

ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN
TRƯỜNG ĐẠI HỌC SƯ PHẠM

TRẦN THỊ HỒNG

NGHIÊN CỨU NUÔI CÂY *IN VITRO* VÀ TẠO RỄ TƠ
Ở CÂY Ô ĐÀU (*Aconitum carmichaelii* Debx.)

Ngành: Sinh học thực nghiệm

Mã số: 8.42.01.14

LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC

Người hướng dẫn khoa học: TS. Nguyễn Thị Ngọc Lan

THÁI NGUYÊN - 2019

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan nội dung trình bày trong luận văn đây là kết quả nghiên cứu của tôi dưới sự hướng dẫn trực tiếp của TS. Nguyễn Thị Ngọc Lan. Các số liệu, kết quả nghiên cứu trong luận văn là trung thực và chưa được công bố trong bất kỳ công trình nào khác.

Thái Nguyên, tháng 11 năm 2019

Tác giả luận văn

Trần Thị Hồng

LỜI CẢM ƠN

Trong suốt quá trình học tập, nghiên cứu và hoàn thiện luận văn này, em đã được tạo điều kiện và nhận được sự giúp đỡ quý báu từ thầy cô, cơ quan, bạn bè đồng nghiệp và gia đình.

Trước hết, em xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc tới TS. Nguyễn Thị Ngọc Lan, người hướng dẫn khoa học đã tận tâm chỉ bảo giúp đỡ em trong suốt quá trình nghiên cứu và hoàn thành luận văn này.

Em cũng xin gửi lời cảm ơn cảm ơn sâu sắc tới Quý thầy cô khoa Sinh học, Trường Đại học Sư Phạm – Đại học Thái Nguyên đã tận tình hướng dẫn, truyền dạy kiến thức cho em trong suốt khóa học.

Em xin gửi lời cảm ơn chân thành đến các thầy giáo, cô giáo trong Ban giám hiệu trường Đại học Sư phạm – Đại học Thái Nguyên, Hội đồng Khoa học của trường và Quý thầy, cô các phòng ban chức năng đã tạo điều kiện và giúp đỡ em trong suốt thời gian học tập tại trường.

Tôi cũng xin được chân thành cảm ơn Ban chủ nhiệm khoa Sinh học đã tạo điều kiện giúp đỡ cả về vật chất và tinh thần cho tôi trong quá trình học tập.

Cuối cùng, tôi xin được gửi lời cảm ơn chân thành tới các đồng nghiệp, bạn bè và gia đình đã luôn quan tâm, động viên, ủng hộ và giúp đỡ tôi.

Dù đã rất cố gắng, tuy nhiên không tránh khỏi những thiếu sót trong luận văn, rất mong nhận được những ý kiến đóng góp của Quý thầy/cô để luận văn thêm hoàn thiện.

Thái Nguyên, tháng 11 năm 2019

Tác giả luận văn

Trần Thị Hồng

MỤC LỤC

LỜI CAM ĐOAN	i
LỜI CẢM ƠN	ii
MỤC LỤC.....	ii
DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU, CÁC CHỮ VIẾT TẮT	iv
DANH MỤC CÁC BẢNG	v
DANH MỤC CÁC HÌNH	vi
MỞ ĐẦU	1
1. Đặt vấn đề.....	1
2. Mục tiêu nghiên cứu	2
3. Nội dung nghiên cứu	2
Chương 1: TỔNG QUAN TÀI LIỆU	3
1.1. Giới thiệu chung về cây Ô đầu	3
1.1.1. Đặc điểm phân loại và hình thái của cây Ô đầu	3
1.1.2. Thu hái, chế biến và bảo quản cây Ô đầu.....	4
1.1.3. Thành phần hóa học, giá trị dược liệu và công dụng của cây Ô đầu	4
1.1.4. Nguồn gốc và phân bố của cây Ô đầu tại Việt Nam	5
1.1.5. Vai trò của cây Ô đầu	6
1.2. Các nghiên cứu nhân giống <i>in vitro</i> trên thế giới và ở Việt Nam	7
1.2.1. Các nghiên cứu nhân giống <i>in vitro</i> trên thế giới.....	7
1.2.2. Các nghiên cứu nhân giống <i>in vitro</i> ở Việt Nam.....	8
1.3. Các nghiên cứu tạo rễ tơ và ứng dụng.....	14
1.3.1. Tạo sinh khối rễ tơ.....	14
1.3.2. Một số nghiên cứu tạo rễ tơ.....	14
Chương 2: VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	18
2.1. Vật liệu và hóa chất	18
2.1.1. Vật liệu nghiên cứu.....	18
2.1.2. Hóa chất, thiết bị.....	18

2.2. Địa điểm nghiên cứu.....	18
2.3. Phương pháp nghiên cứu	19
2.3.1. Phương pháp pha môi trường và nuôi cấy.....	19
2.3.2. Phương pháp nuôi cấy <i>in vitro</i>	19
2.4. Phương pháp nuôi cấy tạo rễ tơ ở cây Ô đầu	21
2.4.1. Chuẩn bị mẫu lây nhiễm.....	21
2.4.2. Chuẩn bị dịch khuẩn <i>Agrobacterium rhizogenes</i>	22
2.4.3. Lây nhiễm mẫu với vi khuẩn.....	22
2.4.4. Diệt khuẩn và cảm ứng rễ tơ.....	22
2.4.5. Nhân nuôi rễ tơ	22
2.4.6. Xác định khối lượng rễ khô	22
2.4.7. Phương pháp xử lý số liệu	23
Chương 3: KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN	24
3.1. Kết quả tạo vật liệu khởi đầu nuôi cấy <i>in vitro</i> cây Ô đầu	24
3.2. Kết quả tái sinh chồi <i>in vitro</i> ở cây Ô đầu	25
3.2.1. Ảnh hưởng của BAP đến khả năng nhân nhanh và sinh trưởng của chồi <i>in vitro</i> ở cây Ô đầu	25
3.2.2. Ảnh hưởng của kinetin đến khả năng nhân nhanh và sinh trưởng của chồi <i>in vitro</i> ở cây Ô đầu	29
3.3. Kết quả tạo cây Ô đầu <i>in vitro</i> hoàn chỉnh	31
3.3.1. Ảnh hưởng của α -NAA đến sự phát sinh rễ <i>in vitro</i> ở cây Ô đầu.....	31
3.3.2. Ảnh hưởng của IBA đến sự phát sinh rễ <i>in vitro</i> ở cây Ô đầu	33
3.4. Kết quả trồng và ra cây ngoài vườn ươm	35
3.5. Tạo dòng rễ tơ ở cây ô đầu	37
3.5.1. Kết quả tạo dòng rễ tơ ở cây Ô đầu	37
KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ.....	45
TÀI LIỆU THAM KHẢO	46

DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU, CÁC CHỮ VIẾT TẮT

2,4-D	: 2,4D-Dichlorophenoxy Acetic Acid
AS	: Acetosyringone
BAP	: 6-Benzyl Amino Purin
ĐC	: Đối chứng
IAA	: Indoly Acetic Acid
IBA	: Indoly Butyric Acid
Kinetin	: 6-furturylamino purine
LB	: Luria Bertani
MS	: Murashige – Skoog
NAA	: α - Naphtalen Acetic Acid

DANH MỤC CÁC BẢNG

Bảng 3.1.	Kết quả tạo vật liệu khởi đầu nuôi cấy <i>in vitro</i> từ đoạn thân cây Ô đầu (n = 100 sau 4 tuần nuôi cấy).....	24
Bảng 3.2.	Ảnh hưởng của BAP đến khả năng nhân nhanh và sự sinh trưởng của chồi ở cây Ô đầu (n = 30)	26
Bảng 3.3	Ảnh hưởng của Kinetin đến khả năng nhân chồi và sự sinh trưởng ở cây Ô đầu (n = 30).....	29
Bảng 3.4.	Ảnh hưởng α -NAA đến sự phát sinh rễ <i>in vitro</i> ở cây Ô đầu	32
Bảng 3.5.	Ảnh hưởng của IBA đến sự phát sinh rễ <i>in vitro</i> ở cây Ô đầu.....	34
Bảng 3.6.	Ảnh hưởng của giá thể đến tỷ lệ sống của cây Ô đầu giai đoạn vườn ươm (n = 30)	36
Bảng 3.7.	Kết quả khảo sát vật liệu thích hợp tạo rễ tơ ở cây Ô đầu (n=150, sau 6 tuần).....	38
Bảng 3.8.	Ảnh hưởng của mật độ vi khuẩn <i>A. rhizogenes</i> , nồng độ AS, thời gian nhiễm khuẩn, thời gian đồng nuôi cấy đến hiệu quả tạo rễ tơ từ đoạn rễ cây Ô đầu (n=150, sau 6 tuần).....	41
Bảng 3.9.	Xác định ngưỡng diệt khuẩn của cefotaxime sau 6 tuần	42
Bảng 3.10.	Ảnh hưởng của trạng thái môi trường đến sự tăng trưởng rễ tơ ở cây Ô đầu sau 6 tuần	43

DANH MỤC CÁC HÌNH

Hình 1.1.	Cây Ô đầu.....	3
Hình 3.1.	Hình ảnh chồi tái sinh khử trùng bằng HgCl_2 0,1% trong 9 phút.....	24
Hình 3.2.	Ảnh hưởng của BAP tới sự phát sinh chồi ở cây Ô đầu sau 8 tuần nuôi cấy	27
Hình 3.3.	Ảnh hưởng của Kinetin tới sự phát sinh chồi ở cây Ô đầu sau 8 tuần nuôi cấy	30
Hình 3.4.	Ảnh hưởng của α -NAA đến sự phát sinh rễ in vitro ở cây Ô đầu sau 8 tuần nuôi cấy	33
Hình 3.5.	Ảnh hưởng của IBA đến sự phát sinh rễ in vitro ở cây Ô đầu sau 8 tuần nuôi cấy	35
Hình 3.6.	Hình ảnh cây Ô đầu trên giá thể đất phù sa + trấu hun.....	36
Hình 3.7.	Khảo sát vật liệu thích hợp để tạo rễ tơ ở cây Ô đầu sau 6 tuần biến nạp	38
Hình 3.8.	Hình ảnh cảm ứng và nuôi cấy rễ tơ ở cây Ô đầu.....	43

MỞ ĐẦU

1. Đặt vấn đề

Việt Nam là một nước nhiệt đới có hệ thực vật phong phú và đa dạng. Trong đó có nhiều loài thực vật được sử dụng làm thuốc hoặc làm nguyên liệu để sản xuất thuốc chữa bệnh như: cây Xạ đen, Bình vôi, Diệp hạ châu, Giảo cổ lam và Ô đầu... Tuy nhiên, nguồn dược liệu ngoài tự nhiên đang bị suy giảm với tốc độ nhanh chóng cả về số lượng và chất lượng. Nhiều loài dược liệu quý ở trong tình trạng khan hiếm và có đang nguy cơ bị tuyệt chủng làm ảnh hưởng đến đa dạng sinh học và nguồn cung cấp dược liệu cho con người, trong đó có cây Ô đầu. Nguyên nhân chủ yếu của vấn đề này là do việc khai thác quá mức, cùng với các điều kiện bất lợi từ môi trường, sự biến đổi khí hậu và sự thu hẹp của diện tích rừng tự nhiên... Vì vậy, cần thiết phải có các biện pháp bảo vệ cũng như phát triển nguồn gen cây dược liệu nói chung và cây Ô đầu nói riêng.

Cây Ô đầu (*Aconitum carmichaelii* Debx.) có chứa aconitin là một loại alkaloid có độc tính cao, tập trung chủ yếu trong củ Ô đầu. Ngoài ra, trong Ô đầu còn chứa nhiều hợp chất khác như các polysaccharide, flavonoid và các acid hữu cơ... Đối với con người, những hợp chất trong Ô đầu có tác dụng giảm đau, chống oxy hoá, tăng cường hệ miễn dịch, ngăn cản sự tăng sinh tế bào, chống ung thư, tác động lên tim mạch... Hiện nay, cây Ô đầu được nhân giống bằng củ con (phụ tử) hoặc cành giâm, nếu trồng bằng cành giâm thì tỷ lệ mọc thành cây cũng không cao. Vì vậy, cần có nghiên cứu tạo ra nguồn đồng đều, sạch bệnh để đáp ứng nhu cầu trồng và phát triển cây Ô đầu. Thực tiễn cho thấy việc sử dụng kỹ thuật nuôi cấy mô tế bào thực vật để nhân giống cây trồng là một sự lựa chọn hiệu quả với nhiều ưu điểm nổi bật là nhân giống nhanh, chủ động, với số lượng lớn, thu được nguồn giống sạch bệnh và giảm chi phí.

Bên cạnh đó, để đáp ứng nhu cầu về thu hợp chất thứ cấp từ cây Ô đầu, việc sản xuất sinh khối thông qua nuôi cấy rễ tơ đang là một hướng đi mới. Nuôi cấy rễ tơ có tính ổn định di truyền, sinh hóa, tốc độ sinh trưởng nhanh và

khả năng tổng hợp các hợp chất tự nhiên ở mức tương đương so với cây còn nguyên vẹn. Do đó, nuôi cấy rễ tơ của cây dược liệu sẽ là một hệ thống hữu ích cho việc sản xuất các hợp chất có hoạt tính sinh dược cao, đặc biệt là cây Ô đầu. Xuất phát từ những lý do trên, chúng tôi tiến hành nghiên cứu đề tài: "**Nghiên cứu nuôi cấy *in vitro* và tạo rễ tơ ở cây Ô đầu (*Aconitum carmichaelii* Debx.)**".

2. Mục tiêu nghiên cứu

Xác định được môi trường thích hợp trong nuôi cấy *in vitro* và tạo rễ tơ ở cây Ô đầu (*Aconitum carmichaelii* Debx.).

3. Nội dung nghiên cứu

- 3.1. Nghiên cứu tạo vật liệu khởi đầu nuôi cấy *in vitro* cây Ô đầu
- 3.2. Nghiên cứu tái sinh chồi *in vitro* cây Ô đầu
- 3.3. Nghiên cứu tạo cây Ô đầu *in vitro* hoàn chỉnh
- 3.4. Nghiên cứu trồng và ra cây ngoài vườn ươm
- 3.5. Nghiên cứu tạo dòng rễ tơ cây Ô đầu