

NGHIÊN CỨU PHƯƠNG PHÁP NHÂN GIỐNG *IN VITRO* CÂY Sắn (*Manihot esculenta*) ĐỂ SẢN XUẤT CÂY GIỐNG SẠCH BỆNH

Dương Thanh Thủy*, Phan Thị Phương Nhi, Trần Thị Triều Hà, Lê Thị Thu Hằng,
Trần Thị Hoàng Đông, Lê Khắc Phúc

Trường Đại học Nông Lâm, Đại học Huế

*Tác giả liên hệ: duongthanhthuy@huaf.edu.vn

Nhận bài: 11/01/2023 Hoàn thành phản biện: 27/03/2023 Chấp nhận bài: 28/03/2023

TÓM TẮT

Phương pháp nhân giống bằng giâm hom ở sắn có những hạn chế như hệ số nhân giống thấp, bệnh tích tụ trong quá trình sinh trưởng của cây mẹ rồi truyền sang cây con. Vì vậy, chúng tôi nghiên cứu phương pháp nhân giống sắn bằng nuôi cây mô nhằm cung cấp nguồn cây giống *in vitro* sạch bệnh. Kết quả cho thấy, nồng độ và thời gian khử trùng mẫu thích hợp là 5% sodium hypochlorite (v/v) trong thời gian 10 phút đối với đốt thân từ vị trí 1 đến 5 và thời gian 20 phút đối với đốt thân từ vị trí 6 đến 10. Để nghiên cứu khả năng nhân nhanh, các đốt thân của chồi *in vitro* phát triển từ mắt ngủ được cấy lên môi trường MS bổ sung 0 – 5 mg/L BAP. Với nồng độ BAP 1 – 3 mg/L, chồi phát triển trực tiếp từ mắt ngủ của đốt thân, nồng độ BAP 4 – 5 mg/L, đốt thân hình thành mô sẹo, chồi sau đó hình thành sau 6 tuần nuôi cấy, tuy nhiên hình thái chồi có những bất thường so với cây mẹ. Do đó, chúng tôi sử dụng phương pháp phát triển chồi trực tiếp từ đốt thân mang mắt ngủ để nhân nhanh trên môi trường MS bổ sung 1mg/L BAP. Chồi và rễ phát triển tạo cây hoàn chỉnh tốt nhất trên môi trường MS bổ sung 1 mg/L BAP kết hợp với 0,1 mg/L NAA.

Từ khóa: Cây sắn, *Manihot esculenta*, Nuôi cấy mô tế bào, Vi nhân giống

STUDY ON *IN VITRO* MICROPROPAGATION OF CASSAVA (*Manihot esculenta*) TO PRODUCT THE FREE-DISEASE CASSAVA PLANTS

Duong Thanh Thuy*, Phan Thi Phuong Nhi, Tran Thi Trieu Ha, La Thi Thu Hang,
Tran Thi Hoang Dong, Le Khắc Phúc

University of Agriculture and Forestry, Hue University

ABSTRACT

Conventional cassava propagation using stem cuttings has limitations, including low multiplication rate and the potential for disease transmission from mother plant to offspring. The objective of this study is to produce the disease – free cassava plants using the *in vitro* propagation. The results indicated that 5% sodium hypochlorite (v/v) at 10 minutes and 20 minutes were effective sterilization for the first to 5th and 6th to 10th nodal explant, respectively. For multiplication, *in vitro* nodes were cultivated in MS medium with 0 – 5 mg/L BAP. In medium with 1 – 3 mg/L BAP, shoots developed directly from nodes, while in medium with 4 - 5 mg/L BAP, shoots developed from callus after six week culture, however, regenerated shoots had some abnormalities in morphology. Therefore, for multiplication of elite cassava plants, the single node culture in the MS media with 1mg/L BAP was selected. The cassava *in vitro* plants developed in MS with 1mg/L BAP and 0,1 mg/L NAA.

Keywords: Cassava, *Manihot esculenta*, Plant tissue culture, Micropopagation

1. MỞ ĐẦU

Cây sắn (*Manihot esculenta* Crantz) là cây trồng lấy củ quan trọng để làm thực phẩm và làm nguyên liệu trong công nghiệp chế biến và năng lượng (Trịnh Xuân Hoạt và cs., 2021). Mặc dù Châu Phi là nước có diện tích trồng sắn lớn nhất thế giới, nhưng những năm gần đây diện tích và sản lượng sắn ở Đông Nam Á ngày càng tăng, tổng sản lượng sắn của khu vực này đạt hơn 55 triệu tấn/năm, chiếm 30% sản lượng sắn thế giới (Saokham và cs., 2021). Tuy nhiên, canh tác sắn ở Đông Nam Á đã và đang bị ảnh hưởng nghiêm trọng của sâu bệnh hại như rệp sáp (*Phenacoccus manihoti*), bệnh bạc lá sắn (*Xanthomonas axonopodis* pv *manihotis*), bệnh chổi rồng (Cassava Witches' Broom Disease - CWBD), đặc biệt là bệnh khảm lá sắn do virus (Cassava Mosaic Disease). Dù mới xuất hiện từ năm 2015 nhưng bệnh khảm lá sắn do virus đã trở thành dịch hại của các vùng trồng sắn ở khu vực Đông Nam Á (Siriwan và cs., 2020).

Việc sử dụng hom giống từ cây mẹ bị bệnh khảm lá do virus sẽ làm giảm năng suất củ (16 – 33%) và giảm hàm lượng tinh bột (22 – 38%), vì vậy công tác giống đang được chú trọng nhằm tạo ra giống khỏe, sạch bệnh (Uke và cs., 2022). Thông thường, sắn được nhân giống chủ yếu bằng phương pháp nhân giống vô tính sử dụng các đoạn thân dài 20 cm, đạt tối thiểu là 6 – 10 đốt (Cục Trồng trọt, 2019). Tuy nhiên, nhược điểm của phương pháp giâm hom này là hệ số nhân giống thấp, trung bình 1 năm, 1 cây chỉ sản xuất được 10 hom giống (1:10), điều này sẽ làm hạn chế khả năng trồng các giống mới trên diện tích lớn vì không đủ số lượng hom giống cần thiết (Demeke và cs., 2014). Hơn thế nữa, sâu bệnh tích tụ trong suốt quá trình sinh trưởng phát triển của cây

mẹ cũng là một nhược điểm của phương pháp nhân giống vô tính bằng giâm hom ngoài đồng ruộng do khả năng truyền bệnh sang cây con (Escobar và cs., 2006).

Phương pháp nuôi cấy mô tế bào thực vật được xem là một trong những biện pháp hiệu quả để sản xuất cây giống sạch bệnh (Uke và cs., 2022). Thông qua quá trình nuôi cấy một bộ phận nhỏ (mô/tế bào) của cây mẹ, một số lượng lớn cây con đồng đều về mặt di truyền và giống cây mẹ sẽ được sản xuất nên phương pháp này còn được gọi là vi nhân giống cây trồng (*in vitro* micropropagation) (Oseni và cs., 2018). Quá trình vi nhân giống cây trồng được thực hiện trong điều kiện vô trùng nên cây con *in vitro* sản xuất ra không mang vi khuẩn, nấm bệnh (George và cs., 2008). Hơn nữa, kết hợp với chẩn đoán phân tử để chọn đúng cây mẹ không mang bệnh virus sẽ cung cấp thêm kỹ thuật nhằm đảm bảo sản xuất giống *in vitro* sạch bệnh. Tuy nhiên, vì bệnh khảm lá sắn là bệnh hại mới xuất hiện trên khu vực Đông Nam Á từ năm 2015 nên những nghiên cứu đồng bộ từ việc sử dụng chỉ thị phân tử để chọn cây mẹ sạch bệnh đến nhân giống cây sạch bệnh bằng nuôi cấy mô để cung cấp cây giống đầu dòng còn hạn chế. Vì vậy, nghiên cứu này được thực hiện với mục đích nghiên cứu nhân giống *in vitro* cây sắn nhằm cung cấp nguồn cây giống sạch bệnh.

2. NỘI DUNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Giống sắn địa phương sạch bệnh thu thập tại Sơn Tây, Quảng Ngãi được kế thừa từ đề tài “Ứng dụng PCR xác định sự hiện diện của virus gây bệnh khảm lá tại Thừa Thiên Huế” - DHL2021-NH-06.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phương pháp khử trùng

Mẫu cây là đoạn thân mang 1 mắt ngủ (đốt thân) được lấy từ cây sắn 3 tháng tuổi trồng trong vườn lưới khoa Nông học, trường Đại học Nông Lâm, Đại học Huế.

Trước khi khử trùng bằng dung dịch sodium hypochlorite (8% chlorine), mẫu cây được rửa sạch bụi bẩn dưới vòi nước chảy trong 10 phút. Trong tủ cấy vô trùng, mẫu cây được rửa lại bằng nước cất vô trùng 1 lần rồi ngâm trong ethanol 70% trong 30 giây. Sau đó, mẫu cây được khử trùng trong dung dịch sodium hypochlorite ở các nồng độ (v/v) và thời gian khác nhau. Tiếp theo, rửa sạch lại mẫu 5 lần với nước cất vô trùng để loại bỏ hết chất khử trùng. Mẫu cây được cắt loại bỏ các phần bị ảnh hưởng bởi chất khử trùng và từng mang mắt ngủ được cấy lên môi trường cơ bản MS (Murashige & Skoog, 1962) + 20g/L sucrose + 7g/L agar + 1g/L than hoạt tính và không bổ sung chất điều hòa sinh trưởng thực vật.

Thí nghiệm 1. Ảnh hưởng của nồng độ dung dịch sodium hypochlorite (v/v) và thời gian khử trùng đến khả năng vô trùng mẫu cây

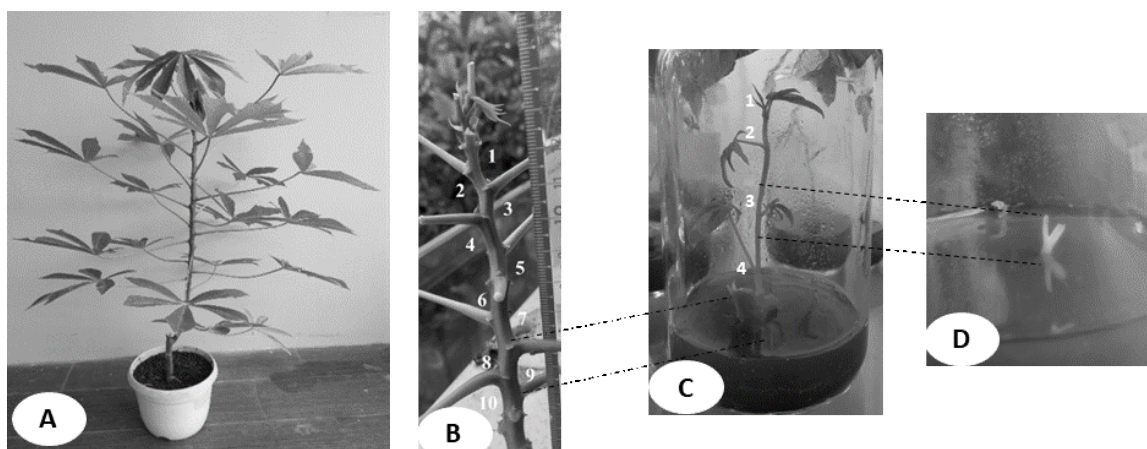
Thí nghiệm 2 yếu tố gồm nồng độ dung dịch sodium hypochlorite (5% và 10% (v/v)) và thời gian khử trùng (10 phút, 15 phút và 20 phút) nhằm xác định nồng độ dung dịch khử trùng sodium hypochlorite và thời gian khử trùng thích hợp để tạo mẫu cây sạch.

Đánh giá hiệu quả khử trùng sau 2 tuần nuôi cấy dựa trên tỷ lệ mẫu nhiễm (%), tỷ lệ mẫu hóa nâu (%) và tỷ lệ mẫu sống (%).

Thí nghiệm 2. Ảnh hưởng của vị trí mẫu và thời gian khử trùng đến khả năng vô trùng mẫu cây

Để lựa chọn vị trí lấy mẫu cây thích hợp, 3 loại mẫu cây đã được sử dụng trong nghiên cứu: Mẫu I - đốt thân vị trí 1 đến 5; mẫu II - đốt thân vị trí 6 đến 10 và mẫu III - đốt thân vị trí 11 đến 15. Chỉ sử dụng các đốt thân có chiều dài đốt lớn hơn 0,5 cm. Sử dụng nồng độ khử trùng tốt nhất ở thí nghiệm 1 với thời gian khử trùng 10 phút, 15 phút và 20 phút

Sau 2 tuần nuôi cấy, theo dõi tỷ lệ mẫu nhiễm (%), tỷ lệ mẫu hóa nâu (%) và tỷ lệ mẫu sống (%).



Hình 1. Vật liệu sử dụng trong các thí nghiệm nhân giống *in vitro* cây sắn

(A) Cây sắn lấy mẫu; (B) các đốt thân mang mắt ngủ sử dụng trong thí nghiệm đánh giá hiệu quả phương thức khử trùng; (C), chồi tái sinh sau 2 tuần nuôi cấy khởi động với 4 đốt thân; (D) đoạn thân *in vitro* mang 1 mắt ngủ sử dụng trong thí nghiệm nhân nhanh.

2.2.2. Phương pháp nhân nhanh chồi in vitro

Thí nghiệm 3. Ảnh hưởng của BAP lên khả năng nhân nhanh chồi từ đốt thân in vitro

Đoạn thân mang 1 mắt ngủ từ chồi in vitro trên các công thức tốt nhất của thí nghiệm 2 được cấy lên môi trường dinh dưỡng cơ bản MS + 20 g/L sucrose + 7 g/L agar + 1g/L than hoạt tính, bổ sung BAP với các nồng độ khác nhau (0 – 5 mg/L).

Theo dõi thí nghiệm sau mỗi 2 tuần. Sau 8 tuần nuôi cấy theo dõi các chỉ tiêu: Tỷ lệ mẫu phát triển chồi (%), số chồi trung bình/mẫu, thời gian cảm ứng tạo chồi (tuần), đặc điểm chồi.

2.2.3. Phương pháp phát triển chồi tạo cây hoàn chỉnh

Thí nghiệm 4. Ảnh hưởng của BAP và NAA lên khả năng phát triển chồi tạo cây hoàn chỉnh

Chồi phát triển sau 4 tuần nuôi cấy được chuyển sang môi trường nền là môi trường MS + 20 g/L sucrose + 7 g/L agar + 1g/L than hoạt tính, bổ sung BAP ở nồng độ

tối ưu nhất trong thí nghiệm 3 kết hợp với các nồng độ NAA khác nhau (0 – 0,3 mg/L).

Thời gian theo dõi thí nghiệm 8 tuần. Chỉ tiêu theo dõi: chiều cao chồi (cm). số lá/chồi, số rễ và chiều dài rễ (cm)

2.2.4. Bố trí thí nghiệm

Các thí nghiệm được bố trí theo kiểu ngẫu nhiên hoàn toàn CRD, lặp lại 3 lần, mỗi lần lặp lại 10 mẫu. Mẫu được nuôi ở nhiệt độ 25-27°C, cường độ chiếu sáng 2000 lux, thời gian chiếu sáng 16h/ngày.

2.2.5. Xử lý số liệu

Trung bình của các công thức thí nghiệm được tính toán và phân tích ANOVA bằng phần mềm R (R core team, 2021). Kiểm định Tukey HSD được sử dụng để phát hiện khác biệt giữa các công thức thí nghiệm ở mức $\alpha = 0.05$

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Ảnh hưởng của nồng độ và thời gian khử trùng đến hiệu quả khử trùng mẫu cấy

Ảnh hưởng của nồng độ và thời gian khử trùng đến hiệu quả khử trùng mẫu cấy được thể hiện ở Bảng 1 và Bảng 2.

Bảng 1. Phân tích ANOVA đánh giá ảnh hưởng của nồng độ chất khử trùng và thời gian khử trùng đến tỷ lệ mẫu nhiễm, tỷ lệ mẫu hóa nâu và tỷ lệ mẫu sống

Yếu tố thí nghiệm	Bậc tự do (df)	Tổng bình phương (SS)		
		Tỷ lệ mẫu nhiễm	Tỷ lệ mẫu hóa nâu	Tỷ lệ mẫu sống
Nồng độ	1	481,5**	8441,6****	4825,3****
Thời gian	2	155,2 ^{ns}	1301,0***	566,2*
Nồng độ*thời gian	2	134,6 ^{ns}	461,3*	187,7 ^{ns}

“****” sai khác ở mức $P \leq 0,0001$; “***” sai khác ở mức $P \leq 0,001$; “**” sai khác ở mức $P \leq 0,01$; “*” sai khác ở mức $P \leq 0,05$; “ns” không có sự sai khác ($P > 0,05$)

Bảng 2. Ảnh hưởng của nồng độ chất khử trùng và thời gian khử trùng đến hiệu quả khử trùng mẫu cây

Nồng độ dung dịch khử trùng (v/v)	Thời gian khử trùng (phút)	Tỷ lệ mẫu nhiễm (%)	Tỷ lệ mẫu hóa nâu (%)	Tỷ lệ mẫu sống (%)
5%	10	32,35 ^a	5,87 ^c	62,89 ^a
	15	34,22 ^a	12,00 ^c	53,78 ^{ab}
	20	31,57 ^a	14,86 ^c	53,57 ^{ab}
10%	10	29,56 ^{ab}	39,78 ^b	30,67 ^{bc}
	15	21,56 ^b	50,67 ^{ab}	28,67 ^c
	20	16,00 ^b	72,22 ^a	12,67 ^c

a, b, c: Các chữ cái khác nhau trong cùng một cột biểu thị mức sai khác có ý nghĩa thống kê ở mức $\alpha=0,05$

Bảng 1 cho thấy nồng độ chất khử trùng có tác động đến hiệu quả khử trùng được đánh giá bằng tỷ lệ mẫu nhiễm, tỷ lệ mẫu hóa nâu và tỷ lệ mẫu sống. Tỷ lệ mẫu cây hóa nâu tỷ lệ thuận với nồng độ chất khử trùng, tức là tỷ lệ này tăng khi nồng độ khử trùng tăng. Các nghiên cứu về tác động của sodium hypochloride trong khử trùng mẫu cây cũng đã chỉ ra rằng nồng độ sodium hypochloride cao tác động có hại lên thực vật thể hiện ở tỷ lệ mẫu hóa nâu và chết (Pierik, 1997; Rodrigues và cs., 2013). Trong khi đó thời gian khử trùng có tác động đến tỷ lệ mẫu hóa nâu ($P \leq 0,0001$) và tỷ lệ mẫu sống ($P \leq 0,05$) nhưng tác động không có ý nghĩa lên tỷ lệ mẫu nhiễm. Tương tác giữa nồng độ chất khử trùng và thời gian khử trùng cũng chỉ tác động có ý nghĩa đến tỷ lệ mẫu hóa nâu mà không có ý nghĩa đến tỷ lệ mẫu nhiễm và tỷ lệ mẫu sống. Điều này có thể do còn những nhân tố khác ảnh hưởng đến tỷ lệ mẫu nhiễm trong khi khử trùng mẫu cây như tác nhân gây nhiễm bên trong mẫu, kết quả tương tự cũng được quan sát thấy trong nghiên cứu của Paula và cs. (2020).

Tỷ lệ mẫu sống là chỉ tiêu quan trọng nhất để đánh giá hiệu quả khử trùng mẫu cây, tỷ lệ này đạt cao nhất khi xác định được nồng độ và thời gian khử trùng thích hợp để

loại bỏ các vi sinh vật tồn tại trên mẫu cây và ít gây hại nhất đến mô thực vật. Trong nghiên cứu này, nồng độ sodium hypochloride 5% cho tỷ lệ sống cao hơn hẳn so với sodium hypochloride 10%. Kết quả tương tự cũng đã được quan sát trong thí nghiệm của Maruthi và cộng sự (2018), nồng độ chất khử trùng và thời gian khử trùng đốt thân sắn thích hợp nhất là 5 % v/v sodium hypochlorite trong 20 – 30 phút. Tuy nhiên, vì kết quả tương tác giữa nồng độ và thời gian khử trùng tác động không có ý nghĩa đến tỷ lệ mẫu sống, hơn thế nữa, theo George và cs. (2008) vị trí mẫu cây cũng đóng vai trò quan trọng trong hiệu quả khử trùng mẫu cây, các mẫu cây ở các vị trí cao, xa mặt đất như chồi thường chứa ít bụi bẩn và vi sinh vật hơn các mẫu cây như thân ngầm, củ, ... (George và cs., 2008). Do đó, để tối ưu hóa quy trình khử trùng, chúng tôi đã tiến hành thí nghiệm ảnh hưởng của vị trí mẫu cây đến hiệu quả khử trùng mẫu cây.

3.2. Ảnh hưởng của vị trí mẫu cây và thời gian khử trùng đến hiệu quả khử trùng mẫu cây

Ảnh hưởng của vị trí lấy mẫu đến hiệu quả khử trùng mẫu cây được thể hiện qua Bảng 3.

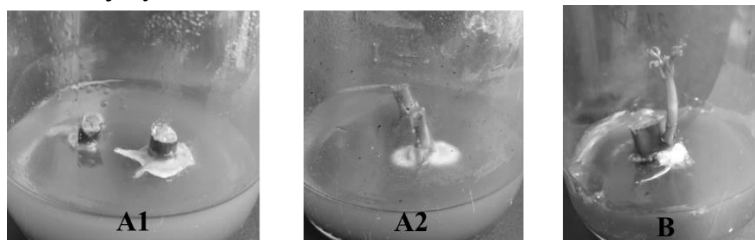
Bảng 3. Ảnh hưởng của vị trí mẫu cây và công thức khử trùng đến hiệu quả khử trùng mẫu cây

Loại mẫu cây	Công thức khử trùng (nồng độ - thời gian)	Tỷ lệ mẫu nhiễm (%)	Tỷ lệ mẫu hóa nâu (%)	Tỷ lệ mẫu sống (%)
I	5 – 10	6,0 ^c	8,0 ^b	86,0 ^a
	5 – 15	6,0 ^c	22,7 ^{ab}	71,3 ^{ab}
	5 – 20	3,3 ^c	42,0 ^a	54,7 ^b
II	5 – 10	29,3 ^b	2,7 ^b	68,0 ^{ab}
	5 – 15	22,7 ^b	8,0 ^b	69,3 ^{ab}
	5 – 20	4,7 ^c	11,3 ^b	84,0 ^a
III	5 – 10	77,3 ^a	3,3 ^b	19,3 ^c
	5 – 15	78,0 ^a	9,3 ^b	12,7 ^c
	5 – 20	64,0 ^a	12,7 ^b	23,3 ^c

^{a, b, c}: Các chữ cái khác nhau trong cùng một cột biểu thị mức sai khác có ý nghĩa thống kê ở mức $\alpha=0,05$

Trong thí nghiệm khử trùng, liên quan đến phản ứng của các loại mẫu cây, tỷ lệ nhiễm trung bình của cả 3 công thức khử trùng ở mẫu III là cao nhất (73,1%), tiếp đến là mẫu II (19,9%) và thấp nhất là mẫu I (5,1%). Trong khi đó, tỷ lệ trung bình mẫu hóa nâu của cả 3 công thức ở mẫu I là 24,2%, cao hơn nhiều so với mẫu II (7,3%) và mẫu III (8,4%). Cuối cùng, tỷ lệ trung bình mẫu sống của cả 3 công thức khử trùng đạt 70,7% ở mẫu I, 73,8% ở mẫu II và chỉ 18,4% mẫu III. Như vậy, tỷ lệ nhiễm rất cao

được ghi nhận ở mẫu III trên tất cả các công thức khử trùng, đó là do sự hiện diện của các tác nhân gây nhiễm bên trong và bên ngoài mẫu cây (Hình 2). Vì vậy, đốt thân từ vị trí 1 – 10 thích hợp để làm mẫu cây trong nuôi cấy mô tế bào cây sắn hơn các đốt thân ở vị trí bên dưới. Điều này cũng có ý nghĩa thực tiễn trong việc sử dụng tối đa nguồn vật liệu ban đầu để nhân giống sắn do các đốt thân từ vị trí 1 – 10 không được sử dụng trong giâm hom ngoài đồng ruộng.



Hình 2. Mẫu III (đốt thân vị trí 11 – 15) bị nhiễm khuẩn (A1) và nhiễm nấm (A2) sau 3 ngày nuôi cấy và sau 2 tuần nuôi cấy (B)

Đối với mẫu cây I, công thức xử lý 5% (v/v) chất khử trùng sodium hypochlorite trong thời gian 10 phút cho tỷ lệ mẫu sống đạt cao nhất (86,0%). Đối với mẫu II, công thức xử lý 5% (v/v) sodium hypochlorite trong 20 phút cho kết quả tốt nhất về tỷ lệ mẫu sống (84%). Magaia (2015) cũng thu được 87% mẫu sống khi xử lý đoạn thân sắn 2 lần bằng 0,05% HgCl_2 trong 2 phút và 0,1 % HgCl_2 trong 1 phút, tuy nhiên trong nghiên cứu của Magaia (2015), tác giả không đưa thông tin chi tiết về vị trí mẫu cây ban đầu. Tỷ lệ sống trong

nghiên cứu của Magai (2015) cũng tương đương với tỷ lệ mẫu sống thu được bằng việc xử lý 5 % v/v sodium hypochlorite trong nghiên cứu này ở thời gian 10 phút đối với mẫu I và thời gian 20 phút đối với mẫu II trong nghiên cứu này. Ưu việt của phương pháp khử trùng bằng sodium hypochlorite so với HgCl_2 là phương pháp của chúng tôi xây dựng rẻ tiền và hóa chất khử trùng sử dụng ít độc hơn.

3.3. Ảnh hưởng của nồng độ BAP đến khả năng nhân nhanh chồi

Sau khử trùng và nuôi cấy 2 tuần trên môi trường cơ bản MS, đốt thân của chồi *in*

vitro được tách riêng và cấy chuyển lên môi trường cơ bản MS với các nồng độ BAP khác nhau (0-5mg/L), kết quả ảnh hưởng của BAP đến khả năng nhân nhanh được thể hiện ở Bảng 4.

Bảng 4. Ảnh hưởng các nồng độ BAP khác nhau đến khả năng nhân nhanh chồi

Nồng độ BAP (mg/L)	Tỷ lệ mẫu tạo chồi (%)	Số chồi/mẫu	Thời gian cảm ứng tạo chồi (tuần)
0,0	0,00	0,00 ^c	-
1,0	100	1,00 ^b	2
2,0	100	1,00 ^b	2
3,0	100	1,00 ^b	2
4,0	100	1,53 ^a	6
5,0	100	1,77 ^a	6

^{a, b, c}: Các chữ cái khác nhau trong cùng một cột biểu thị mức sai khác có ý nghĩa thống kê ở mức $\alpha=0,05$

Trên môi trường không bổ sung BAP, 100% các đoạn thân mang mắt ngủ đều không tạo chồi. Trên các môi trường bổ sung BAP, tất cả các công thức đều tạo chồi (100%) sau 6 tuần nuôi cấy, tuy nhiên thời gian cảm ứng tạo chồi, số chồi/mẫu và đặc điểm chồi có sự khác nhau giữa các công thức thí nghiệm. Ở các nồng độ BAP từ 1-3 mg/L chồi hình thành trực tiếp sau 2 tuần nuôi cấy; sau 4 tuần chồi đạt được kích thước 2,0 - 2,5 cm (Hình 3 – A2), sau đó (giai đoạn 4 – 8 tuần nuôi cấy), chồi kéo dài lóng mà không hình thành đốt thân và lá mới (Hình 3 – A3). Trên môi trường BAP 4 - 5 mg/L, mô sẹo hình thành sau 4 tuần nuôi cấy, chồi tái sinh sau 6 tuần (Hình 3 – B1), tuy nhiên hình thái lá của các chồi tái sinh trên các môi trường này nhỏ và có những sai khác so với cây mẹ (lá không xẻ thùy) (Hình 3 – B2).

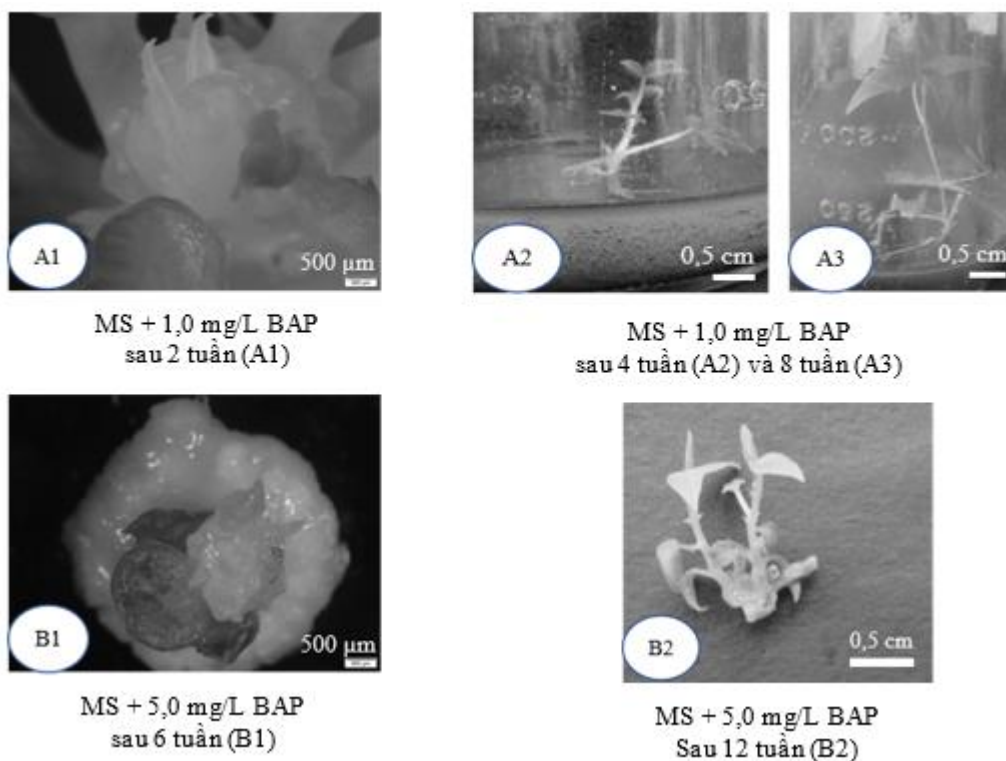
Vì nhân giống thông qua việc sử dụng các đốt thân phụ thuộc vào khả năng tái sinh của mô phân sinh đã có. Nếu mô phân sinh tái sinh trực tiếp thành chồi thì phương pháp này tương tự như giâm hom tại đồng ruộng vì chúng không trải qua trạng thái phân phân hóa của mô nuôi cấy. Nếu

mô phân sinh tái sinh chồi gián tiếp thì các tế bào thực vật trong trường hợp này buộc phải thay đổi cấu trúc phân tử của chúng để tạo ra các loại tế bào khác nhau và do đó dễ xảy ra biến dị (somaclonal variation) (Dale và McPartlan, 1992; Kitimu và cs., 2015). Nhiều nghiên cứu đã chứng minh quá trình phát sinh cơ quan mới thông qua tạo mô sẹo trong nuôi cấy sẽ tạo ra chồi tái sinh có kiểu hình bất thường (Lakshmanan và Taji, 2000; Rout và cs., 2008; Da Silva và cs., 2015); Ngược lại những cây tái sinh trực tiếp từ mô phân sinh được báo cáo là giống với kiểu hình của cây lấy mẫu (Santana và cs., 2009). Vì vậy, mặc dù nhân giống thông qua quá trình phát sinh chồi trực tiếp từ mô phân sinh có hệ số nhân chồi thấp hơn so với cảm ứng tạo cụm chồi thông qua mô sẹo nhưng vẫn được sử dụng nhiều trong vì nhân giống cây trồng nhất là nhân giống các cây đầu dòng do đảm bảo tính ổn định di truyền của giống (George và cs., 2008).

Mục tiêu chính của thí nghiệm này là tạo ra nhiều chồi để từ đó phát triển thành nhiều cây hoàn chỉnh có đặc điểm di truyền giống với cây mẹ, vì vậy chúng tôi lựa chọn phương pháp nhân nhanh bằng cách tái sinh

chồi trực tiếp khi nuôi cấy riêng từng đoạn thân mang 1 mắt ngủ (single node culture). Với phương pháp này, môi trường MS bổ sung 1 – 3 mg/L BAP không có sự sai khác về thời gian cảm ứng tạo chồi và tỷ lệ tạo chồi (Bảng 4), do đó khi cân nhắc đến hiệu quả kinh tế chúng tôi lựa chọn môi trường nhân nhanh là môi trường MS bổ sung 1mg/L BAP. Hơn thế nữa, trên môi trường

này (MS + 1mg/L BAP), không có sự khác biệt về số chồi, thời gian tạo chồi và hình thái chồi của các đốt thân cây vào do đó cả 4 đốt thân *in vitro* này đều có thể sử dụng cho nhân nhanh chồi. Như vậy, sau 6 tuần, từ 10 đốt thân của 1 cây mẹ ban đầu có thể sản xuất ra 40 chồi *in vitro* qua 2 lần cấy chuyển (Hình 1).



Hình 3. Ảnh hưởng của nồng độ BAP khác nhau lên khả năng tái sinh của mô phân sinh trên đốt thân *in vitro*

3.4. Ảnh hưởng của nồng độ BAP và NAA đến khả năng phát triển chồi tạo cây sản *in vitro* hoàn chỉnh

Môi trường cơ bản MS bổ sung 1 mg/L BAP lựa chọn từ thí nghiệm trên được kết hợp với các nồng độ NAA khác nhau nhằm tìm ra môi trường thích hợp cho phát triển chồi tạo cây hoàn chỉnh. Kết quả thí nghiệm được thể hiện ở Bảng 5 và Hình 4.

Chồi sản tái sinh từ đốt thân có khả năng ra rễ ngay trên môi trường cơ bản MS bổ sung 1 mg/L BAP, không bổ sung NAA, tuy nhiên chiều cao chồi, số lá/chồi, số rễ và chiều dài rễ đều thấp hơn so với các công

thức có bổ sung NAA, sự sai khác này là có ý nghĩa thống kê. Trên môi trường cơ bản MS bổ sung 1 mg/L BAP và 0,3 mg/L NAA, chồi có hiện tượng rụng lá (Hình 4_C). Chồi phát triển tốt nhất trên môi trường cơ bản MS bổ sung 1 mg/L BAP và 0,1 mg/L NAA, đặc biệt chiều dài rễ và số lá/cây khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê so với chồi phát triển trên môi trường cơ bản MS bổ sung 1 mg/L BAP và 0,3 mg/L NAA.

Kết quả thí nghiệm phát triển chồi tạo cây hoàn chỉnh của chúng tôi hoàn toàn phù hợp với nhận định của Bùi Trang Việt

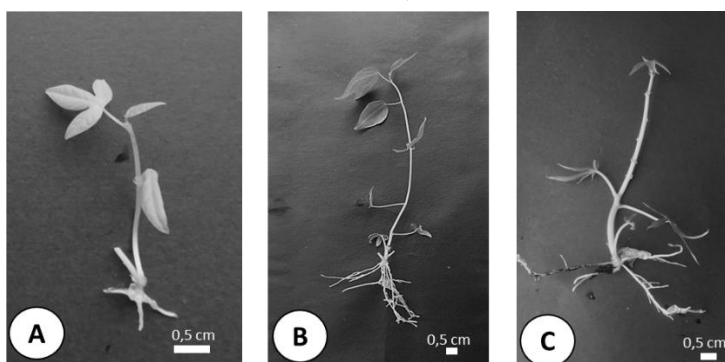
(2000), auxin phối hợp với cytokinin giúp tăng trưởng chồi non, tuy nhiên ở nồng độ

cao, auxin cản sự phát triển của phác thể chồi vừa được tạo thành.

Bảng 5. Ảnh hưởng môi trường cơ bản MS bổ sung 1mg/L BAP kết hợp với các nồng độ NAA khác nhau đến khả năng phát triển chồi tạo cây hoàn chỉnh

Nồng độ NAA (mg/L)	Chiều cao chồi (cm)	Số lá/cây	Số rễ	Chiều dài rễ (cm)
0,0	5,85 ^b	3,30 ^c	3,17 ^b	0,94 ^c
0,1	7,64 ^a	6,57 ^a	6,43 ^a	3,19 ^a
0,3	7,35 ^a	4,00 ^b	6,13 ^a	2,53 ^b

a, b, c: Các chữ cái khác nhau trong cùng một cột biểu thị mức sai khác có ý nghĩa thống kê ở mức $\alpha=0,05$



Hình 4. Ảnh hưởng của các nồng độ NAA khác nhau lên khả năng phát triển chồi, tạo cây in vitro hoàn chỉnh; A – MS + 1,0 mg/L BAP + 0,0 mg/L NAA, B - MS + 1,0 mg/L BAP + 0,1 mg/L NAA; C - MS + 1,0 mg/L BAP + 0,3 mg/L NAA

4. KẾT LUẬN

Công thức khử trùng tốt nhất để khử trùng đoạn thân mang mắt ngủ của sắn là 5% (v/v) sodium hypochlorite trong thời gian 10 phút đối với đốt thân từ vị trí 1 đến 5 và 5% (v/v) sodium hypochlorite trong thời gian 20 phút đối với đốt thân từ vị trí 6 đến 10.

Sử dụng phương pháp phát sinh chồi trực tiếp từ đốt thân *in vitro* riêng rẽ trên môi trường cơ bản MS bổ sung 1mg/L BAP để nhân nhanh chồi sắn.

Môi trường phát triển chồi tạo cây hoàn chỉnh tốt nhất là môi trường MS bổ sung 1mg/L BAP và 0,1 mg/L NAA.

LỜI CẢM ƠN

Công trình này là kết quả trong đề tài khoa học và công nghệ cấp trường trọng điểm năm 2021, mã số TD2021-03. Nhóm tác giả cũng xin được cảm ơn sự hỗ trợ một phần kinh phí của nhóm nghiên cứu mạnh

trường Đại học Nông Lâm, Đại học Huế, mã số NCM.ĐHNL.2021.1

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Tài liệu tiếng Việt

- Cục Trồng trọt (2019). Quy trình sản xuất giống sắn sạch bệnh khảm lá áp dụng cho hộ nông dân, cơ sở sản xuất giống để kinh doanh.
- Trịnh Xuân Hoat, Ngô Chí Hiếu, Ngô Quang Huy, Nguyễn Đức Huy (2021). Xác định phương thức lan truyền của Sri Lankan cassava Mosaic virus (SLCMV) gây bệnh khảm lá sắn ở Việt Nam. *Tạp chí Khoa học Nông nghiệp Việt Nam*, 19 (2), 206 – 214
- Bùi Trang Việt (2000). *Sinh lý thực vật đại cương – Phần II: Phát triển* (81 – 102). NXB quốc gia thành phố Hồ Chí Minh.

2. Tài liệu tiếng nước ngoài

- Da Silva, J. A. T., Lema-Ruminska, J., Tymoszek, A., & Kulpa, D. (2015). Regeneration from chrysanthemum flowers: a review. *Acta Physiologiae Plantarum*, 37(2), 26. DOI: 10.1007/s11738-015-1773-3
- Dale, P. J., & McPartlan, H. C. (1992). Field performance of transgenic potato plants compared with controls regenerated from

- tuber disks and shoot cuttings. *Theoretical and Applied Genetics*, 84, 585–591.
- Demeke, Y., Tefera, W., Dechassa, N., & Abebie, B. (2014). Effects of plant growth regulators on *in vitro* cultured nodal explants of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) clones. *African Journal of Biotechnology*, 13(28).
- Escobar, R. H., Andez, C. H., Larrahondo, N., Ospina, G., Restrepo, J., Noz, L. M., & Roca, W. M. (2006). Tissue culture for farmers: Participatory adaptation of low-input cassava propagation in Colombia. *Experimental Agriculture*, 42(1), 103-120.
- George, E. F., Hall, M. A., & Klerk, G. J. D. (2008). Micropropagation: Uses and Methods. In: George, E. F., Hall, M. A., Klerk, G. J. D. (eds). *Plant Propagation by Tissue Culture* (pp. 29 – 64). Springer, Dordrecht. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-5005-3_2
- Kitimu, S. R., Taylor, J., March, T. J., Tairo, F., Wilkinson, M. J., & Rodríguez-López, C. M. (2015). Meristem micropropagation of cassava (*Manihot esculenta*) evokes genome-wide changes in DNA methylation. *Frontiers in Plant Science*, 6(36), 590. DOI: 10.3389/fpls.2015.00590.
- Lakshmanan, P., & Taji, A. (2000). Somatic embryogenesis in leguminous plants. *Plant Biology*, 2, 136–148. DOI: 10.1055/s-2000-9159.
- Magaia, H.E. (2015). *Assessment and induction of variability through in vitro mutagenesis in cassava (Manihot esculenta Crantz)*. Vellanikkara: College of Horticulture.
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. *Physiology Plant*, 15, 473-497
- Oseni, O.M., Pande, V., & Nailwal, T.K. (2018). A review on plant tissue culture, a technique for propagation and conservation of endangered plant species. *International Journal of Current Microbiology and Applied Science*, 7(7), 3778–86.
- Paula, B.O., Cătană, C., & Cantor, M. (2020). Contamination Control of *In Vitro* Cultures of *Passiflora* Species for Multiplication Purpose. *International Journal of Innovative Approaches in Agricultural Research*, 4(4), 488-496. DOI: 10.29329/ijiaar.2020.320.10
- Pierik, R.L.M. (1997). *In vitro culture of higher plants* (pp. 31- 42). Springer Science. DOI: 10.1007/978-94-011-5750-6
- R Core Team (2021). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Australia. Khai thác từ <https://www.R-project.org/>
- Rodrigues, D. T., Novais, R. F., Venegas, V. H. A., Dias, J. M. M., Otoni, W. C., Villani, E. M. D. A. (2013). Chemical sterilization in *in vitro* propagation of *Arundina bambusifolia* Lindl. and *Epidendrum ibaguense* Kunth. *Revista Ceres*, 6(4), 447-451.
- Rout, G. R., Samantaray, S., & Das, P. (2008). Biotechnology of the banana: a review of progress. *Plant Biology*, 2(5), 512–524. DOI: 10.1055/s-2000-7470.
- Santana, M. A., Romy, G., Matehus, J., Vicente-Villardón, J. L., & Demey, J. R. (2009). A simple and low-cost strategy for micropropagation of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *African Journal of Biotechnology*, 8(16), 3789–3797.
- Saokham, K., Hemniam, N., Roekwan, S., Hunsawattanukul, S., Thawinampan, J., Siriwan, W. (2021). Survey and molecular detection of Sri Lankan cassava mosaic virus in Thailand. *PLoS One*, 16(10), e0252846. DOI: 10.1371/journal.pone.0252846.
- Siriwan, W., Jimenez, J., Hemniam, N., Saokham, K., Lopez-Alvarez, D., Leiva, A. M., Martinez, A., Mwanzia, L., Becerra Lopez-Lavalle, L. A., & Cuellar, W. J. (2020). Surveillance and diagnostics of the emergent Sri Lankan Cassava Mosaic Virus (Fam. Geminiviridae) in Southeast Asia. *Virus Research*, 285, 197959.
- Uke, A., Tokunaga, H., Utsumi, Y., Vu, N. A., Nhan, P. T., Srean, P., Hy, N. H., Ham, L. H., Lopez-Lavalle, L. A. B., Ishitani, M., Hung, N., Tuan, L. N., Van Hong, N., Huy, N. Q., Hoat, T. X., Takasu, K., Seki, M., Ugaki, M. (2022). Cassava mosaic disease and its management in Southeast Asia. *Plant Molecular Biology*, 109(3), 301-311. DOI: 10.1007/s11103-021-01168-2.