

QUY TRÌNH SẢN XUẤT GIỐNG KEO LAI DÒNG BV10, BV16 VÀ BV32 BẰNG PHƯƠNG PHÁP NUÔI CÂY MÔ

Công nghệ nuôi cây mô tế bào có hệ số nhân cao, rút ngắn thời gian đưa giống vào sản xuất, giúp tạo cây hoàn chỉnh với độ trẻ hoá cao, đồng đều về mặt di truyền, sạch bệnh, chất lượng tốt, có rễ cọc phát triển chắc chắn, thân dẻo, chịu được gió mạnh, ít đổ ngã, tốc độ sinh trưởng nhanh để tạo lập rừng keo có năng suất cao nên có thể trồng thành cây lâu năm lấy gỗ, nâng cao giá trị kinh tế, từ đó phát huy vai trò bảo vệ môi trường sinh thái.

Yêu cầu chung về điều kiện thực hiện

* **Nguồn giống:** Nguồn giống để nhân giống là cây đầu dòng (keo lai dòng BV10, BV16, BV32) được cơ quan chức năng công nhận.

* **Trang thiết bị, dụng cụ, hóa chất**

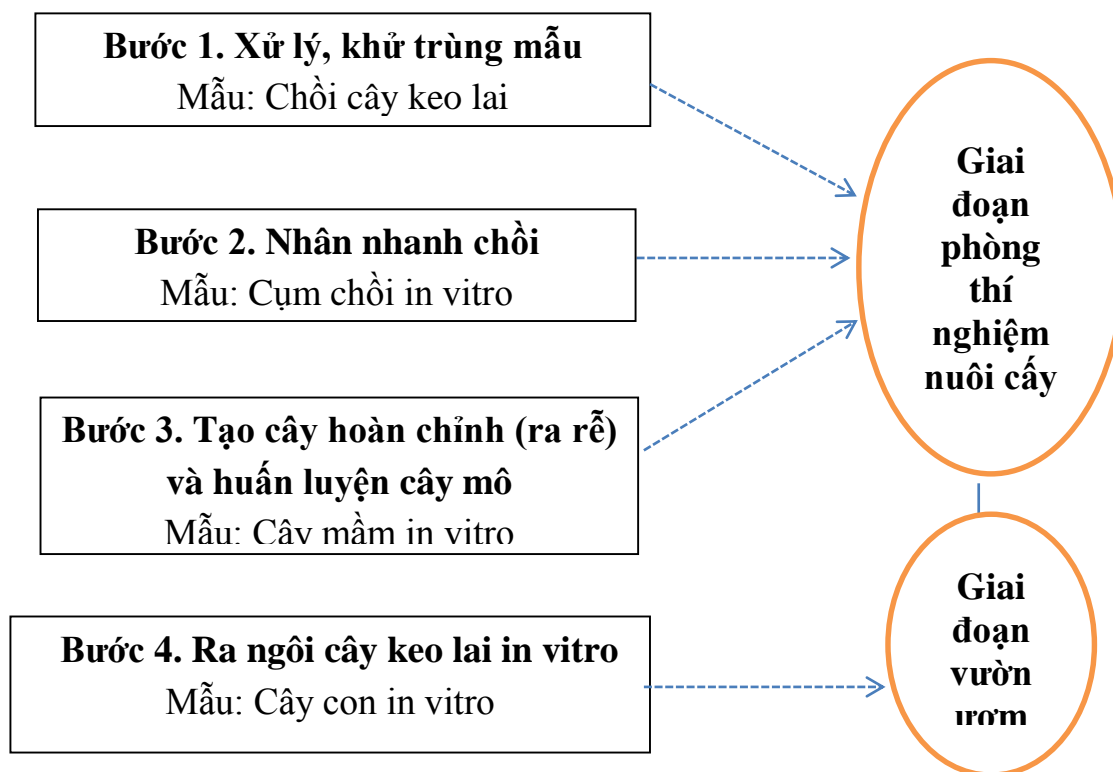
- ❖ Phòng rửa, sấy, hấp dụng cụ
- ❖ Phòng pha hóa chất, nấu môi trường
- ❖ Phòng cấy vô trùng, phòng nuôi
- ❖ Hóa chất, các chất kích thích sinh trưởng.

* **Yêu cầu về điều kiện nuôi cây mô in vitro**

- Phòng nuôi cây mô phải bảo đảm vô trùng. Bình mẫu được nuôi dưới ánh sáng gián tiếp huỳnh quang trắng: cường độ chiếu sáng 2000 – 3000lux, thời gian chiếu sáng 14h/ngày. Nhiệt độ phòng nuôi là $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$.
- Vệ sinh, khử trùng dụng cụ, thiết bị, phòng nuôi cấy; hấp vô trùng bình cấy ở nhiệt độ 121°C , áp suất 1,2 atm trong 20 phút; hấp khử trùng panh gấp, dao cấy, đĩa cấy và trước khi cấy khử trùng trên lửa đèn cồn. pH của môi trường cấy được điều chỉnh ở mức 5,8.
- Chuẩn bị môi trường đúng cách, chọn đúng môi trường cho từng giai đoạn nuôi cấy. Chọn và xử lý mẫu nuôi cấy thích hợp trước khi nuôi cấy, tránh sử dụng mẫu bị nhiễm vào nuôi cấy.

1. Sơ đồ thực hiện

Quy trình sản xuất giống keo lai dòng BV10, BV16 và BV32 bằng phương pháp nuôi cấy mô gồm các bước tạo cây in vitro trong phòng thí nghiệm; huấn luyện cây và ra ngôi (cấy cây, chăm sóc cây keo mô tại vườn ươm) được thể hiện qua sơ đồ sau.



Sơ đồ mô tả các bước thực hiện quy trình sản xuất giống keo lai dòng BV10, BV16 và BV32 bằng phương pháp nuôi cấy mô

2. Các bước thực hiện

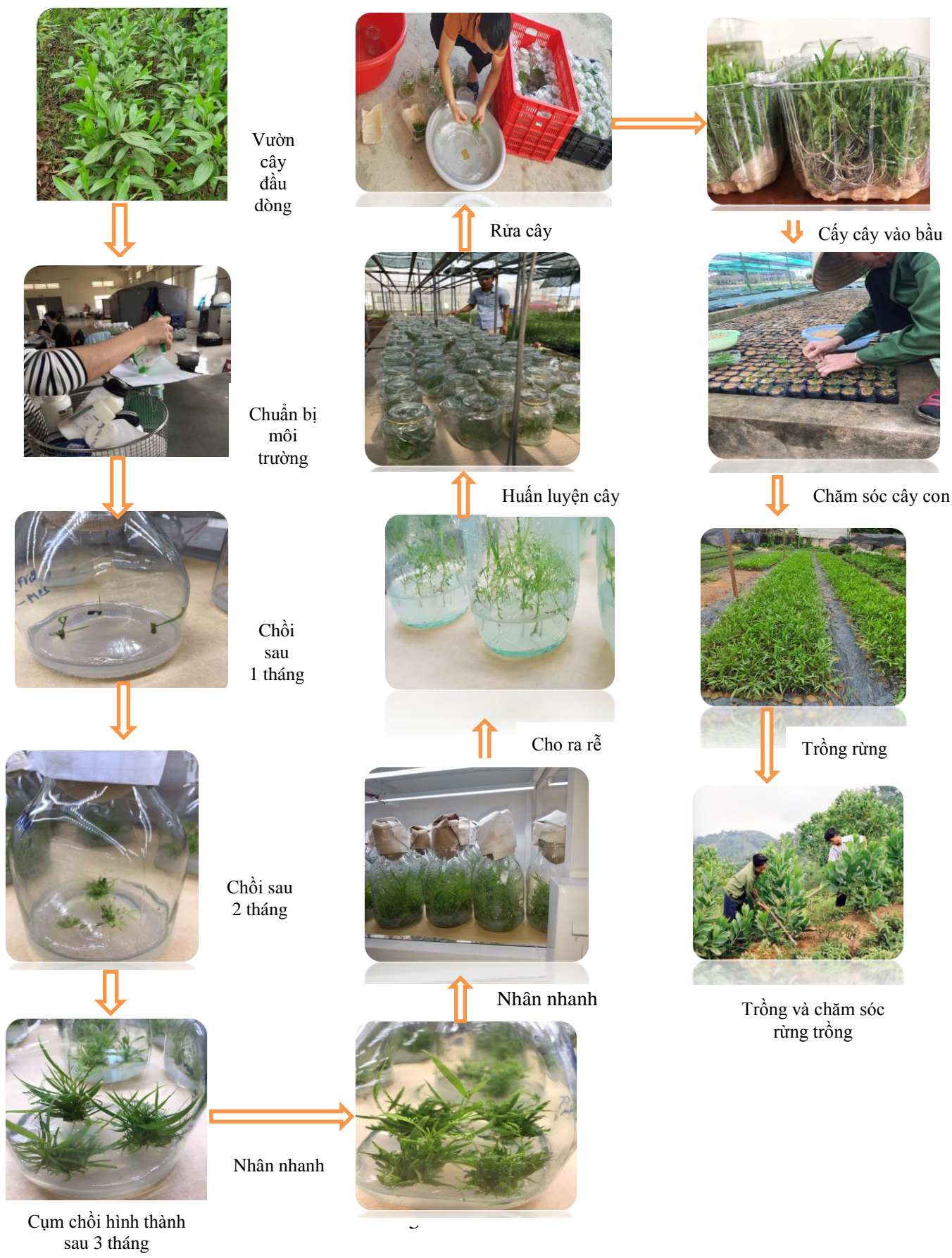
2.1. Bước 1: Khử trùng mẫu và tạo cụm chồi con in-vitro

Mục tiêu của giai đoạn này là tạo được mẫu sạch và non trẻ cho các giai đoạn nuôi cấy tiếp theo nên cần đảm bảo tỷ lệ mẫu nhiễm thấp, tỷ lệ sống cao, mẫu sinh trưởng tốt.

- **Yêu cầu về nguyên vật liệu:** Hóa chất khử trùng: Cồn 70°, HgCl₂ 0,1%, xà phòng, nước cất; môi trường tạo cụm chồi: agar; sucrose; BAP. Chồi keo lai BV10, BV16, BV32: được lấy từ đỉnh sinh trưởng lấy từ các cây Keo lai BV10, BV16, BV32 của cây giống gốc được công nhận, trồng ở trong vườn cây đầu dòng. Yêu cầu chính là chồi trên cây khỏe mạnh, sạch bệnh, sinh trưởng tốt, chọn từ cành nửa hóa gỗ của cành cấp 1 khỏe mạnh, sức sống tốt, không bị sâu bệnh, cành

mọc thẳng hoặc nghiêng không quá 30° so với thân chính; dài 10 - 15cm có chồi và lá phát t

Mô phỏng các bước sản xuất giống keo lai Dòng BV10, BV16 và BV32 tại Thanh Hóa



- Thao tác khử trùng

+ Cắt bỏ phần lá của chồi, rửa sạch bằng dung dịch nước xà phòng loãng để loại bỏ chất bẩn bám trên bề mặt bằng chồi lỏng mềm. Sau đó rửa sạch mẫu dưới vòi nước chảy cho hết xà phòng, tráng lại 2-3 lần bằng nước cất. Tiếp tục rửa chồi bằng nước cất vô trùng 3-5 lần, lắc mạnh mỗi lần trong khoảng từ 3-5 phút để loại bỏ các chất bẩn còn bám trên bề mặt. Chuyển mẫu vào tủ cấy vô trùng và tiến hành thao tác khử trùng mẫu.

+ Khử trùng bề mặt bằng dung dịch cồn 70% bổ sung Tween 20 (4 giọt/100 ml dung dịch) trong 1 phút (lắc nhẹ), sau đó rửa sạch bằng nước cất 3-4 lần. Khử trùng sâu mẫu bằng hóa chất HgCl₂ 0,1% trong thời gian 8 phút, sau đó rửa lại bằng nước cất từ 2-3 lần.

+ Sau khi khử trùng đặt chồi lên đĩa inox vô trùng, dùng giấy thấm vô trùng để thấm khô nước trên bề mặt chồi, sau đó dùng dao cấy cắt chồi thành các đoạn chồi có chiều dài (2 - 2,5cm) có chứa ít nhất một mắt ngủ, cấy lên môi trường nuôi cấy khởi động (MS bổ sung 8 g/l agar; 30 g/l sucrose; 0,5 mg/l BAP). Hơ miệng bình, nút bông trên ngọn lửa đèn cồn và nắp nút bông vào bình. Sau khoảng 30 ngày, lựa chọn chồi sạch bệnh, sinh trưởng tốt để cấy chuyển sang môi trường tạo cụm chồi.

- Tạo cụm chồi con in-vitro

+ Pha chế và nấu môi trường nuôi cấy;

+ Hấp vô trùng bình cấy ở nhiệt độ 121°C, áp suất 12 atm trong 20 phút.

+ Cho môi trường vào bình cấy (sau khi nấu MT 2 ngày), môi trường tạo chồi là môi trường MS có bổ sung 30 g/l sucrose, 8 g/l agar, 1,5mg/l BAP.

+ Chọn những mẫu sống khỏe, không bị nhiễm nấm, khuẩn của giai đoạn vào mẫu để sử dụng làm nguyên liệu tạo chồi.

+ Dùng dao cắt bỏ hai đầu của mẫu cấy, chỉ giữ lại đoạn mang chồi có chiều dài (2 - 2,5cm) và dùng pank gấp mẫu cấy vào môi trường tạo chồi theo phương thẳng đứng. Hơ miệng bình, nút bông trên ngọn lửa đèn cồn và nắp nút bông vào bình (bình tam giác).

+ Sắp xếp bình lên giá ở phòng nuôi với thời gian chiếu sáng là 14 giờ/ngày, nhiệt độ phòng nuôi là $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$, độ ẩm từ 55 đến 60%. Sau khoảng 2 tháng, lựa chọn chồi sạch bệnh, sinh trưởng tốt để cấy chuyển sang môi trường nhân nhanh.

2.2. Bước 2: Nhân nhanh chồi

- Yêu cầu về nguyên vật liệu

+ Môi trường nhân nhanh là môi trường MS có bổ sung 30 g/l sucrose, 8 g/l agar, 1,5mg/l BAP hoặc môi trường MS bổ sung 30 g/l sucrose, 8 g/l agar, 1,5mg/l BAP và 1,5mg/l Kinetin.

+ Mẫu cấy là các cụm chồi in-vitro có chiều cao 1 cm trở lên, được khoảng 2 tháng từ khi tạo cụm chồi, phát triển tốt, không nhiễm nấm, khuẩn.

- Thao tác thực hiện

+ Pha chế và nấu môi trường nuôi cấy;
+ Hấp vô trùng bình cấy ở nhiệt độ 121°C , áp suất 12 atm trong 20 phút.
+ Cho môi trường nhân nhanh vào bình cấy (sau khi nấu MT 2 ngày).
+ Chọn những mẫu sống khỏe, không bị nhiễm nấm, khuẩn của bước 1 để sử dụng làm nguyên liệu tạo chồi.

+ Dùng dao cấy cắt tách cụm chồi thành các cụm nhỏ (5-8 chồi), vệ sinh cụm chồi sau đó dùng pank gấp mẫu cấy vào môi trường nhân nhanh theo phương thẳng đứng, các cụm cách đều nhau. Hơ miệng bình, nút bông trên ngọn lửa đèn cồn và nắp nút bông vào bình. Sau khi cấy xong đưa vào phòng nuôi.

Hàng ngày kiểm tra và loại bỏ bình bị nhiễm nấm và vi khuẩn.

- Cứ sau 4 tuần cấy chuyển một lần cho đến khi đáp ứng số lượng chồi cần thiết. Sau 7 - 8 chu kỳ cấy chuyển cần sử dụng vật liệu mới.

2.3. Bước 3: Tạo cây keo lai hoàn chỉnh

- Yêu cầu về nguyên vật liệu

+ Môi trường: Sử dụng môi trường dinh dưỡng ra rễ $\text{MS}^* = 1/2\text{MS} + 8 \text{ g/l agar} + 30 \text{ g/l sucrose}$ bổ sung 1,5mg/l IBA với keo lai dòng BV10, BV32 và bổ sung 1mg/l IBA với keo lai dòng BV16.

+ Mẫu cấy: Lựa chọn chồi Keo lai *in vitro* đạt tiêu chuẩn: có chiều cao \geq

2 cm, đã hình thành bộ lá (từ 2 đốt lá trở lên) và thân lóng đầy đủ, được cắt và tách ra từ cụm chồi trong môi trường nhân nhanh rồi cấy chuyển sang môi trường cảm ứng tạo rễ.

- Thao tác thực hiện

+ Cấy đơn chồi, cắm chân chồi ngập từ 3-5mm vào môi trường ra rễ theo phương thẳng đứng, khoảng cách cây giữa các chồi từ 0,5-0,8 cm sao cho lá không giao nhau.

+ Sắp xếp bình lên giá trong phòng nuôi, hàng ngày kiểm tra và loại bỏ bình bị nhiễm nấm và vi khuẩn. Sau khoảng 3-4 tuần, chồi ra rễ thành cây keo lai hoàn chỉnh rồi đem bình ra khu vực huấn luyện.

- Huấn luyện cây mô

Tiến hành chuyển bình chứa các cây con *in vitro* ra nhà kính, nhà có mái che nhiệt độ, độ ẩm theo điều kiện môi trường tự nhiên, giúp cây con thích nghi dần với điều kiện bên ngoài, thời gian huấn luyện là 14 ngày. Sau đó chuyển sang bước cấy vào bầu đất.

2.4. Bước 4: Ra ngôi (SX tại vườn ươm)

- Yêu cầu về nguyên vật liệu

+ Yêu cầu cây keo lai *in vitro* khi ra ngôi đủ tiêu chuẩn đã trải qua giai đoạn huấn luyện trong thời gian 14 ngày; Sạch bệnh, không cong queo, không cụt ngọn, không bị tổn thương cơ giới, cây sinh trưởng tốt, lá màu xanh đậm, rễ màu trắng. Chiều cao từ 2,3cm trở lên, số rễ: 3- 5 rễ/cây, chiều dài rễ 1-1,5cm.

+ Đất tầng AB, đất đỏ: chọn loại đất mặt có thành phần cơ giới thịt trung bình. Sau khi lấy về cần làm sạch cỏ dại, đập và nghiền đất nhỏ sau đó sàng và loại bỏ các tạp chất khác.

+ Phân chuồng hoai: Sử dụng nguồn phân trâu bò, đã được ủ hoai mục; trước khi trộn cũng đập và nghiền phân nhỏ, phân toi, đảm bảo độ ẩm khoảng 35% (dùng tay nắm phân không thấy nước rớt).

+ Phân lân: Sử dụng Supe lân;

+ Mùn cưa, trấu: thu thập từ xưởng chế biến gỗ keo, kích thước hạt mùn cưa 0,2mm. Trấu được lấy từ máy xát ở hộ gia đình; mùn cưa và trấu đảm bảo khô, sạch, không lẫn tạp chất;

- + Xơ dừa đã qua xử lý; Vôi bột: đảm bảo khô mịn, không lẫn tạp chất.
- + Nước men vi sinh: sử dụng chế phẩm Trichoderma; Dung dịch Score 250 EC hoặc Benlat C nồng độ 3%.
- + Túi bầu PE, lưới đen che nắng, luống; vật liệu lấp đặt hệ thống tưới: ống nhựa, pép phun, co, ống nhựa, ống kẽm, capin, chụp gai trong, gai ngoài...

- Thao tác thực hiện

✓ Cây con sau khi lấy ra khỏi bình được rửa sạch môi trường, xếp gọn gàng vào hộp có lót báo ẩm để tránh cho cây bị gãy hỏng, mất nước. Ngâm cây khoảng 3 phút trong dung dịch Score 250 EC hoặc Benlat C nồng độ 3% trong thời gian từ 3 đến 5 phút để diệt trừ nấm bệnh trên cây.

✓ Chuẩn bị bầu đất ươm cây

+ Thu thập và lựa chọn nguyên liệu tạo ruột bầu; Trộn hỗn hợp thành phần ruột bầu ươm cây theo tỷ lệ: 65% đất đỏ + 20% phân chuồng hoai+ 6,5% mùn cưa + 8% trấu và xơ dừa + 0,5% vôi bột và nước men vi sinh.

+ Cho hỗn hợp vào túi bầu, đảm bảo 2/3 chiều cao bầu từ đáy bầu lên được nén khá chặt, và 1/3 chiều cao bầu tương đối chặt. Bầu đảm bảo đồng đều không bị rách, không bị biến dạng;

+ Xếp bầu đất thẳng đứng theo hàng, theo luống để tiện việc chăm sóc, quản lý cây sau này.

✓ Cấy cây vào bầu đất

+ Dùng que cắm vào giữa bầu đất để tạo lỗ có độ sâu 2-3cm, nhẹ nhàng đưa phần rễ của cây mầm vào lỗ bầu, đảm bảo rễ cây nằm hoàn toàn dưới mặt đất của bầu, tránh làm cong rễ hay đứt gãy rễ chính, sau đó ấn nhẹ đất xung quanh góc cây mầm để rễ cây tiếp xúc với đất và cây có thể đứng vững theo phương vuông góc với mặt bầu. Cấy xong dùng ô doa tưới nhẹ cho cây.

+ Thời điểm cấy: Cấy cây vào bầu lúc chiều tối để tránh ánh nắng trực tiếp vào luống cây mới cấy.

✓ Chăm sóc cây sau khi cấy

+ Che luống cây mới cấy bằng một lớp nilon trong để duy trì độ ẩm. Làm giàn che trước khi cấy cây vào bầu, sử dụng lưới che nắng độ che phủ 70%. Trong suốt thời gian cây chưa bén rễ không được tháo dỡ màn che phủ cho cây.

+ Tưới nước: Tùy thuộc vào điều kiện thời tiết, vào mùa khô, trời nắng nóng cần tưới đủ ẩm hàng ngày, mùa mưa cần tránh ngập úng. Kết hợp phân bón lá NPK Lotufert Bio Mix Plus định kỳ 30 ngày/lần.

+ Thường xuyên làm cỏ phá váng, làm sạch rãnh luống.

+ Định kỳ 1 tháng/lần đảo bầu, xén rễ, bấm tỉa chồi bất định, trên mỗi cây chỉ để một chồi ngọn).

+ Để phòng trừ sâu bệnh, sử dụng loại thuốc Super tilt 300EC, cứ 10 ngày phun 1 lần. Trường hợp bệnh chưa phát sinh nhiều nên sử dụng hợp chất lưu huỳnh-vôi. Lượng phun 8-10lít/100m². Khi tỷ lệ bị bệnh trên 50% phun 2 ngày/lần đến lúc hết bệnh.

+ Trước khi xuất vườn một tuần cần đảo bầu xén rễ, loại bỏ cây không đủ tiêu chuẩn xuất vườn.

+ Sau khoảng 3-4 tháng tuổi kể từ khi cây được cấy vào bầu, đường kính cổ rễ trên 0,3cm; chiều cao trên 25cm; cây khỏe, cứng cáp, không cụt ngọn, không bị sâu bệnh hại, lá xanh và có từ 10 đến 15 lá; cây có hỗn hợp ruột bầu đầy ngang mặt bầu, bầu không bị vỡ hay biến dạng, rễ cây phủ đều xung quanh mặt trong của bầu là đủ tiêu chuẩn cây con để trồng rừng.

Phạm Hữu Hùng