

NGHIÊN CỨU TÁI SINH CÂY BẠCH ĐÀN LAI UP (*E. urophylla* x *E. pellita*) THÔNG QUA PHÔI SOMA PHỤC VỤ CHO CHUYỂN GEN

Nguyễn Thị Việt Hà^{1*}, Nguyễn Thị Huyền¹, Lê Thị Thủy¹,
Trần Thị Thu Hà¹, Lê Sơn¹, Trần Đức Vượng¹, Nguyễn Hữu Sỹ¹,
Nguyễn Đức Kiên¹, Đào Thị Thuỳ Trang², Phùng Thị Kim Huệ²

¹ Viện Nghiên cứu Giống và Công nghệ Sinh học Lâm nghiệp
Viện Khoa học Lâm nghiệp Việt Nam

² Trường PTTH chuyên Hùng Vương - Gia Lai

TÓM TẮT

Nghiên cứu tái sinh chồi thông qua phôi soma là bước cần thiết để phục vụ cho công tác chuyển gen. Kết quả nghiên cứu tái sinh Bạch đàn lai UP cho thấy với vật liệu ban đầu là đoạn thân và mảnh lá của chồi *in vitro* được nuôi cấy trên môi trường MS giảm ½ Nitơ tổng số (MS*) bổ sung 3,0 mg/l BAP, 0,5 mg/l NAA, 20 g/l Sucrose, 100 ml/l nước dừa và 2,4 g/l Gelrite cho tỷ lệ mẫu tạo mô sẹo đạt 88,3% đối với đoạn thân và 81,7% đối với mảnh lá. Mô sẹo sau đó được kích thích nhân sinh khối và phát triển tạo phôi soma trên môi trường MS* bổ sung 1,0 mg/l BAP, 0,5 mg/l NAA, 20 g/l Sucrose, 100 ml/l nước dừa và 2,4 g/l Gelrite cho tỷ lệ tạo mô sẹo cảm ứng tạo phôi soma là 65,6%. Cụm phôi soma này mầm trên môi trường MS* bổ sung 0,5 mg/l BAP, 0,2 mg/l NAA, 20 g/l Sucrose, 100 ml/l nước dừa và 2,4 g/l Gelrite cho tỷ lệ cụm phôi này chồi đạt 69,3%, số chồi trung bình đạt 6,1 chồi/cụm phôi. Môi trường MS bổ sung 0,5 mg/l BAP, 0,25 mg/l NAA, 30 g/l Sucrose, 15 mg/l Riboflavin và 6,5 g/l Agar thích hợp cho tạo đa chồi với hệ số nhân chồi đạt 6,5 chồi/cụm. Môi trường ½ MS bổ sung 2,0 mg/l IBA, 1,0 mg/l NAA, 15 g/l Sucrose và 7 g/l Agar cho tỷ lệ chồi ra rễ đạt 90,0%, số rễ TB/chồi 5,9 rễ và chiều dài rễ trung bình là 1,6 cm. Sau khi bình cây được huấn luyện 7 - 10 ngày, cây con được cấy vào cát vàng; sau 2 tuần, cây con được cấy vào bầu với thành phần giá thể là 70% đất đồi, 20% xơ dừa và 10% phân vi sinh cho tỷ lệ sống đạt trên 90%. Hệ thống tái sinh cây Bạch đàn lai UP thông qua tạo phôi soma có thể áp dụng để chuyển gen cải thiện giống bạch đàn này.

Từ khóa: Bạch đàn lai UP, *in vitro*, mô sẹo, phôi soma, tái sinh

Keywords: UP hybrid, *in vitro*, callus, somatic embryo, regeneration

Study of background reproductive plants through soma for gene transfer

Leaf and stem of 15 days tissue culture shoots were used as explants to establish a regeneration protocol for Eucalyptus hybrid between *E. urophylla* and *E. pellita* (UP hybrid). The explants were cultured on modified MS medium (MS medium reduced half total nitrogen) supplemented with 3.0 mg/l 6 - benzylaminopurine (BAP), 0.5 mg/l naphthalene acetic acid (NAA), 2% sucrose, 100 ml/l coconut water and 2.4 g/l phytigel, the ratio of callus induction was 88.3% and 81.7% with the stem and in the leaf materials, respectively. Callus was cultured in MS medium (reduced half total nitrogen) supplemented with 0.5 mg/l BAP, 0.2 mg/l NAA, 2% sucrose, 15mg/l riboflavin, 100 ml/l coconut water and 2 g/l phytage, showed a high frequency of adventitious buds formation (69.3%). Regenerated shoots were rooted in ½ MS medium supplemented with 2.0 mg/l indole - 3 - butyric acid (IBA), 1.0 mg/l NAA, 1.5% sucrose and 7g/l Agar. Plantlets were then successfully transplanted to the greenhouse with 90% survival. Generally, Eucalyptus hybrid between *E. urophylla* and *E. pellita* regeneration protocol via somatic embryogenesis induction could be used for genetic transformation.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Bạch đàn lai UP là giống lai giữa Bạch đàn urophylla và Bạch đàn pellita (*E. urophylla* × *E. pellita*) đang ngày càng được ưa chuộng trong trồng rừng sản xuất ở nước ta, một số dòng Bạch đàn lai UP (UP54, UP72, UP97, UP99...) do Viện Nghiên cứu Giống và Công nghệ Sinh học Lâm nghiệp chọn tạo có thể cho năng suất đạt tới 25 - 35 m³/ha/năm trên nhiều dạng lập địa và đã được công nhận là giống tiến bộ khoa học kỹ thuật (Lê Đình Khả et al., 2005). Các dòng Bạch đàn lai UP này đã được chọn làm vật liệu ban đầu cho công tác chuyển gen với mục tiêu là vừa tận dụng được ưu thế lai về sinh trưởng và vừa có thể nâng cao chất lượng gỗ qua chuyển gen.

Trong quy trình chuyển gen cho thực vật nói chung và cây rừng nói riêng, việc nghiên cứu tái sinh chồi trực tiếp thông qua mô sẹo là một trong những hướng đi nền tảng và thiết yếu cho sự thành công của công tác chuyển gen (Bùi Văn Thắng et al., 2013). Cho đến nay, nhiều loài bạch đàn đã được nghiên cứu tái sinh thành công thông qua tạo đa chồi hoặc phôi soma từ các vật liệu là mảnh lá, thân. Wang và Hu (1996) đã thành công trong việc tạo phôi soma cho loài *E. dunnii*; Pinto (2002) nghiên cứu tạo phôi soma cho loài Bạch đàn *Eucalyptus globulus*; Prakash (2005) cũng đã cảm ứng tạo phôi soma cho dòng Bạch đàn *E. Camaldulensis*. Tuy nhiên, 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 là rất khác nhau (Alves et al., 2004;

Dibax et al., 2005; Hajari et al., 2006). Vì vậy, nghiên cứu hệ thống tái sinh chồi thông qua phôi soma cho Bạch đàn lai UP là cần thiết nhằm nâng cao hiệu quả của công tác chuyển gen cho đối tượng này.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Lá non hoặc đoạn thân non không chứa chồi nách của Bạch đàn lai UP ở giai đoạn nhân nhanh trên môi trường nhân chồi trong quy trình nuôi cấy mô thông thường, được cung cấp bởi Viện Nghiên cứu Giống và Công nghệ Sinh học Lâm nghiệp.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng đến khả năng tạo mô sẹo từ đoạn thân, mảnh lá Bạch đàn lai UP

Chồi bạch đàn *in vitro* (chồi sau cấy chuyển nhân nhanh khoảng 15 ngày) được cắt thành các mẫu là mảnh lá/đoạn thân (không chứa mắt ngủ) có kích thước khoảng 0,3 - 0,5 cm, đặt mẫu nằm ngang trên bề mặt đĩa petri chứa môi trường kích thích tạo mô sẹo: môi trường tạo mô sẹo là MS giảm 1/2 Nitơ tổng số (MS*) + 20 g/l Sucrose + 100 ml/l nước dừa + 2,4 g/l Gelrite có bổ sung BAP, NAA ở các nồng độ khác nhau (Bảng 1), với mật độ cấy khoảng 30 mẫu/đĩa petri. Các đĩa này được nuôi trong điều kiện tối hoàn toàn 2 tuần, tiếp theo mẫu được đặt dưới giàn đèn với chu kỳ chiếu sáng 16 giờ/ngày, sau 4 - 6 tuần khảo sát và thu thập số liệu thí nghiệm.

Bảng 1. Ảnh hưởng của chất ĐHST đến khả năng tạo mô sẹo

CTTN	Chất ĐHST		Số lượng mẫu	Tỷ lệ tạo mô sẹo (%)	
	BAP	NAA		Thân	Lá
ĐC	-	-	120	0	0
S1	0,5	0,5	120	70,0 ± 1,5	60,0 ± 1,5
S2	1	0,5	120	76,7 ± 2,5	68,3 ± 1,0
S3	2	0,5	120	81,7 ± 1,3	72,5 ± 0,9
S4	2,5	0,5	120	85,0 ± 2,0	75,8 ± 1,3
S5	3	0,5	120	88,3 ± 1,5	81,7 ± 1,5
S6	4	0,5	120	72,5 ± 1,9	55,0 ± 1,0
F				1,05	0,04
F crit				3,01	

Ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng đến khả năng nhân sinh khối mô sẹo và kích thích phát triển phôi soma

Các mô sẹo hình thành trong thí nghiệm trên được cấy chuyển sang môi trường MS* + 20 g/l Sucrose + 100 ml/l nước dừa + 2,4 g/l Gelrite và bổ sung BAP, NAA với các nồng độ khác nhau (Bảng 2). Các đĩa mẫu mô sẹo được đặt dưới giàn đèn với chu kỳ chiếu sáng 16 giờ/ngày, cấy chuyển mẫu 3 tuần/lần. Sau 6 tuần, khảo sát và thu thập số liệu về khả năng nhân sinh khối mô sẹo và kích thích phát triển phôi soma.

Ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng đến khả năng phát triển chồi Bạch đàn lai UP

Cấy chuyển các khối phôi soma từ môi trường nhân sinh khối mô sẹo và kích thích phát triển phôi soma sang môi trường MS* + 20 g/l Sucrose + 100 ml/l nước dừa + 2,4 g/l Gelrite có bổ sung BAP, NAA với các nồng độ khác nhau (Bảng 3). Các mẫu được đặt dưới giàn đèn với chu kỳ chiếu sáng 16 giờ/ngày, cấy chuyển mẫu 3 tuần/lần; sau 6 tuần khảo sát khả năng phát triển chồi và thống kê kết quả.

Ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng đến quá trình nhân nhanh chồi Bạch đàn lai UP

Dùng dao hoặc kéo cắt các chồi tái sinh khỏe mạnh, không bị nhiễm nấm, khuẩn thành từng đoạn chứa từ 2 - 4 mắt ngủ và dùng panh cấy vào bình tam giác chứa môi trường nhân nhanh chồi MS + 30 g/l sucrose + 15 mg/l Ribofavin + 6,5 g/l Agar và bổ sung BAP, NAA với các nồng độ khác nhau (Bảng 4). Các bình mẫu được chuyển sang nuôi điều kiện tối - sáng (1 tuần tối hoàn toàn - 2 tuần chiếu sáng, thời gian chiếu sáng 8 giờ/ngày), kiểm tra khả năng nhân nhanh chồi và thống kê kết quả...

Ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng đến khả năng ra rễ của chồi Bạch đàn lai UP

Chồi đạt kích thước 2,5 - 3 cm được cấy chuyển sang môi trường tạo rễ 1/2MS + 15 g/l Sucrose + 7 g/l Agar và bổ sung IBA, NAA ở

các nồng độ khác nhau (Bảng 5), với mật độ 30 chồi/bình. Các bình nuôi cấy ra rễ được đặt dưới giàn đèn với chu kỳ chiếu sáng 8 giờ/ngày; sau 3 tuần khảo sát khả năng ra rễ và thống kê kết quả.

Ảnh hưởng của giá thể đến khả năng sống sót và chất lượng cây con vườn ươm

Các chồi bạch đàn đã ra rễ được đưa từ phòng nuôi cấy mô ra dần môi trường tự nhiên bằng cách huấn luyện 7 - 10 ngày trong nhà lưới có mái che. Sau thời gian huấn luyện, các bình cây được mở nắp, rút nhẹ từng cây ra khỏi bình. Rửa sạch Agar ở phần rễ cây, ngâm cây trong dung dịch Benlat C 0,3% sau đó cấy cây vào luống cát vàng đã được xử lý dung dịch KMnO₄ 0,3%. Phun sương trên bề mặt lá để đảm bảo độ ẩm 70 - 80% và che bóng 50%. Sau 2 tuần, cấy chuyển cây vào túi bầu có thành phần ruột bầu khác nhau, tưới nước giữ ẩm. Theo dõi tỷ lệ sống, sinh trưởng, phát triển của từng công thức tại vườn ươm.

Môi trường và điều kiện nuôi cấy in vitro

Tất cả các môi trường được điều chỉnh đến pH = 5,8, khử trùng ở nhiệt độ 121°C, áp suất 1,5 atm trong 20 phút.

Mẫu được nuôi cấy trong phòng thí nghiệm nuôi cấy mô đảm bảo nhiệt độ 25°C ± 2°C; giàn đèn ánh sáng trắng với cường độ chiếu sáng 2.500 lux, thời gian chiếu sáng tùy thuộc vào từng công đoạn trong quy trình tái sinh.

Phương pháp thu thập và xử lý số liệu

Số liệu được thu thập bằng phương pháp theo dõi, quan sát, đếm trực tiếp trên từng công thức thí nghiệm. Các số liệu được tính toán theo phương pháp phân tích thống kê toán học. Quá trình xử lý số liệu được thực hiện trên máy tính với ứng dụng Data Analysis của chương trình Excel. Dùng hàm thống kê Anova để phân tích phương sai một nhân tố với các lần lặp.

III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

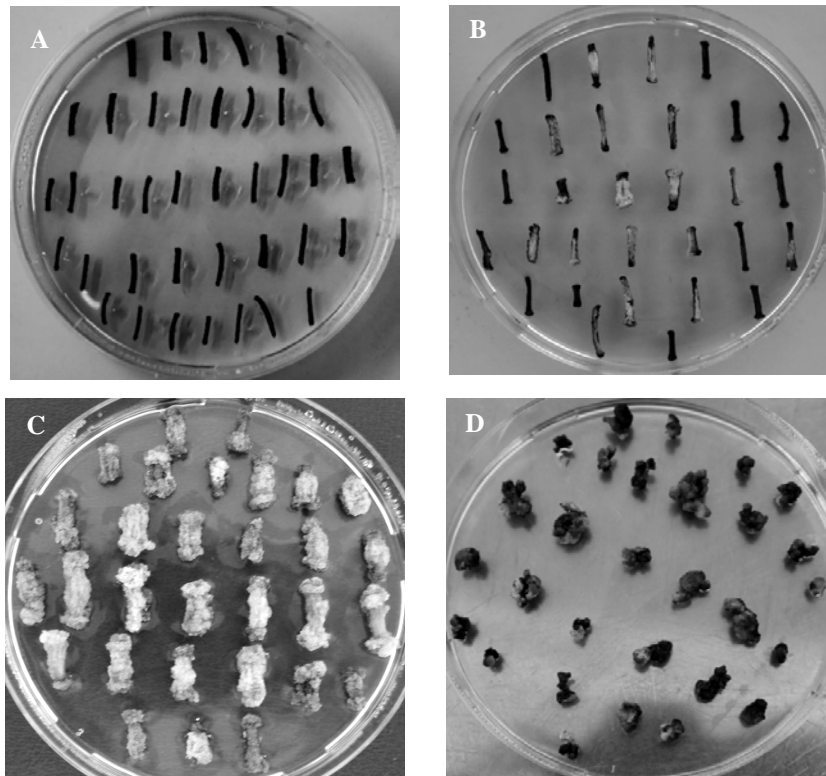
3.1. Ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng đến khả năng tạo mô sẹo bạch đàn lai UP

Đây là một trong những khâu quan trọng và có ý nghĩa quyết định trong quá trình tái sinh. Mẫu từ thân, lá cắt từ cây Bạch đàn lai UP *in vitro* được sử dụng làm vật liệu nuôi cấy. Sau 4 tuần nuôi cấy, khối mô sẹo được hình thành.

Trong môi trường nuôi cấy tạo mô sẹo, chất điều hòa sinh trưởng (ĐHST) đóng vai trò quan trọng trong việc thúc đẩy sự sinh trưởng và phát triển của mẫu. Nhưng tùy thuộc vào mục đích nuôi cấy mà hàm lượng và hoạt chất ĐHST sử dụng là khác nhau. BAP và NAA là hai chất ĐHST có tác dụng kích thích rõ rệt đến sự hình thành mô sẹo. Trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng BAP và NAA bổ sung vào môi trường nuôi cấy để khảo sát được khả

năng tạo mô sẹo của đoạn thân và mảnh lá Bạch đàn lai UP.

Trong 7 công thức thí nghiệm, công thức đối chứng (ĐC) không bổ sung chất ĐHST thì tất cả các mẫu không tạo mô sẹo và bị chết sau 4 tuần nuôi cấy. Ngược lại, ở các công thức thí nghiệm bổ sung chất ĐHST thì tỷ lệ mẫu tạo mô sẹo khá cao từ 70 - 88,3% (mẫu thân) và từ 55 - 81,7% (mẫu lá). Kết quả thu được cho thấy rằng, khi tăng nồng độ BAP từ 0,5 - 3 mg/l và kết hợp với 0,5 mg/l NAA thì tỷ lệ mẫu tạo mô sẹo tăng dần cả mẫu lá và thân; khi sử dụng nồng độ BAP tăng lên 4 mg/l thì tỷ lệ mẫu tạo mô sẹo giảm mạnh, chỉ còn 72,5% ở thân và 55% ở lá. Công thức S5, môi trường bổ sung 3 mg/l BAP + 0,5 mg/l NAA đạt tỷ lệ mẫu tạo mô sẹo cao nhất (88,3% đối với mẫu thân và 81,7% đối với mẫu lá), khối mô sẹo đồng đều, chắc, có màu xanh hoặc đỏ hồng (Hình 1).



Hình 1. Mẫu bạch đàn sau 4 tuần nuôi cấy trên môi trường tạo mô sẹo
 A: Mẫu thân trên công thức ĐC B: Mẫu thân trên công thức S1
 C: Mẫu thân cây trên công thức S5 D: Mẫu lá trên công thức S5

3.2. Ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng đến khả năng nhân sinh khối mô sẹo và kích thích phát triển phôi soma

Sau 6 tuần nuôi cấy, khối mô sẹo lớn dần và phát sinh phôi soma, kết quả được thống kê tại bảng 2:

Bảng 2. Ảnh hưởng của chất ĐHST đến khả năng nhân sinh khối mô sẹo và kích thích phát triển phôi soma

CTTN	Chất ĐHST		Số lượng mẫu (mô sẹo)	Tỷ lệ mô sẹo cảm ứng tạo phôi soma (%)	Đặc điểm phôi soma
	BAP	NAA			
ĐC	-	-	120	0	-
C1	0,2	0,2	120	33,3 ± 1,1	+
C2	0,5	0,2	120	43,3 ± 0,8	++
C3	0,5	0,5	120	58,9 ± 1,5	++
C4	1,0	0,2	120	62,2 ± 1,5	+++
C5	1,0	0,5	120	65,6 ± 0,8	+++
C6	1,5	0,5	120	45,6 ± 0,8	+
F				0,01	
F crit				3,68	

Ghi chú: - Không hình thành phôi soma

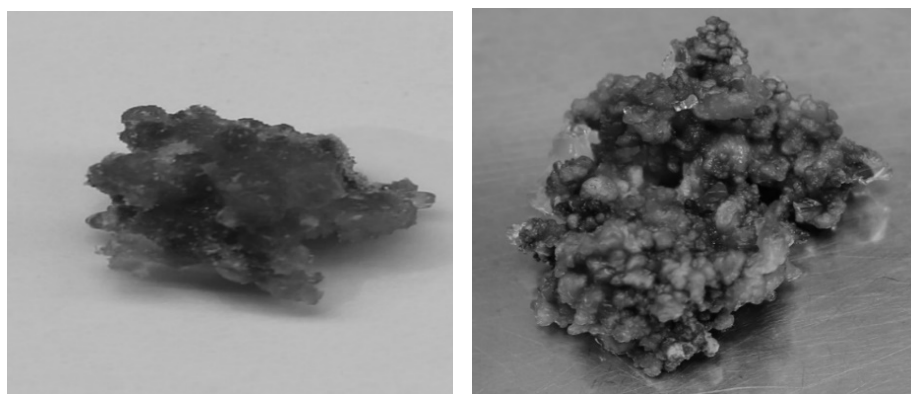
+ Phôi soma chất lượng kém (Các phôi màu trắng, rời rạc)

++ Phôi soma chất lượng khá (Các phôi màu trắng, căng mọng, bó sát)

+++ Phôi soma chất lượng tốt (Các phôi màu hồng, xanh, bó sát, căng mọng)

Kết quả thu được cho thấy rằng, trên công thức môi trường không bổ sung chất ĐHST thì tế bào mô sẹo không hình thành phôi soma. Ngược lại, trên các môi trường bổ sung chất ĐHST thì tế bào mô sẹo cảm ứng tạo phôi soma với tỷ lệ khác nhau rõ rệt. Tỷ lệ mô sẹo cảm ứng tạo phôi soma dao động từ 33,3 đến

65,6% trên các môi trường bổ sung BAP và NAA. Môi trường MS* + 20 g/l Sucrose + 100 ml/l nước dừa + 2,4 g/l Gelrite + 1 mg/l BAP + 0,5 mg/l NAA cho tỷ lệ mô sẹo cảm ứng tạo phôi soma cao nhất 65,6%, các phôi soma màu hồng, xanh, bó sát, căng mọng (Hình 2).



Hình 2. Cụm phôi soma phát sinh trên môi trường chứa công thức C5

Kết quả nghiên cứu này cho tỷ lệ tạo phôi soma cao hơn một số công trình nghiên cứu đã

công bố trước đây. Pinto (2002) đã nghiên cứu tạo phôi soma loài Bạch đàn *E. globulus* từ mô

seo trên môi trường MS bổ sung 3 - 5 mg/l NAA hoặc 1 mg/l NAA kết hợp với 1 mg/l 2,4D cho tỷ lệ tạo phôi soma cao nhất (khoảng 30%). Prakash M.G. và Gurusurthi K. (2005) đã cảm ứng tạo phôi soma loài Bạch đàn *E. tereticornis* trên môi trường MS + 2,22 µM BAP cho tỷ lệ tạo phôi soma cao nhất 54% với 3,33 phôi soma/mẫu nuôi cấy.

3.3. Ảnh hưởng của chất ĐHST đến khả năng bật chồi Bạch đàn lai UP

Sau thời gian nuôi cấy trên môi trường nhân sinh khối mô seo và phát triển phôi soma, các cụm phôi soma được chuyển sang môi trường kích phát triển chồi. Trong 5 tuần nuôi cấy, các chồi được hình thành từ phôi soma, kết quả được ghi chép lại ở bảng dưới đây:

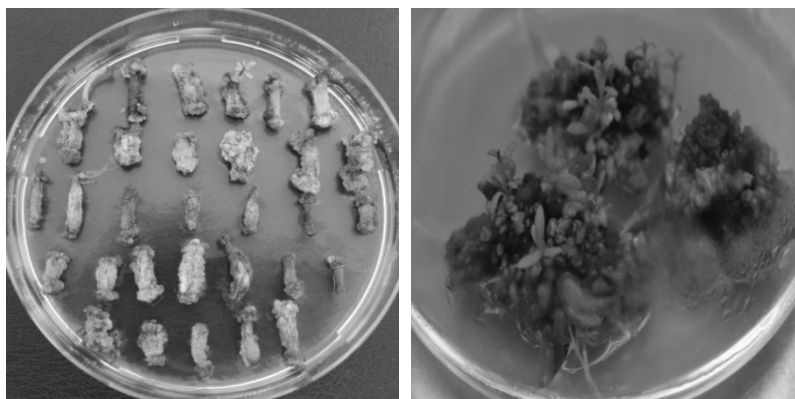
Bảng 3. Ảnh hưởng của chất ĐHST đến khả năng bật chồi bạch đàn lai UP

CTTN	Chất ĐHST		Số lượng mẫu (phôi soma)	Tỷ lệ phôi soma bật chồi (%)	Số chồi/cụm phôi (chồi)
	BAP	NAA			
ĐC	-	-	150	0	0
C1	0,2	0,2	150	58,0 ± 1,5	4,5 ± 0,2
C2	0,5	0,2	150	69,3 ± 2,8	6,1 ± 0,3
C3	0,5	0,5	150	47,3 ± 2,8	5,6 ± 0,4
C4	1,0	0,2	150	40,7 ± 2,8	3,7 ± 0,4
C5	1,0	0,5	150	32,0 ± 2,4	3,5 ± 0,2
C6	1,5	0,5	150	19,3 ± 2,8	2,9 ± 0,2
F				0,05	0,08
F crit				2,76	

Kết quả cho thấy ở công thức ĐC không bổ sung chất ĐHST vào môi trường nuôi cấy thì phôi soma không bật chồi. Trong 7 công thức thí nghiệm thì công thức C2 bổ sung thêm 0,5 mg/l BAP và 0,2 mg/l NAA có tỷ lệ phôi soma bật chồi là cao nhất 69,3%, số chồi trung bình/cụm phôi đạt 6,1 chồi (Hình 3).

Kết quả nghiên cứu này cao hơn so với một số kết quả nghiên cứu đã được công bố. Dibax và

đồng tác giả (2005) tái sinh loài bạch đàn *E. cammaldulensis* từ mảnh lá mầm thu được tỷ lệ mô seo tái sinh chồi 55 - 57,5% trên môi trường MS và WPM bổ sung 0,5 mg/l BAP và 0,2 mg/l NAA. Bùi Văn Thắng và đồng tác giả (2014) chỉ ra rằng phôi soma nảy mầm trên Bạch đàn urô có tỷ lệ cao, đạt 57,69% trên môi trường MS* bổ sung 0,5 mg/l BAP, 0,3 mg/l NAA và 0,1 mg/l IBA.



Hình 3. Cụm phôi soma bật chồi trên môi trường bổ sung 0,5 mg/l BAP và 0,2 mg/l NAA

3.4. Ảnh hưởng của chất ĐHST đến khả năng nhân nhanh chồi bạch đàn lai UP

Để nghiên cứu ảnh hưởng của chất ĐHST đến khả năng nhân nhanh chồi bạch đàn, trong nghiên cứu này chúng tôi đã sử dụng các công thức môi trường có bổ sung hàm lượng các chất ĐHST khác nhau và công thức ĐC không

bổ sung ĐHST kích thích nhân nhanh chồi, với môi trường MS + 30 g/l Sucrose + 6,5 g/l Agar + 15 mg/l Ribofavin bổ sung BAP và NAA ở nồng độ khác nhau, bình mẫu được nuôi tối 7 ngày rồi cho ra nuôi sáng. Kết quả sau 3 tuần nuôi cấy được trình bày ở bảng 4.

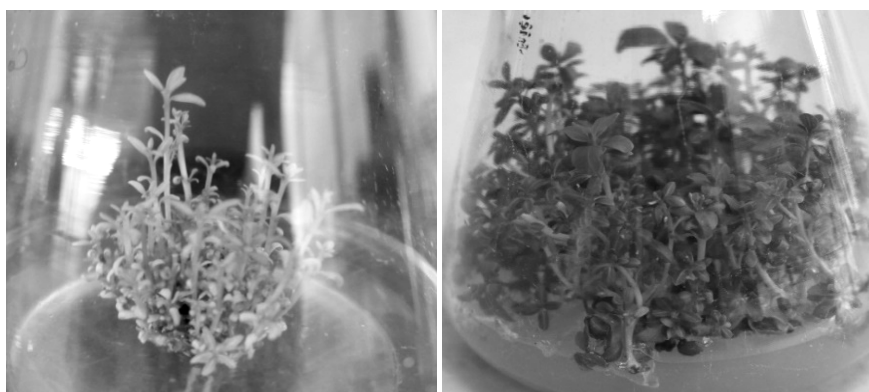
Bảng 4. Ảnh hưởng của chất ĐHST đến khả năng nhân nhanh chồi Bạch đàn lai UP

CTTN	Chất ĐHST		Số lượng mẫu cấy	Tỷ lệ mẫu tạo cụm chồi (%)	Hệ số nhân chồi (số chồi/cụm)	Chất lượng chồi
	BAP	NAA				
ĐC	-	-	120	47,8 ± 2,9	1,0	+
NN1	0,5	0,2	120	71,1 ± 1,9	4,4 ± 0,8	++
NN2	0,5	0,25	120	83,3 ± 1,1	6,5 ± 0,7	+++
NN3	1,0	0,2	120	68,9 ± 2,2	3,2 ± 0,3	++
NN4	1,0	0,5	120	62,2 ± 2,9	3,1 ± 0,1	+
F				0,01	0,07	
F crit				4,26		

Ghi chú: + Chất lượng chồi kém (Chồi thấp và không đồng đều)
 ++ Chất lượng chồi khá (Chồi cao, mảnh, không đồng đều)
 +++ Chất lượng chồi tốt (Chồi cao, mập, đồng đều).

Kết quả ở bảng 4 cho thấy, công thức ĐC không bổ sung chất ĐHST mẫu vẫn có khả năng tạo cụm chồi nhưng tỷ lệ mẫu tạo cụm chồi và hệ số nhân chồi rất thấp (tương ứng 47,8% và 1 chồi/cụm). Ngược lại, trên các môi trường bổ sung chất ĐHST thì tỷ lệ mẫu tạo

cụm chồi khá cao, dao động từ 62,2 đến 83,3% và hệ số nhân chồi dao động từ 3,1 đến 6,5 chồi/cụm. Môi trường MS bổ sung 0,5 mg/l BAP và 0,25 mg/l NAA cho hệ số nhân chồi và tỷ lệ mẫu tạo cụm chồi cao nhất.



Hình 4. Cụm chồi Bạch đàn lai UP trên môi trường MS bổ sung 0,5 mg/l BAP và 0,25 mg/l NAA

3.5. Ảnh hưởng của IBA và NAA đến quá trình ra rễ tạo cây hoàn chỉnh

IBA và NAA là các chất ĐHST thuộc nhóm Auxin, có tác dụng kích thích chồi thực vật tạo rễ trong quá trình nuôi cấy, vì thế, chúng tôi tiến hành khảo sát sự tác động của IBA và NAA đến sự hình thành rễ cây Bạch đàn lai UP. Trên thực tế, các chồi có thể tạo

rễ trên môi trường MS (Prakash M.G., Gurumurthi K., 2005), tuy nhiên tốc độ phát triển chiều cao của chồi có thể nhanh hơn tốc độ ra rễ của chúng. Vì thế, chúng tôi tiến hành thí nghiệm nghiên cứu ảnh hưởng của nồng độ IBA và NAA đến sự ra rễ cây Bạch đàn lai UP, kết quả thu được ở bảng 5 như sau:

Bảng 5. Ảnh hưởng của IBA và NAA đến khả năng ra rễ tạo cây hoàn chỉnh Bạch đàn lai UP

CTTN	Chất ĐHST		Số lượng (chồi)	Tỷ lệ chồi ra rễ (%)	Số rễ TB/chồi	Chiều dài rễ TB (cm)
	IBA	NAA				
ĐC	-	-	120	0	0	0
RR1	1,0	0,5	120	28,9 ± 1,9	2,5 ± 0,4	0,5 ± 0,1
RR2	1,5	1,0	120	72,2 ± 1,1	4,5 ± 0,6	1,3 ± 0,2
RR3	2,0	1,0	120	90,0 ± 1,3	5,9 ± 0,3	1,6 ± 0,1
RR4	2,5	0,5	120	58,9 ± 1,1	3,6 ± 0,4	1,0 ± 0,3
RR5	2,5	1,0	120	50,0 ± 1,9	2,9 ± 0,3	0,7 ± 0,2
F				0,00	0,03	0,08
F crit					3,89	



Hình 5. Cây Bạch đàn lai UP ra rễ *in vitro* trên môi trường 1/2MS + 15 g/l Sucrose + 2 mg/l IBA + 1 mg/l NAA + 7 g/l Agar

Kết quả thu được cho thấy, IBA và NAA có tác dụng rõ rệt lên quá trình hình thành rễ của cây Bạch đàn lai UP. Môi trường đối chứng (ĐC) cho tỷ lệ rễ 0%, môi trường ra rễ tốt nhất là 1/2 MS + 15 g/l Sucrose + 2 mg/l IBA + 1 mg/l NAA + 7 g/l Agar cho tỷ lệ ra rễ đạt 90%, số rễ trung bình/chồi đạt 5,9 rễ, chiều dài rễ trung bình đạt 1,6 cm.

3.6. Sự ảnh hưởng của giá thể đến khả năng sống sót và chất lượng cây con vườn ươm

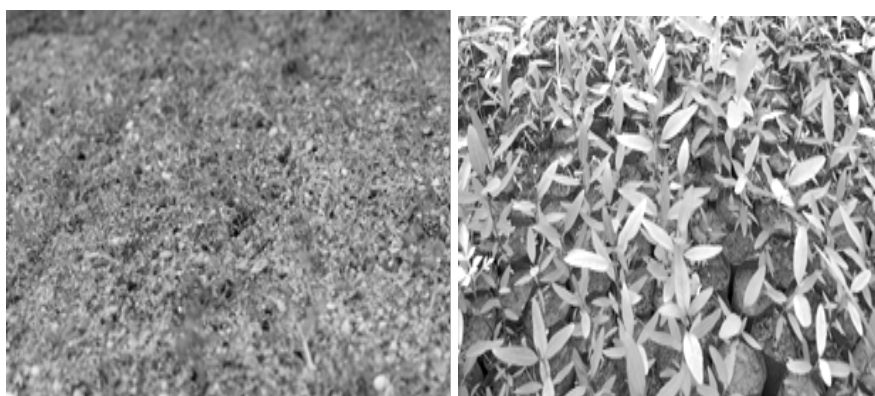
Xơ dừa vừa có khả năng giữ ẩm cao trong sợi vừa thoát nước tốt qua các khoảng trống tạo ra bên trong ruột bầu. Để nghiên cứu sự ảnh hưởng của giá thể tới cây con bạch đàn lai UP, chúng tôi đã sử dụng 4 công thức với tỷ lệ thành phần giá thể khác nhau. Sau 4 tuần theo dõi, kết quả được tổng hợp tại bảng 6.

Bảng 6. Ảnh hưởng của giá thể đến khả năng sống sót và chất lượng cây con Bạch đàn lai UP

CTTN	Thành phần giá thể			Tổng số cây	Số cây sống	Tỷ lệ sống (%)	Chất lượng cây
	Đất đồi (%)	Xơ dừa (%)	Phân vi sinh (%)				
GT1	90		10	210	106	50,5	++
GT2	80	10	10	210	138	65,7	++
GT3	70	20	10	210	190	90,5	+++
GT4	60	30	10	210	173	82,4	++
F				0,01			
F crit				4,25			

Ghi chú: ++: Cây phát triển trung bình

+++ : Cây có sức sống tốt, phát triển nhanh



Hình 6. Cây con Bạch đàn lai UP nuôi cấy mô urom trên giá thể cát và trồng trên giá thể 70% đất đồi, 20% xơ dừa và 10% phân vi sinh

Kết quả nghiên cứu cho thấy khi không sử dụng xơ dừa vào thành phần ruột bầu, giá thể này không thoáng khí và dính bết, mùa mưa bầu bị ngập úng, mùa hanh lại rất nhanh khô hạn, những nguyên nhân trên khiến cây con bị bó cổ rễ và nhiễm nấm bệnh nên chết nhiều, tỷ lệ sống chỉ đạt 50,5%. Tăng tỉ lệ xơ dừa trong thành phần ruột bầu lên 10%, 20% thì tỷ lệ sống của cây con đã cải thiện rõ rệt tương ứng 65,7% và 90,5%. Khi tỷ lệ xơ dừa chiếm 30% giá thể tỷ lệ sống của cây con có dấu hiệu giảm xuống còn 82,4%.

IV. KẾT LUẬN

Hệ thống tái sinh cây Bạch đàn lai UP thông qua phôi soma đã được xây dựng thành công: mảnh lá và đoạn thân của cây *in vitro* nuôi cấy

tạo mô sẹo trên môi trường MS* bổ sung 3,0 mg/l BAP, 0,5 mg/l NAA, 20 g/l Sucrose, 100 ml/l nước dừa và 2,4 g/l Gelrite cho tỷ lệ mẫu tạo mô sẹo đạt 88,8% đối với mẫu thân và 81,7% đối với mẫu lá. Cảm ứng mô sẹo tạo phôi soma trên môi trường MS* bổ sung 1,0 mg/l BAP, 0,5 mg/l NAA, 20 g/l Sucrose, 100 ml/l nước dừa và 2,4 g/l Gelrite có tỷ lệ mô sẹo tạo phôi soma tốt nhất, đạt 65,6%. Cụm phôi soma đưa vào môi trường kích thích tạo chồi MS* bổ sung 0,5 mg/l BAP, 0,2 mg/l NAA, 20 g/l Sucrose, 100 ml/l nước dừa và 2,4 g/l Gelrite cho tỷ lệ phôi tái sinh chồi đạt 69,3%, số chồi TB/cụm phôi đạt 6,1 chồi. Môi trường MS bổ sung bổ sung 0,5 mg/l BAP, 0,25 mg/l NAA, 30 g/l Sucrose, 15 mg/l Riboflavin và 6,5 g/l Agar đạt tỷ lệ 83,3% với

hệ số nhân chồi là 6,5 chồi/cụm. Môi trường 1/2 MS bổ sung 2 mg/l IBA, 1 mg/l NAA, 15 g/l Sucrose và 7 g/l Agar thích hợp cho ra rễ, đạt 90%. Cây được huấn luyện 7 - 10 ngày trước khi trồng trên giá thể cát vàng. Sau 2 tuần chăm sóc và theo dõi, cây con được chuyển sang giá thể gồm 70% đất đồi, 20% xơ dừa và 10% phân vi sinh cho tỷ lệ sống cao nhất, đạt 90,5%.

Lời cảm ơn

Bài báo là một phần kết quả của đề tài “Nghiên cứu tạo giống bạch đàn lai biến đổi gen cho chiều dài sợi gỗ (giai đoạn 2)”. Xin trân trọng cảm ơn Bộ Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn đã tài trợ kinh phí cho nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Alves, ECSC, Xavier A, Otoni WC, 2004. Organogenesis de explante foliar de clones de *Eucalyptus grandis* × *Eucalyptus urophylla*. Pesq Agrop Brasil, 39: 421 - 430.
2. Dibax R., Eisfeld C.L., Cuquel F.L., Koehler H., Quoirin M., 2005. Plant regeneration from cotyledonary explants of *Eucalyptus camaldulensis*. Scientia Agricola (Paracibaba, Brazil), 62: 406 - 412.
3. 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.
4. Lê Đình Khả, Hà Huy Thịnh, Nguyễn Việt Cường, 2005. Cải thiện giống bạch đàn cho các chương trình trồng rừng ở Việt Nam. Khoa học và Công nghệ Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn 20 năm đổi mới, 5: 167 - 178.
5. Prakash M.G. and Gurumurthi K., 2005. Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Eucalyptus tereticornis*. Sm, Cur. Sci., 88: 1311 - 1316.
6. Bùi Văn Thắng, Lê Văn Sơn, Chu Hoàng Hà, 2013. Nghiên cứu tạo cây Xoan ta (*Melia azedarach* L.) chuyển gen P5CSm tăng cường khả năng chống chịu khô hạn. Tạp chí Nông nghiệp và phát triển nông thôn, 1: 203 - 208.
7. Bùi Văn Thắng, Nguyễn Thị Hồng Gấm, Ngô Văn Thanh, Chu Hoàng Hà, 2014. Nghiên cứu hệ thống tái sinh cây Bạch đàn Uro (*Eucalyptus urophylla*) thông qua phôi soma phục vụ chuyển gen. Tạp chí Nông nghiệp và phát triển nông thôn, Chuyên đề Trường Đại học Lâm nghiệp - 50 năm Xây dựng và Phát triển, 11/2014: 155 - 159.

Email tác giả chính: nguyenvietha295@gmail.com

Ngày nhận bài: 27/12/2018

Ngày phản biện đánh giá và sửa chữa: 06/01/2019

Ngày duyệt đăng: 01/04/2019