

NHÂN GIỐNG *IN VITRO* CÂY DÂU NGỌT ĐÀI LOAN

Nguyễn Thị Lý Anh^{1,2*}, Nguyễn Thị Thiết¹, Trần Thị Luyện¹, Đặng Thị Nhân¹, Nguyễn Thị Hân²

¹Khoa Công nghệ Sinh học,

²Viện Sinh học Nông nghiệp, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

*Tác giả liên hệ: ntlanh@vnua.edu.vn

Ngày nhận bài: 26.07.2018

Ngày chấp nhận đăng: 03.12.2018

TÓM TẮT

Nghiên cứu nhân giống *in vitro* cây dâu ngọt Đài Loan nhằm xác định các thông số kỹ thuật cần thiết cho việc sản xuất cây giống chất lượng cao phục vụ nhu cầu mở rộng vùng trồng loại cây ăn quả mới nhập nội này. Sử dụng vật liệu khởi đầu là chồi 1 tháng tuổi của cây mẹ 2 năm tuổi để nuôi cấy *in vitro* cho thấy: Môi trường MS có bổ sung 3 mg BA/l là phù hợp để kích thích tạo chồi từ mắt ngủ với tỷ lệ mẫu tạo chồi đạt 83,33%. Hệ số nhân chồi và chất lượng chồi cao nhất đạt được ở môi trường MS có bổ sung thêm BA (3 mg/l), IBA (0,5 mg/l) và nước dừa (10%) với hệ số nhân đạt 2,93 chồi/ mẫu sau 4 tuần nuôi cấy. Sự hình thành rễ của chồi đạt hiệu quả cao ở môi trường MS có bổ sung 0,5 mg/l IBA với tỷ lệ chồi tạo rễ là 96,67%. Trong nhà lưới, sau 8 tuần trồng trên giá thể cát và cung cấp dinh dưỡng qua lá bằng phân bón Đầu trâu 502 với tần suất phun 1 lần/tuần, cây *in vitro* có tỷ lệ sống cao (80%) và cây sinh trưởng tốt (chiều cao: 8,32 cm/cây, số lá: 7,24 lá/cây) đạt điều kiện chuyển sang trồng chậu. Quy trình nhân giống *in vitro* nêu trên cho hiệu quả cao và dễ dàng áp dụng ở quy mô sản xuất.

Từ khóa: Dâu ngọt, nhân giống *in vitro*, Đầu trâu 502, BA, IBA

In vitro propagation of Taiwanese Sweet Mulberry

ABSTRACT

In vitro propagation of Taiwanese sweet mulberry was carried out to determine technical parameters in the production of high quality planting materials for expanding cultivated area of the newly introduced fruit tree. One-month-old shoots of two-year-old Taiwanese sweet mulberry plants were used as initial materials for *in vitro* culture. Results showed that BA at the concentration of 3mg/l in MS medium was suitable for stimulating *in vitro* shoots from stem nodes with high rate (83.33%). BA at 3 mg/l in combination with 0.5 mg/l IBA and 10% coconut water gave the best shoot multiplication rate (2.93 shoots/explant) and the highest shoot quality after 4 weeks of culture. The highest rooting percentage at 96.67% of shoots was observed after 4 weeks on MS medium containing 0.5 mg/l IBA. The plantlets were successfully acclimated in sandy substrate with a survival rate of 80%. The liquid fertilizer "Buffalo Head 502" foliar spray 1 time/week yielded good quality plantlets suitable for transplanting into pots. This *in vitro* propagation process is highly effective and easy to apply at production scale.

Keywords: Sweet mulberry, *in vitro* propagation, Buffalo head 502, BA, IBA.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Dâu ngọt Đài Loan là cây dâu ăn quả, được chọn tạo bằng phương pháp lai hữu tính giữa dâu tằm (*Morus alba*) với dâu quả dài (*Morus macroura*). Cây dâu lai này có năng suất rất cao và ổn định, cây 4 năm tuổi đạt 45 tấn quả/ha/năm. Quả dâu có chiều dài từ 8-20 cm, đường kính quả đạt 0,5-0,9 cm và khối

lượng từ 4-5 g/quả, quả không có hạt, có hàm lượng đường cao, hàm lượng axit thấp nên rất ngọt (Trần Khắc Thi, 2014). Với ưu thế về năng suất, chất lượng quả và mang lại giá trị kinh tế cao, cây dâu ngọt Đài Loan đã được nhập nội và trở thành cây ăn quả được quan tâm phát triển ở nước ta. Tuy nhiên, cây giống dâu ngọt Đài Loan hiện chỉ được sản xuất bằng cách ghép cành từ cây nhập nội trên gốc ghép là cây dâu địa phương nên hệ số nhân

giống khá thấp và chất lượng cây giống không cao, do đó chưa đáp ứng được nhu cầu cây giống cho người trồng.

Trong sản xuất giống cây trồng, đặc biệt là các cây nhân giống vô tính, công nghệ nuôi cấy mô thực vật *in vitro* đã trở thành công cụ hữu hiệu bởi tạo được cây sạch bệnh, trẻ sinh lý và đạt hệ số nhân giống rất cao. Nuôi cấy *in vitro* đã được thực hiện thành công trên nhiều loài khác nhau của chi dâu tằm (*Morus*) như: *M. alba* (Anis *et al.*, 2003; Chitra & Padmaja, 2005; Ahmad *et al.*, 2007; Balakrishnan *et al.*, 2009; Chattopadhyay *et al.*, 2011), *M. nigra* (Zaki *et al.*, 2011), *M. macroura* (Akram & Aftab, 2012), *M. indica* (Lalitha *et al.*, 2013). Tuy nhiên, nghiên cứu nuôi cấy *in vitro* cây dâu ngọt Đà Loan còn chưa được đề cập ở cả trong và ngoài nước. Vì vậy, nghiên cứu nhân giống *in vitro* cây dâu ngọt Đà Loan là vấn đề cần được tiến hành nhằm xác định các thông số kỹ thuật cần thiết làm cơ sở cho việc sản xuất cây giống chất lượng cao phục vụ mở rộng vùng trồng cây dâu có giá trị nêu trên.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Vật liệu ban đầu sử dụng trong nghiên cứu là các đoạn thân mang mầm ngủ (1,5-2cm) của chồi 1 tháng tuổi của cây mẹ 2 năm tuổi trồng tại vườn thực nghiệm của Viện sinh học nông nghiệp, Học viện Nông nghiệp Việt Nam (Hình 1).

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Khử trùng mẫu cấy

Các đoạn cành mang mầm ngủ được rửa bằng nước xà phòng loãng và rửa lại dưới vòi nước chảy. Tiếp theo, mẫu được khử trùng bằng cồn 70% trong 30 giây, khử trùng tiếp bằng dung dịch Troclosene sodium (NaDCC) 0,5% ở những thời lượng khác nhau, sau đó rửa sạch bằng nước cất vô trùng 3-4 lần, mỗi lần 1 phút. Mẫu cấy được nuôi trên môi trường MS (Murashige-Skoog, 1962) trong thời gian 2 tuần và các mẫu sống, sạch vi sinh vật được sử dụng cho nghiên cứu tạo chồi.

2.2.2. Tạo chồi từ mầm ngủ và nhân nhanh chồi *in vitro* và tạo cây *in vitro* hoàn chỉnh

Mẫu được cấy chuyển sang môi trường MS có bổ sung BA (N^6 - Benzyladenine) từ 0-4 mg/lít để kích thích bật chồi từ mầm ngủ. Các chồi tái sinh tiếp tục được nhân nhanh trên môi trường có bổ sung tổ hợp BA với IBA (Indol-3-butyric acid), nước dừa ở các nồng độ khác nhau tùy từng thí nghiệm. Các chồi có chiều cao 2,0-2,5 cm được tách độc lập và nuôi cấy tạo rễ trên môi trường MS có bổ sung IBA với nồng độ từ 0-2 mg/l.

Môi trường nuôi cấy sử dụng trong các thí nghiệm là môi trường MS cơ bản bổ sung 30 g sucrose/l và 5,0 g agar/l, được điều chỉnh pH = 5,8 trước khi hấp khử trùng ở áp suất tương đương 1 atm (105 kPa), nhiệt độ 121°C, trong 30 phút. Điều kiện nuôi cấy *in vitro*: nhiệt độ 25-27°C, độ ẩm 60-70%, quang chu kỳ 16 giờ sáng/8 giờ tối, chiếu sáng bằng đèn huỳnh quang T8-36W với cường độ ánh sáng 56 $\mu\text{mol/s/m}^2$.

2.2.3. Thích ứng cây *in vitro* tại vườn ươm

Các cây *in vitro* hoàn chỉnh có chiều cao 3,0-3,5 cm với 2-3 lá/cây được lấy ra khỏi bình, rửa sạch môi trường bám trên rễ, cấy vào vỉ nhựa có chứa các loại giá thể khác nhau và đưa ra nhà lưới có mái che nilon vào vụ hè thu (đầu tháng 9). Vỉ cây được che 60% nắng trực tiếp bằng lưới đen thoáng từ 9-17 h. Tưới nước giữ ẩm 3 lần/ngày trong tuần đầu tiên và 2 lần/ngày từ tuần thứ 2. Khả năng sống, sinh trưởng của cây *in vitro* được đánh giá sau 4 tuần trồng để lựa chọn giá thể phù hợp. Tác động của việc cung cấp dinh dưỡng cho cây *in vitro* tại vườn ươm bằng các loại phân bón lá được tiến hành trên các cây sống ổn định ở nền giá thể đã lựa chọn. Nồng độ và dung lượng các loại phân bón lá được sử dụng theo hướng dẫn của nhà sản xuất với tần suất phun 1 tuần/1 lần.

2.2.4. Bố trí thí nghiệm và xử lý số liệu

Các thí nghiệm *in vitro* được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên, lặp lại 3 lần cho một công thức, mỗi lần 10 mẫu. Thí nghiệm tại vườn ươm được bố trí theo khối ngẫu nhiên đầy đủ, mỗi công thức nhắc lại 3 lần, mỗi lần 30 mẫu.

Bảng 1. Ảnh hưởng của dung dịch NaDCC 0,5% đến hiệu quả khử trùng (sau 2 tuần)

Công thức	Thời gian khử trùng (phút)	Tỷ lệ mẫu sạch (%)	Tỷ lệ mẫu chết (%)	Tỷ lệ mẫu nhiễm (%)
CT1	5	21,0	8,6	70,4
CT2	10	37,9	14,6	47,5
CT3	20	59,5	16,0	24,5
CT4	30	44,8	40,6	14,6



Ghi chú: a. Mẫu cây ban đầu b. Mẫu cây sau 1 tuần c. Mẫu cây sau 2 tuần

Hình 1. Các mẫu sống và sạch sau khi khử trùng bằng NaDCC 0,5 % trong 20 phút

Số liệu thực nghiệm được xử lý với phần mềm Microsoft Excel 2010 và IRRISTAT 5.0.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Khử trùng mẫu cấy

Trước khi đưa vào nuôi cấy *in vitro*, các vật liệu thực vật được khử trùng để loại bỏ các vi sinh vật gây nhiễm môi trường dinh dưỡng và làm chết mẫu cấy. Các đoạn thân mang mầm ngủ của chồi cây dâu ngọt Đài Loan đã được khử trùng hiệu quả bằng dung dịch troclosene sodium (NaDCC) 0,5% trong 20 phút với tỷ lệ mẫu sống và sạch vi sinh vật đạt 59,5%. Khi thời gian xử lý ngắn (5-10 phút) tỷ lệ mẫu chết thấp nhưng tỷ lệ mẫu nhiễm vi sinh vật cao và khi kéo quá dài thời gian xử lý mẫu (30 phút) thì các tỷ lệ nêu trên đạt ngược lại (Bảng 1).

Sử dụng các hợp chất chứa chlorine để khử trùng mô thực vật khi nuôi cấy *in vitro* được nhiều tác giả đề cập (Gamborg & Philip, 1995; Pierik, 1997; Mustafa *et al.*, 2012). Hiệu quả khử trùng mẫu cấy bằng NaDCC đã xác định được trong thí nghiệm này là tương tự với các kết quả khử trùng mẫu cấy bằng NaClO hay Ca(ClO)₂ của một số tác giả khác. Akram &

Aftab (2012) đã tạo được mẫu cấy vô trùng khi xử lý đoạn thân của *M. macroura* bằng dung dịch NaClO 1% trong 15 phút; Nông Thi Huệ và cs. (2017) xử lý vô trùng hạt dâu tây bằng Ca(ClO)₂ 0,5% trong 30 phút. Đặng Quang Bích và cs. (2017) đã đạt được tỷ lệ 80% mẫu hạt trà hoa vàng vô trùng khi xử lý bằng NaClO 7% trong 20 phút. Theo tài liệu của Bộ Y tế (2015), NaDCC có hiệu lực khử trùng cao hơn hẳn dung dịch NaClO hay Ca(ClO)₂ có cùng hàm lượng chlorine. Điều đó do hai nguyên nhân: dung dịch NaClO hay Ca(ClO)₂ có pH kiềm, còn NaDCC có pH axit nên hoạt chất OCl⁻ tồn tại bền vững hơn; hơn nữa trong NaDCC chỉ có 50% lượng Clo sẵn có ở dưới dạng tự do (HClO và OCl⁻), phần còn lại ở dạng hợp chất như monochloro-isocyanurate và dichloro-isocyanurate nên được giải phóng dần trong thời gian xử lý.

3.2. Tạo chồi *in vitro* từ mầm ngủ

Trên cơ sở tham khảo các kết quả nghiên cứu đã công bố, môi trường nuôi cấy MS chứa hàm lượng BA khác nhau đã được sử dụng để kích thích sự bật chồi từ mầm ngủ của mẫu cấy. Trong khoảng nồng độ thí nghiệm từ 1-4 mg/l thì tỷ lệ tạo chồi tăng tuyến tính với nồng

độ BA của môi trường nuôi cấy. Bên cạnh đó, số lượng chồi hình thành từ mỗi mẫu cấy cũng phụ thuộc vào nồng độ BA, nhưng chỉ số này tăng dần và đạt cao nhất khi nồng độ BA 3 mg/l và sau đó giảm ở nồng độ BA cao hơn (Bảng 2). Kết quả cao về cả tỷ lệ tạo chồi, số chồi hình thành và chất lượng chồi tạo từ mầm ngủ dâu ngọt Đài Loan đạt được trên môi trường có nồng độ BA là 3mg/l. BA là một cytokinin tổng hợp có tác động khác phục trạng thái ngủ và hiện tượng ưu thế ngọn ở thực vật trong điều kiện *in vitro* (George *et al.*, 2008). BA được dùng tạo chồi từ mầm ngủ của nhiều đối tượng nuôi cấy *in vitro* và đặc biệt là với các loài thuộc chi *Morus* (Vijayan *et al.*, 2014). Đối với loài dâu quả dài *M. macroura* và dâu quả tròn *M. alba*, một số tác giả (Akram & Aftab, 2012; Balakrishnan *et al.*, 2009) đã khẳng định BA tác động tích cực đến sự tạo chồi và số chồi hình thành từ mầm ngủ. Tuy nhiên, nồng độ BA phù hợp để tạo chồi từ mầm ngủ của hai loài trên là

1,0-2,0 mg/l; trong khi với loài *Morus nigra* nồng độ phù hợp lại là 5 mg BA/l (Zaki *et al.*, 2011).

Sự sai khác so với công bố của các tác giả nêu trên có thể lý giải bởi các kiểu gen khác nhau có sự đáp ứng khác nhau đối với chất điều tiết sinh trưởng BA.

3.3. Nhân nhanh chồi và tạo cây *in vitro* hoàn chỉnh

3.3.1. Ảnh hưởng của tổ hợp chất điều tiết sinh trưởng đến nhân chồi *in vitro*

Trong thí nghiệm này, tổ hợp chất điều tiết sinh trưởng phù hợp để nhân chồi *in vitro* cây dâu ngọt Đài Loan là 3 mg BA/l + 0,5 mg IBA/l (Bảng 3). Nhưng điều đáng lưu ý ở đây là khi cố định hàm lượng BA và tăng dần hàm lượng IBA trong môi trường nuôi cấy thì hệ số nhân chồi cũng tăng theo một cách tuyến tính. Do vậy, cần tiếp tục khảo sát thêm tác động của tổ hợp BA với các nồng độ cao hơn của IBA để có thể nâng cao hệ số nhân chồi.

Bảng 2. Ảnh hưởng của nồng độ BA đến khả năng bật chồi của mầm ngủ (sau 4 tuần nuôi cấy)

Công thức	BA (mg/l)	Tỷ lệ tạo chồi (%)	Chiều cao chồi (cm)	Số lá TB (lá/chồi)	Số chồi/mẫu	Hình thái chồi
CT1 (ĐC)	0	12,50	1,83	2,54	1,17	Chồi nhỏ, lá vàng, đốm nâu
CT2	1	29,17	1,85	2,51	1,33	Chồi nhỏ, lá xanh và quăn
CT3	2	54,17	1,97	2,57	1,75	Chồi khỏe, lá xanh nhạt
CT4	3	83,33	2,15	2,17	2,17	Chồi khỏe, lá xanh nhạt
CT5	4	85,66	1,87	1,96	1,87	Chồi nhỏ, lá xanh đậm
CV (%)			3,6	3,1	2,8	
LSD _{0,05}			0,11	0,22	0,08	



Ghi chú: MS + 0 mg/l BA MS + 1 mg/l BA MS + 2 mg/l BA MS + 3 mg/l BA MS + 4 mg/l BA

Hình 2. Ảnh hưởng của nồng độ BA đến sự bật chồi của mầm ngủ sau 4 tuần nuôi cấy

Tổ hợp chất điều tiết sinh trưởng BA (3 mg/l) và IBA (0-0,5 mg/l) đã được sử dụng để nhân nhanh chồi *in vitro* cây dâu ngọt Đài Loan. Sự lựa chọn này dựa trên cơ sở kết quả của thí nghiệm tạo chồi từ mầm ngủ nêu trên và công bố của Akram & Aftab (2012). Hai tác giả này đã đạt được hệ số nhân chồi và chất lượng chồi *in vitro* cao nhất khi nuôi cấy cây dâu quả dài *M. macroura* trên môi trường MS có bổ sung 8,8 µM BA (tương đương 2 mg BA) và 2,0 µM IBA (tương đương 0,4 mg IBA).

3.3.2. Ảnh hưởng của nước dừa đến tăng trưởng của chồi *in vitro*

Trên môi trường nhân nhanh chồi (MS bổ sung 3 mg BA/l + 0,5 mg IBA/l), mặc dù hệ số nhân chồi đã đạt khá cao (2,67 chồi/mẫu) nhưng các chồi tạo thành có chiều cao và số lá trung bình thấp (Bảng 3). Để nâng cao chất lượng chồi, nước dừa đã được bổ sung thêm vào môi trường nhân chồi với hàm lượng khác nhau. Kết quả thí nghiệm thể hiện ở bảng 4 cho thấy nước dừa đã tác động rất tích cực đến chất lượng chồi tái sinh. Ở công thức bổ sung thêm 10% nước dừa chiều cao trung bình của chồi tăng thêm 0,7 cm/chồi và số lá trung bình tăng thêm 1,03 lá/chồi so với công thức không bổ sung thêm nước dừa. Hơn thế, hệ số nhân chồi cũng được tăng thêm khoảng 10%.

Nước dừa là nội nhũ lỏng của quả dừa và là dịch hữu cơ tự nhiên được sử dụng rộng rãi trong nuôi cấy thực vật *in vitro*. Hàm lượng nước dừa trong môi trường nuôi cấy phù hợp cho nhiều loại cây khác nhau thường dao động từ 5-15% (Pierik, 1997). Ngoài các thành phần vitamin, đường, chất khoáng trong nước dừa có

hàm lượng cao 1,3-Diphenylurea nên kích thích mạnh sự phân chia tế bào và sự tăng trưởng chồi mầm (Kobayashi *et al.*, 1995). Ở nước ta, nước dừa là nguyên liệu rất phổ biến và giá khá rẻ. Do vậy, việc bổ sung nước dừa vào môi trường nuôi cấy để cải thiện hệ số nhân và chất lượng chồi *in vitro* là hoàn toàn khả thi, ngay cả khi mở rộng kết quả nghiên cứu này vào thực tiễn sản xuất cây giống ở quy mô lớn.

3.3.3. Ảnh hưởng của chất điều tiết sinh trưởng đến tái sinh rễ của chồi *in vitro*

Kết quả cảm ứng tạo rễ bất định cho chồi *in vitro* cây dâu ngọt Đài Loan bằng IBA được trình bày ở bảng 5. Chồi *in vitro* có thể ra rễ trên môi trường MS không bổ sung IBA nhưng tỷ lệ chồi có rễ thấp (46,67%). Môi trường MS bổ sung thêm 0,5 mg IBA/l cho tỷ lệ chồi tạo rễ (96,67%), số rễ/cây (6,13 rễ) và chiều dài trung bình của rễ (3,02 cm) cao nhất trong các công thức thí nghiệm. Nồng độ IBA tăng cao hơn 0,5 mg/l đã làm giảm tỷ lệ chồi ra rễ và ức chế mạnh sự tăng trưởng của rễ.

IBA là hợp chất auxin tổng hợp được dùng phổ biến để cảm ứng tạo rễ bất định *in vitro* cho nhiều loài của chi *Morus* và nồng độ IBA sử dụng dao động từ 0,25-2,0 mg/l (Vijayan *et al.*, 2014). Nồng độ IBA thích hợp để tạo rễ *in vitro* biến đổi tùy thuộc các loài dâu khác nhau.

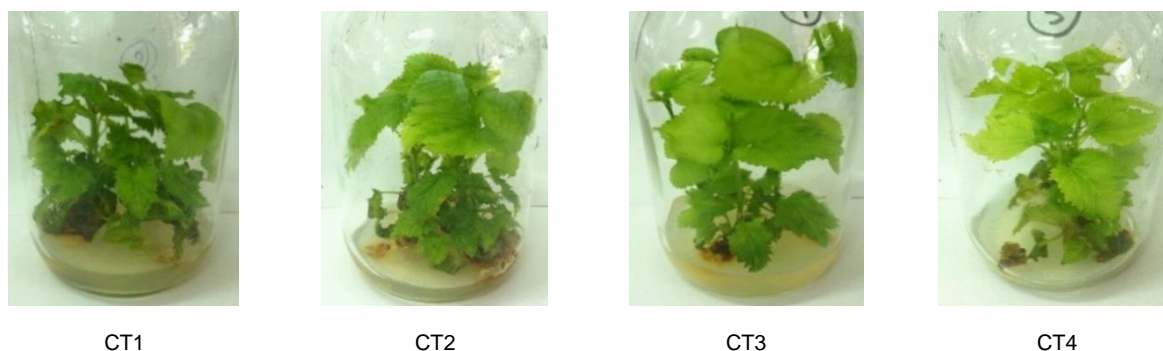
Kết quả nêu trên tương tự kết quả mà Bhau & Wakhlu (2003), Balakrishnan *et al.* (2009) và Sajeevan *et al.* (2011) đã công bố khi dùng IBA cảm ứng tạo rễ *in vitro* cho cây dâu *M. alba*. Akram & Aftab (2012) cũng đã khẳng định nồng độ IBA từ 0,4-0,8 mg/l là phù hợp để kích thích tạo rễ *in vitro* cây dâu quả dài *M. macroura*.

Bảng 3. Ảnh hưởng của tổ hợp BA với IBA đến khả năng nhân chồi (sau 4 tuần nuôi cấy)

Công thức	BA (mg/l)	IBA (mg/l)	Hệ số nhân (chồi/mẫu)	Chiều cao TB (cm)	Số lá TB (lá/chồi)
CT1 (ĐC)	3	0	1,90	2,40	1,55
CT2	3	0,1	2,10	2,42	1,52
CT3	3	0,3	2,44	2,52	1,67
CT4		0,5	2,67	2,58	1,66
CV%			3,4	0,5	1,3
LSD _{0,05}			0,14	0,02	0,09

Bảng 4. Ảnh hưởng của nước dừa đến tăng trưởng của chồi của *in vitro* (sau 4 tuần nuôi cấy)

Công thức	BA (mg/l)	IBA (mg/l)	Nước dừa (%)	Số lá TB (lá/chồi)	Chiều cao TB (cm)	Hệ số nhân (Chồi/mẫu)
CT1 (ĐC)	3	0,5	0	1,60	2,50	2,67
CT2	3	0,5	5	2,50	2,78	2,77
CT3	3	0,5	10	2,63	3,20	2,93
CT4	3	0,5	15	2,54	2,93	2,84
CV (%)				2,0	1,0	1,3
LSD _{0,05}				0,11	0,05	0,11

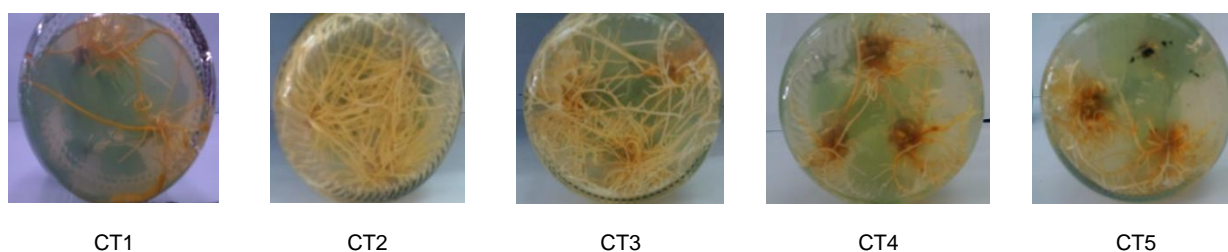


Ghi chú: CT1: MS + 3 mg/l BA + 0,5 mg/l IBA; CT2: MS + 3 mg/l BA + 0,5 mg/l IBA + 5% nước dừa; CT3: MS + 3 mg/l BA + 0,5 mg/l IBA + 10% nước dừa; CT4: MS + 3 mg/l BA + 0,5 mg/l IBA + 15% nước dừa;

Hình 3. Ảnh hưởng của nước dừa đến sự tăng trưởng chồi *in vitro* sau 4 tuần nuôi cấy

Bảng 5. Ảnh hưởng của IBA đến khả năng tái sinh rễ của chồi *in vitro* (sau 4 tuần nuôi cấy)

Công thức	IBA (mg/l)	Tỷ lệ ra rễ (%)	Số rễ TB (rễ/cây)	Chiều dài rễ TB (cm)
CT1 (ĐC)	0	46,67	3,38	3,99
CT2	0,5	96,67	6,13	3,02
CT3	1,0	90,00	3,70	1,57
CT4	1,5	76,67	2,30	1,47
CT5	2,0	66,67	1,90	1,24
CV (%)			3,6	1,0
LSD _{0,05}			0,23	0,03



Ghi chú: CT1: MS + 0 mg/l IBA; CT2: MS + 0,5 mg/l IBA; CT3: MS + 1,0 mg/l IBA; CT4: MS + 10,5 mg/l IBA; CT5: MS + 2,0 mg IBA/l

Hình 4. Ảnh hưởng của IBA đến khả năng ra rễ *in vitro* sau 4 tuần nuôi cấy

Kết quả thu được đối với cây dâu ngọt Đài Loan là hợp lý bởi cây dâu ngọt Đài Loan là con lai của *M. alba* và *M. macroura* nên phản ứng của nó với IBA có sự tương đồng như các cây bố mẹ.

3.4. Thích ứng cây *in vitro* tại vườn ươm

3.4.1. Ảnh hưởng của giá thể trồng đến khả năng sống và sinh trưởng của cây

Khi trồng trên giá thể cát, tỷ lệ cây sống cao nhất (80%) và cây khỏe mạnh. Cây trồng trên giá thể trấu hun hay xơ dừa đều có tỷ lệ cây sống thấp hơn (60-63%) và cây sinh trưởng yếu. Khả năng sống và sinh trưởng của cây *in vitro* trồng trên giá thể trấu hun + cát (1:1) tốt hơn so với sử dụng giá thể trấu hun hay xơ dừa và đạt tỷ lệ cây sống là 73% (Bảng 6).

Giá thể trồng cây là một yếu tố rất quan trọng tạo điều kiện cho cây *in vitro* thích ứng trở lại đời sống tự dưỡng. Các giá thể dùng trồng cây *in vitro* tại vườn ươm thường là cát, trấu hun, xơ dừa, vermiculite... Các giá thể này có thể dùng riêng rẽ hoặc phối trộn theo các tỷ lệ khác nhau để phù hợp cho từng loại cây. Akram & Aftab (2012) đã sử dụng giá thể gồm đất + cát +

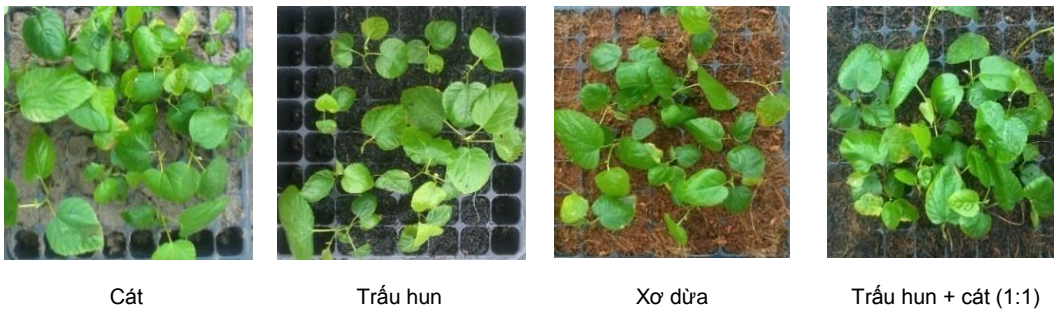
than bùn (1:1:2) cho cây *in vitro* loài *M. macroura* và đạt tỷ lệ sống 65% khi thích ứng cây trong điều kiện tự nhiên. Nghiên cứu của Zaki *et al.* (2011) cũng đã đạt tỷ lệ sống cao nhất là 80% khi trồng cây *in vitro* loài *Morus nigra* trên giá thể cát + vermiculite (1:1). Đối với cây dâu ngọt Đài Loan, trong các loại giá thể nghiên cứu, giá thể cát là phù hợp hơn cả cho cây *in vitro* ở giai đoạn vườn ươm

3.4.2. Ảnh hưởng của phân bón lá đến sinh trưởng của cây *in vitro*

Số liệu trình bày tại bảng 7 cho thấy trong ba loại phân bón lá thử nghiệm, phân Đầu trâu 502 thúc đẩy tăng chiều cao, số lá và chất lượng cây tốt nhất. Sở dĩ loại phân này ưu thế hơn hai loại còn lại vì trong thành phần phân Đầu trâu 502, ngoài các nguyên tố khoáng đa lượng, vi lượng còn có thêm các chất điều tiết sinh trưởng Gibberillic acid và α -Naphthaleneacetic acid. Các cây sau 4 tuần phun phân bón (8 tuần sau khi trồng) có thể chuyển từ khay ươm trên giá thể cát sang trồng chậu hoặc vườn trồng với các loại giá thể giàu dinh dưỡng hơn để phù hợp cho sự sinh trưởng, phát triển tiếp theo.

Bảng 6 . Ảnh hưởng của giá thể đến khả năng sống và sinh trưởng của cây (sau trồng 4 tuần)

Công thức	Loại giá thể	Tỷ lệ cây sống (%)	Chiều cao TB (cm)	Số lá TB (lá/cây)	Hình thái cây
CT1	Cát	80,00	5,50	4,00	Thân và lá to, xanh
CT2	Trấu hun	63,00	5,01	3,62	Thân và lá nhỏ, rụng lá
CT3	Xơ dừa	60,00	5,18	4,50	Thân và lá nhỏ; xanh vàng
CT4	Trấu hun + cát (1:1)	73,00	5,32	4,25	Thân và lá to, xanh
CV%			0,6	0,6	
LSD _{0,05}			0,55	0,47	



Hình 5. Cây *in vitro* sau 4 tuần trồng trên các loại giá thể khác nhau

Bảng 7. Ảnh hưởng của các loại phân bón lá đến sự sinh trưởng của cây *in vitro* tại vườn ươm (sau 4 tuần phun phân bón)

Công thức	Chiều cao cây TB (cm)	Số lá TB (lá/cây)	Hình thái cây
Nước (đối chứng)	6,49	6,43	Cây yếu, lá vàng và nhỏ
Đầu trâu 502	8,32	7,24	Cây khỏe, lá to và xanh
Antonik	7,84	7,08	Cây khỏe, lá xanh, nhỏ
Seaweed	7,21	6,78	Cây khỏe, lá xanh, nhỏ
CV (%)	1,1	4,4	
$LDS_{0,05}$	0,16	0,56	



Nước



Đầu trâu 502



Antonik



Seaweed



Cây trồng chậu

Hình 6. Cây *in vitro* khi phun các loại phân bón lá khác nhau (sau 4 tuần phun phân bón)

Phân bón lá là các hợp chất dinh dưỡng hòa tan được trong nước và cung cấp cho cây bằng cách phun lên lá. Khi bón qua lá, hiệu suất sử dụng chất dinh dưỡng đạt cao hơn bón qua đất bởi tích lá bằng 15-20 lần diện tích đất mà rễ cây phân bố. Đồng thời tốc độ hấp thu và vận chuyển chất dinh dưỡng qua lá cũng nhanh hơn gấp 30 lần hấp thu từ rễ. Do vậy, với cây *in vitro* mới thích ứng với điều kiện sống tự dưỡng, rễ bất định hình thành trong nuôi cấy thường chưa có rễ bên nên việc bón phân qua lá là hết sức cần thiết giúp cây sinh trưởng tốt.

4. KẾT LUẬN

Kết quả nghiên cứu cho phép thiết lập được các thông số kỹ thuật của quy trình nhân giống vô tính *in vitro* cây dâu ngọt Đà Loan khi sử dụng vật liệu khởi đầu là chồi một tháng tuổi của cây mẹ hai năm tuổi. Quy trình này bao gồm đầy đủ các công đoạn: Khử trùng mẫu cây bằng dung dịch NaDCC 0,5% trong 20 phút; kích thích tạo chồi *in vitro* từ mầm ngủ trên môi trường MS + 3 mg/l BA và nhân nhanh chồi *in vitro* trên môi trường MS + 3 mg/l BA + 0,5 mg/l IBA + 10% nước dừa; nuôi cấy chồi trên môi

trường MS + 0,5 mg IBA/l để tạo cây *in vitro* hoàn chỉnh; cây *in vitro* được trồng ở nhà lưới, trên giá thể cát và phun phân bón lá Đầu trâu 502 với tần xuất 1 lần/tuần. Nhân giống *in vitro* cây dâu ngọt Đà Loan theo quy trình nêu trên có hiệu quả cao (hệ số nhân giống 2,93 lần/4 tuần, tỷ lệ cây sống 80%, sau 8 tuần trồng ở vườn ươm cây *in vitro* đạt tiêu chuẩn cây giống) và có thể dễ dàng áp dụng ở quy mô lớn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Ahmad, P., S. Sharma and P.S. Srivastava (2007). *In vitro* selection of NaHCO₃ tolerant cultivars of *Morus alba* (Local and Sujampur) in response to morphological and biochemical parameters. Hort. Sci., 34: 114-122.
- Akram, M. and F. Aftab (2012). Efficient micropropagation and rooting of king white mulberry (*Morus macroura* Miq.) var. laevigata from nodal explants of mature tree. Pak. J. Bot., 44: 285-289.
- Anis M., M. Faisal and S.K. Singh (2003). Micropropagation of mulberry (*Morus alaba* L.) through *in vitro* culture of shoot tip and nodal explants. Plant Tissue Cult., 13: 47-51.
- Balakrishnan V., M.R. Latha, K.C. Ravindran and J.P. Robinson (2009). Clonal Propagation of *Morus*

- alba* L. through nodal and axillary bud explants. Bot. Res. Intl., 2: 42-49.
- Bhau B.S. and A.K. Wakhlu (2003). Rapid micropropagation of five cultivars of mulberry. Biol. Plant, 46: 349-355.
- Đặng Quang Bích, Nguyễn Thị Phương Thảo, Trần Văn Phú, Đinh Trường Sơn, Ninh Thị Thảo, Nguyễn Văn Huân, Trần Văn Lin, Nguyễn Thị Thùy Linh (2017). Quy trình nhân giống *in vitro* cây trà hoa vàng (*Camellia* sp.). Tạp chí Khoa học nông nghiệp Việt nam, 12: 1657-1669.
- Bộ Y tế (2015). Các chất khử khuẩn được sử dụng trong y tế. Phụ lục kèm theo Quyết định số 4290/QĐ-BYT, ngày 15/10/2015.
- Chattopadhyay S., S.G. Doss, S. Halder, A.K. Ali and A.K. Bajpai (2011). Comparative micropropagation efficiency of diploid and triploid mulberry (*Morus alba* cv. S1) from axillary bud explants. Afr. J. Biotech, 10: 18153-18159.
- Chitra D.S.V. and G. Padmaja (2005). Shoot regeneration via direct organogenesis from *in vitro* derived leaves of mulberry using thidiazuron and 6-benzylaminopurine. Sci. Hort., 106: 593-602.
- Gamborg O.L. and Philip G.C. (1995). Plant cell, tissue and organ culture. Pub. Springer, pp. 37-39
- George E. F., M. A. Hall, Geert-Jan De Klerk (2008). Plant Propagation by Tissue Culture. 3rd Edition. Pub. Springer, 1: 205-226.
- Nông Thị Huệ, Phạm Thị Thu Hằng, Tường Thị Thanh Huyền, Nguyễn Thị Thùy Linh, Nguyễn Thị Lâm Hải, Nguyễn Thanh Hải (2017). Nghiên cứu nhân giống *in vitro* cây dâu tây giống SMiA nhập nội từ Mỹ. Tạp chí Khoa học nông nghiệp Việt nam, 12: 1670-1679.
- Kobayashi H., Morisaki N., Tago Y., Hashimoto Y., Iwasaki S., Kawachi E., Nagata R., Shudo K. (1995). Identification of a major cytokinin in coconut milk. Experientia, 51(11): 1081-1084.
- Lalitha, N., S. Kih, R. Banerjee, S. Chattopadhyay, A.K. Saha and B.B. Bindroo (2013). High frequency multiple shoot induction and *in vitro* regeneration of mulberry (*Morus indica* L. cv. S-1635). Int. J. Adv. Res., 1: 22-26.
- Mustafa Yildiz, S. Fatih Ozcan, Cansu T. Kahramanogullari, Ege Tuna (2012). The Effect of Sodium Hypochlorite Solutions on the Viability and In Vitro Regeneration Capacity of the Tissue. The Natural Products Journal, 2(4): 328-331.
- Murashige T., Skoog F. (1962). A revised medium for rapid growth bioassay with tobacco tissue cultures. Physiology Plant, 15: 473-479.
- Pierik R.L.M. (1997). *In vitro* Culture of Higher Plants. Kluwer Academic Publishers, pp.67-94.
- Sajeevan R.S., S.Jeba Singh, K.N. Nataraja and M.B. Shivanna (2011). An efficient *in vitro* protocol for multiple shoot induction in mulberry, *Morus alba* L. variety V1. Intl. Res.J. Plant. Sci., 2: 254-261.
- Trần Khắc Thi (2014). Kỹ thuật trồng dâu siêu ngọt. <http://agriviet.com/threads/giong-cay-dau-qua-dai-dai-loan>
- Vijayan K., P. Jayarama Raju, A. Tikader and B. Saratchandra Vijayan, K., A. Tikader and A.J.T. Da Silva (2014). Biotechnology of mulberry (*Morus* L.) - A review. J. Food Agric., 26(6): 472-496.
- Zaki M., Z.A. Kaloo and M. Sofi (2011). Micropropagation of *Morus nigra* L. from nodal segments with axillary buds. World J. Agri. Sci., 7: 496-503.