

## ẢNH HƯỞNG CỦA ĐƯỜNG, SỰ TRAO ĐỔI KHÍ VÀ GIÁ THỂ LÊN SỰ SINH TRƯỞNG CỦA CÂY DÂU TÂY (*FRAGARIA ANANASSA* DUCH.) CON *IN VITRO* VÀ TỶ LỆ SỐNG CỦA CÂY DÂU TÂY CON *EX VITRO*

NGUYỄN TRÍ MINH

*Phân viện Sinh học tại Đà Lạt*

NGUYỄN THỊ QUỲNH

*Viện Sinh học nhiệt đới*

Cây dâu tây (*Fragaria ananassa* Duch.) thuộc họ Hoa hồng (Rosaceae), có rất nhiều ứng dụng như thân, lá và rễ được dùng làm thuốc chữa bệnh an thần, trái làm thực phẩm, hương liệu và làm rượu. Dâu tây thường được nhân giống bằng cách tách tia (runner) và tách cây con. Tuy nhiên các phương pháp này không cung cấp được số lượng lớn cây con đồng nhất và có chất lượng cao. Nuôi cấy mô quang tự dưỡng là phương pháp nhân giống hiện nay được nhiều người quan tâm, nhằm tạo ra cây con có chất lượng đồng đều và giảm được tỷ lệ cây con chết ở giai đoạn vườn ươm.

Các công trình nghiên cứu gần đây đã chứng minh rằng các cây cấy mô, chồi và mẫu cây *in vitro* đều có khả năng quang hợp và phát triển khả năng quang hợp theo kiểu tự dưỡng như cây bên ngoài tự nhiên. Tuy nhiên, khả năng quang hợp và sinh trưởng của cây *in vitro* bị hạn chế bởi hàm lượng khí CO<sub>2</sub> cung cấp cho cây trong bình nuôi cấy trong suốt thời gian chiếu sáng [1-3]. Sự sinh trưởng của cây *in vitro* của hồ điệp [4], dâu tây [5-7], khoai tây [8] trong điều kiện không đường mạnh hơn trong điều kiện có đường. Nuôi cấy mô trên môi trường không đường đã cải tiến được sự sinh trưởng của cây *in vitro*, giảm được tỷ lệ tạp nhiễm và chi phí chăm sóc trong nhà ươm [9, 10]. Một số nghiên cứu khác về sự bổ sung giá thể và sự trao đổi khí cũng đã cải tiến được sự phát triển của hệ thống của rễ cây cấy mô [11-15]. Những nghiên cứu trên đã mở ra một ý tưởng cần một hệ thống nhân giống vô tính *in vitro* nhằm tạo ra cây dâu tây có chất lượng cao, đồng thời giảm tỷ lệ chết của cây con ở giai đoạn *ex vitro*.

Mục đích của nghiên cứu này là so sánh khả năng sinh trưởng (trọng lượng cây, diện tích lá, số lá mới, tỷ lệ nhiễm *in vitro* và tỷ lệ cây sống *ex vitro*), hệ số quang hợp thuần, hàm lượng clo-rô-phin và tỷ lệ sống của cây dâu tây con sau ống nghiệm trong điều kiện nuôi cấy mô truyền thống và nuôi cấy mô quang tự dưỡng.

### I. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

#### 1. Vật liệu và điều kiện nuôi cấy

*Mẫu:* chồi của cây dâu tây con *in vitro* có ba lá với trọng lượng tươi trung bình 80 mg, được cấy trên môi trường MS có bổ sung 30 g/l đường và 8 g/l thạch theo phương pháp nuôi cấy mô truyền thống.

*Mật độ nuôi cấy:* 4 mẫu trong một hộp magenta; mỗi công thức thí nghiệm gồm 108 mẫu.

*Hộp nuôi cấy:* magenta có dung tích 370 ml; số lần trao đổi khí của hộp có gắn màng trao đổi khí (millipore, Tokyo, Japan) với kích thước của lỗ thông khí là 0,5  $\mu$ m (đường kính của lỗ trên nắp bình là 10 mm) và hộp không gắn màng trao đổi khí là 2,3 và 0,3 lần/giờ được đo theo phương pháp của Kozai [16].

*Môi trường:* MS [17]; dung tích môi trường 80 ml/bình.

*Giá thể:* thạch 8 g/l; florialit 10 g/hộp (florialit, Nisshinbo Industries, Inc., Japan).

*Đường:* không đường và không vitamin trong công thức có gắn màng trao đổi khí, 20 g/l trong tất cả các công thức còn lại.

Phương pháp nuôi cấy: cường độ ánh sáng 50  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$  áp dụng từ ngày thứ 1 đến ngày thứ 8; 100  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$  áp dụng sau ngày thứ 8.

Thời gian chiếu sáng: 16 giờ/ngày, chu kỳ

24 giờ.

Thời gian nuôi cấy: 35 ngày.

## 2. Mô tả thí nghiệm

Bảng 1

Ký hiệu các công thức thí nghiệm

Ký hiệu công thức	Nồng độ của đường (g/l)	Giá thể	Số lần trao đổi khí	Số lượng hộp nuôi cấy trong công thức	Số lượng mẫu trong công thức
SA	30	Thạch	0,3	27	108
SF	30	Florialit	0,3	27	108
FA	0	Thạch	2,3	27	108
FF	0	Florialit	2,3	27	108

### 3. Biểu thức tính cường độ quang hợp thuần của cây *in vitro*

Cường độ quang hợp thuần của một cây,  $P_n$  ( $\mu\text{mol}/\text{giờ}/\text{cây}$ ) được tính theo phương pháp của Fujiwara [19].

$$P_n = [K E V (C_{out} - C_{in})]/N$$

Trong đó: K. là hằng số chuyển đổi  $\text{CO}_2$  từ thể tích sang mol; E. lượng khí trao đổi qua hộp nuôi cấy; V. dung tích khí của hộp nuôi cấy (0,370 l);  $C_{in}$  và  $C_{out}$ . nồng độ  $\text{CO}_2$  ( $\mu\text{mol}/\text{mol}$ ) bên trong và bên ngoài của hộp nuôi cấy trong điều kiện ổn định của chu kỳ sáng; N. số lượng của mẫu cây trong bình cấy.

### 4. Xử lý số liệu

Thí nghiệm được thiết kế ngẫu nhiên với 3 lần lặp lại; thí nghiệm gồm 4 công thức, mỗi công thức gồm 27 hộp magenta; mỗi hộp gồm 4 chồi. Số liệu được xử lý bằng chương trình

thống kê Minitab (Minitab 14, State College, PA, 2003). Giá trị trung bình và sai số có ý nghĩa được tính theo phương pháp thống kê mô tả. So sánh sự tương quan của các giá trị trung bình được tính theo phương pháp của Turkey's Simultaneous Test ( $P \leq 0,05$ ).

## II. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Sau 35 ngày nuôi cấy trong điều kiện *in vitro*, cây dâu tây con được lấy ra khỏi hộp và tính các giá trị của trọng lượng tươi, trọng lượng khô, diện tích lá, số lá mới hình thành, tỷ lệ nhiễm và hàm lượng clo-rô-phin của cây con. Tỷ lệ sống của cây con trồng trong vườn ươm được tính sau 2 tuần.

### 1. Các giá trị trung bình của trọng lượng tươi, trọng lượng khô, số lá mới, diện tích lá, tỷ lệ nhiễm và hàm lượng clo-rô-phin của cây con trong điều kiện *in vitro*

Bảng 2

Các giá trị trung bình của chỉ tiêu về sự sinh trưởng của cây dâu tây con

Công thức	SA	SF	FA	FF
Trọng lượng tươi (mg)	645 $\square$ 41 a	727 $\square$ 41 a	1030 $\square$ 45 b	1328 $\square$ 78 c
Trọng lượng khô (mg)	216 $\square$ 21 a	245 $\square$ 20 a	259 $\square$ 16 b	429 $\square$ 49 c
Số lá mới	4 $\square$ 0,3 a	4 $\square$ 0,2 a	7 $\square$ 0,2 b	8 $\square$ 0,2 c
Diện tích lá ( $\text{cm}^2$ )	27,5 $\square$ 1,6 a	38,5 $\square$ 1,9 b	5439 $\square$ 249 c	6796 $\square$ 238 d
Tỷ lệ bình cấy bị nhiễm bệnh <i>in vitro</i> (%)	17 $\square$ 0,7 a	14 $\square$ 0,6 b	8 $\square$ 0,2 c	5 $\square$ 0,2 d
Hàm lượng Ch a ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	3,0 $\square$ 0,1 a	3,4 $\square$ 0,1 a	4,3 $\square$ 0,1 b	5,5 $\square$ 0,1 b
Hàm lượng Ch b ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	1,4 $\square$ 0,1 a	1,4 $\square$ 0,2 a	1,3 $\square$ 0,1 a	1,7 $\square$ 0,1 a
Hàm lượng Ch a+b ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	4,4 $\square$ 0,2 a	4,8 $\square$ 0,2 a	5,7 $\square$ 0,2 b	7,2 $\square$ 0,2 b

Ghi chú: Ch. Clo-rô-phin.

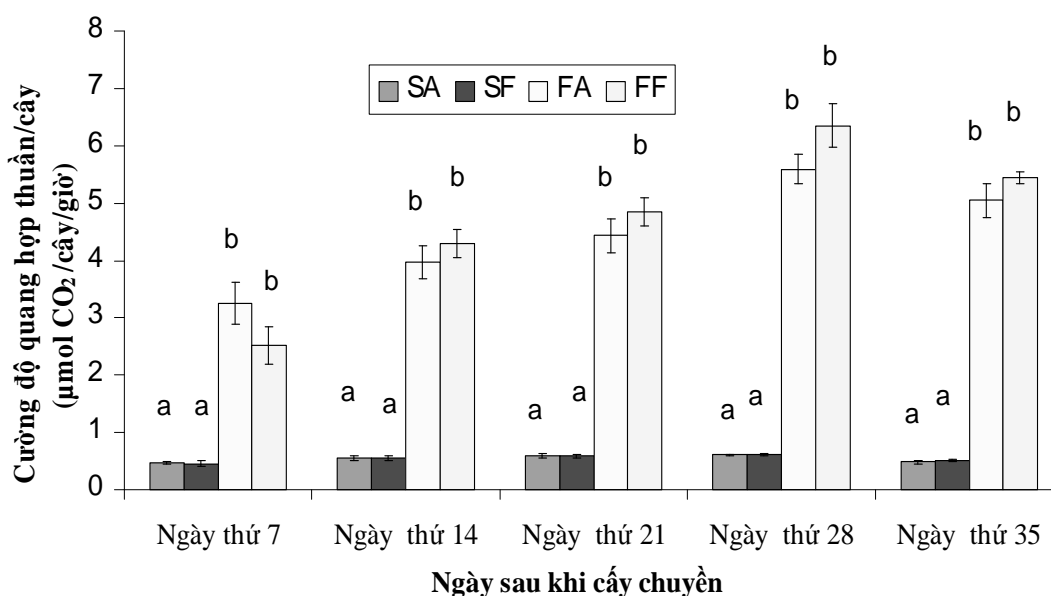
Số liệu trong bảng 2 là các giá trị trung bình (của trọng lượng tươi, trọng lượng khô, số lá mới và diện tích lá) với  $\square$  của sai số chuẩn. Các ký tự a, b, c và d trong các cột biểu diễn sự khác nhau có ý nghĩa của các giá trị trung bình ở mức 5%.

Bảng 2 cho thấy, các giá trị về trọng lượng cây, diện tích lá và số lá mới trong điều kiện giá thể là florialit đều cao hơn hoặc bằng trong điều kiện giá thể là thạch, đặc biệt các giá trị này tăng rất cao trong điều kiện nuôi cấy không đường so với nuôi cấy có đường. Sự bổ sung giá thể florialit vào môi trường nuôi cấy không đường kết hợp với sự trao đổi khí là điều kiện tốt cho cây dâu tây sinh trưởng và giảm được tỷ lệ chết của cây dâu tây con trong điều kiện *in vitro* do tạp nhiễm. Kết quả này cũng giống như kết quả nghiên cứu của một số tác giả khác như: Kozai [5, 7], Doi [4], Mousseau [19].

Hàm lượng clo-rô-phin b trong bốn công thức có khác nhau nhưng không có ý nghĩa về

mặt thống kê, ngược lại hàm lượng clo-rô-phin a trong bảng đã cho thấy sự gia tăng một cách rất có ý nghĩa giữa các công thức không đường và có đường, đặc biệt hàm lượng clo-rô-phin a đạt cao nhất ở các công thức không đường và có sự bổ sung giá thể florialit. Điều này có thể giải thích là giá thể florialit có đặc tính xốp nên tạo được môi trường thông thoáng cho hệ rễ của cây dâu tây phát triển, hút nước và các chất khoáng trong môi trường nhiều hơn so với giá thể là thạch, dẫn đến sự quang hợp diễn ra mạnh và hàm lượng clo-rô-phin đạt cao nhất. Trong trường hợp hàm lượng clo-rô-phin b khác nhau không có ý nghĩa giữa bốn công thức có lẽ là do hàm lượng CO<sub>2</sub> trao đổi qua bình nuôi cấy không đáp ứng đủ cho cây nên hạn chế quá trình quang hợp và dẫn đến bộ lá của cây dâu tây phát triển chậm, do vậy hàm lượng clo-rô-phin b trong lá thấp.

## 2. Cường độ quang hợp thuận của cây dâu tây con *in vitro*

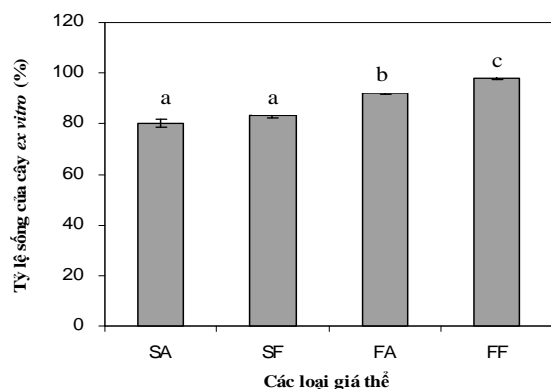


Hình 1. Cường độ quang hợp thuận của cây dâu tây con *in vitro* từ ngày thứ 7 đến ngày thứ 35

Hình 1 cho thấy, cường độ quang hợp thuận trong các công thức không dùng đường rất cao so với các công thức dùng đường và cường độ quang hợp thuận tăng dần từ ngày thứ 7 đến ngày thứ 28, sau đó giảm xuống ở ngày thứ 35. Sự giảm hệ số quang hợp thuận ở ngày thứ 35 so với ngày thứ 28 trong thí nghiệm này cho thấy cây dâu tây con

*in vitro* sinh trưởng tối ưu ở ngày thứ 28 và chuyển sang giai đoạn *ex vitro* là thích hợp nhất. Sự bổ sung giá thể trong thí nghiệm này có ảnh hưởng đến cường độ quang hợp thuận nhưng không có ý nghĩa về mặt thống kê.

## 3. Tỷ lệ sống của cây dâu tây con ở giai đoạn *ex vitro*



**Hình 2.** Tỷ lệ sống của cây dâu tây con ở giai đoạn *ex vitro* sau 2 tuần



**Hình 3.** Cây dâu tây con *in vitro* ở ngày thứ 35

Hình 2 cho thấy, tỷ lệ sống của cây dâu tây



**Hình 4.** Cây dâu tây *ex vitro* ở ngày thứ 14

con *ex vitro* gia tăng một cách rất có ý nghĩa giữa công thức không dùng đường so với công thức dùng đường và tỷ lệ sống đạt cao nhất ở công thức sử dụng giá thể là floralit (98%). Giá thể floralit tạo môi trường thông thoáng, giúp hệ rễ tăng trưởng mạnh và góp phần làm cho cây dâu tây con *in vitro* phát triển cân đối giữa thân và rễ (hình 3).

### III. KẾT LUẬN

Cây dâu tây con hoàn toàn có khả năng sinh trưởng theo kiểu quang tự dưỡng trong điều kiện *in vitro*. Sự sinh trưởng của cây dâu tây con *in vitro* được gia tăng một cách rất có ý nghĩa trong môi trường không đường so với môi trường có đường; các giá trị trọng lượng tươi, trọng lượng khô, số lá mới, diện tích lá và cường độ quang hợp thuận đều đạt cao nhất ở công thức không đường, không vitamin và có bổ sung giá thể là floralit. Giá thể floralit giúp cho rễ của cây dâu tây *in vitro* tăng trưởng mạnh và phát triển cân đối giữa thân và rễ. Cây dâu tây con *ex vitro* sau 15 ngày có tỷ lệ sống cao nhất thuộc về công thức thí nghiệm không đường, không vitamin và có giá thể floralit (98%) và thấp nhất thuộc công thức thí nghiệm có đường và có giá thể là thạch (80%). Kết quả này cho thấy, triển vọng của việc xây dựng quy trình công nghệ sản xuất giống dâu tây dựa trên cơ sở quang tự dưỡng với chi phí sản xuất thấp.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Desjardins Y. et al., 1988: Acta Hort., 230: 45-47.
2. Fujiwara K. et al., 1987: Agr. Meteorol., 43: 21-30.
3. Kozai T., 1991: In vitro Cell Dev. Biol. Plant., 27: 47-51.
4. Doi M. et al., 1989: Environ. Contr. Biol., 27: 9-13.
5. Kozai T. and K. Sekimoto, 1988: Environ. Contr. Biol., 26: 21-29.
6. Fujiwara K. et al., 1988: Acta Hort., 230: 153-158.
7. Kozai T. et al., 1991: Plant Cell, Tissue and Organ Culture., 25:107-115.
8. Kozai T. et al., 1988: Acta Hort., 230: 121-127.
9. Kozai T., 1991: In vitro Cell Dev. Biol. Plant., 27: 47-51.
10. Kozai T. and T. Hoshi, 1989: Future Generation Computer Systems., 5:131-136.
11. Kirdmanee C. et al., 1995: Dev. Biol., 31: 144-149.
12. Afreen-Zobayed F. et al., 2000: 157: 225-231.
13. Adelberg J. et al., 1999: Plant Cell Tissue Org. Cult., 57: 95-104.
14. Kozai T. and C. Kubota, 2001: Plant Res., 114: 525-537.
15. Nguyen Q. T. et al., 2000: Plant Cell Tissue Org. Cult., 58: 51-57.
16. Kozai T. et al., 1986: Agr. Met., 42: 119-127.
17. Murashige T. and F. Skoog, 1962: Physiol. Plant., 15: 473-497.
18. Fujiwara K. et al., 1987: Agric. Meteorol., 43: 21-30.
19. Mousseau M., 1986: Photosynthesis Res., 8: 187-191.

## EFFECTS OF SUGAR CONCENTRATION, NATURAL VENTILATION AND SUPPORTING MATERIALS ON THE GROWTH OF *IN VITRO* STRAWBERRY PLANTLETS (*FRAGARIA ANANASSA* DUCH.) AND ON THE SURVIVAL RATE OF *EX VITRO* PLANTLETS

NGUYEN TRI MINH, NGUYEN THI QUYNH

### SUMMARY

The growth of strawberry (*Fragaria ananassa* Duch.) plantlets cultured *in vitro* as affected by sugar, types of supporting material and number of air exchange of the vessel was investigated. Shoots of *in vitro* strawberry plantlets were cultured on the on full strength MS (Murashige & Skoog 1962) basal liquid medium with 30 g/l sugar and without sugar. Two types of supporting material, agar and florialite, and two levels of air exchange expressed by number of air exchange per vessel, 0.3 and 2.3 per hour, were studied. At the end of a 35-day culture period, fresh weight, dry weight, leaf area, number of leaves, chlorophyll content, photosynthetic net rate of plantlets grown on florialite soaked in sugar-free medium and under the higher number of air exchanges were greater than those in sugar-containing medium. The survival rate of *ex vitro* plantlets cultured under a high number of air exchange and supporting with florialite was also the highest (98%) among SA, SF, FA and FF treatments.

Ngày nhận bài: 30-7-2007