

## NGHIÊN CỨU QUY TRÌNH NUÔI CẤY *IN VITRO* MÔ SẸO CHO GIỐNG BẠCH ĐÀN LAI CT4 VÀ CỤ VĨ DH 32-29

Nguyễn Duy Phương<sup>1</sup>, Nguyễn Văn Cửu<sup>1</sup>, Ngô Thị Vân Anh<sup>1</sup>,  
Nguyễn Thành Đức<sup>1</sup>, Phạm Xuân Hội<sup>1</sup>

### TÓM TẮT

Bạch đàn (*Eucalyptus* sp.) là cây gỗ có giá trị kinh tế cao nhưng việc chọn tạo giống bằng các phương pháp truyền thống gặp nhiều khó khăn do nền di truyền có mức độ dị hợp tử cao. Nghiên cứu nhằm xây dựng một quy trình nuôi cấy *in vitro* và đánh giá ảnh hưởng của NAA, Zeatin đối với phản ứng tạo mô sẹo của 2 giống bạch đàn lai cao sản CT4 và Cụ vĩ DH 32-29 (Cụ vĩ 3229). Môi trường tạo mô sẹo tối ưu chứa NAA 1,0 mg/L, Zeatin 1,5 mg/L; đạt hiệu suất 81,1 và 82,2%. Tỷ lệ mô sẹo tái sinh chồi từ mô sẹo của CT4 và Cụ vĩ 3229 lần lượt đạt 22,4 và 31,7%. Kết quả này là cơ sở cho các nghiên cứu nhân nhanh bạch đàn trong tương lai.

**Từ khóa:** Bạch đàn, giống bạch đàn lai CT4 và Cụ vĩ DH 32-29, nuôi cấy *in vitro*

### I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Bạch đàn (*Eucalyptus* sp.) là cây gỗ cứng có giá trị kinh tế, là nguồn cung cấp bột giấy, gỗ và tinh dầu quan trọng (Eldridge *et al.*, 1994). Cây bạch đàn phát triển nhanh, năng suất cao, thời gian luân canh ngắn, cùng với khả năng thích ứng với nhiều loại môi trường sống khác nhau nên được trồng rất rộng rãi trên thế giới. Ở Việt Nam, bạch đàn cũng là một trong những nhóm cây trồng chủ yếu trong các chương trình trồng rừng hiện nay, với nhiều giống cao sản đang được sử dụng phổ biến hiện nay như CT4 và Cụ vĩ 3229. Trước những ảnh hưởng của biến đổi khí hậu và nhu cầu đòi hỏi ngày càng cao từ các ngành sản xuất sử dụng gỗ bạch đàn, việc phát triển các giống bạch đàn với chất lượng gỗ và khả năng chống chịu stress và sâu bệnh tốt hơn có ý nghĩa rất quan trọng.

Nhiều phương pháp công nghệ sinh học như nhân giống vô tính, sử dụng chỉ thị phân tử, ứng dụng nuôi cấy mô trong vi nhân giống và kỹ thuật di truyền đã được áp dụng để phát triển giống bạch đàn (Labate *et al.*, 2008). Đối với các loài bạch đàn, chọn tạo giống bằng các phương pháp lai thông thường rất khó khăn và tốn thời gian do bạch đàn có bộ gen với mức độ dị hợp tử cao. Hơn nữa, các phương pháp chọn giống phân tử bằng công nghệ gen như chuyển gen hay chỉnh sửa gen dù có tiềm năng rất lớn nhưng rất khó hoặc không thể áp dụng được đối với hầu hết các loài bạch đàn. Nguyên nhân là do những khó khăn về mặt kỹ thuật, mà

chủ yếu là vì thiếu hệ thống nuôi cấy và tái sinh *in vitro* hiệu quả (Prakash & Gurumurthi, 2010).

Nuôi cấy phôi soma là phương pháp tái sinh *in vitro* quan trọng, đã được chứng minh có rất nhiều ưu điểm khi áp dụng cho các loài cây gỗ như bạch đàn, bao gồm cả nhân giống vô tính, bảo quản nguồn gen có giá trị và chuyển gen (Corredoira *et al.*, 2006). Các quy trình chuyển gen sử dụng mô sẹo phôi hóa giúp hạn chế được hiện tượng tạo ra các thể khảm trong quá trình tái sinh chồi (Giri *et al.*, 2004). Tuy nhiên, hiệu suất cảm ứng tạo mô sẹo và tái sinh chồi từ mô sẹo của các loài bạch đàn khá thấp. Rất nhiều báo cáo trước đây thực hiện nuôi cấy tạo mô sẹo từ vật liệu khởi đầu là phôi hợp tử và/hoặc cây con (1-4 tuần tuổi); do đó, vật liệu được nhân giống không có giá trị di truyền. Nghiên cứu này được thực hiện với mục đích tối ưu các điều kiện môi trường nuôi cấy tạo mô sẹo và khảo sát khả năng tái sinh chồi từ mô sẹo cho của hai giống bạch đàn lai phổ biến CT4 và Cụ vĩ 3229 để làm tiền đề cho các nghiên cứu chọn tạo giống bạch đàn bằng công nghệ gen.

### II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

#### 2.1. Vật liệu nghiên cứu

Cây bạch đàn CT4 và Cụ vĩ DH 32-29 (Cụ vĩ 3229) nuôi cấy *in vitro* được cung cấp bởi Công ty CP giống-VTNN công nghệ cao Việt Nam.

#### 2.2. Phương pháp nghiên cứu

*Tối ưu vật liệu tạo mô sẹo bạch đàn:* Mảnh lá

<sup>1</sup> Viện Di truyền Nông nghiệp

\* Tác giả liên hệ, email: phuongnd.bio@gmail.com

và đoạn thân được cắt từ cây bạch đàn nuôi cấy *in vitro* 21 ngày tuổi (chiều cao 5 - 7 cm) và được đặt trên môi trường nuôi cấy tạo mô sẹo (muối MS, IAA 5,0 mg/L, BAP 0,25 mg/L, sucrose 30 g/L, agar 10 g/L). Mẫu được nuôi cấy ở nhiệt độ  $26 \pm 2^\circ\text{C}$ , trong điều kiện tối hoàn toàn. Mẫu được cấy chuyển sang môi trường mới (cùng thành phần) sau 2 tuần. Sau 4 - 5 tuần nuôi cấy, tỷ lệ mẫu tạo mô sẹo được ghi lại. Thí nghiệm được thực hiện với tối thiểu 30 mẫu/giống, lặp lại 3 lần.

**Tối ưu nồng độ NAA và Zeatin trong môi trường nuôi cấy *in vitro* tạo mô sẹo bạch đàn:**

Đoạn thân bạch đàn được đặt trên môi trường nuôi cấy tạo mô sẹo (muối MS, sucrose 30 g/L, Myo-inositol 100 mg/L, agar 10 g/L) được bổ sung chất kích thích sinh trưởng khác nhau. Đối với thí nghiệm đánh giá ảnh hưởng của đơn chất NAA hay Zeatin, chất kích thích sinh trưởng được bổ sung vào môi trường nuôi cấy với các nồng độ lần lượt 0,5 mg/L; 1,0 mg/L; 1,5 mg/L và 2,0 mg/L. Đối với thí nghiệm đánh giá ảnh hưởng của tổ hợp [NAA : Zeatin], chất kích thích sinh trưởng được bổ sung vào môi trường nuôi cấy theo các tỷ lệ khác nhau (Bảng 1).

Mẫu được nuôi cấy ở nhiệt độ  $26 \pm 2^\circ\text{C}$ , trong điều kiện tối hoàn toàn. Sau 4 - 5 tuần nuôi cấy, tỷ lệ mẫu tạo mô sẹo được ghi lại. Thí nghiệm được thực hiện với tối thiểu 30 mẫu/giống, lặp lại 3 lần.

**Bảng 1.** Công thức thành phần [NAA : Zeatin] trong môi trường nuôi cấy tạo mô sẹo bạch đàn

Tên công thức	Thành phần	
	NAA (mg/L)	Zeatin (mg/L)
T1	1,5	1,0
T2	1,0	1,5
T3	1,5	1,5

**Tái sinh chồi từ mô sẹo bạch đàn:** Quy trình nuôi cấy *in vitro* tái sinh chồi từ mô sẹo bạch đàn được xây dựng dựa trên quy trình đã công bố (Sabai *et al.*, 2020; Hajari *et al.*, 2006; Nguyễn Thị Hương và Nguyễn Văn Việt, 2017).

Mẫu mô sẹo được nuôi cấy trên môi trường tái sinh chồi (muối MS, sucrose 30 g/L, Myo-inositol 100 mg/L, BAP 1,5 mg/L, GA3 1,0 mg/L, NAA 0,5 mg/L) ở nhiệt độ  $26 \pm 2^\circ\text{C}$ , trong điều kiện chiếu sáng 16 h/ngày. Các chỉ tiêu bao gồm tỷ lệ mẫu tạo mô sẹo (%), tỷ lệ mẫu tái sinh (%) và tỷ lệ chồi/mô sẹo được theo dõi sau 5 - 6 tuần nuôi cấy. Thí nghiệm được thực hiện tối thiểu 150 mẫu/giống, lặp lại 3 lần.

**Xử lý số liệu thống kê:** Dữ liệu được phân tích thống kê bằng công cụ Excel 2016 để xác định giá trị trung bình và độ lệch chuẩn giữa các lần lặp lại của mỗi thí nghiệm. Giá trị trung bình trong cùng một thí nghiệm được so sánh bằng phân tích phương sai một yếu tố (One-way ANOVA) và kiểm định *t-test* với  $\alpha = 0,05$ .

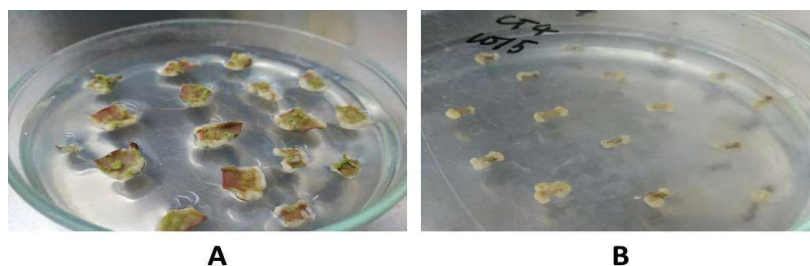
### 2.3. Thời gian và địa điểm nghiên cứu

Nghiên cứu được thực hiện từ tháng 01 năm 2023 đến tháng 12 năm 2023 tại Bộ môn Bệnh học phân tử - Viện Di truyền Nông nghiệp.

## III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### 3.1. Ảnh hưởng của loại mẫu đến khả năng tạo mô sẹo của bạch đàn

Phản ứng tạo mô sẹo ở bạch đàn phụ thuộc vào rất nhiều yếu tố, bao gồm cả loại vật liệu sử dụng để nuôi cấy ban đầu (Prakash & Gurumurthi, 2010). Các loại vật liệu tạo mô sẹo bạch đàn có thể sử dụng như đoạn thân (Deepika *et al.*, 2011) chứa chồi đỉnh Hajari *et al.*, 2006), chồi nách (Corredoira *et al.*, 2015), mô phân sinh chồi, phôi/hạt (Prakash & Gurumurthi, 2010), mảnh lá (Subbaiah & Minocha, 1990; Deepika *et al.*, 2011; Corredoira *et al.*, 2015). Trong nghiên cứu này, khả năng tạo mô sẹo từ mảnh lá và đoạn thân của 2 giống bạch đàn CT4 và Cự vĩ 3229 đã lần lượt được khảo sát nhằm tối ưu vật liệu dùng cho thí nghiệm tạo mô sẹo (Hình 1).

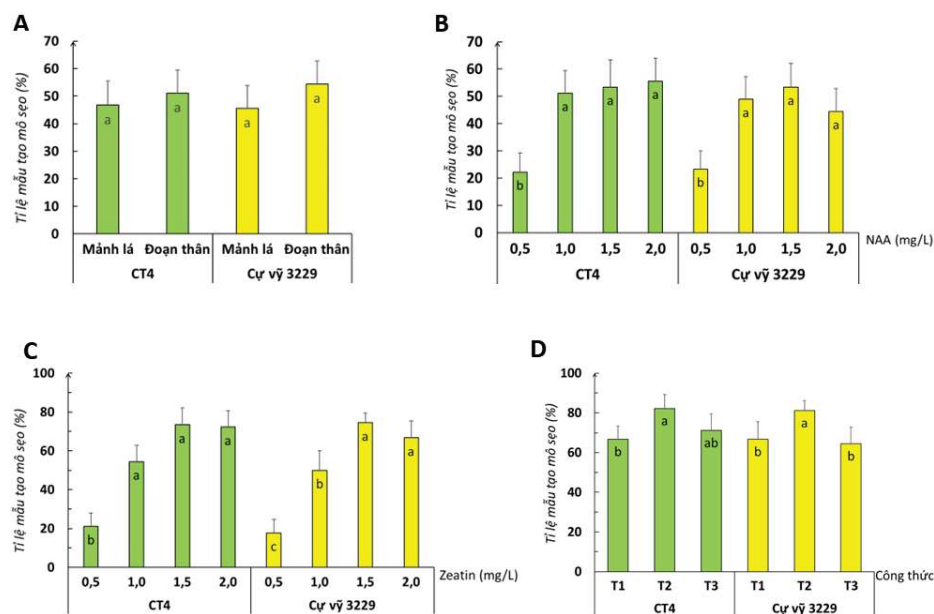


**Hình 1.** Ảnh hưởng của loại mẫu đến khả năng tạo mô sẹo bạch đàn

**Ghi chú:** Mô sẹo được tạo từ mảnh lá (A) và đoạn thân (B) của giống bạch đàn CT4 (Hình ảnh được ghi lại sau 14 ngày nuôi cấy).

So sánh số lượng mẫu tạo mô sẹo giữa 2 thí nghiệm sử dụng 2 loại vật liệu khác nhau (đoạn thân và mảnh lá) không phát hiện có sự sai khác đáng kể ở cả 2 giống, tỷ lệ tạo mô sẹo trung bình từ 45,6 - 54,4% (Hình 2A). Điều này cho thấy cả 2 loại vật liệu này đều có thể sử dụng cho các nghiên cứu tiếp theo. Bên cạnh đó, mô sẹo hình thành từ mảnh lá có kích thước lớn hơn và có xu hướng cứng, đặc hơn; trong khi mô sẹo hình thành

từ đoạn thân nhỏ, mềm và ướt hơn. Trong nghiên cứu của Corredoira và cộng sự (2015), phản ứng tạo mô sẹo của đoạn thân cũng tốt hơn so với mảnh lá cả về mặt số lượng và hình thái mô sẹo. Sự khác biệt này có thể do bản chất di truyền của mỗi giống bạch đàn. Như vậy, đối với 2 giống bạch đàn được nghiên cứu, hiệu quả tạo mô sẹo không phụ thuộc nhiều vào loại vật liệu sử dụng.



**Hình 2.** Ảnh hưởng của loại mẫu và hormone sinh trưởng đến khả năng tạo mô sẹo bạch đàn

*Ghi chú:* Mô sẹo của các giống bạch đàn (CT4, Cự vĩ 3229) được nuôi cấy trên môi trường *in vitro*. (A) Mô sẹo được tạo từ các loại vật liệu khác nhau (Mảnh lá, Đoạn thân). (B) Mô sẹo được nuôi cấy trên môi trường bổ sung NAA với nồng độ khác nhau (0,5; 1,0; 1,5; 2,0 mg/L). (C) Mô sẹo được nuôi cấy trên môi trường bổ sung Zeatin với nồng độ khác nhau (0,5; 1,0; 1,5; 2,0 mg/L). (D) Mô sẹo được nuôi cấy trên môi trường bổ sung [NAA : Zeatin] theo các công thức khác nhau (T1, T2 và T3). Thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Chữ cái giống nhau thể hiện giá trị trung bình sai khác không có ý nghĩa thống kê ( $\alpha = 0,05$ ). Thanh bar thể hiện giá trị độ lệch chuẩn.

### 3.2. Đánh giá ảnh hưởng của NAA đến khả năng tạo mô sẹo của bạch đàn

Cho đến nay, hầu hết các nghiên cứu tạo mô sẹo bạch đàn đều sử dụng hormone auxin là NAA để kích thích phản ứng tạo mô sẹo (Prakash & Gurumurthi, 2010; Deepika *et al.*, 2011; Hajari *et al.*, 2006; Corredoira *et al.*, 2015; Subbaiah & Minocha, 1990). Để xác định ảnh hưởng của NAA đối với khả năng tạo mô sẹo của 2 giống bạch đàn CT4 và Cự vĩ 3229, các nồng độ NAA khác nhau đã lần lượt được khảo sát. Kết quả thu được (Hình 2B) cho thấy 2 giống bạch đàn có phản ứng với NAA khá tương đồng nhau. Cụ thể, tỷ lệ tạo mô sẹo trên môi trường bổ sung NAA 0,5 mg/L đạt

lần lượt 22,2% (CT4) và 23,3% (Cự vĩ 3229). Khi nồng độ NAA trong môi trường nuôi cấy tăng lên 1,0 mg/L, số lượng mẫu tạo mô sẹo đã tăng hơn 2 lần. Tuy nhiên, khi nồng độ NAA tăng cao hơn (1,5 và 2,0 mg/L), hiệu suất tạo mô sẹo thay đổi không đáng kể ở cả 2 giống.

NAA đã được chứng minh rất cần thiết để tạo ra mô sẹo ở nhiều giống bạch đàn (Prakash & Gurumurthi, 2010; Deepika *et al.*, 2011; Hajari *et al.*, 2006; Corredoira *et al.*, 2015; Subbaiah & Minocha, 1990). Auxin dường như có vai trò kép trong phản ứng tạo mô sẹo: vai trò liên quan đến tín hiệu auxin và vai trò liên quan đến đáp ứng stress của tế bào làm thay đổi hàm lượng auxin nội sinh (Corredoira

*et al.*, 2015). Tuy nhiên, đối với mỗi giống/Loài bạch đàn, các nghiên cứu khác nhau sử dụng NAA với nồng độ khác nhau. Ví dụ như Corredoira (2015) đã sử dụng NAA 16,11  $\mu$ M cho giống bạch đàn *Eucalyptus globulus* Labill và giống bạch đàn lai *E. saligna* Smith  $\times$  *E. maidenii* F. Muel. Nồng độ NAA tương tự cũng được sử dụng cho giống bạch đàn Sal-May (Pinto *et al.*, 2002). Subbaiah và Minocha (1990) đã sử dụng NAA từ 0,05 - 5 mg/L để tạo mô sẹo từ bạch đàn *E. tereticornis* SM và không xác định được sự khác biệt đáng kể. Kết quả của nghiên cứu này cũng chỉ ra nồng độ NAA cao >1,0 mg/L không làm thay đổi phản ứng tạo mô sẹo của 2 giống bạch đàn lai CT4 và Cự vĩ 3229. Hơn nữa, hiệu suất tạo mô sẹo của bạch đàn thu được giữa các nghiên cứu rất khác nhau, phụ thuộc vào giống/Loài. Ví dụ, giống *E. tereticornis* SM có tỷ lệ tạo mô sẹo đạt tới 95% trên môi trường bổ sung NAA 0,05 mg/L (Subbaiah và Minocha, 1990); trong khi ở *Eucalyptus camaldulensis*, hiệu suất tạo mô sẹo dao động từ 12 - 44% trên môi trường bổ sung NAA từ 0,1 - 5,0 mg/L (Prakash & Gurumurthi, 2010). Trong thí nghiệm này, môi trường bổ sung NAA 1,0 mg/L là tối ưu nhất về hiệu suất tạo mô sẹo cho 2 giống CT4 và Cự vĩ 3229 (51,1% và 48,9%) và về tính kinh tế.

### 3.3. Đánh giá ảnh hưởng của Zeatin đến khả năng tạo mô sẹo của bạch đàn

Các nghiên cứu trước đây thường sử dụng BAP hay TDZ để kích thích phản ứng tạo mô sẹo ở bạch đàn; trong khi rất ít công bố có sử dụng Zeatin trong nghiên cứu tạo mô sẹo bạch đàn (Barrueto Cid *et al.*, 1999). Trong thí nghiệm này, Zeatin cho thấy tác động rõ rệt đến phản ứng tạo mô sẹo từ đoạn thân của 2 giống bạch đàn nghiên cứu (Hình 2C). Hiệu quả tạo mô sẹo có xu hướng tỷ lệ thuận với nồng độ Zeatin được bổ sung vào môi trường nuôi cấy. Tỷ lệ mẫu tạo mô sẹo cao nhất quan sát được ở thí nghiệm sử dụng Zeatin 1,5 mg/L (73,2% đối với CT4 và 74,4% đối với Cự vĩ 3229). Tuy nhiên, phân tích thống kê chỉ ra rằng giống CT4 trên các môi trường có Zeatin 1,0 - 2,0 mg/L không có sự khác biệt đáng kể về số lượng mẫu tạo mô sẹo; trong khi đối với giống Cự vĩ 3229, nồng độ Zeatin 1,5 và 2,0 mg/L cho tỷ lệ mẫu tạo mô sẹo tương tự nhau và cao hơn rõ rệt so với nồng độ Zeatin 1,0 mg/L.

Nhiều nghiên cứu đã chứng minh Zeatin có thể kích thích phản ứng tạo mô sẹo khi được sử dụng đơn

lẻ không kết hợp với các loại hormone khác (Yaroshko *et al.*, 2023). Tuy nhiên, hầu như chưa có nghiên cứu nào thực hiện đánh giá ảnh hưởng của một loại hormone kích thích sinh trưởng nhóm cytokinin như Zeatin đến khả năng tạo mô sẹo của bạch đàn. Phát hiện của nghiên cứu này đã cho thấy Zeatin cũng có thể được sử dụng để tạo mô sẹo từ đoạn thân của 2 giống bạch đàn lai CT4 và Cự vĩ 3229. Hiệu quả tạo mô sẹo trung bình đạt từ 21,1 - 74,4%, tùy thuộc vào giống và nồng độ Zeatin sử dụng.

### 3.4. Ảnh hưởng của tổ hợp [NAA : Zeatin] đến khả năng tạo mô sẹo của bạch đàn

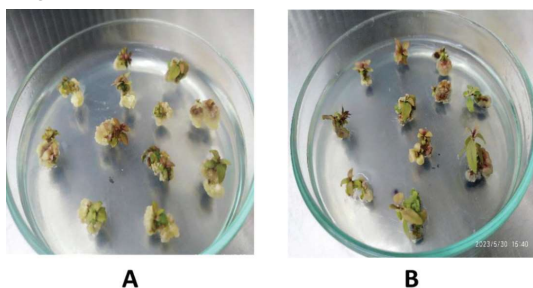
Để tăng hiệu quả tạo mô sẹo của bạch đàn, các tác giả thường sử dụng kết hợp auxin với cytokinin theo tỷ lệ phù hợp, ví dụ như BAP - NAA (Prakash & Gurumurthi, 2010), Zeatin - NAA (Barrueto Cid *et al.*, 1999), BAP - IBA (Prakash & Gurumurthi, 2010), IAA - BAP (Hajari *et al.*, 2006), NAA - Kinetin (Hajari *et al.*, 2006), 2,4-D - BAP (Ngô Thị Minh Duyên *et al.*, 2014). Trong thí nghiệm này, các công thức kết hợp NAA - Zeatin khác nhau đã được thử nghiệm để xác định thành phần môi trường tạo mô sẹo tối ưu cho 2 giống bạch đàn CT4 và Cự vĩ 3229 (Hình 2D). Đối với giống bạch đàn Cự vĩ 3229, hai công thức môi trường T1 và T3 cho tỷ lệ mẫu tạo mô sẹo khác biệt không có ý nghĩa thống kê (66,7% và 64,4%) và không được cải thiện so với công thức môi trường bổ sung đơn chất (đạt lần lượt 53,3% và 74,4%). Số mô sẹo thu được cao nhất với công thức T2, khi kết hợp NAA 1,0 mg/L và Zeatin 1,5 mg/L (tỷ lệ mô sẹo trung bình đạt 81,1%). Kết quả tương tự cũng thu được với giống bạch đàn CT4, trong đó hiệu suất tạo mô sẹo tăng khoảng 10 - 20% trên môi trường bổ sung NAA - Zeatin theo công thức T2 so với môi trường chỉ có đơn chất hay công thức T1 và T3.

Trước đây, Hajari và cộng sự (2006) đã báo cáo kết quả tạo mô sẹo trên các dòng bạch đàn lai *Eucalyptus grandis* và *E. grandis*  $\times$  *E. urophylla* và dòng bạch đàn vô tính đạt 100%. Tương tự, các dòng bạch đàn lai *E. grandis*  $\times$  *E. nitens*, *E. grandis*  $\times$  *E. camaldulensis* và *E. grandis*  $\times$  *E. urophylla* cũng đạt hiệu suất tạo mô sẹo từ 80 - 100% (Deepika *et al.*, 2011). Trong khi đó, Prakash & Gurumurthi (2010) chỉ thu được tỷ lệ tạo mô sẹo trên *E. camaldulensis* cao nhất khoảng 66,33%. Sự khác biệt giữa các kết quả nghiên cứu có thể do sự khác nhau về vật liệu để tạo mô sẹo, thành phần và tỷ lệ

kết hợp các loại hormone và bản chất di truyền của từng giống/Loài. Nghiên cứu này đã thu được tỷ lệ tạo mô sẹo >80% đối với cả 2 giống bạch đàn khi sử dụng đoạn thân từ chồi nuôi cấy *in vitro* là vật liệu nuôi cấy và kết hợp NAA 1,0 mg/L với Zeatin 1,5 mg/L. Công thức môi trường này đã được lựa chọn cho các nghiên cứu tiếp theo sau này.

### 3.5. Đánh giá khả năng tái sinh chồi từ mô sẹo bạch đàn

Mặc dù đã có một thời gian dài phát triển, với nhiều tiến bộ đáng kể trong việc tái sinh và chuyển gen ở cây bạch đàn, hiệu quả chuyển gen bạch đàn nhìn chung vẫn khá thấp, đặc biệt là đối với các giống bạch đàn vô tính ưu tú (Deepika *et al.*, 2011). Để tái sinh các mẫu nuôi cấy có nguồn gốc từ các dòng bạch đàn lai ưu tú phục vụ cho các dây chuyền sản xuất giống cũng như nghiên cứu chuyển gen vào các giống bạch đàn có giá trị kinh tế cao, việc xác định khả năng tái sinh của các giống bạch đàn tiềm năng có ý nghĩa rất quan trọng. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã khảo sát khả năng tái sinh chồi từ mô sẹo của 2 giống bạch đàn lai CT4 và Cự vĩ 3229 (Hình 3). Kết quả khảo sát (Hình 4) cho thấy hiệu suất tái sinh chồi từ mô sẹo của 2 giống bạch đàn được nghiên cứu có sự khác biệt khá rõ rệt. Trong khi tỷ lệ mô sẹo tái sinh quan sát được ở giống bạch đàn CT4 đạt > 30%; tỷ lệ mô sẹo tái sinh của giống bạch đàn Cự vĩ chỉ đạt trung bình 22,4%. Tuy nhiên, khi so sánh về số chồi/mô sẹo, hai giống không có sự khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê, đạt 1,9 - 2,1 chồi/mô sẹo.

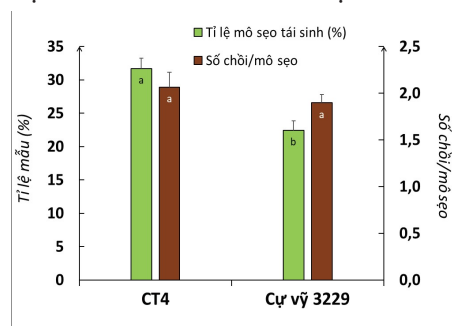


**Hình 3.** Tái sinh chồi từ mô sẹo bạch đàn

*Ghi chú:* Chồi được tái sinh từ mô sẹo của các giống bạch đàn CT4 (A) và Cự vĩ 3229 (B) trên môi trường nuôi cấy *in vitro*. Hình ảnh được ghi lại sau 28 ngày nuôi cấy mô sẹo.

Trước đây, Deepika *et al.*, (2011) đã khảo sát khả năng tái sinh của 8 dòng bạch đàn lai khác nhau và thu được tỷ lệ tái sinh khác biệt nhau rất lớn, dao động từ 6,7% đến 86,7%. Hiệu suất tái sinh chồi từ

mô sẹo của 2 giống bạch đàn lai CT4 và Cự vĩ 3229 trong nghiên cứu này chỉ đạt lần lượt 22,4 - 31,7%. Kết quả này cũng gần với kết quả đạt được trong nghiên cứu của Hajari *et al.*, (2006) trên các dòng bạch đàn lai *E. grandis* x *E. urophylla* (31% - 50%, tùy từng công thức môi trường). Đặc biệt, tác giả này thu được số chồi/mô sẹo dao động từ 1 - 17 khi sử dụng các công thức môi trường khác nhau, cho thấy thành phần hormone cũng ảnh hưởng rất lớn tới hiệu suất nhân đa chồi của bạch đàn.



**Hình 4.** Khả năng tái sinh chồi từ mô sẹo của các giống bạch đàn

*Ghi chú:* Chồi được tái sinh từ mô sẹo của các giống bạch đàn (CT4 và Cự vĩ 3229) trên môi trường nuôi cấy *in vitro*. Giá trị trên đồ thị là tỷ lệ % mô sẹo tái sinh và số chồi/mô sẹo trung bình của 3 lần thí nghiệm. Các chữ cái giống nhau trên cột thể hiện sự sai khác không có ý nghĩa thống kê giữa các giá trị trung bình trong cùng một chỉ số ( $\alpha = 0,05$ ). Thanh bar thể hiện giá trị độ lệch chuẩn.

## IV. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã thiết lập được thành phần môi trường tạo mô sẹo tối ưu cho hai giống bạch đàn lai CT4 và Cự vĩ 3229. Môi trường tạo mô sẹo tối ưu sử dụng NAA 1,0 mg/L, Zeatin 1,5 mg/L; đạt hiệu suất 81,1 - 82,2%. Mô sẹo hình thành từ đoạn thân của hai giống bạch đàn CT4 và Cự vĩ 3229 có tỷ lệ tái sinh chồi đạt 22,4 và 31,7%.

## LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu thuộc Nhiệm vụ thường xuyên Phòng thí nghiệm trọng điểm Công nghệ Tế bào thực vật năm 2023 “Nghiên cứu xây dựng quy trình chuyển hệ thống chỉnh sửa gen CRISPR/Cas9 vào cây mía (*Saccharum officinarum* L.), Khoai tây (*Solanum tuberosum*) và Bạch đàn (*Eucalyptus*)” (Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn). Chúng tôi xin trân trọng cảm ơn.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

Ngô Thị Minh Duyên, Đỗ Thị Thu, Trần Hồ Quang, 2014. 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. *Tạp chí Khoa học Lâm nghiệp*, 4: 3516-3523.
- Nguyễn Thị Hương, Nguyễn Văn Việt, 2007. Xây dựng hệ thống tái sinh bạch đàn uro (*Eucalyptus urophylla* S.T. Blake) từ mô sẹo phục vụ chọn dòng tế bào. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Lâm nghiệp*, 7: 26-33.
- Barrueto Cid L.P., Machado A.C., Carvalheira S.B., 1999. Plant regeneration from seedling explants of *Eucalyptus grandis* × *E. urophylla*, *Plant Cell. Tissue and Organ Culture*, 56: 17-23.
- Corredoira E, Ballester A, Ibarra M, Vieitez AM., 2015. Induction of somatic embryogenesis in explants of shoot cultures established from adult *Eucalyptus globulus* and *E. saligna* × *E. maidenii* trees. *Tree Physiology*, 35 (6): 678-690. doi: 10.1093/treephys/tpv028. Epub 2015 Apr 15. PMID: 25877768.
- Corredoira E, Ballester A, Vieitez FJ, Vieitez AM., 2006. Somatic embryogenesis in chestnut. In: Mujib A, Samaj J (eds) *Plant cell monographs*. Vol. 2. Somatic embryogenesis. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 177-199.
- Corredoira E., Ballester A., Ibarra M., Vieitez A.M., 2015. Induction of somatic embryogenesis in explants of shoot cultures established from adult *Eucalyptus globulus* and *E. saligna* × *E. maidenii* trees. *Tree Physiology*, 35 (6): 678-690.
- Deepika R., Veale A., Ma C., Strauss S.H., Myburg A.A., 2011. Optimization of a plant regeneration and genetic transformation protocol for *Eucalyptus* clonal genotypes. *BMC Proceedings*, 5 (7): 132.
- Eldridge K., Davidson J., Harwood C., Van Wyk, G., 1994. *Eucalypt Domestication and Breeding*. Oxford University Press, Oxford.
- Giri C.C., Shyamkumar B., Anjaneyulu C., 2004. Progress in tissue culture, genetic transformation and applications of biotechnology to trees: an overview. *Trees*, 18: 115 -135.
- Hajari E., Watt M.P., Mycock D.J., McAlister B., 2006. Plant regeneration from induced callus of improved *Eucalyptus* clones. *South African Journal of Botany*, 72 (2): 195-201.
- Labate C.A., de Assis T.F., Oda S., de Mello E.J., Mori E.S., de Moraes M.L.T., Cid L.P.B., Gonzalez E.R., Alfnas A.C., Zauza E.A.V., Foelkel C., Moon D.H., Cos M., 2008. *Eucalyptus*. In: Kole C.H., Hall T.C. (eds) *Compendium of transgenic crop plants: transgenic forest trees species*. Blackwell Publishing, Oxford, pp. 35-108.
- Pinto G., Santos C., Neves L., Araújo C., 2002. Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Eucalyptus globulus* Labill. *Plant Cell Reports*, 21: 208-213.
- Prakash M.G., Gurumurthi K., 2010. Effects of type of explant and age, plant growth regulators and medium strength on somatic embryogenesis and plant regeneration in *Eucalyptus camaldulensis*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 100: 13-20.
- Sabai S.S., David W.M.L., 2020. Plant regeneration from *Eucalyptus bosistoana* callus. *In vitro cellular & Developmental Biology Plant*, 56: 718-725.
- Subbaiah M.M., Minocha S.C., 1990. Shoot regeneration from stem and leaf callus of *Eucalyptus tereticornis*. *Plant Cell Reports*, 9 (7): 370-373.
- Yaroshko O., Pasternak T., Larriba E., Pérez-Pérez J.M., 2023. Optimization of callus induction and shoot regeneration from tomato cotyledon explants. *Plants*, 12 (16): 2942.

## Study on development of protocol for *in vitro* callus culture of eucalyptus hybrid varieties CT4 and Cu vi DH 32-29

Nguyen Duy Phuong, Nguyen Van Cuu,  
Ngo Thi Van Anh, Nguyen Thanh Duc, Pham Xuan Hoi

### Abstract

*Eucalyptus* (*Eucalyptus* sp.) is a valuable wood tree, but traditional breeding methods are challenging due to its high genetic heterozygosity. The study aimed to establish an *in vitro* culture process and evaluate the effects of NAA and Zeatin on the callus formation of two high-yielding hybrid eucalyptus varieties CT4 and Cu vi DH 32-29 (Cu vi 3229). The optimal medium contained NAA 1.0 mg/L, Zeatin 1.5 mg/L, achieving 81.1% and 82.2% efficiency. The rate of callus regeneration of CT4 and Cu vi 3229 reached 22.4 and 31.7%, respectively. This result is the basis for future eucalyptus rapid propagation studies.

**Keywords:** *Eucalyptus*, hybrid eucalyptus varieties CT4 and Cu vi DH 32-29, *in vitro* culture

Ngày nhận bài: 24/8/2024

Ngày phản biện: 18/9/2024

Người phản biện: TS. Lương Thị Hoan

Ngày duyệt đăng: 08/10/2024

## ĐÁNH GIÁ KHẢ NĂNG PHÁT TRIỂN GÓC ĐỘ BỀ MẶT VÀ ĐÂM SÂU CỦA BỘ RỄ LÚA TRONG ĐIỀU KIỆN MẶN *IN VITRO*

Nguyễn Thị Loan<sup>1</sup>, Phạm Thị Hằng<sup>1</sup>,  
Nguyễn Thanh Nhung<sup>1</sup>, Trần Đăng Khánh<sup>2\*</sup>

### TÓM TẮT

Cấu trúc bộ rễ của cây trồng là một đặc tính phức tạp và quan trọng đối với hiệu suất và khả năng chống chịu trong điều kiện khắc nghiệt như hạn hán, ngập lụt và nhiễm mặn. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã đánh giá tác động của mặn đối với chiều cao cây, chiều dài rễ, khả năng phát triển góc độ bề mặt và đâm sâu của hệ thống rễ trên 30 giống lúa bằng cách trồng cây trong môi trường pha thạch với bổ sung 0‰ NaCl và 3‰ NaCl trong 10 ngày, sau đó tiến hành thu thập mẫu, phân tích và đánh giá. Kết quả cho thấy rằng mặn đã làm giảm chiều cao cây (giảm từ 4,5% đến 18,8%), làm ảnh hưởng tiêu cực đến sự phát triển của rễ (giảm từ 0,6 đến 1,2 cm). Mặn không liên quan trực tiếp đến sự phát triển của rễ bề mặt, nhưng lại ức chế sự phát triển của bộ rễ bằng cách làm suy yếu phản ứng hướng trọng lực dẫn đến hệ thống rễ cây có xu hướng phát triển nông hơn.

**Từ khóa:** Cây lúa, chịu mặn, góc phát triển rễ, rễ đâm sâu

### I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Lúa (*Oryza sativa* L.) là loại cây lương thực có vai trò quan trọng nhất ở Việt Nam. Những năm trở lại đây, do ảnh hưởng cực đoan của biến đổi khí hậu dẫn đến tình trạng xâm nhập mặn tại các tỉnh ven biển ngày càng trở nên nghiêm trọng. Diện tích đất trồng và năng suất lúa suy giảm do mặn sẽ đe dọa đến đời sống của nông dân, vấn đề xuất khẩu gạo và an ninh lương thực quốc gia. Mùa khô năm 2019 - 2020, xâm nhập mặn được đánh giá là nghiêm trọng nhất trong lịch sử ở Đồng bằng sông Cửu Long, đã ảnh hưởng đến 10/13 tỉnh ĐBSCL, làm 42,5% diện tích tự nhiên của toàn vùng bị ảnh hưởng, tương đương 1.688.600 ha (Thanh Phong, 2020). Trước tình hình đó, việc chủ động nghiên cứu, chọn tạo giống lúa có năng suất, chất lượng tốt, chống chịu mặn cao, ứng phó với biến đổi khí hậu là việc làm cấp bách và cần thiết của các nhà khoa học.

Hệ thống rễ cây đóng vai trò quan trọng trong việc hấp thụ, vận chuyển nước và chất dinh dưỡng, vì vậy, rễ cây có ảnh hưởng lớn đến năng suất đặc biệt là trong các điều kiện bất lợi như hạn hán, ngập úng và nhiễm mặn. Một số nghiên cứu trước đã chỉ ra rằng, sự tích lũy  $Na^+$  dư thừa trong đất dẫn đến tình trạng thiếu oxy trong đất bạc màu

làm cho sự phát triển của rễ lúa bị còi cọc. Rễ bề mặt giúp cây nhận được nhiều oxy hơn do phần đất bề mặt có hàm lượng oxy nhiều hơn phần đất sâu, giảm thiệt hại do áp lực mặn gây ra (Sun *et al.*, 2008).

Kitomi và cộng sự (2020) đã tiến hành nghiên cứu ảnh hưởng của gen *qSOR1* (*quantitative trait locus for SOIL SURFACE ROOTING 1*) đến sự hình thành rễ bề mặt trong điều kiện nhiễm mặn, kết quả cho thấy, cây đột biến mang gen *qsor1* nhiều rễ bề mặt hơn so với cây đối chứng. Ngoài ra, khi đánh ra ở những cánh đồng bị nhiễm mặn có giá trị EC dao động từ 2 - 9,5 dS/m trong thời gian từ khi thử mặn đến thu hoạch cho thấy, năng suất của dòng đột biến mang gen *qsor1* cao hơn khoảng 15% so với đối chứng. Điều này chỉ ra, rễ bề mặt có thể giúp thực vật tránh các điều kiện bất lợi thay vì trực tiếp chống chịu lại ảnh hưởng do mặn. Từ những lý do trên, chúng tôi tiến hành nghiên cứu khả năng phát triển góc độ bề mặt và đâm sâu của bộ rễ ở một số dòng/giống lúa của Việt Nam trong môi trường thạch có bổ sung NaCl, nhằm đánh giá thêm mối liên quan giữa cấu trúc của bộ rễ đến khả năng chống chịu mặn của các dòng giống lúa.

<sup>1</sup> Bộ môn Kỹ thuật Di truyền, Viện Di truyền Nông nghiệp

<sup>2</sup> Học viện Nông nghiệp Việt Nam

\* Tác giả liên hệ, email: tdkhanh@vaas.vn