

# ỨNG DỤNG CÔNG NGHỆ PHÔI SOMA TRONG CÔNG TÁC BẢO TỒN VÀ PHÁT TRIỂN CÂY THÔNG ĐỎ (*TAXUS WALLICHIANA* ZUCC) ĐANG BỊ TUYỆT DIỆT

**Mã số đề tài: 62-09-05**

**Chủ nhiệm đề tài: PGS.TS. TRẦN VĂN MINH**

Cơ quan công tác: Viện Sinh học Nhiệt đới. Tp.HCM

Địa chỉ liên lạc: 01 Mac Đĩnh Chi, Q.1, TP Hồ Chí Minh

Điện thoại:

## 1. Mục đích và nội dung nghiên cứu

### 1.1. Mục đích

Ứng dụng kỹ thuật nuôi cấy phôi soma trong bảo tồn và phát triển cây thông đỏ

### 1.2. Nội dung nghiên cứu

- Tái sinh cây thông đỏ in vitro nhằm mục tiêu bảo tồn
- Nghiên cứu quá trình phát sinh phôi soma in vitro nhằm mục tiêu phát triển

## 2. Kết quả nghiên cứu của đề tài

Thời gian thực hiện đề tài trong 2 năm (2005-2006). Trong báo cáo này chúng tôi báo cáo nội dung (1) trong toàn tiến trình thực hiện đề tài: Nghiên cứu kỹ thuật nuôi cấy tái sinh cây thông đỏ (*Taxus wallichiana* Zucc) in vitro

### 2.1. Vật liệu

- Mẫu nuôi cấy: cây thông đỏ đầu dòng được giâm cành trong bầu đất với nhiều độ tuổi khác nhau (Trung tâm Nghiên cứu Lâm sinh Đà Lạt thu thập ở vùng núi Liang Biang, Lâm Đồng).

- Điều kiện nuôi cấy: môi trường được vô trùng ở 121°C, 1at, trong 25 phút. Nhiệt độ phòng nuôi cấy 28±1°C. Cường độ chiếu sáng 34,2μmol/m<sup>2</sup>/s. Thời gian chiếu sáng 8giờ/ngày

- Môi trường nuôi cấy: môi trường dinh dưỡng khoáng cơ bản MS (Murashige-Skoog, 1962), WPM (Lloyd & McCown, 1981), WV3 (Coke, 1996), được bổ sung BA (6-benzylaminopurine), kinetin (6-fufurylaminopurine), IBA (β-indol butyric acid), NAA (α-naphthalen acetic acid). Chất chống hóa nâu: than hoạt tính, PVP, AgNO<sub>3</sub>.

### 2.2. Phương pháp

Thí nghiệm được bố trí theo RCBD, 4 lần lặp lại, 5 bình tam giác cho một lần lặp lại, mỗi bình cấy 5 mẫu. Số liệu được phân tích bằng phần mềm thống kê MSTSC.

### 2.3. Kết quả và thảo luận

- *Vô trùng mẫu nuôi cấy*: mẫu nuôi cấy được lấy từ cây mẹ bầu đất 18 tháng tuổi. Chồi đỉnh và chồi bên được sử dụng làm mẫu nuôi cấy. Chồi non được vô trùng

bằng hypochlorite Natri (10%) trong 15 phút. Chồi non vô trùng được đưa vào nuôi cấy in vitro

- *Ảnh hưởng của môi trường khoáng cơ bản đến nuôi cấy tái sinh chồi thông đỏ in vitro*: chồi non được nuôi cấy trên môi trường khoáng cơ bản MS, WPM, WV3 có bổ sung BA (5mg/l). Môi trường MS tỏ ra thích hợp

- *Ảnh hưởng của chất chống hóa nâu đến nuôi cấy tái sinh chồi thông đỏ in vitro*: cây thông đỏ thường tiết ra nhựa đỏ trên vết thương. Sau khi nuôi cấy hồi non 2 ngày thì thấy xuất hiện nhựa đỏ tiết ra vào môi trường làm hạn chế khả năng tái sinh chồi. Trên môi trường MS + BA(5mg/l) có bổ sung than hoạt tính, PVP hay AgNO<sub>3</sub>. Kết quả nghiên cứu cho thấy than hoạt tính (1000mg/l), PVP (150mg/l) và AgNO<sub>3</sub> (150mg/l) đã hạn chế rõ rệt sự tiết nhựa vào môi trường nuôi cấy. Trong đó AgNO<sub>3</sub> tỏ ra hiệu quả hơn

- *Ảnh hưởng của sinh lý mẫu nuôi cấy đến tái sinh chồi thông đỏ in vitro*: sinh lý mẫu nuôi cấy có ảnh hưởng rất lớn đến khả năng tái sinh chồi bên và chồi bất định in vitro. Có nhiều loại mẫu được đưa vào nuôi cấy: (1) ngọn chính + đốt 1, (2) thân chính + đốt 2, (3) thân chính + đốt 3, (4) ngọn cành + đốt 1, (5) thân cành + đốt 2, (6) thân cành + đốt 3. Mẫu được nuôi cấy trên môi trường MS + BA(5mg/l) + AgNO<sub>3</sub>(150mg/l). Kết quả cho thấy mẫu (1) và (2) có số chồi / mẫu cao hơn cả 1,5 và 3

- *Ảnh hưởng của tuổi mẫu nuôi cấy đến tái sinh chồi thông đỏ in vitro*: tuổi mẫu nuôi cấy có vai trò quan trọng, mẫu phải non, và đủ độ tuổi chín sinh lý, sẽ cho phát sinh chồi cao. Mẫu nuôi cấy có tuổi sinh lý 12-15-18 tháng tuổi, được nuôi cấy trên môi trường MS + BA(5mg/l) + AgNO<sub>3</sub>(150mg/l). Kết quả nghiên cứu cho thấy, tỷ lệ chồi tái sinh cao nhất với tuổi mẫu 18 tháng, phát sinh số chồi / mẫu nuôi cấy cao (3,1 chồi)

- *Ảnh hưởng của BA đến tái sinh chồi thông đỏ in vitro*: môi trường dinh dưỡng khoáng cơ bản có bổ sung BA(0,5-2,5-5-10-15mg/l) + AgNO<sub>3</sub>(150mg/l). Kết quả nghiên cứu cho thấy BA(5mg/l) thích hợp cho nuôi cấy tái sinh chồi

- *Ảnh hưởng của BA và Kinetin đến tái sinh chồi thông đỏ in vitro*: nhằm nâng cao khả năng nuôi cấy tái sinh chồi, tổ hợp BA(5mg/l) + Kinetin(0,1-0,5-1-2,5-5mg/l) + AgNO<sub>3</sub>(150mg/l) được bổ sung vào môi trường nuôi cấy MS. Kết quả cho thấy, tổ hợp MS + BA(5mg/l) + K(1mg/l) + AgNO<sub>3</sub>(150mg/l) thích hợp cho nuôi cấy tái sinh chồi, cho số chồi / mẫu nuôi cấy nhiều (3,1 chồi)

- *Ảnh hưởng của mẫu nuôi cấy đến tỷ lệ ngã nghiêng chồi thông đỏ in vitro*: cây thông đỏ có đặc tính khi giâm cành bên ngoài vườn ươm thường có tỷ lệ cây ngã nghiêng cao. Môi trường nuôi cấy tái sinh chồi: MS + BA(5mg/l) + K(1mg/l) + AgNO<sub>3</sub>(150mg/l). Mẫu nuôi cấy: (1) đỉnh thẳng đứng (2) thân thẳng đứng (3) đỉnh cành (4) thân cành. Kết quả nghiên cứu cho thấy, tỷ lệ ngã nghiêng cao khi mẫu nuôi cấy là (3) và (4) so với độ thẳng đứng của trục tung (0°) là >45°, mẫu (1) và (2) có tỷ lệ ngã nghiêng <45°. Mẫu nuôi cấy thích hợp cho tái sinh chồi in vitro là (1) đỉnh thẳng đứng và (2) thân thẳng đứng

- *Ảnh hưởng của tính bảo lưu cục bộ đến sinh trưởng chồi thông đỏ in vitro*: trong giâm cành, với mẫu là cành (nhánh) bên, thường cho cây ngã nghiêng. Nghiên cứu tính bảo lưu cục bộ in vitro cho thấy: trên môi trường nuôi cấy MS + BA(5mg/l) +

AgNO<sub>3</sub>(150mg/l), với mẫu nuôi cấy (1) đỉnh cành (2) thân cành, cho kết quả: góc nghiêng so với trục tung (0°), mẫu nuôi cấy (1) có tỷ lệ ngã nghiêng thấp nhất

- *Ảnh hưởng của điều kiện nuôi cấy thông khí và ánh sáng đến sinh trưởng chồi thông đỏ in vitro*: trên môi trường nuôi cấy MS + BA(5mg/l) + AgNO<sub>3</sub>(150mg/l), mẫu nuôi cấy là thân chính + đốt 2, bình tam giác được đậy kín bằng nắp giấy và nắp cao su, trong điều kiện chiếu sáng 11,4-22,8-34,2μmol/m<sup>2</sup>/s. Kết quả cho thấy trong điều kiện chiếu sáng 11,4-22,8μmol/m<sup>2</sup>/s và đậy bằng nắp giấy cho phát sinh chồi / mẫu cao (2,8 chồi)

- *Nhân nhanh cây thông đỏ in vitro*: chồi non phát sinh trong nuôi cấy được sử dụng làm protocol cho quá trình vi nhân giống. Trên môi trường cơ bản MS có bổ sung BA và K. Kết quả cho thấy môi trường nhân nhanh hiệu quả là MS + BA(5mg/l) + K(1mg/l) cho phát sinh chồi / cụm cao (3,4 chồi). Cây thông đỏ in vitro có tính ưu thế ngọn mạnh mẽ, nuôi cấy đốt thân cho phát sinh chồi bên, nuôi cấy chồi ngọn chỉ cho vươn thân chồi

- *Nuôi cấy phát sinh rễ chồi thông đỏ in vitro*: cây con thông đỏ phát sinh rễ in vitro trên môi trường nuôi cấy WPM + NAA(3mg/l) + Rhizopon(50mg/l) sau 75 ngày nuôi cấy.

#### **2.4. Kết luận**

Cây thông đỏ được nghiên cứu tái sinh và nhân nhanh in vitro nhằm mục tiêu bảo tồn nguồn gen quý hiếm đang bị tuyệt diệt

### **3. Kết quả đã và đang ứng dụng vào thực tiễn**

- Ứng dụng kỹ thuật nuôi cấy tái sinh đỉnh sinh trưởng in vitro nhằm bảo tồn số lượng cây thông đỏ còn sót lại trên Lâm Đồng

- Cây thông đỏ in vitro là nguồn nguyên liệu cho dòng hóa tế bào phôi soma trong công nghệ vi nhân giống và dòng hóa tế bào trong nuôi cấy chiết xuất taxol

### **4. Kết quả đào tạo sau đại học**

Cao học: 01 (bảo vệ 12/2005)

Nghiên cứu sinh: 01 (2006-2009)

### **5. Sản phẩm khoa học**

- 01 bài báo trong tạp chí KH&KT Nông Lâm nghiệp
- 01 bài báo trong tạp chí KH&CN
- 02 bài báo trong Hội nghị NCCB 2006