

NHÂN GIỐNG CÂY MÂY NẾP (*Calamus tetradactylus* Hance) TỪ CHỒI MĂNG

Bùi Văn Thắng¹, Nguyễn Thị Mai Dương¹,
Nguyễn Thị Minh Hằng¹, Hồ Văn Giảng¹, Hà Văn Huân²

TÓM TẮT

Quy trình nhân giống cây Mây nếp từ mẫu cấy là chồi măng đã được thực hiện. Kết quả nghiên cứu cho thấy, sát khuẩn bề mặt mẫu cấy bằng cồn 70% trong 2 phút và khử trùng bằng HgCl_2 0,1% hai lần (lần 1 trong 7 phút và lần 2 trong 3 phút) cho tỷ lệ mẫu sạch 85,5% và mẫu tái sinh chồi 76,3%. Cắm ươm tạo cụm chồi trên môi trường MS cải tiến bổ sung 4 mg/l BAP, 0,25 mg/l kinetin, 0,1 mg/l NAA, 0,25 mg/l IBA, 4 mg/l cysteine và 10 mg/l axit corbic cho tỷ lệ mẫu tạo cụm chồi 76,7% và 4,8 chồi/cụm. Chồi được kích thích tăng trưởng tốt nhất trên môi trường MS cải tiến bổ sung 1 mg/l BAP, 0,25 mg/l kinetin, 0,3 mg/l GA_3 và 1 g/l than hoạt tính (chiều cao chồi trung bình tăng 4,2 cm) sau 4 tuần nuôi cấy. Chồi ra rễ 100% trên môi trường MS cải tiến bổ sung 0,5 mg/l NAA và 0,5 mg/l IBA. Cây con hoàn chỉnh được huấn luyện và chuyển ra trồng trên giá thể 40% đất đồi và 60% cát vàng; cây sinh trưởng và phát triển tốt.

Từ khóa: *Calamus tetradactylus* Hance, cụm chồi, Mây nếp, nhân giống, nuôi cấy mô.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Mây nếp (*Calamus tetradactylus* Hance) là một trong những loài cây lâm sản ngoài gỗ có giá trị kinh tế cao. Sau khai thác, xử lý thân cây rất bền, bóng đẹp, dẻo, dễ uốn nên được ưa chuộng làm nguyên liệu để sản xuất, đồ gia dụng, bàn ghế, sản phẩm mỹ nghệ dùng trong nước và xuất khẩu. Hiện nay, cây Mây nếp được gây trồng khá phổ biến ở một số tỉnh Thái Bình, Phú Thọ, Hà Nội, Hoà Bình, Nghệ An [3].

Trồng rừng nguyên liệu từ cây mây thực sinh thường có hiện tượng phân li hữu tính, nên sinh trưởng, phát triển, cũng như số lượng và chất lượng các sản phẩm chuyên dụng không đồng đều; điều này đã ảnh hưởng không nhỏ tới việc trồng, chăm sóc, khai thác và chế biến. Vì vậy, việc áp dụng kỹ thuật nhân giống tiên tiến nhằm tạo ra cây mây giống có chất lượng cao là rất cần thiết hiện nay. Ở nước ta, việc áp dụng kỹ thuật nuôi cấy mô - tế bào vào sản xuất cây giống đã trở nên phổ biến; đã chủ động sản xuất một lượng lớn cây giống như Bạch đàn, Keo lai, ..., có phẩm chất di truyền tốt và đồng đều phục vụ trồng rừng sản xuất mang

lại giá trị kinh tế cao. Nghiên cứu tái sinh các loài Song mây (*Calamus egregius*, *C. manan*, *C. manillensis*, *C. platyacanthus*) từ vật liệu ban đầu là phôi hạt, chóp rễ, đỉnh chồi và bẹ lá cây mầm cũng đã được nhiều tác giả công bố [2], [4], [5], [6], [7]. Tuy nhiên, đối với mỗi loài mây cụ thể cần có một quy trình nuôi cấy thích hợp mới đạt được hiệu quả cao trong nhân giống; bài báo này giới thiệu nhân giống mây nếp từ chồi măng.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

- Chồi măng cây Mây nếp có đường kính gốc 1–2 cm và chiều cao 15–20 cm, được lấy từ các cụm Mây nếp có chất lượng đã qua tuyển chọn;

- Các loại môi trường nuôi cấy được ghi ở bảng 01.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Các chồi măng được rửa sạch dưới vòi nước chảy, được cắt bỏ rễ, gai và các bẹ lá già bên ngoài, rửa tiếp bằng nước xà phòng. Sát khuẩn bề mặt chồi măng bằng cồn 70% trong 2 phút, sau đó khử trùng hai lần liên tiếp bằng cách phối hợp giữa NaClO 10% và HgCl_2 0,1%

¹ThS. Trường Đại học Lâm nghiệp

²TS. Trường Đại học Lâm nghiệp

(giữa hai lần khử trùng mẫu được rửa bằng nước cất vô trùng 5 lần). Sau khử trùng lần 2, mẫu được tráng bằng nước cất vô trùng 5–10 lần và thấm khô bằng giấy thấm vô trùng. Bóc bỏ bớt một phần bẹ lá và cắt lấy phần cổ rễ, cấy lên môi trường nuôi cấy khởi động (KĐ), nuôi cấy dưới cường độ ánh sáng yếu. Sau 4 tuần chồi măng nảy chồi và được cấy chuyển sang môi trường tạo cụm chồi (CT₁₋₆) lần 1, nuôi trong 4 tuần và tiếp tục cấy chuyển sang môi trường tạo cụm chồi lần 2, nuôi tiếp trong 4 tuần mẫu sẽ tạo cụm chồi. Chọn cụm chồi phát triển đồng đều cấy lên môi trường kích

thích tăng trưởng chồi (TT₁₋₁₂), nuôi trong 4 tuần. Chọn chồi có chiều cao ≥ 4 cm cấy chuyển sang môi trường ra rễ (R₁₋₈). Sau 4 tuần nuôi cây ra rễ, huấn luyện, cấy vào bầu đất và chăm sóc tại vườn ươm.

Điều kiện phòng nuôi cấy: nhiệt độ phòng nuôi $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$, cường độ ánh sáng $1.000 \div 2.000$ Lux, thời gian chiếu sáng 14 h/ngày.

Các loại môi trường nuôi cấy trong nghiên cứu dựa trên môi trường cơ bản MS của Murashige và Skoog, (1962) [1]. MS* là môi trường MS cải tiến có hàm lượng các nguyên tố đa lượng tăng gấp đôi, các thành phần khác giữ nguyên.

Bảng 01. Thành phần các loại môi trường nuôi cấy cây Mây nếp

Giai đoạn nuôi cấy	Ký hiệu môi trường	Thành phần môi trường nuôi cấy
Nuôi cấy khởi động	KĐ	MS bổ sung 20 g/l sucrose, 8 g/l agar
Tạo cụm chồi	CT ₁₋₆	MS* bổ sung 4 mg/l BAP, 0,25 mg/l kinetin, 0,1 – 0,5 mg/l NAA, 0,125 – 0,5 mg/l IBA, 4 mg/l cysteine, 10 mg/l axit corbic, 30 g/l sucrose, 8 g/l agar
Kích thích tăng trưởng chồi	TT ₁₋₁₂	MS* bổ sung 0,5 – 2 mg/l BAP, 0,25 – 0,5 mg/l kinetin, 0,1 – 0,5 mg/l GA ₃ , 30 g/l sucrose, 8 g/l agar, 1 g/l than hoạt tính
Kích thích ra rễ tạo cây hoàn chỉnh	R ₁₋₈	MS* bổ sung 0,5 – 1 mg/l NAA, 0,5 – 1 mg/l IBA, 20 g/l sucrose, 8 g/l agar

III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

3.1. Tạo mẫu sạch *in vitro* từ chồi măng Mây nếp

Kết quả nghiên cứu cho thấy, với cùng một kiểu phối hợp, cùng nồng độ chất khử trùng, nhưng với các khoảng thời gian khử trùng khác nhau cho tỷ lệ mẫu sạch và mẫu tái sinh chồi rất khác nhau (bảng 02). Trong 6 công thức

khử trùng nghiên cứu, công thức KT₅ (khử trùng bằng HgCl₂ 0,1% lần 1 trong 7 phút và lần 2 trong 3 phút) cho kết quả tốt nhất với tỷ lệ mẫu sạch 85,5% và mẫu sạch tái sinh chồi 76,3%. Ở công thức KT₆ (tăng thời gian khử trùng lần 2 lên 5 phút), tỷ lệ mẫu sạch đạt cao nhất (88,9%) nhưng tỷ lệ mẫu tái sinh chồi lại thấp nhất (40,5%).

Bảng 02. Ảnh hưởng của hóa chất và thời gian khử trùng đến kết quả tạo mẫu sạch từ chồi mầm Mây nếp

Công thức	Khử trùng lần 1		Khử trùng lần 2		Tỷ lệ mẫu sạch (%)	Tỷ lệ mẫu sạch tái sinh chồi (%)
	Chất khử trùng	Thời gian (phút)	Chất khử trùng	Thời gian (phút)		
KT ₁	NaClO 10%	10	HgCl ₂ 0,1%	3	42,5	55,2
KT ₂				5	52,6	57,9
KT ₃	HgCl ₂ 0,1%	5	HgCl ₂ 0,1%	3	57,0	65,3
KT ₄				5	60,2	62,7
KT ₅	HgCl ₂ 0,1%	7	HgCl ₂ 0,1%	3	85,5	76,3
KT ₆				5	88,9	40,5

3.2. Tạo cụm chồi Mây nếp

Thí nghiệm tạo cụm chồi với 6 loại tổ hợp chất ĐHST BAP, NAA, IBA và kinetin cho kết quả thu được trình bày ở bảng 03: môi trường nuôi cấy bổ sung 4 mg/l BAP + 0,25 mg/l kinetin và NAA, IBA ở các nồng độ khác nhau cho tỷ lệ mẫu cảm ứng tạo cụm chồi khác nhau rõ rệt, dao động 40%–83,3% và số chồi/cụm 2,2–4,8. Nồng độ NAA (0,1–0,2 mg/l) cho tỷ lệ mẫu tạo cụm chồi 73,3%–83,3%, khi tăng nồng độ lên 0,3–0,5 mg/l tỷ lệ mẫu tạo cụm chồi giảm

manh 60%–40% và số chồi/cụm cũng giảm xuống thấp nhất (2,2 chồi/cụm), chất lượng chồi kém. Trong 6 công thức thí nghiệm, công thức CT₂ (4 mg/l BAP + 0,25 mg/l kinetin + 0,1 mg/l NAA + 0,25 mg/l IBA) cho kết quả tạo cụm chồi tốt nhất với tỷ lệ mẫu cảm ứng tạo cụm chồi 76,7% và 4,8 chồi/cụm, chồi cũng có chất lượng tốt nhất. Công thức CT₃ cho tỷ lệ mẫu tạo cụm chồi cao nhất (83,3%), nhưng số chồi/cụm đạt 3,9 thấp hơn công thức CT₂ và chất lượng chồi trung bình.

Bảng 03. Ảnh hưởng của chất ĐHST đến khả năng tạo cụm chồi Mây nếp

Công thức	Chất ĐHST (mg/l)				Tỷ lệ mẫu tạo cụm chồi (%)	Số chồi TB/cụm	Chất lượng chồi
	BAP	Kinetin	NAA	IBA			
CT ₁	4	0,25	0,1	0,125	73,3	4,2	++
CT ₂	4	0,25	0,1	0,25	76,7	4,8	+++
CT ₃	4	0,25	0,1	0,5	83,3	3,9	++
CT ₄	4	0,25	0,2	0,25	74,5	4,8	+++
CT ₅	4	0,25	0,3	0,25	60,0	3,0	+
CT ₆	4	0,25	0,5	0,25	40,0	2,2	+

Ghi chú: +++: cụm chồi có chất lượng tốt (cụm chồi phát triển đều, chồi mập và vươn cao); ++: cụm chồi có chất lượng trung bình; +: cụm chồi có chất lượng kém; -: không tạo được cụm chồi.

Công nghệ sinh học & Giống cây trồng

3.3. Kích thích tăng trưởng chồi Mây nếp

Thí nghiệm kích thích tăng trưởng chồi Mây

nếp được bố trí với 12 công thức có thành phần và nồng độ chất ĐHST khác nhau. Sau 4 tuần

nuôi thu được kết quả trình bày ở bảng 04 cho thấy, khi sử dụng tổ hợp chỉ có BAP và kinetin ở các nồng độ khác nhau chiều cao chồi tăng thêm không đáng kể (1,0 – 1,8 cm), nhưng khi kết hợp BAP với GA₃ và BAP, kinetin với GA₃ chồi tăng trưởng tốt hơn. Công thức TT₁₁ (1 mg/l BAP, 0,25 mg/l kinetin và 0,3 mg/l GA₃) kích

thích chồi mây Nếp tăng trưởng tốt nhất (chiều cao chồi trung bình đạt 4,2 cm sau 4 tuần nuôi, chiều cao tăng thêm so với chồi cây ban đầu 3,1 cm), chồi có chất lượng tốt, đảm bảo tiêu chuẩn để cấy chuyển sang môi trường kích thích ra rễ tạo cây hoàn chỉnh.

Bảng 04. Ảnh hưởng của chất ĐHST đến tăng trưởng chồi Mây nếp

Công thức	Chất ĐHST (mg/l)			Chiều cao chồi (cm)		Chiều cao chồi tăng thêm (cm)	Chất lượng chồi
	BAP	Kinetin	GA ₃	Trước cấy	Sau cấy		
TT ₁	0,5	0,5	-	1,2	2,8	1,6	++
TT ₂	1,0	0,5	-	1,3	3,1	1,8	++
TT ₃	2,0	0,5	-	1,1	2,1	1,0	++
TT ₄	0,5	-	0,1	0,9	3,5	2,6	+++
TT ₅	0,5	-	0,3	1,3	3,6	2,3	+++
TT ₆	0,5	-	0,5	1,2	3,5	2,3	+++
TT ₇	1,0	-	0,1	1,2	3,6	2,4	++
TT ₈	1,0	-	0,3	1,1	3,7	2,6	++
TT ₉	1,0	-	0,5	0,8	3,4	2,6	++
TT ₁₀	0,5	0,25	0,1	1,2	3,8	2,6	+++
TT ₁₁	1,0	0,25	0,3	1,1	4,2	3,1	+++
TT ₁₂	2,0	0,25	0,5	1,2	2,5	1,3	++

Ghi chú: +++: cụm chồi có chất lượng tốt (các chồi phát triển đều, mập); ++: cụm chồi có chất lượng trung bình (các chồi phát triển không đều, chồi nhỏ).

3.4. Kích thích ra rễ tạo cây hoàn chỉnh

Lựa chọn các chồi có chiều cao ≥ 4 cm cấy lên môi trường ra rễ có bổ sung chất ĐHST NAA và IBA với các nồng độ khác nhau. Sau 4 tuần nuôi kết quả thu được trình bày ở bảng

nồng độ 0,5 và 1 mg/l cho tỷ lệ chồi ra rễ 73 - 80%, nhưng khi môi trường bổ sung tổ hợp NAA (0,5 và 1 mg/l) và IBA (0,5 và 1 mg/l) cho tỷ lệ chồi ra rễ cao 80 – 100%. Trong 8 công thức nghiên cứu, công thức R₅ (0,5 mg/l NAA và 0,5 mg/l IBA) cho tỷ lệ chồi ra rễ cao

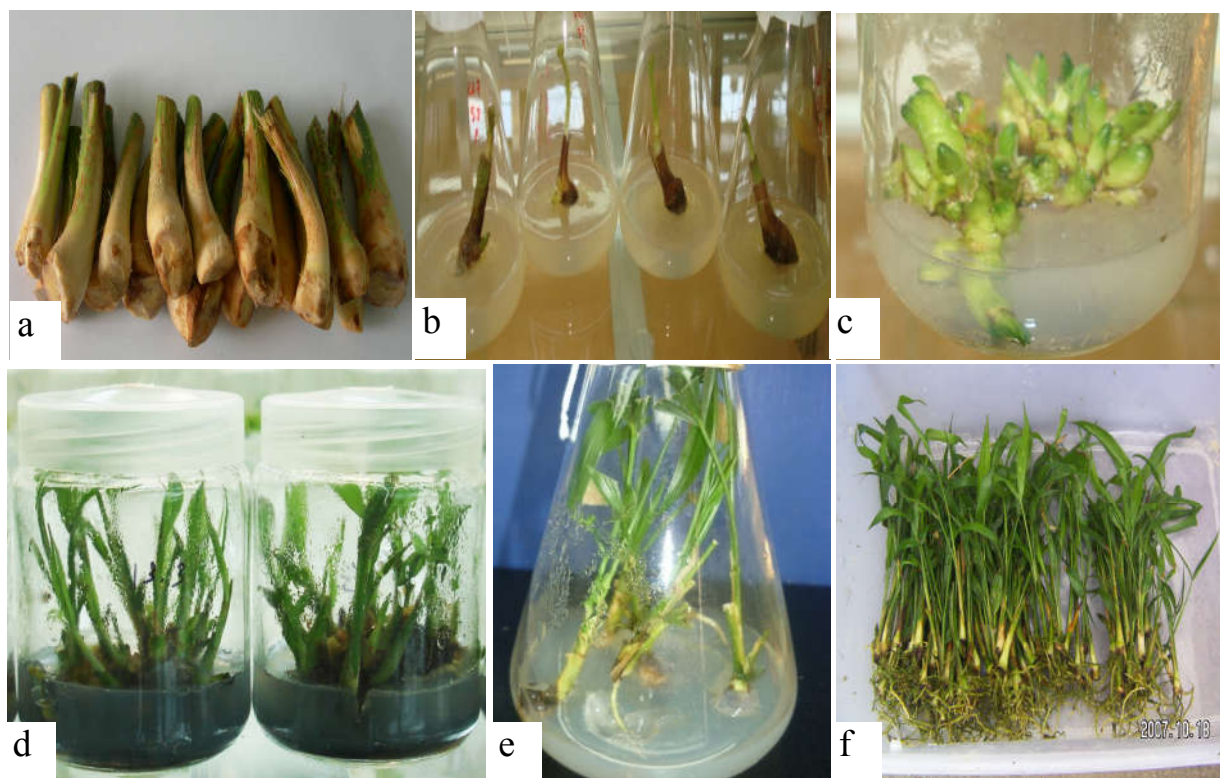
Công nghệ sinh học & Giống cây trồng

Bảng 05. Ảnh hưởng của chất ĐHST đến ra rễ chồi Mây nếp

Công thức	Chất ĐHST (mg/l)		Tỷ lệ chồi ra rễ (%)	Số rễ TB/chồi
	NAA	IBA		
R ₁	0,5	-	73,0	1,1
R ₂	1,0	-	76,7	1,2
R ₃	-	0,5	80,0	1,3
R ₄	-	1,0	74,5	1,4
R ₅	0,5	0,5	100,0	1,5
R ₆	1,0	0,5	93,3	1,4
R ₇	0,5	1,0	80,0	1,3
R ₈	1,0	1,0	83,3	1,4

Sau 4 tuần nuôi, các bình chồi ra rễ được huấn luyện trong nhà lưới 10 ngày để cây con thích nghi dần với điều kiện tự nhiên. Sau khi được rửa sạch agar dưới vòi nước máy, cây

con được vào bầu đất (thành phần ruột bầu 40% đất đồi + 60% cát vàng), cây con được chăm sóc tại vườn ươm với độ ẩm đảm bảo và tránh ánh sáng chiếu trực xạ.



Hình 01. Nhân giống Mây nếp in vitro

a: chồi măng; b: chồi măng tái sinh; c: cụm chồi; d: chồi tăng trưởng; e, f: cây con hoàn chỉnh.

IV. KẾT LUẬN

- Sau khi rửa sạch bằng nước xà phòng loãng, chồi măng Mây nếp được sát khuẩn bề mặt bằng cồn 70% (2 phút) và khử trùng bằng HgCl₂ 0,1% hai lần (lần 1 trong 7 phút và lần 2

Công nghệ sinh học & Giống cây trồng

nhất với tỷ lệ mẫu sạch 85,5% và mẫu tái sinh chồi 76,3%;

- Môi trường có thành phần: MS* bổ sung chất ĐHST 4 mg/l BAP, 0,25 mg/l kinetin, 0,1

mg/l NAA và 0,25 mg/l IBA + 4 mg/l cysteine + 10 mg/l axit corbic + 30 g/l sucrose + 8 g/l agar có tác dụng cảm ứng tạo cụm chồi Mây nếp tốt nhất, với tỷ lệ mẫu tạo cụm chồi 76,7% và 4,8 chồi/cụm;

- Môi trường có thành phần: MS* bổ sung 1 mg/l BAP, 0,25 mg/l kinetin và 0,3 mg/l GA₃ + 30 g/l sucrose + 8 g/l agar + 1 g/l than hoạt tính có tác dụng kích thích chồi Mây nếp tăng trưởng tốt nhất với chiều cao chồi tăng trung bình 4,2 cm sau 4 tuần nuôi;

- Môi trường có thành phần: MS* bổ sung 0,5 mg/l NAA và 0,5 mg/l IBA + 20 g/l sucrose + 8 g/l agar cho tỷ lệ chồi ra rễ 100% và 1,5 rễ/chồi sau 4 tuần nuôi.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Murashige T. And Skoog F., (1962). *A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco*

tissue cultures. *Physiol plant*, 15: 473 – 497.

2. Vũ Thị Huệ, Ngô Văn Thanh, Hà Văn Huân, Hồ Văn Giảng, (2011). *Tạo cây con Song mật bằng phương pháp nuôi cấy in vitro*. *Tạp chí Kinh Tế Sinh Thái*, 38: 118 - 122.

3. Vũ Văn Dũng và Lê Huy Cường, (1996). *Gây trồng và phát triển mây song*. NXB Nông nghiệp Hà Nội.

4. Zeng B., Xu H., Liu Y., Yin G., and Zhang F., (1999). *The impact of macro-elements strength on in vitro proliferation of rattans*. *Journal of Central South Forestry University*, 19: 563-569.

5. Zeng B., (1997). *Tissue culture of Calamus egregius*. *Journal of Central South Forestry University*, 17: 563-569.

6. Zhang F., (1993). *A study on Rattan tissue culture*. *Forest Research*, 6: 486-492.

7. Zhuang C., and Zhou J., (1991). *Plant regeneration in tissue culture of Rattan*. *Acta Botanica Yunnanica*, 13: 97-100.

PROPOGATION OF CALAMUS TETRADACTYLUS HANCE SHOOT BY TISSUE CULTURE

**Bui Van Thang, Nguyen Thi Mai Duong,
Nguyen Thi Minh Hang, Ho Van Giang, Ha Van Huan**

SUMMARY

We studied the effectiveness of different treatments for producing plantlets of *Calamus tetradactylus* Hance using in vitro tissue culture. Our result show that the most suitable bud sterilization method was using KT₅ (ethanol 70% 2 minutes + HgCl₂ 0.1% 7 minutes + HgCl₂ 0.1% 3 minutes); modified MS medium with double macroelement (MS*) supplemented with 4 mg/l 6-benzylaminopurine (BAP), 0.25 mg/l kinetin, 0.1 mg/l 1-Naphthaleneacetic acid (NAA), 0.25 mg/l indole-3-butyric acid (IBA), 4 mg/l cysteine, and 10 mg/l ascorbic acid was the most effective medium for multi-shoot regeneration (76.7% explant regenerated with 4.8 shoots/explant); Shoot elongation was best achieved on MS* medium supplemented with 1.0 mg/l BAP, 0.25 mg/l kinetin, 0.3 mg/l gibberellic acid (GA₃), and 1 mg/l activated charcoal (average height of shoot 4.2 cm, after 4 weeks of cultivation). Regenerated shoots were rooted on MS* medium contained 0.5 mg/l NAA, and 0.5 mg/l IBA, the ratio of rooted shoots was 100%. Thereafter, rooted shoots were transferred from *in vitro* condition to the nursery. *In vitro* plantlets were acclimatized and transplanted in 40% soil and 60% sand. Plantlets grew and developed normally.

Keywords: *Calamus tetradactylus Hance, multi-shoot, regeneration, tissue culture.*

Người phản biện: PGS.TS. Phạm Văn Điền