



(12) **BẢN MÔ TẢ GIẢI PHÁP HỮU ÍCH THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN
GIẢI PHÁP HỮU ÍCH**

(19) **Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ**

(11)



2-0003914

(51) **A01H 4/00; A01C 1/00**
2021.01

(13) **Y**

(21) 2-2022-00456

(22) 26/10/2022

(45) 27/01/2025 442

(43) 26/12/2022 417A1

(73) Viện Khoa học Lâm nghiệp Việt Nam (VN)

Số 46 đường Đức Thắng, phường Đức Thắng, quận Bắc Từ Liêm, Hà Nội.

(72) Phí Hồng Hải (VN); La Ánh Dương (VN); Kiều Thị Hà (VN); Cấn Thị Lan (VN).

(54) **QUY TRÌNH NHÂN GIỐNG MÔ CHO CÁC GIỐNG KEO LÁ LIỀM (ACACIA
CRASSICARPA A. CUNN. EX BENTH.) BẰNG PHƯƠNG THỨC TRỒNG
RỪNG DÒNG VÔ TÍNH THEO GIA ĐÌNH**

(21) 2-2022-00456

(57) Sáng chế đề cập đến quy trình nhân giống mô cho các giống Keo lá liềm (*Acacia crassicarpa* A. Cunn. ex Benth.) bằng phương thức trồng rừng dòng vô tính theo gia đình (Clonal Family Forest - CFF), bao gồm các bước: (a) chọn lọc giống và (b) nhân giống. Quy trình nhân giống mô cho các giống Keo lá liềm bằng phương thức trồng rừng dòng vô tính theo gia đình giúp cho việc sản xuất cây giống Keo lá liềm trong nuôi cấy *in vitro* sử dụng được các giống đã công nhận; giảm tác hại hóa chất tới con người và môi trường; nâng hệ số nhân chồi trên 2,66 lần, chồi xanh và mập, thân phân lông rõ ràng; tỷ lệ chồi hữu hiệu đạt 86,7 %; tỷ lệ ra rễ đạt 92,2 %; chất lượng cây giống tốt hơn 74 - 81 % về tăng trưởng thể tích thân cây, 6,7 - 23,8 % về độ nhỏ cành và độ thẳng thân, góp phần nâng cao năng suất, chất lượng rừng trồng ở nước ta.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế thuộc lĩnh vực Lâm nghiệp, cụ thể là đề cập đến quy trình nhân giống mô cho các giống Keo lá liềm (*Acacia crassicarpa* A. Cunn. ex Benth.) bằng phương thức trồng rừng dòng vô tính theo gia đình (sau đây gọi tắt là quy trình nhân giống mô CFF cho Keo lá liềm) phục vụ trồng rừng cung cấp gỗ lớn.

Tình trạng kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Keo lá liềm (*Acacia crassicarpa* A. Cunn. ex Benth.) được du nhập vào nước ta vào những năm 1980 và là loài cây có khả năng thích nghi với nhiều dạng lập địa khác nhau, như lập địa có độ pH 3,5 - 6,0, từ loại đất đồi tới đất cát podzol cằn cỗi hoặc những lập địa có lượng mưa biến động từ thấp tới rất cao (500 – 3.500 mm), mùa khô kéo dài từ 3 - 6 tháng (Turnbull *et al.*, 1998). Keo lá liềm có sinh trưởng nhanh hơn Keo tai tượng và Keo lá tràm trên vùng đất cát (Harwood, 1993) và phù hợp cho trồng rừng trên 500.000ha vùng đất cát duyên hải miền Trung. Do có khả năng sinh trưởng nhanh, cạnh tranh tốt với cỏ dại và có nốt sần (Doran *et al.*, 1997; Lê Đình Khả, 2003) nên Keo lá liềm có thể tạo các hàng cây chắn gió, cố định các đụn cát ven biển, cải tạo đất (Doran *et al.*, 1997), chống cỏ tranh (Thomson, 1994), tạo cảnh quan và cung cấp gỗ cho ngành công nghiệp chế biến gỗ của nước ta.

Gỗ Keo lá liềm có khối lượng riêng cao (620 kg/m³), rất khỏe và có độ bền cao, phù hợp làm cấu kiện xây dựng chịu lực, đồ gia dụng, gỗ đóng tàu thuyền, gỗ ván sàn, ván nhân tạo, veneer, than và gỗ giấy (Clark, N.B *et al.*, 1991; Turnbull *et al.*, 1998; Semple & Evans, 1998). Như vậy, Keo lá liềm có thể đáp ứng được yêu cầu của “Đề án bảo vệ và phát triển rừng ven biển ứng phó với biến đổi khí hậu giai đoạn 2015-2020” theo Quyết định số 120/2015/QĐ-TTg và “Đề án tái cơ cấu ngành nông nghiệp theo hướng nâng cao giá trị gia tăng và phát triển bền vững” theo quyết định số 899/QĐ-TTg đã được Thủ tướng Chính phủ phê duyệt. Tuy vậy, Keo lá liềm hiện nay hầu như chỉ được trồng bằng cây hữu tính, nhưng nguồn giống ít và chất lượng giống xô bồ, nên năng suất và chất lượng rừng không cao. Hiện nay Keo lá liềm mới chỉ trồng được gần 6.900 ha trong tổng số 500.000 ha đất cát, như vậy nhu cầu giống sẽ rất lớn trong thời gian tới.

Qua các nghiên cứu về chọn giống, Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn đã công nhận nhiều xuất xứ và đặc biệt 11 gia đình có năng suất cao (trên 20 m³/ha/năm) và chất lượng gỗ cao, phù hợp làm gỗ xẻ (Phí Hồng Hải *et al.*, 2015). Tuy nhiên, lượng hạt giống từ các giống này cung cấp cho sản xuất còn nhiều hạn chế. Để phát triển các giống Keo lá liềm này vào sản xuất, rất cần một quy trình nhân giống hàng loạt từ hạt giống của

các cá thể ưu việt trong các giống đã được công nhận, đó chính là quy trình nhân giống mô cho các giống Keo lá liềm bằng phương thức trồng rừng dòng vô tính theo gia đình.

Danh mục tài liệu viện dẫn liên quan:

- Thomson (1994) ghi nhận Keo lá liềm được nhân giống chủ yếu từ hạt. Một kg hạt có tới 35.000-50.000 hạt. Việc xử lý hạt được đề xuất bao gồm ngâm hạt vào nước sôi (100°C) từ 1-2 phút, hoặc giội qua nước sôi với khối lượng nước gấp 10 lần khối lượng hạt. Cây non sinh trưởng nhanh, giai đoạn cây non khoảng 3 tháng tuổi đem trồng là thích hợp. Keo lá liềm cũng có thể nhân giống bằng phương pháp ghép và chiết từ cây 3 tuổi, nếu cây già hơn thì sẽ khó hơn.

- Rawat và Singh (2000) khẳng định rằng số lá/cây quan hệ chặt với sinh trưởng của cây ở 2 tuổi trên hiện trường.

- Bouvet và cộng sự (2017) ghi nhận chọn lọc sớm ở giai đoạn vườn ươm có thể loại bỏ được 30 % cây sinh trưởng kém. Trong khi Hogberg và Karlsson (1998) cho rằng chọn lọc 20 % sinh trưởng chiều cao tốt có thể đem lại tăng thu di truyền 3 % ở cây 6 tuổi.

- White và các cộng sự (2007) cho rằng giống Keo lá liềm thuần loài rất khó nhân giống vô tính, do hiện tượng già hóa nhân vật liệu nhân giống. Do đó, việc nhân giống hàng loạt cho các giống đã chọn lọc phải thực hiện theo phương thức trồng rừng dòng vô tính theo gia đình (Clonal Family Forest - CFF) và bước đầu cho kết quả rất khả quan tại Indonesia.

- Nhân giống mô cũng đã bước đầu được nghiên cứu, điển hình là nghiên cứu của Yang và cộng sự (2006). Các tác giả đã nghiên cứu nhân giống mô từ cuống lá bằng việc sử dụng môi trường MS cải tiến (MS*) và đưa ra các môi trường MS cải tiến như sau: bổ sung 1-phenyl-3-(thiadiazol-5-yl) urea (thidiazuron) (TDZ) và axit α -naphthaleneacetic (NAA) để tạo mô sẹo; bổ sung 0,5 mg/L TDZ và 0,5 mg/L NAA đã tạo chồi bất định; bổ sung 0,1 mg/L TDZ để kéo dài chồi; và môi trường 1/2MS bổ sung 0,5 mg/L axit 3-indolebutyric (IBA) để ra rễ.

- Zhou và cộng sự (2002) cũng đã nghiên cứu nhân giống mô từ hạt Keo lá liềm và đưa ra môi trường tạo chồi MS + 6 BAP 0,5 ~ 2,0 mg/L + NAA 0,1 ~ 0,2 mg/L, môi trường nhân chồi MS + 6 BAP 1,5 mg/L + NAA 0,1 mg/L và môi trường ra rễ là 1/2 MS + IBA 0,5 ~ 1,0 mg/L.

- Đặng Thái Dương (2015) cũng nghiên cứu nhân giống mô Keo lá liềm cho một số dòng chịu nóng cho thấy thời gian khử trùng mẫu chồi đỉnh và đoạn thân cây bằng HgCl₂ 0,1 % trong 8 phút. Môi trường thích hợp nhất cho tái sinh chồi từ lát mỏng là môi trường MS bổ sung 0,3 mg/L TDZ. Môi trường MS bổ sung 0,1 mg/L TDZ thích hợp nhất cho tái sinh chồi đoạn thân. Môi trường tối ưu cho quá trình nhân chồi là môi trường MS bổ sung 0,3 mg/L TDZ kết hợp với 0,5 mg/L NAA. Môi trường 1/2MS bổ sung 1,0 mg/L

IBA thích hợp nhất cho quá trình tạo rế.

- Phí Hồng Hải và cộng sự (2016) cũng đã nghiên cứu nhân giống mô CFF và đã xác định được phương pháp khử trùng và nhân chồi, ra rế, số lần tối đa cấy chuyển cho nhân giống mô CFF với hệ số nhân rất cao từ 2.000 – 2.400 cây con từ 1 hạt nuôi cấy. Vật liệu giống gốc chỉ được sử dụng trong 14 tháng, nếu tiếp tục sử dụng tỷ lệ ra rế giảm nhanh và cây con không đảm bảo chất lượng sinh lý, từ đó ảnh hưởng lớn tới chất lượng rừng trồng sau này. Tuy nhiên, đây mới chỉ là các nghiên cứu trong phòng thí nghiệm và sử dụng lượng hạt giống ít để nhân giống mô CFF, nên có những rủi ro tạo ra những cây giống kém chất lượng do nhân phải hạt giống bị phân ly.

Như vậy các kết quả nghiên cứu trước đây cho thấy vật liệu nhân giống của Keo lá liềm bị già hóa rất nhanh, nên việc chọn lọc và phát triển các dòng vô tính Keo lá liềm là không khả thi. Muốn phát triển các giống Keo lá liềm phải chọn lọc các giống ưu việt và nhân giống hàng loạt theo phương thức trồng rừng dòng vô tính theo gia đình (CFF). Bước đầu cũng đã xác định được phương pháp nhân giống hàng loạt cho một giống Keo lá liềm theo phương thức này và bước đầu cho kết quả rất khả quan trong phòng thí nghiệm với hệ số nhân rất cao (1 hạt giống nhân được 2000-2500 cây giống). Tuy nhiên, đây mới chỉ là các nghiên cứu trong phòng thí nghiệm và sử dụng lượng hạt giống ít để nhân giống mô-hom CFF, nên dễ gặp những rủi ro tạo ra những cây giống kém chất lượng do nhân phải hạt giống bị phân ly. Do vậy, để phát triển vào sản xuất rất cần phải hoàn thiện hơn ở quy mô bán công nghiệp và công nghiệp.

Bản chất kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Mục đích của sáng chế này là giải quyết các vấn đề nêu trên, để đạt được mục đích này sáng chế đề xuất quy trình nhân giống mô Keo lá liềm bằng phương thức trồng rừng dòng vô tính theo gia đình nhằm giảm ảnh hưởng sự phân ly trong hạt giống, giảm ảnh hưởng độc hại trong nuôi cấy mô tế bào, cho hệ số nhân, tỷ lệ chồi hữu hiệu và tỷ lệ ra rế cao, cung cấp cây giống đạt sinh trưởng và chất lượng tốt hơn so với các phương pháp đang sử dụng trong sản xuất.

Quy trình nhân giống mô Keo lá liềm bằng phương thức trồng rừng dòng vô tính theo gia đình bao gồm các bước sau:

(a) Chọn lọc giống

* *Chọn hạt giống:* các giống Keo lá liềm có năng suất đạt từ 20-25 m³/ha/năm, có hàm lượng xenluloza và khối lượng riêng cao, đã được Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn công nhận; Thu hái và sử dụng hạt giống từ các cá thể ưu việt trong các giống được chọn để nhân giống mô CFF.

* *Chọn lọc sớm trong vườn ươm:*

Trước đây mẫu nhân giống nuôi cấy mô CFF là hạt giống gieo ươm trực tiếp trong bình nuôi cấy mô nên sử dụng rất ít lượng giống và hạt giống trong 1 lần nuôi cấy. Hạt giống của các giống luôn có sự phân ly nhất định, do thụ phấn tự do, nên nhân giống mô CFF như vậy có thể cho chất lượng cây giống chưa cao. Để giảm ảnh hưởng phân ly của hạt giống, tăng số lượng hạt/giống và số lượng giống trong nuôi cấy, tăng khả năng chọn lọc được nhiều cá thể tốt nhất để nhân giống, sáng chế này thực hiện gieo ươm ở vườn ươm ít nhất 100 g hạt giống (khoảng 3500 - 5000 hạt) của các cá thể ưu việt trong các giống được chọn nêu trên; sau đó tiếp tục chọn lọc sớm hạt giống có thể nảy mầm nhanh; chọn cây có nhiều số lá thật hơn và chọn tiếp 10 % cây sinh trưởng chiều cao và đường kính gốc nhanh nhất trong số cây còn lại để thu hái chồi phục vụ nhân giống mô CFF.

(b) Nhân giống

** Khử trùng mẫu:*

Trước đây khử trùng mẫu hạt giống và chồi Keo lá liềm bằng HgCl_2 0,05 % - 0,1 % trong thời gian là 5 - 8 phút, nên có sự độc hại mạnh tới con người và môi trường. Sáng chế này thay thế khử trùng các chồi chọn lọc được ở bước b) bằng NaOCl (Javen) nồng độ 5 % với thời gian 6 phút.

** Tạo chồi và cụm chồi:*

Môi trường nhân chồi tốt nhất là $\text{MS} + 0,5 \text{ mg/L TDZ} + 5,5 \text{ g/L aga} + 30 \text{ g/L đường} + 1,0 \text{ mg/L BAP}$. Việc bổ sung thêm TDZ đã nâng cao hệ số nhân chồi, chiều dài chồi cũng như chất lượng chồi tốt nhất; qua đó tăng 2,22 lần hệ số nhân chồi, chiều dài chồi trung bình đạt 2,38 cm, chồi xanh và mập, thân phân lóng rõ ràng. Ở các chu kỳ cấy tiếp theo, việc nhân chồi còn tiếp tục được cấy chuyển vào một môi trường có bổ sung Kinetin ($\text{MS}^* + 5,5 \text{ g/L aga} + 30 \text{ g/L đường} + 1 \text{ mg/L BAP} + 0,1 \text{ mg/L kinetin}$) để tạo cụm chồi, tăng hệ số nhân chồi đạt từ 2,24 đến 2,66 lần gấp 1,19 lần so với đối chứng và chiều dài chồi đạt từ 2,51 cm đến 2,80 cm gấp 1,11 lần so với đối chứng.

** Tạo chồi hữu hiệu:*

Môi trường tạo chồi hữu hiệu là $\text{MS}^* + 1,5 \text{ mg/L BAP} + 0,5 \text{ mg/L kinetin} + 2 \text{ g/L than hoạt tính} + 60 \text{ mg/L adenin sulphat}$. Việc bổ sung adenin sulphat và than hoạt tính cho thấy hệ số nhân chồi, tỷ lệ chồi hữu hiệu tăng lên đáng kể, lần lượt đạt là 2,28 lần và 86,7 %, vượt so công thức đối chứng lần lượt là 1,91 lần và 62,5 %.

** Ra rễ:*

Môi trường ra rễ là $1/2 \text{ MS}^* + 1,0 \text{ mg/L IBA} + 0,5 \text{ mg/L Transplantone (ABT)} + 0,1 \text{ g/L than hoạt tính} + 5,8 \text{ g/L aga} + 15 \text{ g/L đường}$. Việc phối hợp IBA, ABT và than hoạt tính đã ảnh hưởng rõ rệt đến khả năng ra rễ đối với Keo lá liềm. Qua đó tỷ lệ chồi ra rễ trung bình đạt 92,2 % cao hơn so với công thức đối chứng chỉ đạt 26,7 % (gấp 3,25 lần), số rễ trên chồi trung bình đạt 3,2 rễ/chồi cao hơn nhiều so với công thức đối chứng chỉ đạt

0,31 rễ/chồi và chiều dài rễ trung bình đạt 1,58 cm/cái cao hơn so với công thức đối chứng chỉ đạt 0,57 cm/cái.

** Huấn luyện cây con:*

Cây con đã ra rễ *in vitro* sau khi huấn luyện 15 ngày ở nhà lưới sẽ được cấy vào bầu đất. Thành phần ruột bầu được bổ sung (theo tỷ lệ khối lượng) 10 % sơ dừa vụn + 10 % phân chuồng hoai + 1 % phân lân để tăng độ xốp và nhẹ hơn. Sau 20 ngày, tưới thúc bằng hỗn hợp NPK (13:13:13 TE) 1 % với 100 L/20.000 cây. Định kỳ 10 ngày tưới thúc 1 lần; tưới vào lúc trời râm mát, sau đó tưới rửa lại bằng nước sạch; khi chiều cao cây đạt từ 15 - 20 cm thì ngừng tưới.

Quy trình theo sáng chế có những điểm mới sau:

- Quy trình nhân mô CFF Keo lá liềm ở bước (a) gieo ươm ít nhất 100 g hạt giống của các cá thể ưu việt của các giống được chọn; chọn lọc sớm thực hiện qua 3 bước: chọn hạt giống có thể nảy mầm nhanh; chọn cây có nhiều số lá thật hơn và chọn tiếp 10 % cây sinh trưởng chiều cao và đường kính gốc nhanh nhất để lấy chồi đưa vào nuôi cấy mô.

- Quy trình nhân giống mô CFF Keo lá liềm ở bước *khử trùng mẫu* bằng Javen nồng độ 5 % với thời gian 6 phút.

- Quy trình nhân giống mô CFF Keo lá liềm ở bước *tạo chồi và cụm chồi* bổ sung thêm TDZ và kinetin trong môi trường tạo chồi và cụm chồi, qua đó tăng hệ số nhân chồi, chiều dài chồi và chất lượng chồi. Trong môi trường tạo chồi hữu hiệu bổ sung adenin sulphat và than hoạt tính để tiếp tục tăng hệ số nhân chồi và tỷ lệ chồi hữu hiệu.

- Quy trình nhân giống mô CFF Keo lá liềm ở bước *ra rễ* phối hợp IBA, ABT và than hoạt tính trong môi trường ra rễ để tăng tỷ lệ chồi ra rễ và số rễ trên chồi.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Hình 1 là hình vẽ minh họa thể hiện quy trình nhân giống mô cho các giống Keo lá liềm bằng phương thức trồng rừng dòng vô tính theo gia đình.

Hình 2 là hình thể hiện giống Keo lá liềm AC13.

Hình 3 là hình thể hiện cụm chồi được cải thiện sau khi bổ sung TDZ, BAP và Kinetin.

Hình 4 là hình thể hiện cây giống Keo lá liềm đã ra rễ chuẩn bị cấy vào bầu.

Mô tả chi tiết giải pháp hữu ích

Do vật liệu nhân giống vô tính của Keo lá liềm bị già hóa rất nhanh, chỉ sử dụng được dưới 14 tháng tuổi, nên việc chọn lọc và phát triển các dòng vô tính Keo lá liềm là không khả thi. Keo lá liềm được nhân giống chủ yếu từ hạt, nhưng nguồn giống xô bồ, kém chất lượng. Để phát triển các giống Keo lá liềm được công nhận vào sản xuất, rất cần

một quy trình nhân giống hàng loạt từ hạt giống của các cá thể ưu việt trong các gia đình đã được công nhận.

Theo một phương án ưu tiên của sáng chế, quy trình nhân giống mô cho các giống Keo lá liềm bằng phương thức trồng rừng đồng vô tính theo gia đình, được tiến hành như sau:

(a) Chọn lọc giống

** Chọn hạt giống:*

Sử dụng các giống Keo lá liềm đã được Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn công nhận. Các giống này có năng suất đạt từ 23-25 m³/ha/năm, có hàm lượng xenluloza và khối lượng riêng cao; Chọn lọc các cá thể ưu việt của các giống Keo lá liềm trong các vườn giống Keo lá liềm; Thu hái và sử dụng hạt giống của những cá thể ưu việt để nhân giống.

** Chọn lọc sớm trong vườn ươm:*

- Gieo ươm ít nhất 100 g hạt giống trộn đều từ các cá thể ưu việt của các giống chọn lọc được trên luống cát vàng sạch trong nhà kính;

- Chọn lọc hạt giống có thể nảy mầm nhanh;

- Cấy chuyển cây mầm vào bầu đất (với thành phần ruột bầu theo tỷ lệ khối lượng: 79 % đất đồi sàng kỹ + 10 % sơ dừa vụn + 10 % phân chuồng hoai + 1 % phân lân). Bầu đất được xử lý bằng dung dịch thuốc tím 0,1 % hoặc dung dịch chống nấm khác, tưới đều lên bề mặt bầu trước khi cấy cây.

- Sau 14 ngày tuổi, chọn cây có nhiều số lá thật nhất và loại bỏ những cây còn lại.

- Sau 60 ngày tuổi, chọn 10 % cây có sinh trưởng về đường kính gốc và chiều cao nhanh nhất để thu hoạch chồi đỉnh đưa vào nuôi cấy mô.

(b) Nhân giống

** Khử trùng mẫu:*

- Cắt đoạn chồi dài 10 - 15 cm (bỏ ngọn) để làm vật liệu nuôi cấy mô. Vật liệu cần được bảo quản tránh mất nước. Thời gian cắt vật liệu vào đầu buổi sáng những ngày trời nắng ráo.

- Khử trùng vật liệu:

+ Cắt bỏ lá, rửa vật liệu dưới vòi nước chảy bằng chổi lông mềm.

+ Rửa vật liệu bằng nước rửa chén bát, rửa lại dưới vòi nước chảy và tráng qua nước cất vô trùng.

+ Lắc cồn 70 % trong 30 - 60 giây, sau đó tráng bằng nước cất 2 - 3 lần.

+ Ngâm vật liệu trong dung dịch Javen nồng độ 5 % với thời gian 6 phút, sau đó rửa sạch bằng nước cất vô trùng.

- Sau khi khử trùng, dùng panh và dao cắt vật liệu thành các đoạn mẫu dài 2 - 4 cm, có chứa ít nhất 1 mắt ngủ, cấy các đoạn mẫu vào môi trường tái sinh chồi ban đầu (MS + 5,5 g/L aga + 30 g/L đường) theo phương thẳng đứng.

- Sau khi vật liệu đã bật chồi, khoảng 30 - 35 ngày chiều cao chồi đạt từ 1,5 cm trở lên thì cắt chồi và cấy vào môi trường nhân chồi

** Tạo chồi và cụm chồi:*

- Dùng dao hoặc kéo tách thành cụm (5 - 7 chồi), cắm cụm chồi ngập 3 - 5 mm môi trường theo phương thẳng. Loại bỏ mẫu nhiễm mỗi lần cấy chuyển.

- Môi trường: MS + 0,5 mg/L TDZ + 5,5 g/L aga + 30g/L đường + 1,0 mg/L BAP.

- Từ chu kỳ tiếp theo, chuyển sang môi trường: MS* + 5,5 g/L aga + 30 g/L đường + 1 mg/L BAP + 0,1 mg/L kinetin.

- Thời gian cấy chuyển: 20 ngày/chu kỳ

Chỉ cấy chuyển tối đa 7 chu kỳ, sau đó phải thay mẫu mới.

** Tạo chồi hữu hiệu:*

- Dùng dao hoặc kéo tách thành cụm nhỏ (3 - 5 chồi), cắm cụm chồi ngập 3 - 5 mm môi trường theo phương thẳng.

- Môi trường: MS* + 1,5mg/L BAP + 0,5 mg/L kinetin + 2 g/L than hoạt tính + 60 mg/L adenin sulphat.

- Thời gian cấy chuyển: 20 ngày/chu kỳ.

- Số chu kỳ cấy chuyển trước khi tiến hành ra rễ *in vitro*: 1 chu kỳ.

** Ra rễ:*

- Tiêu chuẩn chọn chồi để cấy ra rễ *in vitro* là chồi hữu hiệu có chiều cao trung bình 1,5 cm trở lên; có từ 2 đốt lá trở lên; chồi cứng cáp, thẳng; lá mở, xanh.

- Cấy đơn chồi, cắm chân chồi ngập 3 - 5 mm môi trường theo phương thẳng.

- Môi trường: 1/2 MS* + 1,0 mg/L IBA + 0,5 mg/L ABT + 0,1 g/L than hoạt tính + 5,8 g/L aga + 15 g/L đường.

- Thời gian xuất hiện rễ: 7 ngày; sau 15 ngày rễ phát triển hoàn chỉnh.

- Các bình cây ra rễ hoàn chỉnh được huấn luyện trong nhà lưới 15 ngày.

** Huấn luyện cây con:*

- Cây con đã ra rễ *in vitro* sau khi huấn luyện 15 ngày sẽ được cấy vào bầu đất.

- Cây giống và bầu đất cần được xử lý bằng dung dịch chống nấm. Tách từng cây và cắm vào giá thể. Thành phần ruột bầu: 79 % đất đồi sàng kỹ + 10 % sơ dừa vụn + 10 % phân chuồng hoai + 1 % phân lân. Chế độ chăm sóc như sau:

+ Che sáng: che 70 % trong 7 - 10 ngày đầu và 7 ngày kế tiếp che 50 %, sau đó bỏ hoàn toàn lưới che.

+ Tưới nước: 12 ngày đầu dùng bình phun hay dàn phun sương tưới 4 - 5 lần/ngày (lưu ý: không để bầu đất bị úng, lượng tưới và số lần tưới thay đổi theo điều kiện thời tiết), khi cây ổn định số lần tưới giảm dần.

+ Bón phân: Sau 20 ngày, tưới thúc bằng hỗn hợp NPK (13:13:13 TE) 1 % với 100 L/ 20.000 cây; tưới vào lúc trời râm mát, sau đó tưới rửa lại bằng nước sạch. Định kỳ 10 ngày tưới thúc 1 lần đến khi chiều cao cây đạt từ 15 - 20 cm thì ngừng tưới.

+ Làm cỏ phá váng và làm sạch rãnh luống (25 - 30 ngày/ lần).

+ Đảo bầu, bấm tỉa chồi bất định (chỉ để một chồi ngọn phát triển tốt), và cắt bỏ 1/3 phiến lá sau 1,5 - 2,0 tháng và trước khi xuất vườn, loại bỏ cây bị chết, cây sinh trưởng kém.

Thành phần môi trường cơ bản MS, MS* và 1/2MS* được thể hiện như trong bảng sau:

Bảng 1. Thành phần môi trường nuôi cấy

Thành phần	MS (mg/L)	MS* (mg/L)	1/2MS* (mg/L)
Đa lượng			
Canxi clorua ($\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	440	440	220
Kali phosphat (KH_2PO_4)	170	255	127,5
Kali nitrat (KNO_3)	1900	1900	950
Magie sunfat ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	370	370	185
Amoni nitrat (NH_4NO_3)	1650	1650	825
Canxi nitrat ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$)	-	-	-
Vi lượng			
Coban clorua ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	0,025	0,03	0,015
Đồng sunfat ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)	0,025	0,03	0,015
Sắt sunfat ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	27,8	27,8	13,9
Kali Iốt (KI)	0,83	0,83	0,415
Natri molybdat ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	0,25	0,25	0,125
Kẽm sunfat ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	8,6	8,6	4,3

Thành phần	MS (mg/L)	MS* (mg/L)	1/2MS* (mg/L)
Muối dinatri axit etylendiamin tetraaxetic ($\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}/\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_8\text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	37,2	37,2	18,6
Axit boric (H_3BO_3)	6,2	6,2	3,1
Mangan sunfat ($\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	22,3	22,3	11,15
Vitamin			
Glyxin	2000	2	2
Myo - Inositol	100	100	100
Pyridoxin HCl (vitamin B6)	0,5	0,5	0,5
Thiamin HCl (vitamin B1)	0,1	0,1	0,1
Axit nicotinic	-	0,1	0,1
Biotin	-	0,1	0,1
Axit folic	-	1,0	1,0

Ví dụ thực hiện sáng chế

Các ví dụ dưới đây đề cập tới quy trình nhân giống mô cho các giống Keo lá liềm bằng phương thức trồng rừng dòng vô tính theo gia đình theo các phương án của sáng chế. Tuy nhiên, các phương án này chỉ nhằm mục đích minh họa và không làm hạn chế phạm vi bảo hộ của sáng chế như được nêu trong yêu cầu bảo hộ kèm theo.

Ví dụ 1: Chọn lọc giống

Trong các vườn giống của Keo lá liềm tại Hàm Thuận Nam – Bình Thuận và Cam Lộ - Quảng Trị, chọn lọc và thu hái hạt giống từ các cá thể ưu việt trong 05 gia đình được công nhận để nhân giống.

Sử dụng ít nhất 20 g hạt giống của 05 gia đình AC13, AC25, AC32, AC40, AC73; chọn đều để gieo ươm tại nhà kính. Các gia đình có sinh trưởng nhanh trên vùng đất cát, năng suất từ 21-25 m³/ha/năm; chiều cao dưới cành cao, thân thẳng, cành nhỏ; có khối lượng riêng của gỗ và hàm lượng xenluloza cao.

Trước đây mẫu nhân giống mô CFF là hạt giống được gieo ươm trực tiếp trong bình nuôi cây mô nên số lượng giống và hạt giống/giống ít, do vậy rất dễ bị ảnh hưởng của phân ly trong thụ phấn tự do (hạt giống hữu tính). Để giảm ảnh hưởng phân ly của hạt giống và tăng số lượng giống và hạt giống/giống, tăng khả năng chọn lọc được nhiều cá thể tốt nhất để nhân giống, sáng chế này thực hiện gieo ươm 100 g hạt giống (3500 - 5000 hạt giống) từ các cá thể ưu việt trong 05 giống được công nhận; chọn lọc sớm hạt giống có thể nảy mầm nhanh; tiếp đến chọn cây có nhiều số lá thật hơn và chọn tiếp 10 % cây

sinh trưởng chiều cao và đường kính gốc nhanh nhất trong số cây còn lại. Theo Rawat và Singh (2000) khẳng định rằng số lá/cây quan hệ chặt với sinh trưởng của cây trên hiện trường. Bouvet và cộng sự (2017) cũng khẳng định chọn lọc sớm ở giai đoạn vườn ươm có thể loại bỏ được 30 % cây sinh trưởng kém. Trong khi Hogberg và Karlsson (1998) cho rằng chọn lọc 20 % sinh trưởng chiều cao tốt có thể đem lại tăng thu di truyền 3 % ở cây 6 tuổi.

Khảo nghiệm tăng thu di truyền Keo lá liềm (đây là khảo nghiệm so sánh sinh trưởng giữa các giống có chất lượng di truyền khác nhau) tại vùng vùng lập địa đất cát nội đồng Lệ Xuyên - Quảng Trị được xây dựng vào năm 2016, theo khối ngẫu nhiên đầy đủ, với 9 lô hạt giống có sự khác biệt di truyền, lặp lại 5 lần, 36 cây/ô/lần lặp. Chín lô hạt thí nghiệm cụ thể như sau:

+ 06 lô hạt của 06 gia đình có sinh trưởng tốt trong vườn giống Quảng Trị, trong đó có gia đình AC13 và AC40 là 02 giống đã được Bộ NN & PTNT công nhận.

+ Lô hạt hỗn hợp 20 gia đình tốt nhất tại vườn giống Keo lá liềm tại Bình Thuận

+ Lô hạt nguyên sản - xuất xứ Malta (PNG - nhập từ Úc)

+ Lô hạt đại trà mua từ Công ty 1/5, không rõ xuất xứ

Sau 30 tháng trồng, kết quả cho thấy có sự khác biệt về sinh trưởng giữa các lô hạt trong khảo nghiệm. Tính toán tăng thu di truyền thực tế cho thấy các lô hạt từ các gia đình ưu việt được chọn lọc trong vườn giống tại Quảng Trị và Bình Thuận đều cho sinh trưởng tốt hơn so với lô hạt nguyên sản và đại trà. Lô hạt của giống AC13 và 40 có tăng thu di truyền thực tế về đường kính và chiều cao đạt từ 19,0 – 27,0 %, vượt thể tích thân cây trung bình tới gần 74-81 %, độ nhỏ cành và độ thẳng thân đạt tăng thu thực tế từ 6,7 – 23,8 % so với lô hạt đại trà (Bảng 2). Kết quả này đã minh chứng việc sử dụng giống được công nhận đã được cải thiện cả về năng suất, chất lượng thân cây cho trồng rừng Keo lá liềm.

Bảng 2. Tăng thu di truyền thực tế (R_t %) về sinh trưởng và chất lượng thân cây của các lô hạt so với lô hạt giống đại trà tại vùng lập địa đất đồi ở Lệ Xuyên - Quảng Trị (30 tháng tuổi)

Lô hạt	$R_t - D_{1,3}$	$R_t - H$	$R_t - V$	$R_t - D_{nc}$	$R_t - D_{tt}$
NSan	2,2	8,2	16,3	8,7	13,4
HTN	10,4	11,2	35,4	5,2	5,1
13	19,0	24,4	73,9	8,2	6,7
40	20,1	27,0	80,6	19,8	23,8
44	15,7	19,0	59,6	10,3	9,9
60	9,8	9,5	32,4	5,8	2,0
71	13,6	14,5	48,6	2,7	10,7
94	10,8	13,1	39,6	6,3	8,3

Ghi chú: HTN: lô hạt hỗn hợp thu từ Hàm Thuận Nam; NS: lô hạt xuất xứ nguyên sản;

Ví dụ 2: Khử trùng mẫu

Trước đây hạt giống của các giống được công nhận được rửa dưới vòi nước chảy trong 3 - 5 phút, sau đó rửa bằng nước xà phòng loãng, tráng với nước cất vô trùng 3 - 5 lần, đun trong nước sôi 1 phút, sau đó ngâm trong HgCl_2 0,05 % - 0,1 % trong thời gian 5 - 8 phút. Cuối cùng là tráng bằng nước cất vô trùng 3 - 5 lần. Hóa chất HgCl_2 rất độc hại tới con người và môi trường. Sáng chế này sử dụng mẫu chồi từ các cây giống được chọn lọc sớm và được khử trùng bằng Javen nồng độ 5 % với thời gian 6 phút. Javen có khả năng diệt vi sinh vật cao, có mức độ độc tính thấp đối với mẫu cấy, con người và môi trường; bên cạnh đó lại có khả năng giảm mẫu nhiễm và cho tỷ lệ bật chồi hữu hiệu tương đối tốt.

Phương pháp nghiên cứu xác định thời gian khử trùng mẫu bằng Javen 2,5 % và 5 % với thời gian khác nhau từ 3 - 16 phút. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần với dung lượng mẫu cấy là 30 chồi/công thức thí nghiệm/lần lặp. Các mẫu cấy được đựng trong bình scott, sau đó lắc mẫu trong dung dịch khử trùng là Javen và cuối cùng dùng nước cất đã khử trùng tráng lại mẫu 3 - 5 lần.

Kết quả thí nghiệm Javen ở 2 nồng độ và thời gian khử trùng mẫu khác nhau được thể hiện ở bảng 3. Kết quả kiểm tra thống kê bằng tiêu chuẩn χ^2 về chỉ tiêu tỷ lệ mẫu nảy chồi hữu hiệu đối với dòng Keo lá liềm có sự khác biệt rõ rệt khi khử trùng mẫu bằng Javen 2,5 % và Javen 5 % với thời gian khác nhau ($\text{sig} < 0,05$). Khử trùng mẫu bằng Javen 5 % trong thời gian 6 phút cho tỷ lệ mẫu sạch nảy chồi cao nhất là 30 %. Theo phương pháp khử trùng trước đây sử dụng HgCl_2 0,05 % - 0,1 % trong thời gian 5 - 8 phút chỉ cho tỷ lệ mẫu sạch nảy chồi cao nhất chỉ đạt được 23,3 % (Phí Hồng Hải et al, 2016). Như vậy khử trùng mẫu chồi Keo lá liềm nên ưu tiên sử dụng Javen 5 % trong 6 phút cho hiệu quả khử trùng là tốt hơn so với các phương pháp trước đây.

Bảng 3. Ảnh hưởng của nồng độ Javen và thời gian đến khả năng tạo mẫu sạch nảy chồi của dòng Keo lá liềm

Stt	Nồng độ	Thời gian	Tỷ lệ mẫu sạch nảy chồi (%)
1	Javen 2,5 %	4	10,0
2		8	26,7
3		12	16,7
4		16	13,3
sig	0,018		
5	Javen 5 %	3	13,3
6		6	30,0
7		9	18,9
8		12	11,1
sig	0,005		

Ví dụ 3: Tạo chồi và cum chồi

Thí nghiệm ảnh hưởng của TDZ đến khả năng tái sinh chồi của Keo lá liềm

Đối với các loài keo, môi trường MS (Murashige & Skoog, 1962) được công bố là môi trường cơ bản có thành phần dinh dưỡng phù hợp nhất cho quá trình nhân giống từ tái sinh chồi, đến nhân chồi và ra rễ (Darus H. Ahmas *et al.*, 1989 & 1994; Nguyễn Ngọc Tân *et al.*, 1995; Toda *et al.*, 1995; Đoàn thị Mai *et al.*, 2000). Kế thừa các kết quả nghiên cứu của Lê Đình Khả và đồng tác giả (2003) và Đoàn Thị Mai và đồng tác giả (2003, 2009, 2011) về nhân giống *in vitro* cho các giống keo lai và bạch đàn; sáng chế này sử dụng môi trường MS* được bổ sung các chất điều hòa sinh trưởng thuộc nhóm Cytokinin.

Sáng chế đã thử nghiệm TDZ ở các nồng độ 0,25 - 1 mg/L để xác định được hiệu quả tái sinh chồi của dòng Keo lá liềm và kết quả nghiên cứu được thể hiện ở bảng 3. Kết quả phân tích thống kê cho thấy nồng độ TDZ khác nhau đã ảnh hưởng rõ rệt đến hệ số nhân chồi, chiều dài chồi và chất lượng chồi của dòng Keo lá liềm (Sig. = 0,0001 < 0,05). Từ bảng kết quả cho thấy, môi trường bổ sung 0,5 mg/L TDZ cho hệ số nhân chồi và chiều dài chồi trung bình là lớn nhất, lần lượt là 2,22 lần và 2,38 cm, chồi hình thành cứng cáp, khỏe mạnh sinh trưởng tốt. Khi bổ sung 0,25 mg/L TDZ thì hệ số nhân chồi và chiều dài chồi có sự tăng nhẹ so với môi trường đối chứng không bổ sung TDZ. Còn môi trường bổ sung nồng độ TDZ tăng lên 0,75 mg/L - 1 mg/L cho hệ số nhân chồi giảm đi hơn so với môi trường bổ sung 0,5 mg/L, cụm chồi cũng nhỏ, chồi phát triển kiểu mảnh, nhỏ, chồi hình thành không rõ rệt về thân, lá, nhiều chồi cây hình thành khối mô sẹo to ở gốc.

Bảng 4. Ảnh hưởng của nồng độ TDZ đến khả năng tái sinh chồi của dòng Keo lá liềm

CT	Nồng độ TDZ (mg/L)	Hệ số nhân chồi (lần)	Chiều dài chồi (cm)	Chất lượng chồi
ĐC	0	1,20±0,01 ^c	1,58±0,01 ^d	+
CT1	0,25	1,65±0,02 ^d	1,81±0,03 ^c	++
CT2	0,5	2,22±0,06^a	2,38±0,06^a	+++
CT3	0,75	2,11±0,02 ^b	2,17±0,01 ^b	++
CT4	1	1,83±0,05 ^c	1,87±0,02 ^c	++
sig	0,0001			

Ghi chú: (+) Màu sắc chồi xanh, thân chồi rất mảnh, thân phân lỏng kém;

(++) Màu sắc chồi xanh, thân chồi mảnh, thân phân lỏng rõ ràng;

(+++) Màu sắc chồi xanh, chồi mập, thân phân lỏng rõ ràng.

Ảnh hưởng phối hợp giữa BAP và Kinetin đến khả năng tạo chồi

Cytokinin được biết đến là nhóm chất điều hòa sinh trưởng có tác dụng kích thích sự phân chia tế bào, sự hình thành và sinh trưởng của chồi *in vitro* (Miller, 1961). Để tăng hệ số nhân giống, người ta tăng nồng độ cytokinin trong môi trường nuôi cấy ở giai đoạn

tạo chồi *in vitro* (Nguyễn Quang Thạch, 2007). Các loại cytokinin thường được sử dụng trong nuôi cấy *in vitro* như: BAP, kinetin, TDZ, zeatin,...

Trong thí nghiệm này, môi trường MS* + 1,0 mg/L BAP bổ sung kinetin ở các nồng độ khác nhau từ 0,05 mg/L; 0,1 mg/L; 0,15 mg/L và 0,2 mg/L. Kết quả được trình bày tại bảng 5. Qua kết quả phân tích phương sai một nhân tố ảnh hưởng phối hợp của BAP + kinetin đến khả năng nhân nhanh của Keo lá liềm có kết quả sig < 0,05. Điều đó chứng tỏ nồng độ kinetin khác nhau sẽ ảnh hưởng rõ rệt đến hệ số nhân chồi và chiều dài chồi. Kết quả cũng cho thấy công thức tốt nhất khi sử dụng phối hợp giữa 1,0 mg/L BAP + 0,1 mg/L kinetin cho hệ số nhân chồi (HSNC) đạt 2,66 lần và chiều dài chồi đạt 2,80 cm. Như vậy, khi tăng nồng độ Kinetin từ 0 đến 0,1 mg/L trong môi trường nuôi cấy, cho HSNC đạt từ 2,24 đến 2,66 lần, gấp 1,19 lần so với đối chứng và chiều dài chồi đạt từ 2,51 cm đến 2,80 cm, gấp 1,11 lần so với đối chứng. Tuy nhiên khi tăng tiếp nồng độ kinetin từ 0,15 - 0,2 mg/L thì thấy có chiều hướng làm HSNC và chiều dài chồi giảm (HSNC giảm từ 2,66 xuống còn 2,43 lần, chiều dài chồi giảm từ 2,80 cm xuống 2,55 cm). Như vậy, môi trường nhân nhanh chồi thích hợp cho HSNC, chiều dài chồi và chất lượng chồi sinh trưởng phát triển tốt là môi trường MS* bổ sung 1,0 mg/L BAP và 0,1 mg/L Kinetin.

Bảng 5. Ảnh hưởng phối hợp 1mg/L BAP + Kinetin đến khả năng tạo chồi (sau 30 ngày nuôi cấy)

Công thức	Nồng độ kinetin (mg/L)	HSNC (lần)	Chiều dài TB chồi (cm)	Chất lượng chồi
ĐC	0,00	2,24±0,10 ^d	2,51±0,05 ^d	+++
CT5	0,05	2,50±0,05 ^{bc}	2,67±0,03 ^b	+++
CT6	0,10	2,66±0,08^a	2,80±0,03^a	+++
CT7	0,15	2,57±0,05 ^{ab}	2,71±0,02 ^b	+++
CT8	0,20	2,43±0,06 ^c	2,55±0,07 ^c	+++
Sig.		0,0001	0,0001	

Ghi chú: (+++) Màu sắc chồi xanh, chồi mập, thân phân lóng rõ ràng.

Ví dụ 4: Tạo chồi hữu hiệu

Ảnh hưởng của Adenin sulphat đến tạo chồi hữu hiệu

Adenin sulphat là tiền chất của cytokinin, thường được sử dụng trong nuôi cấy *in vitro* như một chất bổ sung kích thích tăng trưởng tế bào, tỷ lệ phát sinh chồi. Theo các nghiên cứu trước đây, bổ sung than hoạt tính làm tăng tỷ lệ chồi hữu hiệu và chiều cao chồi nhưng hệ số nhân chồi lại giảm đáng kể so với giai đoạn nhân nhanh. Vì vậy, sáng chế khảo sát khả năng ảnh hưởng của adenin sulphat lên quá trình hình thành chồi và chất lượng chồi hữu hiệu của Keo lá liềm. Thí nghiệm tiến hành bổ sung adenin sulphat ở 4

nồng độ khác nhau 30 mg/L; 60 mg/L; 90 mg/L; 120 mg/L vào môi trường MS* + 1,0 mg/L BAP + 0,1 mg/L kinetin + 2 g/L than hoạt tính. Kết quả thu được sau 30 ngày nuôi cấy được trình bày tại bảng 6. Qua kết quả phân tích phương sai một nhân tố cho thấy ảnh hưởng rõ rệt của hàm lượng adenin sulphat đến tỷ lệ chồi hữu hiệu các dòng Keo lá liềm (sig = 0,001). Ở nồng độ 30 mg/L, adenin sulphat chưa có ảnh hưởng rõ rệt đến sự hình thành chồi. Nhưng khi tăng nồng độ lên 60 mg/L adenin sulphat hệ số nhân chồi, tỷ lệ chồi hữu hiệu tăng lên đáng kể và đạt lần lượt là 2,28 lần và 86,7 %, và chiều cao của chồi đáp ứng với yêu cầu của chồi trước khi ra rễ. Tuy nhiên, khi tăng nồng độ adenin sulphat lên 90 và 120 mg/L thì sự ảnh hưởng của adenin sulphat giảm xuống ở tất cả các chỉ tiêu theo dõi. Điều này chứng tỏ khi có mặt adenin sulphat trong môi trường, các chồi đơn sử dụng adenin sulphat làm tiền chất để tổng hợp ra cytokinin nội sinh. Cytokinin nội sinh tác động lên khả năng hình thành chồi của mẫu. Thêm vào đó, cytokinin nội sinh cũng có tác động lên khả năng phát sinh chồi. Sự kết hợp giữa cytokinin ngoại sinh và nội sinh giúp cải thiện khả năng hình thành chồi.

Bảng 6. Ảnh hưởng của adenin sulphat đến chất lượng chồi hữu hiệu và chiều cao của chồi sau 30 ngày nuôi cấy

Công thức	Adenin sulphat (mg/L)	Hệ số nhân chồi (lần)	Tỷ lệ chồi hữu hiệu (%)	Chiều cao chồi (cm)
ĐC	0,0	1,91±0,02 ^c	62,2	3,75±0,03 ^a
CT9	30	2,05±0,01 ^b	77,8	3,68±0,03 ^a
CT10	60	2,28±0,04^a	86,7	3,54±0,04^b
CT11	90	2,10±0,04 ^b	80,0	3,31±0,02 ^c
CT12	120	1,88±0,03 ^c	68,9	3,27±0,04 ^c
Sig.		0,0001	0,0001	0,0001

Như vậy, môi trường MS* + 1,5 mg/L BAP + 0,5 mg/L kinetin + 2 g/L than hoạt tính + 60 mg/L adenin sulphat là môi trường cho hệ số nhân chồi, tỷ lệ chồi hữu hiệu (86,7 % cũng như chất lượng chồi tốt nhất phục vụ cho giai đoạn ra rễ sau đó đạt tỷ lệ cao. Trong khi trước đây khi không bổ sung TDZ, kinetin và adenin sulphat thì tỷ lệ chồi hữu hiệu chỉ đạt 42,8 %.

Ví dụ 5: Khả năng ra rễ

Ảnh hưởng phối hợp của IBA (3 – Indole Butyric Acid) + ABT (Transplantone) đến khả năng ra rễ:

Giai đoạn cuối cùng của quá trình nhân giống *in vitro* là tạo cây con hoàn chỉnh, có bộ rễ cứng cáp để có thể sinh trưởng phát triển tốt tại vườn ươm. Đây là một giai đoạn

quan trọng trong nuôi cấy mô, do đó việc xác định được môi trường ra rễ, thời gian và phương pháp huấn luyện cây con là rất cần thiết. Một trong những chất kích thích tạo rễ thường được sử dụng hiệu quả trong nuôi cấy *in vitro* cho thực vật là IBA, ABT với các nồng độ khác nhau tùy từng đối tượng nghiên cứu. Theo các nghiên cứu trước đối với dòng Keo lá liềm sử dụng 1 mg/L IBA cho hiệu quả ra rễ tốt nhất. Sáng chế thử nghiệm sử dụng 1 mg/L IBA và có bổ sung ABT ở nồng độ (0,25 – 1) mg/L để tăng tỷ lệ ra rễ, trong khi các khoáng chất và đường trong môi trường nuôi cấy cơ bản MS* được điều chỉnh giảm đi một nửa song vẫn đảm bảo cho các chồi có chiều cao từ 2,0 cm trở lên được phát triển bộ lá và thân lóng đầy đủ. Các chồi này sẽ được chọn và cấy trong môi trường ra rễ. Sau 5 - 7 ngày rễ bắt đầu xuất hiện và sau 10 ngày rễ của chồi sẽ được đo đếm các số liệu về số rễ/chồi, chiều dài rễ. Cụ thể kết quả nghiên cứu bổ sung 1 mg/L IBA + ABT với các nồng độ khác nhau vào môi trường ra rễ đối với dòng Keo lá liềm được trình bày ở bảng 7.

Bảng 7. Ảnh hưởng phối hợp của IBA và ABT các nồng độ đến khả năng ra rễ

Ký hiệu CTTN	1/2MS* + ABT các nồng độ (mg/L)	Tỷ lệ chồi ra rễ (%)	Số rễ/chồi TB (cái)	Chiều dài TB của rễ (cm)
ĐC	0,0	26,7	0,31±0,02 ^e	0,57±0,04 ^d
CT13	0,25	55,6	1,27±0,02 ^d	1,07±0,02 ^c
CT14	0,5	86,7	2,92±0,04^a	1,47±0,04^a
CT15	0,75	82,2	2,24±0,05 ^b	1,25±0,05 ^b
CT16	1,0	65,6	1,49±0,02 ^c	1,18±0,03 ^b
<i>Sig.</i>		<i>0,0001</i>	<i>0,0001</i>	<i>0,0001</i>

Qua kết quả phân tích phương sai một nhân tố và khi bình phương cho thấy sự phối hợp của 1 mg/L IBA + ABT các nồng độ khác nhau đã có ảnh hưởng rõ rệt tới khả năng ra rễ của các dòng Keo lá liềm ($\text{sig} = 0,0001$). Kết quả nghiên cứu cũng cho thấy tỷ lệ ra rễ cao nhất ở nồng độ ABT là 0,5 mg/L, đạt 86,7 %, cao hơn so với công thức đối chứng (chỉ đạt 26,7 %), trong khi số rễ/chồi và chiều dài rễ trung bình (2,92 cái/chồi; 1,47 cm) đạt cao hơn nhiều so với công thức đối chứng (0,31 cái/chồi; 0,57 cm). Trong khi sử dụng ABT ở nồng độ thấp hơn (0,25 mg/L) hoặc cao hơn (0,75 mg/L; 1,0 mg/L) thì tất các chỉ tiêu như tỷ lệ ra rễ, số rễ trung bình và chiều dài trung bình đều thấp hơn đáng kể so với nồng độ 0,5 mg/L (bảng 7). Khi quan sát bằng mắt thường, ra rễ của các dòng Keo lá liềm nghiên cứu trong các công thức có nồng độ ABT cao thì mặt cắt phần gốc của chồi cây bị sù to, tạo thành cục mô sẹo, rễ tạo thành không dài.

Ảnh hưởng của than hoạt tính đến khả năng ra rễ

Để tiếp tục nâng cao tỷ lệ ra rễ, nâng cao chất lượng rễ, sáng chế tiến hành thí nghiệm bổ sung thêm than hoạt tính ở 4 hàm lượng khác nhau 0,05 g/L; 0,1 g/L; 0,15 g/L; 0,2 g/L vào môi trường 1/2 MS* + 5,5 g/L aga + 30 g/L đường + 1 mg/L IBA + 0,5 mg/L ABT.

Kết quả thu được sau 10 ngày nuôi cấy tại Bảng 8. Qua kết quả phân tích phương sai một nhân tố và khi bình phương cho thấy ảnh hưởng của hàm lượng than hoạt tính đến khả năng ra rễ của Keo lá liềm có sự khác biệt rõ ràng ($\text{sig} = 0,0001$). Tỷ lệ ra rễ cao nhất ở hàm lượng 0,1 g/L than hoạt tính. Tỷ lệ chồi ra rễ trung bình đạt 92,2 % cao hơn so với công thức đối chứng chỉ đạt 86,2 %, số rễ trên chồi và chiều dài rễ trung bình lần lượt đạt 3,2 cái/chồi và 1,58 cm/chồi. Mặt cắt phần gốc của chồi Keo lá liềm ít sùi hơn so với công thức đối chứng, rễ nhú ra từ than của chồi thay vì mô sẹo như công thức đối chứng.

Bảng 8. Ảnh hưởng hàm lượng than hoạt tính đến khả năng ra rễ

Ký hiệu CTTN	Hàm lượng than hoạt tính (g/L)	Tỷ lệ chồi ra rễ (%)	Số rễ/chồi TB (cái)	Chiều dài TB của rễ (cm)
ĐC	0,0	86,7	2,90±0,05 ^b	1,45±0,03 ^c
CT13	0,05	88,9	3,05±0,06 ^{ab}	1,50±0,04 ^b
CT15	0,1	92,2	3,20±0,05^a	1,58±0,02^a
CT16	0,15	86,7	2,23±0,04 ^c	1,20±0,04 ^b
CT14	0,2	84,4	2,17±0,04 ^c	1,17±0,03 ^b
<i>Sig.</i>		<i>0,0001</i>	<i>0,0001</i>	<i>0,0001</i>

Song khi sử dụng than hoạt tính ở hàm lượng thấp hơn (0,05 g/L) và cao hơn (0,15 g/L; 0,2 g/L) thì tỷ lệ ra rễ, số rễ trung bình và chiều dài trung bình của rễ đều thấp hơn đáng kể so với hàm lượng 0,1 g/L (Bảng 8). Như vậy, môi trường 1/2 MS* + 1,0 mg/L IBA + 0,5 mg/L ABT + 0,1 g/L than hoạt tính + aga 5,8 g/L + đường 15 g/L là môi trường ra rễ phù hợp nhất cho giai đoạn ra rễ của dòng Keo lá liềm, qua đó tăng tỷ lệ ra rễ từ 83,2 % lên 92,2 %, số rễ/chồi từ 2,2 lên 3,2 rễ, tạo được bộ rễ và thân cứng cáp, chất lượng chồi đảm bảo để tiếp tục đưa cây ra ngoài huấn luyện và ra ngoài vườn ươm.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Quy trình nhân giống mô cho các giống Keo lá liềm (*Acacia crassicaarpa* A. Cunn. ex Benth.) bằng phương thức trồng rừng dòng vô tính theo gia đình, bao gồm các bước:

(a) Chọn lọc giống

* Chọn hạt giống:

Chọn các giống Keo lá liềm đã được Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn công nhận; các giống này có năng suất đạt từ 21-25 m³/ha/năm, có hàm lượng xenluloza và khối lượng riêng cao;

* Chọn lọc sớm trong vườn ươm:

- Gieo ươm ít nhất 100 g hạt giống trộn đều từ các cá thể ưu việt của các giống chọn lọc được trên luống cát vàng sạch trong nhà kính;
- Chọn lọc hạt giống có thể nảy mầm nhanh;
- Cấy chuyển cây mầm vào bầu đất (với thành phần ruột bầu theo tỷ lệ khối lượng: 79 % đất đồi sàng kỹ + 10 % xơ dừa vụn + 10 % phân chuồng hoai + 1 % phân lân); bầu đất được xử lý bằng dung dịch thuốc tím 0,1 % hoặc dung dịch chống nấm khác, tưới đều lên bề mặt bầu trước khi cấy cây;
- Sau 14 ngày tuổi, chọn cây có nhiều số lá thật nhất và loại bỏ những cây còn lại;
- Sau 60 ngày tuổi, chọn 10 % cây có sinh trưởng về đường kính gốc và chiều cao nhanh nhất để thu hoạch chồi đỉnh đưa vào nuôi cây mô;

(b) Nhân giống

* Khử trùng mẫu:

- Cắt đoạn chồi đỉnh thu được từ bước (a) với chiều dài 10 - 15 cm, bỏ ngọn để làm vật liệu nuôi cấy mô; chồi đỉnh cần được bảo quản tránh mất nước; thời gian cắt vào đầu buổi sáng những ngày trời nắng ráo;

- Khử trùng chồi đỉnh:

- + Cắt bỏ lá, rửa chồi đỉnh dưới vòi nước chảy bằng chổi lông mềm;
- + Rửa chồi đỉnh bằng nước rửa chén bát, rửa lại dưới vòi nước chảy và tráng qua nước cất vô trùng;
- + Lắc cồn 70 % trong 30 - 60 giây, sau đó tráng bằng nước cất 2 - 3 lần;
- + Ngâm chồi đỉnh trong dung dịch Javen nồng độ 5 % với thời gian 6 phút, sau đó rửa sạch bằng nước cất vô trùng;

* Tạo chồi và cụm chồi:

- Dùng dao hoặc kéo tách thành cụm (5 - 7 chồi), cắm cụm chồi ngập 3 - 5 mm môi trường theo phương thẳng. Loại bỏ mẫu nhiễm mỗi lần cấy chuyển trong đó môi trường nuôi cấy tạo chồi là MS + 0,5 mg/L TDZ + 5,5 g/L aga + 30g/L đường + 1,0 mg/L BAP;

- Từ chu kỳ tiếp theo, chuyển sang môi trường: MS* + 5,5 g/L aga + 30 g/L đường + 1 mg/L BAP + 0.1 mg/L kinetin;

- Thời gian cấy chuyển: 20 ngày/chu kỳ;

Chỉ cấy chuyển tới đa 7 chu kỳ, sau đó phải thay mẫu mới;

* *Tạo chồi hữu hiệu:*

- Dùng dao hoặc kéo tách chồi đỉnh đã khử trùng thành cụm nhỏ (3 - 5 chồi), cắm cụm chồi ngập 3 - 5 mm môi trường theo phương thẳng, trong đó môi trường nuôi cấy tạo chồi hữu hiệu là: MS* + 1,5 mg/L BAP + 0,5 mg/L kinetin + 2 g/L than hoạt tính + 60 mg/L adenin sulphat;

- Thời gian cấy chuyển: 20 ngày/chu kỳ;

- Số chu kỳ cấy chuyển trước khi tiến hành ra rễ *in vitro*: 1 chu kỳ;

* *Ra rễ:*

- Chọn chồi để cấy ra rễ *in vitro* là chồi hữu hiệu có chiều cao trung bình 1,5 cm trở lên; có từ 2 đốt lá trở lên; chồi cứng cáp, thẳng; lá mở, xanh;

- Cấy đơn chồi, cắm chân chồi ngập 3 - 5 mm môi trường theo phương thẳng, trong đó môi trường nuôi cấy ra rễ là: 1/2 MS* + 1,0 mg/L IBA + 0,5 mg/L ABT + 0,1 g/L than hoạt tính + 5,8 g/L aga + 15 g/L đường;

- Thời gian xuất hiện rễ: 7 ngày; sau 15 ngày rễ phát triển hoàn chỉnh;

* *Huấn luyện cây con:*

- Các bình cây ra rễ *in vitro* hoàn chỉnh được huấn luyện trong nhà lưới 15 ngày, cây con đã ra rễ *in vitro* sau khi huấn luyện 15 ngày sẽ được cấy vào bầu đất; thành phần ruột bầu được bổ sung theo tỷ lệ khối lượng: 79 % đất đồi sàng kỹ + 10 % sơ dừa vụn + 10 % phân chuồng hoai + 1 % phân lân để tăng độ xốp và nhẹ hơn; sau 20 ngày, tưới thúc bằng hỗn hợp NPK (13:13:13 TE) 1% với 100 L/20.000 cây; định kỳ 10 ngày tưới thúc 1 lần; tưới vào lúc trời râm mát, sau đó tưới rửa lại bằng nước sạch; khi chiều cao cây đạt từ 15 - 20 cm thì ngừng tưới;

Chế độ chăm sóc như sau:

+ Che sáng: che 70 % trong 7 - 10 ngày đầu và 7 ngày kế tiếp che 50 %, sau đó bỏ hoàn toàn lưới che;

+ Tưới nước: 12 ngày đầu dùng bình phun hay dàn phun sương tưới 4 - 5 lần/ngày; không để bầu đất bị úng, lượng tưới và số lần tưới thay đổi theo điều kiện thời tiết), khi cây ổn định số lần tưới giảm dần;

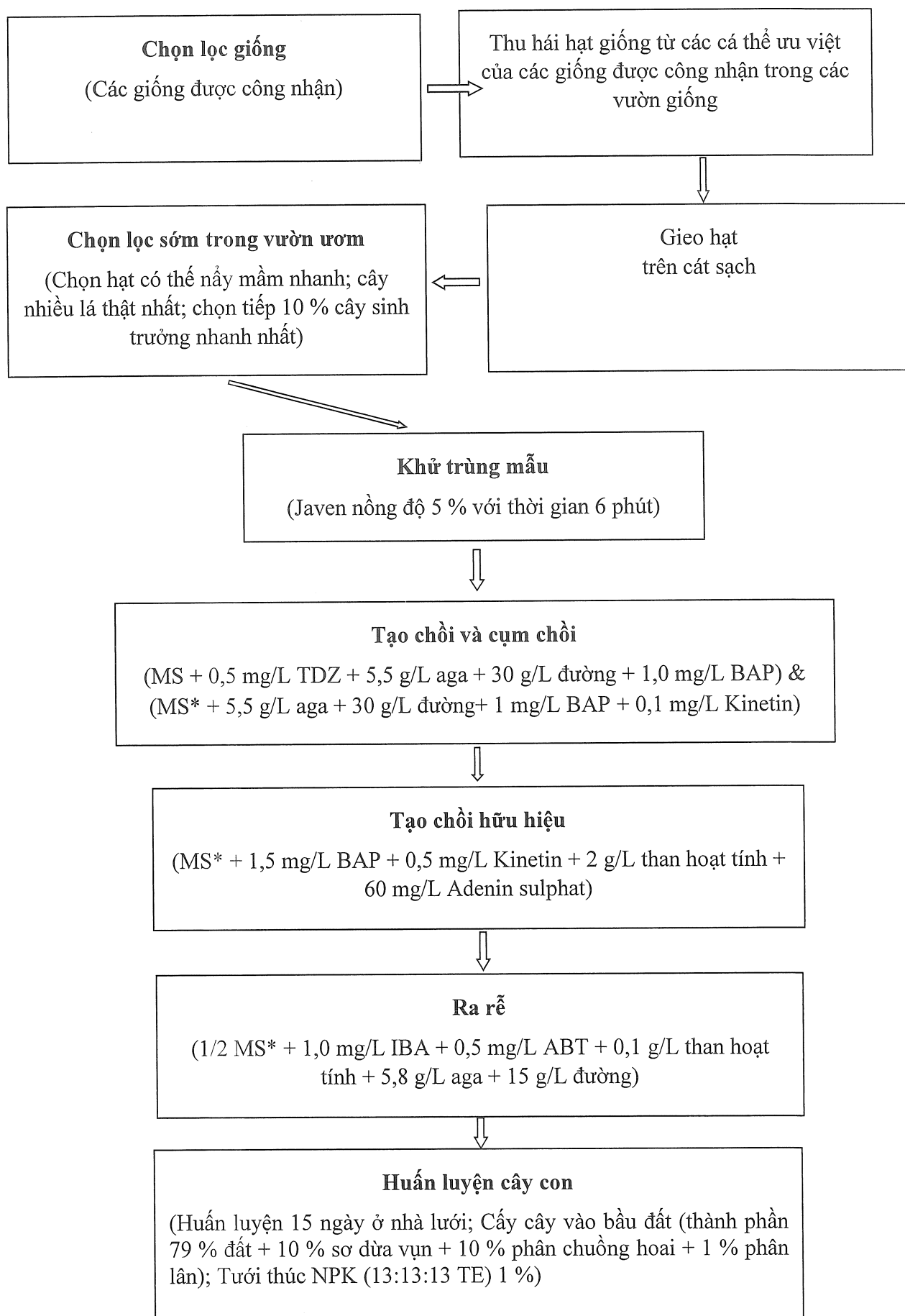
+ Bón phân: sau 20 ngày, tưới thúc bằng hỗn hợp NPK (13:13:13 TE) 1 % với 100 L/ 20.000 cây; tưới vào lúc trời râm mát, sau đó tưới rửa lại bằng nước sạch, định kỳ 10 ngày tưới thúc 1 lần đến khi chiều cao cây đạt từ 15 - 20 cm thì ngừng tưới;

+ Làm cỏ phá váng và làm sạch rãnh luống (25 - 30 ngày/ lần);

+ Đảo bầu, bấm tia chồi bất định (chỉ để một chồi ngọn phát triển tốt), và cắt bỏ 1/3 phiến lá sau 1,5 - 2,0 tháng và trước khi xuất vườn, loại bỏ cây bị chết, cây sinh trưởng kém;

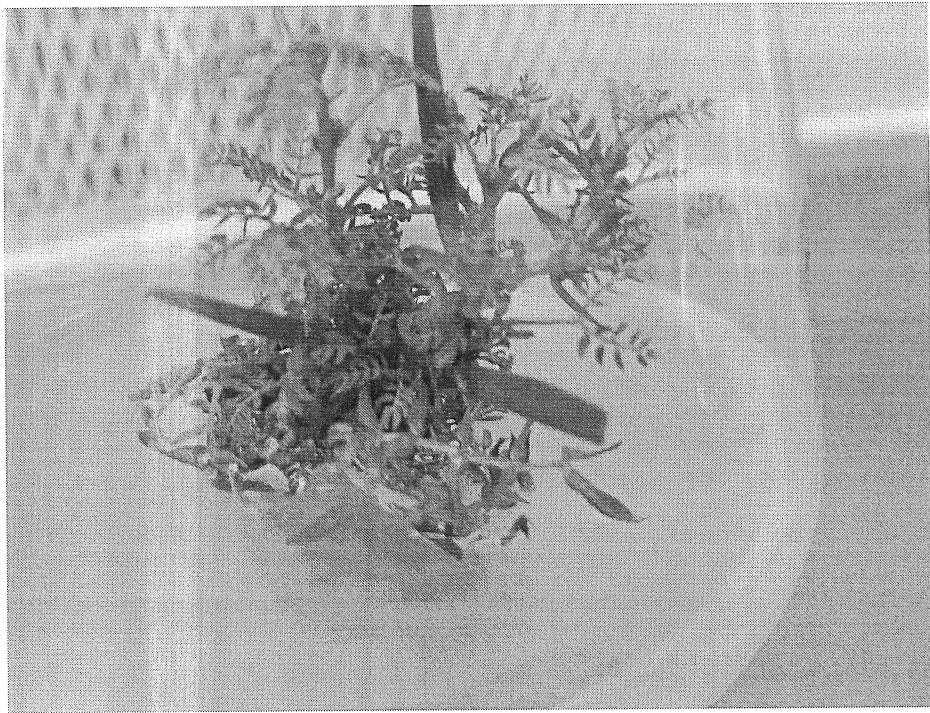
2. Quy trình theo điểm 1, trong đó các giống Keo lá liềm được chọn thuộc 05 giống AC9; AC13; AC20; AC32; AC40 đã được Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn công nhận.

Hình 1



Hình 2



Hình 3**Hình 4**