NGHIÊN CỨU QUY TRÌNH NHÂN *IN VITRO* CÂY SẮN RUỘT VÀNG PHÚ THỌ

Lê Thị Thanh[1], Phạm Thị Hiệp[1], Tống Thị Huyền[1], Lê Thị Thu Trang[1], Nguyễn Phương Nga[1], Tăng Thị Diệp[1], Vũ Thị Phương[1], Đỗ Thị Thanh Thanh[1], Nguyễn Thị Nga[1], Hoàng Minh Chính[1], Phạm Thị Thu Hà[1], Nguyễn Thị Thu Phương[2], Phạm Thiên Thành[1*]

TÓM TẮT

Trong nghiên cứu này, sự hình thành phôi soma và sự tái sinh của cây sắn ruột vàng Phú Thọ từ đỉnh chồi và mảnh lá non lấy từ cây trồng *in vitro* đã được kiểm tra. Các thử nghiệm cho thấy, khử trùng mẫu bằng NaOCl 3% trong 15 phút, lặp lại hai lần cho tỷ lệ mẫu sạch cao (77,8%) và tỷ lệ mẫu chết thấp (24,3%). Môi trường phát sinh mô sẹo tốt nhất là MS nền có bổ sung 10 mg/L 2,4-D cho tỷ lệ hình thành mô sẹo cao đạt 79,4% với nuôi cấy mảnh lá và 81,8% với nuôi cấy chồi đỉnh. Môi trường tạo chồi tốt nhất là MS nền có bổ sung 0,2 mg/L BAP cho tỷ lệ hình thành cây con từ tế bào soma mảnh lá là 49% và tế bào soma chồi đỉnh là 51,7%. Sau 3 tuần nuôi cấy, chồi đạt 4 - 5 cm. Để nhân nhanh, mỗi chồi được cắt thành từng đốt và cấy trên môi trường tái sinh cây. Hệ số nhân chồi từ một chồi ban đầu sau 12 tháng có thể nhân được 76.527.504 cây *in vitro.* Môi trường tái sinh cây hoàn chỉnh là MS nền có bổ sung 0,25 mg/L NAA và 0,4 g/L than hoạt tính cho tỷ lệ ra rễ đạt 100%. Cây sắn *in vitro* thích nghi tốt với giá thể 60% đất phù sa + 40% trấu hun. Cây con có tỷ lệ sống 100%, số lá trung bình đạt 7,3 lá và chiều cao cây đạt 10,2 cm sau hai tuần ươm cây. Quy trình nhân *in vitro* có hệ số nhân cao, cây con sinh trưởng tốt, có khả năng ứng dụng phục vụ sản xuất cây sắn ruột vàng Phú Thọ quy mô công nghiệp.

Từ khóa: Cây sắn (*Manihot esculenta* Crantz), sắn ruột vàng Phú Thọ, nhân giống *in vitro*

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Sắn (*Manihot esculenta* Crantz) thuộc họ Euphorbiaceae, là một trong ba loại cây lương thực chính ở Châu Phi (FAO, 2013), đồng thời là nguồn cung cấp carbohydrate lớn thứ ba (sau lúa và ngô) cho chế độ ăn uống của hơn 800 triệu người trên thế giới (Obueh & Kolawole, 2016). Ngoài ra, một số báo cáo (Amelework *et al*., 2021; Madukosiri, 2013) nhấn mạnh vai trò quan trọng của nó đối với mục đích sử dụng công nghiệp, bao gồm sản xuất tinh bột, thức ăn chăn nuôi, ethanol, dược phẩm, hoá chất, giấy, dệt may và nhiên liệu sinh học. Phạm vi sử dụng rộng rãi như vậy xuất phát từ thực tế là tất cả các bộ phận của cây sắn đều có thể được sử dụng, tùy theo đặc tính vật lý và thành phần hóa học cụ thể của cây sắn.

Sắn là loại cây trồng nhân giống sinh dưỡng phát triển chậm, cần ít nhất 8 tháng thời tiết ấm áp để thu hoạch (Santana *et al*., 2009). Việc nhân giống sắn theo phương pháp truyền thống bằng mắt hom có tỷ lệ nhân thấp, chất lượng bảo quản vật liệu trồng kém, khả năng nhiễm bệnh cao (Escobar *et al*., 2006). Kỹ thuật *in vitro* đã được sử dụng để tạo ra vật liệu trồng sạch bệnh có tiềm năng cho năng suất cao, ngay cả từ cây mẹ bị nhiễm bệnh (Acedo, 2006). Việc tạo ra một giống cây trồng vẫn giữ được những đặc tính tốt có thể đạt được thông qua nhân giống *in vitro*. Phương pháp nhân giống này có khả năng bảo tồn nguồn gen có giá trị (Staden *et al*., 2008), có thể được thực hiện bất kể mùa sinh trưởng, cho phép có được vật liệu trồng quanh năm với số lượng lớn cây con trong khoảng thời gian ngắn (Hopkins, 2007) và do đó đảm bảo mở rộng sản xuất. Ở Việt Nam, nhu cầu tiêu thụ sắn ngày một tăng, trong đó sắn ruột vàng Phú Thọ là giống sắn bản địa có nhiều đặc điểm quý như khả năng sinh trưởng tốt, năng suất cao, chất lượng tốt (dẻo, ngọt, ăn ngon), đặc biệt có chứa beta carotene có giá trị dinh dưỡng cao. Tuy nhiên, diện tích sản xuất giống sắn này trong thực tiễn còn khiêm tốn. Trải qua quá trình sản xuất lâu dài do nhân giống vô tính thiếu chọn lọc nên giống sắn ruột vàng Phú Thọ bị thoái hóa, lẫn giống, độ thuần giống thấp. Vì vậy, để mở rộng sản xuất giống sắn này cần phải có phương pháp tái sinh *in vitro* phù hợp để nhanh chóng tạo ra cây con có đặc điểm di truyền ổn định, đồng nhất và không bị bệnh. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã nỗ lực thiết lập một quy trình nhân *in vitro* cây sắn ruột vàng Phú Thọ đảm bảo sự sẵn sàng cho việc nhân cây giống quanh năm mà không có bất kỳ rào cản mùa vụ nào.

[1] Viện Cây lương thực và Cây thực phẩm; [2] Đại học Nông Lâm Bắc Giang
* Tác giả liên hệ, email: thanhpttm@gmail.com

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Giống sắn ruột vàng Phú Thọ được cung cấp bởi Trung tâm Nghiên cứu và Phát triển Cây có củ, Viện Cây lương thực và Cây thực phẩm.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phương pháp bố trí thí nghiệm

Giâm cành sắn ruột vàng Phú Thọ (*Manihot esculenta* Crantz) trong chậu với hỗn hợp đất thịt và cát mịn theo tỷ lệ 1 : 1 để cải thiện khả năng thoát nước trong điều kiện nhà lưới. Sau 4 - 6 tuần, các đoạn chồi dài khoảng 15 - 20 cm (5 - 7 đốt) được cắt thành từng đoạn 1,5 - 2 cm chứa đốt thân làm nguồn mẫu cho thí nghiệm tạo cây *in vitro* sạch để sử dụng cho các thí nghiệm nhân nhanh *in vitro*.

Các thí nghiệm được tiến hành trên môi trường cơ bản MS (Murashige và Skoog, 1962) + 5 g/L agar + 30 g/L sucrose; pH 5,8 và các chất kích thích sinh trưởng. Điều kiện nuôi cấy: 25 - 28°C, độ ẩm 70 - 80%, thời gian chiếu sáng 16 h sáng và 8 h tối, cường độ ánh sáng 2.000 - 2.500 Lux. Thí nghiệm trong phòng được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên RCBD (Gomez & Gomez, 1984).

Khử trùng mẫu: mẫu mang mắt ngủ, đỉnh chồi dài 1,5 - 2 cm cắt ra từ hom sắn giâm trong bầu đất được rửa sạch bằng xà phòng trong 5 - 10 phút, rửa sạch bằng nước cất vô trùng 3 lần trong buồng cấy, sau đó khử trùng bằng $HgCl_2$, NaOCl với nồng độ và thời gian khác nhau ($HgCl_2$ 0,1% trong 5 phút, 10 phút; $HgCl_2$ 0,2% trong 5 phút, 10 phút và 2 lần 10 phút; NaOCl 2% trong 10 và 15 phút; NaOCl 3% trong 10 phút, 15 phút và 2 lần 15 phút). Mỗi công thức thực hiện với 3 lần nhắc lại, mỗi lần 10 mẫu và cấy 1 mẫu/bình, 10 bình/công thức/lần lặp lại. Sau khi khử trùng, mẫu được cấy lên môi trường nền MS. Sau 14 ngày đánh giá kết quả thí nghiệm của các công thức.

Nuôi cấy tạo mô sẹo: mảnh lá non, đỉnh chồi của cây con *in vitro* giai đoạn 2 tuần tuổi trên môi trường nền MS được cắt thành các mảnh có kích thước 2 mm × 2 mm cấy trên môi trường bổ sung 2,4-D với các nồng độ 8 mg/L, 10 mg/L và 12 mg/L để tìm được nồng độ tối ưu cho việc hình thành mô sẹo. Thí nghiệm được thực hiện với 3 công thức nồng độ 2,4-D, 10 bình/công thức, cấy 5 mẫu/bình, lặp lại 3 lần. Thí nghiệm được theo dõi định kỳ 7 ngày.

Nuôi cấy tái sinh tạo chồi: Mô sẹo có phôi sau đó được chuyển sang môi trường phát sinh và kéo dài chồi gồm môi trường nền MS và chất kích thích sinh trưởng (Kinetine, BAP với các nồng độ 0,2 mg/L, 0,4 mg/L và 0,6 mg/L) để tìm được hoạt chất và nồng độ thích hợp cho tạo chồi. Khả năng tạo chồi được đánh giá sau bốn tuần nuôi cấy.

Nuôi cấy tạo cây hoàn chỉnh: Từ môi trường tạo chồi, mẫu được chuyển sang môi trường tạo cây hoàn chỉnh gồm MS cơ bản, 5 g/L agar, 30 g/L sucrose, pH 5,8 và các chất điều tiết sinh trưởng: BAP 0,2 mg/L và Indole-3-butyric acid (IBA: 0,25; 0,5; 1,0 mg/L); Kinetine 0,2 mg/L và IBA (0,25; 0,5; 1,0 mg/L); NAA (0,25; 0,5 và 1,0 mg/L) và than hoạt tính 0,4 g/L. Đánh giá khả năng sinh trưởng của cây *in vitro* sau 4 tuần nuôi cấy.

Nghiên cứu giá thể cho cây hoàn chỉnh: Cây con hoàn chỉnh được trồng trong 4 loại giá thể: 60% đất phù sa + 40% trấu hun, 50% đất phù sa + 50% xơ dừa, 50% đất phù sa + 25% cát + 25% xơ dừa, 50% đất phù sa + 25% cát + 25% trấu hun. Mỗi công thức thực hiện với 100 cây, lặp lại 3 lần. Cây con được đặt trong nhà lưới, sau 2 tuần theo dõi, đếm số cây sống, số lá/cây và chiều cao cây.

2.2.2. Các chỉ tiêu theo dõi

Tỷ lệ mẫu sạch, mẫu nhiễm trong quá trình khử trùng. Hệ số nhân chồi trung bình được tính trên đơn vị số chồi tái sinh/cành giâm. Tỷ lệ hình thành mô sẹo, tỷ lệ mô sẹo có phôi. Tỷ lệ phôi soma tạo thành cây con. Tỷ lệ ra rễ, số rễ/mẫu, chiều dài rễ, chiều cao cây, số lá/mẫu của cây con *in vitro.* Tỷ lệ sống của cây con *in vitro* trên giá thể.

2.2.3. Phương pháp xử lý số liệu

Số liệu được xử lý bằng phần mềm Excel 2013 và IRRISTAT 4.0.

2.3. Thời gian và địa điểm nghiên cứu

Nghiên cứu được thực hiện từ tháng 10 năm 2022 đến tháng 12 năm 2023 tại Bộ môn Công nghệ Sinh học, Sinh lý Sinh hóa và Công nghệ sau thu hoạch, Viện Cây lương thực và Cây thực phẩm, xã Liên Hồng, TP. Hải Dương, tỉnh Hải Dương.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Tạo vật liệu khởi đầu vô trùng

Khi không khử trùng với $HgCl_2$, NaOCl thì 100% mẫu đưa vào đều bị nhiễm nấm, vi khuẩn. Phản ứng của mẫu cấy với hai hóa chất khử trùng sau 2 tuần nuôi cấy khá giống nhau. Khi xử lý mẫu với $HgCl_2$ (0,1%; 0,2%), NaOCl (2%, 3%) trong thời gian càng dài thì tỷ lệ mẫu sạch càng cao tuy nhiên tỷ lệ mẫu

chết cũng tăng lên. Khi xử lý mẫu bằng dung dịch $HgCL_2$ tỷ lệ mẫu sạch cao (84,4 - 94,4%) nhưng tỷ lệ mẫu chết cũng cao, dao động từ 55,6 - 84,7%. Xử lý kép $HgCl_2$ 0,2% trong thời gian 10 phút cho tỷ lệ mẫu sạch cao nhất (94,4%) nhưng tỷ lệ mẫu chết cũng cao nhất (84,7%). Khi xử lý bằng NaOCl 3% trong thời gian 2 lần 15 phút cho tỷ lệ chết là 24,3% cao hơn 1,7% so với khi xử lý 1 lần 15 phút nhưng tỷ lệ mẫu sạch đạt 77,8%, cao hơn 8,9% so với khi xử lý 1 lần 15 phút. Do đó, xử lý mẫu bằng dung dịch NaOCl 3% trong 2 lần 15 phút được chọn sử dụng vào mẫu tạo nguồn vật liệu cây *in vitro* cho các thí nghiệm tiếp theo (Hình 1).

Hình 1. Tạo vật liệu khởi đầu cho nhân *in vitro* cây sắn ruột vàng Phú Thọ

Ghi chú: a) Hom sắn được giâm trong bầu đất sau 6 tuần; b) Mẫu được khử trùng 2 lần trong 15 phút với NaOCl 3%, cấy trên môi trường nền MS sau 2 tuần nuôi cấy.

Bảng 1. Ảnh hưởng của nồng độ $HgCl_2$ và NaOCl đến khả năng tạo mẫu sạch

Chất khử trùng	Nồng độ (%)	Thời gian xử lý (phút)	Số mẫu	Tỷ lệ mẫu sạch (%)	Tỷ lệ mẫu nhiễm (%)	Tỷ lệ mẫu chết (%)
$HgCl_2$	0,1	5	30	84,4	15,6	60,5
	0,1	10	30	90,0	10,0	55,6
	0,2	5	30	90,0	10,0	65,4
	0,2	10	30	92,2	7,8	69,9
	0,2	2 lần 10 phút	30	94,4	5,6	84,7
NaOCl	2	10	30	54,4	45,6	32,6
	2	15	30	60,0	40,0	27,8
	3	10	30	66,7	33,3	30,0
	3	15	30	68,9	31,1	22,6
	3	2 lần 15 phút	30	77,8	22,2	24,3
Không khử trùng			30	0,0	100,0	100,0

Ghi chú: Môi trường nền MS (MS + 5 g/L agar + 30 g/L sucrose, pH 5,8).

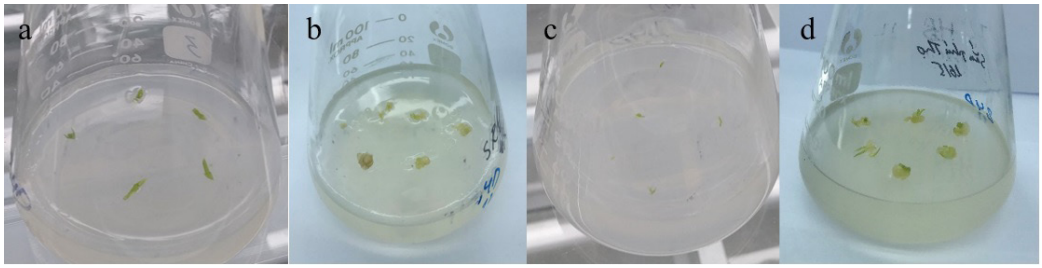
3.2. Xác định môi trường nuôi cấy tạo chồi

Trong nghiên cứu tái sinh cây sắn bằng phương pháp nuôi cấy *in vitro*, nguồn vật liệu dùng cho nuôi cấy có thể từ chồi nách (Konan *et al.*, 1997; Nguyễn Thị Thanh Duyên và *cs.*, 2022; Phạm Thị Hương và *cs.*, 2022), từ chồi đỉnh và lá non cây con *in vitro* (Vidal *et al.*, 2014), nhưng phổ biến nhất là từ đốt thân (Kabir *et al.*, 2015; Mahdi & Edward, 2017; Sessou *et al.*, 2020). Trong thí nghiệm này, mảnh lá non và đỉnh chồi từ cây con *in vitro* giai đoạn 2 tuần tuổi được dùng làm vật liệu nghiên cứu. Lá non được cắt nhỏ thành từng mảnh kích thước 2 mm × 2 mm. Mỗi chồi có thể cắt được 20 mảnh lá. Các mảnh lá và đỉnh chồi được cấy trên môi trường nền MS + 2,4-D (0 mg/L, 8 mg/L, 10 mg/L, 12 mg/L) trong điều kiện 7 ngày tối sau đó chuyển sang điều kiện phòng sáng 14 ngày. Khả năng hình thành mô sẹo được đánh giá sau 3 tuần nuôi cấy. Công thức nền MS có bổ sung 2,4-D phát sinh mô sẹo 100% đối với cả mảnh lá và chồi đỉnh (Bảng 2). Tuy nhiên tỷ lệ mô sẹo xuất hiện phôi khác nhau ở 2 vật liệu nghiên cứu. Tỷ lệ mô sẹo có phôi tăng dần khi nồng độ 2,4-D tăng từ 0-10 mg/L. Nhưng khi tăng nồng độ 2,4-D lên 12 mg/L thì tỷ lệ mô sẹo phát sinh phôi bắt đầu giảm. Tỷ lệ mô sẹo có phôi đạt cao nhất ở công thức nền MS có bổ sung 10 mg/L 2,4-D đối với cả 2 vật liệu nghiên cứu là mảnh lá (79,4%) và chồi đỉnh (81,8%). Quan sát quá trình nuôi cấy cho thấy, lá non và đỉnh chồi sau khi cảm ứng hình thành mô sẹo là những hạt nhỏ li ti, xốp, có màu trắng kem, vàng tươi, sinh trưởng tốt trên môi trường chứa 2,4-D (Hình 2). Nhưng khi tăng nồng độ lên 12 mg/L thì các mô sẹo không còn độ xốp, vàng đậm, ướt, nhiều mô hóa nâu và chết dần. Nguồn nguyên liệu và môi trường nuôi cấy ảnh hưởng đến khả năng hình thành mô sẹo và tỷ lệ tạo phôi. Điều này được thể hiện qua nghiên cứu của Nguyễn Thị Minh Hồng và cộng sự (2018) đối với 5 giống sắn của Việt Nam. Tỷ lệ hình thành mô sẹo từ lá non dao động 88,6 - 100% và từ đỉnh chồi là 87,2 - 100%. Tỷ lệ mô sẹo có khả năng phát sinh phôi cao nhất đạt 80,4% với giống sắn S5.

Bảng 2. Ảnh hưởng của nồng độ 2,4-D đến khả năng hình thành mô sẹo (sau 3 tuần) và phát sinh phôi sắn ruột vàng Phú Thọ

Nồng độ 2,4-D (mg/L)	Số mẫu	Mảnh lá		Chồi đỉnh	
		Tỷ lệ hình thành mô sẹo (%)	*Tỷ lệ mô sẹo có phôi (%)*	*Tỷ lệ hình thành mô sẹo (%)*	*Tỷ lệ mô sẹo có phôi (%)*
0	150	0	0	0	0
8	150	100	43,7	100	56,6
10	150	100	79,4	100	81,8
12	150	100	57,9	100	61,0
CV (%)			*3,6*		*4,2*
$LSD_{0,05}$			*0,12*		*0,18*

Ghi chú: Môi trường nền MS (MS + 5 g/L agar + 30 g/L sucrose, pH 5,8).



Hình 2. Nuôi cấy mảnh lá và chồi đỉnh tạo mô sẹo trên môi trường nền MS + 10 mg/L 2,4-D

Ghi chú: a) Nuôi cấy mảnh lá từ cây sắn in vitro; b) Mô sẹo bắt đầu hình thành sau 10 ngày nuôi cấy mảnh lá; c) Nuôi cấy mẫu chồi đỉnh từ cây sắn in vitro; d) Mô sẹo bắt đầu hình thành sau 10 ngày nuôi cấy chồi đỉnh.

3.3. Nghiên cứu môi trường tạo chồi và kéo dài chồi

Trong nuôi cấy mô tế bào thực vật, chất điều tiết sinh trưởng được bổ sung vào môi trường nhằm kích thích sự phát sinh hình thái của mẫu cấy (Musashige & Skoog, 1962). Trong thí nghiệm này, chất kích thích sinh trưởng của nhóm cytokinin (Kinetine, BAP) được sử dụng nhằm điều khiển sự phát sinh chồi trong nuôi cấy *in vitro* thực vật.

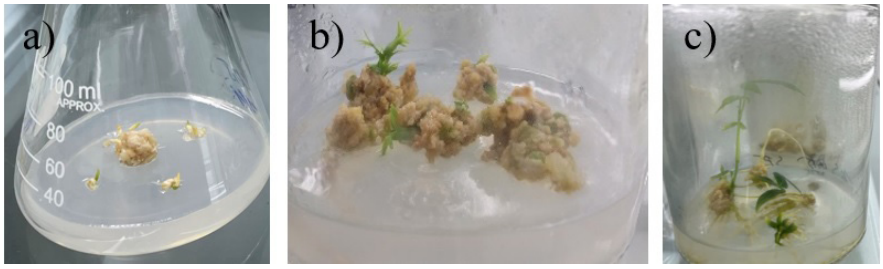
Khi các mô sẹo xuất hiện phôi (mô sẹo có mầm xanh) từ đỉnh chồi và mảnh lá non thu được ở thí nghiệm trên sẽ được chuyển sang môi trường chứa chất điều hòa sinh trưởng Kinetine và BAP tăng dần từ 0 - 0,6 mg/L để kích thích phôi soma nảy mầm. Sau khoảng 2 tuần, cụm phôi bắt đầu bật chồi, lúc này chồi thật xuất hiện và phát triển nhanh. Từ khi phát sinh chồi, sau 2 tuần chồi đã đạt kích thước 4 - 5 cm. Tùy thuộc vào nồng độ kinetine và BAP khác nhau mà mỗi khối mô sẹo phôi hóa có thể xuất hiện 1 - 3 chồi (Bảng 3 và Hình 3). Như vậy, với 20 mảnh lá/chồi sau khi tạo mô sẹo và kéo dài chồi thì thu được trung bình là 8 chồi có lá hoàn chỉnh.

Bảng 3. Ảnh hưởng của Kinetine, BAP đến khả năng tái sinh chồi sắn ruột vàng Phú Thọ sau 4 tuần nuôi cấy

Chất điều tiết sinh trưởng	Nồng độ chất điều tiết sinh trưởng (mg/L)	Tỷ lệ phôi soma tạo thành cây con (%)	
		Phôi soma từ mảnh lá non	*Phôi soma từ chồi đỉnh*
Kinetine	0	0	0
	0,2	45,7	46,7
	0,4	34,3	38,0
	0,6	23,0	27,3
CV (%)		*2,8*	*3,0*
$LSD_{0,05}$		*0,12*	*0,16*
BAP	0	0	0
	0,2	49,0	51,7
	0,4	39,3	45,0
	0,6	24,0	30,0
CV (%)		*3,6*	*3,1*
$LSD_{0,05}$		*0,18*	*0,2*

Ghi chú: Môi trường nền MS (MS + 5 g/L agar + 30 g/L sucrose, pH 5,8).

Ở cùng nồng độ chất kích thích sinh trưởng, BAP luôn cho khả năng phát sinh chồi cao hơn Kinetin. Khi tăng nồng độ Kinetine hoặc BAP từ 0,2 mg/L lên 0,4 mg/L và 0,6 mg/L thì tỷ lệ phôi soma tạo thành cây con không tăng mà giảm dần. Tỷ lệ tạo thành cây con ở phôi soma hình thành từ mảnh lá non và chồi đỉnh đều đạt cao nhất khi bổ sung 0,2 mg/L Kinetine hoặc 0,2 mg/L BAP với tỷ lệ lần lượt là 45,7%; 49,0% với phôi soma từ mảnh lá non và 46,7%; 51,7% với phôi soma từ chồi đỉnh. Tỷ lệ hình thành cây con từ phôi soma tạo thành từ chồi đỉnh cao hơn so với từ mảnh lá non 1% - 2%. Tỷ lệ phôi soma tạo cây trong thí nghiệm này đạt cao nhất là 51,7%, thấp hơn so với kết quả nghiên cứu của Nguyễn Thị Minh Hồng và cộng sự (2018) khi bổ sung 0,3 mg/L BAP cho tỷ lệ tạo cây đạt cao nhất với giống sắn Huay Bong là 81,0%.



Hình 3. Mô sẹo phát sinh chồi trên môi trường nền MS + 0,2 mg/L BAP

Ghi chú: a) Mô sẹo bắt đầu xuất hiện chồi; b) Chồi sau 2 tuần nuôi cấy; c) Chồi sau 3 tuần nuôi cấy.

Chồi kích thước 4 - 5 cm được sử dụng làm vật liệu nhân nhanh. Cắt chồi thành từng đốt, khử trùng bằng NaOCl 3% trong 15 phút và cấy trên môi trường MS nền có bổ sung 0,2 mg/L BAP (Hình 4). Sau 3 tuần nuôi cấy được chồi trưởng thành 4 - 5 cm. Chồi này có thể được sử dụng cho chu kỳ nhân chồi tiếp theo hoặc cấy sang môi trường ra rễ tạo cây hoàn chỉnh để ra vườn ươm. Như vậy, từ một hom sắn ban đầu giâm được chồi có trung bình 6 đốt (Hình 1a). Từ vật liệu này nhân chồi sạch bệnh (Hình 1b). Mỗi chồi sạch bệnh cắt được 20 mảnh lá và một đỉnh sinh trưởng cấy vào môi trường tạo mô sẹo. Qua giai đoạn tạo chồi (sau 13 - 15 tuần), thu được 8 chồi trưởng thành từ một mẫu sạch bệnh trung gian (Hình 1b). Như vậy, từ một hom sắn ban đầu sẽ thu được 48 chồi trưởng thành (6 đốt thân x 8 chồi/đốt thân). Các chồi này được sử dụng nhân nhanh, cứ 3 tuần cho một chu kỳ với hệ số nhân 3 lần. Sau 12 tháng có thể thu được 76.527.504 cây (Bảng 4).

Bảng 4. Hệ số nhân chồi cây sắn ruột vàng Phú Thọ

Mẫu ban đầu	Số chồi nhân vòng 1 (sau 13 - 15 tuần)	Số chồi nhân vòng 2 (sau 16 - 18 tuần)	Số chồi nhân vòng 14 (sau 12 tháng)
Đoạn thân trưởng thành gồm 6 đốt	144	432	76.527.504

Ghi chú: Công thức tính hệ số nhân chồi; 48×3^n; n - số vòng nhân nhanh (từ vòng 2, cứ sau mỗi 3 tuần hoàn thành 1 vòng).

Hình 4. Nhân nhanh giống sắn ruột vàng Phú Thọ trên môi trường nền MS + 0,2 mg/L BAP

Ghi chú: a) Cây sắn được sử dụng làm vật liệu nhân nhanh; b) Cây sắn 1 tuần tuổi nhân đốt thân từ chồi in vitro; c) Cây sắn 2 tuần tuổi.

3.4. Nghiên cứu môi trường tạo cây hoàn chỉnh

Chồi cây sắn ruột vàng Phú Thọ hình thành từ mô sẹo đạt 4 - 5 cm được sử dụng nghiên cứu môi trường ra rễ. Sử dụng chất kích thích sinh trưởng nhóm cytokinin (BAP, Kinetin) ở nồng độ 0,2 mg/L, nhóm auxin (IBA, NAA) ở các dải nồng độ 0 - 1,0 mg/L và than hoạt tính nồng độ 0,4 g/L tạo môi trường khảo sát khả năng ra rễ của cây sắn *in vitro*.

Giai đoạn này thường sử dụng các chất thuộc nhóm auxin kích thích quá trình tạo rễ, tuy nhiên

trong một số trường hợp khi bổ sung kết hợp giữa auxin và cytokinin vào môi trường nuôi cấy cũng cho kết quả tạo rễ tốt hơn so với bổ sung đơn chất auxin. Khi không bổ sung vào môi trường bất cứ chất điều tiết sinh trưởng nào thì rễ cây con vẫn xuất hiện nhưng thời gian rất dài và số lượng rễ ít, rễ phát triển không đồng đều, rễ ngắn, cây phát triển chậm. Kết quả này khác với kết quả nghiên cứu của Nguyễn Thị Minh Hồng và cộng sự (2018), chồi sắn trên môi trường MS phát triển rễ mạnh hơn các môi trường chứa chất điều tiết sinh trưởng. Khi bổ sung thêm vào môi trường nuôi cấy 0,2 mg/L BAP và 0,25 - 1 mg/L IBA thì tỷ lệ ra rễ tăng lên 50%, số rễ, chiều dài rễ, chiều cao cây và số lá cũng tăng lên nhưng khi bổ sung IBA vượt quá 0,25 mg/L thì các chỉ tiêu này bắt đầu giảm dần. Như vậy, bổ sung 0,25 mg/L IBA + 0,2 mg/L BAP vào môi trường nuôi cấy tạo cây hoàn chỉnh cho kết quả tốt nhất (Bảng 5).

Bảng 5. Ảnh hưởng của BAP và IBA đến khả năng tạo rễ cây sắn *in vitro*

Nồng độ BAP (mg/L)	Nồng độ IBA (mg/L)	Thời gian xuất hiện rễ (ngày)	Tỷ lệ ra rễ (%)	Số rễ	Chiều dài rễ (cm)	Cao cây (cm)	Số lá
0	0	42	9,7	0,7	1,2	5,7	2,7
0,2	0,25	12	50,0	2,0	3,7	6,7	4,3
0,2	0,5	16	34,3	1,7	3,7	6,0	2,7
0,2	1,0	21	28,7	1,3	3,0	5,7	2,3
CV (%)					*2,1*	*0,8*	*3,0*
$LSD_{0,05}$					*0,9*	*0,20*	*0,17*

Ghi chú: Môi trường nền MS (MS + 5 g/L agar + 30 g/L sucrose, pH 5,8).

Công thức kết hợp bổ sung 0,2 mg/L Kinetine và 0,25 mg/L IBA vào môi trường nền MS nuôi cấy tạo cây hoàn chỉnh tốt hơn các công thức còn lại với các chỉ số như: Thời gian xuất hiện rễ sớm (13 ngày), tỷ lệ ra rễ cao (45,7%), số rễ cao (2,3 rễ), chiều dài rễ đạt 3,8 cm, chiều cao cây đạt 7 cm và số lá đạt 4 lá (Bảng 6).

Bảng 6. Ảnh hưởng của Kinetine và IBA đến khả năng tạo rễ cây sắn *in vitro*

Nồng độ Kinetine (mg/L)	Nồng độ IBA (mg/L)	Thời gian xuất hiện rễ (ngày)	Tỷ lệ ra rễ (%)	Số rễ	Chiều dài rễ (cm)	Cao cây (cm)	Số lá
0	0	43	10,7	1,0	0,8	5,0	2,3
0,2	0,25	13	45,7	2,3	3,8	7,0	4,0
0,2	0,5	16	35,0	2,0	3,3	6,7	3,0
0,2	1,0	21	29,3	1,7	3,2	6,3	2,7
CV (%)					*3,2*	*1,0*	*3,2*
$LSD_{0,05}$					*1,1*	*0,4*	*0,22*

Ghi chú: Môi trường nền MS (MS + 5 g/L agar + 30 g/L sucrose, pH 5,8).

Khi bổ sung 0,2 mg/L BAP + 0,25 mg/L IBA hoặc 0,2 mg/L Kinetine + 0,25 mg/L IBA thì tỷ lệ chồi hình thành rễ mới đạt cao nhất là 50%. Tuy nhiên, rễ có đặc điểm là ngắn, mập, sần sùi và ít rễ phụ (Hình 5a).

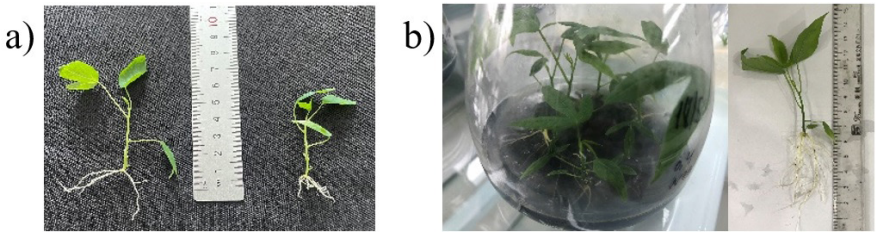
Mô sắn thường có nhựa, gây ảnh hưởng đến chất lượng phôi soma và phân chia tế bào, tạo chồi. Theo một số nghiên cứu thì than hoạt tính có tác dụng cải thiện sự tăng trưởng của tế bào cũng như hấp phụ các chất ức chế sự tăng trưởng tế bào thực vật, làm giảm quá trình oxy hóa của phenol hay sự tích tụ các chất gây hóa nâu, thay đổi pH trung bình đến mức tối ưu, tạo môi trường tối làm giảm hoạt động của enzyme liên quan đến quá trình oxy hóa của phenol gây nên hiện tượng hóa nâu. Tác động của than như một chất điều hòa tăng trưởng còn chưa rõ ràng nhưng một số dẫn chứng công nhận khả năng giải phóng dần một số sản phẩm hấp phụ (chất dinh dưỡng, các chất điều hòa tăng trưởng thực vật), tự bản thân than hoạt tính cũng giải phóng một số chất tự nhiên có thể thúc đẩy sự tăng trưởng (Thomas, 2008). Do đó than hoạt tính (THT) được bổ sung vào môi trường với nồng độ 0,4 g/L cùng với NAA nồng độ 0,25 - 1,0 mg/L. Kết quả cho thấy, thời gian rễ xuất hiện sớm từ 8 đến 19 ngày, tỷ lệ ra rễ dao động 65 - 100%, số rễ dao động 2,0 - 3, rễ chính phát triển dài, khỏe, nhiều rễ nhánh, chiều cao cây và số lá cũng vượt trội hơn các công thức thí nghiệm BAP + IBA hoặc Kinetine + IBA. Công thức bổ sung 0,25 mg/L NAA và 0,4 g/L than hoạt tính vào môi trường nền MS tạo cây hoàn chỉnh thì thời gian xuất hiện rễ rất sớm (8 ngày), tỷ lệ ra rễ đạt 100%, bộ rễ cây con khỏe

mạnh, rễ dài (5,7 cm) và có nhiều rễ phụ. Cây phát triển tốt đạt chiều cao trung bình 8,3 cm và có trung bình 4,7 lá (Bảng 7). Tất cả cây ra rễ có khả năng tái sinh tốt và có thể ra bầu ươm. Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Nguyễn Thị Minh Hồng và cộng sự (2018).

Bảng 7. Ảnh hưởng của NAA và than hoạt tính đến khả năng tạo rễ cây sắn *in vitro*

Nồng độ NAA (mg/L)	Nồng độ THT (g/L)	Thời gian xuất hiện rễ (ngày)	Tỷ lệ ra rễ (%)	Số rễ	Chiều dài rễ (cm)	Cao cây (cm)	Số lá
0	0,4	14	77,7	2,0	3,7	7,0	3,7
0,25	0,4	8	100,0	3,0	5,7	8,3	4,7
0,5	0,4	16	80,7	2,7	4,3	7,3	4,3
1,0	0,4	19	65,0	2,3	3,3	6,7	4,0
CV (%)					*1,18*	*2,1*	*2,8*
$LSD_{0,05}$					*0,23*	*0,21*	*0,19*

Ghi chú: Môi trường nền MS (MS + 5 g/L agar + 30 g/L sucrose, pH 5,8).



Hình 5. Chồi được nuôi cấy trên môi trường tạo rễ

Ghi chú: a) Cây sắn có bộ rễ hoàn chỉnh phát triển từ môi trường nền MS + 0,2 mg/L BAP + 0,25 mg/L IBA. b) Cây sắn hoàn chỉnh phát triển từ môi trường nền MS + 0,25 mg/L NAA + 0,4 g/L THT.

3.5. Nghiên cứu giá thể thích hợp cho cây sắn *in vitro* trong vườn ươm

Cây *in vitro* khi chuyển từ trạng thái dị dưỡng sang trạng thái tự dưỡng phải chịu nhiều yếu tố tác động của ngoại cảnh như ánh sáng, nhiệt độ và độ ẩm không khí sẽ ảnh hưởng không nhỏ đến sự sinh trưởng và phát triển của cây. Do đó, bước đệm trước khi chuyển cây ra ngoài sản xuất là vô cùng quan trọng và cần thiết. Trong nghiên cứu này, cây con hoàn chỉnh đạt tiêu chuẩn (bộ rễ khỏe, 4 - 6 lá, cao 8 cm - 9 cm) từ công thức nền MS + 0,25 mg/L NAA + 4 g/L THT được trồng ra giá thể, chăm sóc và theo dõi trong 2 tuần (Bảng 8, Hình 6). Cây con *in vitro* trong vườn ươm có tỷ lệ sống dao động từ 85,7 - 100%, cây sinh trưởng và phát triển tốt. Trong bốn công thức giá thể, giá thể 60% đất phù sa + 40% trấu hun là thích hợp nhất: cây con có tỷ lệ sống 100%, số lá đạt 7,3 và chiều cao cây đạt 10,2 cm.

Bảng 8. Ảnh hưởng các loại giá thể đến sự phát triển cây sắn *in vitro*

Công thức giá thể	Tỷ lệ sống (%)	Số lá	Chiều cao cây (cm)
60% Đất phù sa + 40% trấu hun	100,0	7,3	10,2
50% đất phù sa + 50% xơ dừa	97,7	7,3	8,7
50% đất phù sa + 25% cát + 25 % xơ dừa	90,3	6,7	8,3
50% đất phù sa + 25% cát + 25 % trấu hun	85,7	6,3	7,7
CV (%)		*3,3*	*4,1*
$LSD_{0,05}$		*0,66*	*0,28*

Hình 6. Giá thể ra cây và trồng thử nghiệm: a) Cây con sắn *in vitro* hoàn chỉnh được ươm trên giá thể; b) Cây sắn *in vitro* trồng thử nghiệm trong nhà lưới sau 2 tháng

IV. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã xác định được quy trình nhân nhanh *in vitro* cây sắn ruột vàng Phú Thọ: Khử trùng mẫu bằng NaOCl 3% trong 15 phút, lặp lại hai lần. Môi trường phát sinh mô sẹo tốt nhất là MS nền có bổ sung 10 mg/L 2,4-D. Môi trường tạo chồi tốt nhất là MS nền có bổ sung 0,2 mg/L BAP. Môi trường tái sinh cây hoàn chỉnh là MS nền có bổ sung 0,25 mg/L NAA và 0,4 g/L than hoạt tính. Giá thể thích hợp cho cây sắn *in vitro* là 60% đất phù sa + 40% trấu hun. Trên môi trường giá thể này, cây con có tỷ lệ sống 100%, số lá trung bình 7,3 lá và chiều cao cây đạt 10,2 cm sau hai tuần ươm cây. Hệ số nhân chồi từ một chồi ban đầu, sau 12 tháng có thể nhân được 76.527.504 cây.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Nguyễn Thị Thanh Duyên, Nguyễn Châu Niên, Dương Tấn Thành và Nguyễn Thị My, 2022**.** Ảnh hưởng của NaOCl, môi trường và các chất điều hòa sinh trưởng đến nhân giống sắn KM140 sạch bệnh (*Manihot esculenta* Crantz) bằng phương pháp *in vitro*. *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển nông thôn,* 21 (1): 9-16.

Nguyễn Thị Minh Hồng, Nguyễn Thị Hoài Thương, Phạm Bích Ngọc, Chu Hoàng Hà, 2018. Nghiên cứu tái sinh một số giống sắn (*Manihot esculenta* Crantz) thông qua mô sẹo phôi hóa. *Tạp chí Công nghệ Sinh học*, 16 (1): 119-126.

Phạm Thị Hương, Lê Ngọc Tuấn, Nguyễn Hùng, Nguyễn Thị Hạnh, Đỗ Thị Trang, Vũ Hồng Vân, Phạm Xuân Hội, 2022. Hoàn thiện quy trình nhân dòng sắn C83 kháng bệnh khảm lá tại Việt Nam. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Nông nghiệp Việt Nam,* 140 (7): 99-106.

Acedo, V. Z., 2006. Improvement of *in-vitro* techniques for rapid meristem development and mass propagation of Philippine cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *Journal of Food, Agriculture and Environment*, 4 (1): 220-224.

Amelework A.B., M.W. Bairu, O. Maema, S.L. Venter, M. Laing, 2021. Adoption and promotion of resilient crops for climate risk mitigation and import substitution: A case analysis of cassava for South African agriculture. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 5: 617783.

Escobar R., A. Hern, N. Larrahondo, G. Ospina, J. Restrepo, L. Mu-Noz and W. Roca, 2006. Tissue culture for farmers: Participatory adaptation of low-input cassava propagation in Colombia. *Experimental Agriculture,* 42 (1): 103-120.

FAO, 2013. *Save and Grow. Cassava: A guide to sustainable production intensification*; FAO: Rome, Italy, pp. 1-129, ISBN 978-92-5107642-2. Available online: https://openknowledge.fao.org/server/api/core/bitstreams/79010f8b-d86c-4303-8488-d20e3f223a4a/content (accessed on 7 May 2024).

Gome, K.A. and A.A. Gomez, 1984. *Statistical procedures for agricultural research (2nd ed.).* John Wiley and Sons, NewYork, 680 p.

Hopkins W., 2007. *Plant biotechnology*. The Green World Series, Infobase Publishing, Chelsa House, NY. USA. pp: 36-39.

Kabir M.H., Mamun A.N.K., Roy P.K., Islam M.R., Jahan M.T. and Talukder S.U., 2015. *In vitro* propagation of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *Nuclear Science and Applications*, 24 (1&2): 23-28.

Konan N.K., Schöpke C., Cárcamo R., Beachy R.N., Fauquet. C., 1997. An efficient mass propagation system for cassava (*Manihot esculenta* Crantz) based on nodal explants and axillary bud-derived meristems. *Plant Cell Reports,* 16: 444–449. https://doi.org/10.1007/BF01092763.

Madukosiri C.H., 2013. Comparative study of some varieties of cassava grown and consumed in Bayelsa State as prospective biofuel and energy food sources. *International Journal of Agricultural Policy and Research*, 1: 156-165.

Mahdi H., R. Edward, 2017. *In vitro* propagation of Malaysian cassava (*Manihot esculenta* Crantz) variety through low cost tissue culture media. *International Journal of Environment, Agriculture and Biotechnology*, 2 (4): 2165-2168.

Murashige T. and F. Skoog, 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Plant Physiology*, 15: 473-497. https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x.

Obueh H.O. and Kolawole S.E., 2016. Comparative study on the nutritional and anti-nutritional compositions of sweet and bitter cassava varieties for garri production. *Journal of Nutrition and Health Sciences*, 3: 302.

Sessou A.F., Kahia J.W., Houngue J.A., Ateka E.M., Dadjo C., and Ahanhanzo C., 2020. *In vitro* propagation of three mosaic disease resistant cassava cultivars. *BMC Biotechnol*, 20 (51). https://doi.org/10.1186/s12896-020-00645-8.

Staden J.V., E. Zazimalova and E.F. George, 2008. Plant Growth Regulators II: Cytokinins, their Analogues and Antagonists, In E.F. George, M. A. Hall and G. De Klerk (Eds.), *Plant Propagation by Tissue Culture*, 3rd Edn, 205-226 (Springer publisher).

Thomas T.D., 2008. The role of activated charcoal in plant tissue culture. *Biotechnology Advances,* 26 (6): 618-631. https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0734975008000864 (accessed on 10 May 2024).

Vidal A.M., M.A.P.C. Costa, A.S. Souza, W.A.B. Almeida, F.V.D. Souza, 2014. *In vitro* regeneration and morphogenesis of somatic embryos of cassava. *Revista Ciência Agronômica*, 45 (3): 558-565. https://www.redalyc.org/pdf/1953/195330648017.pdf.

Study on *in vitro* propagation of Phu Tho yellow flesh cassava

Le Thi Thanh, Pham Thi Hiep, Tong Thi Huyen, Le Thi Thu Trang,
Nguyen Phuong Nga, Tang Thi Diep, Vu Thi Phuong, Do Thi Thanh Thanh, Nguyen Thi Nga,
Hoang Minh Chinh, Pham Thi Thu Ha, Nguyen Thi Thu Phuong, Pham Thien Thanh

Abstract

In this study, somatic embryo formation and regeneration of Phu Tho yellow-flesh cassava plants were investigated using *in vitro* shoot tips and young leaf fragments. The results showed that sterilizing the samples with 3% NaOCl for 15 minutes (repeated twice), resulted in a high rate of clean samples (77.8%) and a low sample mortality (24.3%). The optimal callus induction medium was MS supplemented with 10 mg/L 2,4-D which showed callus formation rate of 79.4% for leaf fragments and 81.8% for shoot tips. For bud production, the best medium was MS supplemented with 0.2 mg/L BAP, which resulted in a seedling formation rate of 49% from leaf fragment somatic cells and 51.7% from apical bud somatic cells. After three weeks of culture, the shoots reached a length of 4 - 5 cm. For rapid multiplication, each shoot was cut into nodal segments and cultured onto a plant regeneration medium. From a single initial shoot, the multiplication process yielded an impressive 76,527,504 *in vitro* plants after 12 months. The complete plant regeneration medium consisting of MS supplemented with 0.25 mg/L NAA and 0.4 g/L activated charcoal achieved a 100% rooting rate. *In vitro* cassava plants adapted well to the substrate mixture of 60% alluvial soil and 40% rice husk. Under this condition, the plantlets exhibited a 100% survival rate with an average of 7.3 leaves and height of 10.2 cm after two weeks of cultivation. The *in vitro* multiplication process had a high multiplication coefficient, the plantlets grew well, and could be applied in large scale production of Phu Tho yellow cassava.

Keywords: Cassava (*Manihot esculenta* Crantz), Phu Tho yellow flesh cassava, *in vitro* propagation

Ngày nhận bài: 19/6/2024
Ngày phản biện: 24/7/2024
Người phản biện: TS. Nguyễn Thanh Nhung
Ngày duyệt đăng: 09/8/2024

THỰC TRẠNG CANH TÁC MÍT TẠI MỘT SỐ HUYỆN CỦA TỈNH ĐẮK LẮK VÀ LÂM ĐỒNG

Đỗ Xuân Đạt[1*], Lại Tiến Dũng[1], Phạm Thị Thu Trang[1], Đỗ Minh Đức[1], Khúc Duy Hà[1],
Đặng Thanh Thúy[1], Phạm Văn Duyên[1], Hoàng Trường Sinh[2], Bùi Thị Phong Lan[2]

TÓM TẮT

Kết quả điều tra thực trạng canh tác mít tại tỉnh Lâm Đồng và Đắk Lắk năm 2023 cho thấy, hiện nay có 07 giống mít, trong đó giống mít Thái siêu sớm được trồng phổ biến chiếm 58 - 70% số hộ, chủ yếu được trồng xen canh (vườn tạp) chiếm 69,2 - 76,7% và ít được đầu tư chăm sóc. Diện tích trồng chuyên canh chiếm 23,3 - 30,8% và được đầu tư chăm sóc như làm cỏ, bón phân, tưới nước, cắt tỉa, xử lý ra hoa đậu quả và trái vụ. Trên cây mít có các loài sâu bệnh hại chính như sâu đục quả (*Glyphodes* sp.), ruồi đục quả (*B. dorsalis*), rệp sáp (*Pseudococcus* sp.) bệnh thối đen quả (*L. theobromae*), bệnh xơ đen (*Pantoea* sp.), bệnh thối thân xì mủ (*Phytophthora* spp.), bệnh vàng lá thối rễ (*Phytophthora* sp., *Fusarium* sp. và *Meloidogyne* sp.),… Sử dụng thuốc hóa học chiếm 75 - 100% số hộ, biện pháp sinh học 4,2 - 16,7% và có 4,2 - 14,2% số hộ kết hợp cả hai biện pháp sinh học và hóa học để phòng chống sâu bệnh hại chính trên cây mít.

Từ khóa: Cây mít, hiện trạng canh tác, Đắk Lắk, Lâm Đồng

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Tây Nguyên được đánh giá là một vùng có nhiều điều kiện thuận lợi, tiềm năng đất đai, kinh nghiệm canh tác và lợi thế sẵn có để phát triển cây mít ở quy mô tập trung. Tính đến năm 2022, diện tích trồng mít của Tây Nguyên khoảng 7.900 ha, diện tích cho sản phẩm là 3.383 ha, sản lượng đạt 65.946 tấn/năm. Trong đó, Đắk Lắk là tỉnh trồng nhiều nhất (2.446,6 ha), sau là Lâm Đồng (1.613,8 ha) (Cục Trồng trọt, 2022).

[1] Trung tâm Đấu tranh sinh học, Viện Bảo vệ Thực vật; [2] Viện Khoa học Kỹ thuật Nông Lâm nghiệp Tây Nguyên
* Tác giả liên hệ, email: doxuandatct@yahoo.com