

NGHIÊN CỨU TÁI SINH *IN VITRO* CÂY QUÝT BẮC KẠN

Nguyễn Thị Tâm¹, Phí Hữu Việt², Dương Hữu Lộc³

¹Trường Đại học Sư phạm - ĐH Thái Nguyên,

²THCS Hàn Thuyên, Lương Tài, Bắc Ninh,

³Trường Đại học Nông Lâm - ĐH Thái Nguyên

TÓM TẮT

Nghiên cứu tái sinh *in vitro* cây quýt Bắc Kạn cho thấy, thời gian khử trùng hạt trong 20 phút bằng dung dịch Javen 60% cho hiệu quả cao nhất. Môi trường MS bổ sung BAP 3,0 mg/l + IBA 1,5 mg/l cho số chồi/mẫu cao hơn hẳn so với các môi trường chỉ có BAP hoặc kinetin. Nồng độ tốt nhất cho chồi ra rễ là α -NAA 0,5 mg/l trên môi trường nền MS, có bổ sung sucrose 30 g/l + agar 9 g/l + nước dừa 50 ml/l. Kết quả nghiên cứu là cơ sở cho việc ứng dụng các công nghệ theo hướng nâng cao chất lượng cây quýt Bắc Kạn

Từ khóa: BAP, IBA, Kinetin, Quýt Bắc Kạn, tái sinh cây

MỞ ĐẦU

Cây quýt đã được UBND tỉnh Bắc Kạn định hướng là cây giúp xóa đói giảm nghèo và phát triển kinh tế của tỉnh. Quả quýt Bắc Kạn chứa nhiều chất dinh dưỡng, vitamin, chất khoáng cần thiết cho sức khỏe con người. Tuy nhiên, quả quýt Bắc Kạn còn vị chua do chứa nhiều axit hữu cơ nên sức cạnh tranh trên thị trường còn chưa cao. Ứng dụng công nghệ sinh học có thể khắc phục hạn chế trên, làm tăng khả năng chuyển hóa đường, tăng độ ngọt, giảm độ chua của quýt Bắc Kạn. Trong đó, nghiên cứu quy trình tái sinh *in vitro* là cơ sở cho việc ứng dụng các công nghệ tiếp theo. Trên thế giới cũng như trong nước đã có một số công trình nghiên cứu xây dựng quy trình tái sinh *in vitro* cây ăn quả có múi. Suneel và cộng sự (2009) [5] đã tìm ra môi trường tái sinh từ đoạn chồi cây non quýt Cleo- Patra. Ở Ấn Độ, Adhikarimayum và cộng sự (2011) [3] nghiên cứu nhân giống quýt *Megaloxycarpa* Lush vùng Manipur từ đoạn thân mang mắt tạo chồi bên. Ở Việt Nam, Phan Hữu Tôn và cộng sự (2014) [1] đã nghiên cứu và xây dựng thành công hệ thống tái sinh *in vitro* cây cam Vinh và quýt Đường Canh từ trụ trên lá mầm. Do các giống cây ăn quả khác nhau về kiểu gen nên có phản ứng khác nhau với môi trường nuôi cấy *in vitro*. Với giống quýt Bắc Kạn chưa có tác giả nào

công bố quy trình tái sinh *in vitro* hoàn chỉnh. Bài báo này trình bày kết quả nghiên cứu nuôi cấy *in vitro* từ đoạn thân mang nách lá mầm của giống quýt Bắc Kạn.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu nghiên cứu

Hạt được thu thập từ quả của giống quýt Bắc Kạn được khử trùng, sau đó cấy trong môi trường nhân tạo để tạo vật liệu sạch ban đầu. Đoạn gốc mang nách lá mầm của các cây con nảy mầm từ hạt được sử dụng làm vật liệu tái sinh *in vitro*.

Phương pháp nghiên cứu

Khử trùng hạt: Hạt được rửa bằng nước sạch, ngâm trong nước xà phòng loãng trong thời gian 5 phút, rửa bằng cồn 70% để làm căng bề mặt, sau đó cho vào dung dịch javen 60% với thời gian khử trùng khác nhau (10 phút, 15 phút, 20 phút, 25 phút 30 phút). Hạt sau khử trùng cấy vào môi trường MS cơ bản có bổ sung agar 9 g/l + sucrose 30 g/l. Theo dõi kết quả sau 4 tuần.

Môi trường nhân chồi: Môi trường tái sinh là MS cơ bản, bổ sung agar 9 g/l + sucrose 30 g/l + nước dừa 50 ml/l có bổ sung chất điều hòa sinh trưởng (BAP, kinetin) với nồng độ 2,0 – 2,5 – 3,0 – 3,5 – 4 mg/l. Kết quả thu được tốt nhất sẽ để nghiên cứu phối hợp với IBA nồng độ 0,5 – 1,0 – 1,5 – 2,0 – 2,5 mg/l. Đối chứng là môi trường MS cơ bản không

* Tel: 0986 059258

bổ sung chất điều hòa sinh trưởng. Các chỉ tiêu theo dõi: Tỷ lệ ra chồi (%), số chồi/mẫu, chiều cao chồi (cm) sau 4 tuần, 6 tuần, 8 tuần.

Môi trường tạo rễ: Các chồi khi đạt chiều cao 1,5 – 2,0 cm được chuyển sang môi trường ra rễ gồm MS cơ bản, bổ sung agar 9 g/l + sucrose 30 g/l + nước dừa 50 ml/l + α -NAA với các nồng độ 0,3; 0,5; 0,7; 0,9; 1,2 mg/l. Đối chứng là môi trường MS cơ bản, không bổ sung chất điều hòa sinh trưởng. Theo dõi tỷ lệ ra rễ (%), số rễ/mẫu và chiều dài rễ sau 4 tuần, 6 tuần, 8 tuần.

Ra cây: Khi cây *in vitro* có chiều cao từ 2,5 cm – 3,0 cm với từ 3 đến 4 rễ, các rễ dài từ 1,5 cm đến 2,0 cm tiến hành ra cây trên các loại giá thể: Đất phù sa, trấu hun, đất phù sa + trấu hun (tỷ lệ 1:1). Trong 2-3 ngày đầu tưới nước sạch bằng cách phun sương 4 giờ/lần, che nilon có đục lỗ để tránh rét và tránh thoát nước nhanh. Sau 3 ngày, bỏ nilon che, để khay cây ra nơi đủ ánh sáng, thoáng khí nhưng hạn chế gió, tránh nắng mưa trực tiếp. Tưới nước bằng bình phun 2-3 lần/ngày.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Ảnh hưởng của thời gian khử trùng tới sự nảy mầm hạt quýt Bắc Kạn

Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của thời gian khử trùng tới sự nảy mầm hạt quýt Bắc Kạn cho thấy, khử trùng hạt bằng javen 60% trong thời gian 20 phút có hiệu quả cao nhất, tỷ lệ nhiễm rất thấp (2,5%) và tỷ lệ nảy mầm cao nhất (97,4%), mầm cao, mập, lá to màu xanh đậm. Với thời gian khử trùng là 25 phút và 30 phút các mẫu không nhiễm, tuy nhiên tỷ lệ nảy mầm thấp hơn hẳn (tỷ lệ nảy mầm lần lượt là 82,5% và 77,5%), mầm thấp, trụ mầm nhỏ, sinh trưởng chậm. Hạt quýt được cấu tạo gồm hai lớp vỏ: lớp vỏ cứng bên ngoài và bên trong là lớp vỏ lụa. Với thời gian khử trùng ngắn, dung dịch chất khử trùng chưa thấm được vào phôi và phôi nhũ nên ít ảnh hưởng đến sự nảy mầm của hạt. Nhưng với thời gian

khử trùng dài thì dung dịch chất khử trùng thấm qua hai lớp màng và ảnh hưởng tới khả năng nảy mầm của hạt. Như vậy, khử trùng hạt quýt bằng javen 60% trong thời gian 20 phút cho hiệu quả tốt nhất.

Ảnh hưởng của BAP tới sự phát sinh chồi của quýt Bắc Kạn

Dựa trên nghiên cứu của một số tác giả trên các đối tượng cam quýt khác nhau như Phan Hữu Tôn (2014) [2], Suneel và cộng sự (2009) [5], chúng tôi tiến hành nghiên cứu thăm dò để tìm ra môi trường tối ưu cho sự phát sinh chồi của cây quýt Bắc Kạn. Trong nghiên cứu này đoạn thân dài 0,8-1,0 cm mang nách lá mầm thu được từ hạt khử trùng nảy mầm được sử dụng làm vật liệu tái sinh *in vitro* trên môi trường MS cơ bản, bổ sung agar 9 g/l + sucrose 30 g/l + nước dừa 50 ml/l + BAP nồng độ 2,0 – 2,5 – 3,0 – 3,5 – 4,0 mg/l. Kết quả thu được thể hiện ở bảng 1. Khả năng phát sinh chồi chịu sự ảnh hưởng của nồng độ BAP. Nồng độ BAP tăng dần từ 2,0 - 3,0 mg/l tỷ lệ mẫu phát sinh chồi và số chồi/mẫu tăng dần. Tăng nồng độ BAP từ 3,6 mg/l thì khả năng phát sinh chồi, số chồi/mẫu bắt đầu giảm. Môi trường nuôi cấy có bổ sung BAP nồng độ 3,0 mg/l có hiệu quả cao nhất, sau 8 tuần tỷ lệ phát sinh chồi đạt 87,8% (đạt 493,3% so đối chứng) và đạt 3,5 chồi/mẫu (đạt 250% so với đối chứng). Ở nghiên cứu này, nồng độ tối ưu cho sự phát sinh chồi của cây quýt Bắc Kạn cao hơn so với các nghiên cứu trên đối tượng cây cam Vinh và quýt Đường Canh của Phan Hữu Tôn (2014) [2], trên đối tượng cây chanh dây của Lê Văn Trường Huân (2007) [1], quýt Cleo- Patra của Suneel và cộng sự (2009) [5], Jajoo (2010) [4]. Sự khác biệt đó có thể là do các giống khác nhau có phản ứng khác nhau với chất kích thích sinh trưởng, do điều kiện thí nghiệm và nguồn hóa chất sử dụng khác nhau.

Bảng 1. Ảnh hưởng của BAP đến sự phát sinh chồi của cây quýt Bắc Kạn (sau 8 tuần nuôi cấy)

BAP (mg/l)	Tỉ lệ mẫu phát sinh chồi (%)		Số chồi/mẫu		Chất lượng chồi
	\bar{X}	% so với ĐC	$\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$	% so với ĐC	
0 (ĐC)	17,8	100	1,4± 0,3	100	+
2,0	57,8	324,7	2,2±0,5	157,1	++
2,5	61,3	344,4	2,4±0,5	171,4	++
3,0	87,8	493,3	3,5±0,7	250,0	+++
3,5	65,7	369,1	2,7±0,5	192,8	+++
4,0	55,7	312,9	2,4±0,6	171,4	++

Ghi chú: (+): Chồi nhỏ, ngắn, lá bé, màu xanh nhạt; (++) : Chồi to, khỏe, lá to phát triển cân đối, số chồi/mẫu ít; (+++): Chồi to, khỏe, lá to, phát triển cân đối, số chồi/mẫu cao

Bảng 2. Ảnh hưởng của kinetin đến sự phát sinh chồi của cây quýt Bắc Kạn

Kinetin (mg/l)	Tỉ lệ mẫu phát sinh chồi (%)		Số chồi/mẫu		Chất lượng chồi
	\bar{X}	% so với ĐC	$\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$	% so với ĐC	
0 (ĐC)	16,7	100	1,5 ± 0,3	100	+
2,0	46,7	279,6	1,9± 0,6	126,6	+
2,5	50,0	299,4	2,2± 0,3	146,7	++
3,0	62,2	372,5	2,4± 0,4	160,0	++
3,5	74,4	445,5	3,0± 0,6	200,0	+++
4,0	52,2	312,6	2,3± 0,5	153,3	++

Ghi chú: (+): Chồi nhỏ, ngắn, lá bé, màu xanh nhạt; (++) : Chồi to, khỏe, lá to phát triển cân đối nhưng số chồi/mẫu ít; (+++): Chồi to, khỏe, lá to, phát triển cân đối, số chồi/mẫu cao

Ảnh hưởng của kinetin tới sự phát sinh chồi của quýt Bắc Kạn

Tiếp tục nghiên cứu ảnh hưởng của kinetin lên sự phát sinh chồi của cây quýt Bắc Kạn bằng cách bổ sung vào môi trường nuôi cấy kinetin có nồng độ 2,0 – 2,5 – 3,0 – 3,5 – 4,0 mg/l. Môi trường đối chứng không bổ sung chất kích thích sinh trưởng. Kết quả thu được cho thấy, nồng độ kinetin đã ảnh hưởng đến khả năng phát sinh chồi của quýt Bắc Kạn, tỉ lệ phát sinh chồi tăng dần khi nồng độ kinetin tăng từ 2,0-3,5 mg/l, khi nồng độ kinetin tăng cao hơn, khả năng phát sinh chồi giảm, sự phát sinh chồi của quýt Bắc Kạn cao nhất khi bổ sung kinetin 3,5 mg/l. Sau 8 tuần, tỉ lệ mẫu phát sinh chồi đạt 74,4% (đạt 445,5% so với đối chứng) và 3,0 chồi/mẫu (đạt 200% so với đối chứng). So sánh môi trường bổ sung BAP 3,0 mg/l với môi trường bổ sung kinetin 3,5 mg/l cho thấy, sau 8 tuần nuôi cấy tỉ lệ mẫu tạo chồi, số chồi/mẫu ở môi trường BAP 3,0 mg/l cao hơn so với môi trường bổ sung kinetin 3,5 mg/l.

Ảnh hưởng của tổ hợp BAP và IBA đến sự phát sinh chồi quýt Bắc Kạn

Ở thí nghiệm trên chúng tôi đã tìm ra nồng độ BAP tốt nhất cho sự phát sinh chồi của quýt Bắc Kạn là 3,0 mg/l. Tuy nhiên, số chồi phát sinh từ mỗi mẫu cây còn thấp, để tăng số chồi/mẫu chúng tôi tiếp tục nghiên cứu ảnh hưởng của tổ hợp chất kích thích sinh trưởng BAP 3,0 mg/l và IBA 0,5 mg/l – 2,5 mg/l đến khả năng phát sinh chồi của quýt Bắc Kạn trong ống nghiệm. Kết quả bảng 3 cho thấy, môi trường có bổ sung IBA kết hợp với BAP 3,0 mg/l cho tỉ lệ phát sinh chồi và số chồi/mẫu cao hơn hẳn so với môi trường chỉ bổ sung riêng rẽ BAP. Khi tăng nồng độ IBA từ 0,5-1,5 mg/l thì tỉ lệ phát sinh chồi và số chồi/mẫu tăng dần, khi nồng độ IBA tăng lên 2,0 mg/l thì tỉ lệ phát sinh chồi và số chồi/mẫu bắt đầu giảm. Môi trường có bổ sung nồng độ BAP 3,0 mg/l+ IBA 1,5 mg/l có hiệu quả cao nhất với tỉ lệ phát sinh chồi là 93,3% (đạt 524,2% so với đối chứng) và 4,7 chồi/mẫu (đạt 349,3% so với đối chứng) sau 8 tuần nuôi cấy.

Bảng 3. Ảnh hưởng của tổ hợp BAP và IBA đến sự phát sinh chồi của cây quýt Bắc Kạn (sau 8 tuần nuôi cấy)

BAP (mg/l)	IBA (mg/l)	Tỉ lệ mẫu phát sinh chồi (%)		Số chồi/mẫu		Chất lượng chồi
		\bar{X}	% so với ĐC	$\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$	% so với ĐC	
3,0	0	17,8	100	1,4±0,3	100	+
	0,5	63,3	357,3	2,7± 0,5	192,9	++
	1,0	68,9	387,1	3,3± 0,3	235,7	+++
	1,5	93,3	524,2	4,7± 0,6	349,3	+++
	2,0	75,6	424,7	3,5± 0,5	335,7	+++
	2,5	56,7	318,5	2,5±0,5	178,6	++

Ghi chú: (+): Chồi nhỏ, ngắn, lá bé, màu xanh nhạt; (++) : Chồi to, khỏe, lá to phát triển cân đối số chồi/mẫu ít; (+++): Chồi to, khỏe, lá to, phát triển cân đối

Bảng 4. Ảnh hưởng của α-NAA đến sự phát sinh rễ của cây quýt Bắc Kạn (sau 8 tuần)

α-NAA (mg/l)	Tỉ lệ mẫu phát sinh rễ (%)	Số rễ/mẫu	Chiều dài rễ (cm)	Chất lượng rễ
0	0	0	0	
0,3	53,3	2,21± 0,4	1,5± 0,1	++
0,5	90,0	2,89± 0,6	2,1±0,1	+++
0,7	56,7	1,75± 0,2	1,4±0,0	+++
0,9	33,3	1,50± 0,4	0,7±0,0	++
1,2	0	0	0	

Ghi chú: (+): Rễ ngắn, nhỏ yếu; (++) : Rễ ngắn, ít lông tơ, hóa nâu nhiều; (+++): Rễ dài, mập, khỏe có nhiều lông tơ

Ảnh hưởng của α-NAA tới sự hình thành rễ

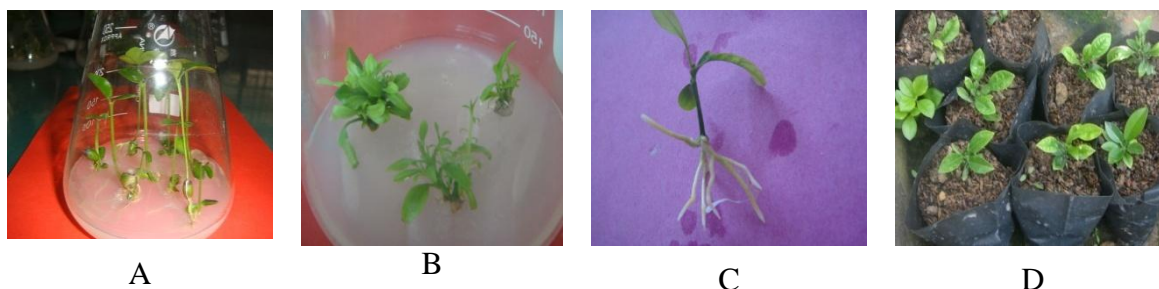
α-NAA là chất điều hòa sinh trưởng nhân tạo thuộc nhóm auxin, có hoạt tính sinh lí như một auxin tự nhiên, có tác dụng thúc đẩy sự sinh trưởng và giãn nở của tế bào, tăng cường các quá trình sinh tổng hợp và trao đổi chất, đặc biệt là kích thích tạo rễ. α-NAA được sử dụng bổ sung vào môi trường nuôi cấy nồng độ từ 0,1 mg/l – 2,0 mg/l. Chúng có hiệu quả sinh lý ở nồng độ thấp. Với những tìm hiểu về đặc tính của α-NAA, chúng tôi tiến hành nghiên cứu ảnh hưởng của α-NAA tới sự hình thành rễ cây quýt Bắc Kạn bằng môi trường cơ bản có bổ sung agar 9 g/l + sucrose 30 g/l + nước dừa 50 ml/l + α-NAA từ 0,3 đến 1,2 mg/l. Kết quả thu được trình bày ở bảng 4.

Qua bảng số liệu cho thấy, nồng độ α-NAA ảnh hưởng đến sự phát sinh rễ của cây quýt Bắc Kạn trong nuôi cấy *in vitro*. Môi trường đối chứng (không bổ sung α-NAA) không thấy có sự phát sinh rễ từ chồi nuôi cấy. Tỉ lệ mẫu cây phát sinh rễ, số rễ/chồi cũng như chiều dài rễ tăng dần khi nồng độ α-NAA tăng từ 0,3-0,5 mg/l. Ở nồng độ α-NAA 0,7

mg/l thì tỉ lệ phát sinh rễ và số rễ/chồi bắt đầu giảm. Sau 8 tuần, môi trường bổ sung α-NAA 0,5 mg/l, tỉ lệ phát sinh rễ đạt 90%, 2,74 rễ/chồi, chiều dài trung bình rễ là 2,1 cm.

Ảnh hưởng của giá thể đến việc đưa cây *in vitro* giống quýt Bắc Kạn ra ngoài tự nhiên

Tiến hành nghiên cứu đưa cây quýt Bắc Kạn *in vitro* ra ngoài tự nhiên trên các loại giá thể: Đất phù sa, trấu hun, đất phù sa + trấu hun (tỉ lệ 1:1) khi cây *in vitro* có chiều cao từ 2,5 cm – 3,0 cm và từ 3 đến 4 rễ, các rễ dài từ 1,5 cm đến 2,0 cm. Cây ở các thí nghiệm đều được chăm sóc như nhau. Kết quả đánh giá sau 8 tuần cho thấy, giá thể tốt nhất là đất phù sa + trấu hun (tỉ lệ 1:1), tỉ lệ cây sống đạt 83,33 %, các cây hình thành nhiều lá mới, lá phát triển, phiến lá rộng màu xanh đậm. Trong khi đó, giá thể là đất phù sa, tỉ lệ cây sống chỉ là 46,67% và trấu hun tỉ lệ cây sống chỉ là 56,67%. Cây trồng ở giá thể đất phù sa không hình thành lá mới, lá rụng nhiều. Cây trồng ở giá thể là trấu hun đã phát sinh lá non mới, tuy nhiên số lượng lá mọc thêm ít.



Hình 1. A. Hạt nảy mầm sau khử trùng bằng Javen 60% trong 20 phút (sau 4 tuần); B. Tái sinh chồi trên môi trường bổ sung BAP3,0mg/l + IBA 1,5mg/l(sau 8 tuần); C. Tạo rễ trên môi trường MS bổ sung α -NAA 0,5mg/l (sau 8 tuần); D. Ra cây trên giá thể đất phù sa + trấu hun (1:1) (sau 8 tuần)

KẾT LUẬN

Nghiên cứu tái sinh *in vitro* cây quýt Bắc Kan cho thấy, thời gian khử trùng hạt thích hợp bằng dung dịch Javen 60% trong 20 phút. Môi trường MS bổ sung BAP 3,0 mg/l + IBA 1,5 mg/l cho số chồi/mẫu cao hơn hẳn so với các môi trường chỉ có BAP hoặc kinetin. Nồng độ tối ưu cho chồi ra rễ là α -NAA 0,5 mg/l trên môi trường nền MS, có bổ sung sucrose 30 g/l + agar 9 g/l + nước dừa 50 ml/l.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Lê Văn Trường Huân, Hoàng Ý Nhi (2007), *Nghiên cứu tạo chồi in vitro ở cây chanh dây (Passiflora edulis Sims.)*, Những vấn đề nghiên

cứu cơ bản trong khoa học sự sống, Nxb khoa học kỹ thuật (2007), tr. 308-310.

2. Phan Hữu Tôn và cộng sự (2014), “Nuôi cấy *in vitro* trụ trên lá mầm giống cam (*Citrus sinensis*), quýt (*Citrus reticulata*)”, *Tạp chí Khoa học và Phát triển*, tập 12, số 5, tr. 641-649.

3. Adhikarimayum H., Kshetrimayum G., Huidrom S., Maibam D. (2011), “*In vitro* propagation of *Citrus megaloxycarpa*”, *Environmental and Experimental Biology*, 9, pp. 129-132.

4. Jajoo A. (2010), “*In vitro* propagation of *Citrus limonia* Osbeck through nucellar embryo culture”. *Curr. Res. J. Bio. Sci.*, 2, pp. 6-8.

5. Suneel S., Atam P., Ajinath T. (2009), “*In Vitro* Propagation of Citrus Rootstocks”, *Notulae Botanicae Horti. Agrobotanici Cluj-Napoca*, 37 (1), pp. 84-88.

SUMMARY

RESEARCH ON *IN VITRO* REGENERATION PROCESS OF *Citrus recutlata* Blanco IN BAC KAN PROVINCE

Nguyen Thi Tam^{1*}, Phi Huu Viet², Duong Huu Loc³

¹TNU - University of Education

²Han Thuyen junior high school, Luong Tai, Bac Ninh

³TNU - University of Agriculture and Forestry

Research on *in vitro* regeneration process for Bac Kan province show that, it has been determined that the best efficiency would be achieved when seed is sterilised for 20 minutes in 60% javen solution. The MS environment added with 3.0 mg/l BAP and 1.5 mg/l IBA gives much higher number of soots per sample than the one added only with either BAP or kinetin. The best concentration for root generation from shoot is 0.5 mg/l α -NAA on basic MS added with 30 gr/l sucrose, 9 grs/l agar and 50 ml/l coconut water. The research result has formed the basis for application of technologies serving the quality improvement of *Citrus recutlata* Blanco in Bac Kan province.

Key word: BAP, IBA, Kinetin, *Citrus recutlata* Blanco in Bac Kan, regeneration

Ngày nhận bài: 31/8/2017; Ngày phản biện: 17/9/2017; Ngày duyệt đăng: 31/10/2017

* Tel: 0986 059258