

**BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO
TRƯỜNG ĐẠI HỌC NÔNG LÂM THÀNH PHỐ HỒ CHÍ MINH
BỘ MÔN CÔNG NGHỆ SINH HỌC**

LÊ HỒNG THỦY TIÊN

**KHẢO SÁT SỰ RA HOA TRONG ỚNG NGHIỆM
Ở CÂY DỪA CẠN (*Catharanthus roseus*)
VÀ DÃ YÊN THẢO (*Petunia hybrida*)**

Luận văn Kỹ sư

Chuyên ngành: Công nghệ sinh học

Thành phố Hồ Chí Minh

Tháng 9/2006

**MINISTRY OF EDUCATION AND TRAINING
NONG LAM UNIVERSITY
BIOTECHNOLOGY DEPARTMENT**

LE HONG THUY TIEN

***IN VITRO* FLOWERING OF
VINCA (*Catharanthus roseus*)
AND PETUNIA (*Petunia hybrida*)**

Thesis Engineering

Major: Biotechnology

Profeser:

PhD. Tran Thi Dung

Student:

Le Hong Thuy Tien

Ho Chi Minh city

9/2006

**BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO
TRƯỜNG ĐẠI HỌC NÔNG LÂM THÀNH PHỐ HỒ CHÍ MINH
BỘ MÔN CÔNG NGHỆ SINH HỌC**



KHÓA LUẬN TỐT NGHIỆP

**KHẢO SÁT SỰ RA HOA TRONG ỚNG NGHIỆM
Ở CÂY DỪA CẠN (*Catharanthus roseus*)
VÀ DÃ YÊN THẢO (*Petunia hybrida*)**

NGÀNH: CÔNG NGHỆ SINH HỌC

NIÊN KHÓA: 2002 – 2006

SINH VIÊN THỰC HIỆN: LÊ HỒNG THỦY TIÊN

**Thành phố Hồ Chí Minh
2006**

**BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO
TRƯỜNG ĐẠI HỌC NÔNG LÂM THÀNH PHỐ HỒ CHÍ MINH
BỘ MÔN CÔNG NGHỆ SINH HỌC**

**KHẢO SÁT SỰ RA HOA TRONG ỐNG NGHIỆM
Ở CÂY DỪA CẠN (*Catharanthus roseus*)
VÀ DÃ YÊN THẢO (*Petunia hybrida*)**

GVHD: TS. TRẦN THỊ DUNG

SVTH: LÊ HỒNG THỦY TIÊN

Thành phố Hồ Chí Minh
2006

LỜI CẢM ƠN

Xin chân thành cảm ơn:

- Ban Giám Hiệu trường Đại học Nông Lâm Tp. Hồ Chí Minh đã tạo mọi điều kiện cho tôi trong suốt thời gian học tập.
- Các thầy cô trong Bộ môn Công nghệ sinh học cùng các thầy cô đã trực tiếp giảng dạy trong suốt bốn năm qua.
- TS. Trần Thị Dung đã tận tình hướng dẫn và động viên trong thời gian thực hiện đề tài tốt nghiệp.
- KS. Trần Ngọc Hùng, KS. Nguyễn Thị Thu Hằng, CN. Trần Thị Bích Chiêu thuộc Trung tâm Công nghệ sinh học Đại học Nông Lâm Tp.HCM.
- KS. Lê Thanh Trung cùng toàn thể lớp CNSH28 thân yêu đã hỗ trợ, giúp đỡ và động viên tôi trong suốt thời gian làm đề tài.

Thành kính ghi ơn ba mẹ cùng những người thân trong gia đình luôn tạo điều kiện và động viên con trong suốt quá trình học tập tại trường.

Tháng 08 năm 2006

Lê Hồng Thủy Tiên

TÓM TẮT

LÊ HỒNG THỦY TIÊN, Đại học Nông Lâm Tp. Hồ Chí Minh. Tháng 08/2006.

“KHẢO SÁT SỰ RA HOA TRONG ống NGHIỆM Ở CÂY DỪA CẠN
(*Catharanthus roseus*) VÀ DÃ YÊN THẢO (*Petunia hybrida*)”

Giảng viên hướng dẫn: TS. Trần Thị Dung

Đề tài được thực hiện tại Bộ môn Công nghệ sinh học Đại học Nông Lâm Tp. HCM trên đối tượng cây hoa Dừa cạn và Dã yên thảo *in vitro*. Tiến hành nuôi cấy cây con trong môi trường cảm ứng ra hoa như sử dụng kết hợp TDZ với NAA, BA với NAA, tăng nồng độ KH_2PO_4 và nồng độ đường, giảm nồng độ KNO_3 .

Những kết quả thu được:

❖ Đối với cây Dừa cạn

- + Môi trường thích hợp nhất cho cây Dừa cạn *in vitro* ra hoa (đạt tỉ lệ 100%) là môi trường MS bổ sung 0,05 mg/l TDZ và 0,1 mg/l NAA. Cây ra nụ sau 58 ngày nuôi cấy và 68 ngày thì hoa nở, trung bình có 4 hoa/cây.
- + Môi trường MS bổ sung 0,1 mg/l TDZ và 0,1 mg/l NAA có tỉ lệ ra hoa thấp hơn đạt 33,33% nhưng có số hoa/cây cao nhất, 5,67 hoa/cây.

❖ Đối với cây Dã yên thảo

- + Trong môi trường MS chứa 340 mg/l KH_2PO_4 (gấp 2 lần so với nồng độ trong MS) và 40 g/l đường 100% cây ra nụ nhưng nụ không nở thành hoa.
- + Các thí nghiệm bổ sung TDZ hoặc BA kết hợp với NAA, tăng nồng độ KH_2PO_4 và nồng độ đường, giảm nồng độ KNO_3 đều không cảm ứng sự hình thành nụ và hoa.

MỤC LỤC

| | |
|---|----------|
| Trang bìa..... | i |
| Lời cảm ơn..... | ii |
| Tóm tắt..... | iii |
| Mục lục..... | iv |
| Danh sách các bảng..... | vii |
| Danh sách các hình..... | viii |
| | |
| PHẦN 1: MỞ ĐẦU..... | 1 |
| 1.1. Đặt vấn đề..... | 1 |
| 1.2. Mục tiêu nghiên cứu..... | 1 |
| 1.3. Giới hạn của đề tài..... | 2 |
| PHẦN 2: TỔNG QUAN TÀI LIỆU..... | 3 |
| 2.1. GIỚI THIỆU VỀ ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU..... | 3 |
| 2.1.1. Giới thiệu về cây Dừa cạn..... | 3 |
| 2.1.2. Giới thiệu về cây Dã yên thảo..... | 4 |
| 2.2. MỘT SỐ YẾU TỐ ẢNH HƯỞNG ĐẾN SỰ RA HOA NGOÀI TỰ NHIÊN..... | 6 |
| 2.2.1. Độ tuổi..... | 7 |
| 2.2.2. Yếu tố môi trường..... | 7 |
| 2.2.2.1. Dinh dưỡng..... | 7 |
| 2.2.2.2. Nhiệt độ..... | 7 |
| 2.2.2.3. Hiện tượng xuân hóa (hay sự thọ hàn)..... | 8 |
| 2.2.2.4. Quang kỳ..... | 9 |
| 2.3. MỘT SỐ YẾU TỐ ẢNH HƯỞNG ĐẾN SỰ RA HOA <i>IN VITRO</i> | 11 |
| 2.3.1. Độ tuổi..... | 12 |
| 2.3.2. Các chất điều hòa sinh trưởng..... | 13 |
| 2.3.3. Dinh dưỡng..... | 15 |
| 2.3.4. Một số yếu tố khác..... | 16 |
| 2.4. SỰ PHÁT TRIỂN CỦA HOA <i>IN VITRO</i> | 18 |
| 2.5. CÁC NGHIÊN CỨU RA HOA <i>IN VITRO</i> | 19 |
| 2.5.1. Trên thế giới..... | 19 |
| 2.5.2. Trong nước..... | 21 |

| | |
|---|-----------|
| PHẦN 3. NỘI DUNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU..... | 22 |
| 3.1. Nội dung | 22 |
| 3.2. Thời gian và địa điểm nghiên cứu | 22 |
| 3.3. Vật liệu | 22 |
| 3.4. Phương pháp nghiên cứu | 23 |
| 3.4.1. Nội dung 1 | 23 |
| 3.4.1.1. Thí nghiệm 1: Ảnh hưởng của nồng độ TDZ và NAA đến sự ra hoa <i>in vitro</i> ở cây Dừa cạn | 23 |
| 3.4.1.2. Thí nghiệm 2: Ảnh hưởng của nồng độ BA và NAA đến sự ra hoa <i>in vitro</i> ở cây Dừa cạn..... | 24 |
| 3.4.2. Nội dung 2 | 24 |
| 3.4.2.1. Thí nghiệm 1: Ảnh hưởng của nồng độ TDZ và NAA đến sự ra hoa <i>in vitro</i> ở cây Dã yên thảo | 24 |
| 3.4.2.2. Thí nghiệm 2: Ảnh hưởng của nồng độ BA và NAA đến sự ra hoa <i>in vitro</i> ở cây Dã yên thảo..... | 24 |
| 3.4.2.3. Thí nghiệm 3: Ảnh hưởng của nồng độ KH_2PO_4 đến sự ra hoa <i>in vitro</i> ở cây Dã yên thảo..... | 25 |
| 3.4.2.4. Thí nghiệm 4: Ảnh hưởng của nồng độ KNO_3 đến sự ra hoa <i>in vitro</i> ở cây Dã yên thảo | 25 |
| 3.4.2.5. Thí nghiệm 5: Ảnh hưởng của nồng độ đường đến sự ra hoa <i>in vitro</i> ở cây Dã yên thảo | 26 |
| 3.4.2.6. Thí nghiệm 6: Ảnh hưởng của nồng độ KH_2PO_4 và nồng độ đường đến sự ra hoa <i>in vitro</i> ở cây Dã yên thảo | 26 |
| 3.5. Các chỉ tiêu theo dõi | 27 |
| 3.6. Xử lý số liệu | 27 |
| PHẦN 4. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN | 28 |
| 4.1. Nội dung 1: Cây Dừa cạn <i>in vitro</i> | 28 |
| 4.1.1. Thí nghiệm 1..... | 28 |
| 4.1.2. Thí nghiệm 2..... | 33 |
| 4.2. Nội dung 2: Cây Dã yên thảo <i>in vitro</i> | 35 |
| 4.2.1. Thí nghiệm 1..... | 35 |
| 4.2.2. Thí nghiệm 2..... | 36 |

| | |
|---|-----------|
| 4.2.3. Thí nghiệm 3..... | 37 |
| 4.2.4. Thí nghiệm 4..... | 38 |
| 4.2.5. Thí nghiệm 5..... | 39 |
| 4.2.6. Thí nghiệm 6..... | 40 |
| PHẦN 5. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ..... | 44 |
| 5.1. Kết luận..... | 44 |
| 5.2. Đề nghị | 44 |
| TÀI LIỆU THAM KHẢO | |
| PHỤ LỤC | |

DANH SÁCH CÁC BẢNG

| Bảng | Trang |
|---|--------------|
| Bảng 3.1 Các nghiệm thức của thí nghiệm ảnh hưởng của nồng độ TDZ và NAA đến sự ra hoa <i>in vitro</i> ở cây Dừa cạn | 23 |
| Bảng 3.2 Các nghiệm thức của thí nghiệm ảnh hưởng của nồng độ BA và NAA đến sự ra hoa <i>in vitro</i> ở cây Dừa cạn | 24 |
| Bảng 3.3. Các nghiệm thức của thí nghiệm ảnh hưởng của nồng độ KH_2PO_4 đến sự ra hoa <i>in vitro</i> ở cây Dã yên thảo | 25 |
| Bảng 3.4. Các nghiệm thức của thí nghiệm ảnh hưởng của nồng độ KNO_3 đến sự ra hoa <i>in vitro</i> ở cây Dã yên thảo | 25 |
| Bảng 3.5. Các nghiệm thức của thí nghiệm ảnh hưởng của nồng độ đường đến sự ra hoa <i>in vitro</i> ở cây Dã yên thảo | 26 |
| Bảng 3.6. Các nghiệm thức của thí nghiệm ảnh hưởng của nồng độ KH_2PO_4 và nồng độ đường đến sự ra hoa <i>in vitro</i> ở cây Dã yên thảo | 27 |
| Bảng 4.1. Ảnh hưởng của nồng độ TDZ và NAA đến sự sinh trưởng của cây Dừa cạn <i>in vitro</i> | 28 |
| Bảng 4.2. Ảnh hưởng của nồng độ TDZ và NAA đến sự ra hoa <i>in vitro</i> của cây Dừa cạn | 29 |
| Bảng 4.3. Ảnh hưởng của nồng độ BA và NAA đến sự sinh trưởng của cây Dừa cạn <i>in vitro</i> | 33 |
| Bảng 4.4. Ảnh hưởng của nồng độ BA và NAA đến sự ra hoa <i>in vitro</i> của cây Dừa cạn | 34 |
| Bảng 4.5. Ảnh hưởng của nồng độ TDZ và NAA đến sự sinh trưởng của cây Dã yên thảo <i>in vitro</i> | 35 |
| Bảng 4.6. Ảnh hưởng của nồng độ BA và NAA đến sự sinh trưởng của cây Dã yên thảo <i>in vitro</i> | 36 |
| Bảng 4.7. Ảnh hưởng của nồng độ KH_2PO_4 đến sự sinh trưởng của cây Dã yên thảo <i>in vitro</i> | 37 |
| Bảng 4.8. Ảnh hưởng của nồng độ KNO_3 đến sự sinh trưởng của cây Dã yên thảo <i>in vitro</i> | 38 |

| | |
|--|----|
| Bảng 4.9. Ảnh hưởng của nồng độ đường đến sự sinh trưởng của cây Dã yên thảo <i>in vitro</i> | 39 |
| Bảng 4.10. Ảnh hưởng của nồng độ KH_2PO_4 và nồng độ đường đến sự sinh trưởng của cây Dã yên thảo <i>in vitro</i> | 40 |
| Bảng 4.11. Ảnh hưởng của nồng độ KH_2PO_4 và nồng độ đường đến sự ra hoa <i>in vitro</i> của cây Dã yên thảo | 41 |

DANH SÁCH CÁC HÌNH

| Hình | Trang |
|--|--------------|
| Hình 2.1. Hoa Dừa cạn | 3 |
| Hình 2.2. Hoa Dã yên thảo | 4 |
| Hình 2.3. Công thức của BA và TDZ | 14 |
| Hình 4.1. Các giai đoạn sinh trưởng và phát triển của Dừa cạn <i>in vitro</i> | 30 |
| Hình 4.2. Quá trình nở hoa của Dừa cạn <i>in vitro</i> | 31 |
| Hình 4.3. Hoa Dừa cạn <i>in vitro</i> | 32 |
| Hình 4.4. Các giai đoạn sinh trưởng và phát triển của Dã yên thảo <i>in vitro</i> | 42 |
| Hình 4.5: Cấu tạo của hoa Dã yên thảo <i>in vitro</i> | 43 |

PHẦN 1: MỞ ĐẦU

1.1. Đặt vấn đề

Trong cuộc sống của mình, thực vật đáp ứng một cách hoàn hảo với điều kiện môi trường để hoàn thành chu trình sinh trưởng và phát triển của chúng. Các quá trình: nảy mầm, tăng trưởng, thành lập hoa, trái, hạt... xảy ra tuần tự theo thời gian và ở những vùng xác định của cơ thể thực vật. Tìm hiểu các quá trình này để trả lời cho ba câu hỏi: khi nào? ở đâu? và như thế nào? là vấn đề của những nhà sinh lý thực vật. Và một trong những quá trình quan trọng nhất của cuộc sống thực vật đồng thời tồn tại nhiều bí ẩn nhất là quá trình ra hoa.

Nuôi cấy mô thực vật ra đời đã nhanh chóng trở thành một công cụ hữu ích để tìm hiểu về sinh lý thực vật, và dường như dưới góc độ *in vitro* thì sự biệt hoá chồi thành hoa được nhìn nhận một cách rõ ràng và chính xác hơn. Nghiên cứu ra hoa trong ống nghiệm không những cung cấp một mô hình cho những nghiên cứu về sự hình thành và phát triển của hoa mà còn có ý nghĩa trong chọn giống cây trồng (thông qua thụ phấn *in vitro*), đặc biệt là ở các cây có thời gian sinh trưởng dài (tre), cây có giá trị dược liệu (nhân sâm, diếp xoăn, húng,...). Vài năm gần đây, những thành công về ra hoa trong ống nghiệm được tiến hành trên cây hoa cảnh như hồng, lan, torenia.... càng gây sự chú ý của mọi người, báo hiệu một tiềm năng thương mại trong ngành hoa cảnh mini. Với ưu điểm nhỏ gọn, không tốn công chăm sóc, cây hoa trong ống nghiệm phù hợp để trang trí ở các văn phòng hiện đại, phù hợp với nhu cầu của cuộc sống hiện đại.

Dựa trên các nghiên cứu đã thực hiện trong và ngoài nước, được sự đồng ý của Bộ môn Công nghệ sinh học trường Đại học Nông Lâm, dưới sự hướng dẫn của TS. TRẦN THỊ DUNG, chúng tôi tiến hành nghiên cứu đề tài:

KHẢO SÁT SỰ RA HOA TRONG ỐNG NGHIỆM Ở CÂY DỪA CẠN (*Catharanthus roseus*) VÀ DÃ YÊN THẢO (*Petunia hybrida*)

1.2. Mục tiêu nghiên cứu

Xác định môi trường thích hợp để cây Dừa cạn và Dã yên thảo ra hoa trong ống nghiệm.

1.3. Giới hạn của đề tài

Do giới hạn về thời gian, đề tài chỉ khảo sát ảnh hưởng của một số chất điều hoà sinh trưởng (BA, TDZ, NAA) và yếu tố dinh dưỡng nhưng chưa khảo sát yếu tố môi trường khác.

PHẦN 2: TỔNG QUAN TÀI LIỆU

2.1. GIỚI THIỆU VỀ ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU

2.1.1. Giới thiệu về cây Dừa cạn

❖ Nguồn gốc phân loại [9]

| | | |
|----------------|---|------------------------------|
| Giới | : | Thực vật |
| Giới phụ | : | Tracheobionta |
| Ngành | : | Magnoliophyta |
| Ngành phụ | : | Spermatophyta |
| Lớp | : | Magnoliopsida |
| Lớp phụ | : | Asteridae |
| Bộ | : | Gentianales |
| Họ | : | Apocynaceae |
| Tên khoa học | : | <i>Catharanthus roseus</i> |
| Tên tiếng Anh | : | Vinca, Madagascar periwinkle |
| Tên tiếng Việt | : | Dừa cạn |



Hình 2.1. Hoa Dừa cạn

Dừa cạn có khả năng chịu hạn và đất nghèo dinh dưỡng, là loài hoa có xuất xứ từ Madagascar và phổ biến ở miền Nam Carolina.

❖ Đặc điểm hình thái và sinh học [2, 11]

Dừa cạn là cây hàng năm, cây cao khoảng 40 – 80 cm tùy theo loài, có nhựa trắng, phân nhánh từ các nách lá thật. Lá đơn, mọc đối, bóng loáng, hình bầu dục, mép nguyên không có răng cưa. Hoa mọc thành cặp ở nách lá, hoa gồm 5 cánh mỏng, tiểu nhụy gắn với phần trên của ống vành, tâm bì rời ở noãn sào [2].

Cây được trồng từ hạt, giâm cành hoặc từ cây con *in vitro*. Dừa cạn thích hợp trồng ở đất tơi xốp, thông thoáng, pH đất thích hợp là từ 5,4 đến 5,8. Dừa cạn trồng từ cây con *in vitro* 1 tháng tuổi sẽ ra hoa sau 3 tháng và hầu như có thể trở hoa quanh năm, chúng không cần bấm đọt để duy trì sự ra hoa. Dừa cạn là một trong những loại cây hàng năm ít bị sâu bệnh nhất, tuy nhiên vẫn có một số bệnh hại xảy ra như: bệnh tàn lụi, đốm lá [11].

❖ Một số loại Dừa cạn [11]

- Cooler Series: có khả năng chịu được điều kiện ẩm ướt. màu sắc sặc sỡ.
- Heat Wave Series: loại này trổ hoa sớm.
- Mediterranean Series: cao chỉ 12 cm nhưng có độ trải rộng lớn, thích hợp để trồng trong các giỏ, chậu cửa sổ, hoa có màu trắng, hồng, tím.
- Pacifica Series: các cánh hoa chồng lấp lên nhau, nở sớm, màu trắng, hồng, đỏ, tím.
- Tropicana Series: hoa to, nở sớm.

Trong đó có một số giống phổ biến

- + Apricot Delight: hoa màu hồng nhạt và “mắt” (chấm màu ở giữa các cánh hoa) màu đỏ tươi.
- + Blue Pear: hoa màu xanh nhạt hơi đỏ với “mắt” trắng.
- + Passion: hoa màu tím đậm với “mắt” màu vàng.

2.1.2. Giới thiệu về cây Dã yên thảo

❖ Nguồn gốc phân loại [12]

| | | |
|------------------|---|------------------------|
| Giới | : | Thực vật |
| Giới phụ | : | Tracheobionta |
| Ngành | : | Magnoliophyta |
| Ngành phụ | : | Spermatophyta |
| Lớp | : | Magnoliopsida |
| Lớp phụ | : | Asteridae |
| Bộ | : | Solanales |
| Họ | : | Solanaceae |
| Giống | : | Petunia |
| Tên khoa học | : | <i>Petunia hybrida</i> |
| Tên thông thường | : | Petunia |
| Tên tiếng Việt | : | Dã yên, Dã yên thảo |



Hình 2.1. Hoa Dã yên thảo

Dã yên thảo có nguồn gốc từ Nam Mỹ, hiện nay Dã yên thảo đã phổ biến khắp thế giới với hàng trăm giống lai.

❖ Đặc điểm hình thái và sinh học [2, 13]

Dã yên thảo là cây sống hằng năm, cây cao 15 – 30 cm. Thân có lông mịn bao quanh, phân nhánh từ các nách lá thật, một nách lá có thể phân nhiều nhánh. Lá đơn, mọc đối hay luân phiên, mặt trên và dưới của lá có phủ lớp lông mịn. Lá hình oval, mềm mại, mép nguyên không có răng cưa.

Hoa cô độc, mọc trên một cọng dài 2 - 3 cm, đài hoa cao 1 – 2,5 cm. Hoa lưỡng tính gồm 5 tiểu nhụy gắn ở phần dưới của ống vành. Nang hũy ngăn thành hai mảnh, hạt nhiều và rất nhỏ [2]. Hoa Dã yên thảo nguyên thủy có hình phễu, tuy nhiên sự lai tạo đã cho nhiều dạng hoa khác nhau như: hoa cánh đơn, hoa cánh kép với mép có viền và gợn sóng, mép đúng hình cung nhọn ở giữa. Màu sắc hoa có thể thay đổi từ tía đến trắng, tía đến đỏ, đỏ đến cam, tím đến tím nhạt. Đặc biệt nhiều loại Dã yên thảo trắng thuần khiết hay xanh nhạt pha hơi đỏ (màu hoa oải hương) có mùi thơm dịu dàng.

Dã yên thảo là cây nhất niên, nở hoa vào mùa hè. Dã yên thảo ưa sáng, sẽ trở nên mảnh khảnh và ít hoa nếu trồng trong tối. Cây thích hợp với điều kiện độ ẩm vừa phải, có thể sống trong điều kiện hơi khô nhưng không thích ứng với điều kiện ngập úng. Cây thích hợp với khí hậu nóng và ẩm, không chịu được nhiệt độ quá lạnh hay quá nóng. Dã yên thảo trồng được trên hầu hết các loại đất, nhưng tốt nhất là đất màu mỡ, đất có pH từ 6.0 – 7.0.

Bấm đọt để kích thích cây đâm nhánh tạo độ rũ cho cây, nếu cây ốm yếu hay sau khi cho hoa rộ thì cũng nên tỉa lá bớt để cây phục hồi lại.

Dã yên thảo thường bị chết vì úng nước, vì vậy cần tưới nước đúng liều lượng, không tưới nước lên lá và nụ tránh làm thối lá và nụ, cải thiện điều kiện vệ sinh và duy trì ẩm độ thích hợp. Ngoài ra, Dã yên thảo thường bị héo rũ do nấm, bị thối nhũn do vi khuẩn cũng như sâu, sên, rệp cắn phá. Một số bệnh virus cũng ảnh hưởng nhiều đến cây như làm biến dạng lá, cây chậm phát triển, hoa không có màu và hình dạng thay đổi, thân tàn lụi liên tục, thối đỉnh, lá có những sọc xanh sáng, bị lốm đốm và héo, có khi kết dính thành cụm [13].

❖ Các loại Dã yên thảo [13]

Grandifloras: hoa lớn, nhiều hoa có đường kính đến 12,5 cm, gồm cả dạng hoa đơn hoặc hoa kép. Một vài giống hoa đơn có cánh gợn sóng hoặc viền, thân leo, có xu hướng lan rộng ra xung quanh. Do hoa lớn, nhiều và thường úp xuống nên dễ bị

thời trong thời tiết nóng và ẩm, nếu muốn trồng loại này thì phải chăm sóc kỹ. Những giống hoa Grandifloras phổ biến: Supercascade, Super magric, Ultra, Storm và Falcon.

Multifloras: hoa nhỏ, đường kính khoảng 5 - 7,5 cm, nhiều hoa, gồm cả dạng hoa đơn và hoa kép. Multiflora sống mạnh mẽ, chịu được nhiệt độ cao lẫn sương giá, kháng được bệnh thối cánh hoa. Những dạng hoa Multifloras đẹp như: Carpet, Primetime, Heavenly Lavender

Floribundas: đây là Dạng trung gian giữa Grandifloras, Multifloras. Nhóm này trổ hoa nhiều như Multifloras và kích thước hoa trung bình. Một số dạng hoa phổ biến: Celebrity, Madness, Double Madness.

Millifloras: cây nhỏ, dạng bụi rậm rạp, cho nhiều hoa có đường kính từ 2,5 – 3,5 cm. Chúng thích hợp để trồng trên các ụ đất hoặc trong giỏ treo. Fantasy là một dạng trong nhóm này.

Spreading Petunias: loại này phát triển chậm nhưng có thể trải rộng ra từ 0,9 – 1,2 m. Hoa có nhiều màu sắc, thích hợp để trồng ở bồn hoa cửa sổ hoặc trong các giỏ treo. Spreading Petunias chịu được khô hạn và rất dễ trồng. Phổ biến nhất trong nhóm này là “Purple Wave”. Ngoài ra trong nhóm này còn có “Wave” và “Laura Bush”.

2.2. MỘT SỐ YẾU TỐ ẢNH HƯỞNG LÊN SỰ RA HOA NGOÀI TỰ NHIÊN

Trong suốt cuộc đời mình, cơ thể thực vật chịu nhiều biến đổi đặc trưng cho từng giai đoạn khác nhau của vòng đời. Ở thực vật có hoa, sự chuẩn bị và thực hiện quá trình sinh sản, sự hình thành và phát triển của hạt và quả là những giai đoạn chủ yếu của sự phát triển. Hoa được thành lập từ chồi ngọn hay chồi nách qua 3 giai đoạn chính: chuyển tiếp ra hoa, tượng hoa, tăng trưởng và nở hoa

- Sự chuyển tiếp ra hoa: gây nên những biến đổi sâu sắc của mô phân sinh ngọn, từ mô phân sinh dinh dưỡng thành mô phân sinh tiền hoa. Tại giai đoạn này có sự tăng mạnh hoạt tính biến dưỡng (tổng hợp RNA, ribosome, protein), sự kéo dài lông thân do hoạt động mạnh của vùng ngọn của mô phân sinh tiền hoa.
- Sự tượng hoa: tức sự sinh cơ quan hoa (bầu noãn, bao phấn, cánh hoa, đài hoa), xảy ra 2- 3 ngày sau giai đoạn chuyển tiếp ra hoa. Sự phát triển của các sơ khởi hoa xảy ra nhanh chóng, làm chồi phồng lên thành nụ hoa.

- Sự tăng trưởng và nở hoa: khi sự tượng hoa hoàn thành, nụ hoa có thể tiếp tục tăng trưởng và nở (đối với cây nhất niên). Tuy nhiên, nụ hoa có thể vào trạng thái ngủ (nụ hoa Lilas được tạo vào cuối hè nhưng hoa chỉ nở vào mùa xuân nhờ nhiệt độ lạnh của mùa đông gỡ trạng thái ngủ). [7]

Quá trình hình thành hoa tưởng chừng là một giai đoạn tất yếu trong cuộc đời của thực vật nhưng thật sự đây là một giai đoạn rất phức tạp. Đã có nhiều nghiên cứu về các yếu tố ảnh hưởng lên sự hình thành hoa, cơ chế tác động của chúng lên cơ thể thực vật nhưng cho đến nay chưa có một quy luật nào chắc chắn và tuyệt đối.

Dựa vào những nghiên cứu trước đây thì có một số yếu tố nổi bật sau đây ảnh hưởng lên sự ra hoa của thực vật

2.2.1. Độ tuổi [7]

Sự ra hoa là bước chuyển quan trọng trong đời sống thực vật. Để một chồi dinh dưỡng trở thành sinh sản, thực vật cần phải đạt tới trạng thái phát triển tối thiểu hay trưởng thành ra hoa. Trạng thái này có thể rất sớm như ở *Arachis* (phát thể hoa thành lập ở nách tử diệp), khoảng 13 lóng ở cà chua, 5 - 7 năm ở các cây ăn trái, khoảng 50 năm ở cây sồi và lên đến 100 năm đối với cây tre.

2.2.2. Yếu tố môi trường

2.2.2.1. Dinh dưỡng [7]

Mỗi giai đoạn sinh trưởng và phát triển thực vật có nhu cầu dinh dưỡng khác nhau. Nhiều loại thực vật ra hoa phụ thuộc vào dinh dưỡng được cung cấp, giai đoạn ra hoa không nhất thiết đòi hỏi dinh dưỡng nhiều mà chủ yếu là cần sự cân đối, đặc biệt là tỉ lệ carbon/ nitơ (C/N). Thông thường, dinh dưỡng giàu đạm kích thích sự phát triển sinh dưỡng, dinh dưỡng giàu carbon kích thích sự hình thành hoa. Do đó, cần có tỉ lệ C/N cao vừa phải sẽ kích thích sự ra hoa, nếu tỉ lệ này thấp thì sự phát triển sinh dưỡng cao, nếu quá thấp hoặc quá cao thì lại ức chế sự sinh trưởng của thực vật.

2.2.2.2. Nhiệt độ [6]

Nhiệt độ môi trường cũng ảnh hưởng đến sự ra hoa trong đó có nhiệt độ thực tại và tổng tích ôn.

- + Nhiệt độ thực tại: mỗi thực vật thường có một nhiệt độ thích hợp để ra hoa.
- + Tổng tích ôn: một số thực vật không phụ thuộc vào nhiệt độ thực tại mà phụ thuộc vào tổng nhiệt độ tích lũy được trong suốt giai đoạn sinh trưởng. Khi đạt được một tổng nhiệt độ thích hợp thì trở hoa.

2.2.2.3. Hiện tượng xuân hoá (hay sự thọ hàn) [7, 9]

Hiện tượng xuân hoá ở thực vật là hiện tượng thực vật ra hoa đáp ứng lại nhiệt độ lạnh (thực vật chỉ ra hoa sau khi đã trải qua giai đoạn nhiệt độ lạnh) đặc biệt là thực vật ôn đới. Điều này đã được chứng minh qua thí nghiệm của Lyssenko (1928) trên cây lúa mì (*Triticum sativum*), ông cho đặt hạt (đã được làm ẩm cho tới 50% trọng lượng khô của hạt) vào phòng lạnh (1 hay 2^o C) trong 1 tháng thì cây không cần qua mùa đông mà vẫn ra hoa vào mùa xuân với năng suất cao. Kỹ thuật này đã được áp dụng trên hàng ngàn hecta ở Liên Xô từ năm 1935. Melchers và Lang (1948) đã chứng minh nhiệt độ lạnh cần cho cây *Jusquamec* kéo dài lóng và ra hoa nhanh hơn so với đề trong điều kiện ẩm. Theo Lang (1965) nhiệt độ thích hợp cho xuân hoá là từ 1^oC đến 7^oC (trích dẫn bởi [9])

Tóm lại, dựa vào yêu cầu thọ hàn có thể phân thực vật ra làm 3 loại:

- + Cây cần thọ hàn tuyệt đối: cần trải qua một thời gian nhiệt độ lạnh mới trở hoa (cây có dạng hoa hồng (roset), cải đường, cà rốt...)
- + Cây cần thọ hàn không bắt buộc: ra hoa sớm hơn nếu được thọ hàn (lúa mạch đen *Petkus*)
- + Cây không cần thọ hàn: cây một năm không qua mùa đông hoặc cây đa niên tượng hoa trước mùa đông.

Vậy nhiệt độ lạnh có ảnh hưởng như thế nào lên cơ thể thực vật mà có thể cảm ứng thực vật ra hoa? Có nhiều giả thuyết được đưa ra như: nhiệt độ lạnh làm ngưng một số phản ứng trao đổi chất ức chế ra hoa nhưng giả thiết này không thuyết phục vì thông thường nhiệt độ thấp làm giảm con đường trao đổi chất. Năm 1948, Malchers và Lang chứng minh rằng nhiệt độ lạnh cần thiết cho những cây dạng hoa hồng có nhu cầu thọ hàn kéo dài lóng và ra hoa. Ngoài ra hai ông còn nhận thấy có sự hiện diện của một chất được gọi là “vernalin” có tác dụng kích thích tạo hoa. Tuy nhiên, bản chất của “vernalin” cho đến nay vẫn chưa tìm ra. [7]

Gần đây, khi nghiên cứu ở mức độ phân tử, Burn và ctv (1993) nhận thấy, sự thọ hàn có liên quan đến sự khử methyl của DNA khi ông nghiên cứu trên cây *Arabidopsis*. Dòng *Arabidopsis* cần nhiệt độ lạnh cho sự ra hoa cũng ra hoa sớm khi xử lý với 5- azacytidine (tác nhân gây methyl hoá DNA) [9].

2.2.2.4. Quang kỳ

Quang kỳ được định nghĩa như độ dài chiếu sáng tới hạn trong ngày có khả năng điều khiển các quá trình sinh trưởng, phát triển của cây, có thể kích thích hoặc ức chế các quá trình khác nhau, phụ thuộc vào các loài khác nhau. Ở cây gai dầu (Cannabis), chúng có khả năng ra hoa nếu giai đoạn chiếu sáng được rút ngắn, với thí nghiệm này Tournois (1912) lần đầu tiên chứng minh sự phụ thuộc của thực vật vào quang kỳ.

Tùy theo phản ứng đối với độ dài sáng tới hạn trong ngày đối với sự ra hoa mà người ta phân chia thực vật thành 3 nhóm chính:

- Cây bất định: có thể ra hoa không phụ thuộc vào độ dài chiếu sáng miễn là giai đoạn sáng đủ cho quang hợp (tối thiểu dinh dưỡng). Trong nhóm này có: cà chua, đậu Hà Lan, bắp,...
- Cây ngày ngắn: bao gồm những cây mà chúng chỉ ra hoa khi độ dài chiếu sáng trong ngày ngắn hơn độ dài sáng tới hạn, giai đoạn tối không được gián đoạn và giai đoạn sáng phải trên tối thiểu dinh dưỡng. Các cây như đậu nành, tía tô, Maryland Manmoth,... thuộc nhóm này.
- Cây ngày dài: bao gồm những cây mà chúng chỉ ra hoa khi độ dài chiếu sáng trong ngày dài hơn độ dài sáng tới hạn. [4]

Tuy nhiên có nhiều loài không phụ thuộc quá chặt chẽ vào quang kỳ: trong quang kỳ thích hợp chúng ra hoa nhanh chóng, trong quang kỳ không thích hợp chúng vẫn ra hoa nhưng chậm hơn. Đó là các cây thích ngày ngắn (vài thứ cúc, Cosmos, Euphorbia) hay các cây thích ngày dài (lúa mì, lúa mạch đen mùa xuân, Nigella). Hiếm hơn, vài loài có thể ra hoa trong bóng tối liên tục như huệ hương (Jacinthe) từ giò, khoai tây từ chồi trên củ. Một số cây có đồng thời hai giới hạn (một trên, một dưới) đó là các cây ngày ngắn- ngày dài, ngày dài- ngày ngắn. [7]

Kích thích quang kỳ được nhận bởi phytochrom. Phytochrom phân bố rộng rãi trong lá, các chồi đang tăng trưởng, vùng dưới ngọn, vùng mô phân sinh và các cơ quan dự trữ: củ, giò, hạt.

Vào năm 1865, Sachs phát hiện ra rằng những cái lá cây để ngoài sáng sản xuất ra những chất hình thành hoa, chúng hiện diện ở hàm lượng rất nhỏ nhưng đóng vai trò tiên phong trong sự ra hoa. Đến năm 1936, Chailakhyan nhận thấy ở cây ngày ngắn Xanthium: chỉ cần đặt một lá trong ngày ngắn (che tối), phần còn lại trong ngày dài, cây có thể ra hoa những vị trí khác nhau. Vậy, lá là nơi nhận cảm ứng còn chồi là nơi

phản ứng ra hoa. Do đó, phải có sự vận chuyển kích thích từ lá tới chồi. Kích thích ấy có bản chất là hormone và Chailakhyan gọi là “florigen”- hormone tạo hoa. Vậy bản chất của florigen là gì? Cơ chế tác động của nó ra sao? Các câu hỏi được đặt ra kích thích các nhà khoa học tìm hiểu về florigen. Thí nghiệm ghép cành (Linvol và ctv, 1962; Zeevaart, 1976) cho thấy florigen có thể dẫn truyền trong libe và thay thế được giữa các loài thực vật khác nhau, các loại thực vật có quang kỳ khác nhau (cây ngày dài, cây ngày ngắn, cây bất định). Điểm khác biệt chính giữa cây ngày ngắn và cây ngày dài là tùy vào thời gian chiếu sáng mà florigen được sản xuất hay không. Đường như cũng có một chất tồn tại và di chuyển ở nhiều cây ngày dài đặt trong điều kiện ngày ngắn, nó có khả năng triệt tiêu sự ra hoa. Nó được gọi là antiflorigen - chất cản trở ra hoa. Hoa có thể hình thành hay không phụ thuộc chính vào nồng độ của hai chất trên (Lang, 1984).

Những cố gắng đi tìm bản chất của florigen vẫn chưa thành công. Gần đây, với tiến bộ về phương pháp phân tích với độ nhạy cao có thể phát hiện sự hiện diện của những hợp chất ở những nồng độ rất nhỏ đã mở ra hy vọng tìm ra florigen. Kết quả cho thấy, ngoại trừ đường, trong libe còn chứa những phân tử nhỏ, peptide, protein (Fisher và ctv, 1992; Sakuth và ctv, 1993; Marentes và Grusak, 1998; Xoconostle-Cazares và ctv, 1999; Kehr và ctv, 1999), và acid nucleic (Kühn và ctv, 1997; Ruiz-Medrano và ctv, 1999). Vì vậy florigen có thể là một peptide, 1 protein, 1 nucleic acid, hay 1 phân tử nhỏ. Chỉ có những phân tích về thành phần của nhựa libe một cách tỉ mỉ mới có thể trả lời chính xác thành phần tự nhiên của florigen là gì. Cho đến nay florigen vẫn là một bí ẩn của sinh lý thực vật [14, 15]

Bên cạnh việc giải thích cơ chế ra hoa bằng florigen còn có thuyết “đồng hồ cát” và thuyết “đồng hồ sinh học”. Hai thuyết này xuất hiện khi người ta phát hiện ra phytochrom có thể chuyển đổi qua lại giữa 2 dạng: dạng bất hoạt (Pr, không cản trở sự ra hoa) sang dạng hoạt động (Pfr, cản trở sự ra hoa) dưới ánh sáng đỏ xa và ngược lại dưới ánh sáng đỏ Pfr chuyển thành Pr. Tuy nhiên, hai thuyết này không thuyết phục bởi chưa giải thích được một số trường hợp. Gần đây, xuất hiện một quan niệm mới về sự ra hoa của thực vật. Quan niệm này cho rằng sự ra hoa được kiểm soát bởi nhiều yếu tố môi trường cùng một lúc, các yếu tố này được thực vật cảm nhận trực tiếp hoặc gián tiếp: lá cảm nhận sự thay đổi của quang kỳ, nhiệt độ bởi cả cơ thể thực vật (riêng sự thò hàn chủ yếu được cảm nhận bởi ngọn chồi), nước bởi hệ thống rễ....yếu tố này

có thể làm thay đổi ngưỡng tác dụng của yếu tố khác. Thực vật tiếp nhận các yếu tố và đáp ứng theo một cách riêng, trong điều kiện thích hợp sẽ ra hoa đồng loạt, đảm bảo cho sự giao phối cùng loài. [7]

Vẫn còn nhiều tranh cãi về cơ chế của sự ra hoa, mỗi thuyết được nêu ra đều có thể giải thích cho một số trường hợp và không thỏa mãn ở một số trường hợp khác, tuy nhiên nó mang giá trị tham khảo to lớn, giúp các nhà sinh lý thực vật định hướng cho những nghiên cứu tiếp theo. Giờ đây, cơ chế ra hoa dần được hé mở bởi ngày càng có nhiều nghiên cứu sâu hơn, ở nhiều góc độ hơn, trong đó đáng chú ý là nghiên cứu ra hoa trong điều kiện *in vitro*.

2.3. MỘT SỐ YẾU TỐ ẢNH HƯỞNG LÊN SỰ RA HOA *IN VITRO*

Năm 1934 đánh dấu một bước ngoặt quan trọng trong lịch sử ngành thực vật học khi White nuôi cấy thành công rễ cây cà chua trong ống nghiệm. Từ đó đến nay, ngành nuôi cấy mô tế bào thực vật đã mang lại vô số thành tựu to lớn phục vụ cho việc tìm hiểu những điều thú vị trong thế giới thực vật. Kỹ thuật nuôi cấy mô không những đáp ứng được nhu cầu ngày càng lớn về số lượng và chất lượng giống cây trồng mà còn là một hệ thống lý tưởng, một công cụ hiệu quả cho các nghiên cứu sâu hơn ở mức tế bào và những cơ chế phát sinh hình thái phức tạp.

Từ đây các nghiên cứu về sự ra hoa của thực vật lại được xem xét dưới một góc độ mới, góc độ *in vitro*. Điều kiện *in vitro* cho phép chúng ta tách biệt mẫu cây với điều kiện môi trường bên ngoài, đồng thời có thể chủ động điều chỉnh các yếu tố vật lý (quang kỳ, cường độ chiếu sáng, nhiệt độ, ẩm độ, pH môi trường nuôi cấy,...), các yếu tố hoá học (nồng độ đường, các chất khoáng, vitamin,...) và đặc biệt là việc bổ sung các chất điều hoà sinh trưởng. Việc cô lập mẫu cây và đặt vào môi trường theo ý muốn tránh sự ảnh hưởng của lá và rễ như ở điều kiện *in vivo* (J.P. Nitsch, 1967; Nitsch, 1972; deFossard, 1974), từ đó cho chúng ta có những kết luận chính xác hơn về cơ chế ra hoa của thực vật. Đặc biệt, nuôi cấy mô giúp rút ngắn giai đoạn non của thực vật (Chang và Hsing, 1980; Nadgauda và ctv, 1990; Lin và Chang, 1998) từ đó giảm được chi phí và thời gian nghiên cứu.

Nhìn chung, các nghiên cứu về sự ra hoa trong ống nghiệm thường được tiến hành theo một trong ba hướng sau

- Nuôi cấy thực vật hoàn chỉnh (cây con *in vitro* có đủ rễ, thân, lá)

Thí nghiệm được bắt đầu bằng việc gieo hạt trên môi trường xác định, trong điều kiện vô trùng. Các cây *in vitro* này được đặt trong điều kiện môi trường cảm ứng ra hoa, có thể là bởi các yếu tố vật lý, hoá học một cách chủ động và chính xác, trong đó quan trọng nhất là sự thay đổi nồng độ các chất điều hòa sinh trưởng thực vật.

- Nuôi cấy đỉnh sinh trưởng

Nuôi cấy đỉnh sinh trưởng cho phép chúng ta có thể cô lập vùng ngọn của thực vật và kích thích chúng ra hoa dưới điều kiện cảm ứng thích hợp. Tiến trình này dài hơn nuôi cấy cây con hoàn chỉnh và đặc biệt thích hợp cho nghiên cứu vị trí ra hoa. Nguyên tắc là không có cơ quan nào khác ngoài đỉnh sinh trưởng được nuôi cấy, nhưng khi cắt đỉnh sinh trưởng thì thường có các lá sơ khởi bao quanh, điều này có thể làm ảnh hưởng đến kết quả sau khi xử lý ra hoa. Vì vậy, sự thành công của thí nghiệm phụ thuộc đáng kể vào kích thước mẫu và sự tác động qua lại giữa các bộ phận, cơ quan.

- Nuôi cấy các bộ phận của thực vật chưa có đỉnh sinh trưởng (mô sẹo, mô lá, rễ, cơ quan hoa, tế bào lớp mỏng, phôi có từ mô sẹo, protoplast...)

Trong trường hợp này, sự ra hoa xảy ra khi các mô hình thành đỉnh sinh trưởng mới. Quá trình có thể thông qua hai con đường biệt hoá cơ quan: trực tiếp và gián tiếp. Với con đường biệt hoá cơ quan gián tiếp: mẫu cấy sẽ tạo mô sẹo rồi sự ra hoa xảy ra hoặc tiếp tục tạo các cơ quan khác rồi mới ra hoa. Còn với con đường trực tiếp, giai đoạn tạo mô sẹo được bỏ qua, hoa được hình thành trực tiếp từ mẫu cấy ban đầu đã tạo đỉnh sinh trưởng mới. [8]

Khả năng hình thành hoa *in vitro* của mẫu cấy phụ thuộc vào nhiều yếu tố bên trong và bên ngoài, hoá học và vật lý nhưng thật sự thì các yếu tố trên đều có ảnh hưởng qua những con đường rất phức tạp và không thể xác định được (Trần Thanh Vân, 1973; Trần Thanh Vân và ctv, 1974; Scorza và Janick, 1980; Croes và ctv, 1985; Lang, 1987; Compton và Vielleux, 1992). Sự ra hoa được xem là một quá trình điều hoà phức tạp bởi sự phối hợp của các yếu tố môi trường và di truyền (Tisserat và Galletta, 1995). Những yếu tố đặc biệt quan trọng là độ tuổi, dinh dưỡng, chất điều hoà sinh trưởng, ánh sáng và pH của môi trường nuôi cấy (Heylen và Vendrig, 1988) [31].

2.3.1. Độ tuổi

Thực vật phải trải qua giai đoạn sinh trưởng sinh dưỡng, đạt đến một giai đoạn trưởng thành nhất định thì ra hoa. Thực vật còn non không ra hoa vì chúng chưa có khả năng ra hoa hoặc đỉnh sinh trưởng không đáp ứng với nhân tố tạo hoa (Lang, 1965;

Hackett, 1985). Mẫu thân cây thuốc lá còn non (Wardell và Skoog, 1996b) và lá từ *Passiflora suberosa* chưa trưởng thành (Scorza và Janick, 1980) không ra hoa [8]. Những kết quả gần đây cho thấy, mô non hoặc đốt thân từ cây con 2 tháng tuổi có thể ra hoa ở tỉ lệ cao (95%). Chang và Hsing (1980) báo cáo rằng: phôi từ callus của cây nhân sâm (*Panax ginseng*) trưởng thành hình thành hoa sau một tháng cấy chuyển. Đối với cây đậu xanh (*Pisum sativum*), tăng tuổi mẫu cấy (cấy chuyển nhiều lần) thì tỉ lệ ra hoa giảm, đến lần cấy chuyển thứ 3 thì không cảm ứng ra hoa nữa [2, 26].

2.3.2. Các chất điều hòa sinh trưởng

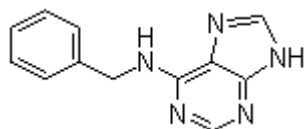
Khi thực vật đạt được độ tuổi nở hoa, các yếu tố môi trường như nhiệt độ, ánh sáng và chất dinh dưỡng có ảnh hưởng đáng kể đến sự hình thành và biệt hóa chồi hoa (Lang, 1952; Salisbury, 1961; Evans, 1971). Những ảnh hưởng này được thực vật cảm nhận gián tiếp thông qua các chất có tác dụng kích thích hay ức chế sự nở hoa tồn tại trong cơ thể chúng. Qua nhiều nghiên cứu cho thấy sự nở hoa dường như là kết quả của sự tương tác giữa các chất điều hòa sinh trưởng thực vật như cytokinin, auxin, gibberellin, ethylene, acid abscisic (ABA) và những chất khác đã biết hoặc chưa biết (Raghavan và Jacobs, 1961; Bernier và ctv, 1977; Wellensiek, 1977). Điều này càng thể hiện rõ hơn trong các nghiên cứu ra hoa trong ống nghiệm và các chất điều hòa sinh trưởng thể hiện rõ vai trò quan trọng của mình. [8]

❖ Cytokinin

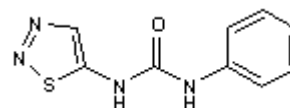
Cytokinin là một trong các chất điều hòa sinh trưởng được sử dụng phổ biến nhất, nó có vai trò kích thích sự phân chia tế bào và hình thành cơ quan, tạo chồi và tăng trưởng nụ nách [7]. Ngoài ra, cytokinin còn thúc đẩy một số thực vật bậc cao chuyển sang giai đoạn sinh sản trong điều kiện *in vitro* (Dickens và Staden, 1988; Paek và ctv, 1989; Wang và ctv, 1993, 1997; Jumin và Nito, 1996; Jumin và Ahmad 1999). Cytokinin cần thiết cho sự sinh trưởng và phát triển của nụ hoa được báo cáo ở cả cây một lá mầm (Mohanram và Batra, 1970; Zhong và ctv, 1992) và hai lá mầm (Rastogi và Sawhney, 1987; Narasimhulu và Reddy, 1984). Cytokinin có thể cảm ứng tạo hoa khi sử dụng đơn lẻ (Duan và Yazawa, 1995; Jumin và Nito, 1996; Nadgauda và ctv, 1997; Jumin và Ahmad, 1999). Ở một số thực vật, để hoa được hình thành thì cần kết hợp cytokinin với auxin (Peeter và ctv, 1994), hay gibberellin (Rastogi và Sawhney, 1987) hoặc kết hợp cùng kinetin, GA3 và IAA (Luo và ctv (2000); Tepfer và ctv, 1966) [20]. Tuy cytokinin có vai trò quan trọng trong việc hình thành hoa *in vitro*

nhưng nó vẫn không thể cảm ứng sự nở hoa ở các mô thực vật còn non. Điều này cho thấy rằng ngoài cytokinin còn có yếu tố khác liên quan đến hướng biệt hóa hoa của thực vật (Wardell và Skoog, 1969b; Scorza và Janick, 1980) [8]

Trong các loại cytokinin thì BA và thidiazuron (TDZ) thường được sử dụng nhất



6- Benzyladenine (BA)



Thidiazuron (TDZ)

Hình 2.3. Công thức của BA và TDZ

TDZ là một chất điều hoà sinh trưởng tổng hợp, không là dẫn xuất của cytokinin nhưng có tác dụng như 1 cytokinin. Các sinh trắc nghiệm được thực hiện nhận thấy rằng TDZ có ảnh hưởng gấp 4 lần hơn cytokinin. Ở nồng độ thấp, TDZ cảm ứng tái sinh chồi trực tiếp từ mô. Ở nồng độ cao, TDZ cảm ứng hình thành sẹo và những cấu trúc bất thường. Ở nồng độ quá cao, TDZ cảm ứng hình thành sẹo và phôi sinh dưỡng từ sẹo. Vì TDZ bền, có hoạt tính cao nên thường được sử dụng trong nuôi cấy mô [5].

Đối với tác dụng kích thích sự ra hoa *in vitro*, đã có nhiều nghiên cứu thành công khi bổ sung TDZ vào môi trường nuôi cấy như *Bambusa edulis* (Chuoun-Sea Lin và ctv, 2002), hoa hồng (Wang G.Y và ctv, 2002), *Cymbidium* (Chang và Chang, 2003) [25, 27, 24].

❖ Gibberellin (GA)

Trong số các loại hormone sinh trưởng, GA có ảnh hưởng ra hoa mạnh nhất. GA ngoại sinh có thể thay thế cho sự cảm ứng của quang kì khi áp dụng cho cây ngày dài phát triển trong điều kiện ngày ngắn như loài có hoa dạng hoa hồng (Lang, 1965; Vince-Prue, 1985; Levy và Dean, 1998; Evans, 1999; Trần Thanh Vân, 1999). Đối với những cây trên, đáp ứng ra hoa (GA hoặc ngày dài) phụ thuộc sự kéo dài cuống hoa. Tuy nhiên, sự ra hoa và kéo dài cuống hoa là hai tiến trình độc lập (Zeevaart, 1984). Thêm vào đó, việc áp dụng GA có thể tạo hoa ở một số cây ngày ngắn trong điều kiện không cảm ứng và có thể thay thế một phần hoặc hoàn toàn cho nhiệt độ thấp ở những câu đòi hỏi lạnh. [9].

Taiz và Zieger (1998) nhận thấy rằng GA có tác dụng thúc đẩy hay ức chế sự hình thành hoa trên nhiều loài. Tuy nhiên, đối với cây ngày trung bình thì yếu tố kiểm soát lại là gen, kết quả về sự ra hoa bởi yếu tố ngoại sinh và nội sinh không rõ ràng.

(McDaniel, 1996a, b). Đối với cây ngày trung bình *Zantedeschia*, GA thúc đẩy sự tạo hoa (Corr và Widmer, 1987; Tjia, 1989, Funnell, 1993; Kuehny, 2000) cũng như đối với loài Araceae (Henny, 1995; Henny và ctv, 1999). Hơn nữa, GA₃ cảm ứng ra hoa ở các loài cây ngày trung bình khác như bắp (Lawson và Poethig, 1995), hướng dương (Almeida và Pereira, 1996). Việc gia tăng hàm lượng GA nội sinh được tìm thấy trước khi có sự biệt hóa ở đỉnh nụ hoa hướng dương (Almeida và Pereira, 1996) và ở đỉnh nụ của những củ *Zantedeschia* cv.CG nảy chồi (Naor). Điều này cho thấy sự gia tăng nồng độ GA cũng có liên quan đến sự biệt hóa và cảm ứng ra hoa ở những cây ngày trung bình [16].

❖ Auxin

Auxin cảm ứng ra hoa ở một số loài khi sử dụng đơn lẻ như ở cây *Torenia* (Tanimoto và Harada, 1981), *Vigna radiata* (Avenido và Haulea, 1990) và *Vigna mungo* (Ignacimuthu và ctv, 1997) hay auxin kết hợp với GA₃ ở cây canation (Sankhla và ctv, 1994) và *Pisum sativum* (G. Franklin và ctv, 2000). Tuy nhiên, ở một vài loài khác thì auxin không có tác dụng (Bergoef và Bruinsma, 1979; Rastogi và Sawhney, 1987) hay thậm chí là ức chế (Blake, 1969; Deaton và ctv, 1984) [trích dẫn từ 26].

Tuy nhiên, Anton và cộng sự (1991) nghiên cứu sự tạo hoa của cây *Nicotiana tabacum* cv *Samsun* bằng cách áp dụng những loại hormone khác nhau trong những thời gian khác nhau cho thấy rằng auxin tuy không có vai trò trong sự tượng hoa nhưng nó quan trọng trong sự biệt hoá của chồi hoa sau đó [trích dẫn từ 27].

2.3.3. Dinh dưỡng

❖ Hàm lượng phospho (P) và nitơ (N)

Như chúng ta đã biết, nitơ là thành phần cơ bản của chất nguyên sinh trong tế bào, quyết định sự sinh trưởng của cây. Ngoài ra, nitơ còn là thành phần cấu tạo của enzyme và diệp lục tố. Trong nuôi cấy mô, cần cung cấp đầy đủ nitơ thông qua các muối nitrat (NO₃⁻) và amon (NH₄⁺). Tuy nhiên ở những môi trường giàu muối khoáng như MS thì cây chỉ phát triển thân lá mà không chuyển tiếp qua giai đoạn sinh sản. Cây thiếu nitơ lá nhỏ, vàng úa, cây chậm phát triển, cằn cỗi và ra hoa sớm. Phospho là nguyên tố quan trọng thứ hai sau nitơ, nó cần thiết để hình thành nucleoprotein của nhân tế bào. Phospho có tác dụng thúc đẩy sự tăng trưởng của rễ, làm cây phát dục nhanh [1]. Trong các nghiên cứu ra hoa trong ống nghiệm thường sử dụng môi trường 1/2 MS hoặc giảm lượng nitrogen, tăng lượng phospho và đã đạt được nhiều thành

công trên trên nhiều loại cây như *Bambusa vulgaris*, *Dendrocalamus giganteus*, *D. strictus* (Rout và Das, 1994), *Cymbidium* (Kostenyuk và ctv, 1999), ginseng (Chang và Hsing, 1980) [29, 23, 21].

❖ **Nồng độ đường**

Đường được xem là nguồn carbon cần thiết trong môi trường nuôi cấy, có vai trò cảm ứng sự hình thành và phát triển của hoa *in vitro* (Steinberg, 1950; Takimoto, 1960; Kimura, 1963; Loo, 1946b; Paulet, 1965; Margara và ctv, 1965; Maheshwari và Venkataraman, 1966; Nitsch, 1972; Dien và Trần Thanh Vân, 1974; Handro, 1977). Các loại đường như glucose, maltose, lactose và raffinose đều có tác dụng tốt mặc dù sucrose được sử dụng phổ biến nhất (Margana và Rancillac, 1966; Nitsch và Nitsch, 1967). Nồng độ đường tốt nhất cho sự ra hoa khác nhau giữa các loài khác nhau. Việc sử dụng các loại đường hòa tan có thể làm gia tăng hoạt động của con đường pentose phosphate (Nitsch, 1972). Ngoài ra, ánh sáng và nhiệt độ thấp cũng đóng vai trò đáng kể trong việc biểu hiện vai trò của đường. [8]

Nuôi cấy *in vitro* đã chứng minh môi trường cảm ứng ra hoa chứa nồng độ đường cao hơn môi trường cho thực vật sinh trưởng sinh dưỡng (Dickens và van Staden, 1998) và sự xử lý này làm tăng quá trình đồng hóa cung cấp cho đỉnh thúc đẩy ra hoa ở một vài loài. Điều này cấu thành cơ bản của thuyết sai lệch về dinh dưỡng (Sachs, 1977). Tuy nhiên nồng độ quá cao của đường làm suy yếu sự sinh trưởng và ức chế ra hoa (Vincent Dielen và ctv, 2000) vì làm ảnh hưởng đến áp suất thẩm thấu của môi trường (trích dẫn từ [28]).

2.3.3. Một số yếu tố khác

❖ **Các chất khác**

Ngoài các chất cơ bản có trong môi trường nuôi cấy như: các chất vô cơ và hữu cơ, chất điều hoà sinh trưởng thì còn có một số chất khác cũng đóng vai trò là tác nhân kích thích hoặc ức chế sự ra hoa trong ống nghiệm. Các chất kích thích sự ra hoa *in vitro* thường là các hợp chất phenol như p-coumaric acid và coumarin (Paulet và Nitsch, 1964), EDTA (Maheshwari và Chauhan, 1963), nước dừa, dịch chiết từ cây *L. annua* đang nở hoa hoặc chưa nở hoa (Pierik, 1967), orotic acid, thymine, adenine, abscisic acid (Nitsch và Nitsch, 1967), glucosamine, diethylstilbesterol, uridylic acid (Margara và Touraud, 1967), amino acid, amino sugars và meso-inositol (Margara và Touraud, 1967). Ngược lại, các RNA nucleosides, Flavin-adenine-dinucleotide

(Chailakhyan và ctv, 1961) và dịch chiết từ cây *Kalanchoe blossfeldiana* chưa được cảm ứng ra hoa (Blake, 1972) có vai trò như chất ức chế sự hình thành hoa [8].

❖ Quang kỳ [8]

Ở điều kiện tự nhiên, quang kỳ đóng vai trò rất quan trọng cho sự ra hoa và qua nhiều nghiên cứu quang kỳ cũng cần thiết cho sự ra hoa *in vitro* đặc biệt là ở các loài nhạy cảm với chiều dài ngày. Các nghiên cứu cho thấy sự cảm ứng quang kỳ của thực vật *in vitro* có thể là do toàn cơ thể thực vật (Hillman, 1959), đỉnh sinh trưởng (Raghavan, 1961; Harada, 1967; Jacobs và Suthers, 1971), đốt thân (Harada, 1966; C. Nitsch, 1967), đoạn cắt của trục dưới lá mầm (Nitsch, 1972), mẫu mô lá (Rossini và Nitsch, 1966) và đốt rễ (Paulet và Nitsch, 1964; Bouriquet, 1966; Margana và Touraud, 1967, 1968). Các xử lý quang kỳ nhìn chung thường ứng dụng cho các mẫu cấy còn non, qua các thí nghiệm cho thấy rằng sự cảm nhận kích thích của ánh sáng ở thực vật phụ thuộc vào sự hiện diện của lá, đỉnh sinh trưởng hoặc cả cây hàn chính. Sự phản ứng của thực vật đáp ứng với quang kỳ còn phụ thuộc vào nồng độ tối thiểu của đường có trong môi trường nuôi cấy (Margana và Touraud, 1968; C. Nitsch, 1967, 1972). Trong một vài trường hợp người ta thấy rằng sucrose có thể thay thế hoàn toàn sự kích thích ngày dài ở các cây *in vitro* (Lona, 1948; Baldev, 1959, 1962; Deltour, 1967). Zeatin có thể thay thế kích thích ngày ngắn cho sự nở hoa của cây *Wolffia microscopica* (Margara và ctv, 1965).

❖ pH và trạng thái vật lý của môi trường nuôi cấy

Sự phát triển của mô có thể thay đổi hoàn toàn nếu chúng được nuôi cấy trên một môi trường đặc hoặc trong một môi trường lỏng. Các rễ của cây endive (một loại rau cải thường được sử dụng ở Châu Âu) được nuôi trong môi trường lỏng có cầu giấy chỉ có thể sinh ra các chồi dinh dưỡng, trong lúc ấy nếu nuôi trên môi trường có agar thì có thể tạo nên các chồi hoa [3]. Tương tự, mẫu cấy rễ *C. intybus* trong môi trường có agar cho tỷ lệ mẫu nở hoa nhiều hơn trong môi trường lỏng sử dụng cầu giấy lọc làm giá thể (Margara và Bouniols, 1967; Bouniols và Margara, 1968; Bouniols, 1971) [7]. Ngược lại, G. R. Rout và P. Das (1994) khi nghiên cứu tạo phôi soma và ra hoa trong ống nghiệm ở 3 loài tre là *Bambusa vulgaris*, *Dendrocalamus giganteus* và *Dendrocalamus strictus* thì môi trường lỏng cảm ứng ra hoa tốt hơn môi trường thạch [29]. Nguyên nhân của hiện tượng này chưa được hiểu rõ, có thể tùy thuộc vào loài thực vật được nuôi cấy.

pH môi trường nuôi cấy có ảnh hưởng đến sự phát triển bình thường của nụ hoa (hoa có đủ các cơ quan hoa). Ví dụ pH 5,0 thích hợp với cây *Cleome* (de Jong, Smit và Bruinsma, 1974), Rastogi và S. ivvhney (1987) nhận thấy các cơ quan hoa của cà chua dài hơn ở pH 4,5 nhưng ở pH 5,8 mới là pH thích hợp nhất cho sự phát triển bình thường của hoa; ở pH 3,9 thì nụ hoa của cây cải dầu (*Brassica napus*) phát triển bình thường (P. L. Polowick và V. K. Sawhney, 1999) [trích dẫn từ 20].

❖ Sự cắt rễ [trích dẫn từ 23]

Việc cắt rễ cũng có hiệu quả tốt lên sự thúc đẩy ra hoa ở vài cây thân gỗ (Fossard 1972, Meilan 1997). Nguyên nhân có thể là do tác nhân ức chế sự ra hoa được hình thành ở rễ, vì vậy người ta loại bỏ dấu hiệu ngăn cản sự hình thành hoa bằng cách cắt rễ. Điều này cũng được thực hiện đối với lan, khi nuôi cấy *Cybidium niveo – marginatum* Mak trên môi trường 1/20 N, 5P, chỉ cắt rễ ngoài ra không sử dụng chất điều hòa sinh trưởng nào thì có 5,2% chồi cho hoa (Kostenyuk, B. J. Oh, I. S. So, 1999).

2.4. SỰ PHÁT TRIỂN CỦA HOA *IN VITRO*

Sự tượng hoa thường xuất hiện sau những cảm ứng bởi môi trường. Giai đoạn này thường được thể hiện trong nuôi cấy *in vitro* và *in vivo* qua sự duy trì và tích lũy tinh bột, sự phân bố phức tạp hơn của lưới nội chất trong tế bào chất, sự tăng cường hoạt động của ty thể, của các enzyme thủy giải, tăng mật độ ribosome, tăng hoạt động của các quá trình nguyên phân và hệ số hô hấp ở đỉnh sinh trưởng hoa (Ebrahim Zadeh và Nicolas – Prat, 1969; Salisbury, 1971; Yeung và Peterson, 1972; Wardell và vavf Skoog, 1973; Trần Thanh Vân và Chlyah, 1976; Bernier và ctv, 1977).

Các hoa tạo ra trong ống nghiệm thường có kích thước nhỏ hơn hoặc có hình dạng khác thường so với hoa ngoài tự nhiên (Buteko, 1964; Ganapathy, 1969; Mehra và Mehra, 1972; Trần Thanh Vân, 1973; Scorza và Janick, 1980) [8]. Nadgauda Rajni S. và ctv (1997, [30]) khi nghiên cứu trên cây tre thì nhận thấy hoa *in vitro* có kích thước nhỏ hơn nhưng vẫn có đầy đủ các cơ quan hoa, tương tự đối với hoa *Gentiana triflora* Pall. var. *axillarflora*, tuy màu sắc hoa có sáng hơn, số bao phấn ít hơn nhưng hoa vẫn có hình chuông nguyên thủy (Zhang và Leung, 2000). Có một vấn đề mà các hoa tạo ra trong ống nghiệm thường hay gặp phải đó là tỉ lệ nở hoa không đạt 100%. Tỉ lệ này đạt khoảng 70 % trên cây hoa nhài (Jumin và Ahmad, 1998), 72% trên lúa mì (Yongsak và ctv, 2000) [19, 31].

2.5. CÁC NGHIÊN CỨU RA HOA *IN VITRO*

2.5.1. Trên thế giới

- Chang và Hsing (1980) tạo phôi từ các mô sẹo rễ của cây nhân sâm (*Panax ginseng*) và các phôi này ra hoa khi nuôi cấy trên môi trường 1/2 MS có bổ sung 1 mg/l BA và 1 mg/l GA₃. Lee và ctv, 1991, phát hiện ra rằng BA đơn lẻ ở nồng độ 5μM trong môi trường MS cũng cho hoa, khi chỉ có GA₃ thì không có hoa. Nhưng W. Tang, 1999, nhận thấy GA₃ cũng có tác dụng tạo hoa, tốt nhất là ở nồng độ 2 mg/l [21].
- G. R. Rout và P. Das (1994) nghiên cứu tạo phôi soma và ra hoa trong ống nghiệm ở 3 loài tre là *Bambusa vulgaris*, *Dendrocalamus giganteus* và *Dendrocalamus strictus*. Đốt thân của cây con tái sinh từ phôi soma được nuôi cấy trên môi trường cảm ứng ra hoa: 1/2 MS bổ sung 0,5 mg/l adenin sulphate; 0,25 mg/l IBA; 0,5 mg/l GA₃ và 3% sucrose. Sau 12 tuần nuôi cấy thì cho hoa, môi trường lỏng cảm ứng ra hoa tốt hơn môi trường có agar (60-70% so với 25-30%) [29].
- Rajani S. Nadgauda và ctv (1997) báo cáo rằng khi nuôi cấy cây con *in vitro* của giống tre *Bambusa arundinacea* trong môi trường MS lỏng chứa 2% sucrose, 5% nước dừa và 2,2 μM BA, sau 3 - 6 tháng có 70 % mẫu cấy ra hoa. Khi so sánh hoa của cây tre *in vitro* và *in vivo*, ông nhận thấy hoa của cây *in vitro* tuy nhỏ hơn nhưng vẫn đủ các cơ quan như bao phấn, bộ nhị, bộ nhụy, lá bắc, màng ngoài và có khả năng thụ phấn [30].
- Kostenyuk và ctv (1999) cảm ứng ra hoa trong ống nghiệm lan *Cymbidium niveo – marginatum* Mak. 40 ngày tuổi. Nhóm nghiên cứu nhận thấy rằng sau 90 ngày nuôi cấy nghiệm thức giảm 1/20 N, tăng 5 lần P bổ sung 10 mg/l BA có cắt rễ hay không cắt rễ tỉ lệ ra hoa cao nhất (97,5%, 96,6%), 10 mg/l BA trong môi trường MS cũng cảm ứng 94,7% cây ra hoa [21].
- H. B. Jumin và M. Ahmad (1999) tiến hành thí nghiệm ra hoa trong ống nghiệm ở cây hoa nhài (*Murraya paniculata* (L). Jack). Hạt được nuôi cấy trên môi trường 1/2 MT (Murashige và Tucker, 1969) chứa 5% sucrose, bổ sung BA ở những pH môi trường khác nhau. Kết quả là nồng độ BA 0,01 mg/l ở pH 5,7 hay pH 6,7 chồi cho nụ hoa sau 60 ngày nuôi cấy, 30 ngày sau đó thì nụ nở, tỉ lệ tương ứng là 95% và 80% [31].

- Vincent Dielen và ctv (2000) nghiên cứu sự ra hoa của chồi cây cà chua (*Lycopersicon esculentum* Mill.). Ông cảm ứng ra hoa bằng cách tăng nồng độ đường, giảm nồng độ NH_4NO_3 , sử dụng đơn lẻ hay phối hợp các chất điều hoà sinh trưởng (BA, Kinetin, zeatin, GA3) ở những nồng độ khác nhau. Kết quả cho thấy: NH_4NO_3 ở nồng độ 8 g/l và 12 g/l tỉ lệ chồi ra hoa là 100% và 73,3 % ; 41,2 % chồi cho hoa ở nồng độ 30 g/l sucrose; BA, kinetin, zeatin, IPA ở nồng độ 3,5 μM thì phần trăm chồi có hoa lần lượt là 63,2%; 66,7%; 61,1%; 55% [28].
- W.L.Koh C.S. Loh (2000) cảm ứng ra hoa cây con 4 tuần tuổi của cây cải dầu (*Brassica napus*) được tái sinh từ phôi thứ. Kết quả cho thấy: môi trường MS chứa 2% sucrose thay đổi 1/5 N, 2 P có 30% cây cho hoa, tỉ lệ này tăng khi tăng sucrose lên 3% (40%). Ngay cả khi chỉ giảm 1/5 N hay không cung cấp N thì cây cũng cho hoa (29,4% và 18,8%). Đáng lưu ý là sự hiện diện của các cytokinin như BAP, zeatin, iPA trong môi trường làm hạn chế sự ra hoa [20].
- G. Franklin và ctv (2000) nuôi cấy chồi của cây đậu xanh (*Pisum sativum*) trong môi trường cảm ứng ra hoa: MS giảm nồng độ NH_4NO_3 , tăng nồng độ đường, bổ sung auxin (NAA, IBA), GA3. Cuối cùng ở 8,5 g/l NH_4NO_3 ; 3% sucrose; 1,0 mg/l GA3 và 0,5 mg/l IBA cho kết quả tốt nhất. Các hoa *in vitro* tự thụ phấn và tạo trái, những hạt *in vitro* tuy tỉ lệ nảy mầm không bằng hạt *in vivo* nhưng cũng khá cao (65%) [26].
- Chuoun-Sea Lin và ctv (2002) nghiên cứu ra hoa trong ống nghiệm chồi của giống tre *Bambusa edulis*. Môi trường cảm ứng ra hoa cơ bản là MS bổ sung cytokinin (TDZ, kinetin, BAP, BA, zeatin), auxin (NAA, IBA, 2,4 D) và thay đổi nồng độ đường cũng như NH_4NO_3 , KNO_3 . Tất cả các nghiệm thức đều ra hoa và tỉ lệ cao nhất (47,5%) là ở nghiệm thức 0,5 M TDZ trong môi trường MS có 30 g/l sucrose [25].
- S. Sudhakaran và V.Sivasankari (2002) chồi của cây húng (*Ocimum basilicum* L.) được cấy trên môi trường 1/2 MS có bổ sung BAP (3- 5- 7 mg/l) và IAA (1-3-5 mg/l). Kết quả khi kết hợp BAP (7 mg/l) và IAA (5 mg/l) thì cây có hoa sau 20 ngày nuôi cấy [32].
- Wang G.Y và ctv (2002) đã nghiên cứu ra hoa trong ống nghiệm ở 6 loại hoa hồng. Cây con tái sinh từ chồi sau 45 ngày thì chuyển sang môi trường MS chứa 400 mg/l myo-inositol, 30 g/l sucrose bổ sung các chất điều hoà sinh trưởng zeatin, TDZ, NAA, BA, IAA, GA₃ ở các nồng độ khác nhau. 156-561 ngày kể từ khi bắt đầu nuôi cấy thì

cây cho hoa *in vitro*, hiệu quả nhất là 0,5 mg/l TDZ hoặc 0,5 mg/l zeatin kết hợp với 0,1 mg/l NAA (49,2%, 44,2%) [27].

- Chen Chang và Wei – Chin Chang (2003) đã thành công khi callus có được từ thân rễ của *Cymbidium ensifolium* var. *misericors* ra hoa *in vitro* trên môi trường 1/2 MS chứa 1,5 μ M NAA kết hợp với TDZ (nồng độ từ 3,3–10 μ M) hay 2iP (nồng độ 10–33 μ M) sau 100 ngày nuôi cấy [24].

2.4.2. Trong nước

- Võ Hồng Vũ (2004) điều khiển quá trình ra hoa *in vitro* của cây hoa salem và hoa hồng, tác giả cho biết 2 yếu tố quan trọng mang tính chất quyết định đến sự nở hoa của thực vật là cytokinin và đường, trong đó, đường là yếu tố tác động chính lên sự hình thành hoa *in vitro*, còn cytokinin là chất kích thích sự hình thành hoa, giúp làm tăng tỉ lệ hình thành hoa và biệt hoá các cấu trúc hoa ở giai đoạn sau khi tượng hoa. Tuy nhiên đôi lúc hoa bị đột biến, cánh hoa không đều, đài hoa chưa chuẩn hoặc có khi chưa ra được màu giống với hoa trồng trong môi trường thiên nhiên,.. [18]

- Phạm Minh Thu (2005) đã thành công khi cho torenia (*Torenia ourieri*) màu tím trở hoa trong ống nghiệm, với cây tái sinh từ phôi tế bào lá cây gốc gieo trồng từ hạt. Tiếp theo đó, Nguyễn Ngọc Thi nghiên cứu qui trình gây phản ứng lên sinh trưởng của cây non bằng cách tác động lên yếu tố dinh dưỡng làm thay đổi cấu trúc sinh học của cây. Từ đó làm thay đổi màu sắc hoa torenia trong ống nghiệm (màu trắng thay vì màu tím) [17].

PHẦN 3: NỘI DUNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

3.1. Nội dung

Đề tài thực hiện gồm 2 nội dung như sau:

Nội dung 1: Khảo sát sự ra hoa *in vitro* ở cây Dừa cạn (*Catharanthus roseus*)

Nội dung 2: Khảo sát sự ra hoa *in vitro* ở cây Dã yên thảo (*Petunia hybrida*)

Đề tài được tiến hành trên cây Dừa cạn và Dã yên thảo *in vitro* do Bộ môn Công nghệ sinh học trường Đại học Nông Lâm Tp. HCM cung cấp.

3.2. Thời gian và địa điểm nghiên cứu

Đề tài được thực hiện từ 1/3 – 1/8/2006 tại Bộ môn Công Nghệ Sinh Học trường Đại học Nông Lâm Tp. HCM.

3.3. Vật liệu

❖ Trang thiết bị và dụng cụ

- Trang thiết bị: tủ cấy vô trùng, nồi hấp, máy đo pH, cân điện tử, máy lạnh nhiệt kế, ẩm kế, kệ đặt bình, đèn neon.
- Dụng cụ: pince, đèn cồn, dao cắt, bình tam giác

❖ Mẫu cây

- Cây Dừa cạn *in vitro* 1 tháng tuổi cao 2 – 3 cm.
- Cây Dã yên thảo *in vitro* 2 tuần tuổi cao 2 – 3 cm.

❖ Điều kiện nuôi cấy

- Cường độ ánh sáng 1000 - 2000lux
- Nhiệt độ phòng cấy $24 \pm 2^{\circ}\text{C}$
- Ẩm độ phòng cấy 55% – 60%
- Thời gian chiếu sáng 16 giờ/ngày

❖ Môi trường nuôi cấy

- Môi trường nuôi cấy cơ bản MS (Murashige & Skoog, 1962)
- Chất điều hòa sinh trưởng
 - + Naphthalen Acetic Acid (**NAA**)
 - + 6- Benzyladenine (**BA**)
 - + Thidiazuron (**TDZ**; N-phenyl-N'-1,2,3-thiadiazol-5-ylurea)

Dùng môi trường MS cơ bản bổ sung các chất điều hoà sinh trưởng (BA, TDZ, NAA), tăng nồng độ đường và KH_2PO_4 hay giảm nồng độ KNO_3 tùy theo từng nghiệm thức. Sử dụng bình nuôi cấy 500ml, mỗi bình chứa 70 ml môi trường được hấp tiệt trùng bằng Autoclave ở điều kiện 121°C , 1,2 atm trong 25 phút trước khi sử dụng.

3.4. Phương pháp nghiên cứu

Các thí nghiệm được bố trí theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên (Completely Randomized Design, CRD), một yếu tố, 3 lần lặp lại, mỗi nghiệm thức cấy 3 bình, mỗi bình 1 mẫu.

3.4.1. Nội dung 1

3.4.1.1. Thí nghiệm 1: Ảnh hưởng của nồng độ TDZ và NAA đến sự ra hoa *in vitro* ở cây Dừa cạn

Bảng 3.1 Các nghiệm thức của thí nghiệm ảnh hưởng của nồng độ TDZ và NAA đến sự ra hoa *in vitro* ở cây Dừa cạn

| Nghiệm thức | Nồng độ TDZ | Nồng độ NAA |
|-------------|-------------|-------------|
| | (mg/l) | (mg/l) |
| 1 (Đ/C) | 0 | 0 |
| 2 | 0,05 | 0,1 |
| 3 | 0,1 | 0,1 |
| 4 | 0,5 | 0,1 |
| 5 | 1,0 | 0,1 |
| 6 | 1,5 | 0,1 |

3.4.1.2. Thí nghiệm 2: Ảnh hưởng của nồng độ BA và NAA đến sự ra hoa *in vitro* ở cây Dừa cạn

Bảng 3.2 Các nghiệm thức của thí nghiệm ảnh hưởng của nồng độ BA và NAA đến sự ra hoa *in vitro* ở cây Dừa cạn

| Nghiệm thức | Nồng độ BA | Nồng độ NAA |
|-------------|------------|-------------|
| | (mg/l) | (mg/l) |
| 1 (Đ/C) | 0 | 0 |
| 2 | 0,1 | 0,1 |
| 3 | 0,5 | 0,1 |
| 4 | 1,0 | 0,1 |
| 5 | 1,5 | 0,1 |
| 6 | 2,0 | 0,1 |
| 7 | 0,1 | 0,3 |
| 8 | 0,5 | 0,3 |
| 9 | 1,0 | 0,3 |
| 10 | 1,5 | 0,3 |
| 11 | 2,0 | 0,3 |

3.4.2. Nội dung 2

3.4.2.1. Thí nghiệm 1: Ảnh hưởng của nồng độ TDZ và NAA đến sự ra hoa *in vitro* ở cây Dã yên thảo

Bố trí thí nghiệm: Thí nghiệm được bố trí giống như ở thí nghiệm 1 của nội dung 1.

3.4.2.2. Thí nghiệm 2: Ảnh hưởng của nồng độ BA và NAA đến sự ra hoa *in vitro* ở cây Dã yên thảo

Bố trí thí nghiệm: Thí nghiệm được bố trí giống như ở thí nghiệm 2 của nội dung 1.

3.4.2.3. Thí nghiệm 3: Ảnh hưởng của nồng độ KH_2PO_4 đến sự ra hoa *in vitro* ở cây Dã yên thảo

Bảng 3.3. Các nghiệm thức của thí nghiệm ảnh hưởng của nồng độ KH_2PO_4 đến sự ra hoa *in vitro* ở cây Dã yên thảo.

| Nghiệm thức | Nồng độ KH_2PO_4 (mg/l) |
|-------------|--|
| 1 (Đ/C) | 170 (theo MS) |
| 2 | 340 (x 2) |
| 3 | 510 (x 3) |
| 4 | 680 (x 4) |
| 5 | 850 (x 5) |

3.4.2.4. Thí nghiệm 4: Ảnh hưởng của nồng độ KNO_3 đến sự ra hoa *in vitro* ở cây Dã yên thảo

Bảng 3.4. Các nghiệm thức của thí nghiệm ảnh hưởng của nồng độ KNO_3 đến sự ra hoa *in vitro* ở cây Dã yên thảo.

| Nghiệm thức | Nồng độ KNO_3 (mg/l) |
|-------------|----------------------------------|
| 1 | 0 |
| 2 | 95 (x 1/20) |
| 3 | 190 (1/10) |
| 4 | 380 (x 1/5) |
| 5 | 1900 (theo MS) |

3.4.2.5. Thí nghiệm 5: Ảnh hưởng của nồng độ đường đến sự ra hoa *in vitro* ở cây Dã yên thảo

Bảng 3.5. Các nghiệm thức của thí nghiệm ảnh hưởng của nồng độ đường đến sự ra hoa *in vitro* ở cây Dã yên thảo.

| Nghiệm thức | Nồng độ đường (g/l) |
|-------------|------------------------|
| 1 (Đ/C) | 30 |
| 2 | 40 |
| 3 | 50 |
| 4 | 60 |

3.4.2.6. Thí nghiệm 6: Ảnh hưởng của nồng độ KH_2PO_4 và nồng độ đường đến sự ra hoa *in vitro* ở cây Dã yên thảo

Phương pháp tiến hành

Các chồi cây Dã yên thảo cao 1 cm cấy vào môi trường tăng nồng độ KH_2PO_4 , sau 20 ngày cấy chuyển vào môi trường tăng nồng độ đường.

Bảng 3.6. Các nghiệm thức của thí nghiệm ảnh hưởng của nồng độ KH_2PO_4 và nồng độ đường đến sự ra hoa *in vitro* ở cây Dã yên thảo.

| Nghiệm thức | Nồng độ KH_2PO_4 (mg/l) | Nồng độ đường (g/l) |
|-------------|--|------------------------|
| 1 (Đ/C) | 170 (theo MS) | 30 |
| 2 | 340 (x 2) | 40 |
| 3 | 510 (x 3) | 40 |
| 4 | 680 (x 4) | 40 |
| 5 | 850 (x 5) | 40 |
| 6 | 340 (x 2) | 50 |
| 7 | 510 (x 3) | 50 |
| 8 | 680 (x 4) | 50 |
| 9 | 850 (x 5) | 50 |
| 10 | 340 (x 2) | 60 |
| 11 | 510 (x 3) | 60 |
| 12 | 680 (x 4) | 60 |
| 13 | 850 (x 5) | 60 |

3.6. Các chỉ tiêu theo dõi

❖ Theo dõi sự sinh trưởng

- Chiều cao cây (cm): đo từ mặt thạch đến đỉnh sinh trưởng.
 - Số lá (lá/cây): đếm tổng số lá đã thấy rõ cuống lá trên cây.
- Chiều cao và số lá được ghi nhận sau 30 ngày và 60 ngày.

❖ Theo dõi sự ra hoa

- Tỷ lệ cây ra nụ (%): là tỷ lệ giữa tổng số cây ra nụ và tổng số mẫu cấy.
- Thời gian ra nụ (ngày): tính từ lúc cấy đến khi cây có nụ đầu tiên.
- Thời gian hoa nở (ngày): tính từ lúc cấy đến khi nụ nở thành hoa đầu tiên.
- Tỷ lệ hoa nở (%): là tỷ lệ giữa tổng số hoa và tổng số nụ.
- Số hoa (hoa/cây): là tổng số hoa trên 1 cây.

3.7. Xử lý số liệu

Số liệu thu thập được được xử lý trên máy vi tính bằng chương trình thống kê Statgraphics 7.0

PHẦN 4. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

4.1. Nội dung 1: Cây Dừa cạn *in vitro*

4.1.1. Thí nghiệm 1

❖ Sự sinh trưởng của cây

Bảng 4.1. Ảnh hưởng của nồng độ TDZ và NAA đến sự sinh trưởng của cây Dừa cạn *in vitro*

| Nghiệm thức | Nồng độ TDZ (mg/l) | Nồng độ NAA (mg/l) | Chiều cao cây (cm) | | Số lá (lá/cây) | |
|-------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|---------------------|--------------------|
| | | | 30 ngày | 60 ngày | 30 ngày | 60 ngày |
| 1 (Đ/C) | 0 | 0 | 4,89 ^a | 7,72 ^a | 21,67 ^a | 31,67 ^a |
| 2 | 0,05 | 0,1 | 4,50 ^{ab} | 6,89 ^{ab} | 17,78 ^b | 24,56 ^b |
| 3 | 0,1 | 0,1 | 4,39 ^{ab} | 6,56 ^b | 16,78 ^{ab} | 21,67 ^b |
| 4 | 0,5 | 0,1 | 4,11 ^b | 6,33 ^b | 13,67 ^{cd} | 18,00 ^c |
| 5 | 1,0 | 0,1 | 3,07 ^{bc} | 4,44 ^c | 10,56 ^{de} | 14,56 ^c |
| 6 | 1,5 | 0,1 | 2,89 ^c | 4,28 ^c | 8,22 ^e | 11,00 ^d |

Ghi chú:

* Trong cùng một cột, các giá trị trung bình có kí tự theo sau giống nhau không có sự khác biệt về mặt thống kê ($P > 0,05$).

Kết quả xử lý số liệu cho thấy chiều cao cây và số lá/cây ở các nghiệm thức so với đối chứng khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê.

Sau 60 ngày nuôi cấy chiều cao cây ở nghiệm thức 2 tương đồng với đối chứng và khác biệt so với các nghiệm thức còn lại. Số lá/cây ở các nghiệm thức giảm dần và ít hơn so với đối chứng.

Như vậy khi giữ nguyên nồng độ NAA (0,1 mg/l), tăng dần nồng độ TDZ thì sự sinh trưởng của cây giảm dần

❖ Sự ra hoa

Bảng 4.2. Ảnh hưởng của nồng độ TDZ và NAA đến sự ra hoa *in vitro* của cây Dừa cạn

| Nghiệm thức | Nồng độ TDZ (mg/l) | Nồng độ NAA (mg/l) | Tỉ lệ cây ra nụ (%) | Thời gian ra nụ (ngày) | Thời gian hoa nở (ngày) | Tỉ lệ hoa nở (%) | Số hoa/cây |
|-------------|--------------------|--------------------|---------------------|------------------------|-------------------------|------------------|-------------------|
| 1 | 0 | 0 | 0 ^a | - | - | - | 0 ^a |
| 2 | 0,05 | 0,1 | 100 ^b | 58,17 | 68,00 | 100 | 4,25 ^b |
| 3 | 0,1 | 0,1 | 33,33 ^c | 59,00 | 69,17 | 100 | 5,67 ^c |
| 4 | 0,5 | 0,1 | 33,33 ^c | 62,33 | 71,67 | 100 | 2,33 ^d |
| 5 | 1,0 | 0,1 | 0 ^a | - | - | - | 0 ^a |
| 6 | 1,5 | 0,1 | 0 ^a | - | - | - | 0 ^a |

Ghi chú:

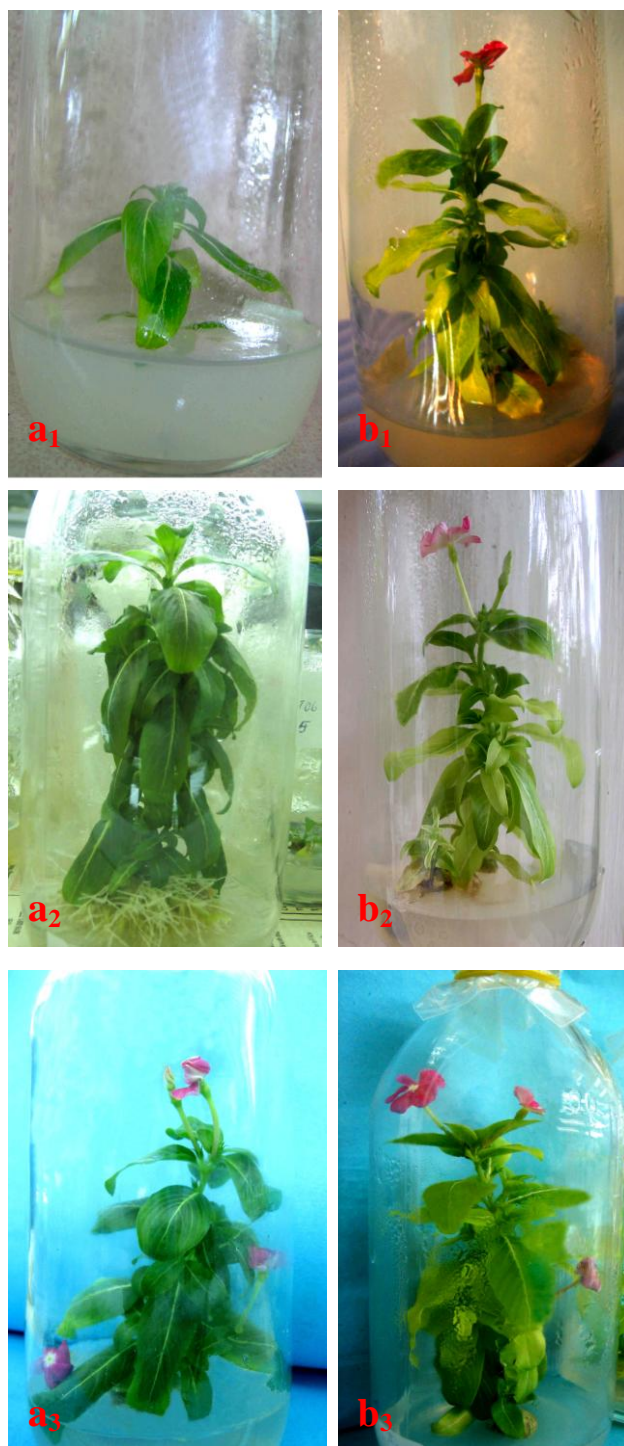
* Trong cùng một cột, các giá trị trung bình có kí tự theo sau giống nhau không có sự khác biệt về mặt thống kê ($P > 0,05$).

Kết quả xử lý số liệu cho thấy tỉ lệ cây ra nụ ở các nghiệm thức 1, 5, 6 tương đồng với nhau và khác biệt có ý nghĩa với các nghiệm thức còn lại về phương diện thống kê. Các nghiệm thức 2, 3 và 4 hình thành nụ và tất cả những nụ này đều nở thành hoa, trong đó nghiệm thức 2 tỉ lệ cây ra nụ cao nhất tiếp theo là nghiệm thức 3 và 4.

Cây Dừa cạn *in vitro* hình thành nụ sau 58 ngày nuôi cấy và sau 68 ngày thì hoa nở. Số hoa/cây nhiều nhất là ở nghiệm thức 3, đạt 5,67 hoa/cây.

Từ kết quả trên có thể nhận thấy rằng, môi trường MS có bổ sung 0,1 mg/l NAA và 0,05 mg/l TDZ là môi trường thích hợp nhất cho cây Dừa cạn ra hoa trong ống nghiệm.

Hoa Dừa cạn *in vitro* có màu đỏ hồng, “mắt” vàng giống như hoa trồng ngoài vườn. Đường kính hoa trung bình khoảng 2 cm, hoa có độ bền từ 2 đến 3 ngày.



Hình 4.1. Các giai đoạn sinh trưởng và phát triển của Dừa cạn *in vitro*

a₁, a₂, a₃: cây Dừa cạn 7 ngày, 50 ngày, 67 ngày sau cấy

b₁, b₂, b₃: cây Dừa cạn 68 ngày, 69 ngày, 70 ngày sau cấy



Hình 4.2. Quá trình nở hoa của Dừa cạn *in vitro*



Hình 4.3. Hoa Dừa cạn *in vitro*

4.1.2. Thí nghiệm 2

❖ Sự sinh trưởng của cây

Bảng 4.3. Ảnh hưởng của nồng độ BA và NAA đến sự sinh trưởng của cây Dừa cạn *in vitro*

| Thí nghiệm thứ | Nồng độ BA (mg/l) | Nồng độ NAA (mg/l) | Chiều cao cây (cm) | | Số lá (lá/cây) | |
|-------------------|-------------------------|--------------------------|---------------------|---------------------|---------------------|----------------------|
| | | | 30 ngày | 60 ngày | 30 ngày | 60 ngày |
| 1 (Đ/C) | 0 | 0 | 4,89 ^a | 7,72 ^a | 25,56 ^a | 31,67 ^a |
| 2 | 0,1 | 0,1 | 4,61 ^{ab} | 7,71 ^a | 23,78 ^a | 27,89 ^a |
| 3 | 0,5 | 0,1 | 4,44 ^{ab} | 6,50 ^{bc} | 14,00 ^{bc} | 21,56 ^{cd} |
| 4 | 1,0 | 0,1 | 4,17 ^{bcd} | 5,67 ^{cde} | 13,00 ^c | 18,56 ^{cde} |
| 5 | 1,5 | 0,1 | 3,67 ^{cde} | 5,11 ^e | 9,11 ^{de} | 13,00 ^f |
| 6 | 2,0 | 0,1 | 2,83 ^f | 4,06 ^f | 8,89 ^e | 11,22 ^f |
| 7 | 0,1 | 0,3 | 4,56 ^{ab} | 6,78 ^b | 25,11 ^a | 27,22 ^{ab} |
| 8 | 0,5 | 0,3 | 4,33 ^{abc} | 6,46 ^{bc} | 13,67 ^{bc} | 20,11 ^{cd} |
| 9 | 1,0 | 0,3 | 4,44 ^{bcd} | 6,22 ^{bcd} | 17,22 ^b | 22,78 ^{bc} |
| 10 | 1,5 | 0,3 | 3,50 ^{def} | 5,39 ^{de} | 14,78 ^{bc} | 17,89 ^{de} |
| 11 | 2,0 | 0,3 | 3,22 ^{ef} | 4,94 ^e | 12,67 ^{cd} | 14,11 ^{ef} |

Ghi chú:

* Trong cùng một cột, các giá trị trung bình có kí tự theo sau giống nhau không có sự khác biệt về mặt thống kê ($P > 0,05$).

Kết quả xử lí số liệu cho thấy sau 60 ngày nuôi cấy, chiều cao cây và số lá/cây ở thí nghiệm thứ 2 tương đồng với đối chứng, các thí nghiệm thứ 3, 8, 9 tương đồng nhau và khác biệt so với các thí nghiệm thứ còn lại.

Như vậy khi bổ sung NAA kết hợp với tăng dần nồng độ BA thì chiều cao cũng như số lá/cây giảm dần, BA ở nồng độ 1,5 mg/l và 2 mg/l ức chế sự sinh trưởng của cây.

❖ **Sự ra hoa**

Bảng 4.4. Ảnh hưởng của nồng độ BA và NAA đến sự ra hoa *in vitro* của cây Dừa cạn

| Nghiệm thức | Tỉ lệ cây ra nụ (%) | Thời gian ra nụ (ngày) | Thời gian hoa nở (ngày) | Tỉ lệ hoa nở (%) | Số hoa/cây |
|--------------------------------|---------------------|------------------------|-------------------------|------------------|-------------------|
| 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 11 | 0 ^a | - | - | - | 0 ^a |
| 7 | 33,33 ^a | 61,33 | 71,33 | 50 | 0,33 ^a |

Ghi chú:

* Trong cùng một cột, các giá trị trung bình có kí tự theo sau giống nhau không có sự khác biệt về mặt thống kê ($P > 0,05$).

Trong 11 nghiệm thức chỉ có nghiệm thức 7 cây hình thành nụ nhưng không khác biệt so với các nghiệm thức còn lại về mặt thống kê.

Qua thí nghiệm có thể thấy, sự kết hợp giữa NAA và BA hầu như không mang lại hiệu quả trong việc ra hoa trong ống nghiệm ở cây Dừa cạn.

Một số nụ không nở có thể là do các cánh hoa không được thành lập hoàn thiện hoặc được thành lập nhưng không phát triển. Tượng hoa và tăng trưởng hoa là hai giai đoạn tách biệt nhau, các chất điều hoà sinh trưởng bổ sung vào môi trường kích thích sự tượng hoa nhưng lại không làm nụ hoa tăng trưởng.

4.2. Nội dung 2: Cây Dã yên thảo *in vitro*

4.2.1. Thí nghiệm 1

❖ Sự sinh trưởng của cây

Bảng 4.5. Ảnh hưởng của nồng độ TDZ và NAA đến sự sinh trưởng của cây

Dã yên thảo *in vitro*

| Thí nghiệm thức | Nồng độ TDZ (mg/l) | Nồng độ NAA (mg/l) | Chiều cao cây (cm) | | Số lá (lá/cây) | |
|--------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|---------------------|
| | | | 30 ngày | 60 ngày | 30 ngày | 60 ngày |
| 1 | 0 | 0 | 15,67 ^a | 23,78 ^a | 25,22 ^a | 44,33 ^a |
| 2 | 0,05 | 0,1 | 8,89 ^b | 12,72 ^b | 25,89 ^a | 36,00 ^b |
| 3 | 0,1 | 0,1 | 7,83 ^b | 11,33 ^b | 23,22 ^a | 32,22 ^{bc} |
| 4 | 0,5 | 0,1 | 5,28 ^c | 7,83 ^c | 18,11 ^b | 28,33 ^c |
| 5 | 1,0 | 0,1 | 4,39 ^c | 6,28 ^c | 11,33 ^c | 17,56 ^d |
| 6 | 1,5 | 0,1 | 2,89 ^d | 4,11 ^d | 9,89 ^c | 15,44 ^d |

Ghi chú:

* Trong cùng một cột, các giá trị trung bình có kí tự theo sau giống nhau không có sự khác biệt về mặt thống kê ($P > 0,05$).

Kết quả xử lí số liệu cho thấy sự khác biệt về chiều cao và số lá/cây giữa các thí nghiệm thức so với đôi chứng có ý nghĩa về mặt thống kê. Sau 60 ngày nuôi cấy, chiều cao cây ở thí nghiệm thức 2 và 3, 4 và 5 tương đồng nhau và khác biệt so với thí nghiệm thức 6.

Khi giữ nguyên nồng độ NAA (0,1 mg/l) kết hợp với tăng nồng độ TDZ thì chiều cao và số lá/cây giảm; ở nồng độ TDZ 1 mg/l và 1,5 mg/l, sự sinh trưởng của cây bị ức chế.

❖ **Sự ra hoa:** ở thí nghiệm này cây Dã yên thảo không hình thành nụ và hoa có thể là do nồng độ TDZ và NAA đã sử dụng hay điều kiện môi trường nuôi cấy chưa thích hợp để cảm ứng sự tượng hoa.

4.2.2. Thí nghiệm 2

❖ Sự sinh trưởng của cây

Bảng 4.6. Ảnh hưởng của nồng độ BA và NAA đến sự sinh trưởng của cây Dã yên thảo *in vitro*

| Thí nghiệm thức | Nồng độ BA (mg/l) | Nồng độ NAA (mg/l) | Chiều cao cây (cm) | | Số lá (lá/cây) | |
|--------------------|-------------------------|--------------------------|--------------------|--------------------|---------------------|----------------------|
| | | | 30 ngày | 60 ngày | 30 ngày | 60 ngày |
| 1 | 0 | 0 | 15,67 ^a | 23,78 ^a | 25,22 ^a | 44,33 ^a |
| 2 | 0,1 | 0,1 | 10,06 ^b | 15,17 ^b | 24,89 ^{ab} | 34,11 ^b |
| 3 | 0,5 | 0,1 | 5,06 ^d | 8,11 ^c | 14,11 ^c | 18,00 ^{cd} |
| 4 | 1,0 | 0,1 | 4,33 ^{de} | 5,94 ^{de} | 9,00 ^{de} | 13,33 ^{de} |
| 5 | 1,5 | 0,1 | 3,00 ^j | 3,67 ^j | 9,00 ^e | 11,89 ^f |
| 6 | 2,0 | 0,1 | 2,72 ^j | 3,28 ^j | 8,22 ^e | 12,00 ^f |
| 7 | 0,1 | 0,3 | 7,72 ^c | 14,11 ^b | 22,33 ^c | 36,67 ^b |
| 8 | 0,5 | 0,3 | 4,72 ^{de} | 6,61 ^d | 12,11 ^{cd} | 19,22 ^c |
| 9 | 1,0 | 0,3 | 3,22 ^{fj} | 4,89 ^{ef} | 13,00 ^c | 15,89 ^{cde} |
| 10 | 1,5 | 0,3 | 3,94 ^{ef} | 5,44 ^e | 9,00 ^e | 13,33 ^{ef} |
| 11 | 2,0 | 0,3 | 3,17 ^{fj} | 4,28 ^{fj} | 8,33 ^e | 12,33 ^f |

Ghi chú:

* Trong cùng một cột, các giá trị trung bình có kí tự theo sau giống nhau không có sự khác biệt về mặt thống kê ($P > 0,05$).

Kết quả xử lí số liệu cho thấy sự khác biệt về chiều cao cây và số lá/cây giữa các thí nghiệm thức so với đối chứng có ý nghĩa về mặt thống kê. Sau 60 ngày nuôi cấy, sự sinh trưởng của cây ở thí nghiệm thức 2 và 7, 5 và 6 tương đồng nhau và khác biệt so với các thí nghiệm thức còn lại.

Như vậy khi bổ sung NAA kết hợp với tăng dần nồng độ BA thì sự sinh trưởng của cây giảm dần và cây hầu như không tăng trưởng khi bổ sung 1,5 mg/l hay 2 mg/l BA.

❖ **Sự ra hoa:** Các nồng độ BA và NAA đã sử dụng trong thí nghiệm chỉ ảnh hưởng đến sự sinh trưởng của cây mà không cảm ứng được sự hình thành hoa.

4.2.3. Thí nghiệm 3

❖ Sự sinh trưởng của cây

Bảng 4.7. Ảnh hưởng của nồng độ KH_2PO_4 đến sự sinh trưởng của cây

Dã yên thảo *in vitro*

| Thí nghiệm thức | Nồng độ KH_2PO_4 (mg/l) | Chiều cao cây (cm) | | Số lá (lá/cây) | |
|--------------------|--|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| | | 30 ngày | 60 ngày | 30 ngày | 60 ngày |
| 1 (Đ/C) | 170 (theo MS) | 15,67 ^a | 23,78 ^a | 25,22 ^a | 44,33 ^a |
| 2 | 340 (x 2) | 8,89 ^b | 18,11 ^b | 20,89 ^b | 31,22 ^b |
| 3 | 510 (x 3) | 9,22 ^b | 17,33 ^b | 21,11 ^b | 27,89 ^c |
| 4 | 680 (x 4) | 7,72 ^c | 15,22 ^c | 19,33 ^b | 25,89 ^c |
| 5 | 850 (x 5) | 7,28 ^c | 14,33 ^c | 19,33 ^b | 27,00 ^c |

Ghi chú:

* Trong cùng một cột, các giá trị trung bình có kí tự theo sau giống nhau không có sự khác biệt về mặt thống kê ($P > 0,05$).

Kết quả xử lí số liệu cho thấy sau 30 ngày và 60 ngày, chiều cao cũng như số lá/cây giữa các thí nghiệm thức so với đối chứng khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê.

Sau 60 ngày nuôi cấy, chiều cao cây ở thí nghiệm thức 2 và 3, 4 và 5 tương đồng nhau; số lá/cây là như nhau ở thí nghiệm thức 3, 4, 5 và khác biệt so với thí nghiệm thức 2. Như vậy khi tăng nồng độ KH_2PO_4 thì sự sinh trưởng của cây kém hơn trong môi trường MS.

❖ **Sự ra hoa:** nồng độ KH_2PO_4 cao chỉ ảnh hưởng đến sự sinh trưởng của cây nhưng không kích thích cây phát dục, Dạ yên thảo không hình thành nụ và hoa.

4.2.4. Thí nghiệm 4

❖ Sự sinh trưởng của cây

Bảng 4.8. Ảnh hưởng của nồng độ KNO_3 đến sự sinh trưởng của cây Dã yên thảo *in vitro*

| Thí nghiệm thức | Nồng độ KNO_3 (mg/l) | Chiều cao cây (cm) | | Số lá (lá/cây) | |
|--------------------|---------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|---------------------|
| | | 30 ngày | 60 ngày | 30 ngày | 60 ngày |
| 1 (Đ/C) | 0 | 6,44 ^a | 10,67 ^a | 22,78 ^a | 22,78 ^a |
| 2 | 95 (1/20) | 4,81 ^c | 12,78 ^a | 15,56 ^c | 17,78 ^b |
| 3 | 190 (1/10) | 7,39 ^a | 17,22 ^b | 19,33 ^b | 26,00 ^{ac} |
| 4 | 380 (1/5) | 7,67 ^a | 22,56 ^c | 14,44 ^c | 27,33 ^c |
| 5 | 1900 (theo MS) | 15,67 ^b | 23,78 ^c | 25,22 ^a | 44,33 ^d |

Ghi chú:

* Trong cùng một cột, các giá trị trung bình có kí tự theo sau giống nhau không có sự khác biệt về mặt thống kê ($P > 0,05$).

Kết quả xử lí số liệu cho thấy sự khác biệt về chiều cao và số lá/cây giữa các thí nghiệm thức có ý nghĩa về mặt thống kê. Sau 60 ngày nuôi cấy chiều cao cây ở thí nghiệm thức 4 và 5 tương đồng so với đối chứng.

Bảng 4.8 cho thấy chiều cao cây thấp nhất khi không cung cấp KNO_3 , chiều cao cây tăng dần khi tăng nồng độ KNO_3 . Như vậy, khi không cung cấp KNO_3 hoặc cung cấp ở nồng độ thấp thì ảnh hưởng đến sự sinh trưởng của cây, hơn nữa cây được nuôi cấy trong môi trường giảm KNO_3 thì thân ốm, dễ ngã đổ, lá không xanh và dễ úa vàng so với cây nuôi cấy trong môi trường MS.

❖ **Sự ra hoa:** ở thí nghiệm này cây Dã yên thảo không hình thành nụ và hoa do giảm lượng đạm trong môi trường nuôi cấy khiến cây sinh trưởng sinh dưỡng yếu nên cây không chuyển sang sinh trưởng sinh sản được.

4.2.5. Thí nghiệm 5

❖ Sự sinh trưởng của cây

Bảng 4.9. Ảnh hưởng của nồng độ đường đến sự sinh trưởng của cây Dã yên thảo *in vitro*

| Thí nghiệm thức | Nồng độ đường (g/l) | Chiều cao cây (cm) | | Số lá (lá/cây) | |
|--------------------|------------------------|--------------------|--------------------|---------------------|--------------------|
| | | 30 ngày | 60 ngày | 30 ngày | 60 ngày |
| 1 (Đ/C) | 30 | 15,67 ^a | 23,78 ^a | 25,22 ^a | 44,33 ^a |
| 2 | 40 | 9,67 ^b | 13,56 ^b | 19,00 ^b | 68,56 ^b |
| 3 | 50 | 8,28 ^c | 12,56 ^b | 20,00 ^b | 74,44 ^b |
| 4 | 60 | 8,17 ^c | 11,67 ^b | 22,56 ^{ab} | 75,11 ^b |

Ghi chú:

* Trong cùng một cột, các giá trị trung bình có kí tự theo sau giống nhau không có sự khác biệt về mặt thống kê ($P > 0,05$).

Kết quả xử lí số liệu cho thấy, sự khác biệt về chiều cao cây và số lá/ cây giữa các thí nghiệm thức so với đối chứng có ý nghĩa về mặt thống kê. Sự sinh trưởng của cây ở các thí nghiệm thức 2, 3, 4 tương đồng nhau, tuy cây thấp hơn cây đối chứng nhưng có nhiều nhánh, nhiều lá và lá xanh đậm hơn.

❖ Sự ra hoa:

Ở thí nghiệm này cây Dã yên thảo không hình thành nụ và hoa.

Đường trong môi trường nuôi cấy đóng vai trò là nguồn carbon cho cây sinh trưởng, tuy nhiên đối với Dã yên thảo đường như đường không có tác dụng cảm ứng ra hoa, có thể những điều kiện môi trường khác như nhiệt độ, ánh sáng cần được kết hợp để đường biểu hiện vai trò này.

4.2.5. Thí nghiệm 6

❖ Sự sinh trưởng của cây

Bảng 4.10. Ảnh hưởng của nồng độ KH_2PO_4 và nồng độ đường đến sự sinh trưởng của cây Dã yên thảo *in vitro*

| Thí nghiệm thức | Nồng độ KH_2PO_4 (mg/l) | Nồng độ đường (g/l) | Chiều cao cây (cm) | | Số lá (lá/cây) | |
|--------------------|---|---------------------------|--------------------|--------------------|---------------------|---------------------|
| | | | 30 ngày | 60 ngày | 30 ngày | 60 ngày |
| 1 (Đ/C) | 170 | 30 | 15,67 ^a | 23,78 ^a | 25,22 ^a | 44,33 ^a |
| 2 | 340 | 40 | 6,67 ^b | 13,22 ^b | 30,56 ^b | 80,00 ^{de} |
| 3 | 510 | 40 | 5,83 ^c | 12,11 ^b | 30,67 ^b | 76,11 ^{cd} |
| 4 | 680 | 40 | 5,78 ^c | 12,79 ^b | 30,78 ^b | 70,11 ^b |
| 5 | 850 | 40 | 6,22 ^{bc} | 13,22 ^b | 30,78 ^b | 71,56 ^{bc} |
| 6 | 340 | 50 | 6,27 ^{bc} | 12,89 ^b | 30,89 ^b | 89,11 ^f |
| 7 | 510 | 50 | 5,92 ^c | 12,79 ^b | 30,78 ^b | 84,00 ^e |
| 8 | 680 | 50 | 5,78 ^c | 11,78 ^b | 31,44 ^{bc} | 84,11 ^e |
| 9 | 850 | 50 | 6,23 ^{bc} | 13,00 ^b | 34,33 ^{cd} | 82,89 ^e |
| 10 | 340 | 60 | 6,28 ^{bc} | 12,22 ^b | 37,78 ^{ef} | 95,67 ^j |
| 11 | 510 | 60 | 5,69 ^c | 12,56 ^b | 38,56 ^{ef} | 94,22 ^j |
| 12 | 680 | 60 | 5,70 ^c | 11,44 ^b | 40,78 ^f | 94,11 ^j |
| 13 | 850 | 60 | 5,96 ^c | 12,56 ^b | 36,11 ^{de} | 92,68 ^j |

Ghi chú:

* Trong cùng một cột, các giá trị trung bình có kí tự theo sau giống nhau không có sự khác biệt về mặt thống kê ($P > 0,05$).

Kết quả xử lí số liệu cho thấy sự khác biệt về chiều cao và số lá/cây giữa các thí nghiệm thức so với đối chứng có ý nghĩa về mặt thống kê.

Sau 60 ngày nuôi cấy, chiều cao cây của các thí nghiệm thức tương đồng nhau và thấp hơn cây đối chứng, tuy nhiên khi tăng nồng độ KH_2PO_4 và nồng độ đường thì cây có sự phân nhánh, thân to khỏe, lá nhiều và xanh hơn. Số lá/cây ở các thí nghiệm thức 10, 11, 12 tương đồng nhau và nhiều nhất.

Từ kết quả trên cho thấy môi trường MS chứa 60 g/l đường và tăng nồng độ KH_2PO_4 là môi trường thích hợp cho sự sinh trưởng của Dã yên thảo *in vitro*.

❖ Sự ra hoa

Bảng 4.11. Ảnh hưởng của nồng độ KH_2PO_4 và nồng độ đường đến sự ra hoa *in vitro* của cây Dã yên thảo

| Nghiệm thức | Tỉ lệ cây ra nụ (%) | Thời gian ra nụ (ngày) | Số nụ/cây | Tỉ lệ hoa nở (%) |
|----------------------------|---------------------|------------------------|-----------|------------------|
| 1, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 13 | 0 ^a | - | - | - |
| 2 | 100 ^b | 44,33 | 7,67 | 0 |
| 10 | 66,67 ^c | 41,00 | 4,00 | 0 |
| 3 | 33,33 ^d | 42,00 | 3,00 | 0 |
| 11 | 66,67 ^c | 41,00 | 4,50 | 0 |
| 12 | 33,33 ^d | 39,00 | 1,00 | 0 |

Ghi chú:

* Trong cùng một cột, các giá trị trung bình có kí tự theo sau giống nhau không có sự khác biệt về mặt thống kê ($P > 0,05$).

Kết quả xử lí số liệu cho thấy tỉ lệ cây ra nụ ở các nghiệm thức 2, 3, 10, 11, 12 so với các nghiệm thức còn lại khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê. Tỉ lệ cây ra nụ cao nhất là ở nghiệm thức 2 và khác biệt so với các nghiệm thức 10 và 11, 3 và 12 tương đồng nhau.

Sau 44 ngày cây Dã yên thảo *in vitro* hình thành nụ hoa, số nụ/cây cao nhất đạt 7 nụ, sự khác biệt về thời gian ra nụ và số nụ/cây giữa các nghiệm thức không có ý nghĩa về mặt thống kê. Như vậy, môi trường MS chứa 340 mg/l KH_2PO_4 và 40 g/l đường là thích hợp nhất cho sự hình thành nụ ở cây Dã yên thảo. có thể do

Điều đáng lưu ý ở đây là tất cả các nụ trên đều tàn sau khoảng 7- 8 ngày mà không nở thành hoa. Sự tượng hoa đã xảy ra, chồi hoa được hình thành với đầy đủ các cơ quan như: đài hoa, cánh hoa, nhị hoa, lá noãn nhưng nụ không tăng trưởng và nở, Nguyên nhân của hiện tượng này không được rõ, có thể do thiếu một số chất dinh dưỡng. Sự thiếu hụt vi lượng (như Bo), sự tương tác giữa các chất điều hoà sinh trưởng nội sinh hay yếu tố gen cũng có thể ảnh hưởng đến sự phát triển của nụ hoa. Sự nở hoa chỉ xảy ra khi chồi hoa đã trưởng thành và được thực hiện nhờ vận động cảm

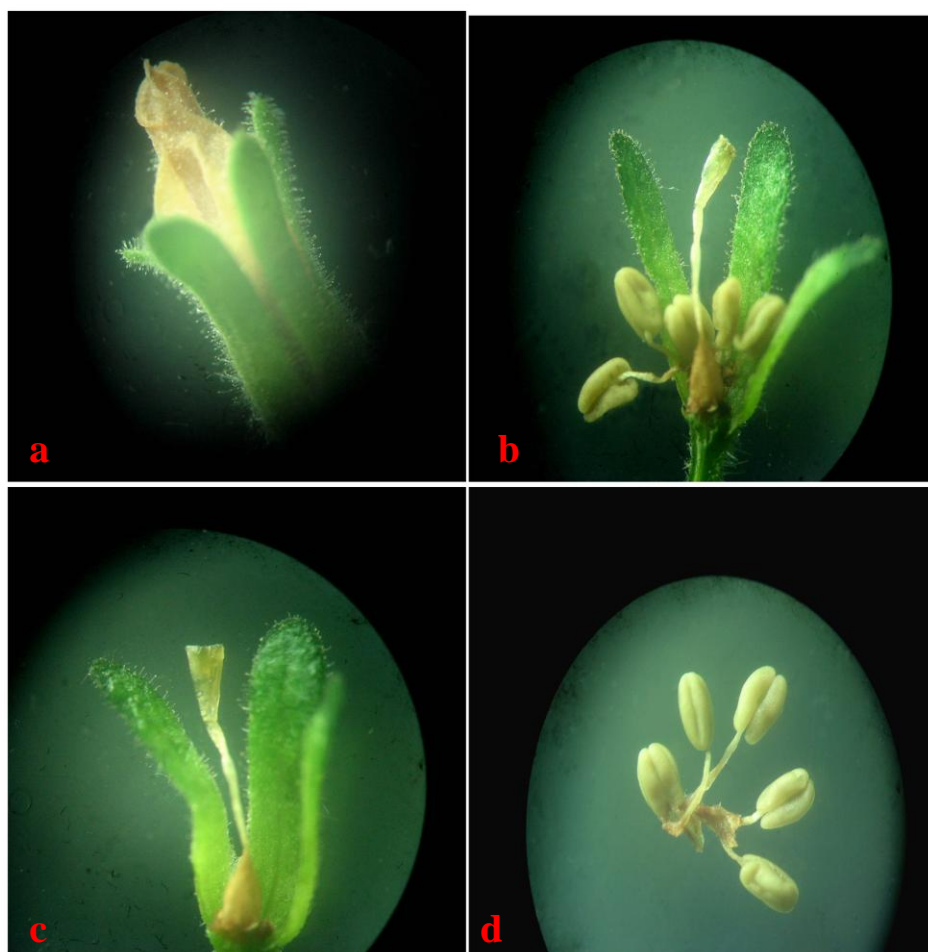
ứng (như quang kỳ, nhiệt độ,...), có thể những điều kiện này chưa được đáp ứng nên nụ không nở.



Hình 4.4. Các giai đoạn sinh trưởng và phát triển của Dã yên thảo *in vitro*

a₁, a₂ : Nghiệm thức 1 và 2, 40 ngày sau cấy

b₁, b₂, b₃: Nụ hoa 45 ngày, 50 ngày, 55 ngày sau cấy



Hình 4.5: Cấu tạo của hoa Dã yên thảo *in vitro*

a: Nụ hoa

b: Các cơ quan hoa

c: Lá noãn

d: Nhị

PHẦN 5: KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

5.1. Kết luận

Từ những kết quả thu được có thể đưa ra một số kết luận sau:

❖ Đối với cây Dừa cạn

- Môi trường thích hợp nhất để Dừa cạn ra hoa trong ống nghiệm là môi trường MS bổ sung 0,05 mg/l TDZ và 0,1 mg/l NAA. Ở nồng độ 0,1 mg/l NAA kết hợp với 0,1 hay 0,5 mg/l TDZ Dừa cạn cũng ra hoa nhưng tỉ lệ thấp hơn.

- Cây Dừa cạn *in vitro* hình thành nụ sau 58 ngày nuôi cấy và sau 68 ngày thì hoa nở. Có 5 hoa/cây, hoa có đường kính 2 cm, độ bền là 2 -3 ngày.

- Khi tăng nồng độ TDZ hoặc BA kết hợp với NAA thì sự sinh trưởng của cây giảm và ức chế ở nồng độ từ 1 – 2 mg/l.

❖ Đối với cây Dã yên thảo

- Nồng độ KH_2PO_4 340 mg/l và 40 g/l đường thích hợp nhất cho sự hình thành nụ sau 41 ngày nuôi cấy, có 7 nụ/cây và các nụ này đều tàn sau khoảng 7 - 8 ngày mà không nở thành hoa.

- Bổ sung TDZ hoặc BA kết hợp với NAA, tăng nồng độ KH_2PO_4 , giảm nồng độ KNO_3 đều ảnh hưởng đến sự sinh trưởng của cây và không cảm ứng được sự ra hoa *in vitro*.

5.2. Đề nghị

Để có thể hoàn thiện được đề tài, chúng tôi xin đề nghị một số hướng nghiên cứu tiếp theo

- Nghiên cứu ảnh hưởng đơn lẻ của các chất điều hòa sinh trưởng TDZ, BA, GA đến sự hình thành hoa trong ống nghiệm.

- Các yếu tố khác như thời gian chiếu sáng, cường độ chiếu sáng, nhiệt độ trong giai đoạn hình thành nụ, giai đoạn nở hoa cũng cần được nghiên cứu thêm.

- Nghiên cứu độ tuổi của mẫu cây ảnh hưởng đến thời gian ra hoa.

- Sử dụng mẫu cây cắt bỏ ngọn để giảm chiều cao cây đồng thời cây phân nhiều nhánh, từ đó có nhiều hoa hơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

TÀI LIỆU TIẾNG VIỆT

1. Trần Thị Dung, 2004. Bài giảng *Trồng trọt đại cương*
2. Phạm Hoàng Hộ, 2000. *Cây cỏ Việt Nam*, Quyển II (in lần 2). Nhà xuất bản trẻ
3. Dương Công Kiên, 2002. Nhà xuất bản Đại học Quốc Gia, Tp. HCM.
4. Hoàng Minh Tấn và Nguyễn Quang Thạch, 1996. *Sinh lý thực vật* (Bài giảng cao học và nghiên cứu sinh ngành trồng trọt - Bảo vệ thực vật – Di truyền giống). Nhà xuất bản Nông Nghiệp Hà Nội, trang 169.
5. Mai Trần Ngọc Tiếng, 2001. *Thực vật bậc cao*. Nhà xuất bản Đại học Quốc Gia, Tp. HCM, trang 109 - 113
6. Bùi Minh Trí, 2003. Bài giảng *Sinh lý thực vật*
7. Bùi Trang Việt, 2000. *Sinh lý thực vật đại cương, phần II: Phát triển*. Nhà xuất bản Đại học Quốc Gia, Tp. HCM, trang 122 – 168, 298 – 308.

TÀI LIỆU TIẾNG NƯỚC NGOÀI

8. Ralph Scorza, 1982. In vitro flowering, *Horticultural reviews* (Ralph Scorza), p. 106-119
9. Taiz and Zeiger, 1998, *Plant Physiology*. Benjamin/ Cummings, Inc., p. 721.

TÀI LIỆU TỪ INTERNET

10. <http://plants.usda.gov/java/ClassificationServlet?source=display&classid=VINCA>
11. <http://hgic.clemson.edu/factsheets/HGIC1158.htm>
12. <http://plants.usda.gov/java/ClassificationServlet?source=display&classid=PETUN>
13. <http://hgic.clemson.edu/factsheets/HGIC1171.htm>
14. <http://www.plantphys.net/article.php?ch=e&id=288>
15. <http://www.biologie.uni-hamburg.de/b-online/e30/30c.htm>
16. <http://www.google.com/search?hl=en&lr=&q=inflorescence%2C+calla+lily%2C+in+vitro%2C+zantedeschia+spp> .
17. <http://www.tuoitre.com.vn/Tianyon/Index.aspx?ArticleID=134107&ChannelID=17>
18. <http://www.sinhhocvietnam.com/vn/modules.php?name=News&file=article&sid=371>

19. Yongsak Kachonpadungkitti, Supot Romchatngoen, Koji Hasegawa and Shigeru Hisajima, 2001. Efficient flower induction from cultured buckwheat (*Fagopyrum esculentum* L.) node segments *in vitro*. *Plant Growth Regulation* 35 (1), p. 37 – 45.
[http://www.springerlink.com/\(m0cykk3ndpnwqkem2vj3nfm0\)/app/home/contribution.asp?referrer=parent&backto=issue,5,14;journal,42,145;linkingpublicationresults,1:100329,1](http://www.springerlink.com/(m0cykk3ndpnwqkem2vj3nfm0)/app/home/contribution.asp?referrer=parent&backto=issue,5,14;journal,42,145;linkingpublicationresults,1:100329,1)
20. W. L. Koh and C. S. Loh, 2000. Direct somatic embryogenesis, plant regeneration and *in vitro* flowering in rapid-cycling *Brassica napus*. *Plant Cell Reports*, Vol. 19, No. 12 Pages: 1177 – 1183.
[http://www.springerlink.com/\(meoxhi45mv15kz55gdgn5m55\)/app/home/contribution.asp?referrer=parent&backto=issue,8,17;journal,67,254;linkingpublicationresults,1:100383,1](http://www.springerlink.com/(meoxhi45mv15kz55gdgn5m55)/app/home/contribution.asp?referrer=parent&backto=issue,8,17;journal,67,254;linkingpublicationresults,1:100383,1)
21. Wei - Chin Chang and Yue – Ie Hsing, 1980. *In vitro* flowering of embryoids derived from mature root callus of ginseng (*Panax ginseng*). *Nature* 284, 341 – 342.
<http://www.nature.com/nature/journal/v284/n5754/abs/284341a0.html;jsessionid=29434F64139F0A02B4ED08BC3D74F30E>
22. W. Tang, 1999. High-frequency plant regeneration via somatic embryogenesis and organogenesis and *in vitro* flowering of regeneration plantlets in *Panax ginseng*. *Plant Cell Report*, 19: 727- 732
23. Kostenyuk , B. J. Oh , I. S. So, 1999. Induction of early flowering in *Cymbidium niveo-marginatum* Mak *in vitro*. *Plant Cell Reports*, Vol. 19, No. 1, pp. 1-5.
[http://www.springerlink.com/\(dvijy2m12nyxho554esclu45\)/app/home/contribution.asp?referrer=parent&backto=issue,1,17;journal,74,250;linkingpublicationresults,1:100383,1](http://www.springerlink.com/(dvijy2m12nyxho554esclu45)/app/home/contribution.asp?referrer=parent&backto=issue,1,17;journal,74,250;linkingpublicationresults,1:100383,1)
24. Chen Chang and Wei-Chin Chang, 2003. Cytokinins promotion of flowering in *Cymbidium ensifolium* var. *misericors* *in vitro*. *Plant Growth Regulation* ,pp: 217 - 221
[http://www.springerlink.com/\(tnfp1g55wj0yqoaabhiak5ys\)/app/home/contribution.asp?referrer=parent&backto=issue,3,10;journal,26,143;linkingpublicationresults,1:100329,1](http://www.springerlink.com/(tnfp1g55wj0yqoaabhiak5ys)/app/home/contribution.asp?referrer=parent&backto=issue,3,10;journal,26,143;linkingpublicationresults,1:100329,1)
25. Chung-Chih Lin, Chuoun-Sea Lin and Wei-Chin Chang, 2002. *In vitro* flowering of *Bambusa edulis* and subsequent plantlet survival. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 72: 71- 78.
[http://www.springerlink.com/\(w5tt2445ihhkawbkkusw0x45\)/app/home/contribution.asp?referrer=parent&backto=issue,10,16;journal,37,238;linkingpublicationresults,1:100327,1](http://www.springerlink.com/(w5tt2445ihhkawbkkusw0x45)/app/home/contribution.asp?referrer=parent&backto=issue,10,16;journal,37,238;linkingpublicationresults,1:100327,1)
26. Franklin G; Pius P.K.; Ignacimuthu S., 2000. Factors affecting *in vitro* flowering and fruiting of green pea (*Pisum sativum* L.). *Euphytica*, Volume 115, Number 1, 2000, pp. 65-74(10)
<http://www.ingentaconnect.com/content/klu/euph/2000/00000115/00000001/00260561;jsessionid=nlnbbm89o5gs.alice>
27. Wang G.Y.; Yuan M.F.; Hong Y, 2002. *In vitro* flowering induction in rose. *In Vitro Cellular and Development Biology - Plant*, Volume 38, Number 5, pp. 513-518(6)
<http://www.ingentaconnect.com/content/cabi/ivp/2002/00000038/00000005/art00024>

28. Vincent Dielen, Violaine Lecouvet, Samuel Dupont and Jean-Marie Kinet, 2000. *In vitro* control of floral transition in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.), the model for autonomously flowering plants, using the late flowering *uniflora* mutant. Journal of Experimental Botany, Vol. 52, No. 357, pp. 715-723
<http://jxb.oxfordjournals.org/cgi/content/full/52/357/715>
29. G. R. Rout and P. Das, 1994. Somatic embryogenesis and *in vitro* flowering of 3 species of bamboo. Plant Cell Reports 13: 683-686.
www.low-cost-medication.com/110/somatic-embryogenesis-of-bamboo.html
30. Rajani S. Nadgauda, C. K. John, V. A. Parasharami, M. S. Joshi & A. F. Mascarenhas, 1997. A comparidon of *in vitro* with flowering in bamboo: *Bambusa arundinace*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 48: 181-188.
www.springerlink.com/index/H2072P5256J53412.pdf
31. H. B. Jumin, M. Ahmad, 1999. High-frequency *in vitro* flowering of *Murraya paniculata* (L). Jack. Plant Cell Reports, Vol. 18, No. 9, pp. 764-768.
www.springerlink.com/index/T3TQPEN8CGKDRE3J.pdf
32. S. Sudhakaran, V. Sivasankari, 2002. *In vitro* flowering Response of *Ocimum basilicum* L. Plant Biotechnology, Vol. 4 (4), pp. 181-183.
www.jplantbiotech.com/journal_dir/pdf_files/vol4_4/vol4_4pp179.pdf

PHỤ LỤC 1

Thành phần môi trường MS (Murashige và Skoog, 1962)

| Nguyên tố | | Nồng độ (mg/l) |
|----------------------|--|----------------|
| Nguyên tố đa lượng | CaCl ₂ | 332,02 |
| | KNO ₃ | 1900,00 |
| | KH ₂ PO ₄ | 170,00 |
| | NH ₄ NO ₃ | 1650,00 |
| | MgSO ₄ .7H ₂ O | 180,54 |
| Nguyên tố vi lượng | CoCl ₂ .6H ₂ O | 0,025 |
| | CuSO ₄ .5H ₂ O | 0,025 |
| | H ₃ BO ₃ | 6,20 |
| | KI | 0,83 |
| | MnSO ₄ .H ₂ O | 16,90 |
| | Na ₂ MoO ₄ .H ₂ O | 0,25 |
| | ZnSO ₄ .H ₂ O | 8,60 |
| Vitamine & aminoacid | Glycine | 2,00 |
| | Myo-Inositol | 100 |
| | Nicotinic acid | 0,50 |
| | Pyridoxine HCl | 0,50 |
| | Thiamine-HCl | 0,10 |
| | FeNaEDTA | 36,70 |

- Agar 7,5 g/l
- pH môi trường (trước khi hấp) 5,8

PHỤ LỤC 2

1. Nội dung 1
1.1. Thí nghiệm 1
❖ Chiều cao cây

One-Way Analysis of Variance

Data: TN1VINCA.CCC60ngay

Level codes: TN1VINCA.NT

Labels:

Means plot: LSD

Confidence level: 95

Range test: LSD

Analysis of variance

| Source of variation | Sum of Squares | d.f. | Mean square | F-ratio | Sig. level |
|---------------------|----------------|------|-------------|---------|------------|
| Between groups | 85.981481 | 5 | 17.196296 | 12.613 | .0000 |
| Within groups | 65.444444 | 48 | 1.363426 | | |

Total (corrected) 151.42593 53

0 missing value(s) have been excluded.

Multiple range analysis for TN1VINCA.CCC60ngay by TN1VINCA.NT

Method: 95 Percent LSD

Level Count Average Homogeneous Groups

| Level | Count | Average | Homogeneous Groups |
|-------|-------|-----------|--------------------|
| 6 | 9 | 4.2777778 | X |
| 5 | 9 | 4.4444444 | X |
| 4 | 9 | 6.3333333 | X |
| 3 | 9 | 6.5555556 | X |
| 2 | 9 | 6.8888889 | XX |
| 1 | 9 | 7.7222222 | X |

| contrast | difference | +/- | limits |
|----------|------------|-----|-----------|
| 1 - 2 | 0.83333 | | 1.10699 |
| 1 - 3 | 1.16667 | | 1.10699 * |
| 1 - 4 | 1.38889 | | 1.10699 * |
| 1 - 5 | 3.27778 | | 1.10699 * |
| 1 - 6 | 3.44444 | | 1.10699 * |
| 2 - 3 | 0.33333 | | 1.10699 |
| 2 - 4 | 0.55556 | | 1.10699 |
| 2 - 5 | 2.44444 | | 1.10699 * |
| 2 - 6 | 2.61111 | | 1.10699 * |
| 3 - 4 | 0.22222 | | 1.10699 |
| 3 - 5 | 2.11111 | | 1.10699 * |
| 3 - 6 | 2.27778 | | 1.10699 * |
| 4 - 5 | 1.88889 | | 1.10699 * |
| 4 - 6 | 2.05556 | | 1.10699 * |
| 5 - 6 | 0.16667 | | 1.10699 |

• denotes a statistically significant difference.

❖ Số lá/cây

One-Way Analysis of Variance

Data: TN1VINCA.sola60ngay

Level codes: TN1VINCA.NT

Labels:

Means plot: LSD

Confidence level: 95

Range test: LSD

Analysis of variance

| Source of variation | Sum of Squares | d.f. | Mean square | F-ratio | Sig. level |
|---------------------|----------------|------|-------------|---------|------------|
| Between groups | 2465.4259 | 5 | 493.08519 | 37.071 | .0000 |
| Within groups | 638.4444 | 48 | 13.30093 | | |

Total (corrected) 3103.8704 53

0 missing value(s) have been excluded.

Multiple range analysis for TN1VINCA.sola60ngay by TN1VINCA.NT

Method: 95 Percent LSD

Level Count Average Homogeneous Groups

| Level | Count | Average | Homogeneous Groups |
|-------|-------|-----------|--------------------|
| 6 | 9 | 11.000000 | X |

| | | | |
|---|---|-----------|---|
| 5 | 9 | 14.555556 | X |
| 4 | 9 | 18.000000 | X |
| 3 | 9 | 21.666667 | X |
| 2 | 9 | 24.555556 | X |
| 1 | 9 | 31.666667 | X |

| contrast | difference | +/- | limits |
|----------|------------|-----|-----------|
| 1 - 2 | 7.11111 | | 3.45754 * |
| 1 - 3 | 10.00000 | | 3.45754 * |
| 1 - 4 | 13.66667 | | 3.45754 * |
| 1 - 5 | 17.11111 | | 3.45754 * |
| 1 - 6 | 20.66667 | | 3.45754 * |
| 2 - 3 | 2.88889 | | 3.45754 |
| 2 - 4 | 6.55556 | | 3.45754 * |
| 2 - 5 | 10.00000 | | 3.45754 * |
| 2 - 6 | 13.55556 | | 3.45754 * |
| 3 - 4 | 3.66667 | | 3.45754 * |
| 3 - 5 | 7.11111 | | 3.45754 * |
| 3 - 6 | 10.66667 | | 3.45754 * |
| 4 - 5 | 3.44444 | | 3.45754 |
| 4 - 6 | 7.00000 | | 3.45754 * |
| 5 - 6 | 3.55556 | | 3.45754 * |

* denotes a statistically significant difference.

❖ **Tỉ lệ cây ra nụ**

One-Way Analysis of Variance

Data: TLRN1VI.Tlranu
Level codes: TLRN1VI.NT
Labels:
Means plot: LSD Confidence level: 95 Range test: LSD
Analysis of variance

| Source of variation | Sum of Squares | d.f. | Mean square | F-ratio | Sig. level |
|---------------------|----------------|------|-------------|---------|------------|
| Between groups | 22777.778 | 5 | 4555.5556 | 999.999 | .0000 |
| Within groups | .000 | 12 | .0000 | | |

Total (corrected) 22777.778 17

0 missing value(s) have been excluded.

Multiple range analysis for TLRN1VI.Tlranu by TLRN1VI.NT

Method: 95 Percent LSD
Level Count Average Homogeneous Groups

| | | | |
|---|---|------------|---|
| 1 | 3 | .000000 | X |
| 5 | 3 | .000000 | X |
| 6 | 3 | .000000 | X |
| 3 | 3 | 33.333333 | X |
| 4 | 3 | 33.333333 | X |
| 2 | 3 | 100.000000 | X |

| contrast | difference | +/- | limits |
|----------|------------|-----|-----------|
| 1 - 2 | -100.000 | | 0.00000 * |
| 1 - 3 | -33.3333 | | 0.00000 * |
| 1 - 4 | -33.3333 | | 0.00000 * |
| 1 - 5 | 0.00000 | | 0.00000 |
| 1 - 6 | 0.00000 | | 0.00000 |
| 2 - 3 | 66.6667 | | 0.00000 * |
| 2 - 4 | 66.6667 | | 0.00000 * |
| 2 - 5 | 100.000 | | 0.00000 * |
| 2 - 6 | 100.000 | | 0.00000 * |
| 3 - 4 | 0.00000 | | 0.00000 |
| 3 - 5 | 33.3333 | | 0.00000 * |
| 3 - 6 | 33.3333 | | 0.00000 * |
| 4 - 5 | 33.3333 | | 0.00000 * |
| 4 - 6 | 33.3333 | | 0.00000 * |
| 5 - 6 | 0.00000 | | 0.00000 |

* denotes a statistically significant difference.

❖ **Thời gian ra nụ**

One-Way Analysis of Variance

3 - 4

3.33333

1.47503 *

* denotes a statistically significant difference.

21.2. Thí nghiệm 2

❖ **Chiều cao cây**

One-Way Analysis of Variance

Data: TN2VINCA.CCC60ngay

Level codes: TN2VINCA.NT

Labels:

Means plot: LSD

Confidence level: 95

Range test: LSD

Analysis of variance

| Source of variation | Sum of Squares | d.f. | Mean square | F-ratio | Sig. level |
|---------------------|----------------|------|-------------|---------|------------|
| Between groups | 118.32747 | 10 | 11.832747 | 14.863 | .0000 |
| Within groups | 70.06000 | 88 | .796136 | | |

Total (corrected) 188.38747 98

0 missing value(s) have been excluded.

Multiple range analysis for TN2VINCA.CCC60ngay by TN2VINCA.NT

Method: 95 Percent LSD

| Level | Count | Average | Homogeneous Groups |
|-------|-------|-----------|--------------------|
| 6 | 9 | 4.0555556 | X |
| 11 | 9 | 4.9444444 | X |
| 5 | 9 | 5.1111111 | X |
| 10 | 9 | 5.3888889 | XX |
| 4 | 9 | 5.6666667 | XXX |
| 9 | 9 | 6.2222222 | XXX |
| 8 | 9 | 6.4555556 | XX |
| 3 | 9 | 6.5000000 | XX |
| 7 | 9 | 6.7777778 | X |
| 2 | 9 | 7.7111111 | X |
| 1 | 9 | 7.7222222 | X |

❖ **Số lá/cây**

One-Way Analysis of Variance

Data: TN2VINCA.sola60ngay

Level codes: TN2VINCA.NT

Labels:

Means plot: LSD

Confidence level: 95

Range test: LSD

Analysis of variance

| Source of variation | Sum of Squares | d.f. | Mean square | F-ratio | Sig. level |
|---------------------|----------------|------|-------------|---------|------------|
| Between groups | 3821.8788 | 10 | 382.18788 | 16.353 | .0000 |
| Within groups | 2056.6667 | 88 | 23.37121 | | |

Total (corrected) 5878.5455 98

0 missing value(s) have been excluded.

Multiple range analysis for TN2VINCA.sola60ngay by TN2VINCA.NT

Method: 95 Percent LSD

| Level | Count | Average | Homogeneous Groups |
|-------|-------|------------|--------------------|
| 6 | 9 | 11.2222222 | X |
| 5 | 9 | 13.0000000 | X |
| 11 | 9 | 14.1111111 | XX |
| 10 | 9 | 17.8888889 | XX |
| 4 | 9 | 18.5555556 | XXX |
| 8 | 9 | 20.1111111 | XX |
| 3 | 9 | 21.5555556 | XX |
| 9 | 9 | 22.7777778 | XX |
| 7 | 9 | 27.2222222 | XX |
| 2 | 9 | 27.8888889 | X |
| 1 | 9 | 31.6666667 | X |

❖ **Tỉ lệ cây ra nụ**

One-Way Analysis of Variance

Method: 95 Percent LSD

| Level | Count | Average | Homogeneous Groups |
|-------|-------|---------|--------------------|
|-------|-------|---------|--------------------|

| | | | |
|---|---|----------|---|
| 1 | 3 | .0000000 | X |
| 7 | 3 | .6666667 | X |

| contrast | difference | +/- | limits |
|----------|------------|-----|---------|
| 1 - 7 | -0.66667 | | 1.85162 |

* denotes a statistically significant difference.

1. Nội dung 2

1.1. Thí nghiệm 1

❖ Chiều cao cây

One-Way Analysis of Variance

Data: TN1PE.CCC60ngay

Level codes: TN1PE.NT

Labels:

Means plot: LSD

Confidence level: 95

Range test: LSD

Analysis of variance

| Source of variation | Sum of Squares | d.f. | Mean square | F-ratio | Sig. level |
|---------------------|----------------|------|-------------|---------|------------|
| Between groups | 2215.1898 | 5 | 443.03796 | 115.227 | .0000 |
| Within groups | 184.5556 | 48 | 3.84491 | | |

Total (corrected) 2399.7454 53

0 missing value(s) have been excluded.

Multiple range analysis for TN1PE.CCC60ngay by TN1PE.NT

Method: 95 Percent LSD

| Level | Count | Average | Homogeneous Groups |
|-------|-------|---------|--------------------|
|-------|-------|---------|--------------------|

| | | | |
|---|---|-----------|---|
| 6 | 9 | 4.111111 | X |
| 5 | 9 | 6.277778 | X |
| 4 | 9 | 7.833333 | X |
| 3 | 9 | 11.333333 | X |
| 2 | 9 | 12.722222 | X |
| 1 | 9 | 23.777778 | X |

| contrast | difference | +/- | limits |
|----------|------------|-----|-----------|
| 1 - 2 | 11.0556 | | 1.85896 * |
| 1 - 3 | 12.4444 | | 1.85896 * |
| 1 - 4 | 15.9444 | | 1.85896 * |
| 1 - 5 | 17.5000 | | 1.85896 * |
| 1 - 6 | 19.6667 | | 1.85896 * |
| 2 - 3 | 1.38889 | | 1.85896 |
| 2 - 4 | 4.88889 | | 1.85896 * |
| 2 - 5 | 6.44444 | | 1.85896 * |
| 2 - 6 | 8.61111 | | 1.85896 * |
| 3 - 4 | 3.50000 | | 1.85896 * |
| 3 - 5 | 5.05556 | | 1.85896 * |
| 3 - 6 | 7.22222 | | 1.85896 * |
| 4 - 5 | 1.55556 | | 1.85896 |
| 4 - 6 | 3.72222 | | 1.85896 * |
| 5 - 6 | 2.16667 | | 1.85896 * |

* denotes a statistically significant difference.

❖ Số lá/cây

One-Way Analysis of Variance

Data: TN1PE.sola60ngay

Level codes: TN1PE.NT

Labels:

Means plot: LSD

Confidence level: 95

Range test: LSD

Analysis of variance

| Source of variation | Sum of Squares | d.f. | Mean square | F-ratio | Sig. level |
|---------------------|----------------|------|-------------|---------|------------|
| Between groups | 5486.9815 | 5 | 1097.3963 | 41.411 | .0000 |
| Within groups | 1272.0000 | 48 | 26.5000 | | |

 Total (corrected) 6758.9815 53
 0 missing value(s) have been excluded.

Multiple range analysis for TN1PE.sola60ngay by TN1PE.NT

Method: 95 Percent LSD

| Level | Count | Average | Homogeneous Groups |
|-------|-------|---------|--------------------|
|-------|-------|---------|--------------------|

| | | | |
|---|---|-----------|----|
| 6 | 9 | 15.444444 | X |
| 5 | 9 | 17.555556 | X |
| 4 | 9 | 28.333333 | X |
| 3 | 9 | 32.222222 | XX |
| 2 | 9 | 36.000000 | X |
| 1 | 9 | 44.333333 | X |

| contrast | difference | +/- | limits |
|----------|------------|-----|-----------|
| 1 - 2 | 8.33333 | | 4.88033 * |
| 1 - 3 | 12.1111 | | 4.88033 * |
| 1 - 4 | 16.0000 | | 4.88033 * |
| 1 - 5 | 26.7778 | | 4.88033 * |
| 1 - 6 | 28.8889 | | 4.88033 * |
| 2 - 3 | 3.77778 | | 4.88033 |
| 2 - 4 | 7.66667 | | 4.88033 * |
| 2 - 5 | 18.4444 | | 4.88033 * |
| 2 - 6 | 20.5556 | | 4.88033 * |
| 3 - 4 | 3.88889 | | 4.88033 |
| 3 - 5 | 14.6667 | | 4.88033 * |
| 3 - 6 | 16.7778 | | 4.88033 * |
| 4 - 5 | 10.7778 | | 4.88033 * |
| 4 - 6 | 12.8889 | | 4.88033 * |
| 5 - 6 | 2.11111 | | 4.88033 |

• denotes a statistically significant difference.

2.2. Thí nghiệm 2

❖ **Chiều cao cây**

One-Way Analysis of Variance

Data: TN2PE.CCC60ngay

Level codes: TN2PE.NT

Labels:

Means plot: LSD

Confidence level: 95

Range test: LSD

Analysis of variance

| Source of variation | Sum of Squares | d.f. | Mean square | F-ratio | Sig. level |
|---------------------|----------------|------|-------------|---------|------------|
| Between groups | 3691.2475 | 10 | 369.12475 | 260.559 | .0000 |
| Within groups | 124.6667 | 88 | 1.41667 | | |

Total (corrected) 3815.9141 98

0 missing value(s) have been excluded.

Multiple range analysis for TN2PE.CCC60ngay by TN2PE.NT

Method: 95 Percent LSD

| Level | Count | Average | Homogeneous Groups |
|-------|-------|---------|--------------------|
|-------|-------|---------|--------------------|

| | | | |
|----|---|-----------|----|
| 6 | 9 | 3.277778 | X |
| 5 | 9 | 3.666667 | X |
| 11 | 9 | 4.277778 | XX |
| 9 | 9 | 4.888889 | XX |
| 10 | 9 | 5.444444 | X |
| 4 | 9 | 5.944444 | XX |
| 8 | 9 | 6.611111 | X |
| 3 | 9 | 8.111111 | X |
| 7 | 9 | 14.111111 | X |
| 2 | 9 | 15.166667 | X |
| 1 | 9 | 23.777778 | X |

❖ **Số lá/cây**

One-Way Analysis of Variance

Data: TN2PE.sola60ngay

Level codes: TN2PE.NT

Labels:

Means plot: LSD Confidence level: 95 Range test: LSD
 Analysis of variance

| Source of variation | Sum of Squares | d.f. | Mean square | F-ratio | Sig. level |
|---------------------|----------------|------|-------------|---------|------------|
| Between groups | 11967.131 | 10 | 1196.7131 | 84.099 | .0000 |
| Within groups | 1252.222 | 88 | 14.2298 | | |
| Total (corrected) | 13219.354 | 98 | | | |

0 missing value(s) have been excluded.

Multiple range analysis for TN2PE.sola60ngay by TN2PE.NT

Method: 95 Percent LSD

| Level | Count | Average | Homogeneous Groups |
|-------|-------|-----------|--------------------|
| 5 | 9 | 11.888889 | X |
| 6 | 9 | 12.000000 | X |
| 11 | 9 | 12.333333 | X |
| 10 | 9 | 13.333333 | XX |
| 4 | 9 | 15.333333 | XXX |
| 9 | 9 | 15.888889 | XXX |
| 3 | 9 | 18.000000 | XX |
| 8 | 9 | 19.222222 | X |
| 2 | 9 | 34.111111 | X |
| 7 | 9 | 36.666667 | X |
| 1 | 9 | 44.333333 | X |

2.3. Thí nghiệm 3

❖ **Chiều cao cây**

One-Way Analysis of Variance

Data: TN3PE.CCC60ngays

Level codes: TN3PE.NT

Labels:

Means plot: LSD Confidence level: 95 Range test: LSD
 Analysis of variance

| Source of variation | Sum of Squares | d.f. | Mean square | F-ratio | Sig. level |
|---------------------|----------------|------|-------------|---------|------------|
| Between groups | 492.31111 | 4 | 123.07778 | 37.296 | .0000 |
| Within groups | 132.00000 | 40 | 3.30000 | | |
| Total (corrected) | 624.31111 | 44 | | | |

0 missing value(s) have been excluded.

Multiple range analysis for TN3PE.CCC60ngays by TN3PE.NT

Method: 95 Percent LSD

| Level | Count | Average | Homogeneous Groups |
|-------|-------|-----------|--------------------|
| 5 | 9 | 14.333333 | X |
| 4 | 9 | 15.222222 | X |
| 3 | 9 | 17.333333 | X |
| 2 | 9 | 18.111111 | X |
| 1 | 9 | 23.777778 | X |

| contrast | difference | +/- | limits |
|----------|------------|-----|-----------|
| 1 - 2 | 5.66667 | | 1.73114 * |
| 1 - 3 | 6.44444 | | 1.73114 * |
| 1 - 4 | 8.55556 | | 1.73114 * |
| 1 - 5 | 9.44444 | | 1.73114 * |
| 2 - 3 | 0.77778 | | 1.73114 |
| 2 - 4 | 2.88889 | | 1.73114 * |
| 2 - 5 | 3.77778 | | 1.73114 * |
| 3 - 4 | 2.11111 | | 1.73114 * |
| 3 - 5 | 3.00000 | | 1.73114 * |
| 4 - 5 | 0.88889 | | 1.73114 |

• denotes a statistically significant difference.

❖ **Số lá/cây**

One-Way Analysis of Variance

Data: TN3PE.sola60ngay

Level codes: TN3PE.NT

Labels:

Means plot: LSD

Confidence level: 95

Range test: LSD

Analysis of variance

| Source of variation | Sum of Squares | d.f. | Mean square | F-ratio | Sig. level |
|---------------------|----------------|------|-------------|---------|------------|
| Between groups | 2063.4667 | 4 | 515.86667 | 64.618 | .0000 |
| Within groups | 319.3333 | 40 | 7.98333 | | |

Total (corrected) 2382.8000 44

0 missing value(s) have been excluded.

Multiple range analysis for TN3PE.sola60ngay by TN3PE.NT

Method: 95 Percent LSD

Level Count Average Homogeneous Groups

| | | | |
|---|---|-----------|---|
| 4 | 9 | 25.888889 | X |
| 5 | 9 | 27.000000 | X |
| 3 | 9 | 27.888889 | X |
| 2 | 9 | 31.222222 | X |
| 1 | 9 | 44.333333 | X |

| contrast | difference | +/- | limits |
|----------|------------|-----|-----------|
| 1 - 2 | 13.1111 | | 2.69258 * |
| 1 - 3 | 16.4444 | | 2.69258 * |
| 1 - 4 | 18.4444 | | 2.69258 * |
| 1 - 5 | 17.3333 | | 2.69258 * |
| 2 - 3 | 3.33333 | | 2.69258 * |
| 2 - 4 | 5.33333 | | 2.69258 * |
| 2 - 5 | 4.22222 | | 2.69258 * |
| 3 - 4 | 2.00000 | | 2.69258 |
| 3 - 5 | 0.88889 | | 2.69258 |
| 4 - 5 | -1.11111 | | 2.69258 |

* denotes a statistically significant difference.

2.4. Thí nghiệm 4

❖ Chiều cao cây

One-Way Analysis of Variance

Data: TN4PE.CCC60ngays

Level codes: TN4PE.NT

Labels:

Means plot: LSD

Confidence level: 95

Range test: LSD

Analysis of variance

| Source of variation | Sum of Squares | d.f. | Mean square | F-ratio | Sig. level |
|---------------------|----------------|------|-------------|---------|------------|
| Between groups | 1205.9111 | 4 | 301.47778 | 20.904 | .0000 |
| Within groups | 576.8889 | 40 | 14.42222 | | |

Total (corrected) 1782.8000 44

0 missing value(s) have been excluded.

Multiple range analysis for TN4PE.CCC60ngays by TN4PE.NT

Method: 95 Percent LSD

Level Count Average Homogeneous Groups

| | | | |
|---|---|-----------|---|
| 1 | 9 | 10.666667 | X |
| 2 | 9 | 12.777778 | X |
| 3 | 9 | 17.222222 | X |
| 4 | 9 | 22.555556 | X |
| 5 | 9 | 23.777778 | X |

| contrast | difference | +/- | limits |
|----------|------------|-----|-----------|
| 1 - 2 | -2.11111 | | 3.61903 |
| 1 - 3 | -6.55556 | | 3.61903 * |
| 1 - 4 | -11.8889 | | 3.61903 * |
| 1 - 5 | -13.1111 | | 3.61903 * |
| 2 - 3 | -4.44444 | | 3.61903 * |
| 2 - 4 | -9.77778 | | 3.61903 * |
| 2 - 5 | -11.0000 | | 3.61903 * |
| 3 - 4 | -5.33333 | | 3.61903 * |

3 - 5 -6.55556 3.61903 *
 4 - 5 -1.22222 3.61903

* denotes a statistically significant difference.

❖ Số lá/cây

One-Way Analysis of Variance

Data: TN4PE.sola60ngay

Level codes: TN4PE.NT

Labels:

Means plot: LSD

Confidence level: 95

Range test: LSD

Analysis of variance

| Source of variation | Sum of Squares | d.f. | Mean square | F-ratio | Sig. level |
|---------------------|----------------|------|-------------|---------|------------|
| Between groups | 3621.2000 | 4 | 905.30000 | 67.420 | .0000 |
| Within groups | 537.1111 | 40 | 13.42778 | | |

Total (corrected) 4158.3111 44

0 missing value(s) have been excluded.

Multiple range analysis for TN4PE.sola60ngay by TN4PE.NT

Method: 95 Percent LSD

| Level | Count | Average | Homogeneous Groups |
|-------|-------|-----------|--------------------|
| 2 | 9 | 17.777778 | X |
| 1 | 9 | 22.777778 | X |
| 3 | 9 | 26.000000 | XX |
| 4 | 9 | 27.333333 | X |
| 5 | 9 | 44.333333 | X |

| contrast | difference | +/- | limits |
|----------|------------|-----|-----------|
| 1 - 2 | 5.00000 | | 3.49203 * |
| 1 - 3 | -3.22222 | | 3.49203 |
| 1 - 4 | -4.55556 | | 3.49203 * |
| 1 - 5 | -21.55556 | | 3.49203 * |
| 2 - 3 | -8.22222 | | 3.49203 * |
| 2 - 4 | -9.55556 | | 3.49203 * |
| 2 - 5 | -26.55556 | | 3.49203 * |
| 3 - 4 | -1.33333 | | 3.49203 |
| 3 - 5 | -18.3333 | | 3.49203 * |
| 4 - 5 | -17.0000 | | 3.49203 * |

* denotes a statistically significant difference.

2.5. Thí nghiệm 5

❖ Chiều cao cây

One-Way Analysis of Variance

Data: TN5PE.CCC60ngay

Level codes: TN5PE.NT

Labels:

Means plot: LSD

Confidence level: 95

Range test: LSD

Analysis of variance

| Source of variation | Sum of Squares | d.f. | Mean square | F-ratio | Sig. level |
|---------------------|----------------|------|-------------|---------|------------|
| Between groups | 860.55556 | 3 | 286.85185 | 66.516 | .0000 |
| Within groups | 138.00000 | 32 | 4.31250 | | |

Total (corrected) 998.55556 35

0 missing value(s) have been excluded.

Multiple range analysis for TN5PE.CCC60ngay by TN5PE.NT

Method: 95 Percent LSD

| Level | Count | Average | Homogeneous Groups |
|-------|-------|-----------|--------------------|
| 3 | 9 | 11.666667 | X |
| 4 | 9 | 12.555556 | X |
| 2 | 9 | 13.555556 | X |
| 1 | 9 | 23.777778 | X |

| contrast | difference | +/- | limits |
|----------|------------|-----|-----------|
| 1 - 2 | 10.2222 | | 1.99451 * |

| | | |
|-------|----------|-----------|
| 1 - 3 | 12.1111 | 1.99451 * |
| 1 - 4 | 11.2222 | 1.99451 * |
| 2 - 3 | 1.88889 | 1.99451 |
| 2 - 4 | 1.00000 | 1.99451 |
| 3 - 4 | -0.88889 | 1.99451 |

* denotes a statistically significant difference.

❖ **Số lá/cây**

One-Way Analysis of Variance

Data: TN5PE.sola60ngay

Level codes: TN5PE.NT

Labels:

Means plot: LSD

Confidence level: 95

Range test: LSD

Analysis of variance

| Source of variation | Sum of Squares | d.f. | Mean square | F-ratio | Sig. level |
|---------------------|----------------|-----------|-------------|---------|---------------------|
| 5667.2222 | 3 | 1889.0741 | 36.387 | .0000 | -----Between groups |
| Within groups | | 1661.3333 | 32 | 51.9167 | |
| Total (corrected) | | 7328.5556 | 35 | | |

0 missing value(s) have been excluded.

Multiple range analysis for TN5PE.sola60ngay by TN5PE.NT

Method: 95 Percent LSD

| Level | Count | Average | Homogeneous Groups |
|-------|-------|---------|--------------------|
|-------|-------|---------|--------------------|

| | | | |
|---|---|-----------|---|
| 1 | 9 | 44.333333 | X |
| 2 | 9 | 68.555556 | X |
| 3 | 9 | 74.444444 | X |
| 4 | 9 | 75.111111 | X |

| contrast | difference | +/- | limits |
|----------|------------|-----|-----------|
| 1 - 2 | -24.2222 | | 6.92031 * |
| 1 - 3 | -30.1111 | | 6.92031 * |
| 1 - 4 | -30.7778 | | 6.92031 * |
| 2 - 3 | -5.88889 | | 6.92031 |
| 2 - 4 | -6.55556 | | 6.92031 |
| 3 - 4 | -0.66667 | | 6.92031 |

* denotes a statistically significant difference.

2.6. Thí nghiệm 6

❖ **Chiều cao cây**

One-Way Analysis of Variance

Data: TN6PE.CCC60ngay

Level codes: TN6PE.NT

Labels:

Means plot: LSD

Confidence level: 95

Range test: LSD

Analysis of variance

| Source of variation | Sum of Squares | d.f. | Mean square | F-ratio | Sig. level |
|---------------------|----------------|-----------|-------------|---------|------------|
| Between groups | 1078.9744 | 12 | 89.914530 | 15.499 | .0000 |
| Within groups | 603.3333 | 104 | 5.801282 | | |
| Total (corrected) | | 1682.3077 | 116 | | |

0 missing value(s) have been excluded.

Multiple range analysis for TN6PE.CCC60ngay by TN6PE.NT

Method: 95 Percent LSD

| Level | Count | Average | Homogeneous Groups |
|-------|-------|---------|--------------------|
|-------|-------|---------|--------------------|

| | | | |
|----|---|-----------|---|
| 12 | 9 | 11.444444 | X |
| 8 | 9 | 11.777778 | X |
| 3 | 9 | 12.111111 | X |
| 10 | 9 | 12.222222 | X |
| 11 | 9 | 12.555556 | X |
| 13 | 9 | 12.555556 | X |
| 4 | 9 | 12.777778 | X |
| 7 | 9 | 12.777778 | X |
| 6 | 9 | 12.888889 | X |

| | | | |
|---|---|-----------|---|
| 9 | 9 | 13.000000 | X |
| 2 | 9 | 13.222222 | X |
| 5 | 9 | 13.222222 | X |
| 1 | 9 | 23.777778 | X |

❖ **Số lá/cây**

One-Way Analysis of Variance

Data: TN6PE.sola60ngay
 Level codes: TN6PE.NT
 Labels:

Means plot: LSD Confidence level: 95 Range test: LSD
 Analysis of variance

| Source of variation | Sum of Squares | d.f. | Mean square | F-ratio | Sig. level |
|---------------------|----------------|------|-------------|---------|------------|
| Between groups | 21680.803 | 12 | 1806.7336 | 72.350 | .0000 |
| Within groups | 2597.111 | 104 | 24.9722 | | |
| Total (corrected) | 24277.915 | 116 | | | |

0 missing value(s) have been excluded.

Multiple range analysis for TN6PE.sola60ngay by TN6PE.NT

Method: 95 Percent LSD

| Level | Count | Average | Homogeneous Groups |
|-------|-------|-----------|--------------------|
| 1 | 9 | 44.333333 | X |
| 4 | 9 | 70.111111 | X |
| 5 | 9 | 71.555556 | XX |
| 3 | 9 | 76.111111 | XX |
| 2 | 9 | 80.000000 | XX |
| 9 | 9 | 82.888889 | X |
| 7 | 9 | 84.000000 | X |
| 8 | 9 | 84.111111 | X |
| 6 | 9 | 89.111111 | X |
| 12 | 9 | 94.111111 | X |
| 11 | 9 | 94.222222 | X |
| 13 | 9 | 94.666667 | X |
| 10 | 9 | 95.666667 | X |

❖ **Tỉ lệ cây ra nụ**

One-Way Analysis of Variance

Data: TLRN6PE.Tlcayranu
 Level codes: TLRN6PE.NT
 Labels:

Means plot: LSD Confidence level: 95 Range test: LSD
 Analysis of variance

| Source of variation | Sum of Squares | d.f. | Mean square | F-ratio | Sig. level |
|---------------------|----------------|------|-------------|---------|------------|
| Between groups | 18333.333 | 5 | 3666.6667 | 999.999 | .0000 |
| Within groups | .000 | 12 | .0000 | | |
| Total (corrected) | 18333.333 | 17 | | | |

0 missing value(s) have been excluded.

Multiple range analysis for TLRN6PE.Tlcayranu by TLRN6PE.NT

Method: 95 Percent LSD

| Level | Count | Average | Homogeneous Groups |
|-------|-------|------------|--------------------|
| 1 | 3 | .000000 | X |
| 3 | 3 | 33.333333 | X |
| 12 | 3 | 33.333333 | X |
| 10 | 3 | 66.666667 | X |
| 11 | 3 | 66.666667 | X |
| 2 | 3 | 100.000000 | X |

| contrast | difference | +/- | limits |
|----------|------------|-----|-----------|
| 1 - 2 | -100.000 | | 0.00000 * |
| 1 - 3 | -33.3333 | | 0.00000 * |
| 1 - 10 | -66.6667 | | 0.00000 * |

Method: 95 Percent LSD

| Level | Count | Average | Homogeneous Groups |
|-------|-------|---------|--------------------|
|-------|-------|---------|--------------------|

| | | | |
|----|---|-----------|---|
| 12 | 1 | 1.0000000 | X |
| 3 | 1 | 3.0000000 | X |
| 10 | 2 | 4.0000000 | X |
| 11 | 2 | 4.5000000 | X |
| 2 | 3 | 7.6666667 | X |

| contrast | difference | +/- | limits |
|----------|------------|-----|---------|
| 2 - 3 | 4.66667 | | 11.4703 |
| 2 - 10 | 3.66667 | | 9.06809 |
| 2 - 11 | 3.16667 | | 9.06809 |
| 2 - 12 | 6.66667 | | 11.4703 |
| 3 - 10 | -1.00000 | | 12.1661 |
| 3 - 11 | -1.50000 | | 12.1661 |
| 3 - 12 | 2.00000 | | 14.0482 |
| 10 - 11 | -0.50000 | | 9.93360 |
| 10 - 12 | 3.00000 | | 12.1661 |
| 11 - 12 | 3.50000 | | 12.1661 |

* denotes a statistically significant difference.