

ẢNH HƯỞNG CỦA ẨM ĐỘ VÀ NHIỆT ĐỘ TRONG PHÒNG NUÔI CÂY ĐẾN SỰ PHÁT TRIỂN QUANG TỰ DƯỠNG CỦA CÂY NEEM THAI (*Azadirachta siamensis*) IN VITRO VÀ EX VITRO

LUANG, PATHUMTHANI 12120, THAILAND

Nguyễn Thị Kim Linh (*), Chalermopol Kirdmanee (**)

(*) Bộ môn Công nghệ Sinh học, Đại học Nông Lâm Tp. HCM

(**) National science and technology development agency, Thailand

SUMMARY

Thai neem (*Azadirachta siamensis*) shoots were cultured photoautotrophically *in vitro* for four weeks at $25 \pm 2^\circ\text{C}$ and $35 \pm 2^\circ\text{C}$ air temperature in combination with three levels of relative humidity ($55 \pm 5\%$, $75 \pm 5\%$ and $95 \pm 5\%$). Plantlets from each treatment *in vitro* were then transplanted into a greenhouse for two weeks. The growth and net photosynthetic rate of plantlets *in vitro*, as well as subsequent growth, and survival percentage of plantlets *ex vitro* were evaluated. High relative humidity significantly increased fresh weight, leaf area regardless of the temperature. However, there was no significant difference in dry weight and net photosynthetic rate per plantlet between treatments. Plantlets cultured under high temperature were higher dry weight, root number, leaf number than those cultured under low temperature. The growth and survival percentage of plantlets *ex vitro* were highest in plantlets cultured *in-vitro* under $75 \pm 5\%$ relative humidity and $35 \pm 2^\circ\text{C}$.

Key words: Thai Neem, *Azadirachta siamensis*, Net photosynthetic rate, relative humidity, temperature, survival percentage.

GIỚI THIỆU

Neem là một loại cây thân gỗ có nhiều công dụng. Neem được sử dụng trị bệnh. Vỏ neem trị các chứng mệt mỏi, ho, sốt rét, mất cảm giác ngon miệng, ói mửa, quá khát nước, các chứng bệnh ngoài da và làm lành vết thương. Lá neem dùng để giải độc và lọc máu. Dầu neem lấy từ hạt là thuốc trị giun sán có hiệu quả. Ngoài ra neem còn có công dụng cải tạo môi trường. Vào mùa hè nóng bức, nhiệt độ dưới tán cây neem thấp hơn 10°C so với nhiệt độ môi trường xung quanh. Cây neem còn lọc sạch những chất gây ô nhiễm môi trường không khí xung quanh. Cây neem cũng có nhiều ứng dụng trong nông nghiệp như: phòng trừ sâu hại, phân bón, dầu neem sử dụng một mình hay phối hợp với hun khói rất có hiệu quả trong việc phòng trừ các loài sâu hại chính trong kho

bảo quản ngũ cốc. Bánh hạt neem cung cấp nhiều loại dinh dưỡng cho cây trồng. Phân bón bằng bánh hạt neem cũng có thể làm giảm nồng độ kiềm trong đất nhờ sản xuất các acid hữu cơ. Vì vậy mà nhu cầu trồng cây neem ngày càng tăng. Tuy nhiên việc nhân giống bằng phương pháp cắt cành và ghép cành truyền thống không đủ đáp ứng nhu cầu lớn như vậy. Do đó việc áp dụng phương pháp vi nhân giống vô tính để nhân nhanh cây neem là rất cần thiết.

Vi nhân giống là một phương pháp có nhiều ưu điểm so với các phương pháp nhân giống truyền thống. Tuy nhiên vẫn còn hạn chế về mặt thương mại do chi phí sản xuất cây con còn cao, hệ số tăng trưởng của cây *in vitro* thấp và tỉ lệ sống của cây *ex vitro* trong vườn ươm thấp (Kozai, 1997). Gần đây đã có nhiều bài báo viết về ảnh hưởng của nhiệt độ trong phòng nuôi cấy và ẩm độ (RH) trong bình nuôi cấy lên sự sinh trưởng và phát triển của cây con trong ống nghiệm cũng như tỉ lệ sống của cây con ngoài vườn ươm. Trong nuôi cấy mô truyền thống, ẩm độ trong bình nuôi cấy thường rất cao làm cho các đặc điểm hình thái và sinh lý mất bình thường (Ziv, 1983; Scloupf, 1995). Lá cây *in vitro* được nuôi ở ẩm độ cao thường có lớp sáp mỏng (Fuchigami, 1981, Grout and Aston, 1977) và khí khổng kém linh hoạt (Brainerd and Fuchigami, 1981). Khi giảm ẩm độ trong bình nuôi cấy thì cây con tỏ ra khỏe mạnh hơn và có chiều cao cây ngắn hơn (Kozai, 1993). Gần đây có nhiều nghiên cứu về ảnh hưởng của sự thay đổi nhiệt độ giữa thời gian chiếu sáng và thời gian tối (DIF) lên cây *in vitro* (Kozai, 1994), sự tương tác giữa DIF và ánh sáng lên cây *in vitro* (Kozai, 1986). Tuy nhiên chưa có nghiên cứu nào về ảnh hưởng của nhiệt độ và ẩm độ lên sự sinh trưởng và phát triển của cây *in vitro* và tỉ lệ sống của cây *ex vitro*.

Mục tiêu của nghiên cứu này là thiết lập một qui trình thuần hóa cây neem *in vitro* để tạo ra những cây neem cấy mô khỏe mạnh có hiệu suất quang hợp thuần cao, một hệ thống rễ hoàn chỉnh và có sự phát triển đồng đều giữa thân lá và rễ.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Mẫu cấy và điều kiện nuôi cấy

Sử dụng phần ngọn mang 2-3 lá của cây neem Thái (*Azadirachta siamensis*) *in vitro* làm vật liệu nuôi cấy ban đầu. Mẫu được cấy trên môi trường MS (Murashige & Skoog, 1962) không bổ sung thêm đường và chất kích thích sinh trưởng. pH môi trường được chỉnh 5.8 trước khi hấp khử trùng. Vermiculite được sử dụng làm giá thể thay vì agar. Sử dụng chai thủy tinh miệng rộng làm bình nuôi cấy. Mỗi bình chứa 35 ml môi trường và 10 g vermiculite. Trong 10 ngày đầu tiên sau khi cấy, toàn bộ cả các nghiệm thức thí nghiệm đều được đặt trong cùng một điều kiện cường độ ánh sáng 100 $\mu\text{mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$, thời gian chiếu sáng 16 h ngày⁻¹, nhiệt độ phòng 25 \pm 2°C, ẩm độ tương đối 75 \pm 5% và nồng độ khí CO₂ ngang bằng với tự nhiên (350 – 450 μmolmol^{-1}). Vào cuối ngày 10, lấy ngẫu nhiên 20 chai chứa mẫu cấy đặt cùng nhau trong một hộp nhựa (kích thước dài 32 cm, rộng 24 cm, cao 18 cm). Trong mỗi hộp nhựa chứa sẵn 1500 ml nước cất khử trùng hoặc dung dịch muối NaCl bão hòa hoặc muối Ca(NO₃)₂.4H₂O bão hòa để điều chỉnh ẩm độ trong hộp 95 \pm 5%, 75 \pm 5% hoặc 55 \pm 5% theo thứ tự. Đặt hộp trong phòng nuôi cấy trong điều kiện nhiệt độ 25 \pm 2°C hoặc 35 \pm 2°C, cường độ ánh sáng 100 $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$, thời gian chiếu sáng 16 h ngày⁻¹.

Vườn ươm

Vào ngày thứ 28, ở mỗi nghiệm thức lấy ra 20 cây neem con để cân trọng lượng tươi, đo chiều dài rễ, chiều cao thân và diện tích lá. 20 cây còn lại của cùng nghiệm thức đó được chuyển ra trồng ở vườn ươm. Toàn bộ các cây này đều được đặt trong điều kiện ẩm độ 60 \pm 5%, nhiệt độ 30 \pm 2°C trong thời gian 2 ngày. Ngày đầu tiên tưới nước phun sương sau mỗi giờ. Ngày thứ 2 cứ sau 2 giờ thì tưới một lần. Ngày thứ 3, chuyển cây ra vườn ươm và tưới 2 lần mỗi ngày. Ẩm độ trong vườn ươm là 60 \pm 5%, nhiệt độ 30 \pm 2 °C, cường độ ánh sáng 8000 $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$.

Các nghiệm thức thí nghiệm được thể hiện ở bảng 1.

Bảng 1. Mô tả các nghiệm thức thí nghiệm

Nghiệm thức	Nhiệt độ (°C)	Ẩm độ (%)
LL	25 \pm 5	55 \pm 5
LM		75 \pm 5
LH		95 \pm 5
HL	35 \pm 5	55 \pm 5
HM		75 \pm 5
HH		95 \pm 5

Các chỉ tiêu theo dõi

Các chỉ tiêu trọng lượng tươi, trọng lượng khô, chiều cao cây, chiều dài rễ, số lượng rễ được thu thập vào ngày thứ 28 sau cấy. Trọng lượng khô của cây được lấy sau khi sấy khô 48 giờ ở nhiệt độ 110°C trong lò sấy (Memmert, model 500, german). Sử dụng phần mềm tính diện tích lá và DT – Scan (Delta –Scan Version 2.03, Delta – T Devices, Ltd., England) để tính diện tích lá.

Hiệu suất quang hợp thuần

Sử dụng máy sắc ký khí (GC, model GC – 17A, Shimadzu Co. Ltd., Japan) để đo nồng độ khí CO₂ bên trong và bên ngoài hộp nuôi cấy. Hiệu suất quang hợp thuần được tính theo công thức $P = [K.E.V(C_{in} - C_{out})] / L$. Trong đó K là hệ số chuyển đổi giữa thể tích và trọng lượng khí CO₂, có giá trị –40.9 mol m⁻³ ở 28°C. E là hệ số trao đổi khí của bình nuôi cấy. V là thể tích khí trong bình nuôi cấy. C_{in} và C_{out} là nồng độ khí CO₂ (mol mol⁻¹) bên trong và bên ngoài bình nuôi cấy. L là diện tích lá (m²).

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Ẩm độ (RH) thật trong bình nuôi cấy

Những bình chứa muối bão hòa có ẩm độ tăng dần theo thời gian nuôi cấy do sự thoát hơi nước của cây và sự bốc hơi của môi trường (Kozai, 1993). Ẩm độ thật trong các bình chứa dung dịch muối NaCl vào ngày thứ 10 và 20 sau cấy lần lượt là 59% và 65%. Tương tự, ẩm độ trong bình chứa dung dịch muối Ca(NO₃)₂.4H₂O vào ngày 10 và 20 sau cấy lần lượt là 81% and 85%. Còn ẩm độ trong các bình chứa nước lần lượt là 94% and 96% vào ngày thứ 10 và 20 sau cấy. Sự thoát hơi nước của cây con trong các bình có ẩm độ thấp cao hơn cây ở các bình có ẩm độ cao. Sự bốc hơi nước của môi trường nuôi cấy trong hộp ẩm độ thấp cũng nhanh hơn ở hộp ẩm độ cao. Điều này góp phần giải thích sự gia tăng ẩm độ trong suốt thời gian nuôi cấy ở các bình chứa dung dịch muối bão hòa cao hơn ở các bình chứa nước cất.

Hiệu suất quang hợp thuần (Đồ thị 1)

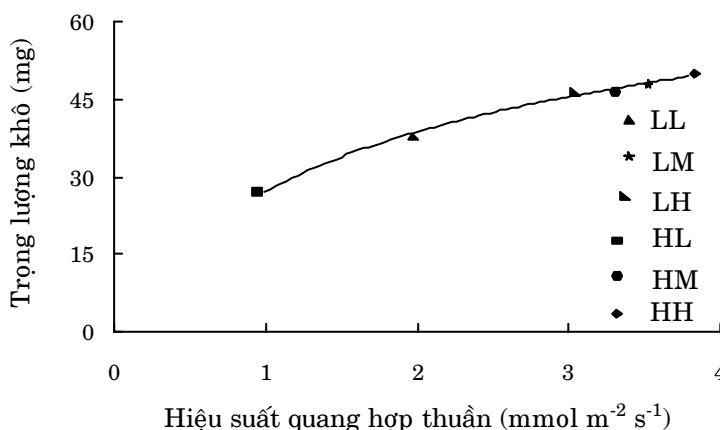
Hiệu suất quang hợp thuần của cây con ở các nghiệm thức LH và HH vào ngày thứ 28 tương đương với cây ở các nghiệm thức LM và HM và cao hơn gần 2 lần so với cây ở các nghiệm thức LL và HL ở bất kỳ điều kiện nhiệt độ cao hay thấp. Trọng lượng khô của cây con nuôi cấy ở nghiệm thức HH là cao nhất nhưng không khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê so với trọng lượng khô của các cây ở các nghiệm thức LM, LH, và HM. Cây con ở nghiệm thức HL có trọng lượng khô thấp nhất. Chúng tôi nhận thấy giữa trọng

lượng khô và hiệu suất quang hợp thuần của cây con có mối quan hệ chặt chẽ nhau. Những cây con có hiệu suất quang hợp thuần cao có khả năng tích lũy nhiều chất khô vì vậy mà có trọng lượng khô cao, ngược lại khi cây có trọng lượng khô cao sẽ kích thích khả năng quang hợp làm cây quang hợp mạnh hơn và có hiệu suất quang hợp thuần cao.

Một điều rất đáng được chú ý ở đây là cây sống trong điều kiện nhiệt độ cao có trọng lượng tươi thấp hơn nhưng trọng lượng khô lại cao hơn cây sống trong điều kiện nhiệt độ thấp. Điều này có thể là nhiệt độ cao đã làm tăng sự trao đổi khí giữa bên trong và bên ngoài bình nuôi cấy vì vậy mà cây con nuôi ở nhiệt độ cao có nhiều cơ hội nhận được khí CO₂ nên hiệu suất quang hợp thuần tăng và vì vậy trọng lượng khô tăng. Hơn nữa, ở nhiệt độ cao quá trình thoát hơi nước ở lá cây diễn ra mạnh làm cho khí khổng mở ra và vì vậy lá lấy được nhiều khí CO₂. Kozai (1993) đã công bố kết quả tương tự như vậy trên cây khoai tây nuôi cấy mô.

Các chỉ tiêu sinh trưởng, phát triển của cây neem in vitro

Nhiệt độ cao làm giảm đáng kể trọng lượng tươi của cây con in vitro ở bất kỳ điều kiện ẩm độ nào. Trọng lượng tươi của cây ở các nghiệm thức LH và HH lớn hơn gấp 2 lần so với trọng lượng tươi của các cây ở nghiệm thức LL và LH ở bất kỳ nhiệt độ thấp hay cao. Sự tương tác giữa nhiệt độ và ẩm độ làm gia tăng trọng lượng tươi của cây. Trọng lượng tươi của cây con ở nghiệm thức LH đạt cao nhất, lớn hơn gấp 4 lần so với cây ở nghiệm thức HL và lớn hơn 2 lần so với cây ở nghiệm thức LL (bảng 2). Cây con ở các nghiệm thức LM và HH có trọng lượng tươi tương đương nhau và nhỏ hơn có ý nghĩa so với trọng lượng tươi của cây ở nghiệm thức LH. Cây ở nghiệm thức HL có trọng lượng khô thấp nhất (bảng 2).



Đồ thị 1. Sự tương quan giữa trọng lượng khô và hiệu suất quang hợp thuần của cây neem con vào ngày thứ 28 trong điều kiện in vitro

Bảng 2. Trọng lượng tươi, diện tích lá, số lá của cây neem in vitro ở các điều kiện nhiệt độ và ẩm độ khác nhau vào ngày thứ 28 sau cấy

Nghiệm thức	Trọng lượng tươi (mg)	Diện tích lá (mm ²)	Số lá
LL ^a	142d	620 d	4 c
LM	223 b	1032 b	5 b
LH	276 a	1286 a	5 b
HL	62 e	491 e	4 c
HM	176c	855 c	5 b
HH	226 b	1029 b	6 a

ANOVA			
Nhiệt độ (N)	**	*	NS
Ẩm độ (A)	**	**	NS
N x A	*	*	*

*: Khác biệt có ý nghĩa ở mức độ $p \leq 0.05$, **: Khác biệt có ý nghĩa ở mức độ $p \leq 0.01$

NS: Khác biệt không có ý nghĩa về mặt thống kê, ^a: Tên các nghiệm thức, xem bảng 1

Các chữ cái khác nhau theo sau số liệu mỗi cột chỉ sự khác biệt có ý nghĩa giữa các nghiệm thức bằng phương pháp Duncan's multiple range test

Cây sống ở điều kiện nhiệt độ thấp có diện tích lá lớn hơn cây sống ở điều kiện nhiệt độ cao. Ở nhiệt độ cao cây có nhiều lá hơn nhưng lá nhỏ hơn nhiều so với cây ở nhiệt độ thấp. Cây sống ở ẩm độ cao có diện tích lá lớn hơn cây sống ở ẩm độ thấp. Diện tích lá của cây ở nghiệm thức LH là lớn nhất và HL là nhỏ nhất. Kozai và các cộng tác viên 1993 cũng đạt được kết quả tương tự trên cây khoai tây. Chúng tôi nhận thấy có sự khác biệt rất rõ ràng về hình thái của cây ở các ẩm độ khác nhau. Cây sống trong điều kiện ẩm độ thấp thì lá có màu xanh đậm, còn cây sống trong điều kiện ẩm độ cao thì lá có màu xanh nhạt. Ở điều kiện ẩm độ thấp (55 ± 5%), hàm lượng nước trong môi trường bị bốc hơi nhanh chóng làm cho môi trường trở nên khô dần và đặc biệt rất khô vào những ngày cuối của thời kỳ nuôi cấy. Vì vậy rễ không phát triển tốt và cũng không hút được dinh dưỡng nuôi cây nên cây phát triển chậm và bị khô dần. Ở điều kiện ẩm độ trung bình (75 ± 5%) cây con sinh trưởng và phát triển rất khoẻ mạnh, tốt hơn cây sống trong điều kiện ẩm độ cao (95 ± 5%). Cây con sống trong điều kiện ẩm độ 75 ± 5% có khả năng chống chịu được sự mất nước quá nhiều qua thoát hơi trên bề mặt lá hoặc trong điều kiện khô hạn khi đưa ra trồng ngoài vườn ươm hay ra ruộng sản xuất (Tanaka, 1992).

Trong số các chỉ tiêu sinh trưởng và phát triển thì chiều cao cây là chỉ tiêu chịu ảnh hưởng của ẩm độ rõ rệt nhất. Ẩm độ càng thấp thì chiều cao cây càng giảm (bảng 3). Vào ngày thứ 28, chiều cao cây ở nghiệm thức LH and HH lần lượt là 30 mm và 29 mm, cao hơn rất có ý nghĩa so với chiều cao cây ở các nghiệm thức còn lại. Cây ở nghiệm thức LM and HM có chiều cao lần lượt là 22 mm and 21 mm, và cao hơn có ý nghĩa so với chiều cao cây ở nghiệm thức LL and HL. Kết quả này cho thấy rằng chiều cao của cây neem con *in vitro* có thể điều khiển được bằng cách khống chế ẩm độ trong bình nuôi cấy.

Cây thấp lại trong điều kiện ẩm độ thấp có thể là một sự thích nghi tốt với điều kiện ẩm độ thấp bên ngoài vườn ươm vì hệ số bốc thoát hơi nước qua lá thấp. Vì vậy, có thể thực hiện việc thuần hóa cây con sống tốt trong điều kiện khan hiếm nước bằng cách khống chế ẩm độ trong bình nuôi cấy (Kozai, 1993).

Sự sinh trưởng và phát triển của cây con trong vườn ươm

Ẩm độ trong bình nuôi cấy không những ảnh hưởng đến trọng lượng tươi và trọng lượng khô (bảng 4) của cây con trong giai đoạn *in vitro* mà còn hưởng mạnh mẽ trọng lượng tươi và trọng lượng khô của cây con trong giai đoạn ngoài vườn ươm. Trọng lượng tươi của cây con vào ngày thứ 14 ở các nghiệm thức HM và LM là cao nhất và cao hơn gấp 1.3 lần so với trọng lượng tươi của cây ở các nghiệm thức LH and HH, đồng thời cao hơn 2.5 lần so với trọng lượng tươi của cây ở các nghiệm thức LL và HL. Cây ở các nghiệm LM và HM có trọng lượng khô cao nhất và cao hơn gấp 1.4 lần so với cây ở nghiệm thức LH and HH, đồng thời cũng cao hơn 3 lần so với cây ở các nghiệm thức LL and HL. Cây ở các nghiệm thức LM and HM có khả năng chống lại sự bốc thoát hơi nước qua lá lớn hơn cây ở các nghiệm thức LH và HL cây con ở nghiệm thức LM và HM có khả năng điều khiển lượng nước thoát hơi qua lá nên lá không bị héo đi và nhờ vậy mà toàn bộ cây vẫn cứ tươi và tiếp tục phát triển trong suốt 3 ngày đầu tiên khi đưa ra vườn ươm. Trong khi đó cây ở các nghiệm thức có ẩm độ cao lá cây bị mất nước nhiều nên bị héo đi và lại tươi lên sau mỗi lần tưới, một số lá mất nước quá nhiều không thể hồi phục được nên đã chết. Điều này giải thích tại sao hệ số tăng trưởng và tỉ lệ sống của cây con ở các nghiệm thức ẩm độ trung bình (75 ± 5%) trong *in vitro* lại cao hơn những chỉ tiêu đó của cây ở các nghiệm thức ẩm độ cao (95 ± 5%).

Bảng 3. Chiều cao cây, chiều dài rễ, và số lượng rễ của cây neem Thai *in vitro* nuôi cấy ở các điều kiện nhiệt độ và ẩm độ khác nhau vào ngày thứ 28

Nghiệm thức	Cao cây (mm)	Dài rễ (mm)	Số rễ
LL ^z	17 c	73 b	1.33
LM	22 b	90 ab	1.73
LH	30 a	106 a	1.24
HL	16 c	23 c	1.13
HM	21 b	60 b	2.11
HH	29 a	62 b	1.85
ANOVA			
Nhiệt độ (N)	NS	*	NS
Ẩm độ (A)	**	*	NS
N x A	*	*	NS

*: Khác biệt có ý nghĩa ở mức độ p ≤ 0.05, **: Khác biệt có ý nghĩa ở mức độ p ≤ 0.01
 NS: Khác biệt không có ý nghĩa về mặt thống kê, ^z: Tên các nghiệm thức, xem bảng 1
 Các chữ cái khác nhau theo sau số liệu mỗi cột chỉ sự khác biệt có ý nghĩa giữa các nghiệm thức bằng phương pháp Duncan's multiple range test.

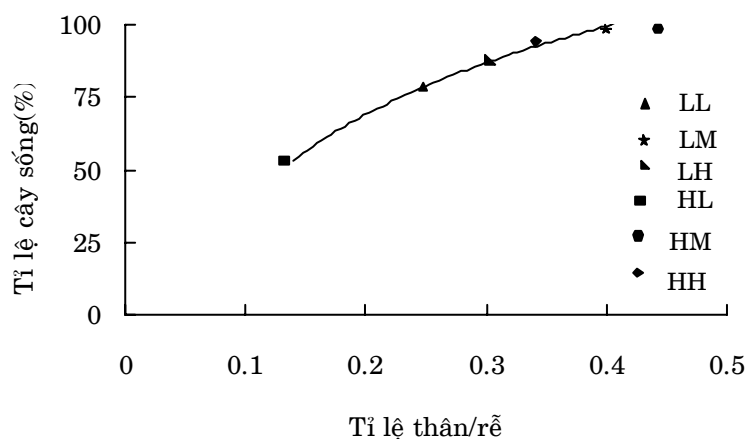
Bảng 4. Trọng lượng tươi, trọng lượng khô, số rễ, và diện tích lá của cây neem thai nuôi cấy mô được chuyển ra trồng ngoài vườn ươm vào ngày thứ 14

Nghiệm thức	Trọng lượng tươi (mg)	Trọng lượng khô (mg)	Dài rễ (mm)	Số rễ	Diện tích lá (mm ²)
LL ^z	240 c	52 c	79	2 c	894 b
LM	523 a	130 a	105	3 b	1353a
LH	450 b	95 b	121	1 d	1397 a
HL	160 c	36 c	48	1 d	656 c
HM	550 a	140 a	99	4 a	1353 a
HH	480 b	110 b	120	2 c	1384 a
ANOVA					
Nhiệt độ (N)	NS	NS	NS	*	NS
Ẩm độ (A)	**	*	NS	*	NS
N x A	**	*	*	*	*

*: Khác biệt có ý nghĩa ở mức độ $p \leq 0.05$, **: Khác biệt có ý nghĩa ở mức độ $p \leq 0.01$

NS: Khác biệt không có ý nghĩa về mặt thống kê, ^z: Tên các nghiệm thức, xem bảng 1

Các chữ cái khác nhau theo sau số liệu mỗi cột chỉ sự khác biệt có ý nghĩa giữa các nghiệm thức bằng phương pháp Duncan's multiple range test.



Đồ thị 2. Ảnh hưởng của chỉ tiêu tỉ lệ thân /rễ đến tỉ lệ cây sống trong vườn ươm

Chỉ tiêu tỉ lệ trọng lượng thân/rễ (đồ thị 2) ảnh hưởng rất lớn đến tỉ lệ cây sống ngoài vườn ươm. Cây con có trị số tỉ lệ trọng lượng thân/rễ càng tiến về 1 thì có khả năng sống càng cao khi đưa ra trồng ngoài vườn ươm. Cây con in vitro nuôi cấy trong điều kiện Ẩm độ trung bình ($75 \pm 5\%$) có sự phát triển cân đối giữa thân lá và rễ nên hệ số này cao nhất (0,5). Bộ rễ phát triển mạnh hút nhiều dinh dưỡng cung cấp cho cây, và thúc đẩy phần thân lá bên trên phát triển; ngược lại, khi thân lá phát triển mạnh thúc đẩy rễ hoạt động và phát triển mạnh hơn. Chính vì vậy cây con nuôi cấy ở điều kiện Ẩm độ trung bình ($75 \pm 5\%$) phát triển rất nhanh và có tỉ lệ sống cao khi trồng ra vườn ươm. Cây con được nuôi trong điều kiện Ẩm độ cao ($95 \pm 5\%$) chỉ có một rễ chính rất dài nhưng không có hệ rễ thứ cấp nên dễ bị tổn thương khi trồng ra vườn ươm vì vậy mà nó không tiếp tục phát triển mà phải mất một thời gian để hồi phục,

kết quả là cây phát triển chậm hơn cây ở điều kiện Ẩm độ trung bình ($75 \pm 5\%$), thậm chí có cây không thể phục hồi được và đã chết làm cho tỉ lệ sống thấp.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

BRAINERD KE. and FUCHIGAMI LH, 1981. *Acclimatization of aseptically cultured apple plants to low humidity*. J Amer Soc Hort Sci 106, 515-518.

FUCHIGAMI LH, CHENG TY, AND SOELDNER A, 1981. *Abaxial transpiration and water loss in aseptically culture plum*. J Amer Soc Hort Sci 106, 519-522.

FUJIWARA K, AITKEN-CHRISTIE J, KOZAI T, 1993. *Water potential of radiata pine shoots culture in vitro under different relative humidities*. Plant Tissue Culture Letters 10 (2), 144 -150.

- FUJIWARA K, KOZAI T, and WATANABE I, 1997. *Fundamental studies on environments in plant tissue culture vessels*. *J Agr Met* **43** (1), 21-30.
- GROUT BWW and ASTON MJ, 1977. Transplanting of cauliflower plants generated from meristem culture. I. water loss and water transfer related to changes in leaf wax and to xylem regeneration. *Hort Res* **17**, 1-7.
- KIRDMANEE C, KITAYA Y, and KOZAI T, 1995. Rapid acclimatization of eucalyptus plantlets by controlling photosynthetic photon flux density and relative humidity. *Environment Control in Biol* **33**, 609-618.
- KIRDMANEE C, KITAYA Y, and KOZAI T, 1995. Effect of CO₂ enrichment and supporting material in vitro on photoautotrophic growth of eucalyptus plantlets in vitro and ex vitro. *In vitro Cell Dev Biol* **31**, 595-600.
- KOZAI T, 1994. Environmental control for autotrophic micropropagation. In: *Collected Papers on Environmental Control in Micropropagation 2* (Edited by Chieri Kubota), pp 467-480.
- KOZAI T ET AL, 1997. Environmental control for the large- scale production of plants through *in vitro* techniques. *Plant cell tissue and organ culture* **51**, 144-151.
- KOZAI T, FUJIWARW K, and WATANABE I, 1986. Fundamental studies on environments in plant tissue culture vessels. *J Agr Met* **42** (2), 119-127.
- KOZAI T, TANAKA K, JOENG BR, and FUJIWARA K, 1993 Effect of relative humidity in the culture vessel on the growth and shoot elongation of potato (*Solanum tuberosum* L.) plantlets *in vitro*. *J Japan Soc Hort Sci* **62** (2), 413-417.
- MURASHIGE T and SKOOG F, 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol Plant* **15**, 473-497.
- SCHLOUPF RM, BARRINGER SA, and SPLITTSTOESSER WE, 1995. A review of hyperhydricity (vitrification) in tissue culture. *Plant Growth Regul Soc of Amer Quarterly* **23**(3), 1949-1958.
- TANAKA K, FUJIWARA K, and KOZAI T, 1992. Effects of relative humidity in culture vessel on the transpiration and net photosynthetic rates of potato plantlets *in vitro*. *Acta Horticulturae* **319**, 452-457.
- ZIV M, MEIR G, and HALEVY AH, 1983. Factors influencing the production of hardened glaucous carnation plantlets in vitro. *Plant Cell Tiss Org* **2**, 55-65.