

VIỆN KHOA HỌC LÂM NGHIỆP VIỆT NAM
TRUNG TÂM NGHIÊN CỨU GIỐNG CÂY RỪNG

BÁO CÁO KẾT QUẢ THỰC HIỆN ĐỀ TÀI NHÁNH

TÊN ĐỀ TÀI:

**HOÀN THIỆN QUY TRÌNH NHÂN NHANH GIỐNG
CÂY TRỒNG RỪNG NĂNG SUẤT CAO BẰNG CÔNG
NGHỆ NUÔI CẤY MÔ TẾ BÀO THỰC VẬT
CHO MỘT SỐ DÒNG KEO LAI, BẠCH ĐÀN LAI
VÀ KEO LÁ TRÀM.**

(Thuộc đề tài KC.04.08)

Chủ nhiệm đề tài nhánh: Th.S. ĐOÀN THỊ MAI

HÀ NỘI, NĂM 2004

I. ĐẶT VẤN ĐỀ.

Nuôi cấy mô là phương pháp khá phổ biến để nhân nhanh các loài cây trồng chất lượng cao. Trong lâm nghiệp phương pháp này đã được áp dụng tương đối sớm ở một số nước tiên tiến như Pháp, Đức, Braxin, Trung Quốc... để nhân nhanh một số giống cây trồng rừng có năng suất cao.

Ở Việt Nam công nghệ này đã được du nhập vào cùng với một số dòng Bạch đàn từ Trung Quốc vào năm 1992 cho một số đơn vị nhằm nhân nhanh các giống ưu trội phục vụ sản xuất.

Ngoài các dòng Keo lai tự nhiên đã được công nhận là giống quốc gia, gần đây Trung tâm nghiên cứu Giống cây rừng thuộc Viện khoa học lâm nghiệp Việt Nam đã chọn tạo được một số giống cây trồng rừng có năng suất và chất lượng cao hơn hẳn các giống đang sử dụng trong sản xuất. Trong đó có một số tổ hợp bạch đàn lai, một số dòng Keo lá tràm. Những giống này đáp ứng được yêu cầu cấp bách về trồng rừng và sản xuất nguyên liệu cho công nghiệp giấy, ván nhân tạo.

Tuy nhiên, những giống nói trên đều là những dòng vô tính không thể nhân giống từ hạt. Nhân giống bằng giâm hom mặc dù có hệ số nhân lớn, kỹ thuật đơn giản hơn nhưng nhân giống bằng nuôi cấy mô là phương pháp nhân giống không những có khả năng nhân nhanh với số lượng lớn, có tác dụng trẻ hoá cao mà còn đảm bảo giữ được các đặc điểm của giống gốc.

Song kết quả nghiên cứu nhân giống bằng nuôi cấy mô mới lần đầu được nghiên cứu và áp dụng thành công cho các đối tượng trên vào năm 2001 thuộc đề tài KC 04.08 nhằm hoàn thiện quy trình nhân giống cây trồng có năng suất cao.

Nhân giống bằng nuôi cấy mô cũng là phương pháp tốt nhất để giải quyết nhu cầu cây con phục vụ trồng rừng sản xuất trên quy mô lớn với độ đồng đều cao, đáp ứng yêu cầu sản xuất công nghiệp. Giải quyết được vấn đề này đã góp phần thiết thực cho việc thực hiện có hiệu quả chương trình trồng mới 5 triệu ha rừng của nhà nước.

II. MỤC TIÊU CỦA ĐỀ TÀI

- Nhân được một số giống mới chọn tạo ở quy mô bán sản xuất: một số dòng Keo lá tràm, một số tổ hợp Bạch đàn lai nhân tạo.
- Tiến hành các thí nghiệm bổ sung, hoàn thiện các khâu trong quy trình nhân giống cho các một số dòng Keo lai.
- Xây dựng được bản hướng dẫn kỹ thuật nhân giống bằng nuôi cấy mô và chuyển giao kỹ thuật cho một số đơn vị.

III. NỘI DUNG NGHIÊN CỨU.

- Xác định tuổi chồi và thời kỳ lấy mẫu thích hợp.
- Xác định môi trường tạo chồi và ra rễ tối ưu.
- Xác định phương pháp dưỡng cây có hiệu quả nhất để đưa vào sản xuất.
- Xây dựng bản hướng dẫn kỹ thuật.

IV. ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU.

1. Keo lá tràm.

Keo lá tràm (*Acacia auriculiformis*) là loài cây mọc nhanh ưa sáng, có tác dụng cải tạo đất, chịu được đất nghèo dinh dưỡng, sống trên đất thiếu ôxi, đất thịt nặng và cả đất cát pha. Gỗ có vai trò quan trọng trong công nghiệp sản xuất nguyên liệu giấy, làm củi, đốt than. Mọc tự nhiên ở miền Bắc nước Úc, Tân Ghinê, Indonesia, đã được gây trồng có hiệu quả ở Đông Phi, Ấn Độ.

Ở Việt Nam đây là loại Keo được trồng thành rừng ở các vùng sinh thái khác nhau như Quảng Nam - Đà Nẵng, Thừa Thiên Huế, Vĩnh Phúc. Cho đến nay Trung tâm nghiên cứu Giống cây rừng đã chọn được các dòng cây trội có giá trị cho trồng rừng: 81, 82, 83, 84, 85 và đang được gây trồng tại Trạm thực nghiệm giống Ba Vì. Ngoài biện pháp nhân giống bằng hom, để đảm bảo tính di truyền của nó và tạo nguồn cây giống phong phú đưa vào sản xuất phục vụ cho nhu cầu trồng rừng, việc nhân giống Keo lá tràm bằng phương pháp nuôi cấy mô phân sinh lần đầu tiên được nghiên cứu và áp dụng thành công tại Trung tâm nghiên cứu giống cây rừng.

2. Keo lai.

Keo lai là giống keo lai tự nhiên giữa hai loài Keo tai tượng (*Acacia mangium*) và Keo lá tràm (*Acacia auriculiformis*), có khả năng sinh trưởng nhanh, phát triển tốt hơn so với các dòng bố mẹ, có tác dụng cải tạo đất và có vai trò quan trọng trong công nghiệp sản xuất bột giấy. Do yêu cầu tạo giống để cung cấp các giống gốc được cải thiện cho các cơ sở sản xuất ngày càng cao nên việc nhân nhanh các giống này trên quy mô bán công nghiệp là một yêu cầu thiết yếu. Kỹ thuật nhân giống nuôi cấy mô cây Keo lai đã được tiến hành tại Trung tâm nghiên cứu Giống cây rừng nhằm hoàn thiện phương pháp nhân giống vô tính cây rừng và tạo ra số lượng cây lớn trong thời gian ngắn phục vụ cho sản xuất và nghiên cứu.

3. Bạch đàn lai.

Bạch đàn là loại cây mọc nhanh, chu kỳ kinh doanh ngắn, có khả năng sinh trưởng trên nhiều dạng lập địa khác nhau, thích hợp cho rừng sản xuất nguyên liệu công nghiệp như giấy, dăm, gỗ trụ mỏ,... Bạch đàn đã được trồng rộng rãi ở nhiều nước trên thế giới. Nhiều giống Bạch đàn được cải thiện cùng với kỹ thuật trồng rừng thâm canh cho năng suất rất cao.

Ở Việt Nam, Bạch đàn chiếm vị trí quan trọng trong cơ cấu cây trồng rừng. Tuy nhiên, năng suất và chất lượng rừng trồng Bạch đàn ở nước ta còn thấp và rất khác nhau giữa các giống Bạch đàn được nhập từ nước ngoài. Gần đây, Trung tâm nghiên cứu Giống cây rừng thuộc Viện khoa học lâm nghiệp Việt Nam đã nghiên cứu lai tạo và chọn lọc được nhiều tổ hợp lai có nhiều triển vọng về khả năng sinh trưởng. Một số tổ hợp lai trong loài và khác loài của các loài Bạch đàn Uro (*Eucalyptus urophylla*), Bạch đàn Camal (*E.camaldulnessis*) và Bạch đàn liễu (*E.exserta*) có thể cho năng suất gấp từ 2 đến 4 lần các loài bố mẹ (Lê Đình Khả và Nguyễn Việt Cường, 1998, 2000). Việc nhân giống bằng phương pháp nuôi cấy mô những giống lai mới được chọn tạo có ý nghĩa rất lớn để sớm đưa những giống này vào sản xuất trên diện rộng và bảo đảm giữ được các đặc điểm ưu việt của chúng.

V. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU.

1. Vật liệu.

1.1. Keo lá tràm.

- Các đoạn chồi của cây con 6 tháng đến 1 năm tuổi của các dòng 81, 82, 83 tại vườn ươm Trung tâm nghiên cứu giống cây rừng.

1.2. Keo lai.

- Các đoạn chồi gốc cây Keo hom 6 tháng tuổi của các dòng BV10, BV16, BV32 tại vườn ươm.

- Từ các cây trội đã được tuyển chọn tại rừng, cắt cành để tạo chồi.

- Từ các cây trội đã xử lý để tạo chồi gốc.

1.3. Bạch đàn lai

- Các chồi khỏe mạnh dài từ 15-20cm có mắt ngủ được lấy từ chồi gốc cây 2 tuổi. Các cây lai này thuộc các tổ hợp lai trong loài và khác loài của Bạch đàn Uro (*E.urophylla*), Bạch đàn trắng (*E. camaldulensis*) và Bạch đàn liễu (*E.exerta*) : U29C3, U29E1, U29U24.

2. Phương pháp nghiên cứu.

2.1. Phương pháp khử trùng.

Mẫu vật được cắt bỏ ngọn, và được khử trùng theo các bước sau:

- Rửa dưới vòi nước sạch nhằm loại bỏ các tác nhân gây bẩn, sau đó được rửa bằng các chất tẩy và tráng sạch bằng nước cất.
- Khử trùng mẫu vật bằng các chất khử trùng bề mặt Canxihipoclorit và $HgCl_2$ có thêm 2-3 giọt Tween 20 trong các thời gian khác nhau.
- Cuối cùng các mẫu vật được rửa sạch bằng nước cất vô trùng và cấy vào môi trường tạo mẫu.

2.2. Môi trường nuôi cấy.

- Môi trường tạo mẫu: môi trường Murashige & Skoog cơ bản (MS)
- Môi trường nhân chồi : môi trường Murashige & Skoog cải tiến (MS*) có bổ sung một số axit amin, vitamin, chất phụ gia : than hoạt tính (CC), nước dừa (CW)...., các Cytokynin ngoại sinh như Benzylamino purine (BAP) và Kinetin (Kn)...
- Môi trường tạo rễ invitro : môi trường Murashige & Skoog cải tiến (MS bổ sung là axit α -Naphthyl acetic (NAA) và axit β - indol butyric (IBA) ở các nồng độ khác nhau.
- Môi trường được điều chỉnh ở độ pH 5.8 với Keo lai và Keo lá trà, 5.8-6.0 đối với môi trường nuôi cấy Bạch đàn.
- Thời gian hấp khử trùng 20 phút (1.2 kg/ cm^3 tại 121°C).

2. 3. Điều kiện nuôi cấy.

Chế độ ánh sáng 3000lux chiếu sáng 10 giờ 1 ngày, nhiệt độ $25 \pm 2^\circ\text{C}$ đối với Keo lai và Keo lá trà.

Chế độ ánh sáng 2000lux chiếu sáng 8 giờ 1 ngày, nhiệt độ $25 \pm 2^\circ\text{C}$ đối với Bạch đàn lai.

Các thí nghiệm đều được bố trí nhiều lần lặp và xử lý kết quả theo phương pháp thống kê thông thường.

2.4. Bố trí thí nghiệm và xử lý số liệu.

Thí nghiệm được bố trí với 3 lần lặp và số mẫu đủ lớn theo quy luật thống kê, số liệu được xử lý trên máy tính bằng chương trình Excel 6.0.

- Số trung bình mẫu tính theo công thức.

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i$$

- Sai tiêu chuẩn (sai dị) mẫu được tính theo công thức.

$$Sd = \pm \cdot \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2}$$

- Hệ số biến động.

$$V \% = \frac{Sd}{X} \cdot 100$$

VI. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU.

A. BẠCH ĐÀN LAI.

1. Khử trùng.

a. Ảnh hưởng của chất khử trùng.

Kết quả khử trùng phụ thuộc vào chất khử, thời gian xử lí và khả năng xâm nhập của hoá chất vào các kẽ lồi lõm trên bề mặt của vật liệu cây.

Trong 2 loại hoá chất có hoạt tính diệt nấm cao được sử dụng trong thí nghiệm thì $HgCl_2$ ở nồng độ 0.1 % cho kết quả tốt nhất: tỉ lệ nhiễm thấp và tỉ lệ nảy chồi cao hơn hẳn khi dùng Canxihypoclorit.

Bảng 1. Kết quả khử trùng mẫu bằng các hoá chất khử.

Thời điểm lấy mẫu	Hoá chất khử trùng	Thời gian khử trùng (phút)	Tỷ lệ nhiễm (%)		Tỷ lệ nảy chồi (%)	
			Đoạn1	Đoạn2	Đoạn1	Đoạn2
8/1999	$HgCl_2$	2	77.00	60.00	22.20	30.00
		4	55.50	54.00	22.20	40.00
		6	50.50	24.00	33.30	38.00
		8	35.50	20.00	33.30	60.00
		10	15.00	10.00	22.20	30.00
8/1999	Canxi hypoclorit	2	90.90	100.0	18.18	0.00
		4	70.00	100.0	20.00	0.00
		6	61.90	80.70	19.00	38.00
		8	40.95	91.60	9.00	12.30
		10	44.73	90.20	5.20	9.50

Từ số liệu của bảng1 cho thấy khi xử lí mẫu bằng $HgCl_2$ và Canxihypoclorit ở thời gian như nhau trong cùng một thời điểm lấy mẫu tỉ lệ nhiễm của mẫu khi xử lí bằng $HgCl_2$ là thấp hơn. Đồng thời, tỉ lệ nảy chồi cũng cao hơn (thấp nhất là 22.2% và cao nhất là 66%) so với khi xử lí bằng Canxihypoclorit (tỉ lệ nảy chồi thấp nhất là 0% và cao nhất là 38%).

Thời gian khử trùng trong vòng 6 đến 8 phút cho kết quả cao nhất: tỉ lệ nhiễm thấp và tỉ lệ nảy chồi khá cao (33.3 - 66 %). Trong khi đó thời gian khử trùng dưới 6 phút cho hiệu quả thấp (nhiễm 100 %). Từ 10 phút trở nên tỉ lệ nảy chồi giảm hẳn.

b. Ảnh hưởng của mùa vụ tới khả năng tái sinh chồi.

Để xác định ảnh hưởng của mùa vụ tới khả năng tái sinh chồi, các thí nghiệm khử trùng được tiến hành trong 12 tháng.

Kết quả thí nghiệm cho thấy những mẫu lấy vào mùa hè - thu cho tỉ lệ nảy chồi cao đạt 22.2-56 %. Có thể thời gian này đang là mùa sinh trưởng mạnh nên quá trình nảy chồi thuận lợi hơn.

Những mẫu lấy ở cùng địa điểm vào mùa đông đến mùa xuân năm sau cho kết quả kém hơn rõ rệt: tỉ lệ nảy chồi chỉ đạt từ 2 đến 15 %. Lúc này là mùa khô, cây sinh trưởng chậm và hay xuất hiện bệnh bạc lá và một số nấm bệnh khác.

Bảng 2. Ảnh hưởng của mùa vụ tới khả năng tái sinh chồi.

Thời điểm lấy mẫu	Thời gian khử trùng (phút)	Tỷ lệ nảy chồi (%)	
		Đoạn1	Đoạn2
Xuân	6	10.00	10.00
	8	10.00	10.00
Hè	6	22.20	38.00
	8	22.20	56.00
Thu	6	19.00	38.00
	8	9.00	15.50
Đông	6	5.00	10.00
	8	2.00	9.00

Kết quả thí nghiệm cũng cho thấy tỷ lệ nảy chồi và khả năng nhân chồi còn phụ thuộc vào loại vật liệu gốc ban đầu.

Bảng 3. Ảnh hưởng của loại vật liệu tới khả năng tái sinh chồi.

Loại vật liệu gốc	Tỷ lệ bật chồi	Hệ số nhân chồi	Chất lượng chồi	Tỷ lệ ra rễ
Chồi vượt	21.15	15.25	Tốt	97.5
Chồi bên	19.75	12.85	Trung bình	92.4

Như vậy để tối ưu hoá công đoạn nhân chồi việc chọn loại vật liệu cũng có vai trò hết sức quan trọng. Các chồi được nhân từ chồi vượt của cây mẹ về cơ bản không sai khác so với các chồi nhân từ chồi bên (cành na) về mặt di truyền và khả năng bật chồi ban đầu nhưng hơn hẳn về chất lượng chồi và khả năng nhân chồi và ra rễ trong các công đoạn tiếp theo.

Bên cạnh việc chọn lựa loại vật liệu cho quá trình khử trùng thì việc thay đổi thành phần và nồng độ chất trong môi trường nuôi dưỡng cũng có tác động không nhỏ đến quá trình tạo chồi.

Bảng 4. Ảnh hưởng của môi trường tới khả năng tái sinh chồi.

Môi trường	Số mẫu thí nghiệm ban đầu	Số chồi tạo thành sau khử trùng	Thời gian xuất hiện chồi	Chiều cao chồi sau 10 ngày
MS	30	32	35-40 ngày	1.5 cm
MS *	30	52.6	25-27 ngày	2.1 cm

Kết quả thí nghiệm cho thấy cùng số mẫu khử trùng, cùng một loại vật liệu khi được cấy vào môi trường MS* sẽ cho số chồi tái sinh lớn hơn (gấp 1,5 lần), khả năng tái sinh chồi nhanh, chiều dài chồi tái sinh cao. Điều này có ý nghĩa rất lớn đến khả năng nhân nhanh các giống có chất lượng do rút ngắn được thời gian tạo chồi cũng như cung cấp lượng chồi lớn cho quá trình nhân chồi ban đầu.

2. Nhân chồi.

Sau khi hình thành và đạt chiều cao từ 1.0 - 1.5 cm chồi được tách ra và cấy chuyển tiếp vào nhân chồi là môi trường MS* có bổ sung các Cytokinin ngoại sinh như Benzyl amino purine (BAP) và Kinetin (Kn).

Phân tích số liệu cho thấy tỉ lệ nhân chồi còn phụ thuộc nhiều vào thành phần và nồng độ của Cytokinin được bổ sung vào môi trường.

Kết quả thí nghiệm cho thấy sự có mặt của BAP khả năng sinh chồi cao nhất thường đạt từ 10 đến 20 chồi /cụm một số mẫu có thể đạt tới 30 chồi/ cụm. Khi phối hợp cả BAP và Kn thì kết quả kém hơn chỉ đạt 6 đến 15 chồi / cụm. Nếu dùng riêng Kn chỉ đạt 2 đến 5 chồi /cụm.

Bảng 5. Kết quả thí nghiệm nhân chồi.

Môi trường MS* + Chất, nồng độ (mg/l)	Tổ hợp U29C3		Tổ hợp U29E1		Tổ hợp U29U24	
	Số chồi/ cụm	Sd	Số chồi/ cụm	Sd	Số chồi/ cụm	Sd
BAP 0.1	6.20	2.29	5.25	2.29	8.25	3.25
BAP 0.5	16.62	2.70	15.35	3.70	14.63	1.56
BAP 1.0	11.49	0.40	12.53	1.40	12.33	2.33
BAP 1.5	8.34	1.56	9.23	1.23	8.33	1.35
Kn 0.5	2.41	0.88	2.3	0.97	2.36	1.03
Kn 1.0	2.68	0.28	3.56	1.10	4.57	1.23
Kn 1.5	2.94	0.11	2.43	0.65	2.82	0.96
Kn 2.0	2.69	0.24	1.89	1.25	2.29	0.33
BAP 0.5 + Kn 0.5	6.22	1.49	5.24	1.33	9.23	0.83
BAP 0.5 + Kn 1.0	12.26	0.94	6.98	0.83	6.33	0.93
BAP 0.5 + Kn 1.5	7.52	0.6	15.23	1.33	7.83	1.36
BAP 0.5 + Kn 2.0	6.71	0.25	7.89	0.33	5.36	1.33

Để xác định điều kiện ánh sáng thích hợp nhằm tối ưu hoá khả năng tạo số lượng và chất lượng chồi tốt nhất cho Bạch đàn lai trong giai đoạn nhân chồi các thí nghiệm về ảnh hưởng của chế độ chiếu sáng đã lần đầu tiên được thực hiện.

Mẫu vật sau khi cấy được nuôi dưỡng trong các chế độ chiếu sáng :

- CD1: Chiếu sáng hoàn toàn trong thời gian nhân chồi (8h/ngày trong 12 ngày của chu kỳ cấy chuyển).

- CD2: 4 ngày không chiếu sáng, chiếu sáng 8h/ngày trong 8 ngày.

- CD3: 6 ngày không chiếu sáng, chiếu sáng 8h/ngày trong 6 ngày.

- CD4: 8 ngày không chiếu sáng, chiếu sáng 8h/ngày trong 4 ngày.

- CD5: Che tối hoàn toàn trong thời gian nhân chồi.

Bảng 6. ảnh hưởng của chế độ chiếu sáng tới khả năng nhân chồi của Bạch đàn lai.

STT	Chế độ	Chiều dài chồi (cm) trung bình sau 12 ngày cấy nhân chồi.			Số chồi/ cụm chồi		
		U29C3	U29E1	U29U24	U29C3	U29E1	U29U24
1.	CD1	1.0	1.33	1.22	16.00	15.78	15.89
2.	CD2	1.51	1.66	1.58	14.00	13.25	12.56
3.	CD3	3.00	3.56	3.20	13.25	13.23	12.31
4.	CD4	3.50	3.61	3.50	12.56	10.27	11.30
5.	CD5	4.00	3.87	3.67	10.25	10.21	10.25

Kết quả thí nghiệm cho thấy các chế độ chiếu sáng có ảnh hưởng rất khác nhau đến sự sinh trưởng về chiều cao của cây.

Đối với Bạch đàn lai ảnh hưởng của chế độ chiếu sáng tới khả năng phát triển chồi là rõ rệt.

Ở chế độ chiếu sáng CD1 cây phát triển nhiều chồi hệ số nhân chồi cao nhất nhưng thân chồi ngắn, tỷ lệ ra rễ thấp, rễ không đều.

Trong khi đó ở chế độ chiếu sáng CD5 số lượng chồi giảm, thân chồi dài và rất mảnh do thiếu ánh sáng, các chồi này có tỷ lệ ra rễ thấp, cây yếu, sức sống giảm do cây không đủ ánh sáng cho quá trình quang hợp.

Chế độ chiếu sáng CD3 cho kết quả tốt nhất, ở chế độ này cây phát triển đều hệ số nhân chồi cao, tỷ lệ ra rễ và sức sống chồi tăng.

Theo Emerson và Arnold (1984) giai đoạn tối của quang hợp dài hơn so với giai đoạn sáng rất nhiều (khác với pha tối), thời gian kéo dài của quang hợp chủ yếu do pha tối quyết định, trong điều kiện thuận lợi tốc độ phản ứng quang hợp do các phản ứng tối chi phối. Như vậy khi thay đổi chế độ chiếu sáng (do cường độ ánh sáng và nhiệt độ không thay đổi) trong giai đoạn nhân chồi đã tối ưu hoá các quá trình của phản ứng quang hợp tạo ra đầy đủ và cân bằng giữa các sản phẩm cần thiết cho sự sinh trưởng và phát triển của chồi.

Đặc biệt khi điều tiết được chế độ chiếu sáng còn giảm thời gian cấy chuyển giữa hai lần nhân chồi từ 20 ngày/ lần cấy chuyển giảm xuống còn 12 ngày/ lần cấy chuyển rút ngắn được 35% thời gian nhân chồi và ra rễ, điều này có ý nghĩa rất lớn trong sản xuất.

Phương pháp cấy cũng có ảnh hưởng trực tiếp đến khả năng nhân chồi của Bạch đàn.

Bảng 7. Ảnh hưởng của phương pháp cấy tới khả năng nhân chồi của Bạch đàn lai.

Phương pháp cấy	Chiều dài chồi (cm) trung bình sau 12 ngày cấy nhân chồi.			Số chồi/ cụm chồi		
	U29C3	U29E1	U29U24	U29C3	U29E1	U29U24
Cấy thẳng	1.20	1.18	1.54	12.57	12.25	11.23
Cấy nằm ngang	2.50	2.36	3.01	22.62	20.28	18.34

Như vậy qua kết quả thí nghiệm cho thấy khi cấy các chồi theo phương pháp nằm ngang tốt hơn so với phương pháp cấy các chồi thẳng. Do các chồi được cắt thành nhiều đoạn, diện tích tiếp xúc, khả năng trao đổi chất với môi trường lớn, khả năng hấp thụ chất dinh dưỡng và chất kích thích sinh trưởng theo cơ chế thụ động cao do đó kích thích sự tái sinh và phát triển chồi nhiều. Hệ số nhân chồi đạt 22.62 so với 12.57 (gấp từ 1,5 đến 2 lần) so với khi cấy thẳng.

Như vậy việc kết hợp giữa thay đổi về thành phần môi trường với phương pháp cấy và chế độ chiếu sáng (chế độ nuôi dưỡng) sẽ làm tăng khả năng tạo chồi tối ưu và chất lượng chồi cũng đảm bảo hơn.

3. Quá trình ra rễ trong lọ.

Khi chồi đạt chiều cao từ 2,5 đến 3 cm có thể cắt để chuyển sang môi trường hình thành rễ. Môi trường hình thành rễ là môi trường MS* có bổ sung NAA và IBA ở các nồng độ khác nhau.

Kết quả thí nghiệm cho thấy, nếu cùng sử dụng nồng độ như nhau thì việc bổ sung thêm IBA luôn cho tỉ lệ cao hơn so với bổ sung NAA và môi trường cấy. Với các công thức sử dụng IBA đạt tỉ lệ ra rễ đạt trên 80%, trong khi dùng NAA tỉ lệ cao nhất chỉ đạt 55%.

Ngoài thành phần môi trường thì nồng độ của các chất kích thích sinh trưởng bổ sung trong môi trường nuôi cấy cũng ảnh hưởng rõ rệt đến kết quả ra rễ. Nồng độ quá thấp chưa thể hiện tác dụng, hay với nồng độ quá cao gây kìm hãm đều dẫn tới kết quả

ra rễ thấp. Do đó, việc tìm được nồng độ tối thích có ý nghĩa rất lớn tới kết quả thí nghiệm.

Bảng 8. Kết quả thí nghiệm kích thích ra rễ bạch đàn lai.

Môi trường MS* + Chất, nồng độ (mg/l)	Tỷ lệ ra rễ của từng tổ hợp					
	U29C3		U29E1		U29U24	
	T.bình	Sai dị	T.bình	Sai dị	T. bình	Sai dị
IBA 0.5 1.0 1.5 2.0	81.56	5.63	82.15	5.89	82.56	6.79
	82.35	4.56	88.35	7.56	84.25	5.56
	97.25	3.29	95.33	4.32	92.23	4.33
	92.56	6.75	88.26	6.53	83.25	8.55
NAA 0.5 1.0 1.5 2.0	41.56	5.67	42.15	5.89	42.26	2.56
	52.33	4.25	48.35	7.56	44.67	3.26
	47.25	3.35	55.32	4.32	52.83	7.78
	42.56	6.68	48.26	6.53	43.65	5.49
IBA+NAA 1.5 + 0.5 1.5 + 1.0 1.5 + 1.5 1.5 + 2.0	61.55	5.52	62.20	3.65	62.31	3.25
	72.31	4.45	68.00	4.59	74.28	6.33
	67.29	3.32	75.04	5.67	72.98	4.61
	62.55	2.56	68.28	5.53	63.01	8.19

Qua kết quả thí nghiệm cho thấy Bạch đàn lai môi trường ra rễ thích hợp là môi trường MS* bổ sung IBA nồng độ 1.5 mg/ lít.

4. Kết luận.

- Thời gian khử trùng tối ưu cho Bạch đàn lai là 6-8 phút trong dung dịch HgCl_2 0,1%.
- Mùa vụ khử trùng thích hợp là vụ mùa hè - thu.
- Môi trường tạo chồi thích hợp là môi trường có bổ sung thêm BAP nồng độ 0,5mg/l, thời gian cấy chuyển thích hợp là 12 ngày/ lần.
- Chế độ ánh sáng thích hợp cho nhân chồi Bạch đàn lai là CD3: 6 ngày không chiếu sáng, chiếu sáng 8h/ngày trong 6 ngày
- Cấy các chồi nằm ngang trên bề mặt môi trường trong giai đoạn nhân chồi cho kết quả tốt hơn khi cấy các chồi thẳng đứng.
- Môi trường tạo rễ phù hợp là môi trường MS* có bổ sung IBA nồng độ 1.5mg/ lít.

B. KEO LÁ TRÀM.

1. Khử trùng

a. Ảnh hưởng của thời gian khử trùng.

Các đoạn chồi được khử trùng bằng HgCl_2 0,1% trong các thời gian từ 2'-10'. Sau đó rửa sạch bằng nước cất vô trùng.

Kết quả thí nghiệm cho thấy tùy thuộc vào mẫu được lấy và thời gian xử lý, tỷ lệ nảy chồi khác nhau. Tỷ lệ nảy chồi tăng dần khi thời gian khử trùng tăng và tỷ lệ nhiễm giảm đi. Chứng tỏ thời gian xử lý ngắn không đủ để loại trừ hết bụi bẩn, nấm bệnh trên mẫu vật. Nhưng thời gian khử trùng quá lâu hoá chất sẽ ngấm sâu vào các cơ quan và làm chết mẫu vật. Kết quả cho thấy với Keo lá tràm thời gian khử trùng 8' và 10' là hiệu quả nhất tỷ lệ nhiễm dưới 60% và tỷ lệ nảy chồi đạt trên 14%.

Bảng 9. Ảnh hưởng của thời gian khử trùng tới khả năng tái sinh chồi của Keo lá tràm.

Hóa chất	Thời gian (Phút)	Tỷ lệ nhiễm (%)		Tỷ lệ nảy chồi (%)	
		Đoạn1	Đoạn2	Đoạn1	Đoạn2
HgCl ₂	2	93.00	95.00	3.50	0.00
	4	85.25	89.50	7.50	3.25
	6	67.25	75.46	13.50	6.78
	8	58.00	60.00	17.00	14.50
	10	45.76	48.00	17.68	14.65
	12	35.00	37.85	9.50	6.30

b. Ảnh hưởng của thời gian thu mẫu.

Các mẫu được lấy vào các tháng khác nhau trong năm.

Bảng 10. ảnh hưởng của mùa vụ tới khả năng tái sinh chồi của Keo lá tràm.

Mùa	Thời gian (Phút)	Tỷ lệ nhiễm (%)		Tỷ lệ nảy chồi (%)	
		Đoạn1	Đoạn2	Đoạn1	Đoạn2
Xuân	8	42.00	43.70	43.00	39.50
	10	37.50	36.00	39.00	38.75
Hạ	8	33.25	29.00	41.50	37.85
	10	30.50	27.85	40.25	30.50
Thu	8	58.00	60.00	17.00	14.50
	10	45.76	48.00	17.68	14.65
Đông	8	32.00	35.67	11.50	15.25
	10	30.56	34.25	10.50	8.75

Kết quả nghiên cứu cho thấy lấy mẫu vào thời kỳ xuân - hè cây đang ở giai đoạn sinh trưởng, phát triển, nên khả năng nảy chồi tốt nhất, mẫu có thể sau 3 tuần được bật chồi, tỷ lệ nảy chồi cao đạt từ 30.50%-43.00%. Vào mùa thu đông do mùa khô, cây đang ở giai đoạn ngủ, khả năng bật chồi chậm hơn phải 35 - 40 ngày mới xuất hiện chồi, tỷ lệ tái sinh chồi thấp 8.70-15.25%.

2. Nhân tạo chồi.

Bảng 11. Kết quả thí nghiệm nhân chồi.

Môi trường MS* + chất, nồng độ (mg/l)	Hệ số nhân chồi của từng dòng (số chồi/cụm)		
	81	82	83
BAP 0.5	3.21	3.25	3.67
BAP 1.0	4.21	3.98	4.25
BAP 1.5	3.25	3.62	3.78
BAP 2.0	2.85	3.12	3.05
Kn 0.5	2.10	2.32	3.01
Kn 1.0	2.15	2.35	2.89
Kn 1.5	3.02	3.24	3.26
Kn 2.0	2.13	2.86	3.20
BAP 0.5+ Kn 0.5	3.25	3.20	3.05
BAP 0.5+ Kn 1.0	3.56	4.00	3.01
BAP 0.5+ Kn 1.5	4.56	4.27	3.89
BAP 0.5+ Kn 2.0	2.56	2.75	3.26

BAP 1.0+ GA 0.5	7.89	8.35	8.26
-----------------	-------------	-------------	-------------

Sau khi chồi xuất hiện 3 tuần chiều cao đạt từ 2-3cm được tách và cấy chuyển vào môi trường nhân chồi là môi trường MS* có bổ các cytokinin ngoại sinh như : BAP, Kn,...

Kết quả thí nghiệm cho thấy BAP có tác dụng mạnh nhất trong quá trình kích thích quá trình nhân chồi của Keo lá trà. Khi dùng kết hợp BAP và Kn cho hệ số nhân chồi cao hơn khi dùng BAP hoặc Kn riêng rẽ.

Môi trường nhân chồi được bổ sung BAP nồng độ 1.0mg/l kết hợp GA3 nồng độ 0.5mg/l cho tỷ lệ nhân chồi cao nhất, hệ số nhân chồi đạt từ 7.89 đến 8.35, cao hơn khi dùng riêng lẻ hoặc kết hợp BAP và Kn, hệ số nhân chồi chỉ đạt 2-5.

Bảng 12 . Ảnh hưởng của môi trường tới sự phát triển của chồi keo lá trà.

Môi trường	Hệ số nhân chồi Số chồi/cụm	Chiều cao chồi (cm)	Số chồi có chất lượng/bình cấy
MS *	4.21	3.98	12
MS*+CW+CC	4.05	4.32	20

Kết quả thí nghiệm cũng cho thấy, khi thay đổi thành phần môi trường nuôi cấy hệ số nhân chồi thay đổi không đáng kể nhưng chiều cao chồi cũng như số lượng chồi đủ tiêu chuẩn cho quá trình ra rễ ở môi trường bổ sung than hoạt tính (CC) và nước dừa (CW) cao hơn hẳn. Do than hoạt tính hấp thụ các sản phẩm gây hại sản sinh trong quá trình trao đổi chất giữa mẫu vật và môi trường nuôi cấy. Mặt khác trong thành phần nước dừa chứa một số chất phù hợp cho quá trình hoàn thiện bộ lá, tăng chiều cao chồi từ đó tăng khả năng tạo rễ và sức chống chịu với sự thay đổi điều kiện môi trường sau khi huấn luyện và cho ra rễ.

3. Quá trình ra rễ trong lọ.

Các chồi cao 2 - 2,5 cm tạo được trong quá trình nhân chồi được tách và cấy vào môi trường ra rễ bổ sung các auxin ngoại sinh.

Bảng 12. Kết quả thí nghiệm ra rễ.

Môi trường 1/2MS* + chất, nồng độ (mg/l)	Tỷ lệ ra rễ của từng dòng (%)			Sai dị		
	81	82	83	81	82	83
IBA 0.5	88.0	90.03	91.73	3.62	3.67	3.21
IBA 1.0	90.33	97.53	95.57	3.12	4.25	4.21
IBA 1.5	98.33	99.12	97.89	2.32	3.78	3.25
IBA 2.0	92.13	90.15	91.35	2.35	3.05	2.85
NAA 0.5	90.12	82.10	85.17	3.24	3.01	2.10
NAA 1.0	92.10	82.56	87.58	2.86	2.89	2.15
NAA 1.5	82.00	82.23	84.25	3.20	3.26	3.02

Kết quả thí nghiệm cho thấy ở môi trường 1/2 MS* bổ sung IBA cho tỷ lệ ra rễ cao hơn hẳn khi dùng NAA ở cùng nồng độ. Trong khi tỷ lệ ra rễ đạt 88-98% khi dùng IBA thì với NAA tỷ lệ ra rễ chỉ đạt 82-92.10%. Tỷ lệ ra rễ cao nhất khi dùng NAA đạt 92.10% trong khi tỷ lệ này ở công thức dùng IBA là 99.12%. Điều này cho thấy IBA thích hợp trong vai trò kích thích tạo rễ cho Keo lá trà.

Khi ra rễ ở môi trường 1/2 MS* bổ sung IBA nồng độ 1.5 mg/l cho kết quả ra rễ tốt nhất đạt tỷ lệ trên 97% cho cả 3 dòng thí nghiệm, khi ta tăng hoặc giảm nồng độ

IBA thì tỷ lệ ra rễ giảm dần. Ở công thức này thấy rằng số lượng và chiều dài rễ cũng cao hơn so với các công thức khác.

4. Ra rễ trực tiếp.

Để rút ngắn thời gian tạo rễ trong ống nghiệm, tăng khả năng chống chịu của cây trước khi đưa ra môi trường các chồi nuôi cấy invitro có chiều cao đạt từ 2,5 cm được cắt xử lý bằng dung dịch Benlat nồng độ 0,3 %, chấm thuốc bột kích thích tạo rễ TTG (thuốc kích thích ra rễ thương phẩm có gốc là IBA do Trung tâm nghiên cứu giống cây rừng pha chế) và cắm trực tiếp vào cát ẩm đã xử lý thuốc tím 0.15%. Các chồi đã xử lý thuốc giảm hom được chăm sóc như phương pháp giảm hom thông thường. Phương pháp này lần đầu tiên được áp dụng với Keo lá tràm .

Kết quả được trình bày ở bảng 15.

Qua kết quả cho thấy theo phương pháp này tỷ lệ ra rễ cao, tận dụng nhân công, tiết kiệm được thời gian và vật tư hóa chất, hạ giá thành sản phẩm. Khi rễ dài 2 cm, cấy cây vào bầu đất và được chăm sóc bình thường tỷ lệ sống đạt trên 85%.

Bảng 13 . Kết quả thí nghiệm ra rễ trực tiếp các dòng Keo lá tràm.

Nồng độ thuốc (%)	Tỷ lệ % ra rễ					
	Dòng số 81		Dòng số 82		Dòng số 83	
	Tb	Sđ	Tb	Sđ	Tb	Sđ
IBA 0.5	80.33	5.3	79.8	5.0	70.3	5.2
1.0	85.00	6.50	85.33	6.1	88.50	6.3
2.0	79.33	8.5	79.4	7.4	78.3	5.3

5. Kết luận.

- Phương pháp khử trùng thích hợp với Keo lá tràm là bằng HgCl_2 0.1% trong 8-10 phút.
- Thời vụ khử trùng thích hợp là vụ xuân - hè.
- Quá trình nhân tạo chồi Keo lá tràm trong môi trường MS* kết hợp với BAP và GA3 có hệ số nhân chồi cao hơn môi trường MS* kết hợp với BAP và Kn, thời gian cấy chuyển thích hợp là 20 - 25 ngày/ lần cấy chuyển (trước đây là 35 - 40 ngày/ lần) .
- Để chuẩn bị cho quá trình ra rễ môi trường nhân chồi thích hợp là môi trường MS* cải tiến bổ sung BAP nồng độ 1.0mg/l , GA3 nồng độ 0.5mg/l , than hoạt tính 1,5g/l và nước dừa 150ml/l.
- Môi trường ra rễ thích hợp cho các dòng Keo lá tràm là môi trường 1/2 MS* có bổ sung IBA nồng độ 1.5 mg/ lit.

C. KEO LAI.

1. Khử trùng.

Ảnh hưởng của thời gian khử trùng.

Các đoạn chồi được khử trùng bằng dung dịch HgCl_2 0,1%, lắc đều trong thời gian 2', 4', 6', 8', 10', 12'. Sau đó rửa sạch bằng nước cất vô trùng.

Kết quả cho thấy xử lý HgCl_2 0,1% trong 12' tỷ lệ nhiễm bằng 0 và cũng không có chồi nào nảy chũng tỏ ở thời gian này HgCl_2 đã gây độc đối với các chồi, các chồi đều chết. HgCl_2 đã thấm vào tế bào chất, phá huỷ chất nguyên sinh, phá huỷ hoạt động sống của tế bào, ảnh hưởng tới mọi quá trình trao đổi chất, do vậy mà ảnh hưởng tới quá trình bật chồi .

Thời gian xử lý HgCl_2 trong 2 phút , 4 phút thì tỷ lệ nhiễm tăng dần và tỷ lệ chồi giảm dần chứng tỏ thời gian xử lý còn quá ít chưa đủ loại trừ một số nấm bệnh , bụi bẩn bám trên mẫu vật vẫn còn tỷ lệ nhiễm nhiều.

Xử lý HgCl_2 trong thời gian 8 phút và 10 phút đều có kết quả tỷ lệ nhiễm dưới 50% (đặc biệt ở đoạn I) và tỷ lệ nảy chồi cũng đạt cao hơn so với các công thức khác.

Bảng 14. Ảnh hưởng của thời gian xử lý bằng HgCl_2 0,1% đến tỷ lệ nhiễm và tỷ lệ bật chồi.

Hóa chất	Thời gian xử lý (phút)	Tỷ lệ nhiễm (%)		Tỷ lệ bật chồi (%)	
		Đoạn1	Đoạn2	Đoạn1	Đoạn2
HgCl_2	2	95.0	98.0	0.0	0.0
	4	87.0	98.0	7.5	0.0
	6	72.3	75.0	14.1	10.5
	8	67.0	66.0	17.3	16.0
	10	68.0	60.0	12.0	14.0
	12	0.0	0.0	0.0	2.0

b. Ảnh hưởng của thời kỳ lấy mẫu.

Các mẫu được lấy vào các mùa trong năm, mỗi lần cách nhau 3 tháng. Do điều kiện thời tiết các mùa khác nhau nên ảnh hưởng rất lớn đến kết quả thí nghiệm .

Kết quả thí nghiệm cho thấy thu mẫu vào mùa hè thu cho tỷ lệ nảy chồi tốt nhất. ở giai đoạn này cây đang sinh trưởng tốt còn các tháng khác đều kém hơn về khả năng bật chồi.

Có thể vào cuối mùa sinh trưởng như trong tháng 10, tháng 12, cây chuyển sang giai đoạn ngừng sinh trưởng , hoặc tháng 2 vào đầu xuân cây chuyển sang giai đoạn sinh trưởng đồng thời cũng là thời gian thuận lợi cho các mầm bệnh phát triển nên đã ảnh hưởng đến tỷ lệ nhiễm bệnh và tỷ lệ bật chồi.

Bảng 15. ảnh hưởng của mùa vụ tới khả năng tái sinh chồi Keo lai.

Mùa	Thời gian xử lý (phút)	Tỷ lệ nhiễm (%)		Tỷ lệ bật chồi (%)	
		Đoạn1	Đoạn2	Đoạn1	Đoạn2
Xuân	8	67.0	66.0	17.3	16.0
	10	68.0	60.0	12.0	14.0
Hạ	8	37.0	74.0	32.0	30.0
	10	32.0	64.0	37.5	40.4
Thu	8	24.0	8.0	35.5	38.5
	10	0.0	6.0	33.5	38.0
Đông	8	5.0	10.0	25.0	18.0
	10	5.0	10.0	27.5	30.0

Ngoài ảnh hưởng của hóa chất khử trùng, thời gian khử trùng thì tuổi của cây mẹ, tuổi của chồi cũng như vị trí lấy vật liệu gốc ban đầu cũng có ảnh hưởng rất lớn đến khả năng tái sinh chồi và phát triển của cây sau này.

Kết quả thí nghiệm cũng cho thấy mẫu vật được lấy từ các chồi vượt cho tỷ lệ tái sinh chồi cao, khả năng phát triển của cây tốt hơn so với mẫu vật được lấy từ các chồi cành.

2. Nhân tạo chồi.

Các chồi bất định cao từ 2-2,5 cm được tách ra, cấy vào môi trường nhân chồi có bổ sung một số chất kích thích sinh trưởng ở các nồng độ khác nhau.

Bảng 16. Ảnh hưởng của các Cytokinin đến khả năng nhân chồi của các dòng Keo lai.

Môi trường MS* + chất- nồng độ(mg/l)	Hệ số nhân chồi của các dòng Keo lai					
	Dòng số 10		Dòng số 32		Dòng số 16	
	Tb	Sd	Tb	Sd	Tb	Sd
BAP 0.5	12.0	3.00	12.33	3.33	8.3	3.03
1.0	20.33	5.03	18.00	4.56	18.00	3.29
2.0	23.33	5.77	20.33	3.33	20.67	4.3
3.0	15.5	3.52	10.56	5.56	13.25	5.35
K 0.5	6.00	2.65	4.6	2.33	5.0	3.06
1.0	9.00	2.00	8.3	2.57	7.6	1.53
2.0	12.33	3.79	9.33	1.33	11.33	3.6
3.0	7.56	2.36	7.56	1.6	7.23	2.35

Số liệu cho thấy khi dùng môi trường MS* + BAP ở các nồng độ 2.0 mg/l cho số chồi nhiều nhất đạt từ 20,33 - 23,3 chồi/cụm, tỷ lệ nhân chồi giảm dần khi nồng độ BAP giảm hoặc tăng.

Trong khi đó công thức MS* + Kn ở nồng độ 2,0mg/l cao nhất chỉ đạt 9 - 12 chồi/cụm .

Điều này chứng tỏ khi nhân chồi bổ sung BAP là phù hợp với quá trình nhân chồi Keo lai.

Sự thay đổi về thành phần môi trường nuôi cấy: nguyên tố đa lượng, vi lượng các chất phụ gia, axit amin cũng có tác động mạnh mẽ đến khả năng hình thành chồi Keo lai.

Bảng 17. ảnh hưởng của thành phần môi trường tới khả năng nhân chồi Keo lai

Môi trường	Hệ số nhân chồi (số chồi/cụm)		
	Dòng BV10	Dòng BV16	Dòng BV32
MS*1	15.63	15.36	17.53
MS* 2	23.33	20.67	20.33
MS*3	17.33	15.50	13.26

Như vậy khi sử dụng các môi trường khác nhau ở cùng nồng độ chất kích thích sinh trưởng cho hệ số nhân chồi khác biệt rõ rệt. Ở môi trường MS*2 đối với tất cả các dòng hệ số nhân chồi cao hơn các công thức MS*1 và MS*3. Mặt khác khi nhân chồi Keo lai trong môi trường MS*2 thời gian cấy chuyển giữa hai lần nhân chồi cũng giảm đáng kể từ 25- 30 ngày/ lần cấy chuyển còn 20- 25 ngày/ lần cấy chuyển điều này có ý nghĩa rất lớn trong sản xuất bởi không những thu được số lượng chồi lớn hơn mà còn rút ngắn được thời gian sản xuất, hạ giá thành sản phẩm.

Phương pháp cấy nhân chồi cũng có ảnh hưởng lớn đến khả năng nhân chồi của Keo lai: khi cấy nhân cụm chồi cho tỷ lệ nhân chồi cao hơn khi cấy riêng lẻ từng chồi. Tuy nhiên để tạo được số lượng lớn các chồi cứng cáp, phát triển đồng đều cho ra rễ chồi non môi trường tối ưu trong giai đoạn chuẩn bị là môi trường MS cải tiến bổ sung BAP nồng độ 1.0mg/l và NAA nồng độ 0.2mg/l, khi nuôi cấy trong môi trường này chồi phát triển đồng đều về chiều cao, độ mập thân, bộ lá do môi trường có tỷ lệ cytokinin/auxin thích hợp.

3. Quá trình ra rễ tron g lọ.

Các chồi cao 2,5 cm tạo trong quá trình nhân chồi được tách ra và cấy vào môi trường ra rễ là môi trường MS* có bổ sung các chất kích thích sinh trưởng.

Kết quả thí nghiệm cho thấy ở môi trường 1/2MS* bổ sung IBA cho tỷ lệ ra rễ cao hơn khi dùng NAA. Môi trường bổ sung IBA cho tỷ lệ ra rễ cao đạt 88.0-98.33% trong khi môi trường bổ sung NAA chỉ đạt 65.31-85.56%.

Môi trường 1/2MS* bổ sung IBA nồng độ 2 mg/l cho kết quả ra rễ tốt nhất dòng BV10 và BV32 đạt tỷ lệ ra rễ 97.33 và 98.33%, riêng dòng BV16 có kết quả ra rễ tốt nhất ở môi trường MS* bổ sung IBA nồng độ 1.0mg/lít đạt 97.2%.

Bảng 18. ảnh hưởng của các chất kích thích sinh trưởng tới khả năng ra rễ của các dòng Keo lai.

Môi trường 1/2MS* + Chất, nồng độ (mg/l)	Tỷ lệ % ra rễ của các dòng keo lai					
	Dòng số 10		Dòng số 32		Dòng số 16	
	Tb	Sd	Tb	Sb	Tb	Sd
+IBA 0.5	88.0	3.00	88.33	8.3	92.67	5.03
	1.0	90.33	5.03	93.00	3.0	97.32
	2.0	97.33	5.77	98.33	5.3	94.67
	2.5	96.21	5.46	92.53	2.9	95.64
+NAA 0.5	75.36	6.35	75.26	5.6	82.16	3.25
	1.0	76.58	6.89	79.26	6.2	85.56
	2.0	81.23	3.56	68.35	6.5	79.36
	2.5	76.53	4.58	65.31	5.1	75.48

Ra rễ trực tiếp bằng thuốc TTG:

Để rút ngắn thời gian tạo rễ trong ống nghiệm, tăng khả năng chống chịu của cây trước khi đưa ra môi trường các chồi có chiều cao đạt từ 2,5 cm được cắt xử lý bằng dung dịch Benlat nồng độ 0,3 %, chấm thuốc TTG và cắm trực tiếp vào cát ẩm đã xử lý thuốc tím 0.15%. Các chồi đã xử lý thuốc giảm hom được chăm sóc như cây mô ra rễ trong lọ thông thường. Việc kết hợp kỹ thuật nuôi cấy mô và giảm hom tạo công nghệ mô - hom này lần đầu tiên đã được thực hiện thành công tại Trung tâm nghiên cứu giống cây rừng.

Phương pháp này cho tỷ lệ ra rễ cao trên 88 %, khi rễ dài 2 cm, cấy cây vào bầu đất và được chăm sóc bình thường tỷ lệ sống đạt trên 80% với các dòng thí nghiệm.

Áp dụng thành công phương pháp này sẽ tận dụng nhân công, tiết kiệm được thời gian và vật tư hóa chất, hạ giá thành sản phẩm.

Bảng 19 . Kết quả thí nghiệm ra rễ trực tiếp các dòng Keo lai.

Nồng độ (%)	Tỷ lệ % ra rễ của các dòng keo lai					
	Dòng số 16		Dòng số 10		Dòng số 32	
	Tb	Sd	Tb	Sd	Tb	Sd
+ IBA 0.5	78.33	4.73	79.67	5.03	70.33	4.16
	1.0	83.00	7.00	83.33	5.51	78.00
	2.0	88.33	9.5	89.33	6.34	88.32
	2.5	72.35	3.26	73.58	8.69	70.25

c. Kết luận.

- Quá trình nhân tạo chồi Keo lai trong môi trường MS* kết hợp với BAP có hệ số nhân chồi cao hơn khi dùng môi trường MS* kết hợp với Kn. thời gian cấy chuyển thích hợp là 20 - 25 ngày/ lần.

- Trong giai đoạn chuẩn bị ra rễ môi trường nhân chồi thích hợp là môi trường MS* cải tiến bổ sung BAP nồng độ 1.0mg/l và NAA nồng độ 0.2mg/l.

- Môi trường ra rễ thích hợp cho các dòng Keo lai dòng BV10, BV32 là môi trường 1/2 MS* có bổ sung IBA nồng độ 2.0 mg/ lit, dòng BV16 là môi trường 1/2MS* bổ sung IBA nồng độ 1.0mg/lit.

- Keo lai ra rễ trực tiếp bằng thuốc TTG cho tỷ lệ ra rễ cao.

D. HUẤN LUYỆN CÂY.

Sau khi cây ra rễ 10 ngày, chiều dài rễ đạt từ 1,5-2cm, được đưa ra nhà huấn luyện trong 1 tuần cho thích nghi dần với điều kiện tự nhiên. Đây cũng là giai đoạn chuyển cây con *invitro* từ trạng thái sống dị dưỡng sang sống hoàn toàn tự dưỡng, do đó phải đảm bảo các điều kiện ngoại cảnh: nhiệt độ, ánh sáng, độ ẩm, giá thể... phù hợp để cây con đạt tỷ lệ sống cao.

Khi đưa cây con từ bình nuôi cấy ra ngoài môi trường, cây được rửa sạch và xử lý bằng Benlat nồng độ 0,15% trong 30 giây trước khi cấy vào 2 loại giá thể giá thể:

- Cấy trực tiếp vào bầu đất: thành phần ruột bầu gồm: phân cãmpôt, xơ dừa...được pha trộn theo các công thức và tỷ lệ khác nhau.

- Cấy vào giá thể cát: sau 4 tuần khi cây ổn định cấy chuyển vào bầu đất.

Hai loại giá thể trên được xử lý Benlat nồng độ 0,15% trước khi cấy cây con.

Cây con được che bằng lưới nilong đen có độ che sáng 75%, hàng ngày được tưới bằng vòi phun sương trong 2 tuần. Khi cây ổn định tháo bỏ dần dần che cho thích nghi dần với điều kiện môi trường và chăm sóc như cây con ở vườn ươm thông thường.

Bảng 20. Ảnh hưởng của giá thể đến khả năng sống và sinh trưởng của cây sau 2 tuần.

Giá thể	Tỷ lệ sống			Chiều cao cây		
	Keo lai	Keo lá trà	Bạch đàn lai	Keo lai	Keo lá trà	Bạch đàn lai
Cát	68,5	65,25	71,0	2,5	3,3	2,5
Bầu đất	92,3	85,5	90,0	4,1	4,0	3,5

Kết quả ở bảng 4 cho thấy cây được chuyển từ môi trường *invitro* ra môi trường bên ngoài sau 2 tuần cây được cấy vào bầu đất thì tỉ lệ sống đạt 85.5-92.3% . Trong khi đó, cây cấy vào giá thể cát tỷ lệ sống chỉ đạt 65.25-71%. Như vậy, giá thể bên ngoài là bầu đất cho tỷ lệ sống cao hơn khi cấy ở giá thể cát. Điều này có thể giải thích do cây nuôi cấy mô thân yếu, tế bào mỏng nước, hệ rễ phát triển chưa hoàn chỉnh nên trong môi trường cát giữ nước kém cây héo nhanh. Cây cấy trong bầu đất được giữ ẩm tốt hơn nên cây mau phục hồi, hệ rễ phát triển nhanh, khả năng tạo tế bào lông hút lớn, giúp cho cây nhanh chóng hút nước và khoáng chất.

Kết quả thí nghiệm cho thấy đối với Bạch đàn lai, cây được huấn luyện trong thời gian từ tháng 9 đến tháng 4 năm sau cho tỷ lệ sống cao đạt 85%-90%, cây phát triển tốt.

- Chế độ tưới nước: Giai đoạn đầu (khoảng 12 ngày) dùng bình phun hay dàn phun sương tưới từ 4-5 lần/ ngày, khi cây ổn định số lần tưới giảm dần.

- Chế độ bón phân: sau khi cấy cây (khoảng 20 ngày) bắt đầu tưới thúc bằng hỗn hợp NPK (5 :10 :3), nồng độ 0,5%, liều lượng là 100 lít /20.000 cây (tưới vào lúc trời râm mát) sau đó phải tưới rửa lại bằng nước sạch, và cứ 10 ngày tưới thúc 1 lần đến khi chiều cao cây đạt từ 15-20cm, thì ngừng tưới.

- Chế độ ánh sáng: các luống Bạch đàn khi cấy xong dùng vòm có phủ kín bằng nilong trắng, trên là lưới che râm có độ che sáng 90%, che trong 10 ngày đầu sau khi cấy. Sau đó bỏ nilong chỉ che lưới có độ che sáng 50-70% khi cây được 1 tháng có thể bỏ hoàn toàn lưới che.

Đối với Keo lai và Keo lá tràm thời gian huấn luyện cây thích hợp là từ tháng 10 đến tháng 6 năm sau. Phương pháp chăm sóc tương tự như với Bạch đàn lai.