

Tạo mô sẹo để tái sinh phôi soma của cây cà phê chè giống TN1

Nguyễn Văn Thường*, Trần Thị Hoàng Anh, Nguyễn Văn Phương,
Chu Thị Phương Loan, Nguyễn Viết Trụ, Võ Thị Thùy Dung

Viện Khoa học kỹ thuật nông lâm nghiệp Tây Nguyên, Viện Khoa học nông nghiệp Việt Nam

Ngày nhận bài 13/1/2017; ngày chuyển phản biện 16/1/2017; ngày nhận phản biện 23/2/2017; ngày chấp nhận đăng 27/2/2017

Tóm tắt:

Tạo mô sẹo để tái sinh phôi là công đoạn đầu tiên trong sản xuất *in vitro* cây giống cà phê. Bài viết giới thiệu kết quả nghiên cứu được thực hiện trên giống cà phê chè TN1 với 4 nội dung, gồm: 1) Xác định phương pháp khử trùng mẫu lá; 2) Xác định ảnh hưởng chất kích thích sinh trưởng lên quá trình phát sinh mô sẹo từ mẫu lá; 3) Đánh giá khả năng nhân sinh khối mô sẹo trên môi trường lỏng lắ; 4) Xác định điều kiện nuôi cấy đến quá trình tái sinh phôi từ mô sẹo trên môi trường lỏng. Kết quả cho thấy, tỷ lệ mẫu vô trùng đạt cao nhất khi khử trùng bằng dung dịch calcium hypochlorite 10% trong thời gian 15 phút. Môi trường MS có bổ sung 2,4D 1 mg/l, Kin 2 mg/l cho số mẫu lá tạo mô sẹo nhiều nhất và mô sẹo có đặc trưng vàng chanh, cứng, có khả năng phát sinh phôi. Môi trường 1/2 MS bổ sung 2ip 0,5 mg/l giúp tăng sinh khối mô sẹo tốt nhất. Phôi tái sinh mạnh nhất trong môi trường 1/2 MS lỏng không chất kích thích sinh trưởng.

Từ khóa: Cà phê chè, khử trùng, mô sẹo, phôi soma, tái sinh.

Chỉ số phân loại: 4.6

Đặt vấn đề

Giống cà phê chè TN1 là con lai thể hệ F_1 (của cặp lai $KH_{3-1} \times \text{Catimor}$) do Viện Khoa học kỹ thuật nông lâm nghiệp Tây Nguyên lai tạo và chọn lọc, có năng suất cao, chất lượng tốt. Giống TN1 đã được Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn công nhận là giống mới vào năm 2011 và cho phép đưa vào trồng thay thế các giống cà phê chè cũ năng suất thấp trong các chương trình tái canh cà phê. Tuy nhiên, chi phí sản xuất hạt giống lai rất cao và khó sản xuất với khối lượng lớn trong thời gian ngắn. Để cung cấp hạt giống lai với số lượng lớn ra sản xuất cần tiếp tục chọn lọc phả hệ đến thể hệ F_5 hay F_6 để có được dòng thuần, nhưng cách này tốn rất nhiều thời gian, công sức và tiền của. Vì vậy, để nhân nhanh với khối lượng lớn và giảm giá thành sản xuất cây giống, TN1 cần được nhân bằng phương pháp vô tính.

Trong các phương pháp nhân giống vô tính, phương pháp nhân giống bằng *in vitro* đã được chứng minh có nhiều lợi thế và ưu điểm hơn hẳn các phương pháp thông thường (như ghép và giâm cành). Theo phương pháp này, khối mô sẹo (callus) được tạo ra từ mẫu lá sẽ tiếp tục được nuôi cấy để tái sinh phôi trước khi tạo thành cây hoàn chỉnh; tế bào mô sẹo có thể phân chia theo cấp số nhân và khi phân hóa thành phôi vô tính sẽ tạo ra số lượng lớn trong thời gian ngắn.

Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

Đối tượng

- Mẫu lá của cây cà phê chè giống TN1 trồng trong nhà kính 2 năm tuổi tại Viện Khoa học kỹ thuật nông lâm nghiệp Tây Nguyên.

- Mô sẹo phát sinh từ mẫu lá (loại có dạng hạt, cứng, màu vàng chanh).

Phương pháp nghiên cứu

Xác định phương pháp khử trùng mẫu lá: Lá non lấy từ lá thứ 2 từ ngọn xuống của cây 2 năm tuổi được trồng trong chậu, mẫu lá được rửa dưới vòi nước chảy, tiếp theo rửa bằng xà phòng rồi rửa sạch lại nhiều lần dưới vòi nước chảy và nhúng vào dung dịch Ethanol 70% trong 30 giây. Sau đó ngâm trong dung dịch khử trùng 15 phút và rửa lại bằng nước cất khử trùng, rồi để ráo.

Mẫu lá sau khi khử trùng được cắt bỏ gân chính và 2 bên mép lá, loại bỏ phần bị tổn thương, cắt thành mảnh nhỏ (mỗi mảnh là một mẫu, có kích thước 1 cm²) và cấy mặt trên của lá tiếp xúc với môi trường MS có bổ sung agar 9 g/l, đường saccharose 30 g/l, pH 5,8. Phòng nuôi cấy được duy trì ở nhiệt độ 24±2°C, độ ẩm 60±5%; chiếu sáng 16/24 giờ, cường độ 2.000 lux. Thời gian khảo sát: 20 ngày nuôi cấy.

*Tác giả liên hệ: Email: nvthuongvnl@yahoo.com.vn

Callus formation to reproduce somatic embryos of arabica coffee cultivar TN1

Van Thuong Nguyen*, Thi Hoang Anh Tran,
Van Phuong Nguyen, Thi Phuong Loan Chu,
Viet Tru Nguyen, Thi Thuy Dung Vo

Western Highlands Agriculture and Forestry Science Institute, VAAS

Received 13 January 2017; accepted 27 February 2017

Abstract:

Four research contents including: 1) Identify a sterilization method for leaf samples; 2) Determine the influence of growth stimulants on callus development of leaves; 3) Assess the capacity of callus growth in shaken solutions; 4) Investigate culture conditions on embryonic reproduction from callus in liquid medium were carried out on the new cultivar TN1 of Arabica coffee. Results showed that the highest percent of aseptic leaf samples was from the sterilization by 10% calcium hypochlorite solution in 15 minutes. MS medium added with 1 mg/l 2,4D and 2 mg/l Kin gave leaf samples producing the most quantity of calluses. Features of these calluses are lemon yellow, tough, and able to produce embryos. 1/2 MS medium added with 0.5 mg/l 2ip was the best to increase the callus biomass. Reproductive embryos were the best in the 1/2 MS liquid medium without growth stimulants.

Keywords: Arabica coffee, callus, reproduction, somatic embryos, sterilization.

Classification number: 4.6

Thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên với 2 yếu tố, 3 lần lặp. Yếu tố chất khử trùng: Natri hypochlorite, calcium hypochlorite. Yếu tố nồng độ: 5, 10, 15, 20 (%). Mỗi công thức gồm 5 bình tam giác, mỗi bình cấy 8 mẫu lá.

Chỉ tiêu theo dõi: Tỷ lệ % mẫu lá sạch và xanh sau 20 ngày nuôi cấy, đặc điểm mẫu lá.

Xác định ảnh hưởng của chất kích thích sinh trưởng lên phát sinh mô sẹo: Mẫu được cấy lên môi trường MS, vitamin B5, có bổ sung agar 9 g/l, đường saccharose 30 g/l, pH 5,8 và bổ sung chất kích thích sinh trưởng 2,4D (0-2 mg/l), Kin (0-2 mg/l). Thời gian khảo sát: 16 tuần nuôi cấy.

Thí nghiệm được bố trí ngẫu nhiên với 2 yếu tố, 3 lần lặp. Yếu tố nồng độ 2,4D có 3 mức: 0, 1 và 2 mg/l. Yếu tố nồng độ Kin có 3 mức: 0, 1 và 2 mg/l. Mỗi công thức có 9 bình tam giác (V = 250 ml), mỗi bình cấy 8 mẫu lá. Chỉ tiêu theo dõi: Tỷ lệ mẫu tạo mô sẹo (%), màu sắc, hình thái (vàng chanh, trắng đục, trắng trong, đen...) của mô sẹo, thời gian tạo mô sẹo, khối lượng (mg).

Đánh giá khả năng nhân sinh khối mô sẹo trên môi trường lỏng lắc: Mô sẹo được chọn lọc kỹ, đạt tiêu chuẩn (dạng hạt, cứng, có màu vàng chanh) được chuyển sang môi trường tăng sinh mô sẹo ở dạng lỏng trong các bình tam giác, đặt trên máy lắc tròn, cài đặt tần số lắc 110 vòng/phút.

Môi trường 1/2 MS lỏng, vitamin B5, có bổ sung đường saccharose 30 g/l, pH 5,8 và chất kích thích sinh trưởng 2ip (0-1 mg/l), NAA (0-0,2 mg/l).

Thí nghiệm được bố trí ngẫu nhiên với 2 yếu tố, 3 lần lặp. Yếu tố nồng độ 2ip có 3 mức: 0, 0,5 và 1 mg/l. Yếu tố nồng độ NAA có 3 mức: 0, 0,1 và 0,2 mg/l. Mỗi công thức có 9 bình tam giác (V = 250 ml), mỗi bình 0,1 g mô sẹo. Chỉ tiêu theo dõi: Khối lượng mô sẹo gia tăng theo các tuần nuôi cấy (mg), màu sắc mô sẹo quan sát bằng mắt thường. Thời gian khảo sát là 10 tuần nuôi cấy.

Xác định điều kiện nuôi cấy thích hợp cho quá trình tái sinh phôi từ mô sẹo: Các mô sẹo vàng chanh, cứng từ thí nghiệm trên được chuyển sang môi trường lỏng sản xuất phôi trong các bình tam giác và đặt trên máy lắc. Sau khi các phôi tăng về kích thước sẽ được chuyển sang các bình tam giác thể tích lớn hơn. Cứ 2 tuần thay mới môi trường cho đến khi phôi phát triển ở dạng thủy lôi.

Môi trường: MS 1/2 lỏng, vitamin B5, có bổ sung đường saccharose 30 g/l, pH 5,8 và bổ sung từng loại chất kích thích sinh trưởng BA (0,1, 0,3 và 0,6 mg/l), NAA (0,6, 0,8 và 1 mg/l), hoặc Kin (0,1, 0,3 và 0,6 mg/l). Thời gian nuôi cấy: 14 tuần trong điều kiện phòng và lắc 120 vòng/phút.

Bố trí thí nghiệm hoàn toàn ngẫu nhiên, gồm 10 công thức, 3 lần lặp. Mỗi công thức 5 bình (V = 100 và 250 ml), mật độ nuôi cấy 1 g/bình. Chỉ tiêu theo dõi: Số lượng phôi

sau 14 tuần nuôi cấy (phôi), khối lượng 100 phôi (mg), tỷ lệ phôi bị biến dị tính trên tổng số phôi (%), chiều dài phôi đo bằng thước có độ chính xác 0,1 mm.

Số liệu được xử lý bằng phần mềm thống kê MSTATC. Số liệu % được chuyển đổi trước khi xử lý [1]. Trong các bảng số liệu, các số trung bình trên cùng một cột theo sau bởi các chữ cái giống nhau thì khác nhau không có ý nghĩa thống kê theo trắc nghiệm Duncan ở mức xác suất $p = 0,05$.

Kết quả và thảo luận

Ảnh hưởng của chất khử trùng và nồng độ đến tỷ lệ mẫu sạch

Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của chất khử trùng và nồng độ đến tỷ lệ mẫu sạch được tổng hợp trong bảng 1.

Bảng 1. Ảnh hưởng chất khử trùng và nồng độ đến tỷ lệ mẫu sạch và xanh.

Công thức	Chất khử trùng	Nồng độ (%)	Tỷ lệ mẫu sống sau 20 ngày (%)	Đặc điểm mẫu lá
1	Natri hypochlorite	5	53,86 d	Lá xoăn
2		10	49,07 e	Lá xoăn
3		15	42,44 f	Lá xoăn
4		20	33,95 g	Lá xoăn
5	Calcium hypochlorite	5	68,21 b	Lá xoăn
6		10	90,74 a	Lá xoăn
7		15	56,33 c	-
8		20	32,56 h	-

Ghi chú: Số liệu (x) được chuyển đổi theo công thức $\text{Acrsin} \sqrt{x}$ trước khi xử lý thống kê; -: Mẫu lá không phản ứng.

Kết quả bảng 1 cho thấy, tỷ lệ mẫu sạch ở các công thức xử lý chất khử trùng và ở các nồng độ khác nhau đều có sự sai khác có ý nghĩa thống kê. Mẫu xử lý natri hypochlorite có tỷ lệ mẫu sạch và xanh thấp. Mẫu xử lý calcium hypochlorite đạt hiệu quả cao hơn. Các mẫu lá sau khi được khử trùng sạch đã phản ứng xoăn lên, tuy nhiên tình trạng này không có ảnh hưởng tới tỷ lệ mẫu sống của lá. Xử lý calcium hypochlorite với nồng độ 10% cho hiệu quả cao nhất (90,74% mẫu sạch), mẫu lá ít bị tổn thương, nhưng khi xử lý nồng độ cao hơn (20%) cho tỷ lệ mẫu sống thấp (32,56%), do nồng độ chất khử trùng cao đã phá hủy các tế bào của lá, làm cho mẫu lá không phản ứng với môi trường. Như vậy, mẫu lá cây cà phê ở vị trí cặp lá thứ 2 trên cành của cây 24 tháng tuổi được khử trùng bằng calcium hypochlorite 10% cho tỷ lệ mẫu sống (mẫu lá sạch và còn màu xanh) cao nhất (90,74%).

Ảnh hưởng chất kích thích sinh trưởng đến sự phát sinh mô sẹo từ mẫu lá

Các mẫu lá sạch, màu xanh (sau 20 ngày khử trùng) được cấy sang môi trường có bổ sung các chất kích thích sinh trưởng để tạo mô sẹo (bảng 2).

Bảng 2. Ảnh hưởng chất kích thích sinh trưởng (2,4D và Kin) đến khả năng tạo mô sẹo từ mẫu lá.

Công thức	Chất điều hòa sinh trưởng		Số mẫu tạo mô sẹo	Tỷ lệ mẫu tạo mô sẹo (%)	Khối lượng mô sẹo (mg)	Đặc điểm mô sẹo
	2,4D (mg/l)	Kin (mg/l)				
1	0	0	-	-	-	-
2		1	2,1 g	2,9 g	4,9 g	Nâu
3		2	6,6 f	9,2 f	14,9 f	Trắng bờ
4	1	0	10,2 e	14,2 e	41,4 e	Xanh nhạt
5		1	20,0 b	27,7 b	70,5 b	Nâu
6		2	34,4 a	47,8 a	144,2 a	Vàng chanh
7	2	0	11,7 d	16,3 d	59,8 c	Đen
8		1	17,3 c	24 c	55,2 d	Xám
9		2	-	-	-	-

Kết quả bảng 2 cho thấy, trong số 9 công thức được nuôi cấy sau 16 tuần, công thức bổ sung 2,4D 1 mg/l và Kin 2 mg/l có số mẫu tạo mô sẹo cao nhất (34,4 mẫu), chiếm 47,8%, đồng thời khối lượng mô sẹo nặng nhất (144,2 mg), đa số có màu vàng chanh, cứng và có khả năng tái sinh phôi. Kết quả này phù hợp với ý tưởng của Dublin (1981) là cần lượng auxin thấp và cytokinin cao để phát sinh mô sẹo trên mẫu lá cà phê chè [2]. Tuy nhiên, sử dụng auxin (2,4D) đơn độc không phát huy hiệu quả, nhưng khi kết hợp cả auxin và cytokinin mẫu lá đã có phản ứng tạo mô sẹo. Các công thức còn lại không tạo mô sẹo hoặc tạo mô sẹo màu đen, trắng, nâu, xanh nhạt, xám, không có khả năng tái sinh phôi.

Khả năng nhân sinh khối mô sẹo trên môi trường lỏng lắc

Sau khi mẫu phát sinh mô sẹo, số lượng mô sẹo được nhân lên gấp nhiều lần so với lượng mô sẹo ban đầu khi cấy vào trong môi trường nhân thích hợp. Chọn lọc mô sẹo có màu vàng, dạng hạt, cấy sang môi trường lỏng để nhân mô sẹo lên số lượng lớn. Nhân mô sẹo có 2 phương pháp là nhân trên môi trường đặc hoặc nhân trên môi trường lỏng.

Mẫu cấy được đặt trong môi trường lỏng và được lắc trên máy lắc tròn với tốc độ thích hợp. Nuôi cấy lỏng lắc có nhiều ưu điểm như: Chuyển động lắc tạo điều kiện cho không khí tự do khuếch tán vào môi trường tốt hơn, tăng lượng oxy hòa tan đáp ứng được nhu cầu hô hấp của tế bào. Do vậy trong nội dung này, chúng tôi chỉ tiến hành nghiên cứu trên môi trường lỏng với thành phần môi trường khác nhau.

Bảng 3. Ảnh hưởng của nồng độ 2ip và NAA đến tăng sinh mô sẹo sau 10 tuần nuôi cấy.

Công thức	Chất kích thích sinh trưởng		Số lần tăng (lần)	Khối lượng mô sẹo tăng (mg)	Màu sắc
	2ip (mg/l)	NAA (mg/l)			
1	0	0	1,05 c	105,3 c	Nâu
2	0	0,5	1,08 c	108,0 c	Nâu đen
3	0	1	1,07 c	107,0 c	Nâu xám
4	0,5	0	2,33 a	232,7 a	Vàng chanh
5	0,5	0,5	1,42 b	142,3 b	Vàng nhạt
6	0,5	1	1,24 bc	123,7 bc	Nâu
7	1	0	1,14 c	114,3 c	Vàng chanh
8	1	0,5	1,10 c	110,3 c	Nâu
9	1	1	1,02 c	101,7 c	Nâu xám

Kết quả bảng 3 cho thấy, mô sẹo nuôi cấy trên môi trường lỏng có bổ sung kết hợp 2ip và NAA không thích hợp cho mô sẹo tăng sinh. Ngược lại, bổ sung một loại 2ip mô sẹo tăng sinh tốt hơn. Đặc biệt mô sẹo tăng sinh tốt nhất trên môi trường 2ip 0,5 mg/l, khối lượng mô sẹo tăng 232,7 mg (gấp 2,33 lần) so với khối lượng ban đầu. Như vậy, nuôi cấy tăng sinh mô sẹo cà phê chè sử dụng 2ip với nồng độ 0,5% là thích hợp nhất.

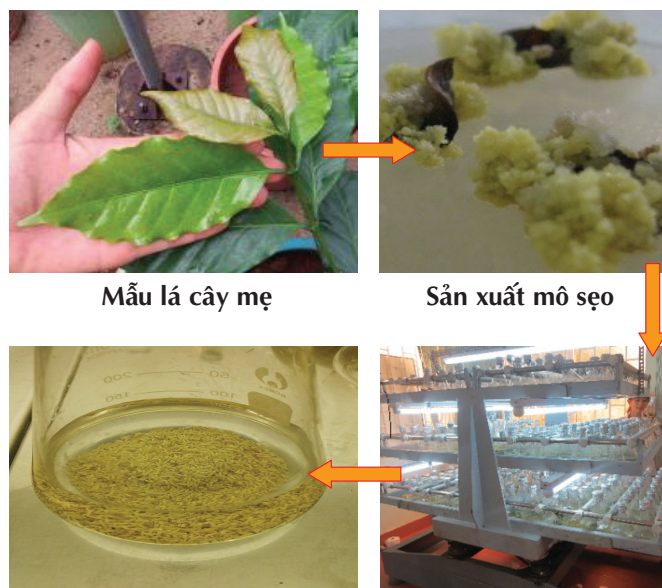
Ảnh hưởng một số chất kích thích sinh trưởng đến tái sinh phôi của mô sẹo trên môi trường lỏng

Kết quả bảng 4 cho thấy, quá trình tái sinh phôi cà phê chè từ mô sẹo chỉ cần dinh dưỡng khoáng và vitamin, không cần bổ sung chất điều hòa sinh trưởng mà vẫn cho kết quả tốt (đôi chứng đạt 1.592 phôi/g mô sẹo, trọng lượng đạt 526,7 mg/100 phôi, chiều dài là 6,7 mm/phôi).

Bảng 4. Ảnh hưởng chất kích thích sinh trưởng đến khả năng tái sinh phôi.

Công thức	Chất kích thích	Số phôi/g mô sẹo	Tỷ lệ phôi biến dị/g mô sẹo	Khối lượng 100 phôi (mg)	Chiều dài phôi (mm)
CT1	ĐC	1.592 a	0,03	526,7 a	6,7 a
CT2	BA (0,1 mg/l)	970 c	0,70	286,8 c	4,3 c
CT3	BA (0,3 mg/l)	406 ef	1,30	227,2 d	3,8 cd
CT4	BA (0,6 mg/l)	330 f	1,40	215,3 d	3,5 cd
CT5	Kin (0,1 mg/l)	1.121 b	0,16	283,6 c	5,3 b
CT6	Kin (0,3 mg/l)	527 d	0,84	225,6 d	4,2 c
CT7	Kin (0,6 mg/l)	43 e	1,40	228,7 d	3,3 d
CT8	NAA (0,6 mg/l)	-	-	-	-
CT9	NAA (0,8 mg/l)	-	-	-	-
CT10	NAA (1,0 mg/l)	-	-	-	-

Nếu bổ sung BA và Kin ở nồng độ thấp thì kích thích phôi tái sinh, tuy nhiên tỷ lệ tái sinh ít. Ở môi trường bổ sung auxin (NAA) mô sẹo không tái sinh phôi, quá trình nuôi cấy mô sẹo từ màu vàng chuyển sang màu đen, mô sẹo không có khả năng tái sinh và chết. Kết quả này phù hợp với kết quả nghiên cứu của J. Van Bostel và M. Berthouly (1996) [3] khi nuôi cấy mô sẹo có khả năng tái sinh phôi trên môi trường không có auxin đã cho khả năng tái sinh phôi và không giống kết quả nghiên cứu tái sinh phôi cà phê chè của E. García và A. Menéndez (1987) [4] là bổ sung NAA 0,8 mg/l. Có thể là do quá trình tái sinh phôi, mô sẹo đã có chất điều hòa sinh trưởng nội sinh, khi bổ sung chất điều hòa sinh trưởng ở nồng độ càng cao thì mô sẹo bị ức chế tái sinh.



Mẫu lá cây mẹ

Sản xuất mô sẹo

Phôi được tái sinh từ mô sẹo

Nhân mô sẹo

Kết luận

- Khử trùng lá bằng dung dịch calcium hypochlorite 10% trong thời gian 15 phút cho tỷ lệ mẫu lá vô trùng đạt cao nhất (90,74%).

- Môi trường MS có bổ sung 2,4D 1 mg/l và Kin 2 mg/l cho số mẫu lá tạo mô sẹo có khả năng phát sinh phôi cao nhất (47,8%).

- Môi trường 1/2 MS có bổ sung 2ip 0,5 mg/l thích hợp nhất cho mô sẹo tăng sinh khối (khối lượng mô sẹo tăng 232,7 mg, gấp 2,3 lần so với khối lượng ban đầu).

- Môi trường MS 1/2 lỏng không chất kích thích sinh trưởng giúp mô sẹo tái sinh phôi tốt nhất (đạt 1.592 phôi/g mô sẹo, khối lượng 526,7 mg/100 phôi, chiều dài là 6,7 mm/phôi).

Trong thời gian tới, đề nghị áp dụng kết quả nghiên cứu để tái sinh phôi từ mô sẹo trong quá trình nhân giống in vitro cà phê chè TN1.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Kwanchai A. Gomez, Arturo A. Gomez (1984), *Statistical Procedures for Agricultural Research*.
- [2] Dublin (1981), "Embryogenese somatique directic sur fragment de feuilles de cafeier Arabusta", *Café Cacao Thé*, **25**, pp.237-242.
- [3] J. Van Bostel, M. Berthouly (1996), "High frequency somatic embryogenesis, and subsequent prolife-ration and regeneration in liquid medium", *Plant cell, Tissue and Organ Culture*, **44**, pp.7-17.
- [4] E. García, A. Menéndez (1987), "Embrionogenesis somática a partir de explantes foliares del cafeto Catimor", *Café Cacao Thé*, **31**, pp.15-22.