

# ỨNG DỤNG CÔNG NGHỆ TẾ BÀO THỰC VẬT TRONG CÔNG TÁC GIỐNG CÂY GIÁ TY

## (*Tectona grandis L.*)

APPLICATION OF PLANT CELL BIOTECHNOLOGY IN TECH IMPROVEMENT

Trần Văn Minh\*, Đinh Quang Diệp\*\*, Lý Minh Saeng \*\*

(\*) Viện Sinh học Nhiệt đới, 1 Mạc Đĩnh Chi, Q1, TPHCM, [drminh@hcm.vnn.vn](mailto:drminh@hcm.vnn.vn).

(\*\*) Đại Học Nông Lâm, Thủ Đức, TPHCM, [dqdiep@hcm.vnn.vn](mailto:dqdiep@hcm.vnn.vn)

### SUMMARY

The rescue of commercial species is a priority for biotechnology to increase multiplication rate and develop reforestation. Such programmes can be carried out simultaneously with the development of the country to maintain the ecosystem natural equilibrium. Teak (*Tectona grandis L.f.*) is a forest tree of high commercial and ecological value because of its rapid growth and wood quality. Teak is a species with problem in the propagation as a result of its high genetic variability. For this reason, alternatives to produce propagules have been developed. With the aim to obtain the plantlets via meristem culture, an in vitro multiplication system for Teak has established

### GIỚI THIỆU

Bảo tồn các loài cây trồng lâm nghiệp có giá trị thương mại là một hướng đi hàng đầu của công nghệ sinh học thực vật để tăng nhanh tốc độ nhân giống và phát triển trồng lại rừng trong chương trình phục hồi rừng. Có nhiều chương trình phục hồi lại rừng bằng con đường công nghệ sinh học ở các nước trong khu vực châu Á và Thái Bình Dương để duy trì sự cân bằng hệ sinh thái tự nhiên. Giá ty là một loài cây thân gỗ có giá trị kinh tế cao vì đặc tính lớn nhanh và giá trị gỗ quý.

Tuy nhiên, trong công tác nhân giống truyền thống bằng hạt, loài giá ty có những rào cản như: khả năng sản xuất hạt của cây thấp (Wellendorf & Kaosa-ard, 1988; White, 1991); ra hoa muộn. Ở cây giá ty, thân thẳng và dài quyết định giá bán buôn phụ thuộc rất nhiều vào khả năng duy trì đinh sinh trưởng trong thời gian dài (White, 1991) do khi cây ra hoa, thân chính sẽ phân đôi; tỷ lệ nẩy mầm thấp (Kaosa-ard, 1986; Mascarenhas et al, 1987; White, 1991); đa dạng về di truyền làm giảm chất lượng gỗ (Bedel, 1989; Dupuy & Verhaegen, 1993; Mascarenhas & Muralidharan, 1993); và chúng ta còn hạn chế kiến thức về di truyền các đặc tính (Wellendorf & Kaosa-ard, 1988; Monteuijs, 2000).

Với kỹ thuật nhân giống bằng hom, hay được gọi là stump ở cây giá ty là nhân giống vô tính với số lượng lớn một hỗn hợp các kiểu di truyền khác nhau mà không duy trì bất kỳ một tính chất cá thể nào. Phương pháp này cho phép tăng số lượng các kiểu di truyền được trẻ hóa. Tuy nhiên, nhân giống bằng hom sẽ gia tăng tính không đồng đều trong quần thể gỗ sản xuất và điều này sẽ dẫn đến tăng tính biến dị ở cây giá ty. Nhưng cũng đạt được việc duy trì được đặc tính từng kiểu di truyền (Monteuijs, 2000)

Nhân giống bằng phương pháp CNTBTV, đặc tính di truyền được bảo đảm qua chu kỳ nhân vô tính và bảo lưu hàng nhiều thế kỷ. Nhân giống bằng phương pháp CNTBTV đảm bảo được đặc tính di truyền cây mẹ và tạo ra quần thể cây rừng đồng đều (Zobel & Talbert, 1984; Timmis, 1985; Ahuja & Libby, 1993a,b). Hơn nữa, kiểu di truyền được chọn lọc để vi nhân giống có thể biểu hiện hiện tượng thuần thực về sinh lý như giảm hay mất hẳn tiềm năng ra rễ nhánh (Timmis, 1985; Wareing, 1987; Monteuijs, 2000). Một đặc tính sinh lý trẻ – hay trẻ hóa – là trạng thái cần thiết thích hợp cho hom ra rễ. Yêu cầu cơ bản để vi nhân giống là khả năng ra rễ bất định (Monteuijs et al, 1995). Điều dễ dàng nhận thấy là khi rễ bất định phát triển, cây giống cây mẹ và đồng đều về hình dạng là tính ưu việt của vi nhân giống. Những đặc tính quý hiện nay của cây giá ty đều đồng cần vi nhân giống là: sinh trưởng nhanh, hình dạng thân, thân thẳng, ra hoa chậm và các tính chất gỗ quý khác (Zobel & Talbert, 1984; Wellendorf & Kaosa-ard, 1988). Tính đồng đều không có được khi nhân giống bằng hạt hay stump.

### VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu nuôi cấy là những chồi đinh và chồi bên cây giá ty Việt Nam đầu dòng có 35 năm tuổi, và từ những stump cây cấy mô đầu dòng của Thái Lan và Myanmar. Mẫu nuôi cấy (là chồi đinh hay đốt thân chồi non) được vô trùng bằng  $HgCl_2$  (0.1%) trong 10 phút. Môi trường nuôi cấy là môi

trường Murashige-Skoog (1962) và Cown-McLloyd (1980) có bổ sung BA, IAA, IBA, NAA, Tyrosine, Adenine sulfate và nước dừa. Kết quả nghiên cứu được phân tích bằng chương trình thống kê MSTATC.

## KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

**Thí nghiệm 1: Ảnh hưởng của môi trường dinh dưỡng cơ bản MS và WPM đến nhân nhanh cây giá ty in vitro**

**Bảng 1. Ảnh hưởng của môi trường dinh dưỡng cơ bản MS và WPM đến nhân nhanh cây giá ty in vitro**

Môi trường (A)	Mẫu nuôi cấy (B)	Chiều cao thân (mm)	Số đốt (no)	Số lá (no)	Chiều dài lá (mm)	Chiều rộng lá (mm)	Phát triển lá (+/-)
MS	N	41,2	3,2	6,5	26,5	13,5	+
	Đ	38,0	3,5	7,2	14,2	7,2	+
WPM	N	53,0	4,0	7,7	24,7	12,5	+
	Đ	41,7	3,5	6,5	20,0	10,4	+
M		43,5	3,5	7,0	21,3	10,9	
CV%		4,15	3,74	2,38	5,88	4,97	
LSD (0.05)							
A x B		ns	ns	ns	11,6	ns	

Ghi chú: N: ngọn Đ: đốt thân

Riêng về môi trường nuôi cấy (A) không tác động có ý nghĩa đến các chỉ tiêu sinh trưởng. Tuy nhiên riêng yếu tố mẫu nuôi cấy (B) cho thấy có sự khác nhau có ý nghĩa giữa hai môi trường cơ bản về chỉ tiêu số đốt (đạt 4 đốt với mẫu nuôi cấy là chồi ngọn) và số lá (đạt 7,7 lá với mẫu nuôi cấy là chồi ngọn). Trong mối tương tác giữa môi trường nuôi cấy và mẫu nuôi cấy (Ax B) cho thấy có sự khác nhau có ý nghĩa về chiều dài lá (với mức sai khác có ý nghĩa thấp nhất là 11,6) đạt 24,7-26,5mm (với mẫu nuôi cấy là chồi ngọn) và 14,2-20,0mm (với mẫu nuôi cấy là đốt thân) (bảng 1). Kết quả nghiên cứu về môi trường nuôi cấy, MS và WPM cho nhận xét, trên môi trường nuôi cấy MS chiều dài lá có sự phát triển cao nhất theo trị tuyệt đối là 26,5mm lá với mẫu nuôi cấy là chồi ngọn, nhưng lại đạt trị tuyệt đối thấp so với trên môi trường nuôi cấy WPM là 20,0mm với mẫu nuôi cấy là đốt thân. Đốt thân là đơn vị chính trong nhân giống, nên môi trường cơ bản WPM được chọn là môi trường nền cho các thí nghiệm về sau này.

**Thí nghiệm 2: Ảnh hưởng của khoáng đa lượng WPM và BA đến nhân nhanh cây giá ty in vitro**

**Bảng 2. Ảnh hưởng của khoáng đa lượng WPM và BA đến nhân nhanh cây giá ty in vitro**

Khoáng đa lượng (A)	BA (mg/l) (B)	Mẫu nuôi cây (C)	Chiều cao thân (mm)	Số đốt (no)	Số lá (no)	Chiều dài lá (mm)	Chiều rộng lá (mm)	Sự phát triển lá (+/-)
WPM	0	N	53,0	4,0	7,7	24,7	12,5	+
		D	41,7	3,5	6,5	20,0	10,5	+
	0,05	N	49,0	3,5	7,2	24,7	11,7	+
		D	54,2	4,0	7,5	23,7	13,0	+
	0,1	N	56,3	3,7	7,7	23,5	12,0	+
		D	58,5	4,0	8,2	26,2	13,7	+
	WPM/2	0	47,2	3,7	6,7	15,7	6,5	+
		D	37,2	3,2	6,5	12,2	6,2	+
0,05	N	56,7	4,2	8,2	18,7	9,0	+	
		D	49,7	3,7	7,0	16,2	7,7	+
	0,1	N	41,2	3,7	7,0	18,2	8,0	+
		D	44,5	3,5	7,2	16,5	7,5	+
M			49,1	3,7	7,3	19,9	9,8	
CV%			2,51	17,10	1,70	2,04	1,93	
LSD (0.05)								
A x B x C			10,3	0,7	ns	5,0	3,2	

Xét riêng về từng yếu tố tác động riêng rẽ, hàm lượng khoáng đa lượng WPM (A), nồng độ BA (B) hay mẫu nuôi cây (C) không tác động có ý nghĩa đến các chỉ tiêu sinh trưởng. Tuy nhiên, sự tương tác giữa hàm lượng khoáng đa lượng và nồng độ BA (Ax B) và sự tương tác giữa khoáng đa lượng và mẫu nuôi cây (Ax C) lại tác động có ý nghĩa về chỉ tiêu chiều dài lá và chiều rộng lá. Kết quả tương tác cho thấy hàm lượng khoáng đa lượng chuẩn ( $x_1$ ) thích hợp cho quá trình nuôi cây hơn hàm lượng phân đôi ( $x_{1/2}$ ) trong mối tương tác với nồng độ BA và mẫu nuôi cây thay đổi. Riêng mối tương tác giữa ba yếu tố nuôi cây có thấy có sự khác nhau rõ rệt giữa các chỉ tiêu sinh trưởng chiều cao thân, số đốt, chiều dài lá và chiều rộng lá với độ sai khác thấp nhất có ý nghĩa tuân tự là 10,3mm chiều cao thân, 0,7 số lá, 5mm chiều dài lá và 3,2mm chiều rộng lá (bảng 2). Kết quả nghiên cứu dẫn đến nhận xét trong mối tương tác giữa hàm lượng khoáng đa lượng, nồng độ BA và mẫu nuôi cây có sự tác động rõ rệt đến các chỉ tiêu chủ yếu trong vi nhân giống. Với hàm lượng khoáng đa lượng chuẩn, nồng độ BA 1mg/l cho kết quả tốt nhất ở các chỉ tiêu sinh trưởng chiều cao thân, số đốt, chiều dài lá và chiều rộng lá trên cả hai loại mẫu nuôi cây. Sự phát triển thân lá đồng bộ sẽ dẫn đến hệ số nhân giống ổn định và chồi khỏe mạnh phát triển bền vững.

**Thí nghiệm 3: Ảnh hưởng của Tyrosine đến nhân nhanh cây giá ty in vitro**

**Bảng 3. Ảnh hưởng của Tyrosin đến nhân nhanh cây giá ty in vitro**

Tyrosin (mg/l) (A)	Mẫu nuôi cấy (B)	Chiều cao thân (mm)	Số đốt (no)	Số lá (no)	Chiều dài lá (mm)	Chiều rộng lá (mm)	Phát triển lá (+/-)
0	N	71,5	4,0	8,5	19,5	9,5	+
	Đ	55,7	4,0	7,5	20,0	12,2	+
10	N	80,0	4,5	9,7	26,7	11,2	+
	Đ	77,2	4,7	8,7	28,2	11,5	+
30	N	40,5	4,2	8,0	16,0	7,7	-
	Đ	25,0	3,2	6,7	7,0	4,5	-
M		55,0	4,1	8,1	19,6	9,0	
CV%		4,83	2,80	2,60	4,81	4,93	
LSD (0.05)							
A x B		21,1	ns	0,8	12,3	4,8	

Trên nền dinh dưỡng nuôi cấy cơ bản WPM, sự tác động riêng rẽ của Tyrosine (A) hay mẫu nuôi cấy (B) không thể hiện rõ rệt. Trong mối tương tác giữa Tyrosine và mẫu nuôi cấy (Ax B), kết quả cho thấy có sự tác động có ý nghĩa trên các chỉ tiêu sinh trưởng chiều cao thân, số lá, chiều dài lá và chiều rộng lá. Ở nồng độ Tyrosine 10mg/l, cho kết quả tốt hơn ở nồng độ 0mg/l và 30mg/l thể hiện ở các chỉ tiêu sinh trưởng nói trên với mẫu nuôi cấy chồi ngắn cho kết quả cao hơn mẫu nuôi cấy là đốt thân (bảng 3). Tyrosine là một loại acid amin được sử dụng nhiều trong nuôi cấy mô, nhất là trên các đối tượng có lá phá triển như giá ty, lõi thọ, chuối... nhằm mục đích tăng cường sự phát triển thân lá, dẫn đến chồi non phát triển khỏe, là một trong những yếu tố đưa cây ra thuần hóa đạt tỷ lệ sống cao.

**Thí nghiệm 4: Ảnh hưởng của Adenine sulfate đến nhân nhanh cây giá ty invitro**

**Bảng 4. Ảnh hưởng của Adenine sulfate đến nhân nhanh cây giá ty in vitro**

Adenine Sulfate (mg/l) (A)	Mẫu nuôi cấy (B)	Chiều cao thân (mm)	Số đốt (no)	Số lá (no)	Chiều dài lá (mm)	Chiều rộng lá (mm)	Sự phát triển lá (+/-)
0	N	49,5	3,7	7,0	21,0	9,7	+
	Đ	52,2	4,0	7,5	19,2	8,5	+
10	N	53,2	4,0	8,0	23,0	10,2	+
	Đ	58,7	5,0	8,2	22,7	9,5	+
30	N	51,2	4,7	8,5	22,7	10,2	+
	Đ	38,2	3,7	7,2	17,0	8,0	+
50	N	56,0	4,7	7,7	24,0	10,5	+
	Đ	45,7	4,0	7,7	18,2	8,7	+
70	N	46,2	4,0	8,0	20,2	9,5	+
	Đ	46,0	3,7	7,5	18,2	7,7	+
100	N	45,2	4,0	8,2	18,2	8,5	+
	Đ	46,7	4,7	7,7	14,7	7,0	+
M		49,1	4,1	7,7	19,9	9,0	
CV%		2,56	1,33	1,42	2,01	2,01	
LSD (0.05)							
A X B		15,3	1,1	1,2	4,7	1,0	

Sự tác động riêng rẽ của Adenine sulfate (A) có ảnh hưởng có ý nghĩa trên chỉ tiêu số đốt. Tuy nhiên, sự tác động riêng rẽ của mẫu nuôi cấy (B) lại không có ý nghĩa đến các chỉ tiêu sinh trưởng. Trong mlõi tương tác giữa Adenine sulfate và mẫu nuôi cấy (Ax B), tác động có ý nghĩa đến hầu hết các chỉ tiêu sinh trưởng. Ở mức nồng độ Adenine sulfate 10mg/l, sự phát triển về số đốt có sai khác rõ rệt, ở cả hai loại mẫu nuôi cấy, đặc biệt là chiều cao thân với mẫu nuôi cấy là đốt thân phát triển (5 đốt) rất có ý nghĩa so với mẫu nuôi cấy là chồi ngọn (4 đốt) (bảng 4). Vì nhân giống với đối tượng là những loài cây lá rộng, sự phát triển của chồi in vitro có liên quan chặt chẽ với môi trường dinh dưỡng và nồng độ BA. Chất điều hòa sinh trưởng BA ngoài tác động kích thích sự phát triển chồi ngọn và đánh thức chồi bên, lại còn tác động trực tiếp đến sự nở lá không bình thường, dẫn đến biến tính tế bào soma. Vậy BA kích thích phát triển chồi hay kích thích nở lá dẫn đến sự phát triển đồng bộ ở các chỉ tiêu sinh trưởng. Adenine sulfate là một chất dẫn suất có gốc cấu tạo vòng purine như BA, nhưng không có vai trò chính là chất điều hòa sinh trưởng. Sự tác động của Adenine sulfate chủ yếu không là kích thích mà chủ yếu là cung cấp một hoạt chất acid amin là Adenine. Với kết quả bảng 4, cho thấy sự có mặt của Adenine sulfate đã dẫn đến hiệu quả tương tự như bổ sung BA vào môi trường nuôi cấy (khi nồng độ Adenine sulfate là 0mg/l). Vậy, BA đóng vai trò kích thích chồi phát triển và sự phát triển lá bình thường của loài cây lá rộng.

**Thí nghiệm 5: Ảnh hưởng của BA và nước dừa (CW) đến nhân nhanh cây giá ty invitro**

**Bảng 5. Ảnh hưởng của BA và nước dừa (CW) đến nhân nhanh cây giá ty in vitro**

BA (mg/l) (A)	Nước dừa (%) (B)	Mẫu nuôi cây (C)	Chiều cao thân (mm)	Số đốt (no)	Số lá (no)	Chiều dài lá (mm)	Chiều rộng lá (mm)	Sự phát triển lá (+/-)	
0.1	0	N	53,0	4,0	7,7	24,7	12,5	+	
		Đ	41,7	3,5	6,5	20,0	10,5	+	
	5	N	68,2	4,5	8,0	27,5	10,7	+	
		Đ	57,7	3,0	6,0	19,5	8,7	+	
	10	N	61,0	4,0	8,2	25,7	11,2	+	
		Đ	59,7	3,5	7,0	20,7	9,5	+	
	15	N	48,7	3,5	7,0	26,5	10,5	+	
		Đ	53,0	3,5	6,7	21,0	9,5	+	
	0	N	49,0	3,5	7,2	22,0	12,0	+	
		Đ	54,0	4,0	7,5	26,0	13,0	+	
0.05	5	N	78,5	4,0	7,5	28,7	11,2	+	
		Đ	73,5	3,7	6,7	26,0	10,5	+	
	10	N	48,7	3,5	6,5	28,5	12,5	+	
		Đ	71,2	3,5	7,2	27,2	11,7	+	
	15	N	59,2	3,7	7,5	24,5	10,0	+	
		Đ	61,2	3,7	7,0	19,7	7,7	+	
M			58,6	3,7	7,1	24,2	10,7		
CV%			2,24	1,62	1,68	1,52	1,52		
LSD (0.05)									
A x B x C			16,3	0,7	1,3	4,0	2,6		

Sự tác động riên rẽ của nước dừa (B) hay mẫu nuôi cây (C) không tác động rõ rệt đến các chỉ tiêu sinh trưởng. BA (A) tác động có ý nghĩa đến sự phát triển số đốt và số lá, nồng độ tác động BA 1 mg/l có hiệu quả hơn nồng độ BA 0,05mg/l. Tương tác giữa nồng độ BA và nước dừa (Ax B) cho thấy sai khác có ý nghĩa ở chỉ tiêu chiều cao thân ở cả hai nồng độ và ở cả hai loại mẫu nuôi cây. Tương tự, sự tương tác giữa nước dừa và mẫu nuôi cây (BxC) cho thấy có sự khác biệt có ý nghĩa về chiều cao thân. Riêng sự tương tác giữa nồng độ BA và mẫu nuôi cây (BxC) không dẫn đến sự sai khác có ý nghĩa ở các chỉ tiêu sinh trưởng. Tương tác giữa nồng độ BA, nước dừa và mẫu nuôi cây (Ax BxC) tác động đến các chỉ tiêu sinh trưởng có ý nghĩa, có ý nghĩa nhất là nước dừa (5%) tác động hiệu quả trên cả hai loại mẫu nuôi cây khi nồng độ BA thấp (0,05mg/l) và hiệu quả rõ rệt khi nồng độ BA 1mg/l ở cả hai loại mẫu nuôi cây (bảng 5). Kết quả nghiên cứu cho thấy, BA có vai trò kích thích chồi phát triển, sự tác động của nước dừa chỉ có ý nghĩa khi nồng độ BA thấp, và sự tác động có ý nghĩa trên hầu hết các chỉ tiêu sinh trưởng khi cả ba yếu tố tương tác tổng hợp. Nước dừa có chứa các loại acid amin tự nhiên, đường đơn hấp thu trực tiếp, và các chất tự nhiên có tác động tương tự cytokinin. Với nồng độ thích hợp của BA, nước dừa không có vai trò rõ rệt, ngược lại hiệu quả tác động tương tác cao của nước dừa được thể hiện khi nồng độ BA thấp. Điều này rất có ý nghĩa trong quá trình phát sinh và tái sinh phôi soma.

**Thí nghiệm 6: Ảnh hưởng của thể tích bình nuôi cấy và sự thông gió đến nhân nhanh cây giá ty invitro**

**Bảng 6. Ảnh hưởng của thể tích bình nuôi cấy và thông gió đến nhân nhanh cây giá ty in vitro**

Bình nuôi cấy (A)	Mẫu nuôi cấy (B)	Chiều cao thân (mm)	Số đốt (no)	Số lá (no)	Chiều dài lá (mm)	Chiều rộng lá (mm)	Phát triển lá (+/-)
300ml + Nắp cao su	N Đ	56,0 58,5	3,7 4,	3,7 8,2	23,7 26,2	12,0 13,2	+
300ml + nắp giấy	N Đ	61,2 64,0	4,7 5,0	8,7 9,5	26,2 28,2	13,0 14,2	+
500ml (hộp nhựa)	N Đ	47,2 55,5	4,0 3,0	7,5 5,7	36,2 31,0	16,7 13,5	+
M		57,1	4,1	7,8	28,6	13,7	
CV%		3,82	12,91	1,82	1,99	1,82	
LSD (0.05)							
A x B		6,9	1,5	2,7	9,2	ns	

Sự tác động riêng rẽ của bình nuôi cấy (A) không ảnh hưởng đến các chỉ tiêu sinh trưởng. Riêng mẫu nuôi cấy (B) có tác động rõ rệt nhất là số lá, số lá đạt cao nhất là 9,5 lá với mẫu nuôi cấy là đốt thân và 8,7 lá với mẫu nuôi cấy là chồi ngọn. Tương tác giữa bình nuôi cấy và mẫu nuôi cấy (Ax B) tác động có ý nghĩa đến các chỉ tiêu sinh trưởng như chiều cao thân, số đốt, số lá và chiều dài lá. Chiều cao thân thể hiện ở hộp nhựa, số đốt thể hiện ở cả ba loại bình, số lá thể hiện ở (bình 300ml + nắp cao su), chiều dài lá thể hiện ở hộp nhựa so với (bình 300ml + nắp cao su) và (bình 300ml + nắp giấy) cho các trị số tuyệt đối đều cao (bảng 6). Thể tích bình nuôi cấy có tác động rõ rệt đến sinh trưởng cây con in vitro, nhất là loài cây lá rộng. Thể tích bình rộng, hàm lượng các chất trao đổi đều cao nhất là CO<sub>2</sub>. Cùng một thể tích bình nuôi cấy (300ml), tăng cường trao đổi khí qua sử dụng nắp giấy, đã cải thiện đến sinh trưởng. Vậy, với những loài lá rộng, sự trao đổi khí đã tác động tích cực đến sinh trưởng.

**Thí nghiệm 7: Ảnh hưởng của cường độ ánh sáng đến nhân nhanh cây giá ty in vitro**

**Bảng 7. Ảnh hưởng của cường độ ánh sáng đến nhân nhanh cây giá ty in vitro**

Cường độ ánh sáng(A) ( $\mu\text{mol/m}^2/\text{s}$ )	Mẫu nuôi cấy (B)	Chiều cao thân (mm)	Số đốt (no)	Số lá (no)	Chiều dài lá (mm)	Chiều rộng lá (mm)	Phát triển lá (+/-)
11,4	N Đ	47,2 55,5	4,0 3,0	7,5 5,7	36,2 31,0	16,7 13,5	+
22,8	N Đ	72,2 51,0	5,0 4,5	9,7 8,0	20,0 15,5	10,0 7,5	+
34,2	N Đ	50,2 33,5	3,7 3,2	7,7 5,7	22,2 15,2	10,0 6,7	+
45,6	N Đ	54,2 38,0	4,5 4,0	9,0 7,2	18,7 16,5	8,2 7,5	+
M		50,3	4,0	7,6	21,9	9,9	
CV%		4,31	2,60	2,11	3,34	3,64	
LSD(0.05)							
A x B		ns	0,5	0,2	4,1	1,9	

Sự tác động riêng rẽ của yếu tố ánh sáng (A) hay mẫu nuôi cấy (B) không có ý nghĩa trên các chỉ tiêu sinh trưởng. Tương tác giữa yếu tố ánh sáng và mẫu nuôi cấy (Ax B) cho thấy có ý nghĩa tác động đến các chỉ tiêu sinh trưởng như số đốt, số lá, chiều dài lá và chiều rộng lá. Ở mức ánh sáng 11,4  $\mu\text{mol/m}^2/\text{s}$  đã có tác động đến sự phát triển chiều dài lá và chiều rộng lá; ở mức ánh sáng

$22,8\mu\text{mol/m}^2/\text{s}$  có tác động đến chiều cao thân và số lá, chỉ tiêu quyết định hệ số nhân giống; ở mức ánh sáng  $34,2-45,622,8\mu\text{mol/m}^2/\text{s}$  cho thấy không sai khác có ý nghĩa (bảng 7). Cây giá ty là cây ưa sáng, stump giá ty sẽ phát triển lá yếu và mỏng khi cường độ ánh sáng thấp (che nắng 75-95%) và ngược lại phát triển mạnh mẽ khi cường độ ánh sáng cao (không che). Trái lại cây giá ty in vitro cho thấy với mức ánh sáng  $11,4-22,8\mu\text{mol/m}^2/\text{s}$  đã thích hợp cho chồi phát triển. Ở các loài cây trồng ngắn ngày khác để chồi in vitro phát triển mạnh mẽ cần mức ánh sáng  $>34,2\mu\text{mol/m}^2/\text{s}$ . Điều này cho thấy, khả năng phản ứng với ánh sáng ở cây giá ty in vitro rất hiệu quả trong sinh trưởng và phát triển. Trong nuôi cấy in vitro, sự phát triển chồi phải phù hợp với tăng sinh nhanh để đạt hệ số nhân giống cao và có cấu hình thích hợp (thân khỏe, lá phát triển vừa phải) để đạt tỷ lệ sống cao khi thuần hóa. Với mức ánh sáng  $11,4-22,8\mu\text{mol/m}^2/\text{s}$ , chồi in vitro đã đạt yêu cầu của thể vi nhân giống.

#### Thí nghiệm 8: Ánh hưởng của vị trí đốt nuôi cấy đến nhân nhanh cây giá ty in vitro

Bảng 8. Ánh hưởng của vị trí đốt nuôi cấy đến nhân nhanh cây giá ty in vitro

Vị trí đốt	Chiều cao thân (mm)	Số đốt (no)	Số lá (no)	Chiều dài lá (mm)	Chiều rộng lá (mm)	Sự phát triển lá (+/-)
Ngọn	43,8	3,6	7,3	17,6	7,5	+
Đốt 1	44,8	3,6	7,3	17,6	7,5	+
Đốt 2	47,6	3,1	5,4	17,1	7,9	+
Đốt 3	32,7	2,8	5,3	13,0	5,5	+
Đốt 4	37,5	3,0	5,3	12,0	5,5	+
M	41,3	3,2	6,1	15,5	6,8	
CV%	16,3	12,0	9,3	21,9	22,8	
LSD (0.05)	10,0	0,6	0,8	5,0	2,3	

Hầu hết các mẫu nuôi cấy đều phát sinh chồi và có các chỉ tiêu sinh trưởng phát triển tốt. Mẫu nuôi cấy là chồi ngọn, đốt 1, đốt 2 cho kết quả không sai khác có ý nghĩa. Tương tự mẫu nuôi cấy là đốt 3 và đốt 4. Mẫu nuôi cấy là đốt 2 cho các trị số tuyệt đối cao như chiều cao thân (47,6mm), số đốt (3,1 đốt), số lá (5,4 lá) chiều dài lá (17,1mm) và chiều rộng lá (7,9mm) (bảng 8). Vị trí đốt nuôi cấy thể hiện tình trạng sinh lý của cây. Nếu cây sinh trưởng chậm, mẫu ở vị trí càng về gần gốc phát sinh chồi càng yếu. Qua bảng 8, cho thấy chồi phát sinh với mẫu nuôi cấy ở bất cứ vị trí nào trên thân, điều này chứng tỏ sự thuần nhất về sinh lý ở các vị trí đốt trên thân và thể hiện cây giá ty có tốc độ sinh trưởng phát triển nhanh in vitro như các loài cây ngắn ngày như khoai tây, khoai lang, khoai mì, xoan, hông...

### Thí nghiệm 9: Sinh trưởng và phát triển cây giá ty in vitro

Bảng 9. Sinh trưởng và phát triển cây giá ty in vitro

Mẫu nuôi cấy (A)	Tuần sau cấy (B)	Chiều cao thân (mm)	Số đốt (no)	Số lá (no)	Chiều dài lá (mm)	Chiều rộng lá (mm)	Phát triển lá (+/-)
Ngọn	1	11,9	1,9	3,8	16,8	8,8	
	2	15,8	2,3	4,6	18,4	8,8	
	3	18,9	2,7	5,4	18,6	8,2	
	4	22,5	3,2	6,5	19,5	9,0	
	5	23,9	3,4	6,8	19,3	9,0	
	6	29,2	4,0	6,8	20,8	10,0	
	7	30,2	4,1	5,9	20,7	10,1	
	8	31,2	4,1	3,3	19,7	10,1	
Đốt	1	-	-	-	-	-	
	2	9,1	1,4	2,7	7,5	3,4	
	3	13,4	1,9	3,7	12,9	6,0	
	4	16,9	2,1	4,2	14,3	6,8	
	5	19,3	2,5	4,8	16,0	7,0	
	6	21,4	2,6	4,8	16,2	8,0	
	7	22,5	3,0	5,2	16,6	8,2	
	8	22,3	3,2	3,9	15,1	7,9	
LSD (0.05)		3,2	0,5	0,7	2,5	1,2	

Với mẫu nuôi cấy là chồi ngọn, cho thấy các chỉ tiêu sinh trưởng tăng nhanh đến tuần thứ 6 sau ngày cấy, và chậm dần gần như không có ý nghĩa thống kê sau tuần thứ 6. Tương tự với mẫu nuôi cấy là đốt thân, cho thấy các chỉ tiêu sinh trưởng tăng nhanh đến tuần thứ 6 sau ngày cấy, và chậm dần gần như không có ý nghĩa thống kê sau tuần thứ 6. Đến tuần thứ 6, là thời gian thích hợp nhất cho cấy truyền. Vậy một chu kỳ nuôi cấy là 6 tuần với mẫu được sử dụng nuôi cấy là chồi ngọn hay đốt thân, điều này phù hợp với sự sinh trưởng của cây dò bầu in vitro (bảng 9). Xác định thời gian cấy truyền, hay nói khác hơn là xác định chu kỳ nuôi cấy in vitro là rất quan trọng. Chu kỳ 6 tuần (45 ngày) là chu kỳ nhanh đối với cây thân gỗ; tương đương với cây nông nghiệp ngắn ngày như chuối, đu đủ, cà phê, cacao... chu kỳ là 6 tuần. Chu kỳ nuôi cấy quyết định hệ số nhân nhanh và kế hoạch sản xuất cây con cấy mô.

### Thí nghiệm 10: Ảnh hưởng của Auxin đến quá trình ra rễ cây giá ty

Bảng 10. Ảnh hưởng của Auxin đến quá trình ra rễ cây giá ty in vitro

Auxin (mg/l)	Chiều cao thân (mm)	Số đốt (no)	Số lá (no)	Chiều dài lá (mm)	Chiều rộng lá (mm)	Số rễ (no)	Chiều dài rễ (mm)	Tỷ lệ ra rễ (%)
DC	6,6	2,9	5,6	13,4	6,3	1,8	28,2	62,5
IAA(0,01)	38,2	3,1	5,5	14,9	6,9	1,8	32,0	100,0
IAA(0,05)	45,2	3,1	6,1	17,5	7,7	2,5	28,2	100,0
IBA(0,01)	46,3	3,6	6,6	15,9	7,2	2,3	35,3	100,0
IBA(0,05)	43,6	3,4	6,5	17,5	8,0	2,2	30,5	100,0
NAA(0,01)	37,6	3,2	5,9	13,1	5,7	1,6	21,3	100,0
NAA(0,05)	48,6	3,3	6,0	14,8	6,7	1,5	25,3	100,0
M	42,3	3,2	6,0	15,3	6,9	1,9	28,9	94,6
CV%	13,3	9,3	10,2	15,0	11,5	20,0	22,0	12,52
LSD0.05	8,1	0,4	0,9	3,3	1,2	0,9	9,2	12,2

Hầu hết các nghiệm thức có bổ sung auxin đều kích thích phát sinh rễ ở giá ty, và có tỷ lệ ra rễ cao hơn đối chứng (62,5%), tương tự như các chỉ tiêu sinh trưởng cũng khác nhau có ý nghĩa. Auxin đóng vai trò quy luật ra rễ ở cây giá ty in vitro. So sánh giữa các nghiệm thức có bổ sung auxin và nồng độ của auxin, cho thấy các chỉ tiêu sinh trưởng không saikhác rõ rệt. Với nồng độ rất thấp của auxin 0,01mg/l đã kích thích phát sinh rễ (bảng 10). Kết quả nhận thấy cây giá ty là cây dễ dàng ra rễ, tương tự như cây khoai tây, khoai lang, keo, bạch đàn, hông, xoan... mà đây là những cây có khả năng giâm hom. Điều này rất lý thú, sẽ dẫn chúng ta đến khả năng nhân nhanh in vivo, khác với giâm hom là cấy cấy mô có đặc điểm sinh lý trẻ, hiệu suất giâm hom sẽ cao và duy trì được lâu, là một trong những yếu tố không thể thiếu để hạ giá thành sản phẩm cây con cấy mô.

### **Thí nghiệm 11: Ảnh hưởng của chế độ thuần hóa đến tỷ lệ sống cây cấy mô**

**Bảng 11. Ảnh hưởng của chế độ thuần hóa đến tỷ lệ cây sống**

Chế độ thuần hóa	Tỷ lệ cây sống sau 21 ngày (%)
Phun sương + đất	36,82
Phun sương + đất + tro trấu	42,25
Phun sương + đất + tro trấu + xơ dừa	68,75
Phun sương + xơ dừa	96,52

Chế độ chuẩn trong thuần hóa là phun sương. Bên cạnh đó cơ chất chiếm vai trò quan trọng. Cơ chất càng tơi xốp, thoát nước nhanh và không úng thường được sử dụng. Với những cơ chất có sẵn như tro trấu và xơ dừa, đều cho thấy là những cơ chất thích hợp cho thuần hóa cây cấy mô. Kết quả nhận thấy chế độ phun sương + cơ chất xơ dừa cho tỷ lệ sống cao (96,52%). Trong cơ chất có đất, hạn chế thoát nước, giữ nước trong đất lâu, không thích hợp với cây con giá ty... cải thiện tính chất đất bằng cách bổ sung tro trấu hay tro trấu + xơ dừa đã nâng cao tỷ lệ sống (42,25-68,75%). Cây giá ty cần đủ ẩm ở môi trường vi khí hậu, nhưng không được quá ẩm, thì xơ dừa đã tỏ ra thích hợp (bảng 11).

### **KẾT LUẬN**

- Chồi đinh cây giá ty đầu dòng và nhập nội được sử dụng như nguyên liệu nuôi cấy ban đầu. Chồi phát sinh mạnh mẽ trên môi trường WPM+BA(0,1mg/l). Chồi non được sử dụng như nguyên liệu cho các thí nghiệm về sau.
- Môi trường dinh dưỡng thích hợp cho nuôi cấy cây giá ty in vitro là WPM.
- Chất điều hòa sinh trưởng BA tác động theo quy luật trong nhân nhanh cây giá ty in vitro ở nồng độ 0,1mg/l.
- Hàm lượng khoáng đa lượng (x1), Tyrosine (10mg/l), Adenine sulfate (10mg/l), nước dừa (5%) đã kích thích có ý nghĩa đến tăng nhanh sinh trưởng và phát triển cây giá ty in vitro.
- Vị trí đốt đem nuôi cấy chồi ngắn, đốt 1-4 được nghiên cứu, mẫu nuôi cấy thể hiện độ thuần sinh lý ở các vị trí nuôi cấy, cho thấy khả năng tăng sinh nhanh in vitro.
- Thể tích bình nuôi cấy, trao đổi khí, cường độ chiếu sáng ảnh hưởng sâu sắc đến khả năng tách sinh nhanh in vitro. Tăng quá trình trao đổi khí (sử dụng nắp giấy), với cường độ chiếu sáng trung bình  $22,8\mu\text{mol/m}^2/\text{s}$ , tăng thể tích bình nuôi cấy (500ml) và giữ ổn định nhiệt độ ( $28\pm1^\circ\text{C}$ ) đã kích thích tăng sinh mạnh mẽ cây giá ty in vitro
- Khảo sát sinh trưởng và phát triển cây giá ty in vitro cho thấy: vào thời điểm 45 ngày sau nuôi cấy là thời điểm cấy truyền tăng sinh khối hay nuôi cấy phát sinh rễ thích hợp nhất.
- Rễ phát sinh dễ dàng in vitro, với nồng độ thấp của auxin (0,05mg/l) cũng đã kích thích chồi non phát sinh rễ 100%.
- Thuần hóa cây giá ty cấy mô bằng phương pháp phun sương giữ ẩm với nền xơ dừa đã giữ được tỷ lệ sống cao (96,52%)
- Một hệ thống thích hợp nhân nhanh cây giá ty bằng kỹ thuật công nghệ tế bào thực vật đã được xây dựng

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- AHUJA MR and WJ. LIBBY, 1993a. Clonal forestry I. *Genetics and biotechnology*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, NewYork, Lodon, Paris, Tokyo, Hongkong, Barcelona, Budapest
- AHUJA MR and WJ. LIBBY, 1993b. Clonal forestry II. *Conservation and application*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, NewYork, Lodon, Paris, Tokyo, Hongkong, Barcelona, Budapest
- BEDEL PE., 1989. *Preliminary observations on variability of teak in India*. Indian For. 115(2):72-81
- DUPUY B. and D. VERHAEGEN, 1993. *Le teck de plantation Tectona grandis en Cote-d'Ivoir*. Bois et Foret des Tropiques 225:9-24
- KAOSAR-ARD A., 1986. *Teak, Tectona grandis Linn.f: nursery techniques with special reference to Thailand*. Danida Forest Seed Centre, Seed leaflet No.4, 11/1986
- LLOYD G. and B. MCCOWN, 1981. *Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, Kalmia latifolia, by use of shoot-tip culture*. In: Comb. Proc. Intl. Plant Prop. Soc., 1981(30):421-426
- MASCARENHAS AF., SV. KENDURKAR, PK. GUPTA, SS. KHUSPE and DC. AGRAWAL, 1987. *Teak*. In: *Cell and tissue culture inforestry* (eds. JM Bonga and DJ Durzan), Vol.3. pp310-315, The Netherland,
- MASCARENHAS AF. and EM. MURALIDHARAN, 1993. *Clonal forestry with tropical hardwoods*. In: Clonal forestry II. Conservation and application (eds. MR Ahuja, WJ Libby). Springer-Verlag, Berlin, Heidelbergh, NewYork, London, Paris, Tokyo, Hongkong, Barcelona, Budapest. Pp 169-187
- MONTEUUUIS O., 2000. *Propagating teak by cuttings and microcuttings*. TEAKNET No.3
- MONTEUUUIS O., D. VALLAURI, C. POUPARD, L. HAZARD, Y. YUSOF, LA. WAHAP, C. GARCIA and M. CHAUVIERE, 1995. *Propagation clonale de tecks matures par bouturage horticole*. Bois et Forets des Tropiques 243:25-39
- MURASHIGE T. and F. SKOOG, 1962. *A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures*. Physiol. Plant. 15:473-497
- TIMMIS R., 1985. *Factors influencing the use of clonal material in commercial forestry*. In: Proc. an int'l conf. on managing forestry trees as cultivated plants, Helsinki, Finland, 23-28 July 1998. pp 259-272
- WAREING PF., 1987. *Phase change and vegetative propagation*. In: Improveing vegetatively propagated crops. Academic Press, London. Pp 263-270
- WELLENDORF H. and A. KAOSA-ARD, 1988. *Teak improvement strategy in Thailand*. Technical Note No.21. Danida Forest Seed Centre, Denmark.
- WHITE KJ., 1991. *Teak: some aspects of research and development*. Publication 1991/17. FAO regional office for Asia and the Pacific (RAPA), Bangkok.
- ZOBEL B. and J. TALBERT, 1984. *Applied forest tree improvement*. John Wiley & Son, NewYork, Chichester, Brisbane, Toronto, Singapore