

NHÂN GIỐNG VÔ TÍNH *IN VITRO* CÂY ĐU ĐỦ *Carica papaya* L.**Đỗ Văn Nam¹, Nguyễn Thị Thủy², Nguyễn Thị Bích Hồng^{3*}, Phạm Thị Ngọc¹,
Nguyễn Văn Hoan¹, Nguyễn Thị Phương Thảo²**¹*Viện Nghiên cứu và Phát triển cây trồng;* ²*Trung tâm Thực nghiệm và Đào tạo nghề;*³*Khoa Nông học,* ⁴*Khoa Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Nông Nghiệp Hà Nội*

Email*: ntbhong@hua.edu.vn

Ngày gửi bài: 04.06.2013

Ngày chấp nhận: 21.09.2013

TÓM TẮT

Nghiên cứu này được tiến hành nhằm xây dựng quy trình nhân giống vô tính *in vitro* dòng bố của giống VNĐĐ9 từ vật liệu đoạn thân mang chồi nách. Kết quả đã xác định được chế độ khử trùng thích hợp là khử trùng kép bằng HgCl₂ 0,1 % lần 1 trong thời gian 10 phút và lần 2 trong thời gian 5 phút. Chế độ khử trùng này cho 86,9 % mẫu sạch. Môi trường thích hợp nhất để cảm ứng tạo callus từ lát cắt đoạn thân là MS+ 1 mg/l α-NAA+ 0,5 mg/l BA, cho tỷ lệ hình thành callus đạt 90,74 % sau 4 tuần nuôi cấy. Tỷ lệ callus tái sinh chồi cao nhất (44,44 %) đạt được trên môi trường MS+ 1 mg/l BA+ 0,1 mg/l α- NAA. Hệ số nhân chồi đạt cao nhất (3,17 lần) trên môi trường MS bổ sung 1 mg/l BA và 0,25 mg/l α-NAA sau 4 tuần nuôi cấy. Môi trường thích hợp để cảm ứng tạo rễ cho chồi *in vitro* là ½ MS bổ sung 1mg/l than hoạt tính và 1,5 mg/l IBA cho tỷ lệ chồi tạo rễ cao nhất đạt 50% sau 4 tuần nuôi cấy.

Từ khóa: BA, IBA, α- NAA, nhân giống vô tính đu đủ, VNĐĐ9.

In vitro* propagation of papaya *Carica papaya* L.*ABSTRACT**

This study was conducted to establish the protocol for *in vitro* propagation of papaya using stem segments. Results showed that double sterilization of explants with HgCl₂ 0.1% first for 10 minutes and followed by 5 minutes was most appropriate. MS medium containing 1 mg/l α-NAA+ 0,5 mg/l BA was optimal for callus induction (90.74%) of young stem slices after 4 weeks of culture. The highest shoot multiplication rate (3.17) was obtained on MS medium supplemented with 1.0 mg/l BA and 0.1 mg/l α- NAA after 4 weeks. Root induction medium was ½ MS containing 1.0 mg/l activated charcoal and 1.5 mg/l IBA. The average rooting percentage was 50% within 4 weeks.

Keywords: BA, α- NAA, IBA, *Carica papaya* L, *in vitro* propagation.**1. ĐẶT VẤN ĐỀ**

Cây đu đủ là loại cây ăn quả đứng đầu trong danh mục những cây cho quả có lợi cho sức khoẻ, bởi đu đủ không chỉ là một thực phẩm dinh dưỡng giàu vitamin A, axit ascorbic, mà còn là vị thuốc tốt giúp cơ thể phòng chống được nhiều bệnh thường gặp như: bệnh ung thư, chống khô mắt, khô da và có tác dụng nhuận tràng.

Ở Việt Nam, cây đu đủ là một cây ăn quả quen thuộc, được trồng phổ biến vì có nhiều lợi ích. Đu đủ vừa dùng ăn tươi vừa dùng làm

nguyên liệu cho công nghiệp chế biến thực phẩm như: nước giải khát, nước quả, mứt...Tuy nhiên, việc mở rộng diện tích trồng cây đu đủ trong những năm gần đây gặp nhiều khó khăn do phần lớn các giống đu đủ trồng phổ biến hiện nay là các giống nhập nội. Các giống này đều bị nhiễm virus xoắn lá (tỷ lệ nhiễm bệnh có khi lên đến 90%) làm cây tàn lụi nhanh, giảm năng suất, sản lượng. Mặt khác, giá thành hạt giống nhập nội rất cao. Trong khi đó, việc lai hữu tính và nhân giống bằng hạt đã làm phân ly các đời sau, mất dần các đặc tính tốt của cây bố mẹ, dẫn

tối thoái hóa giống. Một hạn chế khác của việc nhân giống bằng hạt đó là có tới 30% thậm chí 50% số hạt ở các giống thương mại cho cây đơn tính đực (Jordan et al. 1983).

Trên thế giới, việc vi nhân giống cây đu đủ đã được nhiều tác giả tiến hành như: Rahman et al. (1992), Hassain et al. (1993), Islam et al. (1993). Năm 2012, Protual et al. đã nhân giống *Carica papaya* L. sử dụng chồi và mô lá non làm tăng hệ số nhân lên 34 lần. Tại Việt Nam, nhân giống đu đủ *in vitro* đã được tiến hành trên giống đu đủ Đài Loan nhập nội (Nguyễn Thị Nhẫn & cs., 2002). Giống đu đủ lai VNDD9 là con lai của hai dòng bố mẹ (ĐLD02 x STR), là giống đã được khảo nghiệm quốc gia và được công nhận giống tạm thời năm 2011. Giống lai này có ưu điểm vượt trội so với các giống nhập nội như: khả năng kháng bệnh tốt, năng suất, chất lượng tương đương, thích nghi tốt với điều kiện khí hậu. Để có thể mở rộng diện tích trồng và phát triển giống đu đủ tiềm năng này, việc phát triển được một hệ thống sản xuất giống hoàn chỉnh, trong đó kiểm soát được chất lượng, tiêu chuẩn cây giống và độ sạch bệnh là việc làm tiên quyết. Hướng tới giải quyết nhu cầu trên, nghiên cứu này được thực hiện nhằm tìm hiểu khả năng nhân giống các dòng đu đủ bố mẹ bằng kỹ thuật nuôi cấy *in vitro*, từ đó góp phần đề xuất các giải pháp kỹ thuật trong công tác nhân, sản xuất và duy trì dòng bố (STR) giống VNDD9.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Vật liệu

Đoạn thân chứa chồi nách tách từ cây đu đủ (sau khi cắt bỏ ngọn được 2- 4 tuần) sử dụng làm dòng bố (STR) là giống VNDD9 thu thập từ Sóc Trăng.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Phương pháp khử trùng

Đoạn thân mang mầm chồi phát triển tốt được rửa sạch dưới vòi nước, ngâm trong xà phòng 30 phút sau đó rửa sạch dưới vòi nước và đưa vào buồng cấy vô trùng. Trong buồng cấy vô

trùng, tráng mẫu cấy qua 1 lần bằng nước cất vô trùng trước khi xử lý với ethanol 70°C trong 1 phút và tráng lại một lần bằng nước cất vô trùng. Tiếp theo mẫu được ngâm trong dung dịch Cefotaxime 800 mg/l trong 3 giờ. Sau đó, các mẫu cấy được khử trùng với các chế độ khác nhau bằng dung dịch HgCl_2 0,1%, $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ 5% và NaOCl 5,5%.

Phương pháp cảm ứng callus từ lát cắt đoạn thân

Đoạn thân sạch không chứa mầm chồi trên môi trường MS (nuôi cấy sau 2 tuần) được cắt lát mỏng 2mm chuyển sang môi trường cảm ứng tạo callus là môi trường MS có bổ sung BA nồng độ từ 0 - 1 mg/l và α -NAA có nồng độ từ 0 - 1 mg/l.

Phương pháp nhân nhanh

Các chồi tái sinh từ callus sau 4 tuần nuôi cấy có chiều cao từ 0,3- 0,5 cm, chồi sinh trưởng phát triển bình thường được chuyển sang môi trường nhân nhanh chồi là môi trường MS có bổ sung BA (0 - 1 mg/l) và α -NAA (0 - 0,25 mg/l).

Phương pháp tạo rễ cho chồi in vitro

Chồi *in vitro* có chiều cao từ 1- 1,5 cm, cây sinh trưởng phát triển tốt được chuyển sang nền môi trường MS+ 1g/l than hoạt tính bổ sung IBA hoặc α -NAA để tạo rễ cho chồi *in vitro*.

Điều kiện nuôi cấy

Nhiệt độ 22°C - 24°C, cường độ chiếu sáng là 2000 - 2500 lux, thời gian chiếu sáng 16h/ngày. Môi trường nuôi cấy được điều chỉnh pH = 5.7 trước khi hấp khử trùng ở áp suất 1,1atm, nhiệt độ 121°C trong 20 phút.

Phương pháp bố trí thí nghiệm

Bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên, mỗi công thức 3 lần lặp lại, mỗi lần lặp lại 30 mẫu. Số liệu được xử lý bằng phần mềm Excel và IRRISTAT 4.0.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Nghiên cứu tạo vật liệu khởi đầu

Kết quả bảng 1 cho thấy chế độ khử trùng có ảnh hưởng rõ ràng đến hiệu quả của quá

trình khử trùng mẫu. Khi khử trùng bằng HgCl_2 0,1% trong 10 phút, tỷ lệ mẫu sạch đạt thấp nhất là 7,14%. Trong khi đó, khi tiến hành khử trùng kép kết hợp HgCl_2 0,1% với CaOCl_2 5%, NaOCl 5,5% và HgCl_2 0,1% trong các khoảng thời gian 10 phút và 3 phút, 10 và 5 phút, 10 và 5 phút tương ứng đã làm tăng tỷ lệ mẫu sạch từ 7,14% đến 86,9%. Tuy nhiên yêu cầu của giai đoạn khử trùng là cho tỷ lệ mẫu nhiễm thấp, đồng thời tỷ lệ tái sinh cao, mẫu sinh trưởng phát triển khỏe mạnh. Chính vì vậy chế độ khử trùng kép bằng HgCl_2 0,1% trong thời gian 10 phút và 5 phút khi đạt 86,9% mẫu sạch được lựa chọn để tạo vật liệu khởi đầu.

3.2 Ảnh hưởng của tổ hợp BA và α -NAA đến khả năng hình thành callus từ lát cắt đoạn thân

Trong quá trình nhân giống *in vitro* sự phối hợp giữa auxin và cytokinin ở một nồng độ và tỷ lệ thích hợp có tác động quan trọng tới sự phát sinh hình thái của tế bào, mô nuôi cấy. Phát sinh hình thái thông qua cảm ứng mô sẹo đã

thành công trên nhiều đối tượng cây trồng với ưu điểm cho hệ số nhân cao. Do đó, chúng tôi đã sử dụng hai đại diện của auxin và cytokinin đó là α -NAA và BA để kích thích hình thành mô sẹo từ lát cắt đoạn thân. Mẫu đưa vào nuôi cấy là các đoạn thân sạch (không mang mầm) chồi trong môi trường MS (nuôi cấy sau 2 tuần) được cắt lát mỏng 2mm.

Sự kết hợp giữa BA và α -NAA cho hiệu quả cảm ứng callus tốt hơn việc sử dụng đơn chất BA hoặc α -NAA (Bảng 2). Ngoại trừ công thức MS+ 1 mg/l BA, tất cả các công thức còn lại đều cảm ứng thành công callus. Tỷ lệ hình thành callus tăng từ 0- 90,74% khi kết hợp BA (0-1 mg/l) với α -NAA (0- 1 mg/l). Trong đó, kết hợp 1 mg/l α -NAA và 0,5 mg/l BA, cho tỷ lệ hình thành callus cao nhất đạt 90,74%, đồng thời callus tạo thành có màu trắng, rắn chắc. Theo đánh giá cảm quan, các callus này sẽ có khả năng tái sinh cao. Do đó công thức MS + 1 mg/l α -NAA + 0,5 mg/l BA sẽ được lựa chọn để cảm ứng tạo callus từ lát cắt đoạn thân đủ đủ.

Bảng 1. Ảnh hưởng của chế độ khử trùng đến tỷ lệ mẫu sạch (sau nuôi cấy 4 tuần)

HgCl_2 0,1% (phút)	Ca(OCl)_2 5% (phút)	NaOCl 5,5% (phút)	Tỷ lệ mẫu sạch (%)	Tỷ lệ mẫu chết (%)
10	0	0	7,14	1,2
10	3	0	57,1	9,5
10	0	5	71,4	20,2
10 + 5	0	0	86,9	6,0

Bảng 2. Ảnh hưởng của tổ hợp BA và α -NAA đến khả năng hình thành callus từ lát cắt đoạn thân (Sau 4 tuần nuôi cấy)

α -NAA (mg/l)	BA (mg/l)	Tỷ lệ mẫu tạo callus (%)	Chất lượng callus
0,0	0,0	25,93	Trắng, viền xốp
0,5	0,0	40,74	Xanh, viền xốp
1,0	0,0	46,30	Xanh nhạt, viền xốp
0,0	0,5	9,26	Vàng
0,5	0,5	62,96	Xanh, rắn chắc
1,0	0,5	90,74	Trắng, rắn chắc
0,0	1,0	0,00	Không tạo callus
0,5	1,0	24,07	Xanh, rắn chắc
1,0	1,0	50,00	Trắng, xốp
LSD _{0,05}		5,06	
CV %		7,5	

3.3. Nghiên cứu tái sinh chồi từ callus

Tái sinh chồi là một khâu quan trọng trong nhân giống vô tính thông qua cảm ứng hình thành callus nhằm tạo thành các chồi phục vụ cho nhân nhanh *in vitro*. Sau 4 tuần theo dõi, callus không có khả năng tái sinh tạo chồi trên môi trường đối chứng không bổ sung BA và α -NAA (Bảng 3). Khi kết hợp BA với nồng độ từ 0-1 mg/l với α -NAA từ 0 - 0,25 mg/l đã làm tỷ lệ tái sinh chồi tăng từ 0 - 44,44%, đồng thời chồi tạo thành có màu xanh, sinh trưởng, phát triển bình thường đối lập với đối chứng không bổ sung chất điều tiết sinh trưởng, toàn bộ callus thâm đen và chết. Công thức cho tỷ lệ tái sinh chồi tốt nhất đạt 44,44% là công thức MS+ 1 mg/l BA+ 0,1 mg/l α -NAA.

3.4. Nghiên cứu nhân nhanh chồi đu đủ

Hiệu quả của một qui trình nhân giống *in vitro* thể hiện bằng hệ số nhân giống. Trong quá trình nhân giống *in vitro* sự phối hợp giữa auxin và cytokinin ở một nồng độ và tỷ lệ thích hợp có tác động tốt tới sự hình thành chồi và chất lượng chồi tạo thành. Đối với dòng bố của giống

đu đủ VNDD9 chúng tôi sử dụng BA và α -NAA để nghiên cứu khả năng nhân nhanh.

Việc bổ sung BA và α -NAA đã làm tăng hệ số nhân của chồi đu đủ so với đối chứng không bổ sung. Hệ số nhân chồi tăng từ 1,26- 3,17 lần khi kết hợp BA (0- 1 mg/l) với α -NAA (0- 0,25 mg/l). Trong đó, công thức MS+ 0,5 mg/l BA+ 0,25 mg/l α -NAA cho hệ số nhân đạt 3,17 lần. Bên cạnh đó, các chồi nhân nhanh từ công thức này có cuống to, lá xanh hơn so với chồi từ các công thức còn lại. Theo đánh giá cảm quan thì các chồi này sẽ có sức sống tốt hơn khi ra ngoài vườn ươm. Do đó, công thức MS+ 0,5 mg/l BA+ 0,25 mg/l α -NAA sẽ được lựa chọn để nhân nhanh chồi đu đủ.

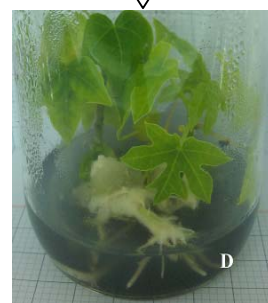
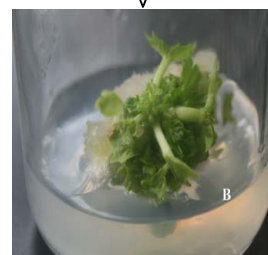
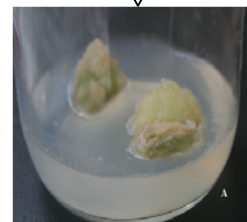
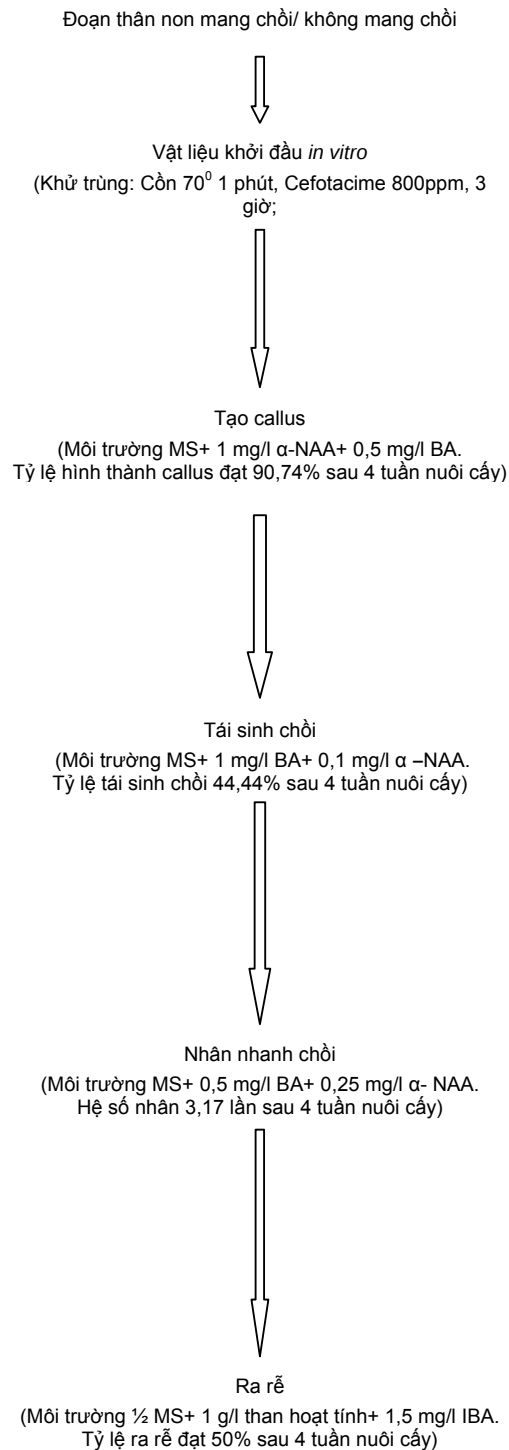
Nghiên cứu nhân *in vitro* trên giống đu đủ Shahi (*Carica papaya* L.) Protul et al. (2012) đã sử dụng BA, zeatin, kinetin riêng rẽ đồng thời kết hợp các chất này với α -NAA để tiến hành nhân chồi đu đủ từ đoạn thân chứa chồi nách. Kết quả cho thấy, sự kết hợp giữa Zeatin ở nồng độ 1 mg/l và 0,2 mg/l α -NAA chồi tốt hơn kết quả nhận được khi sử dụng riêng rẽ BA, zeatin và kinetin.

Bảng 3. Ảnh hưởng của tổ hợp BA và α -NAA đến khả năng tái sinh chồi của callus đu đủ (Sau 4 tuần nuôi cấy)

BA (mg/l)	α -NAA (mg/l)	Tỷ lệ tái sinh chồi (%)	Chất lượng chồi
0	0	0	Thâm đen
0,5	0,1	25,92	xanh
0,5	0,25	16,67	xanh
1	0,1	44,44	xanh
1	0,25	7,4	xanh

Bảng 4. Ảnh hưởng của tổ hợp BA và α -NAA đến khả năng nhân nhanh chồi đu đủ (Sau 4 tuần nuôi cấy)

BA (mg/l)	α -NAA (mg/l)	Hệ số nhân (lần)	Chiều cao chồi TB(cm)	Số lá/chồi (lá)	Đặc điểm hình thái chồi
0,0	0,0	1,26	1,17	2,13	Cuống ngắn, lá xanh, nhỏ
0,5	0,1	1,90	1,17	3,82	Cuống ngắn, cong, gân vàng
1,0	0,1	1,53	0,92	2,44	Cuống khá dài, lá xanh nhạt, gân vàng
0,5	0,25	2,56	1,49	6,46	Cuống to, lá xanh, gân vàng
1,0	0,25	3,17	1,39	5,37	Cuống to, lá xanh
LSD _{0,05}		0,18			
CV %		4,6			



Hình 1. Sơ đồ nhân giống *in vitro* dòng bố giống đu đủ lai VNDD9

Bảng 5. Ảnh hưởng của tổ hợp IBA và α -NAA đến khả năng ra rễ của chồi đu đủ (Sau 4 tuần nuôi cấy)

Nồng độ IBA (mg/l)	Nồng độ α -NAA (mg/l)	Tỷ lệ hình thành rễ (%)	Số rễ TB/ cây
0	0	0	0
0,1	0	0	0
0,25	0	0	0
1	0	0	0
1,5	0	50	6,5
2	0	0	0
0	0,1	0	0
0	0,25	0	0
0	0,5	0	0

3.5. Nghiên cứu tạo rễ cho chồi

Các chồi sau giai đoạn nhân nhanh với chiều cao chồi 1- 1,5 cm, lá xanh, chồi sinh trưởng phát triển bình thường sẽ được chuyển sang môi trường ra rễ để hoàn thiện quá trình nhân giống *in vitro*. Chất cảm ứng ra rễ được sử dụng là IBA và α -NAA trên nền môi trường MS+ 1g/l than hoạt tính.

Kết quả bảng 5 cho thấy: Chồi đu đủ hoàn toàn không có khả năng tạo rễ trên môi trường MS+ 1g/l than hoạt tính cũng như môi trường có bổ sung α -NAA không có tác dụng trong việc hình thành rễ cho chồi đu đủ, trong trường hợp bổ sung IBA chồi đu đủ tạo rễ duy nhất trên môi trường chứa 1,5 mg/l với tỷ lệ chồi tạo rễ là 50% còn ở nồng độ IBA cao hơn hoặc thấp hơn đều không có khả năng tạo rễ cho chồi.

Nghiên cứu tạo cây đu đủ Honey Dew *in vitro* hoàn chỉnh, Modal et al.(1990) đã cảm ứng ra rễ cho chồi đu đủ trên môi trường MS (đa lượng) + 2 mg/l IBA. Cũng cảm ứng rễ cho chồi đu đủ giống Yema *in vitro*, Islam et al. (1999) đã sử dụng môi trường trường MS (đa lượng) + 5 mg/l IBA. Trong khi đó, Protul et al. (2012) đã tìm ra môi trường ra rễ thích hợp nhất cho chồi đu đủ giống Shahi là MS+ 2 g/l than hoạt tính+ 100mg/l urea+ 4 mg/l IBA. Môi trường tốt nhất cho sự hình thành rễ chồi đu đủ *in vitro* giống đu đủ Đài Loan nhập nội là MS+ 0,5 g/l than hoạt tính (Nguyễn Thị Nhấn và cs., 2002). Điều này chứng tỏ chất điều tiết sinh trưởng có tác động khác nhau đối với khả năng hình thành rễ

của các giống khác nhau. Do đó việc lựa chọn chất kích thích ra rễ cần phải được lựa chọn cho phù hợp với từng giống, loài để kích thích hình thành rễ tốt, cho cây con khỏe mạnh đồng thời phải phù hợp với từng điều kiện sản xuất.

4. KẾT LUẬN

Chế độ khử trùng thích hợp nhất cho đoạn thân mang chồi nách là: khử trùng kép bằng HgCl₂ 0,1% trong 10 phút và 5 phút cho tỷ lệ mẫu sạch và tái sinh là 86,9%.

Môi trường thích hợp cho cảm ứng callus từ lát cắt đoạn thân non đu đủ là MS+ 1 mg/l α -NAA + 0,5 mg/l BA. Môi trường này cho tỷ lệ hình thành callus cao nhất đạt 90,74%, đồng thời callus tạo thành có màu trắng, rắn chắc.

Callus đu đủ tái sinh chồi tốt nhất trên môi trường MS + 1 mg/l BA + 0,1 mg/l α -NAA + 30g/l đường saccaroza với tỷ lệ tái sinh đạt 44,44%, chồi sinh trưởng phát triển tốt sau 4 tuần nuôi cấy.

Môi trường thích hợp cho nhân nhanh chồi đu đủ là môi trường MS+ 0,5 mg/l BA+ 0,25 mg/l α -NAA + 30g/l đường saccaroza. Trên môi trường này hệ số nhân đạt 3,17 lần, chiều cao chồi đạt 1,49 cm.

Môi trường thích hợp cho ra rễ đu đủ là MS+ 1 g/l than hoạt tính+ 1,5 mg/l IBA + 30g/l đường saccaroza cho tỷ lệ ra rễ đạt 50% với số rễ trung bình trên cây là 6,5 rễ.

Từ các kết quả nghiên cứu, qui trình nhân dòng bố của giống đu đủ VNĐĐ9 được tóm tắt qua hình 1.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu được thực hiện với sự hỗ trợ kinh phí từ dự án sản xuất “Hoàn thiện qui trình duy trì bố mẹ, sản xuất hạt lai F1 và thâm canh đu đủ thương phẩm giống VNĐĐ9 và VNĐĐ10”, Mã số B2012-11-02 DA của Bộ Giáo dục và Đào tạo.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Islam R., Rahman S.M., Hosain M. and Joarder O.I. (1993). *In vitro* clonal propagation of papaya through culture of lateral buds from mature field- grown plants, *Plant tissue culture*, 3(1): 47-50.
- Jordan M., Cortes I. and Montenegro G. (1983). Regeneration of plants by embryogenesis from callus cultures of *Carica candamarcensis*. *Plant Sci., Let*, 28: 321-326.
- Modal M., Gupta S. and Mukherjee B.B. (1990). *In vitro* propagation of shoot buds of *Carica papaya* L. (Caricaceae) var. Honey Dew. *Plant cell Rep.*, 8: 609-612.
- Murashige T. and Skoog F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15(3): 473-497.
- Nguyễn Thị Nhẫn (2004). Nghiên cứu quy trình nhân nhanh *in vitro* cây đu đủ (*Carica papaya* L.). *Tạp chí KHKT Nông Nghiệp*, 2(3): 174-175.
- Protual K.R., Shyamal K. R. and Lokman Hakim M.d. (2012). Propagation of Papaya (*Carica papaya* L.) CV. Shahi through *in vitro* culture. *Banglades J., Bot*, 41 (2): 191- 195.
- Rahman S.M., Hossain M., Joarder O.I. and Islam R. (1992). Rapid clonal propagation of papaya through culture of shoot apices. *Indian J. Hort.*, 49: 473-497.