

NGHIÊN CỨU NHÂN GIỐNG KEO LÁ TRÀM (*Acacia auriculiformis* A. Cunn. ex Benth) BẰNG PHƯƠNG PHÁP NUÔI CẤY MÔ TẾ BÀO

Triệu Thị Thu Hà, Cần Thị Lan, Đồng Thị Ưng
Viện Nghiên cứu Giống và Công nghệ sinh học Lâm nghiệp

Từ khóa: Keo lá trà, vi nhân giống, nuôi cấy mô tế bào, chồi nách, chồi hữu hiệu, hệ số nhân chồi và ra rễ

TÓM TẮT

Vi nhân giống là công cụ hữu hiệu để đưa nhanh giống mới chất lượng cao, đồng đều và với số lượng lớn vào trồng rừng sản xuất cho các loại cây lâm nghiệp có giá trị thương mại như Keo lá trà. Thí nghiệm nhân giống bằng phương pháp nuôi cấy mô tế bào để hoàn thiện quy trình và cung cấp đủ giống với chất lượng di truyền ổn định cho rừng trồng các giống mới được chọn lọc (như *Cl18*, *Cl7*, *Cl26* và *Cl57*) là cần thiết. Kết quả nghiên cứu nhân giống *in vitro* Keo lá trà cho thấy việc khử trùng mẫu vật (là các chồi vượt hoặc chồi nách) bằng $HgCl_2$ 0,1% trong 5 phút cho tỷ lệ mẫu nhiễm 40,1% và mẫu nảy chồi 31,9%. Các cụm chồi hữu hiệu được nuôi cấy tiếp theo trong môi trường Murashige và Skoog cải tiến (MS^*) bổ sung chất điều hoà sinh trưởng. Tỷ lệ nhân chồi cao nhất đạt được trong môi trường $MS^* + 1,0mg/l$ BAP + 0,5mg/l NAA là 6,0 chồi/cụm, đạt hệ số nhân chồi 2,1 lần và tỷ lệ chồi hữu hiệu 48,3%. Chồi đạt tiêu chuẩn được ra rễ trong môi trường $1/2MS^* + 2,0mg/l$ IBA, đạt tỷ lệ ra rễ 95,3%. Tuy nhiên cũng có thể ra rễ trực tiếp bằng thuốc bột TTG (IBA 1,0%). Cây đã ra rễ *in vitro* được huấn luyện trong thời gian 6 - 10 ngày trước khi chuyển cây ra vườn ươm cho tỷ lệ sống lên tới 85,9%.

In vitro propagation of *Acacia auriculiformis* A. Cunn. ex Benth by tissue culture technique

Keywords: *Acacia auriculiformis*, micro - propagation, tissue culture, axillary shoot, adventitious shoot, multiplication rate and rooting

Micropropagation is an useful technique for mass propagation in clonal forestry. Study on tissue culture propagation to optimize protocol and supply genetically improved varieties for plantations of some selected clones of *A. auriculiformis*, such as *Cl18*, *Cl7*, *Cl26*, and *Cl57* have been conducted. The process was started with explant sterilization using $HgCl_2$ at 0.1% and soaked segments of axillary shoots in 5 minutes. The result achieved 31.9% of shoot proliferation and 40.1% of contamination. The medium $MS^* + 1.0mg/l$ BAP + 0.50mg/l NAA was successfully used for inducing the adventitious shoots with maximum 6 shoots per clump, which equals to average multiplication rate of 2.1 and adventitious shoot percentage of 48.3%. The best rooting responses were observed in the medium $1/2MS^*$ supplemented with 2.0mg/l IBA and the rooting rate reached to 95.3%. Other option for rooting was *in vivo* root by using the commercial product named as TTG containing 1.0% IBA for the standard microshoots. The rooted plantlets were acclimatized in 6 - 10 days before transferring to nursery and obtained successfully survival rate up to 85.9%.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Keo lá tràm (*Acacia auriculiformis* A. Cunn. ex Benth) có nguồn gốc từ Australia, Papua New Guinea và Indonesia, phân bố chủ yếu ở vĩ độ 8 - 16⁰ Nam, ở độ cao 100 - 400m trên mặt biển, lượng mưa 1400 - 3400m m/năm, song có thể chịu được lượng mưa 500 - 1000m m/năm (Doran *et al.*, 1997). Keo lá tràm được du nhập vào Việt Nam từ những năm 1960 và cho đến nay là một trong ba loài keo vùng thấp có diện tích trồng rừng lớn nhất (trên 71.600ha, chiếm 4% tổng diện tích rừng trồng cả nước) (Phí Hồng Hải, 2009).

Keo lá tràm sinh trưởng nhanh, ưa sáng, có tác dụng cải tạo đất, có thể sống trên nhiều loại đất, kể cả đất nghèo, đất rất xấu, đất sét, đất mặn và ngập úng theo mùa (Nguyễn Hoàng Nghĩa, 2003). Gỗ Keo lá tràm có tỷ trọng tương đối cao (0,5 - 0,7 g/cm³), thớ mịn, vân và màu sắc đẹp, nên được dùng phổ biến làm gỗ xẻ để đóng đồ gia dụng và đồ thủ công mỹ nghệ (Pinyopusarerk, 1990). Ở Việt Nam, việc nghiên cứu, tuyển chọn và nhân giống sinh dưỡng (cây hom) cho Keo lá tràm đã được Viện Nghiên cứu Giống và Công nghệ sinh học Lâm nghiệp tiến hành nghiên cứu trong nhiều năm. Kết quả là một số giống sinh trưởng nhanh, năng suất cao (25 - 35 m³/ha/năm) và chất lượng thân tốt (*thân thẳng, chiều cao dưới cành lớn, cành nhánh nhỏ...*), phù hợp cho gỗ xẻ đã được chọn lọc và được Bộ Nông nghiệp và PTNT công nhận là giống quốc gia và giống tiến bộ kỹ thuật (TBKT). Đó là các giống Bvlt25, Bvlt83, Bvlt84, Bvlt85, Clt98, Clt64, Clt57, Clt18, Clt26, Clt171, Clt 133, Clt 43, Clt19, Clt1F, giống quốc gia Clt7 (1998/QĐ/BNN-KHCN, ngày 11 tháng 7 năm 2006 và 2763/QĐ-BNN-LN, ngày 1 tháng 10 năm 2009). Nguồn giống này sẽ bổ sung cho bộ giống keo có chất lượng

cao, đáp ứng được nhu cầu nguyên liệu gỗ xẻ tăng nhanh, phù hợp với đề án tái cơ cấu ngành lâm nghiệp, góp phần đảm bảo tính an toàn sinh học của hệ sinh thái rừng trồng cũng như lợi ích kinh tế nghề rừng.

Cùng với những kết quả về cải thiện giống, công nghệ nhân giống bằng phương pháp nuôi cấy mô (*tissue culture*) được xem là giải pháp công nghệ hàng đầu để duy trì chất lượng di truyền của cây giống và tạo được cây con có hệ rễ đầy đủ. Công nghệ này là quá trình nuôi cấy vô trùng (*in vitro*) các bộ phận tách rời của thực vật, đặc biệt là các mô phân sinh như mô đỉnh chồi và cành. Các mô phân sinh này được nuôi dưỡng thành cây hoàn chỉnh với độ trẻ hoá cao, sạch bệnh, thân dẻo và bộ rễ phát triển gần như cây hạt, cây tương đối đồng đều. Chính vì thế, nhân giống bằng phương pháp nuôi cấy mô cho các giống keo và bạch đàn đã được áp dụng rộng rãi ở một số nước tiên tiến như Ấn Độ, Malaysia, Thái Lan, Braxin,... và ngày càng trở nên phổ biến ở Việt Nam. Tuy nhiên, do cây rừng có chu kỳ sống dài ngày, hệ gen phức tạp, phản ứng của kiểu gen với điều kiện môi trường là rất khác nhau và thực tế cũng cho thấy các giống khác nhau thì hiệu quả nhân giống hoàn toàn khác nhau cho dù là cùng loài, do đó không thể áp dụng một quy trình chung cho tất cả các giống. Vì thế nghiên cứu nhân giống *in vitro* cho từng đối tượng giống cụ thể của Keo lá tràm là việc làm cần thiết góp phần hoàn thiện chiến lược cải thiện giống cho Keo lá tràm ở Việt Nam.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

Chồi đỉnh từ cây vật liệu gốc 1 năm tuổi của 4 giống Keo lá tràm Clt18, Clt7, Clt26, Clt57 dẫn từ khảo nghiệm chứng minh dòng tại Ba Vì - Hà Nội.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Mẫu vật (các đoạn chồi đỉnh có kích thước 10 - 15cm được lấy từ cây vật liệu gốc) được rửa dưới vòi nước chảy, rửa bằng chất tẩy nhẹ (xà phòng hoặc nước rửa chén loãng) tráng qua nước cất vô trùng và cồn 700 trong vòng 30 giây, ngâm trong clorua thủy ngân (HgCl₂ - 0,05% và 0,1%) với thời gian khử trùng 3, 5, 7, 9 và 11 phút. Mẫu vật được nuôi cấy trong 3 loại môi trường MS (Murashige & Skoog, 1962), B5 (Gamborg's medium, 1968), WPM (Mccown Woody Plant Medium, 1980). Các chồi hữu hiệu được nuôi cấy trong môi trường MS* có bổ sung BAP (0,5; 1,0; 1,5; và 2,0mg/l), Kn (0,5; 1,0; 1,5; và 2,0mg/l) và NAA (0,25; 0,5; 0,75 và 1,0mg/l). Thí nghiệm ra rễ được thực hiện trong môi trường 1/2 MS* có bổ sung IBA (0,5; 1,0; 1,5; 2,0 và 2,5mg/l). Môi trường nuôi cấy được điều chỉnh pH = 5,8 và hấp khử trùng ở điều kiện áp suất 1,2atm, nhiệt độ 121°C trong thời gian 20 phút.

Chế độ nuôi mẫu được thực hiện với cường độ chiếu sáng 2000 - 3000 lux, thời gian chiếu sáng 10h, nhiệt độ 25 ± 2°C và chu kỳ cây chuyên là 20 ngày.

Thời gian huấn luyện cây được thực hiện theo 4 công thức: 0 - 5 ngày (CT1); 6 - 10 ngày (CT 2); 11 - 15 ngày (CT3); và 16 - 20 ngày (CT4). Các thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên với 3 lần lặp, 30 mẫu/lặp.

Số liệu về tỷ lệ nhiễm, tỷ lệ bật chồi của mẫu vật, số chồi/cụm và chiều dài chồi, cũng như tỷ lệ sống và chiều cao của cây con được thu thập và xử lý trên phần mềm Excel và SPSS 21.0 theo phương pháp thống kê hiện hành.

III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

3.1. Ảnh hưởng của nồng độ hóa chất và thời gian đến kết quả khử trùng

Kết quả phân tích thống kê cho thấy sử dụng HgCl₂ ở các nồng độ và thời gian khử trùng khác nhau có ảnh hưởng rõ rệt tới tỷ lệ mẫu

nhiễm và tỷ lệ mẫu nảy chồi ($F_{tính} > F_{tra\ bảng}$). Sử dụng HgCl₂ 0,1% trong khoảng thời gian 5 phút đem lại hiệu quả khử trùng tốt nhất đối với các giống Keo lá tràm, với tỷ lệ mẫu nhiễm là 40,1% và tỷ lệ nảy chồi hữu hiệu đạt tới 31,9% (Bảng 1) (Ảnh 1 a và b).

Bảng 1. Kết quả khử trùng Keo lá tràm

Hóa chất	Thời gian (phút)	Tỷ lệ nhiễm (%)	Tỷ lệ nảy chồi (%)
HgCl ₂ 0,05%	3	75,8	4,8
	5	61,4	9,6
	7	47,5	21,7
	9	37,8	18,9
	11	28,9	19,4
HgCl ₂ 0,10%	3	59,2	11,1
	5	40,1	31,9
	7	32,8	20,5
	9	22,5	17,1
	11	17,8	20,1
$F_{tính}$		22,8	9,4
$F_{bảng}$		$F (.05; 9; 20) = 2,39$	

Việc sử dụng HgCl₂ 0,1% khử trùng cho các giống Keo lá tràm Bvlt81, Bvlt82, Bvlt83 cũng đã được thực hiện bởi Đoàn Thị Mai và đồng tác giả (2003), song với thời gian khử trùng lâu hơn (8 - 10 phút) và các tác giả ghi nhận tỷ lệ mẫu nhiễm cao hơn (tới gần 60%), nhưng tỷ lệ mẫu bật chồi lại thấp hơn (chỉ là 14%) so với kết quả của chúng tôi. Ở một nghiên cứu khác, tác giả Girijashankar (2010) lại sử dụng dung dịch sodium hypochlorite (NaOCl) 1,0% thêm một vài giọt Tween - 20 lắc trong 15 phút để đạt hiệu quả khử trùng tốt nhất.

Hiện nay, clorua thủy ngân là một trong những hóa chất được sử dụng phổ biến để khử trùng cho mẫu vật trong nuôi cấy mô, song đặc điểm mẫu vật nuôi cấy ở từng loài là khác nhau, ngay cả trong loài, trên cùng 1 cây mẹ, các vị trí lấy mẫu vật khác nhau được sử dụng nồng độ và thời gian khử trùng khác nhau cũng sẽ cho kết quả khác nhau. Do đó, cần lựa chọn nồng độ và thời gian khử trùng thích hợp

để vừa đảm bảo tỷ lệ mẫu nhiễm thấp vừa đảm bảo tỷ lệ mẫu nảy chồi cao, và chồi tạo được có khả năng sinh trưởng phát triển tốt. Nếu nồng độ hoá chất thấp và thời gian khử trùng chưa đủ, các nguồn bụi bẩn, nấm bệnh, khuẩn,... trên mẫu vật sẽ không thể được loại trừ hết; ngược lại, nếu nồng độ hóa chất quá cao hoặc thời gian khử trùng quá dài, hóa chất sẽ ngấm sâu và phá vỡ cấu trúc tế bào, ảnh hưởng đến sinh trưởng, làm giảm khả năng tái sinh chồi.

Hơn nữa, kết quả khử trùng còn chịu ảnh hưởng của thời vụ vào mẫu. Theo nghiên cứu của Đoàn Thị Mai và đồng tác giả (2003), từ tháng 4 đến tháng 8 được cho là mùa vào mẫu thích hợp nhất vì thời điểm này cây đang ở trong giai đoạn sinh trưởng tốt nhất, nên khả năng bật chồi của các mắt ngủ là cao nhất.

3.2. Ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy tới khả năng tái sinh chồi

Chồi non được nuôi cấy trong môi trường MS tạo ra 3,8 chồi/cụm và chiều dài chồi đạt 2,4cm. Trong khi mẫu nuôi cấy trong môi trường B5 và WPM chỉ đạt 1,8 - 2,7 chồi/cụm và 1,5 - 1,9cm (Ảnh 1c).

Bảng 2. Khả năng tái sinh chồi Keo lá trà trong 3 loại môi trường khác nhau

Môi trường	Số chồi/cụm	Chiều dài chồi (cm)
WPM	2,7	1,9
MS	3,8	2,4
B5	1,8	1,5
F _{tính}	112,7	153,4
F _{bảng}	F(.05; 2; 6) = 5,14	

Kết quả này cũng trùng lặp với kết quả nuôi cấy mô Keo lá trà giống Bvlt81, Bvlt82, Bvlt83 của Đoàn Thị Mai và đồng tác giả (2003) khi chỉ ra rằng môi trường MS là môi trường tái sinh chồi phù hợp. Điều này chứng

tỏ rằng môi trường MS có thành phần và tỷ lệ các nguyên tố đa lượng, vi lượng và vitamin phù hợp cho sự sinh trưởng và phát triển của Keo lá trà. Chúng tôi tiếp tục sử dụng môi trường MS là môi trường cơ bản cho những thí nghiệm nhân chồi và ra rễ tiếp theo.

3.3. Ảnh hưởng của Cytokinin và Auxin đến khả năng nhân chồi Keo lá trà

** Ảnh hưởng của Cytokinin (BAP, Kn) đến khả năng nhân nhanh chồi Keo lá trà*

Công thức môi trường MS cải tiến (MS*) bổ sung 1,0mg/l BAP là công thức cho hệ số nhân chồi Keo lá trà cao nhất: đạt 2,4 lần; có 6,8 chồi/cụm, chiều cao chồi 2,9cm, chồi sinh trưởng tốt. Nếu bổ sung Kn (nồng độ 0,5 - 2,0mg/l) hệ số nhân chồi chỉ đạt 1,9 - 2,2 lần, với 4,5 - 5,4 chồi/cụm và chồi cao 2,2 - 2,5cm.

Bảng 3. Ảnh hưởng của BAP và Kn đến khả năng nhân nhanh chồi Keo lá trà

MS +	Nồng độ (mg/l)	Số chồi/cụm	HSNC** (lần)	Chiều cao chồi (cm)	Chất lượng chồi
ĐC	0	3,8	1,4	2,4	+
BAP	0,5	5,2	1,7	2,6	++
	1,0	6,8	2,4	2,9	+++
	1,5	6,2	2,0	2,5	++
	2,0	5,4	1,9	2,2	+
Kn	0,5	4,9	1,9	2,4	++
	1,0	5,4	2,2	2,5	++
	1,5	5,0	2,0	2,3	++
	2,0	4,5	1,9	2,2	+
F _{tính}		43,1	17,3	29,0	
F _{bảng}		F (.05; 8; 18) = 2,51			

Ghi chú: (+) chồi sinh trưởng kém; (++) chồi sinh trưởng trung bình; và (+++) chồi sinh trưởng tốt; ** HSNC là hệ số nhân chồi

Trong nghiên cứu của Nitiwattanachai (1990), tác giả ghi nhận đã thu được 2,6 chồi/cụm khi nuôi cấy chồi Keo lá trà trong môi trường MS bổ sung 10µM BAP và 0,5µM IBA. Shukor (2000) cũng khẳng định chỉ cần nồng

độ BAP rất thấp (0,1 - 0,5mg/l) đã có thể hình thành chồi ở Keo lá trà, và môi trường nhân nhanh số lượng chồi cho Keo lá trà thích hợp là MS bổ sung 0,5mg/l GA₃ và 0,02mg/l NAA cùng 0,25mg/l BAP.

Các giống Keo lá trà Bvlt81, Bvlt82, Bvlt83, Bvlt84, Bvlt85 được nuôi cấy trong môi trường nhân chồi MS* bổ sung thêm 2,0mg/l BAP, thời gian cấy chuyên là 20 - 25 ngày/lần đã cho hệ số nhân chồi từ 2,12 - 4,34 chồi/cụm. (Đoàn Thị Mai *et al.*, 2003). Năm 2011, Girijashankar đã chỉ ra rằng Keo lá trà được nuôi cấy trong môi trường MS bổ sung 2mg/l BAP và 0,1mg/l NAA sau 3 vòng nuôi cấy có thể tạo ra 7 chồi/cụm, chiều dài trung bình của chồi 2cm.

** Ảnh hưởng phối hợp của Cytokinin và Auxin tới khả năng nhân chồi Keo lá trà*

Vai trò quan trọng của Cytokinin (BAP, Kn) là kích thích mạnh mẽ sự phân hóa chồi. Chính vì vậy mà cùng với Auxin (như IBA, IAA, NAA,...), Cytokinin điều chỉnh hiện tượng ưu thế ngọn, giải phóng các chồi bên

khỏi sự ức chế tương quan của chồi ngọn. (Nguyễn Kim Thanh, Nguyễn Thuận Châu, 2005). Sự kết hợp giữa Auxin và Cytokinin trong môi trường nhân chồi với liều lượng và tỷ lệ hợp lý có tác dụng kích thích các chồi phát triển hài hòa cả về số lượng và chất lượng chồi, thân chồi sẽ cứng cáp hơn, hàm lượng xenlulo tăng, diện tích và số đốt lá trên thân cũng tăng lên. Hiệu quả này đã được nghiên cứu phục vụ cho quá trình chuẩn bị ra rễ (tiền ra rễ) với mục đích tăng số lượng chồi có đủ tiêu chuẩn ra rễ, nâng cao hiệu quả tạo rễ và tỷ lệ cây con sống tại vườn ươm.

Kết quả nghiên cứu cho thấy công thức bổ sung phối hợp giữa 1,0mg/l BAP và 0,50mg/l NAA cho hệ số nhân chồi và số chồi/cụm lần lượt là 2,1 lần - 6,0 chồi/cụm (xếp hạng thứ 3) nhưng lại cho tỷ lệ chồi hữu hiệu cao nhất (48,3 - gấp 1,58 lần so với công thức đối chứng - chỉ bổ sung 1,0mg/l BAP). Vì vậy, chúng tôi chọn môi trường này để nâng cao chất lượng chồi Keo lá trà trước khi tiến hành ra rễ *in vitro* đối với các chồi non (Ảnh 1d).

Bảng 4. Ảnh hưởng phối hợp của BAP và NAA đến hệ số nhân chồi và tỷ lệ chồi hữu hiệu của Keo lá trà

MS* + 1,0mg/l BAP +....mg/l NAA	Số chồi/cụm	HSNC** (lần)	TLCHH*** (%)	Chất lượng chồi
0 (ĐC)	6,8	2,4	30,5	+
0,25	6,3	2,3	36,7	++
0,50	6,0	2,1	48,3	+++
0,75	4,9	1,9	41,5	++
1,00	4,0	1,9	36,1	+
F _{tính}	27,1	30,3	22,4	
F _{bảng}	F _{(.05; 4; 10) = 3,47}			

*** TLCHH là tỷ lệ chồi hữu hiệu

Sự phối hợp giữa Cytokinin và Auxin cũng đã được Shukor và đồng tác giả (2000) nghiên cứu với mục đích tạo ra các chồi Keo lá trà đủ cứng cáp trước khi tiến hành ra rễ

in vitro. Theo đó, các chồi cần được nuôi trong môi trường MS bổ sung 2,0mg/l IBA và 1,0mg/l NAA.

Chồi Keo lá tràm Bvlt81, Bvlt82, Bvlt83, Bvlt84, Bvlt85 có hệ số nhân chồi 7,55 - 8,35 chồi/cụm, chiều cao đạt 3 - 4cm khi được nuôi cấy trong môi trường nhân chồi MS* bổ sung kết hợp 2,0mg/l BAP và 0,5mg/l GA3. (Đoàn Thị Mai *et al.*, 2003).

Cây rừng có chu kỳ sống dài ngày, hệ gen phức tạp, phản ứng của các kiểu gen rất khác nhau đối với cùng một điều kiện môi trường, chính vì vậy trong cùng một loài, với các giống khác nhau thì hiệu quả nhân giống cũng sẽ khác nhau. Do đó, việc xác định môi trường nhân chồi, ra rễ thích hợp và điều kiện nuôi cấy,... cho các giống cây lâm nghiệp là luôn luôn cần thiết và có ý nghĩa thực tiễn trong việc phát triển các giống mới được công nhận hoặc có triển vọng vào sản xuất.

3.4. Ảnh hưởng của Auxin tới khả năng ra rễ Keo lá tràm

* Ảnh hưởng của IBA tới khả năng ra rễ trong điều kiện *in vitro*

Môi trường 1/2 MS* bổ sung 2,0mg/l IBA cho tỷ lệ chồi ra rễ đạt cao nhất (tới 95,3 - cao hơn công thức đối chứng 2,7 lần), có 3,0 rễ/cây và chiều dài rễ 2,5cm. Trong khi đó, nếu bổ sung IBA ở các nồng độ còn lại (0,5; 1,0; 1,5 và 2,5mg/l), tỷ lệ ra rễ chỉ đạt 50,2 - 74,0%, có 1,8 - 2,7 rễ/cây, chiều dài rễ 1,6 - 2,3cm (Bảng 5) (Ảnh 1 e và f).

Bảng 5. Ảnh hưởng của IBA đến khả năng ra rễ của Keo lá tràm

1/2MS + IBA (mg/l)	Tỷ lệ chồi ra rễ (%)	Số rễ /cây	Chiều dài rễ (cm)
0 (ĐC)	31,1	0,3	0,2
0,5	50,2	0,6	0,6
1,0	63,5	0,9	0,9
1,5	84,0	1,5	1,2
2,0	95,3	2,3	1,6
2,5	70,3	2,2	1,4
F _{tính}	20,4	23,6	17,5
F _{bảng}	F _(.05; 5; 12) = 3,11		

Nghiên cứu ra rễ *in vitro* Keo lá tràm cũng đã được các tác giả Nitiwattanachai và đồng tác giả (1990), Đoàn Thị Mai và đồng tác giả (2003), Girijashankar (2011) thực hiện. Các tác giả ghi nhận, loại môi trường được sử dụng như White (1963) + 2µM IBA + 1µM NAA (cho tỷ lệ ra rễ 80%) hay MS* + 2,0mg/l IBA (tỷ lệ ra rễ 97 - 99%) hoặc 1/2MS (63,6%).

* Ảnh hưởng của IBA tới khả năng ra rễ chồi non *in vitro* ở điều kiện vườn ươm

Bên cạnh phương pháp tạo rễ trong bình *in vitro*, các chồi Keo lá tràm đủ tiêu chuẩn ở giai đoạn nhân chồi (20 - 25 ngày kể từ khi cấy chuyên) có chiều dài đạt từ 2,5cm trở lên, có từ 2 số đốt lá trở lên cũng có thể được tạo rễ bằng cách cắt rời rồi chấm gốc vào thuốc kích thích ra rễ dạng bột (TTG có nguồn gốc từ IBA với nồng độ 1%), cho tỷ lệ chồi ra rễ tương đối cao (48,3 - 73,8%).

Bảng 6. Kết quả ra rễ chồi *in vitro* Keo lá tràm bằng chấm thuốc bột TTG

Nồng độ IBA (%)	Tỷ lệ chồi ra rễ (%)	Số rễ (rễ/cây)	Chiều dài rễ (cm)
0	29,2	1,3	0,9
0,5	48,3	1,8	1,2
1,0	73,8	2,4	1,8
1,5	69,4	2,0	1,4
2,0	53,1	1,6	1,3
F _{tính}	12,6	15,4	27,5
F _{bảng}	F _(.05; 4; 10) = 3,47		

3.5. Ảnh hưởng của thời gian huấn luyện tới tỷ lệ sống và sinh trưởng chiều cao của cây con

Cây con *in vitro* sau khi được tạo rễ trong điều kiện nhân tạo sẽ được chuyển ra khu huấn luyện trong thời gian từ 6 - 10 ngày để thích nghi với điều kiện vật lý tự nhiên (tỷ lệ sống đạt 85,9%). Khu huấn luyện được xây dựng gần vườn ươm, được che sáng bằng lưới đen với tỷ lệ chắn sáng 75%.

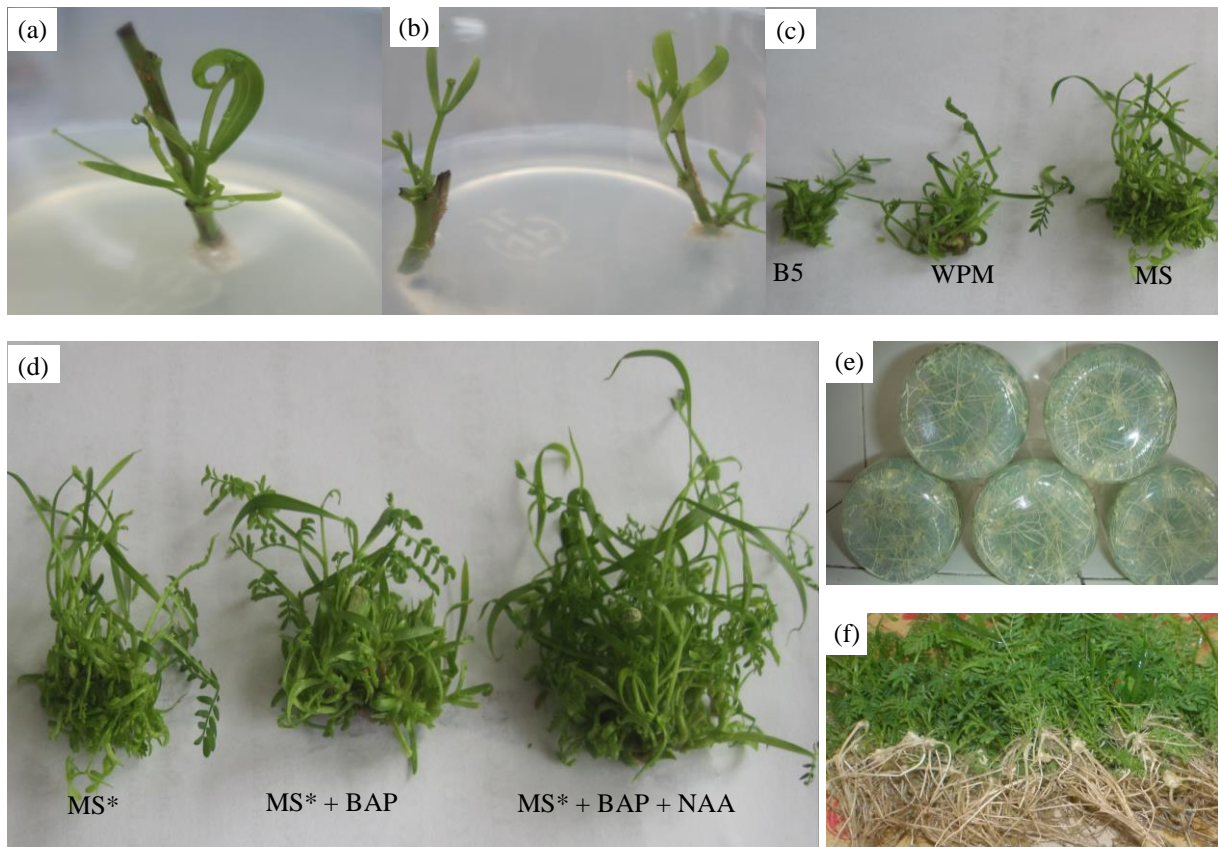
Bảng 7. Ảnh hưởng của thời gian huấn luyện đến tỷ lệ sống và chiều cao của cây con

Thời gian huấn luyện	Tỷ lệ sống (%)	Chiều cao (cm)
0 - 5 ngày	50,4	3,4
6 - 10 ngày	85,9	3,7
11 - 15 ngày	75,3	3,9
16 - 20 ngày	53,8	4,0
F _{tính}	25,2	20,1
F _{bảng}	F _(.05;3;8) = 4,07	

IV. KẾT LUẬN

Kết quả nghiên cứu cho thấy HgCl₂ nồng độ 0,1% được sử dụng để ngâm mẫu vật Keo lá tràm trong 5 phút đem lại hiệu quả khử trùng

cao nhất với tỷ lệ mẫu nhiễm 40,1%, mẫu này chồi 31,9%. Môi trường MS* bổ sung 1,0mg/l BAP và 0,50mg/l NAA là môi trường nhân chồi thích hợp nhất, với hệ số nhân chồi 2,1 lần (trung bình 6,0 chồi/cụm) và tỷ lệ chồi hữu hiệu đạt 48,3%. Trong khi môi trường 1/2 MS* bổ sung 2,0mg/l IBA đạt tỷ lệ ra rễ lên tới 95,3%. Tuy nhiên, đối với Keo lá tràm cũng có thể ra rễ trực tiếp bằng cách sử dụng thuốc bột TTG với nồng độ IBA 1,0% chắm các chồi đạt tiêu chuẩn và đạt tỷ lệ ra rễ 73,8%. Các chồi keo đã ra rễ *in vitro* được huấn luyện trong thời gian 6 - 10 ngày trước khi chuyển cây ra vườn ươm với tỷ lệ sống đạt trung bình 85,9%.



Ảnh 1. Chồi bất định giống Clt18 (a) và Clt57 (b) (20 ngày nuôi cấy); Chồi giống Clt18 nuôi cấy trong 3 loại môi trường (20 ngày) (c); Chồi giống Clt18 nuôi cấy trong môi trường MS* có bổ sung riêng rẽ/phối hợp BAP và NAA (20 ngày) (d); Ra rễ giống Clt18 (10 ngày) (e,f)

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Girijashankar V, 2010. Micropropagation of multipurpose medicinal tree *Acacia auriculiformis*, Journal of Medicinal Plants Research Vol. 5(3): 462 - 466.
2. Hai, P. H., 2009. Genetic improvement of plantation - grown *Acacia auriculiformis* for sawn timber production. Doctoral thesis Swedish University of Agricultural Sciences Uppsala.
3. Haliza Ismail, Noraini, Abdul Shukor, Aziah, Mohd Yusoff, Nor Hasnida Hassan, Fadhilah Zainudin, Nazirah Abdullah and Siti Suhaila Abdul Rahman, 2012. *In vitro* shoot induction of *Acacia auriculiformis* from juvenile and mature sources, Journal of Biotechnology and Pharmaceutical Research Vol. 3(5): 88 - 93.
4. Lê Đình Khả, 2003. Nghiên cứu chọn tạo giống và nhân giống cho một số loài cây trồng rừng chủ yếu ở Việt Nam. Nxb. Nông nghiệp, Hà Nội.
5. Lim, T.W. and Gavinlertvatana, P, 1989. *In vitro* propagation of mature *Acacia auriculiformis* A. Cunn. ex Benth and *A. mangium* Willd. Presented at the Seminar on Winrock Project, Singapore, 17 - 18 August 1989, 9p.
6. Đoàn Thị Mai, Lương Thị Hoan, Lê Sơn, Nguyễn Thanh Hương, 2003. Bước đầu nghiên cứu nhân giống Keo lá tràm bằng phương pháp nuôi cấy mô. Thông tin Khoa học Lâm nghiệp, Viện Khoa học Lâm nghiệp Việt Nam. Số 4.
7. Đoàn Thị Mai, Lê Sơn, 2011. Báo cáo tổng kết đề tài KHCN cấp Nhà nước “Nghiên cứu nhân nhanh giống Keo lai tự nhiên, Keo lai nhân tạo, Bạch đàn uro, Bạch đàn lai nhân tạo (mới chọn tạo) và Lát hoa bằng công nghệ tế bào”. Viện Khoa học Lâm nghiệp Việt Nam.
8. Nguyễn Hoàng Nghĩa, 2003. Phát triển các loài keo *Acacia* ở Việt Nam. Nxb. Nông nghiệp, Hà Nội.
9. Pinyopusarerk, K., 1990. *Acacia auriculiformis*: An Annotated Bibliography. Winrock International -F/FRED and ACIAR, Bangkok, Thailand.
10. Semsuntud N. and Nitiwattanachai W., 1991. Tissue culture of *Acacia auriculiformis*. Proceedings of an international workshop held in Bangkok, Thailand, 11 - 15 February, 1991.
11. Nguyễn Kim Thanh và Nguyễn Thuận Châu, 2005. Giáo trình Sinh lý thực vật (Dùng trong các trường THCN). Nxb. Hà Nội.
12. Turnbull, J.W, 1991. Advances in *Acacia* Research. ACIAR Proceedings No. 35, 234p.

Người thẩm định: TS. Phí Hồng Hải