

NGHIÊN CỨU HỆ THỐNG TÁI SINH CÂY XOAN TA (*MELIA AZEDARACH* L.) THÔNG QUA PHÔI SOMA TỪ THÂN MẦM PHỤC VỤ CHUYỂN GEN

Đỗ Xuân Đồng¹, Bùi Văn Thắng², Hồ Văn Giảng², Nông Văn Hải¹, Chu Hoàng Hà¹

¹Viện Công nghệ sinh học

²Trường Đại học Lâm nghiệp

TÓM TẮT

Hệ thống tái sinh cây xoan ta thông qua phôi soma (somatic embryos) từ thân mầm đã được nghiên cứu hoàn thiện. Kết quả nghiên cứu cho thấy, tỷ lệ hình thành mô sẹo trên môi trường có bổ sung 3 mg/l NAA và 1 mg/l BAP là 92,2%. Các cụm mô sẹo được chuyển sang môi trường cảm ứng tạo phôi (SE3) trong khoảng thời gian 4 tuần cho số phôi cũng như chất lượng phôi là tốt nhất, trung bình 12,7 phôi/đoạn thân mầm ban đầu. Phôi và cụm phôi tiếp tục được chuyển sang nuôi trên môi trường này mầm RE. Khi chồi cây phát triển hoàn chỉnh có chiều dài khoảng 0,7 - 1,5 cm được chuyển sang môi trường ra rễ (MS + 3 mg/l IBA) trong thời gian 3 ngày. Tỷ lệ cây ra rễ đạt 100% khi cây tái sinh được cấy chuyển sang môi trường MS trong thời gian 4 tuần. Nghiên cứu cho thấy tỷ lệ cây tái sinh *in vitro* trồng trong nhà lưới đạt 100% trên giá thể trấu hun và cát theo tỷ lệ 4:6. Cây non hoàn chỉnh được tạo ra trong 18 tuần và quy trình này hoàn toàn thích hợp cho các nghiên cứu chuyển gen ở cây xoan ta tiếp theo.

Từ khóa: Cây xoan ta (*Melia azedarach* L.), nuôi cấy mô, phôi soma, tái sinh, thân mầm

MỞ ĐẦU

Cây xoan có nguồn gốc từ nam châu Á (Cozzo, 1994). Ngoài việc sử dụng gỗ để trang trí, dịch chiết từ lá, thân, hoa, quả có đặc tính như thuốc trừ sâu (Breuer, Schmidt, 1995; Chen *et al.*, 1996; Andreu *et al.*, 2000; Ursi Ventura, Ito, 2000). Dịch chiết từ lá cũng có khả năng ức chế sự tái bản của tế bào ở một số thể gây bệnh của người và động vật (Coto, De Torres, 1999) và ngăn chặn virus Tacaribe gây bệnh viêm não ở chuột (Andrei *et al.*, 1986).

Cây xoan ta (*Melia azedarach* L.) phân bố chủ yếu ở Việt Nam, Lào và Trung Quốc. Ở nước ta cây này được trồng thành rừng hoặc phân tán ở hầu hết các tỉnh từ Bắc đến Nam. Xoan ta là một trong những cây trồng quan trọng trong chiến lược phát triển lâm nghiệp. Nó có mặt ở 6 trên 9 vùng sinh thái lâm nghiệp, trong đó 3 vùng: Vùng Trung tâm, vùng Đồng bằng Sông Hồng và vùng Nam Trung Bộ. Xoan ta đứng đầu trong danh mục các cây trồng được ưu tiên phát triển theo quyết định số 16/2005/QĐ-BNN ngày 15/03/2005 của Bộ trưởng Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn. Đây là loài cây gỗ lớn có thể cao đến 30 m đường kính gần 100 cm. Gỗ xoan có lõi màu hồng hay nâu nhạt, đặc xám trắng, gỗ nhẹ, có vân thớ đẹp nếu được ngâm tẩm thì đây là loại gỗ khá bền khó bị mối mọt, cho nên gỗ

xoan thường được dùng làm xây dựng, trang trí nội thất và điêu khắc. Nhưng khi mới khai thác thì đây là loại gỗ mềm khó sử dụng.

Với hướng nghiên cứu kết hợp giữa chọn giống truyền thống và hiện đại (ví dụ phương pháp tạo các dòng cây chuyển gen thông qua vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens*) cho phép nhanh chóng tạo ra nhiều giống cây trồng có khả năng sinh trưởng nhanh, năng suất cao, chất lượng tốt và có khả năng kháng được các loại sâu bệnh, chống chịu được nhiều điều kiện bất lợi của môi trường. Trong nghiên cứu này, cây xoan ta sẽ được dùng làm nguyên liệu cho các thí nghiệm chuyển các gen mã hóa cho các tính trạng hữu ích, ví dụ như kích thích sinh trưởng nhanh và làm tăng chất lượng gỗ. Trong các nghiên cứu này bước quan trọng đầu tiên là phải thiết lập và tối ưu hệ thống tái sinh cây *in vitro* đạt hiệu suất cao. Đã có một số công bố trên thế giới về kết quả nghiên cứu tái sinh cây xoan (Ahmad *et al.*, 1990; Thakur *et al.*, 1998; Vila *et al.*, 2003, 2005; Sharry, Teixeira da Silva, 2006), tuy nhiên mỗi quy trình lại chỉ thích hợp với từng giống đặc trưng cho từng vùng hay miền. Trong bài báo này chúng tôi trình bày kết quả thiết lập và tối ưu các bước tái sinh cây xoan ta thông qua quá trình tạo phôi soma từ thân mầm nhằm tạo nguyên liệu cho các nghiên cứu chuyển gen tiếp theo.

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Nguyên liệu thực vật: Quả xoan ta được thu hái và chọn lọc từ những cây trội (cây được chọn lọc trong quần thể dựa trên tính trạng sinh trưởng tốt) được Trung tâm Giống và Công nghệ sinh học, Viện Sinh thái rừng và Môi trường, Trường Đại học Lâm nghiệp cung cấp. Sau đó loại bỏ phần thịt quả và tách lấy hạt làm vật liệu nuôi cấy.

Khử trùng hạt và chuẩn bị nguyên liệu tạo phôi soma: Hạt được sát khuẩn bề mặt bằng ethanol 70% trong 3 phút, tiếp tục khử trùng bằng Javen 100% trong 10 phút và chuyển sang Javen 50% trong 5 phút (lắc nhẹ), tiếp theo loại bỏ Javen và rửa sạch bằng nước cất vô trùng 10 lần. Hạt sau khi đã khử trùng được nuôi cấy trên môi trường dinh dưỡng MS bổ sung thêm 3% saccharose với mật độ 15 hạt/bình tam giác 250 ml.

Cầm ứng tạo mô sẹo: Sau 2 tuần nuôi cấy hạt này mầm thành cây mầm. Thân mầm được cắt thành những đoạn nhỏ có kích thước 0,5 cm cấy lên môi

trường CL (Bảng 1), nuôi cấy trong khoảng thời gian 4 tuần.

Cầm ứng tạo phôi soma: Các cụm mô sẹo được tách bỏ những thân cũ và cấy chuyển sang môi trường SE (Bảng 1), nuôi cấy trong 6 tuần.

Phôi soma này mầm: Các cụm phôi soma đã hình thành được chuyển sang môi trường RE (Bảng 1) trong thời gian 6 tuần.

Tạo rễ và ra cây: Các chồi đạt chiều dài từ 0,7 - 1,5 cm được cấy chuyển sang môi trường R (Bảng 1) trong thời gian 4 tuần. Cây có bộ rễ hoàn chỉnh được chuyển ra nhà lưới, trồng trên giá thể bao gồm đất cát pha 60% cộng với trấu hun 40%, trong 2 tuần đầu tránh ánh sáng chiếu trực xạ.

Các môi trường sử dụng trong nghiên cứu này được chỉnh pH = 5,8 và bổ sung thêm 7 g/l agar. Khử trùng ở nhiệt độ 121°C, áp suất 1,5 atm trong thời gian 15 phút. Nuôi cấy ở nhiệt độ $25 \pm 2^\circ\text{C}$, cường độ ánh sáng 3000 lux với thời gian chiếu sáng 16 h/ngày.

Bảng 1. Thành phần các loại môi trường nuôi cấy.

Môi trường	Ký hiệu	Thành phần
Nảy mầm	G	MS + 30 g saccharose + 7 g agar
Cầm ứng mô sẹo	CL	MS + BAP(1 mg/l)+NAA (từ 1 đến 5 mg/l)
Cầm ứng tạo phôi	SE	MS + BAP (từ 7 đến 15 mg/l) + 60 g saccharose + 7 g agar
Phôi soma nảy mầm	RE	MS + 1 mg/l BAP + 30 g saccharose + 7 g agar
Ra rễ	R	MS + 3 mg/l IBA + 30 g saccharose MS + 10 g saccharose

Chú thích: BAP: N6-benzylaminopurine (= 6-benzyladenine, or BA); IBA: indole-3-butyric acid; MS: Murashige and Skoog's medium; NAA: α -naphthaleneacetic.

KẾT QUẢ, THẢO LUẬN

Khả năng cầm ứng mô sẹo từ thân mầm

Sharry và đồng tác giả (2006) đã sử dụng lá mầm để tạo mô sẹo và tạo phôi trên môi trường đặc và nhận thấy ở nồng độ 3 mg/l NAA, 1 mg/l BAP và 5 mg/l GA3 cho kết quả tạo mô sẹo tốt nhất.

Trong nghiên cứu này, các nồng độ từ 1 - 5 mg/l NAA và 1 mg/l BAP (Bảng 2) đã được sử dụng để tạo mô sẹo từ thân mầm của giống xoan ta. Kết quả cho thấy, hầu hết các nồng độ nghiên cứu

có khả năng tạo mô sẹo. Tuy nhiên, chỉ có ở nồng độ 3 mg/l NAA và 1 mg/l BAP là mô sẹo phát triển tốt nhất với tỷ lệ tạo mô sẹo 92,2% (Bảng 2). Ở nồng độ 2, 4 mg/l NAA mặc dù mô sẹo vẫn phát triển, tuy nhiên tỷ lệ tạo mô sẹo và chất lượng mô sẹo thấp hơn. Hơn nữa, ở nồng độ 2, 4 mg/l NAA khi kéo dài thời gian tạo mô sẹo xuất hiện hiện tượng mô sẹo khô và chết dần. Thời gian tạo mô sẹo thích hợp nhất là 4 tuần. Ở các mốc thời gian sớm hơn 4 tuần thì mô sẹo phát triển chưa đầy đủ và khi kéo dài hơn 4 tuần thì mô sẹo bắt đầu khô và chết. Điều này có thể giải thích là do ảnh hưởng của

các hợp chất thứ cấp tiết ra từ mẫu cây. Một yếu tố có ảnh hưởng khá quan trọng đến khả năng tạo mô sẹo là tuổi cây. Nếu thân dùng để tạo mô sẹo quá

già thì tỷ lệ tạo mô sẹo thấp. Tuổi cây sử dụng tạo mô sẹo tốt nhất là khoảng 15 đến 20 ngày sau khi đặt hạt trên môi trường nảy mầm.

Bảng 2. Kết quả tạo mô sẹo.

Môi trường	NAA (mg/l)	BAP (mg/l)	Thân mầm	Tỷ lệ cảm ứng tạo mô sẹo (%)
CL1	1	1	95	72,6
CL2	2	1	110	75,5
CL3	3	1	90	92,2
CL4	4	1	115	77,4
CL5	5	1	123	74,0

Bảng 3. Tỷ lệ % cụm mô sẹo cảm ứng phôi soma và số phôi soma trung bình/cụm mô sẹo.

Môi trường	BAP (mg/l)	Cụm mô sẹo	Tỷ lệ cảm ứng phôi soma (%)	Số phôi soma TB/cụm mô sẹo nuôi cấy
SE1	7	56	78,6	4,7
SE2	9	56	87,5	9,3
SE3	11	60	95,0	12,7
SE4	13	52	82,7	7,3
SE5	15	65	78,5	5,7

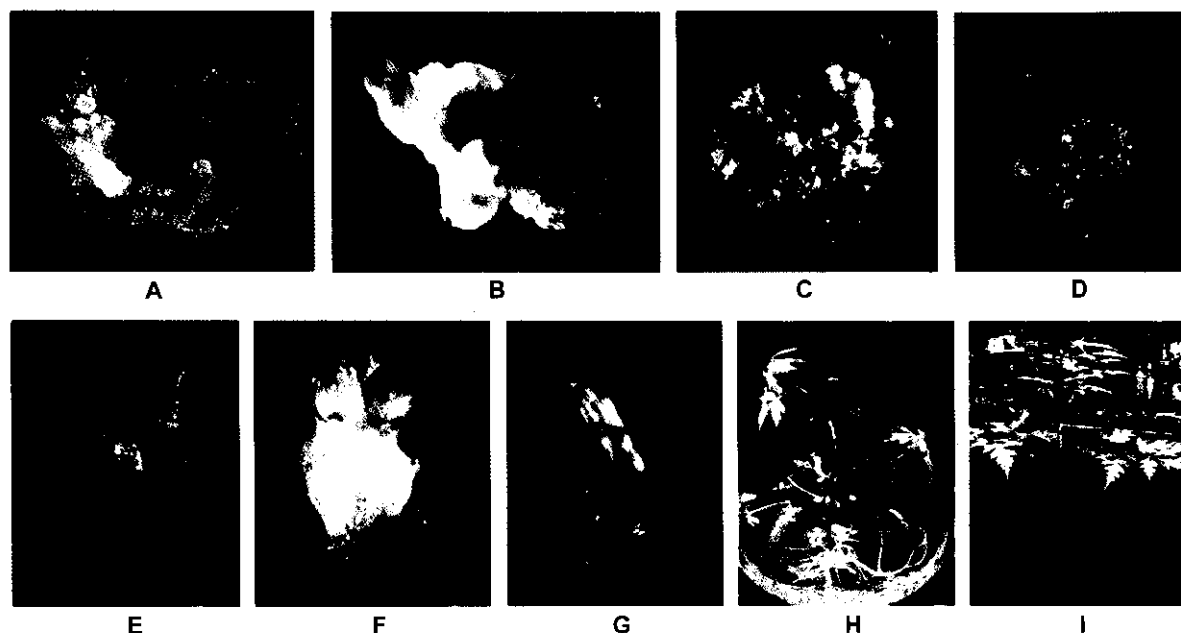
Khả năng cảm ứng phôi từ mô sẹo

Sau khi nuôi trên môi trường cảm ứng tạo mô sẹo 4 tuần , các cụm mô sẹo được chuyển sang môi trường SE. Sau 3 tuần nuôi cấy đã xuất hiện các phôi đầu tiên. Tuy nhiên số lượng phôi và chất lượng phôi thay đổi phụ thuộc vào nồng độ BAP. Ở nồng độ NAA 7 mg/l mặc dù phôi vẫn xuất hiện, nhưng số lượng ít. Ở nồng độ 9 mg/l thì số lượng phôi xuất hiện cũng tương đối nhiều (9,3 phôi/cụm mô sẹo), nhưng nếu duy trì trên môi trường nuôi cấy thì phôi bắt đầu thay đổi từ màu vàng ngà sang màu trắng. Ở nồng độ 11 mg/l NAA phôi phát triển tốt nhất cả về số lượng và chất lượng, số phôi soma tạo được cao nhất là 12,7 phôi trên một đoạn thân mầm ban đầu. Kết quả thu được cũng gần tương tự như của Sharry và đồng tác giả (2006) nồng độ 10 mg/l NAA cho khả năng tạo phôi soma tốt nhất so với các nhóm chất điều hòa sinh trưởng khác. Quan sát dưới kính hiển vi quang học cho thấy, phôi soma có nhiều hình

dạng khác nhau, nhưng đa số là hình cầu và hình trụ (Hình 1B, C). Môi trường nuôi cấy được làm mới 4 tuần một lần để đảm bảo chất lượng môi trường cho phôi phát triển.

Khả năng nảy mầm của phôi

Sau thời gian nuôi cấy trên môi trường SE3 ít nhất 4 tuần, các phôi được hình thành và dần chuyển sang giai đoạn phôi chín. Các cụm phôi chín này được chuyển sang môi trường có nồng độ BAP thấp (1 mg/l BAP) để nảy mầm tạo thành các mầm cây hoàn chỉnh. Giai đoạn này có ý nghĩa quan trọng đối với thí nghiệm, vì nếu số lượng phôi tạo ra nhiều nhưng không nảy mầm được thì cũng không thể có ý nghĩa. Tỷ lệ phôi nảy mầm càng cao thì xác suất chọn được cây biến nạp gen càng lớn. Kết quả có khoảng 70% số phôi có khả năng nảy mầm, tỷ lệ này rất có ý nghĩa cho các thí nghiệm chuyển gen vào cây xoan ta.



Hình 1. Tái sinh cây xoan ta qua các giai đoạn khác nhau. **A:** Mô sẹo đang phân hoá phôi; **B:** Cụm phôi soma; **C:** Phôi soma đang nảy mầm; **D, E, F, G:** Các giai đoạn phát triển của một phôi đơn lẻ; **H:** Cây trên môi trường ra rễ; **I:** Cây trồng chậu đất.

Khả năng tạo rễ

Theo Thakur và đồng tác giả (2004), Vila và đồng tác giả (2005) môi trường MS bổ sung thêm IBA ở nồng độ cao vào giai đoạn tiền cảm ứng rễ sẽ tăng cường khả năng tạo rễ cây xoan ta *in vitro*. Các chồi đạt chiều dài từ 0,7 - 1,5 cm, giai đoạn đầu được cấy lên môi trường tiền cảm ứng tạo rễ MS bổ sung thêm 3 mg/l IBA + 3% saccharose, nuôi trong thời gian 3 ngày và sau đó cây chuyển sang môi trường MS có chứa 1% saccharose không có chất điều hoà sinh trưởng nuôi tiếp trong thời gian 4 tuần. Kết quả thu được cho thấy tỷ lệ chồi ra rễ đạt 100% (Hình 1H). Kết quả này cũng phù hợp với báo cáo của Thakur đồng tác giả (2004), Vila đồng tác giả (2005). Khi nghiên cứu ra rễ cho chồi xoan ta, Sharry và Teixeira da Silva (2006) sử dụng IBA ở nồng độ thấp 0,01 mg/l thì tỷ lệ chồi ra rễ chỉ đạt 17% nhưng khi sử dụng NAA ở nồng độ thấp 0,01 mg/l thì tỷ lệ ra rễ thu được 100% sau 6 tuần nuôi cây.

Trong điều kiện *in vitro*, cây được cung cấp đầy đủ chất dinh dưỡng, ánh sáng và sống trong điều kiện vô trùng. Với mục đích xây dựng một quy trình tái sinh cây hoàn chỉnh phục vụ cho công tác chuyên gen nên hệ thống tái sinh cây không chỉ dừng lại ở

giai đoạn tạo cây *in vitro* mà tiếp tục hoàn thiện chuyển cây ra trồng trong điều kiện nhà lưới. Khi đưa cây tái sinh từ điều kiện phòng thí nghiệm ra nhà lưới cây con phải trải qua các giai đoạn thích nghi dần dần. Cây có bộ rễ phát triển được chuyển ra trồng trên giá thể trấu hun pha cát với tỷ lệ 4:6. Trong 2 tuần đầu cây được nuôi trong phòng nuôi cấy với nhiệt độ 27°C, cường độ chiếu sáng 1000 - 1500 lux, thời gian chiếu sáng 12 h/ngày. Sau 2 tuần đầu cây mô được đưa ra trồng trong nhà lưới, tuần đầu tránh ánh sáng chiếu trực xạ và chăm sóc cây mô như cây hom. Tỷ lệ cây mô sống sót trên giá thể trấu hun pha cát đạt 100% (Hình 1I).

KẾT LUẬN

Thông qua các bước: tạo mô sẹo, cảm ứng tạo phôi, nảy mầm phôi, tái sinh, ra rễ và trồng cây trong bầu đất, một hệ thống tái sinh cây xoan ta hoàn chỉnh thông qua phôi soma đã được nghiên cứu thành công.

Lời cảm ơn: Công trình hoàn thành với sự hỗ trợ kinh phí của đề tài thuộc Chương trình trọng điểm phát triển và ứng dụng Công nghệ sinh học trong

nông nghiệp, Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn. Nghiên cứu được thực hiện có sự dụng các trang thiết bị của Phòng Thí nghiệm trọng điểm Công nghệ Gen, Viện Công nghệ sinh học, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Ahmad Z, Zaidi N, Shah FH (1990) Micropropagation of *Melia azedarach* from mature tissue. *Pakistan J Bot* 22: 172-178.

Andrei GM, Lampuri JS, Coto CE, De Torres RA (1986) An antiviral factor from *Melia azedarach* L. prevents Tacaribe virus encephalitis in mice. *Experientia* 42: 843-845.

Andreu J, Sans A, Riba M (2000) Antifeedant activity of fruit and seed extract of *Melia azedarach* and *Azadirachta indica* on larvae of *Sesamia nonagrioides*. *Phytoparasitica* 28: 311-319.

Breuer M, Schmidt GH (1995) Influence of a short period treatment with *Melia azedarach* extract on food intake and growth of the larvae of *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lep., Noctuidae). *J Plant Dis Protect* 102: 633-654.

Chen CH, Chang S, Cheng L, Hou R (1996) Deterrent effect of the chinaberry extract on oviposition of the diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.) (Lep., Yponomeutidae). *J Appl Ent* 120: 165-169.

Coto CE, De Torres RA (1999) El paraíso (*Melia azedarach* L.): Fuente de productos bioactivos.

Dominguezia 15: 5-15.

Cozzo D (1944) *Árboles para parques y jardines*. Suelo Argentino, Bs. As.:83-84.

Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15: 473-497.

Sharry S, Teixeira da Silva J (2006) Effective organogenesis, somatic embryogenesis and salt tolerance induction *in vitro* in the persian Lilac tree (*Melia azedarach* L.). *Floriculture, Ornamental Plant Biotechn* 2: 318-324.

Sharry S., Cabrera Ponce JL, Estrelia LH, Rangel Cano RM, Lede S, Abedini W (2006) An alternative pathway for plant *in vitro* regeneration of Chinaberry – tree *Meia azedarach* L. derived from the induction of somatic embryogenesis. *Electron J Biotechn* 9(3): 188-194.

Thakur R, Rao P, Bapat V (1998) *In vitro* plant regeneration in *Melia azedarach* L. *Plant Cell Rep* 18: 127-131.

Ursi Ventura M, Ito M (2000) Antifeedant activity of *Melia azedarach* (L.) extracts to *Diabrotica speciosa* (Genn.) (Coleoptera:Chrysomelidae) beetles. *Braz Arch Biol Techn* 2: 215-219.

Vila S, Gonzalez A, Rey H, Mroginski L (2003) Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature zygotic embryos of *Melia azedarach* (Meliaceae). *In vitro Cell Dev Biol Plant* 39: 283-287.

Vila S, Gonzalez A, Rey H, Mroginski L (2005) Plant regeneration, origin, and development of shoot buds from root segment of *Melia azedarach* L. (Meliaceae) seedlings. *In vitro Cell Dev Biol Plant* 41: 746-751.

AN EFFICIENT PROTOCOL FOR PLANT REGENERATION OF XOAN TREE (*MELIA AZEDARACH* L.) VIA SOMATIC EMBRYOGENESIS INDUCTION

Do Xuan Dong¹, Bui Van Thang², Ho Van Giang², Nong Van Hai¹, Chu Hoang Ha^{1,*}

¹Institute of Biotechnology

²Vietnam Forestry University

SUMMARY

A system for callus induction from hypocotyl and regeneration of the persian lilac tree or xoan in Vietnamese (*Melia azedarach* L.) via somatic embryogenesis has been optimised. Research results show that the rate of callus formation on CL media (MS supplemented with 3 mg/l NAA and 1 mg/l BAP) is 92.2%. The callus clusters were subsequently transferred onto SE3 media (MS supplemented with 11 mg/l BAP + 60 g saccharose) for somatic embryogenesis during the period from 4 weeks the number of

* Author for correspondence: Tel: 84-4-37562368; Fax: 84-4-38363144; E-mail: chuhoangha@ibt.ac.vn

embryo as well as embryo quality is the best and the average ratio was 12.7 embryos per explant. Embryo clusters were continue transferred onto RE media for shoot maturation. Complete developed shoots with length of about 0.7 - 1.5 cm were transferred onto R media (MS supplemented with 3 mg/l IBA) for 3 days and rooted on MS without plant growth regulator for 4 weeks with the rate of tree roots out of 100%. Complete plantlets were transferred to greenhouse and cultivated on a mixture rice husk and sand under ratio 4:6. The protocol required 18 weeks in order to produce regenerated plants and the process is entirely appropriate for further genetic transformation experiments.

Keywords: *Callus culture, Melia azedarach L., hypocotyledon, somatic embryos, regeneration*