

NHÂN GIỐNG CÂY MUỒNG HOA PHÁO (*Calliandra calothyrsus*) BẰNG PHƯƠNG PHÁP NUÔI CẤY MÔ

**Mai Vũ Duy*, Lê Vĩnh Thúc, Lê Minh Lý, Nguyễn Thiết, Nguyễn Văn Hón,
Đặng Phương Duyên, Võ Thị Huyền Trân, Nguyễn Khánh Ly**

Khoa Nông nghiệp và Sinh học Ứng dụng, Trường Đại học Cần Thơ

Email: mvduy@ctu.edu.vn*

Ngày gửi bài: 22.04.2014

Ngày chấp nhận: 15.07.2014

TÓM TẮT

Nghiên cứu được thực hiện nhằm mục tiêu tìm nồng độ các chất điều hòa sinh trưởng (BA, NAA), nồng độ khoáng đa lượng MS thích hợp cho tạo chồi, tạo rễ cây muồng hoa pháo (*Calliandra calothyrsus*) *in vitro* và tìm giá thể thích hợp cho giai đoạn *ex vitro*. Nghiên cứu bao gồm 3 thí nghiệm được bố trí theo thể thức hoàn toàn ngẫu nhiên. Kết quả cho thấy: môi trường thích hợp cho tạo chồi là MS bổ sung 0,5-1 mg/l BA (2,5-2,9 chồi/mẫu cấy), môi trường 1/2 MS bổ sung 2mg/l NAA cho rễ hình thành nhiều và phát triển bình thường ở giai đoạn tạo rễ, sử dụng giá thể cát để tiến hành thuần dưỡng cây cấy mô ở vườn ươm cho tỷ lệ sống cao nhất (80%).

Từ khóa: Cây muồng hoa pháo, *Calliandra calothyrsus*, tạo chồi, tạo rễ *in vitro*, thuần dưỡng.

Propagation of Red Calliandra (*Calliandra calothyrsus*) by Tissue Culture

ABSTRACT

The study was conducted for the following objectives: to ascertain the optimal concentration of plant growth regulators (BA, NAA), the MS macromineral concentrations for shoot establishment and root induction of *Calliandra calothyrsus* *in vitro* and to identify the suitable substrates for acclimatization. The research comprised 3 experiments arranged in completely randomized design. The results showed that MS medium supplemented with 0.5 - 1 mg/l BA was the best condition for shoot establishment (2.5-2.9 shoots); 1/2 MS medium supplemented with 2 mg/l NAA induced more normal roots. Acclimatization of micropropagated plants in plastic pots containing a mixture of sand showed highest survival rate (80%).

Keywords: Acclimatization, *Calliandra calothyrsus*, establish shoot, root induction *in vitro*.

1. MỞ ĐẦU

Muồng hoa pháo (*Calliandra calothyrsus*) là cây họ đậu được nhập nội vào Việt Nam trong những năm gần đây có năng suất cao và góp phần vào việc tăng năng suất cho chăn nuôi, cây cho năng suất sinh khối cao (40-45 tấn/ha/năm); lá và cành non rất giàu đạm (23,29% CP/DM) nên làm thức ăn tốt cho gia súc. Cây muồng hoa pháo cho năng suất đạt tốt nhất khi trồng so sánh với bình linh (*Leucaena leucocephala*) và *Flemingia macrophylla* (Nguyễn Thị Hồng Nhân và cs., 2012). Bên cạnh đó, thí nghiệm của

Hu et al. (1983), Mai Vũ Duy và cs. (2012) muồng hoa pháo có khả năng phát triển tốt trong điều kiện đất đai kém dưỡng chất, những vùng đất cát và đất chua có pH < 4,5 đây là một trong những đặc điểm tốt của cây để phát triển ở Đồng bằng sông Cửu Long. Ngoài ra, cây muồng hoa pháo có vai trò cải thiện tính chất hoá học của đất (Gichuru and Kang 1989). Theo Nguyễn Việt Khoa và cs. (2006), cây mọc nhanh có bộ rễ phát triển, có nhiều nốt sần chứa vi khuẩn cố định đạm có tác dụng che phủ bảo vệ, cải tạo, tăng mùn và đạm trong đất

Trên thế giới, cây muồng hoa pháo được trồng nhiều ở Đông Phi, cây cho số lượng trái thấp và chín không đồng đều, trái khi chín có đặc điểm thường bung hạt ra xa cây có thể lên đến 10m, điều này làm hạn chế số hạt được thu (Macqueen, 1993). Ngoài ra, sự thụ phấn để đậu trái ở cây muồng hoa pháo nhờ vào dơi và bướm đêm, sẽ bất lợi ở những nơi không có những loài này sinh sống. Những yếu tố bất lợi khác như mùa khô kéo dài hơn 4 tháng và đất nghèo dinh dưỡng cũng gây hạn chế đến khả năng sản xuất hạt (Chamberlain, 2000). Có một số nghiên cứu nhân giống vô tính bằng cách giâm cành nhưng kết quả rất thấp, chỉ khoảng 12% (MacQueen, 1991; Chang and Martinez, 1984). Theo Nguyễn Văn Quang (2011) cây sản xuất hạt kém, nên việc phát triển cây muồng hoa pháo hiện nay phải nhập hạt giống từ nước ngoài nên vừa đắt tiền vừa không chủ động được nguồn giống.

Nhân giống bằng phương pháp nuôi cấy mô đã được ứng dụng rộng rãi, trở thành một công cụ nhân giống chủ yếu trên thế giới, nhằm cung cấp một lượng lớn cây giống đồng nhất về mặt di truyền trong một thời gian ngắn. Theo Lê Trần Bình và cs. (1997), bằng phương pháp nuôi cấy mô, người ta có thể nhân giống cây trồng ở qui mô công nghiệp với hệ số nhân giống rất cao, thường đạt 3^6 - 10^{12} / năm, không có phương pháp nhân giống vô tính nào khác có hệ số nhân cao hơn. Hiện nay, cây bình linh là một trong những cây họ đậu làm thức ăn gia súc, đã được nghiên cứu nhân giống nhanh bằng phương pháp nuôi cấy mô (Rastogi et al., 2008). Tuy nhiên, cho đến nay chưa có một báo cáo nào về ứng dụng kỹ thuật trên đối với cây muồng hoa pháo. Vì vậy, đề tài được thực hiện với mục tiêu tìm nồng độ các chất điều hòa sinh trưởng (BA, NAA), nồng độ khoáng đa lượng MS thích hợp cho tạo chồi, tạo rễ cây muồng hoa pháo (*Calliandra calothyrsus*) *in vitro* và tìm giá thể thích hợp cho giai đoạn *ex vitro*, góp phần thiết thực vào qui trình nhân giống cây muồng hoa pháo bằng phương pháp nuôi cấy mô, phục vụ cho nghiên cứu và sản xuất.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Vật liệu

2.1.1. Vật liệu và nuôi cấy khởi đầu

Chọn các chồi muồng hoa pháo sinh trưởng tốt ở thời điểm 6 tuần tuổi, không sâu bệnh, lấy mẫu từ nhà lưới bộ môn Khoa học cây trồng, Khoa Nông nghiệp và Sinh học Ứng dụng, Đại học Cần Thơ.

2.1.2. Môi trường nuôi cấy

Khoáng đa lượng, vi lượng theo công thức MS (Murashige and Skoog, 1962) có bổ sung thiamin, pyridoxin, acid nicotinic với nồng độ 1 mg/l, myo-inositol (100 mg/l), nước dừa (100 ml/l), thạch (7 g/l), đường sucrose (30 g/l). Trong đó FeNaEDTA được thay thế bằng 100 mg/l Fe-EDDHA. Tùy theo các thí nghiệm có bổ sung các chất điều hòa sinh trưởng thực vật là BA (Benzyl adenin), NAA (α Naphthalene Acetic Acid). Môi trường được điều chỉnh pH đến 5,8. Thể tích môi trường được rót vào bình thủy tinh tương ứng là 15 ml (sử dụng ở thí nghiệm 1) và 40ml (sử dụng ở thí nghiệm 2) và được thanh trùng ở nhiệt độ 121°C, áp suất 1atm trong 20 phút.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Khử trùng bề mặt mẫu cấy

Các chồi non được cắt từ cây mẹ ở nhà lưới đem vào phòng thí nghiệm để khử trùng. Cắt bỏ lá và ngâm chúng trong xà phòng 5 phút, rửa sạch dưới vòi nước chảy, sau đó đem vào tủ cấy, rửa nhanh bằng cồn 70 trong 5 giây; sau đó ngâm trong dung dịch HgCl₂ 0,1% (7 phút), ngâm tiếp trong dung dịch HgCl₂ 0,1% (7 phút); sau cùng rửa sạch 3-4 lần bằng nước cất vô trùng.

2.2.2. Bố trí thí nghiệm

Thí nghiệm 1: Ảnh hưởng của BA trên sự tạo chồi cây muồng hoa pháo *in vitro*

Thí nghiệm được bố trí theo thể thức hoàn toàn ngẫu nhiên 1 nhân tố, 5 lần lặp lại (mỗi lần lặp lại gồm 5 mẫu cấy), gồm 4 nghiệm thức sau: 0; 0,5; 1; 2 mg/l BA. Mẫu cấy gồm những đoạn thân với 2-3 mắt lá được cấy vào môi trường MS bổ sung BA với các nồng độ khác nhau.

Thí nghiệm 2: Ảnh hưởng của nồng độ khoáng đa lượng MS và NAA đến sự tạo rễ của chồi muồng hoa pháo *in vitro*

Thí nghiệm được bố trí theo thể thức hoàn toàn ngẫu nhiên thừa số hai nhân tố, nhân tố 1 là 4 nồng độ NAA (0; 0,5; 1; 2 mg/l) và nhân tố 2 là 2 nồng độ khoáng đa lượng MS (1/2 MS, MS); gồm 8 nghiệm thức, mỗi nghiệm thức có 5 lần lặp lại, mỗi lần lặp lại gồm 1 bình thủy tinh, mỗi bình thủy cấy 4 mẫu.

Mẫu cấy gồm những chồi có chiều cao 1,2-1,5cm, 3-5 lá, cấy sang môi trường có chứa các nồng độ NAA và khoáng đa lượng MS khác nhau.

Thí nghiệm 3: Ảnh hưởng của các loại giá thể đến tỷ lệ sống cây muồng hoa pháo *in vitro* trong điều kiện nhà lưới

Thí nghiệm được bố trí theo thể thức hoàn toàn ngẫu nhiên 1 nhân tố, mỗi nghiệm thức có 5 lần lặp lại, mỗi lần lặp lại gồm 4 cây, gồm 4 nghiệm thức sau: cát sông, tro, mụn dừa, 1/3 cát sông + 1/3 tro + 1/3 mụn dừa.

Cách tiến hành: cây muồng hoa pháo *in vitro* có kích cỡ và số rễ tương đương nhau từ thí nghiệm tạo rễ, cây được trồng vào các ly nhựa có kích thước 5cm x 6cm (đã đục lỗ sẵn). Các chậu được đặt vào khay nhựa (60cm x 50cm x 20cm) phủ bằng bọc nylon trắng (100cm x 80cm) có đục 20 lỗ (mỗi lỗ đường kính 0,4cm) và phun sương 2-3 lần/ngày. Nhiệt độ trong khay nhựa dao động từ 29-33°C, cường độ ánh sáng (40-50 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$) và ẩm độ 70-80%.

2.2.3. Chỉ tiêu theo dõi

Số chồi hình thành: $\geq 0,2\text{cm}$; Chiều cao chồi: có chiều cao $\geq 0,2\text{cm}$ và đo từ gốc đến chóp lá cao nhất; Tỷ lệ mẫu tạo rễ (%); Số rễ hình thành: $\geq 0,2\text{cm}$; Chiều dài rễ có chiều dài $\geq 0,2\text{cm}$ và lấy chiều dài rễ dài nhất; Tỷ lệ sống (%).

2.3. Xử lý số liệu

Số liệu thí nghiệm được phân tích bằng chương trình SPSS 16.0.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Thí nghiệm 1: Ảnh hưởng của BA trên sự tạo chồi cây muồng hoa pháo *in vitro*

3.1.1. Số chồi tạo thành

Ở thời điểm 4 TSKC (tuần sau khi cấy), môi trường có các nồng độ 0,5 mg/l BA; 1 mg/l BA và 2 mg/l BA cho số chồi tạo thành cao nhất và tương đương nhau (2,5-2,9 chồi), khác biệt có ý nghĩa thống kê 1% so với môi trường không có BA, cho số chồi thấp nhất là 1,4 chồi (Bảng 1). Điều này cho thấy BA là loại cytokinin ngoại sinh ảnh hưởng tích cực trong quá trình tạo chồi cây muồng hoa pháo. Miller et al. (1955) báo cáo rằng cytokinin ngoại sinh có ảnh hưởng đến sự tạo chồi, sẽ làm thay đổi gradient nồng độ chất điều hòa sinh trưởng và thiết lập gradient chất điều hòa sinh trưởng mới, sự thay đổi gradient giúp phá vỡ trạng thái ngủ và kích thích sự hình thành chồi mới.

Bảng 1. Số chồi được tạo thành và chiều cao chồi của chồi muồng hoa pháo trong môi trường có các nồng độ BA (mg/l) khác nhau ở thời điểm 4 tuần sau khi cấy

Nồng độ BA (mg/l)	Số chồi (chồi)	Chiều cao chồi (cm)
0	1,4 b	1,81 a
0,5	2,5 a	1,44 b
1	2,9 a	1,41 b
2	2,5 a	1,13 c
F	**	**
CV(%)	19,11	11,33

Ghi chú: Trong cùng một cột các số có chữ theo sau giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê qua phép thử Duncan; khác biệt có ý nghĩa thống kê 1%.

3.1.2. Chiều cao chồi

Kết quả bảng 1 cho thấy, chiều cao chồi giảm dần khi nồng độ BA tăng ở 4 tuần sau khi cấy (TSKC). Môi trường không bổ sung BA cho chiều cao chồi cao nhất (1,81cm), khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức 1% so với các nghiệm thức còn lại, thấp nhất ở nghiệm thức 2 mg/l BA (1,13cm). Theo George (1993), khi sử dụng cytokinin ở nồng độ cao để kích thích tạo chồi bên có thể làm cản trở sự gia tăng chiều cao của chồi.

Tóm lại, nồng độ 0,5-1 mg/l BA thích hợp cho sự tạo chồi muông hoa pháo *in vitro*, chồi sinh trưởng tốt.

3.2. Thí nghiệm 2: Ảnh hưởng của nồng độ khoáng đa lượng MS và NAA đến sự tạo rễ của chồi muông hoa pháo *in vitro*

3.2.1. Số rễ hình thành

Kết quả bảng 2 cho thấy, ở môi trường có nồng độ 2 mg/l NAA cho số rễ hình thành cao nhất (3,5 rễ), không khác biệt so với nồng độ 1 mg/l NAA (3,1 rễ) nhưng khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức 1% so với các nồng độ còn lại, thấp nhất ở môi trường không có NAA cho số rễ thấp nhất là 2,0 rễ. Điều này cho thấy, NAA là

loại auxin có ảnh hưởng tích cực đến số rễ hình thành của chồi muông hoa pháo. Farooq et al. (2008) báo cáo rằng auxin có vai trò trong việc tạo rễ ở môi trường tạo rễ *in vitro*, thông qua ảnh hưởng của nó đến sự phân chia tế bào và hình thành rễ đầu tiên. Bên cạnh đó, nồng độ khoáng đa lượng MS có ảnh hưởng đến số rễ hình thành, nồng độ 1/2 MS cho số rễ hình thành (3,2 rễ) cao hơn so với nồng độ MS (2,5 rễ), khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức 1% ở thời điểm 4 TSKC. Theo Moncousin (1988), ở các loại cây cảnh thân gỗ, cây ăn trái, cây lâm nghiệp, nồng độ khoáng xuống thấp thường được sử dụng trong giai đoạn tạo rễ *in vitro*. Tương tự, trong nuôi cấy mô một số các loài thân gỗ, nồng độ khoáng cao sẽ ức chế sự hình thành và phát triển rễ (McCown and Sellmer, 1987; Manzanera and Parados 1990; Purohit et al., 1994).

Sự tương tác giữa nồng độ khoáng đa lượng MS và nồng độ NAA có ảnh hưởng đến số rễ hình thành qua phân tích thống kê ở mức ý nghĩa 5%. Trong đó, nghiệm thức 1/2 MS + 2 mg/l NAA cho số rễ cao nhất (4,0 rễ), không khác biệt thống kê so với nghiệm thức MS + 1 mg/l NAA (3,8 rễ) và khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức 5% so với các nghiệm thức còn lại.

Bảng 2. Số rễ hình thành (rễ) trên môi trường có các nồng độ khoáng đa lượng MS và NAA khác nhau ở 4 tuần sau khi cấy

Nồng độ NAA (mg/l) (A)	Nồng độ khoáng đa lượng MS (B)		Trung bình (A)
	½ MS	MS	
0	2,4 cd	1,7 d	2,0 c
0,5	2,5 cd	2,9 bc	2,7 b
1	3,8 ab	2,5 cd	3,1 ab
2	4,0 a	3,0 bc	3,5 a
Trung bình (B)	3,2 a	2,5 b	
F (A)		**	
F (B)		**	
F (A x B)		*	
CV (%)	25,39		

Ghi chú: Trong cùng một cột các số mang chữ cái giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê qua phép thử Duncan; * khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức 5%; ** khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức 1%.

3.2.2. Tỷ lệ tạo rễ

Tỷ lệ tạo rễ chồi muồng hoa pháo khác biệt không có ý nghĩa thống kê giữa các nồng độ NAA, dao động từ 85-100 % (Bảng 3). Nồng độ khoáng đa lượng MS có ảnh hưởng đến tỷ lệ tạo rễ, khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức 1%, ở thời điểm 4 TSKC. Trong đó, nồng độ 1/2 MS cho tỷ lệ tạo rễ (96,3%) cao hơn so với nồng độ MS (92,5%). Tương tự với thí nghiệm của Dimassi-Theriou (1995), sử dụng môi trường MS giảm xuống 1/2 đã giúp nâng tỷ lệ tạo rễ và kích thích kéo dài rễ.

3.2.3. Chiều dài rễ

Ở thời điểm 4 TSKC, kết quả bảng 2 cho thấy, nồng độ NAA trong môi trường nuôi cấy không có ảnh hưởng đến chiều dài rễ, chiều dài rễ dao động từ 4,27-7,95cm. Tuy nhiên, nồng độ khoáng đa lượng MS có ảnh hưởng đến chiều dài rễ, nồng độ 1/2 MS cho chiều dài rễ (5,86cm) cao hơn so với nồng độ MS (5,34cm), khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức 1%. Al Malki and Elmeer (2009) báo cáo rằng nồng độ khoáng MS giúp gia tăng chiều dài rễ hơn so với nồng độ khoáng MS.

Tóm lại, kết quả thí nghiệm cho thấy 1/2 MS + 2 mg/l NAA cho hiệu quả tạo rễ chồi muồng hoa pháo *in vitro* sau 4 tuần nuôi cấy.

3.3. Thí nghiệm 3: Ảnh hưởng của các loại giá thể đến tỷ lệ sống cây muồng hoa pháo *in vitro* trong điều kiện nhà lưới

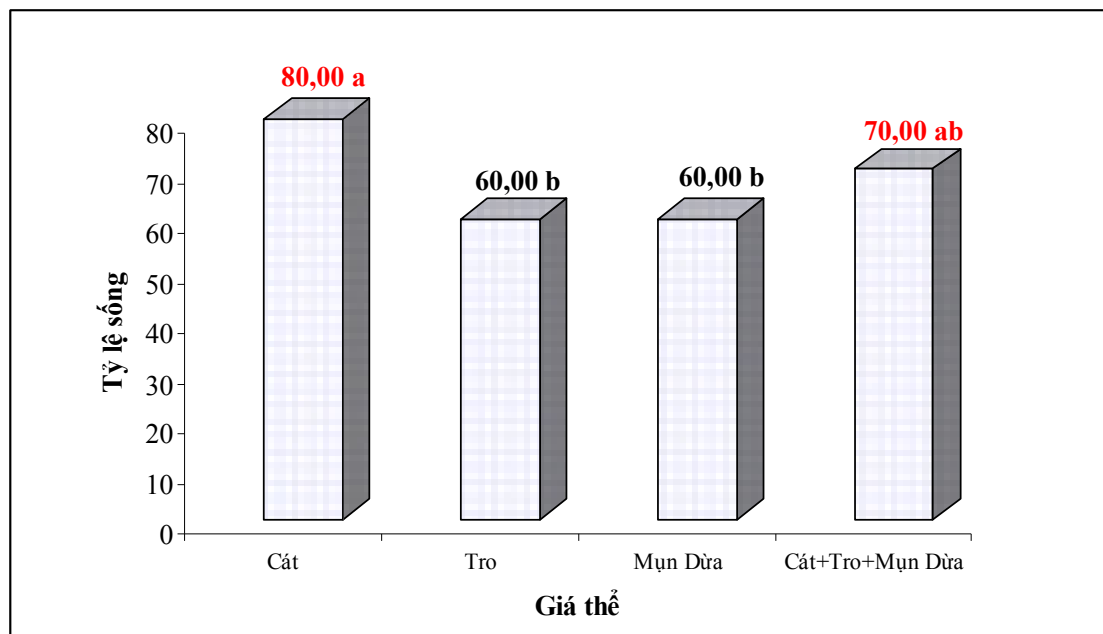
Đưa cây con ra ngoài vườn ươm là giai đoạn quan trọng trong quá trình sản xuất cây giống bằng phương pháp nuôi cấy mô tế bào, nó có ý nghĩa đến ứng dụng quá trình vi nhân giống vào thực tiễn sản xuất. Theo Bekman and Lukens (1997) khi đưa cây *in vitro* ra vườn ươm, giá thể trồng cây là một trong những yếu tố ảnh hưởng đến tỷ lệ sống và sự sinh trưởng của cây.

Kết quả hình 1 cho thấy, sau 4 tuần thuần dưỡng, tỷ lệ sống cao nhất ở nghiệm thức cát (80%), khác biệt không có ý nghĩa thống kê so với nghiệm thức cát + mụn dừa + tro (70%), nhưng khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức ý nghĩa 1% so với các nghiệm thức còn lại. Điều này có thể được giải thích là do tính chất giữ nước kém của giá thể cát nên hạn chế hiện tượng úng đối với bộ rễ của muồng hoa pháo *in vitro* trong giai đoạn đầu khi chế độ phun sương cho cây được thực hiện nhiều lần trong ngày. Tương tự với nghiên cứu của Nguyễn Ngọc Tân và Trần Hồ Quang (1996), ở loài bạch đàn, giá thể cát kết hợp với phun sương và giữ ẩm độ không khí cao cho tỷ lệ sống cao (90%) khi thuần dưỡng.

Bảng 3. Tỷ lệ tạo rễ và chiều dài rễ trên môi trường có các nồng độ khoáng và NAA khác nhau ở 4 tuần sau khi cấy

Nồng độ khoáng đa lượng MS (A)	Tỷ lệ tạo rễ (%)	Chiều dài rễ (cm)
½ MS	96,3 a	5,86 a
MS	92,5 b	5,34 b
Nồng độ NAA (B) (mg/l)		
0	85,0	4,27
0,5	95,0	4,79
1	97,5	5,48
2	100	7,95
F (A)	**	**
F (B)	ns	ns
F (A x B)	ns	ns
CV (%)	9,82	32,53

Ghi chú: Trong cùng một cột các số có mang chữ cái giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê qua phép thử Duncan; ** khác biệt có ý nghĩa thống kê 1%, ns: khác biệt không có ý nghĩa thống kê.



Hình 1. Tỷ lệ sống (%) của cây muồng hoa pháo *in vitro* trên các loại giá thể thuần dưỡng khác nhau sau 4 tuần thuần dưỡng tại vườn ươm

4. KẾT LUẬN

Môi trường MS bổ sung 0,5-1 mg/l BA thích hợp để tạo chồi muồng hoa pháo *in vitro* từ đoạn thân mang các mắt ngủ. Trong giai đoạn tạo rễ, môi trường 1/2 MS bổ sung 2 mg/l NAA cho hiệu quả tạo rễ *in vitro* chồi muồng hoa pháo. Sử dụng giá thể cát để thuần dưỡng muồng hoa pháo tại vườn ươm cho tỷ lệ sống cao (80%).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Al Malki., A.A.H.S., Elmeer K.M.S. (2009). Effect of medium strength and charcoal combined with IBA and NAA on root initiation of *Ficus anastasia*. Acad. J. Plant Sci., 2(3): 169-172.
- Bekman P. and Lukens T. (1997). Simple step for pot calla success. GrowerTalks, 60(12): 49-54.
- Lê Trần Bình, Hồ Hữu Nghị và Lê Thị Muội (1997). Công nghệ sinh học thực vật trong cải tiến giống cây trồng. Nhà xuất bản Nông nghiệp. 188 tr.
- Chamberlain, J.R (2000). Improving Seed Production in *Calliandra calothyrsus* a field manual for Researchers and Extension Workers. Miscellaneous Papers, Oxford Forestry Institute Department of Plant Sciences University of Oxford.
- Chang, B. and Martinez H. (1984). Germplasm resources of *Calliandra calothyrsus* Meissn. in Central America and Panama. Forest Genetic Resources Information, FAO, Rome, 13: 54-58.
- Dimassi-Theriou, K. (1995). *In vitro* rooting of rootstock "GF677" (*Prunus amygdalus x P. persica*) as influenced by mineral concentration of nutrient medium and type of culture-tube sealing material. J. Hort. Sci. 70: 105-108.
- Mai Vũ Duy và Nguyễn Thị Hồng Nhân (2012). Bước đầu khảo sát đặc tính nông học và năng suất của cây *Calliandra calothyrsus*. Tạp chí KHKT Chăn nuôi, 158: 50-56.
- Farooq A., Mandal B. B., Sandhya G. (2008). Effect of some growth regulators on rooting of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) under *in vitro* condition. Appl. Biol. Res., 10: 193-201.
- George E. F. (1993). Plant propagation by tissue culture, Part 1 and 2. Edington, Wilts, England, Exegetics Ltd. 1361 p.
- Gichuru, M.P. and Kang, B.T. (1989). *Calliandra calothyrsus* Meissn. in an alley cropping system with sequentially cropped maize and cowpea in southwestern Nigeria. Agroforestry Systems, 9:191-203.
- Hu, T.W., Cheng, W.E and Shen, T.A. (1983). Growth of the seedlings of four leguminous tree species in relation to soil pH in a pot test. Nitrogen Fixing Tree Research Reports, 1:24-25.
- Nguyễn Việt Khoa, Trần Ngọc Hải, Nguyễn Hữu Hồng và Vũ Văn Mỹ (2006). Cẩm nang ngành Lâm

- ngiệp. Bộ Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn, tr 65.
- MacQueen, DJ. (1991). Exploration and collection of *Calliandra calothyrsus* as a foundation for future genetic improvement. Nitrogen Fixing Tree Research Reports, 9: 96-98.
- Macqueen, D.J. (1993). *Calliandra* Series Racemosae Taxonomic Information; OFI Seed Collections; Trial Design. Oxford: Oxford Forestry Institute.
- Manzanera J. A. and Pardos J. A. (1990), Micropropagation of juvenile and adult *Quercus suber* L., Plant Cell Tissue Org. Cult., 21: 1-8.
- McCown B. and Sellmer J. C. (1987). General media and vessels suitable for woody plant culture, In: Bonga J M and D J Durzan (eds) Cell and Tissue Culture in Forestry, Martinus Nijhoff Publishers, The Netherlands. 1: 4-16.
- Miller C. O., Skoog F., von Saltza H. M., Okumura F. S., Strong F. M. (1955). Kinetin: Structure and synthesis of kinetin. J. Am. Chem. Soc., 77: 2662-2663.
- Moncousin C. (1988). Adventitious rhizogenesis control: new developments. Acta Hort, 230:97-104.
- Nguyễn Thị Hồng Nhân, Nguyễn Văn Hớn và Mai Vũ Duy (2012). So sánh năng suất, giá trị dinh dưỡng, khả năng thích nghi của *Leucaena leucocephala*, *Calliandra calothyrsus* và *Flemingia macrophylla*. Tạp chí KHKT Chăn nuôi. Số 159: 33-39.
- Purohit S. D., Kukda G., Sharma P. and Tak K. (1994). *In vitro* propagation of an adult tree *Wrightia lomentosa* through enhanced axillary branching", *Plant Sci.*, 103: 67-72.
- Nguyễn Văn Quang (2011). Quy trình kỹ thuật trồng cây họ đậu thân gỗ *Calliandra calothyrsus* vùng đồng bằng Bắc Bộ. Trang Tài nguyên di truyền thực vật Việt Nam. Truy cập ngày 16/2/2014 tại <http://www.pgrvietnam.org.vn/?lang=vi&tab=news&pid=37&cid=22&id=148>.
- Rastogi, S.; Rizvi, S.M.H.; Singh, R.P.; Dwivedi, U.N. (2008). *In vitro* regeneration of *Leucaena leucocephala* by organogenesis and somatic embryogenesis. *Biologia plantarum* 52 (4) : 743-748.
- Nguyễn Ngọc Tân và Trần Hồ Quang (1996). Nhân giống bạch đàn lai bằng phương pháp nuôi cấy mô. Kết quả nghiên cứu khoa học công nghệ lâm nghiệp (1991-1995). Nhà xuất bản Nông nghiệp, tr 361. Gichuru, M.P. and Kang, B.T. (1989). *Calliandra calothyrsus* Meissn. in an alley cropping system with sequentially cropped maize and cowpea in southwestern Nigeria. *Agroforestry Systems*, 9:191-203.