

TÁI SINH CHỒI TRỰC TIẾP TỪ MẪU CÂY LÁ CÂY DẦU MÈ (*JATROPHA CURCAS L.*)

Bùi Văn Thế Vinh¹, Chu Thị Bích Phượng¹, Đỗ Đăng Giáp², Thái Xuân Du², Dương Tấn Nhựt³

¹Đại học Kỹ thuật Công nghệ Thành phố Hồ Chí Minh

²Viện Sinh học nhiệt đới

³Viện Sinh học Tây Nguyên

TÓM TẮT

Mẫu cây lá cây Dầu mè được tách từ cây con *in vitro* cũng như cây trưởng thành ngoài tự nhiên được nuôi cấy trên môi trường MS có bổ sung BA và Kinetin riêng lẻ hay kết hợp ở những nồng độ khác nhau để cảm ứng sự tái sinh chồi trực tiếp. Rất nhiều cụm chồi nhỏ được cảm ứng trực tiếp trên môi trường MS có bổ sung 1 mg/l BA và 1 mg/l Kinetin nhưng chỉ có khoảng 5 chồi kéo dài từ mỗi mẫu cây lá ban đầu. Chồi được nhân lên trên môi trường tương tự, tuy nhiên sau một thời gian xuất hiện hiện tượng vàng lá và rụng lá. Cần phải cấy chuyển chồi sang môi trường MS có bổ sung 0,5 mg/l GA₃ và 20% nước dừa để kéo dài chồi và ngăn hiện tượng rụng lá. Các chồi phát triển tốt được chuyển sang môi trường cảm ứng ra rễ là môi trường MS½ có bổ sung 0,5 mg/l NAA. Cây tái sinh sau 4 tháng được chuyển ra vườn ươm với tỉ lệ sống sót đạt trên 80%. Đây là một quy trình hiệu quả để tái sinh chồi trực tiếp từ mẫu cây lá cây Dầu mè, quy trình này có thể được áp dụng trong các nghiên cứu chuyển gene nhằm nâng cao hàm lượng dầu trong hạt mà không qua giai đoạn tạo mô sẹo.

Từ khóa: *Jatropha curcas L.*, tái sinh trực tiếp, chồi bất định, cụm chồi, mẫu cây lá

GIỚI THIỆU

Cây Dầu mè (*Jatropha curcas L.*) còn được gọi là cây Dầu lai, cây Cọc rào, cây Cọc giậu thuộc họ thầu dầu (*Euphorbiaceae*). Cây dạng bụi, lưu niên, có thể cao tới 5 m, có nguồn gốc từ châu Mỹ và được lan rộng ra khắp các vùng nhiệt đới trên thế giới. Đây là loài cây đa mục đích, tất cả các phần của cây đều có giá trị sử dụng. Trong những năm gần đây, loài cây này đã nhận được sự quan tâm của nhiều nhà khoa học trên thế giới do có tầm quan trọng về kinh tế và giá trị dược liệu của nó (Datta, Pandey, 1993). Dầu từ hạt được xem là nguồn nguyên liệu tiềm năng để sản xuất nhiên liệu sinh học, đây là loại nhiên liệu sạch, không độc, thân thiện với môi trường và kinh tế nhờ chi phí sản xuất thấp. Ngoài ra, dầu cũng được sử dụng một cách truyền thống để sản xuất xà phòng, nến, sơn, dầu nhờn và dùng trong y học để làm thuốc xổ (Sujatha, Mukta, 1996).

Cây Dầu mè đã du nhập vào Việt Nam từ rất lâu, được sử dụng làm thuốc chữa bệnh, trồng làm hàng rào và hạt được sử dụng để thắp sáng. Đây là một loại cây trồng có tiềm năng kinh tế rất cao, tuy nhiên hiện nay chưa có nhiều khảo sát, đánh giá về năng suất hạt và hàm lượng dầu của những giống đang được trồng trên đồng ruộng. Việc nghiên cứu khảo nghiệm tính thích ứng của giống, so sánh đánh giá để tìm ra những giống phù hợp với điều

kiện của nước ta là công việc trước tiên, kể đó là tìm biện pháp nhân nhanh giống có năng suất hạt và hàm lượng dầu trong hạt cao. Vấn đề gặp phải của phương pháp nhân giống truyền thống đối với cây Dầu mè là khả năng sống sót của hạt kém, tỉ lệ nảy mầm thấp, khả năng ra rễ của cây con gieo từ hạt ít và chậm (Heller, 1996; Openshaw, 2000), năng suất hạt và hàm lượng dầu trong hạt không đảm bảo ổn định về di truyền (Prabakaran, Sujatha, 1999). Phương pháp nhân giống vô tính truyền thống đối với cây Dầu mè là giâm cành. Tuy nhiên, những cây con được nhân giống bằng cành giâm có tuổi thọ ngắn và khả năng kháng bệnh cũng như kháng hạn kém hơn so với cây con gieo từ hạt (Heller, 1996). Cây con từ cành giâm không tạo được rễ cọc thật sự, thay vào đó chúng tạo ra các rễ cọc giả chỉ có thể cắm sâu xuống đất khoảng 1/2 - 2/3 so với rễ cọc được tạo ra từ cây con gieo từ hạt (Heller, 1996).

Vấn đề trước mắt là cần phải có một lượng lớn cây giống đồng nhất có chất lượng tốt để phục vụ cho ngành công nghiệp sản xuất diesel sinh học. Các phương pháp nhân giống hiện đại áp dụng trên cây Cọc rào chỉ mới phát triển trong khoảng hơn 10 năm trở lại đây. Các phương pháp nhân giống hiện đại có ưu điểm lớn là có khả năng tạo giống cây với số lượng lớn trong khoảng thời gian ngắn với chất lượng cao và đồng nhất về mặt di truyền.

Trong những nghiên cứu trước đây, một số yếu tố ảnh hưởng đến sự phát sinh hình thái của cây Dầu mè *in vitro* đã được khảo sát như loại mô dùng làm mẫu cấy, vị trí lấy mẫu, tuổi sinh lý của mẫu cấy, nồng độ các chất điều hòa sinh trưởng thực vật, thành phần của môi trường nuôi cấy,... (Sujatha, Mukta, 1996; Sardana *et al.*, 2000; Rajore, Batra, 2005; Sujatha *et al.*, 2006; Jha *et al.*, 2007; Shrivastava, Banerjee, 2008). Trong đó, mẫu cây đoạn thân có mang chồi ngủ được xem là nguyên liệu tốt nhất để tái sinh cây *in vitro* do có tỉ lệ nhiễm thấp, giúp giảm đáng kể những biến dị sinh dưỡng nhưng hệ số nhân giống đạt được không cao.

Trong bài báo này, chúng tôi nghiên cứu ảnh hưởng của BA và Kinetin lên sự tái sinh chồi trực tiếp từ mẫu cây lá cây Dầu mè. Ảnh hưởng của GA₃ và nước dừa lên khả năng kéo dài chồi và ngăn cản sự rụng lá đối với chồi bất định cây Dầu mè cũng được khảo sát. Cây con *in vitro* được chuyển ra vườn ươm để đánh giá khả năng sống sót và hoàn thiện quy trình nhân giống cây Dầu mè từ mẫu cây lá trưởng thành với hệ số nhân giống đạt được tương đối cao.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu

Lá *ex vitro* được thu nhận từ những cây Dầu mè trưởng thành 7 tháng tuổi có nguồn gốc từ Ấn Độ được trồng ở Viện Sinh học Nhiệt đới Thành phố Hồ Chí Minh. Những lá non ở gần đỉnh sinh trưởng được sử dụng để làm mẫu cấy (Hình 1). Lá *in vitro* được thu nhận từ chồi ngọn và chồi nách được nuôi cấy trên môi trường WPM (Lloyd, McCown, 1980) có bổ sung 20 g/l đường, 7,5 g/l agar, pH 5,7.

Phương pháp

Khử trùng mẫu cấy

Lá được đặt dưới vòi nước chảy trong 30 phút, sau đó tiến hành rửa sạch bề mặt lá bằng xà phòng loãng (Viso, Việt Nam) và rửa lại bằng nước cất vô trùng. Sau đó, lá được khử trùng bằng dung dịch Javel 7% trong thời gian 15 phút và rửa lại 5 lần bằng nước cất vô trùng.

Cảm ứng tái sinh chồi trực tiếp từ mẫu cây lá

Lá được cắt thành những mảnh nhỏ và được nuôi cấy trên môi trường MS cơ bản (Murashige, Skoog, 1962) có bổ sung 30 g/l sucrose, 8 g/l agar, BA (0,5 - 4,0 mg/l) và Kinetin (0,5 - 4,0 mg/l) riêng

lẻ hay kết hợp. pH môi trường được điều chỉnh về 5,8 trước khi hấp khử trùng ở nhiệt độ 121°C, áp suất 1 atm trong thời gian 30 phút. Các mảnh lá được nuôi trong điều kiện chiếu sáng 16 h/ngày ở nhiệt độ 22 ± 2°C.

Kéo dài chồi bất định

Những chồi bất định tái sinh 4 tuần tuổi được chuyển sang môi trường kéo dài chồi bổ sung 0,5% GA₃ hoặc/và 20% nước dừa, có hoặc không có sự kết hợp với 1,0 mg/l BA, 1,0 mg/l Kinetin. pH môi trường được điều chỉnh về 5,8 trước khi hấp khử trùng ở nhiệt độ 121°C, áp suất 1 atm trong thời gian 30 phút. Chồi được nuôi trong điều kiện chiếu sáng 16 h/ngày ở nhiệt độ 22 ± 2°C.

Cảm ứng tạo rễ

Chồi có kích thước 4 - 5 cm được chuyển sang môi trường cảm ứng tạo rễ là môi trường MS½ có bổ sung NAA (0,1 - 1,0 mg/l) hoặc IBA (0,1 - 1,0 mg/l). pH môi trường được điều chỉnh về 5,8 trước khi hấp khử trùng ở nhiệt độ 121°C, áp suất 1 atm trong thời gian 30 phút. Chồi được nuôi trong điều kiện chiếu sáng 16 h/ngày ở nhiệt độ 22 ± 2°C.

Chuyển cây con ra vườn ươm

Những cây con có bộ rễ phát triển hoàn chỉnh được lấy ra khỏi bình nuôi cấy, rửa dưới vòi nước chảy, ngâm rễ trong nước cất vô trùng trong 1 ngày và trồng vào chậu nhựa có chứa hỗn hợp đất vườn:cát:phân hữu cơ (1:1:1) và phủ lại bằng túi PE. Sau 4 tuần, những cây này được chuyển sang chậu lớn hơn có chứa hỗn hợp đất và phân hữu cơ. Khi cây con phát triển lá mới, tiến hành chuyển cây con ra đồng ruộng.

Xử lý thống kê

Các thí nghiệm được thiết kế theo thể thức hoàn toàn ngẫu nhiên. Mỗi thí nghiệm được lặp lại 3 lần, số liệu được xử lý bằng phần mềm Statgraphics Centurion XV theo phương pháp Duncan Multiple Range Test (DMRT) (Duncan, 1995) ở mức ý nghĩa 5%.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Cảm ứng tái sinh chồi bất định trực tiếp từ mẫu cây lá

Sau 4 tuần nuôi cấy, mẫu lá trên các môi trường cảm ứng xuất hiện những đáp ứng khác nhau. Đầu tiên, những mẫu lá gia tăng về kích thước và sau đó

bắt đầu có sự hình thành mô sẹo và chồi bất định từ vết cắt trên môi trường có bổ sung BA hoặc BA kết hợp với Kinetin ở các nồng độ khác nhau. Kết quả được chi ra trong bảng 1 cho thấy Kinetin khi sử dụng riêng lẻ trong môi trường ở các nồng độ khác nhau (0,5 - 4,0 mg/l) không thích hợp để nuôi cấy mẫu cây lá cây Dầu mè. Ở nồng độ Kinetin thấp, các mẫu cây phát sinh mô sẹo nhưng sau đó dần hóa nâu và chết (Hình 2a).

Kết quả cũng cho thấy BA riêng lẻ trong môi trường ở các nồng độ khác nhau (0,5 - 4,0 mg/l) thích hợp cho sự tạo thành mô sẹo hơn là cảm ứng tạo chồi (Hình 2b). Kết quả này phù hợp với kết luận của Deore và Johnson (2008) khi cho rằng BA cảm ứng kích thích hình thành mô sẹo hơn là chồi bất định đối với mẫu cây lá khi không có sự hiện diện của một cytokinin khác như TDZ trong môi trường nuôi cấy. BA cũng có vai trò cần thiết trong sự phát sinh phôi vô tính từ mẫu lá mầm cây Dầu mè (Kalimuthu *et al.*, 2007). Các tác giả đã chỉ ra rằng trên môi trường MS có chứa 2,0 mg/l BA,

những phôi vô tính hình cầu nhỏ bắt đầu xuất hiện từ bề mặt trên của lá mầm trong vòng 7 - 8 ngày, những cấu trúc này sau đó phát triển thành phôi có màu xanh đậm.

Trên môi trường có bổ sung 1,0 mg/l BA kết hợp với 1,0 mg/l Kinetin, 100% mẫu cây được cảm ứng phát sinh chồi trực tiếp từ rìa các vết cắt của mẫu cây lá (Hình 2c, 2d). Trên môi trường này, số chồi trung bình trên mỗi mẫu cây cũng được ghi nhận đạt kết quả tốt nhất (4,6 chồi/mẫu cây). Khi tăng dần nồng độ kết hợp giữa BA và Kinetin, tỉ lệ mẫu cây phát sinh chồi giảm xuống rõ rệt, đồng thời số lượng chồi được cảm ứng trên mỗi mẫu cây cũng giảm mạnh. Kết quả này cho thấy rằng cả 2 cytokinin BA và Kinetin khi kết hợp với nhau có vai trò điều phối trong việc cảm ứng chồi cây Dầu mè. Ghi nhận này cũng tương tự như kết quả của Deore và Johnson (2008) khi sử dụng kết hợp 2,27 μ M TDZ, 2,22 μ M BA và 0,49 μ M IBA nhưng chỉ thu nhận được khoảng 53,5% mẫu cây có sự cảm ứng tái sinh chồi trực tiếp.

Bảng 1. Ảnh hưởng của BA và Kinetin lên sự cảm ứng tái sinh chồi trực tiếp từ mẫu cây lá cây Dầu mè

Chất điều hòa tăng trưởng		Đáp ứng của mẫu cây			
BA (mg/l)	Kinetin (mg/l)	Mô sẹo (%)	Chồi (%)	Số chồi	Không đáp ứng (%)
0,5		84,27	15,73	1,6de	
1,0		48,15	51,85	2,1cd	
2,0		55,56	44,44	1,3e	
3,0		54,67	33,33	1,3e	12,00
4,0		53,51	25,02	0,3f	21,47
	0,5	27,36			72,64
	1,0	13,49			86,51
	2,0				100
	3,0				100
	4,0				100
0,5	0,5	38,46	61,54	1,8cd	
1,0	1,0		100	4,6a (*)	
2,0	2,0	4,35	95,65	2,9b	
3,0	3,0	31,82	68,18	2,0cd	
4,0	4,0	29,52	62,12	1,6de	8,26

Chú thích: (*): Những chữ cái khác nhau (a,b,c,...) thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa ở mức $\alpha = 0,05$ trong phép thử DMRT

Kéo dài chồi bất định

Ngoài những chồi kéo dài có thể đếm được trên những mẫu cây được cảm ứng trên môi trường có bổ

sung 1,0 mg/l BA và 1,0 mg/l Kinetin còn có rất nhiều cụm chồi nhỏ (Hình 2e). Những cụm chồi nhỏ này cũng được quan sát trên những môi trường có bổ sung BA và Kinetin. Những chồi bất định và cụm

chồi nhỏ được chuyển sang môi trường kéo dài chồi để kích thích kéo dài chiều cao cây trước khi chuyển sang giai đoạn cảm ứng ra rễ tuy nhiên những cụm chồi nhỏ không cho thấy có sự khác biệt đáng kể nào so với môi trường cảm ứng ban đầu.

Những chồi bất định được cấy chuyển sang môi trường MS có bổ sung 1 mg/l BA và 1 mg/l Kinetin cũng không cho thấy có sự kéo dài chồi rõ rệt. Chồi xuất hiện hiện tượng vàng lá và rụng lá. Kết quả được trình bày trong bảng 2 cho thấy môi trường MS bổ sung 0,5 mg/l GA₃ và 20% nước dừa có hoặc không có sự kết hợp với 1 mg/l BA và 1 mg/l Kinetin đạt hiệu quả kéo dài chồi tốt nhất và không có sự khác biệt đáng kể (4,2 - 4,3 cm). Chồi phát triển trên 2 môi trường này có bộ lá phát triển tốt mà không có hiện tượng vàng lá hay rụng lá như những nghiệm thức còn lại (Hình 2g).

GA₃ được chứng minh có vai trò kích thích kéo dài chồi nhờ kéo dài các lóng thân (Diellen *et al.*, 2001). Nước dừa đã được sử dụng rộng rãi trong lĩnh vực nuôi cấy mô và tế bào thực vật nhờ vai trò của một hỗn hợp gồm nhiều chất điều hòa tăng trưởng thực vật phức tạp chưa được biết rõ thành phần và hàm lượng trong đó IAA, Zeatin, GA₃ là những hợp phần quan trọng (Yong *et al.*, 2009). Deore và Johnson (2008) ghi nhận rằng chồi bất định cây Dầu mè được nhân lên và phát triển thành chồi trưởng thành sau khi chuyển sang môi trường MS có bổ sung 1,0 mg/l BA, 0,5 mg/l Kinetin, 0,25 mg/l IAA và 0,25 mg/l GA₃. Trong thí nghiệm này, chúng tôi đã chứng minh vai trò của GA₃ và nước dừa trong việc cảm ứng kéo dài chồi mà không cần có sự hiện diện của một auxin hay cytokinin.

Bảng 2. Ảnh hưởng của GA₃ và nước dừa lên chiều cao chồi cây Dầu mè *in vitro*.

Môi trường nuôi cấy	Chiều cao chồi (cm)	Số lá
MS + 1 mg/l BA + 1 mg/l Kinetin	1,6c	2,6d
MS + 0,5 mg/l GA ₃	2,9b	5,9c
MS + 20% CW	1,8c	3,1d
MS + 0,5 mg/l GA ₃ + 20% CW	4,2a (*)	6,2bc
MS + 0,5 mg/l GA ₃ + 20% CW + 1 mg/l BA + 1 mg/l Kinetin	4,3a	6,7a

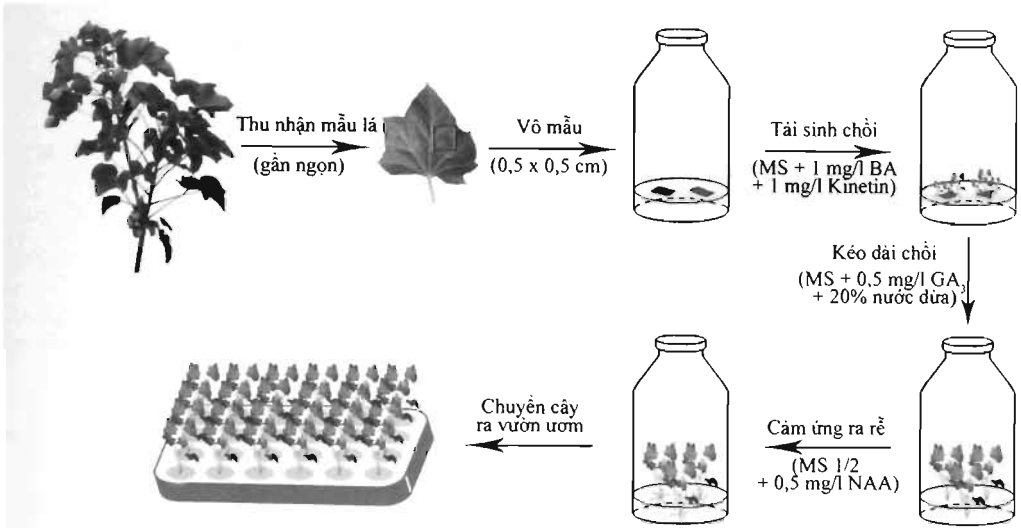
Chú thích: (*): Những chữ cái khác nhau (a,b,c,...) thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa ở mức $\alpha = 0,05$ trong phép thử DMRT

Cảm ứng tạo rễ

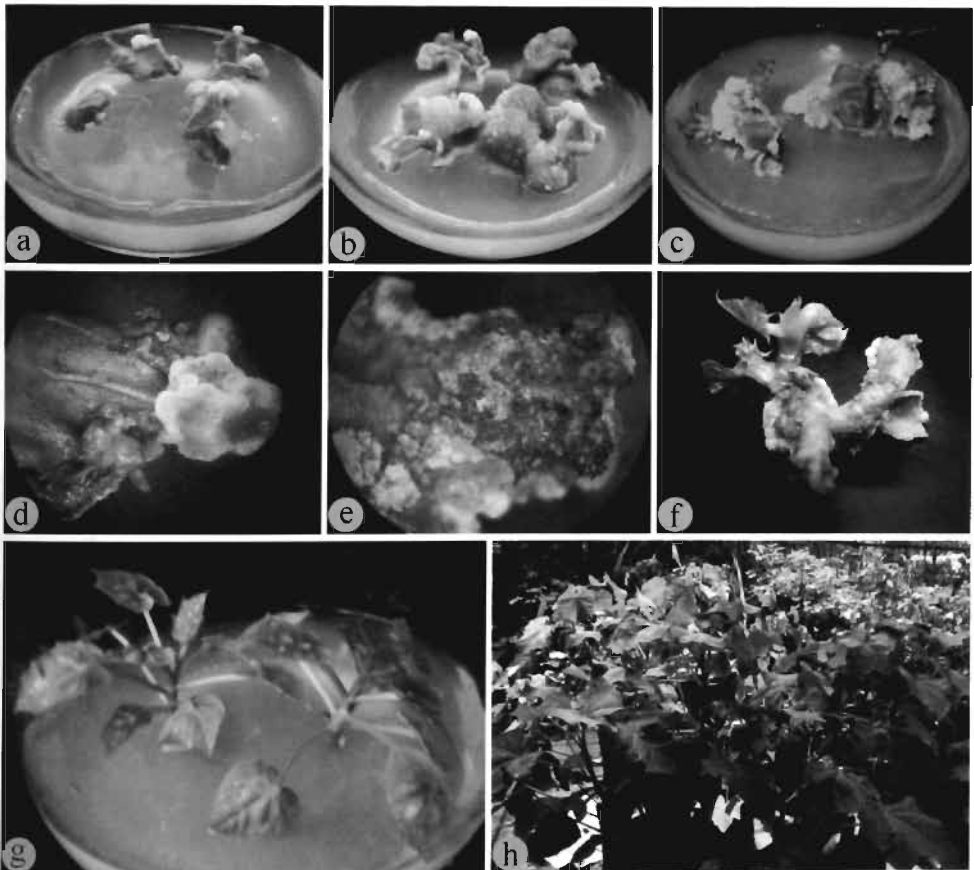
Để cảm ứng ra rễ, những chồi phát triển tốt được cắt ra và đặt thẳng đứng trên môi trường MS_{1/2} có bổ sung NAA và IBA ở những nồng độ khác nhau (Bảng 3). Tất cả các chồi đều phát triển rễ trên môi trường MS có chứa NAA trong vòng 2 tuần. Tuy nhiên, khi nồng độ NAA trong môi trường cao hơn (1,0 mg/l) lại làm giảm số lượng rễ. Môi trường cảm ứng rễ tốt nhất là môi trường MS_{1/2} có bổ sung 0,5 mg/l NAA với số rễ trung bình đạt được là 5,4 rễ/chồi và chiều dài rễ trung bình là 4,7 cm. Môi trường MS_{1/2} bổ sung IBA không thích hợp cho sự ra rễ ở cây Dầu mè tái sinh từ lá do có sự hình thành

mô sẹo ở phần đế chồi. Kết quả tương tự cũng được báo cáo bởi Sujatha và Mukta (1996), Kalimuthu và đồng tác giả (2007). Tuy nhiên, trong môi trường nuôi cấy định chồi cây Dầu mè, IBA (0,5 - 5,0 mg/l) đơn lẻ trong môi trường lại thích hợp hơn cho sự tạo rễ (Rojore, Batra, 2005).

Những cây con *in vitro* có bộ rễ phát triển hoàn chỉnh được rửa dưới vòi nước chảy và trồng trong những chậu nhựa có chứa hỗn hợp đất vườn:cát:phân hữu cơ (1:1:1). Trong những ngày đầu mới chuyển ra điều kiện *ex vitro*, cây con cần được phủ lại bằng túi PE để duy trì độ ẩm. Sau 4 tuần, những cây con này được chuyển ra vườn ươm với tỉ lệ sống sót đạt trên 80%.



Hình 1. Quy trình nhân giống cây Dầu mè từ mẫu cây lá.



Hình 2. Sự tái sinh chồi trực tiếp từ mẫu cây lá Dầu mè. a,b,c. Mẫu cây lá cây Dầu mè trên các môi trường có bổ sung 1,0 mg/l Kinetin (a), 1,0 mg/l BA (b) và 1,0 mg/l BA kết hợp với 1,0 mg/l Kinetin (c) sau 4 tuần nuôi cấy; d,e. Chồi và cụm chồi hình thành từ rìa vết cắt của mẫu cây lá; f. Chồi kéo dài; g. Cây con hoàn chỉnh; h. Cây con ngoài vườn ươm.

Bảng 3. Ảnh hưởng của NAA và IBA lên sự cảm ứng tạo rễ từ chồi cây Dầu mè *in vitro*.

NAA (mg/l)	IBA (mg/l)	Tỉ lệ ra rễ (%)	Số rễ	Chiều dài rễ (cm)
0,1		100	5,1a	2,3b
0,5		100	5,4a (*)	4,7a
1,0		100	4,3b	4,8a
	0,1	100		
	0,5	88,2		
	1,0	81,7		

Chú thích: (*): Những chữ cái khác nhau (a,b,c,...) thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa ở mức $\alpha = 0,05$ trong phép thử DMRT

KẾT LUẬN

Cây Dầu mè là một trong những loại cây trồng đa mục đích mang lại hiệu quả kinh tế cao, nhất là đối với những nước đang phát triển như Việt Nam. Đã có nhiều nghiên cứu trong việc tái sinh loài cây trồng có giá trị này. Tuy nhiên, kết quả đạt được trong nghiên cứu của chúng tôi cho thấy mẫu cây lá là một loại mô cây thích hợp để nhân giống trực tiếp cây Dầu mè mà không qua giai đoạn trung gian tạo mô sẹo. Quy trình tái sinh chồi trực tiếp từ mẫu cây lá có thể được áp dụng hiệu quả trong những nghiên cứu chuyển gen trong tương lai nhằm nâng cao sản lượng quả và hàm lượng dầu trong quả phục vụ cho ngành công nghiệp năng lượng.

Lời cảm ơn: Các tác giả xin chân thành cảm ơn Viện Sinh học Tây Nguyên đã hỗ trợ kinh phí cho nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Datta SK, Pandey RK (1993) *Jatropha curcas* - a promising crop for new source of fuel. *Appl Bot Abs* 13(2): 108-118.

Deore AC, Johnson S (2008) High-frequency plant regeneration from leaf-disc cultures of *Jatropha curcas* L.: an important biodiesel plant. *Plant Biotechnol Rep* 2: 7-11.

Dielen, Lecouvet V, Dupont V, Kinet SJM (2001) *In vitro* control of floral transition in tomato (*Lycopersicon esculentum*), the model for autonomously flowering plants, using the late flowering *uniflora* mutant. *J Exp Bot* 52: 715-723.

Duncan DB (1995) Multiple range and Multiple F tests. *Biometrics* 11(1): 1-5.

Heller J (1996) Physic nut - *Jatropha curcas* L. Promoting the conservation and use of underutilized and neglected

crops. 1. *International Plant Genetic Resources Institute*, Rome, Italia.

Kalimuthu K, Paulsamy S, Senthilkumar R, Sathya M (2007) *In vitro* propagation of the Biodiesel Plant *Jatropha curcas* L. *Plant Tiss Cult Biotech* 17(2): 137-147.

Lloyd G, McCown BH (1980) Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, (*Kalmia latifolia*) by use of shoot tip culture. *Int Plant Prop Soc, Comb Proc* 30: 421-427.

Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15: 473-479.

Openshaw K (2000) A review of *Jatropha curcas*: an oil plant of unfulfilled promise. *Biomass Bioener* 19: 1-15.

Prabakaran AJ, Sujatha M (1999) *Jatropha tanjorensis* Ellis and Saroja, a natural interspecific hybrid occurring in Tamil Nadu, India. *Genet Resour Crop Evol* 46(3): 213-218.

Rajore S, Batra A (2005) Efficient plant regeneration via shoot tip explant in *Jatropha curcas*. *J Plant Biochem Biotech* 14: 73-75.

Rojore S, Batra A (2005) Efficient plant regeneration via shoot tip explants in *J. curcas* L. *J Plant Biochem Biotech* 14: 73-75.

Sardana J, Batra A, Ali DJ (2000) An expeditious method for regeneration of somatic embryos in *Jatropha curcas* L. *Phytomorphology* 50: 239-242.

Shrivastava S, Banerjee M (2008) *In vitro* clonal propagation of physic nut (*Jatropha curcas* L.): Influence of additives. *Inter J Integrative Bio* 3(1): 73-79.

Sujatha M, Makkar HPS, Becker K (2006) Shoot bud proliferation from axillary nodes and leaf sections of non-toxic *Jatropha curcas* L. *Plant Grow Reg* 47: 83-90.

Sujatha M, Mukta N (1996) Morphogenesis and plant regeneration from tissue cultures of *Jatropha curcas*. *Plant Cell Tiss Org Cult* 44: 135-141.

Timir baran Jha TB, Mukherjee P, Datta MM (2007) Somatic embryogenesis in *Jatropha curcas* Linn., an important biofuel plant. *Plant Biotech Rep* 1: 135-140.

Yong JWH, Ge L, Fei Ng Y, Tan SN (2009) The chemical composition and biological properties of Coconut (*Cocos nucifera* L.) water. *Molecules* 14: 5144-5164.

DIRECT SHOOT REGENERATION FROM LEAF EXPLANTS OF *JATROPHA CURCAS* L.

Bui Van The Vinh¹, Chu Thi Bich Phuong¹, Do Dang Giap², Thai Xuan Du², Duong Tan Nhut^{3,*}

¹Hochiminh City University of Technology

²Institute of Tropical Biology

³Tay Nguyen Institute of Biology

SUMMARY

Leaf explants of *Jatropha curcas* L. isolated from both *in vitro* shoots and *ex vitro* mature trees were cultured on MS medium supplemented with BA and Kinetin alone or in combination at various concentrations. A large number of small shoot clumps were induced directly on MS medium containing 1 mg.l⁻¹ BA and 1 mg.l⁻¹ Kinetin, but approximately 5 shoots were elongated from each initial explant. Adventitious shoots were subcultured on the same medium. However, leaves from these shoots became yellow and senescent after a short time. For shoot elongation and leaf fall inhibition, shoots were transfer to MS medium containing 0.5 mg.l⁻¹ GA₃ and 20% coconut water. Rooting was obtained by transferring shoots to MS½ medium containing 0.5 mg.l⁻¹ NAA. Regenerated plantlets were acclimatized in greenhouse conditions with a high survival rate (80%). The results showed that the direct shoot regeneration from leaf explants is a high effective protocol for multiplication of *J. curcas*. This protocol may be an ideal system for future transgenic research.

Keywords: Axillary shoot, direct regeneration, *Jatropha curcas* L., leaf explant, shoot clump

*Author for correspondence: Tel: 84-63-3831056; Fax: 84-63-3831028; E-mail: duongtannhut@gmail.com