



## Nghiên cứu hoàn thiện quy trình nhân giống *in vitro* cây cà chua từ hạt xanh

✦ ThS. NGUYỄN THẾ NHUẬN<sup>1</sup>, VÕ THỊ NGỌC và TRẦN ANH THÔNG

<sup>1</sup>Trung tâm Nghiên cứu Khoai tây, Rau và Hoa.

Cà chua là cây rau được trồng và tiêu thụ phổ biến tại Việt Nam, với diện tích khoảng 23-25 ngàn ha, năng suất trung bình ước đạt 30-40 tấn/ha. Hiện nay, trong sản xuất gần như 100% giống cà chua được sử dụng là giống F1 nhập nội, có giá hạt giống rất cao, trung bình từ 25-40 triệu đồng/kg. Chọn tạo giống cà chua bằng phương pháp lai hữu tính là phương pháp chủ yếu trên toàn thế giới, phương pháp này đã tạo được các giống cà chua có ưu thế lai vượt trội, với năng suất cà chua được cải thiện một cách nhanh chóng. Tuy nhiên, để

phát huy được ưu thế lai trong quá trình lai tạo thì cần phải có được các giống thuần với những tính trạng tốt.

Theo David C.S Tay, từ năm 1975-1987 các tác giả tại AVRDC đã thu thập được 48.723 mẫu giống cà chua từ 153 nước và phân loại được 6.074 dòng nằm trong 13 loài chủ yếu và loài *Lycopersicon esculentum* chiếm đa số (5.365 dòng). Tại Ấn Độ, theo T.A. Thommas và Umesh Chandra, từ năm 1946 đến 1986 Viện Nghiên cứu Nghé vườn và Trường Đại học Nông nghiệp Punjab đã thu thập được 2.559 giống cà chua từ 40 nước trên thế giới phục vụ cho công tác lai.

Có rất nhiều phương pháp để tạo được dòng thuần cà chua, nhưng phổ biến vẫn là phương pháp tự thụ phấn, vốn được nhiều nhà nghiên cứu trên thế giới sử dụng. Bên cạnh đó, cũng có nhiều phương pháp hỗ trợ rút ngắn thời gian tự thụ phấn, nghiên cứu nuôi cấy mô nhân cây giống từ hạt xanh (*in vitro culture of immature seed for rapid generation*) đã được các tác giả tại Úc và Trung tâm Nghiên cứu Rau thế giới thực hiện nhằm rút ngắn thời gian trong việc thực hiện quá trình tự thụ phấn cà chua để tạo dòng thuần. Trên cơ sở này, Trung



# Chuyển giao công nghệ

└ Giới thiệu kết quả nghiên cứu

tâm Nghiên cứu Khoai tây, Rau và Hoa (Viện Khoa học Kỹ thuật Nông nghiệp miền Nam) đã thực hiện nội dung “Nghiên cứu hoàn thiện quy trình nhân cây giống in vitro cà chua từ hạt xanh” nhằm rút ngắn thời gian tạo dòng thuần phục vụ cho công tác chọn tạo giống cà chua lai.

## Vật liệu nghiên cứu và phương pháp xử lý số liệu

**Vật liệu nghiên cứu:** Hạt của quả cà chua dòng thuần T10 (T10 là thuần được Trung tâm Nghiên cứu Khoai tây, Rau và Hoa tự phối đến đời F7) ở các giai đoạn tuổi khác nhau (10 tới 60 ngày tuổi). Loại bỏ phần vỏ, thịt quả, lấy hạt để tiến hành tách lấy phôi để nuôi cấy.

Môi trường nuôi cấy MS (Murashige và Skoog 1962) bổ sung các chất điều hòa sinh trưởng khác nhau: NAA (naphthalene acetic acid), IAA (indo-3-acetic acid), IBA (indole butyric acid), BA (6-benzyl aminopurine), GA3 (gibberellic acid), AC (Activated carbon).

**Phương pháp xử lý số liệu:** số liệu của các chỉ tiêu theo dõi được thu thập bằng phương pháp quan trắc, đo đếm và được xử lý thống kê bằng phần mềm máy tính Excel và phần mềm thống kê sinh học SAS 9.1.

## Kết quả thí nghiệm

### Thí nghiệm 1: Nghiên cứu xác định tuổi trái thích hợp cho nuôi cấy phôi tạo cây cà chua trong ống nghiệm

Thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên (CRD) gồm 6 nghiệm thức (NT), mỗi NT lặp lại 4 lần, mỗi lần lặp là 5 bình tam giác, mỗi bình tam giác cấy 5 hạt, che tối 24 giờ sau cấy.

- Các NT thí nghiệm: NT1 (Hạt từ trái 10 ngày tuổi), NT2 (Hạt từ trái 20 ngày tuổi), NT3 (Hạt từ trái 30 ngày tuổi), NT4 (Hạt từ trái 40 ngày tuổi), NT5 (Hạt từ trái 50 ngày tuổi), NT6 (Hạt từ trái 60 ngày tuổi).

Môi trường: MS + 0,1 mg/L IAA + 0,5 mg/L BA + 0,5 mg/L GA3 + 20 g/L đường + 7g/L agar.

Điều kiện phòng nuôi: ánh sáng đèn huỳnh quang, cường độ ánh sáng 1.800 Lux, thời gian chiếu sáng 16 giờ/ngày, nhiệt độ phòng nuôi 25°C (± 2°C), ẩm độ phòng 30%.



- Chỉ tiêu theo dõi: số hạt nảy mầm sau 7, 10 và 14 ngày cấy mẫu.

- Kết quả:

### Bảng 1. Tuổi trái thích hợp cho nuôi cấy phôi tạo cây

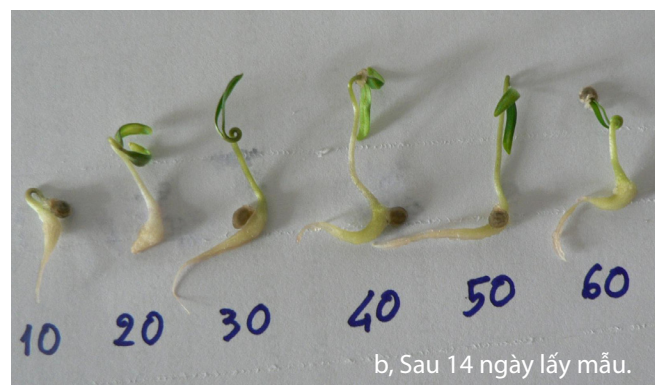
ĐVT: Số hạt nảy mầm

Nghiệm thức	Sau 7 ngày cấy mẫu	Sau 10 ngày cấy mẫu	Sau 14 ngày cấy mẫu
NT1	0,75 f	2,5 f	7,75 d
NT2	2,75 e	9,25 e	17,75 c
NT3	6,0 d	12 d	21 b
NT4	11,0 c	15,25 c	22,25 b
NT5	13,5 b	21 b	24,75 a
NT6	15,5 a	23 a	25 a
CV (%)	2,77	2,95	3,71
LSD <sub>0,05</sub>	1,58	1,65	2,31

**Ghi chú:** Trên cùng một cột, các số trung bình được theo sau cùng một chữ thì không khác biệt ở mức ý nghĩa 0,05.

Kết quả nghiên cứu cho thấy: sau 7 ngày nuôi cấy, tỷ lệ nảy mầm ở các giai đoạn khác nhau có sự khác biệt rõ rệt. Trái 10 ngày tuổi, tỷ lệ nảy mầm chỉ đạt 0,75 hạt (chiếm tỉ lệ 3%) do phôi hạt còn quá non và thời gian nuôi cấy chưa đủ. Tỷ lệ nảy mầm tăng lên rõ rệt khi tuổi trái càng già. Trái 20 ngày tuổi có 2,75 hạt nảy mầm (chiếm 11%). Tỷ lệ nảy mầm tăng tỷ lệ thuận với tuổi trái, trái 30, 40, 50, 60 ngày tuổi số hạt nảy mầm tăng dần 6; 11; 13,5; 15,5 hạt (24%, 44%, 54%, 62%). Trái 50 và 60 ngày sau thụ phấn đã đạt trên 50% số hạt nảy mầm chỉ sau 1 tuần nuôi cấy, do phôi đã trưởng thành gặp điều kiện thuận lợi phát triển nhanh chóng.

Sau 10 ngày nuôi cấy, số hạt nảy mầm của các nghiệm thức đã tăng lên. Trái 10 ngày tuổi đạt 2,5 hạt (10%), chỉ thêm 3 ngày so với hạt 7 ngày tuổi tỷ lệ nảy mầm đã tăng lên đến 7%. Trái 20 ngày tuổi, hạt nảy mầm cũng tăng đáng kể là 9,25 hạt (37%). Tất cả các trái từ 30–60 ngày tuổi còn lại đều tăng số lượng hạt nảy mầm từ 12–23 hạt (48%–92%). Trái 60 ngày tuổi gần như đã nảy mầm được 100%.



Hình 1: Hạt cà chua nảy mầm sau các ngày cấy mẫu khác nhau.

Sau 14 ngày, trái 40-50-60 ngày tuổi đã nảy mầm 90%-100% do phôi đã trưởng thành và thời gian nuôi cấy đủ để hạt sinh trưởng và phát triển. Tuy nhiên, trái 40 ngày sau thụ phấn trở lên đã có thể gieo ngoài vườn ươm và tỷ lệ nảy mầm cũng khá cao, nên khi đưa vào phòng thí nghiệm nên chọn trái ít ngày tuổi hơn để rút ngắn quá trình nhân giống mà cũng không làm ảnh hưởng tới chất lượng giống. Trái 10 ngày tuổi có 7,75 hạt nảy mầm (31%) là quá thấp, chưa bằng ½ tỷ lệ nảy mầm của trái 20 ngày tuổi 17,75 hạt (71%). Đối với trái 30 ngày sau thụ phấn, tỷ lệ nảy mầm cao, 21 hạt (84%), nhưng để rút ngắn thời gian tạo cây trong ống nghiệm, nên chọn trái 20 ngày tuổi để nuôi cấy là hiệu quả nhất.

### Thí nghiệm 2: Nghiên cứu ảnh hưởng của nồng độ GA3 đến sinh trưởng của cây cà chua.

Thí nghiệm được bố trí theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên (CRD) gồm 4 NT, mỗi NT lặp lại 3 lần, mỗi lần lặp 5 bình tam giác, mỗi bình tam giác cấy 5 cây.

- Các NT thí nghiệm: NT1 (MS + 0,0mg/L GA3 + 20g/L đường + 7g/L agar), NT2 (MS + 0,2mg/L GA3 + 20g/L đường + 7g/L agar), NT3 (MS + 0,4mg/L GA3 + 20g/L đường + 7g/L agar), NT4 (MS + 0,6mg/L GA3 + 20g/L đường + 7g/L agar)

- Các chỉ tiêu theo dõi: chiều cao cây (cm) và số lá trên cây

- Kết quả:

**Bảng 2: Ảnh hưởng của nồng độ GA3 đến sinh trưởng của cà chua**

Nghiệm thức	Số lá/cây	Chiều cao cây (cm)
NT1	4,5 b	5,7 d
NT2	4,7 ab	6,4 c
NT3	5,5 a	8,0 a
NT4	4,7 ab	7,1 b
CV (%)	2,32	4,74
LSD <sub>0,05</sub>	0,96	0,5

**Ghi chú:** Trên cùng một cột, các số trung bình được theo sau cùng một chữ thì không khác biệt ở mức ý nghĩa 0,05.

Kết quả trình bày tại Bảng 2 cho thấy, khi tăng nồng độ của GA3 thì chiều cao cây và số lá trên cây cũng tăng theo tỷ lệ thuận với tăng nồng độ bổ sung GA3 từ NT1 đến NT3. Nhưng khi nồng độ GA3 tiếp tục tăng ở NT4 thì số lá trên cây và chiều cao cây lại không tăng lên mà lại giảm xuống. NT3 với nồng độ GA3 được bổ sung là 0,4mg/L cho kết quả tốt nhất, với số lá trên cây nhiều và cây có chiều cao lớn nhất. Cây quan sát trong nghiệm thức này nhận thấy rất mập, khỏe, bộ lá phát triển xanh, tốt hơn hẳn các NT còn lại. NT4 với nồng độ GA3 bổ sung 0,6mg/L cho thấy cây bắt đầu sinh trưởng kém, số lá ít lại, chiều cao cây phát triển kém hơn, thân cây nhỏ, cong queo, có màu vàng hơn so với NT3. Vì vậy, trong thí nghiệm

nghiên cứu ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng GA3 đến sinh trưởng của cây cà chua nuôi cấy *in vitro*, thì NT3 với công thức môi trường có bổ sung GA3: MS + 0,4mg/L GA3 + 20gr/L đường + 7gr/L agar cho kết quả tối ưu và thích hợp nhất.

### Thí nghiệm 3: Nghiên cứu ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng NAA, IBA và IAA đến sự hình thành rễ cây cà chua.

Thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên (CRD) gồm 4 NT, mỗi NT lặp lại 3 lần, mỗi lần lặp 5 bình tam giác, mỗi bình tam giác cấy 5 cây.

- Các NT thí nghiệm: NT1 (MS + 0,1 mg/L NAA + 20 g/L đường + 7g/L agar + 0,2 g/L AC), NT2 (MS + 0,02 mg/L IBA+ 20 g/L đường + 7g/L agar + 0,2 g/L AC), NT3 (MS + 1 mg/L IBA+ 20 g/L đường + 7g/L agar + 0,2 g/L AC), NT4 (MS + 2 mg/L IAA+ 20 g/L đường + 7g/L agar + 0,2 g/L AC)

- Các chỉ tiêu theo dõi: chiều dài rễ (cm) và trọng lượng rễ (mg)

- Kết quả:

**Bảng 3: Ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng đến khả năng ra rễ của cây cà chua**

Nghiệm thức	chiều dài rễ (cm)	Trọng lượng rễ (mg)
NT1	5,6 c	492,38 a
NT2	6,3 c	99,43 c
NT3	8,6 a	118,40 c
NT4	7,2 b	394,63 b
CV (%)	3,58	2,82
LSD <sub>0,05</sub>	0,84	39

**Ghi chú:** Trên cùng một cột, các số trung bình được theo sau cùng một chữ thì không khác biệt ở mức ý nghĩa 0,05.

Kết quả thí nghiệm cho thấy, NT1 bổ sung 0,1 mg/L NAA cho chiều dài rễ 5,6 cm (ngắn nhất) nhưng trọng lượng rễ lại lớn nhất (492,38 mg) vì rễ có nhiều lông hút, rễ mập, bộ rễ trắng giúp cây hút được nhiều chất dinh dưỡng nên cây khỏe, mập, lá cây xanh bóng. NT2 có bổ sung 0,02 mg/L IBA thì chiều dài rễ 6,3 cm và trọng lượng rễ thấp nhất (99,43 mg) do số lượng rễ ít, rất ít lông hút, rễ có màu nâu nhạt, cây phát triển kém, thân nhỏ, không cao, lá không có màu xanh mượt và xoắn lại do bổ sung quá ít chất kích thích ra rễ, tác dụng của chất kích thích ra rễ ở nghiệm thức này không rõ ràng. NT3 với 1 mg/L IBA thì chiều dài rễ dài nhất (8,6 cm) và trọng lượng rễ 118,40 mg, cây ở nghiệm thức này ốm, lá hơi vàng, thiếu độ xanh bóng do rễ quá dài, ốm, có ít lông hút gây khó khăn cho việc hút chất dinh dưỡng. NT4 bổ sung 2 mg/L IAA cho chiều dài rễ là 7,2 cm và trọng lượng rễ đạt 394,63 mg, xếp sau trọng lượng rễ ở NT1. Cây có nhiều rễ nhưng chiều dài rễ lại dài, ốm và ít lông hút nên gây khó khăn cho việc hút chất dinh dưỡng. Cây ở nghiệm thức này cũng tương đối khỏe, lá xanh bóng, rễ trắng.



Hình 2: So sánh rễ cây ở các nghiệm thức

Quan sát thí nghiệm qua các giai đoạn, cây ở NT chứa IBA ra rễ sớm hơn các cây còn lại nhưng rễ ra dài và số lượng rễ, số lượng lông hút trên cây lại ít nên không thích hợp cho môi trường ra rễ cây cà chua *in vitro*. NT1 với công thức môi trường MS + 0,1 mg/L NAA + 20 g/L đường + 7g/L agar + 0,2 g/L AC cho trọng lượng rễ cao nhất, số rễ và số lông hút trên cây là cao nhất và vì vậy, trong thí nghiệm nghiên cứu ảnh hưởng của chất kích thích sinh trưởng lên khả năng ra rễ của cây cà chua *in vitro*, thì NT1 chính là công thức phù hợp nhất cho việc tạo rễ.

## Kết luận và kiến nghị

Môi trường nhập mẫu: MS + 0,1 mg/L IAA + 0,5 mg/L BA + 0,5 mg/L GA3 + 20 g/L đường + 10g/L agar với trái 20 ngày sau khi thụ phấn cho tỷ lệ nảy mầm 68%. Đây là tỷ lệ

này mầm hiệu quả nhất nhằm rút ngắn thời gian nghiên cứu và cho chất lượng cây giống tốt.

Môi trường nhân nhanh: MS + 0,4mg/L GA3 + 20g/L đường + 7g/L agar tốt nhất cho quá trình sinh trưởng của cây cà chua *in vitro*.

Môi trường ra rễ: MS + 0,1 mg/L NAA + 20 g/L đường + 10g/L agar + 0,2 g/L AC cho cây khỏe, mập, lá cây xanh bóng và bộ rễ trắng tối ưu so với các công thức môi trường khác.

Các tác giả đề nghị sử dụng các kết quả của nghiên cứu này vào việc tạo dòng thuần cà chua bằng phương pháp tự phối để rút ngắn thời gian của các đời tự phối nhằm tạo được nhiều dòng thuần cà chua, phục vụ cho công tác lai tạo giống cà chua lai F1. □

## Tài liệu tham khảo

1. Ashby E., 1937. *The determination of size in plants. Proc Linn Soc Lond* 149:2
2. Cong B., Liu J., Tanksley S.D., 2002. *Natural alleles at a tomato fruit size quantitative trait locus differs by heterochronic regulatory mutations. PNAS*, 99(21):13606–13611
3. Domoradzki M., Korpala W., 2005. *Seed size dependent germination of selected vegetable. Acta Agrophysica* 53:607–612
4. Geboloğlu N., Süleyman B., Mine A., and Perihan Ç., 2011. *The role of growth regulators, embryo age and genotypes on immature embryo germination and rapid generation advancement in tomato (Lycopersicon esculentum Mill.). African Journal of biotechnology Vol. 10(24), pp. 4895-4900.*
5. Kiều Thị Thu, 1998. *Nghiên cứu vật liệu khởi đầu phục vụ cho chọn tạo giống cà chua chịu nóng trồng trái vụ. Luận án tiến sĩ khoa học nông nghiệp. Đại học Nông nghiệp I, Hà Nội.*
6. Rao R.G.S., Singh P.M., Rai M., 2008. *Effect of seed maturity and priming on viability and vigour in tomato (Lycopersicon esculentum L.). Eur J Horticult Sci* 73:56–63.