

XÂY DỰNG QUY TRÌNH TÁI SINH ĐA CHỒI TRỰC TIẾP TỪ THÂN MẦM CÂY CAM SÀNH (*CITRUS NOBILIS* LOUREIRO) PHỤC VỤ CHUYÊN GEN

Đỗ Tiến Phát¹, Nguyễn Chi Mai¹, Đặng Hòa Hiếu², Lê Văn Sơn¹, Chu Hoàng Hà¹, Lê Trần Bình¹

¹Viện Công nghệ Sinh học

²Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội

TÓM TẮT

Trong những năm gần đây, việc chuyển gen vào cây cam quýt đã thu được thành công ở một số phòng thí nghiệm. Các phương pháp chuyển gen vào các cây thuộc họ cam quýt bao gồm: Chuyển gen trực tiếp bằng dung hợp tế bào trần, gián tiếp thông qua *Agrobacterium* kết hợp nuôi cấy huyền phù tế bào và sử dụng súng bắn gen. Hiện nay, chuyển gen gián tiếp thông qua *Agrobacterium* với nguyên liệu thân mầm và mô chưa thành thực là phương pháp chuyển gen hiệu quả nhất đối với các cây cam quýt. Mục đích của nghiên cứu này là xây dựng hệ thống tái sinh phục vụ công tác chuyển gen vào cây cam sành bằng *Agrobacterium* thông qua phương pháp tạo đa chồi trực tiếp từ thân mầm. Các bước chính của quy trình tái sinh đa chồi bao gồm: thân mầm khoảng 20 - 25 ngày tuổi được cắt thành từng đoạn dài 10 mm sau đó dùng dao và panh bóc dọc đoạn thân. Mẫu cây được đặt trên môi trường tái sinh chồi bao gồm MS, bổ sung 2 mg/l BAP, 5% đường và 8 g/l agarose. Sau 3 - 4 tuần, kéo dài chồi trên MS bổ sung 0,5 mg/l NAA, 0,1 mg/l GA3 và 2 g/l than hoạt tính. Chồi đơn có chiều cao 3 - 4 cm được tạo rễ trên môi trường MS bổ sung 0,5 mg/l NAA. Cây con có bộ rễ hoàn chỉnh được đưa ra trồng chăm sóc trên giá thể trấu hun trong điều kiện nhà lưới. Tỷ lệ tái sinh chồi thu được 98,5%, hệ số nhân chồi đạt 8,6 chồi/đoạn thân, hiệu quả tạo rễ đạt 71,6%, đưa cây thành công ra trồng và chăm sóc trong điều kiện nhà lưới.

Từ khóa: Cam Sành (*Citrus nobilis* Loureiro), tái sinh đa chồi, thân mầm

MỞ ĐẦU

Citrus, tên gọi chung cho các loại cây ăn quả có múi, đây là loại cây có giá trị dinh dưỡng và kinh tế cao. Mức tiêu thụ quả có múi bình quân đầu người trên thế giới đạt khoảng 16 kg vào năm 2000 (FAO, 2003). Sản lượng quả có múi không ngừng tăng và đạt 89,3 triệu tấn vào niên vụ 2000 - 2001 trong đó 60% được tiêu thụ ở dạng quả tươi và 40% sử dụng cho chế biến (Johnson, 2001).

Việt Nam nằm ở trung tâm phát sinh của nhiều giống cây ăn quả có múi (Võ Văn Chi, 1997). Diện tích, sản lượng tăng đáng kể trong những năm gần đây, đạt 74.600 ha vào năm 2002 với sản lượng 441.800 tấn (Bộ Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn, 2002) tuy nhiên vẫn chưa đáp ứng được nhu cầu tiêu thụ trong nước. Một trong những nguyên nhân dẫn tới sản lượng quả có múi của nước ta còn thấp là do tác hại của sâu bệnh, đặc biệt là các bệnh gây ra bởi vi khuẩn, virus. Hầu hết các vườn trồng cây có múi trong cả nước đều bị nhiễm bệnh vàng lá (Greening), các vùng trồng cam quýt tập trung đều bị nhiễm bệnh tàn lụi (Tristeza) dẫn tới diện tích trồng

mới tăng nhưng diện tích phá đi cũng không nhỏ (Aubert, Lê Thị Thu Hồng, 1996)

Các nghiên cứu trước đây trên cây có múi chủ yếu tập trung vào kỹ thuật canh tác, tuyển chọn và nhân nhanh cây đầu dòng... Một số hướng nghiên cứu mới như: sưu tầm và tạo giống sạch bệnh bằng kỹ thuật vi ghép, bảo quản nguồn gen trong nhà lưới và *in vitro*, tạo quả không hạt (Hà Thị Thủy, 2005). Trong khi đó chưa có nghiên cứu nào về tạo giống kháng bệnh trên đối tượng cam quýt. Vấn đề dịch bệnh ở cây có múi đòi hỏi chúng ta phải có những nghiên cứu cơ bản về nguồn gen và chọn tạo giống mới. Sự phát triển của công nghệ sinh học với kỹ thuật chuyển gen là hướng đi mới góp phần giải quyết được những khó khăn nêu trên. Để tiến hành chuyển gen vào cây cam quýt cần có một quy trình tái sinh *in vitro* hoàn chỉnh với hiệu suất cao.

Cam Sành là giống có năng suất cao, chất lượng tốt, khả năng thích ứng rộng và được trồng rộng rãi ở cả hai miền Nam, Bắc như: Vĩnh Long, Hà Giang, ... (Trần Thế Tục *et al.*, 1996; Đỗ Đình Ca, 1996). Hiện nay, cây cam Sành đã có chỗ đứng vững chắc trong ngành trồng cây ăn quả có múi và hướng

tới xuất khẩu. Mới đây, nhãn hiệu cam Sành đã được Cục sở hữu trí tuệ Việt Nam chấp nhận.

Xuất phát từ những cơ sở đó, chúng tôi tiến hành nghiên cứu "Xây dựng quy trình tái sinh đa chồi trực tiếp từ thân mầm cây cam Sành (*Citrus nobilis* Loureiro) phục vụ chuyển gen".

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu

Nguyên liệu thực vật

Hạt của quả chín giống cam Sành, Hà Giang do Viện Nghiên cứu Rau quả cung cấp.

Môi trường nuôi cấy

Bao gồm các loại môi trường: Môi trường gieo hạt, cảm ứng tạo cụm chồi, kéo dài chồi, tạo rễ (Bảng 1).

Bảng 1. Các loại môi trường sử dụng trong tái sinh cây cam Sành.

Môi trường	Thành phần
Gieo hạt (MS)	MS + 30 g/l sucrose + 9 g/l agarose, pH 5,8
Cảm ứng tạo cụm chồi từ thân mầm (CT1 - CT10)	MS + BAP (0 - 3 mg/l) + Kinetin (0 - 2 mg/l) + NAA (0 - 0,2 mg/l) + 50g/l sucrose + 9 g/l agarose, pH 5,8
Kéo dài chồi (NGP)	MS + 0,5 mg/l NAA + 0,1 mg/l GA3 + 2 g/l than hoạt tính + 30 g/l sucrose + 9 g/l agarose , pH 5,8
Tạo rễ (CR1 - CR5)	MS + NAA (0 - 1,5 mg/l) + IBA (0 - 0,5 mg/l) 30 g/l sucrose + 9 g/l agarose, pH 5,8

MS: Môi trường cơ bản của Murashige và Skoog (1962).

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Tái sinh cụm chồi trực tiếp từ thân mầm

Thân mầm cây cam Sành khoảng 20 - 25 ngày tuổi được sử dụng làm nguyên liệu tái sinh. Giai đoạn này thân mầm chưa hóa gỗ, các mô chưa biệt hóa hoàn toàn đặc biệt là mô phân sinh tượng tầng tạo điều kiện thuận lợi cho tái sinh. Các công bố về tái sinh và chuyển gen gần đây trên cây họ cam quýt, nguyên liệu được các tác giả sử dụng chủ yếu là thân mầm (Yang *et al.*, 2000; Changhe *et al.*, 2002; Kayim *et al.*, 2004). Sau khi loại bỏ hai lá mầm, phần gốc rễ, thân mầm được cắt thành từng đoạn có chiều dài 0,4 - 0,7 mm và đặt nằm ngang trên môi trường cảm ứng tạo cụm chồi. Sau 16 - 22 ngày, một số mẫu cấy bắt đầu xuất hiện các chồi tại điểm cắt ở hai đầu, quá trình

Phương pháp nghiên cứu

Hạt quả chín cam Sành được tách bỏ lớp vỏ ngoài, khử trùng bề mặt bằng cồn 70% trong 1 phút, rửa lại bằng nước cất khử trùng, khử trùng bằng Javen 60% trong 15 phút, rửa lại nhiều lần bằng nước cất khử trùng, thấm khô hạt bằng giấy thấm khử trùng. Hạt được gieo trên môi trường cơ bản MS trong điều kiện tối hoàn toàn. Khoảng 15 ngày sau khi nảy mầm, phần thân mầm được loại bỏ hai lá mầm, phần gốc rễ và cắt thành từng đoạn có kích thước 0,4 - 0,7 cm, đặt nằm ngang trên môi trường tạo chồi CT1 - CT10. Cụm chồi hoàn chỉnh được chuyển sang môi trường kéo dài chồi NGP. Tách chồi đơn có chiều cao 1,5 - 2 cm từ các cụm chồi, cấy lên môi trường tạo rễ CR1- CR5. Cây con *in vitro* có bộ rễ hoàn chỉnh được đưa ra trồng trong giá thể và chăm sóc trong điều kiện nhà lưới.

Các mô nuôi cấy được đặt trong điều kiện nhiệt độ $25 \pm 2^\circ\text{C}$ và chế độ chiếu sáng 16 h/8 giờ tối với cường độ ánh sáng 2000 lux.

bật chồi kết thúc sau khoảng 3 tuần. Trong thí nghiệm này, 10 tổ hợp chất điều tiết sinh trưởng được sử dụng cho việc cảm ứng tạo cụm chồi, mục đích kích thích mô phân sinh tượng tầng biệt hóa thành các chồi bất định. Hiệu quả của các tổ hợp công thức khác nhau được thể hiện rõ qua chỉ tiêu tỷ lệ bật chồi, số chồi trung bình/mẫu cấy (Bảng 2).

Toàn bộ 10 tổ hợp chất điều tiết sinh trưởng với sự kết hợp của ba chất BAP, NAA, kinetin ở các nồng độ khác nhau đều có khả năng kích thích mẫu cấy tạo chồi. Tuy nhiên, tỷ lệ tạo chồi có sự chênh lệch lớn giữa các công thức, dao động từ 15,8 - 82,6%. Thấp nhất là công thức 1 (0,5 mg/l BAP), tỷ lệ đạt cao nhất ở công thức 5 (2 mg/l BAP). Trong khi đó ở công thức đối chứng, môi trường MS cơ bản không có khả năng kích thích tạo chồi từ thân mầm.

Xét về hiệu quả riêng biệt của hai chất kích thích tạo chồi thuộc nhóm cytokinin chúng tôi thấy rằng BAP đem lại hiệu quả cao hơn kinetin ở cùng nồng độ sử dụng (công thức 5 - 2 mg/l BAP và công thức 10 - 2mg/l kinetin). Khi sử dụng riêng biệt BAP thu được kết quả tốt hơn so với việc sử dụng kết hợp với NAA hay kinetin. Một chỉ tiêu quan trọng để đánh giá hiệu quả tái sinh là số chồi trung bình thu được trên mẫu cây. Số chồi

đạt nhiều nhất ở công thức 8 (5,5 chồi/mẫu) tiếp đến là công thức 5 (4,5 chồi/mẫu). Công thức 1 và 10 cho duy nhất một chồi trên một mẫu cây. ở công thức 5, tỷ lệ tạo chồi hơn 80%, số chồi trung bình 4,5 chồi, có nhiều mẫu cây xuất hiện chồi ở cả hai đầu cắt, các chồi đồng đều và sinh trưởng nhanh. Vì vậy, môi trường này được sử dụng cho việc tạo cụm chồi cam Sành trong các nghiên cứu tiếp theo.

Bảng 2. Ảnh hưởng của chất điều tiết sinh trưởng tới khả năng tạo cụm chồi cam Sành.

Công thức	BAP (mg/l)	NAA (mg/l)	Kinetin (mg/l)	Tỷ lệ bật chồi (%)	Số chồi trung bình
ĐC	-	-	-	0,0	-
CT1	0,5	-	-	15,8	1,0
CT2	0,75	-	0,2	30,4	1,5
CT3	1,0	-	-	56,7	2,5
CT4	1,0	-	0,2	52,5	2,2
CT5	2,0	-	-	82,6	4,5
CT6	1,5	-	0,2	61,3	2,8
CT7	2,0	0,2	-	28,5	3,2
CT8	3,0	-	0,2	20,0	5,5
CT9	1,0	-	1,0	49,2	2,5
CT10	-	-	2,0	24,4	1,0

ĐC: Đối chứng, CT: Công thức.

Ảnh hưởng của chiều dài mẫu cây tới khả năng tạo chồi cây cam Sành.

Trong nghiên cứu trên, chúng tôi nhận thấy trong cùng một công thức, những đoạn thân có sai khác lớn về chiều dài có biểu hiện khác biệt về khả năng tạo chồi (số chồi trung bình, mức độ đồng đều giữa các chồi...). ở thí nghiệm này, chúng tôi sử dụng các đoạn thân có chiều dài khác nhau (5; 7; 10; 12 mm) nhằm xác định chiều dài mẫu cây thích hợp cho tái sinh cây cam Sành (Bảng 3).

Tỷ lệ bật chồi ít có sự biến động giữa các công thức, dao động từ 82,7 - 89,5%. Điều này một lần nữa khẳng định hiệu quả của môi trường tái sinh chồi đã chọn ở thí nghiệm trên. Với chiều dài mẫu 5mm, đoạn thân chịu tác động lớn của vết thương ở hai đầu và môi trường nuôi cấy gây ra hiện tượng mẫu chết (2,8%). Khi theo dõi về tốc độ bật chồi, chúng tôi thấy rằng: với kích thước từ 5 - 12 mm,

đoạn thân có chiều dài tăng có khả năng bật chồi sớm hơn. Các đoạn thân có chiều dài 12 mm bắt đầu bật chồi chỉ sau 16 ngày. Trong khi đó, đoạn thân 5 mm bắt đầu bật chồi sau 20 - 21 ngày. Điều này có thể giải thích do ảnh hưởng của dinh dưỡng và lượng hoóc môn nội sinh chứa trong mẫu cây khác nhau. Số chồi trung bình thu được dao động từ 3,2 - 5,6 chồi trên một mẫu cây. Các chồi tạo được ở đoạn thân 5mm nhỏ và phát triển chậm, ở đoạn thân 12mm có hiện tượng ưu thế ngọn, chồi bật trước phát triển nhanh và ức chế các chồi khác phát triển, một số mẫu chỉ có một chồi phát triển. Vì vậy, ở kích thước mẫu cây này, các chồi phát triển không đồng đều và số chồi trung bình cũng giảm. Hiệu quả tái sinh cụm chồi cao nhất thu được với các đoạn thân có chiều dài 10 mm (tỷ lệ tái sinh 89,5%, số chồi trung bình 5,6 chồi). Kết quả này cũng phù hợp với kết quả nghiên cứu của Bond và Roose (1998).

Bảng 3. Ảnh hưởng của kích thước mẫu tới hiệu quả tạo cụm chồi.

Chiều dài mẫu (mm)	Tỷ lệ mẫu chết (%)	Ngày bắt đầu bật chồi	Tỷ lệ mẫu bật chồi (%)	Số chồi trung bình/mẫu
5	2,8	20 - 21	82,7	3,2
7	0,0	18 - 19	86,2	4,0
10	0,0	17	89,5	5,6
12	0,0	16	85,4	3,8

Nâng cao hiệu quả tạo chồi bằng việc bổ đôi mẫu cây

Theo nghiên cứu về giải phẫu mô của Pena và đồng tác giả (2004), chỉ có mô phân sinh tượng tầng mới có khả năng biệt hóa thành các chồi cam quýt. Phần mô phân sinh này nằm ở lớp thứ hai bên trong nhu mô vỏ (pith) và sát ngay bên trong là mô gỗ (xylem). Điều này được chứng minh trong thí nghiệm cảm ứng tạo cụm chồi. Khi cắt ngang thân mầm, mô phân sinh tượng tầng được lộ ra ở hai đầu mẫu cây. Chính vì vậy, các chồi chỉ hình thành ở hai đầu đoạn thân.

Trong thí nghiệm này, việc tăng tiết diện của mô phân sinh tượng tầng được thực hiện bằng cách bổ dọc đoạn thân của bốn công thức chiều dài mẫu ở thí nghiệm trên (Bảng 4).

Khi bổ dọc mẫu cây, chiều dài đoạn thân hầu như không ảnh hưởng tới tốc độ bật mầm tuy nhiên

tỷ lệ mẫu bật chồi lại có biến động lớn. Ở các chiều dài 5; 12 mm, tỷ lệ bật chồi đều giảm so với khi không bổ dọc do tỷ lệ mẫu chết tăng lên. Ở đoạn thân 12 mm, mẫu chết chủ yếu do tác động của thao tác, mẫu quá dài, gây tổn thương nhiều.

Hiệu quả tạo chồi được nâng lên rõ rệt khi tăng tiết diện nhu mô tượng tầng. Số chồi trung bình dao động từ 4,3 - 8,4 chồi/mẫu cây, chồi phát triển đồng đều, không có hiện tượng đơn chồi. Các chồi hình thành, phân bố đều theo chiều dài mẫu cây tại các vị trí mô phân sinh được lộ ra. Điều này đặc biệt quan trọng cho việc chuyển gen sau này vì tăng tiết diện mô phân sinh tượng tầng làm tăng bề mặt tiếp xúc và xâm nhiễm của vi khuẩn ở giai đoạn biến nạp. Khả năng tạo cụm chồi cao nhất khi sử dụng đoạn thân có chiều dài 10 mm (tỷ lệ bật chồi 98,5%, số chồi trung bình 8,4 chồi/mẫu cây), thao tác bổ dọc thân khá thuận lợi.

Bảng 4. Nâng cao hiệu quả tạo cụm chồi bằng việc bổ dọc mẫu cây.

Chiều dài mẫu (mm)	Tỷ lệ mẫu chết (%)	Ngày bắt đầu bật chồi	Tỷ lệ mẫu bật chồi (%)	Số chồi trung bình
5	8,5	18 - 19	67,5	4,3
7	0,0	18	87,3	5,7
10	0,0	18	98,5	8,4
12	4,3	18	68,7	6,2

Kéo dài chồi cam Sành

Sau 4 tuần trên môi trường tạo cụm chồi, các chồi đơn đã hình thành rõ với 2-3 lá thật. Nếu tiếp tục duy trì trên môi trường này, các chồi đơn có xu hướng phát triển chậm lại, rụng lá và xuất hiện các chồi nách. Tuy nhiên, kích thước của từng chồi đơn chưa đảm bảo cho việc tách riêng khỏi cụm chồi. Vì vậy, chúng tôi chuyển toàn bộ cụm chồi sang môi trường kéo dài chồi NGP, với sự có mặt của NAA và

GA3 giúp chồi đơn tăng trưởng về kích thước và chiều cao.

Trên môi trường kéo dài chồi (NGP), các chồi đơn phát triển đồng đều, chất lượng tốt, không có hiện tượng ưu thế giữa các chồi. Sau 6 tuần trên môi trường này, chúng tôi đã thu được những chồi đơn có kích thước đồng đều 4 - 5 cm với 5 - 6 lá thật. Các chồi đơn này đảm bảo tiêu chuẩn để tách khỏi cụm chồi và tạo cây hoàn chỉnh.

Ảnh hưởng của chất điều tiết sinh trưởng tới khả năng tạo rễ cây cam Sành

Cam quýt là một trong những đối tượng khó tạo rễ trong nuôi cấy mô đặc biệt tạo rễ cây sau chuyển gen. Theo các công trình nghiên cứu của Bond và Roose (1998); Yang và đồng tác giả (2000); Kayim và đồng tác giả (2004), đề đưa cây ra điều kiện bên ngoài, các tác giả chủ yếu dùng phương pháp vi ghép (grafting). Tuy nhiên, phương pháp này cần có những điều kiện tối ưu trong khi vi ghép và khó áp dụng với số lượng lớn. Theo nghiên cứu của Gutierrez và đồng tác giả (1997); Hà Thị Thúy (2005), NAA có tác dụng tốt trong việc tạo rễ cây cam quýt *in vitro*. Trong thí nghiệm này chúng tôi sử dụng các nồng độ khác nhau của NAA, IBA cho việc tạo rễ cây cam Sành, kết quả tổng hợp trên bảng 5.

Theo chiều tăng của nồng độ NAA, tốc độ ra rễ, số rễ trung bình và tỷ lệ ra rễ tăng lên. Tuy nhiên, chất lượng rễ không tuân theo quy luật này. Khi nồng độ NAA cao (1 - 1,5 mg/l) rễ cây cam Sành phát triển không bình thường, biến dạng, phát triển chậm. ở công thức đối chứng (MS cơ bản), tốc độ ra rễ rất chậm, tỷ lệ ra rễ thấp (16,4%), toàn bộ các chồi chỉ có một rễ đơn, chất lượng kém. Hiệu quả kích thích ra rễ của IBA thấp hơn nhiều so với NAA ở cùng một nồng độ sử dụng (CR5-17,8% so với CR2 71,6%), so với công thức đối chứng cũng không có sự khác biệt rõ rệt. Việc bổ sung 0,5 mg/l NAA vào môi trường nuôi cấy đã nâng cao hiệu quả tạo rễ cây cam Sành, tỷ lệ ra rễ đạt 71,6% sau 7 tuần, số rễ trung bình 3,0 và chất lượng rễ tốt, cây sinh trưởng khỏe, đảm bảo cho việc ra cây ở vườn ươm.

Bảng 5. Ảnh hưởng của chất điều tiết sinh trưởng tới khả năng ra rễ.

CT	NAA (mg/l)	IBA (mg/l)	Tỷ lệ ra rễ (%)				Số rễ trung bình	Chất lượng rễ
			2 tuần	4 tuần	6 tuần	7 tuần		
ĐC	-	-	0,0	0,0	3,5	16,4	1,0	++
CR1	0,2	-	0,0	8,0	29,5	32,5	1,8	+++
CR2	0,5	-	6,5	32,0	66,2	71,6	3,0	+++
CR3	1,0	-	12,5	54,3	68,3	74,2	3,0	+
CR4	1,5	-	19,0	73,7	81,5	81,5	4,5	+
CR5	-	0,5	0,0	0,0	11,5	17,8	1,0	++

+++ : Rễ vàng ngà tới vàng đậm ngắn, đều, không biến dạng; ++ : Rễ đơn, giòn, dễ gãy, có loại rất dài; + : Rễ bị biến dạng, phình to mọng nước; ĐC: Đối chứng (MS cơ bản).

Khả năng phát triển của cây cam Sành trong điều kiện nhà lưới

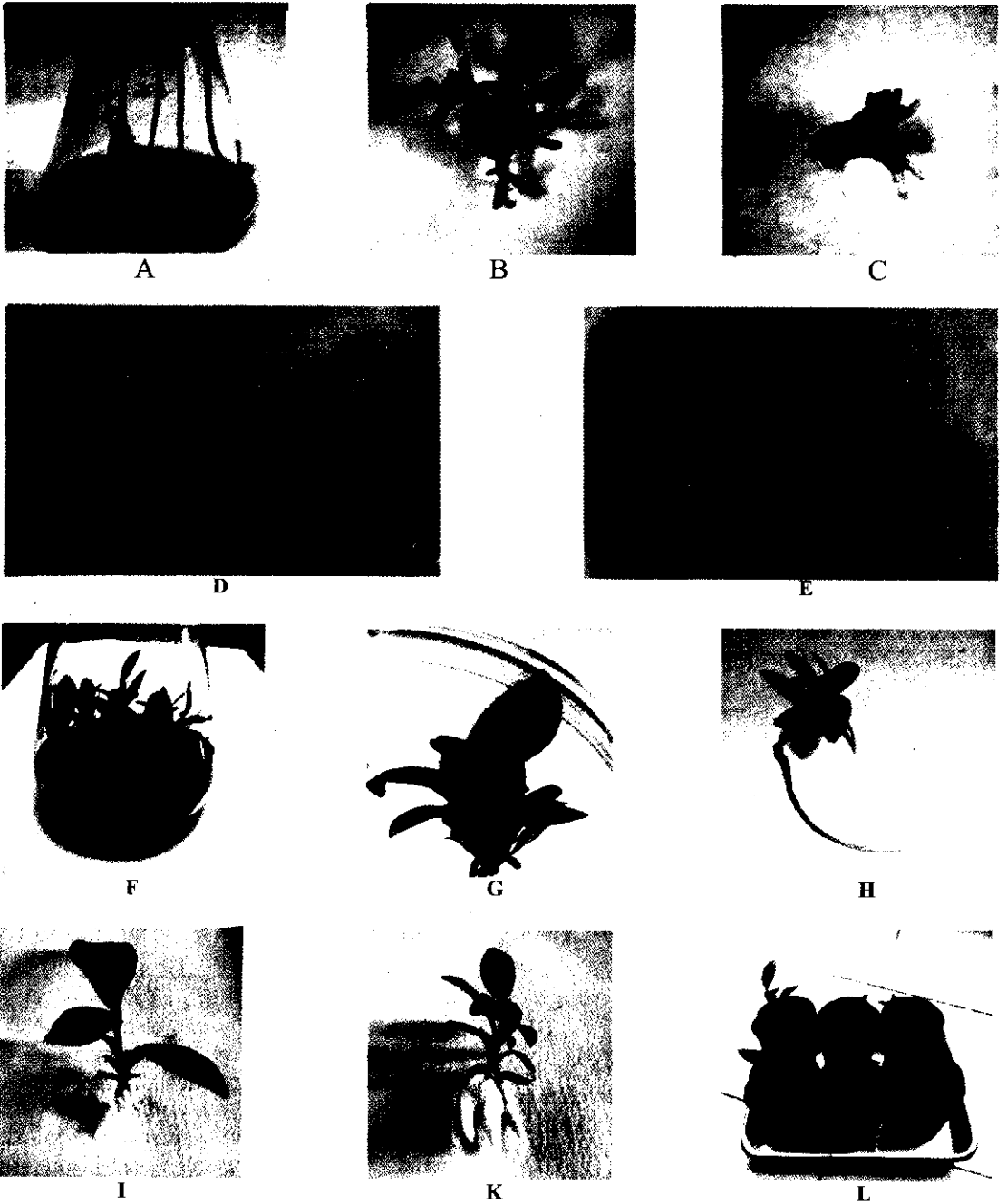
Nhằm mục đích hoàn thiện quy trình tái sinh phục vụ chuyển gen, đánh giá hiệu quả của hệ thống tái sinh, cây *in vitro* được đưa ra trồng chăm sóc trong điều kiện nhà lưới. Cam quýt là loại cây rễ nằm, rất sợ úng và điều kiện đất không tơi xốp (Trần Thế Tục *et al.*, 1998), vì vậy để ra cây thành công cần lựa chọn được giá thể thích hợp. Ba loại giá thể đất, cát, trấu hun được sử dụng kết hợp và riêng rẽ trong thí nghiệm này nhằm tìm ra giá thể thích hợp nhất cho việc ra cây cam Sành *in vitro* (Bảng 6).

Với ưu thế tơi xốp, giữ ẩm tốt, giá thể trấu hun tỏ ra ưu việt hơn cả, với 100% số cây đưa ra sống sót, cây sinh trưởng nhanh. Sau 3 tuần, khoảng 50%

số cây có lá mới xuất hiện, bộ lá xanh sáng. ở hai loại giá thể còn lại, cây con chết chủ yếu do hiện tượng thối rễ, cây héo úa và chết, đặc biệt là giá thể đất:cát:trấu, cây con sống sót sinh trưởng chậm, bộ lá vàng. Sau 5 tuần, cây con xuất hiện rễ và lá mới được bổ sung phân bón vi sinh tổng hợp, đất mùn giúp cây sinh trưởng nhanh và thích ứng với điều kiện trồng trọt

Bảng 6. Ảnh hưởng của giá thể tới tỷ lệ sống.

Giá thể	Tỷ lệ sống sót (%)
Trấu hun	100
1/2 cát + 1/2 trấu hun	75,5
1/3 cát + 1/3 trấu hun + 1/3 đất	20,0



Hình 1. Minh họa cho quy trình tái sinh đa chồi cây cam Sành. **A:** Cây mầm cam Sành 25 ngày tuổi; **B:** Cụm chồi thu được ở công thức CT5; **C:** Cụm chồi thu được ở công thức CT8; **D:** Chồi hình thành trên các đoạn thân sau khi bỏ đọt; **E:** Chồi hình thành trên các đoạn thân không bỏ đọt; **F:** Các cụm chồi được kéo dài; **G:** Cụm chồi cam Sành được tách ra; **H:** Cây cam Sành trên môi trường MS (ĐC); **I:** Cây cam Sành trên môi trường CR2; **K:** Cây cam Sành trên môi trường CR3; **L:** Cây cam Sành trong nhà lưới.

KẾT LUẬN

Đã xây dựng và hoàn thiện hệ thống tái sinh *in vitro* cây cam Sánh bằng việc tạo cụm chồi trực tiếp từ đoạn thân mầm. Hiệu suất tạo cụm chồi đạt 98,5% với hệ số nhân 8,4 cây tái sinh/ một đoạn thân bổ đôi 10 mm. Quy trình được minh họa bằng hình ảnh ở hình 1.

Lời cảm ơn: Công trình này được hoàn thành trong khuôn khổ đề tài KC04.03/06-10 thuộc Chương trình Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ Sinh học, cấp Nhà nước, giai đoạn 2006 - 2010.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Aubert B, Lê Thị Thu Hồng (1996) Phòng chống bệnh nguy hiểm trên cây có múi để mang lại hiệu quả cho nhà vườn ở Việt nam, Nhà xuất bản Nông nghiệp, Hà Nội.

Bộ Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn (2002) Báo cáo thường niên ngành Nông nghiệp. Trung tâm Thông tin Bộ Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn, Hà Nội.

Bond JE, Roose ML (1998) Agrobacterium-mediated transformation of the commercially important citrus cultivar Washington navel orange. *Plant Cell Rep* 18: 229-234.

Changhe Y, Shu H, Chunxian C, Zhanao D, Paul L, Fred G, Gmitter J (2002) Factors affecting Agrobacterium-mediated transformation and regeneration of sweet orange and citrange. *Plant Cell Tiss Org Cult* 71: 147-155.

Đỗ Đình Ca (1996) Khả năng và triển vọng phát triển cây Quýt và một số cây ăn quả có múi khác vùng Bắc Quang - Hà Giang, *Luận án tiến sĩ Nông nghiệp*, Trường Đại học Nông nghiệp I, Hà Nội.

FAO (2003) *Annual statistics. Citrus Fruit: Fresh and*

Process, Rome, Italy.

Gutierrez MA, Luth D, Moore A (1997) Factors affecting Agrobacterium-mediated transformation in Citrus and production of sour orange (*Citrus aurantium* L.) plants expressing the coat protein gene of citrus tristeza virus. *Plant Cell Rep* 16: 745-753

Hà Thị Thúy (2005) Nghiên cứu đặc tính không hạt và phương pháp tạo dòng đa bội ở cây ăn quả có múi, *Luận án tiến sĩ Sinh học*, Trường Đại học Quốc gia, Hà Nội.

Johson MT (2001) Citrus juice production and fresh market extension technologies. FAO/China Citrus Symposium, 14-17, May, 2001, Beijing, China.

Kayim M, Ceccardi TL, Berretta MJG, Barthe GA, Derrick KS (2004) Introduction of a citrus blight-associated gene into Carrizo citrange [*Citrus sinensis* (L.) Osbc. - *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.] by Agrobacterium - mediated transformation. *Plant Cell Rep* 23: 377-385.

Pena L, Perez RM, Cervera M, Juarez JA, Navarro L (2004) Early events in Agrobacterium - mediated genetic transformation of Citrus explant. *Ann Bot* 94: 67-74.

Trần Thế Tục, Cao Anh Long, Phạm Văn Côn, Hoàng Ngọc Thuận, Đoàn Thế Lư (1998) *Giáo trình cây ăn quả*, Nhà xuất bản Nông nghiệp, Hà Nội: 106-137.

Trần Thế Tục, Vũ Mạnh Hải, Đỗ Đình Ca (1996) Các vùng trong cam quýt chính ở Việt Nam. *Tạp chí Nông nghiệp và Công nghiệp thực phẩm* 408: 312-328.

Võ Văn Chi (1997) *Từ điển cây thuốc Việt Nam*, Nhà xuất bản Y học, Hà Nội

Yang ZN, Ingelbrecht IL, Louzada E, Skaria M, Mirkov TE (2000) Agrobacterium - mediated transformation of the commercially important grapefruit cultivar Rio Red (*Citrus paradisi* Macf). *Plant Cell Rep* 19: 1203-1211.

AN EFFICIENT PROTOCOL FOR PLANT REGENERATION OF CAM SANH (*CITRUS NOBILIS* LOUREIRO) VIA MULTI-SHOOT INDUCTION FROM EPICOTYL SEGMENTS

Do Tien Phat¹, Nguyen Chi Mai¹, Dang Hoa Hieu², Le Van Son¹, Chu Hoang Ha¹, Le Tran Binh^{1,*}

¹Institute of Biotechnology

²Hanoi University of Science, VNU

SUMMARY

Citrus transformation has now been achieved in a number of laboratories by various methods, including the direct uptake of naked DNA by protoplasts, the Agrobacterium-mediated transformation of

* Author for correspondence: Tel: 84-4-7564691; Fax: 84-4-8363144; E-mail: binh@ibt.ac.vn

embryogenic suspension-cultured cells and particle bombardment of similar tissues. At present the use of seedling or juvenile plant explant tissues and an *Agrobacterium*-mediated transformation is the most efficient method for producing transgenic *Citrus* plants or plants of the more regenerable *Citrus* relative. Therefore, the purpose of this study is to develop a culture system for *Agrobacterium tumefaciens* mediated gene transformation in Cam Sanh (*Citrus nobilis* Loureiro) through multi-shoot induction method. The multi-shoot induction protocol includes the following major steps: 10 mm epicotyl stem segments were cut from 20 - 25 days old seedling and cut longitudinally; explants were placed on germinating medium containing Murashige and Skoog's (MS) salts, 2 mg/l BAP, 5% sucrose and 8g/l agar. Shoot differentiation was observed in 3 - 4 weeks after transfer onto shoot elongation medium containing MS supplemented with 0.5 mg/l NAA, 0.1 mg/l GA3 and 2 g/l activated charcoal; for rooting, 3 - 4 cm long shoots were cultivated on root induction medium containing 0.5 mg/l NAA; rooted plants were transferred onto soil in green house. The frequency of plant regeneration was 98.5%, the average efficiency for regeneration was 8.4 regenerated shoots per epicotyl stem segment, the frequency of plant rooting was 71.6% and then plantlets were successfully transferred into soil in greenhouse condition.

Keywords: *Cam Sanh (Citrus nobilis* Loureiro), *epicotyl stem, multi-shoot regeneration*