

NGHIÊN CỨU HỆ THỐNG TÁI SINH CÂY BẠCH ĐÀN LAI URÔ (*Eucalyptus urophylla*) THÔNG QUA PHÔI SOMA TỪ CÂY TRỘI ĐƯỢC TUYỂN CHỌN PHỤC VỤ CHUYỂN GEN

Ngô Thị Minh Duyên, Đỗ Thị Thu, Trần Hồ Quang
Viện Nghiên cứu Giống và Công nghệ Sinh học Lâm nghiệp

Từ khóa: Cây bạch đàn lai uro, nuôi cấy mô, phôi soma

TÓM TẮT

Hệ thống tái sinh phôi soma từ cây trội được tuyển chọn cho dòng bạch đàn lai trội uro 89 đã được nghiên cứu thành công. Nguyên liệu cho nghiên cứu tái sinh được lấy từ đoạn thân và lá của chồi in vitro 18 - 22 ngày tuổi sau cấy chuyển. Kết quả nghiên cứu cho thấy, tỷ lệ hình thành mô sẹo trên môi trường MS có bổ sung 2,4D 4mg/l và BAP 3mg/l là 87,9% và 90,5% tương ứng cho đoạn thân và lá. Cụm mô sẹo được chuyển sang môi trường cảm ứng tạo phôi có nồng độ BAP 4mg/l và NAA 0,5mg/l. Cụm phôi tiếp tục được chuyển sang môi trường nảy chồi gồm BAP 1mg/l và NAA 0,5mg/l trong 6 tuần. Môi trường này có tỷ lệ chồi là 53,2% và 62,9% cho đoạn thân và lá. Các chồi sau đó được cấy chuyển sang môi trường tạo rễ gồm 1/2 MS bổ sung thêm IBA 2mg/l và NAA 1mg/l để tạo cây hoàn chỉnh. Môi trường này cho tỷ lệ ra rễ cao nhất là 78,3%.

Study on regeneration system by somatic embryogenesis of selected hybrids of *Eucalyptus urophylla* tree serving for transgenis works

Keywords: *Eucalyptus urophylla* hybrid, somatic embryogenesis, tissue culture

Regeneration from somatic embryogenesis for selected clone of *Eucalyptus urophylla* hybrid have been successfully studied. Materials for regeneration study were obtained from leaves and stem segments of in - vitro shoot after subculture of 18 - 22 days. The study results showed that percentages of callus formation on MS medium supplement with 2.4D 4mg/l and BAP 3mg/l are 87.9% và 90.5 % for stem segments and leaves, respectively. Callus clusters were transferred to embryonic induction medium with BAP 4mg/l and NAA 0.5 mg/. Embryonic cluster continue to be transferred to shoot induction medium containing BAP 1mg/l và NAA 0.5mg/l for six weeks. The medium has shoot induction abilities are 53.3% and 62.9% from stem segments and leaves (respectively). Shoots were then transferred to root induction medium (1/2MS + IBA 2mg/l and NAA 1mg/l) to form complete plant and this medium has highest rooting rate of 78.3%.

I. MỞ ĐẦU

Chuyển gen bạch đàn đã được thực hiện từ những năm 1990 cho nhiều loài bạch đàn như *E. gunnii*, *E. globus*, *E. camaldulensis*, *E. nitens* vv. (Girijashankar, 2011) và chủ yếu tập trung cho các tính trạng về tăng sinh khối, thay đổi tính chất gỗ (thay đổi hàm lượng lignin, cellulose), chống chịu với các điều kiện ngoại cảnh bất lợi (hạn hán, lạnh nhiễm mặn) và sâu bệnh hại.

Nhiều gen hữu ích đã được chuyển vào các loài bạch đàn như gen chống chịu sâu ăn lá (Cry3A, bar) (Harcourt và đồng tác giả, 2000), gen C4H, nptII, uidA (Zenn - Zong và đồng tác giả, 2001) làm giảm hàm lượng lignin được chuyển vào Bạch đàn camal. Gen Ceceropin D làm tăng khả năng chống chịu với vi khuẩn gây héo ngọn (*Pseudomonas solanacearum*) lên 35% ở Bạch đàn uro (Shao và đồng tác giả, 2002), gen CodA làm tăng khả năng hấp thụ lân trong đất cho cây Bạch đàn lai *E. grandis* × *E. urophylla* (Kawazu và đồng tác giả, 2003) vv.

Trong những năm gần đây, việc tạo ra các giống mới bằng cách lai giống trong và khác loài là một hướng đi mới có nhiều triển vọng trong nghiên cứu cải thiện giống cây rừng và đã góp phần nâng cao năng suất rừng trồng. Thông qua các chương trình lai giống và chọn giống, đã có nhiều tổ hợp lai trong và khác loài giữa Bạch đàn uro với các loài bạch đàn khác được đánh giá là những dòng bạch đàn lai có sinh trưởng tốt, vượt trội so với các giống đối chứng và các giống sản xuất đại trà (Hà Huy Thịnh và đồng tác giả, 2011).

Cùng với các giống lai khác loài, nhiều giống lai trong loài có ưu thế lai vượt trội hơn so với giống bố mẹ. Ở Bạch đàn lai UU, khảo nghiệm sau 2 tuổi cho thấy một số tổ hợp lai

trong loài UU có sinh trưởng vượt trội như dòng UU89, UU28, UU78 có sinh trưởng nhanh hơn rõ rệt so với các giống đối chứng Usx (Hà Huy Thịnh và đồng tác giả, 2011).

Trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng dòng bạch đàn lai có triển vọng UU89 làm đối tượng nghiên cứu để chuyển gen tăng chiều dài sợi gỗ EcHB1. Để chuyển được gen đích vào đối tượng nghiên cứu, việc xây dựng được hệ thống tái sinh in - vitro cho cây bạch đàn là rất quan trọng, đặc biệt là việc tái sinh từ nguồn vật liệu lấy từ cây trội đã được chọn lọc ngoài thực địa, không phải tái sinh từ thân mầm. Trong bài báo này, chúng tôi trình bày kết quả tái sinh cây bạch đàn lai uro thông qua phôi soma từ cây trội làm nguyên liệu cho nghiên cứu chuyển gen.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Nguyên liệu là các đoạn thân được lấy từ cây trội dòng UU89 tại Cẩm Quỳnh thuộc Trung tâm Nghiên cứu Thực nghiệm Ba Vì thuộc Viện Nghiên cứu Giống và Công nghệ sinh học Lâm nghiệp - Viện Khoa học Lâm nghiệp Việt Nam.

Các đoạn thân được rửa sạch bằng nước sạch, tiếp tục được rửa bằng xà phòng, sau đó được sát khuẩn bằng cồn 70% trong 2 phút, cuối cùng được khử trùng bằng HgCl₂ 0,05% trong 5 phút và rửa sạch bằng nước cất vô trùng 5 lần. Các đoạn thân đã khử trùng được cấy trên môi trường MS có bổ sung thêm 3% đường sacarose. Các chồi mới được hình thành sau 2 - 3 tuần nuôi cấy, khi các chồi đạt chiều cao 0,5 - 1 cm được cắt và cấy chuyển sang môi trường MS bổ sung thêm 3% đường sacarose, 0,5mg/l BAP và 0,3mg/l IBA để nhân nhanh chồi làm vật liệu cho các thí nghiệm tái sinh qua thân và lá.

2.2. Nghiên cứu môi trường cảm ứng tạo mô sẹo

Các chồi sau cấy chuyển 18 - 22 ngày được cắt thân và lá thành những đoạn nhỏ khoảng 0,5cm, cấy trên môi trường tạo mô sẹo, nuôi cấy trong tối 3 tuần, sau đó chuyển ra điều kiện chiếu sáng 16 h/ngày. Thành phần môi trường thí nghiệm C1, C2, C3, C4 là MS + 2,4D (từ 1 đến 4mg/l) và C5, C6, C7 và C8 là MS + 2,4D (từ 1 đến 4mg/l) + BAP 3mg/l. Đối chứng là ĐC.

2.3. Nghiên cứu môi trường cảm ứng tạo phôi soma

Các cụm mô sẹo được cấy chuyển sang môi trường thí nghiệm, ký hiệu là E1 - E4: MS + BAP (2, 4, 6, 8mg/l) + NAA (0,5mg/l) để cảm ứng tạo phôi soma. Đối chứng là ĐC.

2.4. Nghiên cứu môi trường kích thích phôi soma nảy chồi

Cụm phôi soma được chuyển sang môi trường kích thích nảy chồi thí nghiệm, ký hiệu là G1 - G4 là MS + BAP (từ 0,5 đến 2mg/l) + NAA (0,5mg/l). Đối chứng là ĐC.

2.5. Nghiên cứu môi trường tạo rễ và huấn luyện cây con

Các chồi đạt chiều cao từ 2 - 3cm được cấy chuyển sang môi trường tạo rễ trong 4 tuần. Cây con có rễ hoàn chỉnh được chuyển ra nhà lưới huấn luyện với điều kiện bên ngoài. Cây con được cấy trên giá thể cát trong vòng

2 tuần để cây cứng cáp, sau đó chuyển vào bầu đất, toàn bộ thời gian này được giữ trong điều kiện ánh sáng tán xạ. Thành phần môi trường thí nghiệm R1 - R4 là 1/2MS + IBA (từ 0,5 đến 2mg/l) + NAA (0,5mg/l); R5 - R8 là 1/2MS + IBA (từ 0,5 đến 2mg/l) + ABT (0,5mg/l); R9 là 1/2MS + IBA (2mg/l) + NAA (1mg/l); R10 là 1/2MS + IBA (2mg/l) + ABT (1mg/l).

Các môi trường nuôi cấy invitro là môi trường MS, bổ sung thêm đường 30g/l, gerilte 2,2g/l và các chất điều hòa sinh trưởng khác, pH = 5,8. Môi trường được vô trùng ở 121°C, 1,1 atm trong thời gian 20 phút. Mẫu vật được nuôi cấy ở nhiệt độ 25 - 28°C, ngoại trừ giai đoạn đầu của cảm ứng tạo mô sẹo, các giai đoạn tiếp theo được nuôi cấy với cường độ ánh sáng 2000lux, thời gian chiếu sáng 16 giờ/ngày.

Số liệu được phân tích và so sánh sai khác giữa các công thức thí nghiệm theo chương trình thống kê GraphPad Prism 4.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Tạo mô sẹo từ thân và lá

Ouyang và đồng tác giả (2012) đã phối hợp 2,4D (4,5µM ≈ 1mg/l) và BAP (0,9, 1,8, 2,7µM ≈ 0,2mg/l, 0,4mg/l, 0,6mg/l) để tạo mô sẹo từ thân mầm của cây con bạch đàn lai *E. urophylla* × *E. grandis* cho tỷ lệ mô sẹo đạt 60 - 75%. Khi tác giả phối hợp PBU (13,2µM) với IAA (0,285µM ≈ 0,05mg/l) cho tỷ lệ tạo mô sẹo cao nhất, đạt 96%.

Bảng 1. Ảnh hưởng của nồng độ 2,4D và BAP đến khả năng tạo mô sẹo sau 4 tuần nuôi cấy

Vật liệu nuôi cấy	CTMT	2,4D (mg/l)	BAP (mg/l)	Tỷ lệ tạo mô sẹo	Đặc điểm mô sẹo
Thân	ĐC	0	0		
	C 1	2	0	65,6 ± 3,1	Trắng
	C 2	3	0	72,4 ± 1,3	Trắng
	C 3	4	0	82,4 ± 1,3	Trắng vàng

Vật liệu nuôi cấy	CTMT	2,4D (mg/l)	BAP (mg/l)	Tỷ lệ tạo mô sẹo	Đặc điểm mô sẹo
	C 4	5	0	72,1 ± 1,7	Trắng vàng
	C 5	2	3	71,3 ± 1,6	Xanh vàng, trắng hồng
	C 6	3	3	82,5 ± 2,2	Xanh vàng, trắng hồng
	C 7	4	3	87,9 ± 0,7	Xanh vàng, trắng hồng
	C 8	5	3	83,5 ± 0,7	Xanh vàng, trắng hồng
Lá	ĐC	0	0		
	C 1	2	0	70,5 ± 2,2	Trắng
	C 2	3	0	77 ± 1,1	Trắng
	C 3	4	0	84 ± 0,3	Trắng vàng
	C 4	5	0	75,1 ± 1	Trắng vàng
	C 5	2	3	75,3 ± 1,2	Xanh vàng, trắng hồng
	C 6	3	3	85 ± 1,3	Xanh vàng, trắng hồng
	C 7	4	3	90,5 ± 0,6	Xanh vàng, trắng hồng
	C 8	5	3	84,8 ± 0,7	Xanh, trắng hồng

Trong nghiên cứu này, nguyên liệu là chồi *in vitro* của dòng cây trọt có tỷ lệ mẫu tạo mô sẹo cao nhất 87,9% và 90,5% tương ứng cho đoạn thân và lá ở công thức MS + 2,4D 4mg/l + BAP 3mg/l (Bảng 1). Nếu chỉ sử dụng riêng 2,4D nồng độ từ 2 - 5mg/l, tỷ lệ tạo mô sẹo đạt từ 65,6 - 84%, mô sẹo có màu trắng, trắng vàng. Khi phối hợp các nồng độ 2,4D với BAP nồng độ 3mg/l, thì tỷ lệ tạo mô sẹo đạt cao hơn từ 72,7 - 90,5%, mô sẹo có màu xanh - xanh vàng hoặc xanh - trắng hồng ở cả đoạn thân và lá, loại mô sẹo này có nhiều khả năng biệt hóa thành phôi soma. Không thấy sự hình thành mô sẹo ở công thức đối chứng (không có chất điều hòa sinh trưởng thực vật). Thời gian tạo mô sẹo tốt nhất là 4 tuần, nếu sớm hơn, các mô sẹo chưa phát triển đầy đủ, nếu kéo dài thì mô sẹo bị khô. Ngoài ra các mẫu làm vật liệu nuôi cấy mô sẹo cũng ảnh hưởng lớn đến khả năng tạo mô sẹo. Tuổi chồi *in vitro* sử dụng tạo mô sẹo tốt nhất từ 18 - 22 ngày sau cấy chuyển, trong đó nuôi tối từ ngày khoảng 10 - 14 ngày sau đó chuyển sang nuôi sáng từ 7 - 8 ngày.

3.2. Phát sinh phôi vô tính

Sau 6 tuần nuôi cấy trên môi trường cảm ứng tạo phôi soma, tỷ lệ cảm ứng phôi soma cao nhất là 52,4% và 57,1% tương ứng cho mẫu mô sẹo từ đoạn thân và lá ở công thức MS + BAP 4mg/l + NAA 0,5mg/l (Bảng 2). Phôi soma có màu xanh - hồng hình thành trên khắp bề mặt mô sẹo. Khả năng cảm ứng tạo phôi soma từ các mô sẹo phát sinh từ lá cao hơn khoảng 5% so với các mô sẹo phát sinh từ đoạn thân. Khi giảm nồng độ BAP xuống 2mg/l tỷ lệ phôi soma tạo thành thấp hơn (41 và 45,8% tương ứng cho đoạn thân và lá) nhưng với nồng độ BAP cao 6 - 8mg/l lại có hiện tượng ức chế quá trình tạo phôi soma. 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). Các mô sẹo được cấy chuyển 3 tuần một lần để chất lượng môi trường được đảm bảo cho sự phát triển của phôi.

Bảng 2. Ảnh hưởng của nồng độ BAP và sự phối hợp với NAA đến khả năng tạo phôi Soma sau 6 tuần nuôi cấy

Vật liệu nuôi cấy	Môi Trường	BAP (mg/l)	NAA (mg/l)	Tỷ lệ cảm ứng phôi soma (%)
Thân	E 1	2	0,5	41 ± 2,3
	E 2	4	0,5	52,4 ± 1,6
	E 3	6	0,5	45,2 ± 2,2
	E 4	8	0,5	38,3 ± 2,9
Lá	E 1	2	0,5	45,8 ± 3,2
	E 2	4	0,5	57,1 ± 0,8
	E 3	6	0,5	49,7 ± 1,2
	E 4	8	0,5	42 ± 3,2

3.3. Khả năng nảy chồi của phôi vô tính

Sau thời gian nuôi cấy trên môi trường có nồng độ cytokinin cao, các cụm phôi được chuyển sang môi trường có nồng độ BAP thấp hơn để các mầm phôi tạo thành các chồi hoàn chỉnh. Giai đoạn này rất quan trọng trong chuyển gen, tỷ lệ nảy chồi của phôi càng cao thì xác suất chọn được cây biến nạp gen càng lớn. Kết quả bảng 3 cho thấy, tỷ lệ nảy chồi của phôi soma phụ thuộc rất nhiều vào nồng độ BAP, tỷ lệ nảy chồi cao nhất khi phối hợp BAP nồng độ 1mg/l + NAA nồng độ 0,5mg/l đạt 53,2% và 62,9%, ở công thức này cũng có số chồi/ phôi lớn nhất đạt 5,4 và 5,7 chồi tương ứng cho đoạn thân và lá (Hình 1 C, D). Khi tăng nồng độ BAP lên đến 1,5 và 2mg/l các phôi này bị ức chế quá trình phát sinh chồi. Nhìn chung, ở các nồng độ khác, tỷ lệ nảy chồi của phôi soma thấp dưới 50%. Các

công thức thí nghiệm này đều có sai khác có ý nghĩa với $P < 0,05$.

Kết quả nghiên cứu này cao hơn so với nghiên cứu của Hervé và đồng tác giả (2001) cho hai dòng cây trụi bạch đàn *E. gunnii*, khi tác giả sử dụng BAP nồng độ 1µM/l (~ 0,22mg/l) tỷ lệ phát sinh phôi vô tính đạt 31,1%, tuy nhiên tăng nồng độ BAP lên 2,25µM và 4,5µM (0,5mg/l và 1mg/l) thì tỷ lệ phát sinh phôi giảm tương ứng 20,6% và 5,9%, như vậy chỉ sử dụng BAP riêng rẽ ở nồng độ cao có xu hướng ức chế sự phát sinh phôi vô tính. Nghiên cứu của Ouyang và đồng tác giả (2012) cho thấy bạch đàn lai *E. urophylla* × *E. grandis* có tỷ lệ phát sinh phôi cao đạt 91,3% khi phối hợp BAP 4,46µM + NAA 0,25µM (~1mg/l + 0,05mg/l). Điều này chứng tỏ rằng tỷ lệ phát sinh phôi phụ thuộc vào khả năng thích ứng của từng loài bạch đàn khác nhau.

Bảng 3. Ảnh hưởng của nồng độ BAP và sự phối hợp với NAA đến khả năng nảy chồi sau 6 tuần

Vật liệu nuôi cấy	CTMT	BAP (mg/l)	NAA (mg/l)	Tỷ lệ nảy chồi của phôi soma (%)	Số chồi/phôi
Thân	G 1	0,5	0,5	37,1 ± 2,3	5 ± 0,1
	G 2	1	0,5	53,2 ± 2,3	5,4 ± 0,1
	G 3	1,5	0,5	43,9 ± 2,1	4,5 ± 0,1
	G 4	2	0,5	32,8 ± 2,2	3,2 ± 0,2
Lá	G 1	0,5	0,5	46,8 ± 2,3	5,4 ± 0,1
	G 2	1	0,5	62,9 ± 2,3	5,7 ± 0,1
	G 3	1,5	0,5	53 ± 2,1	4,5 ± 0,1
	G 4	2	0,5	42,2 ± 2,2	3,5 ± 0,2

3.4. Khả năng tạo rễ

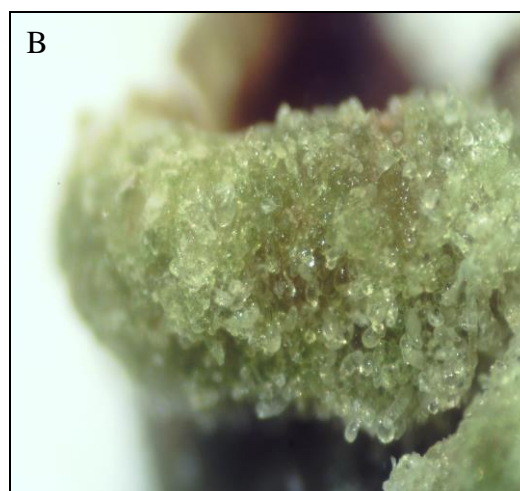
Bạch đàn uro là một trong những loài có khả năng ra rễ khó hơn các loại bạch đàn khác, do vậy các môi trường ra rễ được sử dụng là môi trường 1/2MS có bổ sung thêm IBA, NAA, ABT ở các nồng độ khác nhau. Khi các chồi dài từ 2 - 3cm, khỏe mạnh, được cấy vào môi trường tạo rễ. Kết quả bảng 4 cho thấy từ ngày thứ 10 cấy trên môi trường, rễ bắt đầu xuất hiện, sự phát triển của rễ tập chung từ ngày thứ 12 đến ngày thứ 18 sau khi cấy. Công thức IBA 2mg/l + NAA 1mg/l cho tỷ lệ ra rễ cao nhất đạt 78,3%, các nồng độ phối hợp khác thấp hơn giữa IBA với NAA và

ABT đều cho tỷ lệ ra rễ ít hơn (Bảng 4). Ở công thức này ngoài tỷ lệ ra rễ cao còn tạo cho chồi ra nhiều rễ nhất là 4,9 rễ/chồi.

Kết quả nghiên cứu này có tỷ lệ ra rễ cao hơn so với nghiên cứu của Nourissier và Monteuis (2008) cho bạch đàn *E. urophylla* × *E. grandis* khi phối hợp IBA 1mg/l với BAP 0,08mg/l đạt tỷ lệ ra rễ 50%, nhưng thấp hơn tỷ lệ ra rễ của bạch đàn U6 đạt 93% trong môi trường có IBA 1mg/l (Trần Thị Doanh, 2010). Điều này cũng chứng tỏ rằng các dòng bạch đàn khác nhau có phản ứng hình thành rễ khác nhau.

Bảng 4. Ảnh hưởng của IBA, NAA và ABT đến khả năng ra rễ sau 4 tuần

CTMT	IBA (mg/l)	NAA (mg/l)	ABT (mg/l)	Tỷ lệ ra rễ (%)	Số rễ/chồi	Chiều dài rễ dài nhất (cm)
R 1	0,5	0,5	-	46,7	1,9 ± 0,7	1,7 ± 0,6
R 2	1	0,5	-	60	2,7 ± 0,9	2 ± 0,5
R 3	1,5	0,5	-	73,3	3,5 ± 1,1	2,1 ± 0,5
R 4	2	0,5	-	70	3,2 ± 1,1	2,4 ± 0,6
R 5	0,5	-	0,5	36,7	1,8 ± 0,7	1,2 ± 0,5
R 6	1	-	0,5	43,3	2,7 ± 1,1	1,9 ± 0,7
R 7	1,5	-	0,5	60	3,3 ± 1	2,1 ± 0,5
R 8	2	-	0,5	53,3	3,4 ± 1,1	2,1 ± 0,7
R 9	2	1	-	78,3	4,9 ± 1,5	2,8 ± 0,6
R 10	2	-	1	66,7	4,2 ± 1,2	2,5 ± 0,6





Hình 1. Tái sinh cây bạch đàn qua các giai đoạn khác nhau.

A: cụm mô sẹo đang phân hóa phôi; B: cụm phôi soma;
C, D: Các giai đoạn nảy chồi của phôi soma; E: Cây ra rễ; F: Cây trồng ra bầu đất

IV. KẾT LUẬN

Môi trường MS bổ sung 2,4D nồng độ 4mg/l kết hợp với BAP nồng độ 3mg/l cho hiệu quả tạo mô sẹo cao 87,9% và 90,5% tương ứng cho mẫu thân và lá, mô sẹo xanh có khả năng tạo phôi soma cao.

Môi trường phát sinh phôi soma khi sử dụng MS +BAP nồng độ 4mg/l + NAA nồng độ 0,5mg/l đạt tỷ lệ 52,4% và 57,1% tương ứng cho mẫu thân và lá.

Môi trường MS + BAP nồng độ 1mg/l và NAA nồng độ 0,5mg/l thích hợp cho phôi

soma nảy chồi, đạt tỷ lệ 53,2% và 62,9% tương ứng cho mẫu thân và lá.

Môi trường ra rễ thích hợp khi sử dụng MS + IBA 2mg/l + NAA 1mg/l đạt tỷ lệ ra rễ 78,3%.

LỜI CẢM ƠN

Công trình được hoàn thành bởi kinh phí của đề tài “Nghiên cứu tạo giống bạch đàn lai biến đổi gen cho chiều dài sợi gỗ ở Việt Nam” thuộc “Chương trình trọng điểm ứng dụng Công nghệ Sinh học Nông nghiệp trong lĩnh vực nông nghiệp và phát triển nông thôn đến năm 2020”.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Girijashankar, V., 2011. Genetic transformation of eucalyptus. *Physiology and molecular biology of plants* 17: 9 - 23.
2. Hà Huy Thịnh, Phí Hồng Hải, Nguyễn Đức Kiên, 2011. Chọn tạo giống và nhân giống cho một số loài cây trồng rừng chủ yếu. Nxb. Nông nghiệp, Hà Nội.
3. Harcourt, R. L., Kyozyuka, J., Floyd, R. B., Bateman, K. S., Tanaka, H., Decroocq, V., Llewellyn, D. J., Zhu, X., Peacock, W. J., Dennis, E. S., 2000. Insect - and herbicide - resistant transgenic eucalypts. *Molecular Breeding* 6: 307 - 315.
4. Hervé, P., Jauneau, A., Pâques, M., Marien, J. - N., Michel Boudet, A., Teulieres, C., 2001. A procedure for shoot organogenesis in vitro from leaves and nodes of an elite *Eucalyptus gunnii* clone: comparative histology. *Plant Science* 161: 645 - 653.
5. Kawazu, T., Furuyjyo, A., Ishigi, N., Kasuga, M., Shinozaki, K., Yamaguchi - Shinozaki, K., Hibino, T., 2003. Over expression of a plant mitochondrial citrate synthase in eucalyptus tree improved growth when cultured by al phosphate as a sole phosphate source. *Plant and cell physiology* 44: S91.
6. Nourissier, S., Monteuis, O., 2008. In vitro rooting of two *Eucalyptus urophylla* × *Eucalyptus grandis* mature clones. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* 44: 263 - 272.
7. Ouyang, L., Huang, Z., Zhao, L., Sha, Y., Zeng, F., Lu, X., 2012. Efficient Regeneration of *Eucalyptus urophylla* × *Eucalyptus grandis* from stem segment. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 55: 329 - 334.
8. Shao, Z., Chen, W., Luo, H., Ye, X., Zhan, J., 2002. Studies on the induction of cecropin D gene into *Eucalyptus urophylla* to breeding the resistance varieties to *Pseudomonas solaniacearum*. *Sci Silvae Si* 38: 92 - 97.
9. Trần Thị Doanh, 2010. Hoàn thiện triển khai công nghệ vi nhân giống trong sản xuất công nghiệp giống cây Bạch đàn U6 và một số giống bạch đàn có triển vọng khác tại Quảng Ninh. Báo cáo tổng kết dự án cấp Bộ.
10. Zenn - Zong, C., Shu - Hwa, C., Yi - Chiann, C., Jia - Bin, T., Vincent, L. C., 2001. Plant production of transgenic *Eucalyptus camaldulensis* carrying the *Populus tremuloides* cinnamate 4 - hydroxylase gene. *Plant Biotechnology* 844: 198.

Người thẩm định: TS. Phí Hồng Hải