

XÂY DỰNG HỆ THỐNG TÁI SINH *IN - VITRO* CÂY KHOAI TÂY PHỤC VỤ CHỌN TẠO GIỐNG MỚI BẰNG KỸ THUẬT CHUYỂN GEN VÀ DUNG HỢP TẾ BÀO TRẦN

Study on Potato *In - vitro* Regeneration System for Gene Transferring and Protoplast Fusion

**Đinh Trường Sơn, Nguyễn Thị Phương Thảo, Nguyễn Thị Thanh Phương,
Nguyễn Thị Thu Thủy, Nguyễn Quang Thạch**

Viện Sinh học Nông nghiệp, Trường Đại học Nông nghiệp Hà Nội

TÓM TẮT

Nghiên cứu được tiến hành nhằm xây dựng qui trình tạo callus và tái sinh cây ở cây khoai tây. Đoạn thân và mô lá của dòng khoai tây Diamant ($2n = 4x$) và 3 dòng nhị bội A15, H1959/195, H1929/34 ($2n = 2x$) được nuôi cấy trên môi trường MS có bổ sung các loại đường glucose, sucrose, manitol và các chất điều tiết sinh trưởng α -NAA (0,1 - 0,5 ppm), 2,4-D (0,1 - 0,25 ppm); BA (1 - 3 ppm), Kinetin (0,5 - 3 ppm) riêng rẽ nhằm kích thích quá trình cảm ứng tạo callus và tái sinh chồi. Nhìn chung cảm ứng tạo callus diễn ra khá thuận lợi đối với đoạn thân và mô lá của tất cả các dòng khoai tây nghiên cứu với tỷ lệ mẫu tạo callus đạt khá cao từ 70 - 100% đối với giống Diamant và từ 21,4 - 97,5% đối với các giống nhị bội. Tỷ lệ tạo chồi cao nhất đạt 78,6% khi nuôi cấy đoạn thân của giống Diamant trên môi trường MS + 15 g sacaroza + 30 g manitol + 5 g glucoza + 2 mg BA/lít. Môi trường này cũng cho tỷ lệ tái sinh chồi từ đoạn thân dòng nhị bội H1959/195 cao nhất đạt 52,6%. Đoạn thân ở các vị trí khác nhau cho tỷ lệ sống và khả năng tái sinh chồi khác nhau, cao nhất đạt được với các đoạn thân ở vị trí gần gốc. Sinh trưởng và phát triển của các cây tái sinh *in-vitro* trên đồng ruộng không có sự sai khác so với cây đối chứng.

Từ khoá: Diploid, khoai tây Diamant, tái sinh.

SUMMARY

The investigation was conducted to develop a protocol for callus induction and plant regeneration of potato (*Solanum tuberosum* L). The internodal and leaf explants of the variety Diamant ($2n = 4x$) and 3 diploid clones A15, H1959/195, H1929/34 ($2n = 2x$) were cultured for callus induction and plant regeneration on MS medium supplemented with different types of sugars (sucrose, glucose, manitol) and various concentrations of α -NAA (0.1 - 0.5 ppm), 2,4 -D (0.1 - 0.25 ppm); BA (1 - 3 ppm) and kinetin (0.5 - 3 ppm). Of all cultivar and clones, the callusing response of both types of explants was rather high with the rate from 70.0% to 100% for Diamant and 21.4 - 97.5% for diploid clones. Highest shoot formation (78.6%) was obtained from calli derived from internodal explants of Diamant cultured on MS medium containing 15 g saccharose + 30 g manitol + 5 g glucose + 2 mg/l BA. This medium also gave the highest rate of shoot regeneration from internode induced calli of diploid clone H1959/195 (52.6%). The internodes excised from different position showed different results on survival rate and shoot regeneration. The highest survival rate was obtained with the basal internodes. The morphology of regenerated plants appeared to be similar to that of the control plants when grown in the field.

Key words: Diamant, diploid, potato, regeneration system.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Khoai tây là một trong bốn cây lương thực quan trọng, được xếp sau lúa, ngô và khoai lang ở nước ta. Khoai tây vừa là cây lương thực thực phẩm, vừa là cây rau có giá trị xuất khẩu.

Các nhà khoa học đã và đang nghiên cứu, ứng dụng hàng loạt các phương pháp hiện đại trên đối tượng cây khoai tây, như: các kỹ thuật chọn lọc bằng chỉ thị phân tử, nuôi cấy đỉnh sinh trưởng (meristem), chuyển gen, dung hợp tế bào trần (protoplast)... nhằm tạo ra những giống khoai tây mới với các đặc tính mong muốn. Trong đó, việc nghiên cứu xây dựng hệ thống tái sinh khoai tây được nhiều tác giả quan tâm vì đó là yêu cầu đầu tiên nhưng có ý nghĩa quyết định đến việc thành công của các phương pháp. James and cs. (2000) cho rằng, các dòng khoai tây khác nhau thì có khả năng tái sinh rất khác nhau. Các nghiên cứu chọn giống khoai tây có khả năng chống chịu virus nhờ dung hợp tế bào trần của Nguyễn Quang Thạch, Frei, Wenzel (1993) cho thấy, protoplast đã hình thành các mô sẹo và sau đó được chuyển sang môi trường tái sinh, tạo rễ và hình thành cây hoàn chỉnh.

Mục đích của nghiên cứu này nhằm tiến hành xây dựng hệ thống tái sinh cho một số dòng khoai tây nhập nội, tạo cơ sở cho kỹ thuật chuyển gen và dung hợp tế bào trần trong tạo giống khoai tây mới với năng suất chất lượng cao.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nguyên liệu

Giống khoai tây nuôi cấy mô Diamant và 3 dòng khoai tây nhị bội - diploid (A_{15} , $H_{1929/34}$, $H_{1959/195}$) sạch bệnh được nhập nội từ Đức.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phương pháp nuôi cấy mô tế bào thực vật

Cây khoai tây nuôi cấy mô có 8 lá, cao 7 cm, khối lượng đạt 0,8 g, sinh trưởng bình thường. Mô lá cắt theo kích thước 0,5 x 1 cm, đoạn thân không mang mắt ngủ được cắt theo chiều ngang dài từ 0,5 - 0,7 cm được nuôi cấy trên môi trường cơ bản MS (Murahige & Skoog, 1962) có bổ sung glucose, sucrose, manitol và chất điều tiết sinh trưởng BA, 2,4D, Kinetin, NAA. Môi trường nuôi cấy được điều chỉnh độ pH = 5,8 trước khi tiệt trùng và được khử trùng ở 120°C, 1,0 atm, trong thời gian 20 phút. Mẫu được nuôi ở nhiệt độ $25 \pm 2^\circ\text{C}$, cường độ chiếu sáng 2000 lux, thời gian chiếu sáng 16 h/ngày. Các công thức thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên, mỗi công thức thí nghiệm tiến hành 3 lần nhắc lại, một lần nhắc lại bố trí 5 bình/công thức, mỗi bình cấy 5 mẫu.

Các thí nghiệm đưa cây *in-vitro* ra ngoài vườn ươm: Các cây đạt tiêu chuẩn (cây cao trên 3,5 cm, có từ 4 - 5 rễ trở lên, rễ dài khoảng 2,5 - 3,0 cm) được trồng địa canh. Mỗi công thức nhắc lại 3 lần, mỗi lần nhắc lại trồng 40 cây (hàng cách hàng và cây cách cây 5 cm).

2.2.2. Phương pháp xử lý số liệu

Số liệu được xử lý thống kê sinh học theo chương trình IRRISTAT 4.0 và Microsoft Excel.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

3.1. Nghiên cứu tái sinh giống khoai tây Diamant (2n = 4x)

3.1.1. Ảnh hưởng của nền môi trường đến khả năng phát sinh hình thái của mô nuôi cấy

Các yếu tố của môi trường nuôi cấy, điều kiện nuôi cấy... có ảnh hưởng trực tiếp đến khả năng tái sinh của cây (Robert và cs., 1980) (Bảng 1).

Bảng 1. Ảnh hưởng của nền môi trường đến khả năng phát sinh hình thái của mô nuôi cấy (sau 8 tuần nuôi cấy)

CT	Loại mô	Tỷ lệ mẫu sống (%)	Đường hướng tái sinh của mẫu cấy			Hình thái mẫu nuôi cấy chồi tái sinh
			Tạo callus (%)	Tạo rễ (%)	Tạo chồi (%)	
CT1	Lá	100	0	0	0	Mô lá, mô thân không thay đổi so với ban đầu
	Thân	100	0	0	0	
CT2	Lá	100	100	3,3	0	Callus nhỏ xuất hiện ở hai đầu vết cắt
	Thân	100	100	0	0	

CT1 = MS + 30 g sacaroza (MS1)

CT2 = MS + 15 g sacaroza + 30 g manitol + 5 g glucoza/lít (MS2)

Theo Yee Shirley và cs. (2001), các chồi khoai tây có thể được tái sinh từ một mảnh cuống có kèm cả một phần mô lá hoặc một đoạn thân. Vì vậy, trong nghiên cứu này, cả mô lá và đoạn thân đã được sử dụng để nghiên cứu ảnh hưởng của nền môi trường đến khả năng phát sinh hình thái mô nuôi cấy.

Kết quả ở bảng 1 cho thấy, tỷ lệ sống của mẫu cấy đạt rất cao và đều đạt 100% trên các công thức môi trường. Đường manitol và glucoza tỏ ra có tác động kích thích rất mạnh đến khả năng phát sinh hình thái tạo callus của mẫu cấy. Công thức 1 chỉ bổ sung 30 g sacaroza không hề có sự tái sinh tạo callus trên cả 2 loại mẫu cấy (lá, đoạn thân) trong khi đó ở công thức 2 bổ sung 15 g sacaroza + 30 g manitol + 5 g glucoza/lít cho tỷ lệ tạo callus đều đạt 100% trên cả 2 loại mẫu cấy. Mặc dù, mẫu cấy chưa có hiện tượng tái sinh tạo chồi nhưng nền môi trường MS + 15 g sacaroza + 30 g manitol + 5 g glucoza/lít (MS2), sẽ được sử dụng cho các nghiên cứu tiếp theo.

3.1.2. Ảnh hưởng của các chất điều tiết sinh trưởng đến khả năng phát sinh hình thái của mô nuôi cấy giống khoai tây Diamant

Để điều khiển sự phát sinh hình thái của mô nuôi cấy, người ta bổ sung vào môi trường nuôi cấy hai nhóm chất điều tiết sinh

trưởng thực vật là auxin và cytokinin. Tỷ lệ hàm lượng hai nhóm chất này trong môi trường khác nhau sẽ tạo ra sự phát sinh hình thái khác nhau (Nguyễn Quang Thạch và cs., 2005). Trong nghiên cứu, các chất điều tiết sinh trưởng BA, 2,4D, Kinetin, NAA và một số tổ hợp đã được sử dụng (Bảng 2).

Kết quả bảng 2 cho thấy: trên môi trường có bổ sung 2,4D mẫu cấy là đoạn thân và mô lá chỉ tái sinh tạo callus và tạo rễ mà chưa hề tái sinh tạo chồi. Kết quả này hoàn toàn phù hợp bởi 2,4D là chất điều tiết sinh trưởng thuộc nhóm auxin.

Kết quả bảng 3, 4 cho thấy: BA, kinetin là hai chất kích thích sinh trưởng thuộc nhóm cytokinin, khi bổ sung riêng rẽ vào môi trường nuôi cấy, hai chất đều kích thích khả năng tái sinh tạo callus của mô thân (100%) và mô lá (75,2 - 100%), nhưng lại ức chế hoàn toàn khả năng tạo tạo rễ của mẫu cấy (tỷ lệ tạo rễ bằng 0).

Bổ sung BA đã kích thích khả năng tái sinh tạo chồi của mẫu cấy là mô thân mạnh hơn rất nhiều so với kinetin. Tỷ lệ mẫu cấy tái sinh tạo chồi ở thí nghiệm bổ sung 2,0 mg kinetin cao nhất chỉ đạt 16,0%, trong khi đó ở thí nghiệm bổ sung 2,0 mgBA/l đạt tới 78,6%. Mặt khác, trong môi trường bổ sung 2,0 mgBA mẫu cấy tái sinh chồi rất nhanh, chỉ sau khoảng 2 tuần chồi đã hình thành rõ ràng.

Bảng 2. Ảnh hưởng của 2,4-D đến khả năng phát sinh hình thái của mô nuôi cấy (theo dõi sau 8 tuần)

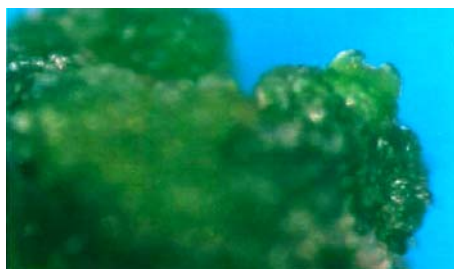
Công thức	Loại mô	Tỷ lệ sống (%)	Đường hướng phát sinh hình thái			Hình thái mô nuôi cấy
			Tạo callus (%)	Tạo rễ (%)	Tạo chồi (%)	
CT1 (MS2) (đối chứng)	Lá	100	100	3,3	0	Có xuất hiện callus nhỏ ở hai đầu vết cắt.
	Thân	100	100	0	0	
CT2 (MS2 + 0,10 mg 2,4-D/l)	Lá	100	100	7,3	0	Có xuất hiện callus ở hai đầu vết cắt. Callus có màu xanh, chắc.
	Thân	100	100	20,6	0	
CT3 (MS2 + 0,15 mg 2,4-D/l)	Lá	93,3	93,3	10,0	0	Càng tăng nồng độ 2,4-D thì callus càng to, càng ngả màu nâu và xốp.
	Thân	100	100	38,8	0	
CT4 (MS2 + 0,20 mg 2,4-D/l)	Lá	78,0	78,0	12,7	0	
	Thân	100	100	25,0	0	
CT5 (MS2 + 0,25 mg 2,4-D/l)	Lá	70,0	70,0	30,0	0	
	Thân	78,0	78,0	23,8	0	

Ghi chú: MS2 gồm: MS + 15 g sacaroza + 30 g manitol + 5 g glucoza/lít) (đối chứng)

Bảng 3. Ảnh hưởng của BA đến khả năng phát sinh hình thái của mô nuôi cấy (theo dõi sau 8 tuần)

Công thức	Loại mô	Tỷ lệ sống (%)	Đường hướng phát sinh hình thái			Hình thái mô nuôi cấy
			Tạo callus (%)	Tạo rễ (%)	Tạo chồi (%)	
CT1 (MS2) (đối chứng)	Lá	100	100	3,3	0	- Sau 20 ngày nuôi cấy, từ đoạn mô thân xuất hiện chồi.
	Thân	100	100	0	0	
CT2 (MS2 + 0,5 mgBA/l)	Lá	98,6	98,6	0	0	- Các mô lá không có khả năng tái sinh tạo chồi.
	Thân	100	100	0	20,3	
CT3 (MS2 + 1,0 mgBA/l)	Lá	96,2	96,2	0	0	- Mô tả sự tái sinh tạo chồi: ban đầu, mẫu cấy tạo callus và phình nhỏ ở hai đầu của đoạn thân. Khi soi trên kính hiển vi, sau 10 - 12 ngày chồi đã hình thành với 2 lá bao nhỏ, sau 2 tuần thì chồi có thể nhìn rõ bằng mắt thường (Hình 1, 2).
	Thân	100	100	0	45,8	
CT4 (MS2 + 1,5 mgBA/l)	Lá	92,8	92,8	0	0	
	Thân	100	100	0	60,1	
CT5 (MS2 + 2,0 mgBA/l)	Lá	88,6	88,6	0	0	
	Thân	100	100	0	78,6	
CT6 (MS2 + 2,5 mgBA/l)	Lá	82,3	82,3	0	0	
	Thân	100	100	0	75,3	
CT7 (MS2 + 3,0 mgBA/l)	Lá	75,2	75,2	0	0	
	Thân	100	100	0	70,7	

Ghi chú: MS2 gồm: MS + 15 g sacaroza + 30 g manitol + 5 g glucoza/lít) (đối chứng)



Hình 1. Callus tái sinh tạo cụm chồi (sau 10 - 12 ngày)



Hình 2. Động thái tái sinh qua các giai đoạn (2 tuần, 4 tuần, 6 tuần, 8 tuần)

Bảng 4. Ảnh hưởng của kinetin đến khả năng phát sinh hình thái của mô nuôi cấy (theo dõi sau 8 tuần)

Công thức	Loại mô	Tỷ lệ sống (%)	Đường hướng tái sinh			Tăng trưởng của chồi tái sinh	
			Tạo callus (%)	Tạo rễ (%)	Tạo chồi (%)	Chiều cao chồi (cm/cây)	Số lá (lá/cây)
CT1 (MS2) (đối chứng)	Lá	100	100	3,3	0	0	0
	Thân	100	100	0	0	0	0
CT2 (MS2 + 0,5 mg kinetin/l)	Lá	100	100	0	0	0	0
	Thân	100	100	0	10,0	0,1	1c
CT3 (MS2 + 1,0 mg kinetin/l)	Lá	100	100	0	0	0	0
	Thân	100	100	0	12,3	0,2	1c
CT4 (MS2 + 1,5 mg kinetin/l)	Lá	93,0	93,0	0	0	0	0
	Thân	100	100	0	14,7	0,4	2b
CT5 (MS2 + 2,0 mg kinetin/l)	Lá	90,0	90,0	0	0	0	0
	Thân	100	100	0	16,0	0,4	2b
CT6 (MS2 + 2,5 mg kinetin/l)	Lá	86,0	86,0	0	0	0	0
	Thân	100	100	0	15,0	0,6	2b
CT7 (MS2 + 3,0 mg kinetin/l)	Lá	80,0	80,0	0	0	0	0
	Thân	100	100	0	13,3	0,7	3a
CV (%)							3,7

Ghi chú: MS2 gồm: MS + 15 g sacaroza + 30 g manitol + 5 g glucoza/lít) (đối chứng)

Từ kết quả nghiên cứu trên, môi trường MS2 (MS + 15 g sacaroza + 30 g manitol + 5 g glucoza/lít) + 2,0 mg BA1, được sử dụng để nghiên cứu ảnh hưởng của vị trí lấy mẫu đến khả năng phát sinh hình thái của đoạn thân (Bảng 5).

Kết quả thí nghiệm trên bảng 5 cho thấy: đã có sự khác nhau rất rõ về khả năng phát sinh hình thái của các đoạn thân. Đoạn thân được cắt càng gần về phía gốc càng có tỷ lệ tạo rễ, tỷ lệ tái sinh tạo chồi và đặc biệt là số chồi tái sinh/mẫu cấy càng cao. Tỷ lệ mẫu tái sinh tạo chồi ở phần thân sát gốc đạt 94,4% cao gấp 1,88 lần so với ở phần thân gần ngọn. Số chồi tái sinh/mẫu cấy ở phần thân sát ngọn chỉ đạt 4,8 chồi/mẫu cấy trong khi đó ở các vị trí khác đạt 14,1 và 20,3 chồi, cao gấp 2,93 lần và 4,22 lần tương ứng.

Kết quả thí nghiệm trên bảng 6 cho thấy:

- Có sự khác nhau về sinh trưởng giữa các thể hệ cây tái sinh khác nhau. Cây ở những thể hệ đầu tiên sinh trưởng chậm và có hiện tượng phân nhánh (số nhánh đạt 1,3, 0,9 và 0,2/cây).

Nhìn chung, cây tái sinh từ thể hệ thứ 4 trở đi đã có các chỉ tiêu sinh trưởng và khả năng tạo củ là tương tự nhau và khá ổn định (thể hệ 4, thể hệ 5) khi so sánh với cây đối chứng.

Thí nghiệm cho thấy, cây tái sinh có khả năng sinh trưởng và phát triển tương đương như cây đối chứng. Hầu hết các chỉ tiêu theo dõi chỉ biến động nhẹ. Qua đó cho thấy, cây tái sinh hoàn toàn không có biến đổi về mặt hình thái so với cây không qua tái sinh khi tiến hành theo dõi ngoài đồng (Hình 3, 4).

Bảng 5. Ảnh hưởng của vị trí lấy mẫu đến khả năng phát sinh hình thái của đoạn thân (theo dõi sau 8 tuần)

Vị trí lấy mẫu (đoạn thân) nuôi cấy	Tỷ lệ mẫu sống (%)	Đường hướng tái sinh			Sinh trưởng của chồi tái sinh		Số chồi tái sinh/mẫu cấy (chồi)
		Tạo callus (%)	Tạo rễ (%)	Tạo chồi (%)	Chiều cao cây (cm/cây)	Số lá (lá/cây)	
Phần ngọn	90,2	90,2	0	50,2	0,6	2,1b	4,8c
Phần giữa	100	100	4,7	89,8	1,4	3,7a	14,1b
Phần gốc	100	100	6,9	94,4	1,6	3,8a	20,3a
CV (%)						3,9	4,3
LSD (0,05)						0,207	1,09

Ghi chú: a, b, c trong một cột biểu thị sự sai khác có ý nghĩa thống kê ($P < 0,05$)

Bảng 6. Sự sinh trưởng ở các thế hệ sau tái sinh (số lần nhân nhanh) và khả năng tạo củ in-vitro của cây tái sinh so với cây đối chứng

Thế hệ	Chiều cao cây (cm/cây)	Số lá/ thân chính (lá/ thân)	Số nhánh (nhánh/cây)	Chiều dài rễ (cm/cây)	Khối lượng/ thân chính (g/thân)	Khả năng tạo củ in - vitro	Quan sát hình thái (Đánh giá qua quan sát màu sắc lá, hình thái rễ,... của cả thân chính và nhánh)
Đ/C	7,5a	8,2a	0	9,5a	0,78	Cây đều ra củ bình thường	Cây sinh trưởng bình thường
TH 1	5,7c	6,2c	1,3	6,7c	0,51	được tạo củ trong điều kiện in- vitro, trung bình 1 củ/cây	Cây sinh trưởng bình thường, thân mập, nhánh sinh trưởng rất mạnh
TH 2	6,8b	7,7b	0,9	7,3b	0,62		Cây sinh trưởng bình thường, thân mập, nhánh sinh trưởng mạnh
TH 3	7,5a	8,0ab	0,2	9,5a	0,72		Cây sinh trưởng bình thường, thân mập, nhánh sinh trưởng rất chậm
TH 4	7,8a	8,2ab	0	9,5a	0,81		Cây sinh trưởng bình thường
TH 5	7,8a	8,3a	0	9,5a	0,82		Cây sinh trưởng bình thường
CV (%)	2,5	2,7	3,9	3,3			
LSD _{0,05}	0,32	0,36		0,508			

Ghi chú: Đ/C: Cây đối chứng

TH 1: Cây tái sinh sau 1 lần cấy chuyển (thế hệ 1)

TH 2: Cây tái sinh sau 2 lần cấy chuyển (thế hệ 2)

a, b, c: trong một cột biểu thị sự sai khác có ý

nghĩa thống kê ($P < 0,05$)

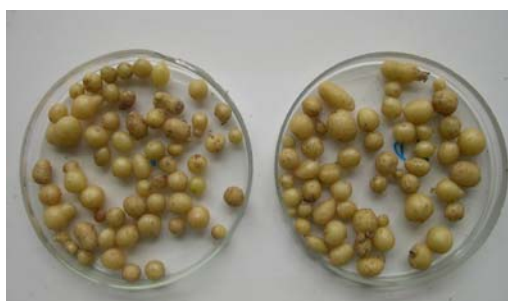
TH 3: Cây tái sinh sau 3 lần cấy chuyển (thế hệ 3)

TH 4: Cây tái sinh sau 4 lần cấy chuyển (thế hệ 4)

TH 5: Cây tái sinh sau 5 lần cấy chuyển (thế hệ 5)

Bảng 7. So sánh sự sinh trưởng, phát triển và khả năng hình thành củ của cây tái sinh với cây đối chứng ngoài đồng ruộng (thời gian trồng từ ngày 01/02 đến 21/04/2004)

Công thức	Chiều cao cây (cm/cây)	Số nhánh (nhánh/cây)	Đường kính thân chính (cm)	Số lá (lá/cây)	Diện tích lá (cm ² /cây)	Số củ (củ/cây)	Khối lượng trung bình củ (g/củ)	Quan sát hình thái củ
Cây tái sinh	38,5	3,5	0,44	47,3	1206,8	7,3	2,8	Bình thường
Cây đối chứng	41,6	3,2	0,47	43,8	1225,1	7,5	2,9	Bình thường



Hình 3. Củ microtuber
Từ cây tái sinh (phải) –
Từ cây đối chứng (trái)



Hình 4. Củ minituber
Từ cây tái sinh (phải) –
Từ cây đối chứng (trái)

3.2. Nghiên cứu tái sinh trên các giống khoai tây nhị bội diploid (2n = 2x)

Thí nghiệm sử dụng nền môi trường cho tỷ lệ tái sinh chồi tốt nhất của giống khoai tây Diamant là MS + 15 g sacaroza + 30 g manitol + 5 g glucoza/lít + 2,0 mg BA/l để khảo sát khả năng phát sinh hình thái của đoạn thân từ các dòng nhị bội A₁₅, H_{1959/195}, H_{1929/34}.

Theo Jhon và cs. (1992), các giống khác nhau có kiểu gen khác nhau thì điều kiện tái sinh không giống nhau. Kết quả cũng tương tự khi thí nghiệm sử dụng 3 giống nhị bội A₁₅, H_{1959/195}, H_{1929/34} thì chỉ có giống H_{1959/195} có phản ứng khá mạnh, tỷ lệ tạo chồi đạt 52,6%, còn các giống A₁₅, H_{1929/34} chỉ tạo callus nhỏ mà không tạo chồi (Bảng 8).

Với nền môi trường MS2, khi bổ sung vào môi trường nghiên cứu tổ hợp BA và αNAA tỷ lệ tạo callus của mô lá rất cao, đạt 77,7% - 89,6% trên dòng H_{1959/195} và 80,5% -

97,5% trên dòng A₁₅ so với đối chứng chỉ khoảng 20%. Nghiên cứu cũng cho thấy, đã có hiện tượng tái sinh tạo chồi từ mô lá của dòng H_{1959/195} nhưng rất thấp, chỉ đạt 2,8% (CT1-4) và 3,8% (CT1-5). Còn trên dòng A₁₅ mô lá chưa tái sinh tạo chồi (Bảng 9).

Hệ thống tái sinh cho cây khoai tây đã được James và cs. (2002) nghiên cứu. Kết quả cho thấy, sự tái sinh tạo chồi được hình thành trên các đoạn thân của 12 giống.

Quá trình tái sinh tạo chồi được xảy ra qua 2 giai đoạn:

(1) Các đoạn thân được nuôi cấy trên môi trường cảm ứng tạo chồi trong 07 ngày;

(2) Sau đó được cấy chuyển sang môi trường tạo chồi. Tương tự như vậy, callus tạo ra từ mô lá các giống nhị bội trên môi trường MS2 có bổ sung 4 mg BA/l + 0,2 mg αNAA/l sau 5 tuần được cấy chuyển sang môi trường MS2 + 2 mg BA/l (Bảng 10).

Bảng 8. Khả năng phát sinh hình thái từ đoạn thân của các dòng khoai tây diploid (sau 6 tuần nuôi cấy)

Tên giống	Tỷ lệ mẫu sống (%)	Đường hướng tái sinh			Sinh trưởng của chồi tái sinh		Hình thái mô nuôi cấy
		Tạo callus (%)	Tạo rễ (%)	Tạo chồi (%)	Chiều cao cây (cm/cây)	Số lá (lá/cây)	
A ₁₅	100	72,5	0	0	0	0	Callus xanh, nhỏ ở hai đầu vết cắt
H _{1959/195}	100	85,9	0	52,6	0,7	2,0	Lúc đầu callus nhỏ xuất hiện ở hai đầu vết cắt, sau đó chồi xuất hiện
H _{1929/34}	100	42,8	0	0	0	0	Callus xanh, nhỏ ở hai đầu vết cắt

Bảng 9. Ảnh hưởng của tổ hợp BA và 0,2 mg αNAA/lít đến khả năng phát sinh hình thái mô lá của các dòng diploid (sau 5 tuần nuôi cấy)

Công thức	Tên giống	Tỷ lệ mẫu sống (%)	Đường hướng tái sinh			Sinh trưởng của chồi tái sinh		Hình thái mô nuôi cấy
			Tạo callus (%)	Tạo rễ (%)	Tạo chồi (%)	Chiều cao cây (cm/cây)	Số lá (lá/cây)	
CT1-1	A ₁₅	100	28,5	8,5	0	0	0	- Ở công thức đối chứng, callus sùi nhỏ, màu xanh ở đầu vết cắt
	H _{1959/195}	100	21,4	5,7	0	0	0	
CT1-2	A ₁₅	95,5	94,0	8,9	0	0	0	- Còn ở các công thức có bổ sung BA và αNAA, callus sùi to, chắc. Callus của A ₁₅ có màu xanh, của H _{1959/195} có màu xanh đậm, hoặc xanh đen
	H _{1959/195}	100	86,1	7,6	0	0	0	
CT1-3	A ₁₅	100	97,5	3,7	0	0	0	
	H _{1959/195}	98,5	87,8	2,9	0	0	0	
CT1-4	A ₁₅	95,2	92,0	1,5	0	0	0	
	H _{1959/195}	98,5	88,5	4,3	2,8	0,1	1,0	
CT1-5	A ₁₅	88,8	84,1	0	0	0	0	
	H _{1959/195}	98,7	89,6	0	3,8	0,1	1,0	
CT1-6	A ₁₅	86,1	80,5	0	0	0	0	
	H _{1959/195}	95,8	77,7	0	0	0	0	

Ghi chú:

CT1-1 = MS2

= MS + 15 g sacaroza + 30 g manitol + 5 g glucoza/lít

CT1-2 = MS2 + 1 mg BA/l + 0,2 mg αNAA/l

CT1-3 = MS2 + 2 mg BA/l + 0,2 mg αNAA/l

CT1-4 = MS2 + 3 mg BA/l + 0,2 mg αNAA/l

CT1-5 = MS2 + 4 mg BA/l + 0,2 mg αNAA/l

CT1-6 = MS2 + 5 mg BA/l + 0,2 mg αNAA/l

Bảng 10. Ảnh hưởng của BA đến khả năng tái sinh tạo chồi từ callus của mô lá các dòng diploid (sau 4 tuần nuôi cấy)

Công thức	Tên giống	Tỷ lệ mẫu sống (%)	Đường hướng tái sinh		Sinh trưởng của chồi tái sinh		Hình thái mô nuôi cấy
			Tỷ lệ callus tạo chồi (%)	Chiều cao chồi (cm)	Số lá (lá/chồi)	Số chồi TB/mẫu (chồi/mẫu)	
CT1	A ₁₅	100	0	0	0	0	Callus từ lá của giống H _{1959/195} tạo chồi mạnh
	H _{1959/195}	100	0	0	0	0	
CT2	A ₁₅	100	0	0	0	0	Callus từ lá của giống H _{1959/195} tạo chồi mạnh
	H _{1959/195}	100	66,6	1,2a	1,0	3,3a	
CT3	A ₁₅	100	0	0	0	0	Callus từ lá của giống H _{1959/195} tạo chồi mạnh
	H _{1959/195}	100	71,4	1,4d	1,0	6,0c	
CT4	A ₁₅	100	0	0	0	0	Callus từ lá của giống H _{1959/195} tạo chồi mạnh
	H _{1959/195}	100	66,6	0,9b	1,0	5,5b	
CT5	A ₁₅	100	0	0	0	0	Callus từ lá của giống H _{1959/195} tạo chồi mạnh
	H _{1959/195}	100	42,8	0,7c	1,0	4,3a	
CV%				2,2		2,5	
LSD _{0,05}				0,075		0,216	

Ghi chú: CT1 = MS2 = MS + 15 g sacaroza + 30 g manitol + 5 g glucoza/lít

CT2 = MS2 + 1 mg BA/l

CT3 = MS2 + 2 mg BA/l

CT4 = MS2 + 3 mg BA/l

CT5 = MS2 + 4 mg BA/l

Việc cấy chuyển callus từ mô sang môi trường mới đã cải tạo đáng kể tỷ lệ tái sinh tạo chồi của mẫu cấy dòng H_{1959/195}. Cụ thể, tỷ lệ tái sinh tạo chồi từ 2,8 - 3,8% đã tăng lên 42,8 - 71,4%, trong đó cao nhất ở công thức CT3 (MS2 + 2 mg BA/l) đạt 71,4% với 6 chồi/mẫu cấy. Bên cạnh đó thì callus từ mẫu lá dòng A15 lại không hề tái sinh tạo chồi (tỷ lệ tạo chồi bằng 0) ở tất cả các công thức.

4. KẾT LUẬN

Trên cùng một môi trường MS2 (MS + 15 g sacaroza + 30 g manitol + 5 g glucoza) + 2 mg BA/lít, đoạn thân giống khoai tây Diamant có tỷ lệ mẫu tạo chồi đạt khá cao 78,6%, giống nhị bội H1959/195 đạt 52,6%, còn đoạn thân các giống A15 và H1929/34 lại không tạo chồi; đoạn thân giống Diamant có vị trí càng gần gốc thì cho tỷ lệ sống và khả năng tái sinh chồi càng cao (tỷ lệ sống đạt 100%, tỷ lệ mẫu tái sinh tạo chồi đạt 94,4%, số chồi tái sinh/mẫu cấy đạt 20,3 chồi).

Trong các môi trường nghiên cứu, mô lá của giống Diamant không hề có sự tái sinh tạo chồi.

Chồi đã được tái sinh trực tiếp từ mô lá của dòng H1959/195 trên môi trường MS2 + 3 mg BA/l + 0,2 mg αNAA/l rất thấp chỉ đạt 3,8%. Nhưng khi callus từ mô lá được đặt vào môi trường MS2 + 2 mg BA/l tỷ lệ tái sinh tạo chồi đã tăng lên rất nhiều 71,4%, trong khi đó mô lá và calus từ mô lá của các dòng nhị bội A15 và dòng H1929/34 cũng không có sự tái sinh tạo chồi.

Khi so sánh cây tái sinh với cây mẹ thì cây tái sinh giữ được toàn bộ các đặc tính nông sinh học của cây mẹ trong điều kiện nuôi cấy *in-vitro* và khi trồng trên đồng ruộng.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

James F. Hutchinson, Daniel Isenegger, Savitri Nadesan, Neil Smith and Peter

- (2000). Waterhouse Potato biotechnology – achievements and opportunities IHD at Potatoes "Linking research to practice" pp. 3-5.
- Jhon S. Hulme, Elaine S. Hinngins and Robert Shields (1992). An efficient genotype - independent method for regeneration of potato plants from leaf tissue, *Plant cell tissue and organ culture* Volum 31, Issue 2.
- Nguyễn Quang Thạch, Nguyễn Thị Lý Anh, Nguyễn Thị Phương Thảo (2005). Giáo trình Công nghệ sinh học nông nghiệp, tr. 56.
- N.Q.Thach, Frei, and G.Wenzel (1993) "Somatic fusion for combining virus resistances in *Solanum tuberosum* L". *Theoretical and applied genetics*. pp. 863 - 867.
- Robert L. Jarret, Paul M. hasegawa, Homer T. Erickson (1980): Factors affecting shoot initiation from tuber discs of potato (*Solanum tuberosum*), *Physiologia Plantrum* Volume 49 Issue 2, pp. 177 -184.