Tạp chí Công nghệ Sinh học **16**(2): 285-292, 2018

GIẢI TRÌNH TỰ GEN *MATK*, PHÂN LOẠI VÀ NHÂN NHANH *IN VITRO* GIỐNG KHOAI MỠ ĐỊA PHƯƠNG (*DIOSCOREA SP.*) TRỒNG TẠI MƯỜNG KHƯƠNG, LÀO CAI

Cao Phi Bằng[1], La Việt Hồng[2,✉]

[1]*Trường Đại học Hùng Vương*
[2]*Trường Đại học Sư phạm Hà Nội2*

✉ Người chịu trách nhiệm liên lạc. E-mail: laviethong.sp2@gmail.com

Ngày nhận bài: 27.7.2017
Ngày nhận đăng: 25.6.2018

TÓM TẮT

Khoai mỡ là tên địa phương của giống cây thuộc họ Củ nâu (Dioscoraceae), được trồng rộng rãi ở Mường Khương, Lào Cai nhờ có giá trị thực phẩm, dược liệu. Nghiên cứu này thực hiện giải trình tự và phân tích gen *MatK* của giống khoai mỡ địa phương Mường Khương, Lào Cai. Kết quả nhận được đoạn gen *MatK* có chiều dài 916 nucleotide và được đăng kí với mã số MF494702 trên GenBank. Phân tích cây di truyền cho phép xác định giống Khoai mỡ địa phương này thuộc loài Khoai mỡ *Dioscorea alata*. Đốt thân thu được từ giống khoai mỡ địa phương được sử dụng làm vật liệu khởi đầu trong nghiên cứu nhân giống *in vitro*. Ở bước tạo và nhân chồi, BAP được sử dụng riêng rẽ hoặc phối hợp với NAA trong nghiên cứu phát sinh chồi. Hiệu quả phát sinh chồi cao hơn ở môi trường MS có bổ sung BAP ở nồng độ 0,3 mg/l so với ở các nồng độ nghiên cứu khác. Sự có mặt NAA 0,5 mg/l trong môi trường MS có chứa BAP kích thích hệ số nhân chồi lớn. Giá trị hệ số nhân chồi lớn nhất nhận được từ môi trường MS có bổ sung BAP 1,5 mg/l và NAA 0,5 mg/l. Ở bước kế tiếp, các chồi *in vitro* được tạo rễ thành công. Số lượng cao rễ/chồi và chiều dài chồi lớn nhất nhận được ở môi trường có bổ sung 0,2 và 0,3 mg/l NAA. Tỉ lệ luyện cây thành công cao khi được trồng trên cả ba loại giá thể đất thịt nhẹ, đất cát và hỗn hợp đất:cát (1:1). Tỉ lệ sống của cây khoai mỡ *in vitro* bằng 100% khi được trồng trên giá thể đất thịt nhẹ trong quá trình luyện *ex vitro*.

Từ khoá: *Giải trình tự, gen MatK, BAP, NAA, khoai mỡ, nuôi cấy in vitro*

MỞ ĐẦU

Nhóm cây khoai mỡ (Yam) thuộc họ Củ nâu (Dioscoreaceae) có giá trị kinh tế rất lớn và là cây lương thực nuôi sống nhiều người ở Châu Phi, Châu Á, Châu Mỹ và vùng Carribe (Hahn *et al.*, 1987). Nhiều loài được trồng do có giá trị lớn về kinh tế (Baah *et al.*, 2009). Khoai mỡ là cây thân leo có rễ củ lớn, chứa nhiều tinh bột, có vị ngọt, ngoài ra các lá non và thân non cây khoai mỡ cũng được sử dụng như một loại rau (Lim, 2016). Ngoài ra, loài cây này còn có nhiều đặc tính quí như giàu khoáng chất, giàu các hợp chất chống oxy hóa, chống dị ứng, chống loãng xương, chống hội chứng homocysteine máu cao, chống tăng huyết áp, tăng cholesterol máu, bảo vệ gan và thận … nên có thể sử dụng như nguồn thảo dược (Lim, 2016).

Họ củ nâu là họ lớn có tới 70 section, riêng chi *Dioscorea* đã có tới hơn 600 loài. Việc phân loại loài là yêu cầu trong nông nghiệp cũng như trong công nghiệp dược phẩm. Các phương pháp phân loại dựa trên hình thái, tế bào học đối với chi này đã có nhiều thành công từ sớm (Schols *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 1982), tuy nhiên, các phương pháp phân loại truyền thống đòi hỏi thời gian và số lượng mẫu vật lớn. Trong khi đó, kĩ thuật "mã vach DNA" (DNA barcoding) đã được sử dụng có hiệu quả trong phân loại thực vật. Riêng đối với chi *Dioscorea*, gen lục lạp *Maturase K* (*MatK*) đã được chứng minh là một chỉ thị phân tử đáng tin cậy và hiệu quả (Sun *et al.*, 2012).

Cây khoai mỡ cũng như một số loài khác thuộc chi *Dioscorea* đã được biết đến và sử dụng từ rất lâu. Việc nhân giống các loài trong chi này có thể thực hiện bằng phương pháp giâm hom. Tuy nhiên, giâm hom là phương pháp nhân giống còn có các nhược điểm như hệ số nhân giống thấp, không đảm bảo sạch bệnh. Gần đây, công nghệ *in vitro* đã được sử dụng để nhân giống nhiều loài thuộc chi này, tiêu biểu như nhân giống *in vitro* khoai mỡ (*D. alata* L.)

từ thân củ nhỏ (Fotso *et al.*, 2013) hay từ đốt thân (Behera *et al.*, 2010; Das *et al.*, 2013). Tương tự, các nghiên cứu nhân giống *in vitro* từ đốt thân các giống khoai mỡ dại cũng đã được báo cáo như *D. wightii* (Mahesh *et al.*, 2010) hay *D. oppositifolia* (Linn) và *D. pentaphylla* (Linn) (Poornima, Ravishankar, 2007), *D. bulbifera* L. (Behera *et al.*, 2010), *D. wallichii* Hook.f. (Thankappan, Abraham, 2013) *D. hispida* (Shukla, Shukla, 2014). Hơn nữa, cùng với nghiên cứu nhân giống *in vitro*, một số hoạt chất có trong thân hành và thân rễ của cây *D. bulbifera* cũng đã được xác định (Narula *et al.*, 2003). Phương pháp nuôi cấy mô giúp sản xuất cây khoai mỡ với số lượng lớn, đồng đều, sạch bệnh. Nghiên cứu này thực hiện giải trình tự và phân tích gen *MatK*, một trong những chỉ thị phân tử sử dụng làm "DNA mã vạch" (DNA barcoding), đối với giống khoai mỡ địa phương tại huyện Mường Khương, Lào Cai và nghiên cứu nhân giống *in vitro* giống khoai mỡ này.

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Nguyên liệu

Đốt thân của cây khoai mỡ thu tại thôn Xóm Mới, xã Mường Khương, huyện Mường Khương, tỉnh Lào Cai được sử dụng làm vật liệu nghiên cứu.

Tách chiết DNA tổng số, khuếch đại và giải trình tự gen *MatK*

Mô lá của cây khoai mỡ địa phương được dùng để tách chiết DNA tổng số theo phương pháp có sử dụng Cetyl trimethylammonium bromide (CTAB) (Borges *et al.*, 2009), kiểm tra độ tinh sạch của DNA tổng số bằng phương pháp điện di trên gel agarose 0,8%. Lấy 0,5 mg DNA sử dụng làm khuôn cho phản ứng PCR khuếch đại gen *MatK* với chu trình nhiệt 94^{o}C/5 phút; 35 chu trình (94^{o}C/30 giây; 55^{o}C/ 50 giây; 72^{o}C/ 60 giây); và chu trình cuối ở 72^{o}C/10 phút, sử dụng cặp mồi gồm mồi xuôi P9F: 5'-CGATCTATTCATTCAATATTTC-3' và mồi ngược P9R: 5'-TCTAGCACACGAAAGTCGAAGT-3'. Sản phẩm PCR được kiểm tra bằng phương pháp điện di trên gel agarose 0,8%, tinh sạch bằng bộ sinh phẩm AccuPrep Gel Purification Kit (BIONEER, Hàn Quốc) và được giải định trình tự bằng máy ABI 3500 XL Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Mỹ) tại Phòng Thí nghiệm trọng điểm Công nghệ gen, Viện Công nghệ Sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

Cây phả hệ được xây dựng từ trình tự được giải trình tự kết hợp với tập hợp các trình tự *MatK* của các loài thuộc chi *Dioscorea* đã có trên GenBank nhờ sử dụng phần mềm MEGA 5.2 (Tamura *et al.*, 2011), với các tham biến: thuật toán Maximum Likelihood, mô hình Tamura-Nei model (JTT), phương pháp bootstrap với 1000 lần lặp lại theo phương pháp đã được miêu tả (Lê Thị Vân Anh, Cao Phi Bằng, 2015)

Nghiên cứu nhân *in vitro* cây khoai mỡ

Tạo vật liệu khởi đầu

Mẫu đốt thân cây khoai mỡ được xử lí sơ bộ bằng cách rửa xà phòng dưới vòi nước chảy, rửa lại bằng nước cất khử trùng trong buồng cấy vô trùng 2 lần, mỗi lần 3 phút, lắc mẫu trong etanol 70% (v/v) trong 3 phút và khử trùng với Javel ở nồng độ 7% trong thời gian 10 phút. Sau đó, các mẫu được lắc trong nước cất vô trùng 3 lần, mỗi lần 3 phút. Các đốt thân được cấy trên môi trường MS (Murashige, Skoog, 1962) có bổ sung 30 g/l sucrose (Qualigens, Mumbai, India), 7 g/l agar (Qualigens, Mumbai, India) và đặt trong phòng nuôi cây, nhiệt độ ngày/đêm 25^{o}C/22^{o}C, thời gian chiếu sáng 14 giờ.

Tạo chồi và nhân nhanh chồi

Đốt thân không bị nhiễm sau 7 ngày trên môi trường MS có bổ sung 30 g/l sucrose (Qualigens, Mumbai, India) và 7 g/l agar được chuyển sang môi trường MS, bổ sung 30 g/l sucrose, 7 g/l agar và 6-Benzylaminopurine (BAP) ở các nồng độ khác nhau (từ 0,1 đến 1,5 mg/l). Ngoài ra, để tìm hiểu hiệu ứng kết hợp giữa auxin với cytokinin đến sự nhân chồi của cây khoai mỡ, NAA (0,5 mg/l) được kết hợp với BAP (từ 0,5 đến 1,5 mg/l). Các chỉ tiêu số chồi/mẫu, số lá/chồi, chiều cao chồi được đánh giá sau 8 tuần nuôi cấy.

Tạo rễ

Các chồi cây đạt kích thước 4-5 cm thu được được cấy sang môi trường MS có bổ sung 30 g/l sucrose, 7 g/l agar và NAA (từ 0,1 đến 0,5 mg/l). Số rễ/chồi, chiều dài rễ (cm) và hình thái cây được đánh giá sau 6 tuần nuôi cấy.

Rèn luyện ngoài vườn ươm (ex vitro)

Cây *in vitro* hoàn chỉnh (có rễ) được chuyển ra ngoài vườn ươm và trồng vào giá thể khác nhau (đất cát, đất thịt và hỗn hợp đất cát với đất thịt). Tỷ lệ sống sót, hình thái cây được theo dõi sau 28 ngày.

Phương pháp phân tích thống kê

Số liệu được thu thập và xử lí thống kê bằng

chương trình Excel 2010 theo mô tả của Nguyễn Văn Mã *et al.,* (2013). So sánh các giá trị trung bình được thực hiện theo phương pháp giới hạn sai khác nhỏ nhất LSD với α=0,05.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Giải trình từ gen *MatK* của giống khoai mỡ địa phương

Gen *MatK* của giống khoai mỡ địa phương Mường Khương, Lào Cai được giải trình tự bằng máy ABI 3500 XL Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Mỹ). Trình tự *MatK* không trọn vẹn được đăng kí trên GenBank, mã số MF494702. Trình tự này dài 916 nucleotide. Trình tự này được sử dụng để xây dựng cây di truyền cùng với tập hợp các trình tự gen *MatK* của các loài khác thuộc chi *Dioscorea* có thu được từ GenBank (Hình 1). Cây di truyền cho thấy trình tự gen *MatK* của giống khoa mỡ địa phương nằm cùng nhánh với trình tự gen *MatK* của loài *D. alata* (mã số KJ629238.1). Hai trình tự này thuộc cùng nhóm với các gen *MatK* của các loài *D. fordii* (EF028333.1) và *D. persimillis* (KJ629245.1). Kết quả này bước đầu cho phép kết luận giống khoai mỡ địa phương Mường Khương, Lào Cai thuộc loài khoai mỡ (*D. alata*).

Hình 1. Cây phả hệ được xây dựng từ trình tự được giải trình tự kết hợp với tập hợp các trình tự *MatK* đã công bố của các loài thuộc chi Dioscrea. Sử dụng phần mềm MEGA 5.2 (Tamura *et al.*, 2011), với các tham biến: thuật toán Maximum Likelihood, mô hình Tamura-Nei model (JTT), phương pháp bootstrap với 1000 lần lặp lại. Vòng tròn màu đen chỉ vị trí phân loại của oài khoai mỡ địa phương trong nghiên cứu này (GenBank, mã số: MF494702).

Trong các nghiên cứu trước đây, nhiều chỉ thị phân tử đã được sử dụng khi phân loại các loài trong chi *Dioscorea* như *MatK*, *rbcL*, *trnL-F* (Gao *et al.,* 2008; Hsu *et al.,* 2013). *MatK* đã được chứng minh là chỉ thị phân tử hiệu quả nhất để phân loại các loài trong chi này (Sun *et al.,* 2012). Trong đó, cây phả hệ được xây dựng từ các chỉ thị *MatK* của các loài thuộc chi *Dioscorea* có mặt ở vùng Đông Á và Đông Nam Á cũng cho thấy *D. alata* rất gần gũi với *D. fordii* (Hsu *et al.,* 2013).

Nghiên cứu nhân giống *in vitro* giống khoai mỡ địa phương Mường Khương, Lào Cai

Để đưa mẫu từ môi trường tự nhiên vào nuôi cấy trong môi trường dinh dưỡng nhân tạo, cần tiến hành khử trùng bề mặt để loại bỏ sự phát triển của vi khuẩn, nấm trên môi trường dinh dưỡng vốn có nhiều đường và các chất hữu cơ. Việc tạo vật liệu khởi đầu là bước đầu tiên trong quá trình nhân giống *in vitro*. Trong thí nghiệm này, hỗn hợp Javel ở nồng độ 7% (v/v) được sử dụng để khử trùng trong thời gian 10 phút, sau khi đã xử lí sơ bộ bằng cách rửa xà phòng dưới vòi nước chảy, rửa lại bằng nước cất khử trùng trong buồng cấy vô trùng 2 lần, mỗi lần 3 phút, lắc mẫu trong ethanol 70% (v/v) trong 3 phút. Javel 7% (v/v) có hiệu quả với việc khử trùng mẫu đốt thân cây khoai mỡ, tỉ lệ mẫu nhiễm chỉ bằng 16,67% trong khi tỉ lệ mẫu sạch sống đạt tới 83,33%, không có mẫu chết. Đốt thân sạch được sử dụng trong các thí nghiệm nhân chồi.

Ảnh hưởng của BAP lên khả năng tạo chồi và nhân nhanh chồi

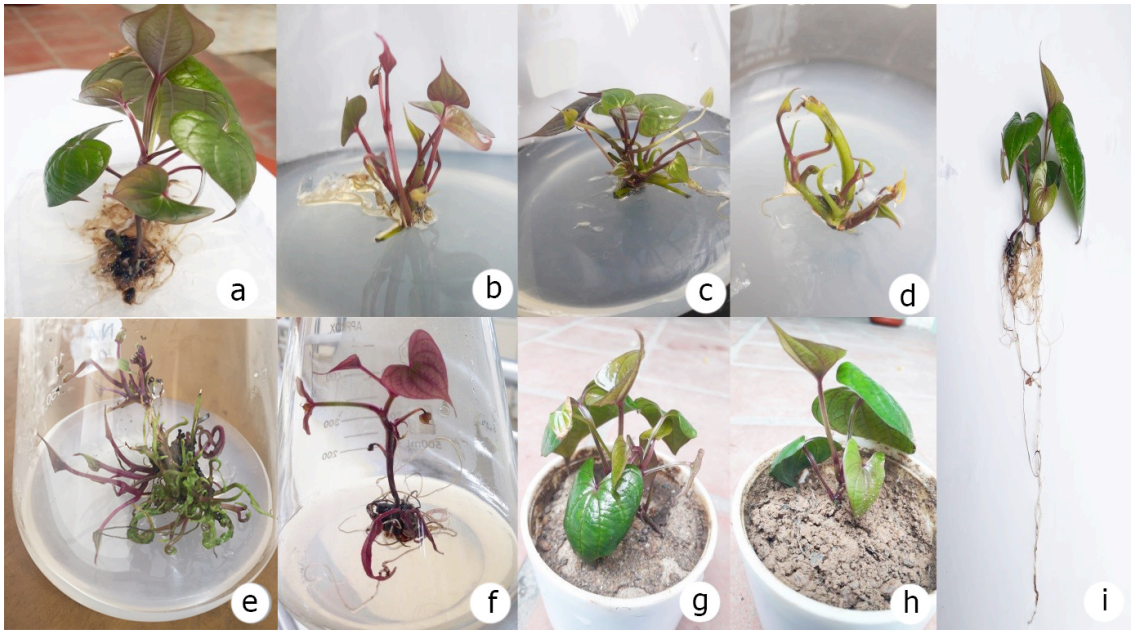
Kết quả thí nghiệm ảnh hưởng của BAP tới quá trình nhân nhanh chồi được thể hiện trong bảng 1. Khi bổ sung BAP với nồng độ khác nhau vào môi trường nuôi cấy đã làm tăng khả năng nhân chồi ở cây khoai mỡ địa phương Mường Khương, Lào Cai.

Bảng 1. Ảnh hưởng của BAP lên khả năng nhân chồi của Khoai mỡ sau 8 tuần nuôi cấy (Các chữ cái khác nhau trong cùng một cột thể hiện sự khác biệt với mức ý nghĩa α = 0,05).

BAP (mg/l)	Số chồi/mẫu	Số lá/chồi	Chiều cao chồi (cm)	Hình thái chồi
0	1,50 ± 0,55^{a}	6,50 ± 1,05^{b}	5,65 ± 0,50^{c}	Thân màu tía, cao, lá to, màu xanh
0,1	3,83 ± 0,75^{c}	2,17 ± 0,75^{a}	2,10 ± 0,26^{a}	Thân màu tía, thấp, lá nhỏ, màu xanh nhạt
0,3	5,00± 0,89^{d}	2,50 ± 0,55^{a}	3,22 ± 0,21^{b}	Thân màu tía, thấp, lá nhỏ, màu xanh nhạt
0,5	2,50 ± 0,55^{b}	2,17 ± 0,41^{a}	2,23 ± 0,56^{a}	Thân màu tía, thấp, lá nhỏ, màu xanh nhạt
1,0	2,67 ± 0,82^{b}	2,83 ± 0,75^{a}	2,93 ± 0,22^{b}	Thân màu tía, thấp, lá nhỏ, màu xanh nhạt
1,5	3,00 ± 0,63^{bc}	2,33 ± 0,82^{a}	2,35 ± 0,19^{a}	Thân màu tía, thấp, lá nhỏ, màu xanh nhạt

Trong môi trường không có BAP, hệ số nhân chồi trung bình đạt 1,55 chồi/mẫu. Trong khi đó, ở các môi trường có bổ sung BAP với nồng độ 0,1; 0,3; 0,5; 1,0 và 1,5 mg/l, hệ số nhân chồi lần lượt bằng 3,83; 5,00; 2,50; 2,67 và 3,00 chồi/mẫu. Như vậy, BAP ở nồng độ 0,3 mg/l có ảnh hưởng tốt nhất đến khả năng nhân nhanh chồi khoai mỡ *in vitro*. Tuy nhiên, chồi ở môi trường không có BAP lại có nhiều lá và cao hơn so với ở môi trường có BAP. Đồng thời, BAP ở các nồng độ thí nghiệm có gây biến đổi hình thái chồi (Bảng 1 và Hình 2). Ở môi trường không bổ sung BAP, chồi cao, thân chồi màu tía, nhiều lá, kích thước lá to, màu xanh. Trong khi chồi ở các môi trường có bổ sung BAP lại có chồi thấp hơn, thân màu tía, kích thước lá nhỏ hơn và lá màu xanh nhạt hoặc tím.

Kết quả nghiên cứu này khẳng định hiệu quả của BAP đối với sự phát sinh và nhân nhanh chồi từ đốt thân hoặc từ các cơ quan khác ở cây thuộc chi *Dioscorea* như ở loài *D. wallichii* Hook.f (Thankappan, Abraham, 2013), *D. bulbifera* (Behera *et al.*, 2010), *D. alata* (Behera, Sahoo, *et al.*, 2010), *D. hispida* (Behera *et al.*, 2008; Shukla, Shukla, 2014). Tuy nhiên, có sự khác nhau giữa nghiên cứu này với các nghiên cứu trên về nồng độ BAP có hiệu quả cao. Trong nghiên cứu của chúng tôi, BAP nồng độ 0,3 mg/l có hiệu quả cao kích ứng tạo chồi và nhân nhanh chồi cây khoai mỡ địa phương Mường Khương, Lào Cai, gần giống với ở loài *D. wallichii*, nồng độ BAP hiệu quả cao là 2 mM (Thankappan, Abraham, 2013). Trong khi đó, ở nồng độ BAP có hiệu quả cao đối với sự phát sinh chồi và nhân nhanh chồi trong các nghiên cứu khác khá cao, 1,0 mg/l đối với loài *D. hispida* (Behera *et al.*, 2008; Shukla, Shukla, 2014), 2 mg/l đối với các loài *D. oppositifolia*, *D. pentaphylla* (Poornima, Ravishankar, 2007). Thậm chí, sự phối hợp giữa BAP 0,25 mg/l với kinetin 2-3 mg/l mới có hiệu quả cảm ứng tạo chồi và nhân nhanh chồi ở *D. alata* (cv. Hatikhujia) với hệ số nhân chồi đạt 2-2,5 chồi/mẫu (Behera *et al.*, 2010).



Hình 2. Hình thái khoai mỡ *in vitro* và *ex vitro,* (a). Chồi Khoai mỡ sau 8 tuần nuôi cấy trên môi trường MS; (b), (c). Chồi Khoai mỡ sau 8 tuần nuôi cấy trên môi trường 0,1 và 0,3 mg/l BAP; (d). Chồi Khoai mỡ sau 8 tuần nuôi cấy trên môi trường 0,5 mg/l BAP+0,5 mg/l NAA; (e). Chồi Khoai mỡ sau 8 tuần nuôi cấy trên môi trường 1,5 mg/l BAP+0,5 mg/l NAA; (f). Chồi Khoai mỡ sau 8 tuần nuôi cấy trên môi trường 2 mg/l BAP+0,5 mg/l NAA,(i). chồi khoai mỡ có rễ trước khi trồng vào giá thể ; (g), (h). Khoai mỡ *ex vitro* ngoài vườn ươm trên các giá thể khác nhau (đất:cát tỉ lệ 1:1, đất thịt nhẹ).

Ảnh hưởng của BAP tới khả năng nhân chồi khi có mặt NAA

Nhằm tìm hiểu tác động tạo và nhân chồi của BAP khi có mặt auxin, chúng tôi đã bổ sung NAA 0,5 mg/l vào môi trường nuôi cấy. Kết quả nghiên cứu (Bảng 2) cho thấy tương tác của BAP ở các nồng độ khác nhau với NAA 0,5 mg/l ảnh hưởng tới sự tạo chồi ở cây khoai mỡ địa phương Mường Khương, Lào Cai.

Khi bổ sung NAA 0,5 mg/l vào môi trường nuôi cấy, hệ số nhân chồi của khoai mỡ cao nhất ở môi trường có 1,5 mg/l BAP, trung bình đạt 6,83 chồi/mẫu. Trong khi đó, việc bổ sung đồng thời NAA với BAP ở các nồng độ 0,5 mg/l và 1,0 mg/l cũng có tác động tốt tới hệ số nhân chồi, lần lượt đạt 4,50 và 3,67 chồi/mẫu. Tuy nhiên, trên môi trường được bổ sung tổ hợp 0,5 mg/l NAA với 2 mg/l BAP, hệ số nhân chồi của khoai mỡ chỉ tương đương với khi được nuôi cấy trên môi trường không có phytohormon. Lưu ý rằng, chồi cây khoai mỡ *in vitro* cao hơn khi được cấy trên môi trường bổ sung NAA 0,5 mg/l với BAP 2,0 mg/l so với các môi trường có NAA 0,5 mg/l với BAP ở các nồng độ 0,5; 1,0 và 1,5 mg/l.

Bảng 2. Ảnh hưởng của tổ hợp BAP và NAA lên khả năng nhân chồi khoai mỡ sau 8 tuần nuôi cấy (các chữ cái khác nhau trong cùng một cột thể hiện sự khác biệt với mức ý nghĩa α = 0,05).

BAP (mg/l)	NAA (mg/l)	Số chồi/mẫu	Số lá/chồi	Chiều cao chồi(cm)
0,0	0,0	1,50 ± 0,55^{a}	6,50 ± 1,05^{c}	5,48 ± 0,34^{c}
0,5	0,5	4,50 ± 1,05^{b}	1,67 ±0,82^{a}	1,85 ± 0,39^{a}
1,0	0,5	3,67 ± 0,82^{b}	1,83 ±0,75^{a}	2,62 ± 0,39^{a}
1,5	0,5	6,83 ± 1,47^{c}	1,50 ± 0,54^{a}	3,83 ± 1,38^{b}
2,0	0,5	1,83 ± 0,75^{a}	3,17 ± 0,75^{b}	4,97 ± 0,72^{c}

Trong một số nghiên cứu trước đây, việc bổ sung NAA 0,5 mg/l vào môi trường khi có cytokinin có hiệu quả đối với quá trình tạo chồi và nhân chồi của một số loài. Chồi loài *D. bulbifera* được cấy trên

môi trường có bổ sung hỗn hợp kinetin 2 mg/l, BAP 1 mg/l và NAA 0,5 mg/l có hệ số nhân chồi tới 8,5 chồi/mẫu, cao hơn so với ở các môi trường chỉ chứa BAP và kinetin (Behera *et al.*, 2010). Tương tự, ở loài khoai mỡ (*D. alata* cv. Hatikhujia), khi phối hợp kinetin kinetin 2 mg/l, BAP 1 mg/l và NAA 0,5 mg/l có hệ số nhân chồi tới 9,5 chồi/mẫu (Behera *et al.*, 2010). Trước đó, Behera *et al.,* (2008) cũng đã thu được kết quả tương tự ở loài *D. hispida* khi cấy trên môi trường MS có bổ sung 2,0 mg/l BAP + 0,5 mg/l NAA + 100 mg/l ascorbic acid (Behera *et al.*, 2008). Tuy nhiên, trong nghiên cứu khác, khi phối hợp BAP hoặc kinetin với NAA 1 µM không làm tăng hệ số nhân chồi ở loài *D. wallichii* (Thankappan, Abraham, 2013).

Ảnh hưởng của NAA đến sự hình thành rễ của chồi Khoai mỡ in vitro

Tạo rễ là giai đoạn cuối cùng của quá trình nhân nhanh *in vitro* nhằm tạo cây hoàn chỉnh, có sức sống cao, có thể ra ngôi. Auxin có hiệu ứng kích thích phân chia tế bào, tạo rễ bất định. Một trong các auxin được dùng rộng rãi trong nuôi cấy mô và tế bào thực vật là NAA. Trong nghiên cứu này, các chồi cây khoai mỡ *in vitro* cao trung bình 3-4 cm được cấy lên môi trường cơ bản MS bổ sung NAA có nồng độ khác nhau để khảo sát ảnh hưởng của các nồng độ NAA tới khả năng tạo rễ *in vitro* của chúng (Bảng 3).

Kết quả nghiên cứu cho thấy, chồi khoai mỡ *in vitro* khi được cấy trên môi trường có bổ sung NAA với các nồng độ từ 0,1 tới 0,5 mg/l đều có khả năng tạo rễ. Tuy nhiên, số lượng rễ và chiều dài rễ khác nhau ở các môi trường có nồng độ NAA khác nhau. Trong đó, chồi được cấy trên môi trường có nồng độ NAA 0,2 mg/l hoặc 0,3 mg có số rễ lớn nhất, trung bình lần lượt có 8 và 7,4 rễ/chồi. Đồng thời, ở hai nồng độ này, chiều dài rễ cũng lớn nhất, lần lượt bằng 15,14 và 14,47 cm. Trong khi tăng nồng độ NAA bổ sung vào môi trường nuôi cấy, số rễ phát sinh cũng như chiều dài rễ giảm xuống. Khi bổ sung NAA 0,4 mg/l vào môi trường, số rễ/chồi chỉ còn 6,00 và chiều dài rễ chỉ đạt 9,54 cm. Số rễ và chiều dài rễ của chồi cấy trên môi trường có bổ sung NAA 0,5 mg/l chỉ bằng khi cấy trên môi trường có bổ sung NAA 0,1 mg/l. Có thể, khi nồng độ NAA thấp không đủ gây ra hiệu ứng phát sinh rễ tối đa ở cây khoai mỡ địa phương. Ngược lại, khi nồng độ NAA quá cao lại dẫn tới hiệu ứng gây độc, làm giảm hiệu ứng phát sinh rễ, đặc biệt lượng NAA cao trong môi trường ức chế kéo dài rễ.

Kết quả nghiên cứu này khẳng định các kết quả nghiên cứu trước đây về hiệu quả của NAA đối với sự tạo rễ *in vitro* của các loài trong chi *Dioscorea*. Tuy nhiên, nồng độ NAA sử dụng trong nghiên cứu này thấp hơn nhiều lần so với ở một số nghiên cứu khác. Trong các nghiên cứu của Behera *et al.*, ở các loài khác nhau thuộc chi *Dioscorea* như *D. hispida* Dennst. (Behera *et al.*, 2008), *D. bulbifera* L. (Behera *et al.*, 2010) hay *D. alata* L. cv. Hatikhujia (Behera *et al.*, 2010), nồng độ NAA có hiệu quả nhất đối với sự tạo rễ trong các nồng độ thí nghiệm là 2 mg/l (tỉ lệ tạo rễ khoảng 90%, số rễ/chồi xấp xỉ 5). Tương tự, ở 2 loài *D. oppositifolia* và *D. pentaphylla*, nồng độ NAA có hiệu quả cao là nhất đối với sự tạo rễ là 2,69 µM, tỉ lệ tạo rễ là 76,9 và 78,4%. Tuy nhiên, khi cấy trên môi trường có bổ sung 2,69 µM, cây có số lượng rễ/chồi nhiều nhất khoảng 5,25 (Poornima, Ravishankar, 2007).

Bảng 3. Ảnh hưởng của NAA lên khả năng nhân chồi của Khoai mỡ sau 6 tuần nuôi cấy (các chữ cái khác nhau trong cùng một cột thể hiện sự khác biệt với mức ý nghĩa α = 0,05).

NAA (mg/l)	Số rễ/chồi	Chiều dài rễ (cm)
0,1	5,80 ± 0,84^{a}	8,84 ± 0,27^{a}
0,2	8,00 ± 1,58^{c}	15,14 ± 0,29^{c}
0,3	7,40 ± 1,52^{bc}	14,74 ± 0,46^{c}
0,4	6,00 ± 0,70^{ab}	9,54 ± 0,36^{b}
0,5	5,20 ± 0,84^{a}	9,08 ± 0,19^{a}

Rèn luyện ngoài vườn ươm (ex vitro)

Giai đoạn rèn luyện ngoài vườn ươm là một khâu quan trọng, giúp cây *in vitro* có thể thích nghi với điều kiện tự nhiên, có tỉ lệ sống cao, sinh trưởng tốt khi đưa cây trồng trên đồng ruộng. Trong nghiên cứu này, việc ra ngôi *ex vitro* cây khoai mỡ địa phương Mường Khương, Lào Cai bước đầu được nghiên cứu với các giá thể khác nhau là đất thịt nhẹ, đất cát pha và hỗn hợp đất:cát = 1:1. Kết quả nghiên cứu được thể hiện trong bảng 4.

Kết quả nghiên cứu cho thấy, giá thể ít ảnh hưởng đến tỉ lệ sống của cây khoai mỡ địa phương

trong quá trình ra ngôi. Cây *in vitro* có tỉ lệ sống cao trên cả ba giá thể đất thịt nhẹ, đất cát pha và hỗn hợp đất:cát (1:1). Trong đó, trên giá thể đất thịt nhẹ, tỉ lệ cây sống của cây con đạt mức 100%. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi khẳng định khả năng thích nghi *ex vitro* tương đối tốt của cây thuộc chi *Dioscorea* ở một số nghiên cứu khác. Tỉ lệ sống cao như thế này cũng thường thấy ở các cây *in vitro* của chi này trong quá trình ra ngôi như ở loài *D.* wallichii (Thankappan*,* Abraham, 2013), *D. hispida* (Shukla*,* Shukla, 2014). Ngoài ra, ngay cả đối với loài *D. alata*, tỉ lệ sống cũng đạt tới 97% khi được cấy trên hỗn hợp đất đen:cát (1:1) (Fotso *et al.*, 2013) hay trên 85% khi được cấy trên hỗn hợp gạch vỡ:đất:than hoạt tính:rêu khô:lá mục (1:1:1:1:1) (Das *et al.*, 2013).

Bảng 4. Ảnh hưởng của giá thể đến sự thuần hoá cây Khoai mỡ *in vitro*.

Giá thể	Tỷ lệ sống(%)	Hình thái cây
Đất thịt nhẹ	100	Cây cứng, khỏe, tạo rễ mới
Đất cát pha	95	Cây mảnh, tạo rễ mới
Đất:cát (1:1)	98	Cây cứng, khỏe, tạo rễ mới

KẾT LUẬN

Trong nghiên cứu này, gen *MatK* của giống khoai mỡ địa phương Mường Khương, Lào Cai đã được giải trình tự từ sản phẩm khuếch đại DNA tổng số tách chiết từ lá. Trình tự *MatK* này không hoàn chỉnh, dài 916 nucleotide và được đăng kí trên GenBank với mã số MF494702. Quá trình nhân giống *in vitro* giống khoai này từ vật liệu khởi đầu là đốt thân cũng đã được thiết lập. BAP có hiệu ứng phát sinh chồi mạnh nhất ở nồng độ 0,3 mg/l. Khi bổ sung NAA 0,5 mg/l vào môi trường nuôi cấy đã làm tăng hiệu ứng tạo chồi ở các nồng độ 0,5; 1,0 và 1,5 mg/l của BAP. Sự phối hợp BAP 1,5 mg/l và NAA 0,5 mg/l trong môi trường nuôi cấy tạo hiệu ứng gây phát sinh chồi cao nhất so với các nồng độ phytohormon khác. NAA ở các nồng độ 0,2 và 0,3 mg/l có hiệu ứng kích thích tạo rễ cao nhất trong số các nồng độ được nghiên cứu đối với chồi cây khoai mỡ địa phương *in vitro*. Tỉ lệ sống của cây khoai mỡ *in vitro* cao ở trên cả ba loại giá thể đất thịt nhẹ, đất cát và hỗn hợp đất:cát (1:1), trong đó, tất cả cây khoai mỡ *in vitro* đều sống sót trên giá thể đất thịt nhẹ trong quá trình luyện *ex vitro*.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Lê Thị Vân Anh, Cao Phi Bằng (2015) Các họ gen mã hóa protein vận chuyển kim loại ở cây họ Đậu (Fabaceae): I. Các gen mã hóa protein vận chuyển đồng (Cu^{2+}). *Tạp chí Công nghệ Sinh học* 13(3): 895–905.

Baah FD, Maziya-Dixon B, Asiedu R, Oduro I, Ellis WO (2009) Nutritional and biochemical composition of *D. alata* (*Dioscorea spp.*) tubers. *J Food Agric Environ 7*(2): 373–378.

Behera KK, Bhunia B, da Silva JAT, Sahoo S (2010) Plantlet Regeneration of Potato Yam (*Dioscorea bulbifera* L.) through *in vitro* Culture from Nodal Segments. *Int J Plant Dev Biol* 4(1): 37–41.

Behera KK, Sahoo S, Prusti AB (2008) Effect of plant growth regulator on *in vitro* micropropagation of 'bitter yam'(*Dioscorea hispida* Dennst.). *International Journal of Integrative Biology* 4(1): 50–54.

Behera KK, Sahoo SS, Prusti A (2010) Micropropagation of greater yam (*Dioscorea alata* L. cv. Hatikhujia) through vine nodes. *J Root Crops* 36(1): 27–32.

Borges A, Rosa MS, Recchia GH, Queiroz-Silva JRd, Bressan EDA, Veasey EA (2009) CTAB methods for DNA extraction of sweetpotato for microsatellite analysis. *Scientia Agricola* 66(4): 529–534.

Das S, Choudhury MD, Mazumdar PB (2013) Micropropagation of *Dioscorea alata* L. through nodal segments. *Afr J Biotechnol* 12(47): 6611–6617.

Fotso F, Sandrine NNMF, Désiré MH, François DP, Denis ON (2013) Micropropagation of *Dioscorea alata* L. from microtubers induced *in vitro*. *Afr J Biotechnol* 12(10).

Gao X, Zhu Y-P, Wu B-C, Zhao Y-M, Chen J-Q, Hang Y-Y (2008) Phylogeny of *Dioscorea* sect. *Stenophora* based on chloroplast matK, rbcL and trnL-F sequences. *J Syst Evol* 46(3): 315–321.

Hahn SK, Osiru DSO, Akoroda MO, Otoo JA (1987) Yam production and its future prospects. *Outlook on Agriculture, 16*(3): 105–110.

Hsu KM, Tsai JL, Chen MY, Ku HM, Liu SC (2013) Molecular phylogeny of *Dioscorea* (Dioscoreaceae) in East and Southeast Asia. *Blumea-Biodiversity, Evolution and Biogeography of Plants* 58(1): 21–27.

Lim TK (2016) *Edible medicinal and non-medicinal plants Volume 10, Modified Stems, Roots, Bulbs* (Vol. 10): Springer.

Mahesh R, Muthuchelian K, Maridass M, Raju G (2010) *In vitro* propagation of wild yam, Dioscorea wightii through nodal cultures. *Int J Biol Technol* 1: 111–113.

Nguyễn Văn Mã, La Việt Hồng, Ông Xuân Phong (2013) *Phương pháp nghiên cứu Sinh lý học thực vật*. Hà Nội: NXB Đại học Quốc gia Hà Nội.

Narula A, Kumar S, Bansal KC, Srivastava PS (2003) *In vitro* micropropagation, differentiation of aerial bulbils and tubers and diosgenin content in Dioscorea bulbifera. *Planta medica* 69(08): 778–779.

Poornima GN, Ravishankar RV (2007) *In vitro* propagation of wild yams, *Dioscorea oppositifolia* (Linn) and *Dioscorea pentaphylla* (Linn). *Afr J Biotechnol* 6(20): 2348–2352.

Schols P, Furness CA, Wilkin P, Smets E, Cielen V, Huysmans S (2003) Pollen morphology of *Dioscorea* (Dioscoreaceae) and its relation to systematics. *Botanical Journal of the Linnean society* 143(4): 375–390.

Shukla S, Shukla SK (2014) *In vitro* regeneration of Dioscorea hispida through nodal expiants-A rich source of starch. *GSTF International Journal on Bioformatics & Biotechnology (JBio)* 3(1): 30–35.

Sun X-Q, Zhu Y-J, Guo J-L, Peng B, Bai M-M, Hang Y-Y (2012) DNA Barcoding the *Dioscorea* in China, a Vital Group in the Evolution of Monocotyledon: Use of *matK* Gene for Species Discrimination. *PLOS ONE* 7(2): e32057.

Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S (2011) MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol 28*(10): 2731–2739.

Thankappan S, Abraham K (2013) Micropropagation and Microtuber Induction in *Dioscorea wallichii* Hook. f. *Journal of Root Crops 38*(2): 109–115.

Zhang MZ, Wu ZJ, Qin HZ, Ding ZJ (1982) Comparative anatomy of Chinese *Dioscorea* and its meaning in sectional divisions. (in Chinese; English summary) *Bull. Nanjing Bot. Gard.(Mem. Sun Tan Sen:* 1–8.

SEQUENCING OF *MATK* GENE FOR TAXONOMIC IDENTIFICATION AND *IN VITRO* PROPAGATION OF A LOCAL YAM (*DIOSCOREA SP.*) CULTIVAR GROWN AT MUONG KHUONG, LAO CAI

Cao Phi Bang[1], La Viet Hong[2]

[1]*Hung Vuong University*
[2]*Ha Noi Pedagogical University 2*

SUMMARY

Khoai mo, local name of Yam species belonging to the Dioscoraceae family, is widely grown at Muong Khuong, Lao Cai province because of their important food and pharmaticeutical valuables. This work aimed to sequence the *MatK* gene obtained from leaves of a local yam grown in Muong Khuong, Lao Cai. The sequencing result showed a partial sequence of the *MatK* gene which was submitted to GenBank with accession MF494702 provided. The length of this partial sequence is 916 nucleotides. Phylogeny analysis indicated that local yam cultivar grown at Muong Khuong, Lao Cai belonged to *Dioscorea alata* species. Nodal segments collected from this local yam were used as initial material for *in vitro* vegetative multiplication. In the shoot formation step, BAP or BAP and NAA complex were used in shoot formation experience. *In vitro* shooting effect was higher on MS medium supplemented with BAP at 0.3 mg/l of contrentration in compared to other studied BAP concentrations. The presence of NAA at 0.5 mg/l in medium containing BAP promoted a high rate of shoot multiplication. Highest value of shoot production was obtained on MS medium fortified with BAP (1.5 mg/l) and NAA (0.5 mg/l) from nodal segments. In next step, shoots were successfully rooted *in vitro*. A high number of roots per shoot and highest length of roots were obtained on MS medium containing 0.2 or 0.3 mg/l of NAA. High acclimatization frequencies were obtained when transferred rooted explants to rich soil, yellow clay soil and soil+sand mixture (1:1). Best survival rate (100%) was achieved on rich soil substrate during *ex vitro* acclimatization process.

Keywords*: Sequencing, MatK gene, BAP, NAA, in vitro Yam, in vitro culture*