

NHÂN GIỐNG *in vitro* CÁC GIA ĐÌNH ƯU VIỆT KEO LÁ LIỀM (*Acacia crassicaarpa* A. Cunn. ex Benth.) PHỤC VỤ TRỒNG RỪNG

Phí Hồng Hải¹, Văn Thu Huyền²

¹Viện Khoa học Lâm nghiệp Việt Nam

²Viện Nghiên cứu Giống và Công nghệ sinh học Lâm nghiệp

TÓM TẮT

Trồng rừng vô tính theo gia đình (CFF - Clonal Family Forestry) cho Keo lá liềm đã được ứng dụng thành công ở Indonesia, đây là phương pháp nhằm nhân giống sinh dưỡng hàng loạt các cá thể ưu việt trong các gia đình ưu việt, không giữ lại dòng vô tính đồng nhất. Ứng dụng phương pháp này, nghiên cứu về nhân giống cho 5 gia đình ưu việt Keo lá liềm trong vườn giống thế hệ 2 tại Quảng Trị và Bình Thuận bằng phương pháp nuôi cấy mô tế bào đã được tiến hành. Hạt giống được rửa dưới vòi nước chảy trong 3 - 5 phút, sau đó rửa bằng nước xà phòng loãng, tráng với nước cất vô trùng 3 - 5 lần, đun trong nước sôi 1 phút, sau đó ngâm trong HgCl₂ ở 2 nồng độ (0,05% trong thời gian 7 phút hoặc 0,1% trong thời gian 5 phút. Cuối cùng là tráng bằng nước cất vô trùng 3 - 5 lần. Hạt đã khử trùng được cấy vào môi trường MS* (MS cải tiến) có bổ sung 4,5 g/L Agar và 30 g/L Đường sucrose. Kết quả cho thấy có tới 23,3% mẫu này mầm. Môi trường MS* bổ sung 1,5 mg/L BAP cùng 2 mg/L NAA và 2,0g/L Than hoạt tính cho 8,9 chồi/cụm và tỷ lệ chồi hữu hiệu là 42,8%. Môi trường ra rễ thích hợp là 1/2MS* bổ sung 1,0 mg/L IBA (tỷ lệ ra rễ đạt 83,2%). Đối với Keo lá liềm chỉ nên nhân chồi đến vòng thứ 7, mỗi vòng 25 ngày, sau đó hủy mẫu. Thông thường, sau 7 lần cấy chuyển từ 1 hạt Keo lá liềm có khả năng tạo được khoảng 2.453 cây con (nuôi dưỡng ở giai đoạn 3 tháng tuổi).

Từ khóa: Gia đình ưu trội, già hóa, Keo lá liềm, nhân giống sinh dưỡng, trồng rừng gia đình dòng vô tính

In vitro propagation for superior families of *Acacia crassicaarpa* A. Cunn. ex Benth. providing for Clonal Family Forestry

Clonal Family Forestry (CFF) was applied successfully for *Acacia crassicaarpa* in Indonesia, which is a method using vegetative propagation methods to multiply the seedlings from superior individual trees within superior family, without retention of individual clone identities. This study on tissue culture propagation for 5 superior families of *Acacia crassicaarpa* in the second generation seed orchard have been conducted as CFF method. *Acacia crassicaarpa* seeds were washed thoroughly under running tap water for 3 - 5 minutes then cleaned with soap solution. Seeds were washed 3 to 5 times with sterile distilled water and were treated to break dormancy by hot water for 1 minutes. The seeds were then treated with 0.1% HgCl₂ for 5 minutes or 0.05% HgCl₂ for 7 minutes. Finally, the seeds were washed 3 to 5 times with sterile distilled water and were placed in culture bottle containing hormone free MS* medium prepared with 30 g/L sucrose and 4.5g/L agar. The pH of the medium was adjusted

Keywords: Superior families, ontogenetic ageing, *Acacia crassicaarpa*, vegetative propagation, clonal family forestry

to 5.8 before autoclaving at 121°C for 20 minutes at 1.2 kg/cm² pressure. The result achieved 23.3% of germination. The medium MS* + 1.5 mg/L BAP + 2.0 mg/L NAA + 2.0 g/L activated charcoal was successfully used for inducing the adventitious shoots with maximum 8,9 shoots per clump, which equals to average multiplication rate of 4.3 and adventitious shoot percentage of 42.8%. The best rooting responses were observed in the medium 1/2MS* supplemented with 1.0mg/L IBA and the rooting rate reached to 83.2%. At 7 subcultures (25 days per cycle), the ontogenetic ageing of explants will appear. Using the micropropagation technique, an estimated 2453 plantlets (3 months) could be produced from a single seed after 7 subcultures.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Keo lá liềm (*Acacia crassicaarpa* A. Cunn. ex Benth.) là loài cây đa tác dụng và có khả năng sinh trưởng nhanh, tương đương với Keo tai tượng và Keo lá tràm (Harwood, 1993). Keo lá liềm là một trong ba loài keo có triển vọng nhất trong các loài thuộc chi keo và được gây trồng rộng rãi ở nhiều nước (Turnbull *et al.*, 1998). Keo lá liềm có nguồn gốc từ Australia, Papua New Guinea (PNG) và Indonesia (Indo). Gỗ của loài này được sử dụng sản xuất gỗ dán, ván dăm, giấy và đồ gỗ gia dụng (Turnbull *et al.*, 1998). Chúng là loài cây trồng rừng chủ yếu ở nhiều nước tại châu Á và châu Phi, và có khả năng thích nghi với nhiều dạng lập địa khác nhau, đặc biệt với môi trường axit cao (pH 3,5 - 6) và đất cát podzol cần cỗi, như dạng đất cát nội đồng bị úng nước trong suốt mùa mưa và khô hạn trong suốt mùa khô (Turnbull *et al.*, 1998).

Công tác cải thiện giống Keo lá liềm ở nước ta chính thức được tiến hành từ những năm 1990. Các kết quả khảo nghiệm và trồng thử đối với loài cây này đã khẳng định: Keo lá liềm là loài có khả năng sinh trưởng nhanh và thích ứng tốt trên đất đồi và đất cát nội đồng có lên líp (Lê Đình Khả, 2003; Nguyễn Hoàng Nghĩa, 2003; Nguyễn Thị Liễu, 2006). Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn đã có quyết

định công nhận các xuất xứ Mata province (PNG), Dimisisi (PNG) và Deri - Deri (PNG) là những xuất xứ có triển vọng cho trồng rừng ở một số vùng trong nước (Lê Đình Khả *et al.*, 2003; Nguyễn Hoàng Nghĩa, 2003; Hà Huy Thịnh, 2006). Một số gia đình, như AC61, AC40, AC9, AC32, AC71 và AC20, cũng đã được Bộ NN&PTNT công nhận là giống tiến bộ kỹ thuật (TBKT) cho Bình Thuận. Các gia đình AC13, AC25, AC73, AC45 và AC34 công nhận là giống TBKT cho Quảng Trị và các lập địa có điều kiện tương tự (Quyết định số 3893/QĐ-BNN-TCLN ngày 20 tháng 9 năm 2016). Đây là những gia đình có năng suất đạt từ 21 - 27 m³/ha/năm, chất lượng gỗ tốt (khối lượng riêng gỗ và hàm lượng cellulose cao, ít mục ruột).

Việc nhân giống vô tính cho các loài keo khác nhau yêu cầu kỹ thuật nhân giống khác nhau. Với các loài keo lai và Keo lá tràm, sau khi chọn lọc cá thể ưu trội và khảo nghiệm dòng vô tính để chọn lọc các dòng ưu việt và từ đó có thể nhân giống sinh dưỡng hàng loạt phục vụ cho sản xuất (Hà Huy Thịnh *et al.*, 2011). Trương Thị Bích Phượng và đồng tác giả (2012) cũng đã nghiên cứu thành công quy trình kỹ thuật nuôi cấy *in vitro* cho Keo lá liềm. Tuy nhiên nỗ lực trồng rừng dòng vô tính đối với Keo lá liềm ở Việt Nam đến nay

vẫn chưa thành công. Một trong những nguyên nhân không thể phát triển rừng trồng dòng vô tính ở Keo lá liềm là vật liệu nhân giống bị già cỗi rất nhanh nên việc lưu trữ giống gốc rất ngắn, tỷ lệ ra rễ thấp và chất lượng cây giống không đảm bảo (Poupard *et al.*, 1994). Chính vì vậy, phát triển dòng vô tính Keo lá liềm là không phù hợp. Phương pháp nhân giống thích hợp cho loài này là nhân giống hạt. Sản xuất ra được số lượng lớn hạt giống có chất lượng cho Keo lá liềm đang là một nhu cầu cấp bách ở Việt Nam. Tuy nhiên nguồn hạt giống chất lượng ở nước ta còn hạn chế, do còn thiếu các rừng giống và vườn giống, hơn nữa tỷ lệ đậu quả ở các rừng giống và vườn giống lại chưa cao (Griffin *et al.*, 2010). Một giải pháp khả quan có thể ứng dụng cho loài keo này là trồng rừng gia đình dòng vô tính (Clonal Family Forest - CFF), tức là trồng rừng gia đình bằng nhân giống sinh dưỡng hàng loạt các lô hạt thu từ các cá thể ưu việt trong các gia đình ưu việt trong các vườn giống hoặc các tổ hợp lai tốt nhất (Griffin *et al.*, 2010). Mỗi một lô hạt thu từ một cá thể ưu việt trong một gia đình ưu việt sẽ bao gồm nhiều kiểu gen khác nhau do quá trình tái tổ hợp trong giai đoạn phân bào giảm nhiễm. Chính vì vậy khi nhân giống CFF sẽ tạo ra rất nhiều dòng vô tính khác nhau. Như vậy rừng trồng gia đình dòng vô tính sẽ đảm bảo tính đa dạng di truyền cao hơn rừng trồng dòng vô tính và từ đó sâu bệnh hại sẽ ít hơn rừng trồng dòng vô tính với số lượng dòng ít (Finkeldey và Hattemer, 2007). Nhân giống CFF cho Keo lá liềm đã được một số công ty giấy lớn ở Indonesia và Malaysia thực hiện thành công. Năng suất rừng trồng CFF đã tăng 15% so với việc trồng rừng bằng hạt giống từ các vườn giống (Wong và Yulianto, 2014).

Xuất phát từ thực tiễn trên, nghiên cứu nhân giống gia đình dòng vô tính bằng nuôi cấy mô

tế bào cho một số gia đình ưu việt Keo lá liềm mới được chọn lọc nhằm góp phần đưa nhanh các giống mới được chọn lọc vào trồng rừng sản xuất được thực hiện. Bài báo này xin được trình bày những kết quả nghiên cứu về ảnh hưởng của nồng độ hóa chất và thời gian đến khử trùng, ảnh hưởng của Cytokinin và Auxin đến khả năng nhân chồi và ảnh hưởng của Auxin tới khả năng ra rễ trong nhân giống gia đình dòng vô tính Keo lá liềm.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

100 gram hạt giống được lấy đều từ 5 gia đình tốt nhất (AC61, AC40, AC9, AC13, AC25) trong vườn giống thế hệ 2 Keo lá liềm tại Quảng Trị và Bình Thuận. Các gia đình đã được Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn công nhận là giống tiến bộ kỹ thuật.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Chế độ nuôi mẫu trong các thí nghiệm được thực hiện với cường độ chiếu sáng 2000 - 3000 lux, thời gian chiếu sáng 10h, nhiệt độ $26 \pm 2^\circ\text{C}$ và chu kỳ cấy chuyển là 20 ngày.

Các thí nghiệm đều được lặp lại 3 lần với 30 mẫu trong mỗi công thức thí nghiệm.

- *Thí nghiệm ảnh hưởng của nồng độ HgCl_2 và thời gian đến kết quả khử trùng*

Hạt giống được chia theo lô hạt và theo công thức thí nghiệm, rửa dưới vòi nước chảy trong 3 - 5 phút, sau đó rửa bằng nước xà phòng loãng, tráng với nước cất vô trùng 3 - 5 lần, đun trong nước sôi 1 phút, sau đó ngâm trong HgCl_2 ở 2 nồng độ (0,05% và 0,1%), và 3 mức thời gian (3, 5, và 7 phút). Cuối cùng là tráng bằng nước cất vô trùng 3 - 5 lần. Hạt đã khử trùng được cấy vào môi trường tái sinh chồi ban đầu là MS*

(MS cải tiến) có bổ sung 4,5 g/L Agar và 30 g/L đường sucrose.

• *Thí nghiệm ảnh hưởng của BAP và NAA đến khả năng nhân chồi*

Sau 10 ngày hình thành cây con với 2 cặp lá kép lông chim, và cho tới 15 ngày khi cây con phát triển hoàn chỉnh mới tiến hành cắt hạ tại gốc 2 lá mầm. Sau đó, mầm được cấy chuyển sang môi trường MS* có bổ sung BAP (với các nồng độ 0,5; 1,0; 1,5; và 2,0 mg/L). Để nâng cao chất lượng chồi phục vụ ra rễ in vitro, chồi Keo lá liềm được nuôi cấy trong môi trường MS* bổ sung BAP ở nồng độ thích hợp đã xác định bổ sung NAA (với các nồng độ 0,25; 0,5; 0,75 và 1,0 mg/L) và than hoạt tính 2g/l.

• *Thí nghiệm ảnh hưởng của IBA đến khả năng ra rễ*

Thí nghiệm ra rễ được thực hiện trong môi trường 1/2MS* có bổ sung IBA (0,5; 1,0; 1,5; 2,0 mg/L). Môi trường nuôi cấy được điều chỉnh pH = 5,8 và hấp khử trùng ở điều kiện áp suất 1,2 atm, nhiệt độ 121°C trong thời gian 20 phút.

• *Thu thập và xử lý số liệu*

Số liệu về tỷ lệ nhiễm, tỷ lệ sạch, tỷ lệ nảy mầm, số chồi/cụm và chiều dài trung bình của chồi, số chồi có chiều cao trên 2cm, số chồi ra rễ, số rễ/chồi và chiều dài rễ 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

Sau 4 ngày khử trùng, hạt Keo lá liềm bắt đầu nảy mầm và sau 10 ngày hạt nảy mầm hoàn toàn. Kết quả khử trùng được trình bày tại bảng 1. Kết quả cho thấy tỷ lệ hạt nhiễm, tỷ lệ hạt nảy mầm và tỷ lệ hạt không nảy mầm ở 6 công thức thí nghiệm có sự sai khác rõ rệt ($F_{tính} > F_{.05}$ tra bảng). Đối với Keo lá liềm, công thức tối ưu cho khử trùng hạt đòi hỏi nồng độ clorua thủy ngân cao hơn ($HgCl_2$ 0,1%) so với Keo tai tượng (Triệu Thị Thu Hà và Phí Hồng Hải, 2016), song thời gian lại ngắn hơn (chỉ 5 phút) cho tỷ lệ nảy mầm (23,3%), tỷ lệ nhiễm (73,3%) (bảng 1 - ảnh 1a).

Bảng 1. Ảnh hưởng của hóa chất và thời gian đến kết quả khử trùng hạt Keo lá liềm

Hóa chất	Thời gian (phút)	Tỷ lệ hạt nhiễm (%)	Tỷ lệ hạt nảy mầm (%)	Tỷ lệ hạt không nảy mầm (%)	Thời gian hạt bắt đầu nảy mầm	Thời gian nảy mầm hoàn toàn
$HgCl_2$ 0,05%	3	70,0	10,0	20,0	5 ngày	10 ngày
	5	66,7	13,3	20,0	5 ngày	10 ngày
	7	66,7	20,0	13,3	4 ngày	10 ngày
$HgCl_2$ 0,1%	3	76,7	16,6	6,7	5 ngày	10 ngày
	5	73,3	23,3	3,4	4 ngày	10 ngày
	7	73,3	20,0	6,7	4 ngày	10 ngày
$F_{tính}$		59,9	38,6	25,4		
$F_{.05}$ tra bảng		$F_{(.05; 5; 12)} = 3,11$				

Griffin Akeng (2000) xử lý hạt Keo lá liềm bằng cloxor 15% trong thời gian 15 phút đã làm giảm tỷ lệ hạt nhiễm xuống dưới 10%. Tương tự, Muhammad và đồng tác giả (2012) thu hái hạt Keo tai tượng từ các cây mẹ ưu trội tại Rajshahi (Bangladesh), sau đó hạt được rửa dưới vòi nước chảy 15 phút, khử trùng bề mặt 15 phút với vài giọt dung dịch khử trùng Savlon, rồi đun sôi trong 2 - 5 phút, tiếp theo ngâm trong nước lạnh 20 phút. Cuối cùng, hạt Keo tai tượng được ngâm trong HgCl₂ 0,1% trong thời gian 5 phút và tráng lại bằng nước cất vô trùng 3 - 5 lần. Hạt sau khi khử trùng được nuôi dưỡng trong môi trường MS bổ sung 3% đường sucrose và 0,8% thạch (pH điều chỉnh đạt 5,7), sau 2 tuần chồi mầm của Keo tai tượng đạt chiều cao từ 1 - 1,5cm. Như

vậy cần xem xét sử dụng cloxor trong khử trùng hạt Keo lá liềm sẽ đem lại hiệu quả cao hơn nhiều so với sử dụng HgCl₂ độc hại.

3.2. Ảnh hưởng của BAP và NAA đến khả năng nhân chồi

a) Ảnh hưởng của BAP

Cytokinin là hormone hình thành chồi vì nó kích thích mạnh mẽ sự phân hóa chồi. Hiện nay, trong nuôi cấy mô tế bào các Cytokinin tổng hợp được sử dụng rộng rãi là BAP (6-benzylaminopurine) và Kn (6-furfurolaminopurine), Ads (Adenin sulphate),... Trong nghiên cứu ảnh hưởng này BAP đã được sử dụng và kết quả được thể hiện tại bảng 2.

Bảng 2. Ảnh hưởng của BAP đến khả năng nhân nhanh chồi Keo lá liềm

BAP (mg/L)	Số chồi/cụm	Hệ số nhân chồi (lần)	Chiều cao chồi (cm)
0	3,3	2,0	2,0
0,5	7,6	2,5	2,4
1,0	9,5	3,1	2,8
1,5	10,7	4,3	3,2
2,0	8,2	3,9	2,2
F _{tính}	82,8	53,1	37,1
F _{.05 tra bảng}		F _{(.05; 4; 10) = 3,47}	

Số chồi/cụm, hệ số nhân chồi và chiều cao chồi có sự khác biệt rõ rệt (mức sai khác ý nghĩa 95%) giữa các công thức về nồng độ bổ sung BAP vào môi trường nuôi cấy. Môi trường MS* bổ sung 1,5 mg/L BAP được cho là thích hợp nhất cho quá trình nhân nhanh chồi thông qua các chỉ số: hệ số nhân chồi đạt tới 4,3 lần và chiều dài trung bình chồi là 3,2cm, trong khi đối chứng chỉ là 2,0 lần và 2,0cm chiều dài TB chồi và các công thức nồng độ khác những chỉ số này lần lượt là dưới 4,0 lần và không quá 2,8cm chiều dài (ảnh 1b).

Báo cáo về nuôi cấy mô cho Keo lá liềm từ hạt của Akeng (2000) cho thấy số lượng chồi/cụm đạt cao nhất trong môi trường MS bổ sung 0,5 mg/L BAP (đạt tới 7 chồi/cụm), tuy nhiên chiều dài trung bình chồi chỉ đạt là 0,8cm. Khi nuôi cấy trong môi trường MS bổ sung 2,0 mg/L 2,4D thì tái sinh chồi Keo lá liềm tốt hơn (đạt 8,3 cụm chồi/cụm) và chiều cao chồi cao hơn (đạt 1,2cm). Kết quả về số lượng chồi đạt được khá khiêm tốn.

b) Ảnh hưởng phối hợp của BAP và NAA

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 và 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 ảnh hưởng phối hợp của BAP (nồng độ tối ưu 1,5 mg/L) với NAA (các

nồng độ, từ 0 đến 1,5 mg/L) + than hoạt tính (2,0 g/L) đến hệ số nhân chồi và tỷ lệ chồi hữu hiệu của Keo lá liềm được thể hiện tại bảng 3. Sự khác biệt về số chồi/cụm, hệ số nhân chồi và tỷ lệ chồi hữu hiệu Keo lá liềm trong các công thức thí nghiệm thể hiện các công thức thí nghiệm ảnh hưởng không đồng nhất đến kết quả nghiên cứu. ($F_{tính} > F_{.05}$ tra bảng). Môi trường MS* + 1,5 mg/L BAP + 0,5 mg/L NAA + 2,0 g/L than hoạt tính đã đạt được số chồi trung bình/cụm là 8,9 chồi, hệ số nhân chồi là 3,7 lần, song xét riêng về tỷ lệ chồi hữu hiệu chỉ là 42,8% (bảng 3, hình ảnh 1c). Như vậy hệ số nhân chồi ở môi trường này của Keo lá liềm có hệ số cao hơn nhưng tỷ lệ chồi hữu hiệu lại thấp hơn so với của Keo tai tượng ở nghiên cứu của Triệu Thị Thu Hà và Phí Hồng Hải (2016).

Bảng 3. Ảnh hưởng phối hợp của BAP với NAA đến hệ số nhân chồi và tỷ lệ chồi hữu hiệu của Keo lá liềm

NAA (mg/L)	Số chồi/cụm	Hệ số nhân chồi (lần)	Tỷ lệ chồi hữu hiệu (%)	Chất lượng chồi
0,0	10,7	4,3	22,6	+
0,1	9,6	4,0	38,4	++
0,5	8,9	3,7	42,8	+++
1,0	7,4	3,3	33,2	++
1,5	6,1	3,1	30,2	+
$F_{tính}$	59,4	19,8	41,8	
$F_{.05}$ tra bảng	$F_{(.05; 4; 10)} = 3,47$			

Theo Akeng (2000), chồi Keo lá liềm nuôi cấy trong môi trường MS bổ sung 2,0 mg/L BAP cho 4,2 chồi/cụm, chiều cao chồi trung bình đạt 2,1cm (cao hơn 0,62cm so với khi bổ sung riêng lẻ BAP).

3.3. Ảnh hưởng của IBA tới khả năng ra rễ

Chất điều hòa sinh trưởng gốc Auxin là một phytohormon có tác dụng điều chỉnh sự hình thành rễ bởi khả năng hoạt hóa các tế bào vùng xuất hiện rễ để tạo nên các mầm rễ bất định,

sau đó là rễ bất định. IBA là một trong số những chất điều hòa sinh trưởng có ảnh hưởng tích cực đến khả năng ra rễ của keo (Đoàn Thị Mai *et al.*, 2003).

Kết quả bổ sung IBA với các nồng độ khác nhau vào môi trường ra rễ 1/2MS*, cho thấy nồng độ 1,0 mg/L IBA có hiệu quả tốt nhất, với tỷ lệ chồi ra rễ đạt 83,2%, cao hơn công thức đối chứng 1,96 lần (42,4%), ngoài ra số rễ TB/cây là 2,3 rễ và chiều dài rễ là 2,1cm;

trong khi ở các nồng độ còn lại tỷ lệ ra rễ chỉ đạt 68 - 72%, với 1,6 - 2,1 số rễ TB/cây, và chiều dài rễ không quá 1,8cm (bảng 4; ảnh 1d).

Kết quả về tỷ lệ ra rễ trên thấp hẳn so với kết quả trước đây của Akeng (2000), khi ra rễ chồi

Keo lá liềm với môi trường 1/2MS* + 2,0 mg/L IBA cho tỷ lệ ra rễ là 100%. So sánh ảnh hưởng của IBA và NNA tác giả cũng cho rằng IBA tác động hiệu quả hơn tới khả năng ra rễ của Keo lá liềm.

Bảng 4. Ảnh hưởng của IBA đến khả năng ra rễ Keo lá liềm

IBA (mg/l)	Tỷ lệ chồi ra rễ (%)	Số rễ (rễ/cây)	Chiều dài rễ (cm)
0	42,4	1,6	0,6
0,1	68,4	1,8	1,4
0,5	72,8	2,1	1,8
1,0	83,2	2,3	2,1
1,5	72,2	1,6	1,6
F _{tính}	70,8	30,1	22,1
F _{.05 tra bảng}	F _{(.05; 4; 10) = 3,47}		

3.4. Xác định khả năng nhân giống gia đình dòng vô tính (CFF) bằng kỹ thuật nuôi cấy mô cho Keo lá liềm

Để bước đầu đánh giá tính hiệu quả của việc nhân giống gia đình dòng vô tính bằng kỹ thuật nuôi cấy mô cho đối tượng nghiên cứu, cần phải xác định số lượng chồi tiêu

chuẩn có thể tạo ra từ 1 hạt được đưa vào nuôi cấy. Vì vậy, cần tiến hành đánh giá các chỉ số nhân chồi, bao gồm hệ số nhân chồi và chiều dài chồi qua các lần cấy chuyển (25 ngày) trước khi cụm chồi hoàn toàn già và không có khả năng sinh chồi, đặc biệt là chồi hữu hiệu.

Bảng 5. Các chỉ tiêu nhân giống qua các lần cấy chuyển của Keo lá liềm

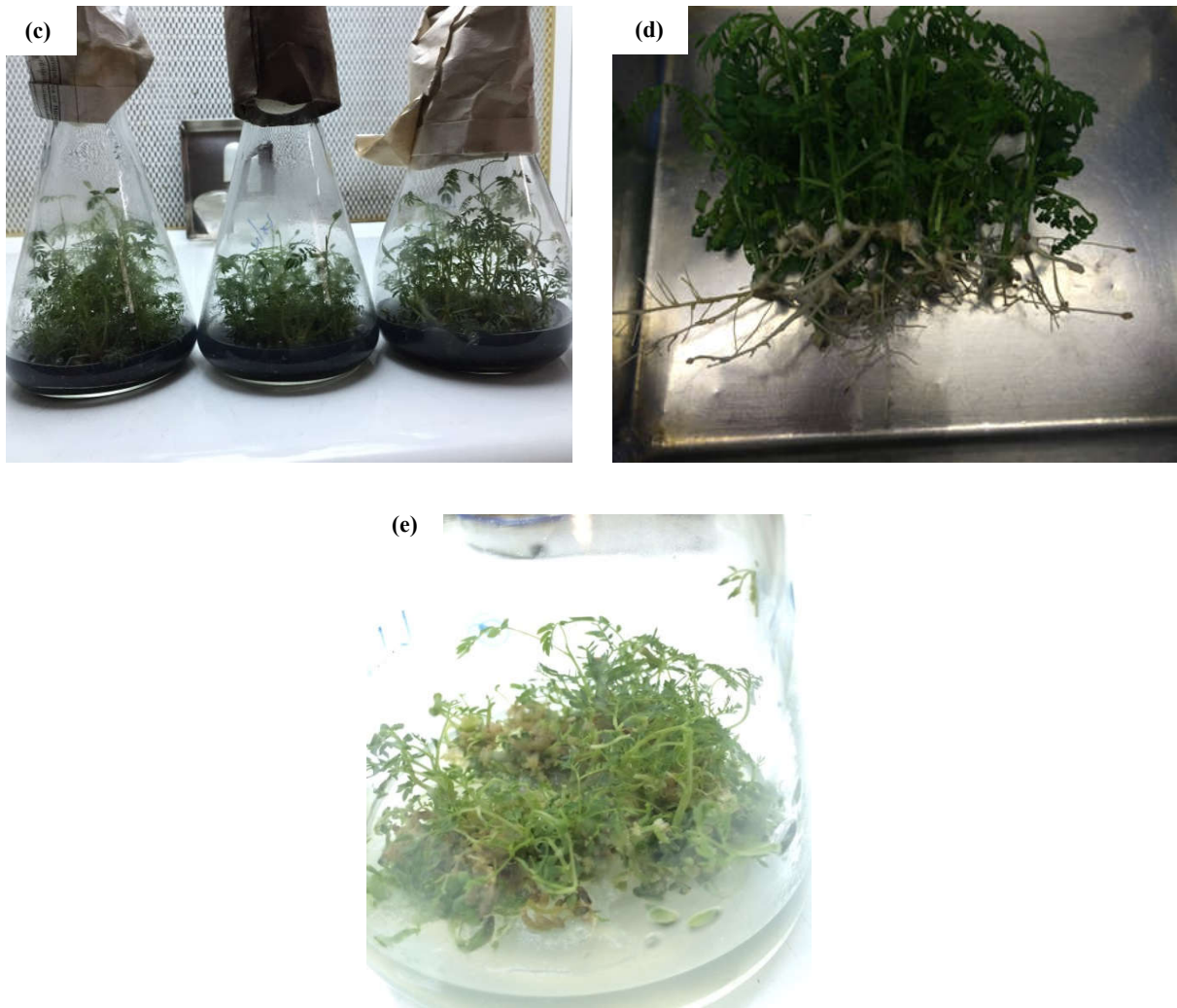
Số lần cấy chuyển	Hệ số nhân chồi (lần)	Chiều dài chồi (cm)	Tỷ lệ chồi hữu hiệu (%)	Chất lượng chồi
Lần 1	1,2 ± 0,2	2,0 ± 0,6	20,1 ± 2,2	+++
Lần 2	2,1 ± 0,2	2,3 ± 0,7	28,5 ± 1,9	+++
Lần 3	3,1 ± 0,3	2,6 ± 0,3	30,0 ± 2,3	+++
Lần 4	3,8 ± 0,5	3,0 ± 0,4	38,3 ± 1,7	+++
Lần 5	4,3 ± 0,6	3,1 ± 0,6	42,8 ± 1,9	+++
Lần 6	4,1 ± 0,4	2,8 ± 0,7	40,5 ± 1,4	+++
Lần 7	3,1 ± 0,5	2,5 ± 0,6	32,2 ± 3,1	++
Lần 8	1,9 ± 0,5	2,0 ± 0,6	27,8 ± 3,1	+
F _{tính}	29,5	18,8	7,4	
F _{bảng}	F _{(.05; 7; 16) = 2,65}			

Kết quả đánh giá được trình bày tại bảng 5 cho thấy, với Keo lá liềm các chỉ tiêu nhân chồi đạt giá trị tốt trong các lần cấy chuyển thứ 3, 4, 5 và 6 với hệ số nhân chồi đạt 3,1 - 4,3 lần, chiều dài chồi đạt 2,6 - 3,1cm, và tỷ lệ chồi hữu hiệu 30,0 - 42,8%. Tuy nhiên, các chỉ số này bắt đầu giảm từ lần cấy chuyển thứ 7 đến lần cấy chuyển thứ 8 với hệ số nhân giảm mạnh từ 4,1 xuống 1,9 lần, chiều cao chồi không vượt quá 3,0cm và tỷ lệ chồi hữu hiệu giảm mạnh từ 40,5 - 27,8%. Hơn nữa, về hình thái các chồi kém xanh, thân phân lóng ngắn, lá không mở và có biểu hiện rụng lá (ảnh 1e). Như vậy là đối với Keo lá liềm, chỉ nên nhân chồi đến vòng thứ 7, mỗi vòng 25 ngày, sau đó hủy mẫu. Thông qua các chỉ tiêu này, có thể xác định nhanh sau 7 vòng cấy chuyển từ 1 hạt Keo lá liềm có khả năng tạo được 2.453 cây con (nuôi dưỡng ở giai đoạn 3 tháng tuổi). Trong khi nuôi cấy *in vitro* sử dụng vật liệu nhân giống là cây mầm từ hạt hệ số nhân cao hơn hẳn so với các phương pháp nhân giống sinh dưỡng thông thường, ví dụ 1kg hạt = 40.000 - 60.000 hạt; vậy 1kg hạt nhân được tối thiểu 98 triệu cây con và như vậy trồng được gần 89.000ha với mật độ 1100 cây/ha. Do đó sẽ giảm việc nhập hạt giống từ nước ngoài (nhập hạt giống từ xuất xứ tốt nhất), tăng năng suất và chất lượng rừng trồng. Vì vậy đây được coi là một phương pháp cần được quan tâm.

IV. KẾT LUẬN

Hạt Keo lá liềm được rửa dưới vòi nước chảy trong 3 - 5 phút, sau đó rửa bằng nước xà phòng loãng, tráng với nước cất vô trùng 3 - 5 lần, đun trong nước sôi 1 phút, sau đó ngâm trong HgCl₂ ở 2 nồng độ 0,05% trong 7 phút hoặc 0,1% trong 5 phút. Cuối cùng là tráng bằng nước cất vô trùng 3 - 5 lần. Hạt đã khử trùng được cấy vào môi trường tái sinh chồi ban đầu là MS* (MS cải tiến) có bổ sung 4,5 g/L Agar và 30 g/L Đường (sucrose). Sau 4 ngày, hạt bắt đầu nảy mầm, sau 10 ngày hình thành cây con với 2 cặp lá kép lông chim, và cho tới 15 ngày khi cây con phát triển hoàn chỉnh mới tiến hành cắt hạ tại gốc 2 lá mầm và cấy chuyển sang môi trường nhân nhanh chồi MS* bổ sung 1,5 mg/L BAP (tạo 10,7 chồi/cụm, chiều dài chồi 3,2cm). Để nâng cao chất lượng chồi phục vụ ra rễ, các chồi Keo lá liềm được nuôi cấy trong môi trường MS* bổ sung 1,5 mg/L BAP cùng 2,0 mg/L NAA và 2,0 g/L than hoạt tính (8,9 chồi/cụm, tỷ lệ chồi hữu hiệu 42,8%). Môi trường ra rễ thích hợp cho Keo lá liềm là 1/2MS* bổ sung 1,0 mg/L IBA (tỷ lệ chồi ra rễ đạt 83,2%). Nghiên cứu cũng cho thấy, đối với Keo lá liềm, chỉ nên nhân chồi đến vòng thứ 7, mỗi vòng 25 ngày, sau đó hủy mẫu. Thông thường, sau 7 vòng cấy chuyển từ 1 hạt Keo lá liềm có khả năng tạo được khoảng 2.453 cây con (nuôi dưỡng ở giai đoạn 3 tháng tuổi).





Ảnh 1. (a) Hạt Keo lá liềm mới nảy mầm sau 15 ngày; (b) Chồi Keo lá liềm nuôi cấy trong môi trường nhân nhanh chồi sau 20 ngày; (c) Chồi Keo lá liềm nuôi cấy trong môi trường nâng cao chất lượng chồi sau 25 ngày; (d) cây Keo lá liềm sau 15 ngày; (e) Bình nhân chồi Keo lá liềm sau 20 ngày ở vòng cấy chuyển thứ 8

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. 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.
2. Finkeldey, R. and Hattermer, H.H., 2007. Tropical Forest Genetics. Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 315pp.
3. Griffin Akeng, 2000. Micropropagation of *Acacia crassicaarpa* A. Cunn ex Benth. Masters thesis, Universiti Putra Malaysia.
4. Griffin, A.R; Tran Duc Vuong; Harbard J.L.; Wong C.Y.; Brooker C.; Vaillancourt R. E., 2010. Improving controlled pollination methodology for breeding *Acacia mangium* Willd. *New Forest*, 1 - 12.
5. Hà Huy Thịnh, 2006. Báo cáo tổng kết đề tài giai đoạn 2001 - 2005, đề tài “Nghiên cứu chọn, tạo giống có năng suất và chất lượng cao cho một số loài cây trồng rừng chủ yếu”. Viện Khoa học Lâm nghiệp Việt Nam, 124 trang.

6. Hà Huy Thịnh, Phí Hồng Hải, Nguyễn Đức Kiên, 2011. Chọn tạo giống và nhân giống cho một số loài cây trồng rừng chủ yếu. Nhà xuất bản Nông nghiệp. 181 trang.
7. Lê Đình Khả, 2003. Nghiên cứu chọn tạo giống và nhân giống cho một số loài cây trồng rừng chủ yếu ở Việt Nam. Nhà xuất bản Nông nghiệp, Hà Nội, 292 trang.
8. Muhammad Shahinozzaman, Mustafa Abul Kalam Azad, Muhammad Nurul Amin, 2012. *In vitro* Clonal Propagation of a Fast Growing Legume Tree - *Acacia mangium* Willd. Employing Cotyledonary Node Explants. *Not Sci Biol*, 2012, 4 (2): pp 79 - 85.
9. Nguyễn Hoàng Nghĩa, 2003. Phát triển các loài keo *Acacia* ở Việt Nam. NXB Nông nghiệp. 132 trang.
10. Nguyễn Kim Thanh và Nguyễn Thuận Châu, 2005. Giáo trình Sinh lý thực vật. Nhà xuất bản Hà Nội.
11. Poupard C, Chauvière M, Monteuis O., 1994. Rooting *Acacia mangium* and *Acacia crassiparva* cuttings: effects of age, within - shoot position and auxin treatment. *Silvae Genetica* 43:226 - 231
12. Triệu Thị Thu Hà và Phí Hồng Hải, 2016. Nghiên cứu nhân giống invitro các gia đình ưu việt Keo tai tượng (*Acacia mangium*) phục vụ trồng rừng dòng vô tính theo gia đình. Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển nông thôn, chuyên san giống số 1.2016, trang 249 - 256.
13. Trương Thị Bích Phượng, Nguyễn Thị Hải Yến, Nguyễn Thị Ánh Hằng, Nguyễn Quang Thành và Đặng Thái Dương, 2012. Nhân giống in vitro cây Keo lá liềm (*Acacia crassiparva* A. Cunn. ex Benth). Tạp chí Công nghệ Sinh học, số 10 (4A), trang 907 - 914.
14. Turnbull, J.W., Crompton, H.R. and Pinyopusarek, K. (eds), 1998. Recent Developments in Acacia Planting. Proceedings of the Third International Acacia Workshop, Hanoi, 27 - 31 Oct 1997. ACIAR Proceedings No. 82. Australian Centre for International Agricultural Research, Canberra. 383 pp.
15. Wong CY, Yulianto M. 2014. Deployment of acacias in short rotation pulpwood plantation. In: 'Sustaining the Future of Acacia Plantation Forestry' International Conference, IUFRO Working Party 2.08.07: Genetics and Silviculture of Acacias, Hue, Vietnam, 18 - 21 March 2014, Compendium of Abstracts.

Người thẩm định: TS. Nguyễn Đức Kiên