

*mangium*, *Acacia auriculiformis*) BV350 và BV523 bằng phương pháp nuôi cấy mô tế bào. *Tạp chí Khoa học Lâm nghiệp*, (3): 33-44. ISSN: 1859-0373.

**Nguyễn Văn Việt, Trần Việt Hà, Kiều Thị Hà, Nguyễn Đức Kiên**, 2019. Ứng dụng kỹ thuật nuôi cấy *in vitro* trong nhân giống một số dòng Keo lá tràm (*Acacia auriculiformis*). *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Lâm nghiệp*, (4): 25-32.

**Abbas H., Qaiser M., Naqvt A.B.**, 2010. Rapid *in vitro* multiplication of *Acacia nilotica* subsp. *hemisperica*, a critically endangered endemic taxon. *Pakistan Journal*

*of Botany*, 42 (6): 4087-4093.

**Al-Wasel A.S.**, 2000. Micropropagation of *Acacia seyal* Del. *in vitro*. *Journal of Arid Environments*, 46 (4): 425-431.

**Dhabhai K., Sharma M.M., Batra A.**, 2010. *In vitro* clonal propagation of *Acacia nilotica* (L.) - a nitrogen fixing tree. *Researcher*, 2 (3): 7-11.

**Rout G.R., Senpati S.K., Aparajeta S.**, 2008. Micropropagation of *Acacia chundra* (Roxb.) DC. *Horticultural Science*, 35: 22-26.

## Effects of growth regulators and training time on *in vitro* propagation of *Acacia* hybrid lines in Thanh Hoa

Pham Huu Hung, Lai Thi Thanh, Nghiem Thi Huong

### Abstract

The study was conducted to determine the appropriate medium for shoot proliferation, plant regeneration and the best training time for BV10, BV16 and BV32 lines of *Acacia* hybrid. The experiments were carried out in the basic MS medium supplemented with growth regulators with different concentrations. The results indicated that the suitable medium for shoot multiplication was MS + 8 g/L agar + 30 g/L sucrose + 1.5 mg/L BAP. In the case of adding TDZ or NAA, the optimal concentration was 0.2 mg/L. The best rooting medium was 1/2MS + 8 g/L agar + 30 g/L sucrose supplemented with 1.5 mg/L IBA for BV10 and BV32 lines of *Acacia* hybrid, supplemented with 1 mg/L IBA for BV16 line of *Acacia* hybrid. In addition, the medium of 1/2MS + 8 g/L agar + 30 g/L sucrose supplemented with 2 mg/L IAA could be used for all three lines of *Acacia* hybrid. Besides, it also determined the appropriate training time was 14 days with more than 85% of survival rate.

**Keywords:** *Acacia* hybrid lines BV10, BV16 and BV32, tissue culture, *in vitro* propagation

Ngày nhận bài: 04/01/2023

Ngày phản biện: 13/02/2023

Người phản biện: TS. Nguyễn Thanh Nhung

Ngày duyệt đăng: 28/02/2023

## XÂY DỰNG PHƯƠNG PHÁP DUNG HỢP TẾ BÀO TRẦN CỦA GIỐNG SẮN KM94 VỚI HAI GIỐNG SẮN HN3 VÀ C-33

Phạm Thị Hương<sup>1</sup>, Lê Ngọc Tuấn<sup>1</sup>, Nguyễn Hùng<sup>1</sup>,  
Nguyễn Thị Hạnh<sup>1</sup>, Phạm Xuân Hội<sup>1</sup>

### TÓM TẮT

Nghiên cứu được thực hiện nhằm phát triển phương pháp tách tế bào trần từ mô thịt lá sắn tại Việt Nam, phục vụ dung hợp tế bào trần, phát triển giống sắn mới. Lá của giống sắn kháng bệnh khảm lá sắn HN3 và dòng sắn C-33 từ cây sắn nuôi cấy *in vitro* được tiền xử lý qua dung dịch có nền khoáng CPW (Frearson *et al.*, 1973) có nồng độ mannitol tăng dần từ 5%; 9% và 13% mannitol, ủ trong các dung dịch trên với thời gian 1 giờ. Sau đó, ủ mẫu lá với dung dịch phân giải mô thịt lá có chứa cellulase 1,6% + macerozyme 0,8% trong thời gian 16 giờ, lắc 50 vòng/phút, ở nhiệt độ 25°C. Sản lượng tế bào trần trung bình giống HN3 đạt  $1,0 \times 10^7$  TBT/g trọng lượng tươi, khả năng sống đạt 95,4%; giống C-33 đạt  $1,9 \times 10^7$  TBT/g trọng lượng tươi với khả năng sống đạt

<sup>1</sup> Viện Di truyền Nông nghiệp

\* Tác giả liên hệ, email:

92,7%. Tế bào trần từ mô sẹo phôi hóa giống KM94 được dung hợp với tế bào trần từ mô thịt lá hai giống sắn HN3 và C-33 sử dụng chất xúc tác PEG MW 4000 ở nồng độ 30%. Mật độ tế bào trần phù hợp cho dung hợp từ  $5 \times 10^5$  -  $1 \times 10^6$ . Tỷ lệ dung hợp trung bình giữa KM94-C33 là 32,68%, KM94×HN3 là 16,8%. Kết quả dung hợp giữa KM94×HN3 đã thu được 8 cây tái sinh.

**Từ khoá:** Cây sắn (*Manihot esculenta* Crantz), tế bào trần, dung hợp

## I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Hiện nay, các phương pháp cải tiến giống sắn chủ yếu được sử dụng là phương pháp lai tạo truyền thống hoặc thông qua kỹ thuật di truyền. Đối với phương pháp lai tạo giống truyền thống, phương pháp để cải tiến giống cây trồng này đang là thử thách rất lớn bởi một vài yếu tố có liên quan bao gồm: thiếu nguồn gen hữu ích cho lai tạo, tính dị hợp cao, thời gian ra hoa không tương thích, khả năng ra hoa trên sắn chỉ hạn chế ở một vài vùng sinh thái nhất định do quá trình ra hoa trên sắn và các loài cây trồng khác phụ thuộc vào một vài yếu tố như thời gian chiếu sáng, các nhân tố nội sinh như gibberellin và tuổi cây. Ở các loài không tương thích về sinh sản, dung hợp tế bào trần là cách tiếp cận hiệu quả trong việc phát triển các cây lai. Tuy nhiên, khó khăn của dung hợp tế bào trần là khả năng tái sinh sản phẩm sau dung hợp. Nhiều nhân tố ảnh hưởng đến khả năng tái sinh của tổ hợp lai bao gồm bản chất của tế bào trần, phương pháp nuôi cấy, môi trường nuôi cấy và mật độ tế bào trần. Việc chọn lọc bố mẹ sử dụng cho dung hợp là rất quan trọng để tạo ra các biến dị mới. Kết quả nghiên cứu đề tài “Nghiên cứu tạo tế bào trần và tái sinh cây hoàn chỉnh phục vụ chọn tạo giống sắn kháng virus” của nhóm nghiên cứu được thực hiện trong giai đoạn từ 8/2019 - 12/2020 đã cho kết quả tái sinh thành công tế bào trần từ mô sẹo phôi hoá của hai giống sắn KM94 (Phạm Thị Hương và cs., 2021). Năm 2020, Nguyễn Anh Vũ đã nghiên cứu phương pháp đánh giá nhanh khả năng kháng bệnh khảm lá trên 12 dòng/giống sắn trong đó có dòng C-33. Kết quả đã khẳng định được dòng C-33 là dòng kháng được bệnh khảm lá sắn, phù hợp làm vật liệu cho các phương pháp lai tạo. Ngoài ra, giống sắn HN3 là giống kháng bệnh khảm lá sắn đã được công bố lưu hành tại vùng Đông Nam Bộ vào năm 2021. Do đó, nghiên cứu sử dụng vật liệu là mô sẹo phôi hoá của giống sắn KM94 và tế bào thịt lá của giống sắn kháng bệnh khảm lá C-33 và HN3 để khắc phục khả năng tái sinh của tổ hợp lai sau dung hợp. Tuy nhiên, nghiên cứu phương pháp tách tế bào trần từ mô thịt lá sắn vẫn chưa được nghiên cứu tại Việt Nam. Do đó, trong nghiên cứu này chúng tôi áp dụng các phương pháp nghiên cứu của các tác giả

khác để hoàn thiện phương pháp tách tế bào trần từ mô thịt lá, phục vụ cho nghiên cứu dung hợp tế bào trần giữa mô sẹo phôi hoá của giống sắn được trồng phổ biến tại Việt Nam (KM94) với tế bào trần từ mô thịt lá của các giống sắn kháng bệnh khảm lá.

Phương pháp tách tế bào trần từ lá sắn đã được các tác giả nghiên cứu và xây dựng. Khởi đầu là nghiên cứu của Shahin và Shepard (1980) với mục tiêu xây dựng phương pháp tách, phân chia và tái sinh chồi từ tế bào trần thịt lá sắn thu được từ cây sắn được trồng và phát triển trong tủ nuôi điều khiển nhiệt độ, ánh sáng của giống sắn Mexico No.35 và CMC 76. Nghiên cứu đã sử dụng tổ hợp enzyme 1,0% cellulase R 10, 0,5% macerozyme, ở 25°C trong điều kiện tối, lắc ở điều kiện 50 - 70 vòng/phút trong thời gian 5 giờ. Sản lượng trung bình của tế bào trần thịt lá đạt được  $5,6 \times 10^6$  g/trọng lượng tươi của lá.

Năm 2017, Wu *et al.* đã công bố phương pháp tách tế bào trần từ lá sắn sử dụng tổ hợp enzyme 1,6% cellulase R-10 và 0,8% macerozyme, ở trong 16 giờ ở nhiệt độ 25°C trong điều kiện tối, sản lượng tế bào trần thu được  $4,4 \times 10^7$  TBT/g trọng lượng tươi và khả năng sống của tế bào trần đạt 92,6%. Tế bào trần sau tách được sử dụng cho mục đích nghiên cứu biểu hiện tạm thời của gen

Năm 2020, Wen *et al.* cũng đưa ra phương pháp tách tế bào trần từ lá sắn sử dụng tổ hợp enzyme Cellulase 0,075% + Macerozyme 0,075%. Hỗn hợp sau đó được ủ ở điều kiện 28°C, 16 giờ ở điều kiện tối. Sản lượng tế bào trần thu được khi tách từ mô thịt lá của các lá non đã mở của giống sắn SC8 đạt  $1,0 \times 10^7$  TBT/g trọng lượng tươi, khả năng sống sót đạt 90%.

Các nghiên cứu dung hợp tế bào trần được tiến hành trên một số đối tượng cây trồng phổ biến khác nhau bao gồm các giống cam quýt (Pereira *et al.*, 2003), cải dầu, chuối và khoai tây (Collonnier *et al.*, 2001; Szczerbakowa *et al.*, 2003; Szczerbakowa *et al.*, 2003; Hoàng Thị Giang, 2016).

Dung hợp tế bào trần trên cây sắn được tiến hành bởi Wen *et al.* (2020) sử dụng phương pháp xung điện. Đây là nghiên cứu dung hợp tế bào trần và tái sinh thành công đầu tiên ở sắn.

## II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Vật liệu nghiên cứu

Cây sắn nuôi cấy mô của hai giống sắn C-33 và HN3 nhập nội từ Trung tâm Nông nghiệp Nhiệt đới Quốc tế CIAT, được nghiên cứu đánh giá kháng bệnh khảm lá tại vùng nhiễm bệnh khảm lá sắn Tây Ninh - Việt Nam.

### 2.2. Phương pháp nghiên cứu

#### 2.2.1. Bố trí thí nghiệm

a) *Thí nghiệm 1. Khảo sát ảnh hưởng của tổ hợp enzyme đến hiệu suất tách tế bào trần từ mô thịt lá sắn*

Lấy 1 g mẫu lá non đã mở của các giống sắn HN3 và C-33 từ cây nuôi cấy mô ở độ tuổi 4 - 6 tuần làm vật liệu tách tế bào trần.

Phương pháp tách tế bào trần từ lá được áp dụng theo quy trình của Wu *et al.* (2017) có cải tiến. Lá đã mở hoàn toàn được cắt thành các lát song song có kích thước 1 mm bề rộng. Sau khi cắt, các mẫu lá được ủ trong dung dịch gây co nguyên sinh CPW (27,2 mg/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 100 mg/L  $\text{KNO}_3$ ; 250 mg/L  $\text{MgSO}_4$ , 0,2 mg/L KI, 150 mg/L  $\text{CaCl}_2$ ; 0,003 mg/L  $\text{CuSO}_4$ ) + 5% mannitol; 9% mannitol và 13% mannitol trong 1 giờ. Sau đó chuyển mẫu vào 10 mL dung dịch phân giải có thành phần như sau: 9% mannitol; 10 mM KCl; 10 mM  $\text{CaCl}_2$ ; 20 mM MES, pH 5,8 với các nồng độ enzyme được khảo sát theo các công thức sau: CT1: Cellulase 1,6% + macerozyme 0,8% (Wu *et al.*, 2017); CT2: Cellulase 1,0% + Macerozyme 0,5% (Shahin and Shepard, 1980); CT3: Cellulase 0,075% + Macerozyme 0,075% (Wen *et al.*, 2020).

Sau đó mẫu lá được ủ với dung dịch enzyme trong thời gian 16 giờ, lắc 50 vòng/phút, ở nhiệt độ 25°C và tách theo như mô tả của Wu *et al.* (2017). So sánh mật độ tế bào trần giữa các công thức thí nghiệm để tìm ra tổ hợp enzyme phù hợp.

b) *Thí nghiệm 2. Ảnh hưởng của dung dịch tiền xử lý đến hiệu suất tách tế bào trần*

Lấy 1 g mẫu lá của các giống sắn C33, HN3 từ cây nuôi cấy mô ở độ tuổi 4 - 6 tuần được cắt nhỏ, ngâm và tiền xử lý qua các dung dịch sau: CT1: CPW (27,2 mg/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 100 mg/L  $\text{KNO}_3$ , 250 mg/L  $\text{MgSO}_4$ , 0,2 mg/L KI, 150 mg/L  $\text{CaCl}_2$ , 0,003 mg/L  $\text{CuSO}_4$ ) + 5% mannitol, ngâm trong 1 giờ. Sau đó chuyển sang dung dịch CPW chứa 9% mannitol, ngâm trong thời gian 1 giờ, tiếp tục

chuyển sang dung dịch CPW chứa 13% mannitol, 1 giờ trước khi chuyển sang ngâm bằng dung dịch phân giải tế bào trần; CT2: CPW + 13% mannitol trong 3 giờ; CT3: CPW + 9% mannitol trong 3 giờ; CT4: Ngâm trong nước khử trùng 3 giờ trước khi ngâm vào dung dịch phân giải enzyme.

Sau đó mẫu lá được ủ với dung dịch enzyme và tách theo như mô tả của Wu *et al.* (2017).

c) *Thí nghiệm 3. Nghiên cứu ảnh hưởng của PEG đến hiệu suất dung hợp tế bào trần*

Tế bào trần từ lá và tế bào trần từ mô sẹo phôi hóa sẽ được dung hợp với nhau sử dụng chất xúc tác PEG ở các nồng độ 20%, 30%, 40% và 50%.

d) *Thí nghiệm 4. Nghiên cứu ảnh hưởng của mật độ tế bào trần đến hiệu suất dung hợp*

Phương pháp tách tế bào trần từ lá, mô sẹo phôi hóa (Phạm Thị Hương và cs., 2021) và phương pháp dung hợp như mô tả ở trên. Thử nghiệm các mật độ tế bào trần cho dung hợp giữa hai giống sắn gồm các mật độ sau  $5 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^6$ ,  $7 \times 10^5$  và  $2 \times 10^5$  TBT/mL.

e) *Thí nghiệm 5. Đánh giá ảnh hưởng của mật độ tế bào trần đến hiệu suất dung hợp*

Thử nghiệm các mật độ tế bào trần cho dung hợp giữa hai giống sắn gồm các mật độ  $5 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^6$ ,  $7 \times 10^5$  và  $2 \times 10^5$  TBT/mL.

f) *Thí nghiệm 6. Ảnh hưởng của điều kiện môi trường nuôi cấy đến hiệu suất tái sinh tế bào trần sau dung hợp*

Tế bào trần từ lá của giống sắn kháng bệnh khảm lá sắn HN3 và C-33 và tế bào trần từ mô sẹo phôi hóa giống sắn KM94 sẽ được dung hợp với nhau sử dụng chất xúc tác PEG ở nồng độ 30%. Mật độ tế bào dung hợp sử dụng là  $5 \times 10^5$  khi dung hợp KM94 với C-33 và mật độ  $1 \times 10^6$  khi dung hợp với HN3. Nuôi cấy các sản phẩm sau dung hợp trên hai loại môi trường khác nhau là môi trường lỏng TM2G-A và môi trường chứa agarose 0,4%. Quan sát sự phát triển, phân chia của tế bào trần sau dung hợp.

+ Đối với tổ hợp lai KM94×C-33. Tế bào trần sau tách sẽ được pha loãng xuống mật độ  $1 \times 10^6$  bằng dung dịch tiền dung hợp (45 g mannitol; 36 g sorbitol; 4,41 g  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ; 5,55 g KCl; 7,88 g Tris-HCl cho 1 lít; pH 7,2). Sau đó trộn theo thể tích tương đương.

+ Đối với tổ hợp lai KM94×HN3. Tế bào trần sau tách sẽ được pha loãng xuống mật độ  $5 \times 10^5$

bằng dung dịch tiền dung hợp và sau đó trộn theo thể tích tương đương.

+ Hút 500  $\mu$ L tổ hợp (KM94×C-33; KM94×HN3) vào ống falcon 12 mL.

+ Bổ sung thêm 500  $\mu$ L PEG 30% (PEG: 300 g PEG/, 54 g/L glucose, 7,35 g CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O trong 1 lít, pH 7,0). Ủ trong thời gian 25 phút, nhiệt độ phòng.

+ Ly tâm 800 rcf/3 phút, sau đó loại bỏ dịch.

+ Thêm 2 mL dung dịch high pH/Ca<sup>2+</sup> (100 mM CaCl<sub>2</sub>; 800 mM mannitol; 100 mM glycine, pH 10,5). Sau 10 phút ủ, tiến hành ly tâm 800 rcf/3 phút. Loại bỏ dịch nổi, thêm 5 ml dung dịch rửa W5P (154 mM NaCl; 125 mM CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O; 5 mM KCl; 5 mM glucose, pH 5,6). Lặp lại bước rửa 3 lần. Sau đó thêm 500  $\mu$ L dung dịch TM2G-A. Nuôi cấy tế bào trần theo 2 phương thức:

+ Nuôi cấy ở điều kiện lỏng: Tiến hành nuôi cấy tế bào trần sau dung hợp trên môi trường nuôi cấy TM-2 (Shadin *et al.*, 1985; Sofiari *et al.*, 1998; Feng *et al.*, 2020) có bổ sung thêm kích thích sinh trưởng phù hợp và thay thế sucrose bằng glucose. Để hình thành callus, môi trường nuôi cấy tế bào trần được giảm dần nồng độ glucose theo chu kỳ 10 ngày bổ sung thêm 3 mL dung dịch mới theo các tiến trình A-B-C-D. Thành phần môi trường A-B-C-D cụ thể như sau: TM-2+ 0,5 mg/L NAA + 1 mg/L Zeatin + glucose với sự giảm dần nồng độ từ 0,36 mol/L (A); 0,33 mol/L (B); 0,30 mol/L (C); 0,25 mol/L (D).

+ Nuôi cấy dạng giọt agarose: Sản phẩm sau dung hợp tế bào trần sẽ được hoà cùng TM2G-A và agarose 4% theo thể tích đảm bảo nồng độ cuối cùng của agarose 0,4% và nuôi cấy theo các bước như nuôi cấy ở điều kiện lỏng.

So sánh hiệu suất tái sinh sản phẩm sau dung hợp sau 21 ngày nuôi cấy.

*e) Thí nghiệm 7. Ảnh hưởng của tổ hợp chất kích thích sinh trưởng đến khả năng tái sinh của tế bào trần sau dung hợp*

Phương pháp nghiên cứu tương tự như trên. Tuy nhiên, tổ hợp kích thích sinh trưởng khác nhau được thử nghiệm thêm khi bổ sung vào môi trường nuôi cấy theo các công thức sau: CT1: TM-2 (Shadin *et al.*, 1985) + 0,5 mg/L NAA + 1 mg/L Zeatin; CT2: TM-2 + 0,5 mg/L NAA + 0,5 mg/L Zeatin; CT3: TM-2 + 0,5 mg/L NAA + 1,5 mg/L Zeatin.

So sánh hiệu suất tái sinh sản phẩm dung hợp sau 21 ngày nuôi cấy.

### 2.2.2. Các chỉ tiêu đánh giá

- Sản lượng tế bào trần trong 1 mL = Số lượng tế bào trần trung bình/(2 × 10<sup>-5</sup>).

- Sản lượng tế bào trần theo g trọng lượng tươi của mẫu = Sản lượng tế bào trong 1 mL/khối lượng lá tươi làm vật liệu tách tế bào trần.

- Khả năng sống của tế bào trần thu được (%) = Số lượng tế bào trần phát màu vàng xanh/tổng số lượng tế bào trần quan sát được × 100.

Phương pháp đánh giá khả năng sống sót của tế bào trần: Áp dụng theo Wen *et al.* (2020). Khả năng sống sót của tế bào trần được kiểm tra bằng cách sử dụng fluorescein diacetate (FDA). Cho 6  $\mu$ L của FDA (5 mg/mL) vào 250  $\mu$ L dịch tế bào trần. Sau 5 phút, soi tế bào trần dưới kính hiển vi Olympus BX50 (Nhật). Các tế bào sống sót là các tế bào có màu vàng xanh khi soi dưới kính hiển vi, có hình cầu còn nguyên vẹn.

- Hiệu suất dung hợp tế bào trần (%) = Số lượng tế bào trần dung hợp/tổng số lượng tế bào quan sát được × 100.

### 2.2.3. Phương pháp xử lý số liệu

Mức ý nghĩa thống kê được xác định bằng phương pháp phân tích phương sai một biến ANOVA ở mức ý nghĩa  $\alpha < 0,05$ , sử dụng phần mềm Statgraphic 19.

## 2.3. Thời gian và địa điểm nghiên cứu

Nghiên cứu được thực hiện từ tháng 7 năm 2021 đến tháng 12 năm 2021 tại Phòng Thí nghiệm Trọng điểm Công nghệ Tế bào thực vật - Viện Di truyền Nông nghiệp.

## III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### 3.1. Khảo sát ảnh hưởng của tổ hợp enzyme đến hiệu suất tách tế bào trần từ mô thịt lá sắn

Để đảm bảo nguồn vật liệu cho dung hợp tế bào trần, chất lượng và sản lượng tế bào trần sử dụng là rất quan trọng. Các nghiên cứu trước đã chỉ ra nguồn mô và nồng độ enzyme và thời gian phân giải là các nhân tố quan trọng ảnh hưởng đến sản lượng và chất lượng tế bào trần thu được. Ngoài ra, tổ hợp enzyme thường sử dụng để tách tế bào trần cho sản lượng và khả năng sống cao là tổ hợp giữa hai enzyme cellulose và macerozyme. Đối với nguồn mô từ lá, lá từ đồng ruộng và nhà kính thường có lớp biểu bì và thành tế bào dày là một

cản trở cho quá trình tách tế bào trần. Trong số ba tác giả nghiên cứu về phương pháp tách tế bào trần, Shahin và Shepard (1980) đã sử dụng mô lá từ điều kiện ngoài nuôi cấy mô, sản lượng tế bào thu được thấp hơn so với hai tác giả Wu *et al.* (2017) và Wen *et al.* (2020) khi sử dụng vật liệu là lá sản từ cây nuôi cấy mô. Do đó, trong nghiên cứu này, lá từ cây *in vitro* được sử dụng làm nguồn vật liệu. Mặt

khác, để tìm ra phương pháp tách tế bào trần phù hợp từ lá, trước khi khảo sát tổ hợp các enzyme phù hợp để tách tế bào trần, nghiên cứu sử dụng tổ hợp enzyme có cùng nồng độ và tiến hành tách tế bào trần với hai phương pháp của hai tác giả khác nhau là Feng *et al.* (2020), Wu *et al.* (2017) (1% cellulase + 0,075 % macerozyme). Kết quả tách tế bào trần được thể hiện trên bảng 1.

**Bảng 1.** So sánh phương pháp tách tế bào trần

STT	Phương pháp tách	Tên dòng	Sản lượng tế bào trần (10 <sup>6</sup> /g FW)	Khả năng sống (%)
1	Wu <i>et al.</i> (2017)	HN3	4,45 ± 0,28 <sup>a</sup>	91,11 ± 0,11 <sup>a</sup>
2	Feng <i>et al.</i> (2020)	HN3	0,67 ± 0,074 <sup>b</sup>	92,3 ± 0,074 <sup>a</sup>

Ghi chú: Các chữ khác nhau trong cùng một cột biểu thị sự sai khác có ý nghĩa, Duncan 0,05.

Kết quả trên bảng 1 cho thấy sản lượng tế bào trần tách theo hai phương pháp trên có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê. Sản lượng tế bào trần theo phương pháp của Wu (2017) cho sản lượng tế bào trần cao hơn đạt  $4,45 \times 10^6$  TBT/g trọng lượng tươi của lá. Trong khi đó, sản lượng tế bào trần tách theo phương pháp của Wen *et al.* (2020) thu được thấp hơn đạt  $0,67 \times 10^6$  TBT/g trọng lượng tươi.

Tuy nhiên, khả năng sống của tế bào trần khi so sánh giữa hai phương pháp đều không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê đạt trên 90%. Do đó, nhóm nghiên cứu lựa chọn phương pháp tách tế bào trần theo Wu *et al.* (2017) để khảo sát ảnh hưởng của nồng độ enzyme đến hiệu suất tách tế bào trần từ mô thịt lá sản của hai giống C-33 và HN3. Kết quả thí nghiệm được thể hiện trên Bảng 2.

**Bảng 2.** Ảnh hưởng của tổ hợp enzyme lên khả năng tách tế bào trần từ lá giống HN3 và C-33

STT	Công thức	Sản lượng tế bào trần (10 <sup>6</sup> /g FW*)	Khả năng sống (%)
Giống HN3			
1	CT1: Cellulase 1,6% + macerozyme 0,8%	4,36 ± 0,48a	90,12
2	CT2: Cellulase 1,0% + Macerozyme 0,5%	2,15 ± 0,043b	91,30
3	CT3: Cellulase 0,075% + Macerozyme 0,075%	0 ± 0c	0 ± 0
Giống C-33			
1	CT1: Cellulase 1,6% + macerozyme 0,8%	11,3 ± 3,7a	91,11
2	CT2: Cellulase 1,0% + Macerozyme 0,5%	3,2 ± 2,56b	92,3
3	CT3: Cellulase 0,075% + Macerozyme 0,075%	0 ± 0	0 ± 0

Ghi chú: \* FW: trọng lượng tươi.

Kết quả trên bảng 2 cho thấy: Tổ hợp các enzyme có nồng độ khác nhau có ảnh hưởng khác nhau đến hiệu suất tách tế bào trần. Trên cả hai giống thí nghiệm, kết quả đều cho thấy công thức CT1 cho sản lượng tế bào trần cao hơn so với hai công thức còn lại. Đáng chú ý công thức CT3 không thu được tế bào trần. So sánh sản lượng tế bào giữa hai giống thí nghiệm, kết quả cũng cho thấy sản lượng tế bào trần thu được đối với giống C-33 ( $11,3 \times 10^6$  TBT/g FW) cao hơn nhiều so với giống HN3 đạt ( $4,36 \times 10^6$  TBT/g FW).

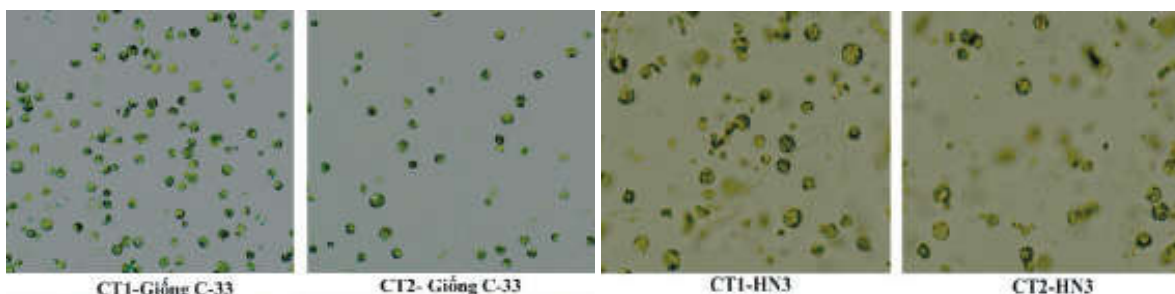
So sánh về khả năng sống của tế bào trần cho thấy không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê về khả năng sống của tế bào trần ở cả hai giống. Khả năng sống trung bình của tế bào trần giống C33 đạt 91,11 - 92,3%, giống HN3 trung bình đạt 90,12 - 91,3%.

Dung dịch enzyme CT1: 1,6% cellulase + 0,8% macerozyme cho hiệu quả tách cao nhất đối với giống HN3 ( $4,36 \times 10^6$  tế bào trần/g trọng lượng tươi) và giống C-33 đạt ( $11,3 \times 10^6$  tế bào trần/g trọng lượng tươi). Wu *et al.* (2017) sử dụng tổ hợp enzyme 1,6% cellulase và 0,8% macerozyme cho

sản lượng tế bào trần của giống SC8 trung bình đạt  $4,4 \times 10^7$  TBT/g trọng lượng tươi. Như vậy, sản lượng tế bào trần của hai giống C-33 và HN3 đều thấp hơn so với giống SC8. Có thể thấy được sản lượng tế bào trần ngoài phụ thuộc vào nồng

độ enzyme còn phụ thuộc vào từng kiểu gen khác nhau.

Như vậy, tổ hợp enzyme phù hợp cho tách tế bào trần từ lá của hai giống sản HN3 và C33 là 1,6% cellulase + 0,8% macerozyme.



Hình 1. Sản lượng và chất lượng tế bào trần của hai giống C-33 và HN3 khi xử lý với tổ hợp enzyme có nồng độ khác nhau

### 3.2. Ảnh hưởng của dung dịch tiền xử lý đến hiệu suất tách tế bào trần

Để đánh giá ảnh hưởng của dung dịch tiền xử lý mẫu lá đến sản lượng tế bào trần thu được. Lá của giống HN3 thu được từ cây nuôi cấy mô sau khi ngắt ra, tại vị trí gân lá cắt thành các đoạn có bề rộng

1 mm song song với nhau, lá sau xử lý được ngâm vào các dung dịch khác nhau, sau đó mẫu lá tiếp tục được cắt nhỏ trước khi ủ enzyme. Đây là bước quan trọng giúp enzyme phân giải mẫu lá tốt hơn, giúp tăng sản lượng tế bào trần, cho tỷ lệ tế bào trần sống cao hơn so với việc xử lý mẫu lá sau khi ủ enzyme. Kết quả thí nghiệm được trình bày tại bảng 3.

Bảng 3. Ảnh hưởng của dung dịch tiền xử lý mẫu lá lên sản lượng tế bào trần từ lá giống HN3

STT	Công thức	Sản lượng tế bào trần ( $10^6$ /g FW)	Khả năng sống (%)
<i>Giống HN3</i>			
1	CT1-Nước	$6,41 \pm 0,40^b$	42,41
2	CT2-CPW9%	$3,64 \pm 0,78^d$	76,82
3	CT3-CPW 5%-9%-13%	$9,33 \pm 1,30^a$	89,23
4	CT4-CPW 13%	$5,08 \pm 0,83^c$	74,19
<i>Giống C-33</i>			
1	CT1-Nước	$5,64 \pm 0,47^c$	37,33
2	CT2-CPW9%	$7,05 \pm 0,81^b$	78,34
3	CT3-CPW 5%-9%-13%	$16,2 \pm 1,35^a$	89,8
4	CT4-CPW 13%	$8,05 \pm 0,39^b$	76,95

Kết quả trên bảng 3 cho thấy tiền xử lý mẫu lá trước khi ủ enzyme ảnh hưởng đáng kể đến sản lượng và khả năng sống của tế bào trần. Trong đó, sản lượng và khả năng sống của tế bào trần đạt cao nhất khi ủ mẫu lá theo công thức 3, tăng dần nồng độ mannitol từ 5% đến 9% và cuối cùng là 13% sau mỗi giờ. Sự thay đổi từ từ của áp suất thẩm thấu giúp tế bào dễ dàng thích nghi, giảm thiểu sự phá vỡ tế bào trong quá trình tách. Theo quan sát, tế bào trần thu được khi mẫu lá giống HN3 và C33 được xử lý với công thức CT3 cho các tế bào tròn, đẹp ít vỡ, sản lượng tế bào trần của hai giống tương ứng đạt  $9,33 \times$

$10^6$  TBT/g trọng lượng tươi và  $18,2 \times 10^6$  TBT/g TLT.

Tiền xử lý mẫu lá bằng dung dịch nước trong 3 giờ cho sản lượng tế bào trần cao ở giống HN3 đạt  $6,41 \times 10^6$  TBT/g trọng lượng tươi, tuy nhiên khả năng sống giảm đáng kể, số lượng tế bào bị vỡ nát cao. Đối với giống C-33 sản lượng tế bào trần tại công thức CT1 cho sản lượng thấp nhất đạt  $5,64 \times 10^6$  TBT/g TLT

Kết quả trên bảng 3 cũng cho thấy khi tiền xử lý mẫu lá với công thức CT2, CT4 sản lượng và chất lượng tế bào thu được đều giảm đáng kể so với công thức CT3 ở cả hai giống C-33 và HN3.

Như vậy, trước khi tiến hành ủ enzyme, mẫu lá nên được cắt nhỏ và ngâm lần lượt qua các dung dịch CPW 5%, CPW 9% và CPW 13% trong 1 giờ.

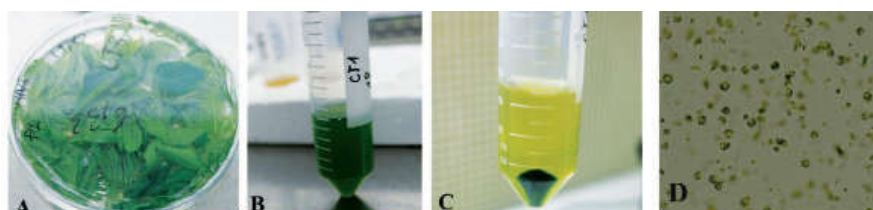
Sau khi hoàn thiện các yếu tố ảnh hưởng đến sản lượng tế bào trần từ mẫu lá, tiến hành tách tế bào trần từ lá của hai giống HN3 và C-33. Kết quả thí nghiệm được trình bày tại bảng 4.

**Bảng 4.** Kết quả tách tế bào trần từ lá giống HN3 và C-33

STT	Tên giống	Sản lượng tế bào trần ( $10^7/g$ FW)	Khả năng sống (%)
1	C-33	$1,9 \pm 0,54$	92,7
2	HN3	$1,0 \pm 0,44$	95,4

Kết quả trên bảng 4 cho thấy, sản lượng trung bình tế bào trần giống HN3 đạt  $1,0 \times 10^7$  TBT/g trọng lượng tươi, giống C-33 đạt  $1,9 \times 10^7$  TBT/g

trọng lượng tươi. Sản lượng và chất lượng tế bào trần đạt yêu cầu cho mục tiêu dung hợp tế bào trần.



**Hình 3.** Quá trình tách tế bào trần của các giống sắn

Ghi chú: A, D. Mô lá được ủ trong dung dịch tiền xử lý, B. Thu dung dịch sau phân giải enzyme sau 18 giờ, C. Thu tế bào trần sau phân giải, D. Tế bào trần của giống HN3.

### 3.3. Nghiên cứu ảnh hưởng của PEG đến hiệu suất dung hợp tế bào trần

Để dung hợp tế bào trần giữa các dòng/giống sắn, tiến hành tách tế bào trần từ lá của hai giống HN3 và C-33 và từ mô sẹo phôi hoá của hai giống KM94. Kết quả tách tế bào trần của các giống sắn được thể hiện tại bảng 5.

**Bảng 5.** Kết quả tách tế bào trần các giống sắn sử dụng cho dung hợp

STT	Tên giống	Sản lượng tế bào trần ( $10^7/g$ FW)
1	HN3	$1,07 \pm 0,05$
2	C-33	$1,93 \pm 0,05$
3	KM94	$1,86 \pm 0,12$

Kết quả trên cho thấy: Sản lượng tế bào trần thu được của các dòng/giống sắn đạt được khá cao, trung bình đều đạt trên  $1,0 \times 10^7$  TBT/g trọng lượng tươi. Chất lượng tế bào trần thu được khá tốt, căng tròn, ít vỡ, đạt tiêu chuẩn sử dụng cho các thí nghiệm đánh giá khả năng dung hợp giữa các tế bào.

Theo các nghiên cứu, khối lượng PEG phù hợp cho dung hợp là từ 400 đến 6000. Trong nghiên

cứu này, tế bào trần giữa giống sắn KM94-HN3, KM94-C33 được dung hợp với nhau sử dụng PEG-MW 4000 ở các nồng độ khác nhau. Mật độ tế bào trần sử dụng cho dung hợp là  $1 \times 10^6$ . Kết quả dung hợp tại bảng 6 cho thấy:

- Đối với tổ hợp KM94-C33-PEG-MW4000. So sánh về tỷ lệ dung hợp giữa các tế bào ở các dung dịch dung hợp có nồng độ PEG-MW4000 20, 30, 40 và 50% cho thấy, tỷ lệ dung hợp cao nhất thu được tại PEG có nồng độ 30%. Tỷ lệ dung hợp đạt 15,33%, tỷ lệ dung hợp giữa hai tế bào đạt 9,03%, tại nồng độ PEG 40%, tỷ lệ dung hợp giữa hai tế bào đạt 10,50%. Tuy nhiên, theo quan sát khi sử dụng nồng độ PEG cao khả năng phục hồi của các tế bào sau dung hợp giảm.

- Tổ hợp KM94-HN3-PEG MW 4000: Kết quả thu được cũng tương tự như tổ hợp trên, nồng độ PEG MW4000 phù hợp cho dung hợp là 30%, tỷ lệ dung hợp đạt 20,80%, trong đó tỷ lệ dung hợp giữa hai tế bào là 17,09%.

Như vậy, nồng độ PEG MW4000 có nồng độ 30% là thích hợp cho phương pháp dung hợp giữa tế bào trần của các giống sắn.

**Bảng 6.** Ảnh hưởng của trọng lượng và nồng độ PEG đến hiệu suất dung hợp tế bào trần

STT	Công thức	Tổng số tế bào quan sát	Số tế bào dung hợp	Số lượng dung hợp giữa hai tế bào	Số lượng dung hợp nhiều tế bào	Tỷ lệ dung hợp (%)	Tỷ lệ dung hợp giữa hai tế bào (%)
A KM94-C33-PEG 4000							
1	KM94-C33-PEG 4000-20%	79,33 ± 3,02	4,25 ± 1,50	2,50 ± 1,73	2,00 ± 0,00	5,00 ± 1,43	3,33 ± 0,58
2	KM94-C33-PEG 4000-30%	65,67 ± 3,6	11,5 ± 2,32	7,00 ± 2,00	4,50 ± 1,54	15,33 ± 2,22	9,03 ± 1,43
3	KM94-C33-PEG 4000-40%	53,40 ± 3,08	5,60 ± 0,89	5,60 ± 0,89	0 ± 0	10,50 ± 1,38	10,50 ± 1,38
4	KM94-C33-PEG 4000-50%	25,25 ± 3,77	2,00 ± 0,82	2,00 ± 0,82	0 ± 0	7,97 ± 3,23	7,97 ± 3,23
B KM94-HN3-PEG 4000							
1	KM94-HN3-PEG 4000-20%	42,43 ± 2,88	6,44 ± 2,92	4,67 ± 1,58	3,50 ± 1,29	18,34 ± 2,65	13,72 ± 3,44
2	KM94-HN3-PEG 4000-30%	59,17 ± 2,31	13,50 ± 1,12	12,67 ± 2,27	3,67 ± 1,03	20,80 ± 2,99	17,09 ± 2,85
3	KM94-HN3-PEG 4000-40%	48,2 ± 2,18	4,20 ± 0,84	4,20 ± 0,84	0 ± 0	8,85 ± 2,19	8,85 ± 2,19
4	KM94-HN3-PEG 4000-50%	61,50 ± 2,66	5,00 ± 1,73	5,00 ± 1,73	0 ± 0	7,20 ± 2,67	7,20 ± 1,67

**3.4. Đánh giá ảnh hưởng của mật độ tế bào trần đến hiệu suất dung hợp**

Sau khi đánh giá được nồng độ PEG phù hợp sử

dụng cho dung hợp, tiến hành nghiên cứu ảnh hưởng của các mật độ tế bào  $1 \times 10^6$ ,  $7 \times 10^5$ ,  $5 \times 10^5$  và  $2 \times 10^5$  tới hiệu suất dung hợp. Kết quả được thể hiện tại bảng 7.

**Bảng 7.** Ảnh hưởng mật độ tế bào trần sử dụng cho dung hợp đến hiệu suất dung hợp

STT	Công thức	Tổng số tế bào quan sát	Số tế bào dung hợp	Số lượng dung hợp giữa hai tế bào	Số lượng dung hợp nhiều tế bào	Tỷ lệ dung hợp (%)	Tỷ lệ dung hợp giữa hai tế bào (%)
A KM94-C33							
1	$1 \times 10^6$	65,00 ± 3,00	13,67 ± 1,53	13,67 ± 1,53	0,00 ± 0,00	21,05 ± 0,5	21,05 ± 0,5
2	$7 \times 10^5$	39,33 ± 2,50	12,67 ± 1,04	9,33 ± 0,50	2,31 ± 0,25	31,93 ± 1,79	23,93 ± 1,83
3	$5 \times 10^5$	27,25 ± 2,56	9,25 ± 1,09	6,25 ± 0,72	3,00 ± 0,41	32,68 ± 1,82	22,02 ± 1,06
4	$2 \times 10^5$	14,75 ± 1,89	3,00 ± 0,82	2,50 ± 0,58	0,67 ± 0,15	20,63 ± 3,91	17,50 ± 3,12
B KM94-HN3							
1	$1 \times 10^6$	10,8 ± 0,55	1,8 ± 0,13	1,5 ± 0,14	0,3 ± 0,13	16,8 ± 1,55	14,7 ± 1,88
2	$7 \times 10^5$	11,5 ± 2,08	0,25 ± 0,08	0,25 ± 0,08	0,00 ± 0,0	9,56 ± 0,60	9,56 ± 0,60
3	$5 \times 10^5$	13,00 ± 1,00	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00	0,00 ± 0,0	7,72 ± 0,60	7,72 ± 0,60
4	$2 \times 10^5$	3,67 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,0	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00

Kết quả bảng 7 cho thấy: Mật độ tế bào và kiểu gen khác nhau có ảnh hưởng rõ rệt đến tỷ lệ dung hợp.

- So sánh về tỷ lệ dung hợp giữa các tế bào:

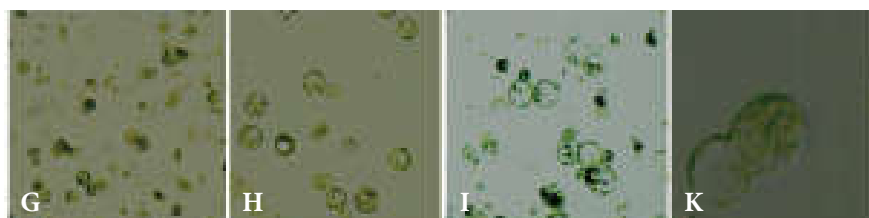
Khi tiến hành dung hợp tế bào trần từ giống KM94 với giống C-33, kết quả cho thấy mật độ tế

bào trần  $5 \times 10^5$  cho tỷ lệ dung hợp tương ứng đạt cao nhất 32,68%. Mật độ cao hơn hay thấp hơn mật độ này đều cho tỷ lệ dung hợp giảm. Trong khi đó, sử dụng tế bào trần từ giống sản kể trên với giống HN3, kết quả thu được tỷ lệ dung hợp cao nhất ở mật độ  $1 \times 10^6$ . Tỷ lệ dung hợp tương ứng đạt 16,8% và 11,63%



Đối với tổ hợp còn lại KM94×HN3, kết quả cho thấy ở mật độ  $1 \times 10^6$  cho tỷ lệ dung hợp giữa hai tế bào cao hơn so với các mật độ còn lại.

Như vậy, khi tiến hành dung hợp giữa KM94 với giống C-33, sử dụng mật độ tế bào trần là  $5 \times 10^5$  và mật độ  $1 \times 10^6$  đối với giống HN3.



Hình 4. Quá trình tách và dung hợp tế bào trần giữa các giống sắn

Ghi chú: G. Tế bào trần của giống HN3, H. Tế bào trần của giống KM94, I. Các tế bào trần tiếp xúc với nhau sau xử lý PEG 4000, K. Quá trình dung hợp giữa hai tế bào.

### 3.5. Nghiên cứu các yếu tố ảnh hưởng tới quá trình nuôi cấy tổ hợp lai sau dung hợp

#### 3.5.1. Ảnh hưởng của điều kiện môi trường nuôi cấy đến hiệu suất tái sinh tế bào trần sau dung hợp

Để đảm bảo sự tái sinh của sản phẩm sau dung hợp, điều kiện môi trường nuôi cấy ảnh hưởng rất lớn đến hiệu suất tái sinh. Đối với phương pháp nuôi cấy tổ hợp lai sau dung hợp trên cây sắn. Tác giả Wen *et al.* (2020) đã công bố nuôi cấy thành công tổ hợp lai sau dung hợp bằng phương pháp xung điện giữa tế bào trần từ mô sẹo

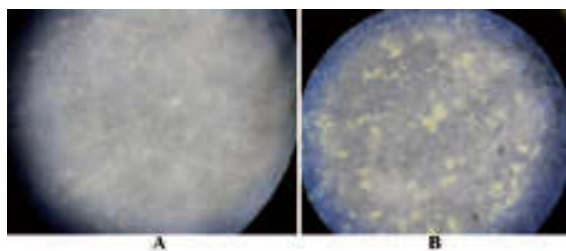
phôi hoá giống TMS60444 với tế bào trần thịt lá giống SC8 trên môi trường lỏng TM2G (Shahin, 1985; Sofiari *et al.*, 1998; Wen *et al.*, 2012) chứa 0,36 mol/L glucose ở mật độ  $5 \times 10^5$  TBT/mL. Sau mỗi 10 ngày, bổ sung lần lượt môi trường TM2G với hàm lượng đường giảm dần 0,33 mol/L; 0,30 mol/L và cuối cùng là 0,25 mol/L giúp kích thích phát sinh callus. Do đó, nghiên cứu này dựa trên thành phần môi trường của Wen *et al.* (2020), tiến hành thử nghiệm nuôi cấy trên môi trường với 0,4% agarose. Kết quả được trình bày tại bảng 8.

Bảng 8. Ảnh hưởng của điều kiện môi trường nuôi cấy đến hiệu suất tái sinh tổ hợp lai sau dung hợp

STT		Tổ hợp lai	Nuôi cấy trên môi trường lỏng	Nuôi cấy trên môi trường có bổ sung 0,4% agarose
1	Hiệu quả phân chia tế bào sau dung hợp (%)	KM94×HN3	$1,89 \pm 0,23^a$	$0,57 \pm 0,081^b$
2		KM94×C33	$2,27 \pm 0,14^c$	$0,92 \pm 0,28^d$

Kết quả trên bảng 8 cho thấy: Điều kiện môi trường nuôi cấy ảnh hưởng rõ rệt lên sự phân chia của tế bào trần sau dung hợp. Các tổ hợp sau dung hợp được nuôi cấy trên môi trường lỏng có tỷ lệ phân chia cao hơn so với nuôi cấy trên môi trường

có bổ sung thêm 0,4% agarose. Khi quan sát kích thước vi mô sẹo được tạo thành trên hai điều kiện nuôi cấy khác nhau cho thấy: trên môi trường lỏng đường kính vi mô sẹo lớn hơn so với môi trường bán lỏng (0,4% agarose).



Hình 5. Ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy lên sự tái sinh tế bào trần sau dung hợp

Ghi chú: A. TBT sau dung hợp nuôi cấy trên môi trường agarose sau 21 ngày, B. TBT sau dung hợp nuôi cấy trên môi trường lỏng sau 21 ngày nuôi cấy.

### 3.5.2 Ảnh hưởng của tổ hợp chất điều hoà sinh trưởng đến khả năng tái sinh của tế bào trần sau dung hợp

Để so sánh ảnh hưởng của tổ hợp kích thích sinh trưởng đến hiệu suất tái sinh của tế bào trần sau dung hợp, dựa trên nghiên cứu của tác giả Sofiari *et al.* (1998) đã cho thấy tổ hợp chất điều hoà sinh trưởng phù hợp cho nuôi cấy tế bào trần là 0,5 mg/L NAA và 1 mg/L Zeatin. Trên cơ sở kết quả nghiên cứu của tác giả, trong thí nghiệm này, tiến hành nuôi cấy sản phẩm sau dung hợp trên môi trường có bổ sung Zeatin ở các nồng độ khác

nhau kết hợp với NAA 0,5 mg/L. Kết quả được trình bày tại bảng 9.

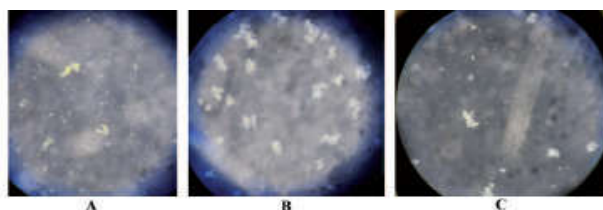
Các tổ hợp lai sau khi nuôi cấy trên môi trường có bổ sung chất điều hoà sinh trưởng Zeatin ở các nồng độ khác nhau kết hợp với 0,5 mg/L NAA thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê về tỷ lệ tái sinh tế bào sau 21 ngày nuôi cấy. Đối với tổ hợp lai KM94×HN3, tỷ lệ tái sinh tế bào đạt cao nhất ở nồng độ Zeatin 1 mg/L. Nồng độ 1,5 mg/L cho tỷ lệ tái sinh thấp nhất đạt 1,18. Đối với các tổ hợp lai còn lại kết quả cũng cho thấy chất điều hoà sinh trưởng Zeatin ở nồng độ 1 mg/L cho tỷ lệ phân chia tế bào đạt cao nhất.

**Bảng 9.** Ảnh hưởng của tổ hợp chất điều hoà sinh trưởng đến hiệu suất tái sinh tổ hợp lai sau dung hợp

STT		Tổ hợp lai	0,5 mg/L NAA+ 0,5 mg/L Zeatin	0,5 mg/L NAA +1mg/L Zeatin	0,5 mg/L NAA +1,5 mg/L Zeatin
1	Hiệu quả phân chia tế bào sau dung hợp (%)	KM94×HN3	1,59 ± 0,05 <sup>b</sup>	1,97 ± 0,17 <sup>a</sup>	1,18 ± 0,12 <sup>c</sup>
2		KM94×C33	1,57 ± 0,24 <sup>c</sup>	2,29 ± 0,20 <sup>d</sup>	1,37 ± 0,21 <sup>c</sup>

Như vậy, môi trường có bổ sung 0,5 mg/L NAA và 1 mg/L Zeatin phù hợp cho nuôi cấy tế bào trần

sau dung hợp. Tỷ lệ phân chia của các tổ hợp lai KM94×HN3; KM94×C33 lần lượt là 1,97; 2,29%.



**Hình 6.** Ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng lên sự tái sinh tế bào trần sau dung hợp

*Ghi chú:* TBT sau dung hợp nuôi cấy trên môi trường TM2G-A + 0,5 mg/L NAA + 0,5 mg/L Zeatin, B. TBT sau dung hợp nuôi cấy trên môi trường TM2G-A + 0,5 mg/L NAA + 1 mg/L Zeatin, C. TBT sau dung hợp nuôi cấy trên môi trường TM2G-A + 0,5 mg/L NAA + 1,5 mg/L Zeatin.

### 3.5.2. Nuôi cấy và tái sinh các tổ hợp lai sau dung hợp

Sau khi tối ưu hóa các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình dung hợp, nuôi cấy tổ hợp lai sau dung hợp, tiến hành các thí nghiệm dung hợp giữa tế bào trần từ mô sẹo phôi hóa giống KM94 với TBT từ mô thịt lá giống C-33 và HN3. Sản phẩm sau dung hợp của các tổ hợp lai trên được nuôi cấy trên môi trường nuôi cấy TM-2 với sự giảm dần hàm lượng đường (Phạm Thị Hương và cs., 2021). Giai đoạn phát triển cuối cùng trên môi

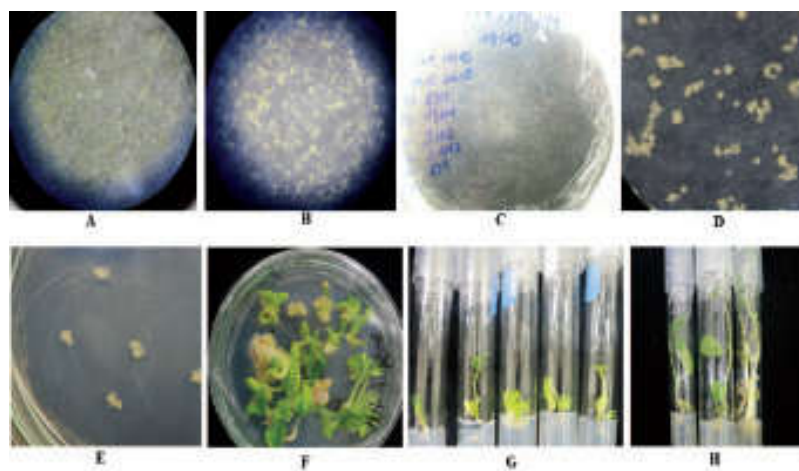
trường lỏng TM-2 với nồng độ 0,25 mol/L glucose giúp các tế bào phát triển dạng vi mô sẹo. Chuyển các vi mô sẹo sang môi trường MMS rắn (Tống Thị Hương và cs., 2018) với hàm lượng sucrose 40 g/L giúp các vi mô sẹo phát triển thành dạng mô sẹo phôi hóa. Mô sẹo phôi hóa tiếp tục được chuyển tiếp sang môi trường nuôi cấy tái sinh tạo cây hoàn chỉnh theo tác giả Phạm Thị Hương và cs. (2020). Kết quả tái sinh các tổ hợp lai sau dung hợp được trình bày tại bảng 10.

**Bảng 10.** Kết quả nuôi cấy, tái sinh các tổ hợp lai sau dung hợp

STT	Tổ hợp lai	Số lượng tế bào nuôi cấy trung bình (TB)	Số tế bào phân chia	Số mô sẹo phôi hoá tạo thành	Tỷ lệ hình thành mô sẹo phôi hoá (%)	Số chồi hữu hiệu tạo thành
1	KM94×HN3	500,000	9,855	177	1.80	8
2	KM94×C-33	250,000	12,015	-	-	-

Kết quả trên bảng 10 cho thấy có sự khác biệt rõ rệt về sự phát sinh mô sẹo phôi hoá giữa các tổ hợp lai. 2 tổ hợp lai đều xuất hiện sự phân chia tế bào sau dung hợp, tuy nhiên chỉ tổ hợp lai KM94×HN3 có xuất hiện sự hình thành mô sẹo phôi hoá. Tỷ lệ phát sinh mô sẹo phôi hoá đạt 1,8%. Mô sẹo phôi hoá của các tổ hợp lai sau khi chuyển sang môi

trường tái sinh đều hình thành chồi hữu hiệu, số chồi hữu hiệu của tổ hợp lai tổ hợp lai KM94×C33 là 8 chồi. Số chồi hữu hiệu của các tổ hợp lai sau đó được chuyển sang môi trường tạo cây hoàn chỉnh, toàn bộ các chồi hữu hiệu đều phát sinh rễ, hình thành cây hoàn chỉnh.



**Hình 7.** Quá trình nuôi cấy, tái sinh sản phẩm sau dung hợp tế bào trần

*Ghi chú:* A. Tế bào trần dung hợp sau 7 ngày nuôi cấy, B. Tế bào trần sau dung hợp sau 21 ngày, C. Tế bào trần sau 2,5 tháng, D. Hình ảnh vi mô sẹo hình thành sau 2,5 tháng dưới kính hiển vi soi nổi. E. Tế bào trần sau dung hợp phát triển dạng mô sẹo phôi hóa sau 3,5 tháng nuôi cấy. F. Mô sẹo phôi hóa tái sinh chồi hữu hiệu sau 2 tháng, G, H. Chồi hữu hiệu tái sinh thành cây hoàn chỉnh.

#### IV. KẾT LUẬN

- Xây dựng thành công phương pháp tách tế bào trần từ mô thịt lá của hai giống sắn HN3 và C-33 kháng bệnh khảm lá phục vụ cho thí nghiệm dung hợp tế bào trần. Mẫu lá từ cây nuôi cấy mô 4 - 6 tuần tuổi của hai giống HN3 và C-33 được sử dụng làm vật liệu tách tế bào trần. Mẫu lá được cắt nhỏ và được ngâm lần lượt qua các dung dịch gây co nguyên sinh CPW 5%, CPW 9% và CPW 13% trong 1 giờ, trước khi bổ sung dung dịch phân giải enzyme (9% mannitol; 10 mM KCl; 10 mM CaCl<sub>2</sub>; 20 mM MES, pH 5,8) có chứa 1,6% cellulase và 0,8% macerozyme và ủ ở điều kiện 25°C, điều kiện tối, 16 giờ. Sản lượng tế bào trần thu được của hai giống HN3 và C-33 lần lượt đạt  $1,0 \times 10^7$  TBT/g FW và  $1,9 \times 10^7$  TBT/g FW.

- Xây dựng phương pháp dung hợp và nuôi cấy các tổ hợp lai sau dung hợp giữa tế bào trần từ mô sẹo phôi hóa của giống sắn KM94 với tế bào trần từ mô thịt lá sắn của hai giống HN3 và C-33. Tỷ lệ dung hợp trung bình giữa KM94-C33 là 32,68%,

KM94×HN3 là 16,8%. Môi trường phù hợp cho nuôi cấy tổ hợp lai sau dung hợp là môi trường lỏng TM-2G kết hợp với 0,5 mg/L NAA và 1 mg/L Zeatin. Kết quả dung hợp giữa KM94×HN3 đã thu được 8 cây tái sinh sau dung hợp.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Hoàng Thị Giang**, 2016. *Tạo thể lai mang gen kháng bệnh mốc sương bằng dung hợp tế bào trần giữa khoai tây đại và khoai tây trồng*. Luận án Tiến sĩ.
- Phạm Thị Hương, Đỗ Thị Như Quỳnh, Nguyễn Anh Vũ**, 2021. Kết quả ban đầu trong nghiên cứu tạo tế bào trần từ mô sẹo phôi hoá của một số giống sắn Việt Nam. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Nông nghiệp Việt Nam*, 122 (01): 26-34.
- Tống Thị Hương, Vũ Anh Thu, Nguyễn Anh Vũ và Nguyễn Văn Đông**, 2017. Kết quả tạo mô sẹo phôi hóa của giống sắn KM 140. *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn*, 2: 61-66.
- Nguyễn Anh Vũ**, 2020. Nghiên cứu phương pháp đánh giá nhanh khả năng kháng bệnh khảm lá trên cây sắn. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Nông nghiệp Việt Nam*, 115 (06): 85-90.

- Collonnier Cecile Karden Mulya, Isabelle Fock, Ika Mariska I., Aline Servaes, Fernand Vedel, Sonja Siljak-Yakovlev, Vongthip Souvannavong V., Georges Ducreux, Darasinh Sihachakr, 2001. Source of resistance against *Ralstonia solanacearum* in fertile somatic hybrids of eggplant (*Solanum melongena* L.) with *Solanum aethiopicum* L. *Plant Science*, 160 (2): 301-33.
- Frearson E.M., Power J.B. & Cocking E.C., 1973. The isolation, culture and regeneration of Petunia leaf protoplasts. *Dev. Biol.*, 33: 130- 137.
- Hu Q., L. Hansen, J. Laursen, C. Dixelius & Andersen, 2002. Intergeneric hybrids between Brassica napus and *Orychophragmus violaceus* containing traits of agronomic importance for oilseed rape breeding. *Theoretical and Applied Genetics*, 105: 834-840.
- Nootjaree Tudsas , Siripong Premjet and Duangporn Premjet, 2015. Establishment of method for protoplast fusion with PEG-mediated between *Jatropha curcas* L. and *Ricinus communis* L. *International Journal of Life Sciences Biotechnology and Pharma Research*, 4(1): 50-56.
- Pereira de Carvalho Costa M. A., B. M. J. Mendes and F. A. A. Mourão Filho, 2003. Somatic hybridization for improvement of citrus rootstock: production of five new combinations with potential for improved disease resistance. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 43(9): 1151-1156.
- Qian, W., Liu, R. and Meng, J., 2003. Genetic effects on biomass yield in interspecific hybrids between *Brassica napus* and *B. Rapa*. *Euphytica* 134: 9-15. doi: 10.1023/A:1026180823401.
- Shahin E.A. and J.F. Shepard, 1980. Cassava mesophyll protoplast: isolation, proliferation and shoot information. *Plant Science Letters*, 17: 459-465.
- Sofiari. C.J.J.M. C. J. J. M. Raemakers, J. E. M. Bergervoet, E. Jacobsen, R. G. F. Visser, 1998. Plant regeneration from protoplasts isolated from friable embryogenic callus of cassava. *Plant Cell Reports*, 18: 159-165.
- Szczerbakowa, U. Maciejewska, E. Zimnoch-Guzowska, B. Wielgat, 2003. Somatic hybrids *Solanum nigrum* (+) *S. tuberosum*: Morphological assessment and verification of hybridity. *Plant Cell Reports*, 21 (6): 577-84. doi: 10.1007/s00299-002-0555-8.
- WEN Feng, Wen-pan SU, Hua ZHENG, Ben-chi YU, Zeng-feng MA, Peng ZHANG, 2020. Plant regeneration via protoplast electrofusion in cassava. *Journal of Integrative Agriculture*, 19 (3): 632-642. doi: 10.1016/S2095-3119(19)62711-5.
- Jun-Zheng Wu, Qin Liu, Xiao-Shan Geng, Kai-Mian Li, Li-Juan Luo & Jin-Ping Liu, 2017. Highly efficient mesophyll protoplast isolation and PEG-mediated transient gene expression for rapid and large-scale gene characterization in cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *BMC Biotechnol*, 17: 29. <https://doi.org/10.1186/s12896-017-0349-2>.

## Establishment of a protoplast fusion method for KM94 variety with two varieties HN3 and C-33

Pham Thi Huong, Le Ngoc Tuan, Nguyen Hung,  
Nguyen Thi Hanh, Pham Xuan Hoi

### Abstract

The study was carried out to develop a method for separating the somatic cell from the leaf tissue of cassava in Vietnam, in order to establish a method for protoplast fusion and develop new cassava varieties. Leaves of SLCMV-resistant cassava cultivars HN3 and C33 were pretreated with CPW medium (Frearson *et al.*, 1973), which had mannitol concentrations increasing gradually from 5%, 9% and 13% and incubated for 1 hour, respectively. Thereafter, leaf samples were incubated with a separation solution supplemented with 1.6% Cellulase + 0.8% Macroenzyme for 16 hours, shaking at 50 rpm, at 25°C. The average productivity of somatic cells reached  $1,9 \times 10^7$  cell/g FW (C33) and  $1.0 \times 10^7$  cell/g FW (HN3). The survival rate achieved 95.4% and 92.7%, correspondingly to C33 and HN3. Embryogenic protoplast of KM94 variety was fused with mesophyll protoplast of two cassava varieties HN3 and C-33 using PEG MW 4000 at 30%. The suitable density for fusion was from  $5 \times 10^5$  -  $1 \times 10^6$  cell/FW. The average fusion rate of KM94×C33 was 32.68%, and of KM94×HN3 was 16.8%. 8 regenerated plants were obtained from the fusion between KM94 and HN3.

**Keywords:** Cassava (*Manihot esculenta* Crantz), protoplast, fusion

Ngày nhận bài: 29/12/2022  
Ngày phản biện: 03/02/2023

Người phản biện: TS. Trần Ngọc Thanh  
Ngày duyệt đăng: 28/02/2023

## NGHIÊN CỨU SỬ DỤNG DUNG DỊCH DINH DƯỠNG HỮU CƠ CHO RAU DỀN ĐỎ TRONG HỆ THỐNG CÁ - RAU (AQUAPONICS)

Bàn Văn Kiên<sup>1</sup>, Nguyễn Thị Ái Nghĩa<sup>2</sup>,  
Nguyễn Phan Việt<sup>3</sup>, Nguyễn Thị Ngọc Dinh<sup>2\*</sup>

### TÓM TẮT

Dinh dưỡng hữu cơ trong hệ thống cá - rau (aquaponics) từ chất thải của cá liệu có đủ dinh dưỡng cho sự sinh trưởng và phát triển của rau trong hệ thống? Để trả lời câu hỏi này, thí nghiệm 1 nhân tố nghiên cứu ảnh hưởng của một số loại dung dịch dinh dưỡng hữu cơ bổ sung qua lá khác nhau đến sinh trưởng, năng suất và chất lượng của rau dền đỏ được trồng trong hệ thống cá - rau. Thí nghiệm được bố trí theo kiểu khối ngẫu nhiên đầy đủ (RCB) với 3 công thức (đối chứng phun nước lã; phun dung dịch dinh dưỡng hữu cơ SOYMIC V và phun dung dịch dinh dưỡng hữu cơ SUPER HUME với nồng độ khuyến cáo cho rau ăn lá là 1%) và 3 lần nhắc lại trong điều kiện vụ Xuân Hè và vụ Hè Thu năm 2022 tại huyện Bảo Yên, tỉnh Lào Cai. Kết quả nghiên cứu cho thấy, sử dụng dung dịch dinh dưỡng hữu cơ phun qua lá cho rau dền đỏ đã làm tăng có ý nghĩa thống kê các đặc điểm sinh trưởng, sinh lý, năng suất của rau dền đỏ so với công thức đối chứng phun nước lã. Trong hệ thống cá - rau cho rau dền đỏ nên bổ sung dung dịch dinh dưỡng phun qua lá SOYMIC V với nồng độ khuyến cáo 1% cho các chỉ tiêu sinh trưởng, sinh lý, năng suất và chất lượng rau tốt nhất.

**Từ khóa:** Rau dền đỏ (*Amaranthus gangeticus*), hệ thống cá - rau (aquaponics), dung dịch dinh dưỡng hữu cơ qua lá

### I. ĐẶT VẤN ĐỀ

WHO xếp Việt Nam nằm trong 50 nước thuộc top 2 của bản đồ ung thư thế giới và mỗi năm Việt Nam có khoảng 115.000 người chết vì ung thư, tương ứng 315 người chết mỗi ngày (Thúy Hạnh, 2016). Số người mắc bệnh ung thư hiện nay rất cao tại Việt Nam có nhiều nguyên nhân, một trong những nguyên nhân đó là dinh dưỡng không an toàn, không hợp lý như khẩu phần ăn có ít hoa quả, ít rau xanh, quá nhiều chất đạm, đặc biệt là mỡ động vật, làm tăng nguy cơ mắc ung thư đại trực tràng và nhiều ung thư khác. Thực phẩm không an toàn là thức ăn có nhiều chất có khả năng gây ung thư như dưa muối chứa nitrat, nitrit gây ung thư thực quản, dạ dày; gạo mốc nhiều aflatoxin gây ung thư gan,... (Nam Phương, 2017). Một trong những giải pháp để có thực phẩm an toàn và chất lượng cao là sản xuất thực phẩm hữu cơ hoặc theo nguyên tắc hữu cơ nghĩa là không sử dụng bất kỳ hóa chất nông nghiệp nào trong sản xuất (Phạm Tiến Dũng và cs., 2016; Nguyễn Thị Ngọc Dinh và cs., 2015; 2020).

Trồng rau - nuôi cá (aquaponics) kết hợp theo hệ thống aquaponics là một trong những giải pháp tốt để có sản phẩm an toàn, chất lượng cao và phù hợp với nhiều điều kiện sản xuất như quy mô hộ gia đình ở những nơi không gian hẹp, những nơi có nguồn nước khó khăn do hệ thống sản xuất này tận dụng được nước nuôi cá tưới rau và rau lại góp phần làm sạch nước thải về cho nuôi cá, nên vừa tiết kiệm nước lại tiết kiệm cả dinh dưỡng và làm sạch môi trường. Hệ thống aquaponics là hệ thống nuôi cá tuần hoàn với hệ thống thủy canh để trồng cây trong một hệ thống canh tác đồng bộ cá - rau, đảm bảo dinh dưỡng được sử dụng một cách hiệu quả. Trong hệ thống này, các sản phẩm thải ra từ cá được phân giải bởi các vi sinh vật và là nguồn dinh dưỡng đầu vào cung cấp cho hệ thống thủy canh để cây trồng phát triển (Bosma *et al.*, 2017; Yeb & Zheng, 2019). Khi cây trồng sử dụng lượng sản phẩm thải ra từ cá cho các hoạt động hô hấp, nó sẽ lọc trong nước, tạo điều kiện thuận lợi cho cá sinh trưởng (Buzby & Lin, 2014). Vì thế, hệ thống này cho phép cây trồng sinh trưởng, phát triển

<sup>1</sup> Trung tâm Nghiên cứu và Chuyển giao Khoa học Công nghệ, Phân hiệu Đại học Thái Nguyên tại tỉnh Lào Cai

<sup>2</sup> Khoa Nông học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

<sup>3</sup> Khoa Tự động và phương tiện kỹ thuật phòng cháy chữa cháy, cứu nạn, cứu hộ - Trường đại học phòng cháy chữa cháy.

\*Tác giả liên hệ, e-mail: ntndinh@vnua.edu.vn