

CÁC HỆ THỐNG NHÂN GIỐNG THOÁNG KHÍ VÀ ẢNH HƯỞNG CỦA CHÚNG LÊN SỰ SINH TRƯỞNG VÀ PHÁT TRIỂN CỦA CÂY DÂU TÂY (*FRAGARIA VESCA* L.) NUÔI CẤY *IN VITRO*

Nguyễn Quốc Thiện¹, Dương Tấn Nhựt²

¹Trung tâm Công nghệ Sinh học, thành phố Hồ Chí Minh

²Phân Viện Sinh học tại Đà Lạt

TÓM TẮT

Một hệ thống thoáng khí lớn sử dụng trong vi nhân giống cây Dâu tây đã được thiết kế trong nghiên cứu này. Mục đích chính của hệ thống này là giúp sự trao đổi khí cho môi trường không khí bên trong bình nuôi cấy. Khi đó, nồng độ CO₂ cũng như các khí khác bên trong hệ thống nuôi cấy tương đương với nồng độ của các khí này ở môi trường bên ngoài. Quá trình quang hợp diễn ra một cách tự nhiên nhờ có sự hiện diện của khí CO₂ trong môi trường nuôi cấy *in vitro*, do đó, sự sinh trưởng và phát triển của cây được đẩy mạnh không những trong điều kiện nuôi cấy *in vitro* mà còn trong điều kiện *ex vitro* khi chuyển cây ra vườn ươm. Cây Dâu tây (*Fragaria vesca* L.) được sử dụng như một cây mô hình trong nghiên cứu này. Chồi Dâu tây được nuôi cấy trên các môi trường có nồng độ đường khác nhau trong các hệ thống bình thủy tinh (GB, 500 ml), hộp nhựa tròn (JV, 600 ml) và hộp nhựa lớn hình chữ nhật (RPV, 3600 ml). Sự sinh trưởng và phát triển trong điều kiện *in vitro* và *ex vitro* của cây Dâu tây được theo dõi và thu số liệu. Nhìn chung, trọng lượng tươi, chiều cao, chiều dài rễ của cây Dâu tây nuôi cấy trong các hệ thống thoáng khí được gia tăng một cách đáng kể. Sự sinh trưởng và phát triển của cây Dâu tây có nguồn gốc từ các hệ thống nuôi cấy nói trên trong điều kiện vườn ươm cũng được cải thiện rõ rệt. Trong các hệ thống nuôi cấy được thiết kế, hệ thống hộp nhựa tròn với hai lỗ thoáng khí và hệ thống hộp nhựa lớn hình chữ nhật (RPV) là hai hệ thống thích hợp nhất cho giai đoạn ra rễ và góp phần đẩy mạnh sự thích ứng ngoài vườn ươm của cây Dâu tây nuôi cấy *in vitro*.

Từ khóa: *Fragaria vesca* L., khí CO₂, nuôi cấy thoáng khí, nuôi cấy *in vitro*, sự sinh trưởng và phát triển

GIỚI THIỆU

Trong hệ thống nuôi cấy *in vitro*, quá trình quang hợp của mẫu cấy chứa diệp lục diễn ra cần có nguồn cung cấp CO₂. Đối với phương pháp vi nhân giống thông thường, nồng độ CO₂ trong bình nuôi cấy bị giảm trong suốt chu kỳ chiếu sáng dẫn đến giảm khả năng quang hợp (Kozai, 1991). Để cải thiện điều kiện nuôi cấy, mẫu cấy chồi hay cây con *in vitro* cần một lượng khí CO₂ cung cấp nhờ vào sự trao đổi khí giữa bình nuôi cấy và môi trường xung quanh phòng nuôi (Kozai, 1991; Kozai, Jeong, 1993; Jeong *et al.*, 1996). Nồng độ CO₂ có tác động trực tiếp đến sự sinh trưởng và phát triển của mẫu cấy. Trong điều kiện nuôi cấy có nồng độ khí CO₂ cao, khả

năng kéo dài chồi và sự phát triển lá của mẫu cấy đối cây Cacao (*Theobroma cacao*) - một loài cây được cho là rất khó nhân giống theo phương pháp vi nhân giống truyền thống - được gia tăng một cách đáng kể (Jeong *et al.*, 1996). Thêm vào đó, cải thiện sự thoáng khí của bình nuôi cấy sẽ giúp tăng cường sự phóng thích các chất độc tiết ra trong quá trình nuôi cấy *in vitro*, các chất này ảnh hưởng không tốt lên sự sinh trưởng và phát triển của mẫu cấy. Ví dụ như khi nuôi cấy những cây thân thảo và thân gỗ bằng phương pháp vi nhân giống thông thường, những mẫu cấy chồi, cây con của chúng xuất hiện dị thường về hình thái sinh lý (thường bị thay đổi về hàm lượng nước). Một số loài cây như cây hoa Bibi (*Gypsophyla*), Cẩm chướng

thường bị hiện tượng thủy tinh thể (cây bị mọng nước) ảnh hưởng lên hình thái giải phẫu của lá, làm cho cây dễ bị mất nước khi ra ngoài điều kiện vườn ươm dẫn đến tỷ lệ sống sót của cây con ngoài vườn ươm thấp (Majada *et al.*, 2001).

Việc gia tăng sự trao đổi khí không những tránh được hiện tượng thủy tinh thể trên cây Đồng Tiền (*Gerbera*) mà còn có khả năng gia tăng sinh khối, chiều cao, diện tích lá và nồng độ diệp lục tố như ở cây Thu hải đường (*Begonia*) (Jeong *et al.*, 1996). Bên cạnh đó, sự phát triển của rễ cũng bị tác động. Khi nuôi cấy trong điều kiện thông thường không có sự thoáng khí, cây chỉ có hệ rễ sơ cấp, do đó, cây rất khó thích nghi với điều kiện ngoài vườn ươm. Để hạn chế số cây chết trong giai đoạn ra vườn ươm, kỹ thuật nuôi cấy thoáng khí giúp cho việc cải thiện chất lượng cây giống, nâng cao khả năng sống sót và đặt biệt trong điều kiện nuôi cấy thoáng khí cho phép cây hình thành hệ rễ thứ cấp ngay trong ống nghiệm (Nhut *et al.*, 2000; 2001; 2002; 2003a, b; 2005a; Dương Tấn Nhựt *et al.*, 2005b). Do nồng độ CO₂ trong bình nuôi cấy khác với nồng độ CO₂ bên ngoài và phụ thuộc vào số lần trao đổi khí trong một giờ của bình nuôi cấy (Jeong *et al.*, 1996), khí CO₂ có thể được bổ sung vào bình nuôi cấy bằng cách sử dụng một màng có khả năng cho khí CO₂ đi vào trong bình nhưng vẫn đảm bảo được điều kiện vô trùng. Hiện nay màng Milliseal đáp ứng được yêu cầu trên và đã được sử dụng rộng rãi trong nhiều lĩnh vực. Khi ứng dụng trong vi nhân giống, màng Milliseal thường được dán trên thành hay nắp bình và đặt trong phòng nuôi cấy bình thường hay phòng có sự làm giàu CO₂ (Jeong *et al.*, 1996). Tốc độ trao đổi khí có thể được gia tăng lên gấp 3 đến 6 lần bằng cách sử dụng màng Milliseals được dán trên bình nuôi cấy (Jeong *et al.*, 1996).

Những màng Miliseal với đường kính từ 10 - 40 mm, đường kính lỗ là 0,5 µm, sản phẩm của công ty Millipore Co. Ltd., Nhật Bản, đã được sử dụng rộng rãi trong nuôi cấy mô, tế bào thực vật. Tuy nhiên, với hạn chế về đường kính (kích thước) của màng, chúng chỉ được sử dụng trong những hệ thống với đường kính lỗ thông khí trên thành bình hoặc trên

nắp với kích thước nhất định (Hình 1c, 1d). Hiện nay, có rất nhiều loại màng thoáng khí tương tự như Milliseal trong đó màng Micropore™ (Công ty 3M Co., Hoa Kỳ), một loại màng được sử dụng rộng rãi (bằng keo chống nhiễm trùng khi phẫu thuật). Chúng có rất nhiều kích cỡ có thể sử dụng cho từng bề mặt có kích thước lớn hay nhỏ. Do những ưu điểm của chúng, trong nghiên cứu này, một hệ thống nuôi cấy thoáng khí kích thước lớn với nhiều cửa sổ thoáng khí được dán với những màng Micropore 3M được nghiên cứu và ứng dụng trong nâng cao chất lượng cây giống Dâu tây thương mại.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Mẫu cấy

Chồi cây Dâu tây (*Fragaria vesca* L.) được nuôi cấy trên môi trường B5 (Gamborg *et al.*, 1968) có bổ sung 1,0 mg/l 6-Benzyl adenine (BA), 30 g/l đường sucrose, 1 g/l than hoạt tính và 8 g/l agar (môi trường tăng sinh). Trong tất cả các nghiên cứu đều sử dụng các mẫu chồi có chiều cao khoảng 3 cm.

Hệ thống nuôi cấy

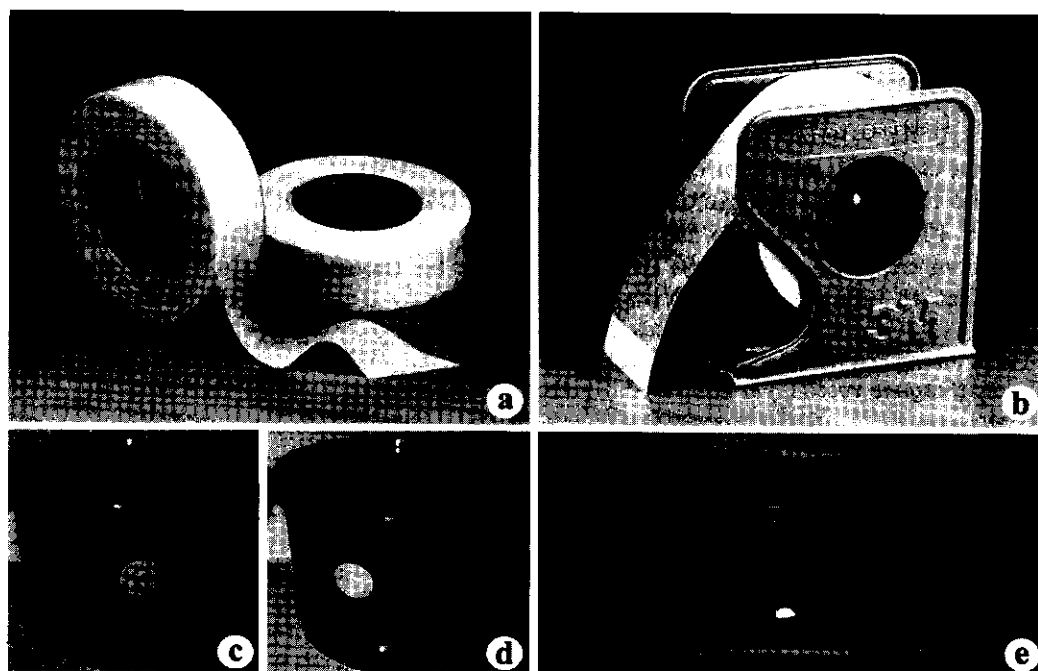
Vật liệu được sử dụng để thiết kế hệ thống trong nuôi cấy gồm:

Hộp nhựa tròn (Jam Vessels-JV, Việt Nam) thường được sử dụng để đựng thức ăn; hộp JV có 1 (JV-1) (Hình 1c) hoặc 2 (JV-2) (Hình 1d) lỗ được dán kín bằng màng Milliseal (có đường kính 18 mm, đường kính lỗ 0,5 µm (Công ty Millipore Co. Ltd., Nhật Bản) hoặc không có lỗ (JV-0).

Hộp nhựa vuông (Rectangular plastic vessels-RPV, Công ty Nhựa Đại Đồng Tiến) có kích cỡ 20 × 30 × 15 cm cũng thường được sử dụng để đựng thức ăn. Trên RPV có 4 cửa với kích cỡ mỗi cửa là 2,5 × 1,5 cm được dán kín với màng Micropore hình vuông (Công ty 3M, Hoa Kỳ) (Hình 1a, 1b, 1e).

Bình thủy tinh (Glass bottle-GB) có nắp đậy bằng nylon, trên nắp có 1 lỗ (d = 0,5 cm) và lỗ được dán lại bằng Micropore (3M, Hoa Kỳ).

Bình thủy tinh không có nắp thoáng khí được sử dụng như một hệ thống đối chứng.



Hình 1. Các vật liệu và hệ thống thoát khí khác nhau. a, b: Micropore™ 3M; c: JV-1; d: JV-2; e: Hộp nhựa hình chữ nhật lớn với 4 cửa thoát khí được dán kín bằng Micropore™ 3M (RPV).

Parafilm (Parafilm®, Hoa Kỳ) được sử dụng để dán các nắp hộp. Môi trường nuôi cấy là môi trường 1/2 MS (Murashige, Skoog, 1962) với 8 g/l agar, 1 g/l than hoạt tính và được bổ sung thêm 30, 15 hoặc 0 g/l đường sucrose và không sử dụng chất điều hòa tăng trưởng nào, chỉnh pH về 5,8 trước khi hấp vô trùng ở 121°C, 1 atm trong 20 min. Mỗi một hệ thống nuôi cấy chứa 80 ml môi trường (ngoại trừ RPV chứa 400 ml môi trường).

Năm mẫu chồi Dâu tây được cấy vào mỗi một hệ thống GB và JV và 30 mẫu chồi được cấy vào hệ thống RPV.

Các mẫu cấy được nuôi cấy ở cường độ chiếu sáng là 45 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ dưới đèn huỳnh quang trong 10 h/ngày, nhiệt độ $25 \pm 2^\circ\text{C}$ và độ ẩm tương đối: 75 - 80%. Sau 4 tuần, các chỉ tiêu sinh trưởng được theo dõi trên các mẫu cây *in vitro*: trọng lượng tươi, chiều cao chồi, các đặc điểm trên lá, rễ.

Sau đó, các cây *in vitro* sẽ được chuyển sang nhà kính để tiếp tục theo dõi sự sinh trưởng và phát triển.

Mỗi thí nghiệm được lặp lại 3 lần, số liệu

được xử bằng phần mềm Microsoft Excel và Duncan's test (Duncan, 1995) với $\alpha = 0,05$. Những số liệu thu được dựa trên các chỉ tiêu theo dõi được trình bày ở các bảng trong phần sau.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Kết quả

Những số liệu thu được sau một tháng nuôi cấy phản ánh ảnh hưởng của hệ thống nuôi cấy thoát khí và không thoát khí lên sự sinh trưởng và phát triển của chồi cây Dâu tây (*Fragaria vesca* L.) *in vitro* trên môi trường không có đường được nêu trong bảng 1.

Kết quả cho thấy, trọng lượng tươi của các mẫu cấy trong hệ thống hộp nhựa tròn hai lỗ (JV-2) cao hơn nhiều so với các hệ thống còn lại. Các mẫu nuôi cấy trong hệ thống hộp nhựa tròn không có nắp thoát khí và bình thủy tinh không thoát khí có trọng lượng tươi thấp nhất. Về hình thái bên ngoài, chồi cây Dâu tây có sự phát triển về chiều cao tốt hơn khi được nuôi cấy trong hệ thống JV-2 khi so sánh với các hệ thống khác. Ngoài ra, mẫu

chồi Dâu tây nuôi cấy trong hệ thống bình thủy tinh không thoáng khí có chiều cao thấp nhất.

Trong trường hợp so sánh chỉ tiêu số lượng rễ của chồi Dâu tây nuôi cấy trong các hệ thống, hệ thống JV-2 cho các chồi có số rễ nhiều nhất. Chồi Dâu tây nuôi cấy trong hệ thống JV-1 và trong hệ thống bình thủy tinh thoáng khí có số lượng rễ tương đương nhau

và nhiều thứ nhì khi so sánh với các hệ thống còn lại. Số rễ của chồi Dâu tây nuôi cấy trong hệ thống bình thủy tinh không thoáng khí là thấp nhất trong tất cả các hệ thống với chỉ 1,5 rễ/mẫu cấy.

Đối với chỉ tiêu so sánh chiều dài rễ Dâu tây, hệ thống JV-1 cho rễ dài nhất (2,5 cm). Hai hệ thống bình thủy tinh không thoáng khí và JV-0 cho chiều dài rễ thấp nhất.

Bảng 1. Ảnh hưởng của hệ thống nuôi cấy thoáng khí và không thoáng khí lên sự sinh trưởng và phát triển của chồi Dâu tây (*Fragaria vesca* L.) *in vitro* trên môi trường không đường.

Hệ thống nuôi cấy	Trọng lượng tươi (mg)	Chiều cao (cm)	Số rễ	Chiều dài rễ (cm)
GB không thoáng khí	230,2c [*]	5,4d	1,5d	1,2c
GB thoáng khí	249,3b	5,6b	2,4b	2,0b
JV - 0	228,4c	5,5c	1,9c	1,0c
JV - 1	256,6b	5,6b	2,5b	2,5a
JV - 2	285,6a	5,7a	2,9a	2,0b

Chú thích: ^{*}: Những mẫu tự khác nhau (a, b, c...) được nêu trong các cột trên biểu diễn sự khác nhau có ý nghĩa với $\alpha = 0,05$ trong Duncan's test.

Khi nghiên cứu ảnh hưởng của các hệ thống thoáng khí và không thoáng khí lên sự sinh trưởng và phát triển của chồi cây Dâu tây *in vitro* trên môi trường có bổ sung 15 g/l đường, trọng lượng tươi cao nhất được quan sát thấy ở hệ thống JV-1 và JV-2 và thấp nhất ở hệ thống bình thủy tinh không thoáng khí. Trong thí nghiệm này, chiều cao chồi cao nhất thu được trong hệ thống bình thủy tinh thoáng khí, còn chiều cao của những chồi trong các hệ thống còn lại không có sự khác

biệt. Thêm vào đó, các chồi được nuôi cấy trong các hệ thống thoáng khí có nhiều rễ (5,8 - 5,9 rễ/mẫu chồi) so với những chồi được nuôi cấy trong hệ thống không thoáng khí (5,4 rễ/mẫu chồi). Còn về chỉ tiêu chiều dài rễ của chồi Dâu tây, trong trường hợp này rễ của chồi nuôi cấy trong hệ thống JV-1 là dài nhất 3,3 cm, dài thứ nhì là rễ của chồi Dâu tây trong hệ thống JV-2 khi so sánh với chiều dài rễ của các chồi nuôi cấy trong các hệ thống còn lại (Bảng 2).

Bảng 2. Ảnh hưởng của hệ thống nuôi cấy thoáng khí và không thoáng khí lên sự sinh trưởng và phát triển của chồi cây Dâu tây (*Fragaria vesca* L.) *in vitro* trên môi trường có bổ sung 15 g/l đường.

Hệ thống nuôi cấy	Trọng lượng tươi (mg)	Chiều cao (cm)	Số rễ	Chiều dài rễ (cm)
GB không thoáng khí	342,6c [*]	5,9b	5,4b	2,6c
GB thoáng khí	367,8b	6,1a	5,9a	2,6c
JV - 0	337,3c	5,8b	5,4b	2,5c
JV - 1	388,0a	5,9b	5,9a	3,3a
JV - 2	387,6a	5,8b	5,8a	2,8b

Chú thích: ^{*}: Những mẫu tự khác nhau (a, b, c...) được nêu trong các cột trên biểu diễn sự khác nhau có ý nghĩa với $\alpha = 0,05$ trong Duncan's test.

Bảng 3. Ảnh hưởng của hệ thống nuôi cấy thoáng khí và không thoáng khí lên sự sinh trưởng và phát triển của chồi cây Dâu tây (*Fragaria vesca* L.) *in vitro* trên môi trường có bổ sung 30 g/l đường.

Hệ thống nuôi cấy	Trọng lượng tươi (mg)	Chiều cao (cm)	Số rễ	Chiều dài rễ (cm)
GB không thoáng khí	354,1e [*]	6,3b	6,2a	3,0b
GB thoáng khí	457,3b	6,5a	6,4a	3,2a
JV - 0	361,3d	5,9d	6,1a	2,5d
JV - 1	446,9c	6,2c	6,2a	3,2a
JV - 2	467,9a	6,1c	6,3a	2,7c
RPV	470,4a	6,3b	6,5a	3,3a

Chú thích: *: Những mẫu tự khác nhau (a, b, c,...) được nêu trong các cột trên biểu diễn sự khác nhau có ý nghĩa với $\alpha = 0,05$ trong Duncan's test.

Kết quả sự sinh trưởng và phát triển của chồi cây Dâu tây *in vitro* trong các hệ thống thoáng khí và không thoáng khí khác nhau trên môi trường có bổ sung 30 g/l đường được thể hiện trong bảng 3.

Số liệu này cho thấy càng có nhiều lỗ thoáng khí trên các hệ thống JV thì trọng lượng tươi của các chồi nuôi cấy trong hệ thống đó càng cao, trong đó hệ thống JV-2 (Hình 2b, 2f) và RPV (Hình 2c₁, 2c₂) cho chồi có trọng lượng tươi cao nhất và chồi có trọng lượng tươi thấp nhất được quan sát thấy ở hệ thống bình thủy tinh không thoáng khí. Trong hệ thống bình thủy tinh thoáng khí, chiều cao chồi của cây Dâu tây *in vitro* phát triển tốt nhất (6,5 cm) trên môi trường có bổ sung 30 g/l đường trong khi hệ thống JV-0 (Hình 2d) thì không thích hợp cho sự phát triển chiều cao, được biểu hiện bởi chiều cao thấp nhất của chồi Dâu tây 5,9 cm khi so sánh với những chồi trong các hệ thống còn lại. Mặt khác, không có sự khác biệt rõ rệt nào giữa số lượng rễ trong tất cả các thí nghiệm. Tuy nhiên hệ thống bình thủy tinh thoáng khí và hệ thống JV-1 (Hình 2e) tạo một hệ rễ phát triển tốt hơn với ưu điểm về chiều dài (3,2 cm) so với hệ rễ của chồi Dâu tây trong hệ thống JV-0 (2,5 cm).

Tóm lại, qua tất cả các thí nghiệm đã thực hiện ở trên cho thấy sự sinh trưởng và phát triển của các chồi cây nuôi cấy từ hệ thống thoáng khí (Hình 2a, 2e; 2b, 2f) tốt hơn so với

các chồi cây nuôi cấy từ hệ thống không thoáng khí (Hình 2d).



Hình 2. Sự sinh trưởng và phát triển của chồi Dâu tây (*Fragaria vesca* L.) nuôi cấy trong các hệ thống thoáng khí khác nhau. a, e: JV-1; b, f: JV-2; d: JV-0; c₁, c₂. Hộp nhựa hình chữ nhật lớn với 4 cửa thoáng khí được dán kín bằng Micropore™ 3M (RPV).

Thuần hóa sau nuôi cấy

Sau 1 tháng nuôi cấy, các chồi được

chuyển sang nhà kính, quan sát sự sinh trưởng và phát triển. Giai đoạn này được thực hiện nhằm nghiên cứu sự phát triển khả năng quang hợp và các sự thích nghi của chồi cây Dâu tây nuôi cấy *in vitro* với môi trường trong nhà kính. Nhìn chung, trọng lượng tươi và chiều cao của những cây Dâu tây có nguồn gốc từ các chồi nuôi cấy trong các hệ thống JV và RPV thoát khí vượt trội hơn so với những cây có nguồn gốc từ chồi nuôi cấy trong các hệ thống còn lại. Tương tự khi so sánh chiều dài và chiều rộng lá của cây Dâu tây có nguồn gốc từ chồi nuôi cấy trong điều kiện thoát khí và không thoát khí.

Thảo luận

Sự trao đổi khí giữa môi trường trong bình nuôi cấy và môi trường bên ngoài được tăng cường nhờ sử dụng màng lọc cho khí đi qua được (Kozai *et al.*, 1986). Nhờ có sự trao đổi khí này mà nồng độ CO₂ bên trong bình nuôi cấy tăng lên làm gia tăng khả năng quang hợp của mẫu cấy.

Để gia tăng sự sinh trưởng và phát triển của *Phalaenopsis* (Doi *et al.*, 1989), *Lilium longiflorum* (Nhut *et al.*, 2004), *Gypsophyla* (Nhut *et al.*, 2004), *Cymbidium* (Kozai *et al.*, 1987), Khoai tây (Kozai *et al.*, 1988a), Cẩm chướng (Kozai, Iwanami, 1988; Kozai, Kubota, 1988; Kozai *et al.*, 1988b) và một số cây nuôi cấy *in vitro* khác, kỹ thuật nuôi cấy thoát khí đã được sử dụng. Hơn nữa, sự nuôi cấy trong điều kiện thoát khí cũng mang lại hiệu quả trong việc thúc đẩy khả năng sinh trưởng và phát triển của các cây có nguồn gốc từ cây được nhân giống *in vitro* trong suốt giai đoạn thích ứng ngoài vườn ươm (Lakso *et al.*, 1986). Trong nghiên cứu này, sự sinh trưởng và phát triển của chồi cây Dâu tây (*Fragaria vesca* L.) nuôi cấy *in vitro* trong các hệ thống thoát khí bao gồm bình thủy tinh thoát khí, JV-1 và JV-2 tốt hơn so với sự sinh trưởng và phát triển của chồi nuôi cấy trong các hệ thống không thoát khí như bình thủy tinh không thoát khí và JV-0. Những kết quả này phù hợp với nhiều kết quả khác đã được nghiên cứu trên cây Dâu tây (Fujiwara *et al.*, 1988; Kozai, Sekimoto, 1988; Kozai *et al.*, 1988c). Arai và đồng tác giả (1989) đã

chứng minh trọng lượng khô và số lượng lông sùng trên bề mặt lá các mẫu Dâu tây được gia tăng nhờ vào sự hiện diện của CO₂ trong các hệ thống nuôi cấy. Việc tăng trọng lượng khô ở các chồi trong giai đoạn thích ứng ngoài vườn ươm cũng được thúc đẩy. Nhìn chung, các chồi nuôi cấy trong các hệ thống thoát khí với môi trường bổ sung 30 g/l đường đều phát triển tốt nhất về trọng lượng tươi, chiều cao chồi, số lượng rễ và chiều dài rễ khi so sánh với các chồi được nuôi cấy ở các hệ thống thoát khí với môi trường không bổ sung đường hoặc bổ sung 15 g/l đường. Với phương pháp nhân giống truyền thống, với tỷ lệ PPF (Photosynthetic Photon Fluxes) thấp hay cường độ ánh sáng thấp và sự nghèo CO₂; sự gia tăng trọng lượng tươi sẽ tỷ lệ thuận với sự gia tăng nồng độ đường. Tuy nhiên, những cây nhân giống theo phương pháp này sẽ không thể thích nghi tốt khi thiếu lượng carbohydrate có sẵn trong môi trường đất ở giai đoạn thích ứng ngoài vườn ươm. Trong hệ thống thoát khí với tỷ lệ PPF thấp nhưng có sự hiện diện của CO₂ thì sự sinh trưởng và phát triển của các chồi gia tăng không chỉ bởi sự gia tăng nồng độ đường mà còn bởi sự đẩy mạnh khả năng quang hợp (Kozai, 1989).

Gần đây, các hệ thống nuôi cấy quang tự dưỡng (photoautotrophic culture systems) có tỷ lệ PPF cao hay cường độ ánh sáng cao kết hợp với sự gia tăng hàm lượng khí CO₂ và môi trường không sử dụng đường cũng thể hiện nhiều ưu điểm trong nhân giống vô tính ở quy mô lớn. Tuy nhiên, hệ thống này hoàn toàn thiếu tính kinh tế và không thể áp dụng trong thời điểm hiện nay do phương pháp này sử dụng cường độ ánh sáng rất cao dẫn đến gia tăng sử dụng điện năng một cách đáng kể. Ngoài ra, để đáp ứng các điều kiện nghiêm ngặt khác như kiểm soát nồng độ CO₂, sự vô trùng trong buồng nuôi cấy... cũng là một quá trình rất phức tạp. Hiện nay, ở những nước phát triển cũng rất khó khăn trong việc áp dụng hệ thống này trong nhân giống thương mại do đó hầu như phương pháp này chỉ thành công về mặt học thuật và cần nhiều cải tiến trong tương lai để có thể ứng dụng trong nhân giống thương mại. Việt Nam và một số nước đang phát triển khác cũng không là ngoại lệ mặc dù đã có một số viện nghiên cứu

sử dụng phương pháp này trong nhân giống cây trồng nhưng khả năng ứng dụng còn rất hạn chế. Do đó, việc nghiên cứu, thiết kế ra các hệ thống nuôi cấy khác vừa đơn giản, vừa gia tăng chất lượng của cây nuôi cấy ở một số chỉ tiêu như trọng lượng tươi, trọng lượng khô, chiều cao chồi, số lượng rễ, tỷ lệ sống sót..., ứng dụng trong sản xuất cây giống thương mại là một vấn đề cấp bách. Theo những kết quả thu được trong nghiên cứu này, hệ thống hộp nhựa tròn (JV) và hộp nhựa hình chữ nhật (RPV) thoáng khí cho thấy hoàn toàn có khả năng ứng dụng trong việc sản xuất cây giống thương mại. Đây là những thiết bị rẻ tiền, đơn giản và dễ mua.

KẾT LUẬN

Tầm quan trọng của các hệ thống thoáng khí trong nuôi cấy mô tế bào thực vật đã được chứng minh thông qua rất nhiều các thí nghiệm trên nhiều đối tượng thực vật khác nhau. Những hệ thống hộp nhựa tròn thoáng khí và đặc biệt là hộp nhựa lớn hình chữ nhật thoáng khí đã cho thấy những ưu điểm trong nhân giống thương mại.

Các mẫu chồi (cây) nuôi cấy trong các hệ thống nuôi cấy thoáng khí sinh trưởng và phát triển một cách mạnh mẽ. Tất cả cây Dâu tây nhân giống bằng hệ thống nuôi cấy thoáng khí đều được tăng cường một cách rõ rệt về khả năng sinh trưởng và phát triển *in vitro* lẫn khả năng thích ứng ngoài vườn ươm.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Arai S, Asao H, Kawabata R, Kobatake H (1989) Effects of CO₂ enrichment on the growth of strawberry plantlets regenerated from shoot tip culture. *J Japan Soc Hortic Sci* 58: 252-253.

Doi M, Oda H, Asahira T (1989) *In vitro* atmosphere of cultured C₃ and CAM plants in relation to day-length. *Environ Control Biol* 27: 9-13.

Duncan DB (1995) Multiple range and multiple F test. *Biometrics* 11: 1-42.

Fujiwara K, Kozai T, Watanabe I (1988) Development of a photoautotrophic tissue culture system for shoots and/or plantlets at rooting and

acclimatization stages. *Acta Hort* 230: 153-158.

Gamborg OL, Miller RA, Ojima K (1968) Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp Cell Res* 50: 151-158.

Jeong BR, Yang CS, Park JC (1996) Growth of *Gerbera hybrida in vitro* as affected by CO₂ concentration and air exchange rate of the vessel. *Acta Hort* 440: 510-514.

Kozai T, Fujiwara K, Watanabe I (1986) Fundamental studies on environments in plant tissue culture vessels. 1. Relation between the culture medium composition and water potential of liquid culture media. *J Agri Metereol* 42: 1-6.

Kozai T, Oki H, Fujiwara K (1987) Effects of CO₂ enrichment and sucrose concentration under high photosynthetic photon fluxes on growth of tissue cultured *Cymbidium* plantlets during the preparation stage. *Symposium on Plant Micropropagation in Horticultural Industries*. Arlon, Belgium 135-141.

Kozai T, Koyama Y, Watanabe I (1988a) Multiplication of potato plantlets *in vitro* with sugar free medium under high photosynthetic photon flux. *Acta Hort* 230: 121-127.

Kozai T, Kubota C, Watanabe I (1988b) Effect of basal medium composition on the growth of carnation plantlets in auto- and mixotrophic tissue culture. *Acta Hort* 230: 119-126.

Kozai T, Iwabuchi K, Watanabe I (1988c) Effects of low air temperature during dark period and CO₂ enrichment during photoperiod on the growth of strawberry plantlets *in vitro*. *Extended Abstr. Annual Autumn Meeting Jap Soc Hort Sci*: 270-271.

Kozai T (1989) Autotrophic (sugar-free) micropropagation for a significant reduction of production costs. In: *Environmental Control in Micropropagation*, Jeong B. R. (Ed.) 1: 47-48.

Kozai T, Iwanami Y (1988) Effects of CO₂ enrichment and sucrose concentration under high photon fluxes on growth of carnation in tissue culture during the preparation stage. *J Japan Soc Hortic Sci* 57: 279-288.

Kozai T, Kubota C (1988) The growth of carnation plantlets *in vitro* cultured photoauto- and photomixotrophically on different media. *Environ Control Biol* 28: 21-27.

Kozai T, Sekimoto K (1988) Effect of the number of air exchanges per hour of the stoppered vessel and the photosynthetic photon flux on the carbon dioxide concentration inside the vessel and the growth of

strawberry plantlets *in vitro*. *Environ Control Biol* 26: 21-29.

Kozai T (1991) Micropropagation under photoautotrophic conditions. In: *Micropropagation - Technology and Application*, Debergh P. C., Zimmerman R. H. (Eds.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands: 447-469.

Kozai T, Jeong BR (1993) Environmental control for autotrophic micropropagation. In: *Environmental Control in Micropropagation 2*, Chieri Kubota (Ed.): 467-480.

Lakso AN, Reisch BI, Mortensen J, Roberts MH (1986) Carbon dioxide enrichment for stimulation of growth of *in vitro* propagated grapevines after transfer from culture. *Amer Soc Hortic Sci* 111: 634-638.

Majada JP, Sierra MI, Sánchez-Tamés R (2001) Air exchange rate affects the *in vitro* developed leaf cuticle of carnation. *Sci Hort* 87: 121-130.

Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Plant Physiol* 15: 473-496.

Nhut DT, Takamura T, Goi M, Watanabe H, Satao M, Tanaka M (2000) The effect of various blue to red ratios for LED irradiation system on the *in vitro* growth of *Phalaenopsis* plantlets. *J Japan Soc Hortic Sci* 218 (Abstract).

Nhut DT, Hong LTA, Watanabe H, Goi M, Tanaka M (2001) *In vitro* growth of banana plantlets cultured under red and blue light-emitting diodes (LEDs) irradiation source. *Acta Hort* 575: 117-124.

Nhut DT, Takamura T, Watanabe H, Murakami A, Murakami K, Tanaka M (2002) Sugar-Free Micropropagation of *Eucalyptus citriodora* Using

Light-Emitting Diodes (LEDs) and Film-Rockwool Culture System. *Environ Control Biol* 40(2): 147-155.

Nhut DT, Takamura T, Watanabe H, Tanaka M (2003a) Efficiency of a novel culture system by using light-emitting diodes (LEDs) on *in vitro* and subsequent of micropropagated banana. *Acta Hort* 616: 121-128.

Nhut DT, Takamura T, Watanabe H, Okamoto K, Tanaka M (2003b) *In vitro* morphological responses of strawberry plantlets cultured under superbright red and blue light-emitting diodes (LEDs). *Plant Cell Tiss Org Cult* 73(1): 43-52.

Dương Tấn Nhựt, Nguyễn Quốc Thiện, Nguyễn Thành Hải, Đoàn Thị Quỳnh Hương, Nguyễn Thị Thúy Hằng, Nguyễn Ngọc Kim Vy, Nguyễn Văn Bình, Phan Xuân Huyền, Nguyễn Thị Diệu Hương, Đỗ Năng Vịnh (2004) Nuôi cấy lỏng và nuôi cấy thoáng khí trong việc gia tăng sự tái sinh chồi và nâng cao chất lượng cây hoa Lily (*Lilium longiflorum*). *Tạp chí Công nghệ Sinh học* 2(4): 487-499.

Nhut DT, Thien NQ, Nhung PT, Thuy PTB, Binh NV, Bui VL, Paek KY (2004) Effect of aeration on the growth and development of *Gypsophyla paniculata* L. cultured *in vitro*. *Propagat Orna Plants* 4(2): 48-52.

Nhut DT, Takamura T, Watanabe H, Tanaka M (2005a) Artificial lighting source using light-emitting diodes (LEDs) in the efficient micropropagation of *Spathiphyllum* plantlets. *Acta Hort* 692: 137-142.

Dương Tấn Nhựt, Nguyễn Quốc Thiện, Vũ Quốc Luận (2005b) Nâng cao chất lượng của các cây giống hoa Cúc và Hồng nuôi cấy *in vitro* thông qua nuôi cấy thoáng khí. *Tạp chí Sinh học* 27(3): 92-95.

A NEW LARGE-SCALE AERATION CULTURE SYSTEM AND ITS EFFECTS ON GROWTH AND DEVELOPMENT OF STRAWBERRY (*FRAGARIA VESCA* L.) SHOOTS CULTURED *IN VITRO*

Nguyen Quoc Thien¹, Duong Tan Nhut^{2,*}

¹Biotechnology Center of Ho Chi Minh City

²Dalat Affiliate Institute of Biology

SUMMARY

A new large-scale aeration culture system has been developed for micropropagation. The

* Author for correspondence: Tel: 063. 831056; Fax: 063. 831028; E-mail: duongtannhut@yahoo.com