

CÔNG NGHỆ SINH HỌC VÀ GIỐNG CÂY TRỒNG

THIẾT KẾ DÒNG TẾ BÀO CẢM ỨNG ỔN ĐỊNH SỬ DỤNG TRONG HỆ THỐNG BIỂU HIỆN PROTEIN

Nguyễn Thị Thu Hương¹

ABSTRACT

The ecdysone inducible system was generated for checking the toxicity of target gene which was transfected into the cells. The retinoid X receptor (RXR) was transfected into HEK293FT to generate the stable cell line pVgRXR-HEK293FT. For checking the function, the cells transfected with pIND-GFP and induced by 1 μ M ponasteron A for GFP expression. The fluorescence signal was detected in the transfected and induced cells informed the success of experiment.

TÓM TẮT

Hệ thống biểu hiện gen cảm ứng ecdysone được thiết kế với mục đích kiểm tra ảnh hưởng gây độc của gen đích. Yếu tố phiên mã (RXR) được chuyển vào tế bào HEK293FT để tạo ra dòng tế bào cảm ứng ổn định có tên gọi pVgRXR HEK293FT nhờ vào kỹ thuật chuyển gen bằng hóa chất. Để kiểm tra hoạt tính, plasmid pIND-GFP chứa protein chỉ thị GFP được chuyển vào các tế bào này và sử dụng ponasteron A để cảm ứng biểu hiện gen đích. Tín hiệu fluorescence ở các tế bào được chuyển gen và cảm ứng bởi ponasteron A chỉ ra sự biểu hiện của gen GFP.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Với mục đích tạo ra những protein mong muốn, các hệ thống biểu hiện được sử dụng một cách rộng rãi. Tuy nhiên, thành công của việc biểu hiện protein thường bị giới hạn bởi vì các ảnh hưởng gây độc của protein đích. Để khắc phục được những giới hạn này, các hệ thống cảm ứng được thiết kế như hệ thống phụ thuộc tetracycline (Tet), promoter/receptor tương tự *Drosophila* cảm ứng ecdysone, virus gây khối u ở chuột cảm ứng glucocorticoid (Ficca et al, 2004).

Hệ thống cảm ứng ecdysone có hoạt tính cơ sở thấp, tính cảm ứng cao, dải hoạt động cao, đáp ứng nhanh, có thể tắt khi loại bỏ chất cảm ứng (Padidam et al, 2003). Bên cạnh đó, do ecdysone là chất ưa lipid tự nhiên nên có thể xuyên qua tất cả các mô và có một nửa thời gian sống thấp nên cho phép cảm ứng chính xác và có hiệu lực (No et al, 1995; Oehme et al, 2005). Thêm vào đó, ecdysteroids không độc và không có ảnh hưởng tới các chức năng sinh lý của động vật có vú (No et al, 1996). Vì những lý do này, hệ thống promoter cảm ứng ecdysone được thiết kế để cảm ứng biểu hiện các tiểu đơn vị khác nhau của AchR trong nghiên cứu này. Thuộc hệ thống ecdysteroid, ecdysone là hormone steroid ở những côn trùng thay lông như *Drosophila melanogaster*. Khi nồng độ ecdysone tăng lên, gen mã hóa cho các protein mà ấu trùng cần và gây ra sự phồng của chromosome được biểu hiện. Trong phòng thí nghiệm, ecdysone hoặc các chất tổng hợp tương tự (münsterone A, ponasterone A), được sử dụng để liên kết với thụ thể và thúc đẩy quá trình nhai trùng hợp đơn vị phiên mã thứ nhất, thụ thể X retinoid (RXR) và đơn vị phiên mã thứ 2, thụ thể ecdyson cải biến (VgEcR), được thiết kế từ một promoter shock nhiệt tối thiểu kết hợp với yếu tố đáp ứng ecdysone/ glucocorticoid (Lueers et al, 2000). Cấu trúc này hoạt động như một phức hợp yếu tố phiên mã, cảm ứng cho sự biểu hiện gen đích.

¹ Trường Đại học Hồng Đức

Tuy nhiên, việc chuyển cả hai vector vào trong cùng một tế bào là một yếu tố trở ngại đáng kể của hệ thống này. Sau khi kết hợp vào trong hệ gen, hoạt động phiên mã của cả hai yếu tố này có thể bị ảnh hưởng từ trình tự genome vùng cánh, kết quả của một hệ thống không có chức năng (Luers et al, 2000).

2. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Nguyên liệu

Dòng tế bào HEK293FT (Life Technology); Plasmid pIND-GFP (Add gene); Plasmid pVG-RXR (Invitrogen).

2.2. Hóa chất

Các hóa chất được sử dụng trong nghiên cứu này đều là những hóa chất có tiêu chuẩn chất lượng cao của các hãng cung cấp lớn như Merck (Đức), Sigma – Aldrich (Đức), Invitrogen (Mỹ), Carl Roth (Đức), Fermentas (Đức), VWR (Đức).

2.3. Phương pháp

2.3.1. Nuôi cấy tế bào

Các tế bào HEK 293FT được nuôi cấy trong môi trường Dulbecco's Modified Eagle (D-MEM). Môi trường nuôi cấy được bổ sung thêm 10% huyết thanh bào thai bò (FBS), 2mM L-Alanyl – L- Glutamine, 1% các amino acid không thiết yếu, 2.25 mM Na₂CO₃ và 1 mM sodium pyruvate. Phương pháp nuôi cấy và tách chiết tế bào được tiến hành theo hướng dẫn của Küpper- 2009.

2.3.2. Thiết kế dòng tế bào cảm ứng ổn định pVgRXR HEK293FT

Plasmid pVgRXR được chuyển vào tế bào HEK293FT nhờ LipofectaminTM 2000 trong các đĩa 24 giếng. Một ngày sau khi chuyển gen, các tế bào sẽ được thu hoạch bằng trypsin, và chuyển vào các đĩa nuôi cấy tế bào 10cm với số lượng tế bào khác nhau (10⁴, 5x10⁴, 10⁵TB/đĩa). Hai ngày sau khi chuyển gen, Zeocin (200µg/ml) được sử dụng để phân lập các tế bào được chuyển gen. Các tế bào được tiếp tục nuôi cấy trong 3 tuần để hình thành cụm tế bào và môi trường nuôi cấy tế bào HEK293FT chứa Zeocin (200 µg/ml) được thay 2 lần/1 tuần. Loại bỏ các đĩa chứa nhiều hơn 50 cụm tế bào. Để kiểm tra chức năng, plasmid pIND-GFP được chuyển vào các tế bào mới được chuyển gen sử dụng các đĩa 96 giếng bằng phương pháp sử dụng LipofectaminTM 2000. 24h sau khi chuyển gen, các tế bào được bổ sung ponasteron A 1µM để cảm ứng biểu hiện gen đích (GFP). Quá trình cảm ứng này được thực hiện hàng ngày trong suốt 5 ngày. Hai mẫu đối chứng được sử dụng: 1) các tế bào HEK293FT không chuyển gen; 2) các tế bào pVgRXR-HEK293FT được chuyển gen với pIND-GFP nhưng không được cảm ứng bởi ponasteron A.

3. KẾT QUẢ

Sau 3 tuần nuôi cấy, 21 cụm tế bào được hình thành trên bề mặt nuôi cấy (số liệu không chỉ ra). Sáu trong số 21 cụm tế bào này có tín hiệu mạnh sau khi được chuyển gen với pIND-GFP và được cảm ứng với ponasteron A 1µM. Kết quả của cụm tế bào số 11 và 16 được sử dụng làm kết quả đại diện.

Không có tín hiệu fluorescence nào được tìm thấy ở mẫu đối chứng số 1-tế bào HEK293FT không được chuyển gen (IC). Tuy nhiên, tín hiệu fluorescence yếu được tìm thấy ở các tế bào HEK293FT được chuyển gen pIND-GFP cảm ứng hoặc không cảm ứng với ponasteron A (IA, IB). Trong trường hợp các tế bào pVgRXR-HEK293FT mới được hình thành (cụm tế bào 11 và 16 được sử dụng làm đại diện), tín hiệu fluorescence rất rõ được phát hiện ở các tế bào chuyển gen với pIND-GFP và cảm ứng bởi ponasteron A 1 μ M (IIA, IIIA). Tuy nhiên, chỉ hai cụm tế bào 11 (II) và 17 (số liệu không chỉ ra) không tìm thấy tín hiệu fluorescence sau khi được chuyển với pIND-GFP và không cảm ứng bởi ponasteron A. Ngược lại, một vài tín hiệu yếu được tìm thấy ở 4 cụm tế bào còn lại (cụm tế bào 16- IIIB). Thêm vào đó, các tín hiệu fluorescence yếu cũng được tìm thấy ở các tế bào pVgRXR-HEK293FT không được chuyển gen pIND-GFP nhưng được cảm ứng ponasteron A 1 μ M (IIC, IIIC).

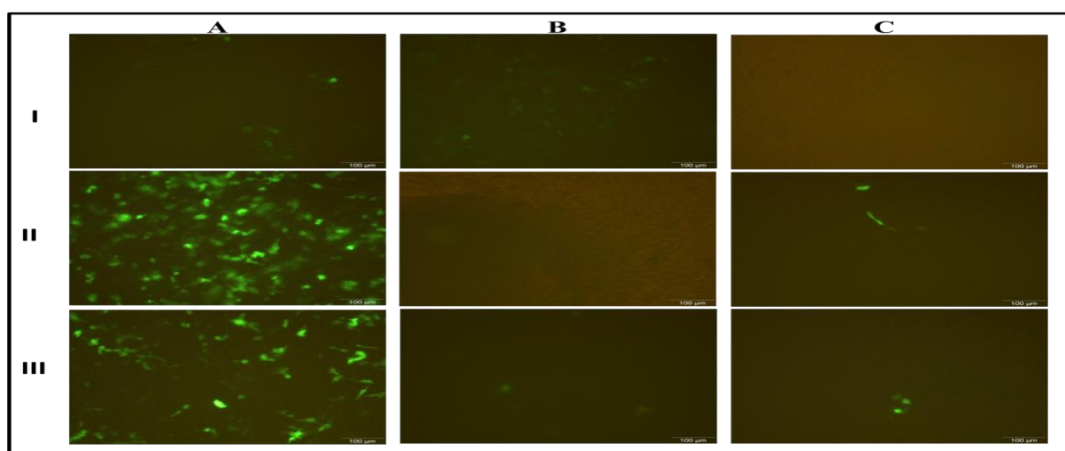


Figure 2: Kiểm tra chức năng của dòng tế bào cảm ứng ổn định pVGRXR HEK293FT

I: tế bào HEK 293FT cell, II: cụm tế bào pVgRXR HEK293 FT 11, III: tế bào pVgRXR HEK293FT 16. A: các tế bào được chuyển gen pIND-GFP và cảm ứng bởi ponasteron A; B: các tế bào chuyển gen pIND-GFP nhưng không được cảm ứng ponasteron A; C: Các tế bào không được chuyển gen nhưng được cảm ứng bởi ponasteron A. Sự biểu hiện GFP yếu được tìm thấy ở các tế bào HEK293FT được cảm ứng (IA) và không được cảm ứng (IB) ponasteron A. Không tín hiệu fluorescence nào được phát hiện ở các tế bào không chuyển gen pIND-GFP nhưng được cảm ứng bởi ponasteron A (IC). Tín hiệu fluorescence mạnh được tìm thấy ở các tế bào pVGRXR HEK293FT cụm 11(IIA) và cụm (IIIA) sau khi được chuyển gen pIND-GFP và cảm ứng bởi ponasteron A. Các tế bào chuyển gen không được cảm ứng ponasteron A, sự biểu hiện gen GFP không được tìm thấy ở cụm tế bào 11(IIIB) nhưng thể hiện yếu ở cụm tế bào 16 (IIIB). Ở các tế bào pVgRXR HEK293FT không được chuyển gen pIND-GFP nhưng được cảm ứng ponasteron A một vài tế bào biểu hiện gen GFP (IIC, IIIC). Hình ảnh được chụp từ kính hiển vi fluorescence CKX41. Scale bar: 100 μ m; Expose time: 2.0s.

4. THẢO LUẬN

Để chọn lọc dòng tế bào ổn định pVgRXR-HEK293FT, các tế bào được xử lý Zeocin 200 μ g/ml. Ở các cụm tế bào được phân lập, tín hiệu fluorescence thể hiện sự biểu hiện của gen đích GFP ở các tế bào được chuyển gen với pIND-GFP và cảm ứng bởi ponasteron A 1 μ M. Kết quả này phù hợp với báo cáo của Lueers và cộng sự. Ở nghiên cứu này, sau khi chuyển pVG-RXR và pER-EGFP vào các tế bào CHO (Chinese hamster ovary) và nuôi cấy

để hình thành các cụm tế bào và sử dụng Zeocin 100µg/ml để phân lập. Các tín hiệu fluorescence chỉ ra sự biểu hiện của gen đích GFP ở các tế bào chuyển gen và sử dụng ponasteron A 1µM để cảm ứng (Lueers et al, 2000). Sự xuất hiện của tín hiệu fluorescence ở các tế bào HEK293FT chuyển gen pIND-GFP kể cả cảm ứng và không cảm ứng ponasteron A. Kết quả này cho thấy sự biểu hiện của gen đích GFP có thể thực hiện ở điều kiện bình thường. Thêm vào đó, 4 trong số 6 cụm tế bào thu thập được có tín hiệu fluorescence yếu sau khi chuyển gen với pIND-GFP nhưng không được cảm ứng ponasteron A. Kết quả cho thấy sự rò rỉ của hệ thống biểu hiện protein cảm ứng. Ngay cả khi chỉ một số ít gen đích được biểu hiện, kết quả này sẽ tăng theo cấp số nhân theo chu kỳ phân chia tế bào. Do đó, 4 cụm tế bào này bị loại bỏ và 2 cụm tế bào không biểu hiện bất kỳ tín hiệu fluorescence nào sau khi chuyển gen với pIND-GFP nhưng không được cảm ứng ponasteron A, được giữ lại cho các nghiên cứu sâu hơn. Kết quả này chứng tỏ hệ thống biểu hiện protein cảm ứng ecdysone là một công cụ hữu hiệu trong việc kiểm soát sự biểu hiện của gen đích.

5. KẾT LUẬN

Thiết kế thành công dòng tế bào cảm ứng ổn định pVGRXR HEK293FT. Để tiếp tục hướng nghiên cứu này, hai cụm tế bào thu thập được sẽ được kiểm tra lại chức năng và sử dụng để biểu hiện các gen mong muốn.

Lời cảm ơn

Nghiên cứu được thực hiện tại Phòng Thí nghiệm Sinh học Phân tử, Trường Đại học Kỹ thuật Brandenburgische, Cottbus- Senftenberg, Đức.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. David No, Tso – Pang Yao, and Ronald M. Evan (1995), Ecdysone – inducible gene expression in mammalian cells and transgenic mice, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Volume 93, pp: 3346-3351.
2. Georg Hermann Lueers, Nicole Jess, Thomas Franz (2000), Reporter – linked monitoring of transgene expression in living cells using the ecdysone – inducible promoter system, *European Journal of Cell Biology*, Volume 79, pp: 653-657.
3. I Oehme, S Boßser, and M Zörnig (2006), Agonists of an ecdysone-inducible mammalian expression system inhibit Fas Ligand- and TRAIL-induced apoptosis in the human colon carcinoma cell line RKO, *Cell Death and Differentiation*, Volume 13, pp:189–201
4. Invitrogen (2006), Lipofectamin™ 2000 user guider
5. Küpper JH (2009): Lab Manual and SOPs Molecular Cell Biology. Senftenberg
6. Mirella L. Meyer- Ficca, Ralph G. Meyer. Heike Kaiser, Alexandra R. Brack, Reinhard Kandolf, Jan-Hainer Kuepper (2004), Comparative analysis of inducible expression systems in transient transfection studies, *Analytical Biochemistry*, Volume 334, pp: 9-19.

PHÂN LẬP VÀ TUYỂN CHỌN DÒNG NẤM CHO SẢN XUẤT MEN RƯỢU BẰNG PHƯƠNG PHÁP SẤY THĂNG HOA

Trịnh Lan Hồng¹

ABSTRACT

In this research, Five dominant mold and three dominant yeast strains were isolated and purified. By screening test of saccharification efficiency, 3 mold isolates were selected and designed as TB-M₂, TH-M₁, and DL-M. By screening test of alcohol production, 3 yeast strains were selected and designed as TB-Y, TH-Y and DL-Y. The potential of mold and yeast strain were TB-M₂ and DL-Y, identified as *Mucor spp* HLT₀₁ and *Saccharomyces cerevisiae*, respectively for freeze dried starter culture.

Keywords: Rice wine, *Saccharomyces cerevisiae*, *Mucor*, freeze-dried starter

TÓM TẮT

Kết quả nghiên cứu đã phân lập được 5 dòng nấm mốc và 3 dòng nấm men điển hình. Sơ tuyển được 3 dòng nấm mốc cho khả năng đường hóa tinh bột cao nhất là TB-M₂, TH-M₁, và DL-M, và 3 dòng nấm men cho khả năng rượu hóa cao nhất là TB-Y, YH-Y và DL-Y. Dòng nấm mốc TB-M₂ và dòng nấm men DL-Y được định danh sơ bộ tương ứng với *Mucor spp* HLT₀₁ and *Saccharomyces cerevisiae* và là hai dòng được tuyển chọn cho sản xuất men rượu theo phương pháp sấy thăng hoa.

Từ khóa: Rượu, *Saccharomyces cerevisiae*, *Mucor*, men rượu đông khô, sấy thăng hoa

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Ở Việt Nam, rượu nếp được sản xuất từ nguồn giống vi sinh vật dưới các dạng bánh men làm rượu. Các nguồn giống chủng này ảnh hưởng lớn đến năng suất và chất lượng rượu. Một số báo cáo điều tra cho thấy có rất nhiều loại nấm men và nấm mốc tồn tại trong các bánh men rượu. Sự đa dạng về chủng loại phụ thuộc vào vùng miền, nguyên vật liệu, kinh nghiệm và môi trường làm bánh men. Bên cạnh các hệ vi sinh vật có ích cho quá trình lên men rượu, bánh men truyền thống còn có rất nhiều các chất nhiễm bẩn và các chủng vi sinh vật gây hại đến sức khỏe con người cũng như làm giảm chất lượng rượu thành phẩm. Nguyên nhân chủ yếu của bánh men không an toàn là tại các địa phương, người dân chủ yếu sản xuất bánh men theo phương pháp truyền thống với hỗn hợp các dòng vi sinh vật không thuần chủng từ các loại lá và bánh men sẵn có.

Từ đó, nghiên cứu này thực hiện nhằm giải quyết vấn đề còn hạn chế về chất lượng kém, không ổn định và tuổi thọ ngắn của bánh men rượu truyền thống, bằng cách phân lập và tuyển chọn các dòng vi sinh vật là nấm men, nấm mốc hữu ích cho sản xuất rượu từ các mẫu bánh men thu thập ở 3 miền Bắc – Trung – Nam để ứng dụng sản xuất men rượu theo phương pháp sấy thăng hoa.

2. NGUYÊN VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nguyên vật liệu, thời gian, địa điểm

Các mẫu bánh men rượu truyền thống thu thập từ 3 miền Bắc – Trung – Nam.

Nghiên cứu được tiến hành năm 2014 tại Phòng thí nghiệm vi sinh thực phẩm, Trường đại học Los Banos, Philippines.

¹ Trường Đại học Hồng Đức

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phân lập các dòng nấm thuần chủng điển hình

Lấy 10g mẫu men rượu đã nghiền nhỏ cho vào 90ml nước muối sinh lý vô trùng 0.85%, đồng nhất mẫu, pha loãng theo dãy số thập phân và nuôi cấy trong môi trường thạch khoai tây PDA ở 30°C trong 48 giờ. Chọn các khuẩn lạc nấm mốc và nấm men điển hình đem cấy chuyển trên môi trường thạch nghiêng và nuôi cấy ở 30°C trong 48 giờ nhiều lần đến khi thu được các dòng thuần.

2.2.2. Sơ tuyển các dòng nấm mốc có khả năng đường hóa tinh bột

Dịch huyền phù của các dòng nấm mốc được cấy vào 50g cơm nếp đã làm nguội đến nhiệt độ khoảng 40-45°C trong bình tam giác và ủ ở điều kiện hiếu khí trong 3 ngày. Các mẫu được đem phân tích lượng đường tổng số và đường khử. Dòng nấm mốc cho 2 chỉ số này cao được chọn cho sản xuất men đông khô.

2.2.3. Đánh giá hiệu suất đường hóa của men nấm mốc đông khô

Quy trình sản xuất men rượu đông khô bằng phương pháp sấy thăng hoa được tiến hành theo quy trình của Dizon và cộng sự (2009).

Các mẫu men đông khô với dòng nấm mốc đơn và hỗn hợp sau khi nghiền nhỏ lần lượt được cấy đều vào các phần cơm nếp 100g riêng rẽ theo tỷ lệ 1%. Sau 3 ngày ủ trong điều kiện hiếu khí, tất cả các mẫu được phân tích tỷ lệ đường tổng số và đường khử. Mẫu men cho tỷ lệ cao nhất tương ứng với chủng nấm mốc được lựa chọn và ứng dụng trong sản xuất rượu.

2.2.4. Đánh giá khả năng lên men rượu của các dòng nấm men

Các dòng nấm men được cấy riêng biệt ở dạng đơn và hỗn hợp vào các bình lên men đặc dụng trên cơ chất là cơm ủ với chủng nấm mốc được chọn. Hỗn hợp được lên men yếm khí trong 10 ngày, lọc vào bình vô trùng, lắng và xác định hàm lượng cồn.

2.2.5. Định danh sơ bộ dòng nấm cho sản xuất men đông khô

Các dòng nấm men và nấm mốc lựa chọn được định danh sơ bộ dựa trên các thí nghiệm đặc trưng về môi trường, hình thái, sinh lý và sinh hóa theo phương pháp của Lodder (1970), Alexopoulos và cộng sự (1996), Kurtzman và Fell (1998), Cappuccino và Sherman (2001), Watanabe (2002)

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Phân lập các dòng nấm thuần chủng điển hình

Kết quả phân lập và chọn lựa được 5 dòng nấm mốc và 3 dòng nấm men điển hình. Các mẫu được dán nhãn dựa trên loại dòng nấm và khu vực thu thập mẫu.

3.2. Sơ tuyển các dòng nấm mốc có khả năng đường hóa tinh bột

Đánh giá khả năng đường hóa của các dòng nấm mốc dựa trên tỷ lệ hàm lượng đường tổng số và đường khử. Kết quả sơ tuyển được 3 dòng có ký hiệu TB-M₂, TH-M₁, và DL-M là cho khả năng đường hóa tinh bột cao nhất.

3.3. Đánh giá hiệu suất đường hóa của men nấm mốc đông khô

Từ 3 dòng nấm mốc tiềm năng được lựa chọn, tạo ra được 7 mẫu men theo phương pháp sấy thăng hoa có chứa dòng nấm đơn và nấm hỗn hợp. Sau thí nghiệm, hai mẫu men tương ứng chứa dòng nấm TB-M₂ và TH-M₁ được đánh giá là tiềm năng nhất trong 7 mẫu men cho sản xuất rượu.

Bảng 1. Hàm lượng đường tổng số và đường khử của các dòng nấm mốc sau 3 ngày ủ

DÒNG NẤM MỐC		ĐƯỜNG TỔNG SỐ (% chất khô)	ĐƯỜNG KHỬ (% chất khô)
Dòng nấm đơn	TB-M ₂	44.13 ± 0.03 ^a	33.01 ± 0.03 ^b
	TH-M ₁	38.70 ± 0.02 ^b	20.23 ± 0.04 ^c
	DL-M	17.35 ± 0.04 ^c	9.28 ± 0.03 ^d
Hỗn hợp các dòng	TH-TB - M	22.24 ± 0.04 ^d	16.24 ± 0.01 ^a
	TH-DL - M	21.82 ± 0.03 ^e	17.45 ± 0.03 ^e
	TB-DL - M	21.47 ± 0.01 ^f	15.76 ± 0.06 ^a
	TB-TH-DL - M	16.99 ± 0.02 ^g	11.00 ± 0.04 ^f

Giá trị trung bình trong cùng một cột có cùng chữ cái không khác biệt đáng kể tại mức ý nghĩa 0.05

3.4. Đánh giá khả năng lên men rượu của các dòng nấm men

Hàm lượng cồn tạo ra bởi ba dòng nấm men riêng rẽ trên cơ chất ủ từ nấm mốc TH-M₁ tương đối thấp chỉ từ 9 – 11%, tỷ lệ này thấp hơn so với tỷ lệ được tạo ra trên cơ chất ủ từ nấm mốc TB-M₂. Hàm lượng cồn tạo ra nhiều nhất sau quá trình lên men là 13% từ mẫu ứng dụng dòng nấm men DL-Y trên cơ chất ủ của dòng nấm mốc TB-M₂. Do đó dòng nấm mốc TB-M₂ và dòng nấm men DL-Y là hai dòng được tuyển chọn cuối cùng ứng dụng trong sản xuất men rượu theo phương pháp sấy thăng hoa và quy trình sản xuất rượu.

Bảng 2. Hàm lượng cồn tạo ra bởi các dòng nấm men khác nhau

MẪU NẤM		HÀM LƯỢNG CỒN (%)
Nấm mốc	Nấm men	
TH – M ₁	TB – Y	11.0 ^{ac}
	TH – Y	9.0 ^b
	DL – Y	11.0 ^{ac}
TB – M ₂	TB – Y	12.0 ^{ac}
	TH – Y	10.0 ^{ac}
	DL – Y	13.0 ^d

Giá trị trung bình có cùng chữ cái không khác nhau đáng kể tại mức ý nghĩa 0.05

3.5. Định danh sơ bộ dòng nấm cho sản xuất men đông khô

3.5.1. Định danh sơ bộ nấm mốc ký hiệu TB-M₂

Khuẩn lạc của TB-M₂ có màu trắng khi mới xuất hiện sau đó chuyển nâu, dạng bông, phát triển rất nhanh, đường kính sau 3 ngày nuôi cấy trong đĩa petri ở nhiệt độ phòng lên tới 68-81 cm. Sợi nấm không có vách ngăn và rễ giả. Giá nang phân nhánh, trong suốt, nhẵn, có chỗ phình ra, kích thước giá nang là 57,91 x 3,28 µm (26,67-106,68 x 1,14-7,62 µm, n = 10).

Túi bào tử hình bầu dục đến hình cầu, có trụ bào tử, trong suốt, nhẵn, kích thước $20.00\ \mu\text{m} \times 18.59\ \mu\text{m}$ ($11,43\text{-}38,10\ \mu\text{m} \times 11,43\text{-}34,29\ \mu\text{m}$, $n = 10$) (Hình 1). Đó là các đặc trưng về hình thái của dòng nấm mốc *Mucor* sp. và được đặt tên là *Mucor* sp. HLT₀₁.

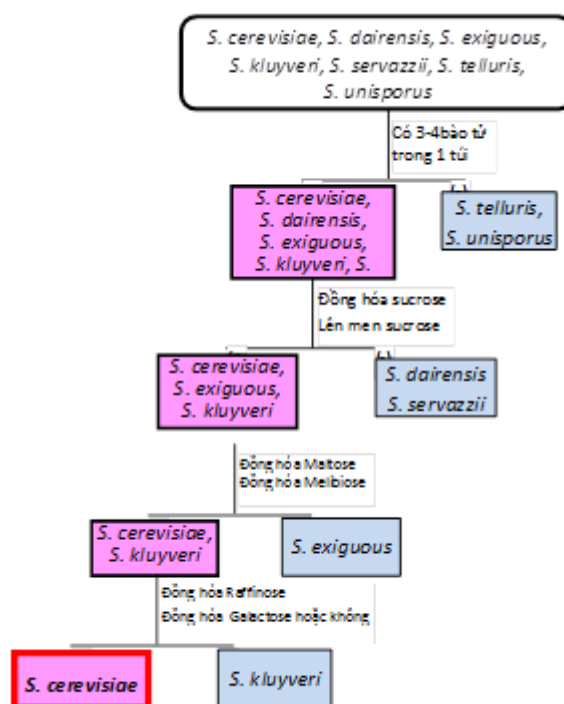
3.5.2. Định danh sơ bộ nấm men ký hiệu DL-Y

Dòng nấm men DL-Y mang những đặc tính thuộc họ Saccharomycetoideae, chi *Saccharomyces* và loài *cerevisiae*. Về hình thái, nó hình thành bào tử túi có chứa 1-4 bào tử, không hình thành sợi nấm. Đây là loại nấm có khả năng đồng hóa đường sucrose, maltose, melibiose nhưng không đồng hóa raffinose.

Hình 1. (1A) Đặc tính hình thái của dòng nấm mốc *Mucor* sp.HLT01; (1B) Sơ đồ xác định loài nấm men thuộc chi *Sacchromyces*



1A



1B

4. KẾT LUẬN

Phân lập và sơ tuyển bước đầu đã chọn được 5 dòng nấm mốc và 3 dòng nấm men điển hình dựa trên khả năng đường hóa tinh bột và khả năng chuyển hóa tạo cồn. Trong đó có 2 dòng nấm mốc tiềm năng để ứng dụng trong lên men rượu là TB-M₂ và TH-M₁. Kết quả cuối cùng tìm ra 2 dòng nấm phù hợp nhất để ứng dụng vào sản xuất men rượu đông khô bằng phương pháp sấy thăng hoa, gồm một dòng nấm mốc ký hiệu TB-M₂ cho hàm lượng đường tổng số và đường khử cao nhất tương ứng đạt 44.13% và 33.01% được định danh sơ bộ là *Mucor* sp. HLT₀₁ và một dòng nấm men ký hiệu DL-Y cho tỷ lệ cồn cao nhất đạt 13% được định danh là *Saccharomyces cerevisiae*.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Alexopoulos CJ, Mims CW, Blackwell M. (1996). Introductory Mycology. 4th ed. John Wiley and Sons, Inc., N.Y., USA. 869 pp.
2. Cappuccino JG, Sherman N. (2001). Microbiology: A laboratory manual. 6th Ed. Pearson Education Inc., San Francisco Boston New York, USA.
3. Dizon EI, Del Rosario OM, Romero MV, Bandonill EH, Morales AV. (2009). Standardization of Starter Culture for Rice Wine (*Tapuy*) Processing. Annual Report. PHILRICE/UPLB.
4. Dizon EI, Del Rosario OM, Lizardo RCM, Tabion MJ, Ibanez VIC. (2013). Establishment of Microbial Succession of Starter Culture for Rice Wine (*Tapuy*) Processing. Terminal Report. TECHNICOM-DOST and UP Los Banos.
5. Dung NTP, Rombouts FM, Nou MJR. (2005). Development of defined mixed-culture fungal fermentation starter granulate for controlled production of rice wine. Innov. Food Sci. Emerg. Technol., 6, 429-441.
6. Kurtzman CP, Fell JW (eds). (1998). The Yeasts, a Taxonomic Study. 4th ed. Elsevier Science B.V., Amsterdam, The Netherlands. 1035 pp.
7. LEE AC, FUJIO Y. 1999. Microflora of banh men, a fermentation starter from Vietnam. World Journal of Microbiology and Biotechnology 15: 57– 62.
8. Lodder J. 1970. The Yeasts, A Taxonomic Study. 2nd ed. North-Holland Publishing Co., Amsterdam, The Netherlands.

KHẢO SÁT MỘT SỐ ĐẶC ĐIỂM NÔNG SINH HỌC VÀ PHÁT HIỆN GEN CHÍN CHẬM TRONG TẬP ĐOÀN GIỐNG CÀ CHUA MỚI NHẬP NỘI

Nguyễn Thị Vân¹

ABSTRACT

Tomato is one kind of fruits, which has high economic and nutrient values. To create tomato varieties with characteristics include delayed ripening, we have conducted using PCR techniques to detect the imported tomatoes that have genes delay ripening process. This is very important in creation of material sources for selection of high quality tomato breeding.

Keywords: tomato, delayed ripening gen

TÓM TẮT

Cây cà chua là loại rau ăn quả có giá trị kinh tế và dinh dưỡng cao. Để tạo ra giống cà chua có đặc tính chín chậm chúng tôi đã tiến hành sử dụng kỹ thuật PCR nhằm phát hiện khả năng mang gen chín chậm của tập đoàn giống cà chua nhập nội. Điều này có ý nghĩa rất quan trọng trong việc tạo ra nguồn vật liệu cho quá trình chọn tạo giống cà chua có chất lượng cao.

Từ khóa: cà chua, cà chua chín chậm.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Cây cà chua (*Lycopersicum esculentum* Mill) là loại rau ăn quả có giá trị dinh dưỡng cao, được trồng với diện tích lớn nhất trong các cây rau. Sản xuất cà chua ở miền Bắc nước ta chủ yếu ở vụ đông xuân có nhiều yếu tố môi trường thuận lợi cho cà chua sinh trưởng, phát triển và ít bị sâu bệnh phá hại nên năng suất và chất lượng khá cao (Nguyễn Thị Hồng Thuý, 2009) [1]. Tuy nhiên do thu hoạch tập trung nên giá tương đối thấp ảnh hưởng đến thu nhập của người sản xuất. Trong khi đó, từ tháng 6 – 9 không có đủ cà chua cung cấp cho thị trường. Vì thế, đã có nhiều biện pháp kỹ thuật nhằm rải vụ cà chua nhưng các giống mới chọn tạo của ta hiện nay chưa có giống nào có đặc tính chín chậm của quả.

Hiện nay nhờ sự phát triển của khoa học công nghệ nhiều nước trên thế giới như Mỹ, Pháp và Nhật đã tạo được nhiều giống cà chua có tính chín chậm hoặc không chín. Những giống cà chua có đặc tính này quả dù đạt kích thước và tích lũy đủ chất khô nhưng không chín trên cây do mất khả năng sinh tổng hợp ethylene - là hormone tín hiệu giúp hoạt hoá nhiều enzyme xúc tiến cho quá trình làm quả chín (Brady và cộng sự, 1985) [2]. Tính chín chậm hoặc không chín được xác định là do một số gen quy định như: gen ức chế quá trình chín của quả, ký hiệu là *rin* (ripening inhibitor) nằm trên nhiễm sắc thể 5 (Vrebalov và cộng sự, 2002) [4], gen *nor* (non-ripening) và gen *Nr* (Never-ripening) [3] quy định tính không chín... Hiện nay người ta đã tìm thấy một số chỉ thị phân tử DNA để phát hiện và chọn lọc các gen gây nên tính chín chậm này. Quả cà chua chín chậm có thời gian sử dụng lâu hơn, độ cứng cao hơn cà chua thông thường do đó ít bị thối dập trong khi vận chuyển, kéo dài được thời gian bảo quản cũng như thời gian sử dụng mà vẫn đảm bảo chất lượng. Chính vì thế, chọn tạo

¹ Trường Đại học Hồng Đức

giống cà chua có đặc tính chín chậm là một giải pháp ưu việt nhằm rải vụ trong nhà mà không cần trồng trái vụ trên đồng ruộng.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

Vật liệu: 18 mẫu giống cà chua nhập nội từ Pháp, Mỹ, Nhật và Nga. Thí nghiệm khảo sát đặc điểm nông sinh học sử dụng đối chứng là giống cà chua Hồng Lan

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Tách chiết DNA cà chua

DNA được chiết xuất theo phương pháp CTAB (Doyle và Doyle, 1990).

2.2.2. Chạy PCR phát hiện gen chín chậm rin

➤ Thành phần phản ứng PCR: 25µl phản ứng bao gồm 5 µl 5X buffer; 3 µl MgCl₂ 3mM; 0,2 µl dNTPs mix 25mM; 1,25 µl F primer 0,5 µM; 1,25 µl R primer 0,5 µM; 0,1 µl Taqpolymerase 0,5 unit; 1 µl Template DNA; thêm nước cất đến 25 µl.

➤ Trình tự cặp mồi (Zhang và cộng sự, 2010)[5]

F: 5'TTAAGTTGCGAAGAAGACTTGTTACCTT3'

R : 5'GCCAAAACACTTCAATTCCTTTAAAATT3'

➤ Chu kỳ nhiệt của phản ứng PCR: 94°C trong 4 phút; 35 chu kỳ: 94°C trong 30 giây, 53°C trong 1 phút, 72°C trong 1 phút và kết thúc là 72°C trong 10 phút.

2.2.3. Điện di, nhuộm và kiểm tra sản phẩm trên gel agarose

Các mảnh khuếch đại bằng PCR sau đó được phân tách bằng điện di trên gel agarose 2% trong đệm TAE 1 X, nhuộm với ethidium bromide và hiển thị dưới ánh sáng UV.

2.3. Phương pháp xử lý số liệu

Các số liệu nghiên cứu được xử lý bằng phần mềm Excel 2007.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Khảo sát một số đặc điểm nông sinh học

3.1.1. Khảo sát các giai đoạn sinh trưởng

Bảng 1. Các giai đoạn sinh trưởng của các mẫu giống cà chua

STT	MG	Thời gian từ trồng đến (ngày)		
		Ra hoa	Thu quả đợt 1	Kết thúc thu hoạch
1	152	28	74	96
2	153	30	68	89
3	160	27	75	97
4	163	30	72	98
5	164	29	68	97
6	R1	28	68	89

STT	MG	Thời gian từ trồng đến (ngày)		
		Ra hoa	Thu quả đợt 1	Kết thúc thu hoạch
7	R2	27	63	87
8	R3	28	68	87
9	R4	27	68	90
10	R5	26	63	86
11	R6	27	63	86
12	R7	28	74	90
13	167	34	76	96
14	168	36	74	94
15	189	33	69	91
16	H13	28	59	89
17	H14	27	63	82
18	ĐC	31	67	108

Bảng 1 cho thấy các mẫu giống ra hoa sớm nhất là R5 (26 ngày); 18, 160, R2, R4, R6 và H14 (27 ngày), muộn nhất là 168 (36 ngày), đối chứng Hồng Lan ra hoa tương đối sớm, 31 ngày sau trồng.

Thời gian từ trồng đến thu quả đợt 1 cho thấy các mẫu giống cho thu quả sớm nhất là H13 (59 ngày) và 190 (61 ngày); muộn nhất là giống 167 cho thu quả lần đầu sau 76 ngày, giống đối chứng cho thu quả lần đầu sau 67 ngày trồng.

3.1.2. Năng suất và các yếu tố cấu thành năng suất

Các giống có tỷ lệ đậu quả không đều, trong đó thấp nhất là 163 (31.5 %), cao nhất là mẫu giống 152 (94.8 %), đa số đạt trên 50 %, và đối chứng có tỷ lệ đậu quả cao (87.5 %).

Giống có năng suất cao nhất là các mẫu giống R3 (2531g). Ngoài ra, nhiều mẫu giống trong tập đoàn nghiên cứu có tổng năng suất cá thể cao hơn đối chứng (2011.9 g), 164 có năng suất cá thể rất thấp, chỉ đạt dưới 500 g.

Bảng 2. Năng suất và các yếu tố cấu thành năng suất của các mẫu giống cà chua

TT	MG	Tỷ lệ đậu quả (%)	Số chùm quả/cây (chùm quả)	Số quả/cây	KLTB quả (g/quả)	NSCT (g/cây)
1	152	94,8	10,4	175,4	13,1	1947,6
2	153	62,3	9,7	164,0	12,3	1853,9
3	160	51,3	8,2	71,3	17,0	1213,5
4	163	31,5	7,1	160,1	12,2	1794,0
5	164	33,3	6,7	12,3	38,1	471,9
6	R1	42,5	7,8	6,4	102,1	659,2
7	R2	42,9	9,8	9,3	94,1	883,9

8	R3	61,1	7,5	21,9	115,2	2531,8
9	R4	32,4	8,4	6,7	132,2	891,3
10	R5	52,7	8,3	14,1	94,0	1333,3
11	R6	44,6	7,4	8,2	182,2	771,5
12	R7	72,5	6,9	12,8	100,8	1299,6
13	167	45,5	9,7	43,9	19,7	865,2
14	168	43,2	9,1	26,8	52,1	1400,7
15	189	57,6	5,1	15,9	50,3	800,0
16	H13	61,8	9,5	18,6	70,3	1323,7
17	H14	50,7	10,5	10,5	106,8	1121,6
18	ĐC	87,5	7,9	34,0	67,9	2011,9

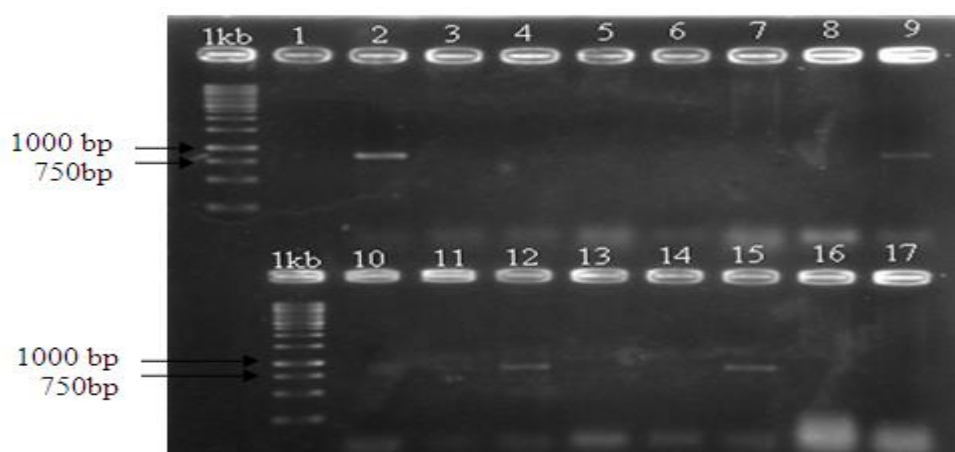
3.2. Kết quả PCR phát hiện gen chín chậm *rin*

Trong nghiên cứu này, đã tiến hành phản ứng PCR với cặp mồi đặc thù phát hiện gen chín chậm *rin* được phát triển bởi Zhang Xiaoli và cộng sự (2010)[5]. Cặp mồi này phát hiện được các mẫu giống mang gen *rin* nhưng không phân biệt được trạng thái đồng hợp tử hay dị hợp tử [5].

Kết quả PCR trình bày trong hình cho thấy mẫu giống 168, 167, R7 có vạch băng với kích thước 850 bp. Kích thước vạch băng PCR là đúng với mô tả của Zhang và cộng sự [5]. Như vậy, nghiên cứu này đã phát hiện được 3 mẫu giống mang gen chín chậm *rin* là 167, 168 và R7.

Mặt khác, đối chứng âm không có vạch băng nhân lên chứng tỏ phản ứng PCR không bị ảnh hưởng của thành phần và nồng độ các hóa chất tham gia.

Các mẫu giống 152, 163 mặc dù quả có biểu hiện tính chín chậm nhưng không mang gen *rin*, rất có thể các mẫu giống này mang gen khác quy định sự chín chậm của quả như *Nr* hay *nor* (Giovannoni và cộng sự, 2005)[3].



Hình 3.1. Ảnh điện di sản phẩm chạy PCR phát hiện gen chín chậm *rin*

Giếng 1 - đối chứng âm (nước cất), giếng 2 - đối chứng dương (mẫu 159 mang

gen *rin*), giếng 3- R1, giếng 4- mẫu R2, giếng 5- mẫu R3, giếng 6- mẫu R4, giếng 7- mẫu R5, 8- mẫu R6, giếng 9- mẫu R7, giếng 10- mẫu 152, giếng 11- mẫu 153, giếng 12- mẫu 168, giếng 13- mẫu 160, giếng 14- mẫu 164, giếng 15- mẫu 167, giếng 16 - mẫu H13, giếng 17- mẫu H14.

4. KẾT LUẬN

- Các mẫu giống có triển vọng: R3, 152 và 153.

- Kết quả PCR phát hiện gen chín chậm đã phát hiện được 3 mẫu giống mang gen chín chậm *rin* là 167, 168 và R7. Đánh giá đặc tính chín chậm quả của các mẫu giống này cho thấy thời gian từ khi đạt kích thước tối đa đến chín hoàn toàn và thời gian tồn trữ quả dài hơn nhiều so với các mẫu giống không mang gen chín chậm *rin*.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Brady, S. Lee, T. Ying, D. Grierson, and J. Giovannoni (1985). Transgenic plants with altered ethylene biosynthesis or perception. *Biotechnology Advances* 21, p: 193–210.
2. Giovannoni và cộng sự (2005). “Ethylene Insensitivity Conferred by the Green- ripe and Never-ripe 2 Ripening Mutants of Tomato”. *Plant Physiology* 138: 267-275.
3. Nguyễn Thị Hồng Thuý (2009). Nghiên cứu một số đặc điểm nông sinh học của một số tổ hợp lai cà chua vụ xuân hè 2009 tại Bắc Ninh. Luận văn thạc sỹ nông nghiệp, trường đại học nông nghiệp I Hà Nội.
4. Julia Vrebalov, Diane Ruezinsky, Veeraragavan Padmanabhan, Ruth White, Diana Medrano, Rachel Drake, Wolfgang Schuch, Jim Giovannoni. (2002). A MADS-Box Gene Necessary for Fruit Ripening at the Tomato Ripening-Inhibitor (*Rin*) Locus. *Science*, vol 296
5. Zhang Xiaoli. (2010). The development of longer shelf-life gen marker and assisted selection of tomato inbredlines. *Huazhong Agricultural University*, 46.

NGHIÊN CỨU KỸ THUẬT PHÂN LẬP, NHÂN GIỐNG VÀ NUÔI TRỒNG NẤM LIM XANH (*Ganoderma lucidum* (Leyss.ExFr.) Karst)

Nguyễn Thị Hồng Gấm¹, Trần Thị Kim Anh¹,
Phạm Văn Nhã¹, Vũ Thành Trung¹

ABSTRACT

From *Ganoderma lucidum* (Leyss. ex Fr. Karst) obtained from forest in Son Dong, Bac Giang, we have successfully isolated stem varieties, breeding level 1 and level 2. From isolated spawn mushroom, we researched cultivation techniques of *Ganoderma lucidum* (Leyss. ex Fr. Karst) using different agroresidues. Results showed that, isolated medium and breeding level 1 is 30 g/l sucrose + 200 g/l potato extract + 7 g/l agar. Formula level 2 multiplication substrate is 90% Khang Dan boiled rice + 10% rice bran. Material mixing formulas and additives for growing mushrooms is best: 84% sawdust + 5% corn bran + 5% rice bran + 5% cotton waste + 1% light powder. Results fungus formation after 27 days seeded on the mushroom farming substrate, mushroom fruit be harvested after 25 days, fresh weight: 43.04 g/fruit, diameter mushroom: 10 cm, mushroom stem length: 4cm, reddish brown.

Key words: *Ganoderma lucidum* (Leyss.ExFr.) Karst; breeding, cultivation.

TÓM TẮT

Từ quả thể nấm Lim xanh thu được từ rừng Lim xanh tại Sơn Động, Bắc Giang, chúng tôi đã phân lập giống gốc, nhân giống cấp 1 và cấp 2 thành công. Từ giống nấm phân lập được, chúng tôi nghiên cứu kỹ thuật nuôi trồng nấm Lim xanh trên cơ chất nhân tạo. Kết quả cho thấy, môi trường phân lập và nhân giống cấp 1 hiệu quả là 30g/l đường sucrose + 200g/l khoai tây + 7g/l agar. Cơ chất nhân giống nấm Lim xanh cấp 2 phù hợp là 90% thóc Khang dân + 10% cám gạo. Công thức phối trộn nguyên liệu và phụ gia để nuôi trồng nấm Lim xanh tốt nhất là: 84% mùn cưa + 5% cám ngô + 5% cám gạo + 5% bông phế liệu + 1% bột nhẹ. Quả nấm ra sau 27 ngày cấy giống, quả thể thu hoạch sau 25 ngày ra, khối lượng quả thể tươi 43,04 g/quả, đường kính mũ 10 cm, cuống dài 4cm, quả thể nấm có màu nâu đỏ.

Từ khóa: nấm Lim xanh, nhân giống, nuôi trồng.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Nấm Lim xanh (*Ganoderma lucidum* (Leyss. Ex Fr.) Karst.) có chứa nhiều hợp chất tự nhiên, trong đó có hàm lượng cao Polysaccharide, Letinan, Germanium, Selenium, Lingzi-8, axit ganoderic, vitamin C và vitamin E. Các chất này có tác dụng hỗ trợ, phòng ngừa và điều trị các bệnh như ung thư, xơ gan, gan nhiễm mỡ, bệnh gout, mỡ trong máu, điều hòa huyết áp, viêm khớp, tiểu đường, giải độc, giảm quá trình lão hóa, tăng cường hệ miễn dịch, nâng cao thể trạng con người. Ở Việt Nam, loại nấm này mọc trên gốc và thân cây gỗ Lim xanh trong các khu rừng nguyên sinh thuộc vùng núi cao Quảng Nam, Quảng Ninh, Bắc Giang,... đã bị khai thác cạn kiệt. Trong khi đó nhu cầu sử dụng nấm Lim xanh của người dân ngày một lớn. Tuy nhiên, kỹ thuật phân lập giống, nhân giống và nuôi trồng nấm Lim xanh trên cơ chất nhân tạo vẫn còn hạn chế. Chúng tôi thực hiện nghiên cứu này nhằm góp phần hoàn thiện kỹ thuật nhân giống và nuôi trồng nấm Lim xanh một cách hiệu quả.

2. MỤC TIÊU, NỘI DUNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Mục tiêu

Xây dựng được kỹ thuật phân lập, nhân giống và nuôi trồng nấm Lim xanh hiệu quả

¹ Trường Đại học Lâm nghiệp

2.2. Nội dung

- (1) Nghiên cứu kỹ thuật phân lập và nhân giống nấm Lim xanh
- (2) Nghiên cứu kỹ thuật nuôi trồng nấm Lim xanh

2.3. Phương pháp nghiên cứu

Quả thể nấm Lim xanh (màu nâu sẫm, đường kính mũ nấm 6- 8cm, cuống nấm dài 4-12cm, hình quạt) từ Sơn Động - Bắc Giang được rửa sạch và khử trùng bằng cồn 70% từ 1÷4 phút. Dùng dao để tách một phần mũ nấm 2 x 2 mm cấy vào môi trường phân lập giống. Sau khi sợi nấm gốc ăn kín môi trường, giống gốc sẽ được cấy chuyển sang môi trường nhân giống cấp 1. Nghiên cứu ảnh hưởng của hàm lượng đường ($10 \div 30\text{g/l}$ sucrose) và hàm lượng khoai tây ($50 \div 300 \text{ g/l}$) đến khả năng ăn lan hệ sợi nấm. Hệ sợi nấm trên môi trường nhân giống cấp 1 được dùng để nhân giống nấm cấp 2. Bố trí 6 công thức nghiên cứu ảnh hưởng của loại cơ chất và phụ gia đến khả năng ăn lan của hệ sợi giống cấp 2. Sử dụng giống cấp 2 nhân được để nghiên cứu kỹ thuật nuôi trồng nấm Lim xanh trên các loại cơ chất (mùn cưa keo, bông phế liệu) bổ sung các phụ gia (cám gạo, bột ngô, đường) với tỷ lệ khác nhau (0,5 - 10 %) trên 11 công thức thí nghiệm. Các chỉ tiêu được đánh giá ở giai đoạn ươm sợi nấm và giai đoạn ra quả thể nấm Lim xanh.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Kết quả phân lập giống và nhân giống nấm Lim xanh

3.1.1. Kết quả phân lập giống

Khi khử trùng quả thể nấm Lim xanh bằng 70%, kết quả cho thấy thời gian khử trùng có ảnh hưởng đến hiệu quả phân lập giống nấm. Công thức khử trùng 3 phút có tỷ lệ mẫu sạch đạt 50% và tỷ lệ mẫu sạch có sợi ăn lan cao nhất đạt 60%. Công thức khử trùng 4 phút có tỷ lệ mẫu sạch đạt cao nhất (75%) nhưng tỷ lệ mẫu sạch có sợi ăn lan là 0%.

Giống nấm đồng nhất một màu trắng trong môi trường nuôi cấy, sợi nấm khỏe, thẳng, ăn lan theo kiểu tia xạ, không thấy xuất hiện những dạng sợi xấu như: rối bông, móc câu, đổi màu... Không có hiện tượng vết đậm vết nhạt khác nhau trên hệ sợi, không tiết dịch màu vàng trong môi trường nuôi cấy.

3.1.2. Kết quả nhân giống nấm Lim xanh

a) Nhân giống cấp 1 trên môi trường thạch

Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của hàm lượng đường sucrose và khoai tây đến khả năng ăn lan hệ sợi nấm trên môi trường nhân giống cấp 1 cho thấy: khi bổ sung 10 - 20 - 30 g/l môi trường thì khả năng ăn lan hệ sợi nấm cấp 1 là không giống nhau. Môi trường bổ sung 30 g/l đường là phù hợp để nhân giống cấp 1 nấm Lim xanh.

Hàm lượng khoai tây khác nhau ($50 \div 300 \text{ g/l}$) bổ sung vào môi trường nhân giống cấp 1 có ảnh hưởng khác nhau tới khả năng ăn lan hệ sợi nấm (Bảng 01). Môi trường bổ sung 200 g/l khoai tây là phù hợp để nhân giống cấp 1 nấm Lim xanh.

Bảng 01. Ảnh hưởng của hàm lượng đường và khoai tây tới khả năng ăn lan hệ sợi nấm cấp 1.

CTTN	Hàm lượng (g/l)		Đường kính hệ sợi nấm ăn lan (cm)					Đặc điểm hệ sợi nấm
			Sau 3 ngày	Sau 7 ngày	Sau 9 ngày	Sau 11 ngày	Sau 14 ngày	
DT1	Đường	10	0,5	2,2	2,8	3,3	3,5	Sợi nấm mảnh, lan không đều
DT2		20	0,7	2,5	3,2	4,0	4,5	Sợi nấm to, khỏe, lan đồng đều
DT3		30	0,8	3,0	3,8	4,5	5,0	Sợi nấm to, khỏe, lan đồng đều
T1	Khoai tây	50	0,5	2,5	2,85	3,2	3,5	Sợi mảnh, lan không đều
T2		100	0,7	2,8	3,3	3,7	4,1	Sợi mảnh, lan đồng đều
T3		200	0,85	3,1	3,6	4,2	5	Sợi to, khỏe, lan đồng đều
T4		300	0,8	3,0	3,5	4,1	4,5	Sợi to, khỏe, lan đồng đều

b) Nhân giống cấp 2 trên môi trường hạt thóc

Kết quả cho thấy thóc tẻ Khang dân cho khả năng ăn lan của hệ sợi nấm cấp 2 tốt nhất trong các công thức nghiên cứu: tỷ lệ bình có sợi nấm ăn lan đến 1/3 bình sau 9 ngày là 90%; tỷ lệ bình có sợi nấm ăn lan đến ½ bình sau 13 ngày là 88,8%; tỷ lệ bình có sợi nấm ăn lan đến ¾ bình sau 16 ngày là 87,5%.

Nghiên cứu ảnh hưởng của phụ gia đến khả năng ăn lan của hệ sợi nấm cấp 2, cho thấy công thức 90% thóc Khang dân + 10% cám gạo là phù hợp để làm giá thể nhân giống cấp 2 nấm Lim xanh (Bảng 02)

Bảng 02. Ảnh hưởng của loại thóc và phụ gia tới khả năng ăn lan hệ sợi nấm cấp 2.

CTTN	Môi trường nhân giống cấp 2		Tỷ lệ (%) bình có sợi nấm ăn đến			Đặc điểm của hệ sợi
			1/3 bình sau 9 ngày	½ bình sau 13 ngày	¾ bình sau 16 ngày	
T1	Loại thóc	Khang dân	90	88,8	87,5	Sợi nấm to, khỏe, lan đồng đều
T2		Nếp thơm	75	60	55,56	Sợi nấm mảnh, lan không đồng đều
T3		50% khang dân + 50% nếp thơm	80	62,5	80	Sợi nấm mảnh, lan đồng đều
C1	Phối trộn phụ gia	90% thóc + 10% cám gạo	85	92,35	95,71	Sợi nấm to, khỏe, lan đều
C2		90% thóc + 10% bột ngô	75	63,85	81,43	Sợi nấm to, khỏe, lan đều
C3		90% thóc + 5% cám gạo + 5% bột ngô	80	81,43	85	Sợi nấm to, khỏe, lan đều

3.2. Kết quả nuôi trồng nấm Lim xanh

3.2.1. Nghiên cứu ảnh hưởng của công thức phối trộn nguyên liệu và hàm lượng phụ gia đến khả năng ăn lan hệ sợi nấm Lim xanh trong bịch nguyên liệu

Tốc độ vượt của hệ sợi là chỉ tiêu đánh giá tốc độ sinh trưởng của nấm trong giai đoạn ươm sợi. Tốc độ sinh trưởng càng nhanh thì càng rút ngắn được thời gian ươm sợi, nâng cao hiệu quả kinh tế. Công thức CT4 có độ vượt hệ sợi cao nhất 2,11cm/3 ngày; cao hơn công thức đối chứng (CTĐC) - 1,85cm/3 ngày và các công thức nghiên cứu khác (Bảng 03). Như vậy, công thức CT4 (84% mùn cưa + 5% cám ngô + 5% cám gạo + 5% bông phế liệu + 1% bột nhẹ) là công thức tốt nhất để nuôi trồng nấm Lim xanh.

Bảng 03. Ảnh hưởng của công thức phối trộn nguyên liệu và hàm lượng phụ gia đến khả năng ăn lan hệ sợi nấm Lim xanh

Ngày CT	Độ vượt của hệ sợi nấm sau các ngày ươm sợi (cm)								Trung bình	Đặc điểm hệ sợi nấm
	Sau 6 ngày	Sau 9 ngày	Sau 12 ngày	Sau 15 ngày	Sau 18 ngày	Sau 21 ngày	Sau 24 ngày	Sau 27 ngày		
CTĐC	1,10	2,12	1,91	1,0	2,07	2,35	2,68	1,57	1,85	Vàng, mảnh, không đều, chun sợi
CT1	1,12	2,13	2,02	1,0	2,23	2,36	2,79	1,3	1,87	Trắng đục, mảnh
CT2	1,25	2,3	2,95	0,78	1,98	2,04	2,95	1,03	1,91	Trắng đục, mảnh
CT3	1,45	2,25	3,05	0,7	2,05	2,25	2,93	0,77	1,93	Trắng đều, sợi khỏe
CT4	1,65	2,5	2,97	1,38	2,06	2,24	2,9	1,2	2,11	Trắng dày, sợi khỏe, mập, đều
CT5	1,26	2,39	3,05	0,65	2,05	2,1	3,07	0,79	1,92	Trắng vàng, mảnh
CT6	1,55	2,54	2,91	1,23	1,97	2,3	2,5	0,9	1,99	Trắng dày, sợi khỏe, mập
CT7	1,35	2,11	2,89	0,75	1,8	2,1	2,85	1,17	1,88	Trắng đều, sợi khỏe
CT8	1,42	2,27	2,79	0,74	1,78	2,15	2,85	1,18	1,90	Trắng đều, sợi khỏe
CT9	1,47	2,37	2,76	0,77	2,08	2,18	2,97	0,8	1,93	Trắng đều, sợi khỏe
CT10	1,53	2,37	2,97	1,13	1,9	1,9	3,0	0,75	1,94	Trắng dày, sợi khỏe, mập

2.2. Nghiên cứu ảnh hưởng của công thức phối trộn nguyên liệu và hàm lượng phụ gia tới sự phát triển của quả thể nấm Lim xanh

Giai đoạn ra quả thể được tính từ khi kết thúc giai đoạn ươm sợi đến khi thu bịch. Thời gian bắt đầu ra quả thể được tính từ khi kết thúc giai đoạn ươm sợi đến khi có dấu hiệu quả thể nhú lên. Thời gian thu hoạch được tính từ khi quả thể nhú lên đến khi thu hái được. Ta giới hạn số lượng quả thể nấm ra 1 lần/bịch là 1 quả thể, tính và so sánh khối lượng quả thể tươi/bịch. Trong 11 công thức nghiên cứu (Bảng 04), công thức CT4 (84% mùn cưa + 5% cám ngô + 5% cám gạo + 1% bột nhẹ) cho kết quả tốt nhất: thời gian ra quả sớm (27 ngày), thời gian thu hoạch nhanh (25 ngày) và chất lượng quả thể tốt (khối lượng quả thể tươi 43,04 g/bịch, đường kính mũ nấm 10 cm, chiều dài cuống nấm 4,0cm, quả thể có màu nâu đỏ).

Bảng 04. Ảnh hưởng của công thức phối trộn nguyên liệu và hàm lượng phụ gia tới sự phát triển của quả thể nấm Lim xanh

CTTN	Thời gian bắt đầu ra quả thể (ngày)	Thời gian thu hoạch (ngày)	Khối lượng quả thể tươi/bịch (g)	Đường kính mũ nấm (cm)	Chiều dài cuống (cm)	Màu sắc quả thể khi thu hái
CTĐC	40	35	16,59	3,5	9,0	Nâu vàng
CT1	35	30	40,82	8,5	9,5	Nâu đỏ
CT2	35	30	30,9	6,5	4,5	Nâu đỏ
CT3	35	30	22,14	5,5	3,0	Nâu đỏ
CT4	27	25	43,04	10	4,0	Nâu đỏ
CT5	35	30	25,7	6,0	7,0	Nâu đỏ
CT6	29	25	35,20	9,0	4,5	Nâu đỏ
CT7	30	28	26,9	4,5	5,0	Nâu đỏ
CT8	30	28	27,86	4,8	6,5	Nâu đỏ
CT9	30	28	27,44	5,3	5,5	Nâu đỏ
CT10	29	27	27,01	6,5	5,5	Nâu đỏ





Hình ảnh. Bình phân lập giống gốc (A); Bình nhân giống cấp 1 (B) và cấp 2 (C); Bịch sợi nấm ăn lan sau 21 ngày (D) và 27 ngày (E) trên công thức nuôi trồng CT4; Quả thể nấm Lim xanh đang phát triển (G) và đủ tiêu chuẩn thu hái (H). Bịch nấm Lim xanh tại khu vực nuôi trồng (I).

4. KẾT LUẬN

Đã xây dựng thành công quy trình kỹ thuật phân lập giống, nhân giống và nuôi trồng nấm Lim xanh trên cơ chất nhân tạo. Với quy trình này, công thức khử trùng quả thể 3 phút có tỷ lệ mẫu sạch đạt 50% và tỷ lệ mẫu sạch có sợi ăn lan cao nhất đạt 60%. Môi trường PAG bổ sung 30 g/l đường + 200 g/l khoai tây + 7 g/l agar nhân giống cấp 1 phù hợp nhất. Môi trường nhân giống cấp 2 hiệu quả nhất là 90% thóc Khang dân + 10% cám gạo. Công thức phối trộn nguyên liệu và phụ gia cho khả năng ăn lan hệ sợi nhanh và khả năng ra quả thể tốt nhất là CT4 (84% mùn cưa + 5% cám ngô + 5% cám gạo + 1% bột nhẹ). Ở công thức phối trộn nguyên liệu nuôi trồng này, cho độ vượt hệ sợi cao nhất 2,11cm/3 ngày, thời gian ra quả sớm (27 ngày), thời gian thu hoạch nhanh (25 ngày) và chất lượng quả thể tốt (khối lượng quả thể tươi 43,04 g/bịch, đường kính mũ nấm 10 cm, chiều dài cuống nấm 4,0cm, quả thể có màu nâu đỏ).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bao, X.F., Wang, X.S., Dong, Q., Fang, J.N., Li, X.Y., 2002. Structural features of immunologically active polysaccharides from *Ganoderma lucidum*. *Phytochemistry* 59, 175-181.
2. Đinh Xuân Linh, Nguyễn Hữu Đồng, Nguyễn Thị Sơn (2008). *Kỹ thuật trồng, chế biến nấm ăn và nấm dược liệu*. NXB Hà Nội.
3. Singh, Jagdeep; Singh Surjeet; Kumar, Ashwani (2015). Cultivation of *Ganoderma lucidum* (Leyss. Ex. Fr. Karst) using different agroresidues. *Research on Crops*. Sep2015, Vol. 16 Issue 3, 598-603.
4. Trịnh Tam Kiệt (2001). *Danh mục các loài thực vật ở Việt Nam*, tập 1, phần Nấm, Nhà xuất bản Nông nghiệp - Hà Nội.

NGHIÊN CỨU SẢN XUẤT LEVAN TỪ *BACILLUS SUBTILIS* D

Vũ Kim Dung¹, Hồ Thị Thủy¹, Nguyễn Thị Nhân¹, Hà Thị Thu Hương¹

ABSTRACT

The levan is an exopolysaccharide composed by fructose residues. Levan has ability to resistant to cancer, reduce cholesterol and regulate immunity. This study aimed to optimise the production of levan synthesized by *B. subtilis* natto D by factorial design and response surface methodology. In view of the independent variables studied, the experiment showed the best results at: sucrose 225 g/L, pH 6, 200 rpm and culture time 21 h; 74.56 g/L of levan. In these optimized condition the highest concentration of Levan 80.83 g/l with culture conditions: pH 7, temperature 40°C and time of 24.6 hours. Levan obtained ensure food safety and it makes the texture of yogurt is more stable when additional 1% (w/w).

Keywords: *Bacillus subtilis*, levan, optimization, polymer, production.

TÓM TẮT

Levan là hợp chất exopolysaccharide, có hoạt tính chống ung thư, giảm cholesterol và điều hòa miễn dịch. Nghiên cứu nhằm tối ưu hóa quá trình sinh tổng hợp levan từ *B. subtilis* natto D bằng phương pháp bề mặt đáp ứng và đánh giá an toàn vệ sinh thực phẩm, ứng dụng của sản phẩm. Trong điều kiện khảo sát ảnh hưởng của đơn yếu tố, hàm lượng levan cao nhất trên nguồn carbon sucrose với nồng độ 225 g/l, pH 6 ở nhiệt độ 37°C thời gian lên men 21 giờ và tốc độ lắc 200 vòng/phút. Khi tối ưu, hàm lượng levan cao nhất đạt 80,83 g/l với điều kiện nuôi cấy: pH 7, nhiệt độ 40°C và thời gian 24,6 giờ. Levan thu được đảm bảo an toàn vệ sinh thực phẩm và làm sữa chua đồng đều, ổn định hơn với nồng độ bổ sung 1% (w/w).

Từ khóa: *Bacillus subtilis*, levan, polymer, sinh tổng hợp, tối ưu.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Levan là hợp chất polymer sinh học được tổng hợp từ vi khuẩn trên môi trường có thành phần chính là sucrose. Đây là polymer của fructose được tạo ra bởi liên kết β - (2 - 6) fructo – furanosidic (Jang K.H. và cs, 2001). Các vi sinh vật có khả năng tổng hợp levan gồm: *B. circulans*, *E.amylovora*, *Seraria* sp., *Acetobacter xylinum* NCI 1005, *Z. mobilis* và *B. subtilis* (Devi G.K. và Alamu A., 2013; Oliveira M.R. và cs, 2007).

Hiện nay, levan đang được rất nhiều nhà khoa học và sản xuất quan tâm bởi các đặc tính vượt trội như: khả năng hòa tan tốt trong dầu và nước, độ kết dính mạnh, khả năng tương thích sinh học tốt, chống ung thư và khả năng tạo màng (Santos L.F.D. và cs, 2013). Vì vậy, levan được ứng dụng trong mỹ phẩm, thực phẩm và dược phẩm (Jaecho C. và cs, 2001; Santos L.F.D. và cs, 2013). Tuy nhiên, cho đến nay các sản phẩm chứa levan còn rất ít do sản lượng lên men thấp. Vì thế, nghiên cứu tìm kiếm chủng, tăng cao năng suất chủng, đáp ứng sản xuất trên quy mô công nghiệp và tạo ra các sản phẩm tăng cường sức khỏe con người là vấn đề bức thiết hiện nay.

2. MỤC TIÊU, NỘI DUNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Mục tiêu

Xác định được điều kiện nuôi cấy tối ưu để *B. subtilis* natto D sinh tổng hợp levan cao.

¹ Trường Đại học Lâm nghiệp

2.2. Nội dung

Nghiên cứu ảnh hưởng của đơn yếu tố; tối ưu hóa quá trình nuôi cấy *B. subtilis* natto D sinh tổng hợp levan cao; bước đầu ứng dụng levan trong thực phẩm.

2.3. Phương pháp nghiên cứu

Nghiên cứu ảnh hưởng của đơn yếu tố đến quá trình sinh tổng hợp levan được thực hiện trên các nguồn carbon lactose, maltose, sucrose, glucose với nồng độ 10 – 25% (w/v); pH 5 – 9; nhiệt độ 25 – 41°C; tốc độ lắc 160 – 240 vòng/phút và thời gian nuôi 10,5 – 42 giờ. Nghiên cứu tối ưu hóa sinh tổng hợp levan: theo phương pháp bề mặt đáp ứng, sử dụng phần mềm Design-Expert 7.15. Ma trận thực nghiệm bao gồm 17 thí nghiệm với khoảng chạy của 3 yếu tố khảo sát: pH (5 – 7), nhiệt độ (33 – 41°C) và thời gian (15 – 27 giờ). Thu nhận levan bằng ethanol với tỷ lệ ethanol: dịch lên men = 3: 1 và hàm lượng levan được xác định theo phương pháp của Santos L.F.D. và cs (2013).

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Khảo sát các yếu tố ảnh hưởng tới sinh tổng hợp levan

Khi nuôi cấy chìm, *B. subtilis* natto D sinh tổng hợp levan cao (74,56 g/l) trong môi trường chứa sucrose với nồng độ 225 g/l, pH 6 ở nhiệt độ 37°C, thời gian lên men 21 giờ và tốc độ lắc 200 vòng/phút.

Bảng 3.1 Ảnh hưởng của một số yếu tố môi trường nuôi cấy đến khả năng sinh tổng hợp levan của *B. subtilis* natto D

Hàm lượng levan (g/l)					
Nguồn carbon	Lactose	4,50 ± 0,14	Nồng độ sucrose (g/l)	150	18,60 ± 0,47
	Maltose	5,64 ± 0,22		175	23,50 ± 0,70
	Sucrose	43,0 ± 1,20		200	43,21 ± 1,95
	Glucose	0		225	53,24 ± 2,00
	Tinh bột	0,50 ± 0,01		250	53,35 ± 2,00
	CMC	0,25 ± 0,01		300	53,50 ± 2,02
pH	5	46,44 ± 1,28	Nhiệt độ (°C)	25	27,12 ± 0,54
	6	64,26 ± 2,20		29	34,16 ± 0,85
	7	53,23 ± 1,51		33	49,28 ± 1,55
	8	40,32 ± 1,00		37	64,67 ± 2,00
	9	20,08 ± 0,60		41	38,23 ± 1,15
Thời gian (giờ)	10,5	30,20 ± 0,09	Tốc độ lắc (vòng/phút)	160	46,32 ± 1,38
	21,0	65,28 ± 2,26		180	65,68 ± 2,08
	31,5	60,04 ± 2,02		200	74,56 ± 2,01
	42,0	55,03 ± 2,32		220	70,12 ± 1,78
	52,5	45,06 ± 2,15		240	54,25 ± 1,38

Điểm nổi bật của nghiên cứu là thời gian lên men thu nhận levan của chủng *B. subtilis* natto D chỉ cần 21 giờ (65,28 g/l) trong khi báo cáo của các tác giả khác cần 10 ngày mà hàm lượng levan chỉ đạt 42 - 52 g/l (Santos L.F.D. và cs, 2013; Shin I.L. và cs, 2005; Szwengiel A.

và cs, 2004). Đây là lợi thế lớn của chủng khi lên men sản xuất levan trên quy mô công nghiệp. Trong số 5 nguồn carbon, *B. subtilis* natto D sử dụng tốt nhất sucrose để sinh tổng hợp levan tương tự như công bố của Shin I.L.và cs (2005), trong khi từ nguồn glucose không thu được sản phẩm này.

3.2. Tối ưu điều kiện sinh tổng hợp levan

Mục đích của nghiên cứu là tìm sự tương tác đồng thời của các yếu tố ảnh hưởng tới sinh tổng hợp levan, nhằm xác định môi trường tối ưu cho levan cao nhất. Với 17 thí nghiệm được thiết kế bằng phần mềm tối ưu (bảng 3.2), hàm lượng levan thu được thấp nhất 51 g/l (thí nghiệm số 3) và cao nhất 79 g/l (thí nghiệm số 8).

Kết quả phân tích phương sai bảng 3.3 cho thấy cả 3 yếu tố pH, nhiệt độ và thời gian đều ảnh hưởng mạnh đến quá trình sinh tổng hợp levan. Giá trị F của mô hình là 23,61 với $p = 0,0002$ ($p < 0,05$) nên dạng mô hình đã lựa chọn là đúng. Giá trị p của “Không tương thích” là 0,2558 ($p > 0,05$) cho thấy mô hình này tương hợp với thực nghiệm. Phương trình hồi quy biểu hiện hàm lượng levan mô tả ảnh hưởng của các yếu tố độc lập (X_1 – pH, X_2 – nhiệt độ, X_3 – thời gian) và các mối tương tác giữa chúng được biểu diễn như sau:

$$\text{Hàm lượng Levan} = +69,80 + 6,38X_1 + 4,25X_2 + 3,38X_3 + 7,25X_1X_2 + 6,00X_1X_3 - 1,75X_2X_3 - 4,40X_1^2 - 4,15X_2^2 - 2,40X_3^2$$

Sử dụng phương pháp hàm kì vọng để tối ưu hoá quá trình nuôi cấy thu nhận levan bằng phần mềm Design-Expert. Kết quả tìm được 43 phương án thí nghiệm trong đó phương án tốt nhất để cực đại hàm mục tiêu dự đoán là: pH 7; nhiệt độ 40°C và thời gian 24,6 giờ. Khi đó, hàm lượng levan đạt được trong các điều kiện theo tính toán là 81,02 g/l. Kết quả này có độ tương thích cao so với kiểm tra bằng thực nghiệm (pH 7; 40°C; 24,6 giờ; hàm lượng levan đạt 80,83 g/l).

Bảng 3.2 Ma trận thực nghiệm Box-Behnken và hàm lượng levan thu được

TT	pH	Nhiệt độ (°C)	Thời gian (giờ)	Hàm lượng levan (g/l)	TT	pH	Nhiệt độ (°C)	Thời gian (giờ)	Hàm lượng levan (g/l)
1	5	33	21	60	10	6	41	15	67
2	7	33	21	57	11	6	33	27	63
3	5	41	21	51	12	6	41	27	71
4	7	41	21	77	13	6	37	21	68
5	5	37	15	59	14	6	37	21	69
6	7	37	15	61	15	6	37	21	70
7	5	37	27	53	16	6	37	21	73
8	7	37	27	79	17	6	37	21	69
9	6	33	15	52					

Bảng 3.3 Kết quả phân tích phương sai mô hình tối ưu bằng phần mềm DX7.1.5

Thông số	Phương sai	Chuẩn F	Mức có nghĩa p	Thông số	Phương sai	Chuẩn F	Mức có nghĩa p
Mô hình	124,98	23,61	0,0002	$X_2.X_3$	12,25	2,31	0,1720
X_1	325,13	61,43	0,0001	X_1^2	81,52	15,40	0,0057
X_2	144,50	27,30	0,0012	X_2^2	72,52	13,70	0,0076
X_3	91,13	17,22	0,0043	X_3^2	24,25	4,58	0,0696
$X_1.X_2$	210,25	39,72	0,0004	Không tương thích	7,42	2,00	0,2558
$X_1.X_3$	144,00	27,21	0,0012				

3.3. Kết quả ứng dụng levan trong sản xuất sữa chua

Chế phẩm levan sau khi sấy (hình 1A) đạt chỉ tiêu vi sinh, hóa lý đối với thực phẩm (bảng 3.4). Do levan là polymer sinh học có nhiều hoạt tính quý như: chống ung thư, giảm cholesterol, điều hòa các hoạt động miễn dịch trong cơ thể, do đó chế phẩm levan có thể bổ sung vào thực phẩm để sản xuất thực phẩm chức năng, tăng cường sức khỏe cho con người. Bổ sung levan 1% (w/w) vào sữa chua cho thấy sản phẩm chứa levan (hình 1C) không thay đổi mùi, vị so với đối chứng (sữa chua không chứa levan – hình 1B) nhưng làm kết cấu sữa chua đồng đều và ổn định hơn. Vì vậy, levan có thể được ứng dụng trong sản xuất các sản phẩm sữa chua chức năng ở quy mô lớn.

Bảng 3.4 Kết quả phân tích chỉ tiêu vi sinh vật và kim loại trong levan thành phẩm

TT	Chỉ tiêu phân tích	Đơn vị	Kết quả	TT	Chỉ tiêu phân tích	Đơn vị	Kết quả
1	Hàm lượng carbohydrate	g/100g	98,5	6	<i>Coliforms</i>	CFU/g	KPH
2	Hàm lượng protein	g/100g	0,5	7	<i>E. coli</i>	CFU/g	KPH
3	Asen	µg/kg	KPH	8	<i>Salmonella</i>	CFU/25g	KPH
4	Chì	µg/kg	KPH	9	<i>B. cereus</i>	CFU /g	KPH
5	Tổng số vi khuẩn hiếu khí	CFU/g	KPH	10	Tổng số bào tử nấm men, mốc	Bào tử/g	KPH

KPH: Không phát hiện

Hình 3.1 Sản phẩm levan khô (A), sữa chua đối chứng (B) và sữa chua bổ sung levan (C)

4. KẾT LUẬN

Kết quả nghiên cứu đã xác định được điều kiện môi trường tối ưu cho sinh tổng hợp levan của chủng *B. subtilis* natto D (80,83 g/l) bao gồm: sucrose (225 g/l), pH 7, nhiệt độ 40°C, tốc độ lắc 200 vòng/phút và thời gian 24,6 giờ. Levan thu nhận được đảm bảo an toàn vệ sinh thực phẩm và bước đầu ứng dụng trong sản xuất sữa chua chức năng.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Devi G.K. & Alamu A. (2013). Production of Biopolymer Levan by *Bacillus subtilis* using Non-Ionic Surfactants. Asian J. Pharm. Tech, 3, pp. 37 - 41.
2. Jaecho C., Hee P.N., Jae Y.S. & Ho L.T. (2001). Molecular and enzymatic characterization of levan fructotransferase from *Microbacterium* sp. AL - 210. J Biotechnol, 91, pp. 49 - 61.
3. Jang K.H., Song K.B., Kim C.H., Chung B.H., Kang S.A., Chun U.H., Choue R.W. & Rhee S. K. (2001). Comparison of characteristics of levan produced by diferent preparations of levansucrase from *Zymomonas mobilis*. Biotechnol Lett, 23, pp. 339 – 344.
4. Szwengiel A., Czarnecka M., Roszyk H. & Czarnecki Z. (2004). Levan production by *Bacillus subtilis* DSM 347 strain. Food Sci Technol Int, 2, pp. 7 - 12.
5. Shin I.L., Yu Y.T., Shienh C.J. & Hsien C.Y. (2005). Selective Production and Characterization of Levan by *Bacillus subtilis* (natto) Takahashi. J. Agric. Food Chem, 53 (21), pp. 8211 - 8215.
6. Santos L.F.D., Melo F., Paiva W.J.M., Borsato D., Dasilva M. & Celligoi M. (2013). Characterization and optimization of levan production by *Bacillus subtilis* (Natto). Rom Biotech Lett, 18, pp. 8413 - 8422.
7. Oliveira M.R., Silva R.S., Buzato J.B. & Celligol M.A.P.C (2007). Study of levan production by *Zymomonas mobilis* using regional low - cost carbohydrate sources. Biochem Eng J, 37, pp. 177 - 183.

PHÂN LẬP VÀ TUYỂN CHỌN CÁC CHỦNG VI KHUẨN CÓ KHẢ NĂNG XỬ LÝ NƯỚC THẢI LÀNG NGHỀ CHẾ BIẾN TINH BỘT DONG RIỀNG

Đoàn Duy Thành¹

ABSTRACT

Activities of *Canna edulis* Ker. Starch Processing village have polluted the water environment. Because of containing organic compounds, biological treatment is suitable. The target of this study is selection of native *Bacillus* strains treating *Canna edulis* Ker. Starch processing village. 18 strains were isolated from soil and wastewater samples. Form cell of 18 isolates were observed. The activities of extracellular enzymes of 18 isolates were investigated. In total 18 isolates, C2, C3, N4, and C5 are positive rods and secreted extracellular protease, amylase, xylanase, and CMC-ase. Testing COD values decreasing rate of wastewater, biomass yield, and sedimentation rate, C5 decreased 27,03% COD values, high and fast biomass yield, and good sedimentation with 7,5 ml/50 ml wastewater. In 3l bottle, COD values were under 150 (mg/l) after 18 hours of treatment, sedimentation rate were 160 ml/1 l wastewater. From API 50 CHB Kit, C5 strain were identified as *Bacillus subtilis* with 96,6% similarity. C5 strains grew well in the environment: KH_2PO_4 (0.5 g/l), K_2HPO_4 (1 g/l), KCl (0.1 g/l), MgSO_4 (0.5 g/l), FeSO_4 (0.008 g/l), Saccarozo (10g/l), yeast extract (5 g/l), pH = 6, the temperature (30°C), shaking speed (200 v/p). C5 strains used as probiotics environmental remediation.

Keywords: *Bacillus*, identity, study.

TÓM TẮT

Làng nghề chế biến tinh bột dong riềng gây ra ô nhiễm nước thải. Với đặc điểm trong nước thải có chứa hợp chất hữu cơ do đó việc xử lý bằng phương pháp sinh học là phù hợp. Mục tiêu nghiên cứu là tuyển chọn được chủng vi khuẩn *Bacillus* bản địa có khả năng xử lý nước thải làng nghề chế biến tinh bột dong riềng. Từ 18 chủng phân lập được tiến hành quan sát hình thái tế bào và thử hoạt tính enzym phân giải (tinh bột, protein, xylan, cellulose) thu được 4 chủng là C2, C3, N4, C5 là trực khuẩn, gram dương, phân giải được các loại cơ chất trên. Sau đó, thử khả năng xử lý làm giảm COD, tăng sinh khối, đo tốc độ lắng trực tiếp trên nước thải. Kết quả chủng C5 giảm 27,03% lượng COD, tăng nhanh sinh khối, tốc độ lắng 7,5 ml/50ml nước thải. Mở rộng quy mô lên bình 3l khả năng giảm COD của chủng C5 đạt dưới 150 (mg/l) sau 18 giờ xử lý, tốc độ lắng là 160 ml/1l nước sau xử lý. Định danh bằng kit API 50CHB chủng C5 thuộc loài *Bacillus subtilis* với độ tương đồng 96,6%. Chủng C5 sinh trưởng tốt trong môi trường: KH_2PO_4 (0.5 g/l), K_2HPO_4 (1 g/l), KCl (0.1 g/l), MgSO_4 (0.5 g/l), FeSO_4 (0.008 g/l), Saccarozo (10g/l), Cao nấm men (5 g/l), pH = 6, nhiệt độ (30°C), tốc độ lắc (200 v/p). Dùng chủng C5 làm chế phẩm sinh học xử lý môi trường.

Từ khóa: *Bacillus*, định danh, hoạt tính.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Hiện nay ô nhiễm nước thải làng nghề chế biến tinh bột dong riềng đang cực kì nghiêm trọng. Nước thải của làng nghề sản xuất tinh bột dong riềng trên cả nước có nồng độ chất ô nhiễm các chất hữu cơ rất cao. Những chỉ tiêu cơ bản như: độ đục nước thải, pH, mùi, nồng độ nitơ, photpho, COD, BOD₅, SS, TS và vi sinh vật gây bệnh tổng số lớn gấp nhiều lần tiêu chuẩn cho phép. Vì vậy, áp lực xử lý ô nhiễm và bảo vệ môi trường làng nghề là rất cấp thiết. Về bản chất, thành phần ô nhiễm chủ yếu trong nguồn thải này là các hợp chất hữu cơ (tinh bột, cellulose, xylan, protein,...) dễ bị phân hủy.

¹ Trường Đại học Lâm nghiệp

Trong các biện pháp sinh học xử lý nước thải đặc biệt là nước thải ô nhiễm hữu cơ, vi sinh vật là nhân tố quan trọng nhất và có tính quyết định đến hiệu quả của quá trình xử lý. Bởi chúng là thành phần chuyển hóa các chất ô nhiễm trong nước thải thành các cấu tử không ô nhiễm và làm sạch nước thải.

Để có thể áp dụng công nghệ vi sinh xử lý nước thải bảo vệ môi trường làng nghề cần phải tìm được các chủng vi sinh vật có khả năng thích ứng với nước thải để chuyển hóa nhanh các chất hữu cơ ô nhiễm. Vì vậy tôi thực hiện đề tài: “Phân lập và tuyển chọn các chủng vi khuẩn có khả năng xử lý nước thải làng nghề chế biến tinh bột dong riềng”. Đề tài khi được thực hiện sẽ cung cấp cơ sở khoa học cũng như thực tiễn giúp xử lý nước thải bảo vệ môi trường làng nghề chế biến tinh bột dong riềng.

2. MỤC TIÊU, NỘI DUNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Mục tiêu

Phân lập và tuyển chọn được các chủng vi khuẩn *Bacillus* bản địa có khả năng xử lý nước thải làng nghề chế biến tinh bột dong riềng để sản xuất chế phẩm vi sinh xử lý nước thải.

2.2. Nội dung

- Nghiên cứu phân lập các chủng vi khuẩn bản địa thuộc giống *Bacillus*.
- Nghiên cứu tuyển chọn chủng vi khuẩn bản địa thuộc giống *Bacillus* có đặc điểm:
 - Nghiên cứu thử nghiệm khả năng xử lý nước thải trong phòng thí nghiệm với quy mô bình 3l.
 - Định danh chủng vi khuẩn được tuyển chọn được bằng phương pháp vi sinh, hóa sinh.
 - Nghiên cứu khảo sát các điều kiện về nguồn cacbon, nitơ, pH, tốc độ lắc, nhiệt độ để chủng vi khuẩn tuyển chọn được có khả năng sinh trưởng và tạo bào tử tốt nhất

2.3. Phương pháp nghiên cứu

- Phương pháp khảo sát chất lượng nước thải
- Phương pháp thử nghiệm tốc độ lắng
- Phương pháp phân lập các chủng vi khuẩn
- Phương pháp tuyển chọn
- Phương pháp thử nghiệm khả năng xử lý nước thải ở quy mô bình 3l
- Phương pháp định tên chủng tuyển chọn bằng kit sinh hóa API 50 CH B.
- Phương pháp khảo sát các yếu tố ảnh hưởng tới khả năng sinh trưởng và phát triển của chủng được tuyển chọn

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Kết quả khảo sát chất lượng nước thải

- Qua lấy mẫu và phân tích cho ta thấy mức ô nhiễm nghiêm trọng cần có các biện pháp xử lý ngay.

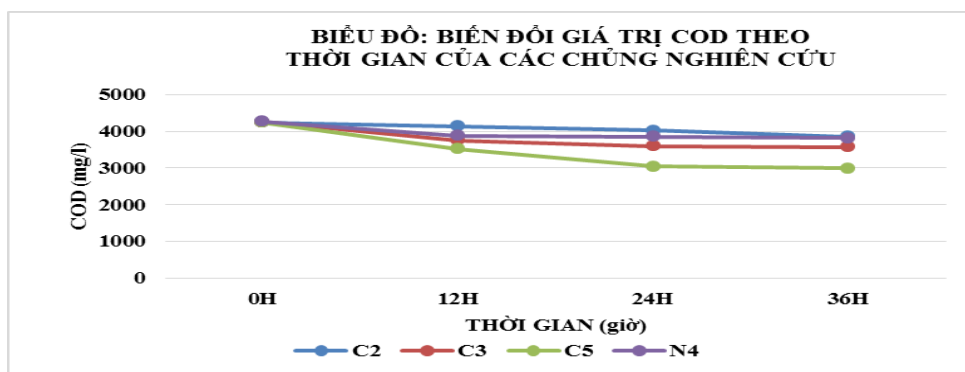
3.2. Kết quả phân lập các chủng vi khuẩn

- Sau khi tiến hành phân lập, thu được các chủng bao gồm: C1, C2, C3, C4, C5, T1, T2, T3, T4, V1, V2, V3, V4, N1, N2, N3, N4, N5.

3.3. Kết quả tuyển chọn các chủng vi khuẩn

- Sau khi quan sát hình thái tế bào và thử một số hoạt tính emzym phân giải tinh bột, protein, xylan, cellulozo ta thu được 4 chủng là C2, C3, N4, C5 đáp ứng được các yêu cầu như là trực khuẩn, gram dương, tiết ra đầy đủ các loại enzyme phân giải 4 loại cơ chất kể trên

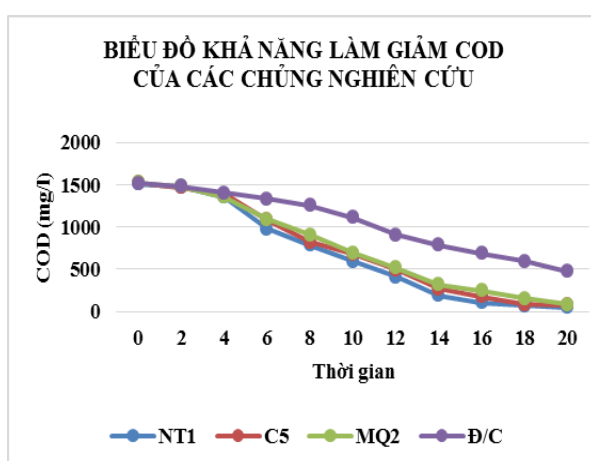
- Từ 4 chủng thu được tiến hành thử khả năng xử lý làm giảm COD, tăng nhanh sinh khối, tốc độ lắng của bùn thải trực tiếp trên nước thải. Qua khảo sát cho thấy chủng C5 có khả năng làm giảm 27,03% lượng COD, tốc tăng sinh khối cao giá trị OD 600 nm tại thời điểm 24 giờ bằng 2, tốc độ lắng 7,5 ml bưng trên 50ml nước thải sau xử lý bùn lắng nhanh và màu nước trong.



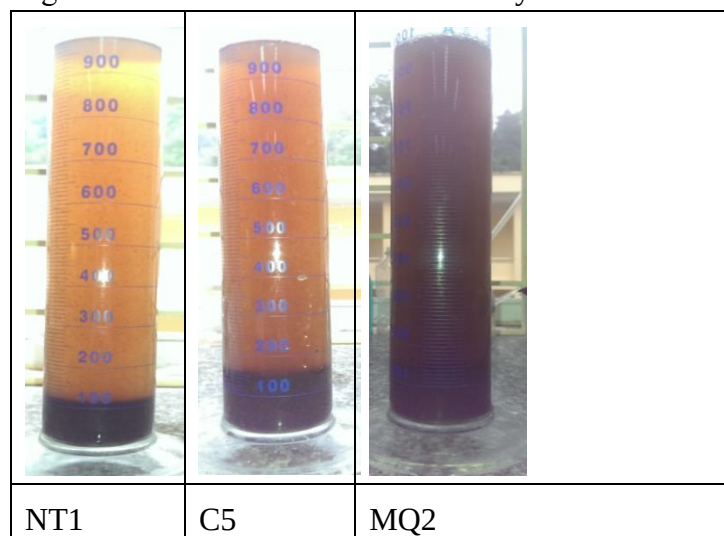
Hình 1: Biểu đồ khả năng xử lý COD của các chủng nghiên cứu

3.4. Kết quả thử nghiệm khả năng xử lý nước thải ở quy mô bình 3l và thử nghiệm khả năng lắng của bùn hoạt tính

Khi mở rộng quy mô thí nghiệm lên bình 3l khả năng giảm COD của chủng C5 tăng đạt giá trị dưới 150 (mg/l) sau 18 giờ xử lý. Khả năng lắng là 160 ml bùn trên 1l nước sau xử lý.



Hình 2: Biểu đồ khả năng xử lý nước thải của các chủng nghiên cứu ở quy mô bình 3l



Hình 2: Kết quả thử khả năng lắng của các chủng nghiên cứu

3.5. Kết quả phương pháp định danh bằng KIT API 50CHB

- Từ kết quả kit chuẩn sinh hóa, tra phần mềm API LAB Plus, chủng vi khuẩn C5 có thể phân loại như sau: Chủng C5 thuộc loài *Bacillus subtilis* với độ tương đồng 96,6%.

3.6. Kết quả khảo sát khả năng sinh trưởng và phát triển của chủng được tuyển chọn

- Chủng C5 sinh trưởng tạo nhiều sinh khối nhất trong điều kiện môi trường như sau: Khoáng cơ bản: KH_2PO_4 (0.5 g/l), K_2HPO_4 (1 g/l), KCl (0.1 g/l), MgSO_4 (0.5 g/l), FeSO_4 (0.008 g/l), Saccarozo (10g/l), Cao nấm men (5 g/l), pH = 6, nhiệt độ nuôi là 30°C, tốc độ lắc là 200 v/p ở điều kiện đó sẽ cho thu sinh khối tốt nhất tại thời điểm sau 24 giờ nuôi và thu bào tử tốt nhất tại thời điểm sau 72 giờ nuôi.

4. KẾT LUẬN

- Phân lập được 18 chủng từ mẫu đất lấy tại làng nghề Minh Hồng.
- Sau khi quan sát hình thái tế bào và thử một số hoạt tính emzym phân giải tinh bột, protein, xylan, cellulozo ta thu được 4 chủng là C2, C3, N4, C5 đáp ứng được các yêu cầu như là trực khuẩn, gram dương, tiết ra đầy đủ các loại enzyme phân giải 4 loại cơ chất kể trên
- Từ 4 chủng thu được tiến hành thử khả năng xử lý làm giảm COD, tăng nhanh sinh khối, tốc độ lắng của bùn thải trực tiếp trên nước thải. Qua khảo sát cho thấy chủng C5 có khả năng làm giảm 27,03% lượng COD, tốc tăng sinh khối cao giá trị OD 600 nm tại thời điểm 24 giờ bằng 2, tốc độ lắng 7,5 ml bưng trên 50ml nước thải sau xử lý bùn lắng nhanh và màu nước trong.
- Khi mở rộng quy mô thí nghiệm lên bình 3l khả năng giảm COD của chủng C5 tăng đạt giá trị dưới 150 (mg/l) sau 18 giờ xử lý. Khả năng lắng là 160 ml bùn trên 1l nước sau xử lý.
- Tiến hành định danh bằng kit API 50CHB chủng C5 thuộc loài *Bacillus subtilis* với độ tương đồng 96,6%.
- Kết quả khảo sát khả năng sinh trưởng và phát triển của chủng C5 cho thấy chủng C5 sinh trưởng tạo nhiều sinh khối trong điều kiện môi trường như sau: KH_2PO_4 (0.5 g/l), K_2HPO_4 (1 g/l), KCl (0.1 g/l), MgSO_4 (0.5 g/l), FeSO_4 (0.008 g/l), Saccarozo (10g/l), Cao nấm men (5 g/l), pH = 6, nhiệt độ nuôi là 30°C, tốc độ lắc là 200 v/p, ở điều kiện đó sẽ cho thu sinh khối tốt nhất tại thời điểm sau 24 giờ nuôi và thu bào tử tốt nhất tại thời điểm sau 72 giờ nuôi.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Coal Mine Methane Recovery: A Primer. September 2009 U.S. Environmental Protection Agency.
2. Dương Văn Sơn, Chế biến tinh bột ướt quy mô nhỏ tại một số địa phương miền Bắc Việt Nam: một số phát hiện và đề xuất giải pháp. Tạp chí Khoa học và Công nghệ. 107(07): p. 69-75.
3. Dang Kim Chi, 2002, Wastewater from production activities in craft villages and some mitigation solutions. Institute for Environment Science and Technology.

4. Đào Thị Hồng Vân, 2012, Nghiên cứu tạo chế phẩm vi sinh vật bản địa nhằm xử lý nước thải sinh hoạt đô thị. Luận án Tiến sỹ Công nghệ Sinh học Thực phẩm.
5. Đỗ Thị Chiến, 9/2006, Phát triển làng nghề-nhiều thách thức đối với môi trường sống ở nông thôn Tạp chí Tài nguyên và môi trường
6. N.K. Quynh M. Hermann, D. Peters, 1998, Reappraisal of Edible Canna as a HighValue Starch Crop in Vietnam, in CIP Program Report.
7. Ganesh D. Saratete Yung-Chung Lo, Wen-Ming Chen, Ming-Der Bai, Jo-Shu Chang, 2009, Isolation of cellulose-hydrolytic and applications of the cellulosic enzymes for cellulosic biohydrogen production. Enzyme and Microbial Technology. 44(417-425).
8. Trần Duy Khánh, 2012, Đánh giá hiện trạng môi trường làng nghề và thực hiện chính sách pháp luật về bảo vệ môi trường làng nghề tại một số tỉnh Bắc Bộ. Trung tâm nghiên cứu tài nguyên và môi trường.

NGHIÊN CỨU NHÂN GIỐNG LAN HOÀNG THẢO KIỀU TÍM (*Dendrobium amabile*) BẰNG PHƯƠNG PHÁP NUÔI CẤY *IN VITRO*

Kiều Hữu Thọ¹, Phạm Nhật Thành¹, Lê Thị Nga¹, Nguyễn Thị Hiền¹

ABSTRACT

In the present study, a highly efficient micropropagation protocol using the seed embryo explants were established in our laboratory for *in vitro* multiplication of *Dendrobium amabile* (Lour.) Obrien, 1909. Results showed that the seed embryo explants were sterilized by 70% ethanol for 1 minute and 0.1% HgCl₂ for 7 minutes. The protocorms were the best formed on Knops medium with supplement 100 ml/l coconut milk + 100 ml/l ascitic potato + 30g/l sucrose + 7g/l agar 0.5mg/l Kinetin + 0.3mg/l BAP + 0,2 mg/l NAA, after 3 weeks of culture, **the** formed protocorm rate was 100%. The protocorms were **multiplied** on Knops with medium supplement 100 ml/l coconut milk + 100 ml/l ascitic potato + 30g/l sucrose + 7g/l agar + 0.5 mg/l Kinetin + 0.3 mg/l BAP + 0.1 mg/l NAA, the multiplication coefficient reached 12,57. Multiple shoots were formed on Knops with medium supplement 100 ml/l coconut milk + 100 ml/l ascitic potato + 30g/l sucrose + 7g/l agar + 0.3mg/l Kinetin + 0.5 mg/l BAP + 0.3 mg/l NAA, after 4 weeks of culture, the average of 3.67 shoots per explant. The elongated shoots were incubated in rooting medium (Knops + 100 ml/l coconut milk + 100 ml/l ascitic potato + 30g/l sucrose + 7g/l agar + 0.3 mg/l NAA + 0.1 mg/l IBA) and cultured 12 days for rooting. The rate of rooting shoot was 100% and average of 4.9 roots per shoot. **The complete plantlets** were successfully acclimatized on 2 weeks. The rate of survival tree 97.67% after 6 weeks planted on 70% crushed coconut fiber + 30% dried seaweed.

Key words: *Dendrobium ochraceum de Wild*; *in vitro*; micropropagation

TÓM TẮT

Từ nguồn vật liệu khởi đầu là phôi hạt được tách từ quả, đã xây dựng thành công quy trình tạo cây con Lan Kiều tím bằng kỹ thuật nuôi cấy *in vitro*. Kết quả cho thấy, môi trường dinh dưỡng (Knops + 100 ml/l ND + 100 ml/l dịch chiết khoai tây + 30 g/l sucrose + 7g/l agar) bổ sung 0,5 mg/l Kinetin + 0,3 mg/l BAP + 0,2 mg/l NAA cho tỷ lệ mẫu tạo thể chồi đạt 100% sau 4 tuần nuôi cấy. Môi trường dinh dưỡng bổ sung 0,5 mg/l Kinetin + 0,3 mg/l BAP + 0,1 mg/l NAA cho hệ số nhân nhanh thể chồi đạt 12,57 lần/4 tuần. Môi trường dinh dưỡng bổ sung 0,3 mg/l Kinetin + 0,5 mg/l BAP + 0,3 mg/l NAA cho hệ số nhân nhanh chồi đạt 3,67 lần/4 tuần. Môi trường dinh dưỡng bổ sung 0,3 mg/l NAA + 0,1 mg/l IBA, tỷ lệ chồi ra rễ đạt 100%; 4,9 rễ/cây; rễ mập. Huấn luyện cây 2 tuần ở nhà lưới sau đó trồng cây con 70% xơ dừa nghiền nhỏ + 30% rong biển khô cho tỷ lệ cây sống 97,67% sau 6 tuần, lá xanh đậm, rễ ăn lan tốt vào giá thể.

Từ khóa: *Dendrobium amabile*; *in vitro*; lan Hoàng thảo Kiều tím; nhân giống.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Lan Hoàng thảo Kiều tím là một loài đặc hữu rất đẹp của Việt Nam (mới chỉ gặp được ở Hướng Hóa - Quảng Trị và Chư Păh- Gia Lai), sống phụ sinh (sống bám trên thân và cành cây gỗ trong rừng rậm nhiệt đới thường xanh mưa mùa ẩm, ở độ cao khoảng 900m). Lan Hoàng thảo Kiều tím là loài có dáng cây và hoa đẹp, được yêu thích trồng làm cảnh.

Lan Hoàng thảo Kiều tím có nguồn gen quý hiếm, có mức đe dọa bậc R trong sách đỏ Việt Nam, đây là loài có dáng cây và hoa đẹp, được yêu thích trồng làm cảnh. Hiện nay giống lan này là đối tượng được bảo vệ trong thiên nhiên của khu rừng cấm Gia Lai, cần gấp rút thu thập cây sống đem về trồng trong vườn thực vật để giữ nguồn gen và nhân giống làm cảnh. Cho tới nay chưa có bất kỳ nghiên cứu nào về kỹ thuật nhân giống, nuôi trồng của loài

¹ Trường Đại học Lâm nghiệp

Lan Hoàng thảo Kiều tím quý hiếm này ở Việt Nam. Vì vậy, nghiên cứu nhân giống Lan Hoàng thảo Kiều tím bằng kỹ thuật nuôi cấy *in vitro* nhằm tạo được số lượng cây lớn trong thời gian ngắn là việc làm thật sự cần thiết.

2. MỤC TIÊU, NỘI DUNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Mục tiêu

Xây dựng được kỹ thuật nhân giống lan Hoàng thảo Kiều tím bằng phương pháp nuôi cấy *in vitro* hoàn chỉnh.

2.2. Nội dung

- (1) Tạo thể chồi *in vitro* lan Hoàng thảo Kiều tím;
- (2) Nhân nhanh thể chồi *in vitro* lan Hoàng thảo Kiều tím;
- (3) Nhân nhanh chồi và kích thích tăng trưởng chồi;
- (4) Tạo rễ *in vitro*;
- (5) Huấn luyện và trồng cây con ở vườn ươm;

2.3. Phương pháp nghiên cứu

Quả lan Hoàng thảo Kiều tím già được rửa dưới vòi nước chảy, ngâm trong dung dịch xà phòng loãng, rửa sạch xà phòng. Khử trùng bằng cồn 70% trong 1 phút và khử trùng tiếp bằng dung dịch $HgCl_2$ 0,1% trong 7 phút. Tráng lại quả bằng nước cất vô trùng 3 ÷ 5 lần, thấm khô quả bằng giấy thấm vô trùng. Tách đôi quả lấy phôi cấy vào môi trường nuôi cấy khởi đầu. Sau 3 ÷ 4 tuần nuôi, phôi nảy mầm tạo thể chồi; cấy chuyển thể chồi sang các môi trường nhân nhanh thể chồi. Cấy chuyển thể chồi sang các môi trường tạo chồi, cấy chuyển chồi sang các môi trường nhân nhanh chồi. Tách riêng từng chồi để cấy chuyển sang môi trường kích thích tăng trưởng chồi. Chọn những chồi có chiều cao ≥ 3 cm cấy sang môi trường ra rễ để tạo cây hoàn chỉnh. Cây con được huấn luyện từ 1 ÷ 4 tuần trong nhà lưới, sau đó được rửa sạch thạch và trồng trên các giá thể khác nhau.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Tạo thể chồi *in vitro* lan Hoàng thảo Kiều tím

Sau khi được khử trùng, phôi được cấy vào các môi trường nuôi cấy khởi đầu khác nhau, sau 2 ÷ 3 tuần nuôi phôi tái sinh tạo thể chồi. Kết quả của thí nghiệm nghiên cứu ảnh hưởng của NAA (0 ÷ 0,5 mg/l) kết hợp với Kinetin (0 ÷ 0,5 mg/l) và BAP (0 ÷ 0,5 mg/l) đến khả năng tạo thể chồi cho thấy: ở các môi trường đều cho tỷ lệ mẫu tạo thể chồi cao (60 ÷ 100%), tuy nhiên hiệu quả tạo thể chồi ở các môi trường là khác nhau. Không bổ sung chất điều hòa sinh trưởng vào môi trường nuôi cấy thì tỷ lệ mẫu tạo thể chồi chỉ đạt 60%. Khi bổ sung thêm các chất điều hòa sinh trưởng vào môi trường nuôi cấy thì tỷ lệ mẫu tạo thể chồi tăng lên một cách rõ rệt. Sử dụng tổ hợp 0,5 mg/l Kinetin với 0,3 mg/l BAP và 0,2 mg/l NAA cho tỷ lệ mẫu tạo thể chồi cao nhất (100%) sau 3 tuần nuôi; thể chồi nhiều, tròn, mập, xanh đậm, sinh trưởng nhanh (Bảng 1).

**Bảng 1. Ảnh hưởng của các chất điều hòa sinh trưởng đến
khả năng tạo thể chồi từ phôi hạt**

CNTN	Chất điều hòa sinh trưởng (mg/l)			Tỷ lệ mẫu tạo thể chồi sau 4 tuần (%)	Đặc điểm thể chồi (sau 4 tuần nuôi)
	Kinetin	BAP	NAA		
ĐC	0	0	0	60,00	Thể chồi ít, màu vàng
CT1	0,1	0,2	0,1	66,67	Thể chồi ít, nhỏ
CT2	0,5	0,3	0,2	100,00	Thể chồi mập, nhiều, xanh đậm
CT3	0,3	0,3	0,5	80,00	Thể chồi mập, xanh nhạt
CT4	0,2	0,5	0,1	73,33	Thể chồi ít, màu vàng

3.2. Nhân nhanh thể chồi in vitro lan Hoàng thảo Kiều tím

Thể chồi 6 tuần tuổi (mập, khá xanh) được cấy chuyển vào môi trường dinh dưỡng cơ bản Knops bổ sung tổ hợp các chất điều hòa sinh trưởng khác nhau. Từ thí nghiệm tiến hành với 6 công thức về ảnh hưởng của Kinetin ($0 \div 0,5$ mg/l) tổ hợp với BAP ($0 \div 0,3$ mg/l) và NAA ($0,1 \div 0,3$ mg/l) cho thấy: ở hầu hết các môi trường đều có hệ số nhân thể chồi rất cao ($6,11 \div 12,57$ lần). Tuy nhiên, hiệu quả nhân nhanh ở các môi trường thí nghiệm là không như nhau, trong đó sử dụng tổ hợp 0,5 mg/l Kinetin với 0,3 mg/l BAP và 0,1 mg/l NAA cho hệ số nhân nhanh cao nhất (12,57 lần/4 tuần); chất lượng thể chồi tốt (mập, phát triển khỏe, màu xanh đậm, đồng đều) (Bảng 2).

**Bảng 2. Ảnh hưởng của các chất điều hòa sinh trưởng đến
khả năng nhân nhanh thể chồi**

CTTN	Chất điều hòa sinh trưởng (mg/l)			Hệ số nhân thể chồi (lần)	Đặc điểm thể chồi
	Kinetin	BAP	NAA		
ĐC	0	0	0	6,11	Thể chồi nhỏ, màu xanh nhạt
KT1	0,3	0,3	0,1	8,33	Thể chồi nhỏ, màu xanh nhạt
KT2	0,3	0,3	0,2	9,22	Thể chồi mập, xanh đậm, đồng đều
KT3	0,5	0,3	0,1	12,57	Thể chồi mập, xanh đậm, đồng đều
KT4	0,1	0,2	0,3	10,22	Thể chồi mập, xanh đậm, đồng đều
KT5	0,5	0,3	0,3	9,44	Thể chồi nhỏ, xanh nhạt

3.3. Nhân nhanh chồi và kích thích tăng trưởng chồi

Thể chồi khi mới cấy chuyển là các hạt có dạng hình cầu, đường kính nhỏ, màu xanh nhạt. Sau 4 tuần nuôi cấy dưới điều kiện nhiệt độ và ánh sáng thích hợp chúng dần phát triển, từ các hạt dạng hình cầu bắt đầu xuất hiện các chồi non với 1-2 lá nhỏ. Các cụm chồi này được tách ra và cấy vào các bình môi trường nhân chồi khác nhau.

Kết quả thí nghiệm được tiến hành với 06 công thức về ảnh hưởng của BAP ($0,3 \div 0,5$ mg/l) phối hợp với Kinetin ($0,3 \div 0,5$ mg/l) và NAA ($0,1 \div 0,3$ mg/l) cho thấy: ở hầu hết các môi trường đều có hệ số nhân chồi khá cao ($1,8 \div 3,76$ lần/4 tuần). Tuy nhiên, hiệu quả nhân nhanh chồi ở các môi trường khác nhau là không như nhau: sử dụng tổ hợp 0,5 mg/l BAP

phối hợp với 0,3 mg/l Kinetin và 0,3 mg/l NAA cho hệ số nhân nhanh cao nhất (3,76 lần/4 tuần); chất lượng chồi tốt (Chồi mập, màu xanh đậm, đồng đều) (Bảng 3).

Bảng 3. Ảnh hưởng của các chất điều hòa sinh trưởng đến khả năng nhân nhanh chồi lan Hoàng thảo Kiều tím

CTTN	Chất điều hòa sinh trưởng (mg/l)			Hệ số nhân chồi (lần)	Đặc điểm chồi nhân
	BAP	Kinetin	NAA		
ĐC	0	0	0	1,00	Chồi nhỏ, màu xanh nhạt, ngắn
ĐG1	0,3	0,3	0,1	1,80	Chồi nhỏ, màu xanh nhạt, ngắn
ĐG2	0,3	0,3	0,3	2,07	Chồi nhỏ, màu xanh nhạt
ĐG3	0,5	0,3	0,1	3,33	Chồi mập, màu xanh đậm, đồng đều
ĐG4	0,5	0,3	0,3	3,67	Chồi mập, màu xanh đậm, đồng đều
ĐG5	0,3	0,5	0,1	3,00	Chồi mập, tương đối đồng đều
ĐG6	0,3	0,5	0,3	3,13	Chồi mập, màu xanh đậm, tương đối đồng đều
ĐG7	0,5	0,5	0,1	2,80	Chồi nhỏ, màu xanh nhạt
ĐG8	0,5	0,5	0,3	2,60	Chồi nhỏ, màu xanh nhạt, ngắn

3.4. Tạo rễ *in vitro*

Lựa chọn các chồi mập, kích thước ≥ 3 cm cấy chuyển sang môi trường tạo rễ. Sau 10 ÷ 14 ngày nuôi các chồi *in vitro* bắt đầu ra rễ. Trong các môi trường có bổ sung các chất điều hòa sinh trưởng khác nhau, tỷ lệ chồi ra rễ ở các công thức đạt khá cao (63,33% ÷ 100%); số rễ trung bình/chồi đạt 2,73 ÷ 4,9. Không bổ sung chất điều hòa sinh trưởng, tỷ lệ chồi ra rễ chỉ đạt 23,23% và số rễ/chồi là 1,63. Nhưng khi bổ sung chất điều hòa sinh trưởng nhóm Auxin thì hiệu quả ra rễ của chồi tăng lên rõ rệt. Công thức môi trường bổ sung 0,3 mg/l NAA kết hợp với 0,1 mg/l IBA thích hợp nhất cho sự phát sinh rễ, tỷ lệ chồi ra rễ ở môi trường này đạt 100%; 4,9 rễ/chồi, rễ mập, xanh đậm (Bảng 4).

Bảng 4. Ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng đến khả năng tạo rễ *in vitro* lan Hoàng thảo Kiều tím

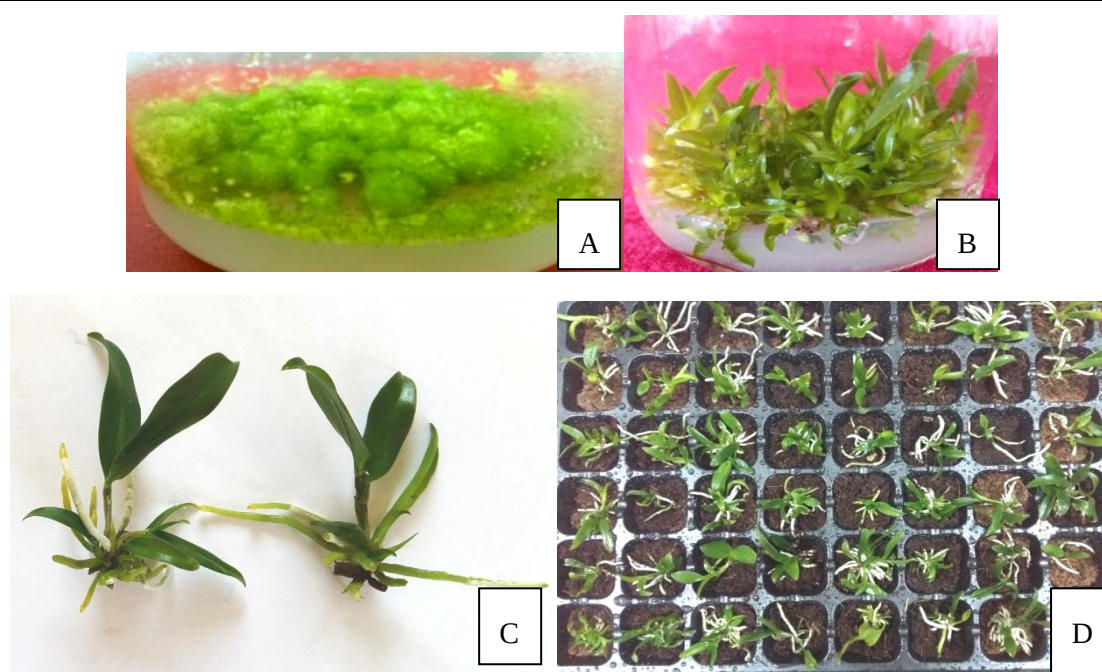
CTTN	Chất ĐHST (mg/l)		Tỷ lệ chồi ra rễ (%)	Số rễ TB/ chồi	Đặc điểm của rễ
	NAA	IBA			
ĐC	0	0	23,33	1,63	Rễ mảnh, màu vàng nhạt
R1	0,1	0	76,67	3,23	Rễ mảnh, màu xanh nhạt
R2	0,3	0	93,33	4,70	Rễ mập, xanh đậm
R3	0	0,1	83,33	4,30	Rễ trung bình, xanh nhạt
R4	0	0,3	96,67	4,07	Rễ mập, xanh đậm
R5	0,3	0,1	100,00	4,90	Rễ mập, xanh đậm
R6	0,1	0,3	73,33	3,33	Rễ trung bình, màu xanh nhạt
R7	0,2	0,1	86,67	3,37	Rễ trung bình, màu xanh nhạt
R8	0,1	0,2	63,33	2,73	Rễ mảnh, màu vàng nhạt

3.5. Huấn luyện và trồng cây con ở vườn ươm

Cây con *in vitro* được huấn luyện trong 2 tuần, sau đó rửa sạch thạch và trồng trên các loại giá thể khác nhau. Kết quả nghiên cứu sau 06 tuần trồng cây với 08 công thức thí nghiệm cho thấy giá thể 70% xơ dừa nghiền nhỏ + 30% rong biển khô cho tỷ lệ cây sống 97,67% sau 6 tuần, lá xanh đậm, rễ ăn lan tốt vào giá thể (bảng 05).

Bảng 05. Ảnh hưởng của loại giá thể ra cây đến khả năng sống của cây con

CTT N	Loại giá thể	Tỷ lệ cây sống (%)	Đặc điểm cây con
GT1	Xơ dừa xé sợi	85,33	Lá xanh đậm, rễ ăn lan kém vào giá thể
GT 2	Xơ dừa nghiền nhỏ	90,67	Lá xanh đậm, rễ ăn lan khá tốt vào giá thể
GT 3	Rong biển	87,67	Lá xanh đậm, rễ ăn lan khá tốt vào giá thể
GT 4	50 % Xơ dừa xé sợi + 50% Rong biển khô	92,34	Lá xanh đậm, rễ ăn lan khá tốt vào giá thể
GT 5	80 % Xơ dừa xé sợi + 20% Rong biển khô	94,67	Lá xanh đậm, rễ ăn lan khá tốt vào giá thể
GT 6	50 % Xơ dừa nghiền nhỏ + 50% Rong biển khô	93,33	Lá xanh đậm, rễ ăn lan khá tốt vào giá thể
GT 7	70 % Xơ dừa nghiền nhỏ + 30% Rong biển khô	97,67	Lá xanh đậm, rễ ăn lan tốt vào giá thể
GT 8	50 % Xơ dừa xé sợi 50 % Xơ dừa nghiền nhỏ	93,33	Lá xanh đậm, rễ ăn lan khá tốt vào giá thể



Hình. Ảnh các giai đoạn chính trong quy trình nhân giống Lan Hoàng thảo Kiều tím *in vitro*

A: Bình thể chồi nhân nhanh; B: Bình chồi nhân nhanh;

C: Cây *in vitro* hoàn chỉnh; D: Khay cây con sau 6 tuần trồng trên giá thể.

4. KẾT LUẬN

Đã xây dựng thành công quy trình kỹ thuật nhân giống Lan Hoàng thảo Kiều tím bằng phương pháp nuôi cấy *in vitro*. Với quy trình này, tỷ lệ mẫu tái sinh thể chồi đạt 100% sau 4 tuần nuôi. Trong môi trường nhân nhanh thể chồi, hệ số nhân thể chồi đạt 12,57 lần/4 tuần với chất lượng thể chồi tốt. Ở môi trường nhân nhanh chồi cho hệ số nhân chồi đạt 3,67 lần/4 tuần. Còn ở môi trường tạo rễ có 100% số chồi ra rễ, 4,9 rễ/ chồi, rễ mập, xanh đậm. 97,67% cây sống sau 6 tuần trồng cây trên giá thể 70% xơ dừa nghiền nhỏ + 30% rong biển khô, cây con có lá xanh đậm, rễ ăn lan tốt vào giá thể.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bộ Khoa học và Công nghệ (2007), *Sách đỏ Việt Nam* (phần Thực vật). Nxb Khoa học Tự nhiên & Công nghệ, Hà Nội. 332
2. Võ Văn Chi, Trần Hợp (1999-2002), *Cây cỏ có ích ở Việt Nam*, Tập I-II, Nxb. Giáo dục, Tp. Hồ Chí Minh.

NGHIÊN CỨU KỸ THUẬT NUÔI TRỒNG NẤM LINH CHI ĐỎ (*GANODERMA LUCIDUM*) TRÊN THÂN CÂY GỖ

Vũ Thị Phương Thảo¹, Bùi Thị Tươi¹, Phạm Văn Hưng¹,
Nguyễn Thị Hồng Gấm¹

ABSTRACT

Cultivation techniques of *Ganoderma lucidum* on wood trunk have been completed research. According to the research results, *Ganoderma lucidum* is sterilized by soaking in alcohol 70% for one minute for the highest cleaning rate, about 92,5%. Formula 2 level multiplication substrate is 50% sawdust + 50% rice bran, mycelium capability highest spread, mycelium thick and good. Finding have shown that *Acacia* is good for *Ganoderma lucidum* with diameter about 15 - 17cm, dimension of hole is 1,0 x 2,5 cm and was care in conditions of humidity 90 - 95%, light 400 - 500lux.

Keywords: *Ganoderma lucidum*., aquaculture, wood trunk

TÓM TẮT

Kỹ thuật nuôi trồng nấm Linh chi đỏ trên thân cây gỗ đã được nghiên cứu hoàn chỉnh. Theo kết quả nghiên cứu thu được, phương thức khử trùng quả thể nấm bằng cách ngâm quả thể trong cồn 70⁰ trong 1 phút cho tỷ lệ mẫu sạch cao nhất 92,5%. Công thức nhân giống cấp 2 là 50% mùn cưa + 50% cám gạo cho khả năng ăn lan hệ sợi cao nhất, hệ sợi nấm dày và khỏe. Khi cấy giống vào các loại cây gỗ khác nhau thì gỗ keo cho khả năng ăn lan hệ sợi và ra quả thể tốt nhất ở đường kính gỗ 15 -17cm, kích thước lỗ cấy giống là 1,0 x 2,5 cm, quả thể nấm Linh chi đỏ trên gỗ cho chất lượng tốt hơn trên mùn cưa và được chăm sóc ở điều kiện độ ẩm 90 ÷ 95%, ánh sáng 400 ÷ 500lux.

Từ khóa: Nấm Linh chi, nuôi trồng, thân cây gỗ

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Nấm Linh chi đỏ được xếp vào nhóm thuốc bổ thượng phẩm và chiếm được vị trí cao trong lịch sử y học cổ truyền. Vì vậy, nó không phải vị thuốc xa lạ với các thầy thuốc.

Đông y coi nấm Linh chi đỏ là "Vua của các loài thảo dược", thậm chí gọi nó là "Nấm bất tử". Loại nấm quý này có khả năng tăng cường hệ miễn dịch, chống ung thư, chữa các bệnh tim mạch, tiểu đường [5], làm dịu thần kinh, chống dị ứng và viêm [1; 7].

Nhờ những giá trị dinh dưỡng và dược học mà chúng ta cần tìm ra phương pháp nuôi trồng nấm Linh chi đỏ một cách hợp lý nhằm nâng cao năng suất và chất lượng của nấm Linh chi đỏ. Thay vì, sử dụng mùn cưa hoặc các phế phẩm nông nghiệp để làm nguyên liệu trồng nấm Linh chi đỏ theo cách truyền thống, cây nấm không to, vị đắng cũng không cao. Đặc biệt ở các khu vực miền núi lại khó kiếm mùn cưa theo đúng yêu cầu. Chính vì vậy, nhóm chúng tôi đã thực hiện đề tài: "**Nghiên cứu kỹ thuật nuôi trồng nấm Linh chi đỏ (*Ganoderma lucidum*) trên thân cây gỗ**" nhằm nâng cao kỹ thuật nuôi trồng nấm Linh chi trên cây gỗ đặc biệt là khu vực miền núi, tạo nguồn dược liệu quý có giá trị kinh tế, nâng cao thu nhập cho người dân góp phần thúc đẩy xóa đói giảm nghèo ở khu vực miền núi.

¹ Trường Đại học Lâm nghiệp

2. MỤC TIÊU, NỘI DUNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Mục tiêu nghiên cứu

2.1.1. Mục tiêu chung

Xây dựng được kỹ thuật nuôi trồng nấm Linh chi đỏ trên thân cây gỗ.

2.1.2. Mục tiêu riêng

Xác định các loại gỗ cây, đường kính gỗ, kích thước lỗ cấy, chế độ chăm sóc đến khả năng ăn lan hệ sợi và ra thể quả nấm Linh chi đỏ.

2.2. Nội dung nghiên cứu

• Phân lập và nhân giống Linh chi đỏ

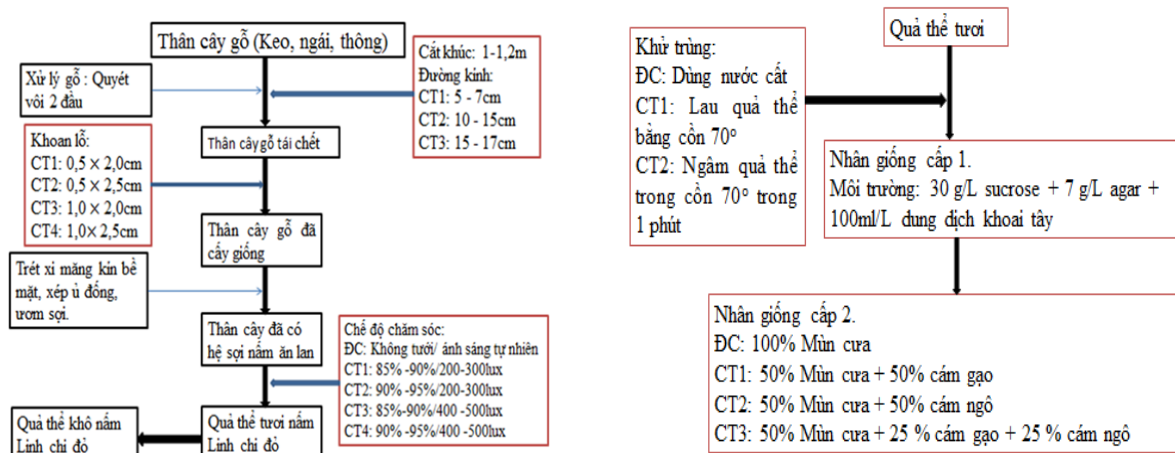
- Nghiên cứu kỹ thuật phân lập giống từ quả thể nấm Linh chi đỏ.
- Nghiên cứu kỹ thuật nhân giống Linh chi đỏ.
- Nghiên cứu đánh giá khả năng ăn lan hệ sợi nấm Linh chi đỏ phân lập và giống nhập về.

• Nghiên cứu kỹ thuật nuôi trồng nấm Linh chi đỏ (*Ganoderma lucidum*) trên thân cây gỗ

- Nghiên cứu ảnh hưởng của loại gỗ, đường kính gỗ, chế độ chăm sóc đến khả năng nuôi trồng nấm Linh chi đỏ.

- Nghiên cứu khả năng ăn lan của hệ sợi nấm và chất lượng quả thể khi cấy trên mùn cưa và cây trên gỗ.

2.3. Phương pháp nghiên cứu



Sơ đồ nuôi trồng nấm Linh chi trên thân cây gỗ

Sơ đồ phân lập và nhân giống nấm

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

3.1. Phân lập và nhân giống Linh chi đỏ

3.1.1. Phân lập giống gốc từ quả thể

Qua bảng 3.1 ta thấy CT2 ngâm quả thể nấm Linh chi đỏ trong cồn 70° trong 1 phút là công thức thí nghiệm tốt nhất cho tỷ lệ mẫu sạch cao nhất (92,5%).

Bảng 3.1. Phân lập giống gốc từ quả thể

CTTN	Tỷ lệ mẫu sạch (%)	Tỷ lệ mẫu nhiễm (%)
ĐC	0	100
CT1	34,5	65,5
<u>CT2</u>	<u>92,5</u>	<u>7,5</u>

3.1.2. Nhân giống cấp 2 nấm Linh chi đỏ**Bảng 3.2. Khả năng ăn lan hệ sợi nấm cấp 2**

CTTN	Khả năng ăn lan hệ sợi (cm)		
	4 ngày	8 ngày	12 ngày
ĐC	1,0	1,4	1,8
<u>CT1</u>	<u>2,5</u>	<u>3,5</u>	<u>4,8</u>
CT2	1,2	2,0	2,5
CT3	1,8	2,6	3,2

Công thức nhân giống cấp 2 thích hợp nhất là CT1 (50 % mùn cưa + 50 % cám gạo) cho khả năng ăn lan hệ sợi là cao nhất, hệ sợi nấm dày.

3.2. Nghiên cứu đánh giá khả năng ăn lan hệ sợi của giống nấm Linh chi đỏ phân lập và giống nhập về**Bảng 3.3. Nghiên cứu đánh giá khả năng ăn lan hệ sợi giống phân lập và giống nhập về**

CTTN	Khả năng ăn lan hệ sợi (cm)		
	10 ngày	20 ngày	30 ngày
<u>PL</u>	<u>6,4</u>	<u>9,1</u>	<u>12,4</u>
NV	5,8	8,5	11,2

Qua bảng 3.3 ta thấy khả năng ăn lan hệ sợi nấm trên giống phân lập nhanh hơn trên giống nhập về. Như vậy, hệ sợi nấm Linh chi đỏ phân lập có khả năng ăn lan hệ sợi nhanh hơn hệ sợi nấm Linh chi đỏ nhập về.

3.3. Nghiên cứu ảnh hưởng của loại cây gỗ đến khả năng ăn lan hệ sợi nấm**Bảng 3.4. Khả năng ăn lan hệ sợi nấm Linh chi đỏ trên các loại gỗ**

Loại gỗ	Khả năng ăn lan hệ sợi (cm)			
	10 ngày	20 ngày	30 ngày	60 ngày
<u>Keo</u>	<u>1,0</u>	<u>2,5</u>	<u>3,6</u>	<u>5,5</u>
Thông	0,2	0,8	1,0	1,5
Ngái	0,5	1,2	1,7	3,4

Ta thấy gỗ keo hệ sợi nấm phát triển mạnh nhất so với gỗ cây thông và cây ngái sau 60 ngày hệ sợi nấm đã ăn lan 5,5cm. Như vậy, Nấm Linh chi đỏ có khả năng ăn lan hệ sợi mạnh nhất trên gỗ cây keo sau đó đến cây ngái.(Hình1)

3.4. Nghiên cứu ảnh hưởng của đường kính gỗ đến khả năng ăn lan hệ sợi nấm Linh chi đỏ

Bảng 3.5. Ảnh hưởng của đường kính gỗ đến sự ăn lan của hệ sợi nấm Linh chi đỏ

Loại cây	Đường kính cây gỗ (cm)	Khả năng ăn lan hệ sợi (cm)			
		10 ngày	20 ngày	30 ngày	60 ngày
Keo	<u>5 - 7</u>	<u>1,5</u>	<u>2,5</u>	<u>3,6</u>	<u>5,5</u>
	10 - 15	1,2	1,5	2,5	4,1
	15 - 17	1,0	1,7	2,0	2,4
Ngái	5 - 7	0,5	1,2	1,7	3,4
	10 - 15	0,5	1,2	1,7	2,1
	15 - 17	0,2	0	0	0
Thông	5 - 7	0,2	0,5	1,3	1,5
	10 - 15	0,2	0	0	0
	15 - 17	0	0	0	0

Gỗ keo ở đường kính 5 - 7 cm tốc độ ăn lan của hệ sợi nấm 60 ngày là (5,5 cm) nhanh nhất so với 2 đường kính còn lại.

Như vậy, hệ sợi nấm phát triển mạnh nhất trên thân cây keo, hệ sợi dày, hệ sợi không mắc bệnh sinh lí sợi nấm.

3.5. Nghiên cứu ảnh hưởng của kích thước lỗ cấy đến khả năng ăn lan hệ sợi

Gỗ cây được chọn để đánh giá là gỗ cây keo (đường kính: 10 - 15 cm).

Bảng 3.6. Ảnh hưởng của kích thước lỗ cấy đến khả năng ăn lan hệ sợi

CTTN	Khả năng ăn lan hệ sợi(cm)			
	10 ngày	20 ngày	30 ngày	60 ngày
CT1	0,7	1,2	2,3	4,2
CT2	1,2	2,2	3,7	5,5
CT3	1,3	2,5	3,6	5,8
<u>CT4</u>	<u>2,2</u>	<u>3,1</u>	<u>4,4</u>	<u>7,2</u>

Từ bảng 3.6 ta thấy CT4 cho khả năng ăn lan hệ sợi của nấm Linh chi đỏ trên thân cây gỗ nhanh nhất sau 60 ngày hệ sợi nấm đã ăn lan 7,2 cm.

3.6. Nghiên cứu ảnh hưởng của loại gỗ đến khả năng ra quả thể nấm Linh chi đỏ

Bảng 3.7. Ảnh hưởng của từng loại gỗ đến khả năng ra quả thể của nấm Linh chi đỏ

Loại gỗ	Thời gian TB ra quả thể (ngày)	Thời gian TB thu hái quả thể (ngày)	Đường kính TB quả thể (cm)	Độ dày TB quả thể (cm)	Khối lượng TB quả thể (g)
<u>Keo</u>	<u>48</u>	<u>52</u>	<u>16,18</u>	<u>0,95</u>	<u>59,0</u>
Thông	0	0	0	0	0
Ngái	62	70	8,62	0,83	51,0

Quả thể nấm Linh chi đỏ trên gỗ keo cho chất lượng quả thể tốt nhất. Keo hoàn toàn thích hợp cho trồng nấm Linh chi đỏ trên gỗ.

3.7. Nghiên cứu ảnh hưởng của đường kính cây gỗ đến khả năng ra quả thể

Bảng 3.8. Ảnh hưởng của đường kính cây gỗ đến khả năng ra quả thể

CTTN	Thời gian TB ra quả thể (ngày)	Thời gian TB thu hái quả thể (ngày)	Đường kính TB quả thể (cm)	Độ dày TB quả thể (cm)	Khối lượng TB quả thể (g)
CT1	45	48	8,0	0,75	48,5
CT2	52	57	10,84	1,1	59,18
CT3	67	72	15,56	1,6	61,24

CT3 cho độ dày, đường kính, khối lượng TB quả thể lớn nhất so với CT1 và CT2.

Như vậy, chất lượng quả thể nấm Linh chi đỏ trên đường kính cây càng lớn thì cho chất lượng quả càng tốt. Tuy thời gian thu hái lâu hơn nhưng cho chất lượng quả tốt hơn rất nhiều so với gỗ cây có đường kính bé.

3.8. Nghiên cứu ảnh hưởng của kích thước lỗ cấy đến khả năng ăn lan hệ sợi

Bảng 3.9. Ảnh hưởng của kích thước lỗ cấy đến khả năng ăn lan hệ sợi

CTTN	Thời gian TB ra quả thể (ngày)	Thời gian TB thu hái quả thể (ngày)	Đường kính TB quả thể (cm)	Độ dày TB quả thể (cm)	Khối lượng TB quả thể (g)
CT1	80	89	10,26	0,9	50,74
CT2	75	78	12,58	1,1	58,32
CT3	74	75	12,72	1,2	57,44
CT4	67	72	15,58	1,6	61,78

Qua bảng 3.9 ta thấy CT4 kích thước lỗ cấy giống (1,0 × 2,5 cm) cho chất lượng quả thể nấm Linh chi đỏ trên thân cây gỗ là tốt nhất.

3.9. Nghiên cứu khả năng ăn lan của hệ sợi nấm khi cấy trên mùn cưa và cấy trên gỗ

Bảng 3.10. Khả năng ăn lan của hệ sợi nấm trên mùn cưa và trên cây gỗ

Gỗ: Cây keo (Đường kính: 10 -15 cm)

CTTN	Khả năng ăn lan hệ sợi (cm)		
	10 ngày	20 ngày	30 ngày
Thân gỗ	1,2	1,5	2,5
Mùn cưa	5,8	8,5	11,2

Khả năng ăn lan hệ sợi của nấm Linh chi đỏ trên mùn cưa nhanh hơn khi cấy nấm Linh chi đỏ trên thân cây gỗ.

3.10. Nghiên cứu chất lượng quả thể nấm Linh chi đỏ cấy trên mùn cưa và cấy trên gỗ.

Bảng 3.11. Nghiên cứu chất lượng quả thể nấm linh chi đỏ

CTTN	Thời gian TB ra quả thể (ngày)	Thời gian TB thu hái quả thể (ngày)	Đường kính TB quả thể (cm)	Độ dày TB quả thể (cm)	Khối lượng TB quả thể tươi (g)	Khối lượng TB quả thể khô (g)
<u>Trên gỗ</u>	<u>67</u>	<u>72</u>	<u>15,58</u>	<u>1,6</u>	<u>61,8</u>	<u>30,5</u>
Mùn cưa	35	32	7,6	0,65	45,5	15,2

Quả thể nấm Linh chi đỏ trên thân cây gỗ có chất lượng tốt hơn quả thể nấm Linh chi đỏ trên mùn cưa.

3.11. Nghiên cứu ảnh hưởng của điều kiện phòng nuôi đến khả năng ra quả thể của nấm Linh chi đỏ trên thân cây gỗ

Bảng 3.12. Ảnh hưởng của điều kiện phòng nuôi trồng đến khả năng ra quả thể

CTTN	Đường kính TB quả thể (cm)	Khối lượng TB quả thể tươi (g)	Đặc điểm quả thể
ĐC	4,54	14,9	Nhỏ, mép nhăn
CT1	8,08	28,9	Cân đối, mép nhăn
CT2	9,48	39,3	Cân đối, mép nhăn
CT3	8,34	30,5	Cân đối, mép nhăn
<u>CT4</u>	<u>15,6</u>	<u>45,64</u>	<u>Cân đối, mép nhăn</u>

Điều kiện nuôi trồng nấm Linh chi đỏ trên thân cây gỗ thích hợp nhất là công thức CT4 (90 % - 95 %/400 - 500 lux)

4. KẾT LUẬN

❖ Phân lập và nhân giống.

- + CT khử trùng tốt nhất: Ngâm quả thể nấm Linh chi đỏ trong cồn 70° trong 1 phút.
- + CT môi trường nhân giống cấp 2 thích hợp nhất (50% mùn cưa + 50% cám gạo).
- + Hệ sợi nấm Linh chi đỏ phân lập khả năng ăn lan hệ sợi nhanh hơn hệ sợi nấm trên thân cây gỗ.

❖ Nuôi trồng nấm Linh chi đỏ trên thân cây gỗ

- + Loại thân cây gỗ khả năng ăn lan hệ sợi mạnh nhất sau 60 ngày là gỗ keo.
- + Đường kính gỗ keo cho khả năng ăn lan hệ sợi nhanh nhất là 5 - 7 cm.
- + Kích thước lỗ cấy giống phù hợp nhất là 1,0 × 2,5 cm.

- + Loại thân cây gỗ cho chất lượng quả thể nấm Linh chi đỏ cao nhất là gỗ cây keo.
- + Đường kính gỗ keo (15 - 17 cm) cho chất lượng quả thể nấm Linh chi đỏ cao nhất.
- + Kích thước lỗ cấy giống nấm Linh chi đỏ phù hợp nhất là 1,0 - 2,5 cm.
- + Khả năng ăn lan hệ sợi nấm Linh chi đỏ trên mùn cưa nhanh hơn nấm Linh chi đỏ trên thân cây gỗ.
- + Quả thể nấm Linh chi đỏ trên thân cây gỗ có chất lượng tốt hơn quả thể nấm Linh chi đỏ trên mùn cưa.
- + Chế độ chăm sóc CT4 là tốt nhất (90% - 95 % / 400 - 500 lux)

HÌNH ẢNH



Keo



Ngái



Hình 1. Hệ sợi nấm ăn lan trên thân cây gỗ

Hình 2. Quả thể nấm Linh chi

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Đỗ Tất Lợi (2006). Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam, Nhà xuất bản y học
2. Định Xuân Linh, Thân Đức Nhã, Nguyễn Hữu Đồng, Nguyễn Thị Sơn (2008), Kỹ thuật trồng, chế biến nấm ăn và nấm dược liệu. NXB Nông nghiệp.
3. Đỗ Huy Bích và cộng sự “Cây thuốc và động vật làm thuốc ở Việt Nam”. Tập 2. Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật.
4. Gao JJ, Hirakawa A, Min BS, Nakamura N, Hattori M (2006): In vivo antitumor effects of bitter principles from the antlered form of fruiting bodies of *Ganoderma lucidum*. Journal of Natural Medicines. 60(1):42-48
5. Hikino H, Ishiyama M, Suzuki Y, Konno C. (1989). Mechanisms of hypoglycemic activity of ganoderan B: A glycan of *Ganoderma lucidum* fruit body. Planta Med. 1989; 55: 423-8.
6. Li Y. Q, Wang S. F (2006). Anti-hepatitis B activities of ganoderic acid from *Ganoderma lucidum*. Biotechnol Lett .28(11):837-41.
7. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK92757>

NHÂN GIỐNG CÂY ĐĂNG SÂM (*CODONOPSIS JAVANICA* (BLUME) HOOK. F. ET THOMS) BẰNG PHƯƠNG PHÁP NUÔI CÂY *IN VITRO*

Cao Thị Việt Nga¹, Vùi Văn Kiên¹

ABSTRACT

The procedure for producing plants of *Codonopsis javanica* (Blume) Hook. f. et Thoms using *in vitro* tissue culture has developed. The result showed that the most suitable seed sterilization method was ethanol 70% in 2 minutes, NaClO 8% in 15 minutes for 70% seeds regenerated; MS medium supplemented with 0.5 mg/l kinetin and 0.2 mg/l NAA, 30g/l sucrose, and 7g/l agar was the most effective medium for multi-shoot regeneration (16,55 shoots/explant), Regenerated shoots were rooted on MS medium contained 0.3 mg/l IBA, 30g/l sucrose, and 7g/l agar, the ratio of rooted shoots was 100% after 4 weeks. At last, rooted shoots were transferred from *in vitro* condition to the nursery garden. *In vitro* plantlets were acclimatized and transplanted in 100% sand for the ratio of lived plantlets 98.89%, Plant grew and developed normally. This *Codonopsis javanica* producing process could be applied to produce high quality *Codonopsis javanica* seedling that could meet the current needs of this seedling

TÓM TẮT

Một quy trình nhân giống cây Đăng sâm bằng kỹ thuật nuôi cấy mô đã được nghiên cứu thành công. Kết quả nghiên cứu cho thấy, sát khuẩn bề mặt mẫu cấy bằng cồn 70% trong 2 phút và khử trùng bằng NaClO 8% trong 15 phút cho tỷ lệ mẫu sạch này mầm 70%. Cảm ứng tạo cụm chồi trên môi trường MS có bổ sung 0,5 mg/l kinetin, 0,2 mg/l NAA, 30g/l sucrose và 7g/l agar cho hệ số nhân nhanh chồi 16,55 lần/chu kỳ (3 tuần), tỷ lệ chồi hữu hiệu ($\geq 2,5$ cm) là 91,09%. Chồi ra rễ 100%, số rễ trung bình 6,17 rễ/cây và chiều dài rễ trung bình 1,2 cm khi nuôi cấy trên môi trường MS bổ sung 0,3 mg/l IBA 20g/l sucrose và 7g/l agar. Cây con hoàn chỉnh được huấn luyện và chuyển ra trồng trên giá thể 100% cát vàng cho tỷ lệ sống 98,89%, chiều cao cây trung bình 11,07 cm và chiều dài rễ trung bình 13,51 cm, cây sinh trưởng và phát triển tốt sau 4 tuần trồng. Quy trình nhân giống này, có thể áp dụng để sản xuất giống cây Đăng sâm chất lượng tốt đáp ứng nhu cầu nguồn cây giống Đăng sâm hiện nay.

Từ khóa: cây Đăng sâm, *Codonopsis javanica*, cụm chồi, nhân giống, nuôi cấy mô.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Đăng sâm (*Codonopsis javanica*) là cây thuốc quý, có giá trị dược liệu cao [2], bộ phận sử dụng chính là rễ củ có thành phần saponin cao, nhiều loại axit amin.....[1]. Rễ củ cây Đăng sâm có tác dụng tốt khi dùng làm thuốc bổ máu, tăng hồng cầu, vàng da, ăn uống khó tiêu.

Hiện nay, nhu cầu của con người về nguồn dược liệu ngày càng tăng. Mặc dù dược liệu hiện nay có thể cung cấp bằng các phương pháp khác nhưng nguồn dược liệu từ nhiên nhiên vẫn được quan tâm và sử dụng phổ biến nhất. Nhưng rừng tự nhiên bị tàn phá nghiêm trọng, vì vậy mà Đăng sâm trong tự nhiên ngày càng ít trong khi nhu cầu lại ngày một tăng. Để có thể cung cấp nguồn dược liệu Đăng sâm chất lượng tốt, bền vững nhu cầu chăm sóc sức khỏe của con người cần thiết cần có vùng trồng trọt dược liệu Đăng sâm. Trong quy trình trồng các loại cây thuốc nói chung và cây Đăng sâm nói riêng, giống tốt quyết định đến năng suất và đặc biệt là hoạt tính dược liệu trong sản phẩm sau thu hoạch.

¹ Trường Đại học Lâm nghiệp

2. MỤC TIÊU, NỘI DUNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Mục tiêu

Xây dựng được quy trình kỹ thuật nhân giống cây Đắng sâm bằng phương pháp nuôi cấy *in vitro* hiệu quả cao, phục vụ cho việc sản xuất cây giống Đắng sâm chất lượng tốt, sạch bệnh.

2.2. Nội dung

- Tạo mẫu sạch Đắng sâm *in vitro*
- Nhân nhanh chồi Đắng sâm *in vitro*
- Tạo cây Đắng sâm *in vitro* hoàn chỉnh
- Huấn luyện và ra ngôi cây Đắng sâm ở vườn ươm

2.3. Phương pháp nghiên cứu

- Chuẩn bị và khử trùng mẫu
- Nuôi cấy ban đầu
- Nhân nhanh
- Tạo cây hoàn chỉnh
- Ra cây
- Xử lý số liệu

Giai đoạn nuôi cấy	Kí hiệu môi trường	Thành phần môi trường nuôi cấy
Nuôi cấy khởi động		MS bổ sung 30g/l sucrose và 7g/l agar
Tạo cụm chồi		MS bổ sung (0,1 - 0,75 mg/l) BAP, (0,2 - 0,75 mg/l) kinetin, (0,1 - 0,3 mg/l) NAA 30g/l sucrose và 7g/l agar
Kích thích tạo cây hoàn chỉnh		MS bổ sung (0,25 - 0,75 mg/l) NAA, 0,3mg/l IBA 20g/l sucrose và 7g/l agar
Ra cây		100% đất tầng B, 75% đất tầng B -25% cát vàng , 50% đất tầng B - 50% cát vàng , 25%đất tầng B-75% cát vàng cát vàng, 100% cát vàng

Các thí nghiệm được bố trí trong bình trụ thủy tinh (5 mẫu/bình 200ml). Mỗi công thức nhắc lại 3 lần. Số liệu xử lý bằng phần mềm Excel và phương pháp Duncan's test (Duncan, 1995) với sai khác có ý nghĩa $p = 0,05$

Điều kiện thí nghiệm: nhiệt độ phòng nuôi cấy: $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$, cường độ chiếu sáng: 3.000 lux, thời gian chiếu sáng: 14h/ngày.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Nuôi cấy khởi động cây Đắng sâm

Hạt Đắng sâm sau khi khử trùng với cồn 70% trong 2 phút, NaClO 8% trong 15 phút cấy trên môi trường khởi động MS bổ sung 30g/l sucrose và 7g/l agar, nuôi cấy dưới đèn neon. Sau 4 tuần nuôi, tỷ lệ hạt Đắng sâm nảy mầm thành cây con đạt 70%, tỉ lệ hạt nhiễm khuẩn 17,8% và tỷ lệ hạt không nảy mầm là 12,2%. Cây con đạt chiều cao từ 5 - 8 cm được sử dụng làm vật liệu cho giai đoạn nhân nhanh chồi

3.2. Nhân nhanh chồi Đảng sâm

Thí nghiệm nhân nhanh chồi Đảng sâm *in vitro* trên 10 công thức thí nghiệm với loại và hàm lượng chất ĐHST khác nhau. Kết quả thu được cho thấy rằng: trên công thức môi trường bổ sung loại và hàm lượng chất ĐHST khác nhau ảnh hưởng rõ rệt tới khả năng tái sinh và tỉ lệ chồi hữu hiệu của Đảng sâm. Hệ số nhân nhanh chồi dao động từ 1,3 đến 16,55 lần/ chu kì nhân (3 tuần) và tỷ lệ chồi hữu hiệu ($\geq 2,5$ cm) dao động từ 66,73 - 91,98%. Trong đó ở công thức đối chứng chỉ cho hệ số nhân chồi thấp (1,3 lần/chu kì) và tỉ lệ chồi hữu hiệu đạt 45,38% trong khi đó công thức DS7: MS + 0,5 mg/l kinetin + 0,2 mg/l NAA, 30g/l sucrose và 7g/l agar cho hệ số nhân nhanh chồi 16,55 lần/chu kì (3 tuần), tỷ lệ chồi hữu hiệu ($\geq 2,5$ cm) là 91,09%.

3.3. Kích thích chồi ra rễ tạo cây hoàn chỉnh

Các chồi hữu hiệu có chiều cao $\geq 2,5$ cm được cắt và cấy lên môi trường ra rễ có bổ sung chất ĐHST NAA và IBA với các hàm lượng khác nhau. Sau 4 tuần nuôi cấy, thấy môi trường MS không bổ sung chất ĐHST không ra rễ sau 4 tuần nuôi cấy, ngược lại trong các môi trường MS có bổ sung (0,25 - 0,75 mg/l) NAA hoặc 0,3mg/l IBA chồi Đảng sâm nuôi cấy *in vitro* cho tỷ lệ chồi ra rễ cao (87,45% - 100%), chiều dài rễ trung bình đạt 0,55 - 1,2 cm, số rễ trung bình/cây đạt 6,17- 18,61 rễ/ cây. Tỷ lệ chồi ra rễ, chiều dài rễ và số rễ trung bình/cây đạt cao nhất tại công thức ĐSRS4: MS + 0,3mg/l IBA 20g/l sucrose và 7g/l agar . Điều này cho thấy ảnh hưởng của IBA tốt hơn NAA đến khả năng kích thích chồi Đảng sâm ra rễ.

3.4. Huấn luyện và ra cây

Sau khi huấn luyện, cây con đủ tiêu chuẩn sẽ được rửa sạch thạch và trồng vào giá thể tại vườn ươm. Thành phần ruột bầu tại vườn ươm quyết định đến khả năng sinh trưởng và phát triển của cây con Đảng sâm. Trong thí nghiệm này nhóm bố trí thí nghiệm với 5 công thức và đánh giá kết quả sau 4 tuần dựa theo chỉ tiêu tỷ lệ sống và sự sinh trưởng của cây con Đảng sâm. Kết quả cho thấy ruột bầu thích hợp nhất cho cây con Đảng sâm phát triển là 100% cát vàng cho tỷ lệ cây sống là 98,89%, chiều cao trung bình 11,07 cm và chiều dài rễ trung bình 13,51 cm, cây con chất lượng tốt.



Hình 1: Hình các giai đoạn của quy trình nhân giống cây Đảng sâm (*Codonopsis javanica*)

4. KẾT LUẬN

- Hạt Đẳng sâm chín thu hoạch sau khi được rửa bằng nước xà phòng loãng, sát khuẩn bề mặt bằng cồn 70% trong 2 phút, khử trùng diệt khuẩn và nấm bằng dung dịch NaClO 8% trong thời gian 15 phút, nuôi cấy trên môi trường MS bổ sung 30g/l sucrose và 7g/l agar cho tỷ lệ mẫu sạch là 70%.

- Môi trường nhân nhanh chồi Đẳng sâm: MS + 0,5 mg/l kinetin + 0,2 mg/l NAA, 30g/l sucrose và 7g/l agar cho hệ số nhân nhanh chồi 16,55 lần/chu kì (3 tuần), tỷ lệ chồi hữu hiệu đạt 91,09%

- Môi trường kích thích chồi Đẳng sâm ra rễ: MS + 0,3mg/l IBA 20g/l sucrose và 7g/l agar sau 4 tuần nuôi cấy tỷ lệ chồi ra rễ là 100%, số rễ trung bình đạt 6,17 rễ/cây và chiều dài rễ trung bình là 1,2 cm.

- Cây Đẳng sâm nuôi cấy *in vitro* hoàn chỉnh được huấn luyện 7 ngày trong nhà huấn luyện để thích nghi dần với điều kiện tự nhiên, cây trồng trên giá thể 100% cát vàng đạt tỉ lệ sống 98,89%, chiều cao trung bình 11,07 cm và chiều dài rễ trung bình 13,51 cm, cây con chất lượng tốt.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Hoàng Minh Chung, Phạm Xuân Sinh (2002), “ Bước đầu tiên nghiên cứu thành phần hóa học của vị thuốc đẳng sâm Việt Nam”, *Tạp chí dược liệu*, số 7(1), tr. 3 – 6
2. Sách đỏ Việt Nam (2007) Phần thực vật - Trang 152

NGHIÊN CỨU XÁC ĐỊNH ĐOẠN DNA BARCODE CHO LOÀI CÂY MỠ PHÚ THỌ (*MAGNOLIA CHEVALIERI* (DANDY) V.S.KUMAR) PHỤC VỤ GIÁM ĐỊNH LOÀI

Lưu Thị Thảo Nguyễn¹, Nguyễn Khánh Huyền¹

ABSTRACT

The genomic DNA was extracted from leaf tissue of *Magnolia chevalieri* (Dandy) V.S.Kumar. The DNA barcode *matK* was amplified from total DNA of *Magnolia chevalieri* (Dandy) V.S.Kumar by PCR technique. The PCR result indicated that DNA bands were amplified from the samples, they have the same size similar to the theoretical size of *matK*. Result nucleotide sequencing of PCR product samples showed that the size of the isolated *matK* gene fragment was 768 bp. The nucleotide sequence of *matK* from *Magnolia chevalieri* (Dandy) V.S. Kumar has been registered on the DNABank.vn with Barcode ID MMC0001. Comparing nucleotide sequences of gene segments *matK* on the corresponding nucleotide sequences in the international gene bank NCBI, choose the order of species highest degree of similarity as follows: gene fragment highly homologous *matK* 99.73% versus species *Conifera Manglietia*. Recommendation for using *matK*, molecular marker as DNA barcode to identify *Magnolia chevalieri* (Dandy) V.S. Kumar species in Phu Tho, Vietnam.

Key words: DNA barcode, *Magnolia chevalieri* (Dandy) V.S. Kumar, Identify species, *matK*

TÓM TẮT

Đã tiến hành phân lập và xác định trình tự nucleotide của đoạn ADN mã vạch *matK*. Đã nhân bản thành công đoạn gen *matK* từ ADN tổng số của loài Mỡ Phú Thọ bằng kỹ thuật PCR. Kết quả xác định trình tự nucleotide của đoạn *matK* nhân bản được, sau khi xử lý, phân tích bằng các phần mềm chuyên dụng thu được kết quả như sau: đoạn gen *matK* có chiều dài 768 nucleotide. Trình tự nucleotide đoạn *matK* đã được đăng ký trên ngân hàng dữ liệu ADN Việt Nam với mã số (Barcode ID) tương ứng là MMC0001. So sánh trình tự nucleotide của đoạn gen *matK* trên với các trình tự nucleotide tương ứng trên ngân hàng gen quốc tế NCBI, chọn trình tự của loài có độ tương đồng cao nhất như sau: đoạn gen *matK* có độ tương đồng 99,73% so với loài *Manglietia conifera*. Gen *matK* có khả năng phân biệt loài mỡ Phú thọ với các loài khác trong họ ngọc lan.

Từ khóa: Giám định loài, *matK*, mã vạch ADN, Mỡ Phú Thọ.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Mỡ Phú Thọ (*Magnolia chevalieri* (Dandy) V.S.Kumar) được đánh giá là một trong các loài cây lấy gỗ có giá trị kinh tế cao ở nước ta. Tuy nhiên loài cây này đang nằm trong danh sách các loài thực vật cần được bảo tồn. Việc lựa chọn giống cây ban đầu để đưa vào triển khai là hết sức quan trọng và là nhiệm vụ cấp thiết trong công tác bảo tồn nguồn gen này.

Trước đây, định danh và phân loại thực vật chủ yếu dựa vào phương pháp hình thái học là chính. Tuy đã có những bước cải tiến trong quá trình áp dụng song vẫn gặp nhiều khó khăn do các giai đoạn phát triển của thực vật khác nhau, thu mẫu rời rạc hay những mẫu vật không nguyên vẹn... Do đó, đòi hỏi cần có phương pháp định danh và phân loại hiện đại hơn khắc phục được những hạn chế này.

¹ Trường Đại học Lâm nghiệp

Hiện nay, việc ứng dụng kỹ thuật mã vạch DNA – xác định các đoạn DNA barcode là một phương pháp tiên tiến, sử dụng trình tự các đoạn DNA ngắn đặc trưng nằm trong bộ genome của sinh vật đang nghiên cứu để nhận biết và phân biệt loài, mang lại hiệu quả cao trong thời gian ngắn, góp phần cải thiện được những mặt hạn chế của những phương pháp trước đây. Do đó, chúng tôi thực hiện đề tài “Nghiên cứu xác định đoạn DNA barcode cho loài cây Mỡ Phú Thọ (*Magnolia chevalieri* (Dandy) V.S.Kumar phục vụ giám định loài” sẽ là căn cứ để phân loại, lựa chọn và xây dựng dữ liệu gen, quý góp phần quản lý tài nguyên thiên nhiên, bảo tồn nguồn gen quý của quốc gia.

2. MỤC TIÊU, NỘI DUNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Mục tiêu nghiên cứu

Xác định được đoạn DNA barcode phục vụ giám định loài Mỡ phú thọ phục vụ giám định loài bằng chỉ thị mã vạch ADN. Góp phần xây dựng cơ sở dữ liệu mã vạch ADN phục vụ cho quản lý nguồn tài nguyên sinh vật.

2.2. Nội dung nghiên cứu

Thu thập mẫu lá cây Mỡ Phú Thọ. Tách chiết DNA tổng số từ mẫu lá. Nhân bản đoạn gen *matK*. Xác định, phân tích trình tự nucleotide đoạn gen *matK*. Xác định mối quan hệ di truyền của cây Mỡ Phú Thọ (*Magnolia chevalieri* (Dandy) V.S.Kumar).

2.3. Phương pháp nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu: Loài Mỡ Phú Thọ *Magnolia chevalieri* (Dandy) V.S. Kumar. Vật liệu nghiên cứu: Cây Mỡ Phú Thọ đã được giám định chính xác tên khoa học, lấy 3 mẫu lá bánh tẻ từ 3 cây khác nhau để trong túi nilon có chứa hạt silica gel hút ẩm, sau đó bảo quản ở -20°C. Kí hiệu các mẫu Mỡ Phú Thọ: MMC1, MMC2, MMC3. Mỗi được sử dụng để nhân đoạn gen *matK* được thiết kế dựa trên các tài liệu đã được công bố: *matK*- mLKT (F) 5'-TTCCATGGCCTTCTTTGCATTTGTTGC - 3' và *matK*-mLKT (R) 5'-TTCCATGGTTTTTTGAGGATCCGCTGT - 3'.

Tách chiết ADN tổng số: ADN tổng số được tách chiết từ các mẫu lá của cây Mỡ Phú Thọ theo bằng kit tách chiết DNA tổng số của hãng Norgen, Canada.

Nhân bản đoạn *matK* bằng kỹ thuật PCR: Đoạn gen *matK* được nhân bản bằng kỹ thuật PCR, mỗi phản ứng PCR được thực hiện trong tổng thể tích 20 µl, bao gồm: H₂O deion (7 µl), 2x PCR Master mix Solution (10 µl), 10 pmol/ µl mỗi xuôi (1,0 µl), 10 pmol/ µl mỗi ngược (1,0 µl) và 50 ng/µl ADN khuôn (1 µl). Chương trình phản ứng PCR: 94°C trong 2 phút; (94°C: 30 giây, 59°C : 30 giây, 72°C : 1 phút) lặp lại 40 chu kỳ; 72°C trong 5 phút; bảo quản sản phẩm PCR ở 4°C. Kết quả PCR được kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 1%, quan sát dưới đèn UV. Sản phẩm PCR được tinh sạch bằng kit tinh sạch của Norgen, Canada.

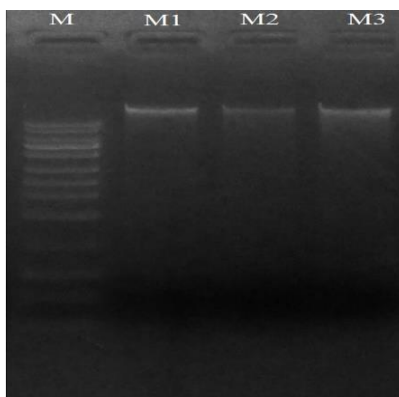
Xác định và phân tích trình tự nucleotide của các đoạn DNA được nhân bản: Sản phẩm PCR sau khi tinh sạch được gửi cho phòng thí nghiệm 1st Base ở Malaysia để giải trình tự.

Trình tự nucleotide của đoạn ADN được xử lý, phân tích bằng BLAST, ClustalW, Mega6. Sau đó được đăng ký trong ngân hàng cơ sở dữ liệu ADN của Việt Nam (www.dnabank.vn).

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Kết quả tách chiết DNA tổng số từ lá cây Mỡ Phú Thọ.

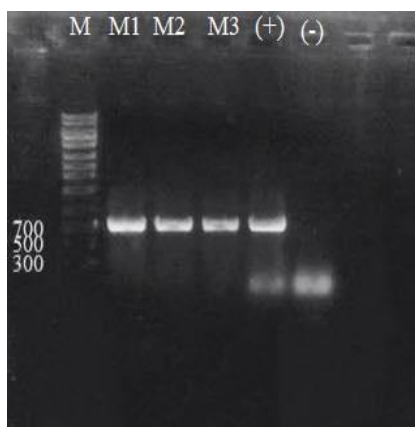
ADN tổng số được tách chiết từ các mẫu lá Mỡ Phú Thọ bằng enzyme, sau đó được tinh sạch và điện di trên gel agarose 1% (Hình 1) cho băng tương đối sắc nét, ít đứt gãy chứng tỏ ADN tổng số còn khá nguyên vẹn, đảm bảo yêu cầu kỹ thuật để làm khuôn cho nhân bản các đoạn ADN quan tâm.



Hình 1. Kết quả tách chiết DNA tổng số 03 mẫu Mỡ Phú Thọ

3.2. Kết quả nhân bản vùng gen *matK* bằng kỹ thuật PCR

Sản phẩm ADN tổng số sau khi tách chiết được dùng trực tiếp làm khuôn để nhân bản gen *matK* sử dụng cặp mồi đặc hiệu. Thành phần và chu trình phản ứng được miêu tả ở phần phương pháp. Mỗi phản ứng lặp lại 3 lần. Sản phẩm PCR được kiểm tra bằng cách điện di trên gel agarose 1%, sử dụng marker 1kb. Đoạn gen *matK* có chiều dài khoảng hơn 700bp. Kết quả điện di cho thấy các băng ADN tương ứng xuất hiện đúng với kích thước dự kiến.



Hình 2. Kết quả nhân bản gen *matK* của 03 mẫu Mỡ Phú Thọ

3.3. Phân tích kết quả

Kết quả xác định trình tự nucleotide cho thấy, đoạn gen *matK* được nhân bản có kích thước 768bp, trong đó không có sự sai khác nào giữa 3 mẫu nghiên cứu, kết quả tương đồng 100%. **Bảng 01. Trình tự nucleotide của đoạn gen *matK*, gồm 768 nucleotide**

(Chiều Barcode ID: MMC0001)

```
TTCCATGGCCTTCTTTGCATTTGTTGCGATTCTTTCTCCACGAGTATCGTAATTCGAA
TAGTCTCATTACTCCAAAGAAATCCATTTCTCTTTTTTCAAAGAGAATCAAAGATT
CTTCTTGTTACTATATAATTCTCATGTATATGAATGTGAATCCGTATTAGTGTTTCTCC
GTAAACAATCTTCTCATTACGATCAACATCCTCTGGAACCTTTCTTGAGCGAACAC
ATTTCTATGGAAAAATAGAACATCTTGTAGTAGTGCTTCGTAATGATTTTCAGAAGA
CCCTATGGTTGTTCAAGGACCCCTTTCATGCATTATGTCAGATATCAAGGAAAATCCA
TTCTGGCTTCAAAGGGGACTCATCTTCTGATGAAGAAATGGAAATCTCACCTTGTC
CATTTTTGGCAATGTCATTTTTTACTTGTGGTCTCTACCGGACAGGATCCATATAAAC
CAATTATACAATCATTCCTTATATTTTCTGGGCTATCTTTCAAGTGTACGACTAAACA
CTTCGGTGGTAAGGATTCAAATGCTAGAGAATTCATTTCTAATAGATACTTCTATTAA
TAAATTCGAGACCCTAGTCCCAATTATTCCTCTGATTGGATCAGTGGCTAAAGCGAA
ATTTTGTAACGTATCAGGGCATCCCATAGTAAGTCGGTCCGGGCCGATTCGTCAGA
TTCTGATATTATCAATCGATTTGGGCGGATATACAGAAATCTTTCTCATTATCACAGC
GGATCCTCAAAAAACCATGGAA
```

So sánh sự khác biệt ở cấp độ loài theo đoạn gen *matK* của loài Mỡ Phú Thọ *Magnolia chevalieri* (Dandy) V.S.Kumar, công bố trên ngân hàng gen DNABank.vn với mã số MMC0001 với trình tự với trình tự gen của loài Mỡ (*Manglietia conifera*), công bố trên ngân hàng gen quốc tế NCBI với mã số AB055541, tỷ lệ tương đồng là 99,73%, trong đó có 2 điểm sai khác: thay thế A bằng G ở vị trí 23 và thay thế T bằng C ở vị trí 746. Điều này có nghĩa là chỉ thị này giúp phân biệt được loài Mỡ Phú Thọ với một số loài khác, do đó đoạn *matK* có thể được sử dụng làm mã vạch cho loài *Magnolia chevalieri* (Dandy) V.S.Kumar.

4. KẾT LUẬN

Từ mẫu lá loài Mỡ Phú Thọ *Magnolia Chevalieri* (Dandy) V.S.Kumar đã tiến hành tách chiết được ADN tổng số từ đó nhân bản thành công đoạn gen *matK* bằng kỹ thuật PCR. Kết quả phân tích trình tự cho thấy độ dài đoạn *matK* là 768bp. Trình tự nucleotide đoạn gen *matK* đã được đăng ký trên ngân hàng dữ liệu ADN Việt Nam với mã số (Barcode ID) MMC0001. Kết quả so sánh trình tự đoạn gen *matK* đã nhân bản thành công với đoạn mã vạch tương ứng trên ngân hàng gen quốc tế NCBI cho thấy đoạn *matK* tương đồng 99,73%. Điều này cho thấy gen *matK* có khả năng phân biệt tốt.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Alvarez I.W.J.F. (2003), *Ribosomal ITS sequences and plant phylogentic inference*, Molecular Phylogenetics and Evolution.
2. Bailey C.D.C.T.G. Harris S.A. Hughes C.E. (2003), *Characterization of angiosperm nrDNA polymorphism, paralogy, and pseudogenes*, Molecular Phylogenetics and Evolution.

3. CBOL Plant Working Group (2009), *A DNA barcode for land plants*.
4. Chen S.Y.H. Han J. Liu C. Song J. Et Al. (2010), *Validation of the ITS2 region as a novel DNA barcodes for identyfying medicinal plant species*, PloS ONE.
5. Gonzalez M.A.B.C. Engel J. Mori S.A. Pe Tronelli P. Et Al. (2009), *Identification of Amazonian trees with DNA barcodes*, PloS ONE.
6. Hebert P.D.N., C.A. Ball S.L., De Waard J.R. (2003), *Biological indentification through DNA barcodes*, Proc R Soc Land B Biol Sci.
7. Kress, J.W., K.J., Zimmer, E.A., Weigt, L.A. & Janzen, D.H. (2005), *Use of DNA barcodes to identify flowering plants*, Proc Natl Acad Sci USA.
8. Mark Y.S.H.P.D.N. (2008), *Barcode of Life*, Scientific American.
9. Nguyễn Đức Lượng (2002), *Công nghệ gen*, NXB Đại học Quốc gia TP HCM.
10. Ratnasingham S.H.P.D.N. (2007), *BOLD: the barcode of life data system*, Mol Ecol Notes.

NGHIÊN CỨU NHÂN GIỐNG LOÀI ĐƯƠNG QUY NHẬT BẢN (*Angelica acutiloba* Kitagawa) BẰNG KỸ THUẬT NUÔI CẤY MÔ - TẾ BÀO THỰC VẬT

Nguyễn Thị Anh¹, Lê Thị Phụng¹, Phan Đức Nhật Ý¹

ABSTRACT

Angelica acutiloba Kitagawa plays a crucial role in traditional medicine with major pharmaceutical value from roots. In this study, germination, multiple shoot induction and rooting were performed in condition with temperature ($24 \pm 2^\circ\text{C}$), humidity ($65 \pm 5\%$). The results showed that Javen 5% for 15 minutes was the best for sterilizing seeds, the rate of clean seeds was 91.33% and all of them germinated. The optimum medium for shoot multiplication was MS supplemented with 0.3mg/l BAP + 0.2 mg/l kinetine + 0.1 mg/l NAA + 30g/l sucrose and 7g/l agar with 3.47 shoots per explant. The highest percentage of rooting (100%) and 11 root each shoot were recorded in the MS media supplemented with 0.1mg/l NAA + 30g/l sucrose and 7g/l agar. These results have shown that the tissue culture method could successfully be applied for mass propagation of *Angelica acutiloba* Kitagawa.

Key words: *Angelica acutiloba*, shoot multiplication, tissue culture.

TÓM TẮT

Cây Đương quy Nhật Bản (*Angelica acutiloba* Kitagawa) là cây thuốc quý, đầu vị trong nhiều bài thuốc cổ truyền, với dược tính chủ yếu đến từ bộ rễ. Trong nghiên cứu này, sự nảy mầm của hạt, nhân nhanh chồi và ra rễ tạo cây hoàn chỉnh của cây Đương quy Nhật Bản in vitro đã được thực hiện trong điều kiện nhiệt độ phòng nuôi $24 \pm 2^\circ\text{C}$, độ ẩm tương đối $65 \pm 5\%$. Kết quả nghiên cứu cho thấy, hạt được khử trùng tốt nhất bằng Javen 5% với thời gian khử trùng là 15 phút cho tỷ lệ hạt sạch là 91,33% và tỷ lệ hạt nảy mầm đạt 91,33%. Khả năng nhân nhanh chồi Đương quy Nhật Bản tốt nhất trên môi trường MS có bổ sung 0,3mg/l BAP + 0,2 mg/l kinentin + 0,1 mg/l NAA + 30g/l sucrose và 7g/l agar với trung bình 3,47 chồi/mẫu, chồi xanh đậm, mập và đồng đều. Tỷ lệ ra rễ của chồi in vitro cao (100%), trung bình 11 rễ/chồi là kết quả tốt nhất khi nuôi cấy trên môi trường MS có bổ sung 0,1mg/l NAA, + 30g/l sucrose và 7g/l agar. Kết quả nghiên cứu cho thấy có thể ứng dụng phương pháp nuôi cấy mô vào nhân giống cây Đương quy Nhật Bản tạo ra lượng cây giống lớn, chất lượng cao cung ứng cho nhu cầu trồng cây dược liệu này.

Từ khóa: *Angelica acutiloba*, Đương quy Nhật Bản, nuôi cấy mô tế bào.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Cây Đương quy Nhật Bản (*A. acutiloba* Kitagawa) thuộc họ Hoa tán *Apiaceae*, là cây thuốc quý, đầu vị và không thể thiếu trong y học cổ truyền đối với việc điều trị bệnh phụ nữ và bồi bổ khí huyết, chữa thiếu máu, đau đầu, kháng viêm, tăng cường miễn dịch,...Ở Việt Nam, Đương quy được di nhập từ Triều Tiên, Nhật Bản và được trồng ở SaPa, Thanh Trì và Mỹ Văn. Trong số các loại Đương quy, cây Đương quy Nhật Bản có vị trí quan trọng nhất về mặt thương mại do mùi vị và giá trị dược lý của chúng. Tuy nhiên, ở Việt Nam rễ Đương quy được sử dụng có tới 80% được nhập từ Trung Quốc [2]. Trong Quyết định phê duyệt quy hoạch tổng thể phát triển cây dược liệu đến năm 2020 và định hướng đến năm 2030 của Chính phủ Việt Nam, Đương quy được quy hoạch trồng 900 ha. Vì vậy, nhu cầu cây giống Đương quy là rất lớn. Hiện nay, Đương quy Nhật Bản chủ yếu được nhân giống bằng hạt hoặc bằng củ. Song hạt giống Đương quy chỉ được sản xuất ở những vùng có khí hậu lạnh như Sapa hoặc những vùng có khí hậu tương tự. Do vậy, việc cung ứng hạt giống Đương quy cho

¹ Trường Đại học Lâm nghiệp

thị trường gặp nhiều khó khăn. Mặt khác, sức nảy mầm của hạt giống Đương quy bị suy giảm mạnh trong quá trình bảo quản. Xuất phát từ những lý do trên chúng tôi tiến hành chuyên đề: **“Nghiên cứu nhân giống loài Đương quy Nhật Bản (*Angelica acutiloba* Kitagawa) bằng kỹ thuật nuôi cấy mô - tế bào thực vật”**

2. MỤC TIÊU, NỘI DUNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Mục tiêu

- Xác định được công thức khử trùng hạt Đương quy Nhật Bản cho tỷ lệ hạt sạch và nảy mầm cao nhất.
- Xác định được môi trường thích hợp đối với nhân nhanh chồi Đương quy Nhật Bản.
- Xác định được công thức môi trường thích hợp cho việc tạo cây Đương quy *in vitro* hoàn chỉnh.

2.2. Nội dung nghiên cứu

- Nghiên cứu công thức khử trùng hạt Đương quy Nhật Bản;
- Nghiên cứu kỹ thuật nhân nhanh chồi *in vitro* Nhật Bản;
- Nghiên cứu kỹ thuật tạo cây Đương quy *in vitro* hoàn chỉnh.

2.3. Phương pháp nghiên cứu

- Phương pháp nghiên cứu kỹ thuật khử trùng mẫu hạt Đương quy;
- Phương pháp nghiên cứu kỹ thuật nhân nhanh chồi Đương quy;
- Phương pháp nghiên cứu kỹ thuật tạo cây hoàn chỉnh;
- Phương pháp thu thập và xử lý số liệu.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của hóa chất khử trùng lên khả năng nảy mầm của hạt Đương quy

Bảng 3.1. Khả năng nảy mầm của hạt Đương quy trong các công thức khử trùng khác nhau

Công thức TN	Hóa chất khử trùng	Thời gian khử trùng (phút)	Tổng số hạt NC	Số hạt sạch TB	Tỷ lệ hạt sạch (%)	Số hạt nảy mầm TB	Tỷ lệ nảy mầm (%)	Số chồi sạch thu được	Đặc điểm của cây mầm
CT1	HgCl ₂ (0,1%)	5	150	132	88,00	97	64,67	97	-
CT2	HgCl ₂ (0,1%)	7	150	142	94,89	82	54,67	82	--
CT3	Javen (5%)	10	150	127	84,67	127	84,67	127	++
CT4	Javen (5%)	15	150	137	91,33	137	91,33	137	++

Ghi chú: ++: chồi mập; --: chồi nhỏ, yếu

Kết quả trên cho thấy khử trùng bằng HgCl_2 0,1% tuy thời gian khử trùng ngắn nhưng cho tỷ lệ mẫu sạch cao hơn Javen và cao nhất ở công thức CT2 (94,89%). Tuy nhiên, những hạt sạch này có khả năng nảy mầm kém hơn so với khử bằng Javen. CT4 (Javen 5% trong 15 phút) cho tỷ lệ hạt sạch 91,33% thấp hơn CT2 nhưng tỷ lệ hạt sạch nảy mầm đạt cao nhất 91,33%. Điều này có thể được lý giải rằng HgCl_2 có khả năng diệt nấm, khuẩn cao hơn Javen, nhưng chất độc này gây ảnh hưởng mạnh đến phôi hạt dẫn đến tỷ lệ nảy mầm thấp hơn.

3.2. Kết quả nghiên cứu nhân nhanh chồi Đương quy.

Kết quả ở bảng 3.2 cho thấy BAP và kinetin hoạt động riêng rẽ ít hiệu quả đối với nhân chồi Đương quy. Khi có sự tổ hợp các chất điều hòa sinh trưởng (H7-H9), hiệu quả kích thích tạo chồi tăng lên rõ rệt ($\geq 60\%$). Trong số đó, tốt nhất là công thức H8 cho tỷ lệ mẫu tạo cụm chồi 75,57% và số chồi trung bình 3,47 chồi/mẫu. Mặt khác, chất lượng chồi ở công thức này có sự khác biệt rõ rệt so với các công thức còn lại, chồi xanh đậm, mập và sự đồng đều của các chồi tạo ra cao. Tuy nhiên, hệ số nhân chồi này thấp hơn so với nghiên cứu của Hoàng Ngọc Nhung và cs (2012) là 8,9 chồi/mẫu. Điều này có thể do mẫu vật dùng tạo cụm chồi và loại chất điều hòa sinh trưởng sử dụng trong hai nghiên cứu có sự khác biệt. Trong nghiên cứu trước sử dụng lát mỏng trên môi trường có bổ sung 0,1 mg/l NAA và 1 mg/l TDZ [1].

Bảng 3.2. Khả năng nhân nhanh chồi Đương quy *in vitro*

Công thức TN	Chất điều hòa sinh trưởng (mg/l)			Tổng số mẫu NC	Số mẫu tạo đa chồi TB	Tỷ lệ mẫu tạo đa chồi (%)	Số chồi TB /mẫu	Chiều cao chồi TB (cm)	Chất lượng chồi
	BAP	Kinetin	NAA						
H1	0,1	-	-	30	2,33	7,77	1,33	3,6	+
H2	0,3	-	-	30	5,00	16,67	1,5	3,63	+
H3	0,5	-	-	30	3,33	11,10	1,67	3,5	+
H4	-	0,1	-	30	2,00	6,67	1,17	4,7	+
H5	-	0,3	-	30	6,67	22,23	1,57	3,53	+
H6	-	0,5	-	30	4,33	14,43	1,27	3,87	+
H7	0,3	0,3	-	30	21,67	72,23	3,37	3,27	+++
H8	0,3	0,2	0,1	30	22,67	75,57	3,47	3,30	+++
H9	0,5	0,3	0,1	30	18,00	60,00	2,43	3,47	++

Ghi chú: +: Chồi nhỏ, xanh nhạt; ++: Chồi mập, xanh đậm, không đồng đều; +++: Chồi mập, xanh đậm, đồng đều

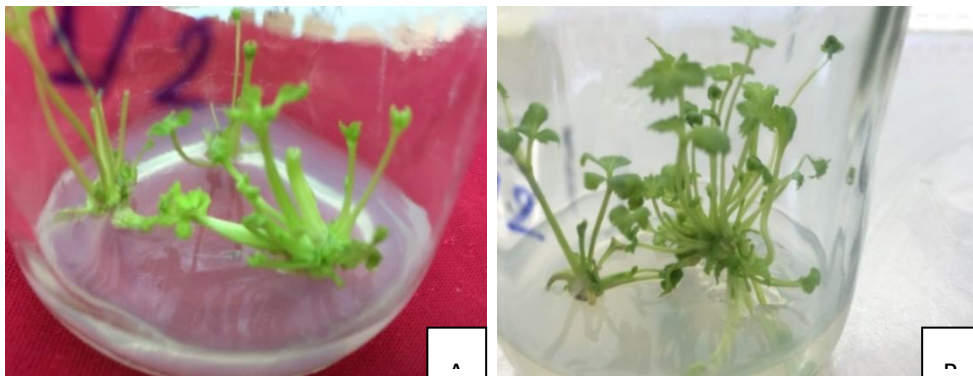
3.3. Ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng đến khả năng ra rễ của chồi Đương quy.

Bảng 3.3. Ảnh hưởng của NAA tới khả năng ra rễ của chồi Đương quy Nhật Bản sau 4 tuần

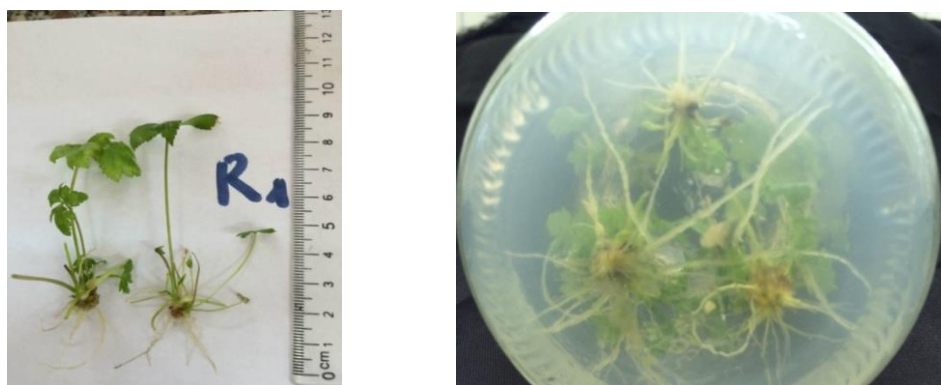
Công thức	NAA (mg/l)	Tổng số chồi NC	Số chồi ra rễ	Tỷ lệ chồi ra rễ (%)	Số rễ/chồi	Chiều dài trung bình rễ (cm)	Chất lượng rễ	Tốc độ ra rễ (ngày)
R1	0,1	30	30	100	11,0	2,23	+++	7
R2	0,3	30	28	93,3	9,3	0,99	++	15
R3	0,5	30	26	86,7	8,3	0,70	+	17

Ghi chú: + : Rễ xấu, mảnh; ++ : Rễ trung bình, mảnh; +++: Rễ tốt, mập, xanh đậm

Trong số ba công thức ra rễ, công thức R1: MS + 0,1mg/l NAA + 30g/l sucrose + 7g/l agar cho tỷ lệ ra rễ 100%, số rễ trung bình/chồi là 11, cao hơn công thức R2 (9,3) và R3 (8,3). Đặc biệt chiều dài trung bình/ rễ của R1 là 2,23cm dài hơn hẳn so với R2 và R3. Sự chênh lệch về kích thước rễ này có liên quan đến tốc độ ra rễ của 3 công thức: ở R1 chỉ sau nuôi cấy 7 ngày rễ bắt đầu xuất hiện và có độ đồng đều cao, trong khi R2 và R3 có thời gian ra rễ muộn hơn R1 rất nhiều. Mặt khác, ở công thức R2, R3 có sự xuất hiện mô sẹo. Như vậy, chỉ với một hàm lượng chất kích thích ra rễ nhỏ (0,1 mg/l NAA) có thể đủ cho quá trình hình thành rễ ở Đương quy Nhật Bản, khi nồng độ NAA cao có thể gây ức chế việc tạo rễ và kích thích tạo mô sẹo.



Hình 1. Cụm chồi Đương quy Nhật Bản trên môi trường H8 ở 2 (A) và 4 tuần tuổi (B)



Hình 2. Rễ Đương quy Nhật Bản sau 4 tuần nuôi cấy trên môi trường R1

4. KẾT LUẬN

- Javen 5% trong thời gian 15 phút là công thức khử trùng thích hợp đối với hạt Đương quy Nhật Bản, cho tỷ lệ hạt sạch là 91,33% và tỷ lệ hạt nảy mầm là 91,33%.

- Môi trường MS có bổ sung 0,3 mg/l BAP; 0,2 mg/l Kinetin, 0,1mg/l NAA; 30 g/l sucrose; 7 g/l agar là thích hợp nhất cho việc nhân nhanh chồi Đương quy Nhật Bản với kết quả tỷ lệ mẫu tạo đa chồi 75,57%; số chồi trung bình 3,47 chồi/ mẫu; chiều cao trung bình là 3,3cm/chồi; chất lượng chồi là mập, xanh đậm, đồng đều.

- Môi trường ra rễ Đương quy Nhật Bản thích hợp: MS có bổ sung 0,1 mg/l NAA + 30g/l sucrose + 7 g/l agar với 11,00 rễ/chồi và chiều dài trung bình rễ là 2,23cm; chất lượng rễ mập, khỏe.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Tiếng Việt

1. Hoàng Ngọc Nhung và cộng sự (2012). Nghiên cứu sự phát sinh cơ quan từ lớp mỏng tế bào cây Đương quy Nhật Bản (*Angelica acutiloba*) nuôi cấy *in vitro*. Tạp chí Sinh học, 34 (3SE): tr 196-204.
2. Hoàng Ngọc Nhung, Nguyễn Thị Quỳnh (2013). Vai trò của thành phần khoáng và giá thể đối với tăng trưởng của cây Đương quy Nhật Bản (*Angelica acutiloba* Kitagawa) nuôi cấy quang tự dưỡng. Báo cáo Hội nghị khoa học công nghệ sinh học toàn quốc 2013. Quyển 2, tr 971-976.
3. Nguyễn Thị Quỳnh và cộng sự (2013). Sự hình thành và tăng trưởng của rễ bất định từ nuôi cấy *in vitro* của cây Đương quy Nhật Bản (*Angelica acutiloba* Kitagawa). Tạp chí Sinh học, 35 (3SE): 165-173.
4. Võ Văn Chi (2003). Từ điển thực vật thông dụng. NXB Khoa học và Kỹ thuật, tập I, tr. 287.

Tiếng Anh

5. Anil Kumar Bisht, et al (2015). Note on somatic embryogenesis and synthetic seed production in *Angelica glauca*: A valuable medicinal plant of Himalaya. Journal of Medicinal Plants Research. Vol.9(12), pp 419-425.
6. Chen HC, et al (2014). Volatile compounds from roots, stems and leaves of *Angelica acutiloba* growing in Taiwan. Nat Prod Commun.
7. Hui Xu, et al. Optimization of growth and pyranocoumarins production in hairy root culture of *Angelica gigas* Nakai. Journal of Medicinal Plants Research Vol. 3(11), pp. 978-981.
8. Iankova E., et al (2001). *In vitro* propagation of *Angelica pancicii* Vauds., an endangered plant species in Bulgaria. Seed Sci & Technol., 29, 477-482.
9. Jin Bong H., Mi-ok Y. (1997). Comparison of chemical components of *Angelica gigas* Nakai and *Angelica acutiloba* Kitagawa. Korean J. Food Sci. Technol. Vol.29, No.6, pp. 1113-1118.
10. Rajiv Kumar Vashistha, et al (2009). Vegetative propagation of *Angelica glauca* Edgew. and *Angelica archangelica* Linn.: two high value medicinal and aromatic herbs of the Himalaya. Nature and Science, 7(8).
11. Shin-Hui Huang, et al (2009). *In vitro* Plant Let Regeneration of the Medicinal *Angelica acutiloba* K. Via Stem Explants. 宜蘭大學生物資源學刊 5(1): 41-45.
12. Thanyawan M., Papavadee S. (2010). Studies on Tissue Culture of *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels. Journal of Thai Traditional & Alternative Medicine Vol. 8 Nos. 2-3.

NGHIÊN CỨU NHÂN GIỐNG LAN KIM TUYẾN ĐÁ VÔI (*Anoectochilus calcareus* Aver.) BẰNG PHƯƠNG PHÁP NUÔI CẤY *IN VITRO*

Đoàn Duy Thành¹, Đâu Thị Lý¹

ABSTRACT

Anoectochilus calcareus Aver. is an endemic species in Vietnam. It is not only folk medicine against hypertension, lung and liver diseases but also decorative plant. Due to overexploitation, the population of this species has been significantly decreased in the wild. Thus, the application of advanced methods to propagating this important medicinal plant is extremely necessary. Nodal segments were cultured to induce multi-shoots on Murashige and Skoog's (MS) base medium supplemented with 0.5 mg/l BAP, 0.3mg/l kinetin, 0.3 mg/l NAA, 2% sucrose, 0.7% agar, 100ml/l coconut milk, 60g/l potato. There was 100% of total samples inducing multi-shoots with the mean shoot number being 7.63 and 2.16cm/shoot. *In vitro* shoots were rooted on the MS medium supplemented with 1,5mg/l NAA, 2% sucrose, 0.7% agar, 100ml/l coconut milk, 60g/l potato and 0.2% activated coal, which resulted in the highest rooting percentage (100%), 2.95 roots per shoot and 1.53cm each root. *A. calcareus* plants with well-developed roots which were transferred to plastic trays containing 100% roots of Fern and covering a thin layer of dried seaweed. The percentage of living plants was 84.37%. These results have shown that the micropropagation could successfully be applied for mass propagation of *A. calcareus* Aver.

Key words: *Anoectochilus calcarus*, *in vitro* propagation, multip-shoot.

TÓM TẮT

Kim tuyến đá vôi là nguồn gen đặc hữu của Việt Nam, vừa có giá trị làm cảnh, vừa có giá trị làm thuốc. Hiện nay, loài cây này đã và đang bị khai thác một cách tận diệt với mục đích thương mại, dẫn đến nguy cơ bị tuyệt chủng ngoài tự nhiên. Vì vậy, việc ứng dụng các phương pháp tiên tiến vào nhân giống loài cây này là rất cần thiết. Nhân giống cây Kim tuyến đá vôi bằng phương pháp nuôi cấy mô bước đầu thu được kết quả tốt. Môi trường khoáng tốt nhất cho tái sinh và sinh trưởng chồi là MS có bổ sung 2% sucrose, 0,7% agar, 100ml/l nước dừa, 60g/l khoai tây. Môi trường thích hợp nhất cho nhân nhanh chồi là MS có bổ sung 0,5mg/l BAP, 0,3mg/l kinetin, 0,3mg/l NAA, 2% sucrose, 0,7% agar, 100ml/l nước dừa, 60g/l khoai tây cho tỷ lệ mẫu tạo đa chồi 100%; 7,63chồi/mẫu; 2,16cm/chồi. Môi trường MS bổ sung 1,5mg/l NAA, 2% sucrose, 0,7% agar, 100ml/l nước dừa, 60g/l khoai tây và 0,2% than hoạt tính cho tỷ lệ chồi ra rễ 100%; 2,95 rễ/chồi và 1,53cm/rễ. Kết quả nghiên cứu cho thấy có thể ứng dụng nuôi cấy *in vitro* vào nhân giống cây Kim tuyến đá vôi tạo ra lượng cây giống lớn, chất lượng cao cung ứng cho nhu cầu trồng, bảo tồn loài cây quý hiếm này.

Từ khóa: *Anoectochilus calcarus*, cụm chồi, kim tuyến đá vôi, nuôi cấy *in vitro*, tái sinh chồi.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Kim tuyến đá vôi hay Lan gấm đá đôi có tên khoa học là *Anoectochilus calcareus* Aver. thuộc họ Lan (Orchidaceae) là loài đặc hữu và nguồn gen quý của Việt Nam. Kim tuyến đá vôi mọc tự nhiên ở một số vùng như Hà Giang, Hòa Bình, Lâm Đồng Khánh Hòa. Sự phân bố của loài này trên thế giới đến nay còn chưa biết. Kim tuyến đá vôi có giá trị làm cảnh vì có lá và hoa đẹp. Ngoài ra còn có giá trị làm thuốc. Hiện nay, Kim tuyến đá vôi được cấp báo thuộc nhóm IA của nghị định 32/2006/CP, nghiêm cấm khai thác vì mục đích thương mại và nhóm thực vật rừng đang có nguy cấp EN A1,d trong sách đỏ Việt Nam[1]. Kim tuyến đá vôi có giá trị cao cả về mặt khoa học lẫn kinh tế, như vậy việc nghiên cứu bảo tồn nguồn gen loài cây

¹ Trường Đại học Lâm nghiệp

này là yêu cầu cấp thiết hiện nay nhằm tìm cách cứu vãn loài cây quý hiếm này khỏi nguy cơ bị tuyệt chủng.

Hiện nay, kỹ thuật nhân giống *in vitro* được ứng dụng rộng rãi và mang lại hiệu quả kinh tế cao. Kỹ thuật này không chỉ có thể tạo ra một số lượng lớn cây giống sạch bệnh, đồng nhất về mặt di truyền trong thời gian ngắn, mà còn khắc phục được những nhược điểm của phương thức nhân giống truyền thống như diện tích canh tác, điều kiện tự nhiên, công chăm sóc. Vì vậy, chúng tôi mạnh dạn tiến hành chuyên đề **“Nghiên cứu nhân giống Kim tuyến đá vôi (*Anoectochilus calcareus* Aver.) bằng phương pháp nuôi cấy *in vitro*”** nhằm đáp ứng nhanh và bền vững nguồn cây giống Kim tuyến đá vôi có chất lượng tốt cung ứng cho nhu cầu trồng và bảo tồn loài cây quý hiếm này.

2. MỤC TIÊU, NỘI DUNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Mục tiêu nghiên cứu

- Xác định được môi trường thích hợp nhân nhanh chồi kim tuyến đá vôi (*A. calcareus* Aver.)
- Xác định được môi trường thích hợp cho giai đoạn ra rễ chồi kim tuyến đá vôi *in vitro*.
- Xác định được loại giá thể trồng cây con *in vitro* kim tuyến đá vôi.

2.2. Nội dung nghiên cứu:

- Nghiên cứu kỹ thuật nhân nhanh chồi kim tuyến đá vôi
 - + Xác định môi trường khoáng thích hợp cho nhân nhanh chồi kim tuyến đá vôi
 - + Ảnh hưởng của các chất điều hòa sinh trưởng lên khả năng nhân nhanh chồi
- Nghiên cứu kỹ thuật tạo cây hoàn chỉnh từ chồi *in vitro*
- Nghiên cứu giá thể trồng cây kim tuyến đá vôi *in vitro*

2.3. Phương pháp nghiên cứu

- Phương pháp nhân nhanh chồi kim tuyến đá vôi
- + Phương pháp xác định môi trường khoáng thích hợp cho tạo đa chồi
- + Phương pháp xác định sự ảnh hưởng của các chất điều hòa sinh trưởng lên khả năng tạo đa chồi
- Phương pháp tạo cây hoàn chỉnh từ chồi kim tuyến đá vôi *in vitro*
- Phương pháp huấn luyện và chăm sóc cây con
- Phương pháp thu thập và xử lý số liệu

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Kết quả nhân nhanh chồi Kim tuyến đá vôi

- ***Ảnh hưởng của môi trường khoáng thích hợp cho tạo đa chồi Kim tuyến đá vôi :***

Chồi Kim tuyến đá vôi *in vitro* tái sinh trên môi trường vào mẫu được cắt thành những đoạn có kích thước 1-1,5cm và được cấy chuyển vào 3 môi trường Knop, MS, Knud* cùng bổ

sung 0,5mg/l BAP; 0,3mg/l kinetin; 0,3mg/l NAA; 20g/l đường sucrose; 6,5g/l agar; 100ml nước dừa; 60 g/l khoai tây. Kết quả sau 8 tuần được thể hiện qua bảng 1.

Bảng 1. Ảnh hưởng của môi trường khoáng lên khả năng tạo đa chồi kim tuyến đá vôi

Công thức	Tổng số mẫu	Số mẫu tạo đa chồi	Tỷ lệ mẫu đa chồi (%)	Số chồi TB/mẫu	Số chồi hữu hiệu	Chiều cao TB chồi hữu hiệu (cm)	Chất lượng chồi
MS	35	35	100	7,63	4,45	2,16	+++
Knop	30	28	93,33	7,23	2,08	1,86	+++
Knud*	30	23	76,67	3,86	1,52	1,54	+

Ghi chú : +++ : chồi mập, lá to, nở rộng; + : chồi gầy, lá nhỏ.

Các mẫu nuôi cấy trên môi trường MS và Knop đều có tỷ lệ mẫu tạo cụm chồi rất cao, lần lượt là 100% và 93,33% với số chồi tương ứng 7,63 chồi (MS) trong đó có 4,45 chồi hữu hiệu (kích thước ≥ 1 cm) và 7,23 chồi (Knop) trong đó có 2,08 chồi hữu hiệu. Như vậy, khả năng tạo đa chồi ở hai môi trường MS và Knop không có sự khác biệt rõ rệt, tuy nhiên số chồi hữu hiệu ở môi trường MS là cao hơn hẳn so với môi trường Knop. Mặt khác, kích thước trung bình của chồi triển vọng ở môi trường MS (2,16 cm) cao hơn ở môi trường Knop (1,86cm). Trong khi, trên môi trường Knud* các chỉ tiêu đo đếm đều thể hiện sự thua kém rõ rệt với hai môi trường còn lại. Điều này khá phù hợp với kết quả của Nguyễn Văn Kết và cs (2004) thu được trên đối tượng *A. formosanus*: Chồi của loài này sinh trưởng và tái sinh tốt nhất trên môi trường MS và H3. Như vậy, đối với Kim tuyến đá vôi, chúng tôi khẳng định môi trường MS là thích hợp nhất cho khả năng tạo cụm chồi *in vitro*.

- Ảnh hưởng của các chất điều hòa sinh trưởng BAP, kinetin và NAA lên khả năng tạo đa chồi Kim tuyến đá vôi

Những chồi sạch tái sinh trên môi trường vào mẫu được cắt thành đoạn 1-1,5cm và được cấy sang môi trường khoáng MS có bổ sung 20 g/l đường sucrose + 6,5g/l agar + 100ml nước dừa + 60 g/l khoai tây + BAP hoặc kinetin và NAA một cách riêng rẽ hoặc kết hợp ở các nồng độ khác nhau. Kết quả sau 8 tuần nuôi cấy được thể hiện trong bảng 2.

Bảng 2. Ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng lên khả năng tạo đa chồi kim tuyến đá vôi

Công thức thí nghiệm	Chất điều hòa sinh trưởng (mg/l)			Số mẫu thí nghiệm	Số mẫu tạo đa chồi	Tỷ lệ mẫu tạo đa chồi (%)	Số chồi/mẫu		Chiều cao chồi TB (cm)	Chất lượng chồi
	BAP	Kinetin	NAA				Số chồi TB/mẫu	Số chồi hữu hiệu TB/mẫu		
ĐC	-	-	-	31	17	54,84	1,58	1,29	1,94	+
S1	0,1	-	-	35	31	88,57	3,69	3,06	2,22	+
S2	0,5	-	-	54	52	96,29	3,83	2,39	2,32	++
S3	1,0	-	-	40	39	97,5	6,1	2,5	1,79	+++
S4	1,5	-	-	32	32	100	5,88	2,53	1,91	+++
S5	2,0	-	-	44	44	100	4,95	2,25	1,93	+++
S6	-	0,1	-	35	26	74,28	2,37	1,6	1,98	++
S7	-	0,5	-	51	38	74,5	2,64	1,48	2,28	++
S8	-	1,0	-	38	29	76,32	2,9	1,82	2,18	++
S9	-	1,5	-	22	18	81,81	3,86	2,36	2,5	++

S10	-	2,0	-	28	20	71,43	2,5	1,54	2,24	++
S11	0,5	0,3	0,3	75	75	100	7,63	4,45	2,16	+++
S12	0,5	0,5	0,3	38	37	97	5,45	3,12	2,19	+++
S13	0,5	0,3	0,2	42	39	93	4,24	2,33	2,33	++
S14	0,5	0,5	0,2	32	32	100	6,26	2,83	2,29	+++

Ghi chú : +++ : chồi mập, lá to, nở rộng; + : chồi gầy, lá nhỏ.

Khi sử dụng riêng rẽ BAP hoặc kinetin cho hiệu quả tạo cụm chồi hơn hẳn mẫu đối chứng. Ở công thức S3 (1mg/l BAP) số lượng chồi đạt cao nhất (6,1 chồi/mẫu) với số chồi hữu hiệu trung bình là 2,5 trong khi công thức cho khả năng nhân chồi cao nhất khi sử dụng kinetin là S9 đạt 3,86 chồi/mẫu. Như vậy, BAP có hiệu quả tạo cụm chồi kim tuyến đá vôi tốt hơn kinetin.

Tất cả các công thức có bổ sung kết hợp các chất điều hòa sinh trưởng (S11-S14) đều tỷ lệ mẫu tạo cụm chồi và số chồi/mẫu cao. Đặc biệt ở công thức S11 và S14 có tỷ mẫu tạo cụm chồi lớn nhất đạt 100% và trên hai môi trường này có số chồi trung bình/mẫu cũng rất lớn, chúng lần lượt là 7,63 và 6,26 chồi/mẫu, chất lượng chồi tốt (thân mập, lóng dài, lá to, khỏe). Tuy nhiên, công thức S11 có số chồi hữu hiệu trung bình (4,45 chồi/mẫu) cao hơn hẳn so với công thức S14. Kết quả này khá phù hợp với kết quả của một số tác giả đi trước khi nghiên cứu một số loài lan kim tuyến cùng chi với kim tuyến đá vôi như: tác giả Phùng Văn Phê và cs (2010), Nguyễn Quang Thạch và cs (2012). Công thức phối hợp S11 có kết quả cao hơn công thức bổ sung BAP (S3) và cao hơn rất nhiều so với các công thức sử dụng kinetin riêng lẻ.

Như vậy, môi trường thích hợp nhất cho việc tạo cụm chồi và nhân nhanh chồi kim tuyến đá vôi là môi trường MS bổ sung 0,5mg/l BAP, 0,3 mg/l Kinetin, 0,3 mg/l NAA, 20 g/l đường sucrose, 6,5g/l agar, 100ml/l nước dừa, 60g/l khoai tây với hệ số nhân chồi là 7,63 chồi/mẫu.

3.2. Kết quả tạo cây hoàn chỉnh từ chồi Kim tuyến đá vôi *in vitro*

Chồi *in vitro* có kích thước từ 3-4 cm, 3-4 lá được chuyển sang môi trường ra rễ MS hoặc 1/2 MS có bổ sung NAA ở các nồng độ khác nhau + 20g/l sucrose + 6,5g/l agar + 100ml/l nước dừa + 60g/l khoai tây + 0,2% than hoạt tính. Kết quả sau 8 tuần cấy chuyển được thể hiện qua bảng 3.

Bảng 3. Khả năng ra rễ của chồi *in vitro* Kim tuyến đá vôi

Công thức	Môi trường	NAA (mg/l)	Số chồi TN	Số chồi ra rễ	Tỷ lệ chồi ra rễ (%)	Số rễ TB/chồi	Chiều dài rễ TB (cm)	Chất lượng cây con
R1	1/2 MS	0,5	33	33	100	2,5	1,45	++
R2	1/2 MS	1,0	34	34	100	2,56	1,51	++
R3	1/2 MS	1,5	20	20	100	2,67	1,19	++
R4	1/2 MS	2,5	31	31	100	2,45	1,37	++
R5	1/2 MS	3,0	28	28	100	2,27	1,22	++
R6	MS	0,5	24	24	100	2,75	1,02	++
R7	MS	1,0	52	52	100	2,75	1,23	++
R8	MS	1,5	60	60	100	2,95	1,53	++
R9	MS	2,5	34	34	100	2,88	1,17	++
R10	MS	3,0	29	29	100	2,7	1,24	++

Qua bảng 05 cho thấy : Tất cả 10 công thức ra rễ đều tỷ lệ ra rễ đạt 100% và số rễ trung bình/chồi khoảng 2,5 đến 3 rễ/chồi. Ở cả hai nhóm công thức 1/2 MS và MS, đều thể hiện nồng độ NAA tăng từ 0,5 đến 1,5mg/l thì số rễ/chồi tăng lên, nhưng khi tiếp tục tăng NAA ở nồng độ cao hơn (2,5 hoặc 3mg/l) thì số rễ/chồi lại giảm. Trong môi trường ½ MS và MS khi bổ sung 1,5mg/l NAA (R3 và R8) đều cho số rễ trung bình trên chồi cao hơn các nồng độ còn lại, tuy nhiên R8 cho số rễ trung bình/mẫu (2,95) và kích thước rễ (1,53 cm) lớn hơn so với R3. Như vậy, Môi trường ra rễ thích hợp nhất đối với Kim tuyến đá vôi là MS có bổ sung 1,5mg/l NAA + 20g/l sucrose + 6,5g/l agar + 100ml/l nước dừa + 60g/l khoai tây + 0,2% than hoạt tính.

3.3. Kết quả ảnh hưởng của giá thể đến khả năng sống của cây con

Cây Kim tuyến đá vôi *in vitro* đủ điều kiện được huấn luyện để thích nghi với điều kiện ánh sáng, nhiệt độ, độ ẩm bên ngoài môi trường tự nhiên. Cây được rửa sạch thạch, trồng và chăm sóc với các giá thể khác nhau thể hiện ở bảng 04.

Bảng 04. Ảnh hưởng của giá thể đến khả năng sống của cây Kim tuyến đá vôi *in vitro*

Công thức	Giá thể	Tỷ lệ cây sống (%)		Chiều cao cây (cm)		Chất lượng cây
		4 tuần	8 tuần	4 tuần	8 tuần	
VU1	100% RDX	93,75	84,37	6,2	7,1	+++
VU2	75% RDX+ 25% ĐSH	66,67	60	4,8	5,3	++
VU3	50% RDX+ 50% ĐSH	25	0	4,5	-	++
VU4	25% RDX+75% ĐSH	0	0	-	-	-
VU5	100% ĐSH	0	0	-	-	-
VU6	50% ĐĐ + 50% RDX	79,36	39,68	5,25	5,75	++
VU7	25% ĐĐ + 75% RDX	90	76,67	6,1	6,75	+++

Ghi chú:

+++ : Cây con khỏe, cứng, lá xòe to và mượt, sự sinh trưởng và bám của rễ vào giá thể nhanh, chắc.

++ : Cây con khỏe, cứng, rễ sinh trưởng chậm, bám vào giá thể kém.

+: Cây con yếu, lá không mượt, rễ sinh trưởng kém và bám vào giá thể kém.

- : Cây héo nhanh, thối cổ rễ và chết.

Từ kết quả ở bảng 04, có thể thấy công thức thí nghiệm VU1, VU7 và VU2 lần lượt là những công thức cho tỷ lệ sống sau 8 tuần cao nhất. Đặc biệt là VU1 (100%) rễ dương xỉ cho tỷ lệ cây sống sau 4 và 8 tuần lần lượt là 93,75% và 84,37%, sự sinh trưởng của cây con cũng như kích thước của cây đều tốt hơn hẳn so với những công thức còn lại. Rễ dương xỉ có khả

năng giữ ẩm tốt, thoáng khí vì vậy giúp cho cây *in vitro* có khả năng hút nước tốt hơn, cây sinh trưởng tốt, lá mượt, trải rộng, cứng cáp, khỏe mạnh, độ bám của rễ vào giá thể cao.



Hình 1. Lan Kim tuyến đá vôi *in vitro*: A và B: Cụm chồi sau 6 và 8 tuần nuôi cấy trong công thức S11; C: Rễ lan kim tuyến trong công thức R8; D, E: Cây con trên giá thể (VU1 và VU2)

4. KẾT LUẬN

- Môi trường MS là môi trường khoáng thích hợp nhất cho tạo cụm chồi Kim tuyến đá vôi.
- Tổ hợp chất điều hòa sinh trưởng 0,5mg/l BAP; 0,3 mg/l Kinetin; 0,3 mg/l NAA trong môi trường MS bổ sung 20g/l sucrose; 6,5g/l agar; 100ml/l nước dừa; 60g/l khoai tây là thích hợp nhất cho tạo cụm chồi Kim tuyến đá vôi với hệ số nhân chồi 7,63 chồi/mẫu.
- Môi trường ra rễ Kim tuyến đá vôi thích hợp nhất là MS bổ sung 1,5mg/l NAA; 20g/l sucrose; 6,5g/l agar; 100ml/l nước dừa; 60g khoai tây với 2,95 rễ/chồi và chiều dài rễ trung bình 1,53 cm/rễ.
- Giá thể thích hợp nhất cho loài Kim tuyến đá vôi là 100% rễ dương xỉ, thu được tỷ lệ cây sống sau 8 tuần là 84,37%, chiều cao cây 7,1cm.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bộ Khoa học và Công nghệ (2007), *Sách đỏ Việt Nam*, Phần II Thực vật, NXB Khoa học và công nghệ, HN, tr. 401-402.

2. Hoàng Thị Giang và cộng sự (2010), *Nghiên cứu nhân giống in vitro và nuôi trồng lan hài quý P. hangianum perner* Guss (hài hăng) thu thập ở Việt Nam. Tạp chí Khoa học và phát triển, tập 8, số 2: 194-201.
3. Nguyễn Quang Thạch và cộng sự (2012), *Nghiên cứu kỹ thuật nhân giống loài lan kim tuyến (Anoetochilus setaceus Blume) in vitro bảo tồn nguồn dược liệu quý*. Tạp chí Khoa học và Phát triển 2012 Tập 10, số 4: 597-603.
4. Nguyễn Thị Sơn và cộng sự (2012), *Nhân giống in vitro loài lan Dendrobium fimbriatum Hook. (hoàng thảo long nhãn)*. Tạp chí Khoa học và Phát triển 2012: Tập 10, số 2: 263 - 271.
5. Nguyễn Tuấn Anh và cộng sự (2013), *Nghiên cứu nuôi cấy lát mỏng trong nhân giống in vitro cây lan kim tuyến Anoetochilus roxburghii (Wall.) Lindl.* Báo cáo khoa học, hội nghị khoa học công nghệ sinh học toàn quốc 2013. Quyển 2. trang 690-694.
6. Nguyễn Văn Nam và cộng sự (2013), *Nhân nhanh hoa lan hồ điệp (Phalaenopsis sp.) bằng công nghệ phôi soma*. Báo cáo khoa học, hội nghị khoa học công nghệ sinh học toàn quốc 2013. Quyển 2. trang 926 - 930.
7. Nguyễn Văn Song (2011), *Nhân nhanh in vitro lan kim điệp (Dendrobium chrysotoxum) - một loài lan rừng có nguy cơ tuyệt*. Tạp chí khoa học Đại học Huế, số 64.
8. N.V.KET, et al (2004), Micropropagation of an endangered orchid *Anoetochilus formosanus*. Biologia Plantarum 48 (3): 339-334,2004.
9. Phùng Văn Phê và cộng sự (2010), *Nghiên cứu kỹ thuật nhân nhanh chồi In vitro loài Lan kim tuyến Anoetochilus roxburghii (Wall.) Lindl.* Tạp chí Khoa học ĐHQGHN, Khoa học Tự nhiên và Công nghệ 26; 248-253.
10. Van Kiet Nguyen (2004). *Effect of Environmental Conditions on in vitro and Ex Vitro Growth of Jewel Orchid Anoetochilus formosanus Hayata*, Thesis for the Degree of Doctor of Philosophy in Agriculture, The Graduate School of Chungbuk National University.
11. Võ Văn Chi (2003), *Từ điển thực vật thông dụng*, tập I, NXB Khoa học và kỹ thuật, tr. 296-297
12. Wu KB (2007). The use and potential for *Anoetochilus formosanus* Hayata. *Agriculture World*. Vol.288, 14-19.
13. Yih-Juh Shiau, et al (2002). Conservation of *Anoetochilus formosanus* Hayata by artificial cross-pollination and *in vitro* culture of seeds. *Bot. Bull. Acad. Sin.* (2002) 43: 123-130

ỨNG DỤNG YẾU TỐ KÍCH THÍCH SINH TRƯỞNG BA, IBA VÀ NAA TRONG NHÂN CHỒI VÀ TẠO RỄ CÂY BA KÍCH (*MORINDA OFFICINALIS* HOW) GIAI ĐOẠN *IN VITRO* TẠI CƠ SỞ 2 - ĐẠI HỌC LÂM NGHIỆP

Đỗ Đức Trí¹, Trần Văn Sang¹, Nguyễn Hữu Hiếu¹, Nguyễn Văn Việt¹

ABSTRACT

Tissue cultivation is an innovative clonal breeding technique. The study results showed that the number of *Morinda officinalis*'s shoots were the biggest when shoots were cultured on the Murashige and Skoog medium supplemented with 1.5 mg/l BA. The levels of IBA effected to the root formation of *Morinda officinalis* higher than the levels of NAA. The results also indicated that the supplemented medium with 0.3 mg/l IBA is the best amount for root formation.

TÓM TẮT

Kỹ thuật nuôi cấy mô là một trong số các kỹ thuật nhân giống cây trồng vô tính quan trọng. Kết quả nghiên cứu quá trình nhân chồi cây Ba kích cho thấy khi bổ sung BA nồng độ 1,5 mg/l vào môi trường Murashige và Skoog (1962) thì khả năng ra chồi là tốt nhất. Nồng độ IBA có khả năng kích thích sự ra rễ hơn hẳn so với NAA, trong đó bổ sung IBA với nồng độ 0,3 mg/l thì khả năng rạo rễ của cây Ba kích đạt kết quả cao nhất.

Từ khóa: Ba kích, ra chồi, nuôi cấy mô

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Hiện nay cùng với sự phát triển của xã hội, đời sống của con người được nâng cao, nhu cầu của con người về nguồn dược liệu theo đó cũng ngày càng tăng. Trong đó cây ba kích (*Morinda officinalis* How) là cây thuốc quý trong y học cổ truyền. Tuy nhiên, do nhu cầu sử dụng cây này làm dược liệu đang gia tăng nên cây ba kích bị khai thác ồ ạt nhiều năm dẫn đến nguồn nguyên liệu đang trở nên kiệt quệ. Trong những năm gần đây xu hướng trồng và kinh doanh cây ba kích lấy củ ngày một gia tăng tại các tỉnh phía Bắc. Tuy nhiên, việc nhân giống cung cấp cho nhu cầu sản xuất hiện nay còn gặp nhiều bất cập. Kỹ thuật nuôi cấy mô là một trong số các kỹ thuật nhân giống cây trồng vô tính là một kỹ thuật cao, kỹ thuật này giúp tạo được số lượng lớn cây giống với phẩm chất tốt, giá thành hạ. Xuất phát từ những cơ sở trên, chúng tôi tiến hành nghiên cứu "Ứng dụng yếu tố kích thích sinh trưởng BA, IBA và NAA trong nhân chồi và tạo rễ cây ba kích (*Morinda officinalis* How) giai đoạn *in vitro* tại cơ sở 2 - Đại học Lâm nghiệp".

2. MỤC TIÊU, NỘI DUNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Mục tiêu

- Khảo sát sự ảnh hưởng của các kích thích sinh trưởng BA, IBA và NAA trong nhân chồi và tạo rễ cây ba kích (*Morinda officinalis* How) giai đoạn *in vitro*

2.2. Nội dung nghiên cứu

- Khảo sát sự ảnh hưởng của BA đến việc nhân chồi cây ba kích, từ đó xác định được nồng độ BA tốt nhất cho quá trình nhân chồi.

¹ Phân hiệu Trường Đại học Lâm nghiệp

- Khảo sát được các mức nồng độ IBA và NAA ảnh hưởng đến sự tạo rễ, từ đó tìm ra nồng độ auxin tốt nhất cho quá trình tạo rễ cây ba kích.

2.3. Phương pháp nghiên cứu

2.3.1 Đối tượng nghiên cứu

Cây ba kích có nguồn gốc từ huyện Hoành Bồ tỉnh Quảng Ninh

2.3.2. Vật liệu nghiên cứu

Mẫu ba kích *in vitro* được lấy từ trường đại học Lâm Nghiệp Việt Nam.

Môi trường MS (Murashige và Skoog, 1962), chất điều hòa sinh trưởng thuộc nhóm cytokinin (BA, KIN), nhóm auxin (IBA, NAA), các vitamin: (MS, riboflavin), đường sucrose, agar.

2.3.3. Phương pháp nghiên cứu

Môi trường Murashige- Skoog (MS) (1962) có bổ sung nồng độ BA (N^6 -Benzyladenine), IBA (3-Indolebutyric acid) ở các mức khác nhau cùng với thành phần cơ bản: 7g/l agar, 30 g/l đường. Chất phụ gia có 10mg/l riboflavine, than hoạt tính ở các khối lượng khác nhau tùy vào loại môi trường; pH 5,8 được dùng làm môi trường nuôi cấy cơ bản cho các thí nghiệm (TN) nuôi cấy *in vitro*. Phương pháp bố trí cho từng thí nghiệm như mô tả dưới đây.

Thí nghiệm 1: Khảo sát nồng độ BA (N^6 -Benzyladenine) ảnh hưởng tới khả năng tạo chồi của cây ba kích. Đoạn thân có 1 mắt lá được tách ra từ chồi của nuôi cấy *in vitro* sẽ được nuôi cấy trên môi trường MS có bổ sung 10mg/l riboflavine và 0,1mg/l IBA kết hợp với BA ở 8 nồng độ khác nhau (0,5; 1,0 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5 và 4mg/l). Thí nghiệm có 8 nghiệm thức với 3 lần lặp lại, mỗi lần lặp lại gồm 4 bình, mỗi bình cấy 8 chồi. Thí nghiệm được thực hiện trong bình thủy tinh loại 500ml với thể tích môi trường là 50ml. Môi trường bổ sung 30g/l sucrose và 7 g/l agar, pH=5,8, hấp khử trùng ở 121⁰C, 1 atm trong 20 phút. Điều kiện nhiệt độ phòng nuôi cấy là 25⁰C, chu kỳ chiếu sáng 10 giờ/ngày, cường độ chiếu sáng 2000 lux.

Thí nghiệm 2: Khảo sát sự hình thành rễ của cây ba kích. Những mẫu chồi khỏe mạnh, mập mạp, có chiều cao trung bình từ 1,7 – 3 cm cấy chuyển sang môi trường MS có bổ sung IBA hoặc NAA với 4 nồng độ khác nhau là 0,1; 0,2; 0,3 và 0,4 mg/l nhằm kích thích tạo rễ. Thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên với ba lần lặp lại, mỗi lần cấy 4 bình, mỗi bình cấy 8 chồi.

2.4. Phương pháp thu thập và xử lý số liệu

- Theo dõi các thí nghiệm về thời gian ở giai đoạn ra chồi và ra rễ có chiều dài, số lượng rễ và chồi thay đổi như thế nào, các thí nghiệm ra rễ theo dõi sau 4 tuần từ khi cấy vào bình rễ. Thí nghiệm được tiến hành trong 4 tuần. Số liệu được thu nhận tại ngày cuối cùng của thí nghiệm.

- Số liệu được xử lý thống kê trên máy tính trên phần mềm Excel và SPSS.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

3.1. Nghiên cứu về công thức môi trường nhân chồi cây ba kích

Bảng 1. Ảnh hưởng của nồng độ BA đến khả năng nhân chồi của cây ba kích

Nồng độ BA (mg/l)	0,5	1	1,5	2	2,5	3	3,5	4
Số chồi	4,33 ^f	9,83 ^b	10,27 ^a	9,88 ^b	8,38 ^c	7,96 ^d	6,21 ^e	6,08 ^e
Chiều cao chồi (mm)	8,42 ^d	8,69 ^{c,d}	10,63 ^a	9,71 ^b	9,17 ^{b,c}	8,58 ^{c,d}	8,38 ^d	7,58 ^f

Kết quả trên cho thấy khi bổ sung nồng độ BA 1,5 mg/l cho chất lượng tốt nhất.

3.2. Nghiên cứu về công thức môi trường tạo rễ cây ba kích

3.2.1. Ảnh hưởng của IBA đến sự hình thành rễ

Bảng 2. Ảnh hưởng của nồng độ IBA đến khả năng ra rễ của cây ba kích

Nồng độ IBA (mg/l)	0,1	0,2	0,3	0,4
Tỷ lệ ra rễ (%)	38 ^d	58 ^c	100 ^a	88 ^b
Chiều dài rễ (mm)	9,58 ^d	16,75 ^c	28,54 ^a	21,50 ^b

Kết quả trên cho thấy khi bổ sung IBA 0,3 mg/l vào môi trường nuôi cấy mẫu chồi cây ba kích cho tỷ lệ ra rễ, số rễ cũng như chiều dài bộ rễ cao nhất.

3.2.2. Nghiên cứu ảnh hưởng của NAA đến khả năng ra rễ của cây ba kích

Bảng 3. Ảnh hưởng của nồng độ NAA đến khả năng ra rễ của cây ba kích

Nồng độ NAA (mg/l)	0,1	0,2	0,3	0,4
Tỷ lệ ra rễ (%)	50,00 ^b	62,50 ^a	66,67 ^a	37,50 ^b
Chiều dài rễ (mm)	1,13 ^c	8,62 ^a	4,79 ^b	0,96 ^c

Hình 1. Chồi cây ba kích trên môi trường bổ sung 1,5 mg/l BA



Kết quả trên cho thấy việc bổ sung NAA 0,2 mg/l và 0,3 mg/l cho tỷ lệ ra rễ cao nhất không có sự khác biệt về mặt thống kê. Tuy nhiên việc bổ sung NAA 0,2 mg/l cho chiều dài rễ cao nhất. Do đó, có thể kết luận bổ sung NAA 0,2 mg/l vào môi trường nuôi cấy là tối ưu nhất.

4. KẾT LUẬN

- Môi trường nhân nhanh thích hợp là môi trường bổ sung 1,5 mg/l BA, 0,1 mg/l IBA, 10 mg/l Riboflavin.

- Việc bổ sung IBA vào môi trường nuôi cấy có tác dụng kích thích sự hình thành rễ, chiều dài rễ cũng như thu được số rễ cao hơn hẳn so với khi bổ sung NAA vào môi trường nuôi cấy.

- Môi trường thích hợp tạo rễ cây ba kích là môi trường MS bổ sung 0,3 mg/l IBA, sau 4 tuần cấy tỷ lệ ra rễ đạt 100%, chất lượng bộ rễ tốt.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Võ Châu Tấn, Huỳnh Minh Tư (2010). *Nghiên cứu nhân giống in vitro cây ba kích*. Tạp chí khoa học công nghệ Đại học Đà Nẵng, 2010, 5(40):191-196.
2. Hoàng Thị Thế, Nguyễn Thị Phương Thảo, Ninh Thị Thảo, Nguyễn Thị Thủy (2013). *Quy trình nhân giống in vitro cây ba kích (Morinda officenalis How)*. Tạp chí Khoa học và Phát triển 2013. Tập 11, số 3: 285-292

CHỌN DÒNG CẨM CHUỖNG GẮM (*Dianthus chinensis* L.) ĐA BỘI BẰNG XỬ LÝ ĐỘT BIẾN COLCHICINE *IN VITRO* TRONG ĐIỀU KIỆN *IN VIVO*

Chu Thùy Dương¹, Trần Thị Hiền¹,
Nguyễn Thị Thu Phương¹, Nguyễn Thị Xuyên¹

ABSTRACT

The aim of study was to select polyploidy lines in China Pink (*Dianthus chinensis* L.) to serve flower breeding. Source materials are the China Pink (pink flower varieties) which are mutated by *in vitro* using colchicine concentrations ray 0%; 0.05%; 0.10%; 0.15%; 0.20% over the period of 24h, 48h. Results showed that *in vitro* mutation using colchicine treatment have changed the characteristics of the growth and development of China Pink *in vivo* conditions. In particular, the formular 0.05% - 48h was the capable formular of growth and development predominate, while the average diameter of flowers get the best results and some special individuals have strong leaves, big size flowers. Researchers have isolated 18 individuals which change in morphology *in vivo* conditions. Using the method of observing the quantity and size of stomata has identified three polyploid individuals. Polyploid individuals were sterilized, added sample, multiplied and cloned, they have growth characteristics *in vitro* conditions better than that of control samples.

Key words: China Pink, colchicine, polyploidy, stomata

TÓM TẮT

Nghiên cứu thực hiện với mục đích chọn được dòng cẩm chướng gắm (*Dianthus chinensis* L.) đa bội phục vụ cho công tác chọn tạo giống. Nguồn vật liệu sử dụng là cây cẩm chướng gắm (giống hoa màu hồng) được đem xử lý colchicine *in vitro* với nồng độ 0%; 0,05%; 0,10%; 0,15%; 0,20% trong khoảng thời gian 24h, 48h. Kết quả cho thấy: xử lý colchicine *in vitro* đã làm thay đổi đặc điểm sinh trưởng, phát triển của cây cẩm chướng gắm trong điều kiện *in vivo*. Đặc biệt, các cây thuộc nghiệm thức 0,05% - 48h có khả năng sinh trưởng, phát triển chiếm ưu thế hơn, đồng thời có đường kính hoa trung bình đạt kết quả tốt nhất và xuất hiện một số cá thể sinh trưởng thân lá mạnh, hoa kích thước lớn. Nghiên cứu đã phân lập được 18 cá thể biến dị hình thái trong điều kiện *in vivo*. Sử dụng phương pháp quan sát số lượng, kích thước khí khổng đã xác định được 3 cá thể đa bội. Các cá thể đa bội này được khử trùng, vào mẫu, nhân nhanh và tạo dòng, so sánh đặc điểm sinh trưởng của các dòng này trong điều kiện *in vitro* đều tốt hơn so với đối chứng.

Từ khóa: cẩm chướng gắm, colchicine, đa bội, khí khổng

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Cẩm chướng gắm (*Dianthus chinensis* L.) được biết đến bởi sự đa dạng về màu sắc hoa, thường được dùng làm hoa trồng chậu, trồng thảm trong công viên hoặc ngoài đường phố bởi có thể trồng được quanh năm. Tuy nhiên, cây cẩm chướng gắm lại có nhược điểm là thân bụi, cành lá nhỏ bé, yếu và rất dễ gãy... nên diện tích trồng chưa nhiều. Vì thế, các phương pháp chọn, tạo giống cần được tiến hành nhằm khắc phục các nhược điểm trên mang lại nhiều lựa chọn cho người trồng và thưởng ngoạn hoa.

Kỹ thuật xử lý đột biến *in vitro* với tác nhân colchicine đã được sử dụng thành công để tạo ra thể đa bội trong nhiều loài thực vật. Ở Việt Nam, hướng nghiên cứu này đã thu được một số kết quả bước đầu đối với cây có mùi và cây dưa hấu (Trần Thị Hạnh và cộng sự, 2003; Lâm Ngọc Phương và Nguyễn Kim Hằng, 2010; Nguyễn Thị Ngọc Trâm và cộng sự, 2012) trong khi trên đối tượng cây hoa chưa được quan tâm đúng mức.

¹ Trường Đại học Nông Lâm Bắc Giang

Nghiên cứu sử dụng phương pháp xử lý đột biến cảm chương colchicine *in vitro*, theo dõi các đặc điểm sinh trưởng, phát triển trong điều kiện *in vivo* nhằm tìm kiếm, sàng lọc các biến dị có lợi, đặc biệt là các cá thể đa bội, nhân dòng phục vụ sự phát triển, đa dạng hoá chủng loại hoa, làm nguyên liệu cho công tác chọn tạo giống và đem lại giá trị kinh tế cho người trồng hoa.

2. MỤC TIÊU, NỘI DUNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Mục tiêu

Nghiên cứu các đặc điểm sinh trưởng, phát triển và theo dõi sự biến dị trong điều kiện *in vivo* của cây cảm chương gắm được xử lý đột biến *in vitro* bằng colchicine nhằm tìm kiếm các biến dị có lợi (khả năng sinh trưởng tốt, thay đổi cấu trúc, màu sắc, số lượng hoa...). Từ đó, xác định các cá thể đa bội thông qua kỹ thuật quan sát tế bào khí khổng và nhân dòng các cá thể này làm vật liệu cho công tác chọn tạo giống cây hoa cảm chương.

2.2. Vật liệu, Nội dung và Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Vật liệu nghiên cứu: các dòng cảm chương gắm đã qua xử lý colchicine *in vitro* đã được tạo cây hoàn chỉnh

2.2.2. Nội dung nghiên cứu

Nội dung 1: Nghiên cứu khả năng sinh trưởng, phát triển và sự biến dị của các dòng cảm chương sau xử lý colchicine *in vitro* trong điều kiện vườn trồng

Nội dung 2: Đánh giá sự thay đổi độ bội thể của một số dạng biến dị của các dòng cảm chương sau xử lý đột biến colchicine *in vitro* bằng phương pháp soi tế bào khí khổng

Nội dung 3: Tạo dòng cảm chương gắm đa bội

2.2.3. Phương pháp nghiên cứu

• **Phương pháp nuôi cấy mô, tế bào thực vật:** Điều kiện nuôi cấy: Ánh sáng: 2000 – 2500 lux, nhiệt độ: $24 \pm 2^{\circ}\text{C}$, thời gian chiếu sáng: 16h sáng - 8h tối. Môi trường nuôi cấy: MS + 30g/l đường saccarose + 6g/l agar + 100mg/l inositol + 1ml/l kinetin.

• **Phương pháp soi khí khổng xác định sự thay đổi độ bội thể:** Lấy lá của các dạng biến dị thu được, sau đó tách lấy 1 lớp biểu bì mặt sau của lá. Quan sát và chụp ảnh khí khổng ở vật kính có độ phóng đại X40 (40 lần), thị kính có độ phóng đại 15 lần có gắn trục vi thị kính; xác định sự sai khác mật độ và kích thước khí khổng. (Hà Thị Thúy, 2005).

• Phương pháp bố trí thí nghiệm

Các công thức thí nghiệm trong phòng nuôi cấy mô được bố trí ngẫu nhiên, mỗi công thức thí nghiệm tiến hành 3 lần nhắc lại, mỗi lần nhắc 45 mẫu.

Các công thức thí nghiệm ngoài vườn trồng được bố trí tuần tự, mỗi công thức thí nghiệm tiến hành 3 lần nhắc lại, mỗi lần nhắc 45 mẫu.

• **Phương pháp xử lý số liệu:** Các số liệu được xử lý thống kê bằng phần mềm Microsoft Office Excel và IRRISTAT 4.0.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Khả năng sinh trưởng, phát triển và sự biến dị của các dòng cảm chương sau xử lý colchicine *in vitro* trong điều kiện vườn trồng

Kết quả nghiên cứu khả năng sinh trưởng, phát triển và sự biến dị của các dòng cảm chương sau xử lý colchicine *in vitro* trong điều kiện vườn trồng cho bởi bảng 3.1

Bảng 3.1. Khả năng sinh trưởng, tỷ lệ biến dị và đặc điểm ra hoa của các dòng cảm chương sau xử lý colchicine *in vitro* trong điều kiện vườn trồng (70 ngày sau trồng)

Công thức	Tỷ lệ biến dị (%)	Số nhánh	Số lá	Chiều cao cây (cm)	Tỷ lệ cây ra hoa (%)	Tổng số nụ, hoa	Đường kính hoa (cm)
DC	0	6,65	25,58	26,99	83,33	11,85	2,57
0%-24h	0	6,71	24,81	25,89	81,48	11,05	2,60
0%-48h	0	5,61	26,38	26,19	88,89	10,78	2,60
0,05%-24h	3,71	7,95	23,95	25,53	27,78	12,55	2,47
0,05%-48h	18,52	10,55	25,85	26,86	70,37	14,05	2,74
0,1%-24h	0	8,45	24,21	24,59	37,04	14,85	2,50
0,1%-48h	5,56	8,75	23,78	25,69	48,15	15,62	2,60
0,15%-24h	0	8,48	23,58	25,83	18,52	9,82	2,47
0,15%-48h	3,33	11,68	23,71	26,66	35,19	15,88	2,57
0,20%-24h	7,41	10,31	23,68	26,16	29,63	14,65	2,44
0,20%-48h	0	11,18	23,21	26,59	33,33	16,48	2,40
CV%		7,0	3,5	3,1		7,6	3,5
LSD _{0,05}		1,14	0,93	1,05		1,22	0,12

Kết quả bảng 3.1 cho thấy, công thức 0,05% - 48h có tỷ lệ biến dị hình thái cao (18,52%), các công thức còn lại đều có tỷ lệ biến dị hình thái thấp (dưới 8%). Các cá thể biến dị này sẽ được đánh dấu và theo dõi so sánh với các cá thể cây đối chứng. Ở thời điểm cây bắt đầu ra hoa, chiều cao và số lá trung bình trên cây ở các công thức không có sự chênh lệch lớn. Trong khi khả năng đẻ nhánh của các dòng cảm chương đã qua xử lý colchicine *in vitro* thể hiện tốt hơn so với đối chứng.

Sau trồng 70 ngày, trong khi công thức đối chứng và các công thức xử lý colchicine 0% đã ra hoa trên 80% thì các công thức còn lại có tỷ lệ ra hoa thấp hơn. Hầu hết các công thức đã qua xử lý colchicine *in vitro* có số lượng nụ, hoa cao hơn đối chứng. Công thức 0,05% - 48h có đường kính hoa trung bình cao hơn đối chứng (2,74 cm), các công thức còn lại cho hoa có đường kính tương đối đồng đều và không có sự khác biệt so với đối chứng.

Như vậy, việc xử lý colchicine *in vitro* đã làm ảnh hưởng tới đặc điểm sinh trưởng, phát triển của cây cảm chương gấm, bao gồm: làm tăng khả năng đẻ nhánh, kéo dài thời gian sinh trưởng sinh dưỡng. Tuy nhiên, hầu hết các dòng cảm chương đã qua xử lý colchicine *in vitro* lại có số nụ, hoa trung bình trên cây cao hơn đối chứng. Đối với hoa trồng thảm như cảm chương gấm thì đây cũng được coi là một đặc điểm có lợi cho công tác chọn tạo giống. Đặc

biệt, công thức 0,05% - 48h là công thức có khả năng sinh trưởng, phát triển, đường kính hoa chiếm ưu thế hơn.

3.2. Sự thay đổi độ bội thể của một số dạng biến dị của các dòng cảm chương sau xử lý đột biến colchicine *in vitro* thông qua phương pháp soi tế bào khí khổng

Quan sát khí khổng các dạng biến dị ở thí nghiệm 1 cho kết quả mật độ khí khổng (số khí khổng trung bình/quang trường) và kích thước khí khổng (số vạch trắc vĩ thị kính) cho bởi bảng 3.2

Bảng 3.2. Mật độ và kích thước tế bào khí khổng của một số dạng biến dị

<i>Cây</i>	<i>Đặc điểm biến dị</i>	<i>Công thức</i>	<i>Mật độ khí khổng</i>	<i>Kích thước khí khổng</i>
0	Bình thường	Đối chứng	18,33	14
I	Hoa đậm	0,1%-48h	14,00	14
II	Sinh trưởng mạnh	0,05%-24h	15,67	13
III	Sinh trưởng mạnh	0,05%-48h	7,67	19
IV	Sinh trưởng mạnh	0,05%-48h	6,67	19
V	Sinh trưởng mạnh	0,1%-24h	14,33	14
VI	Hoa đậm	0,05%-48h	7,33	18
VII	Sinh trưởng mạnh	0,05%-24h	14,67	13
VIII	Sinh trưởng mạnh	0,20%-48h	15,33	13
IX	Sinh trưởng mạnh	0,05%-48h	16,67	14
X	Sinh trưởng mạnh	0,05%-48h	16,33	15
XI	Ra hoa sớm	0,05%-48h	15,67	14
XII	Sinh trưởng mạnh	0,05%-48h	20,33	14
XIII	Sinh trưởng mạnh	0,05%-48h	17,67	13
XIV	Lá sần	0,15%-24h	15,67	14
XV	Sinh trưởng mạnh	0,05%-48h	16,67	15
XVI	Sinh trưởng mạnh	0,20%-24h	15,33	14
XVII	Sinh trưởng mạnh	0,05%-48h	15,67	14
XVIII	Lá sần	0,15%-24h	17,33	13

Kết quả đo đếm thu được ở bảng 3.3 cho thấy, kích thước khí khổng của các mẫu biến dị chia làm hai nhóm rõ rệt. Nhóm 1 gồm các mẫu: I, II, V, VII, VIII, IX, X, XI, XII, XIII, XIV, XV, XVI, XVII, XVIII) có kích thước và mật độ khí khổng không có sự khác biệt so với mẫu đối chứng; nhóm 2 có kích thước khí khổng dài gấp khoảng 2,2 lần và có mật độ khí khổng trung bình thấp hơn nhóm 1, gồm các mẫu III, IV, VI.

Phương pháp kiểm tra độ bội dựa trên đặc điểm khí khổng là rất hiệu quả trong việc xác định thể đa bội (Kim MS and Kim JY, 2003). Lê Đình Khả và cộng sự (2009) cũng khẳng định: kích thước tế bào khí khổng có quan hệ khá chặt chẽ với mức độ đa bội được xác định chỉ số đa bội bằng Flow Cytometry, hơn nữa kích thước tế bào khí khổng cũng là chỉ tiêu dễ xác định và ít tốn kém. Ngoài ra, việc so sánh hình thái để xác định mức bội thể sẽ rất chính

xác nếu các dòng hoặc giống có chung một nguồn di truyền.

Các cá thể biến dị trên có cùng một nguồn di truyền (xuất phát từ cây cảm chương gắm nhân giống *in vitro*, đem xử lý colchicine). Vì vậy, các mẫu III, IV, VI có mật độ và kích thước khí khổng có sự chênh lệch đáng kể so với đối chứng, có thể xác định là các cá thể đa bội.

3.3. Tạo dòng cảm chương gắm đa bội

Các cá thể đa bội (III, IV, VI) được nhân dòng, ký hiệu lần lượt là A, B, C. Kết quả theo dõi đặc điểm sinh trưởng bảng 3.3 cho thấy, các dòng A, B, C đều có tỷ lệ sống, tỷ lệ bật chồi cao (trên 90%). Hệ số nhân chồi, chiều cao, số lá trung bình trên chồi của các dòng đa bội (A, B, C) đều tốt hơn đối chứng trong đó dòng A chiếm ưu thế hơn cả. Chất lượng chồi của dòng A, B, C cũng thể hiện tốt hơn so với đối chứng. Trong đó, dòng C cho hệ số nhân chồi cao và chất lượng chồi (thân mập, lá xanh đậm, kết cấu lá thẳng, kích thước lá lớn) tốt nhất.

Các kết quả nghiên cứu nuôi cấy *in vitro* trên cho thấy, các dòng cảm chương gắm đa bội phân lập được (A, B, C) có khả năng sống và sinh trưởng tốt và có thể sử dụng phương pháp nhân giống *in vitro* thông qua quá trình kích thích phát sinh hình thái theo hướng tạo chồi.

Bảng 3.3. Khả năng sống và tạo chồi của các dòng cảm chương gắm đa bội

Chỉ tiêu Công thức	Tỷ lệ sống (%)	Tỷ lệ bật chồi (%)	Số chồi/ mẫu cấy	Chiều cao (cm)	Số lá	Chất lượng chồi
Đối chứng	97.2	100.0	1.20	4.00	10.00	+
A	95.8	100.0	1.51	5.80	11.43	++
B	100.0	97.9	1.57	4.17	10.77	++
C	95.6	100.0	1.80	4.73	10.83	+++
CV%			7.6	3.5	4.7	
LSD _{0.05}			0.22	0.21	0.36	

Ghi chú: + (chồi phát triển bình thường, lá xanh); ++ (chồi mập, lá xanh đậm, hơi quăn); +++ (chồi mập, lá xanh đậm, lá thẳng, kích thước lá lớn)

4. KẾT LUẬN

1) Các cây cảm chương đã qua xử lý colchicine thể hiện nhiều đặc điểm sinh trưởng, phát triển khác biệt so với đối chứng: kéo dài thời gian sinh trưởng sinh dưỡng, tăng khả năng đẻ nhánh, kéo dài thời gian ra hoa, tăng số lượng nụ, hoa trung bình trên cây. Đặc biệt, công thức 0,05% - 48h là công thức có khả năng sinh trưởng, phát triển chiếm ưu thế hơn.

2) Phân lập được 18 cá thể biến dị hình thái có sự sinh trưởng, phát triển khác biệt rõ rệt so với đối chứng. Kết quả quan sát mật độ và kích thước khí khổng của các mẫu biến dị đã xác định được 3 mẫu (III, IV, VI) là các cá thể đa bội.

3) Các mẫu đa bội này (III, IV, VI) được phân lập, vào mẫu và nhân nhanh tạo thành 3 dòng cảm chương gắm đa bội tương ứng là A, B, C. Kết quả nuôi cấy *in vitro* cho thấy, các dòng đa bội này có khả năng sống và sinh trưởng *in vitro* tốt hơn so với dòng đối chứng ban đầu.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Trần Thị Hạnh và cộng sự (2003), *Tạo dòng tứ bội thể ở cam Xã Đoài bằng xử lý colchicine chồi nuôi cấy trong điều kiện in vitro*, Báo cáo Hội nghị công nghệ sinh học toàn quốc, Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật.
2. Lê Đình Khả và cộng sự (2009), *Nghiên cứu xác định và so sánh một số đặc điểm của các dòng keo tai tượng tứ bội và nhị bội ở Việt Nam*, Tạp chí Nông nghiệp và phát triển nông thôn 2009, số 9: 114 – 120.
3. Lâm Ngọc Phương và Nguyễn Kim Hằng (2010), *Tạo cây dưa hấu tứ bội bằng xử lý colchicine in vitro*, Tạp chí Khoa học, 16a: 234 – 244
4. Hà Thị Thuý (2005), *Nghiên cứu một số đặc điểm sinh học của tính trạng không hạt và phương pháp tạo đa bội thể in vitro ở cây có múi*, Luận văn tiến sĩ sinh học.
5. Nguyễn Thị Ngọc Trâm và cộng sự (2002), *Đánh giá hiệu quả của colchicine trong chọn, tạo giống quýt hồng Lai vùng tứ bội (Citrus reticulata Blanco)*, Tạp chí khoa học, 23a: 174 – 183.
6. Kim MS and Kim JY (2003), *Chromosome doubling of Cymbidium hybrid whit colchicine treatment in meristem culture*, Proc. Nioc., 1:37 – 40.

NGHIÊN CỨU ẢNH HƯỞNG CỦA PHƯƠNG PHÁP XỬ LÝ EMS ĐẾN KHẢ NĂNG PHÁT SINH ĐỘT BIẾN VÀ HÀM LƯỢNG ALKALOID TỔNG SỐ CỦA CÂY DỪA CẠN (*CATHARANTHUS ROSEUS* (L.) G. DON) *IN VITRO*

Trần Thị Hiền¹, Nguyễn Thị Lý Anh²

ABSTRACT

Parts of the periwinkle body with a node was processed with EMS in vitro at concentrations of 0%; 0.5%; 0.1%; 0.15%; 0.2% in 1h, 2h, 3h. Results showed that handling with EMS in vitro method reduced the rate of survival and growth of periwinkle shoots but increased mutation rate and concentration of alkaloid. The formula 0.15% - 2h had the highest rate of mutation (35.19%). Periwinkle shoots growing from parts of body survived after handling at a concentration of 0.2% EMS in 1h, had the highest total amount of alkaloid which is 1.85 times higher than periwinkle shoots untreated with EMS.

Keywords: alkaloid, periwinkle, valuable medicinal plants, ethyl methane sulphonate, in vitro culture.

TÓM TẮT

Đoạn thân mang mắt ngủ Dừa cạn được xử lý EMS in vitro với nồng độ thay đổi từ 0%; 0,5%; 0,1%; 0,15%; 0,2% trong khoảng thời gian 1h, 2h, 3h. Kết quả cho thấy: Xử lý EMS in vitro đã làm giảm tỷ lệ sống và sức sinh trưởng phát triển của chồi Dừa cạn nhưng lại làm tăng tỷ lệ biến dị và hàm lượng alkaloid có trong cây dừa cạn in vitro. Công thức 0,15% - 2h thì tỷ lệ tạo biến dị là cao nhất. Chồi Dừa cạn phát sinh từ đoạn thân sống sót sau khi xử lý EMS ở nồng độ 0,2%-1h có hàm lượng alkaloid tổng số cao nhất, gấp 1,85 lần so với chồi dừa cạn phát sinh từ đoạn thân không xử lý EMS.

Từ khóa: alkaloid, cây dừa cạn, cây thuốc quý, ethyl methane sulphonate

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Dừa cạn (*Catharanthus roseus*(L.) G. Don) là một loại thảo dược quý, chứa nhiều alkaloid (vindolin, vicristin, viblastin, catharanthin...) có tác dụng chữa bệnh.

Theo Cragg và Newman (2005), vinblastine và vincristine là hai trong số các alkaloid được chiết suất từ cây Dừa cạn sử dụng để điều chế biệt dược điều trị ung thư bạch cầu, ung thư tinh hoàn, ung thư vú, ung thư phổi...

Theo Trần Nguyên Hữu và cộng sự (2003), catharanthin và vindolin có tác dụng trong điều trị bệnh huyết áp và tiểu đường. Hai alkaloid này còn là nguồn nguyên liệu để bán tổng hợp nên vinblastin.

Trong quyết định số 61/2007/QĐ-TTG của Thủ tướng Chính phủ về việc phê duyệt “Chương trình nghiên cứu khoa học công nghệ trọng điểm quốc gia phát triển công nghiệp hoá dược đến năm 2020”, nghiên cứu chiết tách vinblastin, vincristin, vindolin và catharanthin từ cây Dừa cạn; bán tổng hợp vinblastin từ vindolin và catharanthin để làm nguyên liệu sản xuất thuốc điều trị bệnh ung thư là một trong nhiệm vụ chủ yếu được đề cập đến.

Giá trị dược liệu và giá trị kinh tế của alkaloid Dừa cạn rất cao, nhu cầu sử dụng chúng để

¹ Trường Đại học Nông Lâm Bắc Giang

² Học Viện Nông nghiệp Việt Nam

chữa bệnh rất lớn. Tuy nhiên, hàm lượng alkaloid trong cây Dừa cạn lại không cao. Ethylmethane sulphonate (EMS) là hợp chất hóa học nằm trong nhóm các hợp chất alkyl hóa, có thể gây nên những đột biến điểm và mất đoạn nhỏ DNA. Do đó, vấn đề sử dụng hóa chất gây đột biến cải thiện hàm lượng alkaloid có trong cây Dừa cạn đang là hướng đi mới được các nhà khoa học rất quan tâm.

2. MỤC TIÊU, NỘI DUNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Mục tiêu

- Xác định ảnh hưởng của xử lý EMS đến tỷ lệ sống, phát sinh biến dị, sinh trưởng phát triển và hàm lượng alkaloid tổng số của cây Dừa cạn *in vitro*.

2.2. Nội dung nghiên cứu

2.2.1. Nghiên cứu tỷ lệ sống , phát sinh biến dị, sinh trưởng và phát triển của các dòng Dừa cạn sau xử lý EMS *in vitro*

2.2.2. Phân tích hàm lượng alkaloid tổng số của cây Dừa cạn đã xử lý EMS *in vitro*

2.3. Phương pháp nghiên cứu

2.3.1. Phương pháp xử lý EMS *in vitro* cây Dừa cạn

- Vật liệu: Đoạn thân mang mắt ngủ Dừa cạn
- Đoạn thân mang mắt ngủ *in vitro* Dừa cạn được cắt thành các mẫu có kích thước khoảng 1.0cm, ngâm vào bình chứa dung dịch EMS với các nồng độ khác nhau (0.05%, 0.10%, 0.15%, 0.20%) và lắc trong các khoảng thời gian thí nghiệm (1h, 2h, 3h).

Các mẫu sau khi xử lý EMS được rửa bằng nước cất vô trùng 5 lần, thấm khô bằng giấy thấm vô trùng và được chuyển nuôi cấy trên môi trường: MS+ 1.0mg/l α -NAA+3.0mg/l BA

2.3.2. Phương pháp tách chiết alkaloid tổng số của Dừa cạn

- Vật liệu: Cây Dừa cạn xử lý EMS *in vitro*
- Toàn bộ rễ, thân, lá Dừa cạn được sấy khô ở 40°C và xay thành bột mịn
- Làm ẩm 20 gam bột Dừa cạn bằng dung dịch ammoniac 25% trong khoảng thời gian 2h
- Chiết Soxhlet bột Dừa cạn sau khi đã tẩm dung dịch amoniac với dung môi chloroform ở nhiệt độ 60°C, thời gian tách chiết 10h
- Thu dịch chiết màu vàng nâu, làm khan bằng Na₂SO₄, cô chân không tách được alkaloid tổng số

2.3.3. Phương pháp bố trí thí nghiệm

Các công thức thí nghiệm trong phòng nuôi cấy mô được bố trí ngẫu nhiên, mỗi công thức thí nghiệm tiến hành 54 mẫu chia làm 3 lần nhắc lại.

Các số liệu được xử lý thống kê bằng phần mềm IRRISTAT 5.0.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

3.1. Ảnh hưởng của EMS đến khả năng sống sót, bật chồi và phát sinh biến dị của đoạn thân Dừa cạn *in vitro*

Theo Đào Thanh Bằng và đồng tác giả (1997), EMS là chất gây đột biến hóa học tác động trực tiếp vào gen của tế bào qua phương thức thẩm thấu qua bề mặt mô. Do đó, thời gian xử lý và nồng độ xử lý có ý nghĩa rất quan trọng. Vì vậy, đối với từng loài cây, từng giống cây cần phải xác định nồng độ và thời gian xử lý thích hợp mới có thể mang lại hiệu quả cao.

Đoạn thân mang mắt ngủ Dừa cạn sau khi được xử lý EMS *in vitro* được cấy trên môi trường MS+ 1.0mg/l α -NAA+3.0mg/l BA

Bảng 1 : Tỷ lệ sống, bật chồi và biến dị của đoạn thân mang mắt ngủ Dừa cạn được xử lý trong dung dịch bổ sung EMS với thời gian và nồng độ khác nhau (sau 4 tuần nuôi cấy)

<i>Công thức</i>	<i>Tổng số mẫu xử lý</i>	<i>Số mẫu sống</i>	<i>Tỷ lệ mẫu sống(%)</i>	<i>Số mẫu biến dị</i>	<i>Tỷ lệ mẫu biến dị (%)</i>
DC (0%-1h)	54	50	92,9	0	0
0,05% - 1h	54	46	85,19	3	5,56
0.10% - 1h	54	43	79,63	7	12,96
0.15% - 1h	54	36	66,67	16	29,63
0.20% - 1h	54	32	59,26	18	33,33
0% - 2h	54	44	81,48	0	0
0.05% - 2h	54	38	70,37	5	9,26
0.10% - 2h	54	30	55,56	9	16,67
0.15% - 2h	54	24	44,44	19	35,19
0,20% - 2h	54	20	37,04	15	27,78
0% - 3h	54	41	75,93	0	0
0.05% - 3h	54	23	42,59	9	16,67
0.10% - 3h	54	19	35,19	8	14,81
0.15% - 3h	54	12	22,22	7	12,96
0,20% - 3h	54	8	14,81	6	11,11

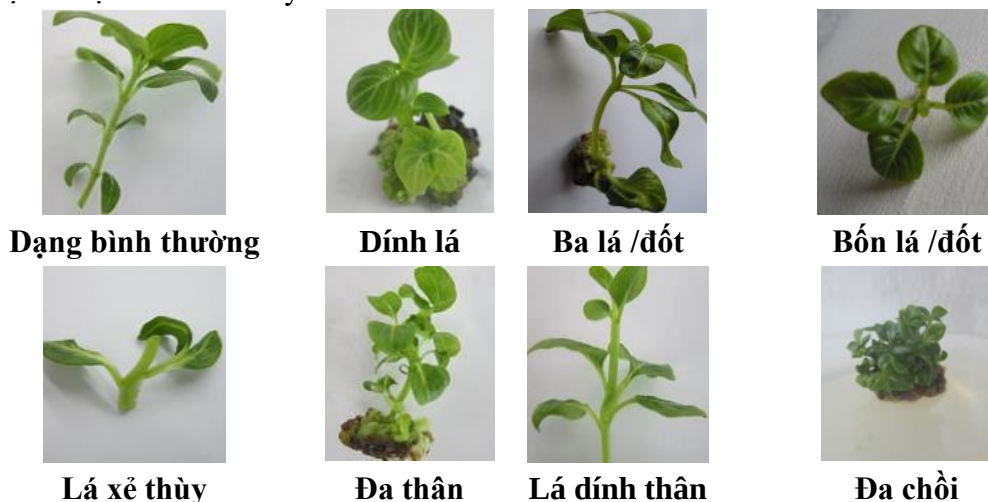
Kết quả bảng 1 cho thấy :

Ở các công thức đối chứng thì đa số các đoạn thân này vẫn sống, có màu xanh bình thường, bật chồi và không xuất hiện biến dị.

Thời gian và nồng độ EMS xử lý tăng lên thì tỷ lệ mẫu sống giảm dần (giảm từ 85,19% xuống còn 14,81%) và tỷ lệ mẫu xuất hiện biến dị cũng biến đổi. Công thức 9 (0,15%-2h) có tỷ lệ mẫu biến dị cao nhất (35,19%). Nếu tiếp tục tăng nồng độ và thời gian xử lý EMS thì tỷ lệ chết sẽ rất cao vì vậy không còn mẫu sống sót để có thể phát sinh đột biến nữa

Các đoạn thân mang mắt ngủ Dừa cạn sau khi được xử lý được cấy chuyển sang môi trường nhân chồi. Theo dõi sự phát triển của mẫu sau khi xử lý nhận thấy: Ở 2 tuần đầu sau khi xử lý EMS, các mẫu có biểu hiện phục hồi. Ở tuần thứ 3 và thứ 4 sau xử lý thì một số mẫu

ở công thức xử lý EMS trong 1h và 2h sinh trưởng tốt, bật nhiều chồi, có nhiều biểu hiện giống với các mẫu ở công thức đối chứng. Ở công thức có thời gian xử lý 2h và 3h với nồng độ xử lý cao 0,15; 0,20% đa số các mẫu không có biểu hiện phục hồi, mẫu có màu vàng nâu, mọng nước và chết. Một số chồi phát sinh từ các mẫu cây sống sót sau xử lý EMS thì phát sinh một số đột biến dưới đây



Hình 1: Các dạng biến dị thu được trong quá trình nuôi cấy in vitro sau xử lý EMS

Bảng 2 : Ảnh hưởng của EMS đến sự sinh trưởng, phát triển của đoạn thân mang mắt ngừ Dừa cạn được lắ trong dung dịch bổ sung EMS với thời gian và nồng độ khác nhau.

CTTN	Nồng độ xử lý (%) – Thời gian xử lý (h)	Hệ số nhân chồi	Số lá (lá/chồi)	Chiều cao (cm)
1	0% - 1h	5.67	11.72	5.49
2	0.05% - 1h	5.13	11.69	5.34
3	0.10% - 1h	3.39	11.17	4.90
4	0.15% - 1h	2.56	10.45	4.33
5	0.20% - 1h	1.96	10.47	4.40
6	0% - 2h	4.67	11.60	5.44
7	0.05% - 2h	3.00	10.50	4.09
8	0.10% - 2h	1.94	9.93	3.61
9	0.15% - 2h	1.37	9.75	3.59
10	0.20% - 2h	1.02	9.18	3.13
11	0% - 3h	4.20	10.88	5.22
12	0.05% - 3h	1.65	10.61	4.30
13	0.10% - 3h	1.39	9.67	3.43
14	0.15% - 3h	0.89	8.67	2.99
15	0.20% - 3h	0.54	8.22	2.56
CV(%)		5.9	3.1	3.4
LSD(%)		0.26	0.53	0.24

Kết quả bảng 2 cho thấy:

Nồng độ và thời gian xử lý EMS có ảnh hưởng tới sự sinh trưởng phát triển của chồi Dừa cạn. Nếu nồng độ và thời gian xử lý EMS càng tăng, sức sinh trưởng của chồi Dừa cạn càng giảm

Trong các công thức nghiên cứu có bổ sung EMS, CT2 (0.05% -1h) là công thức có mẫu sinh trưởng phát triển tốt nhất với hệ số nhân chồi (5.13), số lá TB (11.69 lá/chồi), chiều cao TB (5.34cm)

CT15 (0.2% -3h) là công thức có mẫu sinh trưởng phát triển kém nhất với hệ số nhân chồi (0.54), số lá TB (8.22 lá/chồi), chiều cao TB (2.56cm)

3.2. Phân tích hàm lượng alkaloid của dòng Dừa cạn đã xử lý EMS *in vitro* và cây Dừa cạn không xử lý EMS.

Tiến hành tách chiết hàm lượng alkaloid tổng số của các dòng Dừa cạn đã được xử lý EMS và không xử lý EMS để bước đầu đánh giá được ảnh hưởng của EMS đến khả năng tạo alkaloid trong cây Dừa cạn. Kết quả được trình bày ở bảng 3

Bảng 3: Hàm lượng alkaloid tổng số của 6 mẫu đem phân tích

Mẫu	Hàm lượng (%) alkaloid tổng số	Hàm lượng alkaloid so với đối chứng (lần)
M1	0.19	0.95
M2 (ĐC)	0.20	1.00
M3	0.23	1.15
M4	0.28	1.40
M5	0.36	1.80
M6	0.37	1.85
CV(%)	3.7	
LSD(%)	0.03	

Ghi chú:

M1: Hạt Dừa cạn gieo *in vivo* trong vòng 6 tuần.

M2: Cây Dừa cạn không xử lý EMS được nuôi cấy *in vitro* trong môi trường tạo cây hoàn chỉnh trong 6 tuần.

M3, M4, M5, M6: Cây Dừa cạn phát sinh từ đoạn thân sống sót sau khi xử lý EMS lần lượt ở nồng độ 0,05%-1h; 0,1%-1h; 0,15%-1h; 0,2%-1h và được nuôi cấy *in vitro* trong 6 tuần

Kết quả bảng 3 cho thấy :

EMS có ảnh hưởng đến hàm lượng alkaloid có trong cây Dừa cạn. Hàm lượng alkaloid tổng số càng lớn nếu nồng độ xử lý EMS càng cao (cao nhất là M6: 0,37%, gấp 1,85 lần so với mẫu đối chứng)

4. KẾT LUẬN

1) Nồng độ và thời gian xử lý EMS có ảnh hưởng đến tỷ lệ sống sót, bật chồi, biến dị và sinh trưởng của đoạn thân mang mắt ngủ Dừa cạn. Xử lý đoạn thân mang mắt ngủ Dừa cạn *in vitro* trong dung dịch EMS ở nồng độ 0,15% - 2h thì tỷ lệ tạo biến dị là cao nhất (35,19%)

2) EMS có ảnh hưởng đến hàm lượng alkaloid có trong cây Dừa cạn. Nồng độ xử lý EMS càng cao nồng độ alkaloid càng lớn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Cragg and Newman (2005), *Plants as a source of anti – cancer agents*, Journal of Ethnopharmacology, 72-79
2. Đào Thanh Bằng và cộng sự (1997), *Nghiên cứu hiệu quả của xử lý Ethylmethane sulphonate (EMS) trên ngô giống thế hệ M1 và M2*, Viện Di truyền Nông nghiệp, NXB Nông nghiệp.
3. Vũ Hoàng Hiệp (2008), *Nghiên cứu nuôi cấy in vitro và ảnh hưởng của Ethylmethane sulphonate (EMS) đến cây cảm chướng nuôi cấy mô*, Trường Đại học Nông nghiệp Hà Nội
4. T. Ramakrishnan and C. Vaidyanthan (1977). *Studies in Catharanthus roseus callus cultures. callus initiation and differentiation*. Curr. Sci. 46:364–365.

NGHIÊN CỨU CÁC ĐIỀU KIỆN NUÔI CẤY ĐỂ THU NHẬN VÀ TẠO CHẾ PHẨM CELLULASE TỪ *Trichoderma harzianum* T25

Phan Thị Bé¹, Nguyễn Đắc Thiện¹, Nguyễn Thị Hà Trang¹, Trương Nữ Thùy Trang¹,
Nguyễn Thị Trinh¹, Nguyễn Thị Kim Uyên¹.

ABSTRACT

Cellulase product is good for processing product derived from cellulases. The objective of the article is to study conditions of the semi-solid state with husks substrate and bran to acquire and produce enzyme product from *Trichoderma harzianum*. Bran:rice husk:NH₄NO₃ (7:3:1) ratio, initial moisture is 60%, the most suitable incubation period for enzyme biosynthesis of *Trichoderma harzianum* T25 is 5 days. Cellulase activity in laboratory conditions is 947.15 IU/g.

Keywords: Bran, cellulase, husk, *Trichoderma harzianum* T25.

TÓM TẮT

Chế phẩm cellulase có khả năng xử lý tốt các phế phụ phẩm có nguồn gốc từ cellulose. Mục tiêu của bài báo là nghiên cứu các điều kiện của môi trường bán rắn với cơ chất trấu kết hợp với cám gạo để thu nhận và tạo chế phẩm enzyme từ *Trichoderma harzianum*. Tỷ lệ cám: trấu : NH₄NO₃ (7:3:1), độ ẩm ban đầu 60%, thời gian nuôi cấy 5 ngày thích hợp nhất cho *Trichoderma harzianum* T25 sinh tổng hợp enzyme. Hoạt tính cellulase trong điều kiện phòng thí nghiệm là 947,15 IU/g.

Từ khóa: Cám gạo, Cellulase, Trấu, *Trichoderma harzianum* T25

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Ngày nay, cùng với sự phát triển mạnh mẽ của công nghệ sinh học, các chế phẩm enzyme được sản xuất ngày càng nhiều và được sử dụng trong hầu hết các lĩnh vực. Trong đó, các loại enzyme như: cellulase, protease, amylase,... là những loại enzyme rất quan trọng mang lại nhiều giá trị to lớn trong việc chế biến thực phẩm, thức ăn chăn nuôi, y tế và xử lý môi trường (Phạm Thị Trân Châu, Phan Tuấn Nghĩa, 2006).

Phế phụ phẩm trong ngành công nghiệp thực phẩm và nông nghiệp đang là mối đe dọa đối với môi trường đặc biệt như bã sắn, bã cà phê, trấu, rơm rạ,... Xu hướng hiện nay sử dụng chế phẩm cellulase để xử lý các phế phụ phẩm trên. Cellulase được thu nhận chủ yếu từ nấm men, nấm mốc và vi khuẩn. Nhiều loại nấm sợi có khả năng sinh cellulase thuộc giống *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Alternaria*, *Penicillium*,... Trong đó *Trichoderma* và *Aspergillus* đã được nhiều nhà khoa học nghiên cứu để sản xuất cellulase.

Mục tiêu của bài báo là thu nhận enzyme từ *Trichoderma harzianum* T25 sinh trưởng trên môi trường bán rắn trấu kết hợp với cám gạo nhằm thu nhận enzyme.

2. MỤC TIÊU, NỘI DUNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Mục tiêu

- Nghiên cứu các điều kiện nuôi cấy thích hợp để thu nhận và tạo chế phẩm cellulase từ *Trichoderma harzianum* trên môi trường bán rắn với cơ chất là trấu và cám gạo.
- Đề xuất quy trình công nghệ sản xuất chế phẩm cellulase từ *Trichoderma harzianum*.

¹ Trường Đại học Nông Lâm Huế

2.2. Nội dung nghiên cứu

Khảo sát ảnh hưởng của một số yếu tố đến sự sinh tổng hợp enzyme

- Khảo sát ảnh hưởng của thành phần môi trường bán rắn .
- Khảo sát ảnh hưởng của độ ẩm ban đầu của môi trường.
- Khảo sát ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy.

*Xây dựng quy trình tạo chế phẩm *Trichoderma harzianum* T25*

2.3. Phương pháp nghiên cứu

Xác định hàm lượng đường khử bằng acid dinitro salixylic (DNS)

Hoạt độ cellulase được xác định dựa theo phương pháp của Jeffries (1996) với CMC 1% (Cacboxymethylcellulose) làm cơ chất.

Nguyên tắc: Sử dụng CMC 1% làm cơ chất, ủ dịch chiết enzyme trong 30 phút, pH = 5 ở nhiệt độ 50°C. Hệ enzyme sẽ tác dụng lên CMC giải phóng các phân tử glucose. Dựa vào hàm lượng glucose được giải phóng ra để xác định hoạt độ cellulase bằng phương trình đường chuẩn.

*Khảo sát ảnh hưởng của một số yếu tố đến khả năng sinh tổng hợp cellulase của chủng *T. harzianum* T25.*

Khảo sát ảnh hưởng của thành phần môi trường

Binh	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Cám	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Trấu	9	8	7	6	5	4	3	2	1
NH₄NO₃	1	1	1	1	1	1	1	1	1

Bảng 1. Thành phần môi trường bán rắn.

Chủng *T. harzianum* T25 được nuôi cấy trên môi trường bán rắn với tỷ lệ cám : trấu : NH₄NO₃ theo bảng 1 trong thời gian 5 ngày, nhiệt độ 28°C. Sau thời gian nuôi cấy, tiến hành thu dịch enzyme thô bằng nước cất, xác định hoạt tính của cellulase bằng phương pháp so màu với thuốc thử DNS.

Khảo sát ảnh hưởng của độ ẩm ban đầu của môi trường bán rắn

Tiến hành thí nghiệm trên môi trường với tỷ lệ cám:trấu:NH₄NO₃ là 7:3:1, nhiệt độ 28°C, thời gian 5 ngày. Độ ẩm của môi trường được điều chỉnh từ 40% đến 70%. Dùng nước cất để thu dịch enzyme, xác định hoạt tính enzyme cellulase bằng phương pháp so màu với thuốc thử DNS.

Khảo sát ảnh hưởng của thời gian

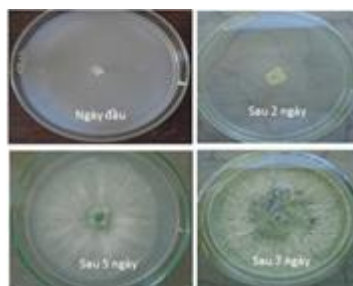
Chủng *T. harzianum* T25 được nuôi cấy trên môi trường với tỷ lệ cám: trấu: NH₄NO₃ = 7:3:1, nhiệt độ 28°C, độ ẩm ban đầu của môi trường 60%. Sau các khoảng thời gian từ 1 ngày đến 10 ngày dùng nước cất để thu lấy dịch enzyme.

Xử lý số liệu

Sử dụng phương pháp phân tích phương sai (ANOVA) xác định sự sai khác giữa các trung bình bằng phần mềm SAS 9.1.

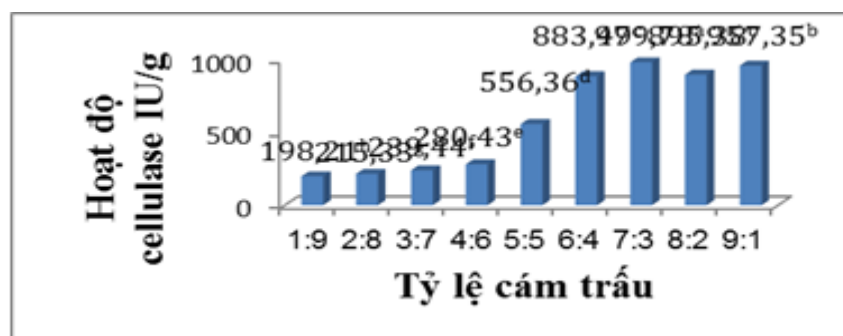
3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

Hình 1. Sợi nấm *T. harzianum* T25



3.1. Ảnh hưởng của thành phần môi trường đến khả năng sinh tổng hợp cellulase từ chủng *T.harzianum* T25

Hình 2. Ảnh hưởng của thành phần môi trường đến hoạt độ cellulase của chủng *T. harzianum* T25



Ghi chú: Các chữ cái khác nhau thể hiện sự khác nhau có ý nghĩa về mặt thống kê, với $\alpha = 0,05$.

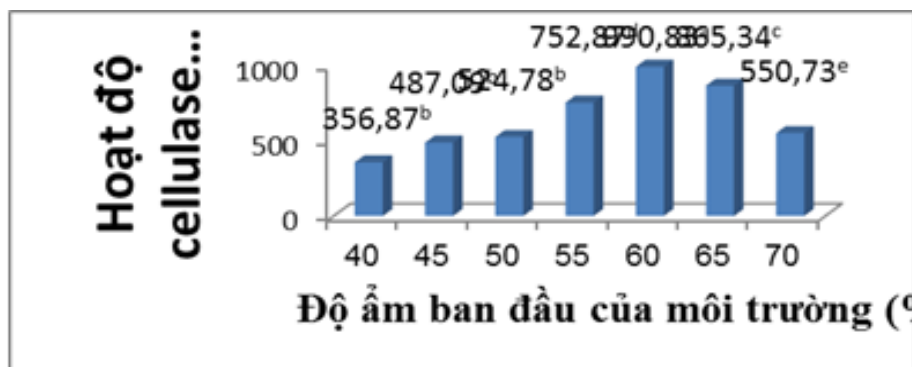
Tiến hành khảo sát ảnh hưởng của thành phần môi trường đến khả năng sinh tổng hợp từ *T. harzianum* T25. Kết quả cho thấy, khi tăng hàm lượng cám thì hoạt độ của enzyme tăng. Hoạt độ đạt cao nhất tại tỷ lệ cám: trấu là 7:3 với hoạt độ 979,78 (IU/g). Tuy nhiên, khi tiếp tục tăng hàm lượng cám thì hoạt độ enzyme giảm. Ở tỷ lệ cám: trấu là 8:2 thì hoạt độ enzyme là 895,38 (IU/g).

3.2. Ảnh hưởng của độ ẩm đến khả năng sinh tổng hợp cellulase của *T. harzianum* T25

Khả năng sinh enzyme của chủng *T. harzianum* T25 tăng khi độ ẩm ban đầu của môi trường tăng từ 40% đến 60% và đạt cao nhất tại 60% với hoạt độ enzyme là 990,83 IU/g. Tiếp tục tăng độ ẩm của môi trường ban đầu thì hoạt độ giảm. Có sự thay đổi về giá trị hoạt độ đo được là do lượng nước có trong môi trường nuôi cấy ảnh hưởng đến quá trình thu nhận chất dinh dưỡng và hoạt động trao đổi chất của nấm mốc. Tuy nhiên, nếu hàm ẩm cơ chất quá cao

làm giảm độ xốp của cơ chất dẫn đến hạn chế sự thông thoáng khí (Thanapimmetha et al, 2012).

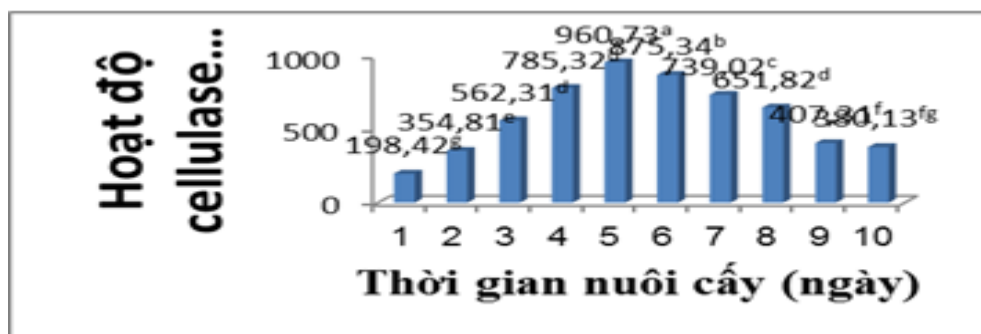
Hình 3. Ảnh hưởng của độ ẩm môi trường đến hoạt độ cellulase sinh tổng hợp từ *Trichoderma harzianum*



Ghi chú: Các chữ cái khác nhau thể hiện sự khác nhau có ý nghĩa về mặt thống kê, với $\alpha = 0,05$.

3.3. Ảnh hưởng của thời gian đến khả năng sinh tổng hợp cellulase của *Trichoderma harzianum*.

Hình 4. Ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy đến hoạt độ cellulase sinh tổng hợp từ *Trichoderma harzianum*

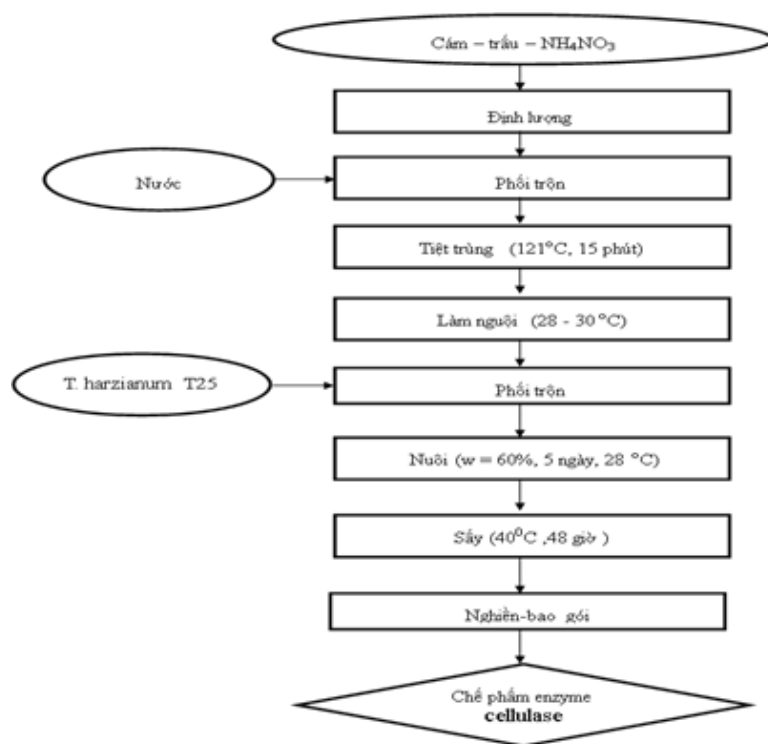


Ghi chú: Các chữ cái khác nhau thể hiện sự khác nhau có ý nghĩa về mặt thống kê, với $\alpha = 0,05$.

Khả năng sinh enzyme của *T. harzianum* T25 thay đổi theo thời gian, thấp nhất sau 1 ngày nuôi cấy và cao nhất sau 5 ngày nuôi cấy với hoạt độ cao nhất là 960,73 IU/g, tiếp tục kéo dài thời gian nuôi cấy hoạt độ của enzyme giảm.

3.4. Đề xuất quy trình công nghệ sản xuất chế phẩm cellulase từ *T. harzianum* T25

Hình 5. Quy trình công nghệ sản xuất chế phẩm cellulase từ *T. harzianum* T25



4. KẾT LUẬN

Môi trường thích hợp cho *Trichoderma harzianum* sinh tổng hợp cellulase là: Tỷ lệ cám : trấu là 7:3, độ ẩm môi trường ban đầu là 60%, thời gian nuôi cấy là 5 ngày. Hoạt tính cellulase thu được là 947,15 IU/g.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Phạm Thị Trân Châu, Phan Tuấn Nghĩa (2006), Công nghệ sinh học - Enzyme và ứng dụng (Tập 3), Nhà Xuất Bản Giáo dục, Hà Nội.
2. Trần Thanh Phong, Hoàng Quốc Khánh, Võ Thị Hạnh, Lê Bích Phượng, Nguyễn Duy Long, Lê Tấn Hưng, Trương Thị Hồng Vân (2007), thu nhận enzyme cellulase của *Trichoderma reesei* trên môi trường bán rắn.
3. Jeffries T.W. (1996), *Production and applications of cellulase laboratory procedures handbook*, US Army Materials Laboratories, pp.
4. Thanapimmetha A, Luadsongkram A, Titapiwatanakun B, Srinophakun P (2012), *Value added waste of Jatropha curcas residue: Optimization of protease production in solid state fermentation by Taguchi DOE methodology*, Industrial Crops and Products.
5. Trần Thị Thanh Thuần, Nguyễn Đức Lượng (2009), *Nghiên cứu enzyme cellulase và pectinase từ chủng Trichoderma viride và Aspergillus niger nhằm xử lý nhanh vỏ cà phê*, Tạp chí phát triển khoa học và công nghệ, tập12, (13).

TẠO PHÔI SOMA TRỰC TIẾP TỪ CHỒI VÀ TÁI SINH CHỒI TỪ PHÔI GIỐNG LAN *DENDROBIUM NESTOR* BẰNG PHƯƠNG PHÁP NUÔI CẤY *IN VITRO*

Nguyễn Hà Phi Long¹, Nguyễn Thị Hà¹, Tô Thị Nhã Trâm¹

ABSTRACT

Today, the *Dendrobium nestor* there is only a very small number, scattered in Ho Chi Minh City and southern provinces. These species are currently famous for noble beauty, fancy, special aromas, great potential in growing orchids cut flower industry in market. The topic chosen *Dendrobium Caesar White* and *Dendrobium Uraivan* make original material. Research results show the best process use disinfected samples with concentrations of 30% Javel in 20 minutes combined with $HgCl_2$ in 2 minutes. Shoot regeneration medium for high efficiency is Knudson C + 2 mg/l BA + 0.5 mg/l IBA. Somatic embryogenesis induction medium is KC additional 20% coconut water combined 1.5 mg/l BA + 0.3 mg/l NAA. Plant regeneration through direct somatic embryogenesis on Knudson C medium additional 2 mg/l BA combined 0.5 mg/l IBA 15% coconut water and 0.5 g/l of activated charcoal. The purpose of the study is the result for the study's premise biomass somatic embryogenesis created a large number of seedlings for production.

Keywords: *Dendrobium nestor*, *Dendrobium Caesar White*, *Dendrobium Uraivan*, Direct somatic embryogenesis

TÓM TẮT

Các giống lan *Dendrobium Nestor* (hay *Dendrobium chịu nhiệt*) hiện nay chỉ còn một số lượng rất ít, phân bố rải rác ở thành phố Hồ Chí Minh và một số tỉnh miền Nam. Đây là những giống hiện được thị trường ưa chuộng bởi vẻ đẹp thanh cao, lạ mắt, mùi hương đặc biệt, rất có tiềm năng trong công nghiệp trồng lan cắt cành. Đề tài đã chọn giống *Dendrobium Caesar White* và *Dendrobium Uraivan* làm vật liệu ban đầu. Kết quả nghiên cứu cho thấy quy trình khử trùng mẫu tốt nhất là sử dụng Javel với nồng độ 30% trong 20 phút kết hợp với $HgCl_2$ 2 phút. Môi trường tái sinh chồi bên cho hiệu quả cao là Knudson C + 2 mg/l BA + 0,5 mg/l IBA. Phôi soma cảm ứng hình thành trên môi trường KC bổ sung 20% nước dừa kết hợp 1,5 mg/l BA + 0,3 mg/l NAA. Chồi tái sinh từ phôi soma đạt hiệu quả cao trên môi trường Knudson C có bổ sung 15% nước dừa, 0,5 g/l than hoạt tính, 0,5 mg/l IBA và 2 mg/l BA. Mục đích của nghiên cứu cũng là kết quả tiền đề cho nghiên cứu nhân sinh khối phôi soma tạo một số lượng lớn cây giống phục vụ sản xuất.

Từ khóa: *Dendrobium chịu nhiệt*, phôi soma trực tiếp, *Dendrobium Caesar White*, *Dendrobium Uraivan*, *Dendrobium nestor*

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Đã từng là nữ hoàng của các loài lan ở Việt Nam giai đoạn trước 1975, các giống *Dendrobium chịu nhiệt* phù hợp với điều kiện với khí hậu miền Nam và có nhiều yếu tố phù hợp cho nhóm lan cắt cành. Sau giai đoạn này, nhiều loại hoa lan lạ và đẹp mắt khác xâm nhập vào Việt Nam khiến các giống lan *Dendrobium chịu nhiệt* mất dần vị thế, do đó số lượng bị giảm đáng kể. Tuy nhiên, hiện nay các giống lan *Dendrobium chịu nhiệt* lại đang có sức hút trở lại nhưng số lượng không đáp ứng đủ cho nhu cầu thị trường nội địa và xuất khẩu.

Ngày nay, phương pháp vi nhân giống hay nhân giống *in vitro* đã trở nên phổ biến trong việc nhân giống nhiều loài cây do nó có ưu điểm nhân giống nhanh với số lượng nhiều và tạo ra được những cây con với chất lượng tốt (Nguyễn Bảo Toàn, 2010). Trong đó, kỹ thuật nhân giống bằng phôi vô tính có thể được thực hiện trên quy mô công nghiệp mà không cần diện tích quá nhiều với hao phí lao động thấp. Đã có rất nhiều nghiên cứu trong và ngoài nước về

¹ Trường Đại học Nông Lâm TP. Hồ Chí Minh

ứng dụng tạo phôi soma trong nhân giống lan Hồ điệp (Dương Tấn Nhựt, 2009) đã thành công khi tạo phôi soma trên môi trường MS có bổ sung 2 mg/l BA kết hợp với 0,5 mg/l NAA, 1 g/l than hoạt tính, 20% nước dừa. Tuy nhiên, việc tạo phôi soma trên cây lan dendrobium vẫn chưa được phát triển, tập trung nghiên cứu nhiều (Chung và cs, 2005).

Để chủ động nguồn cây giống có chất lượng cao, sạch bệnh phục vụ cho phát triển sản xuất cung cấp nhu cầu nội địa cũng như xuất khẩu thì nhiệm vụ nhân giống lan bằng phương pháp nuôi cấy mô là hướng đi đúng đắn nhằm bổ sung thêm các giống lan mới cho thị trường, đẩy mạnh phát triển đa dạng các giống cho ngành lan cắt cành Việt Nam.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Vật liệu: Hai giống lan *Dendrobium* Caesar White và *Dendrobium* Uraivan được mang từ các vườn lan ở thành phố Hồ Chí Minh về chăm sóc tại Vườn ươm Bộ môn Công nghệ sinh học, trường Đại học Nông Lâm thành phố Hồ Chí Minh. Mẫu thí nghiệm là các thân giả hành to, khỏe, màu xanh và không bị bệnh.

Nội dung nghiên cứu:

Khảo sát ảnh hưởng của Javel (NaOCl) đến hiệu quả khử trùng mẫu cấy

Mẫu sau khi cắt từ vườn ươm sẽ được lột bỏ lớp bẹ lá, rửa sạch, ngâm xà phòng, tia dưới vòi nước sạch 10 phút và cho vào bình tam giác đã hấp khử trùng để tiến hành các bước tiếp theo bên trong tủ cấy. Quy trình bên trong được tiến hành như sau: cồn 70⁰ 1 phút, javel 30%, HgCl₂ 2 phút, kháng sinh 20 phút. Trong đó javel 30% được khảo sát với các khoảng thời gian lần lượt là 10, 15, 20, 25 và 30 phút.

Khảo sát ảnh hưởng của BA và IBA đến khả năng tạo chồi cây lan in vitro

Sau 30 ngày nuôi cấy, các mẫu sạch nấm và khuẩn được chuyển sang môi trường Knudson C bổ sung 0,5 mg/l IBA và BA ở các nồng độ khác nhau: 1 mg/l; 1,5 mg/l; 2 mg/l và 2,5 mg/l.

Khảo sát nồng độ BA và NAA đến sự hình thành phôi soma trực tiếp từ chồi in vitro

Các chồi được tách ra từ đốt thân giả hành chuyển sang môi trường cảm ứng tạo phôi soma trực tiếp là Knudson C có bổ sung 20% nước dừa, 0,3 mg/l NAA kết hợp với BA có dãy nồng độ khác nhau gồm 0,5 mg/l; 1 mg/l; 1,5 mg/l; 2 mg/l nhằm khảo sát nồng độ phù hợp cho việc tạo phôi soma trực tiếp từ chồi *in vitro*.

Ảnh hưởng của nồng độ BA và IBA đến khả năng tái sinh chồi từ phôi soma

Các phôi soma được tách từ chồi được chuyển sang môi trường tăng sinh Knudson C bổ sung 10% nước dừa, 30 g/l chuối, 30 g/l khoai tây và 1 mg/l BA để tăng sinh phôi. Sau đó mẫu được chuyển sang môi trường Knudson C + 15% nước dừa và 0,5 mg/l than hoạt tính cảm ứng tái sinh chồi có bổ sung chất điều hòa sinh trưởng BA và IBA ở nồng độ thay đổi theo từng nghiệm thức để khảo sát sự tái sinh chồi từ phôi.

Môi trường nuôi cấy được chuẩn pH về mức 5,7 - 5,8 (dùng NaOH và HCl 1N) trước khi đem hấp vô trùng bằng autoclave ở điều kiện 1atm, 121⁰C trong 20 phút.

Điều kiện phòng nuôi cấy là nhiệt độ $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$, thời gian chiếu sáng 16 - 18 giờ/ngày, cường độ chiếu sáng $40 - 45 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$. Số liệu được lấy sau 30 ngày và 60 ngày nuôi cấy. Số liệu thu thập được sẽ được xử lý thống kê trên máy tính bằng phần mềm MSTATC. Đọc kết quả dựa vào bảng ANOVA, bảng trung bình và bảng so sánh sự khác biệt giữa các nghiệm thức (bằng phương pháp LSD).

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Ảnh hưởng của thời gian khử trùng bằng Javel (NaOCl) đến mẫu cấy

Tỉ lệ vô trùng thành công phụ thuộc vào thời gian khử trùng và nồng độ các chất khử trùng. Năm 2002, Estrela và ctv đưa ra nhận định khi javel (NaClO) tan trong nước sẽ có phản ứng cân bằng qua lại theo phương trình: $\text{NaOCl} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{NaOH} + \text{HClO} + \text{Na}^+ + \text{OH}^- + \text{H}^+ + \text{OCl}^-$

HClO và OCl^- là những chất làm biến tính và thủy phân amino acid. Ngoài ra, NaOCl còn hòa tan chất béo tạo ra các acid béo và chuyển chúng thành muối acid béo và glycerol nhờ phản ứng xà phòng hóa dẫn đến gây chết cho tế bào vi sinh vật.

Bảng 1. Ảnh hưởng của javel (NaOCl) đến tỉ lệ sống và sạch của mẫu lan *Dendrobium* Caesar White và *Dendrobium* Uraiwan

Môi trường	Thời gian khử trùng (phút)	Tỉ lệ mẫu sống và sạch (%)	
		<i>Dendrobium</i> Uraiwan	<i>Dendrobium</i> Caesar White
MS	10	38,89 ^b	44,44 ^c
MS	15	55,56 ^{ab}	55,56 ^{bc}
MS	20	72,22 ^a	77,78 ^a
MS	25	66,67 ^a	72,22 ^{ab}
MS	30	55,56 ^{ab}	61,11 ^{abc}
CV (%)		10,54	11,29

Các ký tự khác nhau theo sau các giá trị trung bình trong cùng một cột thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê ở mức $p < 0,01$ ở giống *Dendrobium* Uraiwan và $0,01 < p < 0,05$ ở giống *Dendrobium* Caesar White. Số liệu chuyển đổi theo đổi theo công thức $y = \arcsin$

$\sqrt{\left(\frac{x}{100}\right)}$ với x là số phần trăm mẫu còn sống và sạch của một nghiệm thức trong một lần lặp lại.

Clorua thủy ngân là chất khử trùng có chứa kim loại nặng, ảnh hưởng trực tiếp đến hệ enzyme của vi sinh vật. Chính vì vậy, khi kết hợp hai chất khử trùng này lại cho hiệu quả khử trùng mẫu rất tốt, đặc biệt kết quả tốt nhất khi sử dụng javel 30% trong 20 phút và HgCl_2 trong 2 phút. Khi khử trùng càng lâu thì càng nhiều vi sinh vật trên bề mặt mẫu cấy bị tiêu diệt, đồng thời dưới tác động của Tween 80 làm giảm sức căng bề mặt của nước, tăng khả năng tiếp xúc của javel với mẫu cấy, hơn nữa chất khử trùng có đủ thời gian để len lỏi vào sâu

bên trong các kẽ chồi, đẩy các bọt khí ra ngoài. Tuy nhiên việc khử trùng mẫu cấy trong thời gian dài, javel sẽ phá vỡ các thành phần của tế bào thực vật nhất là diệp lục tố, sức sống của mẫu càng khó được phục hồi khi số tế bào bị ảnh hưởng càng nhiều. Do đó, theo kết quả ở bảng 1, thời gian khử trùng hợp lý nhất là 20 phút với javel ở nồng độ 30% cho cả 2 giống.

3.2. Sự hình thành chồi trên môi trường Knudson C bổ sung BA và IBA

Kết quả được ghi nhận sau 8 tuần nuôi cấy cho thấy môi trường Knudson C có bổ sung 2 mg/l BA và 0,5 mg/l IBA đạt hiệu quả tạo chồi tốt nhất ở cả hai giống *Dendrobium* Caesar White và *Dendrobium* Uraivan.

Bảng 2. Ảnh hưởng của BA và IBA đến khả năng tạo chồi lan

<i>Dendrobium</i> Caesar White			
Môi trường	BA (mg/l)	IBA (mg/l)	Chiều cao chồi (cm)
KC	0	0	0 ^d
KC	1,0	0,5	1,81 ^b 0,19
KC	1,5	0,5	2,82 ^a 0,24
KC	2,0	0,5	3,25 ^a 0,39
KC	2,5	0,5	0,94 ^c 0,07
CV (%)			12,70

Các giá trị trung bình trong cùng một cột có các ký tự khác nhau thì khác biệt có ý nghĩa về thống kê ($p < 0,01$)



Hình 1. Kết quả tác dụng của BA và IBA lên sự hình thành chồi giống *Dendrobium* Caesar White sau 8 tuần nuôi cấy

Tuy nhiên, khi ở nồng độ này, giống *Dendrobium* Caesar White chỉ có sự khác biệt về chiều cao chồi còn giống *Dendrobium* Uraivan có sự khác biệt về số lượng chồi hình thành

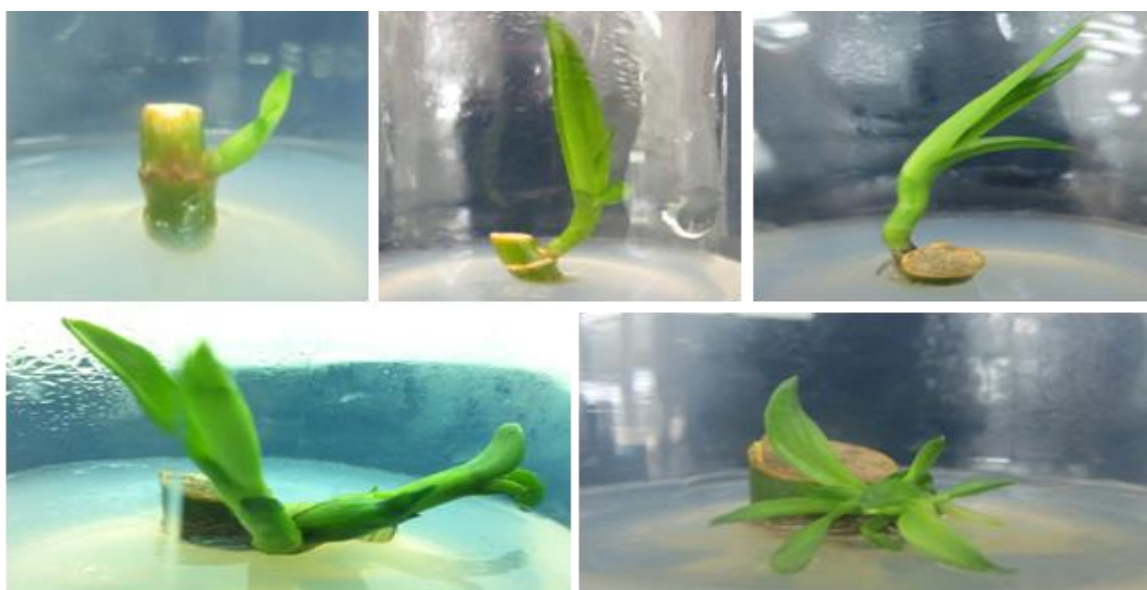
và chiều cao của chồi. Cụ thể, kết quả bảng 2 và hình 1 cho thấy giống *Dendrobium* Caesar White chỉ tạo một chồi ở các nghiệm thức, nhưng về chiều cao và hình thái chồi lại có sự khác biệt. Chiều cao chồi và độ mở của lá có xu hướng tăng theo nồng độ BA trong môi trường nuôi cấy do chất điều hòa sinh trưởng BA thuộc nhóm chất cytokinin thúc đẩy sự phát triển trong sinh trưởng lá (Trần Văn Minh, 1997). Thế nhưng ở nồng độ cao trong môi trường nhân chồi BA làm giảm sự tăng trưởng, giảm chiều dài chồi hay là cả hai (Dương Tấn Nhựt, 2010). Ở nồng độ 1 mg/l BA chồi có chiều cao trung bình 1,81 cm, lá tương đối ngắn và bẹ lá áp sát vào thân. Khi tăng nồng độ BA từ 2,0 lên 2,5 mg/l thì chiều cao chồi giảm, thân nhỏ ở dưới, phình to ở trên, lá phát triển to và dài hơn rất nhiều so với thân chồi, chiều cao chồi chỉ đạt 0,94 cm.

Bảng 3. Sự hình thành chồi lan *Dendrobium* Uraiwan trong môi trường có bổ sung BA và IBA sau 8 tuần nuôi cấy

Nghiệm thức	Môi trường	BA (mg/l)	IBA (mg/l)	Số chồi TB (Chồi)	Chiều cao TB chồi (cm)
C1.2	KC	0	0	1,0 ^c	1,08 ^c 0,09
C2.2	KC	1,0	0,5	1,0 ^c	2,43 ^b ±0,11
C3.2	KC	1,5	0,5	1,0 ^c	3,31 ^a 0,06
C4.2	KC	2,0	0,5	1,56 ^b 0,1	2,39 ^b 0,18
C5.2	KC	2,5	0,5	2,61 ^a 0,26	0,55 ^d 0,04
CV (%)				8,54	5,44

Các giá trị trung bình trong cùng một cột có các ký tự khác nhau thì khác biệt có ý nghĩa về thống kê ($p < 0,01$).

Dựa vào bảng 3 và hình 2 cho thấy giống *Dendrobium* Uraiwan có sự khác biệt về cả số chồi hình thành và chiều cao chồi ở các nghiệm thức. Chồi vẫn hình thành trên môi trường không có chất điều hòa sinh trưởng và nồng độ BA và IBA ở ngưỡng 2,5 mg/l và 0,5 mg/l cho kết quả nhân chồi tốt (2,61 chồi/mẫu). Chiều cao chồi cũng có sự khác biệt rõ rệt, ở nồng độ 1,5 mg/l BA + 0,5 mg/l IBA chồi có chiều cao trung bình cao nhất 3,31 cm. Khi nồng độ BA tăng lên từ 2,0 và 2,5 mg/l thì chiều cao chồi giảm và đạt thấp nhất 0,55 cm ở nồng độ 2,5 mg/l BA. Sự tương quan giữa số chồi và chiều cao chồi và hình thái chồi rất quan trọng cho thí nghiệm tạo phôi, ở nồng độ 2,5 mg/l BA mặc dù có số lượng chồi cao nhất nhưng thân chồi nhỏ, thấp và lá mỏng. Ngược lại, ở nồng độ 2 mg/l BA tuy có số chồi ít hơn nhưng chồi to, khỏe, lá dày, chất lượng tốt rất phù hợp làm vật liệu cho thí nghiệm tạo phôi soma trực tiếp.



Hình 2 Sự hình thành chồi của giống *Dendrobium Uraiwana* trên môi trường bổ sung BA và IBA sau 8 tuần nuôi cấy invitro

Công nghệ tạo phôi soma là một công nghệ tiên tiến do phôi soma là nguồn vật liệu quan trọng cho tạo và nhân giống với số lượng rất lớn. Ngoài ra, phôi soma còn được ứng dụng sản xuất cây sạch bệnh, tạo hạt nhân tạo, chuyển gen, sản xuất hợp chất góp phần bảo quản các nguồn gen quý hiếm (Dương Tấn Nhật, 2011). Do đó, việc ứng dụng tạo phôi soma cho hai giống lan *Dendrobium Caesar White* và *Dendrobium Uraiwana* là thật sự cần thiết. Kết quả tạo phôi soma ở giống *Dendrobium Caesar White* được thể hiện ở bảng 3 và hình 3.

Nhu cầu auxin hoặc các chất điều hòa sinh trưởng thực vật khác cho việc khởi động sự phát sinh phôi để cảm ứng hai cơ chế quan trọng trong phát sinh các tế bào phôi *in vitro* là sự phân chia tế bào bất đối xứng và sự kéo dài tế bào (Dương Tấn Nhật, 2008). Chính vì vậy, ở nghiệm thức đối chứng không sử dụng chất điều hòa sinh trưởng cho kết quả hoàn toàn không có mẫu cảm ứng tạo phôi.

Bảng 3 Ảnh hưởng của BA và NAA đến khả năng tạo phôi trực tiếp lan *Dendrobium Caesar White*

Môi trường	BA (mg/l)	NAA (mg/l)	Tỉ lệ tạo phôi (%)
KC	0	0	0 ^d
KC	0,5	0,3	22,22 ^{cd}
KC	1,0	0,3	44,44 ^{bc}
KC	1,5	0,3	77,78 ^a
KC	2,0	0,3	61,11 ^{ab}
CV (%)			17,82

Các giá trị trung bình trong cùng một cột có các ký tự khác nhau thì khác biệt có ý nghĩa về thống kê $p < 0,01$. Số liệu chuyển đổi theo đổi theo công thức $y = \arcsin \sqrt{\left(\frac{x}{100}\right)}$ với x là số phần trăm mẫu tạo phôi của một nghiệm thức trong một lần lặp lại.

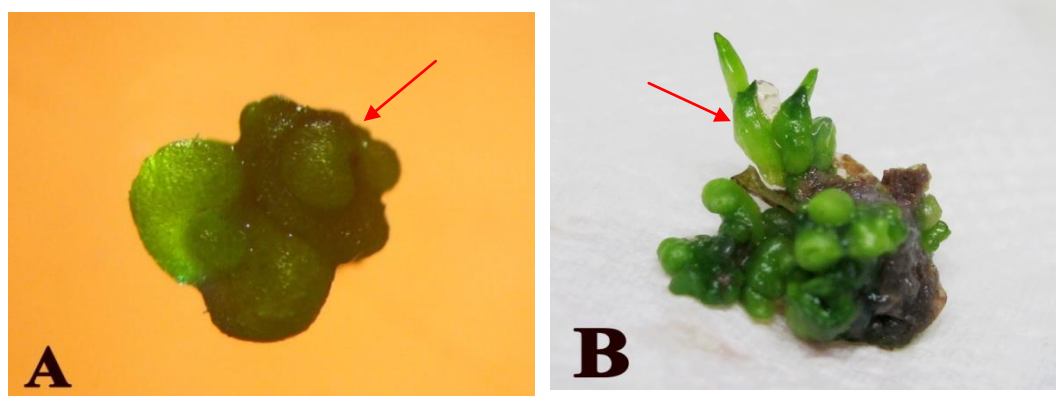


Hình 3. Phôi soma trực tiếp tạo từ chồi lan *Dendrobium Caesar White* trên môi trường có bổ sung BA và NAA

Kết quả nghiên cứu của Chung và cs (2005) về việc tạo phôi soma trực tiếp từ lá trên giống lan *Dendrobium Chiangmai Pink* cũng đưa ra kết quả tương tự. Ở các nghiệm thức tiếp theo, BA được bổ sung vào môi trường Knudson C có 20% nước dừa với nồng độ thay đổi từ 0,5 - 2 mg/l kết hợp với 0,3 mg/l NAA cho kết quả khả quan về sự cảm ứng tạo phôi soma trực tiếp, tỉ lệ mẫu cảm ứng lần lượt là 22,22 %, 44,44% và cao nhất là 77,78% ở các nghiệm thức 0,5 mg/l BA; 1 mg/l BA và 1,5 mg/l. Kết quả này được giải thích do khi bổ sung BA vào môi trường, có tác dụng kích thích sự tăng trưởng tế bào cùng với điều kiện có mặt auxin trong môi trường, nó có tác động lên cả hai bước của sự phân chia tế bào: phân nhân và phân bào. Tuy nhiên, khi nồng độ BA tăng lên 2 mg/l thì tỉ lệ tạo phôi đã giảm chỉ còn 61,11% mẫu cảm ứng tạo phôi. Mặc dù không có sự khác biệt ý nghĩa về mặt thống kê nhưng có thể thấy nồng độ BA 2 mg/l + 0,3 mg/l NAA + 20% nước dừa có dấu hiệu ức chế sự hình thành phôi.

Sự phát sinh phôi chịu ảnh hưởng bởi yếu tố di truyền như những tính trạng khác nhau của các kiểu gen hay giống. Nên chọn mẫu nuôi cấy có ảnh hưởng quan trọng đến các dòng tế bào có khả năng phát sinh phôi (Lo Sciavo, 1995). Ở các loài thực vật khác nhau có tiềm năng phát sinh phôi khác nhau, nên mẫu nuôi cấy chịu ảnh hưởng của kiểu di truyền, giai đoạn phát triển của cây mẹ, sinh lý cây mẹ lấy mẫu và trạng thái mẫu nuôi cấy (Litz và Gray, 1995). Do vậy, khi khảo sát trên cùng một kiểu bố trí thí nghiệm, với giống *Dendrobium Caesar White* ta

thu nhận được kết quả khả quan ở trên, còn với giống *Dendrobium* Uraivan, không nhận thấy dấu hiệu phát sinh phôi soma trực tiếp mà chỉ quan sát được sự tạo chồi trên giống lan này.



Hình 4 Phôi soma lan *Dendrobium* Caesar White

A. Phôi hình tim; B. Phôi nảy mầm

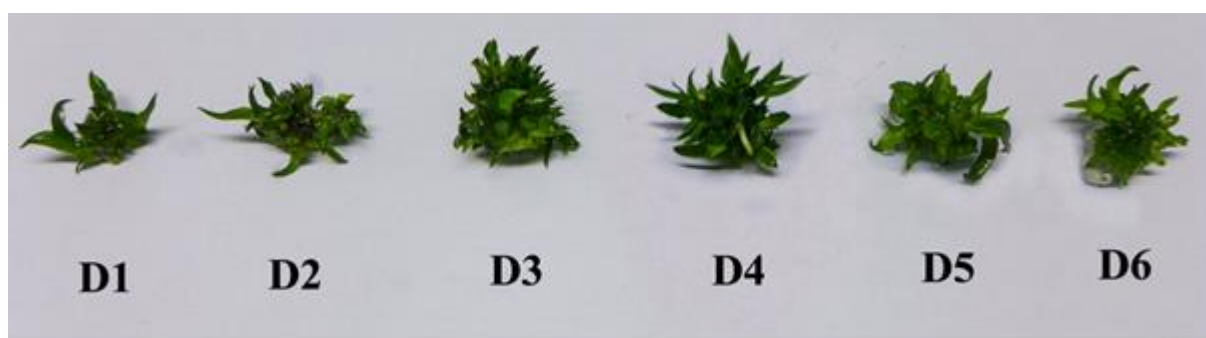
3.3. Ảnh hưởng của nồng độ BA và IBA đến khả năng tái sinh chồi từ phôi soma

Kết quả nghiên cứu cho thấy 100% mẫu cấy đều hình thành chồi, trong đó nghiệm thức môi trường Knudson C có bổ sung 2 mg/l BA và 0,5 mg/l IBA cho số lượng chồi cao nhất (13,48 chồi/mẫu), cụm chồi xanh, các chồi tách nhau rõ ràng, có từ hai đến ba lá, thân chồi phát triển tốt, có sự xuất hiện của rễ. Khi tăng nồng độ BA lên 2,5 mg/l và giữ nguyên nồng độ 0,5 mg/l IBA, số lượng chồi hình thành là 13,18 chồi/mẫu, số chồi không có sự khác biệt so với nghiệm thức D4 (2 mg/l BA + 0,5 mg/l IBA).

Tuy nhiên, ở nghiệm thức bổ sung 3 mg/l BA và 0,5 mg/l IBA, số chồi/mẫu giảm rõ rệt, chỉ còn 7,81 chồi/mẫu. Chỉ có một số chồi có thân chồi vươn cao, mang hai đến ba lá, còn lại vẫn là một khối hình thành lá mầm nhỏ và ngắn, chưa phát triển thành chồi hoàn chỉnh. Ở các nghiệm thức D1, D2, D3 bên cạnh việc hình thành chồi, mẫu cấy có xuất hiện các protocorm phía dưới các chồi, đặc biệt là ở nghiệm thức D2 (1 mg/l BA + 0,5 mg/l IBA) một lượng lớn protocorm được hình thành, mẫu cấy rất dễ tách rời. Số chồi/mẫu lần lượt đạt 3,81 chồi/mẫu ở nghiệm thức D1 (0,5 mg/l BA và 0,5 mg/l IBA), nghiệm thức D2 là 5,17 chồi/mẫu và D3 là 10,56 chồi/mẫu. Các chồi đều xanh và phát triển tốt trên môi trường.

Bảng 4. Số lượng chồi hình thành từ phôi soma lan *Dendrobium* Caesar White sau 60 ngày nuôi cấy

Nghiệm thức	Môi trường	BA (mg/l)	IBA (mg/l)	Số chồi/mẫu
D1	KC	0,5	0,5	3,81 0,39 ^e
D2	KC	1,0	0,5	5,17 0,13 ^d
D3	KC	1,5	0,5	10,56 0,40 ^b
D4	KC	2,0	0,5	13,48 0,34 ^a
D5	KC	2,5	0,5	13,18 0,06 ^a
D6	KC	3,0	0,5	7,81 0,53 ^c
CV (%)				3,87



Hình 5 Chồi lan *Dendrobium* Caesar White sau 60 ngày nuôi cấy

D1: KC + 0,5 mg/l BA + 0,5 mg/l IBA D4: KC + 2,0 mg/l BA + 0,5 mg/l IBA

D2: KC + 1,0 mg/l BA + 0,5 mg/l IBA D5: KC + 2,5 mg/l BA + 0,5 mg/l IBA

D3: KC + 1,5 mg/l BA + 0,5 mg/l IBA D6: KC + 3,0 mg/l BA + 0,5 mg/l IBA

4. KẾT LUẬN

Thời gian xử lý mẫu đốt thân *Dendrobium* Caesar White và *Dendrobium* Uraiwan với Javel 30% trong 20 phút cho hiệu quả tốt, tỉ lệ mẫu sống và sạch nấm, khuẩn cao: *Dendrobium* Caesar White - 77,78%; *Dendrobium* Uraiwan - 72,22%

Môi trường Knudson C chứa 2 mg/l BA và 0,5 mg/l NAA cho phát sinh chồi từ chồi ngủ tốt nhất ở giống *Dendrobium* Caesar White, với chiều cao 3,25 cm phù hợp cho thí nghiệm tạo phôi.

Môi trường Knudson C chứa 2 mg/l BA và 0,5 mg/l NAA cho số chồi phát sinh trên một mẫu tốt (1,56 chồi) và chiều cao chồi trung bình là 2,39 cm đối với giống lan *Dendrobium* Uraiwan.

Môi trường Knudson C bổ sung 20% nước dừa và 1,5 mg/l BA kết hợp 0,3 mg/l NAA cho tỉ lệ tạo phôi soma trực tiếp từ chồi *in vitro* ở giống lan *Dendrobium* Caesar White đạt 77,78%.

Môi trường Knudson C chứa 1,5 mg/l BA kết hợp 0,3 mg/l NAA bổ sung thêm 20% nước dừa không cho kết quả cảm ứng tạo phôi soma trực tiếp đối với giống *Dendrobium* Uraiwan.

Môi trường Knudson C bổ sung 2 mg/l BA kết hợp 0,5 mg/l IBA, 15% nước dừa, 0,5 g/l than hoạt tính cho 100% mẫu phôi tái sinh thành chồi, số chồi/mẫu đạt 13,48 chồi.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bùi Trang Việt. 2000. Phát triển. *Sinh lý thực vật đại cương*. Nhà xuất bản Đại học Quốc gia Tp. Hồ Chí Minh.
2. Chung H. H., Tsung J., and Chang W.C. 2005. Cytokinins induce direct somatic embryogenesis of *Dendrobium* *Chiangmai* Pink and subsequent plant regeneration. *In vitro Cell. Dev. Biol-Plant* 41: 765-769.

3. Chung H. H., Tsung J., and Chang W.C. 2007. Plant regeneration through direct somatic embryogenesis from leaf explants of *Dendrobium*. *Biologia Plantarum* 51 (2): 346-350.
4. Dương Tấn Nhựt, Hồng Ngọc Trâm, Nguyễn Phúc Huy, Đinh Văn Khiêm. 2009. Ảnh hưởng của nước dừa và sucroza lên sự tăng sinh mô sẹo và sự hình thành phôi vô tính ở loài lan hồ điệp [*Phalaenopsis Amabilis* (L.) Blume]. *Tạp chí sinh học* 31: 77-84
5. Dương Công Kiên. 2002. *Nuôi cấy mô thực vật*. Nhà xuất bản Đại học Quốc Gia Tp. Hồ Chí Minh.
6. Dương Tấn Nhựt. 2011. *Công nghệ sinh học thực vật: Nghiên cứu cơ bản và ứng dụng*. Nhà xuất bản Nông nghiệp.
7. Edwin F. George. 1993. *Plant Propagation by Tissue Culture*. Exegetics Ltd., Edington, Wilts. BA13 4QG, England.
8. Mai Xuân Lương. 2005. *Giáo trình Công nghệ sinh học Thực vật*. Đại học Đà Lạt.
9. Nguyễn Bảo Toàn. 2010. *Giáo trình nuôi cấy mô và tế bào thực vật*. Nhà xuất bản Đại học Cần Thơ.
10. Nguyễn Đức Lượng, Lê Thị Thuỷ Tiên. 2002. *Công nghệ tế bào*. Nhà xuất bản Đại học Quốc gia Tp. Hồ Chí Minh.
11. Pyati A.N, Murthy H.N, Halhm E.J & Pack K.Y. 2002. *In vitro* propagation of *Dendrobium macrostachyum* Lindl. - A threatened orchid. *Indian Journal of Experimental Biology*: 620-623
12. Trần Thị Dung. 2003. *Bài giảng nuôi cấy mô tế bào thực vật*. Trường Đại học Nông Lâm Tp. Hồ Chí Minh.
13. Trần Văn Minh. 1999. *Giáo trình Công nghệ sinh học Thực vật*. Viện sinh học nhiệt đới.

TẠO DÒNG PLAMID TÁI TỔ HỢP MANG TRÌNH TỰ MONODON BACULOVIRUS

Huỳnh Đăng Sang¹, Bùi Hoài Thu¹,
Phạm Thị Hồng Phi¹, Huỳnh Thanh Trúc¹

ABSTRACT

Stunt disease in shrimp caused by monodon baculovirus, is one of the dangerous diseases causing major damage to the farmers. PCR is known as a method that detect quickly and precisely this virus. This research was conducted with the purpose of cloning a recombinant plasmid containing MBV sequence to build up positive control for PCR assay. The amplicon that stem from PCR with primers 261F and 261R was inserted into the plasmid pGEM-Teasy. Then, the recombinant vector was transformed into *E. coli* DH5 α and cultured on selective media with LB / X-gal / IPTG / ampicillin. Some white colonies were checked the presence of the target sequence with the pair of primers MBVF/MBVR and SP6/M13. Results of sequencing amplicon formed by PCR with primers SP6/M13 successful confirmed cloning plasmids carrying MBV sequence. The concentration of plasmid was 170 ng/ μ l, equally $1,3 \times 10^{10}$ copy/ μ l. This plasmid could be utilised as a positive control in PCR assay for MBV detection.

TÓM TẮT

Bệnh còi trên tôm do Monodon baculovirus gây ra, là một trong những bệnh nguy hiểm gây thiệt hại lớn cho người nuôi. Kỹ thuật PCR được biết đến như là một phương pháp phát hiện nhanh chóng và chính xác tác nhân gây bệnh này. Đề tài này được thực hiện với mục đích xây dựng dòng plasmid tái tổ hợp để làm chuẩn đối chứng dương cho phản ứng PCR. Sản phẩm khuếch đại với cặp mồi 261F và 261R được chèn vào plasmid pGEM-Teasy. Sau đó, vec-tơ tái tổ hợp được biến nạp vào vi khuẩn *E. coli* DH5 α và được cấy trang trên môi trường chọn lọc LB/X-gal/IPTG/Ampicillin. Các dòng khuẩn lạc màu trắng đã được kiểm tra sự hiện diện của trình tự đích với cặp mồi MBVF/MBVR và SP6/M13. Kết quả giải trình tự với cặp mồi SP6/M13 đã khẳng định nghiên cứu đã tạo dòng thành công plasmid mang trình tự MBV. Kết quả đo OD dòng plasmid này có nồng độ 170 ng/ μ l và tương ứng với $1,3 \times 10^{10}$ bản sao/ μ l. Dòng plasmid này sẽ được sử dụng làm đối chứng dương cho phản ứng PCR phát hiện MBV.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Bệnh còi trên tôm sú (*Penaeus monodon*) và tôm thẻ chân trắng (*Litopenaeus vannamei*) do Monodon baculovirus (MBV) gây ra, là một trong những dịch bệnh nguy hiểm cho nghề nuôi tôm. Vi-rút thường gây bệnh trên tôm sú ở giai đoạn tôm ấu trùng (hatchery-reared larval), tôm hậu ấu trùng (postlarval) và tôm đang lớn (juvenile) (Lightner và ctv, 1983). Bệnh còi không gây tôm chết ồ ạt nhưng làm cho tôm chậm lớn. Cơ quan quốc tế về dịch bệnh động vật (năm 2003) đã xếp MBV vào danh sách các tác nhân gây bệnh đứng thứ 2 trên tôm (OIE, 2003). MBV đã ghi nhận tại nhiều khu vực trên thế giới như Australia, Đông Á, Đông Nam Á, Ấn Độ, Đông Phi, Bắc Mỹ và Trung Đông (Lightner, 1996). Vì MBV chưa có thuốc đặc trị nên nhu cầu kiểm tra tôm bố mẹ, tôm giống sạch vi-rút gây bệnh còi trước khi thả nuôi là một vấn đề quan trọng, đang được nhiều công ty và người nuôi tôm quan tâm. Kỹ thuật PCR được biết đến là một phương pháp có độ nhạy và độ chính xác cao trong việc chẩn đoán MBV (Huỳnh Đăng Sang và ctv, 2013, Win và ctv, 2005). Khi thiết lập phản ứng PCR, chuẩn đối chứng dương rất cần thiết để kiểm soát quá trình thao tác. Vì vậy, nghiên cứu này

¹ Đại học Nông Lâm TP. Hồ Chí Minh

tập trung tạo dòng plasmid mang trình tự MBV nhằm tạo chuẩn đối chứng dương cho phản ứng PCR trong chẩn đoán MBV.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Vật liệu

Mẫu tôm nghi ngờ nhiễm với MBV được chuyển giao từ đề tài nghiên cứu của Huỳnh Dang Sang và ctv (2013). Dòng vi khuẩn *E.coli* DH5 α khả nạp được chuyển giao từ đề tài nghiên cứu của Bùi Cách Tuyến và ctv (2014)

2.2. Phương pháp

2.2.1. Ly trích DNA và thực hiện PCR

Mẫu tôm được ly trích DNA theo hướng dẫn của hãng Biobasic. DNA tổng số được sử dụng làm khuôn cho phản ứng PCR với cặp mồi đặc hiệu cho vi-rút theo nghiên cứu của Huỳnh Dang Sang và ctv (2013).

2.2.2. Tạo và biến nạp vec-tơ tái tổ hợp vào vi khuẩn *E.coli* DH5 α

Sản phẩm khuếch đại dương tính với MBV được chèn vào vec-tơ pGEM – T theo quy trình hướng dẫn của hãng Promega. Vec-tơ tái tổ hợp được biến nạp vào tế bào chủ *E.coli* DH5 α dựa trên nghiên cứu của Bùi Cách Tuyến và ctv (2014). Sau khi biến nạp, dịch huyền phù vi khuẩn được hành cấy trang trên đĩa môi trường LB thạch có Ampicillin/X-gal/IPTG và ủ ở 37 $^{\circ}$ C từ 14 – 16 tiếng.

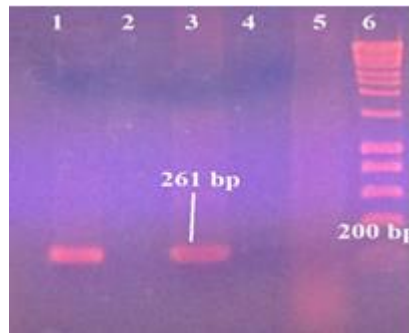
2.2.3. Kiểm tra kết quả biến nạp

Dịch huyền phù của các khuẩn lạc màu trắng đã được kiểm tra với cặp mồi l261F/261R bằng PCR. Bên cạnh đó, cặp mồi SP6 (trình tự 5' GTAAAACGACGGCCAGT 3') và M13 (trình tự 5' TATTTAGGTGACACTATAG 3') có vị trí bắt cặp nằm trên plasmid cũng đã được sử dụng để chạy PCR với dịch huyền phù nhằm khẳng định chính xác sự hiện diện của vec-tơ tái tổ hợp trong các dòng vi khuẩn *E.coli* DH5 α màu trắng. Mỗi phản ứng PCR chứa 25 μ l với các thành phần phản ứng sau: Master Mix (hãng Bioline), 0,3 μ M cho mỗi mồi. Chu trình nhiệt cho phản ứng PCR gồm 94 $^{\circ}$ C trong 5 phút, 35 chu kì ở 94 $^{\circ}$ C 1 phút, 50 $^{\circ}$ C 1 phút, 72 $^{\circ}$ C 1 phút và kết thúc ở 72 $^{\circ}$ C trong 5 phút. Hơn thế nữa, sản phẩm khuếch đại với cặp Sp6 và M13 còn được giải trình tự và so sánh độ tương đồng với các trình tự MBV đã công bố bằng công cụ Blast trên cơ sở dữ liệu NCBI.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả sàng lọc sản phẩm khuếch đại dương tính

Kết quả thực hiện PCR và điện di cho thấy trong số 4 mẫu tôm có triệu chứng chậm lớn được cung cấp với Huỳnh Dang Sang và ctv (2013) chỉ có 2 mẫu xuất hiện băng đích 261 bp (giếng số 1 và 3) và 2 mẫu không có băng (giếng số 2 và 4). Như vậy mẫu tôm ở giếng số 1 và số 3 đã nhiễm MBV trong khi đó mẫu tôm ở giếng số 2 và 4 mặc dù có đặc điểm chậm lớn nhưng không phải do nhiễm MBV. Kết quả kiểm tra này phù hợp với nghiên cứu của Win và ctv (2005) khi tác giả phát triển quy trình phát hiện chính xác MBV với cặp mồi 261F/261R. Sản phẩm PCR dương tính với MBV tiếp tục được sử dụng để tạo vec-tơ tái tổ hợp với plasmid pGEM-Teasy.

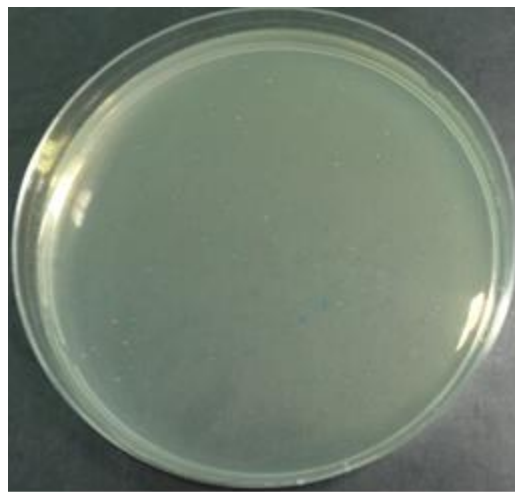


Hình 1. Kết quả điện di sản phẩm PCR với cặp mồi 261F/261R

Giếng 1 đến 4: các mẫu tôm, 5: mẫu âm, 6: thang DNA 100 bp

3.2. Kết quả tạo dòng plasmid tái tổ hợp

Sau khi tạo và biến nạp vec-tơ tái tổ hợp vào tế bào chủ *E.coli* DH5 α , dịch vi khuẩn được cấy trang trên môi trường thạch LB có chứa Ampicillin/X-gal/IPTG. Đĩa khuẩn lạc nuôi cấy xuất hiện đồng thời cả khuẩn lạc trắng và khuẩn lạc xanh. Khuẩn lạc trắng nghi ngờ có mang vec-tơ tái tổ hợp chứa trình tự đích trong khi đó khuẩn lạc xanh chỉ mang đơn thuần mang plasmid pGEM-Teasy.



Hình 2. Đĩa khuẩn lạc trắng xanh trên môi trường thạch LB có chứa Ampicillin/X-gal/IPTG

Từ đĩa nuôi cấy, 8 dòng khuẩn lạc màu trắng nghi ngờ có mang vec-tơ tái tổ hợp đã được chọn để kiểm tra bằng PCR với cặp mồi 261R và 261F. Kết quả điện di thể hiện trong 9 dòng khuẩn lạc trắng được chọn chỉ có duy nhất 1 dòng có khả năng mang trình tự MBV khi xuất hiện băng đích 261 bp (giếng số 8, hình 3). 8 dòng khuẩn lạc còn lại mặc dù có chứa vec-tơ tái tổ hợp nhưng không chứa trình tự MBV. Nguyên nhân có thể là sự tạp nhiễm các dòng vi khuẩn có mang vec-tơ tái tổ hợp từ môi trường xung quanh. Như vậy, kết quả sàng lọc trắng xanh thu nhận được 1 dòng duy nhất khuẩn lạc *E.coli* DH5 α mang có khả năng mang trình tự MBV. Dòng khuẩn lạc này được tăng sinh trong môi trường LB có bổ sung kháng

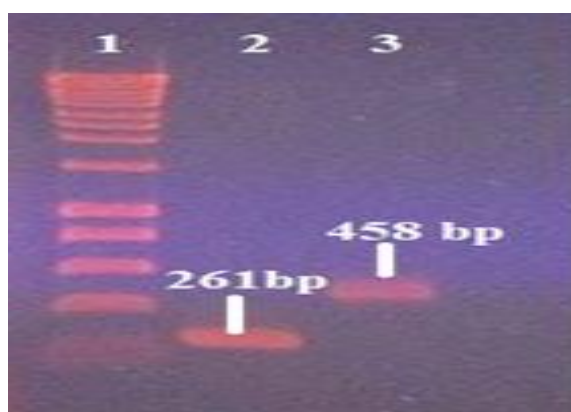
sinh, sau đó được ly trích plasmid và tiếp tục khẳng định lại bằng phản ứng PCR với môi 261F/261R và SP6/M13.



Hình 3. Kết quả kiểm tra các dòng khuẩn lạc trắng với cặp môi 261F và 261R

Giếng 1: thang DNA, giếng 2 đến 9: các dòng khuẩn lạc trắng

Khả năng thu nhận thành công plasmid mang trình tự của MBV là rất công khi khẳng định lại bằng phương pháp PCR với môi 261F/261R và SP6/M13. Dòng plasmid đã hình thành sản phẩm khuếch đại 261 bp khi thực hiện với cặp môi 261F/261R (giếng 1, hình 4). Kết quả này hoàn toàn tương ứng với các nghiên cứu của Win và ctv (2005), Huỳnh Đăng Sang và ctv (2013), cặp môi 261F/261R là cặp môi chuyên biệt với MBV và sẽ hình thành sản phẩm khuếch đại 261 bp nếu như DNA khuôn có trình tự của MBV. Như vậy, plasmid ly trích có trình tự của MBV. Hơn thế nữa, cặp môi SP6/M13 cũng đã được sử dụng để kiểm tra plasmid. Kết quả điện di cho thấy kết quả khuếch đại có kích thước khoảng 458 bp (giếng 2, hình 4). Theo Huỳnh Thanh Trúc (2014), cặp môi SP6/M13 có vị trí bắt cặp nằm trên plasmid pGEM-Teasy và khoảng cách từ vị trí bắt cặp của SP6 đến vị trí bắt cặp của M13 là 197 bp. Vùng trình tự được khuếch đại bởi cặp môi SP6/M13 còn chứa vị trí chèn của trình tự đích nên kích thước của sẽ phẩm khuếch đại sẽ bao gồm 1 phần trình tự của plasmid và trình tự đích chèn vào plasmid. Như vậy, với kích thước sản phẩm khuếch đại 458 bp, nghiên cứu này lại một lần nữa khẳng định plasmid thu được chắc chắn có mang vùng trình tự 261 bp của MBV.



Hình 4. Kết quả điện di sau khi kiểm tra plasmid với cặp môi 261F/261R và SP6/M13

Giếng 1: ladder 1kb, 2: sản phẩm PCR với cặp môi 261F/261R, 3: sản phẩm PCR với cặp môi SP6/M13.

Phương pháp giải trình tự đã được sử dụng để khẳng định lần cuối plasmid thu được có mang chính xác trình tự của MBV. Sản phẩm khuếch đại của plasmid với cặp mồi SP6/M13 đã được giải trình tự mạch xuôi và mạch ngược. Sau khi tiến hành so sánh độ tương đồng của trình tự khuếch đại với các trình tự đã công bố bằng công cụ BLAST, sản phẩm khuếch đại có độ tương đồng rất cao (99%) với trình tự MBV với mã số truy cập KJ184318.1 (Hình 5). Như vậy, nghiên cứu này đã thu nhận thành công dòng plasmid có mang trình tự của MBV. Kết quả đo OD dòng plasmid này có nồng độ 40 ng/μl và tương ứng với $1,13 \times 10^{10}$ bản sao/μl. Plasmid này sẽ được sử dụng làm đối chứng dương trong quy trình phát hiện MBV. Hơn thế nữa, dòng vi khuẩn *E.coli* DH5α có mang véc-tơ tái tổ hợp cũng đã được thu nhận và trữ ở tủ đông -70°C

Penaeus monodon nudivirus, complete genome
Sequence ID: [gb|KJ184318.1](#) Length: 119638 Number of Matches: 1

Range 1: 27376 to 27642 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
481 bits(260)	5e-132	265/267(99%)	1/267(0%)	Plus/Plus
Query 103	AATCCTAGGCGATCTTACCAATACATTTCTATCATAACACGTATCATGAACAACCTTAT	162		
Sbjct 27376	AATCCTAGGCGATCTTACCAATACATTTCTATCATAACACGTATCATGAACAACCTTAT	27435		
Query 163	CAATAAAAGAGGATTTACTATCTATCCAGATGCTTTATTCATGATCATTATTATAAATAC	222		
Sbjct 27436	CAATAAAAGAGGATTTACTATCTATCCAGATGCTTTATTCATGATCATTATTATAAATAC	27495		
Query 223	ACTCATGAGTTCAACACTTCCGACTCTTAAGGGGTCAATCAATATGAATTCTATTGAATC	282		
Sbjct 27496	ACTCATGAGTTCAACACTTCCGACTCTTAAGGGGTCAATCAATATGAATTCTATTGAATC	27555		
Query 283	TATGCTCTTACATGCGCTGATCGAAATGATGGTTAGTATTACAACAAATGAACTGGATAA	342		
Sbjct 27556	TATGCTCTTACATGCGCTGATCGAAATGATGGTTAGTATTACAACAAATGAACTGGATAA	27615		
Query 343	GGAGATGTTTCATCAACGAACG-AATCA 368			
Sbjct 27616	GGAAATGTTTCATCAACGAACGCAATCA 27642			

Hình 5. So sánh độ tương đồng của trình tự khuếch đại bằng cặp mồi SP6/M13 với trình tự MBV có mã số KJ184318.1

4. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

Nghiên cứu đã tạo và giữ dòng thành công dòng plasmid tái tổ hợp mang trình tự MBV. Dòng plasmid này sẽ được sử dụng làm đối chứng dương trong chẩn đoán bệnh còi trên tôm bố mẹ và tôm giống bằng phương pháp PCR nhằm đảm bảo chất lượng nguồn giống trước khi thả nuôi tôm. Nghiên cứu này đã tạo nên tiền đề cho các nghiên cứu định lượng MBV bằng phương pháp real-time PCR dựa trên dòng plasmid được tạo ra.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bùi Cách Tuyến, Đinh Thành Phước, Phạm Thị Anh Thư, Huỳnh Văn Biết, (2014). Tách dòng, tạo plasmit mang gen EPSPS ứng dụng cho phát hiện định lượng đậu nành (*Glycine max* L.) chuyển gen kháng thuốc diệt cỏ Glyphosate bằng kỹ thuật Real-time. Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn, số 244, trang 13-20.
2. Huynh Dang Sang, Ho Thi Bich Tram, Bao Thi Xuan Huong, Huynh Tan Phi, Le Dinh Don. 2013. Study to detect Monodon Baculovirus in black tiger shrimp *Penaeus monodon* by PCR assay. *Journal of Agricultural Science and Technology – Vietnam*, 4:135-138

3. Huỳnh Thanh Trúc. 2014. Cải tiến quy trình phát hiện Yellow head virus bằng kỹ thuật sinh học phân tử. Khóa luận tốt nghiệp chuyên ngành Công nghệ sinh học – Đại học Nông Lâm Tp. HCM
4. Lightner, D.V., 1996. A handbook of Shrimp Pathology and Diagnostic Procedures for Diseases of Cultured Penaeid Shrimp. World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA, p. 304.
5. Lightner, D.V., Redman, R.M., Bell, T.A., 1983. Observations on the geographic distribution, pathogenesis and morphology of the baculovirus from *Penaeus monodon* fabricius. *Aquaculture* 32, 209– 233.
6. OIE, 2003. Spherical Baculovirosis Chapter 4.1.5. Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals. Office International Epizooties, Paris, France, p. 319– 330.
7. Win Surachetpong, Bonnie T. Poulos, Kathy F.J. Tang, Donald V. Lightner. 2005. Improvement of PCR method for the detection of monodon baculovirus (MBV) in penaeid shrimp. *Aquaculture* 249: 69– 75.

ĐÁNH GIÁ HIỆU QUẢ CỦA CHẾ PHẨM VI NẤM TRONG PHÒNG TRỪ TUYẾN TRÙNG *MELOIDOGYNE INCOGNITA* GÂY BỆNH VÀNG LÁ CHẾT CHẬM CÂY HỒ TIÊU TẠI BUÔN MA THUỘT

Tô Thị Mỹ Linh¹, Nông Văn Mậu¹, Phạm Ngọc Cường¹,
Trần Thị Hàng Ni¹, Hồ Tô Huyền Nga¹, Đỗ Thị Kiều An¹

ABSTRACT

In order to evaluate the effect of two micro-fungi formulations (CP1 and CP2) in controlling *Meloidogyne* spp. on black pepper plants, one field experiment was conducted. The experiment included 7 treatments, with 3 replications. The effects of the two formulations in all treatments towards the nematode *Meloidogyne* spp. were slow but stable and gradually increased. In contrast, the product Tervigo 20SC showed quick and high effects on *Meloidogyne* spp. but did not remain stable after being treated for two months. Among treatments, CT4, CT5 and CT6 showed highest effects on the density of *Meloidogyne* spp. on black pepper roots and in soil. This had led to the decline in the yellowing leaf disease incidence and severity caused by *Meloidogyne* spp. .

Key words: biological control, black pepper, *Meloidogyne* spp. , microfungi formulation.

TÓM TẮT

Nhằm đánh giá hiệu lực của 2 chế phẩm vi nấm (CP1 và CP2) trong việc kiểm soát tuyến trùng *Meloidogyne* spp. gây bệnh vàng lá chết chậm cây hồ tiêu, một thí nghiệm theo kiểu khối đầy đủ ngẫu nhiên gồm 8 công thức với 3 lần lặp lại đã được tiến hành trên vườn tiêu kinh doanh trồng trên đất đỏ bazan tại thành phố Buôn Ma Thuột. Các chế phẩm thử nghiệm tuy chậm phát huy hiệu quả trong việc tiêu diệt tuyến trùng và làm giảm tỷ lệ bệnh, chỉ số bệnh vàng lá nhưng hiệu lực kéo dài và bền vững. Trong số các công thức xử lý chế phẩm, các công thức CT4 (45gCP2), CT5 (15g CP1+15g CP2) và CT6 (22,5gCP1 + 22,5g CP2) đem lại hiệu quả làm giảm mật độ tuyến trùng *Meloidogyne* spp. tốt nhất. Hiệu quả diệt tuyến trùng *Meloidogyne* spp. của các công thức này lần lượt là 79,2%; 81,0% và 82,8% trong rễ và 78,1%; 82,3% và 83,2 % trong đất. Điều này dẫn đến làm giảm tỷ lệ bệnh và chỉ số bệnh vàng lá chết chậm do tuyến trùng gây ra. Sau 4 tháng xử lý, tỷ lệ bệnh ở CT6 đã giảm 2,7 lần và chỉ số bệnh đã giảm 6,1 lần so với trước xử lý.

Từ khóa: chế phẩm vi nấm, hồ tiêu, *Meloidogyne* spp. , phòng trừ sinh học, tuyến trùng.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Hồ tiêu (*Piper nigrum* L.) là cây công nghiệp dài ngày có giá trị kinh tế cao, được trồng ở nhiều nơi và có giá trị xuất khẩu cao trên thế giới. Hiện nay, cả nước có trên 85.000 ha trồng hồ tiêu và được trồng nhiều ở các tỉnh Bình Phước, Đồng Nai, Gia Lai, Đắk Lắk, Đắk Nông và Bà Rịa Vũng Tàu (Hiệp hội hồ tiêu Việt Nam, 2015). Tuy nhiên, sản xuất hồ tiêu tại tất cả các vùng trồng tiêu chính trong cả nước hiện đang chịu tổn thất đáng kể do bị bệnh vàng lá chết chậm mà một trong những nguyên nhân gây bệnh chủ yếu là tuyến trùng nốt sần *Meloidogyne inognita* (Đào Thị Lan Hoa và cộng sự, 2003; Trinh, 2010).

Meloidogyne là nhóm tuyến trùng phân bố rộng khắp thế giới, kí sinh trên nhiều loại cây trồng ở các vùng khí hậu khác nhau và gây thiệt hại nặng về mặt kinh tế cho cây hồ tiêu (Trinh, 2010, Koshyet *al.* 2005). Biện pháp phòng trừ tuyến trùng chủ yếu hiện nay là sử dụng một số loại thuốc hóa học đặc hiệu chứa các hoạt chất như Ethoprophos, Carbosulfan, Benfuracarb.... Các loại thuốc hóa học tuy hiệu quả trong việc làm giảm mật độ tuyến trùng

¹ Trường Đại học Tây Nguyên

trong đất và rễ tiêu nhưng vườn cây vẫn bị bệnh và phải áp dụng thuốc cho các năm tiếp theo. Việc sử dụng thuốc liên tục sẽ dẫn đến hiện tượng kháng thuốc, mất cân bằng hệ sinh vật và vi sinh vật đất, dễ dẫn đến hiện tượng bộc phát các dịch bệnh khác và đặc biệt là ảnh hưởng môi trường và tồn dư thuốc trong nông sản.

Gần đây, Nguyễn Văn Nam và cộng sự (2014) đã nghiên cứu và ứng dụng chế phẩm vi nấm CP1 và CP2 trong phòng trừ bệnh vàng lá chết chậm do tuyến trùng *Meloidogynespp.* và *Pratylenchus coffeaegây* bệnh vàng lá cây cà phê với hiệu quả diệt tuyến trùng của các chế phẩm này lên đến gần 80%. Mà *M. incognita* là một trong những tác nhân chính gây bệnh vàng lá chết chậm cây hồ tiêu (Đào Thị Lan Hoa và cộng sự, 2003; Trinh, 2010). Chính vì vậy, chúng tôi đã tiến hành một thử nghiệm đồng ruộng nhằm thử khả năng phòng trừ bệnh vàng lá chết chậm của các chế phẩm này trong vườn hồ tiêu trồng trên đất đỏ bazan tại thành phố Buôn Ma Thuột.

2. MỤC TIÊU, NỘI DUNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Mục tiêu nghiên cứu

Đề tài được thực hiện nhằm mục tiêu đánh giá hiệu quả của hai chế phẩm vi nấm CP1 và CP2 trong việc kiểm soát tuyến trùng *Meloidogyne spp.* gây bệnh vàng lá chết chậm cây hồ tiêu kinh doanh trồng trên đất đỏ bazan tại thành phố Buôn Ma Thuột.

2.2. Nội dung nghiên cứu

Hiệu quả của hai chế phẩm vi nấm CP1 và CP2 trong việc kiểm soát tuyến trùng *Meloidogyne spp.* gây bệnh vàng lá chết chậm cây hồ tiêu

2.3. Đối tượng nghiên cứu

- Chế phẩm CP1: *Peacilomyces* P6, *Metarhizium* M8, *Beauveria* B2 (mật độ bào tử: $\times 10^8$ cfu/g chế phẩm) + vi lượng (Fe, Zn, B) + Acid Humic
- Chế phẩm CP2: Vi nấm *Trichoderma* T3, T8, T11, T15 (mật độ bào tử: $\times 10^8$ cfu/g chế phẩm) + vi lượng (Fe, Zn, B) + Acid Humic
- Cây hồ tiêu giai đoạn kinh doanh trồng trên đất đỏ bazan tại thành phố Buôn Ma Thuột.

2.4. Phương pháp nghiên cứu

2.4.1. Phương pháp bố trí thí nghiệm

Thí nghiệm được tiến hành trong mùa mưa (từ tháng 5 đến cuối tháng 8) năm 2015, trên vườn tiêu kinh doanh trồng trên đất đỏ bazan tại thành phố Buôn Ma Thuột, tỉnh Đắk Lắk. Thí nghiệm được bố trí theo kiểu khối đầy đủ ngẫu nhiên, gồm 8 công thức với 3 lần nhắc lại, 6 trụ tiêu/ô cơ sở. Các công thức thí nghiệm như sau: CT1: 30g CP1/trụ; CT2: 45g CP1/trụ; CT3: 30g CP2/trụ; CT4: 45g CP2; CT5: (15g CP1 + 15g CP2)/trụ; CT6: (22,5g CP1 + 22,5g CP2)/trụ; CT7: 5ml Tervigo 20SC/trụ; CT8: Đối chứng (nước lã).

Chế phẩm được xử lý lần 1 vào đầu mùa mưa và lần 2 cách lần đầu 1 tháng. Chế phẩm được hoà tan vào 4L nước sạch và tưới vào đất ở vị trí gốc xung quanh trụ tiêu.

2.4.2. Chỉ tiêu theo dõi

- Tỷ lệ cây vàng lá (TLVL): $TLVL(\%) = \frac{\text{Tổng số cây vàng lá}}{\text{Tổng số cây theo dõi}} \times 100$

- Chỉ số bệnh (CSB): tính theo công thức của Townsend- Heuberger

$$CSB(\%) = \frac{9n_9 + 7n_7 + 5n_5 + 3n_3 + 1n_1}{9N} \times 100$$

N: Tổng số cây điều tra

n_0 : Số cây không bị nhiễm bệnh

n_1 : Số cây bị nhiễm bệnh cấp 1: <25% số lá trên cây bị vàng, rụng.

n_3 : Số cây bị nhiễm bệnh cấp 3: 25 - 50% số lá trên cây bị vàng, rụng.

n_5 : Số cây bị nhiễm bệnh cấp 5: >50 - 75 % số lá trên cây bị vàng, rụng.

n_7 : Số cây bị nhiễm bệnh cấp 7: >75 - 90 % số lá trên cây bị vàng, rụng.

n_9 : Số cây bị nhiễm bệnh cấp 9: >90 % số lá trên cây bị vàng, rụng tới chết cây.

- Thành phần và mật độ tuyến trùng trong rễ (con/5 g rễ)

- Thành phần và mật độ tuyến trùng trong đất (con/50 g đất)

- Hiệu lực (HL%) của các công thức xử lý đối với tuyến trùng: tính theo công thức

Henderson-Tilton: $HL(\%) = \left(1 - \frac{(T_a \times C_b)}{T_b \times C_a}\right) \times 100$

T_a : Mật số loài tuyến trùng ở công thức xử lý sau xử lý

T_b : Mật số loài tuyến trùng ở công thức xử lý trước thí nghiệm

C_a : Mật số loài tuyến trùng ở công thức đối chứng sau xử lý

C_b : Mật số loài tuyến trùng ở công thức đối chứng trước thí nghiệm.

2.4.3. Thời điểm điều tra

Các chỉ tiêu theo dõi được định kì điều tra: trước xử lý và 1, 2, 3 và 4 tháng sau xử lý.

2.4.4. Phương pháp xử lý số liệu

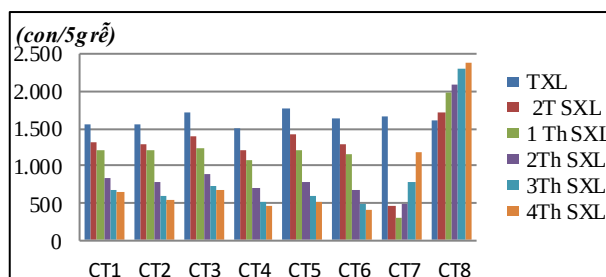
Số liệu thu thập được từ thí nghiệm được xử lý kết quả theo bảng ANOVA và xếp hạng Duncan bằng phần mềm SAS 9.1.3 Portable và Excel.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Ảnh hưởng của các công thức xử lý đến diễn biến mật độ tuyến trùng *Meloidogyne* spp.

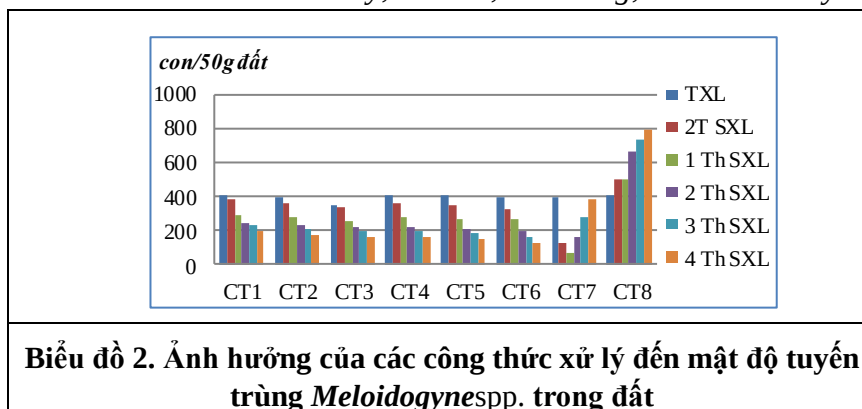
Sau xử lý, mật độ tuyến trùng *Meloidogyne* spp. cả trong rễ và trong đất ở tất cả các công thức (trừ đối chứng) đều giảm tuy mức độ giảm không giống nhau (biểu đồ 1 và 2). Đáng chú ý, tại thời điểm 2 tuần sau xử lý ở CT7, mật độ tuyến trùng trong rễ và trong đất lần lượt giảm đến 3,6 và 3,3 lần so với trước xử lý. Xu hướng giảm này còn kéo dài tới thời điểm 1 tháng sau xử lý và giảm đến 5,4 và 5,7 lần so với trước xử lý. Ở thời điểm 2 tháng sau xử lý, trong khi mật độ tuyến trùng *Meloidogyne* spp. ở các công thức sử dụng chế

phẩm vẫn tiếp tục giảm thì ở CT7, mật độ lại tăng nhẹ, tăng từ 304,4 con/5g rế lên 487,1 con/5g rế và từ 69,7 con/50g đất lên 156,3 con/50g đất và vẫn tiếp tục tăng cho đến khi kết thúc thí nghiệm. Các công thức sử dụng chế phẩm tuy làm giảm mật độ tuyến trùng *Meloidogynespp.* không nhanh và nhiều nhưng vẫn duy trì hiệu lực đến thời điểm kết thúc thí nghiệm (4 tháng sau xử lý). Đặc biệt, sau 4 tháng xử lý, mật độ *Meloidogyne spp.* ở CT6 giảm mạnh nhất, giảm gần 4 lần trong rế và 3,1 lần trong đất. Tuy nhiên, không có sự khác biệt có ý nghĩa về mật độ *Meloidogynespp.* giữa các công thức CT2, CT4, CT5 và CT6.



Biểu đồ 1. Ảnh hưởng của các công thức xử lý đến mật độ tuyến trùng *Meloidogynespp.* trong rế

Ghi chú: TXL: trước xử lý; T: tuần, Th: tháng; SXL: sau xử lý



Biểu đồ 2. Ảnh hưởng của các công thức xử lý đến mật độ tuyến trùng *Meloidogynespp.* trong đất

Ghi chú: TXL: trước xử lý; T: tuần, Th: tháng; SXL: sau xử lý

3.2. Hiệu quả tiêu diệt *Meloidogyne spp.* của các công thức thí nghiệm

Các công thức xử lý chế phẩm đều thể hiện hiệu quả diệt tuyến trùng *Meloidogyne spp.* tốt cả trong đất và rế. Hiệu quả của các chế phẩm tuy chậm phát huy nhưng đều kéo dài và tăng dần theo thời gian theo dõi (bảng 1). Ở thời điểm 2 tuần sau xử lý (SXL), hiệu quả diệt tuyến trùng của các công thức xử lý chế phẩm chỉ bằng khoảng 1/3-1/2 so với công thức CT7. Tuy nhiên, hiệu quả của chế phẩm lại tăng dần theo thời gian và đến thời điểm 3 tháng sau xử lý, hiệu quả của chúng đối với tuyến trùng *Meloidogyne spp.* đã cao hơn so với CT7 và đạt trên 65%. Sau xử lý 4 tháng, hiệu quả của các công thức xử lý chế phẩm đều đạt trên 70%. Sử dụng 45g CP2 (CT4) hoặc 15g CP1 + 15g CP2 (CT5) đem lại hiệu quả không khác biệt có ý nghĩa so với sử dụng 22,5g CP1 + 22,5g CP2 (CT6). Như vậy, để giảm chi phí nhưng vẫn đảm bảo hiệu quả làm giảm mật độ tuyến trùng *Meloidogyne spp.* trong đất và rế tiêu, có thể sử dụng 15g CP1 + 15g CP2/trụ tiêu (CT5).

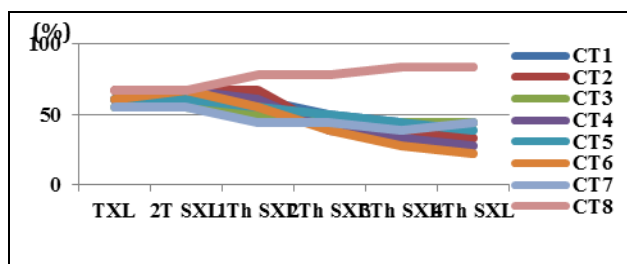
Bảng 1. Hiệu quả diệt tuyến trùng *Meloidogyne* spp. của các công thức xử lý

Công thức	Hiệu quả của các công thức xử lý đối với tuyến trùng <i>Meloidogyne</i> spp. (%)									
	2T SXL		1 Th SXL		2Th SXL		3Th SXL		4Th SXL	
	Trong rễ	Trong đất	Trong rễ	Trong đất	Trong rễ	Trong đất	Trong rễ	Trong đất	Trong rễ	Trong đất
CT1	19,6 ^d	21,2 ^b	36,1 ^c	40,0 ^b	57,6 ^d	61,4 ^b	68,7 ^{cd}	66,9 ^{bc}	71,8 ^d	73,9 ^b
CT2	20,9 ^{cd}	25,0 ^b	36,6 ^{bc}	41,8 ^b	60,4 ^{cd}	63,8 ^b	72,5 ^{bc}	69,6 ^{abc}	76,2 ^{bc}	76,5 ^{ab}
CT3	22,0 ^{bcd}	37,4 ^b	40,5 ^{bc}	53,0 ^b	59,7 ^d	69,3 ^{ab}	70,2 ^{cd}	74,7 ^{ab}	73,2 ^{cd}	80,2 ^{ab}
CT4	23,1 ^{bcd}	23,0 ^b	41,5 ^{bc}	40,4 ^b	64,1 ^{bc}	63,9 ^b	75,9 ^{ab}	71,1 ^{abc}	79,2 ^{ab}	78,1 ^{ab}
CT5	24,4 ^{bc}	35,5 ^b	43,2 ^b	50,8 ^b	65,8 ^b	70,7 ^{ab}	76,6 ^{ab}	76,5 ^a	81,0 ^a	82,3 ^a
CT6	25,8 ^b	33,6 ^b	42,1 ^{bc}	45,6 ^b	67,8 ^b	69,1 ^{ab}	78,5 ^a	76,8 ^a	82,8 ^a	83,2 ^a
CT7	74,0 ^a	76,4 ^a	84,9 ^a	86,4 ^a	77,2 ^a	76,9 ^a	66,3 ^d	62,7 ^c	51,3 ^e	52,7 ^c
CT8	0 ^e	0 ^c	0 ^d	0 ^c	0 ^e	0 ^c	0 ^e	0 ^d	0 ^f	0 ^d
CV (%)	18,3	31,3	18,7	22,3	13,8	19,4	14,0	17,8	13,1	16,5

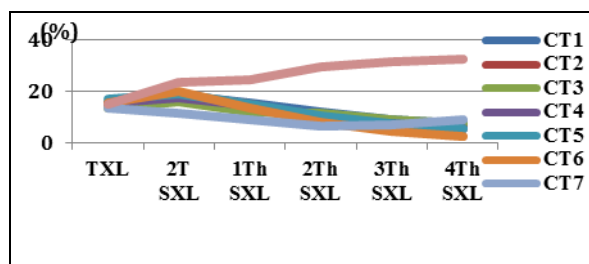
Ghi chú: các kí tự giống nhau theo hàng dọc thể hiện sự sai khác không có ý nghĩa về mặt thống kê ở mức $\alpha = 0,05$; T: tuần; Th: tháng; SXL: sau xử lý

3.3. Ảnh hưởng của các công thức thí nghiệm đến tỷ lệ bệnh và chỉ số bệnh vàng lá

Tỷ lệ bệnh giữa các công thức đã dần bắt đầu thể hiện sự khác biệt từ thời điểm sau xử lý 1 tháng. Trong khi tỷ lệ bệnh ở các công thức thí nghiệm đều giảm, tỷ lệ bệnh ở công thức đối chứng tăng lại tăng từ 66,7% đến 77,8% (biểu đồ 1). Ngoài ra, trong khi tỷ lệ bệnh ở công thức xử lý thuốc chỉ giảm đến thời điểm 3 tháng sau xử lý, ở các công thức xử lý chế phẩm, chỉ tiêu này lại giảm liên tục từ thời điểm 1 tháng sau xử lý đến khi kết thúc thí nghiệm. Đáng chú ý, sau xử lý 4 tháng, tỷ lệ bệnh ở CT6 thấp nhất và không khác biệt có ý nghĩa so với ở các công thức CT2 và CT4. Tỷ lệ bệnh ở công thức này đã giảm khoảng 3 lần so với thời điểm trước xử lý.



Biểu đồ 3. Ảnh hưởng của các công thức xử lý đến diễn biến tỷ lệ bệnh vàng lá do tuyến trùng



Biểu đồ 4. Ảnh hưởng của các công thức xử lý đến diễn biến chỉ số bệnh vàng lá do tuyến trùng

Trước khi xử lý, tuy tỷ lệ bệnh vàng lá chết chậm trong vườn khá cao nhưng bệnh không gây hại nặng, thể hiện ở chỉ số bệnh chỉ dao động trong khoảng 13,6 - 16,7%. Các cây bị nhiễm bệnh đa số chỉ ở mức cấp 1 và cấp 3. Sau xử lý 2 tuần, chỉ duy nhất chỉ số bệnh ở CT7 giảm xuống trong khi lại tăng nhẹ ở tất cả các công thức còn lại. Tuy nhiên, hiệu quả làm giảm chỉ số bệnh của CT7 không kéo dài. Chỉ 2 tháng sau xử lý, chỉ số bệnh lại bắt đầu tăng nhẹ. Ngược lại, chỉ số bệnh ở các công thức có xử lý chế phẩm CP1 và CP2 lại giảm dần đều

qua từng thời kì điều tra. Đặc biệt, chỉ số bệnh ở CT6 giảm mạnh nhất, sau 4 tháng xử lý, chỉ tiêu này đã giảm hơn 6 lần so với trước xử lý. Điều này cho thấy, hiệu lực của các chế phẩm sinh học đối với chỉ số bệnh vàng lá chết chậm tuy chậm phát huy tác dụng (sau xử lý 1-2 tháng) nhưng khá bền vững, làm cho chỉ số bệnh giảm dần một cách liên tục.

4. KẾT LUẬN

- Hiệu quả của các chế phẩm vi nấm CP1 và CP2 đối với mật độ tuyến trùng *Meloidogyne* spp. trong đất và rễ tuy chậm nhưng bền vững và tăng dần theo thời gian xử lý. Do đó, tỷ lệ bệnh và chỉ số bệnh vàng lá do tuyến trùng gây ra trên cây tiêu cũng giảm dần theo thời gian. Ngược lại, thuốc Tervigo 20SC tuy có hiệu lực cao và sớm đối với tuyến trùng nhưng hiệu lực của chúng giảm nhanh chỉ sau 2 tháng xử lý.

- Áp dụng (15g CP1 + 15g CP2)/trụ tiêu cho hiệu quả tương đương (22,5g CP1 + 22,5g CP2)/trụ tiêu trong việc kiểm soát tuyến trùng *Meloidogyne incognita* gây bệnh vàng lá chết chậm cây tiêu.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Hiệp hội hồ tiêu Việt Nam (2015). Diện tích, năng suất, sản lượng hồ tiêu năm 2014. <http://peppervietnam.com/san-xuat/trong-trot/dien-tich--nang-suot--san-luong-ho-tieu-nam-2014-153227>.
2. Đào Thị Lan Hoa, Phan Quốc Sùng, Trần Thị Kim Loang, Tôn Nữ Tuấn Nam, Nguyễn Xuân Hoà và Tạ Thanh Nam (2003). Nghiên cứu bệnh vàng lá chết chậm trên cây tiêu tại Tây Nguyên và biện pháp phòng trừ. *Kỷ yếu hội thảo khoa học bảo vệ thực vật phục vụ cho chủ trương chuyển đổi cơ cấu cây trồng ở các tỉnh phía Nam và Tây Nguyên*, ngày 26-27/6/2003 tại Vũng Tàu.
3. Nguyễn Văn Nam, Đào Thị Lan Hoa, Đỗ Thị Kiều An (2014). *Báo cáo tổng kết đề tài cấp Bộ "Nghiên cứu tuyển chọn vi sinh vật và phát triển chế phẩm sinh học phòng trừ tuyến trùng *Pratylenchus* sp. và *Meloidogyne* spp. gây hại trên cà phê"*. Trung tâm Nghiên cứu Bảo vệ Sức khỏe Cây trồng và Vật nuôi, Liên Hiệp hội Khoa học Kỹ thuật Việt Nam.
4. Sở Nông nghiệp và Phát triển nông thôn tỉnh Đắk Lắk (2015), Báo cáo tình hình phát triển cây hồ tiêu trên địa bàn tỉnh Đắk Lắk, Đắk Lắk.
5. Koshy, P.K., Santhosh, J., Eapen, S.J. and Pandey, R. (2005). Nematode parasites of spices, condiments and medicinal plant. In: Luc, M., Sikora, R.A. and Bridge, J. (Eds.), *Plant parasitic nematode in subtropical and tropical agriculture* (pp. 751-792). Wallingford, UK: CAB International.
6. Trinh, T.T.T. (2010). *Incidence and effect of *Meloidogyne* spp. (Nematode: *Meloidogyninae*) on black pepper in Vietnam*. Doctoral thesis, Catholic University of Leuven.

NGHIÊN CỨU KHẢ NĂNG HẤP PHỤ CHẤT MÀU TARTRAZINE CỦA BỘT NANG MỰC LÊN MEN NHỜ VI KHUẨN TUYỂN CHỌN

Đoàn Chiến Thắng¹, Trần Thị Ngọc¹, Nguyễn Anh Dũng¹, Wang San Lang²

ABSTRACT

The study isolated 45 bacteria strains from agricultural soils using squid pen-containing media. The strains T4, T26 and T29 had the highest tartrazine adsorption capacity on squid pen powder-containing medium. Identification of screened bacteria showed that they were *Bacillus cereus*. The tartrazine adsorption capacity of components of bacterial cultures were investigated. The result showed that fermented squid pen powder was the most important for tartrazine adsorption (79,33% – 90,33%). The optimal pH and cultural time for tartrazine adsorption of fermented squid pen powders were pH 2 and 1 – 2 days. The FT-IR and SEM results demonstrated the tartrazine adsorption capacity of fermented squid pen powders. The tartrazine adsorption process on fermented squid pen powders followed Freundlich model and pseudo-second order kinetic.

Key words: *adsorption, Bacillus cereus, squid pen powder, tartrazine*

TÓM TẮT

Nghiên cứu đã phân lập được 45 chủng vi khuẩn có khả năng lên men bột nang mực từ môi trường đất. Tuyển chọn 3 chủng T4, T26 và T29 có khả năng tạo được môi trường lên men bột nang mực hấp phụ tartrazine cao. Kết quả định danh sinh học phân tử 3 chủng vi khuẩn đều là *Bacillus cereus*. Thành phần nào trong môi trường lên men có khả năng hấp phụ tốt tartrazine đã được xác định. Kết quả cho thấy bột nang mực lên men là thành phần hấp phụ tartrazine chủ yếu trong môi trường (79,33 % - 90,33 %). Thời gian 1-2 ngày, pH 2 thích hợp cho quá trình hấp phụ tartrazine ở bột nang mực lên men. Kết quả FT-IR và SEM cũng đã chứng minh khả năng hấp phụ tartrazine của bột nang mực lên men bởi vi khuẩn tuyển chọn. Quá trình hấp phụ tartrazine của bột nang mực lên men tuân theo mô hình Freundlich và phương trình động học biểu kiến bậc 2.

Từ khóa: *Bacillus cereus, Bột nang mực, hấp phụ, tartrazine*

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Chất màu là thành phần không thể thiếu trong quá trình chế biến thực phẩm, dược phẩm và mỹ phẩm. Chúng được chấp nhận và hiện diện rộng rãi trong nhiều sản phẩm khác nhau. Hiện nay, có khoảng 100,000 loại chất màu có mặt trên thị trường (Nigam và cộng sự, 2000). Quá trình sản xuất chất màu và quá trình sản xuất các sản phẩm chứa chất màu đã thải ra môi trường một lượng không nhỏ chất thải chứa những chất này. Các chất màu azo nói chung và tartrazine nói riêng khó bị xử lý do cấu trúc vòng thơm bền vững. Thông thường chất màu azo có thể được xử lý bằng nhiều phương pháp khác nhau như phân hủy vi sinh, quang phân hủy, phân hủy điện hóa, hấp phụ và đặc biệt là sử dụng vật liệu sinh học với sự tham gia của vi sinh vật.

Các loại phế phẩm như vỏ tôm, nang mực, vỏ cua đã được chứng minh chứa các thành phần protein, chitin, có tiềm năng làm vật liệu hấp phụ chất màu (Liang và cộng sự, 2015, Longhinotti và cộng sự, 1998, Figueiredo và cộng sự, 2005). Quá trình điều chế vật liệu hấp phụ từ các loại phế phẩm này đơn giản và rẻ tiền. Mặt khác, các loại phế phẩm này có thể sử dụng như là thành phần dinh dưỡng để nuôi cấy vi khuẩn (Liang và cộng sự, 2015). Những vi

¹ Trường Đại học Tây Nguyên

² Trường Đại học Tam Kang, Đài Loan

sinh vật này có thể tiết ra enzyme chitinase để phân hủy chitin thành các phân tử ngắn hơn và sự thay đổi của phân tử chitin trước và sau khi bị phân cắt ảnh hưởng tới khả năng hấp phụ chất màu (Suitcharit và cộng sự, 2011; Ali và cộng sự, 2012; Liang và cộng sự, 2015)

Buôn Ma Thuột là vùng có điều kiện tự nhiên thích hợp của nhiều loài vi sinh vật. Nghiên cứu nhằm tìm kiếm, khai thác vi sinh vật tại địa phương có khả năng nâng cao khả năng hấp phụ tartrazine của bột nang mực góp phần xử lý chất thải Tartrazin trong môi trường.

2. MỤC TIÊU, NỘI DUNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Mục tiêu nghiên cứu

- Tuyển chọn một số chủng vi khuẩn có khả năng hấp phụ chất màu tartrazine sử dụng môi trường chứa nang mực.

- Đánh giá khả năng hấp phụ chất màu tartrazine của bột nang mực trước và sau lên men.

2.2. Nội dung nghiên cứu

- Phân lập, tuyển chọn, nghiên cứu một số đặc điểm sinh học và định danh vi khuẩn hấp phụ tartrazine.

- Khả năng hấp phụ tartrazine của sinh khối vi khuẩn, dịch nổi môi trường và bột nang mực lên men.

- Ảnh hưởng của pH đến khả năng hấp phụ tartrazine của bột nang mực lên men.

- Nghiên cứu mô hình hấp phụ đẳng nhiệt và động học hấp phụ tartrazine trên bột nang mực lên men.

- Phân tích FT – IR và SEM bột nang mực lên men.

2.3. Phương pháp nghiên cứu

2.3.1. Nguyên vật liệu

Tartrazine tinh khiết, vi khuẩn đối chứng *Bacillus cereus* TKU034 được cung cấp bởi Đại học TamKang, Đài Loan. Bột nang mực được điều chế từ nang mực thải.

2.3.2. Môi trường nuôi cấy

Môi trường nuôi cấy vi khuẩn: 1% bột nang mực, 0,1% K₂HPO₄, 0,05% MgSO₄ 7H₂O (Liang và cộng sự, 2015). Khử trùng ở 121 °C, 15 phút.

2.3.3. Phương pháp phân lập và tuyển chọn vi khuẩn

Thu nhận và làm thuần các chủng vi khuẩn mọc trên đĩa thạch chứa bột nang mực. Nuôi cấy vi khuẩn 2 ngày trên môi trường bột nang và lắc 150 rpm.

Phương pháp xác định khả năng hấp phụ tartrazine của môi trường nuôi cấy (Liang và cộng sự, 2015): Tartrazine được thêm vào môi trường nuôi cấy vi khuẩn với tỷ lệ 1% dung dịch tartrazine 0,1% (w/v) và lắc ở 150 rpm, 15 phút. Ly tâm 5000 rpm 10 phút, thu dịch nổi. Đo OD dịch nổi ở 427 nm. Khả năng hấp phụ được tính theo công thức:

$$D = 100 \times (A_{\text{ini}} - A_{\text{fin}}) / A_{\text{ini}}$$

D: Khả năng hấp phụ chất màu (%); A_{ini} : Chỉ số mật độ quang ban đầu; A_{fin} : Chỉ số mật độ quang sau khi hấp phụ.

2.3.4. Xác định khả năng hấp phụ tartrazine của các thành phần môi trường nuôi cấy vi khuẩn

Sau khi nuôi cấy vi khuẩn trong môi trường có bột nang mực, thành phần môi trường gồm có: sinh khối vi khuẩn, dịch nổi môi trường và bột nang mực lên men. Xác định khả năng hấp thu Tartrazine của 3 thành phần trên tại các thời điểm 0, 1, 2, 3, 4 ngày nuôi cấy các chủng vi khuẩn tuyển chọn để đánh giá khả năng hấp phụ của từng vật liệu.

2.3.5. Ảnh hưởng của pH đến khả năng hấp phụ tartrazine của bột nang mực lên men

Khả năng hấp phụ chất màu ảnh hưởng bởi pH môi trường. Nuôi cấy vi khuẩn tuyển chọn tại pH 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 trong điều kiện nhiệt độ phòng, tốc độ lắc 150 rpm để nghiên cứu.

2.3.6. Mô hình hấp phụ

Sử dụng hai mô hình phổ biến là mô hình Freundlich và mô hình Langmuir để nghiên cứu quá trình hấp phụ tartrazine trên bột nang mực lên men. Nồng độ tartrazine khảo sát từ 10 – 900 mg/l.

2.3.7. Động học hấp phụ

Động học hấp phụ tartrazine trên bột nang mực lên men được khảo sát theo phương trình động học hấp phụ biểu kiến bậc 1 và bậc 2. Thời gian tiếp xúc giữa bột nang mực lên men và tartrazine được khảo sát từ 5 – 80 phút.

2.3.8. Phân tích FT – IR bột nang mực lên men

Phổ hồng ngoại được quét trong khoảng bước sóng 400 – 4000 cm^{-1} . Vật liệu hấp phụ được trộn với KBr và ép thành đĩa trước khi quét phổ trên máy quang phổ hồng ngoại FT-IR Excalibur 3100.

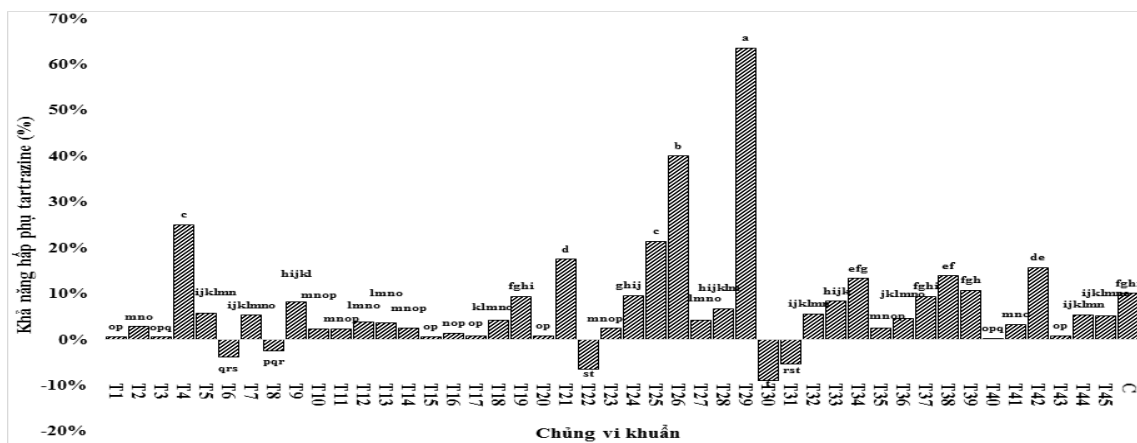
2.3.9. Phân tích SEM bột nang mực lên men

Ảnh SEM của bột nang mực lên men được chụp bằng kính hiển vi điện tử quét FE – SEM S4800.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Phân lập và tuyển chọn vi khuẩn hấp phụ tartrazine

Phân lập được 45 chủng vi khuẩn trên môi trường có bột nang mực. Tuyển chọn 3 chủng vi khuẩn T4, T26 và T29 đã thể hiện khả năng hấp phụ tartrazine tốt nhất (25,07 – 63,66 %), cao hơn so với đối chứng *B. cereus* TKU034 (10,11%). Kết quả hấp phụ tartrazine của môi trường nuôi cấy ba chủng T4, T26 và T29 tương đương với nghiên cứu của Liang và cộng sự (2015) trên đối tượng bột nang mực lên men bằng vi khuẩn *B. cereus* TKU034, TKU030 và TKU027.



Hình 1. Khả năng hấp phụ tartrazine của các chủng vi khuẩn phân lập

Vi khuẩn T4, T26 và T29 có khuẩn lạc màu trắng, đường kính từ 2 – 3 mm, tế bào hình que, gram dương. Khi đánh giá đặc điểm sinh hóa, T4, T26, T29 đều có khả năng sinh catalase, lên men đường glucose, fructose, sucrose, có khả năng sinh enzyme ngoại bào cellulase, protease. Kết hợp với kết quả định danh bằng sinh học phân tử dựa trên trình tự gen 16 S RNA cho thấy cả 3 đều là vi khuẩn *Bacillus cereus*.

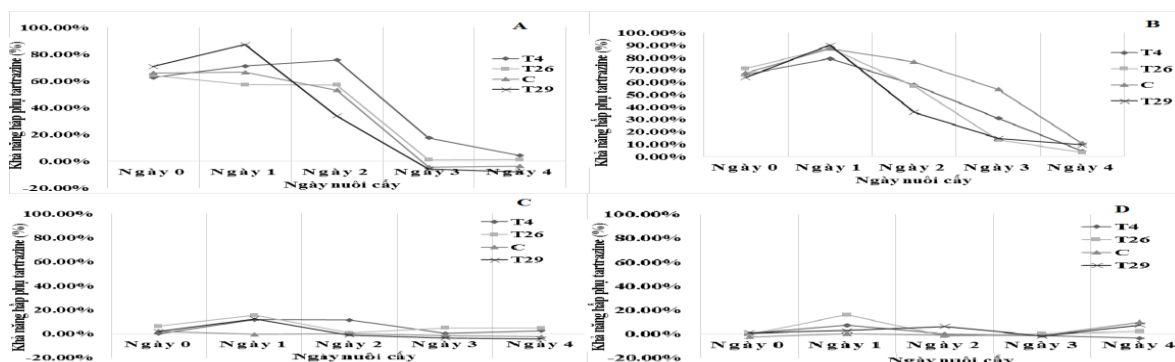
T4	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
☐	Bacillus cereus strain Y8.3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	922	922	100%	0.0	99%	KU041591.1
T26	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
☐	Bacillus cereus ATCC 14579 16S ribosomal RNA (rRNA) gene, complete sequence	992	992	100%	0.0	100%	NR_074540.1
T29	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
☐	Bacillus cereus ATCC 14579 16S ribosomal RNA (rRNA) gene, complete sequence	817	817	100%	0.0	100%	NR_074540.1

Hình 2. Kết quả định danh vi khuẩn tuyển chọn

3.2. Khả năng hấp phụ tartrazine của các thành phần môi trường nuôi cấy vi khuẩn

Kết quả nghiên cứu trong hình 3 cho thấy khả năng hấp phụ tartrazine của môi trường nuôi cấy của các chủng vi khuẩn đạt cao nhất trong khoảng 64,17 – 78,33 %. Trong đó, bột nang mực lên men bởi các chủng vi khuẩn tại ngày 1 có khả năng hấp phụ tartrazine cao nhất đạt 79,33 - 90,33 %. Sinh khối các chủng vi khuẩn cho khả năng hấp phụ tartrazine từ 2,10 % - 15,00 %; khả năng hấp phụ tartrazine của dịch nổi môi trường là 7,30 - 16,00%. Như vậy, bột nang mực lên men là thành phần hấp phụ tartrazine chủ yếu trong môi trường nuôi cấy vi khuẩn. Ngoài ra, kết quả hấp phụ tartrazine của bột nang mực lên men (sau 1 ngày) cao hơn 1,19 – 1,41 lần so với bột nang mực chưa lên men.

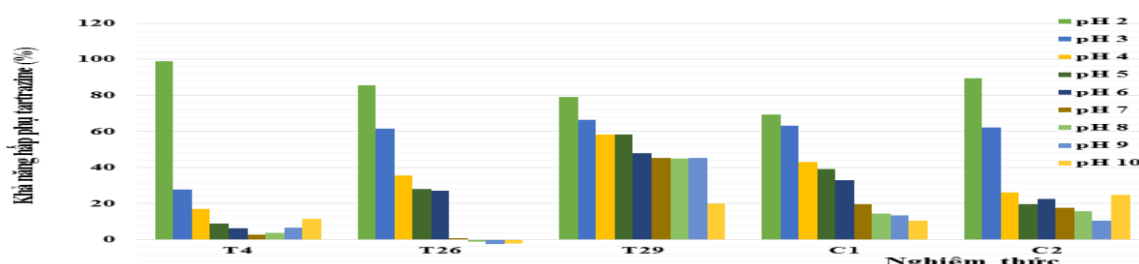
Khả năng hấp phụ tartrazine của các thành phần môi trường có sự biến động theo ngày nuôi cấy. Ở môi trường nuôi cấy các chủng vi khuẩn thì ngày nuôi cấy 0 – 2 cho khả năng hấp phụ tartrazine cao nhất, trong đó bột nang mực lên men hấp phụ tốt nhất sau 1 ngày, sinh khối vi khuẩn là ngày 2 và dịch nổi môi trường nuôi cấy là ngày 1, 4.



Hình 3. Khả năng hấp phụ tartrazine của các thành phần môi trường nuôi cấy vi khuẩn: A Môi trường nuôi cấy vi khuẩn; B bột nang mực lên men; C Sinh khối vi khuẩn; D dịch nổi môi trường nuôi cấy

3.3. Ảnh hưởng của pH đến khả năng hấp phụ tartrazine bột nang mực lên men

pH đóng vai trò quan trọng trong hấp phụ tartrazine của bột nang mực lên men thông qua điện thế bề mặt chất hấp phụ, bậc ion hóa và sự phân ly các nhóm chức. Quá trình hấp phụ tartrazine của bột nang mực lên men được tiến hành trong khoảng pH 2 – 10.



Hình 4. Biểu đồ ảnh hưởng của pH đến khả năng hấp phụ tartrazine của bột nang mực lên men

Ghi chú: C1: Đối chứng bột nang mực lên men bởi *B. cereus* TKU034; C2: Đối chứng bột nang mực không lên men

Các nghiệm thức đều chỉ ra khả năng hấp phụ tartrazine đạt cực đại ở pH (2 79,97% - 98,82%) giảm dần khi tăng pH. Khi tăng pH sự có mặt của ion OH⁻ làm giảm khả năng hấp phụ của tartrazine trên bột nang mực do chất màu này mang tính kiềm, tích điện tích âm.

3.4. Mô hình hấp phụ

Để dự đoán sự tương tác giữa phân tử tartrazine với bề mặt vật liệu hấp phụ, ước tính dung lượng hấp phụ cực đại của vật liệu, hai mô hình hấp phụ đẳng nhiệt Freundlich và Langmuir được sử dụng.

Bảng 1. Phương trình mô hình đẳng nhiệt Langmuir và Freundlich

Nghiệm thức	Mô hình đẳng nhiệt Langmuir	Mô hình đẳng nhiệt Freundlich
T4	$C_e/q_e = 0.0352C_e + 6.6596$ $R^2 = 0.7467$	$\ln q_e = 0.6508 \ln C_e - 1.4512$ $R^2 = 0.97$
T26	$C_e/q_e = 0.0239C_e + 3.9504$ $R^2 = 0.7998$	$\ln q_e = 0.7125 \ln C_e - 1.5484$ $R^2 = 0.9858$
T29	$C_e/q_e = 0.017C_e + 2.964$ $R^2 = 0.7668$	$\ln q_e = 0.779 \ln C_e - 1.7542$ $R^2 = 0.9871$

C1	$C_e/q_e = 0.0229c_e + 3.8272$ $R^2 = 0.8115$	$\ln q_e = 0.7343 \ln c_e - 1.6153$ $R^2 = 0.9876$
C2	$C_e/q_e = 0.0306c_e + 6.0301$ $R^2 = 0.6571$	$\ln q_e = 0.7332 \ln c_e - 1.9009$ $R^2 = 0.9472$

Ghi chú:C1: Đối chứng bột nang mực lên men bởi *B. cereus* TKU034; C2: Đối chứng bột nang mực không lên men

Kết quả nghiên cứu cho thấy hệ số R^2 của mô hình Langmuir nằm trong khoảng 0,65 – 0,81 thấp hơn hệ số R^2 của mô hình Freundlich (0,95 – 0,99). Do đó, mô hình Freundlich phù hợp hơn mô hình Langmuir ở quá trình hấp phụ tartrazine trên bột nang mực. Như vậy, hấp phụ tartrazine trên bột nang mực tuân theo hấp phụ trên vật liệu không đồng nhất, có tính thuận nghịch.

Dung lượng hấp phụ cực đại của bột nang mực ở các nghiệm thức nằm trong khoảng 28,40 – 58,82 mg/g. So sánh với các nghiên cứu trên tro than, Deolied, lông gà, than hoạt tính, chitin, chitosan, carbon từ vỏ dừa, Polyaniline nano layer composite, dung lượng hấp phụ cực đại của vật liệu nghiên cứu tương đương hoặc cao hơn chitin, chỉ kém chitosan và than hoạt tính.

3.5. Động học hấp phụ

Động học hấp phụ là bộ thông số quan trọng để áp dụng mô hình hấp phụ vào thực tế xử lý do có thể dự đoán được tốc độ tách chất ô nhiễm ra khỏi nước. Có hai mô hình thường được sử dụng để nghiên cứu động học hấp phụ là động học hấp phụ biểu kiến bậc 1 và động học hấp phụ biểu kiến bậc 2.

Bảng 2. Một số tham số theo động học hấp phụ biểu kiến bậc 1

NT	Phương trình	R^2	K_1 (phút ⁻¹)	q_e exp (mg/g)	q_e cal (mg/g)
T4	$\text{Log}(q_e - q_t) = -0,0283t - 0,1263$	0,73	0,0623	2,32	0,75
T26	$\text{Log}(q_e - q_t) = -0,032t - 0,0714$	0,91	0,0705	2,72	0,85
T29	$\text{Log}(q_e - q_t) = -0,0225t - 0,2074$	0,81	0,0496	2,91	0,62
C1	$\text{Log}(q_e - q_t) = -0,0241t - 0,2642$	0,65	0,0555	2,51	0,54
C2	$\text{Log}(q_e - q_t) = -0,0264t - 0,1836$	0,89	0,0607	2,44	0,66

Ghi chú:C1: Đối chứng bột nang mực lên men bởi *B. cereus* TKU034; C2: Đối chứng bột nang mực không lên men

Bảng 3. Một số tham số theo động học hấp phụ biểu kiến bậc 2

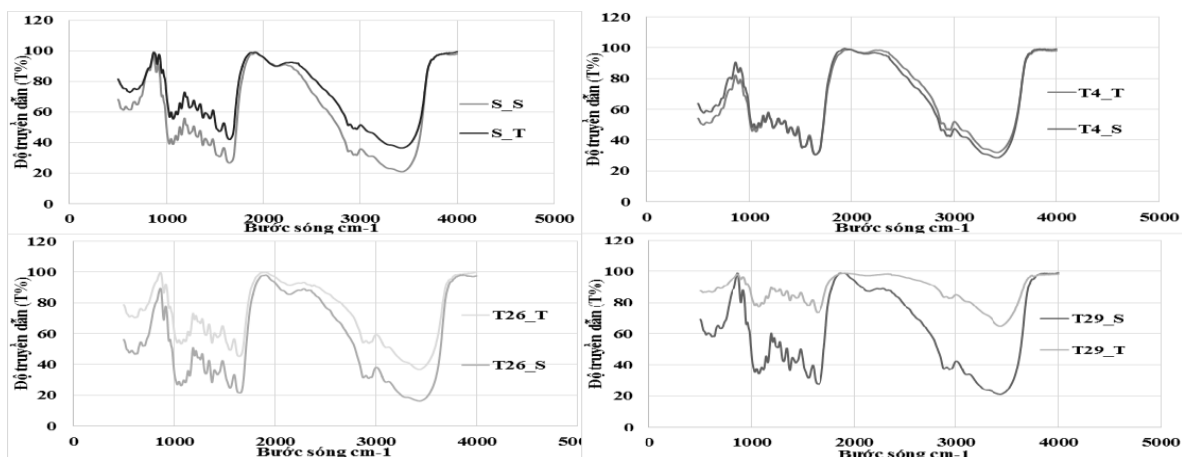
NT	Phương trình	R^2	K_2 (g.mg ⁻¹ .phút ⁻¹)	q_e exp (mg/g)	q_e cal (mg/g)
T4	$t/q = 0,4157t + 1,0619$	0,99	0,1627	2,32	2,41
T26	$t/q = 0,3562t + 0,7364$	0,99	0,1723	2,72	3,81
T29	$t/q = 0,3358t + 0,5268$	0,99	0,2141	2,91	2,98
C1	$t/q = 0,3903t + 0,6691$	0,99	0,2277	2,51	2,56
C2	$t/q = 0,3982t + 0,749$	0,99	0,2117	2,44	2,51

Ghi chú:C1: Đối chứng bột nang mực lên men bởi *B. cereus* TKU034; C2: Đối chứng bột nang mực không lên men

Kết quả giá trị R^2 của mô hình động học biểu kiến bậc 2 cao hơn bậc 1. Ngoài ra, giá trị q_e thực nghiệm và q_e tính toán ở mô hình động học biểu kiến bậc 2 cũng ít sai lệch hơn mô hình động học biểu kiến bậc 1. Do đó, có thể kết luận rằng quá trình hấp phụ tartrazine trên bột nang mực lên men tuân theo mô hình động học biểu kiến bậc 2.

3.6. Phân tích FT – IR bột nang mực lên men

Phân tích FT – IR chỉ ra trong bột nang mực và bột nang mực lên men chứa những nhóm chức có khả năng hấp phụ tốt tartrazine như OH ($3421 - 3438 \text{ cm}^{-1}$), C=O của amide ($1646 - 1654 \text{ cm}^{-1}$).

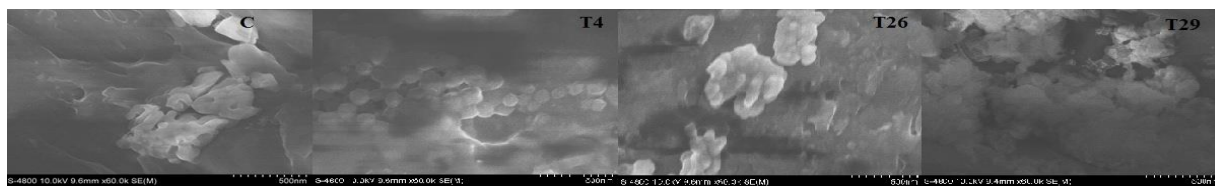


Hình 5. Kết quả FT – IR của bột nang mực lên men trước và sau hấp phụ tartrazine

Phổ FT – IR chỉ ra các đỉnh có sự thay đổi nhỏ về vị trí. Vì vậy, không có sự thay đổi về cấu trúc hóa học của bột nang mực trong quá trình hấp phụ. Do đó, quá trình hấp phụ tartrazine trên bột nang mực lên men tuân theo hấp phụ vật lý.

3.7. Phân tích SEM bột nang mực lên men

Quá trình hấp phụ phụ thuộc vào cấu trúc xốp của vật liệu. Hình 6 chỉ ra bề mặt của bột nang mực và bột nang mực lên men đều có cấu trúc gồ ghề, nhiều lỗ, không đồng nhất. Chứng tỏ bột nang mực lên men và không lên men có khả năng hấp phụ tartrazine hiệu quả.



Hình 6. Kết quả chụp ảnh SEM của bột nang mực lên men sau 1 ngày lên men ở 100 rpm, pH 7

4. KẾT LUẬN

- Nghiên cứu đã tuyển chọn được 3 /45 chủng vi khuẩn có khả năng hấp phụ tartrazine cao là T4, T26 và T29, cao hơn *B. cereus* TKU034 2,48 – 6,29 lần.
- Vi khuẩn T4, T26, T29 đều là *Bacillus cereus*.

- Khả năng hấp phụ tartrazine của bột nang mực lên men cao hơn so với sinh khối vi khuẩn (6,02 - 37,38 lần); so với dịch lên men (5,65 – 10,87 lần) và so với bột nang mực chưa lên men (1,19 – 1,41 lần). Ở pH 2, bột nang mực lên men hấp phụ tartrazine tối ưu.

- Quá trình hấp phụ tartrazine của bột nang mực lên men từ vi khuẩn *Bacillus cereus* T4, T26 và T29 tuân theo mô hình Freundlich và phương trình hấp phụ biểu kiến bậc 2.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Elisane Longhinotti, Fabíola Pozza, Lígia Furlan, Maria de Nazaré de M (1998). Adsorption of Anionic Dyes on the Biopolymer Chitin. J. Braz. Chem. Soc. vol.9 no.5.
2. Figueiredo SA, Loureiro JM, Boaventura RA (2005). Natural waste materials containing chitin as adsorbents for textile dyestuffs: batch and continuous studies. Water Res. 2005 Oct;39(17):4142-52
3. Mohammed A Kassem, and Gamal O El-Sayed (2014). Adsorption of Tartrazine on Medical Activated Charcoal Tablets under Controlled Conditions. J Environ Anal Chem 2014, 1:1
4. Sushmita Banerjee, M.C. Chattopadhyaya (2013). Adsorption characteristics for the removal of a toxic dye, tartrazine from aqueous solutions by a low cost agricultural by-product. Arabian Journal of Chemistry.
5. Syiffa Fauzia, Firda Furqani, Rahmiana Zein, and Edison Munaf (2015). Adsorption and reaction kinetics of tartrazine by using *Annona muricata* L seeds. Journal of Chemical and Pharmaceutical Research, 2015, 7(1):573-582.
6. Tzu-Wen Liang, Chih-Ting Huang, Nguyen Anh Dzong, San-Lang Wang (2015). Squid Pen Chitin Chitooligomers as Food Colorants Absorbers. Mar Drugs. 2015 Jan; 13(1): 681–696
7. Tzu-Wen Liang, Bo-Chang Lo, and San-Lang Wang (2015). Chitinolytic Bacteria-Assisted Conversion of Squid Pen and Its Effect on Dyes and Pigments Adsorption. Mar. Drugs 2015, 13, 4576-4593
8. Takayuki Shibamoto, Leonard F. Bjeldanes and Steve Taylor (1993). Introduction to Food Toxicology. A volume in Food Science and Technology.
9. Y Z Song, J M Xu, J S Lv, H Zhong, Y Ye, J M Xie (2010). Electrochemical reduction of tartrazine at multi-walled carbon nanotube-modified pyrolytic graphite electrode. J of Chemistry. 1030 – 1034
10. San-Lang Wang, Yan-Cheng Chen, Yue-Horng Yen, Tzu-Wen Liang (2012). Utilisation of chitinous materials in pigment adsorption. Food Chemistry 135 (2012) 1134–1140

ẢNH HƯỞNG CỦA MỘT SỐ YẾU TỐ MÔI TRƯỜNG NUÔI CÂY ĐẾN SỰ TẠO MÔ SẸO VÀ KHẢ NĂNG HÌNH THÀNH CẤU TRÚC PHÔI SOMA TỪ CÂY NGÔ TRONG ĐIỀU KIỆN *IN VITRO*

Trần Thị Phương Hạnh¹, Nguyễn Chí Thành²

ABSTRACT

The effective regeneration system plays important role in plant transformation. In general, maize (*Zea mays* L.) is recalcitrant plant in regeneration. Besides, plant regeneration capacity depends on genotype. It was also affected by medium component and the other factors. MS medium (Murashige & Skoog, 1962) supplemented with NAA 4 mg/l and AgNO₃ 10 mg/l promoted callus production from cultured immature embryos of maize in the dark at 22 ± 30C. Somatic embryos regeneration on MS medium (Murashige & Skoog, 1962) supplemented with 2,4 D 2 mg/l with the number of Somatic embryos regeneration was about 7.33/callus, at rate of 64.33% and medium size was 3.91 mm after 5 weeks cultured (2 weeks in the dark and 3 next weeks with 2000 lux light intensity, 12/24 illumination time at 22 ± 30C.

Keyword: *Callus, maize, plant growth regulator, Somatic embryos regeneration*

TÓM TẮT

Khả năng tái sinh của cây trồng nói chung phụ thuộc nhiều vào kiểu gen của thực vật. Đối với cây ngô, vấn đề tái sinh gặp rất nhiều khó khăn, hầu hết các cây ngô có khả năng tái sinh kém và phụ thuộc vào môi trường nuôi cấy và một số yếu tố khác. Mô sẹo đều được hình thành từ các nguồn mẫu rễ, diệp tiêu và phôi non trong đó phôi non được cảm ứng tạo mô sẹo tốt nhất trên môi trường MS bổ sung NAA 2 mg/l kết hợp AgNO₃ với nồng độ 10 mg/l sau 3 tuần nuôi cấy trong điều kiện tối hoàn toàn. Môi trường MS bổ sung 2,4 D 2 mg/l thích hợp cho hình thành cấu trúc phôi từ mô sẹo: tỷ lệ mẫu tạo phôi (64,33%), số phôi (8 phôi), kích thước phôi (3,96mm) sau 5 tuần nuôi cấy (2 tuần đầu trong tối, 3 tuần tiếp theo trong điều kiện chiếu sáng 2000 lux).

Từ khóa: *Chất điều hòa sinh trưởng thực vật, cây ngô, mô sẹo, phôi soma.*

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Khả năng tái sinh của cây trồng nói chung phụ thuộc nhiều vào kiểu gen của thực vật. Đối với cây ngô, vấn đề tái sinh gặp rất nhiều khó khăn, hầu hết các cây ngô có khả năng tái sinh kém và phụ thuộc vào môi trường nuôi cấy và một số yếu tố khác (Armstrong and Green, 1985). Trong khuôn khổ bài báo này, chúng tôi trình bày một số kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của một số yếu tố môi trường đến khả năng tạo mô sẹo và phát sinh phôi soma của giống ngô LVN146. Giống ngô trên đã được trồng và xác định thời vụ sinh trưởng thích hợp trong điều kiện Tây Nguyên.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Vật liệu

Giống ngô LVN146 do Viện Nghiên Cứu Ngô (Đan Phượng, Hà Nội) cung cấp, độ thuần di truyền $\geq 99,9\%$, tỷ lệ nảy mầm $\geq 86\%$, độ ẩm $\leq 11\%$.

2.2. Phương pháp

Lớp mỏng tế bào thu được từ các bộ phận khác nhau gồm rễ, lá non của cây *in vitro* 10 ngày tuổi và tử diệp của cây *in vitro* 4 ngày tuổi nảy mầm từ hạt ngô. Rễ và bao

¹ Trường Đại học Tây Nguyên

² Viện Nghiên cứu Ngô

lá mầm được cắt thành các đoạn 1 cm; Lá được cắt thành các mảnh khoảng 1 cm², tạo các vết thương; Lớp mỏng phôi non được lấy từ bắp non sau khi thụ phấn 14 ngày, mẫu bắp thí nghiệm được giữ ở 4⁰C trong thời gian 10 ngày trước khi tách phôi. Khử trùng bề mặt ngoài của bắp bằng ethanol 70⁰ với thời gian xử lý 20 phút.

Môi trường nuôi cấy được sử dụng là môi trường đa lượng và vi lượng theo thành phần khoáng của môi trường MS (Murashige và Skoog, 1962) bổ sung thêm các thành phần: Đường: 30g/l, AgNO₃ tùy theo từng thí nghiệm, Agar (công ty TNHH Hải Long, Hải Phòng sản xuất): 6g/l, chất điều hòa sinh trưởng auxin (NAA, 2,4 D), AgNO₃, Casein tùy theo từng thí nghiệm. Môi trường được chỉnh pH = 5,8 (chỉnh bằng NaOH 1N và HCl 1N), được hấp khử trùng bằng autoclave ở nhiệt độ 121⁰C và áp suất 1atm trong thời gian 17 phút.

2.2.1. Phương pháp tạo mô sẹo

Các mẫu cây được đặt trên môi trường MS có bổ sung: vitamin Morel, chất điều hòa sinh trưởng thực vật auxin (0 mg/l; 1 mg/l; 2 mg/l; 3 mg/l; 4 mg/l; 5 mg/l NAA) và kết hợp với AgNO₃ với nồng độ 0 mg/l; 5mg/l; 10mg/l; 15 mg/l và 20 mg/l. Các mẫu được đặt trong tối ở điều kiện nhiệt độ 22 ± 2⁰C và ẩm độ 55%.

2.2.2. Phương pháp tạo phôi từ mô sẹo

Mô sẹo 3 tuần tuổi được cắt thành các mảnh nhỏ kích thước 1 x 1cm chuyển sang môi trường tạo phôi (môi trường MS cơ bản có bổ sung: vitamin Morel, 500 mg/l Casein, 30g đường glucose, 15mg/l AgNO₃ và kết hợp với 2,4 D có nồng độ 0 mg/l; 0,5 mg/l; 1 mg/l; 1,5 mg/l; 2 mg/l và 2,5 mg/l nuôi cấy trong tối thời gian 2 tuần sau đó chuyển sang điều kiện chiếu sáng với cường độ ánh sáng 2000 ± 300lux, thời gian chiếu sáng 12/24, nhiệt độ 22 ± 20C và độ ẩm 55% ± 10%. Theo dõi sự phát sinh phôi theo thời gian nuôi cấy.

Quan sát hình thái giải phẫu

Mô sẹo và cấu trúc phôi được xác định bằng cách giải phẫu bằng tay, quan sát dưới kính hiển vi quang học và chụp ảnh.

Xử lý số liệu

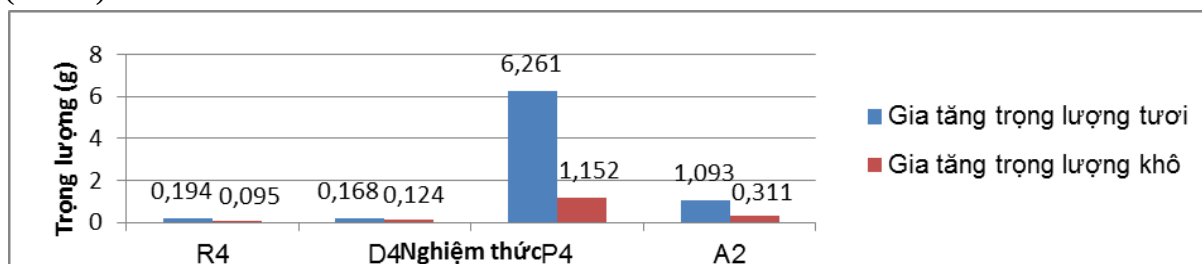
Các số liệu ghi nhận được xử lý thống kê bằng phần mềm Statistical Program cientific System (SPSS) phiên bản 16.0. Sự sai biệt có ý nghĩa ở mức p = 0,05.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

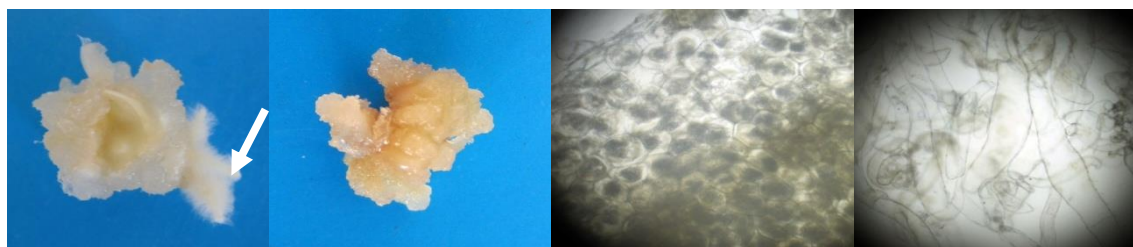
3.1. Ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng thực vật và nitrat bạc lên khả năng tạo mô sẹo từ ngô

Trong điều kiện tối hoàn toàn, ở hầu hết các nghiệm thức có bổ sung auxin (NAA) và AgNO₃, nguồn mẫu rễ và phôi non đều hình thành mô sẹo sau 3 ngày nuôi cấy và 1 tuần nuôi cấy (diệp tiêu), không có sự xuất hiện mô sẹo trong suốt 5 tuần nuôi cấy từ nguồn mẫu lá. Mô sẹo bắt đầu xuất hiện tại các rìa của nguồn mẫu, xung quanh mặt ngoài của mẫu, ở những nơi tiếp xúc với môi trường. Ở tuần thứ 2, mô sẹo tăng sinh nhanh chóng và chiếm toàn bộ bề mặt của mẫu cấy. Sang tuần thứ 3, mô sẹo tăng sinh mạnh, các tế bào bề ngoài mô sẹo tách rời nhau làm mô sẹo trở nên xốp, mô sẹo bên trong chắc. Các tế bào mô sẹo phía ngoài có hình dạng thay đổi, chứa không bào to khác với tế bào phía bên trong có kích thước đều nhau, tế

bào chất đậm đặc, nhân to (những tế bào có thể phát sinh hình thái) (Bùi Trang Việt, 2000) (Hình 1). Các nhóm tế bào này tiếp tục duy trì sự phân chia và chuyển sang hóa nâu ở tuần thứ 4 đối và thứ 5 đối với mẫu cấy trên môi trường chỉ bổ sung NAA, ở tuần thứ 5 đối với môi trường bổ sung NAA kết hợp với AgNO_3 . Nồng độ NAA 4mg/l và AgNO_3 10mg/l thích hợp cho sự hình thành mô sẹo từ các nguồn mẫu cấy (rễ, phôi non, điệp tiêu), trong đó, mô sẹo được hình thành từ phôi non là tốt nhất, gia tăng trọng lượng tươi (6,261g) và gia tăng trọng lượng khô (1,152g) cao hơn hẳn các nguồn mẫu rễ và điệp tiêu (Biểu đồ 1). Kết quả này tương tự kết quả nghiên cứu của Phạm Thị Lý Thu và cộng sự (2005). Điều này có thể được giải thích là do dưới tác động của NAA, các tế bào bắt đầu phân chia mạnh mẽ và có sự biến đổi hình dạng, tế bào kéo dài ở ngày thứ 3 sau nuôi cấy. Sang tuần thứ 2, do auxin kích thích hoạt động của bơm proton màng nguyên sinh chất, giúp H^+ được bơm ra vách tế bào làm pH của vách giảm. Sự giảm pH làm cho vôi nối giữa extensin, hemicellulose, các hợp chất pectic với cellulose bị phá vỡ, Ca^{2+} nối liền các chuỗi hợp chất bị loại đi, enzyme thủy giải được hoạt hóa (β -glucanase, các proteinase) làm vách trở nên lỏng lẻo (Mai Trần Ngọc Tiêng, 2001). Vì vậy, ở tuần thứ 3, dưới tác động của NAA, các tế bào mô sẹo ở ngoài cùng có xu hướng tách rời nhau, làm mô sẹo trở nên xốp. AgNO_3 kích thích quá trình tạo mô sẹo, duy trì sự phân chia của tế bào bằng cách ngăn cản sự hình thành ethylen nội sinh (tạo ra bởi sự tổn thương của các mẫu nuôi cấy và quá trình nuôi cấy in vitro) (Songstad et al, 1992). Do đó, ở các nghiệm thức có bổ sung NAA kết hợp với AgNO_3 duy trì sự phân chia lâu hơn, chất lượng mô sẹo tốt, mô sẹo săn chắc xen kẽ với mô sẹo xốp rất thích hợp với sự phát sinh hình thái (hình 1).



Biểu đồ 1: Sự gia tăng trọng lượng tươi và trọng lượng khô giữa các nghiệm thức cho mô sẹo tốt nhất ở các nguồn mẫu trên môi trường MS có bổ sung 4 mg/l NAA và AgNO_3 sau 5 tuần nuôi cấy (R: rễ, D: từ điệp, P: phôi non, A: lá)



Hình 1: Mô sẹo từ phôi non, mũi tên trắng chỉ rễ

(A): Môi trường MS có bổ sung 4 mg/l NAA. (B): môi trường MS có bổ sung 4 mg/l NAA và AgNO_3 3 tuần tuổi; (C): Tế bào bên trong khối mô sẹo, (D): Tế bào bên ngoài khối mô sẹo 5 tuần tuổi từ phôi non trên môi trường MS có bổ sung 4 mg/l NAA và AgNO_3 .
3.2 Ảnh hưởng của Nồng độ 2,4 D đến sự hình thành cấu trúc phôi soma từ mô sẹo

Mô sẹo tốt nhất 3 tuần tuổi được cấy chuyển sang môi trường tạo phôi. Sự cảm ứng chất điều hòa sinh trưởng ngoại sinh (2,4 D) thể hiện rõ rệt. Sau 1 tuần nuôi cấy có sự tăng sinh tế bào hình thành các khối tế bào tạo phôi nhú ra khỏi bề mặt mô sẹo (xuất hiện các nốt nhỏ li ti). Đến tuần thứ 2 các cấu trúc dạng phôi (phôi hình cầu) được hình thành với kích thước tương đối nhỏ khó nhìn thấy bằng mắt thường sự thay đổi này. Nhưng đến tuần thứ 3 thì phôi soma đã phát triển khá tốt về kích thước mắt thường có thể quan sát dễ dàng. Các cấu trúc dạng phôi phát triển thay đổi về hình dạng và kích thước ở thời gian này chúng có dạng hình cầu hay hình tim màu vàng nhạt (hình 3). Kết quả của sự phát sinh phôi từ mô sẹo trên các môi trường khác nhau được ghi nhận (Bảng 1).

Từ Bảng 1 cho thấy, môi trường không có bổ sung 2,4 D không có sự hình thành cấu trúc phôi, chỉ có sự xuất hiện rễ sau 1 tuần khi cấy chuyển. Ở các tuần tiếp theo, rễ tiếp tục phân chia tăng lên về số lượng và kích thước (Hình 2). Môi trường có bổ sung 2,4 D, mô sẹo đều phôi hóa. Khả năng mô sẹo phôi hóa tỷ lệ với sự tăng nồng độ 2,4 D từ 0,5 – 2 mg/l, trong đó, môi trường có bổ sung 2,4 D 2 mg/l có tỷ lệ mẫu tạo phôi soma (64,33%), số phôi (8 phôi), kích thước phôi (3,96mm) cao nhất.

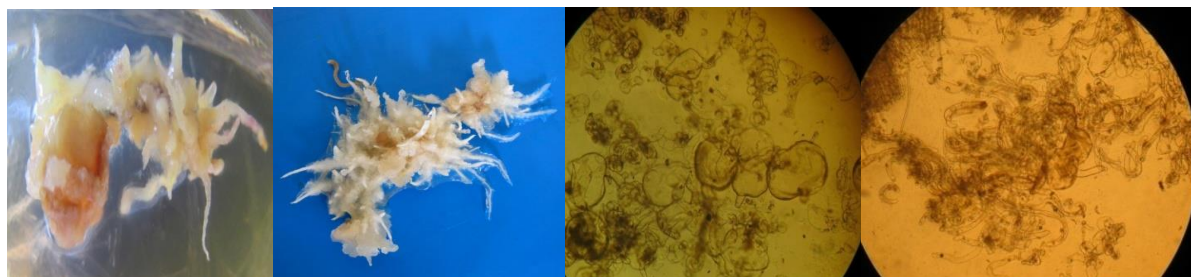
Bảng 1: Ảnh hưởng của 2,4 D đến sự hình thành cấu trúc phôi soma từ mô sẹo

Thí nghiệm	Môi trường	% mẫu tạo phôi	Số phôi soma trên mẫu cấy	Kích thước phôi soma (mm) sau khi cấy chuyển sang môi trường tạo phôi				
				Tuần 1	Tuần 2	Tuần 3	Tuần 4	Tuần 5
P1	MS	0	0	—	—	—	—	—
P2	MS có bổ sung 2,4 D 0,5 mg/l	17,66% ± 2,333 ^b	1,66 ± 0,333 ^b	0,59 ± 0,014 ^b	1,04 ± 0,127 ^b	1,31 ± 0,091 ^b	1,47 ± 0,202 ^b	1,61 ± 0,018 ^b
P3	MS có bổ sung 2,4 D 1 mg/l	30,66% ± 4,666 ^{bc}	4 ± 0,577 ^c	0,84 ± 0,037 ^c	1,64 ± 0,015 ^c	1,78 ± 0,003 ^c	1,95 ± 0,01 ^c	2,15 ± 0,187 ^c
P4	MS có bổ sung 2,4 D 1,5 mg/l	42,33% ± 2,333 ^d	5,66 ± 0,333 ^d	1,35 ± 0,005 ^d	1,76 ± 0,021 ^c	1,98 ± 0,030 ^d	2,18 ± 0,086 ^c _d	2,53 ± 0,020 ^d
P5	MS có bổ sung 2,4 D 2 mg/l	64,33% ± 8,089 ^e	7,33 ± 0,333 ^e	1,42 ± 0,02 ^e	1,97 ± 0,02 ^d	2,06 ± 0,063 ^d	2,48 ± 0,086 ^d	3,91 ± 0,056 ^e
P6	MS có bổ sung 2,4 D 2,5 mg/l	40,33% ± 2,003 ^d	3,66 ± 0,326 ^d	1,32 ± 0,045 ^d	1,24 ± 0,001 ^c	1,83 ± 0,032 ^d	2,21 ± 0,046 ^c _d	3,03 ± 0,030 ^d

Các số trung bình trong cột với các mẫu tự khác nhau thì khác biệt có ý nghĩa ở mức 95%

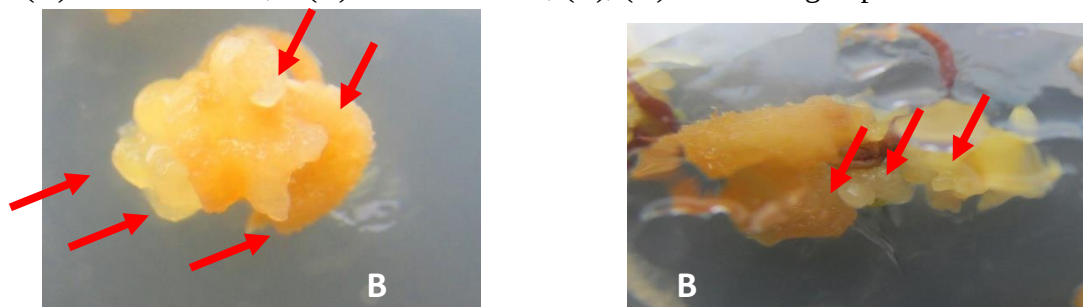
Tuy nhiên, khi nồng độ 2,4 D tăng 2,5 mg/l, tỷ lệ mẫu tạo phôi, số phôi giảm. Như vậy, môi trường có bổ sung 2,4 D 2mg/l thích hợp cho sự tạo phôi từ mô sẹo của giống ngô LVN 146. Kết

quả nghiên cứu này cũng giống như ghi nhận của Bùi Mạnh Cường và cộng sự (2012), Khuất Hữu Trung và cộng sự (2009) ở một số dòng ngô thuần. 2,4 D đóng vai trò quan trọng trong sự phân chia và biệt hóa tế bào đã được nhiều tác giả chứng minh trên các loài thực vật khác nhau (George and Klerk, 2008)



Hình 2: Rễ được hình thành gián tiếp qua mô sẹo môi trường MS đối chứng

(A): Rễ 3 tuần tuổi; (B): Rễ 5 tuần tuổi; (C), (D): hình thái giải phẫu rễ



Hình 3: Phôi soma được hình thành gián tiếp qua mô sẹo trên môi trường bổ sung 2mg/l 2,4D, mũi tên đỏ chỉ phôi

(A): Cấu trúc dạng phôi sau khi cấy chuyển 3 tuần; (B): Cấu trúc dạng phôi sau khi cấy chuyển 5 tuần

4. KẾT LUẬN

Đối với giống ngô LVN 146:

Môi trường MS bổ sung NAA 2mg/l kết hợp AgNO_3 với nồng độ 10 mg/l thích hợp cho sự hình thành mô sẹo từ phôi non.

Môi trường MS bổ sung 2,4 D 2mg/l thích hợp cho hình thành cấu trúc phôi từ mô sẹo: tỷ lệ mẫu tạo phôi (64,33%), số phôi (8 phôi), kích thước phôi (3,96mm).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bùi Mạnh Cường, Mai Xuân Triệu, Ngô Hữu Tình (2012), *Tuyển tập, một số kết quả nghiên cứu khoa học & phát triển cây ngô Việt Nam*, Nxb Nông nghiệp, Hà Nội, 712 tr.
2. Mai Trần Ngọc Tiếng, 2001. Thực vật cấp cao, Nhà xuất bản Đại học Quốc Gia TP. HCM.
3. Bùi Trang Việt (2000). *Sinh lý thực vật đại cương, phần II: Phát triển*. Nhà xuất bản Đại học Quốc gia thành phố Hồ Chí Minh.
4. Phạm Thị Lý Thu (2005), “Ảnh hưởng của một số yếu tố môi trường và tuổi phôi đến

khả năng tái sinh cây từ phôi non dòng ngô nhập nội HR8, HR9), *Tạp chí di truyền học và ứng dụng*, số 3 năm 2005

5. Khuất Hữu Trung, Nguyễn Mỹ Giang, Nguyễn Bích Thủy, Đào Thị Thanh Bằng, Nguyễn Hữu Đồng, Bùi Mạnh Cường (1999), “Thăm dò khả năng tạo callus và tái sinh cây của phôi
6. Nón và nõn chưa thụ tinh phục vụ công tác chọn tạo giống ngô”. *Tạp chí di truyền và ứng dụng*, (1), tr 8-12.
7. Armstrong CL., and Green CE. (1985). Establishment and maintenance of friable, embryogenic maize callus and the involvement of L-proline. *Planta* 164: 207-214
8. Murashige, T. & Skoog, F.C. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum* 15:473-497.
9. George E.F., Hall M.A. and Klerk G.J., 2008. *Plant Propagation by Tissue Culture*. 3rd Edition. Springer, The Netherland.
10. Songstad DD., Petersen WL. and Armstrong CL. (1992), Establishment of friable embryogenic (type II) callus from immature tassels of *Zea mays* (Poaceae). *American Journal of Botany* 79 (7): 761-764.

NGHIÊN CỨU ĐA DẠNG DI TRUYỀN VÀ PHÁT HIỆN GEN KHÁNG BỆNH XOĂN VÀNG LÁ Ở CÀ CHUA

Nguyễn Mạnh Linh¹, Đỗ Quang Đạt¹, Tống Văn Hải¹, Đoàn Xuân Cảnh¹

ABSTRACT

Tomato is a popularly important vegetable in the world and Vietnam. Assessing genetic diversity and detection of genes for disease resistance of the existing germplasm of tomato are useful for development of new varieties with high yield, good quality and disease resistance. In this study, 10 SSR markers and four markers related to TYLCV resistance genes (*Ty1*, *Ty2* and *Ty3*) were used to analyse genetic diversity and identify the TYLCV genes, respectively, of 26 of tomatoes accessions available at food crops research institute. The results showed, that only 5 marker showed polymorphism. 26 accessions were grouped into 5 clusters with similarity coefficients threshold of 0.7 by using NTSYSpc 2.1 software. The information found in this study is very important for new tomato hybrid breeding programs. four of 72 accessions carried *Ty1*, five accessions carried *Ty2* gene and six accessions carried *Ty3* gene.

Keywords: DNA markers, genetic diversity, tomato yellow leaf curl virus, tomato.

TÓM TẮT

Cà chua là một loại rau quan trọng và phổ biến trên thế giới cũng như Việt Nam. Để chọn tạo giống lai (F1) cho năng suất cao, chất lượng tốt bên cạnh các đánh giá về kiểu hình cần nắm được thông tin về quan hệ di truyền. Trong nghiên cứu này 10 chỉ thị SSR đã được sử dụng để đánh giá đa dạng di truyền của 72 mẫu giống cà chua, kết quả thu được 9 chỉ thị cho đa hình. Từ kết quả điện di sản phẩm PCR của 9 chỉ thị cho đa hình, bằng phần mềm NTSYSpc 2.1, đã phân 72 mẫu giống cà chua thành 4 nhóm với hệ số tương đồng 0,7. Kết quả nghiên cứu đã chỉ ra các mẫu giống có độ sai khác di truyền khá cao, chúng có ý nghĩa quan trọng trong tạo giống cà chua lai mới. Bệnh xoăn vàng lá cà chua do phức hợp nhiều virus thuộc chi *Begomovirus*, họ *Geminiviridae* gây ra, là một trong những bệnh hại nguy hiểm nhất đối với cây cà chua ở Việt Nam. Hiện tại chưa có loại thuốc bảo vệ thực vật nào phòng chống được bệnh này, hướng duy nhất là sử dụng gen kháng. Trong nghiên cứu này, chỉ thị phân tử ADN cũng được sử dụng để phát hiện gen kháng *Ty1*, *Ty2* và *Ty3*. Trong tổng số 72 mẫu giống đã phát hiện được 5 mẫu giống cà chua chứa gen *Ty1*, 5 mẫu chứa gen *Ty2* và 6 mẫu chứa gen *Ty3*.

Từ khóa: Cà chua, chỉ thị ADN, đa dạng di truyền, virus xoăn vàng lá cà chua

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Cà chua (*Solanum lycopersicum*) là loại rau ăn quả quan trọng ở nước ta và trên thế giới, chúng dùng để ăn tươi, xào nấu trong các bữa ăn hàng ngày hoặc chế biến thành nhiều thực phẩm khác như: Tương cà chua, nước ép cà chua, mứt cà chua....Tuy nhiên trong quá trình phát triển cây cà chua lâu dài, phổ di truyền của các giống cà chua ngày bị thu hẹp, gây cản trở ngại cho công tác chọn tạo giống cà chua mới kháng bệnh virus xoăn vàng lá. Vì thế, việc xác định được các vật liệu mang gen kháng bệnh xoăn vàng lá và hiểu biết mối quan hệ di truyền giữa các dòng, giống cà chua làm cơ sở cho tạo giống lai F1 năng suất cao, kháng bệnh là vô cùng cần thiết. Trong chọn tạo giống ưu thế lai, sử dụng các bố mẹ có khoảng cách di truyền xa nhau sẽ cho ưu thế lai cao. Tuy nhiên, dựa vào các đặc điểm nông sinh học thì khó có thể kết luận được mối quan hệ di truyền của nguồn vật liệu vì các tính trạng nông sinh học phụ thuộc rất nhiều vào yếu tố môi trường. Trong những năm gần đây, các nhà khoa học đã sử dụng các loại chỉ thị phân tử khác nhau như: RFLP, ISSR, RAPD, SSR và AFLP để

¹ Học viện Nông nghiệp Việt Nam

phân tích mối quan hệ di truyền giữa các giống cà chua ở mức độ ADN, đặc biệt là chỉ thị SSR (Simple Sequence Repeat), chỉ thị dùng để nhận những đoạn AND lặp trong genome để tìm sự đa hình. Các nhà khoa học đã áp dụng chỉ thị này trong phân tích đa hình giữa các loại cây trồng với nhau, từ đó tìm ra sự khác biệt giữa chúng. Các tác giả Parmar và cộng sự (2010), Meng và cộng sự (2010) đã sử dụng các chỉ thị SSR để nghiên cứu đa dạng di truyền của các giống cà chua. Kết quả cho thấy tất cả các chỉ thị đều cho đa hình cao, từ đó có được mối quan hệ di truyền giữa các mẫu giống làm cơ sở cho công tác chọn tạo giống cũng như bảo tồn nguồn gen cà chua. Song song với việc nghiên cứu đa dạng di truyền các mẫu giống cà chua, chỉ thị phân tử ADN cũng được sử dụng để phát hiện gen kháng bệnh xoăn vàng lá là *Ty1*, *Ty2* và *Ty3*. Bệnh xoăn vàng lá do một số loài virus thuộc chi *Begomovirus* gây ra, đang là bệnh gây hại nghiêm trọng nhất đối với cây cà chua. Bệnh này được cho là tác nhân chính gây suy giảm năng suất cà chua ở Việt Nam nói riêng và trên thế giới. Sử dụng giống cà chua kháng là biện pháp hiệu quả nhất để phòng chống bệnh này. Đến nay, các nhà khoa học trên thế giới đã xác định được 5 gen kháng virus xoăn vàng lá. Các gen kháng bệnh xoăn vàng lá gồm gen *Ty1* (Zamir et al., 1994) và *Ty3* (Ji and Scott, 2006) nằm trên nhiễm sắc thể 6, gen *Ty2* nằm trên nhiễm sắc thể 11 (Hanson et al., 2006), gen *Ty4* nằm trên nhiễm sắc thể 3 (Ji et al., 2008) và gen *Ty5* nằm trên nhiễm sắc thể 4 (Anbinder et al., 2009a). Các chỉ thị phân tử liên kết chặt với các gen kháng xoăn vàng lá *Ty1*, *Ty2*, *Ty3* (Castro et al., 2007; Garcia et al., 2007; Ji et al., 2007a; Zhang, 2010) đã được phát triển và sử dụng trong chọn giống giúp giúp cho việc chọn tạo giống kháng cũng như quy tụ nhiều gen kháng vào một giống trở nên thuận lợi và dễ dàng hơn. Mặt khác chúng là các gen trội lên hoàn toàn có thể sử dụng trong các chương trình chọn tạo giống cà chua lai.

Trong nghiên cứu này, chỉ thị phân tử DNA đã được sử dụng để đánh giá đa dạng di truyền và phát hiện gen kháng bệnh xoăn vàng lá *Ty1*, *Ty2* và *Ty3* của 72 mẫu giống cà chua làm tiền đề cho công tác chọn tạo giống cà chua lai, kháng bệnh xoăn vàng lá.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

72 mẫu giống cà chua thuần được thu thập từ Viện Cây lương thực và cây thực phẩm, Trung tâm nghiên cứu rau quả châu Á, Trung tâm Bảo tồn và Phát triển Nguồn gen-Học viện Nông nghiệp Việt Nam và Đại Học UC DAVIS-Mỹ (bảng 1).

10 cặp môi SSR (bảng 2) sử dụng trong nghiên cứu quan hệ di truyền và các chỉ thị liên kết với các gen kháng bệnh xoăn vàng lá (bảng 3).

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phân tích đa dạng di truyền bằng chỉ thị phân tử

*** Chiết tách ADN:** ADN được chiết tách bằng phương pháp CTAB được mô tả bởi Doyle (1990) có cải tiến, cụ thể như sau: 0,1g lá non ở cây khỏe, nghiền nhỏ bằng cối sứ, sau đó thêm 800µl đệm chiết gồm (NaCl 1,5M, EDTA 50mM, Tris-HCl 100mM, CTAB 2%, β mercaptoethanol 1%), tiếp tục nghiền cho đến khi dịch chuyển sang màu xanh đậm. Chuyển dịch nghiền vào ống eppendorf 1,5ml vô trùng, ủ ở nhiệt độ 65⁰C trong 30 phút. Dịch nghiền sau khi ủ được giữ ở nhiệt độ phòng trong 5 phút, sau đó bổ sung thêm 800µl hỗn hợp Choloroform: Isoamylalcol theo tỷ lệ (24:1), lắc nhẹ 10 phút và ly tâm 13.000 vòng/phút

trong 15 phút. Sau ly tâm chuyển phần dịch phía trên sang ống Eppendorf mới. Thêm 800µl Isopropanol, lắc đều rồi đặt ở -20°C trong 30 phút, sau đó ly tâm 13.000 vòng/phút trong 10 phút, thu kết tủa ADN dưới đáy ống. Rửa kết tủa bằng Ethanol 70%, để khô ở nhiệt độ phòng. Hòa tan kết tủa ADN bằng 50µl dung dịch TE (Tris-HCl 10mM, EDTA 1mM) rồi bảo quản ở -20°C.

*** Phản ứng PCR:** Phản ứng PCR được thực hiện trên máy PCR Eppendorf với thể tích phản ứng 20µl, trong đó ADN tổng số 1µl (100ng ADN), primer 1µl (10pM) mỗi loại, PCR master mix 2X của Promega 10,0 µl, nước nuclease free cho đến 20µl. Chu kỳ nhiệt: 94°C trong 5 phút, tiếp tục 35 chu kỳ (94°C trong 30 giây, 38-49°C trong 1 phút (tùy theo cặp mồi, xem bảng 2), 72°C trong 2 phút), cuối cùng 72°C trong 10 phút.

*** Điện di và cho điểm:** 15µl sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 2,0%, hiệu điện thế 60V khoảng 1,5-2 giờ trong đệm TAE bao gồm (Tris-HCl, Acid acetic và EDTA). Sau đó gel được nhuộm bằng Ethidium Bromide 1,0% khoảng 15 phút rồi soi dưới đèn UV, quan sát và chụp ảnh.

*** Xử lý số liệu:** Sự vắng mặt hay có mặt của các vạch băng trên các mẫu giống được ghi lại trong một ma trận nhị phân tương ứng là 1 hoặc 0. Sự tương đồng về di truyền (S) giữa các mẫu giống được tính toán bằng cách sử dụng hệ số tương đồng được mô tả bởi Nei và Li (1973). Các dữ liệu này được sử dụng để xây dựng một cây phả hệ bằng phương pháp phân nhóm UPGMA thông qua phần mềm NTSYS-pc 2.1 (Rohlf, 2000).

Bảng 1. Danh sách các mẫu giống cà chua nghiên cứu

Ký hiệu	Tên mẫu giống	Nguồn gốc	Ký hiệu	Tên mẫu giống	Nguồn gốc
D1	VC/XH-232-14	Viện CLT-TP	D37	T5C1	Viện CLT-TP
D2	PT4719A	AVRDC	D38	T14C1	Viện CLT-TP
D3	CLN1351C	AVRDC	D39	T13C3	Viện CLT-TP
D4	VC/XH-252-17	Viện CLT-TP	D40	VT9	Viện CLT-TP
D5	VC/XH-218-09	Viện CLT-TP	D41	VT5	Viện CLT-TP
D6	VC/XH-126-05	Viện CLT-TP	D42	VT3	Viện CLT-TP
D7	CLN2396-94-16-11-23	AVRDC	D43	VT4	Viện CLT-TP
D8	Mỹ chọn lọc 1	Viện CLT-TP	D44	VT10	Viện CLT-TP
D9	Lan Đá Hải Phòng	Giống đ/p	D45	VT8	Viện CLT-TP
D10	CLN3241F-31-8-16-20	AVRDC	D46	N2	TTBTG
D11	VC/06-2250-5	Viện CLT-TP	D47	N9	TTBTG
D12	CLN2443DC2B-7-23-2-7	AVRDC	D48	N3	TTBTG
D13	VC/06-2250-6	Viện CLT-TP	D49	N1	TTBTG
D14	CLN2131-1-16-17-5	AVRDC	D50	N13	TTBTG
D15	CLN3241F-31-25-13-2	AVRDC	D51	N10	TTBTG

D16	CLN2418F	AVRDC	D52	N14	TTBTG
D17	VC/06-2530-4	Viện CLT-TP	D53	N8	TTBTG
D18	CLN2413-L 12	AVRDC	D54	N11	TTBTG
D19	CLN2237B	AVRDC	D55	N5	TTBTG
D20	CLN2413A	AVRDC	D56	N12	TTBTG
D21	VC/XH.218-09	Viện CLT-TP	D57	TY2	Mỹ
D22	CL 5915-93 D4-1-0-C-1	AVRDC	D58	TY3	Mỹ
D23	VC/XH.122-15	Viện CLT-TP	D59	TY1	Mỹ
D24	VC/VX.282-35	Viện CLT-TP	D60	41C1	Viện CLT-TP
D25	VC/VX.157-33	Viện CLT-TP	D61	18C1	Viện CLT-TP
D26	CLN6046 BC3F2 -20-5-15	AVRDC	D62	21C1	Viện CLT-TP
D27	SC4	Viện CLT-TP	D63	29C1	Viện CLT-TP
D28	C135	Viện CLT-TP	D64	MN5-HT2	Viện CLT-TP
D29	C155	Viện CLT-TP	D65	MN6-14	Viện CLT-TP
D30	SVM1	Viện CLT-TP	D66	MN3-23	Viện CLT-TP
D31	HA2	Viện CLT-TP	D67	MN4-26	Viện CLT-TP
D32	S2C3	Viện CLT-TP	D68	MN1-7	Viện CLT-TP
D33	S2C1	Viện CLT-TP	D69	MN2-15	Viện CLT-TP
D34	T3C2	Viện CLT-TP	D70	Reika	AVRDC
D35	T6C1	Viện CLT-TP	D71	Receive	AVRDC
D36	T7C2	Viện CLT-TP	D72	Resanana	AVRDC

Ghi chú: AVRDC: Asian Vegetable Research and Development Center

CLT - TP: Cây lương thực- thực phẩm

2.2.2. Phát hiện gen kháng Ty1, Ty2 và Ty3 ở 72 mẫu giống cà chua

* **Chiết tách ADN:** Được tiến hành như phần 2.2.1.

* **Môi phát hiện gen kháng Ty1, Ty2, Ty3** (Bảng 3).

Bảng 2. Danh sách các chỉ thị SSR và trình tự môi

STT	Tên môi	Trình tự môi (5'-3')		Ta (°C)	Tham khảo
1	SSR-304	F:	5'-tcc tcc ggt tgt tac tcc ac-3'	49	Parmar và cs, 2010
		R:	5'-tta gca ctt cca ccg att cc-3'		
2	SSR-108	F:	5'-tgt gtt gga tgt ttg gca ct-3'	48.5	
		R:	5'-gcc att gaa act tgc aga ga-3'		
3	Tom 49-50	F:	5'-aag aaa ctt ttt gaa tgt tgc-3'	43	Meng và cs,

		R:	5'-att aca att tag aga gtc aag g-3'		2010
4	Tom 8-9 A	F:	5'-gca ttg att gaa ctt cat tct cgt cc -3'	49	
		R:	5'-att ttt gtc cac caa cta acc g-3'		
5	Tom 322-323	F:	5'-ggg gaa aag agc aaa ata gt-3'	38	
		R:	5'-ttt gta atc cat gtc tat aa-3'		
6	Tom 41-42	F:	5'-gaa atc tgt tga agc cct ctc-3'	48	
		R:	5'-gac tgt gat agt aag aat gag-3'		
7	Tom 61-62	F:	5'-ggc aaa gaa gga ccc aga gc-3'	48	
		R:	5'-ggg gcc taa aaa agt taa at-3'		
8	Tom 69-70	F:	5'-cgg act ccc aga ccc tca t -3'	48	
		R:	5'-acc aat gat act act acc aca ac-3'		
9	Tom 202-203	F:	5'-tgg tca cct tca act ttt ata c-3'	45	
		R:	5'-aaa tga taa tga aat gga gtg a-3'		
10	Tom 300-301	F:	5'-ttc ttt att ttg gag gta -3'	45	
		R:	5'-atc aca aat tca aat cac-3'		

Bảng 3. Trình tự các cặp môi nhân các chỉ thị liên quan đến gen kháng bệnh

TT	Chỉ thị	Trình tự môi	Gen liên kết	Tham khảo
1	JB1	F5' - aac cat tat ccg gtt cac tc - 3'	Ty1	Castro và cộng sự, 2007)
		R5' - ttt cca ttc ctt gtt tct ctg - 3'		
2	TG97	F5' - taa tcc gtc gtt acc tct cct t -3'	Ty1	Han và cộng sự, 2012
		R5' - cgg atg act tca ata gca atg a -3'		
3	T0302	F5' - tgg ctc atc ctg aag ctg ata ggc c - 3'	Ty2	Garcia và cộng sự, 2007
		R5' - tga t(t/g)t gat gtt ctc (t/a)tc tct (c/a)gc ctg - 3'		
4	P6-25	F5' - ggt agt gga aat gat gct gct c - 3'	Ty3	Ji và cộng sự, 2007
		R5' - gct ctg cct att gtc cca tat ata acc - 3'		
		R5' - a ggg ctc ttc tcg ata gta -3'		

*** Phản ứng PCR:** Thành phần mỗi phản ứng 25µl gồm: ADN tổng số 1µl (100ng ADN), 12,5 µl PCR master mix 2X của Promega; 1,0 µl môi xuôi (10 pM); 1,0µl môi ngược (10pM); thêm nước nuclease free đến 25µl. Chu kỳ nhiệt: biến tính ban đầu ở 94°C/5 phút. Thời gian các bước sau tùy mỗi gen: Gen *Ty1* với chỉ thị JB1 và TG97 chạy 20 chu kỳ đầu ở 94°C/10 giây, 55°C/30 giây, 72°C/70 giây; 10 chu kỳ sau ở 94°C/10 giây, 53°C/30 giây, 72°C/70 giây. Các gen *Ty2* và *Ty3* chạy 35 chu kỳ gồm 94°C/30 giây, 53°C/1 phút, 72°C/1

phút. Kết thúc phản ứng bằng bước kéo dài ở 72⁰C /5 phút và giữ ở 4⁰C. Riêng gen *Ty1*, 10µl sản phẩm PCR được ủ qua đêm ở 65⁰C với 5 đơn vị enzyme *TaqI* để phân biệt các alen kháng khác nhau (đồng hợp và dị hợp).

* **Điện di:** Sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 1,5% trong đệm TAE 1 X, sau đó nhuộm với Ethidium bromide, rồi soi dưới đèn UV, quan sát và chụp ảnh.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Nghiên cứu đa dạng di truyền các mẫu giống cà chua

SSR (Simple Sequence Repeat) là chỉ thị dùng để nhận những đoạn ADN lặp trong genome để tìm sự đa hình. Trong nghiên cứu này, 10 chỉ thị có trình tự như bảng 2 đã được sử dụng để nghiên cứu đánh giá mối quan hệ di truyền của các mẫu giống cà chua. Đây là những cặp mồi sử dụng chuyên đánh giá đa dạng di truyền ở cây cà chua và đã được các tác giả Parmar et al. (2010) và Meng et al. (2010) kết luận là có sự đa hình cao. Tuy nhiên trong số 10 chỉ thị SSR được sử dụng, có 9 chỉ thị chiếm 90% cho sản phẩm khuếch đại đa hình, chỉ thị không cho đa hình đó là chỉ thị Tom 202-203, kết quả được tổng hợp ở bảng 4.

Bảng 4. Số alen nhận lên bằng PCR sử dụng các chỉ thị SSR

Chỉ thị	Tổng số alen	Số alen đa hình	Tỷ lệ alen đa hình (%)
SSR-304	7	5	71,43
SSR-108	2	1	50,00
Tom 49-50	4	3	75,00
Tom 8-9 A	5	4	80,00
Tom 322-323	4	4	100,00
Tom 41-42	2	2	100,00
Tom 61-62	5	5	100,00
Tom 69-70	5	5	100,00
Tom 300-301	5	4	80,00
Tom 202-203	4	0	0,00
Tổng cộng	43	33	77,00

Bảng 4 cho thấy chỉ thị nhận lên nhiều alen nhất là chỉ thị SSR-304 với 7 alen trong đó 5 alen đa hình. Chỉ thị nhận lên ít alen nhất là SSR-108 và Tom 41-42 với 2 alen. Qua bảng 4 cũng nhận thấy có 4 chỉ thị cho 100% số alen đa hình là các chỉ thị Tom 322-323, Tom 41-42, Tom 61-62 và Tom 69-70. Tính tỷ lệ chung cho 10 chỉ thị thì tổng số alen nhận lên là 43, số alen đa hình 33 chiếm 77%. Từ kết quả của 9 chỉ thị cho các alen đa hình, trên trường điện di chúng tôi tiến hành ghi điểm (0) và (1). Điểm 0 tức không có alen, điểm 1 có alen ở một vị trí trên các giống. Bằng phần mềm chuyên dụng NTSYSpc 2.1 đã tính toán được hệ số tương đồng di truyền và sơ đồ hình cây quan hệ di truyền của 72 mẫu giống cà chua, qua đó phân theo các nhóm để có hướng sử dụng trong công tác chọn tạo giống.

Theo các tác giả hai giống lai với nhau cho ưu thế lai thì hệ số tương đồng di truyền nằm trong khoảng từ 0,4 đến 0,7. Nếu lớn hơn 0,7 lai với nhau sẽ không cho ưu thế lai, nếu nhỏ hơn 0,4 lai với nhau sẽ gây ra hiện tượng bất dục ở con lai. Như vậy với hệ số tương đồng 0,7 biểu thị trên hình cây chúng tôi chia 72 mẫu giống cà chua nghiên cứu thành 4 nhóm lớn.

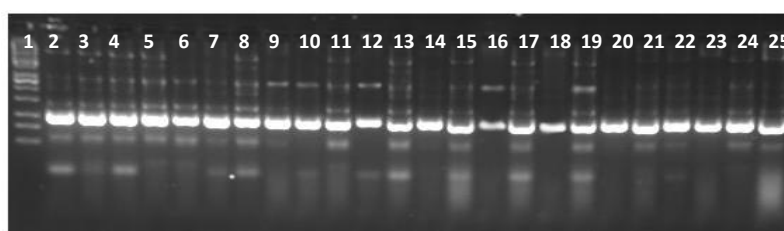
Nhóm 1 gồm 8 mẫu giống: D1, D2, D4, D11, D31, D14, D18 và D13

Nhóm 2 có duy nhất 1 mẫu giống là D59

Nhóm 3 gồm 33 mẫu giống là: D3, D24, D15, D27, D44, D20, D58, D67, D16, D17, D40, D12, D60, D54, D25, D37, D38, D71, D19, D22, D66, D21, D29, D41, D30, D39, D42, D43, D46, D51, D34, D57, D63

Nhóm 4 gồm 30 mẫu giống là: D5, D6, D7, D8, D9, D23, D36, D45, D47, D52, D64, D48, D53, D50, D56, D65, D10, D26, D72, D32, D35, D69, D49, D55, D33, D28, D70, D62, D68, D61.

Qua tính toán chúng tôi cũng nhận thấy hệ số tương đồng của các mẫu giống không nhỏ hơn 0,4. Như vậy các mẫu giống khác nhóm có thể lai với nhau mà không xảy ra hiện tượng bất dục ở con lai.



Hình 1. Điện di sản phẩm PCR chỉ thị SSR 304

1. Lader; 2: D1; 3: D13; 4: 26: D26; 5: 14; 6:D3; 7:D15; 8: D4; 9: D16; 10:D5; 11: D17; 12: D6; 13:D18; 14: D7; 15: D19; 16:D8; 17:D 20; 18: D9; 19: D21; 20:10; 21:D22; 22:D11; 23: D23; 24:D12; 25:D24



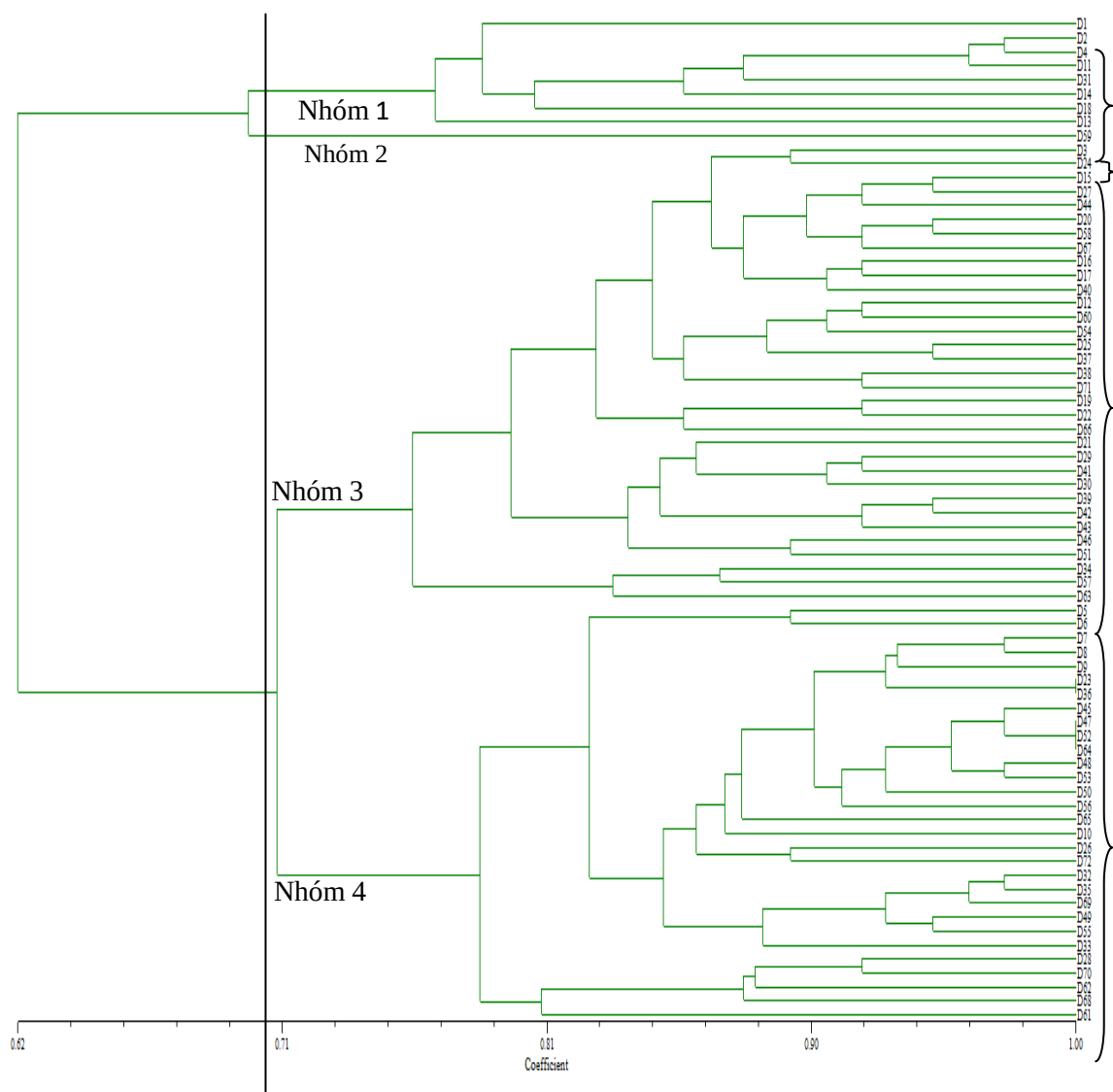
Hình 2. Điện di sản phẩm PCR chỉ thị SSR 108

1. Lader; 2: D25; 3: D37; 4: D26; 5:D38; 6: D27; 7: D39; 8:D28; 9: D40; 10:D29; 11: D41; 12: D30; 13: D42; 14: D31; 15:D43; 16:D32; 17:D44; 18:D33; 19:D45; 20: D34; 21: D46; 22: D35; 23: D47; 24:D36; 25: D48



Hình 3. Điện di sản phẩm PCR chỉ thị Tom49-50

1.lader ; 2: D49; 3: D61; 4:D50; 5:D62; 6:D51; 7:D63; 8:D52; 9:D64; 10:D53; 11: D65; 12:D54; 13:D66; 14:D55; 15:D67; 16:D56; 17:D68; 18:D57; 19:D69; 20: D58; 21:D70; 22:D59; 23:D71; 24: D60; 25:D72



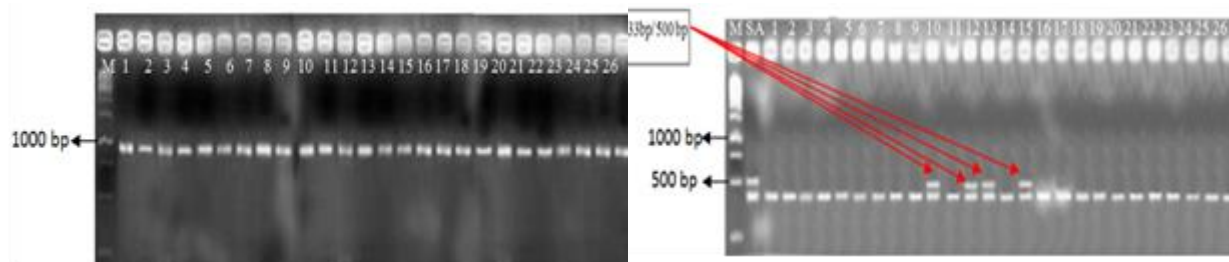
Sơ đồ biểu diễn mối quan hệ di truyền của 72 mẫu giống cà chua

3.2. Phát hiện gen kháng bệnh virus xoăn vàng lá

3.2.1. Phát hiện gen *Ty1*

Castro và cộng sự (2007) đã xác định được chỉ thị JB-1 liên kết chặt với gen *Ty1*. Cũng theo tác giả, các cây đồng hợp tử alen *Ty1/Ty1* có khả năng kháng cao và không biểu hiện triệu chứng bệnh đối với các loài virus gây bệnh xoăn vàng lá cà chua. Theo Garcia và Maxwell (2011), sản phẩm PCR thu được với marker JB- 1 (hình 4a) có kích thước 930bp, với kích thước này không thể phân biệt cây chứa gen đồng hợp trội, đồng hợp lặn. Để phân biệt, sản phẩm PCR được cắt bởi enzyme *TaqI*. Sau phản ứng các mẫu giống mang kiểu gen *ty1/ty1*(đồng hợp lặn) cho một vạch băng kép khoảng 437bp và một băng quá nhỏ khoảng 35bp cho nên khi điện di bằng agar 2% chỉ thấy 1 vạch khoảng 437bp. Các mẫu giống có gen kháng *Ty1/Ty1*(đồng hợp trội) hoặc *Ty1/ty1* (dị hợp tử) cho hai vạch băng khoảng 433bp và 500bp. Nguyên nhân của sự sai khác này là do alen từ *S. lycopersicum* có 2 vị trí cắt của *TaqI*, trong khi alen kháng từ *S. chilense* chỉ có một (Hình 4b) (Garcia và Maxwell, 2011). Tiến

hành phản ứng PCR với chỉ thị JB-1 trên 72 mẫu giống nghiên cứu, điện di sản phẩm PCR (Hình 4a) thu được duy nhất vạch băng 930bp rõ nét ở tất cả các mẫu giống đúng như mô tả của Garcia và Maxwell (2011). Sau khi ủ sản phẩm PCR với *TaqI* thấy 5 mẫu giống có chứa gen là D10, D12, D13, D15 và D59, vết băng của 5 mẫu giống này cũng trùng với vết băng của giống đối chứng SA (Savior).



Hình 4a. Sản phẩm PCR phát hiện gen *Ty1* **Hình 4b. Cắt sản phẩm PCR gen *Ty1* bằng enzyme *TaqI* sản phẩm**

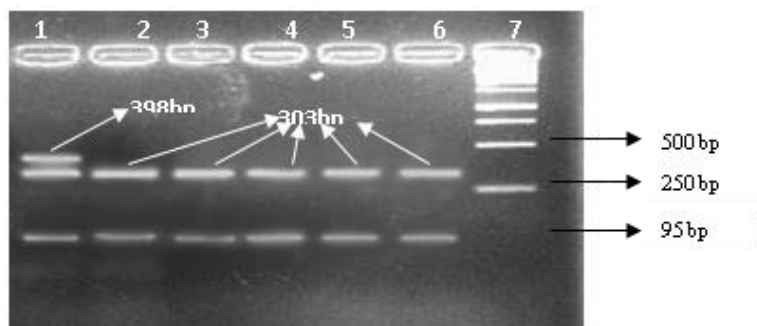
Các giống SA: đối chứng Savior, 10, 12, 13 và 15 chứa gen *Ty1*, các giống còn lại không chứa gen

Như vậy để phát hiện gen *Ty-1*, Castro et al., (2007) đã phát triển chỉ thị CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequences) JB-1 liên kết chặt với gen này. Tuy nhiên, đây là một marker trội, không phân biệt được kiểu gen kháng đồng và dị hợp tử, chính vì vậy các vết băng của các giống chứa gen đều trùng với giống Savior, mà Savior lại là giống lai F1 có kiểu gen kháng dạng dị hợp tử không sử dụng được trong chọn tạo giống cà chua lai. Mới đây, Han và cs., (2012) đã phát triển thành công chỉ thị đồng trội CAPS TG97 cho phép phân biệt được kiểu gen kháng đồng và dị hợp tử. Sản phẩm PCR với cặp mồi TG97F/R là một đoạn ADN dài 398bp ở tất cả các mẫu giống. Sau khi cắt sản phẩm bằng enzyme *TaqI*, các mẫu giống mang gen *Ty1* đồng hợp tử xuất hiện 2 vạch băng dài 303bp và 95bp, các mẫu giống mang gen *Ty1* dị hợp tử xuất hiện 3 vạch băng dài 398, 303 và 95bp, các mẫu giống không có gen kháng không bị cắt nên chỉ có một vạch dài 398bp (Han et al., 2012). Để chứng minh các mẫu giống D10, D12, D13, D15 và D59 chứa gen kháng *Ty1* đồng hợp phục vụ cho công tác chọn tạo giống cà chua lai, chỉ thị TG97 tiếp tục để phát hiện gen *Ty1*. Kết quả cho thấy, cả 5 mẫu giống đều chứa 2 vết băng 303 và 95bp tương ứng với chứa gen *Ty1/Ty1* (hình 4c). Đối chứng Savior chứa gen dị hợp tử *Ty1/ty1* xuất hiện 3 vạch băng có kích thước lần lượt là: 398, 303 và 95bp. Như vậy, 5 mẫu giống D10, D12, D13, D15 và D59 đều chứa gen *Ty1* đồng hợp tử nên hoàn toàn có thể sử dụng trong chọn tạo giống cà chua lai.

Hình 4c. Điện di phát hiện gen kháng *Ty1*

1. Savior chứa gen *Ty1/Ty1*; 2. D10 chứa gen *Ty1/Ty1*; 3. D12 chứa gen *Ty1/Ty1*;

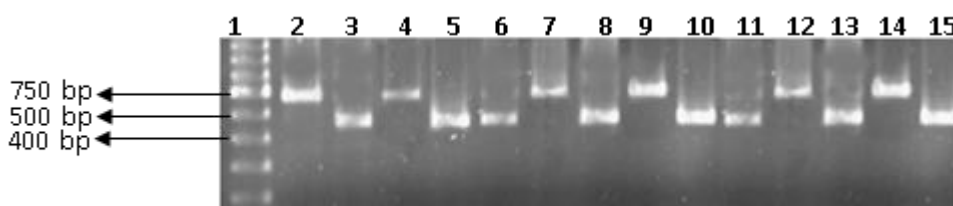
4. D13 chứa gen *Ty1/Ty1*; 5. D15 chứa gen *Ty1/Ty1*; 6. D59 chứa gen *Ty1/Ty1*; 7. leader



3.2.2. Phát hiện gen *Ty2*

Gen *Ty2* đã được lập bản đồ nằm trên NST số 11 liên kết với các chỉ thị RFLP TG393 và TG36 (Hanson et al., 2006). Hiện nay, có một số chỉ thị dựa trên PCR nhằm phát hiện vùng ADN chuyển vị từ loài *S. habrochaites* đã được phát triển. Chỉ thị CAPS TG105A có khả năng khuếch đại mạnh và cắt giới hạn sản phẩm PCR bằng enzyme *TaqI* đã tạo ra các vệt băng đa hình phân biệt *S. habrochaites* và *S. lycopersicum*. Một chỉ thị khác dựa trên PCR là T0302 cũng đã được xác định phát hiện locus *Ty2* mà không cần phải dùng đến enzyme cắt giới hạn. Trong nghiên cứu này đã sử dụng chỉ thị T0302 để phát hiện gen *Ty2/Ty2* (đồng hợp trội). Đối với gen *Ty2*, sản phẩm PCR với cặp mồi T0302F/R nhân chỉ thị T0302, nếu là *Ty2/Ty2* (đồng hợp trội) thì nhân lên đoạn 600bp, nếu là *ty2/ty2* (đồng hợp lặn) nhân lên đoạn 450, nếu là *Ty2/ty2* (dị hợp) cho ba đoạn gồm 450, 600 hoặc 450 và 700bp (Garcia et al., 2007). Kết quả PCR phát hiện gen *Ty2* cho thấy phần lớn các mẫu giống cho sản phẩm là một băng 450bp, tương ứng alen mất cảm *ty2/ty2* (đồng hợp lặn). Chỉ có 5 mẫu giống là D23, D27, D28, D58 và D66 cho vệt băng là 600 bp. Điều này chứng tỏ các mẫu giống này chứa gen *Ty2* đồng hợp trội.

Hình 5. Sản phẩm PCR phát hiện gen *Ty2*



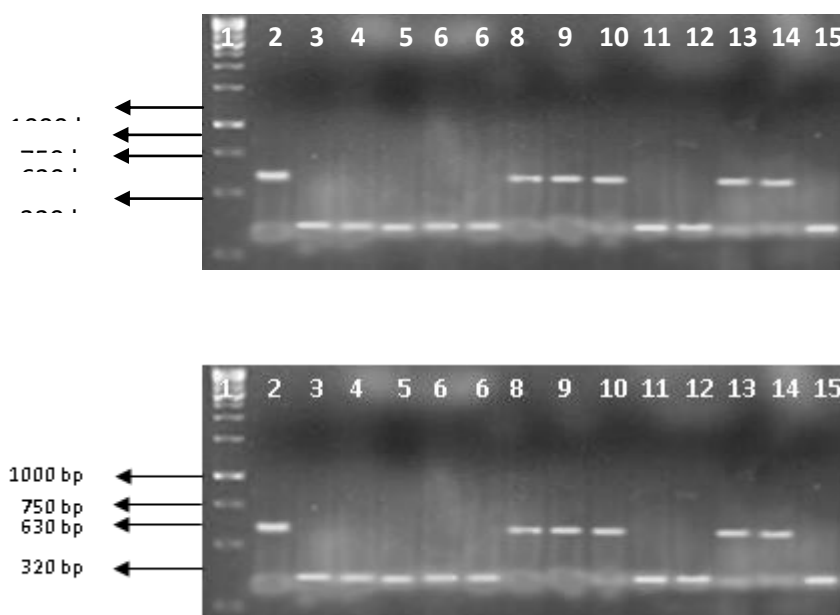
1. Marker; 2. Đối chứng chứa gen; 4, 7, 9, 12 và 14 chứa gen *Ty2*;

2. 3, 5, 6, 8, 10, 11, 13 và 15 không chứa gen

3.1.3. Phát hiện gen *Ty3*

Gen *Ty3* là gen trội nằm trên nhiễm sắc thể số 6 (Ji et al., 2007; Ji and Scott, 2007). Theo Ji et al. (2007), gen *Ty3* định vị tại một vùng có chứa locus FER (25 cM, dòng vector BAC 56B23, AY678298). Cặp mồi P6-25 F/R được thiết kế để khuếch đại trình tự gần đầu 5' của dòng vector BAC 56B23, tạo ra sản phẩm là một băng 660bp đối với alen *Ty3b* và một băng 630bp với alen *Ty3a*, alen mất cảm *Ty3* cho một băng 320bp. Các giống lai dị hợp tử cho sản phẩm là 2 băng 320bp (*ty3*) và 660bp (*Ty3*) hoặc 630bp (*Ty3a*). Khi sử dụng cặp mồi

P6-25F/R để sàng lọc một số giống lai thương mại, Ji et al. (2007) đã thu được một băng 660bp ở ba giống khác nhau. Sử dụng cặp mồi P6- 25F/R để khảo sát khả năng mang gen kháng *Ty3* ở các mẫu giống nghiên cứu, nhận thấy phần lớn các mẫu giống cho một băng 320 bp (*ty3/ty3*) (Hình 6). Có 6 mẫu giống cho vệt băng 630 bp là các mẫu giống: D12, D37, D37, D40, D51 và D58, 6 mẫu này chứa gen (*Ty3/Ty3*).



Hình 6. Điện di sản phẩm PCR phát hiện gen Ty3

1. Marker, 2. Đối chứng chứa gen; 8,9, 10, 13 và 14 chứa gen Ty3,
các giếng còn lại không chứa gen

4. KẾT LUẬN

Sử dụng 10 chỉ thị SSR để nghiên cứu đa dạng di truyền của 72 mẫu giống cà chua thấy rằng 9/10 chỉ thị là đa hình. Tổng số allele được nhận từ các chỉ thị là 43 allele, trong đó có 33 allele đa hình chiếm 77,0 %. Phân tích SSR đã chia 72 mẫu giống thành 4 nhóm, các nhóm được phân có khoảng cách di truyền nhỏ hơn 0,7, trong đó có nhiều mẫu giống thể hiện mức độ sai khác di truyền khá cao, chúng có ý nghĩa sử dụng trong tạo giống cà chua ưu thế lai.

Kết quả điều tra 72 dòng cà chua thuần bằng chỉ thị phân tử ADN phát hiện được 5 dòng có chứa gen đồng trội Ty1 là: D10, D12, D13; D15 và D59, 5 mẫu giống mang gen Ty2 là D23, D27, D28, D57, D66 và 6 mẫu giống mang gen Ty3 là D12, D13, D37, D40, D51, D58. Đây là nguồn vật liệu vô cùng quý giá trong chọn tạo giống cà chua kháng bệnh xoắn vàng lá.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Castro, Ana Pérez de, Blanca, José Miguel, Díez, María José, & Vinals, Fernando Nuez. (2007). *Identification of a CAPS marker tightly linked to the Tomato yellow leaf curl disease resistance gene Ty-1 in tomato*. Eur J Plant Pathol, 117, 347–356.
2. F. James Rohlf, 2000. *NTSYSpc Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System Version 2.1*
3. Han, c., Jianjun, s., Linshan, w., Peng, t. & Yan, q. 2012. *Establishment of CAPS Molecular Marker for Ty-1 Gene Resistant to Tomato Yellow Leaf Curl Disease*. Chinese Agricultural Science Bulletin, 28, 195-200.

4. Hanson, P.M, Green, S.K, & Kuo, G. (2006). *Ty-2 gene on chromosome 11 conditioning geminivirus resistance in tomato*. Report of the Tomato Genetics Cooperative, 56, 17-18.
5. Doyle J. J., và J. L. Doyle. (1990). *A rapid total DNA preparation procedure for fresh plant tissue*. Focus:, 12, 13-15.
6. Kaemmer D, Weising K, Beyermann B, Börner T, Epplen J T, Kahl G. 1995. *Oligonucleotide fingerprinting of tomato DNA*. Plant Breeding, 114, 12-17.
7. Meng Fan-juan, XU Xiang-yang, Huang Feng-lan, LI Jing-fu, 2010. *Analysis of Genetic Diversity in Cultivated and Wild Tomato Varieties in Chinese Market by RAPD and SSR*. Agricultural Sciences in China, 2010, 9(10): 1430-1437.
8. Nei M (1973). *Analysis of gene diversity in subdivided populations*. Proc Natl Acad Sci. 70:3321-3323.
9. Ji, Yuanfu, Salus, Melinda S., Betteray, Bram van, Smeets, Josie, Jensen, Katie S., Martin, Christopher T., Mejía, Luis, Scott, Jay W., Havey, Michael J., & Maxwell, Douglas P. (2007). *Co-dominant SCAR Markers for Detection of the Ty-3 and Ty-3a Loci from Solanum chilense at 25 cM of Chromosome 6 of Tomato*. Report of the Tomato Genetics Cooperative, 57, 25-28.
10. Ji, Yuanfu, Schuster, David J., & Scott, Jay W. (2007). *Ty-3, a begomovirus resistance locus near the tomato yellow leaf curl virus resistance locus Ty-1 on chromosome 6 of tomato*. Molecular Breeding, 20(3), 271-284.
11. Parmar Pritesh, Vishal P. Oza, Vaishnavi Chauhan, A.D. Patel, K.B. Kathiria, and R.B. Subramanian. 2010. *Genetic Diversity and DNA Fingerprint Study of Tomato Discerned by SSR Markers*. International Journal of Biotechnology and Biochemistry, Volume 6 Number 5 (2010): 657–666.
12. Dương Kim Thoa (2012), “*Nghiên cứu nguồn vật liệu khởi đầu cho tạo giống cà chua ưu thế lai phục vụ chế biến ở Đồng bằng sông Hồng*”, Luận án tiến sĩ Nông nghiệp. Trường Đại học Nông nghiệp Hà Nội.

NGHIÊN CỨU ỨNG DỤNG DNA MARKER TRONG KHAI THÁC VÀ CHỌN TẠO GIỐNG LÚA CÓ HÀM LƯỢNG ANTHOCYANIN CAO

Phạm Huệ Anh¹, Đặng Ngọc Trung¹, Nguyễn Hoài Nam¹,
Đỗ Huy Lộc¹, Phan Thị Kiều Anh¹.

ABSTRACT

Anthocyanin is a natural flavonoid and antioxidant compound found in red rice and purple rice (brown rice). Local brown rice of Vietnam is diverse and high potential for high quality food and medicine. This study aimed to identify suitable DNA marker to detect gene controlling anthocyanin synthesis in order to utilize local genetic resource and facilitate rice breeding program by marker assisted-selection in Vietnam. Total 20 local brown rice were collected and measured anthocyanin content by differential pH measurement. Variety N20 with black bran and variety N25 with red-brown bran contained the highest and the lowest anthocyanin content 379mg/100g and 2 mg/100g, respectively. Three DNA marker were used to detect *Rc* gene located in chromosome 7: *Rc*, *qPC7* and *RM21197*. Among them, marker *qPC7* was best choice and could detect *Rc* gene in 20 varieties.

Keywords: Brown rice, anthocyanin content, *Rc* gene, DNA marker.

TÓM TẮT

Anthocyanin là hoạt chất sinh học tự nhiên có nhiều trong gạo đỏ và gạo tím (gạo cẩm), thuộc nhóm flavonoid có khả năng chống oxi hóa cao. Các giống lúa cẩm của Việt Nam rất đa dạng và có nhiều giá trị về dinh dưỡng cũng như dược liệu. Mục tiêu của nghiên cứu là xác định chỉ thị DNA phù hợp để phát hiện gen quy định việc tổng hợp anthocyanin ở lúa nhằm khai thác nguồn gen quý ở các giống bản địa của Việt Nam và hỗ trợ cho công tác chọn tạo giống sử dụng chỉ thị DNA. Tổng số 20 mẫu giống lúa cẩm địa phương được thu thập và đánh giá hàm lượng anthocyanin bằng phương pháp pH vi sai, trong đó mẫu giống N20 vỏ cám đen đậm với hàm lượng anthocyanin cao nhất là 379mg/100g chiếm 0,2% trọng lượng khô. Kết quả chọn lọc trong 3 chỉ thị DNA nằm trên NST số 7 là *Rc*, *qPC7* và *RM21197* đã xác định chỉ thị *qPC7* phù hợp nhất để phát hiện sự có mặt của gen *Rc* trong 20 mẫu giống lúa cẩm nghiên cứu.

Từ khóa: Lúa cẩm, anthocyanin, gen *Rc*, chỉ thị DNA.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Lúa gạo đóng vai trò vô cùng quan trọng trong việc đảm bảo an ninh và an toàn lương thực cho nhân loại trong khi dân số thế giới ngày một tăng nhanh. Hiện nay nhu cầu tiêu dùng các sản phẩm nông nghiệp chứa các hoạt chất sinh học tự nhiên có lợi cho sức khỏe ngày càng tăng. Trên thị trường, người tiêu dùng đặc biệt quan tâm đến gạo đỏ và gạo tím (gạo cẩm) bởi giá trị dinh dưỡng cao do chứa chất chống oxy hóa anthocyanin. Hoạt chất này đã được chứng minh tác dụng làm giảm hình thành mảng bám xơ vữa động mạch, một yếu tố nguy cơ liên quan đến bệnh tim mạch (Huỳnh và *nnk.*, 2011; Andersen và *nnk.*, 2001; Ling và *nnk.*, 2001) [7, 1, 9]. Các công bố nghiên cứu về di truyền học và sinh học phân tử của màu sắc vỏ cám gạo cẩm sẽ cung cấp những thông tin quan trọng làm tiền đề cho công tác chọn tạo giống lúa cẩm chất lượng cao. Hai nhóm nghiên cứu độc lập do Furukawa và *nnk.*, (2007) [5] và Sweeney và *nnk.* (2006) [11] đồng thời xác định được gen *Rc* nằm trên NST số 7 mã hóa cho protein bHLH tham gia tổng hợp anthocyanin.

Ở Việt Nam, lúa cẩm là những giống lúa đặc sản được trồng từ lâu đời, trên nhiều địa phương, nhiều vùng sinh thái khác nhau và rất đa dạng về kiểu hình. Các sản phẩm làm từ gạo nếp, nếp cẩm được sử dụng với nhiều mục đích khác nhau trong đời sống của người dân (rượu nếp cẩm, xôi cẩm, sữa chua nếp cẩm), gạo cẩm có mặt trong rất nhiều lễ hội tạo nên nền văn hóa mang bản sắc văn hóa

¹ Học viện Nông nghiệp Việt Nam

Việt Nam (Ngô và *nnk.*, 2014) [10]. Tuy nhiên, các nghiên cứu về anthocyanin mức độ phân tử lúa cẩm Việt Nam, đặc biệt là các gen quy định tính trạng này còn hạn chế, gây khó khăn cho việc khai thác sử dụng nguồn gen bản địa. Việc ứng dụng chỉ thị DNA trong công tác chọn tạo giống sẽ giúp rút ngắn thời gian đánh giá kiểu gen thông qua kiểu hình vì có thể tiến hành ngay giai đoạn mạ để loại bỏ các cây không mang gen mong muốn. Vì vậy, đề tài được thực hiện là nhằm nghiên cứu xác định chỉ thị DNA phát hiện gen *Rc* phù hợp cho các giống lúa cẩm của Việt Nam và ứng dụng trong công tác bảo tồn và phát triển các giống lúa cẩm.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Vật liệu nghiên cứu gồm 20 mẫu giống lúa cẩm và giống IR24 từ nguồn gen giống lúa của Trung tâm tài nguyên thực vật (bảng 1). Các thí nghiệm được tiến hành tại phòng thí nghiệm Chọn giống phân tử, Trung tâm Nghiên cứu cây trồng Việt Nam-Nhật Bản (CIPR), Học viện Nông nghiệp Việt Nam.

Bảng 1. Danh sách 21 mẫu giống lúa nghiên cứu

STT	Ký hiệu	Tên địa phương	Nguồn gốc
1	N15	Nếp cẩm nương	Cẩm Thủy - Thanh Hóa
2	N16	Nếp cẩm	Bá Thước - Thanh Hóa
3	N17	Nếp cẩm đen	Sapa - Lào Cai
4	N18	Nếp cẩm riệu	Sapa - Lào Cai
5	N19	Nếp cẩm dạng 2	Ngọc Lặc - Thanh Hóa
6	N20	Nếp cẩm	Văn Chấn - Yên Bái
7	N21	Nếp cẩm	Nho Quan - Ninh Bình
8	N22	Nếp cẩm	Bạch Thông - Bắc Cạn
9	N23	Nếp cẩm	Hàm Yên - Tuyên Quang
10	N24	Nếp cẩm có râu	Na Hang - Tuyên Quang
11	N25	Nếp cẩm	Đà Bắc - Hòa Bình
12	N26	Nếp cẩm dạng 1	Ngọc Lặc - Thanh Hóa
13	N27	Nếp cẩm đen	Bá Thước - Thanh Hóa
14	N29	Nếp cẩm	Mai Châu - Hòa Bình
15	N31	Nếp cẩm	Trung tâm TNĐT
16	N32	Nếp cẩm	Lục Nam- Bắc Giang
17	N33	Nếp cẩm	Như Xuân - Thanh Hóa
18	N37	Tẻ cẩm	Viện NC Cây lương thực và Cây thực phẩm
19	N38	Nếp cẩm	Viện NC Cây lương thực và Cây thực phẩm
20	N39	Tẻ cẩm	Viện NC Cây lương thực và Cây thực phẩm
21	IR24	Tẻ thường (ĐC)	Viện nghiên cứu lúa quốc tế (IRRI)

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Đo hàm lượng anthocyanin trong các giống lúa cẩm

Theo phương pháp pH vi sai (Barnes và *nnk.*, 2005; Huỳnh và *nnk.*, 2004) [2, 7]: tiến hành đo độ hấp thụ quang của mẫu tại pH=1 (KCl 0.025M) và pH=4.5 (CH₃CO₂Na.3H₂O 0.4M) tại bước sóng hấp thụ cực đại 530nm, và so sánh với độ hấp thụ tại bước sóng 700 nm. Hàm lượng anthocyanin được tính theo công thức:

$$\% \text{ Anthocyanin toàn phần} = \frac{a}{m(100 - w).10^{-2}} 100\%$$

Trong đó:

m: Khối lượng nguyên liệu ban đầu (g)

w: Độ ẩm nguyên liệu (%)

a: Khối lượng anthocyanin (g):

$$a = \frac{A.M.K.V}{\varepsilon.l}$$

$$A = (A_{530, pH=1} - A_{700nm, pH=1}) - (A_{530, pH=4,5} - A_{700nm, pH=4,5})$$

M : khối lượng phân tử của anthocyanin

ε : độ hấp thụ phân tử.

l: chiều dày cuvet, cm

V: thể tích anthocyanin thu được

2.2.2. Phương pháp xác định gen Rc bằng DNA chỉ thị

Tách chiết DNA: thu mẫu lá của 20 mẫu giống và tách chiết DNA theo phương pháp sử dụng potassium acetate (Dellaporta, 1983) [4].

Phương pháp PCR: qua các công bố liên quan đến gen Rc nằm trên nhiễm sắc thể số 7 (Sweeney và nnk., 2006; Gu và nnk., 2011) [11, 6], chúng tôi lựa chọn được 3 chỉ thị DNA được thiết kế nằm trong các vùng khác nhau của gen Rc là: Rc, qPC7 và RM21197 có trình tự như bảng 2:

Bảng 2. Các chỉ thị sử dụng trong PCR

Tên chỉ thị	Trình tự môi xuôi	Trình tự môi ngược	Nguồn tham khảo	Sản phẩm PCR dự kiến
Rc	5'atcagtcacaggcaccaca3'	5'ccaagatcgcgagaattatga3'	Sweeney và nnk., 2006	229 bp
qPC7	5'gtggacctacagcctct3'	5'ctgcatcaccgtcgactt3'	Gu và nnk., 2011	431 bp
RM21197	5'cggtgagaatgtactctgtcc3'	5'atgggcaagggaattaaagg3'	Gu và nnk., 2011	236 bp

Điều kiện cho PCR: 95°C trong 3 phút và 35 chu kỳ 94°C trong 30 giây, 48°C trong 30 giây, 72°C trong 30 giây và 72°C trong 7 phút. Kiểm tra sản phẩm PCR bằng điện di trên gel agarose 4%, 250V trong 45 phút và nhuộm với Ethidium Bromide 0.5 µg/ml sau đó quan sát bằng máy soi gel UV.

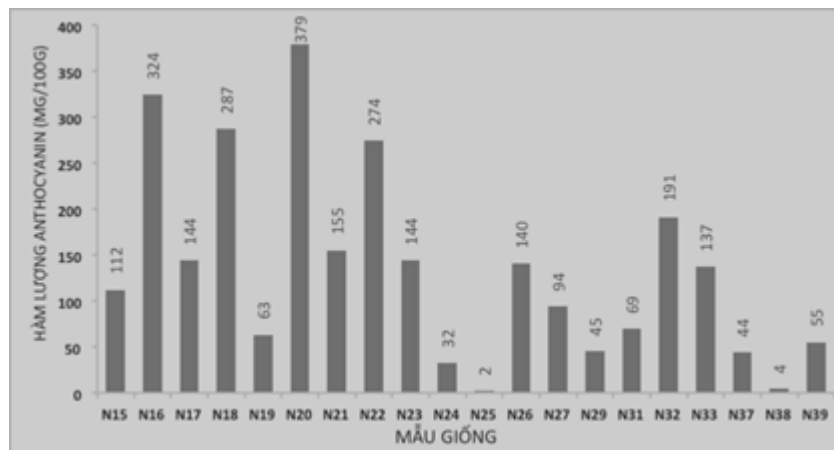
3. KẾT LUẬN VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả xác định hàm lượng anthocyanin

Hình 1. Màu sắc hạt gạo của 20 mẫu giống lúa cảm nghiên cứu



Hình 2. Hàm lượng anthocyanin 20 mẫu giống lúa cẩm.



(Giống IR24 có hàm lượng bằng 0)

Kết quả đo hàm lượng anthocyanin trên 20 giống mẫu lúa: các mẫu giống lúa cẩm khác nhau có hàm lượng anthocyanin không giống nhau, được chia làm 3 nhóm: (i) nhóm 1 có hàm lượng thấp (<100 mg/ 100g) gồm các mẫu giống N19, N24, N25, N27, N29, N31, N37, N38 và N39; (ii) nhóm 2 có hàm lượng trung bình (từ 100 đến 200mg/ 100g) gồm các mẫu giống N15, N17, N21, N23, N26, N32, N33; (iii) nhóm 3 có hàm lượng cao (>200mg/100g) gồm các mẫu giống N16, N18, N20, N22.

Có sự chênh lệch hàm lượng giữa mẫu giống có hàm lượng anthocyanin cao nhất (N20 có nội nhũ hạt gạo màu cẩm đen; 379mg/100g) với mẫu giống có hàm lượng anthocyanin thấp nhất (N25 có nội nhũ hạt gạo màu nâu đỏ, 2mg/100g).

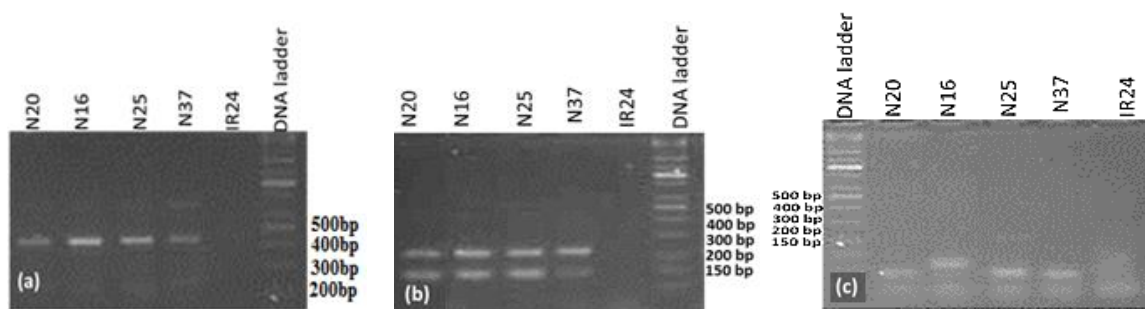
3.2. Kết quả xác định gen *Rc* quy định tổng hợp anthocyanin bằng chỉ thị DNA

Để xác định được DNA chỉ thị nào phát hiện gen *Rc* rõ nhất đơn giản mà chính xác nhất, chúng tôi so sánh kết quả PCR của 3 chỉ thị DNA trên 4 mẫu giống nghiên cứu N16, N20, N25, N37 và IR24. Kết quả trên hình 3a cho thấy chỉ thị qPC7 nhân được một băng ~ 431bp ở cả 4 mẫu DNA lúa cẩm đúng theo thông tin từ công bố của Gu và *nnk* (2011) [6]. Mẫu IR24 không có sản phẩm.

Hình 3b với chỉ thị *Rc* nhân được băng sản phẩm PCR ~ 229bp ở cả 6 mẫu DNA lúa cẩm, không có ở IR24 và kết quả có thêm một băng DNA ~ 300bp chưa xác định ở cả IR24, NC2013, N16, N40, N25, N37 nhưng không có ở N20.

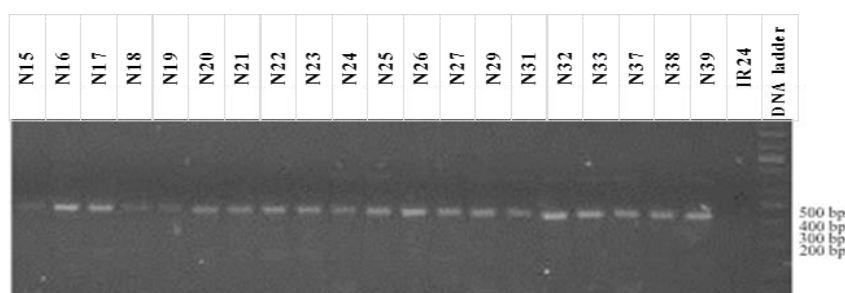
Hình 3c cho kết quả PCR không rõ nét khi sử dụng chỉ thị RM21197, băng DNA khuếch đại không đúng kích thước 250bp như công bố của Gu và *nnk* (2011) [6]. Mẫu IR24 không có sản phẩm PCR.

Như vậy, chỉ thị qPC7 có khả năng ứng dụng cao và được chọn để xác định gen *Rc* cho 20 mẫu giống ở thí nghiệm tiếp theo.



Hình 3. Kết quả PCR sàng lọc khả năng ứng dụng của 4 chỉ thị phân tử DNA

a) chỉ thị qPC7; (b) chỉ thị Rc; (c) chỉ thị RM21197.



Hình 4. Kết quả sản phẩm PCR chỉ thị qPC7.

Kết quả sản phẩm PCR thu được: mẫu IR24 không có sản phẩm PCR trong khi 20 mẫu còn lại đều có băng DNA kích thước phù hợp với thông tin của Gu và *nnk* (2011) [6] công bố về đoạn gen Rc được khuếch đại từ nucleotide 6061943 đến 6062373. Như vậy, chỉ thị qPC7 có độ tin cậy cao và có thể sử dụng để phát hiện gen Rc nằm trên NST số 7 qui định việc tổng hợp anthocyanin.

So sánh với kết quả đánh giá màu sắc và hàm lượng anthocyanin, một số mẫu mang gen nhưng có màu nhạt (N25) với hàm lượng anthocyanin thấp. Điều này có thể được giải thích do sự hoạt động yếu hoặc do tương tác với các gen khác như gen *Rd* là gen cần thiết để thể hiện màu đỏ trong vỏ cám của gạo (Brooks và *nnk.*, 2008; Xie và Dixon, 2005) [3, 12]. Sự tương tác giữa 2 gen Rc và *Rd* này cần phải nghiên cứu thêm để đánh giá mức độ ảnh hưởng đến hàm lượng anthocyanin cuối cùng.

4. KẾT LUẬN

Sử dụng phương pháp pH vi sai đánh giá hàm lượng anthocyanin trong 20 mẫu giống. Chúng tôi phân chia 20 mẫu giống làm 4 nhóm dựa theo tỉ lệ khối lượng khô: nhóm I > 0,2%, nhóm II từ 0,1 %- 0,2%, nhóm III từ 0,01%- 0,1%, nhóm IV < 0,01%

Vỏ cám màu đậm có hàm lượng anthocyanin nhiều hơn vỏ cám màu nhạt. Giống N20 có vỏ cám màu đen đậm là giống có hàm lượng anthocyanin cao nhất 0,379% tương đương với 379 mg/100g bột gạo; giống N25 có vỏ cám màu nâu đỏ là giống có hàm lượng anthocyanin thấp nhất 0,002% tương đương với 2mg/100g bột gạo.

Chỉ thị qPC7 cho kết quả xác định kiểu gen tốt nhất. Ứng dụng chỉ thị qPC7 để xác định gen Rc xuất hiện ở 20 mẫu giống nghiên cứu. Các giống lúa cẩm Việt Nam trong nghiên cứu có màu sắc đặc trưng của anthocyanin đều mang gen Rc.

Lời cảm ơn: nghiên cứu được hỗ trợ một phần kinh phí từ đề tài cấp Học viện do dự án Việt Bỉ tài trợ, mã số T2016-09-14VB, Học viện Nông nghiệp Việt Nam.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Andersen, Øyvind M (2001). "Anthocyanins". Encyclopedia of Life Sciences. *eLS*, John Wiley & Sons, Ltd. doi:10.1038/npg.els.0001909. ISBN 0470016175.
2. Barnes, K. W., Eisele, T., Giusti, M.M., Haché, J., Hofsommer, H., Koswig, S., Krueger, D.A.; Kupina, S., Martin, S.K.; Martinsen, B.K., Miller, T.C.; Paquette, F., A. Ryabkova, A., Skrede, G., Trenn, U. and Wightman, J.D. (2005). Determination of Total Monomeric Anthocyanin Pigment Content of Fruit Juices, Beverages, Natural Colorants, and Wines by the pH Differential Method: Collaborative Study. Lee et al.: Journal of AOAC international Vol. 88, No. 5, 2005
3. Brooks, S. A., Yan, W., Jackson, Jackson, A. K. and Deren, C. W. (2008). Natural mutation in *Rc* reverts white-rice-pericarp to red and results in a new, dominant, wild-type allele: *Rc-g*. Theor. App Genet. 117: 575–580.
4. Dellaporta SL, Wood J, and Hicks JB. (1983). A plant DNA miniprep: version II. Plant Mol Biol Rep 1: 19-21.
5. Furukawa, T., Maekawa, M., Oki, T., Suda, I., Iida, S., Shimada, H., Takamure, I. and Kadowaki, K. (2007). The *Rc* and *Rd* genes are involved in proanthocyanidin synthesis in rice pericarp. The Plant Journal (2006) 49, 91–102.
6. Gu, X.-Y., Foley, M. E., Horvath, David P., Anderson, J. V., Feng, J., Zhang, L., Mowry, Chase R., Ye, H., Suttle, J. C. Kadowaki, K. and Chen. Z., 2011. Association Between Seed Dormancy and Pericarp Color Is Controlled by a Pleiotropic Gene That Regulates Absciscic Acid and Flavonoid Synthesis in Weedy Red Rice. *Genet* 189(4):1515-24
7. Huỳnh Thị Kim Cúc, Phạm Châu Quỳnh, Nguyễn Thị Lan, Trần Khôi Nguyên (2004). Xác định hàm lượng anthocyanin trong một số nguyên liệu rau quả bằng phương pháp pH vi sai, Tạp Chí Khoa Học và Công Nghệ, Đại Học Đà Nẵng, số 3(7), 47-54.
8. Huỳnh Thị Thanh Tuyền, Trần Thị Xuân Hồng (2011). Anthocyanin và những nguyên liệu chứa Anthocyanin. Đại học kỹ thuật công nghệ TP.HCM.
9. Ling, W.H., Cheng, Q.X., Ma, J., and Wang, T. (2001). Red and black rice decrease atherosclerotic plaque formation and increase antioxidant status in rabbits. J. Nutr. 131, 1421–1426.
10. Ngô Thị Hồng Tươi, Phạm Văn Cường, Nguyễn Văn Hoan (2014). Phân tích đa dạng di truyền của các mẫu giống lúa cẩm bằng chỉ thị. Tạp chí Khoa học và Phát triển 2014, tập 12, số 4: 485-494.
11. Sweeney, M. T, Thomson, M. J., Pfeil, B. E and McCouch, S. (2006). Caught Red-Handed: *Rc* Encodes a Basic Helix-Loop-Helix Protein Conditioning Red Pericarp in Rice. The Plant Cell, Vol. 18, 283–294.
12. Xie, D.Y. and Dixon, R.A. (2005). Proanthocyanidin biosynthesis – still more questions than answers? Phytochemistry, 66, 2127–2144.

ĐÁNH GIÁ KHẢ NĂNG KẾT HỢP CHUNG CỦA CÁC DÒNG NGÔ NẾP TÍM TỰ PHỐI GIÀU CHẤT KHÁNG Ô XY HÓA ANTHOCYANIN PHỤC VỤ CHỌN TẠO GIỐNG NGÔ NẾP TÍM ƯU THỂ LAI

Nguyễn Thị Nguyệt Anh¹, Phạm Quang Tuấn¹, Nguyễn Trung Đức¹

ABSTRACT

General combinant ability evaluation of purple waxy maize inbred lines, this lines were inbreeding S3 to S6 generation from domestic and exotics germplasm. Agronomical characteristics, quality, yield and yield components in randomized complete block design with three replication in Spring season 2015. Selection based on 12 traits were identified 10 elite lines have appropriately characteristics, yield higher than 2 t/ha and high anthocyanin from 73,30 to 260,10 mg/100g to bring into testing of general combining ability by tester x line method with two testers. Evaluation of crosses and general combining ability analysis was determined three inbred lines have high combining ability at significant are NT6, NT8 and NT21. This are lines can utilized in hybrid breeding of purple waxy maize, simultaneously, study also supplies useful on the Anthocyanin content into purple waxy maize for purple waxy maize breeding programme in Vietnam.

Key word: purple waxy corn, inbred line, combining ability, heterosis

TÓM TẮT

Đánh giá khả năng kết hợp chung của các dòng ngô nếp tím tự phối đời S3 đến S6 phát triển từ các nguồn gen trong nước và nhập nội. Đánh giá đặc điểm nông sinh học, chất lượng, năng suất và yếu tố tạo thành năng suất trong thí nghiệm đồng ruộng vụ Xuân 2015 và chọn dòng ưu tú dựa trên 12 tính trạng, đánh giá khả năng kết hợp chung bằng lai đỉnh với 2 cây thử. Kết quả đánh giá 40 dòng trong thí nghiệm vụ Xuân đã chọn được 10 dòng ưu tú nhất đưa vào thử khả năng kết hợp và đánh giá các tổ hợp lai trong vụ Thu Đông 2015. Các dòng thử khả năng kết hợp có hàm lượng anthocyanin cao từ 73,30 đến 260,10 mg/100g, năng suất hạt trên 2,0 tấn/ha, chất lượng ăn uống tốt và đặc điểm nông sinh học phù hợp để phát triển dòng thuần. Đánh giá khả năng kết hợp về hai tính trạng mục tiêu là hàm lượng anthocyanin và năng suất bắp tươi xác định được 3 dòng tự phối NT6, NT8 và NT21 có khả năng kết hợp cao phù hợp cho chọn tạo giống ngô nếp tím lai năng suất và hàm lượng anthocyanin cao. Nghiên cứu cũng cung cấp thông tin về hàm lượng anthocyanin trong nguồn gen cho chương trình chọn giống ngô nếp tím ở Việt Nam.

Từ khóa : Ngô nếp tím, dòng tự phối, khả năng kết hợp, ưu thế lai

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Ngô nếp (*Zea mays* L. *ceritina* Kulesh.) là một lương thực phổ biến ở các nước châu Á, bởi vì những đặc điểm chủ yếu của nó về chất lượng ăn uống, dạng bắp, màu sắc hạt. Màu sắc hạt nhiều công bố xác nhận hạt ngô màu sẫm thường chứa hàm lượng các hợp chất có hoạt tính sinh học và chất chống oxy hóa giá trị cao như Anthocyanin. Các hợp chất sinh học này có lợi cho sức khỏe con người do khả năng kháng oxy hóa và tiềm năng hoạt động chống ung thư, ngăn chặn bệnh tim mạch, điều khiển chống béo phì, giảm nhẹ bệnh tiểu đường và khả năng kháng viêm nhiễm (Jones, 2005; He và Giusti, 2010). Màu đen và màu tím ở ngô do hàm lượng anthocyanin cao nằm ở lớp vỏ hạt và lõi ngô (Li *et al.*, 2008). Nghiên cứu đặc tính kháng oxy hóa và chống ung thư của anthocyanin được thực hiện chủ yếu ở ngô nếp tím, đã thu hút của thị trường thực phẩm dinh dưỡng và thực phẩm chức năng (Cevallos-Casals and Cisneros-Zevallos, 2003). Chính vì vậy nghiên cứu chọn giống ngô nếp có chất lượng và giàu

¹ Học viện Nông nghiệp Việt Nam

chất anthocyanin đang phát triển mạnh mẽ ở các nước trong những năm gần đây. Phương pháp lai ngô nếp trắng với ngô nếp tím tạo giống ngô nếp lai chất lượng cao và giàu chất kháng ô xy hóa đã được các nhà chọn giống công bố thành công ([Qing-ping Hu](#) và [Jian-guo Xu](#), 2011, Bhornchai Harakotr và cs, 2013).

Hầu hết các giống ngô nếp tím ở các nước Châu Á và Việt Nam đều là các giống thụ phấn tự do (OPVs) và được nhập nội từ các nước khác. Năng suất hạt của các giống ngô OPVs này thường thấp hơn các giống ngô khác do có bắp và hạt nhỏ. Do vậy, cải tiến các giống ngô OPVs cùng với chọn lọc từ các nguồn gen địa phương và ngoại lai sẽ là nền tảng cho sự phát triển ngô nếp tím ưu thế lai có năng suất và giá trị kinh tế cao.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Vật liệu nghiên cứu gồm 40 dòng ngô nếp tím tự phối đời từ S3 đến S6 (ký hiệu từ NT1 đến NT40), rút dòng từ các giống ngô nếp tím địa phương và nhập nội. Đánh giá khả năng kết hợp chung khả năng kết hợp sớm của các dòng ngô nếp tím sử dụng 2 cây thử là dòng thuần ngô nếp trắng N601 (ký hiệu T1) và N161 (ký hiệu T2) như trình bày trong bảng 1. Đối chứng là giống ngô nếp tím lai Fancy111 nhập nội từ Thái Lan.

Bảng 1: Bảng kê các vật liệu ngô nếp tím sử dụng trong nghiên cứu

TT	Kí hiệu	Phả hệ	Đời tự phối	Nguồn gốc	STT	Kí hiệu	Phả hệ	Đời tự phối	Nguồn gốc
1	NT1	NNT.1	S6	Dienbien, VN	22	NT22	NNT11.2.4	S4	Thái Lan
2	NT2	NNT.2	S3	Hàn Quốc	23	NT23	NNT11.2.5	S4	Thái Lan
3	NT3	NNT.2.1	S4	Hàn Quốc	24	NT24	NT11.2.6	S4	Thái Lan
4	NT4	NNT.2.6	S4	Hàn Quốc	25	NT25	NT11.4	S3	Thái Lan
5	NT5	NNT.3	S3	Hàn Quốc	26	NT26	NT12.2.1	S4	Thái Lan
6	NT6	NNT.5.1	S4	Trung Quốc	27	NT27	NT12.2.2	S4	Thái Lan
7	NT7	NNT.5.2	S4	Trung Quốc	28	NT28	NT12.2.3	S4	Thái Lan
8	NT8	NNT.5.3	S4	Trung Quốc	29	NT29	NT12.2.5	S4	Thái Lan
9	NT9	NNT10.1	S4	Thái Lan	30	NT30	NT13.1	S3	Hàn Quốc
10	NT10	NNT10.2	S4	Thái Lan	31	NT31	NT13.2	S3	Hàn Quốc
11	NT11	NNT10.3	S4	Thái Lan	32	NT32	NT13.3	S3	Hàn Quốc
12	NT12	NNT10.4	S4	Thái Lan	33	NT33	NT13.7	S3	Hàn Quốc
13	NT13	NNT10.5	S4	Thái Lan	34	NT34	NT4.1	S3	Trung Quốc
14	NT14	NNT10.6	S4	Thái Lan	35	NT35	NT4.2	S3	Trung Quốc
15	NT15	NNT10.7	S4	Thái Lan	36	NT36	NT4.3	S3	Trung Quốc
16	NT16	NNT10.8	S4	Thái Lan	37	NT37	NT4.5	S3	Trung Quốc
17	NT17	NNT10.9	S4	Thái Lan	38	NT38	NT6.1	S3	Trung Quốc
18	NT18	NNT11.1	S4	Thái Lan	39	NT39	NT6.2	S3	Trung Quốc
19	NT19	NNT11.2	S4	Thái Lan	40	NT40	NT6.2.4	S4	Trung Quốc
20	NT20	NNT11.2.1	S4	Thái Lan	41	T1	N601	DT	Trung Quốc
21	NT21	NNT11.2.2	S4	Thái Lan	42	T2	N161	DT	Trung Quốc

Ghi chú: DT: dòng thuần

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Thí nghiệm đánh giá dòng vụ Xuân 2015 bố trí thí nghiệm khối hoàn toàn ngẫu nhiên (RCBD), ba lần lặp lại, diện tích 12m². Thí nghiệm đánh giá dòng vụ Xuân 2015 bố trí thí nghiệm khối hoàn toàn ngẫu nhiên, ba lần lặp lại, diện tích 12m². Khoảng cách trồng thí nghiệm đánh giá dòng hàng x hàng 70cm và cây cách cây 20cm, đánh giá tổ hợp lai khoảng cách trồng hàng 70cm và cây cách cây 25cm. Theo dõi sinh trưởng, phát triển đặc điểm nông sinh học, chất lượng, năng suất và yếu tố tạo thành năng suất theo Quy chuẩn VCU QCVN01-56-2011/BNNPTNT.

Xác định độ dày vỏ hạt và phân tích hàm lượng Anthocyanin trong phòng thí nghiệm phân tử của Trung tâm Nghiên cứu cây trồng Việt Nhật, Học viện Nông nghiệp Việt Nam. Xác định độ dày vỏ hạt theo phương pháp của Wolf & cs, (1969) và Eunsoo Choe, 2010, đo bằng vi trắc kế (Micrometer). Xác định hàm lượng anthocyanin theo phương pháp pH vi sai của Ronald E, Wrolstada và cs., 2005.

Phân tích hàm lượng Anthocyanin bằng phương pháp pH vi sai theo phương pháp của Barnes và cs, 2005; H T K Cúc và cs, 2004 dựa trên nguyên tắc: chất màu anthocyanin thay đổi theo pH. Tại pH = 1 các anthocyanin tồn tại ở dạng oxonium hoặc flavium có độ hấp thụ cực đại, còn ở pH = 4,5 thì chúng lại ở dạng carbinol không màu. Đo mật độ quang của mẫu tại pH=1 và pH=4,5 tại bước sóng hấp thụ cực đại, so với độ hấp thụ tại bước sóng 700 nm. Đệm pH=1 (potassium chloride, 0.025M): Cân 1.86g KCL và pha với 980 ml nước. Chuẩn pH=1 (± 0.05) với HCl. Lên thể tích 1L bằng nước cất. Đệm pH=4.5 (sodium acetate, 0.4M): Cân 54.43g CH₃CO₂Na.3H₂O pha với 960 ml nước cất. Chuẩn pH=4.5 (± 0.05) với HCl. Lên thể tích 1L với nước cất. Sau khi đo độ hấp thụ quang chúng tôi tiến hành xác định lượng anthocyanin theo công thức:

$$a = \frac{A.M.K.V}{\epsilon.l} ; g$$

Trong đó :

A là mật độ quang (độ hấp thụ của anthocyanin)

$$A = (A_{\lambda_{max}, pH=1} - A_{700nm, pH=1}) - (A_{\lambda_{max}, pH=4,5} - A_{700nm, pH=4,5})$$

Với $A_{\lambda_{max}, pH=1}$ và $A_{700nm, pH=1}$: Độ hấp thụ tại bước sóng cực đại và 700nm, ở pH = 1

$A_{\lambda_{max}, pH=4,5}$ và $A_{700nm, pH=4,5}$: Độ hấp thụ tại bước sóng cực đại và 700nm, ở pH = 4,5;

M : khối lượng phân tử của anthocyanin không kể ion Cl hay nước tinh thể hóa

ϵ : độ hấp thụ phân tử. l: chiều dày cuvet, cm V: thể tích anthocyanin thu được, l

Từ đó tính được hàm lượng anthocyanin theo phần trăm:

$$\% \text{ Anthocyanin tổng số} = \frac{a}{m(100 - w).10^{-2}} 100\%$$

Trong đó:

a: Lượng anthocyanin tính được theo công thức (2), g;

m: Khối lượng nguyên liệu ban đầu, g;

w: Độ ẩm nguyên liệu, %.

2.3. Phân tích kết quả nghiên cứu

Phân tích chọn lọc dòng ưu tú trên chỉ số chọn lọc mô hình cây lý tưởng theo Claudio Guilherme Portela de Carvalho và cs.,, 2002 công thức tính giá trị chọn lọc như sau:

$$IDI = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{j=1}^n (y_{ij} - v_{o_j})^2}$$

Trong đó: IDI là chỉ số chọn lọc dựa trên khoảng cách của dòng chọn với mô hình cây lý tưởng, n là số tính trạng chọn, và j mức độ quan trọng của tính trạng thứ j^{th} ; v_{o_j} là giá trị tối ưu kiểu hình phù hợp với căn bậc hai của mức độ quan trọng tính trạng thứ j^{th} ; y_{ij} là trung bình giá trị kiểu hình tính trạng ij^{th}

Phân tích khả năng kết hợp chung line x tester theo Singh and Chaudhary (1979) công thức toán học như sau:

$$Y_{ij} = G + g_i + g_j + s_{ij} + e_j$$

Trong đó; Y_{ijk} = giá trị ưu thế lai khi dòng i^{th} lai với cây thử j^{th} , G = trung bình toàn bộ, g_i = khả năng kết hợp chung của dòng i^{th} , g_j = khả năng kết hợp chung của cây thử j^{th} , s_{ij} = khả năng kết hợp riêng khi dòng i^{th} lai với cây thử j^{th} và e_j = sai số ngẫu nhiên.

Phân tích phương sai ANOVA, sai khác nhỏ nhất có ý nghĩa ($LSD_{0,05}$) và hệ số biến động (CV%) theo phương pháp của K. W. Gomez (1984), sử dụng phần mềm IRRISTAT ver. 5.0. Xác định khả năng kết hợp sử dụng chương trình thống kê di truyền lượng của Nguyễn Đình Hiền, 1995.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả đánh giá các dòng ngô nếp tím vụ Xuân năm 2015

Các giai đoạn sinh trưởng và phát triển của các dòng ngô nếp tím (bảng 2) thể hiện các dòng có tổng thời gian sinh trưởng dao động từ 95 đến 104 ngày đều thuộc nhóm ngắn ngày. Không có sự khác biệt giữa các kiểu gen trong nước với các kiểu gen ngoại lai ở các đặc tính sinh trưởng, phát triển. Thời gian sinh trưởng của các dòng ngô nếp tím phù hợp cho chọn tạo giống ngô nếp lai ngắn ngày, phục vụ cho sản xuất ngô ở phía Bắc Việt Nam, đặc biệt trong vụ Đông trên đất cấy hai vụ lúa.

Các dòng ngô có thời gian chênh lệch tung phần- phun râu ngắn hơn sẽ giúp cho việc sản xuất hạt F1 tốt hơn, thích nghi với sự nóng, lạnh thất thường (Shadakshari and G. Shanthakumar, 2015) và phù hợp cho chọn tạo giống ngô nếp tím ưu thế lai. Trong nghiên cứu này, các dòng có chênh lệch tung phần - phun râu ngắn, hầu hết trong khoảng 0 đến 3 ngày, trừ hai dòng NT17 và NT39 chênh lệch 4 ngày; 5 dòng phun râu trước tung phần là NT11, NT15, NT18, NT34 và NT37. Hai cây thử phun râu sau 68-69 ngày, trong khi thời gian từ gieo đến tung phần của các dòng từ 66 – 72 ngày là phù hợp cho lai tạo các tổ hợp lai.

Bảng 2. Các giai đoạn sinh trưởng, phát triển của 40 dòng ngô nếp tím trong vụ Xuân năm 2015 tại Gia Lâm, Hà Nội

DVT: ngày

TT	Dòng	TGS T	G-TP	G-PR	TP- PR	TT	Dòng	TGS T	G-TP	G-PR	TP- PR
1	NT1	98	68	70	2	22	NT22	102	70	71	1
2	NT2	100	69	70	1	23	NT23	103	70	72	2
3	NT3	95	66	68	2	24	NT24	100	69	70	1
4	NT4	96	67	68	1	25	NT25	101	70	70	0
5	NT5	98	67	70	3	26	NT26	100	69	70	1
6	NT6	98	68	69	1	27	NT27	98	68	69	1
7	NT7	102	70	71	1	28	NT28	96	67	68	1
8	NT8	100	69	70	1	29	NT29	98	68	69	1
9	NT9	99	68	70	2	30	NT30	98	67	70	3
10	NT10	98	67	70	3	31	NT31	97	67	69	2
11	NT11	100	70	69	-1	32	NT32	97	67	69	2
12	NT12	96	67	68	1	33	NT33	98	67	70	3
13	NT13	100	68	71	3	34	NT34	104	72	71	-1
14	NT14	100	69	70	1	35	NT35	102	70	71	1
15	NT15	104	72	71	-1	36	NT36	103	70	72	2
16	NT16	103	71	71	0	37	NT37	104	72	71	-1
17	NT17	99	67	71	4	38	NT38	103	71	71	0
18	NT18	100	70	69	-1	39	NT39	99	67	71	4
19	NT19	103	71	71	0	40	NT40	95	67	67	0
20	NT20	101	70	70	0	41	T1	98	66	68	2
21	NT21	102	70	71	1	42	T2	99	67	69	2
cv%		5,4	3,5	2,5	9,4	cv%		5,4	3,5	2,5	9,4
LSD_{0,05}		2,6	2,5	1,7	1,4	LSD_{0,05}		2,6	2,5	1,7	1,4

Ghi chú: TGST: thời gian sinh trưởng, G-TP: thời gian từ gieo đến tung phần, G-PR: thời gian từ gieo đến phun râu, TP-PR: chênh lệch trổ cờ-phun râu;

Một số đặc điểm nông sinh học của các dòng ngô thể hiện qua chiều cao cây dao động từ 85,3-151,8 cm, hầu hết nằm trong khoảng từ 110-130 cm. Chiều cao đóng bắp được tính từ gốc đến đốt mang bắp hữu hiệu đầu tiên và thường tỷ lệ thuận với chiều cao cây. Cây ngô có chiều cao đóng bắp hợp lý sẽ giúp cho bắp ngô dễ nhận phần, quá trình thụ tinh diễn ra dễ dàng, chất dinh dưỡng được tích lũy nhiều tạo điều kiện tăng năng suất, nhưng nếu chiều cao đóng bắp cao quá thì khả năng nhận phần cao nhưng sẽ làm cây ngô dễ đổ gãy và ngược lại chiều cao đóng bắp quá thấp thì khả năng nhận phần kém nhưng ít bị đổ hơn (Ji *et al.*, 2006). Những nghiên cứu của các nhà chọn tạo giống ngô đã chỉ ra rằng tỷ lệ chiều cao đóng bắp khoảng 50% là tối ưu nhất (Ji *et al.*, 2010). Qua số liệu bảng 3 cho thấy, 7 dòng ngô nếp tím NT4, NT19, NT30, NT31, NT32, NT35 và NT40 có tỉ lệ chiều cao đóng bắp trên chiều cao cây lớn hơn 50% và cao hơn 2 cây thử, không thích hợp cho công tác chọn giống ngô chống

đỏ gãy. Quan sát một số chỉ tiêu chất lượng hình thái cho kết quả: gân và phiến lá của các dòng có màu tím nhạt nhưng phần tai lá có màu tím đậm hơn, đa số các dòng có màu sắc thân xanh tím và ở một số dòng có sự phân ly về màu sắc thân và màu sắc hạt từ tím đến trắng như ở các dòng NT7, 10, 15, 20, 33 và 39.

Phân tích hàm lượng anthocyanin của các dòng cho kết quả trong khoảng 1,3 mg/L (NT4) đến cao nhất là 490,2 mg/L (NT25). Các nghiên cứu của Si Hwan Ryu (2010) về ngô nếp tím dao động trong khoảng 0,8 – 111,7 mg/100g. Trong 40 dòng tự phối nghiên cứu có 13 dòng ngô nếp tím có hàm lượng anthocyanin trên 100 mg/L bao gồm NT6, 8, 9, 16, 19, 20, 21, 25, 32, 34, 35, 36 và 38.

Độ dày vỏ hạt trung bình của các dòng ngô nếp tím từ 55,2 đến 122,4 μm . Vỏ hạt mỏng và đặc điểm cấu trúc bắp là những chỉ tiêu chọn lọc quan trọng đối với chương trình chọn tạo giống ngô nếp ăn tươi, bởi vì chúng là những chỉ tiêu đánh giá chất lượng của người tiêu dùng (Choe và cs., 2012). Qua đánh giá đã xác định được 6 dòng có độ dày vỏ hạt $\leq 60 \mu\text{m}$ là NT13, NT22, NT23, NT32, NT36, NT39 tương đương 2 cây thử (63,5-64,4 μm) thích hợp dùng làm vật liệu nâng cao độ mềm đối với chọn tạo giống ngô nếp chất lượng tốt cho thị trường ăn tươi. Hàm lượng đường (độ brix) của các dòng dao động trong khoảng 8,8 (NT39) đến 14,7 (NT7), chỉ tiêu này cùng với độ dày vỏ hạt có ảnh hưởng đến chất lượng thử nếm của các dòng đạt điểm từ 2-4 tương đương với 2 cây thử (điểm 3).

Bảng 3. Một số đặc điểm nông sinh học và chất lượng của 40 dòng ngô nếp tím trong vụ Xuân năm 2015 tại Gia Lâm, Hà Nội

Dòng	CCC		CĐB (cm)	AN ($\mu\text{g}/100\text{g}$)	DVH (μm)	Độ brix (%brix)	Hương vị (1- 5)	Độ mềm (1- 5)
	TB (cm)	CV%						
NT1	123,5	3,8	57,6	35,5	64,6	12,7	2	2
NT2	144,0	7,9	68,0	31,2	70,7	12,6	3	3
NT3	141,9	7,7	62,2	56,4	75,7	12,6	3	3
NT4	137,2	10,1	77,2	1,3	77,3	12,2	2	3
NT5	117,6	11,5	49,0	64,5	97,0	10,7	2	2
NT6	136,5	8,1	60,9	260,1	67,5	14,3	3	3
NT7	118,3	6,9	47,8	23,1	69,4	14,7	2	2
NT8	118,8	10,9	42,6	162,1	78,6	12,7	3	3
NT9	91,6	13,2	37,0	103,4	76,8	12,7	4	4
NT10	104,5	6,7	41,2	15,5	68,8	12,5	3	3
NT11	91,0	7,2	41,2	57,7	69,9	11,2	3	3
NT12	140,2	13,5	65,6	43,2	72,0	10,8	3	3
NT13	127,8	11,0	53,0	52,1	56,3	13,3	3	3
NT14	104,7	5,7	43,4	26,6	78,0	11,2	3	3
NT15	111,7	8,2	55,0	59,2	70,8	11,8	3	3
NT16	85,3	9,6	40,1	144,6	122,4	13,0	3	3
NT17	87,3	7,3	40,4	24,2	96,4	11,9	2	2
NT18	113,9	12,2	56,5	27,9	85,0	14,0	3	3
NT19	142,3	10,9	73,4	119,4	101,9	10,9	2	3
NT20	115,9	7,9	50,6	103,6	68,7	11,2	3	3
NT21	101,4	6,4	49,3	211,1	79,6	13,7	3	3
NT22	112,5	16,5	49,6	57,8	59,2	13,2	3	3
NT23	104,3	7,3	44,5	66,8	58,6	12,5	3	4
NT24	109,4	9,2	46,3	29,2	70,8	12,8	4	3
NT25	131,3	6,8	58,7	490,2	68,6	12,9	3	2

NT26	112,2	13,9	51,8	72,0	70,8	13,1	3	2
NT27	105,5	4,8	42,6	34,0	74,2	12,6	3	3
NT28	150,9	6,4	66,0	49,9	77,3	13,2	3	3
NT29	113,6	8,1	48,6	75,5	78,1	13,4	3	3
NT30	108,9	11,2	59,7	10,4	77,6	12,8	2	3
NT31	108,0	10,7	61,2	48,4	66,5	13,0	3	3
NT32	98,8	6,6	52,2	167,9	60,7	12,8	2	3
NT33	104,7	4,8	43,6	20,1	88,1	13,1	3	3
NT34	134,0	3,9	59,4	287,7	86,8	12,3	3	3
NT35	143,4	10,1	74,5	118,3	78,2	12,0	2	3
NT36	143,3	11,1	54,4	129,0	60,2	13,0	2	3
NT37	148,4	6,2	71,2	73,3	66,2	13,2	3	3
NT38	126,0	10,5	59,8	110,6	74,7	12,2	2	2
NT39	126,3	9,8	63,2	33,3	61,5	8,8	2	3
NT40	151,8	9,4	77,8	33,4	66,1	11,7	3	3
T1	138,5	3,7	66,4	0,9	64,4	14,8	3	3
T2	142,3	4,5	70,1	0,7	63,5	13,7	3	3
LSD_{0,05}	7,24	-	3,40	16,3	5,4	6,6	-	-
Cv%	7,54	-	4,12	9,0	2,4	1,3	-	-

Ghi chú: TB: trung bình, CCC: chiều cao cây, CDB: chiều cao đống bắp, AN: hàm lượng anthocyanin, DVH: độ dày vỏ hạt, thang điểm từ 1-5 tương ứng với ngon đến không ngon.

Các yếu tố cấu thành năng suất của 40 dòng ngô nếp tím nghiên cứu thể hiện số bắp hữu hiệu trên cây không có sự sai giữa các dòng và so với 2 cây thử (0,9-1,3 bắp); chiều dài bắp từ 10,7-16,3 cm; đường kính bắp từ 3,53-4,82cm được xếp vào nhóm trung bình, 4 dòng có đường kính bắp lớn hơn 2 cây thử ở mức có ý nghĩa là NT19, NT21, NT38 và NT39; số hàng hạt/bắp phụ thuộc chủ yếu vào đường kính bắp và kích thước hạt. Nhìn chung các dòng có độ chênh lệch nhau về số hàng hạt/bắp là khá lớn, dao động từ 10,0 đến 19,2 hàng trong đó dòng có số hàng hạt/bắp cao nhất là NT32 (19,2) và NT39 (17,6) và cao hơn hẳn so với các dòng còn lại; số hạt/hàng dao động 14,4 đến 28,0 hạt/hàng, cao nhất ở dòng NT12 và NT19; hầu hết các dòng ngô nếp tím thí nghiệm đều có khối lượng 1000 hạt thấp hơn 2 cây thử trừ dòng NT12 (317 g) và NT31 (288 g) cao hơn ở mức ý nghĩa 0,05. Sự sai khác của các tính trạng liên quan đến bắp giống với nghiên cứu trên các dòng ngô của Mỹ tại trường đại học Ohio (Si Hwan Ryu, 2010).

Bảng 4. Năng suất và các yếu tố cấu thành năng suất của 40 dòng ngô nếp tím trong vụ Xuân năm 2015 tại Gia Lâm, Hà Nội

Dòng	HH/C (bắp)	CDB (cm)	ĐKB (cm)	HB (hàng)	HH (hạt)	P1000 (g)	NSTT (tấn/ha)	NSBT (tấn/ha)
NT1	1,0	12,4	4,09	14,8	18,0	159	1,8	2,9
NT2	1,3	12,2	3,58	10,6	22,2	213	2,1	4,1
NT3	1,2	13,7	4,46	15,5	25,5	209	3,5	6,4
NT4	1,0	13,8	4,56	14,3	21,5	247	3,3	5,8
NT5	1,2	12,3	4,17	12,8	19,8	219	2,4	4,3
NT6	1,0	11,9	3,70	11,2	18,8	226	2,0	3,8
NT7	1,0	14,1	4,00	12,7	24,0	195	2,5	4,8
NT8	1,0	12,0	4,06	14,8	23,6	171	2,6	4,6
NT9	1,0	10,7	4,22	16,0	23,0	164	2,6	4,6
NT10	1,0	12,0	4,09	13,0	24,0	205	2,7	5,2

NT11	1,0	11,8	4,20	14,7	21,3	197	2,6	4,8
NT12	1,0	15,6	4,27	13,3	27,0	317	3,7	5,9
NT13	1,0	16,3	4,50	14,8	25,6	174	2,8	5,4
NT14	1,0	12,3	3,53	12,0	19,6	149	1,5	3,2
NT15	1,0	11,2	4,06	12,7	20,2	187	2,0	3,9
NT16	1,1	11,6	4,21	14,0	22,7	177	2,4	4,3
NT17	1,1	14,0	4,26	13,2	25,4	217	3,1	5,5
NT18	1,0	10,0	3,93	13,6	17,0	168	1,7	3,4
NT19	1,0	14,8	4,62	14,7	27,5	194	3,1	5,6
NT20	1,1	11,8	4,53	14,7	18,5	199	2,3	4,1
NT21	1,0	12,1	4,91	16,0	21,0	171	2,5	4,6
NT22	1,0	11,9	4,52	16,7	16,0	206	2,3	4,3
NT23	1,3	13,2	3,88	10,0	28,0	188	2,3	4,0
NT24	1,0	13,5	4,11	12,0	19,6	232	2,3	4,2
NT25	1,0	11,2	4,05	15,3	16,0	176	1,8	3,5
NT26	1,0	12,5	4,39	12,8	20,4	243	2,7	4,8
NT27	0,9	12,3	4,13	13,5	21,9	176	2,2	4,3
NT28	1,1	13,7	4,34	13,6	20,4	216	2,6	4,7
NT29	1,2	11,9	4,36	15,0	19,3	219	2,7	4,8
NT30	1,3	12,1	4,31	15,6	20,8	142	2,0	3,8
NT31	1,0	10,9	4,48	16,7	18,7	288	3,2	6,1
NT32	1,0	11,2	4,44	19,2	23,4	179	2,7	5,2
NT33	0,9	11,0	4,39	16,8	14,4	187	1,9	3,7
NT34	1,1	11,6	4,08	14,4	20,0	133	1,6	3,5
NT35	1,0	11,8	4,12	13,2	24,2	193	2,6	4,8
NT36	1,0	13,3	3,98	12,4	22,4	161	1,9	3,6
NT37	1,3	13,6	4,58	16,0	25,4	152	2,6	4,8
NT38	1,1	13,4	4,82	15,6	24,0	194	3,1	5,5
NT39	1,0	11,0	4,62	17,6	20,4	191	2,9	5,3
NT40	1,0	13,2	4,45	15,3	21,0	227	3,1	5,6
T1	1,0	14,3	4,20	14,5	23,2	250	2,6	4,9
T2	1,0	14,1	4,21	14,3	24,4	245	2,8	4,5
cv%	8,7	10,82	8,50	11,7	14,4	8,63	7,04	6,45
LSD_{0,05}	0,3	1,32	0,38	1,67	3,14	3,64	0,29	0,58

Ghi chú: HH/C: số bắp hữu hiệu trên cây, CDB: chiều dài bắp, ĐKB: đường kính bắp, HB: số hàng hạt trên bắp, HH: số hạt trên hàng, P1000: khối lượng 1000 hạt, NSTT: năng suất thực thu, NSBT: năng suất bắp tươi.

Năng suất hạt thực thu từ 1,6 tấn/ha (NT34) đến 3,7 tấn/ha (NT12), trong đó có 9 dòng: NT3, NT4, NT12, NT17, NT19, NT31, NT38, NT39 và NT40 có năng suất hạt cao hơn cây thử T1 ở mức có ý nghĩa. Các dòng này thích hợp để làm dòng thuần trong chọn giống ngô nếp tím ưu thế lai và sản xuất hạt lai F1. Năng suất bắp tươi là một mục tiêu quan trọng trong quá trình chọn giống. Qua kết quả nghiên cứu cho thấy có 9 dòng là NT3, NT4, NT12, NT17, NT19, NT31, NT38, NT39 và NT40 có năng suất bắp tươi cao hơn cây thử T1 (4,9 tấn/ha) ở mức có ý nghĩa. Dòng NT3 có năng suất bắp tươi cao nhất với 6,4 tấn/ha, tiếp đó là dòng NT31 và NT42 với 6,1 tấn/ha tương ứng.

Dựa trên các kết quả nghiên cứu để đưa ra những dòng ưu tú có đặc điểm nông sinh học phù hợp, năng suất, chất lượng cao và đặc biệt giàu hàm lượng anthocyanin trong hạt. Các tính trạng được đưa vào chọn lọc là hàm lượng anthocyanin, độ dày vỏ hạt, độ brix, độ mềm, mùi vị, chiều dài bắp, đường kính bắp, số hàng hạt/bắp, số hạt/hàng, khối lượng 1000 hạt, năng suất hạt và năng suất bắp tươi. Kết quả sử dụng chương trình thống kê sinh học của Nguyễn Đình Hiền, dưới áp lực chọn lọc 25%, chỉ số chọn lọc dao động từ 7,16 đến 9,54 đã chọn được 10 dòng ưu tú nhất là các dòng NT21, NT6, NT9, NT8, NT37, NT29, NT19, NT32, NT35 và NT38. Đánh giá bộ lai đỉnh của 10 dòng trên với 2 cây thử ngô nếp trắng nhằm xác định khả năng kết hợp sớm về tính trạng mục tiêu năng suất và hàm lượng anthocyanin phục vụ chọn tạo giống ngô nếp chất lượng dinh dưỡng cao.

3.2. Kết quả đánh giá khả năng kết hợp vụ Thu Đông năm 2015

So sánh một số đặc điểm liên quan đến năng suất và chất lượng ăn uống chủ yếu của các tổ hợp lai. Các tổ hợp lai đều sinh trưởng ngắn ngày, thời gian từ gieo đến thu bắp tươi dao động từ 67-73 ngày, cho năng suất bắp tươi từ 36,40-108,64 tạ/ha hầu hết sai khác so với đối chứng ở mức ý nghĩa 0,05 (trừ THL1 và THL12), hai tổ hợp lai THL11 và THL15 có năng suất bắp tươi cao hơn đối chứng ở mức ý nghĩa 0,05. Chỉ tiêu hàm lượng đường (Brix) xác định tại thời điểm thu bắp tươi không sai khác so với đối chứng, trừ THL12, THL16, THL17 và THL20 thấp hơn đối chứng ở mức ý nghĩa 0,05. Một số chỉ tiêu liên quan đến chất lượng ăn uống khác như mùi vị, độ mềm của các THL đều được đánh giá mức điểm 2-3 là tương đương với đối chứng. Tính trạng mục tiêu hàm lượng anthocyanin của các tổ hợp lai dao động trong khoảng từ 41,38-169,90 mg/100g, trong đó 14 THL có hàm lượng cao hơn mức 100 mg/100g. So sánh hàm lượng anthocyanin của các THL với giống đối chứng ở mức ý nghĩa thống kê 0,05 cho thấy, bốn THL1, THL11, THL12 và THL15 có hàm lượng cao hơn đối chứng, THL9 có hàm lượng không sai khác so với đối chứng, các THL còn lại đều thấp hơn đối chứng có ý nghĩa.

Bảng 5. Một số kết quả đánh giá các tổ hợp lai vụ Thu Đông 2015 tại Gia Lâm, Hà Nội

Ký hiệu	Tổ hợp lai	G-TBT (ngày)	NSBT (tạ/ha)	AN (mg/100g)	Độ brix (%brix)	Hương vị (1-5)	Độ mềm (1-5)
THL1	T1 x NT6	70	90,40 ^{ns}	147,43 ⁺	15,08 ^{ns}	2	2
THL2	T1 x NT8	70	82,24 ⁻	107,34 ⁻	14,54 ^{ns}	2	2
THL3	T1 x NT9	71	73,12 ⁻	108,73 ⁻	13,33 ^{ns}	3	2
THL4	T1 x NT19	70	64,95 ⁻	114,28 ⁻	13,42 ^{ns}	3	2
THL5	T1 x NT21	70	55,60 ⁻	95,86 ⁻	13,60 ^{ns}	3	2
THL6	T1 x NT29	71	73,60 ⁻	87,42 ⁻	12,50 ^{ns}	3	2
THL7	T1 x NT32	71	79,84 ⁻	128,08 ⁻	12,50 ^{ns}	2	2
THL8	T1 x NT35	69	46,48 ⁻	114,63 ⁻	14,30 ^{ns}	2	2
THL9	T1 x NT37	69	68,80 ⁻	130,76 ^{ns}	14,00 ^{ns}	2	2
THL10	T1 x NT38	70	75,76 ⁻	84,16 ⁻	13,95 ^{ns}	2	2
THL11	T2 x NT6	69	99,28⁺	169,90⁺	12,73^{ns}	2	2
THL12	T2 x NT8	69	96,40 ^{ns}	143,84 ⁺	12,07 ⁻	2	2
THL13	T2 x NT9	69	55,60 ⁻	86,08 ⁻	12,93 ^{ns}	2	2
THL14	T2 x NT29	68	36,40 ⁻	113,18 ⁻	13,17 ^{ns}	2	3

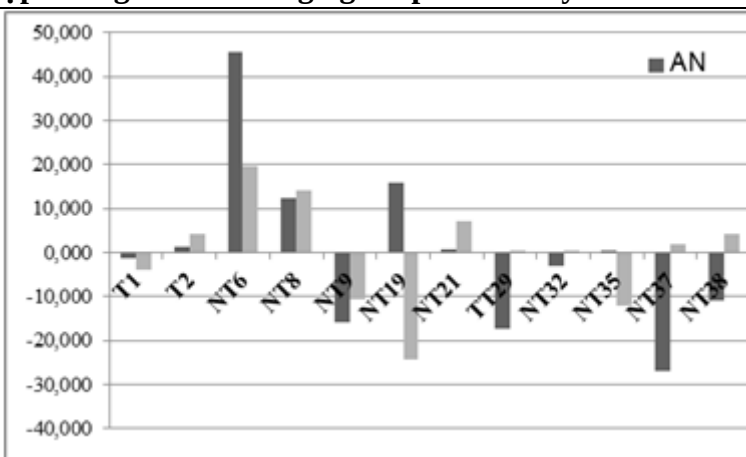
THL15	T2 x NT21	67	108,64 ⁺	162,16 ⁺	12,73 ^{ns}	2	2
THL16	T2 x NT29	73	76,96 ⁻	104,21 ⁻	12,43 ⁻	2	2
THL17	T2 x NT32	70	71,20 ⁻	92,16 ⁻	11,70 ⁻	3	2
THL18	T2 x NT35	69	79,60 ⁻	111,82 ⁻	12,90 ^{ns}	2	2
THL19	T2 x NT37	68	85,12 ⁻	41,38 ⁻	12,93 ^{ns}	2	2
THL20	T2 x NT38	69	83,20 ⁻	120,16 ⁻	12,03 ⁻	2	3
ĐC	Fancy111	67	92,32	135,19	14,00	2	2
CV%		-	4,40	6,43	5,3	-	-
LSD_{0,05}		-	4,22	5,34	1,45	-	-

Ghi chú: G-TBT: gieo đến thu bắp tươi, NSBT: năng suất bắp tươi, AN: hàm lượng anthocyanin, thang điểm 1 đến 5 tương ứng với ngon đến không ngon; (-)thấp hơn đối chứng ở mức ý nghĩa 0,05, (+)cao hơn đối chứng ở mức ý nghĩa 0,05, (^{ns})không sai khác so với đối chứng ở mức ý nghĩa 0,05.

Phân tích phương sai khả năng kết hợp của các dòng ngô nếp nghiên cứu về 2 tính trạng: hàm lượng anthocyanin và năng suất bắp tươi cho thấy có sự sai khác giữa các dòng ở mức ý nghĩa $P < 0,01$. Kết quả phân tích, cây thử T2 (N161) có khả năng kết hợp chung tốt hơn cây thử T1 (N601) về cả 2 tính trạng. Bốn dòng bao gồm NT6, NT8, NT19 và NT21 có KNKH chung về tính trạng hàm lượng anthocyanin; năm dòng bao gồm NT6, NT8, NT21, NT37 và NT38 có KNKH chung về tính trạng năng suất bắp tươi. Như vậy ba dòng NT6, NT8 và NT21 có KNKH chung về cả 2 tính trạng mục tiêu, phù hợp cho chọn tạo giống ngô nếp lai có năng suất và hàm lượng chất kháng ô xy hóa anthocyanin cao. Giá trị khả năng kết riêng, ba dòng NT9, NT19 và NT32 có KNKH riêng với cây thử T1, hai dòng NT8 và NT21 có KNKH riêng với cây thử T2 về cả 2 tính trạng nghiên cứu.

Giá trị khả năng kết hợp chung của các dòng ngô nếp tím và cây thử

Dòng	AN	NSBT
T1	-1,310	-4,080
T2	1,310*	4,080*
NT6	45,489*	19,681*
NT8	12,412*	14,161*
NT9	-15,776	-10,799
NT19	15,830*	-24,484
NT21	0,552*	6,961*
NT29	-17,365	0,121
NT32	-3,060	0,361
NT35	0,045	-12,119
NT37	-27,108	1,801*
NT38	-11,018	4,321*
LSD _{cây thử}	0,196	0,491
LSD _{dòng}	0,438	1,099



(Ghi chú: AN: GCA về hàm lượng anthocyanin, NSBT: GCA về năng suất bắp tươi)

Bảng 6. Giá trị khả năng kết hợp riêng của các dòng ngô nếp tím với 2 cây thử

Dòng	Hàm lượng anthocyanin ($LSD_{0.05}=0,620$)			Năng suất bắp tươi ($LSD_{0.05}=1,554$)		
	T1	T2	Biến động	T1	T2	Biến động
NT6	-9,925	9,924*	196,991	-0,360	0,359	0,259
NT8	-16,941	16,941*	574,006	-3,000	2,999*	17,994
NT9	12,634*	-12,634	319,227	12,840*	-12,841	329,757
NT19	1,862*	-1,862	6,935	18,355*	-18,356	673,849
NT21	-31,843	31,843*	2027,932	-22,440	22,439*	1007,062
NT29	-7,081	7,081*	100,286	2,400*	-2,401	11,525
NT32	19,270*	-19,271	742,704	8,400*	-8,401	141,137
NT35	2,715*	-2,716	14,748	-12,480	12,479*	311,476
NT37	45,999*	-45,999	4231,785	-4,080	4,079*	33,285
NT38	-16,691	16,691*	557,190	0,360	-0,361	0,260

Ghi chú: * = $P < 0,05$

4. KẾT LUẬN

Nghiên cứu thực hiện trên 40 dòng ngô nếp tím tự thụ từ đời S3 đến S6 tại Gia Lâm, Hà Nội. Dựa vào các đặc điểm nông sinh học, năng suất và các chỉ tiêu liên quan đến chất lượng như hàm lượng anthocyanin, độ dày vỏ hạt, độ mềm, độ ngọt, hương vị qua đó chọn lọc được 10 dòng ưu tú nhất có hàm lượng anthocyanin cao, chất lượng tốt và có các đặc điểm nông sinh học thích hợp để tiếp tục tự thụ, phát triển và duy trì dòng thuần. Nghiên cứu này còn bổ sung thông tin về hàm lượng anthocyanin của các nguồn gen ngô ở Việt Nam.

Nghiên cứu kết hợp thử khả năng kết hợp sớm của các dòng ngô thí nghiệm về hai tính trạng mục tiêu là hàm lượng anthocyanin và năng suất bắp tươi xác định được ba dòng NT6, NT8 và NT21 có KNKH về cả 2 tính trạng phù hợp cho chọn tạo giống ngô nếp lai có năng suất và hàm lượng chất kháng ô xy hóa anthocyanin cao.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bhorichai Harakotr, Bhalang Suriarn, Rutchada Tungwongchai, Marvin Paul Scott, Kamol Lertrat, 2013, Inheritance anthocyanin concentration in purple waxy corn (*Zea mays* L.) kernels and cob, 55th Annual maize genetics conference 2013 2013 –St. Chales, Illinois, USA.
2. Cevallos-Casals, B. A., and Cisneros-Zevallos, L. (2003). Stoichiometric and kinetic studies of phenolic antioxidants from Andean purple corn and red-fleshed sweetpotato. *J Agric Food Chem* 51, 3313-9.
3. Choe, E., and Rocheford, T. (2012). Genetic and QTL analysis of pericarp thickness and ear architecture traits of Korean waxy corn germplasm. *Euphytica* 183, 243-260.
4. Claudio Guilherme Portela de Carvalho, Cosme Damião Cruz; José Marcelo Soriano Viana and Derly José Henriques da Silva (2002). Selection based on distances from ideotype. *Crop Breeding and Applied Biotechnology* 2, 171-178.

5. He, J. and M.M. Giusti. 2010. *Annu. Rev. Food Sci Technol.* 1: 163-87.
6. Ji HeeChung, Lee HeeBong and Takeo Yamakawa (2010). Major Agricultural Characteristics and Antioxidants Analysis of the New Developed Colored Waxy Corn Hybrids. *Journal of the Faculty of Agriculture, Kyushu University* 55 (1), 55–59.
7. Ji HeeChung; Cho JinWoong; Yamakawa, T. (2006). Diallel analysis of plant and ear heights in tropical maize (*Zea mays* L.). *Journal of the Faculty of Agriculture, Kyushu University* 51(2): 233-238.
8. Jones, K. 2005. *Herbal Gram.* 65: 46-49
9. Li, C.-Y., Kim, H.-W., Won, S. R., Min, H.-K., Park, K.-J., Park, J.-Y., Ahn, M.-S., and Rhee, H.-I. (2008). Corn Husk as a Potential Source of Anthocyanin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56, 11413-11416.
10. [Qing-ping Hu](#) and [Jian-guo Xu](#), 2011, Profiles of Carotenoids, Anthocyanin, Phenolics, and Antioxidant Activity of Selected Color Waxy Corn Grains during Maturation, *J. Agric. Food Chem.*, 2011, 59 (5), pp 2026–2033
11. Shadakshari and G.Shanthakumar (2015). Evaluation of maize inbred lines for drought tolerance under contrasting soil moisture regimes. *Karnataka Journal of Agricultural Sciences* 28-2, 142-146.
12. Si Hwan Ryu, M.S., (2010). Genetic Study of Compositional and Physical Kernel Quality Traits in Diverse Maize (*Zea mays* L.) Germplasm Thesis for the Degree Doctor of Philosophy in the Graduate School of The Ohio State University.
13. Wrolstad, R. E., Durst, R. W., and Lee, J. (2005). Tracking color and pigment changes in anthocyanin products. *Trends in Food Science & Technology* 16, 423-428.

NGHIÊN CỨU ỨNG DỤNG CHỈ THỊ PHÂN TỬ PHÁT HIỆN GEN THOÁT CỔ BÔNG *EUI* (*ELONGATED UPPERMOST INTERNODE*) PHỤC VỤ CÔNG TÁC CHỌN TẠO DÒNG MẸ LÚA LAI

Nông Thị Huệ¹, Nguyễn Trọng Tú¹, Bùi Thị Thu Hương¹, Hoàng Thị Ngân¹,
Đinh Trường Sơn¹, Nguyễn Thị Phương Thảo¹, Nguyễn Thanh Hải¹,
Nguyễn Thị Lâm Hải¹, Ninh Thị Thảo¹, Nguyễn Thị Châm¹

ABSTRACT

Most maternal cytoplasmic male sterilized line CMS) have a huge problem of incomplete panicle exertion wherein 30 - 60% of the spikelets remain enclosed in flag leaf sheath depending on the maternal line. Application of exogenous GA3 is required to overcome this problem. An approach of genetic alternative to GA3 application have been concerned. A recessive gene (*eui*) that can cause elongation of the uppermost internode was indentified, showing panicle exertion. In this study, DNA markers were applied to determine and screen *eui* gene in CMS lines and F2 segregating and BC1F1 population. The results show that 6 CMS lines 12A, L1, L2, L3, L4, L5 contain *eui* gene. Analysis of F2 and BC1F1 plants' phenotype and genotype showed *eui* gene was regulated by a single recessive gene and followed the laws of Mendelian genetics.

Keywords: *eui*, mutant, rice breeding, panicle enclosure, panicle exertion.

TÓM TẮT

Các dòng mẹ bất dục được sử dụng trong sản xuất hạt F1 gặp phải vấn đề rất lớn đó là lúa trổ bông nghẹn đòng với mức độ từ 30-60% tùy thuộc vào từng dòng mẹ. Việc phun GA3 ngoại sinh là điều bắt buộc để khắc phục tình trạng này. Việc chọn tạo giống lúa lai theo cách tiếp cận về mặt di truyền để thay thế cho việc sử dụng GA3 là một hướng đi rất được quan tâm. *Eui* (*elongated uppermost internode*) là một đột biến gen lặn điều khiển sự kéo dài lóng giáp cổ bông ở giai đoạn làm đòng, thể hiện tính trạng thoát cổ bông. Nghiên cứu này ứng dụng chỉ thị phân tử DNA để xác định và sàng lọc gen thoát cổ bông (*eui*) trong các dòng CMS và trong quần thể phân ly F2 và BC1F1. Kết quả thu được 6 dòng CMS 12A, L1, L2, L3, L4, L5 đều mang gen *eui*. Phân tích kiểu hình và kiểu gen ở quần thể phân ly F2 và BC1F1 cho thấy *eui* do 1 gen lặn quy định và tuân theo quy luật di truyền Mendel.

Từ khóa: *eui*, lúa lai, nghẹn đòng, trổ bông

1. TÍNH CẤP THIẾT, MỤC TIÊU, CÁCH TIẾP CẬN, PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU, PHẠM VI NGHIÊN CỨU, NỘI DUNG NGHIÊN CỨU

1.1. Tính cấp thiết

Các dòng mẹ bất dục được sử dụng trong sản xuất hạt F1 gặp phải vấn đề rất lớn đó là lúa trổ bông nghẹn đòng với mức độ từ 30-60% tùy thuộc vào từng dòng mẹ. Hiện tượng này là do sự giảm chiều dài của lóng giáp cổ bông trong khi không làm ảnh hưởng đến sự vươn dài của bẹ lá đòng. Trong sản xuất hạt lai, để khắc phục tình trạng nghẹn đòng này việc phun GA3 ngoại sinh là điều bắt buộc. Tuy nhiên, phương pháp này tồn tại rất nhiều hạn chế không những làm tăng chi phí sản xuất hạt lai lên ít nhất 10% mà còn tăng khả năng hạt nảy mầm ngay trên bông lúa dẫn đến làm giảm chất lượng và thời gian lưu trữ hạt lai, đồng thời gây ô nhiễm môi trường... Do đó, việc chọn tạo giống lúa lai theo cách tiếp cận về mặt di truyền để thay thế cho việc sử dụng GA3 là một hướng đi bền vững và rất được quan tâm.

¹ Học viện Nông nghiệp Việt Nam

Eui (elongated uppermost internode) là một gen điều khiển sự kéo dài lóng giáp cổ bông ở giai đoạn làm đòng ở lúa, thể hiện tính trạng thoát cổ bông. Theo các phân tích về di truyền và sinh lý, gen eui nằm trên nhiễm sắc thể số 5, do một đột biến lặn điều khiển, di truyền theo định luật phân ly của Mendel (Wu và cs, 1998). Gen eui thể hiện chức năng tương tự nhau ở cả hai loài lúa Japonica và Indica. Các giống lúa có mang gen eui có hàm lượng GAs cao hơn so với các cây dạng đại. Kiểu gen lặn với tính trạng thoát cổ bông này, eui được xem là nhân tố di truyền thứ 4 trong sản xuất lúa lai bên cạnh các gen bất dục đực, gen duy trì và gen phục hồi (Rutger và Carnahan, 1981). Ở Việt Nam hiện nay chưa có bất cứ một công trình nghiên cứu nào về gen eui hữu ích này.

Việc ứng dụng chỉ thị phân tử để phát hiện gen eui đã được tiến hành từ khá sớm. Gangashetti và cs, 2004 xác định chỉ thị OPAG011000 liên kết chặt với tính trạng thoát cổ bông ở khoảng cách di truyền 3.6 cM. Xu và cs, 2004 cũng đã chỉ ra gen eui này nằm trong vùng DNA 98 kb được giới hạn bởi 2 chỉ thị M03876 và M01; 3 chỉ thị được phát hiện là đồng phân ly với eui. Kế thừa các kết quả nghiên cứu từ năm 2004, Gangashetti và cs, 2006 đã phát triển các chỉ thị STS SAG011051 liên kết chặt với gen eui từ chỉ thị RAPD. Chỉ thị này nhân 2 phân đoạn ADN đặc thù 1051bp và 1100bp trong các dòng chứa gen và không chứa gen. Ngoài ra một chỉ thị khác là sMRF19 cũng chỉ ra sự đa hình giữa các dòng bố mẹ. Nhóm tác giả cũng khẳng định trong phương pháp chọn giống nhờ chỉ thị phân tử (MAS) có thể sử dụng quả cả hai chỉ thị SAG011051 và sMRF19 để chuyển gen eui vào các dòng CMS để loại bỏ tính nghẹn đòng của chúng. Trên cơ sở đó chúng tôi đã tiến hành lựa chọn và tìm các chỉ thị phân tử liên kết chặt với gen eui để xác định các dòng CMS có gen, đồng thời phân tích quy luật di truyền của gen này trong các dòng nghiên cứu. Đề tài không chỉ có ý nghĩa về mặt khoa học, cung cấp những dẫn liệu đầu tiên về việc sử dụng các gen để loại bỏ tính nghẹn đòng của dòng bất dục đực mà còn có giá trị thực tiễn cao với việc không sử dụng GA3 là một trong những giải pháp hữu hiệu giảm chi phí sản xuất lúa lai.

1.2. Mục tiêu

1.2.1. Mục tiêu chung

Sàng lọc được chỉ thị phân tử DNA phù hợp để phát hiện gen eui trong tập đoàn vật liệu nghiên cứu làm cơ sở cho việc sản xuất hạt lúa lai và bước đầu phân tích quy luật di truyền của gen eui ở các dòng nghiên cứu.

1.2.3. Mục tiêu cụ thể

- Xác định sự có mặt của gen eui trong các vật liệu nghiên cứu
- Phân tích quy luật di truyền của gen eui

1.3. Cách tiếp cận

Dựa vào kiểu hình thoát cổ bông của vật liệu nghiên cứu, lựa chọn các dòng có khả năng chứa gen. Phát hiện sự có mặt của gen *eui* trong các dòng nghiên cứu bằng marker phân tử liên kết chặt với gen *eui*. Sau khi sàng lọc được các dòng có thể chứa gen *eui*, tiến hành lai thuận nghịch các dòng đó với các dòng có và không có gen *eui*. Sự có mặt của gen *eui* ở thế hệ phân ly và lai lại được xác định bằng phân tích kiểu hình và kiểu gen. Từ đó suy ra quy luật di truyền của gen này trong các dòng vật liệu nghiên cứu.

1.4. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

1.4.1. Vật liệu : 6 dòng lúa CMS bao gồm 12A, 12B L1, L2, L3, L4, L5, 11A, 11B và 2 dòng bố R18, R253 và các tổ hợp lai của F2 của 12A/R18 và 12A/R253 và BC1F1 được cung cấp bởi Viện nghiên cứu và phát triển cây trồng.

Bảng 2.1 Các dòng vật liệu nghiên cứu

TT	Tên dòng	Đặc điểm
1	11A	Dòng bất dục đực, thơm, nhận phần ngoài tốt
2	11B	Dòng duy trì, thơm
3	12A	Dòng bất dục đực, nhận phần ngoài kém
4	12B	Dòng duy trì
5	L1	Dòng bất dục đực
6	L2	Dòng bất dục đực
7	L3	Dòng bất dục đực
8	L4	Dòng bất dục đực
9	L5	Dòng bất dục đực
10	R18	Cho ưu thế lai cao
11	R253	Cho ưu thế lai cao

1.4.2. Phương pháp

Nội dung 1: Xác định sự có mặt của gen eui sử dụng chỉ thị phân tử

Dựa vào các thông tin về gen eui và việc sử dụng các chỉ thị phân tử khác nhau có liên kết chặt với gen eui ở các kết quả nghiên cứu trước, các cặp chỉ thị phân tử đã được lựa chọn (bảng 2.2):

Bảng 2.2 Danh sách các chỉ thị phân tử sử dụng

Loại chỉ thị	Chỉ thị	Trình tự mỗi	Nhiệt độ gắn mỗi	Tài liệu tham khảo
STS	SAG01 ₁₀₅₁ F	CTACGCCTTCAGCTTCGGC	52°C	Gangashetti et al. (2006)
	SAG01 ₁₀₅₁ R	CTACGGCTTCCAACCTCAGAGG		
	sMRF19 F	TTGGCAGTGATGATGGTGGC	58°C	
	sMRF19 R	TGTGCTGGGACCGCCTTTTT		
SSR	RM3476F	GATTCTCGTCGTAATCAAGA	47°C	Khera et al. (2009)
	RM3476R	GATTCTCGTCGTAATCAAGA		
	RM3870F	TACATCTCCGGCGTTTACAC	55°C	
	RM3870R	CCAAGGTTGAAACAGGAAGC		
	RM7446F	TGAAGGCAGTTTCACTGACG	55°C	
	RM7446R	AGCCAAGAAGAAGAAAGGGG		

Phương pháp tách chiết ADN

Mẫu lá lúa thu ở giai đoạn làm đồng được thu thập và lưu giữ ở - 20°C. ADN tổng số được tách chiết theo quy trình của Furuya và cs (2003) có cải tiến. Mẫu lá lúa được cắt và nghiền nhỏ trong 700 µl dung dịch đệm chiết ADN (200mM Tris –HCl, pH 8.0; 25 mM EDTA, pH 8.0; 250 mM NaCl; 1% SDS) thành dung dịch đồng thể. Ly tâm ở 13.000 rpm trong 8 phút. Chuyển phần dịch trong sang ống eppendorf mới và thêm 700 µl dung dịch Phenol: Chloroform:Isoamylalcohol (25:24:1), trộn đều nhẹ nhàng bằng cách đảo ngược ống sau đó li tâm 13.000 rpm trong 8 phút. Hút 500 µl phần dịch trên sang ống eppendorf mới, bổ sung 600 µl dung dịch Chloroform: Isoamyl alcohol (24 :1), trộn đều và ly tâm 13.000 rpm trong 5 phút và hút 400 µl dịch trong lớp trên sang ống eppendorff mới. Lặp lại bước này 2 lần. Dịch trong thu được sau khi ly tâm được bổ sung 800 µl cồn tuyệt đối để thu tủa ADN, trộn đều, để trên đá 5 phút và ly tâm 13.000 rpm trong 10 phút, chất bỏ còn để thu tủa ADN ở đáy ống. Rửa kết tủa thu được bằng 500 µl Ethanol 70%, chất bỏ ethanol, làm khô tủa trong không khí. Hòa tan hoàn toàn tủa trong 50 µl TE (20 mM Tris-HCl pH 8.0; 10 mM EDTA pH 8.0) và bảo quản ở -20°C. Kiểm tra ADN tổng số bằng cách điện di trên gel agarose 1%. Nồng độ và độ tinh sạch của mẫu được kiểm tra trên máy Nanodrop.

Phương pháp phân tích bằng chỉ thị phân tử

Thành phần phản ứng PCR được thể hiện như bảng 2.3

Bảng 2.3: Thành phần phản ứng PCR

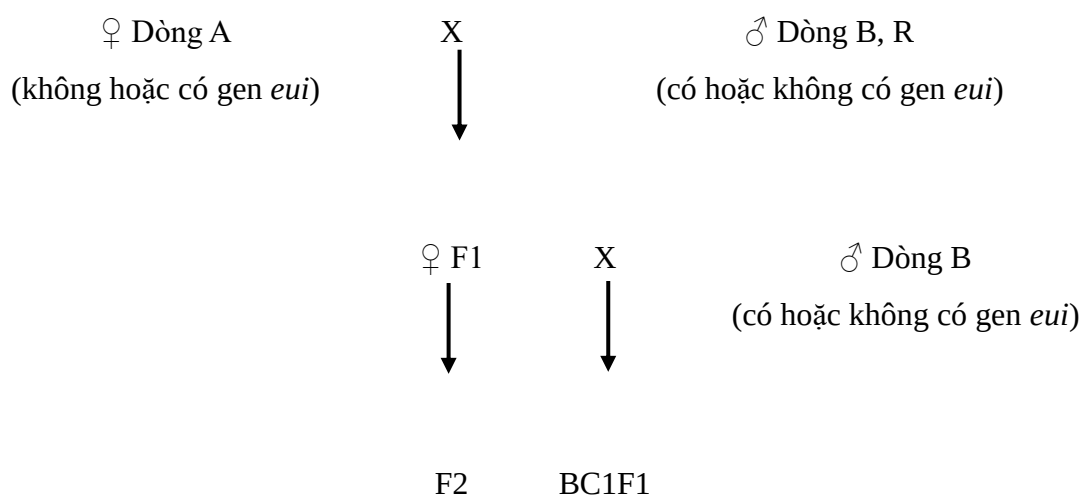
Thành phần	Nồng độ	Thể tích 1 phản ứng (µl)
H ₂ O		14,2
Dung dịch đệm	10 X	2,0
dNTPs	2 mM	2,0
Mg ²⁺	25 mM	0,2
Môi xuôi	10 µM	0,2
Môi ngược	10 µM	0,2
Taq polymerase	5 unit/µl	0,2
DNA khuôn		1,0
Tổng thể tích		20

Chu trình nhiệt được thực hiện theo chu kỳ như sau: 1 chu kỳ đầu 94°C trong 5 phút, 35 chu kỳ tiếp theo bao gồm 94°C trong 1 phút, T_m trong 1 phút và 72°C trong 2 phút, 1 chu kỳ cuối cùng 72°C trong 7 phút. Sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 1,5 %, sau đó bản gel được nhuộm Ethilium bromide trong 15 phút rồi chụp ảnh dưới tia UV

Sản phẩm PCR điện di ở nồng độ gel Agarose 2%, 60V trong 1 giờ 30 phút, sau đó bản gel được nhuộm Ethilium bromide để phát hiện sản phẩm.

Nội dung 2: Phân tích quy luật di truyền của gen *eui*

- Nội dung 2.1: Đánh giá một số đặc điểm sinh trưởng phát triển, đặc điểm nông sinh học của các dòng bố mẹ và tổ hợp lai: Gieo cây và tiến hành lai giữa dòng chứa gen *eui* và dòng ưu tú. Tiến hành gieo hạt F1 thu hạt F2 và tiến hành lai lại với dòng chứa gen *eui* để thu hạt BC1F1 (sơ đồ lai).



(Tỷ lệ bất dục thoát cổ bông/bất dục không thoát cổ bông)

Phương pháp bố trí thí nghiệm và xử lý số liệu

- Thí nghiệm được bố trí tại Viện Nghiên cứu và Phát triển cây trồng.
- Phương pháp bố trí thí nghiệm theo phương pháp tập đoàn, không nhắc lại.

* Các chỉ tiêu theo dõi:

- + Thời gian qua các giai đoạn sinh trưởng
 - Thời gian từ gieo đến trổ 10%
 - Thời gian sinh trưởng.
- + Đặc điểm nông sinh học, sinh trưởng phát triển
 - Chiều cao cây
 - Số lá/thân chính
 - Sức đẻ nhánh.
 - Đặc điểm tính dục của hạt phấn

Số liệu được xử lý thống kê theo chương trình Excel và IRRISTAT 5.0.

- Nội dung 2.2: Phân tích biểu hiện di truyền gen thoát cổ bông (*eui*).

Xác định sự có mặt của gen thoát cổ bông (*eui*) ở các dòng F2 và BC1F1 sử dụng chỉ thị phân tử liên kết chặt với gen *eui* đã phát hiện ở nội dung trên.

1.5. Phạm vi nghiên cứu

Đề tài sử dụng một số dòng lúa bố mẹ của Viện Nghiên cứu và Phát triển cây trồng - Học Viện nông nghiệp Việt Nam để nghiên cứu.

Toàn bộ quá trình nghiên cứu được thực hiện tại phòng thí nghiệm trọng điểm CNSH Thực vật, Khoa Công nghệ sinh học và Viện Nghiên cứu và Phát triển cây trồng

1.6. Nội dung nghiên cứu

Nội dung 1: Xác định sự có mặt của gen *eui* sử dụng chỉ thị phân tử

Nội dung 2: Phân tích quy luật di truyền của gen *eui*

Nội dung 2.1: Đánh giá một số đặc điểm sinh trưởng phát triển, đặc điểm nông sinh học của các dòng bố mẹ và tổ hợp lai

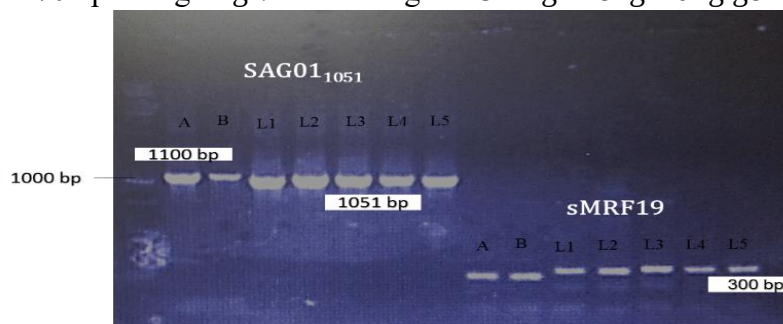
Nội dung 2.2: Phân tích biểu hiện di truyền gen thoát củ bông (*eui*).

2. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

2.1. Nội dung 1: Xác định sự có mặt của gen *eui* sử dụng chỉ thị phân tử

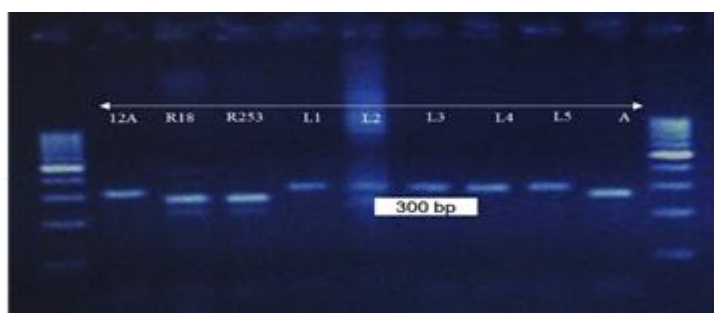
2.1.1. Chỉ thị STS

Kế thừa các kết quả nghiên cứu từ năm 2004, Gangashetti và cs, 2006 đã phát triển các chỉ thị STS SAG01₁₀₅₁ liên kết chặt với gen *eui* từ chỉ thị RAPD. Chỉ thị này nhân 2 phân đoạn ADN đặc thù 1051bp và 1100bp trong các dòng bố mẹ IR91-1591-3 (*eui*) và dòng CMS IR58025A, IR58025B (không *eui*) tương ứng. . Ngoài ra một chỉ thị khác là sMRF19 cũng chỉ ra sự đa hình giữa các dòng bố mẹ. Nhóm tác giả cũng khẳng định trong phương pháp chọn giống nhờ chỉ thị phân tử (MAS) có thể sử dụng quả cả hai chỉ thị SAG01₁₀₅₁ và sMRF19 để chuyển gen *eui* vào các dòng CMS để loại bỏ tính nghen đồng của chúng (Gangashetti và cs, 2006). Kết quả sử dụng nhóm chỉ thị STS cho thấy, tất cả các dòng CMS kiểm tra là 12A, L1, L2, L3, L4, L5 đều nhân được các băng ADN đặc thù của dòng chứa gen *eui* là 1051 bp (SAG01₁₀₅₁) và 300 bp (sMRF19). IR58025A và IR58025B là các dòng CMS và dòng duy trì tương ứng được báo cáo là các dòng không mang gen *eui* (Gangashetti và cs, 2004). Ở các dòng bố R18 và R253 nhân được băng ADN đặc thù của dòng không chứa gen *eui* là 1100 bp và 270 bp tương ứng với các dòng đối chứng không mang gen ở trên. (Hình 1, hình 2)



Ghi chú: A: IR58025A –
dòng CMS; B: IR58025B –
Dòng duy trì tương ứng –
không mang gen *eui*
L1, L2, L3, L4, L5: các
dòng CMS kiểm tra

Hình 1. Ảnh điện di phát hiện gen *eui* sử dụng mồi SAG01₁₀₅₁ và sMRF19



Ghi chú: A: IR58025A –
dòng CMS – không mang
gen *eui*; 12A, L1, L2, L3,
L4, L5: các dòng CMS kiểm
tra; R18 và R253: các dòng
bố kiểm tra

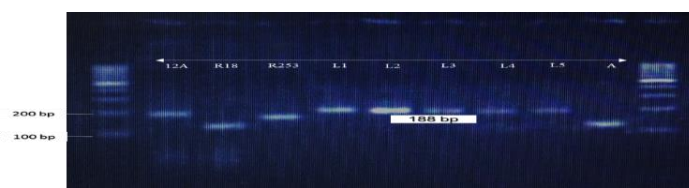
Hình 2. Ảnh điện di phát hiện gen *eui* sử dụng mồi sMRF19

2.1.2. Chỉ thị SSR

Trong nghiên cứu của Khera và cs, 2009 nhóm tác giả đã sử dụng 28 chỉ thị SSR để đánh giá tính đa hình giữa 2 dòng bố mẹ IR91-1591 (eui) và IR58025B (non – eui). Khi phân tích ở thế hệ quần thể F₂, kiểu hình phân ly theo tỷ lệ 3:1; 15 chỉ thị SSR trong tổng số 28 chỉ thị SSR cho sự đa hình giữa chúng. Trong số đó 7 chỉ thị SSR RM6054, RM3870, RM3476, RM5970, RM7801, RM7446 và RM3620 được chỉ ra là liên kết chặt với locus *eui* ở khoảng cách di truyền từ 1.0 đến 7.1 cM. Trong đó hai chỉ thị RM3870 and RM3476 đang được sử dụng để đưa gen *eui* từ dòng IR91-1591-3 vào các dòng CMS thương mại thông qua phương pháp lai lại.

Trên cơ sở đó chúng tôi lựa chọn 3 cặp chỉ thị SSR là RM3870, RM7446 và RM3476 để xác định sự đa hình tạo ra trong các dòng có thể có mặt gen *eui* và các dòng không có gen *eui*. Các được báo cáo tạo ra sự đa hình giữa các dòng bố mẹ có và không có gen *eui*. Dòng CMS - IR58025A (A) được sử dụng làm dòng đối chứng âm không mang gen. Kết quả chỉ ra các chỉ thị RM3870, RM7446 và RM3476 nhận được các băng ADN đặc trưng ở các dòng mang gen *eui* với kích thước tương ứng là 193 bp, 188 bp và 130 bp. Các dòng bố nhận được các băng ADN đặc trưng tương ứng với dòng không mang gen *eui*. Kết quả chỉ ra tất cả các dòng kiểm tra là 12A, L1, L2, L3, L4, L5 đều có chứa gen *eui* và các dòng bố R18 và R253 đều không mang gen. Kết quả này tương ứng với kết quả khi sử dụng nhóm chỉ thị STS ở trên (hình 3, hình 4, hình 5).

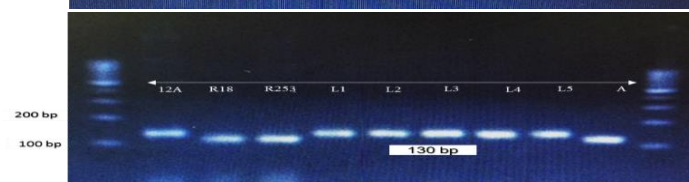
Hình 3. Ảnh điện di phát hiện gen *eui* sử dụng mồi RM7446



Hình 4. Ảnh điện di phát hiện gen *eui* sử dụng mồi RM3870



Hình 5. Ảnh điện di phát hiện gen *eui* sử dụng mồi RM 3476



Tóm lại: tất cả các chỉ thị được lựa chọn đều có thể sử dụng để phát hiện ra sự có mặt của gen *eui*. Tất cả các dòng CMS kiểm tra 12A, L1, L2, L3, L4, L5 đều mang gen *eui*. Như vậy đây sẽ là nguồn vật liệu rất quý giá trong chọn tạo giống. Trong các dòng CMS ở trên chúng tôi lựa chọn dòng 12A là dòng mẹ trong các tổ hợp lai lại. Đây là một dòng CMS triển vọng, kiểm tra có mặt gen thoát cổ bông tuy nhiên khả năng nhận phấn ngoài kém. Với mục đích phát triển dòng này trở thành 1 dòng mẹ điển hình có khả năng nhận phấn ngoài tốt chúng tôi tiến hành đánh giá các đặc điểm nông sinh học của các dòng bố mẹ và các tổ hợp lai. Hơn nữa, để khẳng định giá trị sử dụng của các chỉ thị phân tử liên kết chặt với gen *eui* chúng tôi sử dụng các chỉ thị này để kiểm tra lại sự có mặt của gen *eui* trong các quần thể phân ly F₂ và phép lai thuận nghịch. Trong phép lai thuận nghịch các dòng 12A và dòng duy

trì tương ứng 12B được lai với các dòng 11A và 11B. Trong đó dòng 11A là 1 dòng CMS không có gen eui và khả năng nhận phấn ngoài tốt, 11B là dòng duy trì tương ứng không có gen eui. Đồng thời quy luật di truyền của gen eui cũng được phân tích.

2.2. Nội dung 2: Phân tích quy luật di truyền của gen eui

2.2.1 Đánh giá một số đặc điểm sinh trưởng phát triển, đặc điểm nông sinh học của các dòng bố mẹ và tổ hợp lai

2.2.1.1 Thời gian qua các giai đoạn sinh trưởng của các dòng bố mẹ và tổ hợp lai trong vụ Xuân 2015

Thời kỳ sinh trưởng của lúa bắt đầu từ khi hạt lúa nảy mầm đến chín hoàn toàn được chia làm 3 thời kỳ: thời kỳ sinh trưởng sinh dưỡng; thời kỳ sinh trưởng sinh thực; thời kỳ chín. Thời gian sinh trưởng của cây lúa dài hay ngắn là do thời kỳ sinh trưởng sinh dưỡng quyết định, hai thời kỳ sau hầu như không thay đổi. Kết quả theo dõi thời gian qua các thời kỳ sinh trưởng được thể hiện ở bảng 3.1.

Trong điều kiện vụ Xuân 2015 chúng tôi tiến hành gieo các dòng bố mẹ và tổ hợp lai ngày 19/1, cấy ngày 23/2 nên tuổi mạ là 35 ngày. Thời gian từ gieo đến trổ dao động từ 88-104 ngày, dòng R18 có thời gian từ gieo đến trổ dài nhất (104 ngày) đồng thời có thời gian sinh trưởng cũng dài nhất (133 ngày). Thời gian trổ dài nhất là dòng mẹ 12A và ngắn nhất là tổ hợp lai 12A/R18.

Bảng 4.1 Thời gian qua các giai đoạn sinh trưởng vụ Xuân 2015

Tên dòng, tổ hợp lai	Tuổi mạ	Thời gian từ gieo đến trổ (ngày)	Thời gian trổ (ngày)	Thời gian sinh trưởng (ngày)
11A	35	99	8	130
11B	35	97	7	127
12A	35	90	10	122
12B	35	88	9	120
R18	35	104	7	133
R253	35	102	6	129
11A/12B	35	92	7	123
12A/11B	35	94	7	126
12A/R18	35	101	6	131
12A/R253	35	100	6	129

3.2.1.2. Đặc điểm nông sinh học và tính dục của các dòng bố mẹ và tổ hợp lai

Theo dõi đánh giá về đặc điểm tính dục cho thấy: Hai dòng 11A, 12A và 2 tổ hợp lai 11A/12B, 12A/11B là bất dục. Hai dòng B và 1 tổ hợp lai giữa 12A/R18 là hữu dục. Đa số các dòng và các tổ hợp lai có số lá/thân chính là 14,0 hoặc 15,0 riêng dòng R18 có số lá nhiều nhất 16,0 lá đồng thời chiều cao cây cũng dài nhất đạt $104,1 \pm 2,1$ cm, chiều cao cây thấp nhất là dòng 11A cao $67,2 \pm 2,6$ cm. Số nhánh hữu hiệu đạt từ 3,8-6,3 cao nhất là tổ hợp 12A/11B đạt 6,3 nhánh (bảng 3.2).

Bảng 3.2: Đặc điểm nông sinh học và tính dục của các dòng bố mẹ và tổ hợp lai vụ xuân 2015

Tên dòng, tổ hợp lai	Đặc điểm tính dục	Số lá/thân chính (lá)	Chiều cao cây (cm)	Số nhánh hữu hiệu
11A	Bất dục	15,0	67,2±2,6	5,9
11B	Hữu dục	15,0	78,6±1,5	5,3
12A	Bất dục	14,0	87,5±3,2	4,5
12B	Hữu dục	14,0	93,3±1,8	3,8
R18	Hữu dục	16,0	104,1±2,1	5,2
R253	Hữu dục	15,0	98,4±2,7	5,4
11A/12B	Bất dục	14,0	71,4±2,7	6,1
12A/11B	Bất dục	14,0	76,7±2,6	6,3
12A/R18	Hữu dục	15,0	95,2±2,5	5,7
12A/R253	Hữu dục	14,0	91,7±2,6	5,3

Trong nội dung của kết quả nghiên cứu này chúng tôi đặc biệt quan tâm tới chiều dài cổ bông vì nó thể hiện mức độ trở nghẹn đồng hay mức độ trở thoát của dòng hay của tổ hợp mà chúng tôi nghiên cứu. Thông qua đo đếm chỉ tiêu này chúng tôi có thể biết được biểu hiện di truyền của tính trạng thoát cổ bông từ đó phân tích được quy luật di truyền của gen này. Đánh giá một số đặc điểm nông sinh học của các dòng bố mẹ và tổ hợp lai vụ xuân 2015 chúng tôi thu được kết quả ở bảng 3.3.

Bảng 3.3 Đặc điểm nông sinh học của các dòng bố mẹ và tổ hợp lai vụ xuân 2015

Tên dòng, tổ hợp lai	Chiều dài bông (cm)	Chiều dài cổ bông (cm)	Chiều dài lá đồng (cm)	Chiều rộng lá đồng (cm)
11A	20,4	-9,4±0,23	37,3	2,1
11B	18,5	3,3±0,31	36,1	2,1
12A	27,8	-0,2±0,40	35,3	1,9
12B	26,4	4,4±0,33	33,4	1,9
R18	26,3	8,2±0,50	31,6	2,0
11A/12B	23,6	-9,1±0,21	30,4	2,1
11A/12B//12B	-	-4,7±1,17	-	-
12A/11B	24,1	-8,9±0,32	28,7	2,0
12A/11B//11B	-	-4,5±1,31	-	-
12A/R18	27,2	2,3±0,24	25,6	2,1
12A/R352	26,8	2,0±0,40	24,5	2,0

Kết quả cho thấy: chiều dài bông dao động từ 18,5-27,8cm, dòng 12A có bông dài nhất 27,8cm tiếp đến là dòng 12B, R18. Dòng 11A và 12A là hai dòng bất dục được di truyền tế bào chất nhưng có mức độ trở thoát của cổ bông rất khác nhau, dòng 11A trở bông nghẹn đồng rất nhiều -9,4±0,23cm trong khi đó dòng 12A cổ bông gần như trở bông thoát hoàn toàn -0,2±0,40cm. Các tổ hợp lai thuận, lai nghịch và lai trở lại giữa các dòng 11A, 11B và 12A, 12B cho mức độ trở thoát cổ bông biến động nhiều đặc biệt là khi lai trở lại (BC1F1) cụ thể tổ hợp lai 11A/12B mức độ nghẹn đồng là -9,1±0,21cm, 12A/11B mức độ nghẹn đồng là -

8,9±0,32cm. Các dòng B và tổ hợp lai 12A/R18 đều trở thoát cổ bông từ 2,3±0,24 - 4,4±0,33cm.

So sánh mức độ trở nghen bông giữa con lai F1, BC1F1 và các dòng A cho thấy: con lai F1 có mức độ trở bông nghen bông tương đương với dòng trở bông nghen bông nhiều nhất và ngược lại. Ở BC1F1 thì có biểu hiện như ở dạng trung gian giữa dạng thoát cổ bông và nghen bông.



Dòng 11A: trở bông nghen bông



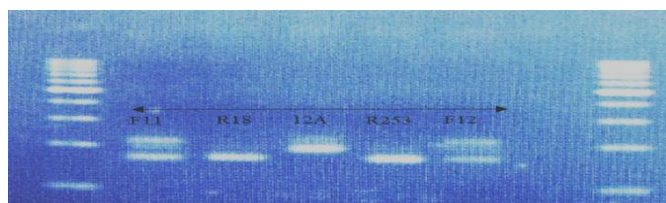
Dòng 12A: trở thoát cổ bông

Hình 6: Sự trở bông của các dòng CMS nghiên cứu

Kết hợp các kết quả trên có thể kết luận rằng tính trạng thoát cổ bông của dòng 12A là do một gen lặn nằm trong nhân điều khiển. Tuy nhiên để khẳng định một cách chắc chắn, chúng tôi sẽ sử dụng chỉ thị phân tử liên kết chặt với gen *eui* RM3870 để phân tích kiểu gen.

2.2.2. Phân tích biểu hiện di truyền gen thoát cổ bông (*eui*).

RM3870 - chỉ thị SSR là một chỉ thị đồng trội do vậy sẽ phân biệt được cá thể dị hợp tử và đồng hợp tử. Kết quả phân tích sử dụng chỉ thị phân tử cho thấy con lai mang cặp gen chung của bố và mẹ



Hình 7: Kết quả kiểu gen con lai F1 của các tổ hợp lai sử dụng chỉ thị RM3870

12A: Dòng mẹ CMS – *eui* và R18; R253: Dòng bố - không *eui*

F11: F1 12A/R18; F12: F1 12A/R253

2.2.2.1. Phân tích kiểu hình

Kết quả đo đếm và đánh giá mức độ trở thoát cổ bông của con lai F1 trong phép lai thuận và nghịch cho thấy 100% số cây không thoát cổ bông ở con lai F1. Kết quả này cho chúng ta thấy tính trạng thoát cổ bông là lặn so với tính trạng không thoát cổ bông hay nghen bông (bảng 3.4). Bảng số liệu này chúng tôi không theo dõi và đánh giá tỷ lệ cây thoát cổ bông của tổ hợp lai 12A/R18. Tổ hợp lai F1 này thể hiện tính dục là hữu dục, hơn nữa các dòng B và tổ hợp lai 12A/R18 đều trở thoát cổ bông từ 2,3±0,24 - 4,4±0,33cm (bảng 3.1), điều này cho thấy sự thoát cổ bông ở dòng này do gen *eui* kiểm soát hay không là không xác định được. Và nếu cho tổ hợp lai F1 này tự thụ thì thế hệ F2 phân ly trở thoát cổ bông hay nghen bông cũng không xác định được là gen *eui* quy định hay không. Trên cơ sở đó chúng tôi chỉ tiến hành phân tích kiểu gen sử dụng chỉ thị phân tử.

Bảng 3.4. Tỷ lệ cây thoát cổ bông của con lai F1 và BC1F1

Tổ hợp	Số cây theo dõi	Số cây thoát cổ bông	Số cây không thoát cổ bông	Tỷ lệ cây thoát cổ bông (%)
12A/11B	100	0	100	0
11A/12B	100	0	100	0
12A/11B//11B (BC1F1)	100	0	100	0
11A/12B//12B (BC1F1')	100	49	51	49%

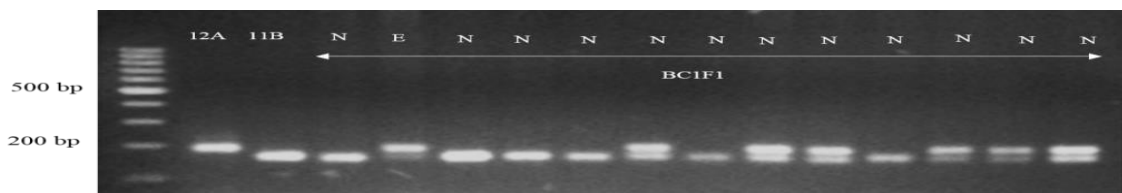
Tiến hành đo đếm và thống kê mức độ trỗi thoát cổ bông ở thế hệ lai trở lại cho thấy: ở tổ hợp 11A/12B//12B khi đo đếm 100 cây có 49 cây thoát cổ bông, 51 cây không thoát. Tỷ lệ cây thoát cổ bông/cây không thoát là 0,96 : 1 xấp xỉ tỷ lệ lý thuyết 1:1. Ở tổ hợp 12A/11B//11B đo đếm 100 cây thì đều không thoát.

Kết hợp từ các kết quả trên có thể kết luận rằng tính trạng thoát cổ bông của dòng 12A là do một gen lặn nằm trong nhân điều khiển. Tiếp tục, chúng tôi sẽ sử dụng chỉ thị phân tử liên kết chặt với gen *eui* RM3870 và RM3476 để phân tích kiểu gen.

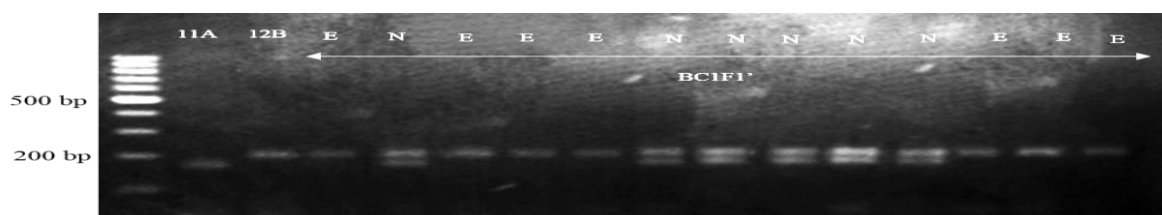
2.2.2.2 Phân tích kiểu gen

Phép lai thuận nghịch BC1F1

Phân tích kiểu gen ở thế hệ BC1F1 sử dụng chỉ thị phân tử để xác định sự có mặt của gen *eui* (kí hiệu là E) và không có gen *eui* (non – *eui*, kí hiệu N); thu được kết quả phân tích kiểu gen như sau: ở tổ hợp lai 11A/12B//12B tỷ lệ E:N là 49:51 (1:1,1) (trong tổng số 100 cây có 17 kiểu gen đồng hợp tử trội và 34 kiểu gen dị hợp tử và 49 mang gen lặn), tỷ lệ này cũng xấp xỉ tỷ lệ lý thuyết 1:1 (hình 8.2). Còn ở tổ hợp 12A/11B//11B có 34 kiểu gen đồng hợp tử trội và 66 kiểu gen dị hợp tử (hình 8.1). Việc phân tích kiểu gen cho kết quả tương ứng với kiểu hình đã phân tích ở trên. Thống kê mức độ trỗi thoát cổ bông ở BC1F1 cho thấy: ở tổ hợp 11A/12B//12B khi đo đếm 100 cây có 49 cây thoát cổ bông, 51 cây không thoát. Tỷ lệ cây thoát cổ bông/cây không thoát là 0,96 : 1 xấp xỉ tỷ lệ lý thuyết 1:1. Ở tổ hợp 12A/11B//11B đo đếm 100 cây đều không thoát.



Hình 8.1 Kết quả phân tích kiểu gen con lai của tổ hợp lai 12A/11B//11B sử dụng chỉ thị RM3870



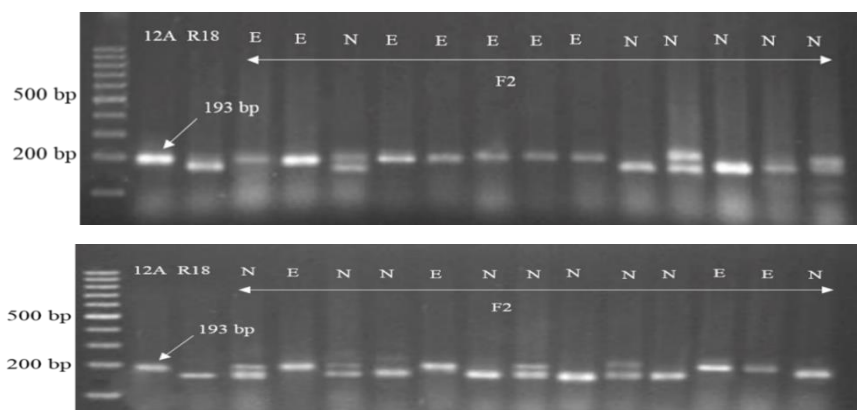
Hình 8. 2 Kết quả phân tích kiểu gen con lai của tổ hợp lai 11A/12B//12B sử dụng chỉ thị RM3870 (Phân tích ở quần thể phân ly F2 của tổ hợp 12A/R18 và 12A/R253)

F2 sinh ra từ kết quả tự thụ từ tổ hợp lai 12A/R18 và 12A/R253 được phân tích kiểu gen cũng sử dụng chỉ thị phân tử RM3870 và RM3476 tương ứng. Kết quả phân tích quần thể phân ly F2 của tổ hợp 12A/R18 sử dụng chỉ thị RM3870 cho thấy tỉ lệ kiểu gen tương ứng là (23:48:29) trong đó 23 kiểu gen đồng hợp tử trội và 48 di hợp tử, 29 đồng hợp tử lặn; quần thể phân ly F2 của tổ hợp 12A/R253 sử dụng chỉ thị RM3476 cho thấy tỉ lệ kiểu gen tương ứng là (24:53:23) trong đó 24 kiểu gen đồng hợp tử trội và 53 di hợp tử, 23 đồng hợp tử lặn (bảng 3.5). Kiểm định giá trị χ^2 cho thấy giá trị này đạt 1.02 và 0.20 tương ứng ở chỉ thị RM3870 và RM3476 nhỏ hơn giá trị χ^2 lý thuyết là 5.99. Như vậy quần thể phân ly F2 của tổ hợp 12A/R18 và 12A/R253 tuân theo quy luật phân ly 1:2:1 của Mendel về kiểu gen eui.

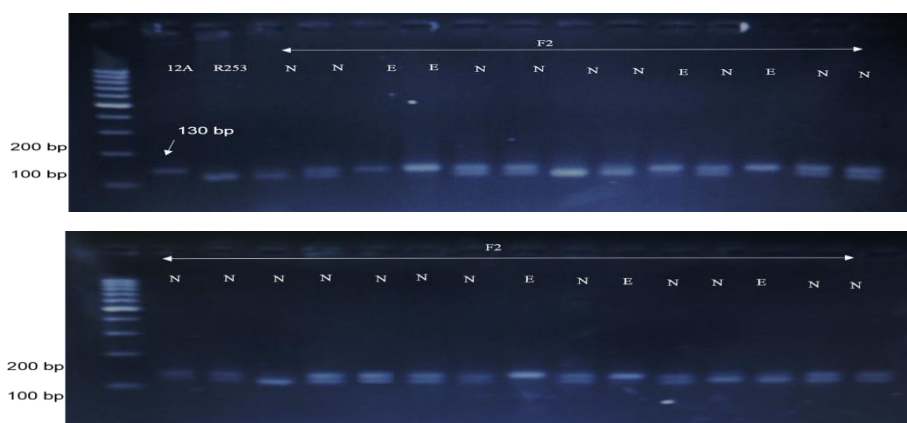
Dựa trên kết quả thu nhận được có thể kết luận rằng quy luật di truyền của gen *eui* ở dòng 12A này là do 1 gen lặn quy định

Bảng 3.5 : Sự phân ly của chỉ thị SSR trong quần thể F2 (12A/R18)

Chỉ thị	Tổng	Phân tích kiểu gen và kiểu hình			Giá trị χ^2
		Cây không có <i>eui</i>		Cây có gen <i>eui</i>	
		<i>Eui/Eui</i>	<i>Eui/eui</i>	<i>eui/eui</i>	
RM3870	100	23	48	29	1.02
RM3476	100	24	53	23	0.20



Hình 9.1: Kiểu gen ở quần thể phân ly F2 của tổ hợp lai 12A/R18 sử dụng chỉ thị RM3870



Hình 9.2: Kiểu gen ở quần thể phân ly F2 của tổ hợp lai 12A/R253 sử dụng chỉ thị RM3476

3. KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

3.1. Kết luận

1) Tất cả các chỉ thị STS gồm SAG011051 và sMRF19 và chỉ thị SSR gồm RM3780, RM7446 và RM 3476 đều cho đa hình giữa dòng có và không có *eui*

2) Tất cả các dòng kiểm tra 12A, L1, L2, L3, L4, L5 đều chứa gen *eui*

3) Đã đánh giá đặc điểm nông sinh học, hình thái, tính dục của các dòng bố mẹ (11A, 11B, 12A, 12B, R18) và tổ hợp lai (11A/12B, 12A/11B, 12A/R18; 12A/R253)

+ Phân tích kiểu hình

BC1F1 (12A/11B//11B) là 100% nghen đồng;

BC1F1' (11A/12B//12B) là 49:51 (Thoát cổ bông : Nghen đồng)

+ Phân tích kiểu gen:

12A/11B//11B cho tỷ lệ là 34 Eui/Eui : 66 Eui/eui

11A/12B//12B cho tỷ lệ là 17 Eui/Eui : 34 Eui/eui và 49 eui/eui

F2 của 12A/R18 cho tỷ lệ là 23 Eui/Eui : 48 Eui/eui : 29 eui/eui

F2 của 12A/R253 cho tỷ lệ là 24 Eui/Eui : 53 Eui/eui : 23 eui/eui

+ Gen *eui* do 1 gen lặn quy định và tuân theo quy luật di truyền Mendel

3.2. Kiến nghị

Các dòng lúa ở các thế hệ phân ly F2 và thế hệ backcross chứa gen *eui* là nguồn vật liệu quý phục vụ chọn tạo dòng mẹ lúa lai tốt. Cần tiếp tục lai tạo và đánh giá ở các thế hệ backcross tiếp theo cho đến khi tạo ra được dòng mẹ mới.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Khera P, Gangashetti MG, Sing S, Ulaganathan K, Shashidhar HE and Freeman WH. (2009). Identification and genetic mapping of elongated uppermost internode gene with microsatellite markers in rice. *Plant Breeding and Crop Science*. 1(10): 336-342
2. Gangashetti MG, Jena KK, Shenoy VV, Freeman WH (2004). Inheritance of elongated uppermost internode and identification of RAPD marker linked to *eui* gene in rice. *Curr Sci* 87:469–475
3. Gangashetti MG, Singh Sukhpal, Khera P, Kadirvel P (2006). Development of STS marker linked to elongated uppermost internode (*eui-1*) gene in rice (*Oryza sativa* L.). *Indian J. Crop Sci.*, 1 (1-2): 113-116.
4. Rutger JN, Carnahan HL (1981) A fourth genetic element to facilitate hybrid cereal production. A recessive tall in rice. *Crop Sci* 21:373–376
5. Wu YL, He ZH, Dong JX, Li DB, Lin HX, Zhuang JY, Lu J, Zheng KL (1998). The RFLP tagging of *eui* gene in rice. *Chin J Rice Sci* 12:119–120
6. Xu, Y., Zhu, Y., Zhou, H., Li, Q., Sun, Z., Liu, Y., Lin, H., and He, Z. (2004). Identification of a 98-kb DNA segment containing the rice *Eui* gene controlling uppermost internode elongation, and construction of a TAC transgene sublibrary. *Mol. Genet. Genomics* 272, 149–155.
7. Zhu Y, Nomura T, Xu Y, Zhang Y, Peng Y, Mao B, Hanada A, Zhou H, Wang R, Li P, Zhu X, Mander LN, Kamiya Y, Yamaguchi S, He Z (2006) ELONGATED UPPERMOST INTERNODE encodes a cytochrome P450 monooxygenase that epoxidizes gibberellins in a novel deactivation reaction in rice. *Plant Cell* 18:442–456

PHÂN LẬP VÀ TUYỂN CHỌN CÁC CHỦNG VI KHUẨN NỘI SINH CÓ KHẢ NĂNG CỐ ĐỊNH ĐẠM, PHÂN GIẢI LÂN, TỔNG HỢP IAA TỪ CÂY LÚA

Phạm Thị Hải¹, Nguyễn Thị Sơn¹, Nguyễn Quang Thạch¹

ABSTRACT

Currently, application of endophytic bacteria which has capable of nitrogen fixing, phosphate solubilizing, IAA synthesizing is one of effective solutions in agricultural production. Using this method, chemical fertilizers are reduced; the environment is fresh and production cost is saved. Besides, the yield and quality of crops are also increased. In this research, 30 endophytic bacterial strains were isolated on RMR medium from stems, leaves and roots of rice in Gialam, Hanoi. The results indicated that three endophytic bacteria strains N6, N15, N26 with the best ability of nitrogen fixing, phosphate solubilizing and IAA synthesizing were selected. All three strains showed the highest activity at pH=7 after 4 days inoculation. At both 32°C and 37°C, the ability of nitrogen fixing is the best, while the optimum temperature for phosphate solubilizing is at 32°C and IAA synthesizing is at 37°C.

Keyword: *nitrogen fixing, phosphate solubilizing, IAA synthesizing, rice endophytic bacteria*

TÓM TẮT

Sử dụng các chủng vi khuẩn nội sinh có khả năng cố định đạm, phân giải lân và tổng hợp indole-3-acetic acid (IAA) là một trong những biện pháp có hiệu quả trong sản xuất nông nghiệp hiện nay. Biện pháp này giảm tải việc sử dụng quá nhiều phân hóa học, không gây ô nhiễm môi trường, tiết kiệm chi phí sản xuất nhưng vẫn đảm bảo chất lượng đồng thời vẫn tăng năng suất cây trồng. Trong nghiên cứu này, 30 chủng vi khuẩn đã được phân lập trên môi trường RMR (Rennie medium supplemented with rice extract and malate) từ thân, lá, rễ của các giống lúa trồng tại Gia Lâm – Hà Nội. Kết quả cho thấy, ba chủng N6, N15, N26 có các khả năng cố định đạm, phân giải lân và tổng hợp IAA tốt nhất. Cả 3 chủng này đều thể hiện các hoạt tính nói trên cao nhất sau 4 ngày nuôi cấy và tại pH =7. Ở nhiệt độ 32°C và 37°C, các chủng này đều có khả năng cố định đạm mạnh nhất. Tuy nhiên, sự phân giải lân mạnh nhất diễn ra ở 32°C và tổng hợp IAA mạnh nhất ở 37°C.

Từ khóa: *vi khuẩn nội sinh lúa, cố định đạm, phân giải lân, tổng hợp IAA*

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Để giảm tải việc sử dụng quá nhiều phân hóa học trong sản xuất lúa, việc sử dụng các chủng vi khuẩn nội sinh có các khả năng cố định đạm, phân giải lân và tổng hợp IAA là một trong những biện pháp có hiệu quả mà không gây ô nhiễm môi trường, tiết kiệm chi phí sản xuất nhưng vẫn đảm bảo chất lượng đồng thời vẫn tăng năng suất cây trồng. Vi khuẩn nội sinh là vi khuẩn trải qua phần lớn vòng đời trong cây trồng (Quispel, 1992). Vi khuẩn nội sinh có thể được xem như là vi khuẩn tập trung trong mô thực vật mà không có những dấu hiệu nhiễm bệnh hay hậu quả tiêu cực đối với cây chủ (Schuluz và Boyle, 2005). Trên thế giới, nhiều vi khuẩn nội sinh được tìm thấy ở rễ, vùng rễ và thân cây lúa như *Azospirillum* sp., *Burkholderia* sp., *Enterobacter* sp., *Herbaspirillum* sp., *Klebsiella* sp... (Koomnok et al., 2007; Mano và Morisaki, 2008). Ở Việt Nam, đặc biệt ở vùng đồng bằng sông Cửu Long đã có nhiều nghiên cứu và ứng dụng vi khuẩn nội sinh ở cây lúa như phân lập được *Burkholderia vietnamiensis*, *Azospirillum lipoferum* từ cây lúa trồng ở miền Nam Việt Nam (Van et al.,

¹ Học viện Nông nghiệp Việt Nam

1994; Cao Ngọc Điệp et al., 2007). Tuy nhiên, việc nghiên cứu về các loài vi khuẩn nội sinh hữu ích trên cây lúa trồng ở đồng bằng sông Hồng chưa được tập trung nghiên cứu.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Vật liệu

Thân, rễ lá mẫu lúa tại Gia Lâm

Hóa chất: Cồn, HgCl_2 , H_2O_2 , $\text{Mg}(\text{SO}_4)_2$, KH_2PO_4 , K_2HPO_4 , CaCl_2 , NaOH , Na_2SO_4 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_3, \dots$

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phân lập các chủng vi khuẩn

Chọn các mẫu lúa đang ở giai đoạn tăng trưởng mạnh. Sau đó rửa cây lúa dưới vòi nước chảy cho sạch đất bám ở thân và rễ, bảo quản ở 4°C . Sau đó cắt rời thân, lá và rễ ra thành từng đoạn nhỏ, khử trùng bề mặt thân, lá, rễ lần lượt bằng cồn 70% trong 3 phút, rửa sạch bằng nước cất vô trùng. Tiếp đến cho HgCl_2 0.1%, lắc nhẹ trong 1 phút, rửa sạch bằng nước cất vô trùng. Làm tương tự với hydrogen peroxide (H_2O_2) 3%, sau đó rửa sạch 4 lần bằng nước cất vô trùng. Để kiểm tra vi sinh vật còn sót lại trên bề mặt thân, lá, rễ cây lúa sau khi khử trùng: 200 μl nước cất vô trùng đã rửa mẫu ở lần cuối cấy lên các đĩa chứa môi trường Tryptone - Yeast extract – glucose agar và ủ ở 30°C trong 24 giờ. Nếu sau 24 giờ, các đĩa môi trường này không xuất hiện các khuẩn lạc thì các mẫu thân lá rễ đã khử trùng đạt yêu cầu. Mẫu thân, lá và rễ sau khi đã khử trùng cho vào cối vô trùng, giã nhuyễn, thêm 1ml nước cất vô trùng vào cối, trộn đều và hút dịch trích mẫu cho vào tube 1,5ml vô trùng. Hút 50 μl dịch trích mẫu cho vào đĩa môi trường RMR sau đó dùng que chang chang đều lên mặt thạch, ủ ở 30°C trong khoảng 1-2 ngày. Sau 1-2 ngày, chọn các khuẩn lạc (khác nhau về hình dạng, màu sắc, kích thước) từ đĩa môi trường trên cấy chuyển nhiều lần đến khi các khuẩn lạc rời ra. Cấy các chủng vi khuẩn đã thuần vào ống nghiệm chứa môi trường RMR đặc và giữ ở 4°C (Cao Ngọc Điệp, 2011)

2.2.2. Xác định khả năng cố định đạm bằng phương pháp Indophenol blue

Hút 0,5ml phần dịch trong sau khi ly tâm dịch nuôi vi khuẩn cho vào các ống nghiệm đã chứa sẵn 2ml nước cất khử trùng cộng với 0,5 ml EDTA. Thêm 1ml dung dịch Phenol nitroprusside và 2ml dung dịch Sodium hypochloride vào mỗi ống, trộn đều dung dịch bằng máy Vortex. Để ổn định ở nhiệt độ phòng khoảng 30 phút. Sau đó tiến hành đo OD ở bước sóng 636nm (OD636nm). Kết quả đo OD của các dòng vi khuẩn được thay vào phương trình đồ thị đường chuẩn, từ đó suy ra được hàm lượng ammonium sinh ra trong dung dịch (Page et al., 1982)

2.2.3. Xác định khả năng hòa tan lân bằng phương pháp acid ascorbi

Hút 0,5ml phần dịch trong sau khi ly tâm dịch, nuôi vi khuẩn cho vào các ống nghiệm đã chứa sẵn 3 ml nước cất khử trùng. Sau đó nhỏ 4ml hỗn hợp thuốc thử (H_2SO_4 5N, $\text{K}(\text{SbO})\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6.1/2\text{H}_2\text{O}$, $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}.4\text{H}_2\text{O}$, Acid Ascorbic 0,1M), trộn đều dung dịch bằng máy Vortex. Để ổn định ở nhiệt độ phòng khoảng 30 phút. Sau đó tiến hành đo OD ở bước sóng 880 nm (OD880nm). Kết quả đo OD của các dòng vi khuẩn được thay vào phương trình

đồ thị đường chuẩn, từ đó suy ra được hàm lượng PO_4^{3-} trong dung dịch (Murphy and Riley, 1977) (Cao Ngọc Diệp, 2011)

2.2.4. Xác định khả năng tổng hợp IAA của vi khuẩn bằng phương pháp Salkowski

Hút 1ml phân dịch trong sau khi ly tâm lạnh (4°C) dịch nuôi vi khuẩn cho vào các ống nghiệm chứa sẵn 2ml thuốc thử Salkowski (H_2SO_4 10,8M và FeCl_3), trộn đều bằng máy vortex. Ủ hỗn hợp trên trong tối 10-15 phút để phản ứng xảy ra hoàn toàn. Tiến hành đo OD ở bước sóng 530nm (OD530nm).

Kết quả đo OD của các dòng vi khuẩn được thay vào phương trình đồ thị đường chuẩn IAA, từ đó suy ra được hàm lượng IAA sinh ra trong dung dịch (Glickmann và Dessaux, 1995)

2.2.5. Khảo sát ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy, nhiệt độ, pH đến hoạt tính cố định đạm, phân giải lân, tổng hợp IAA của các chủng vi khuẩn tuyển chọn.

Các chủng vi khuẩn được nuôi cấy trên các môi trường Burk không đạm, NBRIP, King B trong 1; 2; 3; 4; 5; 6 ngày, ở các dải nhiệt độ 25; 32; 37; 45°C , ở các dải pH, 5; 6; 7; 8; 9 lắc 120 vòng/phút. Sau đó tiến hành kiểm tra các hoạt tính cố định đạm, phân giải lân, tổng hợp IAA của các chủng vi khuẩn tuyển chọn.

2.2.6. Khảo sát ảnh hưởng của môi trường, nhiệt độ, pH đến khả năng sinh trưởng, phát triển của các chủng có khả năng cố định đạm, phân giải lân, tổng hợp IAA cao

Các chủng vi khuẩn được nuôi cấy trên 3 loại môi trường khác nhau Nfb, King B, Fallik ở các dải nhiệt độ 25; 32; 37; 45°C , ở các dải pH 5; 6; 7; 8; 9, lắc 120 vòng/phút. Tiến hành đo OD 660nm sau 48h nuôi cấy để kiểm tra khả năng sinh trưởng của các chủng vi khuẩn tuyển chọn.

3. KẾT QUẢ

3.1. Phân lập các chủng vi khuẩn

Từ thân, lá rễ của các mẫu lúa đã phân lập được 30 chủng vi khuẩn trên môi trường RMR gồm 13 chủng từ mẫu rễ, 10 chủng từ thân và 7 chủng từ mẫu lá. Đặc điểm khuẩn lạc và tế bào của các chủng được thể hiện dưới bảng sau.

Bảng 1: Đặc điểm khuẩn lạc và tế bào của các chủng vi khuẩn phân lập được

TT	Chủng	Nguồn phân lập	Đặc điểm khuẩn lạc				Đặc điểm tế bào
			Hình dạng	Kích thước	Bề mặt khuẩn lạc	Mép khuẩn lạc	Que ngắn
1	N1	Lá	Tròn đều	1,5	Trắng trong, có nhân	Bằng phẳng	Que ngắn
2	N2	Lá	Tròn đều	1,5	Trắng trong, nhầy	Bằng phẳng	Que ngắn
3	N3	Lá	Tròn đều	1	Trắng đục, có nhân	Bằng phẳng	Que ngắn
4	N4	Lá	Tròn đều	1	Trắng đục	Bằng phẳng	Que ngắn
5	N5	Lá	Không đều	1,5	Trắng đục	Nhăn	Que ngắn
6	N6	Lá	Tròn đều	2	Trắng trong, nhầy	Bằng phẳng	Que ngắn
7	N7	Lá	Tròn đều	2	Trắng đục, có nhân	Bằng phẳng	Que ngắn
8	N8	Thân	Tròn đều	1	Trắng trong	Nhăn	Que ngắn
9	N9	Thân	Tròn đều	1	Trắng đục	Bằng phẳng	Que ngắn
10	N10	Thân	Không đều	1	Trắng trong	Bằng phẳng	Que ngắn

11	N11	Thân	Tròn đều	1,5	Trắng đục	Nhấn	Que ngấn
12	N12	Thân	Không đều	2,5	Trắng trong	Bằng phẳng	Que ngấn
13	N13	Thân	Tròn đều	1,5	Trắng trong	Nhấn	Que ngấn
14	N14	Thân	Không đều	2	Trắng đục	Bằng phẳng	Que ngấn
15	N15	Thân	Tròn đều	1,5	Trắng đục	Bằng phẳng	Que ngấn
16	N16	Thân	Tròn đều	1,5	Trắng đục, có nhân	Nhấn	Que ngấn
17	N17	Thân	Tròn đều	2	Trắng trong, nhầy	Bằng phẳng	Que ngấn
18	N18	Rễ	Tròn đều	1	Trắng đục	Nhấn	Que ngấn
19	N19	Rễ	Tròn đều	1	Trắng đục	Bằng phẳng	Que ngấn
20	N20	Rễ	Tròn đều	1,5	Trắng đục, có nhân	Nhấn	Que ngấn
21	N21	Rễ	Tròn đều	1,5	Trắng trong	Nhấn	Que ngấn
22	N22	Rễ	Tròn đều	1,5	Trắng trong, lan	Bằng phẳng	Que ngấn
23	N23	Rễ	Tròn	2	Trắng trong	Bằng phẳng	Que ngấn
24	N24	Rễ	Tròn đều	1	Trắng đục	Bằng phẳng	Que ngấn
25	N25	Rễ	Tròn đều	2	Trắng đục, lan	Bằng phẳng	Que ngấn
26	N26	Rễ	Tròn đều	1,5	Trắng đục	Nhấn	Que ngấn
27	N27	Rễ	Tròn đều	1	Trắng trong, có nhân	Bằng phẳng	Que ngấn
28	N28	Rễ	Tròn	1,5	Trắng trong, nhầy	Bằng phẳng	Que ngấn
29	N29	Rễ	Tròn	2	Trắng đục, có nhân	Nhấn	Que ngấn
30	N30	Rễ	tròn đều	1	Trắng đục	Nhấn	Que ngấn



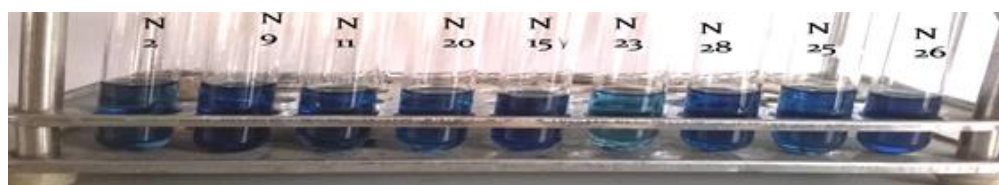
Hình 1: Hình ảnh khuẩn lạc của chủng N6, N26

3.2. Khả năng cố định đạm của các chủng vi khuẩn

Từ 30 chủng vi khuẩn phân lập được đã tuyển chọn được 19 chủng có khả năng cố định đạm. Có 5/19 chủng có khả năng tổng hợp NH_4^+ mạnh là chủng N15 (1,797mg/l), N26 (1,526mg/l), N9 (1,429mg/l), N28 (1,243mg/l), N2 (1,187mg/l)/l.



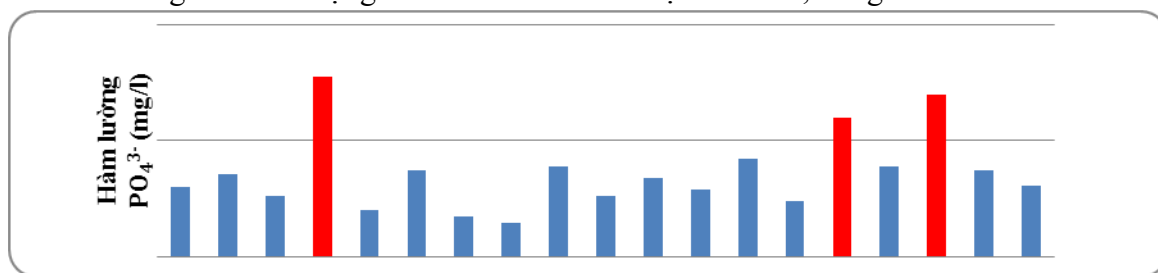
Hình 2: Đồ thị biểu hiện hàm lượng NH_4^+ tổng hợp của các chủng vi khuẩn



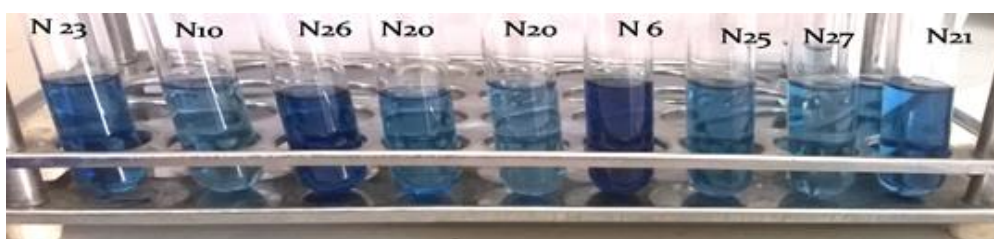
Hình 3: Khả năng tổng hợp NH_4^+ của các chủng vi khuẩn

3.3. Khả năng phân giải lân của các chủng vi khuẩn

Kết quả khảo sát khả năng phân giải lân của 30 chủng vi khuẩn cho thấy 19 chủng có khả năng phân giải lân. 19 chủng vi khuẩn đều có khả năng phân giải lân trong đó có các chủng N6, N26, N23, N21 có khả năng phân giải lân mạnh nhất tương ứng là 7,784mg/l; 6,992 mg/l; 6,014mg/l; 4,197mg/l. Kết quả này thấp hơn rất nhiều so với nghiên cứu của Lăng Ngọc Đậu (2006) về các chủng vi khuẩn nội sinh phân lập từ thân và rễ cây lúa mùa cao sản trên môi trường Nfb với lượng lân hòa tan cao nhất đạt tới 1334,51mg/l.



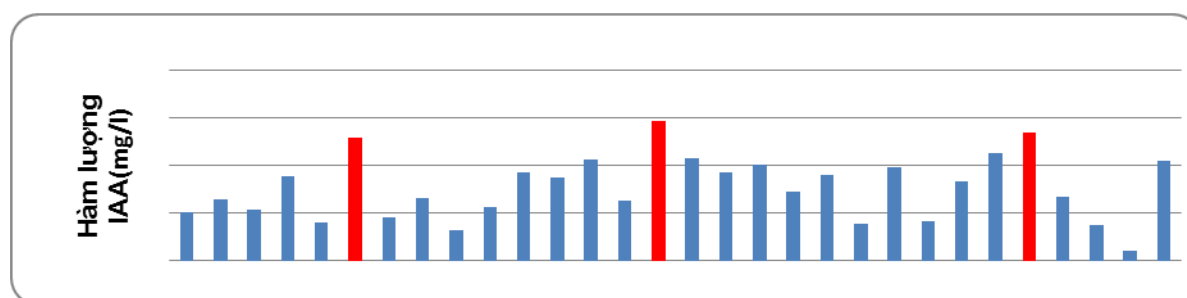
Hình 4: Hàm lượng PO_4^{3-} phân giải của các chủng vi khuẩn



Hình 5: Khả năng phân giải lân của các chủng vi khuẩn

3.4. Khả năng tổng hợp IAA

Nhận thấy, các chủng vi khuẩn đều có khả năng sinh tổng hợp IAA, hàm lượng IAA sinh ra dao động từ 3,75 đến 14,67mg/l. Các chủng N15, N26, N6 có hàm lượng IAA mạnh nhất tương ứng với 14,67mg/l; 13,52mg/l; 12,92mg/l. Khả năng sinh tổng hợp IAA của những chủng vi khuẩn phân lập được thấp hơn các chủng vi khuẩn phân lập được từ rễ và thân cây lúa phân lập trên môi trường Nfb của Lăng Ngọc Đậu (2006) (15,61mg/l).



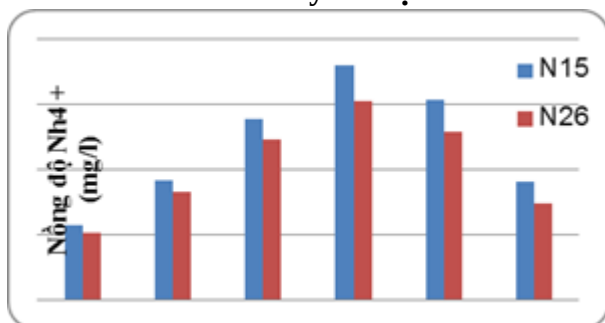
Hình 6: Hàm lượng IAA tổng hợp của các chủng vi khuẩn

3.5. Ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy, nhiệt độ, pH đến khả năng cố định đạm, phân giải lân và tổng hợp IAA của các chủng vi khuẩn tuyển chọn

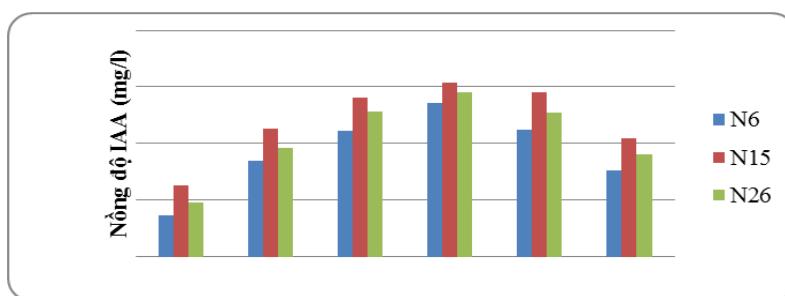
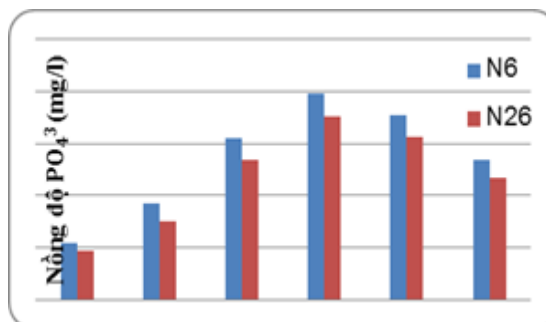
3.5.1. Ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy đến khả năng cố định đạm, phân giải lân và tổng hợp IAA của các chủng vi khuẩn tuyển chọn

Thời gian nuôi cấy có ảnh hưởng lớn đến khả năng sinh cố định đạm, phân giải lân và tổng hợp IAA của 3 chủng vi khuẩn. Hoạt tính của các chủng vi khuẩn tăng theo thời gian từ ngày thứ hai đến ngày thứ 4 sau đó lại giảm dần và đạt giá trị cao nhất ở ngày thứ 4. Hàm lượng NH_4^+ tổng hợp của chủng N15 đạt 1,807mg/l và chủng N26 đạt 1,529mg/l. Hàm lượng PO_4^{3-} phân giải của chủng N6 đạt 7,907 mg/l, chủng N26 đạt 7,050 mg/l. Hàm lượng IAA của chủng N6 đạt 13,58 mg/l, chủng N15 đạt 15,42, chủng N26 đạt 14,50mg/l

Hình 7: Ảnh hưởng của thời gian đến khả năng tổng hợp NH_4^+ của các chủng vi khuẩn tuyển chọn.



Hình 8: Ảnh hưởng của thời gian đến khả năng phân giải lân của các chủng vi khuẩn tuyển chọn.

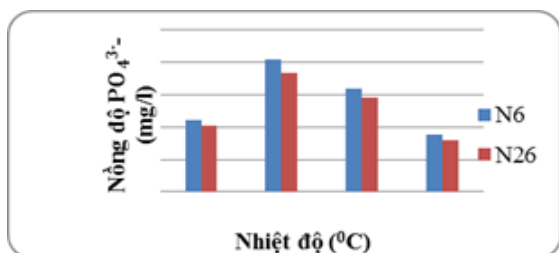


Hình 9: Ảnh hưởng của thời gian đến khả năng tổng hợp IAA của các chủng vi khuẩn tuyển chọn

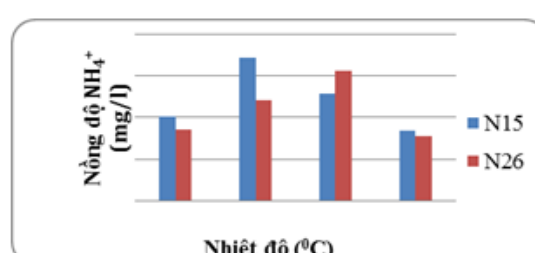
3.5.2 Ảnh hưởng của nhiệt độ đến khả năng cố định đạm, phân giải lân, tổng hợp IAA của các chủng vi khuẩn tuyển chọn

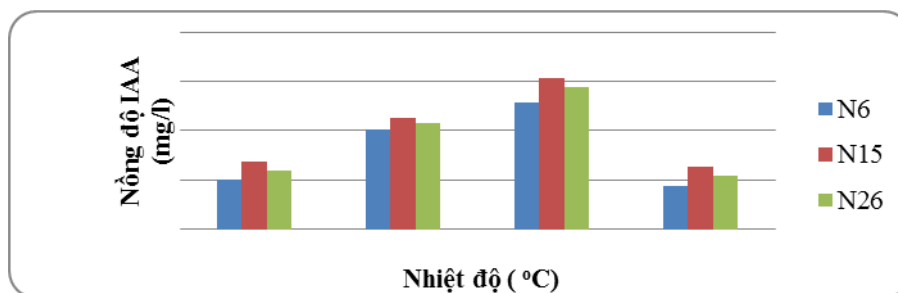
Kết quả nghiên cứu cho thấy nhiệt độ có ảnh hưởng tới khả năng cố định đạm, phân giải lân, tổng hợp IAA của các chủng vi khuẩn. Nhiệt độ thích hợp cho khả năng cố định đạm của chủng N15 là 32⁰C, chủng N26 là 37⁰C. Các chủng có khả năng phân giải lân mạnh nhất tại 32⁰C. Ba chủng vi khuẩn tổng hợp IAA cao nhất ở 37⁰C.

Hình 10: Ảnh hưởng của nhiệt độ đến khả năng cố định đạm của các chủng vi khuẩn tuyển chọn



Hình 11: Ảnh hưởng của nhiệt độ đến khả năng phân giải lân của các chủng tuyển chọn



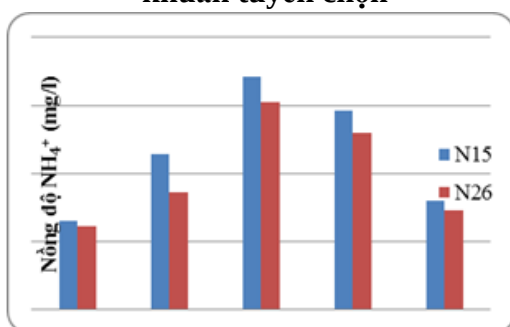


Hình 12: Ảnh hưởng của nhiệt độ đến khả năng tổng hợp IAA của các chủng vi khuẩn tuyển chọn

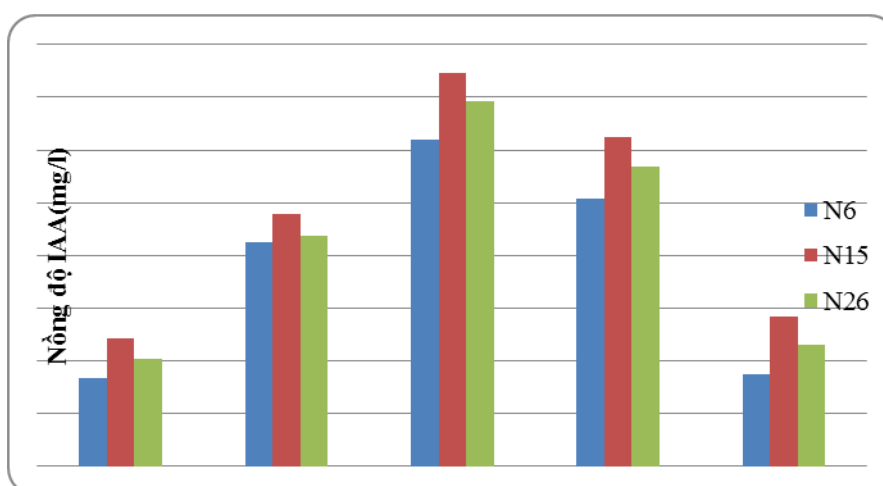
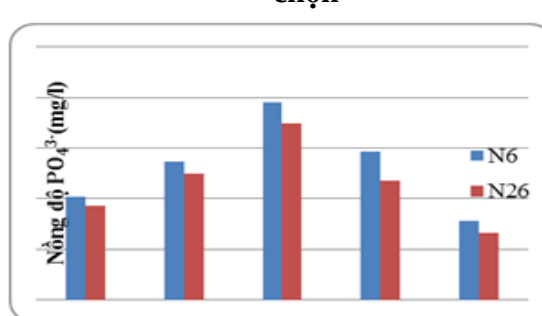
3.5.3 Ảnh hưởng của pH đến khả năng cố định đạm, phân giải lân và tổng hợp IAA của các chủng vi khuẩn tuyển chọn

Từ đồ thị ta nhận thấy cả ba chủng vi khuẩn đều có khả năng cố định đạm, phân giải lân và tổng hợp IAA mạnh nhất tại pH=7, nồng độ NH_4^+ của chủng N15 đạt 1,714mg/l, chủng N26 đạt 1,524mg/l. Nồng độ PO_4^{3-} phân giải của chủng N6 đạt 5,456mg/l, chủng N26 đạt 6,973mg/l. Nồng độ IAA tổng hợp của các chủng đạt được lần lượt là N6: 12,42mg/l, N15: 14,92mg/l, N26: 13,83mg/l.

Hình 13: Ảnh hưởng của pH đến khả năng cố định đạm của các chủng vi khuẩn tuyển chọn



Hình 14: Ảnh hưởng của pH đến khả năng phân giải lân của các chủng vi khuẩn tuyển chọn



Hình 15: Ảnh hưởng của pH đến khả năng tổng hợp IAA của các chủng vi khuẩn tuyển chọn

4. KẾT LUẬN

Trên môi trường RMR, từ các bộ phận rễ, thân, lá lúa đã phân lập được 30 chủng vi khuẩn nội sinh gồm 13 chủng từ mẫu rễ, 10 chủng từ thân và 7 chủng từ mẫu lá.

Đã đánh giá được khả năng cố định đạm, phân giải lân, sinh IAA của các chủng phân lập được và tuyển chọn được 3 chủng có các hoạt tính cố định đạm, phân giải lân, sinh IAA cao nhất: N6, N15, N26.

Cả 3 chủng đều cho hoạt tính cố định đạm, phân giải lân, tổng hợp IAA cao nhất ở sau 4 ngày nuôi cấy, pH =7. Các chủng đều cố định đạm mạnh nhất tại 32⁰C. và 37⁰C, phân giải lân mạnh nhất tại 32⁰C, tổng hợp IAA mạnh nhất tại 37⁰C.

LỜI CẢM ƠN

Chúng tôi xin chân thành cảm ơn GS.TS Cao Ngọc Diệp đã hỗ trợ phương pháp nghiên cứu để công trình được hoàn thành.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Cao Ngọc Diệp, Phạm Thị Khánh Vân và Lăng Ngọc Dậu, (2007). *Phát hiện vi khuẩn Azospirillum lipoferum nội sinh trong cây lúa mùa cao sản (Oryza sativa L.) trồng ở đồng bằng sông Cửu Long*. Báo cáo khoa học Hội nghị toàn quốc Nghiên cứu cơ bản khoa học sự sống, Quy Nhơn 10-08-2007, NXB. KH-KT, trang 456-459.
2. Cao Ngọc Diệp, (2011). *Vi khuẩn nội sinh thực vật (Endophytic bacteria)*. NXB Đại học Cần Thơ, trang 1-48.
3. Lăng Ngọc Dậu, (2006). *Đánh giá khả năng cố định đạm, hòa tan lân và tổng hợp IAA của vi khuẩn sống trong rễ và thân lúa mùa đặc sản ở đồng bằng Sông Cửu Long*. Luận văn tốt nghiệp thạc sĩ ngành Công nghệ sinh học, Trường Đại học Cần Thơ.
4. Glickmann, E. and Y. Dessaux, (1995). *A critical examination of the specificity of the salkowski reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria*. Appl Environ Microbiol, 61(2):793-796.
5. Murphy, J.;Riley, J. R.Amodified, (1977). *Single solutionmethod for the determination of phosphate in natural waters*. Anal. Chem.,27,31-36
6. Page, L., R.H. Miller and R.D. Keeney, (1982). *Methods for Soils Analysis, Part 2: Chemical and Microbial properties*, 2nd edition. American Society of Agronomy Incorporation. USA.
7. Quispel A, (1992). A search of signal in endophytic microorganisms, In: Verma, DPS (Eds.) *Molecular Signail in Plant-Microbe Communications*, CRS Press, Boca Raton, FL p.475-491
8. Schulz B và Boyle C, (2005). *The endophytic continuum*. Mycol Res 109: 661-686
9. Van, T.V., O. Berge, S. Ngo Ke, J. Balandreau and T. Heulin. (2000), *Repeated beneficial effects of rice inoculation with a strain of Burkholderia vietnamiensis on early and late yield component in low fertility sulphate acid soils of Viet Nam*. Plant Soil, 218:273-284

PHÂN LẬP VÀ TUYỂN CHỌN CÁC CHỦNG NẤM MỐC *ASPERGILLUS* SPP. SINH TỔNG HỢP ENZYME INVERTASE

Phạm Thùy Trang¹, Nguyễn Thị Thu¹, Nguyễn Đức Thái¹,
Thái Thị Hà Phương¹, Đặng Quang Cảnh¹

ABSTRACT

Invertase (β -fructofuranosidase E.C.3.2.1.26) catalyzes the hydrolysis of sucrose to glucose and fructose so it is mainly used in the food industry. This study was conducted to isolate and screen fungal strains *Aspergillus* spp. which have invertase activity and study some biochemical characterization of invertase enzyme. From different samples, we isolated 16 fungal strains which have the ability synthesis invertase enzyme with O1, L1.2 expressing highest activity. Strains O1 and L1.2 produced high levels of invertase enzyme under optimized culture conditions at an optimum temperature 35°C, pH 6,5 with ure as nitrogen source and sucrose as carbon source. Enzyme invertase of strain O1 exhibited optimum at temperature 50°C, pH 5,5; strain L1.2 exhibited optimum at temperature 40°C, pH 6. This research showed that the activity of this enzyme increases as additional Mn^{2+} .

Key word: Invertase enzyme, *Aspergillus* spp., , enzyme activity,

TÓM TẮT

Invertase (β -fructofuranosidase E.C.3.2.1.26) là enzyme có khả năng xúc tác phản ứng thủy phân sucrose thành glucose và fructose nên được ứng dụng nhiều trong công nghiệp thực phẩm. Nghiên cứu này nhằm mục đích tuyển chọn các chủng nấm mốc *Aspergillus* spp. có khả năng sinh enzyme invertase và khảo sát một số đặc tính của enzyme này. Từ các nguồn mẫu khác nhau chúng tôi đã phân lập được 16 chủng có khả năng tổng hợp enzyme invertase trong đó chủng O1, L1.2 biểu hiện hoạt tính invertase cao nhất. Hai chủng O1 và L1.2 có khả năng sinh tổng hợp enzyme tốt nhất ở 35°C và pH 6,5 với nguồn nitrogen là urea đối với chủng L1.2 và $NaNO_3$ đối với chủng O1, nguồn carbon là sucrose đối với chủng L1.2 còn với O1 là fructose. Enzyme invertase của chủng O1 hoạt động tối ưu ở 50°C, pH 5,5; đối với chủng L1.2 enzyme này hoạt động tốt nhất ở 40°C, pH 6. Kết quả nghiên cứu cho thấy hoạt tính của enzyme này tăng lên khi bổ sung Mn^{2+} .

Từ khóa: Enzyme invertase, *Aspergillus* spp., hoạt tính enzyme,

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Invertase (EC3.2.1.26) là một enzyme thuộc họ GH 32 của glycoside hydrolase (Alberto *et al.* 2004), nó còn được biết đến với các tên gọi khác như: β -fructofuranosidase, saccharase, glucosucrase, sucrase, β –fructosidase. Invertase có khả năng xúc tác phản ứng thủy phân sucrose thành glucose và fructose (tỉ lệ 1:1) gọi là đường nghịch đảo. Invertase được sử dụng rộng rãi trong công nghiệp thực phẩm đặc biệt là ngành sản xuất bánh kẹo và nước giải khát do đường nghịch đảo ngọt hơn và ít kết tinh hơn so với đường sucrose. Ngoài ra, invertase còn được ứng dụng trong sản xuất đường fructooligosaccharide (FOS) – là loại đường có chức năng làm giảm cholesterol, phospholipid và triglycerides trong máu, cũng như làm giảm huyết áp tâm trương (Nguyễn *et al.*, 2005). Invertase là một enzyme được thu nhận từ nhiều nguồn khác nhau như thực vật, vi khuẩn, nấm men *Saccharomyces* và một số vi nấm như *Aspergillus niger* (Rubio và Navarro, 2006). Tuy nhiên nghiên cứu trong nước về các chủng *Aspergillus* sinh tổng hợp invertase còn hạn chế nên chúng tôi thực hiện nghiên cứu này nhằm

¹ Học viện Nông nghiệp Việt Nam

mục đích phân lập, tuyển chọn các chủng nấm mốc *Aspergillus* spp. có khả năng sinh enzyme invertase và khảo sát một số đặc tính của enzyme này.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu thí nghiệm

Vật liệu phân lập nấm mốc: các chủng nấm mốc được phân lập từ các nguồn vật liệu khác nhau: mẫu lá mục, lạc, gạo, tổ ong mốc, vỏ chanh được lấy từ các khu vực và địa điểm khác nhau: Hà Nội, Nam Định.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Các chủng nấm mốc *Aspergillus* được phân lập theo phương pháp Ulster (Bùi Xuân Đồng, Nguyễn Huy Văn, 2000) trên loại môi trường phân lập là PDA và Czapek-Dox. Sau đó làm thuần bằng cách cấy truyền trên môi trường PDA. Các chủng nấm mốc *Aspergillus* được nuôi lắc trong môi trường Czapek-Dox lỏng pH 5.5 (Sigma- Mỹ), tốc độ lắc 150 rpm, nhiệt độ 35°C, mật độ tiếp giống 10^6 bào tử cho 100ml môi trường lên men. Sau 3 ngày nuôi cấy thu dịch nuôi đem li tâm 10000 rpm ở 4°C trong 20 phút. Phần dịch lỏng thu được sau li tâm sẽ được đưa đi thử hoạt tính enzyme invertase. Dựa vào nguyên lý enzyme invertase có khả năng thủy phân liên kết β -1,2 glucoside của sucrose sản phẩm là glucose và fructose tỉ lệ 1:1. Hoạt tính tương đối của enzyme invertase được xác định bằng phương pháp khuếch tán đĩa thạch: phương pháp này sử dụng thuốc thử TTC 0.1% (2,3,5- triphenyl tetrazolium chloride trong NaOH 0,5M). Đường khử (glucose) sinh ra từ quá trình thủy phân sucrose của enzyme invertase sẽ khử TTC thành triphenylformazon có màu hồng, lượng triphenylformazon tỉ lệ thuận với lượng đường khử sinh ra. Giếng thạch được đục trong môi trường cơ chất sucrose 3% trong đệm natri acetate 50mM pH 5,0. Cho 100 μ l dịch enzyme thô vào vào giếng để qua đêm ở nhiệt độ phòng. Thuốc thử TTC được thêm vào bằng cách phun lên mặt thạch và ủ trong bóng tối 20 phút, rửa đệm acetate 0,1M pH 5,0. Enzyme invertase khuếch tán vào đĩa thạch sản phẩm thủy phân của nó được khẳng định bằng sự xuất hiện vòng đỏ quanh giếng.

Phương pháp so màu DNS: Ủ hỗn hợp phản ứng gồm 200 μ l enzyme thô, 500 μ l dung dịch sucrose 5% và 300 μ l đệm acetate 50mM pH 5,0 ở 50°C trong 30 phút (Bernfeld *et al.*, 1955). 1ml DNS (3, 5-dinitrosalicylic acid) được cho thêm vào hỗn hợp trên và kết thúc phản ứng bằng cách ngâm ống nghiệm trong bể nước sôi 5 phút. Sau khi làm lạnh bằng nước tới nhiệt độ phòng dung dịch phản ứng được dùng để xác định lượng đường khử glucose sinh ra bằng cách đo OD₅₄₀.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN.

3.1. Phân lập và tuyển chọn chủng vi sinh vật có khả năng sinh invertase

Từ các nguồn vật liệu mẫu chúng tôi phân lập được 16 chủng nấm mốc có đặc điểm giống với *Aspergillus* trong đó có 8 chủng khuẩn lạc có màu đen 8 chủng khuẩn lạc có màu xanh rêu, vàng lục. Các chủng nấm mốc được làm thuần và nuôi lỏng lắc trong môi trường Czapek-Dox trong 3 ngày ở 35°C với mật độ 10^6 bào tử/ 100ml môi trường. Sau 3 ngày nuôi thu dịch enzyme thô tiến hành xác định hoạt tính bằng khuếch tán đĩa thạch với cơ chất sucrose và thuốc thử TTC 0.1%. Kết quả được trình bày tại bảng 1.

Bảng 1. Kết quả khả năng tổng hợp enzyme invertase của 16 chủng nấm mốc trên môi trường Czapek-Dox

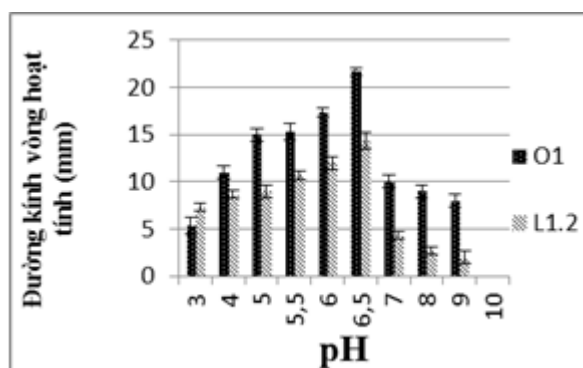
Chủng	Đường kính vòng hoạt tính (mm)	Chủng	Đường kính vòng hoạt tính (mm)
O1	23.67±0.47	G0.2	18.33±0.47
O2	9.00±0.82	L1.1	12.67±0.47
O3	10.67±0.47	L1.2	22.33±0.47
O4	14±0.82	L1.3	6.00±0.82
L1	14.33±0.47	L1.4	13.67±0.47
LB	9±0.82	PL2.1	13.67±0.94
G2.2	21.33±0.47	PL2.2	12.67±0.47
G2.1	14.33±0.94	243	4.33±0.47

Chúng tôi nhận thấy các chủng nấm mốc biểu hiện khả năng thủy phân sucrose khác nhau, trong số 16 chủng nấm mốc tham gia khảo sát, có 2 chủng biểu hiện hoạt tính invertase mạnh nhất là O1 và L1.2 với đường kính vòng phân giải sucrose tương ứng là 23,67 mm và 22,33mm.

3.2. Ảnh hưởng của một số yếu tố đến khả năng tổng hợp invertase.

3.2.1. Ảnh hưởng của pH môi trường

Các chủng *Aspergillus* được nuôi trên môi trường Czapek-Dox lỏng với các pH thay đổi từ 3 – 10. Sau 3 ngày nuôi, dịch nuôi được ly tâm và thử hoạt tính phân giải sucrose. pH môi trường đã ảnh hưởng tới khả năng sinh trưởng và tổng hợp enzyme invertase của các chủng nấm mốc *Aspergillus*. Các chủng *Aspergillus* có khả năng sinh trưởng và tổng hợp enzyme invertase ở dải pH khá rộng từ 3-9, trong đó vùng pH từ 5 – 6.5 là thích hợp nhất. Đối với cả hai chủng nấm mốc thì pH tốt nhất để tổng hợp invertase là 6.5 (hình 1)

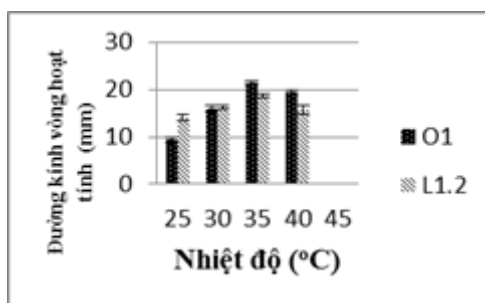


Hình 1. Ảnh hưởng của pH môi trường đến khả năng tổng hợp invertase

3.2.2. Ảnh hưởng của nhiệt độ

Các chủng nấm mốc *Aspergillus* được nuôi trên môi trường Czapek – Dox lỏng với pH 6.5 ở các nhiệt độ: 25, 30, 35, 40, 45°C. Sau khi nuôi 3 ngày thu dịch nuôi đem đi ly tâm để thử hoạt tính phân giải sucrose của các chủng. Các chủng *Aspergillus* đều có khả năng tổng hợp invertase ở dải nhiệt độ từ 25 - 40°C, trong đó chủng O1 và L1.2 có khả năng tổng hợp enzyme cao nhất ở 35°C. Kết quả này phù hợp với kết quả nghiên cứu của

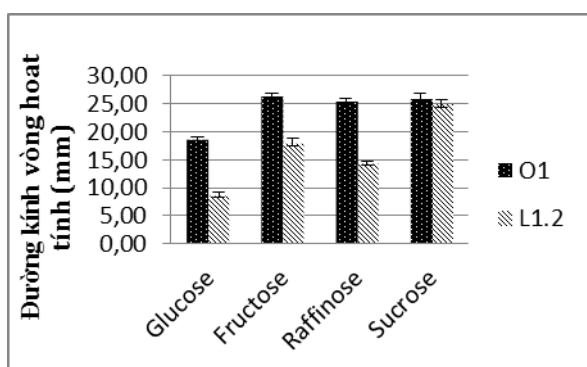
Madhanasundareswari và cộng sự (2015) khi nghiên cứu sản xuất và tối ưu hóa các điều kiện phát triển của chủng nấm mốc sinh enzyme invertase. Tại nhiệt độ 45°C thì cả hai chủng đều không còn khả năng tổng hợp invertase.



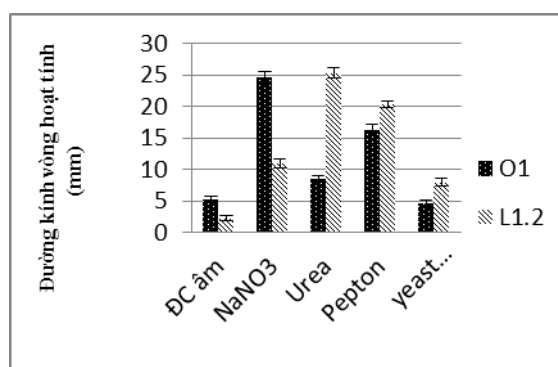
Hình 2. Ảnh hưởng của nhiệt độ nuôi cấy đến khả năng tổng hợp invertase của các chủng *Aspergillus*

3.2.3. Ảnh hưởng của một nguồn carbon

Enzyme invertase là enzyme cảm ứng muốn tổng hợp enzyme cảm ứng cần có 4 điều kiện: có gen tương ứng trong nhiễm sắc thể của tế bào, có đầy đủ cơ chất tương ứng để xây dựng các phần tử enzyme, có năng lượng cần thiết cho sự tổng hợp và phải có chất cảm ứng. Nếu không có chất cảm ứng thì có đủ 3 điều kiện trên cũng không thể tổng hợp enzyme. Tổng hợp enzyme chịu ảnh hưởng lớn của các loại đường sử dụng như nguồn carbon và cơ chất cảm ứng sinh enzyme (Ottoni *et al.*, 2012). Các loại đường khác nhau như glucose, fructose, sucrose và raffinose với nồng độ 1% đã được lựa chọn để thu invertase theo như mô tả của Uma *et al.*, (2010). Chủng L1.2 sản xuất invertase nhiều nhất trong môi trường có đường sucrose là nguồn carbon. Kết quả này phù hợp với kết quả nghiên cứu của Uma *et al.*, (2010) khi nghiên cứu sản xuất, tinh sạch và khả năng đặc tính enzyme invertase từ *Aspergillus flavus* và kết quả của Ottoni *et al* (2012) khi nghiên cứu tối ưu hóa điều kiện sản xuất invertase từ *Aspergillus oryzae* (hình 3). Trong khi đó với chủng O1 thì nguồn carbon tốt nhất lại là fructose tuy nhiên với nguồn carbon là sucrose thì đường kính vòng hoạt tính cũng tương đương chủng L1.2.



Hình 3. Ảnh hưởng của nguồn carbon khác nhau tới khả năng tổng hợp enzyme invertase



Hình 4. Ảnh hưởng của nguồn nitrogen tới khả năng tổng hợp invertase

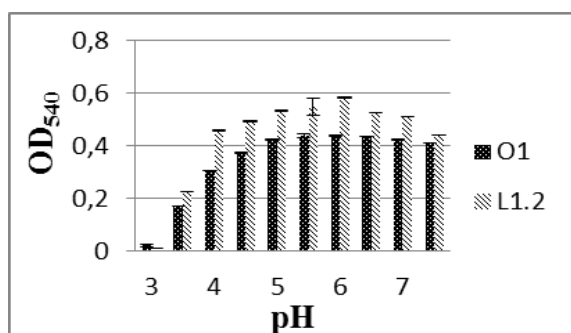
3.2.4. Ảnh hưởng của nguồn nitrogen

Nguồn nitrogen và nguồn carbon là hai yếu tố ảnh hưởng đến sự tăng trưởng của tế bào và sản xuất enzyme của các chủng vi sinh vật (Wen-Chang Chen, Chihhsien Liu., 1996). Hai chủng O1 và L1.2 được nuôi lắc trên môi trường Czapek-Dox lỏng ở pH 6.5, nhiệt độ 35°C, 180 vòng/phút, nguồn carbon là sucrose và thay thế nguồn nitrogen bằng các nguồn nitrogen khác nhau: urea, NaNO₃, pepton và cao nấm men. Các nguồn nitrogen khảo nghiệm đã ảnh hưởng tới sự tổng hợp enzyme invertase của chủng O1 và L1.2 (hình 4). Urea và NaNO₃ là nguồn nitrogen tốt nhất cho sự tổng hợp enzyme invertase của các chủng *Aspergillus* thí nghiệm, trong khi đó cao nấm men lại cho kết quả tổng hợp invertase ngoại bào khá thấp mặc dù sinh khối nấm tăng trưởng mạnh. Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Ottoni *et al* 2012 khi nghiên cứu tối ưu hóa điều kiện sản xuất invertase từ *Aspergillus oryzae*. Ngược lại Wang và Zhou (2006) cho thấy urea hạn chế cả các hoạt động sản xuất invertase và tăng trưởng sinh khối của chủng *Aspergillus sp.*JN19 và cao nấm men được chọn làm nguồn nitrogen tốt nhất. Mặt khác, urea cũng được dùng để cải thiện sản lượng invertase sản xuất từ *Saccharomyces cerevisiae* (Ikram và Sikander 2007), trong khi Rajoka và Yasmeen (2005) thấy rằng NaNO₃ là nguồn nitrogen nghèo nhất cho sự tổng hợp β -fructofuranosidase bởi *A.niger*.

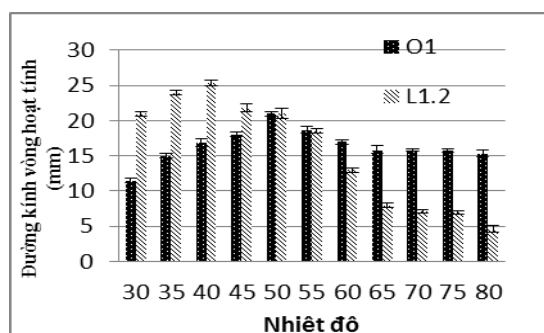
3.3. Một số yếu tố ảnh hưởng đến hoạt tính của invertase

3.3.1. Ảnh hưởng của pH đệm

Enzyme invertase do các chủng *Aspergillus* tổng hợp có giải pH hoạt động khá rộng (Nguyen Q D *et al*, 2005). Chủng O1 hoạt động mạnh nhất ở pH 5.5. Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Nguyen.Q.D và cộng sự (2005) khi tiến hành tinh sạch và khảo sát một số thuộc tính của of β -fructofuranosidase từ *Aspergillus niger* IMI303386. Trong khi đó chủng L1.2 hoạt động mạnh ở pH 6 (hình 5)



Hình 5. Ảnh hưởng của pH đệm đến sự phân giải sucrose của enzyme invertase



Hình 6. Ảnh hưởng của nhiệt độ lên hoạt tính của invertase.

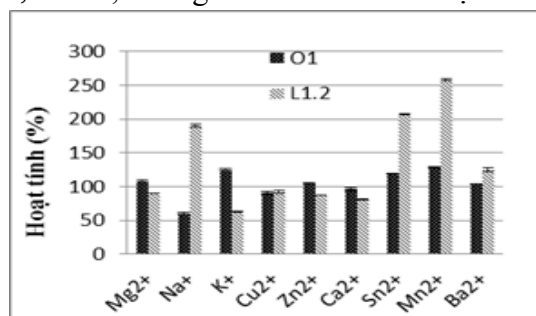
3.3.2. Ảnh hưởng của nhiệt độ

Nhiệt độ ảnh hưởng tới cấu trúc và hoạt động của enzyme, chính vì vậy biết được nhiệt độ hoạt động tối ưu của enzyme là yêu cầu cần thiết. Dịch chiết enzyme thô của các chủng O1 và L1.2 được xử lý các nhiệt độ từ 30°C đến 80°C và kiểm tra hoạt tính bằng phương pháp khuếch tán đĩa thạch. Kết quả (hình 6) cho thấy với nhiệt độ tối ưu cho hoạt tính của enzyme invertase thô của chủng O1 và L1.2 tương ứng là 50°C và 40°C. Sanjay và Sugunan (2006)

cho rằng enzyme này hoạt động tối ưu ở 50°C, pH 5,0. Một số tác giả khác cho rằng invertases hoạt động tối ưu trong phạm vi nhiệt độ rộng 35-75°C tùy thuộc vào nguồn gốc của chúng và thời gian ủ (Kern *et al.*,1992). Nguyen *et al.*, 2005 báo cáo nhiệt độ tối ưu của invertase từ *A. niger* là 50°C. Giá trị nhiệt độ tối ưu của invertase cao hơn được báo cáo bởi nhiều tác giả (Rubio *et al.*,2002; Guimaraes *et al.*,2007; Hussain *et al.*,2009) trong khi giá trị thấp hơn (30°C) đã được báo cáo bởi (Rashad *et al.*,2006).

3.3.3. Ảnh hưởng của một số ion kim loại

Các ion kim loại (nồng độ 5 mM) đã được thêm vào hỗn hợp phản ứng một cách riêng biệt. Sự thủy phân của enzyme được đo và so sánh với mẫu đối chứng không có ion kim loại (Rahul Kumar và Balakrishnan Kesavapillai., 2012). Kết quả cho thấy các ion kim loại có ảnh hưởng khá mạnh tới hoạt tính của invertase, hoạt tính được biểu hiện mạnh hơn khi thêm vào các ion Mn^{2+} , Na^+ , hay Sn^{2+} cũng có tác động đến hoạt tính invertase. Khi bổ sung ion Na^+ hoạt tính invertase từ chủng O1 giảm đáng kể so với khi bổ sung các ion Cu^{2+} , Ca^{2+} . Ion Zn^{2+} cũng gây ức chế hoạt tính invertase từ hai chủng. Các nghiên cứu khác cũng cho thấy các ion kim loại tác động rất khác nhau tới hoạt tính invertase sản xuất từ các nguồn khác nhau. Shankar, Thangamathi, Rama, Sivakumar (2014) cho kết quả rằng enzyme invertase từ chủng nấm men *Saccharomyces cerevisiae* MK hoạt động tối ưu khi có Ca^{2+} , trong khi bị ức chế mạnh bởi K^+ . Rahul Kumar và Balakrishnan Kesavapillai (2012) cho thấy enzyme này được tăng hoạt tính với ion Fe^{3+} , Mn^{2+} , nhưng ion Cu^{2+} ức chế hoạt tính của enzyme này.



Hình 7. Ảnh hưởng của ion kim loại lên hoạt tính của enzyme invertase.

4. KẾT LUẬN

Từ các nguồn mẫu thu thập từ nhiều địa điểm khác nhau chúng tôi phân lập đã được 16 chủng có hoạt tính enzyme invertase, trong đó 2 chủng O1 và L1.2 có hoạt tính cao nhất. Điều kiện môi trường thích hợp cho khả năng sinh tổng hợp enzyme invertase cao nhất của 2 chủng này cũng đã được xác định: Nguồn carbon và nitrogen tốt nhất với chủng L1.2 và O1 tương ứng là : sucrose và $NaNO_3$, fructose và urea; pH và nhiệt độ thích hợp cho hai chủng này sinh trưởng, phát triển là 6,5; 35⁰ C. Hoạt tính enzyme invertase biểu hiện tốt nhất tại nhiệt độ 40°C- 50°C và pH 5,5- 6. Ion Mg^{2+} đã tăng hoạt tính thủy phân của enzyme invertase.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Alberto, F., C. Bignon, G. Sulzenbacher, B. Henrissat and M. Czjzek, 2004. The three dimensional structure of invertase (β -fructosidase) from *Thermotoga maritime* reveals a bimodular arrangement and an evolutionary relationship between retaining and inverting glycosidases. *Journal of Biological Chemistry*, 279:18903-18910

2. Bernfeld, P., S.P. Colowick and N.O. Kaplan, 1955. Amylases α and β , pp. Method in Enzymol. Vol. I, Academic Press Inc., New York, pp: 149-158
3. Guimaraes LHS, Terenzi HF, Polizeli MLT, Jorge JA (2007) Enzyme MicrobTechnol 42:52-57
4. Hussain A, Rashid MH, Perveen R, Ashraf M (2009) Purification, kinetic and thermodynamic characterization of soluble acid invertase from sugarcane (*Saccharum officinarum*). Plant PhysiolBiochem 47:188-194
5. Ikram-Ul-Haq, Sikander A., Kinetics of invertase production by *Saccharomyces cerevisiae* in batch culture. Pak. J. Bot., 39,907-12(2007)
6. Kern G, Schülke N, Schmid FX, Jaenicke R (1992) Stability, quaternary structure, and folding of internal, external, and core-glycosylated invertase from yeast. Protein Sci 1:120-131
7. Nguyen QD, Rezessy-Szabo JM, Bhat MK, Hoschke A (2005) Purification and some properties of β -fructofuranosidase from *Aspergillus niger* IMI303386. Process Biochem 40:2461-2466
8. Ottoni C. A.; R. Cuervo-FernándezII; R. M. PiccoliI; R. Moreiral; B. Guilarte-MaresmaII; E. Sabino da SilvaI; M. F. A. RodriguesI; A. E. Maiorano. Media optimization for β -Fructofuranosidase production by *Aspergillus oryzae*. Braz. J. Chem. Eng. vol.29 no.1 São Paulo Jan./Mar. 2012
9. Rahul Kumar and Balakrishnan Kesavapillai.(2012). Stimulation of extracellular invertase production from spent yeast when sugarcane pressmud used as substrate through solid state fermentation.
10. Rajoka, M. I., Yasmeen, A. (2005). Improved productivity of β -fructofuranosidase by a derepressed mutant of *Aspergillus niger* from conventional and non-conventional substrates. Word J. Microbiol. Biotechnol., 21,471-78.
11. Rashad MM, Mahmoud AEE, Desouky MA, Nooman MU (2006). Purification and characterization of extra and intracellular β -fructofuranosidase from *Saccharomyces cerevisiae* growing on *Eichhorniacrassipes* leaf extract. Deutsche Lebensmittel Rundschau 102:157-166
12. Rubio MC, Runco R, Navarro AR (2002) Invertase from a strain of *Rhodotorula glutinis*. Phytochemistry 61:605-609.
13. Sanjay G, Sugunan S (2006). Enhanced pH and thermal stabilities of invertase immobilized on montmorillonite K-10. Food Chem 94:573-579
14. Shankar T., P. Thangamathi, R. Rama, T. Sivakumar (2014). Characterization of Invertase from *Saccharomyces cerevisiae* MK obtained from toddy sample.
15. Uma C., D. Gomathi, C. Muthulakshmi and V.K. Gopalakrishnan. Production, Purification and Characterization of Invertase by *Aspergillus flavus* Using Fruit Peel Waste as Substrate. Advances in Biological Research 4 (1): 31-36, 2010
16. Wang, L. M., Zhou, H. M. (2006). Isolation and identification of a novel *Aspergillus japonicus* JN19 producing β -fructofuranosidase and characterization of the enzyme. J. Food Biochem., 30,641-58.
17. Wen-chang Chen and Chi-hsien Liu 1996. Production of P-fructofuranosidase by *Aspergillus japonicus*. Enzyme and Microbial Technology 18:153-160, 1996.