

NGHIÊN CỨU ẢNH HƯỞNG CỦA MỘT SỐ YẾU TỐ ĐẾN NUÔI CẤY MÔ SẸO CỦA GIỐNG MÍA K84-200 VÀ UTHONG 12

Cao Lệ Quyên¹, Phạm Thị Vân¹, Nguyễn Thị Thu Hà¹,
Nguyễn Thanh Hà¹, Nguyễn Thành Đức¹, Phạm Xuân Hội¹, Nguyễn Duy Phương^{1,*}

¹ Viện Di truyền Nông nghiệp

* Email: phuongnd.bio@gmail.com

TÓM TẮT

Chọn giống mía (*Saccharum* spp.) bằng công nghệ gen đã chứng minh tính hiệu quả vượt trội so với các phương pháp chọn giống truyền thống. Gần đây, công nghệ chỉnh sửa gen CRISPR/Cas9 ra đời đã tạo nên một cuộc cách mạng trong chọn giống phân tử. Tuy nhiên, hiệu quả ứng dụng chỉnh sửa gen trong chọn tạo giống cây trồng, bao gồm cả cây mía, phụ thuộc rất lớn vào quy trình nuôi cấy *in vitro* và hiệu suất tái sinh chồi. Cho đến nay, các nghiên cứu về tạo mô sẹo và tái sinh chồi của các giống mía phổ biến trong sản xuất như: K84-200 và Uthong 12 còn khá hạn chế. Nghiên cứu này đã xác định được thành phần môi trường tạo mô sẹo tối ưu của K84-200 và Uthong 12 chứa 2,4-D 3,0 mg/L, Casein 500 mg/L, L-proline 500 mg/L, nước dừa 10%; hiệu suất tạo mô sẹo đạt lần lượt 73,3% và 97,8%. Hơn nữa, nghiên cứu đã xác định được hiệu suất tái sinh chồi từ mô sẹo của K84-200 và Uthong 12 đạt lần lượt 48,5% và 16,6%. Nghiên cứu này là tiền đề quan trọng cho các nghiên cứu hệ thống chỉnh sửa gen trên hai giống mía K84-200 và Uthong 12 sau này.

Từ khóa: K84-200, *in vitro*, mía, nuôi cấy mô, Uthong 12.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Mía (*Saccharum* spp.) là một trong những cây công nghiệp có triển vọng nhất trên thế giới [1]. Mía hiện được trồng ở hơn một trăm quốc gia và khu vực, có tổng diện tích khoảng 26 triệu ha, với sản lượng hàng năm là 1,9 tỷ tấn mía tươi, chiếm gần 80% đường và 40% ethanol sinh học trên thế giới, với tổng giá trị sản lượng là 80 tỷ USD [2]. Ở Việt Nam, do nhu cầu sử dụng rất lớn, hàng năm phải nhập khẩu hơn 1 triệu tấn đường. Trong khi nhu cầu thị trường ngày càng tăng, những năm gần đây, tốc độ phát triển của ngành trồng mía ở Việt Nam lại có xu hướng chững lại.

Cây giống là vấn đề then chốt của của ngành mía đường. Theo Hiệp hội các nhà công nghệ mía đường quốc tế (ISSCT), đóng góp khoa học và công nghệ của việc cải tiến giống mía lên tới 60% [3]. Tất cả các nước sản xuất mía đường lớn trên thế giới đều coi việc chọn, tạo và liên tục cải tiến giống mới là nền tảng vững chắc để thúc đẩy

ngành mía đường phát triển ổn định. Tuy nhiên, do mía có bộ gen rất phức tạp, chu kỳ sinh sản kéo dài, khó đánh giá kiểu hình... nên quá trình cải tiến giống mía thường rất chậm so với các loại cây trồng khác như: Lúa, ngô và đậu tương [4, 5]. Vài thập kỉ trở lại đây, với sự phát triển của sinh học phân tử, nhiều phương pháp mới như: Chọn giống bằng chỉ thị phân tử, chuyển gen, đặc biệt là chỉnh sửa gen đã mang lại hiệu quả rất cao trong chọn giống cây trồng, bao gồm cả chọn giống mía, giúp khắc phục được nhược điểm của các phương pháp chọn giống truyền thống [6].

Gần đây, công nghệ chỉnh sửa gen CRISPR/Cas9 ra đời đã mở ra một kỉ nguyên mới cho lĩnh vực khoa học cây trồng nói chung và chọn giống nói riêng. Hệ thống CRISPR/Cas9 cho phép chỉnh sửa chính xác gen mục tiêu trên cây trồng theo hướng có lợi cho mục đích chọn giống. Với ưu điểm vượt trội về tính chính xác và hiệu quả, đồng thời thao tác kĩ thuật tương đối đơn giản, tiết

kiệm thời gian, chi phí nên công nghệ này đang dần trở thành một sự bổ sung hoàn hảo cho các phương pháp chọn giống truyền thống [6, 7]. Tuy nhiên, hạn chế lớn nhất của các hệ thống chỉnh sửa gen ứng dụng CRISPR/Cas9 trên cây trồng là phụ thuộc vào quy trình nuôi cấy *in vitro* [7]. Để có thể sử dụng hệ thống CRISPR/Cas9 trên một đối tượng cây trồng cụ thể, hoàn thiện quy trình nuôi cấy *in vitro* đạt hiệu suất cao là điều kiện tiên quyết. Hơn nữa, rất nhiều quy trình chỉnh sửa gen thực vật hiện nay, bao gồm cả chỉnh sửa gen ở mía, đã sử dụng mô sẹo làm vật liệu để chuyển cấu trúc biểu hiện CRISPR/Cas9 do tính tiện lợi về nguồn vật liệu [7]. Chính vì vậy, nghiên cứu được thực hiện nhằm mục đích tối ưu môi trường nuôi cấy tạo mô sẹo và đánh giá khả năng tái sinh từ mô sẹo của của hai giống mía phổ biến trong sản xuất (K84-200 và Uthong 12), làm tiền đề cho các nghiên cứu chỉnh sửa gen phục vụ chọn tạo giống mía bằng công nghệ CRISPR/Cas9 sau này.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

Giống mía Uthong 12 và K84-200 được cung cấp bởi Công ty Cổ phần Mía đường Thành Thành Công. Các hóa chất chỉnh sửa gen trong nghiên cứu, bao gồm: 2,4-D, Casein và L-proline có độ tinh khiết đạt >98%, được mua từ hãng Merck (Đức); hỗn hợp muối MS (Murashige and Skoog Basal Salt Mixture) được mua từ hãng Sigma (Mỹ).

2.2. Phương pháp

2.2.1. Tối ưu nồng độ 2,4-D trong môi trường nuôi cấy *in vitro* tạo mô sẹo mía

Gốc chồi non được tách từ thân cây mía nuôi cấy *in vitro* 30 ngày tuổi (chiều cao 3 cm) và được đặt trên môi trường nuôi cấy tạo mô sẹo (muối MS 4,3 g/L, sucrose 30 g/L + agar 8 g/L) với các nồng độ 2,4-D khác nhau (1,0 mg/L; 2,0 mg/L; 3,0 mg/L; 4,0 mg/L). Mẫu được nuôi cấy ở nhiệt độ $26 \pm 2^\circ\text{C}$, trong điều kiện tối hoàn toàn. Sau 4 tuần nuôi cấy, tỉ lệ mẫu tạo mô sẹo được tính theo công thức: $(\text{Số mẫu tạo mô sẹo} / \Sigma \text{số mẫu cấy}) \times 100\%$. Thí nghiệm được thực hiện với tối thiểu 30 mẫu/giống, lặp lại 3 lần.

2.2.2. Tối ưu nồng độ Casein và L-proline trong môi trường nuôi cấy *in vitro* tạo mô sẹo mía

Gốc chồi được tách từ thân cây mía nuôi cấy *in vitro* 30 ngày tuổi (chiều cao 3 cm) và được đặt trên môi trường nuôi cấy tạo mô sẹo đã tối ưu thành phần 2,4-D (muối MS 4,3 g/L, sucrose 30 g/L + agar 8 g/L, 2,4-D 3,0 mg/L) có bổ sung Casein và L-proline theo các công thức khác nhau (Bảng 1). Mẫu được nuôi cấy ở nhiệt độ $26 \pm 2^\circ\text{C}$ trong điều kiện tối hoàn toàn. Sau 4 tuần nuôi cấy, tỉ lệ mẫu tạo mô sẹo được tính theo công thức: $(\text{Số mẫu tạo mô sẹo} / \Sigma \text{số mẫu cấy}) \times 100\%$. Thí nghiệm được thực hiện với tối thiểu 30 mẫu/giống, lặp lại 3 lần.

Bảng 1. Công thức thành phần axit amin của môi trường nuôi cấy tạo mô sẹo

Tên công thức	Thành phần	
	Casein (mg/L)	L-proline (mg/L)
T1	0	0
T2	500	0
T3	0	500
T4	500	500
T5	1.000	0
T6	0	1.000

2.2.3. Tối ưu nồng độ nước dừa bổ sung trong môi trường nuôi cấy *in vitro* tạo mô sẹo mía

Gốc chồi được tách từ thân cây mía nuôi cấy *in vitro* 30 ngày tuổi (chiều cao 3 cm) và được đặt trên môi trường nuôi cấy tạo mô sẹo đã tối ưu thành phần 2,4-D, casein và L-proline (muối MS 4,3 g/L, sucrose 30 g/L + agar 8 g/L, 2,4-D 3,0 mg/L, Casein 500 mg/L và L-proline 500 mg/L) có bổ sung nước dừa với tỉ lệ 0%, 5% và 10% (v/v). Mẫu được nuôi cấy ở nhiệt độ $26 \pm 2^\circ\text{C}$ trong điều kiện tối hoàn toàn. Sau 4 tuần nuôi cấy, tỉ lệ mẫu tạo mô sẹo được tính theo công thức: $(\text{Số mẫu tạo mô sẹo} / \Sigma \text{số mẫu cấy}) \times 100\%$. Thí nghiệm được thực hiện với tối thiểu 30 mẫu/giống, lặp lại 3 lần.

2.2.4. Tái sinh chồi mía từ mô sẹo

Quy trình nuôi cấy *in vitro* tái sinh chồi từ mô sẹo mía được xây dựng dựa trên quy trình đã công

bổ của Belete và cs (2017), Roshan và cs (2012) [8, 9]. Mẫu mô sẹo được nuôi cấy trên môi trường tái sinh chồi (muối MS 4,3 g/L, sucrose 30 g/L + agar 8 g/L, BAP 2,0 mg/L, casein 500 mg/L và L-proline 500 mg/L, nước dừa 10%) ở nhiệt độ $26 \pm 2^\circ\text{C}$ trong điều kiện chiếu sáng 16 giờ/ngày. Sau 4 - 5 tuần nuôi cấy, tỉ lệ mẫu tái sinh ($[\text{Số mô sẹo tái sinh} / \Sigma \text{ mô sẹo}] * 100\%$) và tỉ lệ chồi/mô sẹo ($\Sigma \text{ chồi tái sinh thu được} / \Sigma \text{ mô sẹo}$) được ghi lại.

2.2.5. Xử lý số liệu thống kê

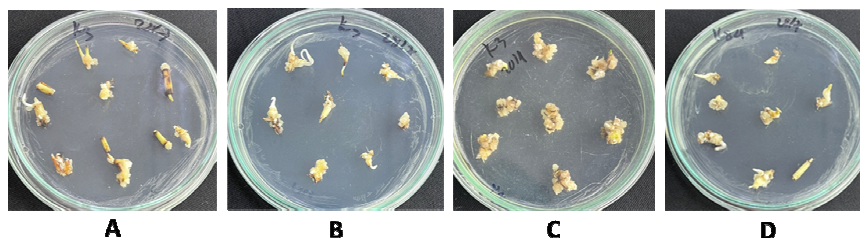
Số liệu được thống kê bằng phần mềm Excel 2016 để tính giá trị trung bình và độ lệch chuẩn các lần lặp lại của mỗi công thức. Giá trị trung bình của các công thức trong cùng thí nghiệm được phân tích bằng so sánh phương sai một nhân

tố (One-way ANOVA) và kiểm định *t-test* trên phần mềm Excel 2016 với $\alpha = 0,05$.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

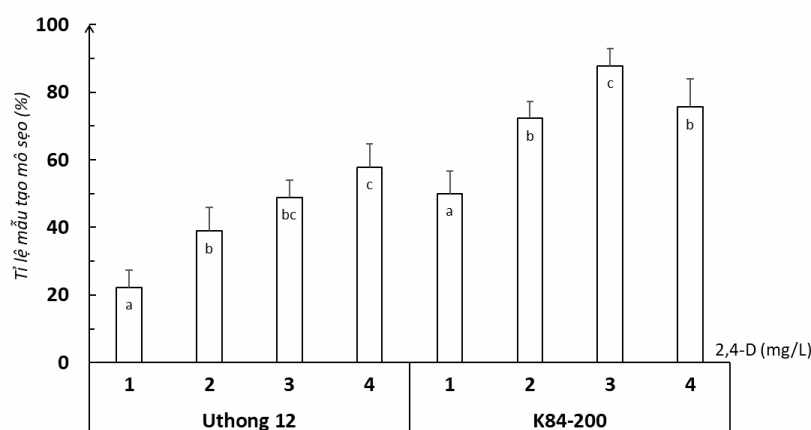
3.1. Ảnh hưởng của 2,4-D đến khả năng tạo mô sẹo của giống mía Uthong 12 và K84-200

Auxin thường được sử dụng trong nuôi cấy *in vitro* tạo mô sẹo, nuôi cấy huyền phù, kích thích sự kéo dài rễ và phân chia tế bào của nhiều loại thực vật. Đối với mía, 2,4-D là loại auxin được sử dụng phổ biến nhất để tạo mô sẹo [10 - 12]. Để đánh giá ảnh hưởng của 2,4-D đối với 2 giống mía nghiên cứu, 2,4-D với các nồng độ khác nhau đã lần lượt được bổ sung vào môi trường từ 1,0 mg/L - 4,0 mg/L đã được khảo sát để xác định nồng độ tối ưu cho việc tạo mô sẹo từ 2 giống mía Uthong 12 và K84-200 (Hình 1).



Hình 1. Tạo mô sẹo mía trên môi trường có bổ sung 2,4-D

Ghi chú: Gốc chồi non của giống mía K84-200 được nuôi cấy trên môi trường tạo mô sẹo có bổ sung 2,4-D 1,0 mg/L (A), 2,0 mg/L (B), 3,0 mg/L (C) và 4,0 mg/L. Hình ảnh được ghi lại sau 30 ngày nuôi cấy.



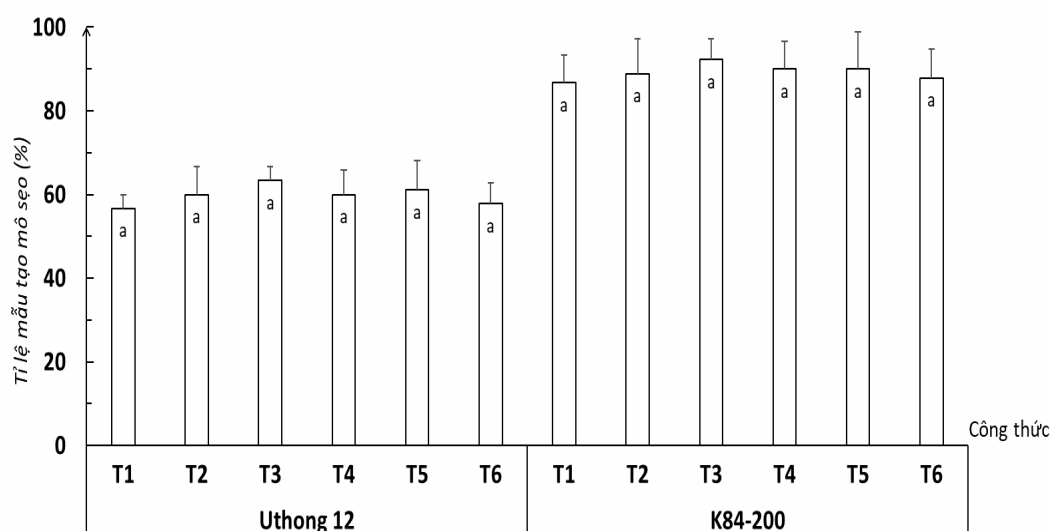
Hình 2. Ảnh hưởng của 2,4-D đến khả năng tạo mô sẹo mía

Ghi chú: Mô sẹo được tạo từ giống mía Uthong 12 và K84-200 trên môi trường nuôi cấy *in vitro* có bổ sung 2,4-D với nồng độ khác nhau (1,0 mg/L; 2,0 mg/L; 3,0 mg/L; 4,0 mg/L). Giá trị trên đồ thị là tỉ lệ tạo mô sẹo trung bình của 3 lần thí nghiệm. Các chữ cái khác nhau trên cột thể hiện sự sai khác có ý nghĩa thống kê giữa giá trị trung bình của mỗi công thức thí nghiệm ($\alpha=0,05$). Thanh bar thể hiện giá trị độ lệch chuẩn.

Các mẫu gốc chồi non bắt đầu tăng sinh sau một tuần nuôi cấy; tuy nhiên, sự hình thành mô sẹo chỉ bắt đầu quan sát thấy ở tuần thứ hai. Sau 4 tuần nuôi cấy, mô sẹo hình thành ở rìa và phát triển thành mô sẹo trưởng thành đầy đủ. Về mặt hình thái, mô sẹo có màu trắng vàng, đặc, khô và có nốt sần (Hình 1). Phản ứng tạo mô sẹo của giống Uthong 12 thấp hơn so với K84-200 (Hình 2). Phân tích chi tiết kết quả thu được cho thấy, việc thay đổi nồng độ 2,4-D trong môi trường nuôi cấy khác nhau có xu hướng ảnh hưởng khá tương đồng giữa các giống. Cụ thể, nồng độ 2,4-D 3,0 mg/L cho kết quả tạo mô sẹo ở tốt nhất ở cả hai giống. Đối với giống Uthong 12, tỉ lệ tạo mô sẹo của môi trường có 2,4-D với nồng độ 3,0 mg/L và 4,0 mg/L khác biệt đáng kể; trong khi 2,4-D 1,0 mg/L và 2,0 mg/L có hiệu quả tạo mô sẹo thấp hơn rõ rệt (22,2% và 38,9%). Đối với giống K84-200, tỉ lệ mẫu tạo mô sẹo trên môi trường có 2,4-D 2,0 mg/L và 4,0 mg/L tương tự nhau (72,2% và 75,6%) và cao hơn môi trường có 2,4-D 1,0 mg/L (50%).

Sự phát triển của mô sẹo mía có liên quan trực tiếp đến sự có mặt của 2,4-D, một loại hormone sinh trưởng có vai trò tạo ra mô sẹo ở hầu hết các loài thực vật [13, 14]. Phản ứng tạo mô sẹo có thể phụ thuộc vào kiểu gen [15]. Trong nghiên cứu này, phản ứng tạo mô sẹo giữa 2 giống K84-200 và Uthong 12 cũng có sự khác biệt đáng kể. Hơn nữa, quá trình hình thành mô sẹo có thể được cải thiện khi tăng nồng độ 2,4-D [16, 17]. Ngược lại, một số nghiên cứu đã cho thấy, nồng độ 2,4-D thấp giúp tăng hiệu quả tạo ra mô sẹo phôi hóa và kích thích mô sẹo phát triển tốt hơn [17, 18]. Tuy nhiên, trong nghiên cứu này, 2,4-D 3,0 mg/L và 4,0 mg/L lại cho kết quả tạo mô sẹo tốt hơn cả, tương đồng với kết quả nghiên cứu của Phan Thị Thu Hiền và cs (2021); Tahir và cs (2011) [12, 15]. Để đảm bảo hiệu quả kinh tế và hiệu suất tạo mô sẹo cao nhất, công thức môi trường sử dụng 2,4-D 3,0 mg/L đã được lựa chọn cho các phân tích tiếp theo.

3.2. Đánh giá ảnh hưởng của Casein và L-proline đến khả năng tạo mô sẹo của giống mía Uthong 12 và K84-200



Hình 3. Ảnh hưởng của Casein và L-Proline đến khả năng tạo mô sẹo mía

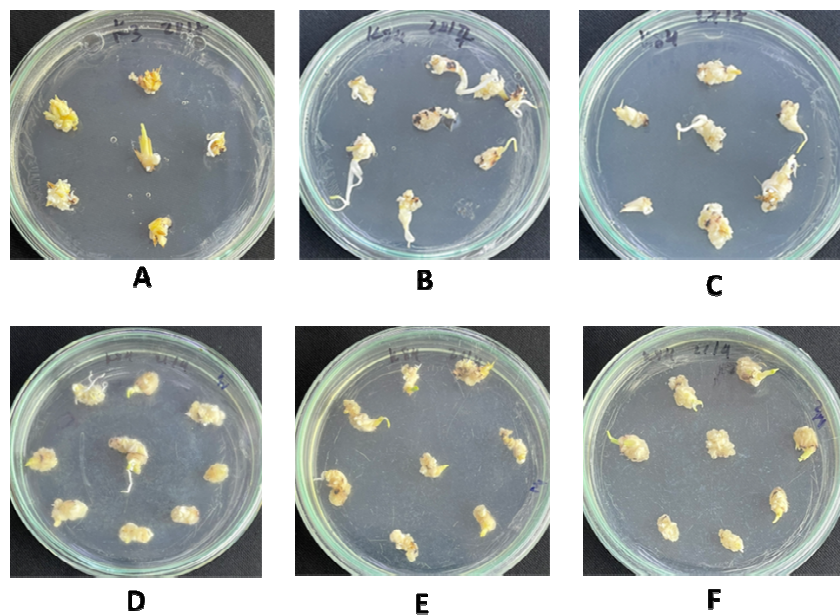
Ghi chú: Mô sẹo được tạo từ giống mía Uthong 12 và K84-200 trên môi trường nuôi cấy in vitro có bổ sung Casein và L-proline với các công thức khác nhau (T1- T6). Giá trị trên đồ thị là tỉ lệ tạo mô sẹo trung bình của 3 lần thí nghiệm. Các chữ cái giống nhau trên cột thể hiện sự sai khác không có ý nghĩa thống kê giữa giá trị trung bình của mỗi công thức thí nghiệm ($\alpha=0,05$). Thanh bar thể hiện giá trị độ lệch chuẩn.

Quá trình tạo mô sẹo của nhiều loài vật trên môi trường nuôi cấy *in vitro* có thể bị ảnh hưởng bởi nhiều yếu tố khác nhau, bao gồm cả thành

phần và nồng độ chất điều hòa sinh trưởng nội sinh và các chất dinh dưỡng như: Casein và L-proline [19]. Trong nghiên cứu này, ảnh hưởng

của việc bổ sung Casein và L-proline với các tỉ lệ khác nhau đối với sự hình thành mô sẹo của 2 giống mía Uthong 12 và K84-200 đã lần lượt được khảo sát. Phân tích kết quả tạo mô sẹo của 2 giống mía cho thấy, hầu như không có sự khác biệt đáng kể về tỉ lệ mẫu tạo mô sẹo giữa các thí nghiệm có bổ sung Casein và/hoặc L-Proline với nhau và so với thí nghiệm đối chứng (T1 - không bổ sung) (Hình 3). Điều này chứng tỏ Casein và L-Proline không có tác dụng kích thích quá trình hình thành mô sẹo ở 2 giống mía nghiên cứu. Tuy nhiên, hình thái mô sẹo trên các môi trường T4, T5 và T6 có kích thước lớn hơn và màu vàng đậm hơn so với mô sẹo trên các môi trường T1, T2 và T3 (Hình 4). Vì vậy, xét cùng với yếu tố chi phí nuôi cấy, công thức môi trường T4 (Casein 500 mg/L và L-Proline 500 mg/L) đã được lựa chọn cho các nghiên cứu tiếp theo.

Casein và L-Proline không thường xuyên được sử dụng phổ biến trong các nghiên cứu tạo mô sẹo mía. Một vài nghiên cứu trước đây đã sử dụng 2 loại hóa chất này ở dạng đơn chất hoặc kết hợp cả hai loại. Ví dụ như Abdelsalam và cs (2021) đã sử dụng Casein 500 mg/L trong môi trường nuôi cấy tạo mô sẹo mía [10]; trong khi Tripathy và Ithape (2020) lại kết hợp L-Proline 100 mg/L và Casein 500 mg/L [20]. Tuy nhiên, chưa có nghiên cứu nào đánh giá ảnh hưởng của 2 hợp chất này đến khả năng tạo mô sẹo mía. Kết quả thu được trong nghiên cứu này đã cho thấy, việc bổ sung Casein và/hoặc L-Proline không làm tăng số lượng mẫu gốc chồi non tạo mô sẹo nhưng có ảnh hưởng tích cực tới hình thái mô sẹo tạo thành sau đó.



Hình 4, Tạo mô sẹo mía trên môi trường có bổ sung Casein và L-proline

Ghi chú: Gốc chồi non của giống mía K84-200 được nuôi cấy trên môi trường tạo mô sẹo có bổ sung Casein và L-proline theo công thức T1 (A), T2 (B), T3 (C), T4 (D), T5 (E) và T6 (F). Hình ảnh được ghi lại sau 30 ngày nuôi cấy.

3.3. Đánh giá ảnh hưởng của nước dừa đến khả năng tạo mô sẹo của giống mía Uthong 12 và K84-200

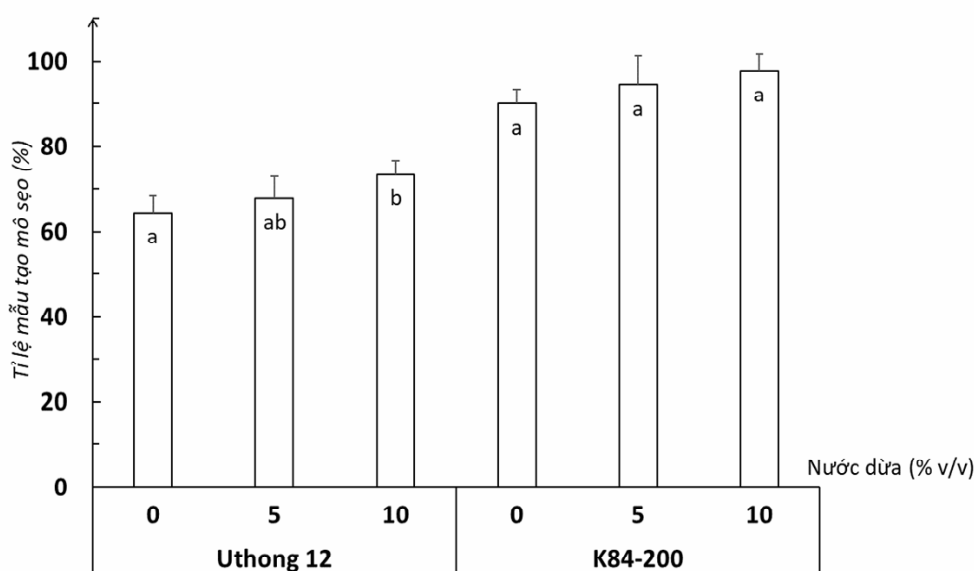
Nước dừa có chứa nhiều thành phần hormone sinh trưởng thực vật và thường được sử dụng trong nuôi cấy mô. Việc bổ sung nước dừa kết hợp với

auxin tổng hợp trong môi trường nuôi cấy mô giúp kích thích sự hình thành mô sẹo, phát triển chồi và nhân đa chồi [21]. Trong thí nghiệm này, các công thức môi trường nuôi cấy với hàm lượng nước dừa khác nhau (0%, 5%, 10%) đã lần lượt được khảo sát hiệu quả kích thích tạo mô sẹo từ gốc chồi non của 2 giống mía Uthong 12 và K84-200. Sau 4 tuần nuôi

cấy, quan sát tỉ lệ mô sẹo hình thành (Hình 5) cho thấy chỉ có giống mía Uthong 12 có phản ứng nhẹ đối với việc bổ sung nước dừa vào thành phần môi trường. Cụ thể, môi trường có bổ sung nước dừa 10% có tỉ lệ mẫu tạo mô sẹo tăng ~11% so với môi trường không bổ sung nước dừa. Ngược lại, cả 3 loại môi trường nuôi cấy giống mía K84-200 không có sự khác biệt rõ rệt về số lượng mô sẹo thu được. Điều này gợi ý rằng mức độ ảnh hưởng của nước dừa đối với phản ứng tạo mô sẹo phụ thuộc vào bản chất di truyền của giống.

Nhiều nghiên cứu trước đây đã sử dụng kết hợp auxin (2,4-D) với nước dừa để tăng hiệu quả tạo mô sẹo [10, 22]. Kết quả nghiên cứu của Abdelsalam và cs (2021); Khan và cs (2020) đã thu

được tỉ lệ tạo mô sẹo cao nhất (> 80%) khi bổ sung nước dừa 10% vào môi trường nuôi cấy giống mía GT 54-9 và CP 77/400 [10, 23]. Ngược lại, nghiên cứu trên các giống mía như: LK 92-11, Isd-16, Isd-28, CPF-246, SPF-234 và HSF-242 đã chỉ ra môi trường chỉ có 2,4-D và không bổ sung nước dừa vẫn thu được hiệu suất tạo mô sẹo tương tự [24 - 26]. Điều này có thể lý giải, do sự khác nhau về bản chất di truyền giữa các giống mía được sử dụng trong nghiên cứu. Nhận định này cũng phù hợp với kết quả thu được ở trên, trong đó việc bổ sung nước dừa chỉ tăng tỉ lệ tạo mô sẹo đối với một trong hai giống mía được nghiên cứu (giống Uthong 12).



Hình 5. Ảnh hưởng của nước dừa đến khả năng tạo mô sẹo mía

Ghi chú: Mô sẹo được tạo từ giống mía Uthong 12 và K84-200 trên môi trường nuôi cấy in vitro có bổ sung nước dừa với các nồng độ (v/v) khác nhau (0%, 5%, 10%). Giá trị trên đồ thị là tỉ lệ tạo mô sẹo trung bình của 3 lần thí nghiệm. Các chữ cái khác nhau trên cột thể hiện sự sai khác có ý nghĩa thống kê giữa giá trị trung bình của mỗi công thức thí nghiệm ($\alpha=0,05$). Thanh bar thể hiện giá trị độ lệch chuẩn.

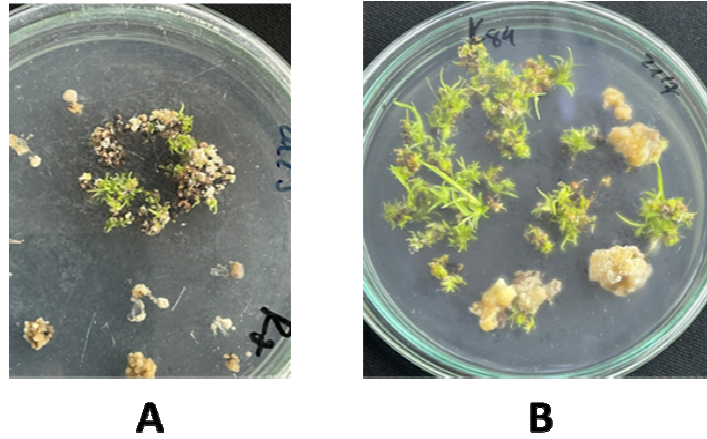
3.4. Đánh giá khả năng tái sinh chồi từ mô sẹo giống mía Uthong 12 và K84-200

Hiệu suất tái sinh chồi từ mô sẹo của mía không chỉ phụ thuộc nhiều vào bản chất giống mà còn chịu nhiều ảnh hưởng từ môi trường nuôi cấy, các loại chất kích thích, điều hòa sinh trưởng [27]. Do đó, thí nghiệm này được thiết kế nhằm mục đích đánh giá khả năng tái sinh của 2 giống mía

Uthong 12 và K84-200 trên nền môi trường tái sinh đã được công bố trước đây (Hình 6) [8, 9]. Kết quả quan sát mô sẹo mía sau 4 tuần nuôi cấy trên môi trường tái sinh chồi (Hình 7) cho thấy, có sự khác biệt rất lớn về số lượng mô sẹo tái sinh cũng như số lượng chồi/cụm chồi trung bình giữa các giống mía. Hiệu suất tái sinh chồi của giống mía Uthong 12 thấp hơn rõ rệt (16,6%) so với giống còn lại

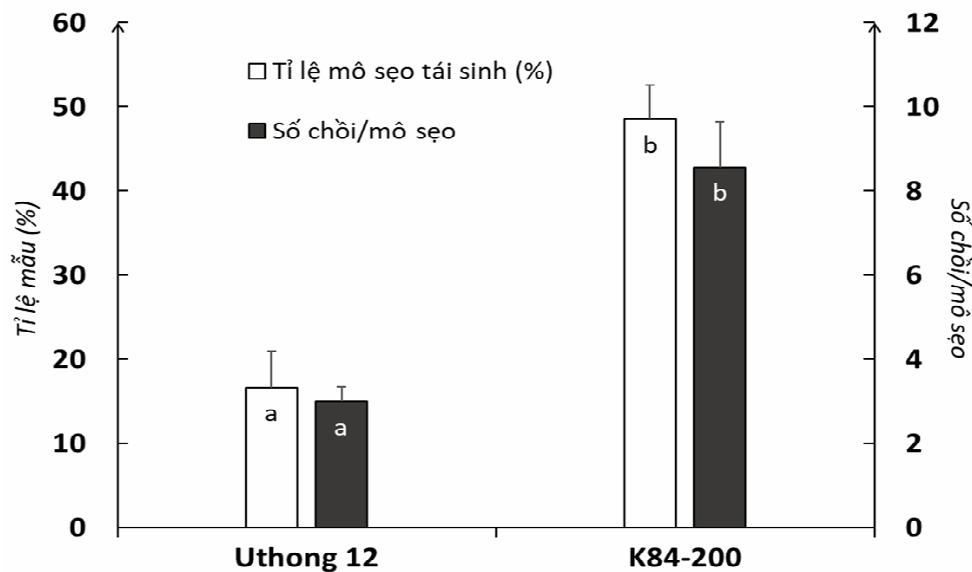
(48,5%). Đồng thời, số lượng chồi thu được từ giống K84-200 cũng cao hơn rất nhiều so với giống Uthong 12 (8,6 chồi/cụm mô sẹo so với 3,0

chồi/cụm mô sẹo). Điều này cho thấy, các nhận định trước đây về khả năng tái sinh của mía phụ thuộc rất nhiều vào bản chất giống [20].



Hình 6. Tái sinh chồi từ mô sẹo mía

Ghi chú: Chồi được tái sinh từ mô sẹo của các giống mía Uthong 12 (A), K84-200 (B) trên môi trường nuôi cấy in vitro. Hình ảnh được ghi lại sau 30 ngày nuôi cấy.



Hình 7. Khả năng tái sinh chồi từ mô sẹo của các giống mía

Ghi chú: Chồi được tái sinh từ mô sẹo của giống mía Uthong 12 và K84-200 trên môi trường nuôi cấy in vitro. Giá trị trên đồ thị là tỷ lệ % mô sẹo tái sinh và số chồi/mô sẹo trung bình của 3 lần thí nghiệm. Các chữ cái khác nhau trên cột thể hiện sự sai khác có ý nghĩa thống kê giữa giá trị trung bình của mỗi giống ($\alpha=0,05$). Thanh bar thể hiện giá trị độ lệch chuẩn.

Nghiên cứu của Roshan và cs (2012) với thành phần môi trường tương tự đã đạt được hiệu suất tái sinh 98% [9]. Shakra và cs (2017) sử dụng môi trường tái sinh có bổ sung NAA 0,5 mg/L và BAP

2,0 mg/L đã thu được tỷ lệ mô sẹo tái sinh rất cao với 4 giống mía: CPF-246, CPF-247, CPF-248, CPF-249 [27]. Nghiên cứu của Tripathy và Ithape (2020) cho thấy BAP 2,0 mg/L và TDZ 0,05 mg/L

đã được bổ sung vào môi trường tái sinh của 5 giống mía phổ biến của Ấn Độ, tỉ lệ tái sinh chồi đạt được từ 22,6 - 87,8% và số chồi/mô sẹo từ 5,8 - 16,0 [20]. Kết quả nghiên cứu này cứu cho thấy, khả năng tái sinh chồi từ mô sẹo ở cây mía bị ảnh hưởng nhiều bởi bản chất di truyền của giống. Hơn nữa, giống mía K84-200 có hiệu suất tái sinh chồi cũng như hệ số nhân chồi khá cao. Phan Thị Thu Hiền (2022) cũng đã nghiên cứu khả năng tái sinh chồi từ mô sẹo tạo thành từ cuộn lá non của giống mía KK3 và thu được hiệu suất khoảng 53% [28]. Như vậy, K84-200 có thể phù hợp để sử dụng cho các nghiên cứu chuyển gen/chỉnh sửa gen sau này. Tuy nhiên, điều này còn phụ thuộc vào khả năng tiếp nhận ADN ngoại lai của các giống mía.

4. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã thiết lập được thành phần môi trường tạo mô sẹo tối ưu cho 2 giống mía K84-200 và Uthong 12. Khả năng tạo mô sẹo của 2 giống mía nghiên cứu bị ảnh hưởng nhiều bởi 2,4-D, ít bị tác động bởi thành phần Casein, L-Proline và nước dừa trong môi trường nuôi cấy. Môi trường tạo mô sẹo tối ưu sử dụng 2,4-D 3,0 mg/L, Casein 500 mg/L và L-Proline 500 mg/L, nước dừa 10%; đạt hiệu suất 73,3 - 97,8%. Mô sẹo của hai giống mía K84-200 và Uthong 12 có tỉ lệ tái sinh chồi đạt 48,5 và 16,6%.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Kandel, R., Yang, X., Song, J., and Wang, J. (2018). Potentials, challenges, and genetic and genomic resources for sugarcane biomass improvement. *Front. Plant Sci.*, 9.
2. FAO (2021). FAOSTAT, FAO statistical databases. Available online at: <http://www.fao.org/faostat/zh/#data/>. Accessed January 5, 2024.
3. Chen, R., Xu, L., Lin, Y., Deng, Z., Zhang, M., Luo, J. (2011). Modern sugarcane genetic breeding (Beijing: China Agriculture Press), 2 - 12.
4. Cursi D. E., Castillo R. O., Tarumoto Y., Umeda M., Tippayawat A., Ponragdee W. (2022). Origin, genetic diversity, conservation, and traditional and molecular breeding approaches in

sugarcane, in *Cash crops*. Eds. Priyadarshan P. and Jain S.M. (Springer, Cham), 83 - 116.

5. Gonçalves M. C., Pinto L. R., Pimenta R. J. G., da Silva M. F. (2024). Sugarcane, in *Viral diseases of field and horticultural crops* (London: Academic Press), 193 - 205.

6. Schaart J. G., van de Wiel C. C. M., Lotz L. A. P., Smulders M. J. M. (2016). Opportunities for products of new plant breeding techniques. *Trends Plant Sci.*, 21(5): 438 - 449.

7. Razzaq A., Saleem F., Kanwa, M., Mustafa G., Yousaf S., Imran Arshad H. M., Hameed M. K., Khan M. S., Joyia F. A. (2019). Modern trends in plant genome editing: An inclusive review of the CRISPR/Cas9 toolbox. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(16): 4045.

8. Belete G., Kassahun B., Mulugeta D. (2017). *In vitro* shoot multiplication of two sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) genotypes using shoot apical meristem. *Advances in Life Science and Technology*, 53.

9. Roshan Z., Shahid A. K., Syed T. S., Muhammad S. K., Kafeel A., Shahenshah N. A. (2012). Efficient invitro regeneration of sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) from bud explants. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 26(4): 3094 - 3099.

10. Abdelsalam N. R., Grad W. E., Ghura N. S. A., Khalid A. E., Ghareeb R. Y., Desoky E. M., Rady M. M., Al-Yasi H. M., Ali E. F. (2021). Callus induction and regeneration in sugarcane under drought stress. *Saudi J. Biol. Sci.*, (12): 7432 - 7442.

11. Đồng Huy Giới, Ngô Thị Ánh (2017). Nghiên cứu sử dụng chế phẩm nano trong nuôi cấy mô cây mía (*Saccharum officinarum* L.). *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Nông nghiệp Việt Nam*, 6(79): 35 - 41.

12. Phan Thị Thu Hiền, Phạm Bá Hải, Bùi Thị Thuỷ, Phạm Ngọc Quỳnh, Phạm Bích Ngọc (2021). Nghiên cứu quy trình tái sinh hiệu quả giống mía KK3 thông qua callus phát sinh từ cuộn

lá non. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Lâm nghiệp*, 4: 11 - 20.

13. Baskaran P. B., Raja R., Jayabalan N. (2006). Development of an *in vitro* regeneration system in sorghum (*Sorghum bicholar* L.) using root tranverse thin layers (tTCLs). *Turk Journal of Botany*, 30: 1 - 9.

14. Mamun M. A., Sikdar M. B. H., Dipak K. P., Rahman M. and Rezuhanul Islam M. D. (2004). *In vitro* micropropagation of some important sugarcane varieties of Bangladesh. *Asian Journal of Plant Science*, 3(6): 666 - 669.

15. Tahir S. M., Victor K. and Abdulkadir S. (2011). The effect of 2,4-dichlorophenoxy acetic acid (2,4-D) concentration on callus induction in sugarcane (*Saccharum officinarum*). *Nigerian Journal of Basic and Applied Science*, 19 (2): 213 - 217.

16. Qin C., Dong Z., Lin W., Deng N. and Tang L. (2005). Effect of exogenous plant growth regulators on *in vitro* regeneration of cotyledonary explants in pepper. *Not. Bot. Hort. Agrobot. Cluj*, XXXIII.

17. Xing Z. Y., Yuan Y. H., Wang L. F. and Zheng L. P. (2010). Regenerating plants from *in vitro* culture of *Erigeron breviscapus* leaves. *African Journal of Biotechnology*, 9(26): 4022 - 4024.

18. Gandonuo C. H., Errabil T., Abrini J., Idaomar M., Chibi F. and Senhaji N. S. (2005). Effect of Genotype on callus induction from leaf explant of sugarcane (*Saccharum* spp). *African Journal of Biotechnology*, 4(11): 1250 - 1255.

19. Minhas D., Raham M. V. and Grover A. (1999). Maintenance of callus growth during sub-culturing is a genotype dependent response in rice: Mature seed-derived callus from IR54 rice cultivar lacks culture ability. *Curr. Sci.*, 77: 1410 - 1413.

20. Tripathy S. K., Ithape D. M. (2020). Genotypic response to callus induction and plant

regeneration in sugarcane, *Journal of Crop and Weed*, 16(2): 239 - 243.

21. Patrick S. M. (2011). Effects of coconut water on callus initiation and plant regeneration potentials of sweetpotato. *Journal and Proceedings of the Royal Society of New South Wales*, 144(3&4): 91 - 101.

22. Ullah M., Khan H., Khan M. S., Jan A., Ahmad K., Khan A. W. (2016). *In vitro* plant regeneration of Sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) the influence of variety, explant, explant position and growth regulators. *ARPN J. Agric. Biol. Sci.*, 11: 267 - 273.

23. Khan M., Ahmad W., Ahmed M., Ullah M., Jan A. (2020). Transformation of the *OsC3H52* gene promoter in tissue culture of sugarcane. *Journal of Animal and Plant Sciences*, 31: 2021.

24. Islam N., Laksana C., Chanprame S. (2016). *Agrobacterium* mediated transformation and expression of *BT* gene in transgenic sugarcane. *J. Int. Soc. Southeast Asian Agric. Sci.*, 22: 84 - 95.

25. Karim M. Z., Amin M. N., Hossain M. A., Aslam S., Hossain F., Alam R. (2002). Micro propagation of two *Sacharrum officinarum* varieties from callus culture. *J. Biol. Sci.*, 2: 682 - 685.

26. Nawaz M., Ullah I., Iqbal N., Iqbal M. Z., Javed M. A. (2013). Improving *in vitro* leaf disk regeneration system of sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) with concurrent shoot/root induction from somatic embryos. *Tur. J. Biol.*, 37: 726 - 732.

27. Shakra J., Rahil S., Ghulam M. T, Ghazala S., Sajid R., Razia S., Muhammad Z. I. (2017). Optimization of protocols for *in vitro* regeneration of sugarcane (*Saccharum officinarum*). *International Journal of Agronomy*, 2017: 1 - 8.

28. Phan Thị Thu Hiền (2022). Nghiên cứu sự tái sinh một bước *in vitro* của giống mía KK3 (*Saccharum officinarum* L.). *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Việt Nam*, 64(5): 70 - 74.

**INVESTIGATION OF FACTORS AFFECTING TISSUE CULTURE IN SUGARCANE
VARIETIES K84-200 AND UTHONG 12**

**Cao Le Quyen¹, Pham Thi Van¹, Nguyen Thi Thu Ha¹,
Nguyen Thanh Ha¹, Nguyen Thanh Duc¹, Pham Xuan Hoi¹, Nguyen Duy Phuong¹**

¹ Agricultural Genetics Institute

Summary

In the realm of scientific advancement, the utilization of genetic technology in the selection of sugarcane (*Saccharum* spp.) varieties has demonstrated remarkable superiority over traditional breeding methods. The emergence of the CRISPR/Cas9 gene editing technology has notably revolutionized molecular breeding. However, the efficacy of gene editing applications in plant breeding, particularly in the context of sugarcane, is substantially reliant upon the in vitro culture process and, more specifically, shoot regeneration efficiency. Notably, there exists a dearth of research on callus formation and shoot regeneration of prominent sugarcane varieties such as K84-200 and Uthong 12 in commercial production. This study has successfully identified the optimal composition of the callus-inducing medium for K84-200 and Uthong 12, incorporating 2,4-D (3.0 mg/L), Casein (500 mg/L), L-proline (500 mg/L) and 10% coconut water, resulting in a scar tissue creation efficiency of 73.3% and 97.8%, respectively. Additionally, the research has ascertained the shoot regeneration efficiency from callus of K84-200 and Uthong 12 to be 16.6% and 48.5%, respectively. These findings represent a crucial foundation for future investigations into gene editing systems pertaining to these two sugarcane varieties.

Keywords: *K84-200, in vitro, sugar cane, tissue culture, Uthong 12.*

Ngày nhận bài: 5/4/2024

Ngày chuyển phản biện: 20/5/2024

Ngày thông qua phản biện: 18/6/2024

Ngày duyệt đăng: 30/6/2024