

Tạo chồi *in vitro* sạch virus cây chanh dây bằng kỹ thuật nuôi cấy mô phân sinh đỉnh

Trần Hiếu^{1,2}, Trương Hoài Phong¹, Nguyễn Thị Như Mai¹, Hoàng Đắc Khải¹, Hoàng Thanh Tùng¹, Đỗ Mạnh Cường¹, Vũ Quốc Luận¹, Lê Ngọc Triệu³, Nguyễn Bá Nam³, Hoàng Thị Như Phương³, Bùi Văn Thế Vinh^{4*}, Dương Tấn Nhựt^{1*}

¹Viện Nghiên cứu Khoa học Tây Nguyên, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, 116 Xô Viết Nghệ Tĩnh, phường 7, TP Đà Lạt, tỉnh Lâm Đồng, Việt Nam

²Phân hiệu Ninh Thuận, Trường Đại học Nông Lâm TP Hồ Chí Minh, 8 Yên Ninh, thị trấn Khánh Hải, huyện Ninh Hải, tỉnh Ninh Thuận, Việt Nam

³Trường Đại học Đà Lạt, 1 Phù Đổng Thiên Vương, phường 8, TP Đà Lạt, tỉnh Lâm Đồng, Việt Nam

⁴Trường Đại học Công nghệ TP Hồ Chí Minh, 475A Điện Biên Phủ, phường 25, quận Bình Thạnh, TP Hồ Chí Minh, Việt Nam

Ngày nhận bài 21/12/2021; ngày chuyển phản biện 23/12/2021; ngày nhận phản biện 17/1/2022; ngày chấp nhận đăng 21/1/2022

Tóm tắt:

Chanh dây là cây trồng mang lại giá trị kinh tế cao. Hiện nay, diện tích trồng cây chanh dây ở Lâm Đồng đang giảm bởi sự lây lan dịch bệnh do virus gây ra. Mục đích của nghiên cứu này là tạo nguồn vật liệu chồi *in vitro* sạch virus phục vụ cho quy trình nhân giống chanh dây sạch bệnh. Chồi đỉnh của chanh dây tím (*Passiflora edulis* Sims.) và vàng (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) thu tại huyện Đam Rông (T1 và V1) và Đức Trọng (T2 và V2) không khử trùng bề mặt được sử dụng làm vật liệu cho nuôi cấy mô phân sinh đỉnh. Mô phân sinh đỉnh (0,2 mm) của cây chanh dây các giống được nuôi cấy trên môi trường MS bổ sung 1,0 mg/l BA. Sau 4 tuần nuôi cấy, tỷ lệ sống và tái sinh đều đạt trên 45,0%. Chồi được tái sinh, sinh trưởng, phát triển mạnh, hình thành các chồi đơn rõ rệt, lá xanh sau 10 tuần nuôi cấy. Những chồi tái sinh này được kiểm tra sạch bệnh đối với 3 loại virus (CMV, ToRSV và Potyvirus) bằng kỹ thuật RT-PCR. Kết quả cho thấy, trong số 4 mẫu kiểm tra, chỉ có 1 mẫu V1 bị nhiễm Potyvirus. Như vậy, những chồi *in vitro* sạch virus này được sử dụng làm vật liệu cho quy trình nhân giống chanh dây tím và vàng sạch virus, góp phần giải quyết nhu cầu giống chanh dây sạch bệnh hiện nay.

Từ khóa: chanh dây, chồi *in vitro* sạch virus, nuôi cấy mô phân sinh đỉnh, tái sinh chồi.

Chỉ số phân loại: 4.6

1. Đặt vấn đề

Chanh dây là một cây trồng quan trọng và được trồng thương mại ở một số quốc gia bao gồm Thái Lan, Úc, Brazil, Hoa Kỳ và Nam Mỹ [1]. Ở Việt Nam, cây chanh dây được du nhập vào khoảng đầu thế kỷ XX nhưng đến những năm gần đây, đối tượng này mới được xác định là loại cây trồng mang lại giá trị kinh tế cao [2]; năng suất bình quân của cây chanh dây đạt 70-100 tấn/ha/năm và quả chanh dây xuất khẩu được xếp hạng ở vị trí thứ 10 về các loại trái cây xuất khẩu trên thế giới. Tại Việt Nam, cây chanh dây được trồng khắp các tỉnh từ Bắc vào Nam, trong đó chủ yếu tập trung ở Lâm Đồng, Gia Lai, Kon Tum, Kiên Giang, Cần Thơ. Tuy nhiên, ở Lâm Đồng, việc trồng cây chanh dây hiện nay vẫn còn phân tán, với quy mô nhỏ. Hơn nữa, diện tích trồng cây chanh dây đang dần bị suy giảm, chủ yếu do dịch bệnh lây lan rộng trên cây chanh dây, trong đó có một số bệnh do virus gây ra, đặc biệt là CMV, ToRSV và Potyvirus [3, 4].

Một số bệnh ở cây chanh dây liên quan đến virus thuộc chi Potyvirus đã được mô tả ở các vùng khác nhau trên thế giới. Potyvirus đầu tiên được phát hiện lây nhiễm trên cây chanh dây là Passion fruit woodiness virus (PWV). Potyvirus chủ yếu lây do sự chích hút của rệp [5]. Virus CMV lần đầu tiên được tìm thấy liên quan đến cây chanh dây ở Úc [6]; cây chanh dây nhiễm virus CMV biểu hiện lốm đốm màu vàng tươi trên lá và trên quả, bắt đầu từ các điểm ngẫu nhiên trên lá ở phần dưới của cây và giảm dần về phía ngọn [5]. Trong khi đó, virus ToRSV gây bệnh trên cây chanh

dây được báo cáo lần đầu tiên ở Peru; tác nhân truyền bệnh virus này được xác định bởi tuyến trùng *Xiphinema americanum*. Virus này gây ra chủ yếu là các đốm và vòng trên lá hoặc thân khi cây bị nhiễm trùng hoặc làm cây bị hoại tử [5]. Hiện nay, các bệnh hại cây trồng do virus gây ra chưa có thuốc đặc trị trên thị trường. Vì vậy, nhu cầu về giống cây chanh dây sạch bệnh virus là cần thiết.

Kỹ thuật nuôi cấy mô phân sinh đỉnh là kỹ thuật đã được sử dụng lâu đời trong công tác nhân giống vô tính cây trồng sạch bệnh virus [7]. Kỹ thuật này cũng đảm bảo sự ổn định di truyền vốn có trong thực vật. Chồi phát triển trực tiếp từ mô phân sinh mà không qua hình thành mô sẹo bảo đảm ổn định di truyền và giảm thiểu biến dị soma. Vì vậy, kỹ thuật này đã ứng dụng thành công trong việc tạo giống cây trồng sạch bệnh trên nhiều đối tượng như tỏi, dâu tây, khoai tây... [8-10]. Quá trình nuôi cấy mô phân sinh đỉnh không phải lúc nào cũng tạo cây sạch virus. Do đó, chồi hoặc cây con được tạo ra từ kỹ thuật này cần phải được kiểm tra tình trạng sạch virus bằng các kỹ thuật phân tích như ELISA và RT-PCR [8]. Trong một nghiên cứu trước đây đối với cây chanh dây tím, bằng kỹ thuật nuôi cấy mô phân sinh đỉnh và cùng với việc sử dụng kỹ thuật ELISA trong xác định chồi sạch virus PWV, S. Prammanee và cs (2011) [1] đã tạo ra giống cây chanh dây sạch bệnh virus này.

Giống chanh dây trồng ở nước ta hiện nay chủ yếu được nhập từ Đài Loan, Trung Quốc với giá thành cao và nguồn cung không ổn định. Bên cạnh đó, người trồng thường sử dụng các phương pháp truyền thống với hệ số nhân thấp như gieo hạt, giâm hom,

*Tác giả liên hệ: Email: duongtannhut@gmail.com, bvt.vinh@hutech.edu.vn

Production of passion fruit virus-free *in vitro* shoots by apical meristem culture

Hieu Tran^{1,2}, Hoai Phong Truong¹, Thi Nhu Mai Nguyen¹,
Dac Khai Hoang¹, Thanh Tung Hoang¹, Manh Cuong Do¹,
Quoc Luan Vu¹, Ngoc Trieu Le³, Ba Nam Nguyen³,
Thi Nhu Phuong Hoang³, Van The Vinh Bui^{4*}, Tan Nhut Duong^{1*}

¹Tay Nguyen Institute for Scientific Research, Vietnam Academy of Science and Technology,
116 Xo Viet Nghe Tinh Street, Ward 7, Da Lat City, Lam Dong Province, Vietnam

²Ninh Thuan Campus, Nong Lam University - Ho Chi Minh City,

8 Yen Ninh Street, Khanh Hai Town, Ninh Hai District, Ninh Thuan Province, Vietnam

³Da Lat University, 1 Phu Dong Thien Vuong Street,

Ward 8, Da Lat City, Lam Dong Province, Vietnam

⁴Ho Chi Minh City University of Technology,

475A Dien Bien Phu Street, Ward 25, Binh Thanh District, Ho Chi Minh City, Vietnam

Received 21 December 2021; revised 17 January 2022; accepted 21 January 2022

Abstract:

Passion fruit is a high economic value crop. Currently, the cultivated area of passion fruit in Lam Dong is decreasing due to the spread of viral diseases. The main aim of this study is to generate disease-free *in vitro* shoots for propagation purposes. The apical shoots of purple (*Passiflora edulis* Sims.) and yellow (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) passion fruit cultivars collected at Dam Rong (T1 and V1) and Duc Trong (T2 and V2) districts, without surface sterilisation, were used as materials for apical meristem culture. The apical meristems (0.2 mm) of passion fruit plants were cultured on MS medium supplemented with 1.0 mg/l BA. After 4 weeks of culture, the survival and regeneration rate reached over 45.0%. Single shoots with green leaves were formed and regenerated after 10 weeks of culture. These regenerated shoots were tested for the presence of 3 viral groups (CMV, ToRSV and Potyvirus) by RT-PCR. The results showed that only 1 of 4 tested samples (V1) was infected with Potyvirus. Thus, these virus-free *in vitro* shoots will be used as materials for propagation to meet the requirement for disease-free purple and yellow passion fruit plants.

Keywords: apical meristem culture, passion fruit, shoot regeneration, virus-free *in vitro* shoots.

Classification number: 4.6

ghép... khiến chất lượng cây giống và độ đồng đều giảm, mức độ thoái hóa và tỷ lệ nhiễm bệnh lại tăng lên. Vì vậy, nghiên cứu này được thực hiện nhằm ứng dụng kỹ thuật nuôi cấy mô phân sinh đỉnh để tái sinh chồi cây chanh dây tím và vàng. Bên cạnh đó, kỹ thuật RT-PCR đã được ứng dụng để kiểm tra tính sạch virus Potyvirus, CMV và ToRSV đối với chồi được tái sinh.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu

Các mẫu chồi đỉnh của cây chanh dây tím (*Passiflora edulis* Sims.) và cây chanh dây vàng (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) 2 tháng tuổi thu nhận tại huyện Đam Rông và Đức Trọng, tỉnh Lâm

Đông được sử dụng làm nguồn mẫu ban đầu cho nuôi cấy mô phân sinh đỉnh.

Môi trường nuôi cấy là MS bổ sung 1,0 mg/l BA, 30 g/l sucrose và 8 g/l agar [1]. Môi trường được điều chỉnh về pH 5,8 trước khi hấp khử trùng ở 121°C, 1 atm trong 30 phút.

2.2. Tái sinh chồi thông qua kỹ thuật nuôi cấy mô phân sinh đỉnh

Những chồi đỉnh giống chanh dây tím và vàng được thu nhận vào mùa khô (từ tháng 12 năm trước đến tháng 4 năm sau) ở 2 khu vực huyện Đam Rông (T1 và V1) và Đức Trọng (T2 và V2) thuộc tỉnh Lâm Đồng. Sau đó, chúng được cắt, rửa sạch với nước vô trùng và được sử dụng trực tiếp để tách mô phân sinh đỉnh (không thông qua khử trùng bề mặt vì sau khi khử trùng mẫu chồi mềm, dễ bị tổn thương và việc tách mô phân sinh gặp khó khăn) dưới kính hiển vi soi nổi (tách bỏ các vảy lá chỉ còn mô phân sinh đỉnh); mô phân sinh đỉnh được cắt với kích thước khoảng 0,2×0,2 mm và được cấy trên môi trường MS có bổ sung 1,0 mg/l BA [1].

Bố trí thí nghiệm: Các thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên. Mỗi nghiệm thức lặp lại 3 lần, mỗi lần lặp lại với 20 mẫu. Các chỉ tiêu: tỷ lệ nhiễm (%), tỷ lệ sống (%) và tỷ lệ tái sinh chồi (%) được ghi nhận sau 4 tuần nuôi cấy; trong khi đó, số chồi/mẫu, chiều cao chồi (cm) và hệ số tái sinh chồi (%) được ghi nhận sau 10 tuần nuôi cấy. Hệ số tái sinh chồi được tính bằng công thức theo phương pháp của J. Dobránszki và J.A. cs (2013) [11] như sau:

$$\text{Hệ số tái sinh chồi} = R_s (\%) \times S \times N$$

trong đó R_s : tỷ lệ tái sinh chồi (%); S : số mẫu; N : số chồi/mẫu.

Sau đó, chồi thu nhận từ nuôi cấy mô phân sinh đỉnh tiếp tục được cấy chuyển sang môi trường MS có bổ sung 1,0 mg/l BA trong 4 tuần để gia tăng chất lượng chồi.

2.3. Kiểm tra virus trong các chồi có nguồn gốc từ nuôi cấy mô phân sinh đỉnh

Thu mẫu và tách chiết ribonucleic acid (RNA) tổng số: Mẫu lá thu nhận từ 20 chồi ở mỗi giống chanh dây (V1, V2, T1 và T2 có nguồn gốc từ nuôi cấy mô phân sinh đỉnh); tương ứng đại diện cho 20 mẫu ngẫu nhiên được trộn lại với nhau để tạo thành mẫu gộp cho mỗi giống/mỗi lần lặp lại thí nghiệm điện di, sau đó cho vào ống ly tâm 2 ml. Mẫu lá mỗi giống chanh dây *in vitro* trong các ống ly tâm được sử dụng để tiến hành tách chiết RNA tổng số. Một bộ kit “*ExiPrep*™ Plus Plant” (Bioneer, Hàn Quốc) được sử dụng cho tách chiết RNA tổng số. Đối với mẫu V1, tiến hành thêm các bước: tinh sạch DNA từ gel bằng bộ Kit AccuPrep® Gel Purification của Hãng Bioneer (Hàn Quốc) theo hướng dẫn của nhà sản xuất; tiến hành gửi mẫu đi giải trình tự theo phương pháp Sanger, sử dụng ngay chính cặp môi khuếch đại PCR để làm môi giải trình tự; từ kết quả giải trình tự có được, sử dụng công cụ BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) để tìm các trình tự có tính tương đồng cao, từ đó xác định loài virus của Potyvirus.

Kiểm tra virus dựa trên kỹ thuật RT-PCR: Các cặp môi đặc hiệu và chu trình nhiệt sử dụng cho từng loại virus được sử dụng như ở bảng 1.

Bảng 1. Môi và chu trình nhiệt tương ứng với virus cần kiểm tra.

TT	Virus	Môi sử dụng (5'-3')	Chu trình nhiệt	Kích thước sản phẩm RT-PCR đặc hiệu cho virus
1	CMV	Mỗi xuôi AM180922: GCATTCTAGATGGACAAATCTGAATC Mỗi ngược AM180923: GCATGGTACCTCAAAGTGGGAGCAC	45°C-20 phút 94°C-5 phút 94°C-45 giây (1) 52°C-1 phút (2) 72°C-1 phút (3) 72°C-10 phút 4°C-trữ (1-3)-35 chu kỳ	657 bp [12]
2	ToRSV	Mỗi xuôi U1: GACGAAGTTATCAATGGCAGC Mỗi ngược D1: TCCGTCCAATCACGCGAATA	45°C-20 phút 95°C-5 phút 95°C-15 giây (1) 55°C-45 giây (2) 72°C-1 phút (3) 72°C-10 phút 4°C-trữ (1-3)-35 chu kỳ	449 bp [13]
3	Potyvirus	Mỗi xuôi MJ1(F): ATGGTHTGGTGYATHGARAAYGG Mỗi ngược MJ2(R): TGCTGCKGCYTTCATYTG	50°C-15 phút 94°C-2 phút 94°C-30 giây (1) 50°C-1 phút (2) 72°C-1 phút (3) 72°C-10 phút 4°C-trữ (1-3)-35 chu kỳ	327 bp [14]

Bộ kit sử dụng để chạy One-step RT-PCR thuộc bộ Mytaq One-step RT-PCR Kit (Bioline, Vương quốc Anh). Tổng thể tích phản ứng 25 µl được sử dụng chung cho tất cả các loại virus gồm: 12,5 µl 2x Mytaq Onestep Mix (1x625 µl), 1 µl mỗi xuôi (10 pmol/µl), 1 µl (10 pmol/µl), 0,5 µl Reverse Transcriptase (1x12,5 µl), 1 µl Rnase inhibitor (10 u/µl), 2 µl Template (100 ng/µl) và 7 µl H₂O.

Sản phẩm của phản ứng RT-PCR được kiểm tra bằng phương pháp điện di trên gel agarose 2% ở hiệu điện thế 60 V sau 2 giờ. Sau khi điện di, gel agarose được nhuộm bằng ethidium bromide. Hình ảnh điện di được chụp dưới tác động của tia UV để ghi nhận các vạch của sản phẩm tương ứng với kích thước thiết kế sẵn ở trên.

2.4. Điều kiện nuôi cấy *in vitro*

Các thí nghiệm nuôi cấy *in vitro* được thực hiện tại Phòng Sinh học phân tử và Chọn tạo giống cây trồng thuộc Viện Nghiên cứu Khoa học Tây Nguyên với nhiệt độ khoảng 25±2°C, độ ẩm 55-60%, thời gian chiếu sáng 16 giờ/ngày và cường độ chiếu sáng khoảng 40-45 µmol.m⁻².s⁻¹ dưới ánh sáng huỳnh quang.

2.5. Phương pháp xử lý thống kê

Các số liệu được xử lý thống kê bằng phần mềm SPSS 20.0 theo phép thử Duncan với p<0,05 [15].

3. Kết quả

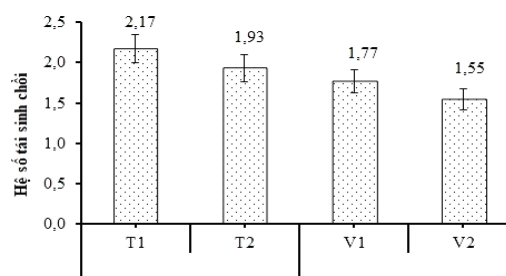
3.1. Tái sinh chồi *in vitro* thông qua kỹ thuật nuôi cấy mô phân sinh đỉnh

Mẫu mô phân sinh đỉnh được tách ra từ những chồi không thông qua khử trùng và được nuôi cấy trên môi trường tái sinh, kết quả sau 4 tuần cho thấy, tỷ lệ nhiễm của mẫu ở tất cả các nghiệm thức giống chanh dây tím thu thập tại khu vực huyện Đam Rông (T1) và Đức Trọng (T2); cũng như giống chanh dây vàng thu thập tại khu vực huyện Đam Rông (V1) và Đức Trọng (V2) đều cho tỷ lệ nhiễm khá cao (trên 50%). Khi so sánh giữa 2 nghiệm thức T1 và T2 của giống chanh dây tím và giữa V1 với V2 của giống chanh dây vàng về các chỉ tiêu theo dõi như tỷ lệ sống, tỷ lệ nhiễm, tỷ lệ tái sinh chồi, số chồi và chiều cao chồi sau 4 tuần và 10 tuần nuôi cấy cho thấy không có sự khác biệt về mặt ý nghĩa thống kê với p<0,05 theo phép thử Duncan (bảng 2). Kết quả này cũng được ghi nhận tương tự đối với hệ số tái sinh chồi giữa 2 nghiệm thức ở cả 2 giống chanh dây (biểu đồ 1). Đặc biệt ở tuần thứ 4, quan sát những mẫu sống không nhiễm cho thấy tất cả mô phân sinh đỉnh đều cảm ứng tái sinh cụm chồi với các chồi có kích thước rất nhỏ (<1 mm) và cụm chồi bắt đầu sinh trưởng mạnh thành các chồi đơn với lá xanh và chồi hình thành rõ rệt sau 10 tuần nuôi cấy (hình 1). Như vậy, kết quả thu được trong nghiên cứu này bước đầu khẳng định hiệu quả của kỹ thuật nuôi cấy mô phân sinh đỉnh trong tái sinh chồi *in vitro* ở cây chanh dây mà không thông qua khử trùng mẫu bằng các chất khử trùng thông dụng. Sau đó, những chồi được tái sinh từ mô phân sinh đỉnh của tất cả nghiệm thức T1, T2, V1 và V2 được cấy chuyển sang môi trường MS có bổ sung 1,0 mg/l BA sau 4 tuần để nhân chồi và chồi này được sử dụng làm vật liệu cho kiểm tra tính sạch virus.

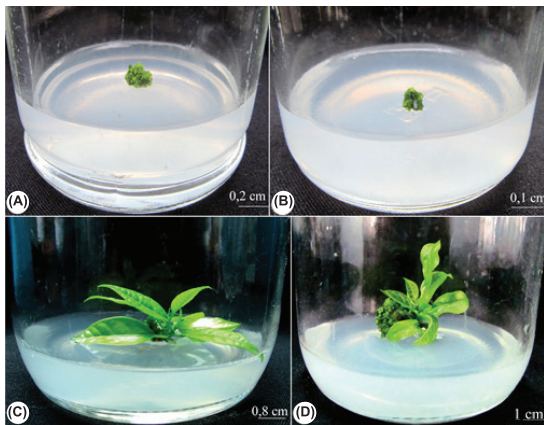
Bảng 2. Nuôi cấy mô phân sinh đỉnh giống chanh dây tím và vàng sau 4 và 10 tuần nuôi cấy.

NT	4 tuần			10 tuần	
	Tỷ lệ sống (%)	Tỷ lệ nhiễm (%)	Tỷ lệ tái sinh chồi (%)	Số chồi	Chiều cao chồi (cm)
T1	50,00a*	50,00a	50,00a	4,33a	1,53a
T2	48,33a	51,67a	48,33a	4,00a	1,43ab
V1	48,33a	51,67a	48,33a	3,67a	1,37b
V2	46,67a	53,33a	46,67a	3,33a	1,47ab

NT: nghiệm thức; *: những chữ cái khác nhau trên cùng 1 cột thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với p<0,05 theo phép thử Duncan.



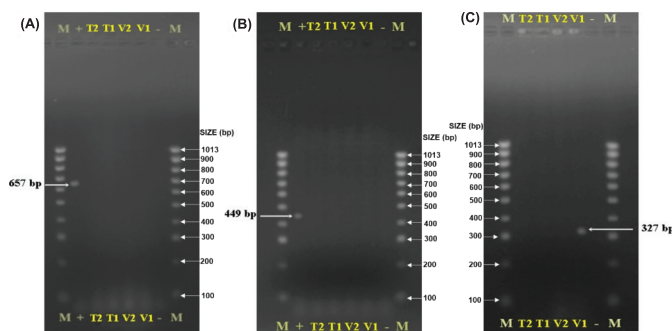
Biểu đồ 1. Hệ số tái sinh chồi thông qua nuôi cấy mô phân sinh đỉnh sau 10 tuần.



Hình 1. Nuôi cấy mô phân sinh đỉnh giống chanh dây tím và vàng. (A, C) Chồi giống chanh dây tím cấy ứng sau 4 và 10 tuần nuôi cấy; (B, D) Chồi giống chanh dây vàng cấy ứng sau 4 và 10 tuần nuôi cấy.

3.2. Kiểm tra sự có mặt của virus trong chồi có nguồn gốc từ nuôi cấy mô phân sinh đỉnh

Lấy 20 chồi của mỗi giống (V1, V2, T1 và T2) trộn lại tạo thành 4 mẫu gộp (V1, V2, T1 và T2 tương ứng). Lá thu nhận từ 4 mẫu gộp được sử dụng để kiểm tra sự có mặt của 3 loại virus: CMV, ToRSV và Potyvirus bằng phương pháp RT-PCR. Kết quả điện di trên gel agarose của các mẫu đối với 3 loại virus gây bệnh cho thấy, cả 3 mẫu thử nghiệm: V2, T1 và T2 đều không phát hiện băng vạch DNA đặc hiệu của 3 loại virus khảo sát; duy nhất chỉ có mẫu V1 xuất hiện băng vạch DNA có kích thước tương đương 327 bp của Potyvirus, không phát hiện các băng vạch DNA đặc hiệu của CMV, ToRSV. Hơn nữa, đối chứng âm trên kết quả điện di đều không hiển thị các băng vạch DNA đặc hiệu của các virus CMV, ToRSV và Potyvirus; đối chứng dương đều hiển thị băng vạch DNA đúng kích thước với các băng vạch DNA đặc hiệu của các virus CMV, ToRSV (657 và 449 bp tương ứng) (hình 2).



Hình 2. Kết quả điện di trên gel agarose kiểm tra độ sạch virus của các mẫu giống chanh dây tím và vàng. (A) Kết quả kiểm tra virus CMV; (B) Kết quả kiểm tra virus ToRSV; (C) Kết quả kiểm tra virus Potyvirus. M: thang HyperLadder 100 bp (Hãng Bioline); "-": đối chứng âm; "+": đối chứng dương; 657 bp: kích thước băng vạch DNA đặc trưng của virus CMV; 449 bp: kích thước băng vạch DNA đặc trưng cho virus ToRSV; 327 bp: kích thước băng vạch DNA đặc trưng cho Potyvirus.

Đối với Potyvirus, vì không có chứng dương (sử dụng môi tổng quát để kiểm tra các loại Potyvirus) nên đối với mẫu V1 tiến hành tinh sạch DNA từ gel bằng bộ kit AccuPrep® Gel Purification của Hãng Bioneer (Hàn Quốc) và tiến hành gửi mẫu đi giải trình tự theo phương pháp Sanger. Kết quả giải trình tự thu được đoạn DNA có độ dài 344 nucleotide, trong đó xác định rõ 326 nucleotide. Đoạn DNA xác định rõ trình tự được tiến hành BLAST trên NCBI và cho kết quả như hình 3. Kết quả hình 3 cho thấy, trình tự Potyvirus trong mẫu V1 tương đồng hoàn toàn (100%) với trình tự dòng virus có mã truy cập trên NCBI FR694183, tương đồng 99,08% với các dòng MK110656, FR694182, FR694181 và FJ896002. Xem xét các trình tự với mã truy cập như trên, kết quả như sau: các trình tự FR694183, FR694182 và FR694181 được xác định thuộc về PWV thuộc nhóm Potyvirus; các trình tự MK110656 và FJ896002 thuộc về Potyvirus gây bệnh trên chanh dây ở Ugandan chưa xác định được loài (unclassified Potyvirus). Như vậy, chỉ có mẫu V1 bị nhiễm Potyvirus, khả năng cao thuộc về PWV.

Sequences producing significant alignments									
Download Select columns Show 100									
select all 14 sequences selected									
Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	Per. Ident	Acc. Len	Accession		
Passiflora woodiness virus partial coat protein gene for polypeptide CP gene region strain Ugandan isolate DSMZ PV-0707	Ugandan Passiflora	603	603	100%	36-168	100.00%	1681	FR694183.1	
Ugandan Passiflora virus isolate KHT-1 complete genome	Ugandan Passiflora	588	588	100%	36-163	99.08%	9670	MK110656.1	
Passiflora woodiness virus partial gene for polypeptide CP gene region strain Ugandan isolate 69c	Passiflora fruit wo	588	588	100%	36-163	99.08%	1720	FR694182.1	
Passiflora woodiness virus partial gene for polypeptide CP gene region strain Ugandan isolate 61	Passiflora fruit wo	588	588	100%	36-163	99.08%	1720	FR694181.1	
Ugandan Passiflora virus isolate UGA-73 polypeptide gene partial cds	Ugandan Passiflora	588	588	100%	36-163	99.08%	1718	FJ896002.1	
Passiflora woodiness virus partial gene for polypeptide CP gene region strain Ugandan isolate 64	Passiflora fruit wo	580	580	100%	26-161	98.77%	1719	FR694180.1	
Ugandan Passiflora virus isolate UGA-15 polypeptide gene partial cds	Ugandan Passiflora	580	580	100%	26-161	98.77%	1718	FJ896000.1	
Ugandan Passiflora virus isolate UGA-17 polypeptide gene partial cds	Ugandan Passiflora	410	410	100%	36-128	92.64%	1718	FJ896003.1	
Passiflora woodiness virus isolate NG43 coat protein gene partial cds	Passiflora fruit wo	451	451	99%	16-122	91.69%	668	KY204619.1	
Bambusa groundnut collyvirus 1 isolate ER07 coat protein gene partial cds	Bambusa ground	233	233	63%	56-57	86.96%	780	U8987197.1	
Bean common mosaic necrosis virus mRNA for coat protein partial cds strain DCMV	Bean common m	217	217	57%	56-52	87.63%	789	AB725585.1	
Bean common mosaic necrosis virus mRNA for coat protein partial cds strain A	Bean common m	217	217	57%	56-52	87.63%	788	AB734777.1	
Zucchini yellow mosaic virus isolate TM40 polypeptide gene complete cds	Zucchini yellow	161	161	65%	26-35	80.73%	9547	KY225556.1	
Zucchini yellow mosaic virus isolate TM50 polypeptide gene complete cds	Zucchini yellow	161	161	65%	26-35	80.73%	9556	KY225544.1	

Hình 3. Kết quả đoạn DNA xác định rõ trình tự được tiến hành BLAST trên NCBI (ngân hàng gen).

4. Bàn luận

Nuôi cấy mô phân sinh đỉnh được xem là một kỹ thuật được ứng dụng thành công trong nhân giống cây trồng sạch bệnh virus [7]. Một trong những giai đoạn quyết định thành công trong quy trình nhân giống *in vitro* sạch virus đó là khử trùng mẫu để tạo nguồn vật liệu *in vitro*. Chất khử trùng thường gây độc đối với mô thực vật khi mẫu tiếp xúc với dung dịch khử trùng (đặc biệt là thủy ngân) trong thời gian khá lâu, làm mẫu chết, giảm tỷ lệ sống; do đó loại, nồng độ, thời gian tiếp xúc và loại bỏ tồn dư của chất khử trùng trong mẫu trở nên quan trọng trong quy trình khử trùng mẫu [16, 17]. Hơn nữa, khử trùng bề mặt không loại bỏ các tác nhân gây nhiễm nội sinh có thể tồn tại bên trong mô [18]. Vì vậy, trong nghiên cứu này, mô phân sinh đỉnh được thu nhận từ các chồi đỉnh của những cây chanh dây lấy trực tiếp từ ngoài đồng ruộng và không thông qua khử trùng bề mặt. Kết quả ghi nhận tỷ lệ nhiễm trên 50% và với phương pháp không khử trùng bề mặt thì kết quả này đã mang lại thành công cao trong khử trùng mẫu. Kết quả của nghiên cứu ghi nhận tương tự như kết quả của H.Y. Reyl và cs (2003) [19]

trên cây *Arachis pintoi*, mẫu nhiễm ghi nhận với tỷ lệ khoảng 60% khi những chồi đỉnh được thu nhận trực tiếp từ những cây trồng ngoài đồng ruộng mà không thông qua khử trùng bằng các hóa chất.

Một số virus gây bệnh trên cây chanh dây toàn thế giới bao gồm, PWV, passiflora ringspot virus (PRV), passiflora latent virus (PLV), passion fruit yellow mosaic virus (PaYMV), cucumber mosaic virus (CMV), cowpea aphid-borne mosaic virus (CABMV), tomato ringspot virus (ToRSV), passion fruit mottle virus (PaMV), purple granadilla mosaic virus (PGMV), passion fruit vein clearing virus và một Potyvirus liên quan đến bệnh khảm trên quả chanh dây đã được báo cáo từ Puerto Rico và Cộng hòa Dominica [20]. Tại Lâm Đồng, có khoảng 3 virus gây hại chính cây chanh dây bao gồm: CMV gây đốm trên lá và trên quả; ToMRV làm lá bị khảm vàng, quả bị biến dạng; quả có hiện tượng bị hóa gỗ do PWV thuộc Potyvirus gây ra [3, 4]. Trong nghiên cứu này, kỹ thuật RT-PCR được sử dụng để kiểm tra 3 loại virus CMV, ToRSV và Potyvirus gây bệnh cây chanh dây tại Lâm Đồng trên những mẫu chồi chanh dây tím và vàng có nguồn gốc từ nuôi cấy mô phân sinh đỉnh. Kết quả cho thấy, chỉ có mẫu V1 bị nhiễm Potyvirus, trong khi 3 mẫu T1, T2 và V2 sạch bệnh đối với cả 3 loại virus gây bệnh được kiểm tra. Một nghiên cứu trước đây của S. Prammanee và cs (2011) [1], sử dụng kỹ thuật ELISA để xác định tính sạch bệnh đối với virus PWV gây bệnh trên cây chanh dây ở tỉnh Chiang Mai, Thái Lan từ những chồi có nguồn gốc nuôi cấy mô phân sinh đỉnh.

Nghiên cứu này là công trình đầu tiên về tạo giống chanh dây sạch bệnh virus (CMV, ToRSV và Potyvirus) ở Việt Nam bằng kỹ thuật nuôi cấy mô phân sinh đỉnh không thông qua khử trùng mẫu. Để tạo giống chanh dây hoàn toàn sạch virus gây bệnh trên cây chanh dây hiện nay là vấn đề cần được quan tâm; nên cần kiểm tra tính sạch virus đối với nhiều loại virus gây bệnh hiện nay. Tuy nhiên, kết quả nghiên cứu này cũng đã đáp ứng một phần về tạo vật liệu chồi *in vitro* chanh dây tím và vàng sạch bệnh virus trong quy trình nhân giống chanh dây sạch bệnh virus. Tóm lại, nuôi cấy mô phân sinh đỉnh đã khẳng định được vai trò trong tạo giống sạch bệnh virus đối với cây chanh dây trong nghiên cứu này và có thể mở rộng ứng dụng cho các đối tượng cây trồng khác hiện nay.

5. Kết luận

Qua nghiên cứu trên, chúng tôi đã thu nhận được những chồi *in vitro* chanh dây tím và vàng sạch virus CMV, ToRSV và Potyvirus bằng kỹ thuật nuôi cấy mô phân sinh đỉnh không thông qua khử trùng bề mặt sau 10 tuần nuôi cấy trên môi trường MS bổ sung 1,0 mg/l BA. Đây là kết quả bước đầu tạo vật liệu chồi sạch virus phục vụ cho các nghiên cứu tiếp theo trong quy trình vi nhân giống chanh dây tím và vàng sạch virus. Góp phần giải quyết vấn đề nhu cầu về giống chanh dây sạch bệnh virus cho nông dân tỉnh Lâm Đồng nói riêng và cả nước nói chung.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được tài trợ bởi Quỹ Phát triển Khoa học và Công nghệ Quốc gia (NAFOSTED) trong đề tài mã số 106.01-2020.10. Các tác giả xin chân thành cảm ơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] S. Prammanee, S. Thumjamras, P. Chiemsombat, et al. (2011), "Efficient shoot regeneration from direct apical meristem tissue to produce virus-free purple passion fruit plants", *Crop Protection*, **30**(11), pp.1425-1429, DOI: 10.1016/j.cropro.2011.07.008.
- [2] L.V.T. Huan, P.Q. Vu (2010), "In vitro asexual propagation of passion fruit (*Passiflora edulis* Sims.) using stem segments bearing axillary buds", *Journal of Biotechnology*, **8**(3), pp.379-385.
- [3] T. Hieu, T.H. Phong, H.D. Khai, et al. (2022), "Efficient production of vigorous passion fruit rootstock for *in vitro* grafting", *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, **148**(1), pp.1-14, DOI: 10.1007/s11240-021-02220-1.
- [4] M.O. Ssemakula, T. Sengooba, J.J. Hakiza, et al. (2012), "Characterisation and distribution of a Potyvirus associated with passion fruit woodiness disease in Uganda", *Plant Disease*, **96**(5), pp.659-665, DOI: 10.1094/PDIS-03-11-0263.
- [5] J.H. Fischer, J.A.M. Rezende (2008), "Diseases of passion flower (*Passiflora* spp.)", *Pest Technology*, **2**(1), pp.1-19.
- [6] R.H. Taylor, K.A. Kimble (1964), "Two unrelated viruses which cause woodiness of passion fruit (*Passiflora edulis* Sims.)", *Australian Journal of Agricultural Research*, **15**(1), pp.560-570, DOI: 10.1071/AR9640560.
- [7] K. Mori, D. Hosokawa (1977), "Localisation of viruses in apical meristem and production of virus-free plants by means of meristem and tissue culture", *Acta Horticulturae*, **78**, pp.389-396, DOI: 10.17660/ActaHortic.1977.78.49.
- [8] M.A. Miassar, D.S. Hassawi, S.M.A. Romman (2011), "Production of virus free potato plants using meristem culture from cultivars grown under Jordanian environment", *The American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences*, **11**(4), pp.467-472.
- [9] H. Taskin, G. Baktemur, M. Kurul, et al. (2013), "Use of tissue culture techniques for producing virus-free plant in garlic and their identification through real-time PCR", *The Scientific World Journal*, **2013**, DOI: 10.1155/2013/781282.
- [10] A.B. Whitehouse, C.L. Govan, K.J. Hammond, et al. (2011), "Meristem culture for the elimination of the strawberry crown rot pathogen *Phytophthora cactorum*", *Journal of Berry Research*, **1**(3), pp.129-136, DOI: 10.3233/BR-2011-014.
- [11] J. Dobránszki, J.A.T.D. Silva (2013), "In vitro shoot regeneration from transverse thin cell layers of apple leaves in response to various factors", *Journal of Horticultural Science & Biotechnology*, **88**(1), pp.60-66, DOI: 10.1080/14620316.2013.11512936.
- [12] S. Kumar, M.S. Khan, S.K. Raj, et al. (2009), "Elimination of mixed infection of Cucumber mosaic and Tomato aspermy virus from *Chrysanthemum morifolium* Ramat. cv. Pooja by shoot meristem culture", *Scientia Horticulturae*, **119**(2), pp.108-112, DOI: 10.1016/j.scienta.2008.07.017.
- [13] J.A. Griesbach (1995), "Detection of tomato ringspot virus by polymerase chain reaction", *Plant Disease*, **79**(1), pp.1054-1056.
- [14] D.R. Wulandari, T.M. Ermayanti (2011), "Detection of Potyvirus using RT-PCR and ACP-ELISA of *Dioscorea* species and *in vitro* shoot multiplication of the virus free plants", *Annales Bogorienses*, **15**(2), pp.1-8.
- [15] D.B. Duncan (1955), "Multiple range and multiple F test", *Biometrics*, **11**, pp.1-42, DOI: 10.1016/j.soilbio.2006.03.024.
- [16] K. Manvir, H.S. Dhaliwal, T. Anirudh, et al. (2015), "In vitro plantlet formation in Carrizo citrange: A promising citrus rootstock", *Indian Journal of Horticulture*, **72**(1), pp.1-6, DOI: 10.5958/0974-0112.2015.00001.8.
- [17] N. Srivastava, B. Kamal, V. Sharma, et al. (2010), Standardization of sterilization protocol for micropropagation of *Aconitum heterophyllum* - An endangered medicinal herb, *Academic Arena*, **2**(6), pp.62-66.
- [18] A.V. Roberts (2003), "Cell, tissue and organ culture: Micropropagation", *Encyclopedia of Rose Science*, University of East London, pp.57-66.
- [19] H.Y. Reyl, L.A. Mroginski (2003), "Regeneration of plants from apical meristem tips and nodal segments of *Arachis pintoi*", *Peanut Science*, **30**(2), pp.75-79, DOI: 10.3146/pnut.30.2.0001.
- [20] A. Brunt, K. Crabtree, A. Gibbs (1990), *Viruses of Tropical Plants*, Commonwealth Agricultural Bureaux International, Wallingford, UK, 707pp.