

NGHIÊN CỨU TÂY SẠCH VIRUS TRÊN MỘT SỐ GIỐNG KHOAI TÂY: KT2, KT3 VÀ VC38 - 6

Nguyễn Thị Vân¹, Nghiêm Thị Hương²

TÓM TẮT

Khoai tây là cây trồng quan trọng có giá trị kinh tế và dinh dưỡng cao. Tuy nhiên việc sử dụng nguồn giống được người nông dân thực hiện theo phương pháp bảo quản liên vụ dẫn đến các giống khoai tây bị thoái hóa, không đảm bảo chất lượng. Đây là vấn đề cần được khắc phục ngay. Vì vậy trong nghiên cứu này tôi đề cập đến kỹ thuật tách meristem để khắc phục hạn chế nói trên. Chúng ta có thể phục tráng lại các giống khoai tây bị thoái hóa cung cấp giống khoai tây sạch bệnh phục vụ sản xuất.

Từ khóa: Khoai tây, bệnh virus, tách meristem, phục tráng giống.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Khoai tây là cây trồng quan trọng có giá trị kinh tế và giá trị dinh dưỡng cao. Trong sản xuất cây khoai tây được nhân giống chủ yếu bằng củ. Theo Nguyễn Quang Thạch, Hoàng Minh Tấn và cộng sự, 1993 [4] có hai nguyên nhân chính gây ra hiện tượng thoái hoá củ giống. Đó là thoái hoá do bệnh lý (nhiễm virus) và thoái hoá do sinh lý (củ giống bị già hoá sinh lý do bảo quản trong điều kiện nóng ẩm).

Hiện tượng thoái hoá giống do virus rất phổ biến, lây lan nhanh và gây thiệt hại bình quân 13% sản lượng khoai tây trên toàn thế giới. Trong sản xuất khoai tây ở nhiều vùng nước ta, các giống khoai tây KT2, KT3 (Bắc Ninh, Bắc Giang), VC38-6 (Thường Tín - Hà Nội) rất được nông dân ưa chuộng vì có nhiều đặc tính quý như: thời gian sinh trưởng ngắn, có thể trồng vào vụ đông sớm, năng suất ổn định, chất lượng tốt, mắt củ nông Tuy nhiên, do sử dụng bằng nguồn giống thực hiện theo phương pháp bảo quản liên vụ dẫn đến các giống khoai tây bị thoái hóa không đảm bảo chất lượng. Đây là vấn đề cần được khắc phục ngay nhằm phát triển sản xuất khoai tây với hiệu quả cao ở nước ta.

Phương pháp nuôi cấy mô phân sinh đỉnh (meristem) tạo nguồn giống sạch bệnh và chống tái nhiễm trong nhân giống cho đến nay vẫn còn được coi là giải pháp đúng đắn, có hiệu quả cao được các nhà nghiên cứu về bệnh cây, sinh lý, sinh hoá thực vật các nhà chọn tạo giống và người sản xuất công nhận [6], [7], [1].

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Các giống khoai tây KT2, KT3, VC38-6, do Trung tâm cây có củ Viện cây lương thực - thực phẩm chọn tạo.

^{1,2} Giảng viên khoa Nông - Lâm - Ngư nghiệp, trường Đại học Hồng Đức

2.2. Nội dung nghiên cứu

2.2.1. Thí nghiệm 1

Ảnh hưởng của tổ hợp KI và GA₃ đến khả năng tái sinh của meristem

+ ĐC : Môi trường MS

+ CT 1: ĐC + 0,04ppm Kinetin + 0,5ppm GA₃

+ CT 2: ĐC + 0,1ppm Kinetin + 0,1ppm GA₃

+ CT 3: ĐC + 0,1ppm Kinetin + 1ppm GA₃

+ CT 4: ĐC + 0,1ppm Kinetin + 2ppm GA₃

+ CT 5: ĐC + 0,1ppm Kinetin + 3ppm GA₃

+ CT 6: ĐC + 0,1ppm Kinetin + 4ppm GA₃

2.2.2. Thí nghiệm 2

Ảnh hưởng của kích thước khác nhau đến khả năng tái sinh meristem.

Thí nghiệm tiến hành trên các kích thước của meristem:

CT 1: 0,1mm

CT 2: 0,3mm

CT 3: 0,5mm

2.3. Phương pháp nghiên cứu

Các thí nghiệm được tiến hành trong phòng nuôi cấy mô, theo phương pháp ngẫu nhiên hoàn toàn, 3 lần lặp lại, mỗi lần lặp lại trên 30 mẫu, các chỉ tiêu theo dõi 7 ngày/lần.

Phương pháp tách meristem

a. Chuẩn bị

Mẫu giống cây cần tách.

Buồng tách đã vô trùng (bật tia UV).

Các dụng cụ dao, kéo, panh đã tiệt trùng bằng ngọn lửa đèn cồn 90°.

Kính hiển vi tách Meristem đã vô trùng.

Cồn 70° để lau dụng cụ và thiết bị.

b. Tiến hành

Tiến hành vô trùng tay bằng cồn 70° trước khi vào buồng tách.

Mẫu cây cần tách đã vô trùng lưu giữ trong các bình thuỷ tinh lau sạch bằng cồn 70°.

Dùng panh vô trùng gấp cây ra khỏi bình sau đó dùng kéo cắt bỏ rễ cây.

Các đỉnh ngọn được đặt dưới kính hiển vi quan sát tiến hành các thao tác.

Cắt bỏ lá trẻ nhất hướng về đỉnh sinh trưởng.

Cắt bỏ lá nguyên thuỷ lớn nhất.

Cắt bỏ đôi lá nguyên thuỷ trẻ nhất còn lại để lộ ra phần lõi của mô phân sinh.

Tách và cấy vào môi trường thích hợp.

Các chỉ tiêu theo dõi

$$\text{Tỷ lệ mẫu tái sinh (\%)} = \frac{\text{Số mẫu tái sinh}}{\text{Tổng số mẫu ban đầu}} \times 100$$

2.4. Xử lý số liệu

Các số liệu được xử lý theo chương trình Excel 2003 và IRISTAT 4.0

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Thí nghiệm 1

Ảnh hưởng của tổ hợp KI và GA₃ đến khả năng tái sinh của meristem.

Từ kết quả thu được ở bảng 1 cho thấy :

Việc bổ sung GA₃ và kinetin có ảnh hưởng rất lớn đến khả năng bật chồi của meristem sau khi tách.

Ở công thức đối chứng môi trường MS không bổ sung kinetin và GA₃ không có hiện tượng bật chồi ở meristem.

Môi trường bổ sung kinetin và GA₃ đã cho tỷ lệ bật chồi từ 19,13% đến 39,34% sau 7 ngày nuôi cấy.

Ở tất cả các giống chỉ sau 7 ngày khả năng bật chồi ở công thức 2 là cao nhất (39,34%) và thấp nhất ở CT5 và CT6 (19,13%).

Bảng 1. Ảnh hưởng của hàm lượng KI và GA₃ đến đến khả năng tái sinh của meristem

Giống \ MT		ĐC	CT1	CT2	CT3	CT4	CT5	CT6
KT2	7 ngày	0	33,11	39,34	25,34	17,01	23,20	19,13
	14 ngày	0	33,11	39,34	25,59	25,51	29,59	25,51
	21 ngày	0	33,11	39,34	25,59	25,51	29,59	25,51
KT3	7 ngày	0	32,33	32,33	16,66	13,67	11,00	11,00
	14 ngày	0	32,33	32,33	19,44	13,67	15,89	16,55
	21 ngày	0	32,33	32,33	19,44	13,67	15,89	16,55
VC38-6	7 ngày	0	25,66	25,66	19,00	19,00	19,00	19,00
	14 ngày	0	25,66	25,66	23,76	9,33	23,76	23,76
	21 ngày	0	25,66	25,66	23,76	9,33	28,38	28,38

Đối với giống KT2:

Sau 7 ngày có tỷ lệ phản ứng trên các CT từ 17,01% đến 39,34%.

Sau 14 ngày trên các môi trường có bổ sung KI và GA₃ đã cho tỷ lệ bật chồi tăng hơn so với 7 ngày: CT3 tăng 4,25%; CT4 tăng 8,50%; CT5 (6,39%); CT6 (6,38%).

Giống KT2 thì CT1 và CT2 cho tỷ lệ phản ứng sau 21 ngày là cao nhất (33,11%) và (39,34%).

Đối với giống KT3:

Sau 7 ngày tỷ lệ bật chồi từ 11% đến 32,33%. Tỷ lệ cao nhất ở CT1(32,33%). Thấp nhất ở CT5 và CT6 (11%) như vậy sau 7 ngày tỷ lệ phản ứng bật chồi có sự chênh lệch giữa CT1; CT2 với CT5; CT6 là 21,33%

Sau 14 - 21 ngày ở CT5 và CT6 có sự chênh lệch tỷ lệ phản ứng bật chồi so với 7 ngày đầu là 15,75% và 16,4% và ở CT4 tỷ lệ phản ứng bật chồi không đổi qua các thời gian tiếp sau.

Như vậy trên giống KT3 chỉ sau 7 ngày đã cho tỷ lệ phản ứng cao nhất là 32,33% trên CT1 và CT2 và tỷ lệ này không đổi ở các thời gian sau. Đối với các CT khác sau 21 ngày tỷ lệ phản ứng tăng so với thời gian đầu: CT3 (2,78%); CT5 (4,89%); CT6 (5,55%).

Đối với giống VC38-6:

Sau 7 ngày cho tỷ lệ phản ứng bật chồi từ 9,33% đến 25,66%. Trong đó tỷ lệ bật chồi trên CT1 và CT2 là cao nhất (25,66%) sau đó là CT3 và CT4 (19%) và thấp nhất ở CT5 và CT6 (9,33%).

Sau 14 ngày khoảng cách tỷ lệ bật chồi so với 7 ngày đầu tăng lên ở CT5 (19,05%) và CT6 (14,43%).

Sau 21 ngày đã có sự thay đổi lớn về tỷ lệ trên các CT theo dõi: CT6 cho tỷ lệ cao nhất 28,38% tiếp đến là CT1 và CT2 đạt 25,66%, tiếp sau là CT3 và CT5 (23,76%) và cuối cùng là CT4 (19%).

Như vậy sau 21 ngày theo dõi giống VC38-6 có tỷ lệ bật chồi cao nhất ở CT6 (28,38%).

Từ phân tích số liệu bảng trên ta thấy: khả năng bật chồi của giống KT2 là cao nhất so với các giống nghiên cứu là 33,11% (CT1); 39,34% (CT2); 25,34% (CT3) và 17,01% ở CT4. Trong CT6 thì giống VC38-6 cho tỷ lệ bật chồi cao nhất (28,38%) sau 21 ngày theo dõi.

Vậy hàm lượng KI và GA_3 có ảnh hưởng rất lớn đến khả năng bật chồi meristem các giống khoai tây và tùy theo mỗi giống mức độ biểu hiện tỷ lệ bật chồi khác nhau. Tuy nhiên tỷ lệ bật chồi trên các giống cao nhất tập trung chủ yếu ở CT1 và CT2 (hàm lượng KI và GA_3 tương đối thấp). Hàm lượng KI và GA_3 cao nhất ở CT6 thì giống VC38-6 cho tỷ lệ bật chồi nhiều nhất.

Qua quá trình nghiên cứu đánh giá bước đầu về ảnh hưởng của KI và GA_3 đến khả năng bật chồi meristem ở các giống sau khi tách nuôi qua 3 tuần trước khi cấy chuyển ra môi trường nuôi cấy tái sinh, chúng tôi đã xác định môi trường thích hợp cho nuôi cấy meristem trên các giống khoai tây nghiên cứu là: MS + 0,04ppm kinetin + 0,5ppm GA_3



KT2(CT3)



KT3(CT3)



VC38-6 (CT1)

Hình 1. Ảnh hưởng của hàm lượng KI và GA_3 đến khả năng tái sinh của meristem sau 21 ngày nuôi cấy

3.2. Ảnh hưởng của các kích thước khác nhau đến khả năng tái sinh của meristem

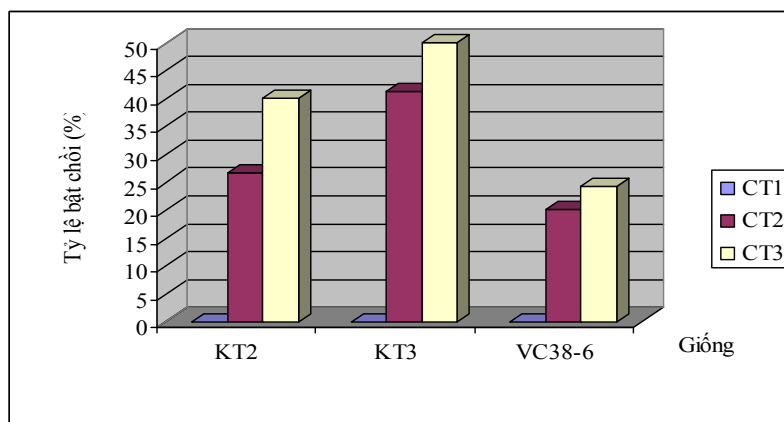
Khi tách meristem ở kích thước càng nhỏ thì khả năng loại trừ virus càng cao, nhưng nếu ta tách ở kích thước quá nhỏ thì tỷ lệ tái sinh cây rất thấp thậm chí không thể tái sinh thành cây.

Bảng 2. Ảnh hưởng của kích thước meristem đến tỷ lệ bật chồi của các giống khoai tây sau 21 ngày

Giống	KT2			KT3			VC38-6		
Kích thước	CT1	CT2	CT3	CT1	CT2	CT3	CT1	CT2	CT3
Tỷ lệ bật chồi (%)	0	26,67	40,00	0	41,18	50	0	20,20	24,22
Độ dài meristem (mm)	-	2,12	3,10	-	3,46	4,22	-	2,46	4,70

(CT1: Kích thước 0,1mm; CT2: Kích thước 0,3mm; CT3: Kích thước 0,5mm)

Kích thước meristem có ảnh hưởng rất lớn đến khả năng bật chồi của các giống khoai tây. Kích thước càng lớn thì tỷ lệ tái sinh thành cây càng cao. Kích thước 0,5mm có tỷ lệ mọc cao nhất đối với tất cả các giống, cao nhất là giống KT3 (50%). Kích thước 0,1mm không có khả năng bật chồi hình thành cây.



Hình 2. Ảnh hưởng của kích thước tách meristem đến tỷ lệ bật chồi của các giống khoai tây

Qua bảng trên cho thấy kích thước ảnh hưởng đến khả năng sinh trưởng của cây khoai tây. Với kích thước 0,5mm sau các tuần nuôi cấy cho khả năng sinh trưởng, phát triển về chiều cao lớn hơn so với kích thước 0,3mm và lớn nhất ở giống VC38-6 (4,70mm). Vậy kích thước meristem càng lớn thì khả năng bật chồi càng cao và khả năng sinh trưởng của cây càng mạnh.

Theo các nghiên cứu của Morel G và Martin C (1955) [6] thì kích thước có ảnh hưởng đến khả năng làm sạch virus. Sau khi tái sinh thành cây chúng tôi tiến hành test ELISA và thu được kết quả thể hiện ở bảng 3.

Theo thống kê từ những kết quả về bệnh virus hại khoai tây trên thế giới thì có 6 loài virus chủ yếu (có tính phổ biến rộng rãi với nồng độ cao) gây hại có ý nghĩa kinh tế ở khoai tây là virus gây cuốn lá X, Y, A, S, M (Mai Thị Tân, 1998) [3]. Theo số liệu điều tra của Vũ Triệu Mân (1986) [2] thì những củ khoai tây bị nhiễm bệnh virus X, Y, S, M và cuốn lá khi đưa vào bảo quản đều tăng lượng củ thối và giảm khả năng nảy mầm.

Ở Việt Nam theo kết quả điều tra của Nguyễn Quang Thạch, Hoàng Minh Tân, Vũ Triệu Mân và cộng sự (1994) [5] ở vùng đồng bằng Bắc Bộ cho thấy các khóm bị bệnh vẫn cho nhiều củ và khối lượng củ thấp, tỉ lệ củ nhỏ cao dẫn đến năng suất cuối cùng giảm từ 40,7%-88,1% so với khóm khỏe.

Bảng 3. Ảnh hưởng của các yếu tố khác nhau đến kết quả tẩy sạch virus trên giống KT2 và VC38-6

Giống	Kích thước (mm)	Kết quả đánh giá độ sạch bệnh	
		Tỷ lệ sạch virus X (%)	Tỷ lệ sạch virus Y (%)
KT2	0,3	20%	13%
	0,5	0	0
VC38-6	0,3	-	15%
	0,5	-	0,5%

Qua kết quả test ELISA cho thấy kích thước meristem ảnh hưởng đến kết quả làm sạch virus của cây khoai tây. Đối với giống KT2 tỷ lệ làm sạch virus ở kích thước 0,3mm là 20% đối với virus X và 13% đối với virus Y. Còn với kích thước 0,5mm không có khả năng làm sạch virus trên giống KT2.

Đối với giống VC38-6, ở kích thước 0,3mm có khả năng làm sạch virus Y với 15% số mẫu tách và kích thước 0,5mm có khả năng làm sạch virus Y với 0,5% số mẫu tách. Giống này không nhiễm virus X.

Vậy kích thước càng lớn thì khả năng làm sạch virus càng giảm.

4. KẾT LUẬN

Môi trường thích hợp để nuôi cấy meristem khoai tây là: MS + 0,04ppm KI + 0,5 ppm GA₃. Các chất điều tiết sinh trưởng KI và GA₃ có ảnh hưởng đến khả năng bật chồi cũng như sự tăng trưởng của meristem khoai tây. Nồng độ GA₃ thích hợp cho nuôi cấy meristem là 0,5mg/l môi trường nuôi cấy.

Kích thước meristem có ảnh hưởng tới khả năng bật chồi và tăng trưởng của meristem khoai tây. Meristem tách ở kích thước < 0,3mm không thể tái sinh và chết 100%. Meristem tách ở kích thước 0,5mm cho tỷ lệ bật chồi cao nhất là 50%.

Kích thước meristem nuôi cấy có ảnh hưởng rất rõ đến kết quả làm sạch virus. Tách meristem ở kích thước 0,3mm có thể làm sạch virus tốt nhất thể hiện trên 2 giống khoai tây KT2, VC38-6. Với giống KT2 thì ở kích thước 0,3mm đã làm sạch được Virus X với tỷ lệ là 20% và Virus Y với tỷ lệ là 13%. Với giống VC38-6 thì ở kích thước này chỉ có khả năng làm sạch Virus Y với tỷ lệ là 15 %. Như vậy, ở kích thước 0,3mm cho tỷ lệ sạch virus Y tốt nhất ở giống VC38-6.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Lê Trần Bình, Hồ Hữu Nhị, Lê Thị Muội (1997), *Công nghệ sinh học trong cải tiến giống cây trồng*, Nxb. Nông Nghiệp, Hà Nội.
- [2] Vũ Triệu Mân (1986), *Bệnh virus hại khoai tây*, Nxb. Khoa học Kỹ Thuật, Hà Nội.
- [3] Mai Thị Tân (1998), *Nuôi cấy meristem và vấn đề phục tráng, cải lương giống khoai tây*, chuyên đề tiên sỹ nông nghiệp ngành nông học, trường Đại học Nông nghiệp, Hà Nội.
- [4] Nguyễn Quang Thạch, Hoàng Minh Tấn và cs (1993), *Một số kết quả nghiên cứu về quá trình già hóa củ giống khoai tây trong bảo quản*, Tạp chí NN và CNTP, Nxb. Nông nghiệp, Hà Nội.
- [5] Nguyễn Quang Thạch, Hoàng Minh Tấn, Vũ Triệu Mân, Mai Thị Tân, Ngô Bích Thảo (1994), *Nghiên cứu phục tráng giống khoai tây thường tín bằng phương pháp nuôi cấy meristem và chọn lọc đồng ruộng*, Báo cáo nghiệm thu đề tài cấp bộ, trường Đại học Nông nghiệp, Hà Nội.
- [6] Morel G., Martin C.(1955), *Guerison dpommes de terre atteintes de maladie a viru*, Comptes rendus de Lacdemie Agrecole Drancaisw, 41, pp 472-745.
- [7] Norris D.O.(1954), *Development of a virus - free stock of green Moutain potato by treatment with malachite green*, Aus.J., Agri.res,5, pp 658-663.

STUDY ON SOME VIRUS CLEANERS OF POTATOES: KT2 , KT3 AND VC38 - 6

Nguyen Thi Van, Nghiem Thi Huong

ABSTRACT

Potato crop is of high economical and nutritional value. However, the using of potato varierty which was performed following the interdepartmental perservation method could result in the degradation of potato varierty and reduce its quality. This problem has to be resolved immediately. Therefore, meristem separation was used to overcome this limitation in this reaseach. By this way, the degenerated potato varieties were reinvigorated to provide the disease free potato varieties for production.

Keywords: *Potato, virus diseases, split meristem.*