

Ảnh hưởng của điều kiện ánh sáng và thành phần dinh dưỡng (đường, benzyl adenine, chlorocholine chloride) đến sự tạo củ bi Khoai tây (*Solanum tuberosum* L.) trong nuôi cấy *in vitro*

Nguyễn Thị Thu Hằng¹, Trịnh Thị Lan Anh¹,
Nguyễn Văn Kết¹, Nguyễn Trung Thành^{2,*}

¹Khoa Nông Lâm, Trường Đại Học Đà Lạt, Đà Lạt, Lâm Đồng, Việt Nam

²Khoa Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQĐHN, 334 Nguyễn Trãi, Hà Nội, Việt Nam

Nhận ngày 08 tháng 1 năm 2015

Chỉnh sửa ngày 06 tháng 3 năm 2015; Chấp nhận đăng ngày 6 tháng 8 năm 2015

Tóm tắt: Trong thí nghiệm này 4 nồng độ đường sucrose (25, 50, 75, 100g/l), 4 nồng độ Benzyl adenine (BA) (0, 2, 4, 6mg/l) và 4 nồng độ Chlorocholine chloride (0, 100, 150, 200mg/l) kết hợp với 2 điều kiện ánh sáng khác nhau là ở 16h chu kỳ quang và điều kiện tối hoàn toàn. Kết quả cho thấy sản xuất củ bi trong ống nghiệm ở điều kiện chiếu sáng 16h chu kỳ quang có hiện tượng củ bi mọc mầm ngay, còn trong điều kiện tối hoàn toàn với nồng độ đường (75 g/l) số củ hình thành/bình cao hơn so với các nồng độ đường khác, với kết quả trên chúng tôi sử dụng nồng độ đường 75g/l kết hợp với các nồng độ BA và nồng độ CCC. Qua quan sát chúng tôi nhận thấy ở nồng độ BA (4mg/l) và nồng độ 150mg/l CCC có số củ hình thành cao hơn.

Từ khóa: Benzyl adenine, sucrose, chlorocholine chloride, *Solanum tuberosum* L.

1. Giới thiệu

Ở nước ta cây Khoai tây là nhóm cây lương thực có tầm quan trọng thứ ba sau Lúa và Ngô. Khoai tây có thời gian sinh trưởng ngắn, từ 80 - 100 ngày, nhưng có khả năng cho năng suất từ 15 - 30 tấn củ/ha với giá trị dinh dưỡng cao. Trong quá trình phát triển kinh tế xã hội, nhu cầu tiêu thụ khoai tây của thị trường nói chung, đặc biệt là các đô thị, khu công nghiệp và khu du lịch, sẽ ngày càng tăng.

Khoai tây alantic là giống khoai tây có chất lượng chế biến khoai tây chips rất tốt, được

trồng rộng rãi ở một số nước có điều kiện thích hợp để làm nguyên liệu (Mỹ, Canada, Úc, Trung Quốc, Châu Âu).

Việt Nam có khả năng phát triển mạnh khoai tây, nhất là ở vùng đồng bằng Bắc Bộ, miền núi phía Bắc, Bắc Trung Bộ và Tây Nguyên. Ước tính, ít nhất có vào khoảng 200.000 ha đất có thể trồng được khoai tây. Tuy nhiên, những năm gần đây, diện tích trồng khoai tây chỉ dao động trong khoảng 30.000 - 35.000 ha với năng suất bình quân khoảng từ 10 - 11 tấn/ha. Một trong những nguyên nhân chủ yếu dẫn đến năng suất thấp và diện tích trồng giảm dần là do thiếu nguồn củ giống tốt, củ giống được nhân giống theo phương pháp truyền thống là sử dụng củ giống từ vụ mùa trước làm

* Tác giả liên hệ. ĐT: 84-914373627.
Email: thanhntsh@gmail.com

giống cho vụ mùa sau do vậy chất lượng thấp (tỷ lệ nhiễm bệnh do virus, nấm cao, độ thuần chủng thấp) [1].

Ngày nay với kỹ thuật nuôi cấy thực vật mô đã hạn chế được các nhược điểm trên và cây Khoai tây ống nghiệm được sản xuất để đáp ứng nhu cầu, tuy nhiên cây con Khoai tây trong ống nghiệm có tỷ lệ chết cao khi vận chuyển, trong quá trình thích nghi với khí hậu và khi trồng ra đồng ruộng. Vì vậy, cần có một nguồn nguyên liệu thay thế để làm giảm tỷ lệ chết là sản xuất củ bi siêu nhỏ. Củ bi siêu nhỏ có thể được lưu trữ trong khoảng thời gian lâu hơn, việc xử lý và vận chuyển dễ dàng hơn so với cây con, do đó có thể là một vật liệu nhân giống lý tưởng [2].

Chúng có thể được trực tiếp gieo vào đất và có thể được sản xuất với số lượng lớn trong bất cứ mùa nào. Chúng có đặc điểm hình thái học và sinh hóa tương tự như củ khoai tây được sản xuất ngoài đồng ruộng [3].

Số lượng và kích thước của củ bi được sản xuất ra phụ thuộc vào nhiều yếu tố, như nồng độ tối ưu của đường, chất kích thích sinh trưởng và các chất kìm hãm sinh trưởng trong môi trường nuôi cấy [4]. Trong số các chất được sử dụng để tạo củ bi thì coumarin, CCC và cytokinin được chú ý nhiều nhất, [4, 5]. Chất kìm hãm sinh trưởng kích thích tạo củ của thực vật dưới điều kiện môi trường không thuận lợi [6] và CCC được sử dụng nhiều trong môi trường nuôi cấy để kích thích tạo củ bi trong ống nghiệm [6, 7].

Với mục đích là tìm ra điều kiện ánh sáng cũng như nồng độ tối ưu nhất của các chất được sử dụng trong thí nghiệm này ảnh hưởng đến sự tạo củ bi trong ống nghiệm.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Mẫu cấy

Nguồn mẫu sử dụng trong nghiên cứu này

là cây khoai tây giống Atlantic *in vitro* được nhân chuyên trên môi trường ½ MS [8], sau khi cây phát triển khoảng 6 đốt dùng làm thí nghiệm. Đối với những cây có 6 đốt, quá trình tạo củ sẽ nhanh hơn [7] và tạo được nhiều củ *in vitro* hơn so với cây ít đốt hơn.

Tuổi sinh lý

Cây con được nuôi cấy ít nhất 4 tuần ở điều kiện 16h chu kỳ quang sẽ cho sự phát triển tạo củ bi nhanh nhất và làm tăng trọng lượng tươi của củ bi [9].

Môi trường nuôi cấy

Môi trường tạo củ bi khoai tây: môi trường lỏng MS [8] có bổ sung đường với nồng độ (25, 50, 75 và 100g/l), BA (0, 2, 4 và 6mg/l) và CCC (0, 100, 150 và 200mg/l). Được điều chỉnh pH = 5,7 ± 0,1; hấp khử trùng trong autoclave ở áp suất 1atm trong thời gian 25 phút ở 121°C.

Điều kiện thí nghiệm

Các thí nghiệm *in vitro* được tiến hành ở điều kiện nhiệt độ trung bình là 25 ± 2°C với 2 điều kiện ánh sáng khác nhau là ở 16h chu kỳ quang bằng đèn huỳnh quang với cường độ ánh sáng là 2500 - 3000 lux và điều kiện trong tối hoàn toàn. Độ ẩm trung bình từ 75 - 80%.

Thiết kế hệ thống nuôi cấy

Bình thủy tinh tam giác 100ml được rót 20ml môi trường cấy chuyên, sau đó đậy nắp nylon chịu nhiệt và buộc thun. Nắp nylon được đục lỗ thoáng khí có đường kính 1cm và sử dụng màng lọc Millipore dán lên phần đục lỗ thoáng khí, màng lọc Millipore có đường kính 2cm và có đường kính lỗ trên màng 0,5 μm do hãng Millipore, Tokyo, Japan sản xuất.

Thay môi trường tạo củ bi

Sau 2 tuần nuôi cấy trong bình thủy tinh tam giác 100ml, cây phát triển hoàn chỉnh và có khoảng 6 đốt, môi trường còn dư trong bình sẽ

được đổ ra và rót vào 40ml môi trường tạo củ bi. Các thao tác trên được thực hiện trong tủ cấy vô trùng.

Thiết kế thí nghiệm

Thí nghiệm 1: Khảo sát ảnh hưởng của các nồng độ đường, BA, CCC khác nhau ở điều kiện chiếu sáng 16h/ngày lên sự tạo củ bi trong ống nghiệm.

Thí nghiệm 2: Khảo sát ảnh hưởng của các nồng độ đường, BA, CCC khác nhau ở điều kiện trong tối hoàn toàn lên sự tạo củ bi trong ống nghiệm.

Các chỉ tiêu theo dõi: thời gian tạo củ, số củ hình thành/bình, trọng lượng tươi, kích thước củ bi.

Xử lý số liệu

Mỗi nghiệm thức được lặp lại 3 lần. Kết quả theo dõi từ ngày thứ 10 cho đến khi củ bi phát triển hoàn chỉnh, số liệu được phân tích sau 45 ngày nuôi cấy (tính từ lúc thay môi trường tạo củ). Giá trị trung bình của mỗi nghiệm thức được xác định bằng phần mềm Microsoft Excel 2003. Các giá trị trung bình được so sánh với nhau theo phương pháp LSD (Least significant difference).

3. Kết quả và thảo luận

3.1. Ảnh hưởng của điều kiện chiếu sáng 16h/ngày kết hợp với các thành phần dinh dưỡng lên sự tạo củ bi trong nuôi cấy *in vitro*

3.1.1. Ảnh hưởng của các nồng độ đường sucrose khác nhau

Kết quả nghiên cứu được chỉ ra ở Bảng 1, cho thấy với nồng độ đường (25, 50g/l) không tạo củ, trong khi đó với nồng độ đường 75g/l cho thời gian tạo củ sớm hơn so với ở nồng độ đường 100g/l, số củ hình thành của 2 nồng độ

đường (75, 100g/l) cho kết quả không khác biệt (Hình 1).

Bảng 1. Ảnh hưởng của nồng độ đường ở điều kiện chiếu sáng 16h/ngày

Nghiệm thức	Thời gian tạo củ (ngày)	Số củ hình thành/bình
25	0.00 c	0.00 b
50	0.00 c	0.00 b
75	20.22 a	2.33 a
100	22.56 b	2.56 a



Hình 1. Ảnh hưởng của đường ở điều kiện chiếu sáng 16h/ngày.

3.1.2. Ảnh hưởng của các nồng độ BA khác nhau

Khi sử dụng đường ở nồng độ 75g/l kết hợp với các nồng độ BA khác nhau, thời gian tạo củ sớm nhất là ở nồng độ 6mg/l, tuy nhiên số lượng củ ở các nghiệm thức không có sự khác biệt. Kết quả được chỉ ra ở Bảng 2 và Hình 2.

Bảng 2. Ảnh hưởng của nồng độ BA ở điều kiện chiếu sáng 16h/ngày

Nghiệm thức	Thời gian tạo củ (ngày)	Số củ hình thành/bình
0	20.22 b	2.44 a
2	22.11 d	2.67 a
4	21.33 c	2.78 a
6	19.56 a	2.44 a



Hình 2. Ảnh hưởng của BA ở điều kiện chiếu sáng 16h/ngày.

3.1.3. Ảnh hưởng của các nồng độ CCC khác nhau

Theo kết quả ở Bảng 3, cho thấy ở các nồng độ CCC (150, 200mg/l) cho thời gian tạo củ sớm hơn tuy nhiên số củ hình thành giữa các nghiệm thức không có sự khác biệt.

Bảng 3. Ảnh hưởng của nồng độ CCC ở điều kiện chiếu sáng 16h/ngày

Nghiệm thức	Thời gian tạo củ (ngày)	Số củ hình thành/bình
0	20.00 c	2.56 a
100	18.33 b	2.67 a
150	17.78 a	2.56 a
200	17.11 a	2.78 a

Khi tạo củ bi khoai tây ở điều kiện chiếu sáng 16h chu kỳ quang củ bi được tạo ra đều có màu xanh và mọc mầm ngay (Hình 3) do vậy tạo củ bi ở điều kiện này không đem lại hiệu quả trong việc sản xuất củ giống và làm nguồn

lưu trữ, theo [5] GA₃ được tổng hợp ức chế cảm ứng tạo củ [9] có thể là do tổng hợp của các solanin alkaloid, hiện tượng tương tự này đã được công bố [10].



Hình 3. Ảnh hưởng của CCC ở điều kiện chiếu sáng 16h/ngày.

3.2. Ảnh hưởng của điều kiện chiếu sáng tới hoàn toàn kết hợp với các thành phần dinh dưỡng lên sự tạo củ bi trong nuôi cấy in vitro

3.2.1. Ảnh hưởng của các nồng độ đường sucrose khác nhau

Kết quả trên chúng tôi nhận thấy rằng thời gian tạo củ, số củ hình thành, trong lượng và kích thước củ có sự khác biệt rõ ràng giữa 4 nghiệm thức, ở nồng độ đường 75g/l cho thời gian tạo củ sớm nhất (13,44 a) nồng độ đường 25g/l không có khả năng tạo củ, nồng độ đường cao hơn hoặc thấp hơn 75g/l sẽ cho thời gian tạo củ dài hơn (Hình 4). Trọng lượng và kích thước của củ bi phụ thuộc vào thời gian tạo củ, thời gian tạo củ sớm hơn sẽ cho trọng lượng và kích thước củ hữu hiệu lớn hơn, Bảng 4.

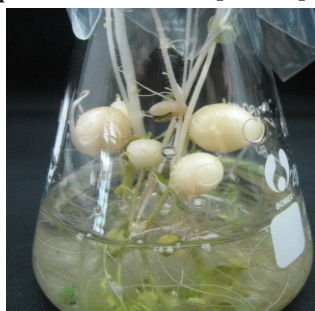
Bảng 4. Ảnh hưởng của nồng độ đường trong điều kiện tối hoàn toàn

NT	Thời gian tạo củ (ngày)	Số củ hình thành/ bình	Trọng lượng củ			Kích thước		
			<200 (mg)	200 - 400 (mg)	>400 (mg)	<3 (mm)	3-5 (mm)	>5 (mm)
25	0,00 d	0,00 c	0,00 c	0,00 b	0,00 c	0,00b	0,00 c	0,00 d
50	35,22 c	4,22 b	2,11 a	0,56 b	1,56 b	1,33 a	1,56 a	1,67 c
75	13,44 a	5,67 a	0,56 b	1,33 ab	3,89 a	0,33 b	1,11 ab	4,22 a
100	16,22 b	4,44 b	0,89 b	2,33 a	1,78 b	1,56 a	0,56 bc	2,33 b

Demet and Tahsin (2010) đã báo cáo rằng ở nồng độ đường cao có thể gây ra sự hình thành của các cơ quan phụ trong các loài thực vật khác nhau, chẳng hạn như củ khoai tây [11].

Đường rất cần thiết trong ống nghiệm như một nguồn năng lượng hoặc một tác nhân tiềm năng thẩm thấu và ở nồng độ cao nó đóng vai trò như là một tín hiệu cho sự hình thành củ bi dẫn đến sự gia tăng về số lượng củ khi nuôi cấy khoai tây [4, 11].

Việc sử dụng của nồng độ đường (8%) mà không bổ sung chất kích thích sinh trưởng thực vật thuận lợi cho việc tạo củ bi làm tăng số lượng, trọng lượng của củ bi so với nồng độ đường thấp hơn (4%). Tuy nhiên, sự gia tăng nồng độ lên đến 12% sẽ làm chậm thời gian tạo củ và kết quả là củ nhỏ hơn, [11, 12].



Hình 4. Ảnh hưởng của đường ở điều kiện tối hoàn toàn.

Bảng 5. Ảnh hưởng của nồng độ BA ở điều kiện tối hoàn toàn

NT	Thời gian tạo củ (ngày)	Số củ hình thành/ bình	Trọng lượng củ			Kích thước		
			< 200 (mg)	200-400 (mg)	> 400 (mg)	< 3 (mm)	3-5 (mm)	> 5 (mm)
0	13,22 a	6,00 a	0,67 c	1,56 ab	3,78 a	0,44 c	1,67 a	3,89 a
2	26,78 b	4,33 c	1,78 b	1,44 ab	1,44 bc	1,22 bc	1,11 a	2,11 b
4	27,33 bc	5,33 ab	3,11 a	1,33 b	1,22 b	2,11 ab	1,22 a	2,11 b
6	28,67 c	5,11 b	2,56 a	1,89 a	0,89 b	2,22 a	1,56 a	1,00 c

Cytokinin được coi là một yếu tố quan trọng cho quá trình hình thành củ bi với một số lý do: thứ nhất, cytokinin được biết là kích thích phân chia tế bào; thứ hai, có dấu hiệu cho

3.2.2. Ảnh hưởng của các nồng độ BA khác nhau

Ở nghiệm thức BA 2mg/l và 6mg/l có sự khác biệt về thời gian tạo củ và số củ hình thành/ bình, nghiệm thức BA 4mg/l không có sự khác biệt đối với 2 nghiệm thức, trọng lượng >400mg là tương đương giữa 3 nghiệm thức, kích thước > 5mm ở nghiệm thức 2 và 4mg/l có khác biệt so với nghiệm thức 6mg/l (Bảng 5).

Thông thường, cytokinin được đưa vào môi trường nuôi cấy trong ống nghiệm để tạo củ bi tây [13]. Cytokinin thúc đẩy tạo củ bi khoai tây *in vitro* bằng cách thay đổi làm cho sự cân bằng GA₃ trong thân cây không xảy ra [7, 13]. Ở nồng độ đường 2%, cytokinin không kích thích cảm ứng tạo củ ở bất kỳ nồng độ BA nào [4]. Nồng độ đường trên 4%, cytokinin sẽ kích thích cảm ứng tạo củ. Nồng độ đường cao kết hợp với cytokinin sẽ tạo củ bi trong ống nghiệm [4].

thấy nó ức chế kéo dài tế bào và kích thích giãn nở tế bào [4]. Những hiện tượng này cần thiết cho sự hình thành và phát triển củ (Hình 5).



Hình 5. Ảnh hưởng của BA ở điều kiện tối hoàn toàn.

3.2.3. Ảnh hưởng của các nồng độ CCC khác nhau

Thời gian tạo củ sớm nhất được biểu hiện ở nồng độ CCC 150mg/l, cao hay thấp hơn nồng độ này đều cho thời gian tạo củ dài hơn, số củ hình thành, trọng lượng củ >400mg, kích thước >5mm cũng ảnh hưởng bởi thời gian tạo củ, thời gian tạo củ sớm hơn cho thấy số củ hình thành, trọng lượng và kích thước cũng vượt trội hơn (Bảng 6).

Bảng 6. Ảnh hưởng của nồng độ CCC ở điều kiện tối hoàn toàn

NT	Thời gian tạo củ (ngày)	Số củ hình thành/ bình	Trọng lượng củ (mg)		Kích thước (mm)			
			<200	200-400	>400	<3	3-5	>5
0	13,22 b	5,44 b	0,67 a	1,44 b	3,33 b	0,33 b	0,89 a	4,33 b
100	13,11 b	4,89 c	0,78 a	1,56 b	3,00 b	0,78 ab	1,33 a	3,22 c
150	11,56 a	6,33 a	0,33 a	1,11 b	5,11 a	0,33 b	1,22 a	5,11 a
200	14,00 c	5,44 b	0,67 a	2,78 a	2,00 c	1,11 a	1,67 a	2,56 d

Sự hiện diện của CCC trong môi trường làm giảm sinh tổng hợp GA_3 và làm tăng tổng hợp acid tuberonic, tăng cường sự hình thành củ [14] đã chỉ ra rằng chất làm chậm sinh trưởng thực vật thường ức chế tổng hợp GA_3 và có thể kích thích tạo củ bi.

Khi ở nồng độ CCC cao hơn số lượng củ bi giảm điều này chỉ ra rằng nồng độ tối đa ở mức độ nhất định CCC có thể tăng cường sự hình thành củ, tương tự như đã được chứng minh của [14, 15] cũng như các công bố về CCC quan trọng cho sự hình thành củ bi *in vitro*, [5] CCC đã được sử dụng với nồng độ cao hơn nồng độ đường thấy rằng không có thay đổi đáng kể về sự hình thành củ mà chỉ ra rằng sự hiện diện của CCC chiếm ưu thế để cảm ứng tạo củ cho dù sử dụng một mình hoặc kết hợp (Hình 6).



Hình 6. Ảnh hưởng của CCC ở điều kiện tối hoàn toàn.

Tài liệu tham khảo

- [1] Hồ Hữu An và Đinh Thế Lộc, Cây có củ và kỹ thuật thâm canh, Quyển 6, Cây khoai tây, NXB Lao động Xã hội, (2005).
- [2] Le C. L., In vitro microtuberization: an evaluation of culture conditions for the production of virus free potatoes, Potato Res., 42 (1999), 489-498.

- [3] Gopal J., L. Minocha and H.S. Dheliwal, Microtuberization in potato (*Solanum tuberosum* L.), Plant Cell Rep., 17 (1998) 794-798.
- [4] Aafia A. and J. Iqbal, Combined effect of cytokinin and sucrose on in vitro tuberization parameters of two cultivars i.e., Diamant and Red Norland of Potato (*Solanum tuberosum* L.), Pak. J. Bot., 42(2) (2010), 1093-1102.
- [5] Iqbal Hussain, Zubeda Chaudhry, Aish Muhammad, Rehana Asghar, S.M. Saqlan Naqvi and Hamid Rashid, Effect of chlorocholine chloride, sucrose and BAP on in vitro tuberization in Potato (*Solanum tuberosum* L.), Pak. J. Bot., 38(2) (2006) 275-282.
- [6] Amina Danwasl, Amir Ali and Kunwar Shoaib, In vitro microtuberization of Potato (*Solanum tuberosum* L.) cultivar kuroda, A New Variety in Pakistan, Inter. J. Agicul & Bio., 83, (2006) 337-340.
- [7] Dobranszki J., Effects of dark treatment on tuber initiation and development of induced potato plantlets cultured In vitro, Acta Botanica Hungarica, 44, (1996): 377-386.
- [8] Murashige T. and F. Skoog., A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures, Plant Physiol., 15 (1962) 473-497.
- [9] Raymond M. Wheeler and Theodore W. Tibbitts, Growth and tuberization of potato (*Solanum tuberosum* L.) under Continuous light, Plant physiol, 80 (1986) 801-804.
- [10] Dobranszki J. K., M. Tabori and A. Ferenczy, Light and genotype effects in vitro tuberization of potato plantlets, Potato Res., 42 (1999) 483-488.
- [11] Demet A. and T. Daradogan, The effect of carbon sources on in vitro microtuberization of potato (*Solanum tuberosum* L.), Turkish Journal of Field Crops, 15(1) (2010) 7-11.
- [12] Khuri S. and J. Moorby, Investigations into the role of sucrose in potato cv. Estima microtubers production in vitro, Ann Bot., 75 (1995)295-303.
- [13] Asma R. and B. Askari, N.A. Abbasi, M. Bhatti and A. Quraishi, Effect of growth regulators on in vitro multiplication of Potato, Inter J. of Agriculture & Bio., 3(2), (2001) 181-182.
- [14] Zakaria M., M.M. Hossain, M.A.Khaileue Mian, T. Hossain and M.Z. Uddin, In vitro tuberization of potato influenced by benzyl adenine and chlorocholine chloride, Bangladesh J. Agril. Res., 33(3) (2008) 419-425.
- [15] Hussey G. and N.J. Stacey, Factors affecting the information of in vitro tubers of potato (*Solanum tuberosum* L.), Ann. Bot., 53 (1984) 565-578.

Effect of the Light Combines with Concentration of Sucrose, Benzyl Adenine, Chlorocholine Chloride to *in vitro* Tuberization of Potato (*Solanum tuberosum* L.)

Nguyễn Thị Thu Hằng¹, Trịnh Thị Lan Anh¹,
Nguyễn Văn Kết¹, Nguyễn Trung Thành²

¹Faculty of Agriculture and Forestry, University of Dalat, Đà Lạt, Vietnam

²Faculty of Biology, VNU University of Science, 334 Nguyễn Trãi, Hanoi, Vietnam

Abstract: In this experiment, four levels of sucrose (25, 50, 75, 100g/l), four concentrations of benzyl adenine (BA) (0, 2, 4, 6mg/l) and four concentrations of Chlorocholine chloride (CCC) (0, 100, 150, 200mg/l) were combined with two different light conditions: cultures kept under 16hrs and under darkness. It was also observed that under light condition most of the culture microtuber produced sprouts. In complete darkness 75g/l of sucrose, 4mg/l of BA and 150mg/l CCC in the mediums resulted in maximum tuber induction.

Keywords: Benzyl adenine, sucrose, chloro choline chloride, *Solanum tuberosum* L.

