

manufactured to overcome the disadvantages of traditional process. The optimal parameters were determined as follow: Soaking temperature is 35°C, soaking time is 4 hours, sowing density is 40 g/dm², water temperature is 28 - 30°C, irrigation cycle is 30 minutes, each irrigating time for 1 minute, watering density is 0.05 L/min/dm², irrigation time is 48 hours, capacity is 7 kg bean sprouts/1kg materials. The product was analyzed for chemical and microbiological composition as well as sensory evaluation and good results were recorded.

Keywords: Bean sprouts, production process, automatic machines, optimization

Ngày nhận bài: 16/4/2019
Ngày phản biện: 21/4/2019

Người phản biện: TS. Hoàng Quốc Tuấn
Ngày duyệt đăng: 15/5/2019

XÂY DỰNG HỆ THỐNG TÁI SINH *IN VITRO* CHO GIỐNG CÀ CHUA MONTAVI

Nguyễn Minh Chiến¹, Tráng A Chinh¹, Đinh Trường Sơn¹

TÓM TẮT

Chiến lược chọn giống cà chua nhờ công nghệ tế bào thực vật hoặc thông qua tạo cây cà chua chuyển gen mang những đặc tính mong muốn là một trong số các cách tiếp cận khá phổ biến hiện nay. Các quy trình tái sinh *in vitro* hiệu quả sẽ góp phần thúc đẩy việc áp dụng kỹ thuật trên nhằm chọn tạo tạo được cây cà chua có các đặc tính mong muốn. Công trình này được thực hiện nhằm xây dựng quy trình tái sinh cho cây cà chua Montavi. Đã xác định được chế độ khử trùng hạt phù hợp là sử dụng Presept 0,5% trong thời gian 10 phút cho kết quả tốt nhất. Từ các kết quả nghiên cứu khả năng tái sinh tạo chồi từ trụ hạ diệp cà chua Montavi trên các môi trường nuôi cấy có bổ sung riêng rẽ hay kết hợp giữa BA, kinetin, IAA, đã xác định được môi trường MS + 30 g sucrose/l + 2 mg BA/l + 0,2 mg IAA/l là phù hợp nhất cho sự tái sinh tạo chồi, tỷ lệ tạo chồi đạt 70%, số chồi đạt 1,9 chồi/mẫu, chất lượng chồi tái sinh tốt.

Từ khóa: Cà chua, Montavi, hệ thống tái sinh *in vitro*

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Trên thế giới cà chua được trồng nhiều thứ hai chỉ sau khoai tây (Abu-Qaoud, 2015). Tại Việt Nam, theo thống kê của Viện Kinh tế Nông nghiệp, năm 2005 cà chua được tiêu thụ phổ biến nhiều thứ hai chỉ sau rau muống với 88% số hộ gia đình tiêu thụ. Tuy nhiên, việc trồng và phát triển diện tích cà chua tại Việt Nam chịu ảnh hưởng lớn của biến đổi khí hậu và sâu bệnh hại. Thêm vào đó, nhu cầu về tăng năng suất và chất lượng quả cà chua nhằm đáp ứng được thị hiếu người tiêu dùng ngày càng đa dạng, do vậy cần thiết phải chọn tạo, cải tiến các giống cà chua hiện có.

Hai hướng nghiên cứu chủ đạo nhằm chọn tạo giống hiện nay là dùng các phương pháp lai tạo truyền thống và phương pháp sử dụng các công cụ công nghệ sinh học. Sử dụng công nghệ tế bào và công nghệ chuyển gen có thể tạo ra vật liệu nguồn gen phục vụ công tác lai tạo giống mới một cách nhanh chóng và dễ dàng hơn so với phương pháp truyền thống. Việc nghiên cứu xây dựng hệ thống tái sinh hiệu quả cho cây cà chua được nhiều tác giả trong và ngoài nước quan tâm do đây là yêu cầu đầu tiên nhưng có ý nghĩa quyết định đến sự thành

công của phương pháp chọn tạo giống (Đỗ Xuân Đồng và *ctv.*, 2007; Ishag *et al.*, 2009; Hà Trần Minh Dũng và *ctv.*, 2012; Gubis *et al.*, 2013; Sherkar and Chavan, 2014; Abu-Qaoud, 2015). Giống cà chua Montavi có khả năng chống chịu bệnh virus xoắn vàng lá, chịu nhiệt, năng suất cao, được nhiều người sử dụng. Mặc dù vậy, việc nghiên cứu hệ thống tái sinh hiệu quả phục vụ công tác cải tiến giống cà chua này là cần thiết.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Hạt giống cà chua Montavi do công ty Hai Mũi Tên Đỏ sản xuất.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Hạt cà chua Montavi được khử trùng bằng cách ngâm trong dung dịch Presept nồng độ 0,5% trong thời gian 10 phút và cấy trên môi trường ¼ MS (Murashige and Skoog, 1962). Mẫu cấy là đoạn trụ hạ diệp không mang mầm ngủ được cắt theo chiều ngang có kích thước 0,8 - 1,0 cm và được đặt nằm ngang trên bề mặt môi trường nuôi cấy. Mẫu cấy sau đó được nuôi cấy trên môi trường cơ bản MS có bổ

¹ Khoa Công nghệ sinh học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

sung sucrose và các chất điều tiết sinh trưởng BA, kinetin, IAA riêng rẽ hoặc tổ hợp. Môi trường nuôi cấy được điều chỉnh pH = 6,0 trước khi được khử trùng ở 121°C; 1,0 atm trong thời gian 20 phút. Mẫu được nuôi ở nhiệt độ 25 ± 2°C, cường độ chiếu sáng 2000 lux, thời gian chiếu sáng 16 h/ngày.

Thí nghiệm được thiết kế ngẫu nhiên hoàn toàn, 3 lần lặp lại, mỗi lần 30 mẫu/công thức. Số liệu được phân tích phương sai một yếu tố (oneway ANOVA) và sai số nhỏ nhất có ý nghĩa Least Significant Difference Test - LSD) bằng phần mềm SPSS và Excel.

2.3. Thời gian và địa điểm nghiên cứu

Nghiên cứu được thực hiện từ tháng 6/2018 đến 4/2019 tại Bộ môn Công nghệ sinh học Thực vật - Khoa Công nghệ sinh học - Học viện Nông nghiệp Việt Nam.

III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

3.1. Ảnh hưởng của nồng độ và thời gian khử trùng đến giai đoạn tạo nguồn vật liệu ban đầu

Việc lựa chọn được hoá chất khử trùng, nồng độ và thời gian khử trùng phù hợp đóng vai trò quan trọng trong giai đoạn tạo nguồn vật liệu ban đầu cho các thí nghiệm xây dựng hệ thống tái sinh về sau. Sodium dichloroisocyanurate là hoạt chất có trong Presept được biết đến là ít độc với mẫu và do vậy được sử dụng với nồng độ lớn (0,5 - 2,0%) và thời gian khử trùng có thể kéo dài từ 5 - 90 phút (Kendon *et al.*, 2017). Chính vì vậy, thí nghiệm này được tiến hành nhằm xác định ảnh hưởng của nồng độ và thời gian khử trùng với Presept tới giai đoạn tạo nguồn vật liệu khởi đầu từ hạt cà chua Montavi. Hạt cà chua sau khi khử trùng được cấy trên môi trường ¼ MS. Kết quả được trình bày tại bảng 1 và bảng 2.

Bảng 1. Ảnh hưởng của thời gian khử trùng đến giai đoạn tạo nguồn vật liệu ban đầu (14 ngày sau gieo hạt)

Công thức	Thời gian khử trùng (phút)	Nồng độ Presept (%)	Tỷ lệ mẫu sạch (%)	Tỷ lệ nảy mầm (%)	Chiều cao (cm/cây)	Quan sát hình thái
CT1	5	0,5	100	89,7	6,46 ± 0,47	Cây khỏe, lá to, rễ dài
CT2	10	0,5	100	93,3	7,1 ± 0,34	Cây khỏe, lá to, rễ dài
CT3	15	0,5	100	91,1	6,3 ± 0,38	Cây khỏe, lá nhỏ
<i>P_{value}</i>				0,84	0,5	

Bảng 2. Ảnh hưởng của nồng độ chất khử trùng đến giai đoạn tạo nguồn vật liệu ban đầu (14 ngày sau gieo hạt)

Công thức	Nồng độ Presept (%)	Thời gian khử trùng (phút)	Tỷ lệ mẫu sạch (%)	Tỷ lệ nảy mầm (%)	Chiều cao (cm/cây)	Quan sát hình thái
CT1	0,1	10	100	88,0	6,2 ± 0,45	Cây khỏe, lá nhỏ
CT2	0,5	10	100	93,3	7,1 ± 0,34	Cây khỏe, lá to, rễ dài
CT3	1,0	10	100	88,8	5,94 ± 0,4	Cây khỏe, lá nhỏ
<i>P_{value}</i>				0,678	0,1	

Kết quả trong bảng 1 và bảng 2 cho thấy tỷ lệ hạt cà chua sau khi khử trùng với thời gian hoặc nồng độ Presept khác nhau đều cho tỷ lệ mẫu sạch vi sinh vật đạt 100%. Kết quả trên chứng tỏ hiệu quả diệt vi sinh vật trên hạt giống của Presept là rất cao.

Kết quả khảo sát ảnh hưởng của thời gian khử trùng đến giai đoạn tạo nguồn vật liệu ban đầu cho thấy: ở nồng độ Presept là 0,5% với thời gian khử trùng là 10 phút cho tỷ lệ hạt cà chua Montavi nảy mầm cao nhất và đạt 93,3% (Bảng 1). Mặc dù vậy, kết quả phân tích thống kê cho thấy sự khác biệt về tỷ lệ nảy mầm, chiều cao cây giữa các công thức là

không có ý nghĩa thống kê (*P-value* > 0,05).

Tương tự như vậy, kết quả khảo sát ảnh hưởng của nồng độ Presept cho thấy: ở nồng độ Presept là 0,5%, tỷ lệ nảy mầm cũng như sinh trưởng của cây *in vitro* là tốt nhất (Bảng 2). Tuy nhiên, sự khác biệt về tỷ lệ nảy mầm, chiều cao cây giữa các nồng độ Presept là không có ý nghĩa thống kê (*P-value* > 0,05).

Từ các kết quả nghiên cứu trên cho thấy: ở giai đoạn tạo nguồn vật liệu ban đầu, có thể sử dụng Presept nồng độ 0,5% trong thời gian 10 phút để khử trùng hạt cà chua Montavi.

3.2. Ảnh hưởng của nồng độ khoáng tới giai đoạn tạo nguồn vật liệu ban đầu

Ở thí nghiệm xác định ảnh hưởng của nồng độ và thời gian khử trùng với Presept, hạt giống được nuôi cấy trên môi trường ¼ MS và sinh trưởng khá tốt.

Tuy nhiên, việc xác định được môi trường phù hợp cho giai đoạn tạo nguồn vật liệu ban đầu là rất quan trọng. Chính vì vậy, thí nghiệm này được tiến hành trên 4 môi trường nuôi cấy có nồng độ dinh dưỡng MS khác nhau. Kết quả được trình bày trên bảng 3.

Bảng 3. Ảnh hưởng của nồng độ khoáng đến sinh trưởng của cây cà chua *in vitro* (14 ngày sau gieo hạt)

Công thức	Nồng độ khoáng	Tỷ lệ nảy mầm (%)	Chiều cao cây (cm/cây)	Số lá (lá/cây)	Khối lượng tươi (mg/cây)	Khối lượng khô (mg/cây)	Quan sát hình thái
CT1	1/8MS	82 ^a	7,9 ± 0,64 ^a	2,5 ± 0,25 ^a	138,4 ± 13,3 ^a	8,8 ± 0,92 ^{ab}	Cây khỏe, thân mảnh, lá nhỏ
CT2	1/4MS	68 ^a	7 ± 0,75 ^a	2,6 ± 0,3 ^a	193,3 ± 25 ^b	11,2 ± 1,34 ^a	Cây khỏe, thân mảnh, lá nhỏ
CT3	1/2MS	42 ^b	3,6 ± 0,66 ^b	1,76 ± 0,3 ^a	80 ± 15,3 ^c	5,8 ± 1,14 ^{bc}	Cây khỏe, thân mảnh, lá nhỏ
CT4	MS	24 ^c	1,8 ± 0,48 ^b	0,96 ± 0,26 ^b	45 ± 12,4 ^c	3,2 ± 0,9 ^c	Cây khỏe, thân mập, lá to
<i>P</i> value		<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	

Ghi chú: Bảng 3 - bảng 6: Các giá trị trung bình trong cùng một cột theo sau bởi cùng một chữ cái là không khác biệt có ý nghĩa thống kê (kiểm định LSD) ở mức độ tin cậy 95%.

Kết quả trên bảng 3 cho thấy: nồng độ khoáng có ảnh hưởng lớn đến sinh trưởng của cây cà chua Montavi sau khi gieo hạt. Các chỉ tiêu tỷ lệ nảy mầm, chiều cao cây, khối lượng tươi, khối lượng khô có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa các môi trường có nồng độ khoáng khác nhau. Cụ thể, sau 14 ngày theo dõi, hạt gieo trên môi trường MS nồng độ thấp (1/8 MS và 1/4 MS) có tỷ lệ nảy mầm cao, thời gian nảy mầm sau gieo hạt ngắn hơn so với môi trường có nồng độ khoáng cao (1/2 MS và MS), các chỉ tiêu về khối lượng khô và khối lượng tươi có sự khác biệt rõ ràng với các công thức còn lại. Tuy nhiên, khi quan sát tại thời điểm 4 tuần sau gieo hạt thì tỷ lệ nảy mầm của hạt giống trên môi trường MS đạt khoảng 70 - 80%, đường kính thân lớn, hệ thống rễ chính và lông hút trên thân phát triển. Chính vì vậy, nhóm tác giả lựa chọn môi trường MS là phù hợp để gieo hạt, tạo nguồn vật liệu ban đầu.

3.3. Ảnh hưởng của BA đến sự phát sinh hình thái cà chua Montavi

Việc bổ sung các chất điều tiết sinh trưởng thuộc nhóm auxin và cytokinin đóng vai trò quyết định

trong điều khiển sự phát sinh hình thái của mẫu mô nuôi cấy. Trong nghiên cứu về hệ thống tái sinh, có thể sử dụng nhiều loại mẫu cấy khác nhau (lá, thân, cuống lá...). Mặc dù vậy, đối với cây cà chua thì vật liệu là trụ hạ diệp được sử dụng khá phổ biến do có khả năng tái sinh cao (Gubis *et al.*, 2013). Vì vậy, thí nghiệm này được tiến hành nhằm nghiên cứu ảnh hưởng riêng rẽ cũng như tổ hợp của các chất điều tiết sinh trưởng BA, Kinetin, IAA tới khả năng tái sinh tạo chồi của mẫu cấy là đoạn trụ hạ diệp cây cà chua Montavi.

Kết quả nghiên cứu trên bảng 4 cho thấy: bổ sung BA đã làm tăng tỷ lệ tái sinh tạo chồi của trụ hạ diệp cà chua Montavi. Trong khi mẫu cấy trên môi trường không bổ sung BA chỉ cho tỷ lệ tái sinh tạo chồi là 3,3% thì trên các môi trường có bổ sung BA có tỷ lệ tái sinh tạo chồi dao động từ 22,2 - 56,6%. Môi trường có bổ sung 2 mg BA/l cho tỷ lệ tái sinh tạo chồi và số chồi tái sinh trên mẫu là cao nhất, đạt 56,6% và 1,73 chồi/mẫu tương ứng, chồi sinh trưởng khỏe, thân mập, lá to (Bảng 4).

Bảng 4. Ảnh hưởng của BA đến sự phát sinh hình thái cà chua Montavi (sau 6 tuần nuôi cấy)

Công thức	Nồng độ BA (mg/l)	Tỷ lệ tạo chồi (%)	Số chồi (chồi/mẫu)	Chiều cao chồi (cm)	Số lá (lá/chồi)	Số rễ (rễ/cây)	Quan sát hình thái
CT1	0	3,3 ^a	0,1 ± 0,1 ^a	0,06 ± 0,06 ^a	0,23 ± 0,23 ^a	0,37 ± 0,15 ^a	Cây/callus yếu, nhỏ, màu xanh nhạt sinh trưởng kém
CT2	0,5	22,2 ^{ab}	0,53 ± 0,17 ^a	0,07 ± 0,02 ^a	0,53 ± 0,18 ^a	0,06 ± 0,06 ^b	Cây/callus yếu, nhỏ, màu xanh nhạt sinh trưởng kém
CT3	1,0	41,6 ^{bc}	0,67 ± 0,2 ^{ac}	0,35 ± 0,13 ^b	0,67 ± 0,21 ^a	0 ^b	Cây/callus yếu, nhỏ, màu xanh nhạt sinh trưởng kém
CT4	1,5	31,6 ^{bc}	0,79 ± 0,33 ^{ac}	0,27 ± 0,13 ^{ab}	0,37 ± 0,23 ^a	0 ^b	Cây/callus khỏe, lá nhỏ sinh trưởng tốt
CT5	2,0	56,6 ^c	1,73 ± 0,35 ^b	0,33 ± 0,07 ^b	1,4 ± 0,31 ^b	0 ^b	Cây/callus khỏe, thân mập, lá to, sinh trưởng tốt
CT6	2,5	43,3 ^c	1,29 ± 0,35 ^{cb}	0,37 ± 0,1 ^b	0,54 ± 0,2 ^a	0 ^b	Cây/callus khỏe, lá nhỏ sinh trưởng tốt
<i>P</i> _{value}		<0,001	<0,001	0,009	0,008	0,001	

3.4. Ảnh hưởng của kinetin đến sự phát sinh hình thái cà chua Montavi

Tương tự như BA, kinetin cũng là một cytokinin và do vậy được sử dụng khá phổ biến trong điều khiển phát sinh hình thái theo hướng tạo chồi hoặc nhân nhanh chồi. Ishag và cộng tác viên (2009)

khi xây dựng hệ thống tái sinh trên giống cà chua *Lycopersicon esculentum* c.v. Omdurman đã kết luận: kinetin cho hiệu quả tái sinh tạo chồi cao hơn so với BA (Ishag *et al.*, 2009). Vì vậy, việc nghiên cứu ảnh hưởng của kinetin đến sự phát sinh hình thái cà chua Montavi là cần thiết. Kết quả được trình bày tại bảng 5.

Bảng 5. Ảnh hưởng của kinetin đến sự phát sinh hình thái cà chua Montavi (sau 6 tuần nuôi cấy)

Công thức	Kinetin (mg/l)	Tỷ lệ tạo chồi (%)	Số chồi (chồi/mẫu)	Chiều cao chồi (cm/chồi)	Số lá (lá/chồi)	Số rễ (rễ/cây)	Quan sát hình thái
CT1	0	13,3	0,37 ± 0,21	0,22 ± 0,15	0,7 ± 0,4	0,63 ± 0,23 ^a	Cây/callus yếu, nhỏ, màu nhạt sinh trưởng kém
CT2	0,5	6,6	0,07 ± 0,05	0,05 ± 0,04	0,1 ± 0,07	0,03 ± 0,03 ^b	Cây/callus yếu, nhỏ, màu nhạt sinh trưởng kém
CT3	1,0	10,0	0,17 ± 0,1	0,19 ± 0,11	0,4 ± 0,26	0,07 ± 0,07 ^b	Cây/callus khỏe, lá nhỏ sinh trưởng tốt
CT4	1,5	16,6	0,47 ± 0,26	0,13 ± 0,06	0,4 ± 0,27	0 ^b	Cây/callus khỏe, lá nhỏ sinh trưởng tốt
CT5	2,0	8,3	0,29 ± 0,2	0,12 ± 0,08	0,5 ± 0,35	0 ^b	Cây/callus yếu, nhỏ, màu nhạt sinh trưởng kém
CT6	2,5	3,3	0,03 ± 0,03	0,07 ± 0,07	0,27 ± 0,27	0,1 ± 0,06 ^b	Cây/callus yếu, nhỏ, màu nhạt sinh trưởng kém
<i>P</i> _{value}		0,58	0,34	0,771	0,756	<0,001	

Kết quả trong bảng 5 cho thấy: có sự dao động về tỷ lệ tạo chồi, số chồi, chiều cao chồi, số lá/chồi, nhưng sự khác biệt giữa các công thức môi trường không bổ sung và có bổ sung kinetin là không có ý

nghĩa thống kê (*P*-value >0,05). Như vậy, có thể kết luận kinetin không ảnh hưởng tới khả năng tái sinh tạo chồi của trụ hạ diệp của cây thuốc lá Montavi. So sánh với kết quả tái sinh trên môi trường có bổ sung

riêng rẽ BA và kinetin cho thấy: BA có hiệu quả tái sinh tạo chồi cao hơn kinetin. Kết quả này có thể coi là đối lập với kết quả nghiên cứu của Ishag và cộng tác viên (2009) khi các tác giả kết luận kinetin có hiệu quả tái sinh tạo chồi cao hơn so với BA khi tiến hành nghiên cứu trên giống cà chua *Lycopersicon esculentum* c.v. Omdurman (Ishag *et al.*, 2009). Rashid và Bal (2010) khi xây dựng hệ thống tái sinh cho các giống cà chua ‘Punjab Upma’ và ‘IPA-3’ đã tìm được môi trường thích hợp nhất là MS có bổ sung kết hợp 0,5mg/l BA và 0,5 mg/l kinetin, cho tỷ lệ tái sinh đạt tương ứng là 86,02% và 82,57% (Rashid and Bal, 2010). Các kết quả trên cho thấy, sự khác biệt về kiểu gen rõ ràng có thể là nguyên nhân chính dẫn tới sự khác biệt về đáp ứng của mẫu cấy với các chất điều tiết sinh trưởng.

3.5. Ảnh hưởng của tổ hợp BA và IAA đến sự phát sinh hình thái cà chua Montavi

Trong nuôi cấy mô tế bào thực vật, việc bổ sung kết hợp giữa các chất điều tiết sinh trưởng thuộc nhóm auxin và cytokinin là rất phổ biến nhằm điều khiển sự phát sinh hình thái của mẫu cấy. Hà Trần Minh Dũng và cộng tác viên (2012) xác định được môi trường thích hợp cho tái sinh chồi từ lá mầm cây cà chua Hồng Châu là MS có bổ sung 0,5 mg/l BA, 0,5 mg/l kinetin, 0,1 mg/l IAA (Hà Trần Minh Dũng và *ctv.*, 2012). Đỗ Xuân Đồng và cộng tác viên (2007) cũng sử dụng môi trường tái sinh có sự kết hợp giữa auxin (IAA) và cytokinin (zeatin) khi xây dựng quy trình tái sinh cho 3 giống cà chua cà múi TS, PT18,

93D4103 (Đỗ Xuân Đồng và *ctv.*, 2007). Kế thừa kết quả nghiên cứu trên (bảng 4), thí nghiệm này sử dụng môi trường có bổ sung BA ở nồng độ 2,0 mg/l và bổ sung thêm IAA với các nồng độ từ 0 - 0,3 mg/l.

Kết quả trên bảng 6 cho thấy: Việc kết hợp giữa BA và IAA đã làm tăng khả năng tái sinh của trụ hạ điệp so với sử dụng BA riêng rẽ. Trong khi công thức bổ sung riêng rẽ 2 mg/l BA chỉ cho tỷ lệ tái sinh chồi đạt 36,6% thì các công thức có bổ sung thêm IAA với nồng độ 0,05 - 0,2 mg/l đã làm tăng tỷ lệ tái sinh tạo chồi và dao động trong khoảng 45,8 - 70,0%. Môi trường bổ sung 2 mg BA/l và 0,2 mg IAA/l cho kết quả tái sinh tạo chồi là cao nhất và đạt 70,0%. Thêm vào đó, số chồi tái sinh trên môi trường này cũng đạt cao nhất (1,9 chồi/mẫu), chất lượng chồi tốt. Kết quả nghiên cứu này có sự trùng lặp hoàn toàn với kết quả của Sherkar và Chavan (2014) khi hai tác giả trên cũng xác định môi trường tái sinh phù hợp nhất cho trụ hạ điệp của giống cà chua Pusa ruby là MS có bổ sung 2 mg BA/l và 0,2 mg IAA/l. Mặc dù vậy, tỷ lệ mẫu tái sinh tạo chồi của giống cà chua Pusa ruby đạt tới 100%, số chồi đạt 1,3 chồi/mẫu cấy (Sherkar and Chavan, 2014). Trong khi đó, kết quả của Ishag và cộng tác viên (2009) lại cho thấy việc kết hợp giữa BA hoặc kinetin với IAA đã làm giảm khả năng tái sinh tạo chồi của cà chua *Lycopersicon esculentum* c.v. Omdurman (Ishag *et al.*, 2009). Như vậy, sự khác biệt về kiểu gen rõ ràng đã ảnh hưởng tới kết quả đáp ứng của mẫu cấy với chất điều hoà sinh trưởng (Gubis *et al.*, 2013).

Bảng 6. Ảnh hưởng của tổ hợp BA và IAA đến sự phát sinh hình thái cà chua Montavi (sau 6 tuần nuôi cấy)

Công thức	BA (mg/l)	IAA (mg/l)	Tỷ lệ tái sinh chồi (%)	Số chồi tái sinh (chồi/mẫu)	Chiều cao chồi (cm/chồi)	Số lá (lá/chồi)	Số rễ (rễ/cây)	Quan sát hình thái
CT1	2,0	0	36,6 ^a	0,93 ± 0,26 ^a	0,29 ± 0,1	0,7 ± 0,2 ^a	0,1 ± 0,1	Cây/callus khỏe, lá nhỏ, sinh trưởng tốt
CT2	2,0	0,05	46,6 ^{ab}	1,27 ± 0,32 ^{ab}	0,6 ± 0,16	1,47 ± 0,35 ^{ab}	0,1 ± 0,06	Cây/callus khỏe, lá nhỏ, sinh trưởng tốt
CT3	2,0	0,1	45,8 ^{ab}	1,17 ± 0,33 ^{ab}	0,4 ± 0,13	1,17 ± 0,35 ^{ab}	0,2 ± 0,17	Cây/callus khỏe, lá nhỏ, sinh trưởng tốt
CT4	2,0	0,2	70,0 ^b	1,9 ± 0,23 ^b	0,72 ± 0,12	2 ± 0,45 ^b	0,17 ± 0,12	Cây/callus khỏe, thân mập, lá to, sinh trưởng tốt
CT5	2,0	0,3	25,0 ^a	0,54 ± 0,13 ^a	0,43 ± 0,18	0,67 ± 0,27 ^a	0,63 ± 0,3	Cây/callus khỏe, lá nhỏ sinh trưởng tốt
<i>P</i> value			0,013	0,05	0,098	0,045	0,128	

IV. KẾT LUẬN

Đã xây dựng được hệ thống tái sinh cho cây cà chua Montavi. Khử trùng hạt giống cà chua Montavi với Presept 0,5% trong thời gian 10 phút là phù hợp nhất và cho kết quả 93,3% số hạt nảy mầm, chiều cao trung bình cây sau 14 ngày gieo hạt đạt 7,1 cm. Từ các kết quả nghiên cứu thành phần, nồng độ các chất điều tiết sinh trưởng bổ sung riêng rẽ hoặc kết hợp giữa BA, kinetin và IAA, đã xác định được môi trường MS + 30 g sucrose/l + 2 mg BA/l + 0,2 mg IAA/l là môi trường cho hiệu quả tái sinh chồi tốt nhất, tỷ lệ tạo chồi đạt 70%, số chồi tái sinh đạt 1,9 chồi/mẫu, chất lượng chồi tái sinh tốt.

LỜI CẢM ƠN

Nhóm tác giả xin cảm ơn sự hỗ trợ tài chính từ quỹ học bổng VNUA-Monsanto, Học viện Nông nghiệp Việt Nam và Đề tài khoa học và công nghệ trọng điểm cấp Học viện năm 2018 “Sử dụng hệ thống CRISPR/Cas9 tạo đột biến định hướng trên gen IAA9 ở cây cà chua”.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Hà Trần Minh Dũng, Dương Ngọc Kiều Thi, Lê Tấn Đức, Nguyễn Hữu Hồ, 2012. Thử nghiệm chuyển gen kháng sâu trên cây cà chua (*Lycopersicon esculentum* Mill.) *in vitro* bằng vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens*. *Tạp chí Khoa học - Trường Đại học Cần Thơ*, 24: 39-48.

- Đỗ Xuân Đồng, Chu Hoàng Hà, Lê Trần Bình, 2007. Nghiên cứu quy trình tái sinh và hệ thống chuyển gen cà chua (*Lycopersicon esculentum* Mill.) của Việt Nam. *Tạp chí Công nghệ Sinh học*, 5: 217-223.
- Abu-Qaoud H, 2015. *In vitro* regeneration of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Plant Cell Biotechnology and Molecular Biology*, 16: 181-190.
- Gubis J, Lajchova Z, Farago J, Rurekova Z, 2013. Effect of genotype and explant type on shoot regeneration in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) *in vitro*. *Czech J. Genet. Plant Breed*, 39: 9-14.
- Ishag S, Osman GM, Khalafalla M, Ishag S, 2009. Effects of growth regulators, explant and genotype on shoot regeneration in tomato (*Lycopersicon esculentum* c.v. Omdurman). *Int. J. Sustain. Crop Prod*, 4: 7-13.
- Kendon JP, Rajaovelona L, Sandford H, Fang R, Bell J, Sarasan V, 2017. Collecting near mature and immature orchid seeds for ex situ conservation: ‘*in vitro* collecting’ as a case study. *Botanical Studies*, 58: 1-14.
- Murashige T, Skoog F, 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15: 473-497.
- Rashid R, Bal SS, 2010. Effect of hormones on direct shoot regeneration in hypocotyl explants of tomato. *Notulae Scientia Biologicae*, 2: 70-73.
- Sherkar HD, Chavan AM, 2014. Studies on callus induction and shoot regeneration in tomato. *Science Research Reporter*, 4: 89-93.

Establishment of efficient *in vitro* regeneration protocol for Montavi tomato

Nguyen Minh Chien, Trang A Chinh, Dinh Truong Son

Abstract

There are many tomato breeding strategies, however, through the creation of transgenic tomatoes or through somaclonal variation are promised and widely used. Efficient protocol for tomato plant regeneration could contribute to creating transgenic or new tomato plants with desired agronomic properties. The purpose of this work is to establish the regeneration protocol for Montavi tomato variety. Montavi seeds were surface sterilized with Presept 0.5% for 10 minutes and then washed 3 - 4 times in autoclaved water. Sterilized seeds were placed on MS basal medium (Murashige and Skoog 1962) without plant growth regulators. 0.8-1cm-long excised hypocotyl segments were used as explants for shoot induction. Explants were placed on media supplied with different types of plant growth regulators (separate and/or in combination between 6-Benzylaminopurine, kinetin, and Indole-3-acetic acid). The most suitable media for callus and shoots regeneration was MS with 30 g sucrose/l and 2 mg BA/l and 0.2 mg IAA, the rate of shoot formation reaches 70%, number of shoots reaches 1.9 buds, regenerated buds were in good condition.

Keywords: Tomato, Montavi, *in vitro* regeneration

Ngày nhận bài: 20/4/2019

Ngày phản biện: 23/4/2019

Người phản biện: PGS. TS. Nguyễn Văn Giang

Ngày duyệt đăng: 15/5/2019

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

Lương Thị Ngọc Tú¹, Trần Đình Hợp¹, Trần Thị Thanh Phương¹,
Nguyễn Nữ Thanh Linh¹, Nguyễn Thị Thanh Tâm¹

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 $HgCl_2$ 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 GA3 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 $HgCl_2$ 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 $HgCl_2$ 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 GA₃, 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.

¹ Viện Khoa học kỹ thuật Nông nghiệp Bắc Trung Bộ