

ĐẶC ĐIỂM SINH THÁI VÀ KỸ THUẬT NHÂN GIỐNG LOÀI THANH MAI (*Myrica esculenta* Buch. - Ham. ex D. Don) BẰNG PHƯƠNG PHÁP NUÔI CẤY MÔ TẠI LÂM ĐỒNG

Phạm Ngọc Tuấn^{1*}, Lê Cảnh Nam², Nguyễn Thanh Nguyên², Phan Hoàng Đại¹,
Phan Xuân Huyền³, Võ Thị Kim Nga¹, Mai Đức Bình¹, Lương Văn Dũng¹, Hoàng Tất Dương⁴

¹ Khoa Nông Lâm, Trường Đại học Đà Lạt

² Viện Khoa học Lâm nghiệp Nam Trung Bộ và Tây Nguyên

³ Viện Nghiên cứu Khoa học Tây Nguyên, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

⁴ Quỹ bảo vệ và phát triển rừng Lâm Đồng

TÓM TẮT

Cây Thanh mai (*Myrica esculenta*) là một loài cây dược liệu có giá trị kinh tế, được sử dụng với nhiều công dụng khác nhau, thuộc nhóm Actinorhizal plants đã được chứng minh là hữu ích trong canh tác trên đất thiếu nitơ. Nghiên cứu về các đặc điểm phân bố, lâm học, sinh thái, và nhân giống bằng kỹ thuật nuôi cấy mô sẽ là cơ sở cho việc phát triển các mô hình trồng cây Thanh mai dưới tán rừng thông tại Lâm Đồng. Tại Lâm Đồng có 2 phân loài/thứ Thanh mai với/có vùng phân bố và kiểu phân bố khác nhau. Đối với loài Thanh mai quả nhỏ, có phân bố ở Đơn Dương, Đức Trọng, Lâm Hà, Đam Rông, Đà Lạt và một phần huyện Di Linh, tham gia vào công thức tổ thành của những loài có ưu thế sinh thái (IV% > 3%), đây là loài cây ưa sáng và chịu hạn, hàm lượng mùn trong đất thấp, pH thấp (< 5,5). Ngược lại, đối với loài Thanh mai quả to có phân bố chủ yếu ở Vườn quốc gia Bidoup - Núi Bà, trong kiểu rừng lá rộng thường xanh và kiểu rừng hỗn giao cây lá rộng lá kim, với kiểu phân bố cụm với số lượng cá thể phát triển thành cụm nhỏ (3-4 cá thể) khắp khu vực, đây là loài cây chịu bóng, mọc ven khe suối, hàm lượng mùn trong đất cao, pH trung bình (6-7). Nghiên cứu về nhân giống bằng phương pháp nhân giống *in vitro*, hạt Thanh mai được sử dụng làm mẫu cấy ban đầu để thiết lập các mẫu chồi cấy. Sự phát triển của chồi Thanh mai trên các môi trường dinh dưỡng bổ sung các chất điều hòa sinh trưởng khác nhau: môi trường Murashige và Skoog (MS) và môi trường cây thân gỗ (WPM), 6- benzyladenine (BA) (0,5-1,5 mg/l), α -naphthaleneacetic acid (NAA) và indole-3-butyric acid (IBA) (0,5-1,5 mg/l) được khảo sát. Trong 9 tuần nuôi cấy, không có sự khác biệt đáng kể giữa hai môi trường WPM và môi trường MS. Tuy nhiên, các đoạn thân và lá của mẫu chồi Thanh mai trong môi trường WPM lớn, thẳng và khỏe hơn so với trong môi trường MS. Nồng độ BA tốt nhất cho mẫu Thanh mai *in vitro* là 0,5 mg/l BA. Nồng độ NAA tối ưu trong môi trường tạo rễ *in vitro* là 0,5 mg/l NAA sau 7 tuần (90%). Việc thuần hóa cây con có nguồn gốc *in vitro* rất khó khăn do tỷ lệ chết của cây con khá cao vì sự xuất hiện của nấm bệnh do độ ẩm cao trong nhà kính. Tuy nhiên, 70-75% cây Thanh mai con được nhân giống thành công trong nhà kính và kết quả cũng chỉ ra rằng môi trường hỗn hợp giữa 50% đất xơ dừa + 50% Perlite phù hợp hơn so với các nghiệm thức khác.

Từ khóa: Thanh mai
in vitro, môi trường
WPM, Thanh mai
Lâm Đồng, sinh thái
cây Thanh mai.

Characterization of ecology and micropropagation of the *Myrica esculenta* Buch. - Ham. Ex D. don species in Lam Dong province

Keywords: *Myrica esculenta* *in vitro*, WPM medium, *Myrica esculenta* Lam Dong, *Myrica esculenta*'s ecology.

Myrica esculenta, a medicinal plant belonging to the group of Actinorhizal plants with different uses, is proved to be useful in farming on nitrogen-depleted soils. The study of the distributive, silvicultural and ecological characteristics, and micropropagation methods will be the basis for building a model of growing Thanh mai tree under the canopy of Pine forests in Lam Dong province. The *M. esculenta* in Lam Dong has different distribution areas and patterns; These small fruit species, grown in Don Duong, Duc Trong, Lam Ha, Dam Rong, Da Lat and a part of Di Linh district, pertain to composition of species that are significant to the forest floor, this is a light-loving and drought tolerant plant, with low humus soils, low pH (< 5.5). By contrast, the large fruit species distributed mainly in Bidoup - Nui Ba National Park, pattern were scattered throughout the area, most of the individuals in small clusters (2-3 individuals) were shade tolerant plants, growing along streams, with high humus soils, pH average (6-7). In Micropropagation of *Myrica esculenta*, the mature nuts of *M. esculenta* were used as primary explants for establishing shoot cultures. The growth of *M. esculenta* shoot cultures was compared on media differing in nutrient formulation, Murashige and Skoog (MS) medium and Woody plant medium (WPM), concentrations of 6- benzyladenine (BA) (0.5-1.5 mg/l), α -naphthaleneacetic acid (NAA) and indole-3-butyric acid (IBA) concentration (0.5-1.5 mg/l). During the 9 weeks culture passage there was no significant difference among two media, the WPM medium and MS medium. However, the stem and leaf segments of the sample *M. esculenta* in WPM medium were larger, straighter and stronger than those of MS medium. The best BA concentration for *M. esculenta* explants was 0.5 mg/l BA. The optimal NAA concentration in the induction medium for rooting of microcuttings was 0.5 mg/l NAA applied for 7 weeks in root media. The acclimatization of rooted microcuttings was difficult because the tendency to desiccate of plantlets and because of the occurrence of diseases due to high humidity in the greenhouse. Nevertheless, 70-75% of the *M. esculenta* plantlets were successfully established in the greenhouse and the results also indicated that the mixed medium between 50% coir soil + 50% Perlite was better growth than the other treatments.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Chi *Myrica* bao gồm khoảng 97 loài cây nhỏ và cây bụi thuộc họ Myricaceae. Chúng được phân bố trên khắp trái đất ở cả vùng ôn đới và cận nhiệt đới (Yanthan, Misra, 2013). Loài *Myrica australiasica* F. Muell phân bố ở Úc và *M. persylvanica* Mirb. ở Bắc Mỹ được xếp vào nhóm dược liệu như loài *M. esculenta* trong hệ thống y học Ấn Độ (Singh *et al.*, 1986).

Cây Thanh mai (*M. esculenta*) là một loài cây có giá trị dược liệu, có thể sử dụng với nhiều công dụng khác nhau (Maikhuri *et al.*, 1994). Chúng thuộc nhóm Actinorhizal plants (thực vật cộng sinh với khuẩn cố định đạm Frankia) hữu ích trong canh tác trên các vùng đất cạn kiệt nitơ (Yanthan, Misra, 2013). Quả Thanh mai đã được công nhận về giá trị dinh dưỡng và dược liệu bởi khả năng cung cấp vitamin C và

các hợp chất polyphenolic như tannin, phenol, flavonoid và flavonol (Panthari *et al.*, 2012). Các bộ phận khác của cây cũng được sử dụng vào các mục đích khác nhau như làm gỗ, nhiên liệu, thức ăn gia súc, thuốc da và thuốc nhuộm màu vàng (Jeeva *et al.*, 2011).

Mặc dù là cây đa tác dụng, tuy nhiên việc gây trồng loài cây này còn rất hạn chế và hầu hết việc sử dụng và thương mại cây trồng Thanh mai phụ thuộc hoàn toàn vào các nguồn thu từ tự nhiên (Kala, 2007). Số lượng cá thể đang bị suy giảm do tình trạng phá rừng và khả năng tái sinh trong tự nhiên kém. Nhân giống, gây trồng, khai thác một cách có hiệu quả và bảo tồn trong tự nhiên là phương pháp tối ưu giúp khôi phục và phát triển số lượng cá thể trong giai đoạn hiện nay.

Công dụng y học cổ truyền của cây Thanh mai là cơ sở cho các nhà khoa học nghiên cứu xác minh tính hiệu quả của nó thông qua những phân tích dược lý hiện đại. Một số chiết xuất thô ở các bộ phận khác nhau của cây và các hợp chất có hoạt tính sinh học đã được đánh giá hiệu quả khác nhau như thuốc giảm đau, chống ung thư, chống oxy hóa, chống viêm, chống bệnh đái tháo đường, làm lành vết thương, giảm stress, chống viêm gan, chống khối u, hạ huyết áp. Một số thử nghiệm trên mô hình động vật *in vitro* và *in vivo* đã kiểm chứng các công dụng trên. Người Ấn Độ ở vùng nông thôn Uttakhand, sử dụng vỏ cây Thanh mai để chữa ho mãn tính, hen suyễn và loét (Gangwar *et al.*, 2010), trong khi đó, hít bột của vỏ cây có thể chữa được đau đầu. Vỏ cây được sắc thuốc giúp giải nhiệt và chữa đau răng, chữa cảm lạnh (Pandey *et al.*, 2016). Quả được sử dụng để ăn sống hoặc dùng làm đồ uống giải khát giúp thanh nhiệt và chống lại bệnh kiết lỵ (Kayang, 2007).

Các báo cáo phân tích, đánh giá hàm lượng dinh dưỡng của quả Thanh mai cho thấy chúng có chứa nhiều chất xơ, protein, chất béo, carbohydrate và nhiều khoáng chất khác như

Na, K, Ca, Mg, Fe, Zn, Mn, Cu (Seal, 2011). Phân tích các chất có hoạt tính sinh học được thực hiện trên quả, lá và vỏ cây Thanh mai cho thấy sự hiện diện của các thành phần hoạt chất khác nhau. Các hoạt chất bao gồm các nhóm alkaloids, glycosides, diarylheptanoids, ionones, steroids, saponin, triterpenoids và các hợp chất dễ bay hơi (Singh *et al.*, 2009).

Sự tái sinh của các loài thực vật được dùng làm lương thực hoặc thực phẩm trong tự nhiên nói chung và cây Thanh mai nói riêng đều kém bởi tình trạng khai thác quá mức và mất dần điều kiện sinh thái cần thiết cho quá trình tái sinh (Sundriyal, Sundriyal, 2001). Cây giống Thanh mai được thu nhận trong điều kiện tự nhiên càng lúc càng ít, loài này thường tái sinh bằng hạt trong tự nhiên. Tuy nhiên, lớp vỏ bên ngoài quá dày khiến nước khó thấm vào bên trong nên tỷ lệ nảy mầm là rất thấp (Bhatt & Dhar, 2004). Khả năng nảy mầm của hạt cây Thanh mai trong điều kiện tự nhiên là rất thấp so với các loài cây rừng khác, do đó nhân giống thông qua nuôi cấy mô, cắt cành, giâm hom, ghép cây là phương thức chủ yếu cho quá trình nhân rộng quy mô loài cây này.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu thực vật

Số liệu nghiên cứu về đặc điểm phân bố, sinh thái loài cây Thanh mai và nguồn mẫu sử dụng (nguồn hạt giống) trong các thí nghiệm nuôi cấy *in vitro* được thu thập từ các lâm phần thuộc Vườn quốc gia Bidoup - Núi Bà và các vùng phụ cận của tỉnh Lâm Đồng.

2.2. Môi trường và điều kiện nuôi cấy

Môi trường MS (Murashige and Skoog) và Woody plant medium (WPM) (Lloyd and McCown, 1981) (bảng 1) được bổ sung đường sucrose (30 g/l), agar (8,5 g/l) là môi trường được sử dụng trong nghiên cứu nhân giống *in vitro*, tùy theo mục đích của

các thí nghiệm mà bổ sung các chất như: BA (6-Benzyl adenine), IBA (β -Indole butyric acid), NAA(α -naphthaleneacetic). Tất cả môi trường nuôi cấy được điều chỉnh về pH= 5,8 trước khi hấp khử trùng ở 1atm (121°C)

trong 25 phút. Điều kiện nuôi cấy, thời gian chiếu sáng 16 giờ/ngày, cường độ ánh sáng 40 - 45 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, nhiệt độ $25 \pm 2^\circ\text{C}$ và độ ẩm không khí 75 - 85%.



Hình 1. Hạt Thanh mai cái (*Myrica esculenta*) thu được từ Vườn quốc gia Bidoup - núi Bà là nguồn mẫu phục vụ cho nhân giống *in vitro*.

Bảng 1. Thành phần dinh dưỡng trong hai loại môi trường MS và WPM

	Môi trường MS	Môi trường WPM
Khoáng đa lượng (Macronutrients)	mg/l	mg/l
Ammonium nitrate (NH_4NO_3)	1.650	400
Calcium chloride ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	440	96
Magnesium sulfate ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	370	370
Potassium sulfate (K_2SO_4)	-	990
Kali nitrate (KNO_3)	1.990	-
Potassium phosphate (KH_2PO_4)	70	170
Calcium nitrate ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)	-	556
Khoáng vi lượng (Micronutrients)		
Boric acid (H_3BO_3)	6,2	6,2
$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	37,2	37,2
KI	0,83	-
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,025	-
Cupric Sulfate ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)	0,25	0,25
Ferrous sulfate ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	27,8	27,8
Manganese sulfate ($\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)	22,3	22,3
Zinc Sulfate ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	8,6	8,6
Sodium molybdate ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	0,25	0,25
Vitamin:		
Myo-inositol	100	00
Nicotinic acid	0,01	0,5
Pyridoxine*HCl	0,01	0,5
Thiamine *HCl	0,01	1,0
Glycine	2,0	2,0

2.3. Phương pháp nghiên cứu

2.3.1. Điều tra phân bố, đặc điểm hình thái cây Thanh mai

Kế thừa các tài liệu nghiên cứu liên quan đến loài Thanh mai tại Lâm Đồng và Việt Nam; Phỏng vấn người dân địa phương, cán bộ kỹ thuật, cán bộ kiểm lâm tại các đơn vị chủ rừng về vùng phân bố tự nhiên của loài nghiên cứu.

Trong vùng phân bố tự nhiên của loài nghiên cứu, tiến hành xác lập các tuyến điều tra, mỗi tuyến dài 3-5 km để điều tra về phân bố, sinh thái, trên tuyến thiết lập các ô mẫu hệ thống có kích thước 1.000 m² (25 × 40 m), ô cách ô 200 m.

(i) *Thu thập số liệu tầng cây gỗ*: Trên mỗi ô tiêu chuẩn tiến hành đo đếm toàn diện với các chỉ tiêu đo đếm: xác định/định danh tên tất cả các loài, chiều cao vút ngọn (H_{vn} , m), đường kính ngang ngực ($D_{1,3}$, cm), với những cây có $D_{1,3} \geq 6$ cm, tọa độ địa lý (theo hệ tọa độ VN2000) và các thông tin sinh thái như: Kiểu rừng, độ tàn che (phần 10), độ cao so với mặt nước biển (m), độ dốc (độ), hướng phơi (độ bắc),... Tổng số ô đo đếm là 40 ô.

Tổ thành được tính theo công thức tính của Daniel Marmillod (1982) thông qua các chỉ tiêu: Mật độ (N%) và tiết diện ngang (G%) theo công thức:

$$IV\% = (N\% + G\%)/2.$$

(ii) *Thu thập số liệu cây tái sinh*: Trên các ô tiêu chuẩn 1.000 m² thiết lập 5 ô dạng bản có kích thước 4 m² (2 × 2m) ở 4 góc ô và 1 ô ở ngay tâm ô tiêu chuẩn để nghiên cứu tái sinh. Cây tái sinh là những cây có $H \geq 0,5$ m, và $D_{1,3} < 6$ cm. Các chỉ tiêu đo đếm cây tái sinh trên ô dạng bản là xác định tên loài, chiều cao cây (H, m) và cây bụi có trong ô phụ.

2.3.2. Vi nhân giống cây Thanh mai

Khảo sát môi trường khoáng thích hợp cho sự sinh trưởng của cây Thanh mai in vitro:

Vật liệu nuôi cấy là những đốt thân *in vitro* của cây Thanh mai được nhân nhanh từ hạt. Môi

trường thí nghiệm là 2 loại môi trường MS và WPM có bổ sung 30 g/l sucrose, 8,5 g/l agar, pH = 5,8. Chỉ tiêu chiều cao mẫu (cm), số lá được ghi nhận.

Khảo sát ảnh hưởng của BA đến sự tái sinh và sinh trưởng chồi: Vật liệu nuôi cấy là những đốt thân *in vitro* của cây Thanh mai thu được từ thí nghiệm trước. Môi trường thí nghiệm là WPM có bổ sung nồng độ BA thay đổi từ 0; 0,5; 1; 1,5 mg/l BA, 30 g/l sucrose, 8,5 g/l agar, pH = 5,8. Chỉ tiêu theo dõi là chiều cao mẫu (cm), số chồi/mẫu, chiều cao trung bình chồi (cm), cùng với đó là các nhận xét về mẫu cây khi kết thúc thí nghiệm.

Khảo sát ảnh hưởng của IBA, NAA đến sự tạo rễ in vitro: Vật liệu nuôi cấy là những chồi ngọn *in vitro* cây Thanh mai thu được từ thí nghiệm trước. Môi trường thí nghiệm là WPM có bổ sung IBA có nồng độ thay đổi từ 0; 0,5; 1; 1,5 mg/l và bổ sung NAA có nồng độ thay đổi từ 0; 0,5; 1; 1,5, 30 g/l sucrose, 8,5 g/l agar, pH=5,8. Chỉ tiêu theo dõi là tỷ lệ ra rễ (%); chiều cao mẫu (cm); số rễ mẫu; chiều dài rễ (cm).

2.3.3. Phân tích, xử lý số liệu

Mỗi nghiệm thức cây 25 mẫu với 3 lần lặp lại, sau 9 tuần nuôi cấy tiến hành thu số liệu. Số liệu của các thí nghiệm thu nhận hoàn toàn ngẫu nhiên và được xử lý bằng phần mềm thống kê MstatC version 1.2, 1989 và Excel.

III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Đặc điểm phân bố và sinh thái cây Thanh mai

Kết quả định danh/phân loại về mặt hình thái cho thấy loài Thanh mai (*Myrica esculenta*) tại Lâm Đồng gồm 2 phân loài (thứ - Subspecies) với các đặc điểm phân bố, sinh thái khác nhau:

3.1.1. Phân loài thứ nhất - Loài quả nhỏ: là loài cây gỗ nhỏ ($H < 5$ m), có kích thước quả nhỏ ($\phi < 1$ cm) có phân bố rải rác trong kiểu

rừng thưa cây lá kim (rừng Thông 3 lá) núi thấp và núi trung bình có độ tàn che thấp từ 0,4 - 0,5; Kiểu rừng này thường có cấu trúc 3 tầng:

i) *Tầng ưu thế sinh thái*: Thành phần loài đơn giản, trong đó loài Thông 3 lá (*Pinus kesiya*) chiếm ưu thế và một số loài khác với chiều cao trung bình 15 - 20 m, có cấu trúc tổ thành đơn giản:

IV% = 61,08T3la + 9,5Dtr + 6,22Qua + 5,29Slo + 5,25Cdx + 6,82Tmai + 5,84 loài khác.

Trong đó T3la: Thông 3 lá, Dtr: dẻ trắng, Qua: Quắn hoa, Slo: Sồi lông, Cdx: Ca di xoan, Tmai: Thanh mai.

Với IV = 6,82% cho thấy Thanh mai quả nhỏ là loài có ưu thế sinh thái trong quần xã thực vật.

ii) *Tầng dưới tán*: Trong tầng này chủ yếu có các loài: Quắn hoa (*Helicia excelsa*), Dẻ trắng (*Lithocarpur dealbatus*), Sồi lông (*Quercus lanata*), Ca di xoan (*Lyonica ovalifolia*), Nén

lá liễu (*Vaccinium iteophyllum*), Sồi helper (*Quercus helferiana*), chiều cao trung bình 5 - 8 m.

iii) *Tầng cỏ quyết*: Có thành phần loài khá đa dạng: Cỏ tranh (*Imperata cylindrica*), Cỏ phao (*Themeda caudata*), Đốt (*Thysanolaena maxima*), Ráng đại dực (*Pteridium aquilinum*), Ráng bích nhật (*Woodwardia japonica*), Ráng tây sơn (*Dicranopteris linearis*), Ráng biệt xỉ (*Brainea insignis*), trong tầng này, thỉnh thoảng xuất hiện nhóm cây bụi thuộc họ Mua (*Melastomataceae*), họ Cà phê (*Rubiaceae*), họ Vót (*Caprifoliaceae*), có chiều cao trung bình dưới 1 m.

Thanh mai quả nhỏ có phân bố tập trung chủ yếu ở độ cao từ 1.200 - 1.500 m so với mặt nước biển tại các huyện trong tỉnh như Đơn Dương, Đức Trọng, Lâm Hà, Đam Rông, thành phố Đà Lạt và một phần huyện Di Linh.



Hình 2. Thanh mai quả nhỏ

Khả năng tái sinh: Qua điều tra thực tế cho thấy mức độ tái sinh bằng hạt của cây Thanh mai rất thấp (< 1%), gần như không có tái sinh, nguyên nhân là do quả bị tác động (con người và động vật), việc đốt trước trong phòng chống cháy rừng thông cũng hạn chế tái sinh bằng hạt của Thanh mai. Về tái sinh chồi, Thanh mai có khả năng tái sinh chồi mạnh, đặc biệt loài quả nhỏ,



Hình 3. Thanh mai quả to

hơn 80% gốc cây bị cưa chặt đều có khả năng tái sinh chồi.

3.1.2. Phân loài thứ 2 - Loài quả lớn

Là loài cây gỗ nhỏ với chiều cao từ 7 - 10 m, kích quả lớn ($\phi > 1$ cm), có phân bố theo từng cụm từ 3 - 4 cá thể và có thể lên đến 20 cá thể, khoảng cách giữa các cụm rất xa nhau và không liên tục trong kiểu rừng hỗn giao cây lá rộng lá

kim và kiểu rừng lá rộng thường xanh với các đặc điểm là độ tàn che cao (> 0,7), tầng thảm mục dày và có cấu trúc 5 tầng:

i) *Tầng vượt tán* - chiều cao trung bình 22-24 m, có các loài phổ biến: Thông 2 lá dẹt, Thông 5 lá, Pơ mu, Chò xốt, Hồng quang;

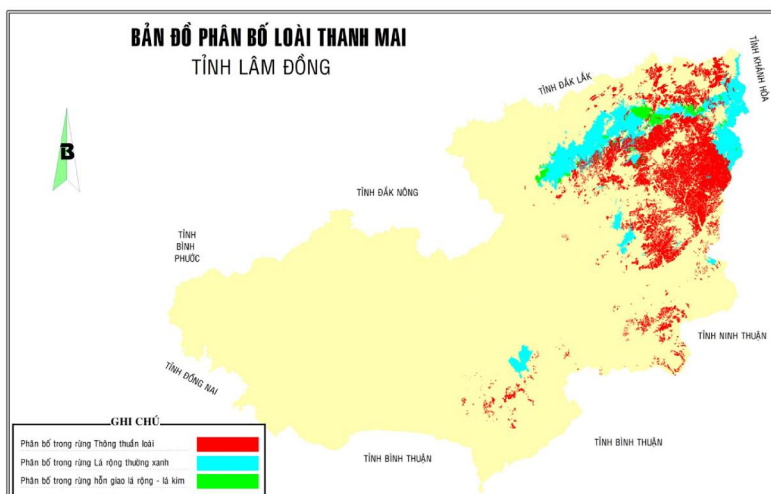
ii) *Tầng ưu thế sinh thái* - chiều cao trung bình 16-17 m, các loài chủ yếu trong tầng này là: Kha thụ nhím, Kha thụ nguyên, Dẻ trái nhỏ, Trâm vỏ đỏ, Sơn linh...;

iii) *Tầng dưới tán* - chiều cao trung bình 7-9 m, có các loài phổ biến: Mật sa, Chân chim, Mua đa hình, Chon trà, Cau chuột;

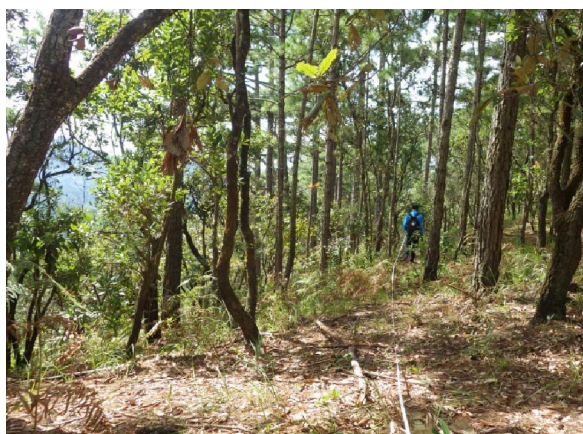
iv) *Tầng cây bụi* - chiều cao 2-4 m, chủ yếu các loài thuộc họ Cà phê (Rubiaceae), họ Mua (Melastomataceae), họ Ô rô (Acanthaceae);

v) *Tầng cỏ quyết* - chiều cao trung bình dưới 1 m, chủ yếu các loài thuộc họ Quyết bá (Selaginellaceae), họ Ô rô (Acanthaceae), họ Thu hải đường (Begoniaceae).

Thanh mai quả lớn có phân bố chủ yếu ở độ cao trên 1.500 m so với mặt nước biển, phân bố chủ yếu tại lâm phận quản lý của Vườn quốc gia Bidoup Núi Bà. Với IV% bé (<1%) cho thấy loài này không phải là loài ưu thế sinh thái trong quần xã thực vật.



Hình 4. Bản đồ phân bố cây Thanh mai ở Lâm Đồng



Hình 5. Kiểu thảm rừng thông 3 lá

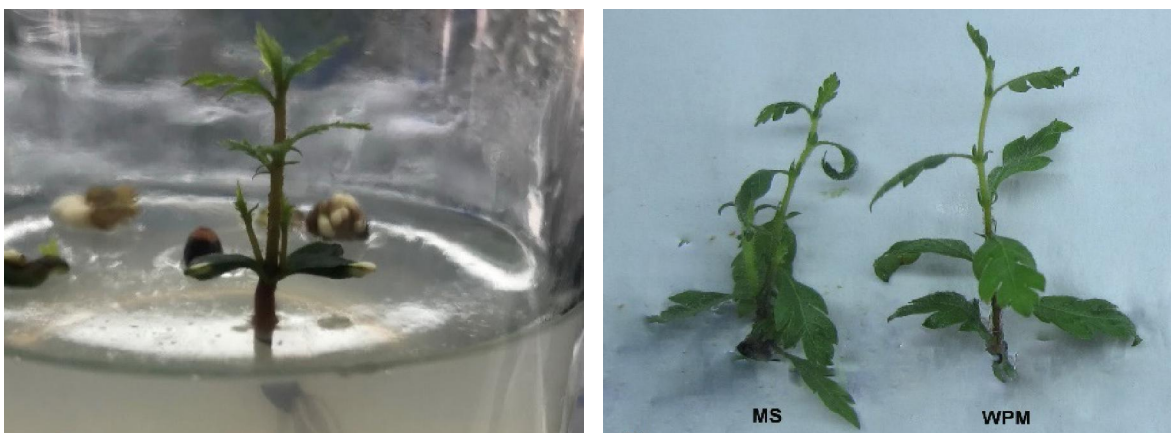


Hình 6. Kiểu thảm rừng lá rộng thường xanh

3.2. Khảo sát môi trường khoáng thích hợp cho sự sinh trưởng của cây Thanh mai *in vitro*

Myrica esculenta là cây ăn quả đơn tính và cây cái có giá trị hơn về mặt kinh tế so với cây đực. Do đó, vi nhân giống dường như là cách duy nhất để nhân nhanh các cây đã chọn.

Việc nhân giống vô tính bằng nuôi cấy mô tế bào thực vật đã được thực hiện đầu tiên bởi Nandwani (1994). Trong khi đó, Bhatt và Dhar (2004) đã nghiên cứu ảnh hưởng của môi trường, chất điều hòa auxin-cytokinin đến ảnh hưởng quá trình tăng trưởng chồi và ra rễ ở các chồi Thanh mai giống cái.



Hình 7. Vi nhân giống *Myrica esculenta*. (A) Nguồn mẫu ban đầu nảy mầm từ hạt *M. esculenta* cái; (B) *M. esculenta* phát triển trên môi trường MS và WPM sau 9 tuần nuôi cấy *in vitro*; Bar = 1 cm

Ảnh hưởng của môi trường khoáng MS và WPM đến chiều cao và số lá của đọt thân *in vitro* Thanh mai sau 9 tuần nuôi cấy được thể hiện ở bảng 2.

Bảng 2. Ảnh hưởng của môi trường khoáng MS và WPM đến chiều cao và số lá của cây Thanh mai *in vitro* sau 9 tuần nuôi cấy.

Nghiệm thức (mg/l)	Chiều cao (cm)	Số lá	Nhận xét mẫu
MS	4,01	15,20	Lá, thân: nhỏ, cong, yếu
WPM	4,90	14,18	Lá, thân: to, khỏe, lá xòe rộng

Kết quả cho thấy sự ảnh hưởng của hai môi trường khoáng WPM và MS lên hai chỉ tiêu chiều cao mẫu và số lá là không có khác biệt lớn (4,90; 4,01, tương ứng) và (15,20; 14,18, tương ứng). Tuy nhiên, khi quan sát các đoạn thân và lá của mẫu giữa hai môi trường WPM và MS (hình 7.B) nhận thấy các đoạn thân ở môi trường WPM to, thẳng và chắc khỏe hơn so với đoạn thân ở môi trường MS (hình 7B). Đặc biệt, lá ở môi trường WPM xòe to, thẳng, ít bị dị dạng trong khi lá ở môi trường MS mỏng và cong lại. Như vậy, môi trường khoáng WPM là

môi trường có ảnh hưởng tốt đến chiều cao và chất lượng thân, lá của cây Thanh mai *in vitro* hơn so với môi trường MS.

Những nghiên cứu trước đây đã chỉ ra rằng sử dụng môi trường có chứa hàm lượng các chất dinh dưỡng thấp sẽ thích hợp cho nuôi cấy mô cây thân gỗ. Tại Việt Nam, các nghiên cứu nuôi cấy mô cây Thủy tùng của Nguyễn Thanh Sum và đồng tác giả (2007), Trần Vinh (2011), Nguyễn Đức Thành và đồng tác giả (2012) cũng đã sử dụng môi trường nuôi cấy cây thân gỗ WPM thay cho môi trường MS.

3.2.1. Ảnh hưởng của BA lên nhân nhanh chồi Thanh mai

Vai trò của cytokinin, đặc biệt là BA trong kích thích phát sinh chồi *in vitro* của các loài cây thân gỗ đã được chứng minh trong các nghiên cứu nuôi cấy mô cây Thủy tùng của Nguyễn Thanh

Sum và đồng tác giả (2007), Trần Vinh (2011), Nguyễn Đức Thành và đồng tác giả (2012). Tốc độ nhân nhanh chồi của nhiều loài cây thân gỗ nuôi cấy *in vitro* phụ thuộc vào loại và nồng độ chất điều tiết sinh trưởng đặc biệt là các chất thuộc nhóm cytokinin bổ sung vào môi trường. Kết quả nghiên cứu được trình bày tại bảng 3.

Bảng 3. Ảnh hưởng của BA đến sự tạo chồi Thanh mai *in vitro* sau 9 tuần nuôi cấy *in vitro* trên môi trường WPM

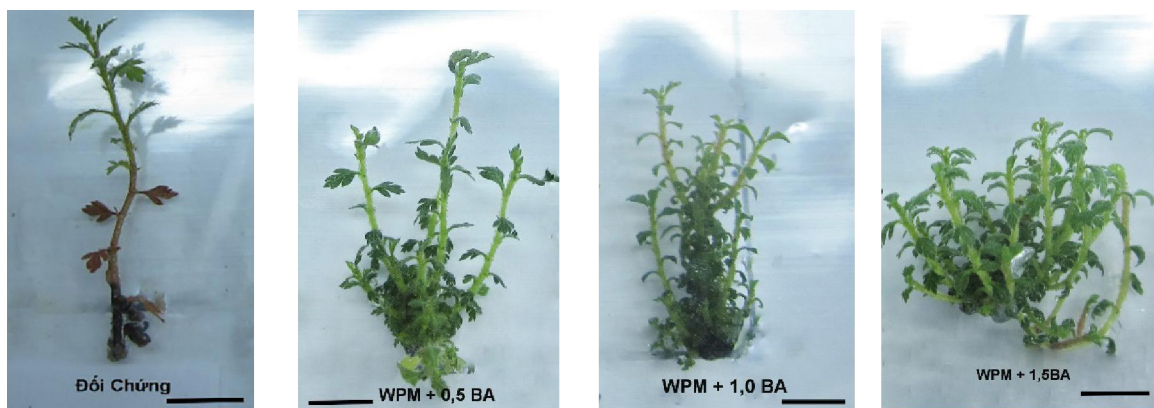
Nghiệm thức (mg/l)	Chiều cao (cm)	Số chồi/ mẫu	Chiều cao TB chồi (cm)
Đối chứng	3,84 ± 0,12a	0,08 ± 0,03d	0,16 ± 0,09d
0,5	3,44 ± 0,29b	6,92 ± 0,60c	1,68 ± 0,09a
1,0	2,43 ± 0,06c	8,85 ± 0,13b	0,94 ± 0,01b
1,5	1,87 ± 0,06d	11,58 ± 0,33a	0,65 ± 0,04c

Các giá trị trung bình trong cùng một cột có các ký tự khác nhau thì khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức $P = 0,05$, Giá trị là trung bình ± SD

Bảng 3 cho thấy giữa các nghiệm thức ở cả 3 chỉ tiêu đều có sự sai khác về mặt thống kê. Cụ thể, khi tăng nồng độ từ 0 đến 1,5 mg/l thì hệ số tạo chồi Thanh mai cũng tăng lên, trong đó hệ số tạo chồi cao nhất ở nghiệm thức 1,5 mg/l BA với 11,58 chồi/mẫu và thấp nhất ở nghiệm thức đối chứng với số chồi tạo thành là 0,08 chồi/mẫu. Tuy nhiên, khi tăng nồng độ nồng độ BA lên thì chiều cao mẫu Thanh mai lại giảm xuống, cụ thể chiều cao mẫu cao nhất ở nghiệm thức đối chứng là 3,84 cm và giảm dần đến nghiệm thức 1,5 mg/l BA thấp nhất 1,87 cm (hình 8).

Đối với chỉ tiêu chiều cao trung bình các chồi, nhận thấy ở nghiệm thức 0,5 mg/l BA cho chiều cao trung bình các chồi là cao nhất (1,68 cm),

trong khi đó ở nghiệm thức đối chứng chiều cao chồi thấp nhất (0,16 cm). Nghiệm thức 1 mg/l BA và nghiệm thức 1,5 mg/l BA cũng cho kết quả chiều cao thấp (0,94 cm và 0,65 cm, tương ứng). Về mặt hình thái, ở nghiệm thức 0,5 mg/l BA các chồi cao, to, khỏe, thẳng, lá to đều không biến dạng, trong khi đó, ở nghiệm thức 1 mg/l BA và 1,5 mg/l BA các chồi nhỏ, ốm, lá nhỏ bị biến dạng ở phần gốc chồi. Chiều cao chồi ảnh hưởng lớn đến hệ số tạo chồi, chiều cao chồi cao sẽ cho hệ số nhân nhanh lớn, kết hợp với chất lượng chồi to, khỏe, lá không biến dạng. Kết quả cho thấy ở nghiệm thức 0,5 mg/l BA là nghiệm thức cho kết quả tốt nhất đến sự tạo chồi Thanh mai *in vitro*.



Hình 8. Nhân nhanh chồi cây Thanh mai trên môi trường WPM có bổ sung BA ở các nồng độ khác nhau sau 9 tuần nuôi cấy; Bar = 1 cm.

Qua kết quả trên cho thấy, BA ở nồng độ 0,5mg/l sẽ kích thích khả năng tạo chồi Thanh mai đồng thời giúp các chồi Thanh mai cao, to tốt hơn hẳn so với nồng độ 1 mg/l và 1,5mg/l. Khi tăng nồng độ BA thì mẫu cấy *in vitro* có xu hướng hạn chế sinh trưởng chiều cao của cây và chiều cao chồi (hình 8). Khi sử dụng nồng độ BA cao sẽ cho chất lượng chồi không tốt, chồi hình thành dạng hoa thị hoặc những nốt nhỏ ở cuối gốc. Một số nghiên cứu như của Tuan và đồng tác giả (2017) nuôi cấy thành công cây *Juglan regia* với chất kích thích sinh trưởng là BA (2,2 μ M); *Juglans* \times *intermedia* với nồng độ 4,4 μ M BA (Tuan *et al.*, 2016), *Pinus wallichiana* (Mathur và Nadgauda, 1999) sử dụng BA với nồng độ 2,5 μ M; (Naik *et al.*, (1998) với cây Pomegranate (*Punica granatum* L.cv. Ganesh) với nồng độ 0,5 mg/l BA trong môi trường MS cho kết quả tốt nhất. Cơ chế tác động của BA ở đây chính là sự hoạt hóa sự phân chia tế bào để hình thành nên tế bào mới, các chồi bên được hình thành. Đồng thời BA còn tác động lên ưu thế ngọn, khi nồng độ BA ở ngưỡng nồng độ cao gây ức chế sự tăng trưởng chiều cao cây và chiều cao chồi lẫn chất lượng chồi bị giảm đi. Nồng độ BA ảnh hưởng đến chất lượng của chồi hình thành từ các thí nghiệm trên cũng phù hợp với những nhận định này. Như vậy, môi trường WPM có bổ sung 0,5

mg/l BA là thích hợp nhất cho việc tạo chồi Thanh mai *in vitro* trong bốn nghiệm thức trên.

3.2.2. Ảnh hưởng NAA và IBA đến khả năng ra rễ của cây Thanh mai *in vitro*

Để tạo được rễ, các chồi cây thường được cấy vào môi trường có auxin như IBA, NAA, IAA,... Nồng độ và thời gian xử lý phụ thuộc vào từng loại cây, ghi nhận được qua cây *Acacia mangium* (Monteuuis, 2000). IBA, NAA là những auxin thông dụng được xử lý kích thích ra rễ thứ cấp ức chế hình thành chồi thứ cấp và chồi phụ. Negussie (1997) đã thành công khi sử dụng IBA với nồng độ 1mg/l và NAA với nồng độ 0,5 mg/l để cho ra rễ cây *Juniperus excelsa*. IBA là auxin thông dụng cho việc tạo rễ đối với một số cây như *Artocarpus heterophyllus* (Rahman và Blake, 1988), *Morus nigra* (Yadav *et al.*, 1990); *Juglan regia* (Tuan *et al.*, 2017); *Juglans* \times *intermedia* (Tuan *et al.*, 2016). Tùy theo đối tượng cây trồng khác nhau mà chúng ta sử dụng kết hợp hoặc riêng rẽ các auxin. Chồi có thể tạo rễ một cách bình thường trong quá trình nhân giống mà không cần tách biệt làm hai giai đoạn tạo chồi và tạo rễ. Tuy nhiên, điều này hiếm khi thấy ở các đối tượng cây gỗ khi nuôi cấy *in vitro*. Trong 7 tuần nuôi cấy trong môi trường có bổ sung auxin, chồi Thanh mai hình thành nên rễ thể hiện ở bảng 4.

Bảng 4. Khảo sát ảnh hưởng của IBA và NAA đến sự tạo rễ *in vitro* cây Thanh mai sau 7 tuần nuôi cấy.

	Nghiệm thức (mg/l)	Tỷ lệ ra rễ (%)	Chiều cao cây (cm)	Số rễ /cây (cái)	Chiều dài rễ (cm)
	Đối chứng	3,33c	3,77 \pm 0,12c	0,27 \pm 0,08 e	0,42 \pm 0,10 e
	0,5	88,33ab	5,29 \pm 0,16b	9,50 \pm 0,28d	2,33 \pm 0,20b
IBA	1	86,67ab	2,09 \pm 0,03d	17,16 \pm 1,01b	2,19 \pm 0,25bc
	1,5	81,67b	2,15 \pm 0,13d	18,65 \pm 0,36a	1,95 \pm 0,05c
	0,5	90,00a	6,31 \pm 0,15a	9,15 \pm 0,35d	3,13 \pm 0,17a
NAA	1	88,33ab	3,81 \pm 0,18c	8,92 \pm 0,24d	1,61 \pm 0,17d
	1,5	83,33ab	2,31 \pm 0,17d	10,98 \pm 0,28c	1,50 \pm 0,24d

Các giá trị trung bình trong cùng một cột có các ký tự khác nhau thì khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức $P = 0,05$, Giá trị là trung bình \pm SD

Kết quả ở bảng 4 cho thấy tỷ lệ ra rễ khác biệt có ý nghĩa thống kê, tỷ lệ ra rễ thấp nhất đối với nghiệm thức đối chứng và nghiệm thức WPM bổ sung 1,5 mg/l BA (3,33% và 81,67%, tương ứng), các nghiệm thức còn lại đều không có sự sai khác về mặt thống kê, trong đó môi trường WPM bổ sung 0,5 mg/l NAA cho tỷ lệ ra rễ lên đến 90%, đây là tỷ lệ ra rễ khá cao trong môi trường nuôi cấy mô cây thân gỗ. Với chỉ tiêu chiều cao cây thì môi trường WPM bổ sung 0,5 mg/l IBA và NAA đều cho kết quả cao hơn so với các nghiệm thức khác và có sự khác biệt về mặt thống kê (6,31 cm và 5,29 cm, tương ứng)

(hình 9). Trong khi đó, các nghiệm thức bổ sung 1; 1,5 mg/l IBA và 1,5 mg/l NAA không có sự sai khác về mặt thống kê (2,09 cm; 2,15 cm và 2,31 cm, tương ứng) và là kết quả thấp nhất ở chỉ tiêu chiều cao cây. Điều này chứng tỏ khi nồng độ IBA và NAA ở ngưỡng 0,5 mg/l giúp cây có chiều cao tốt, nồng độ càng tăng thì chiều cao giảm dần. Với chỉ tiêu số rễ xuất hiện trong thời gian nuôi cấy *in vitro*, ở các nghiệm thức có khác biệt mang ý nghĩa thống kê. Cụ thể, môi trường có bổ sung 1,5 mg/l IBA cho kết quả tốt nhất và nghiệm thức đối chứng cho thấy số rễ xuất hiện thấp nhất (18,65 và 0,27 tương ứng)



Hình 9. Rễ cây Thanh mai trong điều kiện nuôi cấy mô (R) và trên các môi trường bổ sung IBA và NAA ở các nồng độ khác nhau sau 7 tuần nuôi cấy; Bar = 1 cm.

Từ nghiên cứu trên cho thấy nồng độ IBA và NAA càng tăng thì số rễ tạo thành trên mẫu sẽ tăng tuy nhiên lại gây ức chế tăng trưởng chiều cao mẫu lần chiều dài rễ, cụ thể khi xét về chỉ tiêu chiều dài rễ, nghiệm thức môi trường bổ

sung 0,5 NAA mg/l và 0,5 IBA mg/l cho kết quả cao hơn các nghiệm thức khác (3,13 cm và 2,33 cm, tương ứng). Khi nồng độ IBA và NAA tăng lên chiều dài rễ sẽ giảm đi và cho kết quả chỉ tiêu chiều dài rễ thấp ở nghiệm thức đối chứng

(hình 9). Điều này cho thấy ở nồng độ 0,5 mg/l IBA và 0,5 mg/l NAA tuy không cho số lượng rễ nhiều nhất nhưng lại ảnh hưởng tốt nhất đến chiều cao mẫu, chiều dài rễ tạo thành và chất lượng cây với thân to, chắc, khỏe; lá cây to, xòe rộng. Từ đó kết luận nồng độ IBA và NAA ở ngưỡng 0,5 mg/l là phù hợp cho sự tạo rễ của cây Thanh mai *in vitro*

Theo Pierik (1987) IBA, NAA và IAA là những auxin thông dụng được xử lý kích thích ra rễ thứ cấp ức chế hình thành chồi thứ cấp và chồi phụ. Ở nồng độ thấp, auxin kích thích tạo rễ thứ cấp nhưng ở nồng độ cao chúng ức chế việc tạo rễ mà lại kích thích việc tạo callus. IBA và NAA tác dụng hoạt hóa các tế bào vùng xuất hiện rễ để tạo nên các mầm rễ bất định, sau đó các mầm rễ chui ra khỏi vỏ và hình thành rễ bất định, ngoài ra còn có tác động gây ức chế sự sinh trưởng chồi bên. Ở ngưỡng nồng độ quá cao auxin lại gây ức chế sự phát triển chiều cao và chiều dài rễ điều này đúng như kết quả của thí nghiệm. Adsul và đồng tác giả (2019) cũng cho thấy sự thành công khi sử dụng 1,5 mg/l IBA trong giai đoạn ra rễ *in vitro* cây *Ceropegia mohanmii* với số rễ trên cây nhiều (5,7 rễ). Các nghiên cứu về ra rễ *in vitro* cho thấy các loài và nồng độ auxin cần thiết cho sự ra rễ đặc trưng của loài thực vật nhân giống (Rathore *et al.*, 2004).

Như vậy, trong nghiên cứu về nhân giống cây *Myrica esculenta*, môi trường WPM có bổ sung 0,5 mg/l NAA thích hợp cho việc tạo rễ *in vitro* cây Thanh mai. Nồng độ này sẽ tiếp tục được sử dụng để tạo cây con hoàn chỉnh trong nghiên cứu tiếp theo tại vườn ươm.

3.2.3. Thuần hóa cây Thanh mai trong điều kiện nhà kính

Cải thiện tỷ lệ sống sót của cây mô ở giai đoạn vườn ươm góp phần nâng cao hiệu quả vi nhân giống và giảm giá thành cây giống. Trong quá trình thuần hóa cây con Thanh mai có nguồn gốc *in vitro* trong nhà kính, hơn 70 - 75% cây con *Myrica esculenta* được thuần hóa tiếp tục phát triển mạnh. Lý do cây được chuyển từ môi trường *in vitro* ra vườn ươm bị chết chủ yếu là do bộ rễ của cây còn yếu nên chưa thích nghi kịp với môi trường mới. Tuy nhiên, tỷ lệ sống sót vẫn duy trì ổn định trong thời gian tiếp theo. Chiều cao cây và sự xuất hiện các lá mới trên các cây con có nguồn gốc *in vitro* là một tiêu chí hình thái quan trọng trong đánh giá sự thích nghi của những cây được thuần hóa. Đặc biệt, sau 4 tuần ở nhà kính, các lá non đã có màu xanh thẫm và hệ rễ phát triển mạnh mẽ.

Kết quả khảo nghiệm các loại giá thể phù hợp với sinh trưởng cây Thanh mai trong điều kiện vườn ươm thể hiện ở bảng 4 và hình 10.

Bảng 5. Chiều cao cây Thanh mai (cm) có nguồn gốc *in vitro* trên các loại giá thể khác nhau ở điều kiện vườn ươm

Giá thể \ Thời gian (tuần)	4	12	20	Ghi chú
Đất xơ dừa	1,67	2,03b	3,76a	Cây khỏe
Perlite	1,48	2,04b	3,26b	Thân yếu, lá vàng
Đất đen sạch	1,92	2,03b	3,52b	Cây khỏe
50% đất xơ dừa + 50% Perlite	1,87	2,54a	4,26a	Cây khỏe, lá xanh
50% đất đen sạch+ 50% Perlite	1,69	2,38ab	3,82a	Cây khỏe, lá xanh

Các giá trị trung bình trong cùng một cột có các ký tự khác nhau thì khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức $P = 0,05$

Kết quả ở bảng 5 cho thấy giữa các nghiệm thức ở tuần thứ 4 không có sự sai khác về mặt thống kê. Tuy nhiên, từ tuần thứ 12 đã có sự khác biệt mang ý nghĩa thống kê giữa các nghiệm thức. Cụ thể, với chỉ tiêu chiều cao cây sau 12 tuần trồng với giá thể hỗn hợp giữa 50% đất xơ dừa + 50% Perlite và 50% đất đen sạch+ 50% Perlite cho kết quả tốt hơn các nghiệm thức còn lại (2,54 cm và 2,38 cm, tương ứng). Nhưng sau 20 tuần chăm sóc ngoài vườn ươm thì cùng với 2 hỗn hợp giá thể trên đất trộn xơ dừa cũng đã giúp cây phát triển tốt và ổn

định hơn và có khác biệt mang ý nghĩa thống kê với các giá thể còn lại (4,26 cm, 3,82 cm và 3,76 cm, tương ứng). Tuy nhiên, giá thể hỗn hợp giữa 50% đất xơ dừa + 50% Perlite cho thấy cây sinh trưởng cứng cáp và lá xanh hơn các nghiệm thức còn lại. Điều này chứng tỏ các giá thể tối xốp giúp cây Thanh mai phát triển chiều cao và cây sinh trưởng tốt. Perlite cũng là giá thể tối xốp, nhưng là giá thể trơ và không lưu giữ các chất dinh dưỡng vì vậy không thích hợp với Thanh mai ở giai đoạn vườn ươm.



Hình 10. Khảo nghiệm các loại giá thể phù hợp với sinh trưởng cây Thanh mai trong điều kiện vườn ươm. (G1) Đất xơ dừa; (G2) Perlite; (G3) 50% đất xơ dừa + 50% Perlite; (G4) 50% đất đen sạch+ 50% Perlite.

IV. KẾT LUẬN

Dựa trên ghi nhận thực tế và số liệu thử cấp, cây Thanh mai ở Lâm Đồng có vùng phân bố, kiểu phân bố khác nhau và có đặc điểm sinh thái như sau: Đối với loài quả nhỏ, tham gia vào công thức tổ thành của những loài có ý nghĩa đối với thảm rừng, đây là cây ưa sáng và chịu hạn, đất

có độ mùn thấp, pH thấp (< 5,5). Đối với loài quả to, kiểu phân bố là cụm và không liên tục, phần lớn số lượng cá thể trong cụm nhỏ (2-3 cá thể) đây là cây ưa bóng, mọc ven khe suối, đất có độ mùn cao, pH trung bình (6-7).

Nghiên cứu nhân giống bằng phương pháp *in vitro* cho thấy môi trường WPM, 1981 bổ sung

30 g/l đường và 8,5 g/l agar pH = 5,8 là loại môi trường khoáng thích hợp cho sự sinh trưởng của chồi Thanh mai *in vitro*. Môi trường WPM có bổ sung 0,5 mg/l BA; là thích hợp cho sự tạo chồi Thanh mai *in vitro*. Đối với nghiệm thức ra rễ cây Thanh mai *in vitro*, trên môi trường

WPM có bổ sung 0,5 mg/l NAA; là phù hợp cho sự tạo rễ của cây Thanh mai *in vitro*. Ở giai đoạn vườn ươm giá thể hỗn hợp giữa 50% đất xơ dừa + 50% Perlite cho thấy cây sinh trưởng tốt hơn so với các nghiệm thức còn lại.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Adsul, A. A., Chavan, J. J., Gaikwad, N. B., Gurav, R. V., Dixit, G. B., & Yadav, S. R., 2019. In vitro regeneration approaches for restoration of *Ceropegia mohanramii*—an endemic and critically endangered asclepiad. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 17(1), 1-5.
2. Bhatt I.D., Dhar U., 2004. Factors controlling micropropagation of *Myrica esculenta* buch.-Ham. Ex D.Don: A high value wild edible of Kumaun Himalaya. *Afr. J. Biotechnol.* 3(10): 534-554.
3. Daniel Marmillod, 1982. Methodology and results of studies on the composition and structure of a terrace forest in Amazonia
4. Gangwar K.K., Deepali, Gangwar R.S., 2010. Ethnomedicinal plant diversity in Kumaun Himalaya of Uttarakhand, India *Nat Sci* (8): 66-78
5. Jeeva S., Lyndem F.B., Sawian J.T., Laloo R.C., Mishra B.P., 2011. *Myrica esculenta* Buch.-Ham. ex D. Don.- a potential ethnomedicinal species in a subtropical forest of Meghalaya, northeast India. *Asian Pac J Trop Biomed* (1): 174-177.
6. Kala C.P., 2007. Prioritization of cultivated and wild edibles by local people in the Uttaranchal hills of Indian Himalaya. *Indian J Tradit Know* (6): 239-243.
7. Kayang H., 2007. Tribal Knowledge on wild edible plants of Meghalaya, Northeast India. *Indian J Tradit Know* (6):177-181.
8. Lloyd, G., McCown, B., 1981. Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by the use of shoot tip culture. *Proc. Plant Prop. Soc.* 30, 421-427.
9. Maikhuri R.K., Semwal R.L., Singh A., Nautiyal M.C., 1994. Wild fruits as a contribution to sustainable rural development: A case study from the Garhwal Himalaya. *Int J Sustain Dev World Ecol* (1): 56-68.
10. Mathur, G., & Nadgaur, R., 1999. In vitro plantlet regeneration from mature zygotic embryos of *Pinus wallichiana* AB Jacks. *Plant Cell Reports*, 19(1), 74-80.
11. Monteuis, O., & Bon, M. C., 2000. Influence of auxins and darkness on *in vitro* rooting of micropropagated shoots from mature and juvenile *Acacia mangium*. *Plant cell, tissue and organ culture*, 63(3), 173-177.
12. Murashige, T., Skoog, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissues cultures. *Physiol. Plant.* 15, 473-497
13. Nandwani D., 1994. Clonal propagation of *M. esculenta* (Box- berry) A fruit bearing tree of north-east India. *Gartenbauwissenschaft (Horticultural Science)* 59(6): 264-267.
14. Naik, S. K., & Chand, P. K., 1998. In Vitro Clonal Propagation of an Elite Cultivar of Pomegranate (*Punica granatum* L. cv. Ganesh) Using Nodal Explants from Mature Tree. *in vitro* cellular and developmental biology animal, 34, P-1137.
15. Negussie, A., 1997. In vitro induction of multiple buds in tissue culture of *Juniperus excelsa*. *Forest Ecology and Management*, 98(2), 115-123.
16. Pandey G., Sharma B.D., Hore D.K., Rao N.K., 1993. Indigenous minor fruits' genetic resources and their marketing status in north-eastern hills of India. *Journal of Hill Research* 6:1-4.
17. Panthari P., Kharkwal H., Kharkwal H., Joshi D.D., 2012. *Myrica nagi*: A review on active constituents, Biological and therapeutic effects. *Int J Pharm Pharm Sci* (4): 38-42.
18. Pierik, R. L. M., 1987. * In vitro culture of higher plants as a tool in the propagation of horticultural crops. In *International Symposium on Propagation of Ornamental Plants* 226 (pp. 25-40).

19. Rahman, M. A., & Blake, J., 1988. Factors affecting *in vitro* proliferation and rooting of shoots of jackfruit (*Artocarpus heterophyllus* Lam.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 13(3), 179-187.
20. Rathore, J. S., Rathore, V., Shekhawat, N. S., Singh, R. P., Liler, G., Phulwaria, M., & Dagla, H. R., 2004. Micropropagation of woody plants. In *Plant biotechnology and molecular markers* (pp. 195-205). Springer, Dordrecht.
21. Seal T., 2011. Nutritional composition of wild edible fruits in Meghalaya state of India and their ethnobotanical importance. *Res J Bot* (6):58-67.
22. Singh J., Lan V.K., Trivedi V.P., 1986. Pharmacognostic evaluation of Katphala (The bark of *Myrica esculenta* Buch-Ham). *Anc Sci Life* (6): 85-7.
23. Singh N., Khatoon S., Srivastava N., Rawat A., Mehrotra S., 2009. Qualitative and quantitative standardization of *Myrica esculenta* Buch.-Ham. Stem bark by use of HPTLC. *J Plana Chromat* (22): 287-91.
24. Sundriyal M., Sundriyal R.C., 2001. Wild edible plants of the Sikkim Himalaya: nutritive value of selected species. *Economic Botany*, 55 (3): 377- 390.
25. Sum N.T., Tuan P.N, Ket N.V, 2007. Ứng dụng phương pháp vi nhân giống trong bảo tồn giống Thông nước *Glyptostrobus Pensilis* (Staunton ex D. Don) K. Koch. *Tạp chí Khoa học kỹ thuật Nông Lâm nghiệp, Đại học Nông Lâm TP. Hồ Chí Minh*, 1+2: 75-81
26. Thành N. D, Lụa D.T.M, Liên Q. T, 2012. Tạo cây Thông nước - *Glyptostrobus pensilis* (Staunton ex D. Don) K. Koch hoàn chỉnh từ chồi nhân *in vitro*. *Tạp chí Sinh học*, 2012, 34(2): 228-234
27. Tuan, P. N., Meier-Dinkel, A., Höltken, A. M., Wenzlitschke, I., & Winkelmann, T., 2017. Factors affecting shoot multiplication and rooting of walnut (*Juglans regia* L.) *in vitro*. *Acta Horticulturae*, (1155), 525-530.
28. Tuan, P. N., Meier-Dinkel, A., Höltken, A. M., Wenzlitschke, I., & Winkelmann, T., 2016. Paving the way for large-scale micropropagation of *Juglans* × *intermedia* using genetically identified hybrid seed. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 126(1), 153-166.
29. Vinh T., 2011. Nghiên cứu một số đặc điểm sinh học, sinh thái và nhân giống làm cơ sở bảo tồn loài Thuỷ tùng (*Glyptostrobus pensilis* (Staunt.) tại Việt Nam. Luận án Tiến sỹ khoa học Nông nghiệp. Trường Đại học Lâm nghiệp.
30. Yanthan M., Misra A.K., 2013. Molecular approach to the classification of medicinally important actinorhizal genus *Myrica*. *Indian J Biotechnol* 12:133-136.
31. Yadav, U., Lal, M., & Jaiswal, V. S., 1990. Micropropagation of *Morus nigra* L. from shoot tip and nodal explants of mature trees. *Scientia Horticulturae*, 44(1-2), 61-67.

Email tác giả liên hệ: tuanpn@dlu.edu.vn

Ngày nhận bài: 11/11/2021

Ngày phản biện đánh giá và sửa chữa: 16/11/2021

Ngày duyệt đăng: 20/11/2021