

## NGHIÊN CỨU NHÂN GIỐNG KHOAI LANG NHẬT BẰNG PHƯƠNG PHÁP NUÔI CÂY MÔ TẾ BÀO

Lương Thị Ngọc Tú<sup>1</sup>, Trần Đình Hợp<sup>1</sup>, Trần Thị Thanh Phương<sup>1</sup>,  
Nguyễn Nữ Thanh Linh<sup>1</sup>, Nguyễn Thị Thanh Tâm<sup>1</sup>

### TÓM TẮT

Kết quả nghiên cứu nhân giống khoai lang Nhật bằng phương pháp nuôi cấy mô cho thấy phương pháp khử trùng tối ưu cho vật liệu khởi đầu là xử lý mẫu với dung dịch cồn 70% (trong 40 giây) và HgCl<sub>2</sub> 0,1% (trong 10 phút) cho tỷ lệ mẫu sạch và mẫu bật chồi cao nhất tương ứng là 72,04% và 67,12%. Chồi sau khi tái sinh từ đỉnh sinh trưởng sẽ được sàng lọc bệnh virus Sweet Potato Feathery Mottle Virus - SPFMV bằng phương pháp PCR. Môi trường nhân nhanh phù hợp cho mẫu chồi sạch bệnh là MS + 3% Saccarose + 8 g/l agar + 1 ppm BAP, hệ số nhân chồi đạt 4,59 chồi/mẫu cấy, chiều cao trung bình là 3,6 cm. Nền môi trường nước dừa 10% + Saccarose 30 g/l + agar 8g/l + 1 ppm GA<sub>3</sub> có bổ sung 1,5 ppm IAA cho hiệu quả tốt nhất trong giai đoạn tạo cây hoàn chỉnh, số rễ trung bình đạt 8,12 rễ, chiều dài trung bình rễ đạt 7,77 cm, chiều cao trung bình của thân là 7,60 cm.

**Từ khóa:** Khoai lang Nhật, nuôi cấy mô tế bào, sạch bệnh virus

### I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Theo số liệu thống kê của Tổ chức Lương thực và Nông nghiệp Liên Hiệp Quốc, tình hình sản xuất khoai lang trên thế giới có xu hướng tăng lên trong những năm gần đây. Khoảng 111,5 triệu tấn khoai lang được sản xuất năm 2016 và 112,8 triệu tấn năm 2017. Trong đó, diện tích sản xuất khoai lang lớn nhất là ở Châu Á, chiếm 71,8% trên toàn thế giới (FAOSTAT, 2019). Trước tình hình biến đổi khí hậu hiện nay, khoai lang trở thành 1 trong 4 loại cây trồng an ninh lương thực quan trọng (Iese *et al.*, 2018). Ở Việt Nam, từ năm 2015 đến năm 2017, năng suất khoai lang ngày càng tăng lên. Năm 2016 năng suất khoai lang tăng lên 1,3 tạ/ha so với năm 2015, năm 2017 năng suất đạt 110,9 tạ/ha - tăng 5,3 tạ/ha so với năm 2016 (Viện Nghiên cứu Chiến lược Thương hiệu và Cạnh tranh, 2017). Một trong những giống khoai lang có triển vọng được sản xuất lớn là giống khoai lang Nhật. Nhiều năm qua, khoai lang Nhật là cây trồng mang lại nguồn thu nhập cao cho người nông dân, năng suất bình quân là 15 - 16 tấn/ha, một số điển hình đạt trên 20 tấn/ha, giá bán 11.000 đồng/kg. Ở Nghệ An, cũng đã sản xuất khoai lang Nhật nhưng diện tích trồng chưa lớn, chủ yếu đang mua củ từ nơi khác về do gặp khó khăn về nguồn giống. Thực tế sản xuất cho thấy, việc duy trì giống từ vụ này sang vụ khác, năm này qua năm khác đã dẫn đến việc giống bị thoái hóa, nhiễm bệnh virus làm giảm sút cả về năng suất và chất lượng, để cải thiện chất lượng giống nông dân phải mua giống gốc để trồng rất bị động và tốn kém. Kết quả nghiên cứu nhân giống khoai lang Nhật bằng phương pháp nuôi

cây *in vitro* sẽ tạo ra nguồn dây giống đảm bảo chất lượng, sạch virus nhằm cung cấp nguồn dây giống khoai lang Nhật cho người dân sản xuất, khắc phục những nhược điểm của phương pháp nhân giống truyền thống.

### II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

#### 2.1. Vật liệu nghiên cứu

Đỉnh sinh trưởng của mầm củ khoai lang Nhật.

#### 2.2. Phương pháp nghiên cứu

##### 2.2.1. Nghiên cứu tạo vật liệu khởi đầu *in vitro*

Củ giống sau khi được tuyển chọn sẽ được xử lý để thúc bật chồi. Khi chồi cao 10 - 20 cm thì tiến hành cắt ngọn. Mẫu sau khi cắt được rửa dưới vòi nước chảy để loại bỏ dịch mủ khoai, ngâm mẫu 10 - 15 phút trong dung dịch xà phòng loãng nhằm loại bỏ vết bẩn dính trên mẫu. Rửa lại 2 - 3 lần dưới vòi nước máy. Cuối cùng, rửa sạch bằng nước cất.

Mẫu được xử lý sát khuẩn bề mặt bằng dung dịch cồn 70% trong tủ cấy vô trùng thời gian 40 giây, tráng lại bằng nước cất 3 - 4 lần. Khử trùng mẫu bằng HgCl<sub>2</sub> trong các khoảng thời gian khác nhau (5 phút, 7 phút, 10 phút, 15 phút, 20 phút), rửa lại bằng nước cất vô trùng sau mỗi lần khử trùng để tránh tình trạng HgCl<sub>2</sub> ngấm sâu vào trong mẫu. Tách đỉnh sinh trưởng dưới kính hiển vi, kích thước chuẩn từ 0,6 mm - 1 mm, cấy vào môi trường nuôi cấy khởi động (MS + 30 g/l Saccarose + 8 g/l agar + 0,5 ppm GA<sub>3</sub>, pH= 5,6 - 5,8). Sau 4 - 6 tuần đánh giá thời gian khử trùng thích hợp qua các chỉ tiêu: tỷ lệ mẫu nhiễm, tỷ lệ mẫu chết, tỷ lệ mẫu bật chồi.

<sup>1</sup> Viện Khoa học kỹ thuật Nông nghiệp Bắc Trung Bộ

**2.2.2. Sàng lọc cây khoai lang Nhật nuôi cấy mô sạch bệnh virus SPFMV**

Mẫu cây tái sinh từ đỉnh sinh trưởng sẽ được sàng lọc sạch bệnh virus SPFMV (Sweet Potato Feathery Mottle Virus) bằng phương pháp PCR nhằm tạo ra nguồn nguyên liệu sạch bệnh cho giai đoạn nhân nhanh chồi. Phương pháp tách chiết ARN tổng số sử dụng hóa chất Trizol. Giám định bằng kỹ thuật RT-PCR sử dụng ONE-STEP RT-PCR Master Mix (50 phản ứng) (Intron - Hàn Quốc) với cặp mồi đặc hiệu cho virus SPFMV (Sweet Potato Feathery Mottle Virus), có thể khuếch đại đặc hiệu một đoạn có kích thước 700 bp. SPFMV - F : 5'-TACACACTGCTAAAAGTAGG-3'; SPFMV - R : 5'-AGTTCATCATAACCCCATGA-3' (Kwak *et al.*, 2014).

**2.2.3. Nghiên cứu môi trường nhân nhanh thích hợp cho giống khoai lang Nhật**

Sau khi tạo nguồn nguyên liệu khởi đầu sạch bệnh, để tăng hệ số nhân chồi, mẫu tái sinh từ đỉnh sinh trưởng được chuyển sang môi trường dinh dưỡng bổ sung các chất điều tiết sinh trưởng thuộc nhóm: Auxin, cytokinin... kết hợp với các yếu tố nhiệt độ, ánh sáng phù hợp để đạt hệ số nhân cao nhất trong thời gian ngắn nhất mà vẫn đảm bảo được sức sống và bản chất di truyền của cây. Thí nghiệm nghiên cứu ảnh hưởng của 6-Benzylaminopurine (BAP) đến khả năng nhân chồi. Các công thức thí nghiệm được bố trí ngẫu nhiên hoàn toàn với 3 lần nhắc lại, mỗi lần nhắc lại 5 bình, mỗi bình 5 mẫu. CT1 (nền): MS+30 g/l Saccarose + 8 g/l agar; CT2: nền + 0,3 ppm BAP; CT3: nền + 0,7 ppm BAP; CT4: nền + 1 ppm BAP; CT5: nền + 1,5 ppm BAP; pH= 5,6 - 5,8. Sau 4 tuần tiến hành đánh giá ảnh hưởng của BAP đến sinh trưởng và phát triển của mẫu cấy.

**2.2.4. Nghiên cứu môi trường tạo cây hoàn chỉnh**

Sau 3 - 4 tuần chồi phát triển đạt tiêu chuẩn chiều cao 4 - 6 cm, số lượng lá đạt 3 - 4 lá, chồi riêng lẻ sẽ xuất hiện rễ. Chồi sẽ được tạo rễ sớm hơn để tạo thành cây con hoàn chỉnh trên môi trường được bổ sung auxin: IAA, α- NAA... với nồng độ thích hợp. Thí nghiệm nghiên cứu ảnh hưởng của IAA (Indol acetic axit) đến sự phát sinh rễ khoai lang được bố trí trên 5 công thức, 3 lần nhắc lại. CT1 (Đ/c): MT nền = MS + nước dừa 10% + Saccarose 30 g/l + agar 8g/l + 1 ppm GA3 (Phạm Văn Linh, Trịnh Đức Toàn, 2016), pH= 5,6 - 5,8; CT2: MT nền + 0, 5 ppm IAA;

CT3: MT nền +1 ppm IAA; CT4: MT nền + 1,5 ppm IAA; CT5: MT nền + 2 ppm IAA.

**III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN**

**3.1. Nghiên cứu tạo vật liệu khởi đầu *in vitro***

Còn 70% là hóa chất khử trùng bề mặt rất tốt nhưng để khử trùng sạch mẫu cấy thì việc kết hợp với HgCl<sub>2</sub> 0,1% với thời gian thích hợp sẽ nâng cao tỷ lệ sạch bệnh. Nghiên cứu nhằm xác định phương pháp khử trùng mẫu thích hợp tạo vật liệu khởi đầu *in vitro*. Kết quả thí nghiệm được trình bày trong bảng 1.

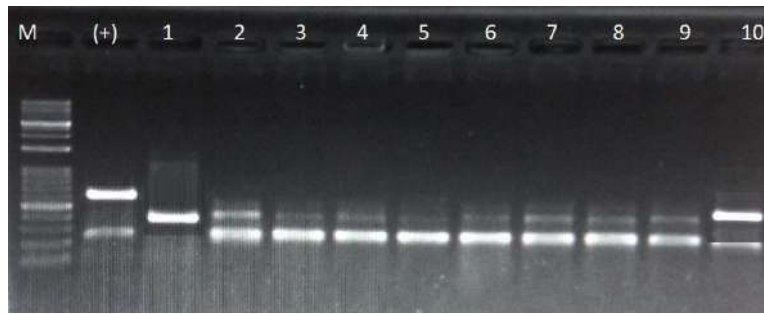
Kết quả cho thấy, công thức thu được mẫu sạch và mẫu sống cao nhất là công thức 3: khử trùng mẫu với dung dịch còn 70 % (40 giây) kết hợp xử lý với dung dịch HgCl<sub>2</sub> (10 phút) đạt tỷ lệ mẫu sạch là 72,04% và mẫu bật chồi là 67,12%. Nếu thời gian khử trùng HgCl<sub>2</sub> quá lâu thì tỷ lệ mẫu chết sẽ tăng lên, tỷ lệ mẫu bật chồi giảm xuống. Ngược lại nếu thời gian khử trùng quá ít thì tỷ lệ mẫu bị nhiễm nấm, khuẩn cao.

**Bảng 1.** Ảnh hưởng của thời gian khử trùng bằng còn 70%, kết hợp với HgCl<sub>2</sub> 0,1% đến hiệu quả khử trùng sau 4 tuần theo dõi

Công thức	Thời gian khử trùng		Tỷ lệ mẫu nhiễm nấm khuẩn (%)	Tỷ lệ mẫu sạch nấm khuẩn	
	Còn 70% (giây)	HgCl <sub>2</sub> (phút)		Tỷ lệ mẫu bật chồi (%)	Tỷ lệ mẫu chết (%)
CT1	40	5	61,91	33,33	4,76
CT2	40	7	48,92	46,26	4,82
CT3	40	10	27,96	67,12	4,92
CT4	40	12	7,39	34,83	57,78
CT5	40	15	2,56	24,99	72,45

**3.2. Sàng lọc cây sạch bệnh virus bằng phương pháp PCR (Polymerase chain reaction)**

Sau khi tạo được vật liệu khởi đầu, tiến hành sàng lọc cây nuôi cấy mô sạch bệnh virus Sweet Potato Feathery Mottle Virus - SPFMV bằng phương pháp PCR. Lấy 10 mẫu lá (mỗi mẫu 0,1 g) của các chồi được tái sinh từ đỉnh sinh trưởng, mỗi chồi là đại diện cho một củ giống ban đầu để tiến hành sàng lọc sạch bệnh virus. Kết quả điện di sau khi chạy PCR cho thấy cả 10 mẫu kiểm tra đều cho kết quả âm tính với virus SPFMV.



**Hình 1.** Hình ảnh chạy điện di kết quả giám định mẫu khoai lang Nhật nuôi cấy mô

Ghi chú: M: 100 bp; (+): đối chứng dương; Các số 1 - 10 là số thứ tự mẫu; 700 bp là kích thước sản phẩm PCR mong đợi.

**3.3. Nghiên cứu môi trường nhân nhanh thích hợp cho giống khoai Nhật**

Chồi được tái sinh từ đỉnh sinh trưởng sau khi sàng lọc sạch bệnh virus sẽ được chuyển sang môi trường nhân nhanh có bổ sung chất kích thích sinh trưởng để tăng hệ số nhân chồi khoai lang. Việc bổ sung BAP (6-Benzylaminopurine) ở các nồng độ khác nhau có ảnh hưởng rõ rệt đến hệ số nhân chồi, chiều cao trung bình của chồi cũng như chất lượng chồi. Nghiên cứu ảnh hưởng của BAP đến hệ số nhân chồi giống khoai nhật được thể hiện ở bảng 2.

**Bảng 2.** Ảnh hưởng của BAP (6-Benzylaminopurine) đến hệ số nhân chồi giống khoai lang Nhật

Công thức	Nồng độ (ppm)	Hệ số nhân (lần)	Chiều cao TB thân (cm)	Chất lượng chồi
CT1 (Đ/c)	0,0	1,93e	1,10e	+
CT2	0,3	2,63d	1,50d	+
CT3	0,7	3,03b	2,07c	++
CT4	1,0	4,59a	3,60a	+++
CT5	1,5	2,79c	2,73b	++
CV (%)		1,35	8,82	
LSD <sub>0,05</sub>		0,08	0,37	

Ghi chú: \*: sai khác có ý nghĩa, ns: sai khác không có ý nghĩa, +++: chồi tốt, ++: chồi trung bình, +: chồi kém.

Từ kết quả trên cho thấy, môi trường nền (MS + 30 g/l Saccarose + 8 g/l agar) có bổ sung 1 ppm BAP là nồng độ thích hợp cho sinh trưởng và phát triển của chồi khoai lang giống khoai nhật, hệ số nhân chồi đạt trung bình 4,59 chồi/ mẫu, chất lượng chồi tốt với chiều cao trung bình là 3,60 cm. Việc bổ sung nồng độ BAP quá cao (1,5 ppm) thì sẽ có tác động ngược lại, hệ số nhân chồi giảm (2,79 lần), chiều cao trung bình chồi chỉ đạt 2,73 cm.

**3.4. Nghiên cứu môi trường tạo cây hoàn chỉnh cho giống khoai lang Nhật**

IAA là auxin tự nhiên, kích thích sinh trưởng, kéo dài tế bào, kích thích sự hình thành rễ. Sự phát sinh rễ khoai lang trên các môi trường có bổ sung IAA ở các nồng độ khác nhau được thể hiện ở bảng 4.

Kết quả cho thấy trên nền môi trường MS + 10% nước dừa + 30 g/l Saccarose + 8 g/l agar + 1 ppm GA3 có bổ sung 1,5 ppm IAA cây con sinh trưởng phát triển tốt, rễ trắng, số rễ trung bình đạt được là 8,12 cm, chiều dài trung bình của rễ đạt 7,77 cm, thân cây phát triển tốt với chiều cao trung bình của thân là 7,60 cm.

**Bảng 3.** Ảnh hưởng của nồng độ IAA đến khả năng tạo cây hoàn chỉnh

Công thức	Nồng độ IAA (ppm)	Số rễ TB/cây (rễ)	Chiều dài TB rễ (cm)	Chiều cao TB thân (cm)
CT1 (Đ/c)	0,0	5,99d	2,53d	5,23
CT2	0,5	6,35c	4,83c	6,53
CT3	1,0	7,15b	6,80b	7,37
CT4	1,5	8,12a	7,77a	7,60
CT5	2,0	7,57b	6,87b	6,13
CV (%)		3,47	7,06	
LSD <sub>0,05</sub>		0,46	0,77	

Ghi chú: a, b, c, d, e: mức phân nhóm trong so sánh Duncan; +++: chồi tốt, ++: chồi trung bình, +: chồi kém.

**IV. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ**

**4.1. Kết luận**

Khử trùng bằng dung dịch cồn 70% (40 giây) kết hợp với xử lý bằng HgCl<sub>2</sub> trong thời gian 10 phút cho hiệu quả khử trùng cao nhất, tỷ lệ mẫu sạch và mẫu bật chồi tương ứng là 72,04% và 67,12%. Môi trường

nhân nhanh chồi sau khi mẫu được tái sinh từ đỉnh sinh trưởng là môi trường MS + 3% Saccarose + 6,5 g/l agar + 1 ppm BAP, chất lượng chồi tốt với hệ số nhân chồi trung bình là 4,59, chiều cao trung bình chồi đạt 3,6 cm. Môi trường tạo cây hoàn chỉnh cho giống khoai lang Nhật là môi trường MS + 10% nước dừa + 30 g/l Saccarose + 8g/l agar + 1 ppm GA3 + 1,5 ppm IAA thích hợp cho sự sinh trưởng và phát triển của cây con *in vitro*, số rễ trung bình/ cây đạt là 8,12 rễ, chiều dài trung bình rễ đạt 7,77 cm, chiều cao trung bình của thân là 7,60 cm.

#### 4.2. Đề nghị

Tiếp tục nghiên cứu nhân giống nuôi cấy mô trên các giống khoai lang triển vọng khác để nâng cao chất lượng nguồn giống sạch bệnh, tăng năng suất và chất lượng dây giống khoai lang.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

Phạm Văn Linh, Trịnh Đức Toàn, 2016. *Kỹ yếu Hội*

*thảo Quốc gia về Khoa học Cây trồng lần thứ 2*. NXB Nông nghiệp, trang: 463-465.

**Viện Nghiên cứu Chiến lược Thương hiệu và Cạnh tranh**, 2017. Báo cáo ngành trồng trọt tại Việt Nam năm 2017.

**FAOSTAT**. Available from: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize>; accessed June 7, 2019.

**Iese.V, Holland. E, Wairiu. M, Havea. R, Patolo. S, Nishi. M, Hoponoa.T, Bourke. R, Dean. A and Waqainabete. L.**, 2018. Facing food security risks: The rise and rise of the sweet potato in the Pacific Islands. *Glob Food Sec.*, 18: 48-56. doi:10.1016/j.gfs.2018.07.004.

**Kwak. H-R, Kim. M-K, Shin. J-C, Lee. Y-J, Seo. J-K, Lee. H-U, Jung. M-N, Kim. S-H and Choi. H-S.**, 2014. The current incidence of viral disease in Korean sweet potatoes and development of multiplex rt-PCR assays for simultaneous detection of eight sweet potato viruses. *Plant Pathol J.*, 30(4): 416-424. doi:10.5423/PPJ.OA.04.2014.0029.

### Study on propagating Japanese sweet potato by cell tissue culture method

Luong Thi Ngoc Tu, Tran Dinh Hop, Tran Thị Thanh Phuong  
 Nguyen Nu Thanh Linh, Nguyen Thị Thanh Tam

#### Abstract

The results of propagating Japanese sweet potato by cell tissue culture method showed that the optimal sterilization method for propagation materials was to treat samples with 70% alcohol solution (for 40 seconds) and HgCl<sub>2</sub> 0.1% (for 10 minutes) and the highest rate of clean samples and shot samples was recorded 72.04% and 67.12%, respectively. Shoots after regeneration from the shoot tip will be screened for virus Sweet Potato Feathery Mottle Virus (SPFMV) by PCR method. Appropriate multiplication medium for disease-free shoots was MS + 3% Saccarose + 8 g/l agar + 1 ppm BAP, shoot multiplier reached 4.59 shoots / culture sample, average height was 3.6 cm. Basic medium: Coconut water 10% + Saccarose 30 g / l + agar 8 g/l + 1 ppm GA3 supplemented with 1.5 ppm IAA was the best effect in the period of complete plant formation; average root number reached 8.12; average root length was 7.77 cm and average stem height was 7.60cm.

**Keywords:** Japanese sweet potato, cell tissue culture, virus free

Ngày nhận bài: 19/6/2019  
 Ngày phản biện: 26/6/2019

Người phản biện: TS. Trần Danh Sứ  
 Ngày duyệt đăng: 11/7/2019