

NGHIÊN CỨU KHẢ NĂNG TÁI SINH VÀ SINH TRƯỞNG CHỒI *IN VITRO* CÂY VIỆT QUẤT (*Vaccinium myrtillus* Linn.) THÔNG QUA NUÔI CẤY ĐỐT THÂN

Phan Xuân Huyền^{1*}, Nguyễn Thị Thanh Hằng¹,
Nguyễn Thị Phượng Hoàng¹, Đinh Văn Khiêm¹

TÓM TẮT

Cây việt quất (*Vaccinium myrtillus* Linn.) là một giống cây ăn trái nhập nội tốt cho sức khỏe và có giá trị kinh tế cao. Hiện nay ở nước ta chưa có công bố nghiên cứu nhân giống *in vitro* cây việt quất. Bài báo này tiến hành nghiên cứu nhân giống *in vitro* cây việt quất bằng phương pháp nuôi cấy đốt thân. Kết quả cho thấy, môi trường WPM bổ sung 0,5 mg/l zeatin kết hợp 0,1 mg/l NAA (chiều cao chồi 4,53 cm, 1 chồi/mẫu, 11,20 đốt/chồi), môi trường WPM bổ sung 1 mg/l BA kết hợp 0,1 mg/l NAA (chiều cao chồi 4,18 cm, 1 chồi/mẫu, 9,10 đốt/chồi) và môi trường WPM bổ sung 1 mg/l Kinetin kết hợp 0,1 mg/l NAA (chiều cao chồi 3,88 cm, 1 chồi/mẫu, 8,50 đốt/chồi) là những môi trường tốt nhất đến sự tái sinh và sinh trưởng chồi *in vitro* cây việt quất. Tạo rễ *in vitro*, môi trường WPM bổ sung 1 mg/l NAA là tốt nhất (chiều cao cây 5,14 cm, chiều dài rễ 1,42 cm, tỷ lệ ra rễ đạt 100%). Cây việt quất cấy mô chuyển ra ngoài vườn ươm thì giá thể vụn xơ dừa là tốt nhất đến sự sinh trưởng và tỷ lệ sống của cây (chiều cao cây 7,46 cm, chiều dài rễ 3,48 cm, tỷ lệ sống 90,48%). Những cây việt quất cấy mô sinh trưởng tốt trên giá thể vụn xơ dừa sau 2 tháng nuôi trồng, cây tiếp tục sinh trưởng tốt sau 3 và 4 tháng nuôi trồng.

Từ khóa: Cây việt quất, chiều cao chồi, môi trường WPM, số chồi, số đốt.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Cây việt quất (*Vaccinium myrtillus* Linn.) là một giống cây ăn trái nhập nội tốt cho sức khỏe và có giá trị kinh tế cao, do có những công dụng như: cung cấp nhiều chất dinh dưỡng có lợi cho cơ thể, giàu chất chống oxy hóa, giúp tăng cường trí nhớ, giúp người béo phì giảm cân khá hiệu quả, làm hạ cholesterol, tốt cho mắt,... Tại nước Mỹ, trái việt quất được xếp hạng trong nhóm 5 loại quả giàu dinh dưỡng nhất [12, 14, 5]. Do đó, việc tiến hành nghiên cứu nhân giống *in vitro* và nuôi trồng thuần hóa giống cây việt quất nhập nội có giá trị này là vấn đề rất cần thiết. Trên thế giới đã có nhiều nghiên cứu nhân giống *in vitro* cây việt quất [1, 2, 11, 3, 10] và cũng đã có nhiều nghiên cứu thành phần hóa học, tác dụng dược tính của quả việt quất [8, 7, 5]. Ở nước ta chưa có nghiên cứu nhân giống *in vitro*, cũng như nghiên cứu thành phần hóa học và tác dụng dược tính của quả việt quất. Hiện nay, cây việt quất đã nhập khẩu và trồng tại nước ta, cây sinh trưởng phát triển tốt và ra hoa đậu quả. Theo phương pháp nhân giống truyền thống bằng hạt thường có nhược điểm là cây giống bị phân ly tính trạng, hạt giống có tỉ lệ nảy mầm thấp.

Theo phương pháp nhân giống bằng giâm cành thì không tạo ra một số lượng lớn cây giống để trồng trên quy mô công nghiệp, cây giống không đồng nhất, thường bị nhiễm bệnh và thoái hóa, cây sinh trưởng phát triển kém và cho năng suất thấp. Ứng dụng công nghệ sinh học, nuôi cấy mô tế bào thực vật trong nhân giống *in vitro* cây việt quất sẽ khắc phục những hạn chế của phương pháp nhân giống trồng truyền thống. Kết quả của nghiên cứu này góp phần cung cấp dữ liệu khoa học về nghiên cứu nhân giống *in vitro* cây việt quất và hướng đến cung cấp cây giống cây mô cho sản xuất.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

Vật liệu: Những cành non của cây việt quất nuôi trồng tại Viện Nghiên cứu Khoa học Tây Nguyên (Hình 1a) được lựa chọn và tiến hành khử trùng mẫu đưa vào ống nghiệm. Mẫu sau khi thu về được rửa sạch bằng nước xà phòng, sau đó khử trùng bằng cồn 70° trong thời gian 1 phút, rửa lại mẫu bằng nước cất vô trùng 6 lần. Tiếp theo, mẫu được khử trùng bằng dung dịch NaOCl 2% trong thời gian 10 phút, rửa lại mẫu bằng nước cất vô trùng 6 lần [16]. Mẫu sau khi khử trùng được cấy trên môi trường WPM (woody plant medium) không bổ sung chất điều hòa sinh trưởng, nhiều chồi non được tái sinh từ các

¹ Viện Nghiên cứu Khoa học Tây Nguyên, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

*Email: phanxuanhuyen1974@gmail.com

đốt thân (Hình 1b). Tiến hành cắt các đốt thân của những chồi non này cấy chuyển trên môi WPM có bổ sung 0,5 mg/l zeatin [3], những chồi tái sinh từ đốt thân được sử dụng làm nguồn vật liệu cho các thí nghiệm (Hình 1c).

Môi trường: WPM [9] là môi trường nuôi cấy được sử dụng cho những thí nghiệm nhân giống *in vitro*, tùy theo mục đích của các thí nghiệm mà bổ sung các chất điều hòa sinh trưởng như: zeatin (Hãng Merck), BA (6-benzyl adenin) (Hãng Merck), Kinetin (Hãng Merck), NAA (α -Naphthalene acetic acid) (Hãng Merck). Giá thể nghiên cứu chuyển cây cấy mô ra ngoài vườn ươm là vụn xơ dừa, đất mùn và đất bazan.

Điều kiện nuôi cấy: Đối với những thí nghiệm *in vitro*, thời gian chiếu sáng 8 giờ/ngày, cường độ ánh sáng $34 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, nhiệt độ $25 \pm 2^\circ\text{C}$ và độ ẩm không khí 75% - 85%. Thực hiện thí nghiệm ở giai đoạn vườn ươm theo điều kiện khí hậu tự nhiên của Đà Lạt - Lâm Đồng, vườn ươm có mái nylon trắng che mưa (nhiệt độ trung bình 18°C - 21°C , độ ẩm trung bình 82%, ánh sáng tự nhiên).

2.2. Phương pháp

2.2.1. Khảo sát ảnh hưởng của zeatin kết hợp NAA đến sự tái sinh và sinh trưởng chồi *in vitro*

Những đốt thân của cây việt quất *in vitro* (Hình 1c) được cấy trên môi trường WPM có bổ sung 0 mg/l; 0,5 mg/l; 1 mg/l; 1,5 mg/l; 2 mg/l zeatin kết hợp 0,1 mg/l NAA, 30 g/l sucrose, 10 g/l agar, pH 5,8. Mỗi nghiệm thức cấy 15 mẫu, sau 50 ngày nuôi cấy tiến hành thu số liệu. Chỉ tiêu theo dõi là chiều cao chồi (cm), số chồi/mẫu, số đốt/chồi và đánh giá cảm quan hình thái chồi.

2.2.2. Khảo sát ảnh hưởng của BA kết hợp NAA đến sự tái sinh và sinh trưởng chồi *in vitro*

Những đốt thân của cây việt quất *in vitro* (Hình 1c) được cấy trên môi trường WPM có bổ sung 0 mg/l; 0,5 mg/l; 1 mg/l; 1,5 mg/l; 2 mg/l BA kết hợp 0,1 mg/l NAA, 30 g/l sucrose, 10 g/l agar, pH 5,8. Mỗi nghiệm thức cấy 15 mẫu, sau 50 ngày nuôi cấy tiến hành thu số liệu. Chỉ tiêu theo dõi là chiều cao chồi (cm), số chồi/mẫu, số đốt/chồi và đánh giá cảm quan hình thái chồi.

2.2.3. Khảo sát ảnh hưởng của Kinetin kết hợp NAA đến sự tái sinh và sinh trưởng chồi *in vitro*

Những đốt thân của cây việt quất *in vitro* (Hình 1c) được cấy trên môi trường WPM có bổ sung 0 mg/l; 0,5 mg/l; 1 mg/l; 1,5 mg/l; 2 mg/l Kinetin kết

hợp 0,1 mg/l NAA, 30 g/l sucrose, 10 g/l agar, pH 5,8. Mỗi nghiệm thức cấy 15 mẫu, sau 50 ngày nuôi cấy tiến hành thu số liệu. Chỉ tiêu theo dõi là chiều cao chồi (cm), số chồi/mẫu, số đốt/chồi và đánh giá cảm quan hình thái chồi.

2.2.4. Khảo sát ảnh hưởng của NAA đến sự tạo rễ *in vitro*

Những đốt thân của cây việt quất *in vitro* (Hình 1c) được cấy trên môi trường WPM có bổ sung 0,5 mg/l; 1 mg/l; 1,5 mg/l; 2 mg/l NAA, 30 g/l sucrose, 10 g/l agar, pH 5,8. Mỗi nghiệm thức cấy 15 mẫu, sau 50 ngày nuôi cấy tiến hành thu số liệu. Chỉ tiêu theo dõi là chiều cao chồi (cm), chiều dài rễ (cm), tỷ lệ mẫu tạo rễ (%) và đánh giá cảm quan hình thái cây.

2.2.5. Khảo sát ảnh hưởng của giá thể đến tỉ lệ sống và sinh trưởng cây cấy mô chuyển ra ngoài vườn ươm

Những cây việt quất cấy mô có đầy đủ thân lá rễ và có chiều cao khoảng 5 cm - 6 cm (Hình 2b) được trồng trên giá thể vụn xơ dừa, đất mùn và đất bazan. Mỗi nghiệm thức trồng 21 cây, sau 50 ngày nuôi trồng tiến hành thu số liệu. Chỉ tiêu theo dõi là chiều cao cây (cm), chiều dài rễ (cm), tỷ lệ sống (%) và đánh giá cảm quan hình thái cây.

2.3. Xử lý số liệu

Số liệu của các thí nghiệm được xử lý bằng phần mềm thống kê SPSS (bản 15.0) trong Duncan's test [4] với $P \leq 0,05$.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Khảo sát ảnh hưởng của zeatin kết hợp NAA đến sự tái sinh và sinh trưởng chồi *in vitro*

Khả năng tái sinh và sinh trưởng chồi *in vitro* cây việt quất từ đốt thân sau 50 ngày nuôi cấy được thể hiện trên bảng 1. Kết quả cho thấy, tất cả các đốt thân nuôi cấy trên những môi trường khác nhau đều tái sinh chồi và chỉ tái sinh 1 chồi/mẫu, tuy nhiên ở các môi trường bổ sung các nồng độ zeatin khác nhau và kết hợp NAA thì có sự sinh trưởng khác nhau. Môi trường bổ sung 0,5 mg/l zeatin kết hợp 0,1 mg/l NAA thì chồi tái sinh và sinh trưởng tốt nhất, với chiều cao chồi 4,53 cm và 11,20 đốt/chồi. Khi tăng nồng độ zeatin từ 0 mg/l - 0,5 mg/l thì chiều cao chồi và số đốt tăng lên, nhưng khi nồng độ zeatin tăng lên 1 mg/l - 2 mg/l thì chiều cao chồi và số đốt giảm xuống. Điều này có thể giải thích, khi nồng độ zeatin thấp thì kích thích sự tái sinh và tăng

trường chiều cao của chồi, nhưng khi nồng độ zeatin tăng cao thì xảy ra quá trình ngược lại ức chế sự sinh trưởng chồi. Kết quả cũng cho thấy, mẫu cấy ở các môi trường có bổ sung zeatin và NAA hình thành callus, trong khi đó những mẫu nuôi cấy trên môi trường không bổ sung chất điều hòa sinh trưởng thì không tạo callus. Đặc điểm hình thái của những chồi ở môi trường không bổ sung chất điều hòa sinh trưởng thì sinh trưởng yếu hơn và có màu xanh đậm hơn (Hình 1d₁). Chồi ở môi trường bổ sung 0,5 mg/l và 1 mg/l zeatin kết hợp 0,1 mg/l NAA thì sinh trưởng tốt hơn và có màu nâu ở phần ngọn (Hình 1d₂, 1d₃). Chồi nuôi cấy trên môi trường bổ sung 1,5 mg/l zeatin kết hợp 0,1 mg/l NAA sinh trưởng yếu hơn và thân chồi có màu nâu (Hình 1d₄). Chồi nuôi cấy trên môi trường bổ sung 2 mg/l zeatin kết hợp 0,1 mg/l NAA sinh trưởng yếu hơn, thân chồi có màu nâu và có biểu hiện mọng nước (Hình 1d₅). Chất điều hòa sinh trưởng zeatin là một cytokinin có tác dụng kích thích sự phân chia tế bào và thúc đẩy sự phát triển của chồi trong nuôi cấy mô tế bào thực vật.

Nhiều nghiên cứu cho thấy, zeatin kết hợp với auxin làm tăng hiệu quả nhân giống thực vật *in vitro*.

Hiện nay ở nước ta chưa có công bố sử dụng zeatin kết hợp với auxin trong nghiên cứu vi nhân giống cây việt quất, nhưng trên thế giới đã có nhiều công bố. Cüce và cs (2016) [2] nghiên cứu nhân giống *in vitro* 3 loài việt quất trong đó có loài *Vaccinium myrtillus*, kết quả cho thấy, môi trường WPM có bổ sung 1 mg/l zeatin và 0,1 mg/l IBA là tốt nhất với 10,83 đốt thân/mẫu. Một nghiên cứu khác của Cüce và Sökmen (2017) [3] xây dựng quy trình nhân giống *in vitro* cây việt quất ở loài *Vaccinium uliginosum* cũng đã sử dụng môi trường WPM để nuôi cấy, kết quả chỉ ra rằng bổ sung kết hợp zeatin và IBA là hiệu quả nhất trong nhân giống *in vitro* loài *Vaccinium uliginosum* với chiều cao chồi thu được là 40,02 mm. Gajdošová và cs (2006) [6] sử dụng zeatin nghiên cứu nhân giống *in vitro* thành công cây việt quất. Mohamed và cs (2018) [10] cũng đã sử dụng zeatin kết hợp với IBA xây dựng thành công quy trình nhân giống *in vitro* loài *Vaccinium corymbosum*.

Như vậy, môi trường WPM bổ sung 0,5 mg/l zeatin kết hợp 0,1 mg/l NAA là tốt nhất đến sự tái sinh và sinh trưởng chồi *in vitro* cây việt quất.

Bảng 1. Ảnh hưởng của zeatin kết hợp NAA đến sự tái sinh và sinh trưởng chồi *in vitro* sau 50 ngày nuôi cấy

Zeatin (mg/l)	NAA (mg/l)	Chiều cao chồi (cm)	Số chồi/mẫu	Số đốt/chồi	Hình thái chồi
0,0	0,0	2,78 ^{c*}	1,0 ^a	6,10 ^d	Chồi có màu xanh đậm hơn và sinh trưởng yếu hơn
0,5	0,1	4,53 ^a	1,0 ^a	11,20 ^a	Chồi sinh trưởng tốt, có màu nâu ở phần ngọn và mẫu tạo callus
1,0	0,1	3,82 ^b	1,0 ^a	9,40 ^b	Chồi sinh trưởng tốt, có màu nâu ở phần ngọn và mẫu tạo callus
1,5	0,1	2,67 ^c	1,0 ^a	8,50 ^c	Chồi sinh trưởng yếu hơn, thân chồi có màu nâu và mẫu tạo callus
2,0	0,1	2,19 ^d	1,0 ^a	4,80 ^e	Chồi sinh trưởng yếu hơn, thân chồi màu nâu, mọng nước và mẫu tạo callus

Ghi chú: *Những chữ khác nhau (a, b,...) trong cùng một cột biểu diễn sự khác nhau có ý nghĩa với $P \leq 0,05$ trong Duncan's test

3.2. Khảo sát ảnh hưởng của BA kết hợp NAA đến sự tái sinh và sinh trưởng chồi *in vitro*

Khả năng tái sinh và sinh trưởng chồi từ đốt thân cây việt quất sau 50 ngày nuôi cấy được thể hiện trên bảng 2. Kết quả cho thấy, BA kết hợp NAA cũng có sự ảnh hưởng tốt lên sự tái sinh và sinh trưởng chồi. Mẫu cấy trên môi trường không có chất điều hòa sinh trưởng và các môi trường có bổ sung các nồng độ BA khác nhau kết hợp 0,1 mg/l NAA đều tái sinh

1 chồi/mẫu, nhưng sinh trưởng của những chồi có sự khác nhau. Những chồi ở môi trường bổ sung 1 mg/l BA kết hợp 0,1 mg/l NAA sinh trưởng tốt nhất, với chiều cao chồi 4,18 cm và 9,10 đốt/chồi. Điều này có thể giải thích nồng độ 1 mg/l BA kết hợp 0,1 mg/l NAA là tối ưu cho sự tái sinh và sinh trưởng chồi *in vitro*. Ở môi trường không bổ sung chất điều hòa sinh trưởng thì chiều cao chồi chỉ đạt 2,69 cm và 6,10 đốt/chồi. Khi tăng nồng độ BA lên 1,5 mg/l và 2 mg/l thì chiều cao chồi giảm xuống (tương ứng 3,72

cm và 3,16 cm) và số đốt cũng giảm xuống (trung bình 8,50 đốt/chồi và 7,10 đốt/chồi). Điều này cho thấy, khi nồng độ BA thấp thì kích thích chồi sinh trưởng tăng chiều cao, nhưng khi nồng độ BA tăng cao thì có tác dụng ngược lại ức chế sự sinh trưởng của chồi, trong khi đó, sự tái sinh chồi ở các nghiệm thức thì không có sự khác biệt. Đặc điểm hình thái chồi cho thấy, mẫu cấy ở các môi trường có bổ sung chất điều hòa sinh trưởng hình thành callus, những chồi nuôi cấy trên môi trường có bổ sung 0,5 mg/l, 1 mg/l và 1,5 mg/l BA có màu nâu xanh ở phần ngọn và chồi sinh trưởng tốt hơn (Hình 1e₂, 1e₃ và 1e₄), thân chồi nuôi cấy trên môi trường 2 mg/l BA có màu nâu và chồi sinh trưởng yếu hơn (Hình 1e₅), chồi cấy trên môi trường không bổ sung chất điều hòa sinh trưởng có màu xanh đậm hơn và sinh trưởng yếu hơn (Hình 1e₁). BA là chất điều hòa sinh trưởng thuộc nhóm cytokinin có vai trò quan trọng trong phân chia tế bào và kích thích sự hình thành chồi. BA được sử dụng phổ biến trong nuôi cấy mô tế

bào thực vật ở giai đoạn nhân nhanh. Ở các loại cây trồng khác nhau thì thích hợp những nồng độ BA khác nhau, có loại cây thích hợp nồng độ BA cao, có loại cây thích hợp nồng độ BA thấp. Trong nhân giống *in vitro*, nhiều nghiên cứu cho thấy việc kết hợp BA với auxin làm tăng hiệu quả nhân giống. Ở nước ta hiện nay chưa có công bố sử dụng BA kết hợp với auxin trong nghiên cứu nhân giống *in vitro* cây việt quất, trên thế giới đã có công bố nhưng vẫn còn rất ít. Melani và Adriana (2016) [11] đã sử dụng BA kết hợp với IBA nghiên cứu nhân giống *in vitro* thành công loài *Vaccinium myrtillus*. Rache và cs. (2010) [17] cũng đã sử dụng BA kết hợp với IAA nghiên cứu nhân giống *in vitro* loài *Vaccinium meridionale*.

Như vậy, môi trường WPM bổ sung 1 mg/l BA kết hợp 0,1 mg/l NAA là tốt nhất đến sự tái sinh và sinh trưởng chồi *in vitro* cây việt quất.

Bảng 2. Ảnh hưởng của BA kết hợp NAA đến sự tái sinh và sinh trưởng chồi *in vitro* sau 50 ngày nuôi cấy

BA (mg/l)	NAA (mg/l)	Chiều cao chồi (cm)	Số chồi/mẫu	Số đốt/chồi	Hình thái chồi
0,0	0,0	2,69 ^{c*}	1,0 ^a	6,10 ^d	Chồi có màu xanh đậm hơn và sinh trưởng yếu hơn
0,5	0,1	3,35 ^c	1,0 ^a	8,30 ^b	Chồi có màu nâu ở phần ngọn, sinh trưởng tốt và mẫu tạo callus
1,0	0,1	4,18 ^a	1,0 ^a	9,10 ^a	Chồi có màu nâu ở phần ngọn, sinh trưởng tốt và mẫu tạo callus
1,5	0,1	3,72 ^b	1,0 ^a	8,50 ^b	Chồi có màu nâu ở phần ngọn, sinh trưởng tốt và mẫu tạo callus
2,0	0,1	3,16 ^d	1,0 ^a	7,10 ^c	Thân chồi có màu nâu, chồi sinh trưởng yếu hơn và mẫu tạo callus

Ghi chú: *Những chữ khác nhau (a, b,...) trong cùng một cột biểu diễn sự khác nhau có ý nghĩa với $P \leq 0,05$ trong Duncan's test.

3.3. Khảo sát ảnh hưởng của Kinetin kết hợp NAA đến sự tái sinh và sinh trưởng chồi *in vitro*

Khả năng tái sinh và sinh trưởng chồi từ đốt thân cây việt quất sau 50 ngày nuôi cấy được thể hiện trên bảng 3. Kết quả cho thấy, những đốt thân nuôi cấy trên tất cả các môi trường đều tái sinh chồi, tuy nhiên ở những môi trường bổ sung các nồng độ Kinetin khác nhau kết hợp 0,1 mg/l NAA thì các chồi có sự sinh trưởng khác nhau. Chồi nuôi cấy trên môi trường bổ sung 1 mg/l Kinetin kết hợp 0,1 mg/l NAA sinh trưởng tốt nhất, với chiều cao chồi 3,88 cm và 8,50 đốt/chồi. Khi tăng nồng độ Kinetin từ 0 mg/l - 1 mg/l thì chiều cao chồi và số đốt/chồi tăng lên,

nhưng khi nồng độ Kinetin tăng 1,5 mg/l - 2 mg/l thì chiều cao chồi và số đốt/chồi giảm xuống. Điều này có thể giải thích, khi nồng độ Kinetin thấp thì kích thích sự tăng trưởng chiều cao chồi và số đốt/chồi, nhưng khi nồng độ Kinetin tăng cao thì xảy ra quá trình ngược lại ức chế sự sinh trưởng chồi. Nhưng sự tái sinh chồi ở nghiệm thức không bổ sung chất điều hòa sinh trưởng và các nghiệm thức bổ sung các nồng độ Kinetin kết hợp NAA thì không có sự khác biệt, chỉ tái sinh 1 chồi/mẫu. Đặc điểm hình thái chồi cho thấy, chồi nuôi cấy trên môi trường bổ sung 0,5 mg/l; 1 mg/l và 1,5 mg/l Kinetin kết hợp 0,1 mg/l NAA có màu nâu ở ngọn và sinh trưởng tốt hơn

(Hình 1f₂, 1f₃ và 1f₄), thân chồi trên môi trường bổ sung 2 mg/l Kinetin kết hợp 0,1 mg/l NAA có màu nâu và sinh trưởng yếu hơn (Hình 1f₅), chồi nuôi cấy trên môi trường không bổ sung chất điều hòa sinh trưởng có màu xanh đậm và sinh trưởng yếu (Hình 1f₁). Các chất điều hòa sinh trưởng thuộc nhóm cytokinin nói chung và chất Kinetin nói riêng đều có tác dụng lên mẫu cấy theo một quy luật chung, khi tăng dần nồng độ thì kích thích sự tái sinh và sinh trưởng chồi của mẫu, khi đến nồng độ tối ưu thì sự tái sinh và sinh trưởng chồi đạt tốt nhất, nhưng khi vượt qua ngưỡng nồng độ tối ưu thì sẽ gây ra hiện tượng ức chế sự tái sinh và sinh trưởng chồi hoặc làm cho mẫu bị chết [15, 16].

Hiện nay chưa có công bố sử dụng Kinetin kết hợp NAA trong nghiên cứu tái sinh và sinh trưởng

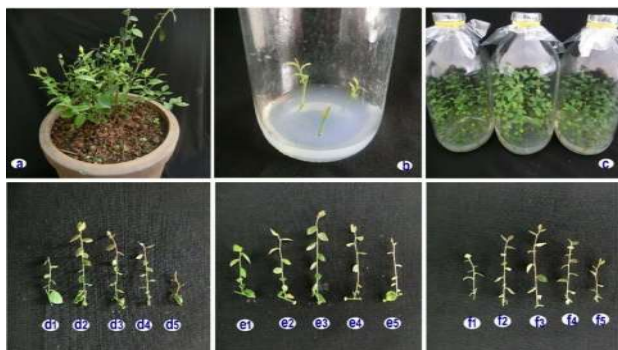
chồi *in vitro* cây việt quất, nhưng ở những cây được liệu đã có nhiều công bố như: Phan Xuân Huyền và Nguyễn Lâm Thanh (2014) [13] khi nghiên cứu nhân giống *in vitro* cây đẳng sâm (*Codonopsis javanica* Blume) thông qua nuôi cấy chồi ngủ đã sử dụng Kinetin kết hợp với NAA, kết quả cho thấy, môi trường bổ sung 0,1 mg/l - 0,3 mg/l kết hợp với 0,1 mg/l NAA có chiều cao chồi tốt nhất; Phan Xuân Huyền và cs (2018) [16] nghiên cứu nhân giống *in vitro* loài lan gấm (*Anoectochilus formosanus* Hayata) cho thấy, môi trường nuôi cấy bổ sung 1 mg/l Kinetin thì chồi tái sinh và sinh trưởng tốt nhất.

Như vậy, môi trường WPM bổ sung 1 mg/l Kinetin kết hợp 0,1 mg/l NAA là tốt nhất đến sự tái sinh và sinh trưởng chồi *in vitro* cây việt quất.

Bảng 3. Ảnh hưởng của Kinetin kết hợp NAA đến sự tái sinh và sinh trưởng chồi *in vitro* sau 50 ngày nuôi cấy

Kinetin (mg/l)	NAA (mg/l)	Chiều cao chồi (cm)	Số chồi/mẫu	Số đốt/chồi	Hình thái chồi
0,0	0,0	2,65 ^{c*}	1,0 ^a	5,80 ^c	Chồi có màu xanh đậm hơn và sinh trưởng yếu hơn
0,5	0,1	3,26 ^b	1,0 ^a	7,80 ^b	Chồi có màu nâu ở phần ngọn và sinh trưởng tốt hơn
1,0	0,1	3,88 ^a	1,0 ^a	8,50 ^a	Chồi có màu nâu ở phần ngọn và sinh trưởng tốt hơn
1,5	0,1	3,14 ^b	1,0 ^a	7,70 ^b	Chồi có màu nâu ở phần ngọn và sinh trưởng tốt hơn
2,0	0,1	2,62 ^c	1,0 ^a	6,10 ^c	Thân chồi có màu nâu và sinh trưởng yếu hơn

Ghi chú: *Những chữ khác nhau (a, b,...) trong cùng một cột biểu diễn sự khác nhau có ý nghĩa với $P \leq 0,05$ trong Duncan's test.



Hình 1. Nghiên cứu khả năng tái sinh và sinh trưởng chồi *in vitro* cây việt quất (*Vaccinium myrtillus* Linn.) thông qua nuôi cấy đốt thân

Ghi chú: a. Cây việt quất; b. Mẫu tái sinh chồi *in vitro* sau khi khử trùng; c. Chồi việt quất *in vitro*; d₁, d₂, d₃, d₄, d₅. Tái sinh và sinh trưởng chồi *in vitro* trên môi trường WPM bổ sung 0 mg/l; 0,5 mg/l; 1 mg/l;

1,5 mg/l; 2 mg/l zeatin kết hợp 0,1 mg/l NAA; e₁, e₂, e₃, e₄, e₅. Tái sinh và sinh trưởng chồi *in vitro* trên môi trường WPM bổ sung 0 mg/l; 0,5 mg/l; 1 mg/l; 1,5 mg/l; 2 mg/l BA kết hợp 0,1 mg/l NAA; f₁, f₂, f₃, f₄, f₅. Tái sinh và sinh trưởng chồi *in vitro* trên môi trường WPM bổ sung 0 mg/l; 0,5 mg/l; 1 mg/l; 1,5 mg/l; 2 mg/l Kinetin kết hợp 0,1 mg/l NAA.

3.4. Khảo sát ảnh hưởng của NAA đến sự tạo rễ *in vitro*

Từ kết quả của những thí nghiệm trên cho thấy môi trường không bổ sung chất điều hòa sinh trưởng thì mẫu cấy không tạo rễ mà chỉ tạo chồi, do đó trong thí nghiệm này NAA được bố trí ngẫu nhiên ở những nồng độ như: 0,5 mg/l; 1 mg/l; 1,5 mg/l và 2 mg/l. Khả năng tạo rễ *in vitro* cây việt quất sau 50 ngày nuôi cấy được thể hiện trên bảng 4. Kết quả cho thấy, các môi trường đều có ảnh hưởng đến sự tạo rễ

của mẫu, tuy nhiên ở những môi trường bổ sung các nồng độ NAA khác nhau thì sự tạo rễ khác nhau. Ở nghiệm thức bổ sung 0,5 mg/l NAA có tỷ lệ tạo rễ thấp nhất, chỉ đạt 80%. Tỷ lệ tạo rễ của mẫu ở các nghiệm thức bổ sung 1,0 mg/l NAA; 1,5 mg/l NAA và 2 mg/l NAA đều đạt 100%.

Theo xử lý thống kê số liệu cho thấy, chiều cao của cây ở các nghiệm thức không có sự khác biệt. Về chiều dài rễ thì theo xử lý thống kê số liệu cho thấy, môi trường bổ sung 0,5 mg/l và 1,0 mg/l NAA không có sự khác biệt, môi trường bổ sung 1,5 mg/l NAA và 2,0 mg/l NAA không có sự khác biệt, nhưng chiều dài rễ ở môi trường bổ sung 0,5 mg/l NAA; 1,0 mg/l NAA và môi trường bổ sung 1,5 mg/l NAA; 2,0 mg/l NAA thì có sự khác biệt có ý nghĩa. Đặc điểm hình thái cây cho thấy, cây nuôi cấy ở tất cả môi trường trên đều sinh trưởng tốt và có màu xanh đậm (Hình 2a₁, 2a₂, 2a₃, 2a₄). Rễ cây nuôi cấy ở môi trường bổ sung 0,5 mg/l NAA; 1 mg/l NAA và 1,5 mg/l NAA có màu trắng, trong khi đó rễ của những cây ở môi trường bổ sung 2 mg/l NAA có màu nâu. NAA là một chất điều hòa sinh trưởng thuộc nhóm auxin có tác dụng kích thích tạo rễ và được sử dụng phổ biến

trong nuôi cấy mô thực vật, tỷ lệ hình thành rễ phụ thuộc vào nồng độ của NAA và cũng phụ thuộc vào từng loại cây trồng.

Ở nước ta hiện nay chưa có công bố sử dụng các chất thuộc nhóm auxin trong nghiên cứu tạo rễ *in vitro* cây việt quất, trên thế giới đã có công bố sử dụng IBA nghiên cứu tạo rễ *in vitro* cây việt quất, nhưng chưa có công bố sử dụng NAA. Cüce và Sökmen (2015) [1] nghiên cứu nhân giống *in vitro* cây việt quất loài *Vaccinium uliginosum* cho thấy, môi trường WPM bổ sung 0,5 mg/l IBA kết hợp với 1,0 mg/l than hoạt tính cho tỷ lệ ra rễ cao nhất là 60%. Mohamed và cs (2018) [10] nghiên cứu nhân giống *in vitro* loài *Vaccinium corymbosum* cho thấy, môi trường WPM bổ sung các kết hợp IBA (1 mg/l) và than hoạt tính (0,1%) thu được số rễ trung bình cao nhất hình thành trên mỗi mẫu là 5,9. Rache và Pacheco (2010) [17] nghiên cứu nhân giống *in vitro* loài *Vaccinium meridionale* cho thấy, tỷ lệ mẫu tạo rễ đạt 88% - 100% sau 60 ngày nuôi cấy.

Như vậy, môi trường WPM bổ sung 1 mg/l NAA là tốt nhất đến sự tạo rễ *in vitro* cây việt quất.

Bảng 4. Ảnh hưởng của NAA đến sự tạo rễ *in vitro* sau 50 ngày nuôi cấy

NAA (mg/l)	Chiều cao cây (cm)	Chiều dài rễ (cm)	Tỷ lệ ra rễ (%)	Hình thái cây
0,5	5,53 ^a	1,46 ^a	80	Cây sinh trưởng tốt, có màu xanh đậm và rễ màu trắng
1,0	5,14 ^a	1,42 ^a	100	Cây sinh trưởng tốt, có màu xanh đậm và rễ màu trắng
1,5	5,12 ^a	1,18 ^b	100	Cây sinh trưởng tốt, có màu xanh đậm và rễ màu trắng
2,0	4,17 ^a	1,12 ^b	100	Cây sinh trưởng tốt, có màu xanh đậm và rễ màu nâu

Ghi chú: *Những chữ khác nhau (a, b,...) trong cùng một cột biểu diễn sự khác nhau có ý nghĩa với $P \leq 0,05$ trong Duncan's test



Hình 2. Nghiên cứu khả năng tái sinh và sinh trưởng chồi *in vitro* cây việt quất (*Vaccinium myrtillus* Linn.) thông qua nuôi cấy đốt thân

Ghi chú: a₁, a₂, a₃, a₄. Tạo rễ *in vitro* trên môi trường WPM bổ sung 0,5 mg/l, 1 mg/l, 1,5 mg/l, 2 mg/l NAA. b. Cây việt quất cấy mô; c₁, c₂, c₃. Cây việt

quất cấy mô trồng trên giá thể vụn xơ dừa, đất mùn và đất bazan; d. Cây việt quất cấy mô sau 2 tháng nuôi trồng trên giá thể vụn xơ dừa; e. Cây việt quất cấy mô sau 3 tháng nuôi trồng trên giá thể vụn xơ dừa; f. Cây việt quất cấy mô sau 4 tháng nuôi trồng trên giá thể vụn xơ dừa.

3.5. Khảo sát ảnh hưởng của giá thể đến tỷ lệ sống và sinh trưởng cây cấy mô chuyển ra ngoài vườn ươm

Nghiên cứu chuyển cây cấy mô ra ngoài vườn ươm là một bước quan trọng trong nuôi cấy mô thực vật. Cây cấy mô phải thích nghi ở điều kiện mới khi chuyển từ điều kiện nuôi cấy *in vitro* ra điều kiện

vườn ươm, bộ rễ của cây con phải thích nghi trên giá thể mới, hơn nữa, độ ẩm trong điều kiện *in vitro* cao và ổn định hơn ở điều kiện ngoài vườn ươm, do đó, cây con dễ bị chết. Vì vậy, cây con cần phải chăm sóc cẩn thận khi chuyển ra ngoài vườn ươm trong thời gian đầu. Khả năng sống sót và thích nghi của cây việt quất cấy mô sau 50 ngày chăm sóc ngoài vườn ươm được thể hiện trên bảng 5. Kết quả cho thấy, cây trồng trên giá thể vụn xơ dừa có tỷ lệ sống và sinh trưởng tốt nhất, với chiều cao cây 7,46 cm, chiều dài rễ 3,48 cm và tỷ lệ sống 90,48%. Cây trồng trên giá thể đất bazan có tỷ lệ sống và sinh trưởng kém nhất, với chiều cao cây 6,13 cm, chiều dài rễ 1,85 cm và tỷ lệ sống 76,19%. Cây trồng trên giá thể đất mùn có tỷ lệ sống và sinh trưởng kém hơn cây trồng trên giá thể vụn xơ dừa, nhưng tốt hơn cây trồng trên đất bazan (chiều cao cây 6,52 cm, chiều dài rễ 2,34 cm và tỷ lệ sống 85,71%). Điều này có thể giải thích giá thể vụn xơ dừa thích hợp cho cây việt quất cấy mô sinh trưởng trong giai đoạn đầu ở điều kiện ngoài vườn ươm.

Đặc điểm hình thái cây cho thấy, cây việt quất cấy mô khi nuôi trồng trên các giá thể đều mọc thêm chồi mới và có màu xanh mượt (Hình 2c₁, 2c₂, 2c₃), cây trồng trên giá thể vụn xơ dừa sinh trưởng tốt hơn cây trồng trên giá thể đất mùn và đất bazan. Những cây việt quất cấy mô trồng trên giá thể vụn xơ dừa

sinh trưởng tốt sau 2 tháng nuôi trồng (Hình 2d), cây vẫn tiếp tục sinh trưởng tốt sau 3 tháng nuôi trồng (Hình 2e) và sau 4 tháng nuôi trồng (Hình 2f). Vụn xơ dừa, đất mùn và đất bazan là những giá thể thường sử dụng trong nghiên cứu chuyển cây cấy mô ra ngoài vườn ươm như: Phan Xuân Huyền và Nguyễn Lâm Thanh (2014) [13] nghiên cứu chuyển cây đẳng sâm cấy mô ra ngoài vườn ươm đã trồng trên giá thể vụn xơ dừa, kết quả ghi nhận sau 20 ngày nuôi trồng và chăm sóc tỷ lệ sống của cây đạt 100%; Phan Xuân Huyền và Nguyễn Thị Phương Hoàng (2017) [15] khi nghiên cứu trồng cây lan gấm cấy mô của loài *Anoectochilus formosanus* ra điều kiện *ex vitro* cũng đã sử dụng giá thể vụn xơ dừa, kết quả cho thấy, tỷ lệ sống của cây đạt 100% sau 2 tháng nuôi trồng. Ở nước ta hiện nay chưa có công bố nghiên cứu chuyển cây việt quất cấy mô ra ngoài vườn ươm nhưng trên thế giới đã có công bố. Mohamed và cs (2018) [10] cho thấy, cây cấy mô việt quất đã trồng thành công trên giá thể đất, với tỷ lệ sống sót đạt 100%. Rache và Pacheco (2010) [17] nghiên cứu chuyển cây việt quất cấy mô ra ngoài vườn trồng trên giá thể đất thành công.

Như vậy, giá thể vụn xơ dừa là tốt nhất để chuyển cây việt quất cấy mô ra điều kiện ngoài vườn ươm.

Bảng 5. Ảnh hưởng của giá thể đến tỉ lệ sống và sinh trưởng cây cấy mô chuyển ra ngoài vườn ươm sau 50 ngày nuôi trồng

Giá thể	Chiều cao cây (cm)	Chiều dài rễ (cm)	Tỷ lệ sống (%)	Hình thái cây
Vụn xơ dừa	7,46 ^{a*}	3,48 ^a	90,48	Cây có màu xanh nhạt và rễ sinh trưởng kém
Đất mùn	6,52 ^b	2,34 ^b	85,71	Cây có màu xanh nhạt và rễ sinh trưởng kém
Đất bazan	6,13 ^c	1,85 ^c	76,19	Cây có màu xanh mượt và rễ sinh trưởng tốt

Ghi chú: *Những chữ khác nhau (a, b,...) trong cùng một cột biểu diễn sự khác nhau có ý nghĩa với $P \leq 0,05$ trong Duncan's test.

4. KẾT LUẬN

Môi trường WPM bổ sung 0,5 mg/l zeatin kết hợp 0,1 mg/l NAA, môi trường WPM bổ sung 1 mg/l BA kết hợp 0,1 mg/l NAA và môi trường WPM bổ sung 1 mg/l Kinetin kết hợp 0,1 mg/l NAA là tốt nhất đến sự tái sinh và sinh trưởng chồi *in vitro* cây việt quất. Môi trường WPM bổ sung 1 mg/l NAA là

tốt nhất đến sự tạo rễ *in vitro* cây việt quất. Chuyển cây việt quất cấy mô ra ngoài vườn ươm thì giá thể vụn xơ dừa là tốt nhất đến sự sinh trưởng và tỉ lệ sống của cây. Những cây việt quất cấy mô sinh trưởng tốt trên giá thể vụn xơ dừa sau 2 tháng nuôi trồng, cây tiếp tục sinh trưởng tốt sau 3 và 4 tháng nuôi trồng.

LỜI CẢM ƠN

Các tác giả xin chân thành cảm ơn Viện Nghiên cứu Khoa học Tây Nguyên, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam đã hỗ trợ nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Cüce M., Sökmen A. (2015). Micropropagation of *Vaccinium myrtillus* L. (Bilberry) naturally growing in the Turkish flora. *Turk J. Biol.*, 39: 233-240.
- Cüce M., Bekircan T., Sökmen A. (2016). Effect of medium pH on shoot regeneration of three *Vaccinium* species naturally growing in Turkish Flora. *Turk J. Life Sci.*, 1(2): 052-058.
- Cüce M., Sökmen A. (2017). *In vitro* production protocol of *Vaccinium uliginosum* L. (bog bilberry) growing in the Turkish flora. *Turk J. Agric. For.*, 41: 294-304.
- Duncan D. B. (1955). Multiple range and F tests. *Biometrics*, 11: 1-42.
- Elkiran O., Avsar C. (2020). Chemical composition and biological activities of the essential oil from the leaves of *Vaccinium myrtillus* L. *Bangladesh J. Bot.*, 49(1): 91-96.
- Gajdošová A., Ostrolucká M. G., Libiaková G., Ondrušková E., Šimala D. (2006). Microclonal propagation of *Vaccinium* sp. and *Rubus* sp. and detection of genetic variability in culture *in vitro*. *J. Fruit Ornament. Plant Res.*, 14: 103-119.
- Güder A., Gür M., Engin M. S. (2015). Antidiabetic and antioxidant properties of bilberry (*Vaccinium myrtillus* Linn.) fruit and their chemical composition. *J. Agr. Sci. Tech.*, 17: 401-414.
- Jaakola L., Riihinen K., Häggman H., Hohtola A. (2009). Bilberry *in vitro* protocols and analyses of phenolic compounds. *Methods Mol. Biol.*, 547: 71-80.
- Lloyd G., McCown B. (1980). Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel (*Kalmia latifolia*) by use of shoot tip culture. *Com. Proc. Int. Plant Prop. Soc.*, 30: 421-427.
- Mohamed G. R. A., Khusnetdinova L. Z., Timofeeva O. A. (2018). Elaboration of micropropagation protocol for *Vaccinium corymbosum* cv. "Sunt Blue Giant". *Asian J. Plant Sci. Res.*, 8(5): 1-11.
- Melani N. A., Adriana P. V. (2016). *In vitro* propagation of *Vaccinium myrtillus*. *J. N. R. D.*, 6: 122-129.
- Nestby R., Percival D., Martinussen I., Opstad N., Rohloff J. (2010). The European blueberry (*Vaccinium myrtillus* L.) and the potential for cultivation. A review. *European J. Plant Sci. Biotechnol.*, 5: 5-16.
- Phan Xuân Huyền, Nguyễn Lâm Thanh (2014). Nghiên cứu nhân giống *in vitro* cây đẳng sâm (*Codonopsis javanica* Blume) thông qua nuôi cấy chồi ngủ. *Tạp chí Công nghệ Sinh học*, 12(4): 659-666.
- Pepkolaj A., Faslia N., Ozuni E. (2017). Chemical variability of wild bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) populations in northern part of Albania. *J. Med. Plants Res.*, 11(37): 576-582.
- Phan Xuân Huyền, Nguyễn Thị Phương Hoàng (2017). Nghiên cứu tái sinh chồi *in vitro* và nuôi trồng cây lan gấm (*Anoectochilus formosanus* Hayata). *Tạp chí Công nghệ Sinh học*, 15(3): 515-524.
- Phan Xuân Huyền, Trần Thị Hoàn Anh, Nguyễn Thị Phương Hoàng, Nguyễn Thị Thanh Hằng, Đinh Văn Khiêm, Hoàng Văn Cường (2018). Nghiên cứu nhân giống *in vitro* và ảnh hưởng của phân bón lá đến sinh trưởng cây lan gấm (*Anoectochilus formosanus* Hayata) tại Lâm Đồng. *Tạp chí Dược liệu*, 23(1): 52-59.
- Rache L. Y. C., Pacheco J. C. M. (2010). *In vitro* propagation of mature plants of *Vaccinium meridionale* (Ericaceae). *Acta Bot. Bras.*, 24(4): 1086-1095.

**STUDY ON ABILITY OF *IN VITRO* SHOOT GROWTH AND REGENERATION
OF *Vaccinium myrtillus* Linn. THROUGH STEM NODE CULTURE**

Phan Xuan Huyen¹, Nguyen Thi Thanh Hang¹,

Nguyen Thi Phuong Hoang¹, Dinh Van Khiem¹

¹Tay Nguyen Institute for Scientific Research,

Vietnam Academy of Science and Technology

Summary

Vaccinium myrtillus Linn. is an imported fruit tree with high economic value and good for human health. Currently, in the Vietnam there has not been publication researched on *in vitro* propagation of blueberry plant. This paper conducted to study *in vitro* propagation of *Vaccinium myrtillus* by method of stem node culture. The results showed that WPM medium supplemented with 0.5 mg/l zeatin combined with 0.1 mg/l NAA (shoot height 4.53 cm, 1 shoot/explant, 11.20 nodes/shoot), WPM medium supplemented with 1 mg/l BA combined with 0.1 mg/l NAA (shoot height 4.18 cm, 1 shoot/explant, 9.10 nodes/shoot) and WPM medium supplemented with 1 mg/l Kinetin combined with 0.1 mg/l NAA (shoot height 3.88 cm, 1 shoot/explant, 8.50 nodes/shoot) were the best media for the regeneration and *in vitro* shoot growth of *Vaccinium myrtillus*. For *in vitro* rooting, WPM medium supplemented with 1 mg/l NAA was the best (plant height 5.14 cm, root length 1.42 cm, rooting rate 100%). Transfer cultivated-tissue *Vaccinium myrtillus* to the greenhouse, substrate of coconut fiber powder was the best for the growth and survival rate of the plants (plant height 7.46 cm, plant length 3.48 cm, survival rate 90.48%). Cultivated-tissue *Vaccinium myrtillus* grew well on substrate of coconut fiber powder after 2 months of cultivation, *Vaccinium myrtillus* plants continued to grow well after 3 months of cultivation and after 4 months of cultivation.

Keywords: *Number of node, number of shoot, shoot height, Vaccinium myrtillus, WPM medium.*

Người phản biện: PGS.TS. Nguyễn Văn Đồng

Ngày nhận bài: 14/5/2021

Ngày thông qua phản biện: 17/6/2021

Ngày duyệt đăng: 24/6/2021