

XÂY DỰNG HỆ THỐNG TÁI SINH BẠCH ĐÀN URÔ (*Eucalyptus urophylla* S.T. Blake) TỪ MÔ SẸO PHỤC VỤ CHỌN DÒNG TẾ BÀO

Nguyễn Thị Hường¹, Nguyễn Văn Việt²

^{1,2}Trường Đại học Lâm nghiệp

TÓM TẮT

Tái sinh bạch đàn thông qua tạo đa chồi trực tiếp từ mô sẹo đã được xây dựng thành công. Kết quả cho thấy, dùng đoạn thân mầm 8 -10 ngày tuổi nuôi trên môi trường khoáng MS bổ sung 0,4 mg/l NAA, 0,2 mg/l IBA, 0,2 mg/l BAP, 100 ml/l nước dừa, 20 g/l sucrose, 7 g/l agar, nuôi trong tối 2 tuần, sau đó chuyển ra nuôi sáng với cường độ ánh sáng 2000 lux cho tỉ lệ tạo mô sẹo 97,8%. Tái sinh đa chồi trực tiếp từ mô sẹo trên môi trường khoáng MS bổ sung 0,6 mg/l BAP, 0,1 mg/l Kinetin, 0,3 mg/l NAA, 100 ml/l nước dừa, 20 g/l sucrose, 7 g/l agar, nuôi dưới ánh đèn neon 2000 lux cho tỷ lệ tái sinh chồi đạt 71,8% và số chồi trung bình/mẫu đạt 8,5 sau 4 tuần nuôi cấy. Kích thích ra rễ tạo cây hoàn chỉnh trên môi trường khoáng cơ bản MS bổ sung 0,3 mg/l NAA, 0,2 mg/l IBA, 20 g/l sucrose, 7 g/l agar, tỷ lệ ra rễ đạt 92,4%. Cây hoàn chỉnh được chuyển ra trồng trong bầu đất với thành phần ruột bầu là đất, cát sạch (1:1), tỷ lệ sống đạt 89%. Hệ thống tái sinh cây bạch đàn hiệu suất cao có thể áp dụng trong tạo giống bạch đàn bằng phương pháp chọn dòng tế bào mang biến dị soma có khả năng chịu mặn.

Từ khóa: Bạch đàn Urô, đa chồi, đoạn thân mầm, mảnh lá mầm, mô sẹo, tái sinh.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Việt Nam là quốc gia giáp biển với bờ biển dài và thảm thực vật phong phú. Trước áp lực của sự biến đổi khí hậu, các giống cây bản địa ngày càng bị thu hẹp diện tích sống do tình trạng nước biển dâng. Vì vậy, các nhà khoa học đang hướng đến giải pháp tạo ra một số loài cây có thể sống và sinh trưởng tốt trên những khu vực có điều kiện khí hậu bất thuận như nóng, lạnh, hạn hoặc những vùng đất bị nhiễm phèn, mặn.

Bạch đàn (*Eucalyptus*) là cây gỗ cứng quan trọng, có nguồn gốc từ Úc. Bạch đàn được trồng rừng với diện tích lớn và phổ biến nhất, ước tính khoảng 20 triệu ha trên toàn thế giới, đặc biệt trồng nhiều ở Trung Quốc, Ấn Độ, Nam Mỹ và Đông Nam Á (FAO, 2000). Các chi bạch đàn gồm hơn 700 loài và các giống lai, nhiều loài có giá trị kinh tế cao như loài *E. Camaldulensis*, *E. grandis*, *E. globulus*, *E. urophylla* và giống bạch đàn lai là các loài đang được gây trồng rừng chủ yếu.

Trong những năm gần đây, công nghệ nuôi cấy mô tế bào thực vật đã ra đời và đang không ngừng phát triển, thu được rất nhiều những

thành tựu nổi bật, có vị trí quan trọng trong lĩnh vực sản xuất giống cây trồng. Ưu điểm nổi bật của phương pháp này là có thể tạo được số lượng cây con lớn trong thời gian ngắn, giữ được đặc tính di truyền ổn định, đồng đều về kiểu hình, các cá thể phát triển bình thường, khỏe mạnh (Lê Trần Bình và cộng sự, 1997). Tái sinh cụm chồi *in vitro* trực tiếp từ mô sẹo đã và đang được nghiên cứu mạnh nhằm phục vụ cho công tác nhân giống, chọn tạo giống cây trồng nông lâm nghiệp (Dương Tấn Nhựt và cộng sự, 2007). Đây là kỹ thuật giúp điều khiển sự phát sinh hình thái của thực vật một cách có định hướng dựa vào sự phân hóa và phản phân hóa trên cơ sở tính toàn năng của tế bào thực vật nhằm tạo ra cây hoàn chỉnh từ vật liệu *in vitro*. Quy trình tái sinh một số loài bạch đàn cũng đã được báo cáo: Bandyopadhyay và cộng sự (1999) đã tái sinh thành công loài bạch đàn *E. nitens* và *E. globules* từ thân mầm; Cid và cộng sự (1999) tái sinh thành công loài bạch đàn lai *E. grandis* x *E. urophylla* từ vật liệu lá mầm; Dibax và cộng sự (2010) tái sinh loài bạch đàn *E. camaldulensis* từ mảnh lá mầm; Huang và

cộng sự (2010) cũng báo cáo tái sinh thành công loài bạch đàn *Eucalyptus urophylla* từ đỉnh thân mầm. Cho đến nay, nhiều loài bạch đàn đã được nghiên cứu tái sinh thành công thông qua tạo đa chồi hoặc phôi soma. Tuy vậy, các kết quả nghiên cứu thu được cho thấy ở mỗi loài bạch đàn, thậm chí ở các dòng trong cùng một loài thì khả năng tái sinh có thể khác nhau (Alves và cộng sự, 2004; Dibax và cộng sự, 2005; Hajari và cộng sự, 2006). Kết quả của nghiên cứu này sẽ là cơ sở khoa học về xây dựng hệ thống tái sinh thông qua tạo đa chồi trực tiếp từ mô sẹo có nguồn gốc khác nhau đạt hiệu quả cao phục vụ cho công tác tạo giống cây trồng có khả năng chống chịu các điều kiện bất lợi.

II. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Hạt giống và vật liệu cành bánh tẻ Bạch đàn Urô (*Eucalyptus urophylla*) được cung cấp từ Viện Nghiên cứu cây nguyên liệu giấy tại xã Phù Ninh, huyện Phù Ninh, tỉnh Phú Thọ.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phương pháp nghiên cứu chung

Bố trí thí nghiệm theo phương pháp sinh học thực nghiệm, lặp lại 3 lần, mỗi lần lặp lại có dung lượng mẫu lớn ($n \geq 30$), kết quả là giá trị trung bình của các lần lặp, khử trùng môi trường nuôi cấy ở nhiệt độ 118°C , áp suất 1 atm, môi trường có pH = 5,8. Cường độ chiếu sáng 2.000 – 3.000 lux, nhiệt độ phòng nuôi $24 \pm 2^{\circ}\text{C}$.

2.2.2. Phương pháp bố trí thí nghiệm

Thí nghiệm 1: Tạo mẫu sạch và tái sinh chồi *in vitro*

Hạt bạch đàn đã được tuyển lựa theo tiêu chuẩn TCVN 5378:1991 về hạt giống lâm nghiệp; mẫu cành bánh tẻ được cắt từ những cây sinh trưởng tốt, không sâu bệnh, mỗi đoạn cành có chiều dài 20 - 30 cm, đường kính 0,2 – 0,3 cm, loại bỏ phần quá non. Tiếp theo, mẫu được làm sạch bằng xà phòng loãng (10%) sau

đó sát khuẩn bề mặt bằng ethanol 70% trong 1 phút. Khử trùng mẫu bằng Javen 6% với các thời gian khác nhau (3 - 11 phút). Sau khi khử trùng, mẫu được cấy trên môi trường khoáng cơ bản MS bổ sung 20 g/l sucrose, 7 g/l agar để tái sinh chồi *in vitro*.

Thí nghiệm 2: Cảm ứng tạo mô sẹo từ các vật liệu khác nhau

Khi hạt này mầm tạo thành cây, mẫu cành đã tái sinh chồi non. Thu nhận cây mầm, lá mầm và chồi non, sau đó cắt mẫu thành các mảnh nhỏ (cắt lá thành mảnh nhỏ $0,5 \text{ cm}^2$; cắt thân mầm thành đoạn 0,5 cm) và nuôi cấy trên môi trường khoáng cơ bản MS bổ sung (0,2 – 1,2 mg/l) NAA, (0,2 - 0,3 mg/l) IBA, (0,1 – 0,6 mg/l) BAP, 100 ml/l nước dừa, 20 g/l sucrose, 7 g/l agar, nuôi tối hai tuần sau đó chuyển ra nuôi sáng.

Thí nghiệm 3: Tái sinh chồi trực tiếp từ mô sẹo

Mô sẹo được tạo ra từ các vật liệu khác nhau được nuôi cấy trên môi trường khoáng cơ bản MS bổ sung (0,2 – 1,2 mg/l) BAP, (0,1 - 0,2 mg/l) Kinetin, (0,1 – 0,6 mg/l) NAA, 100ml/l nước dừa, 20 g/l sucrose, 7 g/l agar.

Thí nghiệm 4: Kích thích ra rễ tạo cây hoàn chỉnh

Cắt chồi hữu hiệu (cao 2 – 2,5 cm) nuôi trên môi trường khoáng cơ bản MS bổ sung 0,5 mg/l NAA, 0,2 mg/l IBA, 20 g/l sucrose và 7 g/l agar.

2.2.3. Phương pháp xử lý số liệu

Xử lý số liệu theo phương pháp thống kê sinh học ứng dụng các phần mềm đã lập trình trên máy tính điện tử như Excel và SPSS.

2.3. Địa điểm nghiên cứu

Nghiên cứu được thực hiện tại phòng thí nghiệm Công nghệ tế bào, Viện Công nghệ sinh học Lâm nghiệp - Trường Đại học Lâm nghiệp.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Tạo mẫu sạch và tái sinh chồi *in vitro*

Mẫu hạt bạch đàn sau khi được làm sạch

được khử trùng bằng dung dịch javen 6% với 5 công thức thí nghiệm bố trí khác nhau về thời gian. Sau 20 ngày nuôi cấy trên môi trường

nuôi cấy khởi đầu, kết quả được trình bày ở bảng 1.

Bảng 1. Kết quả tạo mẫu sạch và khả năng tái sinh chồi

Công thức khử trùng	Mẫu hạt		Mẫu cành bánh tẻ	
	Tỷ lệ mẫu sạch (%)	Tỷ lệ nảy mầm (%)	Tỷ lệ mẫu sạch (%)	Tỷ lệ mẫu tái sinh (%)
KT ₁ = 3'	35,6	30,0	5,7	5,5
KT ₂ = 5'	90,6	82,8	17,3	16,8
KT ₃ = 7'	95,0	61,1	33,7	31,4
KT ₄ = 9'	96,7	57,2	47,7	18,9
KT ₅ = 11'	99,4	15,6	71,3	17,8
	$F_{tính} = 8,48 > F_{0,05} = 5,99$		$F_{tính} = 9,02 > F_{0,05} = 5,99$	

Kết quả cho thấy (bảng 1), tỷ lệ mẫu sạch từ vật liệu hạt đạt 35,6 - 99,4%; từ vật liệu cành đạt 5,7 - 71,3%. Khả năng tái sinh chồi từ các công thức khử trùng cũng khác nhau đáng kể, từ vật liệu hạt và cành non có tỷ lệ tái sinh chồi cao nhất lần lượt là 82,8 và 31,4%. Như vậy, từ các nguồn vật liệu khác nhau đã cho kết quả sai khác rõ rệt ở các công thức khử trùng, với thời gian khử trùng càng dài thì tỷ lệ tạo mẫu sạch càng cao, nhưng khả năng tái sinh chồi càng giảm. Điều này cũng có thể giải thích rằng dung dịch javen 6% là một loại hóa chất dùng để khử trùng làm sạch mẫu nhưng lại có tính độc đối với tế bào thực vật, nếu khử trùng thời gian dài thì hóa chất sẽ ngấm vào mô của tế bào thực vật gây độc cho phôi và làm cho phôi bị chết. Do vậy, trong thí nghiệm này đã lựa chọn công thức khử trùng đối với vật liệu hạt bạch đàn là KT₂ = 5 phút, vật liệu là cành non là KT₃ = 7 phút cho hiệu quả tái sinh cao nhất. Kết quả phân tích phương cũng cho thấy $F_{tính}(\text{vật liệu hạt}) > F_{0,05}$; $F_{tính}(\text{vật liệu cành}) > F_{0,05}$, tức là thời gian khử trùng khác nhau ảnh hưởng rõ

rệt đến khả năng tạo mẫu sạch và khả năng tái sinh chồi.

3.2. Ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng thực vật đến hiệu quả tạo mô sẹo

Trong giai đoạn cảm ứng tạo mô sẹo, môi trường dinh dưỡng có vai trò rất quan trọng đến khả năng hình thành các khối mô sẹo, đặc biệt là chất điều hòa sinh trưởng. Các nghiên cứu cho thấy, auxin và cytokinin là hai nhóm chất điều hòa sinh trưởng có ảnh hưởng lớn nhất, lượng chất điều hòa sinh trưởng bổ sung đối với vật liệu nghiên cứu là lá thường cao hơn so với thân. Các mẫu mô sẹo có chất lượng tốt là những khối mô sẹo cứng, màu nâu đỏ, không bị nhiễm, phát triển tốt. Các thí nghiệm tiến hành dưới đây sẽ giúp tìm ra nồng độ NAA, IBA, BAP phù hợp cho việc cảm ứng hình thành mô sẹo.

3.2.1. Tạo mô sẹo từ vật liệu đoạn thân mầm

Kết quả thí nghiệm về ảnh hưởng của tổ hợp chất điều hòa sinh trưởng NAA, IBA, BAP đến khả năng cảm ứng tạo mô sẹo của đoạn thân sau 4 tuần nuôi cấy được thể hiện ở bảng 2.

Bảng 2. Ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng đến tạo mô sẹo từ đoạn thân mầm

CTTN	Chất ĐHST (mg/l)			Tỷ lệ mẫu tạo mô sẹo (%)	Đặc điểm mô sẹo	Chất lượng mô sẹo
	NAA	IBA	BAP			
ĐC	0	0	0	7,6	-	+
TM ₁	0,2	0,2	0,1	67,8	xốp	+
TM ₂	0,4	0,2	0,2	97,8	cứng	+++
TM ₃	0,6	0,2	0,3	83,3	cứng	+++
TM ₄	0,8	0,3	0,4	82,2	cứng	+++
TM ₅	1,0	0,3	0,5	80,0	xốp	++
TM ₆	1,2	0,3	0,6	74,4	xốp	+

$$F_{tính} = 19,37 > F_{0,05} = 4,60$$

Ghi chú: +: mô sẹo có màu nâu nhạt, kích thước khối mô sẹo nhỏ (đường kính <1 cm); ++: mô sẹo có màu trắng, kích thước trung bình (1 cm); +++: mô sẹo có màu hồng nhạt, kích thước lớn (>1 cm); ++++: mô sẹo có màu hồng, kích thước lớn (>1 cm).

Từ kết quả của bảng 2 cho thấy, khi bổ sung chất điều hòa sinh trưởng vào môi trường nuôi cấy, khả năng tạo mô sẹo từ vật liệu là đoạn thân khá tốt, tất cả các công thức đều cho tỷ lệ mô sẹo cao hơn so với công thức đối chứng. Ở công thức không bổ sung chất điều hòa sinh trưởng, không có mẫu nào tạo được mô sẹo. Khi bổ sung chất điều hòa sinh trưởng có nồng độ từ (0,2 – 1,2 mg/l) NAA; (0,2 - 0,3 mg/l) IBA và (0,1 – 0,6 mg/l) BAP, khả năng cảm ứng tạo mô sẹo có sự thay đổi rõ rệt, chất lượng mô sẹo cũng có sự khác nhau, tỷ lệ tạo mô sẹo cao nhất đạt 97,8% (hình 1a, b, c) ở công thức TM₂, khi nồng độ chất điều hòa sinh trưởng tiếp tục tăng, tỷ lệ tạo mô sẹo có xu hướng giảm dần còn 74,4% (TM₆), cùng với đó là chất lượng mẫu mô sẹo cũng suy giảm. Như vậy, công thức môi trường TM₂ có thành phần gồm môi trường khoáng cơ bản MS bổ

sung 0,4 mg/l NAA, 0,2 mg/l IBA, 0,2 mg/l BAP, 100 ml/l nước dừa, 20 g/l sucrose, 7 g/l agar cho tỷ lệ tạo mô sẹo cao nhất và chất lượng mô sẹo tốt. Kết quả phân tích phương sai cho thấy $F_{tính} > F_{0,05}$, chứng tỏ môi trường nuôi cấy có bổ sung chất điều hòa sinh trưởng thực vật khác nhau có ảnh hưởng rõ rệt đến khả năng tạo mô sẹo từ đoạn thân mầm.

3.2.2. Tạo mô sẹo từ mảnh lá mầm

Tế bào thuộc các mô hoặc các cơ quan đã phân hóa của các cây song tử diệp thường phản phân hóa dưới tác động của auxin (riêng rẽ hay kết hợp với một cytokinin) để cho ra mô sẹo (Lê Hồng Giang và cộng sự, 2010). Trong thí nghiệm này, chúng tôi nghiên cứu sự ảnh hưởng của tổ hợp NAA, IBA và BAP có nồng độ khác nhau đến khả năng cảm ứng tạo mô sẹo của mảnh lá mầm. Sau 4 tuần nuôi cấy, kết quả được trình bày ở bảng 3.

Bảng 3. Ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng đến tạo mô sẹo từ mảnh lá

CTTN	Chất ĐHST (mg/l)			Tỷ lệ mẫu tạo mô sẹo (%)	Đặc điểm mô sẹo	Chất lượng mô sẹo
	NAA	IBA	BAP			
ĐC	0	0	0	3,4	-	-
LM ₁	0,2	0,2	0,1	83,3	xốp	++
LM ₂	0,4	0,2	0,2	80,0	cứng	+++
LM ₃	0,6	0,2	0,3	94,4	cứng	+++
LM ₄	0,8	0,3	0,4	68,9	cứng	+++
LM ₅	1,0	0,3	0,5	38,9	Xốp	++
LM ₆	1,2	0,3	0,6	30,0	xốp	+

$$F_{tính} = 7,90 > F_{0,05} = 4,61$$

Ghi chú: +: mô sẹo có màu nâu nhạt, đường kính khối mô sẹo nhỏ (<1 cm); ++: mô sẹo có màu trắng, đường kính trung bình (1 cm); +++: mô sẹo có màu hồng nhạt, kích thước lớn (>1 cm)

Qua kết quả bảng 3 cho thấy, tỷ lệ tạo mô sẹo của các công thức thí nghiệm bổ sung chất điều hòa sinh trưởng có nồng độ khác nhau đã cho kết quả khác nhau tương đối rõ rệt. Ở công thức đối chứng không bổ sung chất điều hòa sinh trưởng, mẫu tạo mô sẹo rất kém, ở các công thức thí nghiệm có nồng độ chất điều hòa sinh trưởng tăng dần (0,2 – 1,2 mg/l) NAA; (0,2 – 0,3 mg/l) IBA; (0,1 - 0,6 mg/l) BAP. Kết quả cho thấy rất khác nhau, trong đó tỷ lệ tạo mô sẹo tăng dần từ công thức LM₁ (83,3%) đến công thức LM₃ (94,4%), tiếp tục tăng nồng độ chất điều hòa sinh trưởng thì tỷ lệ tạo mô sẹo giảm đi rõ rệt, tỷ lệ thấp nhất ở công thức LM₆ (30%), như vậy có thể nói chất điều hòa sinh trưởng có ảnh hưởng lớn đến khả năng tạo mô sẹo, đặc biệt nồng độ cao có thể gây ức chế quá trình hình thành mô sẹo. Thí nghiệm này, đã chọn được công thức phù hợp cho tạo mô sẹo từ vật liệu mảnh lá mầm là LM₃ (với môi trường khoáng cơ bản MS bổ sung 0,6 mg/l NAA, 0,2 mg/l IBA, 0,3 mg/l BAP, 100 ml/l nước dừa, 30 g/l sucrose, 7 g/l agar), cho hiệu

quả cao về tỷ lệ tạo mô sẹo đạt 94,4% (hình 1d, e), chất lượng mô sẹo tốt, màu nâu đỏ, cứng. Kết quả phân tích phương sai cho thấy $F_{tính} > F_{0,05}$, chứng tỏ nồng độ các chất điều hòa sinh trưởng khác nhau ảnh hưởng rõ rệt đến khả năng tạo mô sẹo từ lá mầm.

3.3. Ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng thực vật đến khả năng tái sinh chồi

Để có được số lượng cây lớn, đòi hỏi mô sẹo có khả năng tái sinh lượng lớn chồi, các chồi sinh trưởng và phát triển tốt. Trong nghiên cứu này, hai nhóm chất điều hòa sinh trưởng được sử dụng là auxin và cytokinin, cụ thể đó là BAP, Kinetin và NAA. Vật liệu được sử dụng là mô sẹo có nguồn gốc từ đoạn thân mầm và mảnh lá mầm.

3.3.1. Tái sinh chồi từ mô sẹo tạo ra từ thân mầm

Kết quả nghiên cứu về ảnh hưởng nồng độ các chất điều hòa sinh trưởng BAP, Kinetin và NAA đến sự tái sinh chồi từ mẫu mô sẹo tạo ra từ đoạn thân mầm sau 4 tuần nuôi cấy được thể hiện trong bảng 4.

Bảng 4. Ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng đến tái sinh chồi từ mô sẹo

CTTN	Chất ĐHST (mg/l)			Mô sẹo từ thân mầm		Mô sẹo từ mảnh lá mầm	
	BAP	Kinetin	NAA	Tỷ lệ tái sinh (%)	Số chồi TB/mẫu	Tỷ lệ tái sinh (%)	Số chồi TB/mẫu
ĐC	0	0	0	17,8	2,5	18,9	2,9
TS ₁	0,2	0,1	0,1	38,9	3,1	34,4	5,4
TS ₂	0,4	0,1	0,2	51,1	5,6	54,4	6,1
TS ₃	0,6	0,1	0,3	71,8	8,5	56,7	6,8
TS ₄	0,8	0,2	0,4	54,4	6,6	67,8	8,3
TS ₅	1,0	0,2	0,5	52,2	5,5	58,9	6,6
TS ₆	1,2	0,2	0,6	41,1	5,7	47,8	4,9

$F_{tính} = 64,62 > F_{0,05} = 4,75$ $F_{tính} = 33,24 > F_{0,05} = 4,75$

Kết quả cho thấy (bảng 4), ở các công thức thí nghiệm có bổ sung các chất điều hòa sinh trưởng có nồng độ tăng dần tương ứng với công thức TS₁ đến TS₆. Sau 4 tuần thí nghiệm cho kết quả có sự khác nhau rõ rệt, với các công thức từ TS₁ đến TS₃, nồng độ chất điều hòa

sinh trưởng tăng lên thì tỷ lệ tái sinh chồi và số chồi tạo ra có xu hướng tăng dần theo chiều thuận, tại công thức TS₃ cho kết quả cao nhất về tỷ lệ tái sinh chồi và số lượng chồi lần lượt là 71,8% và 8,5 chồi/mẫu (hình 1f, g, h). Tiếp tục tăng nồng độ các chất điều hòa sinh trưởng

như ở công thức TS₄ đến TS₆ thì kết quả có xu hướng tăng nghịch, có nghĩa là nồng độ chất điều hòa sinh trưởng tăng nên nhưng tỷ lệ mẫu tái sinh chồi và số lượng chồi tạo ra lại có xu hướng giảm đi. Cụ thể là ở công thức TS₆ bổ sung các chất điều hòa sinh trưởng thực vật có nồng độ cao nhất thì tỷ lệ tạo chồi và số chồi trung bình của một mẫu cũng có giá trị thấp nhất (trừ công thức đối chứng) đạt lần lượt là 41,1% và 5,7. Như vậy, trong phạm vi nghiên cứu này đã chọn được công thức TS₃, có thành phần môi trường khoáng cơ bản là MS bổ sung 0,6 mg/l BAP, 0,1 mg/l Kinetin, 0,3 mg/l NAA, 100 ml/l nước dừa, 20 g/l sucrose, 7 g/l agar là công thức môi trường phù hợp cho tái sinh chồi từ mô sẹo có nguồn gốc là đoạn thân mầm. Kết quả phân tích phương sai cũng cho thấy $F_{tính} > F_{0,05}$, chứng tỏ nồng độ các chất điều hòa sinh trưởng khác nhau có ảnh hưởng rõ rệt đến khả năng tái sinh chồi.

3.3.2. Tái sinh chồi từ mô sẹo tạo ra từ mảnh lá mầm

Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của tổ hợp các chất điều hòa sinh trưởng BAP, Kinetin và NAA có nồng độ khác nhau đến sự tái sinh chồi từ mẫu mô sẹo có nguồn từ mảnh lá mầm sau 4 tuần nuôi cấy được thể hiện trong bảng 4.

Từ kết quả bảng 4 cho thấy tỷ lệ tái sinh và số chồi trung bình trên một mẫu của các công thức có bổ sung BAP, Kinetin và NAA đều lớn hơn công thức đối chứng (ĐC) không bổ sung chất điều hòa sinh trưởng cho tỷ lệ tái sinh thấp (18,9%). Ở các công thức thí nghiệm có bổ sung các chất điều hòa sinh trưởng có nồng độ khác nhau theo quy luật tăng dần, cho kết quả thể hiện sự khác biệt và chia thành hai pha rõ ràng. Từ công thức TS₁ đến TS₄, khi tăng nồng độ chất điều hòa sinh trưởng thì các giá trị về tỷ lệ sống cũng như số chồi tăng theo. Tuy nhiên, khi tiếp tục tăng nồng độ các chất điều hòa sinh trưởng (TS₅ - TS₆) thì kết quả lại có chiều hướng ngược lại (tỷ lệ nghịch). Ở công thức TS₄ cho kết quả tốt nhất về tỷ lệ mẫu tái

sinh chồi cũng như số chồi trung bình của mẫu đạt lần lượt là 67,8% và 8,3 chồi/mẫu (hình 1i). Như vậy, công thức thí nghiệm TS₄ có thành phần là môi trường khoáng cơ bản MS bổ sung 0,8 mg/l BAP, 0,2 mg/l Kinetin, 0,4 mg/l NAA, 100 ml/l nước dừa, 20 g/l sucrose, 7 g/l agar là công thức môi trường phù hợp cho giai đoạn tái sinh chồi từ mô sẹo có nguồn gốc là mảnh lá mầm. Kết quả phân tích phương sai cũng cho thấy $F_{tính} > F_{0,05}$, chứng tỏ, chất điều hòa sinh trưởng khác nhau có ảnh hưởng rõ rệt đến khả năng tái sinh chồi.

3.4. Kích thích ra rễ tạo cây con hoàn chỉnh

Các chồi phát triển tốt (kích thước 2 - 2,5 cm) được cấy chuyển lên môi trường khoáng cơ bản MS bổ sung 0,5 mg/l NAA, 0,2 mg/l IBA, 100 ml/l nước dừa, 20 g/l sucrose và 7 g/l agar. Nuôi trong tối 1 tuần đầu sau đó chuyển ra nuôi sáng 2 tuần với cường độ chiếu sáng 2000 lux, nhiệt độ phòng nuôi $24 \pm 2^{\circ}\text{C}$, sau 4 tuần đạt hơn 92,4% chồi ra rễ. Cây con được chuyển ra trồng trong bầu với ruột bầu hỗn hợp, phối trộn đất tầng mặt và cát theo tỷ lệ 1:1, đạt tỉ lệ sống 89,7%.

IV. KẾT LUẬN

Tái sinh cây bạch đàn thông qua tái sinh đa chồi trực tiếp từ mô sẹo đạt một số kết quả sau:

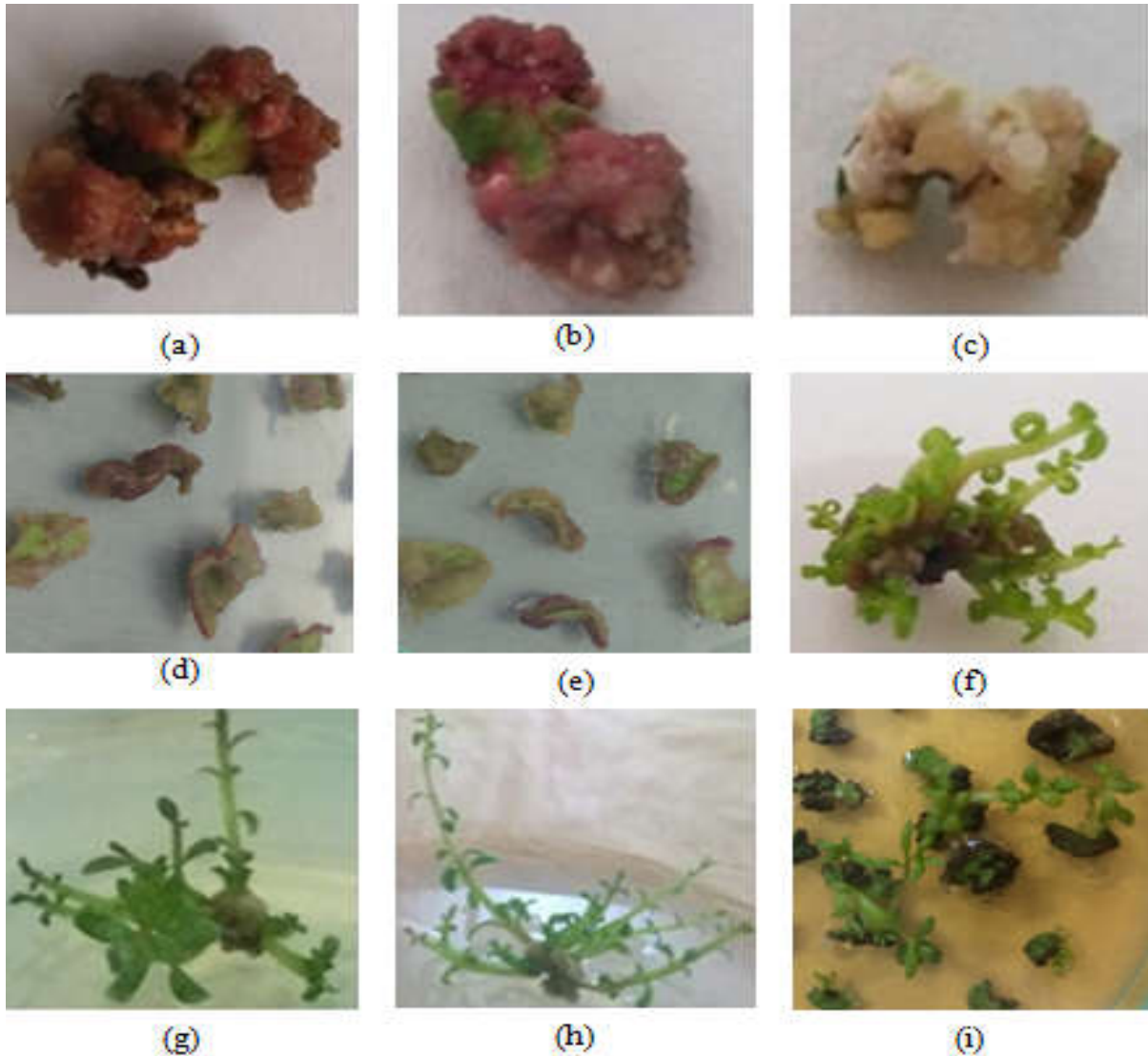
- Dùng dung dịch javen 6% khử trùng hạt trong 5 phút, 7 phút đối với mẫu cành, tỷ lệ mẫu sạch lần lượt là 90,6% và 33,7%; tỷ lệ này mầm lần lượt là 82,8 và 31,4%.

- Thân mầm có tỷ lệ tạo mô sẹo là 97,8% trên môi trường khoáng MS bổ sung 0,4 mg/l NAA, 0,2 mg/l IBA, 0,2 mg/l BAP; mảnh lá mầm cho tỷ lệ tạo mô sẹo đạt 94,4% trên môi trường khoáng MS bổ sung 0,6 mg/l NAA, 0,2 mg/l IBA, 0,3 mg/l BAP.

- Mô sẹo có nguồn từ thân mầm cho tỷ lệ tái sinh chồi và số chồi trung bình lần lượt là 71,8% và 8,5 chồi/mẫu trên môi trường khoáng MS bổ sung 0,6 mg/l BAP, 0,1 mg/l Kinetin,

0,3 mg/l NAA. Vật liệu mô sẹo từ mảnh lá mầm nuôi cấy trên môi trường khoáng MS bổ sung 0,8 mg/l BAP, 0,2 mg/l Kinetin, 0,4 mg/l NAA cho tỷ lệ tái sinh chồi đạt 67,8%, số chồi trung bình/mẫu đạt 8,3.

- Chồi hữu hiệu được nuôi cấy trên môi trường khoáng cơ bản MS bổ sung 0,5 mg/l NAA, 0,2 mg/l IBA, 100 ml/l nước dừa, 20 g/l sucrose và 7 g/l agar, tỷ lệ ra rễ đạt 92,4%.



Hình 1. Một số hình ảnh trong quy trình tái sinh cây bạch đàn Urô

Ghi chú: a, b, c) tạo mô sẹo từ đoạn thân mầm; d, e) tạo mô sẹo từ lá mầm; f, g, h) chồi tái sinh từ mô sẹo có nguồn gốc từ thân mầm; i) chồi tái sinh từ mô sẹo có nguồn gốc mảnh lá mầm.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Dương Tấn Nhựt, Nguyễn Thành Hải, Nguyễn Đức Huy, Lương Ngọc Thuận (2007). Sự phát sinh phôi của các tế bào sinh dưỡng thực vật. *Tạp chí Công nghệ Sinh học* 5.2: 133-149.
2. Lê Trần Bình, Hồ Hữu Nhi, Lê Thị Muội (1997). *Công nghệ sinh học thực vật trong cải tiến giống cây trồng*. NXB. Nông nghiệp Hà Nội: 62-104.
3. Lê Hồng Giang, Nguyễn Bảo Toàn (2010). Tạo

mô sẹo và tái sinh chồi từ mô lá non cây Bí kỳ nam (*Hydnophytum formicarum* Jack.). *Tạp chí Khoa học – Trường Đại học Cần Thơ*, 16a 216-222.

4. Alves, ECSC, Xavier A., Otoni WC. (2004). Organogênese de explante foliar de clones de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla*. *Pesq Agrop Brasil*, 39(5): 421-430.

5. Bandyopadhyay S., Cane K, Rasmussen G., Hamill J.D. (1999). Efficient plant regeneration from

seedling explants of two commercially important temperate eucalypt species – *Eucalyptus nitens* and *E. globules*. *Plant Science*, 140: 189-198.

6. Cid LPB., Machado ACMG., Carvalheira SBRC., Brasileiro ACM. (1999). Plant regeneration from seedling explants of *E. grandis* x *E. urophylla*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 56: 17-23.

7. Dibax R., Deschamps C., Bessalho Filho J. C., Vieira LGE., Molinari HBC., De Campos MKF. And Quoirin M. (2010). Organogenesis and Agrobacterium tumefaciens- mediated transformation of *Eucalyptus saligna* with P5CS gene. *Biologia Plantarum*, 54: 6-12.

8. Dibax R., C. L. Eisfeld, F. L. Cuquel, H. Koehler

and M. Quoirin. (2005). Plant regeneration from cotyledonary explants of *Eucalyptus camaldulensis*. *Scientia Agricola* (Piracicaba, Brazil), 62: 406-412.

9. FAO (Food and Agriculture Organization) (2000). Global Forest Resource Assessment 2000. FAO Forestry Paper No. 140. Rome.

10. Hajari E., Watt M. P., Mycock D. J., McAlister B. (2006). Plant regeneration from induced callus of improved *Eucalyptus clones*. *S. Afr. J. Bot.*, 72: 195-201.

11. Huang Z. C., Zeng F. H., Lu X. Y. (2010). Efficient regeneration of *Eucalyptus urophylla* from seedling-derived hypocotyls. *Biologia Plantarum*, 54: 131-134.

AN EFFICIENT REGENERATION SYSTEM THROUGH CALLUS OF *EUCALYPTUS UROPHYLLA* S. T. BLAKE FOR CELL LINES SELECTION

Nguyen Thi Huong¹, Nguyen Van Viet²
^{1,2}Vietnam National University of Forestry

SUMMARY

Hypocotyls of 8 - 10 day seedling were used as explants to establish a regeneration protocol for *Eucalyptus urophylla*. The explants were cultured in Murashige T. and Skoog F. (MS) medium supplemented with α -naphthalene acetic acid (NAA) 0.4 mg/L, β -indol butyric acid (IBA) 0.2 mg/L, 6-benzylaminopurine (BAP) 0.2 mg/L, coconut water 100 ml/L, sucrose 20 mg/L, agar 7 g/L, the ratio of callus induction was 97.8% after 4 weeks culturing. Callus were cultured in MS medium supplemented with BAP 0.6 mg/L, Kinetin 0.1 mg/L, NAA 0.2 mg/L, sucrose 20 mg/L, coconut water 100 ml/L and agar 7 g/l, showed high frequency of adventitious buds formation (71.8%). Regenerated shoots rooted in MS medium supplemented with NAA 0.3 mg/L, IBA 0.2 mg/L. Plantlets were then successfully transplanted to greenhouse with 92.4% survival. Generally, *Eucalyptus urophylla* regeneration protocol via multiple-shoots induction from callus could be used for further studying as choosing salt tolerant lines formed by *in vitro* somatic mutations .

Keywords: *Eucalyptus urophylla*, hypocotyls, multiple shoots, regeneration, rooted.

Ngày nhận bài : 24/8/2017
Ngày phản biện : 19/9/2017
Ngày quyết định đăng : 03/10/2017