

NHÂN GIỐNG *IN VITRO* CÂY DỨA CAYENNE (*Ananas comosus* L.) BẰNG NUÔI CẤY TẾ BÀO LỚP MỎNG

*IN VITRO PROPAGATION OF PINEAPPLE (ANANAS COMOSUS L.)
THROUGH THIN CELL LAYER CULTURE.*

Nguyễn Thị Thu Hằng, Mai Minh Trí, Trần Thị Dung
Trung tâm Công nghệ Sinh học Đại học Nông Lâm TP.HCM
Tel: 8961712, Email: ttdung@hcmuaf.edu.vn

SUMMARY

Pineapple micropropagation by using thin cell layer technique was studied. Traverse thin cell layer explants excised from the stem of in vitro plants (var. Smooth Cayenne) were cultured on a modified solid MS medium supplemented with 2,4-D and Kinetin. Maximum regeneration was obtained with 0.1 mg.l⁻¹ 2,4-D and 0.1 mg.l⁻¹ Kinetin as early as within 9 days. The best rooting occurred at 2 mg.l⁻¹ IBA. Plantlets were successfully transferred in the greenhouse.

MỞ ĐẦU

Cây Dứa (*Ananas comosus* L.) là một trong các loại cây ăn quả chủ đạo của ngành rau quả Việt Nam. Ở nước ta, dứa trồng chủ yếu để ăn tươi, cô đặc và làm nước ép đóng hộp xuất khẩu. Giống dứa Cayenne (chiếm > 80% diện tích dứa toàn thế giới) rất phù hợp cho việc chế biến đồ hộp, nhưng nhược điểm chủ yếu của giống này là hệ số nhân chồi thấp. Để cung cấp cho 1 ha dứa cần 50.000 – 60.000 chồi giống thì các phương pháp nhân giống cổ truyền khó có thể tạo ra một số lượng lớn chồi đồng đều cùng lúc. Vì lẽ đó, áp dụng kỹ thuật nhân giống *in vitro* là điều cần thiết để đáp ứng được yêu cầu này.

Tế bào lớp mỏng (TCL_s - Thin cell layers) là một phần có kích thước nhỏ lấy từ các mô thực vật, được cắt theo chiều dọc hay chiều ngang của những cơ quan khác nhau như thân, lá, rễ, cành hành, các bộ phận của hoa... Phương pháp nuôi cấy tế bào lớp mỏng đã được áp dụng vào việc nghiên cứu sự phát sinh hình thái và sự phân hóa phôi sinh dưỡng ở nhiều loại cây với ưu điểm là rút ngắn thời gian tái sinh chồi, tốc độ nhân giống nhanh, có thể nhân giống một số loại cây khó nuôi cấy trong ống nghiệm.

Mục tiêu của đề tài là xác định ảnh hưởng của các chất kích thích sinh trưởng đến khả năng tái sinh, nhân chồi và ra rễ của cây dứa Cayenne *in vitro* qua nuôi cấy tế bào lớp mỏng, nhằm nhân nhanh giống dứa phục vụ cho việc mở rộng các vùng nguyên liệu dứa trong nước.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Thí nghiệm được thực hiện tại Trung tâm Công nghệ Sinh học trường ĐH Nông Lâm TP.HCM từ tháng 8 đến tháng 12/2002.

Các mẫu cấy dùng trong thí nghiệm là chồi dứa *in vitro* được nhân lên từ chồi ngọn giống dứa Cayenne nhập nội lấy tại Nông trường Thọ Vực – Đồng Nai, sử dụng tế bào lớp mỏng của phần thân dày 0,3 - 0,5mm, đường kính 3-5mm. Môi trường nuôi cấy theo MS (Murashige và Skoog, 1962) với các chất kích thích sinh trưởng thay đổi theo từng thí nghiệm.

Các thí nghiệm được bố trí theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên đơn yếu tố, 3 lần lặp lại. Thí nghiệm về khả năng tái sinh chồi dứa gồm 4 nghiệm thức kết hợp 2,4D và Kinetin (mg.l⁻¹) là: 0-0 (đối chứng); 0,05-0,05; 0,1-0,1 và 0,5-0,5 (tổng số mẫu cấy là 180). Thí nghiệm về khả năng ra rễ của chồi dứa gồm 5 nghiệm thức IBA (mg.l⁻¹) là: 0 (đối chứng); 1; 1,5; 2 và 2,5 (tổng số mẫu cấy là 90).

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Ảnh hưởng của nồng độ 2,4D và Kinetin đến khả năng tái sinh chồi *in vitro* từ tế bào lớp mỏng cây dứa Cayenne

Các cytokinin đóng vai trò rất quan trọng trong nuôi cấy mô thực vật, chúng kích thích sự phân chia tế bào, giúp cho sự sinh tạo cơ quan và phân hóa chồi được dễ dàng. Thêm vào đó, sự có mặt của auxin đã thúc đẩy việc phân chia tế bào.

Về thời gian xuất hiện chồi: Ở nồng độ 0,1 - 0,5 mg.l⁻¹ 2,4D và 0,1 - 0,5 mg.l⁻¹ Kinetin, thời gian nảy chồi là sớm nhất (8,6 ngày và 9,3 ngày), giữa chúng có sự khác biệt không có ý nghĩa về mặt thống kê nhưng lại khác biệt rất có nghĩa khi so với đối chứng và nồng độ còn lại.

Về tỷ lệ mẫu tái sinh (bảng 1): Ở nồng độ 0,1mg.l⁻¹ 2,4D và 0,1mg.l⁻¹ Kinetin, số mẫu tế bào lớp mỏng tái sinh cao nhất (89%) và thấp nhất là nghiệm thức đối chứng (58%).

Bảng 1. Ảnh hưởng của nồng độ 2,4D và Kinetin đến khả năng tái sinh chồi *in vitro* từ tế bào lớp mỏng cây dứa Cayenne

Nghiệm thức	Nồng độ(mg.l ⁻¹)		Thời gian nảy chồi (ngày)	Tỷ lệ mẫu tái sinh (%)
	2,4D	Kinetin		
1(ĐC)	0	0	10,7 ^a	58
2	0,05	0,05	9,7 ^b	60
3	0,1	0,1	8,6 ^c	89
4	0,5	0,5	9,3 ^{bc}	82
CV (%)			2,30	6,54

Các giá trị trung bình trên cùng 1 cột theo sau không cùng ký tự thì có sự khác biệt rất có ý nghĩa về mặt thống kê ở mức độ 0,01 dựa trên trắc nghiệm phân hạng LSD.

Bảng 2. Ảnh hưởng của nồng độ 2,4D và Kinetin đến hệ số nhân chồi từ tế bào lớp mỏng cây dứa Cayenne *in vitro*

Nghiệm thức	Nồng độ(mg.l ⁻¹)		Hệ số nhân		
	2,4D	Kinetin	10 ngày	20 ngày	30 ngày
1 (ĐC)	0	0	1,21 ^b	1,22 ^d	2,00 ^c
2	0,05	0,05	1,34 ^b	1,71 ^c	2,39 ^c
3	0,1	0,1	2,34 ^b	3,09 ^a	4,08 ^a
4	0,5	0,5	1,28 ^b	2,56 ^b	3,37 ^b
CV (%)			4,79	7,34	6,09

Bảng 3. Ảnh hưởng của nồng độ IBA đến thời gian ra rễ, số rễ và chiều dài rễ của chồi tái sinh từ tế bào lớp mỏng cây dứa Cayenne *in vitro*

Nồng độ IBA (mg.l ⁻¹)	Chỉ tiêu		
	Thời gian ra rễ (NSC)	Chiều dài rễ (cm)	Số rễ (rễ)
0	6,8 ^{ab}	3,18 ^b	3,45 ^c
1	5,8 ^{bc}	4,26 ^a	4,84 ^b
1,5	5,5 ^c	4,37 ^a	4,84 ^b
2	5,2 ^c	4,49 ^a	5,89 ^a
2,5	7,3 ^a	2,40 ^c	5,84 ^a
CV (%)	6,66	7,38	7,00

Về hệ số nhân chồi (bảng 2): Ở nồng độ 0,1 mg.l⁻¹ 2,4 D và 0,1 mg.l⁻¹ Kinetin, hệ số nhân chồi cao nhất ở tất cả các lần theo dõi (đạt 4,08 chồi/mẫu sau 30 ngày nuôi cấy), có sự khác biệt rất có ý nghĩa về mặt thống kê so với đối chứng và các nồng độ còn lại.

Như vậy, thực hiện nuôi cấy tế bào lớp mỏng trong môi trường có bổ sung nồng độ 2,4 D và Kinetin thích hợp đã xúc tiến quá trình tái sinh chồi rút ngắn thời gian tạo vật liệu ban đầu đồng thời tăng hệ số nhân chồi. Nồng độ 0,1mg.l⁻¹ 2,4D và 0,1mg.l⁻¹ Kinetin cho thời gian xuất hiện chồi sớm nhất, tỉ lệ mẫu tái sinh cao nhất và hệ số nhân cao nhất.

Ảnh hưởng của nồng độ IBA đến sự tạo rễ của chồi tái sinh từ lớp tế bào mỏng cây dứa Cayenne *in vitro* (Bảng 3)

Trong sự hình thành rễ đặc biệt là rễ bất định, auxin có tác dụng rất đặc trưng, sử dụng IBA thuộc nhóm auxin để kích thích ra rễ nhằm cho cây ra rễ sớm, số rễ nhiều từ đó rút ngắn được thời gian tạo rễ trong ống nghiệm trước khi đem ra ngoài vườn ươm.

Về thời gian ra rễ: Nồng độ IBA = 2 mg.l⁻¹ cho thời gian xuất hiện rễ sớm nhất (5,2 ngày), có sự khác biệt rất có ý nghĩa về mặt thống kê so với đối chứng nhưng sự khác biệt không có ý nghĩa khi so với nồng độ IBA=1,5 mg.l⁻¹ và IBA = 1 mg.l⁻¹. Nồng độ IBA = 2,5 mg.l⁻¹ cho thời gian ra rễ chậm nhất (7,3 ngày).

Bảng 4. Ảnh hưởng của các phương pháp cấy đến thời gian xuất hiện chồi và hệ số nhân chồi cây dứa Cayenne *in vitro*

Phương pháp nuôi cấy	Môi trường thích hợp	Thời gian xuất hiện chồi (ngày)	Hệ số nhân chồi (chồi/mẫu cấy)	Tổng số chồi/chồi đơn
Chồi đơn có hủy đỉnh	MS+BA (2mg.l ⁻¹)	13,7	11,00	11,00 (*)
Chồi đơn không hủy đỉnh	MS+BA (3mg.l ⁻¹)	20,8	3,78	3,78 (*)
Tế bào lớp mỏng	MS+2,4D(0,1mg.l ⁻¹) +Kinetin(0,1mg.l ⁻¹)	8,6	4,08	20,40 (**)

(*). sau 60 ngày nuôi cấy

(**). sau 30 ngày nuôi cấy

Về chiều dài rễ: Nồng độ IBA = 1,5-2 mg.l⁻¹ cho chiều dài rễ dài nhất (4,26- 4,49cm), sự khác biệt này không có ý nghĩa về mặt thống kê nhưng rất có ý nghĩa khi so sánh với đối chứng. Nồng độ IBA = 2,5 mg.l⁻¹ cho chiều dài rễ ngắn nhất (2,40 cm).

Về số rễ: Nồng độ IBA = 2-2,5 mg.l⁻¹ cho số rễ nhiều nhất (5,84 -5,87 rễ), sự khác biệt này không có ý nghĩa về mặt thống kê nhưng rất có ý nghĩa khi so sánh với đối chứng.

Ảnh hưởng của nồng độ IBA rất khác nhau đến thời gian xuất hiện rễ, chiều dài rễ, số rễ của chồi dứa tái sinh từ lớp tế bào lớp mỏng. Khi nồng độ IBA tăng 0-2mg.l⁻¹ thì số rễ tăng, chiều dài rễ tăng nhưng khi nồng độ IBA vượt quá 2 mg.l⁻¹ thì số rễ tăng nhưng chiều dài rễ giảm đáng kể và thời gian ra rễ cũng kéo dài hơn.

Cây dứa *in vitro* ngoài vườn ươm

Sau khi tạo cây dứa Cayenne *in vitro* hoàn chỉnh (cây đạt chiều cao 4-5 cm, 5-6 lá và cây có 4-5 rễ), chúng tôi tiến hành chuyển cây ra vườn ươm trồng thử nghiệm. Điều kiện tự nhiên ngoài nhà lưới hoàn toàn khác hẳn với điều kiện trong nuôi cấy *in vitro* như nhiệt độ cao, ánh sáng mạnh, ẩm độ thấp, và dinh dưỡng thấp nên cây con dễ bị mất nước và mau bị héo. Cây dứa Cayenne *in vitro* đã được trồng trong bầu đất (1/3 đất +1/3xơ dừa +1/3 phân chuồng hoai), đặt vào nhà lưới trong điều kiện có che mát 50% và tưới phun sương thường xuyên. Sau 30 ngày ra bầu đất, tỉ lệ cây sống đạt 70%, trung bình chiều cao đạt 9,5 cm và số lá đạt 11 lá/cây

So sánh phương pháp nuôi cấy chồi đơn và tế bào lớp mỏng cây dứa Cayenne (Bảng 4)

Sự xuất hiện chồi ở phương pháp nuôi cấy tế bào lớp mỏng sớm hơn khi so sánh với phương pháp nuôi cấy chồi đơn cùng được thực hiện trong môi trường nuôi cấy thích hợp của từng loại mẫu cấy. Mặc dù số chồi/lớp tế bào mỏng thấp hơn số chồi/chồi đơn có hủy đỉnh nhưng đoạn thân cây dứa Cayenne *in vitro* sẽ cắt được 5 lớp tế bào mỏng nên tổng số chồi đạt

được cao hơn. Điều đó cho thấy rằng, sử dụng phương pháp nuôi cấy tế bào lớp mỏng thì thu được hệ số nhân chồi cao hơn nuôi cấy chồi đơn và cũng rút ngắn được thời gian tạo chồi từ đó tăng số lần cấy chuyên và tạo ra được số lượng lớn cây đồng đều cùng lúc.

Sự xuất hiện chồi ở phương pháp nuôi cấy tế bào lớp mỏng sớm hơn khi so sánh với phương pháp nuôi cấy chồi đơn Mặc dù số chồi/lớp tế bào mỏng thấp hơn số chồi/chồi đơn có hủy đỉnh nhưng tổng số chồi từ 5 lớp tế bào mỏng của 1chồi đơn thì cao hơn. Điều đó cho thấy rằng, sử dụng phương pháp nuôi cấy tế bào lớp mỏng thì thu được hệ số nhân chồi cao hơn nuôi cấy chồi đơn và cũng rút ngắn được thời gian tạo chồi từ đó tăng số lần cấy chuyên và tạo ra được số lượng lớn cây đồng đều cùng lúc.

KẾT LUẬN

Nuôi cấy tế bào lớp mỏng đã xúc tiến khả năng nhân chồi, rút ngắn thời gian tạo chồi cây dứa Cayenne trong ống nghiệm. Môi trường thích hợp nhất cho việc nuôi cấy tế bào lớp mỏng cây dứa Cayenne là môi trường MS có bổ sung 0,1 mg.l⁻¹ 2,4D và 0,1mg.l⁻¹ Kinetin trong nhân chồi và IBA = 2 mg.l⁻¹ trong tạo rễ, giúp tạo ra được số lượng lớn cây đồng đều trong thời gian ngắn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

BUI VAN LE, DUONG TAN NHUT, 2000. *Thin cell layer morphogenesis in ornamental species*. Biotechnology in Horticultural and Plantation Crops.

NGUYEN QUANG THACH et al., 2001. *Improving micropropagation technology on pineapple by using thin cell layers, apical dominance breaking and hydroponic method*. International workshop on Biology. HaNoi-VietNam, 391-395..

MIGUEL PEDRO GUERRA et al., 2000. *Improving pineapple micropropagation protocol through explant size and medium composition manipulation*. Fruits 56 (143-154). CIRAD, EDP Sciences.