

## NGHIÊN CỨU TÁI SINH MỘT SỐ GIỐNG Sắn (*MANIHOT ESCULENTA CRANTZ*) THÔNG QUA MÔ SẼO PHÔI HÓA

Nguyễn Thị Minh Hồng<sup>1,2</sup>, Nguyễn Thị Hoài Thương<sup>1</sup>, Phạm Bích Ngọc<sup>1,✉</sup>, Chu Hoàng Hà<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

<sup>2</sup>Trường Đại học Hồng Đức

✉ Người chịu trách nhiệm liên lạc. E-mail: pbngoc@ibt.ac.vn

Ngày nhận bài: 29.6.2017

Ngày nhận đăng: 20.9.2017

### TÓM TẮT

Cây sắn (*Manihot esculenta* Crantz) là một trong ba cây lương thực quan trọng nhất, có giá trị kinh tế cao về nhiều mặt. Việc hoàn thiện quy trình tái sinh cây sắn phục vụ cho tạo cây sắn chuyển gen ở Việt Nam là một vấn đề rất cần thiết. Trong nghiên cứu này, sự tái sinh cây sắn ở năm giống sắn canh tác tại Việt Nam: KM 140 (S1), sắn trắng Nghệ An (S2), sắn đỏ Lạng Sơn (S3), sắn cao sắn Hoà Bình (S4), Huay Bong (S5) thông qua mô sẹo phôi hóa từ các nguồn nguyên liệu đỉnh chồi, cuống lá non, mảnh lá đã được tối ưu. Sau 3 tuần nuôi cây trên nền môi trường MS có bổ sung 10 mg/l Picloram, mẫu cây từ đỉnh chồi cảm ứng tạo mô sẹo cao nhất: 90 – 100%. Mô sẹo được chuyển tiếp sang môi trường tối ưu MS có bổ sung 5 mg/l picloram và 0,2 mg/l IBA cho tỷ lệ tạo FEC đạt 41,1 – 80,4 % sau 8 tuần ở các giống nghiên cứu. Các cụm phôi soma sinh trưởng tốt được chuyển sang môi trường kéo dài chồi MS có bổ sung 0,3 mg/l BAP trong 4 tuần. Tỷ lệ tái sinh tạo cây hoàn chỉnh cao nhất ở giống S1 là 61,67%. Ba tuần sau khi chuyển sang môi trường MS, cây con đạt yêu cầu được mang ra huấn luyện ngoài nhà lưới và trồng trong giá thể TN01 – trấu hun với tỉ lệ 6:4 cho tỷ lệ cây sống 95%. Quy trình tái sinh cây sắn thông qua mô sẹo phôi hóa có thể áp dụng phục vụ công tác cải tạo những giống sắn có tính trạng mong muốn bằng công nghệ chuyển gen.

**Từ khóa:** cây sắn, cuống lá non, đỉnh chồi, FEC (Friable embryogenic callus), mảnh lá, mô sẹo, phôi soma

### ĐẶT VẤN ĐỀ

Cây sắn (*Manihot esculenta* Crantz) là một trong những loại cây lương thực chủ lực quan trọng nhất đối với nhiều nước trên thế giới do chúng khả năng cung cấp carbohydrate cao, thậm chí trong các điều kiện ngoại cảnh bất lợi như lượng mưa thấp, hạn hán hoặc đất nghèo dinh dưỡng (Hoang Kim *et al.*, 2010). Hiện nay, cây sắn đang được coi là cây trồng đem lại giải pháp kép nhằm đạt cả hai mục tiêu: góp phần đảm bảo an ninh lương thực và cung cấp nguyên liệu cho công nghiệp sản xuất nhiều liệu sinh học, từng bước thay thế nhiên liệu hóa thạch (Hoàng Kim, Nguyễn Đăng Mãi, 2011).

Việc cải tiến các giống sắn bằng công nghệ chuyển gen nhằm tăng năng suất, tăng hàm lượng protein, hàm lượng tinh bột và giảm acid cyanhydric là vấn đề đang được quan tâm trên toàn thế giới. Để tạo được cây sắn chuyển gen thì việc nghiên cứu khả năng tái sinh ở các giống sắn là điều rất cần thiết

nhằm xây dựng quy trình tái sinh *in vitro*. Một số hệ thống tái sinh cây sắn thông qua quá trình tạo phôi soma đã được nghiên cứu cải tiến (Mycock *et al.*, 1995; Schopke *et al.*, 1996). Phương pháp nhân nhanh mô sẹo từ các mô sắn trên môi trường bổ sung picloram đã được chứng minh là có khả năng tạo một lượng lớn phôi soma (Taylor *et al.*, 1996). Thay đổi nồng độ auxin và quá trình chuyển đổi môi trường giữa lỏng, rắn cũng ảnh hưởng đến tỷ lệ sống sót các phôi soma (Sofiani *et al.*, 1997). Tuy nhiên chưa có bằng chứng rõ ràng chứng tỏ sự phát triển từ phôi thành cây con có hiệu suất cao ở các giống sắn tại Việt Nam.

Bên cạnh đó mô sẹo phôi hóa (Friable embryogenic callus - FEC) là mô khi tái sinh sẽ tạo ra tỷ lệ chồi bình thường cao nhất so với các cấu trúc mô khác. Mô sẹo phôi hóa sử dụng làm nguyên liệu trong chuyển gen thông qua vi khuẩn *Agrobacterium* cho hiệu suất chuyển gen cao (Bull *et al.*, 2009). Tỷ lệ hình thành phôi soma đạt cao nhất (82 ± 1.7%) ở

giống sắn KM94 trên môi trường MS + 12 mg/l Picloram (Đỗ Xuân Đồng *et al.*, 2012); ở giống sắn TMS 60444 tỷ lệ tạo mô sẹo phôi hóa là 64% (Nguyễn Văn Đồng *et al.*, 2014); giống KM 297 đạt  $30 \pm 3\%$  khi nuôi cấy trên môi trường MS + 8 mg/l picloram (Vũ Văn Kiên, Nguyễn Du Sanh, 2011) và trong báo cáo của Nyaboga *et al.*, (2015) giống sắn TME14 đạt cao (51 – 75%). Gần đây, một số nhà khoa học trên thế giới cũng đã sử dụng các bộ phận khác nhau trên thân cây sắn làm nguồn nguyên liệu tạo mô sẹo và các loại phôi soma. Việc tạo ra những phôi soma chất lượng là yếu tố rất quan trọng để cải tạo giống sắn bằng các phương pháp công nghệ sinh học (Jellili T *et al.*, 2014). Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã tối ưu được quy trình tái sinh cây sắn thông qua phôi soma từ các nguồn nguyên liệu khác nhau một số giống sắn Việt Nam. Kết quả này góp phần phục vụ cho nghiên cứu tạo cây sắn chuyển gen ở các bước tiếp theo.

## VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

### Vật liệu

Vật liệu nghiên cứu gồm 5 giống sắn: KM 140 (S1), sắn trắng Nghệ An (S2), sắn đỏ Lạng Sơn (S3), sắn cao sản Hòa Bình (S4), Huay Bong (S5) do Trung tâm Tài nguyên thực vật, Viện Khoa học nông nghiệp Việt Nam, An Khánh, Hoài Đức, Hà Nội cung cấp.

### Phương pháp nghiên cứu, xử lý số liệu

#### Khử trùng mẫu

Thân sắn non được cắt thành các đoạn mang mắt ngủ với kích thước khoảng 1 – 1,5 cm được khử trùng bằng  $HgCl_2$  0,1% trong 7 phút, tiếp theo loại bỏ  $HgCl_2$  và rửa bằng nước cất vô trùng 5 lần rồi cấy vào môi trường MS. Những chồi non vô trùng mọc lên từ mẫu cây được tiếp tục cấy chuyển lên môi trường MS có bổ sung 30 g/l sucrose.

#### Nuôi cấy tạo mô sẹo sắn

Nguồn nguyên liệu là đỉnh chồi, mảnh lá non và cuống lá của cây sắn *in vitro* khoảng 3 tuần tuổi được sử dụng cho thí nghiệm. Cuống lá và đỉnh chồi được cắt nhỏ với kích thước khoảng 0,3 - 0,5 cm. Đối với lá non (lá thứ nhất, thứ 2 sát với đỉnh sinh trưởng) được cắt thành những mảnh nhỏ có kích thước 0,5 x 0,5 cm, bỏ phần mép lá để thuận lợi cho quá trình tạo mô sẹo. Sau đó, mẫu được cấy lên môi trường tạo mô sẹo CP (MS + picloram 10 mg/l + 20 g/l sucrose + 2,6 g/l gellan) và CD (MS + 10 mg/l

2,4D + 20 g/l sucrose + 2,6 g/l gellan).

### Cảm ứng tạo phôi từ mô sẹo ở sắn

Những mô sẹo có cấu trúc mô chặt, vàng tươi hoặc vàng nhạt đã loại bỏ dịch nhầy ở môi trường CP và CD sau 3 tuần được chuyển sang môi trường phát sinh phôi  $CI_{1-4}$  (MS + 5 mg/l picloram + (0,1; 0,2; 0,3; 0,4) mg/l IBA + 20 g/l sucrose + 2,8 g/l gelatin; pH 5,8) để đánh giá tỷ lệ phát sinh phôi của 5 giống sắn nghiên cứu sau 4, 6 và 8 tuần.

### Tái sinh cây hoàn chỉnh từ phôi

Lựa chọn những cụm phôi có khả năng tái sinh chồi chuyển sang môi trường kích thích phôi nảy mầm  $CN_{1-4}$  (MS + 5 mg/l picloram + (0; 0,3; 0,6; 0,9) mg/l BAP + 20 g/l sucrose + 2,8 g/l gelatin; pH 5,8) sau 4 tuần và tạo cây hoàn chỉnh trên môi trường MS sau 3 tuần. Mẫu được nuôi dưới ánh sáng đèn neon với cường độ chiếu sáng 3000 lux, thời gian chiếu sáng 14 – 16 giờ/ngày, nhiệt độ phòng nuôi cấy  $25 \pm 2^\circ C$ .

### Huấn luyện cây ngoài nhà lưới

Cây sắn tái sinh hoàn chỉnh có số rễ lớn hơn 2 rễ, lá xanh đậm, chiều cao đạt 3 – 5 cm được chuyển ra trồng trên giá thể TN1 (Viện Nông hóa Thổ nhưỡng) và tưới luân theo tỷ lệ 6 : 4, tuần đầu tránh ánh sáng trực xạ và chăm sóc ở điều kiện cung cấp đầy đủ nước và dinh dưỡng.

### Xử lý số liệu

Tất cả các thí nghiệm được thực hiện 50 mẫu/lần, lặp lại 3 lần/ thí nghiệm. Các số liệu được xử lý bằng phần mềm Excel 2013.

## KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### Kết quả nghiên cứu tạo mô sẹo từ các nguồn vật liệu khác nhau ở cây sắn

Theo nhiều nghiên cứu, nguyên liệu thực vật dùng để nghiên cứu hệ thống tái sinh cây sắn *in vitro* rất đa dạng, có thể từ thùy lá non (Li *et al.*, 1998), từ đỉnh chồi của cây con (Zhang., 2000; Đỗ Xuân Đồng *et al.*, 2012), từ chồi nách (Evavs *et al.*, 2015; Nguyễn Văn Đồng *et al.*, 2014), từ mảnh lá, chồi đỉnh và chồi nách (Bull *et al.*, 2009).

Kết quả nghiên cứu thể hiện Bảng 1 cho thấy cả 5 giống sắn đều phát triển hình thành mô sẹo tốt khi nuôi cấy trên môi trường có bổ sung 2,4-D, picloram và đặt mẫu trong tối. Tuy nhiên, tỷ lệ hình thành mô sẹo của 5 giống sắn nghiên cứu từ

đỉnh chồi, lá non, cuống lá ở các giống sắn khác nhau là khác nhau và có sự khác biệt ở hai môi trường nuôi cấy CP và CD (Bảng 1). Kết quả này

cũng phù hợp với nghiên cứu của Đoàn Phương Thủy và Bùi Trang Việt (2006); Đỗ Xuân Đồng *et al.*, (2012).

**Bảng 1.** Ảnh hưởng của nguồn nguyên liệu và môi trường đến khả năng tạo mô sẹo (sau 3 tuần).

Môi trường	Nguyên liệu	Tỷ lệ hình thành mô sẹo (%)				
		S1	S2	S3	S4	S5
CP	Lá non	100 ± 0	89,6 ± 0,44	88,6 ± 0,43	90,0 ± 0,44	99,2 ± 0,49
	Đỉnh chồi	<b>100 ± 0</b>	<b>97,5 ± 0,48</b>	87,2 ± 0,4	90,2 ± 0,45	<b>100 ± 0</b>
	Cuống lá	72,3 ± 0,35	69,7 ± 0,34	64,8 ± 0,32	55,1 ± 0,27	62,3 ± 0,31
CD	Lá non	100 ± 0	90,3 ± 0,45	86,4 ± 0,43	82,1 ± 0,41	97,2 ± 0,48
	Đỉnh chồi	100 ± 0	92,1 ± 0,46	88,9 ± 0,44	84,3 ± 0,42	100 ± 0
	Cuống lá	70,6 ± 0,34	68,7 ± 0,34	63,1 ± 0,31	52,3 ± 0,26	60,1 ± 0,30

Một số nghiên cứu về tái sinh trực tiếp ở cây sắn cho thấy lá non của một số giống sắn có khả năng tạo chồi tốt (Bull *et al.*, 2009; Nyaboga *et al.*, 2015). Vì vậy, lá non của một số giống sắn địa phương đã được chúng tôi sử dụng để nghiên cứu sàng lọc nguồn nguyên liệu thực vật phù hợp cho tái sinh cây từ mô sẹo. Kết quả thu được cho thấy tỷ lệ tạo mô sẹo từ lá non ở 5 giống sắn nghiên cứu trên môi trường nuôi cấy CP và CD sau 3 tuần cho tỷ lệ 82,1 – 100% và cao nhất ở giống sắn S1 (100%). Ngoài lá non, nguồn nguyên liệu là đỉnh chồi cho kết quả tỷ lệ tạo mô sẹo trên 2 môi trường nuôi cấy ở cả 5 giống sắn sau 3 tuần đều đạt tỷ lệ rất cao (87,2 – 100%). Đặc biệt ở 2 giống S1 và S5 tỷ lệ tạo mô sẹo là 100%. Tuy nhiên, khi nghiên cứu tạo mô sẹo dựa trên nguồn vật liệu cuống lá kết quả thu được tỷ lệ tạo mô sẹo từ nguồn vật liệu này thấp hơn khá nhiều khi so sánh với lá non và đỉnh chồi, tỷ lệ thu được là 55,1 – 72,3% (trên môi trường CP) và 52,3 – 70,6 % (trên môi trường CD), mô sẹo chủ yếu hình thành ở 2 đầu cuống và có màu nâu đen, ướt, nhớt. Bên cạnh đó, tốc độ sinh trưởng của mô sẹo từ cuống lá chậm, kém hơn so với tốc độ sinh trưởng từ lá non, đỉnh chồi. Do sự sinh trưởng kém của mô sẹo cuống lá nên chúng tôi không lựa chọn nguồn nguyên liệu này để tiến hành các thí nghiệm tiếp theo. Tương tự, khi nghiên cứu giống sắn TMS 60444 và TME 14 cũng nhận thấy đỉnh sinh trưởng và chồi nách khi nuôi cấy trên môi trường bổ sung 10 mg/l picloram thích hợp cho quá trình tạo mô sẹo và giảm đi sự tích lũy các mô sẹo dễ hỏng (Bull *et al.*, 2009; Nyaboga *et al.*, 2015).

Lá non, đỉnh chồi sau khi được cảm ứng mô sẹo hầu hết các khối mô có màu trắng kem, vàng tươi, mô sẹo mới hình thành là những hạt nhỏ li ti và xốp có màu trắng, vàng nhạt, sinh trưởng tốt trên môi trường

CP nhưng ở môi trường CD mô sẹo lại có màu nâu, ướt, nhớt, sinh trưởng khá. Bên cạnh đó, tốc độ sinh trưởng của mô sẹo từ cuống lá chậm hơn so với tốc độ sinh trưởng từ lá non, đỉnh chồi, mô sẹo chủ yếu hình thành ở 2 đầu cuống và có màu nâu đen, ướt, nhớt. Do đó, chúng tôi không lựa chọn nguồn nguyên liệu này để tiến hành các thí nghiệm tiếp theo.

Từ các kết quả nghiên cứu trên cho thấy, nguyên liệu phù hợp nhất để tạo mô sẹo ở các giống sắn địa phương là đỉnh chồi, tỷ lệ tạo mô sẹo đạt > 80%, mô sẹo sinh trưởng, phát triển tốt. Môi trường CP (MS bổ sung 10 mg/l Picloram) là phù hợp để đánh giá tỷ lệ từ mô sẹo phát sinh phôi soma ở các bước tiếp theo (Hình 1).

#### Ảnh hưởng của chất điều hoà sinh trưởng (Picloram và IBA) đến khả năng phát sinh phôi

Ở thí nghiệm này, mô sẹo từ đỉnh chồi của 5 giống sắn thu được trên môi trường CP sau 3 tuần bắt đầu xuất hiện phôi ở giai đoạn đầu tiên được chuyển lên môi trường CI<sub>1-4</sub>. Trong đó, thành phần môi trường CI gồm: MS + 5mg/l picloram + (0,1; 0,2; 0,3; 0,4) mg/l IBA + 20 g/l sucrose + 2,8g/l gellan. Chúng tôi thu được kết quả như trong Bảng 2.

Trong nghiên cứu, hầu hết các giống sắn có xu thế tăng dần tỷ lệ tạo phôi soma sau 4, 6, 8 tuần và đạt cao nhất ở tuần thứ 8. Tuy nhiên tỷ lệ phôi soma ở các công thức có bổ sung IBA là khác nhau.

Giống sắn S1 và S5 có tỷ lệ tạo phôi soma cao nhất trên môi trường CI<sub>2</sub> là: 76,4% và 80,4%. Khi nồng độ IBA tăng lên 0,3 – 0,4 mg/l, khả năng tạo phôi bắt đầu có xu hướng giảm xuống 68,1% – 50,2% (S1) và 72,1% – 69,3% (S5). Tương tự, ở

giống S2, S3, S4, tỷ lệ tạo phôi đạt cao nhất (41,1 – 60,3%). Tuy nhiên, đây là tỷ lệ khá thấp khi so sánh với 2 giống S1 và S5. Đặc biệt thấp hơn khá nhiều khi so với giống KM 94, KM 140 và TMS 60444 của một số nghiên cứu trước đây (Đỗ Xuân Đồng *et al.*, 2012; Nguyễn Văn Đồng *et al.*, 2014).

**Bảng 2.** Tỷ lệ mô sẹo phát sinh phôi trên môi trường Cl<sub>1-4</sub> (sau 4, 6, 8 tuần).

Tên giống	Môi trường	Tỷ lệ tạo phôi (%)		
		4 tuần	6 tuần	8 tuần
S1	Cl <sub>1</sub>	20,6 ± 0,11	43,8 ± 0,20	61,2 ± 0,30
	Cl <sub>2</sub>	34,9 ± 0,17	57,3 ± 0,28	76,4 ± 0,38
	Cl <sub>3</sub>	23,7 ± 0,11	44,2 ± 0,22	68,1 ± 0,34
	Cl <sub>4</sub>	30,6 ± 0,15	45,9 ± 0,23	50,2 ± 0,25
S2	Cl <sub>1</sub>	17,2 ± 0,08	38,6 ± 0,19	59,7 ± 0,29
	Cl <sub>2</sub>	21,4 ± 0,12	55,3 ± 0,27	60,3 ± 0,30
	Cl <sub>3</sub>	22,6 ± 0,11	40,2 ± 0,20	58,2 ± 0,27
	Cl <sub>4</sub>	25,4 ± 0,12	35,1 ± 0,17	50,0 ± 0,23
S3	Cl <sub>1</sub>	15,3 ± 0,23	29,6 ± 0,18	41,1 ± 0,34
	Cl <sub>2</sub>	16,4 ± 0,15	32,5 ± 0,26	44,5 ± 0,19
	Cl <sub>3</sub>	18,9 ± 0,21	37,7 ± 0,21	46,8 ± 0,25
	Cl <sub>4</sub>	20,5 ± 0,33	40,2 ± 0,18	52,2 ± 0,38
S4	Cl <sub>1</sub>	18,1 ± 0,22	33,4 ± 0,22	49,7 ± 0,37
	Cl <sub>2</sub>	21,9 ± 0,34	38,7 ± 0,11	50,2 ± 0,26
	Cl <sub>3</sub>	24,6 ± 0,18	40,5 ± 0,19	53,4 ± 0,13
	Cl <sub>4</sub>	22,8 ± 0,21	41,3 ± 0,25	55,5 ± 0,35
S5	Cl <sub>1</sub>	25,8 ± 0,12	56,2 ± 0,26	69,7 ± 0,34
	Cl <sub>2</sub>	30,4 ± 0,15	69,3 ± 0,33	80,4 ± 0,41
	Cl <sub>3</sub>	35,2 ± 0,17	66,3 ± 0,32	72,1 ± 0,35
	Cl <sub>4</sub>	33,4 ± 0,16	60,1 ± 0,31	69,3 ± 0,32

Khi tăng nồng độ IBA lên 0,4 mg/l chúng tôi nhận thấy khả năng tạo phôi soma có xu hướng giảm và điều này có thể lý giải rằng nồng độ auxin quá cao đã gây ức chế quá trình phân chia khung tế bào hoặc điều kiện này có thể đã gây ra một phản ứng stress ở các tế bào gây kìm hãm cũng như làm giảm khả năng tạo phôi soma. Có lẽ do chính sự tăng auxin và cytokinin nội sinh ở giai đoạn này đã giúp cho sự phát triển phôi tăng cao. Kết quả này phù hợp với các nghiên cứu khác (Vũ Văn Kiên, Nguyễn Du Sanh, 2011; Đỗ Xuân Đồng *et al.*, 2012; Nguyễn Văn Đồng *et al.*, 2014).

Song song với việc nghiên cứu tỷ lệ tạo phôi soma ở 5 giống sắn (Hình 2) chúng tôi đã quan sát, đánh giá đặc điểm mô sẹo phôi hoá ở các độ tuổi khác nhau sau 4, 6, 8 tuần. Ở giống sắn S1 khối mô màu xanh nhạt, tua dài, chuẩn bị chuyển sang giai đoạn kéo dài tạo thành cây, S2 và S5 ở tuần thứ 6

khối mô vàng tươi, các tế bào không đồng nhất về hình dạng và kích thước; giống S3 và S4 khối mô có màu trắng kem, hình dạng tua ngắn, mô còn non. Các khối mô vẫn có xu hướng tăng dần ở tuần 4, 6, 8 và sang tuần thứ 8 tỷ lệ tạo phôi ở các khối mô đạt cao nhất ở mỗi công thức thí nghiệm và mỗi giống. Thời điểm này mô đã chuyển màu nâu đậm ở giống S1 và S5, có nhiều dịch nhầy, không có hiện tượng gia tăng kích thước; ba giống còn lại S2, S3 và S4 còn xuất hiện màu nâu, đốm đen và khô dần. Như vậy, tỷ lệ mô sẹo có khả năng phát sinh phôi đạt cao nhất ở giống S1 và S5 (76,4 – 80,4%) và thấp nhất ở giống S3 (34,5%) sau 8 tuần.

**Kết quả tạo cây con từ phôi soma**

Những cụm phôi trưởng thành sẽ được chuyển lên môi trường thích hợp để kích thích phôi soma nảy mầm. Sau khoảng 8 – 10 tuần trên môi trường nuôi cấy

cụm phôi hóa bắt đầu bật chồi, lúc này chồi thật xuất hiện và phát triển nhanh. Tùy thuộc vào thành phần môi trường bổ sung các chất thuộc nhóm cytokinin khác nhau, mỗi khối mô sẹo phôi hóa có thể tạo từ 2 đến nhiều chồi sau khoảng 4 tuần (Bull *et al.*, 2009). Điều này chứng tỏ các giống sản địa phương cũng có khả

năng tái sinh thông qua con đường phôi soma và khả năng tái sinh này rất tốt, thể hiện ở chỗ các chồi tạo thành có hình thái bình thường, sinh trưởng phát triển mạnh. Trên cả 5 giống S1, S2, S3, S4 và S5 các cụm phôi soma đều có tỷ lệ nảy mầm nhất định ở tất cả các công thức thí nghiệm (Bảng 3).

**Bảng 3.** Tỷ lệ phôi soma tạo cây con (sau 4 tuần).

Môi trường	Tỷ lệ phôi soma tạo thành cây con (%)				
	Giống				
	S1	S2	S3	S4	S5
CN <sub>1</sub>	23,6 ± 0,18	20,3 ± 0,10	19,2 ± 0,34	20,1 ± 0,22	32,0 ± 0,16
CN <sub>2</sub>	<b>68,7 ± 0,30</b>	40,0 ± 0,19	25,6 ± 0,17	28,4 ± 0,11	<b>81,0 ± 0,40</b>
CN <sub>3</sub>	39 ± 0,19	32,6 ± 0,16	33,8 ± 0,12	32,7 ± 0,31	41,7 ± 0,20
CN <sub>4</sub>	27 ± 0,13	30,8 ± 0,15	29,2 ± 0,28	35,5 ± 0,24	38,1 ± 0,19

Giống S5 có tỷ lệ phôi soma tạo thành cây con cao nhất đạt 81% ở nồng độ 0,3 mg/l BAP so với môi trường không bổ sung BAP là 32,0% và tương tự trên giống S1, S2 tỷ lệ phôi soma tạo thành cây con khi bổ sung 0,3 mg/l BAP lần lượt là: 68,7% và 40%. Tuy nhiên, ở 2 giống S3 và S4 tỷ lệ tạo cây con thấp (25,6 – 28,4%). Bên cạnh đó, khi tăng nồng độ BAP lên 0,6 mg/l và 0,9 mg/l chúng tôi nhận thấy tỉ lệ cụm phôi trưởng thành tạo cây con có xu hướng giảm. Cụ thể: Từ 68,7% xuống 39% và còn 27% ở giống S1; ở giống S2 giảm từ 40% xuống 32,6% và ở giống S5 từ 81,0% xuống 38,1% nhưng giống S3 tăng lên 33,8% ở môi trường CN<sub>3</sub> và S4 tăng lên 35,5% trên môi trường CN<sub>4</sub>. Như vậy, nồng độ BAP không tỷ lệ thuận với tỷ lệ bật chồi, nồng độ BAP tăng nhưng tỷ lệ bật chồi không tăng mà còn giảm ở 3 giống S1, S2, S5; tăng nhẹ ở S3, S4 nhưng lại gây biến dị mẫu chồi, làm ảnh hưởng đến quá trình hình thành cây sản.

Tóm lại, ở 5 giống sản được nghiên cứu đã có sự sai khác về tỷ lệ nảy mầm thành cây con từ phôi

soma trưởng thành ở cùng nồng độ BAP 0,3 mg/l (25,6 – 81,0%). Trong đó, giống S5 có tỷ lệ nảy mầm thành cây con cao nhất đạt 81,0%, sau đó là giống S1 có tỷ lệ nảy mầm là 68,7%, kém nhất là S3 là 25,6% và chủ yếu là các chồi đơn.

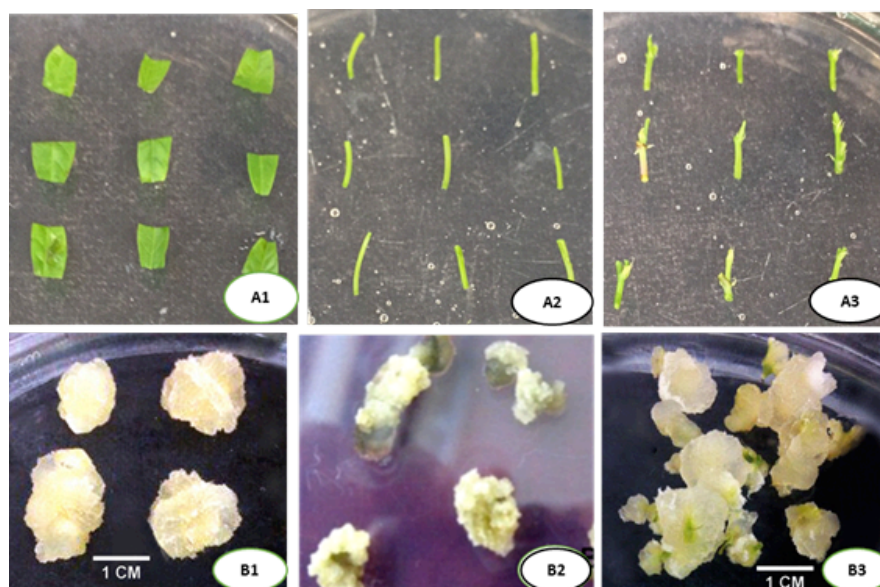
**Khả năng tạo cây hoàn chỉnh và ra cây**

Từ những kết quả đã nghiên cứu cho thấy, các chồi sản tái sinh từ 5 giống S1, S2, S3, S4 và S5 đạt chiều cao từ 1,5 cm đến 2,0 cm được chuyển sang môi trường MS để tạo rễ sau 3 tuần nuôi cấy, khả năng ra rễ nhanh và đạt tỷ lệ hơn 80% trên cả 5 giống sau 2 tuần và đạt 100% sau 3 tuần. Số lượng rễ dao động từ 2 đến 3 rễ/chồi, dài 3 - 5 cm/rễ. Những công thức thí nghiệm môi trường MS có bổ sung chất ĐTST chồi cây sản vẫn ra rễ bắt đầu từ tuần thứ 2 nhưng số lượng rễ ít, mập và ngắn. Như vậy, cây sản phù hợp với ra rễ trên môi trường MS không cần bổ sung chất điều tiết sinh trưởng.

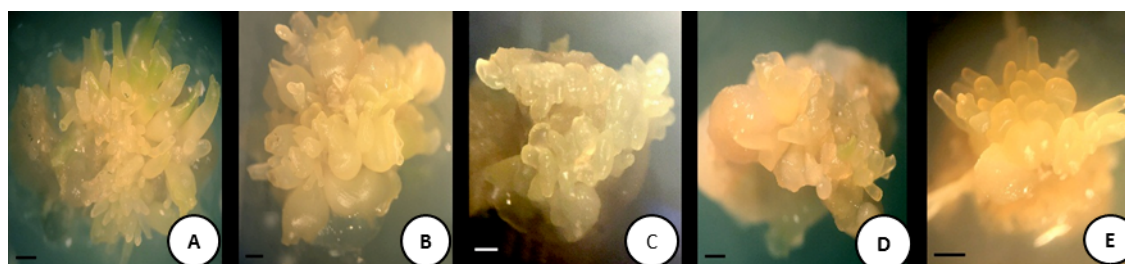
Khả năng tái sinh thành cây hoàn chỉnh từ mô sẹo phôi hóa được thể hiện trên Bảng 4:

**Bảng 4.** Khả năng tái sinh thành cây hoàn chỉnh từ mô sẹo phôi hóa.

Giống	Cụm mô sẹo phôi hoá	Các chỉ tiêu theo dõi		
		Thời gian xuất hiện chồi (ngày)	Thời gian xuất hiện rễ (ngày)	Tỷ lệ tái sinh cây hoàn chỉnh (%)
S1	150	20,7	56,3	61,67
S2	150	24,3	64,2	35,33
S3	150	28,9	67,5	21,20
S4	150	27,1	62,8	24,54
S5	150	23,8	58,7	60,36
	Trung bình	25,0	62,9	40,62



**Hình 1.** Mô sẹo từ các nguồn nguyên liệu khác nhau. A1, A2, A3: Mảnh lá, cuống và đỉnh chồi cây trên môi trường tạo mô sẹo CP; B1, B2, B3: Mô sẹo của lá, cuống và đỉnh chồi trên môi trường CP sau 3 tuần nuôi cấy.



**Hình 2.** Các khối mô sẹo phân hóa các giai đoạn mô phôi khác nhau ở 5 giống sắn thí nghiệm (sau 6 tuần); A: S1; B: S2; C: S3; D: S4; E: S5; 1 bar: 0.1 cm.



**Hình 3.** Chồi và cây sắn tái sinh từ mô sẹo phân hóa. A: cụm phôi đang nảy mầm; B: cây con; C: cây sắn trên môi trường ra rễ.

Các cụm mô sẹo phôi hóa từ 5 giống sắn nghiên cứu khi được nuôi cấy trong môi trường kích thích phôi soma nảy mầm trên môi trường MS bổ sung 0,3mg/l BAP đều có khả năng bật chồi sau 20 – 29 ngày. Tuy nhiên, trong số 750 cụm mô sẹo phôi hóa ở các giống sắn chúng tôi nhận thấy số chồi không bị biến dị, phát triển tốt, trung bình đạt 40,62% và các chồi này tiếp tục được chuyển đến môi trường ra rễ MS. Sau khoảng 56 – 63 ngày rễ bắt đầu xuất hiện từ các chồi phát triển tốt ở các giống sắn nghiên cứu, tỷ lệ tái sinh cây hoàn chỉnh từ 21,20 – 61,67% (Bảng 4). Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Đỗ Xuân Đồng *et al.*, (2012) và cao hơn nhiều khi nghiên cứu trên giống KM140 của Nguyễn Văn Đồng *et al.*, (2014).

Cây sắn hoàn chỉnh được đưa ra khỏi phòng thí nghiệm để cây con dần thích nghi với điều kiện tự dưỡng bằng cách trồng trong giá thể TN01 và tưới hun với tỉ lệ 6:4, tránh ánh sáng chiếu trực xạ và chăm sóc cây ở điều kiện cung cấp đầy đủ nước và dinh dưỡng. Tỷ lệ cây sống, sinh trưởng và phát triển tốt khi ra vườn ươm trung bình ở các giống đạt 95%.

#### KẾT LUẬN

Nguồn vật liệu phù hợp cho các giống sắn tạo phôi soma là đỉnh chồi và giống S1 đạt tỷ lệ tái sinh cây hoàn chỉnh cao nhất trong 5 giống nghiên cứu (61,2%). Môi trường thích hợp tạo mô sẹo là môi trường MS bổ sung 10 mg/l Picloram (CP). Môi trường tạo phôi thích hợp là môi trường MS bổ sung 5 mg/l picloram và 0,2 mg/l IBA (CI<sub>2</sub>). Môi trường kích thích phôi soma nảy mầm là môi trường MS bổ sung 0,3 mg/l BAP (CN<sub>2</sub>). Môi trường tái sinh cây hoàn chỉnh là MS bổ sung 1 mg/l CuSO<sub>4</sub>. Giá thể thích hợp để ra cây sắn ở vườn ươm là: Giá thể TN1: tưới hun với tỉ lệ 6:4. Tỷ lệ cây sống khi ra vườn ươm trung bình ở các giống đạt 95%.

**Lời cảm ơn:** Công trình được hoàn thành với sự hỗ trợ kinh phí của đề tài: “Khai thác và phân lập nguồn gen có sẵn của tập đoàn giống sắn Việt Nam nhằm phát triển các giống sắn có khả năng chống chịu bệnh và năng suất cao bằng công nghệ gen” thuộc nhiệm vụ hợp tác quốc tế về khoa học và công nghệ. Các thí nghiệm này được thực hiện tại Phòng Công nghệ tế bào thực vật, Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Bull SE, Owiti JA, Niklaus M, Beeching JR, Grüssler W, Vanderschuren H (2009) *Agro* - mediated transformation of friable embryogenic calli and regeneration of transgenic cassava. *Nat Protoc* 4: 1845–1854.
- Đỗ Xuân Đồng, Đỗ Hải Lan, Phạm Bích Ngọc, Lê Văn Sơn, Lê Trần Bình, Chu Hoàng Hà (2012) Nghiên cứu hệ thống tái sinh cây sắn (*Manihot esculenta* Crantz) thông qua phôi soma từ đỉnh chồi. *Tạp chí Công nghệ Sinh học* 10(3): 527 – 533.
- Nguyễn Văn Đồng, Nguyễn Anh Vũ, Lê Tiến Dũng, Tống Thị Hương, Lê Thị Ngọc Quỳnh, Lê Thị Lý, Vũ Anh Thu, Vũ Hoàng Nam, Vũ Thế Hà, Lê Huy Hàm, Chikako Utsumin, Yoshinori Utsumin, Motoaki Seki (2014) Kết quả tạo mô sẹo phôi hóa phục vụ cho chuyển gen vào cây sắn. *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển nông thôn*, 8(1): 29 – 35.
- Đoàn Thị Phương Thùy, Bùi Trang Việt (2006) Tìm hiểu sự phát sinh phôi thể hệ từ mô sẹo có nguồn gốc lá khoai mì (*Manihot esculenta* Crantz.) dòng củồng trâu. *Tạp chí KHKT Nông Lâm nghiệp* 1: 19 – 23.
- Hoàng Kim, Nguyễn Đăng Mãi (2011) *Sắn Việt Nam: Hiện trạng, định hướng và giải pháp phát triển những năm đầu thế kỷ 21*. Thông tin về hội thảo sắn Việt Nam lần thứ 10 tại thành phố Hồ Chí Minh ngày 13-14/3/2011. Nhà xuất bản Nông nghiệp (chi nhánh phía Nam), 230 trang (sách chuyên khảo).
- Hoang Kim, Nguyen Van Bo, Hoang Long, Nguyen Trong Hien, Hernan Ceballos and Reinhardt Howeler (2010) *Current situation of cassava in Viet nam*. In CIAT (R.H Howeler editor) A new future for cassava in Asia: Its use as food, feed and fuel to benefit the poor, 8<sup>th</sup> Asian Cassava Research Workshop October 20-24, 2008 in Vientiane, Lao PDR. p. 100 – 112.
- Li H-Q, Huang YW, Liang CY, Guo JY, Liu HX, Potrykus I, Puonti-Kaerlas J (1998) Regeneration of cassava plants via shoot organogenesis. *Plant Cell Rep* 17: 410 – 414.
- Nyaboga EN, Njiru JM, Tripathi L (2015) Factors influencing somatic embryogenesis, regeneration, and *Agrobacterium* - mediated transformation of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) cultivar TME14. *Front Plant Sci* 6: 411.
- Schopke C, Taylor N, Ca'rcamo R, Konan NK, Marmey P, Henshaw GG, Beachy RN, Fauquet C (1996) Regeneration of trans-genic cassava plants (*Manihot esculenta* Crantz) from microbom - barded embryogenic suspension cultures. *Nat Biotechnol* 14: 731 – 735.
- Taylor NJ, Edwards M, Kiernan RJ, Davey CDM, Blakesley D, Henshaw GG (1996) Development of friable embryogenic callus and embryogenic suspension culture systems in cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *Nat Biotechnol* 14: 726 – 730.

Vũ Văn Kiên, Nguyễn Du Sanh (2011) Khảo sát sự phát sinh phôi thể hệ ở khoai mì. *Tạp chí Phát triển Khoa học và Công nghệ* 14(3): 14 – 20.

Zhang P, Puonti-Kaerlas J (2000) PIG-mediated cassava transformation using positive and negative selection. *Plant Cell Rep* 19: 1041 – 1048.

## STUDYING ON REGENERATION OF SEVERAL CASSAVA VARIETIES (*MANIHOT ESCULENTA* CRANTZ) VIA FRIABLE EMBRYOGENIC CALLUS

Nguyen Thi Minh Hong<sup>1,2</sup>, Nguyen Thi Hoai Thuong<sup>1</sup>, Pham Bich Ngoc<sup>1</sup>, Chu Hoang Ha<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Institute of Biotechnology, Vietnam Academy of Science and Technology*

<sup>2</sup>*Hong Duc University*

### SUMMARY

Cassava (*Manihotesculenta* Crantz) is considered as one of the most important food crops which has high economic value in many areas. It is very necessary to perfect the cassava regeneration protocol for genetic transformation purpose. In this study, cassava regeneration via friable embryogenic callus (FEC) from tip bud, young stem, pieces of leaf had been optimized in five cassava varieties which were planted in Vietnam including KM 140 (S1), NgheAn white cassava (S2), Lang Son red cassava (S3), HoaBinh high – yield cassava (S4) and Huay Bong (S5). The results indicated that on MS medium supplemented with 10 mg/l Picloram, the proportion of callus formation was very high, reached from 90 to 100%. In the case of using tip buds, after three weeks, calli were transferred to MS medium adding 5 mg/l picloram and 0,2 mg/l IBA. The proportion of FEC formation reached 41,1 – 80,4 % after 8 weeks of cultivation in all studied Cassava varieties. The samples were transferred to MS medium adding 0,3 mg/l BAP to elongate shoots in 4 weeks. The highest regeneration rate belonged to S1, and was 61,67%. Three weeks after shoot transferring on MS medium, the complete seedlings were grown in substrate which was composed by TN01 and husk hun with ratio of 6:4 in greenhouse. As a result, the rate of survival plants reached to 95%. The process of regeneration of cassava through embryonic calli could be applied for the improvement of desired cassava varieties by method of genetic engineering.

**Keywords:** *Callus, cassava, FEC (Friable embryogenic callus), fragment of leaf, tip bud, young stem.*