

NGHIÊN CỨU TÁI SINH CHỒI THÔNG QUA MÔ SẸO VÀ PHÁT SINH PHÔI SOMA CÁC DÒNG KEO LAI BV350 VÀ BV376

Lê Thị Thủy, Nguyễn Thị Huyền, Nguyễn Thị Việt Hà, Trần Thị Thu Hà, Lê Sơn
Viện Nghiên cứu Giống và Công nghệ Sinh học Lâm nghiệp

TÓM TẮT

Nghiên cứu này xác định các môi trường thích hợp cho quá trình nuôi cấy, hoàn thiện quy trình kỹ thuật nhân giống một số loài keo lai bằng phương pháp tái sinh chồi thông qua mô sẹo và phát sinh phôi soma. Kết quả cho thấy, đoạn thân (không chứa mắt ngủ) và mảnh lá của hai dòng BV350 và BV376 nuôi cấy trên môi trường MS bổ sung 1 mg/l 2,4-D và 0,5 mg/l BAP cho tỷ lệ tạo mô sẹo lần lượt là 81,11% và 84,44% (đoạn thân), 85,56% và 87,33% (mảnh lá). Mô sẹo phát sinh tạo phôi soma trên môi trường MS bổ sung 1 mg/l TDZ và 0,25 mg/l IAA cho tỷ lệ tạo phôi soma của hai dòng BV350 và BV376 lần lượt là 36,67% và 58,34% ở đoạn thân, 50,67% và 60,56% ở mảnh lá. Tái sinh chồi từ phôi soma trên môi trường MS bổ sung 1 mg/l TDZ và 0,25 mg/l IAA cho tỷ lệ tái sinh chồi đạt 36,24% dòng BV350 và 50,62% dòng BV376 sau 6 - 9 tuần nuôi cấy. Nhân nhanh chồi trên môi trường MS bổ sung 1,5 mg/l BAP và 0,5 mg/l NAA cho số chồi trung bình/cụm đạt 5,81 (BV350) và 6,92 (BV376). Kích thích ra rễ tạo cây hoàn chỉnh trên môi trường 1/2 MS bổ sung 1,5 mg/l IBA, tỷ lệ ra rễ đạt 87,62% (BV350) - 91,34% (BV376). Hệ thống tái sinh các dòng keo lai thông qua mô sẹo và phát sinh phôi soma được xây dựng và có thể áp dụng trong chuyên gen/chỉnh sửa gen nhằm tạo ra các giống keo mang các tính trạng mong muốn.

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

ORGANOGENESIS AND PLANT RE-GENERATION FROM CALLUS CULTURE OF ACACIA HYBRID CLONES BV350 AND BV376

Le Thi Thuy, Nguyen Thi Huyen, Nguyen Thi Viet Ha, Tran Thi Thu Ha, Le Son

Institute of Forest Tree Improvement and Biotechnology

ABSTRACT

This study determines the appropriate media in the tissue culture, and perfected the technical process of propagating some acacia hybrid species by the method of shoot regeneration through callus tissue and somatic embryogenesis. The results showed that stem segments (without dormant buds) and leaf fragments of two lines BV350 and BV376 cultured on MS medium supplemented with 1 mg/l 2,4 - D and 0.5 mg/l BAP gave callus formation rates of 81.11% and 84.44% (stem segments), 85.56% and 87.33% (leaf fragments), respectively. Callus induction to form somatic embryos on MS medium supplemented with 1 mg/l TDZ and 0.25 mg/l IAA gave somatic embryogenesis rates of BV350 and BV376 lines of 36.67% and 58.34% in stem segments, 50.67% and 60.56% in leaf fragments, respectively. Shoot regeneration from somatic embryos on MS medium supplemented with 1 mg/l TDZ and 0.25 mg/l IAA gave shoot regeneration rates of 36.24% in BV350 line and 50.62% in BV376 line after 6-9 weeks of culture. Shoot multiplication on MS medium supplemented with 1.5 mg/l BAP and 0.5 mg/l NAA gave an average number of shoots per cluster of 5.81 (BV350) and 6.92 (BV376). Rooting stimulation to create complete plants on 1/2 MS medium supplemented with 1.5 mg/l IBA, rooting rate reached 87.62% (BV350) - 91.34% (BV376). The system of regenerating hybrid Acacia lines through callus and somatic embryogenesis was built and can be applied in gene transfer/gene editing to create Acacia varieties with desired traits.

Keywords: Acacia hybrid, callus, somatic embryogenesis, regeneration

I. MỞ ĐẦU

Keo lai là kết quả lai giống tự nhiên giữa Keo tai tượng (*Acacia mangium*) và Keo lá tràm (*A. auriculiformis*), có khả năng sinh trưởng tốt, thích ứng rộng và cho năng suất gỗ cao, có tiềm năng bộ giấy cao (Lê Đình Khả, 2003). Đây là một trong những loài cây trồng chủ lực mang lại giá trị kinh tế lớn đối với ngành lâm nghiệp ở Việt Nam, với diện tích rừng keo đã đạt trên 2,2 triệu ha và chiếm khoảng 60% tổng diện tích trồng rừng sản xuất của cả nước (Phí Hồng Hải, 2022). Hiện nay, cây con được sử dụng trong trồng rừng các dòng keo lai có năng suất, chất lượng được cải thiện thường được tạo ra bằng phương pháp nhân giống vô tính (Đoàn Thị Mai và Lê Sơn, 2011; Lê Sơn *et al.*, 2013; Cán Thị Lan *et al.*, 2017; Văn Thu Huyền *et al.*, 2021). Đây là hướng đi có ý nghĩa lớn trong việc nâng cao năng suất, chất lượng rừng trồng từ đó nâng cao hiệu quả kinh tế của trồng rừng.

Những nghiên cứu về vi nhân giống keo từ các nguồn mẫu khác nhau như đỉnh sinh trưởng, chồi bất định và những nghiên cứu nhằm cải tiến quy trình nhân giống của loài cây đã được công bố (Cán Thị Lan *et al.*, 2017; Văn Thu Huyền *et al.*, 2021). Tuy nhiên, những nghiên cứu về việc nhân giống và cải thiện giống thông qua hệ thống tái sinh mô sẹo và phát sinh phôi soma cho keo còn hạn chế tại nước ta, đặc biệt là đối với keo lai. Do đó, khi nghiên cứu kết hợp phương pháp nuôi cấy mô *in vitro* và chuyển gen vào chọn tạo giống keo lai mới mang lại những kết quả đáng mong đợi. Việc nghiên cứu tái sinh *in vitro* một số dòng keo lai thông qua mô sẹo và phát sinh phôi soma là cần thiết và có ý nghĩa lớn trong công tác chuyển gen mang tính trạng mong muốn.

Ở 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 với các thí nghiệm khác nhau phục vụ cho chuyển gen như *A. catechu* (Rout *et al.*, 1995), *A. nilotica* (Garg

et al., 1996), *A. mangium* (Xie, Hong, 2001), *A. crassicaarpa* (Yang *et al.*, 2006), *A. hybrid* (BV10, BV16, BV33) (Nguyễn Thị Huyền *et al.*, 2020). Với những kết quả nghiên cứu đã được công bố cho thấy, mỗi loài keo với phương pháp nghiên cứu khác nhau có khả năng tái sinh là khác nhau. Hiện nay, công tác nghiên cứu tái sinh chồi keo lai thông qua mô sẹo và phát sinh phôi soma còn chưa được phổ biến. Do đó, nghiên cứu này được thực hiện nhằm xây dựng quy trình tái sinh chồi thông qua mô sẹo và phát sinh phôi soma cho một số dòng keo lai là một trong những hướng đi mới và cần thiết cho sự thành công của công tác chuyển/chỉnh sửa gen.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Mảnh lá và đoạn thân (không chứa mắt ngủ) được nhân giống bằng nuôi cấy *in vitro* sau 4 tuần nuôi cấy của hai dòng keo lai đã được công nhận là BV350 và BV376 (theo quyết định công nhận số 761/QĐ-BNN-TCLN ngày 6/3/2019 về Công nhận giống cây trồng lâm nghiệp), được cung cấp bởi Viện Nghiên cứu Giống và Công nghệ sinh học Lâm nghiệp, Viện Khoa học Lâm nghiệp Việt Nam.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Ảnh hưởng của 2,4-D và BAP đến khả năng tạo mô sẹo

Dùng dao cắt đoạn thân (không chứa mắt ngủ) và mảnh lá có kích thước 0,3 - 0,5 cm từ các chồi keo lai *in vitro* của hai dòng BV350 và BV376, chúng được đặt trên môi trường cảm ứng tạo mô sẹo: MS (Murashige and Skoog medium) + 30 g/l Sucrose + 2,5 g/l Gelrite + 2,4-D (Axit 2,4-Dichlorophenoxyacetic) + BAP (6-Benzylaminopurine) với các nồng độ khác nhau (bảng 1). Mỗi thí nghiệm được bố trí 3 lần lặp lại, mỗi lần 30 mẫu/công thức. Sau 4 - 8 tuần theo dõi, kiểm tra và tiến hành thu số liệu mẫu tạo mô sẹo.

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

Sử dụng mô sẹo thu ở thí nghiệm trên và cấy chuyển sang môi trường cảm ứng tạo phôi soma: MS + 30 g/l Sucrose + 2,5 g/l Gelrite + TDZ (*Thidiazuron*) + IAA (*Axit indol-3-acetic*) với các nồng độ khác nhau (bảng 2). Mỗi thí nghiệm được bố trí với 3 lần lặp, mỗi lần 30 mẫu/công thức. Sau 6 - 9 tuần theo dõi, kiểm tra và thu thập số liệu mẫu tạo phôi soma.

2.2.3. Ảnh hưởng của TDZ và IAA đến phát sinh chồi từ phôi soma

Các phôi soma thu được từ thí nghiệm trên được chuyển sang môi trường cảm ứng bật chồi: MS + 30 g/l Sucrose + 2,5 g/l Gelrite + TDZ + IAA với các nồng độ khác nhau (bảng 3). Mỗi thí nghiệm được bố trí 3 lần lặp lại, mỗi lần 30 mẫu/công thức. Cây chuyển mẫu 3 tuần/lần, sau 6 - 9 tuần theo dõi, kiểm tra và thu thập số liệu khả năng bật chồi từ các phôi soma.

2.2.4. Ảnh hưởng của BAP và NAA đến khả năng nhân nhanh chồi

Các chồi tái sinh từ phôi soma được cấy chuyển sang môi trường nhân đa chồi: MS + 30 g/l Sucrose + 6,5 g/l Agar + BAP + NAA (*Naphthalene acetic acid*) với các nồng độ khác nhau (bảng 4). Mỗi thí nghiệm được bố trí 3 lần lặp lại, mỗi lần 4 bình/công thức, mỗi bình cấy 3 mẫu. Cây chuyển mẫu 3 tuần/lần và theo dõi khả năng nhân chồi sau 9 tuần nuôi cấy.

2.2.5. Ảnh hưởng của IBA đến khả năng ra rễ của chồi

Các chồi keo lai tái sinh sau khi nhân nhanh đủ tiêu chuẩn và chất lượng (chiều cao từ 2,5 - 3 cm) chuyển sang môi trường ra rễ: 1/2 MS + 15 g/l Sucrose + 7 g/l Agar + IBA (*Indole-3-Butyric acid*) với nồng độ khác nhau (bảng 5). Mỗi lần thí nghiệm được bố trí 3 lần lặp lại, mỗi lần 3 bình/công thức, mỗi bình cấy 30 chồi. Sau 4 tuần nuôi cấy, theo dõi khả năng ra rễ và thu thập số liệu chồi ra rễ, số rễ/chồi và chiều dài rễ.

2.2.6. Điều kiện nuôi cấy

Môi trường nuôi cấy MS bổ sung thêm các chất điều hòa sinh trưởng với nồng độ khác nhau, điều chỉnh pH đạt 5,8 và hấp khử trùng 121°C, 1,5 atm trong thời gian 20 phút. Phòng thí nghiệm nuôi cấy mẫu có nhiệt độ phòng từ 25 - 27°C, có giàn đèn chiếu ánh sáng trắng với cường độ 2.500 lux, thời gian chiếu sáng 8 giờ/ngày (giai đoạn nhân và ra rễ) đến 16 giờ/ngày (giai đoạn cảm ứng tạo mô sẹo và phát sinh phôi soma).

2.2.7. Thu thập và xử lý số liệu

Các chỉ tiêu theo dõi bao gồm tỷ lệ mẫu tạo mô sẹo, tỷ lệ mẫu tạo phôi soma, tỷ lệ mẫu bật chồi, tỷ lệ ra rễ, chiều dài rễ, số lượng rễ. Các số liệu được xử lý thống kê bằng phần mềm SPSS và Excel (*Data Analysis*).

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

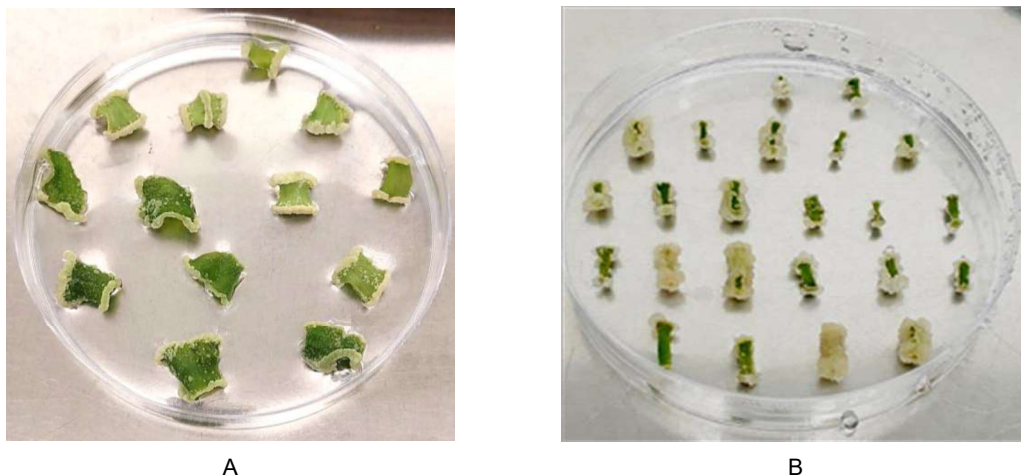
3.1. Kết quả ảnh hưởng của 2,4-D và BAP đến khả năng tạo mô sẹo

Tạo mô sẹo là một bước quan trọng trong quá trình nuôi cấy *in vitro* ở thực vật. Vai trò của 2,4-D và BAP trong quá trình hình thành mô sẹo ở một số loài keo cho kết quả tối ưu nhất đã báo cáo trước đây như *A. nilotica* với 0,4 mg/l 2,4D và 0,2 mg/l BAP (Dhabhai *et al.*, 2010), *A. sinuata* với 4,52 μ M 2,4-D và 2,22 μ M BAP (Vengadesan *et al.*, 2003), A.hybrid (BV10, BV16 và BV33) sử dụng 1 mg/l 2,4-D và 0,5 mg/l BAP (Nguyễn Thị Huyền *et al.*, 2020).

Với mục đích tạo mô sẹo các dòng keo lai BV350 và BV376, chúng tôi đã tiến hành nuôi cấy mảnh lá và đoạn thân (không chứa mắt ngủ) trên môi trường MS bổ sung 2,4-D và BAP ở các nồng độ khác nhau. Trong quá trình theo dõi nhận thấy, đoạn thân (không chứa mắt ngủ) và mảnh lá đặt trên môi trường cảm ứng tạo mô sẹo sau 2 tuần nuôi cấy nhận thấy mẫu bắt đầu cảm ứng hình thành mô sẹo tại vị trí cắt và tiếp xúc trực tiếp với môi trường. Sau 4 tuần nuôi

cây, các mẫu cây được cảm ứng tạo mô sẹo màu vàng nhạt hoặc màu trắng, tiếp tục hình thành tại các vị trí khác và gia tăng khối lượng tươi.

Tùy thuộc vào mỗi công thức thí nghiệm được bố trí mà tỷ lệ hình thành mô sẹo có sự khác nhau (hình 1).



Hình 1. Mảnh lá và đoạn thân sau 4 tuần trên môi trường cảm ứng tạo mô sẹo (A: mảnh lá và B: đoạn thân)

Kết quả bảng 1 cho thấy, công thức đối chứng (ĐC) không bổ sung 2,4-D và BAP không có khả năng cảm ứng tạo mô sẹo ở cả hai dòng keo lai, trong khi các công thức CT1-CT5 có bổ sung 2,4-D và BAP đều cảm ứng tạo mô sẹo với tỷ lệ mẫu tạo mô sẹo khác nhau. Khi kết hợp giữa 2,4-D và BAP, ở công thức CT3, tỷ lệ mẫu tạo mô sẹo từ đoạn thân đạt từ 81,11 - 84,44% và mảnh lá từ 85,56 - 87,33%, tiếp theo là công thức CT2 cho tỷ lệ tạo mô sẹo tương ứng là

74,44 - 75,56% và 76,67 - 81,12%; và công thức CT1 có tỷ lệ tương ứng là 68,89 - 71,11% và 72,22 - 74,44%. Ở công thức CT4 và CT5, khi nồng độ 2,4-D tăng lên 1,5 - 2 mg/l cho kết quả tạo mô sẹo thấp hơn ở cả hai dòng và cả hai loại vật liệu sử dụng cũng như chất lượng mô sẹo tạo thành. Trong hai dòng keo lai được sử dụng, nhận thấy với BV376 cho khả năng cảm ứng tạo mô sẹo tốt hơn so với BV350 ở cả vật liệu sử dụng là mảnh lá và đoạn thân.

Bảng 1. Kết quả ảnh hưởng 2,4-D và BAP đến tỷ lệ mẫu tạo mô sẹo (%)

CT	Chất ĐHST (mg/l)		Đoạn thân		Mảnh lá	
	2,4-D	BAP	BV350 (TB ± Sd)	BV376 (TB ± Sd)	BV350 (TB ± Sd)	BV376 (TB ± Sd)
ĐC	0	0	-	-	-	-
CT1	0,25	0,5	68,89 ± 1,5	71,11 ± 1,9	72,22 ± 1,9	74,44 ± 1,9
CT2	0,5	0,5	74,44 ± 1,5	75,56 ± 1,6	76,67 ± 1,6	81,12 ± 1,5
CT3	1	0,5	81,11 ± 1,5	84,44 ± 1,7	85,56 ± 1,5	87,33 ± 1,6
CT4	1,5	0,5	65,56 ± 1,5	68,89 ± 1,6	66,44 ± 2,7	72,22 ± 1,5
CT5	2	0,5	62,44 ± 0,6	67,78 ± 1,6	61,11 ± 1,9	65,56 ± 1,9
<i>P-value</i>			≤ 0,05	≤ 0,05	≤ 0,05	≤ 0,05

Ghi chú: TB: giá trị trung bình, Sd: sai dị.

Từ những kết quả trên cho thấy có sự ảnh hưởng của 2,4-D và BAP tới khả năng cảm ứng tạo mô sẹo từ đoạn thân và mảnh lá của hai dòng keo lai BV350 và BV376, đồng thời khả năng cảm ứng

của mỗi dòng và mỗi loại vật liệu thu được là khác nhau. Kết quả thí nghiệm cho thấy nồng độ của 2,4-D cao hay thấp đều ảnh hưởng đến tỷ lệ mẫu hình thành mô sẹo cũng như chất lượng mô sẹo.



Hình 2. Khả năng cảm ứng tạo mô sẹo từ mảnh lá sau 8 tuần nuôi cấy
(A: CT3 với 1 mg/l 2,4-D + 0,5 mg/l BAP và B: CT5 với 2 mg/l 2,4-D + 0,5 mg/l BAP)

Như vậy, sau thời gian 8 tuần nuôi cấy thu được môi trường MS bổ sung 1 mg/l 2,4-D và 0,5 mg/l BAP có tỷ lệ cảm ứng tạo mô sẹo tốt hơn so với các nồng độ còn lại trên cả 2 dòng keo lai BV350 và BV376.

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

Thidiazuron (TDZ) được xem là chất điều hòa sinh trưởng thường được sử dụng để kích thích tạo mô sẹo trong các thí nghiệm về nhân giống cho nhiều loài cây trồng (Yang *et al.*, 2006). Kết quả bảng 2 cho thấy ảnh hưởng của TDZ và

IAA đến khả năng cảm ứng phát sinh phôi soma, khi sử dụng kết hợp hai chất điều hòa sinh trưởng cho tỷ lệ mô sẹo tạo phôi soma ở đoạn thân từ 28,32% đến 58,34% và ở mảnh lá từ 34,57% đến 60,56%. Trong khi đó, công thức đối chứng không bổ sung TDZ và IAA cho tỷ lệ mô sẹo cảm ứng tạo phôi soma thấp hơn hẳn so 5 công thức còn lại ở cả đoạn thân (4,26 - 13,47%) và mảnh lá (10,25 - 15,34%). Chứng tỏ, môi trường khi bổ sung TDZ và IAA với các nồng độ khác nhau có ảnh hưởng tới tỷ lệ mô sẹo phát sinh tạo phôi soma cũng như chất lượng phôi soma thu được.

Bảng 2. Kết quả ảnh hưởng của TDZ và IAA đến tỷ lệ mô sẹo cảm ứng tạo phôi soma (%)

CT	Chất ĐHST (mg/l)		Đoạn thân		Mảnh lá	
	TDZ	IAA	BV350	BV376	BV350	BV376
ĐC	0	0	4,26 ± 1,5	13,47 ± 2,7	10,25 ± 2,7	15,34 ± 1,5
NT1	0,5	0,25	33,67 ± 1,7	51,11 ± 1,5	47,78 ± 1,5	55,56 ± 3,1
NT2	1	0,25	36,67 ± 1,9	58,34 ± 2,7	50,67 ± 2,7	60,56 ± 1,5
NT3	1,5	0,25	32,22 ± 1,6	48,94 ± 1,6	41,67 ± 2,7	55,56 ± 4,2
NT4	0,5	0,5	31,11 ± 1,5	36,67 ± 2,7	38,89 ± 3,1	44,62 ± 2,7
NT5	1	0,5	28,32 ± 1,1	34,57 ± 1,8	35,26 ± 2,1	40,36 ± 3,4
P-value			≤ 0,05	≤ 0,05	≤ 0,05	≤ 0,05

Sau 4 tuần nuôi cấy, mô sẹo bắt đầu cảm ứng với môi trường nuôi cấy, gia tăng kích thước và có sự phát sinh hình thái khác nhau ở các công thức khác nhau. Các cụm mô sẹo có màu vàng nhạt hay màu trắng chuyển sang màu vàng đậm hay màu xanh, xuất hiện các phôi hình cầu với kích thước khác nhau. Đến tuần thứ 8 - 9, sự tăng sinh khối rõ rệt và rất khác nhau ở các công thức môi trường được bố trí. Môi trường bổ sung 1 mg/l TDZ và 0,25 mg/l IAA cho kết quả tốt nhất cho quá trình cảm ứng mô sẹo phát sinh phôi soma cả từ vật liệu ban đầu là đoạn thân (36,67 - 58,34%) và mảnh lá (50,67 - 60,56%), trên hai dòng keo lai nghiên cứu. Kết quả nghiên cứu cho thấy, cả hai dòng BV350 và BV376 đều cho tỷ lệ mô sẹo cảm ứng tạo phôi soma thu được với vật liệu là mảnh lá cao hơn so với đoạn thân, đồng thời dòng BV376 có tỷ lệ tạo mô sẹo cao hơn dòng BV350 trong tất cả các công thức thí nghiệm được bố trí.

Khi sử dụng 0,25 mg/l IAA kết hợp với TDZ nồng độ 0,5; 1,0 và 1,5 (tương ứng với NT1 - NT3) cho tỷ lệ phôi soma tạo thành nằm trong khoảng 32,22% đến 58,34% ở đoạn thân và từ 41,67% đến 60,56% ở mảnh lá. Khi tăng nồng độ IAA lên 0,5 mg/l (công thức NT4 và NT5) nhận thấy tỷ lệ mô sẹo cảm ứng tạo phôi soma giảm xuống chỉ đạt 28,32% đến 36,67% ở đoạn thân và 35,26% đến 55,56% ở mảnh lá. Chất lượng phôi soma thu được bị giảm đi, phôi có màu vàng sẫm hay trắng, bông xốp và bị nhũn do hấp thụ nhiều nước.

Từ những kết quả thu được cho thấy, môi trường cảm ứng tạo phôi soma cho tỷ lệ cũng như chất lượng phôi soma tạo thành tốt nhất khi bổ sung 1 mg/l TDZ và 0,25 mg/l IAA với dòng BV376 > dòng BV350, đồng thời mô sẹo từ mảnh lá tạo phôi soma cho tỷ lệ lớn hơn từ đoạn thân.



1 mg/l TDZ + 0,25 mg/l IAA (NT2)



0,5 mg/l TDZ + 0,5 mg/l IAA (NT4)



1 mg/l TDZ + 0,5 mg/l IAA (NT5)

Hình 3. Ảnh hưởng của môi trường bổ sung TDZ và IAA cảm ứng tạo phôi soma sau 9 -12 tuần nuôi cấy

Khi so sánh với một số nghiên cứu đã được công bố trên các loài keo nhận thấy kết quả cảm ứng tạo phôi soma thu được là cao hơn hoặc tương đương. Với loài keo *A. mangium* bổ sung 2,0 mg/l TDZ và 0,25 mg/l IAA cho tỷ lệ tạo phôi soma đạt 16,41% (Xie, Hong, 2001); mẫu lá *A. arabica* sau 8 tuần nuôi cấy trên môi trường bổ sung 6,66 μ M BAP và 6,78 μ M 2,4-D cho tỷ lệ tạo phôi soma đạt 38,4% (Nanda, Rout, 2003); keo lai bổ sung 1,0 mg/l TDZ và 0,25 mg/l IAA cho tỷ lệ tạo phôi soma của 3 dòng BV10, BV16 và BV33 lần lượt là 52,6%; 54,6% và 53,3% đối với đoạn thân và 56,7%; 59,3% và 55,4% đối với mảnh lá (Nguyễn Thị Huyền *et al.*, 2020).

3.3. Kết quả ảnh hưởng của TDZ và IAA đến khả năng phát sinh chồi từ phôi soma

Kết quả của tái sinh sau 6-9 tuần nuôi cấy trên môi trường bổ sung TDZ và IAA với các nồng độ khác nhau có ảnh hưởng đến khả năng phát sinh chồi từ phôi soma (bảng 3). Các phôi soma dạng toi xóp, xuất hiện các chồi xanh có kích thước nhỏ, sau đó tiếp tục phát triển thành chồi lớn (hình 4). Đối với môi trường không bổ sung chất điều hòa sinh trưởng các phôi soma không có khả năng phát sinh chồi và bị khô, teo lại và chết sau 4 - 6 tuần nuôi cấy. Do đó, sự có mặt của TDZ và IAA trong môi trường tái sinh đã kích thích tế bào có khả năng biệt hóa thành tế bào phôi, phát triển để hình thành chồi.

Bảng 3. Kết quả ảnh hưởng của TDZ và IAA đến khả năng phát sinh chồi từ phôi soma

Công thức	Chất điều hòa sinh trưởng (mg/l)		Tỷ lệ bật chồi (%)	
	TDZ	IAA	Dòng BV350	Dòng BV376
ĐC	-	-	-	-
TN1	0,5	0,25	28,42 \pm 2,8	34,16 \pm 3,0
TN2	1	0,25	36,24 \pm 1,2	50,62 \pm 2,7
TN3	1,5	0,25	31,40 \pm 3,1	43,78 \pm 1,5
TN4	0,5	0,5	26,57 \pm 1,7	37,14 \pm 2,1
TN5	1	0,5	21,11 \pm 1,9	32,56 \pm 2,4
	<i>P-value</i>		$\leq 0,05$	$\leq 0,05$

Kết quả bảng 3 cho thấy, môi trường bổ sung 1 mg/l TDZ kết hợp với 0,25 mg/l IAA thu được tỷ lệ bật chồi cao hơn so với các công thức được bố trí, đạt 36,24% đối với dòng BV350 và đạt 50,62% đối với dòng BV376. Sau 6 - 9 tuần nuôi cấy, chồi keo tái sinh màu xanh, mập và đều nhau, đảm bảo chất lượng cho thí nghiệm nhân nhanh chồi tiếp theo. Đồng thời, kết quả cũng cho thấy khả năng phôi soma tái sinh tạo chồi của dòng keo lai BV376 cao hơn so với BV350 trong cùng một điều kiện nghiên cứu.

Khi kết hợp IAA 0,25 mg/l với TDZ tăng lên 1,5 mg/l cũng như khi kết hợp IAA 0,5 mg/l với TDZ 0,5 - 1,0 mg/l thì tỷ lệ bật chồi ở cả hai dòng keo lai được nghiên cứu thu được đều

giảm xuống. Dòng BV350 giảm xuống tương ứng với các công thức TN3, TN4 và TN5 lần lượt là 31,40%, 26,57% và 21,11%; dòng BV376 thu được tương ứng là 43,78%, 37,14% và 32,56%. Chứng tỏ, khi tăng nồng độ TDZ hoặc nồng độ IAA lên cao sẽ gây ức chế khả năng bật chồi từ phôi soma ở hai dòng keo lai BV350 và BV376.

So với một số nghiên cứu trước đây, tỷ lệ tái sinh của các dòng keo lai gồm BV10, BV16 và BV33 nằm trong khoảng 56,7 - 58,4% khi cùng sử dụng phương pháp tái sinh thông qua phôi soma nuôi cấy trong môi trường bổ sung 1 mg/l TDZ kết hợp với 0,25 mg/l IAA (Nguyễn Thị Huyền *et al.*, 2020). Keo *A. sinuata* có tỷ lệ mẫu

bật chồi từ mô sẹo của lá đạt tới 75% khi nuôi cấy trên môi trường 1/2 MS có bổ sung 10%

nước dừa, 13,3 μM BAP và 2,5 mg/l μM Zeatin (Vengadesan *et al.*, 2003).



6 tuần trên môi trường tái sinh



8 tuần trên môi trường tái sinh



10 tuần trên môi trường tái sinh

Hình 4. Phôi soma phát triển trên môi trường tái sinh bổ sung 1 mg/l TDZ và 0,25 mg/l IAA

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

Các cụm soma và mô sẹo xuất hiện các chồi cây con tiếp tục được chuyển sang môi trường nhân nhanh chồi, nhằm tạo ra số lượng lớn chồi có chất lượng tốt và sử dụng cho các mục đích khác nhau. Sau 9 tuần nuôi cấy nhận thấy, các

cụm chồi được nhân trên môi trường MS có bổ sung 1,5 mg/l BAP và NAA ở nồng độ khác nhau cho kết quả nhân nhanh và chất lượng chồi thu được là khác nhau (bảng 4). Chứng tỏ, BAP và NAA có tác dụng quyết định đến nhân nhanh chồi của dòng keo lai được tái sinh từ phôi soma.

Bảng 4. Kết quả ảnh hưởng của BAP và NAA đến khả năng nhân chồi

CT	Chất ĐHST (mg/l)		Dòng BV350		Dòng BV376	
	BAP	NAA	Số chồi/cụm	Chất lượng chồi	Số chồi/cụm	Chất lượng chồi
ĐC	-	-	1,97 ± 0,2	+	3,66 ± 0,4	+
TN1	1,5	0,25	5,73 ± 0,5	++	6,37 ± 0,3	++
TN2	1,5	0,5	5,81 ± 0,3	+++	6,92 ± 0,5	+++
TN3	1,5	0,75	5,46 ± 0,4	++	6,03 ± 0,3	++
TN4	1,5	1	5,17 ± 0,6	++	5,93 ± 0,4	++
TN5	1,5	1,5	5,03 ± 0,2	++	5,34 ± 0,1	++
<i>P-value</i>			≤ 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)

Công thức ĐC không bổ sung chất điều hòa sinh trưởng vào môi trường, do đó hệ số nhân chồi thu được không cao chỉ đạt 1,97 chồi/cụm (BV350) đến 3,66 chồi/cụm (BV376) với chồi bé, yếu và không đồng đều nhau. Hệ số nhân chồi tăng dần khi 1,5 mg/l BAP kết hợp NAA với nồng độ tăng lên. Tuy nhiên, khi nồng độ NAA tăng cao (trên 0,75 mg/l) thì số lượng chồi hình thành bắt đầu giảm và chất lượng chồi cũng giảm. Hiệu quả nhân chồi tốt nhất được ghi nhận tại công thức TN2 bổ sung 1,5 mg/l BAP và 0,5 mg/l NAA. Tại công thức này, số chồi trung bình được tạo thành ở dòng BV350 là 5,81 chồi/cụm và BV376 là 6,92 chồi/cụm; chồi mập mập, khỏe và độ đồng đều nhau là rất cao, mỗi chồi có 4 - 5 lá và xanh.

Việc bổ sung BAP và NAA vào môi trường nuôi cấy được ghi nhận là rất cần thiết cho giai đoạn nhân nhanh *in vitro* ở các nghiên cứu trên đối tượng keo. Bổ sung 1,5 mg/l BAP và 0,5 mg/l NAA được ghi nhận cho hệ số nhân chồi cao nhất và chất lượng chồi tốt nhất ở Keo lá tràm là 6,0 chồi/cụm (Triệu Thị Thu Hà *et al.*, 2014). Trên keo lai, Nguyễn Thị Huyền và đồng tác giả (2020) chỉ ra rằng cũng ở nồng độ 1,5 mg/l BAP và 0,5 mg/l NAA cho số lượng chồi hình thành và chất lượng chồi thu được tốt nhất so với các công thức khảo sát khác ở cả ba dòng keo lai BV10, BV16 và BV33 được tái sinh từ phôi soma lần lượt là 6,9 chồi/cụm, 7,2 chồi/cụm và 6,5 chồi/cụm.



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

3.5. Kết quả ảnh hưởng của IBA đến khả năng ra rễ tạo cây hoàn chỉnh

Auxin là một chất điều hòa sinh trưởng có ảnh hưởng rất lớn đến sự hình thành rễ trong điều kiện *in vitro* và với mỗi loài cây sẽ cảm ứng với các loại Auxin khác nhau ở các nồng độ khác nhau. Trong một số nghiên cứu trước đây đã cho thấy IBA là Auxin phù hợp cho quá trình kích thích hình thành rễ *in vitro* của nhiều loài keo (Đoàn Thị Mai *et al.*, 2009; Cán Thị Lan *et al.*, 2017; Nguyễn Thị Huyền *et al.*, 2020).

Trong nghiên cứu này, nồng độ IBA khác nhau được sử dụng để khảo sát ảnh hưởng của Auxin đến quá trình hình thành rễ tạo cây hoàn chỉnh

của dòng BV350 và BV376 được tái sinh từ phôi soma. Kết quả ở bảng 5 cho thấy, các công thức có bổ sung IBA đều có khả năng kích thích tạo rễ sau 2 tuần nuôi cấy với tỷ lệ ra rễ nằm trong khoảng 74,44 - 87,62% ở dòng BV350 và từ 84,44 - 91,34% ở dòng BV376. Với các công thức khác nhau thì số rễ và chiều dài rễ thu được cũng khác nhau. Ở môi trường nuôi cấy bổ sung 1,5 mg/l IBA cho hiệu quả tạo rễ tốt nhất, số lượng rễ hình thành nhiều nhất, dòng BV350 trung bình 2,82 rễ và chiều dài đạt 3,58 cm; dòng BV376 trung bình 3,13 rễ và chiều dài đạt 3,61 cm. Công thức RR2 này số rễ tạo thành đều to, khỏe và có độ đồng đều.

Bảng 5. Kết quả ảnh hưởng IBA đến khả năng ra rễ

CT	IBA (mg/l)	BV350			BV376		
		Tỷ lệ ra rễ (%)	Số rễ trung bình (cái)	Chiều dài rễ (cm)	Tỷ lệ ra rễ (%)	Số rễ trung bình (cái)	Chiều dài rễ (cm)
ĐC	-	0	0	0	0	0	0
RR1	1	74,44	2,42	3,05	84,44	2,18	3,38
RR2	1,5	87,62	2,82	3,58	91,34	3,13	3,61
RR3	2	78,51	2,38	3,1	86,23	2,33	2,93
<i>P-value</i>		≤ 0,05	≤ 0,05	≤ 0,05	≤ 0,05	≤ 0,05	≤ 0,05

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 thông thường đang sử dụng rộng rãi trong nghiên cứu và sản xuất.



Hình 6. Các chồi keo lai trên môi trường ra rễ bổ sung 1,5 mg/l IBA

IV. KẾT LUẬN

Môi trường MS bổ sung 1 mg/l 2,4-D kết hợp 0,5 mg/l BAP thích hợp cho tạo mô sẹo từ mảnh lá và đoạn thân (không có mắt ngủ). Các mô sẹo được đặt trên môi trường nuôi cấy bổ sung 1 mg/l TDZ kết hợp 0,25 mg/l IAA phù hợp để cảm ứng tạo phôi soma. Đồng thời, các phôi soma cũng được cảm ứng tạo chồi trên môi trường nuôi cấy bổ sung 1 mg/l TDZ kết hợp 0,25 mg/l IAA. Các chồi tái sinh được nhân nhanh trên môi trường nuôi cấy có bổ sung 1 mg/l BAP kết hợp 0,5 mg/l NAA. Môi trường

có bổ sung 1,5 mg/l IBA để phù hợp kích thích ra rễ tạo cây hoàn chỉnh. Nghiên cứu này đã tạo cơ sở khoa học cho việc thiết lập quy trình nhân giống dòng keo BV350 và BV376 thông qua tái sinh chồi từ phôi soma tạo từ mảnh lá và đoạn thân *in vitro* trong tương lai, đồng thời bổ sung thêm một nguồn vật liệu mới vào nhân giống *in vitro* của các dòng keo này. Kết quả nghiên cứu này có thể được sử dụng để nhân giống rộng rãi keo BV350 và BV376, tạo nguồn cây giống số lượng lớn, chất lượng tốt, phục vụ cho công tác trồng rừng với quy mô lớn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Cán Thị Lan, 2017. Báo cáo tổng kết Đề tài: Nghiên cứu nhân nhanh một số giống keo và bạch đàn mới bằng công nghệ tế bào thực vật, Báo cáo tổng kết đề tài, Viện Khoa học Lâm nghiệp Việt Nam.
2. Dhabhai, K., Sharma, M., & Batra, A., 2010. *In vitro* clonal propagation of *Acacia nilotica* (L.)-A nitrogen fixing tree 2(3): 6-11.
3. Đoàn Thị Mai và Lê Sơn, 2011. Báo cáo tổng kết đề tài KHCN cấp Nhà nước “Nghiên cứu nhân nhanh giống keo lai tự nhiên, keo lai nhân tạo, Bạch đàn uro, bạch đàn lai nhân tạp (mới tạo chọn) và Lát hoa bằng công nghệ tế bào”. Viện Khoa học Lâm nghiệp Việt Nam.
4. 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: 905-910.
5. 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.
6. Lê Đình Khả, 2003. Nghiên cứu chọn tạo giống và nhân giống cho một số loài cây trồng rừng chủ lực ở Việt Nam. NXB Nông nghiệp, Hà Nội, 292 trang.
7. Lê Sơn, 2013. Hoàn thiện quy trình nhân nhanh bằng nuôi cấy mô cho 6 giống keo kai đã được công nhận. Báo cáo dự án SXTN cấp Nhà nước, Viện Khoa học Lâm nghiệp Việt Nam.
8. Nanda, R. M., & Rout, G. R., 2003. In vitro somatic embryogenesis and plant regeneration in *Acacia arabica*. Plant cell, tissue and organ culture, 73: 131-135.

9. Nguyễn Thị Huyền, Trần Thị Thu Hà, Hà Thị Huyền Ngọc, Nguyễn Thị Việt Hà, Lê Thị Thủy, Lê Sơn, 2020. Nghiên cứu tái sinh cây keo lai (*Acacia hybrid*) thông qua mô sẹo và phát sinh phôi soma phục vụ chuyển gen. Tạp chí Khoa học Lâm nghiệp số 4/2020, 30-40.
10. Phí Hồng Hải, 2022. Cần cách nhìn đúng về giá trị cây keo. <https://nongnghiep.vn/can-cach-nhin-dung-ve-gia-tri-cay-keo-d319701>. Ngày đăng: 4 tháng 4 năm 2022.
11. Rout, G. R., Samantaray, S., & Das, P., 1995. Somatic embryogenesis and plant regeneration from callus culture of *Acacia catechu*-a multipurpose leguminous tree. *Plant cell, tissue and organ culture*, 42: 283-285.
12. 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.
13. Văn Thu Huyền, Mai Thị Phương Thúy, Đồng Thị Ứng, Nguyễn Anh Dũng, Lê Thị Hoa, Lưu Thị Quỳnh, Hoàng Thị Hồng Hạnh, Đỗ Hữu Sơn, Nguyễn Đức Kiên, Đỗ Tiến Phát, Lê Sơn, 2021. Nghiên cứu nhân giống các dòng keo lai năng suất cao BV376, BV586, BB055 bằng phương pháp nuôi cấy mô. Tạp chí Khoa học Lâm nghiệp số 3/2021:/2021, trang 22-32.
14. Vengadesan G., Ganapathi A., Amutha S., . & Selvaraj N., 2003. High-frequency plant regeneration from cotyledoncallus of *Acacia sinuata* (Lour.) Merr. *In vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, 39: 28-33.
15. Xie, D. Y., & Hong, Y., 2001. Regeneration of *Acacia mangium* through somatic embryogenesis. *Plant Cell Reports*, 20: 34-40.
16. Yang, M., Xie, X., He, X., & Zhang, F., 2006. Plant regeneration from phyllode explants of *Acacia crassicarpa* via organogenesis. *Plant cell, tissue and organ culture*, 85: 241-245.

Email tác giả liên hệ: leson@vafs.gov.vn

Ngày nhận bài: 12/09/2024

Ngày phản biện đánh giá và sửa chữa: 25/09/2024; 02/10/2024

Ngày duyệt đăng: 08/10/2024