

DOI:10.22144/ctu.jvn.2022.132

## KHẢO SÁT KHẢ NĂNG TẠO MÔ SẸO TỪ CÂY LẠC (*Arachis hypogaea* L.) PHỤC VỤ CHO CÔNG TÁC VI NHÂN GIỐNG

Chiêm Tiêu Quyên<sup>1</sup>, Hồng Đức Ân<sup>1</sup>, Nguyễn Ngọc Khánh<sup>1</sup>, Lê Thị Thủy Tiên<sup>1</sup> và Lê Thanh Khang<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Bộ môn Công nghệ Sinh học, Khoa Kỹ thuật Hóa học, Trường Đại học Bách Khoa Thành phố Hồ Chí Minh

<sup>2</sup>Viện Kỹ thuật Công nghệ cao NTT, Trường Đại học Nguyễn Tất Thành

\*Người chịu trách nhiệm về bài viết: Lê Thanh Khang (email: lthanhkhang@gmail.com)

### Thông tin chung:

Ngày nhận bài: 12/05/2022

Ngày nhận bài sửa: 14/06/2022

Ngày duyệt đăng: 07/07/2022

### Title:

Studying the possibility creating callus from peanut (*Arachis hypogaea* L.) for micropropagation

### Từ khóa:

*Arachis hypogaea* L. giống L14, mô sẹo, nuôi cấy mô, sự khử trùng, vi nhân giống

### Keywords:

*Arachis hypogaea* L. (L14), callus, *in vitro* culture, micro propagation, sterilization

### ABSTRACT

In this study, petioles, leaf blades, juvenile root, and epicotyls of L14 peanut were used as source materials for micropropagation. The results revealed that dual disinfection with 2.5 percent NaOCl and 0.5 mL Tween20 solution for 5 minutes for the first time and for 15 minutes for the second time is an efficient sterilization method used for peanut seed. On MS medium supplemented with 10 mg/L 2,4-D, the proportion of callus formation from leaf blades was highest (100%). The structure and color of their callus were spongy and green in treatments supplemented with 2,4-D concentration of 5 mg/L, leaf-induced callus showed the highest shoot regenerating ability on medium treated with 2,4-D 1.25 mg/L and BA 1 mg/L. The highest rooting rate achieved on medium supplemented with NAA 0.2 mg/L and with non-reducing MS content (100%).

### TÓM TẮT

Nghiên cứu này được thực hiện với nguồn vật liệu từ cuống lá, phiến lá, rễ mầm và trục thượng diệp của giống lạc L14. Kết quả nghiên cứu cho thấy công thức khử trùng hiệu quả đối với mẫu hạt lạc là khử trùng kép bằng dung dịch NaOCl 2,5% và 0,5ml Tween20 trong thời gian lần 1 là 5 phút, lần 2 là 15 phút, giữa 2 lần mẫu được rửa sạch bằng nước cất tiệt trùng ít nhất 3 lần. Sau 3 tuần nuôi cấy trên nền môi trường MS có bổ sung 10 mg/L 2,4-D, mẫu cấy từ phiến lá cảm ứng tạo mô sẹo cao nhất: 100%. Môi trường 2,4-D nồng độ 5 mg/L cho mô sẹo dạng chắc và xanh, mô sẹo cảm ứng từ phiến lá tạo chồi cao nhất trên môi trường bổ sung 2,4-D 1,25 g/L và BAP 1 mg/L. Tỷ lệ tạo rễ từ chồi cảm ứng từ mô sẹo phiến lá cao nhất trên môi trường bổ sung NAA 0,2 mg/L và với hàm lượng đa lượng MS 100%.

## 1. GIỚI THIỆU

Lạc (*Arachis hypogaea* L.) là cây trồng phổ biến ở đồng bằng sông Hồng, Đông Nam Bộ và đồng bằng sông Cửu Long của Việt Nam. Lạc được sử dụng cho nhiều mục đích khác nhau như làm nguyên liệu cho công nghiệp, làm thức ăn cho con người và gia súc, làm phân bón cũng như cải tạo đất (Thùy và ctv., 2013). Lạc là một loại thực phẩm có giá trị dinh

dưỡng cao và là nguồn thức ăn giàu lipid, protein (Palanivel et al., 2002). Ở nước ta, lạc trồng rải rác khắp cả nước, trên nhiều loại đất và địa hình khác nhau. Diện tích trồng lạc tăng nhanh trong gần 30 năm trở lại đây, đạt khoảng 246.000 ha (Thùy và ctv., 2013). Cây lạc quan trọng về mặt kinh tế trong nền nông nghiệp thế giới, sự chú trọng trong sản xuất đã chuyển từ đầu vào tối thiểu sang đầu vào

cường độ cao, dẫn đến năng suất cao và chất lượng hạt giống được cải thiện (Bhavya et al., 2013).

Gần đây, kỹ thuật di truyền thực vật tạo ra cây trồng với các đặc điểm mong muốn đã và đang phát triển để phục vụ cho việc sử dụng thực vật của nhân loại (Kiên, 2002). Nuôi cấy mô sẹo cung cấp một loạt các ứng dụng trong dược lý và dược phẩm, cũng như trong nông nghiệp và làm vườn. Nuôi cấy mô sẹo có thể được sử dụng để tạo ra các chất chuyển hóa thứ cấp có hoạt tính sinh học và tạo ra các cây trồng có khả năng chống chịu mặn, hạn, bệnh và sâu bệnh. Mặc dù, tiềm năng của công nghệ nuôi cấy thực vật chưa được khai thác hết, nhưng đã đến lúc phải phát triển và đưa ra thị trường nhiều sản phẩm dựa trên mô sẹo (Thạch và ctv., 2009). Năm 2002, Palanivel và các cộng sự đã đánh giá hiệu quả của quá trình cảm ứng mô sẹo và tái sinh cây con từ các phân đoạn cây một lá mầm trưởng thành của giống lạc VRI-2 và VRI-3 (Palanivel et al., 2002). Năm 2011, Iqbal và các cộng sự đã đưa ra quy trình hiệu quả và đơn giản để tái sinh cây lạc thông qua hình thành phôi trực tiếp và cảm ứng mô sẹo (Iqbal et al., 2011). Thủy và ctv. (2013) đã xử lý mô sẹo của giống lạc L18 bằng thối khô và bằng kết hợp chiếu xạ với thối khô ở ngưỡng chọn lọc thối khô 9 giờ kết hợp với chiếu xạ tia gamma 2 krad, kết quả đã tạo được 198 dòng cây lạc có khả năng chịu hạn.

Trước đây, nhiều nghiên cứu đã thành công trong việc xây dựng hệ thống tái sinh và chuyển gen từ mô sẹo lạc. Hiện nay, đa phần các nghiên cứu nuôi cấy mô sẹo lạc chủ yếu từ phôi. Tuy nhiên, việc nuôi cấy mô sẹo từ phôi sẽ tạo ít mô sẹo hơn số mô sẹo được cảm ứng từ các bộ phận khác của cây lạc. Vì vậy, nghiên cứu này được tiến hành nhằm tạo nguồn mẫu *in vitro* từ các bộ phận của cây lạc để tìm nguồn mẫu cây tối ưu cho việc thực hiện quy trình vi nhân giống cây lạc.

## 2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Nguyên liệu

Hạt giống lạc L14 có nguồn gốc từ Viện Cây lương thực và Cây thực phẩm (thành phố Hải Dương, tỉnh Hải Dương). Môi trường nuôi cấy là MS (Murashige & Skoog, 1962) với 20 g/L sucrose, 10 g/L agar và bổ sung chất điều hòa sinh trưởng khác nhau tùy theo mục đích thí nghiệm. Điều kiện nuôi cấy: nhiệt độ 26 °C - 28°C và thời gian chiếu sáng là 16 giờ/ngày.

### 2.2. Tạo mẫu cây vô trùng

Hạt lạc được rửa sạch dưới vòi nước 15 – 30 phút. Trước khi đem vào tủ cấy để khử trùng, hạt lạc

được lau sạch với cồn bông thấm cồn 70°. Sau đó, chúng được kẹp tách bỏ vỏ lụa.

Mẫu được khử trùng sơ bộ bằng cồn 70° trong 30 giây, sau đó rửa sạch bằng nước cất khử trùng. Trong nghiên cứu này, NaOCl 2,5% và 0,5 mL Tween20 được sử dụng để khử trùng kẹp mẫu. Thí nghiệm được bố trí theo 7 nghiệm thức sau:

Nghiệm thức 1: Khử trùng trong 10 phút.

Nghiệm thức 2: Khử trùng trong 15 phút.

Nghiệm thức 3: Khử trùng trong 20 phút.

Nghiệm thức 4: Khử trùng trong 25 phút.

Nghiệm thức 5: Khử trùng lần 1 trong 5 phút + lần 2 trong 10 phút.

Nghiệm thức 6: Khử trùng lần 1 trong 5 phút + lần 2 trong 15 phút.

Nghiệm thức 7: Khử trùng lần 1 trong 5 phút + lần 2 trong 20 phút.

Sau khi khử trùng lần 1, mẫu được rửa sạch bằng nước cất 3 lần trước khi tiến hành khử trùng lần 2. Sau khi khử trùng lần 2, mẫu được rửa sạch bằng nước cất ít nhất 6 lần, sau đó để khô nước trước khi cấy vào môi trường MS.

Chỉ tiêu đánh giá: tỉ lệ mẫu nhiễm (%); tỉ lệ mẫu vô trùng và còn sống (%) và tỉ lệ mẫu vô trùng và chết (%)

Thời gian đánh giá: sau 2 tuần nuôi cấy.

### 2.3. Khảo sát khả năng tạo mô sẹo từ các bộ phận mẫu cây khác nhau trên cây lạc

Các bộ phận mẫu cây gồm cuống lá, phiến lá, rễ mầm và trục thượng diệp của cây lạc được nuôi *in vitro* 2 tuần tuổi và được sử dụng làm vật liệu cho thí nghiệm. Mỗi bộ phận mẫu cây được cắt với kích thước khoảng 0,3 - 0,5 cm. Riêng lá được cắt thành những mảnh kích thước 0,5 x 0,5 cm. Sau đó, mẫu được cấy lên môi trường tạo mô sẹo MS với 20 g/L sucrose, 10 g/L agar và 2,4-D 10 mg/L. Mỗi nghiệm thức lặp lại 6 lần, mỗi lần lặp lại là 1 bình nuôi với 5 mẫu. Thời gian ghi nhận số liệu là 1 tuần/lần, trong thời gian 3 tuần.

### 2.4. Ảnh hưởng của 2,4-D và BAP lên sự hình thành mô sẹo và tạo chồi từ phiến lá lạc L14

Mẫu cây phiến lá được nuôi cấy trên môi trường MS bổ sung các nồng độ auxin và cytokinin khác nhau. Thí nghiệm được bố trí theo thể thức hoàn toàn ngẫu nhiên với 2 nhân tố là các nồng độ 2,4-D (1,25; 2,5; 5 và 10 mg/L) và BAP (0; 0,5 và 1 mg/L).

Mỗi nghiệm thức lặp lại 10 lần, mỗi lần lặp lại là 1 bình nuôi với 5 mẫu phiến lá.

Chỉ tiêu theo dõi:

- Tỷ lệ tạo mô sẹo (%): (tổng số mẫu tạo mô sẹo/tổng số mẫu cây) x 100.
- Tỷ lệ tạo chồi (%): (tổng số mẫu tạo chồi/tổng số mô sẹo) x 100.

Thời gian ghi nhận số liệu: 1 tuần/lần trong thời gian 4 tuần.

**2.5. Ảnh hưởng của NAA và khoáng đa lượng đến sự tạo rễ của chồi phát triển từ mô sẹo phiến lá lạc L14**

Mẫu mô sẹo từ lá lạc L14 tạo chồi được cấy vào môi trường MS có bổ sung các nồng độ NAA và hàm lượng khoáng khác nhau. Thí nghiệm được bố trí theo thể thức hoàn toàn ngẫu nhiên 2 nhân tố là nồng độ NAA (0; 0,1; 0,2 và 0,4 mg/L) và hàm lượng khoáng đa lượng (MS và 1/2 MS) với 8 nghiệm thức. Mỗi nghiệm thức lặp lại 10 lần, mỗi lần 1 bình nuôi, mỗi bình nuôi với 5 mẫu.

Chỉ tiêu theo dõi: tỉ lệ tạo rễ (%): (số chồi tạo rễ/tổng số chồi) × 100

Chỉ tiêu ghi nhận ở thời điểm 2 và 4 tuần sau khi cấy (SKC).

**2.6. Thống kê phân tích số liệu**

Kết quả được phân tích thống kê bằng phần mềm Minitab 16.0. Kết quả thí nghiệm được biểu thị bằng giá trị trung bình cộng/trừ độ lệch chuẩn. Giá trị trung bình giữa các mẫu thử được so sánh bằng phép thử Tukey. Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê khi  $p < 0,05$ .

**3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN**

**3.1. Tạo mẫu sạch *in vitro***

Trong kỹ thuật nuôi cấy mô tế bào thực vật, khâu đầu tiên rất quan trọng là xác định vật liệu nuôi cấy và phương pháp khử trùng thích hợp (Barna & Waklu, 1994). Phương pháp khử trùng thích hợp phải đảm bảo tỉ lệ nhiễm thấp, tỉ lệ mẫu sống cao, mô nuôi cấy sinh trưởng tốt (Bhatia et al., 1985). Có nhiều hoá chất khác nhau được sử dụng để khử trùng mô nuôi cấy:  $Ca(OCl)_2$ , NaOCl,  $HgCl_2$ ,  $H_2O_2$ ,... (Cheng et al., 1992). Trong nghiên cứu này, dung dịch NaOCl 2,5% và 0,5 mL Tween20 được sử dụng trong thể tích 200 mL để khử trùng mẫu trong khoảng thời gian khác nhau. Kết quả khử trùng được trình bày ở Bảng 1:

**Bảng 1. Hiệu quả khử trùng với các phương thức khác nhau (%)**

Nghiệm thức	Thời gian xử lý NaOCl 2,5% (phút)		Số mẫu	Tỉ lệ mẫu sạch		Tỉ lệ mẫu nhiễm (%)
	Lần 1	Lần 2		Mẫu sống (%)	Mẫu chết (%)	
1	10	-	10	20	10	70
2	15	-	10	30	10	60
3	20	-	10	50	30	20
4	25	-	10	20	70	10
5	5	10	10	50	10	40
<b>6</b>	<b>5</b>	<b>15</b>	<b>10</b>	<b>60</b>	<b>20</b>	<b>20</b>
7	5	20	10	30	60	10

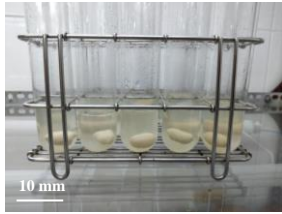
Kết quả ở Bảng 1 cho thấy, đối với khử trùng đơn (1 lần), khi thời gian xử lý càng dài (từ 10 phút đến 20 phút) thì tỉ lệ mẫu vô trùng và còn sống càng tăng lên (từ 20% đến 50%). Tuy nhiên, khi tăng thời gian xử lý NaOCl 2,5% lên 25 phút thì tỉ lệ mẫu sống vô trùng lại giảm (từ 50% xuống còn 20%). Thời gian khử trùng mẫu kéo dài (25 phút) làm tỉ lệ mẫu nhiễm giảm rõ rệt nhưng tỉ lệ mẫu chết lại tăng lên dẫn đến giảm hiệu quả khử trùng.

Đối với khử trùng kép (2 lần: lần 1 khử trùng bằng NaOCl 2,5% trong 5 phút, lần 2 tăng dần thời gian khử trùng bằng NaOCl 2,5% từ 10 đến 20 phút), kết quả cũng cho thấy, khi tăng thời gian khử trùng lần 2 từ 10 đến 20 phút thì tỉ lệ mẫu nhiễm giảm rõ rệt (từ 40% xuống còn 10%), tỉ lệ mẫu sạch sống đạt cao nhất ở nghiệm thức 6 (lần 1: 5 phút, lần

2: 15 phút) đạt 60%, tỉ lệ mẫu nhiễm còn lại 20%. Khi tăng thời gian khử trùng lần 2 lên 20 phút, tỉ lệ mẫu nhiễm cũng giảm còn 10%. Tuy nhiên, tỉ lệ mẫu sạch sống cũng giảm chỉ còn 30%, tỉ lệ mẫu chết tăng cao lên đến 60%, đồng thời quan sát mẫu sạch sống thấy có hiện tượng hóa nâu và khả năng tạo sẹo kém.

Khi so sánh hiệu quả của việc khử trùng đơn và khử trùng kép cho thấy: với cùng khoảng thời gian xử lý hoá chất khử trùng, hiệu quả khử trùng kép cao hơn so với khử trùng đơn. Điều này thể hiện rõ ràng ở nghiệm thức 3 và nghiệm thức 6, với cùng tổng thời gian khử trùng là 20 phút nhưng công thức khử trùng kép cho tỉ lệ mẫu sạch sống cao hơn (60% so với 50%), tỉ lệ mẫu nhiễm như nhau (20%) và tỉ lệ mẫu chết giảm so với khử trùng đơn (20% so với

30%). Đặc biệt, khi quan sát hình thái mẫu sạch sống, có thể thấy, mẫu được khử trùng kép có hình thái trắng, không có hiện tượng hóa nâu như đối với các mẫu được khử trùng đơn (Hình 1). Điều này có thể được lý giải như sau: đối với khử trùng đơn, việc sử dụng hóa chất khử trùng duy nhất 1 lần trong thời gian kéo dài có thể gây tổn thương đối với các tế bào thực vật, đặc biệt là những tế bào còn non, dẫn đến tình trạng tỉ lệ mẫu chết cao và sức sống của các mẫu sạch giảm. Đối với khử trùng kép, việc chia thời gian khử trùng thành 2 lần (giữa 2 lần rửa sạch bằng nước cất ít nhất 3 lần) có tác dụng làm giảm phản ứng gây tổn thương đối với các tế bào thực vật. Đồng thời, lần khử trùng thứ nhất có thể loại bỏ các chất bẩn còn bám trên bề mặt mẫu, điều này làm tăng hiệu quả khử trùng lần 2 (Daimon & Mii, 1991).



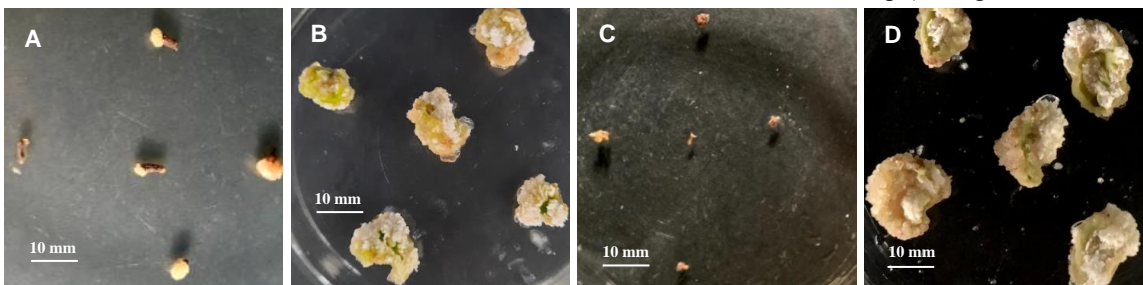
**Hình 1. Hình thái mẫu sạch sống**

Như vậy, công thức khử trùng hiệu quả đối với hạt lạc là khử trùng kép bằng dung dịch NaOCl 2,5% và 0,5 mL Tween20 trong thời gian lần 1 là 5 phút, lần 2 là 15 phút, giữa 2 lần mẫu được rửa sạch bằng nước cất tiệt trùng ít nhất 3 lần.

### 3.2. Sự tạo mô sẹo từ các bộ phận khác nhau ở cây lạc

Tái sinh cây *in vitro* từ các bộ phận khác nhau của cây trồng trong ống nghiệm (cây mầm) đã và đang nhận được sự quan tâm đáng kể. Nhiều nhà nghiên cứu đã sử dụng các bộ phận khác nhau của cây mầm được trồng trong ống nghiệm làm mẫu cây để cải thiện phương pháp vi nhân giống cho nhiều loài thực vật (Lavanya et al., 2014; Aruna & Niranjana, 2016). Các mẫu vô trùng được cấy vào môi trường MS bổ sung 2,4-D 10 mg/L (Paduchuri

et al., 2010). Sau 21 ngày nuôi cấy, kết quả ở Bảng 2 cho thấy phần lớn các mẫu cấy đã cảm ứng với môi trường và tạo thành mô sẹo. Tỉ lệ tạo sẹo khác nhau tùy theo các bộ phận nuôi cấy, trong đó, rễ mầm không có khả năng tạo sẹo, lá có tỉ lệ tạo sẹo 100%, tiếp theo là trục thượng diệp rồi đến cuống lá (Hình 2A). Trong khi đó, sau 7 ngày nuôi cấy phiến lá và trục thượng diệp, các mẫu bắt đầu gia tăng kích thước, sau 21 ngày thì bắt đầu hình thành mô sẹo. Tỉ lệ mẫu tạo mô sẹo cao nhất đạt 100% ở phiến lá và  $90,67 \pm 8,33\%$  ở trục thượng diệp. Bên cạnh đó, đa số mẫu cấy từ phiến lá tạo mô sẹo là những khối có màu xanh, trong khi mẫu cấy từ trục thượng diệp tạo mô sẹo là những khối có màu trắng (Hình 2B). So với mẫu cấy là phiến lá thì mẫu cấy trục thượng diệp có thời gian cảm ứng tạo sẹo dài, nhưng cũng đạt khá cao và cao hơn so với cuống lá. Tỉ lệ tạo mô sẹo của trục thượng diệp thấp hơn so với mẫu phiến lá, nhưng cũng đạt khá cao và cao hơn so với cuống lá ( $74,67 \pm 2,31\%$ ). Về hình thái, các mô sẹo tạo thành từ cuống lá có màu trắng, khối rời (Hình 2A). Như vậy, sau 21 ngày nuôi cấy, đa số các mẫu cấy đều có biểu hiện tạo mô sẹo trên hầu hết các mẫu cấy là cuống lá, phiến lá và trục thượng diệp của cây lạc. Tuy nhiên, thời gian cảm ứng tạo mô sẹo và tỉ lệ tạo mô sẹo ở phiến lá là cao nhất so với cuống lá, rễ mầm và trục thượng diệp. Kết quả này khá phù hợp với nghiên cứu của Limbua et al. (2019). Mặt khác, theo kết quả nghiên cứu, trên 4 loại mẫu cấy thì phiến lá là cho tỉ lệ mẫu tạo mô sẹo cao nhất. Đến giai đoạn 21 ngày SKC, hầu như không có sự tạo mô sẹo tăng thêm ở các mẫu cấy. Qua 21 ngày theo dõi và ghi nhận kết quả, sự tạo mô sẹo ở cả 4 loại mẫu cấy không khác biệt so với thời điểm 7 ngày SKC. Tuy nhiên, có sự thay đổi kích thước và màu sắc mô sẹo. Đối với cuống lá, mô sẹo chuyển từ màu xanh sang màu trắng. Trên phiến lá, mô sẹo phát triển tốt, một số mô sẹo màu trắng chuyển dần sang màu xanh. Đối với trục thượng diệp, màu sắc mô sẹo chuyển từ màu xanh sang màu trắng. Nhìn chung, phiến lá tạo mô sẹo tốt hơn cuống lá, đa số cho mô sẹo chặt, có màu xanh là các mô sẹo dễ dàng tái sinh chồi hơn so với mô sẹo xốp (Lượng & Tiên, 2002).



**Hình 2. Mô sẹo 21 ngày SKC. A: cuống lá. B: phiến lá. C: rễ mầm. D: trục thượng diệp.**

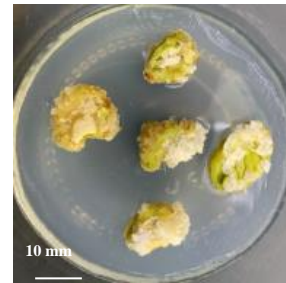
**Bảng 2. Tỷ lệ (%) mẫu tạo mô sẹo của cuống lá, phiến lá, rễ mầm và trực thượng diệp cây lạc 3 tuần sau cấy trên môi trường có 2,4-D 10 mg/L**

Nguyên liệu	Tỷ lệ mẫu tạo mô sẹo (%)	Đặc điểm mô sẹo
Cuống lá	74,67 ± 2,31 <sup>a</sup>	Trắng, khối rời
Phiến lá	100 ± 0 <sup>b</sup>	Xanh, khối chặt
Rễ mầm	-	Không tạo mô sẹo
Trực thượng diệp	90,67 ± 8,33 <sup>b</sup>	Trắng, khối chặt

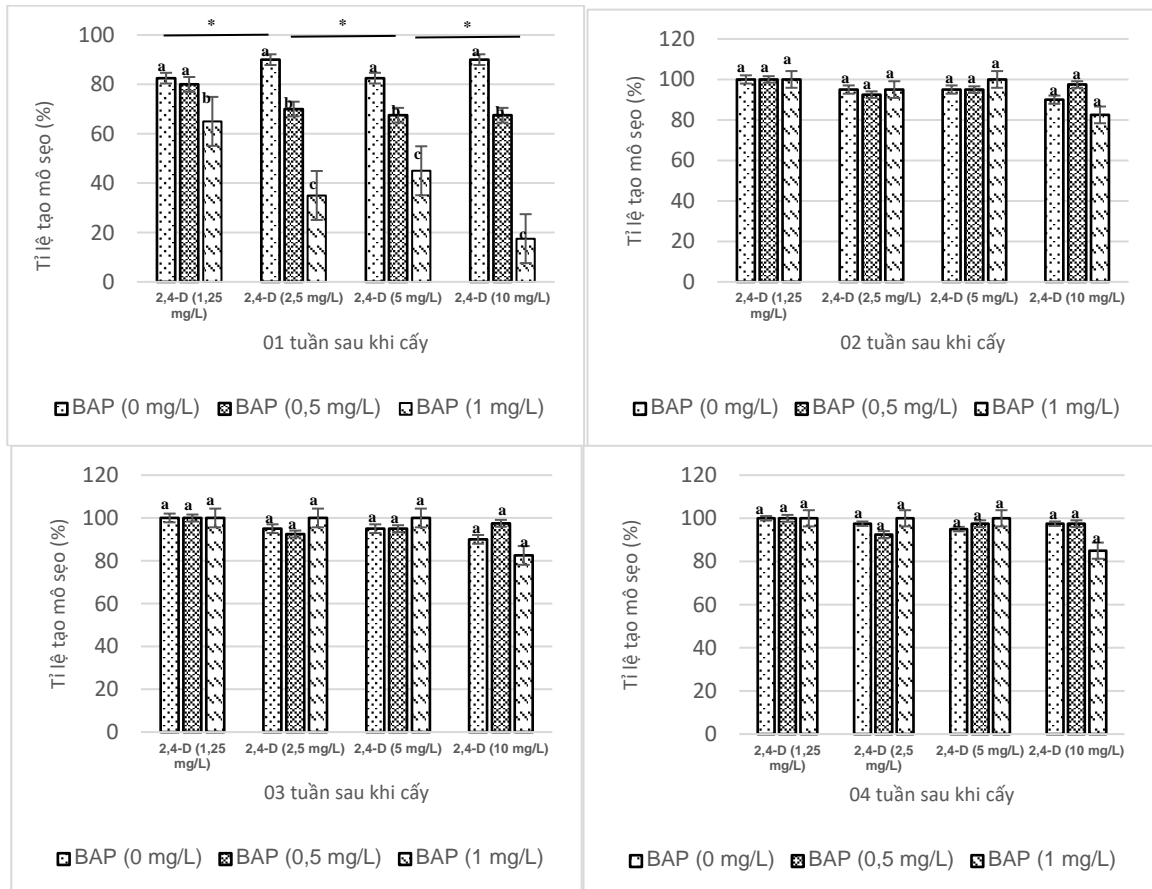
Trong cùng một cột, các giá trị có mẫu tự theo sau giống nhau thì không khác biệt có ý nghĩa thống kê với độ tin cậy > 95%. (-) là không tạo mô sẹo.

**3.3. Ảnh hưởng của 2,4-D và BAP lên sự hình thành mô sẹo và tạo chồi từ phiến lá lạc L14**

Mẫu phiến lá giống lạc L14 khi nuôi cấy trên môi trường bổ sung 2,4-D từ 1,25 – 10 mg/L kết hợp với BAP 0; 0,5 và 1 mg/L có sự hình thành mô sẹo với hình thái khác nhau. Sau 1 tuần nuôi cấy, mẫu phiến lá bắt đầu có sự hình thành mô sẹo với sự cong lên của mẫu cấy và sau đó là sự xuất hiện của mô sẹo ở vị trí mẫu tiếp xúc trực tiếp với môi trường (mặt dưới). Sau đó, mô sẹo hình thành khắp mặt dưới mẫu cấy. Mô sẹo có màu xanh, dạng khối chặt (Hình 3).



**Hình 3. Sự hình thành mô sẹo từ lá trên môi trường MS bổ sung 2,4-D 5 mg/L ở 2 tuần SKC**



**Hình 4. Tỷ lệ tạo mô sẹo (%) từ phiến lá lạc L14 ảnh hưởng bởi 2,4-D và BAP ở 1, 2, 3 và 4 tuần SKC Trong cùng một cột, các giá trị có mẫu tự theo sau giống nhau thì khác biệt không ý nghĩa thống kê với độ tin cậy > 95%. (\*) là sự khác biệt giữa có ý nghĩa thống kê với độ tin cậy > 95% ở từng nồng độ 2,4-D.**

Ở Hình 4, 1 tuần SKC, tỉ lệ tạo mô sẹo không khác biệt giữa các nồng độ 2,4-D nhưng có sự khác biệt giữa các nồng độ BAP. Môi trường chỉ bổ sung 2,4-D, không kết hợp BAP cho tỉ lệ tạo mô sẹo cao nhất, trung bình là  $82,5 \pm 4,3\%$ , kể đến là các môi trường bổ sung 2,4-D 1,25 mg/L kết hợp với BAP 0,5 mg/L ( $80 \pm 6,4\%$ ) và thấp nhất là khi kết hợp với BAP 1 mg/L ( $65 \pm 1\%$ ).

**Bảng 3. Tỉ lệ tạo chồi từ mô sẹo lá sau 2 và 4 tuần nuôi cấy (%)**

Nồng độ 2,4-D và BAP (mg/L)	Tuần SKC	
	2	4
2,4-D 1,25 + BAP 0	15	17,5
2,4-D 2,5 + BAP 0	-	2,5
2,4-D 5 + BAP 0	-	-
2,4-D 10 + BAP 0	-	-
2,4-D 1,25 + BAP 0,5	19,4	44,4
2,4-D 2,5 + BAP 0,5	-	6,9
2,4-D 5 + BAP 0,5	-	-
2,4-D 10 + BAP 0,5	-	-
2,4-D 1,25 + BAP 1	100	100
2,4-D 2,5 + BAP 1	87,5	100
2,4-D 5 + BAP 1	77,5	100
2,4-D 10 + BAP 1	-	100
Trung bình (nồng độ 2,4-D mg/L)		
2,4-D 1,25	44,8 <sup>d</sup>	54 <sup>c</sup>
2,4-D 2,5	29,2 <sup>bc</sup>	36,5 <sup>b</sup>
2,4-D 5	25,8 <sup>a</sup>	33,3 <sup>a</sup>
2,4-D 10	-	33,3 <sup>a</sup>
Trung bình (nồng độ BAP mg/L)		
BAP 0	3,75 <sup>a</sup>	5 <sup>a</sup>
BAP 0,5	4,85 <sup>a</sup>	12,8 <sup>b</sup>
BAP 1	66,3 <sup>b</sup>	100 <sup>c</sup>
F <sub>2,4-D</sub>	26,88 <sup>**</sup>	39,69 <sup>**</sup>
F <sub>BAP</sub>	93,15 <sup>**</sup>	124,14 <sup>**</sup>
F <sub>2,4-D x BAP</sub>	3,01 <sup>**</sup>	2,02 <sup>*</sup>
CV (%)	19,5%	21,2%

Trong cùng một cột, các số liệu có chữ theo sau giống nhau khác biệt không có ý nghĩa thống kê khi sử dụng phương pháp kiểm định Tukey. (\*) là sự khác biệt có ý nghĩa ở mức 5%. (\*\*) là sự khác biệt có ý nghĩa ở mức 1%. (-) là không tạo chồi.

Từ 2 – 4 tuần SKC, tỉ lệ tạo mô sẹo có sự gia tăng ở các nghiệm thức. Nồng độ 2,4-D cũng như BAP khi bổ sung kết hợp không có ảnh hưởng khác biệt lên sự tạo mô sẹo của phiến lá lạc L14. Tỉ lệ tạo mô sẹo đạt từ 85 đến 100% ở các nghiệm thức. Phản ứng tạo mô sẹo là một phản ứng thường gặp trong công nghệ nuôi cấy mô, đặc biệt là trong môi trường MS có chất kích thích mạnh như 2,4-D. Nguyên lý của phản ứng tạo mô sẹo chính là quá trình phân phân hóa tế bào (Sun et al., 2000). Hiệu quả tạo mô sẹo của 2,4-D đã được ứng dụng trong rất nhiều

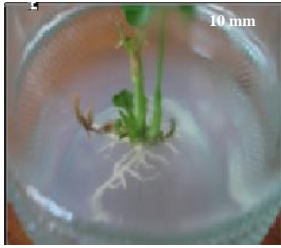
nghiên cứu. Một trong những Auxin tổng hợp quan trọng, 2,4-D đóng một vai trò quan trọng trong mô nuôi cấy, hệ thống tế bào tạo phôi và cảm ứng mô sẹo ở thực vật nghiên cứu nuôi cấy mô (Fei et al., 2016). Cấu trúc và màu sắc mô sẹo ở nghiệm thức có bổ sung 2,4-D đơn nồng độ từ 1,25 đến 10 mg/L có dạng rắn, tương đối chặt và màu xanh. Sự kết hợp 2,4-D và BAP cho mô sẹo có dạng cứng, chặt, màu xanh. Kết quả ở Bảng 3 cho thấy nồng độ 2,4-D sử dụng trong nghiên cứu này thấp hơn so với nghiên cứu của Thủy và ctv. (2013) trên cùng đối tượng nuôi cấy. Giống như kết quả của nghiên cứu này, Priyanka and Anita (2014) chỉ ra rằng, môi trường MS chỉ bổ sung 2,4-D 0,5 và 1 mg/L không kết hợp BAP có khả năng cảm ứng mô sẹo tốt hơn từ các đỉnh chồi và mẫu cây nốt của cây bồ đề. Kết quả nghiên cứu của Su et al. (2011) cũng cho thấy môi trường MS bổ sung 2,4-D 0,5 mg/L kết hợp BAP 0,05 mg/L cho mô sẹo cảm ứng là 100%. Kết quả này cho thấy rằng tỉ lệ của auxin/cytokinin cao là rất quan trọng cho sự hình thành mô sẹo (Su et al., 2011).

Kết quả Bảng 3 cho thấy ở 2 tuần SKC, sự tạo chồi từ mô sẹo có nguồn gốc từ lá khác nhau theo nồng độ 2,4-D và BAP sử dụng. Nồng độ 2,4-D thấp (1,25 mg/L) cho tỉ lệ tạo chồi cao nhất. Tỉ lệ tạo chồi giảm khi tăng nồng độ 2,4-D và ở nồng độ 2,4-D 10 mg/L không có sự tạo chồi. Nồng độ BAP tăng cũng làm tăng tỉ lệ tạo chồi (tăng từ 15% ở nồng độ 0 đến 100% ở nồng độ 1 mg/L). Nghiệm thức 2,4-D 1,25 mg/L không kết hợp BAP cho tỉ lệ tạo chồi thấp nhất, đạt 100%. Nghiệm thức 2,4-D 10 mg/L đơn hoặc bổ sung BAP hay nghiệm thức 2,4-D 2,5 và 5 mg/L kết hợp bổ sung BAP 0,5 và 1 mg/L không có sự tạo chồi. Ở 4 tuần SKC, tỉ lệ tạo chồi đạt 100% ở tất cả các nghiệm thức có bổ sung BAP 1 mg/L, nghiệm thức 2,4-D 5 và 10 mg/L kết hợp BAP 0,5 không có sự tạo chồi. Các nồng độ 2,4-D và BAP bổ sung có ảnh hưởng đến sự tạo chồi. Nồng độ 2,4-D thấp (1,25 mg/L) và BAP cao (1 mg/L) có hiệu quả tạo chồi đối với mẫu mô sẹo phiến lá lạc. Kết quả trên cho phép sử dụng nồng độ BAP thấp hơn nghiên cứu của Vũ Thị Thu Thủy và cộng sự là 2 mg/L so với 1 mg/L của nghiên cứu này (Thủy và ctv., 2013).



**Hình 5. Chồi tái sinh từ mô trên môi trường bổ sung 2,4-D 1,25 mg/L và BAP 1 mg/L sau 2 tuần**

**3.4. Ảnh hưởng của NAA và khoáng đa lượng đến sự tạo rễ của chồi phát triển từ mô sẹo phiến lá lạc L14**



**Hình 6. Chồi cây tái sinh rễ trên môi trường MS bổ sung NAA 0,2 mg/L**

**Bảng 4. Tỷ lệ tạo rễ (%) của chồi lạc L14 ảnh hưởng bởi NAA và khoáng đa lượng ở 2 và 4 tuần SKC**

Nồng độ NAA (mg/L) và hàm lượng khoáng đa lượng	Tuần SKC	
	2	4
NAA 0 + MS	40	60
NAA 0,1 + MS	40	60
NAA 0,2 + MS	80	100
NAA 0,4 + MS	60	100
NAA 0 + 1/2 MS	20	20
NAA 0,1 + 1/2 MS	20	20
NAA 0,2 + 1/2 MS	60	80
NAA 0,4 + 1/2 MS	40	80
Trung bình (NAA)		
NAA 0	30 <sup>c</sup>	40 <sup>d</sup>
NAA 0,1	30 <sup>c</sup>	40 <sup>d</sup>
NAA 0,2	70 <sup>b</sup>	90 <sup>c</sup>
NAA 0,4	50 <sup>a</sup>	90 <sup>c</sup>
Trung bình (đa lượng)		
MS	55 <sup>a</sup>	80 <sup>a</sup>
1/2 MS	70 <sup>b</sup>	50 <sup>b</sup>
F <sub>NAA</sub>	26,88**	30,36**
F <sub>đa lượng</sub>	93,15**	191,69**
F <sub>NAA x đa lượng</sub>	3,01**	2,72**
CV (%)	19,5%	22,45%

Trong cùng một cột, các số liệu có chữ theo sau giống nhau khác biệt không có ý nghĩa thống kê khi sử dụng phương pháp kiểm định Tukey. (\*\*) là sự khác biệt có ý nghĩa ở mức 1 %.

Kết quả ở Bảng 4 cho thấy sự tạo rễ từ chồi xảy ra ngay khi không có sự hiện diện của NAA trong

**TÀI LIỆU THAM KHẢO**

Aruna, M. M., & Niranjana, S. C. (2016). *In vitro* rapid regeneration through direct organogenesis and *ex-vitro* establishment of *Cucumis trigonus* Roxb. - An underutilized pharmaceutically important cucurbit. *Industrial Crops and*

*Products*, 83, 48 – 54.  
<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.12.036>  
 Barna, K. S., & Wakhlu, A. K. (1994). Whole plant regeneration of *Cicer arietinum* from callus cultures via organogenesis. *Plant Cell Rep*, 13,

**4. KẾT LUẬN**

Nghiên cứu tạo mẫu *in vitro* từ các bộ phận khác nhau phục vụ cho công tác nhân giống cây lạc cho thấy, khử trùng bằng dung dịch NaOCl 2,5% và 0,5 mL Tween20 trong thời gian lần 1 là 5 phút, lần 2 là 15 phút, giữa 2 lần mẫu được rửa sạch bằng nước cất tiệt trùng ít nhất 3 lần là tốt nhất, dưới mức thời gian này sẽ cho tỉ lệ nhiễm cao. Trong 4 loại mẫu cấy được khảo sát, phiến lá và trục thượng diệp đều cho kết quả tạo mô sẹo rất cao lần lượt là 100% và 90,67% sau 21 ngày SKC, tốt hơn so với cuống lá chỉ đạt 74,67% và rễ mầm là 0%. Môi trường MS bổ sung 2,4-D nồng độ 5 mg/L cho mô sẹo dạng chắc và có màu xanh. Mẫu phiến lá tạo chồi cao nhất trên môi trường bổ sung 2,4-D là 1,25 g/L kết hợp với BAP 1 mg/L. Tỷ lệ tạo rễ cao nhất trên môi trường bổ sung NAA 0,2 mg/L và với hàm lượng khoáng đa lượng của môi trường MS (100%).

- 510 - 513.  
<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.12.036>
- Bhatia, C. R., Murty, G. S. S., & Mathew, V. H. (1985). Regeneration of plants from de-embryonated peanut cotyledons cultured without nutrients and agar. *Z Pflanzenzuchtig*, *94*, 149 - 155.
- Bhavya, B., Dilta, B. S., Gupta, Y. C., Dhiman, S. R., & Manju, M. (2013). Studies on micropropagation of gerbera (*Gerbera jamesonii* Bolus). *Indian Journal of Applied Research*, *3*(11), 8 - 11.  
<https://doi.org/10.15373/2249555X/NOV2013/4>
- Cheng, M., Hsi, D. C. H., & Phillips, G. C. (1992). *In vitro* regeneration of Valencia type peanut (*Arachis hypogaea* L.) from cultured petioles, epicotyl sections and other seedling explants. *Peanut Sci*, *19*, 82 - 87.  
<https://doi.org/10.3146/i0095-3679-19-2-5>
- Daimon, H., & Mii. (1991). Multiple shoot formation and plant regeneration from cotyledonary node in peanut (*Arachis hypogaea* L.). *Japan J Breed*, *41*, 461 - 466. <https://doi.org/10.3146/i0095-3679-19-2-5>
- Fei, G., Xu, L., Xing, H., Yangling, Z., Xiujing, H., Min, L., Haijian, L., Huanwei, P., Lujiang, L., Zhiming, Z., Guangtang, P., & Yaou, S. (2016). Genome-wide analysis of transcription factors involved in maize embryonic callus formation. *Physiologia Plantarum*, *158*(4), 452 - 462.  
<https://doi.org/10.3146/i0095-3679-19-2-5>
- Kiên, D. C. (2002). *Nuôi cấy mô thực vật*. Nhà xuất bản Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh.
- Iqbal, M. M., Nazir, F., Iqbal, J., Tehrim, S., & Zafar, Y. (2011). *In vitro* micropropagation of peanut (*Arachis hypogaea*) through direct somatic embryogenesis and callus culture. *Int. J. Agric. Biol.*, *13*, 811 - 814.
- Lavanya, A. R., Muthukrishnan, S., Muthukumar, M., Franklin, J. H. B., Senthil, T. K., Kumaresan, V., & Rao, M. V. (2014). Indirect organogenesis from various explants of *Hildegardia populifolia* (Roxb.) Schott & Endl. – A threatened tree species from Eastern Ghats of Tamil Nadu, India. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, *12*(2), 95 - 101.  
<https://doi.org/10.3146/i0095-3679-19-2-5>
- Limbua, P. G., Ngugi, M. P., & Oduo, R. O. (2019). *In vitro* regeneration protocol of kenyan adapted groundnut (*Arachis hypogaea* L.) genotypes using cotyledonary node explants. *J Plant Biochem Physiol*, *7*, 33.  
<https://doi.org/10.4172/2329-9029.1000233>
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiol, Plant*, *15*, 473 - 497. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
- Lượng, N. D., & Tiên, L. T. T. (2002). *Công nghệ tế bào*. Nhà xuất bản Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh.
- Thach, N. Q., Anh, N. T. L., Ngọc, P. K., Minh, T. V., & Thảo, N. T. P. (2009). *Cơ Sở Công nghệ Sinh học – Tập 3 – Công nghệ sinh học Tế Bào*. Nhà xuất bản Giáo dục Việt Nam.
- Paduchuri, P. Y., Deogirkar, G. V., Kamdi, S. R., Kale, M. C., & Rajurkar, M. D. (2010). *In vitro* callus induction and root regeneration studies in *Gerbera jamesonii*. *International Journal of Advanced Biotechnology and Research*, *1*(2), 87 - 90.
- Palanivel, S., Parvathi, S., & Jayabalan, N. (2002). Callus induction and plantlet regeneration from mature cotyledonary segments of groundnut (*Arachis hypogaea* L.). *Journal of Plant Biology*, *45*(1), 22 - 27.  
<https://doi.org/10.1007/BF03030428>
- Priyanka, S., & Anita, R. G. (2014). Micropropagation of *Ficus religiosa* L. via leaf explants and comparative evaluation of acetylcholinesterase inhibitory activity in the micropropagated and conventionally grown plants. *Biotech*, *4*, 477 - 491.  
<https://doi.org/10.1007/s13205-013-0175-8>
- Siwach, P., & Gill, A. R. (2011). Enhanced shoot multiplication in *Ficus religiosa* L. in the presence of adenine sulphate, glutamine and phloroglucinol. *Physiology and Molecular Biology of Plants*.  
<https://doi.org/10.1007/s12298-011-0074-6>
- Su, Y. H., Liu, Y. B., & Zhang, X. S. (2011). Auxin-Cytokinin interaction regulates meristem development. *Molecular plant*, *4*(4), 616 - 625.  
<https://doi.org/10.1007/s12298-011-0074-6>
- Sun, H. W., Nair, A., & Adachi, T. (2000). Campbell plant regeneration from cotyledon tissues of common buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench). *In Vitro Cellular and Developmental Biology Plant*, *36*, 358 - 361.  
<https://doi.org/10.1007/s11627-000-0063-x>
- Thùy, V. T. T., Tâm, N. T., & Mậu, C. H. (2013). Tạo dòng lạc chịu hạn bằng công nghệ tế bào thực vật. *Tạp chí Sinh học*, *35*(3), 357 - 362.