

Vi nhân giống cây dâu tây Mỹ thơm (*Fragaria ananassa* “pajaro”) bằng phương pháp nuôi cấy đỉnh sinh trưởng

Trịnh Ngọc Ái^{1*}, Trần Thị Thúy Liễu¹, Hồ Tuấn Kiệt¹, Thái Nhật Quang¹,
Lê Văn Thức², Nguyễn Minh Hiệp², Nguyễn Tiến Dũng^{3*}

¹Trường Đại học Trà Vinh, 126 Nguyễn Thiện Thành, phường 5, TP Trà Vinh, tỉnh Trà Vinh, Việt Nam

²Viện Nghiên cứu Hạt nhân, Viện Năng lượng Nguyên tử Việt Nam, 59 Lý Thường Kiệt, phường Trần Hưng Đạo, quận Hoàn Kiếm, Hà Nội, Việt Nam

³Trường Đại học Nông Lâm, Đại học Thái Nguyên, xã Quyết Thắng, TP Thái Nguyên, tỉnh Thái Nguyên, Việt Nam

Ngày nhận bài 15/9/2022; ngày chuyển phản biện 18/9/2022; ngày nhận phản biện 11/10/2022; ngày chấp nhận đăng 14/10/2022

Tóm tắt:

Nghiên cứu được thực hiện nhằm đánh giá ảnh hưởng của các nồng độ chất điều hòa sinh trưởng trong vi nhân giống cây dâu tây Mỹ thơm (*Fragaria ananassa* “pajaro”). Mẫu ngó dâu tây Mỹ thơm được khử trùng bằng dung dịch NaOCl với các nồng độ khác nhau (1, 2 và 3%) trong 20 phút. Mẫu đỉnh sinh trưởng được tách ra và nuôi cấy trên môi trường MS (Murashige và Skoog) có chứa 0,3 mg/l BAP (6-benzylaminopurine) trong 8 tuần, sau đó được chuyển sang môi trường nhân chồi MS có chứa BAP (0, 0,1, 0,3 và 0,5 mg/l) và kinetin (6-furfurylaminopurine) mức 0, 0,1, 0,2 và 0,3 mg/l trong sự kết hợp hoặc riêng lẻ. Các mẫu chồi tái sinh sau 6 tuần nuôi cấy được chuyển sang môi trường tạo rễ 1/2 MS có chứa nồng độ NAA (0, 0,1, 0,3, 0,5, 0,7 và 1,0 mg/l) và BAP (0, 0,1, 0,3 và 0,5 mg/l) riêng lẻ hoặc kết hợp. Kết quả cho thấy, khử trùng ở nồng độ 3% NaOCl trong 20 phút cho tỷ lệ mẫu nhiễm thấp nhất (10%) và tỷ lệ tái sinh mẫu cao nhất (80%). Môi trường MS có chứa 0,3 mg/l BAP và 0,1 mg/l kinetin đạt số chồi cao nhất (16,2 chồi/mẫu). Môi trường 1/2 MS có chứa 0,1 mg/l NAA + 0,1 mg/l BAP tạo ra 14,4 rễ/chồi và chiều dài rễ đạt dài nhất (9,1 cm). Ngược lại, mô sẹo được quan sát rõ khi mẫu được nuôi cấy trên môi trường MS có bổ sung nồng độ NAA (0,3-1,0 mg/l) hoặc kết hợp với BAP. Giá thể phân chuồng được ủ hoai với nấm *Trichoderma* và mụn dừa (1:1:1 v/v/v) được xem là phù hợp cho quá trình ra ngôi của giống dâu tây Mỹ thơm.

Từ khóa: dâu tây Mỹ thơm, nuôi cấy đỉnh sinh trưởng, α -naphthaleneacetic acid, 6-benzylaminopurine.

Chỉ số phân loại: 4.6

1. Đặt vấn đề

Cây Dâu tây (*Fragaria ananassa* L.) hay còn gọi là dâu đất, là một chi thực vật hạt kín và loài thực vật có hoa thuộc họ hoa hồng (*Rosaceae*). Dâu tây là loại cây trồng được tiêu thụ phổ biến vì có hương thơm và khả năng kháng oxy hóa cao như pelargonidin, axit ellagic, ellagitannin... [1]. Dâu tây còn là loại trái cây chứa rất ít calo, với nguồn vitamin, khoáng chất dồi dào nên mang lại nhiều lợi ích cho sức khỏe, như làm giảm hàm lượng cholesterol, hạ huyết áp, phòng chống ung thư... [2]. Chính vì vậy, việc phát triển các giống dâu tây được xem là hoạt động hấp dẫn và thu hút nhiều nhà vườn. Giống dâu tây Mỹ thơm được trồng phổ biến do có khả năng thích nghi tốt với điều kiện khí hậu (có khả năng chịu nhiệt lên đến 40°C), có giá trị kinh tế cao, dễ trồng và chăm sóc, ra quả sau 100-120 ngày gieo trồng, cho quả quanh năm, chất lượng quả tốt, năng suất cao.

Dâu tây có thể nhân giống bằng ngó hoặc hạt, tuy nhiên, trồng bằng hạt thì tỷ lệ nảy mầm thấp, cây con tạo ra không đồng đều, thời gian sinh trưởng kéo dài. Đặc biệt là phương pháp nhân giống truyền thống không cung cấp đủ cây giống cho thị trường. S. Karhu và cs (2002) [3] chỉ ra rằng, các cây dâu tây được nhân giống bằng kỹ thuật nuôi cấy mô cho số lượng thân bò nhiều hơn, thời gian nở

hoa dài hơn và năng suất cao hơn so với cây được nhân giống theo phương pháp truyền thống.

Bên cạnh đó, cây dâu tây con dễ bị nhiễm một số bệnh từ cây mẹ, đặc biệt là virus như Strawberry mottle virus (SMoV) và Strawberry mild yellow edge virus (SMYEV), làm ảnh hưởng đến năng suất và chất lượng quả [4]. Một số loài virus làm giảm hơn 80% năng suất cây dâu tây [5]. Vì thế, phương pháp nhân giống truyền thống trở nên không phù hợp trong việc kháng lại các tác nhân gây bệnh.

Nuôi cấy đỉnh sinh trưởng nhằm mục đích loại bỏ vi khuẩn, virus [6], thông qua nuôi cấy đỉnh sinh trưởng, quá trình phân chia tế bào tích cực làm giảm sự phân hóa các mô mạch [7]. Sau khi được tách ra, mô đỉnh sinh trưởng có thể được nuôi cấy và phát triển thành cây hoàn chỉnh, đồng nhất về mặt di truyền và sạch bệnh.

Một trong các yếu tố quan trọng quyết định sự thành công của quá trình vi nhân giống cây dâu tây chính là loại và nồng độ chất điều hòa sinh trưởng được sử dụng [8]. BAP được dùng khá phổ biến trong vi nhân giống cây dâu tây [9, 10]. K.A. Quiroz và cs (2017) [11] cho biết, môi trường nuôi cấy có bổ sung BAP làm gia

*Tác giả liên hệ: Email: ngocai@tvu.edu.vn, dungnt@tuaf.edu.vn

Micropropagation of strawberry (*Fragaria ananassa* “pajaro”) by meristem culture method

Ngoc Ai Trinh^{1*}, Thi Thuy Lieu Tran¹, Tuan Kiet Ho¹,
Nhat Quang Thai¹, Van Thuc Le²,
Minh Hiep Nguyen², Tien Dung Nguyen^{3*}

¹Tra Vinh University, 126 Nguyen Thien Thanh Street, Hamlet 4,
Tra Vinh City, Tra Vinh Province, Vietnam

²Dalat Nuclear Research Institute, Vietnam Atomic Energy Institute,
59 Ly Thuong Kiet Street, Tran Hung Dao Ward, Hoan Kiem District, Hanoi, Vietnam

³Thai Nguyen University of Agriculture and Forestry,
Quyet Thang Commune, Thai Nguyen City, Thai Nguyen Province, Vietnam

Received 15 September 2022; revised 11 October 2022; accepted 14 October 2022

Abstract:

Experiments were carried out to examine the effects of different combinations of plant growth regulators *in vitro* micropropagation of strawberry plants. Specimens were sterilised by a different concentration of sodium hypochlorite - NaOCl (1, 2, and 3%) for 20 mins. A meristem was separated and cultured on Murashige and Skoog (MS) containing 0.3 mg/l BAP for 8 weeks. Initial shoots were transferred to MS with various concentrations of BAP (0, 0.1, 0.3, and 0.5 mg/l) and kinetin (0, 0.1, 0.2, and 0.3 mg/l) in either single or combination. After 6 weeks of culture, the regenerated shoots were transferred on 1/2 MS with different concentrations of NAA (0, 0.1, 0.3, 0.5, 0.7, and 1.0 mg/l) and BAP (0, 0.1, 0.3, and 0.5 mg/l) in either single or combination. The results showed that the lowest percentage of contamination (10%) and the highest percentage of regeneration (80%) response were achieved on MS media by sterilisation with 3% NaOCl for 20 mins. The highest shoot proliferation per explant (16.2 shoots/explant) was reached on MS with 0.3 mg/l BAP plus 0.1 mg/l kinetin. 1/2 MS media with 0.1 mg/l NAA plus 0.1 mg/l BAP induced 14.4 roots per shoot and produced the longest roots (9.1 cm). However, the higher concentration of NAA (0.3-1.0 mg/l) or in combination with BAP resulted in callus formation. The plantlets, thus developed, were hardened and successfully established in soil containing organic fertiliser: Trichoderma: coconut peat (1:1:1 v/v/v).

Keywords: *Fragaria ananassa* “pajaro”, meristem culture, α -naphthaleneacetic acid (NAA), 6-benzylaminopurine (BAP).

Classification number: 4.6

tăng 3-6 chồi/mẫu cấy. Môi trường MS có bổ sung 0,5 mg/l BAP tối ưu cho quá trình tái sinh chồi ở cây dâu tây Sweet Charlie [12]. Bên cạnh đó, kinetin có khả năng gây ra sự tăng sinh của tế bào và quá trình hình thành chồi [13]. Kết quả nghiên cứu của F. Haddadi và cs (2010) [14] cho thấy, cytokinin và auxin đóng vai trò hình thành chồi hoặc rễ. Các chồi được tạo ra từ chồi ngọn giống dâu tây Camarosa trên môi trường MS có bổ sung 2 μ M TDZ và 4 μ M BAP cho số chồi cao nhất (14 chồi/mẫu). Trên môi trường MS có bổ sung 1 μ M NAA hoặc 1 μ M IBA được xem là phù hợp cho quá trình hình thành rễ (6 rễ/mẫu).

Trong nghiên cứu này, chúng tôi tập trung vào ảnh hưởng của nồng độ auxin và cytokin khác nhau (BAP, kinetin và NAA) lên sự tạo chồi và rễ *in vitro* ở cây dâu tây Mỹ thơm. Bên cạnh đó, giá thể phân hữu cơ cũng được đánh giá đến tỷ lệ sống của cây khi ra ngôi nhằm xây dựng được quy trình nhân giống cây dâu tây sạch bệnh.

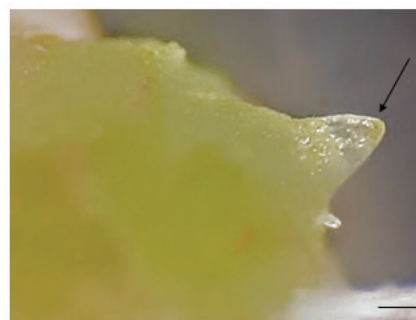
2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.1. Đối tượng

Ngó dâu tây Mỹ thơm từ cây trưởng thành 4-12 tháng tuổi, có chiều dài 10-15 cm được lấy tại Trang trại trồng dâu tây Ichigo, Đà Lạt, Lâm Đồng. Thời điểm thu ngó trước 8 giờ sáng và sau 3 giờ chiều. Ngó sau khi cắt được quấn vào khăn giấy ẩm và bảo quản trong túi nilon để vận chuyển về phòng thí nghiệm và được bảo quản ở nhiệt độ 12°C để phục vụ nghiên cứu.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Ảnh hưởng của nồng độ chất khử trùng NaOCl đến tỷ lệ tái sinh của mẫu cấy: Ngó được rửa sạch dưới vòi nước chảy mạnh trong 2 phút, sau đó lắc đều trong dung dịch xà phòng (1-2 giọt xà phòng trong 100 ml nước) trong 3 phút, tiếp tục rửa dưới vòi nước cho sạch xà phòng rồi rửa lại 3 lần bằng nước cất. Sau đó lắc mẫu trong cồn 70% trong 1 phút, tiếp tục lắc trong dung dịch NaClO (1, 2 và 3%) trong 20 phút và rửa lại 5 lần bằng nước cất vô trùng. Mẫu được cắt bỏ phần thân, giữ lại phần đỉnh phía trên khoảng 1-2 cm. Mẫu được đặt dưới kính hiển vi soi nổi, sau đó dùng panke và dao cắt để loại bỏ lá bao phủ bên ngoài cho đến khi gặp mô phân sinh (đỉnh sinh trưởng có hình dạng má vòm - hình 1). Sau đó, dùng dao mổ cắt theo góc và đỉnh sinh trưởng rồi đặt vào môi trường MS có bổ sung 0,3 mg/l BAP, 30 g/l sucrose, 9 g/l agar, pH 5,8.



Hình 1. Mẫu đỉnh sinh trưởng được tách từ ngó dâu tây Mỹ thơm.

Ảnh hưởng của nồng độ BAP và kinetin lên khả năng nhân chồi: Mẫu đỉnh sinh trưởng tái sái sinh sau 8 tuần sẽ được chuyển sang môi trường MS có bổ sung 30 g/l sucrose, 9 g/l agar, BAP (0, 0,1, 0,3 và 0,5 mg/l) và kinetin (0, 0,1, 0,2 và 0,3 mg/l) trong sự kết hợp hoặc riêng lẻ, pH 5,8. Thí nghiệm được bố trí 3 lần lặp lại, mỗi lần lặp lại chứa 12 mẫu cấy. Sau 6 tuần nuôi cấy tiến hành thống kê các chỉ tiêu:

- Số chồi trung bình (chồi/mẫu): Tổng số chồi tái sinh/số mẫu nuôi cấy.
- Chiều cao trung bình chồi (cm): Dùng thước đo từ cổ đến chóp lá cao nhất của cây.
- Số lá trung bình (lá): Đếm tổng số lá trên thân tính từ lá thật đầu tiên đến lá ngọn còn xanh.

Ảnh hưởng của nồng độ NAA và BAP lên khả năng tạo rễ: Chồi sau 6 tuần tái sinh (5-6 lá) được chuyển sang môi trường tạo rễ 1/2 MS có bổ sung 30 g/l đường, 9 g/l agar, NAA (0, 0,1, 0,3, 0,5, 0,7 và 1,0 mg/l) và BAP (0, 0,1, 0,3 và 0,5 mg/l) riêng lẻ hoặc kết hợp, pH 5,8. Thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên với 3 lần lặp lại, mỗi lần lặp lại chứa 12 mẫu cấy. Sau 6 tuần nuôi cấy tiến hành thống kê các chỉ tiêu:

- Số rễ trung bình/mẫu (rễ): Tổng số rễ/số mẫu nuôi cấy.
- Chiều dài trung bình rễ (cm): Đo từ cổ rễ đến đỉnh sinh trưởng của chóp rễ dài nhất.
- Chiều cao trung bình cây (cm): Dùng thước đo từ cổ rễ đến chóp lá cao nhất của cây.
- Số lá trung bình (lá): Đếm tổng số lá trên thân tính từ lá thật đầu tiên đến lá ngọn còn xanh.

Đánh giá khả năng sống: Cây con nuôi cấy trên môi trường ra rễ sau 8 tuần được dùng để ra ngôi. Bịch cây mô được đặt ở nhiệt độ phòng trong 7 ngày trước khi trồng vào giá thể. Cây dâu tây Mỹ thơm có khoảng 10 rễ, chiều cao cây trung bình 4-5 cm, khoảng 10 lá thật thì được chuyển sang nhà lưới để thích nghi với điều kiện bên ngoài trong 3-4 ngày. Cây được trồng vào giá thể phân hữu cơ (phân chuồng được ủ hoai với nấm Trichoderma và mụn dừa theo tỷ lệ 1:1:1 v/v/v trước khi sử dụng). Theo dõi và thống kê tỷ lệ sống của cây sau 4 tuần ra ngôi. Tỷ lệ sống (%) được tính bằng số cây sống/tổng số cây.

2.3. Điều kiện thí nghiệm

Thí nghiệm được thực hiện trong phòng nuôi cấy mô tế bào thực vật. Môi trường được khử trùng bằng nồi autoclave ở nhiệt độ 121°C, thời gian 20 phút, áp suất 1 atm. Nhiệt độ phòng nuôi cấy là 22-25°C. Cường độ chiếu sáng là 1500-2000 lux. Thời gian chiếu sáng là 16 giờ sáng/8 giờ tối.

2.4. Phân tích thống kê

Số liệu được ghi nhận và xử lý thông kê bằng Excel và SAS 9.4.

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Ảnh hưởng của nồng độ chất khử trùng NaOCl đến tỷ lệ tái sinh của mẫu cấy

Sự lây nhiễm của các mẫu trong nuôi cấy in vitro từ nhiều nguồn khác nhau là một trong những trở ngại lớn cho sự thành công của quá trình nuôi cấy mô. Khử trùng mẫu được xem là điều kiện tiên quyết đánh giá sự thành công của tái sinh *in vitro*. Trong nghiên cứu này, chúng tôi tập trung đánh giá hiệu quả của tác nhân khử trùng lên quá trình tái sinh đỉnh sinh trưởng của giống dâu tây Mỹ thơm ở các nồng độ NaOCl khác nhau (1, 2 và 3%) trong 20 phút (bảng 1). Kết quả cho thấy, nồng độ NaOCl càng thấp (1%) tỷ lệ mẫu nhiễm càng cao (chiếm 30%) và tỷ lệ tái sinh mẫu thấp (65%). Khi tăng nồng độ NaOCl lên 2% tỷ lệ mẫu nhiễm giảm (20%) và tăng tỷ lệ mẫu tái sinh (78%). Mẫu vô trùng và tái sinh cao nhất ở công thức NaOCl 3%, tỷ lệ mẫu nhiễm thấp (10%) và tỷ lệ mẫu tái sinh đạt 80% (bảng 1).

Bảng 1. Ảnh hưởng của nồng độ NaOCl đến tỷ lệ tái sinh của mẫu cấy.

Nồng độ NaOCl (%)	Tỷ lệ mẫu nhiễm (%)	Tỷ lệ mẫu tái sinh (%)
1	30±11,2 ^a	65±13,7 ^b
2	20±11,2 ^{ab}	78±32,6 ^a
3	10±13,7 ^b	80±11,2 ^a

Các chữ cái giống nhau khác biệt không có ý nghĩa thống kê, p=0,05.

NaOCl được xem là chất khử trùng hiệu quả, có khả năng chống lại vi khuẩn, nấm và virus. NaOCl tiêu diệt vi sinh vật thông qua cơ chế hoạt động peroxide của các phân tử chlorua và các ion kết hợp với phân tử protein gây ra cái chết sinh học của sinh vật [15]. Nhìn chung, tất cả nồng độ của NaOCl được sử dụng để vô trùng bề mặt mẫu đều ảnh hưởng đáng kể đến quá trình tái sinh mẫu. Trong đó, nồng độ NaOCl 3% được xem là phù hợp nhất cho quá trình vô trùng mẫu dâu tây Mỹ thơm.

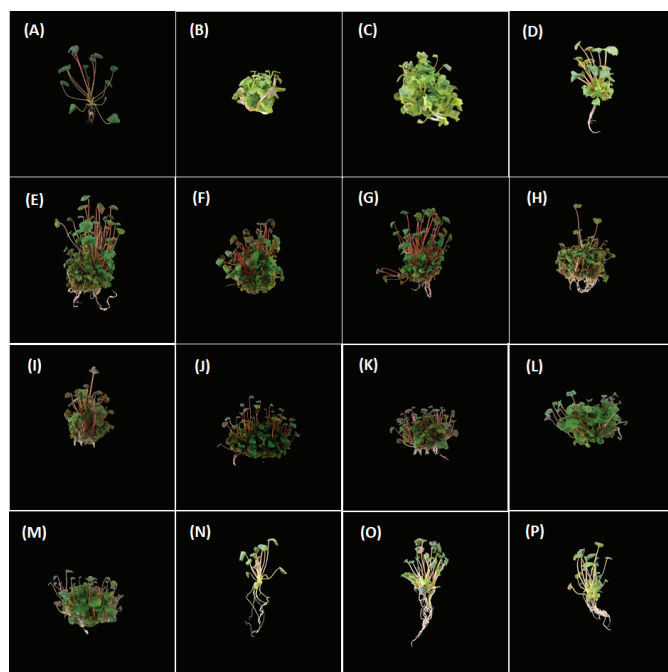
3.2. Ảnh hưởng của nồng độ BAP và kinetin đến khả năng nhân chồi

Để tối ưu môi trường nhân chồi, mẫu đỉnh sinh trưởng sau 8 tuần tái sinh được chuyển sang môi trường MS có chứa nồng độ BAP (0, 0,1, 0,3 và 0,5 mg/l) và kinetin (0, 0,1, 0,2 và 0,3 mg/l) trong sự kết hợp hoặc riêng lẻ. Hiệu quả của quá trình nhân chồi được quan sát rõ sau 6 tuần nuôi cấy. Kết quả cho thấy, sự kết hợp giữa BAP và kinetin cho hiệu quả nhân chồi tốt nhất. Cụ thể, môi trường MS có bổ sung 0,3 mg/l BAP và 0,1 mg/l kinetin cho số chồi cao nhất (16,2 chồi/mẫu), ngược lại môi trường chỉ có kinetin cho số chồi thấp nhất, trung bình 2,3 chồi/mẫu (từ 2,2 đến 2,4), hoặc BAP có số chồi trung bình 8,1 chồi/mẫu (từ 6,8 đến 10,7), cao hơn so với đối chứng (bảng 2, hình 2).

Bảng 2. Ảnh hưởng của nồng độ BAP và kinetin đến khả năng nhân chồi của giống dâu tây Mỹ thơm sau 6 tuần.

BAP (mg/l)	Kinetin (mg/l)	Số chồi/mẫu (chồi)	Số lá/chồi (lá)	Chiều cao chồi (cm)
0	0	1,8±1,1 ^f	9,1±2,8 ^a	3,7±0,8 ^{ab}
0,1	0	10,7±4,5 ^{cd}	5,9±1,1 ^{ode}	1,6±0,3 ^f
0,3	0	6,9±3,1 ^e	5,3±1,3 ^{ode}	1,7±0,4 ^f
0,5	0	6,8±2,8 ^e	5,0±2,1 ^e	2,8±0,6 ^{de}
0,1	0,1	14,0±7,7 ^{abc}	6,9±2,0 ^b	3,7±1,0 ^{ab}
0,1	0,2	12,2±9,2 ^{bcd}	6,5±1,7 ^{bc}	3,8±1,2 ^a
0,1	0,3	9,5±6,4 ^{de}	6,4±1,8 ^{bc}	4,0±1,1 ^a
0,3	0,1	16,2±12,7 ^a	5,9±1,4 ^{bcd}	3,3±0,7 ^{bc}
0,3	0,2	15,6±11,3 ^{ab}	5,8±1,6 ^{ode}	3,0±0,7 ^{de}
0,3	0,3	14,4±9,0 ^{abc}	6,2±2,0 ^{bcd}	2,7±0,6 ^e
0,5	0,1	15,3±9,0 ^{ab}	5,6±1,7 ^{ode}	2,7±0,6 ^e
0,5	0,2	14,6±9,9 ^{ab}	5,6±1,4 ^{ode}	2,8±0,6 ^{de}
0,5	0,3	13,5±7,1 ^{abc}	5,5±1,6 ^{ode}	3,0±0,7 ^{de}
0	0,1	2,4±1,4 ^f	9,6±1,9 ^a	3,2±0,7 ^{cd}
0	0,2	2,3±1,6 ^f	8,8±2,5 ^a	3,0±0,7 ^{de}
0	0,3	2,2±1,7 ^f	8,8±2,0 ^a	2,7±0,8 ^e

Các chữ cái giống nhau khác biệt không có ý nghĩa thống kê, p=0,05.



Hình 2. Ảnh hưởng của nồng độ BAP và kinetin (KN) đến quá trình hình thành chồi ở cây dâu tây Mỹ thơm sau 6 tuần nuôi cấy. (A) Đối chứng; **(B)** 0,1 mg/l BAP; **(C)** 0,3 mg/l BAP; **(D)** 0,5 mg/l BAP; **(E)** 0,1 mg/l BAP + 0,1 mg/l KN; **(F)** 0,1 mg/l BAP + 0,2 mg/l KN; **(G)** 0,1 mg/l BAP + 0,3 mg/l KN; **(H)** 0,3 mg/l BAP + 0,1 mg/l KN; **(I)** 0,3 mg/l BAP + 0,2 mg/l KN; **(J)** 0,3 mg/l BAP + 0,3 mg/l KN; **(K)** 0,5 mg/l BAP + 0,1 mg/l KN; **(L)** 0,5 mg/l BAP + 0,2 mg/l KN; **(M)** 0,5 mg/l BAP + 0,3 mg/l KN; **(N)** 0,1 mg/l KN; **(O)** 0,2 mg/l KN; **(P)** 0,3 mg/l KN.

Theo số liệu ở bảng 2, nồng độ chất điều hoà sinh trưởng tỷ lệ nghịch với số lá được hình thành và tỷ lệ thuận với chiều cao chồi. Kinetin được xem là phù hợp cho quá trình hình thành lá và chiều cao chồi ở cây dâu tây Mỹ thơm hơn so với BAP. Thật vậy, môi trường nuôi cấy có chứa 0,1 mg/l BAP có số lá là 5,9 lá/chồi và chiều cao chồi là 1,6 cm, ngược lại, trong môi trường có chứa 0,1 mg/l kinetin có số lá là 9,6 lá/chồi và chiều cao chồi là 3,2 cm. Tuy nhiên, khi có sự kết hợp giữa BAP và kinetin, chiều cao chồi tăng lên đáng kể, cụ thể môi trường MS có bổ sung 0,1 mg/l BAP và 0,3 mg/l kinetin có chiều cao chồi cao nhất là 4,0 cm.

Trong nuôi cấy mô, chất điều hòa sinh trưởng thực vật là thành phần môi trường quan trọng trong việc xác định con đường phát triển của tế bào thực vật. Cytokinin như là BAP và kinetin có vai trò trong việc làm giảm ưu thế của chồi ngọn, kích thích sự hình thành chồi nách và chồi bất định trong nuôi cấy đỉnh sinh trưởng của cây chuối [16]. Tầm quan trọng của BAP cũng được M.K. Biswas và cs (2007) [17] nhấn mạnh trong nghiên cứu nhân giống cây dâu tây, theo đó BAP có vai trò quan trọng trong quá trình tái sinh cây dâu tây. Kết quả tương tự cũng được báo cáo ở cây *Fragaria indica* Andr [18], đu đủ [19] và *Eucalyptus grandis* [20].

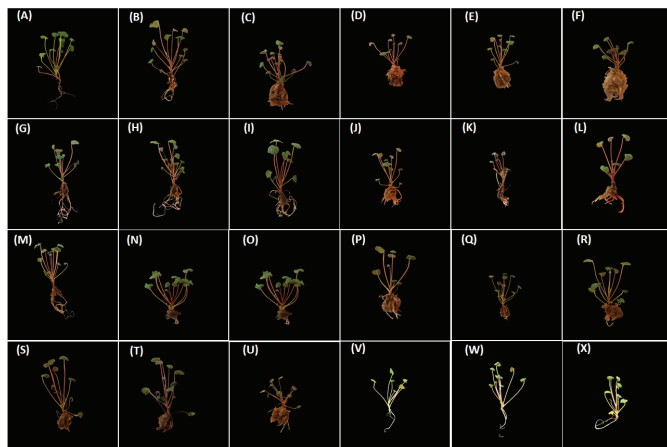
3.3. Ảnh hưởng của nồng độ NAA và BAP đến khả năng tạo rễ

Các chồi nhỏ sau 6 tuần nuôi cấy được chuyển sang môi trường 1/2 MS có chứa nồng độ NAA (0, 0,1, 0,3, 0,5, 0,7 và 1,0 mg/l) và BAP (0,1, 0,3 và 0,5 mg/l) trong sự kết hợp hoặc riêng lẻ. Kết quả sau 6 tuần nuôi cấy cho thấy có sự khác biệt đáng kể ở các công thức thí nghiệm (bảng 3). Ở công thức không bổ sung NAA và BAP, chiều cao cây đo được khoảng 5,3 cm, có 13,1 lá/cây, 7,6 rễ/mẫu và chiều dài rễ trung bình là 5,4 cm (bảng 3). Khi bổ sung NAA (0,1 đến 1,0 mg/l) vào môi trường nuôi cấy, số rễ trung bình/mẫu tăng đáng kể, dao động 11,8-18,0 rễ/mẫu. Tuy nhiên, sự gia tăng nồng độ NAA có xu hướng làm giảm dần chiều dài rễ (2,2-6,1 rễ), chiều cao cây (2,6-4,7 cm) và số lá/cây (10,0-12,0 lá) so với không hoặc bổ sung nồng độ thấp NAA (0,1 mg/l). Ngoài ra, việc bổ sung NAA 0,3-1,0 mg/l còn tạo mô sẹo cao ở mẫu nuôi cấy (bảng 3, hình 3C-3F). Ở các công thức bổ sung riêng lẻ BAP (0,1-0,5 mg/l) cho thấy, mẫu nuôi cấy gia tăng về chiều cao cây, dao động 5,3-5,8 cm, cao hơn các công thức bổ sung riêng lẻ NAA hoặc kết hợp với NAA. Tuy nhiên, kết quả thống kê cũng cho thấy, số lá/cây, số rễ/mẫu lại thấp hơn đáng kể so với các công thức còn lại (bảng 3, Hình 3V-3X). Khi bổ sung kết hợp NAA với BAP cho thấy, môi trường 0,1 mg/l NAA kết hợp với BAP (0,1, 0,3 và 0,5 mg/l) được xem là phù hợp cho quá trình hình thành rễ và không hình thành mô sẹo ở giống dâu tây Mỹ thơm. Trong đó, kết hợp 0,1 mg/l NAA và 0,5 mg/l BAP cho kết quả tốt nhất với chiều cao cây đạt 5,4 cm, 11,2 lá/cây, 12,6 rễ/mẫu và rễ dài 4,2 cm (bảng 3, hình 3I).

Bảng 3. Ảnh hưởng của NAA và BAP đến quá trình hình thành rễ của giống dâu tây Mỹ thơm sau 6 tuần nuôi cấy.

NAA (mg/l)	BAP (mg/l)	Số rễ/mẫu (rễ)	Chiều dài rễ (cm)	Số lá/cây (lá)	Chiều cao cây (cm)	Mô sẹo
0	0	7,6±1,2 ^{bc}	5,4±1,0 ^{bc}	13,1±1,6 ^{ab}	5,3±0,6 ^{abcd}	-
0,1	0	11,8±2,2 ^{bc}	6,1±3,0 ^b	12,0±1,2 ^{abcd}	4,7±1,1 ^{bcdefg}	-
0,3	0	18,0±7,4 ^a	3,7±0,6 ^{defg}	11,0±0,9 ^{bcdef}	3,9±0,6 ^{ghijk}	++
0,5	0	15,4±2,4 ^{ab}	2,6±1,0 ^{fg}	11,0±1,1 ^{bcdef}	3,3±0,8 ^{klm}	++
0,7	0	13,2±9,3 ^{bc}	2,4±0,4 ^g	12,2±1,3 ^{abc}	3,5±0,7 ^{ijkl}	++
1,0	0	12,6±2,7 ^{bc}	2,2±0,5 ^g	10,0±2,5 ^{defg}	2,6±1,0 ⁿ	++
0,1	0,1	14,4±2,3 ^{abc}	9,1±3,7 ^a	12,7±1,1 ^{abc}	4,8±1,0 ^{bcdef}	-
0,1	0,3	14,1±3,4 ^{abc}	8,0±2,6 ^a	11,9±2,0 ^{abcd}	4,6±1,0 ^{bcdefg}	-
0,1	0,5	12,6±2,0 ^{bc}	4,2±1,2 ^{bcdef}	11,2±1,0 ^{bcdef}	5,4±1,2 ^{ab}	-
0,3	0,1	15,4±2,5 ^{ab}	3,4±1,0 ^{fg}	11,1±1,1 ^{bcdef}	4,1±0,7 ^{ghijk}	-
0,3	0,3	13,7±6,0 ^{bc}	3,1±0,7 ^{fg}	11,1±3,9 ^{bcdef}	3,3±0,5 ^{klm}	-
0,3	0,5	13,4±6,0 ^{bc}	2,7±0,9 ^g	7,0±1,9 ^b	2,9±0,9 ^m	-
0,5	0,1	10,9±2,6 ^{cd}	8,7±3,7 ^a	13,3±1,4 ^a	4,7±0,6 ^{bcdefg}	+
0,5	0,3	12,1±2,0 ^{bc}	3,0±1,0 ^{fg}	12,0±3,9 ^{abcd}	4,9±1,0 ^{bcdef}	+
0,5	0,5	13,2±4,7 ^{bc}	2,2±0,5 ^g	10,6±0,9 ^{bcdefg}	3,5±0,7 ^{kl}	++
0,7	0,1	15,4±2,1 ^{ab}	2,9±0,6 ^{fg}	11,2±2,0 ^{bcdef}	3,9±0,8 ^{ghijk}	+
0,7	0,3	12,9±1,9 ^{bc}	2,8±0,8 ^g	12,4±1,7 ^{abc}	4,3±0,4 ^{efghij}	+
0,7	0,5	10,9±2,8 ^{cd}	2,9±0,9 ^{fg}	12,3±1,4 ^{abc}	4,4±0,9 ^{bcdefgh}	+
1,0	0,1	13,3±3,0 ^{bc}	2,2±0,6 ^g	11,7±1,2 ^{bcdef}	5,3±0,9 ^{abc}	+
1,0	0,3	16,2±3,4 ^{ab}	2,6±0,4 ^{fg}	11,3±1,7 ^{bcdef}	3,8±0,7 ^{ijkl}	+
1,0	0,5	13,2±4,1 ^{bc}	2,3±0,4 ^g	10,9±1,8 ^{bcdef}	2,4±1,1 ⁿ	++
0	0,1	6,7±1,7 ^e	4,5±0,8 ^{de}	8,9±1,3 ^e	5,8±0,9 ^a	-
0	0,3	5,8±1,0 ^f	4,1±1,0 ^{def}	9,2±1,2 ^e	5,7±1,0 ^a	-
0	0,5	5,3±1,5 ^e	5,1±1,1 ^{bcd}	9,8±1,6 ^{de}	5,3±1,3 ^{abcd}	-

Các chữ cái giống nhau khác biệt không có ý nghĩa thống kê, p=0,05; +: mô sẹo nhỏ; ++: mô sẹo to; -: không hình thành mô sẹo.



Hình 3. Ảnh hưởng của NAA và BAP đến quá trình hình thành rễ của giống dâu tây Mỹ thơm sau 6 tuần nuôi cấy. (A) Đối chứng; (B) 0,1 mg/l NAA; (C) 0,3 mg/l NAA; (D) 0,5 mg/l NAA; (E) 0,7 mg/l NAA; (F) 1 mg/l NAA; (G) 0,1 mg/l NAA + 0,1 mg/l BAP; (H) 0,1 mg/l NAA + 0,3 mg/l BAP; (I) 0,1 mg/l NAA + 0,5 mg/l BAP; (J) 0,3 mg/l NAA + 0,1 mg/l BAP; (K) 0,3 mg/l NAA + 0,3 mg/l BAP; (L) 0,3 mg/l NAA + 0,5 mg/l BAP; (M) 0,5 mg/l NAA + 0,1 mg/l BAP; (N) 0,5 mg/l NAA + 0,3 mg/l BAP; (O) 0,5 mg/l NAA + 0,5 mg/l BAP; (P) 0,7 mg/l NAA + 0,1 mg/l BAP; (Q) 0,7 mg/l NAA + 0,3 mg/l BAP; (R) 0,7 mg/l NAA + 0,5 mg/l BAP; (S) 1,0 mg/l NAA + 0,1 mg/l BAP; (T) 1,0 mg/l NAA + 0,3 mg/l BAP; (U) 1,0 mg/l NAA + 0,5 mg/l BAP; (V) 0,1 mg/l BAP; (W) 0,3 mg/l BAP; (X) 0,5 mg/l BAP.

M. Ikeuchi và cs (2013) [21] báo cáo rằng, việc bổ sung auxin và cytokinin ngoại sinh có thể cảm ứng tạo mô sẹo ở các loài thực vật khác nhau. Tuy nhiên, quá trình cảm ứng mô sẹo khi nồng độ auxin và cytokinin cân bằng nhau. Khi nồng độ auxin cao hơn cytokinin sẽ hình thành rễ, ngược lại sẽ tái sinh chồi.

Mẫu nuôi cấy bắt đầu hình thành rễ sau 2 tuần nuôi cấy trên môi trường không có bổ sung chất điều hoà sinh trưởng, nhưng cũng không hình thành mô sẹo. Số rễ trung bình trong môi trường cảm ứng tạo rễ là 14,4 rễ/mẫu và chiều dài rễ trung bình cao nhất là 9,1 cm được tìm thấy ở công thức 0,1 mg/l NAA + 0,1 mg/l BAP, trong khi đó, số lá trung bình/mẫu được tìm thấy cao nhất (13,3 lá) ở công thức 0,5 mg/l NAA + 0,1 mg/l BAP, chiều cao cây trung bình lớn nhất ở công thức 0,1 mg/l BAP (5,8 cm) (bảng 3).

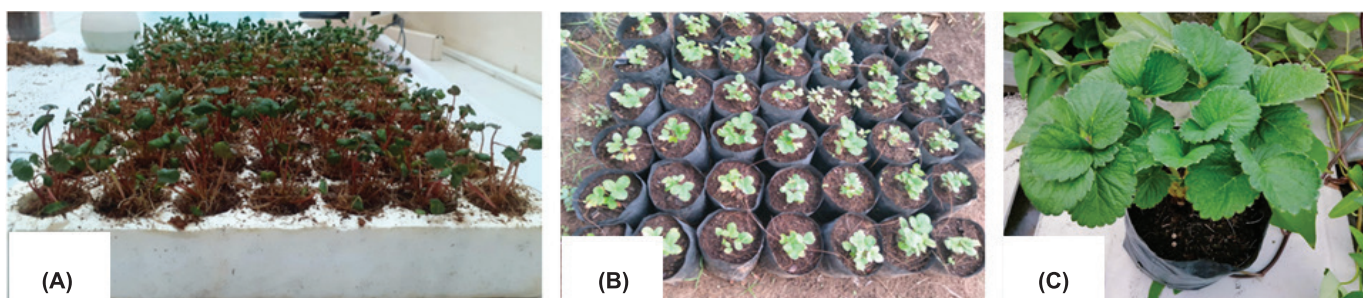
Kết quả nghiên cứu của I.D. Bhatt và cs (2000) [18] cho thấy, môi trường có chứa 1 μ M NAA có khoảng 97% rễ được hình thành ở giống dâu tây Ấn Độ, đồng thời nồng độ NAA càng cao, số rễ hình thành càng ít. Tóm lại, trong môi trường có chứa BAP và NAA sẽ sản sinh ra mô sẹo, có thể gây ức chế sự kéo dài của rễ vì mô sẹo bao phủ chồi và ức chế sự hình thành rễ từ chồi.

Với môi trường không bổ sung auxin hoặc cytokinin, mẫu cấy trung bình có 7,6 rễ/mẫu, chiều dài trung bình rễ đạt 5,4, số lá trung bình 13,1 và chiều cao cây trung bình 5,3 cm. Tuy nhiên, số lá/cây không có sự khác biệt ý nghĩa thống kê so với công thức có bổ sung 0,5 mg/l NAA + 0,1 mg/l BAP (bảng 3).

S.C. Debnath (2005) [22] cũng chỉ ra rằng, môi trường MS không có hormone tạo ra rễ thích hợp cho cây dâu tây ra ngó. Kết quả tương tự cũng tìm thấy trong nghiên cứu của A.Y. ElKichaoui (2014) [23], theo đó môi trường MS không chứa chất điều hoà sinh trưởng có thể tạo ra số lượng rễ, chiều dài rễ và chiều cao cây cao nhất.

3.4. Đánh giá khả năng sống của giống dâu tây Mỹ thơm

Cây con được nuôi cấy trong môi trường tạo rễ sau 8 tuần được chuyển ra ngoài để thuần cây. Sau 2 tuần thuần dưỡng trong giá thể có khoảng 64% mẫu cây sống và sinh trưởng. Cây con bắt đầu ra ngó sau 3 tháng ở nhà lưới và tiếp tục được theo dõi để đánh giá quá trình phát triển của cây (hình 4). Nghiên cứu của F. Haddadi và cs (2010) [14] cho thấy, giá thể chứa perlite, vermiculite và cocopeat (tỷ lệ 2:1:2 v/v/v) có 90% cây sống và khi được tưới với dung dịch Hoagland sẽ kích thích quá trình hình thành ngó. J.J. Medina và cs (2007) [24] cũng đã thành công thuần cây dâu tây con trong giá thể có chứa than bùn, đá trân châu (1:1 v/v) và giữ cây con trong màng polypropylene với 90% độ ẩm trong 3 tuần. Sau đó, cây con được chuyển sang chậu có chứa than bùn, đất cát và đá trân châu (7:2:1 v/v/v) trong 3 tuần tiếp theo.



Hình 4. Cây con dâu tây Mỹ thơm nuôi cấy mô được trồng bằng giá thể phân chuồng ủ hoai với nấm *Trichoderma* và mụn dừa (1:1:1 v/v/v) (A); cây con được chuyển sang chậu lớn sau 6 tuần thuần dưỡng (B); cây con ra ngó sau 3 tháng (C).

4. Kết luận

Từ các kết quả nghiên cứu trên cho thấy, ngó dâu tây Mỹ thơm được khử trùng trong 3% NaClO trong 20 phút cho hiệu quả tái sinh cao nhất và tỷ lệ mẫu nhiễm thấp nhất; số chồi tái sinh tốt nhất được tìm thấy trên môi trường MS có bổ sung 0,3 mg/l BAP và 0,1 mg/l kinetin với 16,2 chồi/mẫu. Chồi dâu tây Mỹ thơm tạo rễ tốt nhất trên môi trường 1/2 MS có bổ sung 0,1 mg/l NAA + 0,1 mg/l BAP với 14,4 và giá thể phân chuồng được ủ hoai với nấm *Trichoderma* và mụn xơ dừa (tỷ lệ 1:1:1 v/v/v) phù hợp cho quá trình ra ngó của giống dâu tây Mỹ thơm (64%). Tuy nhiên, để hoàn thiện quy trình nhân giống cần tiếp tục thử nghiệm các giá thể khác nhau như xơ dừa và phân hữu cơ để tối ưu quá trình ra ngó cho cây dâu tây Mỹ thơm.

LỜI CẢM ƠN

Kết quả nghiên cứu được tài trợ bởi Trường Đại học Trà Vinh thông qua hợp đồng số 254/2021/HĐ.HĐKH&ĐT-DHTV. Các tác giả xin chân thành cảm ơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] N.S. Nehra, K.K. Kartha, C. Stushnoff, et al. (1994), "Effect of *in vitro* propagation methods on field performance of two strawberry cultivars", *Euphytica*, **76**, pp.107-115, DOI: 10.1007/BF00024027.
- [2] S. Afrin, M. Gasparrini, P.R. Rodriguez, et al. (2016), "Promising health benefits of the strawberry: A focus on clinical studies", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **64**(22), pp.4435-4449, DOI: 10.1021/acs.jafc.2c07828.
- [3] S. Karhu, K. Hakala (2002), "Micropropagated strawberries on the field", *Acta Hort.*, **567**, pp.321-324, DOI: 10.17660/ActaHortic.2002.567.68.
- [4] R.R. Martin, I.E. Tzanetakis (2013), "High-risk strawberry viruses by region in the United States and Canada: Implications for certification, nurseries, and fruit production", *Plant Disease*, **97**(10), pp.1358-1362, DOI: 10.1094/PDIS-09-12-0842-RE.
- [5] J.R. Thompson, W. Jelkman (2003), "The detection and variation of strawberry mottle virus", *Plant Disease*, **87**(4), pp.385-390, DOI: 10.1094/PDIS.2003.87.4.385.
- [6] E. Seemüller, F. Merkle (1984), "Eliminierung von phytophthora fragariae durch meristemkultur", *Gartenbauwissenschaft*, **49**(5-6), pp.227-230.
- [7] R.G. Gonzales, K. Quiroz, B. Carrasco, et al. (2010), "Plant tissue culture: Current status, opportunities and challenges", *Cienc. Inv. Agr.*, **37**(3), pp.5-30.
- [8] E. Ambros, E.I. Chertenkova (2021), "Effect of antioxidants and growth regulators on shoot organogenesis in the apical meristem culture of *Fragaria × ananassa* (Duchesne ex Weston) Duchesne ex Rozier", *Proceedings of Universities Applied Chemistry and Biotechnology*, **11**(4), pp.549-560.
- [9] M. Ashrafuzzaman, S.M. Faisal, D. Yadav, et al. (2013), "Micropropagation of strawberry (*Fragaria ananassa*) through runner culture", *Bangladesh Journal of Agricultural Research*, **38**(3), pp.467-472.
- [10] A.J. Passey, K. Barrett, D. James (2003), "Adventitious shoot regeneration from seven commercial strawberry cultivars (*Fragaria × ananassa* Duch.) using a range of explant types", *Plant Cell Rep.*, **21**(5), pp.397-401, DOI: 10.1007/s00299-002-0530-4.
- [11] K.A. Quiroz, M. Berrios, B. Carrasco, et al. (2017), "Meristem culture and subsequent micropropagation of Chilean strawberry (*Fragaria chiloensis* (L.) Duch.)", *Biological Research*, **50**(1), DOI: 10.1186/s40659-017-0125-8.
- [12] S. Knyazev, M.V. Vinter (2021), "Fundamental and applied research in biology and agriculture: Current issues, achievements and innovations", *International Scientific and Practical Conference*, EDP Sciences, **254**, DOI: 10.1051/e3sconf/202125404004.
- [13] S.M. Jain, S.J. Ochatt (2010), *Protocols for In Vitro Propagation of Ornamental Plants*, Humana Press, **589**, 414pp, DOI: 10.1007/978-1-60327-114-1.
- [14] F. Haddadi, M. Abd Aziz, G. Saleh, et al. (2010), "Micropropagation of strawberry cv. Camarosa: Prolific shoot regeneration from *in vitro* shoot tips using thidiazuron with N6- benzylamino-purine", *HortScience*, **45**(3), pp.453-456, DOI: 10.21273/HORTSCI.45.3.453.
- [15] L. Pauling (1955), "The stochastic method and the structure of proteins", *American Scientist*, **43**(2), pp.285-297.
- [16] P. Madhulatha, M. Anbalagan, S. Jayachandran, et al. (2004), "Influence of liquid pulse treatment with growth regulators on *in vitro* propagation of banana (*Musa* spp. AAA)", *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, **76**, pp.189-192, DOI: 10.1023/B:TICU.0000007291.31439.6c.
- [17] M.K. Biswas, M. Hossain, M.B. Ahmed, et al. (2007), "Multiple shoots regeneration of strawberry under various colour illuminations", *American - Eurasian Journal of Scientific Research*, **2**(2), pp.133-135.
- [18] I.D. Bhatt, U. Dhar (2000), "Micropropagation of Indian wild strawberry", *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, **60**, pp.83-88, DOI: 10.1023/A:1006471815566.
- [19] R.A. Cononer, R.E. Litz (1978), "In vitro propagation of papaya (*Carica papaya* L.)", *Hort. Sci.*, **13**, pp.241-242, DOI: 10.21273/HORTSCI.13.3.241.
- [20] L.L.D. Silva (1990), *In vitro Propagation of Adults Eucalyptus Grandis Hill Ex. Maiden from Epicormic Shoots*, Thesis, Universidade Federal De Vicos, 60pp.
- [21] M. Ikeuchi, K. Sugimoto, A. Iwase (2013), "Plant callus: Mechanisms of induction and repression", *The Plant Cell*, **25**(9), pp.3159-3173, DOI: 10.1105/tpc.113.116053.
- [22] S.C. Debnath (2005), "Strawberry sepal: Another explant for thidiazuron-induced adventitious shoot regeneration", *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, **41**, pp.671-676, DOI: 10.1079/IVP2005688.
- [23] A.Y. ElKichaoui (2014), "In vitro propagation of strawberry (*Fragaria × ananassa* Duch.) through organogenesis via runner tips", *Ann. Pl. Sci.*, **3**(3), pp.619-627.
- [24] J.J. Medina, I. Clavero-Ramírez, M.E. Gonzalez-Benito, et al. (2007), "Field performance characterization of strawberry (*Fragaria × ananassa* Duch.) plants derived from cryopreserved apices", *Sci. Hort.*, **113**(1), pp.28-32, DOI: 10.1016/j.scienta.2007.01.030.