

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO BỘ NÔNG NGHIỆP VÀ MÔI TRƯỜNG
VIỆN KHOA HỌC LÂM NGHIỆP VIỆT NAM
-----∞  ∞-----

GIANG THỊ THANH

**NGHIÊN CỨU BỔ SUNG CƠ SỞ KHOA HỌC ĐỂ BẢO TỒN
VÀ PHÁT TRIỂN CÂY THỦY TÙNG (*Glyptostrobus pensilis*
(Staunton ex D. Don) K. Koch) TẠI TÂY NGUYÊN**

LUẬN ÁN TIẾN SĨ LÂM NGHIỆP

Hà Nội, 2025

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO BỘ NÔNG NGHIỆP VÀ MÔI TRƯỜNG
VIỆN KHOA HỌC LÂM NGHIỆP VIỆT NAM
-----∞  ∞-----

GIANG THỊ THANH

**NGHIÊN CỨU BỔ SUNG CƠ SỞ KHOA HỌC ĐỂ BẢO TỒN
VÀ PHÁT TRIỂN CÂY THỦY TÙNG (*Glyptostrobus pensilis*
(Staunton ex D. Don) K. Koch) TẠI TÂY NGUYÊN**

Ngành đào tạo: Di truyền và chọn giống cây lâm nghiệp

Mã ngành: 9 62 02 07

LUẬN ÁN TIẾN SĨ LÂM NGHIỆP

**Người hướng dẫn khoa học: 1. TS. Ngô Văn Cầm
2. TS. Nguyễn Đức Kiên**

Hà Nội, 2025

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan công trình nghiên cứu khoa học này là của cá nhân tôi. Các số liệu, kết quả và hình ảnh trong luận án này là do tôi trực tiếp thực hiện và xử lý. Đồng thời, tôi xác nhận đã được phép sử dụng một phần kết quả từ đề tài Quỹ gen cấp Quốc gia: “*Nghiên cứu khai thác và phát triển nguồn gen cây Thủy tùng (Glyptostrobus pensilis (Staunton ex D. Don) K. Koch) tại một số tỉnh Tây Nguyên*”, mã số: NVQG-2021/ĐT.12 do TS. Lưu Thế Trung làm chủ nhiệm và tôi là cộng tác viên chính.

Các số liệu và kết quả trình bày trong luận án là hoàn toàn trung thực và chưa từng được ai công bố trên bất kỳ công trình nào khác.

Hà Nội, ngày tháng năm 2025
Tác giả

Giang Thị Thanh

LỜI CẢM ƠN

Tác giả xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc và kính trọng đến TS. Nguyễn Đức Kiên, TS. Ngô Văn Cầm đã dành nhiều thời gian công sức để hướng dẫn, định hướng cho tác giả trong quá trình thực hiện luận án.

Tác giả xin chân thành cảm ơn Ban Lãnh đạo Viện Khoa học Lâm nghiệp Việt Nam; Ban Khoa học, Đào tạo và Hợp tác quốc tế đã tạo điều kiện cho tác giả trong suốt quá trình học tập, nghiên cứu tại Viện. Tác giả xin chân thành cảm ơn Viện Khoa học Lâm nghiệp Nam Trung Bộ và Tây Nguyên – đơn vị chủ trì thực hiện đề tài và TS. Lưu Thế Trung - chủ nhiệm đề tài đã tạo điều kiện về thời gian và hỗ trợ nhân lực trong quá trình tác giả thực hiện các nội dung luận án. Tác giả cũng xin chân thành cảm ơn Viện Nghiên cứu Giống và Công nghệ sinh học Lâm nghiệp là đơn vị nơi tác giả sinh hoạt học thuật đã giúp đỡ tác giả trong quá trình thực hiện luận án.

Tác giả xin chân thành cảm ơn tập thể cán bộ và nhân viên Ban quản lý Khu bảo tồn loài – sinh cảnh Thông nước đã hỗ trợ hiện trường nghiên cứu, thu thập số liệu hiện trường để tác giả hoàn thành luận án.

Tác giả xin gửi lời cảm ơn chân thành tới các anh chị đồng nghiệp đã hỗ trợ tác giả trong quá trình triển khai các nội dung luận án và có những đóng góp quý báu giúp tác giả hoàn thành luận án.

Cuối cùng tác giả xin chân thành cảm ơn sự động viên, giúp đỡ của gia đình và bạn bè, đồng nghiệp!

Hà Nội, Ngày tháng năm 2025
Tác giả

Giang Thị Thanh

MỤC LỤC

LỜI CAM ĐOAN	i
LỜI CẢM ƠN	ii
MỤC LỤC	iii
DANH MỤC TỪ VIẾT TẮT	vii
DANH SÁCH BẢNG BIỂU	ix
DANH SÁCH HÌNH ẢNH	xi
MỞ ĐẦU	1
1. Tính cấp thiết của đề tài.....	1
2. Ý nghĩa khoa học và thực tiễn của luận án.....	3
3. Mục tiêu nghiên cứu	3
4. Những điểm mới của luận án.....	4
5. Đối tượng nghiên cứu	4
6. Phạm vi nghiên cứu	4
7. Bố cục luận án	5
Chương 1. TỔNG QUAN VẤN ĐỀ NGHIÊN CỨU.....	6
1.1. Đặc điểm hình thái Thủy tùng.....	6
1.2. Nghiên cứu ngoài nước.....	8
1.2.1. Đặc điểm phân bố và thực trạng quần thể	8
1.2.2. Đặc điểm sinh học.....	9
1.2.3. Nhân giống và gây trồng.....	11
1.3. Nghiên cứu trong nước.....	14
1.3.1. Đặc điểm phân bố và thực trạng quần thể	14
1.3.2. Đặc điểm sinh học.....	17
1.3.3. Nhân giống và gây trồng.....	19
1.4. Nhận định về kết quả và định hướng nghiên cứu phục vụ bảo tồn	22
Chương 2. NỘI DUNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	25

2.1. Nội dung nghiên cứu	25
2.1.1. Nghiên cứu thực trạng quần thể Thủy tùng	25
2.1.2. Đánh giá đa dạng di truyền của Thủy tùng tự nhiên bằng kỹ thuật phân tử ISSR	25
2.1.3. Nghiên cứu bổ sung kỹ thuật nhân giống Thủy tùng	25
2.1.4. Nghiên cứu kỹ thuật trồng và chăm sóc cây Thủy tùng	25
2.1.5. Đề xuất một số biện pháp bảo tồn và phát triển nguồn gen Thủy tùng tại Tây Nguyên.....	25
2.2. Vật liệu nghiên cứu.....	25
2.2.1. Vật liệu nghiên cứu thực trạng quần thể Thủy tùng	25
2.2.2. Vật liệu nghiên cứu đánh giá đa dạng di truyền quần thể Thủy tùng	26
2.2.3. Vật liệu nghiên cứu bổ sung kỹ thuật nhân giống Thủy tùng	26
2.2.4. Vật liệu nghiên cứu kỹ thuật trồng và chăm sóc cây Thủy tùng..	26
2.3. Phương pháp nghiên cứu.....	27
2.3.1. Cách tiếp cận	27
2.3.2. Phương pháp nghiên cứu thực trạng quần thể Thủy tùng	27
2.3.3. Phương pháp nghiên cứu đánh giá đa dạng di truyền quần thể Thủy tùng	31
2.3.4. Phương pháp nghiên cứu bổ sung kỹ thuật nhân giống Thủy tùng	35
2.3.5. Phương pháp nghiên cứu kỹ thuật trồng và chăm sóc cây Thủy tùng	43
2.3.6. Phương pháp nghiên cứu đề xuất một số biện pháp bảo tồn nguồn gen Thủy tùng tại Tây Nguyên	47
Chương 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN.....	48
3.1. Thực trạng quần thể Thủy tùng tại Tây Nguyên	48

3.1.1. Thực trạng quần thể Thủy tùng tự nhiên.....	48
3.1.2. Thực trạng gây trồng Thủy tùng ở Tây Nguyên	54
3.2. Đánh giá đa dạng di truyền cây Thủy tùng	60
3.2.1. Kết quả tách chiết DNA tổng số của các mẫu Thủy tùng.....	60
3.2.2. Ứng dụng DNA barcode để giám định loài Thủy tùng.....	61
3.2.3. Đánh giá đa dạng di truyền của quần thể Thủy tùng hiện có ở Việt Nam	62
3.3. Nghiên cứu bổ sung kỹ thuật nhân giống Thủy tùng.....	70
3.3.1. Nghiên cứu kỹ thuật nhân giống Thủy tùng bằng nuôi cấy <i>in vitro</i>	70
3.3.2. Nghiên cứu bổ sung kỹ thuật nhân giống Thủy tùng bằng giâm hom	79
3.3.3. Nghiên cứu kỹ thuật nhân giống Thủy tùng bằng ghép trên rễ thở	93
3.4. Nghiên cứu kỹ thuật trồng và chăm sóc cây Thủy tùng	99
3.4.1. Đánh giá một số mô hình trồng Thủy tùng trồng tập trung tại Tây Nguyên.....	99
3.4.2. Nghiên cứu ảnh hưởng của độ tàn che đến sinh trưởng cây trồng Thủy tùng	104
3.4.3. Nghiên cứu kỹ thuật bón phân cây trồng Thủy tùng.....	107
3.5. Đề xuất một số biện pháp bảo tồn nguồn gen Thủy tùng tại Tây Nguyên.	109
3.5.1. Tăng cường công tác bảo tồn <i>in situ</i>	110
3.5.2. Xây dựng các khu bảo tồn <i>ex situ</i> và thúc đẩy trồng rừng phân tán	110
3.5.3. Tăng cường đa dạng di truyền loài Thủy tùng.....	111
3.5.4. Đẩy mạnh giáo dục và truyền thông bảo tồn Thủy tùng.....	112

KẾT LUẬN, TỒN TẠI VÀ KIẾN NGHỊ	114
1. Kết luận.....	114
<i>1.1. Thực trạng quần thể Thủy tùng tại Tây Nguyên.....</i>	<i>114</i>
<i>1.2. Đa dạng di truyền quần thể Thủy tùng tự nhiên tại Tây Nguyên</i>	<i>114</i>
<i>1.3. Kỹ thuật nhân giống in vitro Thủy tùng.....</i>	<i>115</i>
<i>1.4. Kỹ thuật nhân giống hom Thủy tùng.....</i>	<i>115</i>
<i>1.5. Kỹ thuật ghép trên rễ thở cây mẹ.....</i>	<i>115</i>
<i>1.6. Kỹ thuật trồng và chăm sóc cây Thủy tùng</i>	<i>116</i>
<i>1.7. Đề xuất một số biện pháp bảo tồn nguồn gen Thủy tùng tại Tây Nguyên.</i>	<i>116</i>
2. Tồn tại	116
3. Kiến nghị.....	117
CÁC CÔNG TRÌNH ĐÃ CÔNG BỐ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN....	118
TÀI LIỆU THAM KHẢO	119
Tài liệu tiếng Việt	119
Tài liệu tiếng Anh	123
PHỤ LỤC.....	i

DANH MỤC TỪ VIẾT TẮT

Ký hiệu viết tắt	Nghĩa đầy đủ
BA	6-Benzyl Adenine
D ₀	Đường kính gốc
D _{1.3}	Đường kính ngang ngực
DCR	Môi trường nuôi cấy <i>in vitro</i> thực vật Duchefa
DI	Chỉ số hại trung bình
ĐHST	Điều hòa sinh trưởng
GA ₃	Gibberellic Acid
G _{ST}	Chỉ số sai khác di truyền Nei
H _e	Hệ số đa dạng di truyền Nei
H _{pop}	Hệ số dị hợp của quần thể
H _{sp}	Hệ số dị hợp của loài
H _T	Chỉ số đa dạng nguồn gen
H _{vn}	Chiều cao vút ngọn
I	Chỉ số đa dạng di truyền Shannon
IBA	β-Indol Butyric Acid
ISSR	Chuỗi lặp lại đơn giản
IAA	Indole-3-Acetic Acid
MS	Môi trường Murashige và Skoog
N _a	Số lượng alen quan sát được
N _e	Số lượng alen có hiệu lực
N _m	Chỉ số trao đổi gen giữa các quần thể
N _{tb}	Số rẽ trung bình/mẫu
NAA	Naphthyl Acetic Acid

Ký hiệu viết tắt	Nghĩa đầy đủ
ÔTC	Ô tiêu chuẩn
P%	Tỷ lệ thiệt hại
PcoA (Principal Coordinates Analysis)	Phân tích tọa độ chính trong quan hệ di truyền
PCR	Phản ứng chuỗi trùng hợp
PIC	Chỉ số mức độ đa hình của một chỉ thị phân tử
PPB	Tỷ lệ phần trăm đa hình
R%	Tỷ lệ mẫu ra rễ
R _i	Chỉ số ra rễ
TCCA	Trichloroisocyanuric acid
VC	Hệ số biến thiên
WPM	Môi trường Woody plant medium

DANH SÁCH BẢNG BIỂU

Bảng 2.1. Trình tự mỗi các vùng gen lục lạp được sử dụng nghiên cứu.....	32
Bảng 2.2. Trình tự mỗi ISSR được sử dụng thực hiện phản ứng PCR.....	33
Bảng 2.3. Công thức loại chất khử trùng và thời gian khử trùng mẫu	36
Bảng 2.4. Công thức môi trường nhân nhanh chồi.....	37
Bảng 2.5. Công thức môi trường ra rễ	38
Bảng 2.6. Công thức nồng độ IBA và thời gian xử lý hom.....	39
Bảng 2.7. Công thức nồng độ IBA và kích thước hom	40
Bảng 2.8. Công thức hỗn hợp chất điều hoà sinh trưởng	41
Bảng 2.9. Công thức loại phân, lượng phân	46
Bảng 3.1. Chất lượng cây Thủy tùng tự nhiên tại tỉnh Đắk Lắk (6/2022).....	51
Bảng 3.2. Sinh trưởng và chất lượng của Thủy tùng trong một số mô hình trồng phân tán tại Tây Nguyên.....	55
Bảng 3.3. Mức độ đa hình của 10 mỗi ISSR.....	62
Bảng 3.4. Thông số đa dạng di truyền của hai quần thể Thủy tùng nghiên cứu.....	64
Bảng 3.5. Các chỉ số đa dạng của hai quần thể Thủy tùng	65
Bảng 3.6. Phân tích phương sai phân tử của mẫu Thủy tùng	65
Bảng 3.7. Khoảng cách di truyền (trên vạch) và mức độ tương đồng (dưới vạch).....	67
Bảng 3.8. Kết quả phân tích phương sai ảnh hưởng của loại chất khử trùng và thời gian khử trùng của mẫu cấy.....	71
Bảng 3.9. Kết quả ảnh hưởng của đồng thời loại chất khử trùng và thời gian khử trùng của mẫu cấy	71
Bảng 3.10. Kết quả ảnh hưởng của nồng độ chất điều hòa sinh trưởng đến quá trình nhân nhanh chồi.....	74
Bảng 3.11. Kết quả ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng lên khả năng	

hình thành rễ cây Thủy Tùng	76
Bảng 3.12. Kết quả phân tích phương sai ảnh hưởng của từng nhân tố: Nồng độ IBA và Thời gian xử lý đến khả năng ra rễ của hom Thủy tùng	80
Bảng 3.13. Kết quả ảnh hưởng của Nồng độ IBA và thời gian xử lý hom đến khả năng giâm hom Thủy tùng (3/2021-5/2021)	81
Bảng 3.14. Kết quả phân tích phương sai ảnh hưởng của từng nhân tố: Nồng độ IBA và Kích thước hom đến khả năng ra rễ của hom Thủy tùng.....	83
Bảng 3.15. Kết quả ảnh hưởng của Nồng độ IBA và kích thước hom đến khả năng giâm hom Thủy tùng (11/2021-1/2022).....	85
Bảng 3.16a. Kết quả ảnh hưởng của hỗn hợp chất điều hoà sinh trưởng đến khả năng giâm hom Thủy Tùng (9/2022-1/2023).....	88
Bảng 3.16b. Kết quả ảnh hưởng của hỗn hợp chất điều hoà sinh trưởng đến khả năng giâm hom Thủy Tùng (9/2022-1/2023).....	89
Bảng 3.16c. Kết quả ảnh hưởng của hỗn hợp chất điều hoà sinh trưởng đến khả năng giâm hom Thủy Tùng (9/2022-1/2023).....	90
Bảng 3.17. Tỷ lệ sống chất lượng của cây ghép Thủy tùng theo phương pháp ghép sau 22 tháng.....	94
Bảng 3.18. Sinh trưởng đường kính gốc (D_0 , mm) và chiều cao (H_{vn} cm) cây ghép Thủy tùng sau 22 tháng tuổi.....	96
Bảng 3.19. Điều kiện lập địa các mô hình trồng Thủy tùng năm 2023	99
Bảng 3.20. Tỷ lệ sống và sinh trưởng của các mô hình Thủy tùng trồng tập trung ở giai đoạn 12 tháng tuổi	101
Bảng 3.21 Tỷ lệ sống và sinh trưởng Thủy tùng theo độ tàn che sau 18 tháng tại xã Ea Drăng, tỉnh Đắk Lắk.....	105
Bảng 3.22. Sinh trưởng Thủy tùng theo các công thức bón phân sau 12 tháng tại thành phố Đà Lạt, tỉnh Lâm Đồng.	108

DANH SÁCH HÌNH ẢNH

Hình 1.1. Hình thái cây Thủy tùng (Trần Vinh, 2011 [35])	7
Hình 2.1. Sơ đồ các bước nghiên cứu của luận án.....	27
Hình 3.1. Quần thể Thủy tùng tự nhiên tại Ea Drăng	50
Hình 3.2. Cây Thủy tùng tự nhiên tại Krông Năng	50
Hình 3.3. Biểu đồ phân bố số cây theo cấp kính tại Ea Drăng	52
Hình 3.4. Biểu đồ phân bố số cây theo cấp kính tại Krông Năng	53
Hình 3.5. Thủy tùng trồng tại Tây Nguyên.....	58
Hình 3.6. Triệu chứng của sâu đục thân <i>Zeuzera multistrigata</i> gây hại trên Thủy tùng	59
Hình 3.7. Mẫu lá Thủy tùng được sử dụng để nghiên cứu	60
Hình 3.8. Kết quả điện di DNA tổng số của các mẫu Thủy tùng	61
Hình 3.9. Kết quả khuếch đại vùng gen.....	61
Hình 3.10. Kết quả khuếch đại sử dụng môi UBC 856.	63
Hình 3.11. Cây phả hệ 163 mẫu Thủy tùng dựa trên hệ số tương đồng di truyền ..	68
Hình 3.12. Kết quả phân tích tọa độ chính trong quan hệ di truyền của các mẫu Thủy tùng được nghiên cứu	69
Hình 3.13. Khử trùng mẫu	73
Hình 3.14. Mẫu khỏe bật chồi sau khi khử trùng.....	73
Hình 3.15. Chồi Thủy tùng trên môi trường WPM bổ sung 0,2 mg/l; 0,5 mg/l; 0,7 mg/l và 1,0 mg/l BA sau 2 tháng nuôi cấy trong <i>in vitro</i>	75
Hình 3.16. Chồi Thủy tùng ở 2 giai đoạn khác nhau	78
Hình 3.17. Rễ cây Thủy tùng trên môi trường WPM bổ sung 10 ppm; 20 ppm; 30 ppm; 40 ppm NAA sau 2 tháng nuôi cấy trong <i>in vitro</i>	79
Hình 3.18. Hom thí nghiệm	86
Hình 3.19. Hom Thủy tùng ra mô sẹo và ra rễ	93

Hình 3.20. Vật liệu ghép	93
Hình 3.21. Cây ghép Thủy tùng	95
Hình 3.22. Hình thái cây Thủy tùng	98
Hình 3.23. Thủy tùng trồng tập trung năm 2023.	101
Hình 3.24. Cây thủy tùng trên các ụ đất ở các độ tàn che khác nhau.....	104
Hình 3.25. Cây Thủy tùng từ hom	107
Hình 3.26. Phát dọn dây leo quấn quanh thân cây Thủy tùng tại Ea Drăng. 110	

MỞ ĐẦU

1. Tính cấp thiết của đề tài

Theo công bố trên The world flora online (WFO) [93] và Plants of the World Online (Kew) [84], Thủy tùng (*Glyptostrobus pensilis* (Staunton ex D.Don) K.Koch)) thuộc họ Hoàng đàn (Cupressaceae), là loài duy nhất còn tồn tại thuộc chi *Glyptostrobus* và được xem như hóa thạch sống của ngành hạt trần (Fagen và cộng sự, 2005) [55], (Ma và cộng sự, 2004) [77], và được biết đến với các tên khác như Shui song [tiếng Trung Quốc]; Chinese deciduous cypress, Canton water pine (tiếng Anh); Thông nước, H'ral (tiếng Việt) (The Plant List, 2020) [92].

Thủy tùng là loài cây gỗ quý hiếm và đang bị đe dọa ở cấp rất nguy cấp (Nghị định 84/2021/NĐ-CP [3], Sách đỏ Việt Nam, 2007 [34], Danh lục đỏ Việt Nam, 2024 [7], IUCN Red List, 2011 [95]), do kích thước quần thể nhỏ, môi trường sống bị thay đổi và không có tái sinh tự nhiên (Nguyễn Huy Sơn và cộng sự, 2006) [29], và đây là loài đặc biệt cần ưu tiên bảo tồn tại Việt Nam (Bảo Huy, 2010) [1].

Theo khảo sát trên thị trường hiện nay, giá gỗ thủy tùng có giá dao động từ vài chục triệu đến hàng trăm triệu đồng mỗi mét khối tùy thuộc vào loại gỗ, kích thước, và chất lượng. Gỗ Thủy tùng có giá trị kinh tế cao là nhờ các đặc điểm như không mối mọt, không cong vênh, có vân thớ, màu sắc đẹp và độ bền cao. Đặc biệt, gỗ có mùi thơm nhẹ, phù hợp với nhiều người. Mặt khác, gỗ Thủy tùng được nhiều người ưa chuộng bởi yếu tố tâm linh, tín ngưỡng. Nhu cầu sử dụng gỗ Thủy tùng cao là một trong những nguyên nhân dẫn đến loài này bị khai thác trái phép và có nguy cơ tuyệt chủng.

Trước thực trạng nguy cấp của loài Thủy tùng, tại Việt Nam các hoạt động bảo tồn loài cũng đã được triển khai từ rất sớm, thông qua các hoạt động điều tra thống kê số lượng cá thể, phân bố, sinh thái, tái sinh loài Thủy tùng (Nguyễn

Ngọc Lung và cộng sự, 1992) [19]; (Nguyễn Hoàng Nghĩa, 1997) [23]; (Bảo Huy, 2010) [14]; (Trần Vinh 2011) [35]. Và thành lập trạm quản lý bảo vệ Thủy tùng từ năm 1987 (Bảo Huy, 2010) [14], đến năm 2011, đã thành lập Ban quản lý Khu bảo tồn loài - sinh cảnh Thông nước, nhằm bảo vệ nghiêm ngặt 162 cây Thủy tùng tự nhiên duy nhất hiện nay ở Việt Nam. Bên cạnh đó các nghiên cứu về đặc điểm sinh học, nhân giống sinh dưỡng và gây trồng Thủy tùng phân tán cũng như nghiên cứu đánh giá đa dạng di truyền Thủy tùng đã bước đầu được tiến hành phục vụ cho mục đích hoạt động bảo tồn loài.

Tuy nhiên, các kết quả nghiên cứu điều tra thống kê, đánh giá thực trạng sinh trưởng, phát triển của các cá thể Thủy tùng tự nhiên đã được thực hiện từ khá lâu và chưa được cập nhật. Nghiên cứu đánh giá đa dạng di truyền loài Thủy tùng chỉ mới thực hiện với số lượng cá thể nhỏ. Các kết quả nghiên cứu nhân giống vẫn còn một số hạn chế như: Nghiên cứu nuôi cấy *in vitro* Thủy tùng có tỷ lệ mẫu sống và tỷ lệ mẫu ra rễ thấp. Nghiên cứu giâm hom Thủy tùng có tỷ lệ hom ra rễ thấp, thời gian giâm hom kéo dài. Phương pháp ghép trên rễ thớ cây mẹ mặc dù cho kết quả khả quan, tuy nhiên, đây mới chỉ là kết quả nghiên cứu bước đầu, do đó, chưa phản ánh được đầy đủ hiệu quả của các phương pháp này. Như vậy để cung cấp cây giống phục vụ cho công tác bảo tồn loài, việc nghiên cứu hoàn thiện kỹ thuật nhân giống vô tính Thủy tùng trong điều kiện hạt Thủy tùng lép và chưa tìm thấy cây tái sinh từ hạt [23] là rất cần thiết. Bên cạnh đó, nghiên cứu về gây trồng Thủy tùng chỉ mới có công bố của Trần Vinh (2016) [36] về kết quả trồng thử nghiệm cây Thủy tùng ghép trên gốc Bụt mọc tại một số vùng khác nhau của tỉnh Đắk Lắk và tại hai địa điểm có phân bố tự nhiên chính. Nghiên cứu gây trồng Thủy tùng chưa quan tâm đến điều kiện lập địa trồng rừng cũng như chế độ chăm sóc để đảm bảo điều kiện tốt nhất cho cây sinh trưởng, phát triển.

Do vậy, **“Nghiên cứu bổ sung cơ sở khoa học để bảo tồn và phát triển**

cây Thủy tùng (*Glyptostrobus pensilis* (Staunton ex D. Don) K. Koch) tại Tây Nguyên” nhằm đánh giá hiện trạng quần thể, mức độ đa dạng di truyền của toàn bộ cá thể Thủy tùng tự nhiên còn lại ở Việt Nam cũng như hoàn thiện được kỹ thuật nhân giống, gây trồng loài cây này là rất cần thiết.

2. Ý nghĩa khoa học và thực tiễn của luận án

Ý nghĩa khoa học:

Luận án đã bổ sung thông tin về hiện trạng quần thể Thủy tùng tại Tây Nguyên, đa dạng di truyền của quần thể Thủy tùng tự nhiên, bổ sung cơ sở khoa học cho nhân giống và bảo tồn nguồn gen Thủy tùng tại Tây Nguyên.

Ý nghĩa thực tiễn:

Đã xác định được kỹ thuật nhân giống Thủy tùng từ nuôi cấy *in vitro*; bổ sung một số kỹ thuật để nâng cao hiệu quả nhân giống Thủy tùng từ giâm hom; áp dụng thành công kỹ thuật nhân giống bằng ghép trên rễ thở để mở rộng phát triển loài Thủy tùng và đề xuất một số giải pháp bảo tồn nguồn gen Thủy tùng tại Tây Nguyên.

3. Mục tiêu nghiên cứu

Mục tiêu chung: Bổ sung cơ sở khoa học để bảo tồn và phát triển nguồn gen cây Thủy tùng tại Tây Nguyên.

Mục tiêu cụ thể:

- Đánh giá được thực trạng quần thể Thủy tùng tự nhiên và trồng ở Tây Nguyên.
- Đánh giá được đa dạng di truyền của toàn bộ cá thể Thủy tùng tự nhiên.
- Hoàn thiện được kỹ thuật nhân giống cây Thủy tùng bằng phương pháp nuôi cấy *in vitro* và giâm hom, đồng thời phát triển được kỹ thuật nhân giống cây Thủy tùng bằng phương pháp ghép trên rễ thở cây Thủy tùng tự nhiên.
- Xác định được một số biện pháp kỹ thuật trồng và chăm sóc cây Thủy tùng tại Tây Nguyên.

- Đề xuất được một số biện pháp bảo tồn và phát triển nguồn gen Thủy tùng tại Tây Nguyên.

4. Những điểm mới của luận án

- Luận án đã nghiên cứu đánh giá đa dạng di truyền và mối quan hệ di truyền của toàn bộ cá thể Thủy tùng tự nhiên tại Tây Nguyên.
- Đã xác định được môi trường để tạo cây Thủy tùng hoàn chỉnh trong nuôi cấy *in vitro* với tỷ lệ ra rễ đạt cao (54,5%), mở ra một biện pháp kỹ thuật nhân giống vô tính hữu hiệu cho bảo tồn loài.

5. Đối tượng nghiên cứu

- Hai quần thể Thủy tùng tự nhiên tại xã Ea Drăng và xã Krông Năng, tỉnh Đắk Lắk.
- Cây Thủy tùng trồng tập trung và trồng phân tán trên các tỉnh Tây Nguyên.

6. Phạm vi nghiên cứu

Về địa điểm nghiên cứu:

- Luận án triển khai tại khu vực phân bố tự nhiên của Thủy tùng: xã Ea Drăng (trước 1/7/2025 là xã Ea Ral, huyện Ea H'Leo) và xã Krông Năng (trước 1/7/2025 là Tráp K'sơ, xã Ea Hồ, huyện Krông Năng), tỉnh Đắk Lắk.
- Xác định loài sâu hại trên Thủy tùng và phân tích đa dạng di truyền loài được thực hiện tại phòng thí nghiệm Trung tâm Nghiên cứu Bảo vệ rừng, và phòng thí nghiệm Sinh học phân tử, Viện Nghiên cứu Giống và CNSH Lâm nghiệp, Viện Khoa học Lâm nghiệp Việt nam
- Các thí nghiệm nhân giống mô, hom được thực hiện tại vườn ươm của Viện Khoa học lâm nghiệp Nam Trung Bộ và Tây Nguyên, phòng thí nghiệm nuôi cấy mô tế bào của Trường Đại học Đà Lạt.
- Khu vực trồng Thủy tùng tại các tỉnh Tây Nguyên: Gia Lai, Đắk Lắk và Lâm Đồng.

Về thời gian: Các nội dung được thực hiện từ 2021 – 2025.

Về nội dung nghiên cứu:

- Đánh giá đa dạng di truyền chỉ thực hiện đối với 163 cây Thủy tùng trong đó 159 cây Thủy tùng tự nhiên tại Tây Nguyên bằng 10 chỉ thị phân tử ISSR.
- Kỹ thuật nhân giống Thủy tùng chỉ nghiên cứu kỹ thuật nhân giống bằng nuôi cấy *in vitro*, bằng giâm hom và bằng ghép trên rễ thở.
- Kỹ thuật trồng và chăm sóc chỉ nghiên cứu ảnh hưởng của độ tàn che và phân bón đến sinh trưởng của cây trồng.

7. Bố cục luận án

Luận án gồm 131 trang (không kể phần phụ lục): Sử dụng 36 tài liệu tiếng Việt, 70 tài liệu tiếng Anh. Luận án có 31 bảng, 28 hình ảnh, 4 công trình công bố.

- Mở đầu: 5 trang.
- Chương 1: Tổng quan vấn đề nghiên cứu: 19 trang.
- Chương 2: Nội dung, vật liệu và phương pháp nghiên cứu: 23 trang.
- Chương 3: Kết quả nghiên cứu và thảo luận: 66 trang.
- Kết luận, tồn tại và kiến nghị: 4 trang.
- Các công trình đã công bố liên quan đến luận án: 1 trang.
- Tài liệu tham khảo: 13 trang.

Chương 1

TỔNG QUAN VẤN ĐỀ NGHIÊN CỨU

1.1. Đặc điểm hình thái Thủy tùng

Đặc điểm hình thái loài Thủy tùng đã được nhiều tác giả nghiên cứu, trong đó trên thế giới như Debreczy và cộng sự, 2011 [52], Coffman, 2021 [49] và ở Việt Nam như Nguyễn Hoàng Nghĩa (2004) [24], Bảo Huy, 2010 [14], Trần Vinh, 2011 [35]. Qua đó, đặc điểm hình thái Thủy tùng được mô tả như sau:

- Thân: Cây gỗ trung bình đến to, thân cao đến 30 m hay hơn, đường kính thân từ 0,6 - 1 m hay hơn. Vỏ Thủy tùng dày (2 - 3 cm), vỏ nứt dọc theo từng mảng to nhỏ khác nhau. Rễ thở Thủy tùng có dạng hình đầu gối, màu nâu đỏ, mềm, kích thước to nhỏ khác nhau, chiều cao của rễ từ 20 - 60 cm, chiều rộng của rễ từ 20 - 30 cm. Rễ thở mọc xung quanh gốc trong phạm vi bán kính tới 7 m.
- Lá: có 2 dạng: ở cành không mang nón, lá có hình dùi, dài 0,6 - 1,3 cm, xếp thành 2 - 3 dãy; ở cành mang nón, lá có hình vẩy, dài 0,4 cm và không rụng.
- Nón: Nón đơn tính, cùng gốc, mọc riêng lẻ ở đầu cành. Nón đực nhỏ, có dạng hình cầu hoặc hình trứng, đường kính từ 2 - 3 mm. Khi còn non, nón đực có màu xám trắng, khi già và chín có màu nâu đen, mỗi nón đực có từ 6 đến 16 vảy lá bào tử xếp xoắn ốc xung quanh nón. Nón cái lớn hơn nón đực, mọc ở những cành thấp hơn. Nón cái có dạng hình quả lê hoặc hình trứng, dài từ 12 đến 22 mm, rộng từ 10 đến 15 mm. Khi nón cái còn non có màu xanh, khi chín có màu nâu sẫm, thường có 6 - 9 vảy, các vảy xếp xít nhau, mỗi vảy mang 1 hạt.
- Hạt: mỗi nón chứa từ 7 - 8 hạt. Hạt có màu nâu sẫm, hình bầu dục hoặc elip, mỏng, dài từ 5 - 6 mm, rộng từ 2,5 - 3,5 mm. Hạt có cánh dài khoảng 3 mm.



Hình 1.1. Hình thái cây Thủy tùng (Trần Vinh, 2011 [35])

a: Thân; b: Vỏ; c: Lá trên cành không mang nón;
 d: Lá trên cành mang nón; e: Nón cái; f: Nón đực; g: Hạt; h: Rễ thở.

1.2. Nghiên cứu ngoài nước

1.2.1. Đặc điểm phân bố và thực trạng quần thể

Thủy tùng có phân bố ở Lào (cao nguyên Nakai, Khammouane), Trung Quốc (Phúc Kiến, Quảng Đông, Quảng Tây, Hải Nam, Giang Tây, Tứ Xuyên, Vân Nam) và Việt Nam (Đắk Lắk) (Averyanov và cộng sự, 2009) [38]. Ngoài ra, Thủy tùng còn được trồng sưu tập tại vườn thực vật Christchurch (Christchurch Botanic Gardens (New Zealand) và vườn thực vật của đại học California (Mỹ) Database (Conifers.org, 2016) [50], (IUCN red list) [67].

Về thực trạng quần thể

Tại Lào, Thủy tùng lần đầu tiên được phát hiện năm 1990 tại cao nguyên Nakai, tỉnh Khammouane. Năm 2007 đã phát hiện quần thể Thủy tùng tự nhiên tại khu bảo tồn quốc gia Nakai-Nam Theun, với số lượng cá thể là 563 cây. Cho đến nay, mặc dù một số cá thể bị mất do việc xây dựng hồ chứa thủy điện và khai thác gỗ trái phép, đây vẫn là quần thể Thủy tùng tự nhiên đẹp nhất trên thế giới, với những cá thể có chiều cao trên 30 m (Michelle, 2017) [79], (Gretchen, 2015) [48]. Mặc dù chưa có đánh giá mức độ bảo tồn quốc gia, Thủy tùng sẽ được đánh giá ở cấp nguy cơ tuyệt chủng (Averyanov và cộng sự, 2014) [37].

Tại Trung Quốc, Thủy tùng phân bố rải rác trong các quần thể ở độ cao dao động từ 31 - 1980 m (Fagen và cộng sự, 2005) [55], (Xingtong và cộng sự, 2019) [96]. Một số cây Thủy tùng lớn được bảo tồn trong khuôn viên của các ngôi đền, dọc theo bờ đê và xung quanh các ngôi làng trong các khu rừng Fengshui linh thiêng có giá trị về mặt văn hóa. Do nhân tố lịch sử và ảnh hưởng của hoạt động con người qua các thời đại mà số lượng cá thể dần bị suy giảm và ở vào trạng thái có nguy cơ tuyệt chủng ngoài tự nhiên. Năm 1999, chính phủ Trung Quốc công bố Thủy tùng thuộc loài phải bảo tồn cấp I (Fagen và cộng sự, 2005) [55]. Thủy tùng là loài sinh vật cổ, cấu trúc và diện tích quần xã đã bị suy giảm mạnh. Bảo vệ nơi sống là khâu quan trọng nhất đối với Thủy tùng hiện nay, nhằm tăng

cường bảo vệ tính đa dạng di truyền.

1.2.2. Đặc điểm sinh học

Đặc điểm sinh thái

Thủy tùng là loài cây ưa sáng, ưa ẩm, thường phát triển thuần loài ven sông suối. Nhiệt độ bình quân từ 15 - 22⁰C, nhiệt độ quá cao hoặc quá thấp có ảnh hưởng đến sinh trưởng của loài cây này. Lượng mưa trung bình năm từ 1.500 - 2.000 mm, lượng mưa lớn có lợi cho Thủy tùng sinh trưởng. Thủy tùng thích ứng với nhiều loại đất khác nhau như đất đá vôi, đất thịt, đất cát, pH từ 5,6 đến 8,5, đất càng sâu và độ phì cao Thủy tùng sinh trưởng càng tốt. Dưới tán cây không thấy cây con tái sinh. Cây con rất nhạy cảm với ánh sáng, cây mọc dưới bóng râm sinh trưởng yếu ớt và dễ bị bệnh. Cây con Thủy tùng chịu được nước nhưng nếu ngâm trong nước lâu ngày lá và ngọn bị héo vàng, cây sẽ bị chết. Rễ cọc kém phát triển chỉ phát triển rễ bên (Han, 1996) [57], (Fagen và cộng sự, 2005) [55], (Thomas và cộng sự, 2011) [95].

Các nghiên cứu về đặc điểm sinh học của loài Thủy tùng được tiến hành ở Trung Quốc từ những năm 1980. Kết quả đã chỉ ra rằng chế độ ngập và mức độ ngập nước là yếu tố cơ bản ảnh hưởng tới sinh trưởng và phát triển của Thủy tùng. Trong môi trường thuận lợi, Thủy tùng sinh trưởng với tốc độ nhanh và đều trong 10 năm đầu. Thủy tùng còn là loài chịu khá với nước ngập mặn, khi còn nhỏ chúng có thể chịu được độ mặn 0,28% (Xing, 1980) [100].

Trong môi trường tự nhiên, Thủy tùng thường sinh trưởng trong các quần thể thuần loài, tuy nhiên cũng có thể phân bố cùng với các loài thuộc chi *Sterculia*, *Pterocymbium*, *Litsea*, *Magnolia*, *Ficus* và *Dipterocarpus*. Trên các lập địa khô thoáng hơn, có thể xuất hiện các loài thuộc chi *Elaeocarpus* và *Syzygium* trong lâm phần (Averyanov và cộng sự, 2009) [38], Nguyễn Tiến Hiệp và cộng sự, 2004) [58]. Ở Việt Nam và Lào, Thủy tùng phân bố trong các quần thể nhỏ, rời rạc, ở các vùng đầm lầy và rừng ngập nước theo mùa (Thomas,

2019) [94], (Averyanov và cộng sự, 2009) [38].

Trong một nghiên cứu của Cindy (2019) [47] cho thấy, trong lâm phần Thủy tùng, cấu trúc phân tầng khá đơn giản, các cá thể tự nhiên có tuổi thọ trung bình từ 15 - 357 năm, trung bình 85 năm. So với quần thể Thủy tùng ở Việt Nam, thành phần thực vật có sự khác biệt, chỉ số Shannon-Wiener trung bình ở tỉnh Phúc Kiến là 0,26 cho thấy mức độ đa dạng thấp hơn so với ở Việt Nam (trung bình 1,97). Kết quả nghiên cứu cũng đã phát hiện được 18 cây Thủy tùng tái sinh tại khu vực nghiên cứu, điều này chứng tỏ khả năng tái sinh của Thủy tùng cực kỳ kém và quần thể của nó đang suy giảm, mặc dù vậy quần thể này sinh trưởng tương đối khỏe mạnh hơn so với quần thể ở Việt Nam.

Đặc điểm cấu trúc di truyền quần thể

Năm 2004, Fagen và cộng sự đã nghiên cứu cấu trúc quần thể và đa dạng di truyền của 170 cá thể từ 14 quần thể Thủy tùng tại Nam và Đông Nam, Trung Quốc bằng 10 mồi ISSR. Kết quả cho thấy mức độ đa dạng di truyền của Thủy tùng khá thấp, với: $PPB = 10,2\%$, $N_e = 1,070$ và $H_{pop} = 0,058$ ở cấp độ quần thể; $PPB = 24,7\%$, $N_e = 1,140$ và $H_{sp} = 0,122$ ở cấp độ loài. Sự khác biệt di truyền đáng kể giữa các vùng là $16,10\%$, (phân tích Amova, $P < 0,005$), giữa các quần thể trong các vùng cụ thể là $29,76\%$ ($P < 0,0002$) và giữa các cá thể trong quần thể là $54,14\%$ ($P < 0,0002$). Mức độ khác biệt di truyền cao giữa các quần thể cũng được phát hiện dựa trên phân tích đa dạng di truyền N_{ei} là $G_{ST} = 51,36\%$ và chỉ số đa dạng của Shannon là $I = 52,54\%$ (Fagen và cộng sự, 2005) [55]. Nguyên nhân dẫn đến mức độ đa dạng di truyền thấp có thể do kích thước quần thể nhỏ và môi trường sống bị thu hẹp. Mức độ đa dạng di truyền rất thấp ở cả quần thể trồng và tự nhiên so với các loài cây hạt trần khác (Wu và cộng sự, 2011) [98].

Năm 2019, Xingtong và cộng sự [96] đã nghiên cứu đa dạng di truyền quần thể của 14 quần thể Thủy tùng tại Trung Quốc, Việt Nam và Lào. Kết quả cho thấy, đa dạng di truyền trong các quần thể thấp và có sự khác biệt lớn giữa các

quần thể do có sự cách ly về mặt địa lý, do đó, mỗi khu vực nên được công nhận là một xuất xứ riêng biệt khi lập kế hoạch cho các hành động bảo tồn. Kết quả nghiên cứu cũng chỉ rõ, sự đa dạng di truyền lớn nhất là trong các quần thể Lào. Ở Việt Nam, các quần thể nhỏ và bị cô lập do hoạt động nông nghiệp hoặc đô thị hóa và hầu hết các cá thể già cỗi, không có khả năng sinh sản (Averyanov và cộng sự, 2009) [38].

1.2.3. Nhân giống và gây trồng

Các nghiên cứu nhân giống vô tính

Về nhân giống in vitro Thủy tùng

Năm 2007, Li và cộng sự [70] đã phát triển các kỹ thuật nuôi cấy *in vitro* Thủy tùng, kết quả như sau.

+ Sử dụng mẫu thí nghiệm là chồi bên của cây giống *in vitro* 100 ngày tuổi. Chồi phát sinh trong môi trường không có hormone hoặc nồng độ hormone thấp. Môi trường tạo chồi là môi trường MS chứa 0,5 mg/l Zeatin, 5,0 mg/l vitamin C và 0,3% sucrose. Sau 20 và 35 ngày, số lượng chồi trung bình có thể đạt tới 4,19 và hệ số nhân chồi 3,965. Sử dụng môi trường MS chứa 0,1 mg/l GA₃, 0,5 mg/l vitamin C và 0,3% sucrose để kéo dài chồi. Các mẫu ra rễ với tỷ lệ 58,3% trên môi trường ½MS bổ sung 0,5 mg/l α-naphthalene axit axetic (NAA), 5,0 mg/l vitamin C và 0,1% sucrose trong 2 tháng (Li và cộng sự, 2007) [70].

+ Mẫu thí nghiệm được cắt từ cây một năm tuổi trong môi trường DCR bổ sung 5,0 mg/l vitamin C và 3% sucrose và chồi bên phát sinh trong 1 tháng. Số chồi trung bình có thể đạt 2,368 và hệ số nhân chồi 1,956. Các mẫu ra rễ với tỷ lệ 26,6% (Li và cộng sự, 2007) [70].

Năm 2008, Li và cộng sự [71] đã tiếp tục nghiên cứu nhân giống *in vitro* Thủy tùng từ hạt Thủy tùng trong môi trường MS. Hạt giống nảy mầm sau 60 ngày. Khi mầm dài 6 cm, cấy chuyển vào môi trường phân hoá có bổ sung các chất kích thích như BA, GA₃ để thúc chồi thứ cấp phát triển. Khi chồi nách phát triển

cấy vào môi trường MS có bổ sung IBA, NAA để cho chồi ra rễ. Tỷ lệ cây sống khi chuyển ra vườn ươm đạt tỷ lệ 70% (Li và cộng sự, 2008) [71].

Năm 2022, Lu và cộng sự [74] đã nghiên cứu tái sinh chồi từ mô sẹo thân mầm. Thử nghiệm nảy mầm của hạt giống ở các giai đoạn phát triển khác nhau. Kết quả cho thấy, các hạt được lấy mẫu ở giai đoạn chưa trưởng thành vào tháng 10 cho thấy tỷ lệ nảy mầm cao nhất (19,2%) và tạo ra cây con khi nuôi cấy trên môi trường $\frac{1}{2}$ Duchefa Culture Research (DCR). Sau đó, cắt thân mầm của cây và cấy trên môi trường tạo mô sẹo và tạo chồi (CSIM), bao gồm môi trường cơ bản Murashige và Skoog (MS) được bổ sung 2 mg/l 6-benzyl adenine (6-BA) và 0,5 mg/l axit α -naphtalen acetic (NAA). Mô sẹo có nguồn gốc từ hypocotyl sau đó được sử dụng làm nguyên liệu ban đầu để tái sinh chồi. Kết quả cho thấy, trung bình có 2,4 chồi bất định có thể được tái sinh từ một mô sẹo có nguồn gốc từ hypocotyl. Hơn nữa, hơn 15 chồi bất định thu được từ một chồi bất định tái sinh gắn một phần mô sẹo có nguồn gốc hypocotyl, khi được cấy chuyển trên môi trường CSIM. Sau khi ra rễ và thích nghi trong 60 ngày, cây con được đưa trở lại khu vực bảo tồn, hình thành rừng Thủy tùng (Lu và cộng sự, 2023) [74].

Về nhân giống bằng giâm hom Thủy tùng

Nghiên cứu của Li và cộng sự, 2007 [70] về kỹ thuật nhân giống bằng phương pháp giâm hom Thủy tùng, kiểm tra nhiều yếu tố khác nhau bao gồm: tuổi của cây mẹ, vị trí cắt hom và giá thể. Phương pháp bố trí thí nghiệm gồm các loại hormone, nồng độ và thời gian xử lý. Hom Thủy tùng được cắt từ phần đỉnh sinh trưởng của cây từ hạt 1 hoặc 2 năm tuổi, ngâm hom trong dung dịch IBA 2000 ppm trong 30 giây hoặc trong dung dịch NAA 100 ppm trong 2 giờ trước khi đưa vào môi trường đá perlite : than bùn = 3 : 7 thì tỷ lệ ra rễ của hom ở các nghiệm thức trên có thể đạt 85% (Li và cộng sự, 2007) [70].

Năm 2008, nhóm nghiên cứu của Li và cộng sự [71] đã tiếp tục tiến hành các

thí nghiệm giâm hom Thủy tùng để đánh giá ảnh hưởng của nồng độ chất điều hòa sinh trưởng thực vật, chế độ chăm sóc (tưới nước), thành phần giá thể và thời gian cắt hom đến sự ra rễ của hom. Kết quả cho thấy hom Thủy tùng có thể ra rễ với tỷ lệ 39% khi sử dụng thuốc ABT 150 ppm trong giá thể 70% đất và 30% than bùn. Kết quả cũng chỉ ra rằng thời gian cắt hom tốt nhất trong năm là mùa xuân (Li và cộng sự, 2008) [71].

Các nghiên cứu nhân giống hữu tính

Từ năm 2014, các nhà khoa học Trung Quốc đã thu thập hạt giống Thủy tùng từ nhiều quần thể tự nhiên, thử nghiệm và xây dựng hướng dẫn kỹ thuật nhân giống Thủy tùng bằng hạt. Hạt Thủy tùng được thu hái, phơi trong nắng nhẹ, xử lý hạt bằng cách ngâm trong thuốc tím 0,5% trong 20 phút rồi rửa sạch; sau đó được gieo trên luống đất pha cát đã được xử lý bằng hóa chất bromogeramine 0,1%. Sau ba tuần, hạt sẽ nảy mầm. Sau hai đến ba tháng, cây giống Thủy tùng sẽ phát triển đạt chiều cao 15 cm, được bứng và cấy chuyển vào túi bầu có kích thước 20 cm x 30 cm với thành phần ruột bầu là than bùn, cát và đất mặt vườn ươm. Cây con được đem trồng rừng khi đã 3 năm tuổi sẽ có tỷ lệ sống cao [88].

Tại Lào, từ năm 2017 các nhà khoa học đã tiến hành nhân giống Thủy tùng bằng hạt, tuy nhiên kết quả chưa được công bố. Theo thông tin cá nhân từ Philip Thomas và Lê Cảnh Nam (2021) thì tỷ lệ hạt chắc và có khả năng nảy mầm rất thấp. Nguyên nhân ban đầu được đánh giá có thể là do quần thể cây mẹ còn trẻ (7 năm tuổi). Hiện nay tại Lào đã xây dựng vườn ươm. Năm 2007, Gretchen đã thu hái khoảng 100.000 hạt nhưng chỉ thu được khoảng hơn 1.000 cây con (Michelle, 2017) [79], (Gretchen, 2015) [48].

Các nghiên cứu gây trồng

Ở Đông Nam Trung Quốc, Thủy tùng được trồng rộng rãi xung quanh các cánh đồng lúa và sông suối để ổn định dòng chảy và đôi khi để lấy gỗ. Ngoài ra, Thủy tùng cũng có ý nghĩa văn hóa, thường được trồng xung quanh các ngôi

làng và đền thờ và làm quà tặng cho những người xây nhà mới (Thomas, 2019 [94]; Paula và cộng sự, 2022 [83]). Do được trồng rộng rãi nên phân bố tự nhiên của loài này rất khó xác định (Wu và cộng sự, 2020) [97].

Thời gian qua, nhiều địa phương của Trung Quốc (Phúc Kiến, Hồ Nam, Quảng Đông, Quảng Tây, Giang Tây) đã dẫn giống để gây trồng hơn 200.000 cá thể trưởng thành, tuy nhiên do chưa chú ý đến điều kiện môi trường sống nên Thủy tùng sinh trưởng kém (IUCN red list) [67]. Để gây trồng có hiệu quả trước hết phải chọn môi trường trồng thích hợp, dẫn giống từ nhiều vùng khác nhau để tăng tính đa dạng di truyền, đồng thời có thể cho thụ phấn chéo để có được thế hệ cây con hữu thụ, khỏe mạnh (Xueying và cộng sự, 2006) [101]. Ngoài ra, còn phải làm tốt công tác tuyên truyền, giáo dục, ngăn chặn sự chặt phá bừa bãi để góp phần bảo tồn thành công loài Thủy tùng tại Trung Quốc (IUCN red list) [67].

Shengping và cộng sự (2003) [87] đã đánh giá về sinh trưởng của Thủy tùng trồng năm 1965 tại Hồ Bắc (xuất xứ Vũ Hán) cho thấy Thủy tùng chống chịu tốt với sâu bệnh, sinh trưởng khá tốt. Sau 34 năm trồng, chiều cao vút ngọn (H_{vn}) trung bình đạt 14,6 m (tương đương 0,43 m/năm) và đường kính ngang ngực trung bình ($D_{1.3}$) đạt 21,9 cm (tương đương 0,64 cm/năm).

1.3. Nghiên cứu trong nước

1.3.1. Đặc điểm phân bố và thực trạng quần thể

Thủy tùng được phát hiện lần đầu tiên ở Việt Nam vào năm 1955 ở buôn Mĩl, xã Ea Hồ, tỉnh Đắk Lắk (Nguyễn Hoàng Nghĩa, 1997) [23]. Dựa vào hóa thạch của loài cây này đã được tìm thấy ở Ninh Bình, Lai Châu và Đắk Lắk cho thấy, trước đây Thủy tùng đã có phân bố khá rộng, khắp từ Bắc đến Nam ((Vũ Văn Cần và cộng sự, 1985) - dẫn theo Nguyễn Hoàng Nghĩa, 1997) [23]. Năm 1992, Nguyễn Ngọc Lung và cộng sự [19] đã điều tra phân bố, sinh thái và tái sinh loài Thủy tùng tại Đắk Lắk, qua đó ghi nhận Thủy tùng tập trung ở 2 điểm

chính là Trấp KSơ, huyện Krông Năng (nay là xã Krông Năng) và tại đập Ea Ral huyện Ea H' Leo (nay là xã Ea Drăng), các cá thể có tình trạng sinh trưởng kém. Báo cáo cũng đề cập đến đặc điểm sinh thái, lâm học của loài, đã xác định thành phần các loài cây tham gia tổ thành rừng với loài Thủy tùng. Năm 2004, Nguyễn Đức Tố Lưu và cộng sự [20] khi nghiên cứu về Thông Việt Nam cho rằng Thủy tùng chỉ được biết có phân bố tự nhiên ở Đắk Lắk. Trong một nghiên cứu khác, Averyanov và cộng sự (2009) [38] bước đầu đã khảo sát sự phân bố của loài Thủy tùng ở Việt Nam và cho biết tại Trấp Ksor (nay là xã Krông Năng) có 34 cá thể và tại Ea Ral (nay là xã Ea Drăng) đã ghi nhận 75 cá thể.

Như vậy, các nghiên cứu về phân bố của các tác giả trong nước về Thủy tùng cho thấy loài này chỉ còn lại một số lượng nhỏ cá thể phân bố rải rác ở Đắk Lắk.

Theo Nghị định số 84/2021/NĐ-CP ngày 22 tháng 9 năm 2021 của Chính phủ về quản lý thực vật rừng, động vật rừng nguy cấp, quý, hiếm và thực thi công ước về buôn bán quốc tế các loài động vật, thực vật hoang dã nguy cấp, Thủy tùng thuộc nhóm IA, là loài cấm khai thác tại Việt Nam. Đây cũng là loại gỗ có giá trị kinh tế rất cao, thường được dùng trong chế tác đồ mỹ nghệ và nội thất cao cấp.

Gỗ Thủy tùng có giá trị kinh tế cao là nhờ các đặc điểm như không mối mọt, không cong vênh, có vân thớ, màu sắc đẹp và độ bền cao. Đặc biệt, gỗ có mùi thơm nhẹ, phù hợp với nhiều người. Mùi hương gỗ Thủy tùng dễ chịu, giúp thư giãn, thoải mái. Càng dùng nhiều năm độ mịn và bóng của gỗ càng cao. Mặt khác, gỗ Thủy tùng được nhiều người ưu chuộng bởi yếu tố tâm linh, tín ngưỡng. Nhiều người quan niệm rằng gỗ Thủy tùng có thể đem lại may mắn, tài lộc, thịnh vượng cho gia chủ khi sử dụng các sản phẩm như tượng phật, vòng trang sức.

Trên thị trường, gỗ Thủy tùng được chia thành 2 loại gồm gỗ Thủy tùng xanh và gỗ Thủy tùng đỏ. Gỗ Thủy tùng xanh: do Thủy tùng ngâm sâu dưới lớp bùn đất, vùng đầm lầy nước đọng trong nhiều năm giúp tạo ra những đường vân

đậm sắc nét, màu xanh thẫm tự nhiên như thạch bích, loại gỗ này rất hiếm và có giá rất cao. Gỗ Thủy tùng đỏ: do sống trong môi trường khô ráo, gỗ Thủy tùng đỏ có màu đỏ hoặc nâu sẫm, vân gỗ thường nhỏ, thỉnh thoảng điểm những đốm sẫm trên thân của khối gỗ, loại này thường có giá thấp hơn. Theo khảo sát giá trên thị trường hiện nay, 1m³ gỗ Thủy tùng đường kính 80 cm có giá từ 250 – 300 triệu đồng.

Về cảnh quan và môi trường

Bên cạnh nguy cơ tuyệt chủng của loài, gỗ có giá trị kinh tế cao, cây Thủy tùng còn có dáng đẹp, do đó thường được trồng làm cảnh trong các công trình kiến trúc, công viên, khu đô thị, sân vườn. Ngoài ra, Thủy tùng còn được trồng xung quanh bờ ao, mái taluy để bảo vệ đất, chống xói mòn và sạt lở đất (Bảo Huy, 2010) [14].

Về công tác bảo tồn loài Thủy tùng

Tại xã Ea Drăng: Trạm Quản lý bảo vệ Thủy tùng được xây dựng vào khoảng 1994 do hạt kiểm lâm huyện Ea H'leo (nay thuộc xã Ea Drăng) quản lý. Ngày 05/05/1994, UBND tỉnh Đắk Lắk đã phê duyệt Quyết định số 157/QĐ-UB về việc thành lập khu bảo vệ quần thể Thông nước (*Glyptostrobus pensilis*) với diện tích 50 ha. Khu vực bảo vệ được khoanh bằng hàng rào kẽm gai, tuy nhiên các vụ khai thác trái phép như cắt gỗ, săn bắt động vật rừng, đào bới rễ, gốc cây cũ vẫn diễn ra, trong năm 2009 là 22 vụ (Bảo Huy, 2010) [14] .

Tại xã Krông Năng: Ngày 24/03/1987 UBND tỉnh Đắk Lắk ban hành Quyết định về việc khoanh cấm khu rừng Trấp KSơ thuộc huyện Krông Năng (nay thuộc xã Krông Năng) là khu rừng bảo vệ nguồn gen cây thông nước với diện tích 96,81ha. Ngày 20/05/1987 Chi cục kiểm lâm tỉnh Đắk Lắk ban hành Quy chế quản lý rừng cấm Trấp KSơ, trong đó quy định chức năng nhiệm vụ của Trạm quản lý bảo vệ rừng thuộc Hạt kiểm lâm huyện Krông Năng (nay thuộc xã Krông Năng). Tuy nhiên, tại khu vực này vẫn thường xảy ra cháy rừng vào

mùa khô do người dân đốt rẫy ở vùng lân cận, hay bơm nước tưới cà phê dẫn đến khô hạn hoặc vào rừng bắt ong. Bên cạnh đó, tình trạng người dân vào khu vực đào bới gốc Thủy tùng vẫn còn phổ biến (Bảo Huy, 2010) [14].

Trước yêu cầu về thực trạng nguy cấp của quần thể Thủy tùng tại Việt Nam, ngày 24/3/2011 Ủy ban nhân dân tỉnh Đắk Lắk đã ban hành Quyết định số 760/QĐ-UBND về việc Thành lập Ban quản lý Khu bảo tồn loài - sinh cảnh Thông nước. Với số lượng cây Thủy tùng tự nhiên là 162 cây.

1.3.2. Đặc điểm sinh học

Thủy tùng đã được nhiều tác giả mô tả như Phạm Hoàng Hộ, 1999 [12]; Trần Hợp 2002 [13]; Nguyễn Đức Tố Lưu, 2004 [20]; Nguyễn Hoàng Nghĩa (2004, 2006) [24,25], Sách đỏ Việt Nam (2007) [34] đều cho thấy đây là cây gỗ lớn, rụng lá, có tán hình nón hẹp, mọc ưu thế trong một số rừng đầm lầy rậm nhiệt đới, đọng nước thường xuyên.

Vùng phân bố Thủy tùng có tầng thảm mục dày (nhỏ nhất là 50cm), điều này liên quan đến lựa chọn địa điểm nhân giống, trồng; hàm lượng acid formic trong đất ngập nước Thủy tùng cao; nghiên cứu về mối quan hệ sinh thái loài có nhận định trước đây Thủy tùng là quần thể thuần loài (phát hiện 50 gốc Thủy tùng/1.000m²) (Bảo Huy và cộng sự, 2010) [14].

Năm 2002, Nguyễn Huy Sơn và cộng sự [28] đã thực hiện dự án "Điều tra đánh giá điều kiện lập địa, đặc điểm lâm học và tái sinh loài Thủy tùng ở Việt Nam" do quỹ nghiên cứu International Foundation for Science (IFS) của Thụy Điển tài trợ. Dự án kết luận rằng do tác động của con người, môi trường sống của Thủy tùng đã bị biến động mạnh, quần thể Thủy tùng suy giảm nhanh chóng cả về số lượng và chất lượng. Số cây mang nón khá ít và phân bố rải rác. Mỗi nón có từ 7 đến 12 hạt nhưng hầu hết là bất thụ, hạt không có phôi và không có khả năng nảy mầm. Quá trình tái sinh tự nhiên bằng hạt hầu như không xuất hiện trong suốt thời gian dài đã qua và có thể cả trong tương lai.

Trần Vinh (2011) [35] trong Luận án tiến sỹ “Nghiên cứu một số đặc điểm sinh học, sinh thái và nhân giống làm cơ sở bảo tồn loài Thủy tùng (*Glyptostrobus pensilis* (Staunt.) K.Koch) tại Việt Nam” đã mô tả khá đầy đủ các đặc điểm hình thái, phân bố và sinh cảnh loài Thủy tùng tại Việt Nam. Bên cạnh đó, bằng việc kết hợp giữa việc thu thập số liệu theo dõi tại hiện trường và giải phẫu, phân tích trong phòng thí nghiệm, tác giả đã chỉ ra nguyên nhân chính dẫn đến tình trạng hạt bất thụ, không có tái sinh tự nhiên bằng hạt của Thủy tùng tại các khu phân bố chính là do phần lớn nón đực có hạt phấn bị hư nên không có khả năng thụ phấn cho noãn của nón cái.

Về đa dạng di truyền

Năm 2010, Vũ Đình Duy và cộng sự [7] đã phân tích đa dạng và quan hệ di truyền của 40 mẫu lá hoặc vỏ thân từ 40 cây Thủy tùng thuộc 2 quần thể ở huyện Krông Năng và huyện Ea H’leo (nay là xã Krông Năng và xã Ea Drăng), tỉnh Đắk Lắk sử dụng 10 môi ISSR để đánh giá mức độ đa hình và mối quan hệ di truyền giữa các cá thể. Kết quả cho thấy: Tổng số 21 allele đã được xác định, với số allele trung bình cho mỗi locus là 2,1. Giá trị PIC (Polymorphic Information Content) dao động từ 0,008 đến 0,229, trung bình 0,122. Tỷ lệ phần trăm locus đa hình chiếm 80%. Kết quả phân tích UPGMA chỉ ra rằng có 3 nhóm phân biệt nhau, trong đó quần thể ở Ea H’Leo (nay là Ea Drăng) có 2 nhóm và 1 nhóm thuộc Krông năng. Trong quần thể ở Ea H’leo (nay là Ea Drăng), có một nhóm gồm 3 cá thể có mối quan hệ rất gần gũi với hệ số tương đồng di truyền > 90%.

Nghiên cứu về đa dạng di truyền của quần thể Thủy tùng ở Đắk Lắk cho thấy mức độ đa dạng di truyền thấp và có sự trao đổi thông tin di truyền giữa hai quần thể Thủy tùng tại huyện Krông Năng và huyện Ea H’leo (nay là xã Krông Năng và xã Ea Drăng). Cần tiếp tục nghiên cứu đa dạng di truyền của loài Thủy tùng ở Việt Nam và Trung Quốc làm cơ sở để nghiên cứu di thực Thủy tùng từ

Trung Quốc về (Bảo Huy và cộng sự, 2010) [14].

Theo kết quả phân đánh giá tính đa dạng di truyền của loài Thủy tùng của Trần Vinh (2011) [35] bằng 9 mồi RAPD cho 31 mẫu Thủy tùng cho thấy trong 49 loại phân đoạn ADN được nhân bản, có 12 loại phân đoạn đa hình, chiếm 24,5%. Kết quả nghiên cứu cho thấy tỷ lệ phần trăm đa hình giữa 31 cá thể Thủy tùng là rất thấp. Kết quả phân tích mối quan hệ di truyền giữa các mẫu Thủy tùng cũng cho thấy, hệ số tương đồng di truyền từng cặp mẫu nằm trong khoảng từ 0,84 - 1,00, có nghĩa sự khác biệt về di truyền giữa các cá thể nằm trong khoảng từ 0,0 - 0,16. Điều này cho thấy 31 cá thể Thủy tùng tại xã Ea Hồ, huyện Krông Năng (nay là xã Krông Năng), xã Ea Ral, huyện Ea H'leo (nay là xã Ea Drăng) có mức độ đa dạng di truyền rất thấp.

1.3.3. Nhân giống và gây trồng

Về nhân giống in vitro Thủy tùng

Ngay từ năm 2007, đã được nhóm tác giả thuộc Khoa Nông Lâm trường đại học Đà Lạt thực hiện nhân giống Thủy tùng bằng nuôi cấy *in vitro*. Kết quả nghiên cứu cho thấy mẫu được lấy từ chồi ngọn và đốt thân cây Thủy tùng tự nhiên, xử lý bằng Javel 2% trong 30 phút cho kết quả tốt với tỷ lệ không nhiễm 70%. Môi trường WPM bổ sung 0,5 mg/IBA là công thức phù hợp cho việc nhân nhanh chồi cây Thủy tùng. Môi trường nuôi cấy có 30 g/l đường và 8 g/l agar là môi trường phù hợp cho sự phát triển chồi Thủy tùng nuôi cấy *in vitro*. Môi trường WPM bổ sung 0,5 mg/l IBA sau 8 tuần nuôi cấy chỉ ra callus, nhưng chưa hình thành được cây con (Nguyễn Thành Sum và cộng sự, 2007) [30].

Nguyễn Đức Thành và cộng sự (2012) [31] đã thành công trong việc tạo và nhân cây Thủy tùng hoàn chỉnh trong điều kiện *in vitro* và đưa ra môi trường đất. Môi trường WPM với 0,5 mg/l BA; 0,2 mg/l NAA; 0,2 g/l myo – inositol; 20 g/l đường sucrose; 2 g/l than hoạt tính và 8 g/l thạch là môi trường phù hợp

cho nhân chồi. Sử dụng môi trường WPM với IBA và NAA (≤ 2 mg/l) có tỷ lệ ra rễ từ 1,28% đến 2,04%. Tiền xử lý chồi với hàm lượng IBA 4 mg/l đã tăng tỷ lệ ra rễ, nhưng cũng chỉ đạt 5,55%.

Theo Trần Vinh (2011) [35], khử trùng mẫu Thủy tùng bằng axit benzoic 0,3% trong 120 phút và HgCl_2 0,1% trong 10 phút cho tỉ lệ mẫu sạch 52,9% và tỉ lệ mẫu bật chồi mới 44,1% cao hơn so với các công thức khác. Đã xác định được công thức môi trường thích hợp cho việc tạo đa chồi và nhân chồi Thủy tùng là: MS* bổ sung 1,0 mg/l BAP + 0,5 mg/l IBA + 30 g/l đường saccarose + 8 g/l agar cho tỉ lệ mẫu tạo đa chồi $> 90\%$, số chồi trung bình/mẫu 2,5 và chiều cao chồi 2,5 cm sau 8 tuần nuôi cấy. Vật liệu thích hợp cho giai đoạn nhân nhanh chồi Thủy tùng *in vitro* là đoạn thân hoặc đoạn gốc chồi với kích thước mẫu cây 0,5 cm. Chồi Thủy tùng đã cảm ứng tạo rễ 23,5% trên môi trường khoáng 1/2MS bổ sung 30 g/l đường + 8g/l agar sau 2 tháng nuôi với 4 lần cấy chuyển, tuy nhiên các chồi này vẫn chưa ra rễ.

Về nhân giống bằng giâm hom Thủy tùng

Năm 1998, Viện KHKT Nông Lâm nghiệp Tây Nguyên đã tiến hành thí nghiệm giâm hom Thủy tùng. Thí nghiệm được bố trí trên nền cát và xử lý bằng hai loại hóa chất kích thích ra rễ là IBA và NAA, tổng số 216 hom. Sau 4 tháng thí nghiệm cho thấy tỷ lệ hom ra rễ trung bình là 17,1%, có công thức trên 20%, công thức đối chứng không ra rễ. Năm 2004 Trung tâm Nghiên cứu thực nghiệm Lâm sinh Lâm Đồng thuộc Viện Khoa học Lâm nghiệp Việt Nam đã giâm 3,500 hom Thủy tùng, tuy nhiên tỷ lệ ra rễ rất thấp, chỉ có 7 hom ra rễ và tạo thành cây (dẫn theo Trần Vinh, 2011) [35].

Năm 2011, Trần Vinh [35] đã tiến hành các nghiên cứu: Ảnh hưởng của chất điều hoà sinh trưởng IBA và NAA đến sự ra rễ của hom ở các nồng độ 1000 ppm đến 4000 ppm; Ảnh hưởng của loại hom và cây cá thể đến khả năng ra rễ của hom Thủy tùng với 3 loại hom: Hom ngọn, Hom giữa và Hom gốc;

Ảnh hưởng của giá thể đến khả năng ra rễ của hom Thủy tùng với các công thức thí nghiệm: 10% tro trấu + 90% cát mịn; 20% tro trấu + 80% cát mịn; 30% tro trấu + 70% cát mịn; 40% tro trấu + 60% cát mịn và 100% cát mịn cho thấy: Giâm hom Thủy tùng với việc xử lý bằng dung dịch IBA 3000 ppm, sử dụng hom ngọn, giâm trong môi trường 30% tro trấu + 70% cát mịn có tỷ lệ sống đạt trên 33% và tỷ lệ ra rễ đạt 20% sau 9 tháng xử lý, cao hơn so với các công thức khác. Môi trường 20% tro trấu + 80% cát mịn có chiều dài rễ cọc và số rễ cấp 1 cao nhất.

Năm 2016, Ngô Văn Cẩm và cộng sự [4] đã nghiên cứu nhân giống bằng hom Thủy tùng với dung dịch IBA 1.000 ppm cho tỷ lệ ra rễ cao nhất (66,7%) và hom nửa hóa gỗ cho tỷ lệ ra rễ 51% sau 100 ngày, với loại hom hóa gỗ từ gốc cây mẹ ngã đổ [5]. Và cũng theo tác giả này, mùa vụ giâm hom Thủy tùng tốt nhất là mùa khô ở Tây Nguyên.

Nhân giống bằng phương pháp ghép

Ghép trên gốc Bụt mọc: Cũng theo Trần Vinh (2011) [35], ghép chồi Thủy tùng trên gốc ghép Bụt mọc cho tỷ lệ ghép thành công là 66,1%. Kết quả nghiên cứu này đã tạo ra hơn 1.000 cây ghép, số cây này đã được đem trồng tại các trạm bảo vệ Thủy tùng và một số nơi khác có điều kiện sinh thái tương đồng để đánh giá về sinh trưởng, phát triển.

Năm 2018 – 2019, Trần Đức Trọng [33], cán bộ kỹ thuật của Ban quản lý khu bảo tồn loài và sinh cảnh Thông nước phối hợp với nhóm nghiên cứu của Viện Khoa học Lâm nghiệp Nam Trung Bộ và Tây Nguyên đã thử nghiệm ghép Thủy tùng trên rễ thở của cây mẹ, với 25 rễ thở được ghép áp mắt và 15 rễ thở được ghép nêm cành ở Trấp Ksor (nay là xã Krông Năng) và 40 rễ thở ở Ea Ral (nay là xã Ea Drăng) cho mỗi phương pháp ghép. Thời gian theo dõi là 12 tháng. Kết quả cho thấy phương pháp ghép áp mắt trên rễ thở là khả thi để bảo tồn *in situ* và phục hồi các quần thể Thủy tùng, cây con có tỷ lệ sống cao (82%).

Về trồng thử nghiệm Thủy tùng

Từ năm 2013, nhóm nghiên cứu của Viện KHLN Nam Trung bộ và Tây Nguyên đã thành công trong việc nhân giống Thủy tùng bằng giâm hom, đã tạo ra được hơn 200 cây con Thủy tùng trong vườn ươm (năm 2016) sau đó đem trồng thử nghiệm tại 3 địa điểm (khu bảo tồn Thủy tùng tại xã Ea Ral, huyện Ea H'Leo (nay là xã Ea Drăng) và tại Tráp K'sơ, huyện Krông Năng (nay là xã Krông Năng) tỉnh Đắk Lắk; Trạm thực nghiệm Kon Hà Nừng, huyện KBang (nay là xã Kbang), tỉnh Gia Lai. Tuy nhiên, tỷ lệ sống trung bình chỉ còn 70,3% sau 1 năm, trong đó tỷ lệ sống đạt cao nhất là tại xã Ea Ral (nay là xã Krông Năng) (81,9%) và thấp nhất là tại Tráp K'sơ (nay là xã Ea Drăng) (58,3%). Bước đầu xác định nguyên nhân gây chết đối với cây Thủy tùng có thể chủ yếu là do thiếu nước vào mùa khô. Kết quả thử nghiệm trồng bảo tồn chưa thể khẳng định do thời gian theo dõi còn ngắn, tuy nhiên cũng đã có những kết quả bước đầu cho thấy khả năng thích nghi của cây con khi được trồng ra môi trường tự nhiên.

Năm 2016, Trần Vinh và cộng sự [36] tiếp tục công bố kết quả trồng thử nghiệm cây Thủy tùng ghép trên gốc Bụt mọc tại một số vùng khác nhau của tỉnh Đắk Lắk và tại hai địa điểm có phân bố tự nhiên chính. Kết quả cho thấy cây Thủy tùng ghép trên gốc Bụt mọc có khả năng thích nghi tốt khi trồng ra ngoài thực địa ở điều kiện trên cạn. Tỷ lệ sống bình quân sau 2 năm trồng đạt 57%. Sau 28 tháng, đường kính gốc trung bình đạt 3,5 - 4,6 cm; chiều cao cây đạt 1,2-1,8 m. Ngoài ra, Thủy tùng có thể sinh trưởng tốt ở ngoài khu vực phân bố tự nhiên (Lắk, Buôn Ma Thuột, ...), cây ưa sáng, không thích hợp với điều kiện bị che bóng.

1.4. Nhận định về kết quả và định hướng nghiên cứu phục vụ bảo tồn

Có thể thấy các nghiên cứu về đặc điểm sinh học, nhân giống và kỹ thuật gây trồng Thủy tùng đã được nhiều tác giả trong và ngoài nước nghiên cứu trong thời gian vừa qua. Tuy nhiên bảo tồn là một quá trình thường xuyên liên tục,

do đó để tiếp tục hoàn thiện các cơ sở khoa học cho việc bảo tồn và phát triển nguồn gen loài Thủy tùng ở nước ta, trong thời gian tới cần tiếp tục thực hiện một số nghiên cứu bổ sung bao gồm:

- *Điều tra đánh giá thực trạng quần thể*: Từ năm 2011 với sự thành lập Ban quản lý Khu bảo tồn loài - sinh cảnh Thông nước cùng với một số hoạt động nghiên cứu thì công tác bảo tồn nguồn gen loài cây này đã đạt được nhiều kết quả. Tuy nhiên từ sau năm 2011, sự biến động của quần thể chưa được đánh giá lại nhằm cung cấp thông tin chi tiết về tình hình sinh trưởng, phát triển của các cá thể, từ đó đề ra chiến lược bảo tồn loài thì điều tra đánh giá thực trạng quần thể là rất cần thiết.

- *Đánh giá đa dạng di truyền của quần thể*: Cho đến nay, các nghiên cứu mới chỉ tiến hành phân tích đa dạng di truyền với một số lượng cá thể hạn chế nên chưa phản ánh hết mức độ đa dạng di truyền của loài. Để có thể xây dựng chiến lược bảo tồn loài cây này một cách hữu hiệu, cần thiết phải phân tích cấu trúc di truyền của toàn bộ quần thể Thủy tùng, đồng thời xác định mức độ quan hệ di truyền giữa các cá thể để có thể xây dựng các quần thể bảo tồn có tính đa dạng di truyền cao.

- *Nghiên cứu nhân giống vô tính*:

+ Nghiên cứu nhân giống *in vitro* Thủy tùng: Mặc dù ở Việt Nam, các nghiên cứu nhân giống Thủy tùng bằng phương pháp *in vitro* đã được tiến hành từ năm 2007, tuy nhiên cho đến nay các kết quả nghiên cứu là chưa hiệu quả, với tỷ lệ ra rễ thấp, chỉ đạt 5,55%. Do vậy, tiếp tục nghiên cứu nhân giống *in vitro*, đặc biệt xác định được ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng lên khả năng hình thành rễ cây Thủy Tùng là cần thiết, nhằm tạo ra nguồn giống số lượng lớn phục vụ công tác bảo tồn và phát triển loài cây này.

+ Nghiên cứu nhân giống bằng hom Thủy tùng: Các kết quả nghiên cứu giâm hom trước đây hầu hết cho tỷ lệ ra rễ thấp, thời gian giâm hom kéo dài (9 tháng)

[35], hoặc sử dụng loại hom trẻ hóa từ gốc cây mẹ ngã đổ [5], là rất khó để áp dụng bởi số lượng hom này không nhiều. Bên cạnh đó, các nghiên cứu nhân giống bằng hom chưa quan tâm đến thời gian xử lý hom, kích thước hom và giâm hom vào mùa mưa cho tỷ lệ ra rễ thấp. Hơn thế nữa hiện nay, ngoài việc sử dụng các chất điều hòa sinh trưởng đơn lẻ, hỗn hợp các chất điều hòa sinh trưởng thực vật cũng được áp dụng khá phổ biến. Năm 2018, Yusnita và cộng sự đã nghiên cứu nhân giống bằng hom cây Mận đỏ (*Syzygium malaccense* (L.) Merr. & Perry) [106], kết quả cho thấy hỗn hợp IBA 1.000 ppm + NAA 1.000 ppm làm tăng cường tỷ lệ ra rễ, chiều dài rễ cao hơn, hình thái rễ tốt hơn và giúp rút ngắn thời gian hình thành rễ so với sử dụng IBA hoặc NAA. Seif và cộng sự (2022) [86] cũng đã tìm ra hỗn hợp IBA 4.000 ppm + NAA 1.000 ppm là tốt nhất để giồng bằng hom cây Sung mỹ (*Ficus Carica* L.), với chiều dài rễ và chất lượng rễ tốt hơn khi xử lý hom bằng IBA hoặc NAA. Dựa trên cơ sở đó, nghiên cứu hỗn hợp chất điều hòa sinh trưởng thực vật trong giâm hom Thủy tùng nhằm nâng cao hiệu quả nhân giống là có thể áp dụng.

+ Các nghiên cứu giai đoạn trước đã bước đầu cho thấy phương pháp ghép trên rễ thở cây mẹ tự nhiên là hướng đi có triển vọng. Tuy nhiên nghiên cứu mới chỉ tiến hành ở quy mô nhỏ với thời gian theo dõi ngắn. Vì vậy, việc nghiên cứu hoàn thiện kỹ thuật ghép trên rễ thở cây mẹ tự nhiên là cần thiết để bảo tồn *in situ*.

- *Nghiên cứu bổ sung kỹ thuật trồng và chăm sóc cây Thủy tùng*: Bên cạnh công tác bảo tồn *in situ* thì công tác bảo tồn *ex situ* cũng có vai trò rất quan trọng. Ở Việt Nam, mới chỉ có một số kết quả trồng thử nghiệm cây Thủy tùng ghép trên gốc Bụt mọc tại Đắc Lắc. Để thực hiện thành công việc bảo tồn *ex situ* cũng như phát triển loài cây này thì việc nghiên cứu bổ sung kỹ thuật gây trồng và chăm sóc cây Thủy tùng là rất cần thiết.

Chương 2

NỘI DUNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nội dung nghiên cứu

2.1.1. Nghiên cứu thực trạng quần thể Thủy tùng

- Đánh giá thực trạng quần thể Thủy tùng tự nhiên.
- Đánh giá thực trạng gây trồng Thủy tùng tại Tây Nguyên.

2.1.2. Đánh giá đa dạng di truyền của Thủy tùng tự nhiên bằng kỹ thuật phân tử ISSR

- Giám định loài Thủy tùng bằng DNA barcode.
- Phân tích mối quan hệ di truyền và cấu trúc di truyền của 2 quần thể Thủy tùng duy nhất còn lại ở Việt Nam.
- Phân tích mức độ sai khác, mối quan hệ di truyền giữa các cá thể được nghiên cứu.

2.1.3. Nghiên cứu bổ sung kỹ thuật nhân giống Thủy tùng

- Nghiên cứu kỹ thuật nhân giống Thủy tùng bằng nuôi cấy *in vitro*.
- Nghiên cứu bổ sung kỹ thuật nhân giống Thủy tùng bằng giâm hom.
- Nghiên cứu kỹ thuật nhân giống Thủy tùng bằng ghép trên rễ thở.

2.1.4. Nghiên cứu kỹ thuật trồng và chăm sóc cây Thủy tùng

- Nghiên cứu ảnh hưởng của độ tàn che đến sinh trưởng của cây trồng Thủy tùng.
- Nghiên cứu kỹ thuật bón phân cho cây trồng Thủy tùng.

2.1.5. Đề xuất một số biện pháp bảo tồn và phát triển nguồn gen Thủy tùng tại Tây Nguyên

2.2. Vật liệu nghiên cứu

2.2.1. Vật liệu nghiên cứu thực trạng quần thể Thủy tùng

Đối tượng nghiên cứu là 2 quần thể Thủy tùng tự nhiên tại xã Ea Drăng và xã Krông Năng, tỉnh Đắk Lắk và toàn bộ cây Thủy tùng trồng phân tán tại các tỉnh: Gia Lai, Đắk Lắk và Lâm Đồng.

Đánh giá tình hình sâu đục thân gây hại trên Thủy tùng: Vật liệu nghiên cứu

là toàn bộ cây Thủy tùng đã được ghép trên gốc Bụt mọc, cây trồng từ hom năm 2014 và cây ghép trên rễ thở năm 2022 tại xã Ea Drăng và xã Krông Năng, tỉnh Đắk Lắk.

2.2.2. Vật liệu nghiên cứu đánh giá đa dạng di truyền quần thể Thủy tùng

Vật liệu nghiên cứu là mẫu lá non và lá bánh tẻ của 163 cây Thủy tùng, trong đó bao gồm toàn bộ 159 cây tự nhiên và 4 cây ghép trên gốc Bụt mọc trồng năm 2014 tại 2 địa điểm Ea Drăng (141 cây tự nhiên và 3 cây ghép trên gốc Bụt mọc) và Krông Năng (18 cây tự nhiên và 1 cây ghép trên gốc Bụt mọc) tại tỉnh Đắk Lắk.

2.2.3. Vật liệu nghiên cứu bổ sung kỹ thuật nhân giống Thủy tùng

Vật liệu nghiên cứu kỹ thuật nhân giống Thủy tùng bằng nuôi cấy *in vitro* và giâm hom là các đoạn chồi non được trẻ hóa từ 2 cây mẹ tự nhiên tại Ea Drăng, Đắk Lắk.

Vật liệu nghiên cứu kỹ thuật nhân giống Thủy tùng bằng ghép trên rễ thở: Vật liệu ghép là cành và mắt ghép từ 4 cây mẹ tại xã Ea Drăng, tỉnh Đắk Lắk. Rễ thở để ghép là toàn bộ rễ thở Thủy tùng đạt tiêu chuẩn ghép trên vùng phân bố của quần thể. Rễ thở để ghép có hình thái sinh trưởng tốt: Không có dấu hiệu tổn thương ở vỏ, không lồi lõm và sâu bệnh hại và cao hơn mực nước khu vực.

2.2.4. Vật liệu nghiên cứu kỹ thuật trồng và chăm sóc cây Thủy tùng

Đối với nội dung đánh giá một số mô hình trồng Thủy tùng trồng tập trung tại Tây Nguyên và ảnh hưởng của phân bón tới sinh trưởng của cây Thủy tùng, vật liệu nghiên cứu là cây ghép trên gốc ghép cây Bụt mọc (*Taxodium distichum* (L.) Rich.) 1 năm tuổi có chiều cao 25 - 30 cm. Cây khỏe mạnh, lá xanh tươi. Hom ghép là hỗn hợp các cây mẹ khác nhau.

Đối với nội dung nghiên cứu ảnh hưởng của độ tàn che đến sinh trưởng cây trồng Thủy tùng, vật liệu nghiên cứu là cây hom, 12-18 tháng tuổi, có chiều cao

12 - 15 cm, cây sinh trưởng khỏe mạnh.

2.3. Phương pháp nghiên cứu

2.3.1. Cách tiếp cận

Luận án được thực hiện với một số cách tiếp cận sau:

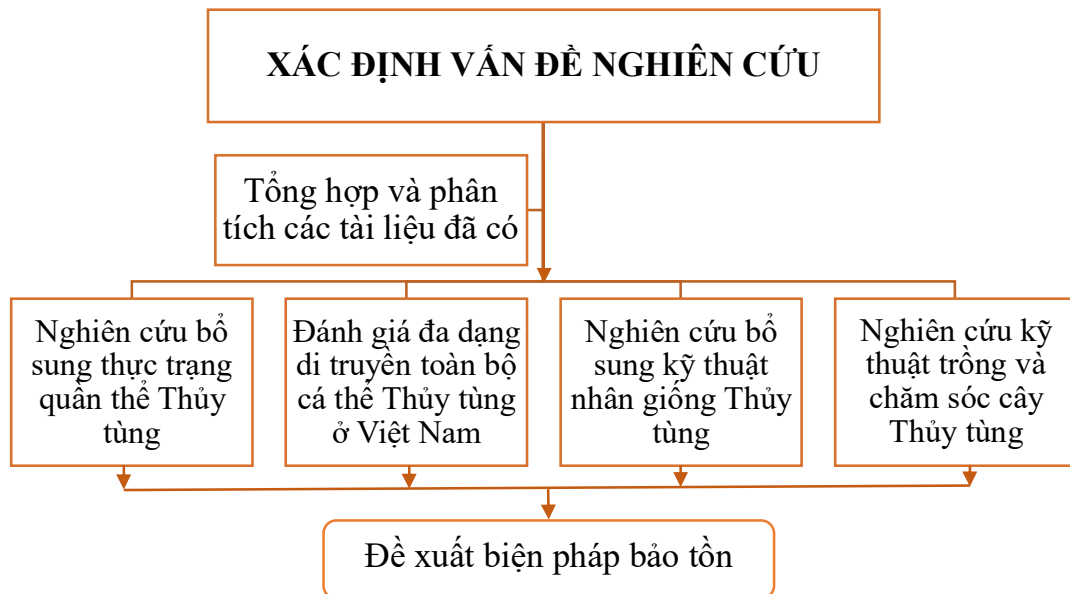
2.3.1.1. Tiếp cận kế thừa

Kế thừa các kết quả nghiên cứu về nhân giống và gây trồng đã có trên thế giới và Việt Nam.

2.3.1.2. Tiếp cận hệ thống

Trên cơ sở xem xét toàn diện các đặc điểm về phân bố, hình thái, sinh thái, tái sinh, đa dạng di truyền, nhân giống và gây trồng để đề xuất một số biện pháp bảo tồn nguồn gen Thủy tùng tại Tây Nguyên.

Các bước tiến hành của luận án được sơ đồ hoá ở hình 2.1



Hình 2.1. Sơ đồ các bước nghiên cứu của luận án

2.3.2. Phương pháp nghiên cứu thực trạng quần thể Thủy tùng

2.3.2.1. Đánh giá thực trạng quần thể Thủy tùng tự nhiên

- Thu thập tổng kết các nghiên cứu, thực trạng về cây Thủy tùng thông qua các

nguồn tài liệu trong và ngoài nước; Thu thập các số liệu, tài liệu, văn bản, bản đồ liên quan đến công tác quản lý bảo tồn cây Thủy tùng hiện nay tại tỉnh Đắk Lắk.

- Trên các khu vực có Thủy tùng phân bố, tiến hành điều tra chi tiết về đặc điểm cấu trúc tầng cây gỗ của lâm phần nói chung và loài Thủy tùng nói riêng để đánh giá hiện trạng lâm phần.

Thời gian thực hiện: tháng 2 - 6/2022.

- Điều tra thực trạng lâm phần: Sử dụng phương pháp điều tra lâm học theo phương pháp ô tiêu chuẩn (ÔTC). Thiết lập ÔTC tạm thời có diện tích 10.000m² (100mx100m).

+ Điều tra tầng cây gỗ lớn: Từ ÔTC 10.000m², chia thành 4 ô 2.500m² (50mx50m), tiến hành điều tra toàn bộ cây có Đường kính ngang ngực ($D_{1,3}$) $\geq$ 6cm. Tổng số ô đo đếm là: $4 \times 3 = 12$ ô.

+ Điều tra tầng cây dưới tán: Từ ÔTC 10.000 m² lập 5 ô 100m² (10mx10m) gồm 04 ô ở 4 góc và 01 ô ở tâm, tiến hành điều tra toàn bộ các cây có Đường kính ngang ngực ($D_{1,3}$) $<$ 6cm và Chiều cao vút ngọn $H_{vn} > 2m$; Tổng số ô đo đếm là: $5 \times 3 = 15$ ô.

+ Điều tra cây bụi và thảm thực bì: Trên ÔTC 10.000 m² điều tra thành phần loài cây bụi và thảm thực bì.

- Điều tra thực trạng quần thể Thủy tùng:

Phương pháp điều tra: Đo đếm tất cả các cây Thủy tùng tự nhiên 2 quần thể.

Phương pháp thu thập số liệu:

- Tọa độ GPS, độ cao: Đo bằng máy GPSMAP 78; Tên loài. Các chỉ tiêu sinh trưởng: $D_{1,3}$: Đo bằng thước dây đo đường kính có kẻ vạch đến mm, H_{vn} : Đo bằng máy đo cao Blumeleiss;

- Mô tả hình thái cây Thủy tùng tự nhiên (159 cây) gồm các chỉ tiêu:

+ Phẩm chất: Theo Tiêu chuẩn quốc gia TCVN 12509-2: 2018 (Bộ Khoa học và Công nghệ, 2018) về Rừng trồng - Rừng sau thời gian kiến thiết cơ bản - Phần 2: Nhóm loài cây sinh trưởng chậm [2] gồm: Tốt: Cây khỏe mạnh, tán đều, không bị

sâu bệnh, Trung bình: Cây có một phần lá bị vàng, lệch tán; Xấu: Cây còi cọc, ít lá, khô hoặc rụng ngọn.

+ Phát sinh chồi mới: 1: có chồi mới; 0: không có chồi mới tại thời điểm tháng 6/2022

+ Ra nón đực, quả nón: 1: có ra nón đực, quả nón; 0: không có nón đực, quả nón tại thời điểm tháng 6/2022

Phương pháp xử lý số liệu:

- Xác định thành phần thực vật khu vực nghiên cứu:

Sử dụng phương pháp chuyên gia để định danh thực vật: Xác định tên thực vật dựa vào đặc điểm hình thái, đặc biệt là hình thái cơ quan sinh sản và so sánh với các tài liệu liên quan. Mỗi loài thực vật được xác định tên (tên thông thường, tên khoa học), họ (họ phổ thông, họ khoa học).

- Xác định cấu trúc tổ thành loài

Cấu trúc tổ thành của quần thể được xác định thông qua các chỉ số quan trọng IV% (Curtis và McIntosh, 1951), qua công thức sau:

$$IV\% = \frac{N\% + G\% + F\%}{3} \quad \text{Với:} \quad (2.1)$$

$$N\% = \frac{ni}{N} \times 100; G\% = \frac{gi}{G} \times 100; F\% = \frac{fi}{F} \times 100 \quad (2.2)$$

ni là mật độ của loài trong tất cả các ô điều tra.

N là mật độ của tất cả các loài trong tất cả các ô điều tra.

gi là tổng tiết diện ngang của loài trong tất cả các ô điều tra; Chỉ số này được tính thông qua số liệu điều tra về đường kính cây $D_{1.3}$ bằng công thức:

$$gi = \frac{\pi \cdot (D_{1.3})^2}{4} \quad \text{Với:} \quad (2.3)$$

G là Tổng tiết diện ngang của tất cả các loài trong tất cả các ô điều tra.

fi là số ô điều tra xuất hiện của loài.

F là tổng số ô xuất hiện của tất cả các loài.

Nếu: $IV\% \geq 3\%$ thì loài đó được tham gia vào công thức tổ thành.

- Đánh giá hiện trạng quần thể Thủy tùng

+ Tỷ lệ cây Tốt, Trung bình, Xấu = $(\Sigma \text{Số cây Tốt, Trung bình, Xấu} / \Sigma \text{Số cây điều tra}) \times 100\%$. (2.4)

+ Tỷ lệ cây ra chồi = $(\Sigma \text{Số cây ra chồi} / \Sigma \text{Số cây điều tra}) \times 100\%$ (2.5)

+ Tỷ lệ cây ra nón đực, quả nón = $(\Sigma \text{Số cây ra nón đực, quả nón} / \Sigma \text{Số cây điều tra}) \times 100\%$ (2.6)

+ Mô tả phân bố số cây theo cấp kính N/D và cấp chiều cao N/H theo thực tế để đánh giá thực trạng sinh trưởng của loài.

2.3.2.2. *Đánh giá thực trạng gây trồng Thủy tùng ở Tây Nguyên*

Phương pháp điều tra: Đo đếm tất cả các cây Thủy tùng trồng phân tán từ năm 2000 đến 2022 tại các tỉnh: Gia Lai, Đắk Lắk và Lâm Đồng. Thời gian thực hiện: tháng 7/2022.

Phương pháp thu thập số liệu: Điều tra thu thập thông tin về các cây Thủy tùng trồng tại các tỉnh: Gia Lai, Đắk Lắk và Lâm Đồng gồm:

- Tọa độ GPS điểm trồng: Đo bằng máy GPSMAP 78; Năm trồng;
- Nguồn gốc cây trồng: Từ hom, từ cây ghép trên gốc bụi mọc;
- Các chỉ tiêu sinh trưởng: $D_{1.3}$: Đo bằng thước dây đo đường kính có kẻ vạch đến mm, H_{vn} : Đo bằng máy đo cao Blumeleiss;
- Phẩm chất: Theo Tiêu chuẩn quốc gia TCVN 12509-2: 2018 về Rừng trồng - Rừng sau thời gian kiến thiết cơ bản - Phần 2: Nhóm loài cây sinh trưởng chậm [2] gồm: Tốt: Cây khỏe mạnh, tán đều, không bị sâu bệnh, Trung bình: Cây có một phần lá bị vàng, lệch tán; Xấu: Cây còi cọc, ít lá.

Phương pháp xử lý số liệu: Tỷ lệ cây Tốt, Trung bình, Xấu = $(\Sigma \text{Số cây Tốt, Trung bình, Xấu} / \Sigma \text{Số cây điều tra}) \times 100\%$. (2.7)

❖ *Đánh giá tình hình sâu đục thân gây hại trên Thủy tùng:*

Thời gian: Từ tháng 2/2024 - 6/2024.

- *Đánh giá mức độ sâu hại*: Dựa trên phân loại mức độ thiệt hại, xác định:

$$\text{Tỷ lệ thiệt hại (P\%)} P\% = (n/N) \times 100 \quad [45], \quad (2.8)$$

Trong đó: n là số cây bị sâu đục thân; N là tổng số cây đã điều tra.

$$\text{Chỉ số hại trung bình (DI)} DI = (\sum n_i \times v_i) / N \quad [45], \quad (2.9)$$

Trong đó: n_i là số cây bị hại ở chỉ số thiệt hại thứ i ; v_i là chỉ số hại cấp i ; N là tổng số cây đã điều tra.

- *Xác định loài sâu đục thân*: Thu 30 mẫu cành Thủy tùng từ cây có từ 2 đến 5 lỗ do sâu đục trên thân, dài 0,8m, các mẫu được đưa về phòng thí nghiệm tại Trung tâm Nghiên cứu Bảo vệ rừng, Viện Khoa học Lâm nghiệp Việt nam. Mô tả đặc điểm của sâu trưởng thành và so sánh với các khóa phân loại của Yakovlev, 2014 [102]; Yakovlev và Witt, 2017 [104].

2.3.3. Phương pháp nghiên cứu đánh giá đa dạng di truyền quần thể Thủy tùng

163 mẫu lá được thu cho vào túi nilong và vận chuyển tới phòng thí nghiệm Sinh học phân tử (Viện Nghiên cứu Giống và CNSH Lâm nghiệp), bảo quản ở 4°C cho đến khi tách chiết DNA.

2.3.3.1. Phương pháp tách chiết DNA tổng số

Trong nghiên cứu này, bộ Kit Thermo được sử dụng để tiến hành tách chiết thu DNA tổng số của 163 mẫu lá. Kiểm tra chất lượng sản phẩm DNA các mẫu Thủy tùng thu được bằng phương pháp điện di trên gel agarose 0,8 % và tiến hành quan sát trên máy soi gel sử dụng tia UV. Tiến hành đo nồng độ và độ tinh sạch của mẫu DNA tổng số thu được bằng máy đo quang phổ hấp thụ Nano drop. Những mẫu DNA đạt nồng độ ≥ 20 ng/ μ l và độ tinh sạch từ 1,8 - 2,0 đủ điều kiện để sử dụng cho phản ứng chuỗi trùng hợp PCR.

2.3.3.2. Ứng dụng DNA barcode để giám định loài Thủy tùng

Trước khi phân tích bằng chỉ thị ISSR, lựa chọn một số mẫu DNA đã được tách chiết làm khuôn để nhân bản tại các vùng gen lục lạp gồm *rbcL* và *matK*.

Phản ứng PCR được thực hiện với tổng thể tích 50 μ l bao gồm 25 μ l Dream Taq Hot Start Mastermix, 2 μ l mỗi xuôi (F) 10 μ M, 2 μ l mỗi ngược (R) 10 μ M,

5 µl DNA tổng số, 16 µl nước deion. Chương trình chạy PCR được tiến hành theo chu trình nhiệt: 4 phút ở 94°C, 36 chu kỳ (1 phút 30 ở 94°C, 60 giây ở T_m (nhiệt độ gắn môi), 1 phút 30 ở 72°C) và ở 72°C trong 10 phút.

Bảng 2.1. Trình tự môi các vùng gen lục lạp được sử dụng nghiên cứu

STT	Tên môi	Trình tự môi (5' – 3')	Nhiệt độ gắn môi (T_m)
1	<i>rcbL</i>	<i>rbcl-IF1</i> CGAATTCCTCCTGCTTATTC	50,8 °C
		<i>rbcl-R</i> TCACAAGCAGCAGCTAGTTCAGGACTC	61,9 °C
2	<i>matK</i>	<i>445mF</i> AAGGAATGGATGGATGGAATAGTCT	55,6 °C
		<i>1209mR</i> CACCCTGAGATGTCACAAAA	52,6 °C

Kiểm tra sản phẩm PCR bằng phương pháp điện di trên gel agarose 1,8% và tinh sạch sản phẩm PCR bằng GeneJET PCR Purification Kit. Quá trình tinh sạch sản phẩm PCR thực hiện theo hướng dẫn của nhà sản xuất theo các bước như sau: Bỏ sung đệm Binding vào sản phẩm PCR với tỷ lệ 1:1, đảo đều và quan sát màu của hỗn hợp dung dịch. Chuyển dung dịch lên cột tinh sạch và ly tâm trong 30 giây với tốc độ 10000 vòng/phút rồi loại bỏ dung dịch đã qua cột. Bỏ sung đệm rửa (đã bỏ sung ethanol) lên cột tinh sạch và ly tâm từ 30-60 giây với tốc độ 10000 vòng/phút. Loại bỏ dòng chảy đã qua cột và đặt cột tinh sạch trở lại ống ban đầu. Ly tâm cột tinh sạch rộng thêm 1 phút với 10000 vòng/phút để loại bỏ hoàn toàn đệm rửa còn sót lại. Chuyển cột tinh sạch sang ống eppendorf 1,5ml mới, bỏ sung 50 µl đệm Elution lên màng của cột tinh sạch và ly tâm 1 phút 10000 vòng/phút. Loại bỏ cột tinh sạch và bảo quản sản phẩm PCR tinh sạch ở -20°C để sử dụng cho giải trình tự DNA. Sau đó, sản phẩm tinh sạch sẽ được đọc trình tự các vùng gen với cả chiều xuôi và ngược.

Kết quả giải trình tự các vùng gen được đối chiếu với nhau theo 2 chiều nhằm loại bỏ các vị trí lỗi do đọc trình tự và phát hiện các đa hình nucleotide đơn. Sử dụng phần mềm Bioedit để phân tích mức độ sai khác và mối quan hệ các mẫu Thủy tùng được phân tích.

Phương pháp xử lý số liệu:

Các đoạn trình tự gen lục lạp *rbcL* và *matK* sau khi giải trình tự được đối chiếu theo 2 chiều nhằm loại bỏ các vị trí lỗi do quá trình đọc bằng phần mềm BioEdit và tiến hành phân tích mức độ sai khác cũng như mối quan hệ các mẫu được phân tích và so sánh với trình tự hiện có trên Ngân hàng gen Quốc tế (NCBI).

2.3.3.3. Khuếch đại gen bằng phản ứng PCR-ISSR

Việc đánh giá mức độ đa dạng di truyền và cấu trúc quần thể của 2 xuất xứ Thủy tùng bằng 10 chỉ thị ISSR (Isshiki và cộng sự, 2008) [66] với trình tự và nhiệt độ gắn mỗi cụ thể được thể hiện ở Bảng 2.2. Phản ứng PCR được thực hiện với tổng thể tích 20 μ l gồm 10 μ l Dream Taq Hot Start Mastermix, 2 μ l mỗi ISSR 10 μ M, 2 μ l DNA tổng số và 6 μ l nước deion. Các bước PCR-ISSR được tiến hành như sau: 94°C trong 5 phút; lặp lại 35 chu kỳ gồm 94°C trong 30 giây, Tm trong 45 giây, 72°C trong 1 phút 30 giây; kết thúc 72°C trong 10 phút.

Bảng 2.2. Trình tự mỗi ISSR được sử dụng thực hiện phản ứng PCR

STT	Tên mỗi	Trình tự mỗi (5' – 3')	Nhiệt độ gắn mỗi (T _m)
1	UBC808	AGAGAGAGAGAGAGAGC	48,8 °C
2	UBC811	GAGAGAGAGAGA GAGAC	46,8 °C
3	UBC818	CACACACACACA CACAG	51,0 °C
4	UBC823	TGTGTGTGTGTGTGTGGA	54,2 °C
5	UBC840	GAGAGAGAGAGAGAGAYT	50,0 °C
6	UBC843	CTCTCTCTCTCTCTGA	48,6 °C
7	UBC851	GTGTGTGTGTGTGTGTCTG	53,9 °C
8	UBC855	ACACACACACACACACG	51,4 °C
9	UBC856	ACACACACACACACACYA	52,8 °C
10	UBC881	GGG TGGGGT GGGGTG	59,3 °C

(Theo Isshiki và cộng sự, 2008) [66]

Thực hiện phản ứng PCR-ISSR cho 163 mẫu Thủy tùng đã được tách chiết DNA tổng số có nồng độ ≥ 20 ng/ μ l, độ tinh sạch từ 1,8-2,0 và có băng trên bản gel sáng, rõ nét và không bị đứt gãy. Sau khi kết thúc chuỗi phản ứng PCR-ISSR, sản phẩm thu được kiểm tra trên gel agarose 1,8% trong dung dịch đệm

1X TAE và nhuộm bằng Redsafe. Bản gel được chạy ở hiệu điện thế 70V trong 70 phút và được quan sát bằng máy soi gel sử dụng tia UV. Kết quả thu được so sánh với thang DNA chuẩn 1 kb của Thermo Scientific.

Phương pháp thu thập số liệu:

Các đoạn khuếch đại từ việc sử dụng chỉ thị ISSR được tính điểm theo ma trận dạng nhị phân trong đó: 0 - phân đoạn DNA không xuất hiện và 1 - phân đoạn DNA xuất hiện

Phương pháp xử lý số liệu

- Các chỉ số đa dạng di truyền được tính toán bằng phần mềm POPGENE v1.32 (Yeh và cộng sự, 1997) và GelAlex gồm:

+ Số lượng alen quan sát được (N_a): $N_a = (1/K) \sum_{i=1}^K n_i$ (2.10)

Trong đó: K: Số lượng locus; n: Số lượng alen trên mỗi locus

+ Số lượng alen có hiệu lực (N_e): $N_e = 1/(1 - h) = 1/\sum p_i^2$ (2.11)

Trong đó: p_i : Tần số xuất hiện của alen thứ i trong một locus;

$h = 1 - \sum p_i^2$: Tỷ lệ dị hợp mong đợi cho 1 locus

+ Hệ số đa dạng di truyền N_{ei} (h): $h = \sum_j^L h_j / L$ (2.12)

Trong nhiều nghiên cứu về di truyền quần thể, chỉ số này thường được so sánh với tỷ lệ dị hợp tử mong đợi (expected heterozygosity - H_e), do giống nhau hoàn toàn về bản chất toán học.

Trong đó: L: Tổng số locus; h_j : chỉ số dị hợp tử ở locus thứ j

+ Chỉ số đa dạng di truyền Shannon (I): $I = - \sum (p_i \times \ln(p_i))$ (2.13)

Trong đó: p_i : Tần suất xuất hiện của alen thứ i trong quần thể; Ln: logarit tự nhiên.

+ Phần trăm đa hình (PPB): $(PPB) = \frac{\text{Số băng DNA đa hình}}{\text{Tổng số băng DNA thu được}} \times 100$ (2.14)

+ Chỉ số đa dạng nguồn gen của tổng các nguồn giống (H_T): $H_T = 1 - \sum (p_i^2)$ (2.15)

Trong đó: p_i : Tần suất xuất hiện của alen thứ i trong quần thể.

+ Chỉ số sai khác di truyền N_{ei} giữa các nguồn giống (G_{ST}): $G_{ST} = \frac{H_T - H_S}{H_T}$ (2.16)

Trong đó: H_T : Chỉ số đa dạng nguồn gen của tổng các nguồn giống;

H_S : Chỉ số đa dạng nguồn gen trong từng nguồn giống.

+ Chỉ số trao đổi gen giữa các nguồn giống (N_m): $N_m = 0,5 \times \frac{1-G_{ST}}{G_{ST}}$ (2.17)

Trong đó: G_{ST} : Chỉ số sai khác di truyền theo N_{ei} (1978) giữa các nguồn giống.

- Phân tích phương sai phân tử (AMOVA), mức độ tương đồng và quan hệ di truyền giữa các mẫu Thủy tùng bằng phần mềm GenAlex.
- Phân tích tọa độ chính PCoA thể hiện mức độ khác biệt di truyền giữa các xuất xứ Thủy tùng bằng phần mềm GenAlEx v6.51b2 (Peakall và cộng sự, 2006).
- Xây dựng cây quan hệ di truyền bằng phần mềm MEGA X (Kumar và cộng sự, 2018) theo phương pháp nhóm cặp không trọng số UPGMA và giá trị Bootstrap với số lần lặp lại 1000 lần.

2.3.4. Phương pháp nghiên cứu bổ sung kỹ thuật nhân giống Thủy tùng

2.3.4.1. Nghiên cứu kỹ thuật nhân giống Thủy tùng bằng nuôi cấy *in vitro*

a. Nghiên cứu ảnh hưởng của loại chất khử trùng và thời gian khử trùng của mẫu cấy.

Các chồi ngọn đã cắt bỏ phần lá được rửa sơ bộ dưới vòi nước chảy, sau đó rửa sạch bằng dung dịch xà phòng loãng 1%, rửa lại bằng nước sạch nhiều lần. Kích thước đoạn chồi: dài 3 - 5 cm, đường kính 1 - 1,5 mm. Ngâm chồi trong dung dịch Viben - C 0,4% trong 30 phút để loại nguồn nấm ban đầu. Sau đó xử lý khử trùng mẫu trong box cấy vô trùng: mẫu được sát khuẩn bằng cồn 70% trong thời gian 1 phút, loại bỏ cồn, rửa sạch cồn bằng nước cất vô trùng 3 lần.

Phương pháp bố trí thí nghiệm: Thí nghiệm được bố trí theo kiểu ngẫu nhiên 2 yếu tố, gồm 3 loại chất khử trùng: TCCA 50%, Javen 50% và $HgCl_2$ ở 2 nồng độ khác nhau: $HgCl_2$ 0,1% và $HgCl_2$ 0,15% và 2 công thức thời gian khử trùng: 15 phút và 20 phút. Mỗi công thức có 15 mẫu. Tổng số mẫu thí nghiệm: 4 loại chất khử trùng x 2 công thức thời gian khử trùng x 15 mẫu/công thức x 3 lần lặp = 360 mẫu. Tất cả mẫu được nuôi cấy trong môi trường WPM (Woody plant

medium) cơ bản, pH=6. Các mẫu thí nghiệm được chăm sóc trong phòng nuôi cấy dưới ánh sáng đèn led với cường độ chiếu sáng 2.500 lux, thời gian chiếu sáng 14 giờ/ngày, nhiệt độ phòng nuôi cấy $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Đo đếm số liệu sau khi kết thúc thí nghiệm: 8 tuần.

Phương pháp thu thập số liệu: Đếm số mẫu không bị nhiễm, số mẫu bật chồi.

Bảng 2.3. Công thức loại chất khử trùng và thời gian khử trùng mẫu

Ký hiệu công thức	Loại chất khử trùng	Thời gian khử trùng
CT1	TCCA	15 phút
CT2	TCCA	20 phút
CT3	HgCl ₂ 0,1%	15 phút
CT4	HgCl ₂ 0,1%	20 phút
CT5	Javen	15 phút
CT6	Javen	20 phút
CT7	HgCl ₂ 0,15%	15 phút
CT8	HgCl ₂ 0,15%	20 phút

b. Nghiên cứu ảnh hưởng của nồng độ chất kích thích sinh trưởng đến quá trình nhân nhanh chồi.

Kế thừa kết quả nghiên cứu của Nguyễn Đức Thành và cộng sự (2012), sử dụng môi trường WPM làm môi trường cơ bản cho các nghiên cứu nhân nhân chồi và cho ra rễ Thủy tùng.

Chọn các mẫu Thủy tùng đạt tiêu chuẩn bật chồi từ thí nghiệm khử trùng mẫu, cắt thành đoạn có kích thước 0,5 - 1,0 cm cấy lên các công thức môi trường nhân chồi.

Phương pháp bố trí thí nghiệm: Thí nghiệm được bố trí theo kiểu ngẫu nhiên 1 nhân tố, môi trường sử dụng là WPM bổ sung chất điều hòa sinh trưởng thực vật BA (6-Benzyl adenine) ở các nồng độ 0,2; 0,5; 0,7 và 1 mg/l. Tổng số mẫu thí nghiệm: 4 công thức x 15 mẫu/công thức x 3 lần lặp = 180 mẫu.

Các công thức môi trường đều bổ sung thêm: 8 g/l agar + 30 g/l đường sucrose. Các mẫu thí nghiệm được chăm sóc trong phòng nuôi cấy với dưới ánh sáng đèn

led với cường độ chiếu sáng 2.500 lux, thời gian chiếu sáng 14 giờ/ngày, nhiệt độ phòng nuôi cây $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Đo đếm số liệu sau khi kết thúc thí nghiệm: 8 tuần.

Bảng 2.4. Công thức môi trường nhân nhanh chồi

Ký hiệu công thức	Môi trường
CT1	WPM + BA 0,2 mg/l
CT2	WPM + BA 0,5 mg/l
CT3	WPM + BA 0,7 mg/l
CT4	WPM + BA 1 mg/l

Phương pháp thu thập số liệu: Số chồi: đếm số chồi tạo được trên mỗi cụm chồi; Chiều cao chồi: Đo bằng thước đo chính các đến 0,1cm cho tất cả các chồi thu được; Mô tả hình thái mẫu thí nghiệm: (++): Chồi mập, vươn cao và có màu xanh đậm; (+): Chồi mảnh, có màu xanh; (-): Chồi có màu vàng, một số chồi bị héo.

c. *Nghiên cứu ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng lên khả năng hình thành rễ cây Thủy Tùng*

Chọn các chồi Thủy tùng đạt tiêu chuẩn mập, vươn cao và có màu xanh đậm từ thí nghiệm nhân nhanh chồi, có chiều cao từ 2 - 3 cm cắt chuyển sang các môi trường có bổ sung chất điều hòa sinh trưởng để kích thích tạo rễ. Mẫu Thủy tùng được cấy trong môi trường nhân giống *in vitro* bổ sung chất kích thích sinh trưởng NAA hoặc IBA và đặt trong tối 6 ngày. Sau đó các mẫu cây sẽ được chuyển qua môi trường $\frac{1}{4}$ WPM + Vermiculite không bổ sung các chất điều hòa sinh trưởng trong 8 tuần.

Phương pháp bố trí thí nghiệm: Thí nghiệm được bố trí theo kiểu ngẫu nhiên 1 nhân tố, môi trường sử dụng là WPM bổ sung các chất điều hòa sinh trưởng thực vật IBA và NAA ở các nồng độ 10, 20, 30, 40 ppm. Đối chứng là môi trường WPM không bổ sung chất điều hòa sinh trưởng. Tổng số mẫu thí nghiệm: 9 công thức x 15 mẫu/công thức x 3 lần lặp = 405 mẫu.

Phương pháp thu thập số liệu: Đếm số mẫu ra rễ, số rễ trên mỗi chồi ra rễ. Chiều dài rễ: Đo bằng thước đo cm chính xác đến 0,1cm cho tất cả các rễ có

chiều dài từ 0,2 cm trở lên.

Bảng 2.5. Công thức môi trường ra rễ

Ký hiệu công thức	Môi trường
MT1	WPM + NAA 10 ppm
MT2	WPM + NAA 20 ppm
MT3	WPM + NAA 30 ppm
MT4	WPM + NAA 40 ppm
MT5	WPM + IBA 10 ppm
MT6	WPM + IBA 20 ppm
MT7	WPM + IBA 30 ppm
MT8	WPM + IBA 40 ppm
Đối chứng (DC)	WPM

Phương pháp xử lý số liệu:

$$+ \text{Tỷ lệ mẫu sạch} = \Sigma \text{ số mẫu sạch} / \Sigma \text{ Số mẫu} \times 100 \quad (2.18)$$

$$+ \text{Tỷ lệ mẫu bật chồi} = \Sigma \text{ số mẫu bật chồi} / \Sigma \text{ Số mẫu} \times 100 \quad (2.19)$$

$$+ \text{Số chồi TB/mẫu} = \Sigma \text{ Số chồi của các mẫu} / \Sigma \text{ Số mẫu} \quad (2.20)$$

$$+ \text{Chiều cao chồi TB} = \Sigma \text{ Chiều cao chồi của các mẫu} / \Sigma \text{ Số chồi đo đếm} \quad (2.21)$$

$$+ \text{Tỷ lệ mẫu ra rễ} = (\Sigma \text{ Số mẫu ra rễ} / \Sigma \text{ Số mẫu đưa vào thí nghiệm}) \times 100 \quad (2.22)$$

$$+ \text{Số rễ TB/mẫu (Ntb)} = \Sigma \text{ Số rễ của các mẫu ra rễ} / \Sigma \text{ Số mẫu ra rễ} \quad (2.23)$$

$$+ \text{Chiều dài rễ TB (Ltb)} = \Sigma \text{ Chiều dài rễ của các mẫu ra rễ} / \Sigma \text{ Số mẫu đo đếm} \quad (2.24)$$

$$+ \text{Chỉ số ra rễ (Ri)} = \text{Ntb} \times \text{Ltb} \quad (2.25)$$

Đánh giá sự khác biệt giữa các công thức thí nghiệm từ các chỉ tiêu theo dõi bằng phương pháp phân tích phương sai (Anova) 1 hoặc 2 nhân tố. Sử dụng tiêu chuẩn tiêu chuẩn Duncan, hoặc tiêu chuẩn tham số Kruskal-Wallis, để xác định công thức tốt nhất. Phương pháp kiểm tra theo tiêu chuẩn tham số Kruskal-Wallis này được áp dụng trên cơ sở dung lượng mẫu nhỏ (Bảo Huy, 2007) [15], khi tỷ lệ mẫu ra rễ thấp.

2.3.4.2. Nghiên cứu bổ sung kỹ thuật nhân giống Thủy tùng bằng giâm hom

Cây Thủy tùng lấy hom có đường kính ($D_{1,3}$) và chiều cao (H_{vn}) lần lượt là

(D_{1,3}: 60,8 cm; H_{vn}: 16m) và (D_{1,3}: 63 cm; H_{vn}: 18 m). Các chất điều hòa sinh trưởng sử dụng gồm: IAA, IBA, NAA và GA₃ ở dạng dung dịch với các nồng độ khác nhau. Giá thể giâm hom là đất thịt được loại bỏ rễ cây và cát mịn sạch với tỉ lệ là cát sạch 50% + đất thịt 50%.

a. Nghiên cứu ảnh hưởng của của nồng độ IBA và thời gian xử lý hom đến khả năng ra rễ của hom Thủy tùng

Phương pháp bố trí thí nghiệm: Thí nghiệm được bố trí theo khối ngẫu nhiên 2 nhân tố, gồm chất điều hòa sinh trưởng thực vật IBA ở các nồng độ khác nhau từ I1: 500, I2:1000, I3: 1.500 ppm và thời gian xử lý hom gồm: T1: 2 giờ, T2: 4 giờ và T3: 6 giờ. Kích thước hom: dài 10 - 12cm. Mỗi công thức sử dụng 35 hom. Tổng số hom thí nghiệm: 9 công thức x 35 hom / công thức x 3 lần lặp = 945 hom. Thời gian thí nghiệm: từ 3/2021 - 5/2021.

Các thí nghiệm được bố trí, theo dõi và chăm sóc một cách đồng đều dưới điều kiện: Mức độ che sáng 50%, Tưới phun sương tự động, duy trì độ ẩm lòng giâm hom là 80 - 85%. Đo đếm số liệu sau khi kết thúc thí nghiệm 60 ngày.

Bảng 2.6. Công thức nồng độ IBA và thời gian xử lý hom

Thời gian xử lý hom (giờ)	Nồng độ IBA (ppm)		
	500	1.000	1.500
2	I1T1	I2T1	I3T1
4	I1T2	I2T2	I3T2
6	I1T3	I2T3	I3T3

Phương pháp thu thập số liệu: Đếm số hom sống, số hom ra rễ.

b. Nghiên cứu ảnh hưởng của nồng độ IBA và kích thước hom đến kết quả giâm hom Thủy tùng

Phương pháp bố trí thí nghiệm: Thí nghiệm được bố trí theo khối ngẫu nhiên 2 nhân tố gồm chất điều hòa sinh trưởng IBA với các nồng độ I1: 1.000 ppm; I2: 1.500 ppm; I3: 2.000 ppm và kích thước hom với ba mức K1: dài 6 ($\pm$ 1)cm;

K2: dài 12 (± 1)cm; K3: dài 18 (± 1)cm. Thời gian ngâm hom là 2 giờ. Mỗi công thức sử dụng 40 hom. Tổng số hom thí nghiệm là: 40 hom/công thức x 9 công thức x 3 lần lặp = 1.080 hom. Thời gian thí nghiệm: từ 11/2021 - 1/2022

Các thí nghiệm được bố trí, theo dõi và chăm sóc một cách đồng đều dưới điều kiện: Mức độ che sáng 50% và tưới phun sương tự động duy trì độ ẩm ở 80 - 85%. Đo đếm số liệu sau khi kết thúc thí nghiệm 60 ngày.

Bảng 2.7. Công thức nồng độ IBA và kích thước hom

Kích thước hom (± 1 cm)	Nồng độ IBA (ppm)		
	500	1.000	1.500
6	I1K1	I2K1	I3K1
12	I1K2	I2K2	I3K2
18	I1K3	I2K3	I3K3

Phương pháp thu thập số liệu: Đếm số hom sống, số hom ra rễ, số rễ/hom. Chiều dài rễ: Đo chiều dài rễ bằng thước đo chính xác đến 0,1cm

c. Nghiên cứu ảnh hưởng của hỗn hợp chất điều hoà sinh trưởng đến khả năng ra rễ của hom Thủy tùng.

Phương pháp bố trí thí nghiệm: Bố trí thí nghiệm theo khối ngẫu nhiên 1 nhân tố là hỗn hợp chất điều hoà sinh trưởng gồm hỗn hợp IBA 1.000 ppm phối hợp với NAA, hoặc IAA hoặc GA3 ở các nồng độ khác nhau từ 200 ppm đến 1.000 ppm. Đối chứng là IBA 1000 ppm. Thời gian ngâm hom là 2 giờ. Mỗi công thức sử dụng 30 hom. Tổng số hom thí nghiệm là: (3 x 5 +1) công thức x 3 lần lặp x 30 hom/công thức = 1.440 hom. Kích thước hom: dài 10 - 12cm. Thời gian thí nghiệm: từ 9/2022 - 1/2023.

Các thí nghiệm được bố trí, theo dõi và chăm sóc một cách đồng đều dưới điều kiện: Mức độ che bóng 50% và tưới phun sương tự động duy trì độ ẩm là 80 - 85%. Đo đếm số liệu sau khi kết thúc thí nghiệm 120 ngày.

Phương pháp thu thập số liệu: Đếm số hom sống, số hom ra rễ, số rễ/hom.

Chiều dài rễ: Đo chiều dài rễ bằng thước đo chính xác đến 0,1 cm.

Bảng 2.8. Công thức hỗn hợp chất điều hoà sinh trưởng

Ký hiệu công thức	Hỗn hợp chất điều hoà sinh trưởng
CT1	IBA 1.000 ppm + NAA 200 ppm
CT2	IBA 1.000 ppm + NAA 400 ppm
CT3	IBA 1.000 ppm + NAA 600 ppm
CT4	IBA 1.000 ppm + NAA 800 ppm
CT5	IBA 1.000 ppm + NAA 1.000 ppm
CT6	IBA 1.000 ppm + IAA 200 ppm
CT7	IBA 1.000 ppm + IAA 400 ppm
CT8	IBA 1.000 ppm + IAA 600 ppm
CT9	IBA 1.000 ppm + IAA 800 ppm
CT10	IBA 1.000 ppm + IAA 1.000 ppm
CT11	IBA 1.000 ppm + GA ₃ 200 ppm
CT12	IBA 1.000 ppm + GA ₃ 400 ppm
CT13	IBA 1.000 ppm + GA ₃ 600 ppm
CT14	IBA 1.000 ppm + GA ₃ 800 ppm
CT15	IBA 1.000 ppm + GA ₃ 1.000 ppm
Đối chứng (DC)	IBA 1.000 ppm

Phương pháp xử lý số liệu:

$$+ \text{ Tỷ lệ hom sống (S\%)} = (\Sigma \text{Số hom sống} / \Sigma \text{Số hom được giâm}) \times 100 \quad (2.26)$$

$$+ \text{ Tỷ lệ hom ra rễ (R\%)} = (\Sigma \text{Số hom ra rễ} / \Sigma \text{Số hom được giâm}) \times 100 \quad (2.27)$$

$$+ \text{ Số rễ TB/hom (Ntb)} = \Sigma \text{Số rễ của các hom ra rễ} / \Sigma \text{Số hom ra rễ} \quad (2.28)$$

$$+ \text{ Chiều dài TB rễ (Ltb)} = \Sigma \text{Chiều dài rễ của các hom ra rễ} / \Sigma \text{Số hom ra rễ} \quad (2.29)$$

$$+ \text{ Chỉ số ra rễ (Ri)} = \text{Ntb} \times \text{Ltb} \quad (2.30)$$

Đánh giá sự khác biệt giữa các công thức thí nghiệm từ các chỉ tiêu theo dõi bằng phương pháp phân tích phương sai (Anova) 1 hoặc 2 nhân tố. Sử dụng tiêu chuẩn tiêu chuẩn Duncan, hoặc tiêu chuẩn tham số Kruskal-Wallis, để xác định công thức tốt nhất. Phương pháp kiểm tra theo tiêu chuẩn tham số Kruskal-Wallis này được áp dụng trên cơ sở dung lượng mẫu nhỏ (Bảo Huy, 2007) [15], khi tỷ lệ hom ra rễ thấp.

2.3.4.3. Nghiên cứu kỹ thuật nhân giống Thủy tùng bằng ghép trên rễ thở

Phương pháp bố trí thí nghiệm: Thí nghiệm được bố trí theo kiểu 1 nhân tố là các phương pháp ghép, gồm Ghép mắt Thủy tùng kiểu cửa sổ trên rễ thở của cây mẹ (gọi tắt là ghép mắt) và Ghép áp cành Thủy tùng trên rễ thở của cây mẹ (gọi tắt là ghép áp cành). Thí nghiệm được bố trí trên 2 khu vực phân bố gồm Ea Drăng và Krông Năng. Mỗi phương pháp ghép ở Ea Drăng thí nghiệm trên 80 rễ thở và ở Krông Năng là trên 20 rễ thở. Tổng số mẫu thí nghiệm trên 200 rễ thở. Phát dọn thực bì, loại bỏ dây leo, dương xỉ và vệ sinh sạch quanh gốc rễ thở cây Thủy tùng. Thí nghiệm bắt đầu từ tháng 10/2021 đến tháng 6/2024.

Kỹ thuật ghép (áp dụng kỹ thuật ghép cây ăn quả, Phan Ngưỡng Tinh và cộng sự, 2007) [32].

- Phương pháp ghép áp cành Thủy tùng trên rễ thở của cây mẹ.

Cành ghép: Từ 4 cây mẹ khỏe mạnh, sinh trưởng tốt tại xã Ea Drăng. Cành để ghép là cành bánh tẻ, màu xanh xen kẽ những vạch nâu, lá to, mầm ngủ to. Kích thước cành ghép: đường kính 8 – 10 mm, dài 8 - 10 cm, có 4 – 6 mắt ngủ.

- Phương pháp ghép mắt Thủy tùng kiểu cửa sổ trên rễ thở của cây mẹ

Mắt ghép: Từ 4 cây Thủy tùng mẹ tại xã Ea Drăng ở trên, lấy mắt ghép trên cành tương tự như phương pháp ghép áp cành. Kích thước khảm ghép: 3 – 4 cm x 3 cm, có 2 – 4 mắt ngủ.

Chăm sóc cây ghép: Cây ghép đảm bảo độ thông thoáng, không bị dây leo, cỏ dại che phủ các gốc ghép.

Thu thập số liệu: 1 tháng/lần vào năm thứ nhất và 6 tháng/lần vào năm thứ hai.

Phương pháp thu thập số liệu:

- + Tỷ lệ sống (%): Đếm số cây sống theo các thời gian thí nghiệm.
- + Chiều cao/dài chồi ghép (H, cm): Đo từ vị trí nảy chồi đến đỉnh sinh trưởng bằng thước dây chính xác đến 0,1 cm

- + Đường kính gốc chồi ghép (D_0 , mm): Đo tại vị trí nảy chồi bằng thước Panme điện tử chính xác đến 0,1 mm
- + Chất lượng sinh trưởng của cây ghép: Đánh giá dựa vào hình thái, theo 3 cấp, Tốt: chồi sinh trưởng tốt, có màu xanh tươi; Trung bình: một phần chồi ghép sinh trưởng kém, màu hơi ngả vàng; Xấu: chồi ghép sinh trưởng kém, màu vàng hoặc hơi ngả sang nâu.

Phương pháp xử lý số liệu

$$+ \text{Tỷ lệ sống} = (\Sigma \text{Số cây sống} / \Sigma \text{Số cây ghép}) \times 100\% \quad (2.31)$$

- + Sinh trưởng đường kính gốc (D_0), chiều cao (H_{vn}) trung bình theo thời gian:

$$D_{0TB} = (\Sigma \text{Số } D_0 / \Sigma \text{Số cây đo đếm}) \quad (2.32)$$

$$H_{TB} = (\Sigma \text{Số } H_{vn} / \Sigma \text{Số cây đo đếm}) \quad (2.33)$$

Đánh giá sự khác biệt giữa các công thức thí nghiệm từ các chỉ tiêu theo dõi bằng tiêu chuẩn Kruskal-Wallis để xác định công thức tốt nhất. (Bảo Huy, 2017) [15].

2.3.5. Phương pháp nghiên cứu kỹ thuật trồng và chăm sóc cây Thủy tùng

2.3.5.1. Đánh giá một số mô hình trồng Thủy tùng trồng tập trung tại Tây Nguyên

Thủy tùng được trồng năm 2023 trên 4 mô hình:

- Thủy tùng trồng trên đất có canh tác cây nông nghiệp gần ngày tại Gia Lai. Mật độ: 450 cây/ha (cự ly 4,7 x 4,7 m) đối với cây Thủy tùng. Diện tích trồng: 01 ha. Loài cây trồng xem gồm: Năm thứ nhất sau khi trồng Thủy tùng, trồng xen Khoai lang (*Ipomoea batatas* (L.) Lam) 4 tháng (từ tháng 6 – 10). Đến tháng 1 năm sau đã trồng xen ớt (*Capsicum frutescens* L.), thời gian canh tác 12 tháng.
- Thủy tùng xen với cây Mắc ca (*Macadamia integrifolia* Maiden & Betche) 5 năm tuổi tại Lâm Đồng. Mật độ: 225 cây/ha (cự ly 4,7 x 4,7 m) đối với mỗi loài Thủy tùng và Mắc ca. Diện tích trồng: 01 ha.
- Thủy tùng theo lỗ trống dưới tán rừng Thông ba lá (*Pinus kesiya* Royle ex Gordon) 44 năm tuổi tại Lâm Đồng. Diện tích lỗ trống: từ 1000 m² trở lên. Diện

tích trồng: 0,5 ha.

- Thủy tùng theo lỗ trống dưới tán rừng Bạch đàn (*Eucalyptus microcorys* F.Muell.) 63 năm tuổi tại Lâm Đồng. Diện tích lỗ trống: từ 1.000 m² trở lên. Diện tích trồng: 0,2 ha.

Xác định điều kiện lập địa trồng Thủy tùng:

- Thu thập các dữ liệu về khí hậu (từ 2019 – 2023): Nhiệt độ không khí trung bình hàng năm, tổng lượng mưa trung bình hàng năm và số tháng có lượng mưa ≥ 60 mm (theo Köppen–Geiger climate classification, tháng khô có lượng mưa < 60 mm) từ niên giám thống kê năm 2023 của Cục thống kê tỉnh Lâm Đồng và tỉnh Gia Lai
- Thu thập các dữ liệu về đất: Độ cao so với mực nước biển: Đo bằng máy GPSMAP 78; Độ dốc: Đo bằng máy Sunto; Loại đất: Theo hệ thống phân loại FAO – UNESCO; Độ dày tầng đất: Đo bằng thước dây có kẻ vạch đến mm; Thành phần cơ giới đất, độ pHKCl và hàm lượng Hữu cơ tổng số (%), N tổng số (%), P₂O₅ dễ tiêu (mg/100g), K₂O dễ tiêu (mg/100g): Phân tích tại Viện Khoa học Nông Lâm nghiệp Tây Nguyên.

Thời gian theo dõi: 12 tháng.

Phương pháp điều tra: Điều tra theo mẫu. Trên mỗi mô hình, đo đếm 50 cây đại diện, không lặp lại.

Phương pháp thu thập số liệu: Tỷ lệ sống: Đếm số cây sống; Sinh trưởng đường kính gốc (D_0 - mm): Đo bằng thước kẹp Panme có độ chính xác đến 0,1 mm; Chiều cao cây (H_{vn} - cm): Đo bằng thước dây có kẻ vạch đến mm.

Phương pháp xử lý số liệu

$$+ \text{Tỷ lệ sống} = (\Sigma \text{Số cây sống} / \Sigma \text{Số cây trồng}) \times 100\% \quad (2.34)$$

+ Sinh trưởng đường kính gốc (D_0), chiều cao (H_{vn}) trung bình theo thời gian:

$$D_{0TB} = (\Sigma \text{Số } D_0 / \Sigma \text{Số cây đo đếm}) \quad (2.35)$$

$$H_{TB} = (\Sigma \text{Số } H_{vn} / \Sigma \text{Số cây đo đếm}) \quad (2.36)$$

2.3.5.2. Nghiên cứu ảnh hưởng của độ tàn che đến sinh trưởng cây trồng Thủy tùng

Phương thức trồng: Trồng vào lỗ trống, cách gốc cây gỗ lớn 4 – 5 m.

Cây trồng trên các ụ đất nhân tạo, đảm bảo nước ngập như nhau, và không ngập lên gốc cây vào mùa nước cao nhất trong năm. Đất: Là đất thịt, thoát nước tốt. Đất được sàng qua lỗ sàng 1 cm để loại bỏ tạp chất trước khi trộn giá thể và được khử trùng bằng thuốc tím (KMnO_4) nồng độ 0,1% với lượng phun 10 lít trên 100m^2 . Xơ dừa: Sử dụng loại xơ dừa ECO N1, với thành phần $\text{N} \geq 0,15\%$; $\text{P}_2\text{O}_5 \geq 0,06\%$; $\text{K}_2\text{O} \geq 0,07\%$; $\text{CaO} = 2,2 \text{ mg/kg}$; Axit Humic: 0,41%; pH: 6,0 - 6,5; EC: 1,2 - 1,8 mS/cm; Độ ẩm: $50 \pm 5\%$; Màu sắc: Nâu sẫm. Phân hữu cơ: Là loại phân bò hoai. Với tỷ lệ: 70% đất + 20% xơ dừa + 10% phân hữu cơ.

Các công thức độ tàn che: $\leq 0,25$; $> 0,25 - 0,50$; $> 0,50 - 0,75$; $> 0,75$; số cây trồng theo mỗi độ tàn che là 25 cây.

Thời gian nghiên cứu: 18 tháng. Dung lượng mẫu: 98 cây.

Chăm sóc cây trồng: Phát dọn thực bì, làm cỏ quanh gốc cây 3 tháng 1 lần.

Phương pháp thu thập số liệu: Tỷ lệ sống: Đếm số cây sống; Sinh trưởng đường kính gốc (D_0 - mm): Đo bằng thước kẹp Panme có độ chính xác đến 0,1 mm; Chiều cao cây (H_{vn} - cm): Đo bằng thước dây có kẻ vạch đến mm; Phẩm chất cây phân theo 3 cấp a: Cây khỏe mạnh, xanh tốt, có chồi mới phát sinh; b: Cây khỏe mạnh, xanh tốt, không có chồi mới phát sinh; c: Cây vàng lá, không có chồi mới phát sinh. Ghi chú các cây bị chết, khô/cụt ngọn, sâu bệnh hại, ...

Phương pháp xử lý số liệu

$$+ \text{Tỷ lệ sống} = (\Sigma \text{Số cây sống} / \Sigma \text{Số cây trồng}) \times 100\% \quad (2.37)$$

+ Sinh trưởng đường kính gốc (D_0), chiều cao (H_{vn}) trung bình theo thời gian:

$$D_{0TB} = (\Sigma \text{Số } D_0 / \Sigma \text{Số cây đo đếm}) \quad (2.38)$$

$$H_{TB} = (\Sigma \text{Số } H_{vn} / \Sigma \text{Số cây đo đếm}) \quad (2.39)$$

Đánh giá sự khác biệt giữa các công thức thí nghiệm từ các chỉ tiêu theo dõi bằng tiêu chuẩn Kruskal-Wallis để xác định công thức tốt nhất. (Bảo Huy, 2017) [15].

2.3.5.3. Ảnh hưởng của phân bón tới sinh trưởng của cây Thủy tùng

Phương pháp bố trí thí nghiệm: Thí nghiệm 1 nhân tố theo phương pháp ngẫu nhiên đầy đủ với 5 công thức bón phân, mỗi công thức được lặp lại 3 lần. Mỗi công thức bón phân chia làm 2 lần, lần đầu bón sau khi trồng 3 tháng, lần 2 bón sau lần đầu 9 tháng với loại phân và lượng phân mỗi lần bón được thể hiện ở bảng 2.9. Dung lượng mẫu: 50 cây/công thức.

Thời gian nghiên cứu: 12 tháng.

Bảng 2.9. Công thức loại phân, lượng phân

Công thức thí nghiệm	Loại phân, lượng phân (g/cây)
BP1	27 g urê + 175g supe lân + 25 g kali (Tương đương 12,5 g N + 12,5 g P + 12,5 g K)
BP2	27 g urê + 350 g supe lân + 25 g kali (Tương đương 12,5 g N + 25 g P + 12,5 g K)
BP3	54 g urê + 175 g supe lân + 25 g kali (Tương đương 25 g N + 12,5 g P + 12,5 g K)
BP4	54 g urê + 350 g supe lân + 25 g kali (Tương đương 25 g N + 25 g P + 12,5 g K)
Đối chứng (DC)	Không bón

Phương pháp thu thập số liệu: Tỷ lệ sống: Đếm số cây sống; Sinh trưởng đường kính gốc (D_0 - mm): Đo bằng thước kẹp Panme có độ chính xác đến 0,1 mm; Chiều cao cây (H_{vn} - cm): Đo bằng thước dây có kẻ vạch đến mm; Phẩm chất cây phân theo 3 cấp a: Cây khỏe mạnh, xanh tốt, có chồi mới phát sinh; b: Cây khỏe mạnh, xanh tốt, không có chồi mới phát sinh; c: Cây vàng lá, không có chồi mới phát sinh. Ghi chú các cây bị chết, khô/cụt ngọn, sâu bệnh hại, ...

Phương pháp xử lý số liệu

+ Tỷ lệ sống = $(\Sigma \text{Số cây sống} / \Sigma \text{Số cây trồng}) \times 100\%$ (2.40)

+ Sinh trưởng đường kính gốc (D_0), chiều cao (H_{vn}) trung bình theo thời gian:

$$D_{0TB} = (\Sigma \text{Số } D_0 / \Sigma \text{Số cây đo đếm}) \quad (2.41)$$

$$H_{TB} = (\Sigma \text{Số } H_{vn} / \Sigma \text{Số cây đo đếm}) \quad (2.42)$$

Đánh giá sự khác biệt giữa các công thức thí nghiệm từ các chỉ tiêu theo dõi bằng tiêu chuẩn Kruskal-Wallis để xác định công thức tốt nhất (Bảo Huy, 2017) [15].

2.3.6. Phương pháp nghiên cứu đề xuất một số biện pháp bảo tồn nguồn gen Thủy tùng tại Tây Nguyên

Dựa trên các tài liệu kế thừa và kết quả nghiên cứu về thực trạng quần thể Thủy tùng; đa dạng di truyền nguồn gen; biện pháp kỹ thuật nhân giống và gây trồng đề xuất một số biện pháp bảo tồn loài Thủy tùng tại Tây Nguyên.

Chương 3

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

3.1. Thực trạng quần thể Thủy tùng tại Tây Nguyên

3.1.1. Thực trạng quần thể Thủy tùng tự nhiên

❖ Đánh giá thực trạng lâm phần

Tại Ea Drăng, thành phần cây gỗ lớn gồm 20 loài (chi tiết ở Phụ lục 1). Trong đó Thủy tùng có mật độ 70 cây/ha, chiếm 6,82% tổng số cây gỗ xuất hiện trên 1 hecta, với tần suất xuất hiện là 6,25% tần suất xuất hiện của tất cả các loài trong lâm phần. Công thức tổ thành loài cây gỗ tại Ea Drăng nơi có Thủy tùng phân bố:

29,96% Trôm Pierre + 18,60% Bùl trung bộ + 13,50% Vừng + 7,41% Thủy tùng + 3,91% Ba gạc + 3,55% Sóc lông + 3,22% Cà chắt + 3,08% Bùl sp + 3,05% Trâm kiền kiền + 13,74% Loài khác.

Thành phần tầng cây dưới tán gồm 11 loài (chi tiết ở Phụ lục 2), trong đó 7 loài có chỉ số quan trọng $IV\% > 3$. Từ đây, xây dựng được công thức tổ thành tầng cây dưới tán như sau:

28,81% Vừng + 23,16% Trôm Pierre + 20,84% Bùl trung bộ + 5,14% Ba gạc + 5,01% Sến đương + 4,98% Bời lời cuống dài + 4,44% Sóc lông + 7,62% Loài khác.

Thành phần cây bụi chủ yếu gồm: Trôm pierre (*Sterculia pierre* Gagnep), Vừng (*Careya sphaerica* Roxb), Ba gạc (*Melicope aff. Triphylla*), Trâm kiền kiền (*Syzygium aff. syzygioides* (Miq.) Merr. & Perry), Bùl trung bộ (*Ilex annamensis* Tardieu), Cỏ lào (*Eupatorium odoratum* L), Mua lá tròn (*Melastoma candidum* D. Don).

Thực bì gồm các loài chính: Choại (*Stenochlaena palustris* Burm. f. Bedd), Môn (*Aglaonema* sp), Nắp ấm (*Nepenthes mirabilis* (Lour.) Druce), Sung leo (*Ficus laevis*), Mây nước (*Calamus palustris*), Đầu riều (*Floscopa glomerulata*),

Bướm bạc (*Mussaenda dinhensis* Pierre ex Pitard), Bòng bòng lá mác (*Lygodium microphyllum*), Rau tàu bay (*Erechtites valerianaefolia* (Wolf.) DC), Dây hoàng đằng (*Fibraurea* sp), Bòng bong leo (*Lygodium japonicum*), Dừa rừng (*Pandanus multirupaceus*), Chóc gai (*Scirpus mucronatus*), Cầm cù (*Hoya diversifolia*).

Tại Krông Năng, thành phần cây gỗ lớn gồm 10 loài (chi tiết Phụ lục 3). Trong đó, Thủy tùng có mật độ 2 cây/ha, chiếm 0,94% tổng số cây gỗ xuất hiện trên 1 hecta, với tần suất xuất hiện là 10,00% tần suất xuất hiện của tất cả các loài trong lâm phần. Công thức tổ thành loài cây gỗ tại Krông Năng nơi có Thủy tùng phân bố:

29,50% Trâm rừng + 19,49% Bùai trung bộ + 13,71% Vừng + 13,63% Trâm Pierre + 8,99% Thủy tùng + 7,01% Sến đương + 8,21% Loài khác.

Kết quả điều tra cho thấy, tại Krông Năng không xuất hiện tầng cây dưới tán. Thành phần thực bì chính gồm các loài như Bòng bong leo (*Lygodium japonicum*), Cầm cù (*Hoya diversifolia*), Cầm cù (*Hoya diversifolia*), Cói mũi dùi (*Scirpus mucronatus*), Nhĩ cán (*Utricularia* sp.), Cỏ năn (*Eleocharis* sp); Cói dùi mũi (*Scirpus mucronatus* L.), Rau mương (*Ludwigia perennis*), Cỏ hôi (*Ageratum conyzoides* L.).

Kết quả phân tích cho thấy sự thay đổi về đa dạng thành phần loài cây gỗ lớn tại hai khu vực là Ea Drăng và Krông Năng qua thời gian: tại Ea Drăng đa dạng thành phần loài cây gỗ lớn đã tăng lên 20 loài, cấu trúc tổ thành loài cũng có sự thay đổi với mật độ Thủy tùng chiếm 6,82%, với tần suất xuất hiện là 6,25% so với kết quả đánh giá thực trạng lâm phần năm 2011 (Trần Vinh, 2011)[35] chỉ có 10 loài, trong đó, mật độ Thủy tùng chiếm 54,32%, với tần suất xuất hiện chiếm 15% tần suất xuất hiện của tất cả các loài trong lâm phần. Ngược lại, tại Krông Năng đa dạng thành phần loài cây gỗ lớn giảm chỉ còn 10 loài so với năm 2011 là 13 loài.

❖ Thực trạng quần thể tự nhiên

Hiện nay quần thể Thủy tùng tự nhiên ở Việt Nam chỉ còn lại tại xã Ea Drăng

và xã Krông Năng, tỉnh Đắk Lắk.

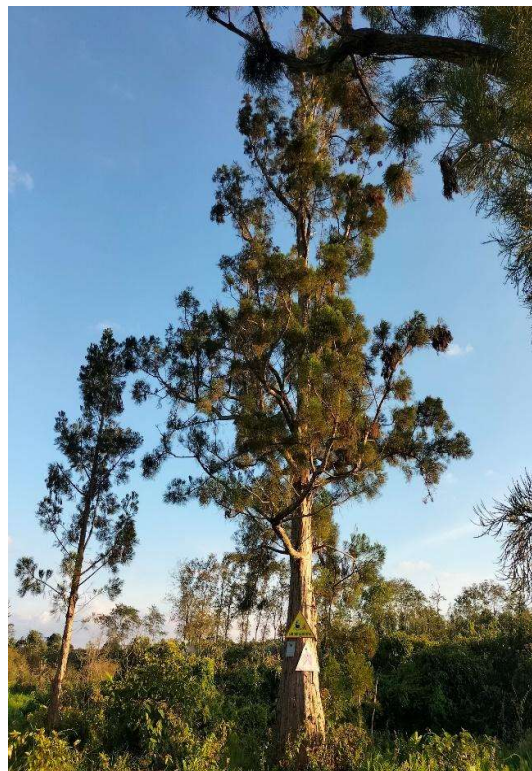
Tại Ea Drăng, có 141 cây, phân bố tập trung trong khu bảo tồn nghiêm ngặt thuộc Ban quản lý Khu bảo tồn loài – Sinh cảnh Thông nước, tọa độ UTM x: 463349 - 465373; y: 1463061 - 1463147, ở độ cao từ 550 đến 582 m so với mặt nước biển, chủ yếu sinh sống trên đất ngập nước (12 tháng/năm) với độ dày tầng mùn cao (trên 1m), thực bì dày (chiếm 64,08% tổng số lượng cá thể). Đây là khu vực Thủy tùng còn nhiều nhất so với các điểm phân bố khác.

Tại Krông Năng, có 18 cây, trong đó có 14 cây phân bố tập trung trong khu bảo tồn nghiêm ngặt thuộc Trạm Quản lý Bảo vệ Thông nước Trấp Ksor, và 4 cây phân tán rải rác trong vườn hộ gia đình, tọa độ UTM x: 475525 - 479201; y: 1429860 – 1437759, ở độ cao từ 713 đến 742 m so với mặt nước biển.

Như vậy số lượng cá thể trong quần thể Thủy tùng tại Việt Nam còn lại là 159 cây.



Hình 3.1. Quần thể Thủy tùng tự nhiên tại Ea Drăng



Hình 3.2. Cây Thủy tùng tự nhiên tại Krông Năng

Theo Nguyễn Hoàng Nghĩa (1997) [23], số lượng cá thể Thủy tùng tại Krông Năng là 32 cây. Như vậy trong vòng 25 năm, số lượng cây tại khu vực này đã giảm 14 cây. Theo Bảo Huy (2010) [14], số lượng cây Thủy tùng tự nhiên tại Tây Nguyên năm 2010 là 254 cây, đến cuối năm 2012 số lượng còn lại 162 cây.

Mặc dù từ năm 2011 đã thành lập Ban quản lý Khu bảo tồn loài-sinh cảnh Thông nước theo Quyết định số 760/ QĐ-UBND ngày 24/3/2011 của Ủy ban nhân dân tỉnh Đắk Lắk và tình trạng chặt phá bất hợp pháp đã chấm dứt nhưng số lượng cá thể vẫn bị suy giảm từ 162 cây còn 159 cây, trong đó tại Ea Drăng giảm 1 cây và tại Krông Năng giảm 2 cây. Kết quả điều tra năm 2022 cho thấy hoạt động canh tác nông nghiệp tập trung ở khu vực xung quanh dẫn đến phân bón và thuốc bảo vệ thực vật đều chảy xuống hồ đã tác động đến môi trường nước cũng có thể dẫn đến Thủy tùng bị chết hoặc suy giảm chất lượng.

Kết quả điều tra phẩm chất cây Thủy tùng tại 2 khu vực phân bố tự nhiên vào tháng 6 năm 2022 được thể hiện ở Bảng 3.1.

Bảng 3.1. Chất lượng cây Thủy tùng tự nhiên tại tỉnh Đắk Lắk (6/2022)

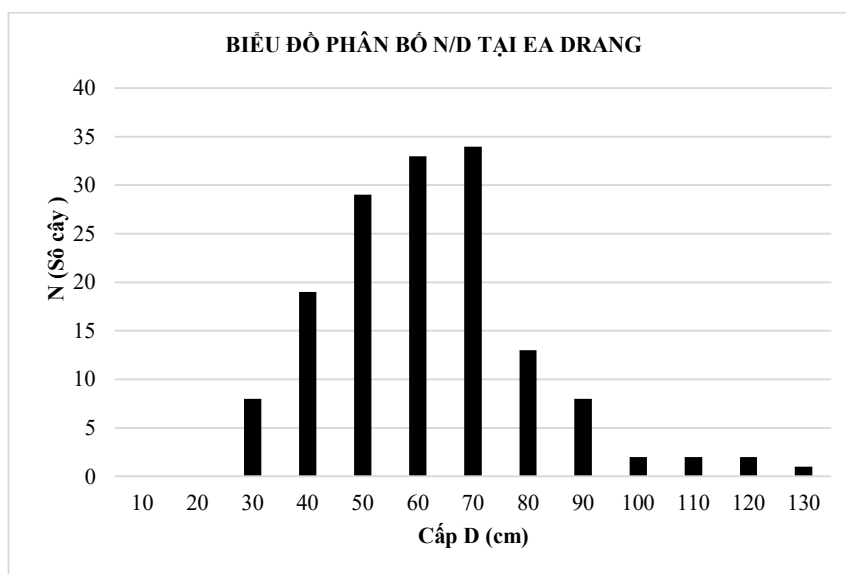
Chỉ tiêu quan sát		Khu vực Ea Drăng		Khu vực Krông Năng	
		Số lượng (cây)	Tỷ lệ (%)	Số lượng (cây)	Tỷ lệ (%)
Phẩm chất	Tốt	131	86,75	7	38,89
	Trung bình	17	11,26	4	22,22
	Xấu	3	1,99	7	38,89
Phát sinh chồi mới	Có chồi mới	150	99,34	18	100,00
	Không có chồi mới	1	0,66	-	-
Nón đực	Có nón	121	80,13	12	66,67
	Không có nón	30	19,87	6	33,33
Quả nón	Có quả	105	69,54	13	72,22
	Không có quả	46	30,46	5	27,78

Từ bảng 3.1 cho thấy, hầu hết các cá thể trong quần thể tại Ea Drăng đều có triển vọng sinh trưởng: Tỷ lệ cây có phẩm chất tốt cao (chiếm 86,75%) và hầu hết cây trong lâm phần này đều có phát sinh chồi mới (chiếm 99,34%). Tỷ lệ cây có ra nón đực cao (chiếm 80,13%), và ra quả nón (chiếm 69,54 %), tuy nhiên chưa ghi nhận cây con Thủy tùng tái sinh từ hạt trong lâm phần.

Tại Krông Năng, sinh trưởng của các cây Thủy tùng kém hơn lâm phần Ea Drăng. Phẩm chất của cây Thủy tùng khá thấp, chủ yếu là trung bình và xấu (chiếm 61,11%), tuy nhiên, 100% cây Thủy tùng trong lâm phần này đều có phát sinh chồi mới. Mặc dù cây vẫn ra nón đực (chiếm 66,67%) và ra quả nón (chiếm 72,22%), tuy nhiên cũng chưa ghi nhận cây con Thủy tùng tái sinh từ hạt trong lâm phần.

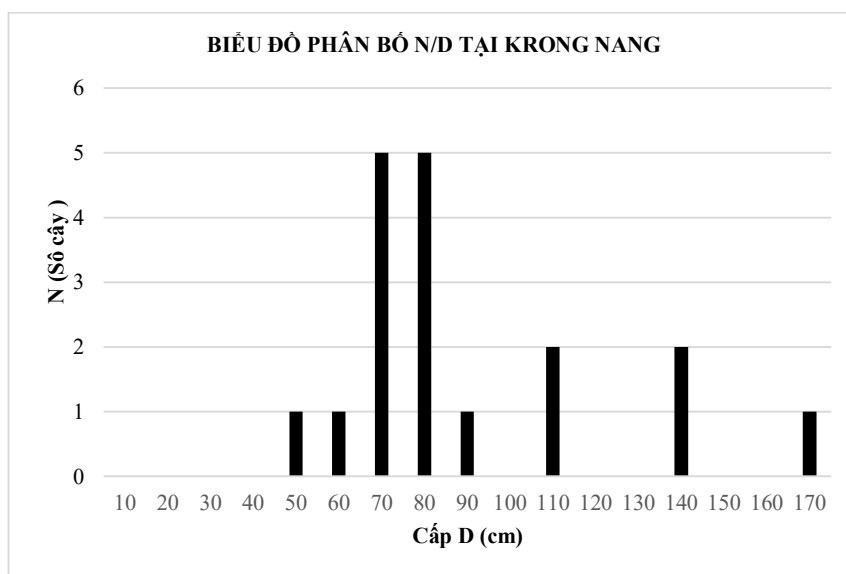
Như vậy, hầu hết các cá thể Thủy tùng đều có phát sinh chồi mới, đây là nguồn vật liệu tốt để tiếp tục nghiên cứu hoàn thiện và phát triển kỹ thuật nhân giống vô tính loài trước thực trạng cây Thủy tùng tự nhiên vẫn ra nón, vẫn có quả nón nhưng chưa ghi nhận cây tái sinh từ hạt trong lâm phần.

Nghiên cứu về cấu trúc quần thể Thủy tùng tự nhiên, kết quả cho thấy:



Hình 3.3. Biểu đồ phân bố số cây theo cấp kính tại Ea Drăng

Tại Ea Drăng, số lượng Thủy tùng còn lại trong lâm phần là những cây gỗ lớn có đường kính từ 30 cm trở lên đến 130 cm với đường kính trung bình của quần thể là 58,1 cm, trong đó cấp kính từ 30 cm đến 40 cm có 27 cây, chiếm 17,88%. Phần lớn các cây tập trung ở cấp kính từ 50 cm đến 70 cm là 96 cây chiếm 63,58%. Ở các cấp kính từ 80 cm đến 90 cm có 21 cây, chiếm 13,91%. Từ cấp kính từ 100 cm trở lên có 7 cây chiếm 4,64%. Bên cạnh đó, sự thiếu hụt cây ở các cấp kính 10 cm và 20 cm, và các cấp kính từ 30 cm đến 70 cm có xu hướng tăng dần cho thấy lâm phần đang thiếu nhóm cây nhỏ do không có cây con tái sinh. Kết quả điều tra 2011 (Trần Vinh, 2011) [35] cho thấy cấu trúc phân bố số cây theo cấp kính của loài trong lâm phần này có dạng lệch trái với tỷ lệ cây có đường kính từ 20 – 40 cm là 115 cây chiếm tỷ lệ 52,5%. Về sinh trưởng chiều cao, trong lâm phần có 121 cây Thủy tùng có chiều cao từ 16 đến 18 m, chiếm 80,13%. Như vậy hiện nay quần thể Thủy tùng này đang già đi và thiếu hụt lớp cây nhỏ thay thế. Do đó để bảo tồn quần thể này, bên cạnh việc bảo vệ nghiêm ngặt các cây Thủy tùng tự nhiên, việc trồng bổ sung số lượng cá thể vào quần thể là rất cần thiết.



Hình 3.4. Biểu đồ phân bố số cây theo cấp kính tại Krông Năng

Kết quả điều tra cho thấy, quần thể Thủy tùng tại Krông Năng cũng còn lại với những cây ở cấp kính lớn từ 50 cm trở lên đến 170 cm, với đường kính trung bình của quần thể là 86,7 cm, lớn hơn lâm phần ở Ea Drăng, tuy nhiên số cây còn lại trong lâm phần là rất ít, các cấp kính từ 10 cm đến 40 cm, 100 cm, 120 cm, 130 cm, 150 cm và 160 cm không có cây. Các cấp kính từ 50 cm đến 90 cm có 13 cây chiếm 72,22%. Các cấp kính còn lại chỉ từ 1 đến 2 cây chiếm 27,78%. Sự thiếu hụt cây ở các cấp kính nhỏ cũng như sự phân bố rải rác ở các cấp kính cho thấy trong quần thể không có cây Thủy tùng tái sinh, bên cạnh đó quần thể đã bị tác động mạnh, dẫn đến cấu trúc phân bố bị phá vỡ, không theo quy luật. So sánh với báo cáo của Trần Vinh (2011) [35] với số cây ở các cấp kính 40 cm đến 70 cm là 18 cây chiếm tỷ lệ 60%, các cấp kính từ 100 cm đến 150 cm chỉ từ 1 đến 3 cây chiếm tỷ lệ 40%. Bên cạnh đó, nghiên cứu sinh trưởng chiều cao của Thủy tùng trong lâm phần này cũng cho thấy, hầu hết cây có chiều cao từ 16 đến 18 m, chiếm 66,67%. Như vậy, Thủy tùng tại lâm phần này cũng không chỉ bị tác động mạnh về cấu trúc phân bố mà còn đang ngày một già đi. Do đó, bên cạnh việc bảo vệ nghiêm ngặt cá thể hiện tại, việc trồng bổ sung để tăng số lượng cá thể vào quần thể cũng như nghiên cứu điều kiện môi trường sống là nhu cầu cấp thiết để bảo tồn quần thể Thủy tùng này.

3.1.2. Thực trạng gây trồng Thủy tùng ở Tây Nguyên

Thủy tùng được trồng tại khu bảo tồn loài Thủy tùng tại xã Ea Drăng và xã Krông Năng, tỉnh Đắk Lắk, và trồng sưu tập, trồng làm cảnh tại các hộ gia đình trên toàn Tây nguyên từ những năm 2000 – 2022 là 200 cây. Trong đó, cây trồng từ hom là 36 cây và cây trồng từ cây ghép trên cây bụt mọc là 164 cây. Phần lớn các cây trồng đều sinh trưởng phát triển tốt. Các cây ghép trên gốc Bụt mọc có sinh trưởng tốt (chiếm 81,71%). Bên cạnh đó, cây trồng có nguồn gốc từ giâm hom cũng sinh trưởng tốt đạt 55,56%, tỷ lệ cây sinh trưởng xấu chỉ

2,78%. Kết quả này cho thấy phương pháp nhân giống bằng hom hay ghép trên Bụt mọc đem lại hiệu quả cao để gây trồng và bảo tồn loài cây này.

Bảng 3.2. Sinh trưởng và chất lượng của Thủy tùng trong một số mô hình trồng phân tán tại Tây Nguyên

Stt	Địa điểm	Số cây	Tuổi	D _{1,3} (cm)	H _{vn} (m)	Phẩm chất (cây)			Ghi chú
						Tốt	TB	Xấu	
1	Nguồn gốc cây con: Ghép trên gốc Bụt mọc								
1.1	xã Ea Drăng, tỉnh Đắk Lắk.	9	8	15,48 ± 2,07	9,28 ± 0,56	8	1	-	Khu vực ngập theo mùa
1.2	xã Ea Drăng, tỉnh Đắk Lắk.	8	8	19,81 ± 2,40	9,98 ± 0,93	8	-	-	Gần mương nước
1.3	xã Krông Năng, tỉnh Đắk Lắk.	51	10	9,42 ± 0,62	4,85 ± 0,26	26	20	5	Khu vực ngập nước
1.4	xã Ea Drăng, tỉnh Đắk Lắk.	2	9	21,50 ± 2,50	10,75 ± 0,25	2	-	-	Gần bờ ao
1.5	phường Tân Lập, tỉnh Đắk Lắk.	30	10	28,00 ± 2,34	11,75 ± 0,67	30	-	-	Trên đất bằng, có tưới ẩm
1.6	phường Tân Lập,	10	1,5	3,15 ± 0,31	2,28 ± 0,35	6	4	-	Gần mương nước

Stt	Địa điểm	Số cây	Tuổi	D _{1,3} (cm)	H _{vn} (m)	Phẩm chất (cây)			Ghi chú
						Tốt	TB	Xấu	
tỉnh Đắk Lắk.									
1.7	xã Quảng Phú, tỉnh Đắk Lắk.	4	2	3,25 ± 0,43	2,50 ± 0,20	4	-	-	Trên đất bằng, có tưới ẩm
2 Nguồn gốc cây con: Giâm hom									
2.1	phường Hội Phú, tỉnh Gia Lai.	11	9	5,27 ± 0,46	3,59 ± 0,20	8	2	1	Trên đất bằng, ít tưới ẩm
2.2	xã Ia Hrug, tỉnh Gia Lai.	3	8	22,17 ± 1,92	9,67 ± 0,17	3	-	-	Gần nguồn nước thải sinh hoạt gia đình
2.3	phường Xuân Hương – Đà Lạt, tỉnh Lâm Đồng.	3	22	6,27 ± 2,19	4,47 ± 1,29	3	-	-	Trên đất bằng, ít tưới ẩm
2.4	phường Cam Ly – Đà Lạt, tỉnh Lâm Đồng.	11	22	13,31 ± 0,95	5,40 ± 0,17	2	11	-	Trên mô đất nổi ở giữa ao nước.

Stt	Địa điểm	Số cây	Tuổi	D _{1,3} (cm)	H _{vn} (m)	Chất lượng (cây)			Ghi chú
						Tốt	TB	Xấu	
2.5	Phường Cam Ly – Đà Lạt, tỉnh Lâm Đồng.	1	5	8,6	8,5	1	-	-	Gần nương nước.

Sai số: là số sau dấu $\pm$

Những cây Thủy tùng trồng gần nguồn nước như bờ nương, bờ ao hay nguồn nước thải sinh hoạt gia đình, phần lớn cây có sinh trưởng tốt. Cụ thể tại xã Ea Drăng, Đăk Lăk, cây trồng ngay gần nương nước, sau 8 năm tuổi, đường kính ngang ngực đạt 19,81 cm và chiều cao vút ngọn đạt 9,98 m. Khi Thủy tùng được trồng ở bờ ao tại Ea Drăng, Đăk Lăk, sau 9 năm, đường kính ngang ngực trung bình đạt 21,5 cm và chiều cao đạt 10,75 m. Khi Thủy tùng được trồng ngay nương nước thải sinh hoạt của gia đình, tại xã Ia Hrun, tỉnh Gia Lai, sau 8 năm tuổi, Thủy tùng cũng đạt sinh trưởng đường kính ngang ngực và chiều cao tốt với giá trị lần lượt là 22,17 cm và 9,67 m.

Những cây Thủy tùng trồng xa nguồn nước, nhưng được tưới ẩm thường xuyên vào mùa khô, cây vẫn sinh trưởng tốt. Cụ thể, tại xã Quảng Phú, tỉnh Đăk Lăk, chỉ sau 2 năm trồng, đường kính ngang ngực trung bình 3,25 cm và chiều cao vút ngọn trung bình 2,50 m. Sau 10 năm, Thủy tùng trồng tại phường Tân Lập, tỉnh Đăk Lăk, đường kính ngang ngực trung bình đạt 28,00 cm và chiều cao vút ngọn trung bình đạt 11,75 m.

Khi trồng Thủy tùng ở vùng ngập nước thường xuyên, cây sinh trưởng chậm hơn so với cây trồng gần nguồn nước như bờ nương, bờ ao. Cụ thể, cây trồng tại vị trí ngập nước thường xuyên tại xã Ea Drăng, Đăk Lăk, đường kính ngang

ngực chỉ đạt 15,48 cm và chiều cao vút ngọn là 9,28 m. Chỉ tiêu này thấp hơn so với cây trồng gần nương nước trong cùng một thời điểm, với cùng nguồn vật liệu.

Từ kết quả điều tra cho thấy, để mở rộng phát triển loài Thủy tùng ở Tây Nguyên, có thể trồng Thủy tùng ở những nơi gần nguồn nước, hoặc nơi chủ động nguồn nước tưới để đảm bảo lượng nước cho cây sinh trưởng tốt vào mùa khô.



Hình 3.5. Thủy tùng trồng tại Tây Nguyên

- a. Cây 1,5 tuổi tại phường Tân Lập, tỉnh Đắk Lắk
- b. Cây 8 năm tuổi tại xã Ea Drăng, tỉnh Đắk Lắk
- c. Cây 21 năm tuổi tại Phường Cam Ly – Đà Lạt, tỉnh Lâm Đồng

❖ **Tình hình sâu hại trên Thủy tùng**

Kết quả điều tra đã ghi nhận loài sâu đục thân *Zeuzera multistrigata* Moore, (thuộc bộ Lepidoptera, họ Cossidae) gây hại trên các cây Thủy tùng ghép trên gốc Bụt mọc 10 năm tuổi, cây trồng từ hom 10 năm tuổi và cây ghép trên rễ thối 2 năm tuổi tại 2 khu vực xã Krông Năng và xã Ea Drăng. Mức độ thiệt hại do sâu đục thân gây ra ở 2 khu vực xã Krông Năng và xã Ea Drăng là khác

nhau. Ở khu vực Krông Năng mức độ thiệt hại nặng ($2 < DI \leq 3$) với tỷ lệ cây bị hại $P\% = 94,1\%$ và chỉ số hại trung bình $DI = 2,18$. Ngược lại, ở khu vực Ea Drăng mức độ thiệt hại nhẹ ($0 < DI \leq 1$) với $P\% = 14,29\%$ và $DI = 0,14$. Nguyên nhân của sự khác biệt này là do ở khu vực Krông Năng có thể do sự lây lan mạnh mẽ của sâu đục thân từ vườn cây công nghiệp và cây nông nghiệp sang rừng Thủy tùng.

Sâu đục thân thuộc giống *Zeuzera* là một trong những loài côn trùng gây hại nguy hiểm trên các loài cây trồng (Chi và cộng sự 2022a) [42], (Chi và cộng sự 2022b) [43], (Fekrat và Farashi 2022) [56], (Chi và cộng sự 2023b) [46]. Trong đó loài *Z. multistrigata* đã được ghi nhận gây hại trên các loài cây công nghiệp và nông nghiệp như: Phi lao (*Casuarina equisetifolia*) ở Trung Quốc (Jinshui và cộng sự 1988) [68], gây hại 2 loài *Persea Bombycina* và *Litsaea polyantha* ở Ấn Độ (Baruah và Saikia 2020) [39]. Ở Việt Nam, *Z. multistrigata* đã hại nghiêm trọng đối với các loài bạch đàn *Eucalyptus* spp (Chi và cộng sự 2022a) [42]. Do đó, việc quản lý loài sâu hại này rất cần được quan tâm để có thể bảo tồn và phát triển thành công cây Thủy tùng tại Việt Nam.



Hình 3.6. Triệu chứng của sâu đục thân *Zeuzera multistrigata* gây hại trên Thủy tùng

3.2. Đánh giá đa dạng di truyền cây Thủy tùng

Phân tích đa dạng di truyền của toàn bộ cá thể Thủy tùng tự nhiên làm cơ sở cho việc đề xuất chiến lược bảo tồn là hoạt động có ý nghĩa khoa học và thực tiễn lớn cho việc bảo tồn và phát triển loài.

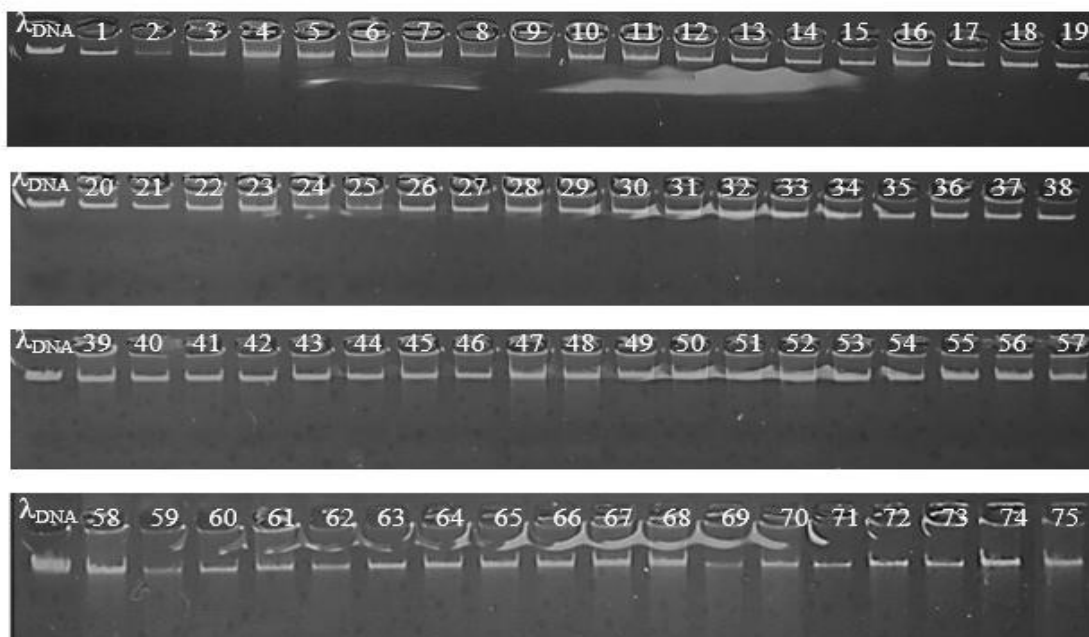


Hình 3.7. Mẫu lá Thủy tùng được sử dụng để nghiên cứu

3.2.1. Kết quả tách chiết DNA tổng số của các mẫu Thủy tùng

DNA tổng số của 163 mẫu Thủy tùng thu tại tỉnh Đắk Lắk được tách chiết và kết quả được kiểm tra trên bản gel agarose qua Hình 3.8. Kết quả thu được cho thấy, DNA tổng số của 163 mẫu Thủy tùng thu được có băng chính sáng, rõ nét, không bị đứt gãy.

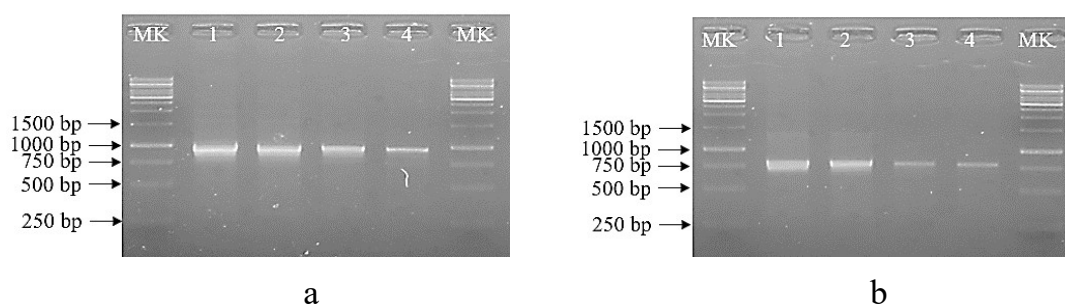
Nồng độ và độ tinh sạch của DNA tổng số 163 mẫu Thủy tùng thu tại tỉnh Đắk Lắk sau khi được kiểm tra và trình bày cụ thể ở Phụ lục 3. Kết quả thu được cho thấy, các mẫu đều có nồng độ $> 20 \text{ ng}/\mu\text{l}$, các chỉ số $\text{OD}_{260 \text{ nm}} / 280 \text{ nm}$ đạt giá trị bằng 1,8 - 2,0. Như vậy, các DNA tổng số mẫu Thủy tùng thu được đều có chất lượng tốt và đủ điều kiện để sử dụng cho các thí nghiệm nghiên cứu tiếp theo.



Hình 3.8. Kết quả điện di DNA tổng số của các mẫu Thủy tùng

3.2.2. Ứng dụng DNA barcode để giám định loài Thủy tùng

Lựa chọn mỗi quần thể nghiên cứu 2 mẫu DNA tiến hành khuếch đại vùng gen *rbcL* và *matK*. Tại vùng gen *rbcL* cho kích thước khoảng 900 bp và vùng *matK* có kích thước khoảng 750 bp (Hình 3.9).



Hình 3.9. Kết quả khuếch đại vùng gen

a. Vùng gen rbcL, b. Vùng gen matK

Tại vùng gen *rbcL*, kết quả cho thấy 4 mẫu được phân tích có rất ít sự sai khác về trình tự vùng gen phân tích nên có mức độ tương đồng cao về mặt di

truyền, dao động trong khoảng 99,6% đến 99,9%. Khi tiến hành so sánh trình tự thu được với ngân hàng gen thu được kết quả tương đồng đến 98,03% loài *Glyptostrobos pensilis* (mẫu JF725918.1) được phân tích tại vùng gen *rbcL*.

Đối với vùng gen *matK*, kết quả cho thấy 4 mẫu được phân tích có sự khác biệt về trình tự tại một số vị trí bị mất đoạn hay tại một số vị trí bị thay thế ở cuối trình tự. Mức độ tương đồng của 4 mẫu nghiên cứu cao (90%), dao động trong khoảng 98,5% đến 99,6% và khi so sánh với ngân hàng gen thu được kết quả tương đồng 89,85% *Glyptostrobos pensilis* (mẫu JN657263.1) được phân tích tại vùng gen *matK*. Kết quả này cho thấy các quần thể Thủy tùng ở Việt Nam và Thủy tùng tại Trung Quốc và Lào là cùng 1 loài. Do đó, trong chiến lược bảo tồn Thủy tùng, có thể nghiên cứu để di thực nguồn giống Thủy tùng từ các quần thể khác ở Trung Quốc hoặc Lào để làm tăng tính đa dạng di truyền.

3.2.3. Đánh giá đa dạng di truyền của quần thể Thủy tùng hiện có ở Việt Nam

3.2.3.1. Kết quả khuếch đại của chỉ thị ISSR

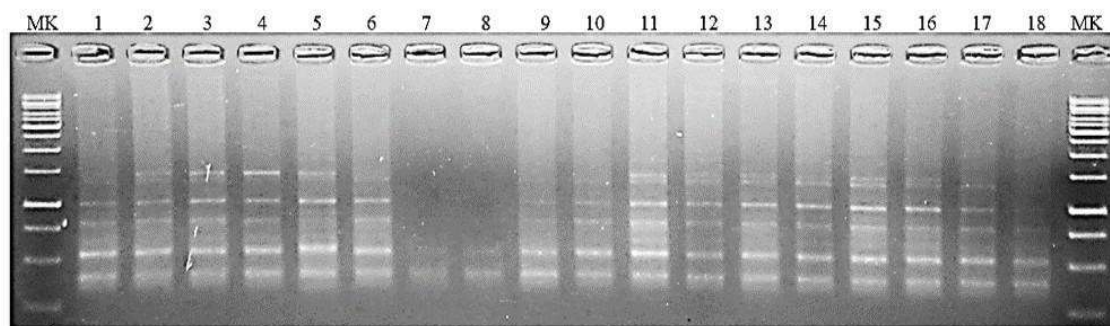
DNA tổng số sử dụng cho phản ứng ISSR được tinh sạch và pha loãng để làm khuôn cho phản ứng khuếch đại gen với 10 môi ISSR. Kết quả phân tích sản phẩm PCR trên gel agarose theo phương pháp điện di đã thu được 245 băng, trong đó có 198 phân đoạn đa hình chiếm tỷ lệ 80,81%.

Bảng 3.3. Mức độ đa hình của 10 môi ISSR

STT	Môi	PPB	PIC	N_a
1	UBC808	90,5	0,745	1,45
2	UBC811	87,5	0,734	1,46
3	UBC818	85,4	0,696	1,43
4	UBC823	84,7	0,675	1,42
5	UBC840	82,6	0,778	1,42
6	UBC843	80,4	0,648	1,39
7	UBC851	78,1	0,676	1,35
8	UBC855	75,6	0,637	1,32

STT	Môi	PPB	PIC	N_a
9	UBC856	74,8	0,568	1,31
10	UBC881	68,5	0,569	1,24
Trung bình		80,81	0,665	1,379

Các phân đoạn được nhân lên có kích thước dao động từ 300 bp đến 2100 bp, số phân đoạn mỗi chỉ thị đạt từ 8 đến 13 với trung bình đạt 11. Hình 3.10 là kết quả khuếch đại của một số mẫu sử dụng môi ISSR trên bản gel agarose thông qua chạy điện di.



Hình 3.10. Kết quả khuếch đại sử dụng môi UBC 856.

(MK: marker 1 Kb, 1-18: Mẫu DNA Thủy tùng đại diện)

3.2.3.2. Mức độ đa dạng di truyền quần thể Thủy tùng

Bảng 3.4 trình bày mức độ đa dạng di truyền của hai quần thể Thủy tùng được nghiên cứu bằng chỉ thị ISSR, trong đó quần thể Ea Drăng thể hiện sự đa dạng di truyền cao hơn so với quần thể Krông Năng. Giá trị trung bình của các chỉ số đa dạng di truyền của hai quần thể Thủy tùng lần lượt là $N_a = 1,767$; $N_e = 1,379$; $I = 0,365$; $H_e = 0,233$ và $PPB = 80,81\%$.

Số alen quan sát được (N_a) của quần thể Ea Drăng là cao nhất đạt 2,000 trong khi quần thể Krông Năng có số alen thấp hơn là 1,533. Bên cạnh đó, số alen có ý nghĩa (N_e) nằm trong khoảng 1,347 (Krông Năng) đến 1,417 (Ea Drăng) và có thể thấy ở cả hai quần thể nghiên cứu N_a luôn lớn hơn N_e . Hệ số

đa dạng di truyền N_{ei} của hai quần thể nằm từ 0,207 đến 0,260, hệ số Shannon nằm từ 0,321 đến 0,409.

Bảng 3.4. Thông số đa dạng di truyền của hai quần thể Thủy tùng nghiên cứu

Quần thể	Số mẫu	Chỉ số đa dạng di truyền				PPB (%)
		N_a	N_e	I	H_e	
Ea Drăng	144	2,000+0,000	1,417+0,049	0,409+0,030	0,260+0,023	94,05
Krông Năng	19	1,533+0,117	1,341+0,053	0,321+0,039	0,207+0,028	67,06
Trung bình		1,767+0,063	1,379+0,036	0,365+0,025	0,233+0,018	80,81

N_a – số alen quan sát được; N_e – số alen có ý nghĩa; H_e – hệ số đa dạng di truyền N_{ei} ; I – hệ số Shannon; PPB – phần trăm đa hình. Sai số: là số sau dấu $\pm$

So sánh với một số loài thông khác, tính đa dạng di truyền của Thủy tùng (sử dụng kỹ thuật ISSR, với 163 mẫu, $I = 0,365$) tương đương so với loài Thông hai lá dẹt (*Pinus krempfii*) tại Tây nguyên (sử dụng kỹ thuật SSR, với 70 mẫu, $I = 0,377$) [27] và thấp hơn nhiều so với Thông xuân nha (*Pinus cernua*) tại Sơn La (sử dụng kỹ thuật ISSR, với 71 mẫu, $I = 0,483$) [9].

Kết quả phân tích cấu trúc quần thể Thủy tùng (Bảng 3.5) nhận thấy hai quần thể nghiên cứu có tính đa dạng di truyền ở mức độ trung bình với chỉ số đa dạng nguồn gen trung bình trong hai quần thể $H_s = 0,2334$, chiếm 95,23% đa dạng nguồn gen của hai quần thể $H_T = 0,2451$. Chỉ số sai khác di truyền G_{ST} giữa hai quần thể được tính cho kết quả chỉ số G_{ST} đạt 0,0480 chứng tỏ chỉ có 4,80% (< 10%) sự sai khác di truyền giữa các mẫu nghiên cứu. Từ giá trị G_{ST} thu được, giá trị N_m được tính toán và đạt 9,9074 cho thấy giữa các mẫu và giữa hai quần thể Thủy tùng nghiên cứu có sự trao đổi gen lớn. Chỉ số này cao hơn kết quả nghiên cứu trước đây của Wu và cộng sự (2011) với loài Thủy tùng

thuộc quần thể tự nhiên ($N_m = 0,1238$) và quần thể trồng ($N_m = 0,1055$) tại Trung Quốc. Điều này có thể giải thích các cá thể Thủy tùng từ 2 quần thể tự nhiên ở nước ta có mối quan hệ tương đối gần gũi về mặt di truyền, có thể 2 quần thể hiện nay còn tồn tại có thể được phân chia từ 1 quần thể ban đầu, được phân tách do các tác nhân mất rừng.

Bảng 3.5. Các chỉ số đa dạng của hai quần thể Thủy tùng

Các thông số	Mean $\pm$ SD
Số lượng mẫu	163
H_T	$0,2451 \pm 0,0296$
H_S	$0,2334 \pm 0,0262$
G_{ST}	0,0480
N_m	9,9077

H_T – Chỉ số đa dạng nguồn gen của các quần thể, H_S – Chỉ số đa dạng gen trung bình trong quần thể, G_{ST} – Chỉ số sai khác di truyền N_{ei} giữa các quần thể, N_m – Chỉ số trao đổi gen giữa các quần thể. Sai số: là số sau dấu $\pm$

Kết quả phân tích AMOVA (Bảng 3.6) cho thấy hầu hết các cá thể đều nằm trong cùng quần thể, chiếm tới 94%.

Bảng 3.6. Phân tích phương sai phân tử của mẫu Thủy tùng

AMOVA	Tỷ lệ
Giữa các quần thể	6%
Trong quần thể	94%
PhiPT	$0,058, P \geq 0,001$

Đối với các loài cây rừng nói chung, mức độ sai khác về mặt phân tử gián tiếp phản ánh hệ thống sinh sản của loài và thường đối với các loài có hình thức sinh sản qua thụ phấn chéo thì giá trị AMOVA giữa các cá thể trong cùng một

quần thể là rất cao ($>75\%$). Thủy tùng là loài cây sinh sản hữu tính được thụ phấn nhờ gió và kết quả phân tích cho thấy mức độ sai khác về mặt phân tử giữa các cá thể trong cùng quần thể rất cao, đạt 94% nhưng mức độ sai khác giữa 2 quần thể nghiên cứu lại rất thấp. So với 4 quần thể Thông hai lá dẹt (*Pinus krempfii*) tại Tây nguyên, mức độ thay đổi phân tử giữa các quần thể là $11,94\%$ và giữa các thể trong quần thể là $88,06\%$ [27], hay so với 3 quần thể Bách xanh (*Calocedrus macrolepis*) tự nhiên tại Tây Nguyên, mức độ thay đổi phân tử giữa các quần thể là $36,33\%$ và giữa các thể trong quần thể là $63,67\%$ [18]. Chứng tỏ 2 quần thể Thủy tùng này có mức độ sai khác về mặt di truyền không cao. Bên cạnh đó, các cây Thủy tùng hiện nay ở nước ta phân bố rời rạc và nhiều cây bị chết, không xuất hiện cây tái sinh trong những năm gần đây và chất lượng hạt thu được kém. Vì vậy, trong thời gian tới ngoài việc bảo tồn tại chỗ các cây hiện có thì cần duy trì đa dạng di truyền và cải thiện khả năng sinh sản của loài này thông qua việc trồng cây mới và xây dựng vườn thực vật tập hợp các cá thể từ các quần thể tự nhiên khác nhau.

3.2.3.3. Mức độ tương đồng và khoảng cách di truyền giữa 2 quần thể Thủy tùng nghiên cứu

Các giá trị về mức độ tương đồng di truyền và khác biệt di truyền (khoảng cách di truyền) giữa hai quần thể nghiên cứu được đưa ra trong Bảng 3.7. Từ kết quả phân tích chỉ ra rằng giá trị về mức độ tương đồng di truyền giữa hai quần thể này là cao, lên tới $97,0\%$. Giá trị của sự khác biệt di truyền giữa hai quần thể Thủy tùng không lớn, chỉ đạt $0,031$.

Bảng 3.7. Khoảng cách di truyền (trên vạch) và mức độ tương đồng (dưới vạch)

Quần thể	Ea H'Leo	Krông Năng
Ea Drăng	-	0,031
Krông Năng	0,970	-

So sánh mức độ tương đồng di truyền của 2 quần thể Thủy tùng là 97,0%, cao hơn nhiều so với 5 quần thể Thông xuân nha (*Pinus cernua*) tại Sơn La (sử dụng kỹ thuật ISSR, với 71 mẫu) có mức độ tương đồng di truyền dao động từ 57,5% đến 84,2% [9], hay so với 4 quần thể Thông hai lá dẹt (*Pinus krempfii*) tại Tây nguyên (sử dụng kỹ thuật SSR, với 70 mẫu), có mức độ tương đồng di truyền dao động từ 59% đến 100% [27], và 3 quần thể Bách xanh (*Calocedrus macrolepis*) tại Tây Nguyên (sử dụng kỹ thuật ISSR, với 70 mẫu), có mức độ tương đồng di truyền là 90% [18].

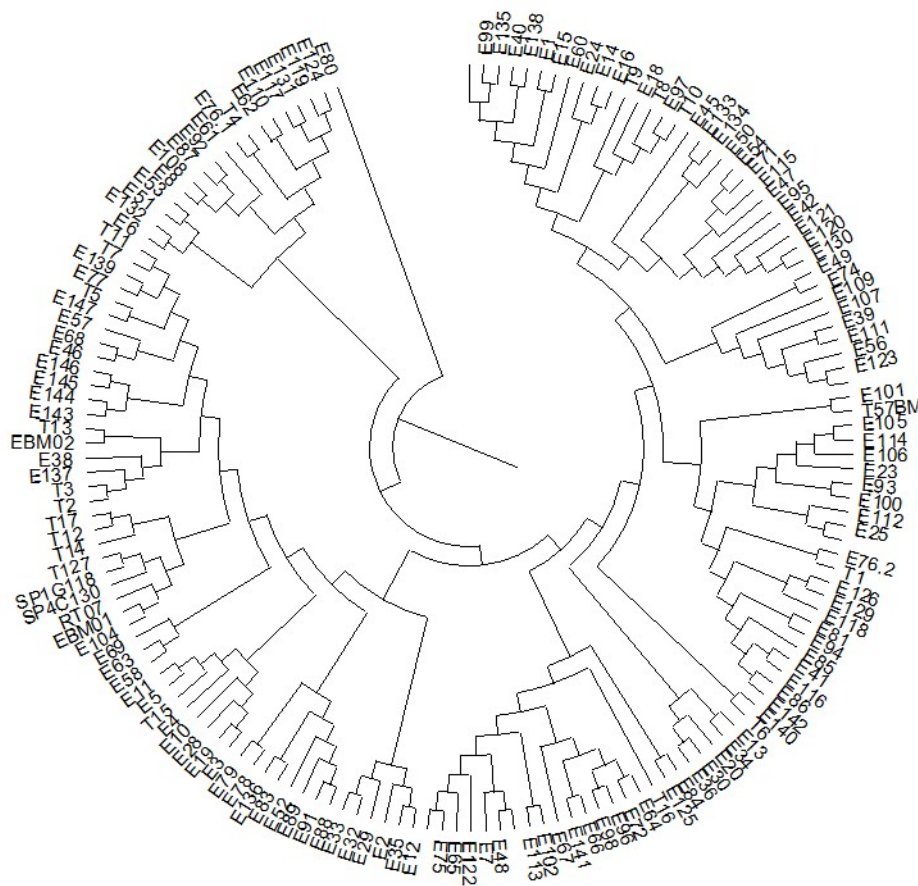
Ngược lại, về khoảng cách di truyền giữa 2 quần thể Thủy tùng là 0,031, thấp hơn so với 5 quần thể Thông xuân nha này với khoảng cách di truyền dao động từ 0,162 đến 0,453 [9], hay 3 quần thể Bách xanh (*Calocedrus macrolepis*) tại Tây Nguyên có khoảng cách di truyền là 0,102 [18].

3.2.3.4. Kết quả phân tích mối quan hệ di truyền giữa các mẫu Thủy tùng

Quan hệ di truyền giữa các cá thể được xây dựng dựa trên hệ số tương đồng và phân nhóm UPGMA bằng phần mềm MEGA X, trong đó 163 mẫu Thủy tùng thuộc hai quần thể Ea Drăng và Krông Năng được phân ra làm các nhóm với các mẫu đan xen nhau.

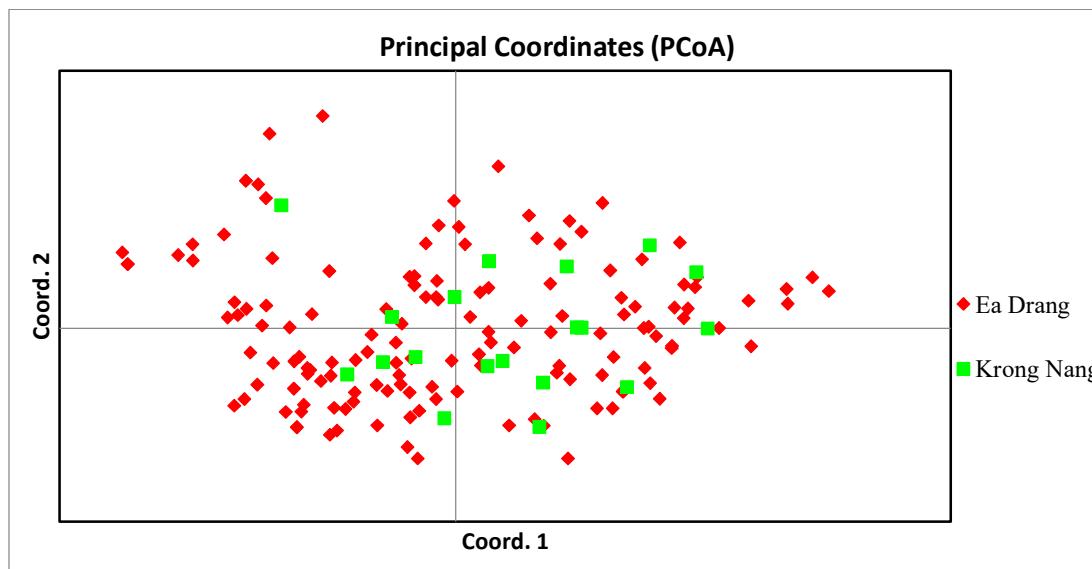
Ở mức độ quần thể, 163 mẫu Thủy tùng có thể chia thành 3 nhánh, nhánh thứ nhất chỉ bao gồm 1 cây E80 duy nhất, điều này cho phép nhận định cây E80 có sự khác biệt di truyền lớn với các mẫu còn lại. Nhánh thứ hai bao gồm 17 cây từ cả 2 quần thể trong đó, phần lớn là các cây thuộc quần thể Ea Drăng

(16/17). Nhánh thứ 3 bao gồm tất cả các cá thể còn lại đến từ cả 2 quần thể nghiên cứu (Hình 3.11). Mặc dù vậy, sự phân tách này là không thực sự rõ ràng. Cây E80 có thể mang một biến dị đột biến, điều này làm nổi bật giá trị bảo tồn riêng biệt của cá thể này trong chiến lược bảo tồn gen. Việc phân nhóm không rõ ràng cũng chỉ ra rằng quá trình chọn lọc tự nhiên hoặc cách ly sinh sản chưa đủ lâu để tạo ra các dòng di truyền riêng biệt rõ ràng.



Hình 3.11. Cây phả hệ 163 mẫu Thuỷ tùng dựa trên hệ số tương đồng di truyền

Phân tích tọa độ chính trong quan hệ di truyền giữa 163 mẫu Thuỷ tùng (Hình 3.12) cho thấy, có sự phân bố di truyền gần nhau và bao trùm lên nhau, chứng tỏ giữa các mẫu có sự trao đổi gen rất lớn. Kết quả này cũng phù hợp với kết quả phân tích ở Bảng 3.7.



Hình 3.12. Kết quả phân tích tọa độ chính trong quan hệ di truyền của các mẫu Thủy tùng được nghiên cứu

Khoảng cách di truyền giữa các cá thể Thủy tùng nghiên cứu là tương đối thấp, dao động từ 0,001 – gần như không có sự sai khác (ví dụ: giữa cây T2 và cây T3) đến 0,023 (giữa cây E80 và E99). Khoảng cách di truyền thấp phản ánh mức độ đa dạng di truyền hẹp – một yếu tố làm gia tăng nguy cơ suy giảm sức sống quần thể nếu xảy ra các biến đổi môi trường đột ngột. Việc sử dụng hệ thống môi có mức độ đa hình cao hơn (như SSR) với số lượng môi lớn hơn sẽ giúp khẳng định rõ hơn về quan hệ di truyền giữa các cá thể có mối quan hệ di truyền gần gũi được xác định trong nghiên cứu này.

Như vậy, kết quả phân tích các chỉ số đa dạng di truyền, cây phân loại và tọa độ phân bố di truyền của các mẫu Thủy tùng thuộc hai quần thể Krông Năng và Ea Drăng đều cho kết quả tương tự nhau. Quần thể Ea Drăng có sự đa dạng di truyền cao hơn và các mẫu của hai quần thể này có sự đan xen, chồng lấp lẫn nhau, thể hiện sự trao đổi nguồn gen lớn giữa mẫu trong cùng quần thể và giữa

các mẫu ở cả hai quần thể. Điều này cho thấy quần thể Ea Drăng có thể đóng vai trò là “nguồn gen trung tâm” cho các hoạt động phục hồi và nhân giống.

Kết quả này khẳng định hai quần thể Thủy tùng còn lại duy nhất tại Việt Nam có mối quan hệ di truyền khá gần gũi, vì vậy, việc bảo tồn tối đa các cá thể hiện có (bảo tồn *in situ*) là rất cần thiết. Bên cạnh đó, áp dụng kết quả nghiên cứu về mối quan hệ di truyền của toàn bộ cá thể tự nhiên hiện nay để lựa chọn các nhóm cây mẹ có khoảng cách xa nhau về để xây dựng các quần thể bảo tồn *ex situ*, kết hợp với nhập nội thêm nguồn gen từ Lào và Trung Quốc từ đó cải thiện mức độ đa dạng di truyền tương đối hạn hẹp của loài cây này.

3.3. Nghiên cứu bổ sung kỹ thuật nhân giống Thủy tùng

3.3.1. Nghiên cứu kỹ thuật nhân giống Thủy tùng bằng nuôi cấy *in vitro*

3.3.1.1. Nghiên cứu ảnh hưởng của loại chất khử trùng và thời gian khử trùng của mẫu cấy

Trong nuôi cấy *in vitro*, khử trùng là khâu quan trọng bậc nhất vì nó tạo được nguồn mẫu sạch cho các nghiên cứu tiếp theo. Với Thủy tùng, các nghiên cứu trước đây cho thấy tỷ lệ mẫu sạch và tỷ lệ mẫu bật chồi thấp.

Để tối ưu phương pháp khử trùng nhằm tạo được số lượng mẫu sạch lớn, 3 loại chất khử trùng: TCCA 50%, Javen 50% và HgCl_2 ở 2 nồng độ khác nhau: HgCl_2 0,1% và HgCl_2 0,15% với các khoảng thời gian khử trùng là 15 phút và 20 phút đã được thử nghiệm. Các mẫu sau khi khử trùng được cấy vào môi trường nuôi cấy và theo dõi sau 2 tháng. Kết quả phân tích Anova cho thấy, cả 2 nhân tố loại chất khử trùng và thời gian khử trùng đều có ảnh hưởng đến tỷ lệ mẫu sạch và tỷ lệ mẫu bật chồi (với P-value < 0,05) (Bảng 3.8).

Về loại chất khử trùng mẫu

Kết quả xếp nhóm Duncan cho thấy hai loại chất khử trùng HgCl_2 0,15% và TCCA cho tỷ lệ mẫu sạch tốt nhất và chưa có sự khác biệt giữa 2 loại chất khử này. Tương tự, đánh giá tỷ lệ mẫu bật chồi cho thấy 3 loại chất khử trùng tốt

nhất là HgCl_2 0,1%, Javen và TCCA. Như vậy, loại chất khử trùng cho đồng thời tỷ lệ mẫu sạch và tỷ lệ mẫu bất chồi cao nhất là TCCA (Phụ lục 9).

Bảng 3.8. Kết quả phân tích phương sai ảnh hưởng của loại chất khử trùng và thời gian khử trùng của mẫu cấy

Nhân tố	P-value	
	Tỷ lệ mẫu sạch (%)	Tỷ lệ mẫu bất chồi (%)
Loại chất khử trùng	0,0001	0,0001
Thời gian khử trùng	0,0001	0,0001

Về thời gian khử trùng mẫu

Tương tự khảo sát loại chất khử trùng, kết quả khảo sát về thời gian khử trùng mẫu cho thấy, khử trùng mẫu ở 20 phút cho tỷ lệ mẫu sạch và tỷ lệ mẫu bất chồi tốt nhất. Như vậy khử trùng mẫu ở 20 phút là phù hợp để tạo mẫu sạch *in vitro* cho chồi Thủy tùng (Phụ lục 9).

Bảng 3.9. Kết quả ảnh hưởng của đồng thời loại chất khử trùng và thời gian khử trùng của mẫu cấy

Ký hiệu công thức	Loại chất khử trùng	Thời gian khử trùng	Số mẫu thí nghiệm	Tỷ lệ mẫu sạch (%)	Tỷ lệ mẫu bất chồi (%)
CT1	TCCA	15 phút	45	62,22 ^b	40,00 ^b
CT2	TCCA	20 phút	45	82,22^a	46,67^{ab}
CT3	HgCl_2 0,1%	15 phút	45	35,56 ^d	24,44 ^c
CT4	HgCl_2 0,1%	20 phút	45	55,56 ^{bc}	51,11 ^a
CT5	Javen	15 phút	45	53,33 ^c	40,00 ^b

Ký hiệu công thức	Loại chất khử trùng	Thời gian khử trùng	Số mẫu thí nghiệm	Tỷ lệ mẫu sạch (%)	Tỷ lệ mẫu bất chồi (%)
CT6	Javen	20 phút	45	57,78 ^{bc}	48,89 ^{ab}
CT7	HgCl ₂ 0,15%	15 phút	45	62,22 ^b	8,89 ^d
CT8	HgCl ₂ 0,15%	20 phút	45	80,00 ^a	26,67 ^c
P-value				0,0001	0,0001

Những số có chữ theo sau giống nhau thì không khác biệt có ý nghĩa thống kê.

Đánh giá ảnh hưởng của đồng thời loại chất khử trùng và thời gian khử trùng mẫu

Từ kết quả phân tích ở bảng 3.9 cho thấy, cả tỷ lệ mẫu sạch và tỷ lệ mẫu bất chồi đều có sự khác biệt trên các công thức thí nghiệm (Phụ lục 9). Sử dụng HgCl₂ 0,15% và TCCA trong 20 phút cho tỷ lệ mẫu sạch đạt cao nhất lần lượt là 80,00% và 82,22%. Tuy nhiên về tỷ lệ mẫu bất chồi, xử lý mẫu bằng HgCl₂ 0,1% trong 20 phút là cao nhất (51,11%) và tỷ lệ này là không có sự khác biệt rõ rệt với TCCA trong 20 phút (46,67%). Với chất khử trùng HgCl₂ 0,15%, tỷ lệ mẫu bất chồi khá thấp chỉ 8,89 – 26,67%, và ở nghiệm thức này, hầu hết các chồi Thủy tùng chuyển dần sang màu đen và bị chết. Từ kết quả phân tích trên có thể kết luận rằng, sử dụng TCCA trong 20 phút là thích hợp để khử trùng mẫu Thủy tùng. Nguồn mẫu không nhiễm sẽ được sử dụng cho các thí nghiệm tiếp theo.

Như vậy, phương pháp khử trùng tốt nhất là sử dụng TCCA và thời gian khử trùng là 20 phút cho tỷ lệ mẫu sạch đạt cao nhất 82,22% và tỷ lệ mẫu bất chồi là 46,46%. Kết quả này cao hơn so với các kết quả nghiên cứu trước đây (Nguyễn Thành Sum và cộng sự, 2007 [30]; Trần Vinh, 2011 [35]; Nguyễn Đức Thành và cộng sự, 2012 [31]) sử dụng các loại hóa chất khử trùng khác

như Javel, axit benzoic và HgCl_2 . Đồng thời, quan sát hình thái mẫu cho thấy, mẫu sau khi khử trùng trên loại chất khử trùng là TCCA vẫn duy trì được màu sắc chồi xanh, không bị thâm đen như khi sử dụng HgCl_2 0,15%.



Hình 3.13. Khử trùng mẫu



Hình 3.14. Mẫu khỏe bật chồi sau khi khử trùng

3.3.1.2. Nghiên cứu ảnh hưởng của nồng độ chất điều hòa sinh trưởng đến quá trình nhân nhanh chồi

Sử dụng môi trường WPM để khảo sát ảnh hưởng của BA đến quá trình nhân nhanh chồi. Kết quả cho thấy Môi trường WPM bổ sung BA ở các nồng độ 0,2; 0,5; 0,7 và 1 mg/l sau 2 tháng theo dõi, số chồi trung bình/mẫu trên các công thức thí nghiệm dao động từ 1,14 chồi/mẫu đến 1,31 chồi/mẫu, tuy nhiên chỉ tiêu này là không khác biệt giữa các công thức thí nghiệm (với P-value > 0,05). Ngược lại, đo đếm chiều cao chồi cho thấy chiều cao chồi trung bình trên các nghiệm thức là có khác biệt rõ (với P-value < 0,05), dao động từ 3,69 cm đến 4,51 cm (Phụ lục 10). Công thức tốt nhất là CT4 (Bổ sung 1mg/l BA) cho chiều cao chồi trung bình cao nhất 4,51 cm.

Đánh giá về mặt hình thái, kết quả theo dõi cho thấy, ở CT2 các chồi, to, khỏe, thẳng. Ở CT1 và CT3 hình thái chồi kém hơn, mặc dù lá vẫn xanh tươi nhưng ở CT1, các chồi chủ yếu nhỏ, trong khi ở CT3, các chồi phần lớn cao

nhưng gãy. Hình thái chồi kém nhất là ở CT4, lá nhỏ bị biến dạng ở phần gốc và chồi có màu vàng. Kết quả này chỉ ra rằng, sử dụng nồng độ BA cao thì chồi sẽ cao nhưng có sức sống kém. Từ kết quả phân tích trên cho thấy sử dụng môi trường WPM bổ sung BA 0,5 mg/l là phù hợp để nhân nhanh chồi Thủy tùng.

Bảng 3.10. Kết quả ảnh hưởng của nồng độ chất điều hòa sinh trưởng đến quá trình nhân nhanh chồi

Ký hiệu công thức	Môi trường	Số mẫu thí nghiệm	Số chồi trung bình/ mẫu (chồi)	Chiều cao chồi trung bình (cm)	Chất lượng chồi
CT1	WPM + BA 0,2 mg/l	45	$1,14 \pm 0,05$	$3,78^b \pm 0,08$	+
CT2	WPM + BA 0,5 mg/l	45	$1,31 \pm 0,02$	$3,87^b \pm 0,09$	++
CT3	WPM + BA 0,7 mg/l	45	$1,17 \pm 0,05$	$3,69^b \pm 0,07$	+
CT4	WPM + BA 1 mg/l	45	$1,17 \pm 0,10$	$4,51^a \pm 0,31$	-
P-value			0,2609	0,0345	

Những số có chữ theo sau giống nhau thì không khác biệt có ý nghĩa thống kê.

Sai số: là số sau dấu $\pm$

++: chồi mập, vươn cao và có màu xanh đậm

+: chồi gãy, có màu xanh

- : chồi có màu vàng, một số chồi bị héo

Benzyladenine (BA) là một cytokinin được sử dụng rộng rãi trong các hệ thống vi nhân giống, thường được sử dụng để nhân nhanh chồi trong nhân giống *in vitro* [76]. Pablo Alonso và cộng sự (2010) cũng đã tìm ra BA 44,4 μ M để nhân chồi loài Thông (*Pinus pinea* L.) là tốt nhất [82]. Một ví dụ khác: Nguyễn Thành Danh và Vương Đình Tuấn (2008) cũng đã dùng BA 2,0 mg/l để nhân

chồi cây Thanh thất (*Ailanthus triphysa* (Dennst) Alson) trong nhân giống *in vitro* [6]. Cơ chế tác động của BA ở đây chính là sự hoạt hóa sự phân chia tế bào để hình thành nên tế bào mới, các chồi mới được hình thành.

So sánh với báo cáo của Lu và cộng sự (2023) [74], môi trường tối ưu để nhân chồi là môi trường MS bổ sung 2 mg/l BA và 0,5 mg/l NAA, trung bình 5,03 chồi trên mỗi mẫu thì kết quả nghiên cứu này có số chồi trung bình trên mỗi mẫu thấp hơn, điều này được giải thích là do nguồn mẫu ban đầu của thí nghiệm trong nghiên cứu của Lu và cộng sự (2023) [74] là từ chồi của hạt mầm, có tuổi sinh lý thấp, trong khi mẫu sử dụng trong Báo cáo này là cây mẹ tự nhiên có tuổi sinh lý cao, do đó ảnh hưởng đến khả năng tái sinh chồi của mẫu.



Hình 3.15. Chồi Thủy tùng trên môi trường WPM bổ sung 0,2 mg/l; 0,5 mg/l; 0,7 mg/l và 1,0 mg/l BA sau 2 tháng nuôi cấy trong *in vitro*

3.3.1.3. Nghiên cứu ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng lên khả năng hình thành rễ cây Thủy Tùng

Xác định môi trường nuôi cấy và chất điều hòa sinh trưởng thực vật để cho

ra rễ là một khâu quan trọng đánh giá sự thành công trong nhân giống *in vitro*. Các nghiên cứu về nhân giống *in vitro* Thủy tùng trước đây chỉ mới dừng lại ở việc tìm ra được môi trường nhân nhanh chồi.

Môi trường WPM được cho là phù hợp để nhân giống một số loài cây thân gỗ [76]. Ví dụ, Mohammed và cộng sự (2017) đã nghiên cứu nhân giống *in vitro* loài Sồi (*Quercus suber* L.), kết quả cho thấy tỷ lệ mô sẹo hình thành cao nhất trên môi trường WPM [79]. Một ví dụ khác, Phí Thị Cẩm Miện và cộng sự (2019) cũng tìm ra môi trường WPM là thích hợp tạo rễ bất định Xáo tam phân (*Paramignya trimera*) trong điều kiện thủy canh *in vitro* [22]. Năm 2009, Đoàn Thị Mai và cộng sự cũng đã tìm ra môi trường thích hợp tạo rễ cây Lát hoa *in vitro* là $\frac{1}{2}$ WPM+ IBA 1,0mg/l [21]. Ở hầu hết các loài cây lá kim, IBA và NAA là những auxin được sử dụng phổ biến nhất để tạo rễ bất định [85].

Để bổ sung kỹ thuật nhân giống *in vitro* Thủy tùng, nghiên cứu khảo sát trên môi trường WPM bổ sung chất điều hòa sinh trưởng IBA và NAA ở các nồng độ khác nhau là cần thiết. Kết quả cho thấy, khi bổ sung IBA vào môi trường nuôi cấy, sau 2 tháng theo dõi, không xuất hiện rễ trên các mẫu thí nghiệm. Và đối chứng (không bổ sung chất điều hòa sinh trưởng) cũng không ra rễ. Như vậy có thể khẳng định NAA là phù hợp để kích thích ra rễ Thủy tùng trong nhân giống *in vitro*.

Bảng 3.11. Kết quả ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng lên khả năng hình thành rễ cây Thủy Tùng

Ký hiệu công thức	Môi trường	Số mẫu thí nghiệm	Tỷ lệ ra rễ (%)	Số rễ trung bình/mẫu	Chiều dài rễ (cm)	Chỉ số ra rễ
MT1	WPM + NAA 10 ppm	45	22,98 ^b	1,50 ± 0,27	1,02 ± 0,21	1,55 ^c ± 0,44
MT2	WPM + NAA 20 ppm	45	25,76 ^b	1,67 ± 0,29	1,31 ± 0,21	2,11 ^{bc} ± 0,47

Ký hiệu công thức	Môi trường	Số mẫu thí nghiệm	Tỷ lệ ra rễ (%)	Số rễ trung bình/mẫu	Chiều dài rễ (cm)	Chỉ số ra rễ
MT3	WPM + NAA 30 ppm	45	54,55 ^a	2,84 ± 0,30	1,86 ± 0,15	5,03 ^a ± 0,56
MT4	WPM + NAA 40 ppm	45	22,73 ^b	2,50 ± 0,43	1,50 ± 0,14	3,73 ^{ab} ± 0,74
P-value			0,0042	0,0239	0,0150	0,0009
MT5	WPM + IBA 10 ppm	45	-	-	-	-
MT6	WPM + IBA 20 ppm	45	-	-	-	-
MT7	WPM + IBA 30 ppm	45	-	-	-	-
MT8	WPM + IBA 40 ppm	45	-	-	-	-
Đối chứng (DC)	WPM	45	-	-	-	-

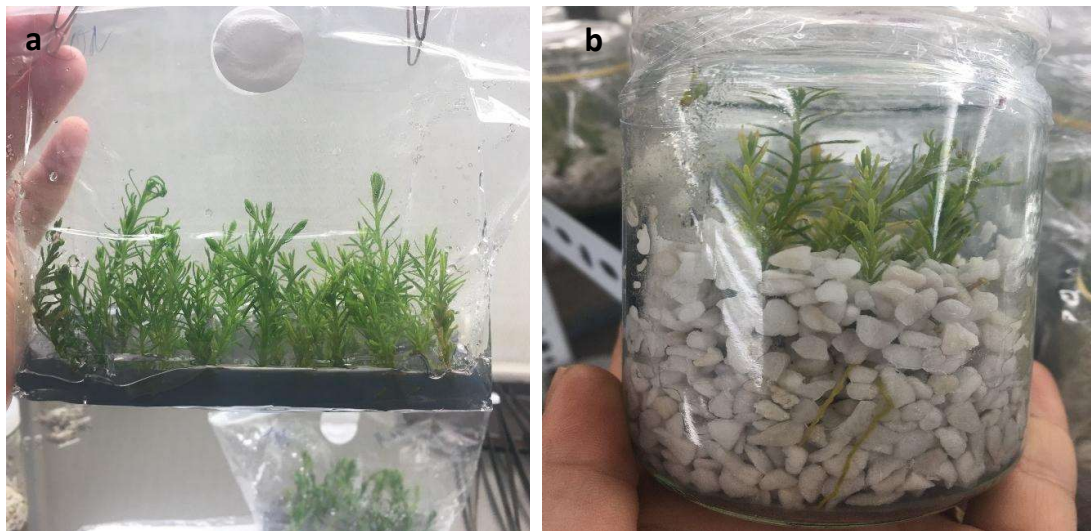
Những số có chữ theo sau giống nhau thì không khác biệt có ý nghĩa thống kê.

Sai số: là số sau dấu ±

Về tỷ lệ ra rễ, các công thức thí nghiệm khác nhau thì tỷ lệ ra rễ của mẫu cũng khác nhau. Khi nồng độ NAA tăng từ 10 ppm đến 30 ppm tương ứng tỷ lệ ra rễ cũng tăng từ 22,98% lên 54,55%. Tuy nhiên khi nồng độ NAA tăng lên 40 ppm thì tỷ lệ này lại giảm xuống còn 22,73%. Kết quả phân tích Anova cũng cho thấy ảnh hưởng rõ rệt của các nồng độ NAA đến tỷ lệ ra rễ của mẫu (với P-value < 0,05). Kết quả xếp nhóm Duncan ở độ tin cậy 95% về tỷ lệ ra rễ của mẫu Thủy tùng chỉ rõ công thức MT3 (môi trường WPM bổ sung NAA 30 ppm) là tốt nhất, với tỷ lệ ra rễ là 54,55% (Phụ lục 11).

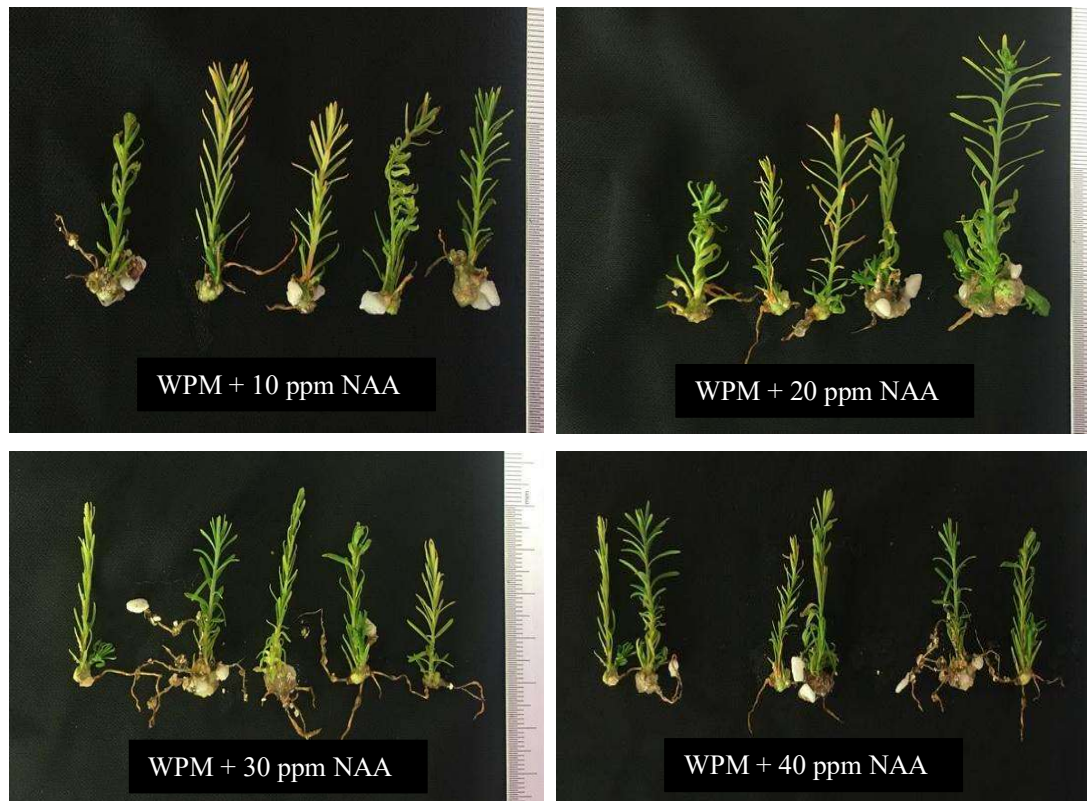
Tiếp tục đánh giá một số chỉ tiêu sinh trưởng rễ của mẫu cũng cho thấy, số rễ trung bình/mẫu, chiều dài rễ và chỉ số ra rễ đều tốt nhất ở công thức MT3. Sau 2 tháng theo dõi, số rễ trung bình dao động từ 1,50 đến 2,84 rễ/mẫu. Chiều dài rễ từ 1,02 đến 1,86 cm. Chỉ số ra rễ từ 1,55 đến 5,03. Kết quả kiểm tra theo tiêu chuẩn tham số Kruskal-Wallis cũng cho thấy rằng, số rễ trung bình/mẫu, chiều dài rễ trung bình và chỉ số ra rễ là khác biệt (với P-value < 0,05). Trong đó công thức MT3 (môi trường WPM bổ sung NAA 30 ppm) là tốt nhất với số rễ trung bình là 2,84 rễ/mẫu; chiều dài rễ là 1,86 cm và chỉ số ra rễ đạt 5,03 (Phụ lục 11).

Như vậy, công thức môi trường để kích thích ra rễ mẫu Thủy tùng là WPM có bổ sung NAA 30 ppm, với tỷ lệ ra rễ cao 54,55%. Mặc dù kết quả này khác biệt không đáng kể so với nghiên cứu của Li và cộng sự, 2007 [70] (sử dụng môi trường $\frac{1}{2}$ MS có bổ sung 0,5 mg/l NAA, nguồn vật liệu là chồi bên từ cây giống *in vitro* 100 ngày tuổi, các mẫu ra rễ với tỷ lệ 58,3%), tuy nhiên kết quả này là phù hợp để nhân giống ở Tây Nguyên trong điều kiện nguồn vật liệu là chồi non được trẻ hóa từ cây mẹ tự nhiên.



Hình 3.16. Chồi Thủy tùng ở 2 giai đoạn khác nhau

a. Giai đoạn cảm ứng; b. Giai đoạn ra rễ



Hình 3.17. Rễ cây Thủy tùng trên môi trường WPM bổ sung 10 ppm; 20 ppm; 30 ppm; 40 ppm NAA sau 2 tháng nuôi cây trong *in vitro*

3.3.2. Nghiên cứu bổ sung kỹ thuật nhân giống Thủy tùng bằng giâm hom

3.3.2.1. Nghiên cứu ảnh hưởng của nồng độ IBA và thời gian xử lý hom đến khả năng ra rễ của hom Thủy tùng

Nồng độ của IBA và thời gian ngâm hom ảnh hưởng rất lớn đến khả năng sống của hom. Thí nghiệm nhằm khảo sát ngưỡng thời gian tốt nhất để ngâm hom, nhằm đảm bảo tỷ lệ sống cũng như tỷ lệ ra rễ của hom. Kết quả phân tích ảnh hưởng của từng nhân tố nồng độ IBA và thời gian xử lý đến khả năng ra rễ của hom Thủy tùng được thể hiện ở bảng 3.12 như sau:

Về nồng độ IBA

Sau 2 tháng theo dõi, nồng độ IBA khác nhau ảnh hưởng rõ rệt đến tỷ lệ sống của hom (với $P\text{-value} < 0,05$) và khi nồng độ IBA càng tăng thì tỷ lệ sống của

hom càng giảm. Tuy nhiên tỷ lệ hom ra rế là chưa có sự khác biệt rõ giữa các nồng độ IBA (với P-value > 0,05). Kết quả xếp nhóm Duncan ở độ tin cậy 95% về tỷ lệ hom sống tốt nhất là ở IBA 500 ppm (Phụ lục 12).

Bảng 3.12. Kết quả phân tích phương sai ảnh hưởng của từng nhân tố: Nồng độ IBA và Thời gian xử lý đến khả năng ra rế của hom Thủy tùng

Nhân tố	P-value	
	Tỷ lệ hom sống (%)	Tỷ lệ hom ra rế (%)
Nồng độ IBA	0,0001	0,4193
Thời gian xử lý hom	0,0001	0,1743

Về thời gian xử lý hom

Kết quả theo dõi sau 2 tháng cho thấy, thời gian xử lý hom khác nhau ảnh hưởng rõ rệt đến tỷ lệ sống của hom (với P-value < 0,05) và khi thời gian xử lý hom càng tăng thì tỷ lệ sống của hom càng giảm. Tuy nhiên tỷ lệ hom ra rế là chưa có sự khác biệt rõ giữa các công thức (với P-value > 0,05). Kết quả xếp nhóm Duncan ở độ tin cậy 95% cho thấy về tỷ lệ hom sống tốt nhất là ở thời gian xử lý hom 2 giờ (Phụ lục 12).

Đánh giá sự tác động đồng thời của nồng độ IBA và thời gian xử lý hom ảnh hưởng đến tỷ lệ sống và tỷ lệ ra rế của hom Thủy tùng

Kết quả phân tích phương sai 2 nhân nhân tố nồng độ IBA và thời gian xử lý hom, sau 2 tháng theo dõi 945 mẫu thu được như sau: Khi nồng độ IBA và thời gian xử lý hom càng tăng thì tỷ lệ sống của hom càng giảm và tỷ lệ hom ra rế cũng giảm.

Từ bảng 3.13 cho thấy, khi xử lý hom ở nồng độ thấp và thời gian ngắn, mặc dù cho tỷ lệ sống cao, nhưng tỷ lệ ra rế lại đạt thấp. Bên cạnh đó, khi xử lý hom ở nồng độ cao trong thời gian ngắn hoặc xử lý hom ở nồng độ thấp trong thời

gian quá dài sẽ gây ức chế sinh trưởng, dẫn đến tỷ lệ hom sống và ra rễ thấp. Sau 2 tháng theo dõi, tỷ lệ sống thay đổi từ 11,43% đến 82,86%, tỷ lệ hom ra rễ từ 0,95% đến 34,29%.

Bảng 3.13. Kết quả ảnh hưởng của Nồng độ IBA và thời gian xử lý hom đến khả năng giâm hom Thủy tùng (3/2021-5/2021)

Ký hiệu công thức	Nồng độ IBA (ppm)	Thời gian xử lý (giờ)	Số hom thí nghiệm	Tỷ lệ hom sống (%)	Tỷ lệ hom ra rễ (%)
I1T1	500	2	105	85,71 ^a	6,67 ^{bc}
I1T2	500	4	105	82,86^a	30,48^a
I1T3	500	6	105	66,67 ^b	22,86 ^{ab}
I2T1	1000	2	105	80,00^{ab}	34,29^a
I2T2	1000	4	105	29,52 ^c	4,76 ^c
I2T3	1000	6	105	23,81 ^{cd}	0,95 ^c
I3T1	1500	2	105	73,33 ^{ab}	24,76 ^a
I3T2	1500	4	105	26,67 ^c	6,67 ^{bc}
I3T3	1500	6	105	11,43 ^d	1,91 ^c
P-value				0,0001	0,0008

Những số có chữ theo sau giống nhau thì không khác biệt có ý nghĩa thống kê.
Sai số: là số sau dấu $\pm$

Kết quả phân tích Anova cũng cho thấy ảnh hưởng đồng thời của nồng độ IBA và thời gian xử lý hom là khác nhau rõ rệt đến tỷ lệ sống (với P-value < 0,05) và tỷ lệ hom ra rễ (với P-value < 0,05). Kết quả phân nhóm tìm công thức tốt nhất bằng tiêu chuẩn Duncan ở độ tin cậy 95% cho thấy, xử lý hom Thủy tùng ở nồng độ IBA 500 ppm và ngâm hom trong 4 giờ đem lại tỷ lệ sống của hom cao nhất là 82,86% với tỷ lệ hom ra rễ cũng đạt 30,48%; bên cạnh đó, có

thể xử lý hom Thủy tùng ở nồng độ IBA 1000 ppm và ngâm hom trong 2 giờ cũng đem lại tỷ lệ sống của hom cao 80,00% với tỷ lệ hom ra rễ đạt cao nhất 34,29% (Phụ Lục 12).

Như vậy, kết quả nghiên cứu đã tìm ra công thức xử lý hom là IBA 500 ppm trong 4 giờ hay IBA 1.000 ppm trong 2 giờ cho tỷ lệ ra rễ đạt từ 30,48% đến 34,29%. Kết quả này thấp hơn rất nhiều so với kết quả nghiên cứu của Li và cộng sự (2007) [70] xử lý hom với IBA 2000 ppm trong 30 giây hoặc trong dung dịch NAA 100 ppm trong 2 giờ thì tỷ lệ ra rễ của hom đạt 85%. Nguyên nhân được giải thích là do nguồn hom mẫu. Hom mẫu trong thí nghiệm của Li và cộng sự (2007) [70] được lấy từ cây hạt 1 - 2 năm tuổi có độ non trẻ cao hơn mẫu được sử dụng trong thí nghiệm này (là những hom được trẻ hóa đầu cành trên cây mẹ mọc tự nhiên) do đó khả năng ra rễ của hom kém hơn. Hơn nữa, theo Li và cộng sự (2007) [70], sự khác biệt đáng kể về tỷ lệ ra rễ của hom đã được tìm thấy giữa các kiểu gen, như vậy, việc chọn lọc cây mẹ để lấy hom có tiềm năng đem lại hiệu quả nhân giống cao hơn. Bên cạnh đó, kết quả nghiên cứu của Ngô Văn Cầm và cộng sự, 2016 [5] cho thấy, công thức tốt nhất cho ra rễ Thủy tùng cao nhất đạt 66,67% là IBA 1.000 ppm, cũng cao hơn rất nhiều so với nghiên cứu này. Điều này cũng có thể được giải thích tương tự như trên, là do nguồn mẫu lấy hom. Trong thí nghiệm của Ngô Văn Cầm và cộng sự, nguồn mẫu là hom được trẻ hóa từ gốc cây mẹ (cây mẹ ngã đổ đã mọc chồi mới), do đó tuổi của hom trẻ hơn rất nhiều so với hom trong thí nghiệm này. Tuy nhiên loại hom này rất ít và khó áp dụng để sản xuất cây giống với số lượng lớn. Nên nghiên cứu nhân giống bằng hom sử dụng loại hom trẻ hóa ở đầu cành thực sự có ý nghĩa.

3.3.2.2. Nghiên cứu ảnh hưởng của nồng độ IBA và kích thước hom đến kết quả giâm hom Thủy tùng

Ảnh hưởng của đồng thời nồng độ IBA và kích thước hom đến kết quả giâm

hom Thủy tùng được đánh giá thông qua tỷ sống, khả năng ra rễ của hom, cũng như sự sinh trưởng của rễ hom, trên cơ sở đó lựa chọn công thức chất điều hòa sinh trưởng và kích thước hom phù hợp nhất để nhân giống. Với thời gian xử lý hom là 2 giờ, thí nghiệm được bố trí theo khối ngẫu nhiên đầy đủ 2 nhân tố 3 lần lặp 40 hom/công thức x 9 công thức x 3 lần lặp.

Kết quả phân tích ảnh hưởng của từng nhân tố nồng độ IBA và kích thước hom đến khả năng ra rễ của hom Thủy tùng được thể hiện ở bảng 3.14 như sau:

Bảng 3.14. Kết quả phân tích phương sai ảnh hưởng của từng nhân tố: Nồng độ IBA và Kích thước hom đến khả năng ra rễ của hom Thủy tùng

Nhân tố	P-value	
	Tỷ lệ hom sống (%)	Tỷ lệ hom ra rễ (%)
Nồng độ IBA	0,0002	0,0001
Kích thước hom	0,0001	0,0169

Về nồng độ IBA

Khi nồng độ IBA càng tăng thì tỷ lệ sống của hom càng giảm và tỷ lệ hom ra rễ cũng giảm. Ở các nồng độ IBA khác nhau thì tỷ lệ sống của hom và tỷ lệ hom ra rễ là khác nhau (với P-value < 0,05) (Phụ lục 13). Trong đó nồng độ IBA tốt nhất là 1.000 ppm.

Về kích thước hom

Tương tự đánh giá ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng thực vật, ảnh hưởng của kích thước hom cũng được đánh giá qua tỷ lệ sống và tỷ lệ hom ra rễ. Từ kết quả phân tích Anova, kích thước hom khác nhau có ảnh hưởng đáng kể đến tỷ lệ sống và tỷ lệ ra rễ của hom với các giá trị P-value < 0,05, khi hom quá nhỏ hoặc quá lớn đều làm giảm tỷ lệ hom ra rễ. Kích thước hom tốt nhất là hom có chiều dài 12 cm và đường kính từ 1 - 2 mm.

Ảnh hưởng của đồng thời nồng độ chất điều hòa sinh trưởng thực vật và kích thước hom đến hiệu quả giâm hom

Ảnh hưởng của đồng thời nồng độ IBA và kích thước hom đến hiệu quả giâm hom được đánh giá thông qua tỷ lệ hom sống, tỷ lệ hom ra rễ, số rễ trung bình trên hom, chiều dài rễ trung bình và chỉ số ra rễ. Kết quả được thể hiện ở Bảng 3.15.

Kết quả phân tích Anova cho thấy, tỷ lệ hom sống và tỷ lệ ra rễ của hom Thủy tùng ở các công thức thí nghiệm khác nhau là khác biệt có ý nghĩa thống kê ở độ tin cậy 95%, với các giá trị P-value < 0,05. Kết quả phân nhóm tìm công thức tốt nhất bằng tiêu chuẩn Duncan ở độ tin cậy 95% cho thấy, nồng độ IBA 1.000 ppm với loại hom có kích thước hom dài trung bình 12 cm là tốt nhất và khác biệt với các công thức còn lại với tỷ lệ hom sống là 67,50% và tỷ lệ hom ra rễ là 25,83% (phụ lục 13).

Kiểm tra bằng tiêu chuẩn phi tham số Kruskal-Wallis về chỉ số ra rễ của hom, kết quả phân tích cũng chỉ ra rằng chỉ số ra rễ của hom trên các công thức thí nghiệm là khác biệt với giá trị P-value < 0,05. Trong đó, sử dụng IBA 1.000 ppm với kích thước hom dài 12 cm và kích thước hom dài 18 cm là tốt nhất với chỉ số ra rễ lần lượt là 51,13 và 65,94. Tuy nhiên, khi sử dụng IBA 1.000 ppm tương ứng với kích thước hom dài 18 cm cho tỷ lệ hom sống và tỷ lệ hom ra rễ thấp hơn so với hom có kích thước hom dài 12 cm. Do đó, công thức tốt nhất để giâm hom Thủy tùng là IBA 1.000 ppm và kích thước hom dài 12 cm.

Bảng 3.15. Kết quả ảnh hưởng của Nồng độ IBA và kích thước hom đến khả năng giâm hom Thủy tùng (11/2021-1/2022)

Ký hiệu công thức	Nồng độ IBA (ppm)	Kích thước hom (± 1 cm)	Số hom thí nghiệm	Tỷ lệ hom sống (%)	Tỷ lệ hom ra rễ (%)	Số rễ TB/hom	Chiều dài rễ TB (cm)	Chỉ số ra rễ
I1K1	1.000	6	120	79,17 ^a	11,67 ^b	1,50 ^b ± 0,17	2,56 ^c ± 0,65	4,29 ^{bc} ± 1,34
I1K2	1.000	12	120	67,50^{ab}	25,83^a	2,67^b ± 0,30	13,59^a ± 3,91	51,13^{ab} ± 18,60
I1K3	1.000	18	120	30,83 ^e	10,00 ^{bc}	4,38 ^a ± 0,75	12,59 ^{ab} ± 2,69	65,94 ^a ± 18,14
I2K1	1.500	6	120	59,17 ^{bc}	0,00 ^e	0,00 ^c ± 0,00	0,00 ^d ± 0,00	0,00 ^d ± 0,00
I2K2	1.500	12	120	65,83 ^{ab}	3,33 ^{de}	1,00 ^b ± 0,00	1,38 ^c ± 0,24	1,38 ^c ± 0,24
I2K3	1.500	18	120	34,17 ^{de}	6,67 ^{cd}	2,25 ^b ± 0,84	1,96 ^c ± 0,50	4,40 ^{bc} ± 1,79
I3K1	2.000	6	120	55,83 ^{bc}	0,00 ^e	0,00 ^c ± 0,00	0,00 ^d ± 0,00	0,00 ^d ± 0,00
I3K2	2.000	12	120	46,67 ^{cd}	2,50 ^{de}	1,33 ^b ± 0,33	5,73 ^{abc} ± 3,12	9,40 ^{abc} ± 6,52
I3K3	2.000	18	120	10,0 ^f	1,67 ^e	1,00 ^b ± 0,00	2,50 ^e ± 0,50	2,50 ^e ± 0,50
		P-value		0,0001	0,0001	0,0012	0,0010	0,0012

Những số có chữ theo sau giống nhau thì không khác biệt có ý nghĩa thống kê.
Sai số: là số sau dấu ±



Hình 3.18. Hom thí nghiệm

a. IBA 1000 ppm + Hom dài 12 cm

b. IBA 1500 ppm + Hom dài 12 cm

Như vậy, nghiên cứu đã tìm ra chất điều hòa sinh trưởng IBA 1000 ppm và kích thước hom dài 12 cm là tốt nhất. Kích thước hom này cũng phù hợp với kết quả nghiên cứu giâm hom của một số loài cây lá kim khác như đối với Thông caribaea (*Pinus caribaea* Morelet) là hom cấp 1, dài 10 - 15 cm [17], các loài Bách xanh (*Calocedrus macrolepis* Kurz), Pơ mu (*Fokienia hodginsii* (Dunn) A. Henry & H. H. Thomas), Thông đỏ (*Taxus wallichiana* Zucc) cũng sử dụng vật liệu là hom dài 10 – 15 cm [26].

3.3.2.3. Nghiên cứu ảnh hưởng của hỗn hợp chất điều hoà sinh trưởng đến khả năng ra rễ của hom Thủy tùng

Hiện nay, bên cạnh việc sử dụng các chất điều hòa sinh trưởng đơn lẻ để nhân giống bằng hom các loài thực vật thân gỗ, hỗn hợp các chất điều hòa sinh trưởng thực vật cũng được áp dụng khá phổ biến. Cụ thể, năm 2018, Yusnita và cộng sự đã nghiên cứu nhân giống bằng hom cây Mận đỏ (*Syzygium malaccense* (L.) Merr. & Perry) [106], kết quả cho thấy hỗn hợp IBA 1.000 ppm + NAA 1.000 ppm làm tăng cường tỷ lệ ra rễ, chiều dài rễ cao hơn, hình thái rễ tốt hơn và giúp rút ngắn thời gian hình thành rễ so với sử dụng IBA hoặc

NAA. Seif và cộng sự (2022) [86] cũng đã tìm ra hỗn hợp IBA 4.000 ppm + NAA 1.000 ppm là tốt nhất để giồng bằng hom cây Sung mỹ (*Ficus Carica* L.), với chiều dài rễ và chất lượng rễ tốt hơn khi xử lý hom bằng IBA hoặc NAA. Dựa trên cơ sở đó, nghiên cứu hỗn hợp chất điều hòa sinh trưởng thực vật trong giâm hom Thủy tùng nhằm nâng cao hiệu quả nhân giống là có thể áp dụng.

Mặc khác, theo Ngô Văn Cầm (2017) [4], giâm hom Thủy tùng vào các tháng mùa khô (tháng 3 và tháng 12) có tỷ lệ hom ra rễ cao hơn các tháng mùa mưa (tháng 6 và tháng 9) với chất điều hòa sinh trưởng IBA 1.000 ppm. Do đó, để nâng cao tỷ lệ ra rễ của hom Thủy tùng vào mùa mưa, nghiên cứu thử nghiệm sử dụng hỗn hợp IBA 1.000 ppm với IAA, NAA và GA₃ ở các nồng độ khác nhau từ 200, 400, 600, 800 và 1.000 ppm là cần thiết.

Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của hỗn hợp chất điều hòa sinh trưởng thực vật đến khả năng ra rễ của hom Thủy tùng được đánh giá qua tỷ lệ sống, tỷ lệ ra rễ, số rễ trên hom, chiều dài rễ dài nhất cũng như các chỉ số ra rễ. Kết quả được trình bày ở Bảng 3.16.

Bảng 3.16a. Kết quả ảnh hưởng của hỗn hợp chất điều hoà sinh trưởng đến khả năng đâm hom Thủy Tùng (9/2022-1/2023)

Ký hiệu công thức	Hỗn hợp chất điều hoà sinh trưởng	Số hom thí nghiệm	Tỷ lệ hom sống (%)	Tỷ lệ hom ra rễ (%)	Số rễ TB/hom	Chiều dài rễ TB (cm)	Chỉ số ra rễ
CT1	IBA 1.000 ppm + NAA 200 ppm	90	58,89a	6,67	1,83 ^b ± 0,65	7,45 ± 1,72	12,98 ^b ± 4,72
CT2	IBA 1.000 ppm + NAA 400 ppm	90	61,11^a	23,33	2,86^a ± 0,37	8,89 ± 0,96	23,80^a ± 3,45
CT3	IBA 1.000 ppm + NAA 600 ppm	90	53,33 ^a	20,00	1,50 ^b ± 0,12	7,78 ± 0,83	12,30 ^b ± 1,91
CT4	IBA 1.000 ppm + NAA 800 ppm	90	47,78 ^{ab}	16,67	1,20 ^b ± 0,11	5,52 ± 0,93	7,64 ^c ± 1,92
CT5	IBA 1.000 ppm + NAA 1.000 ppm	90	46,67 ^{ab}	6,67	1,00 ^b ± 0,00	3,90 ± 0,94	3,90 ^d ± 0,94
Đối chứng (DC)	IBA 1.000 ppm	90	27,78 ^c	3,33	1,00 ^b ± 0,00	7,53 ± 1,79	7,53 ^c ± 1,79
P-value			0,0360	0,1966	0,0005	0,0745	0,0001

Những số có chữ theo sau giống nhau thì không khác biệt có ý nghĩa thống kê.
Sai số: là số sau dấu ±

Bảng 3.16b. Kết quả ảnh hưởng của hỗn hợp chất điều hoà sinh trưởng đến khả năng giám hom Thủy Tùng (9/2022-1/2023)

Ký hiệu công thức	Hỗn hợp chất điều hoà sinh trưởng	Số hom thí nghiệm	Tỷ lệ hom sống (%)	Tỷ lệ hom ra rễ (%)	Số rễ TB/hom	Chiều dài rễ TB (cm)	Chỉ số ra rễ
CT6	IBA 1.000 ppm + IAA 200 ppm	90	35,56	10,00	1,67 ^c ± 0,33	7,40 ^b ± 0,66	14,07 ^b ± 3,98
CT7	IBA 1.000 ppm + IAA 400 ppm	90	28,89	10,00	2,00 ^{bc} ± 0,29	10,43 ^{ab} ± 2,82	27,37 ^{ab} ± 8,95
CT8	IBA 1.000 ppm + IAA 600 ppm	90	35,56	10,00	2,67 ^{ab} ± 0,17	7,90 ^b ± 1,21	22,63 ^b ± 4,14
CT9	IBA 1.000 ppm + IAA 800 ppm	90	37,78	20,00	3,00^a ± 0,31	12,92^a ± 1,06	38,95^a ± 4,46
CT10	IBA 1.000 ppm + IAA 1.000 ppm	90	27,78	16,67	2,60 ^{ab} ± 0,27	8,06 ^b ± 1,10	24,34 ^b ± 5,43
Đối chứng (DC)	IBA 1.000 ppm	90	27,78	3,33	1,00 ^c ± 0,00	7,53 ^b ± 1,79	7,53 ^b ± 1,79
P-value			0,6415	0,3514	0,0117	0,0149	

Những số có chữ theo sau giống nhau thì không khác biệt có ý nghĩa thống kê.
Sai số: là số sau dấu ±

Bảng 3.16c. Kết quả ảnh hưởng của hỗn hợp chất điều hoà sinh trưởng đến khả năng ngâm hom Thủy Tùng (9/2022-1/2023)

Ký hiệu công thức	Hỗn hợp chất điều hoà sinh trưởng	Số hom thí nghiệm	Tỷ lệ hom sống (%)	Tỷ lệ hom ra rễ (%)	Số rễ TB/hom	Chiều dài rễ TB (cm)	Chỉ số ra rễ
CT11	IBA 1.000 ppm + GA ₃ 200 ppm	90	28,89 ^a	0,00	-	-	-
CT12	IBA 1.000 ppm + GA ₃ 400 ppm	90	16,67 ^{bc}	0,00	-	-	-
CT13	IBA 1.000 ppm + GA ₃ 600 ppm	90	17,78 ^{abc}	0,00	-	-	-
CT14	IBA 1.000 ppm + GA ₃ 800 ppm	90	14,44 ^c	0,00	-	-	-
CT15	IBA 1.000 ppm + GA ₃ 1.000 ppm	90	14,44 ^c	0,00	-	-	-
Đối chứng (DC)	IBA 1.000 ppm	90	27,78 ^{ab}	3,33	1,00 ± 0,00	7,53 ± 1,79	7,53 ± 1,79
P-value			0,0464	-	-	-	-

Những số có chữ theo sau giống nhau thì không khác biệt có ý nghĩa thống kê.
Sai số: là số sau dấu ±

- Nhóm hỗn hợp IBA 1000 ppm phối hợp với NAA ở các nồng độ từ 200 ppm đến 1000 ppm

Kết quả phân tích Anova về tỷ lệ hom sống và tỉ lệ hom cho thấy có sự khác nhau rõ rệt giữa các công thức thí nghiệm về tỉ lệ hom sống ($P\text{-value} < 0,05$), tuy nhiên chưa có sự khác nhau rõ rệt giữa các công thức thí nghiệm về tỉ lệ hom ra rễ ($P\text{-value} > 0,05$). Kết quả phân nhóm tìm công thức tốt nhất bằng tiêu chuẩn Duncan ở độ tin cậy 95% đã xác định được công thức IBA 1.000 ppm + NAA 400 ppm cho tỷ lệ hom sống cao nhất đạt 61,11% (Phụ lục 14).

Kết quả kiểm tra thống kê theo tiêu chuẩn phi tham số Kruskal-Wallis về chỉ số ra rễ cho thấy có sự khác biệt giữa các công thức thí nghiệm (với $P\text{-value} < 0,05$). Công thức có chỉ số ra rễ tốt nhất IBA 1.000 ppm + NAA 400 ppm đạt 23,80. Sau đó, khi nồng độ NAA tăng lên thì chỉ số ra rễ giảm xuống. Thấp nhất là công thức IBA 1.000 ppm + NAA 1000 ppm với chỉ số ra rễ chỉ 3,90 (Phụ lục 14).

Như vậy, IBA 1.000 ppm + NAA 400 ppm phù hợp nhất trong các công thức thí nghiệm hỗn hợp IBA 1.000 ppm phối hợp với NAA ở các nồng độ khác.

- Nhóm hỗn hợp IBA 1.000 ppm phối hợp với IAA ở các nồng độ từ 200 ppm đến 1.000 ppm

Kết quả phân tích Anova về tỷ lệ hom sống và tỷ lệ hom ra rễ trên các công thức thí nghiệm là chưa có sự khác biệt với nhau và chưa có sự sai khác đáng kể so với đối chứng ($P\text{-value} > 0,05$).

Kết quả kiểm tra theo tiêu chuẩn phi tham số Kruskal-Wallis về chỉ số ra rễ, cho thấy có sự khác biệt về chỉ số ra rễ ở các công thức thí nghiệm (với $P\text{-value} < 0,05$). Công thức tốt nhất là IBA 1.000 ppm + IAA 800 ppm cho chỉ số ra rễ đạt cao nhất 38,95 (Phụ lục 14).

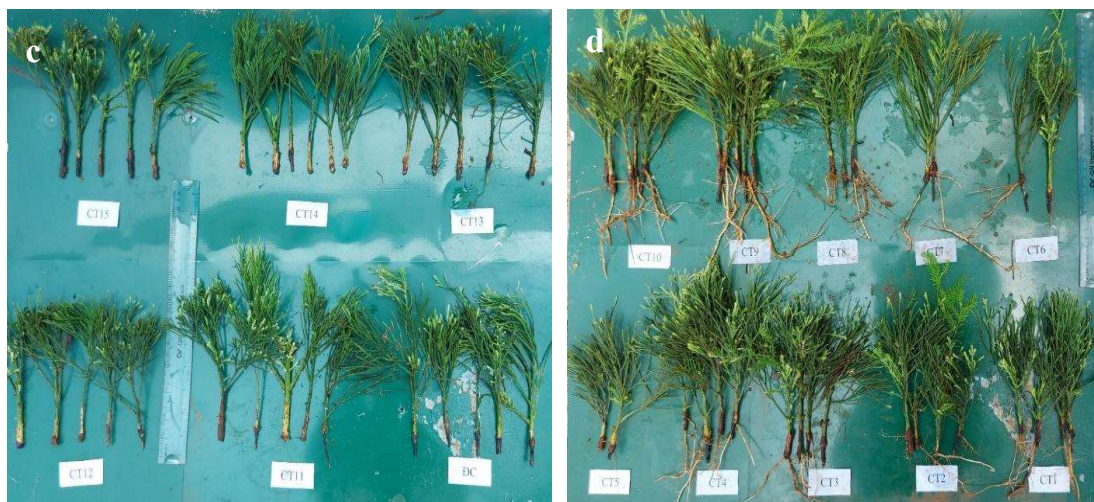
- Nhóm hỗn hợp IBA 1.000 ppm phối hợp với GA₃ ở các nồng độ từ 200 ppm đến 1.000 ppm

Sau 4 tháng theo dõi, chưa ghi nhận hom ra rễ ở các công thức thí nghiệm hỗn hợp IBA 1.000 ppm và GA₃. Do đó, hỗn hợp IBA 1.000 ppm với GA₃ chưa phù hợp để sử dụng trong nhân giống bằng hom Thủy tùng (Phụ lục 14).

So sánh hai công thức giâm hom tốt nhất là IBA 1.000 ppm + NAA 400 ppm và IBA 1.000 ppm + IAA 800 ppm về các chỉ tiêu tỉ lệ hom ra rễ và chỉ số ra rễ cho thấy, mặc dù tỉ lệ hom ra rễ không sai khác (với P-value > 0,05), tuy nhiên chỉ số ra rễ có sự khác nhau rõ rệt giữa 2 công thức thí nghiệm (với P-value < 0,05). Như vậy, khi nghiên cứu hỗn hợp các chất điều hòa sinh trưởng IBA, IAA và GA₃ trong giâm hom Thủy tùng, công thức phù hợp nhất là hỗn hợp IBA 1.000 ppm + IAA 800 ppm.

Từ kết quả số liệu giâm hom ở các thí nghiệm trên cho thấy, thời điểm lấy hom có ảnh hưởng đến kết quả giâm hom Thủy tùng. Đối với hom trẻ hóa ở đầu cành, khi xử lý hom bằng IBA 1.000 ppm, hom lấy vào tháng 3 (tỷ lệ ra rễ 34,29%) cao hơn lấy hom vào tháng 11 (tỷ lệ ra rễ 25,83%) và thấp nhất là vào tháng 9 (tỷ lệ ra rễ 3,33%). Do đó, khi giâm hom Thủy tùng vào tháng 3, nên sử dụng IBA 1000 ppm; khi giâm hom Thủy tùng vào tháng 9, sử dụng hỗn hợp IBA 1000 ppm + IAA 800 ppm là tốt nhất.

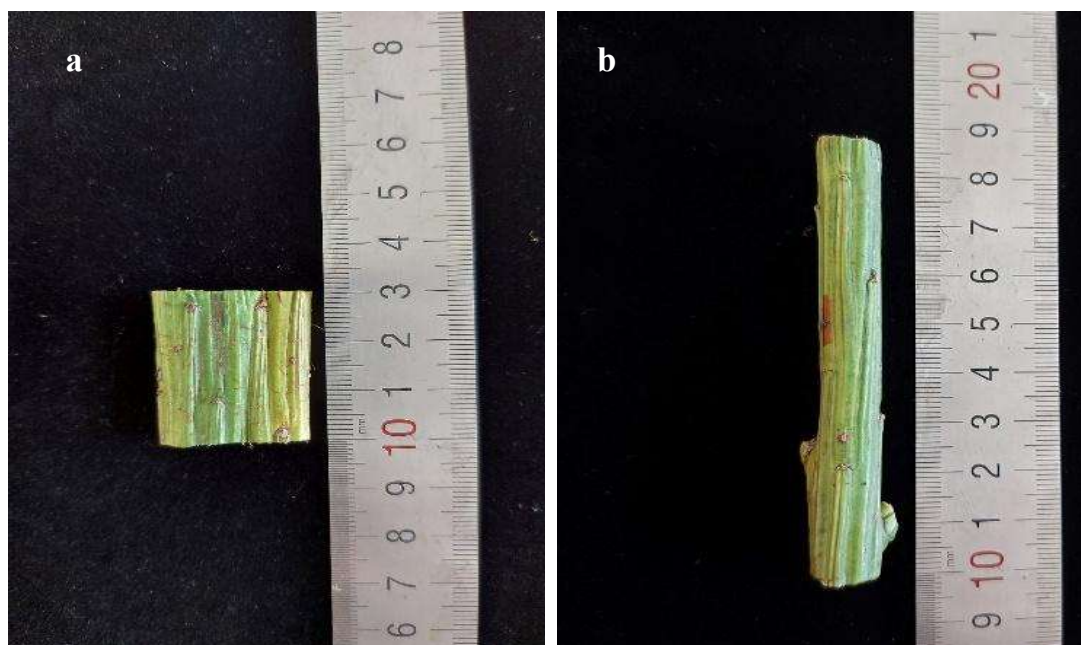




Hình 3.19. Hom Thủy tùng ra mô sẹo và ra rễ

- a. IBA 1.000 ppm + NAA 200 ppm – 1.000 ppm
- b. IBA 1.000 ppm + IAA 200 ppm – 1.000 ppm
- c. IBA 1.000 ppm + GA3 200 ppm – 1.000 ppm
- d. IBA 1.000 ppm + NAA và IAA 200 ppm – 1.000 ppm

3.3.3. Nghiên cứu kỹ thuật nhân giống Thủy tùng bằng ghép trên rễ thỏ



Hình 3.20. Vật liệu ghép

- a. Mắt ghép b. Cành ghép

3.3.3.1. Tỷ lệ sống và chất lượng cây ghép

Tỷ lệ sống là chỉ tiêu quan trọng để đánh giá hiệu quả của phương pháp nhân giống. Kết quả tỷ lệ sống trên 200 mẫu ghép, sau 22 tháng cho thấy với 2 phương pháp ghép, trên 2 khu vực khác nhau có ảnh hưởng rõ rệt đến tỷ lệ sống. Kết quả như sau:

Tại khu vực Krông Năng, tỷ lệ sống của mẫu ghép rất thấp (ghép áp mắt chỉ còn 3 cây và ghép áp cành còn 4 cây trên tổng số 40 cây ghép) sau 22 tháng. Do đó, trong báo cáo này, chỉ phân tích đánh giá cây ghép tại khu vực Ea Drăng.

Qua quan sát cho thấy, nhờ quần thể Thủy tùng khu vực Ea Drăng có chất lượng sinh trưởng tốt, cây khỏe mạnh, lá xanh tươi, mực nước ổn định hơn và số lượng rễ thở để ghép có chất lượng cao hơn Krông Năng.

Tại khu vực Ea Drăng, phương pháp ghép mắt cho tỷ lệ sống cao, đạt 52,5% trong khi phương pháp ghép cành chỉ đạt 40,0% sau 22 tháng. Điều này có thể được giải thích là ghép mắt Thủy tùng trên rễ thở có diện tích tiếp xúc giữa khảm ghép và rễ thở (kích thước khảm ghép: 3 – 4 cm x 3 cm) lớn hơn so với ghép áp cành Thủy tùng trên rễ thở (đường kính cành ghép: 8 – 10 mm), vì vậy ghép mắt cho kết quả tốt hơn. Kết quả này cũng phù hợp với Phan Ngưỡng Tinh và cộng sự, 2007 [32] khi hai cá thể gốc ghép và cành ghép có diện tích tiếp xúc lớn thì tỷ lệ sống cao và nảy mầm nhanh.

Bảng 3.17. Tỷ lệ sống chất lượng của cây ghép Thủy tùng theo phương pháp ghép sau 22 tháng

Phương pháp ghép	Số mẫu thí nghiệm	Tỷ lệ sống (%)	Chất lượng cây		
			Tốt	TB	Xấu
Ghép mắt	80	52,5%	28,6%	42,9%	28,6%
Ghép áp cành	80	40,0%	50,0%	25,0%	25,0%

Phần lớn các cây ghép đều có sinh trưởng từ trung bình đến tốt chiếm từ 71,4% đến 75%. Trong đó, ở phương pháp ghép áp cành, tỷ lệ cây sinh trưởng tốt là cao nhất (chiếm 50%) trong khi ở phương pháp ghép mắt, tỷ lệ này chỉ đạt 28,6%. Ngược lại, tỷ lệ cây có chất lượng sinh trưởng xấu ở phương pháp ghép áp cành là 25%, thấp hơn phương pháp ghép mắt là 28,6%. Bên cạnh đó, hình thái thân cây cũng cho thấy, sau 22 tháng ở phương pháp ghép áp cành có 100% cây ghép đều phát triển thành cây, trong khi ở phương pháp ghép mắt có 21,43% cây ghép có thân nằm ngang mặt đất.



Hình 3.21. Cây ghép Thuỷ tùng
a, b, c. Ghép mắt; d, e, f. Ghép áp cành

3.3.3.2. Sinh trưởng của cây ghép trên rễ thớ

Đánh giá sinh trưởng của cây ghép trên rễ thớ qua đường kính gốc và chiều cao cây. Kết quả theo dõi trên 200 mẫu ghép về sinh trưởng đường kính gốc trung bình (D_0) và chiều cao trung bình (H_{vn}) của cây ghép theo hai phương pháp ghép ở hai khu vực thí nghiệm là Ea Drăng và Krông Năng cho thấy: Sau 3 tháng tuổi, cành ghép và mắt ghép bắt đầu bật chồi. Sau 22 tháng sinh trưởng đường kính gốc và chiều cao cây ghép Thủy tùng tại 2 khu vực theo 2 phương pháp ghép như sau:

Ở Krông Năng, chỉ còn 4 cây, mặc dù sự biến động về các chỉ tiêu sinh trưởng rất lớn, tuy nhiên kết quả cũng chỉ ra rõ ràng cây ghép từ phương pháp ghép áp cành ($D_0 = 6,04$ mm; $H_{vn} = 58,67$ cm) tốt hơn phương pháp ghép mắt ($D_0 = 0,3$ mm; $H_{vn} = 30$ cm).

Ở khu vực Ea Drăng, kết quả phân tích cho thấy cây ghép áp cành sinh trưởng ($D_0 = 12,48$ mm, $H_{vn} = 83,59$ cm) cao hơn rất nhiều so với cây ghép mắt ($D_0 = 6,96$ mm và $H_{vn} = 39,20$ cm) (Phụ lục 15).

Bảng 3.18. Sinh trưởng đường kính gốc (D_0 , mm) và chiều cao (H_{vn} cm) cây ghép Thủy tùng sau 22 tháng tuổi

Phương pháp ghép	Đường kính gốc D_0 (mm)	Chiều cao H_{vn} (cm)
Ghép mắt	$6,96^b \pm 1,52$	$39,20^b \pm 6,81$
Ghép áp cành	$12,48^a \pm 1,13$	$83,59^a \pm 11,21$
P-value	0,00038	0,00015

Những số có chữ theo sau giống nhau thì không khác biệt có ý nghĩa thống kê.

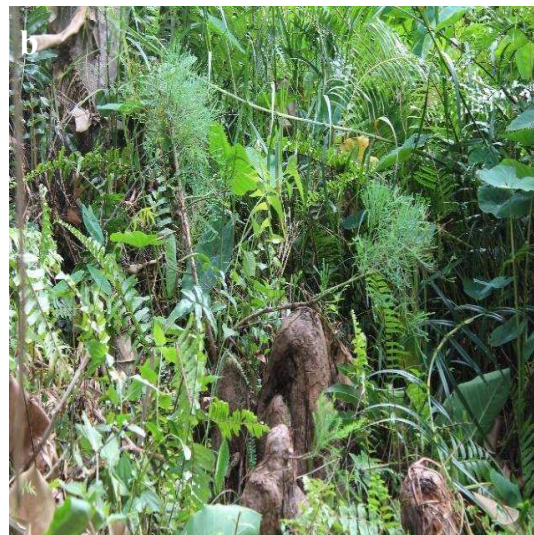
Sai số: là số sau dấu $\pm$

Như vậy, đánh giá về tỷ lệ sống và sinh trưởng cây ghép Thủy sau 22 tháng cho thấy, mặc dù phương pháp ghép mắt có tỷ lệ sống cao, tuy nhiên phương pháp ghép áp cành cho cây sinh trưởng tốt cả về đường kính, chiều cao và chất

lượng cây ghép. Điều này có thể được giải thích là do ở phương pháp ghép áp cành, có sự kết nối đầy đủ của mạch gỗ và libe, do đó cành ghép được cung cấp đầy đủ nước và chất dinh dưỡng trong khi ghép mắt thì chỉ có kết nối phần tượng tầng và libe nên mắt ghép được cung cấp chất dinh dưỡng nhiều hơn (do diện tích tiếp xúc tượng tầng và libe lớn hơn) nhưng không được cung cấp nhiều nước qua kết nối mạch gỗ nên phát triển kém hơn so với ghép cành.

Về hình thái thân cây, mặc dù phương pháp ghép áp cành có tỷ lệ sống thấp hơn, tuy nhiên sau 22 tháng theo dõi, hầu hết những cây ghép phát triển theo phương thẳng đứng, đã hình thành chồi vượt và có triển vọng phát triển thành cây. Ngược lại, ở phương pháp ghép mắt, 21,43% cây có xu hướng nằm ngang, tuy nhiên với tỷ lệ sống cao, đây là điểm ưu việt nhằm cung cấp vật liệu đã trẻ hóa cho công tác giống, đem lại hiệu quả cao trong sản xuất.

Tại khu vực Krông Năng, tỷ lệ sống và sinh trưởng của cây con thấp hơn tại khu vực Ea Drăng, nguyên nhân có thể là do ảnh hưởng của chất lượng rễ thử để ghép. Phần lớn các cây mẹ Thủy tùng tại Krông Năng là những cây ở cấp kính lớn từ 50 - 170cm, chất lượng sinh trưởng của cây mẹ trong quần thể khá thấp với hình thái thân chủ yếu là trung bình và xấu do đó chất lượng rễ thử để ghép cũng kém hơn.





Hình 3.22. Hình thái cây Thủy tùng

a, b: Ghép mắt c, d: Ghép áp cành

e, g: Cây Thủy tùng ghép áp cành sau 22 tháng

3.4. Nghiên cứu kỹ thuật trồng và chăm sóc cây Thủy tùng

3.4.1. Đánh giá một số mô hình trồng Thủy tùng trồng tập trung tại Tây Nguyên

Năm 2023, Thủy tùng được ở Gia Lai và Lâm Đồng, gồm các mô hình trồng trên đất có canh tác cây nông nghiệp ngăn ngày, trồng xen với cây Mắc ca (*Macadamia integrifolia* Maiden & Betcher), trồng theo lỗ trồng dưới tán rừng Thông ba lá (*Pinus kesiya* Royle ex Gordon) và theo lỗ trồng dưới tán rừng Bạch đàn (*Eucalyptus microcorys* F. Muell.) với nguồn gốc cây từ cây ghép trên gốc Bụt mọc. Trong đó, điều kiện lập địa trồng trên 4 mô hình như sau:

Bảng 3.19. Điều kiện lập địa các mô hình trồng Thủy tùng năm 2023

Stt	Chỉ tiêu	Mô hình			
		Trồng xen cây nông nghiệp ngăn ngày	Trồng xen Mắc ca	Trồng dưới tán rừng Thông ba lá	Trồng dưới tán rừng Bạch đàn
I	Khí hậu (2019 – 2023)				
1	Nhiệt độ không khí trung bình hàng năm (độ C)	22,5	18,4	18,4	18,4
2	Tổng lượng mưa trung bình hàng năm (mm)	1.800	1.987	1.987	1.987
3	Số tháng có lượng mưa $\geq$ 60 mm	7	8,4	8,4	8,4
II	Đất				
1	Độ cao (độ)	720	1507	1510	1407
2	Độ dốc (độ)	5	0	10	0
3	Độ dày tầng đất (cm)	>150	65	55	65
4	Loại đất	Đất feralit đỏ vàng phát triển trên đá	Đất feralit đỏ vàng phát triển trên đá	Đất feralit đỏ vàng phát triển trên đá	Đất feralit đỏ vàng phát triển trên đá

Stt	Chỉ tiêu	Mô hình			
		Trồng xen cây nông nghiệp ngắn ngày	Trồng xen Mắc ca	Trồng dưới tán rừng Thông ba lá	Trồng dưới tán rừng Bạch đàn
		bazan	bazan	bazan	bazan
5	Thành phần cơ giới đất	Thịt nhẹ (xốp)	Thịt nặng (chặt)	Thịt nặng (rất chặt)	Thịt nhẹ (xốp)
6	Độ pHKCL	4,46	4,67	4,87	4,41
7	Hữu cơ tổng số (%)	5,80	4,40	1,48	2,68
8	N tổng số (%)	0,22	0,15	0,06	0,08
9	P ₂ O ₅ dễ tiêu (mg/100g)	11,33	1,20	0,05	0,05
10	K ₂ O dễ tiêu (mg/100g)	25,81	4,34	2,72	1,63





Hình 3.23. Thủy tùng trồng tập trung năm 2023.

- a. Thủy tùng 12 tháng tuổi trồng trên đất có cạnh tác của cây nông nghiệp gần ngày.
- b. Thủy tùng 12 tháng tuổi trồng xen với cây Mắc ca.
- c. Thủy tùng 12 tháng tuổi trồng theo lỗ trống dưới tán Thông ba lá.
- d. Thủy tùng 12 tháng tuổi trồng theo lỗ trống dưới tán Bạch đàn.

Kết quả tỷ lệ sống và sinh trưởng của Thủy tùng như sau:

Bảng 3.20. Tỷ lệ sống và sinh trưởng của các mô hình Thủy tùng trồng tập trung ở giai đoạn 12 tháng tuổi

Mô hình	Tỷ lệ sống (%)	D_0 (mm)	H_{vn} (cm)
Trồng xen cây nông nghiệp gần ngày	72,92	$11,07 \pm 0,47$	$54,26 \pm 2,54$
Trồng xen Mắc ca	75,00	$8,14 \pm 0,44$	$43,24 \pm 2,39$
Trồng dưới tán rừng Thông ba lá	76,19	$8,12 \pm 0,28$	$39,31 \pm 2,41$

Mô hình	Tỷ lệ sống (%)	D ₀ (mm)	H _{vn} (cm)
Trồng dưới tán rừng Bạch đàn	55,88	7,84 ± 0,29	40,53 ± 2,25

Sai số: là số sau dấu ±

Kết quả đánh giá tỷ lệ sống và sinh trưởng của Thủy tùng trồng trên đất có canh tác cây nông nghiệp ngắn ngày cho thấy: Sau 12 tháng, tỷ lệ sống của Thủy tùng trồng trên đất có canh tác cây nông nghiệp ngắn ngày đạt 72,92%, các chỉ tiêu đường kính gốc và chiều cao lần lượt là 11,07 mm và 54,26 cm. Sinh trưởng của Thủy tùng trong mô hình này là tốt nhất so với các mô hình trồng xen khác. Nguyên nhân được giải thích là do khu vực có hàm lượng chất hữu cơ tổng số cao nhất trên các mô hình thí nghiệm: 5,8%, với đạm (N) tổng số: 0,22%; lân (P₂O₅) dễ tiêu: 11,33 (mg/100 g); kali (K₂O) dễ tiêu: 25,81 (mg/100 g). Hơn thế nữa do có tầng đất canh tác dày, đất được cày xới trên toàn bộ hiện trường giúp cho hệ rễ của cây phát triển tốt.

Trên mô hình Thủy tùng trồng xen Mắc ca (tại thời điểm trồng cây Mắc ca 5 năm tuổi), tỷ lệ sống của Thủy tùng trồng xen với cây Mắc ca sau 12 tháng là 75%, đường kính gốc và chiều cao cây ở thời điểm 12 tháng tuổi lần lượt đạt là 8,14 mm và 43,24 cm. Có thể thấy sinh trưởng của Thủy tùng ở mô hình trồng xen Mắc ca kém hơn so với mô hình trồng xen cây nông nghiệp ngắn ngày. Nguyên nhân được giải thích là do có tầng đất canh tác chỉ 45cm, với thành phần cơ giới là đất thịt nặng, có kết cấu chặt nên hệ rễ phát triển kém hơn. Hơn nữa, đây là khu vực có hàm lượng chất hữu cơ tổng số là 4,40%, thấp hơn so với khu vực trồng trên đất có canh tác cây nông nghiệp ngắn ngày. Trong đó hàm lượng các nguyên tố đa lượng cũng thấp hơn, với N tổng số là 0,15%; P₂O₅ dễ tiêu: 1,20 (mg/100 g) và K₂O dễ tiêu: 4,34 (mg/100 g).

Trên mô hình Thủy tùng trồng theo lỗ trống dưới tán rừng Thông ba lá (*Pinus*

kesiya Royle ex Gordon), tỷ lệ sống của Thủy tùng trồng theo lỗ trống dưới tán rừng Thông ba lá sau 12 tháng đạt 76,19%, các chỉ tiêu sinh trưởng đường kính gốc và chiều cao cùng độ tuổi đạt lần lượt là 8,12 mm và 39,31 cm. Nguyên nhân của sự sinh trưởng chậm này có thể là do độ tàn che của rừng Thông ba lá làm cây Thủy tùng sinh trưởng kém, ngoài ra đất dưới rừng Thông ba lá là đất có kết cấu chặt và hàm lượng chất hữu cơ tổng số là thấp 1,48%, hàm lượng các nguyên tố đa lượng cũng rất thấp, với N tổng số là 0,06%; P_2O_5 dễ tiêu là 0,05 (mg/100 g) và K_2O dễ tiêu là 2,72 (mg/100 g) cũng làm cây sinh trưởng kém.

Trên mô hình Thủy tùng trồng theo lỗ trống dưới tán rừng Bạch đàn microcorys (*Eucalyptus microcorys* F.Muell.): sau 12 tháng, tỷ lệ sống chỉ đạt 55,88%, các chỉ tiêu sinh trưởng đường kính gốc và chiều cao lần lượt đạt 7,84 mm và 40,53 cm. Có thể thấy tỷ lệ sống của Thủy tùng trong mô hình này là thấp nhất so với các mô hình khác, nguyên nhân có thể là do sự thoái hóa đất và tinh dầu trong lá Bạch đàn khi rụng là môi trường không phù hợp với Thủy tùng. Sinh trưởng của Thủy tùng trong mô hình này là chậm, tương đương với mô hình trồng dưới lỗ trống dưới tán rừng Thông ba lá có thể do đất rừng bị thoái hóa, hàm lượng chất dinh dưỡng thấp, cụ thể là hàm lượng chất hữu cơ tổng số là 2,68%, N tổng số là 0,08%; P_2O_5 dễ tiêu là 0,05 (mg/100 g) và K_2O dễ tiêu là 1,63 (mg/100 g).

Từ kết quả đo đếm tỷ lệ sống, cũng như đánh giá sinh trưởng của cây trồng trên 4 mô hình trên cho thấy: Thủy tùng có thể trồng bảo tồn ngoài khu vực phân bố của loài, trên đất không ngập nước. Có thể trồng Thủy tùng trên đất nông nghiệp để tận dụng không gian dinh dưỡng cũng như chế độ chăm sóc khi canh tác cây nông nghiệp. Có thể trồng xen Thủy tùng theo lỗ trống trên đất trồng cây công nghiệp Mắc ca, hoặc trồng xen Thủy tùng theo lỗ trống dưới tán rừng Thông 3 lá, tuy nhiên cần tiếp tục nghiên cứu chế độ chăm sóc (bón phân, tưới nước, ...) để nâng cao tỷ lệ sống, tạo điều kiện thuận lợi cho cây sinh

trưởng, phát triển trong mùa khô ở giai đoạn đầu trồng rừng.

3.4.2. Nghiên cứu ảnh hưởng của độ tàn che đến sinh trưởng cây trồng Thủy tùng

Nghiên cứu ảnh hưởng của độ tàn che nhằm xác định vị trí trồng phù hợp cho sinh trưởng của cây con trong giai đoạn đầu phát triển.

Tại khu vực phân bố tự nhiên của loài, đất thường xuyên bị ngập nước, tầng thảm mục dày 65 - 75 cm, đó đó để trồng Thủy tùng tại khu vực này cần đắp đất tạo thành các ụ đất có đường kính 50cm, đảm bảo nước ngập như nhau, và không ngập lên gốc cây vào mùa nước cao nhất trong năm. Do đó, nhân tố thổ nhưỡng và độ ẩm đất được coi là có ảnh hưởng như nhau đến tỷ lệ sống và sinh trưởng của Thủy tùng trên các công thức thí nghiệm.



Hình 3.24. Cây thủy tùng trên các ụ đất ở các độ tàn che khác nhau

Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của độ tàn che đến sinh trưởng của Thủy tùng trồng tại khu vực phân bố của loài được thể hiện qua tỷ lệ sống, sinh trưởng đường kính gốc và chiều cao cây sau 18 tháng theo dõi như sau:

Bảng 3.21 Tỷ lệ sống và sinh trưởng Thủy tùng theo độ tàn che sau 18 tháng tại xã Ea Drăng, tỉnh Đắk Lắk

Ký hiệu	Độ tàn che	Số cây thí nghiệm	Tỷ lệ sống (%)	D₀ (mm)	H_{vn} (cm)	Phẩm chất (%)	
						Tốt	Trung bình Xấu
ĐCT1	≤ 0,25	25	40,00	7,94 ± 1,20	47,89 ^{ab} ± 7,25	15,63	9,38 6,25
ĐTC2	> 0,25 – 0,50	25	53,57	8,48 ± 1,37	63,36^a ± 9,58	34,38	9,38 3,13
ĐTC3	> 0,50 – 0,75	25	20,00	6,46 ± 0,59	34,25 ^{bc} ± 2,17	3,13	12,50 0,00
ĐCT4	> 0,75	25	10,00	4,50 ± 0,20	20,00 ^c ± 0,00	0,00	3,13 3,13
P-value				0,26975	0,03902		

Những số có chữ theo sau giống nhau thì không khác biệt có ý nghĩa thống kê.

Sai số: là số sau dấu ±

Từ kết quả tỷ lệ sống của cây trồng ở Bảng 3.21 cho thấy, cây trồng ở ĐTC2 cho tỷ lệ sống cao nhất, đạt 53,57%, tiếp theo sau là ĐTC1 và ĐTC3 lần lượt là 40% và 20%. Thấp nhất là ĐTC4, chỉ 10%. Điều này cho thấy, độ tàn che ảnh hưởng lớn đến tỷ lệ sống của cây. Tỷ lệ sống tốt nhất ở độ tàn che 0,25 - 0,5.

Sau 18 tháng, ở các độ tàn che khác nhau, đường kính gốc trung bình của Thủy tùng là không khác biệt (với P-value > 0,05), trong khi đó chiều cao vút ngọn trung bình là có khác biệt rõ (với P-value < 0,05). Độ tàn che tốt nhất là 0,25 – 0,5, cho đường kính gốc trung bình của cây trồng đạt 8,48 mm và chiều cao vút ngọn đạt đến 63,36 cm. Tiếp theo là độ tàn che từ < 0,25 với các giá trị đường kính gốc trung bình và chiều cao vút ngọn trung bình lần lượt là 7,94 mm và 47,89 cm. Thấp nhất là ở độ tàn che > 0,75 với các chỉ tiêu theo dõi lần lượt là D_0 : 4,5 mm và H_{vn} : 20 cm (Phụ lục 16)

Đánh giá chất lượng cây trồng cũng cho thấy, ở ĐTC1, tỷ lệ cây sinh trưởng tốt đạt 15,63%. Ở ĐTC2, tỷ lệ này đạt cao nhất 34,38%. Ngược lại ở ĐTC3, chủ yếu các cây sinh trưởng là trung bình (12,5%) và ở ĐTC4, chủ yếu cây trồng sinh trưởng trung bình hoặc yếu (3,13%). Như vậy, ở độ tàn che 0,25 – 0,5 cho chất lượng cây trồng tốt nhất với tỷ lệ cây khỏe mạnh chiếm tỷ lệ cao nhất (34,38%).

Từ kết quả phân tích tỷ lệ sống, chất lượng cây trồng và sinh trưởng đường kính gốc cũng như chiều cao cây cho thấy, độ tàn che tốt nhất là 0,25 – 0,5. Sau 18 tháng, tỷ lệ sống đạt 53,57%, phần lớn cây sinh trưởng khỏe mạnh (chiếm 34,38% tổng số cây thí nghiệm) với đường kính gốc trung bình cao nhất 8,48 mm và chiều cao cao nhất là 54,79 cm. Điều này cũng phù hợp với kết luận của Fagen và cộng sự (2005) [55] và Han (1996) [57] rằng cây con Thủy tùng cần có đủ ánh sáng mặt trời, cây mọc dưới bóng râm sinh trưởng yếu ớt và dễ bị bệnh. Cindy và cộng sự (2019) [46] cũng khuyến cáo rằng cần có biện pháp

kiểm soát mật độ tầng dưới tán để cung cấp đủ ánh sáng, đảm bảo sự sống sót của cây giống Thủy tùng trong việc bảo tồn loài.



Hình 3.25. Cây Thủy tùng từ hom
a. 6 tháng tuổi; b. 18 tháng tuổi

3.4.3. Nghiên cứu kỹ thuật bón phân cây trồng Thủy tùng

Kết quả điều tra điều kiện lập địa khu vực trồng Thủy tùng cho thấy: Nhiệt độ không khí trung bình hàng năm $18,4^{\circ}\text{C}$. Tổng lượng mưa trung bình hàng năm 1.987 mm và số tháng có lượng mưa ≥ 60 mm là 7 tháng. Chủ yếu là loại đất feralit đỏ vàng có thành phần cơ giới thịt nặng, độ cao so với mặt nước biển: 1.500 m, độ dày tầng đất: 65 cm, pHKCl: 6,28. Thực vật chủ yếu các loài Cỏ lau (*Saccharum arundinaceum* Retz.), Đơn kim (*Bidens pilosa* L.) và Cỏ lá gừng (*Axonopus compressus* (Sw.) P. Beauv.), với độ che phủ lên đến 80%. Bên cạnh đó, trong mùa khô, cây trồng không được tưới nước,

Sau 3 tháng trồng, bắt đầu thu thập số liệu về tỷ lệ sống, sinh trưởng của cây trên các công thức thí nghiệm. Kết quả sau 12 tháng như sau:

Bảng 3.22. Sinh trưởng Thủy tùng theo các công thức bón phân sau 12 tháng tại thành phố Đà Lạt, tỉnh Lâm Đồng

Công thức	Số cây thí nghiệm	Tỷ lệ sống (%)	D ₀ (mm)	H (cm)	Phẩm chất (%)		
					Tốt	Trung bình	Xấu
BP1	150	77,78	8,53^a ± 0,32	39,24 ± 1,48	90,48	4,76	4,76
BP2	150	55,56	7,26 ^{bc} ± 0,30	36,93 ± 1,59	80,00	13,33	6,67
BP3	150	55,56	7,46 ^{bc} ± 0,26	37,07 ± 0,62	86,67	6,67	6,67
BP4	150	60,71	7,98 ^{ab} ± 0,35	39,41 ± 2,49	88,24	5,88	5,88
Đối chứng (DC)	150	63,64	6,76 ^c ± 0,50	32,14 ± 2,21	78,57	14,29	7,14
P-value			0,0047	0,0857			

Những số có chữ theo sau giống nhau thì không khác biệt có ý nghĩa thống kê.

Sai số: là số sau dấu ±

Kết quả theo dõi trên 5 công thức bón phân, sau 12 tháng, tỷ lệ sống ở BP1 là cao nhất 77,78%, và thấp nhất là BP2 và BP3, chỉ 55,56%. Việc giữ lại thực bì khi bố trí thí nghiệm có vai trò giữ ẩm cho đất, tuy nhiên do mùa khô kéo dài (6 tháng), trong khi cây trồng chưa lấy được nước từ thung lũng và cũng không được tưới bổ sung nước vào mùa khô là nguyên nhân chủ yếu làm tỷ lệ sống của Thủy tùng trên cả 4 công thức bón phân và đối chứng đều thấp (< 80%).

Đánh giá sinh trưởng cây trồng trên các công thức thí nghiệm theo chỉ tiêu đường kính gốc và chiều cao cây như sau:

Sinh trưởng đường kính của cây trồng trên các nghiệm thức đều có tăng, trong đó, cây trồng ở các công thức có bón phân đều cho sinh trưởng đường kính tốt hơn công thức đối chứng. Tại thời điểm tháng thứ 12, sinh trưởng của

cây trên các nghiệm thức dao động từ 6,76 – 8,53 mm. Kết quả phân tích phi tham số Kruskal-Wallis cho thấy, sinh trưởng đường kính gốc ở các công thức thí nghiệm bón phân là khác biệt với P-value < 0,05, trong đó công thức bón phân BP1 là cao nhất đường kính gốc đạt 8,53 mm. Thấp nhất là công thức đối chứng chỉ đạt 6,76 mm (Phụ lục 17).

Tương tự sinh trưởng đường kính gốc, chiều cao cây đều tăng sau 12 tháng theo dõi. Sau 12 tháng, chiều cao cây trung bình dao động từ 32,14 – 39,24 cm. Trong đó, ở công thức BP1 và BP4 có sinh trưởng chiều cao cây trung bình cao hơn các công thức còn lại. Tuy nhiên, sự khác biệt này là không đáng kể (với P-value > 0,05) (Phụ lục 17).

Kết quả theo dõi chất lượng sinh trưởng cây trồng trên các công thức thí nghiệm sau 12 tháng cho thấy, phần lớn các cây trồng trên các công thức thí nghiệm đều có phẩm chất tốt, cao nhất là ở công thức BP1(90,48%), tiếp theo là BP4, BP3 và BP2. Thấp nhất là công thức đối chứng, chỉ 78,57%.

Từ kết quả phân tích tỷ lệ sống, chất lượng cây trồng cũng như các chỉ tiêu sinh trưởng của cây cho thấy, công thức bón phân BP1 (27 g urê + 175g supe lân + 25 g kali (Tương đương 12,5 g N + 12,5 g P + 12,5 g K) là tốt nhất, sau 12 tháng tỷ lệ sống là 77,78%, cây khỏe mạnh, lá xanh tốt đạt trên 90%, đường kính gốc trung bình là 8,53 mm và chiều cao trung bình là 39,24 cm. Tuy nhiên, kết quả đánh giá chỉ mới ở bước đầu, cần tiếp tục theo dõi để có kết luận khoa học chính xác hơn.

3.5. Đề xuất một số biện pháp bảo tồn nguồn gen Thủy tùng tại Tây Nguyên

Hiện nay, ở Việt Nam chỉ còn 159 cá thể Thủy tùng tự nhiên, phân bố tại 2 quần thể tại xã Ea Drăng, và xã Krông Năng, tỉnh Đắk Lắk. Năm 2011, đã thành lập Ban quản lý Khu bảo tồn loài-sinh cảnh Thông nước và tình trạng chặt phá, lấn chiếm đất rừng đã chấm dứt, tuy nhiên đến nay số lượng cá thể Thủy tùng tự nhiên vẫn tiếp tục suy giảm. Bên cạnh đó, đánh giá đa dạng di truyền của tất

cả 159 cá thể tự nhiên cho thấy mức độ đa dạng thấp. Để bảo tồn và phát triển nguồn gen quý hiếm này, trong thời gian tới cần tiến hành một số biện pháp bảo tồn phát triển dưới đây:

3.5.1. Tăng cường công tác bảo tồn *in situ*

Tại hai quần thể tự nhiên, định kỳ chăm sóc phát dọn, chặt bỏ dây leo quấn quanh thân cây, tạo điều kiện thuận lợi cho cây sinh trưởng, phát triển.



Hình 3.26. Phát dọn dây leo quấn quanh thân cây Thủy tùng tại Ea Drăng

Bên cạnh việc bảo vệ nghiêm ngặt quần thể Thủy tùng tự nhiên hiện có, cần có giải pháp trồng bổ sung để tạo thế hệ cây được trẻ hóa thay thế lứa cây già cỗi bằng cách lấy hom cành đã được trẻ hóa của cây mẹ và ghép lại vào rễ thõ cây mẹ để tạo thành quần thể cây mới được trẻ hóa (có thể ghép 3 - 4 cành ghép vào rễ thõ cây mẹ sau đó chọn lấy 1 cây sinh trưởng tốt nhất để lại và loại bỏ các cây khác). Bên cạnh đó, có thể liên tục trồng cây mới có nguồn gốc từ giâm hom hoặc ghép trên gốc Bụt mọc để tạo quần thể đa dạng về cấp tuổi, và trẻ hóa quần thể tự nhiên.

3.5.2. Xây dựng các khu bảo tồn *ex situ* và thúc đẩy trồng rừng phân tán

Bên cạnh công tác bảo tồn *in situ* thì việc xây dựng các khu bảo tồn *ex situ* cho Thủy tùng là rất cần thiết. Giải pháp tối ưu nhất là bảo tồn *ex situ* của toàn

bộ 159 cây mẹ bằng cách nhân giống hom được trẻ hóa hoặc ghép trên gốc ghép Bụt mọc. Để duy trì cấu trúc di truyền quần thể, cần thiết phải trồng một số lượng cây con đồng đều của các cây mẹ. Trong trường hợp không thể bảo tồn *in situ* toàn bộ số cá thể này thì cần bảo tồn số lượng cá thể nhiều nhất có thể, ít nhất là 20 cá thể, trong đó ưu tiên những cá thể có khoảng cách di truyền xa nhau. Bên cạnh đó, cần theo dõi vật hậu để đánh giá khả năng tái sinh bằng hạt khi môi trường sống của các cá thể đã thay đổi khác biệt so với quần thể tự nhiên.

Bên cạnh việc xây dựng các quần thể bảo tồn *ex situ* tập trung thì một giải pháp có hiệu quả để bảo tồn loài cây này là thúc đẩy xã hội hóa công tác bảo tồn bằng cách nhân giống và cung cấp cây giống với đầy đủ thông tin phả hệ cho người dân, đồng thời hướng dẫn người dân kỹ thuật trồng. Các cây và địa điểm trồng cần được đưa vào cơ sở dữ liệu theo dõi phục vụ công tác bảo tồn và phát triển.

3.5.3. Tăng cường đa dạng di truyền loài Thủy tùng

Trên thế giới, Thủy tùng có phân bố ở Lào, Trung Quốc và Việt Nam. Trong đó, quần thể ở Lào được cho là quần thể tự nhiên đẹp nhất thế giới và có mức độ đa dạng di truyền cao hơn các quần thể khác. Ở Trung Quốc, Thủy tùng đã được trồng rộng rãi. Kết quả phân tích di truyền cũng cho thấy quần thể Thủy tùng ở Việt Nam hoàn toàn tương đồng với quần thể ở Lào và Trung Quốc. Do đó có thể xây dựng phương án hợp tác để trao đổi nguồn gen Thủy tùng các quần thể ở Lào hoặc Trung Quốc để làm tăng đa dạng di truyền quần thể bằng cách lấy hạt của các cây mẹ hoặc cây hom hoặc cành ghép tại các nước này để tạo cây giống mới và trồng trong khu vực phân bố tự nhiên của loài cũng như trong các khu bảo tồn *ex situ*.

3.5.4. Đẩy mạnh giáo dục và truyền thông bảo tồn Thủy tùng

Đẩy mạnh hoạt động giáo dục và truyền thông giúp nâng cao nhận thức và huy động sự tham gia của cộng đồng đóng vai trò then chốt trong chiến lược bảo tồn loài, đồng thời phổ biến các kiến thức, kỹ thuật để phát triển nguồn gen cây Thủy tùng tại Tây Nguyên. Một số nội dung hoạt động cụ thể được đề xuất bao gồm: (1) Tăng cường cung cấp kiến thức khoa học về loài Thủy tùng: Xây dựng bộ tài liệu phổ thông và chuyên sâu về loài Thủy tùng, bao gồm: Đặc điểm phân loại, sinh thái học, hiện trạng quần thể và nguyên nhân dẫn đến nguy cơ tuyệt chủng trong tự nhiên. Các tài liệu này sẽ được chuyển tải thông qua các hoạt động như: Tổ chức các buổi tham quan, học tập ngoại khóa tại khu bảo tồn, biên soạn các video, poster và sách ảnh phục vụ giáo dục trong trường học và truyền thông cộng đồng, xây dựng chuyên mục riêng trên các nền tảng mạng xã hội, website của cơ quan chức năng để phổ biến kiến thức. (2) Truyền thông về chính sách và pháp luật liên quan đến bảo tồn loài: Phối hợp với cơ quan kiểm lâm, chính quyền địa phương để phổ biến các quy định pháp luật liên quan đến bảo vệ loài nguy cấp như Thủy tùng (Nghị định 06/2019/NĐ-CP, Luật Lâm nghiệp 2017, v.v.), tập trung vào các chế tài xử phạt đối với hành vi chặt phá, khai thác trái phép. Các hoạt động có thể bao gồm sản xuất và phát sóng các chuyên mục truyền hình, phóng sự, tọa đàm trên đài phát thanh – truyền hình địa phương; phát tờ rơi, áp phích tại các điểm trường, trạm kiểm lâm, UBND xã và nơi công cộng; xây dựng nội dung truyền thông số phát hành qua Zalo, Facebook và các nhóm cộng đồng dân cư. (3) Phổ biến kỹ thuật nhân giống và trồng rừng Thủy tùng: Tổ chức các khóa tập huấn, đào tạo ngắn hạn cho cán bộ lâm nghiệp và người dân về kỹ thuật nhân giống vô tính cũng như kỹ thuật trồng rừng và chăm sóc Thủy tùng. Các hoạt động có thể tiến hành như: hướng dẫn thực hành tại hiện trường vườn ươm và rừng trồng thí nghiệm; cung cấp tài liệu hướng dẫn kỹ thuật bằng hình ảnh và video; xây dựng mô hình

thí điểm trồng rừng Thủy tùng tại các cộng đồng bản địa để nhân rộng và lan tỏa mô hình.

Việc triển khai đồng bộ các hoạt động trên không chỉ nâng cao hiểu biết của người dân về giá trị của loài Thủy tùng mà còn góp phần tăng cường giám sát cộng đồng, giảm thiểu các hành vi vi phạm và thúc đẩy vai trò chủ động của cộng đồng trong công tác bảo tồn và phát triển bền vững loài cây quý hiếm này.

KẾT LUẬN, TỒN TẠI VÀ KIẾN NGHỊ

1. Kết luận

1.1. Thực trạng quần thể Thủy tùng tại Tây Nguyên

- Số lượng Thủy tùng tự nhiên tại Tây Nguyên còn lại là 159 cây. Tại Ea Drăng có 141 cây, các cá thể có triển vọng sinh trưởng tốt. Tại Krông Năng có 18 cây, các cá thể đang trong tình trạng sinh trưởng kém với hình thái thân chủ yếu là trung bình và xấu (chiếm 61,11%).
- Bên cạnh quần thể tự nhiên, tại Tây Nguyên còn có 200 cây Thủy tùng trồng phân tán. Thủy tùng sinh trưởng tốt khi được trồng ở gần nguồn nước hoặc được tưới ẩm thường xuyên, có thể đạt tăng trưởng đường kính từ 2,5 đến 2,8 cm/năm. Thủy tùng sinh trưởng kém hơn khi được trồng ở nơi không được tưới ẩm hoặc bị ngập thường xuyên.
- Thủy tùng trồng phân tán tại xã Krông Năng và tại xã Ea Drăng bị sâu đục thân *Zeuzera multistrigata* gây hại. Ở khu vực Krông Năng mức độ thiệt hại nặng với tỷ lệ cây bị hại $P\% = 94,1\%$ và chỉ số hại trung bình $DI = 2,18$. Ở khu vực Ea Drăng mức độ thiệt hại nhẹ với $P\% = 14,29\%$ và $DI = 0,14$.

1.2. Đa dạng di truyền quần thể Thủy tùng tự nhiên tại Tây Nguyên

- Các quần thể Thủy tùng tự nhiên ở Tây Nguyên có mức độ đa dạng di truyền khá thấp.
- Các chỉ số đa dạng di truyền của hai quần thể Thủy tùng là số alen quan sát được $N_a = 1,767$; số alen có ý nghĩa $N_e = 1,379$; hệ số Shannon $I = 0,365$; hệ số đa dạng di truyền $H_e = 0,233$ và phần trăm đa hình $PPB = 80,81\%$.
- Khoảng cách di truyền giữa các cá thể Thủy tùng nghiên cứu là tương đối thấp, dao động từ 0,001 đến 0,023.
- Mức độ tương đồng di truyền cao 97,0% đồng nghĩa với sự khác biệt di truyền giữa hai quần thể tại Ea Drăng và Krông Năng, tỉnh Đắk Lắk là không lớn, chính tỏ chúng có cùng nguồn gốc, xuất xứ.

- Trình tự vùng gen lục lạp *rbcL* và *matK* của quần thể Thủy tùng tại Tây Nguyên có mức độ tương đồng rất cao với trình tự trên ngân hàng gen NCBI cho thấy chúng cùng là loài Thủy tùng tại Lào và Trung Quốc. Do đó, có thể xây dựng phương án hợp tác trao đổi nguồn gen từ các nước này về Việt Nam để bổ sung nguồn gen cho quần thể Thủy tùng ở Việt Nam.

1.3. Kỹ thuật nhân giống in vitro Thủy tùng

- Loại chất khử trùng là TCCA và thời gian khử trùng là 20 phút cho tỷ lệ mẫu sạch đạt cao nhất 82,22% và tỷ lệ mẫu bật chồi là 46,46%.
- Môi trường WPM + BA 0,5 mg/l là phù hợp để nhân nhanh chồi Thủy tùng, với số chồi trung bình/ mẫu là 1,31 chồi và chiều cao chồi đạt 3,87 cm.
- Môi trường WPM + NAA 30 ppm là thích hợp để kích thích ra rễ Thủy tùng, với tỷ lệ ra rễ đạt 54,55%.

1.4. Kỹ thuật nhân giống hom Thủy tùng

- Vào mùa khô (tháng 3): Sử dụng hom Thủy tùng dài 11 – 12 cm, ngâm gốc hom trong dung dịch IBA 1.000 ppm trong 2 giờ cho kết quả cao nhất với tỷ lệ hom ra rễ đạt 34,29%, và chất lượng bộ rễ tốt.
- Vào mùa mưa (tháng 9): Sử dụng hỗn hợp chất điều hòa sinh trưởng IBA 1.000 ppm + IAA 800 ppm cho kết quả khả quan với tỷ lệ hom ra rễ 20%, cao hơn rõ rệt so với công thức sử dụng IBA 1.000 ppm chỉ đạt 3,3%, và chất lượng bộ rễ tốt.

1.5. Kỹ thuật ghép trên rễ thở cây mẹ

- Sau 22 tháng, tại khu vực Ea Drăng, phương pháp ghép mắt cho tỷ lệ sống 52,5% cao hơn so với ghép áp cành 40,0%. Tuy nhiên cây ghép bằng phương pháp ghép áp cành trên rễ thở cây mẹ tự nhiên sinh trưởng ($D_0 = 12,48$ mm, $H_{vn} = 83,59$ cm) tốt hơn phương pháp ghép mắt ($D_0 = 6,96$ mm và $H_{vn} = 39,20$ cm).

1.6. Kỹ thuật trồng và chăm sóc cây Thủy tùng

- Đối với phương thức trồng dưới tán cây mẹ, độ tàn che tốt nhất để trồng là $\leq 0,5$, sau 18 tháng, tỷ lệ sống đạt 53,57%, đường kính gốc trung bình cao nhất đạt 8,48 mm và chiều cao là 63,36 cm.
- Đối với phương thức trồng thuần loài trên đất trống, công thức bón phân tốt nhất: 27 g urê + 175g supe lân + 25 g kali, sau 12 tháng, tỷ lệ sống đạt 77,78%, đường kính gốc đạt 8,53 mm và chiều cao là 39,24 cm.

1.7. Đề xuất một số biện pháp bảo tồn nguồn gen Thủy tùng tại Tây Nguyên

- Tiếp tục bảo vệ nghiêm ngặt quần thể Thủy tùng tự nhiên hiện có.
- Tăng cường bảo vệ môi trường sống của quần thể Thủy tùng tự nhiên để cây sinh trưởng phát triển tốt, đồng thời có giải pháp quản lý, cải thiện chất lượng môi trường nước, hạn chế tình trạng đổ thuốc bảo vệ thực vật xuống hồ.
- Xây dựng các khu bảo tồn *ex situ* tại Đắk Lắk, Gia lai, Lâm Đồng, với số lượng cá thể nhiều nhất có thể và ưu tiên các cây có khoảng cách di truyền xa nhau. Kết hợp với theo dõi vật hậu để đánh giá khả năng tái sinh bằng hạt của loài.
- Tăng cường đa dạng di truyền loài Thủy tùng thông qua xây dựng phương án hợp tác trao đổi nguồn gen Thủy tùng các quần thể ở Lào hoặc Trung Quốc để làm tăng đa dạng di truyền quần thể.
- Đẩy mạnh giáo dục và truyền thông bảo tồn Thủy tùng

2. Tồn tại

Mặc dù đã có nhiều cố gắng, tuy nhiên do hạn chế về thời gian, luận án vẫn còn một số tồn tại như sau:

- Chưa hoàn thiện được chế độ chăm sóc, huấn luyện cây nhân giống *in vitro* cho đến khi cây đạt tiêu chuẩn xuất vườn.
- Thời gian theo dõi các thí nghiệm kỹ thuật trồng và chăm sóc còn ngắn nên kết quả mới chỉ là bước đầu. Hơn nữa chưa nghiên cứu được chế độ tưới ẩm

vào mùa khô ở Tây Nguyên.

3. Kiến nghị

Để bảo tồn nguồn gen Thủy tùng tại Tây Nguyên một cách hữu hiệu, chúng tôi có một số kiến nghị như sau:

- Quản lý nghiêm ngặt hai quần thể Ea Drăng và Krông Năng, duy trì số lượng cá thể hiện có và bổ sung các thể hệ khác tuổi (trồng từ cây hom, ghép trên rễ thở, ...) nhằm tạo ra quần thể đa dạng về cấp tuổi, trên cơ sở đó trẻ hóa quần thể, nâng cao tính đa dạng di truyền cũng như khả năng tiến hóa của loài.
- Nghiên cứu di thực một số nguồn gen Thủy tùng từ các nước khác kết hợp với nguồn gen bản địa để xây dựng các khu bảo tồn chuyên chỗ Thủy tùng trên một số lập địa thích hợp tại Tây Nguyên nhằm bảo tồn và cải thiện mức độ đa dạng di truyền loài cây này.
- Tiếp tục chăm sóc, bảo vệ, và theo dõi đánh giá tình hình sinh trưởng của các mô hình trồng tập trung và phân tán Thủy tùng đã xây dựng nhằm phát triển nguồn gen loài cây này tại Tây Nguyên.

CÁC CÔNG TRÌNH ĐÃ CÔNG BỐ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN

1. Giang Thị Thanh, Lưu Thế Trung, Phan Thanh Tuấn, Nguyễn Thị Mai Đào, Lê Văn Huy, Võ Nhất Trí, Nguyễn Tấn Phục, Trần Đức Trọng, Võ Thành Tám, Ngô Văn Cầm, Nguyễn Đức Kiên (2023), “Nghiên cứu kỹ thuật nhân giống Thủy tùng (*Glyptostrobus pensilis* Staunton Ex D. Don) K.Koch) bằng phương pháp ghép trên rễ thỏ tại Đắk Lắk, Việt Nam.”, *Tạp chí Khoa học Lâm nghiệp*, (4), tr. 10 – 17.
2. Giang Thị Thanh, Lưu Thế Trung, Trần Văn Ninh, Ngô Văn Cầm, Nguyễn Đức Kiên, Nguyễn Thị Huyền, Trần Thị Thu Hà, Nguyễn Thị Việt Hà, Lê Thị Thủy, Lê Sơn (2024), “Đánh giá đa dạng di truyền nguồn gen cây Thủy tùng (*Glyptostrobus pensilis* (Staunton ex D.Don) K.Koch) sử dụng chỉ thị isst”, *Tạp chí Khoa học Lâm nghiệp*, (4), tr. 4 - 14.
3. Giang Thị Thanh, Nguyễn Như Hiến, Lưu Thế Trung, Ngô Văn Cầm, Nguyễn Đức Kiên (2024), “Hoàn thiện kỹ thuật nhân giống Thủy tùng (*Glyptostrobus Pensilis*) bằng phương pháp giâm hom.”, *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn*, (18) tr. 15 – 22.
4. Giang Thị Thanh, Lưu Thế Trung, Ngô Văn Cầm, Nguyễn Đức Kiên, Nguyễn Minh Chí (2024), “*Zeuzera multistrigata* Moore (Lepidoptera: Cossidae) damaging three new host plants in Vietnam”, *Tạp chí Ecologica Montenegrina* (77), tr. 200-210.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Tài liệu tiếng Việt

1. Bộ Tài nguyên và Môi trường (2012), *Chiến lược quốc gia về đa dạng sinh học đến năm 2020, tầm nhìn đến năm 2030*, Bộ Tài nguyên và Môi trường, Hà Nội.
2. Bộ Khoa học và Công nghệ (2018), *Tiêu chuẩn quốc gia TCVN 12509-2:2018 về Rừng trồng - Rừng sau thời gian kiến thiết cơ bản - Phần 2: Nhóm loài cây sinh trưởng chậm*. Bộ Khoa học và Công nghệ, Hà Nội.
3. Chính phủ nước Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (2021), *Nghị định số 84/2021/NĐ-CP của Chính phủ: Sửa đổi, bổ sung một số điều của Nghị định số 06/2019/nđ-cp ngày 22 tháng 01 năm 2019 của Chính phủ về quản lý thực vật rừng, động vật rừng nguy cấp, quý, hiếm và thực thi công ước về buôn bán quốc tế các loài động vật, thực vật hoang dã nguy cấp*, Số: 84/2021/NĐ-CP ngày 22 tháng 9 năm 2021, Hà nội.
4. Ngô Văn Cầm (2017), *Báo cáo tổng kết đề tài nghiên cứu khoa học và phát triển công nghệ năm 2017: Hoàn thiện kỹ thuật giâm hom Thủy tùng (Glyptostrobus pensilis K.Koch) và trồng thử nghiệm tại Tây Nguyên*, Trung tâm Lâm nghiệp Nhiệt đới, Viện Khoa học Lâm nghiệp Nam Trung Bộ và Tây Nguyên.
5. Ngô Văn Cầm, Nguyễn Như Hiến, Cao Thị Lý, Phạm Tiến Bằng, Thiều Giang Ly, Lê Thị Thu Hồng (2016), “Ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng và loại hom đến khả năng ra rễ của hom Thủy tùng (*Glyptostrobus pensilis*)”, *Tạp chí Khoa học Lâm nghiệp*, Số 2 – 2016. Tr. 4301 – 4305.
6. Nguyễn Thành Danh và Vương Đình Tuấn (2008), *Xây dựng kỹ thuật nhân giống vô tính cây Thanh thất (Ailanthus triphysa)*. Luận văn tốt nghiệp Đại học. Trường Đại học Nông Lâm TP. Hồ Chí Minh.
7. Danh lục đỏ Việt Nam (2024),

<http://vnredlist.vast.vn/glyptostrob-us-pensilis-d-don-k-koch-1873/>

8. Vũ Đình Duy, Bùi Thị Tuyết Xuân, Trần Vinh, và Nguyễn Thị Minh Tâm (2010), “Phân tích đa dạng và quan hệ di truyền quần thể Thủy tùng (*Glyptostrob-us pensilis*) ở Đắk Lắk bằng chỉ thị SSR”, *Tạp chí Công nghệ Sinh học*, 8 (3), 331-336.
9. Vũ Đình Duy, Bùi Thị Tuyết Xuân, Đỗ thị phương thảo, Phan kế lộc, Nguyễn Minh Tâm (2016), “Nghiên cứu đa dạng và biến đổi di truyền ở quần thể tự nhiên của dưới loài Thông xuân nha (*Pinus armandii* subsp xuannhaensis L K Phan) đặc hữu hẹp ở sơn la, Việt Nam bằng chỉ thị ISSR, *Tạp chí Công nghệ Sinh học*, 14 (3), 441 – 450.
10. Nguyễn Thị Mỹ Duyên, Trương Phi Yến, Nguyễn Vũ Phong, 2020, *Bước đầu tạo phôi vô tính từ mô sẹo lá cây Xáo tam phân (Paramignya trimera (Oliv.) Guillaum)*, Hội nghị Công nghệ Sinh học toàn quốc 2020, Bộ môn Công nghệ Sinh học - Trường Đại học Nông Lâm Thành phố Hồ Chí Minh. 879 – 884.
11. Nguyễn Như Hiến, Ngô Văn Cầm, Phạm Tiến Bằng (2015), *Nghiên cứu kỹ thuật nhân giống cây Thủy tùng (Glyptostrob-us pensilis) bằng phương pháp mô – hom và thủy canh phục vụ bảo tồn ở Tây Nguyên*, Trung tâm Lâm nghiệp Nhiệt đới, Gia Lai.
12. Phạm Hoàng Hộ (1999), *Cây cỏ Việt Nam*, Nhà xuất bản trẻ, Hồ Chí Minh.
13. Trần Hợp (2002), *Tài nguyên cây gỗ rừng Việt Nam*, Nhà xuất bản Nông nghiệp, Thành phố Hồ Chí Minh.
14. Bảo Huy (2010), *Dự án bảo tồn loài sinh cảnh Thuỷ tùng (Glyptostrob-us pensilis) tại tỉnh Đắk Lắk giai đoạn 2011-2015*, Đại học Tây Nguyên và Sở Nông nghiệp và Phát triển nông thôn Đắk Lắk, Đắk Lắk.
15. Bảo Huy (2017), *Tin học thống kê trong lâm nghiệp*. Nhà xuất bản Khoa học và kỹ thuật, Tp. HCM, 282tr.

16. Phùng Thị Lan Hương và Nguyễn Thị Định (2020), “Nghiên cứu thành phần hóa học và hoạt tính kháng khuẩn của tinh dầu từ lá Bạch đàn thứ sinh”, *Tạp chí Khoa học và Công nghệ*, 18 (1), 54-61.
17. Cấn Thị Lan, Trịnh Văn Hiệu, Nguyễn Thị Thu Dung, Nguyễn Đình Hải, Hoàng Thanh Thiện (2021), *Quy trình nhân giống Thông caribaea bằng phương pháp giâm hom*. Quyết định 74/QĐ-TCLN-KH&HTQT của Tổng cục Lâm nghiệp, Bộ Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn ngày 13 tháng 4 năm 2021.
18. Trần Thị Liễu, Lê Thị Quỳnh, Vũ Thị Thu Hiền, Đinh Thị Phòng (2015), “Thông số về tính đa dạng di truyền quần thể tự nhiên loài bách xanh (*Calocedrus Macrolepis*) ở Tây Nguyên, Việt Nam bằng chỉ thị ISSR”, *Tạp chí Sinh học*, 37(4): 463-469.
19. Nguyễn Ngọc Lung và cộng sự (1992), *Điều tra phân bố, sinh thái, tái sinh loài Thông nước*, Trung tâm Lâm nghiệp Nhiệt đới, Pleiku, Gia Lai.
20. Nguyễn Đức Tổ Lưu và Philip Ian Thomas (2004), *Cây lá kim Việt Nam*, Nhà xuất bản Thế giới, Hà Nội.
21. Đoàn Thị Mai, Nguyễn Thị Mỹ Hương, Văn Thu Huyền, Vũ Thị Ngọc, Trần Thanh Hương (2009), “Nhân giống Lát hoa bằng phương pháp nuôi cấy mô”, *Tạp chí khoa học Lâm nghiệp*, số 4 – 2009.
22. Phí Thị Cẩm Miện, Nguyễn Đức Bách, Nguyễn Thị Vân Anh, Phạm Bích Ngọc, Chu Hoàng Hà (2019), “Nghiên cứu khả năng tạo rễ bất định Xáo tam phân (*Paramignya trimera*) trong điều kiện thủy canh in vivo”, *Tạp chí khoa học công nghệ Việt Nam*, Khoa học Nông nghiệp 61(7) 7.
23. Nguyễn Hoàng Nghĩa (1997), *Bảo tồn nguồn gen cây rừng*, Trung tâm Nghiên cứu Giống cây rừng, Viện Khoa học Lâm nghiệp Việt Nam.
24. Nguyễn Hoàng Nghĩa (2004), *Cây lá kim Việt Nam*, Nhà xuất bản Nông nghiệp, Hà Nội.

25. Nguyễn Hoàng Nghĩa (2006), *Báo cáo đề tài Bảo tồn nguồn gen giai đoạn 2000 – 2005*, Viện Khoa học Lâm nghiệp Việt Nam.
26. Nguyễn Hoàng Nghĩa và Trần Văn Tiến (2002), “Kết quả nhân giống hom Bách xanh, Pơ mu, Thông đỏ ở Lâm Đồng”, *Tạp chí Nông nghiệp & Phát triển Nông thôn*, 6: 530-531.
27. Đinh Thị Phòng, Vũ Thị Thu Hiền, Trần Thị Liễu, Nguyễn Tiến Hiệp (2014), “Đánh giá tính đa dạng di truyền quần thể tự nhiên loài thông lá dẹt (*Pinus krempfii* Lecomte) ở Tây Nguyên, Việt Nam bằng chỉ thị SSR”, *tạp chí sinh học*, 36(2): 210-219.
28. Nguyễn Huy Sơn và Hoàng Chương (2002), “Đặc điểm vật hậu và khả năng tái sinh tự nhiên của loài thông nước”, *Nông nghiệp và Công nghiệp Thực phẩm*, Hà Nội, 16 (3).
29. Nguyễn Huy Sơn, Nguyễn Xuân Quát, và Đoàn Hoài Nam (2006), *Kỹ thuật trồng rừng thâm canh một số loài cây gỗ nguyên liệu*, Nhà xuất bản Thống kê, Hà Nội.
30. Nguyễn Thành Sum, Phạm Ngọc Tuân, Nguyễn Văn Kết (2007), “Ứng dụng phương pháp vi nhân giống trong bảo tồn giống Thông nước (*Glyptostrobus Pensilis* (Staunton ex D. Don) K. Koch)”. *Tạp chí Khoa học kỹ thuật Nông Lâm nghiệp*, Đại học Nông Lâm tp. Hồ Chí Minh, 1 + 2: 75-81.
31. Nguyễn Đức Thành, Đặng Thị Minh Lua, và Quách Thị Liên (2012), “Tạo cây thông nước *Glyptostrobus pensilis* (Staunton ex D. Don) K. Koch hoàn chỉnh từ chồi nhân *in vitro*.”, *Tạp chí Sinh học*, 32 (2) (2).
32. Phan Ngưỡng Tinh, Hà Quán Võ, Đường Tự Pháp, Vương Trường Xuân, Trần Văn Thành, Trương Khắc Bình, Công Điều Chí (2007), *Kỹ thuật ghép cây ăn quả*. Trung tâm Khuyến nông Quốc gia - Bộ Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn. Nguyên bản tiếng Trung Quốc (NXB Khoa học kỹ thuật Phúc Kiến - năm 1972) được GS.TS. Trần văn Lại - Nguyên Viện

trưởng Viện nghiên cứu Rau quả Trung ương và chị Vương Thục Linh cán bộ Vụ Hợp tác quốc tế biên dịch.

33. Trần Đức Trọng (2019), *Thử nghiệm ghép trên rễ thở để tạo cây con Thủy tùng (Glyptostrobus pensilis (Staunton ex D.Don) K.Koch) tại khu bảo tồn loài – sinh cảnh Thủy tùng*, Luận văn Thạc sỹ, Đại học Tây Nguyên, Ban Mê Thuột.
34. Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam (2007), *Sách đỏ Việt Nam, Phần II - Thực vật*, Nhà xuất bản Khoa học tự nhiên và Công nghệ, Hà Nội.
35. Trần Vinh (2011), *Nghiên cứu một số đặc điểm sinh học, sinh thái và nhân giống làm cơ sở bảo tồn loài thủy tùng (Glyptostrobus pensilis (Staunt.) K.Koch) tại Việt Nam.*, Luận án Tiến sỹ khoa học Nông nghiệp, Trường Đại học Lâm nghiệp, Hà Nội.
36. Trần Vinh, Đặng Đình Đức Phong, và Đặng Thị Thùy Thảo (2016), *Nghiên cứu trồng thử nghiệm cây Thủy tùng (Glyptostrobus pensilis) trên địa bàn tỉnh Đắk Lắk*, Viện khoa học kỹ thuật Nông Lâm nghiệp Tây Nguyên, Buôn Ma Thuột.

Tài liệu tiếng Anh

37. Averyanov L., Nguyen T. H., Nguyen S. K., Lamxay V., Bounphanmy S., Lorphengsy S., Phan K. L., Lanorsavanh S., Chantthavongsa K. (2014), “Gymnosperms of Laos”, *Nord. J. Bot.* 32, 765–805.
38. Averyanov L., Phan K. L., Nguyen T. H., Nguyen S. K., Nguyen T. V., Pham T. D. (2009), “Preliminary observation of native *Glyptostrobus pensilis* (Taxodiaceae) stands in Vietnam”, *Taiwania*, 54 (3).
39. Baruah J.P., Saikia, J. (2020), “Stem borer infestation on muga silkworm (*Antheraea assamensis*) host plants on som (*Persea bombycina*) and soalu (*Litsea polyantha*): A review”. *Indian Journal of Pure & Applied Biosciences*, 8 (5), 73-77.

40. Bhardwaj S.P. (1982), “Note on a new record of leopard moth, *Zeuzera multistrigata* Moore (Lepidoptera: Cossidae), on cherry”. *Indian Journal of Agricultural Sciences*, 52 (12), 881-882.
41. Chen Y.Q., Zhu S.S., Wang G.T., Wei X.Y., Huang X.X., Zhou L.X., *et al.* (2017), “Phylogenetic diversity analysis of the community of extremely small populations of *Glyptostrobos pensilis*.”, *Plant Sci. J.* 35(5), 667–678
42. Chi N.M., Bao H.Q., Pham D.L., Loi, V.V., Yakovlev R.V. (2022a), “The stem borer *Zeuzera multistrigata* Moore (Lepidoptera, Cossidae): a serious pest undermining *Eucalyptus* plantations in Northern Vietnam.”, *Ecologica Montenegrina*, 60, 4-12.
43. Chi N.M., Huong V.D., Pham D.L., Binh L.V., Luu N.V., Ha, K.M., Loi V.V., Yakovlev, R.V. (2022b), “*Neurozerra conferta* (Lepidoptera: Cossidae) damaging *Melaleuca* plantations in Vietnam and its biological control.” *Ecologica Montenegrina*, 60, 13-24.
44. Chi N.M., Pham D.L., Nhung N.P., Hoa N.T.H.H., Do T.T., Tra T.T.L., Loi V.V., Thuy P.T.T., Hai N.D., Tuan D.X., Thu P.Q., Dell B. (2023a), “Integrated pest management of *Hypsipyla robusta* shoottip borer (Lepidoptera: Pyralidae) in *Chukrasia tabularis* (Sapindales: Meliaceae).”, *Journal of Economic Entomology*, 116 (2), 486-495.
45. Chi N.M., Thanh N.V., Quang D.N., Thanh L.B., Thao D.V., Son L.T., Hinh T.X., Thu P.Q., Dell B. (2021), “First report of *Tapinolachnus lacordairei* (Coleoptera: Cerambycidae) damage in *Chukrasia tabularis*.”, *International Journal of Tropical Insect Science*, 41 (1), 909-914.
46. Chi N.M., Yakovlev R.V., Huong D.T., Pham D.L., Tam T.T.T., Long B.D., Luc N.N., Dell B. (2023b), “Stem borer *Orientozeuzera rhabdota* (Lepidoptera, Cossidae) damaging *Manglietia conifera* and *Michelia*

- mediocris* trees in Vietnam.”, *Ecologica Montenegrina*, 63, 86-95.
47. Cindy Q. T., Yongchuan Y., Arata M., Huanchong W., Hong Tr. L., Shuaifeng L., Kun S., Shenhua Q., Ben L., Yi-Fei D., Peng-B. H., Masahiko O., Thach L., Dang Tr. H., Tri M. D., Ming-Chun P., Chongyun W., (2019), “Forest characteristics and population structure of *Glyptostrobus pensilis*, a globally endangered relict species of southeastern China.”, *Plant Diversity* 41(4).
 48. Coffma G. C. (2015), “Discovering the Endangered Cypress Trees of Laos”, *National Geographic, San Francisco, United States*.
 49. Coffman G. C. (2021), “Discovering the Majestic Mai Hing Sam of Laos”, *Arnoldia*, 78:3 18-27
 50. Conifers.org (2016), *Glyptostrobus pensilis*, *The Gymnosperm Database*, <http://www.conifers.org/cu/Glyptostrobus.php>, 1/11/2016.
 51. Cook E. R. (1985), *A time series analysis approach to tree ring standardization*, A Dissertation of Ph.D., The University of Arizona, the US.
 52. Debreczy Z. & Rácz I. (2011), *Conifers Around the World 1-2 1089*, DendroPress Ltd., Budapest
 53. Deleporte P., Laclau J. P., Nzila J. D. D., Kazoti J.G., Marien J.N., Bouillet J.P., Szwarc M., D'Annunzio R., Range J. (2008), “Effects of slash and litter management practices on soil chemical properties and growth of second rotation eucalypts in the Congo”, in: NAMBIAR, E. K. S., ED. *Site managerment and productivity in tropical plantation forests*, 2008 Piracicaba, Brazil and Bogor, Indonesia. Bogor: CIFOR, 5-22.
 54. Duncan R.P. (1989), “An evaluation of erros in tree age estiamtes based on increment cores in Kahikatea (*Dacrycarpus dacrydioides*).”, *New Zealand Natural Sciences*, 16, pp. 31 - 37.
 55. Fagen L., Nianhe X. (2005), “Population structure and genetic diversity

- of an endangered species, *Glyptostrobus pensilis* (Cupressaceae)”, *Botanical Bulletin of Academia Sinica*, 46.
56. Fekrat L., Farashi A. (2022), “Impacts of climatic changes on the worldwide potential geographical dispersal range of the leopard moth, *Zeuzera pyrina* (L.) (Lepidoptera: Cossidae).”, *Global Ecology and Conservation*, 34, e02050.
 57. Han L., Hu Y., Lin J., và Wang X. (1996), “The biology and conservation of *Glyptostrobus pensilis* (a review).”, *Subtropical Plant Research Communications*, 26 (1).
 58. Hiep, N. T. et al. (2004), *Vietnam Conifers: Conservation Status Review 2004.*, Fauna & Flora International, Hanoi, Vietnam.
 59. Holmes R.I. (1983), “Computer assisted quality control in tree ring dating and measurement.”, *Tree ring Bulletin*, 43, pp. 69 - 78.
 60. Huang J.S., Lin, Q.Y. (1990), “Use of a new paste preparation of *Beauveria bassiana* in the forest to control *Zeuzera multistrigata* [lep.: Cossidae].”, *Chinese Journal of Biological Control*, 6 (3), 121-123.
 61. Humánez A., Blasco M., Brisa C., Segura J., Arrillaga I. (2011), “Thidiazuron enhances axillary and adventitious shoot proliferation in juvenile explants of Mediterranean provenances of maritime pine *Pinus pinaster*”, *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 47, pp. 569–577.
 62. Huy B., Poudel K.P., Kralicek K., Hung N.D., Khoa P.V., Phuong V.T., Temesgen H. (2016b), “Allometric Equations for Estimating Tree Aboveground Biomass in Tropical Dipterocarp Forests of Viet Nam.”, *Forests*, 7(180), pp.1-19.
 63. Huy B., Poudel K.P., Temesgen H., (2016c), “Aboveground biomass equations for evergreen broadleaf forests in South Central Coastal

- ecoregion of Viet Nam: Selection of eco-regional or pantropical models.”, *Forest Ecology and Management*, 376(2016), pp. 276 - 283.
64. Huy B., Tinh N.T., Poudel K.P., Frank B.M., Temesgen H., (2019), “Taxonspecific modeling systems for improving reliability of tree aboveground biomass and its components estimates in tropical dry dipterocarp forests.”, *Forest Ecology and Management*, 437(2019), pp. 156 - 174.
 65. Huy, B., Kralicek K., Poudel K.P., Phuong V.T., Khoa P.V., Hung N.D., Temesgen H. (2016a), “Allometric Equations for Estimating Tree Aboveground Biomass in Evergreen Broadleaf Forests of Viet Nam.”, *Forest Ecology and Management*, 382(2016), pp. 193 – 205
 66. Isshiki S., Iwata N., Khan M.M.R., 2008. ISSR variations in eggplant (*Solanum melongena* L.) and related *Solanum* species. *Scientia Horticulture* 117: 186–190.
 67. IUCN RED LIST: <https://www.iucnredlist.org/species/32312/177795446>
 68. Jinshui H., Yuanhui H., Yiliang H. (1988), “A study on the moth borer (*Zeuzera multistrigata* Moore) (Lepidoptera: Zeuzeridae).”, *Forest Research*, 1 (5), 516-523.
 69. Kemp R.H., Namkoong G., Wadsworth F.H., (1993), *Conservation of genetic resources in tropical forest management: principles and concepts*. FAO.
 70. Li B. và Li H., (2007). *Studies on the Vegetative Propagation Techniques of Glyptostrobus pensilis* (Lamb.) K. Koch. Master's thesis. Nanjing Forestry University.
 71. Li B. và Li H., (2008), “Studies on the Vegetative Propagation Techniques of *Glyptostrobus pensilis* (Lamb.) K. Koch, Guilin J. Teacher Colleges”, 22(3): 72-79.
 72. Li B., Li H. G., Wang G. P., (2006), “Tissue Culture and Plantlet Regeneration of *Glyptostrobus pensilis* (Lamb.) K. Koch. Plant.”, *Physiol. Comm.*, 42(6): 1136.

73. Lijuan H., Yuxi H., Jinxing L., Xianpu W. (1996), “The biology and conservation of *Glyptostrobus pensilis* (a review).”, Subtropical Plant Research Communications.
74. Lu Y., Siyu M., Ke L., Tingjin W., Duohong X., Aijun Z., Bin L., Ligen X., Riquan C. & Liping C. (2022), “High frequency adventitious shoot regeneration from hypocotyl-derived callus of *Glyptostrobus pensilis*, a critically endangered plant.”, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, Volume 152, pages 139–149.
75. Lu, S., Zhang, Y., Jiang, G., and Liu, C. (2003), “A preliminary study of introduction of *Glyptostrobus pensilis* and *Taxodium ascendens* in Southwest Hubei Province.”, *Forestry Science & Technology*.
76. Lynne C., (2008), “Tissue Culture for Challenging Woody Plants, Combined Proceedings International Plant Propagators”, Society, Volume 58, 284 – 285.
77. Ma Q. W., Li C.. S., Li F. L., và Vickulin S. (2004), “Epidermal structures and stomatal parameters of Chinese endemic *Glyptostrobus pensilis* (Taxodiaceae)”, *Botanical Journal of the Linnean Society*, 146 (2).
78. McCown B.H. and Lloyd G. (1981), “Woody Plant Medium (WPM)—A Mineral Nutrient Formulation for Microculture of Woody Plant Species.”, *HortScience*, 16, 453-453.
79. Michelle K. B. (2017), *Restoring stands of the critically endangered Chinese swamp cypress (Glyptostrobus pensilis): Planning for revegetation in Lao PDR*, Master, University of San Francisco, The United States of America.
80. Mohammed L. E. K., Brahim E.B., Rabah S., Zineb N. E. A., Safaa R., Ahmed L., (2017), “Callogenesis of Cork Oak (*Quercus suber* L.) through *In Vitro* Culture of Nodes and Internode”, *American Journal of Plant Sciences*, Vol.8 No.8, July 6, 2017.
81. Murashige T., Skoog F., (1962), “A revised medium for rapid growth and

- bioassay with tobacco tissue cultures.”, *Physiol. Plant*, 15: 475-497.
82. Pablo A., Paloma M., Belén Fe., Ana R., Maria L. C. and Ricardo J. O.(2006), “An improved micropropagation protocol for stone pine (*Pinus pinea* L.)”, *Annals of Forest Science*. ISSN: 1286-4560 - eISSN: 1297-966X. Volume 63, Number 8, 2006. Page(s) 879 – 885
 83. Paula P. H., Cindy Q. T., Tetsuya M., Haruka O.i, Shenhua Q., Yongchuan Y., Sonia H. M., Neus N.t, Jordi L. P. (2022), “Ecological niche modeling applied to the conservation of the East Asian relict endemism *Glyptostrobus pensilis* (Cupressaceae)”. *New Forests*, 54:1131–1152.
 84. Plants of the World Online (Kew):
<https://powo.science.kew.org/results?q=Glyptostrobus%20pensilis>
 85. Ragonezi C., Klimaszewska K., Castro M.R., Lima M., de Oliveira P., Zavattieri M.A. (2010), “Adventitious rooting of conifers: Influence of physical and chemical factors”, *Trees*, (24): 975–992
 86. Seif El-Yazal MA, Morsi ME and El-Shewy AA (2022), “A Combination of Wounding, IBA and NAA Resulted in Better Rooting and Shoot Sprouting in White Adriatic Fig (*Ficus Carica* L.) Stem Cuttings”, *Open Access Journal of Agricultural Research*, 7(1): 000279.
 87. Shengping L., Yingtuan Z., Gaoming J., và Changyong L. (2003), “A preliminary study of introduction of *Glyptostrobus pensilis* and *Taxodium ascendens* in Southwest Hubei Province”, *Forestry Science & Technology*, 29 (1).
 88. South China Botanical Garden (2017), *Hanbook for Glyptostrobus pensilis propagation*, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou, China.
 89. Speer, J.H.m Clay, K., Bishop, G. and Creech, M. (2010), “The Effect of Periodical Cicadas on Growth of five Trees Species in Midwestern Deciduous Forest.”, *The American Midland Naturalist*, 164: pp. 173 – 186
 90. Stokes M.A., Mile T.L. (1968), “An introduction to treering dating.”,

University of Chicago, Chicago, the US.

91. Stojičić D., Budimir S., Čokeša V., & Uzelac B. (2024), “Optimization of In Vitro Regeneration of *Pinus peuce* (Gris.)”, *Horticulturae*, 10(1), 97.
92. The Plant List (2020), *Glyptostrobus pensilis* (Staunton ex D.Don) K.Koch., *Dendrologie. Bäume, Sträucher und Halbsträucher, welche in Mittel- und Nord-Europa im Freien kultiviert werden. Kritisch beleuchtet von Karl Koch. Erlangen, .*
93. The World Flora Online (WFO):
<https://www.worldfloraonline.org/taxon/wfo-0000704724>
94. Thomas P. (2019) *Glyptostrobus pensilis* Threatened Conifers of The World (accessed 2023-04-20).
95. Thomas P. , Yang Y., Farjon A., Nguyen D., Liao W, (2011), *Glyptostrobus pensilis*, The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2014.3.
96. Wu X., Ruhsam M., Wen Y., Thomas P. I., Worth J. R. P. , Lin X., Wang M., Lin X., Chen L., Lamxay V, Le Canh N, Coffman G. (2019), The last primary forests of the Tertiary relict *Glyptostrobus pensilis* contain the highest genetic diversity, *Forestry: An International Journal of Forest Research*, 93 (3), 1–17, doi:10.1093/forestry/cpz063
97. Wu X., Ruhsam M., Wen Y., Thomas P. I., Worth J. R. P. , Lin X., Wang M., Lin X., Chen L., Lamxay V, Le Canh N, Coffman G. (2020), “The last primary forests of the Tertiary relict *Glyptostrobus pensilis* contain the highest genetic diversity.”, *Forestry* 93:359–375.
98. Wu Z., Liu J., Hong W., Pan D., và Zheng S. (2011), “Genetic diversity of natural and planted *Glyptostrobus pensilis* populations: a comparative study”, *The journal of applied ecology*, 22 (4).
99. Wu, S., Xia, F., Zhang, F. (2017), “An artificial feed for the young larvae of *Monochamus alternatus* and preparation method.”, China Patent CN, 10324582.2.

100. Xing X. I. Y. (1980), "A preliminary study of the growth of *Glyptostrobos pensilis* in the Pearl river delta", *Journal of South China Agricultural University*, 4.
101. Xueying Z., Peng Y., He Y., Huangjiu X., Pan L., và Ke H. (2006), "Community and Distribution of *Glyptostrobos pensilis* in Zhuhai", *Guangdong Forestry Science and Technology, Zhuhai Wildlife Protection and Administration Institute, College of Forestry, South China Agricultural University, Guangzhou*, 4.
102. Yakovlev R.V. (2014), "Descriptions of three new species of Cossidae (Lepidoptera) from Vietnam, with an updated annotated checklist.", *Zootaxa*, 3802 (2), 240-256.
103. Yakovlev R.V., Shapoval N.A., Ivonin V.V., Knyazev S.A., Kuftina G.N., Masharskiy A.E. (2020), "A new species of carpenter moths (Lepidoptera, Cossidae) from Tarbagatai (NE Kazakhstan) and Altai (SW Siberia, Russia) Mountains.", *Zootaxa*, 4896 (1), 085-095.
104. Yakovlev R.V., Witt T.J. (2017), "Three new species and one new subspecies of *Deserticossus* Yakovlev, 2006 (Lepidoptera: Cossidae) from Kazakhstan, Kyrgyzstan and Russia, with world catalogue of the genus.", *Zootaxa*, 4269 (3), 379-395.
105. Yang H.W., Zhang S.G., Zhang G.Y., Huang J.S., Zheng, H.C. (1990), "Control of leopard moth, *Zeuzera multistrigata* leuconota (Lep.: Cossidae) on casuarina trees by using sponge plugs carrying *Steinernema feltiae*.", *Chinese Journal of Biological Control*, 6 (4), 157-160.
106. Yusnita¹, Jamaludin, Agustiansyah and Dwi Hapsoro (2018), "A Combination of IBA and NAA Resulted in Better Rooting and Shoot Sprouting than Single Auxin on Malay Apple (*Syzygium malaccense* (L.) Merr. & Perry) Stem Cuttings", *AGRIVITA Journal of Agricultural Science*. 40(1): 80-90.

PHỤ LỤC

Phụ lục 1. Thành phần cây gỗ tại Ea Drăng

Stt	Tên phổ thông	Tên Khoa học	Họ Phổ thông	Họ Khoa học
1	Ba gạc	<i>Melicope aff. triphylla</i>	Cam chanh	Rutaceae
2	Bời lời sp	<i>Litsea sp.</i>	Re	Lauraceae
3	Bùi sp	<i>Ilex sp.</i>	Bùi	Aquifoliaceae
4	Bùi trung bộ	<i>Ilex annamensis</i> Tardieu	Bùi	Aquifoliaceae
5	Cà chắc	<i>Shorea aff. obtusa</i> Wall	Dầu	Dipterocarpaceae
6	Côm sp	<i>Elaeocarpus sp.</i>	Côm	Elaeocarpaceae
7	Dục nang	<i>Pterocymbium tinctorium</i>	Trôm	Sterculiaceae
8	Giang núi	<i>Ternstroemia sp.</i>	Ngũ mặc	Pentaphylacaceae
9	Liều	<i>Salix aff. tetrasperma</i> Roxb, var. <i>Nilagirica</i> (Miq.) Anders	Liều	Salicaceae
10	Sén đưng	<i>Raphiolepis aff. indica</i> (L.) Lindl	Hoa hồng	Rosaceae
11	Sóc lông	<i>Glochidion hirsutum</i> (Roxb.) Voigt	Thầu dầu	Euphorbiaceae
12	Sung bò	<i>Ficus aff. subulata</i>	Dầu tằm	Moraceae
13	Sung nam bộ	<i>Semecarpus cochinchinensis</i>	Xoài	Anacardiaceae
14	Sung sp1	<i>Ficus sp1.</i>	Dầu tằm	Moraceae
15	Thủy tùng	<i>Glyptostrobus pensilis</i> (Staunton ex D. Don) K. Koch)	Bụt mọc	Taxodiaceae
16	Trâm chụm ba	<i>Syzygium formosum</i> (Wall.) Masam	Sim	Myrtaceae
17	Trâm kiền kiền	<i>Syzygium aff. syzygioides</i> (Miq.) Merr. & Perry	Sim	Myrtaceae
18	Trôm Pierre	<i>Sterculia pierre</i> Gagnep	Trôm	Sterculiaceae
19	Vùng	<i>Careya sphaerica</i> Roxb	Lộc vùng	Lecythidaceae
20	Hu đay lá nhỏ	<i>Trema orientalis</i>	Du	Ulmaceae

Cấu trúc tổ thành loài cây gỗ tại Ea Drăng

Stt	Tên phổ thông	N%	G%	F%	IV%
1	Trôm Pierre	38,17%	43,37%	8,33%	29,96%
2	Bùi trung bộ	24,73%	22,72%	8,33%	18,60%
3	Vùng	19,08%	13,07%	8,33%	13,50%
4	Thủy tùng	6,82%	9,16%	6,25%	7,41%
5	Ba gạc	1,75%	1,66%	8,33%	3,91%
6	Sóc lông	1,36%	0,94%	8,33%	3,55%
7	Cà chắc	1,46%	1,94%	6,25%	3,22%
8	Bùi sp	1,56%	1,43%	6,25%	3,08%
9	Trâm kiền kiền	1,66%	1,25%	6,25%	3,05%
10	Khác (11 loài)	3,41%	4,46%	33,33%	13,74%
TỔNG		100,00%	100,00%	100,00%	100,00%

Phụ lục 2. Thành phần tầng cây dưới tán tại Ea Drăng

Stt	Tên phổ thông	Tên Khoa học	Họ Phổ thông	Họ Khoa học
1	Ba gạc	<i>Melicope aff. triphylla</i>	Cam chanh	Rutaceae
2	Bời lời cuống dài	<i>Litsea longipes</i> (Meisn.) Hook. f.	Re	Lauraceae
3	Bùi trung bộ	<i>Ilex annamensis</i> Tardieu	Bùi	Aquifoliaceae
4	Gối hạc sp	<i>Leea sp.</i>	Gối hạc	Leeaceae
5	Nhọc	<i>Enicosanthum aff. daclacensis</i> Ban	Na	Anonaceae
6	Sén đương	<i>Raphiolepis aff. indica</i> (L.) Lindl	Hoa hồng	Rosaceae
7	Sóc lông	<i>Glochidion hirsutum</i> (Roxb.) Voigt	Thầu dầu	Euphorbiaceae
8	Sung sp2	<i>Ficus sp2.</i>	Dầu tằm	Moraceae
9	Thùy tùng	<i>Glyptostrobus pensilis</i> (Staunton ex D. Don) K. Koch)	Bụt mọc	Taxodiaceae
10	Trôm Pierre	<i>Sterculia pierre</i> Gagnep	Trôm	Sterculiaceae
11	Vùng	<i>Careya sphaerica</i> Roxb	Lộc vùng	Lecythidaceae

Cấu trúc tổ thành loài cây dưới tán tại Ea Drăng

Stt	Tên phổ thông	G%	N%	F%	IV%
1	Vùng	47.80%	25.58%	13.04%	28.81%
2	Trôm Pierre	24.49%	23.26%	21.74%	23.16%
3	Bùi trung bộ	16.37%	24.42%	21.74%	20.84%
4	Ba gạc	0.91%	5.81%	8.70%	5.14%
5	Sén đương	2.54%	8.14%	4.35%	5.01%
6	Bời lời cuống dài	5.96%	4.65%	4.35%	4.98%
7	Sóc lông	1.12%	3.49%	8.70%	4.44%
8	Khác (4 loài)	0.81%	4.65%	17.39%	7.62%
	tổng	100.00%	100.00%	100.00%	100.00%

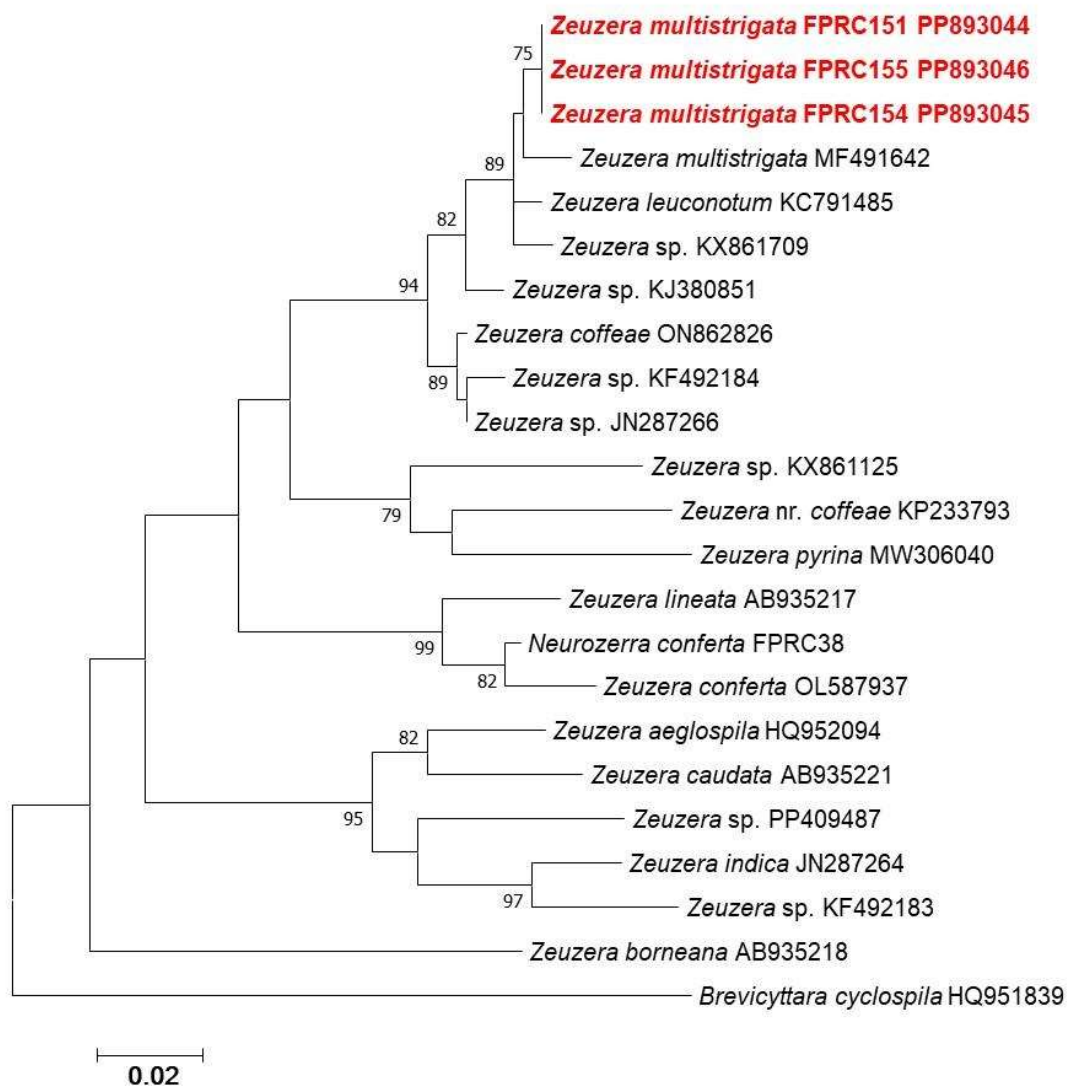
Phụ lục 3. Thành phần cây gỗ lớn tại Krông Năng

Stt	Tên phổ thông	Tên Khoa học	Họ Phổ thông	Họ Khoa học
1	Bùi trung bộ	<i>Ilex annamensis</i> Tardieu	Bùi	Aquifoliaceae
2	Chòi mòi sp	<i>Antidesma</i> sp	Thầu dầu	Euphorbiaceae
3	Sén đương	<i>Raphiolepis aff. indica</i> (L.) Lindl	Hoa hồng	Rosaceae
4	Sóc lông	<i>Glochidion hirsutum</i> (Roxb.) Voigt	Thầu dầu	Euphorbiaceae
5	Thủy tùng	<i>Glyptostrobus pensilis</i> (Staunton ex D. Don) K. Koch)	Bụt mọc	Taxodiaceae
6	Trâm chan lốt	<i>Syzygium chanlos</i>	Sim	Myrtaceae
7	Trâm nhuôm	<i>Syzygium tinctorium</i> (Gagn.) Merr. & Perry	Sim	Myrtaceae
8	Trâm rừng	<i>Syzygium aff. chanlos</i> (Gagnep.) Merr. & Perry	Sim	Myrtaceae
9	Trôm Pierre	<i>Sterculia pierre</i> Gagnep	Trôm	Sterculiaceae
10	Vùng	<i>Careya sphaerica</i> Roxb	Lộc vùng	Lecythidaceae

Cấu trúc tổ thành loài cây gỗ tại Krông Năng

S _{tt}	Tên phổ thông	G%	N%	F%	IV%
1	Trâm rừng	36,74%	35,11%	16,67%	29,50%
2	Bùi trung bộ	12,64%	29,15%	16,67%	19,49%
3	Trôm Pierre	10,75%	13,48%	16,67%	13,63%
4	Vùng	12,07%	14,11%	13,33%	13,17%
5	Thủy tùng	16,04%	0,94%	10,00%	8,99%
6	Sén đương	2,68%	5,02%	13,33%	7,01%
7	Khác (4 Loài)	9,09%	2,19%	13,33%	8,21%
Tổng		100,00%	100,00%	100,00%	100,00%

Phụ lục 4. Kết quả giải trình tự gen các mẫu sâu đục thân Thủy tùng



Phụ lục 5. Danh sách mẫu Thủy tùng phân tích đa dạng di truyền

STT	Ký hiệu	Địa điểm thu mẫu	STT	Ký hiệu	Địa điểm thu mẫu
1	E1	Ea Drăng	35	E37	Ea Drăng
2	E2	Ea Drăng	36	E38	Ea Drăng
3	E3	Ea Drăng	37	E39	Ea Drăng
4	E4	Ea Drăng	38	E40	Ea Drăng
5	E5	Ea Drăng	39	E41	Ea Drăng
6	E6	Ea Drăng	40	E42	Ea Drăng
7	E7	Ea Drăng	41	E43	Ea Drăng
8	E8	Ea Drăng	42	E44	Ea Drăng
9	E10	Ea Drăng	43	E45	Ea Drăng
10	E11	Ea Drăng	44	E46	Ea Drăng
11	E12	Ea Drăng	45	E47	Ea Drăng
12	E13	Ea Drăng	46	E48	Ea Drăng
13	E14	Ea Drăng	47	E49	Ea Drăng
14	E15	Ea Drăng	48	E50	Ea Drăng
15	E16	Ea Drăng	49	E51	Ea Drăng
16	E17	Ea Drăng	50	E52	Ea Drăng
17	E18	Ea Drăng	51	E53	Ea Drăng
18	E19	Ea Drăng	52	E54	Ea Drăng
19	E20	Ea Drăng	53	E56	Ea Drăng
20	E21	Ea Drăng	54	E57	Ea Drăng
21	E22	Ea Drăng	55	E58	Ea Drăng
22	E23	Ea Drăng	56	E60	Ea Drăng
23	E24	Ea Drăng	57	E61	Ea Drăng
24	E25	Ea Drăng	58	E62	Ea Drăng
25	E26	Ea Drăng	59	E63	Ea Drăng
26	E27	Ea Drăng	60	E64	Ea Drăng
27	E28	Ea Drăng	61	E65	Ea Drăng
28	E29	Ea Drăng	62	E66	Ea Drăng
29	E30	Ea Drăng	63	E67	Ea Drăng
30	E32	Ea Drăng	64	E68	Ea Drăng
31	E33	Ea Drăng	65	E69	Ea Drăng
32	E34	Ea Drăng	66	E70	Ea Drăng
33	E35	Ea Drăng	67	E71	Ea Drăng
34	E36	Ea Drăng	68	E72	Ea Drăng

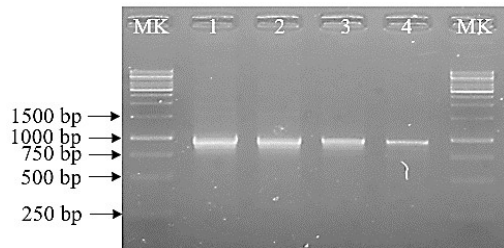
STT	Ký hiệu	Địa điểm thu mẫu
69	E73	Ea Drăng
70	E74	Ea Drăng
71	E75	Ea Drăng
72	E76.1	Ea Drăng
73	E76.2	Ea Drăng
74	E77	Ea Drăng
75	E78	Ea Drăng
76	E79	Ea Drăng
77	E80	Ea Drăng
78	E81	Ea Drăng
79	E83	Ea Drăng
80	E84	Ea Drăng
81	E85	Ea Drăng
82	E86	Ea Drăng
83	E87	Ea Drăng
84	E88	Ea Drăng
85	E89	Ea Drăng
86	E91	Ea Drăng
87	E92	Ea Drăng
88	E93	Ea Drăng
89	E94	Ea Drăng
90	E95	Ea Drăng
91	E96	Ea Drăng
92	E97	Ea Drăng
93	E98	Ea Drăng
94	E99	Ea Drăng
95	E100	Ea Drăng
96	E101	Ea Drăng
97	E102	Ea Drăng
98	E104	Ea Drăng
99	E105	Ea Drăng
100	E106	Ea Drăng
101	E107	Ea Drăng
102	E108	Ea Drăng
103	E109	Ea Drăng
104	E110	Ea Drăng

STT	Ký hiệu	Địa điểm thu mẫu
105	E111	Ea Drăng
106	E112	Ea Drăng
107	E113	Ea Drăng
108	E114	Ea Drăng
109	E115	Ea Drăng
110	E116	Ea Drăng
111	E117	Ea Drăng
112	E118	Ea Drăng
113	E119	Ea Drăng
114	E120	Ea Drăng
115	E121	Ea Drăng
116	E122	Ea Drăng
117	E123	Ea Drăng
118	E124	Ea Drăng
119	E125	Ea Drăng
120	E126	Ea Drăng
121	E129	Ea Drăng
122	E130	Ea Drăng
123	E131	Ea Drăng
124	E132	Ea Drăng
125	E133	Ea Drăng
126	E134	Ea Drăng
127	E135	Ea Drăng
128	E136	Ea Drăng
129	E137	Ea Drăng
130	E138	Ea Drăng
131	E139	Ea Drăng
132	E140	Ea Drăng
133	E141	Ea Drăng
134	E142	Ea Drăng
135	E143	Ea Drăng
136	E144	Ea Drăng
137	E145	Ea Drăng
138	E146	Ea Drăng
139	E147	Ea Drăng
140	SP1-118	Ea Drăng

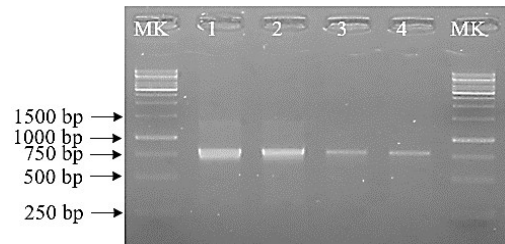
STT	Ký hiệu	Địa điểm thu mẫu
141	SP4-C130	Ea Drăng
142	EBM07	Ea Drăng
143	EBM01	Ea Drăng
144	EBM02	Ea Drăng
145	T1	Krông Năng
146	T2	Krông Năng
147	T3	Krông Năng
147	T4	Krông Năng
149	T5	Krông Năng
150	T6	Krông Năng
151	T7	Krông Năng
152	T8	Krông Năng

STT	Ký hiệu	Địa điểm thu mẫu
153	T9	Krông Năng
154	T10	Krông Năng
155	T11	Krông Năng
156	T12	Krông Năng
157	T13	Krông Năng
158	T14	Krông Năng
159	T15	Krông Năng
160	T16	Krông Năng
161	T17	Krông Năng
162	T127	Krông Năng
163	T57 - BM	Krông Năng

Phụ lục 6. Kết quả khuếch đại vùng gen lục lạp



Vùng gen *rbcL*, kích thước khoảng 900 bp

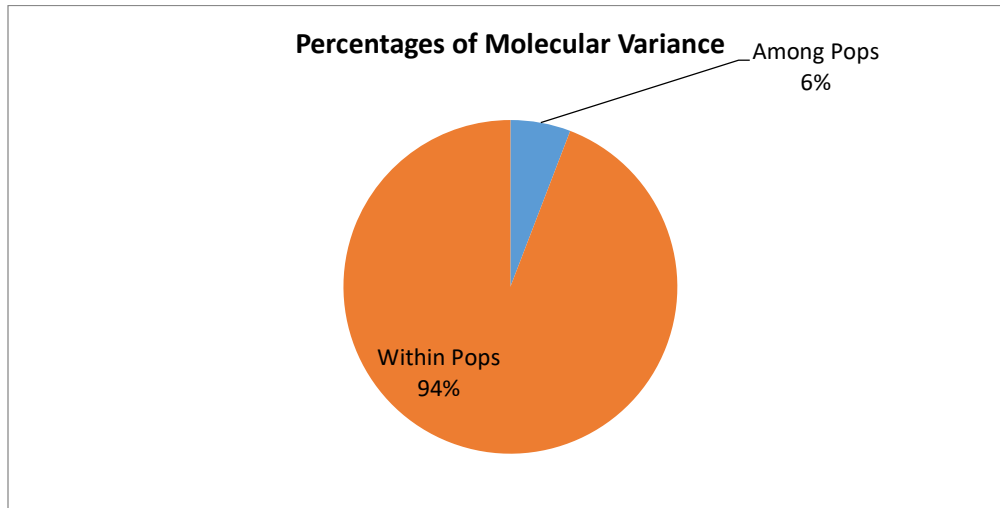


Vùng *MatK* có kích thước khoảng 750 bp

Phụ lục 7. Phân tích phương sai phân tử của mẫu Thủy tùng

Input as Binary Distance Matrix for Calculation of PhiPT

	Data
Data Sheet	163
No. Samples	163
No. Pops	2
No. Regions	1
No. Permutations	999
No. PW Pop Permutations	999



N0	33.571				
SSTOT	947.497				
Pop	Ea Drang	Krong Nang			
n	144	19			
SSWP	841.181	88.526			
Summary AMOVA Table					
Source	df	SS	MS	Est. Var.	%
Among Pops	1	17.790	17.790	0.358	6%
Within Pops	161	929.707	5.775	5.775	94%
Total	162	947.497		6.132	100%
Stat	Value	P(rand >= data)			
PhiPT	0.058	0.003			
PhiPT max	0.747				
Phi'PT	0.078				

Probability, P(rand >= data), for PhiPT is based on standard permutation across the full data set.

$\text{PhiPT} = \text{AP} / (\text{WP} + \text{AP}) = \text{AP} / \text{TOT}$

Key: AP = Est. Var. Among Pops, WP = Est. Var. Within Pops

Phụ lục 8. Phân tích các chỉ số đa dạng di truyền quần thể

Band Frequencies, Allele Frequencies and Estimated Diversity by Pop for Binary (Haploid)

Data

	Data
Data Sheet	163
No. Loci	45
No. Samples	163
No. Pops.	2

Band Frequency, Allele Frequency (p & q), Samples Size, No. Alleles, No. Effective Alleles, Information Index, Diversity and Unbiased Diversity

Mean and SE over Loci for each Pop

Pop		N	Na	Ne	I	h	uh
Ea Drang	Mean	144.000	2.000	1.417	0.409	0.260	0.261
	SE	0.000	0.000	0.049	0.030	0.023	0.023
Krong Nang	Mean	19.000	1.533	1.341	0.321	0.207	0.219
	SE	0.000	0.117	0.053	0.039	0.028	0.029

Grand Mean and SE over Loci and Pops

		N	Na	Ne	I	h	uh
Total	Mean	81.500	1.767	1.379	0.365	0.233	0.240
	SE	6.625	0.063	0.036	0.025	0.018	0.019

Percentage of Polymorphic Loci

Population	%P
Ea Drang	100.00%
Krong Nang	71.11%
	80.805
Mean	85.56%
SE	14.44%

Na = No. of Different Alleles

Ne = No. of Effective Alleles = $1 / (p^2 + q^2)$

I = Shannon's Information Index = $-1 * (p * \ln(p) + q * \ln(q))$

h = Diversity = $1 - (p^2 + q^2)$

uh = Unbiased Diversity = $(N / (N-1)) * h$

Where for Haploid Binary data, p = Band Freq. and q = 1 - p.

Band Patterns for Binary (Haploid) Data

Data Sheet	Data	163
No. Loci		45
No. Samples		163
No. Pops.		2

Total Band Patterns for Binary (Haploid) Data by Populations

Population	Ea Drang	Krong Nang
No. Bands	45	37
No. Bands Freq. $\geq 5\%$	37	37
No. Private Bands	8	0
No. LComm Bands ($\leq 25\%$)	0	0
No. LComm Bands ($\leq 50\%$)	0	0
Mean h	0.260	0.207
SE of Mean h	0.023	0.028
Mean uh	0.261	0.219
SE of Mean uh	0.023	0.029

No. Bands = No. of Different Bands

No. Bands Freq. $\geq 5\%$ = No. of Different Bands with a Frequency $\geq 5\%$

No. Private Bands = No. of Bands Unique to a Single Population

No. LComm Bands ($\leq 25\%$) = No. of Locally Common Bands (Freq. $\geq 5\%$) Found in 25% or Fewer Populations

No. LComm Bands ($\leq 50\%$) = No. of Locally Common Bands (Freq. $\geq 5\%$) Found in 50% or Fewer Populations

$h = \text{Diversity} = 1 - (p^2 + q^2)$

$uh = \text{Unbiased Diversity} = (N / (N-1)) * h$

Where for Haploid Binary data, p = Band Freq. and $q = 1 - p$.

Phụ lục 9. Nghiên cứu ảnh hưởng của loại chất khử trùng và thời gian khử trùng của mẫu cấy.

9.1. Kết quả phân tích ANOVA về tỷ lệ mẫu sạch theo từng nhân tố loại chất khử trùng và thời gian khử trùng

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
MAIN EFFECTS					
A:Loại chat khu trung	0.297778	3	0.0992593	36.37	0.0000
B:Thời gian khu trung	0.145185	1	0.145185	53.20	0.0000
RESIDUAL	0.0518519	19	0.00272904		
TOTAL (CORRECTED)	0.494815	23			

Kết quả xếp loại về tỷ lệ mẫu sạch theo loại chất khử trùng

Method: 95.0 percent Duncan

Loại chat khu trung	Count	LS Mean	LS Sigma	Homogeneous Groups
HgCl2 0,1%	6	0.455556	0.021327	X
Javen	6	0.555556	0.021327	X
HgCl2 0,15%	6	0.711111	0.021327	X
TCCA	6	0.722222	0.021327	X

Kết quả xếp loại về tỷ lệ mẫu sạch theo thời gian khử trùng

Method: 95.0 percent Duncan

Thời gian khu trung	Count	LS Mean	LS Sigma	Homogeneous Groups
15	12	0.533333	0.0150805	X
20	12	0.688889	0.0150805	X

9.2. Kết quả phân tích ANOVA về tỷ lệ mẫu sạch theo hỗn hợp 2 nhân tố loại chất khử trùng và thời gian khử trùng

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	0.468148	7	0.0668783	40.13	0.0000
Within groups	0.0266667	16	0.00166667		
Total (Corr.)	0.494815	23			

Kết quả xếp loại về tỷ lệ mẫu sạch theo hỗn hợp 2 nhân tố loại chất khử trùng và thời gian khử trùng

Method: 95.0 percent Duncan

Hon hop	Count	Mean	Homogeneous Groups
CT3	3	0.355556	X
CT5	3	0.533333	X
CT4	3	0.555556	XX
CT6	3	0.577778	XX
CT7	3	0.622222	X
CT1	3	0.622222	X
CT8	3	0.8	X
CT2	3	0.822222	X

9.3. Kết quả phân tích ANOVA về Tỷ lệ mẫu bất chồi theo từng nhân tố loại chất khử trùng và thời gian khử trùng

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
MAIN EFFECTS					
A:Loại chat khu trung	0.276111	3	0.092037	22.98	0.0000
B:Thời gian khu trung	0.135	1	0.135	33.70	0.0000
RESIDUAL	0.0761111	19	0.00400585		
TOTAL (CORRECTED)	0.487222	23			

Kết quả xếp loại về Tỷ lệ mẫu bất chỗi theo thời gian khử trùng

Method: 95.0 percent Duncan

Thời gian khu trung	Count	LS Mean	LS Sigma	Homogeneous Groups
15	12	0.283333	0.0182708	X
20	12	0.433333	0.0182708	X

Kết quả xếp loại về Tỷ lệ mẫu bất chỗi theo loại chất khử trùng

Method: 95.0 percent Duncan

Loại chất khu trung	Count	LS Mean	LS Sigma	Homogeneous Groups
HgCl ₂ 0,15%	6	0.177778	0.0258388	X
HgCl ₂ 0,1%	6	0.377778	0.0258388	X
TCCA	6	0.433333	0.0258388	X
Javen	6	0.444444	0.0258388	X

9.4. Kết quả phân tích ANOVA về Tỷ lệ mẫu bất chỗi theo hỗn hợp 2 nhân tố loại chất khử trùng và thời gian khử trùng

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	0.448704	7	0.0641005	26.63	0.0000
Within groups	0.0385185	16	0.00240741		
Total (Corr.)	0.487222	23			

Kết quả xếp loại về Tỷ lệ mẫu bất chỗi theo hỗn hợp 2 nhân tố loại chất khử trùng và thời gian khử trùng

Method: 95.0 percent Duncan

Hỗn hợp	Count	Mean	Homogeneous Groups
CT7	3	0.0888889	X
CT3	3	0.244444	X
CT8	3	0.266667	X
CT1	3	0.4	X
CT5	3	0.4	X
CT2	3	0.466667	XX
CT6	3	0.488889	XX
CT4	3	0.511111	X

Phụ lục 10. Nghiên cứu ảnh hưởng của nồng độ chất điều hòa sinh trưởng đến quá trình nhân nhanh chồi.

10.1. Kết quả phân tích ANOVA về chiều cao chồi theo nồng độ chất điều hòa sinh trưởng

Cong thuc	Count	Average	Standard deviation	Coeff. of variation	Standard error	Minimum	Maximum	Range
CT1	3	3.78199	0.129784	3.43161%	0.0749305	3.70417	3.93182	0.227652
CT2	3	3.86586	0.162677	4.20804%	0.0939215	3.75417	4.0525	0.298333
CT3	3	3.69331	0.124196	3.36274%	0.0717048	3.55909	3.80417	0.245076
CT4	3	4.50568	0.534054	11.8529%	0.308336	3.95455	5.02083	1.06629
Total	12	3.96171	0.417371	10.5351%	0.120485	3.55909	5.02083	1.46174

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
MAIN EFFECTS					
A: Cong thuc	1.22829	3	0.40943	4.76	0.0345
RESIDUAL	0.687892	8	0.0859865		
TOTAL (CORRECTED)	1.91618	11			

Kết quả xếp loại về chiều cao chồi theo nồng độ chất điều hòa sinh trưởng

Method: 95.0 percent Duncan

Cong thuc	Count	LS Mean	LS Sigma	Homogeneous Groups
CT3	3	3.69331	0.169299	X
CT1	3	3.78199	0.169299	X
CT2	3	3.86586	0.169299	X
CT4	3	4.50568	0.169299	X

10.2. Kết quả phân tích ANOVA về số chồi theo nồng độ chất điều hòa sinh trưởng

Cong thuc	Count	Average	Standard deviation	Coeff. of variation	Standard error	Minimum	Maximum	Range
CT1	3	1.14141	0.0941144	8.24542%	0.054337	1.08333	1.25	0.166667
CT2	3	1.31313	0.0349909	2.66469%	0.020202	1.27273	1.33333	0.0606061
CT3	3	1.17172	0.0837912	7.15115%	0.0483769	1.08333	1.25	0.166667
CT4	3	1.16667	0.166667	14.2857%	0.096225	1.0	1.33333	0.333333
Total	12	1.19823	0.114475	9.55366%	0.0330461	1.0	1.33333	0.333333

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
MAIN EFFECTS					
A: Cong thuc	0.0543886	3	0.0181295	1.62	0.2609
RESIDUAL	0.0897612	8	0.0112202		
TOTAL (CORRECTED)	0.14415	11			

Phụ lục 11. Nghiên cứu ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng lên khả năng hình thành rễ cây Thủy Tùng

11.1. Kết quả phân tích ANOVA về tỷ lệ ra rễ

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
MAIN EFFECTS					
A:MOI TRUONG	0.214087	3	0.0713623	13.78	0.0042
B:LAN LAP	0.00488789	2	0.00244395	0.47	0.6452
RESIDUAL	0.0310778	6	0.00517964		
TOTAL (CORRECTED)	0.250053	11			

Kết quả xếp loại về tỷ lệ ra rễ

Method: 95.0 percent Duncan

Cong thuc	Count	LS Mean	LS Sigma	Homogeneous Groups
MT4	3	0.227273	0.0415517	X
MT1	3	0.229798	0.0415517	X
MT2	3	0.257576	0.0415517	X
MT3	3	0.545455	0.0415517	X

11.2. Kết quả phân tích về số rễ trung bình

Summary Statistics

	Count	Average	Standard deviation	Coeff. of variation	Standard error	Minimum	Maximum	Range
MT1	8	1.5	0.755929	50.3953%	0.267261	1.0	3.0	2.0
MT2	9	1.66667	0.866025	51.9615%	0.288675	1.0	3.0	2.0
MT3	19	2.84211	1.30227	45.8206%	0.298761	1.0	5.0	4.0
MT4	8	2.5	1.19523	47.8091%	0.422577	1.0	4.0	3.0
Total	44	2.29545	1.23099	53.6271%	0.185578	1.0	5.0	4.0

Kết quả xếp loại theo Kruskal-Wallis Test về số rễ trung bình

Kruskal-Wallis Test

	Sample Size	Average Rank
MT1	8	14.5
MT2	9	16.2778
MT3	19	27.8158
MT4	8	24.875

Test statistic = 9.44007 P-Value = 0.0239767

11.3. Kết quả phân tích về chiều dài rễ

Summary Statistics

	Count	Average	Standard deviation	Coeff. of variation	Standard error	Minimum	Maximum	Range
MT1	8	1.01625	0.589405	57.998%	0.208386	0.35	2.0	1.65
MT2	9	1.30556	0.639553	48.987%	0.213184	0.45	2.3	1.85
MT3	19	1.855	0.638144	34.4013%	0.1464	0.9	3.5	2.6
MT4	8	1.495	0.387409	25.9136%	0.13697	1.0	2.15	1.15
Total	44	1.52466	0.65884	43.2123%	0.0993239	0.35	3.5	3.15

Kết quả xếp loại theo Kruskal-Wallis Test về chiều dài rễ

Kruskal-Wallis Test

	Sample Size	Average Rank
MT1	8	12.6875
MT2	9	18.5
MT3	19	28.9737
MT4	8	21.4375

Test statistic = 10.4511 P-Value = 0.0150955

Kết quả phân tích về chỉ số ra rã

Summary Statistics

	<i>Count</i>	<i>Average</i>	<i>Standard deviation</i>	<i>Coeff. of variation</i>	<i>Standard error</i>	<i>Minimum</i>	<i>Maximum</i>	<i>Range</i>
MT1	8	1.54875	1.23699	79.8705%	0.437344	0.5	3.99	3.49
MT2	9	2.11111	1.40485	66.5457%	0.468284	0.5	4.5	4.0
MT3	19	5.03211	2.45702	48.8268%	0.563678	1.0	11.0	10.0
MT4	8	3.72625	2.09561	56.239%	0.740909	1.5	7.8	6.3
Total	44	3.56386	2.45213	68.8052%	0.369672	0.5	11.0	10.5

Kết quả xếp loại theo Kruskal-Wallis Test về chỉ số ra rã

Kruskal-Wallis Test

	<i>Sample Size</i>	<i>Average Rank</i>
MT1	8	10.625
MT2	9	15.3889
MT3	19	30.0789
MT4	8	24.375

Test statistic = 16.4079 P-Value = 0.000935231

Phụ lục 12. Nghiên cứu ảnh hưởng của nồng độ IBA và thời gian xử lý hom đến khả năng ra rễ của hom Thủy tùng

12.1. Kết quả phân tích ANOVA về tỷ lệ sống của hom theo từng nhân tố nồng độ IBA và thời gian xử lý hom

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
MAIN EFFECTS					
A:NONG DO IBA	8731.07	2	4365.53	24.08	0.0000
B:THOI GIAN	10062.6	2	5031.29	27.75	0.0000
C:LAN LAP	94.3311	2	47.1655	0.26	0.7735
RESIDUAL	3626.3	20	181.315		
TOTAL (CORRECTED)	22514.3	26			

Kết quả xếp loại về tỷ lệ sống của hom theo nhân tố thời gian xử lý hom

Method: 95.0 percent Duncan

THOI GIAN	Count	LS Mean	LS Sigma	Homogeneous Groups
T3	9	33.9683	4.48844	X
T2	9	46.3492	4.48844	X
T1	9	79.6825	4.48844	X

Kết quả xếp loại về tỷ lệ sống của hom theo nhân tố nồng độ IBA

Method: 95.0 percent Duncan

NONG DO IBA	Count	LS Mean	LS Sigma	Homogeneous Groups
I3	9	37.1429	4.48844	X
I2	9	44.4444	4.48844	X
I1	9	78.4127	4.48844	X

12.2. Kết quả phân tích ANOVA về tỷ lệ ra rễ của hom theo từng nhân tố nồng độ IBA và thời gian xử lý hom

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
MAIN EFFECTS					
A:LAN LAP	131.217	2	65.6085	0.31	0.7374
B:NONG DO IBA	385.185	2	192.593	0.91	0.4193
C:THOI GIAN	809.675	2	404.837	1.91	0.1743
RESIDUAL	4241.87	20	212.094		
TOTAL (CORRECTED)	5567.95	26			

12.3. Kết quả phân tích ANOVA về tỷ lệ sống của hom theo hỗn hợp 2 nhân tố nồng độ IBA và thời gian xử lý hom

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
MAIN EFFECTS					
A:LAN LAP	94.3311	2	47.1655	0.70	0.5105
B:HON HOP	21344.2	8	2668.03	39.68	0.0000
RESIDUAL	1075.74	16	67.2336		
TOTAL (CORRECTED)	22514.3	26			

Kết quả xếp loại về tỷ lệ sống của hom theo hỗn hợp 2 nhân tố nồng độ IBA và thời gian xử lý hom

Method: 95.0 percent Duncan

HON HOP	Count	LS Mean	LS Sigma	Homogeneous Groups
I3T3	3	11.4286	4.73405	X
I2T3	3	23.8095	4.73405	XX
I3T2	3	26.6667	4.73405	X
I2T2	3	29.5238	4.73405	X
I1T3	3	66.6667	4.73405	X
I3T1	3	73.3333	4.73405	XX
I2T1	3	80.0	4.73405	XX
I1T2	3	82.8571	4.73405	X
I1T1	3	85.7143	4.73405	X

12.4. Kết quả ANOVA về tỷ lệ ra rễ của hom theo hỗn hợp 2 nhân tố nồng độ IBA và thời gian xử lý hom

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
MAIN EFFECTS					
A:LAN LAP	131.217	2	65.6085	0.81	0.4619
B:HON HOP	4142.1	8	517.763	6.40	0.0008
RESIDUAL	1294.63	16	80.9146		
TOTAL (CORRECTED)	5567.95	26			

Kết quả xếp loại về tỷ lệ ra rễ của hom theo hỗn hợp 2 nhân tố nồng độ IBA và thời gian xử lý hom

Method: 95.0 percent Duncan

HON HOP	Count	LS Mean	LS Sigma	Homogeneous Groups
I2T3	3	0.952381	5.19341	X
I3T3	3	1.90476	5.19341	X
I2T2	3	4.7619	5.19341	X
I3T2	3	6.66667	5.19341	XX
I1T1	3	6.66667	5.19341	XX
I1T3	3	22.8571	5.19341	XX
I3T1	3	24.7619	5.19341	X
I1T2	3	30.4762	5.19341	X
I2T1	3	34.2857	5.19341	X

Phụ lục 13. Nghiên cứu ảnh hưởng của nồng độ IBA và kích thước hom đến kết quả giâm hom Thủy tùng

13.1. Kết quả phân tích ANOVA về tỷ lệ sống của hom theo từng nhân tố nồng độ IBA và kích thước hom

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
MAIN EFFECTS					
A:NONG DO IBA	2246.3	2	1123.15	13.90	0.0002
B:KICH THUOC	8475.46	2	4237.73	52.46	0.0000
C:LAN LAP	6.01852	2	3.00926	0.04	0.9635
RESIDUAL	1615.74	20	80.787		
TOTAL (CORRECTED)	12343.5	26			

All F-ratios are based on the residual mean square error.

Kết quả xếp loại về tỷ lệ sống của hom theo nhân tố nồng độ IBA

Method: 95.0 percent Duncan

NONG DO IBA	Count	LS Mean	LS Sigma	Homogeneous Groups
3	9	37.5	2.99605	X
2	9	53.0556	2.99605	X
1	9	59.1667	2.99605	X

Kết quả xếp loại về tỷ lệ sống của hom theo nhân tố kích thước hom

Method: 95.0 percent Duncan

KICH THUOC	Count	LS Mean	LS Sigma	Homogeneous Groups
3	9	25.0	2.99605	X
2	9	60.0	2.99605	X
1	9	64.7222	2.99605	X

13.2. Kết quả phân tích ANOVA về tỷ lệ ra rễ của hom theo từng nhân tố nồng độ IBA và kích thước hom

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
MAIN EFFECTS					
A:NONG DO IBA	1106.02	2	553.009	26.87	0.0000
B:KICH THUOC	207.407	2	103.704	5.04	0.0169
C:LAN LAP	7.40741	2	3.7037	0.18	0.8366
RESIDUAL	411.574	20	20.5787		
TOTAL (CORRECTED)	1732.41	26			

All F-ratios are based on the residual mean square error.

Kết quả xếp loại về tỷ lệ ra rễ của hom theo nhân tố nồng độ IBA

Method: 95.0 percent Duncan

NONG DO IBA	Count	LS Mean	LS Sigma	Homogeneous Groups
3	9	1.38889	1.51213	X
2	9	3.33333	1.51213	X
1	9	15.8333	1.51213	X

Kết quả xếp loại về tỷ lệ ra rễ của hom theo nhân tố kích thước hom

Method: 95.0 percent Duncan

KICH THUOC	Count	LS Mean	LS Sigma	Homogeneous Groups
1	9	3.88889	1.51213	X
3	9	6.11111	1.51213	XX
2	9	10.5556	1.51213	X

13.3. Kết quả phân tích ANOVA về tỷ lệ sống của hom theo hỗn hợp 2 nhân tố nồng độ IBA và kích thước hom

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
MAIN EFFECTS					
A:CONG THUC	11264.4	8	1408.04	20.99	0.0000
B:LAN LAP	6.01852	2	3.00926	0.04	0.9562
RESIDUAL	1073.15	16	67.0718		
TOTAL (CORRECTED)	12343.5	26			

Kết quả xếp loại về tỷ lệ sống của hom theo hỗn hợp 2 nhân tố nồng độ IBA và kích thước hom

Method: 95.0 percent Duncan

CONG THUC	Count	LS Mean	Homogeneous Groups
I3K3	3	10.0	X
I1K3	3	30.8333	X
I2K3	3	34.1667	XX
I3K2	3	46.6667	XX
I3K1	3	55.8333	XX
I2K1	3	59.1667	XX
I2K2	3	65.8333	XX
I1K2	3	67.5	XX
I1K1	3	79.1667	X

13.4. Kết quả phân tích ANOVA về tỷ lệ ra rễ của hom theo hỗn hợp 2 nhân tố nồng độ IBA và kích thước hom

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
MAIN EFFECTS					
A:CONG THUC	1636.57	8	204.572	37.02	0.0000
B:LAN LAP	7.40741	2	3.7037	0.67	0.5254
RESIDUAL	88.4259	16	5.52662		
TOTAL (CORRECTED)	1732.41	26			

Kết quả xếp loại về tỷ lệ ra rễ của hom theo hỗn hợp 2 nhân tố nồng độ IBA và kích thước hom

Method: 95.0 percent Duncan

CONG THUC	Count	LS Mean	Homogeneous Groups
I3K1	3	0.0	X
I2K1	3	0.0	X
I3K3	3	1.66667	X
I3K2	3	2.5	XX
I2K2	3	3.33333	XX
I2K3	3	6.66667	XX
I1K3	3	10.0	XX
I1K1	3	11.6667	X
I1K2	3	25.8333	X

13.5. Kết quả phân tích về số rễ của hom theo hỗn hợp 2 nhân tố nồng độ IBA và kích thước hom

Summary Statistics

	Count	Average	Standard deviation	Coeff. of variation	Standard error	Minimum	Maximum	Range
I1K1	14	1.5	0.650444	43.3629%	0.173838	1.0	3.0	2.0
I1K2	27	2.66667	1.54422	57.9082%	0.297185	1.0	6.0	5.0
I1K3	16	4.375	3.00832	68.7616%	0.75208	1.0	10.0	9.0
I2K1	1	0.0				0.0	0.0	0.0
I2K2	4	1.0	0.0	0.0%	0.0	1.0	1.0	0.0
I2K3	8	2.25	2.37547	105.576%	0.839855	1.0	8.0	7.0
I3K1	1	0.0				0.0	0.0	0.0
I3K2	3	1.33333	0.57735	43.3013%	0.333333	1.0	2.0	1.0
I3K3	2	1.0	0.0	0.0%	0.0	1.0	1.0	0.0
Total	76	2.51316	2.14472	85.3397%	0.246016	0.0	10.0	10.0

Kết quả xếp loại theo Kruskal-Wallis Test về số rễ của hom theo hỗn hợp 2 nhân tố nồng độ IBA và kích thước hom

Kruskal-Wallis Test

	Sample Size	Average Rank
I1K1	14	29.4643
I1K2	27	44.2593
I1K3	16	53.5
I2K1	1	1.5
I2K2	4	18.0
I2K3	8	34.125
I3K1	1	1.5
I3K2	3	26.1667
I3K3	2	18.0

Test statistic = 25.7405 P-Value = 0.00116323

13.6. Kết quả phân tích về chiều dài rễ của hom theo hỗn hợp 2 nhân tố nồng độ IBA và kích thước hom

Summary Statistics

	Count	Average	Standard deviation	Coeff. of variation	Standard error	Minimum	Maximum	Range
I1K1	14	2.55714	2.42763	94.9354%	0.648812	1.0	9.0	8.0
I1K2	27	13.5926	20.313	149.441%	3.90923	1.0	80.0	79.0
I1K3	16	12.5938	10.7412	85.2901%	2.68531	1.0	31.0	30.0
I2K1	1	0.0				0.0	0.0	0.0
I2K2	4	1.375	0.478714	34.8155%	0.239357	1.0	2.0	1.0
I2K3	8	1.9625	1.40808	71.7491%	0.49783	1.0	5.0	4.0
I3K1	1	0.0				0.0	0.0	0.0
I3K2	3	5.73333	5.40494	94.2721%	3.12054	0.2	11.0	10.8
I3K3	2	2.5	0.707107	28.2843%	0.5	2.0	3.0	1.0
Total	76	8.52237	14.0741	165.143%	1.61441	0.0	80.0	80.0

Kết quả xếp loại theo Kruskal-Wallis Test về chiều dài rễ của hom theo hỗn hợp 2 nhân tố nồng độ IBA và kích thước hom

Kruskal-Wallis Test

	Sample Size	Average Rank
I1K1	14	27.1071
I1K2	27	45.6296
I1K3	16	53.125
I2K1	1	1.5
I2K2	4	18.375
I2K3	8	24.0625
I3K1	1	1.5
I3K2	3	39.6667
I3K3	2	38.25

Test statistic = 26.1058 P-Value = 0.00100738

13.7. Kết quả phân tích về chỉ số ra rễ của hom theo hỗn hợp 2 nhân tố nồng độ IBA và kích thước hom

Summary Statistics

	<i>Count</i>	<i>Average</i>	<i>Standard deviation</i>	<i>Coeff. of variation</i>	<i>Standard error</i>	<i>Minimum</i>	<i>Maximum</i>	<i>Range</i>
I1K1	14	4.29286	5.02386	117.028%	1.34268	1.0	18.0	17.0
I1K2	27	51.1296	96.6924	189.112%	18.6085	1.0	400.0	399.0
I1K3	16	65.9375	72.5695	110.058%	18.1424	1.0	217.0	216.0
I2K1	1	0.0				0.0	0.0	0.0
I2K2	4	1.375	0.478714	34.8155%	0.239357	1.0	2.0	1.0
I2K3	8	4.4	5.0506	114.786%	1.78566	1.0	16.0	15.0
I3K1	1	0.0				0.0	0.0	0.0
I3K2	3	9.4	11.2907	120.114%	6.51869	0.2	22.0	21.8
I3K3	2	2.5	0.707107	28.2843%	0.5	2.0	3.0	1.0
Total	76	33.8092	70.8817	209.652%	8.13069	0.0	400.0	400.0

Kết quả xếp loại theo Kruskal-Wallis Test về chỉ số ra rễ của hom theo hỗn hợp 2 nhân tố nồng độ IBA và kích thước hom

Kruskal-Wallis Test

	<i>Sample Size</i>	<i>Average Rank</i>
I1K1	14	27.0357
I1K2	27	45.6667
I1K3	16	54.6563
I2K1	1	1.5
I2K2	4	14.5
I2K3	8	27.5
I3K1	1	1.5
I3K2	3	34.5
I3K3	2	27.75

Test statistic = 28.1584 P-Value = 0.000445056

Phụ lục 14. Nghiên cứu ảnh hưởng của hỗn hợp chất điều hoà sinh trưởng đến khả năng ra rễ của hom Thủy tùng

Nhóm 1

14.1.1. Kết quả phân tích ANOVA về tỷ lệ sống của hom theo hỗn hợp chất điều hoà sinh trưởng

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
MAIN EFFECTS					
A:CONG THUC	0.216049	5	0.0432099	3.74	0.0360
B:LAN LAP	0.0319753	2	0.0159877	1.39	0.2945
RESIDUAL	0.115432	10	0.0115432		
TOTAL (CORRECTED)	0.363457	17			

Kết quả xếp loại về tỷ lệ sống của hom theo hỗn hợp chất điều hoà sinh trưởng

Method: 95.0 percent Duncan

CONG THUC	Count	LS Mean	Homogeneous Groups
DC	3	0.277778	X
CT5	3	0.466667	XX
CT4	3	0.477778	XX
CT3	3	0.533333	X
CT1	3	0.588889	X
CT2	3	0.611111	X

14.1.2. Kết quả phân tích ANOVA về tỷ lệ ra rễ của hom theo hỗn hợp chất điều hoà sinh trưởng

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
MAIN EFFECTS					
A:CONG THUC	0.102778	5	0.0205556	1.82	0.1966
B:LAN LAP	0.00703704	2	0.00351852	0.31	0.7392
RESIDUAL	0.112963	10	0.0112963		
TOTAL (CORRECTED)	0.222778	17			

14.1.3. Kết quả phân tích về số rễ của hom theo hỗn hợp chất điều hoà sinh trưởng

Summary Statistics

	Count	Average	Standard deviation	Coeff. of variation	Standard error	Minimum	Maximum	Range
CT1	6	1.83333	1.60208	87.3863%	0.654047	1.0	5.0	4.0
CT2	21	2.85714	1.68184	58.8643%	0.367007	1.0	6.0	5.0
CT3	18	1.5	0.514496	34.2997%	0.121268	1.0	2.0	1.0
CT4	15	1.2	0.414039	34.5033%	0.106904	1.0	2.0	1.0
CT5	6	1.0	0.0	0.0%	0.0	1.0	1.0	0.0
DC	3	1.0	0.0	0.0%	0.0	1.0	1.0	0.0
Total	69	1.81159	1.28653	71.0164%	0.15488	1.0	6.0	5.0

Kết quả xếp loại theo Kruskal-Wallis Test về số rễ của hom theo hỗn hợp chất điều hoà sinh trưởng

Kruskal-Wallis Test

	Sample Size	Average Rank
CT1	6	32.75
CT2	21	48.6429
CT3	18	34.5
CT4	15	26.1
CT5	6	20.5
DC	3	20.5

Test statistic = 22.0324 P-Value = 0.000516236

14.1.4. Kết quả phân tích về chiều dài rễ của hom theo hỗn hợp chất điều hòa sinh trưởng

Summary Statistics

	Count	Average	Standard deviation	Coeff. of variation	Standard error	Minimum	Maximum	Range
CT1	6	7.45	4.21319	56.5529%	1.72003	3.2	15.5	12.3
CT2	21	8.88571	4.38603	49.3605%	0.957111	4.9	18.8	13.9
CT3	18	7.78333	3.51036	45.101%	0.8274	3.8	13.8	10.0
CT4	15	5.52	3.61153	65.4263%	0.932493	2.0	10.6	8.6
CT5	6	3.9	2.30043	58.9855%	0.939149	1.8	6.0	4.2
DC	3	7.53333	3.09892	41.1362%	1.78916	5.5	11.1	5.6
Total	69	7.24928	3.99498	55.1087%	0.480939	1.8	18.8	17.0

Kết quả xếp loại theo Kruskal-Wallis Test về chiều dài rễ của hom theo hỗn hợp chất điều hòa sinh trưởng

Kruskal-Wallis Test

	Sample Size	Average Rank
CT1	6	34.0
CT2	21	42.2857
CT3	18	37.8333
CT4	15	27.8
CT5	6	17.25
DC	3	40.5

Test statistic = 10.027 P-Value = 0.0744727 > 0.05

14.1.5. Kết quả phân tích về chỉ số ra rễ của hom theo hỗn hợp chất điều hòa sinh trưởng

Summary Statistics

	Count	Average	Standard deviation	Coeff. of variation	Standard error	Minimum	Maximum	Range
CT1	6	12.9833	11.5541	88.9919%	4.71695	3.2	35.0	31.8
CT2	21	23.8	15.8177	66.461%	3.45171	7.8	56.4	48.6
CT3	18	12.3	8.11491	65.9749%	1.9127	3.8	27.6	23.8
CT4	15	7.64	7.44195	97.4077%	1.9215	2.0	21.2	19.2
CT5	6	3.9	2.30043	58.9855%	0.939149	1.8	6.0	4.2
DC	3	7.53333	3.09892	41.1362%	1.78916	5.5	11.1	5.6
Total	69	13.9087	12.7364	91.5717%	1.53329	1.8	56.4	54.6

Kết quả xếp loại theo Kruskal-Wallis Test về chỉ số ra rễ của hom theo hỗn hợp chất điều hòa sinh trưởng

Kruskal-Wallis Test

	Sample Size	Average Rank
CT1	6	35.0
CT2	21	50.0
CT3	18	36.4167
CT4	15	22.8
CT5	6	12.25
DC	3	28.0

Test statistic = 25.499 P-Value = 0.000111584

Nhóm 2

14.2.1. Kết quả phân tích ANOVA về tỷ lệ sống của hom theo hỗn hợp chất điều hòa sinh trưởng

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
MAIN EFFECTS					
A:CONG THUC	0.0311111	5	0.00622222	0.69	0.6415
B:LAN LAP	0.00777778	2	0.00388889	0.43	0.6607
RESIDUAL	0.09	10	0.009		
TOTAL (CORRECTED)	0.128889	17			

14.2.2. Kết quả phân tích ANOVA về tỷ lệ ra rễ của hom theo hỗn hợp chất điều hòa sinh trưởng

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
MAIN EFFECTS					
A:CONG THUC	0.0516667	5	0.0103333	1.26	0.3514
B:LAN LAP	0.0114815	2	0.00574074	0.70	0.5188
RESIDUAL	0.0818519	10	0.00818519		
TOTAL (CORRECTED)	0.145	17			

14.2.3. Kết quả phân tích về số rễ của hom theo hỗn hợp chất điều hòa sinh trưởng

Summary Statistics

	Count	Average	Standard deviation	Coeff. of variation	Standard error	Minimum	Maximum	Range
CT6	9	1.66667	1.0	60.0%	0.333333	1.0	3.0	2.0
CT7	9	2.0	0.866025	43.3013%	0.288675	1.0	3.0	2.0
CT8	9	2.66667	0.5	18.75%	0.166667	2.0	3.0	1.0
CT9	18	3.0	1.32842	44.2807%	0.313112	1.0	5.0	4.0
CT10	15	2.6	1.0556	40.5999%	0.272554	1.0	4.0	3.0
DC	3	1.0	0.0	0.0%	0.0	1.0	1.0	0.0
Total	63	2.42857	1.14602	47.1891%	0.144385	1.0	5.0	4.0

Kết quả xếp loại theo Kruskal-Wallis Test về số rễ của hom theo hỗn hợp chất điều hòa sinh trưởng

Kruskal-Wallis Test

	Sample Size	Average Rank
CT6	9	20.5
CT7	9	25.5
CT8	9	36.5
CT9	18	39.75
CT10	15	35.3
DC	3	9.5

Test statistic = 14.7092 P-Value = 0.0116798

14.2.4. Kết quả phân tích về chiều dài rễ của hom theo hỗn hợp chất điều hòa sinh trưởng

Summary Statistics

	Count	Average	Standard deviation	Coeff. of variation	Standard error	Minimum	Maximum	Range
CT6	9	7.4	1.96723	26.5842%	0.655744	5.8	10.0	4.2
CT7	9	10.4333	8.4571	81.0584%	2.81903	1.0	20.5	19.5
CT8	9	7.9	3.61974	45.8195%	1.20658	3.2	11.2	8.0
CT9	18	12.9167	4.48661	34.7351%	1.05751	8.4	21.2	12.8
CT10	15	8.06	4.24547	52.6733%	1.09618	3.7	15.8	12.1
DC	3	7.53333	3.09892	41.1362%	1.78916	5.5	11.1	5.6
Total	63	9.64444	5.14906	53.3889%	0.648721	1.0	21.2	20.2

Kết quả xếp loại theo Kruskal-Wallis Test về chiều dài rễ của hom theo hỗn hợp chất điều hòa sinh trưởng

Kruskal-Wallis Test

	<i>Sample Size</i>	<i>Average Rank</i>
CT6	9	23.6667
CT7	9	32.6667
CT8	9	27.6667
CT9	18	45.0
CT10	15	25.3
DC	3	23.5

Test statistic = 14.1068 P-Value = 0.0149451

14.2.5. Kết quả phân tích về chỉ số ra rễ của hom theo hỗn hợp chất điều hòa sinh trưởng

Summary Statistics

	<i>Count</i>	<i>Average</i>	<i>Standard deviation</i>	<i>Coeff. of variation</i>	<i>Standard error</i>	<i>Minimum</i>	<i>Maximum</i>	<i>Range</i>
CT6	9	14.0667	11.9528	84.9727%	3.98427	5.8	30.0	24.2
CT7	9	27.3667	26.8371	98.0648%	8.94568	1.0	61.5	60.5
CT8	9	22.6333	12.4227	54.8866%	4.14089	6.4	33.6	27.2
CT9	18	38.95	18.9056	48.5382%	4.4561	8.4	63.6	55.2
CT10	15	24.34	21.0477	86.4735%	5.43448	3.7	63.2	59.5
DC	3	7.53333	3.09892	41.1362%	1.78916	5.5	11.1	5.6
Total	63	26.4349	20.442	77.3297%	2.57546	1.0	63.6	62.6

Kết quả xếp loại theo Kruskal-Wallis Test về chỉ số ra rễ của hom theo hỗn hợp chất điều hòa sinh trưởng

Kruskal-Wallis Test

	<i>Sample Size</i>	<i>Average Rank</i>
CT6	9	21.5
CT7	9	29.0
CT8	9	32.1667
CT9	18	44.3333
CT10	15	29.0
DC	3	13.0

Test statistic = 15.0073 P-Value = 0.0103313

Nhóm 3

14.3.1. Kết quả phân tích ANOVA về tỷ lệ sống của hom theo hỗn hợp chất điều hòa sinh trưởng

<i>Source</i>	<i>Sum of Squares</i>	<i>Df</i>	<i>Mean Square</i>	<i>F-Ratio</i>	<i>P-Value</i>
MAIN EFFECTS					
A:CONG THUC	0.0651852	5	0.013037	3.42	0.0464
B:LAN LAP	0.00333333	2	0.00166667	0.44	0.6578
RESIDUAL	0.0381481	10	0.00381481		
TOTAL (CORRECTED)	0.106667	17			

Kết quả xếp loại về tỷ lệ sống của hom theo hỗn hợp chất điều hòa sinh trưởng

Method: 95.0 percent Duncan

<i>CONG THUC</i>	<i>Count</i>	<i>LS Mean</i>	<i>Homogeneous Groups</i>
CT14	3	0.144444	X
CT15	3	0.144444	X
CT12	3	0.166667	XX
CT13	3	0.177778	XXX
DC	3	0.277778	XX
CT11	3	0.288889	X

So sánh 2 công thức CT2 và CT9

14.4.1. Kết quả phân tích về số rẽ của hom

Summary Statistics

	Count	Average	Standard deviation	Coeff. of variation	Standard error	Minimum	Maximum	Range
CT2	21	2.85714	1.68184	58.8643%	0.367007	1.0	6.0	5.0
CT9	18	3.0	1.32842	44.2807%	0.313112	1.0	5.0	4.0
Total	39	2.92308	1.51109	51.6953%	0.241968	1.0	6.0	5.0

Kết quả xếp loại theo Kruskal-Wallis Test về số rẽ của hom

Kruskal-Wallis Test

	Sample Size	Average Rank
CT2	21	19.1429
CT9	18	21.0

Test statistic = 0.270389 P-Value = 0.603071

14.4.2. Kết quả phân tích về chiều dài rẽ của hom

Summary Statistics

	Count	Average	Standard deviation	Coeff. of variation	Standard error	Minimum	Maximum	Range
CT2	21	8.88571	4.38603	49.3605%	0.957111	4.9	18.8	13.9
CT9	18	12.9167	4.48661	34.7351%	1.05751	8.4	21.2	12.8
Total	39	10.7462	4.82438	44.894%	0.772519	4.9	21.2	16.3

Kết quả xếp loại theo Kruskal-Wallis Test về chiều dài rẽ của hom

Kruskal-Wallis Test

	Sample Size	Average Rank
CT2	21	13.7857
CT9	18	27.25

Test statistic = 13.6627 P-Value = 0.000218606

14.4.3. Kết quả phân tích về chỉ số ra rẽ của hom

Summary Statistics

	Count	Average	Standard deviation	Coeff. of variation	Standard error	Minimum	Maximum	Range
CT2	21	23.8	15.8177	66.461%	3.45171	7.8	56.4	48.6
CT9	18	38.95	18.9056	48.5382%	4.4561	8.4	63.6	55.2
Total	39	30.7923	18.7117	60.7673%	2.99626	7.8	63.6	55.8

Kết quả xếp loại theo Kruskal-Wallis Test về chỉ số ra rẽ của hom

Kruskal-Wallis Test

	Sample Size	Average Rank
CT2	21	15.5
CT9	18	25.25

Test statistic = 7.14463 P-Value = 0.00751716

Phụ lục 15. Nghiên cứu kỹ thuật nhân giống Thủy tùng bằng ghép trên rễ thỏ

15.1. Kết quả phân tích sinh trưởng về đường kính

Summary Statistics

	Count	Average	Standard deviation	Coeff. of variation	Standard error	Minimum	Maximum	Std. skewness	Std. kurtosis
D ghép ap canh	32	12.475	8.60064	68.943%	1.52039	2.1	33.5	2.06517	-0.353042
D Ghep mat	42	6.95952	7.31881	105.162%	1.12932	0.3	42.5	8.37037	17.4433
Total	74	9.34459	8.31055	88.9343%	0.966082	0.3	42.5	6.13318	5.72062

Kết quả xếp loại theo Kruskal-Wallis Test về đường kính

Kruskal-Wallis Test

	Sample Size	Average Rank
D ghép ap canh	32	47.6719
D Ghep mat	42	29.75

Test statistic = 12.617 P-Value = 0.000381986

15.2. Kết quả phân tích sinh trưởng về chiều cao

Summary Statistics

	Count	Average	Standard deviation	Coeff. of variation	Standard error	Minimum	Maximum	Std. skewness	Std. kurtosis
H ghép ap canh	32	83.5938	63.3907	75.8318%	11.206	9.0	235.0	2.39079	0.269744
H Ghep mat	42	39.2024	44.1225	112.551%	6.80825	1.0	185.0	5.12521	4.49395
Total	74	58.3986	57.3595	98.2207%	6.66791	1.0	235.0	5.02906	2.45974

Kết quả xếp loại theo Kruskal-Wallis Test về chiều cao

Kruskal-Wallis Test

	Sample Size	Average Rank
H ghép ap canh	32	48.3594
H Ghep mat	42	29.2262

Test statistic = 14.3858 P-Value = 0.000148925

Phụ lục 16. Nghiên cứu ảnh hưởng của độ tàn che đến sinh trưởng cây trồng Thủy tùng

16.1. Kết quả phân tích sinh trưởng về đường kính

Summary Statistics

	Count	Average	Standard deviation	Coeff. of variation	Standard error	Minimum	Maximum	Range	Std. skewness	Std. kurtosis
DTC1	10	7.94	3.8024	47.8891%	1.20242	2.1	13.7	11.6	0.332872	-0.63212
DTC2	15	8.48	5.31268	62.6495%	1.37173	3.6	24.0	20.4	3.09424	3.59623
DTC3	5	6.46	1.32778	20.5539%	0.593801	4.3	7.6	3.3	-1.21401	0.869056
DTC4	2	4.5	0.282843	6.28539%	0.2	4.3	4.7	0.4		
Total	32	7.74688	4.28877	55.3613%	0.758154	2.1	24.0	21.9	4.5313	6.29253

Kết quả xếp loại theo Kruskal-Wallis Test về đường kính

Kruskal-Wallis Test

	Sample Size	Average Rank
DTC1	10	18.5
DTC2	15	16.9667
DTC3	5	16.0
DTC4	2	4.25

Test statistic = 3.92429 P-Value = 0.269752

16.2. Kết quả phân tích sinh trưởng về chiều cao

Summary Statistics

	Count	Average	Standard deviation	Coeff. of variation	Standard error	Minimum	Maximum	Range	Std. skewness	Std. kurtosis
DTC1	9	47.8889	21.7626	45.444%	7.2542	20.0	85.0	65.0	0.535138	-0.639912
DTC2	14	63.3636	31.7845	50.1621%	9.58339	33.0	140.0	107.0	1.93912	1.72665
DTC3	4	34.25	4.34933	12.6988%	2.17466	30.0	40.0	10.0	0.677314	-0.0149263
DTC4	2	20.0	0.0	0.0%	0.0	20.0	20.0	0.0		
Total	26	50.1923	27.3818	54.5537%	5.37001	20.0	140.0	120.0	3.2007	3.32907

Kết quả xếp loại theo Kruskal-Wallis Test về chiều cao

Kruskal-Wallis Test

	Sample Size	Average Rank
DTC1	9	13.4444
DTC2	14	17.1818
DTC3	4	9.25
DTC4	2	2.0

Test statistic = 8.3659 P-Value = 0.0390238

Phụ lục 17. Nghiên cứu kỹ thuật bón phân cây trồng Thủy tùng

17.1. Kết quả phân tích sinh trưởng về đường kính

Summary Statistics

	Count	Average	Standard deviation	Coeff. of variation	Standard error	Minimum	Maximum	Range	Std. skewness	Std. kurtosis
BP1	21	8.53333	1.48133	17.3593%	0.323252	5.9	11.9	6.0	0.727591	0.117425
BP2	15	7.26	1.17765	16.2211%	0.304068	5.7	9.4	3.7	0.197947	-0.91401
BP3	15	7.46	0.995562	13.3453%	0.257053	5.8	9.2	3.4	-0.0232328	-0.593002
PB4	17	7.97647	1.45066	18.1867%	0.351837	5.5	10.3	4.8	0.359824	-0.894057
DC	14	6.76429	1.85788	27.466%	0.496538	4.4	11.7	7.3	2.42355	2.41307
Total	82	7.68659	1.52192	19.7997%	0.168068	4.4	11.9	7.5	1.73761	0.139452

Kết quả xếp loại theo Kruskal-Wallis Test về đường kính

Kruskal-Wallis Test

	Sample Size	Average Rank
BP1	21	54.5714
BP2	15	35.6
BP3	15	39.3333
PB4	17	46.2647
DC	14	24.75

Test statistic = 14.9953 P-Value = 0.00471089

17.2. Kết quả phân tích sinh trưởng về chiều cao

Summary Statistics

	Count	Average	Standard deviation	Coeff. of variation	Standard error	Minimum	Maximum	Range	Std. skewness	Std. kurtosis
BP1	21	39.2381	6.789	17.3021%	1.48148	21.0	51.0	30.0	-1.50261	1.51415
BP2	15	36.9333	6.16982	16.7053%	1.59304	29.0	49.0	20.0	0.517999	-0.680547
BP3	15	37.0667	2.40436	6.48659%	0.620803	33.0	43.0	10.0	1.3764	1.33463
PB4	17	39.4118	10.2838	26.0933%	2.4942	25.0	60.0	35.0	1.03571	-0.416872
DC	14	32.1429	8.26352	25.7087%	2.20852	19.0	47.0	28.0	0.241848	-0.717106
Total	82	37.2439	7.57279	20.333%	0.836275	19.0	60.0	41.0	0.845822	1.29018

Kết quả xếp loại theo Kruskal-Wallis Test về chiều cao

Kruskal-Wallis Test

	Sample Size	Average Rank
BP1	21	50.8333
BP2	15	40.3667
BP3	15	39.4
PB4	17	44.0294
DC	14	27.8929

Test statistic = 8.16452 P-Value = 0.0857342

Phụ lục 18. Các phiếu điều tra

PHIẾU ĐIỀU TRA Ô 2.500 m²

I. Mô tả ô 2.500 m² (50m x 50 m)

Tiểu khu

Ngày điều tra:

Khoảnh

Người điều tra:

Thành phần thực bì:

Thành phần cây bụi chủ yếu:

Tọa độ

X:

Y:

II. Điều tra ô tiêu chuẩn

TT	Tên loài cây gỗ	D1,3 (cm)	Hvn (m)	Phẩm chất	Ghi chú
1					
2					
3					
...					

PHIẾU ĐIỀU TRA Ô 100 m²

I. Mô tả ô 100 m² (10m x 10 m)

Tiểu khu

Ngày điều tra:

Khoảnh

Người điều tra:

Tọa độ

X:

Y:

II. Điều tra ô tiêu chuẩn

TT	Tên loài	D1,3 (cm)	Hvn > 2 m	Phẩm chất	Ghi chú
1					
2					
3					
...					

PHIẾU ĐIỀU TRA MÔ TẢ HÌNH THÁI THÂN CÂY

Stt	ID	D1,3 (cm)	Hvn (m)	Chồi 1 có chồi mới; 0: Không có chồi mới	Nón đực 1 có nón đực; 0: Không có nón đực	Quả 1 có ra quả nón; 0: Không có quả nón	Chất lượng Tốt: Cây khỏe mạnh, tán đều, không bị sâu bệnh, Trung bình: Cây có một phần lá bị vàng, lệch tán; Xấu: Cây còi cọc, ít lá, khô hoặc rụng.
1							
2							
3							
...							
159							