

Nghiên cứu sự tái sinh một bước *in vitro* của giống mía KK3 (*Saccharum officinarum* L.)

Phan Thị Thu Hiền*

Khoa Sinh - Kỹ thuật Nông nghiệp, Trường Đại học Sư phạm Hà Nội 2,
32 Nguyễn Văn Linh, phường Xuân Hòa, thị xã Phúc Yên, tỉnh Vĩnh Phúc, Việt Nam

Ngày nhận bài 8/11/2021; ngày chuyển phân biện 12/11/2021; ngày nhận phân biện 14/12/2021; ngày chấp nhận đăng 20/12/2021

Tóm tắt:

Nghiên cứu đã thiết lập được công thức môi trường tái sinh trực tiếp của giống mía KK3. Cụ thể, môi trường thích hợp nhất cho việc tái sinh trực tiếp từ cuộn lá non giống mía KK3 là RE2 (MS + 5 mg/l α -NAA + 1 mg/l Kinetin), tỷ lệ tái sinh đạt 25,27% và số chồi hình thành/1 g cuộn lá non là 11,56. Nghiên cứu cho thấy, vị trí mảnh cắt cuộn lá non phù hợp cho tái sinh trực tiếp nhất là cách đỉnh sinh trưởng 2-6 cm, tỷ lệ tái sinh chồi đạt 25,40%, mẫu tái sinh tốt, tỷ lệ tạo đa chồi cao. Khi sử dụng mảnh cắt thực vật có độ dày 1 cm, tỷ lệ tái sinh đạt cao nhất 25,58%, khả năng hình thành đa chồi cao. Thời gian tiền nuôi cấy có ảnh hưởng tích cực lên khả năng tái sinh chồi trực tiếp từ cuộn lá non của giống mía KK3. Khi tiến hành tiền nuôi cấy trong thời gian 4 ngày giúp tăng khả năng tái sinh của giống mía KK3 (đạt 47,49%). Môi trường MS + 5 mg/l α -NAA + 1 mg/l Kinetin có bổ sung 30% nước dừa cho thấy khả năng tái sinh cao nhất (52,95%) và đạt trung bình 52,33 chồi/1 g cuộn lá non.

Từ khóa: cuộn lá non, KK3, mía, một bước, tái sinh trực tiếp.

Chỉ số phân loại: 4.6

1. Đặt vấn đề

Cây mía (*Saccharum officinarum* L.) thuộc chi *Saccharum*, họ Gramineae, lớp một lá mầm (Monocotyledneae), ngành thực vật hạt kín (Magnoliophyta) [1]. Đây là thành viên duy nhất của họ Poaceae [2]. Các giống mía thương mại ngày nay là con lai giữa *Saccharum officinarum* L. (chiếm 80-90% hệ gen) và *Saccharum spontaneum* L. (chiếm 10-20% hệ gen) [3]. Cây mía có đặc tính di truyền đặc biệt là tính dị hợp tử cao, phù hợp nhất với khí hậu nóng ẩm [4].

Hiện nay, có 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 cung cấp nguyên liệu cho khoảng 70% sản lượng đường toàn cầu, ngoài ra còn cung cấp các nguyên liệu cho ngành công nghiệp sản xuất rượu, acid acetic, ethanol, butanol, giấy, ván ép... [5-10]. Những lợi thế về ethanol của cây mía đối với môi trường đã thay thế các nguyên liệu hóa thạch, xăng... giúp cân bằng năng lượng trong thời đại ngày càng khan hiếm hiện nay [11].

Cho đến nay, phương pháp nhân giống mía truyền thống (như giâm hom) vẫn đang được sử dụng phổ biến nhưng có nhược điểm là sự lây nhiễm sâu bệnh qua các thể hệ, thoái hóa giống theo thời gian, không đồng đều về sản phẩm thương mại... đã làm cho phương pháp này không còn phù hợp. Nghiên cứu tái sinh *in vitro* cây mía đã được các nhà khoa học nghiên cứu. Nguyên liệu thực vật sử dụng để nuôi cấy *in vitro* với nguồn mẫu rất đa dạng như: mảnh cắt cuộn lá non [2, 12], phân đoạn hoa non [13], chồi đỉnh và nách

[14], hạt [15]. Hệ thống tái sinh mía *in vitro* đã được nghiên cứu trên nhiều giống mía, chủ yếu sử dụng để tái sinh cây chuyên gen, một phần khác nhằm mục đích nhân giống cung cấp cho thị trường.

Tuy nhiên, việc nuôi cấy với thời gian càng lâu càng xuất hiện nhiều biến dị soma, ảnh hưởng tới khả năng sống sót của cây mía khi ra vườn ươm. Để hạn chế hiện tượng này, chúng tôi tiến hành nghiên cứu quá trình tái sinh một bước từ cuộn lá non giống mía KK3 nhằm rút ngắn thời gian nuôi cấy trong ống nghiệm, giúp hạn chế tối đa các biến dị soma xảy ra trong quá trình nuôi cấy.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu

Cuộn lá non của giống mía KK3 4-6 tháng tuổi trồng tại Vườn thực nghiệm Khoa Sinh - Kỹ thuật Nông nghiệp, Trường Đại học Sư phạm Hà Nội 2 được cung cấp bởi Viện Nghiên cứu Mía đường (Viện Khoa học Nông nghiệp Việt Nam).

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Nghiên cứu khả năng tái sinh chồi trực tiếp từ cuộn lá non: Cây mía 4-6 tháng tuổi giống KK3 khỏe mạnh được thu thập ở Vườn thực nghiệm Khoa Sinh - Kỹ thuật Nông nghiệp, Trường Đại học Sư phạm Hà Nội 2. Thu mẫu ngọn mía và lau bằng cồn 70%. Lần lượt bóc bỏ các lớp bẹ lá bên ngoài, phần cuộn lá non trắng nõn được đưa vào thí nghiệm.

*Email: phanthithuhien@hpu2.edu.vn

Research on the one-step regeneration of sugarcane in KK3 variety (*Saccharum officinarum* L.) *in vitro*

Thi Thu Hien Phan*

Faculty of Biology - Agricultural Engineering, Hanoi Pedagogical University 2,
32 Nguyen Van Linh Street, Xuan Hoa Ward, Phuc Yen Town, Vinh Phuc Province, Vietnam

Received 8 November 2021; revised 14 December 2021; accepted 20 December 2021

Abstract:

The research has successfully created the formula for direct regeneration medium of sugarcane variety KK3. In detail, the most suitable medium for direct regeneration from young leaf rolls of sugarcane variety KK3 was RE2 (MS + 5 mg/l α -NAA + 1 mg/l Kinetin), the regeneration rate was 25.27%, the number of shoots formed/1.0 g of young leaf rolls reached 11.56 shoots. The study showed that the position of the young leaf rolls cuttings suitable for direct regeneration was the cuttings located from 2-6 cm away from the growth apex. The shoot regeneration rate reached 25.40%, the regenerating samples were 25.40%, good yield, and a high rate of multiple shoot formation. When using plant cuttings with a thickness of 1 cm, the highest regeneration rate was 25.58%, and the ability to form multiple shoots was high. Pre-cultivation time had a positive effect on the ability to regenerate shoots directly from young leaf coils of sugarcane variety KK3. When conducting pre-cultivation in four days will help increase the regeneration ability of the sugarcane variety, reaching 47.49%. MS medium + 5 mg/l α -NAA + 1 mg/l Kinetin supplemented with 30% coconut water showed the highest regeneration ability, reaching 52.95%, number of shoots reaching 52.33 shoots/1 g of young leaf rolls.

Keywords: direct regeneration, KK3, one step, *Saccharum officinarum* L., young leaf rolls.

Classification number: 4.6

Cắt cuộn lá non (có chiều dài khoảng 9 cm tính từ đỉnh sinh trưởng) thành nhiều mảnh cắt thực vật, có đường kính 1 cm. Đặt các mảnh cắt thực vật lên đĩa petri chứa môi trường MS có bổ sung α -NAA 5 mg/l và Kinetin 0,5 mg/l (RE1) [4]. Các công thức thí nghiệm khác (RE2, RE3, RE4) được tăng nồng độ α -NAA và Kinetin lên 10 và 1 mg/l (bảng 1). Sau 4 tuần, thống kê số chồi hình thành.

Bảng 1. Thành phần môi trường tái sinh chồi trực tiếp từ cuộn lá non.

Công thức	Thành phần môi trường
ĐC	MS
RE1	MS + 5 mg/l α -NAA + 0,5 mg/l Kinetin
RE2	MS + 5 mg/l α -NAA + 1 mg/l Kinetin
RE3	MS + 10 mg/l α -NAA + 0,5 mg/l Kinetin
RE4	MS + 10 mg/l α -NAA + 1 mg/l Kinetin

Nghiên cứu ảnh hưởng của nguyên liệu vào mẫu đến khả năng tái sinh trực tiếp của giống mía KK3: Để khảo sát khả năng tái sinh trực tiếp, chúng tôi tiến hành sử dụng 3 mẫu khác nhau (đỉnh sinh trưởng, chồi nách và mảnh cắt cuộn lá non) đặt trên môi trường tái sinh trực tiếp. Sau 4 tuần nuôi cấy thống kê số chồi hình thành.

Nghiên cứu ảnh hưởng của vị trí lát cắt đến khả năng tái sinh của giống mía KK3: Nghiên cứu ảnh hưởng của vị trí lát cắt cuộn lá non đến khả năng tái sinh bằng việc đặt trên môi trường tái sinh đã tối ưu các mảnh cắt thuộc 3 nhóm như sau: OP1 cách đỉnh sinh trưởng 1 cm; OP2: cách đỉnh sinh trưởng 2-6 cm; OP3: cách đỉnh sinh trưởng 7-10 cm. Kết quả thí nghiệm được thống kê sau 4 tuần nuôi cấy.

Nghiên cứu ảnh hưởng của độ dày mẫu cấy lên khả năng tái sinh của giống mía KK3: Sử dụng cuộn lá non của giống mía KK3 cắt thành những mảnh cắt có độ dày lần lượt là 1, 2, 3 và 4 cm đặt lên môi trường tái sinh tối ưu. Kết quả được thống kê sau 4 tuần nghiên cứu.

Nghiên cứu ảnh hưởng của thời gian tiền nuôi cấy đến khả năng tái sinh của giống mía KK3: Để nâng cao hiệu suất tái sinh, chúng tôi tiến hành khảo sát ảnh hưởng của thời gian tiền nuôi cấy đến khả năng tái sinh của giống mía KK3 (trong 2, 4 và 6 ngày) trên môi trường tái sinh tối ưu. Sau 4 tuần nuôi cấy thống kê khả năng tái sinh của giống mía KK3.

Nghiên cứu ảnh hưởng của nồng độ nước dừa lên khả năng tái sinh của giống mía KK3: Tiến hành nghiên cứu ảnh hưởng của nồng độ nước dừa trên 5 công thức thí nghiệm được bố trí theo bảng 2. Sau 4 tuần nuôi cấy thống kê tỷ lệ tái sinh.

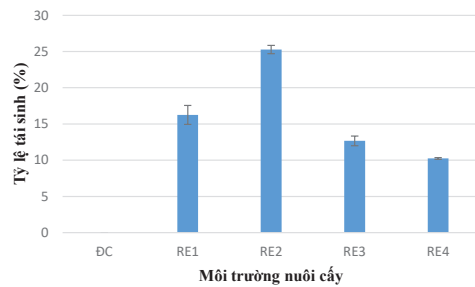
Bảng 2. Môi trường tái sinh một bước giống mía KK3 bổ sung nước dừa với nồng độ khác nhau.

Công thức	Thành phần môi trường
ĐC	MS
CC1	MS + 5 mg/l α -NAA + 1 mg/l Kinetin + 10% nước dừa
CC2	MS + 5 mg/l α -NAA + 1 mg/l Kinetin + 20% nước dừa
CC3	MS + 5 mg/l α -NAA + 1 mg/l Kinetin + 30% nước dừa
CC4	MS + 5 mg/l α -NAA + 1 mg/l Kinetin + 40% nước dừa

3. Kết quả và bàn luận

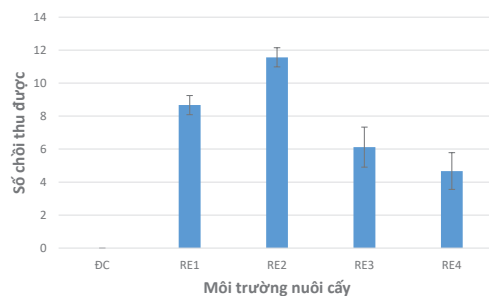
3.1. Ảnh hưởng của nồng độ α -NAA và Kinetin đến sự tái sinh trực tiếp của giống mía KK3

Phương pháp tái sinh trực tiếp chồi mía không qua giai đoạn phôi soma giúp rút ngắn thời gian nuôi cấy, tạo ra được một lượng chồi nhất định trong thời gian ngắn trên môi trường MS cải biên có bổ sung α -NAA và Kinetin [4]. Sự hình thành chồi được ghi nhận sau 4 tuần nuôi cấy được thể hiện ở hình 1 và 2.



Hình 1. Tỷ lệ tái sinh trực tiếp từ cuộn lá non của giống mía KK3 trên môi trường khác nhau.

Kết quả hình 1 cho thấy, trên môi trường MS (đối chứng) không có sự phát sinh chồi trực tiếp từ cuộn lá non. Trên môi trường RE1, RE3 tỷ lệ tái sinh chồi đạt lần lượt là 16,25 và 12,67%. Tỷ lệ tái sinh đạt thấp nhất (10,25%) trên môi trường RE4. Môi trường thích hợp nhất cho việc tái sinh trực tiếp từ cuộn lá non giống mía KK3 là RE2, tỷ lệ tái sinh đạt 25,27%. Kết quả số chồi/1 g cuộn lá non cho thấy, trên môi trường RE1 số chồi thu được đạt 8,67, RE3 là 6,12, RE4 có số chồi thu được thấp nhất (4,67). Môi trường thích hợp nhất cho việc tái sinh trực tiếp từ cuộn lá non là RE2, tỷ lệ tái sinh đạt 11,56 chồi/g cuộn lá non (hình 2). Kết quả thu được cho thấy, để tái sinh chồi chúng tôi đã sử dụng gấp đôi lượng Kinetin so với công thức của R. Gill và cs (2006) [4]. Tuy nhiên, tỷ lệ tái sinh chúng tôi thu được chỉ tương đương với kết quả của R. Gill và cs (2006) [4]. Nguyên nhân hiện tượng này do bản chất di truyền mỗi giống mía khác nhau, dẫn đến khả năng tái sinh của các giống mía trên các môi trường thu được khác nhau.



Hình 2. Số chồi tái sinh từ cuộn lá trên môi trường tái sinh trực tiếp giống mía KK3.

3.2. Ảnh hưởng của các nguyên liệu khác nhau đến khả năng tái sinh chồi trực tiếp

Để tiến hành khảo sát khả năng tái sinh chồi trực tiếp trên các nguyên liệu khác nhau, chúng tôi sử dụng các mẫu cây thực vật khác nhau đặt trên môi trường RE2. Sau 4 tuần thống kê số mẫu tái sinh (bảng 3).

Bảng 3. Ảnh hưởng của nguyên liệu thực vật đến tỷ lệ tái sinh chồi trực tiếp giống mía KK3.

Nguyên liệu thực vật	Tỷ lệ tái sinh (%)
Đỉnh sinh trưởng	6,06 ^c ±0,18
Chồi bên	9,58 ^b ±0,36
Mảnh cắt cuộn lá	25,27 ^a ±0,47
<i>LSD</i> _{0,05}	2,6
<i>CV</i> (%)	0,72

Các chữ cái (a, b, c) thể hiện sự sai khác giữa các công thức nghiên cứu có ý nghĩa thống kê với $\alpha=0,05$.

Kết quả bảng 3 cho thấy, khi sử dụng nguồn mẫu thực vật khác nhau đặt trên môi trường tái sinh MS + 5 mg/l α -NAA + 1 mg/l Kinetin, tỷ lệ tái sinh thấp nhất thu được ở mẫu cây là đỉnh sinh trưởng (6,06%). Trên môi trường này, chồi bên đạt tỷ lệ tái sinh cao hơn (9,58%). mảnh cắt cuộn lá non đạt tỷ lệ tái sinh cao nhất (25,27%). Có hiện tượng này do những mảnh cắt thực vật gần đỉnh sinh trưởng của cây mía tiết ra một lượng lớn phenolic gây độc cho mẫu cây làm ảnh hưởng đến khả năng tái sinh mẫu. Hiện tượng này cũng đã được ghi nhận trong nghiên cứu của R. Kaur và cs (2016) [2].

Như vậy, trên môi trường MS + 5 mg/l α -NAA + 1 mg/l Kinetin, mảnh cắt cuộn lá non của giống mía KK3 cho tỷ lệ tái sinh cao nhất trong các vật liệu sử dụng để nuôi cấy (đạt 25,27%).

3.3. Ảnh hưởng của vị trí lát cắt đến khả năng tái sinh của mẫu

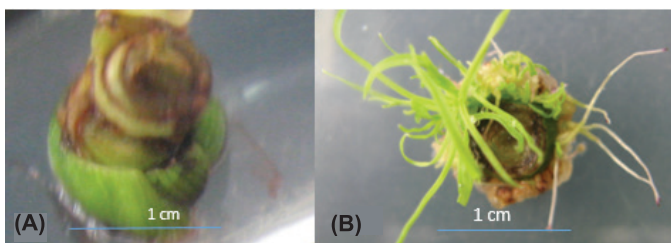
Vị trí lát cắt của cuộn lá non cũng ảnh hưởng đến khả năng tái sinh của mẫu ở giống mía KK3. Các mảnh cắt cuộn lá non thuộc nhóm OP1 (cách đỉnh sinh trưởng 1 cm), OP2 (cách đỉnh sinh trưởng 2-6 cm) và OP3 (cách đỉnh sinh trưởng 7-10 cm) của giống mía KK3 được đặt trên môi trường tái sinh chồi trực tiếp MS + 5 mg/l α -NAA + 1 mg/l Kinetin. Kết quả được trình bày ở bảng 4.

Bảng 4. Ảnh hưởng của vị trí lát cắt mẫu lên khả năng tái sinh trực tiếp giống mía KK3.

Vị trí của mẫu	Tỷ lệ tái sinh	Đặc điểm của mẫu
OP1	9,10 ^a ±0,28	Phenolic tiết ra nhiều
OP2	25,40 ^b ±0,69	Tái sinh tốt, tỷ lệ tạo đa chồi cao
OP3	16,14 ^b ±0,52	Tỷ lệ tạo rễ cao
<i>LSD</i> _{0,05}	1,04	
<i>CV</i> (%)	3,1	

Các chữ cái (a, b, c) thể hiện sự sai khác giữa các công thức nghiên cứu có ý nghĩa thống kê với $\alpha=0,05$.

Kết quả bảng 4 và hình 3 cho thấy, vị trí OP2 cho tỷ lệ tái sinh cao nhất (đạt 25,40%), OP1 cho tỷ lệ tái sinh thấp nhất (đạt 9,10%), nguyên nhân do các mẫu gần đỉnh sinh trưởng có rất nhiều chất phenolic thứ cấp tiết ra trong quá trình nuôi cấy, dẫn đến gây độc mẫu và làm giảm tỷ lệ tái sinh. Khi đặt các mảnh cắt ở vị trí OP3 cho tỷ lệ tái sinh chỉ đạt 16,14%, nhưng mẫu có tỷ lệ tạo rễ bất định cao (bảng 4). Hiện tượng này xảy ra do mẫu già, nồng độ auxin nội sinh cao dẫn đến ưu tiên hình thành tạo rễ.



Hình 3. Hiệu quả tái sinh chồi từ cuộn lá non ở các vị trí khác nhau. (A) Vị trí OP1; (B) Vị trí OP2.

Như vậy, vị trí mảnh cắt cuộn lá non phù hợp cho tái sinh trực tiếp nhất là các mảnh cắt cách đỉnh sinh trưởng 2-6 cm, tỷ lệ tái sinh chồi đạt 25,40%, mẫu tái sinh tốt, tỷ lệ tạo đa chồi cao.

3.4. Ảnh hưởng của độ dày mẫu lên khả năng tái sinh của giống mía KK3

Độ dày của mảnh mô cũng là yếu tố ảnh hưởng đến khả năng tái sinh của giống mía KK3. Chúng tôi sử dụng mảnh cắt có độ dày lần lượt là 1, 2, 3 và 4 cm. Kết quả được trình bày ở bảng 5.

Bảng 5. Ảnh hưởng của độ dày mảnh mô đến khả năng tái sinh chồi trực tiếp của giống mía KK3.

Độ dày của mảnh mô (cm)	Tỷ lệ tái sinh	Khả năng hình thành đa chồi
1	25,58 ^a ±0,78	Tốt
2	18,33 ^b ±0,72	Trung bình
3	12,17 ^c ±0,94	Trung bình
4	8,87±0,65	Ít
<i>LSD</i> _{0,05}	1,47	
<i>CV</i> (%)	4,8	

Các chữ cái (^{a, b, c}) thể hiện sự sai khác giữa các công thức nghiên cứu có ý nghĩa thống kê với $\alpha=0,05$.

Kết quả bảng 5 cho thấy, sử dụng mảnh cắt thực vật có độ dày 4 cm cho tỷ lệ tái sinh thấp nhất (đạt 8,87%) và khả năng hình thành đa chồi thấp. Khi sử dụng mảnh cắt thực vật có độ dày giảm dần, tỷ lệ tái sinh tăng dần. Cụ thể, với độ dày 3 và 2 cm, tỷ lệ tái sinh đạt lần lượt là 12,17 và 18,33%, khả năng hình thành đa chồi trung bình. Khi sử dụng mảnh cắt thực vật có độ dày 1 cm, tỷ lệ tái sinh đạt cao nhất (25,58%), khả năng hình thành đa chồi tốt.

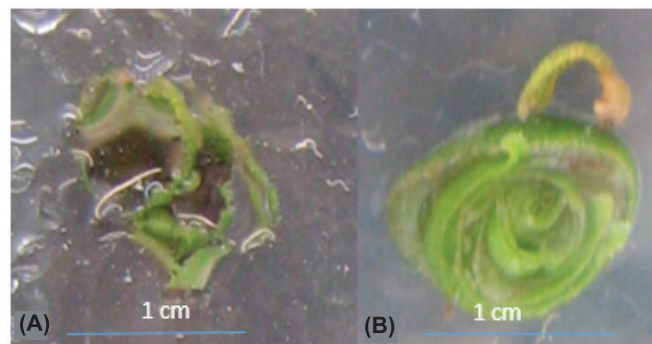
3.5. Ảnh hưởng của thời gian tiền nuôi cấy đến khả năng tái sinh của giống mía KK3

Để nghiên cứu thời gian tiền nuôi cấy tác động đến khả năng tái sinh của giống mía KK3, chúng tôi tiến hành tiền nuôi cấy với thời gian lần lượt 2, 4 và 6 ngày để khảo sát khả năng tái sinh của giống mía KK3. Kết quả được trình bày ở bảng 6.

Bảng 6. Ảnh hưởng của thời gian tiền nuôi cấy đến khả năng tái sinh của giống mía KK3.

Thời gian tiền nuôi cấy (ngày)	Tỷ lệ tái sinh (%)
ĐC	24,26 ^a ±0,74
2	33,75 ^b ±1,08
4	47,49 ^a ±0,79
6	34,03 ^b ±0,60
<i>LSD</i> _{0,05}	1,55
<i>CV</i> (%)	2,40

Các chữ cái (^{a, b, c}) thể hiện sự sai khác giữa các công thức nghiên cứu có ý nghĩa thống kê với $\alpha=0,05$.



Hình 4. Cuộn lá non khi nuôi cấy 4 ngày (A) và 6 ngày (B).

Kết quả bảng 6 và hình 4 cho thấy, khi không tiến hành tiền nuôi cấy (ĐC), tỷ lệ tái sinh đạt 24,26%. Khi tiến hành tiền nuôi cấy trước 2 ngày, tỷ lệ tái sinh đạt cao hơn (33,75%). Nâng số ngày tiền nuôi cấy lên 4 ngày, tỷ lệ tái sinh đạt 47,49%. Khi tiền nuôi cấy 6 ngày, tỷ lệ tái sinh đạt 34,03%. Thời gian tiền nuôi cấy là một công đoạn quan trọng, trong quá trình này phenolic sẽ được tiết ra, khi được chuyển sang môi trường mới lượng chất này sẽ tiết ra ít hơn, đảm bảo cho việc tái sinh dễ dàng và hiệu quả cao hơn.

Như vậy, thời gian tiền nuôi cấy ảnh hưởng tích cực lên khả năng tái sinh chồi trực tiếp từ cuộn lá non của giống mía KK3. Khi tiến hành tiền nuôi cấy trong thời gian 4 ngày sẽ giúp tăng khả năng tái sinh của giống mía (đạt 47,49%).

3.6. Ảnh hưởng của nồng độ nước dừa lên khả năng tái sinh của giống mía KK3

Nước dừa là một dung dịch có ý nghĩa quan trọng trong việc nâng cao khả năng tái sinh chồi của cây. Ở giống mía KK3, chúng tôi sử dụng 5 công thức môi trường khác nhau để khảo sát nồng độ nước dừa thích hợp. Kết quả được trình bày ở bảng 7.

Bảng 7. Ảnh hưởng của nước dừa đến khả năng tái sinh chồi của giống mía KK3.

Công thức	Tỷ lệ tái sinh (%)	Số chồi hình thành (chồi/g cuộn lá non)
ĐC (0% nước dừa)	26,31 ^a ±1,18	22,33 ^a ±0,58
CC1 (10% nước dừa)	32,51 ^b ±0,81	30,67 ^b ±2,52
CC2 (20% nước dừa)	46,58 ^b ±3,22	37,67 ^b ±1,15
CC3 (30% nước dừa)	52,95 ^a ±0,78	52,33 ^a ±0,58
CC4 (40% nước dừa)	36,92 ^a ±0,72	32,33 ^a ±0,58
LSD _{0,05}	3,00	2,40
CV (%)	4,20	3,80

Các chữ (a, b, c) thể hiện sự sai khác giữa các công thức nghiên cứu có ý nghĩa thống kê với $\alpha=0,05$.



Hình 5. Hiện tượng tái sinh chồi từ cuộn lá non sau 4 tuần nuôi cấy.

Về tỷ lệ tái sinh chồi, kết quả bảng 7 và hình 5 cho thấy, trên môi trường đối chứng, tỷ lệ tái sinh đạt 26,31%, số chồi hình thành/1 g cuộn lá non là 22,33. Khi sử dụng môi trường tái sinh có bổ sung 10% nước dừa, tỷ lệ tái sinh đạt 32,51%, số chồi hình thành/1 g cuộn lá non là 30,67. Khi tăng lượng nước dừa lên 20%, tỷ lệ tái sinh đạt 46,58%, số chồi hình thành/1 g cuộn lá non đạt 37,67. Khi tăng nồng độ nước dừa lên 30%, tỷ lệ tái sinh đạt cao nhất 52,95%, số chồi hình thành/1 g cuộn lá non đạt 52,33. Tuy nhiên, khi tăng nồng độ nước dừa lên 40%, tỷ lệ tái sinh giảm, chỉ đạt 36,92%, số chồi hình thành đạt 32,33 chồi/1 g cuộn lá non.

Như vậy, môi trường MS + 5 mg/l α -NAA + 1 mg/l Kinetin có bổ sung 30% nước dừa cho thấy khả năng tái sinh cao nhất (đạt 52,95%), số chồi đạt 52,33 chồi/1 g cuộn lá non.

4. Kết luận

Nghiên cứu đã thiết lập thành công công thức môi trường tái sinh trực tiếp của giống mía KK3. Theo đó, môi trường thích hợp nhất cho việc tái sinh trực tiếp từ cuộn lá non giống mía KK3 là RE2 (MS + 5 mg/l α -NAA + 1 mg/l Kinetin), tỷ lệ tái sinh đạt 25,27%, số chồi hình thành/1 g cuộn lá non đạt 11,56 chồi.

Trong tất cả các mẫu đem nuôi cấy, mảnh cắt cuộn lá non là mẫu cấy cho thấy khả năng tái sinh cao nhất với tỷ lệ tái sinh đạt 25,27%. Kết quả nghiên cứu cho thấy, vị trí mảnh cắt cuộn lá non phù hợp cho tái sinh trực tiếp nhất là các mảnh cắt thuộc vị trí cách đỉnh sinh trưởng 2-6 cm, tỷ lệ tái sinh chồi đạt 25,40%, mẫu tái sinh tốt, tỷ lệ tạo đa chồi cao.

Khi sử dụng mảnh cắt thực vật có độ dày 1 cm, tỷ lệ tái sinh đạt cao nhất 25,58%, khả năng hình thành đa chồi cao.

Thời gian tiền nuôi cấy ảnh hưởng tích cực lên khả năng tái sinh chồi trực tiếp từ cuộn lá non của giống mía KK3. Khi tiến hành tiền nuôi cấy trong thời gian 4 ngày sẽ giúp gia tăng khả năng phát sinh chồi (47,49%).

Môi trường MS + 5 mg/l α -NAA + 1 mg/l Kinetin có bổ sung 30% nước dừa cho thấy khả năng tái sinh cao nhất, đạt 52,95%, số chồi đạt 52,33 chồi/1 g cuộn lá non.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu được thực hiện từ nguồn kinh phí của đề tài "Nghiên cứu tạo cây mía kháng bệnh sử dụng công nghệ gen" (mã số C.2020-SP2-04). Tác giả xin chân thành cảm ơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] D.N. Vinh (2006), *Applied Plant Cell Technology*, Agriculture Publishing House (in Vietnamese).
- [2] R. Kaur, M. Kapoor (2016), "Plant regeneration through somatic embryogenesis in sugarcane", *Sugar Tech.*, **18**, pp.93-99.
- [3] J.Y. Hoarau, L. Grivet, B. Offmann, et al. (2002), "Genetic dissection of a modern sugarcane cultivar (*Saccharum* spp.). II. Detection of QTLs for yield components", *Theor. Appl. Genet.*, **105**(6), pp.1027-1037.
- [4] R. Gill, P.K. Malhotra, S.S. Gosal (2006), "Direct plant regeneration from cultured young leaf segments of sugarcane", *Plant Cell, Tis. and Org. Cul.*, **84**(2), pp.227-231.
- [5] P. Lakshmanan, R.J. Geijskes, K.S Aitken (2005), "Sugarcane biotechnology: The challenges and opportunities", *In Vitro Cell Dev. Biol. Plant*, **41**, pp.345-363.
- [6] R.B. McQualter, B.F. Chong, K. Meyer, et al. (2005), "Initial evaluation of sugarcane as a production platform for p-hydroxybenzoic acid", *Plant Biotechnol. J.*, **3**, pp.29-41, DOI: 10.1111/j.1467-7652.2004.00095.x.
- [7] L.A. Petrasovits, R.B.M. Qualter, K. Leigh, et al. (2013), "Chemical inhibition of acetyl coenzyme A carboxylase as a strategy to increase polyhydroxybutyrate yields in transgenic sugarcane", *Plant Biotechnol. J.*, **11**, pp.1146-1151, DOI: 10.1111/pbi.12109.
- [8] S. Raghavi, R. Sindhu, P. Binod, et al. (2015), "Development of a novel sequential pretreatment strategy for the production of bioethanol from sugarcane trash", *Bioresour. Technol.*, **199**, pp.202-210, DOI: 10.1016/j.biortech.2015.08.062.
- [9] M. Zhang, X. Zhuo, J. Wang, et al. (2015), "Effective selection and regeneration of transgenic sugarcane plants using positive selection system", *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.*, **51**, pp.52-61.
- [10] W. Yao, M. Ruan, L. Qin, et al. (2017), "Field performance of transgenic sugarcane lines resistant to sugarcane mosaic virus", *Frontiers in Plant Sci.*, **8**, DOI: 10.3389/fpls.2017.00104.
- [11] L. Wang, X. Shi, J. Zhang, et al. (2020), "Lightweight and robust rGO/sugarcane derived hybrid carbon foams with outstanding EMI shielding performance", *J. Mater. Res. Technol.*, **52**, pp.119-126, DOI: 10.1016/j.jmst.2020.03.029.
- [12] T. Kumar, Uzma, M.R. Khan, et al. (2014), "Genetic improvement of sugarcane for drought and salinity stress tolerance using Arabidopsis vacuolar pyrophosphatase (AVP1) gene", *Mol. Biotechnol.*, **56**(3), pp.199-209.
- [13] V.Y. Patade, P. Suprasanna (2006), "Advances in the development of *in vitro* culture systems and transgenics in sugarcane", *Int. Symp. Technologies to Improve Sugar Productivity in Developing Countries*, pp.629-636.
- [14] S. Biradar, D.P. Biradar, V.C. Patil, et al. (2009), "In vitro plant regeneration using shoot tip culture in commercial cultivar of sugarcane", *Karnataka IJAAS*, **22**(1), pp.21-24.
- [15] S. Mayavan, K. Subramanyam, M. Arun, et al. (2013), "Agrobacterium tumefaciens - mediated in planta seed transformation strategy in sugarcane", *Plant Cell Rep.*, **32**(10), pp.1557-1574.a