

CHỌN LỌC *IN VITRO* CÁC DÒNG CALLUS QUÝT ĐƯỜNG (*CITRUS RETICULATA* BLANCO) KHÁNG MẶN (NaCl)

Phạm Thị Bích Thủy, Nguyễn Bảo Toàn

Đại học Cần Thơ

TÓM TẮT

Quýt đường là cây ăn quả trồng phổ biến ở Đồng bằng sông Cửu Long. Cây quýt đường không có khả năng kháng mặn, mặc dù ở nồng độ thấp. Kỹ thuật chọn lọc *in vitro* có thể vượt qua các trở ngại về mặn. Mục đích của nghiên cứu này là đánh giá khả năng kháng mặn của các dòng callus quýt đường được nuôi cấy từ phôi tâm. Hai kỹ thuật chọn lọc *in vitro* được áp dụng trong thí nghiệm này là kỹ thuật chọn lọc trên môi trường rắn và kỹ thuật chọn lọc trên môi trường lỏng có lắc. Nồng độ mặn được áp dụng là muối NaCl từ 0; 0,5; 1; 2 và 4 g/l. Kết quả cho thấy rằng kỹ thuật thứ hai làm tăng áp lực chọn lọc. Có nhiều dòng callus quýt đường đã sống sót trong hai kỹ thuật ở các nồng độ muối (NaCl) từ 0 đến 2 g/l. Nhưng khi nồng độ muối cao hơn (4 g/l) hầu như không có callus nào sống sót. Các callus đã chọn lọc được cấy chuyển nhiều lần trên các môi trường có nồng độ muối tương ứng để xác định tính ổn định của các callus đã được chọn lọc. Bốn dòng callus quýt đường sinh trưởng bình thường trên môi trường chọn lọc ở nồng độ muối từ 0; 0,5; 1 và 2 g/l. Sự tái sinh cây con của các callus đã được chọn lọc thông qua phôi soma ở môi trường MS được bổ sung đường galactose 20 g/l.

Từ khóa: Chọn lọc *in vitro*, kháng mặn, nuôi cấy phôi tâm, phôi soma, quýt đường (*Citrus reticulata* Blanco)

MỞ ĐẦU

Quýt là một trong những cây ăn quả được nhập vào nước ta từ rất sớm. Quýt đường là một cây đã được trồng ở nhiều tỉnh Đồng bằng sông Cửu Long và mang lại thu nhập đáng kể cho nông dân. Trong những năm gần đây, diện tích canh tác lúa ở một số tỉnh ven biển đang mất dần do người nông dân chuyển dịch canh tác từ làm ruộng sang nuôi tôm. Điều này đã làm đất canh tác bị nhiễm mặn. Tuy nhiên, không phải người nông dân nào chuyển sang nuôi tôm đều thành công, khi muốn quay trở lại canh tác cây trồng thì đất đã nhiễm mặn. Để tồn tại họ cũng phải trồng nhiều loại cây có khả năng chịu mặn để canh tác. Đa số những cây này thường không mang lại hiệu quả kinh tế cao. Trong khi đó, cây quýt đường mang lại lợi ích đáng kể cho những người nông dân canh tác cây này ở những vùng đất không bị nhiễm mặn. Các cây có múi nói chung hầu như không có khả năng kháng mặn, vì vậy cây này hầu như không thấy canh tác ở những vùng đất nhiễm mặn. Để có thể canh tác tốt trên vùng đất này, việc sử dụng giống quýt kháng mặn là một trong các phương pháp thích hợp nhất và ít tốn kém nhất so với các phương pháp khác như cải tạo đất. Tuy nhiên, công tác lai tạo và chọn giống kháng trên cây có múi thì rất phức tạp, tốn nhiều thời gian, kinh phí

do cây có múi đa số là cây đa phôi. Áp dụng kỹ thuật chọn các biến dị soma *in vitro* thích nghi với mặn bằng kỹ thuật nuôi cấy tế bào có thể vượt qua những trở ngại này. Phương pháp này dựa trên nguyên lý là một số tế bào dinh dưỡng chịu áp lực cao trong môi trường chọn lọc tính kháng. Các tế bào kháng có thể tồn tại trong khi những tế bào không kháng có thể chết. Phương pháp này đạt được số tế bào biến dị thích nghi với môi trường chọn lọc và đã được áp dụng trên nhiều lĩnh vực khác nhau. Kochba và đồng tác giả (1982), Ben-Hayim và Kochba (1983) đã thành công trong việc chọn ra các dòng cam Shamouti kháng mặn (NaCl) và 2,4-D. Đối với môi trường phèn, phương pháp này cũng được áp dụng trên giống cam Pineapple và Amargo (Nguyễn Bảo Toàn *et al.*, 2004). Trên các cây trồng khác cũng được nghiên cứu trên sự chịu phèn như cà chua (Meredith, 1987), củ cải đỏ (Ojima, Ohira, 1983), thuốc lá (Conner, Meredith, 1985), lúa (Van Sint Jan *et al.*, 1997), cỏ Alfalfa (Coulombe, Scoyoc, 1990). Sự chọn lọc được các tế bào kháng không có nghĩa sẽ có được cây kháng. Muốn có được cây kháng thì quá trình biến đổi từ các tế bào kháng thành cây kháng thông qua phôi soma phải được hiểu rõ. Mục đích của nghiên cứu này là nhằm đánh giá sự kháng mặn (NaCl) *in vitro* của các dòng callus quýt đường và biến đổi các callus quýt đường đã được chọn lọc

tính kháng NaCl thành cây con.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu

Các callus từ nuôi cấy phôi tâm (nucellar culture) của giống quýt đường (*Citrus reticulata* Blanco) được tạo từ các thí nghiệm trước. Các callus được cấy chuyển hàng tháng và duy trì trên môi trường cơ bản BM. Môi trường cơ bản BM là môi trường MS (Murashige, Skoog, 1962) được bổ sung 1 mg/l pyridoxine-HCl, 1 mg/l nicotinic acid, 0,2 mg/l thiamine-HCl, 100 mg/l *myo*-inositol, 500 mg/l malt extract, 50 g/l sucrose và 7 g/l agar. pH của môi trường được chỉnh ở 5,7 trước khi hấp khử trùng ở nhiệt độ 121°C trong 15 phút. Các callus được cấy chuyển và được đặt trong phòng cấy mô có nhiệt độ $26 \pm 2^\circ\text{C}$ dưới quang kỳ 16 h được cung cấp bằng các ống đèn huỳnh quang 1,2 m với mật độ dòng photon quang hợp PPFD (photosynthetic photon flux density) là $43 \mu\text{mol. m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Phương pháp thí nghiệm

Chọn lọc các dòng callus kháng mặn trên môi trường đặc

Các cụm callus có nguồn gốc từ phôi tâm của quýt đường ở 32 tuần tuổi được sử dụng làm mẫu vật thí nghiệm chọn lọc tính kháng mặn. Môi trường chọn lọc mặn là môi trường cơ bản BM được bổ sung NaCl ở nồng độ 0,5; 1; 2 và 4 g/l. Sau khi thêm muối vào môi trường, pH được chỉnh ở 5,7. Các nghiệm thức được ký hiệu D2, D3, D4, D5 tương ứng với 0,5; 1,0; 2,0 và 4,0 g/l NaCl. Môi trường BM không bổ sung muối được dùng làm đối chứng và ký hiệu là D1. Môi trường chuẩn bị xong được rót vào bình nuôi cấy có đường kính 8 cm, cao 12 cm. Thí nghiệm được bố trí theo thể thức hoàn toàn ngẫu nhiên (completely randomized design) với 10 lần lặp lại, mỗi lần lặp lại là một bình nuôi cấy (chứa 30 ml môi trường) với 10 khối callus có kích thước khoảng $2 \times 2 \times 2$ mm cho mỗi nghiệm thức. Các callus được cấy vào mỗi bình nuôi cấy khoảng 300 mg. Ghi nhận kết quả sau 30 ngày nuôi cấy. Những cụm callus còn sống (nghỉ ngơi có tính kháng mặn) ở các nghiệm thức được tiếp tục cấy chuyển lần thứ 2 và 3 trên môi trường có các nồng độ muối tương tự để theo dõi khả năng sống và ổn định của các callus đã được chọn lọc. Nếu như chúng có đặc tính kháng mặn thì chúng sẽ phát triển tốt trong môi trường với nồng độ muối tương tự và phát triển một cách đồng đều.

Chọn lọc các dòng callus kháng mặn trên môi trường lỏng

Để tăng áp lực chọn lọc các callus được chuyển từ môi trường chọn lọc rắn sang môi trường lỏng. 200 mg callus sống tốt sau khi cấy chuyển lần thứ ba trên môi trường chọn lọc rắn được cấy chuyển vào bình tam giác 250 ml có chứa 50 ml môi trường với hàm lượng muối NaCl tương tự môi trường đặc, nhưng không có agar. Các bình tam giác được đặt trên máy lắc với vận tốc 90 vòng/phút, ở 27°C , ánh sáng 1000 lux, quang kỳ 16 h. Sau 10 ngày nuôi cấy trong môi trường lỏng các callus được lấy ra cấy chuyển trở lại môi trường đặc trong các đĩa petri có hàm lượng muối NaCl tương tự.

Tạo phôi từ các callus kháng mặn

Các callus ở mỗi nồng độ NaCl được chọn lọc gọi là các dòng callus kháng, được cấy vào môi trường phát sinh phôi. Môi trường phát sinh phôi là môi trường cơ bản BM được bổ sung 20 g/l đường galactose (thay thế đường sucrose) và muối NaCl với hàm lượng tương ứng. Đánh giá khả năng tạo phôi của các callus kháng trên môi trường phát sinh phôi.

Tạo cây hoàn chỉnh từ các phôi kháng

Sau 4 đến 6 tuần, các phôi trưởng thành sau khi phát sinh được chuyển vào môi trường BM có bổ sung 2 g/l than hoạt tính, giúp phôi nảy mầm thành cây hoàn chỉnh. Đánh giá sự chịu mặn thông qua khả năng sống của cây con.

Phân tích số liệu thống kê

Số liệu thu được từ các thí nghiệm được xử lý thống kê phép thử F, Duncan bằng phần mềm SPSS phiên bản 11.5.

KẾT QUẢ THÍ NGHIỆM

Chọn lọc các dòng callus kháng mặn trên môi trường đặc

Sau 30 ngày nuôi cấy đầu tiên, các cụm callus trên 2 nghiệm thức D1 (đối chứng) và D2 (0,5 g/l NaCl) đều sống tốt, callus tăng trưởng và phát triển mạnh (Hình 1A, B). Ở nghiệm thức D3 (1 g/l NaCl) và D4 (2 g/l NaCl) có sự tăng trưởng chậm trong hai tuần đầu, sau đó, callus vàng và hoá nâu (Hình 1C, D, E). Sau 30 ngày trên các cụm callus bị hoá nâu xuất hiện những cụm tế bào nhỏ, trắng, phân chia nhanh. Cụm tế bào này có nguồn gốc từ một vài tế bào có khả năng sống sót trên môi trường muối

NaCl. Bước đầu cho thấy là những tế bào có khả năng kháng muối. Trên môi trường D5 (4 g/l NaCl), do nồng độ muối cao, áp suất thẩm thấu thay đổi tế bào không trao đổi chất được kết quả cụm callus không tăng trưởng, hóa nâu và chết (Hình 1E).

Lần cấy chuyển thứ hai và thứ ba trên môi trường muối các callus sống sót sống tốt trên môi trường tương tự với tỷ lệ phần trăm sống sót cao. Riêng một vài cụm nhỏ tế bào sống được trên môi trường D5 được cấy chuyển lần thứ hai kết quả callus vẫn không tăng trưởng được, tiếp tục hóa nâu và chết (Bảng 1).

Bảng 1. Phần trăm (%) cụm callus sống sót sau 3 lần cấy trên môi trường chọn lọc mặn.

Thí nghiệm (NaCl g/l)	Phần trăm cụm callus sống sót		
	Lần 1	Lần 2	Lần 3
D1(0 g/l)	98 ± 2d	98 ± 2c	96 ± 2c
D2 (0,5 g/l)	92 ± 3d	90 ± 3c	94 ± 2c
D3 (1,0 g/l)	70 ± 4c	76 ± 2b	84 ± 2b
D4 (2,0 g/l)	48 ± 3b	76 ± 4b	82 ± 3b
D5 (4,0 g/l)	6 ± 4a	2 ± 2a	0 ± 0a

Ghi chú: Các giá trị trong cùng một cột được kèm theo sau bởi các ký tự giống nhau thì không khác nhau ở mức ý nghĩa 5% theo phép thử Duncan.

Ở thí nghiệm 0 g/l NaCl và 0,5 g/l NaCl các callus tăng trưởng và phát triển mạnh vì ở nồng độ muối 0,5 g/l tương đối thấp, không ảnh hưởng nhiều đến sự phân chia cũng như sự sinh trưởng của tế bào. *Citrus* là thực vật nhạy cảm với muối, nên khi tăng nồng độ muối NaCl lên 1 và 2 g/l ta thấy có ảnh hưởng rõ đến sự sinh trưởng của callus. Callus sinh trưởng chậm trong hai tuần đầu tiên, sự sinh trưởng chậm này có thể là do các tế bào nằm phía trên không tiếp xúc trực tiếp với môi trường chứa muối nên ít bị ảnh hưởng. Tuy nhiên, các tế bào trong cụm callus có sự trao đổi chất với nhau, nên sau một thời gian, các tế bào phía trên cũng bị ảnh hưởng do hai nguyên nhân, thứ nhất các tế bào này cũng bị hàm lượng muối cao gây độc, thứ hai các tế bào bên dưới không trao đổi chất được với môi trường nên sự trao đổi chất giữa tế bào phía trên và phía dưới cụm callus bị hạn chế.

Trong số hàng triệu tế bào, cũng có những tế bào có khả năng sống sót được nên chúng tiếp tục sinh trưởng tạo thành cụm callus trắng nhỏ trên cụm mô

đã bị vàng, đây bước đầu có thể là những tế bào có tính kháng muối. Khi tăng nồng độ lên 4 g/l NaCl, tế bào bị vàng và hóa nâu là vì ở nồng độ này tế bào không thể trao đổi chất, sự hấp thu nước cũng bị giảm và ion Na⁺ và Cl⁻ trực tiếp gây độc. Trong khi đó, các tế bào của *Citrus aurantium* hoặc cam "Shamouti" *Citrus sinensis*, có thể sống sót trên môi trường bổ sung 0,17 M NaCl tương đương với 10 g/l NaCl (Kochba *et al.*, 1982) do có một sự khác biệt nhau về tính kháng ở các loài. Những cụm tế bào sống sót từ lần cấy đầu tiên được cấy chuyển lần thứ hai và thứ ba trên môi trường muối tương ứng. Các callus có phần trăm sống sót cao hơn những tế bào ở lần đầu. Như vậy, các callus này đã có sự thay đổi để thích nghi với điều kiện môi trường có muối. Riêng một vài cụm nhỏ tế bào sống được trên môi trường 4 g/l NaCl được cấy chuyển lần thứ hai kết quả callus không tăng trưởng, hóa nâu và chết, đây không phải là tế bào có mang tính kháng.

Chọn lọc trên môi trường lỏng

Trong môi trường lỏng, các cụm callus tiếp tục tăng trưởng và tách thành nhiều cụm tế bào nhỏ hơn. Các tế bào lơ lửng trong môi trường lỏng ở 5 ngày tuổi có kích thước các cụm tế bào khoảng 0,3 - 0,5 mm. Sang ngày thứ 10, cụm tế bào trong môi trường lỏng có kích thước tương đối nhỏ (< 0,3 mm) có những cụm chỉ gồm từ vài đến vài chục tế bào.

Khi cấy chuyển từ môi trường lỏng sang môi trường rắn có hàm lượng muối tương tự có những cụm tế bào tăng trưởng mạnh và cũng có một số tế bào không kháng được với muối bị vàng và chết. Ở các thí nghiệm D1, D2, D3 tế bào tiếp tục phân chia mạnh tạo thành những cụm callus tương đối lớn, trong khi đó, thí nghiệm D4 các tế bào tiếp tục phân chia hình thành các cụm callus song song với một số tế bào khác phát sinh phôi soma với số phôi tạo được hình thành tương ứng sau 2, 4, 6 tuần là 19,0; 146,8 và 159,6 (Hình 2).

Tạo phôi từ các callus kháng mặn

Các callus kháng mặn ở mỗi nồng độ NaCl, gọi là các dòng callus kháng sau khi được chuyển vào môi trường phát sinh phôi 20 g/l galactose có bổ sung muối NaCl với hàm lượng tương ứng, sau 4 tuần phôi được tạo thành với tỷ lệ rất cao trên 80% và không khác biệt có ý nghĩa ở các thí nghiệm (Bảng 2). Các callus kháng và không kháng (từ thí nghiệm D1) được chuyển vào môi trường có galactose để biến đổi thành phôi soma. Hầu hết callus kháng đều biến đổi thành phôi kháng. Các phôi kháng này được tiếp tục

nuôi cấy trên môi trường chọn lọc có nồng độ muối giống như ở giai đoạn callus để đánh giá tính kháng ổn định của phôi. Các phôi từ nghiệm thức D1 (đối chứng) cũng tiếp tục chuyển sang môi trường không muối để làm đối chứng.

Bảng 2. Tỷ lệ phần trăm callus kháng và không kháng (đối chứng D1) phát sinh phôi sau 4 tuần trên môi trường BM bổ sung 20 g/l galactose.

Dòng callus kháng	Số cụm callus tạo phôi (%)
D1 (0 g/l NaCl)	88 ± 8
D2 (0,5 g/l NaCl)	92 ± 4
D3 (1,0 g/l NaCl)	80 ± 6

Sự phát sinh phôi từ callus kháng với tỷ lệ cao hơn callus đối chứng có thể là do tuổi của callus kháng cao hơn so với callus ban đầu và tính thấm của màng tế bào kháng có sự thay đổi. Tuy nhiên, khi cấy chuyển sang môi trường đặc, ở nghiệm thức D4 có sự hình thành phôi trực tiếp mà không cần phải tạo phôi trên môi trường có đường galactose. Sự hình thành phôi trực tiếp khi cấy sang môi trường chọn lọc rắn có thể là do dưới áp lực chọn lọc cao các tế bào nhanh lão hóa vì vậy dễ biến đổi từ callus thành phôi soma.

Tạo cây hoàn chỉnh từ phôi kháng

Các phôi trưởng thành của các dòng D1, D2, D3 và D4 sau khi chuyển vào môi trường BM bổ sung 2 g/l than hoạt tính và muối NaCl với nồng độ tương ứng. Các phôi soma này nảy mầm và tăng trưởng thành cây con bình thường trên môi trường có nồng độ muối tương ứng (Bảng 3, Hình 3).

Nghiệm thức D1 (đối chứng) và D2 (0,5 g/l NaCl), phôi trưởng thành và nảy mầm đạt được tỷ lệ phần trăm cao. Nghiệm thức D3 (1 g/l NaCl) và D4 (2 g/l NaCl), phôi này mầm tốt, tuy nhiên, phôi không tăng trưởng hay tăng trưởng rất chậm. Nghiệm thức D4 chỉ có 34% phôi sinh trưởng bình thường thành cây con. Phôi kháng được thu nhận từ nghiệm thức có muối, được biến đổi thành cây con bình thường với hai trường hợp. Thứ nhất, phôi bình thường nảy mầm thành cây con bình thường (có rễ). Thứ hai, phôi bất thường sẽ tạo chồi trên môi trường cơ bản BM, các chồi từ phôi bất thường sẽ được áp dụng kỹ thuật tạo rễ trong ống nghiệm để hình thành cây con.

Các cây con tiếp tục được nuôi cấy trên môi trường chọn lọc muối. Một số cây con không phát triển được có thể là những cây con có mang đặc tính kháng ở mức độ callus và phôi nhưng khi biến đổi thành cây hoàn chỉnh thì đặc tính kháng này không còn nữa. Vì trong giai đoạn thích nghi của cây con chỉ là biến dị thích nghi, do đó chưa có tính ổn định. Nó có thể quay trở lại trạng thái ban đầu hoặc có thể giữ luôn đặc tính. Cần có thời gian theo dõi các thế hệ sau mới đánh giá được. Những cây con khỏe, sinh trưởng bình thường là có nguồn gốc từ những tế bào có tính kháng, có thay đổi về mặt sinh lý, sinh hóa... giúp cho cây có thể sống được trên môi trường có nồng độ muối tương đối cao (1 - 2 g/l). Những cây này có thể được kết luận bước đầu là cây con có tính kháng muối.

Bảng 3. Tỷ lệ phần trăm phôi nảy mầm và phát triển thành cây con trên môi trường cơ bản bổ sung 2 g/l than hoạt tính.

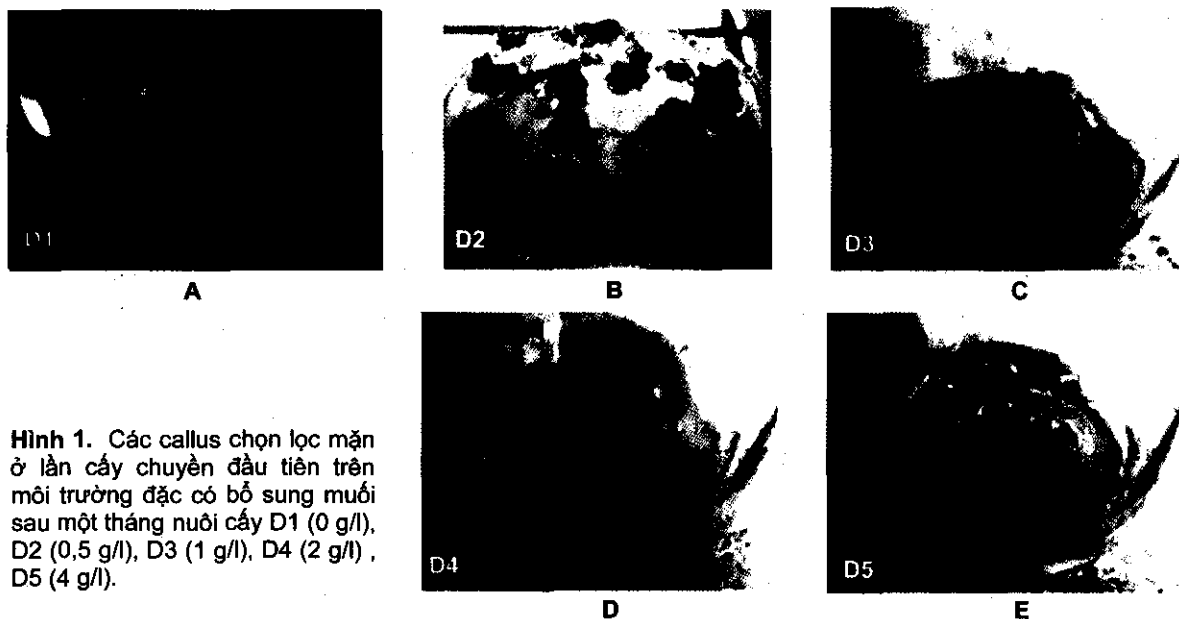
Nghiệm thức	Phôi nảy mầm (%)	Cây con (%)
D1	92 ± 2b	92 ± 2c
D2	84 ± 2a	84 ± 2c
D3	78 ± 2a	62 ± 3b
D4	81 ± 2a	34 ± 3a

Ghi chú: Các giá trị trong cùng một cột được kèm theo sau bởi các ký tự giống nhau thì không khác nhau ở mức ý nghĩa 5% theo phép thử Duncan.

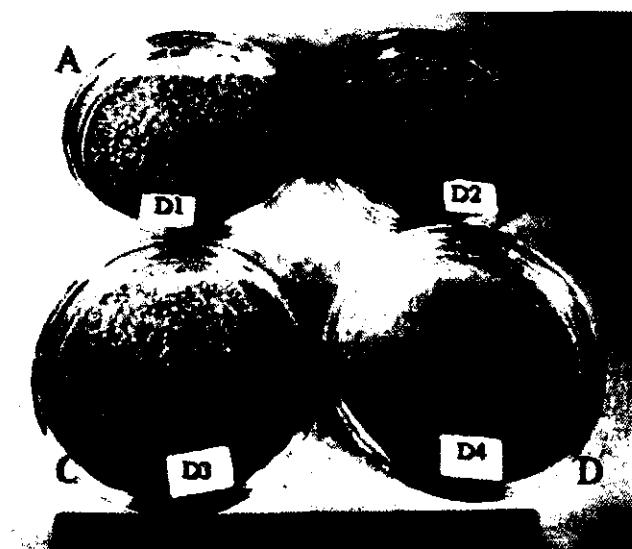
KẾT LUẬN

Kết quả của các thí nghiệm đã chọn lọc được các dòng tế bào callus kháng muối ở các nồng độ thay đổi từ 0,5 - 2 g/l. Nồng độ cao hơn 2 g/l muối không chọn được dòng callus nào. Những cây con tái sinh từ các dòng callus kháng này cũng tiếp tục sống và phát triển được ở điều kiện *in vitro* trên môi trường có bổ sung muối với hàm lượng tương ứng.

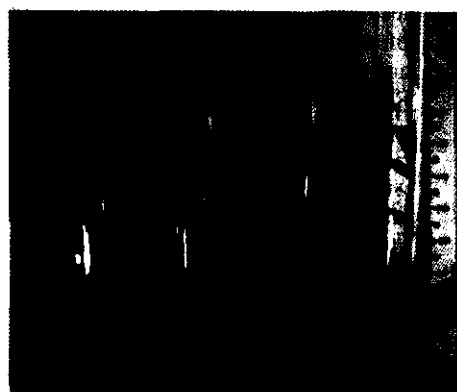
Trong thời gian tới, chúng tôi tiếp tục nghiên cứu hàm lượng các ion Na^+ , Cl^- , Ca^{2+} ... trong tế bào có đặc tính kháng mặn ở các giai đoạn chọn lọc nhằm làm rõ hơn cơ chế của sự kháng mặn ở mức tế bào quyết đường. Chúng tôi cũng tiếp tục đánh giá sự khác biệt giữa các dòng kháng ở mức độ phân tử DNA và đánh giá tính kháng ổn định của cây con ở mức độ nhà lưới và ngoài đồng ruộng.



Hình 1. Các callus chọn lọc mọc ở lằn cấy chuyển đầu tiên trên môi trường đặc có bổ sung muối sau một tháng nuôi cấy D1 (0 g/l), D2 (0,5 g/l), D3 (1 g/l), D4 (2 g/l) , D5 (4 g/l).



Hình 2. Các callus trong môi trường lỏng được chuyển sang môi trường rắn sau 4 tuần nuôi cấy. A, B, C, D từ môi trường D1, D2, D3, D4. Môi trường D4 cho thấy có sự phát sinh phôi (những chấm xanh trong hình).



Hình 3. Các cây con kháng sinh trưởng tốt trên môi trường có muối, từ trái sang: D1, D2, D3, D4.

Lời cảm ơn: Chúng tôi xin chân thành cảm ơn Bộ Giáo dục và Đào tạo, Đại học Cần Thơ đã xét duyệt và tài trợ kinh phí cho nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Ben-Hayyim G, Kochba J (1983) Aspects of salt

tolerance in a NaCl selected stable cell line of *Citrus sinensis*. *Plant Physiol* 72: 685-690.

Conner AJ, Meredith CP (1985) Strategies for selection and characterization of aluminium resistance variants from cell culture of *Nicotiana plumbaginifolia*. *Planta* 166: 466-473.

Coulombe EL, Scoyoc WV (1990) *In-vitro* selection methods for aluminium in alfalfa. *Plant Breed* 60: 58-59.

Kochba J, Ben-Hayyim G, Spiegel-Roy P, Saad S, Neuman H (1982) Selection of stable salt-tolerant callus cell lines and embryos in *C. sinensis* and *C. aurantium*. *Z Pflanzenphysiol* 106: 111-118.

Meredith CP (1987) Selection and characterization of aluminium resistant variants from tomato cell cultures. *Plant Sci Lett* 12: 25-34.

Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15: 473-497.

Nguyen Bao Toan, Nguyen Bao Ve, Debergh PC (2004) Tissue culture approaches for the selection of aluminium tolerant Citrus species in the Mekong Delta of Vietnam. *J Hort Sci Biotechnol* 79(6): 911-916.

Ojima K, Ohira K (1983) Characterization of aluminium and manganese tolerant cell lines selected from carrot cell culture. *Plant Cell Physiol* 24 (5): 784-797.

Van Sint Jan V, Costa de Macedo CJ, Kinet JM, Bouhamont J (1997) Selection of Al-resistant plants from a sensitive rice cultivar, using somaclonal variation, *in vitro* and hydroponic cultures. *Euphytica* 97: 303 -310.

IN VITRO SELECTION OF SALT RESISTANT DUONG MANDARIN (*CITRUS RETICULATA* BLANCO) CALLUS LINES

Pham Thi Bich Thuy, Nguyen Bao Toan*

Cantho University

SUMMARY

Duong mandarin (*Citrus reticulata* Blanco) was a fruit tree cultivated popularly in Mekong Delta. Duong mandarin plant was not resistant to salt (NaCl) inspite of low concentrations. *In vitro* selection technique can overcome these salt obstacles. The objectives of this study were to evaluate salt resistance of callus lines from nucellar calli. Two techniques of *in vitro* selection applied in this study were solid and shaken liquid selective media. Concentrations of salt used in this study were 0; 0.5; 1; 2 and 4 g/l. Results showed that the second technique gave a more serious selection pressure. There were almost the same numbers of surviving calli obtained by two techniques at concentrations of NaCl from 0 to 2 g/l. But, at higher salt concentration of salt (4 g/l), there were no surviving calli. The growth of selected calli was subcultured three times to determine the stability of the selected calli. Four selected callus lines of duong mandarin grew normally on salt selective media at 0; 0.5; 1 and 2 g/l NaCl. Plantlet regeneration of selected calli through embryogenesis obtained at MS medium supplemented galactose 20 g/l.

Keywords: Duong mandarin (*Citrus reticulata* Blanco), galactose, *in vitro* selection, nucellar culture, salt resistance

* Author for correspondence: Tel: 84-710-3893179; Fax: 84-710-3830814; E-mail: nbtoan@ctu.edu.vn