

Xây dựng hệ thống tái sinh *in vitro* phục vụ chuyển gen ở giống lạc L27 (*Arachis hypogaea* L.)

Vì Thị Xuân Thủy*, Lê Sỹ Bình

Trường Đại học Tây Bắc, phường Tô Hiệu, tỉnh Sơn La, Việt Nam

Ngày nhận bài 12/3/2025; ngày chuyển phản biện 14/3/2025; ngày nhận phản biện 5/4/2025; ngày chấp nhận đăng 10/4/2025

Tóm tắt:

Lạc (*Arachis hypogaea* L.) chứa nhiều giá trị dinh dưỡng tốt cho sức khỏe con người, nhưng phần lớn protein trong lạc có khả năng gây dị ứng cao, đồng thời hàm lượng các amino acid thiết yếu chứa lưu huỳnh thấp. Hơn nữa, sản lượng và giá trị dinh dưỡng ở cây lạc bị ảnh hưởng tiêu cực bởi hạn hán, nhiệt độ khắc nghiệt, độ mặn, lũ lụt và nồng độ CO₂... Mục tiêu của nghiên cứu này nhằm xây dựng hệ thống tái sinh hiệu quả, phục vụ kỹ thuật chuyển gen qua trung gian *Agrobacterium* để nâng cao khả năng chống chịu và cải thiện chất lượng hạt lạc. Kết quả nghiên cứu cho thấy, hiệu quả khử trùng hạt lạc bằng HgCl₂ 0,1% là tốt nhất với tổng thời gian xử lý là 9 phút (5 phút lần 1 và 4 phút lần 2). Chồi ngọn tái sinh tốt nhất ở nồng độ 1,5 mg/l benzylaminopurine (BAP), còn nách lá mầm là 2,0 mg/l BAP. Chồi nách lá mầm cảm ứng tạo đa chồi tốt nhất ở nồng độ 2,0 mg/l BAP kết hợp với 0,7 mg/l α -naphthaleneacetic acid (α -NAA), đạt 4,43 chồi/mẫu. Ngược lại, chồi ngọn không cảm ứng tạo đa chồi. Chồi cảm ứng ra rễ tối ưu ở 0,7 mg/l α -NAA, đạt 8,32 rễ/chồi. Ngưỡng chọn lọc kanamycin hiệu quả ở giai đoạn tái sinh chồi là 75 mg/l, còn giai đoạn ra rễ là 50 mg/l.

Từ khóa: đa chồi, lạc, *in vitro*, ra rễ, tái sinh chồi.

Chỉ số phân loại: 4.1, 4.6

Development of an *in vitro* regeneration system for genetic transformation in peanut variety L27 (*Arachis hypogaea* L.)

Thi Xuan Thuy Vi*, Sy Binh Le

Tay Bac University, To Hieu Ward, Son La Province, Vietnam

Received 12 March 2025; revised 5 April 2025; accepted 10 April 2025

Abstract:

Arachis hypogaea L. has high nutritional value for human health; however, its proteins are highly allergenic, and the levels of essential sulfur-containing amino acids are relatively low. Moreover, peanut yield and nutritional value are adversely affected by abiotic stresses, including drought, extreme temperatures, salinity, flooding, and elevated CO₂ concentrations. This study aimed to develop an efficient regeneration system for *Agrobacterium*-mediated genetic transformation to enhance stress tolerance and improve seed quality in peanuts. The results indicated that the most effective seed sterilisation was achieved using 0.1% mercury(II) chloride (HgCl₂) for a total of 9 minutes (5 minutes for the first treatment and 4 minutes for the second treatment). The optimal shoot tip regeneration was observed at 1.5 mg/l benzylaminopurine (BAP), while cotyledon axil explants showed the best response at 2.0 mg/l BAP. Multiple shoot induction from cotyledon axil explants was most successful with a combination of 2.0 mg/l BAP and 0.7 mg/l α -naphthaleneacetic acid (α -NAA), producing an average of 4.43 shoots per explant. In contrast, apical shoot tips did not induce multiple shoot formation. The highest rooting efficiency was achieved with 0.7 mg/l α -NAA, resulting in an average of 8.32 roots per shoot. Kanamycin selection was effective at 75 mg/l during shoot regeneration and 50 mg/l during rooting.

Keywords: *Arachis hypogaea* L., *in vitro*, multi-shoot, rooting, shoot regeneration.

Classification numbers: 4.1, 4.6

*Tác giả liên hệ: Email: xuanthuy@utb.edu.vn

1. Đặt vấn đề

Lạc (*Arachis hypogaea* L.) hay còn gọi là đậu phộng thuộc họ đậu, là một loại cây trồng quan trọng trên toàn thế giới. Châu Á là nơi sản xuất lạc chính, chiếm 60% sản lượng thế giới. Hạt lạc là một loại thực phẩm giàu năng lượng, chứa lượng lớn chất béo, protein, carbohydrate, vitamin tan trong chất béo và tan trong nước, khoáng chất. Hạt lạc được tiêu thụ trên toàn thế giới do giá trị dinh dưỡng cao, sẵn có và giá cả cạnh tranh so với các loại hạt khác. Do hàm lượng dinh dưỡng cao, hạt được sử dụng để chống suy dinh dưỡng ở hầu hết các nước đang phát triển. Lipid, protein và carbohydrate không chỉ cung cấp năng lượng mà còn cung cấp các chất dinh dưỡng thiết yếu cho các chức năng bình thường của cơ thể như tạo chất dự trữ và xây dựng cơ bắp. Vitamin cần thiết cho chức năng tế bào bình thường, tăng trưởng, phát triển, phòng ngừa bệnh tật và hoạt động như coenzyme trong quá trình sản xuất năng lượng [1-3]. Các nghiên cứu đã chỉ ra rằng, việc sử dụng hạt lạc thường xuyên có khả năng giảm tỷ lệ mắc các bệnh tim mạch và sỏi mật ở cả hai giới và bệnh tiểu đường ở phụ nữ [4].

Trên thế giới, khoảng 2/3 tổng diện tích trồng lạc nằm ở các vùng khô hạn và bán khô hạn. Hạn hán ảnh hưởng đến đặc điểm hình thái, sinh lý và sinh hóa..., do đó làm giảm sản lượng, chất lượng của lạc [5]. Hạn hán làm giảm nghiêm trọng sự hấp thụ các chất dinh dưỡng như nitơ, photpho và kali... làm cho sự sinh trưởng và phát triển của lạc bị ảnh hưởng, dẫn đến giảm sinh khối, năng suất. Mức độ nghiêm trọng của hạn hán trên cây lạc ngoài phụ thuộc vào thời gian và cường độ của hạn, còn phụ thuộc vào thời điểm sinh trưởng của lạc. Nếu hạn hán kéo dài từ khi bắt đầu ra hoa đến giai đoạn làm hạt, sẽ khiến năng suất giảm tới 50%. Bên cạnh đó, hạn cũng ảnh hưởng tiêu cực đến chất lượng dinh dưỡng của hạt lạc. Oleic là acid béo quan trọng liên quan đến chất lượng, hương vị, thời gian bảo quản của hạt lạc, hàm lượng bị giảm khi bị tác động của hạn [6]. Đặc biệt, hạn có thể gây ra sự gia tăng ô nhiễm aflatoxin (chất có khả năng gây ung thư cao đối với cả động vật và con người) trong hạt lạc, do đó làm giảm nghiêm trọng chất lượng hạt [7].

Lạc có nhiều giá trị dinh dưỡng tốt cho sức khỏe con người, tuy nhiên, phần lớn protein trong lạc có khả năng gây dị ứng cao và những người bị dị ứng với lạc nên tránh ăn hạt lạc hoặc các sản phẩm thực phẩm có thể chứa lạc. Ngoài ra, protein hạt lạc có hàm lượng các amino acid thiết yếu chứa lưu huỳnh thấp [2, 8]. Sản lượng, giá trị

dinh dưỡng bị tác động bởi nhiều yếu tố phi sinh học như hạn, nhiệt độ khắc nghiệt, độ mặn, lũ lụt và nồng độ CO₂... [9, 10]. Do đó, cần có nhiều nghiên cứu hơn nữa để tăng các amino acid thiết yếu và giảm hoặc loại bỏ tính gây dị ứng của protein lạc, tăng cường khả năng chống chịu của lạc. Điều này có thể thực hiện được nhờ sự tiến bộ trong công nghệ chỉnh sửa gen.

Đã có nhiều nghiên cứu thành công trong việc xây dựng hệ thống tái sinh từ mô sẹo lạc được cảm ứng từ các bộ phận khác nhau, phục vụ chuyển gen nhờ *Agrobacterium* [11, 12]. Hệ thống tái sinh tạo đa chồi cũng là phương pháp có tiềm năng lớn trong chuyển gen qua *Agrobacterium*, với thời gian tái sinh cây ngắn, cây tái sinh có sức sống tốt, nhưng chưa được quan tâm nghiên cứu. Nghiên cứu này nhằm phát triển một hệ thống tái sinh tạo đa chồi hiệu quả của cây lạc, phục vụ kỹ thuật chuyển gen vào cây lạc thông qua trung gian *Agrobacterium*, để nâng cao khả năng chống chịu, cải thiện chất lượng hạt lạc.

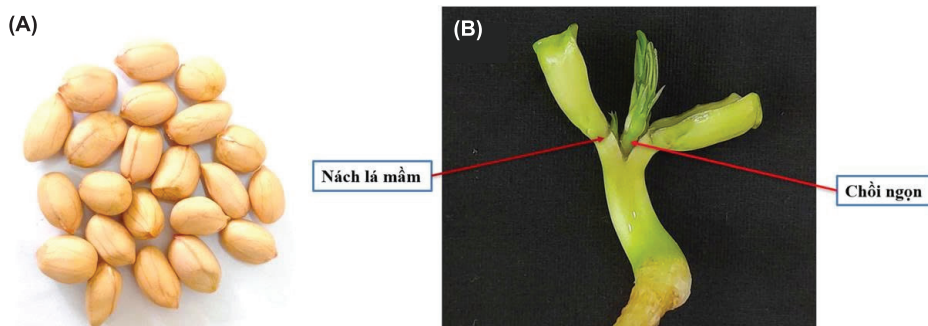
2. Vật liệu, phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu

Hạt lạc giống L27 của Trạm Khuyến nông thị xã Phú Thọ, tỉnh Phú Thọ được sử dụng trong các thí nghiệm, giống lạc này được trồng phổ biến, có diện tích canh tác lớn và cho năng suất cao (32-45,5 tạ/ha). Sử dụng chồi ngọn, nách lá mầm của mầm lạc 7 ngày tuổi (tính từ ngày vào mẫu) nuôi *in vitro* để làm vật liệu nghiên cứu (hình 1). Môi trường nuôi cấy là MS [13] bổ sung saccharose 20 g/l, agar 7 g/l và bổ sung chất điều hòa sinh trưởng khác nhau tùy theo mục đích thí nghiệm. Điều kiện nuôi cấy với nhiệt độ 25±2°C, cường độ ánh sáng 2.500 lux, thời gian chiếu sáng 14 giờ/ngày.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Khử trùng hạt: Quả lạc giống L27 sau khi phơi khô, bóc vỏ, lựa chọn hạt mẩy, không sâu bệnh. Hạt lạc được rửa sạch dưới vòi nước chảy, sau đó tiến hành khử trùng bằng dung dịch HgCl₂ 0,1% trong thời gian khác nhau. Sau lần 1 khử



Hình 1. Hình thái hạt (A), chồi ngọn và nách lá mầm của giống lạc L27 (B).

trùng, tiến hành rửa mẫu bằng nước cất vô trùng ít nhất 5 lần mới tiến hành khử trùng lần 2, sau đó rửa mẫu lại 3-5 lần để khô và hạt được cấy trên môi trường MS.

Ảnh hưởng của nồng độ BAP đến khả năng tái sinh chồi: Chồi ngọn, nách lá mầm được gây tổn thương bằng châm kim nhọn (15 lần/mẫu), sau đó được nuôi trên môi trường MS bổ sung BAP các nồng độ khác nhau.

Ảnh hưởng của nồng độ BAP và α-NAA đến khả năng tạo đa chồi: Chồi tái sinh 21 ngày tuổi được chuyển sang môi trường chứa BAP và bổ sung α-NAA các nồng độ khác nhau.

Ảnh hưởng của nồng độ α-NAA đến khả năng tạo rễ: Chồi đạt kích thước 2-3 cm được nuôi trên môi trường MS, có bổ sung α-NAA với nồng độ khác nhau.

Ngưỡng chọn lọc kanamycin ở giai đoạn chồi: Nách lá mầm sau khi gây tổn thương bằng kim nhọn, được nuôi trên môi trường MS + BAP 2,0 mg/l, được bổ sung kanamycin (0-100 mg/l).

Ngưỡng chọn lọc kanamycin ở giai đoạn ra rễ: Chồi đạt kích thước 2-3 cm được nuôi trên môi trường MS có bổ sung α-NAA 0,7 mg/l, được bổ sung kanamycin với nồng độ 0-100 mg/l.

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Khử trùng hạt lạc tạo vật liệu khởi đầu in vitro

Kết quả khử trùng hạt lạc L27 để tạo vật liệu khởi đầu cho nuôi cấy *in vitro* bằng HgCl₂ 0,1% được trình bày ở bảng 1. Kết quả bảng 1 cho thấy, với khử trùng 1 lần (khử trùng đơn) khi tăng thời gian khử trùng HgCl₂ 0,1% từ 3 đến 11 phút thì tỷ lệ mẫu nhiễm giảm rõ rệt từ 100 còn 20%. Điều đó chứng tỏ, HgCl₂ 0,1% có khả năng khử trùng tốt. Tuy nhiên, khi tăng thời gian khử trùng thì tỷ lệ mẫu không tái sinh cũng tăng theo. Tỷ lệ mẫu sạch tái sinh ở thời gian khử trùng 9 và 11 phút tương đương nhau, đạt lần lượt 44,45 và 44,44%. Với khử trùng 2 lần (khử trùng kép) cho thấy hiệu quả khử trùng tốt hơn. Cùng thời gian khử trùng 9 phút thì ở khử trùng kép (5 phút lần 1 và 4 phút lần 2) tỷ lệ mẫu nhiễm còn 14,44% và tỷ lệ mẫu sạch, tái sinh đạt tới 67,78%, cao hơn 1,52 lần so với khử trùng đơn và cũng là công thức khử trùng hiệu quả nhất. Kết quả nghiên cứu của C.T. Quyen và cs (2022) [12] khử trùng hạt lạc L14 bằng NaOCl 2,5% cũng cho thấy khử trùng kép hiệu quả hơn so với khử trùng đơn.

Bảng 1. Ảnh hưởng của thời gian xử lý HgCl₂ 0,1% đến khả năng tạo mẫu sạch của lạc L27 sau 21 ngày nuôi cấy.

| Thời gian (phút) | Số lượng mẫu | Tỷ lệ mẫu nhiễm (%) | Tỷ lệ mẫu không nhiễm (%) | | |
|------------------|--------------|---------------------|---------------------------|--------------------|---------------------|
| | | | Tỷ lệ không tái sinh | Tỷ lệ mẫu tái sinh | |
| Lần 1 | Lần 2 | | | | |
| 3 | 90 | 100 ^a | 0 ^e | 0 ^f | |
| 5 | 90 | 63,33 ^b | 11,11 ^d | 25,56 ^e | |
| 7 | 90 | 46,67 ^c | 16,67 ^c | 36,66 ^d | |
| 9 | 90 | 32,22 ^d | 23,33 ^b | 44,45 ^c | |
| 11 | 90 | 20,00 ^e | 35,56 ^a | 44,44 ^c | |
| 5 | 3 | 90 | 21,11 ^e | 16,67 ^c | 62,22 ^b |
| 5 | 4 | 90 | 14,44 ^f | 17,78 ^c | 67,78 ^a |
| 5 | 5 | 90 | 13,33 ^f | 22,22 ^b | 64,45 ^{ab} |

Các chữ cái khác nhau trong cột biểu thị sự sai khác có ý nghĩa thống kê với p<0,05.

3.2. Ảnh hưởng của nồng độ BAP đến khả năng tái sinh chồi

Chồi ngọn, nách lá mầm lạc L27 được gây tổn thương bằng kim nhọn, sau đó tiến hành đánh giá ảnh hưởng của BAP đến khả năng tái sinh chồi. Kết quả sau 30 ngày nuôi cấy được trình bày ở bảng 2.

Bảng 2. Ảnh hưởng của nồng độ BAP đến khả năng tái sinh chồi ngọn, nách lá mầm của lạc L27.

| Mẫu | Nồng độ BAP (mg/l) | Số lượng mẫu | Tỷ lệ mẫu tái sinh (%) | Chất lượng chồi |
|-------------|--------------------|--------------------|--------------------------|--------------------------|
| Chồi ngọn | 0 | 90 | 23,33 ^d | Chồi gầy, lá xanh nhạt |
| | 0,5 | 90 | 34,44 ^c | Chồi trung bình, lá xanh |
| | 1,0 | 90 | 68,89 ^b | Chồi mập, lá xanh đậm |
| | 1,5 | 90 | 86,67 ^a | Chồi mập, lá xanh đậm |
| | 2,0 | 90 | 87,78 ^a | Chồi trung bình, lá xanh |
| | 2,5 | 90 | 88,89 ^a | Chồi trung bình, lá xanh |
| Nách lá mầm | 0 | 90 | 13,33 ^e | Chồi gầy, lá xanh nhạt |
| | 0,5 | 90 | 23,22 ^d | Chồi gầy, lá xanh nhạt |
| | 1,0 | 90 | 46,67 ^c | Chồi trung bình, lá xanh |
| | 1,5 | 90 | 71,11 ^b | Chồi mập, lá xanh đậm |
| | 2,0 | 90 | 84,44 ^a | Chồi mập, lá xanh đậm |
| 2,5 | 90 | 85,56 ^a | Chồi trung bình, lá xanh | |

Các chữ cái khác nhau trong cột biểu thị sự sai khác có ý nghĩa thống kê với p<0,05.

Kết quả bảng 2 cho thấy, với mẫu là chồi ngọn nếu không bổ sung BAP (đối chứng) chồi tái sinh đạt 23,33%, chồi gầy, lá xanh nhạt. Khi bổ sung BAP tỷ lệ tái sinh tăng rõ rệt, ở nồng độ BAP 1,5 mg/l tỷ lệ chồi tái sinh 86,67% (gấp 3,71 lần đối chứng), chất lượng chồi tốt, chồi mập, lá xanh đậm. Khi tăng BAP lên 2,0 và 2,5 mg/l tỷ lệ chồi tái sinh tăng lên lần lượt là 87,78 và 88,89% nhưng không có sự sai khác có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$ với tỷ lệ tái sinh chồi ở 1,5 mg/l BAP, hơn nữa chất lượng chồi lại giảm, chồi trung bình, lá xanh. Với mẫu là nách lá mầm, BAP cũng ảnh hưởng tích cực đến khả năng tái sinh chồi, ở lô đối chứng tỷ lệ tái sinh chỉ đạt 13,33%, chồi gầy, lá xanh nhạt. Nhưng bổ sung BAP tỷ lệ tái sinh và chất lượng chồi tăng lên. Trên môi trường bổ sung BAP 2,0 mg/l, tỷ lệ tái sinh chồi đạt 84,44%, chồi mập mạp, lá xanh đậm. Khi tăng BAP lên 2,5 mg/l, tỷ lệ tái sinh đạt 85,56% nhưng chất lượng chồi lại giảm. Do đó, nồng độ BAP thích hợp cho tái sinh chồi ngọn của giống lạc L27 là 1,5 mg/l, tái sinh nách lá mầm là 2,0 mg/l. Theo nghiên cứu của P.T.B. Hoa và cs (2021) [14], nồng độ BAP tái sinh chồi nách lá mầm của giống lạc L14 là 4 mg/l, có thể thấy, nồng độ BAP thích hợp cho tái sinh phụ thuộc vào giống lạc và bộ phận sử dụng.

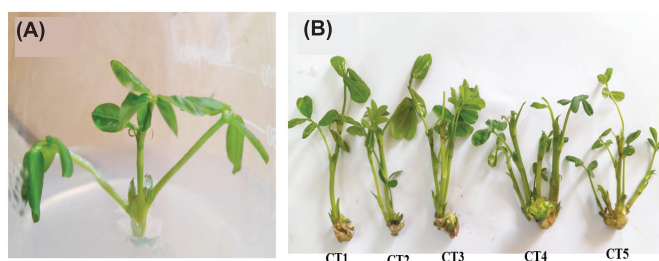
3.3. Ảnh hưởng của nồng độ BAP và α -NAA đến khả năng tạo đa chồi

Khả năng tạo đa chồi là yếu tố quan trọng để tăng hiệu suất chuyển gen nhờ *Agrobacterium* [15], do đó ảnh hưởng của nồng độ BAP và α -NAA đến khả năng tạo đa chồi của chồi ngọn, chồi nách lá mầm lạc L27 được tiến hành, kết quả được trình bày ở bảng 3, hình 2.

Bảng 3. Ảnh hưởng của nồng độ BAP và α -NAA đến khả năng tạo đa chồi lạc L27.

| Mẫu | Nồng độ BAP (mg/l) | Nồng độ α -NAA (mg/l) | Số chồi/mẫu | Chiều cao trung bình chồi (cm) | Trạng thái chồi |
|-------------|--------------------|------------------------------|--------------------|--------------------------------|------------------|
| Chồi ngọn | 1,5 | 0,0 | 1,00 ^c | 10,21 ^a | Mập, xanh đậm |
| | | 0,3 | 1,00 ^c | 10,06 ^a | Mập, xanh đậm |
| | | 0,5 | 1,03 ^c | 9,96 ^a | Mập, xanh đậm |
| | | 0,7 | 1,01 ^c | 10,27 ^a | Mập, xanh đậm |
| | | 0,9 | 1,02 ^c | 9,85 ^a | Mập, xanh đậm |
| Nách lá mầm | 2,0 | 0,0 | 1,24 ^c | 10,34 ^a | Mập, xanh đậm |
| | | 0,3 | 2,12 ^{dc} | 10,09 ^a | Mập, xanh đậm |
| | | 0,5 | 3,15 ^c | 9,74 ^a | Mập, xanh đậm |
| | | 0,7 | 4,43 ^b | 9,24 ^a | Mập, xanh đậm |
| | | 0,9 | 5,54 ^a | 8,06 ^{ab} | Trung bình, xanh |

Các chữ cái khác nhau trong cột biểu thị sự sai khác có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$.



Hình 2. Ảnh hưởng của nồng độ BAP và α -NAA đến khả năng tạo đa chồi của chồi ngọn (A) và chồi nách lá mầm (B) của lạc L27. CT1: BAP 2,0 mg/l + α -NAA 0,0 mg/l; CT2: BAP 2,0 mg/l + α -NAA 0,3 mg/l; CT3: BAP 2,0 mg/l + α -NAA 0,5 mg/l; CT4: BAP 2,0 mg/l + α -NAA 0,7 mg/l; CT5: BAP 2,0 mg/l + α -NAA 0,9 mg/l.

Kết quả bảng 3, hình 2A cho thấy, chồi ngọn nuôi trên môi trường bổ sung BAP và α -NAA vẫn không cảm ứng tạo đa chồi, các lô thí nghiệm đều đạt 1 chồi/mẫu, chồi mập mạp, sinh trưởng tốt đều đạt chiều cao 9,85-10,27 cm. Ở chồi nách lá mầm khi bổ sung 2,0 mg/l BAP vẫn có cảm ứng tạo đa chồi, tuy nhiên chỉ đạt 1,24 chồi/mẫu. Khi bổ sung thêm α -NAA 0,3 mg/l, số chồi/mẫu tăng lên 2,12. Khi tăng α -NAA lên 0,9 mg/l, cảm ứng ra chồi đạt cao nhất với 5,54 chồi/mẫu, nhưng chất lượng chồi có xu hướng giảm, chồi có chiều cao trung bình đạt 8,06 cm. Còn ở công thức bổ sung BAP 2,0 mg/l + α -NAA 0,7 mg/l chồi mập, lá và chồi màu xanh đậm, sinh trưởng tốt và đạt 4,43 chồi/mẫu, đây là công thức cảm ứng chồi tốt nhất trong các nghiệm thức nghiên cứu (không chỉ tối đa số chồi, mà còn xét chất lượng chồi và khả năng sử dụng cho chuyển gen). Như vậy, để chuyển gen vào lạc L27 nhờ vi khuẩn trung gian *Agrobacterium* thì sử dụng tái sinh từ nách lá mầm, do chồi ngọn không cảm ứng tạo đa chồi.

3.4. Ảnh hưởng của nồng độ α -NAA đến khả năng ra rễ

Cảm ứng ra rễ tạo cây hoàn chỉnh có vai trò quan trọng để có thể đưa cây *in vitro* ra ngoài môi trường sống. Nhóm chất điều hòa sinh trưởng auxin có tác dụng kích thích cảm ứng ra rễ của chồi ở nồng độ thích hợp, có nhiều nhóm auxin được dùng trong nuôi cấy mô như: IAA, IBA, α -NAA. Nghiên cứu của P.T.B. Hoa và cs (2021) [14] cho thấy, α -NAA có ảnh hưởng tích cực nhất đến sự ra rễ của giống lạc L14. Do đó, ảnh hưởng của nồng độ α -NAA đến khả năng ra rễ của chồi nách lá mầm lạc L27 được nghiên cứu, kết quả được trình bày ở bảng 4 và hình 3.

Kết quả bảng 4 và hình 3 cho thấy, chồi nách lá mầm lạc L27 nếu không bổ sung α -NAA sau 21 ngày nuôi cấy bắt đầu ra rễ, chỉ có 6/90 chồi ra rễ đạt 6,67%, đạt 1,20 rễ/chồi,

Bảng 4. Ảnh hưởng của nồng độ α -NAA đến khả năng ra rễ của chồi nách lá mầm lạc L27.

| Nồng độ α -NAA (mg/l) | Ngày bắt đầu ra rễ (ngày) | Tỷ lệ ra rễ (%) | Số rễ/chồi | Chất lượng rễ |
|------------------------------|---------------------------|--------------------|--------------------|--------------------------------------|
| 0,0 | 21 | 6,67 ^d | 1,20 ^{dc} | Rễ ngắn, mảnh, không có rễ thứ cấp |
| 0,1 | 12 | 57,78 ^c | 2,34 ^d | Rễ trắng, mập, ít rễ thứ cấp |
| 0,3 | 11 | 71,11 ^b | 4,32 ^c | Rễ trắng, dài, mập, nhiều rễ thứ cấp |
| 0,5 | 10 | 82,22 ^b | 6,43 ^b | Rễ trắng, dài, mập, nhiều rễ thứ cấp |
| 0,7 | 9 | 100 ^a | 8,32 ^b | Rễ trắng, dài, mập, nhiều rễ thứ cấp |
| 0,9 | 9 | 100 ^a | 12,75 ^a | Rễ nâu, mập, ngắn, nhiều rễ thứ cấp |

Các chữ cái khác nhau trong cột biểu thị sự sai khác có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$.

rễ nhỏ, ngắn, không có rễ thứ cấp. Khi bổ sung α -NAA 0,1 mg/l sau 12 ngày đã ra rễ, tỷ lệ ra rễ tăng lên rõ rệt, đạt từ 57,78%, đạt 2,34 rễ/chồi, rễ trắng, mập nhưng ngắn và rất ít rễ thứ cấp. Tăng nồng độ α -NAA lên 0,7 và đạt tỷ lệ ra rễ 100%, số lượng rễ/chồi đạt 8,32, chất lượng rễ tốt, rễ trắng, mập, dài, nhiều rễ thứ cấp. Khi tăng lên 0,9 mg/l đạt 100% mẫu ra rễ, số rễ nhiều tới 12,75/chồi, tuy nhiên chất lượng rễ giảm, rễ màu nâu, ngắn và rất nhiều rễ thứ cấp. Kết quả này cho thấy, nồng độ α -NAA tốt nhất để cảm ứng ra rễ của chồi nách lá mầm là 0,7 mg/l.



Hình 3. Ảnh hưởng của nồng độ α -NAA đến khả năng ra rễ của chồi nách lá mầm lạc L27.

3.5. Ngưỡng chọn lọc kanamycin ở giai đoạn tái sinh chồi và ra rễ

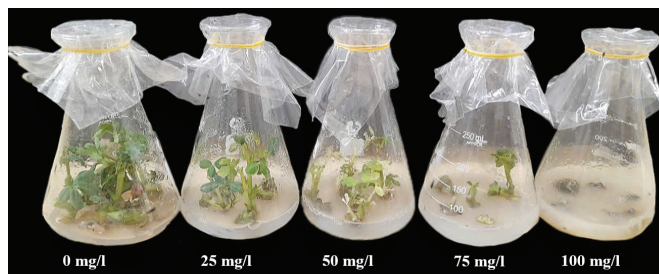
Trong chuyển gen nhờ *Agrobacterium*, thiết kế vector chọn lọc cây chuyển gen kháng sinh kanamycin được sử dụng phổ biến [16], do đó để chọn được cây mang gene chuyển, tiến hành nghiên cứu ngưỡng chọn lọc kanamycin ở giai đoạn tái sinh chồi của nách lá mầm và khả năng ra rễ của giống lạc L27. Kết quả được trình bày ở bảng 5 và hình 4. Kết quả bảng 5 cho thấy, để chọn lọc được cây mang gen

chuyển sử dụng kanamycin ở nồng độ 75 mg/l ở giai đoạn tái sinh chồi nách lá mầm và 50 mg/l ở giai đoạn ra rễ là hiệu quả. Kết quả này cũng tương đồng với nghiên cứu chuyển gen bằng *Agrobacterium* vào giống lạc L12 của N.T.T. Nga và cs (2012) [11] ở giai đoạn tái sinh chồi là 75 mg/l.

Bảng 5. Ảnh hưởng của nồng độ kanamycin đến khả năng tái sinh chồi và ra rễ của giống lạc L27.

| Nồng độ kanamycin (mg/l) | Tỷ lệ chồi tái sinh (%) | Trạng thái chồi | Tỷ lệ ra rễ (%) | Chất lượng rễ |
|--------------------------|-------------------------|---|--------------------|--------------------------------------|
| 0 | 88,89 ^a | Chồi mập, màu xanh đậm, sinh trưởng tốt | 100 ^a | Rễ trắng, dài, mập, nhiều rễ thứ cấp |
| 25 | 67,78 ^b | Chồi mập, màu xanh, sinh trưởng tốt | 46,34 ^b | Rễ nâu, mập, ngắn, nhiều rễ thứ cấp |
| 50 | 35,56 ^c | Chồi mảnh, màu xanh nhạt, sinh trưởng chậm | 16,32 ^b | Rễ nâu, mảnh, ngắn, ít rễ thứ cấp |
| 75 | 21,11 ^d | Chồi mảnh, thấp, màu vàng nhạt, sinh trưởng kém | 0 ^d | 0 |
| 100 | 0 ^e | Mẫu đen, không tái sinh | 0 ^d | 0 |

Các chữ cái khác nhau trong cột biểu thị sự sai khác có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$.



Hình 4. Ảnh hưởng của kanamycin đến khả năng tái sinh chồi giống lạc L27.

4. Kết luận

Trong nghiên cứu này, hiệu quả khử trùng hạt lạc bằng $HgCl_2$ 0,1% tốt nhất, với tổng thời gian xử lý là 9 phút (5 phút lần 1 và 4 phút lần 2), đạt tỷ lệ mẫu tái sinh là 67,78%. Đối với nguyên liệu tái sinh là chồi ngọn, nồng độ BAP 1,5 mg/l là tốt nhất cho tái sinh chồi, còn đối với nách lá mầm là 2,0 mg/l. Chồi nách lá mầm cảm ứng tạo đa chồi tốt nhất với BAP 2,0 mg/l + 0,7 mg/l α -NAA đạt 4,43 chồi/mẫu, ngược lại chồi ngọn không cảm ứng tạo đa chồi. Nồng độ α -NAA cảm ứng ra rễ tối ưu là 0,7 mg/l, đạt 8,32 rễ/chồi, rễ trắng, dài, mập, nhiều rễ thứ cấp. Kanamycin 75 mg/l cho chọn lọc tái sinh chồi và 50 mg/l chọn lọc ra rễ, để chọn lọc được cây mang gen chuyển hiệu quả nhất. Kết quả này là cơ sở để xây dựng quy trình chuyển gen qua trung gian *Agrobacterium*, để nâng cao khả năng chống chịu, cải tạo chất lượng hạt lạc.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được tài trợ từ nguồn kinh phí khoa học và công nghệ của Bộ Giáo dục và Đào tạo cho đề tài mã số: B2024 -TTB-06. Các tác giả xin chân thành cảm ơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] S.S. Arya, A.R. Salve, S. Chauhan (2015), "Peanuts as functional food: A review", *J. Food Sci. Technol.*, **53**, pp.31-41, DOI: 10.1007/s13197-015-2007-9.
- [2] R. Bonku, J. Yu (2020), "Health aspects of peanuts as an outcome of its chemical composition", *Food Science and Human Wellness*, **9**, pp.21-30, DOI: 10.1016/j.fshw.2019.12.005.
- [3] V. Amba, G. Murphy, A.E.S. Wang, et al. (2019), "Nut and peanut butter consumption and mortality in the national institutes of health-AARP diet and health study", *Nutrients*, **11**, DOI: 10.3390/nu11071508.
- [4] B.J. Azad, E. Daneshzad, L. Azadbakht (2020), "Peanut and cardiovascular disease risk factors: A systematic review and meta-analysis", *Food Sci. Nutr.*, **60(7)**, pp.1123-1140, DOI: 10.1080/10408398.2018.1558395.
- [5] M.F. Seleiman, N.A. Suhaibani, N. Ali, et al. (2021), "Drought stress impacts on plants and different approaches to alleviate its adverse effects", *Plants*, **10(2)**, pp.259-325, DOI: 10.3390/plants10020259.
- [6] S. Pokhrel, P. Kharel, S. Pandey, et al. (2025), "Understanding the impacts of drought on peanuts (*Arachis hypogaea* L.): Exploring physio-genetic mechanisms to develop drought-resilient peanut cultivars", *Front. Genet.*, **15**, DOI: 10.3389/fgene.2024.1492434.
- [7] L. Hou, W. Liu, Z. Li, et al. (2014), "Identification and expression analysis of genes responsive to drought stress in peanut", *Russ. J. Plant Physiology*, **61**, pp.842-852, DOI: 10.1134/S1021443714060089.
- [8] R.R. Bansode, P.D. Randolph, N.J. Plundrich, et al. (2019), "Peanut protein-polyphenol aggregate complexation suppresses allergic sensitisation to peanut by reducing peanut-specific IgE in C3H/HeJ mice", *Food Chem.*, **299**, DOI: 10.1016/j.foodchem.2019.125025.
- [9] S. Chaudhry, G.P.S. Sidhu (2022), "Climate change regulated abiotic stress mechanisms in plants: A comprehensive review", *Plant Cell Rep.*, **41(1)**, pp.1-31, DOI: 10.1007/s00299-021-02759-5.
- [10] S. Sachdev, S.A. Ansari, M.I. Ansari, et al. (2021), "Abiotic stress and reactive oxygen species: Generation, signaling, and defense mechanisms", *Antioxidants*, **10(2)**, DOI: 10.3390/antiox10020277.
- [11] N.T.T. Nga, L.T. Binh (2012), "Establishment of a system for regeneration and transformation in peanut (*Arachis hypogaea* L.) using somatic embryo", *Academia Journal of Biology*, **34(3)**, pp.370-376, DOI: 10.15625/0866-7160/v34n3.2471.
- [12] C.T. Quyen, H.D. An, N.N. Khanh, et al. (2022), "Studying the possibility of callus induction from peanut (*Arachis hypogaea* L.) for micropropagation", *Can Tho University Journal of Science*, **2**, pp.155-162, DOI: 10.22144/ctu.jvn.2022.132.
- [13] T. Murashige, F. Skoog (1962), "A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures", *Physiologia Plantarum*, **15(3)**, pp.473-497.
- [14] P.T.B. Hoa, N.H. Tue, P.T.Q. Trang, et al. (2021), "An efficient protocol for *in vitro* regeneration of peanut (*Arachis hypogaea* L.) cultivar L14", *Bioscience Journal*, **37**, pp.1-6, DOI: 10.14393/BJ-v37n0a2021-56949.
- [15] M.G. Sangari, S.R.H. Chandar, S. Mahalakshmi, et al. (2024), "CRISPR/Cas genome editing in legume crops: Challenges and opportunities: A review", *Legume Research*, **47(6)**, pp.875-883, DOI: 10.18805/LR-5321.
- [16] V.T.X. Thuy, B.T.H. Loan, N.H. Quan, et al. (2025), "Characteristics of the constructs designed from the *AhDREB* gene of peanut and the expression vector pBI121 containing the CaMV 35S promoter", *TNU Journal of Science and Technology*, **230(9)**, pp.49-57, DOI: 10.34238/tnu-jst.11608 (in Vietnamese).