

HỌC VIỆN NÔNG NGHIỆP VIỆT NAM

----- □ □ □ -----



NGUYỄN VĂN HỒNG

**NGHIÊN CỨU BIỆN PHÁP KỸ THUẬT NHÂN
GIỐNG HOA ĐỒNG TIỀN BẰNG PHƯƠNG
PHÁP NUÔI CẤY MÔ TẠI THÁI NGUYÊN**

LUẬN VĂN THẠC SĨ NÔNG NGHIỆP

**Dịch vụ viết báo cáo thực tập trọn gói website: luanvantot.com Zalo/tele
0934573149**

Tham khảo miễn phí các tài liệu khác tại luanvantot.com

**ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN
TRƯỜNG ĐẠI HỌC NÔNG LÂM**

NGUYỄN VĂN HỒNG

**NGHIÊN CỨU BIỆN PHÁP KỸ THUẬT NHÂN
GIỐNG HOA ĐỒNG TIỀN BẰNG PHƯƠNG
PHÁP NUÔI CẤY MÔ TẠI THÁI NGUYÊN**

CHUYÊN NGÀNH TRỒNG TRỌT

MÃ SỐ: 60.62.01

LUẬN VĂN THẠC SĨ NÔNG NGHIỆP

Người hướng dẫn khoa học: PGS.TS. NGÔ XUÂN BÌNH

**Dịch vụ viết báo cáo thực tập trọn gói website: luanvantot.com Zalo/tele
0934573149**

Tham khảo miễn phí các tài liệu khác tại luanvantot.com

**Dịch vụ viết báo cáo thực tập trọn gói website: luanvantot.com Zalo/tele
0934573149**

Tham khảo miễn phí các tài liệu khác tại teamluanvan.com

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan rằng số liệu và kết quả nghiên cứu trong luận văn này là hoàn toàn trung thực và chưa hề sử dụng cho bảo vệ một học vị nào. Mọi sự giúp đỡ cho việc hoàn thành luận văn đều đã được cảm ơn. Các thông tin, tài liệu trình bày trong luận văn này đã được ghi rõ nguồn gốc.

TÁC GIẢ

Nguyễn Văn Hồng

LỜI CẢM ƠN

Tôi xin chân thành cảm ơn PSG. TS. Ngô Xuân Bình - Phó Trưởng Khoa Nông học Trường Đại học Nông Lâm Thái Nguyên đã tận tình giúp đỡ, hướng dẫn tôi trong quá trình triển khai thực hiện đề tài, cũng như trong quá trình hoàn chỉnh luận văn tốt nghiệp.

Tập thể Thầy giáo, Cô giáo Khoa Nông học, đặc biệt là Cán bộ Giáo viên thuộc bộ môn Công nghệ Sinh học và bảo quản chế biến – Khoa Nông học - Trường Đại học Nông Lâm Thái Nguyên,

Cảm các sinh viên thực tập tốt nghiệp K36TT, K37TT và nhóm sinh viên nghiên cứu khoa học K38 CNSH – Trường Đại học Nông Lâm Thái Nguyên đã giúp đỡ tôi trong quá trình thực hiện đề tài.

Cảm ơn bạn bè và người thân đã động viên giúp đỡ tôi trong quá trình học tập và hoàn thành luận văn.

Một lần nữa tôi xin trân trọng cảm ơn!

TÁC GIẢ

Nguyễn Văn Hồng

NHỮNG TỪ VIẾT TẮT

CT	- Công thức
TN	- Thí nghiệm
ĐTST	- Điều tiết sinh trưởng
MS	- Murashige and Skoog, 1962
BAP	-
6-benzylaminopurine Kinetin	-
6-furfurylaminopurine DTZ	-
Thidiazuron	
NAA	- α-Naphlene axetic acid
2,4 - D	- Acid 2,4 dichlorophenoxy acetic

MỤC LỤC

Trang

Chương I - MỞ ĐẦU.....	1
1.1- Đặt vấn đề	1
1.2- Mục đích và Yêu cầu của đề tài	2
1.2.1- Mục đích.....	2
1.2.2 - Yêu cầu.....	2
1.3 - Ý nghĩa của đề tài.....	3
Chương II - TỔNG QUAN TÀI LIỆU	4
2.1. Tình hình sản xuất và tiêu thụ hoa trên thế giới và ở Việt Nam.....	4
2.1.1. Tình hình sản xuất và tiêu thụ hoa cắt trên thế giới	4
2.1.2. Tình hình sản xuất và tiêu thụ hoa tại Việt Nam	8
2.2. Nguồn gốc, phân loại và đặc điểm thực vật học của cây hoa đồng tiền...14	
2.2.1. Nguồn gốc, vị trí, phân loại.....	14
2.2.2. Đặc tính sinh vật học của cây hoa đồng tiền	15
2.3. Nhân giống hoa đồng tiền.....	16
2.4. Khái quát về nuôi cấy mô tế bào thực vật	19
2.4.1. Khái niệm nuôi cấy mô tế bào thực vật.....	19
2.4.2. Sơ lược lịch sử nuôi cấy mô tế bào thực vật	20
2.4.3. Cơ sở khoa học của phương pháp nuôi cấy mô tế bào thực vật	22
2.4.4. Điều kiện và môi trường nuôi cấy mô tế bào thực vật	25
2.4.5. Các công đoạn của nuôi cấy mô tế bào	33
2.4.6. Nhân giống vô tính in vitro – ưu nhược điểm của phương pháp.....	35
2.5. Ứng dụng nuôi cấy mô trong nhân giống cây hoa.....	37
Chương III-NỘI DUNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	39
3.1. Đối tượng và Phạm vi nghiên cứu.....	39
3.2. Nội dung nghiên cứu	40

3.3. Phương pháp nghiên cứu.....	40
3.4. Xử lý số liệu	50
Chương IV- KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN	51
4.1. Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của chất khử trùng tới tỷ lệ sống của mẫu cây	51
4.2. Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của chất điều tiết sinh trưởng đến tỷ lệ .tạo callus từ mẫu cây.....	58
4.3. Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của chất điều tiết sinh trưởng đến tái sinh chồi hoa đồng tiền từ callus.....	64
4.4. Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của chất điều tiết sinh trưởng đến sự nhân nhanh chồi hoa đồng tiền.....	77
4.5. Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của NAA đến sự ra rễ của chồi hoa đồng tiền nuôi cấy mô	87
4.6. Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng giá thể đến sự sinh trưởng, phát triển của cây hoa đồng tiền sau in vitro.....	90
Chương V- KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ	94
5.1.Kết luận	94
5.2. Đề nghị	94
TÀI LIỆU THAM KHẢO.....	95
Phô Biếu.....	98

1.1. Đặt vấn đề

C
h
ơ
n
g
I
M
Ở
Đ
À
U

Hoa đồng tiền có tên khoa học là *Gerbera Jamesonii Bolus* (còn gọi là hoa mặt trời hay hoa Phu Lãng), có nguồn gốc từ Nam Phi. Đến nay, hoa đồng tiền được trồng ở nhiều nước trên thế giới điển hình là: Hà Lan, Mỹ, Đức, Nhật Bản, Trung Quốc....[3]

Hoa đồng tiền rất phong phú đa dạng với nhiều màu sắc khác nhau như: đỏ, cam, vàng, trắng, phấn hồng, tím,... Trên một bông hoa có thể có một màu đơn hoặc nhiều màu xen kẽ. Hoa đồng tiền có cuống hoa to, là hoa lý tưởng để làm bó hoa, lẵng hoa và cắm nghệ thuật rất được ưa chuộng. Ngoài ra đồng tiền có thể được trồng vào chậu để chơi cả chậu hoa trong suốt một thời gian dài, đặt trong phòng làm việc, phòng khách rất phù hợp.

Trong sản xuất, cây hoa đồng tiền là loài hoa có giá trị kinh tế cao: Hoa đồng tiền có thể trồng một lần và cho thu hoạch quanh năm, mỗi cây cho khoảng từ 50 - 60 bông/năm [3], một ha hoa đồng tiền có thể trồng khoảng 60.000 cây [3]; giá hoa đồng tiền ở Thái nguyên tại ruộng vào ngày thường là 200-300 đồng/bông, vào ngày lễ tết giá từ 500 -1000 đồng/bông (tết 2007). Vì

vậy giá trị trên đầu bông hoa đồng tiền không cao như hoa phăng, hoa lily, hoa layon,... tuy nhiên hiệu quả kinh tế thu được trên một đơn vị diện tích lại khá cao.

Hoa đồng tiền ở nước ta được nhập nội từ những năm 1940 và đến nay đã phát triển ra nhiều tỉnh thành trong cả nước. Tuy nhiên diện tích trồng hoa đồng tiền trong cả nước còn thấp, chất lượng hoa của một số vùng còn yếu, chủ yếu được trồng ở một số địa phương có điều kiện như: Đà Lạt, Hà Nội, Hải Phòng, Thành Phố Hồ Chí Minh.... Nguyên nhân của hạn chế về diện tích và chất lượng hoa đồng tiền là [13]:

+ Thiếu giống tốt và thường xuyên phải nhập nội chủ yếu từ Hà Lan và Trung Quốc với giá thành cao (5.000 đồng/cây con) và không rõ nguồn gốc, thiếu chủ động. Do vậy chi phí sản xuất của người trồng hoa bị nâng cao, từ đó giá thành sản xuất cũng lên cao.

+ Hoa đồng tiền thường nhiễm bệnh nhất là nấm phytophthora trong điều kiện trồng trọt ở vùng nhiệt đới nước ta. Với nguồn nước ô nhiễm, vệ sinh đồng ruộng kém, cành hoa bị cắt sát đất dễ mắc cảm với bệnh nên các giống đồng tiền bị thoái hoá rất nhanh.

Thái Nguyên là một Thành phố phát triển, nhu cầu hoa của người dân khá cao. Tuy nhiên hoa đồng tiền giống và thương phẩm vẫn phải nhập lại từ một số tỉnh lân cận hoặc Trung Quốc, Hà Lan cho nên giá thành thường cao. Đứng trước yêu cầu của thực tế sản xuất, việc ***“Nghiên cứu biện pháp kỹ thuật nhân giống hoa đồng tiền bằng phương pháp nuôi cấy mô tại tỉnh Thái Nguyên”*** là rất cần thiết. Kết quả nghiên cứu sẽ tạo tiền đề cho triển khai sản xuất giống hoa đồng tiền nuôi cấy mô tại tỉnh Thái Nguyên.

1.2. Mục đích và Yêu cầu của đề tài

1.2.1. Mục đích

Nghiên cứu thành công kỹ thuật nhân giống thành công hoa đồng tiền bằng phương pháp nuôi cấy mô. Góp phần phục vụ công tác duy trì và sản xuất giống hoa đồng tiền chất lượng cao bằng phương pháp nuôi cấy mô trên địa bàn tỉnh Thái Nguyên.

1.2.1. Yêu cầu của đề tài

- Nghiên cứu ảnh hưởng của chất khử trùng tới hiệu quả khử trùng để hoa đồng tiền non.

- Nghiên cứu ảnh hưởng của một số chất điều tiết sinh trưởng tới khả năng tạo callus từ vật liệu khởi đầu là để hoa đồng tiền non sạch bệnh.

- Nghiên cứu ảnh hưởng của một số chất điều tiết sinh trưởng tới tái sinh chồi hoa đồng tiền từ callus.
- Nghiên cứu ảnh hưởng của một số chất điều tiết sinh trưởng đến khả năng nhân nhanh của chồi hoa đồng tiền.
- Xác định ảnh hưởng của NAA tới khả năng ra rễ của chồi hoa đồng tiền.
- Xác định giá thể phù hợp cho sinh trưởng phát triển của hoa đồng tiền nuôi cấy mô trong giai đoạn vườn ươm.

1.3. Ý nghĩa của đề tài

*** Ý nghĩa Khoa học:**

- Kết quả nghiên cứu sẽ đưa ra được một biện pháp kỹ thuật nhân giống hoa đồng tiền bằng phương pháp in vitro. Đánh giá được tác động của một số chất điều tiết sinh trưởng trong nhân giống hoa đồng tiền.
- Đánh giá được tác động của các giá thể đến sinh trưởng của cây con trong giai đoạn vườn ươm.
- Bổ sung nguồn tài liệu tham khảo cho công tác nghiên cứu, giảng dạy và sản xuất cây hoa đồng tiền.

*** Ý nghĩa thực tiễn sản xuất:**

Sản xuất được cây con sinh trưởng phát triển tốt, đồng đều và sạch bệnh với khối lượng lớn, kịp thời phục vụ cho sản xuất. Thuận lợi cho việc áp dụng các biện pháp kỹ thuật trong giai đoạn sản xuất hoa thương phẩm, từ đó kích thích sản xuất hoa phát triển.

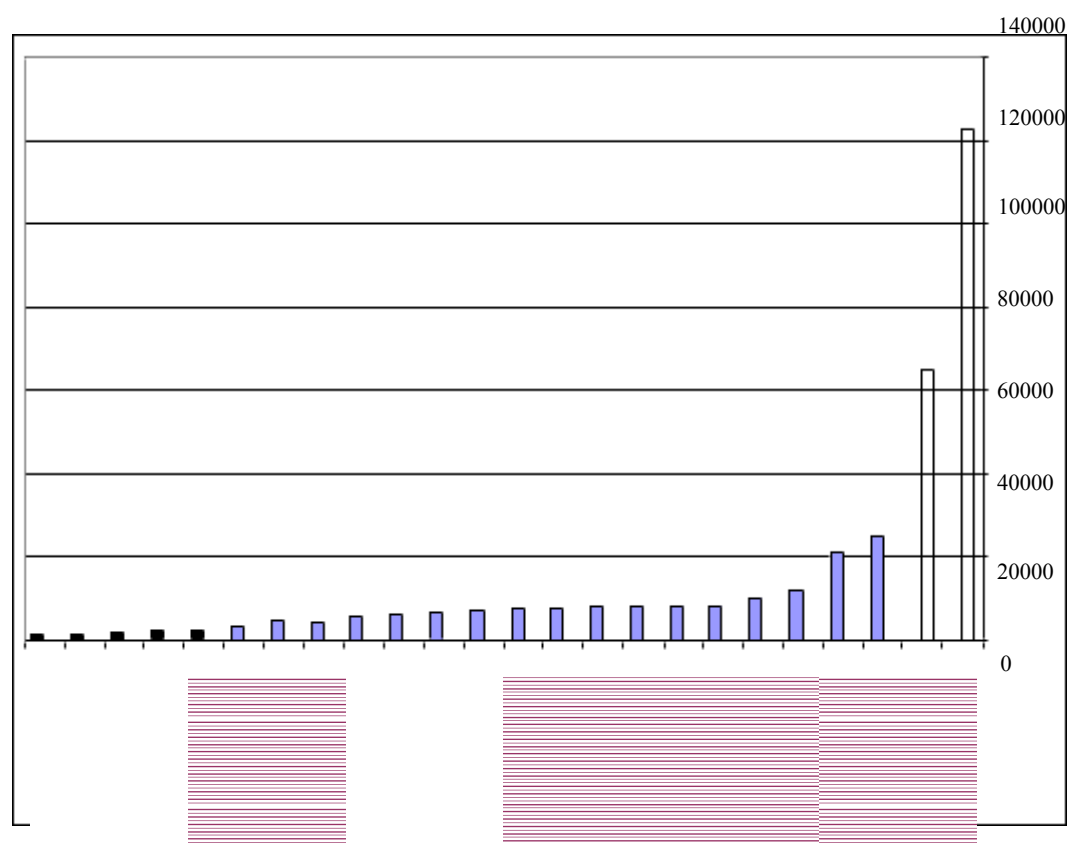
Chương II

TỔNG QUAN TÀI LIỆU

2.1. Tình hình sản xuất và tiêu thụ hoa trên thế giới và ở Việt Nam

2.1.1. Tình hình sản xuất và tiêu thụ hoa cắt trên thế giới

* *Tình hình sản xuất hoa cắt và cây cảnh trên thế giới*



Đồ thị 2.1. Diện tích trồng hoa, cây cảnh của một số nước trên thế giới (ha)

(Nguồn: Jo Wijnands, 2005)

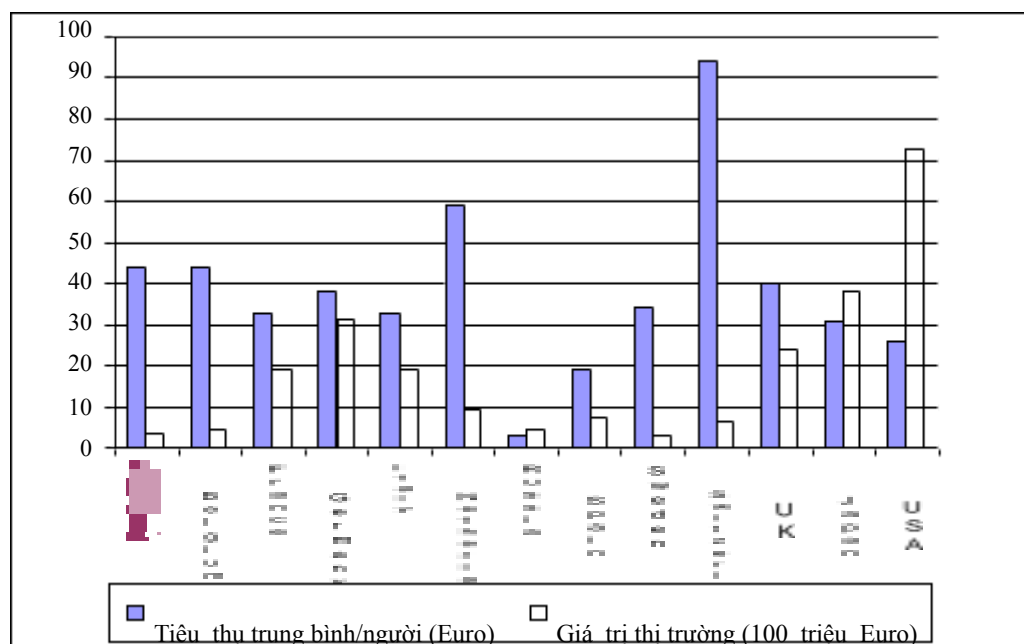
Nhìn vào đồ thị ta thấy: diện tích trồng hoa, cây cảnh tập trung chủ yếu ở các nước châu Âu và châu Á, một phần ở các nước châu Phi.

Trong đó, ngành sản xuất hoa cắt và cây cảnh không ngừng phát triển và mở rộng ở nhiều nước trên thế giới trong những năm gần đây như: Trung Quốc, Ấn Độ, Hàn Quốc, Nhật Bản, Đài Loan, Hà Lan, Mỹ, Pháp, Đức, Anh, Úc, Newzealand, Kenya, Ecuador, Colombia, Israel...

Hiện nay, Trung Quốc là nước có diện tích trồng hoa, cây cảnh lớn nhất thế giới với diện tích là 122.600 ha, nước có diện tích trồng hoa, cây cảnh lớn thứ hai là Ấn Độ : 65.000ha. Mỹ là nước đứng thứ 3, với khoảng 60.000 ha (AIPH, 2004) [16]. Một số nước châu Âu như : Pháp, Đức, Tây Ban Nha, Anh, Hà Lan, Israel... có nghề trồng hoa phát triển, diện tích trồng hoa của các nước đều ở mức trên 15.000ha. Sản xuất hoa ở các nước châu Âu chiếm khoảng 15% lượng hoa trên thế giới. Ở châu Phi, Kenya là nước trồng nhiều hoa nhất với diện tích 2.180ha. Nam Phi và Zimbabwe có diện tích trồng hoa khoảng 1.100ha.

*** *Tình hình tiêu thụ hoa trên thế giới***

Tình hình tiêu thụ hoa trung bình/người và ước tính giá trị thị trường của một số nước trên thế giới được thể hiện ở đồ thị 2.1.1b như sau:



Đồ thị 2.2. Tình hình tiêu thụ hoa cắt trên đầu người và giá trị thị trường (100 triệu Euro) của một số nước trên thế giới (Nguồn: Jo Wijnands, 2005)

Trên thế giới có 3 thị trường tiêu thụ hoa chính là Mỹ, các nước châu Âu và Nhật Bản (Buschman, 2005) [18].

Hàng năm giá trị xuất khẩu hoa cắt trên thế giới khoảng 25 tỷ USD, đứng đầu trong 4 nước xuất khẩu hoa trên thế giới là Hà Lan 1.590 triệu USD, Colombia 430 triệu USD, Kenya 70 triệu USD và Israel 135 triệu USD [22].

Đức là một trong những nước nhập khẩu hoa cắt lớn nhất thế giới, với giá trị nhập khẩu hoa cắt của Đức là 880 triệu Euro mỗi năm; Anh: 830 triệu Euro; Mỹ: 600 triệu Euro; Canada: 203 triệu Euro. Hà Lan không chỉ là nước xuất khẩu nhiều hoa mà còn là một nước nhập khẩu hoa lớn, giá trị nhập khẩu chiếm khoảng 25% xuất khẩu (Jo Wijnands, 2005) [20].

Tiêu thụ hoa bình quân trên đầu người hàng năm của các nước trên thế giới biến động trong phạm vi rất rộng từ vài Euro như ở Nga đến trên 90 Euro như ở Thụy Sĩ. Ước tính giá trị thị trường cao nhất là Mỹ, đạt trên 7.000 triệu Euro; sau đó đến Nhật, đạt gần 4.000 triệu Euro; Đức trên 3.000 triệu Euro và Anh trên 2.000 triệu Euro...

Tính theo số lượng hoa cắt năm 2006, 11 nước châu Âu đã xuất khẩu 175,86 triệu cành hoa cắt [23]. Tiêu thụ hoa cắt ở châu Á cũng tăng nhanh từ những năm 1993 trở lại đây như : Indonêxia năm 1993 tiêu thụ 33,93 triệu cành, năm 1999 tiêu thụ 58,99 triệu cành; Trung Quốc sản xuất và tiêu thụ năm 1993 khoảng 400 triệu cành, đã tăng lên 1,09 tỷ cành vào năm 1996 (Yang Xiaohan, 1996) [24].

Như vậy, thị trường hoa cắt trên thế giới là rất lớn và đang có xu thế tăng mạnh. Tính chất chuyên nghiệp ngày càng tăng thể hiện nhu cầu của người tiêu dùng ngày một tăng tạo ra những khó khăn và thách thức về thị trường cho các nước xuất khẩu hoa (Jo Wijnands, 2005) [20].

**** Tình hình sản xuất hoa đồng tiền trên thế giới***

Năm 1697 Relomen phát hiện thấy ở vùng phía Nam châu Phi (Delánia) và ông đã đưa về vườn thực vật nước Anh. Irwin Luynch là người đầu tiên tiến hành lai tạo các giống đồng tiền với nhau [3]. Sau đó người Pháp

và người Hà Lan cũng tiến hành lai tạo và dần dần 2 nước này đã trở thành trung tâm tạo giống đồng tiền thế giới. Từ năm 1980, mỗi năm thế giới đã tạo ra được trên 80 chủng loại giống khác nhau, hoa có đường kính 8 cm trở lên và tạo ra những giống lai cánh hoa kép. Hiện nay, các giống hoa đồng tiền to đang được trồng rộng rãi trong sản xuất, phần lớn các giống hoa đồng tiền mới là do các nhà tạo giống Hà Lan tạo ra.

Hoa đồng tiền là một trong mười loại hoa quan trọng nhất trên thế giới (Sau hoa Hồng, Cúc, Lan, Cẩm chướng, Layon). Các nước có sản lượng hoa lớn là: Hà Lan, Côlômbia, Pháp, Trung Quốc... Ở các nước này hầu hết đồng tiền được trồng trong nhà có mái che có hệ thống điều chỉnh nhiệt độ, ẩm độ, ánh sáng, tưới nước, bón phân bằng chế độ tự động hoặc bán tự động. Do đó, năng suất, chất lượng hoa đồng tiền của các nước này rất cao: đạt 4,8 triệu bông hoa/ha/năm.

Theo Hà Tiểu Đề, (2000) [19], diện tích trồng hoa của Hà Lan là 8.017 ha, đạt giá trị sản lượng 3.590 triệu USD. Hầu hết các giống hoa đồng tiền tại Hà Lan là những giống hoa lai, hoa to, được những nhà chọn tạo giống của Hà Lan lai tạo ra, trong đó công ty Florist của Hà Lan là một cơ sở quan trọng về nghiên cứu, buôn bán và sản xuất hoa đồng tiền của thế giới.

Ở Ba Lan, hoa đồng tiền được trồng chủ yếu là sản phẩm của nuôi cấy mô, đây cũng chính là loại hoa quan trọng nhất chiếm khoảng 90% tổng sản phẩm hoa từ nuôi cấy mô năm 1984. Tại Trung Quốc, ngay từ những năm 1920, hoa đồng tiền cắt cành đã được sản xuất ở Mai Long, Thượng Hải song phát triển rất kém do giống bị thoái hóa trầm trọng. Từ năm 1987 đến nay, nhờ ứng dụng kỹ thuật nuôi cấy mô nên đã khắc phục được tình trạng thoái hóa giống, qua đó diện tích trồng hoa đồng tiền ngày một mở rộng và phát triển. Cơ sở trồng hoa đầu tiên ở Thượng Hải có 35 ha, Giang Tô 6 ha, sau đó

Viện nghiên cứu khoa học rau quả và nông trường Liên Vân lần đầu tiên thử nghiệm trên quy mô lớn.

2.1.2. Tình hình sản xuất và tiêu thụ hoa tại Việt Nam

Việt Nam có điều kiện khí hậu phù hợp cho nhiều loài hoa và cây cảnh phát triển. Tính đến năm 2005, nước ta có khoảng 13.200ha diện tích trồng hoa cây cảnh (Bộ Nông nghiệp và phát triển nông thôn, 2007) [1]. Sản xuất hoa cho thu nhập cao, bình quân đạt khoảng 70-130 triệu đồng/ha nên rất nhiều địa phương trong cả nước đang mở rộng diện tích trồng hoa trên những vùng đất có tiềm năng [25].

Tại miền Bắc, sản xuất hoa tập trung ở một số địa phương: Thành Phố Hà Nội, Hà Tây, Hải Dương, Hải Phòng, Vĩnh Phúc, Hưng Yên, Thái Bình, Bắc Ninh, Quảng Ninh, Lào Cai, Sơn La và Hà Giang. Loại hoa sản xuất nhiều nhất ở vùng này là hoa Cúc, chiếm khoảng 35%, thứ 2 là hoa Hồng chiếm 32%; còn lại là các loại hoa khác, như: Lay ơn, Đồng tiền, Cẩm chướng, Huệ, Lan...[26].

Vùng sản xuất nhiều hoa ở phía Bắc gồm: Tây Tựu-Từ Liêm-Hà Nội: 330ha ; Vĩnh Phúc 867ha ; Hải Phòng : 755ha ; Hoàn Bồ - Quảng Ninh 10ha; Lào Cai 95,7ha; Sơn La 22ha, Hà Giang 18ha.

Các tỉnh phía Nam, Thành Phố Hồ Chí Minh là địa phương có diện tích trồng hoa cây cảnh lớn khoảng 700ha, với 1.400 hộ sản xuất trên 8 quận huyện, các loại hoa trồng chính là: hồng môn, lay ơn, đồng tiền, thiên điều...

Được thiên nhiên ưu đãi về điều kiện thời tiết, khí hậu thêm vào đó là truyền thống và kinh nghiệm của người trồng hoa. Lâm Đồng đã trở thành trung tâm sản xuất hoa cắt cành lớn nhất cả nước, với diện tích trồng hoa cây cảnh năm 2005 là 2027ha [25]. Hoa được sản xuất chủ yếu ở Thành Phố Đà Lạt, các xã Hiệp Thành, Hiệp An, sản lượng hoa khoảng 640 triệu cành. Nghề trồng hoa ở Đà Lạt đang có xu hướng phát triển mạnh, áp dụng công nghệ cao

vào sản xuất, sử dụng giống mới, cải tiến quy trình canh tác, áp dụng các loại phân bón thể hệ mới với đặc tính phân giải chậm, sử dụng các vật liệu hỗ trợ sản xuất.... nhưng ứng dụng mang lại hiệu quả rõ rệt nhất là sản xuất hoa trong nhà màng, sử dụng các hệ thống tưới cải tiến và sử dụng giống thông qua kỹ thuật nhân cấy mô thực vật (Nguyễn Văn Tới, 2007) [11].

Diện tích trồng hoa, cây cảnh của nước ta tăng trưởng ổn định trong suốt 12 năm qua; so năm 1994, diện tích hoa cây cảnh năm 2006 tăng 3,8 lần (diện tích hoa cây cảnh năm 1994 : 3.500ha, năm 2006 : 13.400ha) giá trị tăng 6 lần, đạt 1.045 tỷ đồng (Đỗ Tuấn Khiêm, 2007) [5]. Hiệu quả kinh tế từ trồng hoa gấp 10 lần so với lúa và 7 lần so với cây trồng khác; nếu đầu tư 28 triệu cho 1 ha hoa thì lợi nhuận thu được 90 triệu đồng (Nguyễn Xuân Linh, 1998) [6].

Mặc dù diện tích trồng hoa cây cảnh ở nước ta tăng, nhưng việc sử dụng hoa cắt ở nước ta chưa nhiều, bình quân khoảng 1USD/người/năm, so sánh với các nước khác trên thế giới, như: Mỹ, Đức, Nhật, Hà Lan, Italia...(bình quân 1 người 16,6USD/năm) thì nước ta sử dụng hoa cắt còn rất ít. Tiêu thụ hoa trong nước đa dạng về chủng loại, nhưng chất lượng hoa thấp, giá rẻ, hiệu quả kinh tế không cao; hoa được tiêu thụ tập trung chủ yếu vào những ngày lễ, tết, các ngày kỷ niệm. Hiện nay, Việt Nam đã xuất khẩu được một số loại hoa cắt cành như : hồng, phong lan, cúc, đồng tiền, cẩm chướng, Lily sang Trung Quốc, Đài Loan, Nhật Bản, Singapore, Australia, Ả rập, nhưng số lượng chưa nhiều bình quân khoảng 10 triệu USD/năm. Sở dĩ sản phẩm hoa cây cảnh của Việt Nam khó thâm nhập thị trường thế giới là do chủng loại, chất lượng, kích cỡ không đồng đều, chưa đáp ứng được thị hiếu của khách hàng quốc tế [25].

Sự chênh lệch về giá cả giữa thị trường hoa Việt Nam và thị trường hoa thế giới cũng thể hiện khá rõ trên hoa đồng tiền. Theo kết quả điều tra thực trạng sản xuất hoa đồng tiền cho thấy, hoa đồng tiền bán tại ruộng dao động

từ 500-1100 đ/bông (tết 2006) bán tại thị trường là 1.500-2.000 đ/bông. Trong khi giá thành và giá bán hoa đồng tiền ở Việt Nam hết sức rẻ thì giá hoa đồng tiền tại một số nước phát triển cao hơn rất nhiều, tại Mỹ là 20.000-25.000 VNĐ/bông.

**** Những thuận lợi, khó khăn và phương hướng sản xuất hoa ở Việt Nam [6].***

Kết quả nghiên cứu đề tài “ Điều tra khả năng phát triển hoa ở khu vực miền Bắc Việt Nam” của PGS.TS Nguyễn Xuân Linh (viện di truyền nông nghiệp Việt Nam) đã thực hiện trong 2 năm 1996-1997. PGS.TS Nguyễn Xuân Linh đã đưa ra những đánh giá sau :

+ Những điều kiện thuận lợi của sản xuất hoa ở Việt Nam

- Việt Nam là một nước nông nghiệp, diện tích tự nhiên lớn, 80% dân số sống bằng nghề nông, nông dân cần cù, giàu kinh nghiệm sản xuất, nghề trồng hoa có từ lâu đời.

- Thị trường tiêu thụ hoa ngày càng được mở rộng, có tiềm năng xuất khẩu hoa ra các nước khác.

- Một số loại hoa họ nhiệt đới có nguồn gốc ở Việt Nam thích hợp với điều kiện tự nhiên của vùng.

- Nhà nước đang khuyến khích phát triển hoa để phục vụ nhu cầu trong nước và xuất khẩu.

+ Những khó khăn của sản xuất hoa Việt Nam

- Khí hậu miền Bắc nóng, ẩm về mùa hè đặc biệt trong các tháng từ tháng 5 đến tháng 8, mùa đông thì có gió mùa Đông Bắc lạnh, độ chiếu sáng ngắn, yếu. Miền Nam quanh năm nóng ẩm, có mùa đông khô và mùa nóng mưa, ẩm độ cao, điều kiện khí hậu không thuận lợi cho các cây hoa có nguồn gốc ôn đới.

- Chưa có các giống hoa chất lượng cao, thích ứng với điều kiện của vùng. Tuy một số vùng có một số giống hoa đẹp, quý như trà, lan, Anthirium

nhưng ở dạng hoa đại nên không thể cạnh tranh được với các dạng hoa lai tạo có màu sắc sặc sỡ và chưa có chỗ đứng trên thị trường thế giới.

- Sản xuất hoa tản mạn, các tiến bộ kỹ thuật trong sản xuất bảo quản hoa chưa được áp dụng rộng rãi.

- Thiếu các phương tiện, thiết bị bảo vệ hoa trong điều kiện nắng nóng, mưa, bão... như nhà kính, nhà lưới, nhà che.

- Thị trường hoa chưa phát triển trong cả nước và xuất khẩu

- Những đội ngũ cán bộ khoa học về cây hoa chưa được đào tạo đầy đủ.

- Việc đầu tư giống hoa của các nước vào Việt Nam còn hạn chế.

- + Phương hướng phát triển sản xuất cây hoa ở Việt Nam

- Nhà nước cần đầu tư cho công tác nghiên cứu phát triển hoa ở Việt Nam, khai thác hợp lý, tận dụng tiềm năng, khắc phục những hạn chế, khó khăn, đem lại hiệu quả cao cho sản xuất hoa ở nước ta.

- Trước mắt tập trung nghiên cứu, cải tiến giống, đầu tư phát triển các loài hoa nhiệt đới quý, đẹp được thị trường chấp nhận, có khả năng thích ứng điều kiện tự nhiên của vùng, phát triển các giống hoa ôn đới theo mùa vụ cho các vùng có khí hậu thích hợp.

- Tăng cường đào tạo cán bộ về hoa, áp dụng các tiến bộ về sản xuất, bảo quản, chế biến hoa của thế giới vào điều kiện sản xuất hoa của vùng.

- Tạo cơ sở kỹ thuật cho sản xuất, chế biến, bảo quản hoa như nhà lưới, nhà kính, nhà che cây hoa, kho lạnh, bến bãi, bảo quản, lưu giữ phục vụ xuất khẩu hoa.

- Tìm kiếm thị trường tiêu thụ hoa.

- Tích cực hợp tác, mời các chuyên gia hàng đầu về hoa của các nước tiên tiến sang truyền đạt kinh nghiệm, kỹ thuật trong sản xuất hoa.

- Dự kiến năm 2010 diện tích trồng hoa sẽ đạt 16.000 ha với 5 tỷ cành hoa, ước tính đạt doanh thu xuất khẩu 60 triệu USD [12].

**** Tình hình sản xuất hoa đồng tiền ở Việt Nam***

Hoa đồng tiền là 1 trong 10 loại hoa quan trọng nhất trên thế giới, sau hồng, cúc, lan, cẩm chương, lay ơn....

Trong các loại hoa đồng tiền đã và đang được trồng tại Việt Nam thì hoa đồng tiền kép nhập nội là một trong những cây cho hiệu quả kinh tế cao nhất. Từ một sào hoa đồng tiền giống mới chăm sóc đúng kĩ thuật có thể cho thu nhập gần 50 triệu/sào/năm. [6]

Ở Việt Nam giống hoa đồng tiền đơn được nhập về trồng đầu tiên khoảng từ những năm 1940. Đặc điểm của giống hoa đơn này là cây sinh trưởng khỏe, thích nghi tốt với điều kiện tự nhiên nhưng nhược điểm là hoa nhỏ, cánh đơn, màu sắc đơn điệu, vì vậy hiện nay người ta ít trồng.

Từ những năm 1990, một vài Công ty và những nhà trồng hoa Việt Nam bắt đầu nhập các giống đồng tiền lai (hoa kép) từ Đài Loan, Hà Lan, Trung Quốc về trồng. Các giống này tỏ ra có nhiều ưu điểm: hoa to, cánh dày, gồm nhiều tầng xếp lại với nhau, màu sắc phong phú, hình dáng hoa cân đối, rất đẹp, năng suất cao. Vì vậy, những giống này đã được tiếp nhận và phát triển mạnh mẽ ở khắp mọi vùng, mọi tỉnh thành trên cả nước.

Trồng đồng tiền về cơ bản không khó, xong do đặc tính của cây đồng tiền khác biệt so với một số loại hoa khác, nếu cần phải có những biện pháp kỹ thuật riêng biệt. Nắm được điều này nghề sản xuất hoa đồng tiền ở Việt Nam còn có cơ hội phát triển hơn nữa.

**** Xu thế của nghề trồng hoa đồng tiền [7].***

- Kết hợp giữa khoa học và sản xuất, nâng cao hàm lượng KHKT.

Không có khoa học và kỹ thuật cao, thì không thể có chất lượng cao và hiệu quả kinh tế cao. Kết hợp giữa nghiên cứu khoa học với sản xuất và thị trường là đặc điểm của các nước trồng hoa tiên tiến. Ví dụ các công ty sản

xuất hoa nổi tiếng đều có các cơ sở khoa học chuyên nghiên cứu kết hợp với sản xuất, không ngừng đưa ra giống mới, kỹ thuật trồng trọt mới, tăng năng lực cạnh tranh của công ty.

- Công nghiệp hoá hiện đại hoá sản xuất.

Sức cạnh tranh của hoa trên thị trường chủ yếu quyết định bởi trình độ chuyên môn hoá, công nghiệp hoá và hiện đại hoá sản xuất. Các nước sản xuất hoa tiên tiến đều có nhà ươm, quy mô lớn được hiện đại hoá, do kết cấu hợp lý, thiết bị tiên tiến nên trình tự sản xuất được thực hiện một cách khoa học, sản lượng và chất lượng hoa đều rất cao. Sử dụng nhà ươm có thiết bị hiện đại, trồng trên nền không đất... là xu thế phát triển sản xuất hoa đồng tiền.

Công nghiệp hoá sản xuất có thể sản xuất liên tục trên quy mô lớn, trồng trong dung dịch, chuyên môn hoá mới mở rộng được quy mô, hạ được giá thành nâng cao được sức cạnh tranh và hiệu quả kinh tế.

- Tăng cường việc chọn tạo và nhập giống mới, công tác giống phải luôn luôn đi đầu.

Giống là lực lượng sản xuất chủ yếu của sự nghiệp trồng hoa. Người nào có giống tốt, năng suất cao, chất lượng cao, chống bệnh tốt người đó sẽ đứng vững trên thị trường và do đó có lợi nhuận cao.

- Chọn giống trồng trong chậu.

Hoa đồng tiền trồng trong chậu đang được lưu hành trên thế giới, các tỉnh ven biển phía đông Trung Quốc cũng bắt đầu.

Trồng hoa trong chậu ngoài ưu thế ít sâu bệnh, còn có đặc điểm là có hoa quanh năm, có ưu thế rất lớn vào mùa đông khi ít hoa. Nhưng trồng trong chậu tương đối ít, màu sắc đơn điệu, tăng cường chọn tạo và nhập giống trong chậu là con đường rất có triển vọng.

2.2. Nguồn gốc, phân loại và đặc điểm thực vật học của cây hoa đồng tiền

2.2.1. Nguồn gốc, vị trí, phân loại.

Cây hoa đồng tiền có tên khoa học là *Gerbera jamesonii* Boiss & Hausskn có nguồn gốc từ Nam Phi. Theo hệ thống học thực vật mới nhất, cây hoa đồng tiền được phân loại như sau:

Giới: Plantae
Ngành: Magnoliophyta
Lớp: Magnoliopsida (lớp 2 lá mầm)
Bộ: Asteraceae (họ cúc)
Phân họ: Mutisioideae
Chi: Gerbera

Chi đồng tiền *Gerbera* có khoảng 40 loài. Các giống trồng hiện nay là con lai giữa *G. viridifolia* Schult Bip và *G. jamesonii* với các giống lai tự nhiên ở Nam Phi.

Năm 1889, đồng tiền được Hooker miêu tả lần đầu tiên trong tạp chí tư vấn Curtis dưới tên gọi Cúc Transrace hay Cúc barbetan.

Theo Hà Tiểu Đệ và cộng sự (2000) [19], cây hoa đồng tiền là cây thân thảo, rễ chùm, cao 50-60cm. Thân có lông, lá đứng, hình dạng lá thay đổi theo sự sinh trưởng từ dạng trứng đến trứng dài, lá dài từ 15- 25 cm, rộng 5- 8 cm hình xẻ thùy rộng và sâu, mặt dưới lá có lớp lông nhung.

Hoa đồng tiền có dạng cụm, hoa đầu lớn, cụm hoa dạng đầu bẹ ngoài là một bông hoa trên thực tế là một tập hợp nhiều bông hoa nhỏ riêng biệt. Phía ngoài hoa hình lưỡi tương đối lớn mọc xếp thành một hoặc vài vòng. Do sự thay đổi hình thái và màu sắc nên tâm hoa rất được chú ý trong chọn tạo giống mới. Hoa đồng tiền nở theo thứ tự từ ngoài vào trong, hoa hình lưỡi nở trước, hoa hình tia nở sau theo từng vòng một.

Hoa đồng tiền có khoảng 40 loài thuộc loại hoa lưu niên ra hoa quanh năm, độ bền hoa cắt cao, được coi là 1 loài hoa đẹp trong thế giới hoa. Dựa vào hình thái hoa, người ta chia thành 3 nhóm: Hoa kép, hoa đơn và hoa đơn nhị kép [3].

Nhóm 1 - Đồng tiền đơn: Hoa chỉ có một hoặc 2 tầng cánh, xếp xen kẽ nhau tạo vòng tròn. Hoa mỏng và yếu hơn hoa kép, màu sắc hoa ít hơn, điển hình là trắng, đỏ, tím, hồng.

Nhóm 2 - Hoa đồng tiền kép: Cánh hoa to gồm hơn 2 tầng, bông to, đường kính có thể đạt tới 12 - 15 cm, cánh hoa tụ lại thành bông nằm ở đầu trục chính, cuống dài 40 - 60 cm. Màu sắc đa dạng như trắng, đỏ, vàng, hồng, gạch cua.

Nhóm 3 - Hoa đơn nhị kép: Bên ngoài cùng cánh đơn, bên trong cánh kép dày đặc, thường màu trắng trong lớp cánh kép màu cánh sen nhưng nhóm này không đẹp bằng hoa kép.

Như vậy, trong ba nhóm hoa trên, đồng tiền kép là nhóm hoa có giá trị cao, được ưa chuộng hơn cả và cũng là đối tượng lý tưởng của nuôi cấy mô tế bào thực vật.

2.2.2. Đặc điểm thực vật học của cây hoa đồng tiền [3].

Cây hoa đồng tiền thuộc loại cây thân thảo họ cúc.

- Thân, lá: Thân ngầm, không phân cành mà chỉ đẻ nhánh, lá và hoa phát triển từ thân. Lá mọc chéo so với mặt đất một góc 15 - 45°, hình dáng lá thay đổi theo giống và sự sinh trưởng của cây, từ hình trứng thuôn đến hình thuôn dài. Lá dài từ 15 - 25 cm, rộng 5 - 8 cm, có hình lông chim, xẻ thùy nông hoặc sâu, mặt lưng lá có lớp lông nhung.

- Rễ: Rễ đồng tiền thuộc dạng rễ chùm, phát triển khỏe, rễ hình ống, ăn ngang và nổi phía trên mặt luống, rễ thường vươn dài tương ứng với diện tích lá tỏa ra.

- Hoa: đồng tiền do hai loại hoa nhỏ hình lưỡi và hình ống tạo thành, là loại hoa tự đơn hình đầu. Hoa hình lưỡi tương đối lớn mọc ở phía ngoài xếp thành vòng hoặc vài vòng nhỏ, do sự thay đổi hình thái và màu sắc nên được gọi là mắt hoa hoặc tâm hoa, rất được chú trọng. Trong quá trình hoa nở, hoa hình lưỡi nở trước, hoa hình ống nở theo thứ tự ngoài vào theo từng vòng một.

- Quả: quả đồng tiền thuộc dạng quả bế có lông, không có nội nhũ, hạt nhỏ, một gam hạt có khoảng 280-300 hạt.

2.3. Nhân giống hoa đồng tiền.

Hoa đồng tiền có thể nhân giống bằng các phương pháp là: phương pháp hữu tính (nhân giống bằng hạt) và phương pháp nhân giống vô tính (nhân giống bằng tách cây, cắm cành, nuôi cây mô tế bào). Các vùng trồng hoa đồng tiền chủ yếu sử dụng giống từ nuôi cấy mô. Có nhiều tác giả sử dụng biện pháp nuôi cấy mô để sản xuất giống hoa đồng tiền. Cụ thể như sau:

*** Theo Th.S Đặng Văn Đông và PGS.TS Đinh Thế Lộc [3]:**

Hoa đồng tiền nhân giống bằng phương pháp nuôi cấy mô có thể tiến hành như sau:

Vật liệu vào mẫu là đế hoa non. Cắt lấy nụ có đường kính khoảng 1cm, lấy bông thấm muối rửa sạch, đưa vào tủ nuôi cấy mô. Rửa sạch rồi cho vào dung dịch chlorua thủy ngân 0,1% tiêu độc trong 20 phút, lấy ra dùng nước sạch rửa 3-4 lần, dùng panh và dao bóc vẩy, cắt bỏ tất cả hoa nhỏ, giữ lấy đế hoa, cắt đế hoa thành từng miếng nhỏ vuông 2 - 3mm. Nuôi cấy ở $24 \pm 2^{\circ}\text{C}$, cường độ chiếu sáng 2.000 - 3.000lux. Mỗi ngày chiếu sáng 12 - 16 giờ.

Môi trường nuôi cấy đòi thứ nhất là:

MS + BA4 mg/l + NAA 0,2 mg/l + IAA 0,2 mg/l

Sau 4 tuần hình thành một thân mầm. Sau đó, mầm chuyển vào môi trường:

MS + KT 5mg/l + IAA 1 mg/l nuôi cấy tiếp. Đợi khi mầm cao 2cm, cắt chuyển vào môi trường 1/2MS + NAA 0,1mg/l cho ra rễ, sau khoảng 4 tuần sẽ ra rễ dài 2 - 3cm.

Chuyển cây con đã ra rễ trồng trên chất nền gồm 1 phần mùn cưa, 1 phần than bùn, 1 phần vụn đá xốp rồi dùng lưới cản quang che nắng, che mưa. Ở nơi độ ẩm không khí cao mỗi ngày phun nước 1 lần, 1 tuần phun dung dịch dinh dưỡng 1 lần, sau 2-3 tuần cây sẽ sống, tăng dần cường độ chiếu sáng, chăm sóc 5 - 6 tuần có thể đưa ra trồng ngoài ruộng. Ở nơi khô hạn cần tăng cường phun mù để nâng cao tỷ lệ cây sống.

*** Theo Hoàng Thị Phương Nga và cộng sự [9]:** Hoa đồng tiền nhân giống bằng phương pháp nuôi cấy mô được tiến hành như sau:

- *Tạo nguồn vật liệu khởi đầu:*

Nguồn mô ban đầu để tạo nguyên liệu khởi đầu cho quá trình nuôi cấy trong ống nghiệm là các nụ hoa non của một số giống hoa đồng tiền Hà Lan

Hoá chất khử trùng: nước Javen 1/8 trong 10 phút, rửa bằng nước cất vô trùng 2 lần rồi khử trùng tiếp lần 2 bằng dung dịch HgCl₂ 0,1% trong 7 phút, rửa sạch mẫu bằng nước vô trùng 3 lần.

Môi trường tái sinh tối ưu: MS + 1ppm BAP + 0,2 ppm Kinetin+0,2ppm IAA + 2,5% Saccaroza + 6,5 g Agar/l.

Trên môi trường này sau 8-10 tuần các mẫu nuôi cấy sẽ hình thành chồi hay callus. Để tăng cường nguồn mẫu ban đầu phục vụ cho quá trình nhân nhanh tiếp theo chúng ta sẽ áp dụng phương pháp nuôi cấy lát mỏng tế bào.

Lớp mỏng các giống được cắt với kích thước 0,5-0,7mm lấy từ những mẫu đồng tiền rồi cấy trên môi trường tái sinh tối ưu: MS + 1ppm BAP + 0,2 ppm Kinetin+0,2ppm IAA + 2,5% Saccaroza + 6,5 g Agar/l.

Cấy 5 - 7 lát/bình nuôi cấy. Sau 6 - 7 tuần nuôi cấy ta sẽ thu được lượng mẫu tăng 5 - 7 lần so với dùng phương pháp nhân chồi thông thường.

- Kỹ thuật nhân nhanh.

Môi trường tối ưu sử dụng cho quá trình nhân nhanh: MS + 1 ppm

Kinetin + 10% nước dừa + 2,5% Saccaroza + 6,5 g Agar/l

Các mẫu nuôi cấy sau một số lần nhân nhanh thì khả năng đẻ chồi tăng lên nhưng chất lượng chồi giảm đi rất mạnh thể hiện là số chồi rất nhiều nhưng chồi rất nhỏ, yếu, khả năng ra rễ kém khi ra vườn ươm tỷ lệ chết rất cao. Chính vì vậy mà cần phải có quá trình vào mẫu liên tục để thay thế, các mẫu qua cấy chuyển 8 - 10 lần. Các mẫu sau cấy chuyển 5-6 lần thì nên giảm nồng độ chất điều tiết sinh trưởng 50%. Cụ thể là sau 6 lần cấy chuyển môi trường tối ưu để tiếp tục cấy chuyển là:

MS + 0,5 ppm Kinetin + 10% nước dừa + 2,5% Saccaroza + 6,5 g Agar/l

Trên môi trường nhân này ta tiếp tục nhân các mẫu thêm 4 - 5 lần nữa rồi chuyển toàn bộ mẫu cấy sang môi trường dinh dưỡng không có chất điều tiết sinh trưởng cụ thể là

MS + 10% nước dừa + 2,5% Saccaroza + 6,5 g Agar/l

Chồi sau 4-5 lần cấy ta chọn lấy những chồi đủ tiêu chuẩn cấy sang môi trường tạo rễ rồi loại bỏ toàn bộ mẫu đó thay thế bằng loạt mẫu mới.

- Kỹ thuật tạo cây hoàn chỉnh.

Môi trường tốt nhất để tạo rễ cho chồi hoa đồng tiền là :

MS + 0,1ppm NAA + 2,5% đường Saccaroza + 6,5g Agar/l

- Kỹ thuật ra cây ngoài vườn ươm.

Giá thể thích hợp nhất cho việc ra cây là: 1 mùn + 1 chậu hun.

*** Theo Ngô Đăng Vịnh, Hà Thị Thúy, Dương Minh Nga [13]: đã đưa ra quy trình nhân giống hoa đồng tiền như sau:**

Vật liệu vào mẫu là đế hoa đồng tiền non của các giống hoa đồng tiền nhập nội từ nước ngoài. Quy trình nuôi cấy như sau:

Sử dụng dung dịch HgCl_2 nồng độ 0,1 % với thời gian 10 phút là thích hợp nhất cho khử trùng để hoa đồng tiền.

Môi trường tạo callus và tái sinh chồi là MS + 0,2 mg TDZ/l + 0,1 mg NAA/l + 50 gram đường/l + 6 gram agar/l.

Môi trường nhân nhanh tốt nhất là môi trường bán lỏng MS + 1,5 mg BAP /l + 10% nước rửa + 1mg/l B1 + 50 gram đường/l + 3 gram agar/l

Môi trường ra rễ là môi trường MS + 0,5 mg NAA/l + 50 gram đường/l + 6 gram agar/l.

Giá thể thích hợp nhất cho cây con trong giai đoạn vườn ươm là hỗn hợp 1 đất + 1 trấu hun + $\frac{1}{4}$ vi sinh.

2.4. Khái quát về nuôi cấy mô tế bào thực vật

2.4.1. Khái niệm nuôi cấy mô tế bào thực vật

Nhân giống vô tính là hình thức nhân giống thông qua các cơ quan dinh dưỡng (thân, lá, vỏ, củ...) bao gồm các phương pháp giâm cành, chiết cành, mắt ghép và nuôi cấy in vitro. Trong đó nuôi cấy in vitro được coi là phương pháp hữu hiệu nhất.

Nhân giống vô tính in vitro được tiến hành trên nguyên tắc cắt nuôi đoạn thân có mang chồi ở nách lá, đoạn rễ hay mảnh củ, cánh hoa, có kích thước nhỏ phù hợp với điều kiện vô trùng của ống nghiệm [2].

Phương pháp nhân giống in vitro đã bổ sung cho các kỹ thuật nhân giống vô tính cổ điển như giâm, chiết, ghép tách dòng một kỹ thuật tiên bộ với những ưu điểm như: Tốc độ nhân giống cao từ 33 đến 1012 một năm [2], ví dụ trong 1 ml dung dịch môi trường có từ 100.000 - 1000.000 tế bào nuôi nên ở điều kiện thích hợp mỗi tế bào có thể chuyển hoá tạo phôi và mọc cây, từ 1ml dung dịch môi trường có thể tạo ra cả rừng cây [14]; Chủ động sản xuất, không phụ thuộc vào điều kiện thời tiết, mùa vụ; Có khả năng công nghiệp hóa cao do nuôi cấy trong điều kiện ổn định về môi trường dinh

duỡng, nhiệt độ, ánh sáng, do đó có thể công nghiệp hóa hoàn toàn từ khâu nhân cây giống với số lượng lớn đến khi ươm trồng trong nhà lưới.

2.4.2. Sơ lược lịch sử nuôi cấy mô tế bào thực vật

Nuôi cấy mô tế bào thực vật đã trải qua một lịch sử phát triển lâu dài và được đánh dấu bằng những sự kiện chính sau:

- Năm 1902, Harberlandt lần đầu tiên đưa ra các lý thuyết và Schneider và Butschli (người mô tả chính xác quá trình phân chia tế bào) vào thực nghiệm nuôi cấy mô cây 1 lá mầm nhưng không thành công[16].

- Năm 1929 - 1933 lần lượt Bchumuker, Scheitter, Pfcifer và Lance thành công trong việc nuôi cấy một đoạn đầu mút rễ hoàn chỉnh [2].

- Năm 1934, Kogl lần đầu tiên xác định được vai trò của IAA, một hooc môn thực vật đầu tiên thuộc nhóm Auxin có khả năng kích thích sự phát triển tăng trưởng và phân chia tế bào thực vật [14].

- Năm 1939, Gautheret, Nobecourt và White đã đồng thời nuôi cấy mô sẹo thành công trong thời gian dài từ mô tượng tầng, Nobetcourt nuôi cấy củ Cà rốt và nhận được sự phân bào tạo ra khối tế bào phân chia.

- Năm 1941, Overbeek và cộng sự đã sử dụng nước dừa trong nuôi cấy phôi non ở cây cà rốt Patura [10].

- Năm 1955, Miller và cộng sự phát minh ra cấu trúc và sinh tổng hợp Kinetin là 1 cytokinin đóng vai trò quan trọng trong phân bào và phân hóa chồi ở mô nuôi cấy [10].

- Năm 1957, Skoog và Miller tạo ra được chồi từ mảnh mô thân cây thuốc lá đồng thời khám phá vai trò của tỷ lệ nồng độ các chất Auxin/ Cytokinin, nồng độ auxin/ nồng độ cytokinin < 1 có xu hướng tạo ra chồi. Ngược lại khi nồng độ auxin/ nồng độ cytokinin > 1 mô có xu hướng tạo rễ.

Tỷ lệ nồng độ auxin và cytokinin thích hợp sẽ kích thích phân hóa cả chồi và rễ, tạo cây hoàn chỉnh [14].

- Năm 1958, Keinert và Sterward tạo được phôi và cây hoàn chỉnh từ tế bào tượng tầng tách từ cây cà rốt được nuôi cấy một dạng huyền phù [2].

- Năm 1960, Morel đã thực hiện bước ngoặt cách mạng trong sử dụng kỹ thuật nuôi cấy đỉnh sinh trưởng trong nhân nhanh các loại địa lan cymbidim.

- Năm 1960, Cooking lần đầu tiên sử dụng enzym phân giải thành tế bào và đã tạo ra số lượng lớn tế bào trần ở những cây trồng khác nhau [14].

- Năm 1966, Guha và cộng sự thành công trong nuôi cấy thể đơn bội ở cà độc dược từ bao phấn[10].

- Năm 1967- 1968, lần lượt Nichkoi Nakato và cộng sự tạo được cây đơn bội từ bao phấn thuốc lá [15].

- Năm 1971, Takeb tái sinh thành công cây thuốc lá từ tế bào trần [10].

- Năm 1972, Carlson và cộng sự lần đầu tiên thực hiện lai tế bào soma giữa các loài, tạo được cây từ dung hợp tế bào trần của 2 loài thuốc lá *Nicotiana glauca* và *N. langsdorfi* [14].

- Năm 1977, Chers lai thành công tế bào soma cây cà chua và cây khoai tây [15].

Từ năm 1977 đến nay, công nghệ tế bào thực vật đã có những bước tiến vượt bậc với việc áp dụng các công nghệ cao trong chọn tạo giống cây trồng như: đột biến tế bào soma, cứu phôi lai xa, dung hợp tế bào trần, tạo dòng kháng thể, nuôi cấy bao phấn, hạt phấn trên nhiều đối tượng cây trồng. Chúng ta đang bước vào giai đoạn thứ tư của nuôi cấy mô tế bào, đây là giai đoạn nuôi cấy mô tế bào được ứng dụng mạnh mẽ vào thực tiễn chọn giống, nhân giống, sản xuất các chất thứ cấp có hoạt tính sinh học và nghiên cứu lý luận di truyền ở thực vật bậc cao [2].

2.4.3. Cơ sở khoa học của phương pháp nuôi cấy mô tế bào thực vật.

*** *Tính toàn năng (Totipotence) của tế bào [10].***

Năm 1902, Nhà Sinh lý thực vật học người Đức Haberlandt, đã tiến hành nuôi cấy các tế bào thực vật để chứng minh tế bào là toàn năng.

Haberlandt cho rằng mỗi tế bào của bất kỳ sinh vật nào cũng đều có khả năng tiềm tàng để phát triển thành một cơ thể hoàn chỉnh. Ông nhận thấy rằng, mỗi tế bào của cơ thể đa bào đều phát sinh từ hợp bào thông qua quá trình phân bào nguyên nhiễm. Điều đó có nghĩa là mỗi tế bào của một sinh vật sẽ chứa toàn bộ thông tin di truyền cần thiết của một cơ thể hoàn chỉnh. Khi gặp điều kiện thuận lợi nhất định, những tế bào đó có thể sẽ phát triển thành một cơ thể hoàn chỉnh.

Năm 1953, Miller và Skoog (Notingham. Unio) đã thành công khi thực nghiệm tái sinh cây con từ tế bào lá, chứng minh được tính toàn năng của tế bào. Thành công trên đã tạo ra công nghệ mới: công nghệ sinh học ứng dụng trong nhân giống vô tính, tạo giống cây trồng và dòng chống chịu.

Tính toàn năng của tế bào mà Haberlandt nêu ra chính là cơ sở lý luận của phương pháp nuôi cấy mô và tế bào thực vật. Cho đến nay, con người đã hoàn toàn chứng minh được khả năng tái sinh một cơ thể thực vật hoàn chỉnh từ một tế bào riêng rẽ.

*** *Sự phân hoá và phản phân hoá tế bào***

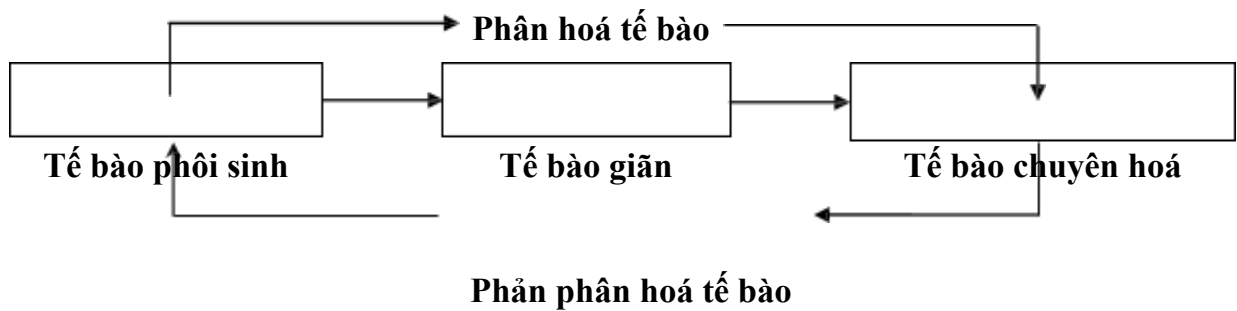
Theo PGS - TS Nguyễn Quang Thạch và Cs [10]: cơ thể thực vật trưởng thành là một chỉnh thể thống nhất bao gồm nhiều cơ quan chức năng khác nhau, trong đó có nhiều loại tế bào thực hiện các chức năng khác nhau. Tuy nhiên tất cả các loại tế bào đó đều bắt nguồn từ tế bào phôi sinh.

Sự phân hoá tế bào là sự chuyển các tế bào phôi sinh thành các tế bào của mô chuyên hoá, đảm nhận các chức năng khác nhau trong cơ thể. Ví dụ Mô dậu làm nhiệm vụ quang hợp, mô bì làm nhiệm vụ bảo vệ, nhu mô làm

nhiệm vụ dự trữ, mô dẫn làm nhiệm vụ vận chuyển nước và chất dinh dưỡng... Quá trình phân hoá tế bào có thể biểu diễn ở sơ đồ sau:

Tế bào phôi sinh → Tế bào giãn → Tế bào chuyên hoá

Mặc dù các tế bào đã chuyển hoá thành các mô chức năng nhưng chúng vẫn không mất đi khả năng phân chia của mình. Trong điều kiện thích hợp, các tế bào lại có thể trở về dạng tế bào phôi sinh và phân chia mạnh mẽ. Quá trình đó được gọi là phản phân hoá tế bào, (ngược lại với quá trình phân hoá tế bào). Có thể sơ đồ hoá như sau:



Về bản chất sự phân hoá và phản phân hoá là một quá trình hoạt hoá, phân hoá gen. Tại một thời điểm nào đó trong quá trình phát triển cá thể, có một số gen được hoạt hoá (mà trước đây bị ức chế) để cho biểu hiện trạng thái mới, một số gen khác lại bị đình chỉ hoạt động. Điều này xảy ra theo một chương trình đã được mã hoá trong cấu trúc phân tử AND của mỗi tế bào. Mặt khác, khi tế bào nằm trong khối mô của cơ thể thường bị ức chế bởi các tế bào xung quanh. Khi tách riêng tế bào tạo điều kiện thuận lợi cho các gen được hoạt hoá. Quá trình phân hoá được xảy ra theo một chương trình định sẵn.

*** Cơ chế di truyền thông qua các hệ tế bào**

Theo Nguyễn Hồng Minh [8]: cơ chế di truyền thông qua các thể hệ tế bào bao gồm các công đoạn:

Trong nội bộ từng cơ thể được diễn ra theo cơ chế nguyên phân, đây là cơ chế phân bào mà từ một tế bào ban đầu sẽ phân chia thành hai tế bào con có bộ NST giống nhau và giống tế bào mẹ ban đầu. Như vậy qua nguyên phân bộ NST của tế bào mẹ đã chuyển nguyên vẹn sang tế bào con. Sở dĩ có hiện tượng này là do trước mỗi lần giảm phân, mỗi phân tử ADN đã thực hiện quá trình tái sinh để từ mỗi phân tử ADN hình thành 2 phân tử ADN giống nhau và giống ADN ban đầu. Quá trình này được thực hiện ở kỳ trung gian và thông qua cơ chế phân ly đều của NST ở kỳ sau, là cơ sở cho sự truyền nguyên vẹn thông tin di truyền trong nội bộ cơ thể.

Giữa 2 thế hệ cơ thể được hình thành thông qua cơ chế giảm phân đã làm cho ở thế hệ đời sau có hiện tượng phân ly tính trạng, do bộ NST của thế hệ sau không giống nhau và không giống bố mẹ. Vì vậy việc duy trì các tính trạng mong muốn ở bố mẹ sang thế hệ sau bằng sinh sản hữu tính sẽ không thể đảm bảo hoàn toàn chắc chắn. Đây là một trở ngại lớn trong sinh sản hữu tính. Ngày nay bằng phương pháp sinh sản vô tính người ta đã khắc phục được nhược điểm này. Đặc biệt là nhân giống vô tính in vitro.

Dựa trên cơ chế nguyên phân, trong nhân giống in vitro khi lấy các bộ phận sinh dưỡng trong một cây đem nhân giống thì các bộ phận đó có thông tin di truyền giống nhau và tạo nên các cơ thể mới có thông tin di truyền giống nhau và giống cơ thể mẹ. Như vậy nếu cơ thể mẹ có các tính trạng di truyền tốt thì các tính trạng đó sẽ được thể hiện ở mọi cơ thể con cái.

*** Cơ sở hóa học của nuôi cấy mô, tế bào**

Môi trường nuôi cấy được coi là vấn đề quyết định sự thành bại của quá trình nuôi cấy. Theo Street, 1973 [21]: Môi trường nuôi cấy như là phần “đệm” để cung cấp các chất cần thiết cho sự tăng trưởng và phân hoá của mô trong suốt quá trình nuôi cấy invitro. Môi trường nuôi cấy của hầu hết các loài thực vật bao gồm các muối khoáng đa lượng, vi lượng, nguồn cacbon, các

axitamin, các chất điều hoà sinh trưởng và một số phụ gia khi cần, tùy vào từng loài, giống, nguồn gốc mẫu cây, cơ quan khác nhau trên cùng cơ thể mà dinh dưỡng cần cho sự sinh trưởng tối ưu của chúng khác nhau.

Theo Nguyễn Hồng Minh [8]: Đến nay có rất nhiều môi trường dinh dưỡng đã lần lượt được tìm ra trên cơ sở cải tiến môi trường của Kotte và Robbin (1992) như: Môi trường White(1934), môi trường Knudson (1946), Vacin và Went (1949), môi trường Heller (1953), môi trường Musanige-Skoog (1962), môi trường Knop (1974), môi trường WMR (1982), Aderson (1984),... Tuy nhiên mỗi môi trường chỉ thích hợp cho một hoặc một số loại cây nhất định như: Môi trường Knudson; Vacin và Went chỉ thích hợp cho các loài Lan, môi trường Murasinge - Skoog (1962) thích hợp cho các loài cây thân thảo và một số loài cây thân gỗ sinh trưởng nhanh như keo, bạch đàn..., môi trường WMP lại chỉ thích hợp cho các loại cây thân gỗ.

Yêu cầu đặt ra khi lựa chọn môi trường là phải thích hợp với sự sinh trưởng và phát triển tối ưu ở từng giai đoạn của mô nuôi cấy, thành phần và hàm lượng các chất phải thật chính xác và phù hợp với từng đối tượng cụ thể. Môi trường MS là môi trường chủ yếu được lựa chọn trong nhân giống in vitro.

2.4.4. Điều kiện và môi trường nuôi cấy mô tế bào thực vật

Môi trường nuôi cấy là điều kiện tối cần thiết, là yếu tố quyết định cho sự phân hoá tế bào và cơ quan nuôi cấy.

a) Điều kiện nuôi cấy mô tế bào thực vật

*** Điều kiện vô trùng**

Theo Nguyễn Quang Thạch[14]: Nuôi cấy Invitro là nuôi cấy trong điều kiện vô trùng. Nếu không đảm bảo tốt điều kiện vô trùng mẫu nuôi cấy hoặc môi trường sẽ bị nhiễm, mô nuôi cấy sẽ bị chết. Điều kiện vô trùng có ý nghĩa quyết định đến sự thành bại của của nuôi cấy mô invitro.

Phương pháp vô trùng vật liệu thông dụng nhất hiện nay là dùng các chất hóa học, tia cực tím có khả năng diệt nấm và vi khuẩn.

Vô trùng ban đầu là một thao tác khó và là khâu đầu tiên có ý nghĩa quyết định. Tuy vậy, nếu tìm được nồng độ và thời gian xử lý thích hợp sẽ cho tỷ lệ sống cao, thông thường hay sử dụng một số hóa chất như HgCl_2 0.1%, NaHCl 10%, nước Clolox, cồn 760, clorox,... để khử trùng.

Phương tiện khử trùng: Nồi hấp vô trùng, tủ sấy, buồng và bàn cấy vô trùng, phòng nuôi cấy.

*** Điều kiện ánh sáng và nhiệt độ**

Ánh sáng và nhiệt độ là hai yếu tố chính có ảnh hưởng cơ bản đến quá trình sinh trưởng của mô nuôi cấy.

Ánh sáng:

Sự phát sinh hình thái của mô nuôi cấy chịu ảnh hưởng từ các yếu tố như: thời gian chiếu sáng, cường độ ánh sáng và chất lượng ánh sáng. Thời gian chiếu sáng tác động đến quá trình phát triển của mô nuôi cấy. Thời gian chiếu sáng thích hợp với đa số các loài cây là 12 – 18 h/ngày.

Cường độ ánh sáng tác động đến sự phát sinh hình thái của mô nuôi cấy.

Theo Ammirato (1986): cường độ ánh sáng cao kích thích sự sinh trưởng của mô sẹo. ngược lại, cường độ ánh sáng thấp kích thích sự tạo chồi. Nhìn chung cường độ ánh sáng thích hợp cho mô nuôi cấy là 1000 - 7000 lux (Morein, 1974), ngoài ra chất lượng ánh sáng cũng ảnh hưởng tới sự phát sinh hình thái của mô thực vật invitro: ánh sáng đỏ làm tăng chiều cao của thân chồi hơn so với ánh sáng trắng. Nếu mô nuôi cấy trong ánh sáng xanh thì sẽ ức chế vươn cao nhưng lại có ảnh hưởng tốt tới sự sinh trưởng của mô sẹo. Hiện nay trong các phòng thí nghiệm nuôi cấy mô để cung cấp nguồn ánh sáng có cường độ 2000 - 2500 lux người ta sử dụng các đèn huỳnh quang đặt cách bình nuôi cấy từ 35- 40 cm.

Nhiệt độ:

Trong nuôi cấy mô tế bào thực vật, nhiệt độ là nhân tố quan trọng ảnh hưởng tới sự phân chia tế bào và các quá trình sinh hóa trong cây. Tùy thuộc vào xuất xứ của mẫu nuôi cấy mà điều chỉnh nhiệt độ cho phù hợp. Nhìn chung nhiệt độ thích hợp nhất cho sự sinh trưởng tốt ở nhiều loài cây là 25°C (white, 1973).

b) Môi trường nuôi cấy mô tế bào thực vật

Môi trường dinh dưỡng phải có đầy đủ các chất dinh dưỡng, các chất cần thiết cho sự phân chia, phân hoá tế bào cũng như sự sinh trưởng bình thường của cây.

Thành phần hóa học của môi trường đóng vai trò quyết định đến sự thành công hay thất bại của nuôi cấy tế bào và mô thực vật. Mỗi một loại vật liệu khác nhau có những đòi hỏi khác nhau về thành phần môi trường, khi bắt đầu nghiên cứu một số loài mới hoặc giống mới cần phải chọn lựa cho đối tượng nghiên cứu một loại môi trường cơ bản phù hợp.

Từ những năm 1933, Tukey đã nghiên cứu tạo ra môi trường nuôi cấy thực vật, cho đến nay đã có rất nhiều loại môi trường khác nhau được sử dụng cho mục đích này, trong đó có một số môi trường cơ bản được sử dụng rất phổ biến như MS, LS, WP. Ví dụ, môi trường MS (Murashige&Skoog, 1962) là môi trường được sử dụng rộng rãi nhất trong nuôi cấy mô của tế bào thực vật, môi trường MS thích hợp cho cả thực vật 1 lá mầm, 2 lá mầm. Hay môi trường Gamborg (1965) còn gọi là B5 dùng thử nghiệm trên đậu tương, được sử dụng trong tách và nuôi tế bào trần.

Tuy có rất nhiều loại môi trường nuôi cấy mô tế bào thực vật nhưng đều gồm một số thành phần cơ bản sau [2]:

- + Các muối khoáng đa lượng và vi lượng.
- + Nguồn cacbon.
- + Các vitamin và aminoaxit.

+ Chất bổ sung, chất làm thay đổi trạng thái môi trường.

+ Các chất điều hòa sinh trưởng.

*** *Các muối khoáng đa lượng và vi lượng***

Đối với cây trồng, các chất khoáng đa và vi lượng đóng vai trò rất quan trọng. Ví dụ magiê là một phần của phân tử diệp lục, canxi cấu tạo màng tế bào, nitơ là thành phần quan trọng của vitamin, amino axit và protein. Ngoài ra, các nguyên tố vi lượng như Fe, Zn, Mo, Mn là thành phần của một số enzym cần thiết cho hoạt động sống của tế bào.

Muối khoáng là thành phần không thể thiếu trong các môi trường nuôi cấy tế bào thực vật, làm vật liệu cho sự tổng hợp các chất hữu cơ, enzym.

Các ion của các muối hòa tan giúp ổn định áp suất thẩm thấu của môi trường trong tế bào, duy trì điện thế hóa của thực vật. Ví dụ: K, Ca rất quan trọng trong điều hòa tính thấm lọc của tế bào.

*** *Nguồn cacbon***

Khi nuôi cấy in vitro, các tế bào thực vật thường không có khả năng quang hợp, do đó đòi hỏi phải cung cấp nguồn cacbon cho các hoạt động dinh dưỡng của tế bào.

Nguồn cacbon được ưa chuộng nhất hiện nay trong nuôi cấy là đường saccarose, một số trường hợp sử dụng glucose và fructose thay thế cho saccarose nhưng chúng thường nghèo hydrat cacbon so với nhu cầu của thực vật.

Ngoài ra, khi khử trùng môi trường, cần chú ý không nên kéo dài thời gian để tránh xảy ra hiện tượng caramen hóa, làm cho môi trường chuyển sang màu vàng dẫn đến ức chế sự sinh trưởng và phát triển của tế bào.

*** *Các vitamin và axit amin***

Ảnh hưởng của các vitamin đến sự phát triển của tế bào nuôi cấy in vitro ở các loài khác nhau là khác nhau.

Hầu hết tế bào nuôi cấy đều có khả năng tổng hợp tất cả các loại vitamin cơ bản nhưng với số lượng dưới mức yêu cầu. Để mô có thể sinh trưởng, tốt nhất phải bổ sung thêm vào môi trường một hay nhiều loại vitamin và amino axit. Trong các loại vitamin, B1 được xem là vitamin quan trọng nhất cho sự phát triển của thực vật. Axit nicotinic (B3) và pyridoxine (B6) cũng có thể được bổ sung vào môi trường nuôi cấy nhằm tăng cường sức sống cho mô [4].

*** *Các chất bổ sung***

Nước dừa[13]: công bố đầu tiên về sử dụng nước dừa trong nuôi cấy mô thuộc về Van Overbeek và cộng sự (Van Overbeek cs, 1941). Sau đó tác dụng tích cực của nước dừa trong môi trường nuôi cấy mô, tế bào thực vật đã được nhiều tác giả ghi nhận. Nước dừa đã được xác định là rất giàu các hợp chất hữu cơ, chất khoáng và chất kích thích sinh trưởng (George, 1993; George, 1996). Nước dừa đã được sử dụng để kích thích phân hóa và nhân nhanh chồi ở nhiều loại cây. Nước dừa thường được lấy từ quả dừa để sử dụng tươi hoặc sau bảo quản. Thông thường nước dừa thường được sử lý để loại trừ các protein, sau đó được lọc qua màng lọc để khử trùng trước khi bảo quản lạnh. Tồn dư của protein trong nước dừa không gây ảnh hưởng đến sinh trưởng của mô hoặc tế bào nuôi cấy, nhưng sẽ dẫn đến kết tủa dung dịch khi bảo quản lạnh. Chất cặn có thể được lọc hoặc để lắng dưới bình rồi gạn bỏ phần cặn. Nước dừa thường sử dụng với nồng độ 5- 20% thể tích môi trường, kích thích phân hóa và nhân nhanh chồi.

Dịch chiết nấm men: Có tác dụng kích thích sự sinh trưởng và phát triển của mô và tế bào. Dịch chiết nấm men là chế phẩm thường dùng trong nuôi cấy vi sinh vật, mô tế bào động vật với nồng độ thích hợp.

Ngoài ra, có thể sử dụng dịch thủy phân casein hydrolyase (0,1- 1%) hoặc bột chuối với hàm lượng 40g bột khô trong 100 g/l (xanh) nhằm tăng cường sự phát triển của mô sẹo hay cơ quan nuôi cấy.

Agar: trong môi trường nuôi cấy đặc, người ta thường sử dụng agar để làm rắn hoá môi trường. Nồng độ agar sử dụng thường là 0,6- 1%, đây là loại tinh bột đặc chế từ rong biển để tránh hiện tượng mô chìm trong môi trường hoặc bị chết vì thiếu O₂ nếu nuôi trong môi trường lỏng và tĩnh.

pH môi trường: Với mỗi loại cây trồng yêu cầu một loại môi trường khác nhau nhưng pH của môi trường thường từ 5,6- 6,0 [14].

Nếu pH của môi trường thấp hơn 5 thì thạch sẽ khó đông và cao hơn 6 sẽ làm môi trường bị cứng [14].

*** Các chất điều tiết sinh trưởng**

Các chất kích thích sinh trưởng gồm 2 nhóm chính auxin và cytokinin, ngoài ra còn có gibberlin và etylen cũng là nhóm chất tham gia điều tiết sự sinh trưởng phát triển và phân hóa cơ quan.

- Auxin:

Chất auxin tự nhiên được tìm thấy nhiều ở thực vật là indol axetic axit(IAA). IAA có tác dụng kích thích sinh trưởng kéo dài tế bào và điều khiển sự hình thành rễ. Ngoài IAA, còn có các dẫn xuất của nó là naphtyl axetic axit(NAA) và 2,4 – diclophenoxy axit(2,4 D). Các chất này cũng đóng vai trò quan trọng trong sự phân chia của mô và trong quá trình hình thành rễ. NAA được Went và Thimann(1937) phát hiện. Chất này có tác dụng tăng hô hấp của tế bào và mô nuôi cấy, tăng hoạt tính enzym và ảnh hưởng mạnh đến trao đổi chất của nitơ, tăng khả năng tiếp nhận và sử dụng đường trong môi trường. NAA là auxin nhân tạo, có hoạt tính mạnh hơn auxin tự nhiên IAA. NAA có vai trò quan trọng đối với phân chia tế bào và tạo rễ. Kết quả nghiên cứu của Butenko (1964) cho thấy NAA tác động ở mức độ phân tử trong tế

bào theo ba cơ chế: Cơ chế thứ nhất: NAA gắn với phân tử enzym và kích thích enzym hoạt động. Sarkissian đã phát hiện tác dụng của auxin thích thích hoạt tính của ATPase; Cơ chế thứ hai: Auxin tác động vào gen và các enzym phân giải axit nucleic; Cơ chế thứ ba: Auxin tác động thông qua sự thay đổi tính thấm thấu của màng. Dùng phương pháp đánh dấu phân tử có thể thấy NAA dính kết vào màng tế bào làm cho màng hoạt động như một bơm proton và bơm ra ngoài ion H^+ Làm màng tế bào mềm và kéo dài ra, do đó tế bào lớn lên và dẫn tới sinh trưởng. Trong tế bào NAA có tác dụng lên sự tổng hợp axit nucleic.

Trong cây auxin được tổng hợp ở các mô non đặc biệt là lá đang phát triển và vùng đỉnh chồi. Từ những vùng này auxin được chuyển xuống các phần phía dưới của cây.

- *Cytokinin*:

Cytokinin là chất điều hoà sinh trưởng có tác dụng làm tăng sự phân chia tế bào. Các cytokinin thường gặp là kinetin, 6-benzyl aminopurin (BAP). Kinetin được Skoog phát hiện ngẫu nhiên trong chiết xuất axit nucleic. Kinetin thực chất là một dẫn xuất của bazơ nitơ adenine. BAP là cytokinin tổng hợp nhân tạo nhưng có hoạt tính mạnh hơn kinetin. Kinetin và BAP cùng có tác dụng kích thích phân chia tế bào kéo dài thời gian hoạt động của tế bào phân sinh và làm hạt chế sự hoá già của tế bào. Ngoài ra các chất này có tác dụng lên quá trình trao đổi chất, quá trình tổng hợp AND, tổng hợp protein và làm tăng cường hoạt tính của một số enzym. Cơ chế tác dụng của auxin ở mức độ phân tử trong tế bào thể hiện bằng tác dụng tương hỗ của cytokinin với các nucleoprotein làm yếu mối liên kết của histon với AND, tạo điều kiện cho sự tổng hợp AND.

Những nghiên cứu của Miller và Skoog (1963) đã cho thấy không phải các chất kích thích sinh trưởng ngoại sinh tác dụng độc lập với hoocmon sinh

trưởng nội sinh. Phân chia tế bào, phân hoá và biệt hoá được điều khiển bằng sự tác động tương hỗ giữa các hoocmon ngoại sinh và nội sinh. Tác động phối hợp của auxin và cytokinin có tác động quyết định đến sự phát triển và phát sinh hình thái của tế bào và mô. Những nghiên cứu của Skoog cho thấy tỷ lệ auxin/cytokinin cao thì thích hợp cho sự hình thành rễ, và thấp thì thích hợp cho quá trình phát sinh chồi. Nếu tỷ lệ này ở mức độ cân bằng thì thuận lợi cho phát triển mô sẹo (callus). Das(1958) và Nitsch(1968) khẳng định rằng chỉ khi tác dụng đồng thời của auxin và cytokinin thì mới kích thích mạnh mẽ sự tổng hợp AND, dẫn đến quá trình mitosis và cảm ứng cho sự phân chia tế bào. Theo Dmitrieva(1972) giai đoạn đầu của quá trình phân bào được cảm ứng bởi auxin còn giai đoạn tiếp theo thì cần tác động tổng hợp của cả hai chất kích thích. Skoog và Miller (1957) đã khẳng định vai trò của cytokinin trong quá trình phân chia tế bào cụ thể là cytokinin điều khiển quá trình chuyển pha trong mitosis và giữ cho quá trình này diễn ra một cách bình thường.

Cytokinin được tổng hợp bởi rễ và hạt đang phát triển.

- Gibberellin:

Gibberellin được phát hiện đầu tiên bởi nhà nghiên cứu người Nhật Kurosawa(1920) khi nghiên cứu bệnh ở mạ lúa do nấm *Gibberella fujikuroi* gây ra. Năm 1939 đã tách chiết được Gibberellin từ nấm *G. fujikuroi* và được gọi là Gibberellin A. Gibberellin có tác dụng kéo dài tế bào, nhất là thân và lá vì vậy khi xử lý với các cây đột biến lùn và các cây này có thể khôi phục lại bình thường. Về sau, các nghiên cứu khám phá ra là trong cơ thể thực vật cũng có các chất giống như Gibberellin cả về cấu tạo và tác dụng. Những chất này đặt tên theo thứ tự là A1, A2, A3, A4, v.v. Do Gibberellin tồn tại trong thực vật, nó tham gia vào các quá trình sinh trưởng và phát triển trong sự tương tác với các chất điều hoà sinh trưởng khác.

Trong cây Gibberellin được tổng hợp ở lá đang phát triển, quả và rễ sau đó được vận chuyển đi khắp nơi trong cây và có nhiều trong phloem và xylem.

- *Ethylen*:

Ethylen là chất điều hoà sinh trưởng dạng khí. Ethylen có rất nhiều tác dụng đối với hoạt động sinh lý và trao đổi chất ở thực vật. Đã từ lâu vai trò của ethylen đối với việc làm tăng hô hấp trong thời gian quả chín đã được ứng dụng nhiều. Trong những năm gần đây đã xem xét tác dụng của ethylen lên sự kéo dài thân và rễ, kích thích tế bào phát triển về bề ngang, kích thích nảy mầm, tạo lông rễ, tạo hoa ở dứa và lan, ức chế vận chuyển ngang và xuống của auxin.

2.4.5. Các công đoạn của nuôi cấy mô tế bào

Theo PGS.TS. Ngô Xuân Bình và Cs [2]: Trong nuôi cấy mô, tế bào gồm 5 giai đoạn sau:

- *Giai đoạn 1 : Giai đoạn chuẩn bị*

Đây là giai đoạn quan trọng quyết định toàn bộ quy trình nhân giống invitro. Mục đích của giai đoạn này là phải tạo được nguyên liệu thực vật vô trùng để đưa vào nuôi cấy.

Mẫu đưa từ bên ngoài vào phải đảm bảo các yêu cầu sau: tỷ lệ nhiễm thấp; tỷ lệ sống cao; tốc độ sinh trưởng nhanh.

Kết quả của giai đoạn này phụ thuộc vào cách lấy mẫu, nồng độ và thời gian xử lý diệt khuẩn. Vật liệu thường được chọn và đưa vào nuôi cấy là : Đỉnh sinh trưởng, chồi nách, hoa tự, hoa, đoạn thân, mảnh, lá, rễ.

- *Giai đoạn 2 : Tái sinh mẫu nuôi cấy*

Mục đích của giai đoạn này là tái sinh một cách định hướng sự phát triển của mô nuôi cấy. Quá trình này được điều khiển chủ yếu bằng các chất điều hòa sinh trưởng (tỷ lệ auxin/cytokinin) đưa vào môi trường nuôi cấy.

Tuy nhiên bên cạnh đó cũng phải quan tâm đến tuổi của mẫu đem vào nuôi cấy. Thường các mô non, chưa phân hoá có khả năng tái sinh cao hơn những mô đã chuyên hoá.

- Giai đoạn 3 : giai đoạn nhân nhanh chồi

Mục đích của giai đoạn này là tạo hệ số cao nhất. Chính vì thế giai đoạn này được coi là giai đoạn then chốt của quá trình nuôi cấy. Để tăng hệ số người ta thường đưa vào môi trường nuôi cấy các chất điều hòa sinh trưởng (auxin, cytokinin, ...), các chất bổ sung khác như nước dừa, dịch chiết nấm men,..., kết hợp với các yếu tố ánh sáng, nhiệt độ thích hợp. Tùy thuộc vào đối tượng nuôi cấy, người ta có thể nhân nhanh bằng cách kích thích sự hình thành các cụm chồi (nhân cụm chồi), hay kích thích sự phát triển của các chồi nách hoặc thông qua việc tạo thành cây từ phôi vô tính.

- Giai đoạn 4 : Tạo cây hoàn chỉnh

Khi đạt được kích thước nhất định các chồi được chuyển sang môi trường ra rễ. Thường sau 2-3 tuần, các chồi riêng lẻ này sẽ ra rễ và trở thành cây hoàn chỉnh. Ở giai đoạn này người ta bổ sung vào môi trường nuôi cấy các chất điều hòa sinh trưởng thuộc nhóm auxin, là nhóm hormon thực vật quan trọng có chức năng tạo rễ phụ từ mô nuôi cấy. Trong nhóm này các chất IAA, IBA, NAA, 2,4-D được nghiên cứu và sử dụng nhiều nhất để tạo rễ cho chồi.

- Giai đoạn 5 : giai đoạn đưa cây ra đất

Đây là giai đoạn cuối cùng của quá trình và nó quyết định khả năng ứng dụng của quá trình nhân giống invitro trong thực tiễn sản xuất. Đây là giai đoạn chuyển cây từ môi trường dị dưỡng sang môi trường tự dưỡng hoàn toàn. Do đó phải đảm bảo các điều kiện ngoại cảnh thích hợp để cây có thể đạt tỷ lệ sống cao trong vườn ươm cũng như trong ruộng sản xuất.

2.4.6. Nhân giống vô tính in vitro – ưu nhược điểm của phương pháp.

Theo PGS- TS Ngô Xuân Bình [2]: "Nhân giống vô tính invitro là phương pháp sản xuất hàng loạt cây con từ các bộ phận của cây (các cơ quan, mô, tế bào) bằng cách nuôi cấy chúng trong ống nghiệm ở điều kiện vô trùng tuyệt đối có môi trường nuôi cấy thích hợp và được kiểm soát".

Nguyên tắc cơ bản cho nhân giống vô tính là: Mọi cơ thể sinh vật phức tạp đều gồm nhiều đơn vị nhỏ là các tế bào hợp thành. Các tế bào đã phân hóa đều mang các thông tin có trong các tế bào đầu tiên và là những tế bào độc lập, từ đó để tái tạo lại toàn bộ cơ thể.

**** Ưu điểm của phương pháp nhân giống vô tính in vitro [10][14]***

+ Đưa ra sản phẩm nhanh.

Theo lý thuyết, một quần thể có độ đồng đều cao có thể tái sinh từ bất kể cây ưu việt chọn lọc nào. Do đó, người ta có thể chọn lọc một cây có tính trạng mong muốn để nhân lên thành một số lượng lớn phục vụ cho mục đích thương mại, cho dù cây đó là dị hợp tử về mặt di truyền.

Nhanh: trong một số trường hợp kỹ thuật này đảm bảo cho tốc độ nhân nhanh giống cây, trong 1 - 2 năm có thể tạo ra hàng triệu cây. Hệ số nhân giống in vitro thường đạt 36 -1012/năm ở các loại cây khác nhau. Như vậy, không có một kỹ thuật nhân giống vô tính nào khác lại có hệ số nhân giống cao hơn.

Sản phẩm cây giống đồng nhất: về cơ bản nuôi cấy mô là công nghệ nhân dòng, do đó có thể tạo ra một quần thể có độ đồng đều cao hơn.

Tiết kiệm được không gian: vì hệ thống sản xuất hoàn toàn trong phòng thí nghiệm nên không có sự ảnh hưởng của thời tiết, các vật liệu khởi đầu có kích thước bé, mật độ cây tạo nên trên một đơn vị diện tích lớn hơn nhiều so với sản xuất trên đồng ruộng và trong nhà kính theo phương pháp truyền

thống.

+ Tính khả thi rộng

Ví dụ: kỹ thuật giâm cành thì có thể ứng dụng thành công ở một số cây nhất định, vì kích thước 5 - 20 cm, khả năng tạo rễ phụ ở vùng mô thượng tầng gần vết cắt hoặc khả năng đánh thức chồi phụ vẫn bị các vùng tế bào lân cận và phần toàn bộ còn lại của đoạn giâm khống chế.

Nếu tiến hành nuôi cây mô với kích thước 5 - 10 mm thì tương tác giữa các tế bào và các loại mô đơn giản đi rất nhiều, hiệu quả tác động của các biện pháp nuôi cấy sẽ phải cao hơn.

+ Có tiềm năng công nghiệp hoá cao

Nuôi cấy trong điều kiện chủ động hoàn toàn về môi trường dinh dưỡng, chế độ chiếu sáng và nhiệt độ là tiền đề hoàn toàn thoát khỏi sự lệ thuộc mùa vụ vẫn xảy ra trong sản xuất nông nghiệp và có thể công nghiệp hoá hoàn toàn công việc sản xuất giống trong một dây chuyền sản xuất liên tục.

+ Nâng cao chất lượng sản phẩm: cải tiến kiểu gen của cây có thể được điều chỉnh bằng cách sử dụng các chất điều tiết sinh trưởng, các kỹ thuật như chuyển nạp gen trong điều kiện nuôi cấy in vitro. Bằng kỹ thuật này có thể chủ động làm thay đổi kiểu gen thực vật như mong muốn dễ dàng hơn so với sử lý bằng các chất biến dị vào cây trồng so với trên đồng ruộng hay trong nhà lưới, nhà kính.

+ Khả năng tiếp thị tốt: dạng sản phẩm linh hoạt, lợi thế vận chuyển, sản xuất quanh năm làm tăng khả năng tiếp thị và kinh doanh của sản phẩm.

*** *Nhược điểm của nuôi cấy mô***

Bên cạnh những ưu điểm đó thì cũng có những nhược điểm mà công nghệ nuôi cấy mô, tế bào gặp phải như: đòi hỏi trình độ kỹ thuật cao, kinh phí đầu tư bước đầu cao, thực hiện khó khăn đối với một số cây trồng, sản phẩm bị biến đổi kiểu hình [2], [14].

2.5. Ứng dụng nuôi cấy mô trong nhân giống cây hoa

*** *Ứng dụng nuôi cấy mô tế bào với cây hoa trên thế giới***

Các nước chiếm ưu thế trong thị trường hoa tươi của thế giới là những nước có công nghệ sản xuất hoa tiên tiến và hiệu quả. Họ đã nghiên cứu và ứng dụng thành công những kỹ thuật sinh học và nông nghiệp hiện đại trong từng khâu sản xuất như: chọn, tạo giống mới, nhân giống, nuôi trồng, bảo quản hoa,... Vậy, để có thể thương mại hoá ngành sản xuất hoa phải chương trình hoá được quá trình sản xuất cấp bao nhiêu sản phẩm, loại gì, vào thời gian nào, tiêu chuẩn như thế nào... điều này chỉ có thể thực hiện được trên nền kỹ thuật cao và trước hết phải có công nghệ nhân giống hiện đại. Đó chính là công nghệ nuôi cấy mô tế bào thực vật. Chỉ riêng Hà Lan hàng năm đã sản xuất 15 triệu cây hoa đồng tiền bằng phương pháp nuôi cấy mô để cung ứng cho sản xuất. Ở Thái Lan mỗi năm xuất khẩu 13.000 tấn hoa Lan cắt cành, tương ứng với 350 - 400 triệu cành hoa cắt, loại hoa này đều sử dụng giống cây từ nguồn nuôi cấy mô. Nuôi cấy mô được ứng dụng trên rất nhiều loài hoa có chất lượng:

Trên hoa loa kèn: ở Hà Lan nuôi cấy mô cung ứng được 8.020.133.000 cây(1986) lớn hơn năm 1982 là 7.217.528.000 cây [6].

Trên đối tượng hoa Lan: năm 1982 Hà Lan sản xuất được 3.119.000 cây cúc giống in vitro, đến năm 1986 con số này tăng tới 73.650.000 cây [6]. Công nghệ nhân giống tiên tiến này đã trở thành nền tảng cho ngành sản xuất hoa cây cảnh của Hà Lan cũng như các nước sản xuất hoa khác trên thế giới. Bằng công nghệ nhân giống in vitro người ta đã sản xuất được số lượng lớn các cây giống khoẻ, sạch bệnh và hoàn toàn đồng nhất về mặt di truyền. Hệ số nhân giống in vitro của cây cúc đạt rất cao (410-610/năm).

Ngoài ra cũng có rất nhiều giống hoa khác có giá trị được sản xuất bằng phương pháp nuôi cấy mô như: hoa lan, hoa lily, hoa đồng tiền, hoa lay ơn,....

Có thể nói công nghệ nhân giống bằng phương pháp nuôi cấy mô là công nghệ tiên tiến đang được rất nhiều nước có nền nông nghiệp phát triển áp dụng hiệu quả.

**** Ứng dụng nuôi cấy mô tế bào với cây hoa ở Việt Nam***

Công nghệ sinh học hiện đại được đưa vào nước ta khá muộn (khoảng đầu thập niên 90), tuy nhiên cũng được phát triển khá nhanh và áp dụng trên nhiều lĩnh vực như: Y học, nông nghiệp (nhân giống, lai tạo, cấy gen,...),... Đặc biệt trong lĩnh vực nông nghiệp đã đem lại nhiều thành quả lớn. Xin đơn cử một số thành tựu trong nhân giống in vitro cây hoa:

Năm 1995, viện kỹ thuật nông nghiệp Việt Nam đã thành công trong việc nhân giống hoa loa ken bằng phương pháp nuôi cấy mô [1].

Năm 2005, Phân viện sinh học nhiệt đới tại Đà Lạt đã thành công trong việc nhân giống hoa lily bằng phương pháp nuôi cấy mô [25].

Nhiều loài hoa khác như hoa Lan, hoa cúc, hoa đồng tiền... cũng được một số viện và trung tâm công nghệ sinh học của Việt Nam tiến hành nhân giống bằng phương pháp nuôi cấy mô thành công trong những năm qua. Tuy nhiên giá thành cây giống nuôi cấy mô còn khá cao.

Chương III

NỘI DUNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

3.1. Đối tượng và phạm vi nghiên cứu

** Đối tượng nghiên cứu.*

Nghiên cứu trên giống hoa đồng tiền Hà Lan là Đại Tuyết Cam. Đây là giống hoa đồng tiền đang được người trồng hoa Thái Nguyên ưa chuộng về giá trị thẩm mỹ và giá trị kinh tế. Hoa thuộc loại hoa đồng tiền kép, nhị màu xanh, hoa màu vàng cam.

Vật liệu nuôi cấy là đế hoa của nụ hoa non (mới nhú khỏi mặt đất từ 5-10cm) lấy từ cây hoa đồng tiền sạch bệnh, sinh trưởng phát triển bình thường.

** Phạm vi nghiên cứu*

- Địa điểm và điều kiện tiến hành nghiên cứu:

Phần nuôi cấy in vitro được thực hiện tại phòng thí nghiệm “Công nghệ tế bào thực vật”, Bộ Môn CNSH Nông Nghiệp, Khoa Nông Học, Trường Đại học Nông Lâm Thái Nguyên. Phòng thí nghiệm vô trùng với các điều kiện vật lý như sau: Ánh sáng: 2000- 2500 lux; Thời gian chiếu sáng: 8- 10 h/ngày; Nhiệt độ: $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$; Độ ẩm: 60- 70%.

Phần ra cây trong giá thể được thực hiện trong nhà lưới Trường Đại học Nông Lâm Thái Nguyên

** Thời gian nghiên cứu:* Từ Tháng 1/2008 đến tháng 3/2009

** Giới hạn các nội dung nghiên cứu:*

Các nghiên cứu kỹ thuật nhân giống hoa đồng tiền bằng phương pháp nuôi cấy mô được tiến hành trong phòng thí nghiệm ở các giai đoạn: khử trùng đế hoa, tạo callus, tái sinh chồi, nhân nhanh cụm chồi, ra rễ tạo cây hoàn chỉnh.

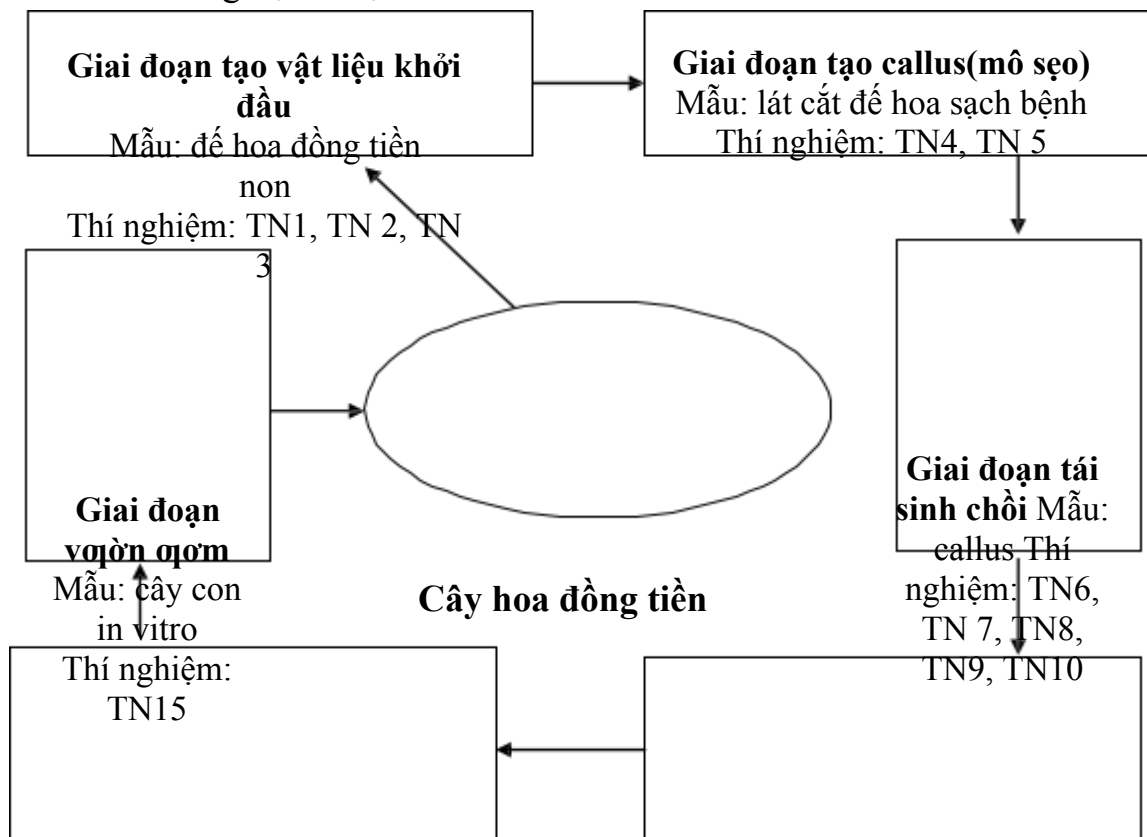
Giai đoạn ngoài vườn ươm được tiến hành nghiên cứu ảnh hưởng một số giá thể đến sự sinh trưởng của cây con trong giai đoạn ra cây.

3.2. Nội dung nghiên cứu

- Nghiên cứu ảnh hưởng của chất khử trùng đến tỷ lệ sống của mẫu cây
- Nghiên cứu ảnh hưởng của một số chất điều tiết sinh trưởng tới khả năng tạo callus (mô sẹo) của mẫu nuôi cấy.
- Nghiên cứu ảnh hưởng của một số chất điều tiết sinh trưởng đến khả năng tái sinh chồi từ callus.
- Nghiên cứu ảnh hưởng của một số chất điều tiết sinh trưởng đến khả năng nhân nhanh của chồi hoa đồng tiền.
- Nghiên cứu ảnh hưởng của nồng độ NAA đến khả năng ra rễ của chồi hoa đồng tiền.
- Nghiên cứu ảnh hưởng một số loại giá thể đến sinh trưởng phát triển của cây con sau nuôi cấy mô.

3.3. Phương pháp nghiên cứu

Các thí nghiệm được tiến hành theo sơ đồ sau:



**Dịch vụ viết báo cáo thực tập trọn gói website: luanvantot.com Zalo/tele
0934573149**

Giai đoạn tạo cây hoàn chỉnh

Mẫu: chồi in vitro

Thí nghiệm: TN14

Giai đoạn nhân nhanh

cụm chồi

Mẫu: chồi in vitro

Thí nghiệm: TN11, TN12, TN13

*** Giai đoạn tạo vật liệu khởi đầu**

- Vật liệu khử trùng: để hoa đồng tiền non mới nhú khỏi mặt đất từ 5cm đến 10 cm.
- Phương pháp xử lý mẫu: để hoa đồng tiền non được đem rửa sạch bằng bột giặt dưới vòi nước 3 lần. Rửa sạch bằng nước máy và tráng 3 lần bằng nước cất. Đem ngâm trong nước cất 30 phút, loại bỏ cuống nụ, tráng lại 3 lần bằng nước cất ở tủ vô trùng. Sau đó khử trùng bằng hóa chất khử trùng. Kết thúc khử trùng ta cắt để hoa đồng tiền non thành những lát mỏng có kích thước 2mm x 2mm (mẫu nuôi cấy) rồi cấy vào môi trường vào mẫu để đánh giá hiệu quả khử trùng và giúp mẫu ổn định trước khi đi vào nuôi cấy.
- Hóa chất khử trùng: Clolox, oxy già (H_2O_2), thủy ngân chlorua chlorua ($HgCl_2$).
- Môi trường nuôi cấy: MS (Murashige&Skoog, 1962), bổ sung 30 gram saccarose/lít, 6,5 gram agar/lít, pH = 5,8.
- Các công thức được bố trí theo kiểu ngẫu nhiên hoàn toàn với, 4 lần nhắc lại, mỗi lần nhắc lại 60 mẫu/CT.
- **Các thí nghiệm tiến hành:**
Thí nghiệm 1 : Nghiên cứu ảnh hưởng của chất khử trùng bằng H_2O_2 tới tỷ lệ sống của mẫu cấy. Các công thức như sau:

CT(a)	Thời gian và nồng độ xử lý nước oxy già	CT(b)	Thời gian và nồng độ xử lý nước oxy già
CT 1	Không xử lý	CT 6	10% + 10 phút
CT 2	3% + 10 phút	CT 7	10% + 20 phút
CT 3	3% + 20 phút	CT 8	10% + 30 phút
CT 4	3% + 30 phút	CT 9	10% + 40 phút
CT 5	3% + 40 phút		

(a), (b): Công thức thí nghiệm

Thí nghiệm 2 : Nghiên cứu ảnh hưởng chất khử trùng Clolox đến tỷ lệ sống của mẫu nuôi cấy. Các công thức thí nghiệm là:

CT(a)	Thời gian và nồng độ xử lý nước Clorox	CT(b)	Thời gian và nồng độ xử lý nước Clorox
CT 1	Không xử lý	CT 8	15% + 10 phút
CT 2	5% + 10 phút	CT 9	15% + 20 phút
CT 3	5% + 20 phút	CT1 0	15% + 30 phút
CT 4	5% + 30 phút	CT1 1	20% + 10 phút
CT 5	10% + 10 phút	CT1 2	20% + 20 phút
CT 6	10% + 20 phút	CT1 3	20% + 30 phút

CT 7	10% + 30 phút		
---------	---------------	--	--

(a), (b): Công thức thí nghiệm

Thí nghiệm 3: Nghiên cứu ảnh hưởng của chất khử trùng bằng thủy ngân chlorua (HgCl_2) tới tỷ lệ sống của mẫu nuôi cấy. Các công thức thí nghiệm như sau:

CT _{a)}	Thời gian và nồng độ xử lý nước HgCl_2	CT _{b)}	Thời gian và nồng độ xử lý nước HgCl_2
CT 1	Không xử lý	CT 8	0,15% HgCl_2 trong 7 phút
CT 2	0,1% HgCl_2 trong 3 phút	CT 9	0,15% HgCl_2 trong 10 phút
CT 3	0,1% HgCl_2 trong 5 phút	CT10	0,2% HgCl_2 trong 3 phút
CT 4	0,1% HgCl_2 trong 7 phút	CT11	0,2% HgCl_2 trong 5 phút

CT 5	0,1% HgCl ₂ trong 10 phút	CT1 2	0,2% HgCl ₂ trong 7 phút
CT 6	0,15% HgCl ₂ trong 3 phút	CT1 3	0,2% HgCl ₂ trong 10 phút
CT 7	0,15% HgCl ₂ trong 5 phút		

(a), (b): Công thức thí nghiệm

- Các chỉ tiêu theo dõi:(theo dõi sau 20 ngày)

+ Tỷ lệ mẫu nhiễm:

$$\text{Tỷ lệ mẫu nhiễm(\%)} = \frac{\Sigma \text{ số mẫu nhiễm}}{\Sigma \text{ số mẫu đưa vào}} \times 100$$

$$+ \text{Tỷ lệ mẫu sống (sạch-sống):} = \frac{\Sigma \text{ số mẫu sống}}{\Sigma \text{ số mẫu đưa vào}} \times 100$$

$$\text{Tỷ lệ mẫu chết(\%)} = \frac{\Sigma \text{ số mẫu chết}}{\Sigma \text{ số mẫu đưa vào}} \times 100$$

+ Tỷ lệ mẫu chết (sạch – chết):

Tỷ lệ mẫu chết (%)

=

*** Giai đoạn tạo callus**

- Các lát cắt để hoa đồng tiền non sạch bệnh (mẫu nuôi cấy) thu được ở giai đoạn khử trùng được cấy chuyển sang môi trường tạo callus. Môi trường nền (MT nền) tạo callus là MS bổ sung 30 gram saccarose/lít, 6,5 gram agar/lít, pH = 5,8. Chất điều tiết sinh trưởng là 2,4 - D (axid 2,4 dichlorophenoxy acetic), NAA (α - Naphlene axetic acid) được bổ sung vào MT nền với nồng độ khác nhau tùy thuộc vào từng công thức thí nghiệm.

- Các công thức được bố trí theo kiểu ngẫu nhiên hoàn toàn với 4 lần nhắc lại, mỗi lần nhắc lại 60 mẫu/CT.

- Các thí nghiệm tiến hành:

Thí nghiệm 4: Nghiên cứu ảnh hưởng của nồng độ NAA đến tỷ lệ tạo callus từ đế hoa đồng tiền non.

CT1	: MT nền + 0 mg NAA/l
CT2	: MT nền + 0,5 mg NAA/l
CT3	: MT nền + 1,0 mg NAA/l
CT4	: MT nền + 1,5 mg NAA/l
CT5	: MT nền + 2,0 mg NAA/l

CT6 : MT nền + 2,5 mg NAA/l

CT7 : MT nền + 3,0 mg NAA/l

Thí nghiệm 5: Nghiên cứu ảnh hưởng của nồng độ 2,4-D đến tỷ lệ tạo callus từ đế hoa đồng tiền non .

CT1 : MT nền + 0,0 mg 2,4.D/l

CT2 : MT nền + 0,5 mg 2,4.D/l

CT3 : MT nền + 1,0 mg 2,4.D/l

CT4 : MT nền + 1,5 mg 2,4.D/l

CT5 : MT nền + 2,0 mg 2,4.D/l

CT6 : MT nền + 2,5 mg 2,4.D/l

CT7 : MT nền + 3,0 mg 2,4.D/l

- Chỉ tiêu theo dõi:

+ Tỷ lệ hình thành mô sẹo:

$$\text{Tỷ lệ hình thành mô sẹo (\%)} = \frac{\Sigma \text{mẫu tạo mô sẹo (mẫu)}}{\Sigma \text{mẫu nuôi cấy(mẫu)}} \times 100$$

+ Màu sắc mô sẹo

*** Giai đoạn tái sinh chồi**

- Mẫu nuôi cấy sử dụng trong nội dung này là các callus (lát cắt) được tạo ra từ đế hoa đồng tiền non. Các callus được cấy chuyển vào môi trường tái sinh có môi trường nền (MT nền) là MS bổ sung 30 gram saccarose/lít, 6,5 gram agar/lít, pH = 5,8 và chất điều tiết sinh trưởng sử dụng là BAP (6 - benzylaminopurine), Kinetin (6 - furfurylaminopurine), TDZ (Thidiazuron), NAA. Các chất điều tiết sinh trưởng được bổ sung vào MT nền với nồng độ khác nhau tùy thuộc vào công thức thí nghiệm.

Dịch vụ viết báo cáo thực tập trọn gói website: luanvantot.com Zalo/tele 0934573149

- Các công thức được bố trí theo kiểu ngẫu nhiên hoàn toàn với 4 lần nhắc lại, mỗi lần nhắc lại 90 callus/CT.

- Các thí nghiệm tiến hành:

Thí nghiệm 6: Nghiên cứu ảnh hưởng của nồng độ BAP đến khả năng tái sinh chồi từ callus.

CT1 : MT nền + 0,0 mg BAP/l

CT2 : MT nền + 0,5 mg BAP/l

CT3 : MT nền + 1,0 mg BAP/l

CT4 : MT nền + 1,5 mg BAP/l

CT5 : MT nền + 2,0 mg BAP/l

Thí nghiệm 7: Nghiên cứu ảnh hưởng của nồng độ Kinetin đến khả năng tái sinh chồi từ callus.

CT1 : MT nền + 0,0 mg Kinetin/l

CT2 : MT nền + 0,5 mg Kinetin/l

CT3 : MT nền + 1,0 mg Kinetin/l

CT4 : MT nền + 1,5 mg Kinetin/l

CT5 : MT nền + 2,0 mg Kinetin/l

Thí nghiệm 8: Nghiên cứu ảnh hưởng phối hợp TDZ và Kinetin đến khả năng tái sinh chồi từ callus.

CT1 : MT nền + 0,0 mg DTZ/l + 0,0 mg Kinetin/l

CT2 : MT nền + 1,0 mg DTZ/l + 0,5 mg Kinetin/l

CT3 : MT nền + 1,0 mg DTZ/l + 1,0 mg Kinetin/l

CT4 : MT nền + 1,0 mg DTZ/l + 1,5 mg Kinetin/l

CT5 : MT nền + 1,0 mg DTZ/l + 2,0 mg Kinetin/l

CT6 : MT nền + 2,0 mg DTZ/l + 0,5 mg Kinetin/l

CT7 : MT nền + 2,0 mg DTZ/l + 1,0 mg Kinetin/l

CT8 : MT nền + 2,0 mg DTZ/l + 1,5 mg Kinetin/l

CT9 : MT nền + 2,0 mg DTZ/l + 2,0 mg Kinetin/l

Thí nghiệm 9: Nghiên cứu ảnh hưởng phối hợp BAP và Kinetin đến khả năng tái sinh chồi từ callus

- CT1 : MT nền + 1,0 mg BAP/l+ 0,1 mg Kinetin/l
CT2 : MT nền + 1,0 mg BAP/l+ 0,2 mg Kinetin/l
CT3 : MT nền + 1,0 mg BAP/l+ 0,3 mg Kinetin/l
CT4 : MT nền + 1,5 mg BAP/l+ 0,1 mg Kinetin/l
CT5 : MT nền + 1,5 mg BAP/l+ 0,2 mg Kinetin/l
CT6 : MT nền + 1,5 mg BAP/l+ 0,3 mg Kinetin/l
CT7 : MT nền + 2,0 mg BAP/l+ 0,1 mg Kinetin/l
CT8 : MT nền + 2,0 mg BAP/l+ 0,2 mg Kinetin/l
CT9 : MT nền + 2,0 mg BAP/l+ 0,3 mg Kinetin/l

Thí nghiệm 10: Nghiên cứu ảnh hưởng của tổ hợp BAP, Kinetin và NAA đến khả năng tái sinh chồi từ callus. Nồng độ BAP và nồng độ Kinetin sử dụng trong thí nghiệm là nồng độ trong tổ hợp giữa BAP và Kinetin cho kết quả tốt nhất trong thí nghiệm 9. Ký hiệu tổ hợp BAP và Kinetin tốt nhất là [BAP*,K*].

- CT 1 : MT nền + [BAP*,K*] + 0,1 mg NAA/l
CT 2 : MT nền + [BAP*,K*] + 0,2 mg NAA/l
CT 3 : MT nền + [BAP*,K*] + 0,3 mg NAA/l
CT 4 : MT nền + [BAP*,K*] + 0,4 mg NAA/l
CT 5 : MT nền + [BAP*,K*] + 0,5 mg NAA/l
CT 6 : MT nền + [BAP*,K*] + 1,0 mg NAA/l

- Các chỉ tiêu theo dõi:

+ Tỷ lệ bật chồi

Σ số mẫu bật chồi

Tỷ lệ bật
chồi(%)

Hệ số bật
chồi(chồi/callus)

Σ số mẫu đưa vào

=

=

Σ số lượng chồi bật

+ Hệ số bật
chồi:

Σ số callus bật chồi

**Dịch vụ viết báo cáo thực tập trọn gói website: luanvantot.com Zalo/tele
0934573149**

x 100%

x 100%

*** Giai đoạn nhân nhanh cụm chồi**

- Các chồi sinh trưởng bình thường có đầy đủ thân và lá (không bị dị dạng) được sử dụng làm vật liệu cấy chuyển sang môi trường nhân nhanh. Trong giai đoạn này tiến hành nghiên cứu ảnh hưởng của các chất điều tiết sinh trưởng là BAP, kinetin, nước dừa (ND) đến sự nhân nhanh của chồi hoa đồng tiền. Môi trường nền (MT nền) được sử dụng là MS bổ sung 30 gram saccarose/lít, 6,5 gram agar/lít, pH = 5,8.

- Các công thức được bố trí theo kiểu ngẫu nhiên hoàn toàn với 4 lần nhắc lại, mỗi lần nhắc lại 10 chồi/CT.

- Các thí nghiệm tiến hành:

Thí nghiệm 11 : Nghiên cứu ảnh hưởng của nồng độ Kinetin đến hiệu quả nhân chồi

CT1 : MT nền + 0,0 mg Kinetin/l

CT2 : MT nền + 0,5 mg Kinetin/l

CT3 : MT nền + 1,0 mg Kinetin/l

CT4 : MT nền + 1,5 mg Kinetin/l

CT5 : MT nền + 2,0 mg Kinetin/l

CT6 : MT nền + 2,5 mg Kinetin/l

CT7 : MT nền + 3,0 mg Kinetin/l

Thí nghiệm 12: Nghiên cứu ảnh hưởng của nồng độ BAP đến hiệu quả nhân chồi.

CT1 : MT nền + 0,0 mg BAP/l

CT2 : MT nền + 0,5 mg BAP/l

CT3 : MT nền + 1,0 mg BAP/l

CT4 : MT nền + 1,5 mg BAP/l

CT5 : MT nền + 2,0 mg BAP/l

CT6 : MT nền + 2,5 mg BAP/l

CT7 : MT nền + 3,0 mg BAP/l

Thí nghiệm 13: Nghiên cứu ảnh hưởng phối hợp của BAP và nước dừa (ND) tới sự nhân nhanh của chồi hoa đồng tiền. Nồng độ BAP được sử dụng trong thí nghiệm là nồng độ cho kết quả cao nhất trong thí nghiệm 12. Ký hiệu là BAP*.

CT1 : MT nền + BAP* + 0 % ND

CT2 : MT nền + BAP* + 5 % ND

CT3 : MT nền + BAP* + 10% ND

CT4 : MT nền + BAP* + 15% ND

CT5 : MT nền + BAP* + 20% ND

CT6 : MT nền + BAP* + 25% ND

CT7 : MT nền + BAP* + 30% ND

- Các chỉ tiêu theo dõi:

+ Hệ số nhân chồi (%)

$$\text{Hệ số nhân chồi (\%)} = \frac{\Sigma \text{ số chồi bật}}{\Sigma \text{ số chồi cấy}} \times 100\%$$

=

+ Chất lượng chồi bật:

Chồi tốt: chồi mập, lá xanh thẫm

Chồi khá: chồi bình thường, lá xanh

Chồi trung bình: Chồi hơi gầy, lá xanh.

Chồi kém: Chồi gầy, lá xanh nhạt, hoặc chồi bị dị dạng

+ Chiều cao chồi (cm) : sử dụng ở thí nghiệm 13

+ Số lá/chồi (lá/chồi): sử dụng ở thí nghiệm 13

*** Giai đoạn tạo cây hoàn chỉnh**

Dịch vụ viết báo cáo thực tập trọn gói website: luanvantot.com Zalo/tele 0934573149

Thí nghiệm 14: Nghiên cứu ảnh hưởng của nồng độ NAA đến hiệu quả ra rễ.

- Mẫu nuôi cấy: Chồi hoa đồng tiền khỏe mạnh có từ 3 - 5 lá thu được

từ quá trình nhân nhanh.

- Môi trường nền (MT nền) :MS(Murashige&Skoog, 1962) bổ sung 30 gram saccarose/lít, 6,5 gram agar/lít , pH = 5,8.

- Chất điều tiết sinh trưởng sử dụng: NAA

- Các công thức được bố trí theo kiểu ngẫu nhiên hoàn toàn với 4 lần nhắc lại, mỗi lần nhắc lại 60 chồi/CT.

- Các công thức thí nghiệm:

CT1 : MT nền + 0,00 mg NAA/l

CT2 : MT nền + 0,10 mg NAA/l

CT3 : MT nền + 0,15 mg NAA/l

CT4 : MT nền + 0,20 mg NAA/l

CT5 : MT nền + 0,25 mg NAA/l

CT6 : MT nền + 0,30 mg NAA/l

CT7 : MT nền + 0,50 mg NAA/l

- Các chỉ tiêu theo dõi:

+ Tỷ lệ chồi ra rễ $\frac{\text{Tổng số chồi bật rễ(chồi)}}{\text{Tổng số chồi cấy(chồi)}} \times 100\%$

Tỷ lệ chồi ra rễ (%) $= \frac{\text{Tổng số rễ ra}}{\text{Tổng số cây tạo thành}}$

+ Số rễ/cây

$\frac{\text{Số rễ/cây (rễ)}}{\text{Số rễ/cây}}$

=

+ Chiều dài rễ /cây: tính từ cổ rễ đến chóp rễ

+ Màu sắc rễ

*** Giai đoạn vờn vờn**

Thí nghiệm 15: Nghiên cứu ảnh hưởng của loại giá thể đến khả năng sinh trưởng phát triển của cây con sau nuôi cấy mô.

- Vật liệu: cây hoa đồng tiền con sau nuôi cấy mô.
- Phương pháp ra cây: trước khi đưa cây con ra trồng ngoài tự nhiên, người ta thường tiến hành huấn luyện để cây quen dần với điều kiện môi

trường bên ngoài. Thời gian này có thể kéo dài khoảng 7 ngày và tăng dần cường độ vào những ngày cuối để tăng nhanh khả năng thích nghi của cây. Cây con trong bình cấy được rửa sạch những phần thạch hoặc đường bám vào vì chúng thường là môi trường thích hợp cho nấm bệnh phát triển hoặc côn trùng tấn công. Tiếp đó ngâm cây vào nước để tránh hiện tượng mất nước, rồi đem trồng vào giá thể.

- Chế độ chăm sóc cây con trong giá thể: trong thời gian cây ở trong giá thể, ngày tiến hành tưới phun 2 lần bằng nước sạch (giữ ẩm độ giá thể khoảng 75 - 85%).

- Các công thức được bố trí theo kiểu ngẫu nhiên hoàn toàn với 3 lần nhắc lại, mỗi lần nhắc lại 60 mẫu/CT.

- Các công thức của thí nghiệm:

CT 1: Cát

CT 2: Trấu hun

CT 3: 1 đất + 1 cát

CT 4: 1 Cát + 1 đất + 1 Trấu hun

CT 5: 1 Cát + 1 đất + 1 Trấu hun + 1/4 phân vi sinh SG

(SG: Phân vi sinh Sông Gianh thương phẩm)

- **Các chỉ tiêu theo dõi:** Theo dõi 10 ngày/lần

+ Tỷ lệ cây sống

$$\text{Tỷ lệ cây sống (\%)} = \frac{\Sigma \text{cây sống(cây)}}{\Sigma \text{cây ra ngôi(cây)}} \times 100\%$$

+ Biến động chiều cao cây: Chiều cao về sau- chiều cao ban đầu

+ Biến động Số lá/cây: số lá về sau - số lá ban đầu

3.4. Xử lý số liệu:

Dịch vụ viết báo cáo thực tập trọn gói website: luanvantot.com Zalo/tele 0934573149

Các số liệu thu được xử lý thống kê bằng phần mềm excel và chương trình xử lý Irristat.

Chương IV

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

4.1. Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của chất khử trùng tới tỷ lệ sống của mẫu cấy (đế hoa đồng tiền non)

Mỗi loại hóa chất khử trùng có tác dụng tiêu diệt đối với những loại vi sinh vật (nấm, khuẩn) khác nhau. Tác dụng của mỗi loại hóa chất đối với vi sinh vật tùy thuộc vào nồng độ và thời gian khử trùng bằng hóa chất đó. Vì vậy, việc lựa chọn loại hóa chất, nồng độ và thời gian khử trùng bằng hóa chất đó cũng là rất quan trọng. Nó quyết định đến sự thành công hay thất bại trong công tác khử trùng. Việc tiến hành nghiên cứu hiệu quả khử trùng của một số hóa chất thường sử dụng để khử trùng (Oxi già (H_2O_2), clolox, Thủy ngân chlorua.) sẽ cho ta có một quyết định đúng đắn về loại hóa, nồng độ và thời gian khử trùng thích hợp nhất.

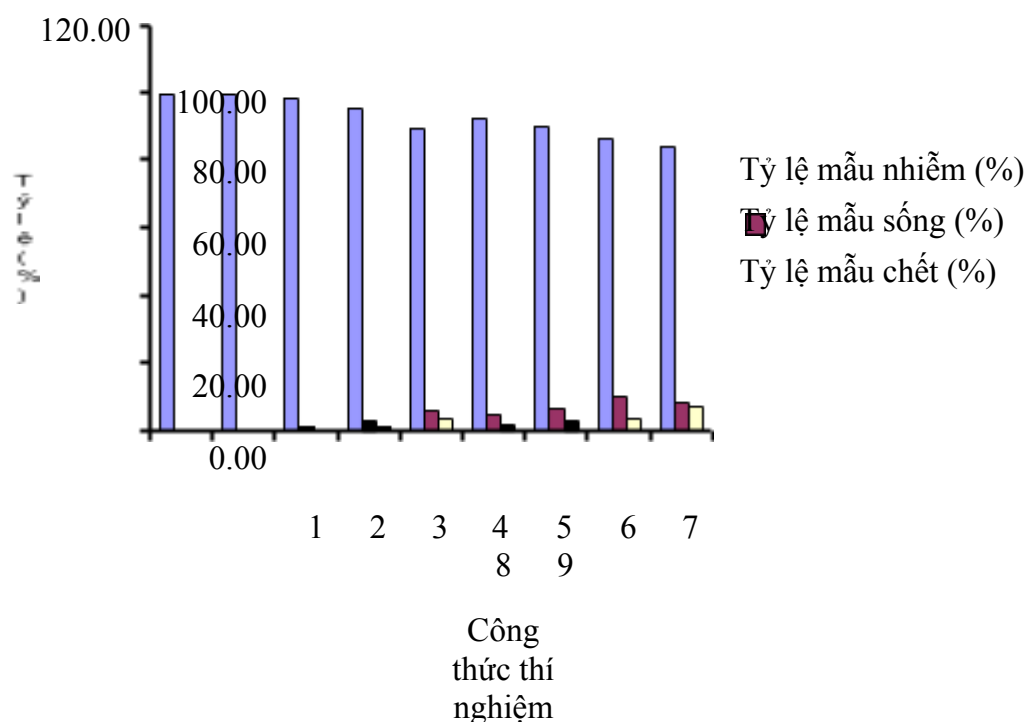
*** Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của chất khử trùng oxy già đến tỷ lệ sống của mẫu cấy.**

Bảng 4.1. Ảnh hưởng của chất khử trùng oxy già đến tỷ lệ sống của đế hoa đồng tiền non (sau 20 ngày nuôi cấy)

CT TN	Tỷ lệ mẫu nhiễm (%)	Tỷ lệ sống (%)	Tỷ lệ chết (%)
1	100,0 0	0,0 0 _g	0,0 0
2	100,0 0	0,0 0 _g	0,0 0
3	98,7 5	1,2 5 _f	0,0 0
4	95,4 2	3,3 3 _e	1,2 5
5	90,0 0	6,2 5 _c	3,7 5
6	92,9 2	5,0 0 _d	2,0 8

7	90,4 2	6,6 7 _c	2,9 2
8	86,2 5	10,00_a	3,7 5
9	84,1 7	8,3 3 _b	7,5 0
CV%		8,7 0	

(a, b, c, d, e, f, g: mức phân nhóm trong so sánh Duncan)



Đồ thị 4.1. Ảnh hưởng của của chất khử trùng oxy già đến tỷ lệ sống của để hoa đồng tiền non

Kết quả nghiên cứu được thể hiện ở bảng 4.1 và đồ thị 4.1:

Tỷ lệ sống của các công thức dao động từ 0 đến 10%. Kết quả thí nghiệm được phân làm 7 nhóm kết quả theo so sánh Duncan xếp theo thứ tự từ cao xuống thấp là a, b, c, d, e, f, g. Trong đó, công thức 8 có số mẫu sống đạt giá trị cao nhất là 10,00 % ở nhóm "a"; công thức 1 và công thức 2 thu được số mẫu có tỷ lệ sống là 0% giá trị thấp nhất ở nhóm "g"; tỷ lệ mẫu sống ở công thức 9 là 8,33% ở nhóm "b"; tỷ lệ mẫu sống ở công thức 5 và công thức 7 là 6,25% và 6,67% ở nhóm "c"; tỷ lệ mẫu sống ở công thức 6 là 5% ở mức "d"; tỷ lệ mẫu sống ở công thức 4 là 3,33% ở mức "e"; tỷ lệ mẫu sống ở công thức 3 là 1,25% ở mức "f". Đa phần ở các công thức, mẫu bị chết sau đó do bị nhiễm. Công thức không xử lý (CT 1) và công thức xử lý nước oxy già nồng độ thấp trong thời gian ngắn (CT2), 100% số mẫu bị nhiễm.

Dịch vụ viết báo cáo thực tập trọn gói website: luanvantot.com Zalo/tele 0934573149

Kết quả của thí nghiệm cho thấy: oxy già khử trùng mẫu hoa đồng tiền non tốt nhất ở nồng độ 10% trong thời gian 30 phút.

*** Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng chất khử trùng bằng Clorox đến tỷ lệ sống của mẫu cấy**

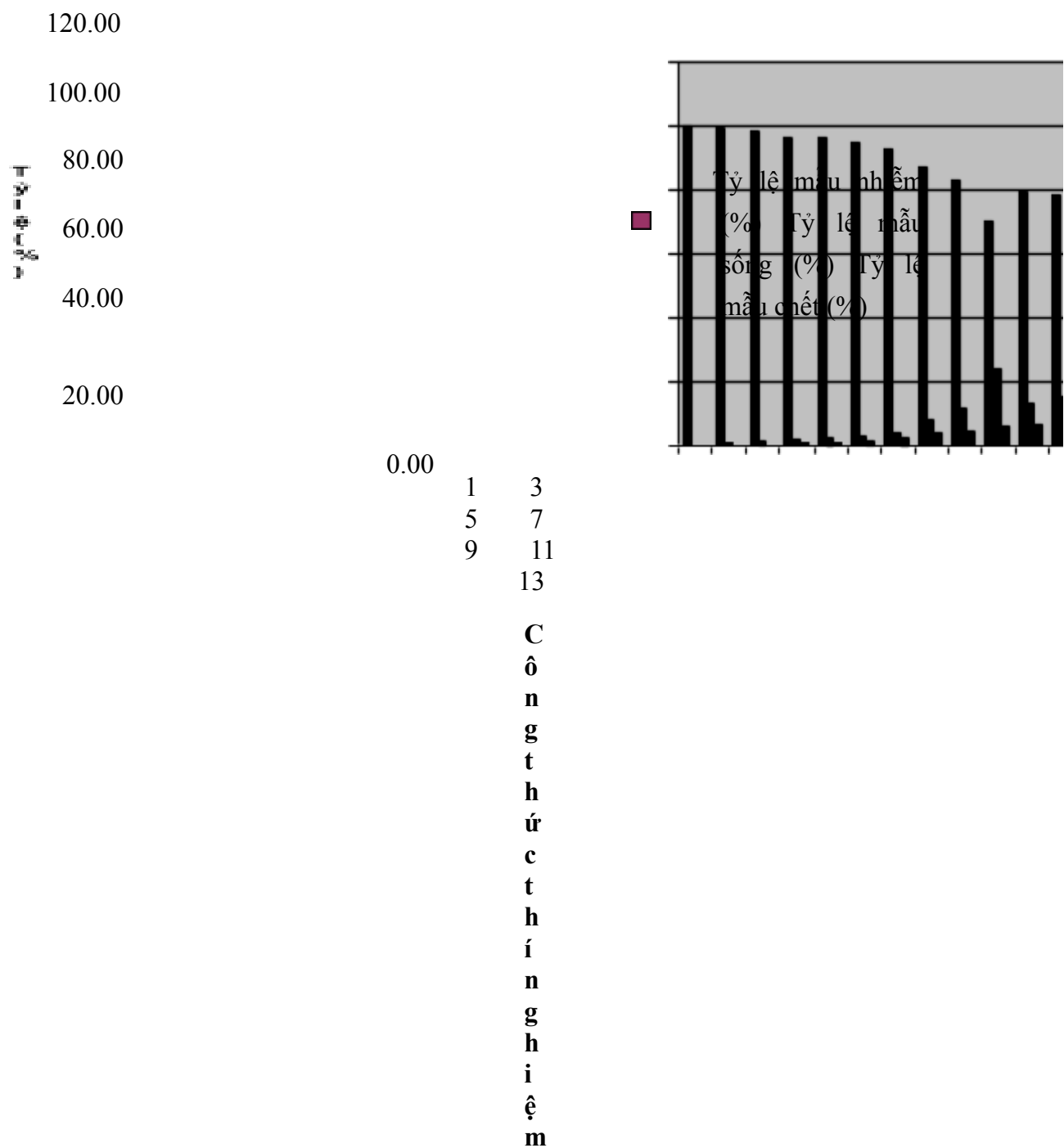
Clorox là chất khử trùng được sử dụng trong nhiều phòng thí nghiệm. Clorox được sử dụng trong nuôi cấy mô tế bào với mục đích chủ yếu là tiêu diệt nấm khuẩn. Đây là chất khử trùng đã được sử dụng và đạt hiệu quả trên nhiều loại vật liệu: như khử trùng phôi hạt lúa, khử trùng hoa lúa trong nuôi cấy bao phấn, khử trùng hoa ngô trong nuôi cấy noãn ngô,... Trong nuôi cấy hoa đồng tiền, Javen thương phẩm (clorox pha loãng) cũng được viện công nghệ sinh học trường đại học nông nghiệp Hà Nội sử dụng để khử trùng để hoa đồng tiền khá hiệu quả. Chúng tôi tiến hành khử trùng clorox đối với đế hoa đồng tiền non và thu được kết quả sau:

Bảng 4.2. Ảnh hưởng của chất khử trùng Clorox đến tỷ lệ sống của đế hoa đồng tiền non (sau 20 ngày nuôi cấy)

CT TN	Tỷ lệ mẫu nhiễm (%)	Tỷ lệ sống (%)	Tỷ lệ chết (%)
1	100,0 0	0,0 0 _j	0,0 0
2	99,1 7	0,8 3 _j	0,0 0
3	98,3 3	1,67 ij	0,0 0
4	96,6 7	2,0 8 _i	1,2 5
5	96,6 7	2,5 0 _i	0,8 3
6	95,0 0	3,3 3 _h	1,6 7
7	92,5 0	4,5 8 _g	2,9 2
8	87,0 8	8,3 3 _f	4,5 8
9	82,9	12,0	5,0

	2	8 _e	0
1 0	70,4 2	23,7 5_a	5,8 3
1 1	79,5 8	13,7 5 _d	6,6 7
1 2	78,3 3	15,4 2 _c	6,2 5
1 3	73,7 5	17,9 2 _b	8,3 3
CV(%)		8, 8	

(a, b, c, d, e, f, g,.... mức phân nhóm trong so sánh Duncan)



**Đồ thị 4.2. Ảnh hưởng của chất khử trùng Clorox đến tỷ lệ sống của
đế hoa đồng tiền non**

Kết quả thu được ở bảng 4.2 và đồ thị 4.2 cho thấy:

Theo so sánh duncan: công thức 10 công thức thu được tỷ lệ mẫu sống đạt giá trị cao nhất là 23,75 % ở mức "a"; công thức 1 và công thức 2 (không xử lý và xử lý nồng độ thấp trong thời gian ngắn) thu được số mẫu có tỷ lệ sống thấp nhất là 0% và 0,83% ở mức "j"; các công thức 13, 12, 11 và 9 có tỷ lệ mẫu sống đạt giá trị tương đối cao lần lượt là: 17,92%, 15,42%, 13,75%, và 12,08% ở các mức "b", "c", "d" và "e" trong so sánh Duncan; các công thức còn lại từ công thức 3 đến công thức 8 có tỷ lệ mẫu sống đạt giá trị tương đối thấp dưới 10% (bảng 4.2), đa phần mẫu không xử dụng được do bị nhiễm bệnh.

Kết quả nghiên cứu cho thấy: nước Clorox khử trùng mẫu hoa đồng tiền non trong nuôi cấy tốt nhất ở nồng độ 15% trong thời gian 30 phút.

*** Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của chất khử trùng thủy ngân chlorua (HgCl₂) đến tỷ lệ sống của mẫu cấy.**

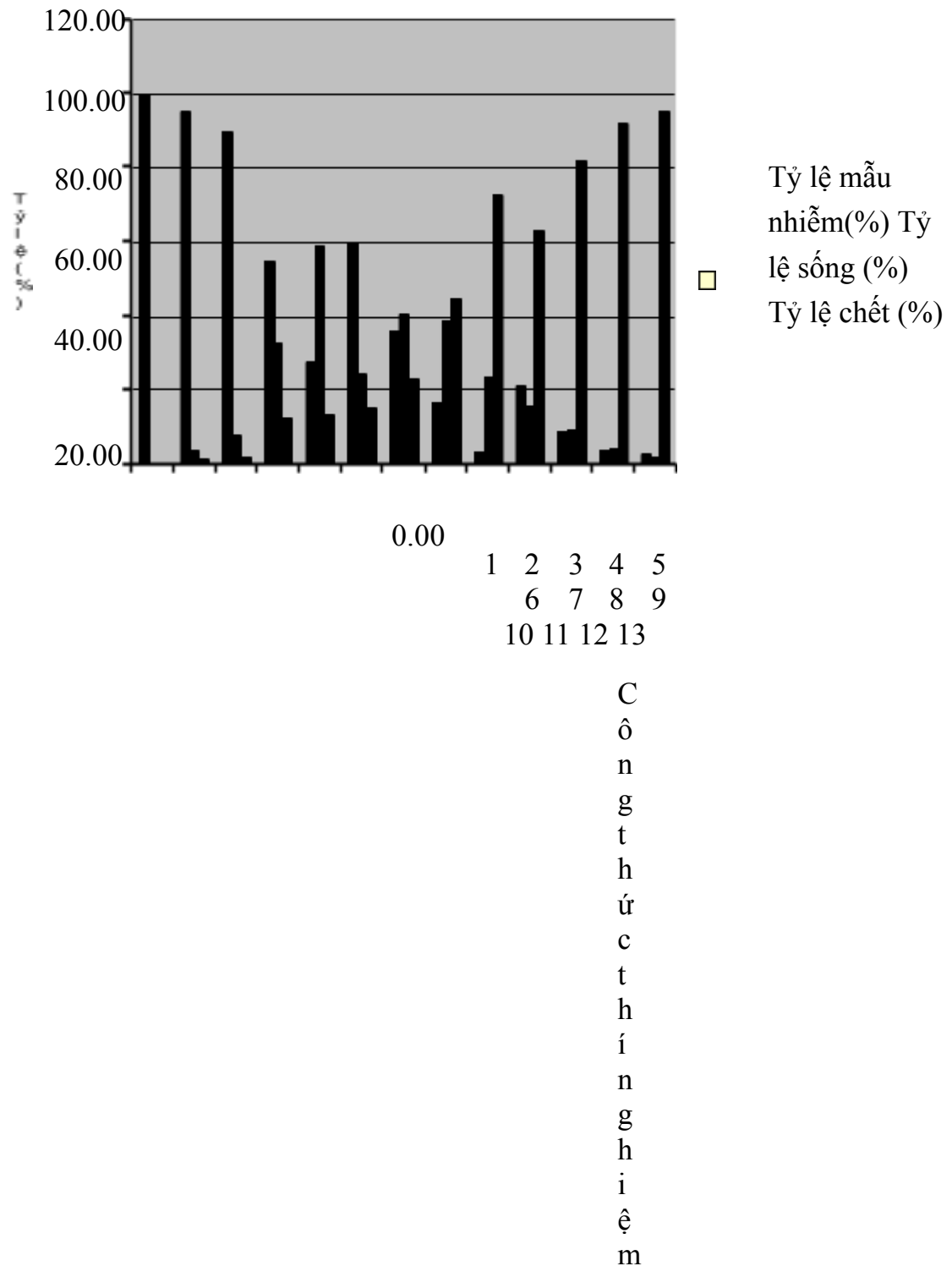
Thủy ngân là một loại hoá chất độc nên được dùng rất hạn chế và cẩn thận. Nhưng do việc khử trùng để hoa đồng tiền rất khó khăn, tỷ lệ mẫu sống thấp khi sử dụng oxy già hay clolox nên sử dụng thủy ngân chlorua ở nồng độ thấp để khử trùng là cần thiết. Nồng độ thủy ngân chlorua sử dụng khử trùng để hoa đồng tiền non trong thí nghiệm 0,1-0,2% . Kết quả thu được ở bảng sau:

Bảng 4.3. Ảnh hưởng của chất khử trùng thủy ngân (HgCl₂) đến tỷ lệ sống của để hoa đồng tiền non (sau 20 ngày nuôi cấy)

CT TN	Tỷ lệ mẫu nhiễm (%)	Tỷ lệ sống (%)	Tỷ lệ chết (%)
CT 1	100,0 0	0,0 0 _j	0,0 0
CT 2	95,0 0	3,7 5 _h	1,2 5
CT 3	90,0 0	7,9 2 _g	2,0 8
CT 4	54,5 8	32,9 2 _d	12,5 0
CT 5	27,5 0	58,7 5_a	13,7 5
CT 6	60,0 0	24,5 8 _e	15,4 2
CT 7	35,8 4	40,8 3 _b	23,3 3
CT 8	16,6 7	38,7 5 _c	44,5 8
CT 9	3,3 3	23,7 5 _e	72,9 2
CT 10	21,2 5	15,8 3 _f	62,9 2
CT 11	8,7	9,1	82,0

	5	7 _g	8
CT 12	3,7 5	4,1 7 _h	92,0 8
CT 13	2,9 2	1,6 7 _i	95,0 0
CV(%)		5, 6	

(a, b, c, d.....: mức phân nhóm trong so sánh Duncan)



Đồ thị 4.3. Ảnh hưởng của chất khử trùng thủy ngân (HgCl₂) đến tỷ lệ sống của đế hoa đồng tiền non

Từ kết quả thu được ở bảng 4.3 và đồ thị 4.3 cho thấy:

Thuỷ ngân tỏ ra có tác dụng diệt nấm, khuẩn khá tốt, tỷ lệ mẫu nhiễm giảm từ 100% (không xử lý CT1) xuống còn 2,92% (CT13). Tuy nhiên số lượng mẫu chết cũng tăng cao từ 0% (CT1) lên 95% (CT13).

Kết quả về tỷ lệ mẫu sống được phân thành các nhóm theo thứ tự giảm dần trong so sánh duncan là a, b, c, d, e, f, g, h, i, j. Trong đó: công thức 5 thu được số mẫu sống cao nhất là 58,75 % ở mức "a"; công thức 1 thu được số mẫu sống thấp nhất là 0% ở mức "j"; tỷ lệ mẫu sống ở công thức 7 là 40,83 % ở mức "b"; tỷ lệ mẫu sống ở công thức 8 là 38,75 % ở mức "c"; tỷ lệ mẫu sống ở công thức 4 là 32,92% ở mức "d" trong so sánh Duncan; tỷ lệ mẫu sống ở công thức 6 và công thức 9 là 24,58 % và 23,75 % ở mức "e"; tỷ lệ mẫu sống ở công thức 10 là 15,83% ở mức "f"; công thức 3 và công thức 11

có tỷ lệ mẫu sống là 7,92 % và 9,17 % ở mức "g"; công thức 2 và công thức 12 có tỷ lệ mẫu sống ở mức "h" là 3,75% và 4,17%.

Như vậy: khi xử lý mẫu với $HgCl_2$ mẫu ít bị nhiễm nhưng tỷ lệ chết tương đối cao. Tuy nhiên qua nghiên cứu cho thấy, thủy ngân chlorua khử trùng để hoa đồng tiền non tốt nhất ở nồng độ 0,1% $HgCl_2$ trong 10 phút.

*** So sánh kết quả nghiên cứu khử trùng ở 3 loại hóa chất (clorox, nước oxy già và $HgCl_2$)**

Bảng 4.4. So sánh kết quả nghiên cứu khử trùng của 3 loại hóa chất (clorox, nước oxy già và $HgCl_2$)

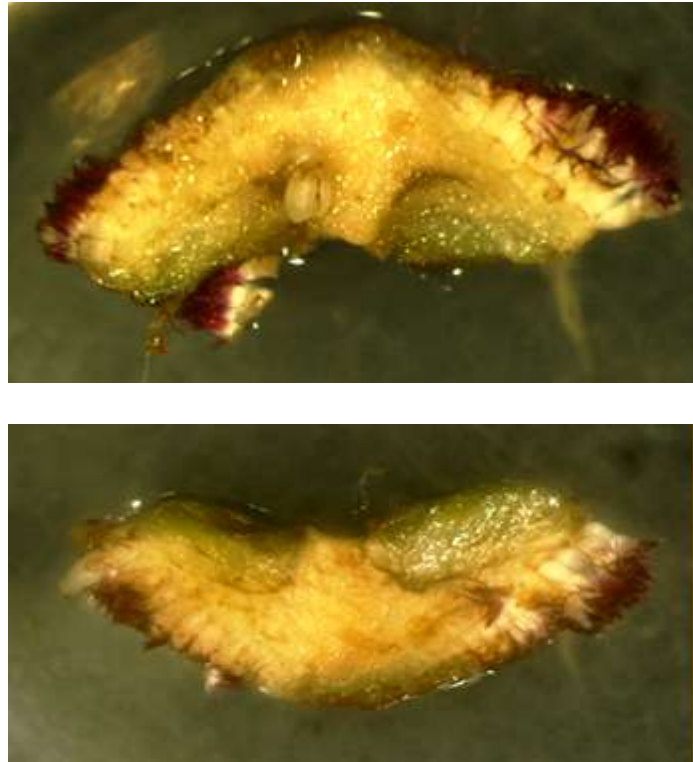
S tt	Hóa chất khử trùng	Tỷ lệ mẫu nhiễm (%)	Tỷ lệ sống (%)	Tỷ lệ chết (%)
1	Clorox 15% trong 30 phút	70,42 _d	23,75 _c	5,83 _e
2	Clorox 20% trong 30 phút	73,75 _c	17,92 _d	8,33 _c
3	Oxy già 10% trong 30 phút	86,25_a	10,00 _e	3,75 _f
4	Oxy già 10% trong 40 phút	84,17 _b	8,33 _f	7,50 _c
5	$HgCl_2$ 0,1% trong 10 phút	27,50 _f	58,75_a	13,75 _b
6	$HgCl_2$ 0,15% trong 5 phút	35,84 _e	40,83 _b	23,33_a
CV(%)		1, 9	2, 7	7, 1

(a, b, c, d.....: mức phân nhóm trong so sánh Duncan)

Sau khi tiến hành nghiên cứu ba thí nghiệm với ba loại hóa chất khử trùng (clorox, nước oxy già và $HgCl_2$). Mỗi thí nghiệm chọn lọc hai công thức cho kết quả tốt nhất để so sánh trên cơ sở so sánh theo phân nhóm Duncan. Kết quả so sánh được thể hiện ở bảng 4.4. Trong 3 loại hóa chất, xử lý $HgCl_2$ cho kết quả tốt nhất: xử lý $HgCl_2$ 0,1% trong 10 phút đạt tỷ lệ sống 58,75%, ở mức a (so sánh Duncan), xử lý $HgCl_2$ 0,15% trong 5 phút đạt tỷ lệ sống 40,83%, ở mức b (so sánh Duncan). Hóa chất có hiệu quả sau $HgCl_2$ là

clorox: xử lý Clorox 15% và 20% trong 30 phút đạt tỷ lệ sống lần lượt là 23,75%, 17,92%. Hóa chất xử lý có hiệu quả thấp nhất là nước oxy già 10,00% và 8,33% (bảng 4.4).

Kết quả thí nghiệm cho thấy trong ba loại hóa chất, hiệu quả khử trùng giảm dần theo thứ tự $HgCl_2$, Clorox và nước oxy già. $HgCl_2$ là loại hóa chất tương đối độc hại, ở những phòng thí nghiệm điều kiện xử lý chất thải chưa đảm bảo, có thể sử dụng nước clorox để khử trùng mẫu nuôi cấy trong nhân giống hoa đồng tiền.



Hình 4.1: Mẫu đế hoa đồng tiền non sạch bệnh

4.2. Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của chất điều tiết sinh trưởng đến tỷ lệ tạo callus từ mẫu cấy

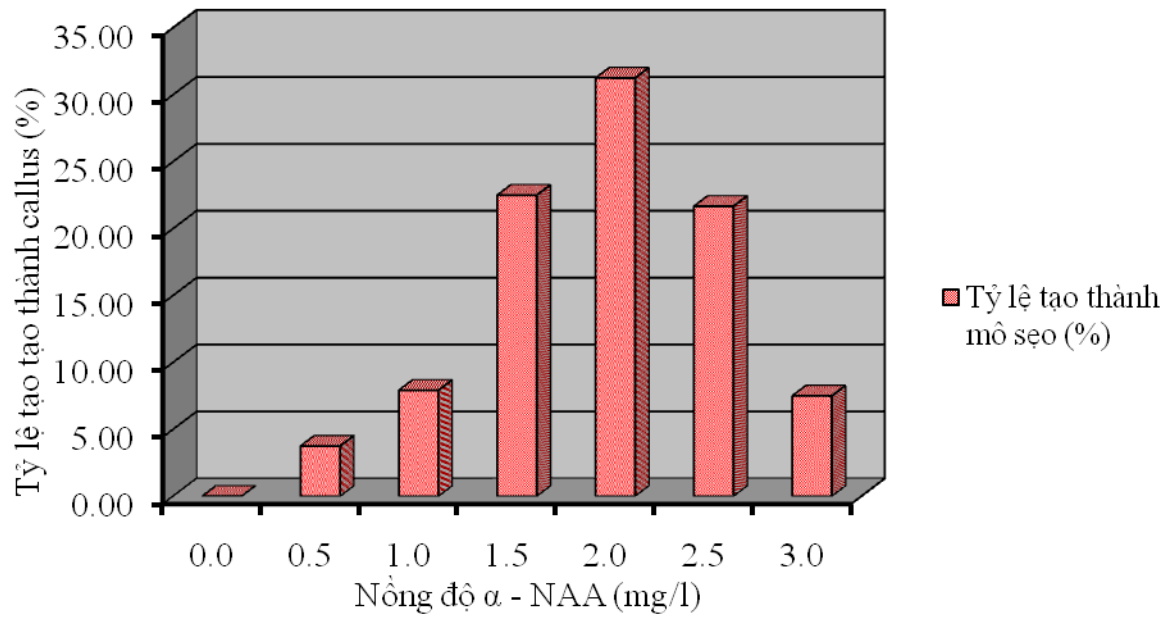
Ngoài việc cung cấp dinh dưỡng cho mô nuôi cấy sinh trưởng và phát triển, với mục đích tạo mô sẹo cho mẫu nuôi cấy (đế hoa đồng tiền non) chúng tôi sử dụng NAA và 2,4 - D với các nồng độ khác nhau để khảo sát sự hình thành callus từ mẫu cấy. Các mẫu sạch bệnh được cấy chuyển sang môi trường MS + 30 gram saccarose/lít + 6,5 gram agar/lít được bổ sung một lượng NAA hoặc 2,4 - D của từng công thức thí nghiệm. Kết quả thu được như sau:

*** Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của nồng độ NAA đến tỷ lệ tạo callus của đế hoa đồng tiền non**

Bảng 4.5. Ảnh hưởng của nồng độ NAA đến tỷ lệ tạo callus của đế hoa đồng tiền non (sau 3 tuần)

C T T N	Nồng độ NAA (mg/l)	Tổng số mẫu cấy (mẫu)	Số mẫu tạo mô sẹo (mẫu)	Tỷ lệ tạo thành mô sẹo (%)	Màu sắc mô sẹo
1	0, 0	240	0	0,0 0 _g	
2	0, 5	240	9	3,7 5 _f	Vàng gạch cua
3	1, 0	240	1 9	7,9 2 _d	Vàng gạch cua
4	1, 5	240	5 4	22,50 _b	Vàng gạch cua
5	2, 0	240	7 5	31,25_a	Vàng gạch cua
6	2, 5	240	5 2	21,67 _c	Vàng nâu, đen
7	3, 0	240	1 8	7,5 0 _e	Vàng nâu, đen
CV(%)				5,9 0	

(a, b, c, d, e, f, g – nhóm phân mức trong so sánh duncan)



**Đồ thị 4.4. Ảnh hưởng của nồng độ NAA đến tỷ lệ hình thành callus của
đế hoa đồng tiền non**

Kết quả nghiên cứu thể hiện ở bảng 4.5 và đồ thị 4.4. Tỷ lệ tạo thành callus của các công thức dao động từ 0 đến 31,25%. Kết quả thí nghiệm được phân làm 7 nhóm trong so sánh duncan xếp theo thứ tự từ cao xuống thấp là a, b, c, d, e, f, g. Trong đó: công thức 5 có tỷ lệ tạo thành callus có giá trị đạt cao nhất là 31,25% ở nhóm “a”; công thức 1 (không bổ sung NAA) có tỷ lệ tạo thành callus thấp nhất là 0% ở mức “g”; công thức 2 có tỷ lệ tạo thành callus là 3,75% ở mức “f”; công thức 3 có tỷ lệ tạo thành callus là 7,75% ở mức “d”; công thức 4 có tỷ lệ tạo thành callus là 22,50% ở “b”; công thức 6 có tỷ lệ tạo thành callus là 21,67% ở nhóm “c”; công thức 7 có tỷ lệ tạo thành callus là 7,5% ở nhóm “e”.

Với chỉ tiêu cảm quan là màu sắc mô sẹo: ở công thức 2, 3, 4 và 5 có màu gạch cua. Công thức 6 và công thức 7 có màu nâu, đen. Theo thực tế thí nghiệm thì các callus có màu trên khả năng tái sinh chồi từ mô sẹo rất thấp.

Kết quả thí nghiệm cho thấy: nồng độ NAA bổ sung vào môi trường nền cho tỷ lệ tạo callus cao nhất là 2 mg/l.

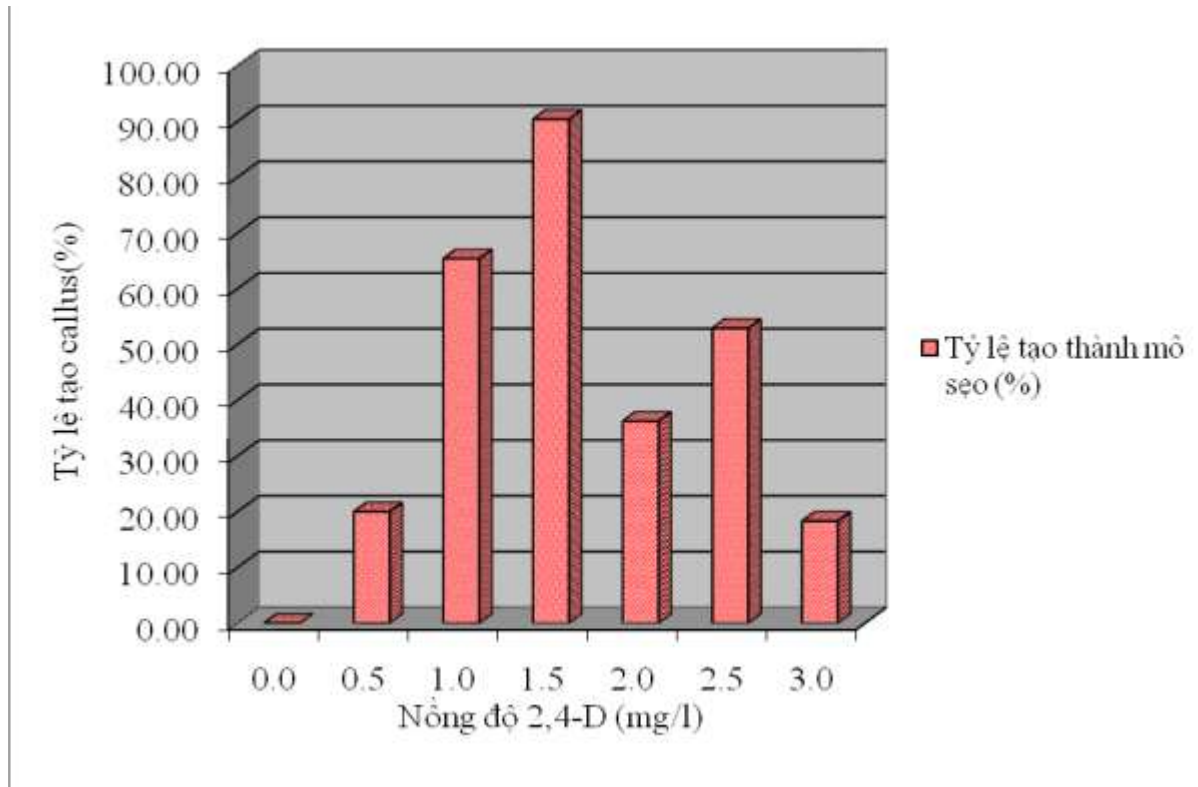
*** Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của nồng độ 2,4 - D tới sự hình thành callus của đế hoa đồng tiền non**

2,4 - D là Auxin có hiệu quả đối với môi trường tạo và phát triển callus [13]. Trong công tác nuôi cấy mô tế bào, 2,4 - D được sử dụng để tạo callus trên nhiều đối tượng như: tạo callus từ hạt phấn lúa (trong quy trình nuôi cấy bao phấn), Kumar Surinder [21] đã sử dụng 1,5 mg/l 2,4 - D để tạo callus trên hoa đồng tiền... Để tạo được callus tốt phục vụ cho giai đoạn tái sinh chồi, chúng tôi tiến hành thử nghiệm khả năng tạo callus của đế hoa đồng tiền non ở các nồng độ 2,4-D ở các nồng độ từ 0 – 3,0 mg/l. Kết quả như sau:

Bảng 4.6. Nghiên cứu ảnh hưởng của nồng độ 2,4 – D đến khả năng tạo mô sẹo của đế hoa đồng tiền non (sau 3 tuần)

C T T N	Nồng độ 2,4 D (mg/ l)	Tổng số mẫu cấy (mẫu)	Số mẫu tạo mô sẹo (mẫu)	Tỷ lệ tạo thành mô sẹo (%)	Màu sắc mô sẹo
1	0, 0	24 0	0	0,0 0 _f	
2	0, 5	24 0	4 8	20,00 _c	Vàng - sáng
3	1, 0	24 0	15 7	65,42 _b	Vàng - sáng
4	1, 5	24 0	21 7	90,42_a	Vàng nhạt, sáng
5	2, 0	24 0	8 7	36,25 _d	Vàng sẫm
6	2, 5	24 0	12 7	52,92 _c	Vàng gạch cua
7	3, 0	24 0	4 4	18,33 _e	nâu-đen
CV(%)				3,7 0	

(a, b, c, d, e, f, g – nhóm phân mức trong so sánh duncan)



Đồ thị 4.5. Nghiên cứu ảnh hưởng của nồng độ 2,4 - D đến khả năng tạo mô sẹo của đế hoa đồng tiền non

Kết quả của thí nghiệm thể hiện trong bảng 4.6 và đồ thị 4.5. 2,4 - D cho tỷ lệ tạo callus khá cao. Tỷ lệ tạo callus trong các công thức dao động từ 0 đến 90,42%. Kết quả thí nghiệm được phân làm 6 nhóm phân mức trong so sánh duncan theo thứ tự từ cao xuống thấp là a, b, c, d, e, f. Trong đó: công thức 4 cho tỷ lệ tạo callus cao nhất đạt 90,42% ở mức “a”; công thức 1 (không bổ sung 2,4-D) cho tỷ lệ tạo callus thấp nhất là 0%; công thức 3, 6 và 5 có tỷ lệ mẫu tạo callus tương đối cao lần lượt là: 65,42%, 52,92% và 36,25% ở các mức “b”, “c” và “d”; các công thức 2 và công thức 7 có tỷ lệ tạo callus ở mức tương đối thấp là 20% và 18,33%.

Theo kết quả thu được thì có thể nói công thức 4 có nồng độ 2,4 - D là 1,5 mg/l là nồng độ phù hợp nhất để tạo callus từ đế hoa đồng tiền non. Khi ta tiếp tục tăng nồng độ 2,4 - D vượt quá ngưỡng này thì tỷ lệ tạo callus thường giảm. Tuy nhiên công thức 5 lại có hiện tượng tăng tỷ lệ tạo callus nằm ngoài quy luật này. Điều này có thể giải thích theo giả thuyết: có thể xảy ra hiện tượng tác động đặc biệt đến các tế bào callus và rất có khả năng có hiện tượng đột biến của tế bào callus. Cần có những nghiên cứu sâu hơn về sự biến đổi đột ngột này.

Theo kết quả cảm quan thu được ta có: các callus tạo ra ở công thức 2, công thức 3 và công thức 4 có màu vàng - sáng đến vàng nhạt – sáng. Nhưng khi nồng độ 2,4 - D bổ sung vượt quá ngưỡng tối ưu cho tỷ lệ tạo callus (công thức 4) thì callus chuyển sang màu vàng sẫm (CT5), vàng gạch cua (CT6) và nâu-đen (CT7). Theo thực nghiệm quan sát thì những callus có màu vàng đến vàng nhạt có khả năng tái sinh chồi cao hơn những callus có màu gạch cua và màu nâu - đen.

Như vậy: bổ sung vào môi trường nền 1,5 mg 2,4 - D/lít là thích hợp nhất cho tỷ lệ tạo callus và màu sắc callus từ đế hoa đồng tiền non tốt nhất.

Kết luận chung cho giai đoạn tạo callus: Nồng độ 2,4-D thích hợp nhất để bổ sung vào môi trường MS có bổ sung 30 gram saccarose/lít + 6,5 gram agar/lít + 1,5 mg/l 2,4D, pH=5,8 với mục đích tạo mô sẹo từ đế hoa đồng tiền non là 1,5 mg/l.

Hình 4.2. Một số hình ảnh callus

4.3. Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của chất điều tiết sinh trưởng đến tái sinh chồi hoa đồng tiền từ callus

Tái sinh chồi từ callus là công đoạn rất quan trọng trong quy trình nhân giống cây trồng bằng phương pháp nuôi cấy mô, tế bào. Trong giai đoạn này ngoài cung cấp dinh dưỡng để các tế bào mô sẹo sinh trưởng thì việc bổ sung các chất điều tiết sinh trưởng như Auxin, Cytokinin... có tác dụng kích thích mô sẹo sinh trưởng phát triển và kích thích sự phát sinh hình thái từ thông qua quá trình phân hóa tế bào mô sẹo.

Sự phát sinh hình thái (hình thành chồi hay rễ) từ mô sẹo (callus) phụ thuộc các yếu tố sau:

- Điều kiện nuôi cấy: nhiệt độ, ẩm độ, ánh sáng...
- Mô sẹo: trạng thái sinh trưởng, thành phần và hàm lượng các chất

ĐTST nội sinh.

- Môi trường dinh dưỡng nuôi cấy mô sẹo, thành phần và hàm lượng các chất điều tiết sinh trưởng ngoại sinh bổ sung vào môi trường nuôi cấy.

Trong sự phát sinh hình thái của mô sẹo theo hướng tạo rễ hay tạo chồi phụ thuộc chủ yếu vào sự cân bằng chất điều tiết sinh trưởng (Auxin/Cytokinin). Nếu sự cân bằng này nghiêng về phía Auxin thì sẽ phát sinh rễ, sự cân bằng nghiêng về phía Cytokinin sẽ phát sinh chồi. Tuy nhiên trạng thái cân bằng này là trạng thái tổng hòa của chất điều tiết sinh trưởng nội sinh và ngoại sinh tác động mô sẹo trong điều kiện nhất định.

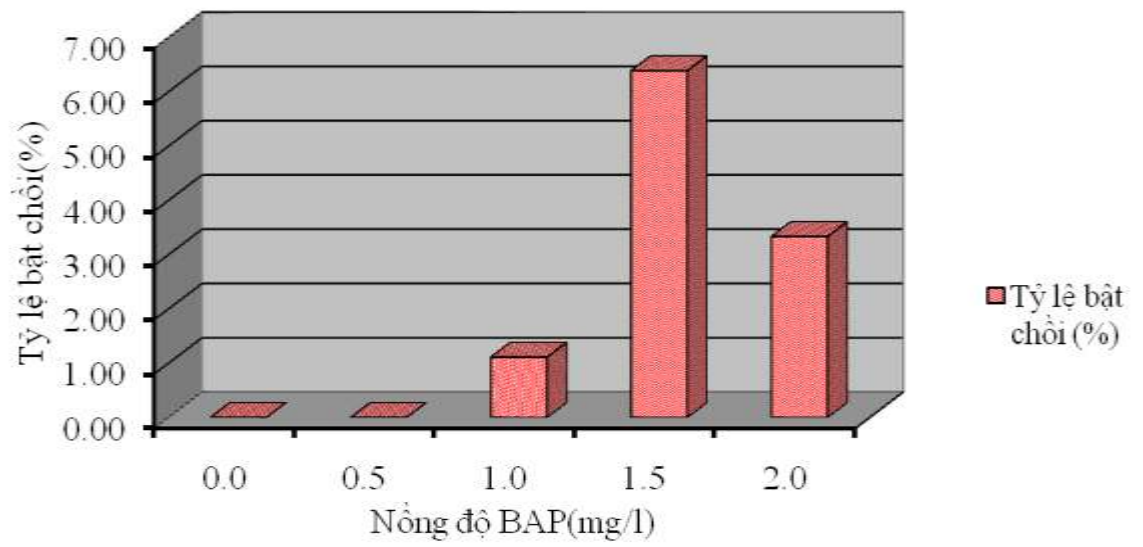
Tái sinh chồi là công đoạn rất quan trọng trong nhân giống cây trồng nói chung và nhân giống hoa đồng tiền nói riêng. Kết thúc giai đoạn tạo mô sẹo, callus tốt (có màu vàng, sáng) được cấy chuyển callus sang môi trường tái sinh chồi. Kết quả thử nghiệm ảnh hưởng của các chất điều tiết sinh trưởng như: BAP, Kinetin, DTZ, NAA đến sự tái sinh chồi từ mô sẹo như sau:

*** Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của nồng độ BAP đến khả năng tái sinh chồi từ callus**

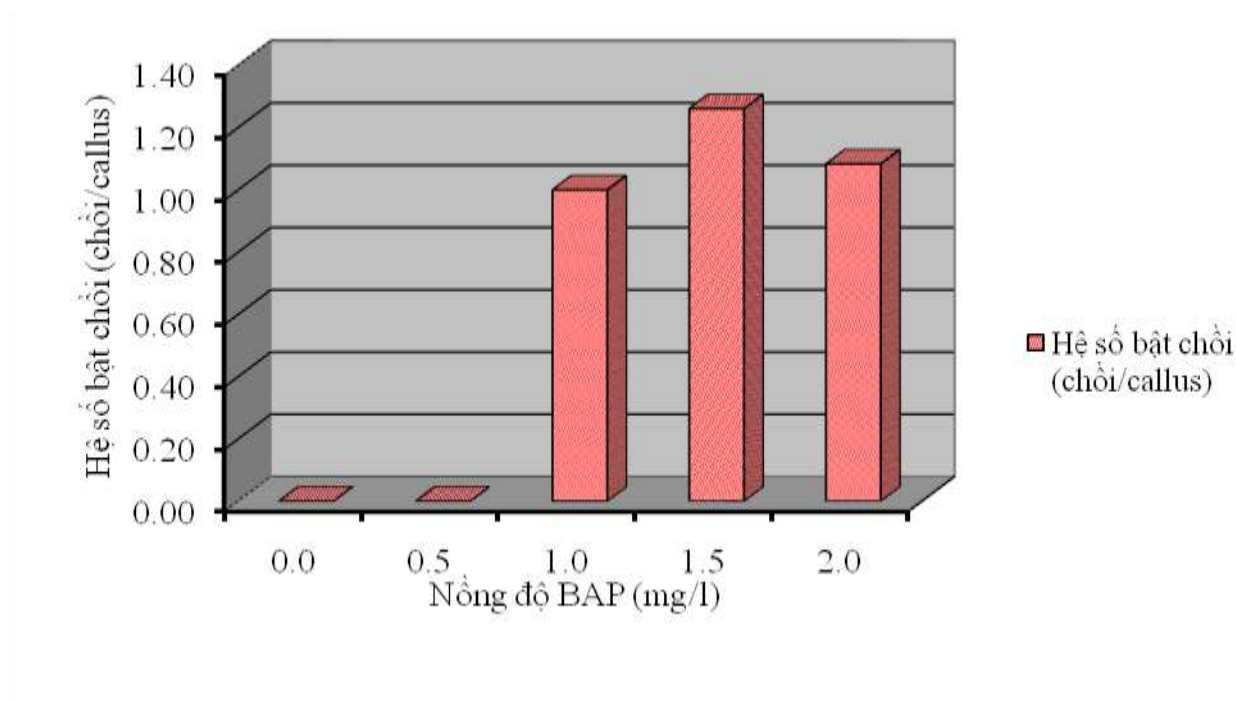
Bảng 4.7. Ảnh hưởng của nồng độ BAP đến khả năng tái sinh chồi từ callus (sau 12 tuần)

C T	Nồng độ BA P (mg /l)	Số mẫu cây chuyển n (mẫu u)	Số callus bật chồi (callus)	Tỷ lệ bật chồi (%)	Số lượng chồi bật (chồi i)	Hệ số bật ch ồi (chồi/callu s)
1(đ/ c)	0, 0	36 0	0	0,00	0	
2	0, 5	36 0	0	0,00 _{ns}	0	
3	1, 0	36 0	4	1,11*	4	1,00*
4	1, 5	36 0	2 3	6,39*	2 9	1,26*
5	2, 0	36 0	1 2	3,33*	1 3	1,08*
CV(%)				5, 5		5, 2
LSD 5%				0,53		0,1 5

(ns- sai khác không có ý nghĩa; *- công thức có sự sai khác có ý nghĩa)



Đồ thị 4.6. Ảnh hưởng của nồng độ BAP đến tỷ lệ bắt chồi từ callus



Đồ thị 4.7. Ảnh hưởng của nồng độ BAP đến hệ số bật chồi từ callus

Kết quả thu được trong bảng 4.7 và đồ thị 4.6, 4.7 cho thấy:

Với độ tin cậy 95%: các công thức thí nghiệm trừ công thức 2 đều có tỷ lệ bật chồi cao hơn đối chứng không bổ sung chất ĐTST (hoàn toàn không bật chồi). Điều đó chứng tỏ BAP có tác dụng thúc đẩy sự tái sinh chồi từ callus của hoa đồng tiền.

Các công thức nhìn chung có tỷ lệ tái sinh chồi từ callus thấp. Khi nồng độ BAP tăng từ 0,5 mg/l đến 2,0 mg/l thì tỷ lệ bật chồi tăng từ 0% lên 6,39%, hệ số bật chồi tăng từ 1 đến 1,26 chồi/callus. Công thức 4 có bổ sung 1,5 mg/l có tỷ lệ bật chồi đạt cao nhất là 6,39, có hệ số tái sinh chồi đạt 1,26 chồi/callus.

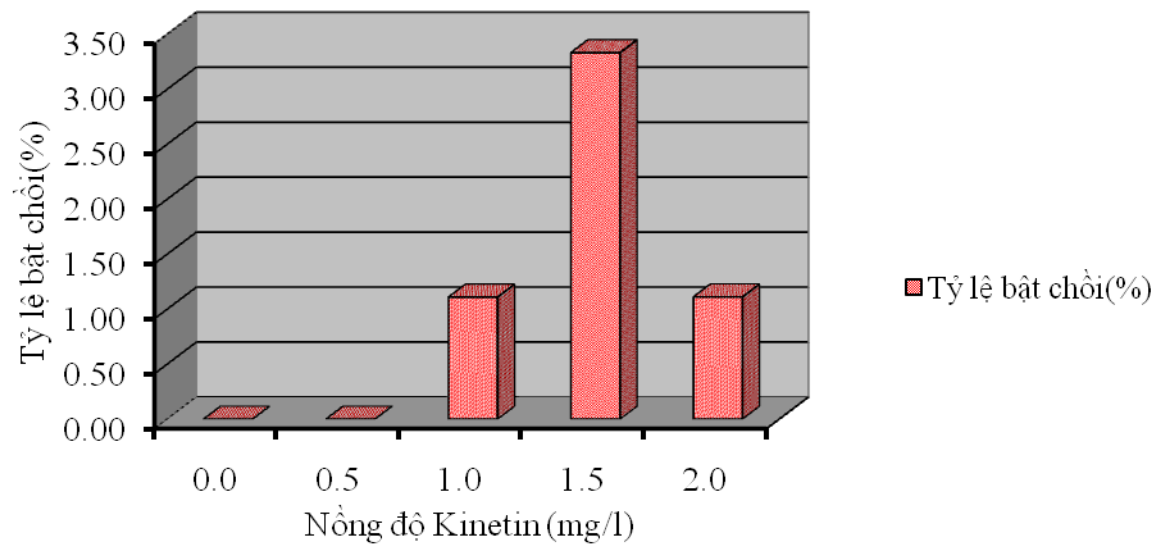
Từ kết quả thí nghiệm thu được cho thấy: với độ tin cậy 95% ta có thể kết luận: BAP có thể kích thích callus bật chồi. Nồng độ BAP thích hợp nhất cho tái sinh chồi là 1,5mg/l.

*** Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của nồng độ Kinetin đến khả năng tái sinh chồi từ callus.**

Bảng 4.8. Ảnh hưởng của nồng độ Kinetin đến khả năng tái sinh chồi từ callus (sau 12 tuần)

C T	Nồng độ Kinetin (mg/ l)	Số mẫu cây chuyển n (mẫu u)	Số callus bật chồi (callus)	Tỷ lệ bật chồi (%)	Số chồi b ật (chồ i)	Hệ số bật ch ồi (chồi/callu s)
1(đ/ c)	0, 0	36 0	0	0,00	0	
2	0, 5	36 0	0	0,00 _{ns}	0	
3	1, 0	36 0	4	1,11*	4	1,0 0
4	1, 5	36 0	1 2	3,33*	1 2	1,0 0
5	2, 0	36 0	4	1,11*	4	1,0 0
CV(%)				0, 1		
LSD 5%				0,001		

(*: công thức có sự sai khác có ý nghĩa so với đối chứng)



Đồ thị 4.8. Ảnh hưởng của nồng độ kinetin đến tỷ lệ bắt chồi từ callus

Từ kết quả ở bảng 4.8 và đồ thị 4.8 cho thấy:

Nhìn chung các công thức trong thí nghiệm có tỷ lệ tái sinh rất thấp. Ở công thức đối chứng không bổ sung kinetin và công thức 2 có nồng độ bổ sung kinetin thấp (0,5 mg/l) không có hiện tượng bật chồi. Khi ta tiếp tục tăng nồng độ Kinetin lên từ 1,0 mg/l đến 2,0 mg/l, thì có hiện tượng tái sinh chồi từ callus. Tuy nhiên tỷ lệ tái sinh chỉ đạt từ 1,11% lên đến 3,33% và hệ số tái sinh chồi là 1. Công thức 4 có bổ sung 1,5 mg/l, có tỷ lệ bật chồi đạt cao nhất là 3,33%, có hệ số tái sinh chồi đạt 1 chồi/callus.

Vậy với độ tin cậy 95% ta có thể kết luận: Kinetin có thể kích thích callus bật chồi. Nồng độ Kinetin thích hợp nhất cho tái sinh chồi là 1,5 mg/l.

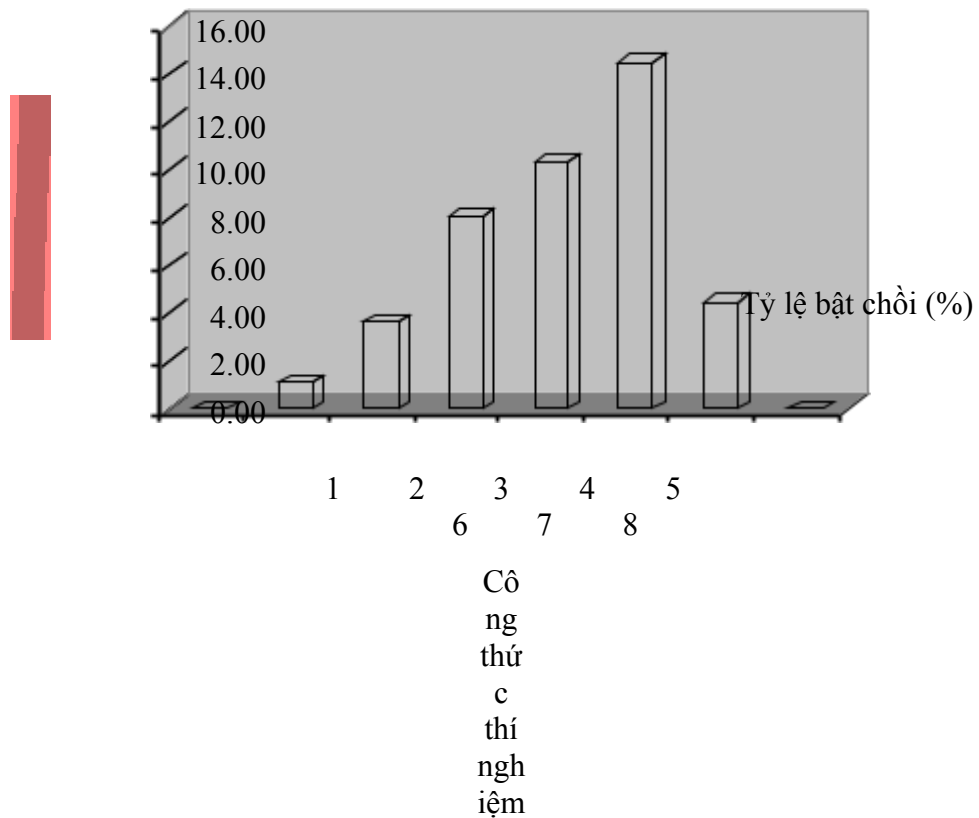
*** Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng phối hợp TDZ và Kinetin đến khả năng tái sinh từ callus**

Bảng 4.9. Ảnh hưởng phối hợp nồng độ TDZ và Kinetin đến khả năng tái sinh chồi từ callus (sau 12 tuần)

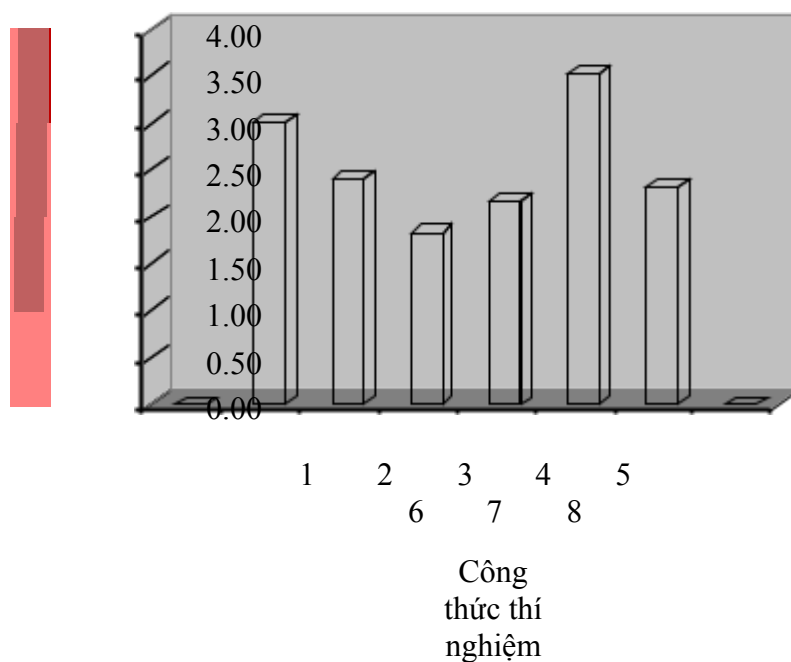
C T	Nồng độ chất		Số mẫu cây	Số callus	Tỷ lệ	Số chồi	Hệ số bật
	ĐTST(mg/l)		chuyể n	bât chồi	bât chồi	b ật	ch ồi
	TD Z	Kineti n	(mẫ u)	(callus)	(%)	(chồ i)	(chồi/callu s)
1	1,0	0, 5	36 0	0	0,00 _f	0	
2	1,0	1, 0	36 0	4	1,11 _e	1 2	3,00 _{ab}
3	1,0	1, 5	36 0	1 3	3,61 _d	3 1	2,38 _{ab}
4	1,0	2, 0	36 0	2 9	8,06 _c	5 3	1,83 _b
5	2,0	0, 5	36 0	3 7	10,28 _b	8 0	2,16 _b
6	2,0	1, 0	36 0	5 2	14,44_a	183	3,52_a

7	2,0	1,5	360	16	4,44 _d	37	2,31 _{ab}
8	2,0	2,0	360	0	0,00 _f	0	
CV(%)					6,50		7,20

(a, b, c, d, e, f, g:,,,, mức phân nhóm trong so sánh Duncan)



Đồ thị 4.9. Ảnh hưởng phối hợp nồng độ TDZ và Kinetin đến tỷ lệ tái sinh chồi từ mô sẹo



Hệ số bật chồi
(chồi/callus)

Đồ thị 4.10. Ảnh hưởng phối hợp nồng độ TDZ và Kinetin đến hệ số tái sinh chồi từ mô sẹo

Kết quả thí nghiệm thể hiện ở bảng 4.9 và đồ thị 4.9, 4.10. Các công thức có tỷ lệ mẫu bật chồi dao động từ 0 đến 14,44%. Kết quả thí nghiệm được xếp theo 6 mức phân nhóm trong so sánh duncan theo thứ tự từ cao xuống thấp là a, b, c, d, e, f. Cụ thể là: tỷ lệ bật chồi ở công thức 6 đạt cao nhất là 14,44% ở mức “a”; công thức 1 và công thức 8 không bật chồi và

được xếp ở mức “f”; tỷ lệ bật chồi ở công thức 5 là 10,28% ở mức “b”; tỷ lệ bật chồi ở công thức 4 là 8,06% ở mức “c”; tỷ lệ bật chồi ở công thức 3 và công thức 7 là 3,61% và 4,44% ở mức “d”; tỷ lệ bật chồi ở công thức 2 là 1,11% ở mức “e”. Nhìn chung tỷ lệ bật chồi ở các công thức là thấp.

Hệ số bật chồi phản ánh số chồi thu được trên một callus tái sinh. Hệ số bật chồi trong thí nghiệm dao động từ 1,83 chồi/callus đến 3,52 chồi/callus và được phân thành các mức phân nhóm trong so sánh duncan theo thứ tự giảm dần là a, ab, b. Theo so sánh duncan: Công thức 6 đạt cao là 3,53 chồi/callus ở mức “a”. Hệ số bật chồi ở công thức 4 và công thức 5 đạt thấp là 1,83 chồi/callus và 2,16 chồi/callus ở mức “b” (không khác biệt rõ so với công thức 2, công thức 3 và công thức 7). Hệ số bật chồi ở công thức 2; công thức 3 và công thức 7 là 3 chồi/callus; 2,38 chồi/callus và 2,31 chồi/callus ở mức “ab” (không khác biệt rõ so với công thức 6).

Như vậy: Trong thí nghiệm này, 2mg DTZ/l + 1mg Kinetin/l bổ sung vào môi trường nền là sự phối hợp tốt nhất giữa DTZ và Kinetin đối với mục đích tái sinh chồi từ callus.

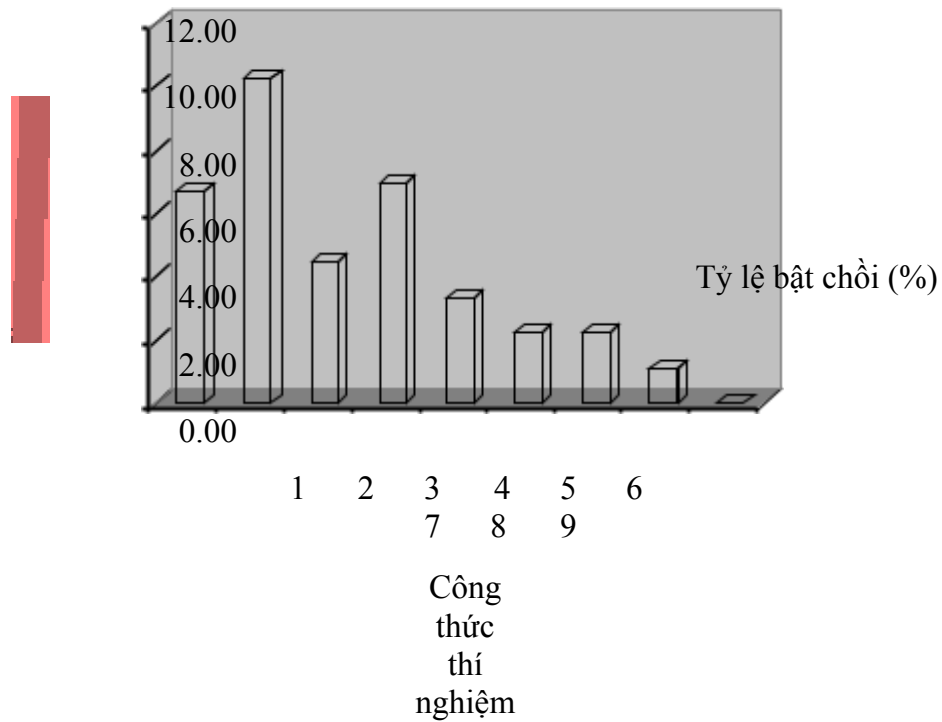
*** Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng phối hợp của BAP và Kinetin đến khả năng tái sinh chồi từ callus**

Bảng 4.10. Ảnh hưởng phối hợp BAP và Kinetin đến khả năng tái sinh chồi từ callus (sau 12 tuần)

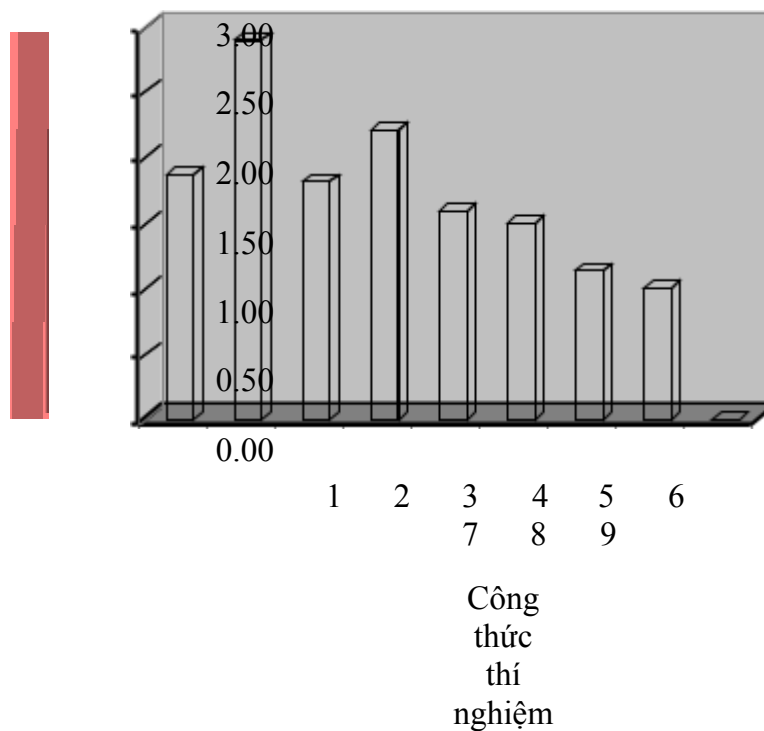
C T	Nồng độ ĐTST(mg/ l)		Số mẫu cấy chuyển (mẫu)	Số chồi bật (chồi)	Tỷ lệ bật chồi (%)	Số chồi bật (chồi)	Hệ số bật chồi (chồi/callu s)
	BA P	Kineti n					
1	1,0	0, 1	36 0	2 4	6,67 _b	4 5	1,87 _c
2	1,0	0, 2	36 0	3 7	10,28 _a	107	2,89 _a
3	1,0	0, 3	36 0	1 6	4,44 _c	2 9	1,81 _c
4	1,5	0, 1	36 0	2 5	6,95 _b	5 5	2,20 _b

5	1,5	0, 2	36 0	1 2	3,33 _d	1 9	1,59 _d
6	1,5	0, 3	36 0	8	2,22 _e	1 2	1,50 _e
7	2,0	0, 1	36 0	8	2,22 _e	9	1,13 _f
8	2,0	0, 2	36 0	4	1,11 _f	4	1,00 _f
9	2,0	0, 3	36 0	0	0,00 _g	0	
CV(%)					6, 3		7, 5

(a, b, c, d, e, f, g - mức phân nhóm trong so sánh Duncan)



Đồ thị 4.11. Ảnh hưởng phối hợp nồng độ BAP và Kinetin đến tỷ lệ chồi tái sinh chồi từ callus



Hệ số bật chồi
(chồi/callus)

Đồ thị 4.12. Ảnh hưởng phối hợp BAP và Kinetin đến tỷ lệ chồi tái sinh chồi từ callus

Qua bảng 4.10 và đồ thị 4.11, 4.12 cho thấy:

Tất cả các công thức thí nghiệm trừ công thức 9 đều có hiện tượng bật chồi. Tỷ lệ bật chồi biến động từ 1,11% đến 10,28%, hệ số bật chồi biến động từ 1 chồi/callus đến 2,89 chồi/callus. Chứng tỏ sự phối hợp giữa BAP và

Kinetin có mang lại hiệu quả bật chồi. Tuy nhiên hiệu quả này ở các mức khác nhau phụ thuộc vào nồng độ phối hợp.

Tỷ lệ bật chồi ở các công thức được xếp theo thứ tự từ cao xuống thấp trong so sánh duncan là a, b, c, d, e, f. Trong đó: tỷ lệ bật chồi ở công thức 2 đạt cao nhất là 10,28% ở mức “a”; tỷ lệ bật chồi ở công thức 9 thấp nhất là 0% ở mức “g”; tỷ lệ bật chồi ở công thức 1 và công thức 4 là 6,67% và 6,95% ở mức “b”; tỷ lệ bật chồi ở công thức 3 là 4,44% ở mức “c”; tỷ lệ bật chồi ở công thức 5 là 3,33% ở mức “d”; tỷ lệ bật chồi ở công thức 6 và công thức 7 đều bằng 2,22% ở mức “e”; tỷ lệ bật chồi ở công thức 8 là 1,11 % ở mức “f”.

Hệ số bật chồi dao động từ 1 đến 2,89 chồi/callus. Theo so sánh duncan ta có: công thức 2 có hệ số bật chồi cao nhất đạt 2,89 chồi/callus ở mức “a”; công thức 8 và công thức 9 có hệ số bật chồi thấp nhất là 1 và 1,13 chồi/callus ở mức “f”; công thức 4 có hệ số bật chồi là 2,2 chồi/callus ở mức “b”; công thức 1 và công thức 3 có hệ số bật chồi là 1,87 chồi/callus và 1,81 chồi/callus ở mức “c”; công thức 5 và công thức 6 có hệ số bật chồi là 1,59 chồi/callus và 1,5 chồi/callus ở mức “d” và “e”.

Như vậy: Nồng độ phối hợp giữa 1mg BAP/l+0,2mg Kinetin/l vào môi trường nền (MS bổ sung 30 gram saccarose/lít, 6,5 gram agar/lít, pH=5,8) là thích hợp nhất trong thí nghiệm tái sinh chồi hoa đồng tiền bằng phối hợp BAP và Kinetin.

*** Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng phối hợp của tổ hợp nồng độ BAP, Kinetin tốt nhất ([BAP*,K*]) với NAA đến khả năng tái sinh chồi.**

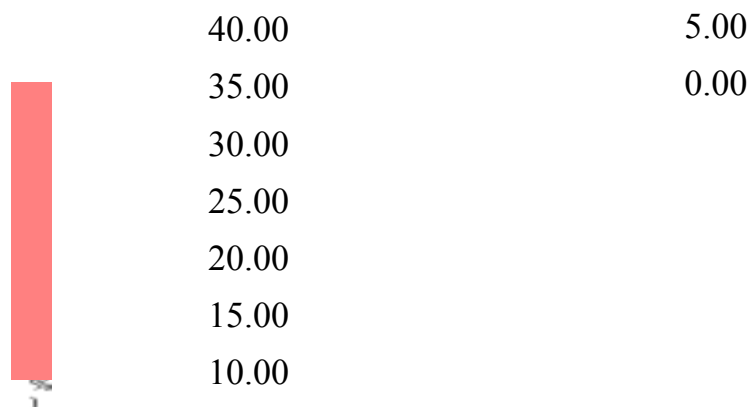
Mặc dù sự phối hợp giữa BAP và Kinetin trong thí nghiệm trên có khả năng tái sinh chồi từ callus nhưng tỷ lệ tái sinh còn thấp. Trên cơ sở làm thay đổi trạng thái cân bằng Auxin/cytokinin, bổ sung một lượng nhỏ và tăng dần Auxin rất có thể cải thiện được kết quả tái sinh chồi. Để thực hiện việc này việc tiếp tục nghiên cứu ảnh hưởng phối hợp của 1,0 mg BAP/l + 0,2 mg

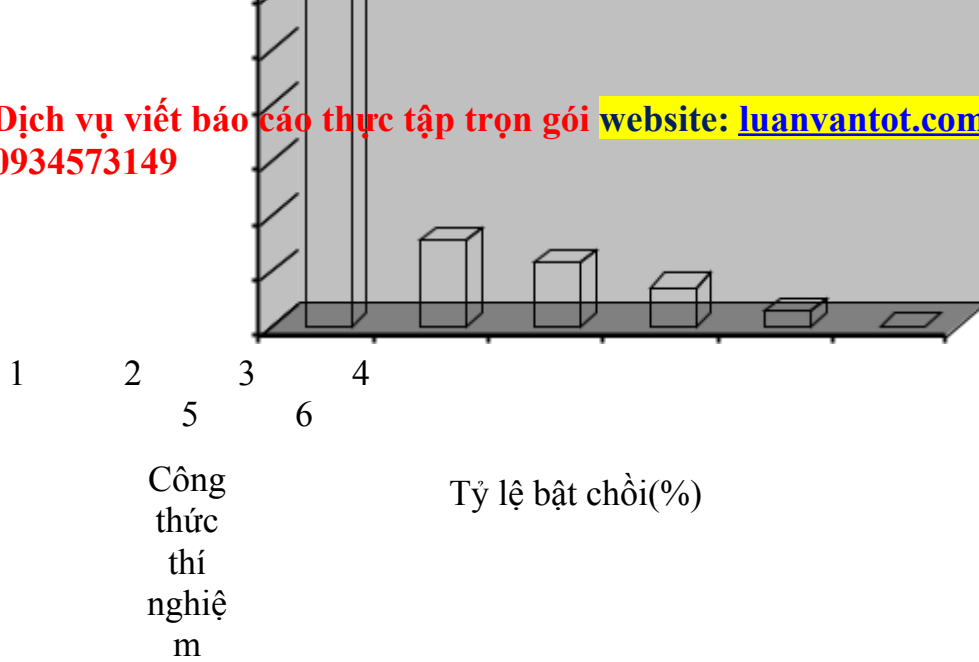
Kinetin/l (là nồng độ phối hợp tốt nhất thu được ở thí nghiệm trên) với NAA ở ngưỡng nồng độ từ 0,1 - 1,0 mg/l là cần thiết. Kết quả thu được ở bảng 4.11 và đồ thị minh họa 4.13, 4.14.

Bảng 4.11. Ảnh hưởng phối hợp của tổ hợp nồng độ BAP, Kinetin tốt nhất ([BAP*,K*]) với NAA đến khả năng tái sinh chồi(sau 12 tuần)

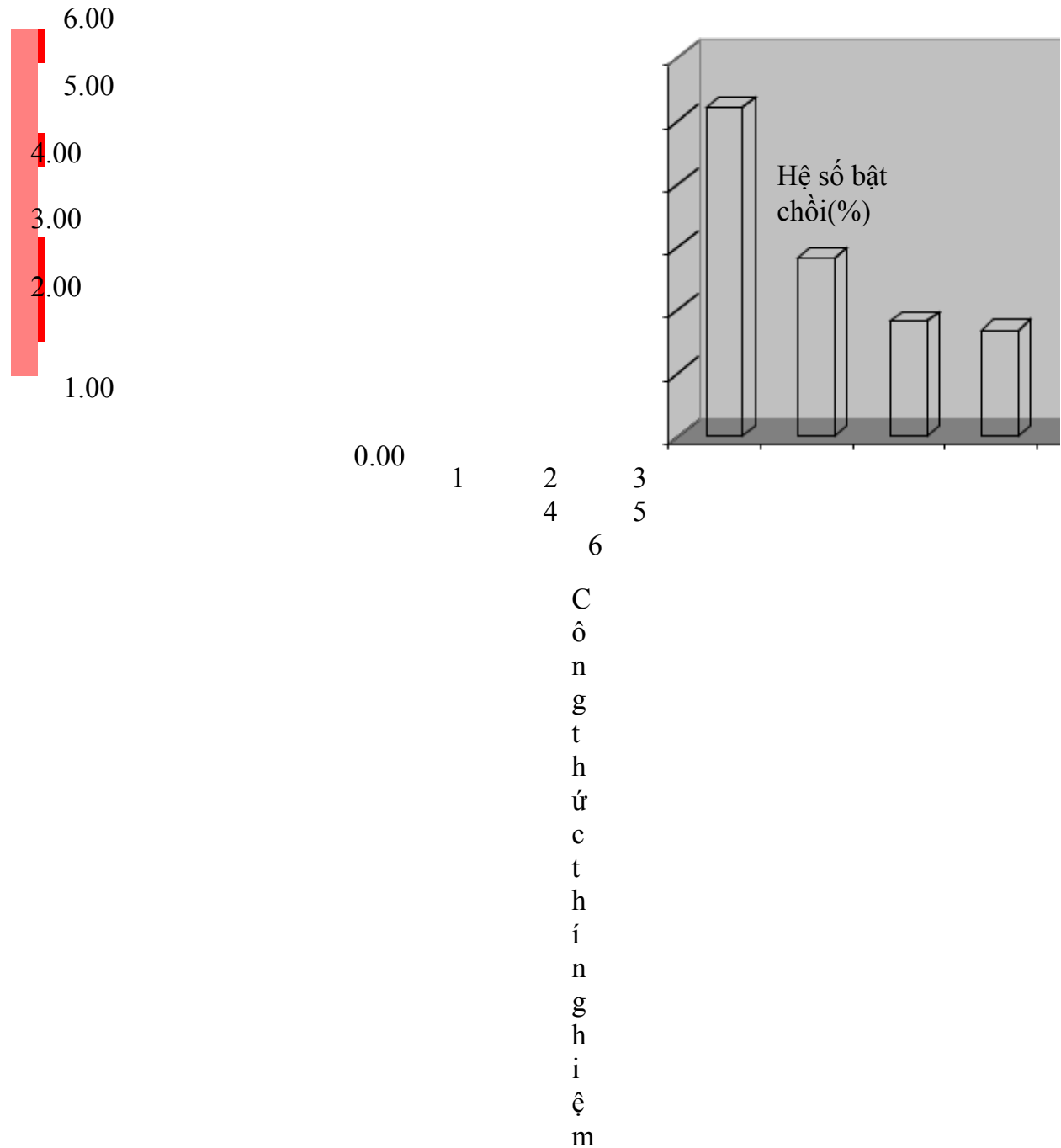
C T	Nồng độ chất ĐTST (mg/ l)			Số callus (callu s)	Số callus bật chồi (callus)	Tỷ lệ bật chồi (%)	Số chồi bật (chồi)	Hệ số bật chồi (chồi/callu s)
	BA P	Kineti n	NA A					
1	1, 0	0, 2	0,1	360	130	36,11 ^a	677	5,21 ^a
2	1, 0	0, 2	0,2	360	2 8	7,78 ^b	7 9	2,82 ^b
3	1, 0	0, 2	0,3	360	2 1	5,83 ^c	3 8	1,81 ^c
4	1, 0	0, 2	0,4	360	1 3	3,61 ^d	2 2	1,69 ^c
5	1, 0	0, 2	0,5	360	5	1,39 ^e	6	1,20 ^d
6	1, 0	0, 2	1,0	360	0	0,00 ^f		
CV(%)						5, 2		6, 5

(a, b, c, d, e, f – là mức phân nhóm trong so sánh Duncan)





Đồ thị 4.13. Ảnh hưởng phối hợp của tổ hợp nồng độ BAP, Kinetin tốt nhất với NAA đến tỷ lệ chồi tái sinh từ callus



Đồ thị 4.14. Ảnh hưởng phối hợp của tổ hợp nồng độ BAP, Kinetin tốt nhất với NAA đến hệ số tái sinh chồi từ callus

Từ kết quả bảng 4.1 và đồ thị 4.13, 4.14 cho thấy:

Trong thí nghiệm này với sự bổ sung của NAA vào sự kết hợp 1,0 mg BAP/l + 0,2mg Kinetin/l thì có sự biến đổi. Trừ công thức 6 với nồng độ NAA

quá cao (1,0 mg/l) là cho tỷ lệ bật chồi bằng 0% còn các công thức còn lại đều cho tỷ lệ bật chồi và hệ số bật chồi nhất định. Ở các công thức có tái sinh chồi, tỷ lệ tái sinh chồi biến động từ 1,39% đến 36,11%. Hệ số bật chồi biến động từ 1,2 chồi/callus đến 5,21 chồi/callus. Điều này chứng tỏ sự phối hợp của NAA với 1,0 mg BAP/l + 0,2 mg Kinetin/l là mang lại hiệu quả bật chồi.

Tỷ lệ bật chồi được xếp thành 6 mức phân nhóm trong so sánh duncan và được xếp theo thứ tự từ cao xuống thấp là a, b, c, d, e, f. Theo so sánh duncan: tỷ lệ bật chồi ở công thức 1 đạt cao nhất là 36,11% ở mức “a”; tỷ lệ bật chồi ở công thức 6 thấp nhất là 0% ở mức “f”; tỷ lệ bật chồi ở công thức 2 là 7,78% ở mức “b”; tỷ lệ bật chồi ở công thức 3 là 5,83% ở mức “c”; tỷ lệ bật chồi ở công thức 4 là 3,61% ở mức “d”; tỷ lệ bật chồi ở công thức 5 là 1,39%

ở mức “e”. Như vậy, nồng độ NAA là 0,1 mg/l bổ sung vào môi trường nền có bổ sung 1,0mg BAP/l + 0,2mg Kinetin/l mang lại sự cân bằng Auxin/Cytokinin tốt nhất cho việc các tế bào mô sẹo phân hóa theo hướng phát sinh chồi.

Hệ số tái sinh chồi phản ánh hiệu xuất bật chồi trên callus và cũng phản ánh sự cân bằng giữa Auxin và cytokinin. Hệ số tái sinh chồi được xếp thành 4 mức phân nhóm trong so sánh duncan theo thứ tự giảm dần từ cao xuống thấp là a, b, c, d. Hệ số tái sinh chồi đạt cao nhất ở công thức 1 là 5,12 chồi/callus ở mức “a”; hệ số tái sinh chồi thấp nhất ở công thức 5 là 1,2 chồi/callus ở mức “d”; Hệ số tái sinh chồi ở công thức 2 là 2,82 chồi/callus ở mức “b”; hệ số tái sinh chồi ở công thức 4 và công thức 5 là 1,81 chồi/callus và 1,69 chồi/callus ở mức “c”.

Từ kết quả thu được trong thí nghiệm cho thấy rằng: Nồng độ NAA thích hợp nhất cho tái sinh chồi bổ sung vào môi trường MS + 30 gram saccharose/lít + 6.5 gram agar/lít + 1,0 mg BAP/l+0,2 mg Kinetin/l, pH=5, 8 là 0,1 mg/l.

Kết luận chung cho giai đoạn tái sinh chồi: mặc dù sự tác động riêng rẽ của 1,0 mg BAP/l, 1,5 mg Kinetin/l hay sự phối hợp của 1,0 mg BAP/l+0,2 mg Kinetin/l, 2 mg/l DTZ + 1mg Kinetin/l, 1,0 mg BAP/l+ 0,2 mg Kinetin/l + 0,1 mg NAA/l đều có khả năng kích thích mô sẹo trong môi trường dinh dưỡng (MS + 30 gram saccharose/lít + 6,5 gram agar/lít, pH=5,8) tái sinh chồi ở những tỷ lệ bật chồi và hệ số bật chồi nhất định. Tuy nhiên chỉ có sự phối hợp của 1,0 mg BAP/l+ 0,2 mg Kinetin/l + 0,1 mg NAA/l bổ sung vào môi trường nuôi cấy là mang lại hiệu quả tái sinh cao nhất với tỷ lệ tái sinh đạt cao nhất là 36,11 và hệ số bật chồi đạt 5,21 chồi/callus. Vì vậy, môi trường MS + 30 gram saccharose/lít + 6,5 gram agar/lít + 1,0 mg BAP/l+ 0,2 mg Kinetin/l + 0,1 mg/l α -NAA, pH=5,8 là môi trường được chọn để tái sinh chồi hoa đồng

tiền từ callus.



Bắt đầu phát sinh chồi



Chồi hoàn chỉnh



Cụm chồi hoàn thiện bật ra từ callus



Hình 4.3. Một số hình ảnh phát triển của chồi tái sinh từ callus

4.4. Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của chất điều tiết sinh trưởng đến sự nhân nhanh chồi hoa đồng tiền

Nhân nhanh là giai đoạn kích thích sự phân hóa các mầm chồi từ một hay vài chồi ban đầu. Đây là giai đoạn không thể thiếu với một quy trình sản xuất giống có tính chất công nghiệp bằng phương pháp nhân giống in vitro. Trong giai đoạn này sự sinh trưởng và phát triển của mô nuôi cấy phụ thuộc vào điều kiện nuôi cấy (nhiệt độ, ánh sáng), môi trường nuôi cấy (thành phần dinh dưỡng, chất điều tiết sinh trưởng và tỷ lệ giữa chúng). Tùy theo từng loại cây mà người ta có thể bổ sung vào môi trường nuôi cấy các chất điều tiết sinh trưởng với nồng độ và tỷ lệ khác nhau để thu được hệ số nhân chồi và chất lượng chồi cao nhất.

Với mục đích nhân nhanh chồi hoa đồng tiền sau tái sinh, chúng tôi tiến hành nghiên cứu ảnh hưởng của nồng độ một số loại Cytokinin (BAP, Kinetin) và sự phối hợp giữa Cytokinin(BAP) với nước dừa đến sự nhân nhanh của chồi hoa đồng tiền sau tái sinh. Kết quả thu được ở như sau:

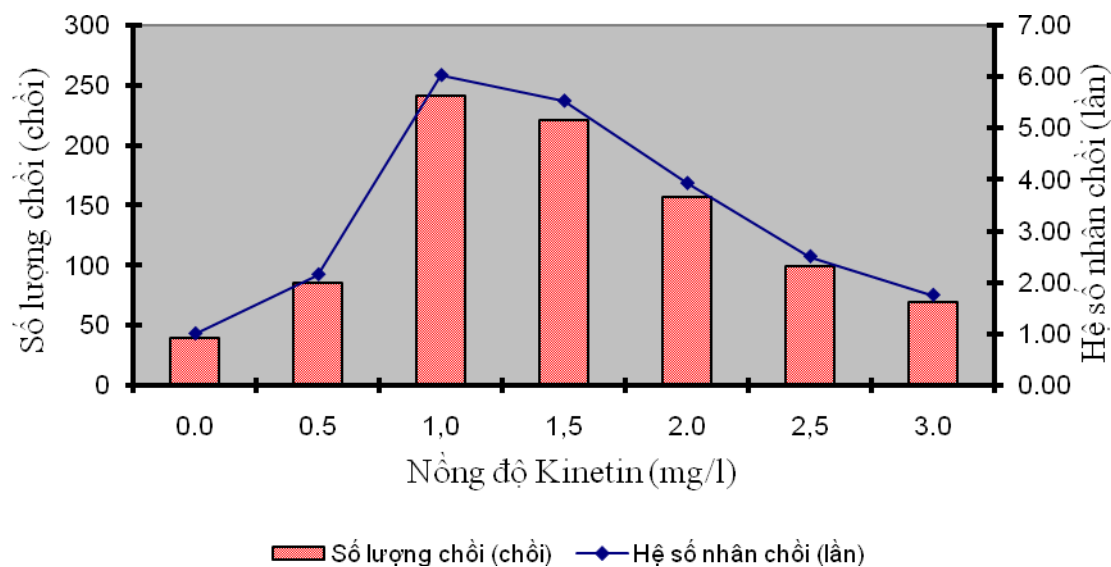
*** Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của nồng độ Kinetin tới hiệu quả nhân chồi.**

Bảng 4.12 : Ảnh hưởng của nồng độ Kinetin đến hiệu quả nhân chồi

CT	Nồng độ Kinetin (mg/l)	Số mẫu cây sạch bệnh (chồi)	Theo dõi sau 6 tuần		
			Số chồi thu được (chồi)	Hệ số nhân chồi (lần)	Chất lượng chồi
1	0,0	40	40	1,00 _g	Tốt
2	0,5	40	86	2,15 _e	Tốt
3	1,0	40	241	6,03_a	Tốt
4	1,5	40	221	5,53 _b	Tốt

5	2, 0	4 0	15 7	3,93 _c	Kh á
6	2, 5	4 0	10 0	2,50 _d	Kh á
7	3, 0	4 0	7 0	1,75 _f	Ké m
CV(%)				4,2 0	

(a, b, c, d, e, f, g – là mức phân nhóm trong so sánh Duncan)



Đồ thị 4.15. Ảnh hưởng của nồng độ Kinetin đến hệ số nhân chồi

Sau 6 tuần nuôi cây kết quả thu được ở bảng 4.12 và đồ thị 4.15. Ngoài công thức 1 không bổ sung Kinetin không tăng về số lượng chồi (hệ số nhân chồi bằng 1 lần) còn tất cả các công thức còn lại đều cho hệ số nhân chồi lớn hơn 1. Theo phương pháp so sánh duncan hệ số nhân chồi được xếp giảm dần theo mức phân nhóm là a, b, c, d, e, f, g.

Khi bổ sung nồng độ kinetin tăng từ 0 đến 1,0 mg/l thì hệ số nhân chồi tăng dần từ 1 lần đến 6,03 lần. Trong đó công thức 3 có hệ số nhân chồi đạt cao nhất là 6,03 lần ở nhóm “a”; công thức 1 và công thức 2 có hệ số nhân chồi đạt 1 lần và 2,15 lần ở mức "g" và mức "e" (so sánh duncan).

Nếu nồng độ kinetin vượt quá 1 mg/l (công thức 3), tăng từ 1,5 mg/l (công thức 4) đến 3,0 mg/l (công thức 7), thì hệ số nhân chồi lại có chiều hướng giảm từ 5,53 lần xuống 1,75 lần. Trong đó: công thức 7 có nồng độ Kinetin cao nhất nhưng hệ số nhân chồi lại ở mức thấp nhất (1,76 lần) trong các công thức có bổ sung kinetin và được xếp vào nhóm “f”; công thức 4 có hệ số nhân chồi là 5,53 lần ở mức “b”; công thức 5 có hệ số nhân chồi là 2,93

lần ở mức “c”; công thức 6 có hệ số nhân chồi là 2,5 lần ở mức “d”. Như vậy, không hẳn cứ tăng nồng độ kinetin thì có thể tăng hệ số nhân chồi hoa đồng tiền. Với hoa đồng tiền, ngưỡng nồng độ kinetin thích hợp để cho hệ số nhân chồi cao nhất là 1 mg/l. Vượt quá ngưỡng này sẽ làm ức chế sự nhân chồi.

Để lựa chọn đúng nồng độ kinetin thích hợp cho nhân nhanh chồi hoa đồng tiền thì ngoài chỉ tiêu hệ số nhân chồi còn phải chú ý đến chất lượng chồi. Trong các công thức thí nghiệm có nồng độ kinetin tăng từ 0 lên đến 1,5 mg/l thì chồi đều phát triển bình thường và cụm chồi tạo thành sau 6 tuần nuôi cấy được đánh giá là tốt (chồi mập, lá xanh thẫm). Tuy nhiên ở nồng độ kinetin cao quá 1,5 mg/l chất lượng chồi có xu thế giảm, từ chồi bình thường, lá xanh (loại khá) đến chồi gầy, lá xanh nhạt, hoặc chồi bị dị dạng (loại kém).

Từ phân tích trên cho thấy: nồng độ Kinetin thích hợp nhất để bổ sung vào môi trường MS + 30 gram saccarose/lít + 6.5 gram agar/lít, pH = 5,8 với mục đích nhân nhanh chồi là 1,0 mg/l. Trong môi trường này có hệ số nhân chồi đạt 6,03 lần, chồi mập, xanh thẫm.

*** Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của nồng độ BAP tới hiệu quả nhân chồi.**

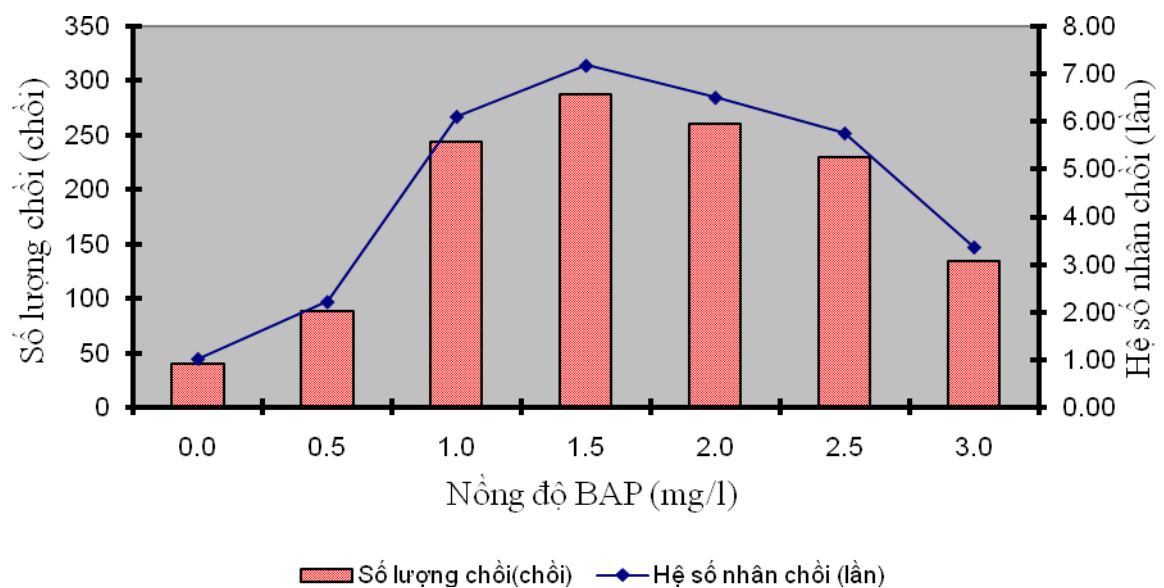
BAP và Kinetin là hai loại chất điều tiết sinh trưởng cùng thuộc nhóm Cytokinin. Chúng có tác dụng kích thích sự phân hóa các cơ quan nuôi cấy, đặc biệt là theo hướng tạo chồi. Tuy nhiên, mỗi loại lại có hoạt tính khác nhau và thích hợp với từng loại cây trồng. Vì vậy, để có sự lựa chọn chính xác loại Cytokinin phù hợp với nhân nhanh đồng tiền thì cần tiếp tục nghiên cứu ảnh hưởng của BAP đến nhân nhanh chồi hoa đồng tiền. Kết quả thu được ở bảng

4.13 và đồ thị
4.16.

Bảng 4.13. Nghiên cứu ảnh hưởng của BAP đến hiệu quả nhân chồi

CT	Nồng độ BAP (ppm)	Số mẫu cây sạch bệnh (chồi)	Theo dõi sau 6 tuần		
			Số chồi (chồi)	Hệ số nhân chồi (lần)	Chất lượng chồi
1	0,0	40	40	1,00 _g	Tốt
2	0,5	40	88	2,20 _f	Tốt
3	1,0	40	244	6,10 _c	Tốt
4	1,5	40	287	7,18 _a	Tốt
5	2,0	40	260	6,50 _b	Tốt
6	2,5	40	230	5,75 _d	Khá
7	3,0	40	134	3,35 _e	Kém
CV(%)				4,60	

(a, b, c, d, e, f, g – là mức phân nhóm trong so sánh Duncan)



Đồ thị 4.16. Nghiên cứu ảnh hưởng của nồng độ BAP đến hệ số nhân chồi

Kết quả thu được ở bảng 4.13 và đồ thị 4.16:

Hệ số nhân chồi dao động từ 1 lần đến 7,18 lần. Hệ số nhân chồi được xếp theo thứ tự từ cao xuống thấp trong so sánh duncan là a, b, c, d, e, f, g.

Theo so sánh duncan: công thức 4 có hệ số nhân chồi đạt cao nhất là 7,18 lần ở mức “a”; công thức 1 có hệ số nhân chồi thấp nhất là 1 lần ở mức “g”;

công thức 5 có hệ số nhân chồi là 6,5 lần ở mức “b”; công thức 3 có hệ số nhân chồi là 6,1 lần ở mức “c”; công thức 6 có hệ số nhân chồi là 5,75 lần ở mức “d”; công thức 7 có hệ số nhân chồi là 3,35 lần ở mức “e”; công thức 2 có hệ số nhân chồi là 2,2 lần ở mức “f”.

Ở công thức 1, công thức 2, công thức 3, công thức 4, công thức 5 có nồng độ BAP từ 0 đến 1,5 mg/l có chất lượng tốt, chồi mập, lá xanh thẫm. Nhưng khi tăng nồng độ BAP vượt quá 2mg/l (ở công thức 6 và công thức 7) thì chất lượng chồi bị giảm sút từ chồi bình thường, lá xanh (loại khá) xuống thành chồi gầy, lá xanh nhạt, hoặc chồi bị dị dạng (loại kém).

Về mặt giá trị, hệ số nhân chồi ở nồng độ thích hợp nhất của BAP cao hơn ở Kinetin. Và sức chịu nồng độ cao của chồi hoa đồng tiền đối với BAP cũng tốt hơn với Kinetin: thể hiện ở sự giảm hệ số nhân chồi của BAP chậm hơn của Kinetin khi vượt quá ngưỡng tối thích; cùng ở nồng độ là 3,0 mg/l nhưng hệ số nhân khi sử dụng BAP vẫn là 3,35 lần trong khi sử dụng kinetin chỉ còn 1,75 lần. Đối với chỉ tiêu chất lượng chồi cũng cho kết quả tương tự: chất lượng chồi khi sử dụng BAP giảm khi nồng độ là 2,5 mg/l đến 3,0 mg/l, khi sử dụng Kinetin chất lượng chồi giảm ngay từ nồng độ 2,0 mg/l đến 3,0 mg/l.

Vậy, công thức 4 có bổ sung 1,5 mg BAP/l vào môi trường nền (MS + 30 gram saccarose/lít + 6,5 gram agar/lít, pH=5,8) là thích hợp nhất trong thí nghiệm nghiên cứu ảnh hưởng của BAP đến hiệu quả nhân chồi.

*** Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng phối hợp của BAP và nước dừa đến sự nhân nhanh chồi hoa đồng tiền.**

Nước dừa là chất điều tiết sinh trưởng tự nhiên rất giàu các hợp chất hữu cơ, chất khoáng và chất kích thích sinh trưởng. Nước dừa thường được sử dụng để kích thích phân hóa và nhân nhanh chồi trong nuôi cấy mô tế bào. Hơn nữa với vai trò là chất điều tiết sinh trưởng tự nhiên nước dừa có thể

mang lại hiệu quả không những về hệ số nhân chồi mà còn cho chất lượng chồi tốt, bền vững trong duy trì in vitro.

Qua nhiều lần nhân nhanh chất lượng chồi có xu hướng giảm sút. Để giải quyết vấn đề này và đảm bảo hệ số nhân chồi trong nhân nhanh, thì việc bổ sung nước dừa vào môi trường nhân nhanh tốt nhất đã thu được trong các thí nghiệm trên (môi trường có bổ sung 1,5 mg BAP/l) là phù hợp với mục đích nghiên cứu khả năng nâng cao chất lượng chồi của nước dừa trong nhân nhanh. Kết quả sau

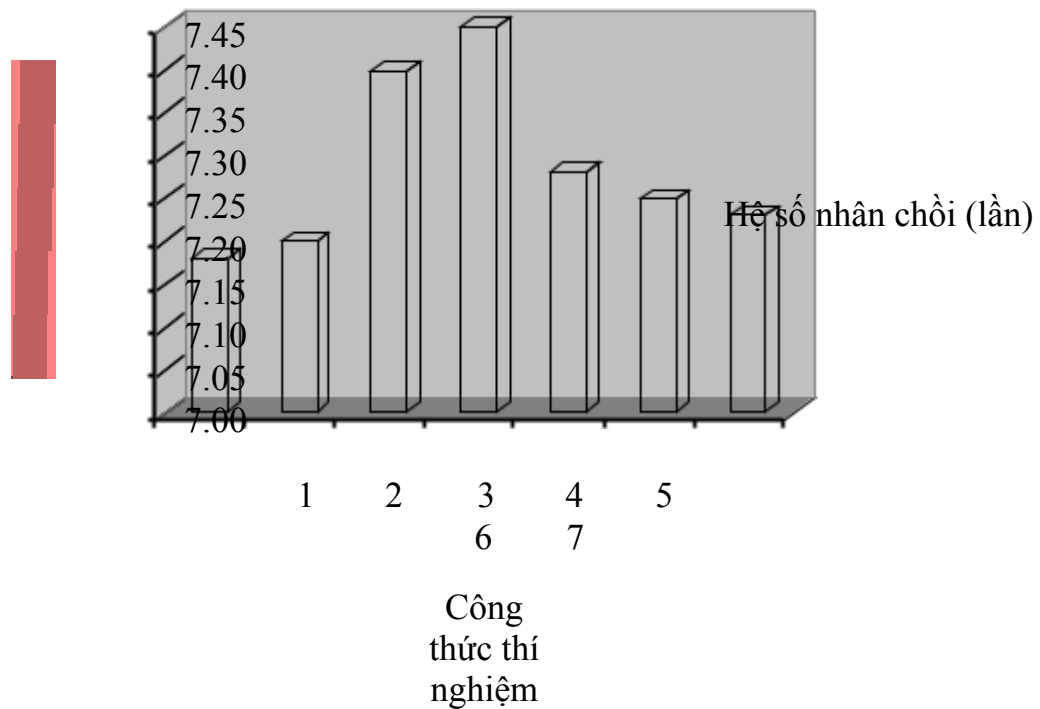
6 tuần nuôi cấy thu được ở bảng 4.14 và đồ thị 4.17, 4.18.

Bảng 4.14. Nghiên cứu ảnh hưởng sự phối hợp giữa của BAP và nước dừa đến sự nhân nhanh của chồi hoa đồng tiền

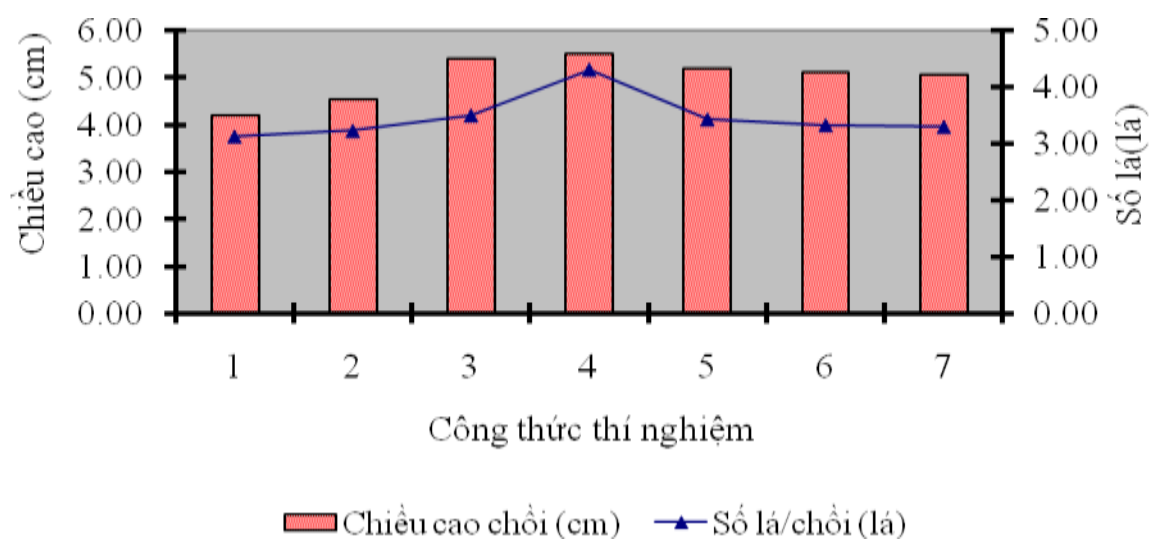
C T	Nồng độ chất ĐTST		Theo dõi sau 6 tuần				
	BA P (mg/ l)	Nước c dừa(%)	Số chồi thu được (chòi i)	Hệ số nhân chồi (lần n)	Chiều cao chồi (cm)	Số lá/ch ồi (Chiếc c)	Chất lượng chồi i
1	1, 5	0	287	7,18 _a	4,20 _e	3,13 _c	+
2	1, 5	5	288	7,20 _a	4,54 _d	3,23 _b _c	+
3	1, 5	1 0	296	7,40 _a	5,39 _{ab}	3,50 _b	++
4	1, 5	1 5	298	7,45_a	5,50_a	4,30_a	++++
5	1, 5	2 0	291	7,28 _a	5,20 _{bc}	3,43 _b	++
6	1, 5	2 5	290	7,25 _a	5,10 _c	3,33 _b _c	++

7	1, 5	3 0	289	7,23 _a	5,07 _c	3,30 _b _c	+
<i>CV</i> (%)				2, 8	2, 8	3,8	

(a, ab, b, bc, c – là mức phân nhóm trong so sánh Duncan)



Đồ thị 4.17. Ảnh hưởng sự phối hợp giữa của BAP và nước dừa đến hệ số nhân chồi



Đồ thị 4.18. Ảnh hưởng sự phối hợp giữa của BAP và nước dừa

đến đến số lá và chiều cao chồi

Kết quả ở bảng 4.14 và đồ thị 4.17, 4.18 cho thấy:

Khi bổ sung nước dừa vào môi trường nhân nhanh thì hệ số nhân chồi biến động từ 7,18 lần đến 7,45 lần. Tuy nhiên, theo phương pháp so sánh

duncan thì không có sự khác biệt về hệ số nhân chồi giữa các công thức và đều được xếp vào nhóm “a”. Tức là việc bổ sung nước dừa không có giá trị rõ rệt trên chỉ tiêu hệ số nhân chồi trong nhân nhanh.

Đối với chỉ tiêu chiều cao chồi ta thấy: Tất cả các công thức có bổ sung nước dừa đều cho kết quả cao hơn công thức không bổ sung nước dừa vào môi trường nuôi cấy. Chiều cao chồi dao động từ 4,2 cm đến 5,5 cm và được xếp vào các nhóm phân mức a, ab, bc, c, d, e trong so sánh duncan. Trong đó: công thức 4 và công thức 3 có chiều cao chồi đạt cao nhất là 5,5 cm và 5,39 cm ở nhóm “a” và “ab”; công thức 1 có chiều cao chồi thấp nhất là 4,2 cm ở mức “e”; công thức 5 có chiều cao chồi là 5,2 cm ở mức “bc” trong so sánh duncan. Công thức 6 và công thức 7 có chiều cao chồi là 5,1 cm và 5,07 cm ở mức “c”; công thức 2 có chiều cao chồi đạt 4,64 cm ở mức “d”.

Đối với chỉ tiêu số lá/chồi, theo phép so sánh duncan ta thấy: công thức 4 có số lá/chồi đạt cao nhất là 4,3 lá ở mức “a”; công thức 3 và công thức 5 có số lá/chồi là 3,5 lá và 3,43 lá ở mức “b”; các công thức 2, công thức 6 và công thức 7 đạt 2,23 lá/chồi, 3,33 lá/chồi và 3,3 lá/chồi được xếp ở mức “bc”; công thức 1 không sử dụng nước dừa có số lá/chồi đạt thấp nhất là 3,13 ở mức “c”.

Bên cạnh chỉ tiêu về số lượng là chiều cao chồi và số lá/chồi, thì chỉ tiêu cảm quan về chất lượng cho thấy: công thức có bổ sung nước dừa ở nồng độ thấp (5%) thì không thấy rõ sự khác biệt so với đối chứng, nhưng các công thức có bổ sung nước dừa ở nồng độ từ 10%-30% đều thấy chất lượng chồi đạt mức cao (+++ hay ++) hơn so với đối chứng(+). Công thức 4 chất lượng chồi đạt điểm cao nhất ở mức (+++).

Như vậy: mặc dù bổ sung nước dừa vào môi trường nhân nhanh không làm tăng rõ rệt hệ số nhân chồi nhưng chất lượng chồi thì tốt hơn hẳn so với không bổ sung nước dừa. Nồng độ nước dừa bổ sung vào môi trường MS + 30

gram saccarose/lít + 6.5 gram agar/lít + 1,5 mg BAP, pH=5, 8 thích hợp nhất trong nhân nhanh là 15%.

Kết luận chung cho giai đoạn nhân nhanh cụm chồi: trong giai đoạn nhân nhanh các Cytokinin như BAP, Kinetin đều có khả năng nhân nhanh chồi và hệ số nhân khá cao. Tuy nhiên, Sử dụng 1,5 mg BAP/l + 15% nước dừa bổ sung vào môi trường MS + 30 gram saccarose/lít + 6,5 gram agar/lít, pH = 5,8 là thích hợp nhất cho hệ số nhân chồi cao nhất, chất lượng chồi tốt nhất, kéo dài tuổi thọ của chồi trong nhân nhanh.



*Chồi
có bổ
sung
nước
dừa
trong
nhân
nhanh*



*Chồi
được
nhân
nhanh
bằng
BAP
hoặc
Kinetin*



*Chồi dị
dạng*



Hình 4.4: Một số hình ảnh nhân nhanh cụm chồi hoa đồng tiền

4.5. Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của NAA đến sự ra rễ của chồi hoa đồng tiền nuôi cấy mô.

Giai đoạn ra rễ cho chồi là công đoạn cuối cùng của quy trình nhân giống bằng phương pháp nuôi in vitro. Kết thúc giai đoạn này chúng ta sẽ thu được những cây hoàn chỉnh (đầy đủ rễ và thân, lá) cung cấp cho giai đoạn luyện cây con giai đoạn vườn ươm. Trong giai đoạn này, người ta thường sử dụng chất ĐTST thuộc nhóm Auxin để kích thích sự ra rễ của chồi sau giai đoạn nhân nhanh.

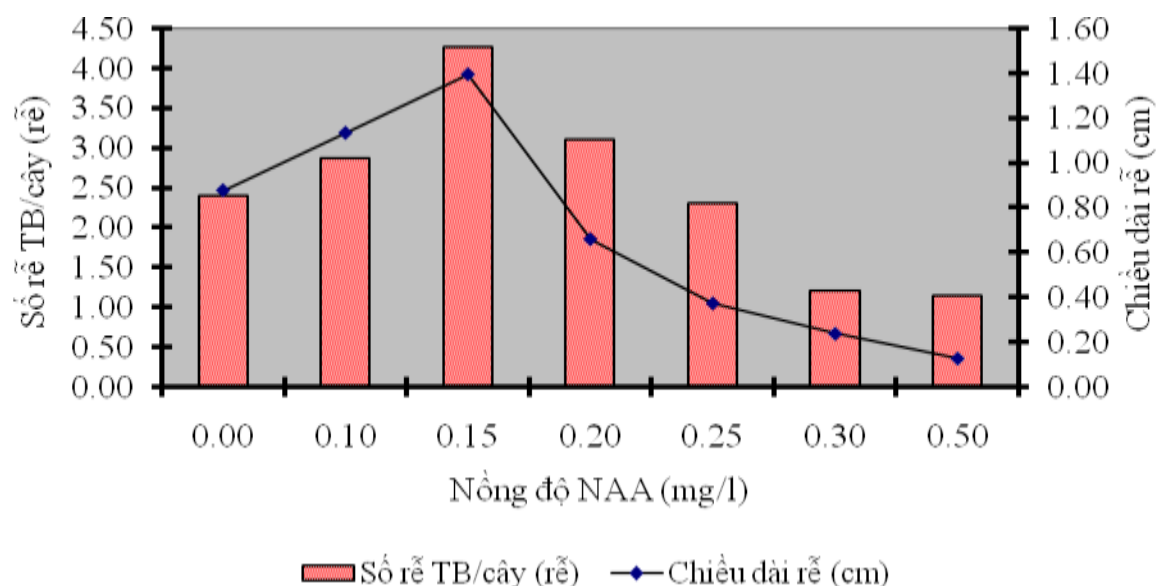
Trên thực tế, đồng tiền là loại cây có bộ rễ chùm nên để đảm bảo cây con sinh trưởng, phát triển tốt ngoài tự nhiên, việc nghiên cứu tạo bộ rễ khỏe, cứng cáp là yếu tố then chốt, quyết định thành công của giai đoạn này. Với mục đích trên, NAA được sử dụng trong giai đoạn này để nghiên cứu ảnh hưởng của nồng độ NAA đến sự ra rễ của chồi hoa đồng tiền. Sau 20 ngày nuôi cấy thu được kết quả sau:

Bảng 4.15. Ảnh hưởng của nồng độ NAA đến hiệu quả ra rễ

C T T N	Nồng độ NAA (mg/l)	Sau 20 ngày			
		Tỷ lệ ra rễ (%)	Số rễ/cây (r Ễ)	Chiều dài rễ (c m)	Màu sắc rễ
1	0,0 0	10 0	2,4 1 _d	0,88 _c	Trắng
2	0,1 0	10 0	2,8 7 _c	1,13 _b	Trắng
3	0,1 5	10 0	4,2 6_a	1,39_a	Trắng
4	0,2 0	10 0	3,1 0 _b	0,66 _d	Trắng
5	0,2 5	10 0	2,3 1 _d	0,38 _e	Trắng

6	0,3 0	10 0	1,2 1 _e	0,24 _f	Nâ u
7	0,5 0	10 0	1,1 5 _e	0,13 _g	Nâ u
<i>CV(%)</i>			5, 3	4, 4	

(a, b, c, d, e, f, g – là mức phân nhóm trong so sánh Duncan)



Đồ thị 4.19. Ảnh hưởng của nồng độ NAA đến số lượng rễ/cây và chiều dài rễ

Kết quả thu được trong bảng 4.15 và đồ thị 4.19 cho thấy: Trong tất cả các công thức thí nghiệm đều ra rễ đạt tỷ lệ 100%. Chứng tỏ rằng: chồi hoa đồng tiền có thể ra rễ ngay trong môi trường nền và môi trường có bổ sung NAA nồng từ 0,1mg/l đến 0,5 mg/l. Mặc dù tỷ lệ ra rễ không có sự khác biệt giữa các công thức có và không bổ sung NAA nhưng số rễ/cây và chiều dài rễ/cây lại có sự khác biệt. Cụ thể là:

Số rễ/cây dao động từ 1,15 rễ đến 4,26 rễ và được xếp theo thứ tự giảm dần trong so sánh duncan là a, b, c, d, e. Theo so sánh duncan: công thức 3 có số lượng rễ/cây đạt cao nhất là 4,26 rễ ở mức “a”; công thức 1 (không bổ sung NAA) và công thức 5 có số lượng rễ/cây là 2,41 rễ và 2,31 rễ ở mức “d”; các công thức trong các công thức 4 và công thức 2 có số rễ/cây cao hơn công thức 1 và được xếp ở mức “b” và “c”; công thức 6 và công thức 7 có số rễ/cây thấp hơn công thức 1 và được xếp ở mức “e”.

Chiều dài rễ/cây dao động từ 0,13 đến 1,39 cm và được xếp theo thứ tự giảm dần vào các nhóm phân mức trong so sánh duncan là a, b, c, d, e, f, g.

Trong đó, công thức 3 có số chiều dài rễ/cây đạt cao nhất là 1,39 cm, công thức 1 (không bổ sung NAA) có chiều dài rễ/cây là 0,88 rễ ở mức “c”, công thức 2 có chiều dài rễ/cây là 1,13 cm ở mức “b”, các công thức 4, 5, 6, 7 đều có chiều dài rễ thấp hơn công thức 1 (không bổ sung NAA) và được xếp theo thứ tự giảm dần trong so sánh duncan là “d”, “e”, “f”, “g”.

Với chỉ tiêu cảm quan là màu sắc rễ thì công thức và công thức 2, 3, 4 và 5 đều có rễ màu trắng, thích hợp cho cây sinh trưởng, phát triển trong giai đoạn vườn ươm. Công 6 và công thức 7 cho rễ màu nâu, không thích hợp cho cây sinh trưởng, phát triển trong giai đoạn vườn ươm.

Từ kết quả trên ta thấy: chồi hoa đồng tiền sinh trưởng trong môi trường nên có khả năng tự phát sinh rễ. Tuy nhiên chất lượng rễ lại chịu sự chi phối của nồng độ NAA. Nếu nồng độ NAA thích hợp sẽ có giúp chồi phát sinh bộ rễ tốt nhất (số lượng, chiều dài và màu sắc rễ phù hợp), tuy nhiên nếu nồng độ cao sẽ ức chế sự sinh trưởng của rễ thể hiện là số rễ giảm và chiều dài rễ giảm, rễ có hiện tượng nâu hóa.

Như vậy: công thức số 3 có bổ sung 0,15 mg NAA/l vào môi trường nền (MS + 30 gram saccharose/lít + 6.5 gram agar/lít, pH = 5.8) là thích hợp nhất để tạo cây hoàn chỉnh cho chồi hoa đồng tiền.



Hình 4.5. Hình ảnh ra rễ của chồi hoa đồng tiền nuôi cấy

mô

4.6. Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng giá thể đến sự sinh trưởng, phát triển của cây hoa đồng tiền sau in vitro.

Đưa cây ra giá thể là giai đoạn cuối cùng của quá trình nhân giống trong giai đoạn này đưa cây từ môi trường nhân tạo sang môi trường tự nhiên việc lựa chọn giá thể thích hợp cho sự sinh trưởng phát triển của cây rất quan trọng.

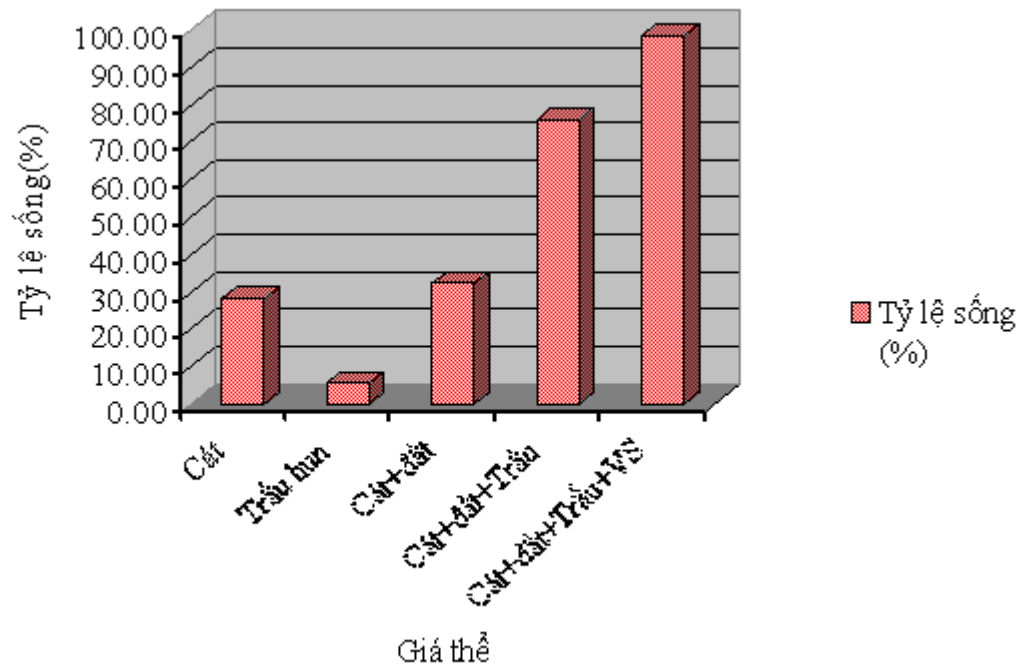
Mỗi một giá thể có đặc tính khác nhau. Mỗi loài cây trồng khác nhau trong giai đoạn vườn ươm phụ có yêu cầu khác nhau đối với điều kiện ngoại cảnh. Nhìn chung, giá thể tốt là giá thể có khả năng giữ ẩm tốt, thoát nước tốt và có khả năng cung cấp dinh dưỡng cho cây con giai đoạn đầu tiếp cận với môi trường sống tự nhiên. Hoa đồng tiền sau nuôi cây mô có yêu cầu rất chặt đối với điều kiện môi trường, độ ẩm phải lớn nhưng không bị úng, nhiệt độ môi trường không quá cao, giá thể sạch và có khả năng cung cấp dinh dưỡng cho giai đoạn cây con trong vườn ươm. Để xác định giá thể phù hợp, chúng tôi tiến hành thử nghiệm loại giá thể và kết quả thu được ở bảng sau:

Bảng 4.16. Nghiên cứu ảnh hưởng giá thể đến khả năng sinh trưởng phát triển của cây con sau nuôi cấy mô.

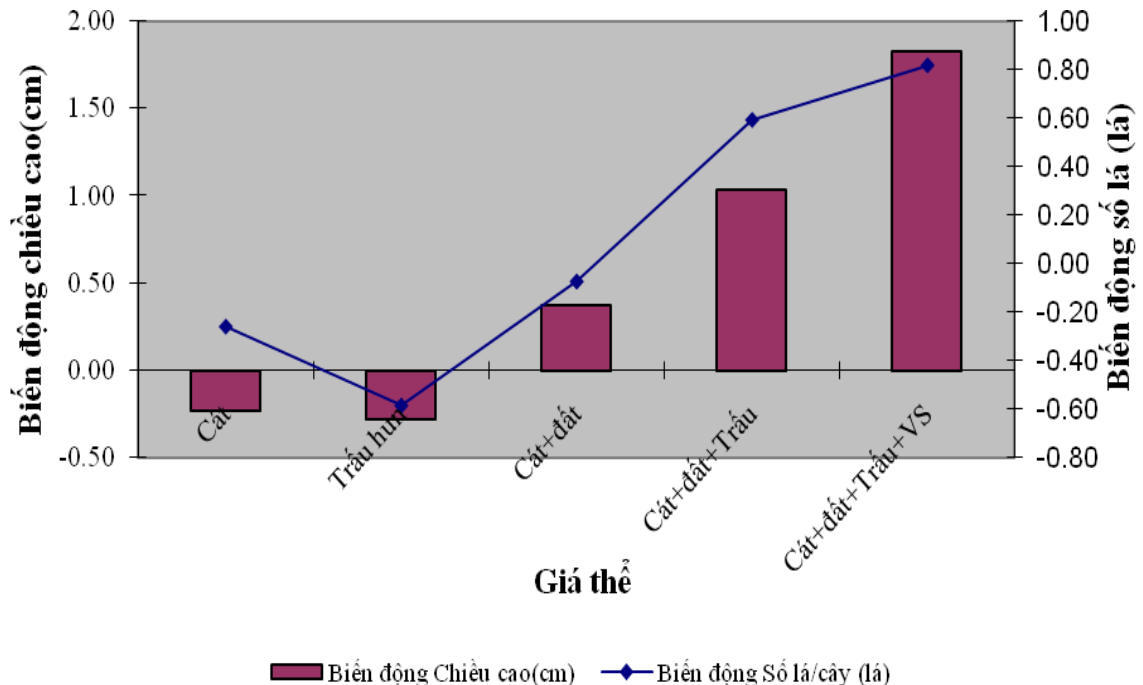
C T T N	Giá thể	Tỷ lệ sống (%)	Sau 30 ngày	
			Biến động chiều cao (cm)	Biến động Số lá/cây (lá)
1	Cát	28,33 ^c	-0,2 3 ^d	-0,26 ^d
2	Trấu hun	5,56 ^d	-0,2 8 ^e	-0,58 ^e
3	1Cát+1đất	32,22 ^c	0,3 7 ^c	-0,07 ^c
4	1Cát+1đất+1trấu hun	76,11 ^b	1,0 3 ^b	0,5 9 ^b
5	1Cát+1đất+1trấu hun	98,33^a	1,8^a	0,8 2^a

	+1/4vi sinh SG		3	
	CV(%)	7, 5	2, 3	6, 9

(a, b, c, d, e, - mức phân nhóm trong so sánh Duncan)



Đồ thị 4.20. Ảnh hưởng của giá thể đến tỷ lệ sống của cây con trong vườn ươm



Đồ thị 4.21. Ảnh hưởng của giá thể đến tăng trưởng chiều cao và số lá của cây con trong vườn ươm

Theo bảng 4.16 và đồ thị 4.20, 4.21 cho thấy: Các giá thể khác nhau cho cho thấy khả năng sống và sinh trưởng của cây con khác nhau:

Giá thể trấu hun (công thức 2) có khả năng thoát nước tốt, giữ nước kém và có thành phần Kali kiềm tính cao không thích hợp với hoa đồng tiền con, chiều cao và số lá mang giá trị âm, tỷ lệ sống sau 30 ngày đạt thấp nhất (5,56%) trong các giá thể thí nghiệm, ở mức “d” trong so sánh duncan.

Giá thể cát mặc dù trong những ngày đầu tiên cây phát triển tương đối tốt do cát có khả năng thoát nước tốt song cũng giữ nước kém và dễ bị rửa trôi các chất dinh dưỡng nên cây con chết nhiều sau 30 ngày, đồng thời cây mảnh và yếu. Tỷ lệ sống chỉ đạt 28,33% (ở mức “c” trong so sánh duncan), biến động chiều cao và số lá mang giá trị âm (lá bị chết, rụng).

Giá thể 1cát + 1đất cho tỷ lệ sống đạt 32,22%, được xếp vào kênh “c” trong so sánh duncan cùng với giá thể cát. Cây trong 20 ngày đầu sinh trưởng yếu, sau đó thì có hiện tượng sinh trưởng trở lại tuy không mạnh. Hiện tượng lá rụng vẫn còn nên biến động số lá mang giá trị âm. Tuy nhiên chiều cao cây đã bắt đầu tăng do sự xuất hiện của lá mới.

Giá thể ở công thức 4 (1Cát+1đất+1trấu hun) và công thức 5 (1Cát + 1đất + 1trấu hun + 1/4vi sinh SG) có tỷ lệ sống cao nhất (công thức 5 là 98,33– mức “a” trong so sánh duncan) và cao thứ 2 (công thức 4 đạt 76,11 – mức “b”trong so sánh duncan). Cây xuất hiện lá mới và tăng trưởng về chiều cao tốt. Trong đó, giá thể thể tốt nhất là giá thể ở công thức 5 (1Cát+1đất+1trấu hun +1/4vi sinh SG), cho tỷ lệ mẫu sống đạt 98,33% (ở kênh “a” trong so sánh duncan). Giá thể này cung cấp đầy đủ dinh dưỡng cho cây con, có khả năng giữ và thoát nước tốt vì sau 30 ngày cây trồng trên giá thể này cho cây phát triển khỏe mạnh, cứng cáp, bản lá mở rộng, màu xanh thẫm.

Một điểm đáng lưu ý khi trồng trên giá thể này là phải cho phân vi sinh xuống phía dưới vì trong giai đoạn đầu cây còn non, nhu cầu dinh dưỡng chưa cao.

Như vậy, giá thể thích hợp nhất cho cây đồng tiền trong giai đoạn vườn ươm là giá thể gồm đất, cát, trấu và phân vi sinh Sông Gianh được trộn theo tỷ lệ 1:1:1:1/4.



Hình 4.6. Hoa đồng tiền nuôi cấy mô sinh trưởng trên giá thể trong vườn ươm

Chương V

KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

5.1. Kết luận:

Sau khi tiến hành các thí nghiệm đề tài xin đưa ra một số kết luận sau trong nhân giống hoa đồng tiền (giống đại tuyết cam) bằng phương pháp nuôi cấy mô như sau:

1. Kỹ thuật khử trùng để hoa đồng tiền non tốt nhất là khử trùng bằng 0,1% HgCl₂ trong thời gian 10 phút.
2. Bổ sung 1,5 mg/lít 2,4 - D vào môi trường MS + 30 gram saccarose/lít + 6,5 gram agar/lít +, pH = 5,8 là tốt nhất để tạo callus từ đề hoa đồng tiền non.
3. Bổ sung 0,1 mg/l NAA vào môi trường MS + 30 gram saccarose/lít + 6,5 gram agar/lít + 1,0 mg/lít BAP + 0,2 mg/lít Kinetin + 0,1 mg/lít NAA, pH = 5,8 là thích hợp nhất cho tái sinh chồi từ callus.
4. Bổ sung 1,5 mg/lít BAP + 15% nước dừa vào môi MS + 30 gram saccarose/lít + 6,5 gram agar/lít +, pH = 5,8 mang lại hiệu quả cao nhất trong nhân nhanh chồi hoa đồng tiền sau tái sinh.
5. Bổ sung 0,15 mg/l NAA vào môi trường MS + 30 gram saccarose/lít + 6,5 gram agar/lít + 0,15 mg/lít NAA, pH = 5,8 mang lại hiệu quả ra rễ tốt nhất trong giai đoạn tạo cây hoàn chỉnh từ chồi hoa đồng tiền.
6. Giá thể ra cây hoa đồng tiền nuôi cấy mô tốt nhất đối với trong giai đoạn vườn ươm là giá thể đất, cát, trấu và phân vi sinh Sông Gianh được trộn theo tỷ lệ 1:1:1:1/4.

5.2. Đề nghị

1. Tiếp tục đưa giống hoa đồng tiền nuôi cấy mô ra ngoài sản xuất đồng ruộng để khảo sát sinh trưởng, phát triển và năng suất, chất lượng hoa.
2. Khảo sát quy trình trên một số giống hoa đồng tiền khác ngoài sản xuất như: Linh Long, Nhiệt đới Thảo nguyên, Bờ Biển Dương Quang...

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Tài liệu trong nước:

- 1 Nguyễn Thị Lý Anh (2005), *Sự tạo củ Lily in vitro và sự sinh trưởng của cây Lily trồng từ củ in vitro*, Tạp chí khoa học kỹ thuật nông nghiệp Tập III số 5
- 2 Ngô Xuân Bình, Nguyễn Thị Thuý Hà, 2000. *Giáo trình công nghệ sinh học*
- 3 Th.S Đặng Văn Đông và PGS.TS Đinh Thế Lộc, 2003- *Hoa đồng tiền*. NXB Lao Động – Xã Hội.
- 4 Đặng Thị Thanh Hương, 2002. *Nghiên cứu nhân giống hoa đồng tiền bằng phương pháp nuôi cấy in vitro*, Báo cáo thực tập tốt nghiệp, Trường đại học Nông Nghiệp 1 Hà Nội
- 5 Đỗ Tuấn Khiêm (2007), *Báo cáo tổng kết đề tài Nghiên cứu khả năng thích ứng và xây dựng mô hình sản xuất một số loài hoa giá trị cao tại Bắc Kạn*, Sở Công nghiệp-Khoa học và Công nghệ Bắc Kạn, tr. 4-45
- 6 Nguyễn Xuân Linh (1998), *Hoa và kỹ thuật trồng hoa*, Nxb Nông nghiệp Hà Nội.
- 7 Đoàn Thị Luyện, 2007- *Nghiên cứu tuyển chọn giống hoa đồng tiền tại Thái Nguyên* . Báo cáo thực tập tốt nghiệp, Trường Đại học Nông lâm Thái Nguyên
- 8 Nguyễn Hồng Minh, 2002- *Giáo trình di truyền học*. Đại học nông nghiệp I-Hà Nội
- 9 Hoàng Thị Nga, Nguyễn Thị Phương Hoa, Nguyễn Thị Giang, Nguyễn Quang Thạch, Nguyễn Thị Lý Anh - *Xây dựng quy trình nhân giống hoa đồng tiền bằng kỹ thuật cấy mô*. Tạp trí nông nghiệp và phát triển nông thôn, Số 8/2003

Dịch vụ viết báo cáo thực tập trọn gói website: luanvantot.com Zalo/tele 0934573149

10 Nguyễn Quang Thạch và CS, 2003 – *Bài giảng công nghệ sinh học thực vật*. Đại học NN I - Hà Nội

- 11 Nguyễn Văn Tới (2007), *Ứng dụng Khoa học công nghệ trong sản xuất hoa tại Đà Lạt, Thông tin khoa học công nghệ số 3/2007*, Sở khoa học công nghệ Lâm Đồng
- 12 PGS.TS Đào Thanh Vân(CB), Th.s Đặng Thị Tố Nga, 2006- *GT cây hoa*. Đại Học Nông Lâm Thái Nguyên.
- 13 Ngô Đăng Vịnh, Hà Thị Thúy, Dương Minh Nga - *Nghiên cứu hoàn thiện quy trình nhân nhanh các giống hoa đồng tiền nhập nội bằng công nghệ in vitro*- Tạp trí nông nghiệp và phát triển nông thôn, Số 8/2003, 1012-1014.
- 14 Đỗ Năng Vịnh, 2005. *Công nghệ tế bào thực vật ứng dụng*. NXB Nông Nghiệp
- 15 Đỗ Năng Vịnh, 2002. *CNSH cây trồng*. NXB Nông Nghiệp
- 16 Vũ Văn Vụ- Nguyễn Mộng Hùng- Lê Hồng Điệp, 2006- *Công nghệ sinh học*. NXB Giáo dục

Tài liệu nước ngoài

- 17 AIPH. (2004), *International statistics flower and plants*. Institut fyf Gartenbauökonomie der Universität Hannover. Volume 52
- 18 Buschman.J.C.M., Okubo.H., Miller.W.B., Chastagner.G.A. (2005), *Globalisation-flower-flower bulds-buld flowers*. Acta Horticulture, 673, pp. 27-33
- 19 Ha Tieu De, Trieu Thong Nhat, Lo Kim Vu, 2000, *gerbera flower*. NXB KHKT Giang To, Trung Quoc.
- 20 Jo Wijnands., 2005. *Sustainable International Networks in the flower Industry Bridging Empirical Findings and Theoretical Approaches*. ISHS.p.26-69
- 21 Street (1973), *Plant tissue and cell culture*, Bor Monogrvol, II Black Well Scient, Publ, London

- 22 KUMAR Surinder ; JITENDER KUMAR KANWAR, 2003, *PLANT EGENERATION FROM CELL SUSPENSIONS IN Gerbera jamesonii Bolus*

Các trang web truy cập

- 23 <http://www.flowerzone.co.nz/industry.html>
- 24 <http://www.p-maps.org>
- 25 <http://www.fao.org>, Yang Xiaohan, Liu Guangshu and Zhu Lu., 1996.
- 26 <http://www.rauhoaquavietnam.vn>
- 27 <http://xttm.agroviet.gov.vn/en/newsletter/2004/june.asp>

MÔI TRƯỜNG		Phô Biếu		
MS (1 lít)		Thành phần	Amount to take	Final
Nhóm phần	Thành phần	Dung dịch (g/l)	Preparation (ml)	Concentration (g/l)
I	NH ₄ NO ₃	20	1650	
	82.5 KNO ₃			
	MgSO ₄ · 7H ₂ O	95	370	1900
II	MnSO ₄ · 4H ₂ O	2.23		22.3
	ZnSO ₄ · 7H ₂ O	10.6		
	1.058			
III	CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.0025		0.025
	CaCl ₂ · 2H ₂ O		440	
	KI		0.83	
III	CoCl ₂ · 6H ₂ O	0.0025		0.025
	KH ₂ PO ₄		17	

IV	H ₃ BO ₃ 0.62 10	170 6.2		
	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O FeSO ₄ . 7H ₂ O	0.025 10	27.85 37.25	0.25
V	2.784 Na EDTA.2H O 3.724 2 2			
Vitamins		mg/100 ml Nicotinic acid 0.5 Glycine	100 0.5 100 2 2	
Hormones		Thiamine HCl 0.1 Pyridoxine HCl 0.5 NAA	100 0.1 100 0.5 10 10 1	
Inositol		Kinetin	10 10 1	100
Saccarose				30000
Agar				8000
PH	5.8			

	DANH MỤC BẢNG	tr ng
Bảng 4.1	Ảnh hưởng của của chất khử trùng oxy già đến tỷ lệ sống của đế hoa đồng tiền non	51
Bảng 4.2	Ảnh hưởng của chất khử trùng Clorox đến tỷ lệ sống của đế hoa đồng tiền non	53
Bảng 4.3	Ảnh hưởng của chất khử trùng thủy ngân ($HgCl_2$) đến tỷ lệ sống của đế hoa đồng tiền non	55
Bảng 4.4	So sánh kết quả nghiên cứu khử trùng của 3 loại hóa chất	57
Bảng 4.5	Ảnh hưởng của nồng độ NAA đến khả năng tạo mô sẹo của đế hoa đồng tiền non	59
Bảng 4.6	Nghiên cứu ảnh hưởng của nồng độ 2,4-D đến khả năng tạo mô sẹo của đế hoa đồng tiền non	61
Bảng 4.7	Ảnh hưởng của nồng độ BAP hoặc nồng độ Kinetin đến khả năng tái sinh chồi từ callus	65
Bảng 4.8	Ảnh hưởng của nồng độ Kinetin hoặc nồng độ Kinetin đến khả năng tái sinh chồi từ callus	67
Bảng 4.9	Ảnh hưởng phối hợp nồng độ TDZ và Kinetin đến khả năng tái sinh chồi từ callus	68
Bảng 4.10	Ảnh hưởng phối hợp BAP và Kinetin đến khả năng tái sinh chồi từ callus	70
Bảng 4.11	Ảnh hưởng phối hợp của những tổ hợp nồng độ BAP, Kinetin tốt nhất ($[BAP^*, K^*]$) với NAA đến khả năng tái sinh chồi	73
Bảng 4.12	Ảnh hưởng của nồng độ Kinetin đến hiệu quả nhân chồi	77

Bảng 4.13	Nghiên cứu ảnh hưởng của BAP đến hiệu quả nhân chồi	8
Bảng 4.14	Nghiên cứu ảnh hưởng sự phối hợp giữa nồng độ BAP tốt nhất và nồng độ nước dừa tới sự nhân nhanh của chồi hoa đồng tiền	0
Bảng 4.15	Nghiên cứu ảnh hưởng của nồng độ NAA đến hiệu quả ra rễ	8
Bảng 4.16	Nghiên cứu ảnh hưởng giá thể đến khả năng sinh trưởng phát triển của cây con sau nuôi cấy mô	7
		9
		0

DANH MỤC ĐỒ THỊ VÀ ẢNH

DANH MỤC ĐỒ THỊ

Phần II – Tổng quan tài liệu

Đồ thị 2.1	Diện tích trồng hoa và cây cảnh của một số nước trên thế giới (ha)	4
Đồ thị 2.2	Tình hình tiêu thụ hoa cắt trên đầu người và giá trị thị trường (100 triệu Euro) của một số nước trên thế giới	5

Phần IV – Kết quả và thảo luận

Đồ thị 4.1	Ảnh hưởng của của chất khử trùng oxy già đến tỷ lệ sống của đế hoa đồng tiền non	5
Đồ thị 4.2	Ảnh hưởng của chất khử trùng Clorox đến tỷ lệ sống của đế hoa đồng tiền non	2
Đồ thị 4.3	Ảnh hưởng của chất khử trùng thủy ngân (HgCl ₂) đến tỷ lệ sống của đế hoa đồng tiền non	5 4 5 6
Đồ thị 4.4	Ảnh hưởng của nồng độ NAA đến tỷ lệ hình thành mô sẹo của đế hoa đồng tiền non	5 9
Đồ thị 4.5	Nghiên cứu ảnh hưởng của nồng độ 2,4–D đến khả năng tạo mô sẹo của đế hoa đồng tiền non	6 1
Đồ thị 4.6	Ảnh hưởng của nồng độ BAP đến tỷ lệ bật chồi từ callus	6 5
Đồ thị 4.7	Ảnh hưởng của nồng độ BAP đến hệ số bật chồi từ callus	6 6
Đồ thị 4.8	Ảnh hưởng của nồng độ kinetin đến tỷ lệ bật chồi từ callus	6 7
Đồ thị 4.9	Ảnh hưởng phối hợp nồng độ TDZ và Kinetin đến tỷ lệ tái sinh chồi từ mô sẹo	6 9
Đồ thị	Ảnh hưởng phối hợp nồng độ TDZ và Kinetin đến hệ số	

4.10

tái sinh chồi từ mô sẹo

6

9

Bảng 4.11

Ảnh hưởng phối hợp nồng độ BAP và Kinetin đến tỷ lệ
chồi tái sinh chồi từ callus

7

1

Bảng 4.12	Ảnh hưởng phối hợp BAP và Kinetin đến tỷ lệ chồi tái sinh chồi từ callus	71
Đồ thị 4.13	Ảnh hưởng phối hợp của những tổ hợp nồng độ BAP, Kinetin tốt nhất với NAA đến tỷ lệ chồi tái sinh từ callus	73
Đồ thị 4.14	Ảnh hưởng phối hợp của những tổ hợp nồng độ BAP, Kinetin tốt nhất với NAA đến hệ số tái sinh chồi từ callus	74
Đồ thị 4.15	Ảnh hưởng của nồng độ Kinetin đến hệ số nhân chồi	77
Đồ thị 4.16	Ảnh hưởng của nồng độ BAP đến hệ số nhân chồi	80
Đồ thị 4.17	Ảnh hưởng phối hợp của BAP và nước dừa tới hệ số nhân chồi	83
Đồ thị 4.18	Ảnh hưởng phối hợp của BAP và nước dừa tới số lá và chiều cao cây	83
Đồ thị 4.19	Nghiên cứu ảnh hưởng của nồng độ NAA đến số lượng trung bình và chiều dài rễ trung bình	88
Đồ thị 4.20	Ảnh hưởng của giá thể đến tỷ lệ sống của cây con trong vườn ươm	91
Đồ thị 4.21	Ảnh hưởng của giá thể đến tăng trưởng chiều cao và số lá của cây con trong vườn ươm	91
DANH MỤC ẢNH		
Hình 4.1	Mẫu đế hoa đồng tiền non sạch bệnh	58
Hình 4.2	Một số hình ảnh callus	63

Hình 4.3	Một số hình ảnh phát triển của chồi tái sinh từ callus	7
		6
Hình 4.4	Một số hình ảnh nhân nhanh cụm chồi hoa đồng tiền	8
		6
Hình 4.5	Hình ảnh ra rễ của chồi hoa đồng tiền nuôi cấy mô	8
		9
Hình 4.6	Hoa đồng tiền nuôi cấy mô sinh trưởng trong giá thể ngo ài vườn ươm	9 3

**PHẦN SỬ LÝ SỐ
LIỆU**

SINGLE EFFECT ANOVA FOR UNBALANCED DATA FILE JAVEN 13/ 4/**
13:12

PAGE 1

**TN ANH HUONG CUA JAVEN DEN TY LE SONG CUA MAU
CAY**

ANOVA FOR SINGLE EFFECT - T

VARIATE	TREATMENT MS - DF	RESIDUAL MS - DF	F-RATIO
F-PROB			
TL SONG	234.96 12	0.51566 39	455.66
	0.000		

TABLE OF MEANS FOR FACTORIAL EFFECTS FILE JAVEN 13/ 4/** 13:12

PAGE 2

TN ANH HUONG CUA JAVEN DEN TY LE SONG CUA MAU CAY

MEANS FOR EFFECT T

T	NOS	TL SONG
1	4	0.0000
2	4	0.835000
3	4	1.67000
4	4	2.08500
5	4	2.50000
6	4	3.33000
7	4	4.58250
8	4	8.33000
9	4	12.0850
10	4	23.7475
11	4	13.7475
12	4	15.4175
13	4	17.9150
SE (4)		0.359046
N=		
5%L 39DF		1.02699
SD		

ANALYSIS OF VARIANCE SUMMARY TABLE FILE JAVEN 13/ 4/** 13:12

PAGE 3

VARIATE	GRAND MEAN	STANDARD DEVIATION	C OF V T
	(N= 52)		
	SD/MEAN NO.		BASED ON
	OBS.		% TOTAL SS
TL SONG	52 8.1727	7.4619	0.71809
		0.0000	8.8

TN ANH HUONG CUA O XY GIA DEN TY LE SONG CUA MAU CAY

VARIATE	SOURCE OF VARIATION	DF	SUMS OF SQUARE	MEAN SQUARE	F RATIO	PROB
L						
N						
1 T		8	421.446	52.6808	341.23	0.000

2

* RESIDUAL	27 4.16835	.154383
------------	------------	---------

* TOTAL (CORRECTED)	35 425.615	12.1604
---------------------	------------	---------

--- TABLE OF MEANS FOR FACTORIAL EFFECTS

FILE OXI GIA 13/

4/** 13:15

PAGE 2

TN ANH HUONG CUA O XY GIA DEN TY LE SONG CUA MAU CAY

MEANS FOR EFFECT T

-

T	NOS	TL SONG
1	4	0.0000
		00
2	4	0.0000
		00
3	4	1.25025
4	4	3.33300
5	4	6.25025
6	4	5.00000

```

7          4          6.667
              00
8          4          10.00
              00
9          4          8.333
              00
SE (      4)          0.1964
N=              58
5%L      27DF          0.5700
SD              48

```

 ANALYSIS OF VARIANCE SUMMARY TABLE FILE OXI GIA 13/ 4/** 13:15

----- PAGE 3

TN ANH HUONG CUA O XY GIA DEN TY LE SONG CUA MAU
 CAY

F-PROBABLIITY VALUES FOR EACH EFFECT IN THE MODEL. SECTION

- 1

VARIATE	GRAND MEAN (N= 36)	STANDARD DEVIATION	C OF V	T
	NO.	BASED ON TOTAL SS	BASED ON RESID SS	%
TL SONG	36 4.5371	3.4872	0.39292	8.7
		0.0000		

BALANCED ANOVA FOR VARIATE TL SONG FILE THUYNGAN 13/ 4/**
 13:20

----- PAGE 1

**TN ANH HUONG CUA THUY NGAN DEN TY LE SONG CUA MAU
 CAY**

VARIATE V003 TL SONG

L	SOURCE OF VARIATION	DF OF	SUMS SQUARE S	MEAN SQUAR ES	F RATIO PROB	E R L N
---	---------------------	----------	---------------------	---------------------	-----------------	------------------

=====

==

1	T	12	16143.5	1345.29	*****	0.000
---	---	----	---------	---------	-------	-------

2

*	RESIDUAL	39	50.0830	1.28418		
---	----------	----	---------	---------	--	--

 -

*	TOTAL (CORRECTED)	51	16193.6	317.521		
---	-------------------	----	---------	---------	--	--

TABLE OF MEANS FOR FACTORIAL EFFECTS FILE THUYNGAN 13/ 4/** 13:20

----- PAGE 2

TN ANH HUONG CUA THUY NGAN DEN TY LE SONG CUA MAU
 CAY

MEANS FOR EFFECT T

T	NOS	TL SONG
1	4	0.0000
		00
2	4	3.74750
3	4	7.91500
4	4	32.9175
5	4	58.7475
6	4	24.5825
7	4	40.8350
8	4	38.7500
9	4	23.7475
10	4	15.8350

11	4	9.16500
12	4	4.16500
13	4	1.25250
SE (4)		0.566608
N=		
5%L 39DF		1.62069
SD		

ANALYSIS OF VARIANCE SUMMARY TABLE FILE THUYNGAN 13/ 4/** 13:20
----- PAGE 3
TN ANH HUONG CUA THUY NGAN DEN TY LE SONG CUA MAU
CAY
F-PROBABLIITY VALUES FOR EACH EFFECT IN THE MODEL. SECTION - 1

VARIATE	GRA ND (N=	ME AN 52)	STANDARD DEVIATION ----- --	C OF V T	
	NO.		BASED ON ON	%	
	OBS.		TOTAL SS SS	RESID	
TL SONG	52	20.128	17.819	1.1332	5.6 0.0000

SO SANH ANH HUONG CUA OXY GIA, THUY NGAN, CLOROX DEN HIEU QUA KHU TRUNG

BALANCED ANOVA FOR VARIATE				N	FILE	SS	9/ 4/**	21:52													
-----								PAGE		1											
VARIATE V003 N																					
LN	SOURCE OF VARIATION			DF	SUMS OF	MEAN	F RATIO	PROB													
						ER SQUARES															
						SQUARES															
						LN															
=====																					
1	T			5	12630.1	2526.02	*****	0.000	2												
*	RESIDUAL			18	25.7476	1.43042															

*	TOTAL (CORRECTED)			23	12655.9	550.255															

BALANCED ANOVA FOR VARIATE				S	FILE	SS	9/ 4/**	21:52													
-----								PAGE		2											
VARIATE V004 S																					
L	SOURCE OF VARIATION			DF	SUMS	MEAN	F RATIO														
N				OF			PROB														
					SQUARE	SQUAR															
					S	ES															
=====																					
==																					
1	T			5	7716.06	1543.21	*****	0.000													
*	RESIDUAL			18	9.03822	.502124			2												

*	TOTAL (CORRECTED)			23	7725.10	335.874															

--- BALANCED ANOVA FOR VARIATE				C	FILE	SS	9/ 4/**	21:52													
-----								PAGE		3											
VARIATE V005 C																					
L	SOURCE OF VARIATION			DF	SUMS	MEAN	F RATIO														
N				OF			PROB														
					SQUARE	SQUAR															
					S	ES															
=====																					
==																					
1	T			5	1024.72	204.943	379.22	0.000													
*	RESIDUAL			18	9.72773	.540429			2												

*	TOTAL (CORRECTED)			23	1034.44	44.9759															

--- TABLE OF MEANS FOR FACTORIAL EFFECTS						FILE	SS	9/ 4/**													
21:52																					
-----								PAGE		4											
MEANS FOR EFFECT T																					

-																					

	T	NOS	N	S	C
1		4	70.4175	23.7475	5.83500
2		4	73.7475	17.9150	8.33000
3		4	86.2525	10.0000	3.74750
4		4	84.1650	8.33000	7.50000
5		4	27.4975	58.7475	13.7475
6		4	35.8350	40.8350	23.3300

SE (	4)	0.598001	0.354303	0.3675
N=				70
5%L	18DF	1.77675	1.05269	1.092
SD				10

-				
ANALYSIS OF VARIANCE SUMMARY TABLE FILE SS 9/ 4/** 21:52				
-----				PAGE
53sx				


```
-
* TOTAL (CORRECTED)                27 23393.9      866.440
-----
--- TABLE OF MEANS FOR FACTORIAL EFFECTS          FILE MS-24D      30/
3/**                      2:43
----- PAGE      2
                        Tao mo seo bang 2,4D(ty le tao callus)
MEANS FOR EFFECT T
-----
---

      T      NOS      %MOSEO
1          4          0.0000
              00
2          4          20.0000
3          4          65.4150
4          4          90.4175
```

```

5          4          36.25
          00
6          4          52.91
          75
7          4          18.33
          25
SE (      4)          0.7498
N=          29
5%L      21DF          2.205
SD          23
-----

```

ANALYSIS OF VARIANCE SUMMARY TABLE FILE MS-24D 30/ 3/** 2:43
----- PAGE 3

Tao mo seo bang 2,4D(ty le tao callus)
F-PROBABLIITY VALUES FOR EACH EFFECT IN THE MODEL. SECTION
- 1

VARIATE	GRAND MEAN (N= 28)	STANDARD DEVIATION	C OF V T SD/MEAN
	NO.	BASED ON TOTAL SS	BASED ON RESID SS
	OBS.		%
%MOSEO	28 40.476	29.435	1.4997 3.7
		0.0000	

BALANCED ANOVA FOR VARIATE %BATCHOI FILE KINETIN 11/ 4/**
2: 2

----- PAGE 1

Anh huong cua nong do kinetin toi tai sinh choi

VARIATE V003 %BATCHOI	LN	SOURCE OF VARIATION	DF	SUMS OF SQUARES	MEAN SQUARES	F RATIO	PROB	ER LN
1 T			4	29.5704	7.39260	*****	0.000	2
* RESIDUAL			15	.631061E-05	.420708E-06			
* TOTAL (CORRECTED)			19	29.5704	1.55634			

BALANCED ANOVA FOR VARIATE HSBAT FILE KINETIN 11/ 4/** 2: 2
----- PAGE 2

Anh huong cua nong do kinetin toi tai sinh choi

VARIATE V004 HSBAT	L	SOURCE OF VARIATION	DF	SUMS OF SQUARES	MEAN SQUAR ES	I RATIO PROB	E R L N
1 T			4	4.80000	1.20000	*****	0.000 2
* RESIDUAL			15	.861786E-07	.574524E-08		
* TOTAL (CORRECTED)			19	4.80000	.252632		

TABLE OF MEANS FOR FACTORIAL EFFECTS FILE KINETIN 11/ 4/** 2: 2
----- PAGE 3

Anh huong cua nong do kinetin toi tai sinh choi

MEANS FOR EFFECT T

T	NOS	%BATCHOI	HSBAT
1	4	0.0000	0.0000
		00	00
2	4	0.0000	0.0000
		00	00

3	4	1.11000	1.00000
4	4	3.33000	1.00000
5	4	1.11000	1.00000
SE (	4)	0.324310E-	0.378987E-
N=		03	04
5%L	15DF	0.977584E-	0.114240E-
SD		03	03

ANALYSIS OF VARIANCE SUMMARY TABLE FILE KINETIN 11/ 4/** 2: 2
----- PAGE 4

Anh huong cua nong do kinetin toi tai sinh choi
F-PROBABLIITY VALUES FOR EACH EFFECT IN THE MODEL. SECTION

- 1

VARIATE	GRAND MEAN	STANDARD DEVIATION
	C OF V T (N= 20)	
	----- SD/MEAN	NO.
	BASED ON	BASED ON
	OBS.	TOTAL SS RESID SS
%BATCHOI	20	1.247
	1.1100	5
HSBAT	20	0.5026
	0.60000	2

	0.64862E-	0.1
	03	0.0000
	0.75797E-	0.0
	04	0.0000

BALANCED ANOVA FOR VARIATE %BATCHOI FILE BAP 11/ 4/** 1:29
----- PAGE 1

Anh huong cua BAP den tai sinh choi

VARIATE V003 %BATCHOI						
L	SOURCE OF VARIATION	DF	SUMS	MEAN	F RATIO	E
N		OF	SQUARE	SQUAR	PROB	R
			S	ES		L
=====						
==						
1	T	4	114.607	28.6517	232.54	0.000
					2	
	* RESIDUAL	15	1.84815	.123210		

-						
	* TOTAL (CORRECTED)	19	116.455	6.12921		

--- BALANCED ANOVA FOR VARIATE HSBAT FILE BAP 11/ 4/** 1:29
----- PAGE 2

Anh huong cua BAP den tai sinh choi

VARIATE V004 HSBAT						
L	SOURCE OF VARIATION	DF	SUMS	MEAN	F RATIO	E
N		OF	SQUARE	SQUAR	PROB	R
			S	ES		L
=====						
==						
1	T	4	4.13822	1.03456	87.38	0.000
					2	
	* RESIDUAL	15	.177600	.118400E-01		

-						
	* TOTAL (CORRECTED)	19	4.31582	.227148		

TABLE OF MEANS FOR FACTORIAL EFFECTS FILE BAP 11/ 4/** 1:29
----- PAGE 3

Anh huong cua BAP den tai sinh choi

MEANS FOR EFFECT T				

	T	NOS	%BATCHOI	HSBAT
1		4	6.67000	1.87250
2		4	10.2775	2.89250
3		4	4.44000	1.81250
4		4	6.94750	2.20250
5		4	3.33000	1.58500
SE (	4)		0.175506	0.544059E-01
N=				
5%L	15DF		0.529038	0.163999
SD				

ANALYSIS OF VARIANCE SUMMARY TABLE FILE BAP 11/ 4/** 1:29
----- PAGE 4

Anh huong cua BAP den tai sinh choi

```

F-PROBABLIITY VALUES FOR EACH EFFECT IN THE MODEL. SECTION - 1
VARIATE      GRAND MEAN  STANDARD  DEVIATION  C OF V |T      |
              (N=    20)  ----- SD/MEAN |
              NO.          |
              | OBS.      |
              |
%BATCHOI      2    6.333    2.475    0.35101    5.5
              0    0        7          0.0000
      HSBAT    2    2.073    0.4766    0.10881    5.2
              0    0        0          0.0000

BALANCED ANOVA FOR VARIATE %BATCHOI  FILE BAP&KI  29/ 3/** 22: 4
----- PAGE 1
Tai sinh choi bang phoi hop BAP va Kinetin
VARIATE V003 %BATCHOI
LN      SOURCE OF VARIATION      DF  SUMS OF      MEAN      F RATIO PROB  ER
              SQUARES      SQUARES
=====
=
1 T              8 345.564      43.1955      631.04 0.000

* RESIDUAL              27 1.84817      .684509E-
              01
-----
--
* TOTAL (CORRECTED)              35 347.412      9.92607

```


BALANCED ANOVA FOR VARIATE					
VARIATE V004 HSBAT		DF	SUMS	MEAN	F RATIO
SOURCE OF VARIATION		OF	SQUARE	SQUAR	PROB
			S	ES	
1	T	7	46.1696	6.59566	352.99 0.000
*	RESIDUAL	24	.448449	.186854E-01	2
*	TOTAL (CORRECTED)	31	46.6181	1.50381	

TABLE OF MEANS FOR FACTORIAL EFFECTS					FILE TDZ	29/ 3/** 22:36
					----- PAGE	
					3	
Tai sinh chôi bang phôi hop cua TDZ va Kinetin						
MEANS FOR EFFECT T						

	T	NOS	%BATCHOI	HSBAT		
1		4	0.0000	0.0000		
			00	00		
2		4	1.11000	3.00000		
3		4	3.60750	2.39500		
4		4	8.05750	1.82750		
5		4	10.2775	2.16000		
6		4	14.4400	3.52000		
7		4	4.44000	2.31250		
8		4	0.0000	0.0000		
			00	00		
SE (	4)		0.169933	0.683472E-		
N=				01		
5%L	24DF		0.495986	0.199486		
SD						

ANALYSIS OF VARIANCE SUMMARY TABLE FILE TDZ 29/ 3/** 22:36				
----- PAGE 4				
Tai sinh chôi bang phôi hóp của TDZ và Kinetin				
F-PROBABLIITY VALUES FOR EACH EFFECT IN THE MODEL. SECTION - 1				
VARIATE	GRA ND (N=)	ME AN 32)	STANDARD DEVIATION	C OF V T
	NO.		BASED ON	SD/MEAN
	OBS.		TOTAL SS	RESID
			SS	
%BATCHOI	3	5.24	5.002	0.339
	2	16	3	87
HSBAT	3	1.90	1.226	0.136
	2	19	3	69

BALANCED ANOVA FOR VARIATE %BATCHOI FILE BAPKINAA 30/ 3/** 9:20				
----- PAGE 1				
Tai sinh chôi bang su phôi hóp của BAP;Kinetin; NAA				
VARIATE V003 %BATCHOI	DF	SUMS	MEAN	F RATIO
L SOURCE OF VARIATION	OF	SQUARE	SQUAR	PROB
N		S	ES	
=====				
1 T	5	3658.62	731.723	***** 0.000
* RESIDUAL	18	4.00354	.222419	2

* TOTAL (CORRECTED)	23	3662.62	159.244	

--- BALANCED ANOVA FOR VARIATE HS BAT FILE BAPKINAA 30/ 3/** 9:20				

----- PAGE 2				
Tai sinh chôi bang su phôi hóp của BAP;Kinetin; NAA				
VARIATE V004 HS BAT BAT BAT BAT BAT BAT BAT BAT	DF	SUMS OF	MEAN	F RATIO PROB
LN SOURCE OF VARIATION		SQUARES	SQUARES	ER
=====				
=				

```

1 T                                5 63.1411      12.6282      678.26 0.000  2
* RESIDUAL                        18 .335131      .186184E-01
-----

```

```

-
* TOTAL (CORRECTED)              23 63.4762      2.75983
-----

```

```

-
TABLE OF MEANS FOR FACTORIAL EFFECTS  FILE BAPKINAA   30/ 3/**   9:20
----- PAGE 3

```

```

                                Tai sinh choi bang su phoi hop cua BAP;Kinetin; NAA
MEANS FOR EFFECT T
-----

```

```

---
      T      NOS      %BATCHOI      HS BAT
1          4        36.1150        5.20750
2          4        7.78000        2.81750
3          4        5.83750        1.80750
4          4        3.60750        1.69000
5          4        1.38750        1.12500
6          4         0.0000         0.0000
                        00          00

```

SE(N= 4) 0.235806 0.682247E-01
5%LSD 18DF 0.700615 0.202705

ANALYSIS OF VARIANCE SUMMARY TABLE FILE BAPKINAA 30/ 3/** 9:20
PAGE 4
Tai sinh choi bang su phoi hop cua BAP;Kinetin; NAA
F-PROBABLIITY VALUES FOR EACH EFFECT IN THE MODEL. SECTION
- 1

VARIATE	GRAND MEAN (N= 24)	STANDARD DEVIATION	C OF V T SD/MEAN
	NO.	BASED ON TOTAL SS	BASED ON RESID SS
	OBS.		%
%BATCHOI	24 9.1212	12.619	0.47161
HS BAT	24 2.1079	1.6613	0.13645
		0.0000	6.5

BALANCED ANOVA FOR VARIATE HS NHAN FILE BAP 31/ 3/** 21:21
PAGE 1

Nhan nhanh bang BAP(he so nhan choi)

BALANCED ANOVA FOR VARIATE HSN FILE BAP 30/ 3/** 9: 7
PAGE 1

Anh huong cua BAP toi he so nhan choi

VARIATE V003 HSN	DF	SUMS OF SQUARE S	MEAN SQUAR ES	F RATIO PROB	E R L N
1 T	6	136.374	22.7289	503.75	0.000
* RESIDUAL	21	.947504	.451192E-01		
* TOTAL (CORRECTED)	27	137.321	5.08597		

TABLE OF MEANS FOR FACTORIAL EFFECTS FILE BAP 30/ 3/** 9: 7
PAGE 2

Anh huong cua BAP toi he so nhan choi

MEANS FOR EFFECT T

1 4 1.000

2

3

4

5

6

4 5.750
00

7

4 3.350
00

SE(

4)

0.1062

N=

06

5%L

21DF

0.3123

SD

51

--- T NOS HSN

 --- ANALYSIS OF VARIANCE SUMMARY TABLE FILE BAP 30/ 3/** 9: 7
 ----- PAGE 3

Anh huong cua BAP toi he so nhan choi
 F-PROBABLIITY VALUES FOR EACH EFFECT IN THE MODEL. SECTION - 1
 VARIATE GRAND MEAN STANDARD DEVIATION C OF V |T |
 (N= 28) ----- SD/MEAN |
 | NO. BASED ON BASED ON % |
 | OBS. TOTAL SS RESID SS |
 |
 HSN 28 4.5821 2.2552 0.21241 4.6
 0.0000

Nhan nhanh bang Kinetin(he so nhan)

BALANCED ANOVA FOR VARIATE HSN FILE KINETIN 30/ 3/** 8:21
 ----- PAGE 1

Anh huong cua nong do kinetin den he so nhan choi
 VARIATE V003 HSN
 L SOURCE OF VARIATION DF SUMS MEAN F RATIO PROB
 N OF SQUARE SQUAR LN
 S ES
 =====
 ==
 1 T 6 89.6586 14.9431 779.64 0.000
 2
 * RESIDUAL 21 .402502 .191668E-
 01

 * TOTAL (CORRECTED) 27 90.0611 3.33560

TABLE OF MEANS FOR FACTORIAL EFFECTS FILE KINETIN 30/ 3/** 8:21
 ----- PAGE 2

Anh huong cua nong do kinetin den he so nhan choi
 MEANS FOR EFFECT T

---	T	NOS	HSN
1		4	1.00000
2		4	2.15000
3		4	6.02500
4		4	5.52500
5		4	3.92500
6		4	2.50000
7		4	1.75000
SE(N= 4)			0.692220E-01
5%LSD 21DF			0.203580

 ANALYSIS OF VARIANCE SUMMARY TABLE FILE KINETIN 30/ 3/** 8:21
 ----- PAGE 3

Anh huong cua nong do kinetin den he so nhan choi
 F-PROBABLIITY VALUES FOR EACH EFFECT IN THE MODEL. SECTION
 - 1

VARIATE	GRAND MEAN (N= 28)	STANDARD DEVIATION	C OF V T SD/MEAN
	NO.	BASED ON TOTAL SS	BASED ON RESID SS
	OBS.		%
HSN	28 3.2679	1.8264	0.13844
		0.0000	4.2

Nhan nhanh bang BAP+Nuc ruu(He so nhan, chieu cao, so la)

BALANCED ANOVA FOR VARIATE HS FILE BAP+ND 30/ 3/** 20:14
 ----- PAGE 1

ANH HUONG CUA BAP+NUOC DUA TOI NHAN NHANH CHOI DONG
 TIEN VARIATE V003 HS

LN	SOURCE OF VARIATION	DF	SUMS OF SQUARES	MEAN SQUARES LN	F RATIO	PROB
1	T	6	.258571	.430952E-01	1.00	0.450
*	RESIDUAL	21	.902500	.429762E-01		
* TOTAL (CORRECTED)		27	1.16107	.430026E-01		

BALANCED ANOVA FOR VARIATE CC FILE BAP+ND 30/ 3/** 20:14
 ----- PAGE 2

ANH HUONG CUA BAP+NUOC DUA TOI NHAN NHANH CHOI DONG
 TIEN

LN	SOURCE OF VARIATION	DF	SUMS OF SQUARES	MEAN SQUARES	F RATIO	PROB	ER LN
1	T	6	5.28689	.881148	45.34	0.000	
*	RESIDUAL	21	.408100	.194333E-01			2
* TOTAL (CORRECTED)		27	5.69499	.210925			

--- BALANCED ANOVA FOR VARIATE SL FILE BAP+ND 30/ 3/** 20:14
 ----- PAGE 3

ANH HUONG CUA BAP+NUOC DUA TOI NHAN NHANH CHOI DONG
 TIEN

VARIATE V005 SL

L N	SOURCE OF VARIATION	DF	SUMS OF	MEAN	F RATIO	PROB ER	LN
			SQUARES	SQUAR ES			
=====							
1	T	6	3.67857	.613095	34.80	0.000	2

```
* RESIDUAL                21 .370000      .176190E-01
-----
* TOTAL (CORRECTED)       27 4.04857      .149947
-----
--- TABLE OF MEANS FOR FACTORIAL EFFECTS                FILE BAP+ND      30/
3/** 20:14
```

```
----- PAGE      4
              ANH HUONG CUA BAP+NUOC DUA TOI NHAN NHANH CHOI DONG
              TIEN
```

MEANS FOR EFFECT T

```
-----
              T          NOS          HS          C          S
              T          C          L
1              4          7.17500      4.19750      3.12500
2              4          7.20000      4.53500      3.22500
3              4          7.40000      5.39250      3.50000
4              4          7.45000      5.50250      4.30000
5              4          7.27500      5.20250      3.42500
6              4          7.25000      5.09500      3.32500
7              4          7.22500      5.07000      3.30000
SE (          4)          0.103654      0.697017E-      0.663684E-
N=              01              01
5%L      21DF          0.304843      0.204991      0.195188
SD
-----
```

```
ANALYSIS OF VARIANCE SUMMARY TABLE  FILE BAP+ND      30/ 3/** 20:14
----- PAGE      5
              ANH HUONG CUA BAP+NUOC DUA TOI NHAN NHANH CHOI DONG
              TIEN F-PROBABLIITY VALUES FOR EACH EFFECT IN THE MODEL. SECTION - 1
```

```
VARIATE          GRA      ME      STANDARD          C OF V |T
ND      AN      DEVIATION
(N=      28      -----      SD/MEAN |
 )      --
NO.          BASED ON      BASED          %      |
OBS.          TOTAL SS      RESID          |
              SS
          HS      2  7.28      0.2073      0.207      2  0.45
              8  21          7          31          .  01
              8
          CC      2  4.99      0.4592      0.139      2  0.00
              8  93          7          40          .  00
              8
          SL      2  3.45      0.3872      0.132      3  0.00
              8  71          3          74          .  00
              8
```

Ra re bang NAA(so luong re TB, chieu dai re TB)

VARIATE V003 SL RE TB RE TB RE TB

```
L      SOURCE OF VARIATION          DF      SUMS          MEAN          F RATIO PROB
N      OF          SQUARE          SQUAR          ER          LN
              S          ES
=====
==
1 T          6 28.4812      4.74687      272.83 0.000
              2
* RESIDUAL          21 .365373      .173987E-
              01
-----
* TOTAL (CORRECTED)          27 28.8466      1.06839
-----
```

```
BALANCED ANOVA FOR VARIATE CHIEUDAI  FILE NAA      30/ 3/** 0:25
----- PAGE      2
              Ra re bang NAA(so luong re TB, chieu dai re TB)
```

VARIATE V004 CHIEUDAI							
LN	SOURCE OF VARIATION			DF	SUMS OF SQUARES	MEAN SQUARES	F RATIO PROB ER LN
1	T			6	5.36249	.893748	991.73 0.000 2
*	RESIDUAL			21	.189252E-01	.901200E-03	
*	TOTAL (CORRECTED)			27	5.38141	.199312	

--- TABLE OF MEANS FOR FACTORIAL EFFECTS FILE NAA 30/ 3/** 0:25
 ----- PAGE 3

Ra re bang NAA(so luong re TB, chieu dai re TB)

MEANS FOR EFFECT T

T	NOS	S RE TB	CHIEUDAI
1	4	2.4075	0.8775
		0	00
2	4	2.8675	1.132
		0	50
3	4	4.2625	1.392
		0	50

```
4          4          3.10000      0.660000
5          4          2.31250      0.375000
6          4          1.21250      0.240000
7          4          1.15000      0.130000
SE (      4)          0.659521E-    0.150100E-
N=              01              01
5%L    21DF          0.193964      0.441441E-
SD                          01
```

ANALYSIS OF VARIANCE SUMMARY TABLE FILE NAA 30/ 3/** 0:25

----- PAGE 4

Ra re bang NAA(so luong re TB, chieu dai re
TB) F-PROBABLIITY VALUES FOR EACH EFFECT IN THE MODEL. SECTION - 1

VARIATE	GRAND MEAN	STANDARD DEVIATION		
C OF V T	(N= 28)			
SD/MEAN	NO.			
BASED ON	BASED ON	%		
OBS.	TOTAL SS	RESID SS		
SL RE TB	28 2.4732	1.0336	0.13190	5.3 0.0000
CHIEUDAI	28 0.68679	0.44644	0.30020E-01	4.4 0.0000

BALANCED ANOVA FOR VARIATE SLA FILE BD CC 13/ 4/**
13:39

----- PAGE 1

ANH HUONG CUA GIA THE DEN CAY CON TRONG VUON UOM

VARIATE V003 SLA

L	SOURCE OF VARIATION	DF	SUMS OF	MEAN	F RATIO	E	
N			SQUARES	SQUAR	PROB	R	
				ES		L	
						N	
1	T	4	4.15071	1.03768	*****	0.000	2
*	RESIDUAL	10	.467246E-03	.467246E-04			

* TOTAL (CORRECTED) 14 4.15117 .296512

BALANCED ANOVA FOR VARIATE CCAO FILE BD CC 13/ 4/** 13:39

----- PAGE 2

ANH HUONG CUA GIA THE DEN CAY CON TRONG VUON UOM

VARIATE V004 CCAO

L	SOURCE OF VARIATION	DF	SUMS OF	MEAN	F RATIO	PROB	
N			SQUARES	SQUAR	ER		
				ES		LN	
1	T	4	9.65677	2.41419	*****	0.000	2
*	RESIDUAL	10	.160020E-02	.160020E-03			

* TOTAL (CORRECTED) 14 9.65837 .689884

BALANCED ANOVA FOR VARIATE %SONG FILE BD CC 13/ 4/** 13:39

----- PAGE 3

ANH HUONG CUA GIA THE DEN CAY CON TRONG VUON UOM

VARIATE V005 %SONG

L	SOURCE OF VARIATION	DF	SUMS	MEAN	F RATIO	PROB
N		OF	SQUARE	SQUAR	ER	
			S	ES		LN
1	T	4	17348.8	4337.20	334.68	0.000

					2
* RESIDUAL					10 129.594 12.9594

-					
* TOTAL (CORRECTED)					14 17478.4 1248.46

--- TABLE OF MEANS FOR FACTORIAL EFFECTS					FILE BD CC 13/ 4/**
13:39					
					----- PAGE 4
ANH HUONG CUA GIA THE DEN CAY CON TRONG VUON UOM					
MEANS FOR EFFECT T					

T	NOS	S L A	CCAO	%SONG	
1	3	-.260000	-.230000	27.77	
2	3	-.583333	-.283333	67	5.556
3	3	-.733333E-	0.370000	67	32.22
4	3	01	1.03667	33	76.11
5	3	0.593333	1.83333	00	98.33
		0.816667		33	

```

SE(N=      3)                0.394650E-02  0.730342E-02  2.07841
5%LSD  10DF                0.124356E-01  0.230133E-01  6.54914
-----
--- ANALYSIS OF VARIANCE SUMMARY TABLE                FILE BD CC      13/ 4/**
13:39
----- PAGE      5
              ANH HUONG CUA GIA THE DEN CAY CON TRONG VUON UOM
F-PROBABLIITY VALUES FOR EACH EFFECT IN THE MODEL. SECTION - 1
  VARIATE      GRAND MEAN  STANDARD  DEVIATION  C OF V |T
              (N=      15)  ----- SD/MEAN |
              | NO.      BASED ON  BASED ON  %      |
              | OBS.      TOTAL SS   RESID SS              |
              |
    SLA        15 0.98667E-010.54453    0.68355E-02  6.9
              0.0000
    CCAO        15 0.54533    0.83059    0.12650E-01  2.3
              0.0000
    %SONG       15 48.000     35.334     3.5999      7.5
              0.0000

```