

ỨNG DỤNG PHƯƠNG PHÁP VI NHÂN GIỐNG TRONG BẢO TỒN GIỐNG CÂY THỦY TÙNG [*Glyptostrobus pensilis* (Staunton ex) K.Koch]

USING IN VITRO PROPAGATION TO PRESERVE *Glyptostrobus pensilis* (Staunton ex.) VARIETY

Nguyễn Thanh Sum, Phạm Ngọc Tuấn, Nguyễn Văn Kết

Khoa Nông Lâm – Trường Đại học Đà Lạt – Email: ketnv@dlu.edu.vn

ABSTRACT

Shoots tip of *Glyptostrobus pensilis* (Staunton ex.) were cultured on woody plant medium (WPM) supplemented with benzyladenine (BA-0.5mg/l), 8g/l agar and 30g/l succrose being most effective multiplied *in vitro*. Rooting was induced in WPM supplemented with 0.5 mg/l indole-3-butyric acid (IBA). By contrast, increasing BA up to 1.5mg/l, callus become more large and microcuttings also showed reduced rooting capacity.

Key words: *Glyptostrobus pensilis*, *in vitro*, BA, IBA

ĐẶT VẤN ĐỀ

Thủy tùng (*Glyptostrobus pensilis* (Staunton ex) K. Koch) là loài cây có giá trị cao về mặt khoa học và kinh tế. Ngày nay, theo điều tra nhận thấy Thủy tùng chỉ còn phân bố ở một số tỉnh của Trung Quốc như Phúc Kiến, Vân Nam và Khăm Muộn (Lào). Tại Việt Nam, Thủy tùng được phát hiện lần đầu tiên vào năm 1955 ở buôn Mil, xã Eahô, cách Buôn Mê Thuộc 45km về phía Đông Bắc. Hiện chỉ còn lại 32 cây ở vùng Trấp Ksor, Huyện Krôngnăng và đập Eadra, xã Eawy, huyện EaH'leo. (Nguyễn Hoàng Nghĩa, 1997).

Loài cây này bị đe dọa tuyệt chủng, không phải vì phân bố hẹp và số cá thể còn lại quá ít mà vì quá trình tái sinh tự nhiên rất kém, cùng với sự gia tăng về dân số nên môi trường sống đang bị xâm phạm và thu hẹp. Việc nhân giống thành công cây thủy tùng bằng phương pháp nuôi cấy mô sẽ mở ra một triển vọng mới trong công tác bảo tồn nguồn gen cây rừng, bên cạnh đó việc áp dụng kỹ thuật công nghệ sinh học trong nghiên cứu sẽ đem lại cho ngành lâm nghiệp những hướng phát triển có nhiều triển vọng mới. Nghiên cứu hướng tới là xác định được môi trường phù hợp cũng như hàm lượng các Auxin, Cytokynin thích hợp cho sinh trưởng và phát triển của cây Thủy tùng trong môi trường *in vitro* thông qua việc ứng dụng kỹ thuật nuôi cấy mô.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu

Mẫu cấy là chồi ngọn và đốt thân của cây Thủy tùng.

Nội dung

- Khảo sát thời gian và nồng độ chất khử trùng mẫu Thủy tùng
- Khảo sát môi trường khoáng thích hợp cho sự tăng trưởng chồi Thủy tùng nuôi cấy *in vitro*
- Khảo sát ảnh hưởng của BA đến khả năng hình thành cụm chồi Thủy tùng nuôi cấy *in vitro*
- Ảnh hưởng của hàm lượng đường và agar lên sự sinh trưởng, phát triển của chồi Thủy tùng nuôi cấy *in vitro*
- Khảo sát ảnh hưởng của bình nuôi cấy có và không có trao đổi khí trong giai đoạn nhân nhanh chồi Thủy tùng nuôi cấy *in vitro*
- Nghiên cứu ảnh hưởng của IBA và NAA đến sự sinh trưởng của cây Thủy tùng *in vitro*

Phương pháp nghiên cứu

Các chồi ngọn và đốt thân được rửa sạch rồi cắt thành các đoạn non dài 2-3 cm sau đó tiến hành khử trùng với các nồng độ khác nhau.

Sau khi khử trùng, mẫu được cắt thành từng mẫu nhỏ có chứa đỉnh sinh trưởng, hoặc các chồi non, kích thước từ 3 đến 5 mm, sau đó được đưa vào bình cấy có chứa các môi trường thích hợp như MS, WPM... Sau 2 tuần nuôi cấy các mẫu

Tất cả các thí nghiệm được tiến hành trong tủ cấy vô trùng. Môi trường và các dụng cụ nuôi cấy đều được vô trùng ở 120°C trong vòng 30 phút, bình nuôi cấy là các bình thủy tinh được đậy kín bằng nắp nhựa và được bịt kín bằng băng keo nhằm ngăn cản sự trao đổi khí với môi trường ngoài, và các hộp nhựa 500ml được đậy kín, mỗi bình nuôi cấy được cấy 5 mẫu

Các thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên (CRD) với 3 lần lặp lại, mỗi nghiệm thức cấy trong 5 bình thủy tinh (hay hộp nhựa 500ml), mỗi bình được cấy 5 mẫu. Số liệu được đo đếm vào ngày thứ 60 sau khi nuôi cấy ở tất cả các thí nghiệm. Số liệu thu được được xử lý thống kê bằng phần mềm MSTAT-C..

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Khảo sát thời gian và nồng độ chất khử trùng mẫu Thủy tùng

Qua kết quả thu được cho thấy mẫu được xử lý ở nồng độ Javel 2% trong 30 phút cho kết quả tốt với tỷ lệ không nhiễm khá cao là 70%, khi tăng nồng độ lên 3% đến 4% trong thời gian 30 phút sẽ gây chết mẫu. Thời gian xử lý mẫu từ 10 đến 20 phút thì tỷ lệ nhiễm vẫn cao hơn nồng độ 2% trong 30 phút. Dưới các nồng độ và thời gian trên tỷ lệ nhiễm mẫu khá cao (Hình 1).

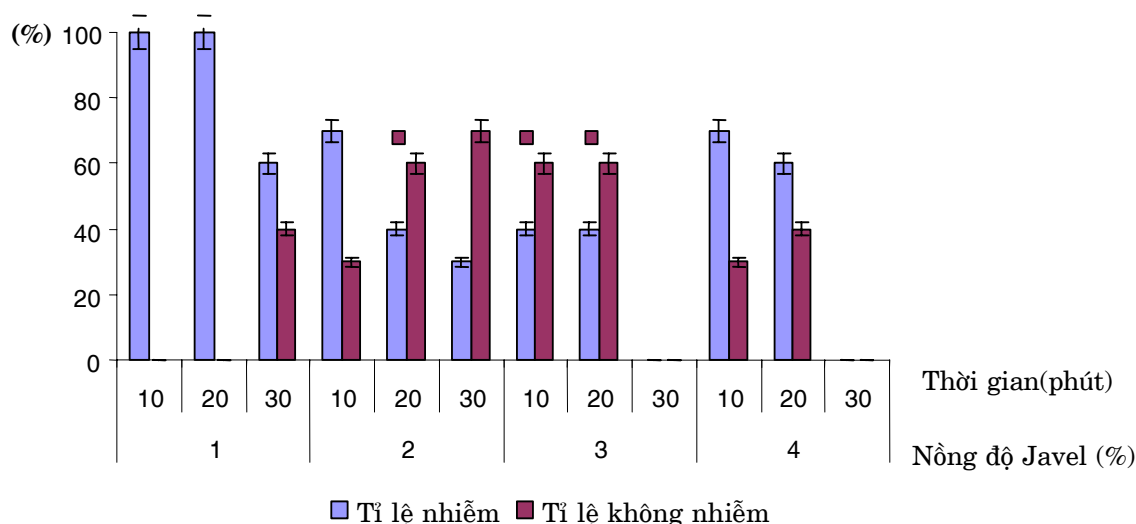
Khảo sát môi trường khoáng thích hợp cho sự tăng trưởng chồi Thủy tùng nuôi cấy *in vitro*

Trong môi trường WPM, với chỉ tiêu số lượng chồi trung bình trên mẫu, nghiệm thức bổ sung 1,0 mg/l BA cho kết quả cao hơn so với các nghiệm

thức khác (2,1 chồi). Các nghiệm thức còn lại cho thấy các nghiệm thức có bổ sung BA số lượng chồi trung bình trên mẫu cao hơn so với nghiệm thức đối chứng. Trong môi trường MS, nghiệm thức đối chứng có số lượng chồi trung bình trên mẫu cao hơn so với các nghiệm thức có bổ sung BA (Bảng 1).

Như vậy, chồi Thủy tùng được nuôi cấy trong môi trường WPM có các chỉ tiêu nghiên cứu cao hơn so với môi trường MS, một số chỉ tiêu mẫu nuôi cấy trên môi trường WPM cao gấp đôi so với mẫu được nuôi cấy trên môi trường MS.

Xét trên toàn lô thí nghiệm có thể nhận thấy giữa môi trường MS và WPM có sự sai khác một cách có ý nghĩa. Môi trường WPM là phù hợp trong việc nuôi cấy mô cây Thủy tùng. Môi trường WPM sẽ là môi trường được chọn lọc sử dụng trong các nghiên cứu tiếp theo.



Hình 1. Thời gian và nồng độ chất khử trùng mẫu Thủy Tùng

Khảo sát ảnh hưởng của BA đến khả năng hình thành cụm chồi Thủy tùng nuôi cấy *in vitro*

Ở các nồng độ BA lớn hơn 1 mg/l hầu như có biểu hiện gây ức chế sự sinh trưởng cũng như tỉ lệ sống của chồi cây giảm sút đáng kể. Số lượng chồi trung bình trên mẫu dưới tác động của BA tốt nhất là ở nồng độ 1 mg/l. Nói chung, hệ số nhân chồi dưới tác động của BA là chưa cao, tối đa là hai chồi trên một mẫu. Như vậy, xét chung về các chỉ tiêu đã theo dõi, nghiệm thức 0,5mg/l BA tỏ ra phù hợp nhất do có tỷ lệ mẫu sống cao (88,8%) (Bảng 2).

Ảnh hưởng của hàm lượng đường và agar lên sự sinh trưởng, phát triển của chồi Thủy tùng nuôi cấy *in vitro*

Ảnh hưởng của hàm lượng đường và agar đến phát sinh số chồi trung bình mẫu Thủy tùng nuôi cấy in vitro

Môi trường không chứa aga và đường, chồi Thủy tùng *in vitro* chết sau 5 tuần nuôi cấy. Agar là một polysaccaric với nguyên tử lượng cao, nồng độ thường dùng trong nuôi cấy mô là 0,6 – 0,8 %. Nếu nồng độ agar tăng lên nó làm cho mẫu cấy khó hấp thu chất dinh dưỡng trong môi trường. Sự sinh trưởng *in vitro*

có kết quả đối nghịch nếu hàm lượng agar quá cao (Stolz, 1967). Điều này cũng phù hợp ở nghiệm thức với nồng độ đường từ 20 đến 50 g/l và nồng độ agar 16 g/l thì chồi gần như không tái sinh (Bảng 3).

Sự phát sinh chồi của Thủy tùng nuôi cấy *in vitro* không có sự khác biệt rõ rệt khi hàm lượng đường trong môi trường biến động từ 30 đến 50 g/l. Hàm lượng agar bổ sung trong môi trường có sự khác biệt ở các nghiệm thức khác nhau, nhưng nghiệm thức bổ sung 4g và 8g agar không có sự khác biệt rõ rệt.

Như vậy, số lượng chồi trung bình của cây Thủy tùng *in vitro* trong nghiệm thức khảo sát nồng độ đường và agar thể hiện ở bảng 3 cho thấy sự thay đổi nồng độ đường từ 30 đến 50 g/l và nồng độ agar biến động trong khoảng 4 đến 8 g/l là như nhau.

Ảnh hưởng của hàm lượng đường và agar lên sự phát triển chiều cao trung bình của chồi Thủy tùng nuôi cấy in vitro

Với chỉ tiêu chiều cao trung bình của mẫu, nghiệm thức bổ sung hàm lượng đường khác nhau đã thể hiện có sự khác biệt rõ rệt. Hàm lượng đường 30g/l là nghiệm thức ưu thế phát triển về chiều cao so với các nghiệm thức còn lại (Bảng 4).

Bảng 2. Ảnh hưởng của môi trường WPM và BA đến tạo cụm chồi cây Thủy tùng *in vitro*

Môi trường	Nghiệm thức BA (mg/l)	Chiều cao mẫu (cm)	Tỷ lệ mẫu sống (%)	Số lượng chồi trên mẫu
WPM	DC	0,4 d	80,00 ab	1,46 bc
	0,5	1,5 a	88,75 a	1,59 b
	1,0	1,6 a	76,67 b	2,08 a
	2,0	1,6 a	55,00 c	1,30 cd
	3,0	1,4 b	60,00 c	1,52 bc
	4,0	0,9 c	30,00 d	1,16 d
	5,0	1,1 c	31,25 d	1,40 bed
LSD (0,05)		0,1	10,04	0,28

Các giá trị trung bình trong cùng một cột có các ký tự khác nhau thì khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức P ≤ 0,005

Bảng 3. Ảnh hưởng của hàm lượng đường và agar lên sự phát sinh số chồi trung bình Thủy tùng nuôi cấy *in vitro*

Agar(g/l)	Đường(g/l)					Trung bình
	0	20	30	40	50	
0	-	-	-	-	-	0,00 c
4	-	0,91	0,93	1,28	1,03	0,83 ab
8	-	1,07	1,30	0,97	1,13	0,89 a
16	-	0,95	0,99	1,09	1,02	0,81 b
Trung bình	0,00 c	0,73 b	0,80 ab	0,83 a	0,79 ab	LSD (0,05)
LSD (0,05)			0,08			0,07

Các giá trị trung bình trong cùng một cột có các ký tự khác nhau thì khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức P ≤ 0,005

Bảng 4. Ảnh hưởng của hàm lượng đường và agar lên phát triển chiều cao trung bình của chồi Thủy tùng nuôi cấy *in vitro*

Agar(g/l)	Đường (g/l)					Trung bình
	0	20	30	40	50	
0	-	-	-	-	-	0,0 d
4	-	0,8	0,9	1,2	1,2	0,8 b
8	-	0,9	1,8	1,2	0,7	0,9 a
16	-	0,7	0,8	0,6	0,7	0,5 c
Trung bình	0,0 d	0,6 c	0,9 a	0,7 b	0,6 c	LSD (0,05)
LSD (0,05)				0,07		0,06

Các giá trị trung bình trong cùng một cột có các ký tự khác nhau thì khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức $P \leq 0,005$

Bảng 5. Ảnh hưởng của hàm lượng đường và agar đến tỷ lệ thủy tinh thể (%) của chồi Thủy tùng nuôi cấy *in vitro*

Agar (g/l)	Đường (g/l)					Trung bình
	0	20	30	40	50	
0	-	-	-	-	-	0,0 d
4	-	42,0	36,0	28,0	17,0	0,8 b
8	-	0,0	8,0	17,0	10,0	0,9 a
16	-	10,0	10,0	0,0	0,0	0,5 c
Trung bình	0,0 d	13,1 ab	13,7 a	11,5 b	6,8 c	LSD (0,05)
LSD (0,05)			1,91			1,70

Các giá trị trung bình trong cùng một cột có các ký tự khác nhau thì khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức $P \leq 0,005$

Với các nghiệm thức bổ sung agar, có sự khác biệt rõ rệt giữa các nghiệm thức, trong đó nghiệm thức bổ sung 8g/l agar khác biệt so với các nghiệm thức khác và là nghiệm thức cây Thủy tùng nuôi cấy *in vitro* phát triển tốt nhất. Như vậy, chiều cao của mẫu Thủy tùng nuôi cấy *in vitro* ở nghiệm thức môi trường nuôi cấy có 30 g/l đường và 8 g/l agar vượt trội so với các nghiệm thức khác.

**Hình 1.** Chồi Thủy tùng

Điều này cho ta thấy nếu bổ sung một lượng đường vừa đủ (30 g/l) thì cây sinh trưởng tốt nhưng với lượng đường tăng cao (50 g/l) thì mẫu cây Thủy tùng *in vitro* có chiều cao phát triển chậm lại. Vì vậy ở thí nghiệm trên môi trường nuôi cấy có 30g/l đường và 8 g/l agar được đánh giá là tối ưu.

Ảnh hưởng của hàm lượng đường và agar đến tỷ lệ thủy tinh thể của chồi Thủy tùng nuôi cấy in vitro

Ảnh hưởng của hàm lượng đường và agar đến tỷ lệ thủy tinh thể của chồi Thủy tùng nuôi cấy *in vitro* qua bảng 5 đã thể hiện có sự khác biệt rõ rệt ở các nồng độ đường và agar khác nhau. Như vậy, ngoại trừ ở môi trường không chứa aga và đường, chồi Thủy tùng chết sau 5 tuần nuôi cấy, với nghiệm thức bổ sung đường, nồng độ cho tỷ lệ thủy tinh thể thấp nhất là 50 g/l. Với nghiệm thức bổ sung agar, nồng độ 16 g/l là nồng độ cho tỷ lệ thủy tinh thể thấp nhất đối với cây Thủy tùng nuôi cấy *in vitro*.

Khảo sát ảnh hưởng của bình nuôi cấy có và không có trao đổi khí trong giai đoạn nhân nhanh chồi Thủy tùng nuôi cấy *in vitro*

Nuôi cấy với màng milipore một lớp và hai lớp có sự khác biệt về số lượng chồi trung bình/ mẫu

giữa nuôi cấy chồi đơn và cụm chồi ở cả hai kiểu có nắp đậy và màng milipore, thể hiện ở bảng 6. So với đối chứng thì việc nuôi cấy thoáng khí làm cho chồi thấp hơn về chiều cao và số lượng chồi trung bình/mẫu nhưng chồi tốt hơn với lá xanh đậm.

Nghiên cứu ảnh hưởng của IBA và NAA đến sự sinh trưởng của cây Thủy tùng *in vitro*

Trong 8 tuần nuôi cấy trong môi trường có bổ sung auxin, chồi Thủy tùng phát triển thành các

dạng calus khác nhau (thể hiện ở bảng 7 và hình 2). Đối với các loài cây thân gỗ, việc ra rễ trong môi trường *in vitro* rất khó khăn, chủ yếu thực hiện ở môi trường *ex vitro*.

Với nồng độ IBA từ 0,25 đến 0,5 mg/l (nghiệm thức R₂ và R₃) callus ra với hình dạng xốp, trắng.

Với IBA nồng độ 0,5mg/l (R₃) có xuất hiện hình dạng của rễ, với chiều dài khoảng 0,2 cm.

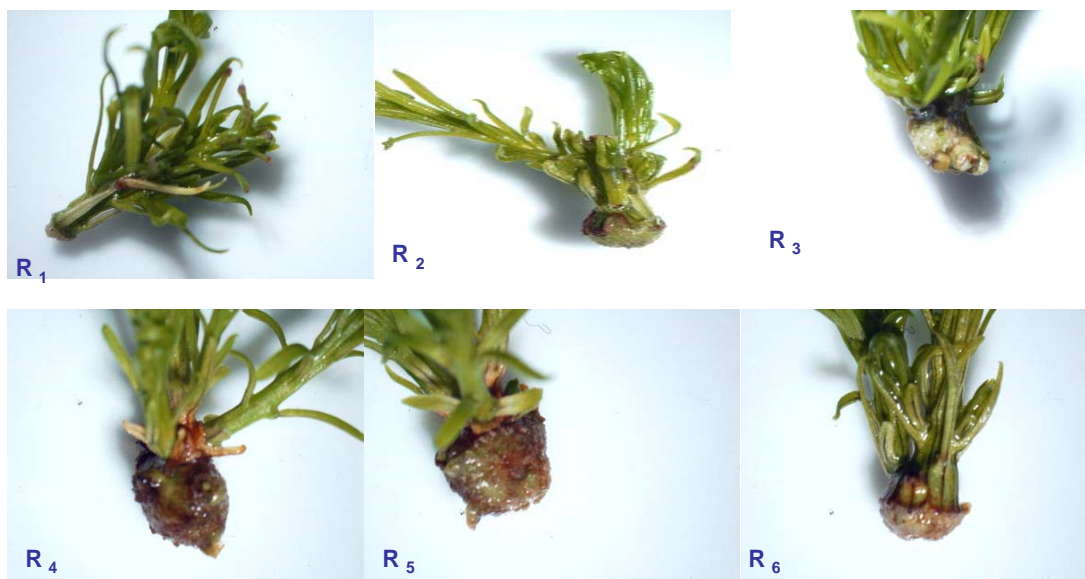
Bảng 6. Ảnh hưởng kiểu màng milipore lên khả năng sinh trưởng và phát triển của chồi Thủy tùng *in vitro*

Màng milipore	Kiểu mẫu cấy	Chiều cao trung bình chồi (cm)	Số lượng chồi TB/mẫu
ĐC	Chồi đơn	1,6 b	1,7 c
	Cụm chồi	1,7 a	2,8 a
1 lớp	Chồi đơn	-	-
	Cụm chồi	-	-
2 lớp	Chồi đơn	0,9 c	1,2 d
	Cụm chồi	0,4 d	2,3 b
LSD (0,05)		0,04	0,16

Các giá trị trung bình trong cùng một cột có các ký tự khác nhau thì khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức P ≤ 0,005

Bảng 7. Biểu hiện tại gốc chồi cây Thủy tùng *in vitro* sau khi sử dụng các nồng độ NAA và IBA sau 8 tuần nuôi cấy

Kí hiệu	Nghiệm thức		Biểu hiện tại gốc chồi nuôi cấy
	NAA (mg/l)	IBA (mg/l)	
R ₁	-	-	Callus nhỏ, xốp
R ₂	-	0,25	Callus xanh, xốp
R ₃	-	0,5	Callus trắng, xốp, có dấu hiệu ra rễ
R ₄	-	0,75	Callus có màu đỏ, xốp
R ₅	-	1,0	Callus có màu đỏ, xốp
R ₆	-	1,5	Callus có màu đỏ, xốp
R ₇	-	2,0	Callus xanh, chai cứng
R ₈	-	3,0	Callus xanh, chai cứng
R ₉	-	4,0	Callus xanh, chai cứng
R ₁₀	-	5,0	Callus xanh, chai cứng
R ₁₁	0,5	-	Callus xanh, chai cứng
R ₁₂	1,0	-	Callus có màu đỏ, xốp
R ₁₃	2,0	-	Callus có màu đỏ, xốp
R ₁₄	3,0	-	Callus có màu đỏ, xốp
R ₁₅	4,0	-	Callus có màu đỏ, xốp
R ₁₆	5,0	-	Callus xanh, chai cứng
R ₁₇	0,5	0,5	Callus xanh, xốp
R ₁₈	1,0	0,5	Callus xanh, xốp
R ₁₉	1,5	0,5	Callus xanh, xốp
R ₂₀	2,0	0,5	Callus xanh, xốp
R ₂₁	3,0	0,5	Callus có màu đỏ, xốp



Hình 2. Biểu hiện tại gốc chồi cây Thủy tùng *in vitro* khi sử dụng IBA sau 8 tuần nuôi cấy

Khi tăng nồng độ IBA lên đến từ 0,75 đến 1,5 mg/l (R4 đến R6) thì callus xuất hiện thành cục to, sần sùi có màu đỏ, khi tăng nồng độ IBA lên trên 1,5 mg/l (trên R7) thì callus xuất hiện thành từng khối lớn, màu xanh, chai cứng.

Khi sử dụng NAA trong nuôi cấy cây Thủy tùng *in vitro*, có sự hình thành callus ở cuối gốc chồi nuôi cấy. Hình dạng callus là một khối lớn chứa nước và có màu ngả đỏ nếu tăng nồng độ lên cao, callus là các cục có hình dạng xanh cứng. Trong các nghiệm thức bổ sung auxin NAA hoàn toàn không thấy xuất hiện rễ hoặc các dạng callus trắng, xốp có khả năng phát triển thành rễ.

Qua qua trình nghiên cứu, nhận thấy IBA với nồng độ 0,5 mg/l cho kết quả khả quan nhất, trên nồng độ này phần lớn callus sinh ra không có khả năng phát triển thành rễ. Chính vì vậy nghiệm thức tiếp theo là cố định nồng độ IBA ở mức 0,5 mg/l và bố trí NAA ở các mức từ 0,5 đến 3,0 mg/l.

Sau 8 tuần, các mẫu nghiên cứu xuất hiện các hình dạng callus khác nhau trong đó nghiệm thức 0,5 IBA + 0,5 NAA có nhiều khả năng phát triển thành rễ. Các nồng độ còn lại cho ra các loại callus với các dạng khác nhau, khó phát sinh thành rễ.

KẾT LUẬN

- Mẫu Thủy tùng xử lý ở nồng độ Javel 2% trong 30 phút cho kết quả tốt với tỷ lệ không nhiễm khá cao là 70%, khi tăng nồng độ lên 3% đến 4% trong thời gian 30 phút sẽ gây chết mẫu. Thời gian xử lý mẫu từ 10 đến 20 phút thì tỷ lệ nhiễm vẫn cao hơn nồng độ 2% trong 30 phút.

- So với môi trường MS, môi trường WPM phù hợp trong việc nuôi cấy mô cây Thủy tùng

- Môi trường WPM bổ sung 0,5 mg/l BA là nghiệm thức phù hợp cho việc nhân nhanh chồi cây Thủy tùng *in vitro*.

- Môi trường nuôi cấy có 30 g/l đường và 8 g/l agar là môi trường phù hợp cho sự phát triển chồi cây Thủy tùng nuôi cấy *in vitro*.

- Nuôi cấy chồi cây Thủy tùng *in vitro* với màng milipore 1 lớp nhiễm hoàn toàn sau 1 tuần nuôi cấy.

- Môi trường WPM bổ sung 0,5 mg/l IBA sau 8 tuần nuôi cấy xuất hiện callus trắng, hơi xốp có hình dạng của rễ.

- Tăng nồng độ IBA lên, xuất hiện callus có hình dạng khác nhau, nồng độ IBA lên trên 1,5 mg/l thì callus xuất hiện thành từng cục to, màu xanh, chai cứng, những loại callus này sẽ không có khả năng phát triển thành rễ.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Phạm Hoàng Hộ, 2001. *Cây cỏ Việt Nam*. NXB Trẻ.

Trần Hợp, 2002. *Tài nguyên cây gỗ Việt Nam*. NXB nông nghiệp.

Mai Xuân Lương, 2003. *Giáo trình Sinh Lý Thực Vật*. Khoa Đào tạo Sau đại học, Trường Đại học Đà Lạt.

Trần Văn Minh, 2003. *Công nghệ Sinh học Thực Vật*. Giáo trình cao học - Nghiên cứu sinh, Trường Đại học Nông Lâm Tp. HCM.

Nguyễn Hoàng Nghĩa, 1997. *Bảo tồn nguồn gen cây rừng*. NXB nông nghiệp.

Nguyễn Văn Uyển và cộng sự, 1993. *Nuôi cấy mô tế bào phục vụ công tác giống cây trồng*. NXB Nông nghiệp Hà Nội.

Farjon, Thomas, Nguyen Duc To Luu, 2005. *Glyptostrobus pensilis*. In: IUCN 2006.

IUCN Red List of Threatened Species. <http://www.iucnredlist.org/search/details.php/32312/all>

Kozai, 1991. Autotrophic micropropagation, Biotechnology in Agriculture and Forestry, High-Tech and Micropropagation I, *Bajaj YPS (ed)* 17:313-343.

Murashige, Skoog, 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant* 15: 475 - 497.