Tạp chí KHLN 4/2014 (3491 - 3498)
©: Viện KHLNVN - VAFS
ISSN: 1859 - 0373 Đăng tải tại: *www.vafs.gov.vn*

# NGHIÊN CỨU MỘT SỐ YẾU TỐ ẢNH HƯỞNG ĐẾN TỶ LỆ TẠO PHÁT SINH, NHÂN NHANH KHỐI TIỀN PHÔI VÀ TẠO PHÔI SOMA THÔNG NHỰA (*Pinus merkusii*) TRONG ĐIỀU KIỆN *IN VITRO*

**Phan Thị Mỵ Lan, Nguyễn Xuân Cường**
*Viện Khoa học Lâm nghiệp Nam Bộ*

**TÓM TẮT**

Thông nhựa (*Pinus merkisii)* là cây có giá trị kinh tế cao, mặt khác Thông nhựa còn có khả năng sinh trưởng trên đất nghèo, xấu, khô hạn. Vì vậy kỹ thuật tạo phôi soma thông qua nuôi cấy phôi non được nghiên cứu và áp dụng đã tạo được khối lượng lớn cây xanh của dòng mong muốn để cung cấp cho sản xuất. Các yếu tố ảnh hưởng đến tỷ lệ tạo phát sinh và nhân nhanh khối tiền phôi soma Thông nhựa đã được nghiên cứu. Tỷ lệ hình thành khối tiền phôi 25,3 - 40% của phôi soma đạt được khi chưa trưởng thành nuôi cấy trên môi trường LVM bổ sung 2,4D (2,0mg/l) và BA (1,0mg/l). Tỷ lệ này đã được cải thiện lên đến 37,6 - 58,3% khi thay thế BA (1,0mg/l) bằng 24 - epibrassinolide 1,0mg/l. Môi trường tối ưu nhất cho hệ số tăng sinh khối ở tất cả các dòng là LVM kết hợp với 2,4 - D (2,0mg/l + BA (1,0mg/l). Trọng lượng tươi tăng từ 2,58 đến 3,89 lần ở tuần đầu tiên sau cấy. Số phôi soma tạo thành dao động 40 đến 58,33 phôi/1g trọng lượng tươi tùy theo các dòng khi nuôi cấy trên môi trường thành thục LVM kết hợp với nồng độ ABA từ 80 - 90µM.

***Từ khóa*:** Thông nhựa, phôi soma, 24 - epibrassinolide, 2,4 - dichlorophenoxyacetic acid

**Study on some factors influencing the rate of initiation, proliferration and maturation of embryogenic tissues in *Pinus merkusii* Jung et De Vrise *in vitro***

*Pinus merkusii* is a species with high economic value, on the other hand pine has the ability to grow and thrive on poor soil, bad drought. Therefore, somatic embryogenesis techniques through immature embryos culture were studied and applied to create large volumes of flow desired trees to provide production. Factors influencing initiation and proliferation of embryonal tissues of *Pinus merkussi* were studied. Embryogenesis ratio 25.3% to 40.0% of somatic embryos were achieved when immature zygotic embryos were cultured on LVM medium supplemented with 2,4 - D 2.0mg/l and BA 1.0mg/l. Somatic embryo formation rate has been improved up to 37.6 - 58.3% when replaced BA 1.0mg/l by 24 - epibrassinolide 1.0mg/l. Optimum medium for fast coppiced in all lines was associated with LVM combined 2,4 - D (2,0mg/l) and BA (1,0mg/l), fresh weigh increased from 2.58 to 3.89 time in the first week. The number of somatic embryos 40.0 to 58.3/1g of fresh weight of embryogenic tissue depending on lines on maturation medium LVM combined with ABA from 80 to 90µM.

***Keyword*:** *Pinus merkusii*, somatic embryogenesis, 24 - epibrassinolide, 2,4 - dichlorophenoxyacetic acid

## I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Thông nhựa (*Pinus merkisii* Jung et De Vrise) là cây có giá trị công nghiệp toàn diện cả về hai mặt gỗ và nhựa. Gỗ Thông nhựa có vân đẹp, mùi thơm, sợi dài, có nhiều đặc tính cơ lý tốt, gỗ bền, chống chịu được mối mọt. Thông nhựa là loài cây có nhiều nhựa nên gỗ nặng và bền hơn gỗ Thông ba lá. Chính vì vậy, gỗ Thông nhựa không chỉ được dùng làm đồ mộc, xây dựng, nguyên liệu giấy mà nó còn được sử dụng làm tà vẹt và đồ thủ công mỹ nghệ (Lâm Công Định, 1977). Ngoài ra Thông nhựa còn có khả năng sinh trưởng và phát triển tốt trên các lập địa đất nghèo, xấu và khô hạn, do đó loài cây này luôn là loài cây phủ xanh đất trống đồi núi trọc (Viện Khoa học Lâm nghiệp, 2002).

Kỹ thuật tạo phôi soma được nghiên cứu và áp dụng nhiều để cải thiện giống cây lâm nghiệp ở các nước ôn đới trong vài thập niên gần đây. Lợi ích quan trọng nhất của kỹ thuật này là khả năng giữ các tế bào tiền phôi soma của các dòng ưu việt trong điều kiện đông khô hàng chục năm, thậm chí hàng trăm năm vẫn không ảnh hưởng đến tính di truyền của vật liệu khi được tái sinh. Việc tạo thể tiền phôi soma còn được dùng tạo cây xanh của những dòng mong muốn với khối lượng lớn trong điều kiện *in vitro* để cung cấp cho sản xuất. Mặt khác, thể tiền phôi cũng là một loại vật liệu được sử dụng kỹ thuật chuyển gene để cải thiện giống (Ellis D, 1995).

Bài báo này trình bày các kết quả nghiên cứu về ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng 2,4 - D, 24 - epibrassinolide, BA và ABA đến tỷ lệ phát sinh phôi, tỷ lệ phát sinh khối tiền phôi soma, tăng sinh khối tế bào tiền phôi và thành thục hóa khối tiền phôi. Đây mới chỉ là kết quả ban đầu trong chuỗi nghiên cứu kỹ thuật nhân giống in vitro bằng phôi soma cho Thông nhựa.

## II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Vật liệu nghiên cứu

Vật liệu nghiên cứu thí nghiệm 1 và thí nghiệm 2 là quả non của 4 dòng Thông nhựa số 29, 31, 6 và 54 do Viện Giống và Công nghệ sinh học Lâm nghiệp, Viện Khoa học Lâm nghiệp Việt Nam cung cấp. Quả thông non của 4 dòng Thông nhựa được thu hái từ cây thông sinh trưởng và phát triển tốt, sạch bệnh. Quả thông non được thu hái từ đầu tháng 6 đến cuối tháng 6/2013. Quả thông giai đoạn này có đặc điểm sau: hạt căng tròn, vỏ hạt có màu nâu cánh gián, phôi non có màu trắng đục như hạt gạo nếp.

Sau khi tạo phát sinh, lựa chọn khối nhầy trắng trong suốt được tách khỏi vật liệu và cấy chuyển sang môi trường nhân nhanh và thành thục hóa. Khối nhầy trắng có đặc điểm bao gồm hai phần rõ rệt: phần đầu chứa tế bào chất dày đặc (embryonic embryo), phần đuôi là những tế bào dây treo trong suốt (highly vacuolated suspensor) (Khối nhầy trắng nhuộm bằng dung dịch 0,05% acetocarmine và soi dưới kính hiển vi quang học) (Thí nghiệm 3 và thí nghiệm 4).

### 2.2. Phương pháp nghiên cứu

***Phương pháp xử lý mẫu***

Quả thông non sau khi thu thập, được vô trùng 5 phút trong cồn $96^0$ trong tủ cấy vi sinh. Sau đó quả được rửa 3 lần với nước cất vô trùng và phôi non được tách từ quả rồi cấy vào đĩa petri (90 × 10mm) có chứa các môi trường LVM có bổ sung L - glutamine 5000mg/l; casamino acid 500mg/l; myo - inositol 100mg/l; sucrose 20g/l, phytagel 4g/l và các chất điều hòa sinh trưởng tùy theo thí nghiệm, pH = 5,7 và được để trong buồng tối của phòng nuôi có nhiệt độ 25±2$^o$C.

***Phương pháp xử lý số liệu:*** Số liệu thu thập được xử lý và phân tích bằng phần mềm Excel và SPSS 16.0.

***Thí nghiệm 1: Ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng 2,4 - D và BA đến tỷ lệ phát sinh phôi.***

*Phương pháp nghiên cứu*: Tiến hành nghiên cứu tổ hợp 2 chất 2,4 - D và BA bổ sung vào môi trường LVM + sucrose (20g/l), phytagel 4g/l; L - glutamine 500mg/l, aminoacid (1000mg/l) được tiến hành thí nghiệm theo 4 nghiệm thức (NT) sau: NT1: ĐC 0mg/l 2,4 - D 0mg/l BA, NT2: 1mg/l 2,4 - D + 1mg/l BA, NT3: 2mg/l 2,4 - D + 2mg/l BA, NT4: 2mg/l 2,4 - D + 3mg/l BA. Thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên với 3 lần lặp mỗi lần 3 đĩa (20 phôi non/đĩa).

*Chỉ tiêu theo dõi*: Tỷ lệ phát sinh khối tiền phôi (%) (Sau 4 tuần nuôi cấy)

***Thí nghiệm 2: Ảnh hưởng của sự phối hợp 2,4 - D (2,0mg/l) với 24 - epibrassinolide đến tỷ lệ phát sinh khối tiền phôi soma.***

*Phương pháp nghiên cứu:* Thí nghiệm được thực hiện với 5 nghiệm thức với nồng độ chất điều hòa sinh trưởng thay đổi: NT1: 24 - epi (0mg/l) + 2,4 - D (2mg/l); NT2: 24 - epi (0,05mg/l) + 2,4 - D (2mg/l); NT3: 24 - epi (0,25mg/l) + 2,4 - D (2mg/l); NT4: 24 - epi (0,5mg/l) + 2,4 - D (2mg/l); NT5: 24 - epi (1,0mg/l) + 2,4 - D (2mg/l). Thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên với 3 lần lặp mỗi lần 3 đĩa (20 phôi non/đĩa).

*Chỉ tiêu theo dõi*: Tỷ lệ phát sinh khối tiền phôi (%) (Sau 4 tuần nuôi cấy)

***Thí nghiệm 3: Nghiên cứu hiệu quả của sự phối hợp 2,4 - D và BA đến tăng sinh khối tế bào tiền phôi***

*Phương pháp nghiên cứu*: Cân 150mg cụm tế bào tiền phôi đưa vào môi trường LVM lỏng, lắc nhẹ cho các cụm tế bào bị tách rời. Dùng micropipet hút các tế bào tiền phôi cho qua phễu lọc Buchner để thu tế bào lại trên giấy lọc vô trùng. Chuyển giấy lọc có chứa các tế bào sang đĩa petri chứa môi trường LVM dùng cho tăng sinh, thí nghiệm tiến hành theo 5 nghiệm thức sau: NT1: 2,4 - D (0mg/l) + BA (1,0mg/l); NT2: 2,4 - D (1,0mg/l) + BA (1,0mg/l); NT3: 2,4 - D (2,0mg/l) + BA (1,0mg/l); NT4: 2,4 - D (2,0mg/l) + BA (2,0mg/l); NT5: 2,4 - D (3,0mg/l) + BA (2,0mg/l). Thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên với 3 lần lặp lại, mỗi lần lặp 3 đĩa, 150mg/đĩa.

*Chỉ tiêu theo dõi*: Trọng lượng tăng sau 1 tuần, 2 tuần nuôi cấy (mg)

$$\text{Hệ số tăng sinh khối (lần)} = \frac{\text{Trọng lượng sau 1 tuần}}{\text{Trọng lượng ban đầu}}$$

***Thí nghiệm 4: Ảnh hưởng của nồng độ Abscisic acid (ABA) đến thành thục hóa khối tiền phôi.***

*Phương pháp nghiên cứu:* Cân 150mg cụm tế bào tiền phôi đưa vào môi trường LVM lỏng, lắc nhẹ cho các cụm tế bào bị tách rời. Dùng micropipet hút các tế bào tiền phôi đổ qua phễu lọc Buchner thu tế bào lại trên giấy lọc vô trùng. Chuyển giấy lọc có chứa các tế bào sang đĩa petri chứa môi trường nền LVM (sucrose 60g/l, phytagel 10g/l) dùng cho thành thục có bổ sung ABA các nồng độ (0, 30, 60, 80, 90, 100, 120µM). Thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên với 3 lần lặp lại, mỗi lần lặp 3 đĩa, 150mg/đĩa.

*Chỉ tiêu theo dõi*: Số phôi soma tạo thành (số phôi/1g trọng lượng tươi) (sau 12 tuần nuôi cấy).

## III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

### 3.1. Ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng 2,4 - D và BA đến tỷ lệ phát sinh phôi

Trong nuôi cấy *in vitro* các tế bào hay loại mô có nguồn gốc, xuất xứ khác nhau có những nhu cầu khác nhau về chất điều hòa sinh trưởng. Phôi non được ghi nhận là loại vật liệu thích hợp nhất cho tạo phôi soma cũng như cung cấp vật liệu cho biến nạp gene (Klimaszewska, 2000; Walter *et al.*, 2002). Vì các tế bào tiền phôi được sử dụng trong giai đoạn đang phân chia mạnh sẽ giúp khả năng biệt hóa tạo phôi soma, tạo cây hoàn chỉnh với hiệu quả cao. Hơn nữa, tiền phôi soma được tạo bởi việc nuôi cấy từng phôi non riêng lẻ nên đảm bảo tính di truyền cao.

Kết quả đánh giá hiệu quả của sự phối hợp chất điều hòa sinh trưởng 2,4 - D và BA được thể hiện tại bảng 1 và cho thấy công thức cho tỷ lệ tạo phát sinh khối tiền phôi soma cao nhất ở tất cả các dòng là môi trường LVM kết hợp với 2,0mg/l 2,4 - D + 1,0mg/l BA. Dòng có tỷ lệ tạo phát sinh khối tiền phôi cao nhất là dòng 54 với tỷ lệ 40,0% ở công thức 2,0mg/l 2,4 - D kết hợp với 1,0mg/l BA. Khi tăng nồng độ 2,4 - D và BA thì tỷ lệ tạo phát sinh khối tiền phôi giảm dần. Sự chi phối của kiểu gene có ảnh hưởng rất đáng kể trong tạo phát sinh phôi. Các dòng số 6 và 29 cho tỷ lệ phát sinh thấp hơn các dòng 54 và 31. Ghi nhận này phù hợp với công bố của Tang và cộng sự (2001) khi nuôi cấy phôi chín để tạo mô sẹo của 24 kiểu gene *Pinus taeda*. Các tác giả này ghi nhận tần số tạo phôi biến động từ 18,2 đến 77,7% tuỳ thuộc kiểu gene. Để tạo phát sinh phôi trong cấy phôi non của *Pinus thunbergii*, Maruyama và đồng tác giả (2005) đã thu được 1,1% phát sinh phôi soma trên môi trường không bổ sung auxin (2,4 - D).

**Bảng 1.** Hiệu quả của sự phối hợp 2,4D với BA đến tỷ lệ phát sinh khối tiền phôi soma

| Nghiệm thức | | Tỷ lệ phát sinh khôi tiền phôi (%) | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| 2,4 - D (mg/l) | BA (mg/l) | 29 | 31 | 54 | 6 |
| 0.0 | 1.0 | 0,0 ± 0,0 c | 0,0 ± 0,0 c | 0,0 ± 0,0 c | 0,0 ± 0,0 c |
| 1,0 | 1,0 | 20,7 ± 0,88 b | 29,3 ± 1,20 b | 32,3 ± 1,45b | 27,7 ± 0,88a |
| 2,0 | 1.0 | 25,3 ± 2,33 a | 39,0 ±2,51 a | 40,00 ± 2,64a | 28,7 ± 1,20a |
| 2,0 | 2.0 | 21,3 ± 0,88 b | 37,7 ± 1,45 a | 38,00 ±0,57a | 28,00 ± 2,08a |
| 3,0 | 2.0 | 18,7 ± 0,33 b | 35,00 ± 1,53a | 31,7 ± 1,76b | 21,00 ±1,15b |

* Môi trường: LVM, phytagel 4g/l, sucrose 20g/l.

* Sau dấu ± sai số chuẩn. Các chữ cái trong cùng một cột không cùng ký tự biểu hiện sự khác biệt rất có ý nghĩa về mặt thống kê ở mức độ 0,05.

### 3.2. Ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng 2,4 - D (2,0mg/l) và 24 - epibrassinolide (24 - epi) đến tỷ lệ phát sinh khối tiền phôi soma

24 - epibrassinolide là một lớp hóa học của Polyhydroxysteroids đã được công nhận như là một lớp thứ sáu của hormone thực vật, nó có phổ phản ứng sinh lý rộng có khả năng tạo phôi soma trong hạt trần (Laine và David, 1990). Do đó, mục đích của nghiên cứu này nhằm xác định vai trò của 24 - epi trong tạo phát sinh phôi soma.

Kết quả tại bảng 2 cho thấy khi khảo sát ảnh hưởng của sự phối hợp 2,4 - D (2,0mg/l) với 24 - epibrassinolide đến tỷ lệ phát sinh tiền phôi. Không bổ sung hay có bổ sung 24 - epibrassinolide ở nồng độ 0,05mg/l, thì tất cả

các dòng đều không cho tỷ lệ phát sinh tiền phôi. Công thức cho tỷ lệ phát sinh tiền phôi cao nhất ở tất cả các dòng là 2,4 - D (2,0mg/l) kết hợp với 1,0mg/l 24 - epibrassinolide. Dòng có tỷ lệ phát sinh phôi cao nhất là dòng 29 (58,3%), tiếp đến là dòng 54 (54,3%), dòng 6 (42,0%), thấp nhất là dòng 31 (37,7%). Khi tăng nồng độ 24 - epibrassinolide lên đến 1,5mg/l không cho tỷ lệ phát sinh ở cả 4 dòng. Theo công bố của Malabadi và đồng tác giả (2011). Các tác giả ghi nhận việc bổ sung 24 - epiBrassinosteroids 2,0µM và 9,0µM 2,4 - D đã góp phần cải thiện tạo phát sinh phôi soma của 5 kiểu gene của *Pinus caribaea* trên môi trường MSG 1/2 từ phôi trưởng thành với tỷ lệ 87% ở dòng PC05.

**Bảng 2.** Hiệu quả của sự phối hợp 2,4 - D (2,0mg/l) với 24 - epibrassinolide đến tỷ lệ phát sinh khối tiền phôi soma

| Nghiệm thức | | Tỷ lệ phát sinh khối tiền phôi (%) | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| 2,4 - D (mg/l) | 24 - epi (mg/l) | 29 | 31 | 54 | 6 |
| 2,0 | 0,0 | 0,0 ± 0,0 d | 0,0 ± 0,0 b | 0,0 ± 0,0 d | 0,0 ± 0,0 c |
| 2,0 | 0,05 | 0,0 ± 0,0 d | 0,0 ± 0,0 b | 0,0 ± 0,0 d | 0,0 ± 0,0 c |
| 2,0 | 0,25 | 4,3 ± 0,33 c | 0,0 ± 0,0 b | 8,00 ± 0,0c | 0,0 ± 0,0 c |
| 2,0 | 0,5 | 11,00 ± 1,15 b | 2,00 ± 0,0b | 21,00 ± 1,0b | 11,00 ± 1,15b |
| 2,0 | 1,0 | 58,3 ± 2,60a | 37,7 ± 1,76a | 54,3 ± 2,84a | 42,00 ±1,76a |
| 2,0 | 1,5 | 0,0 ± 0,0d | 0,0 ± 0,0 b | 0,0 ± 0,0d | 0,0 ± 0,0 c |

* Môi trường: LVM, phytagel 4g/l, sucrose 20g/l.

* Sau dấu ± sai số chuẩn. Các chữ cái trong cùng một cột không cùng ký tự biểu hiện sự khác biệt rất có ý nghĩa về mặt thống kê ở mức độ 0,05.

### 3.3. Ảnh hưởng của sự phối hợp 2,4 - D và BA đến tăng sinh khối tế bào tiền phôi

Thành phần môi trường dùng cho nhân nhanh khối tiền phôi cũng giống như giai đoạn tạo phát sinh, những chất ĐHST như auxin (2,4 - D) và cytokinin (BA) vẫn có vai trò rất quan trọng trong giai đoạn nhân nhanh khối tiền phôi (Park YS *et al.,* 2006).

**Bảng 3.** Hiệu quả của sự phối hợp 2,4 - D và BA đến tăng sinh khối tế bào tiền phôi soma

| Tên dòng | Công thức thí nghiệm | | Sau 1 tuần nuôi cấy | | Sau 2 tuần nuôi cấy | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | 2,4 - D (mg/l) | BA (mg/l) | Trọng lượng (mg) | Hệ số nhân (lần) | Trọng lượng (mg) | Hệ số nhân (lần) |
| 29 | 0,0 | 1,0 | 247,33c | 1,65 | 257,33c | 1,71 |
| | 1,0 | 1,0 | 260,33c | 1,73 | 285,00c | 1,90 |
| | 2,0 | 1,0 | 457,00a | 3,04 | 467,00a | 3,11 |
| | 2,0 | 2,0 | 342,00b | 2,27 | 356,33b | 2,37 |
| | 3,0 | 2,0 | 185d | 1,12 | 179,00d | 1,19 |
| 31 | 0,0` | 1,0 | 247,33c | 1,64 | 261,67b | 1,74 |
| | 1,0 | 1,0 | 266,33c | 1,77 | 271,00b | 1,80 |
| | 2,0 | 1,0 | 389,33a | 2,59 | 382,33a | 2,55 |
| | 2,0 | 2,0 | 337,63b | 2,25 | 356,67a | 2,37 |
| | 3,0 | 2,0 | 255,00c | 1,70 | 255,00b | 1,70 |

| Tên dòng | Công thức thí nghiệm | | Sau 1 tuần nuôi cấy | | Sau 2 tuần nuôi cấy | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | 2,4 - D (mg/l) | BA (mg/l) | Trọng lượng (mg) | Hệ số nhân (lần) | Trọng lượng (mg) | Hệ số nhân (lần) |
| 54 | 0,0 | 1,0 | 301,33bc | 2,01 | 329,00b | 2,19 |
| | 1,0 | 1,0 | 315,67bc | 2,10 | 325,67b | 2,17 |
| | 2,0 | 1,0 | 584,33a | 3,89 | 496,67a | 3,31 |
| | 2,0 | 2,0 | 392,67b | 2,62 | 396,67d | 2,64 |
| | 3,0 | 2,0 | 241,67c | 1,61 | 225,00c | 1,50 |
| 6 | 0,0` | 1,0 | 158,67d | 1,05 | 179,00c | 1,19 |
| | 1,0 | 1,0 | 212,33c | 1,42 | 208,33c | 1,39 |
| | 2,0 | 1,0 | 424,67a | 2,83 | 425,00a | 2,83 |
| | 2,0 | 2,0 | 313,00b | 2,08 | 272,33b | 1,81 |
| | 3,0 | 2,0 | 187,67c | 1,25 | 178,33c | 1,19 |

Ghi chú: Môi trường LVM. Trọng lượng ban đầu: 150mg/đĩa.

* Các chữ cái trong cùng một cột đối với từng dòng không cùng ký tự biểu hiện sự khác biệt rất có ý nghĩa về mặt thống kê ở mức độ 0,05.

Qua số liệu tại bảng 3 cho thấy các dòng khác nhau cho hệ số tăng sinh khối khác nhau. Nồng độ 2,4 - D (2,0mg/l) kết hợp với BA (1,0mg/l) đã cho hệ số tăng sinh khối cao nhất ở cả 4 dòng Thông nhựa sau 1 tuần và 2 tuần nuôi cấy, tuy nhiên khi tăng nồng độ ở cả 2,4 - D và BA lên thì hệ số tăng sinh khối có xu hướng giảm dần. Sang tuần thứ 2 trọng lượng cũng như hệ số tăng sinh khối của các tế bào trong các nghiệm thức hầu như không tăng hoặc tăng không đáng kể.

### 3.4. Ảnh hưởng của nồng độ ABA (Abscisic acid) đến thành thục hóa và tạo phôi soma

Không giống như sự phát triển của phôi trong cây hạt kín, giai đoạn phát triển sớm của phôi soma cây hạt trần cần nồng độ cao của ABA bên ngoài để chuyển sang giai đoạn phát triển sau (Lelu - Walter MA *et al.,* 2008). Abscisic acid được xem như là một "cái ngắt" có tác dụng chuyển chương trình trong quá trình phát triển phôi sang giai đoạn tạo trụ lá mầm.

Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của nồng độ ABA đến thành thục hóa và tạo phôi soma được thể hiện ở bảng 4 và cho thấy các dòng khác nhau cho tỷ lệ tạo phôi soma khác nhau. Nhiều nghiên cứu đã cho rằng chỉ 6 giờ sau khi bổ sung ABA đã ghi nhận một số thay đổi trong thể hiện gene và tổng hợp protein, đặc biệt là LEA protein (Dunstan *et al.,* 1998). Phản ứng tạo phôi thành thục khác nhau giữa các loài bị chi phối bởi kiểu gene. Giai đoạn sinh trưởng của phôi đóng vai trò quan trọng trong việc hình thành phát sinh phôi soma. Trong chi Pinus, giai đoạn cotyledon thường cho kết quả tạo phôi soma tốt hơn những giai đoạn khác (Minocha, 1995). Khi không bổ sung ABA tất cả các dòng đều không tạo ra phôi soma, khi nồng độ ABA tăng lên thì số phôi soma cũng tăng. Dòng cho số phôi cao nhất là dòng 31 (58,3 phôi/1g) tiếp đến là dòng 54 (58,00 phôi/1g) và dòng 29 (40,0 phôi/1g) ở cùng nồng độ ABA (80µM) (bảng 4). Tuy nhiên đối với dòng số 6 số phôi cao nhất (40,7 phôi/1g) ở nồng độ ABA (90µM). Harry và Thorpe (1991) cho rằng cần bổ sung ABA (40µM) (≈10,56mg/l) vào môi trường nuôi cấy để có được sự phát triển bình thường của phôi. Ngược lại Lelu và đồng tác giả (1999) lại cho rằng việc bổ sung ABA là cần thiết cho tạo phôi thành thục trên các loài quả nón.

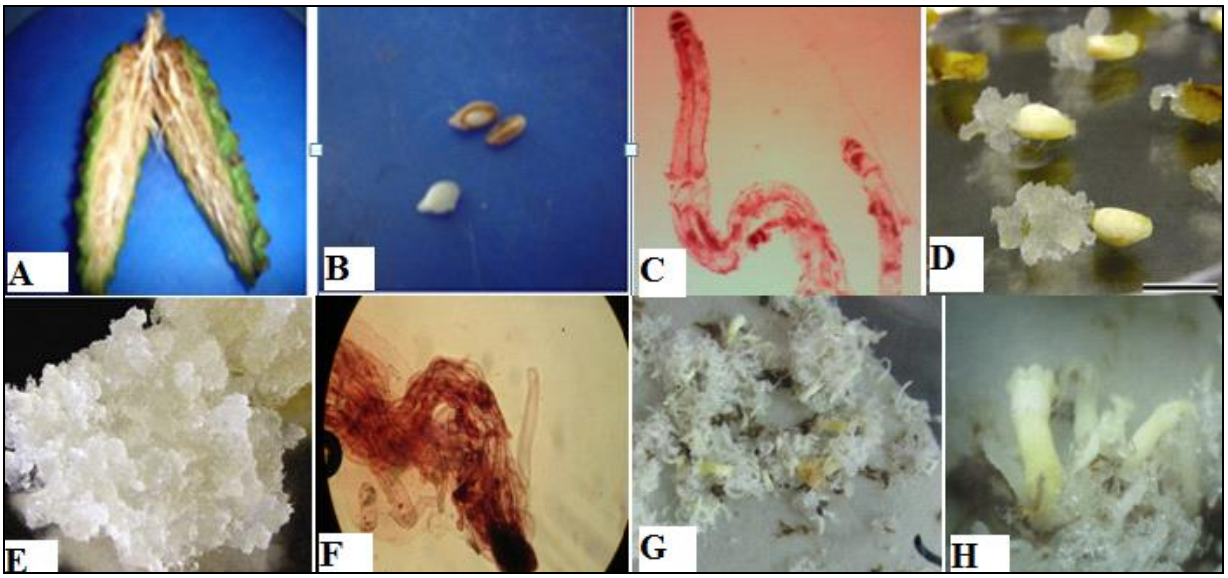
**Bảng 4.** Ảnh hưởng của nồng độ ABA đến thành thục hóa và tạo phôi soma

| Nồng độ ABA (µM) | Số phôi soma/1g trọng lượng tươi tiền phôi | | | |
|---|---|---|---|---|
| | 29 | 31 | 54 | 6 |
| 0 | 0,0 ± 0,0e | 0,0 ± 0,0f | 0,0 ± 0,0e | 0,0 ± 0,0e |
| 30 | 2,3 ± 0,33d | 3,7 ± 0,67e | 5,7 ± 0,33d | 2,3 ± 0,57e |
| 60 | 22,0 ±0,57c | 24 ± 0,577d | 20,0 ± 0,57c | 10,7 ± 0,33d |
| 80 | 40,0 ± 0,00a | 58,3 ± 0,33a | 58,0 ± 1,52a | 31,7 ± 1,2b |
| 90 | 32,0 ± 0,00b | 45,3 ± 0,88b | 33,0 ± 0,67b | 40,7 ± 0,67a |
| 100 | 22,3 ± 0,67c | 37,6 ± 0,33c | 33,3 ± 0,33b | 19,0± 0,00c |

* Sau dấu ± là sai số chuẩn, các chữ cái trong cùng một cột không cùng ký tự biểu hiện sự khác biệt rất có ý nghĩa về mặt thống kê ở mức độ 0,05.

Môi trường nền LVM + sucrose (60g/l) + phytagel (10g/l) để trong tối hoàn toàn sau 8 - 12 tuần, trọng lượng ban đầu 150mg/đĩa.

Một số hình ảnh quá trình tạo thể tiền phôi, nhân nhanh và thành thục hóa tạo phôi soma Thông nhựa thông qua nuôi cấy phôi non




*Ghi chú*: (A): Quả Thông non; (B): Hạt và phôi non; (C): Hình thái phôi non quan sát dưới kính hiển vi quang học sau khi nhuộm 0,05% acetocarmine; (D): Tiền phôi soma trên môi trường tạo phát sinh sau 4 tuần nuôi cấy; (E): Tiền phôi soma trên môi trường nhân nhanh; (F): Hình thái giải phẫu tiền phôi soma trên môi trường nhân nhanh sau khi nhuộm 0,05% acetocarmine; (G) Phôi soma hình thành sau 8 tuần nuôi cấy trên môi trường thành thục; (F): Phôi soma dưới kính hiển vi quang học

## IV. KẾT LUẬN

- Chất kích thích sinh trưởng và nồng độ có ảnh hưởng rõ rệt đến tỷ lệ tạo phát sinh khối tiền phôi Thông nhựa. Tỷ lệ tạo phát sinh cao nhất ở công thức LVM kết hợp với 2,4 - D (2,0mg/l) + 24 - epibrassinolide (1,0mg/l) cho tỷ lệ phát sinh từ 37,7% đến 58,3% tùy các dòng và cao nhất là dòng 29 cho tỷ lệ 58,3%.

- Môi trường tối ưu nhất cho hệ số tăng sinh khối ở tất cả các dòng là LVM kết hợp với |2,4 - D (2,0mg/l) + BA (1,0mg/l) trọng lượng tươi tăng từ 2,58 đến 3,89 lần ở tuần đầu tiên.

- Môi trường thích hợp nhất trong giai đoạn thành thục và tạo phôi soma là: LVM kết hợp với ABA (80µM) đối với các dòng 29, 31, 54 cho số phôi soma dao động từ 40 - 58,3 phôi/1g, dòng môi trường LVM kết hợp ABA (90µM) cho số phôi 40,7 phôi/1g.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO


1. Dunstan DI; Dong J - Z; Carrier DJ & Abrams S, 1998. Events following ABA treatment of spruce somatic embryos. In vitro Cel Dev. Biol - Plant. 34: 159 - 168.
2. Ellis D, 1995. Genetic transformation of smatic embryos. In. Bajaj YBS (ed) Biotechnology in Agriculture and Forestry Vol. 3. Somatic embryogenesis.
3. Harry IS, Thorpe TA, 1991. Somatic embryogenesis and plantlet regenration from mature zygotic embryos of red spruce. Bot Gaz. 152: 446 - 452.
4. Klimazewska.K, Cardou MB; Cyr DR and Sutton BCS, 2000. Influence of gelling agents on culture medium gel strength, water availability, tissue water potential, and maturation response in embryogenic cultures of *Pinus strobus* l. In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant 36: 279 - 286
5. Lâm Công Định, 1977. Trồng rừng thông. Nxb. Nông nghiệp Hà Nội, 223 trang
6. Lelu MA; Bastien C; Drugeault A; Gouez ML and Klimaszewska K, 1999. Somatic embryogenesis and plantlet development. I. *Pinus sylvestris* and *Pinus pinaster* on medium with and without growth regulators. Physiol. Plant. 105: 719 - 728.
7. Lelu - Walter MA, Bernier - Cardou M, Klimaszewska K, 2008. Clonal plant production from self - and cross - pollinated seed families of *Pinus sylvestris* (L.) through somatic embryogenesis. Plant Cell Tissue and Organ Culture 92: 31 - 45
8. Malabadi R. B., Teixeira da Silva J. A., Mulgund G. S., 2011. Induction of somatic embryogenesis in *Pinus Caribaea*. Tree and Forestry science and Biotechnology 5(1): 27 - 32.
9. Maruyama E, Hosoi Y, Ishii K, 2005. Propagation of Japanese red pine (Pinus densiflora Zieb. et Zucc.) via somatic embryogenesis. Propagation of Ornamental Plants 5: 199 - 204.
10. Minocha S. C. ; Minocha, R, 1995. Historical aspects of somatic embryogenesis in woody plants. In: Jain, S. M.; Gupta, P. K.; Newton, R. J., ed. Somatic embryogenesis in woody plants. Vol. 1. Dordrecht, Netherlands: Kluwer Academic Publishers: 9 - 22.
11. Tang W, Guo ZC and Ouyang F, 2001. Plant regeneration from embryogenic cultures initiated from mature Loblolly pine zygotic embryos. In Vitro Cell. Dev. Biol - Plant 37: 558 - 563.
12. Viện khoa học lâm nghiệp Việt Nam, Viện tư vấn phát triển kinh tế - xã hội nông thôn và miền núi, 2002. Kĩ thuật trồng cây làm nguyên liệu giấy, Nxb. Lao động - Xã hội, Hà Nội.
13. Park YS., Lelu MA.,Walter L. Harvengt., Trontin JF., MacEacheron I., Klimaszewska K. & Bonga JM, 2006. Initiation of somatic embryogenesis in *Pinus banksiana*, *P. strobus*, *P. pinaster*, and *P. sylvestris* at three laboratories in Canada and France. Plant Cell Tiss Organ Cult 86: 87 - 101.
14. Walter C, Charity J, Grace L, Hofig K, Moller R, Wagner A,2002. Gene technologies in *Pinus radiata* and *Picea abies*: tools for conifer iotechnology in the 21st century. Plant Cell Tissue Organ Cult 70: 3 - 12.


**Người thẩm định:** TS. Phí Hồng Hải