

**ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN**  
**TRƯỜNG ĐẠI HỌC NÔNG LÂM**



**DƯƠNG THỊ NHUNG**

**NGHIÊN CỨU NHÂN GIỐNG CÂY SÓI RỪNG**

**(*Sarcandra glabra* (Thunb.) Nakai)**

**BẰNG KỸ THUẬT NUÔI CÂY *IN VITRO***

**LUẬN VĂN THẠC SĨ**  
**CÔNG NGHỆ SINH HỌC**

**Thái Nguyên – 2020**

ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN  
TRƯỜNG ĐẠI HỌC NÔNG LÂM



**DƯƠNG THỊ NHUNG**

**NGHIÊN CỨU NHÂN GIỐNG CÂY SÓI RỪNG**

**(*Sarcandra glabra* (Thunb.) Nakai)**

**BẰNG KỸ THUẬT NUÔI CÂY *IN VITRO***

**Ngành : Công nghệ sinh học**

**Mã số ngành: 8.42.02.01**

**LUẬN VĂN THẠC SĨ**  
**CÔNG NGHỆ SINH HỌC**

**Người hướng dẫn khoa học: 1. PGS.TS. TRẦN THỊ THU HÀ**  
**2. TS. NGUYỄN XUÂN VŨ**

**Thái Nguyên - 2020**

## LỜI CAM ĐOAN

Em xin cam đoan số liệu và kết quả nghiên cứu đề tài “ **Nghiên cứu nhân giống cây Sói rừng (*Sarcandra glabra* (thunb.) Nakai) bằng kỹ thuật nuôi cấy *in vitro***” là trung thực, được thực hiện tại Viện Nghiên cứu và Phát triển Lâm nghiệp - Đại học Nông lâm - Đại học Thái Nguyên. Ngoài ra, trong bài báo cáo có sử dụng một số nguồn tài liệu tham khảo đã được trích dẫn rõ ràng và được phép công bố.

Em xin hoàn toàn chịu trách nhiệm về tính trung thực của các nội dung trong đề tài của mình.

**Học viên**

## LỜI CẢM ƠN

Trong quá trình học tập và hoàn thành luận văn tốt nghiệp, em đã nhận được sự giúp đỡ về nhiều mặt của các cấp lãnh đạo, các tập thể và các cá nhân.

Trước tiên, em xin bày tỏ lòng biết ơn chân thành đến giáo viên hướng dẫn **PGS.TS. Trần Thị Thu Hà** và **TS. Nguyễn Xuân Vũ** đã luôn tận tình hướng dẫn, giúp đỡ em trong suốt quá trình thực hiện và hoàn thành luận văn này.

Em xin bày tỏ lời cảm ơn đến **Viện Nghiên cứu và Phát triển Lâm nghiệp** cùng các cán bộ, quý đồng nghiệp đã tạo điều kiện thuận lợi cho em hoàn thành đề tài nghiên cứu này.

Cuối cùng em xin gửi lời cảm ơn chân thành và sâu sắc nhất tới gia đình, người thân và bạn bè đã động viên, giúp đỡ em trong suốt quá trình học tập và thực hiện đề tài.

Em xin chân thành cảm ơn!

*Thái Nguyên, tháng 11 năm 2020*

**Học Viên**

## MỤC LỤC

LỜI CAM ĐOAN .....	i
LỜI CẢM ƠN .....	ii
MỤC LỤC .....	iii
DANH MỤC CÁC TỪ VIẾT TẮT .....	vi
DANH MỤC BẢNG.....	vii
DANH MỤC HÌNH.....	viii
MỞ ĐẦU .....	1
1. Đặt vấn đề .....	1
2. Mục tiêu nghiên cứu .....	2
Chương 1.TỔNG QUAN TÀI LIỆU .....	3
1.1. Giới thiệu về Chi Sói rừng và loài cây Sói rừng ( <i>Sarcandra glabra</i> (Thunb.) Nakai).....	3
1.1.1. Phân loại, phân bố.....	3
1.1.2. Đặc điểm thực vật học .....	3
1.1.3. Giá trị của cây Sói rừng ( <i>Sarcandra glabra</i> (Thunb.) Nakai).....	4
1.2. Cơ sở việc định danh loài và xác định quan hệ di truyền .....	5
1.3. Tình hình nghiên cứu nhân giống cây Sói rừng.....	7
1.3.1. Tình hình nghiên cứu nhân giống cây Sói rừng trên thế giới .....	7
1.3.2. Tình hình nghiên cứu nhân giống cây Sói rừng ở nước ta .....	8
1.4. Cơ sở phương pháp nhân giống in vitro (vi nhân giống).....	9
1.4.1. Ưu điểm của phương pháp nuôi cấy mô tế bào thực vật .....	10
1.4.2. Nhược điểm của phương pháp nuôi cấy mô tế bào thực vật .....	10
1.4.3. Các phương pháp nuôi cấy mô .....	10
1.4.4. Các yếu tố ảnh hưởng đến nuôi cấy mô thực vật.....	11
1.4.5. Các giai đoạn trong nhân giống invitro .....	15
Chương 2. ĐỐI TƯỢNG, NỘI DUNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU .....	18
2.1. Đối tượng và phạm vi nghiên cứu .....	18
2.1.1. Đối tượng nghiên cứu .....	18

2.1.2. Phạm vi nghiên cứu .....	18
2.2. Nội dung nghiên cứu.....	18
2.3. Phương pháp nghiên cứu .....	18
2.3.1. Điều tra đánh giá thực trạng phân bố và thu thập mẫu nghiên cứu .....	18
2.3.2. Phương pháp nhận dạng mẫu nguồn gen cây Sói rừng bằng đặc điểm hình thái .....	21
2.3.3. Phương pháp nhận dạng mẫu nguồn gen cây Sói rừng bằng chỉ thị DNA.....	22
2.3.4. Phương pháp nhân giống in vitro cây Sói rừng .....	25
2.3.5. Phương pháp xử lý số liệu .....	28
Chương 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU .....	29
3.1. Điều tra, đánh giá thực trạng phân bố, giá trị sử dụng của của loài Sói rừng và thu thập mẫu. ....	29
3.2. Kết quả nhận dạng mẫu nguồn gen cây Sói rừng bằng đặc điểm hình thái.....	34
3.2.1. Đặc điểm mẫu cây Sói rừng thu thập được tại huyện Xín Mần .....	34
3.2.2. Đặc điểm mẫu cây Sói rừng thu thập được tại huyện Mèo Vạc .....	35
3.2.3. Đặc điểm mẫu cây Sói rừng thu thập được tại huyện Quản Bạ.....	36
3.2.4. Đặc điểm mẫu cây Sói rừng thu thập được tại huyện Hoàng Su Phì .....	37
3.2.5. Đặc điểm mẫu cây Sói rừng thu thập được tại huyện Vị Xuyên .....	38
3.3. Kết quả nhận dạng mẫu nguồn gen cây Sói rừng bằng chỉ thị DNA.....	40
3.3.1. kết quả tách chiết DNA tổng số của mẫu Sói rừng nghiên cứu.....	40
3.3.2. Kết quả PCR của mẫu Sói rừng nghiên cứu .....	41
3.3.3. Kết quả giải trình tự vùng ITS-rDNA của mẫu Sói rừng nghiên cứu .....	42
3.3.4. Kết quả phân tích đa dạng di truyền, xác định mối quan hệ di truyền giữa 15 mẫu Sói rừng nghiên cứu .....	43
3.4. Kết quả nghiên cứu nhân giống in vitro cây Sói rừng .....	45
3.4.1. Chọn vật liệu khởi đầu .....	45
3.4.2. Ảnh hưởng của thời gian khử trùng bằng HgCl <sub>2</sub> 0,1% đến khả năng tạo mẫu vô trùng .....	45
3.4.3. Nghiên cứu ảnh hưởng của các chất kích thích sinh trưởng đến khả năng nhân nhanh chồi Sói rừng .....	47

3.4.4. Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của các chất kích thích sinh đến khả năng ra rễ chồi Sói rừng .....	55
3.4.5. Nghiên cứu đưa cây ra nhà kính .....	58
3.4.6. Chăm sóc cây giai đoạn in vitro.....	6
KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ .....	64
1. Kết luận.....	64
2. Kiến nghị.....	65
TÀI LIỆU THAM KHẢO .....	66

## DANH MỤC CÁC TỪ VIẾT TẮT

<b>Từ, thuật ngữ viết tắt</b>	<b>Nghĩa đầy đủ của từ, thuật ngữ (Cả tiếng anh và tiếng việt)</b>
DNA	Deoxyribonucleic acid
PCR	Polymerase Chain reaction
SR	Sói rừng
Cs	Cộng sự
IAA	Indole - 3- acetic acid
NAA	Naphthylacetic acid
BAP	Benzylaminopurine
IBA	Indo – 3 – butyric acid
MS	Murashige Skoog
CT	Công thức
LSD	Least Significant Difference Test – Sai khác nhỏ nhất có ý nghĩa
CV	Coefficient of Variation – Hệ số biến động



## DANH MỤC BẢNG

Bảng 3.1. Đặc điểm phân bố Sói rừng theo tuyến điều tra .....	31
Bảng 3.2. Đặc điểm mẫu thu thập.....	33
Bảng 3.3. Đặc điểm hình thái các mẫu Sói rừng thu thập tại huyện Xín Mần .....	34
Bảng 3.4. Đặc điểm hình thái các mẫu Sói rừng thu thập tại huyện Mèo Vạc.....	35
Bảng 3.5. Đặc điểm hình thái các mẫu Sói rừng thu thập tại huyện Quán Bạ .....	36
Bảng 3.6. Đặc điểm hình thái các mẫu Sói rừng thu thập tại huyện Hoàng Su Phì ...	37
Bảng 3.7. Đặc điểm hình thái các mẫu Sói rừng thu thập tại huyện Vị Xuyên.....	38
Bảng 3.8. Danh sách 15 mẫu lá Sói rừng trong nghiên cứu .....	40
Bảng 3.9. Độ dài trình tự của 15 mẫu Sói rừng nghiên cứu .....	42
Bảng 3.10: Hệ số tương đồng di truyền giữa 15 mẫu Sói rừng nghiên cứu và 2 mẫu tham chiếu .....	44
Bảng 3.11. Kết quả ảnh hưởng của thời gian khử trùng bằng HgCl <sub>2</sub> 0,1% đến khả năng tạo mẫu vô trùng (sau 4 tuần nuôi cấy) .....	46
Bảng 3.12. Ảnh hưởng của nồng độ BAP đến khả năng nhân nhanh chồi Sói rừng (sau 4 tuần nuôi cấy) .....	48
Bảng 3.13. Ảnh hưởng của tổ hợp BAP và Kinetin đến hệ số nhân chồi sau 4 tuần nuôi cấy (sau 4 tuần nuôi cấy) .....	50
Bảng 3.14. Ảnh hưởng của tổ hợp BAP và Kinetin với NAA đến hệ số nhân chồi (sau 4 tuần nuôi cấy) .....	52
Bảng 3.15. Ảnh hưởng của tổ hợp BAP, Kinetin với IBA đến hệ số nhân chồi sau 4 tuần nuôi cấy.....	54
Bảng 3.16. Kết quả ảnh hưởng của nồng độ NAA đến khả năng ra rễ của chồi Sói rừng .....	56
Bảng 3.17. Kết quả ảnh hưởng của nồng độ IBA đến khả năng ra rễ của chồi Sói rừng.....	57
Bảng 3.18. Ảnh hưởng của một số loại giá thể đến tỷ lệ sống của cây Sói rừng in vitro sau 8 tuần theo dõi.....	59

## DANH MỤC HÌNH

Hình 1.1. Cây Sói rừng .....	3
Hình 3.1. Mẫu Sói rừng thu thập tại huyện Xín Mần .....	35
Hình 3.2. Mẫu Sói rừng thu thập tại huyện Mèo Vạc.....	36
Hình 3.3. Mẫu Sói rừng thu thập tại huyện Quán Bạ .....	37
Hình 3.4. Mẫu Sói rừng thu thập tại huyện Hoàng Su Phì .....	38
Hình 3.5. Mẫu Sói rừng thu thập tại huyện Vị Xuyên.....	39
Hình 3.6. kết quả tách chiết DNA tổng số của 15 mẫu Sói rừng nghiên cứu.....	41
Hình 3.7. Kết quả PCR của 15 mẫu Sói rừng nghiên cứu với cặp mồi ITS4/ITS5; M: Marker generuler 1kb plus DNA .....	42
Hình 3.8. Cây phát sinh chủng loại của 15 mẫu Sói rừng nghiên cứu với mẫu tham chiếu MH270480.1 <i>Chloranthus erectus</i> và KP317601.1 <i>Sarcandra glabra</i> .....	44
Hình 3.9. Kết quả khử trùng mẫu đoạn thân Sói rừng bằng HgCl <sub>2</sub> 0,1% .....	47
Hình 3.10. Ảnh hưởng của nồng độ BAP đến hệ số nhân chồi cây Sói rừng.....	49
Hình 3.11. Ảnh hưởng của nồng độ BAP kết hợp với Kinetin đến hệ số nhân chồi cây Sói rừng .....	51
Hình 3.12. Ảnh hưởng của tổ hợp BAP và Kinetin với NAA đến hệ số nhân chồi cây chồi Sói rừng .....	53
Hình 3.13. Ảnh hưởng của tổ hợp BAP và Kinetin với IBA đến khả năng nhân nhân chồi Sói rừng .....	55
Hình 3.14. Ảnh hưởng của NAA đến kết quả ra rễ chồi Sói rừng.....	57
Hình 3.15. Ảnh hưởng của IBA đến kết quả ra rễ chồi Sói rừng .....	58
Hình 3.16. Ảnh hưởng của một số loại giá thể đến tỷ lệ sống của cây Sói rừng.....	59
Hình 3.17. Sói rừng giai đoạn sau in vitro .....	8