

NGHIÊN CỨU TÁI SINH CÂY KEO LAI (*Acacia hybrid*) THÔNG QUA MÔ SẸO VÀ PHÁT SINH PHÔI SOMA PHỤC VỤ CHUYỂN GEN

Nguyễn Thị Huyền*, Trần Thị Thu Hà, Hà Thị Huyền Ngọc,
Nguyễn Thị Việt Hà, Lê Thị Thủy, Lê Sơn

*Viện Nghiên cứu Giống và Công nghệ Sinh học Lâm nghiệp -
Viện Khoa học Lâm nghiệp Việt Nam*

TÓM TẮT

Nghiên cứu tái sinh cây keo lai (*Acacia hybrid*) thông qua sự hình thành mô sẹo và phát sinh phôi soma có ý nghĩa quan trọng, phục vụ cho công tác chuyển gen vào giống cây này. Kết quả nghiên cứu tạo mô sẹo từ đoạn thân và mảnh lá của 3 dòng keo lai BV10, BV16, BV33 có tỷ lệ đạt từ 88,3% đến 93,6% trong môi trường MS bổ sung 1 mg/l 2,4-D và 0,5 mg/l BAP. Với môi trường MS bổ sung 1 mg/l TDZ và 0,25 mg/l IAA, tỷ lệ mô sẹo phát triển tạo phôi soma đạt từ 52,6% đến 59,3%; tỷ lệ phát sinh chồi từ phôi soma đạt từ 56,7% đến 58,4% sau 9 tuần nuôi cấy. Môi trường MS bổ sung 1,5 mg/l BAP và 0,5 mg/l NAA thích hợp cho quá trình nhân nhanh với số chồi trung bình đạt 6,5 đến 7,2 chồi/cụm. Môi trường ra rễ thích hợp là 1/2MS bổ sung 1,5 mg/l IBA có tỷ lệ ra rễ đạt từ 88,33% đến 90,83%. Hệ thống tái sinh keo lai thông qua mô sẹo và phát sinh phôi soma có thể áp dụng để chuyển gen nhằm tạo được một số giống keo lai mới mang tính trạng mong muốn.

Từ khóa: Keo lai, mô sẹo, phôi soma, tái sinh

Regeneration of acacia hybrid through callus and somatic embryogenesis for gene transfer

Research on regenerating acacia hybrid through callus and somatic embryogenesis is important, serving the gene transfer into this plant. Results of research on creating callus tissue from the young shoot segments and leaf pieces of 3 clones of hybrid *Acacia* BV10, BV16 and BV33 resulted ratio of callus induction from 88.3% to 93.6% in MS medium supplemented with 1 mg/l 2.4-D and 0.5 mg/l BAP. In MS medium supplemented with 1 mg/l TDZ and 0.25 mg/l IAA, the percentage of callus that formed somatic embryos ranges from 52.6% to 59.3%; the percentage of somatic embryos that developed shoots reached 56.7% to 58.4% after 9 weeks of culture. MS medium supplemented with 1.5 mg/l BAP and 0.5 mg/l NAA is suitable for multiplication with an average of 6.5 to 7.2 shoots/cluster. Appropriate rooting medium is 1/2MS supplemented with 1.5 mg/l IBA with rooting rates from 88.33% to 90.83%. *Acacia* hybrid regeneration system through callus and somatic embryogenesis can be applied for gene transfer to create new varieties with desired traits.

Keywords: *Acacia* hybrid, callus, somatic embryogenesis, regeneration

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Keo lai (*Acacia hybrid*) là giống lai giữa Keo tai tượng và Keo lá tràm (*Acacia mangium* × *Acacia auriculiformis*) đang được sử dụng rộng rãi trong trồng rừng sản xuất ở nước ta. Đây là loài cây gỗ nhỡ, cao tới 25 - 30m, đường kính đạt 30 - 40cm, thân thẳng, cành nhánh nhỏ, có khả năng thích ứng rộng, chống chịu sâu bệnh tốt, có thể cải tạo đất và có tiềm năng bột giấy cao (Lê Đình Khả, 2003). Một số dòng keo lai tự nhiên như BV10, BV16, BV32, BV33,... do Trung tâm Nghiên cứu Giống cây rừng (nay là Viện Nghiên cứu Giống và Công nghệ Sinh học Lâm nghiệp) chọn tạo và đã được Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn công nhận là giống tiến bộ kỹ thuật.

Hiện nay, cùng với việc tạo ra các dòng keo lai có năng suất, chất lượng và có khả năng chống chịu cao bằng phương pháp truyền thống thì, chọn tạo giống bằng công nghệ sinh học được đánh giá là bước đột phá đã đem lại những thành quả to lớn, đặc biệt là công nghệ biến đổi gen. Việc nghiên cứu chuyển các gen tăng năng suất, chất lượng vào keo lai là nghiên cứu có ý nghĩa thiết thực trong việc nâng cao tính an toàn sinh học của rừng keo lai. Trong nghiên cứu quy trình chuyển gen, việc nghiên cứu tái sinh chồi trực tiếp thông qua mô sẹo và phôi soma là một trong những hướng đi nền tảng và thiết yếu cho sự thành công của chuyển gen. Như vậy, xây dựng quy trình tái sinh cây keo lai là việc làm cần thiết và có ý nghĩa của quá trình chuyển gen để tạo ra các giống keo lai mới có năng suất, chất lượng được cải thiện.

Cho đến nay, một số loài keo đã được nghiên cứu tái sinh thành công thông qua mô sẹo và phôi soma từ các vật liệu là mảnh lá, đoạn thân phục vụ cho chuyển gen. Theo Rout và đồng tác giả (1995), sự hình thành phôi soma thứ cấp đã thu được sau 4 tuần nuôi cấy trên môi trường và nuôi cấy được duy trì trong 18 tháng mà không bị mất đi khả năng tái sinh ở loài

Keo *A. catechu*. Garg và đồng tác giả (1996) chỉ ra rằng với loài Keo *A. nilotica*, kích thước của phôi soma đã tăng lên rất nhiều và có khả năng tái sinh thành cây sau 8 tuần nuôi cấy. Ở Keo tai tượng, các mô sẹo hoặc phôi hình tim được cấy trên môi trường bổ sung 2,0 mg/l TDZ và 0,25 mg/l IAA xuất hiện cảm ứng phát sinh phôi soma thứ cấp, duy trì trong hơn 6 tháng bằng cách cấy chuyển mỗi tháng một lần (Xie DY, Hong Y, 2001). Với Keo lá liềm, sử dụng các mảnh lá nuôi cấy trên môi trường MS có bổ sung 0,5 mg/l TDZ và 0,5 mg/l NAA cho tỷ lệ hình thành chồi từ các nốt sần là cao nhất (Mingjia Yang *et al.*, 2006). Như vậy, các kết quả nghiên cứu thu được ở mỗi loài keo với phương pháp nghiên cứu và khả năng tái sinh là khác biệt nhau. Hiện nay, nuôi cấy *in vitro* các dòng keo lai được nghiên cứu rộng rãi, tuy nhiên việc nghiên cứu tái sinh cây keo lai thông qua mô sẹo và phát sinh phôi soma còn chưa được triển khai. Do đó, việc nghiên cứu tái sinh *in vitro* keo lai thông qua mô sẹo và phát sinh phôi soma là cần thiết và có ý nghĩa lớn cho công tác chuyển gen mang tính trạng mong muốn vào loài này.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Các dòng keo lai đã được công nhận BV10, BV16 (theo quyết định công nhận số 132/QĐ/BNN-KHCN, ngày 17 tháng 1 năm 2000) và BV33 (theo quyết định công nhận số 1998/QĐ/BNN-KHCN, ngày 11 tháng 07 năm 2006), được cung cấp bởi Viện Nghiên cứu Giống và Công nghệ Sinh học Lâm nghiệp.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng đến khả năng tạo mô sẹo từ đoạn thân và mảnh lá các dòng keo lai

Chồi keo lai *in vitro* các dòng BV10, BV16, BV33 được cắt thành các mẫu gồm đoạn thân (không chứa mắt ngủ) và mảnh lá có kích

thước từ 0,3 - 0,5cm, đặt mẫu lên trên bề mặt môi trường kích thích tạo mô sẹo. Môi trường tạo mô sẹo: MS + 30g/l Sucrose + 2,5g/l Gelrite có bổ sung 2,4-D và BAP với các nồng độ khác nhau (Bảng 1), với số lượng 150 mẫu/công thức. Sau 4 - 8 tuần theo dõi, kiểm tra và tiến hành thu số liệu.

Chỉ tiêu theo dõi: Tỷ lệ% mẫu tạo mô sẹo từ đoạn thân và mảnh lá của các dòng keo lai được tiến hành thí nghiệm.

2.2.2. Ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng đến khả năng cảm ứng hình thành phôi soma

Mô sẹo thu ở thí nghiệm trên được cấy chuyển sang môi trường cảm ứng hình thành phôi soma. Môi trường cảm ứng: MS + 30g/l Sucrose + 2,5g/l Gelrite và bổ sung TDZ, IAA với các nồng độ khác nhau (bảng 2). Sau 6 - 9 tuần theo dõi, kiểm tra và thu thập số liệu.

Chỉ tiêu theo dõi: Sự biến đổi màu sắc của mô sẹo, khả năng hình thành phôi soma từ mô sẹo giữa các dòng keo lai được tiến hành thí nghiệm.

2.2.3. Ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng đến khả năng bật chồi keo lai

Tiếp tục cấy chuyển các khối phôi soma được tạo thành từ thí nghiệm trên sang môi trường MS + 30 g/l Sucrose + 2,5g/l Gelrite có bổ sung TDZ và IAA với các nồng độ khác nhau (bảng 3). Các mẫu được cấy chuyển 3 tuần/lần, sau 6 - 9 tuần khảo sát khả năng phát triển bật chồi và thống kê kết quả.

Chỉ tiêu theo dõi: Tỷ lệ (%) cụm phôi soma bật chồi giữa các dòng keo lai được tiến hành thí nghiệm.

2.2.4. Ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng đến khả năng nhân nhanh chồi keo lai

Sử dụng các chồi tái sinh khỏe mạnh, không bị nhiễm nấm và nhiễm khuẩn cấy vào bình chứa môi trường nhân đa chồi. Môi trường bao gồm

MS + 30 g/l Sucrose + 6,5 g/l Agar có bổ sung BAP và NAA với các nồng độ khác nhau (bảng 4); cấy chuyển mẫu 3 tuần/lần. Theo dõi khả năng nhân chồi sau 6 tuần nuôi cấy và thống kê kết quả.

Chỉ tiêu theo dõi: Số chồi nhân trên cụm và chất lượng chồi sau khi tiến hành nhân nhanh của các dòng keo lai.

2.2.5. Ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng đến khả năng ra rễ của chồi keo lai

Các chồi keo lai sau khi nhân nhanh đủ tiêu chuẩn cao 2,5 - 3 cm chuyển sang môi trường ra rễ 1/2MS + 15 g/l Sucrose + 7 g/l Agar và bổ sung IBA với nồng độ khác nhau (bảng 5). Các bình nuôi cấy ra rễ được đặt dưới giàn đèn với chu kỳ chiếu sáng 8 giờ/ngày, sau 4 tuần khảo sát khả năng ra rễ và thống kê kết quả.

Chỉ tiêu theo dõi: Tỷ lệ chồi ra rễ (%), số rễ trung bình trên một chồi và chiều dài rễ trung bình (cm) của các chồi keo lai.

2.2.6. Môi trường và điều kiện nuôi cấy

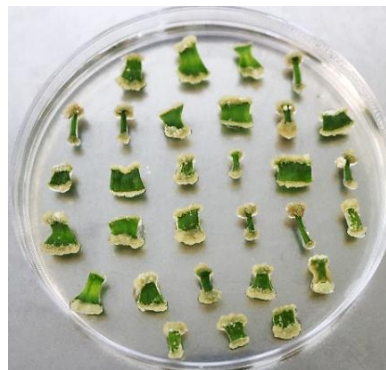
Môi trường nuôi cấy là môi trường đa - vi lượng theo Murashige và Skoog (1962), ký hiệu là MS. Tùy theo các thí nghiệm được bố trí có bổ sung chất điều hòa sinh trưởng thực vật 2,4-D, BAP, NAA, IAA, IBA và TDZ. Môi trường được điều chỉnh pH đạt 5,8 và được hấp khử trùng ở 121°C, áp suất 1,5 atm trong thời gian 20 phút.

Mẫu được nuôi cấy trong phòng thí nghiệm nuôi cấy mô đảm bảo nhiệt độ phòng từ 25 - 27°C, giàn đèn ánh sáng trắng với cường độ chiếu sáng 2.500 lux, chu kỳ chiếu sáng các giai đoạn đầu là 16 giờ/ngày, đến giai đoạn nhân chồi và ra rễ thì thời gian chiếu sáng là 8 giờ/ngày.

2.2.7. Phương pháp thu thập và xử lý số liệu

Số liệu được thu thập bằng phương pháp theo dõi, quan sát, đếm trực tiếp trên từng công thức thí nghiệm. Các số liệu được tính toán

theo phương pháp phân tích thống kê toán học. Quá trình xử lý số liệu được thực hiện trên máy tính với ứng dụng Data Analysis của chương trình Excel. Dùng hàm thống kê Anova để phân tích phương sai một nhân tố với các lần lặp. Khi giá trị P-value < 0,05 thì có sự khác biệt giữa các công thức và có sự sai khác rõ rệt về mặt thống kê, khi P-value > 0,05 thì sai khác giữa các công thức là chưa đủ lớn và không có sự sai khác về mặt thống kê.



Hình 1. Mẫu cấy trên môi trường tạo mô sẹo

III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

3.1. Ảnh hưởng của 2,4-D và BAP đến khả năng tạo mô sẹo từ đoạn thân và mảnh lá

Đoạn thân và mảnh lá cắt từ cây keo lai *in vitro* các dòng BV10, BV16, BV33 được sử dụng làm vật liệu nuôi cấy trên môi trường thí nghiệm. Sau 10 - 15 ngày nuôi cấy, mẫu bắt đầu cảm ứng hình thành mô sẹo ở hai mép của đầu cắt và phần có tiếp xúc với môi trường (hình 1).

Tiếp đó, mô sẹo phát triển rộng ra tạo thành một khối màu vàng nhạt hoặc màu trắng, mềm và có dạng rời. Sau 4 - 8 tuần nuôi cấy, kết quả thu được cho thấy sự bổ sung 2,4-D và BAP, cũng như sự tương tác giữa các nồng độ của 2,4-D và BAP có ảnh hưởng khác biệt nhau tới sự hình thành mô sẹo từ đoạn thân và mảnh lá của các dòng keo lai BV10, BV16 và BV33 (bảng 1).

Bảng 1. Ảnh hưởng của 2,4-D và BAP đến khả năng tạo mô sẹo các dòng keo lai

Công thức	Chất ĐHST (mg/l)		Số lượng mẫu	Dòng BV10 Tỷ lệ tạo mô sẹo (%)		Dòng BV16 Tỷ lệ tạo mô sẹo (%)		Dòng BV33 Tỷ lệ tạo mô sẹo (%)	
	2,4-D	BAP		Thân	Lá	Thân	Lá	Thân	Lá
ĐC	-	-	150	0	0	0	0	0	0
CT1	0,25	0,5	150	76,7 ± 2,11	79,3 ± 2,76	74,6 ± 1,64	76,6 ± 2,11	73,3 ± 2,35	75,3 ± 1,83
CT2	0,5	0,5	150	81,3 ± 1,63	83,3 ± 2,37	78,7 ± 1,63	80,7 ± 2,49	80,6 ± 2,78	81,9 ± 1,82
CT3	1	0,5	150	92,6 ± 1,33	93,6 ± 2,37	88,3 ± 1,63	89,3 ± 1,33	89,3 ± 1,48	90,6 ± 1,49
CT4	1,5	0,5	150	78,6 ± 1,63	75,3 ± 1,86	75,3 ± 1,64	78,0 ± 1,63	76,6 ± 2,36	78,2 ± 1,82
CT5	2	0,5	150	66,7 ± 2,11	68,7 ± 2,95	64,7 ± 1,64	68,6 ± 1,63	63,3 ± 2,36	65,3 ± 1,83
<i>P-value</i>				<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05

Hiệu quả phối hợp giữa auxin 2,4-D và cytokinin BAP trong sự cảm ứng tạo mô sẹo đã được chứng minh trên nhiều loài keo, ví dụ lá mầm cây *Acacia nilotica* phát sinh tạo mô sẹo tối ưu trên môi trường MS bổ sung 0,4 mg/l 2,4-D và 0,2 mg/l BAP (Dhabhai and Batra, 2010), cây *Acacia sinuata* tạo mô sẹo tốt nhất trên môi trường nuôi cấy MS bổ sung 4,52µM 2,4-D và 2,22µM BAP (Vengadesan *et al.*, 2003). Trong thí nghiệm này đã sử dụng

2,4-D và BAP để bổ sung vào môi trường nuôi cấy tạo mô sẹo. Kết quả cho thấy sự kết hợp giữa 2,4-D và BAP với nồng độ khác nhau cho tỷ lệ mẫu tạo mô sẹo ở các công thức thí nghiệm là khác nhau và có sự sai khác rõ rệt về mặt thống kê với giá trị P-value < 0,05. Như vậy, nồng độ chất điều hòa sinh trưởng (ĐHST) trong các công thức thí nghiệm ở bảng 1 có ảnh hưởng đến tỷ lệ tạo mô sẹo ở các dòng keo lai.

Trong các công thức thí nghiệm ở bảng 1, công thức đối chứng (ĐC) không bổ sung chất ĐHST thì các mẫu nuôi cấy đều không cảm ứng tạo mô sẹo và thâm hai mép ở đầu cắt phần tiếp xúc với môi trường. Sau 4 - 8 tuần nuôi cấy không tạo mô sẹo và dần chết. Đối với các công thức có bổ sung 2,4-D và BAP thì tỷ lệ tạo mô sẹo của các dòng keo lai BV10, BV16, BV33 là khá cao với cả mẫu mảnh lá và đoạn thân.

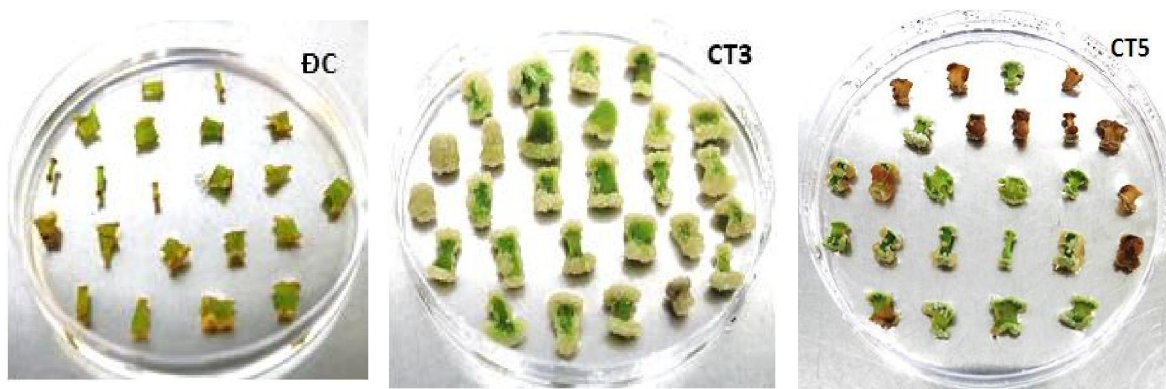
Dòng keo lai BV10 có tỷ lệ tạo mô sẹo đạt từ 68,7 - 93,6% ở lá và 66,7 - 92,6% ở thân. Kết quả thu được cho thấy khi tăng nồng độ 2,4-D từ 0,25 - 1 mg/l kết hợp với 0,5 mg/l BAP thì tỷ lệ tạo mô sẹo tăng dần, khi tăng nồng độ 2,4-D từ 1 - 2 mg/l thì tỷ lệ mô sẹo giảm dần ở cả lá và thân. Công thức thí nghiệm CT3, môi trường có bổ sung 1 mg/l 2,4-D và 0,5 mg/l BAP đạt tỷ lệ mô sẹo cao nhất (93,6% ở lá và 92,6% ở thân), mô sẹo tạo thành có màu trắng hoặc vàng nhạt, tạo khối bông xốp và đồng đều nhau.

Đối với dòng keo lai BV16, sau 8 tuần theo dõi cho kết quả tỷ lệ tạo mô sẹo đạt từ 68,6 - 89,3% ở lá và từ 64,7 - 88,3% ở đoạn thân. Môi trường cảm ứng có bổ sung 0,5 mg/l BAP và kết hợp với 2,4-D có nồng độ từ 0,25 - 2 mg/l thì tỷ lệ tạo mô sẹo có sự khác biệt giữa

các công thức thí nghiệm. Công thức đạt tỷ lệ tạo mô sẹo cao nhất (89,3% ở lá và 88,0% ở thân) là CT3 bổ sung 1mg/l 2,4-D và 0,5 mg/l BAP, mô sẹo tạo thành có màu trắng hay vàng nhạt, mềm và có dạng rời.

Ở dòng keo lai BV33, công thức CT3 bổ sung 1 mg/l 2,4-D và 0,5 mg/l BAP cho tỷ lệ tạo mô sẹo cao nhất (90,6% ở lá và 89,3% ở thân) và đặc điểm của mô sẹo tạo thành có màu trắng hay vàng nhạt, đồng đều và mềm. Ngược lại, môi trường CT5 bổ sung 2 mg/l 2,4-D và 0,5 mg/l BAP lại cho tỷ lệ tạo mô sẹo thấp hơn (65,3% ở lá và 63,3% ở thân), mô sẹo tạo thành không đều nhau, màu vàng nhạt hay sẫm hơn và rời nhau.

Kết quả thu được sau 8 tuần nuôi cấy, cho thấy môi trường MS bổ sung 1 mg/l 2,4-D và 0,5 mg/l BAP cho tỷ lệ cảm ứng tạo mô sẹo là tốt nhất và cho chất lượng mô sẹo tốt hơn so với các công thức còn lại ở cả 3 dòng keo lai BV10, BV16 và BV33. Đồng thời, tỷ lệ tạo mô sẹo ở mẫu lá ở cả 3 dòng keo lai là cao hơn so với mẫu thân được sử dụng làm thí nghiệm. Như vậy, thí nghiệm được tiến hành trên 3 dòng keo lai với mẫu lá và mẫu thân thì dòng keo lai BV10 cho tỷ lệ tạo mô sẹo cao hơn so với hai dòng còn lại trên cùng một công thức môi trường MS bổ sung 1 mg/l 2,4-D và 0,5 mg/l BAP.



Hình 2. Mẫu keo lai sau 4 đến 8 tuần nuôi cấy trên môi trường tạo mô sẹo

3.2. Ảnh hưởng của TDZ và IAA đến khả năng cảm ứng hình thành phôi soma

Sau 6 - 9 tuần nuôi cấy trên môi trường có bổ sung TDZ và IAA, các khối mô sẹo đã có sự

chuyển biến về màu sắc và cảm ứng phát sinh tạo phôi soma. Kết quả được thể hiện ở trong bảng 2 dưới đây.

Bảng 2. Ảnh hưởng của TDZ và IAA đến khả năng cảm ứng hình thành phôi soma

Công thức	Chất ĐHST (mg/l)		Số lượng mẫu	Tỷ lệ mô sẹo cảm ứng tạo phôi soma (%) - BV10		Tỷ lệ mô sẹo cảm ứng tạo phôi soma (%) - BV16		Tỷ lệ mô sẹo cảm ứng tạo phôi soma (%) - BV33	
	TDZ	IAA		Lá	Thân	Lá	Thân	Lá	Thân
ĐC	-	-	150	9,4 ± 1,33	6,7 ± 2,35	11,3 ± 1,63	8,2 ± 1,63	8,7 ± 1,63	6,1 ± 1,34
TN1	0,5	0,25	150	39,3 ± 2,78	34,67 ± 1,83	42,6 ± 2,49	38,7 ± 1,63	38,6 ± 1,63	36,2 ± 1,34
TN2	1	0,25	150	56,7 ± 1,82	52,6 ± 2,78	59,3 ± 1,64	54,6 ± 1,63	55,4 ± 2,49	53,3 ± 2,11
TN3	1,5	0,25	150	44,0 ± 2,79	38,6 ± 1,83	48,0 ± 1,63	44,7 ± 1,63	44,6 ± 1,64	38,0 ± 1,63
TN4	0,5	0,5	150	33,3 ± 1,82	29,3 ± 2,78	40,0 ± 2,11	36,0 ± 2,49	35,3 ± 1,64	31,3 ± 1,63
TN5	1	0,5	150	24,6 ± 1,83	21,3 ± 2,97	31,3 ± 1,63	24,0 ± 2,49	28,1 ± 1,63	25,3 ± 1,64
<i>P-value</i>				<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05

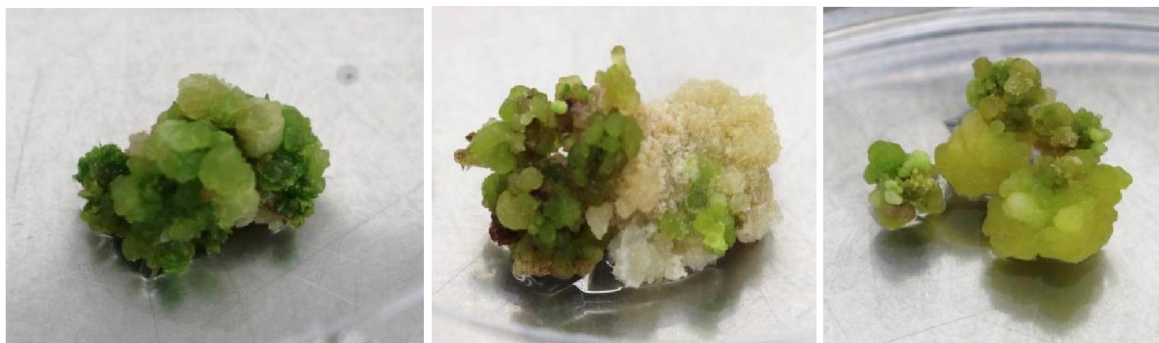
Kết quả thu được cho thấy, khi không bổ sung TDZ và IAA thì tế bào mô sẹo cảm ứng hình thành phôi soma có tỷ lệ thấp ở cả 3 dòng keo lai (từ 6,1% đến 11,3%). Ngược lại, trong thí nghiệm có bổ sung TDZ và IAA thì tế bào mô sẹo cảm ứng phát sinh tạo phôi soma với tỷ lệ khác nhau ở các nồng độ và các dòng keo lai, có sự sai khác rõ rệt về mặt thống kê với giá trị $P\text{-value} < 0,05$. Như vậy, các công thức thí nghiệm được bố trí có ảnh hưởng đến tỷ lệ mô sẹo phát sinh tạo phôi soma.

Trong 5 công thức thí nghiệm, công thức TN2 bổ sung 1 mg/l TDZ và 0,25 mg/l IAA thu được chất lượng phôi soma và tỷ lệ mô sẹo cảm ứng tạo phôi soma cao hơn hẳn so với các công thức còn lại. Mô sẹo khi cấy sang công thức môi trường TN2 có sự biến đổi màu sắc từ màu trắng hay vàng nhạt chuyển dần sang màu xanh hay xanh vàng, căng mọng, bó sát và đồng đều nhau (hình 3). Tỷ lệ mô sẹo cảm ứng tạo phôi soma thu được cao hơn, có sự chênh lệch giữa các dòng và nguyên liệu tạo thành mô sẹo (lá và

thân), ở dòng BV10 đạt từ 52,6% (thân) đến 56,7% (lá); ở dòng BV16 đạt từ 54,6% (thân) đến 59,3% (lá); cuối cùng ở dòng BV33 đạt từ 53,3% (thân) và 55,4% (lá).

Mặt khác, ở công thức thí nghiệm TN5 bổ sung 1 mg/l TDZ và 0,5 mg/l IAA thu được tỷ lệ tạo phôi soma tương đối thấp, chỉ chiếm 21,3% (thân) và 24,6% (lá) ở dòng BV10; dòng BV16 từ 24,0% (thân) đến 31,3% (lá); dòng BV33 từ 25,3% (thân) đến 28,1% (lá). Chất lượng phôi soma thu được kém, màu trắng đục hay vàng sẫm, bông xốp và rời rạc.

Như vậy, kết quả thu được cho thấy môi trường MS bổ sung 1 mg/l TDZ và 0,25 mg/l IAA cho tỷ lệ mô sẹo cảm ứng tạo phôi soma và chất lượng phôi soma là tốt hơn; mô sẹo hình thành từ mảnh lá cảm ứng tạo phôi soma cho tỷ lệ cao hơn mô sẹo từ đoạn thân. Trong các dòng keo lai, ở cùng một công thức môi trường, dòng BV16 cho tỷ lệ tạo phôi soma cao hơn so với dòng BV10, BV33 và đạt tỷ lệ cao nhất là 59,3% trong môi trường MS bổ sung 1 mg/l TDZ và 0,25 mg/l IAA.



Hình 3. Phôi soma phát sinh trên môi trường bổ sung 1 mg/l TDZ và 0,25 mg/l IAA

Kết quả nghiên cứu này có tỷ lệ cảm ứng tạo phôi soma cao hơn so với một số công trình nghiên cứu đã công bố trước đây. Xie DY và Hong Y (2001) đã nghiên cứu tạo phôi soma loài Keo tai tượng (*Acacia mangium*) từ mô sẹo trên môi trường MS bổ sung 2,0 mg/l TDZ và 0,25 mg/l IAA cho tỷ lệ tạo phôi soma cao nhất (khoảng 16,41%). Ngoài ra, R.M. Nanda và G.R. Rout (2003) đã chỉ ra sau 8 tuần nuôi cấy trên môi trường MS có bổ sung 6,66 μ M BA

và 6,78 μ M 2,4-D cho tỷ lệ tạo phôi soma ở mẫu lá cây Keo ả rập (*Acacia arabica*) cao nhất (đạt 38,4%).

3.3. Ảnh hưởng của TDZ và IAA đến khả năng tạo chồi keo lai từ phôi soma

Các chồi keo lai được hình thành sau 6 - 9 tuần nuôi cấy từ phôi soma trên môi trường MS có bổ sung TDZ và IAA, kết quả được thể hiện trong bảng 3.

Bảng 3. Ảnh hưởng của TDZ và IAA đến khả năng bật chồi các dòng keo lai

Công thức	Chất ĐHST(mg/l)		Số lượng mẫu	Dòng BV10	Dòng BV16	Dòng BV33
	TDZ	IAA		Tỷ lệ bật chồi (%)	Tỷ lệ bật chồi (%)	Tỷ lệ bật chồi (%)
ĐC	-	-	120	0	0	0
TN1	0,5	0,25	120	36,8 ± 2,37	38,3 ± 1,67	36,7 ± 2,35
TN2	1	0,25	120	58,4 ± 1,43	56,7 ± 1,25	57,5 ± 1,67
TN3	1,5	0,25	120	45,0 ± 1,70	48,3 ± 1,67	47,5 ± 2,76
TN4	0,5	0,5	120	39,1 ± 1,47	38,3 ± 1,47	41,6 ± 1,67
TN5	1	0,5	120	33,3 ± 2,33	31,6 ± 2,33	35,8 ± 1,44
<i>P-value</i>				<0,05	<0,05	<0,05

Khả năng bật chồi ở các công thức thí nghiệm có sự khác nhau và có sự sai khác rõ rệt về mặt thống kê (P -value < 0,05). Như vậy, các công thức thí nghiệm bổ sung nồng độ chất ĐHST khác nhau có ảnh hưởng đến khả năng bật chồi và số chồi/cụm của keo lai.

Kết quả thu được ở bảng 3, cho thấy công thức TN2 bổ sung 1mg/l TDZ kết hợp với 0,25 mg/l

IAA thu được tỷ lệ bật chồi (56,7% đến 58,4%) cao hơn so với các công thức thí nghiệm khác. Dòng BV10 cho tỷ lệ phôi soma tạo chồi là 58,4%, dòng BV16 đạt 56,7% phôi soma tạo chồi và dòng BV33 cho 57,5% tạo chồi. Với môi trường MS không bổ sung chất điều hòa sinh trưởng (ĐC) thì phôi soma khó có khả năng tái sinh để hình thành chồi. Như

vậy, sự có mặt của chất kích thích sinh trưởng TDZ và IAA trong môi trường nuôi cấy đã kích thích tế bào có khả năng sinh phôi biệt hóa thành tế bào phôi, phát triển qua các giai đoạn để hình thành chồi.

Kết quả thí nghiệm cho thấy phôi soma nuôi cấy trên môi trường MS bổ sung 1 mg/l TDZ

kết hợp với 0,25 mg/l IAA của các dòng BV10, BV16 và BV33 có khả năng tái sinh bật chồi cao, đạt tỷ lệ tương ứng là 58,4%, 56,7% và 57,5% sau 9 tuần; chồi tái sinh màu xanh, to và đồng đều. Dòng BV10 cho tỷ lệ bật chồi cao hơn so với hai dòng BV16 và BV33 ở cùng một công thức môi trường.



Hình 4. Phôi soma bật chồi trên môi trường bổ sung 1 mg/l TDZ và 0,25 mg/l IAA



Hình 5. Cụm chồi hình thành từ phôi soma

Kết quả nghiên cứu trên có tỷ lệ bật chồi cao hơn so với tỷ lệ hình thành chồi đạt 56% từ các nốt sần của mảnh lá Keo lá liềm nuôi cấy bằng môi trường MS có bổ sung 0,5 mg/l TDZ và 0,5 mg/l NAA theo công thức của Mingjia Yang và đồng tác giả (2006); nhưng lại thấp hơn so với tỷ lệ bật chồi đạt 75% từ mô sẹo của mẫu lá *Acacia sinuata* nuôi cấy bằng môi trường 1/2 MS có bổ sung 10% nước dừa, 13,3 μ M BA và 2,5 mg/l μ M Zeatin theo nghiên cứu của Vengadesan G. và đồng tác giả (2003).

3.4. Ảnh hưởng của BAP và NAA đến khả năng nhân nhanh chồi keo lai

Để nghiên cứu khả năng nhân nhanh chồi keo lai nhằm tạo ra số lượng lớn chồi có chất lượng tốt, các chồi mới hình thành được nuôi cấy trên môi trường MS có bổ sung BAP và NAA ở nồng độ khác nhau. Sau 6 tuần nuôi cấy, thu được kết quả ở bảng 4.

Bảng 4. Ảnh hưởng BAP và NAA đến khả năng nhân chồi các dòng keo lai

CT	Số lượng mẫu	Chất ĐHST		Dòng BV10		Dòng BV16		Dòng BV33	
		BAP (mg/l)	NAA (mg/l)	Số chồi/cụm	Chất lượng chồi	Số chồi/cụm	Chất lượng chồi	Số chồi/cụm	Chất lượng chồi
ĐC	120	-	-	3,2 ± 0,12	+	37 ± 0,21	+	2,9 ± 0,10	+
N1	120	1,5	0,25	6,0 ± 0,22	++	6,3 ± 0,16	++	5,7 ± 0,12	++
N2	120	1,5	0,5	6,9 ± 0,18	+++	7,2 ± 0,19	+++	6,5 ± 0,14	+++
N3	120	1,5	0,75	6,5 ± 0,12	+++	6,8 ± 0,10	+++	5,9 ± 0,11	++
N4	120	1,5	1,0	5,8 ± 0,15	++	6,5 ± 0,13	++	5,3 ± 0,12	+
<i>P-value</i>				<0,05		<0,05		<0,05	

Ghi chú:

- + Chất lượng chồi kém (Chồi thấp và không đồng đều)
- ++ Chất lượng chồi khá (Chồi cao, mảnh, không đồng đều)
- +++ Chất lượng chồi tốt (Chồi cao, mập, đồng đều)

Kết quả bảng 4 cho thấy, môi trường bổ sung 1,5 mg/l BAP và NAA ở các nồng độ 0,25 mg/l; 0,5 mg/l; 0,75 mg/l; 1,0 mg/l thì hệ số nhân chồi đạt được có sự khác nhau ở các công thức và ở các dòng, có sự sai khác rõ rệt về mặt thống kê (*P-value* < 0,05). Ở cùng công thức N2 thì khả năng nhân chồi của dòng BV16 vẫn cao hơn cả (7,2 chồi/cụm), tiếp theo là dòng BV10 (6,9 chồi/cụm) và thấp hơn là dòng BV33 (6,5 chồi/cụm); chất lượng chồi thu được cao, mập và đồng đều nhau hơn so với các công thức thí nghiệm còn lại. Công thức đối chứng (ĐC) không bổ sung chất điều hòa sinh trưởng nên hệ số nhân chồi thấp, thu được từ 2,9 đến 3,7 chồi/cụm, chất lượng chồi kém và không đều nhau. Như vậy, trong quá trình nhân nhanh chồi của 3 dòng keo lai, sử dụng môi trường MS bổ sung 1,5 mg/l BAP và 0,5 mg/l NAA sẽ cho hệ số nhân chồi cao hơn và chất lượng chồi tốt, trong đó dòng BV16 cho hiệu quả nhân nhanh cao hơn so với hai dòng còn lại.

Nghiên cứu nêu trên cho kết quả nhân nhanh chồi *in vitro* tương đương với nghiên cứu của Triệu Thị Thu Hà và đồng tác giả (2014) trên cây Keo lá tràm (*Acacia auriculiformis* A. Cunn. ex Benth) với khả năng nhân chồi cao nhất trong môi trường MS có bổ sung 1 mg/l BAP và 0,5 mg/l NAA là 6,0 chồi/cụm. Mặt

khác nghiên cứu trên có số lượng chồi/cụm tạo ra cao hơn so với công trình nghiên cứu của Kshipra Dhabhai và đồng tác giả (2010) khi nghiên cứu nhân giống *in vitro* cây Keo ả rập (*Acacia nilotica*) là 4,6 chồi/cụm trong môi trường nuôi cấy MS bổ sung 0,6 mg/l BAP và 1 mg/l Kinetin.

So sánh với kết quả nghiên cứu của Đoàn Thị Mai và đồng tác giả (2009) về nhân giống bằng nuôi cấy mô trên các dòng keo lai này cho khả năng nhân chồi từ 7,5 - 8,2 chồi/cụm trên môi trường MS*(có cái tiến) + 1,5mg/l BAP cao hơn so với kết quả nghiên cứu này. Quá trình chồi tái sinh chồi từ phôi soma có thể là nguyên nhân dẫn đến việc hệ số nhân chồi thu được thấp hơn so với khi sử dụng chồi trực tiếp lên từ đoạn thân.



Hình 6. Cụm chồi keo lai trên môi trường MS bổ sung 1,5 mg/l BAP và 0,5 mg/l NAA

3.5. Ảnh hưởng của IBA đến khả năng ra rễ tạo cây keo lai hoàn chỉnh

Môi trường ra rễ cho chồi các dòng Keo lai: 1/2 MS bổ sung thêm IBA ở các nồng độ 0,5;

1; 1,5; 2 mg/l, sau 30 ngày nuôi cấy, kết quả thu được được thể hiện trong bảng 5.

Bảng 5. Ảnh hưởng IBA đến khả năng ra rễ của các dòng keo lai

IBA (mg/l)	BV10			BV16			BV33		
	Tỷ lệ ra rễ (%)	Số rễ TB (cái)	Chiều dài rễ (cm)	Tỷ lệ ra rễ (%)	Số rễ TB (cái)	Chiều dài rễ (cm)	Tỷ lệ ra rễ (%)	Số rễ TB (cái)	Chiều dài rễ (cm)
ĐC	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0,5	74,17	3,3	3,4	78,33	3,5	3,5	77,50	3,7	3,2
1,0	81,67	3,7	3,8	83,33	3,7	3,7	80,00	3,9	3,6
1,5	88,33	4,1	3,9	90,83	4,4	4,6	89,17	4,3	4,4
2,0	83,35	4,4	3,5	85,83	4,3	4,1	85,00	4,4	4,2
<i>P-value</i>	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001

Theo bảng 5, đối với 3 dòng keo lai được nghiên cứu thì IBA có tác động mạnh đến quá trình ra rễ tạo cây hoàn chỉnh và cho tỷ lệ chồi ra rễ cao. Tỷ lệ ra rễ của 3 dòng keo lai khi bổ sung IBA vào môi trường ra rễ đạt từ 74,17% đến 90,83%, trong khi đó công thức đối chứng ĐC không bổ sung IBA nên các chồi không ra rễ.

Từ kết quả thu được nhận thấy, môi trường 1/2MS bổ sung nồng độ 1,5 mg/l IBA là thích hợp cho quá trình ra rễ của chồi keo lai các dòng. Khi chồi cấy trong môi trường này cho tỷ lệ ra rễ của các dòng đạt từ 88,33% đến 90,83%, rễ ra trung bình đạt 4,1 - 4,4 trên chồi với chiều dài từ 3,9 - 4,6 cm. Vậy nên, môi trường phù hợp cho các dòng keo lai ra rễ là 1/2MS + 1,5 mg/l IBA. Đối với 3 dòng keo lai được cho ra rễ, từ bảng số liệu cho thấy dòng BV16 cho tỷ lệ chồi ra rễ cao nhất (90,83%), tiếp theo là BV33 (89,17%) và thấp hơn là BV10 (88,33%) ở môi trường bổ sung 1,5 mg/l IBA. Kết quả này cũng tương tự với nghiên cứu của của Đoàn Thị Mai và đồng tác giả (2009) khi các dòng keo lai cho tỷ lệ ra rễ đạt từ 89,45% đến 92,27% bằng phương pháp nuôi cấy đỉnh chồi với môi trường ra rễ 1/2MS* (có cải tiến) + IBA 1,5mg/l. Như vậy,

quá trình tái sinh chồi thông qua mô sẹo và phôi soma không ảnh hưởng đến kết quả ra rễ cũng như chất lượng cây con so với việc sử dụng chồi nhân nhanh theo phương pháp nuôi cấy mô đang sử dụng rộng rãi trong nghiên cứu và sản xuất.

IV. KẾT LUẬN

Quy trình tái sinh cây keo lai (*Acacia hybrid*) thông qua mô sẹo và phôi soma được xây dựng như sau: Đoạn thân và lá cây keo lai *in vitro* 3 dòng BV10, BV16, BV33 được nuôi cấy tạo mô sẹo trên môi trường MS bổ sung 1 mg/l 2,4-D và 0,5 mg/l BAP cho tỷ lệ mẫu sẹo tạo mô sẹo từ 88,3% đến 93,6%. Cảm ứng mô sẹo tạo phôi soma đạt từ 52,6% đến 59,3% trên môi trường MS bổ sung 1 mg/l TDZ và 0,25 mg/l IAA. Cụm phôi soma được chuyển sang môi trường kích thích tạo chồi MS bổ sung 1 mg/l TDZ + 0,25 mg/l IAA cho tỷ lệ tái sinh tạo chồi đạt từ 56,7% đến 58,4% sau 9 tuần nuôi cấy. Môi trường MS bổ sung 1,5 mg/l BAP + 0,5 mg/l NAA cho hệ số nhân chồi cao nhất, với số lượng chồi từ 6,5 đến 7,2 chồi/cụm. Môi trường 1/2MS + 1,5 mg/l IBA thích hợp cho ra rễ, đạt từ 88,33% đến 90,83% và số rễ trung bình từ 4,1 đến 4,4 rễ.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Đoàn Thị Mai, Nguyễn Thị Mỹ Hương, Vũ Thị Ngọc, Trần Thanh Hương, Văn Thu Huyền, 2009. Nuôi cấy mô một số giống keo lai mới chọn tạo. Tạp chí Khoa học Lâm nghiệp, số 2.
2. Garg L, Bhandari NN, Rani V, Bhojwani SS, 1996. Somatic embryogenesis and regeneration of triploid plants in endosperm cultures of *Acacia nilotica*. Plant Cell Reports, 15: 855-858.
3. Kshipra Dhabhai, M SharmaM, Amla Batra, 2010. *In vitro* clonal propagation of *Acacia nilotica* (L.) - a nitrogen fixing tree. Researcher, 2(3): 1-6.
4. Lê Đình Khả, 2003. Nghiên cứu chọn tạo giống và nhân giống cho một số loài cây trồng rừng chủ yếu ở Việt Nam. NXB Nông nghiệp, Hà Nội. 292 trang
5. Mingjia Yang, Xiangming Xie, Xiaoqing He & Fangqiu Zhang, 2006. Plant regeneration from phyllode explants of *Acacia crassicaarpa* via organogenesis. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 85: 241-245.
6. Ortiz BOC, Reyes MEP, Balch EPM, 2000. Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Acacia farnesiana* and *A.schaffneri*. In vitro Cellular and Developmental Biology - plant, 36: 268-272.
7. R.M. Nanda & G.R. Rout, 2003. In vitro somatic embryogenesis and plant regeneration in *Acacia arabica*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 73: 131-135
8. Rout GR, Samantaray S, Das P, 1995. Somatic embryogenesis and plant re-generation from callus culture of *Acacia catechu* - a multipurpose leguminous tree. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 42: 283-285.
9. Trần Quang Báo, Hồ Thị Huệ, 2016. Đặc điểm sinh trưởng của các dòng keo lai trồng tại huyện Xuân Lộc, tỉnh Đồng Nai. Tạp chí Khoa học Lâm nghiệp, số 2: 4326-4334.
10. Triệu Thị Thu Hà, Cấn Thị Lan, Đồng Thị Ứng, 2014. Nghiên cứu nhân giống Keo lá tràm (*Acacia auriculiformis* A. Cunn. ex Benth) bằng phương pháp nuôi cấy mô tế bào. Tạp chí Khoa học Lâm nghiệp, số 4: 1508-1505
11. Vengadesan G., Ganapathi A., Amutha S., Selvaraj N., 2003. High-frequency plant regeneration from cotyledon callus of *Acacia sinuata* (Lour.) Merr. In vitro Cellular and Developmental Biology - Plant, 39: 28-33.
12. Xie DY, Hong Y, 2001. Regeneration of *Acacia mangium* through somatic embryogenesis, Plant Cell Reports, 20: 917-922.
13. Zhang H, Huang X, Fu J, 2003. Preliminary study on somatic embryogenesis of a tree legume - *Acacia auriculiformis*. Acta Scientiarum Univer-sitatis Sunyatseni, 36: 122-125.

Email tác giả liên hệ: nguyenhuyen215.ht@gmail.com

Ngày nhận bài: 04/08/2020

Ngày phản biện đánh giá và sửa chữa: 13/08/2020

Ngày duyệt đăng: 17/08/2020