

NGHIÊN CỨU NHÂN NHANH *IN VITRO* CÂY HỒNG (*Paulownia fortunei*) NHẬP NỘI

Nguyễn Thị Lâm Hải*, Trần Đông Anh, Phạm Thị Thu Hằng, Đinh Trường Sơn,
Đặng Thị Thanh Tâm, Nguyễn Thanh Hải, Nông Thị Huệ, Ninh Thị Thảo, Lưu Thị Hoa

Học viện nông nghiệp Việt Nam

*Tác giả liên hệ: ntlhai@vnua.edu.vn

Ngày nhận bài: 14.12.2022

Ngày chấp nhận đăng: 02.03.2023

TÓM TẮT

Cây hồng (*Paulownia fortunei*) nhập nội từ Canada là loại cây lấy gỗ có giá trị kinh tế cao do có tốc độ sinh trưởng vượt trội, chất lượng gỗ tốt, chống chịu sâu bệnh. Do là cây nhập nội nên việc chủ động nguồn giống là cần thiết để phát triển giống cây này tại Việt Nam. Trong nghiên cứu này, nhân nhanh cây hồng nhập nội bằng nuôi cấy mô đã được tiến hành. Vật liệu để vào mẫu là chồi cây hồng 03 tháng tuổi. Chồi cây được xử lý với KMnO_4 0,1% trong 30 phút, sau đó khử trùng trong dung dịch Natri Troclosene 0,5% trong 20 phút và HgCl_2 0,2% trong 10 phút, cuối cùng mẫu cấy được ngâm trong dung dịch Cefotaxim 100 mg/l trong 10 phút. Tỷ lệ tạo mẫu sống vô trùng đạt 35,7%. Môi trường nhân nhanh tốt nhất cho chồi hồng *in vitro* là môi trường MS có bổ sung 0,5 mg/l BAP với hệ số nhân chồi thu được là 5,43 chồi/mẫu, chiều cao chồi đạt 4,32 cm/chồi. Môi trường thích hợp nhất để tạo rễ cây hồng *in vitro* là môi trường $\frac{1}{2}$ MS trong thời gian 3 tuần. Giá thể ra ngôi cho tỷ lệ cây sống cao là Peatmoss cho tỷ lệ cây sống đạt 97,2% trong thời gian 3 tuần.

Từ khóa: Cây hồng, *Paulownia fortunei*, nhân nhanh *in vitro*, BAP, Peatmoss.

Rapid *In-vitro* Propagation of Exotic Dragontree (*Paulownia fortunei*)

ABSTRACT

Dragon tree (*Paulownia fortunei*) introduced from Canada is a wooden plant with high economic value due to its outstanding growth rate, high timber quality, and tolerance to insect pests and diseases. Because of exocytic origin, rapid propagation by tissue culture to produce large quantity of planting materials is necessary and suitable for the development of this species in Vietnam. Explants were collected from three-month-old plants. They were treated with 0.1% KMnO_4 for 30 minutes, then sterilized in 0.5% troclosene sodium solution for 20 minutes, followed by 0.2% HgCl_2 for 10 minutes. Finally, the explants were soaked in 100 mg/l cefotaxim solution in 10 minutes for initial culture with survival rate of 35.7%. The best medium for *in vitro* shoot regeneration was MS medium supplemented with 0.5 mg/l BAP with the shoot multiplication rate of 5.43 shoots/explant and average shoot height of 4.32cm. The best medium for *in vitro* rooting was $\frac{1}{2}$ MS medium for 3 weeks. Growth substrate for high survival rate was peatmoss (97.2%) after 3 weeks of acclimatization.

Keywords: Dragontree, *Paulownia fortunei*, *in vitro* propagation.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Chi *Paulownia* là chi cây trồng bản địa của Trung Quốc, do sự phát triển nhanh chóng và giá trị của chúng trên thị trường gỗ, nhiều loài hồng được trồng ở một số vùng ôn đới và cận nhiệt đới trên toàn thế giới (Freeman & cs., 2012). Trong điều kiện tự nhiên, cây hồng 10 năm tuổi có đường kính ngang ngực từ 30-40cm,

thể tích gỗ 0,3-0,5m³ (Zhu & cs., 1986). Gỗ hồng nhẹ nhưng chắc, khô khá nhanh và có thớ gỗ sáng màu, đẹp mắt, không dễ bị cong vênh, nứt nẻ hoặc biến dạng. Ngoài ra, gỗ hồng rất dễ gia công, thích hợp để chạm khắc và có đặc tính cách nhiệt tốt (Zhu & cs., 1986). Do tốc độ tăng trưởng nhanh và hàm lượng cellulose cao (440g cellulose/kg), chất độn từ gỗ hồng được sử dụng thành công để tạo ra hỗn hợp sinh học có

thể phân hủy axit polylactic, hoặc tạo ra vật liệu tổng hợp có độ uốn và độ bền va đập tương đương hoặc vượt trội so với vật liệu tổng hợp của chất độn bột gỗ thông (Lopez & cs., 2012). Bột gỗ hồng có thể được sử dụng trong sản xuất vật liệu tổng hợp polypropylen (Tisserat & cs., 2013). Hoa và lá cây hồng là nguồn cung cấp chất béo, đường và protein tốt, được sử dụng làm thức ăn cho lợn, cừu và thỏ. Hàm lượng nitơ trong lá cây hồng được so sánh tương đương với một số cây họ đậu. Lá cây hồng được nông dân ở Quảng Tây Trung Quốc sử dụng làm cây phân xanh, cải tạo đất, xử lý chất thải chăn nuôi (Zhu & cs., 1986; Song, 1988).

Cây hồng được nhân giống từ hạt, giâm cành hoặc nhân nuôi cấy mô trong ống nghiệm. Hạt của cây hồng có tỉ lệ nảy mầm thấp và cần có chế độ xử lý đặc biệt, tỉ lệ nảy mầm chỉ đạt 29% đối với *P. fortunei*, 13% với loài *P. kawakami*, 23% với loài *P. taiwaniana* (Venkateswarlu & cs., 2001). Cây trồng từ hạt cũng có tốc độ sinh trưởng chậm hơn so với cây được nhân giống bằng phương thức giâm cành hoặc cây nuôi cấy mô (Bergman & Moon, 1997). Cây giống tạo ra từ cách giâm cành có giá thành thấp nhưng số lượng không đủ nhiều để đáp ứng nhu cầu trồng rừng quy mô lớn. Vì nhân giống cây hồng đang trở thành phương pháp nhân giống phổ biến thay thế các phương pháp nhân giống truyền thống ở Trung Quốc, Úc, Canada và Mỹ với ưu điểm tạo ra cây giống đồng đều và số lượng lớn. Nhiều loài thuộc chi *Paulownia* đã được nhân giống thành công nhờ kỹ thuật nuôi cấy mô với nguồn mẫu từ cây non hoặc từ cây trưởng thành (Burger & Wu, 1985; Song & cs., 1989; Rao & cs., 1996). Các đoạn thân mang chồi nách, đỉnh chồi non hoặc từ lá cũng được sử dụng thành công làm vật liệu nhân giống (Ho & cs., 1997; Chauhan & Emmannuel, 1998; Song & cs., 1989).

Cây hồng có nguồn gốc từ Úc, Canada, Trung Quốc đã được nhập nội về Việt Nam từ những năm 2000 và được trồng ở một số tỉnh phía Bắc và Tây Nguyên, Tây Nam Bộ. Việc nhân giống vô tính cây hồng đã được nghiên cứu ở Việt Nam với mục đích cung cấp cây giống số

lượng lớn đáp ứng nhu cầu trồng rừng của người dân và tạo giống kháng bệnh (Đoàn Thị Ái Thuyền & cs., 2001; Thái Xuân Du, 2001; Lưu Việt Dũng, 2002; Lê Tấn Đức, 2003; Bùi Duy Ngọc & cs., 2007;). Cây hồng được nhân giống bằng công nghệ nuôi cấy mô cho nhiều ưu điểm như cây giống sinh trưởng đồng đều, sạch bệnh, chủ động được nguồn giống và khắc phục được nhược điểm tỉ lệ nảy mầm thấp và tỉ lệ sống thấp, phụ thuộc vào điều kiện ngoại cảnh của các phương pháp gieo hạt và giâm cành (Đoàn Thị Ái Thuyền & cs., 2001). Cây hồng nhập nội từ Canada có ưu điểm sinh trưởng nhanh, đồng đều, thích nghi tốt với điều kiện sinh thái và lập địa của Việt Nam, tuy nhiên do là cây nhập nội nên có giá thành cao và việc nghiên cứu nhân giống quy mô lớn chưa được thiết lập. Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành nhân giống *in vitro* cây hồng nhập nội từ Canada do Công ty Cổ phần Tập đoàn Gỗ Toàn Cầu cung cấp nhằm chủ động nguồn giống cây hồng cung cấp cho diện tích trồng hàng ngàn hecta tại các tỉnh phía Bắc Việt Nam của công ty và các đơn vị đối tác.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

Vật liệu nhân giống: Cây hồng giống nhập nội từ Canada được cung cấp bởi Công ty Cổ phần Tập đoàn Gỗ Toàn Cầu (Hà Nội).

Vật liệu khác: Các hoá chất cơ bản dùng trong nuôi cấy mô tế bào thực vật. Giá thể Peatmoss (rêu, than bùn) của công ty Nord Agri, Latvia.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Tạo nguồn vật liệu khởi đầu *in vitro*

Chồi bánh tẻ của cây hồng kích thước trung bình 4cm có từ 2 đến 3 mắt ngủ được thu thập và xử lý với KMnO_4 0,1% trong 30 phút rồi khử trùng trong buồng cấy vô trùng với các chế độ khử trùng kép khác nhau (Bảng 1). Chồi cây sau đó được rửa sạch bằng nước vô trùng và cấy vào môi trường khởi động 1/2 MS + 1,0 mg/l BAP (Murashige & Skoog, 1962; Venkateswarlu & cs., 2001) trong 3 tuần để theo dõi tỉ lệ tạo chồi sạch và tìm ra công thức khử trùng mẫu tối ưu.

2.2.2. Nghiên cứu môi trường nhân nhanh chồi thích hợp

Chồi cây hồng tái sinh từ mắt ngủ có chiều cao 2,0-2,5cm, sinh trưởng khoẻ mạnh, được sử dụng để tiến hành nhân nhanh. Chồi được nuôi cấy trên môi trường MS có bổ sung riêng rẽ Benzylaminopiurin (BAP: 0,1; 0,5; 1,0; 1,5 và 2,0 mg/l), Kinetin (0,1; 0,5; 1,0; 1,5 và 2,0 mg/l), Thidiazuron (TDZ: 0,1; 0,2; 0,5; 0,7; 1,0 mg/l) ở các nồng độ khác nhau để lựa chọn nồng độ chất điều tiết sinh trưởng tối ưu để nhân nhanh chồi. Sau đó môi trường nhân nhanh chồi thích hợp nhất được bổ sung kết hợp với α -Naphthaleneacetic (α -NAA: 0,2; 0,5; 0,7, và 1,0 mg/l) hoặc axit Indole-3-acetic (IAA: 0,1; 0,2; 0,5 và 0,7 mg/l) hoặc chất hữu cơ tự nhiên (khoai lang 30 g/l; khoai tây 30 g/l; chuối chín 30 g/l; nước dừa 10% v/v) để nuôi cấy chồi cây hồng nhằm tìm ra môi trường tối ưu nhất để nhân nhanh cây hồng *in vitro*.

2.2.3. Nghiên cứu môi trường tạo rễ thích hợp

Các chồi có chiều cao 2,5-3,0cm, có từ 2 đến 3 cặp lá được cấy vào môi trường ra rễ để tạo cây hoàn chỉnh. Môi trường ra rễ là môi trường 1/2 MS có bổ sung chất điều tiết sinh trưởng α -NAA (0,2; 0,5; 1,0 mg/l) hoặc axit Indole-3-butyric (IBA: 0,2; 0,5; 1,0 mg/l) để lựa chọn nồng độ tối ưu để kích thích ra rễ.

2.2.4. Ra ngôi cây *in vitro*

Cây con có chiều cao 3-4cm, 4-5 rễ và có từ 3 lá trở lên được sử dụng để ra ngôi. Cây con được đưa ra nhà lưới có mái che trong 5 ngày, sau đó rửa sạch môi trường bám ở rễ và trồng vào giá thể có chứa Peatmoss với tỉ lệ phối trộn khác nhau trong 3 tuần.

2.2.5. Điều kiện thí nghiệm

Các thí nghiệm được tiến hành trong điều kiện nhân tạo: cường độ ánh sáng: 2.000-2.500 Lux; thời gian chiếu sáng: 16h sáng/8h tối; độ ẩm: 70-80%; nhiệt độ: $25 \pm 2^\circ\text{C}$.

Tất cả các môi trường nuôi cấy được bổ sung 6,0 g/l agar và 30 g/l sucrose, pH = 5,8. Môi trường được hấp khử trùng ở 121°C trong 20 phút, áp suất 1atm. Thể tích mỗi bình cấy là 50ml môi trường. Mỗi bình cấy 10 mẫu.

2.2.6. Bố trí thí nghiệm và xử lý số liệu

Các thí nghiệm được bố trí ngẫu nhiên hoàn toàn (CRD) với 3 lần lặp lại, mỗi lần lặp lại 50 mẫu. Số liệu được phân tích phương sai (ANOVA) một nhân tố và phân tích hậu kiểm Fisher's PLSD với mức $P \leq 0,05$ bằng phần mềm SPSS (ver. 16).

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Tạo vật liệu khởi đầu

3.1.1. Ảnh hưởng của chế độ khử trùng đến việc tạo vật liệu khởi đầu cho nuôi cấy *in vitro* chồi cây hồng

Chồi cây Hồng sau khi được khử trùng theo các chế độ khác nhau (Bảng 1) được cấy trên môi trường tái sinh chồi 1/2 MS + 1,0 mg/l BAP (Venkateswarlu & cs., 2001) trong 3 tuần để theo dõi tỷ lệ mẫu vô trùng phát chồi và tìm ra chế độ khử trùng tối ưu nhất.

Kết quả trình bày ở bảng 1 cho thấy, chế độ khử trùng ở công thức 4 (CT4) với việc ngâm xử lý mẫu cấy lần lượt trong các dung dịch Natri Troclosene 0,5% (20 phút), HgCl_2 0,2% (10 phút) và Ceofotaxim 100 mg/l (10 phút) cho tỉ lệ mẫu sống bật chồi cao nhất đạt 35,7% sau 3 tuần nuôi cấy tái sinh chồi.

Bảng 1. Ảnh hưởng của các chế độ khử trùng đến việc tạo vật liệu khởi đầu cho quá trình nuôi cấy *in vitro* chồi cây hồng (sau 3 tuần)

Công thức	Chế độ khử trùng	Tỷ lệ mẫu vô trùng phát chồi (%)	Tỷ lệ mẫu nhiễm chết (%)
CT1	Natri Troclosene 0,5% (15 phút); HgCl_2 0,1% (5 phút)	$14,3 \pm 2,1$	$85,7 \pm 3,5$
CT2	Natri Troclosene 0,5% (15 phút); HgCl_2 0,2% (10 phút)	0,0	100,0
CT3	HgCl_2 0,1% (5 phút); HgCl_2 0,1% (10 phút); Ceofotaxim 100 mg/l (10 phút)	0,0	100,0
CT4	Natri Troclosene 0,5% (20 phút); HgCl_2 0,2% (10 phút); Ceofotaxim 100 mg/l (10 phút)	$35,7 \pm 2,8$	$64,3 \pm 2,6$

Tỉ lệ mẫu nhiễm 100% cũng được mô tả trong nghiên cứu của Corredoira & cs. (2008) khi tiến hành khử trùng mẫu đoạn thân chồi hồng *P. tomentosa* cắt trực tiếp từ cây hồng sinh trưởng ngoài môi trường. Corredoira & cs. (2008) chỉ thu được chồi hồng vô trùng ở giai đoạn nuôi cấy khởi động khi khử trùng đoạn chồi thứ cấp dài 4 đến 10cm - mọc ra trong quá trình giám canh các đoạn thân cây hồng trong nhà có mái che. Khử trùng đoạn thân mang mắt ngủ của chồi hồng bằng dung dịch Chlorine 5% hoặc $HgCl_2$ 0,1% cũng được nhiều tác giả thực hiện trong các nghiên cứu đã công bố của mình (Rout & cs., 2001; Clapa & cs., 2014), tuy nhiên các tác giả này thường không công bố tỉ lệ mẫu nhiễm hoặc tỉ lệ mẫu sống sau khi khử trùng nên không có nhiều thông tin để so sánh. Trong nghiên cứu của chúng tôi, lý do chính của việc phải sử dụng chế độ khử trùng với nhiều loại chất khử trùng khác nhau do chồi cây hồng *P. fortunei* có một lớp lông tơ mềm rất khó khử trùng bề mặt, ngoài ra chồi cây trước khi nuôi cấy có kích thước nhỏ và thường dính đất nên cần khử trùng nhiều bước hơn.

3.2. Nhân nhanh chồi

3.2.1. Ảnh hưởng của BAP, Kinetin, TDZ đến nhân nhanh chồi hồng

Trong thí nghiệm này, chồi cây hồng *in vitro* thu được từ quá trình cấy khởi động được cấy vào môi trường nhân nhanh có bổ sung BAP, Kinetin, TDZ với các nồng độ khác nhau (Bảng 2) để theo dõi sự hình thành chồi và sự nhân nhanh cây hồng *in vitro*. Kết quả theo dõi sau 4 tuần nuôi cấy được trình bày ở bảng 2 và hình 2.

Kết quả được trình bày ở bảng 2 cho thấy việc bổ sung BAP có ảnh hưởng tích cực đến quá trình phát sinh chồi. Môi trường có bổ sung BAP cho chất lượng chồi tốt, chồi xanh, mập, các chồi bên phát triển tốt. Môi trường bổ sung BAP ở nồng độ 0,5 mg/l cho số chồi trung bình cao nhất đạt 5,43 chồi/mẫu với chiều cao trung bình 4,32cm và số lá trung bình 5,15 lá/chồi (Hình 2A). Kinetin và TDZ đều ảnh

hưởng đến sự hình thành chồi hồng *in vitro* ở những khía cạnh khác nhau. Hệ số nhân chồi cao nhất là 2,0 chồi/mẫu được quan sát ở các công thức môi trường có bổ sung 1,0 mg/l Kinetin và 4,0 chồi/mẫu trên môi trường bổ sung 0,5 mg/l TDZ. Tuy nhiên chất lượng chồi ở các môi trường có bổ sung các chất này có sự khác biệt rõ rệt. Ở các môi trường có bổ sung Kinetin thì chồi thường nhỏ, màu xanh nhạt, chiều cao thấp, khó quan sát (Hình 2B), nếu tiếp tục nuôi cấy thêm 2 tuần trong điều kiện *in vitro* thì các chồi này thường bị thủy tinh hóa hoặc héo lá, lụi chồi. Ngược lại ở môi trường có bổ sung TDZ chồi thường có màu xanh đậm, chồi mập, cao, sinh trưởng phát triển tốt và dễ đo đếm (Hình 2C). Như vậy, ngoại trừ Kinetin, việc sử dụng BAP và TDZ một cách đơn lẻ đều có tác dụng tốt trong việc nhân nhanh chồi hồng trong điều kiện *in vitro*. Tuy nhiên BAP nên được lựa chọn để đưa vào môi trường nhân nhanh chồi do đây là một chất điều tiết sinh trưởng thực vật phổ biến và có giá thành rẻ hơn so với TDZ. Các nhóm nghiên cứu của Song & cs. (1989), Đoàn Thị Ái Thuyền & cs. (2001), Shtereva & cs. (2014) khi sử dụng BAP ở nồng độ 1,0 mg/l hoặc 1,5 mg/l để nhân nhanh chồi hồng *in vitro* đều thu được tỉ lệ bật chồi và tạo cụm chồi cao hơn hẳn so với các công thức bổ sung BAP ở nồng độ thấp hơn hoặc cao hơn. Tuy nhiên, hệ số nhân tối ưu nhất trong nghiên cứu của chúng tôi thu được tại công thức môi trường chỉ bổ sung 0,5 mg/l BAP, tương tự như kết quả nghiên cứu do Pozoga & cs. (2019) thực hiện trên giống lai *P. tomentosa* × *P. fortunei*. Kết quả này đã khẳng định bổ sung BAP nồng độ 0,5 mg/l vào môi trường nhân nhanh *in vitro* chồi hồng nhập nội cho hiệu quả rõ rệt trong việc nhân nhanh chồi và tạo cụm chồi.

3.2.2. Ảnh hưởng kết hợp của BAP với α -NAA và IAA tới sự nhân nhanh chồi hồng

Trong nghiên cứu này, chồi cây hồng *in vitro* được cấy vào môi trường BAP kết hợp với α -NAA hoặc IAA (Bảng 3) để tìm ra công thức môi trường cho hệ số nhân chồi cao và chất lượng chồi tốt.



Hình 1. Chồi cây hồng sau 3 tuần nuôi cấy khởi động trên môi trường 1/2 MS + 1mg/l BAP

Bảng 2. Ảnh hưởng của BAP, Kinetin, TDZ lên nhân nhanh chồi hồng sau 4 tuần nuôi cấy

Công thức	BAP (mg/l)	Kinetin (mg/l)	TDZ (mg/l)	Số chồi/mẫu (chồi)	Chiều cao chồi (cm)	Số lá/chồi (lá)	Chất lượng chồi
CT1	0,0	-	-	1,60 ± 0,35	3,60 ± 0,07	5,64 ± 0,11	++
CT2	0,1	-	-	2,17 ± 0,94	4,15 ± 0,05	5,35 ± 0,07	+++
CT3	0,5	-	-	5,43 ± 0,68	4,32 ± 0,03	5,15 ± 0,09	+++
CT4	1,0	-	-	4,77 ± 0,54	3,51 ± 0,07	5,11 ± 0,09	++
CT5	1,5	-	-	2,87 ± 0,69	3,54 ± 0,05	5,28 ± 0,14	+++
CT6	2,0	-	-	2,93 ± 0,59	3,93 ± 0,07	5,47 ± 0,12	+++
CT7	-	0,1	-	1,63 ± 0,33	2,98 ± 0,05	5,54 ± 0,16	++
CT8	-	0,5	-	1,23 ± 0,73	3,83 ± 0,10	5,27 ± 0,08	+
CT9	-	1,0	-	2,00 ± 0,51	3,40 ± 0,03	5,35 ± 0,12	+
CT10	-	1,5	-	1,30 ± 0,40	2,40 ± 0,07	5,46 ± 0,11	+
CT11	-	2,0	-	1,67 ± 0,40	3,06 ± 0,05	5,28 ± 0,09	+
CT12	-	-	0,1	1,87 ± 0,19	1,06 ± 0,07	5,61 ± 0,07	+++
CT13	-	-	0,2	2,79 ± 0,32	2,15 ± 0,19	5,63 ± 0,09	+++
CT14	-	-	0,5	4,00 ± 0,41	2,24 ± 0,27	5,50 ± 0,10	+++
CT15	-	-	0,7	3,32 ± 0,24	3,32 ± 0,29	5,25 ± 0,18	+
CT16	-	-	1,0	3,50 ± 0,12	3,75 ± 0,23	5,02 ± 0,20	+

Ghi chú: (+): Chồi nhỏ, màu xanh; (++) : Chồi to trung bình, màu xanh đậm (+++): Chồi to, xanh đậm; Số liệu được thể hiện dưới dạng Giá trị trung bình cộng/trừ độ lệch chuẩn.



(A)



(B)



(C)

Hình 2. Chồi *in vitro* cây hồng trên môi trường MS có bổ sung 0,5 mg/l BAP (Hình A); 1,0 mg/l Kinetin (Hình B); 0,5 mg/l TDZ (Hình C)

Bảng 3. Ảnh hưởng của BAP với α -NAA và IAA đến sự nhân nhanh *in vitro* chồi hồng sau 4 tuần nuôi cấy

Công thức	BAP (mg/l)	α -NAA (mg/l)	IAA (mg/l)	Số chồi/mẫu (chồi)	Chiều cao (cm)	Chất lượng chồi
CT1	0,5	0,0	-	5,70 ± 0,26	5,55 ± 0,06	+++
CT2	0,5	0,2	-	4,20 ± 0,46	4,43 ± 0,06	++
CT3	0,5	0,5	-	4,05 ± 0,38	4,41 ± 0,13	++
CT4	0,5	0,7	-	4,57 ± 0,36	4,69 ± 0,11	++
CT5	0,5	1,0	-	3,50 ± 0,24	3,47 ± 0,21	++
CT6	0,5	-	0,1	3,43 ± 0,12	3,35 ± 0,13	+
CT7	0,5	-	0,2	3,70 ± 0,14	3,72 ± 0,16	++
CT8	0,5	-	0,5	3,43 ± 0,22	3,71 ± 0,18	++
CT9	0,5	-	0,7	3,47 ± 0,16	3,49 ± 0,21	++

Ghi chú: (+): Chồi nhỏ, màu xanh; (++): Chồi to trung bình, màu xanh đậm (+++): Chồi to, xanh đậm; Số liệu được thể hiện dưới dạng Giá trị trung bình cộng/trừ độ lệch chuẩn

Kết quả trình bày ở bảng 3 cho thấy, việc bổ sung α -NAA hoặc IAA kết hợp với BAP vào môi trường nuôi cấy không làm tăng đáng kể hệ số nhân chồi so với việc bổ sung BAP đơn lẻ. Hệ số nhân chồi thu được ở các công thức thí nghiệm có bổ sung thêm α -NAA hoặc IAA đều thấp hơn so với môi trường chỉ có BAP ở nồng độ 0,5 mg/l. Hệ số nhân chồi cao nhất chỉ đạt được là 4,57 chồi/mẫu với môi trường MS bổ sung 0,5 mg/l BAP và 0,7 mg/l α -NAA hoặc chỉ đạt được trung bình 3,70 chồi/mẫu với môi trường MS bổ sung 0,5 mg/l BAP và 0,2 mg/l IAA. Tuy nhiên việc bổ sung α -NAA và IAA ở nồng độ cao khiến việc tạo rễ và phát triển lá của các chồi hồng có xu hướng tăng lên rõ rệt (Hình 3B, 3C). Hai môi trường bổ sung 0,7 mg/l α -NAA và 0,2 mg/l IAA trở lên đều có tỉ lệ ra rễ cao, trong đó công thức bổ sung 0,7 mg/l α -NAA tạo rễ mập, dài (Hình 3B). Việc chồi *in vitro* xuất hiện rễ trong quá trình nhân nhanh cũng được Lưu Việt Dũng (2002) quan sát được khi nhân nhanh 4 giống cây hồng bản địa, cây hồng *in vitro* có bộ rễ chất lượng tốt, mọc khỏe trên môi trường MS có bổ sung 1,0 mg/l α -NAA và 0,5 mg/l BAP. Việc tạo rễ sớm trong quá trình nhân nhanh chồi khiến cho cụm chồi không phát triển mà chỉ phát triển chồi đơn, điều này không có lợi cho giai đoạn nhân nhanh tạo cụm chồi ở cây hồng.

Nhiều nhóm tác giả khi nghiên cứu sự kết hợp bổ sung giữa các nhóm chất hormone thực vật để nâng cao hiệu quả nhân nhanh *in vitro* cây hồng đều cho thấy việc kết hợp giữa các nhóm chất này ở nồng độ khác nhau ảnh hưởng nhiều đến hệ số nhân chồi và chất lượng cụm chồi cây hồng trong điều kiện *in vitro*. Đoàn Thị Ái Thuyền & cs. (2001) kết luận rằng môi trường thích hợp cho việc nhân chồi hồng là môi trường MS bổ sung 2 tổ hợp chất kích thích sinh trưởng, tổ hợp 0,1 mg/l α -NAA và 1,0-1,5 mg/l BAP; tổ hợp 0,1 mg/l α -NAA và 2,0 mg/l Kinetin, cả hai công thức này đều cho hệ số nhân chồi cao và chất lượng chồi tốt. Pozoga & cs. (2019) cũng khẳng định môi trường MS bổ sung 1,0 mg/l Kinetin và 1,0 mg/l α -NAA thích hợp cho việc nhân nhanh chồi hồng *in vitro*. Lê Tấn Đức (2003) cho rằng tổ hợp môi trường MS bổ sung BAP 10 mg/l + IBA 0,6 mg/l thích hợp cho việc nhân nhanh chồi hồng *in vitro*. Lưu Việt Dũng (2002) kết luận hệ số nhân đạt 4,5 lần sau 4 tuần nuôi cấy với bốn giống hồng thu thập từ Tuyên Quang, Yên Bái, Thái Nguyên và Sơn La trong môi trường MS bổ sung 0,1 mg/l α -NAA và từ 2,5-3,0 mg/l BAP. Trong nghiên cứu của chúng tôi, việc kết hợp 0,5 mg/l BAP + 0,7 mg/l α -NAA trong môi trường MS để nhân nhanh chồi hồng cũng cho hiệu quả tương tự với các nghiên cứu đã công bố của các tác giả này,

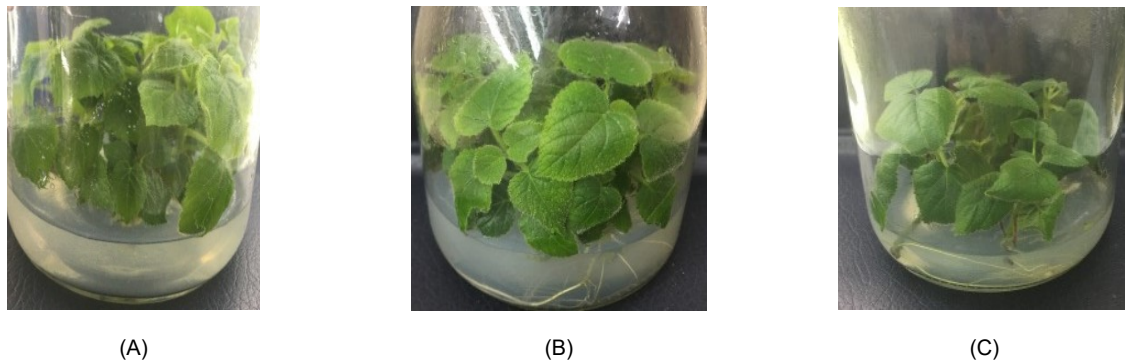
tuy nhiên hệ số nhân vượt trội nhất vẫn chỉ đạt được khi sử dụng BAP đơn lẻ ở nồng độ 0,5 mg/l. Điều đó cho thấy khi nhân nhanh cây hồng nhập nội, việc sử dụng đơn lẻ BAP cho hiệu quả nhân chồi cao hơn việc kết hợp BAP với các hormone thực vật khác.

3.2.3. Ảnh hưởng của chất hữu cơ tự nhiên đến sự nhân nhanh chồi cây hồng

Chất hữu cơ tự nhiên cũng có những tác động không nhỏ đến khả năng nhân nhanh chồi. Một số chất hữu cơ đã được sử dụng hiệu quả trong nuôi cấy mô cây hồng bao gồm nước dừa, chuối tiêu chín, khoai tây (Burger & cs., 1985; Song & cs., 1989; Rao & cs., 1996). Thí nghiệm này được thực hiện nhằm so sánh tác dụng của các chất hữu cơ tự nhiên tới nhân nhanh chồi hồng trên môi trường nền là MS có bổ sung

0,5 mg/l BAP. Thí nghiệm được theo dõi trong 4 tuần và thu được kết quả được trình bày trong bảng 4.

Kết quả trình bày ở bảng 4 cho thấy các chất hữu cơ tự nhiên như nước dừa, chuối chín, khoai tây, khoai lang không làm tăng khả năng tạo chồi của cây hồng trong điều kiện nuôi cấy *in vitro* so với công thức đối chứng không bổ sung chất hữu cơ. Chồi cây hồng nhân nhanh trên các môi trường có bổ sung các chất hữu cơ tự nhiên khác nhau này đều cho kết quả khá tương đồng với kết quả nhân nhanh chồi ở công thức đối chứng không bổ sung chất hữu cơ tự nhiên về hệ số nhân và hình thái cây *in vitro*. Như vậy để tiết kiệm chi phí và thao tác trong quá trình nhân giống cây hồng *in vitro*, việc bổ sung các chất hữu cơ tự nhiên vào môi trường là không cần thiết.



Hình 3. Chồi hồng sau 4 tuần nuôi cấy trên môi trường MS + 0,5mg/l BAP không bổ sung α -NAA (Hình A); bổ sung 0,7 mg/l α -NAA (Hình B); bổ sung 0,2 mg/l IAA (Hình C)

Bảng 4. Ảnh hưởng của chất hữu cơ tự nhiên đến sự nhân nhanh chồi cây hồng sau 4 tuần nuôi cấy

Công thức	Chất hữu cơ	Nồng độ	Hệ số nhân (chồi/mẫu)	Chiều cao chồi (cm/mẫu)	Hình thái chồi
CT1	Đối chứng	0	5,80	6,72	++
CT2	Khoai lang	30 g/l	5,03	5,05	+
CT3	Khoai tây	30 g/l	5,77	6,70	+
CT4	Chuối chín	30 g/l	5,23	5,38	+
CT5	Nước dừa	10%	5,90	6,41	+
LSD _{0,05}			0,67	0,22	
CV%			6,5	4,4	

Ghi chú: Môi trường nền: MS + 0,5 mg/l BAP + 30 g/l sucrose + 6 g/l agar; ++: Chồi to, cao, lá màu xanh đậm, lá to; +: Chồi trung bình, thấp, lá màu xanh nhạt, lá nhỏ.

Bảng 5. Ảnh hưởng của α -NAA đến sự ra rễ cây hồng *in vitro* sau 3 tuần nuôi cấy

Công thức	Nồng độ α -NAA (mg/l)	Thời gian bắt đầu xuất hiện rễ	Số rễ trung bình (rễ/ chồi)	Chiều dài rễ (cm/ rễ)	Tỉ lệ chồi tạo rễ (%)
CT1	0,0	4 ngày	4,30	7,65	100
CT2	0,2	5 ngày	6,60	4,82	100
CT3	0,5	5 ngày	11,20	5,81	100
CT4	1,0	5 ngày	16,00	4,65	100
LSD _{0,05}			0,39	0,26	
CV%			2,1	2,3	



(A)



(B)

Hình 4. Chồi hồng sau 3 tuần nuôi cấy trên môi trường 1/2MS (Hình A) và môi trường 1/2MS + 0,2 mg/l α -NAA (Hình B)

Bảng 5. Ảnh hưởng của IBA đến sự tạo rễ chồi hồng *in vitro* sau 3 tuần nuôi cấy

Công thức	Nồng độ IBA (mg/l)	Thời gian bắt đầu hình thành rễ	Số rễ (rễ/ mẫu)	Chiều dài rễ (cm/rễ)	Tỉ lệ hình thành rễ (%)
CT1	0	4 ngày	4,23	5,46	100
CT2	0,2	6 ngày	5,60	5,42	100
CT3	0,5	6 ngày	5,80	5,30	100
CT4	1,0	6 ngày	6,07	6,77	100
LSD _{0,05}			0,34	0,26	
CV%			3,30	2,20	



(A)



(B)

Hình 5. Chồi hồng sau 4 tuần nuôi cấy trên môi trường 1/2MS (Hình A) và môi trường 1/2MS + 0,2 mg/l IBA (Hình B)

3.3. Tạo cây hoàn chỉnh

Giai đoạn tạo cây hoàn chỉnh chính là giai đoạn tạo rễ cho các chồi *in vitro* thu được sau quá trình nhân nhanh, giai đoạn này cần đảm bảo vừa giúp cây ra rễ và vừa tăng sinh về kích thước để tạo ra cây có thể tự hấp thụ nước và quang hợp ở môi trường tự nhiên. IBA và α -NAA là hai chất điều tiết sinh trưởng thực vật thường hay được bổ sung vào môi trường nuôi cấy mô tế bào cây hồng trong giai đoạn ra rễ (Rout & cs., 2001, Corredoira & cs., 2008). Một số nghiên cứu của các nhóm tác giả khác trên đối tượng cây hồng cũng chỉ ra rằng việc cấy chuyển chồi cây hồng *in vitro* sang môi trường không có chất điều tiết sinh trưởng cũng làm kích thích sự lớn lên của chồi và hình thành rễ cho chồi cây (Ipekci & Gozukirmizi, 2004; Rao & cs., 1996). Trong nghiên cứu này, IBA và α -NAA cũng được sử dụng để kích thích sự ra rễ *in vitro* từ chồi cây hồng, với đối chứng là môi trường không bổ sung chất điều tiết sinh trưởng nhóm này.

3.3.1. Ảnh hưởng của α -NAA đến sự ra rễ chồi cây hồng *in vitro*

Để khảo sát ảnh hưởng của α -NAA đến sự ra rễ và chất lượng rễ chồi cây hồng *in vitro*, α -NAA ở các nồng độ 0,2 mg/l, 0,5 mg/l và 1,0 mg/l được bổ sung vào môi trường nền 1/2MS và tiến hành nuôi cấy chồi trong 3 tuần. Kết quả thí nghiệm được trình bày ở bảng 5.

Kết quả trình bày ở bảng 5 cho thấy việc bổ sung α -NAA vào môi trường nuôi cấy kích thích sự hình thành rễ *in vitro* và làm tăng số lượng rễ trung bình ở mỗi cây so với môi trường không bổ sung α -NAA. Tuy nhiên rễ cây ở các môi trường có bổ sung α -NAA có xu hướng mọc ngắn và mập hơn so với môi trường không bổ sung auxin này (Hình 4). Tại môi trường không bổ sung α -NAA chồi cây hồng bắt đầu hình thành rễ 4 ngày sau khi cấy, nhanh hơn khoảng 1 ngày so với các công thức môi trường có bổ sung α -NAA. Rao & cs. (1996), Ipekci & Gozukirmizi (2004) cũng thành công trong việc tạo rễ cho chồi *in vitro* các giống *P. tomentosa*, *P. fortunei* × *P. tomentosa* và *P. kawakamii* bằng việc cấy chuyển sang môi trường không bổ sung chất điều tiết sinh trưởng thực vật. Như vậy, việc bổ sung α -NAA vào môi trường nuôi cấy không

thực sự cần thiết để kích thích tạo rễ cho chồi cây hồng *in vitro*, chồi cây hồng có thể dễ dàng ra rễ và đạt số rễ với chất lượng tốt trên môi trường nền 1/2 MS không bổ sung chất điều tiết sinh trưởng.

3.3.2. Ảnh hưởng của IBA đến sự tạo rễ cây hồng *in vitro*

Để khảo sát ảnh hưởng của IBA đến sự ra rễ và chất lượng rễ chồi cây hồng *in vitro*, IBA ở các nồng độ 0,2 mg/l; 0,5 mg/l và 1,0 mg/l được bổ sung vào môi trường nền 1/2 MS và tiến hành nuôi cấy chồi trong 3 tuần.

Kết quả trình bày ở bảng 5 cho thấy việc bổ sung IBA vào môi trường nuôi cấy không kích thích sự hình thành rễ *in vitro* và làm tăng số lượng rễ trung bình ở mỗi cây so với môi trường không bổ sung IBA. Tại môi trường không bổ sung IBA chồi cây hồng bắt đầu hình thành rễ 4 ngày sau khi cấy, nhanh hơn khoảng 2 ngày so với các công thức môi trường có bổ sung IBA. Ở tất cả các công thức thí nghiệm đều quan sát được rễ cây có chất lượng tốt, rễ có nhiều lông hút và không bị đứt gãy khi nhấc cây ra khỏi môi trường (Hình 5). Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cũng tương tự như kết quả của Shtereva & cs. công bố năm 2014 khi tiến hành nuôi cấy chồi cây *P. elongata* × *P. fortunei* và *P. tomentosa* trên môi trường 1/2 MS bổ sung 1,0 mg/l IBA sau 4 tuần nuôi cấy rễ dài trung bình 4,9cm và 4,7cm hình thành 2-3 rễ/chồi. Như vậy, việc bổ sung IBA vào môi trường nuôi cấy là không thực sự cần thiết để kích thích tạo rễ cho chồi cây hồng *in vitro*, chồi cây hồng có thể dễ dàng ra rễ và đạt số rễ với chất lượng tốt trên môi trường nền 1/2MS không bổ sung chất điều tiết sinh trưởng.

3.4. Ra ngôi cây hồng *in vitro*

Cây hồng có chiều cao 3-4cm, có từ 3-4 rễ và 2-3 lá được tạo ra từ quá trình nhân nhanh được trồng ra ngôi theo cách thức ra ngôi cây *in vitro* thông dụng. Bình chứa cây hồng được đặt trong nhà lưới dưới ánh sáng tán xạ trong thời gian 5 ngày để luyện cây. Cây hồng *in vitro* được rửa sạch môi trường bám quanh rễ trước khi đem trồng vào giá thể. Các giá thể được thử nghiệm bao gồm Peatmoss; Peatmoss: xơ dừa (tỉ lệ 1:1); Peatmoss: xơ dừa: đất (tỉ lệ 1:1:1).

Bảng 6. Ảnh hưởng của các loại giá thể đến chất lượng cây hồng ra ngôi trong vườn ươm
(sau 3 tuần theo dõi)

Giá thể	Tỉ lệ sống (%)	Chiều cao chồi (cm)	Số lá trung bình	Tốc độ ra lá mới (lá/tuần)	Đường kính thân (cm)
Peatmoss	97,2	5,24	3,93	1,82	0,45
Peatmoss: xơ dừa tỉ lệ 1:1	96,2	6,78	3,53	1,92	0,53
Peatmoss: xơ dừa: đất tỉ lệ 1:1:1	80,3	5,05	3,73	1,95	0,52
LSD _{0,05}	0,39	0,21	0,25	0,26	0,25
CV%	3,2	2,2	2,3	4,8	3,7



Hình 6. Cây hồng ra ngôi sau 3 tuần trên giá thể Peatmoss

Kết quả nghiên cứu trình bày ở bảng 6 và hình 6 cho thấy, cây hồng nuôi cấy mô thích nghi rất tốt với các loại giá thể khác nhau ngoài vườn ươm. Khi được trồng trong các loại giá thể khác nhau tỉ lệ sống của cây vẫn rất cao trong đó giá thể Peatmoss và Peatmoss trộn với xơ dừa tỉ lệ 1:1 cho tỉ lệ sống đạt tới trên 90%, là tỉ lệ được chấp nhận khi ra ngôi cây *in vitro*. Do hiện nay việc sử dụng xơ dừa tương đối phức tạp do phải xử lý khử chất mất 1 tháng trước khi dùng, do đó trong sản xuất cây khi ra ngôi với số lượng lớn, chúng tôi đề xuất chỉ sử dụng giá thể Peatmoss không pha trộn để ra cây.

4. KẾT LUẬN

Chế độ khử trùng với Natri Troclosene 0,5% (20 phút); HgCl₂ 0,2% (10 phút); Ceofotaxim 100 mg/l (10 phút) cho tỉ lệ mẫu vô trùng đạt 35,7% trong giai đoạn nuôi cấy tái sinh chồi. Môi trường MS + 0,5 mg/l BAP + 6,0 g/l agar + 30 g/l sucrose, pH = 5,8 là môi trường thích hợp để nhân nhanh *in vitro* chồi hồng. Môi trường 1/2 MS + 6,0 g/l agar + 30 g/l sucrose, pH = 5,8 thích hợp để ra rễ tạo cây hoàn chỉnh đối với chồi hồng tạo ra trong điều kiện *in vitro* trong 3 tuần.

Cây hồng hoàn chỉnh được ra ngôi trên giá thể Peatmoss trong thời gian 3 tuần đủ điều kiện để đóng sang bầu lớn và trồng trên đồng ruộng.

LỜI CẢM ƠN

Chúng tôi xin gửi lời cảm ơn đến Công ty Cổ phần Tập đoàn gỗ Toàn Cầu đã cung cấp giống cây hồng nhập nội để thực hiện nghiên cứu.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Bergman B.A. & Moon H.K. (1997). *In vitro* adventitious shoot production in *Paulownia fortunei*, Plant Cell Reports. 16: 315-319.
- Bùi Duy Ngọc, Nguyễn Đình Hợp & Nguyễn Thị Minh Xuân (2007). Bước đầu nghiên cứu nâng cao khối lượng thể tích gỗ hồng (*Paulownia fortunei*). Tạp chí Khoa học Lâm nghiệp. 1: 291-296.
- Burger D.W., Liu L. & Wu L. (1985). Rapid Micropropagation of *Paulownia tomentosa*. HortScience. 20(4): 760-761.
- Chauhan L.M.S. & Emmanuel C.J.S.K. (1998). *In vitro* clonal propagation of *Paulownia fortunei*. Indian Journal of Forestry. 21(4): 327-334.
- Clapa D., Fira A., Simu M., Vasu L.B. & Buduroi D. (2014). Improved *In Vitro* Propagation of *Paulownia elongata*, *P. fortunei* and its

- Interspecific Hybrid *P. elongata* x *P. fortunei*. Bulletin UASVM Horticulture. 71(1): 6-14.
- Corredoira E., Balleste A. & Vieitez A.M. (2008). Thidiazuron-induced high-frequency plant regeneration from leaf explants of *Paulownia tomentosa* mature trees. Plant Cell Tissue and Organ Culture. 95: 197-208.
- Đoàn Thị Ái Thuỳên, Vũ Ngọc Phương, Thái Xuân Du & Nguyễn Văn Uyên (2001). Nghiên cứu nhân giống cây hồng (*Paulownia fortunei*) bằng phương pháp nuôi cấy mô. Tạp chí Sinh học. 23(3): 46-50.
- Freeman C.C., Rabeler R.K. & Elisens W.J. (2012). Flora of North America. Provisional Publication. 17.
- Ho C.K., Chen Z.Z., Tsai J.Y. & Yang J.C. (1997). Nodule Culture of *Paulownia x taiwaniana*. Taiwan Journal of Forestry Science. 12(1): 39-45.
- Ipekci Z. & Gozukirmizi N. (2004). Indirect somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf and internode explants of *Paulownia elongata*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 79: 341-345.
- Lê Tấn Đức (2003). Nghiên cứu hệ thống tái sinh *in vitro* cây hồng (*Paulownia fortunei*) và ảnh hưởng của tác nhân chọn lọc để tạo cây chuyên gen. Hội nghị CNSH Toàn quốc. 2: 1023-1028.
- Lopez F., Perez A., Zamudio M.A.M., De Alva H.E. & Garcia J.C. (2012). *Paulownia* as Raw Material for Solid Biofuel and Cellulose Pulp. Biomass and Bioenergy. 45: 77-86.
- Lưu Việt Dũng (2002). Nhân giống vô tính cây hồng (*Paulownia fortunei*) bằng phương pháp nuôi cấy mô tế bào thực vật. Tạp chí Sinh học. 24(2): 79-86.
- Murashige T. & Skoog F.A. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiology Plant. 15. 473-495.
- Rao C.D., Goh C.J. & Kumar P.P. (1996). High Frequency Adventitious Shoot Regeneration from Excised Leaves of *Paulownia* spp. Cultured *in vitro*. Plant Cell Reports. 16(3-4): 204-209.
- Rao C.D., Goh C.J. & Kumar P.P. (1996). High frequency adventitious shoot regeneration from excised leaves of *Paulownia* spp. cultured *in vitro*. Plant Cell Reports. 16: 204-223.
- Rout G.R., Reddy G.M & Das P. (2001). Studies on *in vitro* Clonal Propagation of *Paulownia tomentosa* STEUD. and Evaluation of Genetic Fidelity through RAPD Marker. Silvae Genetica. 50(5-6): 208-212.
- Shtereva L., Vasilevska I.R., Karceva T. & Kraptchev B. (2014). Micropropagation of six *Paulownia* genotypes through tissue culture. Central European Agriculture. 15(4): 147-156.
- Song S.L., Sato T., Saito A. & Kihachiro O. (1989). Meristematic culture of seven *Paulownia* species. Journal of the Japanese Forest Society. 71(11): 456-462.
- Song Y. (1988). Nutritive Components of *Paulownia* Leaves as Fodder. Chemical Industry and Forest Products. 8: 44-49.
- Thái Xuân Du (2001). Quy trình trồng và chăm sóc cây hồng sau giai đoạn ươm nghiệm. Tạp chí Công nghệ sinh học và Nông nghiệp sinh thái bền vững. Nhà xuất bản Nông nghiệp. 3: 79-85.
- Tisserat B., Joshee N., Mahapatra A.K., Selling G.W. & Finkenstadt V.L. (2013). Physical and Mechanical Properties of Extruded Poly(lactic acid)-Based *Paulownia elongata* Bio-Composites. Industrial Crops and Products. 44: 88-96.
- Venkateswarlu B., Mukhopadhyay J., Sreenisavan E. & Moses Kumar V. (2001). Micropropagation of *Paulownia fortunei* through *in vitro* axillary shoot proliferation. Indian Journal of Experimental Biology. 39: 594-599.
- Zhu Z.H., Chao C.J., Lu X.Y. & Xiong Y.G. (1986). *Paulownia* in China: Cultivation and Utilization. Asian Network for Biological Sciences and International Development Research Centre, Singapore. pp. 1-65.