

**TRƯỜNG ĐẠI HỌC NÔNG LÂM TP.HCM
BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO
KHOA: CÔNG NGHỆ SINH HỌC**



ĐẶNG THỊ THANH THÚY

**NHÂN GIỐNG *IN VITRO* CÂY GIÁNG HƯƠNG
(*Pterocarpus macrocarpus*)**

**Luận văn kỹ sư
Chuyên ngành: Công nghệ sinh học**

Tp.Hồ Chí Minh
Tháng 08/2006

**TRƯỜNG ĐẠI HỌC NÔNG LÂM TP.HCM
BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO
KHOA: CÔNG NGHỆ SINH HỌC**



**NHÂN GIỐNG *IN VITRO* CÂY GIÁNG HƯƠNG
(*Pterocarpus macrocarpus*)**

**Luận văn kỹ sư
Chuyên ngành: Công nghệ sinh học**

**GVHD:
TS. Trần Thị Dung**

**SVTH:
Đặng Thị Thanh Thúy
Khóa: 28**

**Tp. Hồ Chí Minh
Tháng 08/2006**

LỜI CẢM TẠ

Tôi xin chân thành cảm tạ:

- ✓ Ban Giám hiệu trường Đại học Nông Lâm Thành Phố Hồ Chí Minh, Ban chủ nhiệm Bộ Môn Công nghệ sinh học, cùng tất cả quý thầy cô đã truyền đạt kiến thức cho tôi trong suốt quá trình học tại trường.
- ✓ TS. Trần Thị Dung đã hết lòng giúp đỡ tôi trong suốt thời gian thực tập tốt nghiệp.
- ✓ ThS. Trương Mai Hồng đã cung cấp hạt giống giúp tôi thực hiện đề tài.
- ✓ Công lao to lớn của cha mẹ đã không ngại cực khổ để nuôi con khôn lớn và cho con được ăn học tới ngày hôm nay.
- ✓ Cảm ơn KS. Nguyễn Thị Thu Hằng, KS. Trần Thị Bích Chiêu và KS. Tôn Bảo Linh đã giúp đỡ tôi rất nhiều và tạo điều kiện thuận lợi cho tôi trong suốt thời gian thực tập tốt nghiệp.
- ✓ Các bạn bè thân yêu của tôi đã chia sẻ cùng tôi bao khó khăn trong lúc thực tập.

Sinh viên thực tập

Đặng Thị Thanh Thúy

TÓM TẮT

ĐẶNG THỊ THANH THÚY, Đại Học Nông Lâm Tp. Hồ Chí Minh. Tháng 2/2006. “Nhân giống *in vitro* cây Giáng hương (*Pterocarpus macrocapus*)”. Giáo viên hướng dẫn: TS. TRẦN THỊ DUNG.

Giáng hương là một trong những loại cây gỗ quý đang có nguy cơ bị diệt chủng do nạn chặt phá rừng bừa bãi. Để khôi phục lại hiện trạng rừng như trước đây phải mất rất nhiều thời gian. Nhưng đây là một việc vô cùng cấp bách để cứu nguy cho tình trạng lá phổi của hành tinh đang ngày càng bị thương tổn. Vì thế, chúng tôi tiến hành nhân giống vô tính cây giáng hương để tìm ra quy trình sản xuất giáng hương đảm bảo về số lượng và chất lượng.

Những kết quả đạt được:

- Hạt giáng hương rất khó nhiễm khuẩn hay nhiễm nấm so với những bộ phận khác như hạt phấn, hoa,... Tuy nhiên, hạt giáng hương có vỏ bọc dày làm hạn chế khả năng nảy mầm của hạt, dẫn đến giảm số lượng cây con *in vitro*.
- Môi trường MS có bổ sung nồng độ BA = 1,5 (mg/l) và NAA = 0,1 (mg/l) thích hợp cho sự tạo chồi của cây giáng hương *in vitro*.
- Bổ sung vào môi trường nuôi cấy WPM nồng độ NAA = 2mg/l sẽ tạo được cây giáng hương *in vitro* hoàn chỉnh với thời gian tạo rễ là nhanh nhất (chỉ trong 4 ngày là xuất hiện rễ).

MỤC LỤC

CHƯƠNG	TRANG
Lời cảm tạ.....	i
Tóm tắt.....	ii
Mục lục	iii
Danh sách các bảng	vi
Danh sách các hình	vii
Danh sách các chữ viết tắt	viii
1. MỞ ĐẦU	1
1.1 Đặt vấn đề	1
1.2 Mục đích yêu cầu	2
1.2.1 Mục đích	2
1.2.2 Yêu cầu	2
1.3 Giới hạn đề tài	2
2. TỔNG QUAN TÀI LIỆU.....	3
2.1 Giới thiệu về cây giáng hương	3
2.1.1 Mô tả cây	3
2.1.2 Sinh học	3
2.1.3 Phân bố	3
2.1.4 Đặc điểm gỗ và công dụng	4
2.1.5 Tình trạng.....	4
2.1.6 Giải pháp bảo vệ	4
2.2 Nhân giống cây trồng <i>in vitro</i>	4
2.2.1 Khái niệm nuôi cấy mô tế bào thực vật	4
2.2.2 Cơ sở khoa học chung về nuôi cấy mô tế bào thực vật	5
2.2.3 Lợi ích của nhân giống bằng nuôi cấy mô tế bào thực vật.....	6
2.2.4 Các phương pháp nuôi cấy mô tế bào thực vật.....	7
2.2.4.1 Nuôi cấy đỉnh sinh trưởng.....	7
2.2.4.2 Nuôi cấy mô sẹo.....	7

2.2.4.3 Nuôi cấy tế bào đơn.....	8
2.2.4.4 Nuôi cấy protoplast - chuyển gen.....	8
2.2.4.5 Nuôi cấy hạt phấn đơn bội	8
2.2.5 Các giai đoạn nhân giống <i>in vitro</i>	8
2.2.5.1 Giai đoạn 1	8
2.2.5.2 Giai đoạn 2	9
2.2.5.3 Giai đoạn 3	9
2.2.5.4 Giai đoạn 4	9
2.2.5.5 Giai đoạn 5	10
2.2.6 Các yếu tố ảnh hưởng đến nhân giống <i>in vitro</i>	10
2.2.6.1 Mẫu nuôi cấy.....	10
2.2.6.2 Điều kiện nuôi cấy.....	11
2.2.6.3 Ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy.....	12
2.2.7 Những vấn đề trong nhân giống <i>in vitro</i>	12
2.2.7.1 Tính bất định về mặt di truyền	12
2.2.7.2 Sự hoại mẫu.....	13
2.2.7.3 Việc sản xuất chất gây độc từ mẫu cấy	13
2.2.7.4 Sử dụng thuốc kháng sinh	14
2.2.7.5 Hiện tượng thủy tinh thể.....	14
2.2.8 Chất điều hòa sinh trưởng thực vật.....	14
2.2.8.1 Auxin	15
2.2.8.2 Cytokynin	15
2.2.9 Những thành tựu về nuôi cấy mô cây rừng	16
2.2.9.1 Trên thế giới	16
2.2.9.2 Tại Việt Nam	17
3. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU.....	19
3.1 Đối tượng thí nghiệm	19
3.2 Thời gian và địa điểm nghiên cứu.....	19
3.3 Vật liệu nghiên cứu	19
3.3.1 Trang thiết bị và dụng cụ dùng trong nghiên cứu.....	19
3.3.2 Môi trường nuôi cấy	19
3.4 Điều kiện nuôi cấy <i>in vitro</i>	21

3.5 Phương pháp khử trùng.....	21
3.5.1 Vật liệu.....	21
3.5.2 Phương pháp khử trùng mẫu.....	21
3.5.3 Cây mẫu.....	21
3.6 Phương pháp thí nghiệm.....	22
3.6.1 Thí nghiệm 1.....	22
3.6.2 Thí nghiệm 2.....	22
3.6.2.1 Thí nghiệm 2a.....	22
3.6.2.2 Thí nghiệm 2b.....	23
3.6.3 Thí nghiệm 3.....	24
3.6.4 Phân tích thống kê.....	25
4. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN.....	26
4.1 Thí nghiệm 1: Ảnh hưởng của nồng độ và thời gian khử trùng đến tỷ lệ sống của mẫu cây cây giáng hương <i>in vitro</i>	26
4.2 Thí nghiệm 2.....	27
4.2.1 Thí nghiệm 2a: Ảnh hưởng của nồng độ BA và NAA lên khả năng tạo chồi của cây giáng hương <i>in vitro</i>	28
4.2.2 Thí nghiệm 2b: Khảo sát ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy đến khả năng tạo chồi của cây giáng hương <i>in vitro</i>	30
4.3 Thí nghiệm 3: Khảo sát ảnh hưởng của IBA và NAA đến sự hình thành rễ của cây giáng hương <i>in vitro</i>	31
5. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ.....	33
5.1 Kết luận.....	33
5.2 Đề nghị.....	33
6. TÀI LIỆU THAM KHẢO.....	34
PHỤ LỤC.....	35
PHỤ LỤC 1.....	36
PHỤ LỤC 2.....	38

DANH SÁCH CÁC BẢNG

Bảng	Trang
4.1: Kết quả khử mẫu hạt giáng hương sau 4 tuần nuôi cấy trên môi trường $\frac{1}{2}$ MS.	26
4.2: Ảnh hưởng của nồng độ BA và NAA lên khả năng tạo chồi hạt giáng hương sau 6 tuần nuôi cấy.....	28
4.3: Ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy đến khả năng tạo chồi của giáng hương <i>in vitro</i> sau 6 tuần nuôi cấy.....	30
4.4: Ảnh hưởng của IBA và NAA đến sự hình thành rễ của giáng hương <i>in vitro</i> sau 4 tuần nuôi cấy.	31

DANH SÁCH CÁC HÌNH

Hình	Trang
2.1: Cây giáng hương	3
2.2: Mẫu gỗ giáng hương	4
4.1: Hạt giáng hương <i>in vitro</i> nảy mầm	27
4.2 Cây con giáng hương <i>in vitro</i>	27
4.3: Chồi cây giáng hương <i>in vitro</i> được tạo thành sau 6 tuần nuôi cấy trên các môi trường khác nhau	29
4.4: Chồi cây giáng hương <i>in vitro</i> được tạo thành sau 6 tuần nuôi cấy trên các môi trường khác nhau	30
4.5: Cây giáng hương <i>in vitro</i> hoàn chỉnh sau 4 tuần nuôi cấy.....	32

DANH SÁCH CÁC CHỮ VIẾT TẮT

MS	:	Murashige và Skoog
WPM	:	Llooyd và Mc Cown
ĐHSTTV	:	Điều hòa sinh trưởng thực vật
PVP	:	Polyvinyl pyrrolidone
ABA	:	Acid abxixic
IBA	:	Indol butyric acid
NAA	:	Napthlacetic acid
2,4-D	:	2,4-Dichlorophenol acetic acid
IAA	:	Indol acetic acid
BAP	:	6-Benzylaminopurin
Ki	:	Kinetin
Z	:	Zeatin
TDZ	:	Thidiazuron
BA	:	Benzyl adenin

Chương 1.MỞ ĐẦU

1.1 Đặt vấn đề

Rừng là hệ sinh thái có ý nghĩa to lớn trong bảo vệ môi trường sống con người. Rừng cũng là nguồn tài nguyên dồi dào đáp ứng được sự phát triển của nền kinh tế đất nước. “Bản thân rừng là hệ sinh thái lớn phức tạp và tự điều chỉnh” (Siscop, 1978).

Không chỉ cung cấp tài nguyên phục vụ đời sống con người, rừng còn góp phần quan trọng trong việc tái tạo tiêu khí hậu, làm trong sạch môi trường, chống xói mòn đất, chống lũ lụt,... Đặc biệt trong chiến tranh, tên của nhiều khu rừng đã đi vào lịch sử, tâm thức của người Việt Nam như: Cai Kinh, Trà Lĩnh, Trường Sơn,... Ngược dòng lịch sử ta thấy rừng đã gắn bó lâu đời với người Việt, những tộc người Việt cổ sống trong hang Con Moong từ thời cổ xưa đã sống nhờ rừng mà phát triển. Rừng còn đi vào thi ca truyền thuyết, các câu truyện cổ,... Có thể nói rừng là một phần trong đời sống văn hoá của dân tộc ta.

Thế nhưng qua nhiều thập kỷ, trên quy mô toàn cầu, rừng nhiệt đới đang ngày càng bị tàn phá, suy kiệt do nhiều nguyên nhân. Nhiều nhà khoa học đánh giá hệ sinh thái rừng nhiệt đới là phức tạp nhất nhưng cũng rất dễ suy tàn, khả năng phục hồi kém sau khi bị những tác động nghiêm trọng.

Do nhận thức rõ vai trò đặc biệt quan trọng của rừng cũng như của cây xanh đối với mọi hoạt động của con người cho nên trong những năm gần đây công tác trồng rừng rất được chú trọng. Cũng như để hoà vào nhịp độ phát triển công nghệ sinh học trên thế giới. Ngành lâm nghiệp và nhà nước đầu tư xây dựng những trung tâm giống cây trồng lâm nghiệp với quy mô hiện đại như trung tâm nuôi cấy mô thuộc Xí nghiệp giống và phục vụ trồng rừng TP.HCM, Trung tâm nghiên cứu lâm nghiệp ở Phù Ninh (Vĩnh Phú).

Phần lớn cây gỗ sinh sản bằng hạt. Các nhà chuyên môn thường nói: “Muốn nền sản xuất nông-lâm nghiệp ổn định, có năng suất cao, công tác giống phải đi trước một bước, riêng đối với cây rừng thì thời gian đi trước ít nhất phải mười năm” (Lê Đình Khả, 1992).

Rừng nước ta đang bị mất dần nhiều loại thực vật có giá trị kinh tế cao. Trong đó giáng hương là loài cây gỗ quý. Hiện nay do tình trạng phá rừng làm cho trữ lượng của loài này bị giảm sút nặng và nằm trong danh sách các loài cần được bảo vệ.

Với các điều kiện đó và có lẽ cũng không còn là quá sớm đối với công cuộc trồng rừng trong tương lai của đất nước, được sự chấp thuận của Bộ môn Công nghệ sinh học và sự hướng dẫn tận tình của cô Trần Thị Dung chúng tôi thực hiện đề tài: “**Nhân giống *in vitro* cây giáng hương (*Pterocarpus macrocarpus*)**”.

1.2 Mục đích yêu cầu

1.2.1 Mục đích

- Khảo sát ảnh hưởng của nồng độ và thời gian khử trùng đến tỷ lệ sống của hạt giáng hương *in vitro*.
- Khảo sát ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy đến sự nhân chồi và khả năng tạo rễ của cây giáng hương *in vitro*.

1.2.2 Yêu cầu

- Xác định được nồng độ và thời gian khử trùng thích hợp đối với hạt giáng hương *in vitro*.
- Xác định nồng độ chất điều hoà sinh trưởng thực vật thích hợp đến khả năng tạo chồi của cây giáng hương *in vitro* bằng phương pháp nuôi cấy chồi nách.
- Xác định nồng độ chất điều hoà sinh trưởng thực vật thích hợp cho sự tạo rễ cây giáng hương *in vitro* trước khi đem ra vườn ươm.

1.3 Giới hạn đề tài

Do thời gian có hạn nên chưa thực hiện được thí nghiệm đưa cây con giáng hương *in vitro* ra vườn ươm.

Chương 2. TỔNG QUAN TÀI LIỆU

2.1 Giới thiệu khái quát về cây giáng hương

Tên thường gọi: Cây Hương

Tên khoa học: *Pterocarpus macrocarpus* Kurz

Họ: *Fabaceae*

Họ phụ: *Faboideae*

Bộ: *Fabales*



Hình 2.1: Cây giáng hương

2.1.1 Mô tả cây

Giáng hương là loại cây gỗ lớn, thuộc loại cây gỗ thân thẳng, tròn to có tán rộng, có chiều cao khoảng từ 25 đến 40 mét, đường kính thân 0,9 mét hay lớn hơn, thay lá vào mùa khô, gốc có bạnh vè, vỏ màu nâu sẫm, nứt dọc. Khi bị thương sẽ có nhựa đặc màu đỏ tươi chảy ra. Cành non mảnh và có lông, cành già nhẵn. Lá kép lông chim lẻ một lần, dài từ 15-25cm; mang 9-11 lá chét. Lá chét có hình bầu dục thuôn, gốc tròn, đầu có mũi nhọn cứng. Hoa có màu vàng và có mùi thơm, làm thành chùm ở nách lá, có cuống dài và nhiều lông màu nâu. Đài hình chuông cong ở gốc, có 5 răng ngắn, gần bằng nhau hay không bằng nhau. Quả hình tròn dẹp, có mũi cong về hướng cuống, màu vàng nâu, giữa quả có từ 1 đến 2 hạt, xung quanh có cánh mỏng và có lông mịn nhung.

2.1.2 Sinh học

Là loài có lượng quả được sinh ra hàng năm rất nhiều, nhưng khả năng tái sinh hạt rất kém có thể do lửa rừng. Tuy nhiên, về khả năng tái sinh chồi thì rất khoẻ mạnh. Cây con được tạo từ hạt mang trồng sẽ phát triển nhanh trong thời gian rừng non, tăng trưởng chiều cao mạnh nhất lúc 16-20 năm tuổi, đến giai đoạn trung niên sẽ chậm dần.

2.1.3 Phân bố

Giáng hương phân bố chủ yếu trong rừng rậm nhiệt đới nửa rụng lá, mọc ở độ cao dưới 700-800m, thường mọc hỗn giao với một số loài cây lá rộng khác. Chẩn hạn như giáng hương thường mọc ở ranh giới với rừng rụng lá cây họ dầu (*Dierocapaceae*), mọc hỗn giao với một số loài cây lá rộng khác như gỗ đỏ (*Afzelia xylocalpa*), muồng đen (*Cassia siamea*), bằng lăng (*Lagerstromia* sp.), bình linh (*Vitex*

sp.),... Ưu đất có thành phần đất thịt nhẹ đến trung bình, phong hóa từ các đá trầm tích và macma acid, có khi cả trên đất đỏ bazan.



2.1.4 Đặc điểm gỗ và công dụng:

Gỗ đẹp, có mùi thơm, màu nâu hồng, mịn, có vân đẹp do vòng năm khá rõ ràng, tia rất nhỏ, mật độ cao; mạch to, tỷ trọng 0,84 – 0,90.

Hình 2.2: Mẫu gỗ giáng hương

Thuộc nhóm gỗ quý hiếm, có mùi thơm, hoa văn rất đẹp, được nhiều người ưa chuộng, dùng để làm đồ gỗ cao cấp và mặt hàng mỹ nghệ, ít bị nứt nẻ và không bị mối mọt. Ngoài ra nhựa còn có thể làm thuốc nhuộm màu đỏ.

2.1.5 Tình trạng:

Là loại cây rừng có giá trị kinh tế cao. Ở nước ta rất ít có diện tích rừng cây giáng hương mọc tập trung ở độ tuổi thành thực, chủ yếu là mọc rải rác, đan xen với những loài khác, hoặc tái sinh tự nhiên sau nương rẫy, do người dân bảo vệ, nuôi dưỡng trong đất vườn rẫy, đang ở tuổi còn non hoặc tuổi trung niên. Cây có đường kính lớn thì rất hiếm. Là loài cây quý hiếm của tỉnh đang bị người dân khai thác sử dụng không hợp lý, làm giảm dần về số lượng vốn đã khan hiếm lại càng khan hiếm hơn. Mức độ đe dọa: bậc V.

2.1.6 Giải pháp bảo vệ:

Giáng hương là đối tượng được bảo vệ của các khu rừng cấm Mom Rây, Ch. Đôn,...

Đề nghị Kiểm lâm địa bàn và Chính quyền địa phương quản lý chặt chẽ, bằng cách không cấp giấy phép chặt hạ đối với những loại cây trung niên, chưa đến tuổi thành thực, nhằm bảo vệ nguồn gen quý hiếm. Đồng thời, đề nghị trồng xen vào diện tích trồng keo lá tràm và vận động cộng đồng trồng theo ranh đất.

2.2 Nhân giống cây trồng *in vitro*

2.2.1 Khái niệm nuôi cấy mô tế bào thực vật

Nuôi cấy mô tế bào thực vật là một công cụ cần thiết trong nhiều lĩnh vực nghiên cứu cơ bản và ứng dụng của ngành sinh học. Nhờ áp dụng kỹ thuật nuôi cấy mô, con người đã thúc đẩy thực vật sinh sản nhanh hơn gấp nhiều lần tốc độ vốn có

trong tự nhiên. Do đó, tạo ra hàng loạt cá thể mới giữ nguyên tính trạng di truyền của cơ thể mẹ, làm rút ngắn thời gian đưa một giống mới vào sản xuất.

Hơn nữa, dựa vào kỹ thuật nuôi cấy mô có thể duy trì và bảo quản cây trồng quý hiếm.

Nhân giống vô tính bằng kỹ thuật nuôi cấy mô bắt đầu bằng một mảnh nhỏ thực vật vô trùng đặt vào môi trường dinh dưỡng thích hợp. Chồi mới hay mô sẹo mà mẫu cấy này tạo ra bằng sự tăng sinh được phân chia và cấy chuyển để nhân giống.

Nuôi cấy mô tế bào thực vật cho đến nay được chứng minh là phương pháp nghiên cứu quá trình hình thành cơ quan hiệu quả nhất. Năm 1939, nghiên cứu quá trình hình thành cơ quan trên sự hình thành chồi (White, 1939) và rễ (Nobercourt, 1939). Và các kết quả nghiên cứu về sự tác động của các nhân tố bên trong và bên ngoài ảnh hưởng đến sự hình thành cơ quan (Thorpe, 1980, 1988). Qua kết quả nghiên cứu quá trình hình thành cơ quan *in vitro*, cho thấy có 3 nhân tố ảnh hưởng trực tiếp: Môi trường nuôi cấy, điều kiện nuôi cấy và mẫu được sử dụng trong nuôi cấy.

Vận dụng quá trình hình thành cơ quan *in vitro* qua sự tác động tương hỗ của các nhân tố nói trên, có hàng ngàn loài thực vật đã được nghiên cứu quá trình hình thành chồi và rễ (Brown & Thorpe, 1986).

2.2.2 Cơ sở khoa học chung về nuôi cấy mô tế bào thực vật

Nuôi cấy mô tế bào thực vật là một ngành khoa học trẻ nằm trong sinh lý thực vật. Ở nước ta ngành này mới được chú ý và phát triển khoảng 15 – 20 năm trở lại đây. Trong công tác giống cây trồng, kỹ thuật nuôi cấy mô tế bào thực vật đã được phát triển những cơ sở lý thuyết về tế bào học và cơ sở sinh lý thực vật học như Nguyễn Văn Uyển (1993) và một số nhà nuôi cấy mô nước ngoài đã nhận định:

- Đó là tính toàn thể của mô và tế bào thực vật, cho phép tái sinh được cây hoàn chỉnh từ mô, thậm chí từ một tế bào nuôi cấy tách rời. Đây là một điểm rất quan trọng, bởi vì trên cơ sở đơn vị mô, tế bào, các nhà sinh vật học thực hiện được những kỹ thuật tiên tiến cho việc chọn, cải thiện và cải tạo giống cây trồng.

- Khả năng loại trừ virus bằng nuôi cấy đỉnh sinh trưởng, tạo các dòng vô tính sạch bệnh ở các cây nhân giống vô tính. Vấn đề này được các nhà khoa học khai thác để phục tráng các giống khoai tây, cây ăn trái (cam, quýt).

- Khả năng dùng chồi nách, các thể chồi protocorm vào nhân giống vô tính với tốc độ cực nhanh cây trồng phục vụ sản xuất: cây lương thực (khoai tây), cây cảnh (phong lan), cây lâm nghiệp (bach đàn, téch,...).

- Khả năng bảo quản các nguồn gen bằng nuôi cấy trong ống nghiệm, khả năng trao đổi Quốc tế các nguồn gen sạch bệnh dưới dạng cây nuôi trong ống nghiệm.

- Khả năng tạo các cây đơn bội qua nuôi cấy túi phấn và hạt phấn, từ đó tạo ra các dòng đồng hợp tử tuyệt đối và nhờ đó rút ngắn được chu trình lai tạo.

- Khả năng hấp thu DNA ngoại lai vào tế bào nhờ công nghệ gen.

- Khả năng nuôi cấy tế bào thực vật như nuôi cấy vi sinh vật và qua đó khả năng ứng dụng di truyền phân tử vào thực vật bậc cao phục vụ công tác tạo giống.

- Kỹ thuật nuôi cấy protoplast và khả năng dung hợp protoplast tái sinh cây hoàn chỉnh từ các protoplast lai.

- Khả năng sử dụng nuôi cấy phôi để khắc phục hiện tượng bất thụ khi lai xa.

- Khả năng tồn trữ các tế bào thực vật sống trong thời gian dài và ở nhiệt độ thấp không mất tính toàn thể của tế bào.

Đồng thời nuôi cấy mô tế bào cũng tạo những cơ sở cho quá trình nghiên cứu di truyền thực vật, vai trò chất điều hoà sinh trưởng thực vật.

Ngày nay cùng với công nghệ gen, nuôi cấy mô tế bào là một phần quan trọng không thể thiếu, thúc đẩy việc ứng dụng công nghệ sinh học trong ngành kinh tế. Hai nhiệm vụ lớn của công nghệ sinh học thực vật ở nước ta từ nay tới năm 2010 là: Tạo ra các giống cây trồng mới bằng phương pháp công nghệ sinh học thực vật, đặc biệt là công nghệ gen và nhân nhanh các giống, dòng ưu việt bằng kỹ thuật nuôi cấy mô tế bào thực vật (Nguyễn Văn Uyên, 1995).

2.2.3 Lợi ích của nhân giống bằng nuôi cấy mô tế bào thực vật

Theo Bùi Bá Bồng (1995), nhân giống bằng nuôi cấy mô có những lợi điểm sau:

Tạo ra cây con đồng nhất và giống như cây mẹ. Phần này giống như nhân giống vô tính. Đối với các cây trồng thuộc nhóm thụ phấn chéo như phần lớn các loài cây ăn trái, các cây con sinh ra từ hạt không hoàn toàn đồng nhất, và có thể không giống như cây mẹ, trong trường hợp này nhân giống vô tính có lợi điểm hơn nhân giống qua hạt.

So với kiểu nhân giống vô tính thông thường (chiết cành, hom), nhân giống bằng nuôi cấy mô có ưu điểm là có thể nhân một số lượng cây con lớn từ một cá thể ban đầu trong thời gian ngắn.

Có thể tạo ra cây con sạch bệnh nhờ áp dụng việc chọn lọc vật liệu ban đầu một cách chặt chẽ hoặc làm cho vật liệu ban đầu trở nên sạch bệnh. Không chiếm nhiều diện tích, không bị ảnh hưởng bởi thời tiết, điều kiện ngoại cảnh. Một giống cây quý có thể được nhân ra nhanh chóng để đưa vào sản xuất. Việc trao đổi giống được dễ dàng.

2.2.4 Các phương pháp nuôi cấy mô tế bào thực vật

Theo Dương Công Kiên (2002), có một số phương pháp nuôi cấy mô tế bào thực vật như sau:

2.2.4.1 Nuôi cấy đỉnh sinh trưởng

Một trong những phương thức sinh trưởng để đạt được mục tiêu trong nuôi cấy tế bào và mô thực vật là nuôi cấy đỉnh sinh trưởng (bao gồm nuôi cấy chồi đỉnh và chồi bên).

Sau khi vô trùng, mẫu sẽ được nuôi cấy trên môi trường thích hợp chứa đầy đủ chất dinh dưỡng khoáng vô cơ và hữu cơ hoặc môi trường khoáng có bổ sung chất kích thích sinh trưởng thích hợp,...

Từ đỉnh sinh trưởng, sau một khoảng thời gian nuôi cấy nhất định mẫu sẽ phát triển thành một chồi hay nhiều chồi. Chồi tiếp tục phát triển vươn thân, ra lá và rễ để trở thành cây hoàn chỉnh. Cây con được chuyển ra đất dần dần thích nghi và phát triển bình thường.

2.2.4.2 Nuôi cấy mô sẹo

Mô sẹo là một khối tế bào phát triển vô tổ chức, hình thành do sự phản phân hoá của tế bào đã phân hoá. Mô sẹo sẽ phát triển nhanh khi môi trường có sự hiện diện của auxin. Khối mô sẹo có khả năng tái sinh thành cây hoàn chỉnh trong điều kiện môi trường không có chất kích thích tạo mô sẹo.

2.2.4.3 Nuôi cấy tế bào đơn

Khi mô sẹo được nuôi cấy trong môi trường lỏng và được đặt trên máy lắc có tốc độ điều chỉnh thích hợp sẽ tách ra thành nhiều tế bào riêng lẻ gọi là tế bào đơn. Tế bào đơn được lọc và nuôi cấy trên môi trường đặc biệt để tăng sinh khối.

Sau một thời gian nuôi cấy kéo dài trong môi trường lỏng tế bào đơn được tách ra và trải trên môi trường thạch. Khi môi trường thạch có bổ sung auxin, tế bào đơn phát triển thành cụm tế bào mô sẹo. Khi trên môi trường thạch có tỷ lệ cytokinin – auxin thích hợp, tế bào đơn có khả năng tái sinh thành cây hoàn chỉnh.

2.2.4.4 Nuôi cấy protoplast - chuyển gen

Protoplast (tế bào trần) là tế bào đơn tách lớp vỏ cellulose, trong điều kiện nuôi cấy thích hợp, protoplast có khả năng tái sinh màng tế bào, tiếp tục phân chia và tái sinh thành cây hoàn chỉnh.

Khi tế bào mất vách và tiến hành dung hợp, hai protoplast có khả năng dung hợp với nhau tạo ra tế bào lai, đặc tính này cho phép cải thiện giống cây trồng. Quá trình dung hợp protoplast có thể được thực hiện trên hai đối tượng cùng loài hay khác loài.

2.2.4.5 Nuôi cấy hạt phấn đơn bội

Hạt phấn ở thực vật được nuôi cấy trên những môi trường thích hợp tạo thành mô sẹo. Mô sẹo này được tái sinh thành cây hoàn chỉnh là cây đơn bội.

2.2.5 Các giai đoạn nhân giống *in vitro*

Theo Nguyễn Xuân Linh (1998), sự thành công của việc nhân giống *in vitro* chỉ đạt được khi trải qua các giai đoạn:

2.2.5.1 Giai đoạn 1: Khử trùng mô nuôi cấy

Đây là giai đoạn tối quan trọng quyết định toàn bộ quá trình nhân giống *in vitro*. Mục đích của giai đoạn này là phải tạo ra được nguyên liệu vô trùng để đưa vào nuôi cấy *in vitro*.

Theo tài liệu của Street (1974) các chất diệt nấm khuẩn để xử lý mô nuôi cấy như sau:

Tác nhân vô trùng	Nồng độ (%)	Thời gian xử lý (phút)	Hiệu quả
Hypochlorit Calcium	9-10	5-30	Rất tốt
Natri hypochlorit	2	5-3	Rất tốt
Hydroperoxid	10-12	5-15	Tốt
Nước brom	1 -2	2 – 10	Rất tốt
HgCl ₂	0,1 -1	2 – 10	TB
Chất kháng sinh	4 – 50mg/l	30 – 60	Khá tốt

Vô trùng mô cấy là một thao tác khó, ít khi thành công ngay lần đầu tiên. Tuy vậy, nếu kiên trì tìm được nồng độ và thời gian vô trùng thích hợp thì sau vài lần thử chắc chắn sẽ đạt kết quả.

2.2.5.2 Giai đoạn 2: Tái sinh mẫu nuôi cấy

Mục đích của các giai đoạn này là sự tái sinh một cách định hướng các mô nuôi cấy. Quá trình này được điều khiển chủ yếu dựa vào tỷ lệ của các hợp chất auxin, cytokinin ngoại sinh đưa vào môi trường nuôi cấy. Tuy nhiên, bên cạnh điều kiện đó cũng cần quan tâm tới tuổi sinh lý của mẫu cấy. Thường mô non, chưa phân hoá có khả năng tái sinh cao hơn các mô trưởng thành đã chuyên hoá sâu. Người ta cũng còn nhận thấy rằng mẫu cấy trong thời gian sinh trưởng nhanh của cây trong mùa sinh trưởng cho kết quả rất khả quan trong tái sinh chồi.

2.2.5.3 Giai đoạn 3: Nhân nhanh

Giai đoạn này được coi là giai đoạn then chốt của quá trình. Để tăng hệ số nhân, ta thường đưa thêm vào môi trường dinh dưỡng nhân tạo các chất điều hoà sinh trưởng (Auxin, Cytokinin, Gibberellin,...), các chất bổ sung khác như nước dừa, dịch chiết nấm men,... kết hợp với các yếu tố nhiệt độ, ánh sáng thích hợp. Tùy thuộc vào từng đối tượng nuôi cấy, người ta có thể nhân nhanh bằng kích thích sự hình thành qua các cụm chồi (nhân cụm chồi) hay kích thích sự phát triển của các chồi nách (vi giâm cành) hoặc thông qua việc tạo cây từ phôi vô tính.

2.2.5.4 Giai đoạn 4: Tạo cây hoàn chỉnh

Khi đạt được kích thước nhất định, các chồi được chuyển từ môi trường ở giai đoạn 3 sang môi trường tạo rễ. Thường 2 – 3 tuần, từ những chồi riêng lẻ này sẽ xuất

hiện rễ và trở thành cây hoàn chỉnh. Ở giai đoạn này người ta thường bổ sung vào môi trường nuôi cấy các auxin là nhóm hormon thực vật quan trọng có chức năng tạo rễ phụ từ mô nuôi cấy.

2.2.5.5 Giai đoạn 5: Đưa cây ra đất

Giai đoạn đưa cây hoàn chỉnh từ ống nghiệm ra đất là bước cuối cùng của quá trình nhân giống *in vitro* và là bước quyết định khả năng ứng dụng quá trình này trong thực tiễn sản xuất.

Đây là giai đoạn chuyển cây con *in vitro* từ trạng thái sống dị dưỡng sang sống hoàn toàn tự dưỡng, do đó phải đảm bảo các điều kiện ngoại cảnh (nhiệt độ, ánh sáng, ẩm độ, giá thể,...) phù hợp để cây con đạt tỷ lệ sống cao trong vườn ươm cũng như ruộng sản xuất.

2.2.6 Các yếu tố ảnh hưởng đến nhân giống *in vitro*

2.2.6.1 Mẫu nuôi cấy

Murashige (1974) ghi nhận sự quan trọng của chọn lựa mẫu cây thích hợp và chỉ cho thấy hầu hết những cơ quan có thể dùng để nuôi cấy mô. Điều quan trọng cho thấy một số nhân tố khi chọn lọc mẫu bao gồm kiểu gen, cơ quan được chọn lọc, tuổi sinh lý, mùa vụ, giai đoạn sinh trưởng, độ khoẻ của mẫu và nguồn mẫu.

- Kiểu gen

Kiểu gen ảnh hưởng sâu sắc đến quá trình nuôi cấy. Với loài thuốc lá được sử dụng như cây kiểu mẫu, Cheng và Smith (1973) ghi nhận sự khác nhau giữa các genom qua nuôi cấy sinh trưởng mô lõi. Hơn nữa, Jaramillo và Summers (1990) ghi nhận kiểu di truyền ảnh hưởng đến số lượng và đường kính mô sẹo qua nuôi cấy hạt phấn cà chua *Lycopersicon esculentum* Mill.

- Chọn cơ quan

Murashige (1974) cho rằng hầu hết các loại cơ quan và mô đều có khả năng sử dụng nuôi cấy *in vitro*. Ông cho rằng mẫu nuôi cấy khác nhau ở các loài khác nhau, như ở Petunia dùng chồi đỉnh để nuôi cấy, theo Doerschung và Miller (1976) cho rằng chồi mầm thích hợp làm mẫu nuôi cấy ở các cây nảy mầm từ hạt.

- Tuổi và sinh lý

Tuổi thực của mẫu nuôi cấy và tuổi theo mùa trong năm của mẫu nuôi cấy cho thấy có ảnh hưởng quan trọng đến sự biệt hoá tế bào và tuổi sinh lý. Có nhiều nghiên

cứu khác nhau về ảnh hưởng của tuổi sinh lý mẫu nuôi cấy, theo Pierik (1970) ghi nhận rễ phát sinh trên lá non và không phát sinh trên lá già.

- Mẫu *in vitro*

Trong những năm gần đây, nhiều kết quả nghiên cứu cho thấy mẫu *in vitro* có khả năng tái sinh cao hơn mẫu lấy từ cây mẹ trên đồng ruộng hay trong vườn ươm như ở cây Azalea (Economou và Read, 1986). Tuy nhiên, Lu et al. (1991) ghi nhận nuôi cấy túi phấn đạt tỷ lệ thành công cao khi nuôi cấy túi phấn trên cây đồng ruộng.

- Sức sống của mẫu

Điều cần thấy rằng mẫu cây mẹ có ảnh hưởng rất quan trọng đến nuôi cấy *in vitro*. Morel (1952, 1955) nuôi cấy đỉnh sinh trưởng để loại virus sản xuất những cây sạch bệnh và điều này nói lên rằng cần phải cẩn thận chọn mẫu nuôi cấy nhất là đối với những cây bệnh, nếu nuôi cấy cây bị bệnh thì sẽ có một số lượng lớn những cây bệnh được nhân lên.

2.2.6.2 Điều kiện nuôi cấy

Nhiệt độ

Nhiệt độ thích hợp cho nuôi cấy mô là 20 – 27°C. Theo Murashige (1974), nhiệt độ ảnh hưởng sâu sắc đến sinh trưởng và phát triển cây *in vitro* qua những tiến trình sinh lý như hô hấp hay hình thành tế bào hay cơ quan.

Cường độ ánh sáng

Cường độ ánh sáng là một nhân tố quan trọng trong quang hợp, ảnh hưởng đến khả năng nuôi cấy *in vitro* cây có lá xanh. Ảnh hưởng của ánh sáng hình như có liên hệ với các loài, có loài chịu ánh sáng cao, ánh sáng trung bình và ánh sáng thấp hay tối (Papachatzki et al., 1981; Miller và Murashige, 1976; Thorpe và Murashige, 1970). Việc nuôi cấy *in vitro* tốt nhất trong điều kiện ánh sáng 1000 lux (Dương Công Kiên, 2002).

Quang kỳ và chất lượng ánh sáng

+ Thời gian chiếu sáng

Ảnh hưởng sâu sắc đến những đáp ứng sinh lý ở cây trồng.

+ Chất lượng ánh sáng

Ảnh hưởng trực tiếp đến cây *in vitro*, vì ánh sáng cao hơn ánh sáng đỏ hay ánh sáng đỏ có ảnh hưởng đến những biến đổi sinh lý trên cây như ra hoa, chế độ dinh dưỡng và những hiện tượng khác như tăng sinh chồi *in vitro*.

+ Các chất khí

Thành phần chất khí trong bình nuôi cấy có ảnh hưởng đến sinh trưởng cây *in vitro*. O₂, CO₂ và ethylen là những thành phần chất khí được khảo sát nhiều trong môi trường nuôi cấy. Ẩm độ cũng được quan tâm đến, do ảnh hưởng đến quá trình làm khô mẫu nuôi cấy.

2.2.6.3 Ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy

Lựa chọn môi trường nuôi cấy thích hợp trong nuôi cấy mô là rất cần thiết. Vì mỗi loại cây trồng khác nhau đều yêu cầu một hàm lượng dinh dưỡng khác nhau. Mặt khác, môi trường còn thay đổi tùy thuộc vào sự phân hoá của mô cấy, tùy theo trường hợp duy trì mô ở trạng thái mô sẹo, tạo rễ, tạo mầm hay tái sinh cây hoàn chỉnh.

Việc lựa chọn môi trường cần dựa vào tài liệu đã cho cùng đối tượng nuôi cấy hoặc thăm dò qua một số môi trường đã cho để xác định môi trường thích hợp cho mẫu nuôi cấy.

Các môi trường đều được thành lập từ một số thành phần chính với nguyên tắc có sự cân bằng các yếu tố trong môi trường.

Các thành phần chính:

- Đường làm nguồn carbon.
- Các muối khoáng đa lượng.
- Các vitamin.
- Các chất sinh trưởng.

Ngoài ra các tác giả còn cho thêm một số chất hữu cơ như: Nước dừa, nước chiết nấm men.

2.2.7 Những vấn đề trong nhân giống *in vitro*

2.2.7.1 Tính bất định về mặt di truyền

Mặc dù kỹ thuật nhân giống vô tính đã được sử dụng nhằm mục đích tạo ra quần thể cây trồng đồng nhất (true-to-type) với số lượng lớn, nhưng cũng tạo ra những biến dị soma qua nuôi cấy mô sẹo và nuôi cấy tế bào đơn. Những biến dị này được nghiên cứu vận dụng vào cải thiện giống cây trồng (Evans và Sharp, 1986, 1988;

Larkin, 1987). Tần số biến dị thì hoàn toàn khác nhau và không lặp lại (Sreissen và Karp, 1985; Fish và Karp, 1986).

Những nhân tố gây ra biến dị tế bào soma như:

- Kiểu di truyền
- Thể bội
- Số lần cấy chuyển
- Loại mô

2.2.7.2 Sự hoại mẫu

Có hai tác nhân làm hư mẫu nuôi cấy *in vitro*:

- Bị vi sinh vật huỷ hoại, có thể khử trùng mẫu trước khi đưa vào môi trường.
- Bị virus hay thể giống như virus xâm nhiễm, không hại mẫu nhưng có ảnh hưởng về sau.

Tuy nhiên có sự xâm nhiễm của vi sinh vật như *Agrobacterrium*, *Bacillus* và *Pseudomanas* vào nhu mô dẫn truyền sẽ hoại mẫu khi tế bào bắt đầu phân chia.

Có thể làm giảm khả năng hoại mẫu bằng cách:

- Khử trùng mẫu trước khi cấy vào môi trường.
- Sử dụng mẫu nuôi cấy là mô phân sinh đỉnh.

2.2.7.3 Việc sản xuất chất gây độc từ mẫu cấy

Thường chúng ta hay thấy hiện tượng hoá nâu hay hoá đen mẫu, sinh trưởng của mẫu bị ngăn chặn hay hư mẫu. Hiện tượng này là do mẫu nuôi cấy có chứa nhiều chất tannin hay hydroxyphenol, có nhiều trong mô già hơn mô non.

Khi môi trường và mô cấy bị đổi màu quá mức thì absorbent được sử dụng. Hai loại absorbent thông thường là polyvinylpyrrolidone (PVP) và than hoạt tính. Nhưng một số nghiên cứu cho rằng nên sử dụng than hoạt tính (Mohamed – Yassen et al., 1995 và Wann et al., 1997)

Nhiều phương pháp làm giảm sự hoá nâu được đề nghị và được nhiều nhà khoa học đồng ý như:

Sử dụng mẫu cấy nhỏ từ mô non.

Gây ít vết thương trên mẫu khi khử trùng.

Ngâm mẫu vào dung dịch ascorbic acid và citric acid vài giờ trước khi cấy.

Nuôi cấy trong môi trường lỏng, oxy thấp, không có đèn 1-2 tuần.

Chuyển mẫu từ môi trường có chất kích thích sinh trưởng thấp qua môi trường có nồng độ cao hơn.

2.2.7.4 Sử dụng thuốc kháng sinh

Có nhiều loại thuốc kháng sinh sử dụng trong nuôi cấy mô, nhằm hạn chế sự hoại mẫu của vi sinh vật như kanamycin, penicillin, nystatin, amphotericin B,... Nồng độ sử dụng 5 -100 g/l phụ thuộc vào vật liệu nuôi cấy như tế bào hay tế bào trần. Sự huỷ hoại của chất kháng sinh lên mô thực vật xảy ra ở plastid hay mitochondria, xử lý càng lâu hay nồng độ càng cao dễ dàng dẫn đến sự thay đổi kiểu gen của tế bào chất hay DNA.

2.2.7.5 Hiện tượng thủy tinh thể

Thân lá phồng to chứa nhiều nước, cây có dạng trong. Đây là một dạng bệnh lý thường thấy khi cây được nuôi trong môi trường mà việc trao đổi khí giữa cây và môi trường bên ngoài bị dừng lại, quá trình thoát hơi nước tập trung trong cây.

Một số phương pháp hạn chế quá trình hoá thủy tinh thể:

Giảm sự hút nước của cây trong *in vitro* bằng cách tăng nồng độ đường trong môi trường cấy hoặc dùng các chất có áp suất thẩm thấu cao.

Tránh gây thương tổn trên mẫu cấy và tiếp xúc với mẫu cấy ít nhất.

Ở một số loài có thể sử dụng chất ABA.

Giảm nồng độ đạm trong môi trường cấy.

Giảm C_2H_2 trong bình nuôi cấy bằng cách thông gió tốt, tăng cường ánh sáng và giảm nhiệt độ phòng cấy.

2.2.8 Chất điều hoà sinh trưởng thực vật (ĐHSTTV)

Chất ĐHSTTV hay hormones sinh trưởng là các hợp chất hữu cơ (gồm các sản phẩm thiên nhiên của thực vật và các hợp chất tổng hợp nhân tạo). Chúng có tác dụng điều tiết các quá trình sinh trưởng và phát triển của thực vật. Tuy nhiên, các chất ĐHSTTV chỉ làm tăng cường quá trình trao đổi chất mà không tham gia trực tiếp vào quá trình trao đổi chất. Nó không thể dùng để thay thế chất dinh dưỡng. Chất ĐHSTTV gây nên tác dụng mạnh mẽ với một lượng vô cùng bé lên trao đổi chất của tế

bào, ở nồng độ cao chúng có thể hoạt động như chất kìm hãm. Trong thành phần môi trường nuôi cấy, các chất ĐHSTTV làm việc như chiếc chìa khoá đóng mở sự hoạt động của gen, điều khiển sự phát sinh hình thái và tổng hợp hoạt chất. Tác dụng của chất ĐHSTTV liên quan đến hiện tượng kìm hãm và cảm ứng tổng hợp enzyme trong cơ thể thực vật, hoạt hoá các bộ phận của phân tử DNA. Mỗi một chất ĐHSTTV đều mang một chức năng riêng, nhưng trong cơ thể của thực vật, để điều khiển những hoạt động của thực vật, chúng tham gia vào thường không phải là một mà là vài chất. Tuy mỗi giai đoạn nuôi cấy, giai đoạn phát triển của thực vật, sự kết hợp các chất này có khác nhau. Trong phạm vi nghiên cứu của đề tài chúng tôi sử dụng các chất thuộc nhóm auxin và cytokinin.

2.2.8.1 Auxin

Tác dụng sinh lý của auxin chủ yếu làm tăng thể tích của tế bào, kích thích sự hình thành rễ, kìm hãm sự sinh trưởng của chồi bên, kìm hãm sự rụng hoa, rụng quả. Auxin hoạt hoá các hợp chất cao phân tử (protein, cellulose, pectin) và ngăn cản sự phân giải chúng. Auxin được xem là hormone thực vật quan trọng nhất vì chúng có vai trò rất cơ bản trong quá trình phối hợp sinh trưởng và biệt hoá tế bào cần thiết cho sự phát triển bình thường của thực vật. Auxin cùng với một số chất điều chỉnh khác đảm bảo cho sự tạo thành khối các tế bào đang phân chia thành cơ thể thực vật hoàn chỉnh.

Trong nuôi cấy mô thường sử dụng các chất như:

- Indol acetic acid (IAA)
- Naphthyl acetic acid (NAA).
- 2,4-D Dichlorophenol acetic acid (2,4-D).
- Indol butyric acid (IBA).

2.2.8.2 Cytokinin

Bao gồm các nhóm chất:

- 6-Benzylaaminopurin (BAP).
- Kinetin (Ki).
- Zeatin (Z).
- Thidiazuron (TDZ).

Cytokinin có tác dụng kích thích sự sinh trưởng của tế bào cây mô và làm tăng tốc độ phân bào. Khi ở nồng độ cao, nó có tác dụng kích thích sự tạo chồi, đồng thời ức chế sự phân hoá rễ của mô cấy.

Cytokinin có hiệu quả rất rõ trên sự phân chia của tế bào, trong quá trình này cytokinin cần thiết nhưng chúng không có hiệu quả nếu vắng mặt auxin. Trong một tỷ lệ giữa cytokinin và auxin thì có kích thích tạo chồi hay tạo rễ, thông thường cytokinin cao hơn auxin thì kích thích tạo chồi. Và ngược lại, auxin cao hơn cytokinin thì kích thích sự tạo rễ.

Trong cơ thể thực vật cytokinin có tác dụng rất lớn là tăng cường sự tổng hợp DNA và protein, kích thích quá trình trao đổi chất.

2.2.9 Những thành tựu về nuôi cấy mô cây rừng trên thế giới và Việt Nam

2.2.9.1 Trên thế giới

Ngành nuôi cấy mô đã thu được nhiều thành tựu ở các lĩnh vực cây trồng công nghiệp (cà phê, thuốc lá, cọ dầu, cao su,...), cây nông nghiệp, thực phẩm (khoai tây, lúa, bắp cải,...), cây cảnh (phong lan, cẩm chướng, huệ,...) (Albert Sassons, 1988; Nguyễn Văn Uyên và các tác giả, 1993; Bezborogov và các tác giả, 1994). Đặc biệt trên lĩnh vực cây cảnh thì phong lan nuôi cấy mô được phát triển rất rộng rãi cả trong nước và ngoài nước (Nguyễn Thiện Tích và các tác giả, 1988; Võ Thị Bạch Mai, 1996). Cây ăn trái lâu năm: cây khế, măng cầu xiêm, măng cụt,... (Nguyễn Văn Uyên và các tác giả, 1993). Trong tạp chí "*Plant physiology*" (1988) và nhiều tài liệu khác, các nhà khoa học Nga cũng cho biết kết quả nuôi cấy mô nhiều loài cây khác nhau như thông, bạch dương,...

Ngày nay cây trồng từ cấy mô không chỉ quen thuộc với các nhà nghiên cứu, các nhà kinh doanh, sản xuất chuyên nghiệp mà cả những người nông dân, người làm vườn thủ công cũng đã biết và quan tâm tới như cây khoai tây, cây chuối,...

Tuy nhiên trên lĩnh vực cây trồng rừng, nhất là những cây quý, hiếm, lâu năm do những đặc thù riêng còn ít được nghiên cứu kể cả về chủng loài và quy mô nghiên cứu. Các kết quả đã có đều chủ yếu nghiên cứu cho các loài cây mọc nhanh, cây có giá trị kinh tế trong thời hạn kinh doanh ngắn, có khả năng mau chóng đáp ứng nhu cầu phủ xanh đất trồng và cung cấp được khối lượng nguyên liệu đáng kể cho nền kinh tế và đời sống người dân (nhựa mủ, gỗ, củi,...).

Reilly và Washev (1977) đã tách chồi mầm cây thông (*Pinus* sp.) được tách từ hạt gieo trong ống nghiệm. Từ những năm 1970 người ta đã nuôi cấy thành công mảnh lá, cuống lá, đoạn thân, rễ bạch đàn (Albert Sassons, 1988). Các nhà nghiên cứu Mỹ đã

tạo được cây con từ nuôi cấy đoạn thân loài *Eucalyptus grandis*, *E. gunni*, *E. danrympleama* ... vào các năm 1977, 1979.

Năm 1973, Afocel đã khởi sự nghiên cứu nhân giống vô tính cây bạch đàn nhằm mục đích sản xuất lớn các dòng vô tính chịu lạnh, năng suất gỗ cao. Người ta đã tạo cây từ hạt nảy mầm trong ống nghiệm, hoặc cắt các chồi non từ các cây chọn lọc, từ cành ghép. Từ năm 1975, cây cấy mô được bắt đầu trồng ra ngoài đất với số lượng 20.000 cây / tháng.

Một số giống bạch đàn có năng suất cao, hay giá trị kinh tế về tinh dầu cũng được thử nghiệm ở nhiều nước nhiệt đới: Ấn Độ, Senegal, hàng năm từ một đoạn cành có thể cho 50.000 cây con hay hơn nữa (Albert Sassons, 1988).

Tại hội nghị Kaset Sart (Thái Lan, 1994) cũng đã báo cáo kết quả nhân giống thành công 55 loài tre trúc và dự định phục vụ dự án trồng rừng của Thái Lan, với sản lượng 1 triệu cây con / năm (Pranon Prutgongse, 1994).

Ở Malaysia cũng đã có kết quả vi nhân giống các loài cây gỗ như *Acacia mangium*; *Gmelia arborea* (Marziah Mahmood, 1995).

2.2.9.2 Tại Việt Nam

Nước ta có một số cơ sở giống cây rừng, Viện lâm nghiệp, nhiều Trường Đại học Nông Nghiệp và khoa học (sinh học) cũng đã xây dựng các phòng nuôi cấy mô. Điển hình là Xí nghiệp giống và phục vụ trồng rừng TP.HCM đã được chuyển giao một Trung tâm nuôi cấy mô lớn từ Quảng Đông (Trung Quốc). Hiện nay Trung tâm có khả năng cung cấp 1 triệu cây con / năm với khoảng 10 dòng bạch đàn và các loại tếch, keo lá tràm (báo cáo tại hội nghị CNSH lần III, 1995).

Trung tâm nghiên cứu lâm nghiệp Phù Ninh-Vĩnh Phú cũng xây dựng phòng nuôi cấy mô 1994, đến tháng 5 năm 1995 đã sản xuất 50000 cây con bạch đàn, và trồng thử ở một số tỉnh Vĩnh Phú, Quảng Ninh, Gia Lai (Mai Đình Hồng, 1995). Cũng như kết quả thông báo nuôi cấy mô bạch đàn lại thành công và trồng ra ngoài đất tự nhiên của Nguyễn Ngọc Tân (1995).

Khoa lâm nghiệp trường Đại học Nông Lâm TP. HCM, cũng đã có nhiều thành tựu về nuôi cấy mô cây rừng như: nuôi cấy mô một loài cây bạch đàn (*E. camaldulensis*), cây thông caribê (*Pinus caribaea*), cây giá tỵ (*Tectona grandis* Linn

F.), cây thông ba lá (*Pinus kharya* Royle), cây thông đỏ, cây trầm hương, cây mây nếp,... song kết quả còn chủ yếu dừng lại ở giai đoạn ống nghiệm.

Qua các kết quả còn rất hạn hẹp như vậy, chúng tỏ những năm qua nhu cầu thị trường cây cấy mô cho trồng rừng trong nước chưa cao nhất là đối với các loài cây gỗ quý, hiếm, lâu năm. Mặc dù vậy những thành tựu đã có cũng là những cơ sở, kinh nghiệm và hy vọng để đặt vấn đề nuôi cấy cây giáng hương, là một loài cây quý của rừng nhiệt đới đang có nguy cơ bị tiêu diệt.

Hy vọng không chỉ đặt vào khả năng thành công từ các thí nghiệm mà cả triển vọng ứng dụng trong thực tế trồng rừng ở nước ta. Vì ngoài những thành tựu không nhỏ nêu trên, còn phải nói đến một thành công rất lớn trong định hướng phát triển ngành nuôi cấy mô cây rừng của nhà nước và các nhà chuyên môn lâm nghiệp. Đó là sự đầu tư thích đáng để chuyên giao những công nghệ hiện đại từ Trung Quốc, đặc biệt là ở Xí nghiệp giống và phục vụ trồng rừng TP.HCM được đánh giá là trung tâm nuôi cấy mô lớn và hiện đại nhất trong nước hiện nay. Trên thực tế xí nghiệp đã triển khai hiệu quả, đã trồng thử và cung cấp giống cây mô cho một số cơ sở trồng rừng. Kết quả cây con (bach đàn) sau một năm có thể đạt chiều cao 6-7 m, đường kính gốc đạt 10cm. Chỉ sau 3 tháng một số giống bach đàn đo được đường kính gốc bình quân 3,8 cm. Chiều cao vút ngọn 2,5-2,8 m (đo tháng 10.1996).

Trong thời gian tới, các trung tâm và cơ sở nuôi cấy mô khác sẽ còn đưa ra nhiều thành công nuôi cấy cây rừng với nhiều chủng loại hơn, phục vụ được các kế hoạch trồng rừng của nước ta. “*Kế hoạch CNSH năm 1996 – 2010 trong đó quan tâm nhân nhanh các cây lâm nghiệp, cây cảnh, cây thuốc quý*” (Nguyễn Văn Uyển, 1995).

Hiện nay vấn đề khẩn thiết và cần quan tâm hơn nữa tới tiềm năng của việc phổ biến ứng dụng vi nhân giống đối với các loài cây gỗ. Ảnh hưởng kinh tế của ứng dụng nhân giống vô tính các loài thực vật này là rất lớn đối với những vùng nhiệt đới và á nhiệt đới (Gamborg, 1995).

Chương 3. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

3.1 Đối tượng thí nghiệm

Thí nghiệm được tiến hành trên cây giáng hương (*Pterocarpus macrocarpus*).

3.2 Thời gian và địa điểm nghiên cứu

Đề tài được thực hiện từ ngày 6/2- 18/6/2006 tại Bộ môn Công nghệ sinh học trường Đại học Nông Lâm.

3.3 Vật liệu nghiên cứu

3.3.1 Trang thiết bị và dụng cụ

Thiết bị: tủ vô trùng, nồi hấp, máy đo pH, cân điện tử, máy lạnh, nhiệt kế, ẩm kế, kệ đặt bình, đèn neon,...

Dụng cụ: pince, kéo, dao cắt, bình thủy tinh 500ml, đĩa, đèn cồn.

3.3.2 Môi trường nuôi cấy

Các môi trường được sử dụng gồm: Môi trường MS, ½ MS, WPM. Trong đó môi trường ½ MS là môi trường MS mà thành phần đa lượng được giảm đi một nửa.

- Môi trường MS cải tiến (Murashige và Skoog, 1962)

	Thành phần	Nồng độ (mg/l)
Khoáng đa lượng	NH ₄ NO ₃	1650
	KNO ₃	1900
	CaCl ₂ .2H ₂ O	440
	MgSO ₄ .7H ₂ O	370
	KH ₂ PO ₄	170
Khoáng vi lượng	MnSO ₄ .4H ₂ O	23,3
	ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,6
	H ₃ BO ₃	6,2
	KI	0,83
	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25
	CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025
	CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025

Sắt EDTA	Na ₂ .EDTA	37,3
	FeSO ₄ .7H ₂ O	27,8
Vitamin	myo-Inositol	100
	Thiamin (B ₁)	0,1
	Nicotinic acid	0,5
	Pyridoxine HCl	0,5
	Glycine	2

- Môi trường WPM (Llooyd và McCown, 1981)

	Thành phần	Nồng độ (mg/l)
Khoáng đa lượng	NH ₄ NO ₃	400
	CaNO ₃	556
	K ₂ SO ₄	990
	CaCl ₂	96
	KH ₂ PO ₄	170
	MgSO ₄	370
Sắt EDTA	FeNa ₂ EDTA	65,1
Khoáng vi lượng	MnSO ₄ .4H ₂ O	23,3
	ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,6
	H ₃ BO ₃	6,2
	KI	0,83
	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25
	CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025
	CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025
Vitamin	myo-Inositol	100
	B ₁	1
	B ₆	0,5
	Nicotinic acid	0,5
	Glycine	2

Các chất điều hoà sinh trưởng thực vật được sử dụng là BA, NAA, IBA (mg/l).

Các thành phần khác:

Đường sucrose	30 g/l
Agar	7,5 /l
Nước dừa	10%
Than hoạt tính	1g/l

Môi trường được điều chỉnh về pH=5,7 ± 0,1 (bằng KOH 1N và HCl 1N) trước khi hấp khử trùng bằng autoclave ở 1atm (121⁰C) trong 25 phút.

3.4 Điều kiện nuôi cấy *in vitro*

Thời gian chiếu sáng	16 giờ/ngày
Nhiệt độ	25 ± 2 ⁰ C
Độ ẩm	75-80%
Cường độ ánh sáng	2000-3000 lux

3.5 Phương pháp khử trùng

3.5.1 Vật liệu

Hạt giáng hương do Khoa Lâm Nghiệp trường Đại Học Nông Lâm cung cấp

3.5.2 Phương pháp khử trùng mẫu

- Bên ngoài tử cây:

Hạt đã được bóc vỏ đem rửa bằng xà bông

Rửa sạch xà bông bằng nước máy

- Trong tử cây vô trùng:

Rửa hạt bằng nước cất vô trùng

Lắc cồn 70⁰ trong 30 giây

Rửa lại 3 lần bằng nước cất vô trùng

Ngâm trong Javel (nồng độ và thời gian theo thí nghiệm)

Rửa lại 3 lần bằng nước cất vô trùng

3.5.3 Cây mẫu

Tạo vết thương cho hạt

Cấy mẫu vào bình thủy tinh chứa 30ml môi trường ¹/₂MS không bổ sung chất điều hoà sinh trưởng thực vật

3.6 Phương pháp thí nghiệm

Các thí nghiệm đều được bố trí theo kiểu thí nghiệm đơn yếu tố và hoàn toàn ngẫu nhiên, với 3 lần lặp lại. Trong mỗi bình cấy một mẫu. Mỗi bình chứa 50ml môi trường

3.6.1 Thí nghiệm 1: Ảnh hưởng của nồng độ và thời gian khử trùng đến tỷ lệ sống của mẫu cấy cây giáng hương *in vitro*.

- Mục đích thí nghiệm: Xác định nồng độ javel và thời gian thích hợp cho việc vô trùng mẫu giáng hương nhằm tạo nguồn mẫu sạch ban đầu cho quá trình nhân giống tiếp theo.

- Vật liệu thí nghiệm: Hạt giáng hương

Thí nghiệm gồm: 9 nghiệm thức

Nghiệm thức	Nồng độ Javel (%)	Thời gian khử trùng (phút)
NT1	5	5
NT2	5	10
NT3	5	15
NT4	10	5
NT5	10	10
NT6	10	15
NT7	12	5
NT8	12	10
NT9	12	15

Mỗi nghiệm thức cấy 3 bình

Tổng số mẫu: 81

Thời gian thí nghiệm: 4 tuần

Chỉ tiêu theo dõi:

Tỷ lệ hạt nảy mầm (%): $(\text{Tổng số hạt nảy mầm} / \text{tổng số mẫu cấy}) \times 100$

Tỷ lệ hạt không nhiễm (%): $(\text{Tổng số hạt không nhiễm} / \text{tổng số mẫu cấy}) \times 100$

Tỷ lệ hạt nhiễm (%): $(\text{Tổng số hạt nhiễm} / \text{tổng số mẫu cấy}) \times 100$

3.6.2 Thí nghiệm 2: Khảo sát ảnh hưởng của các môi trường lên khả năng tạo chồi cây giáng hương *in vitro*.

3.6.2.1 Thí nghiệm 2a: Ảnh hưởng của nồng độ BA và NAA lên khả năng tạo chồi của cây giáng hương *in vitro*.

- Mục đích thí nghiệm: Xác định nồng độ thích hợp BA và NAA thích hợp cho quá trình tạo chồi của cây giáng hương *in vitro*, làm nguồn nguyên liệu cho quá trình vi nhân giống tiếp theo.
- Vật liệu thí nghiệm: Chồi con *in vitro* mọc lên từ hạt giáng hương đã được vô trùng và nuôi cấy trong môi trường $\frac{1}{2}$ MS ở thí nghiệm 1 sau 4 tuần nuôi cấy.

Thí nghiệm gồm: 8 nghiệm thức

Nghiệm thức	Môi trường	BA(mg/l)	NAA (mg/l)
NT1 (ĐC)	WPM	0	0
NT2	WPM	0,5	0,1
NT3	WPM	1	0,1
NT4	WPM	1	0,5
NT5	WPM	1,5	0,1
NT6	WPM	1,5	0,5
NT7	WPM	2	0,1
NT8	WPM	2	0,5

Mỗi nghiệm thức cấy 3 bình

Tổng số mẫu: 72 mẫu

Thời gian thí nghiệm: 6 tuần

Chỉ tiêu theo dõi:

- Số lượng chồi (chồi): Tổng số chồi/ tổng số mẫu cấy
- Chiều cao chồi (cm): Đo từ mặt thạch đến đỉnh cao nhất của cụm chồi
- Hệ số nhân chồi: Tổng số chồi / mẫu cấy

3.6.2.2 Thí nghiệm 2b: Khảo sát ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy cơ bản đến khả năng tạo chồi của giáng hương *in vitro*.

- Mục đích thí nghiệm: Xác định được loại môi trường cơ bản thích hợp cho sự tăng trưởng và phát sinh cụm chồi của cây giáng hương *in vitro* nhằm làm dồi

dào lượng mẫu và đảm bảo chất lượng mẫu về kích thước cũng như khả năng tăng trưởng mạnh cho lần vi nhân giống sau.

- Vật liệu thí nghiệm: Chồi giáng hương *in vitro* ở thí nghiệm 2.

Thí nghiệm gồm: 3 nghiệm thức

Nghiệm thức	Môi trường	BA (mg/l)	NAA (mg/l)
NT1(ĐC)	WPM	1,5	0,1
NT2	$1/2$ MS	1,5	0,1
NT3	MS	1,5	0,1

Mỗi nghiệm thức cấy 3 bình

Tổng số mẫu: 27

Thời gian thí nghiệm: 6 tuần

Chỉ tiêu theo dõi:

- Chiều cao chồi (cm): Đo từ mặt thạch lên đến đỉnh cao nhất của cụm chồi.
- Số lượng chồi (chồi): Tổng số chồi / tổng số mẫu cấy.
- Hệ số nhân chồi: Tổng số chồi / mẫu cấy.

3.6.3 Thí nghiệm 3: Khảo sát ảnh hưởng của IBA và NAA đến sự hình thành rễ của giáng hương *in vitro*.

- Mục đích thí nghiệm: Xác định nồng độ IBA và NAA thích hợp cho quá trình tạo rễ của cây giáng hương *in vitro*, nhằm chuẩn bị cây con khoẻ mạnh để đưa ra vườn ươm.
- Vật liệu thí nghiệm: Chồi tách ra từ thí nghiệm 2 có kích thước khoảng 2– 3 cm.

Thí nghiệm gồm: 9 nghiệm thức

Nghiệm thức	Môi trường	IBA (mg/l)	NAA (mg/l)
NT1 (ĐC)	WPM	0	0
NT2	WPM	0,5	0
NT3	WPM	1	0
NT4	WPM	1,5	0
NT5	WPM	2	0
NT6	WPM	0	0,5
NT7	WPM	0	1
NT8	WPM	0	1,5
NT9	WPM	0	2

Mỗi nghiệm thức cấy 3 bình

Tổng số mẫu: 81 mẫu

Thời gian thí nghiệm: 6 tuần

Chỉ tiêu theo dõi:

- Thời gian chồi tạo rễ (ngày sau cấy): Tính từ lúc cây mới tạo rễ.
- Số rễ /cây (rễ): Đếm tất cả rễ ở mỗi cây khi 50% số cây đã ra rễ
- Chiều dài rễ (mm): Đo chiều dài rễ sau 4 tuần nuôi cấy

3.6.4 Phân tích thống kê

Số liệu thu thập được xử lý trên máy vi tính bằng chương trình thống kê Statgraphic 7.0. Đọc kết quả dựa vào bảng ANOVA, bảng trung bình và bảng so sánh khác biệt giữa các nghiệm thức (Bảng phương pháp LSD)

Chương 4. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

4.1. Ảnh hưởng của nồng độ và thời gian khử trùng đến tỷ lệ sống của mẫu cấy cây giáng hương *in vitro*.

Khử mẫu là một bước làm quan trọng để đảm bảo cho nguồn nguyên liệu sau này của quá trình nhân giống *in vitro* do nguồn mẫu ban đầu không sạch, lấy từ tự nhiên còn lẫn bùn, đất, không vô trùng, dễ mang mầm bệnh,... Giáng hương là loại cây họ đậu, hạt có vỏ bọc bên ngoài nên cũng rất khó có tình trạng nhiễm khi khử mẫu hơn là so với khử mẫu từ các bộ phận khác như: chồi, thân,...

Bảng 4.1: Kết quả khử mẫu hạt giáng hương sau 4 tuần nuôi cấy.

Nghiệm thức	Tỷ lệ hạt nhiễm (%)	Tỷ lệ hạt không nhiễm (%)	Tỷ lệ hạt nảy mầm (%)
NT1	33,33 ^a	66,67 ^c	0,00 ^a
NT2	66,67 ^b	33,33 ^b	0,00 ^a
NT3	100,00 ^c	0,00 ^a	0,00 ^a
NT4	100,00 ^c	0,00 ^a	0,00 ^a
NT5	66,67 ^b	33,33 ^b	0,00 ^a
NT6	100,00 ^c	0,00 ^a	100,00 ^d
NT7	100,00 ^c	0,00 ^a	66,67 ^c
NT8	100,00 ^c	0,00 ^a	33,33 ^b
NT8	100,00 ^c	0,00 ^a	0,00 ^a
CV (%)	8,83	1,42	0,67

*Các giá trị theo sau bởi chữ cái trong cùng một cột không cùng ký tự biểu hiện sự khác biệt rất có ý nghĩa về mặt thống kê ở mức độ 0,05.

Tuy tỷ lệ hạt không nhiễm thì rất cao nhưng tỷ lệ hạt nảy mầm lại quá thấp. Điều này là do hạt có vỏ bọc bên ngoài đóng vai trò như bảo vệ ngăn cản sự nảy mầm của hạt.



Hình 4.1: Hạt giáng hương *in vitro* nảy mầm



Hình 4.2 Cây con giáng hương *in vitro*

Qua kết quả trên cho thấy:

Đối với cây giáng hương thì nồng độ javel và thời gian khử trùng thích hợp là 10% javel trong 15 phút.

Các hạt giáng hương bị nhiễm hầu như là bị nhiễm nấm, thường xảy ra đối với trường hợp khử trùng ở nồng độ javel và thời gian khử trùng thấp.

4.2 Khảo sát ảnh hưởng của các môi trường lên khả năng tạo chồi của cây giáng hương *in vitro*.

Việc nhân chồi *in vitro* có vai trò quan trọng trong việc tạo ra lượng lớn cây con *in vitro* làm nguyên liệu cho các quá trình nhân giống tiếp theo. Đây là quá trình quan trọng và cũng có thể nói đây là nhiệm vụ của nhân giống vô tính.

Thật ra, bản thân thực vật có khả năng tự tổng hợp và điều chỉnh các chất điều hòa sinh trưởng thực vật thích hợp với mỗi thời kỳ sinh trưởng, phát triển, với thời tiết khí hậu, điều kiện sống. Vai trò của các chất sinh trưởng thể hiện ở nhiều mặt như điều khiển vận động, điều khiển quá trình ra hoa, các hoạt động sinh lý, sinh hóa trong cơ thể thực vật (Oparin, 1977; Maróti Mihaly, 1976; Nguyễn Văn Uyển, 1995). Đối với mô nuôi cấy trong tình trạng dị dưỡng, khả năng tự tổng hợp và điều chỉnh các chất điều hòa sinh trưởng là rất hạn chế, cần bổ sung những chất này vào môi trường nuôi cấy một lượng phù hợp. Tùy vào mỗi loại mô cây, loại cây, thời gian phát triển của mô cấy và mục đích nuôi cấy mà chịu sự ảnh hưởng của nồng độ chất điều hòa sinh trưởng khác nhau.

4.2.1 Ảnh hưởng của nồng độ BA và NAA lên khả năng tạo chồi của cây giáng hương *in vitro*.

Bảng 4.2: Ảnh hưởng của nồng độ BA và NAA lên khả năng tạo chồi cây giáng hương *in vitro* sau 6 tuần nuôi cấy.

Nghiệm thức	BA (mg/l)	NAA (mg/l)	Số chồi (chồi)	Chiều cao chồi (cm)	Hệ số nhân chồi
NT1 (ĐC)	0,0	0,0	1,0 ^a	1,17 ^a	1,00 ^a
NT2	0,5	0,1	1,7 ^a	1,43 ^{abc}	1,67 ^c
NT3	1,0	0,1	1,3 ^a	1,30 ^{ab}	1,33 ^b
NT4	1,0	0,5	2,0 ^a	2,01 ^d	2,00 ^d
NT5	1,5	0,1	6,3^b	2,20^d	6,33^f
NT6	1,5	0,5	4,7 ^b	1,90 ^{cd}	4,67 ^e
NT7	2,0	0,1	1,0 ^a	1,77 ^{bcd}	1,00 ^a
NT8	2,0	0,5	1,0 ^a	1,17 ^a	1,00 ^a
CV(%)			13,9	12,99	12,29

*Các giá trị theo sau bởi chữ cái trong cùng một cột không cùng ký tự biểu hiện sự khác biệt rất có ý nghĩa về mặt thống kê ở mức độ 0,05.

Ở nghiệm thức 5 (nồng độ BA=1,5 mg/l; NAA=0,1 mg/l) số lượng chồi tạo thành và chiều cao chồi đảm bảo làm nguồn nguyên liệu *in vitro* cho các quá trình nhân giống tiếp theo. Do đó ở nồng độ BA=1,5 mg/l; NAA=0,1 mg/l rất thích hợp cho sự nhân chồi ở cây giáng hương *in vitro*.

Bảng kết quả trên cho thấy giáng hương tái sinh chồi tốt ở nồng độ BA=1,5 mg/l và NAA=0,5 mg/l. Tuy nhiên ở nghiệm thức này phần lớn chồi tạo thành có khả năng tăng trưởng chiều cao chồi rất thấp.

Ở nghiệm thức 2 (nồng độ BA=0,5 mg/l; NAA= 0,1 mg/l) và ở nghiệm thức 4 (nồng độ BA=1mg/l; NAA=0,5mg/l) thì chồi bên phát triển khá tốt nhưng số lượng lại ít.

Ở nghiệm thức 8 (độ BA=2 mg/l; NAA=0,5 mg/l) chồi hầu như không xuất hiện, chiều cao chồi giảm và có hiện tượng tạo sẹo, nguyên nhân do hàm lượng chất điều hoà sinh trưởng cao gây ức chế khả năng phát triển chồi của cây giáng hương *in vitro*.



BA=0mg/l; NAA=0mg/l



BA=0,5mg/l; NAA=0,1mg/l



BA=1mg/l; NAA=0,1mg/l



BA=1mg/l; NAA=0,5mg/l



BA=1,5mg/l; NAA=0,1mg/l



BA=1,5mg/l; NAA=0,5mg/l



BA=2mg/l; NAA=0,1mg/l



BA=2mg/l; NAA=0,5mg/l

Hình 4.3: Chồi cây giáng hương in vitro được tạo thành sau 6 tuần nuôi cấy trên các môi trường khác nhau

4.2.2 Khảo sát ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy cơ bản đến khả năng tạo chồi của cây giáng hương *in vitro*.

Bảng 4.3: Ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy đến khả năng tạo chồi của cây giáng hương *in vitro* sau 6 tuần nuôi cấy.

Nghiệm thức	Môi trường	Số chồi (chồi)	Chiều cao chồi (cm)	Hệ số nhân chồi (chồi)
NT1	WPM	2,0 ^a	1,4 ^a	2,00 ^b
NT2	½ MS	1,33 ^b	1,87 ^b	1,33 ^c
NT3	MS	3,67^a	3,13^a	3,00^a
CV (%)		10,2	8,09	12,77

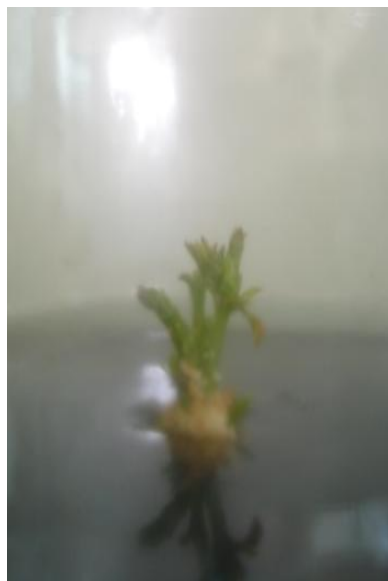
*Các giá trị theo sau bởi chữ cái trong cùng một cột không cùng ký tự biểu hiện sự khác biệt rất có ý nghĩa về mặt thống kê ở mức độ 0,05.

Kết quả trên cho thấy ở nghiệm thức 2 (môi trường MS) cho số chồi nhiều, chồi phát triển khoẻ mạnh hơn so với môi trường ½ MS và môi trường dành cho cây thân gỗ WPM.

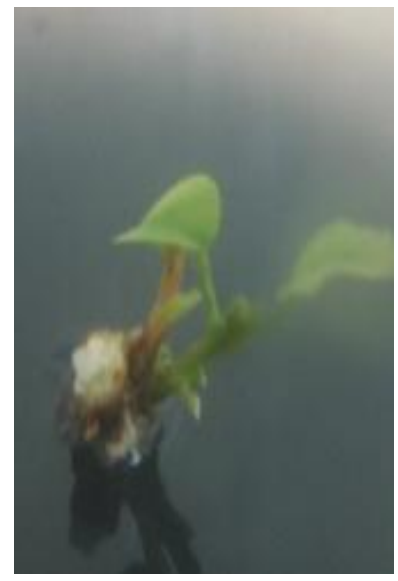
Có thể trong môi trường cây thân gỗ thành phần khoáng đa lượng thấp, chồi tuy có phát triển nhưng kích thước chồi không đảm bảo làm nguồn nguyên liệu cho quá trình nhân giống tiếp theo so với môi trường MS.



Môi trường MS



Môi trường WPM



Môi trường ½ MS

Hình 4.4: Chồi cây giáng hương *in vitro* được tạo thành sau 6 tuần nuôi cấy trên các môi trường khác nhau.

4.3 Khảo sát ảnh hưởng của IBA và NAA đến sự hình thành rễ của cây giáng hương *in vitro*.

Rễ là một bộ phận quan trọng của cây. Nó có tác dụng hút nước, muối khoáng và chất dinh dưỡng cung cấp cho cây sinh trưởng và phát triển. Do đó, trong việc tạo cây *in vitro* hoàn chỉnh ta phải quan tâm đến bộ rễ của cây, tìm môi trường thật sự thích hợp cho sự tạo và phát triển của rễ. Cây *in vitro* có bộ rễ khỏe thì mới có khả năng sống trong điều kiện vườn ươm do khi chuyển từ điều kiện *in vitro* ra vườn ươm có sự tác động mạnh mẽ đến cây con *in vitro* như: âm độ, ánh sáng, nhiệt độ, môi trường thuần hóa không thích hợp,...cây rất dễ bị chết.

Bảng 4.4: Ảnh hưởng của IBA và NAA đến sự hình thành rễ của cây giáng hương *in vitro* sau 4 tuần nuôi cấy.

Nghiệm thức	NAA (mg/l)	IBA (mg/l)	Thời gian ra rễ (ngày)	Số rễ (rễ)	Chiều dài rễ (cm)
NT1	0	0	0,0 ^a	0,0 ^a	0,00 ^a
NT2	0,5	0	10,0 ^e	6,0 ^{abc}	0,75 ^{ab}
NT3	1	0	10,0 ^e	4,0 ^{abc}	0,25 ^{ab}
NT4	1,5	0	7,5 ^d	4,0 ^{abc}	1,25 ^{bc}
NT5	2	0	4,0 ^b	10,0 ^c	0,85 ^{abc}
NT6	0	0,5	0,0 ^a	0,0 ^a	0,00 ^a
NT7	0	1	10,0 ^e	2,5 ^{ab}	0,40 ^{ab}
NT8	0	1,5	7,0^d	8,5^{bc}	3,50^b
NT9	0	2	5,0 ^c	6,5 ^{abc}	2,00 ^c
CV(%)			6,07	7,67	12,42

*Các giá trị theo sau bởi chữ cái trong cùng một cột không cùng ký tự biểu hiện sự khác biệt rất có ý nghĩa về mặt thống kê ở mức độ 0,05.

Cây giáng hương *in vitro* có khả năng tạo rễ rất mạnh. Trong đó nghiệm thức 8 (nồng độ NAA=0 mg/l; IBA=1,5 mg/l) cho kết quả tạo rễ nhanh, dài nhất. Như vậy nồng độ này rất thích hợp cho sự tạo rễ của cây giáng hương *in vitro*.

Ở các nghiệm thức khác giáng hương *in vitro* cũng có khả năng tạo rễ nhanh nhưng kích thước rễ không đảm bảo cho giai đoạn vườn ươm sau này do quá ngắn.

Ở nghiệm thức 5 (NAA=2mg/l; IBA= 0mg/l) cũng cho ra rễ sớm nhưng rễ chỉ phát triển ở mức độ những sợi trắng, mảnh, ngắn dù rất nhiều. Điều này không đảm bảo cho việc đem trồng ở vườn ươm.

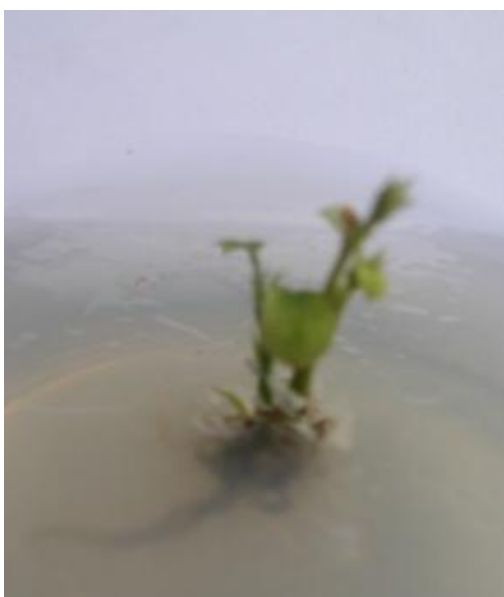
Ở nghiệm thức 4 (NAA=1,5mg/l; IBA=0mg/l) chồi con giáng hương *in vitro* cũng có tạo rễ nhưng có xu hướng tạo sẹo.



NAA=2mg/l



NAA=1,5mg/l



IBA=2mg/l



IBA=1,5mg/l

Hình 4.5: Cây giáng hương *in vitro* hoàn chỉnh sau 4 tuần nuôi cấy.

Chương 5. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

5.1 Kết luận

Qua những thí nghiệm đã thực hiện chúng tôi đã rút ra được những kết luận sau về việc nhân giống *in vitro* cây giáng hương:

- Hạt giáng hương *in vitro* có tỷ lệ sống cao nhất khi chúng được xử lý ở nồng độ javel là 10% trong 15 phút.
- Môi trường MS với nồng độ BA=1,5 (mg/l); NAA=0,1 (mg/l) rất thuận lợi cho khả năng tạo chồi giáng hương *in vitro*.
- Nồng độ IBA=2mg/l sẽ giúp cây giáng hương *in vitro* ra rễ nhanh và khỏe, rất thích hợp cho việc đem cây ra vườn ươm.

5.2 Đề nghị

- Tiếp tục nghiên cứu thêm để tìm ra chất điều hòa sinh trưởng thích hợp cho việc nhân chồi đặc biệt là tăng trưởng chồi.
- Nghiên cứu ở giai đoạn vườn ươm để tìm ra giá thể thích hợp cho sự phát triển của cây giáng hương *in vitro*.
- Nghiên cứu lập ra quy trình kỹ thuật nhân giống và trồng cây giáng hương *in vitro* để có hiệu quả kinh tế cao nhất.
- Nghiên cứu về khả năng nhân giống cây giáng hương bằng phương pháp giâm cành trong điều kiện *in vivo* để tạo ra lượng cây con nhanh, khỏe.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

TIẾNG VIỆT

1. Trần Thị Dung, 2003, *Bài giảng nuôi cấy mô tế bào thực vật*, Trường Đại học Nông Lâm TP.HCM.
2. Trương Mai Hồng, 1997, *Nghiên cứu xây dựng quá trình nhân giống in vitro cây cẩm lai Bà Rịa (Dalbergia bariaensis Pierre)*, Trường Đại học Nông Lâm TP.HCM.
3. Trần Văn Minh, 2000, *Công nghệ sinh học thực vật*, Viện sinh học nhiệt đới TP.HCM.
4. Cao Minh Thủy Nguyên, 2005, *Nhân giống vô tính in vitro cây Bạch đàn chanh (Eucalyptus citriodora)*, Trường Đại học Nông Lâm TP.HCM.
5. Nguyễn Kim Thanh, Nguyễn Thuận Châu, 2005, *Giáo trình sinh lý thực vật*, NXB Hà Nội.
6. Phạm Minh Thảo, 2005, *Rừng Việt Nam*. Nhà xuất bản Lao động.

INTERNET

<http://sonongnghiep.angiang.gov.vn>

<http://www.ddd.go.th>

<http://www.forest.go.th>

<http://www.springeslink.com>

PHỤ LỤC

PHỤ LỤC 1

Bảng số liệu gốc từ các thí nghiệm

Bảng 1: Kết quả khử mẫu hạt giáng hương sau 4 tuần nuôi cấy

Nghiệm thức	Tỷ lệ hạt không nhiễm (%)	Tỷ lệ hạt nhiễm (%)	Tỷ lệ hạt nảy mầm (%)
NT1	33,33	66,67	0,00
NT2	66,67	33,33	0,00
NT3	100,00	0,00	0,00
NT4	100,00	0,00	0,00
NT5	66,67	33,33	0,00
NT6	100,00	0,00	100,00
NT7	100,00	0,00	66,67
NT8	100,00	0,00	33,33
NT9	100,00	0,00	0,00

Bảng 2: Ảnh hưởng của nồng độ BA và NAA lên khả năng tạo chồi cây giáng hương in vitro sau 6 tuần nuôi cấy.

Nghiệm thức	Số chồi (chồi)	Chiều cao chồi (cm)	Hệ số nhân chồi
NT1 (ĐC)	1,0	1,17	1,00
NT2	1,7	1,43	1,67
NT3	1,3	1,30	1,33
NT4	2,0	2,01	2,00
NT5	6,3	2,20	6,33
NT6	4,7	1,90	4,67
NT7	1,0	1,77	1,00
NT8	1,0	1,17	1,00

Bảng 3: Ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy đến khả năng tạo chồi của cây giáng hương *in vitro* sau 6 tuần nuôi cấy

Nghiệm thức	Số chồi (chồi)	Chiều cao chồi (chồi)	Hệ số nhân chồi
NT1	2,00	1,40	2,00
NT2	1,33	1,87	1,33
NT3	3,67	3,13	3,00

Bảng 4: Ảnh hưởng của IBA và NAA đến sự hình thành rễ của cây giáng hương *in vitro* sau 4 tuần nuôi cấy

Nghiệm thức	Thời gian ra rễ (ngày)	Số rễ (rễ)	Chiều dài rễ (cm)
NT1(ĐC)	0,0	0,0	0,00
NT2	10,0	6,0	0,75
NT3	10,0	4,0	0,25
NT4	7,5	4,0	1,25
NT5	4,0	10,0	0,85
NT6	0,0	0,0	0,00
NT7	10,0	2,5	0,40
NT8	7,0	8,5	3,50
NT9	5,0	6,5	2,00

PHỤ LỤC 2

Bảng phân tích số liệu các thí nghiệm

THI NGHIEM 1

TY LE HAT KHONG NHIEM

BANG ANOVA

One-Way Analysis of Variance

Data: THUY.HATKNHIEM

Level codes: THUY.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	9382.9136	8	1172.8642	999.999	.0000
Within groups	.0000	9	.0000		
Total (corrected)	9382.9136	17			

0 missing value(s) have been excluded.

BANG TRUNG BINH

Table of means for THUY.HATKNHIEM by THUY.NT

Level	Count	Average	Std. Error (internal)	Std. Error (pooled s)	95 % LSD intervals for mean	
NT1	2	33.330000	.00000E0000	.00000E0000	33.330000	33.330000
NT2	2	66.670000	.00000E0000	.00000E0000	66.670000	66.670000
NT3	2	100.000000	.00000E0000	.00000E0000	100.000000	100.000000
NT4	2	100.000000	.00000E0000	.00000E0000	100.000000	100.000000
NT5	2	66.670000	.00000E0000	.00000E0000	66.670000	66.
NT6	2	100.000000	.00000E0000	.00000E0000	100.000000	100.000000
NT7	2	100.000000	.00000E0000	.00000E0000	100.000000	100.000000
NT8	2	100.000000	.00000E0000	.00000E0000	100.000000	100.000000
NT9	2	100.000000	.00000E0000	.00000E0000	100.000000	100.000000
Tota	18	85.185556	.00000E0000	.00000E0000	85.185556	85.185556

BANG KET QUA TRAC NGHIEM PHAN HANG

Multiple range analysis for THUY.HATKNHIEM by THUY.NT

Method: 95 Percent LSD

Level	Count	Average	Homogeneous Groups
NT1	2	33.330000	X
NT2	2	66.670000	X
NT5	2	66.670000	X
NT3	2	100.000000	X
NT4	2	100.000000	X
NT6	2	100.000000	X
NT7	2	100.000000	X
NT8	2	100.000000	X
NT9	2	100.000000	X

contrast	difference	+/-	limits
NT1 - NT2	-33.3400		0.00000 *
NT1 - NT3	-66.6700		0.00000 *
NT1 - NT4	-66.6700		0.00000 *
NT1 - NT5	-33.3400		0.00000 *

* denotes a statistically significant difference.

TY LE HAT NHIEM

BANG ANOVA

One-Way Analysis of Variance

Data: TN1.HATNHIEM

Level codes: TN1.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	9382.9136	8	1172.8642	999.999	.0000
Within groups	.0000	9	.0000		
Total (corrected)	9382.9136	17			

0 missing value(s) have been excluded.

BANG TRUNG BINH

Table of means for TN1.HATNHIEM by TN1.NT

Level	Count	Average	Std. Error (internal)	Std. Error (pooled s)	95 % LSD intervals for mean	
1	2	66.670000	.00000E0000	.00000E0000	66.670000	66.670000
2	2	33.330000	.00000E0000	.00000E0000	33.330000	33.330000
3	2	.000000	.00000E0000	.00000E0000	.000000	.000000
4	2	.000000	.00000E0000	.00000E0000	.000000	.000000
5	2	33.330000	.00000E0000	.00000E0000	33.330000	33.330000
6	2	.000000	.00000E0000	.00000E0000	.000000	.000000
7	2	.000000	.00000E0000	.00000E0000	.000000	.000000
8	2	.000000	.00000E0000	.00000E0000	.000000	.000000
9	2	.000000	.00000E0000	.00000E0000	.000000	.000000
Total	18	14.814444	.00000E0000	.00000E0000	14.814444	14.814444

-

BANG KET QUA TRAC NGHIEM PHAN HANG

Multiple range analysis for TN1.HATNHIEM by TN1.NT

Method: 95 Percent LSD

Level	Count	Average	Homogeneous Groups
3	2	.000000	X
4	2	.000000	X
6	2	.000000	X
7	2	.000000	X
8	2	.000000	X
9	2	.000000	X
2	2	33.330000	X
5	2	33.330000	X
1	2	66.670000	X

contrast	difference	+/-	limits
1 - 2	33.3400		0.00000 *
1 - 3	66.6700		0.00000 *
1 - 4	66.6700		0.00000 *
1 - 5	33.3400		0.00000 *

* denotes a statistically significant difference

-

TY LE HAT NAY MAM

BANG ANOVA

One-Way Analysis of Variance

Data: TH11.NAYMAM

Level codes: TH11.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	22222.667	8	2777.8333	999.999	.0000
Within groups	.000	9	.0000		
Total (corrected)	22222.667	17			

0 missing value(s) have been excluded.

BANG TRUNG BINH

Table of means for TH11.NAYMAM by TH11.NT

Level	Count	Average	Std. Error (internal)	Std. Error (pooled s)	95 % LSD intervals for mean	
NT1	2	.000000	.000000E0000	.000000E0000	.000000	.000000
NT2	2	.000000	.000000E0000	.000000E0000	.000000	.000000
NT3	2	.000000	.000000E0000	.000000E0000	.000000	.000000
NT4	2	.000000	.000000E0000	.000000E0000	.000000	.000000
NT5	2	.000000	.000000E0000	.000000E0000	.000000	.000000
NT6	2	100.000000	.000000E0000	.000000E0000	100.000000	100.000000
NT7	2	66.670000	.000000E0000	.000000E0000	66.670000	66.670000
NT8	2	33.330000	.000000E0000	.000000E0000	33.330000	33.330000
NT9	2	.000000	.000000E0000	.000000E0000	.000000	.000000
Total	18	22.222222	.000000E0000	.000000E0000	22.222222	22.222222

-

BANG KET QUA TRAC NGHIEM PHAN HANG

Multiple range analysis for TH11.NAYMAM by TH11.NT

Method: 95 Percent LSD

Level Count Average Homogeneous Groups

NT1	2	.000000	X
NT2	2	.000000	X
NT3	2	.000000	X
NT4	2	.000000	X
NT5	2	.000000	X
NT9	2	.000000	X
NT8	2	33.330000	X
NT7	2	66.670000	X
NT6	2	100.000000	X

contrast	difference	+/-	limits
NT1 - NT2	0.00000		0.00000
NT1 - NT3	0.00000		0.00000

BẢNG KẾT QUẢ TRẮC NGHIỆM PHÂN HẠNG

Multiple range analysis for SCHOI.SOCHOI by SCHOI.NT

Method: 95 Percent LSD

Level	Count	Average	Homogeneous Groups
NT1	3	1.0000000	X
NT7	3	1.0000000	X
NT8	3	1.0000000	X
NT3	3	1.3333333	X
NT2	3	1.6666667	X
NT4	3	2.0000000	X
NT6	3	4.6666667	X
NT5	3	6.3333333	X

contrast	difference	+/-	limits
NT1 - NT2	-0.66667		1.87004
NT1 - NT3	-0.33333		1.87004
NT1 - NT4	-1.00000		1.87004
NT1 - NT5	-5.33333		1.87004 *
NT1 - NT6	-3.66667		1.87004 *

* denotes a statistically significant difference.

-

CHIỀU CAO CHỖI

BANG ANOVA

One-Way Analysis of Variance

Data: CCCHOI.CCAOCHOI

Level codes: CCCHOI.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	3.5516667	7	.5073810	4.380	.0069
Within groups	1.8533333	16	.1158333		
Total (corrected)	5.4050000	23			

0 missing value(s) have been excluded.

BẢNG TRUNG BÌNH

Table of means for CCCHOI.CCAOCHOI by CCCHOI.NT

Level	Count	Average	Std. Error (internal)	Std. Error (pooled s)	95 % LSD intervals for mean	
NT1	3	1.1666667	.1666667	.1964971	.8720446	1.4612888
NT2	3	1.4333333	.1452966	.1964971	1.1387112	1.7279554
NT3	3	1.3000000	.0577350	.1964971	1.0053779	1.5946221
NT4	3	2.0666667	.0666667	.1964971	1.7720446	2.3612888
NT5	3	2.2000000	.1154701	.1964971	1.9053779	2.4946221
NT6	3	1.9000000	.1000000	.1964971	1.6053779	2.1946221
NT7	3	1.7666667	.4702245	.1964971	1.4720446	2.0612888
NT8	3	1.1666667	.0881917	.1964971	.8720446	1.4612888
Total	24	1.6250000	.0694722	.0694722	1.5208354	1.7291646

-

BẢNG KẾT QUẢ TRẮC NGHIỆM PHÂN HẠNG

Multiple range analysis for CCCHOI.CCAOCHOI by CCCHOI.NT

Method: 95 Percent LSD

Level	Count	Average	Homogeneous Groups
NT1	3	1.1666667	X
NT8	3	1.1666667	X
NT3	3	1.3000000	XX
NT2	3	1.4333333	XXX
NT7	3	1.7666667	XXX
NT6	3	1.9000000	XX
NT4	3	2.0666667	X
NT5	3	2.2000000	X

contrast	difference	+/-	limits
NT1 - NT2	-0.26667		0.58924
NT1 - NT3	-0.13333		0.58924
NT1 - NT4	-0.90000		0.58924 *
NT1 - NT5	-1.03333		0.58924 *
NT1 - NT6	-0.73333		0.58924 *

* denotes a statistically significant difference.

HE SO NHAN CHOI

BẢNG ANOVA

One-Way Analysis of Variance

Data: HSN1.HSNCHOI

Level codes: HSN1.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	56.621200	7	8.0887429	999.999	.0000
Within groups	.000000	8	.0000000		
Total (corrected)	56.621200	15			

0 missing value(s) have been excluded.

-

BẢNG TRUNG BÌNH

Table of means for HSN1.HSNCHOI by HSN1.NT

Level	Count	Average	Std. Error (internal)	Std. Error (pooled s)	95 % LSD intervals for mean	
NT1	2	1.0000000	.00000E0000	.00000E0000	1.0000000	1.0000000
NT2	2	1.6700000	.00000E0000	.00000E0000	1.6700000	1.6700000
NT3	2	1.3300000	.00000E0000	.00000E0000	1.3300000	1.3300000
NT4	2	2.0000000	.00000E0000	.00000E0000	2.0000000	2.0000000
NT5	2	6.3300000	.00000E0000	.00000E0000	6.3300000	6.3300000
NT6	2	4.6700000	.00000E0000	.00000E0000	4.6700000	4.6700000
NT7	2	1.0000000	.00000E0000	.00000E0000	1.0000000	1.0000000
NT8	2	1.0000000	.00000E0000	.00000E0000	1.0000000	1.0000000
Total	16	2.3750000	.00000E0000	.00000E0000	2.3750000	2.3750000

BẢNG KẾT QUẢ TRẮC NGHIỆM PHÂN HẠNG

Multiple range analysis for HSN1.HSNCHOI by HSN1.NT

Method: 95 Percent LSD

Level	Count	Average	Homogeneous Groups
NT1	2	1.0000000	X
NT7	2	1.0000000	X
NT8	2	1.0000000	X
NT3	2	1.3300000	X
NT2	2	1.6700000	X
NT4	2	2.0000000	X
NT6	2	4.6700000	X
NT5	2	6.3300000	X

contrast	difference	+/-	limits
NT1 - NT2	-0.67000		0.00000 *
NT1 - NT3	-0.33000		0.00000 *
NT1 - NT4	-1.00000		0.00000 *
NT1 - NT5	-5.33000		0.00000 *
NT1 - NT6	-3.67000		0.00000 *

* denotes a statistically significant difference.

-

Thí nghiệm 2b

B ảng ANOVA

One-Way Analysis of Variance

Data: COIDI.SOCHOI

Level codes: COIDI.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	8.6666667	2	4.3333333	7.800	.0214
Within groups	3.3333333	6	.5555556		
Total (corrected)	12.000000	8			

0 missing value(s) have been excluded.

BẢNG TRUNG BÌNH

Table of means for COIDI.SOCHOI by COIDI.NT

Level	Count	Average	Std. Error (internal)	Std. Error (pooled s)	95 % LSD intervals for mean	
NT1	3	2.0000000	.5773503	.4303315	1.2552027	2.7447973
NT2	3	1.3333333	.3333333	.4303315	.5885361	2.0781306
NT3	3	3.6666667	.3333333	.4303315	2.9218694	4.4114639
Total	9	2.3333333	.2484520	.2484520	1.9033244	2.7633422

-

BẢNG KẾT QUẢ TRẮC NGHIỆM PHÂN HẠNG

Multiple range analysis for COIDI.SOCHOI by COIDI.NT

Method: 95 Percent LSD			
Level	Count	Average	Homogeneous Groups
NT2	3	1.3333333	X
NT1	3	2.0000000	X
NT3	3	3.6666667	X

contrast	difference	+/-	limits
NT1 - NT2	0.66667		1.48959
NT1 - NT3	-1.66667		1.48959 *
NT2 - NT3	-2.33333		1.48959 *

* denotes a statistically significant difference.

-

CHIEU CAO CHOI

BẢNG ANOVA

One-Way Analysis of Variance

Data: COILAI1.CCCHOI

Level codes: COILAI1.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	4.8266667	2	2.4133333	9.963	.0124
Within groups	1.4533333	6	.2422222		

 Total (corrected) 6.2800000 8

0 missing value(s) have been excluded.
 BẢNG TRUNG BÌNH

Table of means for COILAI1.CCCHOI by COILAI1.NT

Level	Count	Average	Std. Error (internal)	Std. Error (pooled s)	95 % LSD intervals for mean	
NT1	3	1.4000000	.2081666	.2841492	.9082082	1.8917918
NT2	3	1.8666667	.0881917	.2841492	1.3748748	2.3584585
NT3	3	3.1333333	.4371626	.2841492	2.6415415	3.6251252
Total	9	2.1333333	.1640536	.1640536	1.8493972	2.4172695

—

BẢNG KẾT QUẢ TRẮC NGHIỆM PHÂN HẠNG

Multiple range analysis for COILAI1.CCCHOI by COILAI1.NT

Method: 95 Percent LSD

Level	Count	Average	Homogeneous Groups
NT1	3	1.4000000	X
NT2	3	1.8666667	X
NT3	3	3.1333333	X

contrast	difference	+/-	limits
NT1 - NT2	-0.46667		0.98358
NT1 - NT3	-1.73333		0.98358 *
NT2 - NT3	-1.26667		0.98358 *

* denotes a statistically significant difference.

—

HE SO NHAN CHOI

BẢNG ANOVA

One-Way Analysis of Variance

Data: HSN2.HSNCHOI

Level codes: HSN2.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	4.2378000	2	2.1189000	999.999	.0000

```

Within groups          .0000000    6    .0000000
-----
Total (corrected)     4.2378000    8

```

0 missing value(s) have been excluded.
BẢNG TRUNG BÌNH

Table of means for HSN2.HSNCHOI by HSN2.NT

```

-----
Level Count      Average      Std. Error      Std. Error      95 % LSD
              (internal)      (pooled s)      intervals for mean
-----
NT1      3      2.0000000      .000000E0000      .000000E0000      2.0000000      2.0000000
NT2      3      1.3300000      .000000E0000      .000000E0000      1.3300000      1.3300000
NT3      3      3.0000000      .000000E0000      .000000E0000      3.0000000      3.0000000
-----
Total    9      2.1100000      .000000E0000      .000000E0000      2.1100000      2.1100000

```

—

BẢNG KẾT QUẢ TRẮC NGHIỆM PHÂN HẠNG

Multiple range analysis for HSN2.HSNCHOI by HSN2.NT

Method: 95 Percent LSD

```

-----
Level      Count      Average      Homogeneous Groups
-----
NT2          3      1.3300000      X
NT1          3      2.0000000      X
NT3          3      3.0000000      X
-----

```

```

-----
contrast          difference +/-      limits
NT1 - NT2          0.67000      0.00000 *
NT1 - NT3         -1.00000      0.00000 *
NT2 - NT3         -1.67000      0.00000 *
-----

```

* denotes a statistically significant difference.

—

THÍ NGHIỆM 3

THỜI GIAN RA RỄ

BẢNG ANOVA

One-Way Analysis of Variance

Data: RARE.TGRARE

Level codes: RARE.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          256.44444          8          32.055556          577.000          .0000

```

Within groups .50000 9 .055556

 Total (corrected) 256.94444 17

0 missing value(s) have been excluded.
 BẢNG TRUNG BÌNH

Table of means for RARE.TGRARE by RARE.NT

Level	Count	Average	Std. Error (internal)	Std. Error (pooled s)	95 % LSD intervals for mean	
NT1	2	.0000000	.0000000	.1666667	-.2666704	.266670
NT2	2	10.0000000	.0000000	.1666667	9.7333296	10.266670
NT3	2	10.0000000	.0000000	.1666667	9.7333296	10.266670
NT4	2	7.5000000	.5000000	.1666667	7.2333296	7.766670
NT5	2	4.0000000	.0000000	.1666667	3.7333296	4.266670
NT6	2	.0000000	.0000000	.1666667	-.2666704	.266670
NT7	2	10.0000000	.0000000	.1666667	9.7333296	10.266670
NT8	2	7.0000000	.0000000	.1666667	6.7333296	7.266670
NT9	2	5.0000000	.0000000	.1666667	4.7333296	5.266670
Total	18	5.9444444	.0555556	.0555556	5.8555543	6.033335

—

BẢNG KẾT QUẢ TRẮC NGHIỆM PHÂN HẠNG

Multiple range analysis for RARE.TGRARE by RARE.NT

Method: 95 Percent LSD

Level	Count	Average	Homogeneous Groups
NT1	2	.0000000	X
NT6	2	.0000000	X
NT5	2	4.0000000	X
NT9	2	5.0000000	X
NT8	2	7.0000000	X
NT4	2	7.5000000	X
NT2	2	10.0000000	X
NT3	2	10.0000000	X
NT7	2	10.0000000	X

contrast	difference	+/-	limits
NT1 - NT2	-10.0000		0.53334 *
NT1 - NT3	-10.0000		0.53334 *
NT1 - NT4	-7.50000		0.53334 *
NT1 - NT5	-4.00000		0.53334 *

* denotes a statistically significant difference.

SO RE

BẢNG ANOVA

One-Way Analysis of Variance

Data: SORE.SORE

Level codes: SORE.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	194.77778	8	24.347222	2.756	.0762
Within groups	79.50000	9	8.833333		
Total (corrected)	274.27778	17			

0 missing value(s) have been excluded.

-

BẢNG TRUNG BÌNH

Table of means for SORE.SORE by SORE.NT

Level mean	Count	Average	Std. Error (internal)	Std. Error (pooled s)	95 % LSD intervals for
NT1	2	.0000000	.0000000	2.1015867	-3.3625861 3.362586
NT2	2	6.0000000	1.0000000	2.1015867	2.6374139 9.362586
NT3	2	4.0000000	4.0000000	2.1015867	.6374139 7.362586
NT4	2	4.0000000	4.0000000	2.1015867	.6374139 7.362586
NT5	2	10.0000000	.0000000	2.1015867	6.6374139 13.362586
NT6	2	.0000000	.0000000	2.1015867	-3.3625861 3.362586
NT7	2	2.5000000	2.5000000	2.1015867	-.8625861 5.862586
NT8	2	8.5000000	.5000000	2.1015867	5.1374139 11.862586
NT9	2	6.5000000	.5000000	2.1015867	3.1374139 9.862586
Total	18	4.6111111	.7005289	.7005289	3.4902491 5.731973

BẢNG KẾT QUẢ TRẮC NGHIỆM PHẦN HẠNG

Multiple range analysis for SORE.SORE by SORE.NT

Method: 95 Percent LSD

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

NT1	2	.0000000	X
NT6	2	.0000000	X
NT7	2	2.5000000	XX
NT3	2	4.0000000	XXX
NT4	2	4.0000000	XXX
NT2	2	6.0000000	XXX
NT9	2	6.5000000	XXX
NT8	2	8.5000000	XX
NT5	2	10.0000000	X

contrast	difference	+/-	limits
NT1 - NT2	-6.00000		6.72517
NT1 - NT3	-4.00000		6.72517
NT1 - NT4	-4.00000		6.72517
NT1 - NT5	-10.0000		6.72517 *

* denotes a statistically significant difference.

-

CHIỀU DÀI RỄ

BẢNG ANOVA

One-Way Analysis of Variance

Data: CHDAI.CDAIRE

Level codes: CHDAI.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	20.640000	8	2.5800000	8.795	.0019
Within groups	2.640000	9	.2933333		

Total (corrected) 23.280000 17

0 missing value(s) have been excluded.

BẢNG TRUNG BÌNH

Table of means for CHDAI.CDAIRE by CHDAI.NT

Level	Count	Average	Std. Error (internal)	Std. Error (pooled s)	95 % LSD intervals for mean	
NT1	2	.0000000	.0000000	.3829708	-.6127620	.6127620
NT2	2	.7500000	.2500000	.3829708	.1372380	1.3627620
NT3	2	.2500000	.2500000	.3829708	-.3627620	.8627620
NT4	2	1.2500000	.2500000	.3829708	.6372380	1.8627620
NT5	2	.8500000	.3500000	.3829708	.2372380	1.4627620
NT6	2	.0000000	.0000000	.3829708	-.6127620	.6127620
NT7	2	.4000000	.1000000	.3829708	-.2127620	1.0127620
NT8	2	3.5000000	1.0000000	.3829708	2.8872380	4.1127620
NT9	2	2.0000000	.0000000	.3829708	1.3872380	2.6127620
Total	18	1.0000000	.1276569	.1276569	.7957460	1.2042540

—

BẢNG KẾT QUẢ TRẮC NGHIỆM PHẦN HẠNG

Multiple range analysis for CHDAI.CDAIRE by CHDAI.NT

Method: 95 Percent LSD

Level Count Average Homogeneous Groups

NT1	2	.0000000	X
NT6	2	.0000000	X
NT3	2	.2500000	XX
NT7	2	.4000000	XX
NT2	2	.7500000	XX
NT5	2	.8500000	XXX
NT4	2	1.2500000	XX
NT9	2	2.0000000	X
NT8	2	3.5000000	X

contrast	difference	+/-	limits
NT1 - NT2	-0.75000		1.22552
NT1 - NT3	-0.25000		1.22552
NT1 - NT4	-1.25000		1.22552 *
NT1 - NT5	-0.85000		1.22552

* denotes a statistically significant difference.