

Evaluation of the materials for introgression of multiple blast resistant genes into the 'BC15' rice variety by molecular markers

Nguyen Thi Minh Nguyet, Nguyen Ba Ngoc, Nguyen Thi Nhai,
Chu Duc Ha, Ta Hong Linh, Dao Van Khoi, Pham Xuan Hoi, Le Hung Linh

Abstract

Improvement of the blast resistance in rice varieties by marker-assisted backcrossing (MABC) approach has been regarded as one of the most effective tools. In this study, a comprehensive investigation of the genotypes and phenotypes of improved 'BC15' rice lines harboring two blast resistant genes, *Pik-h* and *Piz-5*, was carried out. Particularly, the BC₃F₃ populations exhibited high resistance to the blast isolates under greenhouse condition. The presence of *Pik-h* and *Piz-5* genes and the genetic background of these individuals were then validated and confirmed by PCR technique with a collection of specific SSR markers. As a result, three individuals, A2.1.15.3.3, A2.1.19.9.8 and A2.1.26.3.12, were obtained to expand the populations in the fields. We found that the whole three lines that shared similar agronomical traits with the original BC15 rice variety, resistance to blast disease (scored ≤ 3). Among them, the A2.1.15.3.3 line was selected to develop a promising line for further studies. Taken together, our study could provide a basic understanding of the improvement of stress tolerance in rice varieties by the MABC approach.

Keywords: Rice (*Oryza sativa*), resistance, blast disease, molecular marker, BC15

Ngày nhận bài: 22/8/2020
Ngày phản biện: 14/9/2020

Người phản biện: TS. Trần Đức Trung
Ngày duyệt đăng: 02/10/2020

KẾT QUẢ BAN ĐẦU TRONG NGHIÊN CỨU TẠO TẾ BÀO TRẦN TỪ MÔ SẸO PHÔI HÓA CỦA MỘT SỐ GIỐNG SẢN VIỆT NAM

Phạm Thị Hương¹, Đỗ Thị Như Quỳnh¹, Nguyễn Anh Vũ¹

TÓM TẮT

Nhằm mục đích xây dựng hệ thống chỉnh sửa gen không chuyển gen, sử dụng ribonucleoprotein Cas9 trên đối tượng cây sắn, chúng tôi đã nghiên cứu tạo mô sẹo phôi hóa (MSPH) và tế bào trần (TBT) từ mô sẹo phôi hóa của các giống sắn BK, KM94 và KM140. MSPH của các giống sắn BK, KM94 và KM140 đã được tạo thành công với tỉ lệ lần lượt đạt 22,6%, 21,8% và 22,4%. Nghiên cứu tỉ lệ các enzyme phân giải thành tế bào cellulase, macerozyme và pectolyase cho thấy tổ hợp enzyme 10 g/l cellulase RS Onozuka + 400 mg/l macerozyme + 100 mg/l pectolyase với thời gian ủ 18 giờ cho sản lượng TBT cao trên hai giống sắn KM94 và KM140 lần lượt đạt $1,09 \times 10^7$ và $1,06 \times 10^7$ TBT/g trọng lượng tươi của mẫu. Nghiên cứu cũng chỉ ra sản lượng TBT có sự khác biệt giữa các MSPH được cấy chuyển với tần suất khác nhau. Sản lượng và khả năng sống sót của TBT giống giống KM94 và KM140 đạt cao nhất ở thời điểm MSPH được cấy chuyển 4 tuần/lần. Khả năng tái sinh của TBT giống KM140 sau tách được đánh giá khi nuôi cấy ở các mật độ khác nhau 1×10^4 , 1×10^5 , 3×10^5 , 5×10^5 , mật độ 3×10^5 cho hiệu quả tái sinh cao nhất.

Từ khóa: Cây sắn (*Manihot esculenta* Crantz), mô sẹo phôi hóa, tế bào trần

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Sắn (*Manihot esculenta* Crantz) là cây lương thực chính của hơn 500 triệu người trên thế giới, đặc biệt là ở các nước châu Phi, nơi cây sắn được coi là giải pháp an ninh lương thực hàng đầu để chống tình trạng suy dinh dưỡng. Ở Việt Nam, cây sắn đã chuyển đổi vai trò từ cây lương thực thành cây công nghiệp, sản xuất sắn là nguồn thu nhập quan trọng của các hộ nông dân nghèo tại các huyện vùng núi

do sản dễ trồng, ít kén đất, ít vốn đầu tư, phù hợp sinh thái và điều kiện kinh tế nông hộ.

Hiện nay, các giống sắn mới tại Việt Nam được tạo ra chủ yếu thông qua lai tạo truyền thống và nhập nội từ CIAT sau đó được chọn tạo và khảo nghiệm để tuyển chọn thích hợp với từng vùng sinh thái. Một trong những định hướng nghiên cứu phát triển sắn của Việt Nam từ 2012 đến 2020 đó là kết hợp giữa phương pháp lai tạo giống truyền thống

¹ Viện Di truyền Nông nghiệp

và phương pháp lai tạo giống hiện đại như chuyển gen hoặc đột biến gen tạo giống sản có năng suất cao, chất lượng tốt, kháng bệnh. Hiện nay, công nghệ chỉnh sửa gen đang dần thay thế cho công nghệ chuyển gen do việc thiết kế cấu trúc chỉnh sửa gen đơn giản. Trong số các hệ thống chỉnh sửa gen đang được sử dụng hiện nay, hệ thống chỉnh sửa gen thông qua ribonucleoprotein trong đó các tác nhân chỉnh sửa gen như sg RNA và protein Cas9 được tổng hợp và kết hợp trong ống nghiệm tạo thành phức hợp ribonucleoprotein (RNP) hoạt động. So với hệ thống chỉnh sửa gen thông qua chuyển gen, hệ thống này không chuyển bất cứ một gen nào trong cây đích, do đó cây được chỉnh sửa gen không phải là cây chuyển gen. Vật liệu lý tưởng cho hệ thống chỉnh sửa gen thông qua RNP là TBT do khả năng tiếp nhận RNP, tái sinh thành cây hoàn chỉnh và dễ dàng xác định hiệu quả đột biến gen mục tiêu (Woo *et al.*, 2015). Việc phân lập các đột biến từ nuôi cấy TBT cũng được thực hiện dễ dàng hơn.

TBT là các tế bào thực vật không có thành tế bào nhưng màng nguyên sinh chất và các thành phần tế bào khác vẫn giữ nguyên, do đó vẫn đảm bảo khả năng tái sinh thành cây hoàn chỉnh. Nghiên cứu tạo và tái sinh TBT được thực hiện trên nhiều đối tượng cây trồng khác nhau và từ nguồn nguyên liệu khác nhau bao gồm: thịt lá, lá mầm, trụ dưới lá mầm, lá, rễ và lông tơ, mô sẹo phôi hóa.

Các nghiên cứu về tạo và tái sinh TBT ở cây sản rất hạn chế, do quá trình tái sinh cây hoàn chỉnh từ TBT ở cây sản tương đối khó, nghiên cứu của tác giả Shadin và Shephard (1980) đã công bố kết quả tái sinh cây thành công từ TBT tách từ thịt lá, tuy nhiên việc lặp lại kết quả đó không thành công bởi các tác giả khác (Anonymous 1985; Nzoghe, 1989; Anthony *et al.*, 1995; Sofiari 1996), mặc dù tỉ lệ sống sót của TBT sau khi tách đạt 85%.

Năm 1996, Sofiari cũng đã tiến hành nghiên cứu sử dụng các vật liệu tách TBT từ mô phân sinh đỉnh, lá non và phôi soma, tuy nhiên TBT tách từ những vật liệu này khi tái sinh cho callus màu xanh và rễ bất định. Sau đó, cùng với nghiên cứu về dạng mới của phôi soma Sofiari đã sử dụng MSPH làm vật liệu tách TBT và đã đưa đến thành công trong tái sinh cây hoàn chỉnh từ nuôi cấy TBT giống sản TMS60444. Tỉ lệ tái sinh cây hoàn chỉnh đạt được là $1 \text{ cây}/2 \times 10^4$ TBT nuôi cấy.

Tại Việt Nam, nghiên cứu tạo TBT và dung hợp TBT đã được tiến hành trên một số đối tượng cây trồng khác như cam, khoai tây, chuối Cau Mãn.... Tuy nhiên, chưa có nghiên cứu nào về tạo TBT trên

cây sản. Do đó, đây là hướng nghiên cứu mới và cần thiết phải thực hiện góp phần tạo nền tảng cho việc thực hiện các nghiên cứu cải tạo giống sản sau này. Chính vì vậy, chúng tôi đã tiến hành tạo tế bào trần trên cây sản thuộc đề tài “Nghiên cứu tạo tế bào trần và tái sinh cây hoàn chỉnh phục vụ chọn tạo giống sản kháng virus” của Phòng thí nghiệm Trọng điểm Công nghệ Tế bào thực vật.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Cây sản *in vitro* của các giống KM94, KM140 và BK lưu giữ tại Phòng thí nghiệm Quốc tế chọn giống phân tử cây sản, Phòng thí nghiệm Trọng điểm Công nghệ Tế bào thực vật, Viện Di truyền Nông nghiệp được sử dụng để tạo MSPH và TBT.

- Giống sản KM94: Là con lai của tổ hợp lai Rayong1 × Rayong90. KM94 thuộc nhóm sản đắng, thân cong ở phần gốc, ngọn tím, năng suất củ tươi 28,1 tấn/ha, hàm lượng tinh bột 27,4%-29%

- Giống sản KM140: Là con lai của tổ hợp KM98-1 × KM36. KM140 có thân xanh, thẳng, ngọn xanh, cây cao vừa phải, không phân nhánh. Năng suất củ tươi 33,4 - 35,0 tấn/ha.

- Giống sản BK: Có nguồn gốc từ quần thể hạt thụ phấn tự do của giống BKA900, có thời gian sinh trưởng trung bình 9 - 10 tháng, có tỷ lệ tinh bột đạt 25 - 27%, năng suất củ tươi đạt trên 50 tấn/ha.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phương pháp tạo mô sẹo phôi hóa của một số giống sản

Phương pháp tạo MSPH dựa trên nghiên cứu của tác giả Tống Thị Hường và cộng tác viên (2018) và tác giả Utsumi và cộng tác viên (2017).

Quy trình tạo MSPH được tóm tắt như sau:

Cây *in vitro* (4 - 8 tuần tuổi) → tách chồi nách nuôi cấy trên môi trường CAM 4-7 ngày trong điều kiện tối → tạo phôi soma sơ cấp (CIM, 3 tuần, 28°C, điều kiện tối) → phôi soma thứ cấp, 3 tuần, 28°C, điều kiện tối → chọn lọc phôi soma (DKW, 2 tuần, 28°C, điều kiện tối) → tạo MSPH (MMS, cấy chuyển 3 - 4 tuần/lần × tối đa 6 tháng, 28°C, điều kiện tối).

Các môi trường sử dụng trong quá trình tạo MSPH:

+ Môi trường MS (môi trường nuôi cấy cây sản): 0,44% MS bột chứa vitamin, 2 μM CuSO₄, 2% sucrose, 0,8% Noble agar, pH 5,8.

+ Môi trường CAM (môi trường kích thích chồi bên): 0,44% MS bột chứa vitamin, 2 μM CuSO₄, 10 mg/l BAP, 2% sucrose, 0,8% Noble agar, pH 5,8.

+ Môi trường CIM (môi trường tạo phôi soma): 0,44% MS bột chứa vitamin, 2 μM CuSO_4 , 12 mg/l picloram, 2% sucrose, 0,8% Noble agar, pH 5,8.

+ Môi trường DKW (môi trường chọn lọc phôi soma): 0,522% DKW bột chứa vitamin, 2 μM CuSO_4 , 12 mg/l picloram, 2% sucrose, 0,8% Noble agar, pH 5,8.

+ Môi trường tạo mô sẹo phôi hóa MMS: 1/10 nền khoáng MS, 12 mg/l picloram, 2% sucrose, 0,8% Noble agar, pH 5,8.

2.2.2. Phương pháp phân lập tế bào trần từ mô sẹo phôi hóa

Phương pháp phân lập TBT từ MSPH được áp dụng theo Feng và cộng tác viên (2020) có cải tiến môi trường cho nuôi cấy MSPH sử dụng môi trường MMS (1/10 MS + 20 g/l sucrose + 10 g/l agar + 12 mg/l picloram) như sau:

Thu mẫu sau khi nuôi huyền phù trong môi trường SH6 sau 5 ngày. Ủ mẫu với dung dịch enzyme phân giải, lắc mẫu 50 vòng/phút, trong 18 giờ ở 28°C, điều kiện tối. Mô sau phân giải được lọc qua màng lọc 80 μm (Nybolt, Switzerland). Dung dịch sau lọc được chuyển vào ống ly tâm 12 ml và ly tâm ở 960 vòng/phút trong 6 phút. Loại bỏ dịch nổi, hòa tan kết tủa sau ly tâm trong 1,0 - 1,5 ml dung dịch mannitol 13% chứa dung dịch thu TBT CPW. Sau đó, thêm nhẹ nhàng 1,5 ml dung dịch mannitol 13% có chứa TBT lên trên dung dịch 26% sucrose có chứa CPW. Ly tâm 960 vòng/phút trong 6 phút. TBT sống sót được hình thành ở giữa hai lớp dung dịch. Thu lớp TBT sau đó hòa tan với lượng tương đương dung dịch RS chứa 127,4 g/l mannitol và 27,75 g/l CaCl_2 . Ly tâm 960 vòng/phút trong 6 phút. TBT sau tinh sạch được hòa tan trong 1,5 ml dung dịch RS.

- Thành phần dung dịch enzyme phân giải: Hỗn hợp enzyme (cellulase, macerozyme, pectolyase), muối đa lượng (368 mg/l CaCl_2 ; 34 mg/l KH_2PO_4 ; 740 mg/l KNO_3 ; 492 mg/l $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$); muối vi lượng (19,2 mg/l Na-EDTA; 14 mg/l $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$); chất thẩm thấu (91 g/l D-mannitol) và 0,5 g/l MES.

- Dung dịch thu nhận TBT CPW + 13% mannitol: 27,2 mg/l KH_2PO_4 ; 100 mg/l KNO_3 ; 250 mg/l MgSO_4 ; 0,2 mg/l KI; 150 mg/l CaCl_2 ; 0,003 mg/l CuSO_4 ; 13% mannitol.

- Dung dịch thu nhận TBT CPW + 26% sucrose: 27,2 mg/l KH_2PO_4 ; 100 mg/l KNO_3 ; 250 mg/l MgSO_4 ; 0,2 mg/l KI; 150 mg/l CaCl_2 ; 0,003 mg/l CuSO_4 ; 26% sucrose.

Ảnh hưởng của enzyme và nồng độ enzyme đến khả năng tạo TBT từ MSPH: MSPH giống KM94 và KM140 được nuôi cấy huyền phù sau 5 ngày, được

lọc qua rây lọc có đường kính mắt lưới là 1 mm^2 . 1g mô sẹo sau sàng lọc được chuyển vào đĩa petri (đường kính 9 cm). Bổ sung thêm dung dịch enzyme phân giải theo các nồng độ sau:

CT1: 10 g/l Cellulase RS Onozuka + 200 mg/l macerozyme + 10 mg/l pectolyase.

CT2: 10 g/l Cellulase RS Onozuka + 400 mg/l macerozyme + 100 mg/l pectolyase.

CT3: 10 g/l Cellulase RS Onozuka + 600 mg/l macerozyme + 500 mg/l pectolyase.

Ảnh hưởng của thời gian xử lý enzyme đến khả năng tạo TBT từ MSPH: Dung dịch enzyme phân giải được bổ sung vào MSPH và được ủ ở các thời gian khác nhau: 16 giờ, 18 giờ và 20 giờ. Tiến hành thu TBT theo các bước đã được mô tả ở trên. Thu số liệu đánh giá ảnh hưởng của thời gian xử lý enzyme đến sản lượng và chất lượng TBT thu được.

Ảnh hưởng của tần suất cấy chuyển MSPH đến khả năng tạo TBT: MSPH được tiến hành cấy chuyển trên môi trường MMS theo các thời gian khác nhau: 2 tuần cấy chuyển/lần; 3 tuần cấy chuyển/lần và 4 tuần cấy chuyển/lần. Chuyển 1 g MSPH của giống KM94 và KM140 vào bình tam giác có chứa 50 ml dung dịch SH6 lỏng. Nuôi từ 5 - 7 ngày. Tiến hành phân lập TBT theo phương pháp của Feng và cộng tác viên (2020). Sau tách tiến hành đo đếm thu số liệu, đánh giá ảnh hưởng của tần suất cấy chuyển MSPH đến sản lượng và chất lượng TBT thu được.

2.2.3. Phương pháp đếm số lượng TBT

TBT sau khi tách được đếm trong buồng đếm hemocytometer (sâu x rộng x dài: 0,2 x 0,25 x 0,25 mm). Buồng đếm này có ô vuông nhỏ với diện tích là 0,00625 mm^2 và mỗi ô vuông to (gồm 16 ô vuông nhỏ) có diện tích là 0,1 mm^2 . Bề dày của buồng đếm là 0,2 mm.

Sản lượng TBT trong 1 ml = Số lượng TBT trung bình / (2 x 10⁻⁵).

Sản lượng TBT theo g trọng lượng tươi của mẫu = Sản lượng tế bào trong 1 ml / khối lượng MSPH làm vật liệu tách TBT.

Phương pháp đánh giá khả năng sống sót của tế bào trần: Theo Feng và cộng tác viên (2020).

Khả năng sống sót của tế bào trần được kiểm tra bằng cách sử dụng fluorescein diacetate (FDA). Thêm 6 μl của FDA (5 mg/ml) vào 250 μl dịch tế bào trần. Sau 5 phút, soi tế bào trần dưới kính hiển vi Olympus BX50 (Nhật).

Khả năng sống sót của tế bào trần thu được = Số lượng tế bào trần phát màu vàng xanh / tổng số lượng tế bào trần quan sát được x 100.

2.2.4. Phương pháp tái sinh TBT

Phương pháp tái sinh tế bào trần theo Sofari và cộng tác viên (1998) và Wen Feng và cộng tác viên (2020) có cải tiến. Tiến hành nuôi cấy tế bào trần trên môi trường nuôi cấy TM-2 (Shadin *et al.*, 1985; Sofiari *et al.*, 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 cụ thể như sau:

- Môi trường A: TM-2 (Shadin *et al.*, 1985) + 0,36 mol/l glucose - sau 2 lần bổ sung dung dịch đầu tiên.

- Môi trường B: TM-2 (Shadin *et al.*, 1985) + 0,33 mol/l glucose - sau 2 lần bổ sung dung dịch tiếp theo.

- Môi trường C: TM-2 (Shadin *et al.*, 1985) + 0,30 mol/l glucose - sau 2 lần bổ sung tiếp theo.

- Môi trường D: TM-2 (Shadin *et al.*, 1985) + 0,25 mol/l glucose - sau 2 lần bổ sung tiếp theo.

Sau khi xuất hiện vi mô sẹo trên môi trường D, hút 400 µl dịch nuôi cấy chuyển sang đĩa chứa môi trường MMS 4 (1/10 nền khoáng MS, 12 mg/l picloram, 4% sucrose, 0,8% Noble agar, pH 5,8) nuôi cấy trong thời gian 3 tuần, nhiệt độ 28 °C, trong điều kiện tối. Sau 3 tuần, cấy chuyển mẫu sang môi trường MMS 2 (1/10 nền khoáng MS, 12 mg/l picloram, 2% sucrose, 0,8% Noble agar, pH 5,8 để tạo mô sẹo phôi hóa.

Ảnh hưởng của mật độ nuôi cấy tới khả năng tái sinh của TBT: TBT sau tách sẽ được tiến hành nuôi

cấy ở các mật độ khác nhau 2×10^5 , 3×10^5 , 5×10^5 , 10×10^5 TBT/ml. Tỷ lệ tái sinh của TBT được đánh giá sau 7 ngày nuôi cấy. Tỷ lệ tái sinh TBT được tính như sau:

Tỷ lệ tái sinh = Số tế bào phân chia/tổng số tế bào nuôi cấy $\times 100\%$.

2.3. Thời gian và địa điểm nghiên cứu

Nghiên cứu được thực hiện từ tháng 8 năm 2019 đến tháng 8 năm 2020 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. Kết quả tạo mô sẹo của các giống sắn

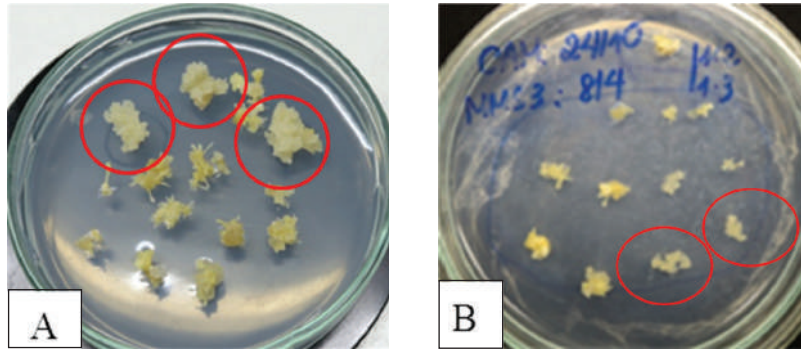
Theo các nghiên cứu tạo TBT trước đó của các tác giả, các vật liệu đã được sử dụng cho tách TBT gồm tế bào thịt lá (Shadin and Shephard, 1980; Anonymous 1985; Nzoghe, 1989; Anthony *et al.*, 1995; Sofiari 1996) và mô sẹo phôi hóa (Sofiari *et al.*, 1998; Feng *et al.*, 2020). Tuy nhiên, khả năng tái sinh của TBT tạo từ tế bào thịt lá thấp hơn rất nhiều so với từ MSPH. Do vậy, chúng tôi đã tiếp tục nghiên cứu tạo MSPH từ các giống KM94, KM140 và BK làm vật liệu cho việc phân lập TBT. Năm 2018 nhóm nghiên cứu đã thiết lập thành công quy trình tạo MSPH và tái sinh cây hoàn chỉnh đối với giống KM94 và KM140. Áp dụng quy trình này và có cải tiến, nghiên cứu hiện tại tiếp tục tạo MSPH đối với giống sắn BK, hiện đang được trồng phổ biến tại các tỉnh miền núi phía Bắc. Kết quả tạo mô sẹo giống KM94, KM140 và giống sắn BK được thể hiện ở bảng 1.

Bảng 1. Kết quả tạo mô sẹo phôi hóa giống BK, KM94 và KM140

STT	Số chồi	Số mẫu tạo mô sẹo	Số mẫu tạo mô sẹo phôi hóa	Tỷ lệ tạo mô sẹo (%)	Tỷ lệ tạo mô sẹo phôi hóa (%)
Giống BK	15,5 ± 3,6	8,3 ± 2,3	1,9 ± 1,1	62,2	22,6
Giống KM94	18,4 ± 2,3	13,3 ± 3,1	2,3 ± 0,7	83,0	21,8
Giống KM140	13,8 ± 4,05	5,7 ± 2,55	1,2 ± 0,59	41,9	22,4

Theo Taylor và cộng tác viên (1996), môi trường GD với hàm lượng MS giảm đi 1/2 là môi trường tốt nhất cho tạo mô sẹo phôi hóa. Tuy nhiên, đến năm 2017 nghiên cứu của Utsumi và cộng tác viên cho thấy dưới điều kiện giảm 1/10 hàm lượng nitrate, kali và phosphate trong môi trường MS giúp tăng tỷ lệ tạo mô sẹo phôi hóa của giống TMS. Áp dụng nghiên cứu này của Utsumi và cộng tác viên (2017) môi trường tạo mô sẹo phôi hóa cho 3 giống sắn Việt Nam sử dụng môi trường MS có hàm lượng khoáng

giảm đi 1/10 đã tạo thành công mô sẹo phôi hóa của 3 giống BK, KM 94 và KM 140. Kết quả tạo MSPH các giống trên bảng 1 cho thấy tỷ lệ tạo mô sẹo và MSPH có sự chênh lệch giữa các giống thí nghiệm, tuy nhiên sự chênh lệch không đáng kể. Không có sự liên hệ giữa tỷ lệ tạo mô sẹo và tỷ lệ tạo MSPH. Giống KM140 và giống KM94 có tỷ lệ tạo mô sẹo cao hơn so với giống BK, tuy nhiên tỷ lệ tạo MSPH của giống BK đạt cao nhất 22,6%.



Hình 1. Mô sẹo phôi hóa (khoanh tròn) của giống sắn BK (A), KM94 (B)

Ảnh hưởng của enzyme và nồng độ enzyme đến khả năng tạo TBT từ MSPH: Tổ hợp enzyme khác nhau có ảnh hưởng đáng kể lên sản lượng và khả năng sống sót của TBT. Loại enzyme thường được sử dụng cho tách TBT được đánh giá là cho sản lượng TBT và khả năng sống sót cao là tổ hợp của enzyme cellulase RS, macerozyme và pectolyase. Nghiên cứu trước đây đã cho thấy việc sử dụng tổ hợp 3 loại enzyme với nồng độ tương ứng là 10 g/l cellulase, 200 mg/l macerozyme, 10 mg/l pectolyase, tạo được TBT từ MSPH trên giống sắn TMS60444 đạt sản

lượng $1,5 \times 10^6$ TBT/g trọng lượng tươi (Sofari *et al.*, 1998). Gần đây nhất, đầu năm 2020, quy trình phân lập TBT với 3 loại enzyme trên có cải tiến tăng nồng độ enzyme (400 mg/l macerozyme và 100 mg/l pectolyase) cho sản lượng TBT gấp đôi, đạt $3,0 \times 10^6$ TBT/g trọng lượng tươi trên giống TMS60444.

Để khảo sát nồng độ tối ưu cho phân lập tách TBT của các giống sắn Việt Nam, tổ hợp và nồng độ các loại enzyme trên đều được áp dụng và tiếp tục cải tiến tăng nồng độ macerozyme và pectolyase. Kết quả được trình bày tại bảng 2.

Bảng 2. Ảnh hưởng của nồng độ enzyme đến khả năng tạo TBT từ MSPH của giống sắn KM94 và KM140

Công thức thí nghiệm	Sản lượng TBT (10^7 /g)		Khả năng sống sót (%)	
	KM94	KM140	KM94	KM140
CT1	$0,72 \pm 0,06$	$0,94 \pm 0,02$	$89,90 \pm 2,45$	$87,87 \pm 5,51$
CT2	$1,09 \pm 0,12$	$1,06 \pm 0,05$	$91,99 \pm 6,26$	$92,01 \pm 3,71$
CT3	$0,26 \pm 0,15$	$0,84 \pm 0,04$	$85,02 \pm 9,23$	$82,54 \pm 6,34$

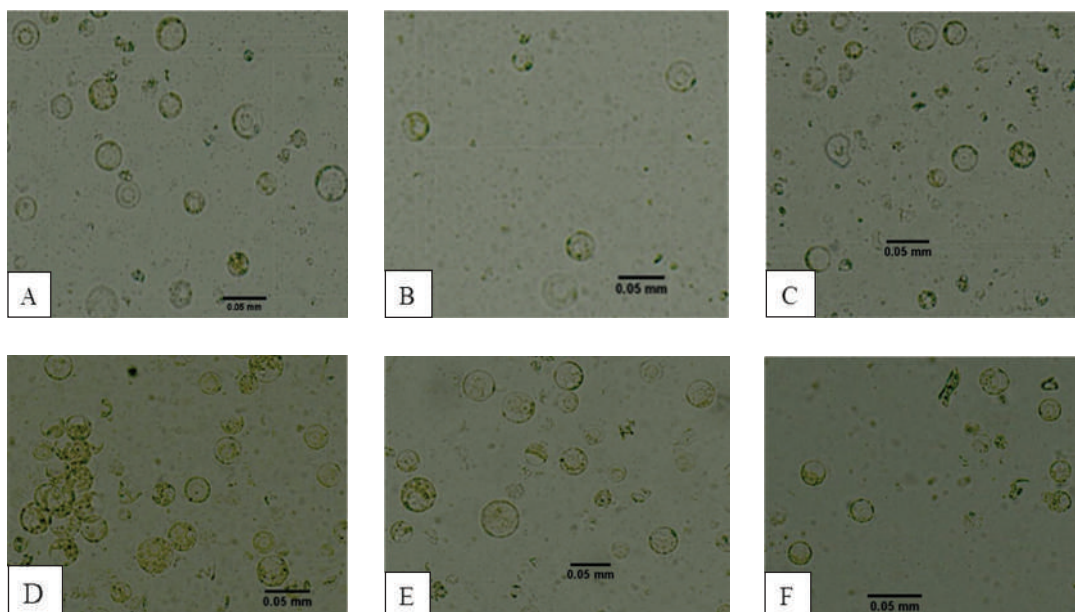
Ghi chú: CT1: 10 g/l Cellulase RS Onozuka + 200 mg/l Macerozyme + 10 mg/l Pectolyase. CT2: 10 g/l Cellulase RS Onozuka + 400 mg/l Macerozyme + 100 mg/l Pectolyase. CT3: 10 g/l Cellulase RS Onozuka + 600 mg/l Macerozyme + 500 mg/l Pectolyase.

Kết quả trên bảng 2 cho thấy sản lượng TBT tăng khi nồng độ của cả 3 loại enzyme đều tăng từ CT1 lên CT2. Tuy nhiên, khi tiếp tục tăng nồng độ của enzyme macerozyme và pectolyase (CT3) sản lượng TBT cũng như khả năng sống sót đều giảm ở cả hai giống thí nghiệm. Kết quả cũng cho thấy sản lượng TBT đạt cao nhất ở giống KM94 là $1,09 \times 10^7$ TBT/g và giống KM140 sản lượng đạt được là $1,06 \times 10^7$ TBT/g ở CT2 với nồng độ enzyme 10 g/l cellulase, 400 mg/l macerozyme và 100 mg/l pectolyase.

Đối với giống KM94, tổ hợp enzyme theo công thức 1 có sự chênh lệch đáng kể về sản lượng tế bào nhưng đối với giống KM140 sự chênh lệch này là không đáng kể. Khả năng sống sót của TBT của giống KM140 ở CT1 và CT2 không có sự khác biệt,

do đó lựa chọn tổ hợp enzyme theo CT1 cho giống KM140 giúp giảm lượng enzyme cần sử dụng. Tổ hợp enzyme theo công thức 1 phù hợp hơn đối với giống KM94.

Ảnh hưởng của thời gian xử lý enzyme đến khả năng tạo TBT từ MSPH: Thời gian phân giải enzyme cũng là một trong nhân tố ảnh hưởng tới sản lượng TBT và phụ thuộc vào từng loại mô. Ở sắn, TBT tách từ thịt lá, thời gian xử lý enzyme là 16 giờ (Anthony *et al.*, 1995; Wu *et al.*, 2017). Trong khi đó, đối với TBT tách từ MSPH yêu cầu thời gian xử lý enzyme dài hơn, thông thường là 18 giờ (Sofari *et al.*, 1998; Feng *et al.*, 2020). Do đó, nghiên cứu tiến hành thử các khoảng thời gian ủ enzyme khác nhau 16 giờ, 18 giờ và 20 giờ.



Hình 2. Ảnh hưởng của tổ hợp enzyme đến khả năng tạo tế bào trần từ mô sẹo phôi hóa

Ghi chú: A-B-C.TBT giống KM140 tách theo tổ hợp enzyme tương ứng CT2-CT1-CT3; D-E-F. TBT giống KM94 tách theo tổ hợp enzyme tương ứng CT2-CT1-CT3.

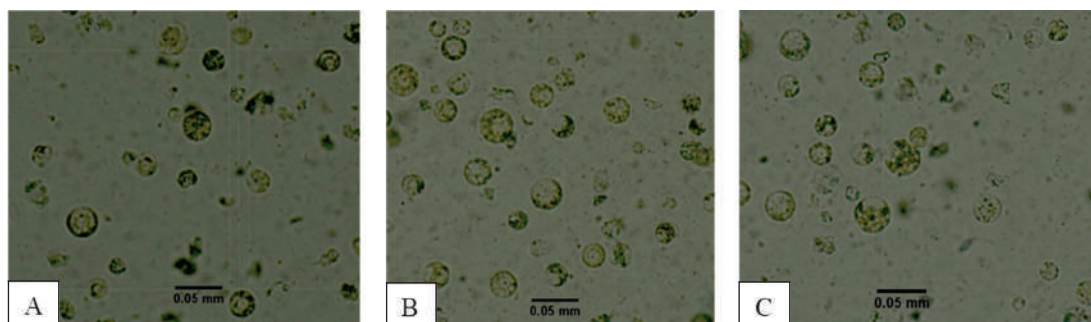
Bảng 3. Ảnh hưởng của thời gian xử lý enzyme đến khả năng tạo tế bào trần

Thời gian xử lý enzyme	Sản lượng TBT ($10^7/g$)		Khả năng sống sót (%)	
	KM94	KM140	KM94	KM140
16 giờ	$0,72 \pm 0,09$	$0,83 \pm 0,05$	$90,42 \pm 3,78$	$88,01 \pm 5,59$
18 giờ	$1,08 \pm 0,06$	$1,34 \pm 0,03$	$92,94 \pm 3,60$	$90,05 \pm 6,53$
20 giờ	$0,56 \pm 0,04$	$0,38 \pm 0,04$	$87,18 \pm 4,63$	$86,66 \pm 7,17$

Kết quả trên bảng 3 cho thấy có sự khác biệt về sản lượng tế bào cũng như khả năng sống sót tại các thời điểm xử lý enzyme khác nhau. Đối với giống KM94, sản lượng TBT cũng như khả năng sống sót thu được cao nhất ở 18 giờ đạt $1,08 \times 10^7/g$, khả năng sống sót đạt 92,94%, sản lượng giảm còn $0,56 \times 10^7$ khi tăng thời gian ủ enzyme lên 20 giờ với khả năng sống sót đạt 87,18%.

Đối với giống KM140, thời gian ủ enzyme thích hợp nhất là 18 giờ cho sản lượng cao nhất đạt $1,34 \times 10^7$ và khả năng sống sót là 90,05%. Tăng thời gian xử lý với enzyme lên 20 giờ làm sản lượng TBT cũng như khả năng sống sót giảm đáng kể.

Như vậy, thời gian ủ enzyme thích hợp cho thí nghiệm đánh giá khả năng phân tách TBT từ MSPH là 18 giờ. Kết quả này cũng phù hợp với kết quả của các tác giả khác trên giống TMS60444.



Hình 2. Ảnh hưởng của thời gian xử lý enzyme đến khả năng tạo TBT giống KM140

Ghi chú: A. TBT xử lý enzyme trong 16 giờ, B. TBT xử lý enzyme trong 18 giờ, C. TBT xử lý enzyme trong 20 giờ.

Ảnh hưởng của tần suất cấy chuyển MSPH đến khả năng tạo TBT: Độ tuổi của thực vật cũng đóng vai trò quan trọng trong quá trình tách TBT. Đối với TBT thịt lá, vật liệu thực vật có độ tuổi nhỏ hơn hoặc lớn hơn 60 ngày đều không phù hợp cho tách TBT, sản lượng TBT thu được thấp. Thực vật ở giai đoạn ra hoa cũng cho sản lượng TBT thấp (Evans and Brano, 1983). Đối với nguồn vật liệu để tách TBT ở dạng huyền phù hoặc callus, điều kiện sinh

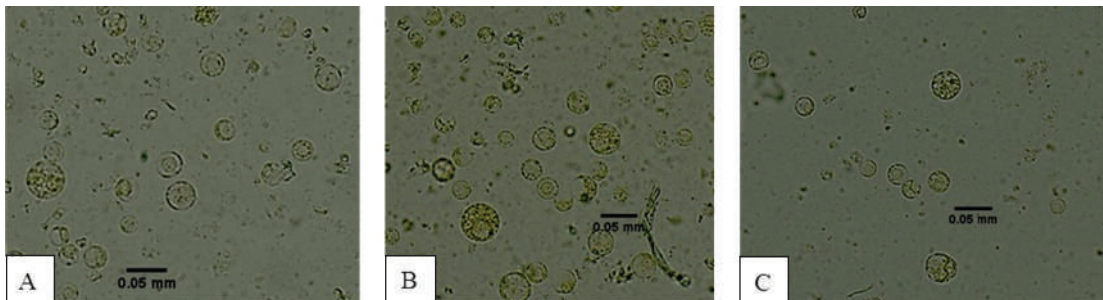
trưởng của các tế bào này đóng vai trò quan trọng trong thành công của các thí nghiệm tách TBT. Các tế bào ở pha sinh trưởng là phù hợp nhất cho tách TBT giúp giảm nồng độ enzyme và tăng khả năng sống sót của TBT (Evans and Brano, 1983). Tại thí nghiệm này, thời gian nuôi cấy MSPH được đánh giá tại các thời điểm 2 tuần cấy chuyển/lần, 4 tuần cấy chuyển/lần và 6 tuần cấy chuyển/lần.

Bảng 4. Ảnh hưởng của tần suất cấy chuyển mô sẹo phôi hóa đến khả năng tạo TBT

Tần suất cấy chuyển	Sản lượng TBT (10 ⁷ /g)		Tỉ lệ sống sót (%)	
	KM94	KM140	KM94	KM140
6 tuần/lần	1,16 ± 0,20	1,03 ± 0,007	84,15 ± 3,79	79,97 ± 4,22
4 tuần/lần	1,58 ± 0,06	1,20 ± 0,01	88,79 ± 5,76	86,08 ± 2,05
2 tuần/lần	0,34 ± 0,07	0,70 ± 0,01	92,88 ± 5,88	90,09 ± 6,88

Kết quả trên bảng 4 cho thấy ở cả hai giống thí nghiệm, tần suất cấy chuyển MSPH ảnh hưởng đáng kể tới sản lượng và khả năng sống sót của TBT. Ở thời điểm 2 tuần, sản lượng TBT thu được thấp nhất ở hai giống KM94 và KM140 tương ứng đạt 0,34 × 10⁷ tế bào/g trọng lượng tươi và 0,70 × 10⁷ tế bào/g trọng lượng tươi, tuy nhiên về khả năng sống

sót ở thời điểm MSPH 2 tuần/lần cho khả năng sống sót cao hơn so với thời điểm 6 tuần/lần. Sản lượng và khả năng sống sót của TBT đạt cao nhất ở thời điểm MSPH được cấy chuyển 4 tuần/lần. Tăng tần suất cấy chuyển lên 6 tuần/lần, sản lượng tế bào và khả năng sống sót ở cả hai giống KM94 và KM140 đều giảm.



Hình 3. Ảnh hưởng của tần suất cấy chuyển mô sẹo phôi hóa đến khả năng tạo TBT

Ghi chú: A. TBT tách từ MSPH nuôi cấy 2 tuần tuổi, B. TBT tách từ MSPH nuôi cấy từ 4 tuần tuổi, C. TBT tách từ MSPH nuôi cấy 6 tuần tuổi.

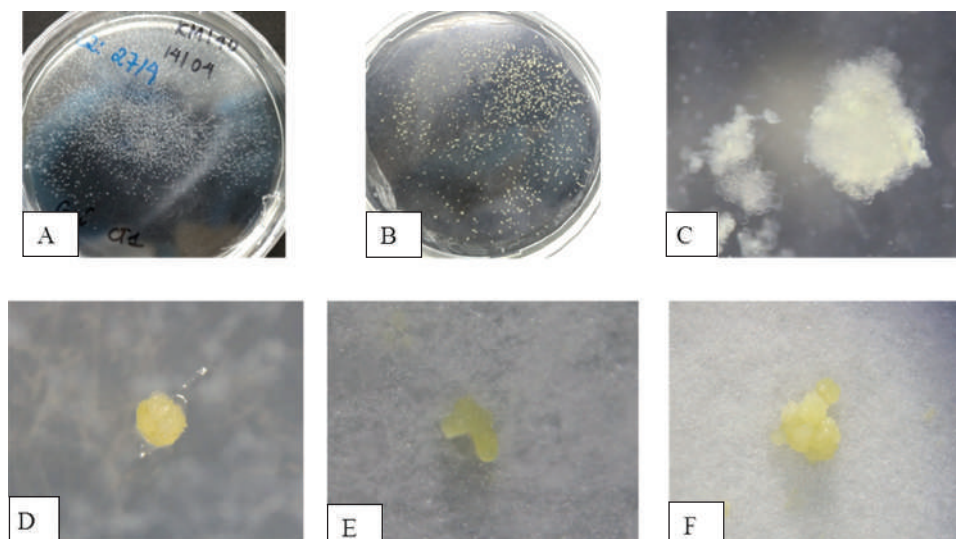
Ảnh hưởng của mật độ nuôi cấy tới khả năng tái sinh của TBT: Theo nghiên cứu của tác giả Sofiari và cộng tác viên (1998), khả năng tái sinh của TBT giống TMS660444 phụ thuộc vào mật độ TBT. Tác giả tiến hành nghiên cứu ở các nồng độ nuôi cấy khác nhau 2 × 10⁵, 3 × 10⁵, 5 × 10⁵, 10 × 10⁵ (TBT/g). Kết quả cho thấy ở nồng độ 5 × 10⁵ cho hiệu quả tái sinh cao nhất đạt 0,23%. Để khảo sát nồng độ tối ưu cho nuôi cấy TBT của các giống sản Việt Nam, nghiên cứu tiến hành với các mật độ 1 × 10⁴, 5 × 10⁵, 1 × 10⁵, 2 × 10⁵, 5 × 10⁵ (TBT/g).

Bảng 5. Ảnh hưởng của mật độ nuôi cấy tới khả năng tái sinh của tế bào giống KM140

STT	Mật độ tế bào	Hiệu quả phân chia của TBT (%)	Số lượng microcallus	Số callus xuất hiện đến hiện tại
1	1 × 10 ⁴	0	0	0
2	1 × 10 ⁵	15,53	0	0
3	3 × 10 ⁵	18,42	196	3
4	5 × 10 ⁵	20,53	0	0

Các TBT sau khi tách được nuôi cấy trên môi trường nuôi cấy TM-2 có bổ sung các chất kích thích sinh trưởng giúp tăng cường sự phân chia của tế bào. Sau 5 ngày nuôi cấy, sự xuất hiện của các colony đã có thể quan sát thấy bằng mắt thường. Kết quả trên bảng 5 cho thấy ở mật độ 5×10^5 hiệu quả phân chia của TBT đạt cao nhất 20,53%, tuy nhiên, ở mật độ

3×10^5 hiệu quả phân chia đạt 18,42% nhưng đây là công thức thu được số lượng vi mô sẹo (microcallus) cao nhất (196), trong đó đã xuất hiện 3 cấu trúc mô sẹo khi chuyển sang môi trường tạo mô sẹo (Hình 4). Do đó, mật độ 3×10^5 hiện tại được đánh giá là nồng độ phù hợp cho nuôi cấy TBT giống sắn KM140.



Hình 4. Các giai đoạn nuôi cấy TBT giống KM140

Ghi chú: A. TBT hình thành dạng colony sau 7 ngày nuôi cấy, B. TBT hình thành dạng microcallus sau 40 ngày nuôi cấy trên môi trường TM2G. D, E, F: TBT hình thành cấu trúc mô sẹo ở các hình dạng khác nhau, hình cầu, hình hai lá mầm sau 2,5 tháng nuôi cấy.

IV. KẾT LUẬN

Nghiên cứu này lần đầu tiên cho thấy có thể tạo tế bào trần thành công từ mô sẹo phôi hóa trên các giống sắn Việt Nam bao gồm KM94 và KM140. Tổ hợp enzyme bao gồm 10 g/l cellulase, 400 mg/l macerozyme và 100 mg/l pectolyase với thời gian ủ 18 giờ phù hợp cho tách TBT từ MSPH của giống sắn KM94 và KM140. Thời gian cấy chuyển tối ưu đối với mô sẹo phôi hóa của giống KM94 và KM140 cho việc tạo tế bào trần là 4 tuần một lần. Trong điều kiện nuôi cấy phù hợp với mật độ 3×10^5 TBT/ml, tế bào trần của giống KM140 có hiệu suất tái sinh đạt 18,42% và đã tái sinh thành cấu trúc mô sẹo.

LỜI CẢM ƠN

Kinh phí thực hiện nghiên cứu này được Bộ Khoa học Công nghệ cấp cho đề tài “Nghiên cứu tạo tế bào trần và tái sinh cây hoàn chỉnh phục vụ chọn tạo giống sắn kháng virus” thuộc nhiệm vụ thường xuyên của Phòng thí nghiệm Trọng điểm Công nghệ Tế bào thực vật và được Viện Khoa học Nông nghiệp Việt Nam phê duyệt.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Tống Thị Hương, Nguyễn Văn Đồng, Nguyễn Anh Vũ, Phạm Thị Hương, Nguyễn Hùng, Lê Ngọc Tuấn, Nguyễn Thị Hạnh**, 2018. Báo cáo tổng kết đề tài Nghiên cứu xây dựng quy trình tạo mô sẹo phôi hóa và tái sinh hoàn chỉnh cho một số giống sắn - Viện Di truyền Nông nghiệp.
- Anonymous**, 1985. CIAT: annual report. *Centro International de Agricultura Tropical*, Cali, Columbia, pp. 197-217.
- Anthony P, Davey MR, Power JB, Lowe KC**, 1995. An improved protocol for the culture of cassava leaf protoplasts. *Plant Cell Tissue Organ Cul*, 42: 229-302.
- Evans, D.A., Brano**, 1983. Protoplast isolation and culture. In: *Handbook of plant cell culture*, vol 1, pp. 124-176, Evans, D.A., Sharp, W.R., Ammirato, P.V. Yamato, Y., eds. McMillan Publishing Co., New York.
- Je Wook Woo, Jungeun Kim, Soon Il Kwon, Claudia Corvalan, Seung Woo Cho, Hyeran Kim, Sang-Gyu Kim, Sang-Tae Kim, Sungwa Choe & Jin-Soo Kim**, 2015. DNA-free genome editing in plants with preassembled crispr-cas9 ribonucleoproteins. *Nature Biotechnology*, doi:10.1038/nbt.3389.

Jun-Zheng Wu, Qin Liu, Xiao-Shan Geng, Kai-Mian Li, Li-Juan Luo and 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 Biotechnology*, pp. 17:29

Shadin EA, Shepard JF, 1980. Cassava mesophyll protoplasts: isolation, proliferation and shoot formation. *Plant Sci Lett* 17: 459-465.

Sofiari E, 1996. *Regeneration and transformation of cassava (Manihot esculenta Crantz)*, PhD thesis, Wageningen Agricultural University.

Sofiari E, Raemakers C.J.J.M, Bergervoet M, Jacobsen.R, Visser R.G.F, 1998. Plant regeneration from proplasts isolated from friable embryogenic callus of cassava. *Plant Cell Reports*, 18: 159-165.

Talyor 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*: 726-730.

Nzoghe D, 1989. *Recherche de conditions permettant l'obtention neoformations chez differents genotypes de manioc (Manihot esculenta Crantz): extension à la culture de protoplastes*. PhD thesis, Université De Paris Sud Centre D'Orsay.

Yoshinori Utsumi, Chikako Utsumi, Maho Tanaka, Vu The Ha, Akihiro Matsui, Satoshi Takahashi, Motoaki Seki, 2017. Formation of friable embryogenic callus in cassava is enhanced under conditions of reduced nitrate, potassium and phosphate. *PLoS ONE*, 12 (8): e0180736. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0180736>.

Wen Feng, Su Wen-pan, Zeng Hua, Yu Ben-chi, Ma Zeng-feng, Zhang Peng, Guo Wen-wu, 2020. Plant regeneration via protoplast electrofusion in cassava. *Journal of Integrative Agriculture*, 19 (3): 632-642.

Initial success on protoplast production from friable embryonic callus of Vietnamese cassava varieties

Pham Thi Huong, Do Thi Nhu Quynh, Nguyen Anh Vu

Abstract

Friable embryonic callus (FEC) and protoplast production from BK, KM94 and KM140 cassava varieties were studied for establishing a non-transgenic genome editing system using ribonucleoprotein Cas9 system. FEC production in BK, KM94 and KM140 rates reached 22.6%, 21.8% and 22.4%, respectively. Cell-wall degrading enzymes were found to be most effective at 10 g/l cellulase RS Onozuka + 400 mg/l macerozyme + 100 mg/l pectolyase and 18 hours incubation for protoplast production from KM94 and KM140 (1.09×10^7 protoplasts/g FW and 1.06×10^7 protoplast/g FW, respectively). Subculture frequency of every 4 weeks resulted in highest protoplast yield and survival rate for KM94 and KM140. Protoplast regeneration rate of KM140 was tested with different recovering inoculation densities of 1×10^4 , 1×10^5 , 3×10^5 and 5×10^5 (per ml) and 3×10^5 protoplasts/ml was most effective.

Keywords: Cassava (*Manihot esculenta* Crantz), friable embryonic callus, protoplast

Ngày nhận bài: 15/9/2020

Ngày phản biện: 23/9/2020

Người phản biện: TS. Lê Thị Tuyết Châm

Ngày duyệt đăng: 02/10/2020

NGHIÊN CỨU ĐA DẠNG NGUỒN GEN BÍ ĐỎ Ở MIỀN BẮC VIỆT NAM BẰNG CHỈ THỊ SSR

Trần Thị Huệ Hương¹, Hoàng Thị Huệ²,
Lê Thị Thu Trang², Đàm Thị Thu Hà², Lê Tuấn Nghĩa²

TÓM TẮT

Nghiên cứu đã sử dụng chỉ thị SSR để đánh giá đa dạng di truyền nguồn gen bí đỏ được thu thập ở các tỉnh miền Bắc Việt Nam. Kết quả nghiên cứu sử dụng 48 chỉ thị SSR để phân tích đa dạng di truyền của 132 mẫu giống bí đỏ cho thấy: Số alen thu được tại mỗi locut dao động từ 2 - 6 alen, tổng số alen trên tất cả các locut là 126, trung bình là 2,63 alen/locut. Mức độ tương đồng dao động từ 0,64 đến 0,92 và hệ số PIC dao động từ 0,16 - 0,65 và trung bình là 0,42. Đã xác định được 10 chỉ thị gồm: CMTp127, CMTm232, CMTm120, CMTp182, CMTp193, CMTm252,

¹ Viện Khoa học nông nghiệp Việt Nam; ² Trung tâm Tài nguyên thực vật