

NHÂN GIỐNG CÂY HÀM HƯƠNG (*Nashia inaguensis*) BẰNG KỸ THUẬT NUÔI CẤY MÔ

Nguyễn Văn Ấy^{1*}, Võ Thị Bích Ngân²,
Trần Nguyễn Phương Lam¹ và Lê Văn Hòa¹

TÓM TẮT

Nuôi cấy *in vitro* cây Hàm hương (*Nashia inaguensis* Millsp.) nhằm xác định môi trường thích hợp trong nhân nhanh trong thời gian ngắn. Kết quả nghiên cứu cho thấy: (i) chồi Hàm hương có thể tái sinh từ mô sẹo trong môi trường MS bổ sung TDZ nồng độ 0,01 mg/L, nhân nhanh số lượng chồi trong môi trường MS bổ sung 0,5 mg/L BA cho tỷ lệ tạo chồi cao (7,55 chồi sau 40 ngày nuôi cấy); (ii) Trong giai đoạn tạo rễ, sử dụng môi trường MS không chất điều hòa sinh trưởng (tỷ lệ tạo rễ cao, 100%), các cây con có thể thuần dưỡng trong điều kiện nhà lưới; và (iii) Ở giai đoạn thuần dưỡng, có thể sử dụng giá thể mụn xơ dừa : tro trấu (tỷ lệ 1:1) hoặc mụn xơ dừa : phân rơm : tro trấu (tỷ lệ: 1 : 1 : 1) để tiến hành thuần dưỡng cây Hàm hương *in vitro* với điều kiện phủ bọc nylon đều cho tỷ lệ sống cao (94,7 - 100%). Các cây con sinh trưởng, phát triển tốt và có thể trồng trong điều kiện tự nhiên.

Từ khóa: Cây Hàm hương (*Nashia inaguensis* Millsp.), nuôi cấy *in vitro*, nhân giống

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Ngày nay cây bonsai được xem như một thú vui tao nhã của con người. Bonsai là một hình thức nghệ thuật pha trộn giữa hội họa và điêu khắc, giúp con người hoà mình với thiên nhiên, hướng về cái đẹp, cái thiện và sống tốt lành hơn. Bên cạnh những loại cây thân gỗ quen thuộc như linh sam, nguyệt quế, sung, si,... cây Hàm hương (*Nashia inaguensis* Millsp., họ Verbenaceae) đang được người dân chọn làm bonsai là loài thực vật bản địa thuộc vùng Caribe, dạng cây gỗ nhỏ, lá nhỏ màu xanh bóng và có mùi thơm dễ chịu, dễ tạo dáng, ngoài ra cây còn được dùng làm trà và gia vị đối với một số món ăn... (Scotto *et al.*, 2016). Đối với cây Hàm hương cũng như các loại cây cảnh hiện nay, việc nhân giống chủ yếu bằng giâm hoặc chiết cành, các nghiên cứu về nuôi cấy mô loại cây này còn rất hạn chế. Trong khi đó, các phương pháp nhân giống truyền thống thường có hệ số nhân thấp, cây dễ bị thoái hóa dẫn đến chất lượng giảm. Phương pháp vi nhân giống đã được áp dụng rộng rãi đối với nhiều loài cây thân gỗ, cho hệ số nhân giống cao, cây giống đồng đều, sức sống khỏe, sạch bệnh, rút ngắn thời gian nhân giống, đáp ứng được yêu cầu của sản xuất, giảm thiểu vấn đề khai thác tự nhiên. Một số kết quả nghiên cứu tiêu biểu về nhóm cây thân gỗ có tính được hay làm bonsai kể đến như nhân giống *in vitro* cây xáo tam phân (*Paramignya trimera* (Oliv.) Guill.) của Trần Trung Hiếu và cộng sự (2017); cây Re hương (*Cinnamomum parthenoxylon* (Jack) Meisn) của Khuất Thị Hải Ninh và cộng sự (2017);

cây mai vàng (*Ochna integerrima* (Lour.) Merr.) của Hồ Thị Cẩm Nguyên và cộng sự (2019); cây keo lá tràm (*Acacia auriculiformis* A. Cunn. ex Benth) của Lê Thị Như Nguyệt và cộng sự (2019), tạo phôi vô tính từ mô sẹo lá cây xáo tam phân của Nguyễn Thị Mỹ Duyên và cộng sự (2020)... Do đó, việc nhân giống cây Hàm hương bằng kỹ thuật nuôi cấy mô được thực hiện nhằm tìm ra môi trường nuôi cấy thích hợp, có thể ứng dụng vào thực tế sản xuất, từ đó góp phần khắc phục tình trạng thiếu hụt cây giống như hiện nay.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Cây Hàm hương (*Nashia inaguensis* Millsp.) trồng trong nhà lưới tại Trường Đại học Cần Thơ. Chọn những cành khoảng 2 - 3 tháng tuổi, sinh trưởng tốt và không bị sâu bệnh để làm vật liệu thí nghiệm.

Môi trường nuôi cấy là môi trường cơ bản MS (Murashige & Skoog, 1962), bổ sung 30 g/L sucrose, 100 mL/L nước dừa, 8 g/L agar, 1 mg/L thiamine, 1 mg/L axit nicotinic, 1 mg/L pyridoxin; điều chỉnh pH = 5,8.

Các chất điều hòa sinh trưởng thực vật: NAA, BA, IBA (Merck).

Vật liệu thuần dưỡng: tro trấu, mụn xơ dừa, phân rơm chậu nhựa có kích thước 5 × 6 cm.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Tạo vật liệu khởi đầu

Cắt và rửa sạch các đoạn thân mang mầm ngủ (2 - 4 cm) và tiến hành khử trùng: ngâm với nước xà phòng trong 10 - 15 phút; rửa dưới vòi nước chảy (5 phút). Sau đó ngâm trong dung dịch clorox 30% trong 15 phút; khử trùng mẫu bằng dung dịch HgCl₂ 0,1% trong 20 phút, rửa lại mẫu 3 - 4 lần bằng nước cất vô trùng. Dùng kẹp chuyển các mẫu sang lọ thủy tinh có nắp chứa 30 mL môi trường MS đặc vô trùng, mỗi lọ chứa 1 mẫu. Sau 2 - 3 tuần, các mầm ngủ sẽ phát triển thành chồi. Các mẫu chồi sau đó được cấy chuyển vào môi trường MS đặc bổ sung 1 mg/L BA để tạo đủ số lượng chồi ban đầu cho các thí nghiệm.

Mẫu *in vitro* thân non Hàm hương (dài 1,5 cm) được nuôi cấy trong môi trường MS đặc bổ sung 2 mg/L NAA kết hợp với 7 mg/L 2,4-D để kích thích tạo mô sẹo trong thời gian 50 ngày. Sau đó, các cụm mô sẹo được sử dụng để bố trí trong thí nghiệm tái sinh chồi.

2.2.2 Bố trí thí nghiệm

a) Thí nghiệm 1: Ảnh hưởng của TDZ đến khả năng tái sinh chồi của cụm mô sẹo tạo thành từ thân chồi non

Chọn các cụm mô sẹo có kích thước 0,5 × 0,5 cm rồi chuyển vào môi trường MS bổ sung 50 mL/L nước dừa, 40 g/L sucrose và thidiazuron (TDZ) ở các nồng độ khác nhau. Thí nghiệm 1 nhân tố được bố trí theo thể thức hoàn toàn ngẫu nhiên, với 4 nghiệm thức, mỗi nghiệm thức có 3 lần lặp lại, mỗi lần lặp lại 3 bình, mỗi bình nuôi cấy

3 cụm mô sẹo (callus) có kích thước và màu sắc tương đương nhau. Thí nghiệm được bố trí theo các nghiệm thức như sau: CT1. MS + 0 mg/L TDZ (đối chứng); CT2. MS + 0,01 mg/L TDZ; CT3. MS + 0,03 mg/L TDZ; CT4. MS + 0,05 mg/L TDZ.

b) Thí nghiệm 2: Ảnh hưởng của BA đến tỷ lệ nhân chồi cây Hàm hương in vitro

Chọn các đỉnh chồi đơn *in vitro* được tạo thành từ thí nghiệm tái sinh chồi (thí nghiệm 1), có cùng kích thước (2,5 cm), sinh trưởng tốt để tiến hành thí nghiệm. Thí nghiệm 1 nhân tố (nồng độ BA) được bố trí theo thể thức hoàn toàn ngẫu nhiên, với 6 nghiệm thức, 7 lần lặp lại/nghiệm thức, mỗi lần lặp lại là 1 bình chứa 3 chồi đơn. Các nghiệm thức được bố trí như sau:

CT1. MS + 0 mg/L BA (đối chứng); CT2. MS + 0,5 mg/L BA; CT3. MS + 1 mg/L BA; CT4. MS + 2 mg/L BA; CT5. MS + 3 mg/L BA; CT6. MS + 4 mg/L BA.

c) Thí nghiệm 3: Ảnh hưởng của IBA và hàm lượng khoáng đa lượng đến sự tạo rễ cây Hàm hương in vitro

Chọn các chồi cây Hàm hương *in vitro* có cùng kích thước (2,5 cm), sinh trưởng tốt ở thí nghiệm 1 để tiến hành thí nghiệm. Thí nghiệm 2 nhân tố (môi trường MS đầy đủ và MS giảm 1/2 hàm lượng khoáng đa lượng với các nồng độ IBA khác nhau) được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên, 12 nghiệm thức, 7 lần lặp lại/nghiệm thức, 3 chồi/bình nuôi cấy/1 lần lặp. Các nghiệm thức được bố trí như ở bảng 1.

Bảng 1. Thành phần môi trường nuôi cấy của các nghiệm thức tạo rễ cây Hàm hương *in vitro*

Môi trường	Nồng độ IBA (mg/L)					
	0	1	2	3	4	5
MS	NT1	NT2	NT3	NT4	NT5	NT6
½ MS	NT7	NT8	NT9	NT10	NT11	NT12

Ghi chú: Môi trường ½ MS là môi trường MS có hàm lượng khoáng đa lượng giảm đi một nửa; NT: Nghiệm thức.

d) Thí nghiệm 4: Ảnh hưởng của các loại giá thể đến sự thuần dưỡng cây Hàm hương trong điều kiện nhà lưới

Chọn những cây Hàm hương có kích thước và số rễ tương đương nhau từ nghiệm thức tốt nhất của thí nghiệm tạo rễ (thí nghiệm 3), rửa sạch agar và trồng vào các chậu nhựa có kích thước 5 × 6 cm (dưới đáy chậu có đục 3 lỗ để thoát nước), mỗi chậu trồng một cây. Sau đó cho tất cả các chậu chứa cây vào khay xốp được phủ màng nylon, phun sương 1 - 2 lần/ngày. Sau 2 tuần, lỗ trên bọc nylon được làm rộng dần ra cho cây quen với điều kiện bên

ngoài. Đến cuối tuần thứ 3, tháo bỏ hoàn toàn bọc nylon. Thí nghiệm 1 nhân tố được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên, với 04 nghiệm thức, 5 lần lặp lại, mỗi lần lặp lại là 15 cây, cụ thể: NT1: tro trấu; NT2: mụn xơ dừa; NT3: tro trấu + mụn xơ dừa (tỷ lệ 1 : 1); NT4: tro trấu + mụn xơ dừa + phân rơm (tỷ lệ 1 : 1 : 1).

2.2.3. Các chỉ tiêu theo dõi

Chỉ tiêu theo dõi gồm: số chồi, số rễ, tỷ lệ chồi tạo rễ (%), tỷ lệ cây sống (%) theo thời gian khảo sát. Trong đó:

- Số chồi: tổng số chồi mới (>1 cm) hình thành tại các thời điểm khảo sát.

- Số rễ: số rễ hình thành của 1 chồi trong bình nuôi cấy của nghiệm thực thí nghiệm.

- Tỷ lệ (%) chồi tạo rễ: tổng số chồi tạo rễ/tổng số chồi trong 1 bình nuôi cấy.

- Tỷ lệ (%) mẫu tái sinh chồi: số mẫu mô sẹo hình thành chồi trong mỗi lọ của nghiệm thực thí nghiệm.

- Tỷ lệ (%) cây sống: tổng số cây sống/tổng số cây của nghiệm thực thí nghiệm.

2.2.4. Phương pháp xử lý số liệu

Số liệu được xử lý bằng chương trình SPSS 22.0, phân tích phương sai và so sánh các trung bình nghiệm thực theo kiểm định Duncan ở mức ý nghĩa 5%.

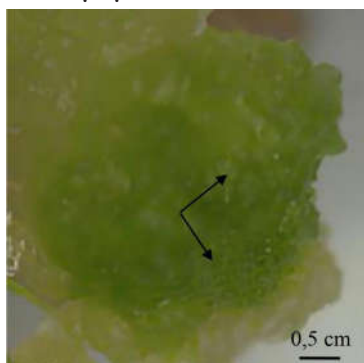
2.3. Thời gian và địa điểm nghiên cứu

Nghiên cứu được tiến hành từ tháng 02/2023 đến tháng 3/2024 tại phòng Công nghệ Mô và Tế bào thực vật, Khoa Sinh lý - Sinh hoá, Trường Nông nghiệp, Trường Đại học Cần Thơ. Điều kiện nuôi cấy: ẩm độ 55%, nhiệt độ $24 \pm 2^\circ\text{C}$, cường độ sáng 2.000 ± 500 lux, chu kỳ quang 16 giờ/ngày và nhà lưới (ẩm độ $70 \pm 5\%$, nhiệt độ $28 \pm 2^\circ\text{C}$, cường độ chiếu sáng 3.500 ± 500 lux).

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Ảnh hưởng của TDZ đến khả năng tái sinh chồi từ mô sẹo tạo thành từ thân chồi non

Vào thời điểm 10 ngày sau khi cấy, ở nghiệm thực MS bổ sung 0,01 mg/L TDZ và 0,03 mg/L TDZ, các cụm mô sẹo đã có sự biến đổi về cấu trúc và hình thành chồi (Hình 1). Theo Nguyễn Bảo Toàn (2010), sự hiện diện của cytokinin là yếu tố chính điều khiển quá trình sinh mạch giúp cho sự tạo chồi khi tái sinh từ mô sẹo.



Hình 1. Sự hình thành chồi của cụm mô sẹo vào thời điểm 10 ngày sau khi cấy trên môi trường MS + 0,03 mg/L TDZ

Kết quả thí nghiệm cho thấy, việc bổ sung chất điều hòa sinh trưởng thực vật góp phần cho việc cảm ứng tế bào phân chia và phát sinh cơ quan chồi, nồng độ TDZ khác nhau có ảnh hưởng khác nhau lên sự tái sinh chồi. Kết quả ở bảng 2 cho thấy, vào thời điểm 20 ngày sau khi cấy, tỷ lệ mô sẹo tạo chồi ở các nghiệm thực có sự khác biệt ở mức ý nghĩa 5%. Trong đó, nghiệm thực MS + 0,01 mg/L TDZ cho tỷ lệ chồi tái sinh cao nhất (33,3%), nhưng lại không khác biệt so với nghiệm thực MS + 0,03 mg/L TDZ (16,7%). Nghiệm thực đối chứng MS (không có bổ sung TDZ) không có sự tái sinh chồi (0%). Kết quả này phù hợp với nhận định của Murthy và cộng sự (1998), TDZ là loại cytokinin có hiệu quả cao, có thể cảm ứng sự phát sinh cơ quan ở nồng độ thấp và làm giảm ưu thế chồi ngọn. Theo Huetteman và Preece (1993), TDZ có hiệu quả cao trong sự cảm ứng phát sinh chồi của cây thân gỗ. TDZ là chất điều hòa sinh trưởng thực vật có tác dụng mạnh trong sự tạo chồi bất định. Ngoài ra, TDZ còn kích thích sự tổng hợp cytokinin nội sinh và ức chế sự phân hủy bởi enzyme oxy hóa cytokinin, TDZ khá bền vững trong môi trường nuôi cấy. Kết quả ở bảng 2 cũng cho thấy khi nồng độ TDZ tăng lên 0,05 mg/L thì khả năng tái sinh chồi của cụm mô sẹo Hàm hương giảm xuống còn 7,4%, ở nồng độ này có thể TDZ đã gây độc cho mẫu cấy, một số mẫu đã bị biến đổi từ màu vàng xanh chuyển dần sang màu nâu đen và chết sau 30 ngày nuôi cấy. Điều này cho thấy, môi trường nuôi cấy không có cytokinin thì tái sinh chồi từ mô sẹo khó xảy ra nhưng khi nồng độ cytokinin (TDZ) tăng lên 0,05 mg/L tỷ lệ tái sinh chồi giảm.

Bảng 2. Khả năng tạo chồi của mẫu mô sẹo trong môi trường MS bổ sung TDZ (20 ngày sau khi cấy)

Nghiệm thực	Số mô sẹo tạo chồi	Tỷ lệ mô sẹo tạo chồi (%)
MS (đối chứng)	0	0,0 ^b
MS + 0,01 mg/L TDZ	9	33,3 ^a
MS + 0,03 mg/L TDZ	5	18,5 ^{ab}
MS + 0,05 mg/L TDZ	2	7,4 ^b
$F_{tính}$		*
CV (%)		5,4

Ghi chú: Trong cùng một cột, các số có chữ theo sau giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê qua phép thử Duncan; *: khác biệt có ý nghĩa 5%.

3.2. Ảnh hưởng của BA đến tỷ lệ nhân chồi cây Hàm hương *in vitro*

Kết quả ở bảng 3 và hình 2 cho thấy, số lượng chồi của các nghiệm thức có khuynh hướng gia tăng dần trong suốt thời gian thí nghiệm. Số chồi ở các nghiệm thức lại không khác biệt có ý nghĩa thống kê vào thời điểm 10 và 20 ngày sau khi cấy. Tuy nhiên, vào thời điểm 30 ngày sau khi cấy, số chồi cao nhất ở các nghiệm thức MS bổ sung BA ở các nồng độ 0,5; 2; 3 và 4 mg/L (với số chồi lần lượt là 4,76; 3,81; 5,19 và 5,24 chồi), khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê ở mức 1% so với các nghiệm thức còn lại. Nghiệm thức đối chứng (MS

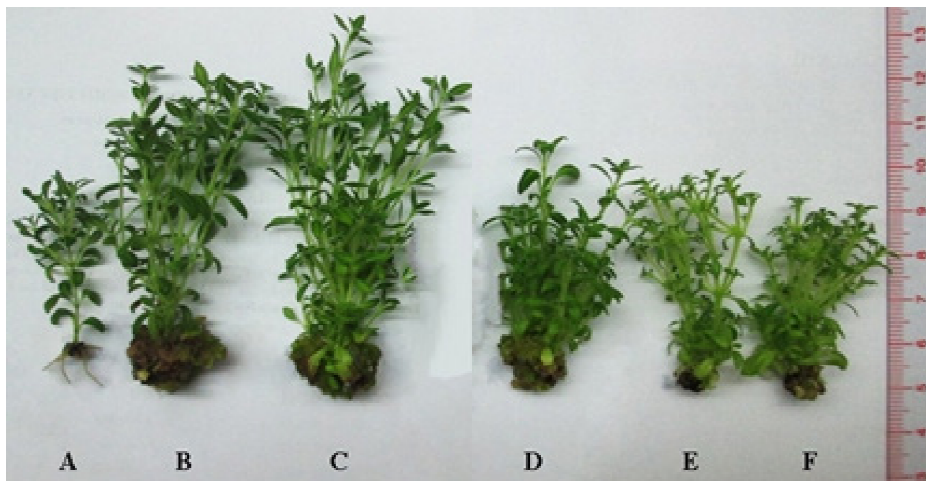
không bổ sung BA) có số chồi thấp nhất vào thời điểm này (Bảng 3).

Kết quả thống kê ở bảng 3 cũng cho thấy sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức 5% về số chồi giữa các nghiệm thức vào thời điểm 40 ngày sau khi cấy, trong đó nghiệm thức MS bổ sung 0,5 mg/L BA có số chồi nhiều nhất (7,55 chồi), nghiệm thức đối chứng có số chồi thấp nhất (4,91 chồi). Tuy nhiên, số chồi của nghiệm thức MS bổ sung 0,5 mg/L BA lại không khác biệt so với các nghiệm thức MS bổ sung BA 3 mg/L (6,20 chồi) và MS bổ sung BA 4 mg/L (6,15 chồi).

Bảng 3. Ảnh hưởng của BA đến số lượng chồi (≥ 2 cm) của cây Hàm hương *in vitro* theo thời gian nuôi cấy

Nghiệm thức (BA, mg/L)	Thời gian (ngày sau khi cấy)			
	10	20	30	40
Đối chứng (MS)	1,05	1,62	2,81 ^c	4,91 ^b
0,5	1,19	2,62	4,76 ^{ab}	7,55 ^a
1	1,19	1,86	3,33 ^{bc}	4,81 ^b
2	1,33	2,28	3,81 ^{abc}	5,81 ^b
3	1,14	2,04	5,19 ^a	6,20 ^{ab}
4	1,23	2,19	5,24 ^a	6,15 ^{ab}
F	ns	ns	**	*
CV (%)	20,57	35,13	26,11	24,02

Ghi chú: Trong cùng một cột, các số có chữ theo sau giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê qua phép thử Duncan; *: khác biệt có ý nghĩa 5%; **: khác biệt có ý nghĩa 1%; ns: không khác biệt có ý nghĩa thống kê.



Hình 2. Sự sinh trưởng của chồi cây Hàm hương ở thời điểm 40 ngày sau khi cấy

Ghi chú: (A) MS (không bổ sung BA); (B) MS + BA 0,5 mg/L; (C) MS + BA 1,0 mg/L; (D) MS + BA 2,0 mg/L; (E) MS + BA 4,0 mg/L; (F) MS + BA 3,0 mg/L.

Để tăng hệ số nhân chồi phải tăng hàm lượng cytokinin, nhất là đối với các loại có hàm lượng cytokinin nội sinh thấp. Hàm lượng cytokinin cao

sẽ hoạt hóa hình thành chồi bất định, chồi nhiều nhưng sẽ có kích thước nhỏ (Vũ Văn Vụ và cs., 2006; Nguyễn Văn Ấy và cs., 2019). Những chồi

này không thể sử dụng ngay mà cần phải có thời gian phát triển thêm để sử dụng cho những mục đích tiếp theo (tạo rễ, thuần dưỡng...). Kết quả nghiên cứu cho thấy trong giai đoạn nhân chồi cây Hàm hương, sử dụng môi trường MS bổ sung 0,5 mg/L BA là thích hợp nhất, tạo được nhiều chồi hữu hiệu có chất lượng tốt.

3.3. Ảnh hưởng của IBA và hàm lượng khoáng đa lượng đến sự tạo rễ cây Hàm hương *in vitro*

Kết quả thí nghiệm cho thấy không cần bổ sung IBA khi tạo rễ *in vitro* cho cây Hàm hương. Các chồi ở các nghiệm thức bổ sung IBA nồng độ thấp từ 1 - 2 mg/L đều có hiện tượng tạo mô sẹo, trong khi các nghiệm thức không bổ sung chất điều

hòa sinh trưởng thì cây phát triển bình thường và có rễ xuất hiện ở thời điểm 40 ngày sau khi cấy (Bảng 4). Theo Vũ Văn Vụ và cộng sự (2006), auxin được dùng với hàm lượng thấp sẽ gia tăng sự hình thành rễ phụ, ngược lại, nếu dùng với nồng độ cao thì sẽ ảnh hưởng không tốt lên sự hình thành rễ, nhưng lại kích thích sự tạo mô sẹo. Ở thí nghiệm này, chỉ với nồng độ 1 mg/L IBA đã phát sinh mô sẹo cho thấy, có sự hiện diện của auxin nội sinh cao trong cây Hàm hương *in vitro*. Kết quả này cũng tương tự như nghiên cứu trên cây Hoắc hương (*Pogostemon cablin* (Blanco) Benth) nuôi cấy *in vitro*, mẫu cấy hình thành mô sẹo trong môi trường bổ sung NAA ở nồng độ thấp (Tạ Như Thục Anh và cs., 2008; Nguyễn Văn Ấy và cs., 2014).

Bảng 4. Ảnh hưởng của IBA và khoáng đa lượng đến tỷ lệ (%) tạo rễ *in vitro* của chồi Hàm hương

Nghiệm thức		Thời gian (ngày sau khi cấy)			
Hàm lượng khoáng	Nồng độ IBA (mg/L)	10	20	30	40
MS	0	61,9	95,2 ^a	95,2 ^{ab}	100 ^a
	1	42,9	71,4 ^{ab}	90,5 ^{ab}	95,2 ^a
	2	33,3	90,5 ^{ab}	100 ^a	100 ^a
	3	33,3	71,4 ^{ab}	85,7 ^{ab}	95,2 ^a
	4	00,0	14,3 ^c	57,1 ^b	57,1 ^b
	5	9,5	66,7 ^{ab}	85,7 ^{ab}	85,7 ^{ab}
½MS	0	76,2	85,7 ^{ab}	100 ^a	100 ^a
	1	42,9	95,2 ^a	95,2 ^{ab}	100 ^a
	2	28,6	47,6 ^{bc}	71,4 ^{ab}	71,4 ^{ab}
	3	52,4	80,9 ^{ab}	95,2 ^{ab}	95,2 ^a
	4	61,9	80,9 ^{ab}	100 ^a	100 ^a
	5	4,8	76,2 ^{ab}	76,2 ^{ab}	85,7 ^{ab}
Trung bình tỷ lệ (%) tạo rễ của IBA	0	69,1 ^a	90,5	97,6	100
	1	42,9 ^{ab}	83,3	92,9	97,6
	2	30,9 ^{ab}	69,1	85,7	85,7
	3	42,9 ^{ab}	76,2	90,5	95,2
	4	30,9 ^{ab}	47,6	78,6	78,6
	5	7,1 ^b	71,4	80,9	85,7
Trung bình tỷ lệ (%) tạo rễ của hàm lượng khoáng	MS	30,2	68,3	85,7	88,9
	½MS	44,4	77,8	89,7	92,1
F_{IBA}		**	ns	ns	ns
$F_{\text{Hàm lượng khoáng}}$		ns	ns	ns	ns
$F_{IBA \times \text{Hàm lượng khoáng}}$		ns	**	**	**
CV (%)		75,86	33,48	24,09	14,40

Ghi chú: Các chữ cái theo sau các số trung bình giống nhau thì không khác biệt có ý nghĩa thống kê qua phép thử DUNCAN, ns: không khác biệt có ý nghĩa thống kê, **: khác biệt thống kê ở mức ý nghĩa 1%; $F_{\text{Hàm lượng khoáng}}$ (A): Giá trị F của môi trường nuôi cấy MS và ½ MS; F_{IBA} (B): Giá trị F của nồng độ chất ĐHST IBA; $F(A \times B)$: Giá trị F của sự tương tác giữa môi trường nuôi cấy và nồng độ IBA.

Trong quá trình vi nhân giống, tỷ lệ chồi tạo rễ *in vitro* cao sẽ góp phần quan trọng và đem lại hiệu quả kinh tế cao hơn. Trong thí nghiệm này, kết quả về tỷ lệ chồi cây Hàm hương tạo rễ *in vitro* cho thấy sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê về tỷ lệ tạo rễ của các chồi cây Hàm hương giữa hai nồng độ khoáng đa lượng (môi trường MS và ½ MS) trong suốt thời gian khảo sát. Điều này chứng tỏ hàm lượng khoáng đa lượng không có ảnh hưởng đến chồi cây Hàm hương *in vitro* trong quá trình tạo rễ (Bảng 4).

Mặt khác, kết quả cho tỷ lệ (%) chồi tạo rễ của nồng độ IBA thể hiện ở bảng 4 cho thấy, nghiệm thức không bổ sung IBA cho tỷ lệ tạo rễ cao (tỷ lệ trung bình 69,1% tại thời điểm 10 ngày sau khi tạo rễ) lại không khác biệt có ý nghĩa thống kê so với các nghiệm thức, ngoại trừ nghiệm thức 5 mg/L IBA. Vào thời điểm 20, 30 và 40 ngày sau khi cấy, môi trường bổ sung IBA từ 0 - 5 mg/L đều cho tỷ lệ tạo rễ cao (từ 78,6 đến 100%) và sự khác biệt giữa các nghiệm thức này không có ý nghĩa thống kê.

Tuy nhiên, kết quả thống kê ở bảng 4 cho thấy, có sự tương tác giữa hàm lượng khoáng đa lượng MS trong môi trường nuôi cấy và nồng độ IBA ở các nghiệm thức đến tỷ lệ tạo rễ của chồi cây hàm hương *in vitro* vào thời điểm 20, 30 và 40 ngày sau khi cấy, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức 1%, trong đó nghiệm thức môi trường MS và 4 mg/L IBA cho tỷ lệ tạo rễ thấp nhất (lần lượt là 14,3; 57,1 và 57,1% vào thời điểm 20, 30 và 40 ngày sau khi cấy). Nghiệm

thức MS và ½ MS không bổ sung IBA có tỷ lệ tạo rễ 100%. Điều này cho thấy có thể do cây Hàm hương có hàm lượng auxin nội sinh cao nên trong giai đoạn này mặc dù môi trường không có chất điều hòa sinh trưởng nhưng vẫn có hiệu quả tạo rễ.

3.4. Ảnh hưởng của loại giá thể lên sự sinh trưởng của cây Hàm hương *in vitro* trong điều kiện nhà lưới

3.4.1. Tỷ lệ cây sống

Tỷ lệ sống sót của những chồi con sau khi đem ra vườn ươm (nhà lưới) là chỉ tiêu quan trọng nhất vì nó quyết định rất lớn đến sự thành công của việc nuôi cấy mô (Nguyễn Văn Ấy và cs., 2019). Có nhiều yếu tố ảnh hưởng đến tỷ lệ sống sót của cây con sau khi đem ra vườn ươm, trong đó chất lượng cây con và điều kiện môi trường ngoại cảnh của vườn ươm giữ vai trò quan trọng. Kết quả ở bảng 5 cho thấy trong suốt thời gian thuần dưỡng (7, 14, 21 và 28 ngày), cây con ở nghiệm thức giá thể tro trấu có tỷ lệ sống thấp nhất (tỷ lệ sống lần lượt là 92; 62,67; 56; 56 và 56% vào thời điểm 7, 14, 21, 28 và 35 ngày sau khi thuần dưỡng) và khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức 1% với các các nghiệm thức còn lại. Vào thời điểm 35 ngày sau khi thuần dưỡng, cây con ở nghiệm thức mụn xơ dừa và các nghiệm thức sử dụng giá thể phối trộn với nhau đều có tỷ lệ sống cao (94,67 - 100%), khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức 1% so với nghiệm thức giá thể tro trấu.

Bảng 5. Ảnh hưởng các loại giá thể đến tỷ lệ sống (%) của cây Hàm hương theo thời gian thuần dưỡng trong nhà lưới

Nghiệm thức (Loại giá thể)	Thời gian (ngày sau khi thuần dưỡng)				
	7	14	21	28	35
Tro trấu	92,0 ^b	62,67 ^b	56,0 ^b	56,0 ^b	56,0 ^b
Mụn xơ dừa	100,0 ^a	94,67 ^a	94,67 ^a	94,67 ^a	94,67 ^a
Tro trấu + mụn xơ dừa (1 : 1)	100,0 ^a	97,33 ^a	97,33 ^a	97,33 ^a	97,33 ^a
Tro trấu + mụn xơ dừa + phân rơm (1 : 1 : 1)	100,0 ^a	100,0 ^a	100,0 ^a	100,0 ^a	100,0 ^a
F	**	**	**	**	**
CV (%)	3,73	7,80	7,47	7,47	7,47

Ghi chú: Trong cùng một cột, các số có chữ theo sau giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê qua phép thử Duncan; **: khác biệt có ý nghĩa 1%.

3.4.2. Sự sinh trưởng của cây Hàm hương *in vitro* trong điều kiện nhà lưới

Sau khi ra chậu, chiều cao cây ở các nghiệm thức đều có sự gia tăng (Bảng 6 và Hình 3). Sự gia

tăng về chiều cao cây phản ánh khả năng thích nghi của các cây *in vitro* với điều kiện nhà lưới. Kết quả cho thấy sinh trưởng của cây Hàm hương trên các loại giá thể có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê

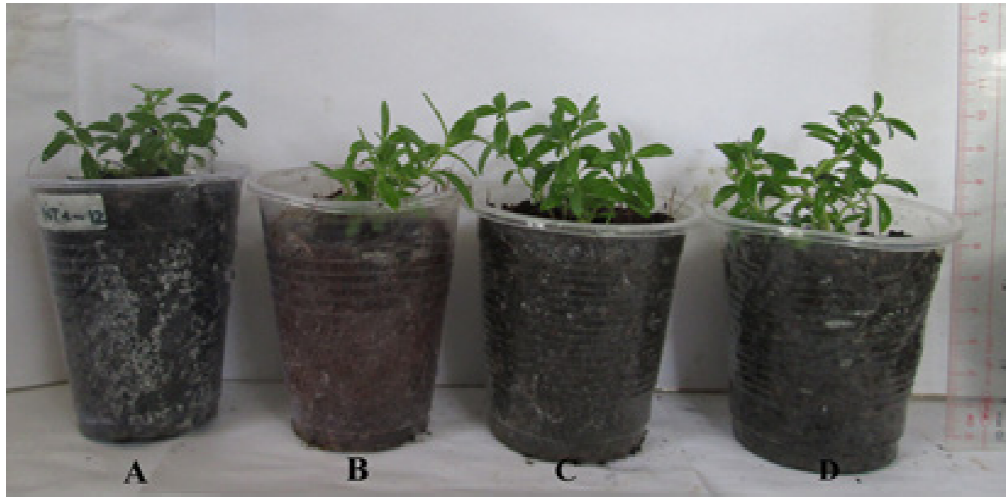
ở mức 1% trong suốt thời gian khảo sát. Trong đó chiều cao cây gia tăng tốt nhất ở nghiệm thức giá thể tro trấu + mụn xơ dừa + phân rơm phối trộn

với tỷ lệ 1:1:1 và nghiệm thức tro trấu và xơ dừa với tỷ lệ 1:1. Các nghiệm thức giá thể đơn có hiệu quả kém hơn trong việc làm gia tăng chiều cao cây.

Bảng 6. Ảnh hưởng các loại giá thể đến chiều cao (cm) của cây Hàm hương theo thời gian thuần dưỡng trong nhà lưới

Nghiệm thức (Loại giá thể)	Thời gian (ngày sau khi thuần dưỡng)				
	7	14	21	28	35
Tro trấu	0,19 ^c	0,88 ^b	1,50 ^b	2,36 ^b	2,82 ^b
Mụn xơ dừa	0,35 ^{bc}	0,98 ^b	1,92 ^b	2,53 ^b	2,91 ^b
Tro trấu + mụn xơ dừa (1 : 1)	0,58 ^a	1,42 ^a	2,41 ^a	3,24 ^a	3,89 ^a
Tro trấu + mụn xơ dừa + phân rơm (1 : 1 : 1)	0,44 ^{ab}	1,46 ^a	2,85 ^a	3,59 ^a	4,22 ^a
F	**	**	**	**	**
CV (%)	24,99	15,50	11,17	9,19	10,19

Ghi chú: Trong cùng một cột, các số có chữ theo sau giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê qua phép thử Duncan; **: khác biệt có ý nghĩa 1%.



Hình 3. Cây Hàm Hương vào thời điểm 35 ngày sau khi thuần dưỡng trong nhà lưới

Ghi chú: (A) Tro trấu; (B) Mụn xơ dừa; (C) Tro trấu + mụn xơ dừa (1 : 1); (D) Tro trấu + mụn xơ dừa + phân rơm (1 : 1 : 1).

IV. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

4.1. Kết luận

Chồi Hàm hương tái sinh từ mô sẹo trên môi trường MS bổ sung 0,01 mg/L TDZ, đạt tỷ lệ tái sinh chồi 33,3% sau 20 ngày nuôi cấy. Các chồi này có thể tiếp tục được nhân nhanh trên môi trường MS bổ sung 0,5 mg/L BA và 100 mL/L nước dừa (tạo ra 7,55 chồi từ một chồi ban đầu sau 40 ngày nuôi cấy). Trong giai đoạn tạo rễ, sử dụng môi trường MS không bổ sung IBA cho tỷ lệ tạo rễ cao (100%).

Giá thể thích hợp để thuần dưỡng cây hàm hương là hỗn hợp tro trấu : mụn xơ dừa (tỷ lệ 1 : 1) hoặc hỗn hợp tro trấu : mụn xơ dừa : phân rơm (tỷ

lệ 1 : 1 : 1) kết hợp với phủ màng nylon trong 21 ngày đầu khi thuần dưỡng, tỷ lệ sống cao (94,67 - 100%), các cây con sinh trưởng và phát triển tốt và có thể trồng ra điều kiện tự nhiên.

4.2. Đề nghị

Tiếp tục trồng và theo dõi sinh trưởng của cây Hàm hương *in vitro* trong điều kiện tự nhiên so với cây Hàm hương được tạo ra bằng phương pháp truyền thống.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Tạ Như Thục Anh, Trần Dụ Chi, Vũ Văn Vụ, 2008. Bước đầu nghiên cứu ảnh hưởng của các chất điều hòa sinh trưởng đến sự phát sinh hình thái của mô

- lá cây hoặc hương nuôi cấy *in vitro*. *Tạp chí Khoa học Đại học Quốc gia Hà Nội, Khoa học Tự nhiên và Công nghệ*, 24 (1): 44-49.
- Nguyễn Bảo Toàn**, 2010. *Giáo trình Nuôi cấy mô thực vật*. Nhà xuất bản Đại học Cần Thơ.
- Nguyễn Văn Ấy, Lê Văn Hòa, Mai Văn Trâm và Trần Duy Bình**, 2014. Nhân giống cây bằng lăng nhiều hoa (*Lagerstroemia floribunda* Jack) bằng kỹ thuật nuôi cấy mô. *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, 31: 64-70.
- Nguyễn Văn Ấy, Lê Văn Bé và Trần Thanh Mến**, 2019. *Nuôi cấy mô thực vật: Nguyên lý và Thực hành*. Nhà xuất bản Đại học Cần Thơ.
- Nguyễn Thị Mỹ Duyên, Trương Phi Yến, Nguyễn Vũ Phong**, 2020. Bước đầu tạo phôi vô tính từ mô sẹo lá cây xáo tam phân (*Paramignya trimera* (Oliv.) Guillaum). Trong *Kỷ yếu Hội nghị Công nghệ Sinh học Toàn quốc 2020*, tr. 879-884.
- Trần Trung Hiếu, Huỳnh Văn Chung, Bùi Thị Linh Huệ, Lương Thị Mỹ Ngân, Bùi Lan Anh và Bùi Văn Lệ**, 2017. Nhân giống *in vitro* xáo tam phân (*Paramignya trimera* (Oliv.) Guill.). *Tạp chí Phát triển Khoa học và Công nghệ*, 20: 48-57.
- Hồ Thị Cẩm Nguyên, Phạm Ngọc Hà, Nguyễn Thị Nhã**, 2019. Thiết lập qui trình nhân giống *in vitro* cây mai vàng (*Ochna integerrima* (Lour.) Merr.). *Tạp chí Khoa học và Công nghệ*, 6: 28-32.
- Huetteman, C.A. and Preece, J.E.** 1993. Thidiazuron: a potent cytokinin for woody plant tissue cultures. *Plant Cell Tissue Organ Cult*, 33: 105-119.
- Lê Thị Như Nguyệt, Nguyễn Thị Thanh Nga và Phan Thị Phương Nhi**, 2019. Quy trình nhân giống *in vitro* cây keo lá tràm (*Acacia auriculiformis* A. Cunn. ex Benth). *Tạp chí Khoa học Đại học Huế: Nông nghiệp và Phát triển nông thôn*, 128 (3D): 33-41.
- Khuất Thị Hải Ninh, Nguyễn Quỳnh Trang, Bùi Văn Thắng và Vũ Văn Thông**, 2017. Nghiên cứu nhân giống *in vitro* Re hương (*Cinnamomum parthenoxylon* (Jack) Meisn. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Lâm nghiệp*, (20-10): 42-48.
- Vũ Văn Vụ, Nguyễn Mộng Hùng và Lê Hồng Điệp**, 2006. *Công nghệ sinh học, tập 1: Công nghệ sinh học tế bào*. Nhà xuất bản Giáo dục, Hà Nội.
- Murashige, T., and Skoog, F.**, 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15 (3): 473-497.
- Murthy, B.N.S., Murch, S.J. and P.H. Saxena**, 1998. Thidiazuron: A potent regulator of *in vitro* plant morphogenesis. *In vitro Cell Developmental Biology-Plant*, 34: 267-275.
- Scotto, C.I., Burger, P., Khodjet el Khil, M., Ginouves, M., Prevot, G., Blanchet, D., Delprete, P.G. & Fernandez, X.**, 2016. Composition and antifungal activity of the essential oil of *Nashia inaguensis* Millsp. (Verbenaceae) cultivated in French Guiana. *Journal of Essential Oil Research*, 28 (4): 305-311.

Progagation of *Nashia inaguensis* by tissue culture technique

Nguyen Van Ay, Vo Thi Bich Ngan,
Tran Nguyen Phuong Lam and Le Van Hoa

Abstract

In vitro culture of *Nashia inaguensis* (Millsp.) was carried out to determine the appropriate media for rapid multiplication of this plant. The results showed that: (i) shoots of *Nashia inaguensis* could be regenerated from callus in MS medium supplemented with 0.01 mg/L TDZ. Then MS medium supplemented with 0.5 mg/L BA was used for rapid proliferation of shoots *in vitro* (7.55 shoots after 40 days cultured); (ii) During the rooting stage, solid MS medium without growth regulators was used (high rooting rote, 100%); and (iii) Acclimatization of micropropagated plants which were planted in plastic pots containing coconut (fiber) dust + rice husk ashes (1 : 1) or coconut (fiber) dust + decayed straw + rice husk ashes (1 : 1 : 1) dust showed a high survival rate (94.7 - 100%), and most seedlings grew very well.

Keywords: *Nashia inaguensis* (Millsp.), *in vitro* culture, propagation

Ngày nhận bài: 20/4/2024
Ngày phản biện: 20/5/2024

Người phản biện: TS. Phạm Thị Lý Thu
Ngày duyệt đăng: 10/6/2024

ẢNH HƯỞNG CỦA MỘT SỐ LOẠI PHÂN BÓN HỮU CƠ VI SINH ĐẾN GIỐNG CHÈ LCT1

Phan Chí Nghĩa^{1*}, Triệu Khánh Thiện²,
Trần Xuân Hoàng³, Mai Thị Như Trang⁴

TÓM TẮT

Nghiên cứu nhằm xác định tính chất lý, hóa và sinh học đất trồng chè cũng như sinh trưởng, phát triển, năng suất, chất lượng chè LCT1 sau 1 và 2 năm bón phân hữu cơ vi sinh (HCVS). Kết quả nghiên cứu cho thấy bón phân HCVS giúp cải thiện một số tính chất lý, hóa và sinh học đất trồng chè, trong đó giảm dung trọng đất 0,11 - 0,15 g/cm³, tăng tỷ trọng đất từ 0,01 đến 0,03 g/cm³ và tăng độ xốp đất từ 8,60 đến 10,25%, tăng pH đất từ 0,03 đến 0,09, tăng hàm lượng chất hữu cơ từ 0,59 đến 0,65%, tăng hàm lượng NPK tổng số từ 0,01 đến 0,10% và gia tăng mật độ vi sinh vật phân giải xenlulo trong đất từ 10² - 10⁴ CFU/g đất lên đến 10⁵ - 10⁸ CFU/g đất so với đối chứng. Vườn chè LCT1 được bón phân HCVS sinh trưởng và phát triển tốt hơn, qua đó làm tăng năng suất từ 0,73 đến 3,30% so với đối chứng, đạt 6,84 - 7,02 tấn/ha. Khi bón phân HCVS, các chỉ tiêu sinh hóa của giống chè LCT1 đạt chỉ tiêu chất lượng chè xanh và tăng so với đối chứng 0,12 - 0,7% về hàm lượng chất hoà tan, 0,11 - 0,22% về hàm lượng axit amin, 0,05 - 0,22% về hàm lượng đường khử, 0,11 - 1,18% về hàm lượng hợp chất thơm. Thử nếm cảm quan có tổng điểm đánh giá từ khá trở lên, đạt > 17 điểm.

Từ khóa: Phân bón hữu cơ vi sinh, năng suất, chất lượng giống chè LCT1, chất lượng đất trồng chè

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Hiện nay, nhu cầu về sản phẩm chè xanh chất lượng cao ngày càng tăng. Giống chè LCT1 có hàm lượng tanin trung bình, hàm lượng axit amin cao, phù hợp để làm nguyên liệu chế biến chè xanh. Chất lượng thử nếm cảm quan xếp loại khá với những đặc điểm nổi trội về ngoại hình, màu nước đẹp, vị ngọt, hương thơm đặc trưng (Bộ Nông nghiệp và PTNT, 2010). Giống LCT1 đang được nghiên cứu để phát triển tại khu vực các tỉnh trung du và miền núi phía Bắc.

Có nhiều nguyên nhân làm cho chè xanh của Việt Nam chưa đạt so với sản xuất chè xanh trên thế giới, trong đó có việc lạm dụng phân hóa học trong thời gian dài đã làm cây chè bị suy thoái, giảm khả năng sinh trưởng và phát triển. Ngoài ra, đất trồng chè (thường là đất dốc) có độ xói mòn cao, hàm lượng dinh dưỡng nghèo đặc biệt là hàm lượng mùn và độ ẩm thấp (Bộ Nông nghiệp và PTNT, 2021). Vì vậy, để tăng cường sức sản xuất bền vững ở các vùng trồng chè, cần phải chú trọng đến những kỹ thuật sử dụng đất hiệu quả, thâm canh nhưng vẫn bảo vệ và nâng cao độ phì nhiêu của đất.

Phân bón HCVS có tác dụng cung cấp các chủng vi sinh vật có lợi cho độ phì đất, đồng thời phân giải những phế phụ phẩm nông nghiệp tạo ra nguồn hữu cơ tại chỗ cung cấp cho cây chè (Phạm Văn Toàn, 2013). Tuy nhiên, ở Việt Nam vẫn chưa có nhiều nghiên cứu về ảnh hưởng của phân bón hữu cơ vi sinh lên đất trồng và sinh trưởng của những giống chè mới như LCT1. Chính vì vậy, chúng tôi thực hiện nghiên cứu này nhằm đánh giá ảnh hưởng của việc bón thay thế một phần phân bón hoá học bằng phân HCVS đến tính chất đất trồng và năng suất, chất lượng của giống chè LCT1.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Giống chè LCT1 (tuổi 5) được tuyển chọn từ tổ hợp con lai giữa giống Trung du và chè Shan Cù Dễ Phụng đã được Bộ Nông nghiệp và PTNT công nhận giống sản xuất thử năm 2018 và được công bố lưu hành năm 2021.

- Phân bón đa lượng: đạm urê Phú Mỹ (N: 46,3%), supe lân Lâm Thao (P₂O₅: 16 - 16,5%) và kali clorua Phú Mỹ (K₂O: 61 ± 1%).

¹ Trường Đại học Hùng Vương

² UBND xã Việt Hồng, huyện Trấn Yên, tỉnh Yên Bái

³ Viện Khoa học Kỹ thuật Nông Lâm nghiệp miền núi phía Bắc

⁴ Trung tâm Phát triển công nghệ Tây Bắc, Trung tâm Nghiên cứu và Phát triển công nghệ cao (VAST)

* Tác giả liên hệ, email: chinghiaphan@gmail.com