

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO
TRƯỜNG ĐẠI HỌC NÔNG LÂM TP. HỒ CHÍ MINH
BỘ MÔN CÔNG NGHỆ SINH HỌC

**********



KHUÛ HOÀNG MINH

NUÔI CÂY MÔ CÂY TRAI NAM BỘ
(*Fagraea cochinchinensis* A.Chev.)

Luận văn kỹ sư
Chuyên ngành: Công Nghệ Sinh Học

Thành phố Hồ Chí Minh
Tháng 09/2006

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

NUÔI CÂY MÔ CÂY TRAI NAM BỘ
(Fagraea cochinchinensis A.Chev.)

Luận văn kỹ sư
Chuyên ngành: Công Nghệ Sinh Học

GVHD:
PGS.TS. TRẦN VĂN MINH

Sinh viên thực hiện:
KHUU HOÀNG MINH
Khóa: 2002-2006

Thành phố Hồ Chí Minh
Tháng 09/2006

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

**********

**TISSUE CULTURE OF FAGRAEA COCHINCHINENSIS
TREE (*Fagraea cochinchinensis* A.Chev.)**

Graduation thesis

Major: Biotechnology

Professor

A.Professor. Dr. TRAN VAN MINH

Student

KHUU HOANG MINH

Term: 2002 - 2006

Ho Chi Minh City
09/2006

LỜI CẢM ƠN

Em xin chân thành cảm ơn:

- ❖ Cha mẹ đã suốt đời tận tụy để con có được ngày hôm nay.
- ❖ 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 em trong suốt quá trình học tập tại trường.
- ❖ Thầy Trần Văn Minh đã tận tình hướng dẫn, ân cần chỉ bảo và giúp đỡ em trong suốt thời gian thực hiện đề tài.
- ❖ Cô Bùi Thị Tường Thu, Thạc sĩ Trần Văn Định, cử nhân Nguyễn Thị Kim Uyên, kỹ sư Trương Thị Hảo cùng các bạn sinh viên đang thực tập tại Phòng Công Nghệ Sinh Học Cây Ăn Quả thuộc Viện Sinh Học Nhiệt Đới thành phố Hồ Chí Minh đã tận tình hướng dẫn và giúp đỡ em hoàn thành khoá luận này.
- ❖ Xin gửi lời cảm ơn đến tập thể lớp Công Nghệ Sinh Học 28 đã gắn bó, đồng viên, giúp đỡ tôi trong suốt 4 năm qua.

Sinh viên thực hiện

Khru Hoàng Minh

TÓM TẮT

KHUU HOÀNG MINH, Đại học Nông Lâm TP.Hồ Chí Minh. Tháng 8/2006.
“NUÔI CÂY MÔ CÂY TRAI NAM BỘ (*Fagraea cochinchinensis* A.Chev.)”.

Giảng viên hướng dẫn: PGS.TS. TRẦN VĂN MINH

Đề tài được thực hiện tại Phòng thí nghiệm Công Nghệ Sinh Học Cây Ăn Trái, Viện Sinh Học Nhiệt Đới tại TP.HCM. Thời gian thực hiện tháng 2 đến tháng 8 năm 2006.

Mục đích: Nghiên cứu khả năng nhân giống nhanh cây Trai *in vitro* nhằm cung cấp nguồn cây giống ban đầu sạch bệnh có tính đồng nhất về mặt di truyền, phục vụ cho công tác bảo tồn nguồn gen và trồng rừng trên quy mô lớn.

Ở nước ta, cây Trai Nam Bộ là loại cây gỗ quý, gỗ thuộc nhóm I. Gỗ có mùi chua, màu vàng có vân đẹp, màu sắc óng ánh, bền, rất cứng, nặng ($d = 0,85$), chịu nước và chôn lâu dưới đất, đóng đồ gỗ nội thất cao cấp, gỗ xây dựng, gỗ lót sàn nhà, khung tàu.... Đây là cây gỗ quý hiếm được xếp vào các loại cây đang bị đe dọa và mức độ đe dọa theo phân hạng của Tổ chức bảo tồn thiên nhiên thế giới (UICN, 2001) là rất nguy cấp và phải đối mặt với nguy cơ tuyệt chủng trong tự nhiên rất cao trong một tương lai rất gần. Do đó, chúng tôi tiến hành đề tài “**NUÔI CÂY MÔ CÂY TRAI NAM BỘ** (*Fagraea cochinchinensis* A.Chev.)” để phục vụ cho mục đích trên.

Từ kết quả thực nghiệm, chúng tôi đạt được một số kết quả sau:

- ✚ Mẫu Trai thực sinh được vô trùng tốt nhất trong dung dịch Hypo – Na 25% với thời gian 20 – 30 phút kết hợp với dung dịch $HgCl_2$ 0,05% trong 15 phút.
- ✚ Môi trường WPM + BA (0,1 mg/l) thích hợp nuôi cấy phát sinh chồi cây Trai *in vitro*.
- ✚ Môi trường WPM + BA (1 mg/l) thích hợp cho nuôi cấy tạo cụm chồi cây Trai
- ✚ Môi trường WPM bổ sung BA (0,5 mg/l) thích hợp cho nhân cụm chồi cây Trai
- ✚ Môi trường WPM thích hợp cho quá trình tái sinh cụm chồi cây Trai *in vitro*.
- ✚ Môi trường WPM + BA (0,1 mg/l) + CW (10 %) thích hợp cho quá trình vươn thân cây Trai *in vitro*.
- ✚ Cây Trai *in vitro* ra rễ dễ dàng trong môi trường WPM + IBA (0,3 mg/l)

MỤC LỤC

PHẦN	TRANG
TRANG TỰA	
LỜI CẢM ƠN.....	iii
TÓM TẮT.....	iv
MỤC LỤC	v
DANH MỤC CÁC CHỮ VIẾT TẮT.....	viii
DANH SÁCH CÁC HÌNH.....	ix
DANH SÁCH CÁC BẢNG	x
DANH SÁCH CÁC BẢNG	x
Phần 1. MỞ ĐẦU	1
1.1 ĐẶT VẤN ĐỀ.....	1
1.2 MỤC ĐÍCH VÀ YÊU CẦU.....	2
1.2.1 Mục đích	2
1.2.2 Yêu cầu	2
1.3 GIỚI HẠN ĐỀ TÀI.....	3
Phần 2.TỔNG QUAN TÀI LIỆU.....	4
2.1 ĐẶC ĐIỂM LÂM SINH HỌC CÂY TRAI NAM BỘ (<i>Fagraea cochinchinensis</i> A.Chev.).....	4
2.1.1 Vị trí phân loại.....	4
2.1.2 Phạm vi phân bố	5
2.1.3 Đặc điểm sinh học	5
2.1.4 Giá trị sử dụng và tính chất của gỗ Trai	6
2.2 ỨNG DỤNG NUÔI CÂY MÔ TẾ BÀO THỰC VẬT TRONG CÔNG TÁC CHỌN GIỐNG CÂY TRỒNG.....	6
2.2.1 Lịch sử nuôi cấy mô tế bào thực vật.....	6
2.2.2 Khái niệm nuôi cấy mô tế bào	8
2.2.3 Ứng dụng nuôi cấy mô tế bào thực vật trong chọn giống cây trồng	8
2.2.4 Ưu điểm của phương pháp nuôi cấy mô tế bào thực vật.....	10

2.3	VI NHÂN GIỐNG CÂY THÂN GỖ	10
2.3.1	Những thành tựu của nuôi cấy mô cây thân gỗ trong và ngoài nước	10
2.3.2	Vi nhân giống từ cây còn non.....	13
2.3.2.1	Tổng quát	13
2.3.2.2	Nuôi cấy cơ quan	13
2.3.2.3	Nuôi cấy phôi.....	15
2.3.3	Vi nhân giống từ cây trưởng thành.....	16
2.3.3.1	Tổng quát	16
2.3.3.2	Nuôi cấy cơ quan	17
2.3.3.3	Nuôi cấy phôi.....	18
2.4	CÁC PHƯƠNG PHÁP NUÔI CÂY MÔ TẾ BÀO THỰC VẬT.....	19
2.4.1	Nuôi cấy đỉnh sinh trưởng	19
2.4.2	Nuôi cấy mô sẹo	19
2.4.3	Nuôi cấy tế bào đơn	19
2.4.4	Nuôi cấy Protoplast – chuyển gen	20
2.4.5	Nuôi cấy hạt phấn đơn bội:.....	20
2.5	CÁC YẾU TỐ ẢNH HƯỞNG ĐẾN QUÁ TRÌNH NUÔI CÂY MÔ.....	20
2.5.1	Mô nuôi cấy	20
2.5.2	Vô trùng trong nuôi cấy.....	20
2.5.3	Điều kiện nuôi cấy.....	23
2.5.4	Môi trường nuôi cấy	25
2.5.5	Nước dừa	25
2.5.6	Vai trò của chất kích thích sinh trưởng trong nuôi cấy	26
2.5.7	Ảnh hưởng của than hoạt tính	28
2.5.8	Ảnh hưởng của pH và Agar.....	28
Phần 3.	VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU.....	30
3.1	VẬT LIỆU	30
3.2	BỐ TRÍ THÍ NGHIỆM	31
3.2.1	Thí Nghiệm 1: Vô trùng mô cấy ban đầu từ cây Trai thực sinh.....	32
3.2.2	Thí Nghiệm 2: Khảo sát khả năng phát sinh chồi cây Trai <i>in vitro</i> trên các môi trường khoáng cơ bản có bổ sung BA (0,1 mg/l).	33

3.2.3	Thí nghiệm 3: Ảnh hưởng của nồng độ BA đến quá trình nuôi cấy tạo cụm chồi cây Trai <i>in vitro</i> .	34
3.2.4	Thí Nghiệm 4: Khảo sát sự ảnh hưởng của BA trong nhân cụm chồi cây Trai <i>in vitro</i> .	34
3.2.5	Thí Nghiệm 5: Khảo sát quá trình tái sinh cụm chồi cây Trai <i>in vitro</i> .	35
3.2.6	Thí Nghiệm 6: Ảnh hưởng của nước dừa (Cw) trong nhân giống cây Trai <i>in vitro</i> .	36
3.2.7	Thí Nghiệm 7: Nuôi cấy tạo rễ cây trai <i>in vitro</i> .	36
3.3	ĐỊA ĐIỂM VÀ THỜI GIAN NGHIÊN CỨU	37
Phần 4. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN		38
4.1	Thí Nghiệm 1: Vô trùng mô cấy ban đầu từ cây Trai thực sinh.	38
4.2	Thí nghiệm 2: Khảo sát khả năng phát sinh chồi cây Trai <i>in vitro</i> trên các môi trường khoáng cơ bản có bổ sung BA (0,1 mg/l).	43
4.3	Thí nghiệm 3: Ảnh hưởng của BA đến quá trình nuôi cấy tạo cụm chồi cây Trai <i>in vitro</i> .	45
4.4	Thí nghiệm 4: Khảo sát sự ảnh hưởng của BA trong nhân cụm chồi cây Trai <i>in vitro</i> .	47
4.5	Thí nghiệm 5: Khảo sát quá trình tái sinh cụm chồi cây Trai <i>in vitro</i> .	49
4.6	Thí nghiệm 6: Ảnh hưởng của nước dừa (Cw) đến nhân nhanh cây Trai <i>in vitro</i> .	51
4.7	Thí nghiệm 7: Nuôi cấy tạo rễ cây Trai <i>in vitro</i> .	54
Phần 5. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ		56
5.1	KẾT LUẬN	56
5.2	ĐỀ NGHỊ	56
Phần 6. TÀI LIỆU THAM KHẢO		57
Phần 7. PHỤ LỤC		a

DANH MỤC CÁC CHỮ VIẾT TẮT

BA	: Benzyl adenine
Ki	: Kinetin
2,4-D	: Dichlorophenory acetic acid
HgCl ₂	: Thủy ngân chlorite
IAA	: β -indole acetic acid
IBA	: β -indole butyric acid
NAA	: α -naphtalen acetic acid
Cw	: Nước dừa (Coconut water)
Suc	: Đường sucrose
CRD	: Completely randomized design
Ctv	: Cộng tác viên
CV	: Hệ số biến động
LSD	: Sai số nhỏ nhất
MS	: Murashige – Skoog, 1962
WPM	: Lloy – Mc Cown, 1980
CRC	: Critically Endangered

DANH SÁCH CÁC HÌNH

Hình 2.1: Thân cây Trai trưởng thành (A). Hoa (B), cành mang quả cây Trai (C).....	29
Hình 4.1: Mẫu thực sinh cây Trai được vô trùng phát sinh chồi (A), (B) từ đốt thân; (C), (D) từ đốt ngọn.	42
Hình 4.2: Khả năng phát sinh chồi cây Trai <i>in vitro</i> từ nuôi cấy chồi đỉnh trên môi trường MS (A), và WPM (B) có bổ sung BA (0,1 mg/l).....	44
Hình 4.3: Ảnh hưởng của BA đến quá trình nuôi cấy tạo cụm chồi cây Trai <i>in vitro</i> . Cụm chồi trên môi trường có nồng độ BA 0,1 mg/l (A); nồng độ 0,5 mg/l (B); nồng độ 1 mg/l (C).	46
Hình 4.4: Nhân cụm chồi cây Trai <i>in vitro</i> trên môi trường có bổ sung BA. (A) nồng độ 0,01 mg/l; (B) nồng độ 0,1 mg/l ; (C) nồng độ 0,5 mg/l.	48
Hình 4.5: Tái sinh cụm chồi cây Trai <i>in vitro</i> trên môi trường khoáng cơ bản MS (A), WPM (B).	50
Hình 4.6: Cây Trai <i>in vitro</i> vươn thân trên môi trường có chứa nước dừa (A) 5% nước dừa; (B) 10% nước dừa.	53
Hình 4.7: Cây Trai <i>in vitro</i> ra rễ trong môi trường WPM bổ sung IBA (0,3 mg/l).....	55
Hình 4.8: Cây Trai <i>in vitro</i> ra rễ được thuần hóa và ra bầu đất trong điều kiện vườn ươm.	55

DANH SÁCH CÁC BẢNG

Bảng 3.1a: Ảnh hưởng của nồng độ Natri hypochlorite và thời gian xử lý vô trùng mẫu.....	32
Bảng 3.1b: Ảnh hưởng của nồng độ Natri hypochlorit, HgCl ₂ và thời gian xử lý vô trùng mẫu	33
Bảng 3.2: Khả năng phát sinh chồi cây Trai <i>in vitro</i> trên các môi trường khoáng cơ bản có bổ sung BA (0,1 mg/l).....	34
Bảng 3.3: Ảnh hưởng của nồng độ BA đến khả năng tạo cụm chồi cây Trai <i>in vitro</i> .	34
Bảng 3.4: Ảnh hưởng của BA trong nhân cụm chồi cây Trai <i>in vitro</i>	35
Bảng 3.5: Tái sinh cụm chồi cây Trai <i>in vitro</i>	35
Bảng 3.6: Ảnh hưởng của nước dừa (Cw) đến nhân nhanh cây Trai <i>in vitro</i>	36
Bảng 3.7: Nuôi cấy tạo rễ cây Trai <i>in vitro</i>	37
Bảng 4.1a: Ảnh hưởng của nồng độ Natri hypochlorit và thời gian xử lý vô trùng mẫu	40
Bảng 4.1b: Ảnh hưởng của nồng độ Natri hypochlorit, HgCl ₂ và thời gian xử lý vô trùng mẫu.	41
Bảng 4.2: Khả năng phát sinh chồi cây Trai <i>in vitro</i> trên các môi trường khoáng cơ bản có bổ sung BA (0,1 mg/l).	43
Bảng 4.3: Ảnh hưởng của BA đến quá trình nuôi cấy tạo cụm chồi cây Trai <i>in vitro</i> .	45
Bảng 4.4: Ảnh hưởng của BA trong nhân cụm chồi cây Trai <i>in vitro</i>	47
Bảng 4.5: Tái sinh cụm chồi cây Trai <i>in vitro</i>	49
Bảng 4.6: Ảnh hưởng của nước dừa (Cw) đến nhân nhanh cây Trai <i>in vitro</i>	52
Bảng 4.7: Ảnh hưởng của các auxin đến sự ra rễ cây Trai <i>in vitro</i>	54

Phần 1. MỞ ĐẦU

1.1 ĐẶT VẤN ĐỀ

Năm 1964, Xukasov đã viết: “Có thể khẳng định không có một thảm thực vật nào có ích cho loài người như rừng ” (Lâm Xuân Sanh, 1982).

Rừng là một môi trường sống của con người và các hệ sinh vật khác trên trái đất, là mái nhà che chở, là niềm tự hào của nhiều Quốc gia. Rừng là nguồn cung cấp tài nguyên dồi dào cho sự phát triển của nền kinh tế đất nước.

Ngoài ra, rừng còn giữ vai trò vô cùng to lớn trong hệ sinh thái chung của hành tinh, và bản thân rừng là hệ sinh thái lớn phức tạp và tự điều chỉnh (Siscop, 1987). Hàng ngày, hàng giờ cây cối trong rừng tiến hành quá trình quang hợp đã cung cấp một lượng lớn Oxy, hấp thụ khí CO₂ do người và động vật thải ra (Trần Cẩm Vân, Bạch Phương Lan, 1995).

Tuy nhiên qua nhiều thập kỷ, rừng trên thế giới đang ngày càng bị tàn phá nặng nề do nhiều nguyên nhân, đặc biệt là do sự tàn phá quá mức ở các nước đang phát triển và sự suy kiệt của các rừng nhiệt đới. Các nhà khoa học đã đánh giá hệ sinh thái rừng nhiệt đới là phức tạp nhất nhưng cũng rất dễ bị suy tàn, khả năng phục hồi kém sau những tác động nghiêm trọng.

Tại hội nghị Lâm nghiệp thế giới (1986) đã nêu: “ Rừng nhiệt đới chẳng khác gì con ngỗng đẻ trứng vàng. Nếu một lần chỉ lấy đi một phần nhỏ thì sản xuất sẽ được duy trì mãi mãi, nhưng lấy đi tất cả thì nó sẽ mất vĩnh viễn.” Thực tế là con người đã lấy đi quá nhiều từ cây gỗ lớn đến cây bụi, cây cỏ, từ các động vật lớn, nhỏ và kể cả đất rừng cũng bị thu hẹp dần. Trong khi đó, con người chưa khôi phục, chưa trả lại cho rừng được bao nhiêu.

Trong lời tựa cuốn “Công nghệ vi sinh bảo vệ môi trường” Mai Đình Yên (1995) đã viết: “Những cánh rừng bạt ngàn xanh tươi – lá phổi của trái đất đang ngày càng bị thu hẹp diện tích và có nguy cơ biến mất dần đi. Hệ sinh thái phong phú trên trái đất – sản phẩm chọn lọc ngàn đời của thiên nhiên, vốn rất cân bằng và đa dạng đang bị con người dần dần phá vỡ”.

Trong khi nước ta nằm trong vùng khí hậu nhiệt đới gió mùa, lượng mưa hàng năm cao và tập trung chủ yếu vào mùa mưa. Những điều kiện này thích hợp cho sự sinh trưởng và phát triển của cây Trai Nam Bộ. Đây là cây gỗ quý hiếm được xếp vào các loại cây đang bị đe dọa và mức độ đe dọa theo phân hạng của UICN (2001) là rất nguy cấp và nguy cơ tuyệt chủng trong tự nhiên cao. Về giá trị kinh tế đây là cây gỗ đang được các nhà kinh doanh và chế biến gỗ quan tâm do nó có giá trị kinh tế cao. Ngoài việc được dùng để đóng các đồ gỗ cao cấp, làm vật liệu xây dựng, khung tàu thuyền... thì cây Trai Nam Bộ còn được dùng để trồng rừng phủ xanh đồi trọc, trồng trang trí ở các đường phố. Ở nước ta, cây Trai chưa được trồng phổ biến, trong khi đó nhu cầu sử dụng gỗ cây Trai nói riêng và các loại gỗ có phẩm chất tốt ngày càng tăng cao trong xã hội.

Để đáp ứng nhu cầu trong nước về cây Trai giống chất lượng và sạch bệnh phục vụ công tác bảo tồn nguồn gen và trồng rừng trên quy mô lớn, chúng tôi thực hiện đề tài “**NUÔI CÂY MÔ CÂY TRAI NAM BỘ (*Fagraea cochinchinensis* A.Chev.)**”.

1.2 MỤC ĐÍCH VÀ YÊU CẦU

1.2.1 Mục đích

- ❖ Nghiên cứu khả năng nhân giống nhanh cây Trai *in vitro* nhằm cung cấp nguồn cây giống ban đầu sạch bệnh có tính đồng nhất về mặt di truyền, đáp ứng yêu cầu cây giống phục vụ cho công tác bảo tồn nguồn gen và trồng rừng trên quy mô lớn.

1.2.2 Yêu cầu

- ✚ Vô trùng mẫu nuôi cấy
- ✚ Khảo sát quá trình phát sinh chồi cây Trai *in vitro* trên các môi trường khoáng cơ bản có bổ sung BA (0,1 mg/l)
- ✚ Ảnh hưởng của BA đến quá trình nuôi cấy tạo cụm chồi cây Trai *in vitro*
- ✚ Khảo sát sự ảnh hưởng của BA trong nhân cụm chồi cây Trai *in vitro*
- ✚ Khảo sát quá trình tái sinh cụm chồi cây Trai *in vitro*
- ✚ Ảnh hưởng của nước dừa (Cw) trong nhân giống cây Trai *in vitro*
- ✚ Nghiên cứu nuôi cấy tạo cây Trai *in vitro* hoàn chỉnh

1.3 GIỚI HẠN ĐỀ TÀI

Do thời gian nghiên cứu có hạn, đề tài chỉ tập trung nghiên cứu các kỹ thuật liên quan đến việc hoàn thiện quy trình nuôi cấy *in vitro* cây Trai Nam Bộ (*Fagraea cochinchinensis* A.Chev.).

Phần 2. TỔNG QUAN TÀI LIỆU

2.1 ĐẶC ĐIỂM LÂM SINH HỌC CÂY TRAI NAM BỘ (*Fagraea cochinchinensis* A.Chev.)

2.1.1 Vị trí phân loại

Giới	<i>Plantae</i>
Ngành	<i>Magnoliophyta</i>
Lớp	<i>Magnoliopsida</i>
Phân lớp	<i>Asteridae</i>
Bộ	<i>Gentianales</i>
Họ	<i>Loganiaceae</i>
Chi	<i>Fagraea</i>
Loài	<i>Fagraea cochinchinensis</i> A.Chev.

* Tên gọi khác:

- *Fagraea fragrans* Roxb.
- *Fagraea gigatea* Ridley.
- *Fagraea sororia* J.J.Smith.
- *Fagraea wallichiana* Benth.

* Tên thông thường ở các nước

- Ironwood (English).
- Pangsoma (Bangladesh).
- Ki badak, Kayu tammusu, Ambinaton (Indonesia).
- Tatraou (Cambodia).
- Manpa (Laos).
- Anan, Ahnyim (Myanmar).
- Tembusu hutan, Tembusu padang, Tembusu tembaga (Malaysia).
- Urung, Dolo, Susulin (Philippines).
- Tembusu, Tembusu hutan/padang, Tembusu padang (Singapore).

- Kankrao, Man pla, Thamsao (Thailand).
- Trai Nam Bộ, Trai, Tembusu, Tembesu (Việt Nam).
- Tembesu (Brazil).

* Tên Thương Mại: Tembesu.

2.1.2 Phạm vi phân bố

Cây phân bố nhiều ở Việt Nam (chủ yếu ở miền Nam), ở Campuchia, Lào, Malaysia, Indonesia, Brazil, Myanmar, Philippines, Thailand, Bangladesh.

Cây còn được trồng làm cây trang trí ở các đường phố Malaixia, Indônêxia.

Tại Việt Nam cây mọc từ Hà Tĩnh, Quảng Bình, Quảng Trị, Thừa Thiên Huế, Gia Lai, Kon Tum, Đắk Lắk, Tây Ninh, Kiên Giang, Côn Đảo, Phú Quốc.

Cây mọc trong các rừng thứ sinh, nơi đất hoang, trên bờ ao, đất ngập theo chu kỳ rồi khô, kể cả đất khô, lầy, có bùn hay có cát...

2.1.3 Đặc điểm sinh học

- Cây gỗ lớn, thân thẳng hình trụ, cao 25 – 30 m, đường kính đạt tới 1,5 m.
- Góc đôi khi có bạnh vè nhỏ.
- Vỏ ngoài xám hay nâu vàng, nứt dọc, thịt vỏ nhiều xơ, có vị đắng.
- Lá hình bầu dục hoặc hình trứng ngược, đầu nhọn kéo dài hoặc có mấu góc hình nêm.
- Lá mọc kiểu đối chữ thập tập trung đầu cành, dài 7 – 12 cm và rộng 2 – 5cm, màu xanh sẫm, gân bên vắn hợp mép.
- Hoa tự ngù ở nách lá hay đầu cành phân nhánh nhiều.
- Mỗi cụm có 20 – 30 hoa màu trắng, rất thơm gồm 5 cánh dài dính lại thành ống, trên có 5 thùy, cánh tràng 5, hợp với 5 thùy không bằng nhau, có 5 nhị, chỉ mảnh, bao phấn hình bầu dục. Bầu nhẵn, vòi dài hơn nhị.
- Quả mọng hoặc thịt, lúc chín màu đỏ đường kính 1,5 – 2 cm, 1 – 3 hạt tròn dẹt trên có phủ lông màu ánh bạc.
- Cây phát triển chậm và chu kỳ ra hoa tùy thuộc vào sự xen kẽ mùa khô và ẩm.

- Mùa hoa tháng 4 – 6, quả tháng 7 – 11.
- Gỗ có mùi chua, màu vàng, rất cứng, gỗ nặng có tỷ trọng $d = 0,85$.
- Là loài gỗ quý, chịu nước và chôn lâu dưới đất, dùng làm cột nhà, đóng đồ gỗ, gỗ xây dựng.
- Gỗ thuộc nhóm I.

2.1.4 Giá trị sử dụng và tính chất của gỗ Trai

Gỗ Trai màu vàng rất cứng và gỗ nặng có tỷ trọng $d = 0,85$, có giá trị kinh tế cao. Gỗ Trai có mùi chua, không mục (ở trong đất còn nguyên vẹn cả trăm năm), được sử dụng vào nhiều mục đích khác nhau: vật liệu xây dựng, khung tàu, làm đồ gỗ nội thất cao cấp....

Vỏ có chứa Alkaloid giống stricnin, có tác dụng hạ nhiệt và trị rét, tuy nhiên nếu sử dụng quá liều thì sẽ gây độc.

Lá trừ sốt rét, lợi tiêu hóa, trừ hen.

Vỏ cây và lá sắc uống dùng làm thuốc trị lỵ. Lá giã ra và nấu lên lấy nước tắm rửa chữa bệnh ghẻ.

Trong y học dân gian Thái Lan, lá cũng được dùng trị các bệnh về da.

Ở Malaysia, nước sắc lá và các nhánh dùng để trị xuất huyết trong phân khi bị bệnh lỵ.

Lõi cây dùng trong y học dân gian Campuchia trị bệnh đường tiêu hóa. Vỏ cây cũng được những người già dùng để kéo dài tuổi thọ.

2.2 ỨNG DỤNG NUÔI CẤY MÔ TẾ BÀO THỰC VẬT TRONG CÔNG TÁC CHỌN GIỐNG CÂY TRỒNG

2.2.1 Lịch sử nuôi cấy mô tế bào thực vật

Năm 1838, hai nhà sinh vật học Đức là Schleiden và Schwann đề xướng học thuyết tế bào và nêu rõ: “*Mọi cơ thể sinh vật phức tạp đều gồm nhiều đơn vị nhỏ, các tế bào hợp thành*”. Các tế bào đã phân hoá đều mang các thông tin di truyền có trong tế bào đầu tiên, đó là trứng sau khi thụ tinh và là những đơn vị độc lập từ đó có thể xây dựng lại toàn bộ cơ thể.

Năm 1902, Haberlandt là người đầu tiên đưa các giả thiết của Schleiden và Schwann vào thực nghiệm. Ông viết trong một tác phẩm như sau: “Để kết luận, tôi tin tưởng rằng tôi đã không đưa ra một tiên đoán quá táo bạo nếu cho rằng bằng cách nuôi cấy, người ta có khả năng tạo thành công các phôi nhân tạo từ các tế bào sinh dưỡng”. Ông đã gặp thất bại trong nuôi cấy các tế bào đã phân hoá tách từ một số cây một lá mầm như: *Erythronium*, *Ornithogalum*, *Tradescantia*. Ngày nay, chúng ta biết rất rõ nguyên nhân thất bại của ông vì cây một lá mầm là đối tượng rất khó nuôi cấy. Hơn nữa, ông lại dùng các tế bào đã mất hết khả năng tái sinh.

Năm 1922, Kote (học trò Haberlandt) và Robbins (nhà khoa học người Mỹ) đã lặp lại thí nghiệm của Haberlandt và nuôi cấy được đỉnh sinh trưởng tách ra từ đầu rễ của một loại cây thuộc họ hòa thảo tạo ra hệ rễ nhỏ và có cả rễ phụ. Tuy nhiên, sự sinh trưởng như vậy chỉ tồn tại trong một thời gian sau đó chậm lại và ngừng hẳn mặc dù tác giả đã chuyển sang môi trường mới.

Năm 1934, White J.P. thông báo nuôi cấy thành công trong một thời gian dài đầu rễ cà chua (*Lycopersicum esculentum*) trong môi trường lỏng chứa khoáng, glucose, và nước chiết nấm men. Sau đó, White cũng là người chứng minh có thể thay thế nước dịch chiết nấm men bằng hỗn hợp ba loại Vitamin nhóm B, Thiamin (B1), Pyridoxin (B6) và Nicotinic acid.

Năm 1937, Gautheret và Nobecout đã tạo ra và duy trì được sự sinh trưởng mô sẹo cây cà rốt trong một thời gian dài trong môi trường thạch cứng.

Năm 1941, Overbeck đã chứng minh được vai trò của chất kích thích sinh trưởng trong nuôi cấy phôi họ cà. Trong thời gian này chất kích thích sinh trưởng nhân tạo thuộc nhóm auxin đã được nghiên cứu và tổng hợp hóa học thành công. Và năm 1948, Steward đã xác định được tác dụng của nước dừa trong nuôi cấy mô sẹo cây cà rốt.

Năm 1955, người ta tìm ra tác dụng kích thích phân bào của kinetin. Sau đó các chất cytokinine khác như BAP, 2 iP, Zeatin cũng được phát hiện.

Năm 1957, SKoog và Miller công bố kết quả nghiên cứu về tỷ lệ giữa kinetin/auxin đối với sự hình thành các cơ quan từ mô sẹo trên cây thuốc lá.

Từ năm 1954 đến năm 1959 kỹ thuật tách và nuôi cấy tế bào đơn đã được phát triển, các tác giả đã gieo tế bào đơn và nuôi cấy tạo được cây hoàn chỉnh.

Năm 1966, Guha và Mahheswari nuôi cấy thành công tế bào đơn bội từ nuôi cấy túi phấn cây cà độc dược.

Năm 1967, Bougin và Nistsh tạo thành công cây đơn bội từ túi phấn cây thuốc lá.

Từ 1980 đến 1992 hàng loạt các thành công mới trong lĩnh vực công nghệ gen thực vật và được công bố.

Khả năng ứng dụng nuôi cấy mô tế bào thực vật dễ thấy nhất là trong lĩnh vực nhân giống và phục tráng cây trồng. Từ đó đến nay, công nghệ nuôi cấy mô tế bào thực vật đã được phát triển với tốc độ nhanh trên rất nhiều loại cây khác nhau.

2.2.2 Khái niệm nuôi cấy mô tế bào

Nuôi cấy mô tế bào thực vật hay còn gọi là nuôi cấy *in vitro* là công cụ cần thiết trong nhiều lĩnh vực nghiên cứu cơ bản và ứng dụng của ngành công nghệ sinh học. Nhờ áp dụng kỹ thuật nuôi cấy mô, con người đã thúc đẩy thực vật sinh sản nhanh hơn gấp nhiều lần so với 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 giống mới vào sản xuất. Hơn nữa dựa vào kỹ thuật nuôi cấy mô có thể duy trì và bảo quản nhiều giống cây trồng quý hiếm để phục tráng giống cây trồng.

Phương pháp nuôi cấy mô tế bào thực vật bắt đầu từ một mảnh nhỏ thực vật vô trùng được đặt trong môi trường dinh dưỡng thích hợp. Chồi mới hay mô sẹo mà mẫu cấy này sinh ra bằng sự tăng sinh được phân chia và cấy chuyển để nhân giống.

2.2.3 Ứng dụng nuôi cấy mô tế bào thực vật trong chọn giống cây trồng

Nuôi cấy mô tế bào thực vật là một ngành khoa học trẻ nằm trong sinh lý thực vật. Mặc dù phôi thai từ đầu thế kỷ 20, khả năng ứng dụng của nuôi cấy mô tế bào thực vật vào chọn giống và nhân giống cây trồng chỉ rõ nét vào khoảng 25 năm gần đây do các phát hiện sau:

- Tính toàn thể (totipotency) 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.

- 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 thực vật và khả năng gây biến tính (transformation) ở thực vật do DNA ngoại lai nhờ công nghệ gene (Genetic engineering).
- 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 (cybrid).
- Khả năng loại trừ virus bằng phương pháp nuôi cấy đỉnh sinh trưởng, tạo các dòng vô tính sạch bệnh ở các cây nhân giống vô tính.
- Khả năng dùng chồi nách, các thể chồi protocol vào nhân giống vô tính với tốc độ cực nhanh một số cây trồng nông nghiệp.
- Khả năng sử dụng phương pháp nuôi cấy phôi để khắc phục hiện tượng bất thụ khi lai xa.
- Khả năng bảo quản các nguồn gene bằng nuôi cấy trong ống nghiệm. Khả năng trao đổi quốc tế các nguồn gene sạch bệnh dưới dạng cây nuôi trong ống nghiệm.
- Khả năng tồn trữ các tế bào thực vật sống trong thời gian dài và ở nhiệt độ thấp mà không mất tính toàn thể của tế bào.

Ở nước ta, nghiên cứu nuôi cấy mô tế bào thực vật chỉ mới bắt đầu từ năm 1975. Ý thức được triển vọng to lớn của ngành khoa học hiện đại này trong chọn giống và nhân giống cây trồng nông nghiệp, ở các cơ sở nghiên cứu thuộc Trung Tâm Khoa Học Tự Nhiên và Công Nghệ Quốc Gia, các trường Đại học, các đơn vị thuộc Bộ, Viện... đã chú ý xây dựng các phòng nghiên cứu nuôi cấy mô thực vật, từng bước xây dựng tiềm lực khoa học và cán bộ nghiên cứu về ngành này.

2.2.4 Ưu điểm của phương pháp nuôi cấy mô tế bào thực vật

Phương pháp nuôi cấy mô có 5 điểm chính nổi bật hơn các phương pháp nhân giống cổ điển khác:

- Nhân nhanh giống cây trồng do có hệ số nhân cao.
- Các cây giống sau khi nuôi cấy mô có sự đồng nhất về mặt di truyền.
- Loại sạch được bệnh cây, đảm bảo các cây giống khỏe mạnh, có sức tăng trưởng nhanh.
- Hoàn toàn chủ động được kế hoạch sản xuất cây trồng.
- Trẻ hóa vật liệu giống.

2.3 VI NHÂN GIỐNG CÂY THÂN GỖ

2.3.1 Những thành tựu của nuôi cấy mô cây thân gỗ trong và ngoài nước

Cây thân thảo là đối tượng đầu tiên được sử dụng trong nghiên cứu vi nhân giống. Sau 4 thập kỉ phát triển của kỹ thuật nuôi cấy mô tế bào thực vật, kỹ thuật nuôi cấy mô cây thân thảo được hoàn thiện khá đầy đủ. Trong thập niên 90, cây thân gỗ (Cây ăn trái và cây rừng) được đặc biệt chú ý, nhằm mục tiêu ứng dụng những kỹ thuật hiện đại của công nghệ sinh học thực vật vào cải thiện và nhân nhanh các loài cây ăn trái thân gỗ và cây trồng rừng có giá trị kinh tế cao như chuối, mía, cà phê, cọ dầu, khoai tây, cây ăn quả, cây có múi... và một số loại cây rừng như cây thông (*Pinus radita*), cây bạch đàn, cây hồng, cây dầu rái...(Trần Văn Minh, 2004). Trung Quốc đã tạo cây mô thành công cho khoảng 100 loài cây thân gỗ như phi lao, bạch đàn, bao đồng, tẻch.... Ở Philippines đã thành công trên diện rộng về nuôi cấy cây bạch đàn, nhất là các loài đặc sản có trong rừng tự nhiên: Phong lan, cây dược liệu.... Kỹ thuật này đã tạo được cây mô phi lao sinh trưởng nhanh, kháng bệnh và cố định đạm cao cho trồng rừng. Hiện nay, các nước có nền công nghệ sinh học cao đã tự động hóa nhân giống cây thân gỗ, đặc biệt là bắt đầu nhân một số loại cây rừng phục vụ công tác tái sinh những cánh rừng. Ở Newzealand có 2,5 triệu cây rừng được sản xuất hằng năm qua vi nhân giống những họ và dòng cây *Radiata pine* chọn lọc (Gleed, 1991). Tại Hoa Kỳ và Phần Lan, cây con Birch (*Betula Pentula* Roth) được sản xuất trên quy mô thương mại (McCown, 1989) cây bạch đàn được sản xuất ở Úc, Brazil (Tormala,

1990)... và cây Redwood ở Hoa Kỳ và Pháp. Tự động hóa vi nhân giống là một thành công để hạ chi phí cho cây con nuôi cấy mô ở các nước có công nghệ cao (Trần Văn Minh, 2004).

Hiện nay, Việt Nam đã nuôi cấy thành công một số loại cây thân gỗ gồm có: cây ăn trái như cam, quýt, nhãn, măng cụt,... và một số loại cây rừng như bạch đàn, các loài keo, giá ty, cẩm lai, dó bầu, anh đào, cây hồng, cây dầu rái....

Ngành nuôi cấy mô Việt Nam hiện đã thoát khỏi giai đoạn phôi thai của nó và đang chuẩn bị những đóng góp tích cực vào lý luận sinh học và thực tiễn cây trồng Nông Lâm Nghiệp.

Cho đến nay, kỹ thuật nuôi cấy mô trên đối tượng cây thân gỗ cũng vẫn còn ở mức độ nghiên cứu nhiều hơn là đưa vào sản xuất thương mại. Tuy nhiên, cũng có những thành công rất đáng trân trọng phục vụ cho công tác cải thiện giống cây ăn trái và phục hồi rừng (Trần Văn Minh, 2004).

➤ Những khó khăn và thuận lợi trong nuôi cấy in vitro cây thân gỗ:

Có những đặc điểm khác nhau trong kỹ thuật nuôi cấy mô cây thân thảo và cây thân gỗ (Pierik, 1975; Bonga và Duan, 1982; Kunneman-Kooij, 1984) được đúc kết:

- ❖ Các loài cây thân gỗ ít có khả năng tái sinh hơn cây thân thảo.
- ❖ Các nghiên cứu nhân giống trên cây thân thảo được bắt đầu trễ hơn so với cây thân thảo.
- ❖ Việc cảm ứng sự trẻ hóa ở cây thân gỗ khó hơn ở cây thân thảo.
- ❖ Tốc độ nhân giống cây thân gỗ thấp hơn cây thân thảo.
- ❖ Tác động của trạng thái hưu miên trên sự tăng trưởng của chồi và sự kéo dài của thân cây thân gỗ theo từng thời kì trong năm.
- ❖ Cây thân gỗ dễ bị ảnh hưởng bởi các chất độc tiết ra trong môi trường nuôi cấy.
- ❖ Mô của cây thân gỗ khó khử trùng hơn vì đại đa số mọc ở ngoài thiên nhiên.

- ❖ Cây thân gỗ và cây bụi thường được chọn để nhân dòng sau khi cây đã trưởng thành. Ở giai đoạn này các mô của cây thường rất khó hoặc không thể sử dụng được trong nhân giống *in vitro*.
 - ❖ Sự đa dạng về mặt di truyền của cây thân gỗ lớn hơn so với cây nông nghiệp và các loại cây thân thảo khác do đó sau khi nhân giống sẽ thu được nhiều kết quả khác nhau khó kiểm soát.
 - ❖ Cây thân gỗ không thể trồng được trong nhà kính, vì vậy việc thu mẫu bị ảnh hưởng rất nhiều bởi điều kiện khí hậu và các điều kiện tăng trưởng khác.
- Tuy có những đặc điểm khó khăn so với cây thân thảo, kỹ thuật nuôi cấy *in vitro* trên cây thân gỗ đạt được những thuận lợi (Trần Văn Minh, 2004) như sau:
- ❖ Nhân giống *in vitro* nhanh hơn nhân giống *in vivo* (*Paulownia*).
 - ❖ Sau khi trẻ hóa mẫu nuôi cấy *in vitro*, tốc độ tăng sinh *in vitro* càng lúc càng nhanh hơn tăng sinh *in vivo* (*Teak*).
 - ❖ Sinh trưởng và phát triển cây *in vitro* nhanh hơn cây từ hạt (*Agarwood*).
 - ❖ Ứng dụng kỹ thuật nuôi cấy đỉnh sinh trưởng kết hợp với xử lý nhiệt làm sạch bệnh và trẻ hóa cây thân gỗ (*Red cedar*).
 - ❖ Cây *in vitro* được nhân nhanh quanh năm trong phòng thí nghiệm (*Neem*).
 - ❖ Sau quá trình trẻ hóa *in vitro*, cây thân gỗ *in vitro* được sử dụng làm cây mẹ đầu dòng cho quá trình nhân nhanh *in vivo* trên vườn ươm (*Acacia*).
 - ❖ Dễ dàng tạo biến tính tế bào soma *in vitro* phục vụ công tác chọn dòng đột biến.
 - ❖ Sử dụng phương pháp sinh trưởng chậm để bảo quản nguồn gene đang bị tuyệt diệt (*Taxus*).

- ❖ Sử dụng kỹ thuật nuôi cấy tế bào soma hay dịch huyền phù tế bào đơn trong công tác giống cây thân gỗ (*Mangosteen*).

2.3.2 Vi nhân giống từ cây còn non

2.3.2.1 Tổng quát

Cây còn non đối với cây thân gỗ được xác định là cây trồng từ hạt được 1 năm tuổi. Nhân giống vô tính cây thân gỗ còn non thông qua hai con đường nuôi cấy cơ quan và nuôi cấy phôi. Phương pháp thông dụng đang dùng hiện nay là nhân giống vô tính qua nuôi cấy cơ quan. Điểm khác nhau giữa nuôi cấy cơ quan và nuôi cấy phôi khác nhau ở chỗ là phát sinh chồi ngọn (shoot) hay chồi bên (axillary) đầu tiên và sau đó phát triển rễ, cây hoàn chỉnh được tái tạo; trong nuôi cấy phôi thì phôi phát sinh đầu tiên, sau đó hình thành lá mầm và rễ, là giai đoạn nảy mầm thành cây hoàn chỉnh.

2.3.2.2 Nuôi cấy cơ quan

a. Các bước nhân giống và môi trường:

- Hình thành chồi từ mẫu đưa vào nuôi cấy.
- Vươn dài thân và nhân giống.
- Tạo rễ.
- Thuần hóa *in vitro* cây con.

Tuy nhiên, mỗi loài cây trồng được xác định các bước có khác nhau (Thorpe et al., 1991). Chọn lựa môi trường nuôi cấy cho từng bước phụ thuộc vào từng loại cây trồng, từ nồng độ muối thấp cho đến cao. Môi trường có hàm lượng muối thấp như: Gresshoff và Doy (GD – 1972); Lloyd và McCown's Woody Plant (WPM – 1980); 1/4 – 1/2 Schenk và Hildebrant (SH – 1972); Murashige – Skoog (MS – 1962); Quoirin và Le Poivre (LP – 1977). Môi trường có hàm lượng muối cao như: MS, LP, SH. Ngoài ra, các nhà khoa học thường bổ sung vào môi trường cơ bản được chọn lựa trước cho phù hợp từng loại cây trồng và từng bước nhân giống. Thí dụ: Khi tạo chồi thì việc lựa chọn mẫu và cytokinin có ý nghĩa hơn lựa chọn môi trường dinh dưỡng. Còn khi chọn chỉ tiêu là vươn dài thân, nhân chồi và tạo rễ thì dinh dưỡng môi trường ảnh hưởng đến hệ số nhân chồi và chất lượng chồi. Cấy chuyển từ môi trường có hàm

lượng muối cao xuống thấp thích hợp cho phát sinh chồi rễ hay hình thành rễ (Horgan và Aitken, 1981).

b. Tạo chồi:

Chọn mẫu trong tình trạng sinh lý thích hợp và đang phát triển cho khả năng tạo chồi cao. Mẫu non và chứa nhiều dinh dưỡng có nhu mô phân sinh cho khả năng tạo chồi cao. Chồi mầm cây từ hạt còn non có khả năng tạo chồi nhiều hơn từ cây già và có BA (Goldfarb et al., 1991; Ellis và Bilderback, 1991). Phôi hợp tử trưởng thành, lá mầm, phần trên lá mầm, và chồi bên của lá thứ nhất hay thứ hai chứa nhiều tế bào mô phân sinh, tạo được chồi ngọn hay chồi bên (Thorpe et al., 1991). Chồi ngọn hình thành hầu hết ở các mẫu cây, ngược lại chồi bên chỉ tạo được khi có chứa tế bào mô phân sinh.

Chồi thường được tạo trên môi trường có cytokinin (BA) với nồng độ 0,5 – 5 mg/l, trên 5 mg/l chồi ngọn và chồi bên xuất hiện chậm sau 4 – 6 tháng, dưới 0,5 mg/l chỉ có vài chồi xuất hiện sau 2 – 3 tháng. Đôi khi cũng dùng các loại cytokinin khác như 2iP, kinetin, zeatin riêng rẽ hay kết hợp với BA (Harry et al., 1987). Auxin và gibberellin cũng được dùng nhưng không có ảnh hưởng rõ rệt, đôi khi cũng dùng auxin với nồng độ 0,05 – 0,5 mg/l (NAA). Trong những thí nghiệm gần đây cho thấy ABA làm tăng hiệu quả BA trên các loài *Pinus* (Sen et al., 1989; Chang et al., 1991). Quy luật tác động của ABA chưa rõ ràng, nhưng có lẽ có một quy luật tương hỗ giữa sự phát sinh chồi và sự tạo ra các peroxidase.

c. Vươn thân và nhân giống:

Môi trường cho vươn thân môi trường nhân giống nhưng không có cytokinin. Sử dụng than hoạt tính (0,5 – 1%) rất cần thiết cho sự vươn thân (Nairn, 1987). Đường sucrose 3% thích hợp cho vươn thân và nhân giống và giảm 2% cho tạo rễ (Berlyn et al., 1991). Môi trường lỏng, hay một lớp dung dịch lỏng trên lớp agar thích hợp cho vươn thân, thấy ở cây *Pinus* (Aitken- Chirstie và Jones, 1987). Và cần phải quan tâm đến vấn đề cây bị hỏng hay thủy tinh thể do quá trình nuôi cấy.

Nhân giống được thực hiện bằng hai phương pháp:

⇒ phương pháp cắt đốt, có thể có hay không có cytokinin.

⇒ Phương pháp nhân theo dạng cụm chồi, có sử dụng cytokinin kích thích chồi phát sinh và phát triển, phương pháp này thường dùng đối với cây thân gỗ.

Ngoài ra còn có phương pháp thứ (3) tạo cụm chồi trên môi trường có cytokinin với mẫu là chồi ngọn hay chồi bên có chứa nhiều mô phân sinh, sau đó cấy chuyển trên môi trường không có cytokinin thì chồi phát triển vươn dài, ghi nhận được qua cây *Pinus radiata* (Aitken- Christie et al., 1988); *Picea glauca* và *Populus* (McCown et al., 1988); *Pinus eldaric* (Phillip và Gladfelter, 1991) và *Eucalyptus grandis* (Warrag et al., 1991).

d. Tạo rễ và thuần hoá:

Nhiều tác giả đồng ý rằng sự tạo rễ chịu ảnh hưởng auxin, cách xử lý auxin, chất lượng chồi, tuổi sinh lý, từng giống cây và nhiệt độ. Rễ được tạo ra trong *in vitro* ngắn sau đó vươn dài khi ra đất. Để tạo được rễ, cây thường được cấy vào môi trường có auxin như IBA, NAA hay cả hai loại với nồng độ 0,1 – 5 mg/l (IBA) và 0,1 – 5 mg/l (NAA). Nồng độ và thời gian xử lý phụ thuộc vào giống. Đôi khi dùng phương pháp nhúng một thời gian ngắn có nồng độ auxin cao (50 – 1000 mg/l). Tạo rễ và thuần hoá thường đi đôi với nhau. Trong giai đoạn thuần hoá, cây con cần được duy trì tình trạng tự dưỡng, giảm ẩm độ từ 90% xuống 30 – 50%, lá dày lên và rễ phát triển.

2.3.2.3 Nuôi cấy phôi

a) Các bước nhân giống và môi trường

Tạo cây từ phôi, trải qua 5 bước:

- Tạo phôi.
- Nhân phôi.
- Phát triển và trưởng thành phôi.
- Nảy mầm của phôi.
- Thuần hoá cây con *in vitro*.

Môi trường nuôi cấy giống như môi trường nuôi cấy cơ quan. Thêm ABA vào trong môi trường cho sự phát triển phôi là cần thiết.

b) Phát sinh phôi và nhân phôi

Phôi hợp tử chưa trưởng thành, 3-5 tuần, được dùng làm nguyên liệu tạo phôi (Thorpe et al., 1991). Và phụ thuộc vào mẫu đưa vào tạo phôi mà quyết định đặc tính của phôi (Sotak et al., 1991; Ruaud, 1991). BA (0.5-5 mg/l) và 2.4D (1-10 mg/l) được dùng để tạo phôi (Hakman và Von Arnold, 1985; Gupta và Durzan, 1987; Merkle và Sommer, 1986) và có nhiều trường hợp ngoại trừ có thể không có auxin hay thay bằng loại auxin khác. Tuy nhiên, cho đến nay ý kiến được nhiều nhà khoa học đồng ý cho nhiều loại cây trồng là auxin rất cần thiết cho điều khiển sự phát sinh, phát triển phôi trưởng thành đồng nhất (Komamine et al., 1990; Carman, 1990). Nhân phôi bằng môi trường lỏng được sử dụng phổ biến hiện nay. Hàm lượng agar và pH cũng ảnh hưởng đến sự hình thành phôi (Von Arnold, 1987).

c) Phát triển và trưởng thành của phôi

Để phôi phát triển và trưởng thành cần có ABA (10-20 mg/l) ở cây *Conife*. ABA kích thích sự hình thành nơi dự trữ lipid, protein và carbohydrate trong sự phát triển phôi mà điều này cần thiết cho phôi nảy mầm (Hakman và Von Arnold, 1988; Roberts et al., 1990a; Joy et al., 1991). Môi trường có áp suất thẩm thấu cao, sự trao đổi tốt O₂ và CO₂ cải thiện chất lượng và số lượng phôi được tạo ra (Kvaalen và Von Arnold, 1991). Dùng đường sucrose (12%) tạo áp suất thẩm thấu (Gates và Greenwood, 1991) hay dùng polyethylen glycol (PEG) để tạo áp suất thẩm thấu tăng sự trưởng thành và làm khô phôi (Attree et al., 1991). Đối với cây thân gỗ, sự hình thành phôi trên môi trường không có auxin.

d) Sự nảy mầm của phôi

Sự nảy mầm của phôi thường được thực hiện trên môi trường agar, nhưng khả năng tái sinh cây từ phôi cây thân gỗ được nhận thấy là thấp (Thorpe et al., 1991; Taurus et al., 1991). Tái sinh phôi trên cầu giấy đặt trên môi trường lỏng có ẩm độ cao cải thiện được khả năng tái sinh (Roberts et al., 1990b, 1991).

2.3.3 Vi nhân giống từ cây trưởng thành

2.3.3.1 Tổng quát

Nhân giống vô tính cây trưởng thành khó khăn hơn cây còn non. Có những báo cáo gần đây về nhân vô tính cây trưởng thành và cây được làm trẻ lại (Boulay, 1987;

Dunstan, 1988; Pierik, 1990; Thorpe et al., 1991). Nhân vô tính từ cơ quan và từ phôi, có hai loại mẫu được dùng:

- (a) Mô non ở gần gốc.
- (b) Chồi trưởng thành ở đỉnh cây.

Nhân giống từ mô non (a) thu được nhiều kết quả. Nuôi cấy phôi từ cây trưởng thành còn nhiều hạn chế.

2.3.3.2 Nuôi cấy cơ quan

a. Xử lý cây mẹ

Trước khi được đưa vào nuôi cấy *in vitro*, cây mẹ có tuổi trưởng thành lớn, được đem đi giâm cành, chiết cành... để tạo ra những mô non hóa. Vi ghép trong *in vitro* thành công trên một số cây thân gỗ, với mắt ghép là đỉnh sinh trưởng mô non hóa như cây redwood (Tran Van et al., 1991), western red cedar (*Thuja plicata* D. Don ex Lambert) (Mission et al., 1991)... Thí dụ, cây western red cedar 183 tuổi, được tách mầm 6 – 7 mm, cấy trên góc ghép non, sau đó cây được tái sinh, những cây này nhân vô tính trên môi trường MS có 2iP, ở giai đoạn vươn thân có bổ sung than hoạt tính và ra rễ 90%, cây được khảo sát trên đồng sau 4 năm (Mission et al., 1991).

b. Tổng quát

Mô được sử dụng là những mô từ cây mẹ trưởng thành, mô non hơn hay mô già hơn. Có 4 bước nhân giống:

- (1) Tạo chồi.
- (2) Vươn thân và nhân giống.
- (3) Tạo rễ.
- (4) Thuần hóa cây *in vitro*.

Các bước này thực hiện trên cây redwood (*Sequoia sempervirens*) *Eucalyptus*, blackwood, và *Cunninghamia lanceolata* với mô non, còn với mô già như *Sequoiadendron giganteum* Bucholz. Môi trường nhân giống như nuôi cấy cây còn non. Trong môi trường bổ sung thêm than hoạt tính giúp thân vươn dài. Các điều kiện nuôi cấy cần phải nghiên cứu và chọn lựa thích hợp hơn (Monteuuis, 1987).

c. Tạo chồi

Chọn mẫu đang tăng trưởng, có nhu mô đỉnh hay chồi bên được kích thích tạo chồi, trên mẫu mô có sẵn chồi non 1 – 2 mm. Cytokinin có sẵn trong mô liên quan đến sự tạo chồi. Chọn những chồi vươn ra ánh sáng thì khả năng tạo chồi cao. Chồi được tạo ra nhưng khả năng vươn thân và thành cây khó khăn ở một số giống.

d. Vươn thân và nhân giống

Môi trường chồi vươn thân không có chất sinh trưởng và bổ sung than hoạt tính (0,5-2%) được sử dụng phổ biến ở cây *Conifer* (Boulay, 1979), và khi cây vươn thân, có rễ và được nhân giống. Ở cây *Radiata pine*, khi chồi bên phát sinh, chồi được tách ra và được nuôi cấy trên môi trường có 5 mg/l BA (Horgan, 1987), nhưng nếu không đúng giai đoạn tăng trưởng thì mẫu sẽ bị chết. Đối với nhiều cây thân gỗ, khi chồi xuất hiện, thường được tách và cấy trên môi trường có nồng độ chất sinh trưởng thấp như BA (0,2-2 mg/l) (Chalupa, 1987), BA + IBA (Meier-Dinkel, 1991) hay BA + IBA + GA₃ (Tricoli et al., 1985). Tuy nhiên nếu được cấy trên môi trường có cytokinin và than hoạt tính hay không có cytokinin thì cây sẽ được trẻ hóa (Fouret et al., 1986; Monteuis và Bon, 1989).

e. Tạo rễ và thuần hóa

Đối với mẫu già, auxin cần thiết cho tạo rễ (Preege et al., 1991), thường dùng IBA hay IBA + NAA để tạo rễ. Môi trường MS lỏng + IBA có tác dụng tạo rễ ở cây *Paulownia taiwaniana* (Yang et al., 1989). Bổ sung Rooting hay Quercitin cũng có kết quả *Prunus serotina Ehrh* với 16 giờ chiếu sáng (Tricoli et al., 1985). Vậy nhân tố quyết định đến sự ra rễ: dùng chồi có chất lượng, cơ chất xốp, phun sương giữ ẩm và giảm nhiệt độ ngày, tách mô sẹo ở gốc và môi trường nuôi cấy tạo rễ có 6% đường sucrose. Boulay (1989) còn ngâm cây redwood trong dung dịch auxin (24 giờ) có chứa Benomyl (thuốc trừ nấm) tạo rễ 60-100%.

2.3.3.3 Nuôi cấy phôi

Môi trường tạo phôi là GD, có bổ sung 50µm BA và 1µm NAA, trên cây *Pinus banksiana* (Chesick và Bergman, 1991). Phôi vô tính được hình thành trên mô cây rừng già được dùng làm mẫu nuôi cấy là cây White Oak: MS + 200 mg/l casein hydrolysate + 2,4D (1 mg/l), thời gian nuôi cấy 4 – 6 tuần sau đó cấy chuyển qua môi trường MS + BA (1 mg/l) thời gian nuôi cấy 6 – 8 tuần thì phát sinh phôi sau đó cấy

chuyên trên môi trường không sinh trưởng phát triển phôi trưởng thành. Phôi được nhân liên tục 1,5 năm.

2.4 CÁC PHƯƠNG PHÁP NUÔI CÂY MÔ TẾ BÀO THỰC VẬT

2.4.1 Nuôi cấy đỉnh sinh trưởng

Sau khi vô trùng, đỉnh sinh trưởng sẽ được nuôi cấy trên môi trường thích hợp chứa đầy chất dinh dưỡng khoáng vô cơ và hữu cơ hoặc môi trường khoáng có bổ sung chất kích thích sinh trưởng thích hợp. Từ một 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 một cây hoàn chỉnh. Cây con được chuyển ra đất có điều kiện sinh trưởng phát triển bình thường.

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 hóa của các tế bào đã phân hóa. Mô sẹo sẽ phát triển nhanh khi môi trường tạo mô sẹo có sự hiện diện của auxin. Khối mô sẹo có khả năng tái sinh thành cây hoàn chỉnh trong môi trường không có chất kích thích tạo mô sẹo. Nuôi cấy mô sẹo thường được thực hiện đối với các loại thực vật không có khả năng nuôi cấy đỉnh sinh trưởng. Từ một cụm tế bào mô sẹo có thể tái sinh cùng lúc nhiều chồi hơn là nuôi cấy đỉnh sinh trưởng, tuy nhiên mức độ phát sinh biến dị tế bào soma lại cao hơn.

2.4.3 Nuôi cấy tế bào đơn

Khối mô sẹo được nuôi cấy trong môi trường lỏng và lắc với tốc độ phù hợp sẽ tách 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. Với các cơ chất thích hợp được bổ sung vào môi trường nuôi cấy tế bào đơn ta có khả năng thu được các chất có hoạt tính sinh học. 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 môi trường có tỷ lệ auxin và cytokinin thích hợp thì tế bào đơn có khả năng tái sinh thành cây con hoàn chỉnh.

2.4.4 Nuôi cấy Protoplast – chuyển gen

Protoplast (tế bào trần) là tế bào đơn được tách lớp vỏ cellulose, có sức sống và duy trì đầy đủ chức năng sẵn có. 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.

2.4.5 Nuôi cấy hạt phấn đơn bội:

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

2.5 CÁC YẾU TỐ ẢNH HƯỞNG ĐẾN QUÁ TRÌNH NUÔI CẤY MÔ

2.5.1 Mô nuôi cấy

Theo lý thuyết tất cả các mô chưa hóa gỗ đang sinh trưởng mạnh như: Mô phân sinh ngọn, tượng tầng, đầu rễ, phôi đang phát triển, thịt quả non..., khi đặt vào môi trường có chứa một lượng hormon thích hợp đều có khả năng tạo mô sẹo. Tuy nhiên, mỗi tế bào ở mỗi mô khác nhau có khả năng tạo mô sẹo, phân hóa thành rễ, thân, cành, lá... rất khác nhau.

Do đó kết quả thu được cũng rất khác nhau ở những mẫu khi đưa vào nuôi cấy. Việc chọn mẫu thực vật để sử dụng trong quá trình nuôi cấy có vai trò quyết định, nếu chọn sai mẫu chúng ta sẽ không thu nhận được kết quả, hoặc thu được những cây sẽ không phát triển mạnh, thậm chí cây có thể ngưng phát triển ở một giai đoạn nhất định (Nguyễn Đức Lượng, 2001). Các kết quả nghiên cứu cho thấy để bắt đầu nghiên cứu nhân giống vô tính một cây nhất định, người ta chú trọng đến các chồi bên và mô phân sinh đỉnh.

2.5.2 Vô trùng trong nuôi cấy

Môi trường nuôi cấy mô thực vật có chứa đường, muối khoáng và vitamin, thích hợp cho các loài nấm, vi khuẩn phát triển. Do tốc độ phân chia tế bào của nấm và vi khuẩn lớn hơn rất nhiều so với tế bào thực vật. Nếu môi trường nuôi cấy bị nhiễm vài bào tử nấm hoặc vi khuẩn thì sau vài ngày đến một tuần toàn bộ bề mặt môi trường

nuôi cấy và mẫu cấy sẽ phủ đầy nấm, khuẩn, thí nghiệm phải loại bỏ vì trong điều kiện này mô cấy không thể phát triển và chết dần. Khác với thí nghiệm vi sinh có thể kết thúc trong vài ngày, mức độ vô trùng trong thí nghiệm nuôi cấy mô thực vật đòi hỏi rất cao mới có hi vọng thành công.

Để đảm bảo điều kiện vô trùng trong quá trình nuôi cấy đòi hỏi chúng ta phải thực hiện các yêu cầu sau:

- Vô trùng mô cấy.
- Vô trùng dụng cụ thủy tinh, môi trường và nút đậy.
- Trong thao tác nuôi cấy cần phải tránh làm rơi nấm, khuẩn lên bề mặt môi trường nuôi cấy.

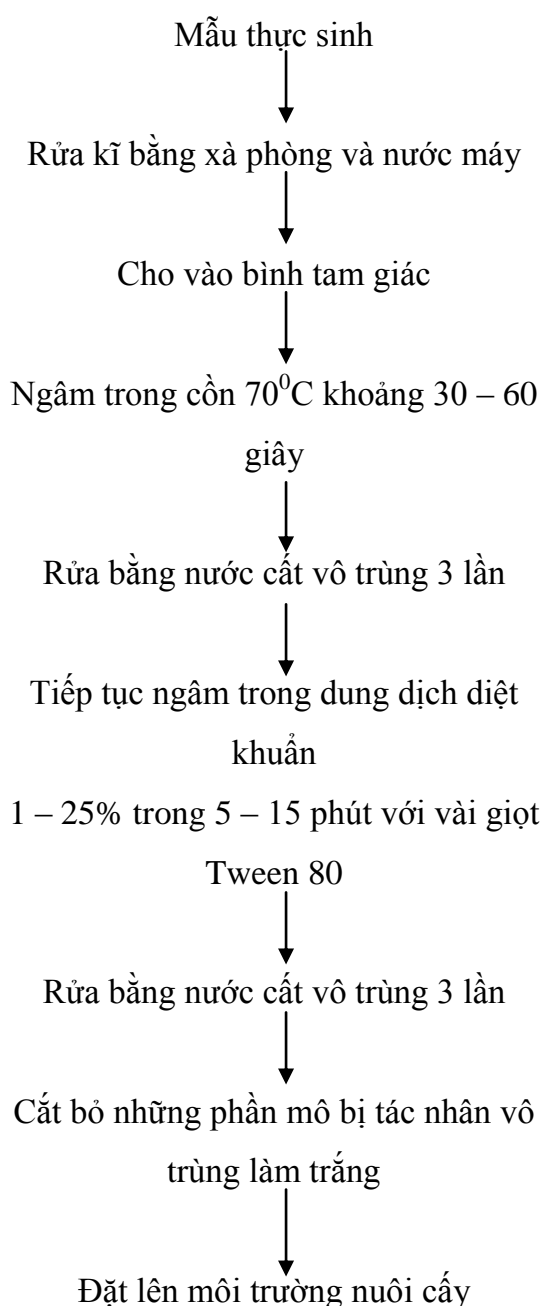
Mô cấy có thể là các bộ phận khác nhau của thực vật, tùy theo sự tiếp xúc với môi trường bên ngoài mà các bộ phận này chứa nhiều hay ít vi khuẩn, nấm. Phương pháp vô trùng mẫu cấy phổ biến hiện nay là dùng các chất hóa học có hoạt tính diệt nấm, khuẩn. Hiệu lực diệt nấm, khuẩn của các chất này phụ thuộc vào thời gian xử lý, nồng độ và khả năng xâm nhập của chúng trên bề mặt mô cấy. Các chất kháng sinh ít được sử dụng vì tác dụng không triệt để và ảnh hưởng xấu lên sự sinh trưởng của mô cấy. Ngoài ra, người ta còn sử dụng các chất làm giảm sức căng bề mặt như: Tween 80, fotoflo, teepol vào dung dịch diệt nấm khuẩn.

Street (1974), đưa ra khái niệm về nồng độ và thời gian sử dụng các chất diệt nấm khuẩn để xử lý mô cấy như sau (Trần Văn Minh, 2005):

Tác nhân vô trùng	Nồng độ %	Thời gian xử lý (phút)	Hiệu quả
Hypochlorite canxi	9 – 10	5 – 30	Rất tốt
Hypochlorite natri	2	5 – 30	Rất tốt
Hydroperoxid (H ₂ O ₂)	10 – 12	5 – 15	Tốt
Nước Brom	1 – 2	2 – 10	Rất tốt
HgCl ₂	0,1 – 1	2 – 10	Trung bình
Chất kháng sinh	4 – 50 mg/l	30 – 60	Khá tốt

Trong quá trình xử lý mô cấy phải ngập hoàn toàn trong dung dịch diệt nấm, khuẩn, với các bộ phận có bám nhiều cát, bụi trước khi xử lý cần rửa sạch bằng xà phòng và nước máy. Sau khi xử lý xong, mô cấy được rửa sạch nhiều lần bằng nước cất vô trùng (tối thiểu 3 lần), loại bỏ những phần bị tác nhân vô trùng trước khi đặt mô cấy lên môi trường nhằm tránh ảnh hưởng trực tiếp của tác nhân vô trùng lên mô cấy (Trần Văn Minh, 2005).

Sơ đồ xử lý mẫu thực sinh:



2.5.3 Điều kiện nuôi cấy

➤ Nhiệt độ:

Nhiệt độ có ảnh hưởng sâu sắc đến sinh trưởng và phát triển cây *in vitro* qua các tiến trình sinh lý như hô hấp, hình thành tế bào và cơ quan, nhiệt độ thích hợp nhất thường được dùng trong nuôi cấy mô tế bào là từ 20 – 27⁰C (Trần Văn Minh, 2005). Còn theo Hughes (1981), nhiệt độ thích hợp trong nuôi cấy mô là 32 – 35⁰C, trong khi những báo cáo khác ghi nhận nhiệt độ thích hợp cho *Streptocapus* là 12⁰C (Appelyren và Heide, 1972), với nhiều loài cây *Begonia* nhiệt độ thích hợp là 15 – 24⁰C (Heide, 1965; Fannesbad, 1974). Tuy nhiên nhiều đề nghị cho rằng nên tránh nhiệt độ cao, bởi vì nhiệt độ cao có thể làm cho chức năng kích thích tạo chồi của Cytokinin giảm. Hầu hết, những thí nghiệm nuôi cấy mô thực vật được thực hiện trong phòng thí nghiệm khống chế nhiệt độ, một vài loài cây như Lily sự hình thành thể giò được thực hiện bằng tăng cường sử dụng chu kỳ nhiệt độ ngày và đêm. Những người trồng cây công nghiệp cũng sử dụng nhiệt độ để duy trì khả năng sinh trưởng khi yêu cầu nhiệt cho cây non còn thấp. Nuôi cấy ở ngăn lạnh làm giảm sinh trưởng và làm giảm giá thành cần thiết do cấy truyền, những cây nuôi cấy này được di chuyển từ ngăn lạnh đến nơi bắt đầu nhân chồi lại khi yêu cầu nhân giống tăng (Hartmann và ctv, 1997).

➤ Ánh sáng:

Ảnh hưởng của ánh sáng có thể được chia ra trong sự tác động của cường độ ánh sáng (bức xạ hoạt động quang hợp), thời gian chiếu sáng (quang chu kỳ) và chất lượng ánh sáng đến sinh trưởng, phát triển của thực vật. Cường độ ánh sáng là nhân tố quan trọng trong quang hợp, ảnh hưởng đến khả năng nuôi cấy *in vitro* ở những cây có diệp lục tố, mức cường độ ánh sáng điển hình cho vi nhân giống là từ 40 – 80 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{giây}$ trong nuôi cấy vượn thân, nhưng cường độ ánh sáng bên trong các bình nuôi cấy có thể thấp hơn nhiều.

Kiểu nút đậy kín có thể làm giảm sự truyền ánh sáng vào trong bình cấy, các loài cây khác nhau thì yêu cầu mức độ ánh sáng khác nhau, biên độ ánh sáng này rất thấp so với bức xạ bên ngoài và trong nhà kính (600 – 1200 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{giây}$). Bức xạ ánh sáng cao hơn trong nuôi cấy dị dưỡng có thể làm mất diệp lục (Chlorophyll) và hoại tử lá (Hartmann và ctv, 1997). Rất nhiều nghiên cứu có hệ thống về tác động của

quang chu kỳ trong sự phát triển mô nuôi cấy, nhưng chiều dài ngày dài hơn từ 12 – 16 giờ thường là thích hợp nhất. Phản ứng quang chu kỳ của hoa có thể được tạo ra trong *in vitro*, chồi cây cảm chương có thể ra hoa bằng cách xử lý 16 giờ chiếu sáng, nhưng các thực vật còn lại chỉ 12 giờ là đã có thể ra hoa (Hartmann và ctv, 1997).

Chất lượng ánh sáng là chức năng của đèn chiếu sáng trong nuôi cấy và kiểu bình cấy được sử dụng. Thông thường trong các phòng nuôi cấy mô sử dụng đèn ánh sáng trắng hoặc ánh sáng trắng pha đỏ, chất lượng ánh sáng bị ảnh hưởng bởi chất lượng đường truyền của bình và kiểu nút đậy. Bình thủy tinh không truyền được ánh sáng có bước sóng ngắn hơn 290 nm, trong khi đó bình polycarbonate không truyền được ánh sáng có bước sóng ngắn hơn 390 nm, mặc dù đây là những số đo khác nhau, nhưng ánh sáng có bước sóng quang trọng nhất cho quang hợp và sự phát sinh quang hình thái là từ 400 – 800 nm. Chất lượng ánh sáng cũng làm thay đổi phản ứng sinh trưởng của chồi *in vitro*. Nuôi cấy cây phong lữ (*Pelargonium*) trong ánh sáng đỏ làm tăng chiều dài chồi hơn so với ánh sáng trắng, trong khi đó ánh sáng xanh làm giảm sự kéo dài chồi, ngược lại khả năng quang hợp cao nhất khi chồi cây Bulo (*Betula*) đặt trong ánh sáng xanh so với ánh sáng trắng hoặc đỏ, ánh sáng xanh cũng kích thích phát sinh diệp lục và gia tăng kích thước lá. Người ta cho rằng chất lượng ánh sáng là quan trọng trong giai đoạn thuần hóa cây non và có thể bị kích thích bởi xử lý ánh sáng xanh trước khi di chuyển cây từ nuôi cấy. Chất lượng ánh sáng cũng có thể tác động gián tiếp lên sự phát triển chồi, là nguyên nhân làm các yếu tố môi trường phát triển trong nuôi cấy thay đổi (Hartmann và ctv, 1997). Nhìn chung ánh sáng kiềm hãm sự phát triển của rễ và có vài chỉ dẫn rằng ngăn không cho ánh sáng từ vùng rễ thì có lợi cho việc hình thành rễ (Hartmann và ctv, 1997).

➤ Không khí:

Các chất khí có tác động lên sự phát triển chồi trong nuôi cấy *in vitro* bao gồm oxy, carbon dioxide và ethylene. Các nhà trồng cây thương mại không nỗ lực làm thay đổi mức không khí trong nuôi cấy, tuy nhiên tất cả sự đóng kín và nắp đậy sử dụng cho nuôi cấy mô là trao đổi khí được ở một vài mức độ khác nhau, thường có sự thúc đẩy tăng trưởng thông qua lỗ thông khí bị đóng kín hoặc cung cấp qua màng lọc trao đổi khí (Hartmann và ctv, 1997).

2.5.4 Môi trường nuôi cấy

Trong tất cả các môi trường nuôi cấy đều bao gồm năm thành phần chính sau đây:

- Các muối khoáng đa lượng
- Các muối khoáng vi lượng
- Các Vitamin
- Đường làm nguồn cacbon
- Các chất điều hòa sinh trưởng

Ngoài ra, người ta còn bổ sung thêm một số chất hữu cơ có thành phần xác định như acid amin, EDTA, hoặc không xác định như nước dừa, dịch chiết nấm men... vào trong môi trường tùy theo nhu cầu riêng của từng đối tượng nuôi cấy.

Trong hàng trăm môi trường do rất nhiều tác giả đề nghị cho nhiều loại cây khác nhau, có thể phân loại ra 3 môi trường:

- Môi trường nghèo chất dinh dưỡng: White, Knop.
- Môi trường có hàm lượng chất dinh dưỡng trung bình: B5, Gamborg.
- Môi trường giàu chất dinh dưỡng: MS (Mura shige – Skoog).

2.5.5 Nước dừa

F Mariat là người đầu tiên công bố sử dụng thành công nước dừa trong gieo hạt hoa Lan *in vitro*. Nước dừa (coconut water) là một dưỡng chất có chứa đầy đủ các ion hữu cơ, các thành phần nitrogen, các amino acid, enzyme, các acid vô cơ, các vitamin, các đường đơn alcohol, các chất điều hoà sinh trưởng và các chất khác. Như vậy, nước dừa là một chất dinh dưỡng cung cấp tất cả các thành phần cần thiết cho nhu cầu sinh trưởng của tế bào nuôi cấy. Trong nuôi cấy mô việc bổ sung nước dừa vào môi trường nuôi cấy sẽ hạn chế bớt (hay không cần) sử dụng chất điều hoà sinh trưởng, hạn chế xảy ra các biến dị bất lợi do quá trình nuôi cấy *in vitro* trong thời gian dài (Trần Văn Minh, 2004).

Cũng có một số tác giả cho rằng bổ sung vào môi trường nuôi cấy 10 – 20 % nước dừa tương đương với tác dụng của việc bổ sung lượng BA 1 – 2 mg/l.

Kết quả phân tích thành phần của nước dừa từ non đến già:

- *Amino acid tự do*: đạt nồng độ từ 190,5 – 685,0 ppm trong nước dừa tính theo tuổi của quả từ non đến già. Khi hấp ở nhiệt độ cao chỉ còn 70 ppm.
- Amino acid dạng liên kết có trong protein và peptid.
- Axit hữu cơ.
- Đường.
- RNA và DNA.
- Ngoài ra nước dừa còn chứa các hợp chất quan trọng đối với tế bào nuôi phân lập như: Myo inositol, các chất có hoạt tính auxin, các cytokinin dạng glucoside (Trần Văn Minh, 2004).

2.5.6 Vai trò của chất kích thích sinh trưởng trong nuôi cấy

Chất điều hoà sinh trưởng là những chất với liều lượng thấp hiệu ứng sinh học cao, được tổng hợp tại một cơ quan và gây ảnh hưởng điều tiết đến các quá trình sinh lý, trao đổi chất nào đó trong những cơ quan khác. Chất điều hoà sinh trưởng là sản phẩm trao đổi chất bình thường của cơ thể thực vật. Nó đóng vai trò chủ đạo trong quá trình sinh trưởng, phát triển và những quá trình sinh lý, hoá sinh khác cũng như trong phản ứng thích nghi của thực vật đối với điều kiện của môi trường (Bùi Trang Việt, 2000).

➤ Auxin:

Auxin hoạt hoá sự phân bào, sinh trưởng kéo dài, cần cho sự tạo mạch dẫn và ra rễ, tăng trưởng của quả, tạo quả không hạt, kích thích sinh trưởng của ống phấn (Bùi Trang Việt, 2000).

Sự vận chuyển auxin có vai trò quan trọng trong sự tăng trưởng và phân hoá, auxin giúp kéo dài và phân chia tế bào, các hiện tượng hướng động, ưu thế ngọn, lão suy, rụng, đậu, tăng trưởng và chín của quả....(Nguyễn Văn Ké, 2000).

Auxin kích thích mạnh sự kéo dài tế bào diệp tiêu. Sự kéo dài của tế bào rễ cần những nồng độ auxin thấp hơn nhiều so với thân và chồi. Hiệu ứng auxin giảm khi nồng độ auxin nhỏ hơn nồng độ tối ưu và trở nên độc ở các nồng độ quá cao.

Tất cả cây trồng đều tổng hợp được chất auxin (dạng tổng hợp) tùy theo giai đoạn phát triển của chúng. Ngay từ khi chất auxin được nhận dạng, có nhiều chất có cấu trúc gần nhau và giống nhau về mặt hoá học đã được thí nghiệm.

Một vài chất này đã thể hiện các đặc tính tương tự như các đặc tính của chất auxin, nhưng thường với các liều lượng thấp hơn, hơn nữa chúng ít bị kiểm soát bởi các enzyme và có thể có một tác động kéo dài trong đó có NAA. Trong lĩnh vực nuôi cấy *in vitro*, những chất này đã chiếm một vị trí quan trọng, hai tính chất được nghiên cứu nhiều là kích thích sự phân chia tế bào và sự hình thành rễ (Trần Văn Minh, 2004).

Auxin chẳng những kích thích sự tăng trưởng của chồi non mà còn khởi phát cho sự tạo mới. Ở nồng độ thấp và thường dùng kết hợp với cytokinin thì auxin khởi phát mô phân sinh ngọn, vượt quá nồng độ giới hạn thì auxin ngăn cản sự phát triển của lá mới hay của mô phân sinh bên (Bùi Trang Việt, 2000).

➤ **Cytokinin:**

Các cytokinin kích thích mạnh sự phân chia tế bào với điều kiện có sự hiện diện của auxin. Cytokinin cũng giúp sự gia tăng kích thước tế bào và sinh tổng hợp protein. Cytokinin ngăn cản sự lão hoá mô, thúc đẩy sự hình thành chồi non nhưng lại ức chế sự tạo rễ (Dương Công Kiên, 2002).

Sự sinh trưởng tổng hợp Cytokinin ở trong cây xảy ra ở những vùng rất khác nhau, đặc biệt là ở những nơi có sự phân chia tế bào mạnh (ở ngọn thân hay rễ). Nó hiện diện hầu hết trong các mô, đặc biệt trong hạt, trái và trong rễ. Tuy nhiên, rễ là nơi tổng hợp nhiều nhất. Vì vậy khi rễ bị tổn thương thì thấy sự phát triển yếu do không tạo đủ cytokinin. Nó hoạt hoá sự phân bào, song tác động này chỉ thể hiện trong sự phối hợp với auxin (Trần Văn Minh, 2004). Trong nuôi cấy mô, cytokinin thể hiện các tính chất cho phép chúng ta giải quyết những khó khăn trong việc duy trì sự sống của mô, kích thích sự phân chia tế bào và định hướng tế bào trong con đường phân hoá (Trần Văn Minh, 2004).

➤ **Gibberellin:**

Hiệu ứng chính của các gibberellin là kéo dài thân, kích thích sự kéo dài lóng. Gibberellin kích thích mạnh sự phân chia tế bào mô vỏ và biểu bì.

Kích thích sự kéo dài lóng, vừa do sự kéo dài vừa do sự phân chia tế bào thân, là đặc tính nổi bật của gibberellin. Xử lý gibberellin làm tăng năng suất mía cây và đường (do kích thích sự kéo dài lóng). Gibberellin liều cao (hay phối hợp với cytokinin) kích thích mạnh sự tăng trưởng lá. Trên lá yếm mạch hay diệp tiêu lúa, gibberellin chỉ có vai trò làm tăng hiệu ứng auxin (Bùi Trang Việt, 2000).

2.5.7 Ảnh hưởng của than hoạt tính

Nồng độ sử dụng thường là từ 0,2 – 3%. Than hoạt tính có những tác dụng sau:

- Hấp thụ độc tố nâu/đen (hợp chất phenol và melanin) và các độc tố không màu khác.
- Hấp thụ các hợp chất hữu cơ khác (auxin, cytokinin, ethylene, vitamin, chelate Fe và Zn...).
- Thúc đẩy sự tạo phôi soma.
- Ổn định độ pH.

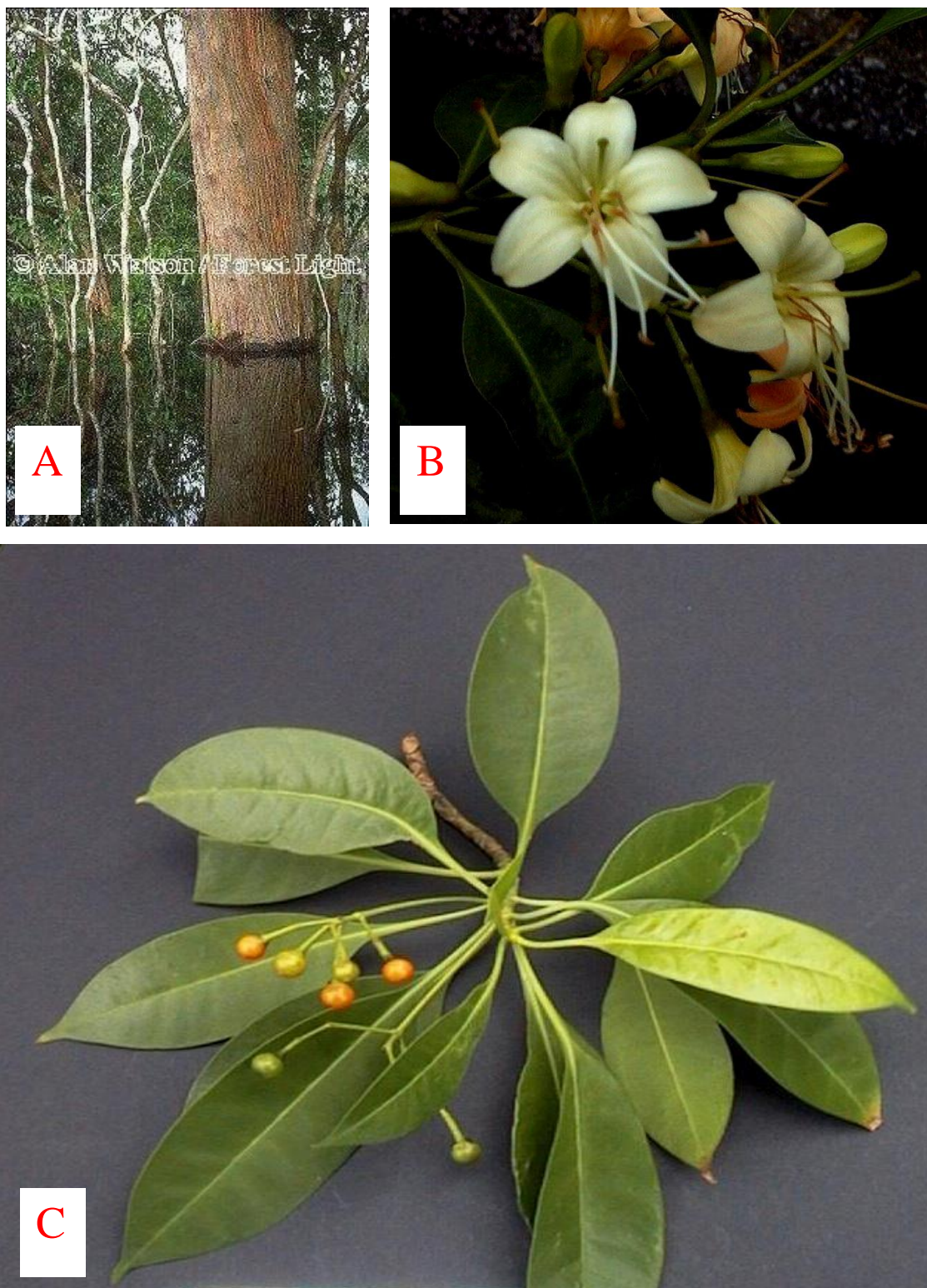
2.5.8 Ảnh hưởng của pH và Agar

pH của môi trường nuôi cấy thường ở khoảng 5,8 – 6 thì tốt trong nuôi cấy mô. Nếu pH môi trường thấp hơn 4,5 hoặc cao hơn 7 đều ức chế sự phát triển của mô (Nguyễn Văn Uyển, 1993 và Bùi Bá Bổng, 1995).

Agar xuất phát từ rong biển, được sử dụng như là chất keo trong hầu hết môi trường dinh dưỡng. Agar là polysaccharide, trọng lượng phân tử cao có khả năng làm đông môi trường. Agar hoà tan hình thành chất keo kết dính với nước và hấp thụ hoá chất. Nồng độ agar thường sử dụng trong nuôi cấy mô là 0,6 – 0,8 %.

Trong những năm gần đây sử dụng môi trường hai pha (pha rắn và pha lỏng) trở nên khá phổ biến vì tốc độ nhân giống cao và giảm hiện tượng thủy tinh thể. Đầu tiên mẫu cấy được đặt trên môi trường rắn, sau đó thêm vào một lớp môi trường lỏng. Một phần mẫu cấy ở trong môi trường lỏng, một phần ở trong môi trường rắn, một phần ở trong không khí.

Nếu nuôi cấy trong môi trường lỏng cần phải cung cấp oxy tạo sự thoáng khí bằng cách sử dụng máy lắc. Tế bào, mô nuôi cấy có thể bị tổn thương nhưng thường sinh trưởng và phát triển tốt vì mẫu cấy hấp thu dinh dưỡng dễ dàng trên toàn bộ mẫu cấy.



Hình 2.1: Thân cây Trai trưởng thành (A). Hoa (B), cành mang quả cây Trai (C).

Phần 3. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

3.1 VẬT LIỆU

❖ Mẫu nuôi cấy

Sử dụng cành non khoảng 30 – 45 ngày tuổi dài khoảng 5 – 7 cm, rửa sạch nhiều lần dưới vòi nước máy, sau đó rửa trong dung dịch nước xà phòng 0,1 % trong 15 phút và được rửa lại bằng nước máy bình thường.

Sau đó mẫu này được ngâm trong dung dịch cồn 70⁰ trong 30 – 60 giây. Rửa sạch bằng nước cất vô trùng 3 lần trước khi ngâm trong dung dịch diệt khuẩn với vài giọt Tween 80. Những phần mô bị tẩy trắng bởi tác nhân diệt khuẩn được cắt bỏ. Cuối cùng mẫu được cắt thành những đoạn dài 1 – 2 cm đặt trong môi trường nuôi cấy ống nghiệm.

❖ Dụng cụ nuôi cấy

Tủ cấy vô trùng, nồi hấp vô trùng, ống nghiệm 25 x 100 mm, bình tam giác dung tích 300ml, được đậy kín bằng nắp cao su hoặc bông gòn, đĩa nhôm đường kính 20 cm, cốc, ống đong, pipet, cân điện tử,....

❖ Môi trường nuôi cấy

MS (Murashige – Skoog, 1962), WPM (Lloyd – Mc Cown, 1980), được bổ sung đường, agar và các chất điều hòa sinh trưởng như BA (6 – amino purine), IBA (Indol butyric acid), NAA(α - naphthalene acetid acid), nước dừa (CW – coconut water) tùy theo yêu cầu của từng thí nghiệm.

❖ Thẻ tích môi trường nuôi cấy

Ban đầu cấy trong ống nghiệm chứa 10 ml môi trường vô trùng, sau 7 – 10 ngày mẫu nuôi cấy được chuyển sang bình tam giác 300 ml có chứa 65 ml môi trường.

❖ Điều kiện nuôi cấy

Môi trường và dụng cụ nuôi cấy được hấp vô trùng bằng nồi hấp vô trùng ở nhiệt độ 121⁰C và áp suất 1 atm trong 23 phút.

Cường độ chiếu sáng: 3000 lux.

Thời gian chiếu sáng: 8 giờ/ngày.

Nhiệt độ phòng: 26 – 30⁰C.

Độ ẩm: 60 – 80%.

3.2 BỐ TRÍ THÍ NGHIỆM

Vi nhân giống cây Trai Nam Bộ *in vitro* theo hướng tạo cụm chồi có sử dụng cytokinin với mẫu là chồi ngọn hay chồi bên có chứa nhiều mô phân sinh. Sau đó cấy chuyển sang môi trường không có cytokinin thì chồi phát triển vươn dài.

Các thí nghiệm được bố trí theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên một yếu tố (Completely randomized design, CRD), 3 lần lặp lại, mỗi nghiệm thức ở từng lần lặp lại cấy ba bình tam giác thể tích 300 ml có chứa 65 ml môi trường nuôi cấy, mỗi bình cấy ba mẫu. Đối với môi trường ống nghiệm thì thể tích sử dụng khoảng 10 ml.

Khi xử lý thống kê số liệu của các chỉ tiêu sinh trưởng là sử dụng các trị trung bình của từng lần lặp lại. Các số liệu được thu thập và xử lý bằng phần mềm Excel, Mstat-C.

Phân tích ANOVA, sau đó kiểm tra trắc nghiệm phân hạng bằng trắc nghiệm LSD hoặc trắc nghiệm Duncan's cho từng chỉ tiêu của thí nghiệm, với mức xác suất có ý nghĩa $P = 0,05$. Các số liệu trong bảng là các trị trung bình của ba lần lặp lại sau khi xử lý thống kê có được.

Các chỉ tiêu theo dõi:

- ❖ Số lá/mẫu: đơn vị là lá.
- ❖ Hiện tượng phù gôc/gôc bình thường: +/-.
- ❖ Số chồi/cụm: đo số chồi phát sinh, thao tác được thực hiện trong tủ vô trùng, đơn vị là số lượng.
- ❖ Tỷ lệ mẫu sống vô trùng (%).
- ❖ Chiều cao chồi: đo chiều cao thân chồi của chồi có chiều cao thân cao nhất, thao tác được thực hiện trong tủ cấy vô trùng, đơn vị tính là mm.
- ❖ Sự phát triển lá (+/-) được đánh giá bằng mắt.

3.2.1 Thí Nghiệm 1: Vô trùng mô cấy ban đầu từ cây Trai thực sinh

Mẫu cấy sau khi được khử trùng trong tủ cấy sẽ được cắt theo từng đốt đều nhau dài khoảng 0,5 – 1 cm, loại bỏ những phần bị ngấm chất khử trùng rồi cấy vào các ống nghiệm có chứa 10 ml môi trường làm việc, mỗi lần cấy 30 ống nghiệm, mỗi ống nghiệm chứa 1 mẫu thực sinh.

Thời gian nuôi cấy: 7 – 10 ngày.

Môi trường vô mẫu: MS.

Hóa chất được sử dụng là Natri hypochlorit (10 – 30 %) và HgCl_2 (0,05 %).

Bảng 3.1a: Ảnh hưởng của nồng độ Natri hypochlorite và thời gian xử lý vô trùng mẫu

NT	Nồng độ Na – Hypo (%)	Thời gian (phút)
1	10	15
2	10	20
3	10	30
4	20	15
5	20	20
6	20	30
7	25	15
8	25	20
9	25	30
10	30	15
11	30	20
12	30	30

Bảng 3.1b: Ảnh hưởng của nồng độ Natri hypochlorit, HgCl₂ và thời gian xử lý vô trùng mẫu

NT	Nồng độ Natri hypochlorit (%)	Thời gian (phút)	Nồng độ HgCl ₂ (%)	Thời gian (phút)
1	10	15	0,05	10
2	10	20	0,05	10
3	10	30	0,05	10
4	20	15	0,05	12
5	20	20	0,05	12
6	20	30	0,05	12
7	25	15	0,05	15
8	25	20	0,05	15
9	25	30	0,05	15
10	30	15	0,05	15
11	30	20	0,05	15
12	30	30	0,05	15

Chỉ tiêu theo dõi:

$$\text{Tỷ lệ mẫu sống vô trùng (\%)} = \frac{\text{Số mẫu sống không bị nhiễm khuẩn, nấm}}{\text{Tổng số mẫu cấy}} \times 100$$

3.2.2 Thí Nghiệm 2: Khảo sát khả năng phát sinh chồi cây Trai *in vitro* trên các môi trường khoáng cơ bản có bổ sung BA (0,1 mg/l).

Thí nghiệm gồm 2 nghiệm thức được bố trí theo kiểu CRD (hoàn toàn ngẫu nhiên) đơn yếu tố, mỗi nghiệm thức có 3 lần lặp lại, mỗi nghiệm thức cấy 3 bình tam giác có chứa 65 ml môi trường nuôi cấy. Mỗi bình cấy 3 mẫu.

Mục đích của thí nghiệm là khảo sát sự phát sinh chồi của cây Trai *in vitro* trên các môi trường khoáng cơ bản.

Bảng 3.2: Khả năng phát sinh chồi cây Trai *in vitro* trên các môi trường khoáng cơ bản có bổ sung BA (0,1 mg/l)

NT	Môi trường	Nồng độ BA (mg/l)
1	MS	0,1
2	WPM	0,1

Thời gian lấy số liệu: 1 tháng

3.2.3 Thí nghiệm 3: Ảnh hưởng của nồng độ BA đến quá trình nuôi cấy tạo cụm chồi cây Trai *in vitro*.

Môi trường khoáng cơ bản nuôi cấy là WPM và bổ sung BA nồng độ thay đổi từ 0 – 1 mg/l. Thí nghiệm gồm có 5 nghiệm thức được bố trí theo kiểu CRD đơn yếu tố, mỗi nghiệm thức có 3 lần lặp lại, mỗi nghiệm thức cấy 3 bình tam giác có chứa 65 ml môi trường nuôi cấy. Mỗi bình cấy 3 mẫu. Thời gian lấy số liệu 1 tháng.

Mục tiêu của thí nghiệm này là xác định nồng độ BA nào thích hợp cho nuôi cấy tạo cụm chồi cây Trai *in vitro*. Dựa vào tài liệu tham khảo và quá trình thí nghiệm thăm dò nồng độ BA được chia theo các mức sau:

Bảng 3.3: Ảnh hưởng của nồng độ BA đến khả năng tạo cụm chồi cây Trai *in vitro*

Nghiệm thức	Môi trường	BA
1	WPM	0
2	WPM	0,1
3	WPM	0,3
4	WPM	0,5
5	WPM	1

3.2.4 Thí Nghiệm 4: Khảo sát sự ảnh hưởng của BA trong nhân cụm chồi cây Trai *in vitro*.

Mục đích của thí nghiệm là khảo sát sự ảnh hưởng của BA ở những nồng độ khác nhau lên mẫu nuôi cấy (0 mg/l; 0,01 mg/l; 0,03 mg/l; 0,05 mg/l 0,1 mg/l; 0,5 mg/l). Và kết luận ở nồng độ nào của BA thì hiệu quả nhân cụm chồi cao nhất và chồi phát triển nhiều nhất.

Thí nghiệm này có 6 nghiệm thức bố trí theo kiểu CRD (hoàn toàn ngẫu nhiên), đơn yếu tố. Mỗi nghiệm thức lặp lại ba lần và mỗi nghiệm thức cấy vào ba bình tam giác 300 ml chứa 65 ml môi trường WPM. Trong mỗi bình tam giác cấy ba mẫu.

Bảng 3.4: Ảnh hưởng của BA trong nhân cụm chồi cây Trai *in vitro*

NT	Môi Trường	Nồng độ BA (mg/l)
1	WPM	-
2	WPM	0,01
3	WPM	0,03
4	WPM	0,05
5	WPM	0,1
6	WPM	0,5

- Chỉ tiêu khảo sát:

+ Số chồi/cụm.

+ Chiều cao chồi.

- Thời gian theo dõi lấy số liệu: 1 tháng

3.2.5 Thí Nghiệm 5: Khảo sát quá trình tái sinh cụm chồi cây Trai *in vitro*.

Thí nghiệm có 2 nghiệm thức bố trí theo kiểu CRD với ba lần lặp lại. Mỗi lần lặp lại cấy vào ba bình tam giác chứa 65 ml môi trường nuôi cấy. Mỗi bình cấy ba cụm chồi.

Mục đích thí nghiệm là xác định được môi trường khoáng cơ bản nào thích hợp cho tái sinh cụm chồi ở thí nghiệm 4.

Bảng 3.5: Tái sinh cụm chồi cây Trai *in vitro*

NT	Môi trường nuôi cấy
1	MS
2	WPM

Chỉ tiêu theo dõi:

- Số chồi/cụm.

- Chiều cao chồi.

- Sự phát triển lá (+/-).

Thời gian lấy số liệu: 1 tháng

3.2.6 Thí Nghiệm 6: Ảnh hưởng của nước dừa (Cw) trong nhân giống cây Trai *in vitro*.

Thí nghiệm có 3 nghiệm thức được bố trí theo kiểu CRD (hoàn toàn ngẫu nhiên). Mỗi nghiệm thức lặp lại 3 lần và mỗi lần lặp lại được cấy vào 3 bình tam giác 300 ml chứa 65 ml môi trường WPM có bổ sung BA ở nồng độ 0,1 mg/l. Mỗi bình cấy ba mẫu.

Bảng 3.6: Ảnh hưởng của nước dừa (Cw) đến nhân nhanh cây Trai *in vitro*

NT	Môi Trường	Nồng độ BA (mg/l)	Cw (%)
1	WPM	0,1	0
2	WPM	0,1	5
3	WPM	0,1	10

- Chỉ tiêu khảo sát:

+Số chồi/cụm.

+Số lá/mẫu.

+Chiều cao chồi (mm).

- Thời gian theo dõi lấy số liệu: 1 tháng.

3.2.7 Thí Nghiệm 7: Nuôi cấy tạo rễ cây trai *in vitro*.

Mục đích của thí nghiệm này là tạo ra được cây Trai *in vitro* với đầy đủ thân, lá, và rễ để đưa ra vườn ươm. Ngoài ra, nhiều tác giả còn cho rằng sự tạo rễ chịu ảnh hưởng auxin, chất lượng chồi, tuổi sinh lý, từng giống cây và nhiệt độ. Để tạo rễ cây được cấy vào môi trường nuôi cấy có bổ sung auxin như IBA, NAA hay cả hai với nồng độ 0,1 – 5 mg/l (IBA) và 0,1 – 5 mg/l (NAA).

Thí nghiệm này có 4 nghiệm thức được bố trí theo kiểu CRD (hoàn toàn ngẫu nhiên). Mỗi nghiệm thức lặp lại cấy vào bình tam giác 300 ml chứa 65ml môi trường WPM bổ sung IBA ở những nồng độ khác nhau.

Bảng 3.7: Nuôi cấy tạo rễ cây Trai *in vitro*

NT	Môi trường	IAA (mg/l)	IBA (mg/l)
1	MS	2	1
2	WPM	-	0,1
3	WPM	-	0,3
4	WPM	-	0,5

Thời gian theo dõi lấy số liệu: 1 tháng

3.3 ĐỊA ĐIỂM VÀ THỜI GIAN NGHIÊN CỨU

- Đề tài được thực hiện tại Phòng thí nghiệm Công Nghệ Sinh Học Cây Ăn Trái, Viện Sinh Học Nhiệt Đới thuộc Viện Khoa Học và Công Nghệ Việt Nam tại TP.HCM.
- Thời gian thực hiện từ tháng 2 đến tháng 8 năm 2006.

Phần 4. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

4.1 Thí Nghiệm 1: Vô trùng mô cấy ban đầu từ cây Trai thực sinh

Môi trường nuôi cấy mô thực vật có chứa đường, muối khoáng và vitamin, thích hợp cho các loài nấm, vi khuẩn phát triển. Do tốc độ phân chia tế bào của nấm và vi khuẩn lớn hơn rất nhiều so với tế bào thực vật. Nếu môi trường nuôi cấy bị nhiễm vài bào tử nấm hoặc vi khuẩn thì sau vài ngày đến một tuần toàn bộ bề mặt môi trường nuôi cấy và mẫu cấy sẽ phủ đầy nấm, khuẩn. Thí nghiệm phải loại bỏ vì trong điều kiện này mô cấy không thể phát triển và chết dần. Khác với thí nghiệm vi sinh có thể kết thúc trong vài ngày, mức độ vô trùng trong thí nghiệm nuôi cấy mô thực vật đòi hỏi rất cao mới có hi vọng thành công.

Đây là bước quan trọng trong nuôi cấy mô cây Trai Nam Bộ. Mục tiêu đạt được của thí nghiệm này là xác định nồng độ của hóa chất diệt khuẩn (Natri hypochlorit và HgCl_2) và thời gian vô trùng mẫu mô ban đầu để tạo ra nguồn nguyên liệu cho các thí nghiệm sau.

Kết quả thí nghiệm cho thấy:

Từ nghiệm thức 1 đến nghiệm thức 9, tỷ lệ mẫu sống vô trùng tăng theo tỉ lệ thuận với nồng độ Natri hypochlorit (10 – 25 %) trong thời gian từ 15 – 30 phút.

Từ nghiệm thức thứ 10 trở đi thì tỷ lệ mẫu sống vô trùng giảm theo tỷ lệ nghịch với nồng độ Natri hypochlorit (30 %) và thời gian ngâm trong dung dịch Natri hypochlorit tăng từ 15 – 30 phút. Vì nồng độ sử dụng Natri hypochlorit quá cao làm cho mẫu bị ngộ độc chất khử trùng..

Trong bảng 4.1a , ở nồng độ Natri hypochlorite là 10 % ngâm trong thời gian 15 phút cho tỷ lệ mẫu sống vô trùng thấp nhất (1,1 %) và ở nồng độ 25 % ngâm trong 30 phút cho tỷ lệ mẫu sống vô trùng cao nhất (4,4 %). Do đó, ngoài việc sử dụng Natri hypochlorit để diệt nấm thì cần kết hợp thêm với một dung dịch diệt khuẩn khác như HgCl_2 ... để tăng thêm tỷ lệ mẫu sống vô trùng trong quá trình vô mẫu.

Như vậy, việc sử dụng riêng rẽ dung dịch Natri hypochlorite để vô trùng mẫu Trai thực sinh chưa đạt hiệu quả cao.

Trong bảng 4.1b, chúng ta thấy khi sử dụng kết hợp giữa Natri hypochlorit và HgCl_2 thì tỷ lệ mẫu sống vô trùng tăng lên theo tỷ lệ thuận với nồng độ Natri Hypochlorite sử dụng (10 – 25 %) trong thời gian từ 10 – 30 phút. Tỷ lệ mẫu sống vô trùng tăng lên là do dung dịch Natri hypochlorite có khả năng diệt nấm tốt đồng thời dung dịch HgCl_2 lại có khả năng diệt khuẩn khá tốt. Đây là hai yếu tố quyết định sự thành công trong quá trình vô trùng mẫu.

Việc kết hợp sử dụng dung dịch Natri hypochlorite kết hợp với dung dịch HgCl_2 làm cho tỷ lệ mẫu sống vô trùng cao hơn so với khi chỉ sử dụng riêng rẽ dung dịch Natri hypochlorit trong vô trùng mẫu mô ban đầu từ cây Trai thực sinh (6,2 % so với 4,4 %).

Trong trường hợp này, nghiệm thức thứ 9 cho tỷ lệ mẫu sống vô trùng cao nhất (6,2 %). Nghĩa là nồng độ Natri hypochlorit sử dụng là 25 % ngâm trong thời gian 30 phút, sau đó ngâm trong dung dịch HgCl_2 0,05 % trong 15 phút. Nghiệm thức thứ 1 cho tỷ lệ mẫu sống vô trùng thấp nhất (2,5 %). Nồng độ Natri hypochlorit sử dụng ở nghiệm thức này là 10 % ngâm trong 15 phút và kết hợp ngâm với dung dịch HgCl_2 0,05 % trong 10 phút.

Từ nghiệm thức thứ 10 trở đi thì tỷ lệ mẫu sống vô trùng giảm vì nồng độ sử dụng Natri hypochlorit quá cao (30 %) làm cho mẫu mô bị ngộ độc chất khử trùng và chết. Đồng thời chúng ta cũng biết rằng HgCl_2 là chất khử trùng khá độc cho mẫu cấy, cho người sử dụng và cho cả môi trường sống. Do đó, chúng ta nên hạn chế sử dụng chất này nhiều và nên sử dụng khi thật sự cần thiết.

Như vậy, để vô trùng mẫu Trai thực sinh tốt nhất chúng ta dùng dung dịch Natri hypochlorit nồng độ 25 % ngâm trong 20 – 30 phút kết hợp với ngâm trong dung dịch HgCl_2 nồng độ 0,05 % trong thời gian 15 phút. Đây là phương pháp có hiệu quả tốt nhất để vô trùng mẫu Trai thực sinh.

Bảng 4.1a: Ảnh hưởng của nồng độ Natri hypochlorit và thời gian xử lý vô trùng mẫu

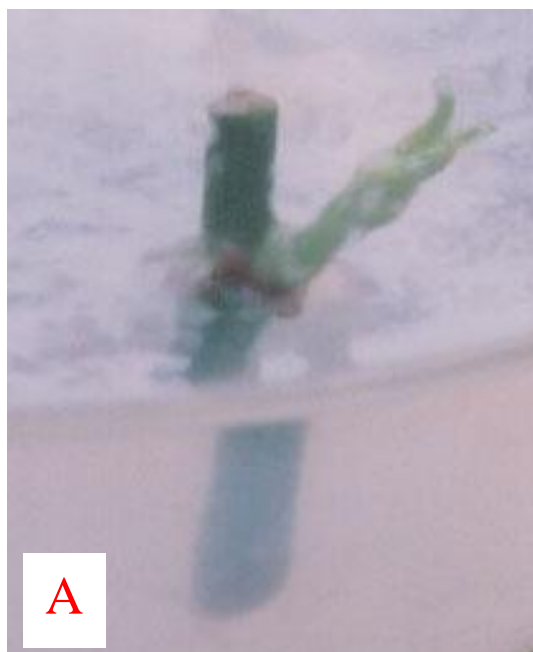
NT	Nồng độ Na – Hypo (%)	Thời gian (phút)	Tỷ lệ mẫu sống vô trùng (%)
1	10	15	1,1 ^H
2	10	20	1,5 ^G
3	10	30	2,2 ^F
4	20	15	2,4 ^F
5	20	20	3,4 ^D
6	20	30	3,7 ^C
7	25	15	4,1 ^B
8	25	20	4,1 ^B
9	25	30	4,4^A
10	30	15	3,7 ^C
11	30	20	3,3 ^D
12	30	30	2,8 ^E
	CV (%)		4,0
	LSD _{0,05}		0,206

Trong cùng một cột, các giá trị trung bình theo sau bởi các chữ cái không cùng kí tự thì có sự khác biệt rất có ý nghĩa về mặt thống kê với mức xác suất $P = 0,05$.

Bảng 4.1b: Ảnh hưởng của nồng độ Natri hypochlorit, HgCl₂ và thời gian xử lý vô trùng mẫu.

NT	Nồng độ Natri hypochlorit (%)	Thời gian (phút)	Nồng độ HgCl ₂ (%)	Thời gian (phút)	Tỷ lệ mẫu sống vô trùng (%)
1	10	15	0,05	10	2,5 ^H
2	10	20	0,05	10	3,4 ^G
3	10	30	0,05	10	3,8 ^F
4	20	15	0,05	12	4,3 ^E
5	20	20	0,05	12	4,9 ^C
6	20	30	0,05	12	5,5 ^B
7	25	15	0,05	15	5,7 ^B
8	25	20	0,05	15	6,0^A
9	25	30	0,05	15	6,2^A
10	30	15	0,05	15	4,9 ^C
11	30	20	0,05	15	4,6 ^D
12	30	30	0,05	15	3,4 ^G
CV (%)					3,01
LSD _{0,05}					0,232

Trong cùng một cột, các giá trị trung bình theo sau bởi các chữ cái không cùng kí tự thì có sự khác biệt rất có ý nghĩa về mặt thống kê với mức xác suất $P = 0,05$.



Hình 4.1: Mẫu thực sinh cây Trai được vô trùng phát sinh chồi (A), (B) từ đốt thân; (C), (D) từ đốt ngọn.

Thí nghiệm 2: Khảo sát khả năng phát sinh chồi cây Trai *in vitro* trên các môi trường khoáng cơ bản có bổ sung BA (0,1 mg/l).

Mục đích của thí nghiệm là khảo sát sự phát sinh chồi của cây Trai trên các môi trường khoáng cơ bản. Tuy nhiên, tài liệu công bố về nuôi cấy mô cây Trai không nhiều, ít công bố. Do đó thí nghiệm được thực hiện mang tính chất thăm dò. Mặt khác đa số cây rừng thì khả năng phát sinh chồi trên môi trường khoáng cơ bản gặp khó khăn. Đó là lý do tại sao phải bổ sung thêm vào môi trường nuôi cấy BA nồng độ 0,1 mg/l. Khả năng phát sinh chồi của cây Trai sẽ có hiệu quả hơn dưới tác dụng của BA vì mẫu nuôi cấy là chồi đỉnh *in vitro* chứa nhiều nhu mô phân sinh có khả năng tạo chồi cao. Đây là bước quan trọng tạo nguồn nguyên liệu cho các nghiên cứu tiếp theo.

Kết quả thực nghiệm (Bảng 4.2) cho thấy:

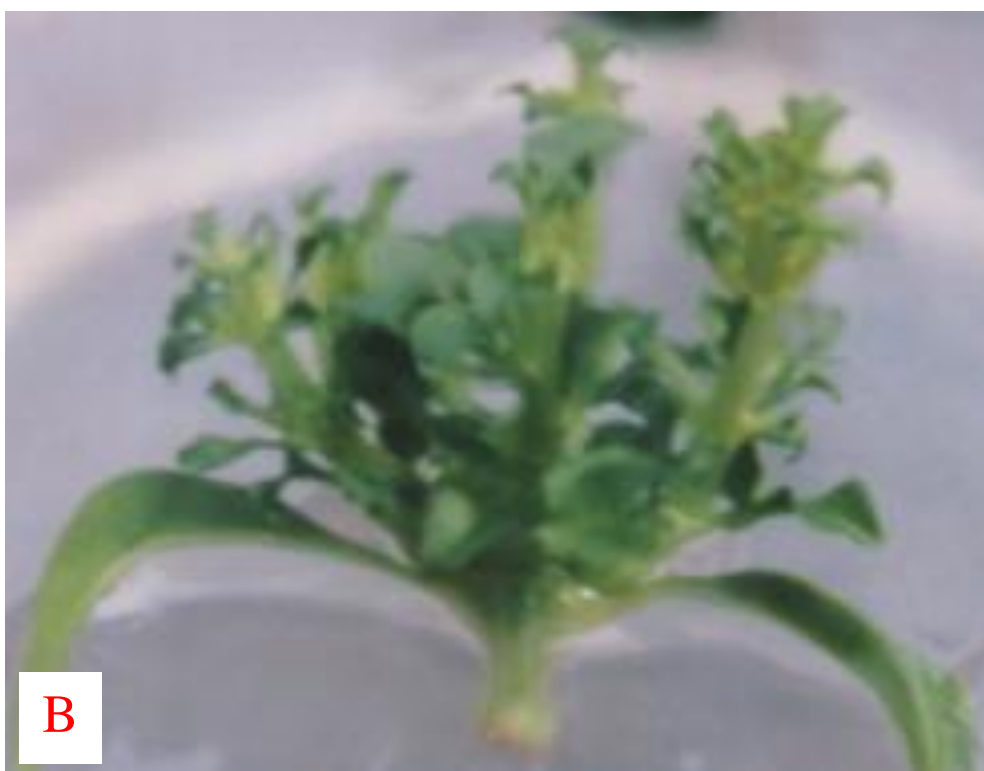
Môi trường MS bổ sung BA (0,1 mg/l) kích thích phát sinh chồi/cụm là 8,6 chồi. Trong khi đó môi trường WPM bổ sung BA (0,1 mg/l) cho phát sinh chồi là 15,4 chồi. Cả hai nghiệm thức đều có dấu hiệu phù gốc là do mẫu cấy có sự nhạy cảm dưới tác dụng của BA.

Như vậy, môi trường WPM bổ sung BA (0,1 mg/l) cho phát sinh chồi cao, thích hợp cho tạo cụm chồi cây Trai *in vitro*. BA đóng vai trò quan trọng trong phát sinh cụm chồi. Và cụm chồi được sử dụng là nguồn nguyên liệu trong thí nghiệm tiếp sau.

Bảng 4.2: Khả năng phát sinh chồi cây Trai *in vitro* trên các môi trường khoáng cơ bản có bổ sung BA (0,1 mg/l).

NT	Môi trường	Nồng độ BA (mg/l)	Số chồi/cụm	Phù gốc
1	MS	0,1	8,6	+
2	WPM	0,1	15,4	+
	CV (%)		0,83	

Kết quả này có sự khác biệt rất có ý nghĩa về mặt thống kê học với mức xác suất $P = 0,05$.



Hình 4.2: Khả năng phát sinh chồi cây Trai *in vitro* từ nuôi cấy chồi đỉnh trên môi trường MS (A), và WPM (B) có bổ sung BA (0,1 mg/l).

4.2 Thí nghiệm 3: Ảnh hưởng của BA đến quá trình nuôi cấy tạo cụm chồi cây Trai *in vitro*.

Sử dụng kết quả từ các thí nghiệm trước, thí nghiệm này được nuôi cấy trên môi trường khoáng cơ bản WPM bổ sung BA nồng độ 0 – 1 mg/l.

Kết quả thí nghiệm được thể hiện ở bảng 4.3 cho thấy: Tất cả các nghiệm thức thí nghiệm đều phát sinh cụm chồi. Đồng thời giữa các nghiệm thức thí nghiệm khả năng phát sinh cụm chồi có sự khác biệt rất có ý nghĩa về mặt thống kê học ở mức xác suất 0,05.

Nồng độ BA càng tăng lên thì khả năng tạo cụm chồi cũng tăng theo. Khi nồng độ BA đạt 1 mg/l thì các chồi mới hình thành có dạng li ti rất nhiều, rất nhỏ và chiều cao thấp.

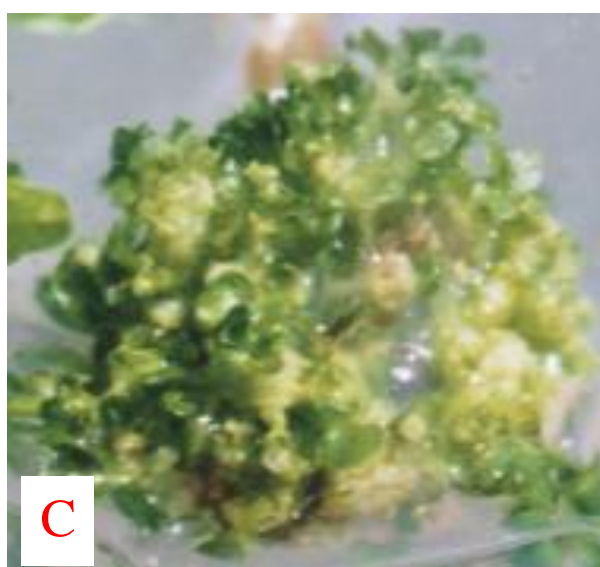
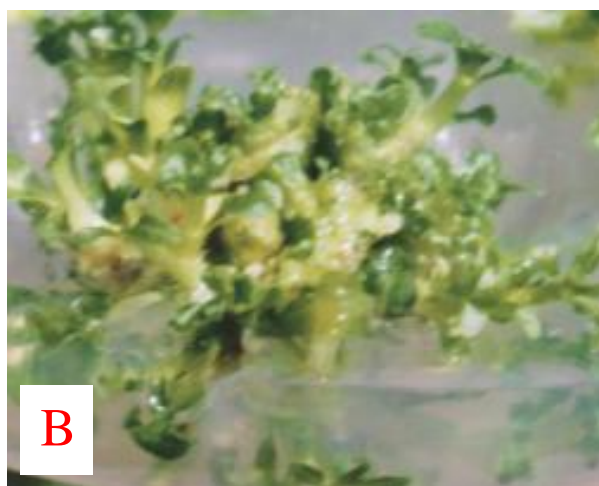
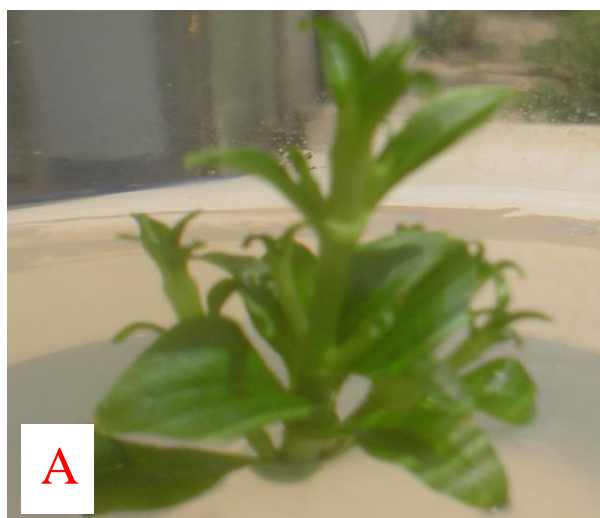
Mẫu này được sử dụng cho thí nghiệm nhân cụm chồi trong thí nghiệm tiếp theo.

Kết quả thí nghiệm này cho thấy nồng độ BA tối ưu cho tạo cụm chồi là 1 mg/l. Như vậy, để nhân giống cây Trai *in vitro* nên nhân nhanh bằng phương pháp cụm chồi.

Bảng 4.3: Ảnh hưởng của BA đến quá trình nuôi cấy tạo cụm chồi cây Trai *in vitro*

Nghiệm thức	Môi trường	BA	Số chồi/cụm	Chiều cao chồi
1	WPM	0	3,1 ^E	20,5 ^A
2	WPM	0,1	15,8 ^D	14,5 ^B
3	WPM	0,3	17,5 ^C	12,6 ^C
4	WPM	0,5	19,5 ^B	11,5 ^D
5	WPM	1	30,2^A	10,2^E
	CV (%)		0,58	0,72

Trong cùng một cột, các giá trị trung bình theo sau bởi các chữ cái không cùng kí tự thì có sự khác biệt rất có ý nghĩa về mặt thống kê với mức suất $p = 0,05$ bởi trắc nghiệm LSD.



Hình 4.3: Ảnh hưởng của BA đến quá trình nuôi cấy tạo cụm chồi cây Trai *in vitro*. Cụm chồi trên môi trường có nồng độ BA 0,1 mg/l (A); nồng độ 0,5 mg/l (B); nồng độ 1 mg/l (C).

4.3 Thí nghiệm 4: Khảo sát sự ảnh hưởng của BA trong nhân cụm chồi cây Trai *in vitro*.

Kết quả thực nghiệm (Bảng 4.4) cho thấy nồng độ BA càng cao cho số chồi phát sinh càng tăng và chiều cao thân chồi giảm dần ở các nghiệm thức. Ở nghiệm thức thứ 6 nồng độ BA là 0,5 mg/l cho số chồi phát sinh là 20,5 chồi cao nhất so với các nghiệm thức còn lại nhưng chiều cao thì thấp nhất (10,9 mm). Như vậy, BA ảnh hưởng mạnh đến khả năng nhân cụm chồi của cây Trai *in vitro*.

Bảng 4.4: Ảnh hưởng của BA trong nhân cụm chồi cây Trai *in vitro*.

NT	Môi Trường	Nồng độ BA (mg/l)	Số chồi/cụm	Chiều cao chồi (mm)
1	WPM	-	3,4 ^F	21,5 ^A
2	WPM	0,01	11,3 ^E	16,7 ^B
3	WPM	0,03	12,6 ^D	15,1 ^C
4	WPM	0,05	14,3 ^C	13,7 ^D
5	WPM	0,1	16,4 ^B	12,7 ^E
6	WPM	0,5	20,5^A	10,9^F
		Cv (%)	0,76	0,66

Trong cùng một cột, các giá trị trung bình theo sau bởi các chữ cái không cùng kí tự thì có sự khác biệt rất có ý nghĩa về mặt thống kê với mức suất $p = 0,05$ bởi trắc nghiệm LSD.



Hình 4.4: Nhân cụm chồi cây Trai *in vitro* trên môi trường có bổ sung BA. (A) nồng độ 0,01 mg/l; (B) nồng độ 0,1 mg/l ; (C) nồng độ 0,5 mg/l.

4.4 Thí nghiệm 5: Khảo sát quá trình tái sinh cụm chồi cây Trai *in vitro*.

Mục đích của thí nghiệm này là nâng cao chiều cao thân chồi và có lá phát triển mạnh mẽ là yếu tố cơ bản trong nghiên cứu nuôi cấy phát sinh rễ và thuần hóa. Kết quả thí nghiệm 4 cho thấy cụm chồi cây Trai *in vitro* phát sinh mạnh nhưng chiều cao thân chồi thấp, nên cần có giai đoạn trung gian tái sinh cụm chồi. Kết quả thực nghiệm (Bảng 4.5) cho thấy khả năng tái sinh của cụm chồi cây Trai *in vitro* trong môi trường WPM có chiều cao chồi đạt được cao (17,5 mm). Đồng thời số chồi trên cụm cũng đạt cao (6,5 chồi) và lá cũng rất phát triển (+). Trong khi đó môi trường MS cho khả năng tái sinh cụm chồi thấp hơn. Chiều cao chồi chỉ đạt 15,3 mm và số chồi/cụm là 4,3 chồi, lá kém phát triển hơn (-).

Như vậy, môi trường WPM thích hợp cho khả năng tái sinh cụm chồi cây Trai *in vitro* nhằm làm nguồn nguyên liệu cho các thí nghiệm nhân giống sau.

Bảng 4.5: Tái sinh cụm chồi cây Trai *in vitro*

NT	Môi trường nuôi cấy	Số chồi/cụm	Chiều cao chồi (mm)	Phát triển lá (+/-)
1	MS	4,3	15,3	-
2	WPM	6,5	17,5	+
	Cv (%)	1,85	0,61	

Kết quả này có sự khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê với mức xác suất $P = 0,05$.



Hình 4.5: Tái sinh cụm chồi cây Trai *in vitro* trên môi trường khoáng cơ bản MS (A), WPM (B).

4.5 Thí nghiệm 6: Ảnh hưởng của nước dừa (Cw) đến nhân nhanh cây Trai *in vitro*.

Nước dừa (coconut water) là một dưỡng chất có chứa đầy đủ các ion hữu cơ, thành phần nitrogen, các amino acid, enzyme, các acid vô cơ, các vitamin, các loại đường nhất là đường đơn gốc alcohol, các chất điều hòa sinh trưởng và các chất khác.

Như vậy, nước dừa là một chất dinh dưỡng cung cấp tất cả các thành phần cần thiết cho nhu cầu sinh trưởng của tế bào trong nuôi cấy. Trong khi nuôi cấy sự bổ sung nước dừa sẽ giảm bớt sử dụng hay không sử dụng các chất điều hòa sinh trưởng, là nguyên nhân hạn chế thấp nhất biến dị do quá trình nuôi cấy *in vitro* trong một thời gian dài.

Mục đích của thí nghiệm này là nghiên cứu ảnh hưởng của việc bổ sung nước dừa có phối hợp với các chất điều hòa sinh trưởng trong nhân giống cây Trai Nam Bộ.

Trong thí nghiệm này, chồi non *in vitro* được nuôi cấy trên môi trường WPM có bổ sung BA (0,1 mg/l) và nước dừa (0 – 10 %).

Kết quả (Bảng 4.6) cho thấy các nghiệm thức thí nghiệm đều có khả năng phát sinh chồi. Song, số chồi/cụm, chiều cao chồi, số lá sai biệt rất có ý nghĩa về mặt thống kê học với mức xác suất $P = 0,05$. Nghiệm thức 1 không có bổ sung nước dừa thì khả năng phát sinh chồi kém hơn so với hai nghiệm thức còn lại. Nhưng khi bổ sung nước dừa hàm lượng từ 5 – 10 % vào trong môi trường nuôi cấy thì số chồi/cụm, chiều cao chồi, số lá tăng lên rõ rệt.

Hàm lượng nước dừa (10 %) thì phát sinh chồi cao nhất 15,5 (chồi), kích thích vươn thân chồi (32,4 mm) và phát triển lá (8,4 lá).

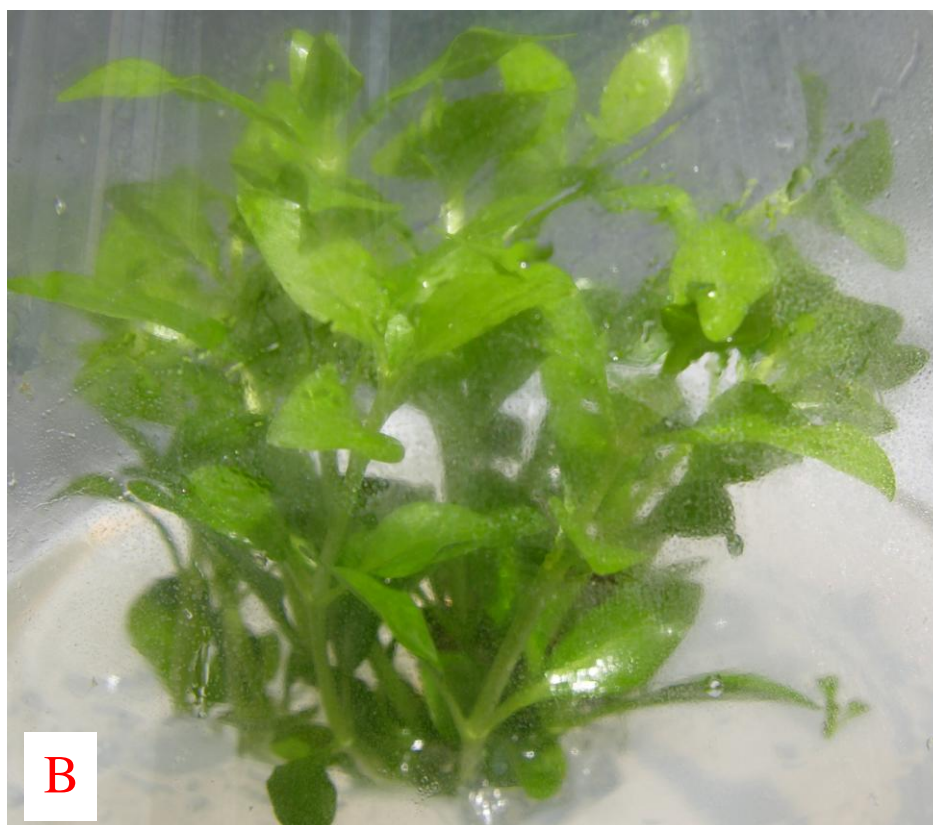
Với hàm lượng bổ sung nước dừa 10 % này cũng thích hợp trong nuôi cấy mô nhiều cây khác như dó bầu (*Aquiliria crassna* Pierre ex. Lecomte) (Đình Trung Chánh, 1998), cây nhãn (*Euphoria longan* L.) (Trần Văn Minh, 2004), Caribê (*Pinus caribaea*) (Hà Thị Loan, 2003). Mặt khác, một số loài cây không cần bổ sung nước dừa trong nuôi cấy vẫn cho kết quả tốt như cây xoài (*Mangifera india* L.), cây sầu riêng (*Duriozibethinus* Mur) (Trần Văn Minh, 2004).

Như vậy, môi trường WPM + BA (0,1 mg/l) bổ sung thêm nước dừa (10 %) cho kết quả vươn thân tốt nhất trong nhân giống cây Trai *in vitro*.

Bảng 4.6: Ảnh hưởng của nước dừa (Cw) đến nhân nhanh cây Trai *in vitro*

NT	Môi Trường	Nồng độ BA (mg/l)	Cw (%)	Số chồi/cụm	Số lá/mẫu	Chiều cao chồi (mm)
1	WPM	0,1	0	7,6 ^C	6,4 ^C	15,7 ^C
2	WPM	0,1	5	13,2 ^B	7,6 ^B	22,6 ^B
3	WPM	0,1	10	15,5^A	8,4^A	32,4^A
		CV (%)		0,83	1,34	0,42

Trong cùng một cột, các giá trị trung bình theo sau bởi các chữ cái không cùng kí tự thì có sự khác biệt rất có ý nghĩa về mặt thống kê với mức suất $P = 0,05$ bởi trắc nghiệm LSD.



Hình 4.6: Cây Trai *in vitro* vươn thân trên môi trường có chứa nước dừa (A) 5% nước dừa; (B) 10% nước dừa.

4.6 Thí nghiệm 7: Nuôi cấy tạo rễ cây Trai *in vitro*.

Mục tiêu là xác định môi trường ra rễ nhanh chóng và hiệu quả nhất.

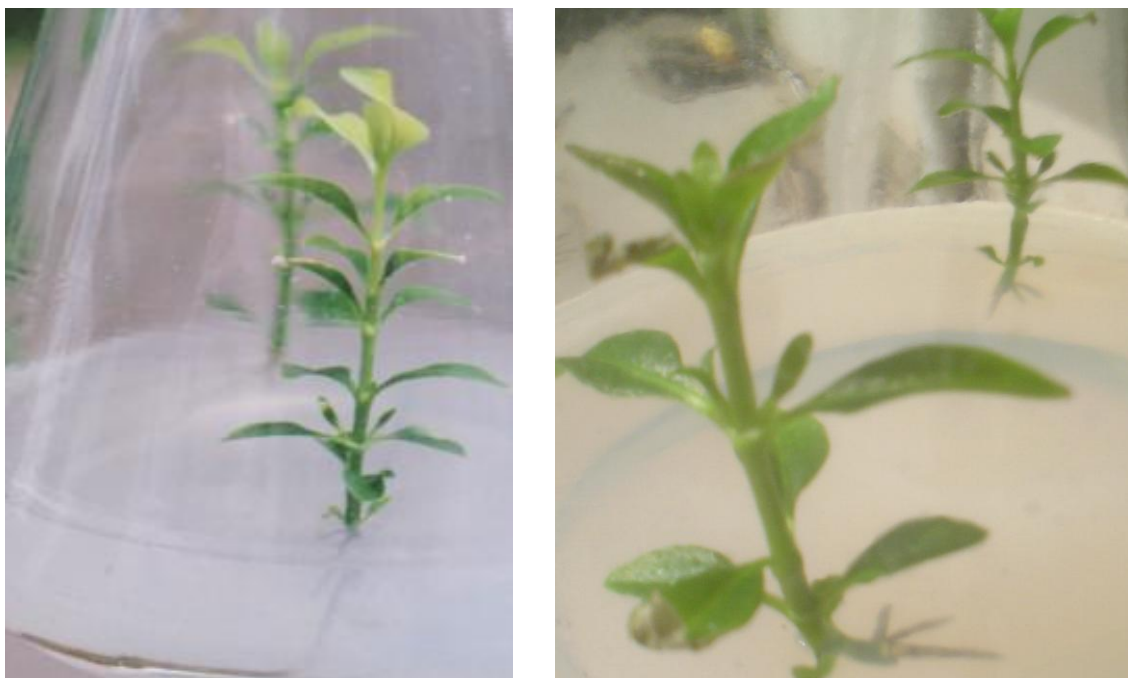
Trong nuôi cấy mô, việc bổ sung các auxin vào môi trường nuôi cấy cho hiệu quả kích thích cây khỏe mạnh, tạo nhiều rễ, phát triển tốt (Banerjee và Delanghe, 1985).

Kết quả thực nghiệm (Bảng 4.7) cho thấy cây Trai ra rễ trong môi trường WPM + IBA (0,3 mg/l) sau 30 ngày nuôi cấy. Các nghiệm thức còn lại không có dấu hiệu ra rễ.

Như vậy, môi trường thích hợp cho tạo rễ cây Trai là WPM + IBA (0,3 mg/l).

Bảng 4.7: Ảnh hưởng của các auxin đến sự ra rễ cây Trai *in vitro*

NT	Môi trường	IAA (mg/l)	IBA (mg/l)	Ra rễ
1	MS	2	1	-
2	WPM	-	0,1	-
3	WPM	-	0,3	+
4	WPM	-	0,5	-



Hình 4.7: Cây Trai *in vitro* ra rễ trong môi trường WPM bổ sung IBA (0,3 mg/l).



Hình 4.8: Cây Trai *in vitro* ra rễ được thuần hóa và ra bầu đất trong điều kiện vườn ươm.

Phần 5. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

5.1 KẾT LUẬN

Từ kết quả thực nghiệm, chúng tôi có một số kết luận sau:

- ❖ Mẫu Trai thực sinh được vô trùng tốt nhất trong dung dịch Natri hypochlorit 25 % trong thời gian 20 – 30 phút kết hợp với dung dịch HgCl_2 0,05 % trong 15 phút.
- ❖ Môi trường khoáng cơ bản WPM bổ sung BA (0,1 mg/l) kích thích phát sinh chồi cây Trai *in vitro*.
- ❖ Môi trường khoáng cơ bản WPM bổ sung BA (1 mg/l) thích hợp tạo cụm chồi cây Trai *in vitro*.
- ❖ Môi trường WPM bổ sung BA (0,5 mg/l) thích hợp cho nhân cụm chồi cây Trai *in vitro*.
- ❖ Môi trường WPM thích hợp cho tái sinh cụm chồi cây Trai *in vitro*.
- ❖ Môi trường WPM + BA (0,1 mg/l) + CW (10 %) thích hợp cho vươn thân cây Trai *in vitro*.
- ❖ Cây Trai *in vitro* ra rễ dễ dàng trong môi trường WPM + IBA (0,3 mg/l).

5.2 ĐỀ NGHỊ

- ❖ Nghiên cứu tiếp điều kiện đưa cây mô từ bình nuôi cấy *in vitro* ra môi trường ngoài và theo dõi sinh trưởng trong giai đoạn ra vườn ươm đến khi đạt tiêu chuẩn trồng rừng.
- ❖ Xây dựng tiếp quy trình nhân giống cây Trai *in vitro* và trên vườn ươm.

Phần 6. TÀI LIỆU THAM KHẢO

TIẾNG VIỆT

1. Lê Xuân Ái, 2003. *Ứng dụng công nghệ nuôi cấy mô tế bào thực vật trong việc bảo tồn in vitro nguồn gen quý hiếm cây lát hoa (Chukrasia tabularis. A.Juss) tại Côn đảo*. Luận văn thạc sĩ khoa học nông nghiệp. Đại học Nông lâm TP. Hồ Chí Minh.
2. Đinh Trung Chánh, 1998. *Vi nhân giống cây Dó bầu (Aquilaria crasna Pierre ex Lecomte) bằng phương pháp nuôi cấy đỉnh sinh trưởng*. Luận văn thạc sĩ khoa học Nông nghiệp. Đại học Nông Lâm TP. Hồ Chí Minh.
3. Trần Thị Dung, 2005. *Nuôi cấy mô tế bào thực vật*. Đại học Nông Lâm TP. Hồ Chí Minh.
4. Trần Văn Định, 2005. *Bảo tồn nguồn gen cây thông đỏ (Taxus bacata var wallichiana Zucc.) bằng kỹ thuật nuôi cấy tái sinh đỉnh sinh trưởng in vitro*. Luận văn thạc sĩ khoa học Nông Nghiệp. Đại học Nông Lâm TP. Hồ Chí Minh.
5. Nguyễn Thượng Hiền, 1998. *Thực vật và đặc sản rừng*. Đại học nông lâm TP. Hồ Chí Minh.
6. Phạm Hoàng Hộ, 1972. *Cây cỏ Miền Nam Việt Nam*, tập 2. Trang 137. Bộ Giáo Dục Trung Tâm học liệu.
7. Trương Mai Hồng, 1997. *Nghiên cứu xây dựng quy trình nhân giống in vitro cây cẩm lai Bà Rịa (Dalbergia bariensis Pierre)*. Luận văn thạc sĩ khoa học nông nghiệp, Đại học Nông lâm TP. Hồ Chí Minh.
8. Trần Hợp, 2002. *Tài nguyên cây gỗ Việt Nam*. Nhà xuất bản Nông nghiệp. Trang 658.
9. Dương Công Kiên, 2002. *Nuôi cấy mô thực vật*. Nhà xuất bản Đại Học quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh.

10. Nguyễn Đức Lượng, 2002. *Công nghệ tế bào*. Nhà xuất bản Đại Học Quốc Gia TP. Hồ Chí Minh.
11. Vương Lợi, 2002. *Tìm hiểu các yếu tố thích hợp để nhân nhanh cây Giá Ty (Tectona grandis Linn.F) bằng kỹ thuật nuôi cấy mô*". Luận văn tốt nghiệp cử nhân khoa học. Trường Đại Học Khoa Học Tự Nhiên – ĐHQGTPHCM.
12. Trần Văn Minh, 1997 (a). *Những phương pháp nâng cao tính đa dạng di truyền cây ăn trái*. Nhà xuất bản trẻ. Viện sinh học nhiệt đới, 225 trang.
13. Trần Văn Minh, 1997(a). *Công nghệ sinh học cây ăn trái*. Nhà xuất bản trẻ. Viện sinh học nhiệt đới, 578 trang.
14. Trần Văn Minh, 2004. *Công nghệ sinh học – Giáo trình cao học – nghiên cứu sinh*. Trường đại học Nông Lâm TP. Hồ Chí Minh, 933 trang.
15. Nguyễn Hoàng Nghĩa, 1997 (a). *Bảo tồn tài nguyên di truyền thực vật rừng*. Nhà xuất bản Nông nghiệp, Hà Nội, 115 trang.
16. Nguyễn Hoàng Nghĩa, 1997 (b). *Nhân giống vô tính và trồng rừng dòng vô tính*. Nhà xuất bản Nông nghiệp, Hà Nội, 120 trang.
17. Nguyễn Hoàng Nghĩa, 2005. *Kết quả nghiên cứu bảo tồn nguồn gen cây rừng*. Thông tin chuyên đề Lâm Nghiệp số 1 – 2005. Viện khoa học Lâm Nghiệp Việt Nam.
18. Ly Meng Seang, 2003. *Ứng dụng công nghệ tế bào thực vật trong nhân nhanh cây giá ty (Tectoni grandis Linn.F.) in vitro*. Luận văn thạc sĩ khoa học nông nghiệp, Đại học nông lâm TP. Hồ Chí Minh.
19. Nguyễn Văn Uyển, 1996. *Những phương pháp công nghệ sinh học thực vật*. Nhà xuất bản Nông nghiệp, tập 1, 2.
20. Bùi Trang Việt, 2000. *Sinh lý thực vật đại cương*. Đại học quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh, 333 trang.
20. Viện sinh học nhiệt đới, 2001. *Tuyển tập công trình nghiên cứu khoa học và công nghệ (1999 - 2000)*. Nhà xuất bản nông nghiệp Tp. Hồ Chí Minh, 441 trang.

- 21 Viện sinh học nhiệt đới, 2001. *Công nghệ sinh học và Nông nghiệp sinh thái bền vững*. Nhà xuất bản nông nghiệp. Trang 82 – 91.
- 22 Lu, C., 1993. *The use of thidiazuron in tissue culture. In vitro cell. Dev. Biol.*29:92-96

INTERNET

1. <http://delta-intkey.com/wood/english/www/logfafra.htm>
2. www.forestlight.co.uk/galleries/11/126.jpg
3. rmb.rnus.edu.sg/.../pg17_plantf.jpg
4. http://www.desert-tropicals.com/Plants/Loganiaceae/Fagraea_fragrans.html
5. [http://ecocrop.fao.org/GPPIS.exe\\$ShowHost?Host=6077](http://ecocrop.fao.org/GPPIS.exe$ShowHost?Host=6077)
6. <http://www.forest.go.th/botany/Flora/species%20list/volume6/Longaniaceae.htm>
7. <http://www.worldagroforestry.org/SEA/Products/AFDbases/WD/asps/DisplayDetail.asp?SpecID=1474>
8. botany.cs.tamu.edu/FLORA/schoepke/fag-fr-2.jpg
9. www.acs.ac.th/.../stories/botanic/fagraea03.jpg
10. <http://www.vncreatures.net/mapbgm.php>
11. http://72.14.235.104/search?q=cache:FbdGwzVzMLYJ:www.lrc-hueuni.edu.vn/dongy/show_target.plx%3Furl%3D/thuocdongy/T/Trai.htm%26key%3D%26char%3DT+Fagraea&hl=vi&gl=vn&ct=clnk&cd=2
12. http://72.14.235.104/search?q=cache:tE2zLAHUns4J:www.lamdong.gov.vn/kiemlam/phanloaigo/Phanloai_go2.htm+Fagraea&hl=vi&gl=vn&ct=clnk&cd=4

Phần 7. PHỤ LỤC

Các môi trường khoáng cơ bản dùng trong thí nghiệm nuôi cấy mô cây
Trai *in vitro*.

Thành phần (1)	Hàm lượng (mg/l) (2)	
	MS (3)	WPM (4)
Nguyên tố đa lượng		
CaCl ₂ .2H ₂ O	440	96
Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	-	556
KNO ₃	1900	-
K ₂ SO ₄	-	990
KH ₂ PO ₄	170	170
MgSO ₄ .7H ₂ O	370	370
NH ₄ NO ₃	1650	400
NaH ₂ PO ₄	-	-
Nguyên tố vi lượng		
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025	0,025
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025	0,025
FeSO ₄ .7H ₂ O	27,8	-
H ₃ BO ₃	6,2	6,2
KI	0,83	-
MnSO ₄ .H ₂ O	-	22,3
MnSO ₄ .4H ₂ O	23,3	-
Na ₂ EDTA	37,3	-
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25	0,25
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,6	8,6
Sodium Ferric	-	30
Vitamin và amino acid		
Biotin	-	-
Glycine	2,0	2,0
Myo – inositol	100	100

Nicotinic acid	0,5	0,5
Pyridoxine HCl	0,5	0,5
Thiamin HCl	0,1	0,1

Thí nghiệm 1: Vô trùng mô cây ban đầu từ cây Trai thực sinh

a) Vô trùng bằng Hypo – Natri:

Bảng phân tích ANOVA về tỷ lệ mẫu sống vô trùng

	Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Square	F-value	Prob.
Between	11	37.407	3.401	226.712	0.0000
Within	24	0.360	0.015		
Total	35	37.767			

Coefficient of Variation = 4.00%

b) Vô trùng bằng Hypo – Natri kết hợp với HgCl₂

Bảng phân tích ANOVA về tỷ lệ mẫu sống vô trùng

	Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Square	F-value	Prob.
Between	11	44.220	4.020	209.739	0.0000
Within	24	0.460	0.019		
Total	35	44.680			

Coefficient of Variation = 3.01%

Thí nghiệm 2: Khả năng tạo cụm chồi cây Trai *in vitro* trên các môi trường khoáng cơ bản có bổ sung BA (0,1 mg/l).

Bảng phân tích ANOVA về số chồi/cụm

	Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Square	F-value	Prob.
Between	1	69.360	69.360	6936.013	0.0000
Within	4	0.040	0.010		
Total	5	69.400			

Coefficient of Variation = 0.83%

Thí nghiệm 3: Ảnh hưởng của BA đến khả năng tạo cụm chồi cây Trai *in vitro*.

Bảng phân tích ANOVA số chồi/cụm

	Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Square	F-value	Prob.
Between	4	1125.444	281.361	28136.087	0.0000
Within	10	0.100	0.010		
Total	14	1125.544			

Coefficient of Variation = 0.58%

Bảng phân tích ANOVA chiều cao chồi (mm)

	Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Square	F-value	Prob.
Between	4	195.156	48.789	4878.881	0.0000
Within	10	0.100	0.010		
Total	14	195.256			

Coefficient of Variation = 0.72%

Thí nghiệm 4: Khảo sát sự ảnh hưởng của BA trong nhân cụm chồi cây Trai *in vitro*.

Bảng phân tích ANOVA số chồi/cụm

	Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Square	F-value	Prob.
Between	5	494.005	98.801	9880.083	0.0000
Within	12	0.120	0.010		
Total	17	494.125			

Coefficient of Variation = 0.76%

Bảng phân tích ANOVA chiều cao chồi (mm)

	Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Square	F-value	Prob.
Between	5	206.640	41.328	4132.808	0.0000
Within	12	0.120	0.010		
Total	17	206.760			

Coefficient of Variation = 0.66%

Thí nghiệm 5: Khảo sát quá trình tái sinh cụm chồi cây Trai *in vitro*.

Bảng phân tích ANOVA số chồi/cụm

	Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Square	F-value	Prob.
Between	1	7.260	7.260	726.000	0.0000
Within	4	0.040	0.010		
Total	5	7.300			

Coefficient of Variation = 1.85%

Bảng phân tích ANOVA chiều cao chồi (mm)

	Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Square	F-value	Prob.
Between	1	7.260	7.260	725.998	0.0000
Within	4	0.040	0.010		
Total	5	7.300			

Coefficient of Variation = 0.61%

Thí nghiệm 6: Ảnh hưởng của nước dừa (Cw) đến nhân nhanh cây Trai *in vitro*.

Bảng phân tích ANOVA số chồi/cụm

	Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Square	F-value	Prob.
Between	2	99.060	49.530	4952.994	0.0000
Within	6	0.060	0.010		
Total	8	99.120			

Coefficient of Variation = 0.83%

Bảng phân tích ANOVA chiều cao chồi (mm).

	Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Square	F-value	Prob.
Between	2	422.540	211.270	21126.906	0.0000
Within	6	0.060	0.010		
Total	8	422.600			

Coefficient of Variation = 0.42%

Bảng phân tích ANOVA số lá /mẫu

	Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Square	F-value	Prob.
Between	2	6.080	3.040	304.001	0.0000
Within	6	0.060	0.010		
Total	8	6.140			

Coefficient of Variation = 1.34%