10,51 ± 0,25 <sup>a</sup>

Ghi chú: Trong cùng một cột, các chữ cái khác nhau thể hiện sự sai khác có ý nghĩa thống kê với  $p < 0,05$ .

Khi hàm lượng NAA tăng thì số rễ phát sinh cũng tăng, từ 11,02 rễ ở CT1 tăng lên đến 19,28 rễ ở CT4. Số rễ tăng nhanh khi tăng nồng độ NAA từ 0,5 mg/L lên 1 mg/L, cụ thể là từ 11,02 rễ tăng lên 15,57 rễ, sau đó tăng dần ở nồng độ 1,5 - 2 mg/L nhưng không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa hai nồng độ này (CT3 và CT4). Ngược lại, chiều dài rễ lại giảm dần khi bổ sung NAA với hàm lượng tăng dần, giảm từ 1,4 cm ở CT1 xuống còn 0,66 cm ở CT4. Điều này là do giai đoạn kéo dài rễ rất mẫn cảm với nồng độ auxin và môi trường nuôi cấy có nồng độ auxin cao gây ức chế sự kéo dài và sinh trưởng của rễ (Abdulmalik *et al.*, 2013; Baker and Wetzstein, 1994). Ở tất cả các công thức thí nghiệm, rễ phát sinh đều to mập và khỏe mạnh.

Như vậy, môi trường MS có bổ sung 1 mg/L NAA (CT2) là môi trường thích hợp cho khả năng ra rễ, tạo cây hoàn chỉnh của dứa MD2.

## IV. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

### 4.1. Kết luận

Tối ưu được phương pháp tạo chồi và nhân nhanh chồi trực tiếp từ mắt ngủ của chồi nách giống dứa MD2. Thực hiện phương pháp khử trùng mẫu chồi nách theo các bước chính sau: (1) Xử lý mẫu với chất diệt nấm Ridomil Gold 0,3% trong 30 phút; (2) khử trùng với HgCl<sub>2</sub> 0,1% trong thời gian 15 phút (chia làm 2 lần 7 phút + 8 phút), tráng bằng nước cất vô trùng nhiều lần cho đến khi

mẫu sạch; (3) mẫu sau khi khử trùng được cấy lên môi trường MS có bổ sung 500 mg/L cefotaxime. Khả năng bật chồi tốt nhất trên môi trường nuôi cấy MS có bổ sung 3 mg/L BAP. Môi trường nuôi cấy MS bổ sung BAP 3 mg/L và NAA 1 mg/L thích hợp để nhân nhanh chồi dứa MD2 trực tiếp từ chồi ngủ, với hệ số nhân chồi đạt 4,47. 1 mg/L NAA bổ sung vào môi trường MS thích hợp để ra rễ, tạo cây hoàn chỉnh.

#### 4.2. Đề nghị

Xây dựng tiêu chuẩn cây dứa MD2 xuất bình và phương pháp huấn luyện cây ngoài vườn ươm để hoàn thiện quy trình vi nhân giống cho giống dứa MD2 bằng phương pháp nhân chồi trực tiếp.

#### LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được thực hiện trong khuôn khổ đề tài “Nghiên cứu xây dựng hệ thống nhân giống bằng phương pháp nuôi cấy mô tế bào cho một số cây ăn quả nhằm cung cấp nguồn giống sạch bệnh cho sản xuất”, thuộc Nhiệm vụ nghiên cứu thường xuyên theo chức năng của Phòng thí nghiệm trọng điểm Công nghệ tế bào thực vật, Viện Di truyền Nông nghiệp, năm 2021 - 2022.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Ab Rahman, N.A., Abdul Latif, N., Udin, E.Z., Awal, A., Shamsiah, A., 2021. *In vitro* regeneration and acclimatization of pineapple (*Ananas comosus* L. Merr.var. MD2). *Food Research*, 4: 164-172.
- Abdulmalik, M., Usman, I., Olarewaju, J., Aba, D., 2013. Effect of Naphthalene Acetic Acid (NAA) on *in vitro* rooting of regenerated microshoots of groundnut (*Arachis hypogaea* L.). *Bayero Journal of Pure and Applied Sciences*, 5: 128-131.
- Acland, J.D., 1971. *East African crops: An introduction the production of field and plantation crop in Kenya, Tanzania and Uganda*. FAO of the UN. ed. FAO/Longman, UN.
- Akbar, M.A., Karmakar, B.K., Roy, S.K., 2003. Callus Induction and High-Frequency Plant Regeneration of Pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merr.). *Plant Tissue Culture*, 13: 109-116.
- Akdemir, H., Suzerer, V., Tilkat, E., Onay, A., Çiftçi, Y.O., 2016. Detection of Variation in Long-Term Micropropagated Mature Pistachio via DNA-Based Molecular Markers. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 180: 1301-1312.
- Amar, A.T., Tong, P.S., Casey, N., 2015. The MD2 “Super Sweet” pineapple (*Ananas comosus*). *UTAR Agriculture Science Journal*, 1: 14-17.
- Baker, C.M., Wetzstein, H.Y., 1994. Influence of auxin type and concentration on peanut somatic embryogenesis. *Plant Cell, Tissue Organ Culture*, 36: 361-368.
- Cuenca, B., Ballester, A., Vieitez, A.M., 2000. *In vitro* adventitious bud regeneration from internode segments of beech. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 60: 213-220.
- Danso, K.E., Ayeh, K.O., Oduro, V., Amiteye, S., Amoatey, H.M., 2008. Effect of 6-benzylaminopurine and -naphthalene acetic acid on *in vitro* production of MD2 pineapple planting materials. *World Applied Sciences Journal*, 3 (4): 614-619.
- Dewald, M.G., Moore, G.A., Sherman, W.B., Eans, M.H., 1988. Production of pineapple plant *in vitro*. *Plant cell Reports*, 7: 535-537.
- Drew, R.A., 1980. Pineapple tissue culture-unequalled for rapid multiplication. *Queensland Agricultural Journal*, 106: 447-451.
- Escalona, M., Lorenzo, J.C., Gonzalez, B., Daquinta, M., Gonzalez, J., Desjardins, J., Borroto, C.G., 1999. Pineapple (*Ananas comosus* L. Merr) micropropagation in temporary immersion systems. *Plant Cell Reports*, 18: 743-748.
- Hamid, N.S., Bukhori, M.F.M., Jalil, M., 2013. Direct and indirect plant regenerations of pineapple var. MD2. *Malaysian Society of Applied Biology*, 42: 61-66.
- Joy, P.P., Anjana, R., Prince Jose, 2013. Protocol for micropropagation of pineapple (MD-2), Annual Research and Development Report for 2012-13. Pineapple Research Station (Kerala Agricultural University), India.
- Khatun, M.M., Khanam, D., Hoque, M.A., Quasem, A., 1997. Clonal propagation of pineapple through tissue culture. *Plant Tissue Culture*, 7: 143-148.
- Medina, J.D.C., Garcia, H.S., 2005. Pineapple: post-harvest operations, in: *Post-Harvest Compendium*. FAO, UN, pp. 1-38.
- Morton, J.F., 1987. Pineapple, in: *Fruits of Warm Climates*. University of Miami, US, pp. 18-28.
- Murashige, T., Skoog, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Plant Physiology*, 15: 473-497.
- Radha, T., Mathew, L., 2007. *Fruit crops*. Peter K.V. ed, Horticultures science series - 3. New India.
- Rahman, K.W., Amin, M.N., Azad, M.A.K., 2001. *In vitro* rapid propagation of pineapple, *Anana comosus* (L.) Menn. *Plant Tissue Culture*, 11: 47-53.
- Rahman, Z.A., Abbas, H., Othman, A.N., Sembok, W.Z.W., 2019. Influence of agitation rate on the growth of MD2 pineapple protocorm-like bodies and

- shoots in liquid-shake culture. *American Journal of Plant Sciences*, 10: 1233-1238.
- Roy, S.K., Rahman, M., Hauque, S., 2000. *Mass Propagation of Pineapple through in Vitro Culture, in: Transplant Production in the 21<sup>st</sup> Century*. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, pp. 279-283.
- Sha Valli Khan, P.S., Prakash, E., Rao, K.R., 2002. Callus induction and plantlet regeneration in *Bixa oreliana* L., an annatto-yielding tree. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 38: 186-190.
- Vuylsteke, D., Swennen, R., Wilson, G.F., De Langhe, E.A.L., 1988. Phenotypic variation among *in vitro* propagated plantain (Musasp/CV AAB). *Scientia Horticulturae*, 36: 79-88.
- Zepeda, C., Sagawa, Y., 1981. In Vitro Propagation of Pineapple. *HortScience*, 16: 495.

## Direct regeneration and *in vitro* propagation of MD2 pineapple variety

Hoang Thi Giang, Truong Thu Lan, Bui Thi Minh,  
Nguyen Thi Hong Nhung, Phung Thi Phuong Nhung

### Abstract

This study was carried out to optimize the method of shoot regeneration and rapid multiplication directly from the dormant axillary buds on suckers of the MD2 pineapple variety. Results showed that the explants were effectively sterilized by using fungicide 0.1% mercuric chloride for 15 min and cultured on the medium supplemented with 500 mg/L cefotaxime. The best direct shoot regeneration was observed on MS medium containing 3 mg/L BAP. MS medium supplemented with 3 mg/L BAP and 1 mg/L NAA was suitable for direct shoot multiplication, with a multiplication rate of 4.47. The optimal medium for rooting was MS added with 1 mg/L NAA. This study will be the basis for further studies on efficient micropropagation systems for MD2 pineapple.

**Keywords:** Pineapple (*Ananas comosus* L.), MD2, rapid multiplication, *in vitro*

Ngày nhận bài: 14/11/2022

Ngày phản biện: 28/11/2022

Người phản biện: PGS.TS. Trần Thị Lệ Minh

Ngày duyệt đăng: 28/12/2022

## NGHIÊN CỨU KHẢ NĂNG NHÂN CHỒI CÂY ĐIỀU TỪ MẪU CÀNH NON BẰNG PHƯƠNG PHÁP NUÔI CẤY MÔ

Dương Minh Nga<sup>1</sup>, Lê Thị Như<sup>1</sup>, Phạm Xuân Hội<sup>1</sup>, Nguyễn Thành Đức<sup>1</sup>,  
Phạm Thị Mai<sup>1</sup>, Nguyễn Văn Toàn<sup>1</sup>, Không Ngân Giang<sup>1\*</sup>

### TÓM TẮT

Mục tiêu của nghiên cứu này là đánh giá khả năng nhân chồi *in vitro* từ cành non của giống điều AB0508. Nghiên cứu đã so sánh ảnh hưởng của agar và phytagel kết hợp với chất chống oxy hóa Poly Vinyl Pyrrolidone (PVP) và than hoạt tính để giảm sự hóa nâu do các hợp chất phenolic trong mẫu gây ra. Kết quả cho thấy, sử dụng môi trường nuôi cấy MS, bổ sung đường 30 g/L, Phytagel 2,25%, PVP 1 g/L, nuôi cấy trong điều kiện chiếu sáng 16 giờ với cường độ ánh sáng 45 - 55  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  cho tỷ lệ hóa nâu của mẫu thấp nhất và tỷ lệ sống tốt nhất (27,12%). Các chất điều hòa sinh trưởng thuộc nhóm cytokinin đóng vai trò quan trọng trong việc tạo chồi ở cây điều, trong đó BAP cho hiệu quả cao hơn so với Kinetin và TDZ. Bổ sung 6-Benzyl amino purine (BAP) 4 mg/L đã tạo ra sự hình thành chồi cao nhất (27,24%), giảm nồng độ BAP xuống 2 mg/L đã thúc đẩy sự hình thành chồi mới (3,79 chồi/mẫu).

**Từ khóa:** Cây điều, *in vitro*, nhân chồi, cành non

<sup>1</sup> Viện Di truyền Nông nghiệp, Viện Khoa học Nông nghiệp Việt Nam

\* Tác giả liên hệ, e-mail: ngangiang.khong2010@gmail.com