

ẢNH HƯỞNG CỦA VẬT LIỆU NUÔI CÂY MÔ SẸO VÀ THÀNH PHẦN MÔI TRƯỜNG ĐẾN KHẢ NĂNG TÁI SINH CHỒI Ở KHOAI LANG

Vũ Thị Lan*

Trường Đại học Khoa học - ĐH Thái Nguyên

TÓM TẮT

Khoai lang là cây lương thực quan trọng trên thế giới và ở Việt Nam. Khoai lang được xem là đối tượng khó tái sinh và chuyển gen vì tính phụ thuộc kiểu gen trong nuôi cấy *in vitro*. Trong bài báo này, chúng tôi trình bày các kết quả nghiên cứu tiếp theo về việc so sánh hiệu quả tái sinh chồi từ mô sẹo có nguồn gốc là đỉnh chồi và mảnh lá và kết quả về ảnh hưởng của thành phần môi trường lên khả năng tái sinh của mô sẹo. Chúng tôi đã chứng minh được vật liệu nuôi cấy mô sẹo là đỉnh chồi ở giống khoai lang KB1 khi nuôi cấy trên các môi trường tương ứng cho hiệu quả tái sinh chồi từ mô sẹo cao hơn (tỉ lệ tái sinh chồi đạt 67,50%) so với vật liệu nuôi cấy mô sẹo từ mảnh lá (tỉ lệ tái sinh đạt 40,00%). Môi trường nuôi cấy cho hiệu quả tái sinh chồi cao từ mô sẹo ở khoai lang là môi trường R1 (MS + sucrose 30 g/l + agar 8 g/l + kinetin 0,5 mg/l + BAP 1,0 mg/l).

Từ khóa: Giống khoai lang KB1, mô sẹo, môi trường, *Ipomoea batatas* L., tái sinh chồi.

MỞ ĐẦU

Khoai lang [*Ipomoea batatas* (L) Lam] thuộc họ Convolvulaceae, chi *Ipomoea* là cây lương thực đứng hàng thứ bảy trên thế giới sau lúa mì, lúa nước, ngô, khoai tây, lúa mạch, sắn. Khoai lang có hàm lượng đường, vitamin A và năng lượng cao hơn so với lúa mì, lúa nước, sắn. Củ và lá của khoai lang được sử dụng để làm thức ăn gia súc, chế biến bột, rượu cần, bánh kẹo và gần đây đang được nghiên cứu để làm màng phủ sinh học.

Nhiều nghiên cứu cho thấy khoai lang là một trong những đối tượng khó xây dựng hệ thống tái sinh cây *in vitro* và chuyển gen. Trong nhiều năm qua đã có nhiều nghiên cứu trên thế giới tập trung vào việc tìm ra môi trường nuôi cấy cũng như phương thức tái sinh phù hợp ở các giống khoai lang khác nhau. Phương thức tái sinh cây *in vitro* có thể thông qua sự phát sinh cơ quan từ rễ, lá và đốt thân [5], [7], [9] hoặc thông qua đa chồi từ mô sẹo [3].

Việc ứng dụng kỹ thuật nuôi cấy mô và tế bào thực vật vào nghiên cứu tạo giống khoai lang sạch bệnh sẽ góp phần vào việc tăng năng suất cũng như diện tích khoai lang tại Việt

Nam. Đã có một số nghiên cứu về sự tái sinh *in vitro* của một số giống khoai lang Việt Nam nhưng kết quả thu được còn hạn chế, đặc biệt là chưa tập trung hoàn thiện hệ thống tái sinh của các giống khoai lang địa phương có năng suất và chất lượng tốt. Trong các nghiên cứu được công bố trước đây, chúng tôi đã trình bày kết quả nghiên cứu về việc hoàn thiện quy trình tái sinh thông qua đa chồi từ mô sẹo để phục vụ cho chuyển gen vào giống khoai lang địa phương có chất lượng tốt KB1 [1]. Trong bài báo này, chúng tôi trình bày các kết quả nghiên cứu tiếp theo về việc so sánh hiệu quả tái sinh chồi từ mô sẹo có nguồn gốc là đỉnh chồi và mảnh lá và kết quả về ảnh hưởng của thành phần môi trường lên khả năng tái sinh của mô sẹo.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu nghiên cứu

Giống khoai lang KB1 do phòng Công nghệ Tế bào thực vật - Viện Công nghệ sinh học cung cấp.

Phương pháp nghiên cứu

Phương pháp nuôi cấy mô sẹo

Nguyên liệu nuôi cấy là đỉnh chồi hoặc mảnh lá non của giống khoai lang KB1 *in vitro* khoảng 2 tuần tuổi. Đỉnh chồi được cắt nhỏ

* Tel: 0914 504250, Email: lanvt@tus.edu.vn

với kích thước khoảng 0,3 cm - 0,5 cm; lá non được cắt thành những mảnh nhỏ có kích thước 0,5 cm x 0,5 cm. Đỉnh chồi, mảnh lá được nuôi cấy trên môi trường tạo mô sẹo ở khoai lang (CP) [4] bổ sung sucrose 30 g/l, gelrite 2,5%, picloram 0,5 mg/l (CP3). Cây chuyên mô sẹo 2 tuần/lần để thu sinh khối mô sẹo.

Phương pháp tái sinh cây từ mô sẹo

Để tái sinh chồi từ mô sẹo khoai lang chúng tôi sử dụng phương pháp nuôi cấy gồm hai giai đoạn: Giai đoạn đầu là nuôi cấy cảm ứng trên môi trường bổ sung kết hợp ABA và GA₃, giai đoạn tiếp theo là nuôi cấy tái sinh chồi trên môi trường tái sinh.

Cảm ứng trên môi trường bổ sung kết hợp ABA và GA₃: Sau khi thu được sinh khối mô sẹo, chọn lọc những khối mô sẹo có khả năng phân hóa cấy chuyển vào môi trường cảm ứng tạo phôi EG có bổ sung sucrose 20 g/l, gelrite 2,5 g/l, vitamin C 50 mg/l và bổ sung ABA 1,0 mg/l kết hợp với GA₃ thay đổi từ 0,5; 1,0; 2,0; 4,0 mg/l (kí hiệu môi trường là EG1 - EG4).

Nuôi cấy mô sẹo trên môi trường EG khoảng 10 - 15 ngày, sau đó chuyển các khối mô sẹo phân hóa sang môi trường tái sinh chồi. Môi trường tái sinh chồi (MKB) là môi trường MS bổ sung kinetin 0,5 mg/l, BAP 1,0 mg/l.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Ảnh hưởng của vật liệu tạo mô sẹo đến hiệu quả tái sinh chồi

Các nghiên cứu trước đây của chúng tôi cho thấy mô sẹo khoai lang được cảm ứng trên môi trường ABA và GA₃ khi chuyển sang môi trường tái sinh bổ sung kinetin và BAP cho hiệu quả tái sinh rất khả quan. Tuy nhiên, đối với mỗi nguồn nguyên liệu đem nuôi cấy là đỉnh chồi và mảnh lá khi nuôi cấy trên cùng môi trường tạo mô sẹo CP3 bổ sung picloram 0,5 mg/l thì có sự hình thành và sinh trưởng phát triển của mô sẹo có những đặc trưng khác nhau dẫn đến có sự khác biệt về hình thái và cả đặc tính mô sẹo [1].

Trong nghiên cứu này, sự sinh trưởng và phát triển của các mô sẹo có nguồn gốc từ đỉnh chồi và mảnh lá tiếp tục được theo dõi trên các môi trường qua các giai đoạn cảm ứng biệt hóa mô sẹo và giai đoạn tái sinh chồi từ mô sẹo. Kết quả thu được cho thấy mô sẹo có nguồn gốc từ đỉnh chồi hay mảnh lá cho hiệu quả tái sinh khác biệt rõ rệt trên các môi trường tương ứng.

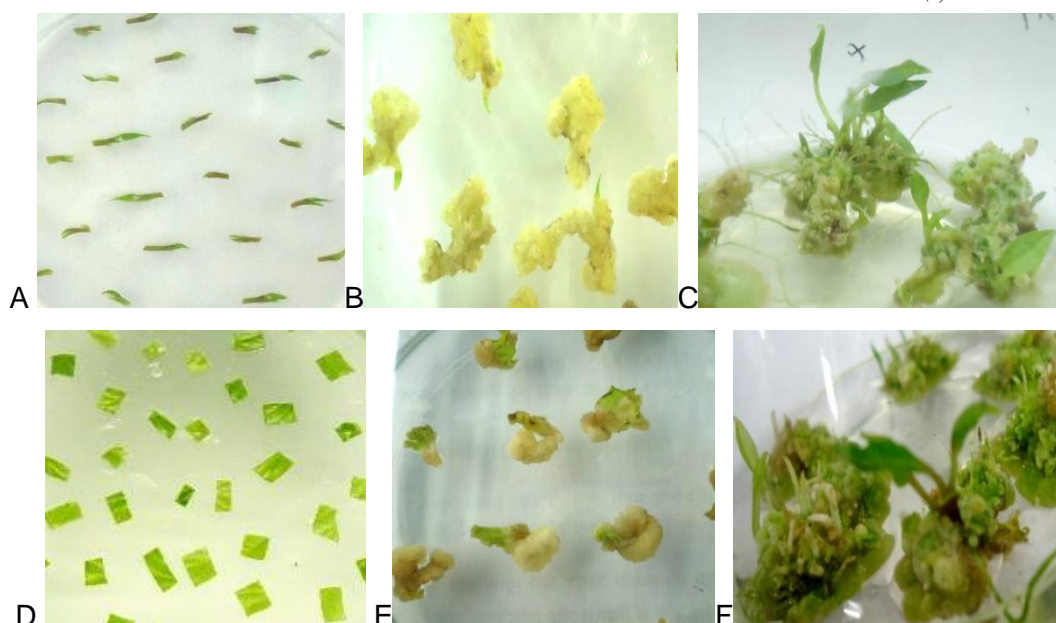
Đối với mô sẹo có nguồn gốc từ đỉnh chồi sau khi được cảm ứng trên các môi trường bổ sung kết hợp ABA và GA₃ với nồng độ khác nhau (môi trường EG1-EG4) được chuyển sang môi trường tái sinh MKB bổ sung kinetin 0,5 mg/l và BAP 1,0 mg/l đã có khả năng phân hóa tốt và hình thành đa chồi. Mô sẹo trên EG1-EG4 đã hình thành chồi sau khoảng 20 ngày (sớm hơn so với đối chứng). Tỷ lệ tái sinh chồi tăng dần từ môi trường EG1 đến EG2 và giảm ở môi trường EG3 và EG4. Trên môi trường đối chứng ĐC1 (không bổ sung GA₃ và ABA) tỷ lệ tái sinh chồi đạt thấp nhất là 22,10% sau 40-60 ngày, mỗi mô sẹo chỉ hình thành chồi đơn. Môi trường EG1 tỷ lệ tái sinh chồi đạt khá cao (45,25%) sau 60 ngày nuôi cấy, có sự hình thành 1-2 chồi/mô sẹo. Trên môi trường EG2 (1,0 mg/l ABA + 1,0 mg/l GA₃), tỷ lệ tái sinh chồi đạt cao nhất (67,5%) sau khoảng 40 ngày với số lượng chồi là từ 1 - 6 chồi trên mỗi mô sẹo, chồi hình thành sinh trưởng phát triển tốt. Môi trường EG3 có tỷ lệ tái sinh giảm thấp hơn môi trường EG1, đạt 60%, số chồi tạo thành cũng từ 1 - 3 chồi/mô sẹo.

Như vậy, sự cảm ứng phân hóa và tái sinh chồi từ mô sẹo đỉnh chồi đã đạt được khá cao khi nuôi cấy trên các môi trường tái sinh. Kết quả này của chúng tôi phù hợp với nghiên cứu của Xing và đtg (2008) [8], môi trường bổ sung ABA 1,0 mg/l và GA₃ 1,0 mg/l phù hợp cho hình thành phôi soma và tái sinh cây khoai lang, tỷ lệ tái sinh là 30,9%, sự tạo chồi từ các mô sẹo phân hóa là 30 ngày.

Bảng 1. Hiệu quả tái sinh chồi của mô sẹo có nguồn gốc từ đỉnh chồi và mảnh lá

Vật liệu tạo mô sẹo	Môi trường cảm ứng mô sẹo bổ sung ABA kết hợp với GA ₃			Tỉ lệ tái sinh chồi của mô sẹo trên môi trường MKB (%)			Số chồi/mẫu
	Kí hiệu	ABA (mg/l)	GA ₃ (mg/l)	20 ngày	40 ngày	60 ngày	
Đỉnh chồi	ĐC1	0	0	10,50 ^b	20,00 ^c	22,50 ^c	1
	EG1	1,0	0,5	18,18 ^b	36,36 ^b	45,25 ^b	1-2
	EG2	1,0	1,0	33,34 ^a	54,17 ^a	67,50 ^a	1-6
	EG3	1,0	2,0	20,00 ^b	44,00 ^{ba}	60,00 ^{ab}	1-3
	EG4	1,0	4,0	17,50 ^b	37,50 ^b	50,00 ^b	1-2
Mảnh lá	EG1	1,0	0,5	-	-	12,50 ^c	1
	EG2	1,0	1,0	20,00 ^a	40,00 ^a	40,00 ^a	1-3
	EG3	1,0	2,0	-	20,00 ^b	30,00 ^b	1-2
	EG4	1,0	4,0	-	7,14 ^c	7,14 ^c	1

Ghi chú: (-): chưa tái sinh;

**Hình 1.** Tái sinh chồi thông qua mô sẹo từ đỉnh chồi (A-C) và mảnh lá (D-F) ở cây khoai lang KBI: A, D: Đỉnh chồi và mảnh lá ban đầu; B và E: mô sẹo; C và F: chồi tái sinh từ mô sẹo

Ảnh hưởng của các tổ hợp môi trường ở các giai đoạn nuôi cấy tương ứng đến sự tái sinh của mô sẹo từ mảnh lá cũng đã được chúng tôi đánh giá. Kết quả thu được cho thấy, các mô sẹo lá được nuôi cấy cảm ứng trên các môi trường bổ sung ABA 1,0 mg/l kết hợp với GA₃ (0,5; 1,0; 2,0; 4,0 mg/l) sau 60 ngày đều đã có sự tái sinh chồi (bảng 1 và hình 1). Trên các tổ hợp môi trường bổ sung tỉ lệ ABA và GA₃ khác nhau đã có ảnh hưởng khác biệt lên sự tái sinh của mô sẹo hình thành từ mảnh lá.

Sau 40 ngày nuôi cấy, ở các môi trường bổ sung nồng độ GA₃ khác nhau (1,0; 2,0; 4,0 mg/l) đều đã có sự tái sinh chồi. Tỉ lệ tạo chồi giảm dần khi bổ sung vào môi trường nồng độ của GA₃ tăng từ 1,0 mg/l lên 2,0 và 4,0 mg/l. Điều này chứng tỏ ở nồng độ thích hợp, GA₃ có tác dụng kích thích sự biệt hóa nảy chồi của mô sẹo nhưng nếu ở nồng độ cao có thể gây ức chế. Hiệu quả tạo chồi đạt cao nhất thu được ở môi trường EG2 (1,0 mg/l ABA + 1,0 mg/l GA₃), tỉ lệ tạo chồi đạt 40% sau 40- 60 ngày nuôi cấy, số chồi tạo thành trên mỗi cụm

mô sẹo là 1 - 3 chồi. Kết quả này cho thấy hiệu quả tái sinh chồi của mô sẹo lá thấp hơn so với mô sẹo đỉnh chồi. Khi nghiên cứu sự tái sinh chồi trực tiếp từ mảnh lá của giống KB1 chúng tôi đã thu được tỉ lệ tái sinh chồi đạt là 55,00% khi nuôi cấy trên môi trường MS bổ sung 1 mg/l NAA kết hợp với 8 mg/l AgNO₃ [2].

Như vậy có thể kết luận được rằng mảnh lá phù hợp cho nuôi cấy tái sinh chồi trực tiếp hơn là nuôi cấy tái sinh thông qua mô sẹo. Tuy hiệu quả tái sinh từ mô sẹo lá không cao nhưng đã chứng minh được khả năng tái sinh của các mô sẹo từ các vật liệu nuôi cấy khác nhau của giống khoai lang KB1.

Ảnh hưởng của thành phần môi trường đến khả năng tái sinh chồi của mô sẹo

Có nhiều nghiên cứu trên thế giới đã cho thấy việc bổ sung AgNO₃ vào môi trường nuôi cấy có thể thúc đẩy tái sinh chồi từ nhiều loài thực vật khác nhau như khả năng cải thiện sự tăng sinh của mô sẹo, tăng cường hiệu quả tái sinh trực tiếp, thúc đẩy sự tạo rễ. Đối với khoai lang, đã có những nghiên cứu về việc bổ sung AgNO₃ làm tăng cường hiệu quả của tái sinh trực tiếp chồi từ mảnh lá [6], [2].

Tiếp thu các kết quả thu được và dựa trên các nghiên cứu trước chúng tôi tiến hành nghiên cứu khả năng tái sinh của mô sẹo đỉnh chồi khoai lang trên ba loại môi trường tái sinh: Môi trường bổ sung kết hợp cytokinin (môi trường R1), môi trường bổ sung cytokinin và AgNO₃ 8 mg/l (môi trường R2) và ảnh hưởng của NAA 1,0 mg/l với AgNO₃ 8 mg/l (môi trường R3).

Các khối mô sẹo đã được cảm ứng phôi hóa trên môi trường EG2 (bổ sung ABA 1,0 mg/l và GA₃ 1,0 mg/l) được chuyển lên các môi trường tái sinh là môi trường R1, R2, R3. Kết quả cho thấy, sau 20 ngày nuôi cấy trên cả 3 môi trường đều đã có sự hình thành chồi (Bảng 2). Hiệu quả tái sinh chồi từ mô sẹo cao nhất ở môi trường R2 (đạt 45,45%), trên

môi trường R1 tỉ lệ tạo chồi thấp hơn, đạt 33,34% và thấp nhất ở môi trường R3, tỉ lệ là 20,08%. Sau 40 ngày nuôi cấy, tỉ lệ tạo chồi trên môi trường R2 đạt 54,45% và ở môi trường R1 tỉ lệ này đạt 54,17%, thấp nhất ở môi trường R3 (46,15%). Tuy nhiên, đến 60 ngày nuôi cấy, tỉ lệ này đã có sự thay đổi, tỉ lệ tạo chồi ở môi trường R1, R2 và R3 lần lượt là, đạt cao nhất ở R1 (67,50%), môi trường R2 thấp hơn và đạt 63,64%, thấp nhất vẫn là môi trường R3 (53,58%).

Bảng 2. Ảnh hưởng của thành phần môi trường đến tỉ lệ tái sinh của mô sẹo đỉnh chồi

Môi trường	Số mẫu	Tỉ lệ tái sinh (%) trên môi trường tái sinh			Số chồi/mô sẹo
		20 ngày	40 ngày	60 ngày	
R1	36	33,34 ^b	54,17 ^a	67,50 ^a	1-5
R2	31	45,45 ^a	54,45 ^a	63,64 ^{ab}	1-5
R3	33	20,08 ^c	46,15 ^b	53,85 ^b	1-5

Ghi chú: R1: MS + kinetin 0,5 mg/l + BAP 1,0 mg/l; R2: MS + kinetin 0,5 mg/l + BAP 1,0 mg/l + 8,0 mg/l AgNO₃; R3: MS + NAA 1,0 mg/l + AgNO₃ 8,0 mg/l

Nghiên cứu này cho thấy mô sẹo ngọn được cảm ứng phôi hóa và đưa lên môi trường tái sinh cho hiệu quả tái sinh cao trên hai môi trường R1 và R2. Trên môi trường có bổ sung AgNO₃ cho hiệu quả tái sinh tốt ngay từ 20 - 30 ngày đầu tiên sau nuôi cấy. Tuy nhiên trên môi trường R1, tỉ lệ tái sinh ở giai đoạn đầu thấp hơn nhưng đến 30 ngày là tương đối cao và chênh lệch có ý nghĩa so với tỉ lệ tái sinh trên môi trường R2. Chính vì vậy, chúng tôi cho rằng môi trường R1 (MS bổ sung kinetin 0,5 mg/l, BAP 1,0 mg/l) là môi trường phù hợp cho tái sinh chồi ở mô sẹo khoai lang.

KẾT LUẬN

Đã chứng minh được vật liệu nuôi cấy mô sẹo là đỉnh chồi ở giống khoai lang KB1 khi nuôi cấy trên các môi trường tương ứng cho hiệu quả tái sinh chồi từ mô sẹo cao hơn (tỉ lệ tái sinh chồi đạt 67,50%) so với vật liệu nuôi cấy mô sẹo từ mảnh lá (tỉ lệ tái sinh đạt 40,00%).

Môi trường nuôi cấy cho hiệu quả tái sinh chồi cao từ mô sẹo ở khoai lang là môi trường R1 (MS + 30 g/l sucrose + 8 g/l agar + 0,5 mg/l kinetin + 1,0 mg/l BAP).

Lời cảm ơn

Tác giả xin cảm ơn sự hỗ trợ về hóa chất và thiết bị của Phòng Công nghệ tế bào thực vật, Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm KH&CN Việt Nam.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Vũ Thị Lan, Nguyễn Thị Nga, Nguyễn Đình Trọng, Phạm Bích Ngọc, Chu Hoàng Hà, Lê Trần Bình (2013), "Hiệu quả của ABA và GA₃ lên quá trình tạo đa chồi từ mô sẹo ở khoai lang *Ipomoea batatas* (L.) Lam", *Tạp chí Công nghệ Sinh học*, 11, (4), tr. 727-734.
2. Vũ Thị Lan, Phạm Bích Ngọc, Chu Hoàng Hà, Lê Trần Bình (2015), "Nghiên cứu tái sinh chồi trực tiếp từ cuống lá và mảnh lá của giồng khoai lang Chiêm Dâu và KB1", *Tạp chí Khoa học và Công nghệ, ĐHQGHN*, 31, (4S), tr. 177-184.
3. Anwar N., Junko K., Watarabe A. (2011), "Transgenic sweet potato expressing mammalian cytochrome P450", *Plant Cell Tiss Organ Cult.*, 105, pp. 219-231.
4. Chee R. P., Leskovar D. I., Cantliffe D. J., (1992), "Optimizing embryogenic callus and embryo growth of a synthetic seed system for sweet potato by varying media nutrient concentration", *J. Am. Soc. Hort. Sci.*, 117, pp. 663-667.
5. Dessai A. P., Gosukonda R. M., Blay E., Dumenyo C. K., Medina - Bolivar F., Prakash C. S. (1995), "Plant regeneration of sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) from leaf explants in vitro using a two - stage protocol", *Scientia Horticulturae*, 62, pp. 217 - 224.
6. Gong Y., Gao F., Tang K. (2004), "In vitro high frequency direct root and shoot regeneration in sweet potato using the ethylene inhibitor silver nitrate", *South Afr. J. Botany*, 71, (1), pp. 110-113.
7. Gosukonda R. M., Prakash C. S., Porobodessai A., Blay E., Peterson (1995), "Thidiazuron - induced adventitious shoot regeneration of sweet potato *Ipomoea batatas*", *In vitro Cell Dev. Biol.*, 31, pp. 65 – 71.
8. Xing Y., Ji Q., Yang Q., Luo Y., Li Q., Wang X. (2008), "Studies on Agrobacterium - mediated genetic transformation of embryogenic suspension cultures of sweet potato", *Afr. J. Biotechnol.*, 7, (5), pp. 534 - 540.
9. Zheng Q., Dessai A. P., Prakash C. S., (1996), "Rapid and repetitive plant regeneration in sweetpotato via somatic embryogenesis", *Plant Cell Rep.*, 15, pp. 381-385.

SUMMARY

THE EFFICIENCY OF MATERIALS AND MEDIUMS ON THE SHOOT REGENERATION FROM CALLUS OF SWEET POTATO *Ipomoea batatas* (L) Lam

Vũ Thị Lan*

University of Science - TNU

Sweetpotato [*Ipomoea batatas* (L.) Lam.] is an important food crop in the world as well as in Vietnam. It is well known as a recalcitrant crop for gene transformation and tissue culture because of its genotype dependent *invitro* responses. This paper presents the results of comparison of shoot regeneration ration of from two materials including shoot tip and leaf explants. We have demonstrated that shoot regeneration efficiency of calli from shoot tip were significantly higher (67.5%) than that of calli from leaf explants (40.00%). The most suitable medium for high shoot regeneration efficiency from callus was R1 medium (MS medium which added 30 grs/l sucrose, 2.5 grs/l gelrite, 0.5 mg/l kinetin and 1.0 mg/l BAP).

Key words: Callus, KB1 variety, *Ipomoea batatas* L., medium, shootregeneration

Ngày nhận bài: 01/9/2017; Ngày phản biện: 22/9/2017; Ngày duyệt đăng: 16/10/2017

* Tel: 0914 504250, Email: lanvt@mus.edu.vn