

NGHIÊN CỨU KHẢ NĂNG TÁI SINH MỘT SỐ GIỐNG BƯỚI (*Citrus grandis* (L.) Osbeck) BẰNG PHƯƠNG PHÁP NUÔI CẤY IN VITRO

Là Văn Hiến¹, Nguyễn Tiến Dũng¹,
Dương Thị Thắm^{1,2}, Ngô Xuân Bình¹

TÓM TẮT

Nghiên cứu khả năng tái sinh một số giống bưởi: Diễn, Phúc Trạch, Năm Roi, Đoan Hùng và bưởi Đỏ được tiến hành tại Khoa Công nghệ sinh học và Công nghệ thực phẩm, Trường Đại học Nông Lâm Thái Nguyên. Thân mầm cây con 14 ngày tuổi được cắt thành đoạn ngắn có kích thước 0,7 - 1,0 cm, cắt vát hai đầu, để nuôi cấy tái sinh chồi. Tiến hành tái sinh trên môi trường bổ sung BAP ở các nồng độ 1,0 - 2,5 mg/l. Kết quả thu được BAP 2,0 mg/l phù hợp cho tái sinh và tạo đa chồi ở cả 5 giống bưởi. Trong đó bưởi Diễn và bưởi Đỏ đạt tỷ lệ tái sinh tốt nhất, tương ứng 41,67%, 64% với số chồi thu được 8,7 chồi/mẫu và 7,2 chồi/mẫu. Chồi mầm có chiều dài 2 - 3 cm được nuôi cấy ra rễ trên môi trường có bổ sung NAA và IBA để tạo cây hoàn chỉnh. Năm giống bưởi thí nghiệm đều có khả năng ra rễ ở nồng độ NAA 1,0 mg/l và IBA 1,0 mg/l. Kết quả nghiên cứu này sẽ là tiền đề để tiến hành các nghiên cứu khác như: chuyển gen, vi ghép in vitro tạo cây sạch bệnh cũng như các nghiên cứu ứng dụng khác trong chọn tạo giống cam quýt ở Việt Nam.

Từ khóa: Bưởi, chồi, in vitro, tái sinh, kích thích sinh trưởng.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Bưởi (*Citrus grandis* (L.) Osbeck) là một trong những loại cây ăn quả có mùi có giá trị dinh dưỡng và giá trị kinh tế cao. Theo số liệu phân tích trong 100 g thịt quả bưởi tươi có chứa 6-12% đường, lipit 0,1 g, protein 0,9 g, xenluloza 0,2 g, vitamin B1, B2, caroten 0,2 mg... và một số khoáng chất ở dạng vi lượng cần thiết cho cơ thể con người (Vũ Công Hậu, 1998). Ở Việt Nam, bưởi là cây ăn quả đặc sản được trồng phổ biến trên khắp ba miền với hơn 100 giống trong đó có nhiều giống quý như: bưởi Năm Roi, bưởi Phúc Trạch, bưởi Đoan Hùng, bưởi Diễn, bưởi Đỏ Mê Linh (Trần Thế Tục *et al.*, 1998). Trên thế giới, diện tích cây bưởi đạt 276.222 ha với sản lượng 7.738.814 tấn (FAOSAT, 2011). Ở Việt Nam cây có mùi được coi là loại cây ăn quả quan trọng để phát triển một nền nông nghiệp hàng hóa. Theo số liệu thống kê, diện tích cây ăn quả có mùi khoảng 138 nghìn ha với sản lượng hàng năm khoảng 1,4 triệu tấn, trong đó tập trung chủ yếu ở miền Nam chiếm 70% (khoảng trên 91 nghìn ha, sản lượng 1 triệu tấn); miền Bắc khoảng 47 nghìn ha, sản lượng 340 nghìn tấn (Tổng cục Thống kê, 2011).

Nhiều năm trở lại đây tình hình tiêu thụ quả có mùi, trong đó có bưởi, ở nước ta có xu hướng tăng mạnh, do vậy một số vùng có xu hướng mở rộng diện tích với nhiều giống mới có năng suất và chất lượng cao. Tuy nhiên, bình quân tiêu thụ quả có mùi trên đầu người mỗi năm còn thấp, chỉ đạt khoảng 7 kg/người, thấp hơn so với tiêu thụ bình quân khoảng 16 - 18 kg/người trên thế giới và trên 40 kg/người ở Tây Âu và Bắc Mỹ (FAOSAT, 2011). Hiện tại quả có mùi của Việt Nam mới chỉ cung cấp được 1/3 nhu cầu thị trường trong nước, còn 2/3 vẫn phải nhập khẩu từ nước ngoài, do vậy cần phải thúc đẩy phát triển mạnh mẽ ngành cây ăn quả của cả nước.

Hiện nay, sản xuất cây giống chủ yếu dựa trên phương pháp truyền thống như gieo hạt, chiết, ghép cành. Các phương pháp này còn tồn tại nhiều hạn chế như thời gian cây ra hoa kết quả lâu, năng suất thấp, dễ bị nhiễm bệnh từ cây gốc, do đó chưa đáp ứng được nguồn giống sạch bệnh (Hoàng Ngọc Thuần, 2000). Trên thế giới đã có nhiều nghiên cứu ứng dụng vi ghép, nuôi cấy mô và chuyển gen kháng vi rút trong chọn tạo giống cây có mùi sạch bệnh (Navarro L. *et al.*, 1975; Moore G. A. *et al.*, 1992; Hammschlag F. *et al.*, 1995; Yang Z. N. *et al.*, 2000; Usman M. *et al.*, 2005; Duan Y. X. *et al.*, 2007). Ở Việt Nam, việc ứng dụng các kỹ thuật tiên tiến trong nhân giống cam quýt đã được triển khai như ứng dụng vi ghép trong nhân giống cam chanh (Lê Trần Bình,

¹ Khoa CNŞH-CNTP, Đại học Nông Lâm Thái Nguyên

² Viện Nghiên cứu và Phát triển Lâm nghiệp

1993) hay tạo cây sạch bệnh bằng vi ghép, tạo quả không hạt (Hà Thị Thúy, 2010) và xây dựng quy trình tái sinh cây cam Sành để phục vụ chuyển gen (Đỗ Tiến Phát *et al.*, 2007). Mặc dù vậy chưa có nhiều nghiên cứu về tạo giống kháng bệnh và bảo tồn nguồn gen *in vitro* trên đối tượng cây có múi. Do vậy, việc ứng dụng nuôi cấy mô tế bào trong chọn tạo và nhân giống cây có múi sẽ góp phần nâng cao hiệu quả trong chọn tạo giống cây ăn quả có múi. "*Nghiên cứu khả năng nhân nhanh một số giống bưởi (Citrus grandis (L.) Osbeck) bằng phương pháp nuôi cấy in vitro*" được thực hiện trên năm giống bưởi: Bưởi Diễn, Phúc Trạch, Năm Roi, Đoan Hùng và bưởi Đỏ. Kết quả của nghiên cứu sẽ là cơ sở để thực hiện các nghiên cứu tiếp theo trong công tác chọn tạo giống bưởi ở Việt Nam.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Vật liệu thí nghiệm là thân mầm cây con 2 tuần tuổi được nuôi cấy nảy mầm từ hạt trên môi trường MS (Murashige và Skoog, 1962) của 5 giống bưởi: Diễn, Phúc Trạch, Năm Roi, Đoan Hùng và bưởi Đỏ được thu thập từ vườn thí nghiệm của trường Đại học Nông Lâm Thái Nguyên tại huyện Phú Lương, Thái Nguyên.

Hóa chất sử dụng chủ yếu gồm MS đa lượng và vi lượng (Merk), chất kích thích sinh trưởng BAP và NAA (Duchefa).

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Khử trùng hạt và tạo vật liệu nghiên cứu

Hạt của 5 giống bưởi: Diễn, Phúc Trạch, Năm Roi, Đoan Hùng và bưởi Đỏ, được rửa sạch dưới vòi nước chảy và tráng lại 2-3 lần bằng nước cất. Tiếp đó hạt được khử trùng bằng cồn 70% trong 2 phút sau đó tráng lại bằng nước cất vô trùng 1 - 2 lần. Sau cùng hạt được khử trùng bằng NaClO 0,5% (NaClO 5,5% nguyên chất) trong 10 phút, tráng sạch bằng nước cất vô trùng 4-5 lần. Tách bỏ vỏ hạt và nuôi cấy nảy mầm trên môi trường MS + đường 30 g/l + aga 5,4 g/l, pH = 5,6 để lấy mẫu tiến hành các thí nghiệm.

Cây con nảy mầm sau 14 ngày được tiến hành lấy mẫu: Dùng dao số 15 cắt bỏ phần lá mầm, trụ dưới và rễ mầm. Thân mầm được cắt thành các đoạn ngắn, vát đầu (khoảng 0,7-1,0 cm) để sử dụng cho các thí nghiệm.

2.2.2. Nuôi cấy tái sinh và kéo dài chồi

Mẫu nuôi cấy tái sinh là các đoạn thân mầm ngắn được cắt từ thân mầm của cây con sau 14 ngày tuổi. Khả năng tái sinh chồi của các giống bưởi được thử nghiệm trên môi trường MS + IAA 0,2 mg/l + đường 30 g/l + aga 5,4 g/l với các nồng độ BAP khác nhau: 1,0 mg/l, 1,5 mg/l, 2,0 mg/l và 2,5 mg/l. Chồi tái sinh sau 20 ngày được cấy chuyển sang môi trường kéo dài MS bổ sung GA₃ với nồng độ 1,0 mg/l.

2.2.3. Tạo cây hoàn chỉnh

Chồi tái sinh có chiều cao 2-3 cm được sử dụng cho thí nghiệm ra rễ. Dùng dao số 11 cắt từng chồi riêng rẽ và nuôi cấy trên môi trường MS có bổ sung NAA hoặc IBA với các nồng độ: 0,5 mg/l, 1,0 mg/l, 1,5 mg/l, 2,0 mg/l để kích thích ra rễ tạo cây hoàn chỉnh.

Điều kiện trong phòng thí nghiệm: Nhiệt độ 25°C, chiếu sáng 16 h/ ngày, cường độ 2000 lux.

Điều kiện và giá thể ra cây con: Giá thể để ra cây con bao gồm đất : trấu hun (tỷ lệ 2:1). Cây con được ra cây ở nhà lưới có mái che, nhiệt độ dao động 25°C - 30°C, độ ẩm 70% - 80%, ánh sáng 2000 - 2500 lux.

Chỉ tiêu theo dõi :

$$\text{Tỷ lệ tái sinh chồi (\%)} = \frac{\sum \text{mẫu nảy chồi}}{\sum \text{mẫu ban đầu}} \times 100$$

$$\text{Hệ số nhân nhanh chồi (\%)} = \frac{\sum \text{số chồi thu được}}{\sum \text{số chồi ban đầu}} \times 100$$

$$\text{Tỷ lệ ra rễ (\%)} = \frac{\text{Số mẫu có rễ}}{\sum \text{mẫu cấy trên môi trường RM}} \times 100$$

Phương pháp xử lý số liệu

Kết quả thí nghiệm được xử lý thống kê bằng phần mềm Excel 2003 và IRRISTAT 5.0.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Ảnh hưởng của BAP đến khả năng tái sinh chồi

Hạt của 5 giống bưởi Diễn, Phúc Trạch, Năm Roi, Đoan Hùng và bưởi Đỏ sau khi khử trùng được nuôi cấy nảy mầm trên môi trường MS (hình 1-A). Sau 14 ngày nảy mầm cây con được sử dụng cho các thí nghiệm (hình 1-B). Thân mầm được cắt thành đoạn ngắn (0,7-1,0 cm) vát hai đầu và nuôi cấy tái sinh chồi

trên môi trường MS bổ sung BAP ở các nồng độ 1,0 đến 2,5 mg/l.

Bảng 1. Ảnh hưởng của BAP đến khả năng tạo tái sinh chồi (sau 21 ngày)

BAP (mg/l)	Diễn		Phúc Trạch		Năm Roi		Đoan Hùng		Đồ	
	Tỷ lệ tái sinh (%)	Hệ số nhân chồi (chồi)	Tỷ lệ tái sinh (%)	Hệ số nhân chồi (chồi)	Tỷ lệ tái sinh (%)	Hệ số nhân chồi (chồi)	Tỷ lệ tái sinh (%)	Hệ số nhân chồi (chồi)	Tỷ lệ tái sinh (%)	Hệ số nhân chồi (chồi)
0,0	8,30 ^a	1,02 ^a	6,67 ^a	1,16 ^a	11,67 ^a	2,32 ^a	3,33 ^a	1,02 ^a	12,00 ^a	2,20 ^a
1,0	23,30 ^d	3,06 ^d	21,67 ^d	2,19 ^d	25,00 ^d	3,78 ^d	25,56 ^d	2,06 ^d	35,20 ^d	5,04 ^d
1,5	26,60 ^c	6,38 ^c	25,00 ^c	3,37 ^b	28,33 ^c	3,94 ^c	28,89 ^c	2,38 ^c	48,92 ^c	6,30 ^b
2,0	41,67 ^a	8,70 ^a	33,30 ^a	4,68 ^a	56,67 ^a	5,33 ^a	33,33 ^a	2,70 ^a	64,20 ^a	7,20 ^a
2,5	30,00 ^b	7,43 ^b	28,30 ^b	3,25 ^c	37,67 ^b	4,25 ^b	30,00 ^b	2,43 ^b	53,00 ^b	6,10 ^c
CV(%)	8,3	6,9	4,3	5,6	6,7	5,3	5,1	4,9	6,3	5,9
LSD _{0,05}	3,92	3,15	3,82	3,14	4,15	4,23	3,47	2,05	4,20	4,08

Chữ cái a, b, c, d, e thể hiện mức độ so sánh phân hạng Duncan

Kết quả nghiên cứu ở bảng 1 cho thấy BAP có ảnh hưởng rõ rệt đến khả năng tái sinh chồi ở năm giống bưởi. Tỷ lệ tái sinh chồi tăng lên đáng kể khi bổ sung BAP vào môi trường nuôi cấy, dao động từ 21,67 đến 64,20% tùy theo giống. Trong đó, ở nồng độ BAP 2 mg/l tỷ lệ tái sinh chồi và số chồi cao hơn các nồng độ khác ở cả năm giống bưởi nghiên cứu: Diễn 41,67%, Phúc Trạch 33,3%, Năm Roi 56,67%, Đoan Hùng 33,33% và bưởi Đồ 64,2%; hệ số nhân chồi lần lượt đạt 8,7, 4,68, 5,33, 2,7, 7,2 chồi (hình 1-D1-3). Khi bổ sung BAP với nồng độ cao hơn hay thấp hơn 2,0 mg/l tỷ lệ tái sinh chồi và số chồi thu được có xu hướng giảm ở cả năm giống bưởi. Tuy nhiên tỷ lệ này cao hơn nhiều so với đối chứng không bổ sung BAP (bảng 1).

BAP được sử dụng phổ biến để tái sinh chồi invitro ở cam quýt (Welton A. B. A. *et al.*, 2002; Usman M. *et al.*, 2005; Duan Y. X. *et al.*, 2007). Các báo cáo cho thấy khả năng tái sinh chồi có sự khác biệt rõ rệt ở các giống. Trong cùng điều kiện thí nghiệm, Welton và đồng tác giả (2002) nhận thấy sự khác biệt về tỷ lệ tái sinh ở các giống Natal, Valencia, Hamlin và Rangpur. Tỷ lệ tái sinh chồi cao nhất khi bổ sung BAP 1,0 mg/l, ngoại trừ giống Rangpur

thích hợp ở nồng độ BAP 3,5 mg/l. Các nghiên cứu khác cho rằng BAP 2,0 mg/l thích hợp cho tái sinh chồi ở giống cam Bingtang (*Citrus sinensis* L. Osb.) (Duan Y. X. *et al.*, 2007) hay giống bưởi Carizzo (Sarma C. *et al.*, 2011). Tuy nhiên BAP nồng độ cao (10 mg/l) lại thích hợp ở các giống Kinnow (*Citrus reticulata* L. Blanco), Sweet lime (*Citrus limmetoides* L.) và Succari (*Citrus sinensis* Osbeck) (Usman M. *et al.*, 2005). Sự khác biệt này cho thấy kiểu gen ảnh hưởng lớn đến khả năng tái sinh của các giống bưởi (Duan Y. X. *et al.*, 2007; Usman M. *et al.*, 2005). Kết quả nghiên cứu ở bảng 1 cho thấy khả năng tái sinh và số chồi thu được có sự chênh lệch đáng kể giữa các giống bưởi, trong đó Năm Roi và Đồ có kết quả tốt hơn so với ba giống còn lại ở nồng độ BAP 2,0 mg/l.

3.2. Ảnh hưởng của NAA, IBA đến khả năng ra rễ

Chồi tái sinh có chiều cao khoảng 2-3 cm được chuyển sang môi trường tạo rễ có bổ sung NAA hoặc IBA nồng độ từ 0,5 đến 2,0 mg/l. Kết quả ở bảng 2 và 3 cho thấy khả năng ra rễ tăng lên rõ rệt khi bổ sung NAA hoặc IBA vào môi trường nuôi cấy.

Bảng 2. Ảnh hưởng của NAA đến khả năng ra rễ (sau 45 ngày)

NAA (mg/l)	Diễn		Phúc Trạch		Năm Roi		Đoan Hùng		Đồ	
	Tỷ lệ ra rễ (%)	Chiều dài rễ (cm)	Tỷ lệ ra rễ (%)	Chiều dài rễ (cm)	Tỷ lệ ra rễ (%)	Chiều dài rễ (cm)	Tỷ lệ ra rễ (%)	Chiều dài rễ (cm)	Tỷ lệ ra rễ (%)	Chiều dài rễ (cm)
0,0	0,00 ^a	0,0 ^a	0,00 ^a	0,0 ^a	0,00 ^a	0,0 ^a	0,00 ^a	0,0 ^a	0,00 ^a	0,0 ^a
0,5	20,00 ^b	4,5 ^c	20,00 ^b	4,2 ^c	5,00 ^d	3,3 ^d	10,00 ^d	3,5 ^d	20,02 ^d	6,3 ^c

1,0	33,30 ^a	7,6 ^a	30,00 ^a	7,2 ^a	35,00 ^a	7,2 ^a	30,00 ^a	5,8 ^a	36,20 ^a	7,8 ^a
1,5	14,62 ^c	5,5 ^b	16,60 ^c	5,0 ^b	30,00 ^b	6,1 ^b	25,00 ^b	5,6 ^b	22,41 ^b	6,7 ^b
2,0	10,00 ^d	3,8 ^d	6,67 ^d	3,2 ^d	20,00 ^c	5,4 ^c	15,00 ^c	5,2 ^c	21,30 ^c	6,7 ^b
CV(%)	4,0	5,5	4,3	6,1	5,0	6,5	4,3	6,1	7,1	6,6
LSD _{0,05}	3,15	3,42	4,05	5,29	3,56	2,42	3,85	3,29	4,90	5,29

Chữ cái a, b, c, d, e thể hiện mức độ so sánh phân hạng Duncan

Trong đó nồng độ 1,0 mg/l cho tỷ lệ ra rễ cao hơn các công thức khác. Với NAA 1,0 mg/l, tỷ lệ mẫu ra rễ dao động từ 30,00% đến 36,20% và chiều dài rễ từ 5,8 đến 7,8 cm (bảng 2, hình 1-F2). Tương tự, tỷ lệ mẫu ra rễ trên môi trường IBA 1,0 mg/l dao động từ 18,3% đến 26,33%, chiều dài rễ dao động từ 6,1 đến

7,1 cm (bảng 3, hình 1-F1). Khi tăng nồng độ NAA hoặc IBA cao hơn 1,0 mg/l tỷ lệ ra rễ có xu hướng giảm xuống ở cả năm giống bưởi. Kết quả nghiên cứu cho thấy nhìn chung môi trường có bổ sung NAA và IBA đều có khả năng kích thích ra rễ tốt hơn so đối chứng.

Bảng 3. Ảnh hưởng của IBA đến khả năng ra rễ (sau 45 ngày)

IBA (mg/l)	Diễn		Phúc Trạch		Năm Roi		Đoan Hùng		Đồ	
	Tỷ lệ ra rễ (%)	Chiều dài rễ (cm)	Tỷ lệ ra rễ (%)	Chiều dài rễ (cm)	Tỷ lệ ra rễ (%)	Chiều dài rễ (cm)	Tỷ lệ ra rễ (%)	Chiều dài rễ (cm)	Tỷ lệ ra rễ (%)	Chiều dài rễ (cm)
0,0	0,00 ^c	0,0 ^c	0,00 ^c	0,0 ^c	0,00 ^c	0,0 ^c	0,00 ^c	0,0 ^c	0,00 ^c	0,0 ^c
0,5	16,67 ^c	4,3 ^c	12,60 ^c	4,0 ^c	11,70 ^d	2,3 ^d	12,00 ^c	2,1 ^d	13,00 ^d	2,5 ^d
1,0	26,67 ^a	6,8 ^a	23,30 ^a	6,5 ^a	23,30 ^a	6,1 ^a	18,03 ^a	6,6 ^a	26,33 ^a	7,1 ^a
1,5	20,00 ^b	5,0 ^b	10,00 ^b	4,8 ^b	15,00 ^b	4,4 ^b	15,40 ^b	5,2 ^b	17,00 ^b	5,9 ^b
2,0	3,30 ^d	3,0 ^d	6,67 ^d	2,8 ^d	13,30 ^c	3,5 ^c	11,30 ^d	4,1 ^c	15,30 ^c	5,3 ^c
CV(%)	5,4	4,4	6,4	4,3	4,7	6,1	4,9	5,5	7,3	6,7
LSD _{0,05}	2,81	3,30	3,82	2,28	2,70	3,80	3,61	3,82	4,81	3,70

Chữ cái a, b, c, d, e thể hiện mức độ so sánh phân hạng Duncan

Một số nghiên cứu cho rằng bưởi là một trong những đối tượng khó tạo rễ do vậy cần sử dụng NAA hoặc IBA để kích thích ra rễ (Usman *et al.*, 2005; Đỗ Tiến Phát *et al.*, 2007). Một số công bố cho thấy hiệu quả ra rễ của NAA cao hơn IBA ở cùng nồng độ 1,0 mg/l (Đỗ Tiến Phát *et al.*, 2007; Sarma C. *et al.*, 2011). Báo cáo của Usman và đồng tác giả (2005) cho rằng ở nồng độ NAA 1,0 mg/l tỷ lệ ra rễ của bưởi Kinnow, Sweet lime, Succari lần lượt là 40%, 37,5% và 25%. Ở nghiên cứu khác, Sandra và Morehart (1998) cho rằng tăng nồng độ IBA trên môi trường nuôi cấy sẽ không nâng cao tỷ lệ ra rễ cũng như chiều dài rễ ở giống cam Osage (*MacLura pomifera* (Raf.) Schneid). Các kết quả nghiên cứu cho thấy ngoài auxin, yếu tố giống cũng ảnh hưởng lớn đến khả năng tạo rễ ở cam quýt.

Kết quả ở bảng 2, 3 và hình 1-E1, E2 cho thấy NAA hoặc IBA ở nồng độ 1,0 mg/l có thể sử dụng cho tái sinh rễ của các giống bưởi nghiên cứu.

Bảng 4. Kết quả ra cây con ở giai đoạn vườn ươm (sau 30 ngày)

Giống	Số cây đưa ra trồng (cây)	Số cây sống (cây)	Tỷ lệ cây sống (%)	Số lá/cây (lá)	Chiều cao cây (cm)
Diễn	36	33	91,6	4 - 6	7,8
Phúc Trạch	28	21	75,0	5 - 7	7,1
Năm Roi	25	17	68,0	4 - 5	6,0
Đoan Hùng	21	18	85,7	4 - 6	5,5
Đồ	42	39	92,8	5 - 8	7,3

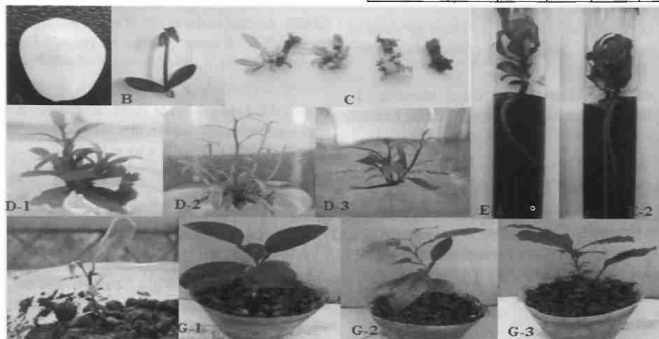
Sau khi tạo cây hoàn chỉnh, cây con của 5 giống bưởi được trồng trên giá thể đất: trấu hun (tỷ lệ 2:1) trong điều kiện nhà lưới có mái che. Kết quả ở bảng

4 cho thấy bưởi Đò và bưởi Diễn có tỷ lệ cây sống cao đạt 92,8% và 91,6%. Tiếp đến hai giống bưởi Đoan Hùng và bưởi Phúc Trạch thu được tỷ lệ cây sống lần lượt là 85,7% và 75%. Giống bưởi Năm Roi thu được tỷ lệ cây sống thấp hơn so với các giống trước đó, kết quả là 68%. Sau 30 ngày theo dõi cây con ở giai đoạn vườn ươm đều sinh trưởng tốt với số lá trung bình 4 – 8 lá, chiều cao cây 5,5 – 7,8 cm.

Kết quả ở bảng 5 cho thấy giống bưởi Đò, Diễn và Phúc Trạch đều có khả năng nhân giống in vitro sau 125 ngày nuôi cấy để tạo cây con phục vụ sản xuất.

Bảng 5. Kết quả nhân giống một số giống bưởi (sau 125 ngày)

Giống	Tỷ lệ mẫu tái sinh (%)	Hệ số nhân chồi (chồi)	Số cây đưa ra trồng (cây)	Số cây sống (cây)	Tỷ lệ cây sống (%)
Diễn	57,2	6,4	46	40	86,9
Phúc Trạch	41,0	4,4	38	32	84,2
Năm Roi	60,8	4,3	35	27	77,1
Đoan Hùng	40,0	2,4	27	20	74,0
Đò	70,3	6,2	50	44	88,0
Trung bình	53,9	4,7	196	128	83,1



Hình 1. Kết quả tái sinh một số giống bưởi

A- Hạt trước khi nảy mầm; B- cây con 14 ngày tuổi; C- mẫu nảy chồi 14 ngày; D- kéo dài chồi sau 30 ngày (D1- Diễn, D2- Năm Roi, D3- Phúc Trạch); E- cây ghép 14 ngày; E- chồi ra rễ 20 ngày (E1- IBA 1,0 mg/l, E2- NAA 1,0 mg/l); G- cây trồng trên đất (G1- Diễn; G2- Phúc Trạch; G3- Năm Roi)

4. KẾT LUẬN

Có thể nhân nhanh 5 giống bưởi được tiến hành bằng phương pháp nuôi cấy mô cho kết quả tốt trên môi trường nuôi cấy MS có bổ sung BAP 2,0 mg/l và IAA 0,2 mg/l. Tạo cây hoàn chỉnh được thực hiện trên môi trường MS bổ sung NAA 1,0 mg/l hoặc IBA 1,0 mg/l và hỗn hợp đất trấu hun (tỷ lệ 2:1) dùng làm giá thể đưa cây con ra đất. Sau 30 ngày cây con sinh trưởng tốt với chiều cao 5,5 đến 7,8 cm, 4 đến 8 lá/cây.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Duan Y. X., Liu X., Fan J., Li Li D., Chao Wu R. and Guo W. W. (2007). Multiple shoot induction from

seedling epicotyls and transgenic citrus plant regeneration containing the green fluorescent protein gene. *Botanical Studies*, 48, p.165-171.

2. Đỗ Tiến Phát, Nguyễn Chi Mai, Đặng Hòa Hiếu, Lê Văn Sơn, Chu Hoàng Hà, Lê Trần Bình (2007). Xây dựng quy trình tái sinh đa chồi trực tiếp từ thân mầm cây cam sành (*Citrus nobilis* loureiro) phục vụ chuyển gen. *Tạp chí Công nghệ sinh học* 5(3), trang 363-370.

3. FAOSTAT (2011). Agricultural data, available from: <http://faostat.fao.org/>

4. Hammischlag F., Ritchie D., Werner D., Hashmul G., Krusberg L., Meyer R., Huettel R.

(1995). In vitro selection of disease resistance in fruit trees. *Acta Hort.* 392: 19-26.

5. Hà Thị Thủy (2010). Nghiên cứu tạo giống bưởi, cam, quýt không hạt bằng công nghệ sinh học. Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn.

6. Hoàng Ngọc Thuận (2000). *Nhân giống vô tính cây ăn quả (chiết, ghép, giâm cành, tách chồi và nuôi cấy in vitro*. Nxb Nông nghiệp, Huế.

7. Moore G. A., Jacano C. C., Neidigh J. L., Lawrence S. D. and Cline K. (1992). *Agrobacterium*-mediated transformation of citrus stem segments and regeneration of transgenic plants. *Plant Cell Rep.* 11, p. 238-242.

8. Lê Trần Bình (1993). *Ứng dụng kỹ thuật vi ghép trong nhân giống cam chanh*. Nxb Nông nghiệp, Huế.

9. Navarro L., Roistacher C. N. and Murashige T. (1975). Improvement of shoot tip grafting *in vitro* for virus-free citrus. *HortScience*, 100, pp. 471-479.

10. Tổng cục Thống kê, 2011. Nông nghiệp, Lâm nghiệp và Thủy sản www.gso.gov.vn

11. Yang Z. N., Ingelbrecht I. L., Louzada E., Skaria M., Mirkov T. E. (2000). *Agrobacterium* mediated transformation of the commercially important grapefruit cultivar Rio Red (*Citrus paradisi* Macf.). *Plant Cell Reports*, 19, p. 1203-1211.

12. Sandra M. K. and Morehart A. L. (1998). Tissue culture of Osage orange. *Hort. Sci.*, 23(3): 613-615.

13. Sarma C., Borthakur A., Singh S., Modi M. K., Sen P. (2011). Efficient in vitro plant regeneration from cotyledonary explants of *Citrus reticulata* L. Blanco. *Annals of Biological Research*, 2 (6):341-348.

14. Usman M., Muhammad S., Fatima B. (2005). *In vitro* multiple shoot induction from nodal explants of Citrus. *Journal Central European Agriculture*, 6(4), p.435-442.

15. Welton A. B. A., Francisco A. A. M. F., Beatriz M. J. M., Adriana P. M. R. (2002). In vitro organogenesis optimization in *Citrus sinensis* and *C. limonia*. *Scientia Agricola*, v.59, n.1, p.35-40.

STUDY ON THE CAPACITY OF REGENERATION OF SOME GRAPEFRUIT CULTIVARS (*Citrus grandis* (L.) Osbeck) BY IN VITRO CULTURE METHOD

La Van Hien¹, Nguyen Tien Dung¹, Duong Thi Tham^{1,2}, Ngo Xuan Binh^{1,3}

¹ Faculty of Biotechnology and Food Technology

² Institute of Research and Forestry Development

³ Office of national programs for science and technology, Ministry of science and technology

Summary

Study on the capacity of shoot regeneration of five grapefruit cultivars: Dien, Phuc Trach, Nam Roi, Doan Hung and Do were carried out at Faculty of Biotechnology and Food technology, TUAF. Hypocotyls of 14 day-old seedlings were dissected into short fragments (0.7-1.0 cm length) for investigation of shoot regeneration. In order to induce shoots, fragments were cultured on the MS agar medium that supplemented various BAP concentrations, 1.0 to 2.5 mg/l. The results showed that BAP 2.0 mg/l was suitable for shoot regeneration for all examined varieties, wherein Dien and Do cultivars were obtained the highest level of shoot regeneration, 41.6 and 64%, the mean number of shoots was 8.7 and 7.2, respectively. Moreover, the results also indicated that either NAA or IBA at 1.0 mg/l concentration could be applied for root induction for all five cultivars. These results might be useful for other studies such as gene transformation, in vitro grafting... to generate new citrus varieties.

Keywords: *In vitro*, grapefruit, growth regulation, regeneration, shoot.

Người phản biện: PGS.TS. Nguyễn Văn Đông

Ngày nhận bài: 22/5/2015

Ngày thông qua phản biện: 22/6/2015

Ngày duyệt đăng: 29/6/2015