

## NGHIÊN CỨU QUY TRÌNH TÁI SINH HIỆU QUẢ GIỐNG MÍA KK3 THÔNG QUA CALLUS PHÁT SINH TỪ CUỘN LÁ NON

Phan Thị Thu Hiền<sup>1</sup>, Phạm Bá Hải<sup>1</sup>, Bùi Thị Thủy<sup>1</sup>, Phạm Ngọc Quỳnh<sup>1</sup>, Phạm Bích Ngọc<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Trường Đại học Sư phạm Hà Nội 2

<sup>2</sup>Viện Công nghệ Sinh học, Viện Hàn Lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

### TÓM TẮT

Quy trình tái sinh hiệu quả giống mía KK3 đã được nghiên cứu thành công. Môi trường tạo mô sẹo tốt nhất cho giống mía KK3 là MS có bổ sung 4 mg/l 2,4-D, trên môi trường này, giống mía KK3 cho thấy tỷ lệ tạo mô sẹo cao nhất tỷ lệ mô sẹo đạt 94,78%. Môi trường MS có bổ sung 0,9 mg/L 2,4-D là môi trường tối ưu để mô sẹo của giống mía KK3 hình thành phôi soma. Trên môi trường này, giống mía KK3 cho tỷ lệ hình thành phôi soma cao nhất, đạt 82,39%. Môi trường thích hợp cho tỷ lệ tái sinh cao là MS có bổ sung 1,5 mg/L BAP và 0,5 mg/L kinetin với tỷ lệ 92,56%. Trên môi trường này, số chồi tạo thành/0,5 g cụm phôi là 40,24 chồi. Môi trường ra rễ tối ưu đối với giống mía KK3 là MS có bổ sung 3 mg/L  $\alpha$  - NAA. Trên môi trường này, tỷ lệ ra rễ đạt 92,48%, số rễ/chồi là 8,01 rễ. Quy trình này có thể được áp dụng trong sử dụng cho các nghiên cứu cần thiết có quy trình tái sinh giống mía KK3.

**Từ khóa:** Callus, cuộn lá non, KK3, tái sinh.

### 1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Hiện nay, khoảng 110 quốc gia sản xuất đường từ mía hoặc củ cải đường và 8 quốc gia sản xuất đường từ mía và củ cải đường. Mía trung bình chiếm gần 80% sản lượng đường toàn cầu. (<http://faostat.fao.org>). Ngoài ra, cây mía cung cấp các nguyên liệu thay thế lương thực, chẳng hạn như thức ăn chăn nuôi, chất xơ và năng lượng, đặc biệt là nhiên liệu sinh học (ethanol làm từ đường) và sản xuất điện từ bã mía. Mía thường được coi là một trong những nguồn cung cấp sinh khối quan trọng và hiệu quả nhất để sản xuất nhiên liệu sinh học. Những người trồng mía cùng với các công ty chế biến cây mía thành các sản phẩm năng lượng, thực phẩm... đang tìm cách giải quyết các mối liên quan đến sản xuất đường, nhiên liệu sinh học và bảo vệ tính bền vững của ngành này.

Cây mía (*Saccharum officinarum* L.) thuộc chi *Saccharum*, họ Gramineae, lớp một lá mầm (Monocotyledoneae), ngành thực vật hạt kín (Magnoliophyta) (Đỗ Năng Vịnh, 2006). Trong đó, chi *Saccharum* gồm có sáu loài khác nhau: *S. barberi* L., *S. edule* L., *S. officinarum* L., *S. robustum* L., *S. sinense* L., và *S. spontaneum* L. Trong số này, *S. officinarum* L. (loài được thuần hóa để canh tác và cung cấp đường) và *S. spontaneum* (loài hoang dại với bộ NST thể dị bội) được cho là tổ tiên của mía trồng ngày nay (Sandhu *et al.*, 2012). Các giống mía thương mại ngày nay là con lai giữa *S. officinarum* L.

(chiếm 80 - 90% hệ gen) và *S. spontaneum* L. (chiếm 10 - 20% hệ gen) (Hoarau *et al.*, 2002).

Với vai trò quan trọng như vậy, việc nghiên cứu về cây mía đã được các nhà khoa học nghiên cứu rất nhiều hướng, trong đó việc xây dựng hệ thống tái sinh qua phôi soma là bước cơ bản để nghiên cứu các thí nghiệm chuyên sâu khác. Phôi soma đã được dùng để làm thể nhận gen trong nhiều thí nghiệm chuyển gen (Snyman *et al.*, 2006; Christy *et al.*, 2009; Van Der Vyver, 2010; Zhu *et al.*, 2011; Taparia *et al.*, 2012). Vật liệu ban đầu có thể là cuộn lá non, cụm hoa non... đặt lên môi trường 2,4-D tạo mô sẹo. Chuyển mô sẹo lên môi trường có bổ sung 2,4-D với nồng độ thấp hơn để tạo phôi soma. Nguyên liệu thực vật dùng để nuôi cấy *in vitro* rất đa dạng, có thể từ mảnh cắt cuộn lá non (Kumar *et al.*, 2014; Kaur, Kapoor, 2016), từ phân đoạn hoa non (Suprasanna, Bapat, 2006), từ chồi đỉnh và chồi nách (Biradar *et al.*, 2009), từ hạt (Mayavan *et al.*, 2013). Hệ thống tái sinh mía *in vitro* đã được tiến hành và nghiên cứu trên nhiều giống mía, chủ yếu sử dụng để tái sinh cây chuyển gen.

Có rất nhiều giống mía được canh tác hiện nay, trong đó có giống mía KK3 có khả năng sinh trưởng và phát triển tốt đặc biệt là khả năng nảy chồi mạnh, mầm to chắc và khỏe, trữ lượng đường cao. Trên thực tế, giống mía KK3 là giống năng suất cao, chất lượng tốt nên việc nghiên cứu hệ thống tái sinh thông qua phôi

soma là rất cần thiết cho các nghiên cứu chuyên sâu sau này.

## **2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU**

### **2.1. Vật liệu thực vật**

Cuộn lá non của giống mía KK3 (*Saccharum officinarum* L.) 06 tháng tuổi trồng tại vườn thực nghiệm khoa Sinh - KTNN được cung cấp bởi Viện nghiên cứu mía đường Việt Nam.

### **2.2. Phương pháp nghiên cứu**

#### **2.2.1. Phương pháp tạo mô sẹo (callus)**

Cắt cuộn lá non (có chiều dài khoảng 1 - 9 cm tính từ chồi đỉnh) thành nhiều mảnh cắt thực vật có đường kính 1 cm. Đặt các cuộn lá non lên đĩa Petri chứa môi trường MS có bổ sung 2,4-D ở các ngưỡng nồng độ 0, 1, 2, 3, 4, và 5 mg/L để tạo mô sẹo trong điều kiện tối hoàn toàn, nhiệt độ  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ . Sau 3 tuần, thống kê số mô sẹo hình thành (Phan Thị Thu Hiền *et al.*, 2015).

#### **2.2.2. Phương pháp tạo mô sẹo phân hóa (phôi soma)**

Các mô sẹo lên tốt được chuyển sang môi trường MS có bổ sung 0,3, 0,6, 0,9, 1,2, 1,5 mg/L 2,4-D để tạo phôi soma trong tối (Phan Thị Thu Hiền *et al.*, 2015).

#### **2.2.3. Phương pháp tái sinh chồi từ mô sẹo**

Các cụm phôi chín sau 2 tuần được đặt trên môi trường có bổ sung tổ hợp 2 chất kích thích sinh trưởng kinetin và BAP. Tiến hành thống kê các chồi được hình thành sau 4 tuần (Phan Thị Thu Hiền *et al.*, 2015).

#### **2.2.4. Phương pháp ra rễ**

Các chồi có chiều cao từ 3 cm trở lên được đặt trên môi trường ra rễ MS có bổ sung NAA (0, 1, 2, 3, 4 và 5 mg/L) dựa vào công thức ra rễ của Phan Thị Thu Hiền và cộng sự có cải biến bằng cách tối ưu lại nồng độ NAA bổ sung vào môi trường ra rễ (Phan Thị Thu Hiền *et al.*, 2015).

Chồi có từ 3 lá thật được tách ra, đặt lên 5 loại môi trường ra rễ khác nhau, sau 4 tuần, thống kê số rễ được tạo ra.

#### **2.2.5. Phương pháp thí nghiệm và xử lý số liệu**

Thí nghiệm được bố trí ngẫu nhiên, 3 lần lặp lại ở mỗi công thức, số mẫu sử dụng mỗi lần thí nghiệm  $\geq 30$  mẫu. Các môi trường sử dụng trong nghiên cứu này được chỉnh pH = 5,8, có bổ sung

30 g sucrose và 7,0 g agar/l. Khử trùng ở nhiệt độ  $117^\circ\text{C}$ , áp suất 1,5 atm trong 15 phút. Nuôi cấy ở nhiệt độ  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , cường độ ánh sáng 3000 lux, chế độ sáng/tối mỗi ngày 16 h/8h. Xử lý số liệu bằng phần mềm Excel 2016.

## **3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN**

### **3.1. Ảnh hưởng của 2,4-D đến sự hình thành mô sẹo tạo từ cuộn lá cây mía**

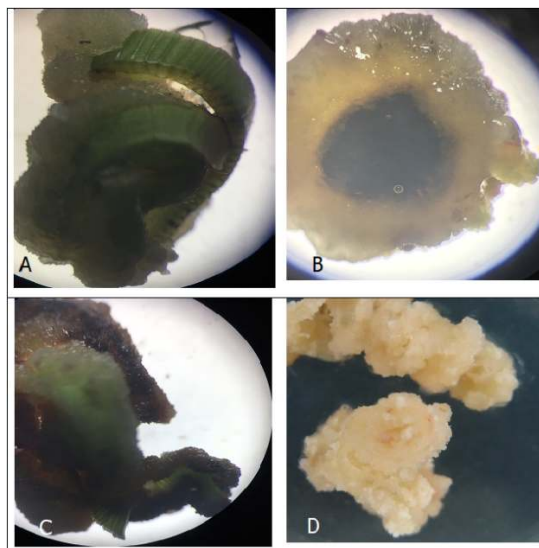
Kết quả thu được cho thấy, môi trường đối chứng MS không có bổ sung 2,4-D, không có phản ứng tạo mô sẹo. Khi bổ sung 2,4-D vào môi trường nuôi cấy điều kiện tối trong khoảng thời gian từ 7 - 21 ngày, cho thấy sự hình thành mô sẹo tương ứng với nồng độ 2,4-D khác nhau. Thời gian hình thành mô sẹo biến đổi phụ thuộc vào nồng độ auxin bổ sung vào môi trường nuôi cấy.

Kết quả nghiên cứu cho thấy, trên môi trường có bổ sung các nồng độ 2 mg/L, 3 mg/L và 4 mg/L 2,4-D các mẫu mô cây thể hiện sự hình thành mô sẹo sớm (trong khoảng thời gian 7 ngày nuôi cấy). Ngưỡng nồng độ 1 mg/L và 5 mg/L cho thấy sự hình thành mô sẹo chậm hơn sau khoảng 02 tuần. Mỗi loại môi trường cho tỷ lệ tạo mô sẹo khác nhau. Trong quá trình nghiên cứu, chúng tôi thu được 04 loại mô sẹo khác nhau.

Dạng mô sẹo thứ nhất, là dạng mô sẹo không tạo phôi soma, có màu xanh. Dạng này không thể tái sinh ở giai đoạn sau trong nghiên cứu này. Dạng mô sẹo thứ hai là dạng mô sẹo nhầy, ẩm ướt và có màu nâu, ít tạo phôi soma. Dạng mô sẹo thứ ba là dạng mô sẹo có màu đen không có phôi. Dạng mô sẹo thứ tư là dạng mô sẹo mô sẹo xốp, có màu vàng sáng, có các dạng phôi soma chứa các dạng cấu trúc hình cầu màu trắng hoặc màu kem - mô sẹo phân hóa. Trong bốn dạng này, chỉ có dạng mô sẹo phân hóa có thể tham gia vào các giai đoạn sau của nghiên cứu này, dạng này tham gia vào quá trình tạo nhiều phôi soma và tái sinh tạo đa chồi ở cây mía rất tốt. Nghiên cứu này của chúng tôi phù hợp với nghiên cứu của Phan Thị Thu Hiền và cộng sự (2015), tuy nhiên, nghiên cứu này đã phát hiện ra một dạng mô sẹo mới là dạng mô sẹo thứ ba là dạng mô sẹo có màu đen không có phôi so với nghiên cứu trước

đó của Phan Thị Thu Hiền và cộng sự năm 2015. Các mô sẹo được tạo ra rất đa dạng, phong phú về hình dạng, kích thước và đặc tính sinh lý, tùy thuộc vào hai yếu tố nhất định là mô cấy và môi trường nuôi cấy. Nếu sử dụng mô quá già sẽ tạo

dạng mô sẹo bị đen – dạng 3, nếu sử dụng mô non nhưng nuôi cấy trên môi trường có nồng độ 2,4-D quá cao thì sẽ tạo ra dạng mô sẹo không thể phân hóa và không tham gia được vào quá trình tái sinh tạo đa chồi (Hình 1).



**Hình 1. Các dạng mô sẹo khác nhau thu được sau khi nuôi cấy**

(A: Mô sẹo không tạo phôi soma, có màu xanh; B: Mô sẹo nhầy, ẩm ướt và có màu nâu, ít tạo phôi soma; C: Mô sẹo có màu đen không có phôi, D: Mô sẹo mô sẹo xốp, có màu vàng sáng, có các dạng phôi soma chứa các dạng cấu trúc hình cầu màu trắng hoặc màu kem - mô sẹo phân hóa)

Kết quả thu được cho thấy sự khác biệt về kết quả tạo mô sẹo ở mỗi nồng độ 2,4-D trên các môi trường nuôi cấy trong điều kiện tối hoàn toàn. Cụ thể, môi trường đối chứng MS không bổ sung 2,4-D không cho thấy sự phát sinh mô sẹo. Khi bổ sung 1 mg/L 2,4-D vào môi trường nuôi cấy, tỷ lệ mô sẹo đã đạt 50,48%. Tỷ lệ mô sẹo phát sinh tỷ lệ thuận với nồng độ 2,4-D khi tăng nồng độ này lên 2 mg/L, 3 mg/L. Ở dải nồng độ 2 mg/L, 3 mg/L 2,4-D, tỷ lệ mô sẹo đạt lần lượt 77,65% và 86,31%. Tỷ lệ mô sẹo đạt cao nhất trên môi trường MS có bổ sung 4 mg/L 2,4-D, tỷ lệ tạo

mô sẹo của giống mía KK3 đạt 94,78%. Tuy nhiên, trên môi trường MS bổ sung 5 mg/L 2,4-D, tỷ lệ mô sẹo chỉ đạt 94,78% (Bảng 1). Có hiện tượng này do 2,4-D là chất kích thích sinh trưởng thuộc nhóm Auxin có tác dụng tạo mô sẹo khi nuôi cấy mô non thực vật trong điều kiện tối. Mỗi giống mía đều có nồng độ tối ưu 2,4-D tạo mô sẹo khác nhau do hàm lượng auxin nội sinh mỗi giống khác nhau. Đối với giống mía KK3, nồng độ 2,4-D tối ưu là 4 mg/L cho tỷ lệ mô sẹo là 94,78%, đạt cao nhất trong năm loại môi trường thí nghiệm.

**Bảng 1. Tỷ lệ tạo mô sẹo của giống mía KK3 khi sử dụng môi trường MS có bổ sung 2,4-D sau 21 ngày trong tối (%)**

Môi trường	Tỷ lệ tạo mô sẹo (TB ± SD)
MS (ĐC)	0
MS + 1mg/L 2,4-D	50,48 ± 0,82
MS + 2mg/L 2,4-D	77,65 ± 0,85
MS + 3mg/L 2,4-D	86,31 ± 1,48
<b>MS + 4mg/L 2,4-D</b>	<b>94,78 ± 1,86</b>
MS + 5mg/L 2,4-D	89,38 ± 1,08

Như vậy, trên môi trường MS có bổ sung 2,4-D, giống mía KK3 đều có khả năng tạo mô sẹo tốt (đối chứng không tạo mô sẹo). Trong đó, môi trường MS có bổ sung 4 mg/L 2,4-D cho thấy tỷ lệ tạo mô sẹo cao nhất và đạt 94,78%.

### 3.2 Ảnh hưởng của 2,4-D lên sự hình thành phôi soma từ mô sẹo

Phôi soma (phôi được hình thành từ cơ quan sinh dưỡng) được tạo ra bằng cách sử dụng các chất điều tiết sinh trưởng trong môi trường nuôi cấy.

Các mô sẹo sau 21 ngày nuôi cấy được cấy chuyển sang môi trường tạo phôi soma với 2,4-D dải nồng độ 0,3 – 1,5 mg/L. Có sự phân biệt giữa mô sẹo có khả năng tạo phôi soma và mô sẹo không có khả năng tạo phôi soma.

Kết quả nghiên cứu cho thấy, các môi trường có bổ sung 2,4-D đều có khả năng tạo phôi soma. Trên môi trường MS cơ bản, tỷ lệ tạo phôi soma được tạo ra ít nhất, tỷ lệ tạo phôi soma chỉ đạt 5,39%. Sở dĩ trên môi trường MS không bổ sung 2,4-D nhưng cụm mô sẹo vẫn tạo được phôi soma vì trong cụm mô sẹo vẫn còn có 2,4-D, khi được cấy chuyển lên môi trường MS thì

nồng độ 2,4-D tích lũy của cụm mô sẹo giảm, dẫn đến kích hoạt sự hình thành phôi soma (Bảng 2).

Trên môi trường MS có bổ sung 0,3 mg/L, tỷ lệ hình thành phôi soma cao hơn, đạt 18,38%. Khi tăng nồng độ 2,4-D lên 0,6 mg/L, tỷ lệ hình thành phôi soma đạt 32,57%. Trên môi trường MS có bổ sung 0,9 mg/L 2,4-D, đạt tỷ lệ hình thành phôi cao nhất, đạt 82,39%. Khi tăng nồng độ 2,4-D lên 1,2 mg/L và 1,5 mg/L, tỷ lệ tạo phôi soma lần lượt đạt 42,01% và 35,15%. Môi trường bổ sung 1,5 mg/L, cụm mô sẹo còn xuất hiện rễ (bảng 2).

Phôi soma là cấu trúc đặc biệt có khả năng tích trữ năng lượng dưới dạng tinh bột để cung cấp năng lượng cho quá trình tái sinh chồi. Phôi soma là dạng tế bào được hình thành trên tế bào có hàm lượng nhân đậm đặc, nhân lớn. Ngược lại, ở những tế bào có hàm lượng tế bào chất đậm đặc, nhân nhỏ (tế bào quá già hoặc quá non) thường sinh ra các mô sẹo không phôi hóa, tức là không có khả năng tái sinh. Kết quả này chúng tôi thu được cũng phù hợp với nghiên cứu khác (Silveira et al., 2013).

**Bảng 2. Ảnh hưởng của nồng độ 2,4-D tới sự hình thành phôi soma từ mô sẹo của các giống mía sau 2 tuần nuôi cấy (%)**

Nồng độ 2,4-D (mg/L)	Tỷ lệ tạo phôi soma (TB (%) ± SD)
0	5,39 ± 0,42
0,3	18,38 ± 0,58
0,6	32,57 ± 0,28
<b>0,9</b>	<b>82,39 ± 0,82</b>
1,2	42,01 ± 0,67
1,5	35,15 ± 0,32

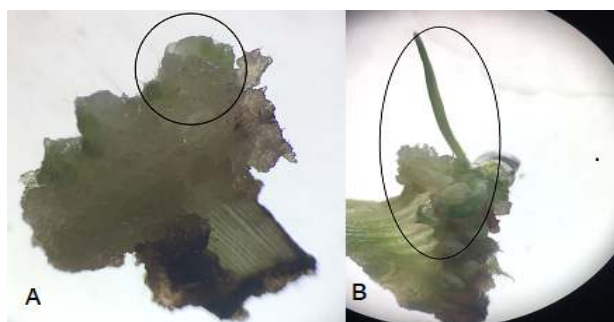
Như vậy, môi trường MS có bổ sung 0,9 mg/L 2,4-D là môi trường tối ưu để mô sẹo của giống mía KK3 hình thành phôi soma. Trên môi trường này, giống mía KK3 cho tỷ lệ hình thành phôi soma cao nhất xấp xỉ 82,39%.

### 3.3 Ảnh hưởng của tổ hợp BAP và kinetin lên sự hình thành chồi từ phôi soma cây mía

#### 3.3.1 Ảnh hưởng của tổ hợp BAP và kinetin đến tỷ lệ tái sinh chồi của các cụm phôi soma

Mô sẹo được đặt trên môi trường tạo phôi soma trong 2 tuần. Phôi được hình thành đến lúc phát triển thành dạng phôi chín, phôi tích trữ đầy đủ chất dinh dưỡng và cơ quan cần thiết. Các cụm

phôi chín được chuyển sang môi trường MS có bổ sung tổ hợp BAP và kinetin nồng độ khác nhau để nảy mầm tạo đa chồi. BAP và kinetin là hai chất điều hòa sinh trưởng thuộc nhóm cytokinin có tác dụng kích thích rõ rệt đến sự hình thành chồi bất định đồng thời ức chế mạnh sự tạo rễ của chồi nuôi cấy. Giai đoạn hình thành chồi từ phôi soma rất quan trọng vì nó quyết định hiệu suất tái sinh của cây. Kết quả thu được thể hiện ở bảng 3.4 cho thấy, các cụm phôi soma của giống mía KK3 đều có phản ứng tái sinh tạo đa chồi nhất định trên các môi trường khác nhau (Hình 2, 3).



**Hình 2. Hiện tượng phôi soma tái sinh tạo chồi chụp bằng kính hiển vi**

(A: Phôi soma chín bắt đầu tái sinh; B: Chồi được tái sinh từ phôi soma sau 07 ngày)

Phân tích chi tiết kết quả cho thấy, trên môi trường đối chứng (ĐC), tỷ lệ tái sinh đạt 15,57%. Trên môi trường có bổ sung 0,5 mg/L BAP và 0,5 mg/L Kinetin, tỷ lệ tái sinh đã cao hơn hẳn đối chứng, đạt 52,83%. Khi tăng nồng độ BAP lên 1 mg/L, tỷ lệ tái sinh đạt 72,12%. Tỷ lệ tái sinh đạt cao nhất trên môi trường MS

có bổ sung 1,5 mg/L BAP và 0,5 mg/L kinetin, tỷ lệ tái sinh đạt 92,56%. Tuy nhiên, trên môi trường có bổ sung BAP lên 2 mg/L và 0,5 mg/L kinetin, tỷ lệ tái sinh tạo đa chồi có xu hướng giảm, chỉ đạt 61,42%. Với môi trường bổ sung 2,5 mg/L BAP và 0,5 mg/L kinetin, tỷ lệ tái sinh tạo đa chồi đạt thấp nhất, chỉ 42,63% (Bảng 4).



**Hình 3. Đa chồi tái sinh từ phôi soma của giống mía KK3**

Tỷ lệ tái sinh này cao hơn so với kết quả của Kaur và cộng sự (2016) trên môi trường có bổ

sung 0,25 mg/L BAP, tỷ lệ tái sinh chồi đạt cao nhất 80%.

**Bảng 4. Ảnh hưởng của tổ hợp kích thích sinh trưởng BAP và kinetin lên tỷ lệ tái sinh tạo đa chồi từ phôi soma của các giống mía (%)**

<i>Hoocmon sinh trưởng</i>	<i>Tỷ lệ tái sinh (TB(%) ± SD)</i>
0 (ĐC)	15,57 ± 0,34
0,5 mg/L BAP + 0,5 mg/L kinetin	52,83 ± 1,43
1 mg/L BAP + 0,5 mg/L kinetin	72,12 ± 0,97
<b>1,5 mg/L BAP + 0,5 mg/L kinetin</b>	<b>92,56 ± 1,03</b>
2 mg/L BAP + 0,5 mg/L kinetin	61,42 ± 0,60
2,5 mg/L BAP + 0,5 mg/L kinetin	42,63 ± 0,24

Như vậy, môi trường tối ưu để giống mía KK3 đạt tỷ lệ tái sinh cao là MS có bổ sung 1,5 mg/L BAP và 0,5 mg/L Kinetin với tỷ lệ 92,56%.

### 3.3.2 Ảnh hưởng của tổ hợp BAP và kinetin lên số chồi hình thành trên cụm phôi soma

Tổ hợp chất kích thích sinh trưởng BAP và

kinetin không chỉ ảnh hưởng đến tỷ lệ tái sinh chồi, mà còn quyết định số chồi được hình thành của cụm phôi soma. Bằng phương pháp xác định khối lượng của phôi trước khi thực hiện thí nghiệm, chúng tôi đã thống kê được số lượng chồi/0,5 g cụm phôi soma sau 4 tuần nuôi cấy (bảng 5).

**Bảng 5. Ảnh hưởng của tổ hợp chất kích thích sinh trưởng BAP và kinetin lên số lượng chồi hình thành (số chồi/0,5 g cụm phôi soma chín) của các giống mía**

<i>Hoocmon sinh trưởng</i>	<b>Số chồi hình thành <i>TB(%) ± SD</i></b>
0 (ĐC)	4,08 ± 0,83
0,5 mg/L BAP + 0,5 mg/L Kinetin	12,67 ± 0,42
1 mg/L BAP + 0,5 mg/L Kinetin	24,08 ± 0,35
<b>1,5 mg/L BAP + 0,5 mg/L Kinetin</b>	<b>40,24 ± 0,58</b>
2 mg/L BAP + 0,5 mg/L Kinetin	9,02 ± 0,82
2,5 mg/L BAP + 0,5 mg/L Kinetin	5,23 ± 1,08

Chi tiết kết quả thu được cho thấy, trên tất cả các môi trường sử dụng trong thí nghiệm này đều cho phản ứng tạo chồi, tuy nhiên số lượng chồi hình thành trên các loại môi trường khác nhau. Trên môi trường MS, giống mía KK3 cho số chồi tạo thành/cụm phôi ít nhất, chỉ đạt 4,08 chồi/0,5 g cụm phôi soma. Môi trường MS bổ sung 0,5 mg/L BAP và 0,5 mg/L kinetin cho số chồi/cụm phôi soma cao hơn, đạt 12,67 chồi/0,5

g cụm phôi, gấp xấp xỉ 3 lần so với môi trường đối chứng. Trên môi trường MS có bổ sung 1 mg/L BAP + 0,5 mg/L kinetin, số chồi tạo thành đạt 24,08 chồi/0,5 g cụm phôi. Khi tăng nồng độ BAP lên 1,5 mg/L và 0,5 mg/L kinetin, số chồi đạt được cao nhất 40,24 chồi/0,5 g cụm phôi. Khi tăng nồng độ BAP lên 2 mg/L và 2,5 mg/L, số chồi đạt được lần lượt là 9,02 và 5,23 chồi/0,5 g cụm phôi (bảng 5, hình 5).



**Hình 5. Cụm phôi soma tái sinh tạo đa chồi trên các môi trường tái sinh khác nhau**

(Chú thích A: Cụm phôi soma nuôi cấy trên môi trường đối chứng B: Cụm phôi soma nuôi cấy trên môi trường MS bổ sung 0,5 mg/L BAP + 0,5 mg/L kinetin; C: Cụm phôi soma nuôi cấy trên môi trường MS 1 mg/L BAP + 0,5 mg/L kinetin; D: Cụm phôi soma nuôi cấy trên môi trường MS bổ sung 1,5 mg/L BAP + 0,5 mg/L kinetin; E: Cụm phôi soma nuôi cấy trên môi trường MS bổ sung 2 mg/L BAP + 0,5 mg/L kinetin; F: Cụm phôi soma nuôi cấy trên môi trường MS bổ sung 2,5 mg/L BAP + 0,5 mg/L kinetin).

Trong nghiên cứu này, kết quả tái sinh của chúng tôi cao hơn kết quả nghiên cứu tái sinh từ phôi của Alcantara và cộng sự (2014) khi sử dụng MS có bổ sung 17,8  $\mu$ M BAP để tái sinh hai giống mía RB855156 và RB72454, kết quả cho thấy hai giống mía này thể hiện khả năng tái sinh khác nhau trên cùng một môi trường, và kết quả tái sinh của các giống mía này lần lượt chỉ đạt xấp xỉ 70 - 80%.

Như vậy, KK3 là giống mía có khả năng tái sinh tạo đa chồi rất tốt, số chồi tái sinh từ phôi soma cao. Môi trường thích hợp để tái sinh tốt

phải là môi trường vừa cho tỷ lệ tái sinh cao là 1,5 mg/L BAP và 0,5 mg/L Kinetin với tỷ lệ 92,56%. Trên môi trường này, số chồi tạo thành/0,5 g cụm phôi là 40,24 chồi.

### 3.4. Đánh giá khả năng tạo rễ của giống mía KK3 *in vitro*

Các chồi mía chuyển sang môi trường MS bổ sung các nồng độ NAA khác nhau, nuôi cây trong 4 tuần để theo dõi sự ra rễ. Kết quả thu được cho thấy, rễ phát triển trên tất cả các loại môi trường, kể cả môi trường đối chứng MS (Bảng 6).

**Bảng 6. Ảnh hưởng của IBA đến tỷ lệ ra rễ (%) của giống mía KK3**

Nồng độ NAA	Tỷ lệ ra rễ	Đặc điểm rễ
0 (ĐC)	40,24 $\pm$ 0,34	A
1 mg/LNAA	62,17 $\pm$ 0,51	A
2 mg/LNAA	80,56 $\pm$ 0,51	B
<b>3 mg/LNAA</b>	<b>92,48 <math>\pm</math> 0,19</b>	<b>B</b>
4 mg/L NAA	81,24 $\pm$ 0,56	C
5 mg/L NAA	30,28 $\pm$ 0,54	C

Chú thích: A: Rễ ngắn, ít lông hút, phân nhánh ít, xuất hiện muộn sau 02 tuần; B: Rễ dài, phân nhánh tốt, nhiều lông hút, xuất hiện sau 01 tuần nuôi cấy; C: Rễ nhiều lông hút, xuất hiện sau 01 tuần nuôi cấy; C: Rễ xuất hiện sau 01 tuần nuôi cấy, rễ ngắn, ít lông hút.

Kết quả thu được cho thấy, môi trường MS (đối chứng) giống mía KK3 cũng có phản ứng tạo rễ nhưng rễ ngắn, phân nhánh ít, sức sống thấp, rễ xuất hiện muộn sau 02 tuần nuôi cấy, tỷ lệ đạt 40,24%. Sở dĩ có hiện tượng này (MS không bổ sung NAA) nhưng cây mía *in vitro* vẫn tạo rễ có thể do cây mía có hàm lượng auxin nội sinh nhất định, điều này cũng xảy ra với giống mía ROC22 khi được nuôi cấy trên môi trường MS cơ bản (Phan Thị Thu Hiền *et al.*, 2015).

Trên môi trường có bổ sung 1 mg/L NAA, tỷ lệ tạo rễ cao hơn hẳn, đạt 62,17%. Tuy nhiên, trên môi trường này, rễ ngắn, ít lông hút, phân

nhánh ít, xuất hiện muộn sau 02 tuần. Khi tăng nồng độ NAA lên 2 mg/L, tỷ lệ tạo rễ đạt 80,56%. Trên môi trường này, thu được dạng rễ có đặc điểm nhiều lông hút, xuất hiện sau 01 tuần nuôi cấy. Trên môi trường MS bổ sung 3 mg/L, tỷ lệ tạo rễ đạt 92,48%, rễ dài, nhiều lông hút, xuất hiện sau 01 tuần nuôi cấy, phân nhánh tốt, nhiều lông hút. Khi tăng nồng độ NAA lên 4 mg/L, tỷ lệ ra rễ đạt 81,24%, thấp hơn so với môi trường bổ sung 3 mg/L NAA (hình 6, bảng 6). Tăng nồng độ NAA 5 mg/L, tỷ lệ tạo rễ chỉ đạt 30,28%, rễ ngắn, ít lông hút. Tỷ lệ tạo rễ thu được ở môi trường bổ sung 5 mg/L NAA thấp hơn so với nhóm đối chứng.



**Hình 6. Rễ mía thu được trong điều kiện nuôi cấy khác nhau**

Ngoài ra, chúng tôi nhận thấy thêm hiện tượng cây mía *in vitro* bị bạch tạng khi nuôi cấy trên môi trường bổ sung NAA 5 mg/L, nguyên nhân có thể do được nuôi cấy trên môi trường có bổ sung nồng độ chất kích thích sinh trưởng quá cao. Hiện tượng này thường thấy trong nuôi cấy mô thực vật, kèm theo một số hiện tượng

như thủy tinh hóa, Trong một số trường hợp nhân giống *in vitro* có xảy ra đột biến tế bào soma một cách ngẫu nhiên. Thông thường khi nuôi cấy mô sẹo gặp nhiều đột biến hơn nuôi cấy mô đỉnh sinh trưởng. Nguyên nhân gây ra hiện tượng này có thể là do kiểu di truyền của mô nuôi cấy (Đỗ Năng Vịnh, 2006) (hình 7).



**Hình 7. Hiện tượng bạch tạng trong nuôi cấy *in vitro* của giống mía KK3 trên môi trường bổ sung 5 mg/L NAA**

Xét số lượng rễ/ chồi, môi trường đối chứng có số rễ/chồi chỉ xấp xỉ 1,51 rễ/chồi. Trên môi trường có bổ sung thêm NAA cho thấy số rễ/chồi cao hơn, đạt 4,25 và 6,36 trên môi trường bổ sung lần lượt 1 mg/L và 2 mg/L. Trên môi trường bổ sung 3 mg/L, số chồi đạt được

trung bình là 8,01 chồi, số lượng rễ này được ghi nhận cao nhất trong các công thức thí nghiệm. Khi tăng nồng độ NAA lên 4 mg/L và 5 mg/L, số lượng rễ/chồi lần lượt là 4,70 và 2,92. Hiện tượng này xuất hiện do NAA quá cao cũng làm ức chế quá trình tạo rễ (Bảng 7).

**Bảng 7. Ảnh hưởng của nồng độ NAA lên số rễ trung bình (TB)/chồi giống mía KK3**

<b>Nồng độ NAA</b>	<b>Số rễ/chồi ± SD</b>
0 (ĐC)	1,51 ± 0,05
1 mg/LNAA	4,25 ± 0,30
2 mg/LNAA	6,36 ± 0,17
<b>3 mg/LNAA</b>	<b>8,01 ± 0,06</b>
4 mg/L NAA	4,70 ± 0,35
5 mg/L NAA	2,92 ± 0,58

Như vậy, môi trường ra rễ tối ưu đối với giống mía KK3 là MS có bổ sung 3 mg/L NAA. Trên môi trường này, tỷ lệ ra rễ đạt 92,48%, số

rễ/chồi là 8,01 rễ. Rễ dài, phân nhánh tốt, nhiều lông hút, xuất hiện sau 01 tuần nuôi cấy, đủ điều kiện để cho ra bầu đất (Hình 8).



**Hình 8. Rễ cây mía KK3 nuôi cấy *in vitro***



#### 4. KẾT LUẬN

Như vậy, môi trường tạo mô sẹo tốt nhất cho giống mía KK3 là MS có bổ sung 4 mg/l 2,4-D, trên môi trường này, giống mía KK3 cho thấy tỷ lệ tạo mô sẹo cao nhất tỷ lệ mô sẹo đạt 94,78%. Môi trường MS có bổ sung 0,9 mg/L 2,4-D là môi trường tối ưu để mô sẹo của giống mía KK3 hình thành phôi soma. Trên môi trường này, giống mía KK3 cho tỷ lệ hình thành phôi soma cao nhất, đạt 82,39%. Môi trường thích hợp cho tỷ lệ tái sinh cao là MS có bổ sung 1,5 mg/L BAP và 0,5 mg/L kinetin với tỷ lệ 92,56%. Trên môi trường này, số chồi tạo thành/0,5 g cụm phôi là 40,24 chồi. Môi trường ra rễ tối ưu đối với giống mía KK3 là MS có bổ sung 3 mg/L  $\alpha$  - NAA. Trên môi trường này, tỷ lệ ra rễ đạt 92,48%, số rễ/chồi là 8,01 rễ. Hệ thống tái sinh rất có ý nghĩa trong các nghiên cứu tiếp theo, đặc biệt trong công tác chuyển gen.

#### Lời cảm ơn:

Nghiên cứu này được tài trợ từ nguồn kinh phí Khoa học Công nghệ của Trường ĐHSP Hà Nội 2 cho đề tài mã số C.2020 - SP2 – 04.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Alcantara GB, Dibax R, Oliveira RA, Bessalho Filho JC, Daros E, 2014. Plant regeneration and histological study of the somatic embryogenesis of sugarcane (*Saccharum spp.*) cultivars RB855156 and RB72454. *Acta Sci* 36(1): 63-72.
- Biradar S, Biradar D, Patil V, Patil S, Kambar N, 2009. *In vitro* plant regeneration using shoot tip culture in commercial cultivar of sugarcane. *Karnataka IJAAS* 22(1): 21-24.
- Christy LA, Arvinth S, Saravanakumar M, Kanchana M, Mukunthan N, Srikanth J, Thomas G, Subramonian N, 2009. Engineering sugarcane cultivars with bovine pancreatic trypsin inhibitor (aprotinin) gene for protection against top borer (*Scirpophaga excerptalis* Walker). *Plant cell rep* 28(2): 175-184.
- Phan Thị Thu Hiền, Phạm Bích Ngọc, Chu Hoàng Hà, 2015. Hệ thống tái sinh từ phôi soma của một số giống mía cao sản (*Saccharum officinarum* L.) phục vụ công tác chuyển gen. *Tạp chí Công nghệ Sinh học* 13 (3):907-917.
- Hoarau JY, Grivet L, Offmann B, Raboin LM, Diorflar JP, Payet J, Hellmann M, D'Hont A, Glaszmann JC, 2002. Genetic dissection of a modern sugarcane

cultivar (*Saccharum spp.*). II. Detection of QTLs for yield components. *Theor Appl Genet* 105(6): 1027-1037.

- Kaur R, Kapoor M, 2016. Plant regeneration through somatic embryogenesis in sugarcane. *Sugar Tech* 18(1): 93-99.

- Kumar T, Khan MR, Abbas Z, Ali G M, 2014. Genetic improvement of sugarcane for drought and salinity stress tolerance using *Arabidopsis vacuolar pyrophosphatase (AVP1)* gene. *Mol Biotechnol* 56(3): 199-209.

- Mayavan S, Subramanyam K, Arun M, Rajesh M, Dev GK, Sivanandhan G, Jaganath B, Manickavasagam M, Selvaraj N, Ganapathi A, 2013. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated in planta seed transformation strategy in sugarcane. *Plant cell rep* 32(10): 1557-1574.

- Sandhu SK, Thind K, Singh P, 2012. Variability trends for brix content in general cross combinations of sugarcane (*Saccharum spp.*) complex. *World J Agric Sci* 8: 113-117.

- Silveira V, de Vita AM, Macedo AF, Dias MFR, Floh EIS, Santa-Catarina C, 2013. Morphological and polyamine content changes in embryogenic and non-embryogenic callus of sugarcane. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 114(3): 351-364.

- Snyman S, Meyer G, Richards J, Haricharan N, Ramgareeb S, Hockett B, 2006. Refining the application of direct embryogenesis in sugarcane: effect of the developmental phase of leaf disc explants and the timing of DNA transfer on transformation efficiency. *Plant cell rep* 25(10): 1016-1023.

- Suprasanna P, Bapat V, 2006. Advances in the development of *in vitro* culture systems and transgenics in sugarcane. *Int. Symp. Technologies to improve sugar productivity in developing countries. China:* 629-636.

- Taparia Y, Gallo M, Altpeter F, 2012. Comparison of direct and indirect embryogenesis protocols, biolistic gene transfer and selection parameters for efficient genetic transformation of sugarcane. *Plant Cell, Tissue and Organ Cult* 111(2): 131-141.

- Van Der Vyver C, 2010. Genetic transformation of the euploid *Saccharum officinarum* via direct and indirect embryogenesis. *Sugar Tech* 12(1): 21-25.

- Đỗ Năng Vịnh, 2006. Công nghệ tế bào thực vật ứng dụng. NXB Nông nghiệp, Hà Nội.

- Zhu YJ, McCafferty H, Osterman G, Lim S, Agbayani R, Lehrer A, Schenck S, Komor E, 2011. Genetic transformation with untranslatable coat protein gene of sugarcane yellow leaf virus reduces virus titers in sugarcane. *Transgenic res* 20(3): 503-512.

- <http://faostat.fao.org>

## **STUDY ON THE EFFICIENT PROTOCOL REGENERATION OF KK3 VARIETY SUGARCANE THROUGH CALLUS DEVELOPED FROM YOUNG LEAF ROLLS**

**Phan Thi Thu Hien<sup>1</sup>, Pham Ba Hai<sup>1</sup>, Bui Thi Thuy<sup>1</sup>, Pham Ngoc Quynh<sup>1</sup>, Pham Bich Ngoc<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>*Hanoi Pedagogical University No2*

<sup>2</sup>*Institute of Biotechnology, Vietnam Academy of Science and Technology*

### **SUMMARY**

The efficient regeneration protocol was established of KK3 sugarcane variety has been successfully studied. The best callus forming medium on KK3 sugarcane variety was MS supplemented with 2.4-D 4 mg/L on this medium, KK3 sugarcane variety showed the highest callus formation rate, the callus rate reached 94.78%. MS medium supplemented with 0.9 mg/L 2.4-D was the optimal medium for callus KK3 to form somatic embryos. On this medium, the sugarcane variety KK3 gave the highest rate of somatic embryo formation, approximately 82.39%. The suitable medium for good regeneration must be medium with a high regeneration rate of 1.5 mg/L BAP and 0.5 mg/L Kinetin at the rate of 92.56%. On this medium, the number of shoots forming/0.5 g embryo cluster was 40.24 shoots. The optimal rooting medium for sugarcane variety KK3 was MS supplemented with 3 mg/L NAA. On this medium, the rooting rate reached 92.48%, the number of roots/buds was 8.01 roots. This process can be used for genetic engineering experiments with KK3 sugarcane.

**Keywords: Callus, KK3, regeneration, young leaf roll.**

**Ngày nhận bài : 19/4/2021**

**Ngày phản biện : 20/5/2021**

**Ngày quyết định đăng : 04/6/2021**