

NGHIÊN CỨU NHÂN GIỐNG *in vitro* CÂY NGHIÊN GÂN BA (*Excentrodendron tonkinense* (A.Chev.)) H.T.Chang & R.H.Miau

Đặng Thị Thu Hà^{1,*}, Nguyễn Thanh Tiến¹, Phạm Thu Hà¹,
Lê Sĩ Hồng¹, Nguyễn Công Hoan¹, Vũ Văn Thông¹

¹ Trường Đại học Nông Lâm, Đại học Thái Nguyên

*Email: dangthithuha@tuaf.edu.vn

TÓM TẮT

Nghiên gân ba (*Excentrodendron tonkinense*) là loài cây gỗ quý có giá trị kinh tế và bảo tồn cao, hiện đang chịu áp lực suy giảm quần thể tự nhiên do khai thác quá mức. Nghiên cứu này được thực hiện nhằm bước đầu xây dựng quy trình nhân giống *in vitro* cho loài thông qua các giai đoạn tạo mẫu sạch, nhân nhanh chồi, kéo dài chồi, tạo rễ và huấn luyện cây con. Kết quả cho thấy, xử lý mẫu bằng HgCl₂ 0,1% trong 5 phút cho tỷ lệ mẫu sạch đạt 63,33% và tỷ lệ mẫu tái sinh đạt 56,67%. Môi trường MS bổ sung 1,5 mg/L BAP, 0 - 0,2 mg/L NAA, 30 g/L sucrose và 7 g/L agar cho hệ số nhân chồi 2,3 - 2,5 lần, với chiều cao chồi trung bình 1,60 - 1,87 cm sau 6 tuần nuôi cấy. Ở giai đoạn kéo dài chồi, môi trường MS bổ sung 1,5 mg/L BAP và 0,2 mg/L kinetin cho chiều cao chồi trung bình cao nhất, đạt 3,20 cm sau 6 tuần. Môi trường MS bổ sung 1,0 mg/L NAA thích hợp nhất trong số các công thức khảo sát cho quá trình tạo rễ, với tỷ lệ chồi ra rễ đạt 50%, trung bình 2,5 rễ/chồi và chiều dài rễ đạt 2,0 cm. Cây con được huấn luyện trong điều kiện *ex vitro* trong 10 ngày trước khi chuyển sang giá thể gồm 80% đất tầng B và 20% xơ dừa đạt tỷ lệ sống 100% sau thời gian theo dõi, cây sinh trưởng khỏe, lá xanh đậm và rễ bắt đầu bám giá thể. Kết quả nghiên cứu cung cấp cơ sở bước đầu cho việc hoàn thiện quy trình nhân giống *in vitro* và phát triển nguồn cây giống phục vụ bảo tồn Nghiên gân ba.

Từ khoá: *Excentrodendron tonkinense*, Nghiên gân ba, nhân giống *in vitro*, BAP, NAA, huấn luyện cây con.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Nghiên gân ba (*Excentrodendron tonkinense*) là thực vật có hoa trong chi Nghiên (*Excentrodendron*) thuộc họ Đay Tiliaceae, Bộ: Bông Malvales [1]. Gỗ Nghiên gân ba thuộc gỗ nhóm 2 theo bảng phân loại nhóm gỗ Việt Nam, đây là loại gỗ quý, màu nâu đỏ, cứng, thớ thẳng, vân đẹp, ít co rút, dùng đóng thuyền và để xây dựng; cũng thường được dùng làm thớt, làm bệ các tượng mỹ nghệ cao cấp. Tuy có khu vực phân bố rộng ở các Khu Bảo Tồn thiên nhiên Pà Cò - Hang Kia, Hữu Liên và Vườn Quốc gia Ba Bể, nhưng vẫn xảy ra tình trạng khai thác trái phép. Loài đang đứng trước nguy cơ bị tuyệt chủng ngoài thiên nhiên [2]. Vì vậy, việc phát triển các công nghệ nhân giống nhân tạo để phục vụ công tác bảo tồn và phục hồi rừng là một yêu cầu cấp bách. Để giải quyết bài toán nguồn giống, các phương pháp nhân giống vô tính truyền thống đã bước đầu được nghiên cứu. Đáng chú ý là nghiên cứu của Trần Xuân Hùng (2020) [3] về đặc điểm

sinh học và thử nghiệm giâm hom cây Nghiên gân ba, cùng nghiên cứu của Nông Bảo Chung (2021) [4] tại Trường Đại học Nông Lâm, Đại học Thái Nguyên về việc tối ưu hóa giá thể và chất điều hòa sinh trưởng trong kỹ thuật giâm hom. Các kết quả này đã chứng minh khả năng ra rễ của hom Nghiên gân ba và mở ra triển vọng sản xuất cây con không qua hạt. Tuy nhiên, phương pháp giâm hom truyền thống vẫn tồn tại những hạn chế khi áp dụng vào thực tiễn bảo tồn và sản xuất quy mô lớn như: Hệ số nhân giống thấp và phụ thuộc mùa vụ, rào cản từ tuổi sinh lý của cây mẹ, nguy cơ thoái hóa và dịch bệnh. Trong khi đó, kỹ thuật nhân giống *in vitro* (nuôi cấy mô tế bào thực vật) trên cây Nghiên gân ba là một trong những kỹ thuật công nghệ tiên tiến có thể giúp tạo ra nguồn cây giống Nghiên gân ba có độ đồng đều cao, sạch bệnh trong thời gian ngắn phục vụ tốt cho công tác bảo tồn và phát triển loài cây quý hiếm này. Cho đến nay, các công bố về quy trình nhân giống (từ khử trùng mẫu, nhân nhanh chồi, kích thích ra rễ đến huấn luyện cây con ngoài

tự nhiên) cho loài cây này đã có nghiên cứu từng giai đoạn nhưng chưa có quy trình hoàn chỉnh. Vì vậy, việc nghiên cứu nhân giống Nghiến gân ba (*Excentrodendron tonkinense*) bằng kỹ thuật nuôi cấy mô nhằm góp phần bảo tồn và phát triển loài thực vật nguy cấp này.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng và vật liệu nghiên cứu

- Đối tượng nghiên cứu: Loài Nghiến gân ba (*E. tonkinense*)

- Vật liệu nghiên cứu: Chồi bánh tẻ cây mẹ Nghiến gân ba do Trường Đại học Nông Lâm, Đại học Thái Nguyên cung cấp.

- Điều kiện hấp vô trùng các môi trường nuôi cấy: Môi trường MS cơ bản [5] có bổ sung + 30 g/l Sucrose + 7 g/l agar, pH = 5,8. Điều kiện chiếu sáng: 10 giờ/ngày. Cường độ ánh sáng 2.000 – 3.000 lux. Nhiệt độ phòng nuôi 25 ± 2°C.

2.1.1. Phương pháp bố trí thí nghiệm và thu thập số liệu

2.1.1.1. Ảnh hưởng kỹ thuật khử trùng đến khả năng tạo mẫu sạch

- Chồi bánh tẻ chứa mắt ngủ, cắt bỏ lá được rửa sạch bằng nước lã sau đó ngâm mẫu trong nước xà phòng đặc, dùng chổi lông để rửa mẫu, sau đó rửa lại cho sạch dưới vòi nước chảy. Rửa lại mẫu bằng nước cất 2 - 3 lần, đựng mẫu trong bình có nút đảm bảo sạch. Khử trùng mẫu cấy: Thực hiện trong hộp cấy vô trùng, đầu tiên mẫu được rửa bằng nước cất vô trùng 2 - 3 lần, mỗi lần rửa khoảng 2 - 3 phút. Mẫu cấy được lắc trong cồn 70⁰ trong thời gian 30 giây và rửa sạch bằng nước cất vô trùng. Sau đó, được khử trùng bằng HgCl₂ 0,1% với thời gian 4, 5, 6 và 7 phút. Sau khi khử trùng đổ bỏ hết dung dịch diệt khuẩn HgCl₂ và lắc mạnh bằng nước cất đã vô trùng 3 - 5 lần (mỗi lần từ 3 - 5 phút). Mẫu được dùng panh và kéo để cắt bỏ bớt những phần mô bị thâm do ngâm dung dịch thủy ngân hoặc những phần mẫu quá già, rồi cấy vào môi trường MS + 30 g/l Sucrose + 7 g/l agar, pH môi trường = 5,8 (mẫu cấy có chiều dài 2 - 3 cm, có ít nhất 1 mắt ngủ). Thí nghiệm gồm 4 công thức, mỗi công thức lặp lại 3 lần lặp lại, mỗi lần lặp lại 5 chai (6 mẫu/1 chai). Sau 4 tuần nuôi cấy, các chỉ tiêu thu thập là số mẫu sạch nảy chồi, số mẫu sạch chết và số mẫu nhiễm.

2.1.1.2. Ảnh hưởng của chất điều hoà sinh trưởng đến khả năng nhân nhanh chồi

Mẫu sạch được tạo ra ở thí nghiệm 1 được chuyển sang các loại môi trường MS nuôi cấy có bổ sung 30 /l Sucrose + 7 g/l agar + BAP (1,0 - 2 mg/l) + Kinetin (0,5 - 1.0 mg/l) + NAA (0,2 mg/l), pH = 5,8. Thí nghiệm gồm 10 công thức, mỗi công thức lặp lại 3 lần, mỗi lần lặp lại 5 chai, mỗi chai 6 mẫu. Theo dõi sau 6 tuần nuôi cấy, các chỉ tiêu thu thập là số mẫu tạo cụm chồi, hệ số nhân chồi, chiều cao chồi.

2.1.1.3. Ảnh hưởng của nồng độ Kinetin đến khả năng kích thích tăng trưởng chồi

Để tiếp tục nghiên cứu khả năng kích thích tăng trưởng chồi, sử dụng công thức nhân nhanh chồi tốt nhất ở thí nghiệm 2 tiếp tục chuyển sang môi trường MS + 30 g/l Sucrose + 7 g/l agar có bổ sung thêm BAP (1,5 mg/l), Kinetin (0,2 - 0,6 mg/l). Thí nghiệm gồm 4 công thức, mỗi công thức lặp lại 3 lần, mỗi lần lặp lại 5 chai, mỗi chai 6 mẫu. Sau 6 tuần nuôi cấy, các chỉ tiêu thu thập là số mẫu tạo cụm chồi, hệ số nhân chồi, chiều cao chồi.

2.1.1.4. Ảnh hưởng của nồng độ NAA và IBA đến khả năng tạo rễ chồi in vitro

Chồi có chiều cao từ 2,5 - 3 cm, sinh trưởng tốt được cho ra rễ trên môi trường MS được bổ sung 30 g/l Sucrose + 7 g/l agar, + IBA (0,5 - 1,5 mg/l) + NAA (0,5 - 2 mg/l), pH = 5,8. Thí nghiệm gồm 7 công thức, mỗi công thức lặp lại 3 lần, mỗi lần lặp lại 5 chai, mỗi chai 6 mẫu. Sau 4 tuần nuôi cấy, các chỉ tiêu thu thập là: Đếm số chồi ra rễ, số lượng rễ/chồi, đo chiều dài rễ, chất lượng rễ

2.1.1.5. Nghiên cứu ảnh hưởng của thời gian huấn luyện cây mô trong bình đến khả năng sống ở giai đoạn vườn ươm

Các bình cây mô hoàn chỉnh được đưa ra ngoài huấn luyện trong điều kiện nhà huấn luyện có mái che bằng nhựa, xếp bình cây trên các giàn trong thời gian 0, 5, 10 và 15 ngày trước khi cấy sang bầu. Sau thời gian huấn luyện, cây con được đem ra trồng thử nghiệm trên giá thể là 80% đất tầng B + 20% sơ dừa. Các công thức đều được chăm sóc ở cùng chế độ che sáng 50%, trong một tháng đầu, cùng chế độ tưới nước (các công thức đều được chăm sóc ở cùng chế độ che sáng 50%, trong một tháng đầu, cùng chế độ tưới nước (1 ngày/1 lần). Thí nghiệm bố trí theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên, 3 lần lặp lại, 30 cây/công

thức/lần lặp. Sau 30 ngày tiến hành thu thập số liệu về tỉ lệ cây sống và chất lượng cây.

2.2. Phương pháp xử lý số liệu

Số liệu thu thập được xử lý bằng phần mềm Excel và SPSS [5]

* Tính toán các chỉ tiêu thu thập:

$$\text{Tỷ lệ mẫu sạch nảy chồi (\%)} = \frac{\text{Số mẫu sạch nảy chồi}}{\text{Tổng số mẫu cây}} \times 100$$

$$\text{Hệ số nhân chồi (lần)} = \frac{\text{Số chồi tạo sạch}}{\text{Tổng số chồi cây ban đầu}} \times 100$$

$$\text{Tỷ lệ ra rễ (\%)} = \frac{\text{Số chồi ra rễ}}{\text{Tổng số chồi cây ban đầu}} \times 100$$

- Phân tích phương sai các nhân tố bố trí theo khối ngẫu nhiên đầy đủ và kiểm tra sai dị lớn nhất theo tiêu chuẩn Duncan bằng phần mềm SPSS 20.0 theo Nguyễn Hải Tuất & cs (2005) [5].

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

3.1. Ảnh hưởng thời gian khử trùng mẫu đến khả năng tạo mẫu sạch Nghiến gân ba

Kết quả khử trùng chồi bằng HgCl_2 0,1% trong 4 phút cho thấy tỉ lệ mẫu sạch đạt thấp nhất (23,33%), nhưng tất cả các mẫu sạch đều có

thể tái sinh tạo chồi. Khi thời gian khử trùng tăng lên 5 phút, tỷ lệ mẫu sạch tái sinh đạt cao nhất (56,67%). Thời gian khử trùng tăng từ 6 - 7 phút, tỷ lệ mẫu tái sinh trên số mẫu sạch giảm dần. Thời gian khử trùng 7 phút tỷ lệ mẫu sạch đạt cao nhất là 83,33% nhưng do bị xử lý bằng HgCl_2 0,1% trong thời gian dài nên bị hóa đen và chết mà không có khả năng tái sinh tạo chồi. Theo Đinh Thị Huyền (2006) [7], bước đầu nhân giống cây Vù Hương cho thấy, khử trùng mẫu bằng HgCl_2 0,1% trong thời gian 7 phút cho kết quả tốt nhất với 30% mẫu nảy chồi chất lượng chồi tốt. Điều này chứng tỏ, đối với chồi Nghiến gân ba thời gian khử trùng càng dài thì khả năng tái sinh chồi càng giảm. HgCl_2 không chỉ diệt nấm, vi khuẩn mà còn ảnh hưởng đến sức sống mẫu, bởi đây là một chất cực độc với tế bào sống, ngấm nhanh vào tế bào gây chết tế bào hoặc mất khả năng nảy chồi. Kết quả phân tích phương sai cho thấy Sig. = 0,0001 < 0,05. Điều này chứng tỏ số mẫu sạch tái sinh chồi chịu ảnh hưởng rõ rệt bởi thời gian khử trùng bằng HgCl_2 0,1% (Bảng 1).

Bảng 1. Ảnh hưởng của thời gian khử trùng bằng HgCl_2 0,1% đến khả năng tạo mẫu sạch của Nghiến gân ba

Công thức thí nghiệm	Thời gian khử trùng (phút)	Số mẫu cây (mẫu)	Số mẫu sạch		Số mẫu sạch tái sinh chồi	
			N (mẫu)	Tỉ lệ (%)	N (mẫu)	Tỉ lệ (%)
CT1	4	90	21	23,33	21	23,33
CT2	5	90	57	63,33	55	61,11
CT3	6	90	72	80,00	18	20,00
CT4	7	90	75	83,33	0	0
Sig.			0,0001		0,0001	

Như vậy, công thức khử trùng bằng HgCl_2 0,1% đối với cây Nghiến gân ba trong 5 phút là

thích hợp nhất, cho tỉ lệ mẫu sạch cao và cũng không gây ức chế nảy chồi hoặc chết mẫu.



Hình 1. Chồi Nghiến gân ba tái sinh sau 4 tuần nuôi cấy

3.2. Ảnh hưởng của loại và nồng độ chất điều hòa sinh trưởng đến khả năng nhân nhanh chồi Nghiến gân ba

Nồng độ chất điều hòa sinh trưởng, tỷ lệ auxin và cytokinin ảnh hưởng đến quá trình cảm ứng tạo thể chồi (PLBs). Trong đó, NAA là một loại auxin có tác dụng kích thích sự phân hóa và

sinh trưởng của mô sẹo hay thể chồi. BAP là một loại cytokinin được dùng phổ biến trong việc kích thích phân hóa chồi ở nhiều loài thực vật [8]. Bảng 2 cho thấy thay đổi nồng độ BAP (1,0 - 2,0 mg/l) đã ảnh hưởng rõ rệt đến tỉ lệ mẫu tạo cụm chồi, hệ số nhân chồi, chiều cao chồi cũng như chất lượng chồi (Sig. < 0,05).

Bảng 2. Ảnh hưởng của loại và nồng độ chất điều hòa sinh trưởng đến khả năng tạo cụm chồi Nghiến gân ba

Công thức thí nghiệm	Chất điều hòa sinh trưởng (mg/l)			Số chồi thí nghiệm (chồi)	Số chồi tạo cụm chồi		Hệ số nhân chồi (lần)	Chiều cao chồi trung bình (cm)	Chất lượng chồi
	BAP	Kinetin	NAA		N	Tỷ lệ %			
ĐC	-	-	-	90	0	0	0	0	
NC1	1,0	-	0,2	90	80	88,88	2,2	0,9	++
NC2	1,0	-	-	90	75	83,33	2,0	1,17	+++
NC3	1,5	-	0,2	90	90	100,00	2,5	1,87	+++
NC4	1,5	-	-	90	90	100,00	2,3	1,60	+++
NC5	2	-	0,2	90	77	85,55	2,0	1,37	++
NC6	2	-	-	90	75	83,33	1,9	1,50	++
NC7	-	0,5	0,2	90	0	0	0	0	
NC8	-	0,5	-	90	3	3,33	1,3	0,37	+
NC9	-	1,0	0,2	90	8	8,88	1,4	0,47	+
NC10	-	1,0	-	90	6	6,67	1,2	0,40	+
PTPS	Sig.				0,0001		0,0001	0,0001	

Ghi chú: PTPS: Phân tích phương sai; +++: Chất lượng chồi tốt (chồi cao, mập và đồng đều, màu xanh đậm); ++: Chất lượng trung bình (chồi cao, mập, các chồi trong cụm không đồng đều, màu xanh); +: Chất lượng chồi kém (chồi thấp, không đồng đều, màu xanh nhạt).

Với công thức ĐC - không sử dụng chất điều hòa sinh trưởng, dễ dàng nhận thấy chồi Nghiến gân ba ở tất cả lần lặp không cảm ứng tạo cụm chồi. Khi bổ sung BAP sử dụng nồng độ 1,0 mg/l kết hợp NAA nồng độ 0,2 mg/l cho tỷ lệ tạo cụm chồi đạt 88,88%, hệ số nhân chồi đạt 2,0 lần, chiều cao chồi đạt 0,9 cm và chất lượng chồi đạt trung bình. Khi tăng BAP nồng độ 1,5 mg/l kết hợp NAA nồng độ 0,2 mg/l thì tỷ lệ tạo cụm chồi đạt 100%, hệ số nhân chồi đạt 2,5 lần và chiều cao chồi đạt 1,87 cm và chất lượng chồi đạt tốt. Khi tăng BAP nồng độ 2 mg/l kết hợp NAA nồng độ 0,2 mg/l thì tỷ lệ tạo cụm chồi đạt 85%, hệ số nhân chồi đạt 2,2 lần và chiều cao chồi đạt 1,37 cm và chất lượng chồi đạt trung bình. Do vậy, công thức MS + 30 g /l Sucrose + 7 g agar + 1,5 mg/l BAP + (0 - 0,2) mg/l NAA là công thức đem lại hiệu quả tạo cụm chồi tốt nhất. Kết quả nghiên

cứu của Khuất Thị Hải Ninh và Nguyễn Thị Thơ (2022) [9], nhân giống cây Đinh mật (*Fernandoa brilletii* (Dop.) Steenis) cho thấy, môi trường MS + 1,5 mg/l BAP cho tỉ lệ mẫu tái sinh chồi cao nhất (đạt 88,9%), chiều cao chồi lớn nhất (đạt 2,13 cm) và nhân chồi cây Màng tang trong môi trường 0,2 mg/l NAA + 1,5 mg/l BAP với hệ số nhân 3,86 lần [10]. Chứng tỏ, bản chất di truyền của từng loài quyết định sự khác biệt trong quá trình tái sinh chồi.

3.3. Ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng đến khả năng kích thích tăng trưởng chồi

Sau thời gian tạo cụm chồi, để tiếp tục nghiên cứu khả năng tăng trưởng chồi, chồi Nghiến gân ba được cấy chuyển sang môi trường MS + 30 /l Sucrose + 7 g /l agar + 1,5 mg/l BAP có bổ sung thêm Kinetin. Sau 6 tuần cấy chuyển, kết quả được tổng hợp ở bảng 3.

Bảng 3. Khả năng kích thích tăng trưởng chồi của Nghiến gân ba trong môi trường MS có bổ sung BAP + Kinetin

Công thức thí nghiệm	Chất điều hòa sinh trưởng (mg/l)		Số chồi thí nghiệm (chồi)	Số chồi tạo cụm chồi		Hệ số nhân chồi (lần)	Chiều cao chồi trung bình (cm)	Chất lượng chồi
	BAP	Kinetin		N	Tỷ lệ %			
TTC1	1,5	0	90	90	100,00	2,5	1,87	+++
TTC2	1,5	0,2	90	90	100,00	2,7	3,20	+++
TTC3	1,5	0,4	90	88	96,67	2,5	2,70	+++
TTC4	1,5	0,6	90	84	93,33	2,2	2,13	++
PTPS	Sig.			0,0001		0,04	0,0001	

Ghi chú: PTPS: Phân tích phương sai; +++: Chất lượng chồi tốt (chồi cao, mập và đồng đều, màu xanh đậm); ++: Chất lượng trung bình (chồi cao, mập, các chồi trong cụm không đồng đều, màu xanh); +: Chất lượng chồi kém (chồi thấp, không đồng đều, màu xanh nhạt).

Bảng 3 cho thấy, khi sử dụng môi trường MS + 1,5 mg/l BAP và có bổ sung Kinetin ở nồng độ thay đổi từ 0 - 0,6 mg/l có ảnh hưởng rõ rệt đến khả năng tạo cụm chồi, hệ số nhân chồi, chiều cao chồi cũng như chất lượng chồi (Sig. < 0,05).

Công thức bổ sung 1,5 mg/l BAP + 0,2 mg/l Kinetin cho giá trị tất cả các chỉ tiêu theo dõi đều

đạt ngưỡng tốt nhất, tương ứng với tỷ lệ chồi tạo cụm chồi là 100%, hệ số nhân chồi 2,7 lần, chiều cao chồi đạt vượt trội lên đến 3,2 cm. Với chiều cao chồi tốt, chồi mập khỏe, cứng cáp, xanh đậm nên hoàn toàn đủ tiêu chuẩn chuyển sang giai đoạn ra rễ tạo cây *in vitro* hoàn chỉnh.



Hình 2. Chồi/cụm chồi Nghiến gân ba khi vừa cấy chuyển (hình trái) và sau 6 tuần cấy chuyển (hình phải) trong môi trường TTC2

3.4. Ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng đến khả năng ra rễ tạo cây hoàn chỉnh

Kết quả kiểm tra thống kê cho thấy có sai khác giữa các công thức thí nghiệm ở tất cả các chỉ tiêu như tỉ lệ chồi ra rễ, số rễ/chồi, chiều dài rễ (Sig < 0,05). Nghiên cứu này cho thấy, các loại môi trường khác nhau có chất điều hòa sinh trưởng với các nồng độ khác nhau cũng đã ảnh hưởng đến quá trình tạo cây hoàn chỉnh loài Nghiến gân ba.

Bảng 4 cho thấy, công thức ĐC không bổ sung chất điều hòa sinh trưởng nhóm auxin chồi Nghiến gân ba hoàn toàn không ra rễ. Nhóm công

thức bổ sung 0,5 - 1,5 mg/l IBA đều không thích hợp tới khả năng ra rễ của chồi Nghiến gân ba, cho tỷ lệ ra rễ rất thấp (0 - 5,5%), chất lượng rễ chỉ ở mức trung bình; chồi Nghiến gân ba sau 3 tuần cấy chuyển gần như không sinh trưởng, chồi chuyển màu vàng, yếu ớt. Theo kết quả nghiên cứu của Dương Công Kiên (2003) [11], việc sử dụng khoáng đa lượng ở các giai đoạn tạo cây cần nồng độ thấp sẽ chỉ thích hợp cho một số loài cây. Môi trường có bổ sung 0,5 - 2,0 mg/l NAA khá phù hợp với sinh trưởng và kích thích hình thành rễ ở loài Nghiến gân ba. Sau gần 4 tuần cấy chuyển chồi sinh trưởng tốt, thân mập, xanh đậm, tỷ lệ chồi ra rễ thay đổi từ 10 - 50%, chất lượng rễ

từ trung bình đến tốt. Trong đó, công thức môi trường MS + 1,0 mg/l NAA cho tỷ lệ chồi ra rễ cao nhất (đạt 50% số lượng chồi), số rễ trung bình khá cao (2,5 rễ/chồi) với chiều dài rễ là 2,0 cm, chất lượng rễ tốt (rễ trắng đục, mập và phân nhánh thứ cấp). Khi tăng nồng độ NAA lên 1,5 - 2 mg/l tỷ lệ chồi ra rễ giảm dần xuống 10 - 15,5%, số rễ

(1,7 - 2,1 rễ/chồi) và chiều dài rễ (1,5 - 1,8 cm), chất lượng rễ cũng giảm dần. Như vậy, môi trường MS có bổ sung 30 g /l Sucrose + 7 g /l agar + 1,0 mg/l NAA là môi trường phù hợp nhất đến khả năng hình thành rễ, tạo cây *in vitro* Nghiến gân ba hoàn chỉnh.

Bảng 4. Ảnh hưởng của loại và nồng độ chất điều hòa sinh trưởng đến khả năng ra rễ của chồi Nghiến gân ba

Công thức thí nghiệm	Chất điều hòa sinh trưởng (mg/l)		Số chồi thí nghiệm (chồi)	Số chồi ra rễ		Số rễ trung bình/ chồi (rễ)	Chiều dài rễ trung bình (cm)	Chất lượng rễ
	NAA	IBA		N (chồi)	Tỷ lệ (%)			
ĐC	-	-	90	0	0	0	0	-
R1	0,5	-	90	23	25,55	1,6	1,8	Trung bình
R2	1,0	-	90	45	50	2,5	2,0	Tốt
R3	1,5	-	90	14	15,5	2,1	1,8	Trung bình
R4	2,0	-	90	9	10	1,7	1,5	Trung bình
R5	-	0,5	90	0	0	0	0	-
R6	-	1,0	90	5	5,5	1,8	1,3	Trung bình
R7	-	1,5	90	0	0	0	0	-
Sig.				0,0001		0,0001	0,0001	

3.5. Ảnh hưởng của thời gian huấn luyện đến khả năng sống của cây Nghiến gân ba khi ra cây

Trong điều kiện nuôi cây *invitro* cây luôn được cung cấp đầy đủ chất dinh dưỡng và được nuôi cấy trong điều kiện ổn định về dinh dưỡng, khoáng, vitamin... thích hợp cho từng giai đoạn nuôi cấy nên trước khi chuyển cây ra trồng ngoài tự nhiên cần huấn luyện để cây thích nghi, tăng tỉ lệ sống.

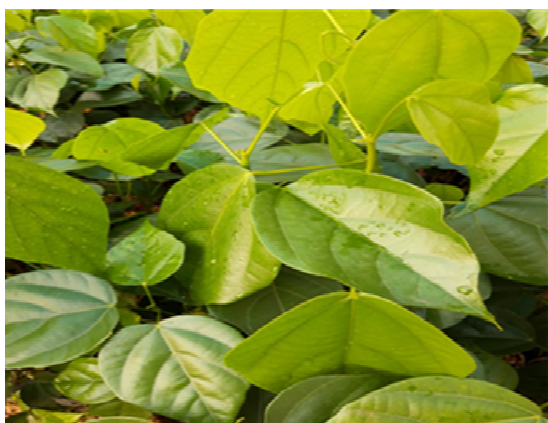
Để xác định ảnh hưởng của thời gian huấn luyện đến tỷ lệ sống của cây, tiến hành thử nghiệm với 4 công thức thí nghiệm. Sau thời gian huấn luyện, cây con được đem ra trồng thử nghiệm trên giá thể là 80% đất tầng B + 20% sơ dừa. Các công thức đều được chăm sóc ở cùng chế độ che sáng 50%, cùng chế độ tưới nước (1 ngày/1 lần). Sau 30 ngày tiến hành thu thập số liệu và kết quả được tổng hợp tại bảng 5.

Bảng 5. Ảnh hưởng của thời gian huấn luyện đến khả năng sống của Nghiến gân ba khi ra cây

Công thức thí nghiệm	Thời gian huấn luyện (ngày)	N (cây)	Tỷ lệ cây sống (%)	Chất lượng cây
ĐC	0	90	20,00	Cây yếu, lá xanh vàng
HL1	5	90	83,33	Chồi cao, mảnh, các chồi trong cụm không đồng đều, màu xanh.
HL2	10	90	100	Cây khỏe, lá xanh đậm, rễ bắt đầu bám giá thể
HL3	15	90	100	Cây khỏe, lá xanh đậm, rễ bắt đầu bám giá thể
PTPS	Sig.		0,0001	

Ghi chú: PTPS: Phân tích phương sai

Kết quả kiểm tra thống kê cho thấy $\text{Sig.} = 0,0000 < 0,05$ chứng tỏ tỷ lệ sống của cây Nghiến gân ba ở các thời gian huấn luyện khác nhau là có sự khác nhau rõ rệt và tăng dần theo thời gian huấn luyện. Khi đưa cây ra giá thể không qua thời gian huấn luyện cây yếu, cây nhỏ, thân yếu, rễ bám giá thể yếu nên thường bị héo, rễ khô và chết dần. Tỷ lệ sống ở công thức đối chứng chỉ đạt 20%. Qua thời gian huấn luyện tỷ lệ, cây sống cũng tăng dần lên 83,33% ở 5 ngày huấn luyện và đạt đến 100% khi huấn luyện từ 10 ngày trở lên. Thời gian huấn luyện 5, 10 và 15 ngày không chỉ có sai khác rõ về tỷ lệ sống mà còn ảnh hưởng rõ đến chất lượng cây con, khả năng bám giá thể của rễ và sự sinh trưởng của cây con. Nhìn chung, thời gian huấn luyện càng tăng thì chất lượng và sự sinh trưởng của cây con càng tốt. Theo Khuất Thị Hải Ninh và Nguyễn Thị Thơ, (2022) [9], nghiên cứu nhân giống *in vitro* cây Đinh mật (*Fernandoa brilletii* (Dop.) Steenis) cần được huấn luyện cây mô trong thời gian 20 ngày trong điều kiện ánh sáng tán xạ là phù hợp tỉ lệ cây sống đạt 91,1%. Như vậy, đối với cây Nghiến gân ba, ở các công thức huấn luyện 10, 15 ngày là hai công thức huấn luyện tốt nhất. Tuy nhiên, trong nuôi trồng đại trà chỉ cần lựa chọn công thức huấn luyện 10 ngày, không chỉ cho tỷ lệ sống cao mà còn rút ngắn được toàn bộ quy trình nuôi cấy.



Hình 3. Cây Nghiến gân ba trồng trong bầu đất

4. KẾT LUẬN

Công thức khử trùng hiệu quả nhất để tạo mẫu sạch, mẫu sạch tái sinh chồi cây Nghiến gân ba là sử dụng HgCl_2 0,1% trong 5 phút cho tỉ lệ mẫu sạch là 63,33% và tỉ lệ mẫu tái sinh là 56,67%.

Công thức môi trường $\text{MS} + 1,5 \text{ mg/l BAP} + (0 - 0,2) \text{ mg/l NAA} + 30 \text{ g/l Sucrose} + 7 \text{ g/l agar}$

cho hệ số nhân chồi 2,3 - 2,5 lần và chiều cao chồi 1,6 - 1,87 cm. Thời gian của một chu kỳ cấy chuyển là 6 tuần.

Công thức môi trường $\text{MS} + 30 \text{ /l Sucrose} + 7 \text{ g /l agar} + 1,5 \text{ mg/l BAP} + 0,2 \text{ mg/l Kinetin}$ là công thức đem lại hiệu quả tăng trưởng chồi tốt nhất đối với loài Nghiến gân ba. Sau 6 tuần nuôi cấy, chồi Nghiến gân ba đạt chiều cao trung bình 3,2 cm - hoàn toàn đủ tiêu chuẩn cây chuyển sang môi trường tạo rễ tạo cây *in vitro* hoàn chỉnh.

Môi trường tạo rễ tạo cây hoàn chỉnh: $\text{MS} + 1,0 \text{ mg/l NAA} + 30 \text{ g/l Sucrose} + 7 \text{ g/l agar}$ cho tỷ lệ chồi ra rễ là 50%, số lượng rễ trung bình là 2,5 rễ, chiều dài rễ là 2,0 cm, chất lượng rễ tốt.

Khi đưa giá thể cây mô Nghiến gân ba ra môi trường tự nhiên cần huấn luyện trong 10 - 15 ngày thì tỷ lệ cây sống cao đạt 100%, chất lượng cây con tốt (cây khỏe, lá xanh đậm, rễ bắt đầu bám giá thể).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. Nguyễn Tiến Bản (chủ biên) (2005). *Danh lục các loài thực vật Việt Nam tập III*. Nxb Nông nghiệp.
- [2]. Bộ Khoa học và Công nghệ (2007). *Sách Đỏ Việt Nam - Phần II: Thực vật*, Nxb Khoa học tự nhiên và Công nghệ, Hà Nội
- [3]. Trần Xuân Hùng (2020). *Nghiên cứu đặc điểm và nhân giống vô tính cây Nghiến gân ba (Excentrodendro tonkinensis) bằng phương pháp giâm hom*. Luận văn Thạc sĩ, chuyên ngành Lâm sinh, Trường Đại học Nông Lâm - Đại học Thái Nguyên.
- [4]. Nông Bảo Chung (2021). *Nghiên cứu khả năng nhân giống bằng phương pháp giâm hom loài cây Nghiến gân ba (Excentrodendro tonkinensis) tại Trường Đại học Nông Lâm Thái Nguyên*. Khóa luận tốt nghiệp đại học, chuyên ngành Quản lý tài nguyên rừng, Trường Đại học Nông Lâm - Đại học Thái Nguyên.
- [5]. Nguyễn Hải Tuất, Nguyễn Trọng Bình (2005). *Khai thác và sử dụng SPSS xử lý số liệu trong lâm nghiệp*. Nxb Nông nghiệp, Hà Nội.
- [6]. Murashige, T; Skoog, F (1962). "A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*. 15 (3): 473 - 497.
- [7]. Đinh Thị Huyền (2006), *Nghiên cứu nhân giống Vù Hương (Cinnamomum balansae)*

và Tràm lá dài (*Melaleuca leucadendra*) bằng phương pháp nuôi cấy *in vitro*. Khoá luận tốt nghiệp đại học, Chuyên ngành Lâm sinh. Trường Đại học Lâm nghiệp.

[8]. Schaller GE, Bishopp A & Kieber JJ (2015). The yin - yang of hormones: Cytokinin and auxin interactions in plant development. *Plant Cell*, 27, 44 - 63.

[9]. Khuất Thị Hải Ninh, Nguyễn Thị Thơ (2022). Nghiên cứu nhân giống cây Đinh mật (*Fernandoa brilleitii* (Dop.) Steenis) bằng phương pháp nuôi cấy mô. Báo cáo chuyên đề

nghiên cứu khoa học, Viện Công nghệ sinh học lâm nghiệp- Trường Đại học Lâm nghiệp.

[10]. Lê Xuân Đắc, Hà Hồng Hải, Đào Thị Thu Hà, Nguyễn Thanh Danh, Lê Thị Xuân, Nông Văn Hải, Lê Trần Bình (2004). Nhân nhanh và bảo tồn cây Màng tang (*Litsea verticillata*) được tìm thấy ở Vườn Quốc gia Cúc Phương bằng kỹ thuật nuôi cấy mô tế bào thực vật. *Tạp chí Công nghệ sinh học*, 2 (4): 479 - 486.

[11]. Dương Công Kiên (2003). *Nuôi cấy mô thực vật II* (Tập 2). Giáo trình đại học chuyên ngành Công nghệ sinh học - Sinh học thực vật. Đại học quốc gia Thành Phố Hồ Chí Minh, tr 205 - 210.

**THE RESEARCH ON *IN VITRO* PROPAGATION OF
Excentrodendron Tonkinense (A.Chev.) H.T.Chang & R.H.Miau**

**Dang Thi Thu Ha¹, Nguyen Thanh Tien¹, Pham Thu Ha¹,
Le Si Hong¹, Nguyen Cong Hoan¹, Vu Van Thong¹**

¹ *Thainguyen University of Agriculture and Forest*

Abstract

Excentrodendron tonkinense belongs to Group II timber according to the Vietnamese wood classification system. It is a valuable species currently facing a high risk of extinction in the wild due to extensive illegal logging. Therefore, the application of invitro propagation techniques for the conservation and development of this rare species is of great necessity. The research results showed that explants sterilized with 0.1% HgCl₂ solution for 5 minutes achieved a contamination-free rate of 63.33% and a regeneration rate of 56.67%. The culture medium MS supplemented with 1.5 mg/L BAP, 0 - 0.2 mg/L NAA, 30 g/L sucrose and 7 g/L agar was suitable for shoot multiplication, with a multiplication rate of 2.3 - 2.5 times and shoot height ranging from 1.6 to 1.87 cm. After 6 weeks of culture on MS medium containing 30 g/L sucrose, 7 g/L agar, 1.5 mg/L BAP and 0.2 mg/L kinetin, the shoots reached an average height of 3.20 cm, meeting the standard for transfer to rooting medium to produce complete in vitro plantlets. The rooting medium (MS supplemented with 1.0 mg/L NAA, 30 g/L sucrose and 7 g/L agar) resulted in a rooting rate of 50%, with an average of 2.5 roots per shoot, root length of 2.0 cm and good root quality. When transferring the *Excentrodendron tonkinense* tissue-cultured plantlets onto substrates in natural conditions, an acclimatization period of 10 days is required to achieve a high survival rate of 100%, with good seedling quality, healthy growth, dark green leaves and roots beginning to firmly attach to the substrate.

Keywords: *Excentrodendron tonkinense*, *in vitro*, *lauraceae*, *propagation*.

Ngày nhận bài: 12/02/2026

Ngày chuyển phản biện: 6/3/2026

Ngày thông qua phản biện: 15/4/2026

Ngày duyệt đăng: 12/5/2026