

## NGHIÊN CỨU NHÂN GIỐNG BẰNG PHƯƠNG PHÁP NUÔI CẤY MÔ CÁC DÒNG KEO TAM BỘI X201 VÀ X205

Lê Sơn<sup>1</sup>, Mai Thị Phương Thúy<sup>1</sup>, Trương Thị Thùy Linh<sup>2</sup>,  
Nguyễn Thị Kim Thanh<sup>2</sup>, Lưu Thị Quỳnh<sup>1</sup>, Nguyễn Thị Bích Ngọc<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Viện Nghiên cứu Giống và Công nghệ sinh học Lâm nghiệp

<sup>2</sup> Trường Đại học Khoa học Tự nhiên - Đại học Quốc gia Hà Nội

<sup>3</sup> Khoa Nông Lâm, Trường Đại học Tây Bắc

### TÓM TẮT

Trong thời gian gần đây, nghiên cứu chọn tạo giống đa bội đã được tiến hành cho các loài keo nhiệt đới, qua đó một số giống keo lai tam bội có sinh trưởng nhanh, có chiều dài sợi gỗ thích hợp cho trồng rừng gỗ lớn đã được chọn lọc và công nhận là giống cây lâm nghiệp mới như các dòng X201 và X205. Việc nghiên cứu nhân giống bằng nuôi cấy mô cho các giống mới chọn tạo này sẽ góp phần đưa nhanh các kết quả nghiên cứu vào sản xuất. Kết quả nghiên cứu cho thấy, phương pháp khử trùng mẫu thích hợp cho các dòng keo lai tam bội X201 và X205 là sử dụng HgCl<sub>2</sub> nồng độ 0,1% trong 10 phút với tỷ lệ bật chồi hữu hiệu đạt 58,5% đến 65,4%. Môi trường nhân chồi thích hợp cho các dòng keo lai tam bội X201 và X205 nghiên cứu là môi trường MS\* có bổ sung BAP nồng độ 1,5 mg/l cho hệ số nhân chồi đạt 2,6 và 2,9 lần tương ứng. Để kích thích tạo rễ, sử dụng môi trường 1/2MS\* + IBA nồng độ 2,0mg/l là thích hợp nhất với tỷ lệ ra rễ đạt trên 97% cho cả 2 dòng keo lai tam bội nghiên cứu.

**Từ khóa:** Keo lai tam bội, nuôi cấy mô, X201, X205.

### STUDY ON THE PROPAGATION OF TRIPLOID ACACIA HYBRID CLONES X201 AND X205 BY TISSUE CULTURE

Le Son<sup>1</sup>, Mai Thi Phuong Thuy<sup>1</sup>, Truong Thi Thuy Linh<sup>2</sup>,  
Nguyen Thi Kim Thanh<sup>2</sup>, Luu Thi Quynh<sup>1</sup>, Nguyen Thi Bich Ngoc<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Institute of Forest Tree Improvement and Biotechnology

<sup>2</sup> Hanoi University of Science - Vietnam National University - Hanoi

<sup>3</sup> Faculty of Agriculture and Forestry - Tay Bac University

### SUMMARY

In the last decade, breeding on polyploidy has been conducted for tropical acacias. Some new triploid acacia hybrid clones with fast-growing and longer fibre lengths were selected and recognized as new forest cultivars. The study on vegetative propagation by tissue culture, therefore is required for better deployment. The results showed that using HgCl<sub>2</sub> 0.1% to sterile shoots in 10 mins has the highest adventitious shoot rates (58.5 - 65.4%). The modified Murashige and Skoog media (MS\*) with phytohormones were evaluated for their suitability to support shoot induction, shoot multiplication and root formation. The highest percentage of multiple shoot induction was achieved on MS + BAP (1.5 mg/l). Elongated shoots showed the best rooting response on 1/2 MS\* + IBA (2.0 mg/l) with rooted shoot rates reached up to 97%.

**Keywords:** Tissue culture, triploid acacia hybrid, X201, X205.

## I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Ở nước ta, các loài keo Acacia chiếm vị trí đặc biệt quan trọng trong chiến lược trồng rừng cung cấp nguyên liệu giấy, bảo vệ môi trường, phát triển kinh tế - xã hội và gần đây là cung cấp gỗ lớn. Trong đó, Keo tai tượng, Keo lá tràm và giống lai giữa 2 loài này (gọi tắt là keo lai) là những loài quan trọng nhất. Tính đến năm 2022, diện tích rừng trồng các loài keo trên cả nước đạt khoảng 2,2 triệu ha, trong đó, chủ yếu là hai loài Keo tai tượng và keo lai (Tổng cục Lâm nghiệp, 2022).

Các nghiên cứu cải thiện giống cho nhóm loài keo (chủ yếu là Keo tai tượng và Keo lá tràm) được triển khai từ những năm 1980 của thế kỷ trước bằng việc xây dựng các khảo nghiệm loài và xuất xứ tương đối đồng bộ và có hệ thống trên cả nước. Từ kết quả khảo nghiệm, đã chọn được một số xuất xứ Keo tai tượng và Keo lá tràm có triển vọng cho từng vùng trồng (Lê Đình Khả, 2001). Một số xuất xứ đã được công nhận là giống tiến bộ kỹ thuật để trồng trong cả nước. Song song với đó, giống keo lai tự nhiên (giữa Keo tai tượng và Keo lá tràm) vào năm 1993 đã được phát hiện và chọn lọc (Lê Đình Khả, 2001) đồng thời với các nghiên cứu lai giống (tự nhiên, nhân tạo) giữa các cây bố mẹ là cây trội Keo tai tượng và Keo lá tràm đã được tuyển chọn.

Từ năm 2002, một hướng nghiên cứu mới bắt đầu được tiến hành cho các loài keo nhiệt đới ở nước ta đó là chọn giống keo đa bội. Đa bội hóa là sự tăng bội bộ nhiễm sắc thể đơn bội ( $n = x$ ) trong một tế bào của cùng 1 loài (thể tự đa bội - autopolyploid) hoặc của 2 loài khác nhau (thể dị đa bội - allopolyploid) (Barringer, 2007). Trong lâm nghiệp việc chọn tạo và sử dụng giống đa bội là một hướng đi mới và kỳ

vọng có được những giống mới với sự khác biệt lớn về kiểu gen và kiểu hình, bởi cây rừng thường ở thể dị hợp tử. Kết quả của việc nhân lên về số lượng nhiễm sắc thể sẽ dẫn đến tăng liều lượng gen, tăng mức độ dị hợp tử và do đó tăng mức độ tương tác giữa thông tin di truyền (Ramsey and Schemske, 2002). Một đặc tính quan trọng của cây đa bội là tính bất thụ một phần hoặc toàn phần của thể tam bội ( $3x$ ) thu hút được sự quan tâm của các nhà chọn tạo giống lâm nghiệp bởi rất nhiều loài cây rừng có xu thế xâm lấn do sai quả, hạt có sức sống dài, đặc biệt là các loài cây trồng rừng thương mại luân kỳ ngắn và diện tích trồng tăng nhanh như các loài keo, thì việc nghiên cứu và phát triển các quần thể chọn giống  $3x$  bất thụ, giúp hạn chế sự xâm lấn của chúng đối với môi trường, giảm chi phí quản lý các cánh rừng trồng, cải thiện khả năng sinh trưởng và chất lượng gỗ là một hướng đi được kỳ vọng sẽ đem lại lợi ích cho cả trồng rừng sản xuất lẫn bảo tồn hệ sinh thái rừng (Griffin *et al.*, 2015).

Việc ứng dụng công nghệ tế bào trong chọn tạo giống cho keo đa bội được bắt đầu bằng việc nhập nội 38 dòng Keo tai tượng tứ bội ( $4x$ ) về Việt Nam dưới dự án ACIAR (FST 2003/002) năm 2002. Tiếp đến là việc xây dựng vườn lai giống, gồm 33 dòng  $4x$  của Keo tai tượng được trồng xen với 20 dòng  $2x$  tốt nhất của Keo tai tượng và Keo lá tràm (10 dòng/loài) để đẩy mạnh khả năng thụ phấn chéo giữa các cá thể đa bội. Song với sự phát triển của công nghệ nuôi cấy cứu phôi *in vitro* cũng như kế thừa các kết quả nghiên cứu và nguồn vật liệu sẵn có từ dự án ACIAR (FST 2008/007), một chiến lược cải thiện giống đa bội cho keo nhiệt đới ở Việt Nam đã được xây dựng (Griffin *et al.*, 2015) và kỳ vọng sẽ mang lại những kết quả khác biệt so

với phương pháp chọn tạo giống truyền thống. Trong giai đoạn 2014 - 2019, Viện Nghiên cứu Giống và Công nghệ sinh học Lâm nghiệp đã chọn tạo được 4 dòng Keo tam bội X101, X102, X201 và X205 có sinh trưởng nhanh, được Bộ Nông nghiệp và PTNT công nhận là giống cây lâm nghiệp mới (theo Quyết định công nhận giống số 1458/QĐ-BNN-KHCN ngày 20 tháng 4 năm 2020). Để phát triển các giống này vào sản xuất, việc tiến hành các nghiên cứu về nhân giống nuôi cấy mô là cần thiết, từ đó xây dựng quy trình nhân giống nhằm tạo ra số lượng cây con có chất lượng phục vụ trồng rừng.

## II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Vật liệu nghiên cứu

Các chồi bánh tẻ thu từ cây vật liệu gốc keo tam bội dòng X201 và X205 1 - 2 tuổi đã được xử lý tạo chồi tại vườn ươm của Viện Nghiên cứu Giống và Công nghệ sinh học Lâm nghiệp - Viện Khoa học Lâm nghiệp Việt Nam.

### 2.2. Phương pháp nghiên cứu

#### 2.2.1. Địa điểm, điều kiện bố trí thí nghiệm

Phòng thí nghiệm nuôi cấy mô thuộc Viện Nghiên cứu Giống và Công nghệ sinh học Lâm nghiệp - Viện Khoa học Lâm nghiệp Việt Nam.

*Điều kiện thí nghiệm:*

- Số giờ chiếu sáng: 10 h/ngày
- Cường độ chiếu sáng: 2.000 - 3.000 lux
- Nhiệt độ phòng nuôi:  $25 \pm 2^\circ\text{C}$
- Các dụng cụ sử dụng và môi trường nuôi cấy được hấp khử trùng ở điều kiện nhiệt độ  $121^\circ\text{C}$  trong thời gian 20 - 40 phút.
- Độ pH của môi trường nuôi cấy: 5,8.

#### 2.2.2. Phương pháp tiến hành

*Thí nghiệm xác định nồng độ hóa chất và thời gian khử trùng thích hợp cho các dòng keo lai tam bội*

Mục tiêu của giai đoạn này là tạo được mẫu sạch và non trẻ cho các giai đoạn nuôi cấy tiếp theo nên cần đảm bảo tỷ lệ mô nhiễm thấp, tỷ lệ sống cao, mô tồn tại và sinh trưởng tốt.

Bố trí công thức thí nghiệm, các công thức khác nhau ở loại hóa chất, nồng độ và thời gian khử trùng. Nội dung bố trí các công thức thí nghiệm được thể hiện như sau:

Thí nghiệm sử dụng loại hóa chất khử trùng là:

- $\text{HgCl}_2$  ở 3 nồng độ 0,05%, 0,1% và 0,15%
- Đối chứng (0%)

Thời gian khử trùng: 5, 10, 15 phút.

Thí nghiệm được bố trí với 3 lần lặp và 30 mẫu/lặp/công thức.

Chỉ tiêu theo dõi: số mẫu sống, số bật chồi, số mẫu nhiễm.

*Thí nghiệm xác định môi trường nhân chồi thích hợp cho keo lai tam bội*

Đây là giai đoạn cực kỳ quan trọng và quyết định sự thành công của toàn bộ quá trình nhân giống. Trong giai đoạn này, vai trò của chất điều hoà sinh trưởng là cực kỳ quan trọng để sản sinh ra lượng chồi tối đa mà vẫn đảm bảo sức sống và bản chất di truyền của vật liệu nuôi cấy.

Kế thừa các kết quả nghiên cứu về keo lai trước đây, môi trường MS được chọn lọc là môi trường khoáng chất cơ bản để nuôi cấy cho các dòng keo lai. Các loại môi trường có sự thay đổi về tỷ lệ, thành phần các chất đa lượng, vi lượng dựa trên môi trường này được thí nghiệm, cụ thể như sau:

- Môi trường MS cơ bản (MS): Sử dụng môi trường MS (Murashige and Skoog, 1962) và thành phần Vitamin của Morel.
- Môi trường MS cải tiến cho keo lai (MS\*).

Kế thừa các kết quả nghiên cứu về keo lai trước đây, 5 công thức thí nghiệm xác định ảnh hưởng của BAP đến khả năng nhân chồi các dòng keo lai tam bội được bố trí như sau:

- Công thức 1: Đối chứng
- Công thức 2: MS cải tiến + BAP 0,5 mg/lít
- Công thức 3: MS cải tiến + BAP 1,0 mg/lít
- Công thức 4: MS cải tiến + BAP 1,5 mg/lít
- Công thức 5: MS cải tiến + BAP 2,0 mg/lít

Thí nghiệm được bố trí với 3 lần lặp và 30 mẫu/lặp/công thức.

Chỉ tiêu theo dõi: số chồi/cụm, số lượng chồi có chiều cao từ 1,5 cm trở lên.

*Thí nghiệm xác định môi trường ra rễ tạo cây hoàn chỉnh cho keo lai tam bội*

Ảnh hưởng của các auxin đến tỷ lệ ra rễ, số rễ trung bình và chiều dài trung bình/chồi. Các chồi đủ tiêu chuẩn cao trên 1,5 cm cứng cáp khoẻ mạnh được cấy vào môi trường ra rễ là môi trường có 1/2 thành phần của MS\* được bổ sung IBA ở các nồng độ 1,0; 1,5; 2,0 và 2,5 mg/l.

Thí nghiệm được bố trí với 3 lần lặp và 30 mẫu/lặp/công thức.

Chỉ tiêu theo dõi: chiều dài rễ, số rễ/chồi.

### 2.3. Xử lý số liệu

#### 2.3.1. Tính toán các chỉ tiêu theo dõi

- + Tỷ lệ mẫu sạch (%) =  $(\text{Tổng số mẫu sạch} / \text{Tổng số mẫu cấy}) \times 100$
- + Tỷ lệ mẫu bật chồi (%) =  $(\text{Tổng số mẫu bật chồi} / \text{Tổng số mẫu cấy}) \times 100$
- + Hệ số nhân chồi (lần) =  $\text{Tổng số chồi mới hình thành} / \text{Số chồi cấy ban đầu}$
- + Số chồi trung bình =  $\text{Tổng số chồi} / \text{Tổng số mẫu}$

$$+ \text{Số lá trung bình} = \text{Tổng số lá} / \text{Tổng số chồi}$$

$$+ \text{Chiều cao chồi trung bình (cm)} = \text{Tổng chiều cao chồi} / \text{Tổng số chồi}$$

$$+ \text{Tỷ lệ chồi hữu hiệu} = (\text{Số chồi có chiều cao từ 2,5 cm trở lên} / \text{Tổng số chồi thu được}) \times 100$$

$$+ \text{Tỷ lệ mẫu ra rễ (\%)} = (\text{Tổng số mẫu ra rễ} / \text{Tổng số mẫu cấy}) \times 100$$

$$+ \text{Số rễ trung bình} = \text{Tổng số rễ} / \text{Tổng số mẫu}$$

$$+ \text{Chiều dài rễ trung bình (cm)} = \text{Tổng chiều dài rễ} / \text{Tổng số rễ}$$

#### 2.3.2. Kiểm tra ảnh hưởng của các nhân tố đến kết quả thí nghiệm

Kiểm tra ảnh hưởng của các nhân tố thí nghiệm đến số rễ và chiều dài rễ bằng phương pháp phân tích phương sai, trong đó, công thức thí nghiệm có ảnh hưởng nhất được xác định thông qua kết quả kiểm tra sai dị về trị số trung bình giữa hai công thức có trị số lớn nhất theo tiêu chuẩn Student. Quá trình xử lý số liệu được thực hiện trên phần mềm Excel và SPSS.

## III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### 3.1. Xác định phương pháp khử trùng mẫu thích hợp cho các dòng keo lai tam bội

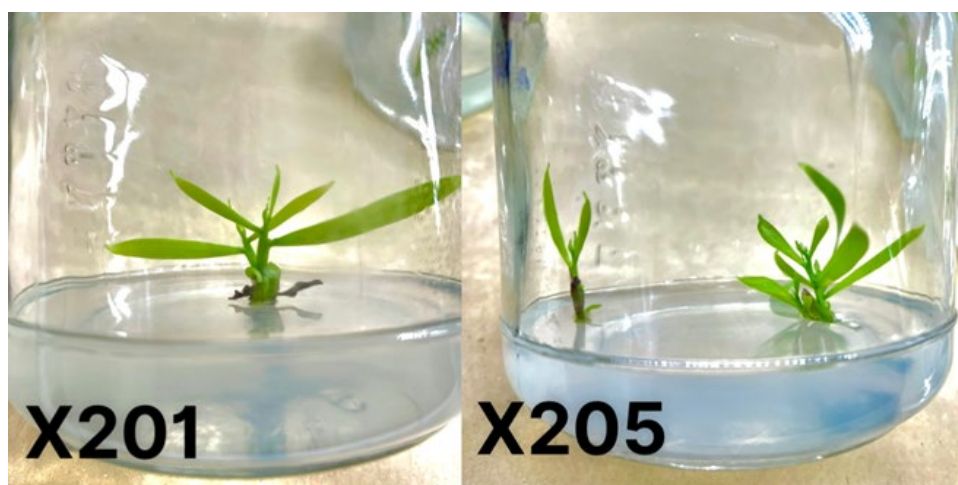
Khử trùng mẫu là giai đoạn đầu của quá trình nuôi cấy mô, có vai trò quan trọng trong việc trực tiếp tạo ra nguồn vật liệu ban đầu cho các giai đoạn nuôi cấy tiếp theo. Hiện nay, phương pháp hóa học được sử dụng phổ biến để khử trùng mẫu cấy. Những hóa chất được sử dụng phổ biến trong nuôi cấy mô tế bào thực vật như: HgCl<sub>2</sub>, NaClO, các chất kháng sinh,... cũng có thể bổ sung thêm Tween 20, Tween 80,... hoặc xử lý bằng cồn 70° để tăng độ xâm nhập các chất diệt khuẩn vào bề mặt mẫu nuôi cấy.

**Bảng 1.** Kết quả thí nghiệm nghiên cứu ảnh hưởng của loại hóa chất và thời gian đến kết quả khử trùng cho keo tam bội dòng X205 và X201

Hóa chất	Nồng độ	Thời gian (phút)	Dòng X205		Dòng X201	
			Tỷ lệ mẫu nhiễm (%)	Tỷ lệ bật chồi hữu hiệu (%)	Tỷ lệ mẫu nhiễm (%)	Tỷ lệ bật chồi hữu hiệu (%)
HgCl <sub>2</sub>	0,05%	5	32,2 ± 5,9	22,0 ± 4,3	30,0 ± 11,1	14,6 ± 9,8
		10	26,7 ± 11,1	43,3 ± 9,2	25,6 ± 14,8	41,5 ± 1,7
		15	16,7 ± 0,0	58,4 ± 8,3	15,6 ± 3,7	52,9 ± 3,0
	0,10%	5	15,6 ± 3,7	45,1 ± 9,7	17,8 ± 3,7	42,6 ± 4,6
		10	6,7 ± 2,0	65,4 ± 9,5	7,8 ± 3,7	58,5 ± 3,7
		15	11,1 ± 3,7	56,2 ± 5,4	11,1 ± 3,7	53,8 ± 2,5
	0,15%	5	13,3 ± 8,1	52,7 ± 7,4	10,0 ± 1,1	52,2 ± 6,5
		10	11,1 ± 7,1	46,7 ± 2,4	10,0 ± 4,4	39,8 ± 4,3
		15	4,4 ± 1,8	25,3 ± 4,3	3,3 ± 1,1	16,0 ± 6,5
Đối chứng			100,0	0,0	100,0	0,0
<i>F tính</i>			199,8	9,85	222,36	40,1
<i>F crit</i>			2,39			

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 hóa chất và thời gian khử trùng khác nhau cũng sẽ cho kết quả khác nhau. Do đó, cần lựa chọn thời gian và nồng độ khử trùng thích hợp để vừa đảm bảo tỷ lệ mẫu nảy chồi cao, vừa có tỷ lệ mẫu nhiễm thấp và đảm bảo

chồi có khả năng sinh trưởng phát triển tốt. Nếu nồng độ hóa chất thấp và thời gian khử trùng chưa đủ, bụi bẩn, khuẩn, nấm bệnh,... sẽ không thể được loại trừ hết; trái ngược lại, nếu nồng độ hóa chất quá cao và thời gian khử trùng quá dài, hóa chất sẽ ngấm vào và phá vỡ cấu trúc tế bào, ảnh hưởng đến sinh trưởng, giảm khả năng tái sinh chồi.

**Hình 1.** Chồi bất định keo tam bội của hai dòng đã bật chồi sau 25 ngày khi sử dụng phương pháp khử trùng thích hợp

Kết quả phân tích số liệu cho thấy: tỷ lệ mẫu sống, tỷ lệ mẫu nhiễm và tỷ lệ mẫu bật chồi ở các công thức thí nghiệm với cả 2 dòng keo lai tam bội đều có sự sai khác rõ rệt ( $F_{tính} > F_{crit}$ ). Sử dụng  $HgCl_2$  0,1% trong khoảng thời gian 10 phút đem lại hiệu quả khử trùng tốt nhất. Cụ thể như sau: khi sử dụng  $HgCl_2$  0,1% trong 10 phút thì tỷ lệ mẫu sống là từ 91,1 - 96,7%, tỷ lệ mẫu nhiễm chỉ còn 7,8 - 6,7% và tỷ lệ bật chồi hữu hiệu 58,5 - 65,4%. Kết quả này tương tự các nghiên cứu trước đây về nhân giống cho các dòng keo lai tự nhiên BV71, BV73, BV75 của Đoàn Thị Mai và Lê Sơn (2011), mẫu cũng đã được khử trùng bằng  $HgCl_2$  nồng độ 0,1% với 8 - 10 phút cho tỷ lệ mẫu nhiễm chỉ từ 58,52 - 72,59% và tỷ lệ bật chồi đạt từ 8,15 - 11,11%. Kết quả khử trùng mẫu các dòng keo lai tam bội X102, X102 của Đoàn Thị Ứng và đồng tác giả (2020) cũng cho thấy khi sử dụng  $HgCl_2$  nồng độ 0,05% trong 5 phút cho tỷ lệ mẫu sống đạt 80% và tỷ lệ bật chồi hữu hiệu là 28,4%. 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 phù hợp để khử trùng mẫu vật cho các giống cây rừng trong nuôi cấy mô.

Để giảm thiểu yếu tố độc hại của  $HgCl_2$ , một số hóa chất khử trùng thay thế khác đã được đề xuất. Đoàn Thị Ứng và đồng tác giả (2020) đã đề xuất dùng Javen 3% để khử trùng cho các mẫu keo lai tam bội X101 và X102, tác giả Girijashankar (2011) cũng 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 lá tràm.

**3.2. Xác định môi trường nhân chồi thích hợp cho keo lai tam bội**

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. Thí nghiệm xác định môi trường nuôi cấy cơ bản cho các dòng keo lai được tiến hành với môi trường đã được sử dụng cho nhân chồi các dòng keo lai tự nhiên trong các nghiên cứu trước đây là môi trường MS cải tiến (ký hiệu MS\*). Đây là môi trường đã được sử dụng tương đối rộng rãi cho nghiên cứu nhân giống cho cây rừng bằng nuôi cấy mô (Đoàn Thị Mai và Lê Sơn, 2011).

**Bảng 2.** Kết quả nhân chồi sau 25 ngày cấy thí nghiệm của hai dòng X201 và X205

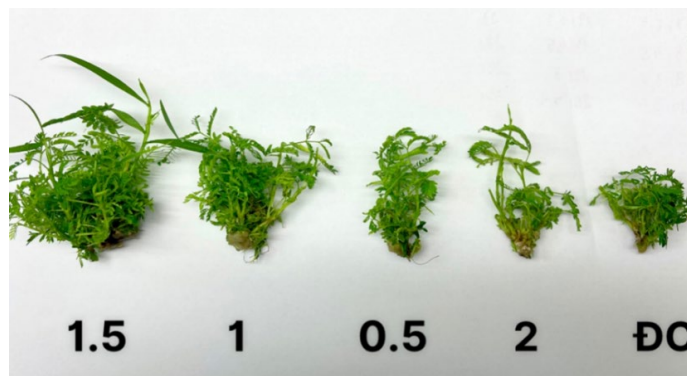
MS* + BAP (mg/l)	Dòng X205			Dòng X201		
	Số chồi/cụm	Chiều cao chồi (cm)	Hệ số nhân chồi	Số chồi/cụm	Chiều cao chồi (cm)	Hệ số nhân chồi
0	1,1 ± 001	2,3 ± 0,5	1,3	1,1 ± 0,01	2,1 ± 0,5	1,1
0,5	2,44 ± 0,01	3,4 ± 1,3	1,8	2,5 ± 0,02	3,4 ± 1,3	1,9
1,0	3,49 ± 0,01	3,6 ± 1,7	2,2	4,5 ± 0,01	3,6 ± 1,3	2,0
1,5	5,58 ± 0,02	3,9 ± 1,4	2,9	5,6 ± 0,02	3,8 ± 1,2	2,6
2,0	4,44 ± 0,01	3,5 ± 1,1	2,4	4,4 ± 0,01	3,1 ± 0,7	2,2
<i>F tính</i>	28,5	3,6		19,4	7,6	
<i>F crit</i>	2,62					

Kết quả thí nghiệm cho thấy, BAP có tác dụng rõ rệt lên quá trình tạo chồi của các dòng keo tam bội khi so sánh với công thức đối chứng

(không sử dụng chất kích thích sinh trưởng). Môi trường bổ sung BAP ở nồng độ 1,5 mg/l có hệ số nhân chồi đạt được cao nhất là từ 2,6

đối với dòng X201 và 2,9 đối với dòng X205. Khi sử dụng công thức này, các chồi tạo được cũng có chiều cao trung bình cao hơn hẳn các công thức còn lại đạt 3,8 - 3,9 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 tam bội, tuy nhiên chiều cao chồi thu lại chỉ đạt 3,1 - 3,5 cm, hệ số nhân chồi cũng chỉ còn 2,2 - 2,4. Do đó, môi trường MS\* có bổ sung BAP nồng độ 1,5mg/l được chọn làm môi trường nuôi cấy chung cho cả 2 dòng keo tam bội 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; chứng tỏ với keo 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, tùy thuộc vào từng đối tượng nghiên cứu có số chồi thu được có chất lượng tốt, tương đối đồng đều (thể hiện ở mức độ sai dị thấp hơn so với công thức đối chứng). Đối với các dòng keo lai tam bội X101 và X102, môi trường nhân chồi có hiệu quả nhất được xác định là MS\* có bổ sung 1,0 mg/l BAP và 0,25 mg/l GA3 cho chỉ tiêu số chồi/cụm đạt 5,0 - 5,5 (Đồng Thị Ứng *et al.*, 2020). Như vậy, các dòng keo lai tam bội khác nhau sẽ có phản ứng khác nhau với thành phần môi trường nuôi cấy.



**Hình 2.** Chất lượng chồi các chồi keo tam bội dòng X205 sau 25 ngày nuôi cấy trong các công thức thí nghiệm khác nhau

### 3.3. Xác định môi trường ra rễ thích hợp cho keo tam bội

Môi trường cơ bản được sử dụng là một nửa các chất đa lượng và vi lượng của môi trường MS\* được bổ sung thêm auxin là IBA ở các nồng độ khác nhau.

Các chồi có chiều cao trên 1,5 cm có đủ chất lượng được chọn lọc (cứng cáp, thân to khỏe và thẳng) cấy vào môi trường ra rễ, nuôi cấy trong điều kiện nhân tạo, sau 6 - 8 ngày rễ bắt đầu xuất hiện và sau 15 - 17 ngày cấy, các chồi ra rễ được đo đếm các số liệu về tỷ lệ ra rễ, chiều dài rễ. Kết quả thí nghiệm cho thấy, đối với hai dòng keo lai tam bội mới chọn tạo, IBA có tác dụng mạnh mẽ đến quá trình tạo

rễ. Các công thức nồng độ khác nhau của IBA có ảnh hưởng đến tỷ lệ ra rễ của 2 dòng keo lai tam bội nghiên cứu ở mức ý nghĩa ( $F$  tính  $> F$  crit). Trong các công thức nghiên cứu, công thức IBA với nồng độ là 2,0 mg/l cho các chỉ tiêu về chiều dài rễ, tỷ lệ ra rễ cao nhất so với các công thức nồng độ còn lại (bảng 3). Khi sử dụng nồng độ này tỷ lệ chồi ra rễ đạt 97,8 - 98,9%, với chiều dài rễ trung bình đạt từ 3,68 - 3,93 cm. Môi trường có bổ sung IBA nồng độ 2,0 mg/l cũng là môi trường thích hợp cho việc kích thích tạo rễ các dòng keo lai tam bội X101 và X102 như trong các nghiên cứu trước đây của Đồng Thị Ứng và đồng tác giả (2020).

**Bảng 3.** Kết quả thí nghiệm kích thích tạo rễ cho các dòng keo tam bội X201 và X205

Nồng độ IBA (mg/l)	Dòng X201		Dòng X205	
	Chiều dài rễ TB (cm)	Tỷ lệ chồi ra rễ (%)	Chiều dài rễ TB (cm)	Tỷ lệ chồi ra rễ (%)
ĐC	1,84 ± 0,3	53,3 ± 4,4	2,41 ± 0,57	67,8 ± 8,1
1,0	2,94 ± 0,6	85,6 ± 3,7	3,01 ± 0,21	90,0 ± 11,1
1,5	3,31 ± 0,3	91,1 ± 3,7	3,43 ± 0,41	92,2 ± 3,7
2,0	3,68 ± 0,4	97,8 ± 3,7	3,93 ± 0,89	98,9 ± 3,7
2,5	2,41 ± 0,1	68,9 ± 9,6	2,65 ± 0,78	83,3 ± 7,8
<i>F tính</i>	80,3	8,9	4,71	6,08
<i>Fcrit</i>	3,47			

Tuy nhiên, khi bổ sung IBA đến nồng độ 2,5 mg/l thì các thông số theo dõi có xu hướng giảm đi, cụ thể: tỷ lệ ra rễ chỉ đạt từ 68,8 - 83,3% và chiều dài trung bình của rễ đã giảm còn 2,41 - 2,65 cm.

Điều này chứng tỏ nồng độ IBA cao ảnh hưởng rất lớn 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 tam bội nghiên cứu. Từ

đó, có thể kết luận với các dòng keo tam bội thí nghiệm môi trường tạo rễ thích hợp nhất là môi trường 1/2MS\* + IBA nồng độ 2,0 mg/l.

Bảng số liệu cũng cho thấy, cùng loại chất, cùng nồng độ, các dòng keo tam bội khác nhau thì khả năng ra rễ cũng khác nhau, trong 2 dòng keo lai tam bội thí nghiệm, dòng X205 là dòng cho tỷ lệ ra rễ cao hơn so với dòng X201.



**Hình 3.** Chất lượng rễ và chiều cao các cây con dòng X205 ứng với các nồng độ IBA khác nhau

**IV. KẾT LUẬN**

Đã xác định được điều kiện nhân giống bằng nuôi cấy mô thích hợp cho hai dòng keo lai tam bội X201 và X205 như sau:

1. Phương pháp khử trùng thích hợp cho hai dòng keo lai tam bội X201 và X205 nghiên cứu là sử dụng dung dịch HgCl<sub>2</sub> nồng độ 0,1% trong vòng 5 phút cho tỷ lệ bất chồi hữu hiệu đạt từ 58,5 - 65,4%.

2. Môi trường nhân chồi thích hợp cho các dòng keo lai tam bội X201 và X205 nghiên cứu là môi trường MS\* có bổ sung BAP nồng độ 1,5 mg/l với hệ số nhân chồi đạt từ 2,6 - 2,9 lần với chiều cao chồi trung bình đạt trên 3,8 cm sau 25 ngày nuôi cấy.

3. Môi trường ra rễ thích hợp cho các dòng keo tam bội nghiên cứu là 1/2 MS\* + IBA nồng độ 2,0 mg/l cho tỷ lệ ra rễ trên 97% ở cả 2 dòng keo lai tam bội nghiên cứu với chiều dài rễ trung bình đạt từ 3,6 cm.



## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Barringer B.C., 2007. Polyploidy and self-fertilization in flowering plants, *American Journal of Botany*, 94(9), pp. 1527 - 33.
2. Girijashankar V., 2011. Micropropagation of multipurpose medicinal tree *Acacia auriculiformis*. *J. Med. Plant Res.*, 5, pp. 462-466.
3. Griffin A.R., Nghiem Quynh Chi, Harbard J. L., Do Huu Son, Harwood C.E., Aina Price, Tran Duc Vuong, Koutoulis A. & Ha Huy Thinh, 2015. Breeding polyploid varieties of tropical acacias: progress and prospects. *Southern Forests: a Journal of Forest Science*, DOI: 10.2989/20702620.2014.999303.
4. 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, Viện Khoa học Lâm nghiệp Việt Nam.
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. Murashige T., Skoog F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.*, 15, pp. 473 - 497.
7. Ramsey J. and D.W. Schemske, 2002. Neopolyploidy in flowering plants, *Annual review of ecology and systematics*, 33(1), pp. 589 - 639.
8. Đồng Thị Ưng, Nghiem Quỳnh Chi, Lưu Thị Quỳnh, Văn Thu Huyền, 2020. Nghiên cứu nhân giống cho một số dòng keo lai tam bội (X101, X102) mới được công nhận bằng phương pháp nuôi cấy mô tế bào. *Tạp chí Khoa học Lâm nghiệp*, số 5.

**Email tác giả liên hệ:** leson@vafs.gov.vn

**Ngày nhận bài:** 25/11/2023

**Ngày phản biện đánh giá và sửa chữa:** 04/12/2023

**Ngày duyệt đăng:** 06/12/2023