

ỨNG DỤNG KỸ THUẬT BÌNH PHẢN ỨNG SINH HỌC TRONG VI NHÂN GIỐNG CÂY CỎ VETIVER (*Vetiveria zizanioides* L.)

Nguyễn Văn Ấy, Nguyễn Quốc Hội và Lê Văn Hòa¹

ABSTRACT

Temporary Immersion Bioreactor (TIB) is an efficient culture technique, which is applied on many plant species, aimed at a rapid proliferation of large scale plantlets with high quality. In order to apply this new technique to propagation of, the results showed that: (1) The trial of effects of Benzyl Adenine (BA) and a combination of BA and Naphthalene Acetic Acid (NAA) on growth medium revealed that liquid MS medium supplemented with 2 ppm BA yielded a stable multiplication rate. It was thus, selected for further experiment by using TIB; (2) The trial of effects of TIB with different amount of filters and culture conditions on plant growth indicated that a TIB (1 l volume) equipped with 2 microfilters and placed in the nethouse conditions could reach the best multiplication rate. In average, from one original shoot, there are 42 billions of new shoots can be produced per year. Therefore, the multiplication rate is 90 folds higher than other methods of micropropagation.

Keywords: *Temporary Immersion Bioreactor (TIB), Vetiver, Benzyl Adenine, Naphthalene acetic acid*

Title: *Application of Temporary Immersion Bioreactor Technique to Micropropagation of Vetiver (*Vetiveria zizanioides* L.) Grass*

TÓM TẮT

Bình phản ứng sinh học là một kỹ thuật mới đã và đang được ứng dụng trên nhiều đối tượng thực vật nhằm nhân nhanh số lượng cây giống. Thí nghiệm được thực hiện trên cỏ Vetiver, kết quả cho thấy: (1) Ảnh hưởng của Benzyl Adenine (BA) và các nghiệm thức kết hợp giữa BA và Naphthalene acetic acid (NAA), môi trường thích hợp cho vi nhân giống cỏ Vetiver là môi trường MS lỏng có bổ sung 2 ppm BA. Môi trường này được chọn để tiếp tục nhân trong bình phản ứng sinh học (TIB) nhằm đạt hệ số nhân chồi cao nhất; (2) Hiệu quả của bình TIB có gắn 1, 2 hoặc 3 màng lọc thông khí và điều kiện môi trường nuôi cấy cho thấy nghiệm thức có 2 màng lọc khí và được đặt ở điều kiện bên ngoài phòng tăng trưởng là có thể đạt hệ số nhân chồi cao nhất (với bình 1 lít), trên 42 tỷ chồi/năm, gấp 90 lần so với phương pháp nhân giống thông thường.

Từ khoá: *Bình phản ứng sinh học, Vetiver, Benzyl Adenine, Naphthalene acetic acid*

1 MỞ ĐẦU

Cây cỏ Vetiver là một trong những loại cỏ được trồng ở nhiều nước trên thế giới nhằm mục đích chủ yếu là bảo vệ đất đai, chống xói mòn, chống ô nhiễm môi trường. Ở nước ta cũng đã trồng loại cỏ này dọc theo ven đê, ven sông tuy nhiên diện tích và mức độ sử dụng còn rất hạn chế vì số lượng của chúng còn quá ít.

¹ Khoa Nông Nghiệp và Sinh Học Ứng Dụng

Cây cỏ Vetiver thuộc họ Gramineae, trong họ này có 3 loài phổ biến được trồng là: *Vetiveria zizanioides*, *Vetiveria nigratina* và *Vetiveria nemoralis* (Phạm Hoàng Hộ, 2000). Loài cỏ này có một sức sống rất mạnh mẽ. Bộ rễ của chúng phát triển thành chùm đan xen trong đất và có thể chịu được lực bằng 1/6 lần so với tính chịu lực của bê tông (75MPa) (Mekonnen, 2000). Mặt khác, chúng lại có khả năng thích nghi ở nhiều vùng sinh thái khác nhau.

Phương pháp nhân giống *in vitro* đã và đang được phát triển rất mạnh mẽ nhằm cung cấp một số lượng lớn giống cây trồng đáp ứng yêu cầu trong thời gian ngắn. Bên cạnh đó, Temporary Immersion Bioreactor (TIB), được gọi là bình phản ứng sinh học, là phương pháp mới đang được ứng dụng ở nhiều nơi trên thế giới và trên nhiều đối tượng thực vật. Mục đích của phương pháp này là làm gia tăng sự trao đổi khí trong môi trường nuôi cấy để gia tăng sinh khối. Do đó, cây con sẽ được tạo ra nhiều hơn trong thời gian ngắn.

Đề tài nhằm mục đích tìm ra môi trường và loại bình phản ứng sinh học (TIB) thích hợp để đạt hệ số nhân giống cao nhất. Qua đó có thể đáp ứng được nhu cầu về con giống đang thiếu hụt hiện nay, đồng thời góp phần làm giảm chi phí sản xuất và hạ giá thành cây con giống.

2 PHƯƠNG TIỆN VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Phương tiện

- Chọn những cây cỏ Vetiver khoảng 4-5 tháng tuổi, sinh trưởng tốt, không sâu bệnh, được lấy tại nhà lưới của Bộ môn Sinh Lý-Sinh Hoá, khoa Nông Nghiệp và Sinh Học Ứng Dụng, trường Đại Học Cần Thơ.
- Thí nghiệm được tiến hành tại phòng Nuôi cấy mô của Bộ môn Sinh Lý-Sinh Hoá, khoa Nông Nghiệp và Sinh Học Ứng Dụng, trường Đại học Cần Thơ từ 1/2005-6/2005.

2.2 Phương pháp

2.2.1 Thí nghiệm 1: Nhân chồi bằng phương pháp *in vitro*

- Mục đích: tìm môi trường thích hợp để đạt hệ số nhân cao nhất
- Thí nghiệm được bố trí theo thể thức hoàn toàn ngẫu nhiên, với 10 nghiệm thức, 4 lần lặp lại, mỗi lần lặp lại quan sát 4 mẫu chồi. Các nghiệm thức được trình bày qua Bảng 1 sau đây:

Bảng 1: Nồng độ BA và NAA ở các nghiệm thức khác nhau

Nghiệm thức	Nồng độ BA (ppm)	Nồng độ NAA (ppm)
Đôi chứng	0	0
BA	1	0
BA	2	0
BA	4	0
BA+NAA	1	0,10
BA+NAA	1	0,20
BA+NAA	2	0,20
BA+NAA	2	0,40
BA+NAA	4	0,40
BA+NAA	4	0,80

2.2.2 Thí nghiệm 2: Nhân chồi *in vitro* kết hợp với sử dụng bình phản ứng sinh học (TIB)

- Mục đích tìm ra một dạng bình thích hợp cho hệ số nhân giống cao nhất và hiệu quả kinh tế nhất.
- Thí nghiệm được bố trí theo thể thức hoàn toàn ngẫu nhiên 2 nhân tố: số màng lọc thông khí của bình (1, 2 và 3 màng lọc khí) và hai điều kiện môi trường nuôi cấy. Mỗi thí nghiệm có 3 nghiệm thức, mỗi nghiệm thức có 9 lần lặp lại, mỗi lần lặp lại tương ứng 9 chồi.
- Mỗi ngày, 10 ml môi trường được cung cấp cho mỗi bình.

2.2.3 Chỉ tiêu theo dõi

- Các chỉ tiêu quan sát bao gồm trọng lượng cụm chồi, số chồi >3 cm, số chồi >2 cm. Quan sát và ghi nhận chỉ tiêu 2 tuần/lần.
- Tính thống kê bằng chương trình MSTATC.
- Dùng chương trình Microsoft Excel để vẽ đồ thị.
- Tính hệ số nhân giống theo George (1993):

$$K = (N/N_0)^{T/t}$$

Trong đó:

- K: số chồi
- N_0 : số chồi ban đầu
- N: số chồi thu được sau một lần cấy
- T: thời gian cần để thực hiện (tuần)
- t: thời gian giữa hai lần cấy chồi (tuần).

3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Thí nghiệm 1: Nhân chồi cỏ Vetiver (*Vetiveria zizanioides* L.) bằng phương pháp *in vitro*

Mục đích của thí nghiệm là tìm môi trường thích hợp để đạt hệ số nhân cao nhất. Các kết quả được ghi nhận như sau:

3.1.1 Trọng lượng cụm chồi

Kết quả được trình bày ở Bảng 2 cho thấy trọng lượng của các cụm chồi ở các nghiệm thức đều có xu hướng gia tăng, tuy nhiên giữa các nghiệm thức không khác biệt có ý nghĩa thống kê vào giai đoạn 2 tuần sau khi cấy. Nguyên nhân có thể là do các mẫu chồi đang ở giai đoạn phân hoá mầm chồi nên chưa có sự khác biệt nhiều giữa các nghiệm thức. Vào giai đoạn 4, 6, 8 và 10 tuần sau khi cấy trọng lượng cụm chồi đã có sự gia tăng đáng kể qua các nghiệm thức và có sự khác biệt thống kê giữa các nghiệm thức ở mức ý nghĩa 1%, trong đó nghiệm thức 2 ppm BA và nghiệm thức 4 ppm BA tạo ra những chồi to hơn, khỏe hơn nên trọng lượng cụm chồi ở 2 nghiệm thức này luôn là cao nhất. Trong quá trình tiến hành thí nghiệm ở các nghiệm thức có BA và NAA kết hợp, có sự xuất hiện của các cụm chồi (màu hơi trắng xốp và gòn giống callus) từ tuần thứ 6 trở đi. Do đó, trọng lượng cụm chồi ở các nghiệm thức này tăng lên đáng kể.

Bảng 2: Ảnh hưởng của nồng độ BA và NAA đến trọng lượng cụm chồi (g) theo thời gian

Nghiệm thức (ppm)	Tuần sau khi cấy				
	2	4	6	8	10
Đối chứng	0,33 ^{ab}	0,43 ^d	0,47 ^d	0,63 ^f	0,39 ^d
BA 1	0,53 ^{ab}	0,79 ^{abc}	1,36 ^b	1,99 ^{bcd}	2,26 ^b
BA 2	0,58 ^a	1,10 ^a	1,78 ^a	2,31 ^b	2,57 ^{ab}
BA 4	0,35 ^b	0,95 ^{ab}	1,80 ^a	3,33 ^a	2,63 ^{ab}
BA 1+NAA 0,1	0,43 ^{ab}	0,72 ^{bcd}	1,14 ^{bc}	1,55 ^{de}	1,73 ^c
BA 1+NAA 0,2	0,45 ^{ab}	0,84 ^{abc}	1,29 ^b	1,76 ^{cde}	2,65 ^{ab}
BA 2+NAA 0,2	0,49 ^{ab}	0,77 ^{bc}	1,37 ^b	1,69 ^{cde}	2,95 ^a
BA 2+NAA 0,4	0,35 ^b	0,60 ^{cd}	1,04 ^{bc}	1,74 ^{cde}	2,47 ^{ab}
BA 4+NAA 0,4	0,38 ^b	0,66 ^{bcd}	1,18 ^{bc}	2,09 ^{bc}	2,57 ^{ab}
BA 4+NAA 0,8	0,44 ^b	0,51 ^{cd}	0,79 ^d	1,34 ^e	2,33 ^b
F _{tính}	ns	**	**	**	**
CV (%)	28,05	27,37	22,52	16,14	15,55

Trong cùng một cột các số có chữ theo sau giống nhau không khác biệt có ý nghĩa thống kê.

ns: không khác biệt ý nghĩa thống kê

* và **: khác biệt thống kê ở mức ý nghĩa 5% và 1%

3.1.2 Số lượng chồi lớn (chồi hữu hiệu, > 3 cm)

Kết quả ở Bảng 3 cho thấy số chồi lớn (chồi hữu hiệu) đã có sự gia tăng nhanh và có sự khác biệt thống kê giữa các nghiệm thức ở mức ý nghĩa 1% ở các thời điểm 2, 4, 6, 8 và 10 tuần sau khi cấy. Trong đó, nghiệm thức có nồng độ 2 ppm BA và 4 ppm BA có số lượng chồi hữu hiệu cao nhất nhưng giữa chúng lại không có sự khác biệt. Kết quả này cũng phù hợp với kết quả nghiên cứu của Võ Thanh Tân (2004). Nguyên nhân có thể là do ở các nghiệm thức kết hợp BA và NAA không có hiệu quả cho sự phát triển chồi hữu hiệu ở các nồng độ này, trong khi ở nghiệm thức không kết hợp các cụm chồi hữu hiệu tiếp tục hình thành và phát triển thành các chồi hữu hiệu mới.

Bảng 3: Ảnh hưởng của nồng độ BA và NAA đến số lượng chồi lớn theo thời gian

Nghiệm thức (ppm)	Tuần sau khi cấy				
	2	4	6	8	10
Đối chứng	0,00 ^c	0,000 ^f	0,25 ^d	0,38 ^d	0,19 ^d
BA 1	0,75 ^a	2,13 ^c	5,06 ^b	6,88 ^b	12,81 ^b
BA 2	0,81 ^a	4,75 ^a	10,1 ^a	13,88 ^a	19,56 ^a
BA 4	0,56 ^b	3,13 ^b	9,31 ^a	12,75 ^a	19,41 ^a
BA 1+NAA 0,1	0,38 ^b	1,06 ^{de}	2,75 ^{bc}	4,50 ^{bc}	8,00 ^c
BA 1+NAA 0,2	0,06 ^c	0,75 ^{efg}	3,25 ^{bc}	2,94 ^c	6,31 ^c
BA 2+NAA 0,2	0,06 ^c	1,63 ^{cd}	4,06 ^{bc}	4,06 ^c	8,38 ^c
BA 2+NAA 0,4	0,13 ^c	0,81 ^{def}	3,31 ^{bc}	3,31 ^c	5,38 ^c
BA 4+NAA 0,4	0,00 ^c	1,36 ^{cde}	3,31 ^{bc}	4,31 ^c	5,50 ^c
BA 4+NAA 0,8	0,06 ^c	0,50 ^{fg}	1,19 ^{cd}	2,44 ^{cd}	5,19 ^c
F _{tính}	**	**	**	**	**
CV (%)	43,48	34,14	35,57	29,97	29,21

Trong cùng một cột các số có chữ theo sau giống nhau không khác biệt có ý nghĩa thống kê.

** : khác biệt thống kê ở mức ý nghĩa 1%.

3.1.3 Số lượng chồi nhỏ (2–3 cm)

Kết quả ở Bảng 4 cho thấy vào thời điểm 2, 4, 6 và 8 tuần sau khi cấy các nghiệm thức đã có sự khác biệt thống kê ở mức ý nghĩa 1%, trong đó nghiệm thức 2 và 4 ppm BA là cao nhất so với các nghiệm thức còn lại. Nghiệm thức đối chứng hầu như tạo chồi rất ít trong suốt thời gian thí nghiệm, vì vậy nó có trọng lượng, số chồi lớn cũng như số chồi nhỏ là ít nhất trong tất cả các nghiệm thức.

Đến giai đoạn 10 tuần số lượng chồi nhỏ ở các nghiệm thức tương đương nhau, cao nhất là ở nghiệm thức có bổ sung 4 ppm BA, riêng ở nghiệm thức đối chứng và nghiệm thức có bổ sung 1 ppm BA kết hợp với 0,2 ppm NAA là rất ít, các nghiệm thức có sự khác biệt thống kê ở mức ý nghĩa 5%.

Bảng 4: Ảnh hưởng của nồng độ BA và NAA đến số lượng chồi nhỏ theo thời gian

Nghiệm thức (ppm)	Tuần sau khi cấy				
	2	4	6	8	10
Đối chứng	0,00 ^d	0,00 ^d	0,00 ^c	0,00 ^e	0,06 ^c
BA 1	0,38 ^b	0,50 ^{cd}	0,36 ^{bc}	0,94 ^{bc}	1,63 ^{ab}
BA 2	0,81 ^a	1,38 ^{ab}	0,81 ^{bc}	1,16 ^b	1,69 ^{ab}
BA 4	0,31 ^b	1,75 ^a	2,31 ^a	3,44 ^a	2,00 ^a
BA 1+NAA 0,1	0,19 ^{bcd}	0,94 ^{bc}	0,63 ^{bc}	0,75 ^{cd}	1,00 ^b
BA 1+NAA 0,2	0,06 ^d	0,44 ^{cd}	0,57 ^{bc}	0,81 ^{bcd}	0,75 ^{bc}
BA 2+NAA 0,2	0,31 ^b	0,56 ^{cd}	0,81 ^{bc}	0,94 ^{bc}	1,19 ^{ab}
BA 2+NAA 0,4	0,13 ^d	0,31 ^d	1,06 ^b	0,31 ^{de}	1,13 ^{ab}
BA 4+NAA 0,4	0,13 ^{cd}	0,38 ^{cd}	0,75 ^{bc}	1,18 ^{bc}	1,13 ^{ab}
BA 4+NAA 0,8	0,00 ^d	0,00 ^d	0,63 ^{bc}	0,94 ^{bc}	1,25 ^{ab}
F _{tính}	**	**	**	**	*
CV (%)	50,85	64,91	66,25	33,70	49,37

Trong cùng một cột các số có chữ theo sau giống nhau không khác biệt có ý nghĩa thống kê.

ns: không khác biệt ý nghĩa thống kê.

* và **: khác biệt thống kê ở mức ý nghĩa 5% và 1%.

3.2 Thí nghiệm 2: Nhân chồi *in vitro* kết hợp với sử dụng bình phản ứng sinh học (TIB)

3.2.1 Số lượng chồi hữu hiệu (>3 cm)

Kết quả thống kê ở Bảng 5 cho thấy qua 6 tuần sau khi cấy số chồi hữu hiệu trong bình phản ứng sinh học (TIB) tăng rất nhanh và khác biệt thống kê ở mức ý nghĩa 5% về điều kiện môi trường thí nghiệm, trong đó môi trường nuôi cấy trong phòng tăng trưởng là tốt hơn so với bên ngoài. Sự khác biệt này có thể là do trong phòng tăng trưởng được đảm bảo tốt hơn và môi trường bên ngoài có nhiều thay đổi về thời tiết hơn nên các mẫu chồi chưa ổn định được so với môi trường trong phòng cho nên có sự chênh lệch này. Tuy nhiên, yếu tố về số màng lọc cũng như sự tương tác giữa số màng lọc và môi trường nuôi cấy lại không có sự khác biệt về mặt thống kê.

Kết quả ở Bảng 5 cũng cho thấy không có sự khác biệt về số lượng chồi lớn giữa các nghiệm thức ở trong và ngoài phòng tăng trưởng cũng như sự tương tác giữa môi trường nuôi cấy và số màng lọc khí ở giai đoạn 4 tuần và 6 tuần sau khi cấy. Điều này cho thấy chỉ cần sử dụng 1-2 màng lọc khí cho bình TIB thể tích 1 lít là

có thể trao đổi khí tốt cho sự phát triển của chồi cỏ ở hai điều kiện bên trong phòng tăng trưởng và điều kiện bên ngoài.

Bảng 5: Ảnh hưởng của điều kiện môi trường nuôi cấy và số màng lọc khí lên sự tăng trưởng của số chồi hữu hiệu theo thời gian

Nghiệm thức	Tuần sau khi cấy								
	2			4			6		
	Trong phòng	Ngoài phòng	TB số chồi (lọc)	Trong phòng	Ngoài phòng	TB số chồi (lọc)	Trong phòng	Ngoài phòng	TB số chồi (lọc)
1 lọc	3,11	3,44	3,28	8,11	12,00	10,06	13,78	18,56	16,17
2 lọc	4,22	2,33	3,28	9,56	8,89	8,78	16,78	17,89	17,33
3 lọc	4,67	3,33	4,00	10,44	9,56	10,00	17,00	17,22	17,11
TB số chồi (ĐKNC)	4,00 ^a	3,04 ^b		9,37	9,85		15,85	17,89	
F _{ĐKNC} (A)	*			ns			ns		
F _{lọc} (B)	ns			ns			ns		
F(A*B)	ns			ns			ns		
CV (%)	39,06			37,32			29,73		

F_{ĐKNC}: giá trị F của điều kiện nuôi cấy (trong và ngoài phòng tăng trưởng)

TB số chồi (ĐKNC): trung bình số chồi ở hai điều kiện nuôi cấy

TB số chồi (lọc): trung bình số chồi ở các nghiệm thức về số lọc

Trong cùng một cột các số có chữ theo sau giống nhau không khác biệt có ý nghĩa thống kê.

ns: không khác biệt ý nghĩa thống kê

*: khác biệt thống kê ở mức ý nghĩa 5%

3.2.2 Số lượng chồi nhỏ (2-3 cm)

Bảng 6: Ảnh hưởng của điều kiện môi trường nuôi cấy và số màng lọc khí lên sự tăng trưởng của số chồi nhỏ theo thời gian

Nghiệm thức	Tuần sau khi cấy								
	2			4			6		
	Trong phòng	Ngoài phòng	TB số chồi (lọc)	Trong phòng	Ngoài phòng	TB số chồi (lọc)	Trong phòng	Ngoài phòng	TB số chồi (lọc)
1 lọc	1,44	1,78	1,61	3,33	3,78	3,56	5,89	8,89	7,39 ^b
2 lọc	1,44	2,22	1,83	4,00	2,78	3,39	7,33	12,44	9,89 ^a
3 lọc	1,67	1,78	1,72	4,44	3,44	3,94	10,22	8,77	9,50 ^{ab}
TB số chồi (ĐKNC)	1,52	1,93		3,93	3,33		7,82 ^b	10,04 ^a	
F _{ĐKNC} (A)	ns			ns			**		
F _{lọc} (B)	ns			ns			*		
F(A*B)	ns			ns			**		
CV (%)	52,41			41,24			33,26		

F_{ĐKNC}: giá trị F của điều kiện nuôi cấy (trong và ngoài phòng tăng trưởng)

TB số chồi (ĐKNC): trung bình số chồi ở 2 điều kiện nuôi cấy

TB số chồi (lọc): trung bình số chồi ở các nghiệm thức về số lọc khí

ns: không khác biệt ý nghĩa thống kê

* và **: khác biệt thống kê ở mức ý nghĩa 5% và 1%

Kết quả thống kê ở Bảng 6 cho thấy không có sự khác biệt ý nghĩa thống kê về số chồi nhỏ qua các nghiệm thức được bố trí trong và ngoài phòng tăng trưởng và không có sự tương tác của hai yếu tố điều kiện môi trường nuôi cấy và số màng lọc trong bình TIB ở thời điểm 2 và 4 tuần sau khi cấy.

Vào thời điểm 6 tuần sau khi cấy, sự tương tác giữa điều kiện môi trường nuôi cấy và các nghiệm thức về số màng lọc ở mức ý nghĩa 1%. Giữa các nghiệm thức về số màng lọc cũng có sự khác biệt ý nghĩa thống kê ở mức ý nghĩa 5%. Trong đó nghiệm thức 2 màng lọc và nghiệm thức 3 màng lọc khí là tốt nhất và giữa chúng không có sự khác biệt nhau. Dựa vào kết quả được trình bày ở Bảng 7 ta chỉ cần sử dụng bình TIB có 2 màng lọc khí và được nuôi cấy bên ngoài điều kiện thường là có thể thích hợp cho sự nhân nhanh chồi cỏ Vetiver.

Bảng 7: Tương tác của điều kiện môi trường nuôi cấy và số màng lọc khí lên sự tăng trưởng của số chồi nhỏ vào thời điểm 6 tuần sau khi cấy

Điều kiện môi trường nuôi cấy	Số lọc khí	Trung bình số chồi nhỏ
Trong phòng	1	5,89 ^d
	2	7,33 ^{cd}
	3	10,22 ^b
Ngoài phòng	1	8,89 ^{bc}
	2	12,44 ^a
	3	8,78 ^{bc}

Trong cùng một cột các số có chữ theo sau giống nhau không khác biệt có ý nghĩa thống kê

Tương tác có ý nghĩa thống kê ở mức ý nghĩa 1%

3.2.3 Trọng lượng cụm chồi

Bảng 8: Ảnh hưởng của điều kiện môi trường nuôi cấy và số lọc khí lên sự tăng trọng lượng cụm chồi (g) ở thời điểm 6 tuần sau khi cấy

Nghiệm thức	Điều kiện môi trường nuôi cấy		
	Trong phòng	Ngoài phòng	TBTL cụm chồi (lọc)
1 lọc	1,49	1,70	1,60 ^b
2 lọc	1,74	1,96	1,85 ^{ab}
3 lọc	1,87	2,22	2,05 ^a
TBTL cụm chồi (ĐKNC)	1,70	1,96	
F _{ĐKNC} (A)	ns		
F _{lọc} (B)	*		
F(A*B)	ns		
CV (%)	28,96		

F_{ĐKNC}: giá trị F của điều kiện nuôi cấy (trong và ngoài phòng tăng trưởng)

TBTL cụm chồi (ĐKNC): trung bình trọng lượng cụm chồi ở 2 điều kiện nuôi cấy

TBTL cụm chồi (lọc): trung bình trọng lượng cụm chồi ở các nghiệm thức về số lọc khí

Trong cùng một cột các số có chữ theo sau giống nhau không khác biệt có ý nghĩa thống kê.

ns: không khác biệt ý nghĩa thống kê

**: khác biệt thống kê ở mức ý nghĩa 5%*

Kết quả phân tích thống kê ở Bảng 8 cho thấy có sự khác biệt của các nghiệm thức về số màng lọc ở mức ý nghĩa 5%. Trong đó nghiệm thức 2 màng lọc và 3 màng

lọc là không khác biệt nhau về trọng lượng. Tuy nhiên, yếu tố về môi trường nuôi cấy cũng như sự tương tác giữa môi trường nuôi cấy và số màng lọc lại không có sự khác biệt ý nghĩa thống kê trong kiểm định. Do đó, ta chỉ cần bình TIB có hai màng lọc và đặt ở bên ngoài phòng tăng trưởng là thích hợp.

3.2.4 Hệ số nhân giống

Dựa vào công thức tính hệ số nhân giống của George (1993) và kết quả nhân chồi đã được trình bày ở Bảng 5, nếu chọn nghiệm thức nhân chồi (có 2 ống lọc khí và nuôi cấy ở điều kiện bình thường) trong môi trường MS có bổ sung BA với nồng độ 2 ppm thì sau 6 tuần thu được trung bình là 16,8 chồi. Về mặt lý thuyết, sẽ tạo ra được trên 42 tỉ chồi/năm từ một chồi ban đầu. Như vậy, nếu ta tiến hành vi nhân giống cỏ Vetiver bên ngoài phòng tăng trưởng bằng phương pháp TIB không những giảm được chi phí đầu tư mà giá thành sản phẩm cũng giảm đi rất nhiều.

3.2.5 Giá thành sản xuất

Giá thành sản xuất cây con là tổng chi phí cho qui trình sản xuất chia cho số lượng cây tạo ra trên một đơn vị thời gian. Theo lý thuyết có hai khoản chi chính yếu được tính: (i) Chi phí xây dựng, vận hành của diện tích khoảng không gian của phòng tăng trưởng; (ii) Chi phí cho tử cấy vận hành trong một khoảng thời gian (Võ Thanh Tân, 2004). Dựa vào cách tính chi phí này thì rõ ràng rằng chi phí xây dựng phòng tăng trưởng với nhiệt độ $26 (\pm 2)^{\circ}\text{C}$, ánh sáng 1000 lux, 16 giờ chiếu sáng/ngày được thay thế bằng chi phí xây dựng nhà lưới có mái che thoả mãn yêu cầu $29 (\pm 2)^{\circ}\text{C}$, ẩm độ $71 (\pm 2)\%$ sử dụng ánh sáng tự nhiên (1100 lux) thì chi phí đầu tư sẽ thấp hơn rất nhiều. Chi phí vận hành tử cấy như nhau bởi các khâu tách, cấy truyền đều phải thực hiện trong tử cấy. Tuy nhiên, với phương pháp bình TIB thì công cho khâu tách và cấy chuyên là ít hơn nhiều so với phương pháp nuôi cấy trong phòng tăng trưởng. Tổng chi phí sản xuất sẽ thấp hơn trong phòng tăng trưởng trên 99%.

4 KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

4.1 Kết luận

- Môi trường thích hợp cho vi nhân giống cỏ Vetiver là môi trường lỏng MS có bổ sung 2 ppm BA để có thể đạt số chồi cao nhất.
- Số màng lọc khí tốt nhất cho vi nhân giống cỏ Vetiver là 2 màng lọc cho bình TIB thể tích 1 lít.
- Điều kiện môi trường nuôi cấy giữa trong và ngoài phòng tăng trưởng không có khác biệt ý nghĩa thống kê.
- Hệ số nhân giống của phương pháp sử dụng bình TIB cao gấp 90 lần so với phương pháp nhân giống *in vitro* thông thường.
- Giá thành sản xuất cây con giống cỏ Vetiver của phương pháp nhân giống bằng bình TIB thấp hơn so với phương pháp nhân giống thông thường 99 lần.

4.2 Đề nghị

- Sử dụng loại bình TIB 1 lít có 2 màng lọc khí và được bố trí ở điều kiện tự nhiên để nhân nhanh cỏ Vetiver và đồng thời làm giảm giá thành sản xuất cây con giống.
- Cần được tiếp tục theo dõi và nghiên cứu nhằm hoàn thiện hơn nữa về bình phản ứng sinh học trong vi nhân giống ở qui mô lớn hơn; góp phần ứng dụng rộng rãi trên các đối tượng cây trồng khác.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

GEORGE, E.F., 1993. Plant Propagation by Tissue Culture, 2nd Ed.. Exegetics Limited, p.441.

MEKONNEN, A. 2000. Handbook on Vetiver Grass Technology, From Propagation to Utilisation, For Ethiopia, p.1-23.

PHẠM HOÀNG HỘ. 2000. Cây cỏ Việt Nam, Quyển 3, NXB Trẻ, trang 710.

VÕ THANH TÂN. 2004. Nghiên cứu phương pháp nhân giống cỏ Vestiver, Luận án Thạc sĩ khoa học Nông Nghiệp, Trường Đại học Cần Thơ.