

TẠO CÂY THÔNG NƯỚC - *Glyptostrobus pensilis* (Staunton ex D. Don) K. Koch HOÀN CHỈNH TỪ CHỒI NHÂN IN VITRO

Nguyễn Đức Thành*, Đặng Thị Minh Lụa, Quách Thị Liên

Viện Công nghệ sinh học, (*)nguyenducthanh_pcg@ibt.ac.vn

TÓM TẮT: Thông nước (*Glyptostrobus pensilis*) là loài cây có tên trong Sách Đỏ Việt Nam và Danh lục Đỏ IUCN với cấp độ CR (rất nguy cấp). Ở Việt Nam, có khoảng 300 cá thể thông nước, phân bố chủ yếu ở rừng đặc rụng Eural thuộc huyện EaH'Leo và khu bảo tồn thiên nhiên Tráp Ksor, Krông Năng. Thông nước không những có giá trị về mặt khoa học mà nó còn có giá trị về mặt kinh tế. Vì thế, việc nghiên cứu bảo tồn và phát triển loài cây này là hết sức cấp bách. Những nỗ lực nghiên cứu tái sinh loài cây này bằng hạt đều không có kết quả. Vì vậy, nhân giống vô tính (giâm cành, ghép, cấy mô) có thể là giải pháp cho nhân nhanh cây thông nước. Mặc dù đã có một số công bố về nhân giống thông nước bằng cấy mô tế bào nhưng kết quả vẫn còn hạn chế, đặc biệt là việc tạo cây hoàn chỉnh. Trong bài này, chúng tôi công bố kết quả nhân và tạo cây thông nước hoàn chỉnh trong điều kiện in vitro và đưa ra môi trường đất. Môi trường WP với 0,5 mg/l BAP; 0,2 mg/l NAA; 0,2 g/l myo-inositol; 20 g/l đường sucrose; 2 g/l than hoạt tính và 8 g/l thạch là môi trường phù hợp cho nhân chồi thông nước in vitro. Môi trường WP với 0,2 mg/l IBA hoặc NAA cho cảm ứng ra rễ từ chồi thông nước in vitro. Tuy nhiên, tỷ lệ ra rễ còn thấp. Tiền xử lý chồi thông nước in vitro với hàm lượng IBA cao đã gia tăng tỷ lệ ra rễ ở các chồi, tỷ lệ đạt 5,55%. Những kết quả nhận được sẽ đóng góp vào nghiên cứu bảo tồn và phát triển loài cây quý hiếm và đang bị đe dọa này.

Từ khóa: *Glyptostrobus pensilis*, cây hoàn chỉnh, chồi in vitro, thông nước, tiền xử lý, tạo rễ.

MỞ ĐẦU

Thông nước (thủy tùng) là loài cây xuất hiện cùng thời với bách xanh cổ, cách đây khoảng 10 triệu năm, là loài cây gỗ lớn, cao tới 25 m, đường kính thân từ 60-80 cm. Thông nước có tên trong Sách Đỏ Việt Nam 2007 [2] và Danh lục Đỏ IUCN [15], được đánh giá với cấp độ CR (rất nguy cấp) và được xem như hóa thạch sống của ngành hạt trần tại Việt Nam. Trước đây, thông nước được phát hiện phân bố ở Trung Quốc, Việt Nam [3, 4]. Hiện nay, ở Trung Quốc không còn cá thể thông nước trong tự nhiên; ở Lào, có khoảng 100 cá thể được tìm thấy ở cao nguyên Nakai. Ở Việt Nam, có khoảng 300 cá thể thông nước, phân bố chủ yếu ở rừng đặc rụng Eural thuộc huyện EaH'Leo và khu bảo tồn thiên nhiên Tráp Ksor, Krông Năng. Ngoài ra, còn một vài cá thể ở Cư Né, Quảng Hà và Trường Hà [13]. Tuy nhiên, các cá thể thông nước ngày một già cỗi và đang thoái hóa nghiêm trọng, trong khi, hơn 20 năm qua không hề thu được hạt từ những cây này [1].

Thông nước không những có giá trị về mặt khoa học mà nó còn có giá trị về mặt kinh tế. Từ vỏ và lá của cây có thể chiết xuất được một số dược liệu quý chữa bệnh ung thư, bệnh

phong, thuốc giảm đau... Gỗ thông nước chắc, vân đẹp, không bị mối mọt, có màu nâu đỏ viền vàng nên được ưa chuộng để xây dựng đền đài, nhà cửa, đồ mỹ nghệ, đồ dùng cao cấp. Với những giá trị trên, thông nước là loài cây quý đang bị săn lùng ráo riết. Nhiều năm qua, các nhà khoa học đã tiến hành nghiên cứu nhằm phục hồi loài cây quý này. Những nỗ lực nghiên cứu tái sinh loài cây này bằng hạt đều không có kết quả. Vì vậy, nhân giống vô tính (giâm cành, cấy mô, ghép) có thể là giải pháp cho nhân nhanh cây thông nước. Các tác giả Trung Quốc đã công bố thành công bước đầu trong nhân giống bằng giâm cành và tái sinh cây từ chồi nách [7] và tái sinh thông qua con đường phân hóa cơ quan [5, 6]. Ở Việt Nam, cũng đã có thông tin về nhân cây Thông nước bằng giâm cành, cấy mô và ghép chồi trên gốc cùng loài xong kết quả còn hạn chế [12, 14]. Trong bài này, chúng tôi công bố kết quả nhân và tạo cây thông nước hoàn chỉnh trong điều kiện in vitro và đưa ra môi trường đất. Những kết quả đạt được sẽ đóng góp vào nghiên cứu bảo tồn và phát triển loài cây quý hiếm và đang bị đe dọa này.

PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Vật liệu

Mẫu cành thông nước được lấy từ cá thể thông nước cổ thụ tại Tráp Ksor, Krông Năng, Đắk Lắk.

Môi trường nuôi cấy sử dụng là môi trường cơ bản Smith [10], WP [8] và MS [9].

Phương pháp

Phương pháp khử trùng mẫu: mẫu được rửa sạch với xà phòng qua vòi nước chảy liên tục, rồi tiến hành khử trùng theo các bước sau: rửa nước cất vô trùng 3 lần, rửa cồn 70% trong 1 phút sau đó rửa lại với nước cất vô trùng 3 lần, ngâm mẫu trong dung dịch HgCl₂ 0,2% trong khoảng thời gian nhất định và cứ 5 phút lắc một lần. Cuối cùng rửa mẫu với nước cất vô trùng 3-5 lần và ngâm mẫu trong nước cất khoảng 15 phút trước khi cấy. Trong nghiên cứu này chúng tôi sử dụng phương pháp khử trùng kép với HgCl₂ 0,2% với những khoảng thời gian khác nhau.

Phương pháp tạo chồi từ mắt ngủ: sau khi khử trùng, mẫu được cắt thành những đoạn dài 5-8 cm và cấy vào ống nghiệm nhỏ kích thước 2 × 20 cm chứa môi trường tạo chồi bao gồm môi trường cơ bản Smith cộng thêm 2 mg/l BAP; 0,1 mg/l NAA; 30 mg/l đường sucrose; 8 g/l agar; pH 5,6-5,8.

Phương pháp nhân chồi: sau một tháng nuôi cấy trên môi trường tạo chồi, chồi bắt đầu nhú ra từ mắt ngủ ở cành. Mẫu được cắt nhỏ ra

thành từng đoạn mang 2-3 chồi rồi cấy vào 2 loại môi trường nhân chồi là môi trường cơ bản Smith và WP cộng thêm 0,5 mg/l BAP; 0,2 mg/l NAA; 0,2 g/l myo-inositol; 20 g/l đường sucrose; 8 g/l thạch; 2 g/l than hoạt tính; pH 5,6-5,8 nhằm khảo sát hệ số nhân chồi trên 2 loại môi trường cơ bản này.

Phương pháp tạo rễ từ chồi nuôi cấy in vitro: các chồi tạo và nhân trên môi trường nhân chồi hoàn toàn không ra rễ. Để tạo rễ, các chồi được đưa lên môi trường tạo rễ hoặc gây cảm ứng tạo rễ sau đó đưa lên môi trường tạo rễ.

Phân tích số liệu: các giá trị trung bình và sai số chuẩn tính toán theo phần mềm Excel.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Khử trùng và tạo chồi sạch từ mắt ngủ

Do các mẫu cành chồi thông nước có lớp vỏ ngoài không phẳng và các mẫu được lấy từ cây lâu năm nên lớp vỏ ngoài có rất nhiều vi khuẩn và nấm. Để tạo được các mẫu cấy vô trùng, chúng tôi đã sử dụng dung dịch HgCl₂ 0,2% và phương pháp khử trùng kép với các thời gian khác nhau. Sau khi khử trùng, chúng tôi cấy mẫu vào môi trường tạo chồi, sau 1 tháng nuôi cấy trên môi trường tạo chồi, chúng tôi xác định tỷ lệ mẫu nhiễm, tỷ lệ mẫu chết, tỷ lệ mẫu tạo chồi để nghiên cứu ảnh hưởng của thời gian khử trùng lên sức sống và sự tạo chồi của mẫu. Kết quả được chỉ ra ở bảng 1.

Bảng 1. Ảnh hưởng thời gian khử trùng kép lên tỷ lệ nhiễm và tạo chồi sạch của các mẫu chồi Thông nước

Thời gian khử trùng kép (phút)	Số mẫu cấy	Tỷ lệ mẫu nhiễm (%)	Tỷ lệ mẫu chết (%)	Tỷ lệ mẫu tạo chồi sạch (%)
2 và 10	52	28,8	3,8	50
10 và 10	67	20,9	19,4	34,3
15 và 10	69	13,1	26,1	17,3

Kết quả trong bảng 1 cho thấy, thời gian khử trùng càng dài thì tỷ lệ mẫu nhiễm càng giảm nhưng tỷ lệ mẫu chết lại tăng do HgCl₂ gây độc cho mẫu. Tỷ lệ mẫu tạo chồi cũng giảm dần khi thời gian xử lý tăng dần. Với ba công thức có thời gian khử trùng khác nhau, công thức khử 2 phút sau đó rửa sạch và tiếp tục khử 10 phút cho tỷ lệ mẫu cho chồi sạch cao nhất

(tới 50%). Vì vậy, chúng tôi đã sử dụng phương pháp khử trùng kép bằng HgCl₂ 0,2% (khử trùng lần một 2 phút, lần hai 10 phút) để khử trùng mẫu thông nước trong những nghiên cứu tiếp theo.

Nhân chồi chồi ban đầu

Sau thời gian nhân chồi 4 - 6 tuần trên hai

loại môi trường cơ bản là môi trường Smith và WP với 0,5 mg/l BAP; 0,2 mg/l NAA; 0,2 g/l myo-inositol; 20 g/l đường sucrose; 8 g/l thạch; 2 g/l than hoạt tính. Hệ số nhân chồi được xác định bằng cách đếm số chồi mới tạo ra từ 10 mẫu trên mỗi loại môi trường cơ bản. Kết quả được chỉ ra ở bảng 2.

Bảng 2. Ảnh hưởng môi trường cơ bản lên hệ số nhân chồi Thông nước in vitro

Môi trường cơ bản	Hệ số nhân chồi
Smith	15,7 ± 4,6
WP	12,1 ± 3,1

Kết quả cho thấy, hệ số nhân chồi trên cả hai loại môi trường cơ bản trên đều khá cao, hệ số nhân chồi trên môi trường cơ bản Smith cao hơn môi trường WP. Tuy nhiên, trên môi trường

cơ bản WP, chồi phát triển tốt hơn, phần lớn đạt chiều cao trên 3 cm và có nhiều chồi đạt chiều cao trên 5 cm (hình 1). Vì vậy, chúng tôi chọn môi trường WP làm môi trường cơ bản để nhân chồi cho các thí nghiệm ra rễ tiếp theo.

Nhân nhanh tạo nguồn nguyên liệu cây Thông nước in vitro

Ba công thức môi trường được sử dụng cho nhân nhanh tạo nguồn nguyên liệu cây thông nước in vitro (bảng 3). Kết quả cho thấy, trên môi trường WP cho từ 1-3 chồi, các mẫu thông nước phát triển nhanh về chiều cao, hệ số nhân chồi thấp, trung bình là 2,2 chồi. Trên môi trường WP có bổ sung thành phần vitamin của WP, từ mỗi mẫu cấy ban đầu thường cho từ 3 đến 5 chồi, hệ số nhân chồi trung bình là 4,18 chồi.

Bảng 3. Ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy đến hệ số nhân chồi cây thông nước in vitro

Công thức	Môi trường cơ bản	Casein (mg/l)	Số mẫu	Số chồi	Hệ số nhân chồi
1	WP	-	50	110	2,20
2	WP + vit WP	-	50	209	4,18
3	WP + vit WP	100	50	431	8,62

Đối với công thức môi trường WP + vitWP bổ sung thêm 100 mg/l casein, hệ số nhân chồi là cao nhất, đạt từ 6-8 chồi. Quan sát bằng mắt thường cho thấy, các mẫu cây sau 45 ngày nuôi cấy thường phát triển thành cụm chồi, phần dưới tạo đê, các chồi không phát triển về chiều cao (hình 2). Nguyên nhân phát triển thành cụm chồi ở công thức môi trường này có thể là do trong môi trường có bổ sung casein, casein đã kích thích tạo sự phân hóa mạnh mẽ và phát triển thành cụm chồi. Số lượng chồi nhiều nên có sự cạnh tranh về dinh dưỡng, do vậy, ở các cụm chồi này cây không phát triển chiều cao. Kết quả này phù hợp với kết luận của Đỗ Tiến Phát và nnk. (2009) [11] khi nghiên cứu bổ sung casein vào môi trường nuôi cấy tạo đa chồi ở cây *Pinus merkusii* Jungh & de Vies. Tác giả có kết luận, khi bổ sung casein đã kích thích sự phân chia, tạo đa chồi; tuy nhiên chỉ nuôi cấy trong thời gian nhất định, sau đó cấy chuyển sang môi trường kéo dài chồi. Như vậy, công thức môi trường WP + vitWP + 100 mg/l casein cho hệ số nhân chồi cao nhất, hệ số trung bình

là 8,62 chồi. Hệ số này cao hơn kết quả công bố của Li et al. (2008) [6], trong đó các tác giả nhận được hệ số nhân chồi là 4,19 trên môi trường cơ bản MS. Hệ số tạo chồi ở các chồi in vitro (bảng 3) thấp hơn hệ số tạo chồi ban đầu (bảng 2) có lẽ là do trong cùng thời gian nuôi cấy, các chồi in vitro thường mất một thời gian hình thành mô sẹo ở phần đế sau đó tái sinh các cụm chồi. Phụ thuộc vào thành phần môi trường số chồi tạo được khác nhau ở mỗi công thức. Trong thời gian 6 tuần đầu, số chồi thường chưa nhiều, nhưng tiếp tục nuôi, cây số chồi sẽ tăng lên đáng kể.

Các nhân tố ảnh hưởng đến sự hình thành rễ cây thông nước in vitro

Ảnh hưởng của các chất điều hòa sinh trưởng đến khả năng ra rễ của cây thông nước in vitro

Trong quá trình nuôi cấy, các chồi hình thành có thể phát sinh rễ tự nhiên, tuy nhiên ở cây thông nước khả năng tạo rễ từ chồi nuôi cấy là rất hiếm. Do đó, việc nghiên cứu tạo rễ cần được nghiên cứu. Để tạo rễ, môi trường cơ bản

WP có bổ sung các hàm lượng auxin khác nhau, cụ thể là IBA và NAA với hàm lượng lần lượt là 0,2 mg/l, 0,5 mg/l, 1 mg/l được sử dụng. Kết quả thu được thể hiện ở bảng 4.

Từ kết quả thu được ở bảng 4 chúng tôi thấy rằng, khi bổ sung 0,2 IBA mg/l vào môi trường

nhiên cứu, hầu hết các mẫu thông nước sinh trưởng phát triển bình thường và tỷ lệ lên tới 78,2%. Ở một số mẫu cây thông nước nuôi cấy có hiện tượng phình to phần chân mẫu tiếp xúc với môi trường nuôi cấy (tạo đế), tỷ lệ chiếm đến 20%, trong khi đó, tỷ lệ ra rễ chỉ đạt 1,28%.

Bảng 4. Ảnh hưởng các chất điều hòa sinh trưởng đến khả năng ra rễ cây thông nước

Công thức	Hóa chất	Hàm lượng (mg/l)	Số mẫu cây	Cây bình thường (%)	Số mẫu tạo rễ (%)	Số mẫu mô sẹo hóa (%)	Số mẫu tạo đế (%)
WPI1	IBA	0,2	55	78,2	1,28	0	20
WPI2		0,5	60	12	-	35	53
WPI3		1	50	-	-	100	-
WPN1	NAA	0,2	55	49	2,04	12,7	34,5
WPN2		0,5	54	-	-	100	-
WPN3		1	60	-	-	100	-

Khi tăng nồng độ IBA bổ sung vào môi trường nuôi cấy lên 0,5 mg/l, chúng tôi thấy tỷ lệ mẫu phình to phần chân tiếp xúc (tạo đế) lên đến 53%; tỷ lệ mô sẹo hóa là 35%; số cây sinh trưởng bình thường chỉ còn 12%. Không có mẫu nào tạo rễ. Tiếp tục tăng nồng độ IBA bổ sung vào môi trường nuôi cấy lên đến 1 mg/l thì toàn bộ số mẫu cây thông nước sau 60 ngày nuôi cấy mô sẹo hóa.

Như vậy, bước đầu chúng tôi có nhận xét, hàm lượng chất điều hòa sinh trưởng IBA càng cao thì khả năng mô sẹo hóa các mẫu thông nước càng lớn; với hàm lượng IBA bằng hoặc nhỏ hơn 0,2 mg/l đã có sự tạo rễ cây thông nước. Tuy nhiên, tỷ lệ rất thấp.

Đối với trường hợp NAA, khi bổ sung 0,2 mg/l vào môi trường nghiên cứu, một số lượng tương đối lớn các mẫu thông nước phình to phần chân mẫu (tạo đế) tiếp xúc với môi trường (tỷ lệ là 34,5%) chỉ còn 49% số mẫu cây thông nước sinh trưởng phát triển bình thường. Tỷ lệ tạo rễ đạt 2,04%. Khi tăng nồng độ NAA bổ sung vào môi trường nuôi cấy lên 0,5 mg/l và 1 mg/l, chúng tôi thu được toàn bộ số mẫu cây thông nước mô sẹo hóa sau 60 ngày nuôi cấy.

Cũng giống như khi nghiên cứu bổ sung IBA vào môi trường nuôi cấy, khi nghiên cứu bổ sung chất điều hòa sinh trưởng là NAA vào

môi trường nuôi cấy, bước đầu chúng tôi có nhận xét, hàm lượng NAA càng cao thì khả năng mô sẹo hóa các mẫu thông nước càng lớn; với hàm lượng NAA bằng hoặc nhỏ hơn 0,2 mg/l có hiện tượng tạo rễ cây thông nước.

Như vậy, với nồng độ các chất điều hòa sinh trưởng (IBA, NAA) $\leq 0,2$ mg/l đã xuất hiện rễ cây thông nước. Tuy nhiên, vì số mẫu cây ra rễ còn ít, nên vấn đề tạo rễ ở thông nước cần được tiếp tục nghiên cứu.

Ảnh hưởng xử lý auxin nồng độ cao đến khả năng ra rễ của chồi thông nước nuôi cấy in vitro

Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của các chất sinh trưởng đưa vào môi trường nuôi cấy lên khả năng tạo rễ của chồi thông nước cho thấy tỷ lệ tạo rễ còn thấp. Khi tăng nồng độ lên cao trong môi trường nuôi cấy lại ảnh hưởng xấu đến tạo rễ và thiên về tạo mô sẹo. Vì vậy, chúng tôi nghiên cứu việc xử lý các chồi in vitro với nồng độ auxin cao trước khi nuôi cấy trên môi trường có nồng độ auxin thấp (tiền xử lý). Dựa trên kinh nghiệm các nghiên cứu giảm cành, IBA thường được dùng để xử lý ra rễ. Vì vậy, trong nghiên cứu này IBA với các nồng độ cao (10 mg/l, 20 mg/l và 40 mg/l) đã được sử dụng cho việc tiền xử lý các chồi in vitro trước khi đưa lên môi trường ra rễ có nồng độ IBA 0,2 mg/l. Kết quả được chỉ ra ở bảng 5.

Bảng 5. Ảnh hưởng tiền xử lý IBA nồng độ cao đến khả năng ra rễ của chồi thông nước nuôi cấy in vitro

Công thức	Nồng độ (mg/l)	Số chồi cây	Tỷ lệ chồi bình thường (%)	Số chồi tạo rễ	Số chồi mô sẹo hóa (%)	Số chồi tạo đế (%)
TXL1	10	75	100	0	0	0
TXL2	20	80	96,2	2	0	2,5
TXL3	40	90	91	5	0	5,55

Kết quả trong bảng 5 cho thấy, khi xử lý IBA ở nồng độ cao đã gia tăng khả năng ra rễ ở chồi thông nước nuôi cấy in vitro.

Như vậy, chúng tôi đã tạo được cây thông

nước hoàn chỉnh từ chồi nhân in vitro (hình 3A) các cây thông nước với rễ phát triển được đưa trồng vào chậu với giá thể trấu hun và đất (tỷ lệ 1:1) (hình 3B).



Hình 1. Chồi thông nước phát triển trên môi trường WP



Hình 2. Cụm chồi thông nước phát triển trên môi trường WP + vitWP bổ sung thêm 100 mg/l casein



Hình 3. Cây thông nước với rễ phát triển (A) và cây trồng trong chậu đất (B)

KẾT LUẬN

Từ những kết quả nhận được chúng tôi rút ra một số kết luận sau:

Phương pháp khử trùng kép bằng $HgCl_2$ 0,2% (khử trùng lần một 2 phút, lần hai 10 phút) cho hiệu quả chồi sạch cao.

Môi trường WP với 0,5 mg/l BAP; 0,2 mg/l NAA; 0,2 g/l myo-inositol; 20 g/l đường sucrose; 8 g/l thạch; 2 g/l than hoạt tính là môi trường phù hợp cho nhân chồi thông nước in vitro.

Môi trường WP với 0,2 mg/l IBA hoặc

NAA cho cảm ứng ra rễ từ chồi thông nước in vitro. Tuy nhiên, tỷ lệ ra rễ còn thấp.

Tiền xử lý chồi thông nước in vitro với hàm lượng IBA cao đã gia tăng tỷ lệ ra rễ ở các chồi, tỷ lệ đạt 5,55%.

Lời cảm ơn: Các tác giả xin cảm ơn tiến sĩ Nguyễn Tiến Hiệp đã hỗ trợ trong việc tiếp cận một số quần thể và thu mẫu thông nước tại tỉnh Đắk Lắk. Công trình hoàn thành với kinh phí đề tài cấp cơ sở Viện Công nghệ sinh học “Nghiên cứu nhân giống cây thông nước”.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Averyanov L. V., Phan K. L., Nguyen T. H., Nguyen S. K., Nguyen T. V., Pham T. D., 2009. Preliminary observation of native *Glyptostrobus pensilis* (Taxodiaceae) stands in Vietnam, Taiwan, 54(3): 191-212.
2. Bộ Khoa học và Công nghệ, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam, 2007. Sách Đỏ Việt Nam. Phần II - Thực vật. Nxb. Khoa học tự nhiên và Công nghệ. Trang 524-525.
3. Farjon A., C. N. Page, 1999. Conifers Status survey and conservation action plan. IUCN/SSC Conifer Specialist Group. IUCN, Gland, Switzerland and Cambridge, UK.
4. Li F. G., N. H. Xia, 2004. The geographical distribution and cause of threat to *Glyptostrobus pensilis* (Taxodiaceae). J. Trop. Subtrop. Bot., 12: 13-20.
5. Li B., Li H. G., Wang G. P., 2006. Tissue Culture and Plantlet Regeneration of *Glyptostrobus pensilis* (Lamb.) K. Koch. Plant Physiol. Comm., 42(6): 1136.
6. Li B., Li H. G., Wang G. P., 2008. Plantlet Regeneration of *Glyptostrobus pensilis* (Lamb.) K. Koch from seedling stem, <http://www.paper.edu.cn/index.php/default/redirect.php/content/200806-390>.
7. Li B., Li H., 2008. Studies on the Vegetative Propagation Techniques of *Glyptostrobus pensilis* (Lamb.) K. Koch. Guilin J. Teacher Colleges, 22(3): 72-79.
8. McCown B. H., Lloyd G., 1981. Woody plant medium (WPM). A revised mineral nutrient formulation for microculture of woody plant species. Hort. Sci., 16: 453.
9. Murashige T., Skoog F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant, 15: 475-497.
10. Smith D. R., Horgan K. R., Aitken-Christie J., 1982. Micropropagation of *Pinus radiata* for forestation. In: Fujiwara A (Ed) Plant Tissue Culture. Proc 5th Intern Cong Plant Tissue and Cell Culture, Maruzen, Tokyo, 1982, pp: 723-724.
11. Đỗ Tiên Phát, Đinh Thị Phòng, Nguyễn Văn Phương, Chu Hoàng Hà, Vương Đình Tuấn, 2009. Nghiên cứu tái sinh cây thông nhựa (*Pinus merkussi* Jungh. & de Vries) thông qua phôi hạt chín. Tạp chí Công nghệ sinh học, 7(1): 59-65.
12. Nguyễn Thanh Sum, Phạm Ngọc Tuấn, Nguyễn Văn Kết, 2007. Ứng dụng phương pháp vi nhân giống trong bảo tồn giống thông nước *Glyptostrobus Pensilis* (Staunton ex D. Don) K. Koch. Tạp chí Khoa học kỹ thuật Nông Lâm nghiệp, Đại học Nông Lâm tp. Hồ Chí Minh, 1+2: 75-81.
13. Nguyễn Minh Tâm, 2011. Bảo tồn và sử dụng bền vững một số loài thông quý hiếm có giá trị kinh tế cao đang bị đe dọa tuyệt chủng và khu hệ nấm cộng sinh có ích trong các loài nghiên cứu. Báo cáo Tổng kết dự án Khoa học công nghệ về bảo vệ môi trường. Hà Nội, 2011.
14. Trần Vinh, 2010. Nghiên cứu đặc điểm sinh học, sinh thái và nhân giống, bảo tồn thông nước tại Việt Nam. <http://agriviet.com/nd/3745-nhan-giong-vo-tinh-cay-thuy-tung/>.
15. Thomas P., Yang Y., Farjon A., Nguyen D., Liao W., 2011. *Glyptostrobus pensilis*. In: IUCN 2011. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2011.2. <www.iucnredlist.org>. Downloaded on 16 April 2012.

REGENERATION OF COMPLETE *Glyptostrobus pensilis* (Staunton ex D. Don) K. Koch PLANTS FROM IN VITRO DERIVED SHOOTS**Nguyen Duc Thanh, Dang Thi Minh Lua, Quach Thi Lien**

Institute of Biotechnology, VAST

SUMMARY

Glyptostrobus pensilis (Staunton ex D. Don.) K. Koch is an endangered species that cited in Vietnam and World's Red Books. In Vietnam, *Glyptostrobus pensilis* is distributed in two locations of Dak Lak province: about 200 individuals in special use forest of Eral, EaH'Leo district and 30 individuals in Trap Ksor's special use forest of Krong Nang district. *Glyptostrobus pensilis* is not only important for botanical science as a living fossil of gymnosperm, but for economic value as well. Therefore, the study on conservation and development of this tree species is a very urgent task. Many attempts to regenerate the tree from the seeds have been failed. So, the vegetative propagation (cutting, grafting and tissue culture) could be a good alternative solution for rapid propagation of *Glyptostrobus pensilis*. Although, there were some reports on propagation of *Glyptostrobus pensilis* by tissue culture, but the generation of whole plants in in vitro condition was still limited. In this paper, the regeneration of complete *Glyptostrobus pensilis* plants from in vitro derived shoots and successful transfer of the plants to the soil are presented. The WP medium with 0.5 mg/l BAP, 0.2 mg/l NAA, 0.2 g/l myo-inositol, 20 g/l sucrose, 2 g/l active charcoal and 8 g/l agar was suitable for shoot propagation. The WP medium supplemented with 0.2 mg/l IBA or NAA did the promotion of root formation, but the root production rate was still low. The pretreatment of in vitro shoots by high concentration of IBA has enhanced the root production rate from in vitro derived shoots up to 5.55%. The results obtained in this study will contribute to the conservation and development of this rare, valuable and endangered tree species.

Keywords: *Glyptostrobus pensilis*, complete plant, in vitro shoot, pretreatment, root formation.

Ngày nhận bài: 10-1-2012