

NGHIÊN CỨU NHÂN GIỐNG CÁC DÒNG KEO LAI MỚI (*Acacia mangium* × *Acacia auriculiformis*) BV350 VÀ BV523 BẰNG PHƯƠNG PHÁP NUÔI CẤY MÔ TẾ BÀO

Tạ Thu Trang¹, Khuất Thị Hải Ninh², Đỗ Hữu Sơn¹, Cấn Thị Lan¹
Kiều Thị Hà¹, Nguyễn Thị Thu Dung¹

¹Trung tâm Thực nghiệm và Chuyển giao Giống cây rừng,
Viện Nghiên cứu Giống và Công nghệ Sinh học Lâm nghiệp

²Trường Đại học Lâm nghiệp

TÓM TẮT

Nghiên cứu nhân giống các dòng keo lai mới (*Acacia mangium* × *Acacia auriculiformis*) BV350 và BV523 bằng phương pháp nuôi cấy mô tế bào sẽ góp phần hoàn thiện quy trình chọn tạo giống keo lai mới. Kết quả nghiên cứu nhân giống bằng phương pháp nuôi cấy mô hai dòng keo lai mới cho thấy việc sử dụng chồi vượt hay chồi nách làm vật liệu vào mẫu, khử trùng bằng HgCl₂ 0,1% trong thời gian 7 phút cho hiệu quả cao nhất: tỷ lệ mẫu sạch nảy chồi (HSNC) hữu hiệu ở hai dòng keo lai BV350 và BV523 lần lượt là 40,4% và 42,6%. Tuy nhiên, việc sử dụng javen 3 - 5% trong thời gian 7 phút cũng cho hiệu quả khá tốt với tỷ lệ mẫu sạch nảy chồi hữu hiệu ở hai dòng keo lai mới lần lượt là 31,9% và 33,7%. Để giảm bớt độc hại cho người dùng và cho môi trường thì việc dùng javel trong khử trùng được khuyến khích hơn là dùng HgCl₂ mặc dù hiệu quả kém hơn. Các chồi hữu hiệu được tái sinh trong môi trường Murashige và Skoog cải tiến (MS*) có bổ sung 1 mg/l BAP. Hệ số nhân chồi cao nhất đạt được trong môi trường MS* + 1,0 mg/l BAP + 0,5 mg/l kinetin (BV350 có HSNC: 2,66 lần; BV523 có HSNC: 2,78 lần). Tỷ lệ chồi hữu hiệu cao nhất đạt được trong môi trường MS* + 1,0 mg/l BAP + 0,5 mg/l Kn + 1,0g/l AC (dòng keo lai BV350 có tỷ lệ chồi hữu hiệu và chiều cao của chồi lần lượt là 87% và 3,75 cm; BV523 có tỷ lệ chồi hữu hiệu và chiều cao của chồi lần lượt là 88% và 3,7 cm). Chồi hữu hiệu đạt tiêu chuẩn được ra rễ trong môi trường 1/2MS* + 2 mg/l IBA, tỷ lệ ra rễ đạt 86,7% và 92,2% với hai dòng keo lai tương ứng. Thời gian huấn luyện 7 ngày cho tỷ lệ cây con sống ở ngoài vườn ươm cao với hai dòng keo lai lần lượt là 84,4% và 82,2%.

Từ khóa: keo lai, nuôi cấy mô

Study on propagation of new acacia hybrid clones (*Acacia mangium* × *Acacia auriculiformis*) BV350 and BV523 by tissue culture method

Study on propagating of new acacia hybrid clones (*Acacia mangium* × *Acacia auriculiformis*) BV350 and BV523 by tissue culture method was investigated. The results has a the potential to contribute to completing the process of selecting and creating new acacia hybrids. The results of propagation by tissue culture method of two new acacia hybrid lines showed that the use of overshoot or axillary buds as the sample material, sterilization with 0.1% HgCl₂ for 7 minutes provided the highest efficiency. The effective budding (HSNC) of two acacia hybrid lines BV350 and BV523 were 40.4% and 42.6%, respectively. However, the use of 3 - 5% javen for 7 minutes also gave good results with the effective percentage of clean samples budding of two new acacia hybrid lines were 31.9% and 33.7%, respectively. To reduce toxicity to users and the environment, the

Keywords: acacia hybrid, tissue culture

use of javel in disinfection is recommended over HgCl₂ although less effective. Effective shoots were regenerated in modified Murashige and Skoog medium (MS*) supplemented with 1 mg/l BAP. The highest shoot multiplication coefficient was obtained in MS* + 1.0 mg/l BAP + 0.5 mg/l kinetin medium (BV350 has HSNC: 2,66 times; BV523 has HSNC: 2,78 times). The highest effective shoot ratio was obtained in MS* + 1.0 mg/l BAP + 0.5 mg/l Kn + 1.0 g/l AC medium (The effective shoot ratio and height of shoots of acacia hybrid BV350 were 87% and 3.75 cm, respectively; BV523 had effective shoot ratio and shoot height of 88% and 3.7 cm, respectively). Qualified effective shoots were rooted in 1/2MS* + 2 mg/l IBA medium, the rooting rate was 86.7% and 92.2% with two acacia hybrid lines respectively. The training time at 7 days gave a high percentage of seedlings survival. The survival rate of BV350 and BV523 lines was 84.4% and 82.2%, respectively.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Keo lai tự nhiên giữa Keo tai tượng và Keo lá tràm (*Acacia mangium* × *Acacia auriculiformis*) được phát hiện từ năm 1991 (Lê Đình Khá, 1999). Keo lai có các đặc điểm hình thái trung gian giữa Keo tai tượng và Keo lá tràm, có biên độ sinh thái rộng, phù hợp trên nhiều dạng lập địa, sinh trưởng nhanh, năng suất cao và có các tính chất gỗ đáp ứng tốt yêu cầu về gỗ nguyên liệu phục vụ cho ngành công nghiệp chế biến.

Từ các nghiên cứu về keo lai trước đây, đã chọn lọc và công nhận được một số dòng keo lai có năng suất cao, chất lượng tốt như giống keo lai BV10, BV16, BV32, BV33, BV71, BV73, BV75, TB1, TB6, TB11, TB12, AH1, AH7. Tuy nhiên, số lượng các giống keo lai được áp dụng vào trồng rừng sản xuất còn hạn chế, bên cạnh đó việc trồng rừng keo lai thuần loài trên diện tích lớn qua nhiều chu kỳ tiềm ẩn nhiều nguy cơ về an toàn sinh học và sâu bệnh hại. Vì vậy, việc nghiên cứu chọn tạo thêm các giống keo lai mới bổ sung vào cơ cấu cây trồng rừng là cần thiết.

Trong giai đoạn vừa qua, Viện Nghiên cứu Giống và Công nghệ sinh học Lâm nghiệp đã nghiên cứu chọn lọc và được công nhận các giống keo lai mới là BV586, BV584, BV523, BV434, BV376, BV350 và BB055. Những giống này có năng suất cao từ 30 - 35

m³/ha/năm, thân thẳng, ít cành nhánh nên rất thích hợp cho trồng rừng cung cấp gỗ xẻ. Để áp dụng rộng rãi vào sản xuất và đảm bảo năng suất, chất lượng của các giống thì phương pháp nhân giống bằng phương pháp nuôi cấy mô tế bào tối ưu nhất. Bên cạnh đó, các giống keo lai có phản ứng với điều kiện nuôi cấy khác nhau, do đó chúng ta cần tiến hành nghiên cứu nhân giống cho từng giống cụ thể.

Báo cáo này trình bày kết quả “Nghiên cứu nhân giống các dòng keo lai mới (*Acacia mangium* × *Acacia auriculiformis*) BV350 và BV523 bằng phương pháp nuôi cấy mô tế bào” nhằm hoàn thiện quy trình nuôi cấy, áp dụng vào sản xuất trên quy mô lớn.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Chồi bánh tẻ thu từ cây mẹ (1,0 - 1,5 tuổi) đã được trẻ hóa của các dòng keo lai BV350 và BV523 trồng tại vườn ươm Trung tâm Thực nghiệm và Chuyển giao Giống cây rừng, Viện Nghiên cứu Giống và Công nghệ sinh học Lâm nghiệp.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Mẫu vật nuôi cấy là các đoạn chồi đỉnh sinh trưởng có kích thước 10 - 15 cm lấy từ cây vật liệu gốc đã được xử lý tạo chồi; rửa thô dưới

vòi nước chảy; cọ rửa bằng xà phòng hoặc nước rửa chén; tráng rửa lại với nước cất vô trùng và cón 70⁰ trong vòng 30 giây - 1 phút; ngâm lác trong thủy ngân clorua (HgCl₂ 0,1%) hoặc javen 3 - 5% với thời gian khử trùng 3, 5, 7, 9 phút.

Mẫu nuôi cấy trong môi trường MS* (kế thừa kết quả nghiên cứu của giai đoạn trước đối với keo lai của Đoàn Thị Mai *et al.*, 2000 - 2010; Cán Thị Lan *et al.*, 2012 - 2014). Các chồi hữu hiệu được tái sinh trong môi trường MS* có bổ sung BAP (6 - benzylaminopurine) ở các nồng độ khác nhau: 0,5 mg/l; 1 mg/l; 1,5 mg/l và 2 mg/l. Tìm được nồng độ BAP tốt nhất tiến hành bổ sung Kinetin ở các mức nồng độ khác nhau: 0,25 mg/l; 0,5 mg/l; 0,75 mg/l và 1 mg/l. Sau khi đã chọn được môi trường nhân chồi tối ưu, tiến hành bổ sung than hoạt tính (AC) vào môi trường với hàm lượng khác nhau: 0,5 g/l; 1 g/l; 1,5 g/l và 2 g/l để tạo ra số lượng và chất lượng chồi đa trước khi bước vào giai đoạn ra rễ.

Thí nghiệm ra rễ được nuôi cấy trong môi trường 1/2MS* có bổ sung IBA (Indol butyric acid) (1 mg/l; 1,5 mg/l; 2 mg/l và 2,5 mg/l). Các bình cây mô ra rễ được huấn luyện dưới ánh sáng tán xạ trong thời gian 0; 7; 14 và 21 ngày trước khi cấy cây ra vườn ươm.

Mẫu nuôi cấy trong môi trường được hấp khử trùng ở điều kiện áp suất 1,2 atm, nhiệt độ 121°C trong thời gian 20 phút và có pH = 5,8;

Chế độ nuôi mẫu được thực hiện với cường độ chiếu sáng 2.000 - 3.000 lux, thời gian chiếu sáng 10 h, nhiệt độ phòng nuôi cây 25± 2°C và chu kỳ cấy chuyên 20 - 25 ngày.

Các thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên với 3 lần lặp, 30 mẫu/lặp. Các chỉ tiêu đo đếm số liệu như tỷ lệ nhiễm, tỷ lệ bật chồi hữu hiệu, số chồi/cụm, chiều dài chồi được thu thập và xử lý theo phương pháp phân tích thống kê toán học trên phần mềm Excel 5.0 và SPSS 16.0.

III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

3.1. Xác định chế độ khử trùng thích hợp cho các dòng keo lai

Để hoàn thiện một quy trình nhân giống *in-vitro* thì khâu vào mẫu là bước tạo mẫu nuôi cấy khởi đầu cho cả quá trình nuôi cấy. Phương pháp vô trùng mô cấy thông dụng nhất hiện nay là dùng các chất hóa học có hoạt tính diệt nấm khuẩn. Hiệu lực diệt nấm khuẩn của các chất này phụ thuộc vào thời gian xử lý, nồng độ và khả năng xâm nhập của chúng vào các kẽ ngách lồi lõm trên bề mặt mô nuôi cấy. Trong các chỉ tiêu để đánh giá hiệu quả khử trùng (loại hóa chất, nồng độ, thời gian) thì chỉ tiêu tỷ lệ mẫu nảy chồi hữu hiệu là yếu tố quan trọng nhất để quyết định chế độ khử trùng thích hợp. Kết quả nghiên cứu khử trùng cho các dòng keo lai được thể hiện ở bảng 1.

Bảng 1. Kết quả khử trùng các dòng keo lai

STT	Loại hóa chất	Thời gian khử trùng (phút)	Tỷ lệ mẫu nảy chồi hữu hiệu (%)	
			Dòng BV350	Dòng BV523
1	HgCl ₂ 0,1%	3	15,2	14,7
2		5	25,6	30,9
3		7	40,4	42,6
4		9	26,7	26,4
Sig.			0,002	0,0001
1	NaClO 5%	3	13,6	12,9
2		5	21,2	25,3
3		7	31,9	33,7
4		9	23,5	23,3
Sig			0,03	0,01

Kết quả phân tích cho thấy chỉ tiêu tỷ lệ mẫu nảy chồi hữu hiệu ở các công thức có sự sai khác rõ rệt (Sig. < 0,05). Điều đó chứng tỏ công thức khử trùng khác nhau sẽ ảnh hưởng rõ rệt đến khả năng nảy chồi hữu hiệu của hai dòng keo lai BV350 và BV523. Kết quả thí nghiệm cũng cho thấy, hai dòng keo lai BV350 và BV523 đều đạt hiệu quả khử trùng tốt nhất là HgCl₂ 0,1% trong thời gian 7 phút với tỷ lệ

mẫu nảy chồi hữu hiệu cho hai dòng keo lai nghiên cứu lần lượt là 40,4% và 42,6%. Kết quả khử trùng với NaClO 3 - 5% trong thời gian 7 phút với tỷ lệ mẫu nảy chồi hữu hiệu cho hai dòng keo lai BV350 và BV523 lần lượt là 31,9% và 33,7%. Với mục tiêu để giảm bớt độc hại cho người dùng và cho môi trường thì việc dùng javen trong khử trùng được khuyến khích hơn là dùng HgCl₂ mặc dù hiệu quả kém hơn.



Chồi keo lai sau khi khử trùng



Chồi keo lai BV350 khử trùng trong HgCl₂ 0,1%



Chồi keo lai BV350 khử trùng trong NaClO 3 - 5%



Chồi keo lai BV523 khử trùng trong HgCl₂ 0,1%



Chồi keo lai BV523 khử trùng trong NaClO 3 - 5%

Hình 1. Chồi hai dòng keo lai trong các công thức khử trùng với thời gian 7 phút sau 4 tuần

Trong các kết quả nghiên cứu của Đoàn Thị Mai và đồng tác giả (2003, 2009, 2011) về nhân giống cho các giống keo lai và bạch đàn đã sử dụng HgCl₂ 0,1% trong thời gian 8 - 10 phút và Triệu Thị Thu Hà & đồng tác giả (2014) về nhân giống Keo lá tràm sử dụng HgCl₂ 0,1% trong 5 phút cho hiệu quả tốt nhất. Tuy nhiên

để lựa chọn loại hóa chất, nồng độ và thời gian thích hợp phụ thuộc vào nhiều yếu tố (loài, loại mẫu, vị trí lấy mẫu, thời gian lấy, kích thước mẫu...), ngay cả khi trong cùng loài, trên cùng một cây vật liệu thì việc lựa chọn cũng khác nhau bởi đối tượng khác nhau sẽ có phản ứng không giống nhau với các hóa chất khử trùng.

3.2. Xác định môi trường tái sinh chồi, nhân chồi và nâng cao chất lượng chồi thích hợp cho 2 dòng keo lai

3.2.1. Ảnh hưởng của BAP đến khả năng tái sinh chồi đối với 2 dòng keo lai

Thành phần môi trường nuôi cấy là một trong những yếu tố quan trọng nhất quyết định sự tăng trưởng và phát triển hình thái của tế bào và mô thực vật trong quá trình nuôi cấy. Đối với các loài keo, môi trường MS (Murashige & Skoog, 1962) được công bố là môi trường cơ bản có thành phần dinh dưỡng phù hợp nhất cho quá trình nhân giống từ tái sinh chồi, đến nhân chồi và ra rễ (Darus H. Ahmas *et al.*,

1989 & 1994; Nguyễn Ngọc Tân *et al.*, 1995; Toda *et al.*, 1995; Đoàn Thị Mai *et al.*, 2000). Kế thừa các kết quả nghiên cứu của Lê Đình Khả và đồng tác giả (2003) và Đoàn Thị Mai và đồng tác giả (2003, 2009, 2011) về nhân giống *in vitro* cho các giống keo lai và bạch đàn. Sử dụng môi trường MS* được bổ sung các chất điều hòa sinh trưởng thuộc nhóm Cytokinin.

Nghiên cứu này đã sử dụng BAP ở các nồng độ 0,5 mg/l; 1,0 mg/l; 1,5 mg/l và 2,0 mg/l để xác định hiệu quả tái sinh chồi cho các dòng keo lai nghiên cứu. Kết quả nghiên cứu thu được thể hiện trong bảng 2.

Bảng 2. Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của BAP đến khả năng nhân chồi của đối tượng nghiên cứu

Dòng	Công thức	Nồng độ BAP (mg/l)	Hệ số nhân chồi (lần)	Chiều dài TB chồi (cm)	Chất lượng chồi
BV350	ĐC	0	1,20±0,04 ^c	1,81±0,03 ^d	+
	CT1	0,5	1,67±0,04 ^b	2,13±0,04 ^c	++
	CT2	1	2,22±0,06 ^a	2,54±0,05 ^a	+++
	CT3	1,5	2,21±0,03 ^a	2,38±0,05 ^b	++
	CT4	2	2,09±0,03 ^a	2,13±0,04 ^c	++
Sig.			0,0001		
BV523	ĐC	0	1,36±0,03 ^d	1,94±0,04 ^d	+
	CT1	0,5	1,91±0,03 ^c	2,19±0,2 ^c	++
	CT2	1	2,44±0,05 ^a	2,66±0,39 ^a	+++
	CT3	1,5	2,20±0,04 ^b	2,59±0,3 ^a	++
	CT4	2	2,14±0,04 ^b	2,31±0,2 ^b	++
Sig.			0,0001		

(Các số liệu được theo sau bởi các ký tự khác nhau có ý nghĩa khác biệt với độ tin cậy 95%)

Ghi chú: (+) Màu sắc chồi xanh, thân chồi rất mảnh, thân phân lỏng kém;

(++) Màu sắc chồi xanh, thân chồi mảnh, thân phân lỏng rõ ràng;

(+++) Màu sắc chồi xanh, chồi mập, thân phân lỏng rõ ràng.

Qua kết quả phân tích phương sai một nhân tố của hệ số nhân chồi và chiều dài chồi đều có: Sig. = 0,0001 < 0,05. Điều đó chứng tỏ môi trường có nồng độ BAP khác nhau sẽ ảnh hưởng rõ rệt đến hệ số nhân chồi và chiều dài chồi của hai dòng keo lai BV350 và BV523.

Từ bảng kết quả trên, cho thấy khi sử dụng BAP nồng độ 1,0 mg/l đều cho hiệu quả tái sinh chồi tốt nhất đối với cả hai dòng keo lai

BV350 và BV523 với hệ số nhân chồi đạt lần lượt là 2,22 và 2,44 lần.

Toda và đồng tác giả (1995) cũng từng khẳng định số lượng chồi keo lai tạo được phụ thuộc vào nồng độ BA (benzyladenine) được bổ sung vào môi trường nuôi cấy, đồng thời tác giả chỉ ra có 80% chồi keo lai được hình thành khi nuôi cấy trong môi trường nhân chồi MS bổ sung 1,0 mg/l BA.



Keo lai BV350 khi vừa cấy vào môi trường tái sinh



Keo lai BV350 trong CT2 sau 30 ngày



Keo lai BV523 khi vừa cấy vào môi trường tái sinh



Keo lai BV523 trong CT2 sau 30 ngày

Hình 2. Keo lai khi vừa cấy vào môi trường tái sinh và khi nuôi cấy 30 ngày

3.2.2. Ảnh hưởng phối hợp giữa BAP và Kn đến khả năng nhân nhanh chồi đối với 2 dòng keo lai

có tác dụng kích thích các chồi phát triển hài hòa cả về số lượng và chất lượng chồi, tạo tiền đề tốt cho quá trình ra rễ.

Sự phối hợp giữa các cytokinin trong môi trường nhân chồi với liều lượng và tỷ lệ hợp lý

Bảng 3. Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng phối hợp của BAP + Kn đến khả năng nhân nhanh của keo lai (sau 25 ngày nuôi cấy)

Dòng	Công thức	Nồng độ Kinetin (mg/l)	HSNC (lần)	Chiều dài TB chồi (cm)	Chất lượng chồi
BV350	ĐC	0	2,24±0,1 ^d	2,51±0,05 ^c	++
	CT5	0,05	2,50±0,05 ^{bc}	2,67±0,03 ^{ab}	++
	CT6	0,1	2,66±0,08 ^a	2,80±0,03 ^a	+++
	CT7	0,15	2,57±0,05 ^{ab}	2,71±0,02 ^a	++
	CT8	0,2	2,43±0,06 ^c	2,55±0,07 ^{bc}	+
Sig.			0,0001	0,005	

Dòng	Công thức	Nồng độ Kinetin (mg/l)	HSNC (lần)	Chiều dài TB chồi (cm)	Chất lượng chồi
BV523	ĐC	0	2,45±0,04 ^c	2,67±0,04 ^{bc}	++
	CT5	0,05	2,62±0,03 ^b	2,78±0,02 ^{ab}	++
	CT6	0,1	2,78±0,04 ^a	2,88±0,02 ^a	+++
	CT7	0,15	2,61±0,05 ^b	2,79±0,04 ^{ab}	++
	CT8	0,2	2,48±0,02 ^c	2,64±0,06 ^c	+
Sig.			0,0001	0,008	

(Các số liệu được theo sau bởi các ký tự khác nhau có ý nghĩa khác biệt với độ tin cậy 95%)

Ghi chú: (+) Màu sắc chồi xanh, thân chồi rất mảnh, thân phân lỏng kém;

(++) Màu sắc chồi xanh, thân chồi mảnh, thân phân lỏng rõ ràng;

(+++) Màu sắc chồi xanh, chồi mập, thân phân lỏng rõ ràng.

Qua kết quả phân tích phương sai một nhân tố ảnh hưởng phối hợp của BAP + Kn đến khả năng nhân nhanh của keo lai đều có kết quả Sig. < 0,05. Điều đó chứng tỏ hàm lượng đường khác nhau sẽ ảnh hưởng rõ rệt đến hệ số nhân chồi và chiều dài chồi của hai dòng keo lai.

Kết quả phân tích số liệu cho hiệu quả tốt nhất khi sử dụng phối hợp giữa 1,0 mg/l BAP + 0,5 mg/l Kn cho cả hai dòng BV350 (HSNC: 2,66 lần và chiều dài chồi: 2,8 cm); BV523 (HSNC: 2,78 lần và chiều dài chồi: 2,88 cm).

Kết quả nghiên cứu cho thấy việc bổ sung thêm Kinetin vào môi trường nuôi cấy trong khi đã có mặt BAP với nồng độ thấp cho hiệu quả nhân chồi cao nhưng khi tăng nồng độ Kinetin lên thì hiệu quả nhân chồi lại giảm. Như vậy, với một số đối tượng khi bổ sung thêm Cytokinin khác sẽ làm kìm hãm quá trình kích thích tạo chồi. Do nồng độ Cytokinin quá cao làm ức chế quá trình phát sinh và phát triển của chồi.



Keo lai BV350 trong CT đối chứng



Keo lai BV350 trong CT6



Keo lai BV523 trong CT đối chứng



Keo lai BV523 trong CT6

Hình 3. Keo lai BV523 và BV350 trong công thức xấu nhất và tốt nhất sau 25 ngày nuôi cấy

Kết quả thí nghiệm nhân nhanh chồi cho thấy cụm chồi keo lai có nhiều chồi nhưng tỷ lệ chồi hữu hiệu không cao nên cần nuôi cấy trong môi trường nâng cao chất lượng chồi để tạo nhiều chồi hữu hiệu hơn

3.2.3. Xác định hàm lượng than hoạt tính thích hợp đến khả năng hình thành chồi và chất lượng chồi hữu hiệu

Than hoạt tính (Activated charcoal - AC) được bổ sung vào môi trường nuôi cấy để tăng cường sự sinh trưởng và phát triển của cây nuôi cấy *in vitro*.

Tiến hành thí nghiệm bổ sung hàm lượng than hoạt tính ở 4 hàm lượng khác nhau 0,5 g/l; 1 g/l; 1,5 g/l; 2 g/l vào môi trường MS* + 1,0 mg/l BAP + 0,5 mg/l Kn. Kết quả thu được sau 25 ngày nuôi cấy được thể hiện bảng 4.

Bảng 4. Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của hàm lượng than hoạt tính (AC) đến chất lượng chồi hữu hiệu và chiều cao của chồi keo lai

Dòng	Công thức	Hàm lượng than hoạt tính (g/l)	HSNC (lần)	TLCHH (%)	Chiều cao chồi (cm)
BV350	ĐC	0	2,65±0,04 ^a	45	2,82±0,04 ^d
	CT9	0,5	2,10±0,01 ^b	65	3,08±0,02 ^c
	CT10	1	1,91±0,03 ^c	87	3,75±0,04 ^a
	CT11	1,5	1,83±0,04 ^{cd}	80	3,31±0,03 ^b
	CT12	2	1,78±0,03 ^d	69	3,09±0,03 ^c
Sig.			0,0001		
BV523	ĐC	0	2,77±0,02 ^a	54	2,87±0,01 ^d
	CT9	0,5	2,28±0,02 ^b	76	3,23±0,03 ^c
	CT10	1	1,99±0,03 ^c	88	3,70±0,04 ^a
	CT11	1,5	1,80±0,03 ^d	84	3,38±0,04 ^b
	CT12	2	1,75±0,06 ^d	75	3,26±0,07 ^{bc}
Sig.			0,0001		

(Các số liệu được theo sau bởi các ký tự khác nhau có ý nghĩa khác biệt với độ tin cậy 95%).

Kết quả phân tích phương sai một cho nhân tố ảnh hưởng của hàm lượng than hoạt tính đến chất lượng chồi hữu hiệu keo lai đều có kết quả Sig. = 0,0001 < 0,05. Điều đó chứng tỏ hàm lượng than hoạt tính ảnh hưởng rõ rệt đến HSNC và TLCHH đối với cả hai dòng keo lai.

Qua bảng 4 cho thấy ở cả 2 dòng keo lai BV350 và BV523 đều đạt tỷ lệ chồi hữu

hiệu cao nhất và chiều cao của chồi đáp ứng với yêu cầu của chồi trước khi ra rễ khi bổ sung 1 g/l than hoạt tính vào môi trường nuôi cấy.

Như vậy, môi trường MS* + 1,5 mg/l BAP + 0,5 mg/l Kn + 1 g/l AC là môi trường cho tỷ lệ chồi hữu hiệu cũng như chất lượng chồi tốt nhất phục vụ cho giai đoạn ra rễ sau đó đạt tỷ lệ cao.



Keo lai BV350 trong công thức đối chứng



Keo lai BV350 trong CT10



Keo lai BV523 trong công thức đối chứng



Keo lai BV523 trong CT10

Hình 4. Keo lai trong công thức đối chứng và CT10 sau 25 ngày nuôi cấy

3.3. Xác định môi trường ra rễ thích hợp cho các dòng keo lai

IBA là chất điều hòa sinh trưởng được sử dụng phổ biến trong nuôi cấy mô tế bào thực vật, có tác dụng lớn trong việc kích thích tạo rễ. Nó

được sử dụng với nồng độ khác nhau tùy từng đối tượng. Nghiên cứu xác định ảnh hưởng của IBA tới hiệu quả ra rễ sẽ được tiến hành bằng việc bổ sung IBA với thang nồng độ khác nhau (0 mg/l(ĐC), 1 mg/l; 1,5 mg/l; 2 mg/l và 2,5 mg/l vào môi trường 1/2MS*

Bảng 5. Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của IBA đến khả năng ra rễ của các dòng keo lai

Dòng	Công thức	1/2 MS* + IBA các nồng độ (mg/l)	Tỷ lệ chồi ra rễ (%)	Số rễ/chồi TB (cái)	Chiều dài TB của rễ (cm)
BV350	ĐC	0	26,7	0,31±0,02 ^d	0,57±0,03 ^d
	CT13	1	55,6	1,27±0,18 ^c	1,07±0,04 ^c
	CT14	1,5	65,6	2,24±0,07 ^b	1,25±0,03 ^{bc}
	CT15	2,0	86,7	2,92±0,04 ^a	1,47±0,06 ^a
	CT16	2,5	82,2	1,49±0,03 ^c	1,18±0,04 ^b
Sig.			0,0001		
BV523	ĐC	0	32,2	0,42±0,06 ^d	0,82±0,11 ^c
	CT13	1,0	61,1	1,30±0,08 ^c	1,10±0,04 ^b
	CT14	1,5	84,4	2,23±0,13 ^b	1,20±0,04 ^b
	CT15	2,0	92,2	3,20±0,13 ^a	1,58±0,05 ^a
	CT16	2,5	86,7	2,17±0,09 ^b	1,17±0,07 ^b
Sig.			0,0001		

(Các số liệu được theo sau bởi các ký tự khác nhau có ý nghĩa khác biệt với độ tin cậy 95%).

Qua kết quả phân tích phương sai một nhân tố ảnh hưởng của nồng độ IBA đến khả năng ra rễ của hai dòng keo lai đều có kết quả $Sig. = 0,0001 < 0,05$. Điều đó chứng tỏ nồng độ IBA ảnh hưởng rõ rệt đến khả năng ra rễ đối với cả hai dòng keo lai.

Kết quả nghiên cứu ở bảng 5 cho thấy ở cả hai dòng keo lai nghiên cứu đều đạt tỷ lệ ra rễ cao nhất ở nồng độ IBA là 2,0 mg/l. Đối với dòng keo lai BV350 cho kết quả tỷ lệ chồi ra rễ trung bình đạt 86,7%, đối với dòng keo lai BV523 cho tỷ lệ chồi ra rễ trung bình đạt 92,2%.



Keo lai BV350 trong CT đối chứng



Keo lai BV350 trong CT15



Keo lai BV523 trong CT đối chứng



Keo lai BV523 trong CT15

Hình 5. Keo lai BV523 và BV350 trong công thức đối chứng và CT15 sau 25 ngày

Kết quả nghiên cứu cũng cho thấy khi tăng nồng độ của IBA lên trong môi trường ra rễ thì hiệu quả ra rễ cũng tăng lên. Nhưng khi tăng vượt quá 2 mg/l thì hiệu quả ra rễ lại giảm đi rõ rệt. Tỷ lệ chồi ra rễ giảm, phần tiếp xúc với môi trường ra rễ bị sùi nhiều, nguyên nhân là do hàm lượng auxin ngoại sinh cao có thể gây ức chế sự ra rễ, rễ sinh mảnh, ngắn và thâm đen.

3.4. Ảnh hưởng của thời gian huấn luyện đến tỷ lệ cây sống và chiều cao của cây con ở vườn ươm

Huấn luyện cây mô là giai đoạn tạo điều kiện cho cây con trong bình nuôi làm quen dần với môi trường tự nhiên bên ngoài để cây cứng cáp, khỏe mạnh, khi đưa cây ra ngoài vườn đạt tỷ lệ cây sống cao, cây sinh trưởng đồng đều.

Đây được coi là một bước thuần hóa trước khi tách khỏi điều kiện *in vitro*. Thời gian thích nghi có vai trò rất quan trọng trong việc tăng tỷ lệ cây sống khi đưa ra ngoài vườn ươm sau 2 tháng.

Qua kết quả phân tích phương sai một nhân tố ảnh hưởng của thời gian huấn luyện đến tỷ lệ cây sống và chiều cao của cây con hai dòng keo lai ở vườn ươm đều có kết quả $Sig. < 0,05$. Điều đó chứng tỏ thời gian huấn luyện ảnh hưởng rõ rệt đến tỷ lệ sống và chiều cao đối với cả hai dòng keo lai.

Tỷ lệ cây sống tăng lên khi kéo dài thời gian huấn luyện và đạt tỷ lệ sống cao nhất khi cây được huấn luyện đủ thời gian 14 ngày cho cả 2 dòng keo lai: dòng BV350 có tỷ lệ cây sống 93,3%; dòng BV523 có tỷ lệ cây sống 95,6%.

Bảng 6. Ảnh hưởng của thời gian huấn luyện đến tỷ lệ cây sống và chiều cao của cây con ở vườn ươm

Dòng	Thời gian huấn luyện	Tỷ lệ sống (%)	Chiều cao (cm)
BV350	0 ngày	75,6	3,16±0,05 ^d
	7 ngày	84,4	4,27±0,04 ^c
	14 ngày	93,3	5,25±0,06 ^b
	21 ngày	75,6	5,53±0,06 ^a
Sig.		0,004	0,0001
BV523	0 ngày	71,1	3,53±0,06 ^d
	7 ngày	82,2	4,40±0,08 ^c
	14 ngày	95,6	5,48±0,15 ^b
	21 ngày	84,4	5,80±0,03 ^a
Sig.		0,0001	0,0001

(Các số liệu được theo sau bởi các ký tự khác nhau có ý nghĩa khác biệt với độ tin cậy 95%)

Sau khi huấn luyện trong thời gian 7 ngày, tỷ lệ sống của cả hai dòng keo lai cũng rất cao: Dòng BV350 có tỷ lệ cây sống 84,4%; dòng BV523 có tỷ lệ cây sống 82,2%. Cây được huấn luyện trong khoảng thời gian này cho bộ

rễ phát triển cân đối, rễ mập, cây đanh. Nên để rút ngắn thời gian trong sản xuất có thể huấn luyện trong 7 ngày thay vì phải huấn luyện 14 ngày.



Keo lai BV350 chưa huấn luyện



Keo lai BV350 huấn luyện ở thời gian 14 ngày



Keo lai BV523 chưa huấn luyện



Keo lai BV523 huấn luyện ở thời gian 14 ngày



Keo lai BV523 không huấn luyện trồng ở vườn ươm sau 2 tháng



Keo lai BV523 huấn luyện 14 ngày trồng ở vườn ươm sau 2 tháng

Hình 6. Keo lai BV523 và BV350 ở thời gian huấn luyện 0 ngày và 14 ngày trước và sau khi cấy ra vườn ươm sau 2 tháng

IV. KẾT LUẬN

Kết quả nghiên cứu cho thấy khi dùng HgCl₂ nồng độ 0,1% trong 7 phút cho kết quả tỷ lệ mẫu sạch nảy chồi hữu hiệu ở hai dòng keo lai lần lượt là 40,4% và 42,6%. Khi khử trùng bằng javen 3 - 5% trong thời gian 7 phút, tỷ lệ mẫu nảy chồi ở hai dòng keo lai BV350 và BV523 lần lượt là 31,91% và 33,7%. Tuy hiệu quả khử trùng của javen kém hơn HgCl₂ nhưng do giảm thiểu được mức độ độc hại với người dùng và môi trường nên được khuyến cáo dùng thay thế. Môi trường MS* + 1,0 mg/l BAP + 0,5 mg/l Kn + 30 g/l đường + 5,5 g/l agar cho hiệu quả tốt nhất cho cả hai dòng

BV350 (HSNC: 2,66 lần và chiều dài chồi: 2,8 cm); BV523 (HSNC: 2,78 lần và chiều dài chồi: 2,88 cm). Môi trường MS* + 1,0 mg/l BAP + 0,5 mg/l Kn + 30 g/l đường + 5,5 g/l agar cho hiệu quả tạo chồi hữu hiệu và chiều cao chồi tốt nhất với dòng BV350 là 87% và 3,75 cm, BV523 là 88% và 3,7 cm. Môi trường 1/2MS* + 2 mg/l IBA cho hiệu quả ra rễ tốt nhất. Đối với dòng keo lai BV350 cho kết quả tỷ lệ chồi ra rễ trung bình đạt 86,7%, đối với dòng keo lai BV523 cho tỷ lệ chồi ra rễ trung bình đạt 92,2%. Thời gian huấn luyện tốt nhất cho hai dòng keo lai nghiên cứu đem lại tỷ lệ sống cao là 7 ngày.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Darus H. Ahmad, 1989. "A note on the acacia hybrid in forest plantation in Peninsular Malaysia". J. Tropical Forest Science, 170 - 171.
2. Darus H. Ahmad, 1994. "Multiplication of *Acacia mangium* by stem cutting and tissue culture techniques", Advances in tropical acacia research, pp. 32 - 34.
3. Triệu Thị Hà, Cấn Thị Lan và Đồng Thị Ứng, 2014. Nghiên cứu nhân giống Keo lá tràm (*Acacia auriculiformic* A. Cunn. Ex Benth) bằng phương pháp nuôi cấy mô tế bào. Tạp chí Khoa học Lâm nghiệp, số 4, 3508 - 3515.
4. Lê Đình Khả, 1999. Nghiên cứu sử dụng giống lai tự nhiên giữa Keo tai tượng và Keo lá tràm ở Việt Nam. NXB Nông nghiệp, Hà Nội, 2007 trang.
5. Lê Đình Khả, 2003. Chọn tạo và nhân giống cho một số loài cây trồng rừng chủ yếu ở Việt Nam. NXB Nông nghiệp, Hà Nội.
6. Cấn Thị Lan, 2014. Nghiên cứu nhân nhanh một số giống keo và bạch đàn mới bằng công nghệ tế bào thực vật, Báo cáo tổng kết đề tài.
7. Đoàn Thị Mai, 2003. Nhân giống cho một số loài cây trồng rừng có năng suất, chất lượng cao bằng phương pháp nuôi cấy mô. Báo cáo Hội nghị "Công nghệ sinh học" toàn quốc. Hà Nội tháng 11 năm 2003.
8. Đoàn Thị Mai, Lê Sơn, Lương Thị Hoan, Ngô Thị Minh Duyên, Nguyễn Thiên Hương, 2005. Nhân giống một số loài cây trồng rừng có năng suất, chất lượng cao bằng phương pháp nuôi cấy mô. Tạp chí Khoa học Lâm nghiệp, số 2.
9. Đoàn Thị Mai, Nguyễn Thị Mỹ Hương, Vũ Thị Ngọc, Trần Thanh Hương, Văn Thu Huyền, 2009a. Nuôi cấy một số giống keo lai mới chọn tạo. Tạp chí Khoa học Lâm nghiệp, số 2, trang 905 - 910
10. Đoàn Thị Mai, Lê Sơn, 2011. Nhân nhanh giống keo lai tự nhiên, keo lai nhân tạo, Bạch đàn Uro, bạch đàn lai nhân tạo và Lát hoa mới chọn tạo bằng công nghệ tế bào. Báo cáo tổng kết đề tài thuộc chương trình công nghệ sinh học trong Nông nghiệp và Phát triển nông thôn.

Email tác giả liên hệ: dohuuson@gmail.com

Ngày nhận bài: 04/06/2021

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

Ngày duyệt đăng: 14/06/2021