

NGHIÊN CỨU NHÂN GIỐNG CÁC DÒNG KEO LAI NĂNG SUẤT CAO BV376, BV586, BB055 BẰNG PHƯƠNG PHÁP NUÔI CẤY MÔ

Văn Thu Huyền¹, Mai Thị Phương Thúy¹, Đồng Thị Ưng¹, Nguyễn Anh Dũng¹
Lê Thị Hoa¹, Lưu Thị Quỳnh¹, Hoàng Thị Hồng Hạnh¹, Đỗ Hữu Sơn¹
Nguyễn Đức Kiên¹, Đỗ Tiến Phát², Lê Sơn¹

¹Viện Nghiên cứu Giống và Công nghệ Sinh học Lâm nghiệp - Viện Khoa học Lâm nghiệp Việt Nam

²Viện Công nghệ Sinh học - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

TÓM TẮT

Trong thời gian gần đây, một số giống keo lai có năng suất, chất lượng cao đã được nghiên cứu chọn tạo nhằm bổ sung nguồn giống có phẩm chất di truyền được cải thiện cho cơ cấu cây trồng rừng. Để phát triển các giống này vào sản xuất, việc nghiên cứu nhân giống bằng nuôi cấy mô là việc làm có ý nghĩa. Nghiên cứu nhân giống bằng nuôi cấy mô cho các dòng BV376, BV586 và BB055 đã được thực hiện tại Viện Nghiên cứu Giống và Công nghệ Sinh học, kết quả nghiên cứu cho thấy: Phương pháp khử trùng thích hợp là HgCl₂ nồng độ 0,1% trong vòng 5 phút cho tỷ lệ bật chồi cao nhất đạt 37,5%. Môi trường nuôi cấy cơ bản MS có cải tiến về thành phần và nồng độ các chất đa lượng, vi lượng (MS2) có bổ sung BAP nồng độ 1,5 mg/l và NAA 0,5 mg/l cho tỷ lệ nhân chồi cao (hệ số nhân chồi đạt từ 4,9 - 5,8), chất lượng chồi tốt. Môi trường 1/2MS2 có bổ sung IBA nồng độ 1,5 - 2,0 mg/l cho tỷ lệ ra rễ trên 80%. Kết quả này là cơ sở quan trọng cho việc xây dựng quy trình nhân giống bằng nuôi cấy mô cho các dòng keo lai mới chọn tạo từ đó tiến hành công tác chuyển giao giống và quy trình nhân giống cho các đơn vị nghiên cứu và sản xuất giống cây lâm nghiệp để phát triển các giống mới này vào trồng rừng sản xuất.

Từ khóa: keo lai, nhân chồi, nhân giống *in vitro*, nuôi cấy mô, ra rễ

***In vitro* micropropagation for newly selected acacia hybrid clones BV376, BV586 và BB055**

Recently, a number of high-yield acacia hybrid clones have been researched and selected to improve genetic quality for forest plantation. To develop these varieties into production, research on propagation by tissue culture is necessary. Research on propagation by tissue culture for acacia hybrid clones BV376, BV586 and BB055 was carried out at the Institute of Forest Tree Improvement and Biotechnology. The research results showed that the optimal method for bud sterilization was soaked in HgCl₂ 0.1% for 5 minutes that gave the highest budding rate of 37.5%. The basal culture medium Murashige and Skoog (MS) with improved composition and concentration of macro-nutrients and micro-nutrients (MS2) with 1.5 mg/l BAP and 0.5 mg/l NAA for high shoot multiplication (4.9 - 5.8 shoots per clump). The 1/2MS2 medium + IBA concentration of 1.5 - 2.0 mg/l produced over 80% of rooted shoots. This result provides an important basis for a propagation process by tissue culture for newly selected acacia hybrid lines.

Keywords: acacia hybrid, *in vitro* propagation, multi-shoot, rooting, tissue culture

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Giống keo lai tự nhiên giữa Keo tai tượng (*Acacia mangium*) và Keo lá tràm (*A. auriculiformis*) (thường được gọi tắt là keo lai) đã được ghi nhận là có nhiều đặc điểm ưu việt hơn so với 2 loài bố mẹ như: sinh trưởng nhanh, thích ứng được trên nhiều dạng lập địa và kháng sâu bệnh. Từ năm 1991, các dòng keo lai tự nhiên đã được phát hiện, nghiên cứu chọn lọc và được phát triển rộng rãi trong sản xuất. Ở nước ta đến nay đã có trên 600.000 ha rừng keo lai đã được trồng, trong đó nhu cầu diện tích trồng rừng hàng năm của keo lai được dự đoán từ 20.000 - 30.000 ha. Tuy nhiên, do nhiều nguyên nhân mà cho đến nay mới chỉ có khoảng 10 dòng keo lai tự nhiên đã được phát triển rộng rãi trong sản xuất. Mặt khác, rừng trồng các loài keo nhiệt đới (bao gồm keo lai và Keo tai tượng) gần đây được ghi nhận đã bị ảnh hưởng nặng nề bởi nấm bệnh cũng như điều kiện bất lợi của môi trường và biến đổi khí hậu. Vì vậy, công tác chọn giống keo lai cần được liên tục tiến hành để vừa chọn tạo được các giống mới có năng suất, chất lượng cao vừa đảm bảo được tính an toàn sinh học cho rừng trồng.

Kết quả khảo nghiệm dòng vô tính keo lai gần đây đã chọn được các dòng keo lai BV376, BV586 và BB055 là những dòng triển vọng và đã được công nhận là giống tiến bộ kỹ thuật nhằm đưa các giống này vào sản xuất. Để phát triển các giống này vào sản xuất thì việc nghiên cứu nhân giống bằng phương pháp nuôi cấy mô là hướng đi hiệu quả nhất. Quy trình nhân giống bằng nuôi cấy mô cho keo lai trước đây đã được áp dụng rộng rãi, tuy nhiên các quy trình này lại không thể áp dụng hoàn toàn cho các giống mới chọn lọc này do 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 nên trong cùng một loài, với các dòng khác nhau thì hiệu quả nhân giống cũng rất khác nhau

cho dù là cùng loài (do đặc điểm về mặt di truyền không đồng nhất). Mặt khác các công trình nghiên cứu về nuôi cấy mô tế bào cho các dòng keo lai mới chọn tạo chưa có. Do đó, xác định và tối ưu hóa phương pháp nhân giống cho 3 dòng keo lai BV376, BV586 và BB055 bằng phương pháp nuôi cấy mô là cần thiết và có ý nghĩa. Bài báo này giới thiệu kết quả nghiên cứu quy trình nhân giống bằng nuôi cấy mô cho 3 dòng keo lai mới nhằm góp phần trong việc phát triển nhanh các giống có năng suất cao này vào trồng rừng sản xuất.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

- Các dòng keo lai BV376, BV586 và BB055 do Viện Nghiên cứu Giống và Công nghệ Sinh học Lâm nghiệp tuyển chọn. Các dòng này có sinh trưởng trung bình 20 - 35 m³/ha/năm và đã được Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn công nhận là giống cây trồng mới theo quyết định số 761/QĐ-BNN-TCLN ngày 06/03/2019 ngày 06 tháng 03 năm 2018.

- Vật liệu nghiên cứu: Vật liệu được sử dụng cho các thí nghiệm tạo mẫu ban đầu (khử trùng) là các chồi bánh tẻ chưa bật chồi nách thu từ cây mẹ (cây vật liệu gốc) của các dòng keo lai từ 6 tháng tuổi được trồng tại vườn ươm Viện Nghiên cứu Giống và Công nghệ Sinh học Lâm nghiệp.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Địa điểm, điều kiện bố trí thí nghiệm

* Địa điểm: Phòng thí nghiệm nuôi cấy mô - tế bào, Viện Nghiên cứu Giống và Công nghệ Sinh học Lâm nghiệp, Viện Khoa học Lâm nghiệp Việt Nam - Đức Thắng - Bắc Từ Liêm - Hà Nội.

* Điều kiện bố trí thí nghiệm: Các thí nghiệm được duy trì trong điều kiện nhân tạo với các thông số: Số giờ chiếu sáng trong ngày: 10 h/ngày, cường độ ánh sáng: 2.000 - 3.000 lux, nhiệt độ phòng nuôi: 25 - 27°C.

2.2.2. Phương pháp bố trí thí nghiệm

Các nội dung thí nghiệm được tiến hành như sau:

** Xác định loại hóa chất và thời gian khử trùng thích hợp cho các dòng keo lai nghiên cứu*

Thí nghiệm sử dụng loại hóa chất khử trùng là HgCl₂ (ở nồng độ 0,05% và 0,1%) và Ca(OCl)₂ (ở nồng độ 5% và 10%) trong các khoảng thời gian khác nhau. Các chỉ tiêu theo dõi: số mẫu sống, số mẫu chết, số mẫu nhiễm, số mẫu nảy chồi.

** Xác định môi trường nuôi cấy cơ bản cho các dòng keo lai nghiên cứu*

Kế thừa các kết quả nghiên cứu trước đây (Đoàn Thị Mai, Lê Sơn *et al.*, 2011), môi trường MS được xác định là môi trường nuôi cấy thích hợp cho keo lai, vì vậy thí nghiệm xác định môi trường nuôi cấy cơ bản cho các dòng keo lai nghiên cứu trong bài báo này được triển khai dựa trên sự thay đổi về tỷ lệ, thành phần các chất đa lượng, vi lượng và vitamin của môi trường này gồm: (1) Môi trường MS cơ bản (MS) (Murashige, Skoog, 1962), (2) Môi trường MS cải tiến cho keo lai theo Đoàn Thị Mai và đồng tác giả (2011) (MS1), và (3) Môi trường MS cải tiến cho các dòng keo lai nghiên cứu (MS2). So với môi trường MS và MS1 đã công bố, một số chất đa lượng ở môi trường MS2 được bổ sung hàm lượng cao hơn, cụ thể: KH₂PO₄ 225 mg/l, CaCl₂ 440 mg/l, H₃BO₃ 9,3 mg/l, MnSO₄ 33,7 mg/l, ZnSO₄ 12,9 mg/l, myo-inositol 150 mg/l, acid nicotinic 1,0 mg/l. Ngoài ra, môi trường MS2 cũng được bổ sung thêm KI, biotin, axit ascorbic, PVP và casein. Các chỉ tiêu theo dõi: số chồi/cụm, chiều cao chồi.

** Xác định ảnh hưởng của BAP và Kinetin đến phát triển chồi của các dòng keo lai nghiên cứu*

Kế thừa các kết quả nghiên cứu về keo lai trước đây (Đoàn Thị Mai, Lê Sơn *et al.*, 2011), 7 công thức thí nghiệm xác định ảnh hưởng

của các chất kích thích sinh trưởng (BAP và Kinetin) ở các nồng độ 1,0; 1,5 và 2,0 mg/l. Các chỉ tiêu theo dõi: số chồi/cụm, chiều cao chồi, số lượng chồi có chiều cao từ 2 cm trở lên.

** Xác định ảnh hưởng của NAA đến chất lượng chồi của các dòng keo lai nghiên cứu*

Sau khi đã xác định được môi trường tốt nhất trong trong nội dung 3, thí nghiệm xác định ảnh hưởng của sự phối hợp giữa Cytokinin và Auxin đến sự phát triển chồi của keo lai được tiến hành với việc bổ sung thêm NAA ở các nồng độ 0,25; 0,5; 0,75 và 1,0 mg/l. Các chỉ tiêu theo dõi: số chồi/cụm, chiều cao chồi, số lượng chồi có chiều cao từ 2 cm trở lên.

** Xác định ảnh hưởng của IBA và NAA đến ra rễ của các dòng keo lai nghiên cứu*

Các chồi đủ tiêu chuẩn cao trên 2 cm cứng cáp khỏe mạnh được cấy vào môi trường ra rễ là môi trường có 1/2 thành phần của MS2 và giảm 1/2 hàm lượng đường được bổ sung IBA hoặc NAA ở các nồng độ 0,5; 1,0; 1,5 và 2,0 mg/l. Các chỉ tiêu theo dõi: số ra rễ, chiều cao rễ, số rễ/chồi.

2.2.3. Xử lý số liệu

Các thí nghiệm được bố trí với 3 lần lặp và 30 mẫu/lặp/công thức. Kiểm tra ảnh hưởng của các nhân tố thí nghiệm đến các chỉ tiêu nghiên cứu trong các thí nghiệm bằng phương pháp phân tích phương sai.

+ Tính F_A:
$$F_A = \frac{n-a}{n-1} \cdot \frac{V_A}{V_N}$$

Nếu F_A < F_{0,05} tra bảng với bậc tự do k₁ = a - 1 và k₂ = n - a thì nhân tố A tác động đồng đều lên kết quả thí nghiệm.

Nếu F_A > F_{0,05} tra bảng với bậc tự do k₁ = a - 1 và k₂ = n - a thì nhân tố A tác động không đồng đều đến kết quả thí nghiệm.

Quá trình xử lý số liệu được thực hiện trên phần mềm Excel và SPSS.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Ảnh hưởng của hóa chất và thời gian khử trùng đối với các dòng keo lai nghiên cứu

Khử trùng mẫu là giai đoạn đầu của quá trình nuôi cấy *in vitro*, có vai trò quan trọng trong việc tạo nguồn vật liệu ban đầu cho các giai đoạn nuôi cấy tiếp theo. Hiện nay, phương pháp hóa học được sử dụng phổ biến để khử trùng mẫu cấy. Những hóa chất có tác dụng diệt khuẩn được sử dụng phổ biến trong nuôi

cấy mô tế bào thực vật như: $HgCl_2$, $NaClO$, $Ca(OCl)_2$, H_2O_2 , $AgNO_3$, các chất kháng sinh (Nguyễn Đức Thành, 2000)... cũng có thể bổ sung thêm Tween 20, Tween 80,... hoặc xử lý bằng cồn 70^0 để tăng độ xâm nhập và bám dính của các chất diệt khuẩn vào bề mặt mẫu cấy. Nghiên cứu này sử dụng $HgCl_2$ và $Ca(OCl)_2$ làm chất khử trùng. Kết quả thí nghiệm nghiên cứu ảnh hưởng của hóa chất và thời gian đến kết quả khử trùng đối với các dòng keo lai được thể hiện tại bảng 1.

Bảng 1. Ảnh hưởng của các loại hóa chất và thời gian khử trùng lên các dòng keo lai

Hóa chất	Thời gian (phút)	CT	Tỷ lệ mẫu sống (%)	Tỷ lệ mẫu nhiễm (%)	TLNCHH (%)
$HgCl_2$ 0,05%	3	1	93,1±1,7	57,6±2,6	4,4±0,9
	5	2	91,2±1,3	51,2±3,1	8,2±1,9
	7	3	86,2±2,1	36,4±1,8	27,9±2,1
	9	4	69,1±2,2	29,1±1,5	21,3±2,3
	11	5	61,2±2,6	25,2±1,3	25,1±2,8
$HgCl_2$ 0,1%	3	6	88,9±2,0	51,9±1,9	12,4±1,9
	5	7	85,2±2,1	38,3±1,4	37,5±2,8
	7	8	75,3±2,0	27,9±1,3	28,6±2,3
	9	9	63,9±1,4	19,8±2,0	23,2±2,5
	11	10	53,1±1,4	16,3±1,6	18,4±2,3
$Ca(OCl)_2$ 5%	5	11	97,6±0,6	97,6±0,7	1,1±0,3
	10	12	95,2±0,5	92,4±0,7	1,3±0,6
	15	13	89,4±0,8	88,3±1,2	2,9±0,9
	20	14	83,6±1,0	86,2±1,4	3,2±1,3
	25	15	81,6±1,3	81,4±1,0	5,4±1,4
$Ca(OCl)_2$ 10%	5	16	97,1±1,3	91,1±1,2	1,6±0,4
	10	17	94,2±1,2	87,1±0,5	2,5±0,6
	15	18	88,3±1,7	80,9±1,9	3,9±0,9
	20	19	82,1±1,2	76,5±0,9	5,1±1,2
	25	20	80,4±1,5	70,1±1,8	6,4±0,9
$F_{tính}$			22,90	71,84	6,22
$F_{bảng}$			$(0,05; 19; 40) = 1,85$		

Kết quả phân tích số liệu cho thấy: tỷ lệ mẫu sống, tỷ lệ mẫu nhiễm và tỷ lệ mẫu nảy chồi ở 20 công thức thí nghiệm với keo lai đều có sự sai khác rõ rệt ($F_{tính} > F_{.05}$).

Trong 2 loại hóa chất được sử dụng thì $HgCl_2$ cho hiệu quả khử trùng cao hơn hẳn so với $Ca(OCl)_2$ (bảng 1). Kết quả này cũng tương tự như một số nghiên cứu trước đây cho một số đối tượng cây rừng và các dòng keo lai mới được tuyển chọn (Nguyễn Ngọc Tân *et al.*, 1997; Đoàn Thị Mai *et al.*, 2009; Đoàn Thị Mai, Lê Sơn *et al.*, 2011). Như vậy, $HgCl_2$ mặc dù có những hạn chế nhất định (có tính độc mạnh cho con người và môi trường) nhưng vẫn

là chất rất thích hợp trong nghiên cứu khử trùng mẫu vật cho các giống cây rừng.

Trong các công thức thí nghiệm, việc sử dụng $HgCl_2$ 0,1% trong khoảng thời gian 5 phút đem lại hiệu quả khử trùng tốt nhất, cho tỷ lệ mẫu sống là 85,2%, tỷ lệ mẫu nhiễm là 38,3% và tỷ lệ nảy chồi hữu hiệu (TLNCHH) đạt tới 37,5%.

Giữa các giống khác nhau, hiệu quả khử trùng ở công thức tốt nhất cũng có sự sai khác rõ rệt ($F_{tính} > F_{0,05}$) (bảng 2). Trong 3 giống keo lai nghiên cứu thì hiệu quả khử trùng tốt nhất ở giống BV376 với tỷ lệ nảy chồi hữu hiệu đạt 51,6%, trong khi tỷ lệ nhiễm chỉ là 35,9%.

Bảng 2. Hiệu quả khử trùng đối với từng giống nghiên cứu

Dòng	CT khử trùng tốt nhất	Tỷ lệ nhiễm (%)	TLNCHH (%)
BV586	$HgCl_2$ 0,1 - 5 phút	31,7±1,2	44,2±1,5
BB055	$HgCl_2$ 0,1 - 5 phút	32,6±2,5	41,3±3,5
BV376	$HgCl_2$ 0,1 - 5 phút	35,9±0,6	51,6±1,7
$F_{tính}$		29,89	111,64
$F_{0,05}$ tra bảng		$F_{(0,05; 3; 8)} = 4,06$	

Kết quả này tương tự như các nghiên cứu trước đây về nhân giống cho các dòng keo lai tự nhiên BV71, BV73, BV75 trong nghiên cứu của Đoàn Thị Mai, Lê Sơn và đồng tác giả (2011). Các dòng cũng đã được khử trùng bằng $HgCl_2$ nồng độ 0,1% với 8 - 10 phút cho tỷ lệ mẫu nhiễm thấp (chỉ từ 58,52 - 72,59%) và tỷ lệ bật chồi khá cao (đạt từ 8,15 - 11,11%). Tuy nhiên, ở một nghiên cứu khác, tác giả Girijashankar (2010) 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 cho các dòng keo lai nghiên cứu.

3.2. Kết quả xác định môi trường nuôi cấy cơ bản cho các dòng keo lai nghiên cứu

Môi trường có vai trò quan trọng quyết định khả năng phân chia, phân hóa và hình thái của các mẫu cấy vì nó là nguồn cung cấp

dinh dưỡng duy nhất cho mẫu vật nuôi cấy. Việc xác định môi trường nuôi cấy cơ bản là tiền đề để có thể thiết kế các thí nghiệm nhằm xác định môi trường nhân chồi, xác định môi trường ra rễ cho các đối tượng nghiên cứu.

Kết quả thí nghiệm cho thấy, môi trường MS1 đã được sử dụng để nuôi cấy các dòng keo lai tự nhiên thành công trước đây (Nguyễn Ngọc Tân *et al.*, 1995; Nguyễn Ngọc Tân *et al.*, 1997; Đoàn Thị Mai *et al.*, 2009, Đoàn Thị Mai, Lê Sơn *et al.*, 2011; Lê Sơn *et al.*, 2013) song lại không cho kết quả cao khi sử dụng để nuôi cấy các dòng keo lai mới chọn tạo (bảng 3). Trong các môi trường đã thử nghiệm, môi trường MS2 là thích hợp nhất cho quá trình tái sinh trong nuôi cấy, từ đó môi trường này được sử dụng để cấy khởi động nhằm tạo ra một số lượng chồi đủ lớn, sạch bệnh và tương đối đồng đều về mặt sinh lý cho những

thí nghiệm tiếp theo. Khi sử dụng môi trường này, các đối tượng nghiên cứu có hệ số nhân chồi (HSNC) cao hơn sử dụng các loại môi trường còn lại, đạt từ 3,3 - 3,7 và chiều dài

trung bình của chồi cũng đạt từ 3,2 - 3,5 cm (bảng 3). Các chồi mới tạo được khi nuôi cấy trong môi trường MS2 cũng có chất lượng khá tốt: thân chồi cứng cáp, lá phát triển.

Bảng 3. Ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy đến các dòng keo lai

Môi trường	Dòng BV376		Dòng BV586		Dòng BB055	
	HSNC	Chiều dài chồi (cm)	HSNC	Chiều dài chồi (cm)	HSNC	Chiều dài chồi (cm)
MS	2,3±0,8	2,7±1,2	3,1±1,2	3,1±0,9	2,2±1,0	2,8±1,1
MS1	2,5±0,6	3,1±1,1	2,6±1,1	2,7±1,0	2,4±1,1	3,1±1,1
MS2	3,3±0,7	3,2±0,9	3,7±1,2	3,4±1,1	3,4±1,2	3,5±1,1
$F_{tính} = 5,34 > F_{tra\ bảng} = 3,42$						

Như vậy, các môi trường được cải tiến dựa trên môi trường MS cơ bản rất thích hợp cho nuôi cấy mô keo lai do có thành phần, tỷ lệ giữa các nguyên tố đa lượng, vi lượng và vitamin phù hợp cho sự sinh trưởng và phát triển của keo lai nói chung hơn là các môi trường khác (Đoàn Thị Mai, Lê Sơn *et al.*, 2011). Kết quả này một lần nữa cho thấy, đối với keo lai nói chung, mỗi dòng lại có phản ứng khác nhau với môi trường nuôi cấy. Vì thế, các nghiên cứu xác định môi trường nhân giống thích hợp cho từng đối tượng nghiên cứu là cần thiết.

3.3. Ảnh hưởng của BAP và Kinetin đến chất lượng chồi của các dòng keo lai nghiên cứu

Để xác định môi trường nhân chồi thích hợp cho các đối tượng nghiên cứu, môi trường MS2 đã được xác định ở thí nghiệm trên được sử dụng làm môi trường cơ bản cho các thí nghiệm tiếp theo. Việc lựa chọn chất kích thích sinh trưởng cũng như các nồng độ khác nhau để xác định môi trường nhân chồi thích hợp cho các đối tượng nghiên cứu được thiết lập dựa trên các kết quả nghiên cứu về nhân giống cho keo lai tự nhiên trước đây của Nguyễn Ngọc Tân và đồng tác giả (1997), Đoàn Thị Mai, Lê Sơn và đồng tác giả (2011) với các nồng độ 1,0 mg/l; 1,5 mg/l và 2,0 mg/l. Kết quả thí nghiệm xác định ảnh hưởng của BAP và Kinetin (Kn) đến khả năng tạo chồi của các dòng keo lai được trình bày tại bảng 4.

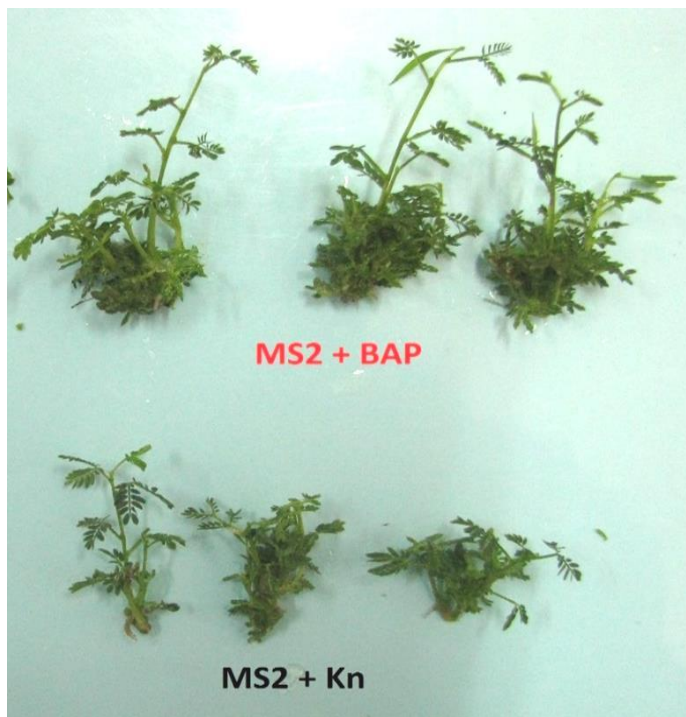
Bảng 4. Ảnh hưởng của BAP và Kn đến khả năng nhân chồi keo lai sau 25 ngày nuôi cấy

Môi trường MS2 +	Ký hiệu	Dòng BV376		Dòng BV586		Dòng BB055	
		HSNC	Chiều dài chồi (cm)	HSNC	Chiều dài chồi (cm)	HSNC	Chiều dài chồi (cm)
BAP 1,0 mg/l	1	3,9±1,2	3,5±1,1	4,5±1,3	3,5±1,1	3,8±1,2	3,9±1,3
BAP 1,5 mg/l	2	4,5±1,3	3,9±1,3	4,6±1,4	3,6±1,2	4,4±1,3	4,4±1,2
BAP 2,0 mg/l	3	4,2±1,1	3,6±1,2	4,8±1,3	3,5±1,1	3,9±1,2	4,3±1,2
Kn 1,0 mg/l	4	3,4±1,2	3,2±1,1	4,1±1,3	3,5±1,2	3,6±1,1	3,5±1,1
Kn 1,5 mg/l	5	3,7±1,2	3,4±1,3	4,3±1,2	3,6±1,1	3,8±1,2	3,7±1,2
Kn 2,0 mg/l	6	3,5±1,1	3,3±1,2	4,2±1,3	3,4±1,3	3,5±1,3	3,6±1,1
0	ĐC	3,3±0,7	3,2±0,9	3,7±1,2	3,4±1,1	3,4±1,2	3,5±1,1
$F_{tính} = 5,34 > F_{tra\ bảng} = 3,4$							

Kết quả thí nghiệm cho thấy, BAP có tác dụng rõ lên quá trình tạo chồi của các dòng keo lai khi so sánh với công thức đối chứng (không sử dụng chất kích thích sinh trưởng) hay khi sử dụng chất kích thích sinh trưởng là Kn ở cùng nồng độ (bảng 4, hình 1).

Môi trường bổ sung BAP ở nồng độ 1,5 mg/l có hệ số nhân chồi đạt được cao nhất là từ 4,4 đến 4,5 tùy thuộc vào các dòng thí nghiệm. Khi sử dụng công thức này, các chồi tạo được cũng có chiều cao trung bình cao hơn hẳn các công thức còn lại (3,9 - 4,5 cm). Môi trường được bổ sung BAP ở nồng độ 2,0 mg/l cũng cho hệ số nhân chồi tương đối cao đối với dòng keo lai BV586 (HSNC đạt 4,8) tuy nhiên

chiều cao chồi chỉ đạt 3,5 cm (trong khi chỉ số này đạt 3,6 cm khi nuôi cấy trong môi trường bổ sung BAP nồng độ 1,5 mg/l). Do đó, môi trường MS2 có bổ sung BAP nồng độ 1,5 mg/l được chọn làm môi trường nuôi cấy chung cho cả 3 dòng keo lai nghiên cứu. Kết quả này cũng tương tự như trong các nghiên cứu trước đây về nhân giống các dòng keo lai, Keo lá tràm mới được chọn lọc (Đoàn Thị Mai, Lê Sơn *et al.*, 2011, Nguyễn Ngọc Tân *et al.*, 1995, Nguyễn Ngọc Tân *et al.*, 1997, Lê Sơn *et al.*, 2013) chứng tỏ với keo lai nói chung môi trường có bổ sung BAP nồng độ 1,5 mg/l hoặc 2,0 mg/l là tương đối phù hợp cho quá trình nhân chồi.



Hình 1. Các cụm chồi keo lai được nuôi cấy trong các công thức môi trường nhân chồi MS2 được bổ sung BAP (hàng trên) và Kinetin (hàng dưới)

3.4. Ảnh hưởng của NAA đến nâng cao chất lượng chồi cho các dòng keo lai nghiên cứu

Đối với keo, để chuẩn bị cho quá trình ra rễ cần phải nâng cao chất lượng chồi. Mục đích của giai đoạn này là tăng số lượng chồi có đủ tiêu chuẩn cho quá trình ra rễ. Thông thường môi

trường nuôi cấy sẽ được bổ sung thêm auxin ở các nồng độ khác nhau tùy thuộc vào đối tượng nghiên cứu. Môi trường MS2 có bổ sung BAP nồng độ 1,5 mg/l đã được xác định cho quá trình nhân nhanh số lượng chồi cho keo lai. Tuy nhiên, khi sử dụng môi trường này, tỷ lệ chồi

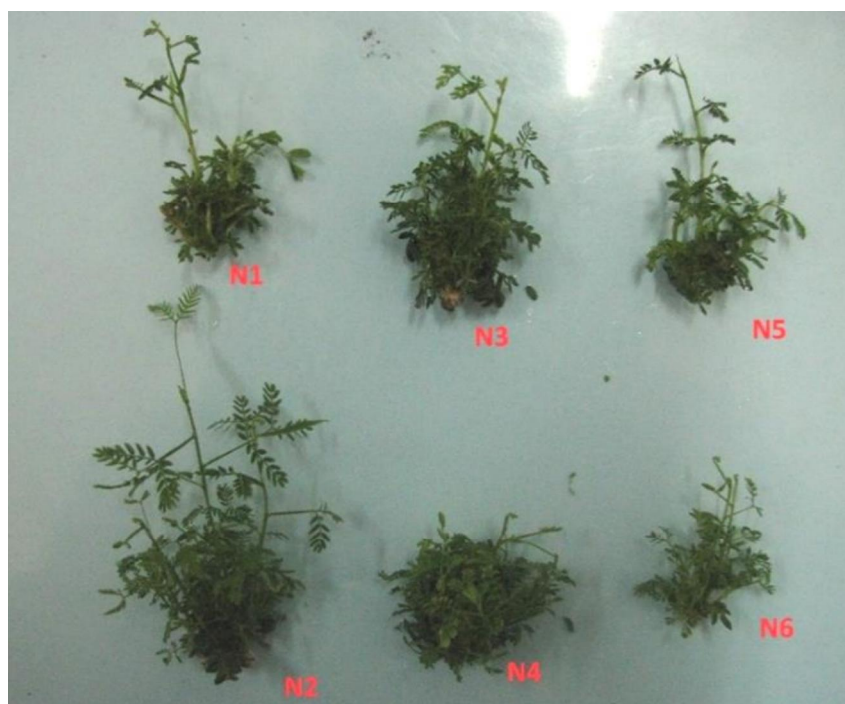
hữu hiệu thu được cho quá trình ra rễ là chưa cao, do đó để nâng cao chất lượng các chồi tạo được chuẩn bị cho ra rễ môi trường này còn được bổ sung thêm NAA ở các nồng độ 0,25; 0,5; 0,75; 1,0; 1,25 và 1,5 gm/l. Số liệu thu thập sau 30 ngày nuôi cấy được trình bày tại bảng 5.

Bảng 5. Ảnh hưởng của NAA nâng cao chất lượng cụm chồi keo lai sau 30 ngày nuôi cấy

MS2 + BAP 1,5 mg/l + NAA (mg/l)	Ký hiệu	Dòng BV376		Dòng BV586		Dòng BB055	
		HSNC	Chiều dài chồi (cm)	HSNC	Chiều dài chồi (cm)	HSNC	Chiều dài chồi (cm)
0,25	N1	3,8±1,2	4,1±1,1	4,7±1,4	4,2±1,2	4,5±2,1	4,5±1,3
0,5	N2	5,5±2,3	5,8±1,9	5,1±2,1	5,2±1,5	4,9±1,2	5,5±1,4
0,75	N3	5,3±2,5	5,6±1,8	4,7±1,3	4,8±1,1	4,7±1,3	5,2±1,5
1,0	N4	4,7±2,2	4,4±2,5	4,4±1,7	4,7±1,4	4,2±1,6	4,9±2,1
1,25	N5	4,5±1,4	4,2±1,9	4,3±1,3	4,2±1,1	6,1±2,1	4,6±1,6
1,5	N6	4,8±1,7	3,9±1,2	4,0±1,2	4,1±1,5	5,8±1,6	4,3±1,7
0	ĐC	4,5±1,3	3,9±1,3	4,6±1,4	3,6±1,2	4,4±1,3	4,4±1,2
$F_{tính}=6,81 > F_{tra\ bảng} = 3,67$							

Kết quả thí nghiệm cho thấy, khi bổ sung thêm NAA vào môi trường nuôi cấy, không chỉ có chỉ tiêu hệ số nhân chồi thu được cao hơn so với khi sử dụng BAP riêng lẻ mà chất lượng

các chồi thu được (số đốt lá, màu sắc và hình thái chồi) cũng như chiều cao chồi cũng tăng lên đáng kể (bảng 5).



Hình 2. Các chồi keo lai dòng BV568 sau 30 ngày nuôi cấy trong các công thức thí nghiệm khác nhau

Công thức môi trường MS2 + BAP 1,5 mg/l + NAA 0,5 mg/l cho hệ số nhân chồi (HSNC) cao nhất đạt từ 4,9 đến 5,8 tùy thuộc vào từng dòng đồng thời số chồi thu được có chất lượng tốt, tương đối đồng đều (bảng 5, hình 2), số chồi có chiều cao từ 3 cm trở nên đạt khoảng 60% của tổng số chồi thu được, có nghĩa là cứ 10 chồi tạo được thì có trung bình 6 chồi đủ chất lượng cho quá trình ra rễ. Nếu trong môi trường không bổ sung NAA (ĐC) số chồi đủ chất lượng cho quá trình ra rễ chỉ đạt 30 đến 40%, thì rõ ràng việc bổ sung này có ý nghĩa rất lớn cho quá trình nhân nhanh của các dòng keo lai thí nghiệm.

3.5. Ảnh hưởng của IBA và NAA đến khả năng ra rễ của các dòng keo lai nghiên cứu

Để xác định môi trường ra rễ thích hợp cho từng đối tượng nghiên cứu. Môi trường cơ bản được sử dụng là một nửa các chất đa lượng và vi lượng của môi trường MS cải tiến (1/2MS2) được bổ sung thêm các auxin: IBA và NAA ở các nồng độ khác nhau. Các chồi có chiều cao từ 2,0 cm có đủ chất lượng được chọn lọc và cấy vào môi trường ra rễ, nuôi cấy trong điều kiện nhân tạo, sau 5 - 7 ngày rễ bắt đầu xuất hiện và sau 14 - 16 ngày cấy, các chồi ra rễ được đo đếm các số liệu về tỷ lệ ra rễ, chiều dài rễ và số rễ trên chồi.

Bảng 6. Kết quả thí nghiệm kích thích tạo rễ cho các dòng keo lai BV376, BV586 và BB055

Môi trường 1/2 MS2 +	Ký hiệu	Dòng BV376			Dòng BV586			Dòng BB055		
		Tỷ lệ ra rễ (%)	Chiều dài rễ (cm)	Số rễ trung bình (cái)	Tỷ lệ ra rễ (%)	Chiều dài rễ (cm)	Số rễ trung bình (cái)	Tỷ lệ ra rễ (%)	Chiều dài rễ (cm)	Số rễ trung bình (cái)
IBA 0,5 mg/l	I1	65,25	3,5	3,2	67,36	3,7	3,4	67,12	3,7	3,4
IBA 1,0 mg/l	I2	71,23	4,2	3,5	73,48	4,8	3,7	73,4	4,3	3,9
IBA 1,5 mg/l	I3	79,45	3,8	4,2	81,27	4,2	4,5	81,06	3,7	4,1
IBA 2,0 mg/l	I4	73,36	3,2	4,5	79,24	3,5	4,6	82,45	3,2	4,3
NAA0,5 mg/l	N1	55,24	4,2	2,6	62,47	3,7	3,1	58,14	3,8	3,2
NAA1,0 mg/l	N2	58,35	3,5	3,1	65,46	3,9	3,5	60,53	4,2	3,6
NAA1,5 mg/l	N3	60,48	3,2	3,4	67,23	4,4	3,6	65,45	3,6	3,8
NAA2,0 mg/l	N4	58,52	3,3	3,7	62,6	3,8	3,8	62,18	3,2	4,0
0	ĐC	30,24	1,7	1,4	55,20	2,0	1,7	33,43	1,9	1,8
		F _A = 12,3 > F _{tra bảng} = 6,2						/t/ = 22,1 > t _{tra bảng} = 3,1		

Kết quả cho thấy, đối với các dòng keo lai mới nghiên cứu, IBA có tác dụng mạnh mẽ đến quá trình tạo rễ (bảng 6, hình 3). Tỷ lệ chồi ra rễ thu được của tất cả các dòng nghiên cứu bổ sung IBA đều cao hơn so với bổ sung NAA. Tỷ lệ ra rễ trong môi trường có bổ sung IBA đạt từ 65,25 đến 82,45%, trong khi sử dụng NAA để kích thích tạo rễ thì tỷ lệ này chỉ đạt từ 55,24 đến 67,23%, và đều cao hơn so với các công thức đối chứng chỉ cho tỷ lệ ra rễ đạt từ 30,24 đến 55,20% (bảng 6). Mặt khác, khi

sử dụng IBA với nồng độ cao, chỉ tiêu số rễ trung bình/chồi đạt cao hơn so với khi sử dụng chất kích thích tạo rễ ở nồng độ thấp hơn nhưng chiều dài rễ trung bình và chất lượng rễ tạo được lại thấp hơn.

Môi trường có bổ sung IBA nồng độ 1,5 mg/l cho tỷ lệ ra rễ thấp nhất đạt 79,45% và cao nhất đạt 81,27%, trong khi đó nếu sử dụng môi trường có IBA nồng độ 2,0 mg/l thì tỷ lệ ra rễ lại giảm với hai trên ba dòng keo lai nghiên cứu, và chỉ tiêu chiều dài rễ cũng giảm đi. Điều

này chứng tỏ, nồng độ IBA cao ảnh hưởng tới quá trình trao đổi chất, từ đó kìm hãm sự phân chia tế bào và quá trình tạo rễ của các dòng keo lai nghiên cứu. Mặc dù, môi trường 1/2 MS2 có bổ sung IBA nồng độ 2,0 mg/l cho tỷ lệ ra rễ dòng BB055 cao hơn so với nồng độ 1,5 mg/l nhưng sự khác nhau là không đáng kể (82,45 và 81,06%). Từ đó, có thể kết luận với các

dòng keo lai thí nghiệm môi trường tạo rễ thích hợp nhất là môi trường 1/2MS2 + IBA nồng độ 1,5 mg/l.

Bảng 6 cũng cho thấy, cùng loại chất, cùng nồng độ, đối với các dòng keo lai khác nhau thì khả năng ra rễ cũng khác nhau. Trong 3 dòng keo lai nghiên cứu, dòng BV586 cho tỷ lệ ra rễ cao hơn so với các dòng còn lại.



Hình 3. Các chồi keo lai dòng BB055 ra rễ trong môi trường có bổ sung IBA (hàng trên) và NAA (hàng dưới)

IV. KẾT LUẬN

1 - Phương pháp khử trùng thích hợp cho các dòng keo lai nghiên cứu là sử dụng dung dịch $HgCl_2$ nồng độ 0,1% trong vòng 5 phút cho tỷ lệ bật chồi hữu hiệu đạt 37,5%.

2 - Môi trường nuôi cấy cơ bản cho các dòng keo lai nghiên cứu là môi trường MS cải tiến về thành phần và nồng độ các chất đa lượng, vi lượng (kí hiệu MS2).

3 - Môi trường nhân chồi thích hợp cho các dòng keo lai BV376, BV586 và BB055 là môi trường MS2 có bổ sung BAP nồng độ 1,5 mg/l và NAA 0,5 mg/l.

4 - Môi trường ra rễ thích hợp cho các dòng keo lai nghiên cứu là 1/2MS2 + IBA nồng độ 1,5 - 2,0 mg/l cho tỷ lệ ra rễ trên 80%.

Kết quả nghiên cứu là cơ sở quan trọng cho việc xây dựng quy trình nhân giống bằng nuôi cấy mô cho các dòng keo lai mới chọn tạo từ đó tiến hành công tác chuyển giao giống và quy trình nhân giống cho các đơn vị nghiên cứu và sản xuất giống cây lâm nghiệp để phát triển các giống mới này vào trồng rừng sản xuất.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này là một phần kết quả của chương trình cải thiện giống keo lai do Viện Nghiên cứu Giống và Công nghệ Sinh học thực hiện. Xin chân thành cảm ơn Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn đã tài trợ kinh phí cho nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Đoàn Thị Mai, Lê Sơn, 2011. 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. Báo cáo tổng kết đề tài KHCN, Viện Khoa học Lâm nghiệp Việt Nam.
2. Đoàn Thị Mai, Nguyễn Thị Mỹ Hương, Vũ Thị Ngọc, Trần Thanh Hương, Văn Thu Huyền, 2009. Nuôi cấy một số giống keo lai mới chọn tạo, Tạp chí Khoa học Lâm nghiệp số 2, trang 905 - 910.
3. Girijashankar V., 2012. *In vitro* regeneration of *Eucalyptus camaldulensis*. *Physiol Mol Biol Plants*, 18 (1): 79 - 87.
4. Lê Sơn, 2013. Hoàn thiện quy trình nhân nhanh bằng nuôi cấy mô cho 6 giống keo lai đã được công nhận. Báo cáo dự án SXTN cấp Nhà nước, Viện Khoa học Lâm nghiệp Việt Nam.
5. Murashige T. and Skoog. F, 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiology Plant* 15: 473 - 478.
6. Nguyễn Ngọc Tân, 1995. Nhân giống keo lai bằng nuôi cấy mô phân sinh. In trong Kết quả nghiên cứu khoa học công nghệ giai đoạn 1990 - 1995. NXB Nông nghiệp, Hà Nội.
7. Nguyễn Ngọc Tân, Trần Hồ Quang, Ngô Thị Minh Duyên, 1997. Nhân giống keo lai bằng nuôi cấy mô phân sinh. In trong Kết quả nghiên cứu khoa học về chọn giống cây rừng, Tập 2, Chủ biên Lê Đình Khả, NXB Nông nghiệp, Hà Nội.
8. Nguyễn Đức Thành, 2000. Nuôi cấy mô tế bào thực vật - Nghiên cứu và ứng dụng. NXB Nông nghiệp, Hà Nội. 199 trang.

Email tác giả liên hệ: vanthuhuyen.fsiv@gmail.com

Ngày nhận bài: 08/06/2021

Ngày phản biện đánh giá và sửa chữa: 11/06/2021

Ngày duyệt đăng: 14/06/2021