

## NGHIÊN CỨU TÁI SINH CÂY THÔNG NHỰA (*PINUS MERKUSII* JUNGH. & DE VRIES) THÔNG QUA PHÔI HẠT CHÍN

Đỗ Tiên Phát<sup>1</sup>, Đinh Thị Phòng<sup>1,3</sup>, Nguyễn Văn Phụng<sup>1</sup>, Chu Hoàng Hà<sup>1</sup>, Vương Đình Tuấn<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Viện Công nghệ sinh học, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam

<sup>2</sup>Phân Viện Khoa học Lâm nghiệp Nam Bộ, Viện Khoa học Lâm nghiệp Việt Nam

<sup>3</sup>Bảo tàng Thiên nhiên Việt Nam, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam

### TÓM TẮT

Sâu róm thông là loại dịch hại đặc hữu ở Đông Nam Á và là sâu hại nghiêm trọng nhất đối với cây thông nhựa (*Pinus merkusii* Jungh. & de Vries) ở Việt Nam trong những năm gần đây. Với mục đích chuyển gen kháng sâu vào cây thông nhựa, nghiên cứu này đề cập đến quy trình tái sinh đa chồi thông qua phôi hạt chín với các bước sau: Hạt chín của cây thông nhựa được khử trùng bằng cồn 70%, javen 60%, rửa lại bằng nước cất khử trùng, tách phôi và đặt lên môi trường cảm ứng tạo đa chồi (môi trường WP bổ sung 1 mg/l BAP; 2 mg/l NAA; 1 g/l casein). Sau 6 ngày cảm ứng, phôi được chuyển sang môi trường tạo đa chồi (môi trường WP bổ sung 9 mg/l BAP) và cụm chồi xuất hiện sau hai tháng nuôi cấy. Chồi được kéo dài trên môi trường WP bổ sung 0,5 mg/l NAA; 0,2 mg/l GA3; 1 g/l than hoạt tính. Các chồi đơn đạt chiều cao 2 - 3 cm được tách và cấy chuyển sang môi trường tạo rễ (WP bổ sung 0,5 mg/l IBA). Tỷ lệ tái sinh đa chồi cao nhất thu được ở gia đình thông nhựa số 54 (67,5%), hệ số nhân chồi đạt 12,5 chồi trên một phôi hạt chín. Môi trường có bổ sung 1 mg/l IBA thích hợp cho việc tạo rễ cây thông nhựa với tỷ lệ tạo rễ đạt 68,9%. Các cây *in vitro* hoàn chỉnh đã được trồng thành công trong nhà lưới tại Trại Thực nghiệm sinh học, Viện Công nghệ sinh học, Cổ Nhuế, Từ Liêm, Hà Nội.

**Từ khóa:** Cảm ứng tạo đa chồi, cụm chồi, hạt chín, phôi hạt, sâu róm thông, thông nhựa

### MỞ ĐẦU

Các loài thông thuộc chi *Pinus* là đối tượng cây lâm nghiệp được trồng phổ biến ở nhiều nước trên thế giới như Hoa Kỳ, Canada, Chile, New Zealand, Úc, Nam Phi, Tây Ban Nha... (Francisca *et al.*, 2002; Jean *et al.*, 2002; Tere *et al.*, 2005). Ở nước ta, cây thông đóng vai trò quan trọng trong cơ cấu cây rừng. Diện tích trồng thông chiếm tỷ lệ cao nhất trong tổng diện tích rừng trồng ở nước ta. Đây là loại cây có khả năng sinh trưởng trên điều kiện đất đai thoái hóa, nghèo dinh dưỡng và trong điều kiện lập địa xấu (Francisca *et al.*, 2002). Ngoài tác dụng phủ xanh đất trống đồi trọc, phục hồi cảnh quan, chắn gió, làm sạch môi trường, thông còn cung cấp gỗ và nhựa phục vụ cho công nghiệp. Hai thành phần chính của nhựa thông là tinh dầu thông (turpentine) và tùng hương (colophony) được sử dụng rộng rãi trong công nghiệp chế biến sơn, mỹ phẩm, hóa chất tẩy rửa... Trong số các loài thông đang được trồng ở nước ta, thông nhựa (*Pinus Merkusii* Jungh. & de Vries) là loài có giá trị kinh tế cao và được trồng với diện tích lớn nhất (Nguyễn Hoàng Nghĩa, 2008).

Một trong những trở ngại lớn cho công tác trồng rừng thông là sâu róm. Các biện pháp kỹ thuật canh

tác, sinh học đã được áp dụng trong phòng chống sâu róm nhưng rất hạn chế. Biện pháp hóa học được sử dụng khi dịch bùng phát mạnh song rất khó thực hiện bởi chiều cao và sức sinh sản nhanh của sâu hại. Ngoài ra, nó còn tiềm ẩn các nguy cơ về môi trường sinh thái. Tuy nhiên, việc tạo giống cây thông kháng sâu bằng phương pháp truyền thống hầu như không có hiệu quả. Công nghệ gen là một trong những giải pháp tạo ra những bước đột phá về năng suất, chất lượng cũng như tính chống chịu với điều kiện bất lợi. Cho đến nay, đã có nhiều công bố thành công về chuyển gen thông qua vi khuẩn *Agrobacterium* ở một số loài thông như *Pinus taeda*, *Pinus roxburghii*, *Pinus omorika* và *Pinus radiata* (Parasharami *et al.*, 2006; Francisca *et al.*, 2002).

Xuất phát từ yêu cầu trên nghiên cứu này trình bày kết quả “Nghiên cứu tái sinh cây thông nhựa (*Pinus merkusii* Jungh. & de Vries) thông qua phôi hạt chín” làm cơ sở cho nghiên cứu tạo cây thông nhựa kháng sâu bằng phương pháp chuyển gen.

### VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

#### Nguyên liệu thực vật

Hạt chín của 6 gia đình thông nhựa có mã số

kí hiệu: số 2, số 6, số 29, số 31, số 44 và số 54. Các gia đình thông nhựa được chọn lọc với các ưu điểm sinh trưởng nhanh, sản lượng nhựa cao...do Trung tâm Nghiên cứu giống cây rừng, Viện Khoa học Lâm nghiệp Việt Nam cung cấp.

## Phương pháp nghiên cứu

### Tạo vật liệu nuôi cấy

Hạt chín của 6 gia đình thông nhựa được tách bỏ lớp vỏ gỗ, khử trùng bề mặt bằng cồn 70% trong 1 phút, rửa lại bằng nước cất khử trùng, khử trùng bằng javen 60% bổ sung Tween 20 trong 15 phút, rửa lại nhiều lần bằng nước cất khử trùng, thấm khô hạt bằng giấy thấm khử trùng. Sử dụng panh, dao, kéo vô trùng tách phôi hạt khỏi nội nhũ làm nguyên liệu cho các thí nghiệm tiếp theo.

### Cầm ứng và tạo đa chồi

Phôi hạt được đặt trên môi trường cầm ứng tạo đa chồi có bổ sung NAA, BAP, casein giúp kích thích quá trình phân chia của phôi, thành phần ghi rõ ở bảng 1 và được ký hiệu là (WPI). Yếu tố thí nghiệm được quan tâm là thời gian cầm ứng với các mức khác nhau 2, 4, 6 và 8 ngày. Sau thời gian cầm ứng, phôi hạt được cấy chuyển sang môi trường tạo đa chồi ký hiệu SPi (Bảng 1).

### Kéo dài chồi và tạo rễ

Các cụm chồi hoàn chỉnh được chuyển sang môi trường kéo dài chồi WGP. Các chồi đơn có chiều cao 1 - 2 cm trên các cụm chồi được tách và cấy lên môi trường tạo rễ PR1- PR5 (Bảng 1). Cây thông nhựa *in vitro* có bộ rễ hoàn chỉnh được đưa ra trồng trong giá thể và chăm sóc trong điều kiện nhà lưới. Thành phần các môi trường nuôi cấy trong nghiên cứu như trong bảng 1.

**Bảng 1.** Các loại môi trường sử dụng trong tái sinh cây thông nhựa.

Môi trường	Thành phần
Cầm ứng tạo đa chồi (WPI)	WP* + BAP ( 1 mg/l) + NAA (2 mg/l) + 1 g/l casein + 50 g/l sucrose + 9 g/l agar, pH 5,8
Môi trường tạo đa chồi (SPi)	WP* + BAP (5 - 13 mg/l) + 30 g/l sucrose + 9 g/l agar, pH 5,8
Kéo dài chồi (WGP)	WP* + 0,5 mg/l NAA + 0,2 mg /l GA3 + 2 g/l than hoạt tính + 30 g/l sucrose + 9 g/l agar, pH 5,8
Tạo rễ (PR1- PR5)	MS* + NAA (0 - 1,5 mg/l) 30 g/l sucrose + 9 g/l agar, pH 5,8

**Ghi chú:** WP\*: Môi trường cơ bản của Mc Cown và Llyod (1981).

## KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### Tái sinh cụm chồi từ phôi hạt chín

Trong các kết quả về tái sinh đa chồi cũng như phôi soma đối với cây thông đã được công bố trong thời gian gần đây, nguyên liệu được sử dụng cho tái sinh gồm có cây mầm, phôi hạt chín, lá mầm và phôi hạt chưa chín (Jean *et al.*, 2002; Tuija *et al.*, 2003; Emilio *et al.*, 2005). Tuy nhiên, các kết quả thành công trong chuyển gen, nguyên liệu được sử dụng chủ yếu là phôi hạt chín (Francisca *et al.*, 2002).

Để làm cơ sở cho việc nghiên cứu khả năng tái sinh của 6 gia đình thông nhựa trội đã được lựa chọn, trong nghiên cứu này, chúng tôi cũng sử dụng nguyên liệu là hạt hỗn hợp của cả 6 gia đình cây thông nhựa. Phôi được tách từ hạt chín và đặt lên môi trường cầm ứng tạo đa chồi trong 5 - 7 ngày.

Sau thời gian cầm ứng, mẫu vật được chuyển lên môi trường tạo đa chồi (PN1-PN5) với việc bổ sung chất điều tiết sinh trưởng BAP nồng độ từ 5 mg/l đến 13 mg/l (Bảng 2). Kết quả bảng 2 cho thấy, các nồng độ BAP sử dụng khác nhau không chỉ ảnh hưởng tới tỷ lệ tạo đa chồi mà còn ảnh hưởng tới khả năng mô sẹo hóa mẫu cấy và tỷ lệ mẫu chết. Tỷ lệ mẫu tạo đa chồi tăng dần theo chiều tăng nồng độ BAP từ PN1 tới PN3 (6,8 - 53,6%). Tuy nhiên, khi tiếp tục tăng nồng độ của BAP, khả năng tạo đa chồi có xu hướng giảm xuống ở PN5 (17,9%) nguyên nhân do tỷ lệ mẫu chết tăng mạnh.

Tỷ lệ phôi bị mô sẹo hóa giảm dần theo chiều tăng nồng độ BAP, dao động từ 3,8% (PN5) đến 84,6% (ĐC). Tương tự, tỷ lệ mẫu tạo đơn chồi cũng giảm dần theo chiều tăng nồng độ của chất điều tiết sinh trưởng. Như vậy, việc bổ sung BAP làm giảm khả năng phát sinh mô sẹo, kích thích việc hình

thành chồi bất định trong nuôi cấy *in vitro* cây thông nhựa. Tuy nhiên, khi các mẫu cây được chuyển từ môi trường cảm ứng tạo đa chồi (WPI) sang môi trường tạo đa chồi (PN), lượng mẫu chết tăng dần theo nồng độ BAP, đó là do tác động đột ngột của môi trường nuôi cấy với mẫu vật. Ngoài ra, trong nghiên cứu này chúng tôi quan sát thấy, các mẫu có

thời gian cảm ứng khác nhau có mức độ mô sẹo hóa khác nhau và đây là yếu tố chúng tôi cần quan tâm để nâng cao hiệu quả tạo đa chồi.

Căn cứ vào hiệu quả tạo đa chồi của các công thức khác nhau, chúng tôi lựa chọn môi trường tái sinh đa chồi có bổ sung 11 mg/l BAP làm cơ sở cho các thí nghiệm tiếp theo.

**Bảng 2.** Ảnh hưởng của BAP tới việc tạo đa chồi từ hạt hỗn hợp của 6 gia đình cây thông nhựa.

Ký hiệu công thức	BAP (mg/l)	Tỷ lệ tạo mô sẹo (%)	Tỷ lệ mẫu tạo chồi đơn (%)	Tỷ lệ mẫu tạo đa chồi (%)
ĐC	0	84,2	12,5	0
PN1	5	54,5	18,2	6,8
PN2	7	52,3	13,1	21,5
PN3	9	15,9	10,1	53,6
PN4	11	5,1	6,8	48,8
PN5	13	3,8	2,6	17,9

### Ảnh hưởng của thời gian cảm ứng tới kết quả tạo đa chồi

Trong nghiên cứu của Jean và đồng tác giả (2002), Xiaofei và đồng tác giả (2005), chỉ ra rằng, kích thước hay tuổi của mẫu vật có ảnh hưởng trực tiếp tới khả năng tái sinh và chuyển gen vào cây thông. Bên cạnh đó, thời gian cảm ứng ảnh hưởng trực tiếp tới kích thước mẫu cấy, thời gian cảm ứng càng dài kích thước mẫu càng lớn. Kết quả ở thí nghiệm trên đã cho thấy thời gian cảm ứng có tác động tới khả năng mô sẹo hóa và tái sinh chồi. Do vậy, nhằm nâng cao hiệu quả tái sinh đa chồi cây thông nhựa, trong nghiên cứu này, yếu tố thí nghiệm được quan tâm là ảnh hưởng của thời gian cảm ứng tới hiệu quả tái sinh chồi. Vật liệu sử dụng là hạt hỗn hợp của cây thông nhựa, ngưỡng thời gian cảm ứng được bố trí dao động từ 2 - 8 ngày, kết quả thu được thể hiện qua tỷ lệ tạo đa chồi, đơn chồi và tỷ lệ mẫu mô sẹo hóa (Bảng 3).

Kết quả nghiên cứu cho thấy, giai đoạn cảm ứng

có vai trò quan trọng tới hiệu quả tái sinh chồi trực tiếp từ phôi hạt chín. Thể hiện rất rõ ở công thức đối chứng, phôi sau khi tách không qua giai đoạn cảm ứng đặt trực tiếp lên môi trường tạo đa chồi, tỷ lệ mẫu chết cao (42,5%). Ngoài ra, tỷ lệ mẫu chết giảm dần theo chiều tăng của thời gian cảm ứng. Trong giai đoạn cảm ứng các tế bào phân chia mạnh, phôi tăng nhanh về kích thước đồng thời xuất hiện hiện tượng mô sẹo hóa mẫu cấy. Tỷ lệ mô sẹo hóa mẫu cấy tăng lên khi thời gian cảm ứng tăng, dao động từ 12,5% (2 ngày) tới 72,3% (8 ngày). Thời gian cảm ứng cũng đóng vai trò quan trọng tới việc hình thành đa chồi trong nuôi cấy cây thông nhựa. Cụ thể, lượng mẫu tạo đơn chồi giảm dần khi tăng thời gian cảm ứng và tỷ lệ mẫu tạo đa chồi tăng lên. Tuy nhiên, khi thời gian cảm ứng quá dài (8 ngày), tỷ lệ tạo đa chồi giảm mạnh do lượng mẫu bị mô sẹo hóa tăng cao. Mức thời gian cảm ứng 6 ngày đem lại hiệu quả tạo đa chồi cao nhất (59,7%) và tỷ lệ mẫu chết thấp (9,7%), đây là mức thời gian thích hợp được chúng tôi áp dụng trong các thí nghiệm tái sinh tiếp theo.

**Bảng 3.** Thời gian cảm ứng và hiệu quả tạo đa chồi từ hạt hỗn hợp của 6 gia đình cây thông nhựa.

Thời gian cảm ứng (ngày)	Tỷ lệ mẫu tạo đa chồi (%)	Tỷ lệ mô sẹo hóa (%)	Tỷ lệ mẫu tạo đơn chồi (%)	Tỷ lệ mẫu chết (%)
ĐC	0,0	0,0	57,4	42,5
2	7,6	12,5	48,5	31,4
4	42,5	28,3	11,3	17,9
6	59,7	30,6	0,0	9,7
8	19,5	72,3	0,0	8,2

**Ghi chú:** ĐC: Phôi sau khi tách đặt ngay lên môi trường tạo đa chồi không qua thời gian cảm ứng.

## Hiệu quả tạo đa chồi của 6 gia đình cây thông nhựa

Theo các nghiên cứu đã công bố, các loài thông khác nhau ảnh hưởng khá rõ nét tới hiệu quả tái sinh và chuyển gen (Christian *et al.*, 2002). Trên cơ sở 6 gia đình thông nhựa được Trung tâm Nghiên cứu giống cây rừng, Viện Khoa học Lâm nghiệp Việt Nam cung cấp, mục đích của nghiên cứu này nhằm lựa chọn được gia đình thông nhựa có hiệu quả tái sinh tốt nhất để phục vụ cho các thí nghiệm chuyển gen ở giai đoạn sau (Bảng 4).

Phôi hạt chín của 6 gia đình thông nhựa được cấy lên các môi trường tối ưu cho việc tạo đa chồi (đã lựa chọn trong các thí nghiệm trên). Các chỉ tiêu được quan tâm ở đây là tỷ lệ tạo đa chồi và số chồi trung bình trên một mẫu. Kết quả cho thấy, tỷ lệ tạo đa chồi của 6 gia đình thông nhựa dao động từ 13,9 - 67,5%, cao nhất là gia đình TN54 và thấp nhất là gia đình TN29.

Hầu hết các gia đình thông nhựa đều cho tỷ lệ tái sinh thấp (dưới 50%) ngoại trừ gia đình thông nhựa số 54 (TN54). Số chồi trung bình thu được cũng có khác biệt giữa các gia đình thông nhựa khác nhau, dao động từ 6,2 - 12,5 chồi/phôi. Trong thí nghiệm này, ngoài việc tạo đa chồi và đơn chồi cũng xuất hiện các mẫu mô sẹo hóa và hiện tượng mẫu chết. Với tỷ lệ tạo đa chồi và số chồi trung bình cao nhất, gia đình thông nhựa số 54 (TN54) được lựa chọn để làm nguyên liệu nghiên cứu trong các thí nghiệm chuyển gen.

**Bảng 4.** Hiệu quả tái sinh *in vitro* của 6 gia đình cây thông nhựa.

Tên gia đình thông	Tổng số mẫu	Tỷ lệ tạo đa chồi (%)	Tỷ lệ tạo đơn chồi (%)	Số chồi TB
TN6	180	36,1	30,0	8,3
TN2	180	42,2	19,6	10,8
TN31	180	38,3	20,0	8,5
TN44	180	41,7	25,5	7,8
TN54	180	67,5	18,2	12,5
TN29	180	13,9	23,0	6,2

**Bảng 5.** Nồng độ NAA và hiệu quả tạo rễ cây thông nhựa số 54 (TN54).

Công thức	NAA (mg/l)	Tỷ lệ tạo rễ (%)	Số rễ trung bình	Ngày bắt đầu ra rễ	Chất lượng rễ
ĐC	0	0,0	-	-	-
PR1	0,2	24,2	2,0	48	++
PR2	0,5	41,0	3,0	43	++
PR3	1	49,7	3,0	43	+
PR4	1,5	30,4	4,2	40	+

**Ghi chú:** ++: Rễ ngắn, nhỏ, mô sẹo phát sinh ít; +: Rễ phình to, mô sẹo hình thành nhiều.

## Tạo rễ cây thông nhựa nuôi cấy *in vitro*

Trong nghiên cứu Konstantin và đồng tác giả (2003), tác giả đã sử dụng hai chất điều tiết sinh trưởng là NAA và IBA bổ sung vào môi trường nuôi cấy nhằm kích việc tạo rễ cho cây thông nuôi cấy *in vitro* (loài *Pinus radiata*). Trong nghiên cứu này, chúng tôi thử nghiệm tác động riêng rẽ của hai chất này tới hiệu quả tạo rễ của cây thông nhựa.

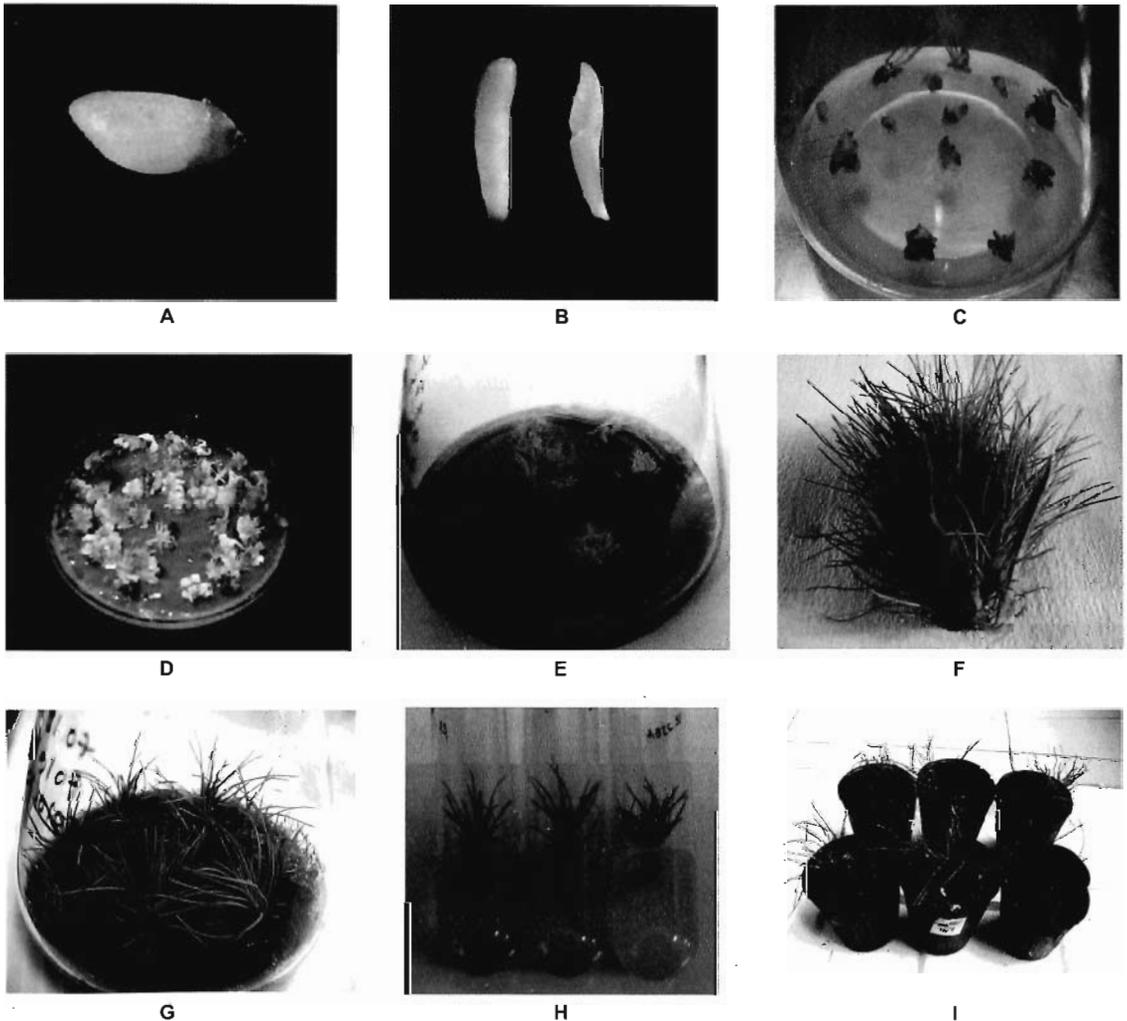
### Vai trò của NAA tới hiệu quả tạo rễ

Francisco và đồng tác giả (1997) đã bổ sung NAA vào môi trường nhằm kích thích tạo rễ với cây thông nuôi cấy *in vitro*. Kết quả nghiên cứu cũng chỉ ra rằng việc bổ sung NAA ở nồng độ cao có thể gây ra hiện tượng mô sẹo hóa phần gốc mẫu cấy gây khó khăn cho việc ra cây. Trong nghiên cứu này, chúng tôi bổ sung vào môi trường tạo rễ nồng độ NAA dao động từ 0,2 - 1,5 mg/l nhằm tìm ra nồng độ phù hợp cho việc ra rễ cây thông nhựa. Kết quả bảng 5 cho thấy, tỷ lệ cây thông nhựa ra rễ dao động từ 24,2 - 49,7%, tăng dần từ nồng độ 0,2 mg/l - 1 mg/l NAA. Ở công thức PR4 (1,5 mg/l NAA), tỷ lệ cây tạo rễ giảm xuống còn 30,4%, nguyên nhân chủ yếu do việc hình thành khối mô sẹo lớn ở phần gốc đã ức chế việc hình thành rễ. Bên cạnh đó, số rễ trung bình có chiều hướng tăng lên theo chiều tăng nồng độ NAA đồng thời thời gian xuất hiện rễ ngắn hơn. Tuy nhiên, chất lượng rễ cây thông nhựa tạo được trên các môi trường bổ sung NAA có chất lượng kém, rễ phình to, đen, khả năng kéo dài chậm và thường hình thành các mô sẹo ở phần sát gốc thân.

**Bảng 6.** Nồng độ IBA và hiệu quả tạo rễ cây thông nhựa số 54 (TN54).

Công thức	IBA (mg/l)	Tỷ lệ tạo rễ (%)	Số rễ trung bình	Ngày bắt đầu ra rễ	Chất lượng rễ
ĐC	0	0,0	-	-	-
PR5	0,2	44,4	1	40	++
PR6	0,5	55,6	1	38	+++
PR7	1	68,9	1	36	+++
PR8	1,5	48,5	1	36	+

**Ghi chú:** +: Rễ phình to, đen; ++: Rễ ngắn, mảnh, ít phân nhánh; +++: Rễ phát triển nhanh, dài, màu trắng, phân nhiều rễ cấp 1.



**Hình 1.** Các bước tái sinh cây thông nhựa từ phôi hạt chín. **A.** Hạt thông sau khử trùng tách vỏ; **B.** Phôi thông được tách từ hạt chín; **C.** Phôi thông trên môi trường cảm ứng tạo đa chồi; **D.** Cụm chồi hình thành trên môi trường tạo đa chồi; **E.** Cụm chồi phát triển trên môi trường kéo dài chồi; **F.** Cụm chồi hoàn chỉnh; **G.** Chồi đơn phát triển trên môi trường kéo dài; **H.** Cây hoàn chỉnh trên môi trường tạo rễ; **I.** Cây thông nhựa đang phát triển trên giá thể (cát vàng - trấu hun tỷ lệ 1:1) 4 tuần.

## Vai trò của IBA đến hiệu quả tạo rễ

IBA là nhóm chất điều tiết sinh trưởng được sử dụng nhiều trong nuôi cấy *in vitro* cây thông. Nhằm so sánh hiệu quả tạo rễ với NAA, trong nghiên cứu này nồng độ IBA cũng được bố trí dao động từ 0,2 - 1,5 mg/l môi trường nuôi cấy (Bảng 6).

Tỷ lệ cây thông nhựa ra rễ trên môi trường bổ sung IBA dao động từ 44,4 - 68,9%, cao nhất là PR7 (1 mg/l) và thấp nhất PR5 (0,2 mg/l). Thời gian bắt đầu xuất hiện rễ cũng giảm dần theo chiều tăng nồng độ IBA (từ 36 - 40 ngày), tuy nhiên ở tất cả các công thức đều thu được số rễ trung bình trên một mẫu cấy là một rễ. Tính ưu việt của IBA thể hiện rất rõ ở chất lượng rễ cây thông tái sinh *in vitro*, rễ thu được mảnh, khả năng kéo dài nhanh, rễ trắng và phân nhiều rễ cấp 1. Ở tất cả các công thức không xuất hiện mô sẹo hóa ở phần gốc mẫu cấy.

Như vậy, sử dụng IBA trong việc tạo rễ cây thông nhựa (*Pinus merkusii*) nuôi cấy *in vitro* đem lại hiệu quả cao hơn so với NAA cả về tỷ lệ cây tạo rễ và chất lượng rễ. Nồng độ thích hợp được sử dụng trong tạo rễ là 1 mg/l môi trường, kết quả này cũng phù hợp với nghiên cứu của Jean và đồng tác giả (2002).

## KẾT LUẬN

Đã nghiên cứu thành công hệ thống tái sinh cây *in vitro* từ phôi hạt chín đối với 6 gia đình thông nhựa (số 2, số 6, số 29, số 31, số 44 và số 54) với tỷ lệ tái sinh đa chồi dao động từ 13,9 % (gia đình thông nhựa số 29) đến 67,5 % (gia đình thông nhựa số 54).

Với tỷ lệ tạo đa chồi và số chồi trung bình đạt cao nhất, gia đình thông nhựa số 54 (TN54) sẽ được lựa chọn để làm nguyên liệu trong các thí nghiệm chuyển gen. Điều kiện tái sinh chồi của gia đình này như sau: thời gian cảm ứng thích hợp là 6 ngày trên môi trường WPI. Nồng độ BAP thích hợp cho tạo đa chồi là 9 mg/l và nồng độ IBA tối ưu cho ra rễ là 1 mg/l. Hệ số nhân chồi đạt 12,5 chồi/mẫu nuôi cấy, tỷ lệ cây tạo rễ là 68,9%. Các cây tái sinh hoàn chỉnh đã phát triển tốt trong điều kiện nhà lưới trên giá thể cát vàng - trấu hun tỷ lệ 1:1

**Lời cảm ơn:** Công trình này được hoàn thành trong khuôn khổ đề tài cấp nhà nước "Nghiên cứu ứng dụng công nghệ gen để tạo cây thông có khả năng

chống chịu cao với sâu róm" giai đoạn 2006 - 2010.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Christian W, Julia C, Lynette G, Kai H, Ralf M, Armin W (2002) Gene technologies in *Pinus radiata* and *Picea abies*: tools for conifer biotechnology in the 21st century. *Plant Cell Tiss Org Cult* 70: 3-12.
- Emilio M, Yoshihisa H, Katsuaki I (2005) Somatic embryo production and plant regeneration of Japanese black pine (*Pinus thunbergii*). *Forest Research* 10: 403-407.
- Francisca C, Felipe A, Marlene G, Consuelo M, Patricio AJ (2002) Stable transformation of *Pinus radiata* embryogenic tissue by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell Tiss Org Cult* 70: 251-257.
- Francisco S, William SD, Jeffrey KD, Trevor AT (1997) *In vitro* regeneration of plantlets from mature embryos of *Pinus ayacahuite*. *Tree Physiol* 17: 787-796.
- Jean HG, Yuanxiang Z, Veeraragavan P, Maria EM, Ronald JN (2002) Transformation and regeneration of loblolly pine: shoot apex inoculation with *Agrobacterium*. *Mol Breed* 10: 131-141.
- Konstantin AS, Roman VM, Sergey VD (2003) Plantlet regeneration from subculturable nodular callus of *Pinus radiata*. *Plant Cell Tiss Org Cult* 72: 139-146.
- McCown BH, Lloyd C (1981) Woody plant medium (WPM) A revised mineral nutrient formulation for microculture of woody plant species. *Hortsci* 16: 453.
- Nguyễn Hoàng Nghĩa (2008) *Pinus merkusii* Jungh et de Vriese. *Asia Pacific Forest Genetic Resources Programme* [www.apforgen.org](http://www.apforgen.org)
- Pařasharami VA, Naik VB, Arnold VS, Nadgauda RS, Clapham DH (2006) Stable transformation of mature zygotic embryos and regeneration of transgenic plants of chir pine (*Pinus roxburghii* Sarg.). *Plant Cell Rep* 24: 708-714.
- Tere ZS, Jana MK, Laurence GN, Ja NS (2005) Stable transformation of embryogenic tissues of *Pinus nigra* Am. using a biolistic method. *Biotechnol Lett* 27: 899-903.
- Tuija SA, Teijo ON, Hely MH (2003) The production of transgenic Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) via the application of transformed pollen in controlled crossings. *Transgenic Res* 12: 375-378.
- Xiaofei L, Wenbo Z, Katsuaki T, Susumu T, Kanji O, Hiroyoshi T (2005) Stable genetic transformation of *Larix gmelinii* L. by particle bombardment of zygotic embryos. *Plant Cell Rep* 24: 418-425.

## PLANT REGENERATION FROM MATURE SEED'S EMBRYO OF *PINUS MERKUSII* JUNGH. JUNGH VRIES

Do Tien Phat<sup>1</sup>, Dinh Thi Phong<sup>1,3\*</sup>, Nguyen Van Phuong<sup>1</sup>, Chu Hoang Ha<sup>1</sup>, Vuong Dinh Tuan<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Institute of Biotechnology, Vietnam Academy of Science and Technology

<sup>2</sup>South Vietnam Forest Science sub-Institute, Forest Science Institute of Vietnam

<sup>3</sup>Vietnam National Museum of Nature, Vietnam Academy of Science and Technology

### SUMMARY

*Dendrolimus punctatus* (Walker) is endemic to Southeast Asia and has been the most serious damaging insect on *Pinus merkusii* Jungh. & de Vries species of Vietnam in recent years. In an attempt to develop transgenic *Pinus merkusii* Jungh. & de Vries plant with insect resistant gene, a protocol for plant generation from embryos of the plant was carried out. The multi-shoot induction protocol includes several steps: The mature seed, at first, was surface-sterilized in 70% ethanol (v/v), followed by 60% Javen (v/v) and few washes with sterile distilled water. The embryos were aseptically removed from sterilized mature seeds and placed horizontally on the shoot induction medium (WP medium supplemented with 1 mg l<sup>-1</sup> BAP, 2 mg l<sup>-1</sup> NAA, 1 mg l<sup>-1</sup> casein hydrolysate). After 6 days, explants were transferred to the multi-shoot medium (WP medium supplemented with 9 mg l<sup>-1</sup> BAP). Multi-shoots were transferred into shoot-elongation medium consisted of WP medium supplemented with 0.5 mg l<sup>-1</sup> NAA, 0.2 mg l<sup>-1</sup> GA3, 1 mg l<sup>-1</sup> activated charcoal. For rooting, 2 - 3 cm long shoots were cultivated on the root induction medium containing 0.5 mg l<sup>-1</sup> IBA. The highest frequency of plant regeneration was up to 67.5%. The average efficiency for regeneration was 12.5 regenerated shoots per embryo. The frequency of rooted plant was 68.9%. Rooted plants successfully transferred into the soil in greenhouse.

**Keywords:** *Dendrolimus punctatus* (Walker), embryo, mature seed, multi-shoot induction, shoot-tuft, *Pinus merkusii* Jungh. & de Vries