

BKHCN
VCNSH

**BỘ KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ
VIỆN CÔNG NGHỆ SINH HỌC**

SẢN PHẨM

**ĐỀ TÀI: NGHIÊN CỨU SỬ DỤNG CÔNG NGHỆ TẾ
BÀO VÀ KỸ THUẬT CHỈ THỊ PHÂN TỬ PHỤC VỤ
CHỌN TẠO GIỐNG CÂY TRỒNG**

MÃ SỐ: KC.04.08

**CHỦ NHIỆM: PGS. TSKH. LÊ THỊ MUỘI
THƯ KÝ: TS. ĐINH THỊ PHÒNG**

**CƠ QUAN CHỦ TRÌ: VIỆN CÔNG NGHỆ SINH HỌC
CƠ QUAN QUẢN LÝ: VIỆN KH VÀ CN VIỆT NAM
THỜI GIAN THỰC HIỆN: 36 THÁNG (TỪ 10/2001 ĐẾN 10/2004)**

Hà Nội, 12/2004

MỤC LỤC

- I. **Danh sách các dòng cây trồng chọn tạo được**
- II. **Quy trình nhân giống *in vitro* một số giống cây trồng**
 - II.1. **Quy trình công nghệ**
 - 1. Quy trình công nghệ nhân giống Bạch đàn lai bằng giâm hom và nuôi cấy mô
 - 2. Quy trình công nghệ nhân giống Keo lai bằng giâm hom và nuôi cấy mô
 - 3. Quy trình công nghệ nhân nhanh *in vitro* cây Ba kích quy mô bán sản xuất
 - 4. Quy trình nhân nhanh *in vitro* một số giống Địa lan quy mô bán sản xuất
 - II.2. **Quy trình nghiên cứu**
 - 1. Quy trình nhân giống *in vitro* hai dòng lúa bất dục
 - 2. Quy trình nhân giống *in vitro* hai giống điều
- III. **Danh sách và trình tự các chỉ thị phân tử**
- IV. **Quy trình nghiên cứu chọn tạo các giống lúa, ngô, lạc và đậu tương**
 - 1. Quy trình tạo các dòng lúa đặc sản bằng kỹ thuật chọn dòng biến dị soma kết hợp với xử lý tia gamma
 - 2. Quy trình chọn giống lúa phẩm chất phục vụ xuất khẩu bằng công nghệ tế bào thực vật và chỉ thị phân tử
 - 3. Quy trình chọn tạo lúa chất lượng, kháng đạo ôn bằng công nghệ tế bào thực vật và chỉ thị phân tử
 - 4. Quy trình chọn tạo dòng ngô thuần bằng công nghệ tế bào thực vật và chỉ thị phân tử
 - 5. Quy trình chọn tạo giống lạc kháng bệnh rỉ sắt có sự trợ giúp của chỉ thị phân tử
 - 6. Quy trình chọn tạo giống đậu tương kháng bệnh rỉ sắt và chịu hạn có sự trợ giúp của chỉ thị phân tử
- V. **Báo cáo tóm tắt giống lúa DR3**

I. Danh sách các dòng cây trồng chọn tạo được

DANH SÁCH CÁC DÒNG LÚA TẠO RA TRONG ĐỀ TÀI

I. LÚA CHẤT LƯỢNG CAO KHÁNG ĐẠO ÔN

TT	Cấp lai	Số dòng chọn lọc		Mục tiêu chọn dòng	Tổng dòng
		Dòng ĐBK	Dòng cây lai		
1	Moroberekan/K DML105	1 dòng (HPMK1)	2 dòng F4 (MK1, MK2)	Lúa kháng đạo ôn, chất lượng cao	3
2	Moroberekan/W AB56-125 Và ngược lại	2 dòng HPMD4, HPMD 9	0	Lúa kháng đạo ôn, chất lượng cao	11
3	C101A51/ KDML105	0	1 dòng F2 CAK1	Lúa kháng đạo ôn, chất lượng cao	1
4	C71/KDML105	0	1 dòng F7 (CK1)	Lúa kháng đạo ôn, chất lượng cao	1
5	Tẻ tép/Q5 và ngược lại	0	1 dòng F2 TQ1	Lúa kháng đạo ôn năng suất cao	1
6	Q5/KDML105	0	1 dòng F2 QK1	Lúa năng suất cao, chất lượng tốt	1
7	KDML105/WA B56-125 Và ngược lại	2 dòng (HPKW1 HPKW2)	2 dòng F7 (KW1, KW2)	Lúa chất lượng cao	2
8	WAB56-125/ Tẻ tép	2 dòng (HPWT1, HPWT2)	0	Lúa kháng đạo ôn chất lượng cao	2
9	Khang dân/ Moroberekan	0	2 dòng F5 (KDM1, KDM2)	Lúa kháng đạo ôn chất lượng khá	2
10	Khang dân/ Tẻ tép	0	1 dòng F3 (KT1)	Lúa kháng đạo ôn chất lượng khá	1
11	BR12/ WAB56-125	0	1 dòng F7 (BW12)	Lúa kháng đạo ôn, chất lượng khá	1
12	BR12/Tám thơm	0	0	Lúa kháng bệnh đạo ôn, chất lượng cao	
13	BR12/KDML10 5	0	1 dòng F2 BK1	Lúa kháng bệnh đạo ôn, chất lượng cao	1
14	C71/WAB56- 125	0	1 dòng F2 CW1	Lúa kháng bệnh đạo ôn, chất lượng cao	1
				Tổng	28

II. LÚA XUẤT KHẨU

1. Các dòng từ nuôi cấy túi phấn và tế bào soma trồng thể hệ A 1 và A 2

Số tt	Tên dòng	Nguồn gốc	Số dòng	Ghi chú
	Từ tế bào soma			
1		DS20	120	
2		NTCD	54 dòng	
3		Jamine 85	523 dòng	
		Kho DawMali 105	514	
	Túi phấn			
5		OM 1490/KDM 105	56	
6		OM 1490/Jamine 85	22	
7		OM 1490/NTCD	21	
8		OM 1490/OMCS2000	40	
9		OM 2507/ OM 1490	18	
10		OM 4392/ OM 1490	60	
		Tổng số	914	

2. Các dòng từ nuôi cấy túi phấn và tế bào soma đang trồng ngoài đồng chọn lọc thể hệ A 4 và Soma 5

Số tt	Tên dòng	Nguồn gốc	Số dòng	Ghi chú
	Từ tế bào soma			
1		DS20	2	
2		NTCD	7 dòng	
3		Jamine 85	150 dòng	
		OM 3536	17 dòng	
	Túi phấn			
5		OM 1490/KDM 105	15	
6		OM 1490/Jamine 85	13	
7		OM 1490/NTCD	5	
8		OM 1490/OMCS2000	45	
9		OM 2507/ OM 1490	1 dòng	Có triển vọng năng suất cao
10		IR 64/ Jamine 85	1 dòng	Có triển vọng năng suất cao
		Tổng số	256 dòng	

III. LÚA CHẤT LƯỢNG CAO DÙNG TRONG NƯỚC

1. Danh sách các dòng cây tái sinh

TT	Tên giống	Số dòng cây	Số dòng thu được hạt
1	Dự thom	201	118
2	Tẻ Di Hương	100	63
3	Tám áp bẹ	139	77
4	Tám xoan	137	105
	Tổng cộng	577	363

2 Danh sách các dòng MR2 không cảm quang

TT	Tên dòng	C.Cao cây (cm)	Số bông/ khóm	Dài bông (cm)	Số hạt/bông	Tỷ lệ lép (%)	Dài hạt (mm)	Rộng hạt (mm)	Màu sắc, dạng hạt	Thời gian ST (ngày)	TL 1000 hạt
1	TXL7-01-1	100,5	9,2	21,95	93,90	12,14	7,48	3,03	Nâu sáng Bầu tròn	116	23,8
2	TXL7-01-2	124,8	8,6	22,35	107,7	8,54	7,26	3,06	Nâu sáng Vàng sáng Bầu tròn	120	23,6
3	TXL7-01-3	112,1	7,2	22,30	89,60	17,07	7,50	3,36	Nâu sáng Vàng sáng Bầu tròn, có râu	120	23,0
4	TXL9-29-3-1	130,3	7,4	23,53	118,21	34,52	7,92	2,62	Nâu sáng Nhỏ thon	115	22,2
5	TXL9-29-3-2	127,5	7,1	22,96	105,65	36,45	7,87	2,61	Nâu sáng Nhỏ thon	115	22,1
6	TXL9-29-3-3	124,2	7,0	20,27	86,80	47,60	7,68	2,59	Nâu sáng Nhỏ thon	124	21,8

7	TXL9-29-3-4	122,7	9,3	19,31	80,23	94,30	7,72	2,64	Nâu sáng Nhỏ thon	124	20,5
8	TXL9-29-3-5	115,4	6,8	18,60	96,75	24,82	8,31	2,97	Vàng sáng, râu rất dài, hạt to dài	124	23,5
9	TXL9-29-3-6	150,3	7,5	22,71	76,12	10,52	8,42	3,54	Vàng sáng Hạt rất to	124	27,6
10	TXL9-29-3-7	130,6	5,6	22,56	75,51	31,86	7,25	2,46	Vàng sáng, nhỏ	124	19,6
11	TXL9-29-3-8	115,9	3,9	19,63	86,72	26,34	7,49	2,73	Vàng sáng, nhỏ	124	20,2
12	TXL9-29-3-9	130,2	6,4	21,12	90,74	25,60	8,15	2,89	Vàng sáng Dài	124	21,1
13	TXL9-29-3-10	135,4	4,5	22,24	81,15	30,23	8,27	3,32	Vàng sáng Dài-to	124	23,4
14	TXL9-29-3-11	117,5	5,7	21,15	76,88	26,78	8,21	3,29	Vàng sáng Dài-to	124	22,7
15	TXL9-29-3-12	142,0	3,6	19,27	84,86	22,71	7,41	2,56	Vàng sáng nhỏ	124	20,3
16	TXL9-29-3-13	150,4	2,6	18,38	83,45	24,51	7,71	2,64	Vàng sáng nhỏ	124	19,8
17	TXL9-29-3-14	120,4	6,4		87,42	28,56	7,78	2,68	Vàng sáng nhỏ	124	19,4
18	TXL9-29-3-15	118,5	8,4	19,54	75,65	100,00	-	-	Nâu - lép	-	-
19	DTL7-01-8	145,6	6,2	16,70	67,50	72,30	7,43	2,62	Vàng sáng	140	20,5
20	TDHL9-8-5	130,3	7,4	18,50	72,70	60,70	7,50	2,91	Vàng sáng	130	21,8
21	Tám Hạt nhỏ	96,3	9,0	23,80	149,10	8,11	8,66	2,48	Vàng, Nhỏ thon	110	19,2

DANH SÁCH CÁC DÒNG LẠC

1. Tổ hợp lai và số lượng các dòng F2

STT	Tổ hợp lai	Số dòng F2	Ghi chú
1	ICG950166 x L12	67	Đã được đánh giá phân tử tính kháng bệnh rỉ sắt. Kết quả phân tích chỉ ra 13 dòng mang chỉ thị liên quan.
2	L12 x ICG950166	158	
3	L08 x ICG95051	206	Đã được đánh giá phân tử tính kháng bệnh rỉ sắt
4	ICG11505 x L12	188	
5	Gié nho quan x L08	194	
	Tổng số	813	

2. Danh sách các dòng F3 mang chỉ thị liên quan đến tính kháng bệnh rỉ sắt cặp lai (ICG950166 x L12)

TT	Tên dòng	Ghi chú
1	B24	Đang tiếp tục trồng để đánh giá một số đặc điểm nông học để phát triển thành giống
2	B37	
3	B41	
4	B46	
5	B60	
6	B102	
7	B108	
8	B3	
9	B6	
10	B7	
11	B12	
12	B21	
13	B110	

DANH SÁCH CÁC DÒNG ĐẬU TƯỚNG

1. Tổ hợp lai và số lượng các dòng F2

STT	Tổ hợp lai	Số dòng F2	Ghi chú
1	ĐT2000 x ĐT12	117	Một số dòng đã được đánh giá phân tử tính kháng bệnh rỉ sắt
2	ĐT2000 x Cúc vàng	243	Một số dòng đã được đánh giá phân tử tính kháng bệnh rỉ sắt
	Tổng số	360	

2. Danh sách các dòng triển vọng đã được phân tích với các chỉ thị liên quan đến tính kháng bệnh rỉ sắt và chịu hạn

TT	Tên dòng	Ghi chú
1	ĐT213.4.347	Trong đó dòng ĐT213.4.347 (ĐT26) đang tham gia khảo nghiệm cơ bản vụ đông 2004.
2	ĐT320.2.176	
3	ĐT213.5.250	
4	ĐT147.3.386	
5	ĐT98.1.120	
6	ĐT356.3.372	
7	ĐT320.3.221	

DANH SÁCH DÒNG TẠO RA TỪ KỸ THUẬT NUÔI CẤY BAO PHẦN 2001-2004

T.T	Tên dòng	Ký hiệu dòng vụ Xuân 2004
1	AC1	C49N
2	AC2	C50N
3	AC3	C51N
4	AC4	C54N
5	AC5	C56N
6	AC6	C121N
7	AC7	C156N
8	AC8	C157N
9	AC9	C43
10	AC10	C44
11	AC11	C46
12	AC12	C47
13	AC13	C48
14	AC14	C49
15	AC15	C52
16	AC16	C53
17	AC17	C58
18	AC18	C59
19	AC19	C60
20	AC20	C61
21	AC21	C62
22	AC22	C63
23	AC23	C64
24	AC24	C67
25	AC25	C69
26	AC26	C72
27	AC27	C73
28	AC28	C74
29	AC29	C75
30	AC30	C76
31	AC31	C77
32	AC32	C79
33	AC33	C80
34	AC34	C81
35	AC35	C82

T.T	Tên dòng	Ký hiệu dòng vụ Xuân 2004
46	AC46	C95
47	AC47	C96
48	AC48	C102
49	AC49	C104
50	AC50	C105
51	AC51	C111
52	AC52	C113
53	AC53	C114
54	AC54	C115
55	AC55	C117
56	AC56	C119
57	AC57	C121
58	AC58	C123
59	AC59	C124
60	AC60	C125
61	AC61	C126
62	AC62	C127
63	AC63	C128
64	AC64	C129
65	AC65	C131
66	AC66	C133
67	AC67	C136
68	AC68	C138
69	AC69	C153
70	AC70	C154
71	AC71	C156
72	AC72	C161
73	AC73	C166
74	AC74	C168
75	AC75	C170
76	AC76	C173
77	AC77	C174
78	AC78	C176
79	AC79	C177
80	AC80	C178

DANH SÁCH DÒNG TẠO RA TỪ KỸ THUẬT NUÔI CẤY BÀO PHẦN 2001-2004

T.T	Tên dòng	Ký hiệu dòng vụ Xuân 2004
36	AC36	C86
37	AC37	C87
38	AC38	C89
39	AC39	C93
40	AC40	C94
41	AC41	C198
42	AC42	C199
43	AC43	C207
44	AC44	C209
45	AC45	C210
91	AC91	C213
92	AC92	C214
93	AC93	C216
94	AC94	C219
95	AC95	C220
96	AC96	C221
97	AC97	C225
98	AC98	C179
99	AC99	C181
100	AC100	C182
101	AC101	C183
102	AC102	C187

T.T	Tên dòng	Ký hiệu dòng vụ Xuân 2004
81	AC81	C188
82	AC82	C189
83	AC83	C192
84	AC84	C195
85	AC85	C196
86	AC86	C226
87	AC87	C227
88	AC88	C228
89	AC89	C229
90	AC90	C230
103	AC103	C233
104	AC104	C236
105	AC105	C237
106	AC106	C240
107	AC107	C245
108	AC108	C248
109	AC109	C249
110	AC110	C251
111	AC111	C252
112	AC112	C255
113	AC113	C256
114	AC114	C258

II. Quy trình nhân giống *in vitro* một số giống cây trồng

II.1. Quy trình công nghệ

BKHCN
VCNSH

BỘ KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ
VIỆN CÔNG NGHỆ SINH HỌC

SẢN PHẨM II - 2

CÔNG NGHỆ NHÂN GIỐNG BẠCH ĐÀN LAI BẰNG GIÂM HỒM VÀ NUÔI CẤY MÔ

**Thuộc đề tài: Nghiên cứu sử dụng công nghệ tế
bào và kỹ thuật chỉ thị phân tử phục vụ chọn
tạo giống cây trồng**

Mã số: KC.04.08

Hà Nội, 11/2004

BỘ NÔNG NGHIỆP VÀ PHÁT TRIỂN NÔNG THÔN
VIỆN KHOA HỌC LÂM NGHIỆP VIỆT NAM

HƯỚNG DẪN KỸ THUẬT

**NHÂN GIỐNG, TRỒNG VÀ KHAI THÁC CÁC
GIỐNG BẠCH ĐÀN CAO SẢN.**

Hà Nội, 2004

BỘ NÔNG NGHIỆP VÀ PHÁT TRIỂN NÔNG THÔN
VIỆN KHOA HỌC LÂM NGHIỆP VIỆT NAM

HƯỚNG DẪN KỸ THUẬT

**NHÂN GIỐNG, TRỒNG VÀ KHAI THÁC CÁC
GIỐNG BẠCH ĐÀN CAO SẢN.**

Hà Nội, 2004

HƯỚNG DẪN KỸ THUẬT NHÂN GIỐNG, TRỒNG VÀ KHAI THÁC CÁC GIỐNG BẠCH ĐÀN CAO SẢN.

I. MỤC TIÊU.

- Bản hướng dẫn kỹ thuật này giới thiệu những kỹ thuật cơ bản về nhân giống, trồng và chăm sóc rừng trồng, khai thác Bạch đàn trước khi sử dụng.

- Trồng rừng sản xuất nguyên liệu công nghiệp, gỗ quy cách lớn, sản xuất đồ gia dụng đạt năng suất từ 15-25m³ gỗ/ha/năm ở miền Bắc và miền Trung, 20-30m³ gỗ/ha/năm ở miền Nam.

II. PHẠM VI VÀ ĐỐI TƯỢNG ÁP DỤNG.

Quá trình sản xuất chia làm 2 giai đoạn:

1. Sản xuất cây giống.

- Sản xuất bằng giâm hom: áp dụng cho quy mô hộ gia đình, lâm trường, tập đoàn sản xuất nơi không có điều kiện nhân giống bằng kỹ thuật nuôi cấy mô. Quy mô tùy theo yêu cầu của trồng rừng.

- Sản xuất bằng nuôi cấy mô: áp dụng cho các trung tâm kỹ thuật lâm nghiệp có đủ điều kiện. Nơi sản xuất bằng nuôi cấy mô nên kết hợp cả giâm hom với quy mô từ 0,5 triệu cây/năm trở lên.

2. Trồng rừng.

- Trồng rừng tập trung để cung cấp nguyên liệu, quy mô từ hộ gia đình đến sản xuất vùng lớn, diện tích tối thiểu 1 hecta trở lên.

- Chỉ sản xuất và trồng các giống đã được Bộ NN&PTNT công nhận là giống tiên bộ kỹ thuật.

III. ĐIỀU KIỆN CẦN VÀ ĐU ĐỀ ÁP DỤNG.

1. Sản xuất giống bằng giâm hom.

- Có nhà giâm hom, nhà lưới.
- Có vườn giống gốc, các giống đã được công nhận và phù hợp với địa phương.
- Có các trang thiết bị, vật tư tối thiểu: hệ thống tưới phun, giàn che... vườn ươm thông dụng.
- Có cán bộ kỹ thuật, ít nhất một kỹ sư lâm sinh có trình độ kỹ thuật và kinh nghiệm đối với các đơn vị sản xuất trên quy mô lớn.
- Đối với hộ gia đình phải có đủ điều kiện về vốn và kỹ thuật.

2. Sản xuất giống bằng nuôi cấy mô.

- Có đủ cán bộ kỹ thuật đã được tập huấn (ít nhất một kỹ sư lâm sinh hay kỹ sư sinh học) và một số công nhân kỹ thuật.
- Có phòng nuôi cấy mô và các trang thiết bị cần thiết.
- Có vườn giống gốc như ở giâm hom.

3. Trồng rừng nguyên liệu.

3.1. Khí hậu.

- Nhiệt độ trung bình hàng năm 22-27°C (nhiệt độ tối cao tuyệt đối là 40°C, tối thấp tuyệt đối là 2°C).
- Lượng mưa hàng năm từ 1500-2500mm.

3.2. Địa hình và đất đai.

- Có nơi sử dụng hoặc tiêu thụ gỗ Bạch đàn ổn định.
- Rừng trồng Bạch đàn phải có đường vận chuyển gỗ tương đối dễ dàng.
- Độ dốc nhỏ hơn 15°.
- Có đất thích hợp như: đất phù sa châu thổ, các loại đất phù sa khác, đất cát đã ổn định có màu vàng, nâu hay đỏ, đất phù sa cổ và đất xám bạc màu, đất feralit trên các đá mẹ trầm tích biến chất, đất phèn đã lên lớp, độ pH_{KCL}: 3-7.

3.3. Vốn.

- Có đủ vốn và vật tư thực hiện cho cả luân kỳ.

IV. NỘI DUNG.

1. Nguồn giống:

- Sử dụng bộ giống đã được chuyển giao công nghệ hoặc được Bộ NN&PTNT công nhận như: U6, PN2, PN14, GU8, các dòng Bạch đàn lai đã qua khảo nghiệm...
- Giống để trồng rừng phải là cây con sản xuất bằng hom hoặc nuôi cấy mô được tạo từ bộ giống đã được công nhận, do các cơ quan chuyên môn cung cấp.
- Có ít nhất 3 dòng cho một lô trồng tập trung.

2. Kỹ thuật nhân giống.

2.1. Nhân giống bằng hom.

2.1.1. Xây dựng vườn giống lấy hom.

- Vườn giống lấy hom phải được xây dựng trên đất có đủ ánh sáng gần vườn ươm, gần nhà giám hom và có nguồn nước tưới. Tính theo công suất nhà hom thì cứ 2000m² vườn giống đủ cung cấp hom cho nhà công suất 250.000 cây/vụ.
- Đất để trồng vườn giống lấy hom phải có thành phần cơ giới nhẹ hoặc trung bình, thoát nước tốt, độ sâu tầng mặt hơn 50 cm.
- Phương pháp làm đất là cày/bừa toàn diện 2 lần.

Cây trồng vườn giống lấy hom.

- Cây trồng vườn giống để lấy hom phải là cây mô hoặc cây hom thể hệ đầu của các giống Bạch đàn đã được công nhận.

- Cây giống lấy hom phải được trồng trước đợt thu chồi đầu tiên ít nhất 2 tháng. Tùy điều kiện địa hình và quy mô vườn giống mà cây giống trong mỗi dòng vô tính có thể trồng theo hàng hoặc theo khối riêng rẽ và phải ghi rõ số hiệu của từng dòng. Cự ly giữa các hàng là 60 cm, giữa các cây là 50 cm.

- Khi trồng phải bón lót cho mỗi cây 1 kg phân chuồng hoai, 100 g phân NPK (5:10:3) hoặc 200g phân lân hữu cơ vi sinh.

Chăm sóc cây lấy hom.

- Vườn lấy hom phải được chăm sóc, bảo vệ cẩn thận không để sâu bệnh, người và gia súc phá hoại. Chung quanh vườn giống lấy hom phải có hàng rào bảo vệ.
- Phải thường xuyên tưới nước đủ ẩm cho cây.
- Sau khi trồng 1 tháng phải làm cỏ, vun gốc và lập lại theo định kỳ 2 tháng 1 lần.
- Sau mỗi lần thu hoạch chồi phải dọn vệ sinh gốc cây, khử trùng cây giống bằng cách phun Benlat nồng độ 0,15%, hoặc Viben-C (Benlat-C) nồng độ 0,3%, xới vun quanh gốc.
- Hàng năm, khi kết thúc mùa khai thác hom phải chặt bỏ các cây giống yếu, bị sâu bệnh.
- Một tháng trước vụ giám hom phải dọn tạo chồi và bón thúc cho cây giống bằng phân chuồng hoai liều lượng 1 kg/cây hoặc phân NPK (5:10:3) 100g/ cây, hay phân hữu cơ vi sinh 150g/cây.

Thời hạn sử dụng cây lấy hom.

Chỉ sử dụng cây giống để lấy hom trong 3-4 năm, sau đó phải thay thế bằng cây mô mới hoặc cây hom thể hệ đầu được nhân giống từ cây mô.

2.1.2. Mùa giám hom và kỹ thuật tạo chồi.

Mùa giám hom.

Phụ thuộc vào mùa trồng rừng của từng vùng. Nguyên tắc chung là giám hom phải được thực hiện trước khi trồng 2,5-3,5 tháng.

Đốn tạo chồi lần đầu.

Được thực hiện sớm nhất là 50-60 ngày sau khi trồng. Việc đốn tạo chồi lần đầu được thực hiện bằng cách dùng kéo cắt ngang thân cách mặt đất 20-30 cm. Gốc đã cắt được khử trùng bằng cách phun Benlat nồng độ 0,15% hoặc Viben-C (Benlat C) nồng độ 0,3% cho ướt cả cây.

Cắt chồi:

Lứa chồi đầu tiên được cắt sau khi đốn tạo chồi 28-30 ngày, sau đó có thể cách 10-15 ngày cắt chọn 1 lần. Việc cắt chồi phải được tiến hành vào buổi sáng. Chồi đã cắt được ngâm ngay gốc vào nước sạch và bảo quản nơi râm mát.

2.1.3. Nhà giám hom.

Nhà giám hom:

- Nhà giám hom phải đặt ở vị trí bằng phẳng, thông thoáng, thoát nước, liền kề với vườn ươm, không úng ngập về mùa mưa, có đủ nguồn nước sạch cung cấp cho sản xuất cây hom cả về mùa khô.

- Nhà giám hom được làm theo nhiều kiểu dáng và kích thước khác nhau phụ thuộc vào quy mô sản xuất và điều kiện cụ thể của đơn vị. Có 2 loại nhà giám hom phổ biến : nhà mái rút bằng lưới nilong và nhà mái che bằng tấm tôn nhựa. Điều quan trọng là nhà giám hom phải vững chắc, cao ráo, thông thoáng phù hợp với khí hậu địa phương, tạo điều kiện môi trường tốt nhất cho hom ra rễ, đồng thời thuận tiện cho các hoạt động sản xuất.

- Mái nhà hom che bằng lưới, các tấm đan bằng tre nứa hay các tấm tôn nhựa có độ che sáng 75%. Phía trong nhà hom ở độ cao 2,5-3m có tấm lưới che phụ để điều chỉnh ánh sáng trong những ngày nắng gắt. Xung quanh nhà giám hom từ nền đến độ cao 2m được che bằng lưới nilong đen có độ che sáng 75% để hạn chế nắng xiên và gió.

Luống giám hom.

Trong nhà giám hom có các luống giám được xây theo dạng bể nông có chiều rộng 1,4m, luống cách luống 30-50cm. Luống giám hom có nền dốc về phía rãnh thoát nước ở hai bên thành, ở giữa đặt các vòi phun. Thành luống xây cao 10-12cm. Chiều dài luống giám hom phụ thuộc vào kích thước của nhà giám hom.

Lều giám hom.

Trên luống chụp các lều giám hom có khung vòm bằng sắt hoặc tre và phủ nilong trắng để đủ ánh sáng và giữ ẩm cho hom giám.

Giá thể giám hom.

a. Cây trên nền cát vàng.

b. Cây thẳng vào bầu đất: Tùy thuộc vào điều kiện tong nơi mà có thể lựa chọn các loại hỗn hợp ruột bầu sau:

+ Sử dụng 100% đất tầng B đập nhỏ, sàng bỏ tạp vật và những hạt đất to để đóng bầu.

+ Sử dụng hỗn hợp gồm: 20% phân ủ tổng hợp (có tỷ lệ 20% trấu + 30% mùn cưa + 45-50% phân chuồng + 5% phân xanh) + 80% đất tầng B để đóng bầu.

+ 50% đất tầng B + 25% cát sạch + 25% than trấu

+ 40% đất tầng B + 30% cát + 30% than trấu

+ 50% cát + 50% than trấu

+ 30% cát phía trên và 70% đất tầng B phía dưới.

- Bầu giám hom bằng nilong cỡ 9x11cm (đường kính 5-6 cm) có đáy và đục 3-7 lỗ để thoát nước.

- Xử lý giá thể giám hom: Dùng Benlat nồng độ 0,15% (15g/ 10 lít nước) cho 50m² bề mặt bầu và giá thể giám hom, hoặc dùng thuốc tím (KMnO₄) nồng độ 0,1% (10g/10 lít nước) tưới cho 10 m² mặt bầu để phòng chống nấm bệnh. Việc xử lý tiến hành trước khi cấy hom 12 giờ.

Các công trình phụ trợ.

- Hệ thống tưới nước gồm: hệ thống cấp nước, hệ thống phun sương và hệ thống thoát nước.

- Nhà xử lý kỹ thuật: nơi cất và xử lý hom, nơi để dụng cụ, kho chứa vật liệu làm giá thể giám hom.

2.1.4. Cắt tạo hom và giám hom.

Tạo hom.

- Phải dùng kéo thật sắc để cắt tạo hom, tuyệt đối không làm trầy xước hoặc dập gốc hom. Hom cắt lần nào phải cấy ngay lần ấy. Không được để hom cắt ngày hôm trước sang ngày hôm sau mới cấy, nhất là trong điều kiện nắng nóng.

- Mỗi chồi cắt 1 hom ngọn (hom 1) dài 7 - 10 cm mang 6 - 8 lá. Vết cắt ở vị trí 0,2cm phía dưới đốt dưới cùng. Sau đó cắt bỏ toàn bộ 2 lá dưới cùng và 1/2 phần của 2 lá kế tiếp. Cũng có thể sử dụng hom 2 để giám. Tuy nhiên hom này chỉ lấy 2 đốt (mang 2 lá), dài khoảng 5 - 7cm và phải xử lý bằng thuốc kích thích ra rễ có nồng độ cao hơn.

Xử lý hom.

Hom sau khi cắt phải ngâm ngay vào dung dịch Benlat nồng độ 0,2% (2g benlat/ 10 lít nước) trong thời gian 15-20 phút để phòng nấm bệnh.

Chuẩn bị.

Trước khi cấy hom, nền giâm phải được tưới nước cho thật ẩm toàn bộ ruột bầu. Hom sau khi cắt được chấm gốc vào thuốc kích thích ra rễ TTG1 (do Trung tâm nghiên cứu giống cây rừng pha chế) hoặc các loại thuốc kích thích ra rễ khác sau đó cấy ngay vào bầu (mỗi bầu cấy 1 hom) hoặc giá thể giâm hom khác, không được làm mất thuốc kích thích ra rễ hoặc trầy xước gốc hom.

Kỹ thuật cấy hom.

- Cấy hom vào bầu đất: dùng que cấy có đường kính lớn hơn đường kính gốc hom một chút để chọc một lỗ sâu 2-3 cm giữa bầu, cắm hom và dùng ngón tay cái và ngón trỏ bóp nhẹ đất xung quanh gốc hom để phần hom dưới mặt đất được tiếp xúc hoàn toàn với đất bầu và giữ cho hom đứng thẳng.

- Cấy hom trên nền cát vàng: dùng que cấy chọc một lỗ sâu 2-2,5 cm, cắm hom, dùng ngón trỏ và ngón giữa nhẹ xung quanh gốc hom để giữ cho hom đứng thẳng, cấy các hàng cách nhau 4-5cm, hom cách nhau 2,5-3 cm. Sau khi cấy dùng ô doa tưới đều 1 lần toàn bộ mặt luống.

2.1.5. Chăm sóc hom giâm và cấy hom.

Chăm sóc hom trong luống giâm.

- Ngay sau khi cấy phải phủ nilong trắng mờ lên khung vòm luống giâm để giữ ẩm và tưới phun sương cho hom hàng ngày.

- Thời gian tưới cách nhau 30-40 phút, mỗi lần 7-10 giây tùy thuộc thời tiết (đối với khí hậu miền Bắc).

- Ở miền Nam sau khi cấy không che phủ nilong thì tưới phun sương 15 giây/ 1 lần mỗi lần 5 giây sau đó thời gian tưới giảm dần.

- Nơi không có hệ thống phun sương thì dùng bình phun tay.

Nguyên tắc chung là phải giữ lá của hom luôn tươi (độ ẩm không khí trong lều giâm hom trên 80%) và nhiệt độ không quá 32°C.

Việc tưới phun như vậy phải tiến hành đến khi bộ rễ của hom phát triển hoàn chỉnh (thời gian này thường kéo dài 3-4 tuần tùy theo mùa).

- Giâm tưới nước 1 tuần trước khi chuyển cây ra nuôi dưỡng tại vườn ươm.

- Một tuần trước khi chuyển cây ra khỏi nhà hom phun Benlat nồng độ 0,3% để phòng trừ nấm bệnh.

- Không dùng nước giếng khoan bơm trực tiếp để tưới cho hom.

Chăm sóc cây hom ngoài vườn ươm.

- Đối với hom giâm trong cát: Sau 2-3 tuần, rễ hom dài 1,2-2cm cấy chuyển hom vào bầu đất và tiếp tục che nắng bằng lưới nilong đen hoặc các tấm tre, nửa có độ che sáng 70% cho tới khi cây hom sống ổn định thì dỡ bỏ dần che.

- Đối với hom giâm thẳng vào bầu: Sau khi cấy 3-5 tuần, chuyển cây con ra vườn ươm để nuôi dưỡng.

- Phải luôn cung cấp đủ nước cho cây hom, đặc biệt thời gian mới chuyển cây ra vườn ươm không để hom bị héo.

- Định kỳ 3 tuần tưới phân 1 lần với liều lượng 1 kg NPK (5:10:3) hoà tan trong 33 lít nước tưới cho 5000 cây. Sau mỗi lần tưới phân phải tưới rửa lá bằng nước sạch.

- Riêng bầu có trộn phân ủ tổng hợp thì không cần tưới phân.

- Cắt bỏ các chồi phụ chỉ để lại 1 chồi chính.

Phòng trừ sâu bệnh.

- Định kỳ 2 tuần phun Ben lat 1 lần với nồng độ 0,06% (6g Benlat/10 lít nước/ 50 m²) hoặc da khuẩn linh nồng độ 0,1% để phòng chống nấm bệnh. Khi thấy có nấm bệnh phát triển thì mỗi tuần phun thuốc 2 lần với nồng độ cao hơn (8g Benlat/10 lít nước/ 50 m² hoặc da khuẩn linh nồng độ 0,12 - 0,14%). Thường xuyên theo dõi hom giâm, nhặt bỏ lá rụng và hom chết, nhổ bỏ cỏ dại mọc trong bầu hay nền giâm. Khai thông hệ thống thoát nước trong và ngoài bể để tránh cho hom khỏi úng nước.

- Khi hom bị thối, nấm bệnh hàng loạt thì phải loại nhổ hoàn toàn và khử trùng giá thể giâm hom bằng dung dịch thuốc tím hay Ben lat ở nồng độ cao (0,4-0,5%).

Hãm sinh trưởng và phân loại cây hom.

- Ngưng tưới phân trước khi xuất cây đi trồng 2 tuần. Trong trường hợp phải lưu giữ cây ở vườn lâu hơn thì phải đảo bầu, trải nilong xuống nền xếp bầu, hạn chế tưới phân và nước để hãm cây.

- Khi chuyển cây hom ra vườn ươm để huấn luyện phải tiến hành phân loại theo sinh trưởng để có chế độ chăm sóc thích hợp.

Tiêu chuẩn cây con xuất vườn.

Cây hom xuất vườn đạt chiều cao 20-25 cm, xanh, khỏe mạnh, đồng đều và không sâu bệnh.

2.2. Nhân giống bằng phương pháp nuôi cấy mô.

- Vật liệu: Sử dụng bộ giống đã được Bộ NN&PTNT công nhận.

- Chỉ áp dụng cho các cơ sở sản xuất có đủ các điều kiện và trên quy mô lớn.

- Nhân giống bằng nuôi cấy mô bao gồm các công đoạn sau:

2.2.1. Khử trùng

- Mẫu vật là các đoạn chồi gốc dài 10-15cm có mắt ngủ lấy từ cây con 6 tháng đến 1 năm tuổi. Lấy mẫu vào buổi sáng những ngày nắng.

- Khử trùng bề mặt: Dùng nước tẩy rửa trong 3 phút, sau rửa lại mẫu dưới vòi nước chảy nhằm loại bỏ các tác nhân gây bẩn.

- Khử trùng mẫu bằng $HgCl_2$ 0,1% trong 10 phút, dùng nước cất vô trùng rửa lại 5-6 lần cho sạch.

- Dùng panh, kéo cắt từng đoạn mẫu có từ 1-2 mắt ngủ cấy vào môi trường MS cơ bản, các thao tác được thực hiện trong tủ cấy vô trùng.

Điều kiện nuôi cấy và môi trường nuôi cấy

- Các mẫu vật được nuôi cấy ở nhiệt độ từ 21-28°C.

- Thời gian chiếu sáng 8-10 giờ/ ngày.

- Cường độ ánh sáng: 1500-2000 lux.

- Môi trường nhân chồi: là môi trường MS* (cải tiến) có bổ xung BAP (Benzyl amino purine) 1mg/l + NAA (1-Naphthyl acetic acid) 0,4 mg/l + đường 30 g/l + thạch 6g/l, pH: 5,8.

- Môi trường ra rễ: là môi trường MS* bổ xung IBA (3-Indol butyric acid) 1mg/l + ABT 0,4mg/l + đường 15g/l + thạch 6,5 g/l, pH: 5,8.

- Hấp khử trùng môi trường ở 121°C, áp suất 1,4 atm trong thời gian 20 phút.

2.2.2. Nhân chồi Bạch đàn.

Sau khi các chồi bất định xuất hiện khoảng (30-45 ngày), đạt chiều cao 1,5-2cm được tách ra và cấy vào môi trường nhân chồi. Sau đó cứ 12-15 ngày cấy chuyển sang môi trường mới, khi cấy loại bỏ những mẫu bị nhiễm khuẩn.

2.2.3. Ra rễ.

Khi chồi đạt chiều cao từ 2,5-3cm thẳng, khỏe mạnh có thể cắt để cấy chuyển sang môi trường hình thành rễ. Mật độ cấy trung bình 40-45 chồi/bình.

2.2.4. Ra ngôi và chăm sóc cây con.

Huấn luyện cây con trong ống nghiệm.

Sau khi cây ra rễ chuyển ra nhà huấn luyện trong điều kiện nhiệt độ tự nhiên, ánh sáng 5000-10000 lux. Thời gian huấn luyện 6-8 ngày để cây quen dần với điều kiện tự nhiên thì tiến hành cấy cây vào bầu đất.

Công đoạn tạo bầu và xử lý bầu ươm cây mô giống như trong phương pháp giâm hom.

Cấy cây.

- Chuẩn bị dung dịch hồ rễ : đất tầng B đã xử lý dung dịch thuốc tím 0,1% tỷ lệ 1đất/1nước trước khi hồ rễ trước 12 tiếng. Khi dùng rửa thuốc tím bằng nước sạch từ 3-4 lần và tạo cho đất ở dạng hồ loãng để hồ rễ cây.

- Lấy cây mầm từ trong lọ, rửa hết thạch bằng nước sạch, nhúng rễ cây vào dung dịch hồ rễ.

- Dùng que cấy cắm vào giữa bầu một lỗ có độ sâu 2-3cm, dùng ngón tay cái và ngón trỏ giữ cho cây thẳng đứng, đưa nhẹ cây vào lỗ có trên bầu, không được làm cong rễ, lấy que cấy ấn nhẹ xung quanh gốc để rễ cây tiếp xúc với đất, cấy đến đâu dùng ô doa tưới nhẹ đến đó.

Chăm sóc cây con.

- Chế độ tưới: 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 (tùy từng điều kiện thời tiết mà điều chỉnh chế độ tưới cho phù hợp).

- 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. Các công đoạn khác cho đến khi cây con xuất vườn giống như phương pháp giâm hom thông thường.

3. Trồng rừng bạch đàn.

3.1. Làm đất.

- Trước khi làm đất phải tiến hành xử lý thực bì.

Tùy điều kiện đất đai, khả năng đầu tư mà lựa chọn biện pháp làm đất thích hợp.

- Cày toàn diện hoặc cày theo băng, cày ngấm theo rạch sâu trên 50cm ở nơi có điều kiện thâm canh và ở nơi đất bí chặt.

- Việc làm đất phải hoàn thành trước khi trồng ít nhất 1 tháng.

- Đào hố theo kích thước 30x30x30cm.

- Lấp hố: lấp hố trước khi trồng 7 -10 ngày, dùng lớp đất mặt trộn đều với phân và đất quanh hố lấp gần đầy miệng hố.

- Những nơi đất ngập nước phải lên líp mới trồng rừng. Líp rộng 1-1,5 m trồng 1 hàng cây. Líp rộng 3-4m trồng 2 hàng cây, độ cao mặt líp cao hơn mặt nước tối thiểu 50cm.

- Nơi ngập phèn nên đắp líp trước một mùa để đất được rửa phèn trước khi trồng thì rừng sẽ sinh trưởng tốt hơn.

- Những nơi đất ngập nước theo mùa thì phải làm mố.

3.2. Bón lót.

Sử dụng phân NPK (5:10:3) để bón lót với liều lượng 100-200g/hố. Nơi có điều kiện bón 2kg phân chuồng hoai/hố. Bón lót được tiến hành đồng thời với lấp hố bằng cách trộn đều với đất ở độ sâu giữa hố, sau đó lấy đất lấp nền.

3.4. Mật độ trồng rừng.

Tùy theo mục đích trồng rừng, điều kiện thâm canh, điều kiện đất đai mà lựa chọn mật độ thích hợp.

- Trồng rừng sản xuất gỗ nguyên liệu có mật độ trồng 1650 cây/ha (3m x 2m), nếu lay go lớn phải tỉa thưa sau khi trồng 3-4 năm chỉ để lại mật độ cuối cùng 600-800 cây/ha.

3.5. Thời vụ trồng.

- Phải trồng vào đầu mùa sinh trưởng.

Cụ thể:

- Các tỉnh miền Bắc trồng vào trung tuần tháng 3 đến tháng 5 và từ tháng 7 đến tháng 9.

- Các tỉnh khu 4 và bắc Trung Bộ từ tháng 9 đến tháng 12.

- Các tỉnh nam Trung Bộ và Nam Bộ: tháng 5-7.

- Các tỉnh Tây Nguyên:

Đông Trường Sơn: tháng 5 - 6.

Tây Trường Sơn: tháng 6 - 7.

Tùy điều kiện khí hậu cụ thể của từng nơi và thời tiết từng năm mà chọn thời vụ trồng thích hợp. Nguyên tắc chung khi chọn mùa trồng rừng là bắt đầu mùa mưa và kết thúc chậm nhất 2 tháng trước khi kết thúc mùa mưa. Thời điểm trồng thích hợp là vào những ngày có mưa hoặc trước khi có mưa 1-2 ngày.

3.6. Kỹ thuật trồng.

Trước khi trồng cần chọn cây giống đồng đều, loại bỏ những cây dập gãy.

Trộn đều đất trong hố, lấp đất đầy hố, sau đó tạo thành lỗ đủ để đặt bầu thấp hơn miệng hố 1-1,5cm. Xé bỏ vỏ bầu, đặt bầu vào lỗ, giữ cho cây thẳng đứng. Lấp đất và lên chặt cho đến khi đất đầy ngang miệng hố.

Sau khi trồng 2-3 tuần tiến hành trồng dặm. Cây trồng dặm phải là cây đủ tiêu chuẩn như cây trồng chính đã được dự trữ trước trong vườn ươm và được chăm sóc đặc biệt để có chất lượng

cao và kích thước tương đương với cây trồng trên đồi, tạo cho cây sinh trưởng phát triển đồng đều.

3.7. Chăm sóc.

Tùy điều kiện lập địa từng nơi mà có biện pháp chăm sóc thích hợp. Thời gian chăm sóc 3 năm đầu, mỗi năm chăm sóc 2-3 lần. Các nội dung chăm sóc cụ thể.

Năm thứ 1:

- Chăm sóc lần 1: được thực hiện sau khi trồng 2-3 tháng. Dây cỏ theo hàng rộng 1m, cắt gỡ dây leo quấn vào thân cây, vun gốc kết hợp với trồng dặm bổ xung.

- Chăm sóc lần 2 kết hợp với phòng chống cháy rừng: vào thời điểm kết thúc mùa mưa bắt đầu chuyển sang mùa nắng. Dây cỏ theo hàng cây, sau đó cây giữa hai hàng cây bằng giàn chảo 7, cây đường bao chống cháy

Ở những nơi không có điều kiện chăm sóc bằng cơ giới: thay biện pháp cây giữa 2 hàng bằng phát dọn cây bụi, cỏ dại thủ công ở

Năm thứ 2 và 3:

- Chăm sóc lần 1: vào thời điểm đầu mùa mưa. Phát dọn toàn diện cây bụi, cỏ dại, cắt gỡ dây leo quấn vào thân cây, kết hợp với bón thúc phân NPK (100-150g/hố).

- Chăm sóc lần 2 Kết hợp với phòng chống cháy rừng: Vào thời điểm cuối mùa mưa bắt đầu chuyển sang mùa nắng. Phát dọn toàn diện cây bụi, cỏ dại, cắt gỡ dây leo quấn vào thân cây theo hàng cây, sau đó cây giữa hai hàng cây bằng giàn chảo 7, cây đường bao chống cháy.

4. Bảo vệ rừng trồng.

- Cây trồng bằng hom rất dễ bị các loài côn trùng như: dế, mối, sâu đất, cào cào, châu chấu cắn phá ở giai đoạn cây con. Biện pháp phòng trừ là rải thuốc vào hố khi trồng cây. Các loại thuốc thông dụng là: lentretr, basudin hộp... Liều lượng khoảng từ 3-5g/ hố.

- Thường xuyên theo dõi tình hình sâu bệnh, khi thấy sâu bệnh xuất hiện kịp thời bắt giết hoặc phun thuốc để phòng trừ tận gốc, không để sâu bệnh phát sinh thành dịch.

- Cấm chăn thả trâu bò vào rừng mới trồng.

- Không cho người vào rừng chặt phá lấy củi, quét lá.

- Có biện pháp chống lửa rừng theo quy định phòng chống cháy rừng. Làm đường băng cản lửa có chiều rộng 5-6 m quanh lô.

- Thường xuyên có người tuần tra, gác gác, bảo vệ rừng, phát hiện ngăn ngừa kịp thời các tác nhân phá hoại kể cả sâu bệnh hại.

5. Khai thác và sử dụng gỗ Bạch đàn.

5.1. Chu kỳ kinh doanh.

Tùy mục đích kinh doanh chu kỳ khai thác có thể thay đổi:

- Đối với gỗ nguyên liệu từ 6-7 năm.

- Đối với gỗ lớn từ 12 năm trở lên.

5.2. Mùa khai thác.

Thường tiến hành vào cuối mùa sinh trưởng, tùy thuộc điều kiện thời tiết và nhu cầu thị trường từng nơi mà có thể thay đổi cho phù hợp.

5.3. Kỹ thuật chặt hạ và phân loại gỗ.

Rừng trồng Bạch đàn thường được khai thác trắng. Dùng dao chặt hoặc cưa máy cắt sát gốc. Cây đứng Bạch đàn sau khi chặt hạ được chia thành nhóm theo đường kính và cắt khúc tùy theo mục đích sử dụng và yêu cầu của khách hàng.

6. Bảo quản gỗ Bạch đàn sau khi chặt.

Gỗ bạch đàn sau khi khai thác cần được bảo quản tạm thời nơi râm mát. Và vận chuyển sớm đến nơi tiêu thụ.

V. HIỆU QUẢ.

- Bạch đàn là loài cây đa tác dụng, mọc nhanh, chu kỳ kinh doanh ngắn, hiệu suất sử dụng gỗ cao, sản phẩm gỗ Bạch đàn dễ tiêu thụ thích hợp cho rừng sản xuất nguyên liệu công nghiệp như: giấy, dăm, gỗ trụ mố, gỗ xẻ....

- Ước tính hiệu quả kinh tế:

STT	Chỉ tiêu	Đ.vị tính	Hiện trạng sản xuất	Khi áp dụng	Tỷ lệ %
1	Năng suất rừng trung bình	M3/ha/năm	8	25	312
2	Suất đầu tư	Triệu đồng/ha	6	15	250
3	Giá trị sản phẩm kinh tế	Triệu đồng/ha	9	30	310
4	Chu kỳ kinh doanh	Năm	7	7	

TÀI LIỆU THAM KHẢO.

Nguyễn Tiến Đại, 2003. Trồng rừng Bạch đàn. Bài tham gia chuẩn bị quy trình nhân giống, trồng và khai thác Bạch đàn, 5 trang.

Đoàn Thị Mai, 2001. Tài liệu tập huấn kỹ thuật nuôi cấy mô - giâm hom. Trung tâm nghiên cứu giống cây rừng, 5 trang.

Đoàn Thị Mai, Nguyễn Việt Cường, Ngô Thị Minh Duyên, Nguyễn Thiên Hương, 2000. Kết quả bước đầu về nhân giống Bạch đàn lai bằng phương pháp nuôi cấy mô phân sinh. Tạp chí Lâm nghiệp, số 10-2000, trang 46-47.

Đoàn Thị Mai và cộng tác viên, 2003. Nhân giống một số loài cây trồng rừng có năng suất, chất lượng cao bằng phương pháp nuôi cấy mô. Bài báo cáo tại Hội nghị công nghệ sinh học toàn quốc 2003.

Đoàn Thị Nga. Tài liệu tập huấn kỹ thuật nuôi cấy mô bạch đàn. Trung tâm nghiên cứu nguyên liệu giấy Phù Ninh.

Lê Đình Khả, 2003. Một số vấn đề cần chú ý khi nhân giống cây rừng bằng hom. Cục phát triển lâm nghiệp. Bản tin 5 triệu hecta rừng, trang 2 -7.

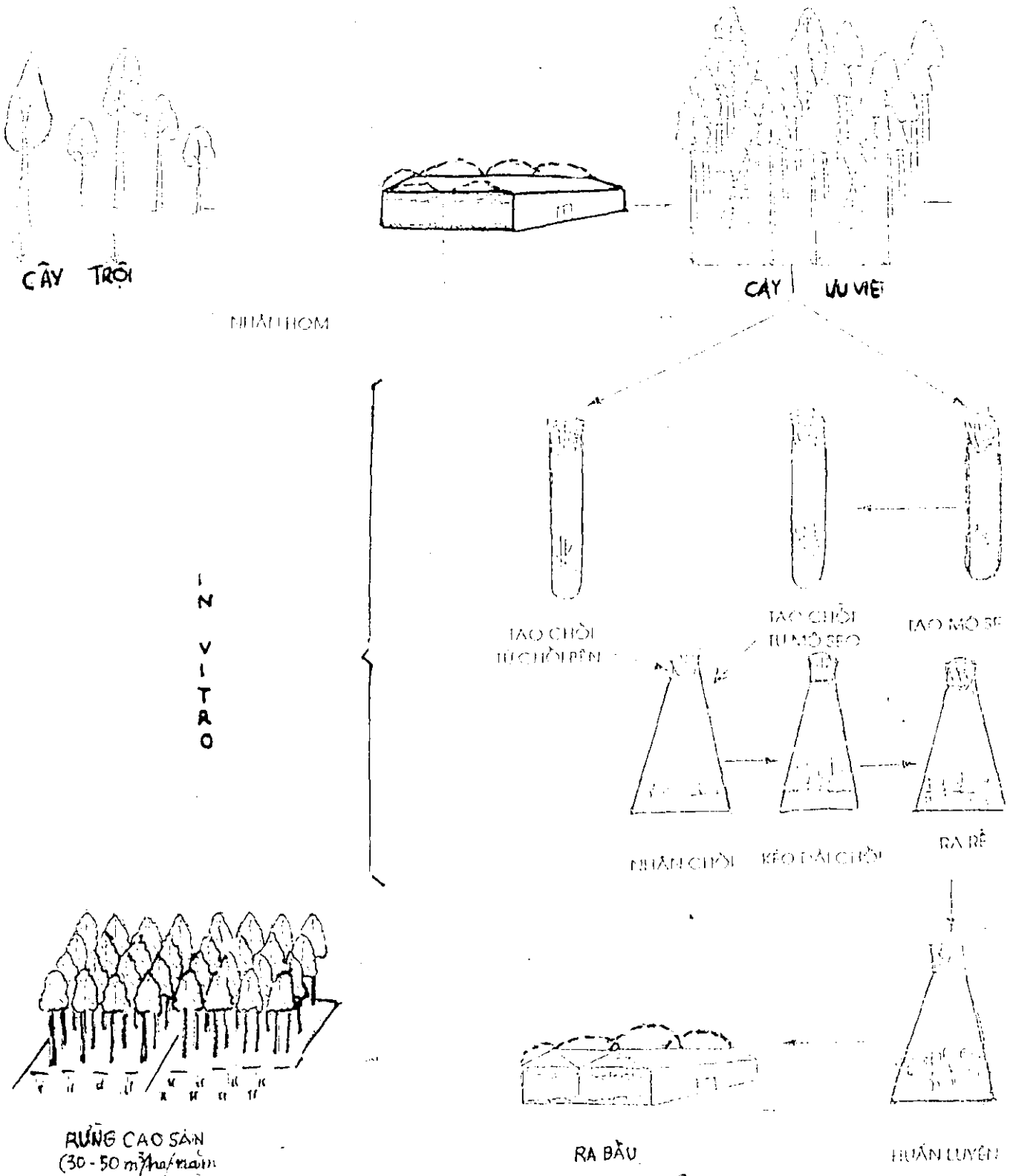
Lê Đình Khả, Đoàn Thị Mai, 2002. Một số phương thức nhân giống trong sản xuất lâm nghiệp. Trong "Công nghệ nhân giống và sản xuất giống cây trồng, giống cây lâm nghiệp và giống vật nuôi. Nhà xuất bản nông nghiệp. Hà Nội, trang 166 - 182.

Nguyễn Ngọc Tân, Trần Hồ Quang, 1997. Nhân giống cây lai giữa Bạch đàn liễu và Bạch đàn trắng bằng phương pháp nuôi cấy mô. Kết quả nghiên cứu khoa học về chọn giống cây rừng. Nhà xuất bản nông nghiệp, trang 103-107.

Trung tâm khoa học và ứng dụng sản xuất nông – lâm nghiệp Quảng Ninh. Quy trình kỹ thuật nhân giống Bạch đàn bằng phương pháp nuôi cấy mô.

Trung tâm nghiên cứu nguyên liệu giấy Phù Ninh. Ứng dụng công nghệ nuôi cấy mô nhân hom trong lâm nghiệp. Tham luận tại hội thảo nuôi cấy mô và nhân hom. Tp. Hồ chí minh 11-1997. 17 trang.

SƠ ĐỒ NHÂN GIỐNG CÂY ƯU VIỆT
BẢNG: PHƯƠNG PHÁP NUÔI CÂY MÔ VÀ TẾ BÀO



BKHCN
VCNSH

BỘ KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ
VIỆN CÔNG NGHỆ SINH HỌC

SẢN PHẨM II - 3

**CÔNG NGHỆ NHÂN GIỐNG KEO LAI
BẰNG GIÂM HOM VÀ NUÔI CẤY MÔ**

**Thuộc đề tài: Nghiên cứu sử dụng công nghệ tế
bào và kỹ thuật chỉ thị phân tử phục vụ chọn
tạo giống cây trồng**

Mã số: KC.04.08

Hà Nội, 11/2004

BỘ NÔNG NGHIỆP VÀ PHÁT TRIỂN NÔNG THÔN
VIỆN KHOA HỌC LÂM NGHIỆP VIỆT NAM

HƯỚNG DẪN KỸ THUẬT

**NHÂN GIỐNG, TRỒNG VÀ KHAI THÁC
KEO LAI NĂNG SUẤT CAO**

Hà Nội, 2004

BỘ NÔNG NGHIỆP VÀ PHÁT TRIỂN NÔNG THÔN
VIỆN KHOA HỌC LÂM NGHIỆP VIỆT NAM

HƯỚNG DẪN KỸ THUẬT

**NHÂN GIỐNG, TRỒNG VÀ KHAI THÁC
KEO LAI NĂNG SUẤT CAO**

Hà Nội, 2004

HƯỚNG DẪN KỸ THUẬT NHÂN GIỐNG, TRỒNG VÀ KHAI THÁC KEO LAI NĂNG SUẤT CAO

Cơ quan biên soạn

*Trung tâm nghiên cứu giống cây rừng
(Viện Khoa học lâm nghiệp Việt Nam)*

1. MỤC TIÊU

Bản hướng dẫn kỹ thuật này giới thiệu những kỹ thuật cơ bản về nhân giống, trồng và chăm sóc rừng trồng, khai thác và bảo quản gỗ keo lai trước khi giao cho bên chế biến nhằm đạt năng suất 20 - 30 m³/ha/năm ở miền Bắc và miền Trung, 30 - 40 m³/ha/năm ở miền Nam; đạt tỷ lệ gỗ nguyên liệu giấy và dăm trên 80 %, tỷ lệ gỗ xẻ thành phẩm trên 45%.

2. PHẠM VI ÁP DỤNG

Bản hướng dẫn kỹ thuật này được áp dụng trong tất cả các thành phần kinh tế, ở những nơi có điều kiện sinh thái thích hợp cho trồng Keo lai đạt năng suất cao, trong cả nước.

3. ĐIỀU KIỆN CẦN THIẾT ĐỂ ÁP DỤNG BẢN HƯỚNG DẪN KỸ THUẬT

3.1. Điều kiện khí hậu

Nhiệt độ không khí trung bình hàng năm: 21 - 27°C, tối cao tuyệt đối dưới 42°C, tối thấp tuyệt đối trên 0°C.

Lượng mưa hàng năm: từ 1700 mm trở lên

Số tháng có lượng mưa trên 100 mm: ít nhất 5 tháng

Lượng bốc hơi hàng năm: dưới 1500 mm

3.2. Điều kiện địa hình và đất đai

Đất trồng rừng Keo lai ở độ cao dưới 500 m (cho các tỉnh miền Bắc), và dưới 800 m (cho các tỉnh miền Nam); có độ dốc dưới 25°; độ dày tầng đất trên 50 cm, độ pH (KCl) cao hơn 4,0 (pH > 4,0), độ đá lẫn (có đường kính trên 0,5 cm) dưới 20%, hàm lượng mùn trước khi trồng trên 1,5%. Đất trồng Keo lai tốt nhất là đất bồi tụ, đất phù sa và phù sa cổ, đất phát triển trên diệp thạch, trên đá riolit. Đất trồng Keo lai để sản xuất gỗ lớn là đất còn tính chất đất rừng và có độ phì cao.

3.3. Nguồn giống

Sử dụng các dòng Keo lai đã qua khảo nghiệm, được nhà nước công nhận và do cơ quan chuyên môn cung cấp

3.4. Điều kiện nhân lực

Có đủ nhân lực được tập huấn về kỹ thuật nhân giống Keo lai, có hiểu biết về kỹ thuật lâm sinh, kỹ thuật nhân giống, trồng rừng và phòng chống sâu bệnh. Hộ gia đình trồng Keo lai cần có tư vấn của cán bộ chuyên môn.

3.5. Cơ sở vật chất

- Có đủ các thiết bị và thuốc phòng chống sâu bệnh và các biện pháp bảo đảm an toàn lao động

- Nơi sản xuất hom phải có nhà giâm hom với hệ thống phun sương được vận hành tốt hoặc có khu giâm hom với đủ thiết bị tưới phun

- Nơi sản xuất cây mô phải có nhà nuôi cấy mô với đủ thiết bị cần thiết.

3.6. Vốn

- Có khả năng đầu tư xây dựng cơ sở nhân giống hom với đủ thiết bị tưới phun cần thiết,

- Có đủ vốn đầu tư bảo đảm trồng rừng cả luân kỳ ở mức thâm canh.

3.7. Luân kỳ trồng

Luân kỳ trồng Keo lai là 6- 8 năm (để làm giấy hoặc dăm) hoặc trên 12 năm (để lấy gỗ xẻ, gỗ bóc, đồ mộc).

4. NỘI DUNG BẢN HƯỚNG DẪN KỸ THUẬT

4.1. Giống Keo lai

Giống Keo lai được dùng để trồng rừng là giống đã được nhà nước công nhận và đã qua khảo nghiệm khu vực hoá. Các giống được trồng phải có năng suất cao, có hình dạng thân đẹp và chưa bị sâu bệnh, có tỷ lệ sử dụng gỗ làm nguyên liệu giấy sợi trên 70%, làm gỗ xẻ trên 45%. Các giống Keo lai được dùng để trồng rừng là BV10, BV16, BV32, BV33, TB6, TB12.

4.2. Công nghệ nhân giống Keo lai bằng giâm hom và nuôi cấy mô

4.2.1. Nhân giống Keo lai bằng giâm hom

Nhân giống Keo lai bằng hom gồm các công việc sau đây:

- Xây dựng vườn cung cấp hom

Vườn cung cấp hom được xây dựng gần vườn ươm, nơi có địa hình tương đối bằng phẳng (đốc dưới 5") và dễ quản lý.

Đất để trồng cây giống có thành phần cơ giới nhẹ hoặc trung bình, để thoát nước, tạt đất sâu trên 50 cm. Phương pháp làm đất là cày bừa toàn diện hai lần và phân loãng hoặc phân khu để gây trồng (tùy điều kiện đất ở từng nơi).

Cây giống trong vườn cung cấp hom được trồng theo hàng cách nhau 0,8 m, cây trong hàng cách nhau 0,5 m.

Trước khi trồng phải bón lót mỗi hố 1 kg phân chuồng và 100 g phân NPK hoặc 300 g phân lân hữu cơ vi sinh.

- Nguồn giống cho vườn cung cấp hom

Nguồn giống để trồng trong vườn cung cấp hom phải là cây nuôi cấy mô được lấy từ giống gốc của các dòng Keo lai đã được nhà nước công nhận và do các cơ quan chuyên môn cung cấp. Sau 4 năm sử dụng để lấy hom phải thay bằng các dòng keo lai mới đã được trẻ hoá bằng cây nuôi cấy mô do các cơ quan chuyên môn cung cấp.

Mỗi cơ sở cần dùng ít nhất 3 dòng Keo lai để nhân giống. Dòng Keo lai nào bị bệnh ở rừng trồng có ảnh hưởng nghiêm trọng đến sinh trưởng và đến tỷ lệ sống phải kịp thời thay bằng dòng khác từ khâu vườn giống.

- Cắt tạo chồi cho cây giống và cắt hom

Cắt tạo chồi lần đầu được thực hiện sau khi trồng 2 tháng bằng cách dùng kéo cắt cành cắt cây ở độ cao 30 cm. Gốc cây đã cắt được khử trùng bằng cách phun thuốc Benlát nồng độ 0,15% (1,5 g thuốc pha trong 1 lít nước) hoặc Benlát-C (hoặc Viben-C) nồng độ 0,3% (3 g trong 1 lít nước) cho ướt đều cả cây thì thôi (thường là 1 lít được phun trên 10 m²).

Sau khi cắt tạo chồi lần đầu 20 - 25 ngày thì cắt hom từ chồi vượt. Từ đó cứ 20 - 25 ngày lại cắt hom một lần tùy theo điều kiện thời tiết trong năm, điều kiện đất đai và chăm sóc ở từng nơi (về mùa hè và chăm sóc tốt thì chỉ sau 20 ngày có thể cắt chồi một lần).

Nơi đất có độ phì cao và được chăm sóc tốt thì số hom cắt được trung bình từ mỗi cây giống như sau:

Năm đầu cắt được 150 - 200 hom.

Năm thứ hai cắt được 350 - 500 hom.

Năm thứ ba cắt được 500 - 650 hom.

Năm thứ tư cắt được 650 - 700 hom.

Sau từng năm cắt hom, cần để cây giống nghỉ một thời gian phục hồi và chăm sóc cẩn thận, đầu vụ giâm hom năm sau lại cắt đốn như kiểu đốn chẻ để cây ra chồi mới.

Thời gian sử dụng cây giống không quá 4 năm. Sau đó phải trồng lại cây giống mới bằng cây mô từ giống gốc do cơ quan chuyên môn cung cấp.

- Chăm sóc cây giống

Sau mỗi lần cắt cành phải kết hợp cắt tỉa cành và tạo tán cho cây giống, khử trùng cho cây giống bằng cách phun Benlát-C hoặc Viben-C nồng độ 0,3% (3 g pha trong 1 lít nước), xới đất chung quanh gốc, làm cỏ toàn diện và vun gốc cho cây.

Đầu mùa xuân hàng năm phải cắt cành tạo tán, làm cỏ và bón thúc cho cây giống bằng 2 kg phân chuồng hoai/cây hoặc 50 g NPK/cây (loại có tỷ lệ 5:10:3, hoặc có tỷ lệ tương tự), hay 150 g phân hữu cơ vi sinh, rồi vun gốc cho cây.

Phải thường xuyên tưới đủ ẩm cho cây giống, song không được để đất bị ướt.

- Cắt cành và cắt hom

Cắt cành lấy hom bằng kéo cắt cành và tiến hành vào buổi sáng. Khi cắt cành phải chừa lại một mắt lá trên cây để ra chồi mới. Cành đã cắt được để ở nơi râm mát hoặc ngâm phần gốc vào nước.

Cắt hom để giâm bằng dao ghép hoặc kéo thật sắc để tránh làm dập hom.

Hom giâm tốt nhất là hom ngọn (hom đoạn một) có chiều dài 12 - 14 cm. Khi cần dùng hom đoạn hai thì mỗi hom phải gồm 2 - 3 lá, song cắt bỏ 1 - 2 lá dưới cùng, chỉ để lại 1 - 2 lá phía trên và phải cắt bớt 2/3 phiến lá. Phần gốc hom phải được cắt vát 45° và phải cắt thật gọn để không bị dập.

- Kỹ thuật giâm hom và thuốc giâm hom

Hom đã cắt được ngâm ngay vào dung dịch Benlát-C nồng độ 0,3% trong 15 - 20 phút, sau đó xử lý ra rễ bằng cách chấm gốc cắt vào thuốc bột TTG (tên viết tắt của Trung tâm nghiên cứu giống cây rừng), hoặc Seradix, hoặc các loại thuốc bột khác được pha trộn từ thuốc gốc IBA (Indol Butiric Acid) với tỷ lệ 1%, hoặc các loại thuốc khác có tỷ lệ ra rễ cao.

- Giá thể giâm hom

Hom Keo lai có thể giâm vào bầu nylon, có đáy và được đục lỗ để thoát nước, hoặc cây trên cát vàng đã được khử trùng bằng Benlát-C nồng độ 0,3% hoặc bằng thuốc tím (KMnO_4) nồng độ 0,1%. Hai loại thuốc này đều được phun ở mức 10 lít trên 100 m².

Bầu giâm hom và bầu cấy cây đều có kích thước 9 x 12 cm. Thành phần ruột bầu là 70% đất vườn ươm (hoặc đất tầng B) và 30% phân ủ tổng hợp; hoặc 89% đất vườn ươm, 10% phân chuồng hoai và 1% phân lân nung chảy.

- Mùa giâm hom

Mùa giâm hom phụ thuộc vào mùa trồng cây ở từng vùng. Nguyên tắc chung là giâm hom được thực hiện trước khi trồng 3 tháng, nếu giâm hom trước quá lâu thì phải có biện pháp hãm cây. Mùa giâm hom thích hợp nhất là các tháng mùa mưa. Ở các tỉnh miền Bắc mùa giâm hom bắt đầu từ tháng 4 và kết thúc vào tháng 10. Ở các tỉnh bắc Trung Bộ mùa giâm hom từ tháng 5 đến tháng 10. Ở các tỉnh miền Nam có thể giâm hom quanh năm, song phải chú ý để phù hợp với mùa trồng cây (bắt đầu giâm hom trước mùa trồng 2 tháng và kết thúc giâm hom trước khi hết mùa trồng 3 tháng).

- Nhà giâm hom

Có hai kiểu nhà giâm hom là nhà mái rút bằng lưới nylon và nhà mái che bằng tấm tôn nhựa. Nhà giâm hom có công suất 1 triệu cây/năm thì diện tích xây dựng là 1000 m², công suất dưới 500.000 cây/năm thì diện tích xây dựng là 500 m².

i. Nhà mái rút bằng lưới nylon

Mái rút bằng lưới nylon xanh hoặc đen có độ che 75% lắp cách mặt nền nhà 2,7 - 3,0 m. Xung quanh nhà, từ nền đến độ cao 2,0 m, được che bằng lưới nylon có độ kín 90%. Từ độ cao 2 m đến mái rút được để trống.

ii. Nhà mái che bằng tôn nhựa trong

Nhà mái che bằng tôn nhựa trong là nhà hai mái có độ dốc 15°, mép dưới mái đặt cao cách nền 3,0 m và rộng hơn nền 0,4 m. Cách nền 2,7 - 3,0 m lắp dàn che kéo rút bằng lưới nylon có độ kín 75%. Xung quanh nhà xây tường cao 30 cm (có chừa phần cửa để ra vào), từ độ cao 30 cm đến 2,0 m được che bằng lưới nylon có độ kín 90%. Từ độ cao 2 m đến mái nhà được để trống.

- Khu giám hom không có mái che

Ở một số tỉnh phía Nam có thể giám hom trực tiếp trong bầu đất tại vườn ươm. Trong trường hợp này việc giám hom được tiến hành dưới giàn phun theo chế độ phun sương từ trên xuống và thời gian ngừng phun rất ngắn (xem mục phun sương).

- Luống giám hom

Luống giám hom được xây theo dạng bể nông trong nhà giám hom. Luống có chiều rộng phía ngoài 1,4 m, phía trong 1,2 m (ở giữa cao hai bên thấp theo dạng sông trâu có độ dốc 3% để thoát nước). Xung quanh là thành bể cao 5 cm, dày 10 cm. Chiều dài luống giám hom thay đổi theo điều kiện cụ thể ở các nhà giám hom. Mặt bể và thành bể được láng xi măng để không thấm nước. Luống giám hom cách nhau 50 cm và có độ dốc 2% theo hệ thống tiêu nước của nhà giám hom.

Luống giám hom có thể có khung vòm che hoặc không.

Luống có khung vòm che thì trên luống có khung vòm được làm bằng sắt tròn có đường kính 8 mm, uốn theo hình cung có chiều rộng phía dưới 1,43 m (để bao lên khung bể), cao 90 cm, được cố định bằng hai thanh dằng. Thanh dằng phía dưới được lắp cách chân khung vòm 10 cm, thanh dằng phía trên được lắp cách thanh dằng phía dưới 50 cm.

Các khung vòm được hàn với nhau bằng các thanh dọc đặt phía ngoài cứ 2 khung thành một khối liền. Các thanh dọc phía trên khung vòm được đặt sao để nylon phủ ngoài không bị đọng nước mưa.

Phun sương

Phun sương cho hom giám được thực hiện theo chế độ phun tự động, bán tự động, hoặc phun tay (nơi chưa có điều kiện). Các vòi phun có lỗ phun (pép phun) 1,0 mm được lắp cách nhau 1 m trên hệ thống ống dẫn nước đặt giữa các luống giám hom. Nước dùng phun sương là nước đã được lọc khử sắt và nhôm.

Khi phun sương theo kiểu phun ngang (được áp dụng cho các bể có khung vòm) thì vòi phun có chiều cao 30 cm được lắp trên các gờ (cao 5 cm) nằm giữa từng luống giám theo chiều dọc luống.

Khi phun sương từ trên xuống (áp dụng cho các luống giám hom không có vòm che) thì vòi phun được đặt ở độ cao 2,0 m dọc theo các luống giám hom (khoảng cách vòi phun trên ống nước vẫn là 1 m).

Trong mùa hè thời gian mỗi lần phun là 5 - 6 giây, thời gian gián cách 10 phút.

Trong mùa đông thời gian mỗi lần phun là 10 giây, thời gian gián cách 1 giờ 30 phút.

Nơi không dùng lưới che thì thời gian mỗi lần phun 4 - 5 giây, thời gian gián cách 20 giây.

- Chuyển cây hom ra vườn ươm hoặc cấy cây hom vào bầu

Sau khi giâm 18 - 20 ngày hom giâm bắt đầu ra rễ, tỷ lệ ra rễ cao nhất có thể đạt 80 - 95% ở quy mô sản xuất.

Khi giâm hom trực tiếp trong bầu đất thì sau 25 ngày dỡ bỏ nilon che khỏi vòm, bớt dần lượng phun và thời gian phun sương để cây quen dần với điều kiện ẩm tự nhiên, sau 30 ngày thì đưa cây hom có lá còn xanh (tức đã ra rễ) xếp vào vườn ươm theo luống rộng 1,0 m rồi vun đất xung quanh như khi cấy cây con.

Khi giâm hom trên nền cát thì sau 25 - 35 ngày (tùy điều kiện thời tiết từng nơi) cấy cây hom đã ra rễ vào bầu đất có thành phần ruột bầu như bầu để giâm hom, sau đó xếp các bầu cây hom lên các luống đã chuẩn bị sẵn ở vườn ươm, che nắng trong tuần đầu và thường xuyên tưới đủ ẩm.

4.2.2. Nhân giống Keo lai bằng nuôi cây mô

Nhân giống bằng nuôi cây mô bao gồm các công đoạn chính là tạo chồi, lấy mẫu, khử trùng, nhân chồi, cho ra rễ và cấy cây vào bầu.

Mỗi đồng vô tính chỉ được dùng nuôi cấy mô trong 10 chu kỳ nhân giống, sau đó phải thay bằng mẫu mới được lấy từ những cây tốt nhất đã qua chọn lọc và đánh giá.

- *Tạo chồi, lấy mẫu và khử trùng*

Tạo chồi để nuôi cấy mô bằng cách cắt cây hom (lấy từ cây giòng gốc) ở độ cao 5 cm để tạo chồi vượt.

Khi chồi vượt cao 15 - 20 cm thì cắt đoạn chồi dài 10 - 15 cm (bò ngọn) để nuôi cấy mô.

Mùa cắt chồi là tháng 4 đến tháng 8 (ở các tỉnh miền Bắc) và các tháng mùa mưa ở các tỉnh phía Nam (thời gian cắt chồi là đầu buổi sáng).

Đoạn chồi đã cắt (dài 10 - 15 cm) được rửa sạch bằng nước xà phòng dưới vòi nước chảy, sau đó lau bằng bông tẩm cồn 70% rồi rửa lại thật sạch bằng nước cất, cắt thành đoạn ngắn có ít nhất một mắt chồi ngủ.

Khử trùng mẫu vật bằng Clorua thủy ngân (HgCl_2) 0,1% trong thời gian 10 phút.

- *Nhân chồi*

Môi trường nhân chồi ban đầu là MS (Murashige và Skooge) cải tiến có bổ sung thêm Riboflavin 0,1 mg/lít, Biotin 0,1 mg/lít, đường sacharo 30 g/lít, Agar-Agar 7 g/lít, và Polyvinyl pyrrolone (PVP) 1 g/lít. Điều chỉnh độ pH = 5,8. Môi trường được hấp vô trùng ở nhiệt độ 121°C ở áp suất 1,4 atm trong thời gian 20 phút. Môi trường đã hấp vô trùng được cho vào bình cấy hình hộp hoặc bình tam giác miệng rộng.

Chồi được nuôi trong bình đặt trên giá có độ chiếu sáng 2500 - 3000 lux, nhiệt độ trong phòng 25°C $\pm$ 2°C.

Trước khi cấy chồi phải khử trùng cho panh gấp bằng cách đốt trên ngọn lửa đèn cồn. Sau khi cấy phải đậy lọ bằng nắp nhựa (bình hình hộp) hoặc nút bông (bình tam giác miệng rộng).

Sau 30 - 40 ngày, khi chồi bắt định dài 1,5 - 2,0 cm, thì cắt và cấy chuyển sang môi trường nhân chồi MS cải tiến trong Agar - Agar 7 g/lít có thêm BAP (Benzylamino purine) 1,5 mg/lít.

Sau đó cứ 25 ngày cấy chuyển một lần cho đến lúc đủ lượng chồi cần thiết để ra rễ.

- *Cho ra rễ*

Ra rễ chồi non Keo lai được thực hiện cả trong môi trường dinh dưỡng lẫn trực tiếp trên cát vàng.

Môi trường ra rễ cho Keo lai là 1/2 MS cải tiến trong 7g/lít Agar-Agar có bổ sung IBA 2 mg/lít đường sacharo 15g/lít và PVP 1 g/lít.

Cho ra rễ trực tiếp trên cát vàng bằng cách cắt chồi dài 2,5 - 3,0 cm bỏ phần gốc, ngâm trong dung dịch Benlat 0,15% trong 10 phút, rồi chấm thuốc bột TTG1 hoặc các loại thuốc bột khác có tỷ lệ ra rễ cao, dùng que chọc lỗ rồi cấy lên cát ở độ sâu 1,0 - 1,5 cm.

- Cấy cây vào bầu

Khi cây mô đã ra rễ hoàn chỉnh thì cấy vào bầu có thành phần ruột bầu như bầu ươm cây hom và chăm sóc như chăm sóc cây hom. Cây ra rễ trong môi trường dinh dưỡng thì trước khi cấy phải rửa sạch Agar-Agar. Sau khi cấy cây mô vào bầu cần chú ý che nắng và bảo đảm ẩm cho cây trong một tuần đầu, sau đó theo chế độ chăm sóc thông thường.

4.2.3. Vườn ươm cây hom và cây mô

- Xây dựng vườn ươm

Vườn ươm được xây dựng gần khu giâm hom và nuôi cấy mô, thuận lợi cho việc tưới tiêu nước và chăm sóc cây ươm. Khi thiết kế vườn ươm phải có đường đi lại cho người và các phương tiện cơ giới, nơi có điều kiện thì lắp đặt hệ thống tưới.

Vườn ươm có công suất 1 triệu cây/năm phải có diện tích 2000 m². Vườn ươm có công suất dưới 500.000 cây/năm có diện tích 1.000 m².

Xây dựng vườn ươm được tiến hành theo các bước san ủi nền, nhát hết cỏ dại, làm luống.

Luống rộng một mét, rãnh luống rộng 30 cm, chiều dài luống thay đổi theo điều kiện cụ thể ở từng nơi. Hướng luống phải phù hợp với điều kiện địa hình và thuận tiện cho việc tưới nước.

- Chăm sóc cây hom và cây mô trong vườn ươm

Cây giống đã được chuyển từ khu nhân giống ra vườn ươm phải kịp thời tưới đủ ẩm, khi cần phải che nắng bằng cách cắm ràng hoặc bằng lưới nylon. Sau đó, tùy điều kiện thời tiết từng nơi mà tưới nước hoặc phun nước, bảo đảm đủ ẩm cho cây giống, song không được để bầu đất bị ứ đọng. Sau khi cấy 15 ngày phải nhổ hết cỏ trên nền luống, trong bầu cây và ở các rãnh luống.

Trong quá trình nuôi dưỡng cây phải kịp thời bấm tỉa các chồi bất định (trên mỗi cây chỉ để một chồi phát triển). Sau khi đưa cây ra vườn ươm hai tháng, khi cây giống cao 25 - 30 cm, thì đưa đi trồng.

Trước khi cây xuất vườn một tuần phải đào bầu, loại bỏ cây bị chết và cây yếu kém để bảo đảm chất lượng rừng trồng và cây trồng có tỷ lệ sống cao.

- Phòng trừ sâu bệnh ở vườn ươm

Cứ 7 - 10 ngày một lần phun dung dịch Benlat-C (hoặc Viben-C) nồng độ 0,3% ở mức 10 lít/100 m² để phòng bệnh thối nhũn hom hoặc bệnh cháy lá ở vườn ươm.

Có thể dùng thuốc Aliette 5g hoà trong 8 lít nước hoặc Supertit 10 cc hoà trong 8 lít nước để phun trên 100 m², cứ 7 - 10 ngày một lần, để phòng chống bệnh cháy lá.

Trong mùa đông - xuân ở các tỉnh miền Bắc thường có bệnh phấn trắng. Khi cây bị bệnh phải kịp thời phun các thuốc diệt bệnh có hợp chất lưu huỳnh, trong đó dung dịch vôi - lưu huỳnh (Calci-polysulfur) là loại thuốc rất có hiệu quả. Thuốc này được phun ở nồng độ tính theo thể tích "nước cốt" khoảng 2% với lượng phun 8 - 10 lít/100 m² vào buổi chiều hoặc vào những ngày mát trời để phòng chống trước lúc bệnh xảy ra. Khi có triệu chứng bệnh thì cứ hai ngày một lần phải phun dung dịch vôi - lưu huỳnh cho đến lúc hết bệnh thì thôi.

"Nước cốt" được chuẩn bị bằng cách lấy 1 kg vôi sống tôi với nước thành dạng sệt. Sau đó cho từ từ 2,3 kg bột lưu huỳnh, trộn đều, đổ thêm 10 lít nước và tiếp tục khuấy đều. Đun nhỏ lửa và khuấy đều cho đến khi sôi, tiếp tục đun, khuấy và cho thêm nước để

giữ lượng nước như ban đầu. Khi dung dịch ngả màu nâu sẫm thì đun thêm 15 phút nữa, sau đó cho lắng đọng và lọc lấy nước trong.

Khi có để phá hại phải dùng bã độc bằng cách trộn cám gạo với thuốc Diptex theo tỷ lệ 1% rắc lên ruộng lúc chiều tối để diệt hoặc đào hố và đổ nước để bắt giết kịp thời. Khi xuất hiện các loại sâu hại khác đều cần kịp thời bắt giết vào đầu buổi sáng, khi sâu còn ở trên cây, không để xảy ra dịch.

Khi sâu bệnh có triệu chứng trở thành dịch thì cần xin tư vấn của các cơ quan bảo vệ thực vật để có biện pháp diệt trừ kịp thời, không để sâu bệnh lan ra diện rộng.

4.3. Trồng rừng Keo lai

- Giống cây trồng và phương thức trồng

Giống Keo lai được dùng để trồng rừng cao sản là các dòng vô tính (cây hom hoặc cây mô) đã được nhà nước công nhận và do cơ quan chuyên môn cung cấp. Các dòng này được trồng theo phương thức hỗn hợp ngẫu nhiên, hoặc hỗn hợp theo khối, hoặc theo hàng để giảm thiểu sâu bệnh hại. Mỗi khu trồng ít nhất 3 dòng vô tính.

- Cách làm đất, đào hố

Đất trồng Keo lai có năng suất cao phải đạt các tiêu chuẩn như đã nêu ở phần trên. Việc làm đất phải được tiến hành một tháng trước khi trồng.

Nơi đất bằng thì làm đất toàn diện bằng cày sâu 25 cm, sau đó cày rạch hàng sâu hơn 50 cm bằng cày một lưỡi theo khoảng cách 3,0 m.

Nơi đất dốc thoải thì làm đất theo băng bằng cách cày sâu hơn 25 cm bằng cày 3 lưỡi theo băng rộng 1,8 m, băng chứa rộng 1,2 m. Cày rạch hàng sâu hơn 50 cm giữa băng cày bằng cày một lưỡi. Trước khi cày cần dọn sạch thực bì và nhổ hết gốc cây.

Đào hố trồng cây theo đường rạch hàng, kích thước hố 30 x 30 x 30 cm.

Làm đất thủ công chỉ áp dụng nơi đất có độ phì cao và có độ sâu trên 1 m. Trong trường hợp này sau khi phát dọn thực bì thì xới đất theo băng rộng 1 m, sau đó đào hố kích thước 40 x 40 x 40 cm

- Bón lót và kỹ thuật trồng cây

Bón lót được tiến hành ngay sau khi đào hố và trước khi trồng ít nhất một tuần. Nơi có điều kiện thì bón lót mỗi hố 3 - 4 kg phân chuồng hoai, 300g NPK (loại phân có tỷ lệ 5:10:3, hoặc có tỷ lệ tương tự) và 50g vôi bột. Nơi không có phân chuồng thì bón mỗi hố 300 g phân lân vi sinh, 250 - 300 g NPK và 50 g vôi bột.

Sau khi bón lót phải trộn đều phân với đất trong hố rồi mới lấp đất. Mặt đất đã lấp thấp hơn đất xung quanh 1,0 - 1,5 cm. Trước khi trộn phân và lấp đất cần kiểm tra lượng phân đã bón trong các hố đào.

Trước khi trồng cần xé bỏ vỏ bầu cho từng cây. Khi trồng cần để cây đứng thẳng, chôn sâu lút trên phần cổ rễ 3 cm, dùng hai tay ém chặt đất xung quanh bầu và cổ rễ. Sau khi trồng mặt đất quanh cổ rễ cần thấp hơn xung quanh 1,0 cm để giữ được nước mưa.

- Mật độ trồng

Mật độ trồng thay đổi theo điều kiện độ phì đất và yêu cầu sản phẩm thu hoạch. Nguyên tắc chung là để lấy gỗ kích thước lớn thì trồng thưa, để lấy gỗ kích thước nhỏ thì trồng dày hơn, không tỉa thưa thì trồng theo mật độ cuối cùng, có tỉa thưa thì trồng dày hơn, nơi đất tốt trồng thưa hơn nơi đất xấu.

Keo lai được trồng theo khoảng cách 2,5 x 3,0 m (mật độ 1330 cây/ha) đến 3,0 x 3,0 m (mật độ 1110 cây/ha), trồng để lấy gỗ xẻ thì đến năm thứ ba phải tỉa thưa.

- Mùa trồng và thời tiết khi trồng

Mùa trồng Keo lai thích hợp nhất ở các tỉnh phía Bắc là từ tháng 4 đến tháng 6, sau đó là từ tháng 7 đến tháng 9; ở các tỉnh nam Trung Bộ và Nam Bộ là từ tháng 5 đến

tháng 7; ở các tỉnh bắc Trung Bộ là từ tháng 9 đến tháng 12; ở các tỉnh Tây Nguyên từ tháng 5 đến tháng 9.

Nguyên tắc chung khi chọn mùa trồng là bắt đầu trồng vào đầu mùa mưa (đặc biệt là thời kỳ có lượng mưa hàng tháng hơn 100 mm), kết thúc trồng chậm nhất 2 tháng trước khi hết mùa mưa.

Thời tiết trồng Keo lai thích hợp là những ngày có mưa nhỏ hoặc ngày trời mát trước khi mưa 1 - 2 ngày.

- Chăm sóc sau khi trồng

Chăm sóc rừng trồng Keo lai được tiến hành trong 3 năm đầu: bắt đầu ngay sau khi trồng một tuần đến hết năm thứ ba thì thôi.

Một tuần sau khi trồng Keo lai phải kiểm tra tỷ lệ sống, kịp thời trồng dặm những cây bị chết, sau ba tuần lại kiểm tra và trồng dặm lần thứ hai.

Sau hai tháng phải cắt hết các thân phụ và cành quá lớn, chỉ để lại một thân chính, đồng thời làm cỏ trong phạm vi 50 cm quanh gốc và vun gốc cho cây. Sau đó, làm cỏ vun gốc một lần nữa vào cuối mùa mưa. Ở các tỉnh miền Nam thì lần chăm sóc cuối sau khi đây có dùng cây giàn chèo 7 để cây băng chống cháy.

Năm thứ hai chăm sóc 2 lần: Lần đầu chặt tỉa các thân phụ, chỉ để lại một thân, chặt tỉa cành quá lớn trên cây, tạo điều kiện cho thân chính phát triển, sau đó để làm cỏ xới đất, bón phân NPK (100 g/cây cách gốc 15 cm) rồi vun gốc cho cây. Lần thứ hai làm cỏ theo hàng và vun gốc cho cây vào cuối mùa mưa (ở các tỉnh miền Nam kết hợp chống cháy bằng cây giàn chèo 7).

Năm thứ ba sau khi tỉa thân phụ và cành quá lớn xới đất làm cỏ theo hàng mỗi bên rộng 50 cm, bón phân NPK quanh gốc ((150 g/cây và cách gốc 20 cm), rồi vun gốc cho cây, phát dọn hết thực bì phân diện tích đất còn lại. Ở các tỉnh miền Nam cần có biện pháp phòng chống cháy bằng cây giàn chèo 7 vào cuối mùa mưa.

Nguyên tắc chung là việc làm cỏ, xới đất kết hợp với bón phân và vun gốc chỉ tiến hành vào đầu mùa mưa hàng năm (từ năm thứ hai đến hết năm thứ ba thì thôi), các lần làm cỏ vun gốc về sau trong năm không phải bón phân, muốn kinh doanh gỗ xẻ phải tỉa thưa. Nơi có mùa khô như các tỉnh miền Nam thì lần chăm sóc cuối cùng trong năm phải kết hợp phòng chống cháy bằng cơ giới như giàn cây chèo 7 lấp sau máy kéo.

- Tỉa thưa

Tỉa thưa cho rừng Keo lai trồng lấy gỗ xẻ, tiến hành vào năm thứ ba và năm thứ năm theo phương thức tỉa dần, mỗi lần có cường độ tỉa 25%. Số cây chừa lại sau tỉa thưa lần cuối là 450 -500 cây/ha. Cây chặt tỉa là những cây sinh trưởng kém, cây cong queo, cây gãy ngọn, cây có cành nhánh lớn, cây bị sâu bệnh v.v.

- Bảo vệ rừng

Sau khi trồng cây 3 tháng phải phòng trừ mối và dế cắn cây mới trồng. Biện pháp phòng chống dế như ở giai đoạn vườn ươm, phòng chống mối bằng cách đặt thuốc dẫn dụ do các cơ sở diệt mối cung cấp và hướng dẫn thực hiện.

Sau khi trồng một năm phải thường xuyên theo dõi tình hình sâu bệnh. Khi thấy sâu bệnh xuất hiện phải kịp thời tổ chức bắt giết hoặc phun thuốc để diệt tận gốc, không để sâu phát sinh thành dịch.

Khi cây bị bệnh ảnh hưởng nghiêm trọng đến sinh trưởng phải kịp thời chặt bỏ, đưa ra khỏi khu rừng và đốt cả cây.

Phòng chống cháy được thực hiện kết hợp trong quá trình chăm sóc rừng, hoặc làm băng cản lửa rộng 5 -6 m quanh lô trồng, hoặc có chòi canh theo quy định bảo vệ rừng.

Cần tuân tra canh gác bảo vệ rừng kịp thời ngăn chặn các tác nhân phá hại.

4.4. Khai thác và bảo quản gỗ tạm thời sau khai thác

Rừng trồng Keo lai được khai thác theo phương thức chặt trắng toàn diện.

- Tuổi khai thác

Tuổi khai thác thay đổi theo mục đích sử dụng gỗ và điều kiện lập địa ở từng nơi. Sử dụng gỗ làm giấy sợi và dăm thì tuổi chặt là 6 tuổi (nơi đất tốt) đến 8 tuổi (nơi đất kém hơn), sử dụng gỗ có kích thước lớn hoặc trung bình thì tuổi chặt là trên 12 tuổi tùy điều kiện lập địa ở từng nơi.

- Mùa khai thác

Khai thác Keo lai được nên tiến hành vào cuối mùa sinh trưởng trong năm. Mùa khai thác ở các tỉnh miền Bắc là vào mùa thu - đông, ở các tỉnh miền Nam là vào mùa khô. Khi cần thiết có thể thay đổi để phù hợp với yêu cầu về gỗ và điều kiện cụ thể ở từng nơi.

- Kỹ thuật chặt hạ, cắt khúc và phân loại gỗ

Kỹ thuật chặt hạ là dùng dao hoặc cưa máy cưa sát gốc cây. Cây đã chặt hạ được cắt khúc tùy theo yêu cầu sử dụng gỗ.

Gỗ có đường kính đầu nhỏ từ 15 cm trở lên thì không bóc vỏ, cắt khúc có độ dài theo yêu cầu của bên mua.

Gỗ có đường kính đầu nhỏ 6 - 14 cm dùng làm nguyên liệu giấy sợi hoặc ván dăm thì bóc vỏ và cắt khúc dài 2 m.

Gỗ có đường kính nhỏ hơn 6 cm và cành nhánh thì cắt khúc theo yêu cầu của người sử dụng.

- Bảo quản gỗ tạm thời sau khai thác

Sau khi cắt khúc cần xếp gỗ theo khối ở chỗ râm mát, thoáng khí để tránh nứt nẻ và hạn chế nấm bệnh xâm nhập, và tổ chức vận chuyển nhanh đến nơi tiêu thụ.

4.5. Hiệu quả trồng Keo lai năng suất cao

Keo lai là giống cây trồng lâm nghiệp mới, không những sinh trưởng nhanh mà còn có khả năng cải tạo đất, cũng như có hiệu suất bột giấy và độ bền của giấy cao hơn Keo tai tượng và Keo lá trầm. Vì thế, được nhiều nơi hưởng ứng gây trồng và hiện đang có diện tích trồng rừng hàng năm lớn nhất ở nước ta.

Có thể thấy năng suất rừng trồng Keo lai ở giai đoạn 5 - 7 tuổi tại một số nơi khảo nghiệm có năng suất cao như Hàm Yên (Tuyên Quang), Bình Thanh (Hoà Bình) và Đồng Hà (Quảng Trị), cũng như một số chỉ tiêu về tiềm năng bột giấy được xác định tại Ba Vì (Hà Tây) như bảng 1 dưới đây:

Bảng 1. Năng suất cao nhất của rừng trồng ở giai đoạn 5,5-7 tuổi (1996 - 2003) và tiềm năng bột giấy của Keo lai

Giống	Năng suất (m ³ /ha/năm)	Chỉ số chất lượng (điểm)	Tỷ trọng gỗ khô kiệt	Hiệu suất bột giấy (%)	Tính chất giấy	
					Độ chịu kéo (m)	Độ chịu gấp (đôi lần)
Keo lai	43 - 45	550 - 570	0,491	50,8	7962	2100-3000
Keo tai tượng	20 - 25	260 - 320	0,474	49,9	5460	1200
Keo lá trầm	10 - 15	150 - 350	0,517	50,5	6285	1700-2000

Như vậy, ở những nơi có độ phì cao năng suất rừng trồng Keo lai có thể gấp hơn 2 lần Keo tai tượng và gấp 4 lần Keo lá trầm, trong khi Keo lai có tỷ trọng gỗ trung gian, hiệu suất bột giấy và tính chất cơ học của giấy lại cao hơn Keo tai tượng và Keo lá trầm. Chứng tỏ trồng Keo lai có thể đưa lại hiệu quả kinh tế gấp 2 lần trồng Keo tai tượng và gấp 3 - 4 lần trồng Keo lá trầm, đặc biệt là trồng để làm nguyên liệu sản xuất

giấy. Nghiên cứu bước đầu ở Nhật Bản cũng thấy gỗ Keo lai của ta có thể làm gỗ dán dùng trong xây dựng.

Điều đặc biệt là ở giai đoạn vườn ươm Keo lai có lượng nốt sần rất cao. Đất dưới tán rừng Keo lai cũng có số tế bào vi sinh vật (TBVSV), số tế bào vi khuẩn cố định đạm (TBVKCĐĐ) rất cao, có dung trọng nhỏ hơn (nghĩa là đất tơi xốp hơn), có hàm lượng mùn cao hơn Keo tai tượng và Keo lá trầm. Chứng tỏ Keo lai có khả năng cải tạo đất cao hơn các loài cây bố mẹ (bảng 2). Trồng Keo lai không chỉ có hiệu quả kinh tế cao mà còn góp phần cải tạo đất một cách đáng kể.

Bảng 2. Một số đặc điểm đất dưới tán rừng Keo lai

Công thức	Số lượng nốt sần ở rễ cây ươm * (cái)	Số TB VSV trong 1 g đất * (x 10 ⁶)	Số TB VKCĐĐ trong 1 g đất * (x 10 ²)	Dung trọng tầng đất 0-10 cm** (g/cm ³)	Hàm lượng mùn tầng đất 0-10 cm ** (%)
Keo lai	40- 80	1780	360	1,06 - 1,23	3,5
Keo tai tượng	6 -9	101	325	1,15 - 1,31	2,5
Keo lá trầm	7 -17	386	290	1,12 - 1,34	2,0
Đất trống	0	18,4	11	1,18 - 1,40	1,4

* Lê Đình Khả, Ngô Quế, Nguyễn Đình Hải (1999), ** Đoàn Ngọc Dao (2003)

5. Một số tài liệu tham khảo chính

Đoàn Ngọc Dao, 2003. Tiếp tục đánh giá sinh trưởng và khả năng cải tạo đất của Keo lai và các loài keo bố mẹ tại một số vùng sinh thái ở giai đoạn sau 5 năm tuổi. Luận văn cao học. Đại học lâm nghiệp, 60 trang.

Nguyễn Tiến Đại, 2003. Trồng rừng Keo lai ở vùng Đông Nam Bộ. Bài tham gia chuẩn bị quy trình nhân giống, trồng và khai thác Keo lai, 7 trang.

Đoàn Thị Mai, 2001. Tài liệu tập huấn kỹ thuật nuôi cấy mô Keo lai. Trung tâm nghiên cứu giống cây rừng, 5 trang.

Lê Đình Khả, 2003. Một số vấn đề cần chú ý khi nhân giống cây rừng bằng hom. Cục phát triển lâm nghiệp. Bản tin 5 triệu hecta rừng, trang 2 -7.

Lê Đình Khả, 1999. Nghiên cứu sử dụng giống lai tự nhiên giữa Keo tai tượng và Keo lá trầm ở Việt Nam. Nhà xuất bản Nông nghiệp, Hà Nội, 207 trang.

Le Dinh Kha, 1996. Studies on natural hybrids of *Acacia mangium* and *A. auriculiformis* in Vietnam. Trong Tree Improvement for sustainable tropical forestry, Cairns, Queensland, Australia. QFRI-IUFRO Conferent, Vol. 2, trang 328 -332.

Lê Đình Khả, Đoàn Thị Mai, 2002. Một số phương thức nhân giống trong sản xuất lâm nghiệp. Trong "Công nghệ nhân giống và sản xuất giống cây trồng, giống cây lâm nghiệp và giống vật nuôi. Nhà xuất bản nông nghiệp, Hà Nội, trang 166 - 182.

Lê Đình Khả, Hà Huy Thịnh, Hồ Quang Vinh, Nguyễn Đình Hải, 2003. Sử dụng một số giống keo acacia có năng suất cao cho các chương trình trồng rừng ở nước ta. Bộ NN&PTNT. Hội thảo giống cây lâm nghiệp, Hà Nội ngày 24 tháng 6, 9 trang.

Lê Đình Khả, Hồ Quang Vinh, 1998. Giống Keo lai và vai trò của cải thiện giống và các biện pháp thâm canh khác trong tăng năng suất rừng trồng. Tạp chí lâm nghiệp, số 9 trang 48 - 51.

Lê Đình Khả, Lê Quang Phúc, 1995. Tiềm năng bột giấy của Keo lai. Tạp chí Lâm nghiệp, số 3, trang 6 - 7.

Lê Đình Khả, Lê Quang Phúc, 1999. Tiềm năng bột giấy của các dòng Keo lai được lựa chọn qua khảo nghiệm dòng vô tính.(chưa xuất bản).

BKHCN
VCNSH

BỘ KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ
VIỆN CÔNG NGHỆ SINH HỌC

SẢN PHẨM II - 4

QUY TRÌNH NHÂN NHANH *IN VITRO* CÂY BA KÍCH QUY MÔ SẢN XUẤT

**Thuộc đề tài: Nghiên cứu sử dụng công nghệ tế
bào và kỹ thuật chỉ thị phân tử phục vụ chọn
tạo giống cây trồng**

Mã số: KC.04.08

Hà Nội, 11/2004

**BỘ Y TẾ
VIỆN DƯỢC LIỆU**

**QUY TRÌNH NHÂN NHANH *IN VITRO*
CÂY BA KÍCH (*Morinda officinalis*. How - Rubiaceae)
VÀ CÂY NGUỒ TẮT (*Achyranthes bidentata* Blume – Amarathaceae)**

Thuộc đề tài nhánh cấp nhà nước: Sử dụng công nghệ tế bào thực vật để phục tráng, nhân nhanh và xây dựng hệ thống sản xuất giống ba kích và ngưu tất có chất lượng cao bắt nguồn từ *in vitro*.

Mã số: KC 04 – 08

Chủ nhiệm đề tài nhánh: TS. Phạm Văn Hiến

Cơ quan chủ trì đề tài nhánh: Viện Dược liệu- 3B Quang Trung, Hà Nội

Điện thoại: 8252644 – 8247057 – 8257904. **Fax:** 84-4- 8254357.

E-mail: imm@fpt.vn

Những người thực hiện chính:

CN. Vũ Hoài Sâm

ThS. Nguyễn Trần Hy

CN. Tạ Như Thục Anh

KS. Trần Thị Liên

I - Giới thiệu chung

1. Cây ba kích (*Morinda officinalis*. How – Rubiaceae)

Theo y học cổ truyền, ba kích là vị thuốc có tác dụng bổ trí não, trợ dương, ích tinh, mạnh gân cốt, chữa các bệnh về tình dục, người già mệt mỏi, kém ăn, ít ngủ nhưng không có biểu hiện về bệnh lý. Đặc biệt, tuy giúp bình thường hóa và cải thiện tình dục nhưng ba kích không kích dục, không có tác dụng kiểu androgen và không độc. Gần đây, thành phần hóa học và nhiều tác dụng dược lý mới của ba kích đã được phát hiện như chống stress, chống trầm cảm, và chống oxy hóa.

Với phương châm “phòng bệnh hơn chữa bệnh” của ngành y tế, việc nghiên cứu sản xuất các loại thuốc bổ để tăng cường sức khỏe thường xuyên của cộng đồng, góp phần ngăn ngừa bệnh tật ngày càng tăng được đẩy mạnh. Trong bối cảnh đó, ba kích đang trở thành một trong những cây thuốc bản địa độc đáo của nước ta. Mặt khác, ba kích lại là cây chỉ thích hợp để trồng xen ở đất đồi, không cạnh tranh về đất với các cây trồng khác, vì vậy, nó có ý nghĩa to lớn cho việc tăng thu nhập cho đồng bào vùng cao.

Trước những năm 1970, nguồn ba kích chỉ dựa vào việc khai thác tự nhiên từ rừng thuộc một số tỉnh phía Bắc như Tuyên Quang, Yên Bái, Phú Thọ, Lạng Sơn, Hà Bắc, Quảng Ninh, Hoà Bình và Hà Tây. Do nhu cầu trong nước và thế giới ngày càng tăng nên ba kích mọc hoang bị khai thác ngày càng kiệt quệ. Mặt khác, rừng ở vùng phân bố của ba kích bị tàn phá nghiêm trọng khiến cây lâm vào tình trạng gần như tuyệt chủng và bị liệt vào sách đỏ Việt Nam. Vì vậy, việc nghiên cứu trồng cây ba kích là con đường duy nhất để duy trì và phát triển nguồn thuốc quý này.

Nhưng hiện nay, việc nhân giống là một tồn tại, cản trở việc mở rộng diện tích trồng ba kích. Cây trồng sau 15 tháng mới có 3,5 % số cây ra hoa và sau 22 tháng mới có 1,2 % số cây đậu quả. Sau 3 năm, tỷ lệ này cũng chỉ đạt khoảng 30 % và hệ số nhân giống bằng hạt chỉ đạt 1,1/năm. Ba kích cũng có thể nhân giống bằng cành giâm, nhưng hệ số nhân của phương pháp này chỉ đạt 0,61/năm, mặc dù đã sử dụng các chất kích thích sinh trưởng. Tóm lại, các phương pháp nhân giống truyền thống như gieo hạt, giâm cành không thể đáp ứng nhu cầu về cây giống để phát triển trồng ba kích, ít nhất trong vòng 15 – 20 năm tới, chưa kể đến những hạn chế của phương pháp này đối với sự sinh trưởng, phát triển, năng suất và chất lượng của cây giống. Vì vậy, việc sử dụng công nghệ tế bào thực vật để nhân nhanh ba kích là yêu cầu rất cấp bách.

2. Cây nguru tất (*Achyranthes bidentata* Blume – Amaranthaceae)

Rễ củ nguru tất là vị thuốc quan trọng và phổ biến trong y học cổ truyền, rất công hiệu đối với các bệnh có căn nguyên từ gan, thận, đau lưng, mỏi gối, viêm thấp đa khớp, chân tay co quắp, bại liệt... Nguru tất có mặt trong hàng trăm bài thuốc đông y khác nhau và đã được bào chế thành các dạng thuốc lưu hành rộng rãi trên thị trường như viên Bidentin dùng để chữa tăng cholesterol máu, rối loạn lipoprotein máu, cao huyết áp, viên Dentonin chữa viêm lợi và viêm quanh răng.

Là một cây di thực (1960) đã trở thành cây bản địa, nguru tất được trồng trên quy mô lớn ở đồng bằng và trung du Bắc bộ trong cơ cấu cây trồng vụ đông với sản lượng hàng ngàn tấn, đạt hiệu quả cao hơn nhiều cây rau màu vụ đông khác. Tuy nhiên, mấy năm gần đây, trong khi nhu cầu trong nước và thế giới ngày càng tăng thì diện tích trồng nguru tất lại dần bị thoái hóa theo chiều hướng ra hoa sớm, củ nhỏ, nhiều xơ, năng suất giảm và vì vậy làm nản lòng người trồng do hiệu quả kinh tế thấp.

Bình thường, nguru tất gieo trồng vào tháng 9 – 10, đến khi sắp thu hoạch (tháng 4-5 năm sau) mới ra hoa. Nhưng hiện nay, cây trồng sau 2-3 tháng đã ra hoa (tháng 12-1) thậm chí có năm cây ra hoa vào tháng 11. Việc phục tráng và thiết lập một hệ thống sản xuất hạt giống nguru tất có chất lượng cao là một nhu cầu bức xúc. Cho đến nay, chưa có công trình nào nghiên cứu để giải quyết vấn đề này một cách triệt để để ứng dụng vào sản xuất.

II - Địa chỉ áp dụng

Các phòng nghiên cứu sản xuất giống, sản xuất dược liệu. Đặc biệt thích hợp với các phòng nuôi cấy mô của các tỉnh miền núi và trung du Việt Nam.

III – Trang thiết bị và các hoá chất đi kèm

1. Trang thiết bị:

Trang thiết bị của một phòng nuôi cấy mô cơ bản, như: máy cất nước chai lần, ống nghiệm và bình tam giác thủy tinh chịu nhiệt, nồi hấp được đặt ở chế độ 116°C , áp suất $0,8\text{kg/cm}^2$ trong 40 phút, tủ cấy laminar, máy đo pH và các dụng cụ để thao tác khi pha môi trường và trong tủ cấy.

Phòng nuôi được duy trì ở nhiệt độ $25-27^{\circ}\text{C}$, độ ẩm $\leq 70\%$, cường độ chiếu sáng là 2000 lux với chu kỳ chiếu sáng 14 giờ/ngày.

2. Hoá chất:

Chuẩn bị các dung dịch mẹ: dung dịch khoáng theo môi trường của Murashige và Skooge năm 1962 (MS)

MS1	NH_4NO_3	33 g	} Pha trong 2 lít
	KNO_3	38 g	
	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	8,8 g	
	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	9,2 g	
	KH_2PO_4	3,4 g	
MS2	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2,785 g	} Pha trong 0,5 lít
	EDTA	3,725 g	
MS3	H_3BO_3	310 mg	} Pha trong 0,5 lít
	MnSO_4	1115 mg	
	ZnSO_4	430 mg	
	KI	41,5 mg	
	Na_2MoO_4	12,5 mg	
	CuSO_4	1,25 mg	
	CoCl_2	1,25 mg	

Thành phần của một lít môi trường cơ bản:

MS1 (100 ml) + MS2 (5 ml) + MS3 (10 ml) MS

Pyridoxin (VTM B ₆)	0,5 mg	} VTM
A. nicotinic	0,5 mg	
Thiamin (VTM B ₁)	0,1 mg	
Glicin	3 mg	
Adenin	5 mg	
Inositol	100 mg	

Thạch (agar) 7 g/l

Đường sucrose

Than hoạt tính (THT) 0,5 g/l

Các chất điều tiết sinh trưởng:

Cytokinin: 6- benzyladenin purin (BAP); kinetin (Kn)

Auxin: β -indol butiric acid (IBA); α -naphthyl acetic acid (α – NAA)

IV – Qui trình

1- Cây ba kích

Bước 1: Lấy mẫu:

Các mẫu được chọn để đưa vào nuôi cấy là các đốt thân (single-node) dạng bánh tẻ từ cây ngoài tự nhiên.

Bước 2: Khử trùng mẫu:

Lấy ngọn chồi và đốt thân (dài 1-1,5 cm) rửa sạch bụi đất bằng nước máy, ngâm trong nước xà phòng loãng từ 10 -12 phút và lắc đều, sau đó, ngâm trong thuốc diệt nấm 30 phút, rồi tráng sạch thuốc diệt nấm bằng nước máy. Khử trùng bề mặt mẫu trên bằng HgCl_2 0,07 % trong 10 phút trong điều kiện vô trùng (trong tủ cấy laminar), sau đó, tráng lại nhiều lần bằng nước cất vô trùng, rồi cấy vào môi trường dinh dưỡng.

Bước 3: Cấy khởi động

Mẫu sau khi được khử trùng cấy vào môi trường : (BS1)

MS + VTM + 30 g/l đường + 0,7 g/l thạch + 0,5 mg/l Kn + pH 5,8.

Sau 4 tuần, từ mỗi đốt thân phát sinh ra 2 chồi nách ở 2 nách lá của đốt thân. Sau 8 tuần, chồi cao từ 4 -6cm và có từ 4-5 đốt thân.

Bước 4: Giai đoạn nhân nhanh

Cắt các chồi thu được ở giai đoạn khởi động thành từng ngọn và từng đốt thân riêng lẻ (khoảng 1cm), cấy cả 3 loại mẫu: ngọn, đốt và phần gốc còn lại vào một trường tối thích cho giai đoạn nhân nhanh, môi trường (BS2):

MS + VTM + 3 mg/l BAP + 30 g/l đường + 7mg/l thạch + pH 5,8

Sau 75 ngày nuôi cấy, trung bình mỗi mẫu cho khoảng 20 chồi, với chiều cao mỗi chồi từ 2-5cm tương ứng với 2-6 đốt thân.

Bước 5: Giai đoạn tạo cây hoàn chỉnh

Tách các chồi đạt tiêu chuẩn từ 3-4 đốt thân trở lên cấy vào môi trường tạo rễ, (BS3):

1/4 MS + VTM + 0,5 g/l THT + 7 g/l thạch + pH 5,8

Nuôi ở giai đoạn này từ 1 – 5 tháng.

Các chồi không đạt tiêu chuẩn trên tiếp tục được cấy chuyển vào môi trường nhân nhanh như bước 4.

Bước 6: Giai đoạn đưa cây ra vườn ươm

Thường tiến hành vào mùa xuân, hè và thu rồi nuôi tiếp đến tháng 2 năm sau.

Cho cây làm quen dần với môi trường tự nhiên bằng cách đưa bình nuôi ra khỏi phòng nuôi, đặt ở điều kiện nhiệt độ và ánh sáng phòng.

Có hai cách tạo cây giống ngoài vườn ươm, đó là:

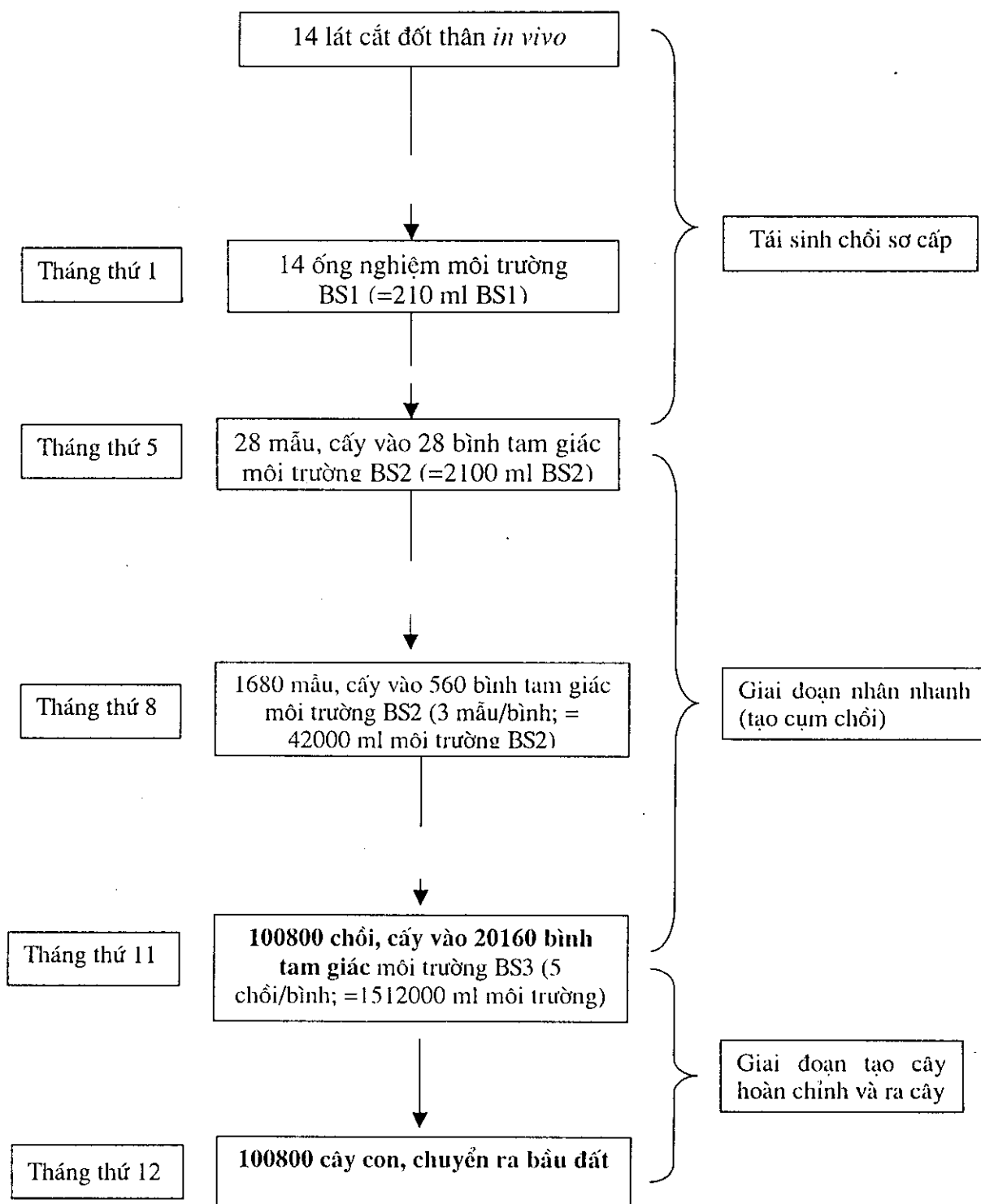
Cách 1: Tạo rễ *ex vitro*

Tách các chồi *in vitro* có từ 4 đốt trở lên ($\geq 4\text{cm}$) khỏi cụm, rửa sạch môi trường bằng nước thường, nhúng nhanh (quick-deep) vào dung dịch IBA (1 mg/l), rồi cấy vào bầu nylon chứa hỗn hợp đất màu, trấu hun và phân mục (6:2:1) và nuôi ở điều kiện môi trường phun sương với tần suất 15 phút/giờ. Sau 7 –10 ngày các chồi hình thành rễ.

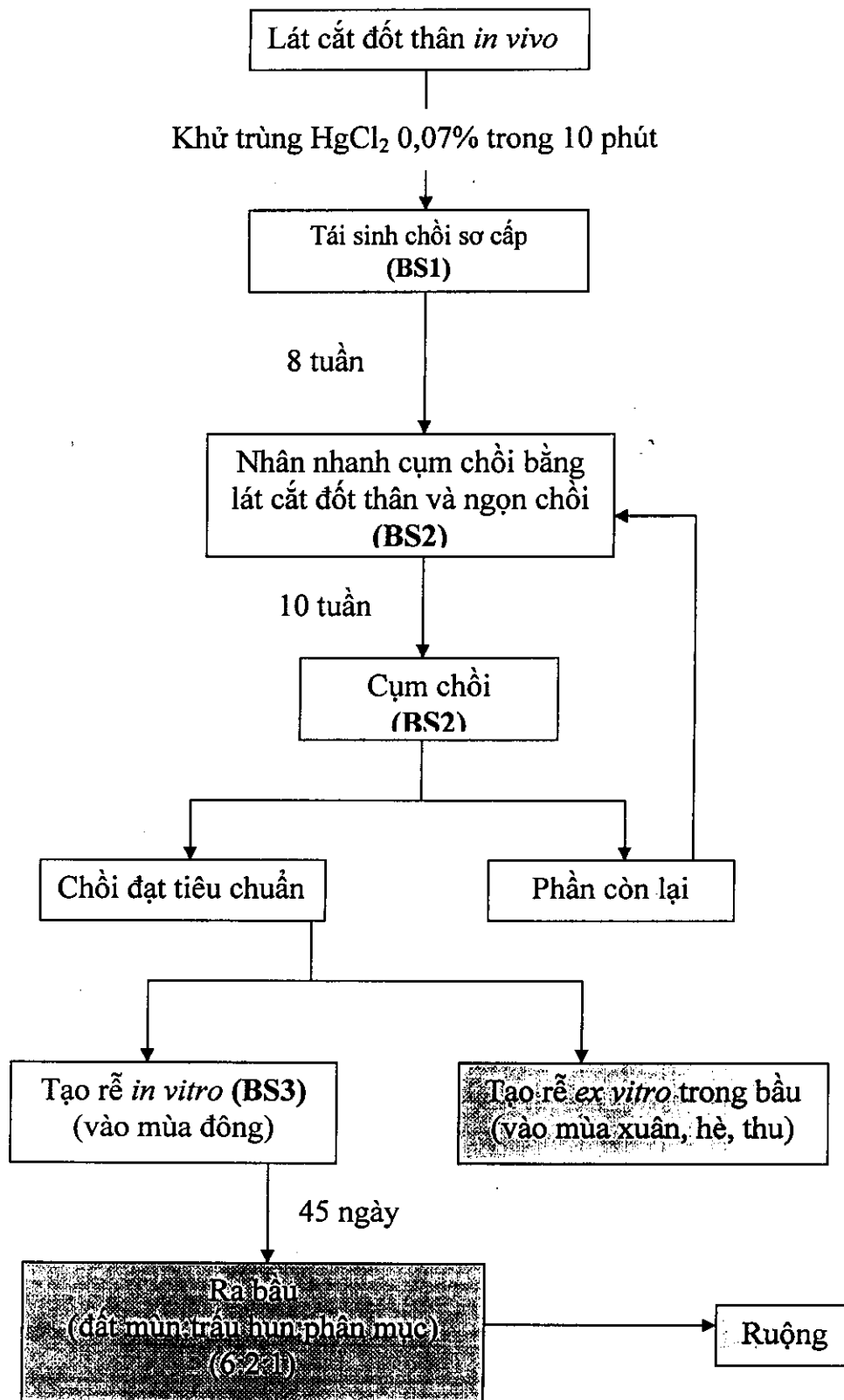
Cách 2: Đưa cây con ra bầu

Rút cây con *in vitro* ra khỏi bình, rửa sạch thạch bám ở rễ rồi cấy vào bầu nylon và nuôi trong điều kiện môi trường như trên. Thời điểm thích hợp cho phương pháp này là từ tháng 3 đến tháng 5 trong điều kiện thời tiết ở Hà Nội.

Các bước tiến hành trên được mô tả bằng qui trình sau:



Các bước tiến hành trên được mô tả bằng qui trình sau:



2. Cây nguru tất

a) Nhân nhanh *in vitro* bằng phương pháp tái sinh trực tiếp

Bước 1: Lấy mẫu

Lấy đoạn gốc thân (thường được gọi là mắt cua) trước khi mầm ngủ phát động, dài 1- 1,5cm từ cây đã được chọn lọc.

Bước 2: Khử trùng

Khử trùng các đoạn gốc thân trên tương tự như đối với ba kích

Bước 3: Cây khởi động (Tạo cây *in vitro* sơ cấp)

Các mẫu sau khi khử trùng được cấy vào môi trường NS1, bao gồm các thành phần sau:

MS + 0,1 mg/l IBA + VTM + 20 g/l đường + pH 5,8 (NS1)

Sau 40 ngày, 2 chồi ngủ phát sinh ở mắt cua, cao tới 11cm nhưng chỉ có trung bình 2-3 đốt.

Bước 4: Nhân nhanh

Cắt ngọn chồi và đốt thân cây nguru tất *in vitro* (dài 1- 1,5cm) cấy vào môi trường:

MS + VTM + 20 g/l đường + 7g/l thạch + pH 5,8 (NS2)

Cấy truyền nhiều lần để nhân được số cây cần thiết. Cứ sau mỗi 30 ngày cấy chuyển một lần. Cây nhân trong môi trường này không cần phải qua giai đoạn tạo rễ và có thể đưa thẳng ra bầu.

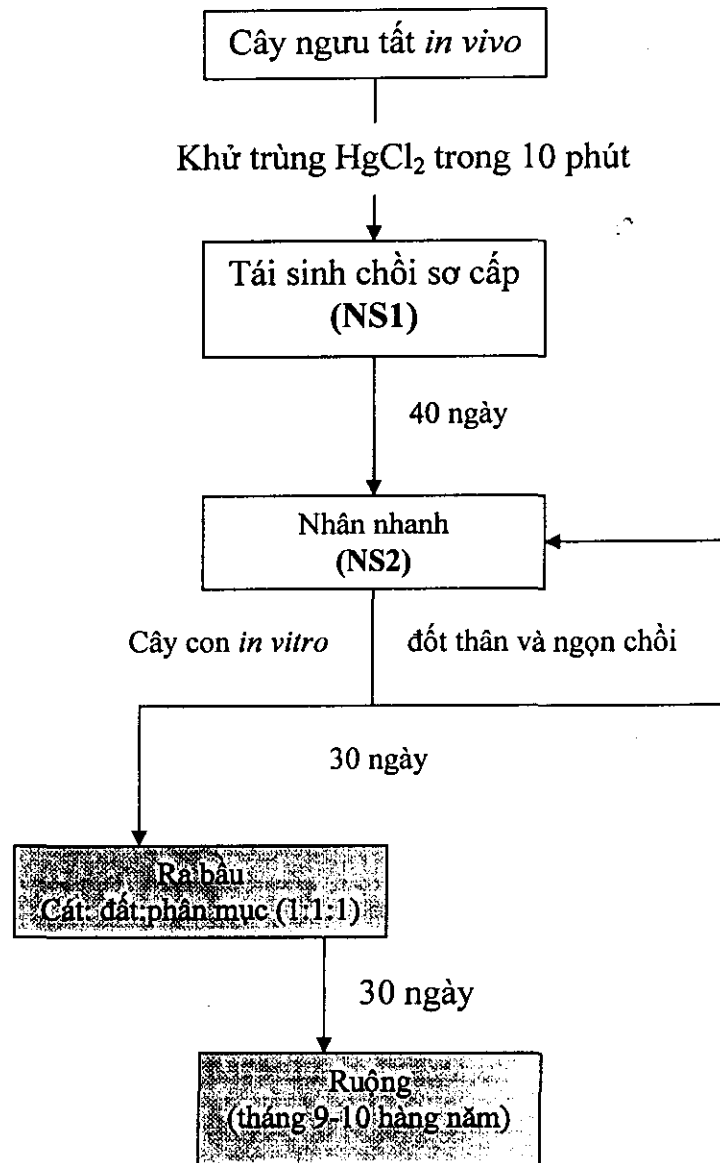
Bước 5: Đưa cây ra vườn ươm (thường thực hiện vào tháng 9- tháng 10 hàng năm)

Sau 30 ngày nuôi trong ống nghiệm, cây nguru tất con được chuyển ra vườn ươm theo phương pháp như sau: Cây con được rửa sạch khỏi môi trường nuôi cấy bám trên rễ, sau đó trồng vào bầu nylon chứa cát + đất + phân mục (1:1:1). Đặt các bầu này trong điều kiện vườn ươm và tưới ẩm hàng ngày. Sau 30 ngày đưa cây ra ruộng trồng để thu hạt.

b) Nhân *in vitro* bằng con đường gián tiếp:

Mô sẹo tạo được từ gian đốt thân (internode) cây *in vivo* và từ hypocotyl đều bị hóa nâu trong quá trình cấy truyền. Chưa tìm được biện pháp khắc phục.

Quy trình nhân nhanh cây ngư tử:



V- Một số điều cần lưu ý:

1. Cây ba kích:

- Qui trình được hoàn thiện trong khoảng thời gian 1 đến 1,5 năm, với hệ số nhân là $3,7 \times 10^4$ / năm.
- Giai đoạn toạ rễ *in vitro* nên được thực hiện vào mùa đông để đến mùa xuân có thể đưa cây ra bầu

2. Cây ngư tử:

- Vì ngư tử là cây có nhiều hạt và nhân giống khá dễ dàng bằng hạt, nên phương pháp này chỉ áp dụng cho việc nhân nhanh những cá thể đầu dòng đã được chọn lọc. Đó là những cá thể có thời gian sinh trưởng sinh dưỡng kéo dài, chậm ra hoa và cho năng suất củ cao.
- Vào thời vụ của ngư tử (tháng 9- 10 hàng năm), tạo cây con *in vitro* để đưa ra ngoài.
- Qui trình nhân nhanh *in vitro* ngư tử kéo dài trong 1 năm, với hệ số nhân là 12^9 /năm.

BKHCN
VCNSH

BỘ KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ
VIỆN CÔNG NGHỆ SINH HỌC

SẢN PHẨM II - 5

**QUY TRÌNH NHÂN NHANH *IN VITRO*
MỘT SỐ GIỐNG ĐỊA LAN QUY MÔ BÁN
SẢN XUẤT**

**Thuộc đề tài: Nghiên cứu sử dụng công nghệ tế
bào và kỹ thuật chỉ thị phân tử phục vụ chọn
tạo giống cây trồng**

Mã số: KC.04.08

Hà Nội, 11/2004

Qui trình nhân nhanh *in vitro* một số giống địa lan quy mô bán sản xuất

Qui trình nhân nhanh một số giống địa lan bằng kỹ thuật nuôi cấy mô bao gồm các giai đoạn: điều tra thu thập nguồn mẫu giống; khử trùng; xác định cơ quan nuôi cấy, kích thước, tìm nồng độ chất điều tiết sinh trưởng thích hợp cho sự phát sinh hình thái của cơ quan này; nhân nhanh bằng kỹ thuật cắt lớp mỏng; tạo cây hoàn chỉnh; xác định tiêu chuẩn của cây invitro; thời vụ ra cây, giá thể ra cây, xác định chế độ dinh dưỡng thích hợp.

Các giai đoạn này được thực hiện như sau:

TRONG PHÒNG THÍ NGHIỆM

Chuẩn bị môi trường nuôi cấy: Môi trường sử dụng trong qui trình nhân một số giống địa lan được mô tả dựa trên môi trường khoáng cơ bản theo Murashige và Skoog (1962) gồm các thành phần ghi dưới đây:

Lượng pha 1 lít dd mẹ

Lượng lấy cho 1 lit môi trường

1. Đa lượng

NH_4NO_3	33,0g	Lấy 50ml/1lít
KNO_3	38,0g	
$\text{MgSO}_4.7\text{H}_2\text{O}$	7,4g	
KH_2PO_4	3,4g	
* $\text{CaCl}_2. 2\text{H}_2\text{O}$	8,8g	($\text{CaCl}_2. 2\text{H}_2\text{O}$ pha riêng)

2. Vi lượng

H_3PO_3	620,0mg	Lấy 10ml/1lít
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	2230,0mg	
$\text{ZnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	860,0mg	
KI	83,0mg	
$\text{MoO}_4 \text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	25,0mg	
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	2,5mg	
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	2,5mg	

3. Sắt

$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	5,56mg	Lấy 5ml/1lít
Na_2EDTA	7,46mg	

4. Vitamin

Glycine	400,0mg	Lấy 5ml/1lít
Axit Nicotinic (B_5)	100,0mg	
Pyridoxin (B_6)	100,0mg	
Thiamin HCl (B_1)	20,0mg	

*Inositol 100,0mg/ 1lít

pH = 5,8 - 6,0

Các thành phần hoá chất dùng trong pha chế môi trường nuôi cấy được pha thành 5 dung dịch mẹ như sau:

Dung dịch ĐL: Muối khoáng chính(trừ CaCl_2), được cân lượng như ở bảng trên đây, hoà tan từng chất, pha hỗn hợp và lên thể tích 1lít. Khi dùng pha 1lít môi trường thì dùng 50ml lượng dung dịch này

+ **Dung dịch CaCl_2 :** Cân lượng 8,8g hoà tan bằng nước cất rồi lên thể tích 1 lít. Dùng 50 ml dung dịch này khi pha 1lít môi trường.

+ **Dung dịch vi lượng:** chúng ta cân lượng hoá chất như ở bảng trên(pha mẹ cho 200 lit môi trường), pha tan từng chất với nước cất, rồi lên thể tích là 1 lít. Khi pha môi trường lấy 10ml dung dịch này.

+ **Dung dịch sắt:** cân riêng và hoà tan hai lượng muối trên bằng nước cất nóng vừa pha vừa đun nhẹ.

+ **Dung dịch vitamin:** Thành phần gồm các vật chất hữu cơ và vitamin. Cân lượng các chất như trong bảng dưới đây, pha trong nước cất thành 1 lít.

Ghi chú: 5 loại dung dịch trên đều phải bảo quản ở 4 °C.

Môi trường khoáng cơ bản được bổ xung thêm các chất kích thích sinh trưởng tùy theo mục đích sử dụng như BA để kích thích tái tạo protocorm, kinetin có tác dụng tái tạo chồi từ lát cắt mỏng, αNAA và than hoạt tính có tác dụng tạo rễ hình thành cây hoàn chỉnh. Về tính năng tác dụng của những chất kích thích sinh trưởng đó có thể nêu như sau:

BA(tên đầy đủ là benzyladenin) có hoạt tính auxin, nhưng không mạnh như kinetin. Sự có mặt của BA với nồng độ thích hợp trong môi trường nuôi

cây tạo nên sự cân bằng mới về các chất điều hoà sinh trưởng, khiến cho ưu thế chồi ngọn bị phá vỡ, chồi phát triển thành cụm chồi.

Kinetin là một hoạt chất có nguồn gốc tự nhiên thuộc nhóm Cytokinin, kích thích phân bào và tạo chồi với mô phân sinh. Trong môi trường cân bằng động với BA, Kinetin cho phép giữ cho khối mô nuôi cấy phát triển theo một dạng nhất định, chẳng hạn như dạng cụm chồi non hoàn toàn hay cụm chồi cho nhiều chồi già.

α NAA(tên đầy đủ là Naptinaxeticacid) có hoạt tính auxin. Sự có mặt của α NAA ở nồng độ thích hợp trong môi trường nuôi cấy tạo nên sự cân bằng mới về các chất điều hoà sinh trưởng, từ đó có quá trình tái tạo rễ.

Than hoạt tính tuy không phải là chất điều tiết sinh trưởng nhưng nó có tác dụng hấp phụ bớt các chất điều tiết sẵn có còn tồn dư ở giai đoạn nhân nhanh, làm cho mối cân bằng giữa auxin và cytokinin thuận lợi theo xu hướng thuận lợi cho việc hình thành rễ.

Pha 100 ml mỗi loại chất BA, kinetin, α NAA theo tỷ lệ 1:1 như sau:

Cân 100mg mỗi loại, cho vào lọ thủy tinh sạch, thêm NaOH 0,1N cho đến khi tan hết và rồi lên thể tích là 100ml. Khi sử dụng lấy các chất ĐTST phải sử dụng các dụng cụ sạch.

Tiến hành pha chế môi trường: mỗi mẻ là 20 lít

Phần 1: Cân 130g agar bột vào nồi đun môi trường (nồi thủy tinh hay kim loại) thêm khoảng 5 lít nước cất, đặt lên bếp đun cho thạch tan hoàn toàn.

Phần 2: Cân 200g đường saccaroza+ 2 lít nước+ 1 lít dung dịch ĐL+1 lít dung dịch CaCl_2 +0,2lít dung dịch vi lượng+ 0,1 lít dung dịch sắt + 0,1 lít dung dịch vitamin+ 2g myo inositol+ nước dừa...đo pH và chỉnh về 5,8 bằng các dung dịch NaOH 0,1N; HCl 0,1N

Trộn hai phần với nhau thêm nước cất cho đủ thể tích 20 lít. Dùng máy phân phối môi trường cho vào các bình tam giác là 50 hay 70ml, nút bình tam giác bằng bông không thấm nước, bọc ngoài nút bông là nút giấy và khử trùng 20 phút ở 120°C . Tiến hành đặt các bình tam giác này ở nơi khô mát, vô trùng trong khoảng 2 tuần.

Lấy mẫu vật: Chồi đỉnh, mắt ngủ trên các chồi non được tách ra từ các cây mẹ khoẻ mạnh. Tiến hành tách cắt các chồi bên có chiều cao từ 3 đến 5 cm.

Khử trùng: Dụng cụ được sử dụng trực tiếp khi khử trùng là các bình trụ có nắp. Các chồi bên được sơ rửa sạch bằng dung dịch nước xà phòng.

Lần 1: dùng HgCl_2 0,1% khử trùng trong 7 phút.

Lần 2: bóc loại bỏ hoàn toàn lá bao ngoài, khử trùng lại bằng HgCl_2 0,1% trong 2 phút.

Cây mẫu vật và kích thích quá trình phát sinh hình thái: dùng dao mổ đã vô trùng tách bỏ hết phần vỏ lá bao, phần mô đã bị tổn thương do khử trùng, để lại những phần chồi bên tinh sạch có kích thước nhỏ khoảng 5x5mm. Dùng panh cấy lên môi trường (MS+ 10% nước dừa+ 10g Saccroza + 6,5g agar+1,5mg BA)/1lít; pH: 5,8; lượng môi trường là 70ml/1 bình tam giác, được hấp khử trùng 20 phút ở 120°C ; Các bình mẫu được nuôi trong điều kiện: nhiệt độ 20 - 25°C , cường độ chiếu sáng: 3000 – 3500 lux, quang chu

kỳ: 16 giờ sáng/ 8 giờ tối. Trong điều kiện như vậy mẫu cây phát sinh hình thái tạo chồi và tiền chồi(thể protocorm).

Nhân nhanh: sản phẩm của giai đoạn khởi động mẫu là nguồn vật liệu(phương pháp cắt lớp mỏng) cho giai đoạn này. Trong giai đoạn nhân nhanh sẽ thu được hai dạng: tiền chồi, chồi.

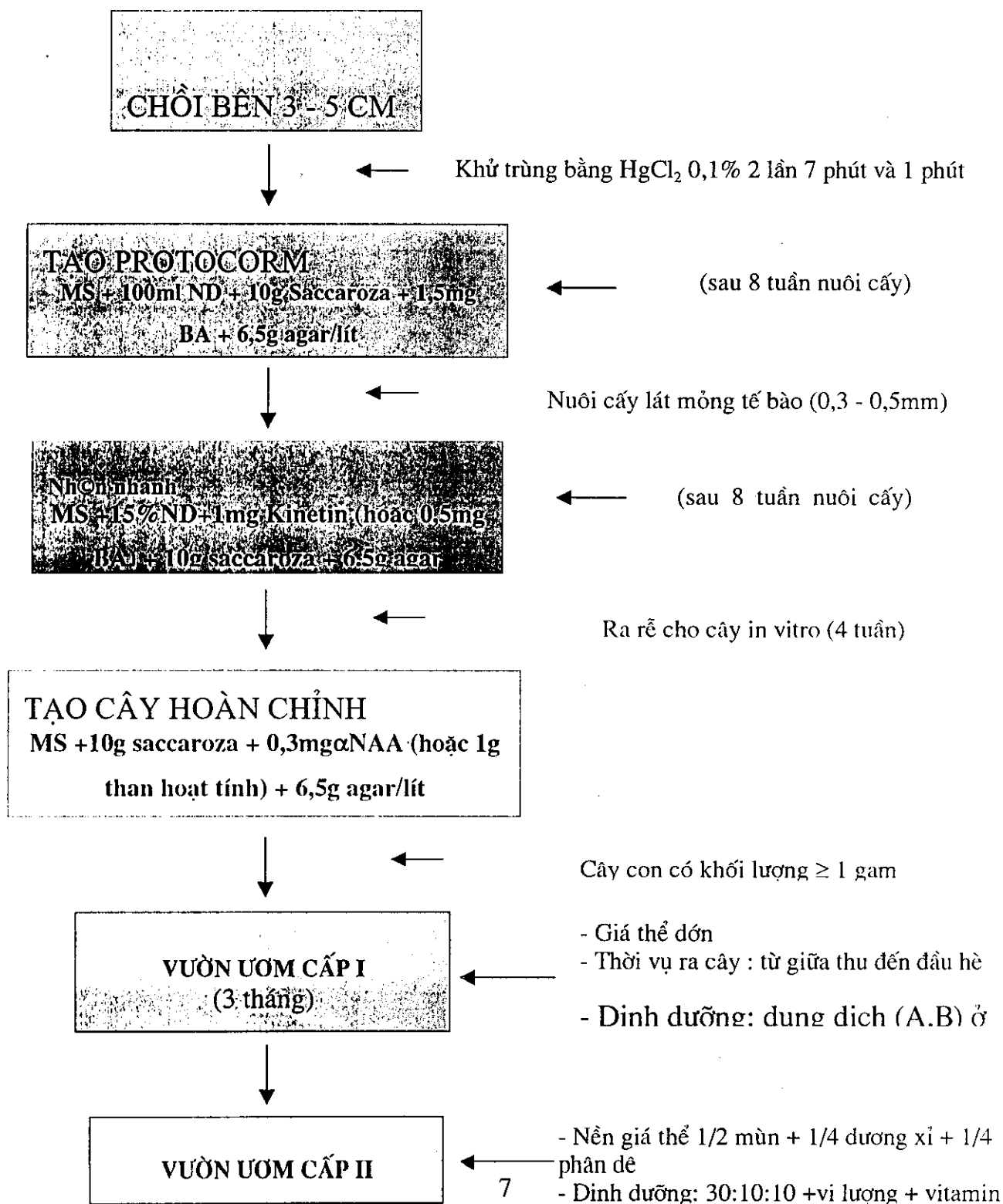
Thẻ tiền chồi(dạng protocorm tiếp tục cắt thành từng lát mỏng có kích thước từ 0,3 – 0,5 mm, được cấy trên môi trường (MS+ 15% nước dừa+ 10g Saccroza + 6,5g agar +1,0mg Kinetin hoặc 0,5mg BA)/1lít ; pH: 5,8; lượng môi trường là 70ml/1 bình tam giác, được hấp khử trùng 20 phút ở 120°C; Các bình mẫu được nuôi trong điều kiện: nhiệt độ 20 - 25°C, cường độ chiếu sáng: 3000 – 3500 lux, quang chu kỳ: 16 giờ sáng/ 8 giờ tối.

Tất cả các chồi có chiều cao khoảng 5,5 – 6,5 cm sẽ được chuyển sang giai đoạn sau, giai đoạn tạo cây hoàn chỉnh.

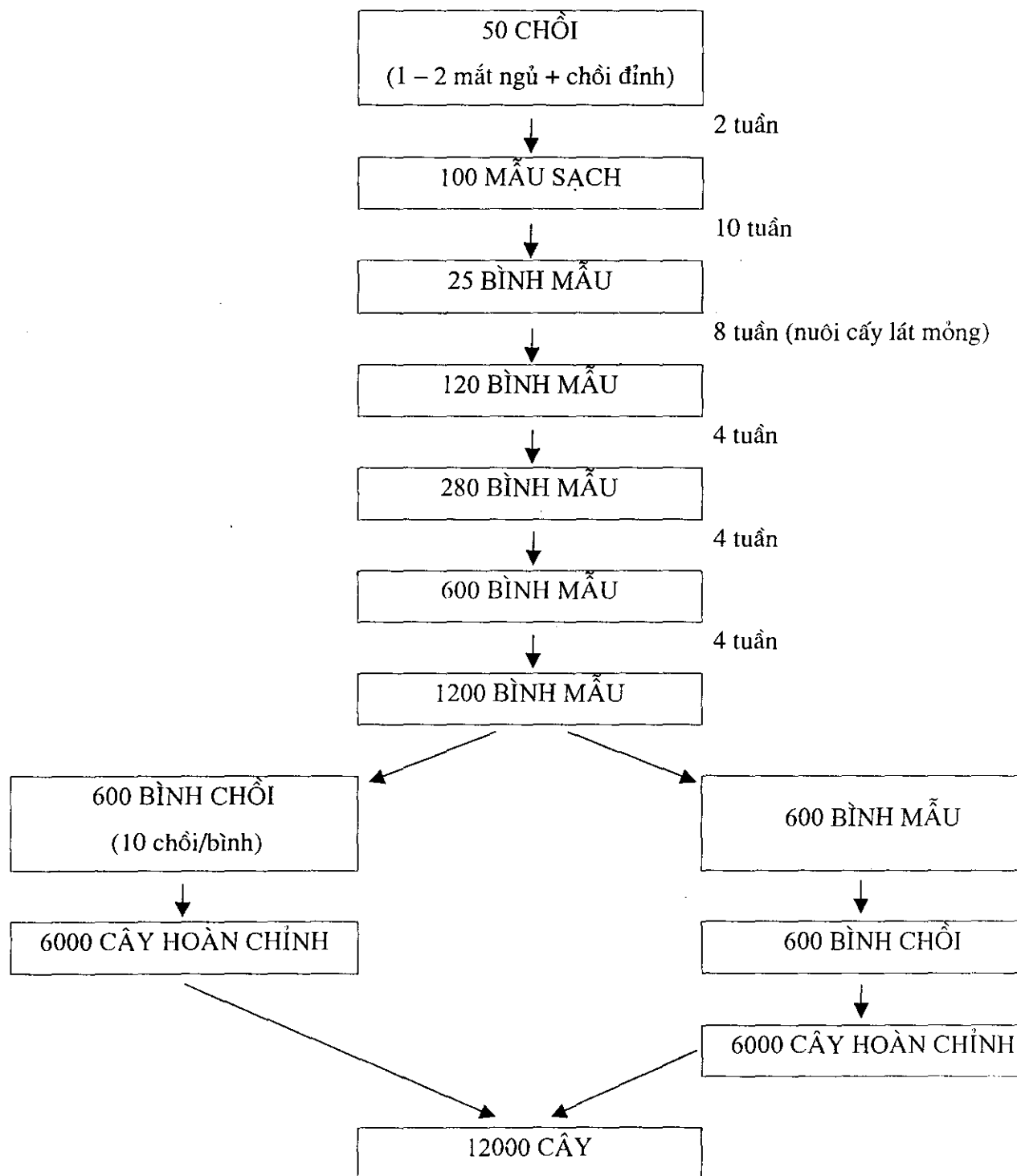
Hệ số nhân nhanh: sau 8 tuần nuôi cấy vòng nhân nhanh được lặp lại, cứ như vậy việc nhân nhanh được tiến hành quanh năm với hệ số nhân 6,23⁶

Tạo cây hoàn chỉnh: Các chồi có chiều cao 5,5 – 6,5 cm, mập khỏe được chuyển vào môi trường kích thích ra rễ sau: (MS+ 10g Saccroza + 6,5g agar+ 0,3mg α NAA hoặc 1g than hoạt tính)/1lít ; pH: 5,8; lượng môi trường là 50ml/1 bình tam giác, được hấp khử trùng 20 phút ở 120°C; Các bình mẫu được nuôi trong điều kiện: nhiệt độ 20 - 25°C, cường độ chiếu sáng: 3000 – 3500 lux, quang chu kỳ: 16 giờ sáng/ 8 giờ tối.

QUY TRÌNH NHÂN GIỐNG ĐỊA LAN BẰNG NUÔI CẤY MÔ



QUY TRÌNH SẢN XUẤT 1 VẠN CÂY IN VITRO/ NĂM



QUY TRÌNH CÔNG NGHỆ SAU NUÔI CẤY MÔ

Giai đoạn ở vườn ươm cấp I:

*** Chuẩn bị nhà trồng cây:**

Vườn ươm cấp I cần có các yêu cầu sau:

- + Lưới đen che nắng: dùng loại lưới che 80 - 85 % ánh sáng.
- + Mái che mưa (có thể dùng ni lông hoặc mái nhựa...)
- + Giàn để cây (cao 40 – 50 cm).
- + Vườn được đặt ở vị trí thông thoáng .

*** Chuẩn bị cây**

Các cây sau giai đoạn tạo cây hoàn chỉnh có đủ tiêu chuẩn Cây in vitro có trọng lượng > 1 gam có 5 – 6 lá, 3 – 5 rễ được đưa khỏi phòng nuôi cấy để dưới ánh sáng tán xạ cho quen dần với điều kiện môi trường tự nhiên. Sau 2- 3 tuần dùng panh gấp cây khỏi bình nuôi cấy thả vào chậu nước sạch rửa hết agar bám trên rễ sau đó rửa lại thêm một đến 2 lần nữa rồi xếp cây vào rổ để ở chỗ mát cho ráo nước.

*** Chuẩn bị giá thể:**

Dớn khô bỏ vào chậu nước sạch cho hút nước đến bão hoà. Sau đó vắt kiệt nước chuẩn bị để trồng.

Vườn ươm I trồng cây trong các rổ thưa có khả năng thoát nước tốt. Dưới đáy rổ lót lớp xốp vụn 2- 3 cm. Tiếp theo là lớp xơ dừa chỉ sao cho lớp này còn cách mặt rổ 3 – 4 cm lớp giá thể xơ dừa này vừa có tác dụng tiết kiệm dớn vừa có tác dụng làm thông thoáng hơn.

*** Cách trồng**

Dùng dớn đã vát khô quấn cây sao cho kín hết các rễ (khi quấn cần để hở phần cổ rễ) rồi xếp cây vào các rổ có xơ dừa đã chuẩn bị sẵn với mật độ 60 – 70 cây/rổ có diện tích 0,25 m². Phun mù trên bề mặt cho ướt lá dùng vòm che ni lông bao lấy rổ cây (vòm che cao hơn mặt rổ 20- 30 cm trên đó chọc các lỗ nhỏ). Một ngày mở ni lông phun mù như trên 3- 4 lần. Sau 5 đến 7 ngày thì có thể bỏ vòm che trên các rổ. Sau khi bỏ vòm che duy trì chế độ tưới ẩm 70 – 80 % (chế độ tưới trong vườn ươm I hoàn toàn là phun sương).

Tuỳ theo thời vụ ra cây khác nhau mà sau 4 – 5 tuần tiến hành cung cấp dinh dưỡng cho cây con sử dụng dinh dưỡng AB(theo tỷ lệ 1:1, nồng độ 1/250) 1 lần/tuần phun ướt đều trên lá. Sau 3 tháng các cây sẽ được chuyển sang vườn ươm cấp II.

Vườn ươm cấp II:

Khu vườn trồng cấp 2 cần chuẩn bị tương tự như vườn ươm cấp 1 chỉ có phần lưới che sáng giảm bớt nghĩa là giai đoạn này chỉ cần dùng lưới che ánh sáng loại 50 – 60% ánh sáng.

* Chuẩn bị giá thể, chậu trồng.

+ Phân dê ủ kỹ sau 2 – 3 tháng có thể dùng được

+ Rễ cây dương xỉ chặt nhỏ thành các đoạn 3 – 5 cm

+ Mùn

Ba loại trên được trộn theo tỷ lệ 1/2 mùn : 1/4 rễ dương xỉ : 1/4 phân dê trộn đều

+ Chậu trồng: sử dụng chậu nhựa đen mềm, chiều cao 20 – 30 cm đường kính 10 – 15 cm.

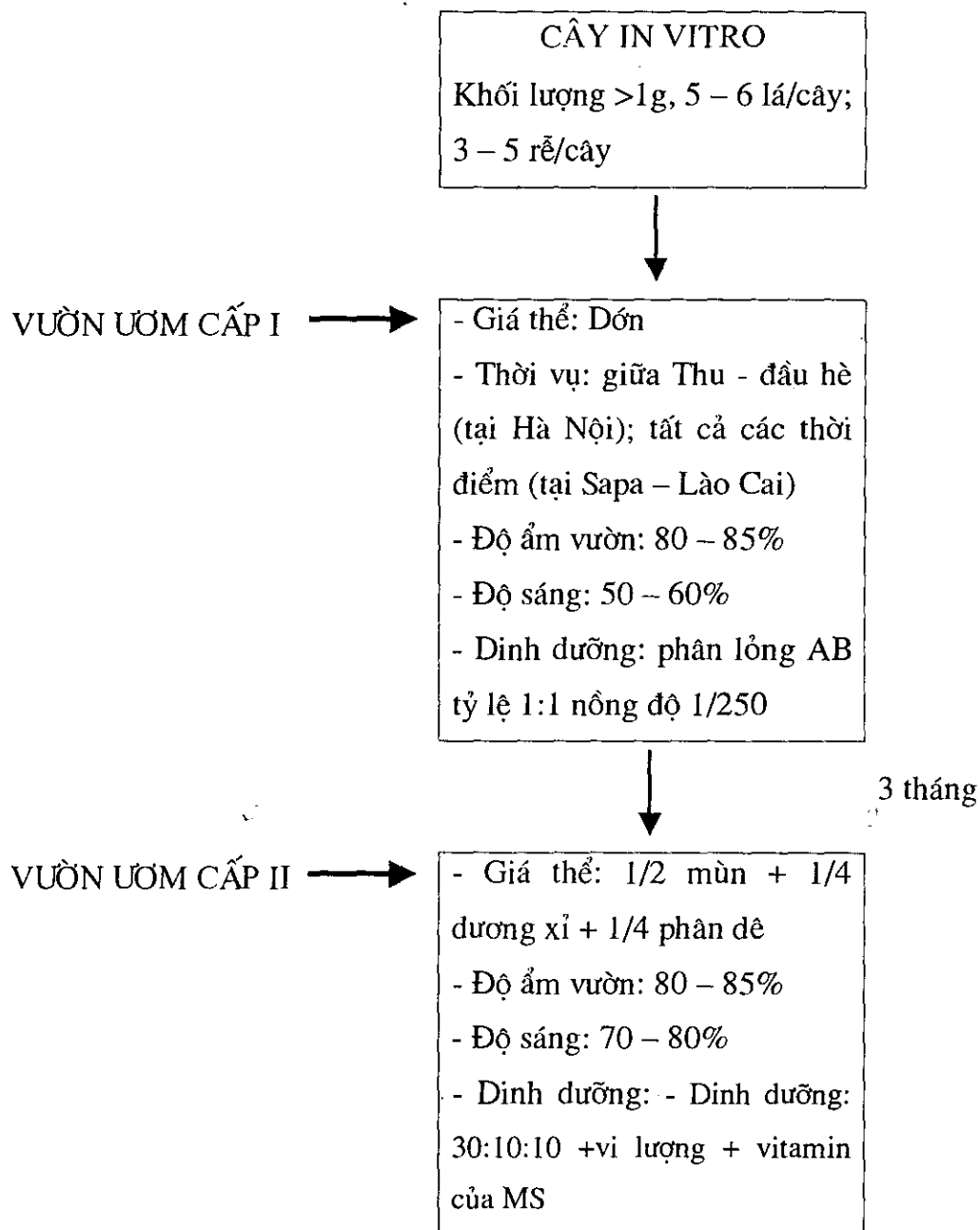
Giá thể trộn xong cho vào chậu khi cách mặt chậu 5 cm thì nhấc cây từ rổ đặt vào chậu trồng 3 cây/chậu. Trồng cây hở cổ rễ, sau khi trồng xong xếp cây lên giá rồi phun cho ướt cả cây và giá thể.

Duy trì độ ẩm (75 – 80%) đặc biệt là độ ẩm của không khí và sự thông thoáng là rất quan trọng. Sau khi trồng sang chậu được 2 – 3 tuần thì có thể tưới bổ xung thêm dinh dưỡng 2 tuần/ 1 lần bằng loại phân có tỷ lệ ni tơ cao (N:P:K=30:10:10).

* Phòng trừ sâu bệnh

Đối tượng sâu bệnh hại chính trên cây địa lan ở cả vườn ươm cấp 1 và vườn sản xuất là bệnh thối khuẩn thường xuất hiện nhiều khi nhiệt độ không khí cao, mưa kéo dài hay khi trời có sương ẩm độ không khí > 90%. Vì vậy thường sau khi có hiện tượng trên chúng ta tiến hành phun phòng cho cây bằng một trong các loại thuốc sau: Alli S, SOM5D với lượng thuốc 2 gam/lít phun sương cho ướt lá và giá thể.

SƠ ĐỒ QUY TRÌNH CÔNG NGHỆ SAU NUÔI CẤY MÔ



II.2. Quy trình nghiên cứu

BKHCN
VCNSH

BỘ KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ
VIỆN CÔNG NGHỆ SINH HỌC

SẢN PHẨM II - 6

**QUY TRÌNH NHÂN NHANH *IN VITRO* HAI
DÒNG LÚA BẮT DỤC**

**Thuộc đề tài: Nghiên cứu sử dụng công nghệ tế
bào và kỹ thuật chỉ thị phân tử phục vụ chọn
tạo giống cây trồng**

Mã số: KC.04.08

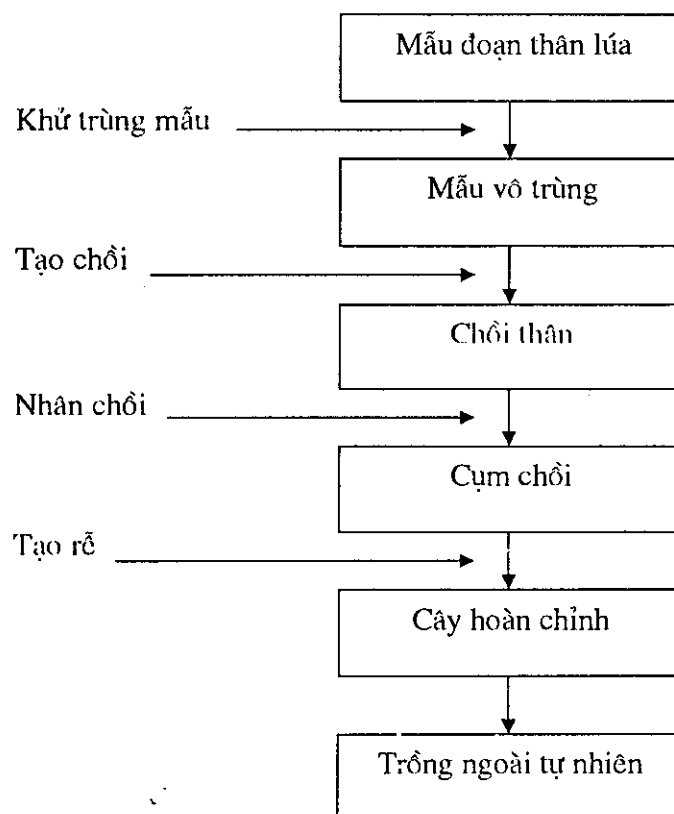
Hà Nội, 11/2004

QUY TRÌNH NHÂN NHANH *IN-VITRO* HAI DÒNG LÚA BẮT DỤC NHỊ 232 VÀ BOA

I. Mở đầu

Quy trình nhân dòng nhanh *in-vitro* các dòng lúa bắt dục bao gồm các giai đoạn: Xác định và thu nhận loại cơ quan dùng cho nuôi cấy; khử trùng mẫu cấy; xác định các điều kiện dinh dưỡng, các chất điều hòa sinh trưởng thực vật, các điều kiện nuôi cấy thích hợp cho sự phát sinh hình thái của mẫu nuôi cấy; nhân nhanh cây; tạo cây hoàn chỉnh; xác định thời vụ và các điều kiện chăm sóc thích hợp để cây *in-vitro* phát triển tốt.

Các giai đoạn này được tiến hành như sau:



II. Quy trình thực hiện

1. Chuẩn bị môi trường nuôi cấy

Môi trường cơ bản sử dụng trong nhân dòng lúa bất dục là môi trường MS (Murashige & Skoog, 1962) có thành phần như trong bảng 1:

Bảng 1. Thành phần các chất của môi trường MS cơ bản

Stock	Tt	Nhóm chất	Nồng độ sử dụng (mg/l)	Nồng độ trong Stock (g/l)
		Khoáng đa lượng		Stock 50X
i	1	KH_2PO_4	170	8,50
	2	KNO_3	1900	95
	3	MgSO_4	180,54	9,025
	4	NH_4NO_3	1650	82,500
ii	5	CaCl_2	332,20	33,22 (Stock 100X)
		Khoáng vi lượng		Stock 100X
iii	6	$\text{CoCl}_2.6\text{H}_2\text{O}$	0,025	0,0025
	7	$\text{CuSO}_4.5\text{H}_2\text{O}$	0,025	0,0025
	8	H_3BO_3	6,20	0,6200
	9	KI	0,83	0,0620
	10	$\text{MnSO}_4.\text{H}_2\text{O}$	16,90	1,6900
	11	$\text{Na}_2\text{MnO}_4.2\text{H}_2\text{O}$	0,25	0,0250
	12	$\text{ZnSO}_4.7\text{H}_2\text{O}$	8,60	0,860
iv	13	FeNaEDTA	36,70	3,67 (Stock 100X)
		Các vitamin		Stock 100X
v	14	Glycine	2,00	0,20
	15	Myo-Inositol	100	10,00
	16	Nicotinic acid	0,50	0,05
	17	Pyridoxin HCl	0,50	0,05
	18	Thiamine HCl	0,10	0,01

Các hóa chất dùng trong pha chế môi trường nuôi cấy được pha thành 5 dung dịch mẹ (stock) như sau:

i) **Dung dịch đa lượng:** Các muối khoáng chính (trừ CaCl_2), được cân như trên bảng 1, đem hòa tan từng chất trong nước cất rồi chỉnh thể tích đến 1 lít. Khi pha môi trường nuôi cấy thì sử dụng 20 ml stock /lít môi trường.

ii) **Dung dịch CaCl_2 :** Cân 33,22 g CaCl_2 , hòa tan trong nước cất, chỉnh đến 1 lít. Khi pha môi trường nuôi cấy, lấy 10 ml stock /lít môi trường.

iii) **Dung dịch vi lượng:** Cân các hóa chất như trong bảng 1, hòa tan trong nước cất và chỉnh đến thể tích 1 lít. Khi pha môi trường thì lấy 10 ml stock /lít môi trường.

iv) **Dung dịch sắt:** Cân riêng và hòa tan hai muối trên bằng nước cất nóng, vừa pha vừa đun nhẹ. Khi pha môi trường thì dùng 10 ml stock /lít môi trường.

v) **Dung dịch vitamine:** Cân các hóa chất như trong bảng 1 và hòa tan trong nước cất, chỉnh thể tích đến 1 lít. Khi pha môi trường thì sử dụng 10 ml stock /lít môi trường.

Ghi chú: 5 loại stock trên phải được bảo quản ở 4°C.

Môi trường khoáng cơ bản được bổ sung thêm các chất điều hòa sinh trưởng tùy theo mục đích của người nghiên cứu. Về tính năng tác dụng của các chất điều hòa sinh trưởng, có thể được tóm tắt như sau:

a) Các chất thuộc nhóm auxin

a-NAA (a-Naphthalen acetic acid): sự có mặt với nồng độ tích hợp của a-NAA trong môi trường nuôi cấy tạo ra cân bằng mới về các chất điều hòa sinh trưởng, kích thích quá trình tạo rễ.

b) Các chất thuộc nhóm cytokinin

* BAP (6-Benzylaminopurin): có hoạt tính Cytokinin nhưng yếu hơn Kinetin. Ở nồng độ thích hợp, BAP kích thích phá vỡ ưu thế chồi ngọn làm chồi phát triển thành cụm chồi.

* Kinetin (6-furfurylaminopurine): là hợp chất tự nhiên, có tác dụng kích thích phân bào và tạo chồi với mô phân sinh. Trong mối tương tác cân bằng động với BAP, Kinetin cho phép giữ khối mô nuôi cấy phát triển theo một dạng nhất định.

Cách pha các dung dịch gốc của các chất điều hòa sinh trưởng như sau:

(Ví dụ: dung dịch gốc có nồng độ 1mg/ml).

+ Cân 100 mg chất điều hòa sinh trưởng, cho vào dụng cụ đựng sạch, cho thêm dung dịch NaOH 0,5N để hòa tan hết rồi sau đó chỉnh thể tích bằng nước cất thành 100 ml.

+ Ngoài các thành phần trên, trong môi trường nuôi cấy còn có các thành phần khác như:

- Các đường (chủ yếu là sucrose, D-sorbitol, glucose) có vai trò là nguồn cung cấp cacbon và năng lượng cho mô nuôi cấy.

- Than hoạt tính có vai trò giúp giải phóng nhanh các chất trao đổi thứ cấp của mô nuôi cấy và trong một số trường hợp nó có ảnh hưởng đến sự phát sinh hình thái của mô nuôi cấy do nó đã hấp phụ một phần các chất điều hòa sinh trưởng có trong môi trường nuôi cấy.

- Agar: là chất tạo độ rắn cho môi trường nuôi cấy giúp mô nuôi cấy có giá thể để bám lên. Nồng độ sử dụng của agar trong môi trường nuôi cấy có thể thay đổi theo mục đích, thông thường sử dụng từ 0,7 đến 1,0% (tính theo khối lượng/thể tích).

Cách pha môi trường nuôi cấy: (2lít)

Cho 1 lít nước cất vào cốc đong thủy tinh, rồi bổ sung các dung dịch stock theo tỷ lệ như trên, cho thêm đường, các chất điều hòa sinh trưởng, định mức tới thể tích 2 lít. Dem dung dịch đi chuẩn pH tới 5,8 bằng cách sử dụng NaOH 0,1N và HCl 0,1N.

Bổ sung 16g agar vào dung dịch trên, đun sôi cho đến khi agar hoà tan hoàn toàn. Dùng nước cất để định mức lại thể tích đủ 2lít. Sau đó chia môi trường vào các bình tam giác 250 ml, mỗi bình 50 ml môi trường, nút miệng bình bằng bông sạch, bọc ngoài bằng nút giấy.

Môi trường được khử trùng trong nồi hấp ở nhiệt độ 120°C, 1 at trong thời gian 20 phút.

2. Các bước tiến hành nhân dòng và hoàn thiện cây

Bước 1: Lấy mẫu

Lấy cây non hay các đốt thân mọc từ gốc rễ (dài 2-3 cm và có mầm ở giữa) của hai dòng lúa bất dục trên.

Bước 2: Khử trùng mẫu

Đầu tiên, sát trùng mẫu bằng cồn 70% trong 1 phút, rửa sạch bằng nước cất vô trùng, sau đó khử trùng lại bằng HgCl_2 0,1% trong 10 phút. Rửa sạch nhiều lần bằng nước cất vô trùng.

Bước 3: Tạo chồi từ đoạn thân

Mẫu vô trùng được cấy vào môi trường tạo chồi: MS cơ bản + 10 g/l sucrose + 8 g/l agar, pH: 5,8. Nuôi trong điều kiện nhiệt độ 26 ± 2°C, cường độ chiếu sáng 3000 lux, thời gian chiếu sáng 14h/ngày đêm, độ ẩm phòng nuôi là 60 ± 5%.

Bước 4: Nhân cụm chồi

Gây cụm chồi bằng cách tách chồi nách và chồi đỉnh sang môi trường MS cơ bản bổ sung 2mg/l BAP + 0,2 mg/l NAA + 1 mg/l Kinetin + 20 g/l sucrose + 8 g/l agar, pH: 5,8. Nuôi trong điều kiện như đã mô tả ở trên. Tính hệ số nhân chồi bằng số chồi trung bình tạo được sau 3 - 4 tuần nuôi cấy.

Bước 5: Duy trì chồi dài hạn

Các cụm chồi cây bất dục được duy trì trên môi trường MS không có chất điều hòa sinh trưởng, cấy chuyển chồi sau 4 -5 tháng nuôi cấy.

Bước 6: Tạo rễ cho chồi

Các chồi được tách khỏi các cụm chồi và cấy lên môi trường tạo rễ: MS cơ bản + 0,2 mg/l NAA + 20 g/l sucrose + 8 g/l agar, pH: 5,8. Nuôi trong điều kiện như trên.

Bước 7: Tạo cây hoàn chỉnh

Chồi cây đã có rễ được cấy chuyển sang môi trường MS 1/10 không có vitamime, chất điều hòa sinh trưởng và đường, để cây phát triển bộ rễ đầy đủ, mới đem trồng ở điều kiện tự nhiên.

BKHCN
VCNSH

BỘ KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ
VIỆN CÔNG NGHỆ SINH HỌC

SẢN PHẨM II - 7

**QUY TRÌNH NHÂN NHANH *IN VITRO*
HAI GIỐNG ĐIỀU**

**Thuộc đề tài: Nghiên cứu sử dụng công nghệ tế
bào và kỹ thuật chỉ thị phân tử phục vụ chọn
tạo giống cây trồng**

Mã số: KC.04.08

Hà Nội, 11/2004



QUY TRÌNH NHÂN GIỐNG IN VITRO CÂY ĐIỀU BẰNG NUÔI CÂY LỚP MỎNG TẾ BÀO VÀ QUANG TỰ DƯỠNG

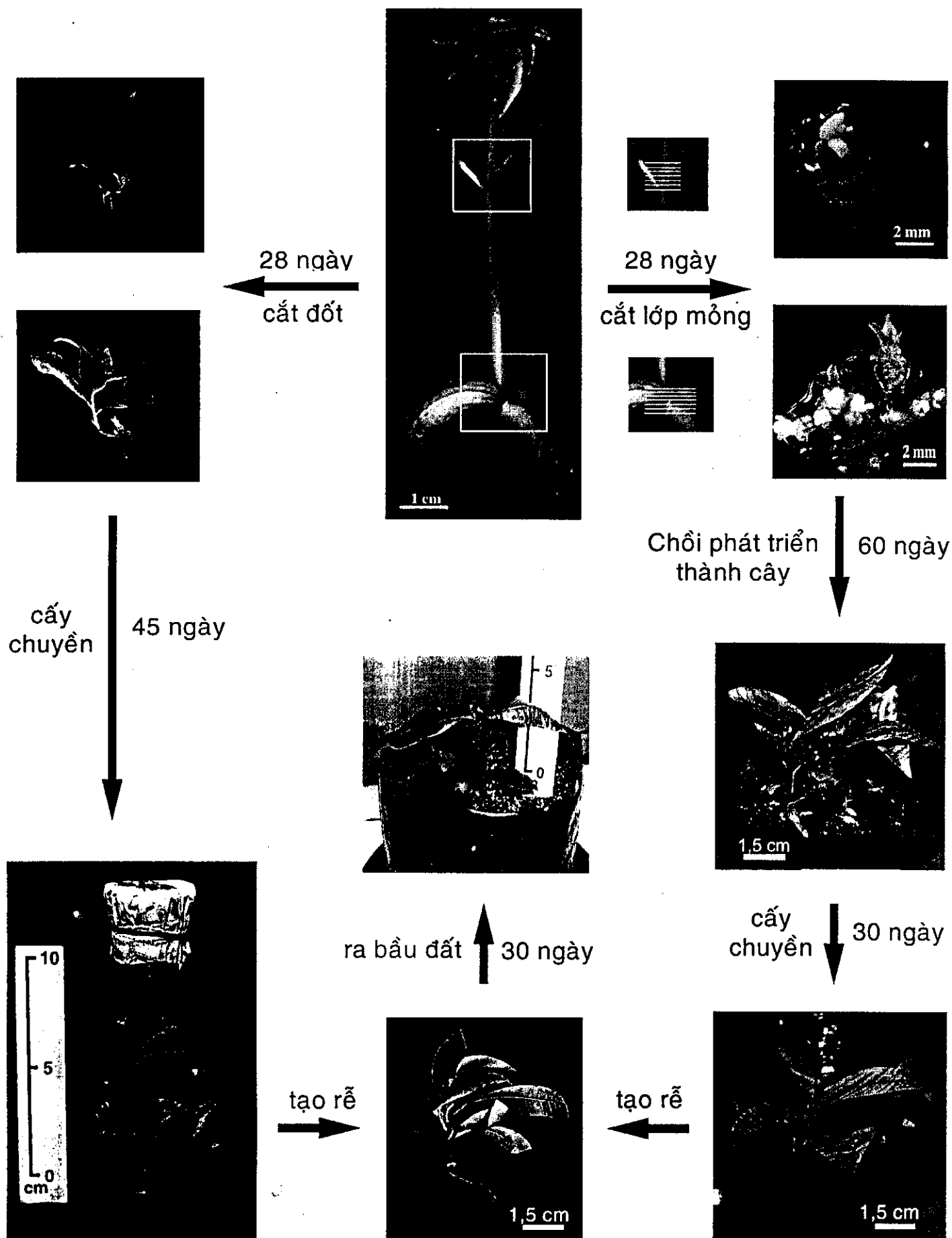
Việc nhân giống in vitro cây điều bằng phương pháp nuôi cấy lớp mỏng tế bào và quang tự dưỡng có thể thực hiện theo các bước sau (hình minh họa đính kèm):

1. **Bước 1: Khử trùng mẫu (hạt điều trưởng thành).** Vỏ ngoài của hạt khử trùng bằng dung dịch NaOCl 1% trong 24 giờ và khử trùng tiếp bằng dung dịch NaOCl 1% đối với vỏ lụa trong 20 phút.
2. **Bước 2: Tạo cây mầm in vitro.** Hạt sau khi khử trùng được gieo trên môi trường khoáng MS (Murashige & Skoog, 1962), không đường, không vitamin trong 14 ngày.
3. **Bước 3: Tạo chồi từ nuôi cấy lớp mỏng đốt thân và đốt tử diệp:** Lớp mỏng (0,3-0,5 mm) từ đốt thân và đốt tử diệp được nuôi trên môi trường MS có bổ sung BA, KN, NAA theo tỷ lệ 10:1:0,5 để tạo chồi sau 28 ngày. Cây được nuôi trong phòng có nhiệt độ 25 °C, cường độ ánh sáng 40 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, thời gian chiếu sáng 12 h/ngày.
4. **Bước 4: Tăng trưởng chồi.** Chồi từ lớp mỏng được cấy chuyển liên tục 2 tuần/lần trên môi trường mới (giống như bước 3) trong thời gian 60 ngày.
5. **Bước 5: Nuôi cấy quang tự dưỡng.** Đốt thân in vitro (từ nuôi cấy lớp mỏng hoặc nuôi cấy cắt đốt) có chiều cao trung bình 2-3 cm, mang 1-2 lá, được cấy sang môi trường khoáng MS (đa lượng 1/2) không có đường, vitamin và chất điều hoà tăng trưởng thực vật. Cây được nuôi trong phòng có nhiệt độ 25 °C, cường độ ánh sáng 70 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, thời gian chiếu sáng 16 h/ngày.
6. **Bước 6: Ra bầu đất.** Cây nuôi cấy quang tự dưỡng sau 45-60 ngày mang nhiều rễ sẽ được đưa ra bầu đất (đất trộn tro trấu với tỷ lệ 1:1 đã được khử trùng).

Tp. HCM ngày 10 tháng 11 năm 2004

Chủ nhiệm đề tài nhánh

Nguyễn Thị Quỳnh



Cây điều in vitro trong điều kiện nuôi cấy quang tự dưỡng
(môi trường không đường, không vitamin)

QUY TRÌNH NHÂN GIỐNG IN VITRO CÂY ĐIỀU TỪ NUÔI CẤY
LỚP MỎNG CÂY MẦM VÀ QUANG TỰ DƯỠNG

III. Danh sách và trình tự các chỉ thị phân tử

BKHCN
VCNSH

BỘ KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ
VIỆN CÔNG NGHỆ SINH HỌC

SẢN PHẨM III - 8

DANH SÁCH VÀ TRÌNH TỰ CÁC CHỈ THỊ PHÂN TỬ

**Thuộc đề tài: Nghiên cứu sử dụng công nghệ tế
bào và kỹ thuật chỉ thị phân tử phục vụ chọn
tạo giống cây trồng**

Mã số: KC.04.08

Hà Nội, 11/2004

CÁC CHỈ THỊ PHÂN TỬ

Bảng 1. Trình tự nucleotide của các cặp mồi SSR liên quan đến tính kháng bệnh đạo ôn ở lúa

TT	Tên mồi	Trình tự mồi	Kích thước đoạn ADN (bp)
1	RG64 (Pi-2t)	5-GTTGTTTGAGCTCTCCAATGCCTGTTC-3 5- CTGCAGTGCAATGTACGGCCAGG-3	1155
2	RZ536 (Pi-1t)	5-ATAGGAGGAGGAGGGCAA-3 5-ACTTGTCATGCCCAGCTA-3	213

Bảng 2. Trình tự nucleotide của các cặp mồi SSR liên quan đến chất lượng lúa gạo

TT	Tên mồi	Trình tự mồi	Kích thước đoạn ADN (bp)
1	Wxa	5-GTATACAGCAATAAACCCATGAGCT-3 5-TAGCTGTTGCTGTGGAAGATC-3	2487
2	RG171	5-TGACAGGTTTGCTGTCTCC-3 5-TTCCCCCCTTTTGGGTT-3	557
3	RZ284	5-GGAACAGTTCTCAGTTTGC-3 5-GCACTTGAAGGATCAGCT-3	343
4	RG28	5-GATGGGGTAGACTAGACCA-3 5-TACCCAATCTACCCAATCAG-3	390
5	G243A	5-CCAACTTAGGAATGCAT-3 5-TTGCAAGTAAGAGAAGC-3	143

Ghi chú:

Wxa - mồi liên kết với hàm lượng Amyloza cao

RG171 và G243 - các mồi liên kết với độ bền gel

RZ284 - mồi liên kết với độ dài hạt

RG28 - mồi liên kết với tính thơm của gạo

Bảng 3. Trình tự nucleotide của các cặp môi SSR liên quan đến tính kháng bệnh rỉ sắt ở lạc

STT	Tên môi	Trình tự các nucleotide	Kích thước đoạn AND (bp)
1	L26	5' CGTCGGATTTATCTG CCA GT 5' AGTAGGGGCAAGGGTTGATG	152
2	L38	5' CTT TCG CGC TTG TTT GAA AT ' 5' AAG CTG CGT GTA AAA GGG TC	298
3	L32	5' GGA CAG CCG GAT GCT ATT TA 5' ACA TGA GTC CCT TTT CCC TT	281
4	L36	5' GCA ACT AGG GTG TAG GCC GT 5' CAA CCC TAT ACA CCG AGG GA	285
5	L38	5' CGTTCTTTGCCGTTGATT CT 5' AGCACGCTCGTTCTCTCA TT	282
6	L43	5'TGACCAAAGTGATGAAGG GA 5'AAGTTGTTTGTACATCTGTCATCG	262
7	L52	5' ATT CGT CTC CTT CTT TTG GC 5' TTT TGC TTC CAA ATG GCT TC	350
8	L54	5' CAT GCC ATC ATC ACA ACA CA 5' GGA GGA AGC AAT GGT TTC AG	305

Bảng 4. Trình tự nucleotide của các cặp mồi SSR liên quan đến tính kháng bệnh rỉ sắt ở đậu tương

STT	SSR	Trình tự mồi xuôi (F) ngược (R) Từ đầu 5' đến 3'	Nhóm liên kết	Kích thước đoạn ADN (bp)
1	Satt 042	F- GACTTAATTGCTTGCTAT R- GTGGTGCACACTCACTT	<i>Al</i>	172
2	Satt173	F-TGCGCCATTATTCTTCA R-AAGCGAAATCACCTCCTCT	O	198

Bảng 5. Trình tự nucleotide của các cặp mồi SSR liên quan đến tính chịu hạn ở đậu tương

STT	SSR	Trình tự mồi xuôi (F) ngược (R) Từ đầu 5' đến 3'	Nhóm liên kết	Phân đoạn ADN (bp)
1	Satt 489	F-CGTGTGCTTGCTTCTCTTAGACTGACT R-GCGTACTACTTACCCTGTTTGTCTAAAA	C2	261 bp
2	Satt373	F- TCCGCAGATAATTCGTAAAAT R-GGCCAGATACCCAAGTTGTACTTGT	L	248 bp
3	Satt150	F-AAGCTTGAGGTTATTCGAAAATGAC R-TGCCATCAGGTTGTGTAAGTGT	M	201 bp

Bảng 6. Trình tự nucleotide của các cặp mồi SSR liên quan đến tính kháng bệnh khô vằn ở ngô

TT	Tên mồi	Trình tự mồi xuôi (F) ngược (R) (Từ đầu 5' đến 3')	Phân đoạn ADN (bp)
1	phi065	5' AGGGACAAATACGTGGAGACACAG 3' 5' CGATCTGCACAAAGTGGAGTAGTC 3'	131-151
2	phi123	5' GGAGACGAGGTGCTACTTCTTCAA 3' 5' TGTGGCTGAGGCTAGGAATCTC 3'	146-160

IV. Quy trình chọn tạo các giống lúa , ngô, lạc và đậu tương

BỘ KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ
VIỆN CÔNG NGHỆ SINH HỌC

SẢN PHẨM II - 9

**QUY TRÌNH TẠO CÁC DÒNG LÚA ĐẶC SẢN
BẰNG KỸ THUẬT CHỌN DÒNG BIẾN DỊ
SOMA KẾT HỢP VỚI XỬ LÝ TIA GAMMA**

**Thuộc đề tài: Nghiên cứu sử dụng công nghệ tế
bào và kỹ thuật chỉ thị phân tử phục vụ chọn tạo
giống cây trồng**

Mã số: KC.04.08

Hà Nội, 11/2004

BKHCN
VCNSH

BỘ KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ
VIỆN CÔNG NGHỆ SINH HỌC

SẢN PHẨM II - 10

QUY TRÌNH CHỌN GIỐNG LÚA PHẨM CHẤT PHỤC VỤ XUẤT KHẨU BẰNG CNTBTV CÓ SỰ TRỢ GIÚP CỦA CTPT

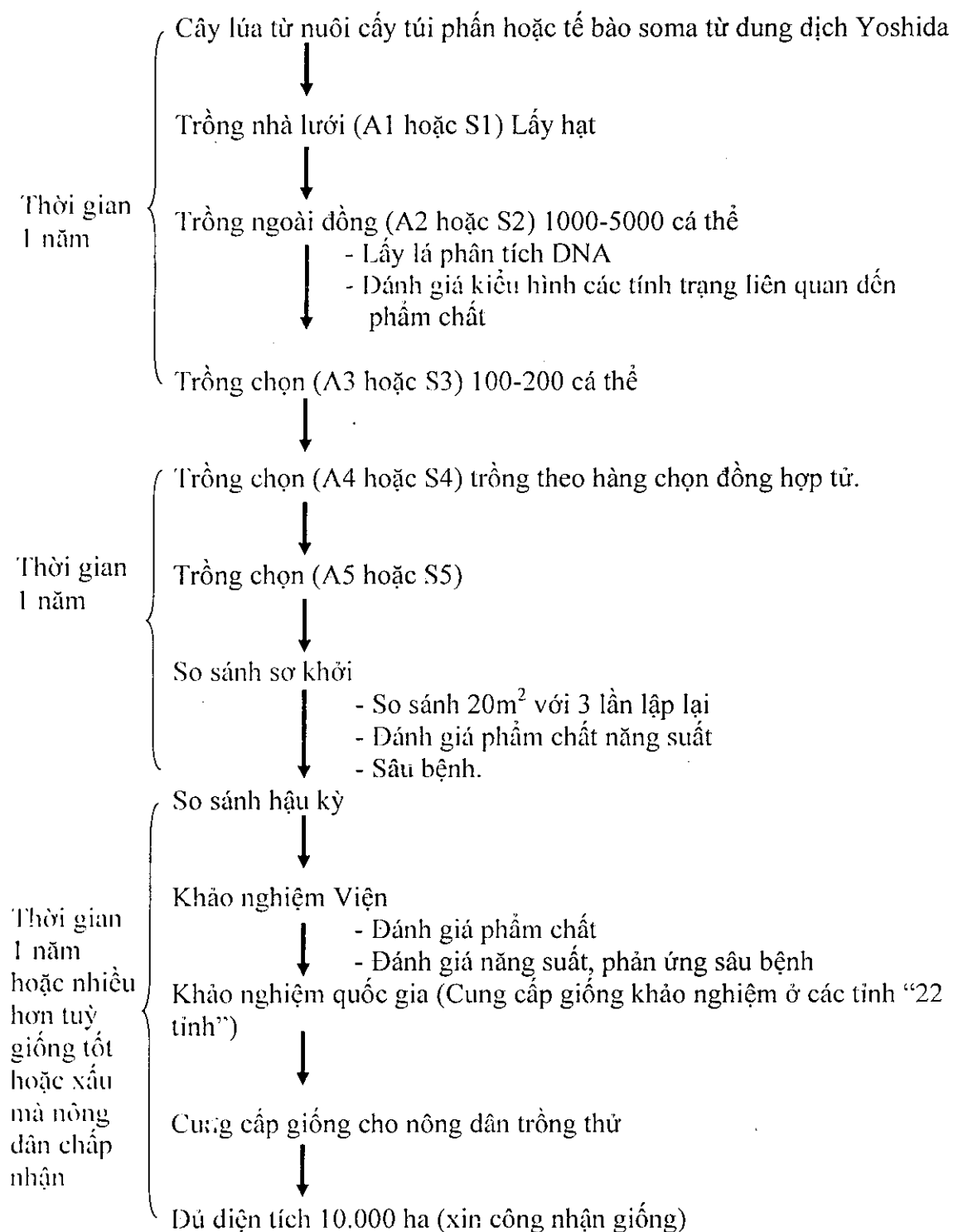
**Thuộc đề tài: Nghiên cứu sử dụng công nghệ tế
bào và kỹ thuật chỉ thị phân tử phục vụ chọn
tạo giống cây trồng**

Mã số: KC.04.08

Hà Nội, 11/2004

QUY TRÌNH CHỌN GIỐNG LÚA PHẨM CHẤT PHỤC VỤ XUẤT KHẨU

Nguyễn Thị Lang
Viện Lúa Đồng Bằng sông Cửu Long



MỘT SỐ KẾT QUẢ CHÍNH

1. Vật liệu và phương pháp

Vật liệu: Vật liệu thực vật gồm các giống như trong bảng 10; Các cặp mỗi được sử dụng trong nghiên cứu có trình tự như trong bảng 1.

Bảng 1. Một số đặc điểm các giống trong tổ hợp lai để cấy túi phấn và tế bào soma

TT	Tên giống	Đặc điểm
1	IR 64	Năng suất cao, ngon cơm, thời gian sinh trưởng ngắn
2	OM 1490	Thấp cây, năng suất cao, ngắn ngày
3	OMCS 2000	Ngắn ngày, ít bạc bụng, năng suất cao
4	Khao dawk Mali 105	Thơm, ngon cơm, cao cây, phẩm chất tốt
5	DS 20	Năng suất cao, ngắn ngày, thơm, ngon cơm
6	Jamine 85	Năng suất cao, ngắn ngày, thơm, ngon cơm
7	OM 3536	Năng suất, ngắn ngày, thơm, ngon cơm, protein cao
8	OM 4392	Giàu vitamine, năng suất cao (do chuyển gen IR 64)
9	Tequing	Japonica, nguồn gốc Trung Quốc và năng suất cao
10	Nàng thơm chợ đào	Ngon cơm, thơm dẻo, dài ngày

Phương pháp: Nuôi cấy tế bào soma, phương pháp nuôi cấy bao phấn, khử trùng đồng, các môi trường nuôi cấy (tạo mô sẹo, tái sinh cây, tạo cây hoàn chỉnh...), đánh giá một số đặc điểm nông học, phẩm chất gạo, phân tích phân tử...

2. Kết quả khai thác vật liệu di truyền phục vụ nuôi cấy tế bào soma và túi phấn

Quan sát một số tổ hợp trên quần thể F2 với hai thông số hệ số di truyền (H) và phương sai kiểu gen (sg^2) trên hàm lượng amylose, tỉ lệ protein, độ bền thể gel (GC) và độ hoá hồ (GT). Kết quả nhận được ở bảng 2 cho thấy hàm lượng amylose của các tổ hợp tương đối cao. Chứng tỏ rằng amylose được kiểm soát chủ yếu do di truyền bên trong. Giá trị H thấp trên các tính trạng độ bền gel, độ hoá hồ. Một vài tổ hợp ghi nhận trên tỉ lệ protein có H thấp. Điều này cho thấy các chỉ tiêu trên có sự tương tác kiểu gen và môi trường (GxE). Qua kết quả giúp chúng ta chọn vật liệu ban đầu để khai thác các tính trạng mong muốn thông qua nuôi cấy bao phấn.

Bảng 2. Hệ số di truyền và phương sai của vài tổ hợp, phân tích quần thể F2

Cặp lai	Amylose		GC		GT		Protein	
	sg^2	H	sg^2	H	sg^2	H	sg^2	H
1	1,20**	0,76	0,01	0,10	0,01	0,12	0,06	0,23
2	1,23*	0,84	0,05	0,20	0,01	0,40	0,04	0,13
3	0,8**	0,75	0,07	0,28	0,02	0,45	0,12*	0,36
4	1,2*	0,83	0,12*	0,32	0,30*	0,62	0,10*	0,32

Ghi chú: 1: IR 64/ Jamine; 2: IR 64/ KhaoDawMali105; 3: OM 1490/ Nàng thơm chợ đào; 4: OMCS 2000/ KhaoDawMali 105; * và **: ý nghĩa mức 0,05 và 0,01.

BỘ KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ
VIỆN CÔNG NGHỆ SINH HỌC

SẢN PHẨM II - 11

**QUY TRÌNH CHỌN TẠO LÚA CHẤT
LƯỢNG, KHÁNG ĐẠO ÔN BẰNG CÔNG
NGHỆ TẾ BÀO THỰC VẬT VÀ CHỈ THỊ
PHÂN TỬ**

**Thuộc đề tài: Nghiên cứu sử dụng công nghệ tế
bào và kỹ thuật chỉ thị phân tử phục vụ chọn tạo
giống cây trồng**

Mã số: KC.04.08

Hà Nội, 11/2004

QUI TRÌNH CHỌN DÒNG LÚA KHÁNG BỆNH ĐẠO ÔN , CHẤT LƯỢNG CAO BẰNG CÔNG NGHỆ TẾ BÀO VÀ TRỢ GIÚP CỦA CÁC CHỈ THỊ PHÂN TỬ

Qui trình chọn dòng lúa kháng bệnh đạo ôn, chất lượng cao bằng công nghệ tế bào và trợ giúp của các chỉ thị phân tử đã được tiến hành theo các bước như sau:

Bước 1. Chuẩn bị nguyên vật liệu

a. Thu thập các giống lúa kháng bệnh đạo ôn và giống lúa chất lượng cao

- Giống lúa Moroberekan và C101A51 – nhận từ Viện Nghiên cứu lúa Quốc tế. Giống lúa Moroberekan mang 2 gen kháng bệnh đạo ôn là Pi5(t) và Pi7(t) đã được xác định bởi Wang và cộng sự (1994), giống lúa C101A51 mang gen kháng Pi-2(t) đã được xác định bởi Mackill và cộng sự (1992)

- C71 và Tẻ tép nhận từ Viện Bảo vệ Thực vật. Tẻ tép là giống lúa kháng bệnh đạo ôn bền vững đã được xác định bởi Mackill và cộng sự (1996). C71 là giống lúa kháng bệnh đạo ôn được chọn tạo tại Viện bảo vệ thực vật và đã được công nhận năm 1995

- BR12 - dòng lúa kháng bệnh đạo ôn mới chọn tạo tại phòng Di truyền tế bào thực vật - Viện Công nghệ sinh học

- KDML105 - giống lúa chất lượng cao nhận từ Viện Nghiên cứu lúa Quốc tế

- WAB56-125 - giống lúa ngắn ngày và chất lượng khá, cây cứng chống đổ tốt

- Khang dân - giống lúa đang được trồng phổ biến, có năng suất cao và chất lượng khá nhận từ Viện Bảo vệ thực vật

b. Các môi STS:

RG64 - môi liên kết với gen kháng bệnh đạo ôn Pi-2(t)

RZ536 - môi liên kết với gen kháng đạo ôn Pi-1(t)

Wxa - môi liên kết với hàm lượng Amyloza cao

RG171 và G243 - các môi liên kết với độ bền gel

RZ284 - môi liên kết với độ dài hạt

RG28 - môi liên kết với tính thơm của gạo

c. Trình tự các môi như sau:

TT	Tên môi	Trình tự môi	Độ dài đoạn ADN (bp) (Sản phẩm PCR)
1	RG64-F (431)	5-GTTGTTTGAGCTCTCCAATGCCTGTTC-3	1155
	RG64-R (432)	5-CTGCAGTGCAATGTACGGCCAGG-3	
2	RZ536-F	5-ATAGGAGGAGGAGGGCAA-3	

			213
	RZ536-R	5-ACTTGTCATGCCCAGCTA-3	
3	Wxa-F	5-GTATACAGCAATAAACCCATGAGCT-3	2487
	Wxa-R	5-TAGCTGTTGCTGTGGAAGATC-3	
4	RG171-F	5-TGACAGGTTTGCTGTCTCC-3	557
	RG171-R	5-TTTCCCCCCTTTTGGGTT-3	
5	RZ284-F	GGAACAGTTCTCAGTTTGC-3	343
	RZ284-R	5-GCACTTGAAGGATCAGCT-3	
6	RG28-F	5-GATGGGGTAGACTAGACCA-3	390
	RG28-R	5-TACCCAATCTACCCAATCAG-3	
7	G243A-F	5-CCAACCTTAGGAATGCAT-3	143
	G243A-R	5-TTGCAAGTAAGAGAAGC-3	

Bước 2. Chọn các tổ hợp lai và lai hữu tính để thu nhận hạt lai F1

Các tổ hợp lai được chọn trên cơ sở: cây bố là cây lúa kháng bệnh đạo ôn và cây mẹ có chất lượng cao hoặc ngược lại, nhằm mục đích qui tụ các đặc điểm kháng bệnh đạo ôn và chất lượng tốt ở con lai. Các cặp lai được lập thành bảng sau.

Bảng tổng hợp các tổ hợp lai giữa các giống lúa kháng bệnh đạo ôn và giống lúa chất lượng cao chọn lọc

TT	Các tổ hợp lai	Mục tiêu chọn dòng
1	Moroberekan/KDML105	Lúa kháng đạo ôn, chất lượng cao
2	Moroberekan/WAB56-125	Lúa kháng đạo ôn, chất lượng cao
3	C101A51/KDML105	Lúa kháng đạo ôn, chất lượng cao
4	C71/KDML105	Lúa kháng đạo ôn, chất lượng cao

5	KDML105/WAB56-125 <i>Và ngược lại</i>	Lúa chất lượng cao
6	WAB56-125/Tétép	Lúa kháng đạo ôn chất lượng cao
7	Khang dân/Moroberekan	Lúa kháng đạo ôn chất lượng khá
8	Khang dân/Tétép	Lúa kháng đạo ôn chất lượng khá
9	BR12/WAB56-125	Lúa kháng đạo ôn, chất lượng khá
10	BR12/Tám thơm	Lúa kháng bệnh đạo ôn, chất lượng cao
11	BR12/KDML105	Lúa kháng bệnh đạo ôn, chất lượng cao
12	C71/WAB56-125	Lúa kháng bệnh đạo ôn, chất lượng cao

Lai hữu tính được thực hiện theo phương pháp lai thông thường bằng tay. Hạt F1 thu nhận được một phần gieo trồng ra nhà lưới, một phần nuôi cấy trong ống nghiệm để giữ giống.

Bước 3. Trồng cây F1 và các dòng lúa chọn lọc ra đồng ruộng

Hạt lai trồng ra nhà lưới cho cây lai F1. Từ cây F1, chúng tôi tiến hành chọn dòng theo hai hướng.

a. Chọn dòng bằng phương pháp nuôi cấy bao phấn từ cây F1

- Nuôi cấy bao phấn tạo mô sẹo: Các dòng lúa được lấy ở giai đoạn có tai lá đồng cách tai lá thứ nhất chừng 2-5 cm tùy thuộc các dòng/giống lúa khác nhau. Đồng được lấy vào buổi sáng từ 9 – 10h. Đồng xử lý lạnh trước khi đem cấy ở điều kiện 6 – 8°C trong thời gian 2-5 ngày. Đồng sau khi khử trùng, chọn các hoa có hạt phấn ở giai đoạn đơn nhân, cắt lấy các bao phấn cấy lên môi trường tạo mô sẹo (N6 + 2mg/l 2,4D + 10mg/l AgNO₃ + 0,5mg/l kinetin + 8g/l thạch + 60g/l đường), trong điều kiện không chiếu sáng và nhiệt độ phòng 26 - 28°C.

- Tái sinh cây từ mô sẹo nuôi cấy bao phấn trên môi trường MSC1 (MS + 1mg/l BAP + 0,2mg/l NAA + 100ml/l nước dừa + 30g/l đường + 8g/l thạch), tạo rễ trên môi trường MS không có chất kích thích sinh trưởng, trong điều kiện ánh sáng đèn nê ông và nhiệt độ phòng 28°C.

- Trồng cây ra ruộng thí nghiệm, đánh giá các chỉ tiêu nông sinh học theo phương pháp thông dụng của Trung tâm Khảo nghiệm giống cây trồng thuộc Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn.

- Chọn dòng thuần kháng bệnh đạo ôn, chất lượng cao từ các dòng nuôi cấy bao phấn

b. Chọn dòng bằng phương pháp chọn lọc cá thể ở các đời cây lai

Chọn dòng bằng phương pháp chọn lọc cá thể ở các đời cây lai: từ đời cây lai F1 cho tự phối tạo đời F2, các cây F2 được chọn lọc và đánh giá sớm tính kháng bệnh đạo ôn và chất lượng gạo bằng các chỉ thị phân tử STS để định hướng chọn lọc ở các đời sau theo phổ hệ.

Các cây F2 đã chọn lọc, được trồng thành hàng ở đời F3. Các đời F4, F5, F6: chọn các cây ưu tú nhất trong các hàng tốt nhất từ các hệ tốt nhất, để trồng ở đời sau. Đến đời F7 khi các hệ đã tương đối đồng đều, tiến hành chọn các dòng thuần. Kiểm tra tính kháng bệnh đạo ôn và chất lượng gạo của các dòng thuần bằng chỉ thị phân tử, lấy nhiễm nhân tạo trong nhà kính và phân tích sinh hoá. Đến đời F8 thu nhận hạt cho khảo nghiệm.

Bước 4. Khảo nghiệm và công nhận giống

Dựa vào kết quả nhận được ở các bước trên, chọn ra một số dòng lúa ưu tú cho khảo nghiệm để phát triển thành giống.

Các phương pháp nghiên cứu

- *Tách chiết và tinh sạch ADN genôm lúa theo phương pháp dùng CTAB của Shaghi Maroof và CS (1984)*

- *Phản ứng PCR với các môi STS được tiến hành như sau:*

Hỗn hợp phản ứng PCR (25 μ l) chứa trong ống Eppendorf (0,5ml) bao gồm: nước vô trùng 17,4 μ l; dung dịch đệm 10 X PCR 2,5 μ l; dNTP (5mM) 0,6 μ l; MgCl₂ (50mM) 0,5 μ l; mỗi (Primer) 1 μ l; Taq polymerase 0,5 μ l; ADN mẫu tách từ lá lúa 2,5 μ l (0,02 μ g/ μ l).

Chương trình chạy PCR cho các môi STS: 1) 94^oC 4 phút; 2) 40 chu kỳ (94^oC - 1 phút, 58^oC -1 phút30 giây, 72^oC - 2 phút); 3) 72^oC - 5 phút.

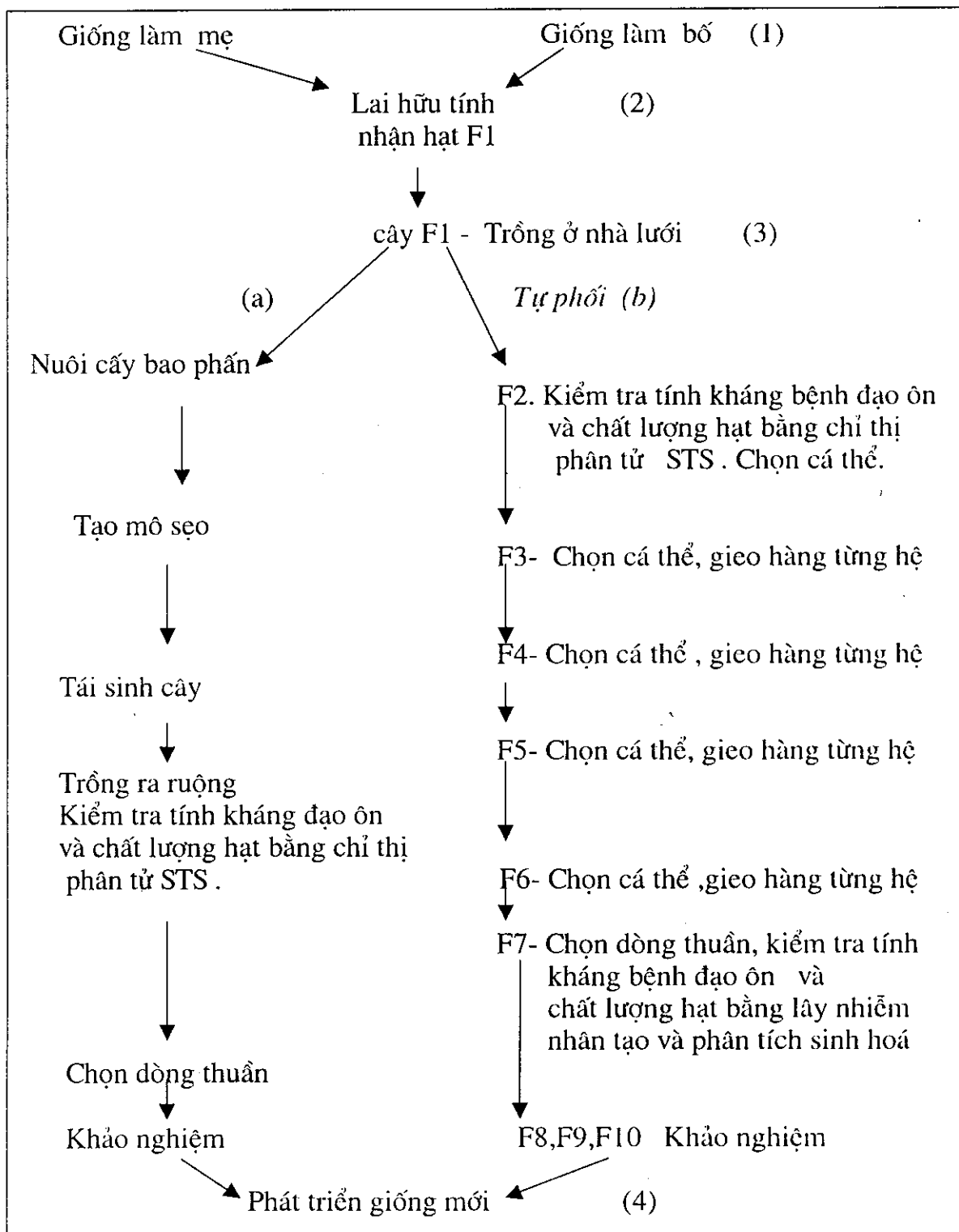
Điện di và đọc kết quả PCR: Sản phẩm PCR được kiểm tra bằng phương pháp điện di trên gel agarose 1%. Mẫu ADN (sản phẩm PCR) được trộn đều với đệm nạp mẫu 3X trước khi nạp mẫu vào giếng. Thời gian điện di khoảng 2 giờ ở điện thế 70V. Nhuộm ADN bằng EtBr, trong thời gian 30 phút. Rửa gel bằng nước cất trong 30 phút. Sau đó, bản gel được quan sát và chụp ảnh dưới đèn tử ngoại.

- *Đánh giá tính kháng bệnh đạo ôn bằng lây nhiễm nhân tạo trong nhà kính được thực hiện tại Viện Bảo vệ thực vật*

- *Phân tích sinh hoá được thực hiện tại Trung tâm kiểm tra và tiêu chuẩn hoá chất lượng nông sản – Viện Công nghệ sau thu hoạch.*

- *Phân tích phân tử theo phương pháp thông dụng của phòng DTTBV*

QUI TRÌNH CHỌN DÒNG LÚA KHÁNG BỆNH ĐẠO ÔN CHẤT LƯỢNG CAO



Chú thích: Thời gian để thực hiện qui trình như sau:

- Thu thập vật liệu ban đầu đến F1: 12 tháng

Thu thập hạt giống, trồng cây bố, mẹ, lai để thu hạt F1 qua 1 vụ = 6 tháng.

Trồng cây F1 thu đồng và hạt F2 qua 1 vụ = 6 tháng.

- **Chọn dòng bằng phương pháp chọn cá thể ở các thế hệ con lai:** 66 tháng
Từ F2 tự phối đến F10 qua 9 vụ = 54 tháng + 12 tháng
(với các dòng/ giống lúa trồng được cả 2 vụ trong 1 năm)

- **Chọn dòng bằng phương pháp nuôi cấy bao phấn:** 48 tháng
Nuôi cấy bao phấn để tạo mô sẹo = 2,5 tháng
Mô sẹo tái sinh cây, tạo cây hoàn chỉnh = 3,5 tháng
Cây trong ống nghiệm ra nhà lưới qua 1 vụ = 6 tháng (cây S1)
Cây thế hệ S1 trồng ra ruộng được cây S2 qua 1 vụ = 6 tháng
Chọn dòng kháng bệnh đạo ôn, chất lượng hạt ở thế hệ S2
Chọn dòng thuần từ S3 đến S5, qua 3 vụ = 18 tháng

Danh sách các nguồn vật liệu ban đầu

- Giống lúa Moroberekan
- C101A51
- Tẻ tép
- C71
- BR12
- KDML105
- WAB56-125
- Khang dân
- Q5
- Tám thơm

Danh sách các dòng lúa chọn lọc

T	Cấp lai	Số dòng chọn lọc		Mục tiêu chọn dòng	Chú thích
T		III. DÒNG ĐBK	Dòng cây lai		
1	Moroberekan/ KDML105	1 dòng (HPMK1)	2 dòng F4 (MK1, MK2)	Lúa kháng đạo ôn, chất lượng cao	
2	Moroberekan/ WAB56-125 Và ngược lại	2 dòng HPMD4, HPM D9	0	Lúa kháng đạo ôn, chất lượng cao	
3	C101A51/ KDML105	0	1 dòng F2 CAK1	Lúa kháng đạo ôn, chất lượng cao	
4	C71/KDML1 05	0	1 dòng F7 (CK1)	Lúa kháng đạo ôn , chất lượng cao	

5	Tẻ tép/Q5 và ngược lại	0	1 dòng F2 TQ1	Lúa kháng đạo ôn năng suất cao	
6	Q5/KDML10 5	0	1 dòng F2 QK1	Lúa năng suất cao, chất lượng tốt	
7	KDML105/W AB56-125 <i>Và ngược lại</i>	2 dòng (HPKW1 HPKW2)	2 dòng F7 (KW1, KW2)	Lúa chất lượng cao	
8	WAB56-125/ Tẻ tép	2 dòng (HPWT1, HPWT2)	0	Lúa kháng đạo ôn chất lượng cao	
9	Khangdân/ Moroberekan	0	2 dòng F5 (KDM1, KDM2)	Lúa kháng đạo ôn chất lượng khá	
10	Khangdân/ Tẻ tép	0	1 dòng F3 (KT1)	Lúa kháng đạo ôn chất lượng khá	
11	BR12/ WAB56-125	0	1 dòng F7 (BW12)	Lúa kháng đạo ôn, chất lượng khá	
12	BR12/Tám thơm	0	0	Lúa kháng bệnh đạo ôn, chất lượng cao	
13	BR12/KDML 105	0	1 dòng F2 BK1	Lúa kháng bệnh đạo ôn, chất lượng cao	
14	C71/WAB56- 125	0	1 dòng F2 CW1	Lúa kháng bệnh đạo ôn, chất lượng cao	

Trong số các tổ hợp lai trên đây có 3 tổ hợp (số 3,4,8) đã tiến hành lai từ năm 1998, tổ hợp khác được tiến hành từ năm 2001. Nhìn chung các dòng cây lai đã cho hạt của đời F3, F4, F5 và F7, vì vậy, cần phải tiếp tục chọn lọc đến F8 và các đời sau để đi đến kết quả cuối cùng chọn được các dòng thuần kháng bệnh đạo ôn, chất lượng tốt cho khảo nghiệm và phát triển ra sản xuất.

Dòng lúa đã đưa đi khảo nghiệm

Đã đưa Khảo nghiệm 1 dòng lúa từ nuôi cấy bao phần cây F1 của cặp lai KDML105 với WAB56-125 (*HPKW1*).

BỘ KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ
VIỆN CÔNG NGHỆ SINH HỌC

SẢN PHẨM II - 12

**QUY TRÌNH CHỌN TẠO DÒNG THUẦN
NGÔ BẰNG CÔNG NGHỆ TẾ BÀO THỰC
VẬT VÀ CHỈ THỊ PHÂN TỬ**

**Thuộc đề tài: Nghiên cứu sử dụng công nghệ tế
bào và kỹ thuật chỉ thị phân tử phục vụ chọn
tạo giống cây trồng**

Mã số: KC.04.08

Hà Nội, 11/2004

QUY TRÌNH TẠO DÒNG THUẦN BẰNG KỸ THUẬT NUÔI CẤY BAO PHẦN VÀ PHỐI HỢP CHỈ THỊ PHÂN TỬ TRONG CHỌN TẠO GIỐNG NGÔ CHỊU BỆNH KHÔ VẦN, NĂNG SUẤT CAO

I. CHỌN TẠO NGUỒN VẬT LIỆU NUÔI CẤY BAO PHẦN:

1. Mục tiêu:

- Các nguồn vật liệu phải có các đặc tính nông học ưu việt: Khả năng chống chịu tốt, có năng suất cao, màu hạt đáp ứng được nhu cầu thương mại...
- Có khả năng sinh sản đơn tính đực.

2. Phương pháp:

- Truyền tính cảm ứng từ các nguồn vật liệu có khả năng sinh sản đơn tính đực sang các nguồn vật liệu ưu tú nhưng không có khả năng sinh sản đơn tính đực theo phương pháp lai hữu tính.
- Sử dụng cờ của con lai F1 làm vật liệu nuôi cấy.

II. NUÔI CẤY BAO PHẦN TẠO DÒNG ĐƠN BỘI KÉP:

1. Hệ thống môi trường nuôi cấy (bảng 1):

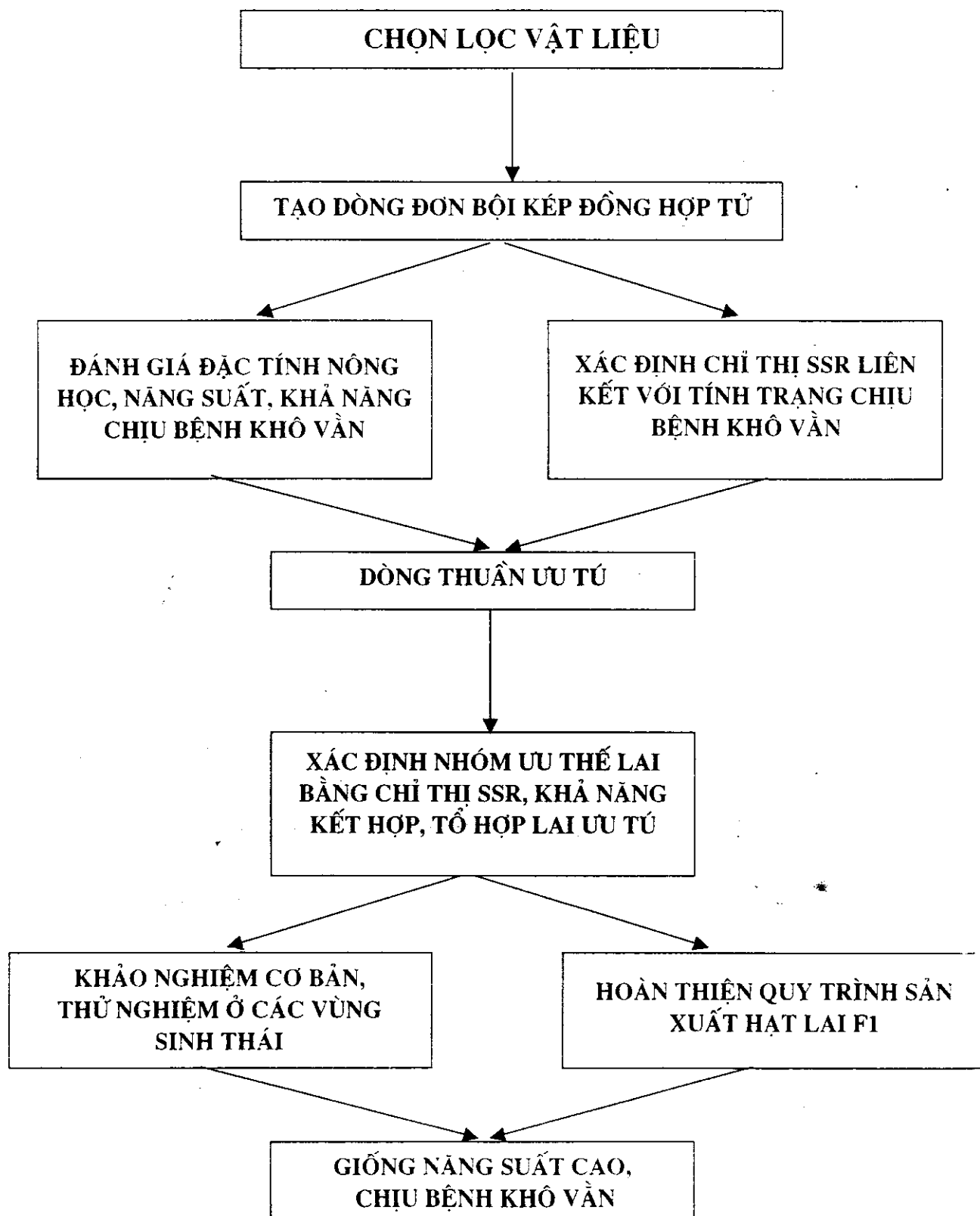
- Môi trường tạo phôi: YP+500mg Casein + 0,5% than hoạt tính.
- Môi trường tái sinh cây: N6 + 0,5-1 mg Kinetin.
- Môi trường tạo cây hoàn chỉnh: MS + 0,5-1 mg NAA.

2. Phương pháp:

a) Phương pháp xử lý mẫu:

- Cờ ngô được thu hái ở giai đoạn 1 nhân sớm đến 2 nhân sớm.
- Xử lý lạnh từ 7-14°C trong 7-14 ngày.
- Xử lý khử trùng mẫu: cờ ngô sau khi đã xác định ở giai đoạn từ một nhân sớm đến 2 nhân sớm, xử lý lạnh, được khử trùng trong dung dịch hypochloride natri 1% hoặc HgCl_2 0,5% từ 10-15 phút. Mẫu được cấy trên môi trường tạo phôi.

**SƠ ĐỒ CHỌN TẠO GIỐNG NGÔ CHỊU BỆNH KHÔ VẦN,
NĂNG SUẤT CAO DỰA TRÊN KỸ THUẬT NUÔI CẤY BAO PHẦN VÀ
PHỐI HỢP CHỈ THỊ PHÂN TỬ**



b) Điều kiện nuôi cấy

- Mẫu được nuôi cấy trong điều kiện không có ánh sáng từ 4 đến 6 tuần.
- Nhiệt độ nuôi cấy từ 27 đến 30°C.

c) Tạo cây đơn bội kép

- Đa bội hoá các phôi đơn bội:
- + Phôi có kích thước 0,5-1mm được cấy chuyển sang môi trường tương ứng, bổ sung 250mg/l colchicine, hoặc bao phần sau 21 ngày nuôi cấy trong môi trường tạo phôi được cấy chuyển sang môi trường tương ứng, bổ sung 250mg/l colchicine và xử lý ở 7°C từ 7 – 14 ngày.
- + Các phôi sau khi xử lý đa bội thể được cấy chuyển sang môi trường tái sinh cây.
- Tạo cây hoàn chỉnh: Các phôi tái sinh có đủ thân lá được cấy chuyển sang môi trường tạo rễ.
- Các cây hoàn chỉnh được ra ngôi trên nền trấu hun + 1/10 dung dịch MS.

d) Đánh giá cây lưỡng bội đồng hợp

- Đánh giá mức độ hữu thụ trên đồng ruộng.
- Sử dụng chỉ thị SSR đánh giá mức độ đồng hợp ở các locus khảo sát.

III. ĐÁNH GIÁ CÁC DÒNG ĐƠN BỘI KÉP ĐỒNG HỢP:

1. Đánh giá các đặc tính nông học:

- Đánh giá các đặc điểm sinh trưởng: Thời gian sinh trưởng, thời gian trổ cờ, tung phấn, phun râu.
- Đánh giá các đặc tính chống chịu: Chịu hạn, đổ, các loại bệnh...
- Đánh giá các yếu tố cấu thành năng suất và năng suất: tỷ lệ bắp hữu hiệu, chiều dài bắp, đường kính bắp, số hàng hạt, số hạt trên hàng, trọng lượng 1000 hạt.

2. Đánh giá khả năng chịu bệnh khô vằn:

- Đánh giá khả năng chịu bệnh khô vằn bằng phương pháp gây nhiễm nhân tạo ở giai đoạn cây có từ 5 – 9 lá thật theo quy trình của Viện Bảo vệ Thực vật.
- Xác định chỉ thị SSR phi065

3. Tuyển chọn các dòng thuần ưu tú:

Các dòng thuần ưu tú mang những đặc điểm sau:

- Có thời gian sinh trưởng thuộc nhóm chín sớm (từ 95-105 ngày), chín trung bình (110-115 ngày), chín muộn (120-125 ngày).
- Chống đổ, chịu hạn, bệnh khô vằn.
- Có năng suất từ 1 tấn đến 3,5 tấn/ha.
- Có màu hạt đáp ứng được yêu cầu tạo giống thương mại.
- Có khả năng kết hợp tốt.

IV. XÁC ĐỊNH TỔ HỢP LAI ƯU TÚ

1. Xác định nhóm ưu thế lai:

- Sử dụng chỉ thị SSR phân tích đa dạng di truyền tập đoàn dòng ưu tú theo quy trình của AMBIONET cung cấp.
- Phân nhóm ưu thế lai theo sơ đồ phả hệ.

2. Thiết kế sơ đồ lai:

- Thiết kế sơ đồ lai theo nhóm ưu thế lai.
- Chọn cây thử trong hệ thống lai đỉnh.

3. Tiến hành lai tạo:

- Thiết kế sơ đồ lai tạo trên đồng ruộng.
- Tiến hành lai theo sơ đồ lai đã thiết kế.

4. Khảo sát các tổ hợp lai:

- Thiết kế sơ đồ thí nghiệm so sánh giống theo khối ngẫu nhiên hoàn chỉnh.
- Đánh giá các đặc tính nông sinh học, năng suất, khả năng chống chịu.
- Thu thập số liệu và xử lý thống kê sinh học.
- Tuyển chọn các tổ hợp lai ưu tú.

5. Thử nghiệm ở các vùng sinh thái

- Xác định các vùng sinh thái.
- Xác định cơ cấu cây trồng, cơ cấu mùa vụ.
- Xác định quy mô thử nghiệm.
- Thử nghiệm và đánh giá khả năng sinh trưởng phát triển, mức độ thích ứng, sự tiếp nhận của nông dân.

V. HOÀN THIÊN QUY TRÌNH SẢN XUẤT HẠT LAI F1

1. Đánh giá mức độ tương đồng giữa bố và mẹ:

- Đánh giá sự tương đồng về thời gian sinh trưởng.
- Đánh giá nhu cầu về dinh dưỡng, các biện pháp canh tác.

2. Xác định các vùng sinh thái phù hợp để sản xuất hạt giống.

- Xây dựng mô hình sản xuất thử ở các vùng sinh thái.
- Xác định thời vụ sản xuất.
- Xác định tỷ lệ cây giữa bố và mẹ.

3. Tổng kết và xây dựng mô hình sản xuất hạt lai F1 có hiệu quả cao.

- Tổng kết số liệu.
- Tính toán hiệu quả kinh tế.
- Đề xuất mô hình sản xuất hạt lai F1 có hiệu quả cao.

SƠ ĐỒ CHỌN TẠO GIỐNG LVN145

Thời gian thực hiện

1998-2000

Tập hợp tuyển chọn tạo vật liệu



1999-2000

Tạo dòng thuần bằng kỹ thuật
nuôi cấy bao phấn



2001-2002- 2003

- Đánh giá (độ thuần di truyền,
đặc tính nông học, khả năng chịu
bệnh khô vằn).
- Phân nhóm ưu thế lai



2001- 2002

Lai tạo theo sơ đồ lai đỉnh top crop



2001- 2004

Thí nghiệm so sánh thử nghiệm,
khảo nghiệm



2005

Đề nghị công nhận

BỘ KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ
VIỆN CÔNG NGHỆ SINH HỌC

SẢN PHẨM II - 13

**QUY TRÌNH CHỌN TẠO GIỐNG LẠC
KHÁNG BỆNH RỈ SẮT CÓ SỰ TRỢ GIÚP
CỦA CHỈ THỊ PHÂN TỬ**

**Thuộc đề tài: Nghiên cứu sử dụng công nghệ tế
bào và kỹ thuật chỉ thị phân tử phục vụ chọn
tạo giống cây trồng**

Mã số: KC.04.08

Hà Nội, 11/2004

PHƯƠNG PHÁP XÁC ĐỊNH CHỈ THỊ PHÂN TỬ TRONG NGHIÊN CỨU DA DẠNG VÀ ỨNG DỤNG TRONG TẠO GIỐNG CÂY TRỒNG

I. Giới thiệu

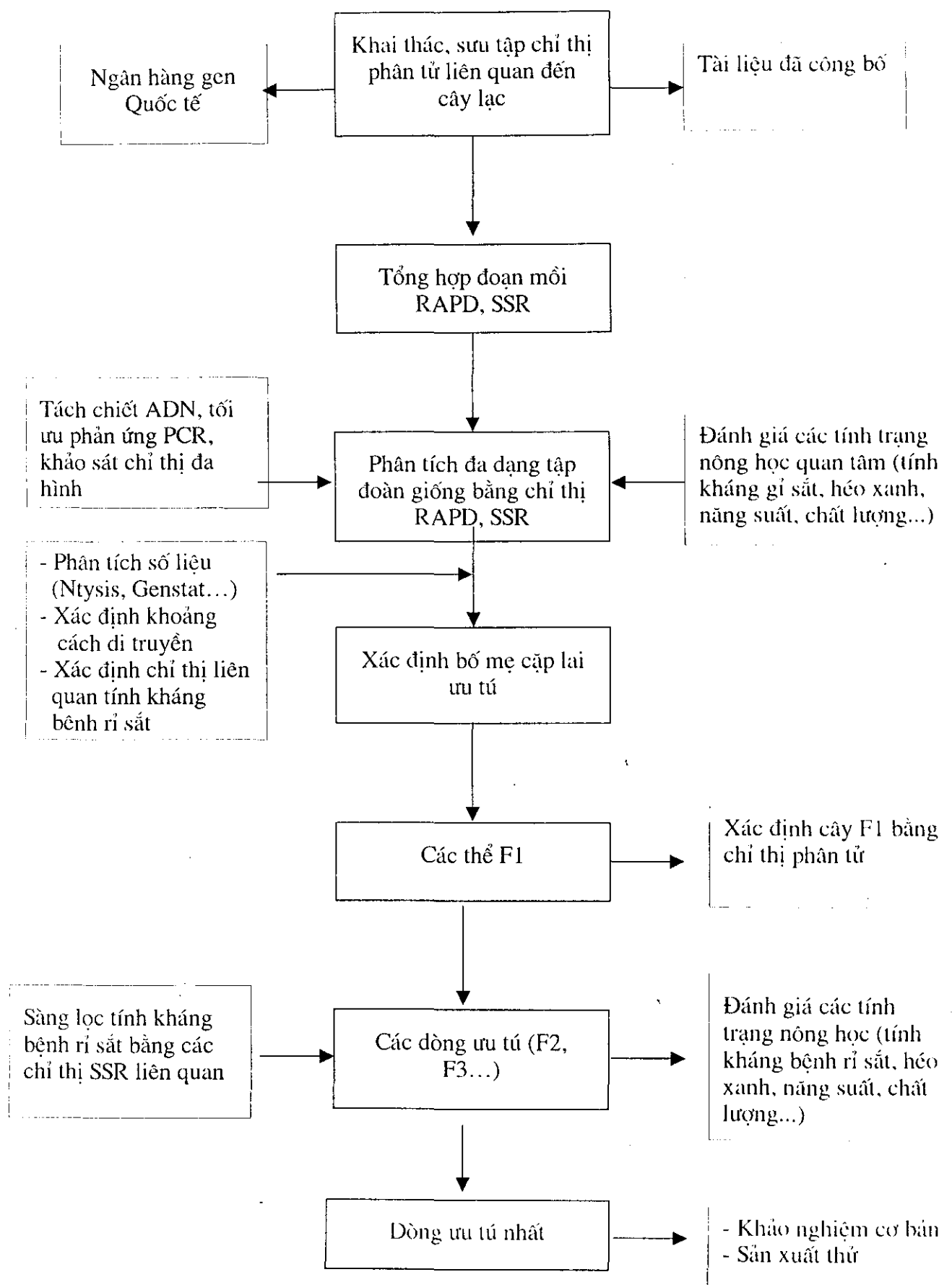
Gần đây chọn tạo giống dưới sự trợ giúp của chỉ thị phân tử đang được ứng dụng rộng rãi ở các Viện nghiên cứu trên thế giới (Mỹ, Trung Quốc, IRRI, Ấn Độ). Chỉ thị phân tử liên kết chặt chẽ với các gen sẽ được sử dụng để chọn lọc các cá thể ngay ở giai đoạn sớm mà không phải phụ thuộc vào điều kiện môi trường. Chọn giống dưới sự hỗ trợ của chỉ thị phân tử (Marker Assisted Selection = MAS) rất có hiệu quả trong tạo giống lúa kháng bệnh bạc lá, cà chua chịu bệnh nấm sương, lạc, đậu tương kháng bệnh gỉ sắt... Kỹ thuật chỉ thị phân tử đảm bảo cho các nhà chọn tạo giống nhận diện chính xác các gen liên quan ở giai đoạn sớm mà không bị chi phối bởi điều kiện môi trường và thời gian tạo giống rút ngắn xuống từ 2-3 năm.

Quy trình thiết lập: Muốn xác định được các chỉ thị phân tử liên quan đến tính trạng mong muốn. Trước tiên phải xác định được cặp lai trong tập đoàn giống lạc có allen về tính trạng mong muốn ngược nhau. Sử dụng các chỉ phân tử phân tích quần thể lai hữu tính F1, F2, F3 (khoảng 100 – 300 dòng), đồng thời theo dõi kiểu hình. Kết quả được xử lý bằng các phần mềm chuyên dụng, từ kết quả phân tích sẽ tìm được các chỉ thị liên quan đến tính trạng quan tâm.

Dựa vào các tài liệu về lạc đã công bố trên các tạp chí thế giới và ngân hàng gen quốc tế, chúng tôi tìm kiếm các chỉ thị phân tử có liên quan đến tính trạng mong muốn và sử dụng các chỉ thị này trên các dòng lai F1, F2, F3... của tổ hợp lai lạc theo tính kháng gỉ sắt.

Sơ đồ tổng quát:

Sơ đồ các giai đoạn sử dụng chỉ thị phân tử trong tạo giống cây trồng



II. Các bước tiến hành

1. Khai thác, sưu tập chỉ thị phân tử

- Các chỉ thị phân tử được khai thác từ ngân hàng gen quốc tế
- Chỉ thị phân tử cũng được khai thác từ các công trình trong và ngoài nước đã công bố trên các tạp chí.

2. Tổng hợp đoạn môi (chỉ thị)

- Đoạn môi có thể được tổng hợp từ máy tổng hợp oligonucleotit tự động tại Viện Công nghệ Sinh học
- Các đoạn môi cũng có thể được đặt tổng hợp bởi các công ty, các hãng sản xuất trên thế giới.

3. Thu nguyên liệu nghiên cứu

- Nguyên liệu nghiên cứu là các tập đoàn giống được thu thập trong và ngoài nước.
- Mẫu vật tách chiết ADN có thể thu trực tiếp ngoài đồng ruộng hoặc trồng cây trong phòng thí nghiệm để thu mẫu vật sạch.

4. Đánh giá tính kháng bệnh rỉ sắt/héo xanh bằng các phương pháp tiêu chuẩn của quốc tế

- Đánh giá tính kháng bệnh (rỉ sắt, héo xanh vi khuẩn ...) theo tiêu chuẩn quốc tế được thực hiện tại Viện Khoa học kỹ thuật nông nghiệp Việt Nam.
- Đánh giá một số tính trạng nông học (năng suất, chất lượng...) do Trung tâm nghiên cứu và thực nghiệm cây đậu đỗ thực hiện.

5. Tách chiết ADN tổng số

Để các nghiên cứu về đa dạng tập đoàn chính xác thì các mẫu ADN tách chiết phải có đủ các tiêu chuẩn: Không đứt gãy, sạch protein và có hàm lượng đồng đều.

6. Phân tích đa dạng tập đoàn bằng chỉ thị phân tử (RAPD, SSR,..) và xác định các chỉ thị liên quan

- Phân tích PCR các mẫu vật với các đoạn môi ngẫu nhiên hoặc đặc hiệu
- Điện di kiểm tra sản phẩm trên gel agarose 2% và trên gel polyacryl amit 6%.
- Nhuộm gel bằng ethidium bromide và nhuộm bạc
- Chụp ảnh và phân tích số liệu.
- Sử lý số liệu trên phần mềm máy tính chuyên dụng NTSYSpc version 2.0 để lập ra bảng hệ số tương đồng và sơ đồ hình cây thể hiện mối quan hệ giữa các giống.
- Phân tích mối liên quan giữa kiểu gen và kiểu hình trong chương trình Genstat

7. Xác định bố mẹ cặp lai ưu tú

- Dựa vào mối quan hệ di truyền giữa các giống.
- Năng suất, tính chống chịu bệnh ...

Từ hai yếu tố trên chọn các cặp lai phù hợp theo hướng nghiên cứu.

8. Tiến hành lai hữu tính đối với các cặp lai ưu tú: Gieo trồng các cây F1. Kiểm tra các thể lai F1 bằng các chỉ thị phân tử.

9. Sử dụng các chỉ thị phân tử liên quan tính kháng bệnh rỉ sắt để sàng lọc ra các dòng lai trong quần thể F2, F3... Phân tích các đặc điểm nông học và tính ổn định di truyền của các dòng mang các chỉ thị liên quan.

10. Kiểm tra dòng ưu tú, khảo nghiệm cơ bản và sản xuất thử.

III. Trình tự các cặp môi SSR và RAPD

Bảng 1. Trình tự chỉ thị RAPD được sử dụng trong nghiên cứu đa hình tập đoàn giống lạc

Tên môi	Trình tự nucleotide	Tên môi	Trình tự nucleotide
RA31	5'AACCGACGGG 3'	RA159	5' GTCCACACGG 3'
RA36	5'TACCACCCCG 3'	UBC3	5' CTATGCCGAC 3'
RA40	5'GGCGGACTGT 3'	UBC776	5' CCTGCTCATC 3'
RA45	5'TACCACCCCG 3'	OPL3	5' CTGTTGCTAC 3'
RA142	5'CAATCGCCGT 3'	OPH08	5' CCTCCAGTGT 3'
RA143	5'TCGGCGATAG 3'		

Bảng 2. Trình tự 23 cặp môi SSR được thiết kế riêng cho lạc

TT	Trình tự	Kích thước allen lý thuyết (bp)
1	5' ATA CGT GAC TTG GGC CAG AC 5' AGT GAA AAA TAC ACC CAA CGA A	152
2	5' TCT GTT GAG AAC CAC CAG CA 5' GTG CTA GTT GCT TGA CGC AC	198
3	5' GCA ACT AGG GTG TAG GCC GT 5' CAA CCC TAT ACA CCG AGG GA	285
4	5' TCA ACT TTG GCT GCT TCC TT 5' TCA ACC GTT TTT CAC TTC CA	285
5	5' CGT CGG ATT TAT CTG CCA GT 5' AGT AGG GGC AAG GGT TGA TG	152
6	5' AAT CCG ACG CAA TGA TAA AAA 5' TCC CCT TAT TGT TCC AGC AG	265
7	5' AAC TCG CTT GAT CCG GCT AA 5' AGG AAT AAT AAC AAT ACC AAC AGC	264
8	5' CTT TCG CGC TTG TTT GAA AT 5' AAG CTG CGT GTA AAA GGG TC	298
9	5' ATC ACC ATC AGA ACG ATC CC 5' TTT GTA GCC TTC TGG CGA GT	269
10	5' AAG CTG AAC GAA CTC AAG GC 5' TGC AAT GGG TAC AAT GCT AGA	265
11	5' GGA CAG CCG GAT GCT ATT TA 5' ACA TGA GTC CCT TTT CCC TT	281
12	5' AAT GCA TGA GCT TCC ATC AA 5' AAC CCC ATC TTA AAA TCT TAC CAA	259

13	5' TGA CCA AAG TGA TGA AGG GA 5' AAG TTG TTT GTA CAT CTG TCA TCG	262
14	5' TGT CGT TGT AAG ACC TCG GA 5' TTG GTT TCC TTA AGG CTT CG	290
15	5' TGA GTT TCC CCA AAA GGA GA 5' CAA CAA CAA TAC GGC CAA CA	132
16	5' ATC ATT GTG CTG AGG GAA GG 5' CAC CAT TTT TCT TTT TCA CCG	238
17	5' ATT CCC ATG TCG TCA AGA CC 5' GCG ACG GTA TTG GCT TTT AG	203
18	5' TTC ACC CGT ACA AAC CAG TG 5' CCT CGG CAG ATC TGG AGT AA	292
19	5' ACT CCC GAT GCA CTT GAA AT 5' AAC CTC TGT GCA CTG TCC CT	225
20	5' TTG CTA CTA AGC CGA AAA TGA A 5' CTT GAA ATT AAC ACA TAT GCA CAC A	230
21	5' ATC CCT GAT TAG TGC AAC CC 5' CGT AGG TGG TTT TAG GAG GG	203
22	5' CTC AAA AAG CGC TTA GCC AC 5' CTG CCT ACT GCC TAC TGC CT	194
23	5' CGT TCT TTG CCG TTG ATT CT 5' AGC ACG CTC GTT CTC TCA TT	282

IV. Hóa chất và thiết bị cần thiết cho nghiên cứu

a) Hóa chất sử dụng cho sinh học phân tử

Bảng 3. Hoá chất

TT	Tên hoá chất
1	Disstilled phenol
2	Disstilled ethanol
3	NaCl
4	Tris Base
5	Glycine
6	Sodium lauryl sulphate (SDS)
7	EDTA (Sodium salt)
8	Acetic acid (glacial)
9	Proteinase K
10	DNase-free Rnase
11	Rnase T ₂
12	Pancreatic Rnase
13	Dnase I

TT	Tên hoá chất
14	S ₁ nuclease
15	Alkaline phosphatase
16	DNA ligase from T ₄
17	T ₄ polynucleotide kinase
18	DNA polymerase I
19	Terminal deoxynucleotidyl transferase
20	Various restriction endonucleases
21	Agarose type V
22	Acrylamide
23	Bis-acrylamide
24	Ethidium bromide
25	Acridine orange
26	Nitrocellulose paper
27	Formamide
28	Polyethylene glycol
29	CaCl ₂
30	ZnSO ₄
31	Sarcosyl
32	MgCl ₂
33	Various plasmid-harboring bacterial strains
34	CsCl
35	Bacteriophage DNA
36	Molecular weight marker for DNA
37	In vitro translation system
38	Radiolabeled compounds like
39	α - (32 p) d ATP
40	α - (32 p) TTP
41	γ - (32 p) ATP
42	Bạc nitrat...

b) Thiết bị sử dụng: Bao gồm các ống pipet các loại, đầu côn các loại, pipetman, ống corning 50ml, các ống đong... Máy ly tâm lạnh, máy khuấy từ, máy lắc, máy trộn mẫu, máy làm khô ADN, máy điện di ngang, điện di đứng, máy soi gel - UV, máy đo quang phổ, máy chụp ảnh, máy PCR, máy scan, tủ lạnh – 20°C, -85°C...

Quy trình tách chiết ADN thực vật

* Dung dịch chiết: Tris-HCl 0,1 M; NaCl 1,4 M; EDTA 0,02 M; CTAB 4%.

* Quy trình:

- Lấy 25 ml dung dịch chiết, bổ sung thêm 25 µl Mercaptoethanol trộn đều (Buffer A), ủ ở 65°C cho đến khi dùng (dùng trong ngày).
- Lấy 200 mg lá non nghiền trong nitor lỏng thành dạng bột mịn.
- Thêm vào 700 µl Buffer A trộn đều và ủ ở 65°C ít nhất 1 giờ. Sau đó, lấy ra để ở nhiệt độ phòng 5 phút.
- Thêm 600 µl cloroform: isoamin tỉ lệ 24:1 vào trộn đều trong 5 phút ở nhiệt độ phòng.
- Ly tâm với tốc độ 13.000 v/p trong 5 phút và hút cẩn thận 500 µl dung dịch chiết sang một ống eppendorf 1,5 ml mới.
- Thêm 500 µl iso propanol trộn đều, đặt trong đá lạnh cho ADN kết tủa trong 10 phút.
- Ly tâm 13.000 v/p trong 5 phút, đổ bỏ dung dịch trên thu lại cặn. Rửa cặn bằng cồn 70% hai lần.
- Làm khô ADN thu được bằng máy Speed-vac.
- Hòa tan ADN thu được trong 100 µl H₂O cất 2 lần deion, ủ trong 37°C trong 1 giờ và bảo quản ở -20°C.

* ADN tách chiết, được kiểm tra độ sạch và hàm lượng bằng máy đo quang phổ hấp phụ.

Tối ưu phản ứng PCR

* Tối ưu các thành phần hóa chất trong phản ứng RAPD.

- Đệm PCR : 1X
- MgCl₂ : 3mM
- 4dNTPs : 150 µM
- Đoạn mồi : 300 nM
- Taq polymeraza : 0,75 đơn vị
- ADN khuôn : 5-10 ng

* Chương trình nhiệt độ trong phản ứng RAPD

Bước 1: 94°C - 3 phút, bước 2: 94°C - 1 phút, bước 3: 36°C - 45 giây, bước 4: 72°C - 2 phút, bước 5: 72°C - 20 phút và bước 6: lưu giữ ở 4°C. Từ bước 2 đến bước 4 lặp lại 45 chu kỳ

* Tối ưu các thành phần hóa chất trong phản ứng SSR.

- Đệm PCR : 1X
- MgCl₂ : 2,5 mM
- 4dNTPs : 150 µM
- Mồi xuôi : 150 nM
- Mồi ngược : 150 nM
- Taq polymeraza : 1 đơn vị
- ADN khuôn : 5-10 ng

* Chương trình nhiệt độ trong phản ứng SSR

Bước 1: 94°C - 3 phút, bước 2: 94°C - 30 giây, bước 3: X°C - 45 giây, bước 4: 72°C - 1 phút, bước 5: 72°C - 10 phút và bước 6: lưu giữ ở 4°C. Từ bước 2 đến bước 4 lặp lại 34 chu kỳ. X°C là nhiệt độ gắn mồi, tùy thuộc vào từng mồi cụ thể.

**VIỆN KHOA HỌC KỸ THUẬT NÔNG NGHIỆP VIỆT NAM
TRUNG TÂM NGHIÊN CỨU & THỰC NGHIỆM ĐẬU ĐỒ**

QUI TRÌNH ĐÁNH GIÁ BỆNH & CHỌN GIỐNG LẠC

Tên đề tài : “ Nghiên cứu sử dụng công nghệ tế bào và kỹ thuật chỉ thị phân tử phục vụ chọn tạo giống lạc”. thuộc đề tài KC 04 - 08

Chủ trì đề tài nhánh : Th.S. Nguyễn Văn Thắng

Cơ quan chủ trì đề tài nhánh : Trung tâm nghiên cứu & Thực nghiệm đậu đỗ

Thời gian thực hiện : Tháng 10 năm 2001 đến tháng 10 năm 2004

Hà nội 2004

QUI TRÌNH ĐÁNH GIÁ BỆNH

I. ĐÁNH GIÁ BỆNH

Cơ sở của các phương pháp là bằng biện pháp nhân tạo tạo ra áp lực bệnh đủ để cho bệnh lây lan nhanh chóng và có tác động trực tiếp lên các mẫu giống cần đánh giá.

Gỉ sắt

- Trong phòng bằng phương pháp lá cắt (Detached Leaf Technique - Melouk và Band 1978).
- Ngoài đồng theo PP hàng nhiễm (*infectorrow method*- Subrahmanyam 1982 a- b)

Héo xanh:

- PP nhiễm hạt nảy mầm
- PP xét thương rỗ

1. Chuẩn bị nguồn bệnh

- Bệnh gỉ sắt:

Thu các lá bị bệnh từ các cây bệnh lưu giữ trong nhà lưới hoặc ngoài đồng tùy theo thời vụ.

Tiến hành ủ lá bệnh trong điều kiện nhiệt độ 28-30 oC, độ ẩm 80-90 % trong 2-3 ngày

Dùng bàn chải, chải nhẹ bào tử từ các ổ bệnh trên các lá bị bệnh.

Lọc dịch bào tử đảm bảo độ sạch và sau đó tiến hành kiểm tra nồng độ bào tử.

Dịch bào tử dùng nhiễm có nồng độ 100 000 bào tử/ 1ml dịch

- Bệnh héo xanh

Thu thập nguồn bệnh

Phân lập nguồn bệnh trên môi trường TZC (nhặt các khuẩn lạc có biểu hiện độc tính cao)

Thử độc tính trên thuốc lá

Nhân nguồn bệnh đã được phân lập trên môi trường SPA (nhiệt độ 28-30 oC, trong 48-72 giờ)

Bảo quản dài hạn trong nitơ lỏng, ngắn hạn trong nước cất ở điều kiện lạnh.

Dịch khuẩn lạc dùng lây nhiễm có nồng độ $10^8 - 10^{10}$ khuẩn lạc/1ml dung dịch.

2. Phương pháp lây nhiễm

Bệnh gỉ sắt

- *phương pháp hàng nhiễm (infectorrow method):*

Gieo xen kẽ 2-4 hàng giống đánh giá với 1 hàng nhiễm. Hàng nhiễm được gieo trước hàng giống cần đánh giá 10-15 ngày.

Phun dịch bào tử khi cây có 3-5 lá thật (phun cho cả hàng nhiễm và hàng giống cần đánh giá)

Sau khi phun cần tưới đẫm nước để đảm bảo độ ẩm không khí >90% trong vòng 3 ngày tạo điều kiện cho bào tử nảy mầm.

Đánh giá bệnh theo phương pháp cho điểm (1-9) ở ngày thứ 30 sau lây nhiễm.

- *Phương pháp lá tách (detached leaf technique):*

Ngắt lá chết thứ ba từ đỉnh xuống của các mẫu giống cần đánh giá (Thường làm buổi sáng).

Rửa sạch

Phun đều dịch bào tử lên cả hai mặt lá

Cắm các lá chết vào khay cát đã khử trùng hoặc quần bông vào đầu cuống lá rồi đặt vào đĩa petri có lót giấy hút ẩm bão hoà nước tiệt trùng

Đặt các khay lá/ đĩa petri vào buồng sinh trưởng (Đặt ở điều kiện ánh sáng thường, nhiệt độ 28-30 oC, độ ẩm 95%)

Đánh giá bệnh theo phương pháp cho điểm (1-9) ở ngày thứ 21 kể từ ngày nhiễm.

Bệnh héo xanh:

- Phương pháp nhiễm hạt nảy mầm:

Ngâm, ủ các mẫu giống cần đánh giá cho nảy mầm, sau đó ngâm trong dịch khuẩn 30 phút, vớt ra gieo ngay.

Đánh giá tỷ lệ cây sống sót một lần sau khi gieo 45 ngày hoặc 2 lần vào 25-30 ngày và 45 ngày sau gieo

Tỷ lệ cây sống sót (%) = Số cây sống / Tổng số hạt gieo x 100

- Phương pháp sát thương rễ

Tưới dịch khuẩn lác vào vùng rễ các cây lác 3-5 lá thật đã được dùng dao sát thương.

Tính tỷ lệ cây sống sót 45 ngày sau lây nhiễm.

Tỷ lệ cây sống sót (%) = Số cây sống / tổng số cây được nhiễm x 100

Được đánh giá theo phương pháp cho điểm 1-9 (Subrahmanyam 1980)

Đánh giá bệnh trong phòng theo PP lá tách – Thang 1-9

1-5 kháng cao

6-7 kháng TB

8- nhiễm nhẹ

9 nhiễm nặng

Điểm	Nhận biết
1	Không có vết bệnh
2	Vết bệnh chiếm 0,5% diện tích lá
3	Vết bệnh chiếm 1% diện tích lá
4	Vết bệnh chiếm 2% diện tích lá
5	Vết bệnh chiếm 5% diện tích lá
6	Vết bệnh chiếm 10% diện tích lá
7	Vết bệnh chiếm 20% diện tích lá
8	Vết bệnh chiếm 35% diện tích lá
9	Vết bệnh chiếm ≥ 50% diện tích lá

Đánh giá ngoài đồng theo phương pháp hàng nhiễm - Thang điểm 1-9 của ICRISAT (Subrahmanyam 1982)

Điểm	Rỉ sắt	Đốm lá	% DTL bị hại
1	Không có vết bệnh	Không có vết bệnh	0
2	Có rất ít vết bệnh trên lá già	Có rất ít đốm bệnh trên lá già	1-5
3	Có một ít đốm bệnh trên lá già và bắt đầu có sự hình thành bào tử	Có một ít đốm bệnh trên lá già và lác đác có sự hình thành bào tử	6-10
4	Vết bệnh xuất hiện các đốm to hoặc nhỏ rất rõ, nhất là ở tầng lá già và giữa	Xuất hiện các đốm bệnh nhỏ, nhất là ở tầng lá dưới và giữa	11-20
5	Vết bệnh xuất hiện nhiều ở tầng lá già và giữa, một số lá vàng và bắt đầu héo, sự hình thành bào tử ở mức độ vừa phải	Vết bệnh xuất hiện nhiều ở tầng lá già và giữa, một số lá vàng và bắt đầu rụng, sự hình thành bào tử ở mức độ vừa phải	21-30
6	Tương tự như với điểm 5 nhưng sự hình thành bào tử mạnh hơn	Tương tự như với điểm 5 nhưng sự hình thành bào tử mạnh hơn	31-40
7	Vết bệnh xuất hiện trên toàn bộ cây, tầng lá già và giữa bị khô	Vết bệnh xuất hiện trên toàn bộ cây, tầng lá già và giữa bị rụng	41-60
8	Tương tự điểm 7 nhưng lá bị khô nhiều hơn	Tương tự điểm 7 nhưng lá bị rụng nhiều hơn	61-80
9	50-100% lá bị khô héo	50-100% lá bị rụng, cây gần như trơ trụi.	81-100

DTL: diện tích lá

I. PP lai hữu tính

Lai theo PP do SN Nigam (1990) đề xuất.

Chọn giống bố mẹ: Tùy theo mục tiêu chọn giống và lai tạo để chọn bố mẹ tuy nhiên thường chọn Giống kháng cao làm bố và nhiễm nặng nhưng có NS cao làm mẹ.

Tùy theo thời gian từ mọc đến ra hoa của từng giống mà quyết định thời gian gieo hợp lý sao cho các giống bố mẹ ra hoa cùng thời điểm

Trồng cây bố mẹ theo hàng gần nhau

Khử đực và đánh dấu hoa lai tiến hành sau 2 giờ chiều

Thụ phấn trước 9 giờ sáng (càng sớm càng tốt sau khi hoa tung phấn)

Theo dõi tỷ lệ đậu quả

Thu hoạch quả lai: chỉ thu những quả lai đã được đánh dấu

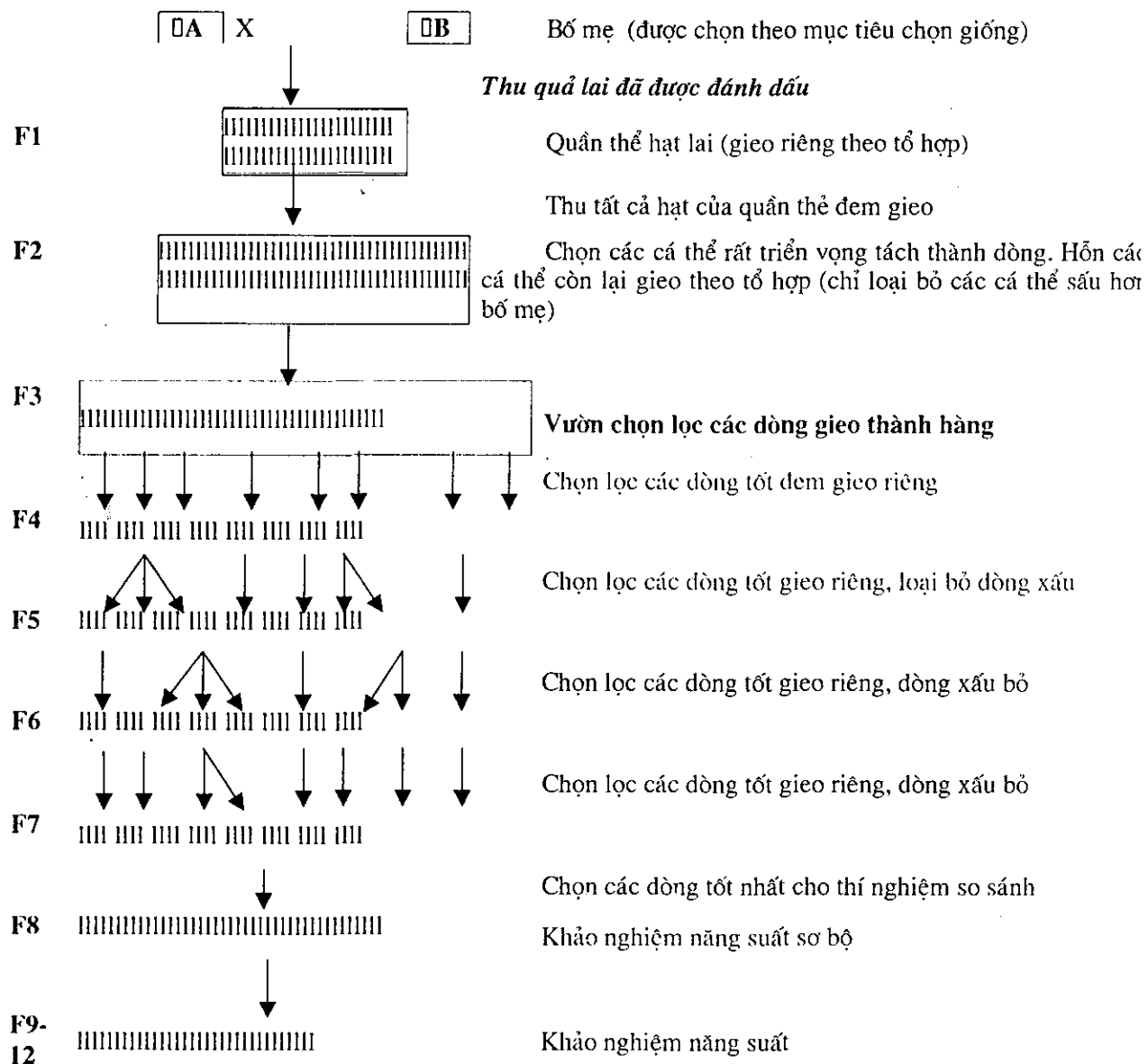
II. Phát triển quần thể & Chọn lọc

- Trồng hạt lai ở khoảng cách hàng rộng (hàng x hàng 45-50 cm, cây x cây 20 cm), loại bỏ các tổ hợp tự thụ, thu hoạch toàn bộ hạt
- Gieo thế hệ F2 ở vụ tiếp theo ở khoảng cách hàng rộng. Tùy theo mục đích chọn lọc chia ra hai cách sau

+ Phát triển quần thể để đánh giá đa dạng di truyền: Lấy ngẫu nhiên 200- 300 các thể thu hoạch riêng, gieo tiếp từng cá thể theo hàng- Lấy mẫu lá phân tích đa dạng di truyền và đánh giá bệnh trong phòng (PP lá tách) .đánh giá các một số đặc tính nông học quan trọng.

+ Chọn lọc dòng triển vọng: Chọn các cá thể có các đặc tính nông học và năng suất chấp nhận được thu hoạch riêng- Gieo các cá thể theo hàng riêng trong điều kiện lây nhiễm nhân tạo (PP hàng nhiễm). Đánh giá năng suất và phản ứng với bệnh. Thu hoạch các dòng cho năng suất cao, kháng bệnh. Chọn lọc ở các vụ tiếp theo. F5- F6 so sánh sơ bộ.

Sơ đồ chọn tạo giống lạc bằng lai hữu tính theo phương pháp chọn lọc cá thể (phổ hệ) cải tiến



BỘ KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ
VIỆN CÔNG NGHỆ SINH HỌC

SẢN PHẨM II - 14

**QUY TRÌNH CHỌN TẠO GIỐNG ĐẬU
TƯƠNG KHÁNG BỆNH RỈ SẮT VÀ CHỊU
HẠN CÓ SỰ TRỢ GIÚP CỦA CHỈ THỊ
PHÂN TỬ**

**Thuộc đề tài: Nghiên cứu sử dụng công nghệ tế
bào và kỹ thuật chỉ thị phân tử phục vụ chọn
tạo giống cây trồng**

Mã số: KC.04.08

Hà Nội, 11/2004

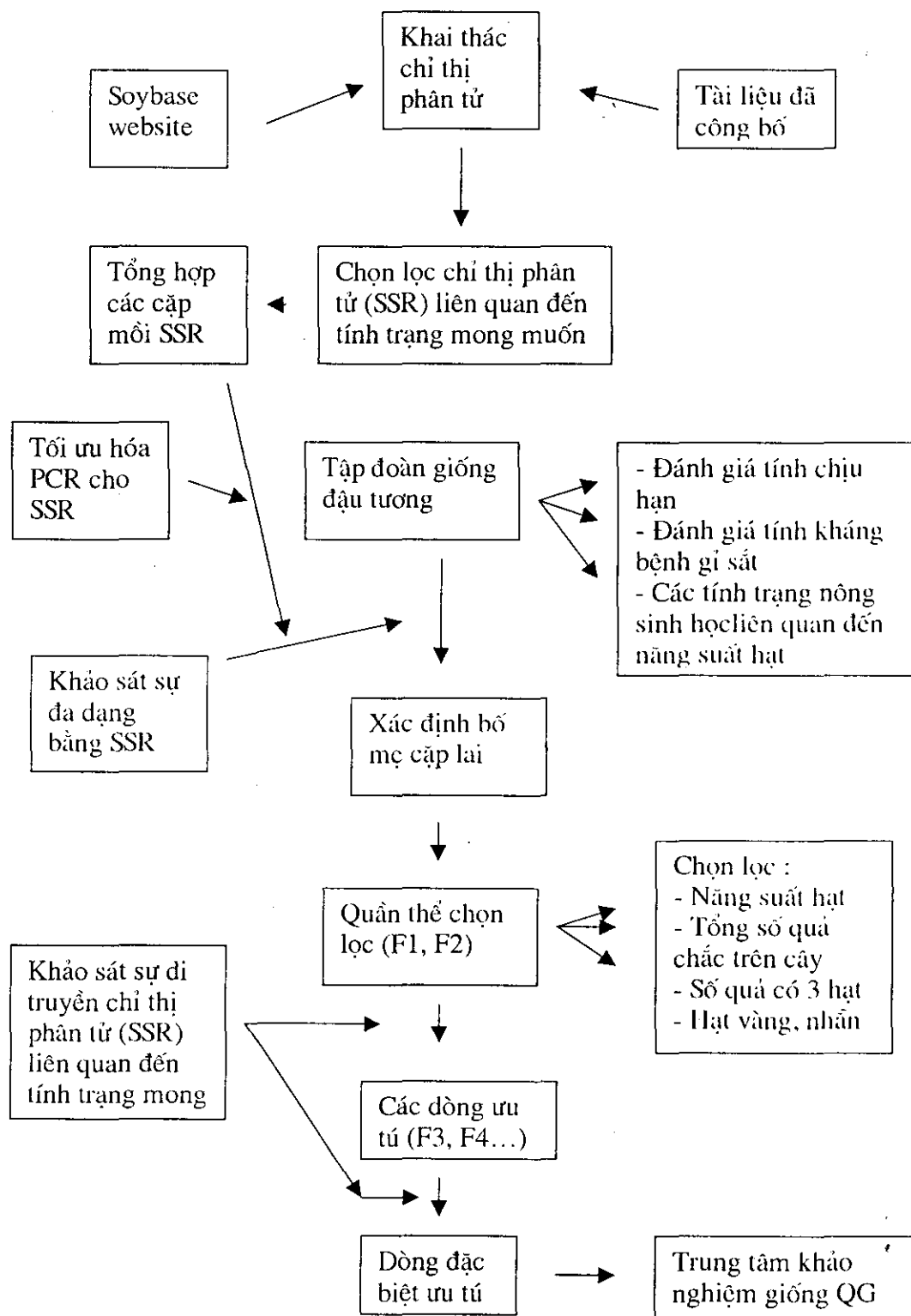
PHƯƠNG PHÁP XÁC ĐỊNH CHỈ THỊ PHÂN TỬ LIÊN QUAN ĐẾN TÍNH CHỊU HẠN VÀ TÍNH KHÁNG BỆNH GỈ SẮT

Nguyên lý: Chỉ thị phân tử (RFLP, SSR, RAPD...) được phát triển mạnh mẽ nhằm mục đích lập bản đồ gen, định vị các tính trạng nông học có giá trị kinh tế cao và chọn lọc nhanh các dòng lai có các tính trạng như mong muốn đó.

Quy trình xây dựng: Để xác định được chỉ thị phân tử liên quan đến tính trạng mong muốn, cần phải tìm được cặp lai trong tập đoàn giống đậu tương có allele về tính trạng mong muốn ngược nhau. Sau khi lai hữu tính, cần nghiên cứu quần thể các dòng lai F₂, F₃ (khoảng 100-300 dòng) bằng các chỉ thị phân tử đồng thời theo dõi tính trạng mong muốn theo kiểu hình trong các thời điểm khác nhau trong suốt quá trình sinh trưởng. Kết quả được xử lý bằng các phần mềm chuyên dụng, chúng ta sẽ tìm được các chỉ thị liên quan đến tính trạng này.

Để rút ngắn thời gian, trên cơ sở các tài liệu về đậu tương đã công bố trên thế giới và soybase website (<http://129.186.26.94>), chúng tôi chọn lọc các chỉ thị phân tử có liên quan đến tính trạng mong muốn và nghiên cứu hoàn thiện và áp dụng phương pháp sử dụng các chỉ thị này trên các dòng lai thế hệ F₂, F₃... của tổ hợp lai để chọn giống đậu tương theo tính trạng mong muốn.

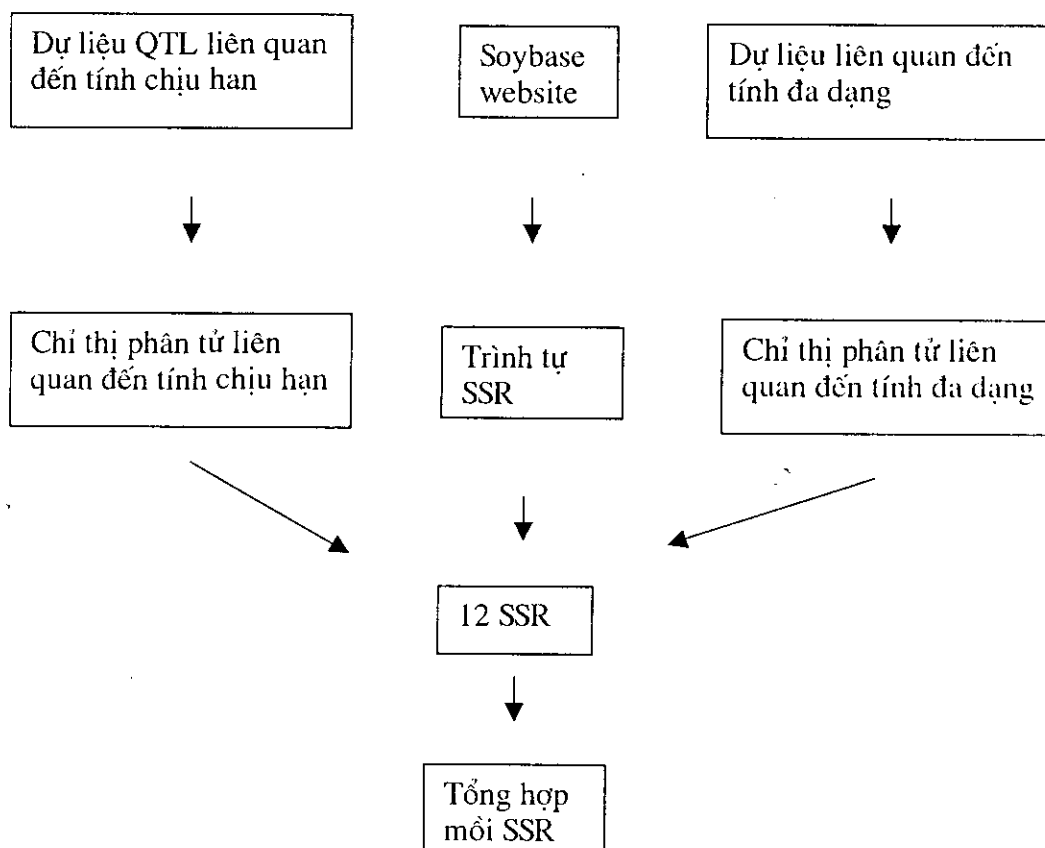
Sơ đồ tổng quát biểu diễn dưới đây



1. Xác định chỉ thị phân tử cho tính chịu hạn:

Tính chịu hạn do nhiều gen quyết định theo các hướng như tránh hạn, chịu hạn và chịu mất nước. Locus tính trạng số lượng (QTL) liên quan đến tính chịu hạn được nghiên cứu tương đối kỹ ở đậu tương.

Khai thác chỉ thị phân tử cho tính chịu hạn

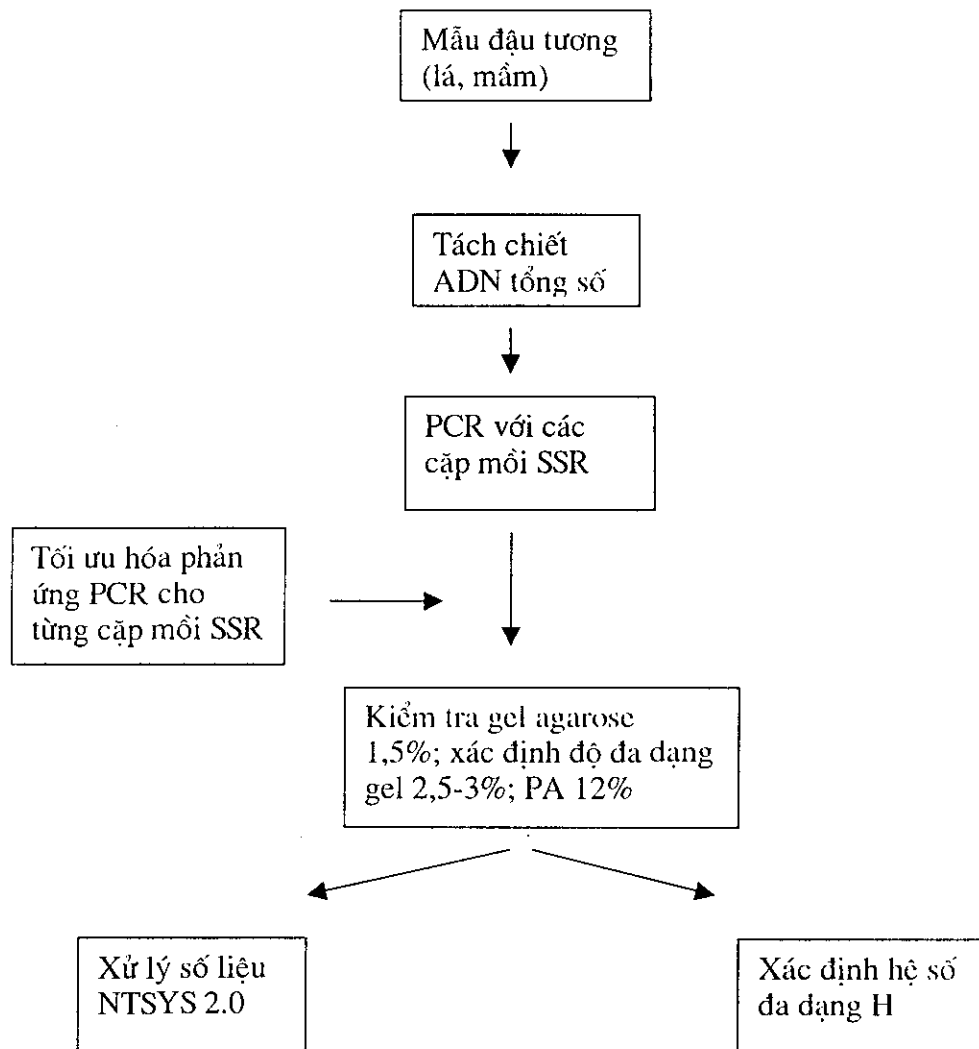


Trình tự các chỉ thị SSR được sử dụng

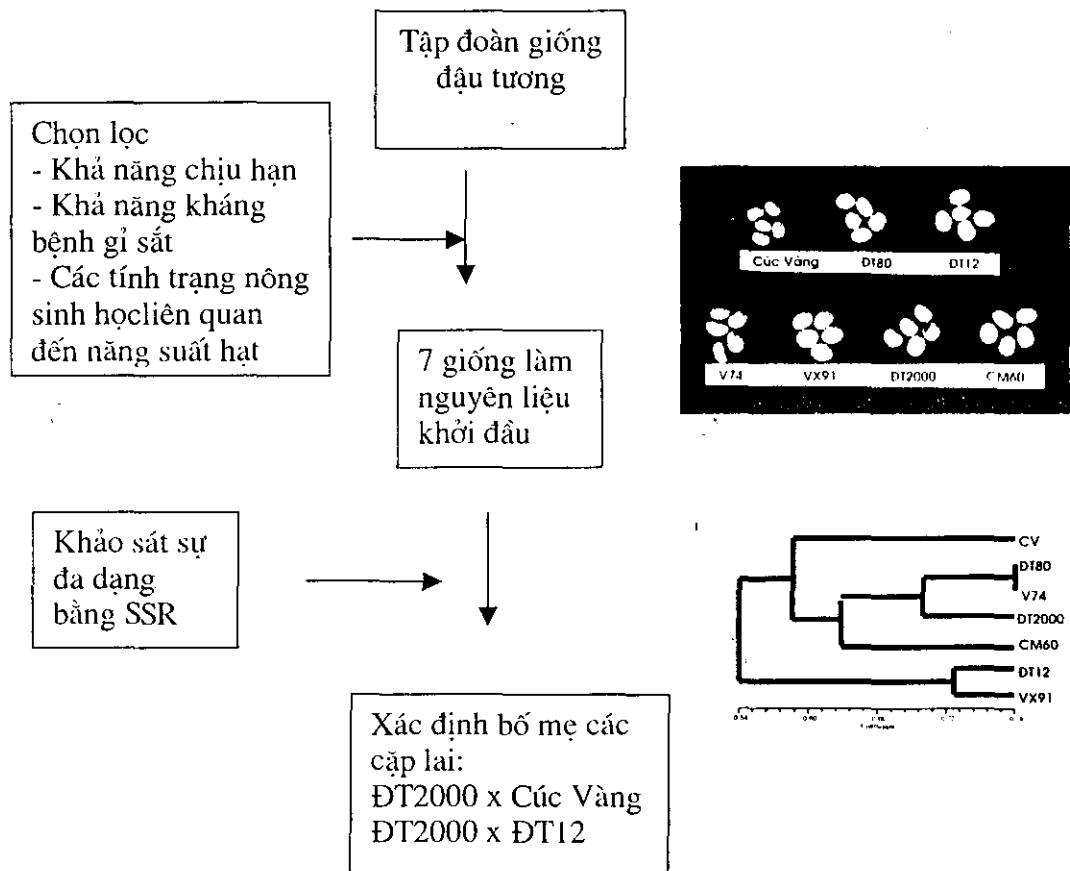
Stt	SSR	Trình tự mỗi xuôi (F) ngược (R) Từ đầu 5' đến 3'	Nhóm liên kết	Kích thước allele
1	Satt557	F- GCGGGATCCACCATGTAATATGTG R- GCGCACTAACCCTTTATTGAA	C2	207 bp
2	Satt 489	F- CGTGTGCTTGCTTCTCTTAGACTGACT R-GCGTACTACTTACCCTGTTTGTCTAAAA	C2	261 bp
3	Satt373	F- TCCGCAGATAATTTCGTAAAAT R-GGCCAGATACCCAAGTTGTACTTGT	L	248 bp
4	Satt567	F-GGCTAACCCGCTCTATGT R- GGGCCATGCACCTGCTACT	M	113 bp
5	Satt150	F-AAGCTTGAGGTTATTCGAAAATGAC R-TGCCATCAGGTTGTGTAAGTGT	M	201 bp

Stt	SSR	Trình tự mỗi xuôi (F) ngược (R) Từ đầu 5' đến 3'	Nhóm liên kết	Kích thước allele
1	Satt 042	F- GACTTAATTGCTTGCTAT R- GTGGTGCACACTCACTT	A1	172 bp
2	Satt 005	F- TATCCTAGAGAAGAATAAAAAA R- GTCGATTAGGCTTGAAATA	D1b	141 bp
3	Satt146	F-AAGGGATCCCTCAACTGACTG R-GTGGTGGTGGTGAAGAACTATTAGAA	F	287 bp
4	Satt175	F- GACCTCGCTCTCTGTTTCTCA R- GGTGACCACCCCTATTCTTAT	M	163 bp
5	Satt173	F-TGCGCCATTTATTCTTCA R-AAGCGAAATCACCTCCTCT	O	198 bp
6	Satt009	F- CCA ACT TGA AAT TAC TAG AGA AA R- CTT ACT AGC GTA TTA ACC CIT	N	158 bp (Att) _{1,4}
7	Satt 431	F- GCG TGG CAC CCT TGA TAA ATA A R- GCG CAC GAA AGT TTT TCT GTA A	J	230 bp (Att) _{2,1}

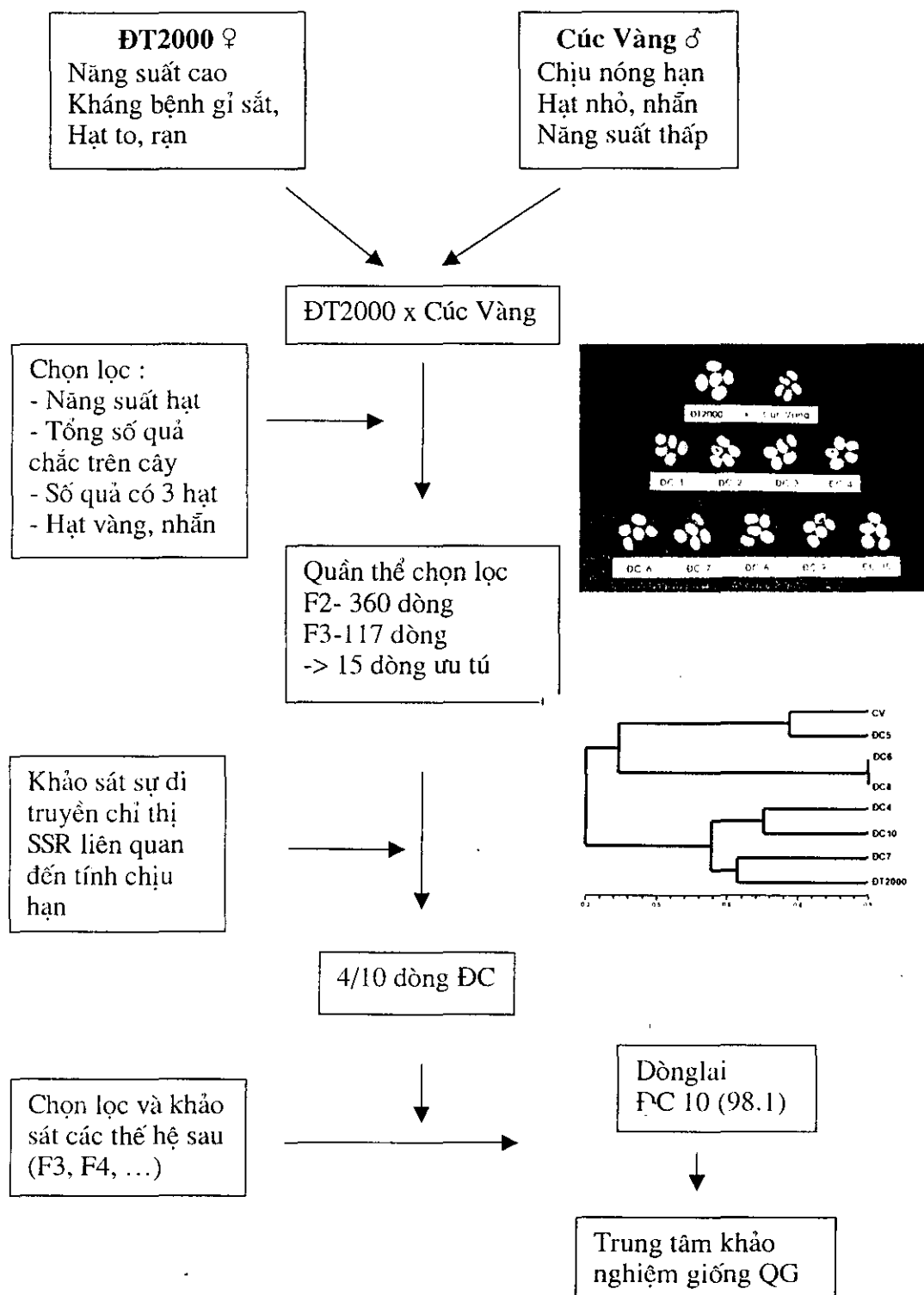
Hoàn thiện phương pháp SSR



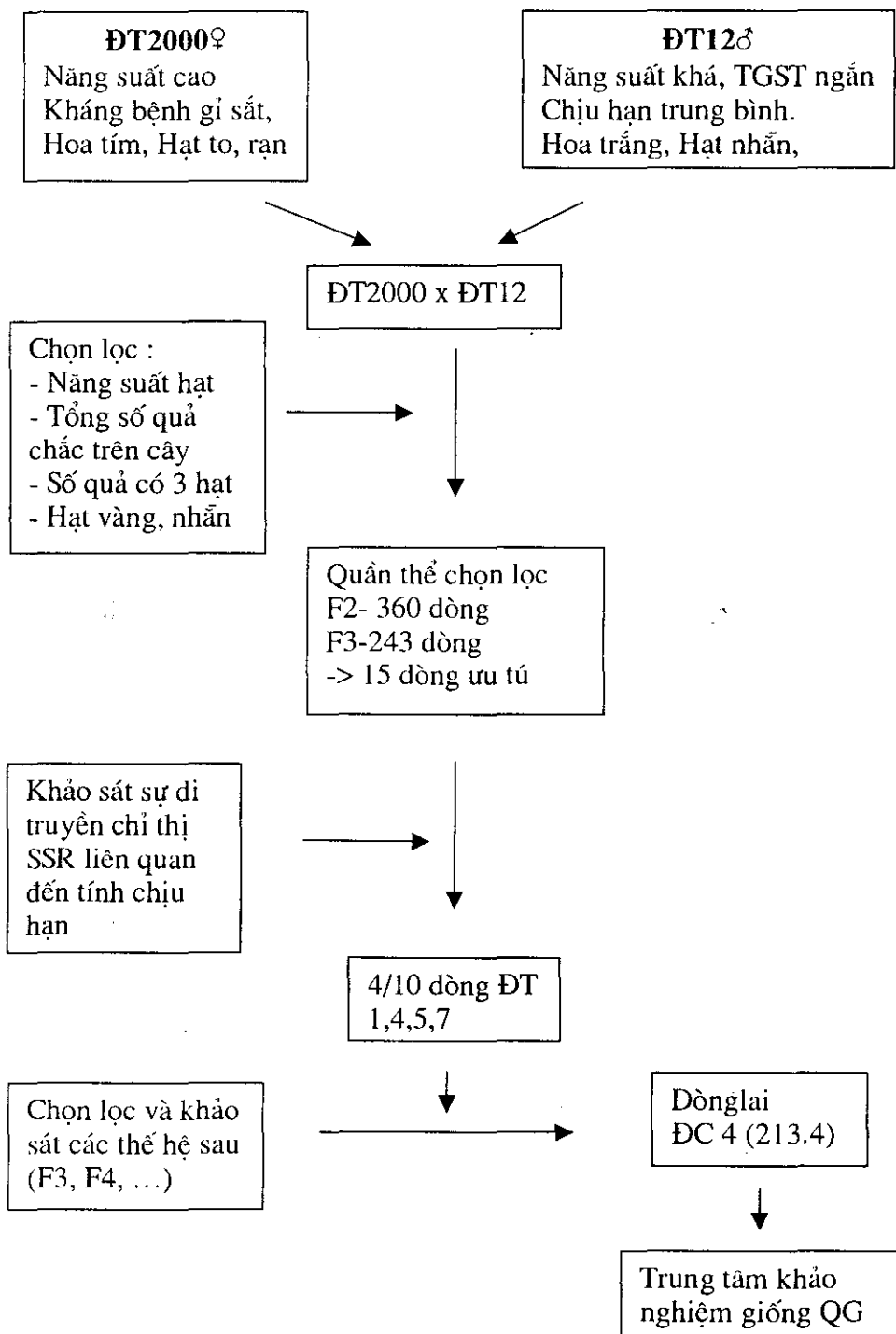
Phương pháp nghiên cứu kết hợp ngoài đồng ruộng



Tổ hợp DT2000 – Cúc Vàng



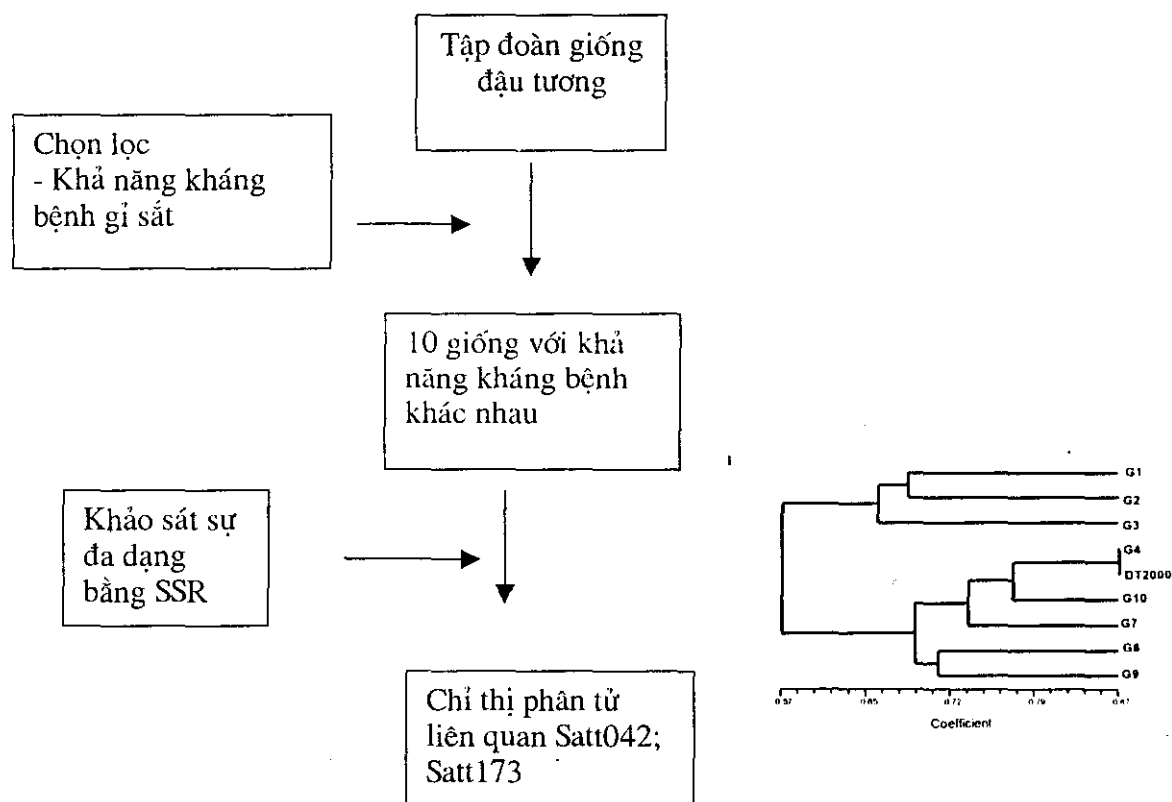
Tổ hợp lai ĐT2000- ĐT12



2. Xác định chỉ thị phân tử liên quan đến tính kháng bệnh gỉ sắt

Nguyên lý:

Tính kháng bệnh do các đơn gen: gen trội (dominant resistance gene) ở cây và gen không gây hại cũng mang tính trội (dominant avirulence gene) ở tế bào nấm gây hại. Để chọn giống đậu tương kháng bệnh cần phải phân lập được các gen này, định vị chúng trên các nhóm liên kết gen (nhiễm sắc thể). Gen kháng bệnh gỉ sắt cho đến nay vẫn chưa được nghiên cứu sâu, chưa được phân lập, định vị. Có nhiều hướng khác nhau để tiến hành công việc này. Một trong những hướng đó là tìm các chỉ thị phân tử liên quan đến tính kháng bệnh.



Báo cáo kết quả nghiên cứu năm 2001- 2004

Tên đề tài : " Nghiên cứu sử dụng chỉ thị phân tử trong chọn tạo giống đậu tương năng suất cao, kháng bệnh rỉ sắt và chịu hạn ".

Cán bộ thực hiện:

Ts. Trần Thị Trường, Prof. Acad. DrSc. Trần Đình Long, Ts. Nguyễn Thị Bình, Ks. Nguyễn Thị Loan, Ks. Nguyễn Thị Mỹ Hạnh, Ts. Trần Thị Phương Liên và ctv.

Quy trình chọn tạo giống đậu tương kháng bệnh gỉ sắt và chịu hạn gồm các bước sau

1. Đánh giá đặc tính kháng bệnh, chịu hạn cho các mẫu giống đậu tương ở điều kiện đồng ruộng, nhân tạo nhằm phân nhóm các mẫu giống ở mức khác nhau và xác định giống có khả năng chống chịu tốt.
2. Phòng công nghệ tế bào để phân tích sự đa dạng di truyền của các mẫu giống ở các nhóm chịu hạn, kháng bệnh khác nhau. Phân tích đặc tính chịu hạn, khả năng kháng bệnh gỉ sắt của các mẫu giống. Nhằm chọn được mẫu giống có những tính trạng mong muốn là cơ sở để xác định tổ hợp lai.
3. Tiến hành lai hữu tính.
4. Đánh giá con lai F2 thông qua các đặc điểm nông sinh học chọn ra dòng ưu tú.
5. Giữ hạt dòng lai F3 ưu tú sang phòng công nghệ tế bào phân tích, đánh giá đặc tính kháng bệnh, chịu hạn cho các mẫu giống .
6. Đánh giá, lựa chọn dòng từ F2-F5 trong điều kiện thí nghiệm đồng ruộng, vùng điều kiện khó khăn không tưới được(nước trời) và vùng có dịch bệnh gỉ sắt.
7. Tiến hành thí nghiệm so sánh khảo nghiệm năng suất F6,F7.
8. Khảo nghiệm các dòng triển vọng ở các vùng sinh thái khác nhau.

Các phương pháp sử dụng để đánh giá:

1. phương pháp đánh giá khả năng kháng bệnh gỉ sắt (*Phakopsora pachyrhizi* Sydow)

a. Điều kiện ngoại ruộng

Thí nghiệm được gieo tuần tự, mỗi giống 3 hàng, 10 mẫu giống có 1 đối chứng nhiễm và kháng. Chăm sóc thí nghiệm theo quy trình hướng dẫn của trung tâm nghiên cứu và thực nghiệm đậu đỗ. Đánh giá mức độ kháng bệnh theo hướng dẫn của trung tâm rau màu Châu Á (AVRDC) với thang điểm ở bảng 1.

Bảng 1: Thang điểm đánh giá sự phản ứng của giống đậu tương với bệnh gỉ sắt.

Cấp bệnh	Nhiễm bệnh (% diện tích)	Mức kháng
0	0	Kháng rất cao (KRC)
1	1-10	Kháng cao (KC)
2	11-25	Kháng (K)
3	26-50	Nhiễm trung bình (NTB)
4	51-75	Nhiễm (N)
5	76-100	Nhiễm nặng (NN)

b) Phương pháp nhiễm bệnh nhân tạo

Nhiễm bệnh trong nhà lưới

Chuẩn bị cây: Phương pháp nhiễm bệnh theo Bộ môn Di truyền miễn dịch thực vật, 1990

1. Thí nghiệm trồng các mẫu giống trong nhà lưới. Giai đoạn nhiễm lên cây là V2 + 1 lá kép) hoặc R5 (hình thành hạt)

2. Chuẩn bị dịch bào tử.

Lá bệnh được rửa sạch, sau đó cho vào túi Polyetylen và đặt vào chỗ tối khoảng 12 h, nhiệt độ 20-25°C. Dùng những lá này tạo dịch vẫn có 5.10^4 bào tử/ml.

3. Nhiễm bệnh :

Dùng bông quét hoặc phun dịch vẫn bào tử lên 2 mặt lá với lượng 0,5ml/dm².

4. Chăm sóc sau khi lây nhiễm .

- Tưới nước cho cây.
 - Chụp túi Polyetylen lên cây 24 tiếng (để trong tối 12 tiếng), nhiệt độ từ 18-30⁰C
 - Đánh giá sau 15 ngày lây nhiễm.
- * Đánh giá bệnh theo hướng dẫn của AVRDC
- Đánh giá bệnh theo thang 5 điểm và tính tỷ lệ nhiễm bệnh (%) và chỉ số bệnh (%) theo bảng 2 và công thức:

$$TLB \text{ (Tỷ lệ bệnh \%)} = \frac{B}{A} \times 100$$

Trong đó: B: Tổng số cây bị bệnh

A: Tổng số cây điều tra

$$CSB \text{ (\%)} = \frac{b_1 \times 1 + b_2 \times 2 + b_3 \times 3 + b_4 \times 4 + b_5 \times 5}{A \times 5}$$

Trong đó: b₁, b₂, b₃, b₄, b₅ số cây bị bệnh cấp 1, 2, 3, 4, 5

A: Tổng số cây điều tra

Bảng 2: Thang điểm đánh giá mức độ lây nhiễm bệnh nhân tạo

Mức kháng	Chỉ số bệnh(C.S.B) %
Kháng cao	1-20
Kháng	21-30
Nhiễm trung bình	31-50
Nhiễm	51-70
Nhiễm nặng	71-100

2. Phương pháp đánh giá tính chịu hạn

1. Đánh giá mức độ héo úa

Trồng đậu tương vào chậu, vại và đặt trong nhà lưới có mái che. Mỗi giống được bố trí công thức tưới nước bình thường và một công thức tưới nước định kỳ để hạn cây héo úa và tiến hành đánh giá.

+ Sau khi để cây bị héo và được tưới nước và tiếp tục đánh giá khả năng phục hồi.

Điểm 5: Lá trên cây bị héo và khô > 70%.

Điểm 4: Lá trên cây héo tương đối nhiều (51 - 70%) số lá trên cây.

Điểm 3: lá héo ở mức trung bình (31- 50%) số lá trên cây.

Điểm 2: lá héo ở mức độ không đáng kể (21 - 30%) số lá trên cây.

Điểm 1: lá héo ở mức độ dưới 20% số lá trên cây.

2. So sánh năng suất của công thức cây được tưới và công thức cây để hạn nhằm đánh giá mức độ suy giảm năng suất của dòng giống đó.

$$G = 100 - \frac{M2}{M1} \times 100$$

Trong đó: G: Suy giảm năng suất

M1: Năng suất hạt của cây tưới nước

M2: năng suất hạt của cây bị làm khô héo

- Năng suất giảm < 20% là giống có khả năng chịu hạn tốt
- Năng suất giảm 21 - 40% giống có khả năng chịu hạn khá
- Năng suất giảm 41 - 60 % giống có khả năng chịu hạn trung bình
- Năng suất giảm 61 - 80% giống có khả năng chịu hạn yếu.
- Năng suất giảm > 80% giống có khả năng chịu hạn kém.

SƠ ĐỒ TỔNG QUÁT CHỌN TẠO GIỐNG ĐẬU TƯƠNG BẰNG PHƯƠNG PHÁP HIỆN ĐẠI

Đánh giá đặc tính kháng bệnh gỉ sắt, chịu hạn của các mẫu giống trong điều kiện tự nhiên, nhân tạo, để phân lập và chọn ra mẫu dòng có đặc tính chịu hạn, kháng bệnh ở các mức khác nhau.



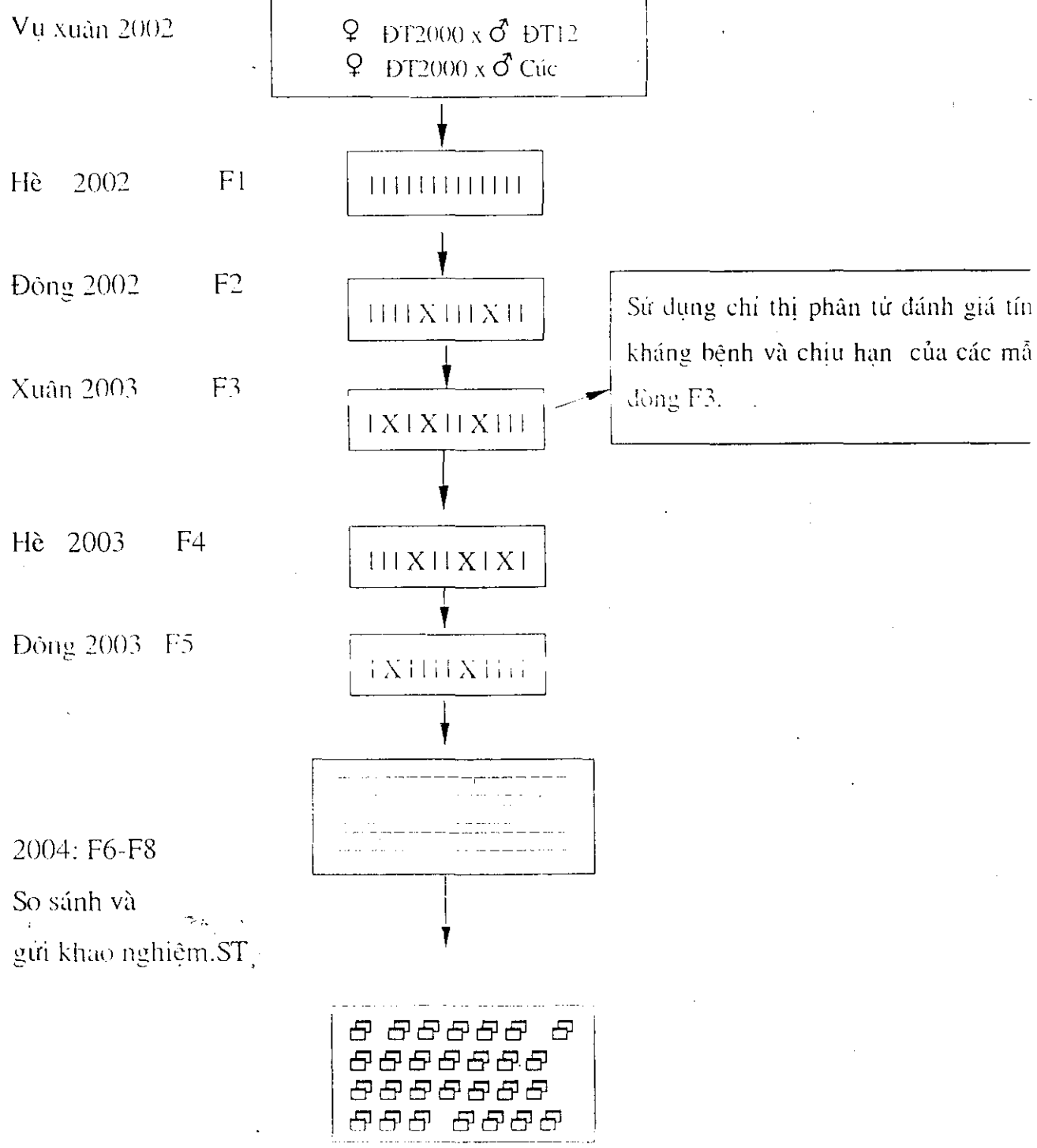
Các mẫu giống chọn được chuyển tới phòng công nghệ tế bào để đánh giá sự đa dạng di truyền của chúng và xác định đặc tính chịu hạn kháng bệnh của các mẫu giống đó.



Kết hợp việc đánh giá mẫu giống bằng phương pháp nông sinh học và chỉ thị phân tử đã chọn được mẫu giống DT2000, DT12 và cúc.

- DT2000 có tiềm năng năng suất cao có khả năng kháng bệnh gỉ sắt nhưng khả năng chịu hạn kém, thời gian sinh trưởng dài(105-110ngày), vỏ hạt rạn nứt, màu vỏ hạt vàng hơi xám
- Giống DT12 có năng suất khá cao ổn định và có khả năng chịu hạn, kháng bệnh gỉ sắt trung bình và thời gian sinh trưởng ngắn(71-78ngày), vỏ hạt vàng đẹp. Như vậy DT12 và DT2000 có độ tương đồng di truyền thấp hay có sự khác biệt về di truyền. Bởi vậy chúng tôi chọn tổ hợp lai giữa DT2000(mẹ) và DT12(bố).
- Giống cúc có năng suất thấp, có khả năng chịu hạn khá tốt, thời gian sinh trưởng ngắn(75-80ngày).





V. Báo cáo tóm tắt giống lúa DR3

BKHCN
VCNSH

BỘ KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ
VIỆN CÔNG NGHỆ SINH HỌC

SẢN PHẨM I - 15

BÁO CÁO TÓM TẮT GIỐNG LÚA DR3

**Thuộc đề tài: Nghiên cứu sử dụng công nghệ tế
bào và kỹ thuật chỉ thị phân tử phục vụ chọn
tạo giống cây trồng**

Mã số: KC.04.08

Hà Nội, 11/2004

TRUNG TÂM KHOA HỌC TỰ NHIÊN VÀ CÔNG NGHỆ QUỐC GIA
VIỆN CÔNG NGHỆ SINH HỌC

BÁO CÁO KHOA HỌC TÓM TẮT GIỐNG LÚA DR3

CÁC TÁC GIẢ:

ĐINH THỊ PHÒNG
LÊ TRẦN BÌNH
LÊ XUÂN ĐẮC
BÙI CHI LĂNG
LÊ THỊ MUỘI

Gửi trình:

HỘI ĐỒNG KHOA HỌC GIỐNG
BỘ NÔNG NGHIỆP VÀ PHÁT TRIỂN NÔNG THÔN

HÀ NỘI, 9/2003

BÁO CÁO KHOA HỌC TÓMTẮT VỀ GIỐNG LÚA DR3

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Ở nước ta, trong vài năm gần đây tạo giống cây trồng mới bằng công nghệ tế bào thực vật như: (1) Tạo dòng thuần bằng nuôi cấy bao phấn; (2) chọn dòng tế bào mang biến dị soma, đã thu được nhiều kết quả rất đáng khích lệ ở Viện Công nghệ Sinh học (CNSH), Viện Di truyền nông nghiệp và Viện Nghiên cứu lúa đồng bằng sông Cửu Long (NCLĐBSCL) (Bùi Bá Bổng, 1997; Đinh Thị Phòng, Lê Thị Muội, Lê Trần Bình, 1999). Đây là kết quả của một hướng nghiên cứu mới đối với Việt Nam góp phần giải quyết vấn đề nâng cao tính chống chịu của giống cây trồng, cải thiện năng suất và ổn định sản xuất.

Trong chương trình Công nghệ sinh học KC08 giai đoạn 1991-1995 do Bộ Nông nghiệp và CNTP chủ trì, Viện Công nghệ Sinh học đã thực hiện đề tài KC08-15 với kết quả là xây dựng và triển khai thành công kỹ thuật chọn dòng tế bào kết hợp với xử lý các điều kiện ngoại cảnh cực đoan kết quả tạo được hai dòng lúa DR1 và DR2 có khả năng chịu lạnh và hạn tốt, trong đó DR2 đã được công nhận là giống lúa quốc gia 1998. Hiện nay DR2 không chỉ được gieo trồng ở 12 tỉnh miền núi phía Bắc mà còn cả ở phía Nam (Kon Tum), Lào với quy mô diện tích hàng năm khoảng gần 1000 ha. Hiện nay giống lúa mới DR2 đang thực sự tỏ ra chiếm ưu thế trên các vùng đất trung du và miền núi, đặc biệt là những vùng thường xuyên bị hạn ở các tỉnh phía Bắc (Đinh Thị Phòng và cs, 1998).

Trong giai đoạn từ 1997 đến 2000 Phòng Công nghệ tế bào thực vật, Viện CNSH tiếp tục sử dụng phương pháp chọn dòng tế bào mang biến dị soma và đã chọn tạo được dòng lúa DR3 có triển vọng. Mục đích của việc chọn tạo giống mới là duy trì và nâng cao khả năng chống chịu đồng thời chú ý tới hình thái hạt gạo dài và chất lượng gạo của các dòng được tạo ra nhằm đáp ứng yêu cầu của thực tiễn.

II. NGUỒN GỐC GIỐNG VÀ PHƯƠNG PHÁP CHỌN TẠO

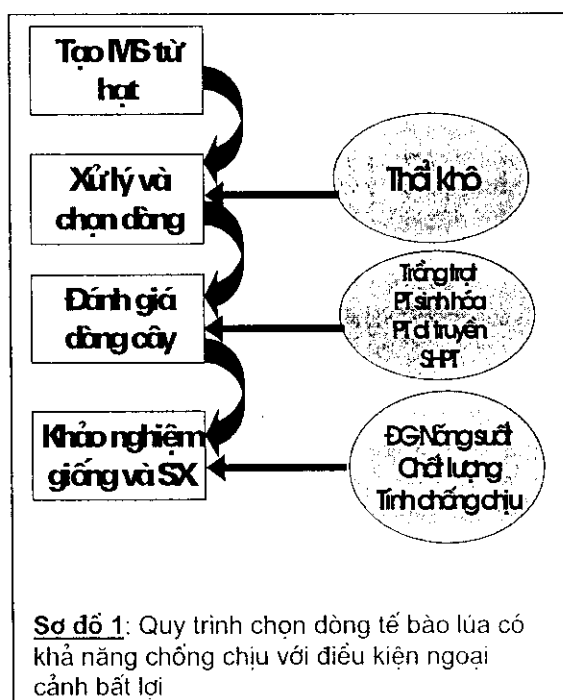
2.1. Nguồn gốc giống

Chúng tôi sử dụng giống lúa CR203. Đây là giống lúa vẫn đang được sản xuất (20 năm), giống lúa CR203 có khả năng thích ứng rộng, dễ tính, năng suất ổn định... tuy nhiên có nhược điểm: đẻ nhánh ít, chịu hạn, lạnh và chống đổ kém.

2.2. Phương pháp chọn tạo

Việc tạo và chọn giống được tiến hành theo phương pháp chọn dòng tế bào nuôi cấy *in vitro* mang biến dị soma. Phương pháp này có những ưu điểm sau:

1. Tế bào nuôi cấy *in vitro* có tần số biến dị ngẫu nhiên tương đối cao (10^{-6} - 10^{-8}).
 2. So sánh với phương pháp chọn cá thể phương pháp chọn dòng tế bào có số lượng tế bào tham gia chọn lọc nhiều hơn 10^2 - 10^4 lần, nhưng qui mô thí nghiệm được thu gọn về đĩa nuôi cấy (1 đĩa nuôi 10^8 tế bào tương đương 100 ha trồng mật độ 100 cá thể/m²).
 3. Có thể chủ động khống chế và tạo ra điều kiện chọn lọc nhân tạo, ví dụ: hạ thấp nhiệt độ, làm mất nước, xử lý độc tố ... mà các phương pháp đồng ruộng khó thực hiện..
 4. Rút ngắn thời gian chọn dòng từ 3-4 năm xuống còn 1 năm.
- Toàn bộ quá trình chọn dòng được tiến hành như sau (Sơ đồ 1):



Hạt lúa khô được bóc vỏ trấu, khử trùng và nuôi trên môi trường tạo mô sẹo. Sau 4 tuần khối mô sẹo được tách nhỏ thành những cụm tế bào có đường kính 2 mm, đặt lên giấy thấm tiết trùng, tiến hành thổi khô bằng không khí vô trùng các khối mô tới mức chúng mất 80% trọng lượng tươi (tương đương 95% toàn bộ lượng nước có trong mô). Nuôi tế bào đã bị thổi khô lên môi trường tái tạo mô sẹo và sau đó tái sinh cây. Cây xanh tái sinh được nuôi thành từng dòng riêng rẽ, chuyển ra trồng chậu vại để thu hạt R0. Tiếp tục đánh giá trên đồng ruộng các thế hệ tiếp theo R1 và R2 để khẳng định sự ổn định di truyền tính trạng và chọn dòng có triển vọng sản xuất. Kiểm tra tính chống chịu ở mức tế bào mô sẹo, hạt R0, R1, R2 và các thế hệ tiếp theo. Phân tích hoá sinh và sinh học phân tử các dòng chọn lọc, so sánh với giống gốc ban đầu. Nhân giống những dòng có triển vọng để gửi khảo nghiệm theo hệ thống quốc gia và sản xuất trình diễn.

III. QUÁ TRÌNH CHỌN TẠO VÀ KIỂM TRA DÒNG

3.1. Kết quả chọn tạo ba dòng lúa triển vọng

Quá trình chọn lọc xử lý mất nước cực đoan mô sẹo giống CR203, các dòng R0 thu được cũng đã thể hiện những biến động di truyền rất lớn về một số đặc điểm nông sinh học như chiều cao cây, chiều dài bông, dạng hạt... Những biến dị này cũng xảy ra tương tự như việc chọn ra 2 dòng DR1 và DR2. Các tính trạng chọn lọc tỏ ra ổn định cao ở thế hệ R2 (bảng 1 và bảng 2). Qui luật biến đổi các đặc điểm di truyền của cả 3 dòng về các đặc điểm nghiên cứu là gần như nhau. Sau đây dòng R4.DR75134 (=DR3) được chọn đại diện để trình bày ở đây.

Bảng 1: Mức độ biến dị một số chỉ tiêu nông sinh học của giống gốc CR203 và các dòng cây xanh thuộc quần thể R0 tái sinh từ mô sẹo sống sót sau khi xử lý mất nước ($n \geq 30$; $\alpha = 0,05$)

STT	Các chỉ tiêu	CR203 (đối chứng)		Quần thể Ro	
		$\bar{X}$	Cv(%)	$\bar{X}$	Cv(%)
1	Chiều cao cây (cm)	93,6 $\pm$ 5,00	4,80	103,7 $\pm$ 7,30	30,09
2	Số nhánh/khóm	7,3 $\pm$ 4,00	53,40	9,6 $\pm$ 4,00	42,20
3	Chiều dài bông (cm)	20,0 $\pm$ 2,00	9,10	22,5 $\pm$ 6,00	20,09
4	Số hạt chắc/bông	114,0 $\pm$ 31,00	26,70	102,8 $\pm$ 54,00	104,84
5	Chiều dài hạt (mm)	7,4 $\pm$ 2,00	2,20	8,64 $\pm$ 0,04	0,40
6	Chiều rộng hạt (mm)	2,7 $\pm$ 0,10	3,40	2,7 $\pm$ 0,03	1,17
7	Tỉ trọng 1000 hạt (g)	24 $\pm$ 1,00	4,20	22 $\pm$ 0,30	1,52

Bảng 2: Mức độ biến dị một số chỉ tiêu nông sinh học của dòng R1.DR7513, R2.DR75134 (ký hiệu R, R2 chỉ thể hệ con cái thứ nhất, thứ hai của các dòng R0 tái sinh từ mô sẹo có nguồn gốc từ CR203) ($n \geq 30$; $\alpha = 0,05$)

STT	Các chỉ tiêu	R1.DR7513		R2.DR75134 (=DR3)	
		$\bar{X}$	Cv(%)	$\bar{X}$	Cv(%)
1	Chiều cao cây(cm)	84,9 $\pm$ 4,10	4,80	88,1 $\pm$ 4,40	4,90
2	Số dảnh/khóm	15,2 $\pm$ 3,96	26,05	7,8 $\pm$ 2,59	33,20
3	Chiều dài bông(cm)	23,5 $\pm$ 8,60	36,50	21,37 $\pm$ 1,35	6,30
4	Số hạt chắc/bông	130 $\pm$ 4,47	3,40	122,3 $\pm$ 9,19	7,51
5	Chiều dài hạt(mm)	8,24 $\pm$ 0,30	2,60	8,04 $\pm$ 0,10	1,24
6	Chiều rộng hạt(mm)	2,37 $\pm$ 0,03	1,26	2,35 $\pm$ 0,07	2,85
7	T.lượng 1000hạt (g)	23 $\pm$ 0,20	0,86	24 $\pm$ 0,10	0,41

Nhận xét đánh giá chung:

Qua 2 vụ trồng (vụ Đông Xuân 1997-1998 và vụ Mùa 1998) và theo dõi trên đồng ruộng ở mức độ thí nghiệm và tiến hành nhân kiểm tra đồng ở diện rộng (400m²/đồng vụ mùa 1998 tại Hợp tác xã Phú Diễn). Chúng tôi có nhận xét:

- Dòng R5.DR75133: độ thuần giống khá, trổ tập trung, đẻ khỏe, Hạt dài hơn CR203 (tỉ lệ D/R=3,26 so CR203 là 2,7). Năng suất vụ mùa 1998 đạt 210 kg/sào. Thời gian sinh trưởng tương tự như giống CR203.
- Dòng R5.DR75134 (DR3): độ thuần giống khá, trổ tập trung, đẻ khỏe, dạng hình đẹp, cứng cây, hạt dài (D/R = 3,27). Chịu hạn khá. Năng suất vụ mùa đạt 200/sào. Thời gian sinh trưởng ngắn hơn CR203 là 5 ngày. Hạt có râu (chỉ hạt đầu bông).
- Dòng R5.DR75136: có các đặc điểm tương tự như dòng R5DR75133. Hạt dài và mảnh hơn cả 2 dòng DR75133 và DR75134 (D/R= 3,35).

3.2. Chỉ tiêu sinh hóa của một số dòng cây chọn lọc

Hàm lượng protein biến động không nhiều so với đối chứng, tuy nhiên ở những dòng chọn lọc có các đặc điểm hình thái và nông sinh học quý như dáng cây gọn, tương đối sạch sâu bệnh và chịu hạn tốt, có hàm lượng protein tổng số cao hơn đối chứng.

Hàm lượng đường tan có chiều hướng tăng lên ở hầu hết các dòng chọn lọc. Chẳng hạn hàm lượng đường tan của dòng R2.DR7513(DR3) cao hơn giống gốc CR203 là 0,18%. Theo nhiều tác giả thì hàm lượng đường tan trong cây (số liệu phân tích thu được lại là của hạt) liên quan trực tiếp đến khả năng chống chịu như chịu hạn, chịu lạnh. Kết quả này phù hợp với những nhận định trước đây về tăng áp suất thẩm thấu của tế bào thông qua các phân tử đường tan làm tăng khả năng chịu hạn.

3.3. Tính chịu hạn của các dòng chọn lọc

3.3.1. Kiểm tra tính chịu hạn của tế bào cây tái sinh thể hệ R0

Hạt thu được từ các dòng cây tái sinh R0 (tức là hạt thể hệ R1) được dùng làm nguyên liệu tạo mô sẹo. Mô sẹo bị thối khô theo qui trình đã mô tả bằng luồng khí vô trùng của bàn cấy. Dùng phương pháp nhuộm TTC để đánh giá sức sống của mô sẹo. Giá trị đo ở 485 nm phản ánh tỷ lệ mô sống sót. Kết quả đánh giá 5 dòng được trình bày ở hình 2 cho thấy ngoài dòng DR741 còn lại 4 dòng DR774, DR742, DR728 và DR283 có sức chịu thối khô cao hơn hẳn so với đối chứng. Điều đó chứng tỏ rằng đặc điểm chịu mất nước không những được duy trì

- Trọng lượng 1000 hạt: 24 gram
- Năng suất thực thu: 45-55 tạ/ha
- Khả năng chống chịu: chịu hạn, chịu nóng, chống đổ và chịu khá với một số loại sâu bệnh chính.

V. QUÁ TRÌNH KHẢO NGHIỆM VÀ SẢN XUẤT THỬ

5.1. Tóm tắt kết quả của 3 vụ khảo nghiệm cơ bản

(trích từ văn bản Kết quả khảo nghiệm cơ bản vụ Đông Xuân 1998-1999, vụ Mùa 1999 và vụ Mùa 2000 của Trung tâm Khảo nghiệm giống cây trồng TƯ)

Vụ Đông xuân 1998-1999: Thời gian sinh trưởng vụ Đông Xuân 130-135 ngày, Năng suất bình quân đạt vụ Đông xuân 49,0 tạ/ha, cao nhất đạt 60,5 tạ/ha. Ưu điểm nổi bật là độ thuần cao, quần thể đều, trổ tập trung, cứng cây chống đổ khá, Cần tiếp tục khảo nghiệm.

Vụ Mùa 1999: Thời gian sinh trưởng 110-115 ngày. năng suất bình quân đạt 52,3 tạ/ha, cao nhất đạt 67,1 tạ/ha, đặc biệt chịu nóng hạn ở vụ Mùa và có dạng hạt thon dài, chất lượng gạo khá. DR3 được đánh giá là giống triển vọng.

Vụ Mùa 2000: Ưu điểm nổi bật là độ thuần cao, quần thể đều, đẻ khoẻ, trổ tập trung, cứng cây chống đổ khá, đặc biệt chịu nóng hạn ở vụ Mùa và có dạng hạt thon dài, chất lượng gạo khá. DR3 vẫn được đánh giá là giống triển vọng.

Bảng 4 : Năng suất thực thu qua 3 vụ khảo nghiệm cơ bản của DR3 (tạ/ha)*

TT	Địa điểm	Vụ Đông xuân 1998-1999		Vụ Mùa 1999		Vụ Mùa 2000	
		CR203 (đ/c)	DR3	CR203 (đ/c)	DR3	CR203 (đ/c)	DR3
1	Hưng Yên	74,5	60,5	52,2	67,1	40,6	41,8
2	Nam Hà	35,2	-	65,0	56,3	46,3	-
3	Hải Phòng	50,7	-	-	-	-	-
4	Thanh Hoá	49,3	48,5	53,6	48,0	51,3	55,5
5	Hà Tĩnh	56,9	-	-	-	-	-
6	Bắc Giang	-	-	56,3	55,0	54,3	-
7	Vĩnh Phúc	41,8	37,3	34,5	35,0	-	-
8	Phủ Thọ	-	-	44,3	56,3	49,5	-
9	Tuyên Quang	43,3	48,0	43,2	40,8	-	-
10	Điện Biên	-	-	-	-	51,0	52,0
11	Hải Dương	46,0	54,0	60,0	60,0	59,1	-
	Bình quân	48,5	48,9	51,1	52,3	50,3	49,8

Ghi chú: dấu (-) không có số liệu (*số liệu do Trung tâm Khảo nghiệm giống cây trồng Trung ương cung cấp).

đồng, mỗi cốc trồng 20 mầm. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần và nuôi ở điều kiện ánh sáng bình thường, nuôi bằng dung dịch MS pha loãng 10 lần, 2 ngày thay nước một lần. Khi cây mạ có 3 lá, tiến hành xử lý sốc hạn trong dung dịch 1/10 MS chứa 25% Sorbitol. Sau 6 giờ, 12 giờ và 24 giờ xử lý sorbitol tiến hành thu lá và rễ để tách chiết ngay proline hoặc giữ ở -80°C . Hàm lượng proline của lá và rễ được tách chiết và xác định theo phương pháp của Bates và cs (1973). Kết quả phân tích hàm lượng proline nhận được cũng cho kết quả các dòng chọn lọc khi xử lý hạn đều có sự gia tăng hàm lượng proline từ 1,4 đến 1,5 lần so với giống gốc giống gốc CR203 ($11,28 \mu\text{M/g}$ (DR2) hoặc $10,52 \mu\text{M/g}$ (R6.DR75134 = DR3) so với $7,37 \mu\text{M/g}$ (CR203). Điều đó chứng tỏ rằng, các dòng cây tái sinh từ các tế bào chịu xử lý mất nước thực sự đã có sự cải thiện về tính chịu hạn.

3.4. Sự thay đổi phân tử các dòng chọn lọc

Đánh giá bộ genom của các dòng cây tái sinh từ các mô xử lý mất nước bằng kỹ thuật RAPD với 10 primer ngẫu nhiên có độ dài 10 nucleotid kết quả nhận được: 9/10 primer là có sự biểu hiện đa hình. Số đoạn DNA được nhân bản trong phản ứng PCR trung bình của một primer ít nhất là 4 đoạn, nhiều nhất là 13 đoạn. Các đoạn có độ dài từ 0,25 đến 2,5 kb. Kết quả điện di sản phẩm PCR của các dòng chọn lọc tính chịu mất nước với các mẫu ngẫu nhiên cho thấy các phân đoạn DNA được nhân bản trong phản ứng PCR có sự xuất hiện mới hoặc không xuất hiện. Như vậy, sự xuất hiện hay không xuất hiện các phân đoạn DNA của các dòng chọn lọc tính chịu mất nước đã được so sánh với giống gốc CR203 là 8% (1-0,92). Cho đến nay có nhiều giả thuyết liên quan đến sự thay đổi di truyền trong quá trình chọn lọc các dòng tế bào mang biến dị soma thông qua nuôi cấy mô. Ở đây có thể nêu ra khả năng tái tổ chức bộ genom, dẫn đến những kết quả thay đổi kiểu hình (thay đổi tính chịu hạn và chịu lạnh). Sự thay đổi này là cơ sở để chọn ra những vật liệu khởi đầu trong cải tạo giống cây trồng và cũng là những gợi ý cho việc tìm hiểu bản chất tính chịu hạn ở mức độ phân tử.

3.5. Chất lượng thương phẩm và chất lượng cơm của DR3

Một trong những chỉ tiêu chất lượng thương phẩm (marketing quality) là độ dài của hạt: Giống DR3 có chỉ số tỷ lệ dài/rộng là 3,27 cao hơn cả giống gốc CR203 là 2,74 và cao hơn hẳn DR2 là 2,62. Thông thường các loại gạo indica của thị trường xuất khẩu phải có chỉ số này lớn hơn 3.

Chỉ tiêu chất lượng thương phẩm tiếp theo là tỷ lệ và độ bạc bụng hay tỷ lệ độ trong của hạt: Theo đánh giá của người sản xuất và tiêu dùng, tỉ lệ gạo xát đạt 73 % (khá cao so với thông thường là 68-69%), tỉ lệ hạt gạo nguyên cao, hạt gạo DR3 dài và trong (ít bạc bụng). Chất lượng cơm (Eating quality) được xác định bởi độ mềm và độ đậm cảm quan: Cơm nấu từ gạo DR3 mềm và đậm hơn CR203 và DR2.

IV. ĐẶC ĐIỂM CỦA DÒNG R5.DR75134

Nguồn gốc: Chọn dòng tế bào từ giống CR203

Đặc điểm: - Chiều cao cây: 90 - 95 cm

- Thời gian sinh trưởng: - Vụ mùa 110 - 115 ngày; Xuân muộn 135 - 140 ngày; Xuân chính vụ 155 - 165 ngày

- Số nhánh / khóm: 8-10

- Số hạt trên bông: 120 - 160 hạt

- Dạng hạt: chiều dài/rộng = 3,27; hạt đầu bông có râu

bằng con đường phân bào nguyên nhiễm của các tế bào soma mà còn có khả năng di truyền sang thế hệ con cái thông qua sinh sản hữu tính.

3.3.2. Khả năng chịu hạn của các dòng chọn lọc ở giai đoạn cây đẻ nhánh bằng phương pháp gây hạn nhân tạo

Tóm tắt phương pháp như sau: Gieo các mầm lúa của các giống và dòng vào trong chậu kích thước 10cm x 20cm, chứa lượng đất như nhau. Mỗi chậu trồng 10 cây, 3 chậu cho một giống hoặc dòng. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần trong điều kiện nhà lưới có mái che mưa. Mọi chế độ chăm sóc là như nhau. Sau 15 ngày rút nước để hạn. Khi trong lô thí nghiệm xuất hiện 1/2 số cây héo thì bắt đầu tưới phục hồi, lượng nước cung cấp chỉ đủ cho cây trong khoảng thời gian 6 giờ/ngày sau đó cây lại trong tình trạng thiếu nước. Chu kỳ lặp lại 15 lần. Sau đó thả cả chậu cây vào bồn chứa nước trong khoảng thời gian 6 - 8 tiếng, rửa đất, rửa nhẹ, tiến hành đánh giá các chỉ tiêu. Giống lúa NN8 được dùng là giống đối chứng không chịu hạn.

Kết quả về đánh giá khả năng chịu hạn của các cây lúa qua 8 chỉ tiêu phân tích được chỉ ra giống NN8 có 7/8 chỉ tiêu phân tích đạt giá trị thấp, còn giống CH133 có các chỉ tiêu đạt giá trị cao. Điều này phản ánh khả năng chịu hạn của giống CH133 tốt hơn giống NN88. Kết quả nhận được ở đây hoàn toàn phù hợp với kết quả đánh giá tính chịu hạn khi gây hạn nhân tạo ở giai đoạn mạ 3 lá (Đinh Thị Phòng, 1996) và cũng phù hợp với thực tế sản xuất (giống NN8 là giống không có khả năng chịu hạn, giống CH133 là giống có khả năng chịu hạn tương đối tốt).

Phân tích 8 chỉ tiêu liên quan đến tính chịu hạn ở giống DR2 và 5 dòng chọn lọc về tính chịu mất nước có nguồn gốc từ giống CR203 cũng cho kết quả tương đối khác nhau, song cả giống DR2 và 5 dòng chọn lọc đều có các chỉ tiêu nghiên cứu vượt xa so với giống gốc CR203. Chỉ số chịu hạn tương đối của các giống và dòng liên quan đến 8 tính trạng đã được phân tích (bảng 3). Chỉ số chịu hạn càng lớn thì khả năng chịu hạn càng cao: dòng lúa R6.DR7812 có khả năng chịu hạn tốt nhất xếp thứ nhất với chỉ số chịu hạn (S) là 3523,4, xếp thứ hai là dòng DR75134 (DR3) (S=3320,0), xếp thứ ba là giống DR2 (S =3213,4) và xếp thứ 9 là giống NN8 (S=1460,5).

Bảng 3. Chỉ số chịu hạn tương đối của các giống và dòng chọn lọc

*: Chỉ số chịu hạn tương đối được tính theo công thức:

$$S = \frac{1}{2\sqrt{2}} \times \sin \alpha (a_n b_n + b_n c_n + \dots f_n a_n)$$

- S: chỉ số chịu hạn tương đối của một giống;
- a, b, c... là các chỉ tiêu theo dõi; n: thứ tự giống từ 1 đến n;
- góc α là góc tạo bởi hai trục mang trị số gần nhau và tính bằng: $\alpha = -360/x$

Giống	Chỉ số chịu hạn *	Xếp thứ tự
CR203	2081,7	8
NN8	1460,5	9
CH133	2190,9	7
DR2	3213,4	3
R6.DR75133	2788,8	5
R6.DR75134 (DR3)	3320,5	2
R6.DR75136	2355,8	6
R3.DR7812	3523,4	1
R3.DR74112	3210,1	4

3.3.3. Khả năng chịu hạn của các dòng chọn lọc bằng việc xác định hàm lượng proline

Tóm tắt các phương pháp như sau: Hạt lúa nảy mầm, khi mầm mạ dài 1,5cm - 2cm, đặt các mầm vào cốc nuôi đường kính 7 cm, cao 6 cm có lót giấy lọc. Ba cốc cho một giống hoặc



Hình 1. Giống lúa DR3 trồng ở Sênegan (ảnh trên) và Hội nghị đầu bờ ở Sóc Sơn, Hà Nội (ảnh dưới)

5.2. Kết quả sản xuất thử giống lúa DR3

5.2.1. Kết quả sản xuất thử

- Song song với khảo nghiệm cơ bản, chúng tôi cũng đã tiến hành triển khai gieo cấy thử giống lúa DR3 chủ yếu trên chân đất bạc màu và thiếu nước cục bộ. Trải qua mười vụ sản xuất thử, năm vụ Đông Xuân (1998-1999; 1999-2000, 2000-2001, 2001- 2002 và 2002-2003) và năm vụ Mùa (1999, 2000, 2001, 2002 và mùa 2003) tại 12 tỉnh Sơn La, Hà Tây, Hà Nội, Bắc Giang... với tổng diện tích là 2958 ha (Bảng 5). Diện tích sản xuất thử ít nhất là 0,2 ha và nhiều nhất là 10 ha.

- Năm 1999, giống lúa DR3 cũng được TTKNGCTTU và Văn phòng chuyển giao giống cây trồng mới Đại Mỗ đưa sang trồng thử nghiệm tại Senegan và Lào cũng có nhận xét là giống lúa DR3 có khả năng chịu hạn, chịu nóng và năng suất khá hơn các giống địa phương. Hiện nay DR3 vẫn được duy trì sản xuất ở một số diện tích tại Lào.

- Theo yêu cầu của một số địa phương về mở rộng sản xuất thử giống lúa DR3, vụ Mùa năm 2003 chúng tôi đã triển khai sản xuất thử lúa DR3 tại vùng đất khô khan ở tỉnh Vĩnh Phúc, KonTum và Hà Tĩnh. Theo báo cáo thực tế của các địa phương cho thấy giống lúa DR3 phát triển khá hơn cả giống Khang Dân và Q5 đang sản xuất tại địa phương.

Tóm tắt chung nhận xét của các địa phương tham gia sản xuất lúa DR3: Độ thuần giống khá, trổ tập trung, đẻ khỏe, dạng hình đẹp, cứng cây. Chịu nóng và chịu hạn khá, tương đối sạch sâu bệnh. Năng suất đạt từ 40-60 tạ/ha. Thời gian sinh trưởng ngắn hơn CR203 là 5 ngày. Dạng hạt thon dài, chất lượng gạo khá hơn DR2. Có ưu thế rõ trong vụ Mùa.

Bảng 5: Thống kê diện tích sản xuất giống lúa DR3 trong 10 vụ sản xuất thử (ĐX 1998-1999, vụ Mùa 1999, ĐX 1999-2000, vụ Mùa 2000, ĐX 2000-2001, Mùa 2001, ĐX 2001-2002 và vụ Mùa 2002, vụ ĐX2002 và Mùa 2003)

TT	Địa điểm sản xuất	Diện tích (ha)	Năng suất (tạ/ha)
1	Hiển Quang-Phủ Thọ	99	44-53
2	Sóc Sơn, Hà Nội	254	46-60
3	Phủ Diễn-Hà Nội	50	45-59
4	Phủ Yên-Sơn La	343	44-61
5	Hiệp Hoà-Bắc Giang	160	47-61
6	Yên Thế-Bắc Giang	184	40-63
7	Bảo Đài- Bắc Giang	161	41-56
8	Xuân Hương-Bắc Giang	138	42-57
9	Tuyên Quang	297	41-60
10	Cao Bằng	290	41-56
11	Trạch Mĩ Lộc-Hà Tây	194	40-62
12	Cần Kiệm – Hà Tây	87	40-60
13	Cầm Yên-Thanh Hoá	124	40-51
14	Cầm Giang- Thanh Hoá	140	42-60
15	Thái nguyên	255	38-47
16	Phi Mô, Lạng Giang	170	40-54
17	Do Thượng-Vĩnh Phúc	10	42-52
18	Hương Sơn-Hà Tĩnh	2	42-57
	Tổng	2958 ha	

5.2.2. Nhận xét của các địa phương tại hội nghị đầu bờ

- Hội nghị đầu bờ lần thứ nhất tổ chức ngày 06/9/2002 có 50 đại biểu của cơ quan Trung ương và các địa phương tham dự. Hội nghị đã kết luận: Giống lúa DR3 có độ thuần khá, sinh trưởng khỏe, trổ tập trung, khả năng thích ứng rộng, đặc biệt cho vùng đất thiếu nước cục bộ nghèo dinh dưỡng và năng suất đạt bình quân 45 tạ/ha. Giống lúa DR3 ưu thế hơn giống lúa Khang

dân ở vụ Mùa. Nhiều địa phương như Thái Nguyên, Phú Thọ, Bắc Giang... đề nghị cho triển khai rộng giống lúa DR3 vào vụ Mùa năm 2003.

- Theo thông báo ngày 20/8/2003 Ban chủ nhiệm HTX Sơn Tân kết hợp với Phòng NN Huyện Hương Sơn, Hà Tĩnh đã tổ chức hội nghị đầu bờ để thăm quan sản xuất lúa DR3. Hội nghị được đông đảo các cán bộ và nông dân trong huyện tham dự. Tất cả các thành viên đều đánh giá lúa DR3 phát triển tốt, sạch sâu bệnh, chịu nóng, chịu hạn, trổ tập trung, rất thuần và có ưu thế hơn hẳn giống Khang dân đang sản xuất đại trà tại địa phương, đặc biệt tại các chân ruộng khó khăn về nước, ước tính năng đạt 55 tạ/ha. Hiện nay bà con nông dân HTX trong huyện đã đăng ký hết giống DR3 sản xuất vụ Mùa năm 2003 (khoảng 11 tấn) cho vụ Đông xuân 2004.

5.2.3. Tính ưu việt của giống lúa DR3

Giống lúa DR2 và giống lúa DR3 đều được tạo ra bằng kỹ thuật chọn dòng tế bào của công nghệ sinh học có nguồn gốc từ giống lúa CR203. Giống lúa DR2 có nhiều tính ưu việt so với giống gốc CR203 về tính chịu hạn, chịu lạnh, độ thuần... (Bảng 6). Tuy nhiên về hình thái hạt gạo có hạn chế (hạt bầu và tỉ lệ bạc bụng tương đối cao). Khắc phục nhược điểm này giai đoạn 1997-1998 chúng tôi tiếp tục sử dụng phương pháp chọn dòng tế bào và tạo được dòng lúa DR75134 (DR3). Ưu điểm của giống lúa DR3 so với giống lúa DR2 và giống gốc CR203 ngoài tính chịu hạn, chịu nóng, độ thuần... thì còn có ưu điểm nổi bật là hạt gạo DR3 dài, trong, và chất lượng cơm khá.

Bảng 6: So sánh một số đặc điểm nông học và chất lượng thương phẩm chính của giống lúa DR3, với giống DR2 và giống gốc CR203.

Đặc điểm	DR2	DR3	CR203 (giống gốc)
Tên dòng	DR/283156	DR/5134	
Nguồn gốc chọn lọc	CR203	CR203	Lai tạo
Chiều cao cây (cm)	90 - 95	90 - 95	95-100
Thời gian sinh trưởng (ngày)			
Vụ Mùa	110-115	110-120	115-120
Xuân chính vụ	155-160	155-160	150-160
Xuân muộn	135-140	135-140	135-145
Số nhánh/ khóm	8-10	7-10	4-5
Số hạt chắc/ bông	130-170	120-160	95-150
Dạng hạt	Bầu	Thon dài	Bầu
Tỉ lệ dài/rộng hạt lúa	2,64	3,28	2,7
Độ bạc bụng	++	+	++
Độ trắng trong	++	+++	++
Trong lượng 1000 hạt (gram)	24,5	24	23
Khả năng chống chịu	Chịu hạn, chịu rét, chống đổ	Chịu hạn, chịu nóng, Chống đổ	Chịu hạn, rét và chống đổ trung bình

VI. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

1. DR3 là giống lúa mới được tạo ra bằng công nghệ chọn dòng tế bào của công nghệ sinh học thực vật đã được khảo nghiệm cơ bản qua 3 vụ trên mạng lưới khảo nghiệm quốc gia. Đây là giống lúa thấp cây, ngắn ngày, chịu hạn, chống đổ, đẻ nhánh và sinh trưởng khoẻ, độ thuần giống khá, trổ tập trung, cho năng suất vượt đối chứng CR203 một cách ổn định từ 5-8%, có chất lượng thương phẩm cao hơn các giống DR2 và CR203.

2. DR3 đã được sản xuất thử trong 10 vụ liên tiếp, tới nay đã có 12 tỉnh và thành phố triển khai gieo cấy với tổng diện tích khoảng 2958 hecta. Kết quả cho thấy giống lúa DR3 có khả năng thích nghi rộng về chân đất gieo trồng, tương đối sạch sâu bệnh, năng suất vượt CR203 từ 10-15% ở tất cả các chân đất bạc màu và thiếu nước cục bộ. Giống DR3 có ưu thế ở vụ Mùa.

3. Để giống lúa DR3 sớm được chính thức đưa vào sản xuất, Viện Công nghệ Sinh học kính đề nghị Hội đồng khoa học giống của Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn xem xét và cấp giấy chứng nhận theo qui định hiện hành.