

ỨNG DỤNG KỸ THUẬT NUÔI CÂY *IN VITRO* TRONG NHÂN GIỐNG MỘT SỐ DÒNG KEO LÁ TRÀM (*Acacia auriculiformis*)

Nguyễn Văn Việt¹, Trần Việt Hà¹, Kiều Thị Hà², Nguyễn Đức Kiên²

¹Trường Đại học Lâm nghiệp

²Viện Khoa học Lâm nghiệp

TÓM TẮT

Keo lá tràm còn gọi là Tràm bông vàng, có thớ mịn, vân và màu sắc đẹp, là một trong những loài cây đang được ưa chuộng trên thị trường đồ mộc ở trong nước và trên thế giới. Vì vậy, việc áp dụng phương pháp nhân giống tiên tiến - nuôi cây *in vitro* những loài cây này là rất cần thiết. Kết quả nghiên cứu chỉ ra, chồi bánh tẻ cây Keo lá tràm được sát khuẩn bằng cồn 70% trong 1 phút, khử trùng bằng HgCl₂ 0,1% trong 7 phút và nuôi cây trên môi trường MS bổ sung 30 g/l sucrose và 6,5 g/l agar, cho tỷ lệ mẫu sạch tái sinh chồi cao nhất là 33,85% đối với dòng keo Clt43; đạt 29,23% đối với dòng keo Clt98. Nhân nhanh chồi trên môi trường dinh dưỡng cơ bản MS* bổ sung 1 mg/l BAP; 0,5 mg/l Kinetin; 1 g/l than hoạt tính, cho hệ số nhân chồi đối với hai dòng Keo trên lần lượt là 2,75 và 2,62 lần. Tạo cây hoàn chỉnh trên môi trường ½ MS* bổ sung 2,0 mg/l IBA, tỷ lệ ra rễ đối với dòng keo lá tràm Clt43 và Clt98 lần lượt là 88,52 và 85,33%; số rễ trung bình lần lượt là 2,6 và 2,8 rễ/cây; chiều dài rễ lần lượt là 1,43 và 1,5 cm/rễ. Kết quả nghiên cứu cho thấy có thể ứng dụng phương pháp nuôi cây *in vitro* trong nhân giống 2 dòng Keo lá tràm trên nhằm tạo ra số lượng lớn cây giống, chất lượng cây tốt, đáp ứng cho nhu cầu trồng rừng gỗ lớn hiện nay ở Việt Nam.

Từ khóa: Đa chồi, Keo lá tràm, nhân giống, nuôi cây *in vitro*, tạo rễ.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Keo Acacia là một chi thực vật họ phụ Trinh nữ (*Mimosoideae*) thuộc họ Đậu (*Leguminosae*) bao gồm khoảng 1.200 loài có phân bố rộng ở châu Á và châu Đại Dương. Keo lá tràm còn gọi là Tràm bông vàng, là loài cây đơn thân, thẳng, thường xanh và sinh trưởng khá nhanh. Hiện nay, ở nước ta Keo lá tràm là một trong những loài cây trồng rừng kinh tế chủ yếu. Tổng diện tích rừng trồng Keo lá tràm ở Việt Nam khoảng 90.000 ha, tương đương với 4,5% tổng diện tích rừng trồng trong cả nước (Lê Đình Khả, 2003). Đây là loài cây thích ứng khá rộng với các vùng sinh thái khác nhau của nước ta, từ điều kiện khí hậu, đất đai của vùng cát ven biển tương đối khô hạn miền Trung đến vùng núi thấp dưới 400 m ở Tây nguyên (Lê Đình Khả, 2001). Gỗ Keo lá tràm có tỷ trọng 0,5 - 0,7 g/cm³, thớ mịn, vân và màu sắc đẹp, là một trong những loài cây đang được ưa chuộng trên thị trường đồ mộc ở nước ta và trên thế giới.

Trước đây, việc cung cấp cây giống cho rừng trồng chủ yếu bằng phương pháp giâm hom song phương pháp này còn mang nhiều mặt hạn chế chưa đáp ứng được nhu cầu về cây giống, trong khi đó công nghệ nuôi cấy mô ngày một phát triển và mang lại những đặc điểm ưu trội hơn hẳn so với các phương thức nhân giống giâm hom như: cây giống tạo ra bằng phương pháp nuôi cấy mô có thể sản xuất quanh năm không phụ thuộc vào mùa vụ, cần ít

diện tích sản xuất, cây giống sản xuất ra hoàn toàn sạch bệnh, đồng nhất về mặt di truyền, có độ trẻ hóa cao, có khả năng sinh trưởng và phát triển tốt hơn khi trồng trên hiện trường. Trên thế giới và Việt Nam đã có nhiều công trình nghiên cứu về *Acacia auriculiformis* như Cán Thị Lan và cộng sự (2014); Đoàn Thị Mai và cộng sự (2000, 2003,...); Haliza Ismail *et al* (2016)... Tuy nhiên, nghiên cứu về nhân giống *in vitro* dòng Keo lá tràm Clt43 và Clt98 chưa từng được công bố.

Bài báo này công bố kết quả nghiên cứu nhân giống thành công một số dòng Keo lá tràm bằng phương pháp nuôi cấy *in vitro*, nhằm tạo ra số lượng lớn cây giống phục vụ trồng rừng sản xuất ở Việt Nam.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng và vật liệu nghiên cứu

- Đối tượng nghiên cứu: Hai dòng Keo lá tràm Clt43 và Clt98 được cung cấp từ Viện nghiên cứu Giống & Công nghệ sinh học Lâm nghiệp – Viện Khoa học Lâm nghiệp Việt Nam.

- Vật liệu nghiên cứu:

+ Chồi bánh tẻ của hai dòng Keo lá tràm Clt43 và Clt98 của cây 1 - 1,5 năm tuổi.

+ Vật liệu và hóa chất là loại phổ biến dùng trong nuôi cấy mô tế bào.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Điều kiện bố trí thí nghiệm

Điều kiện thí nghiệm tuân theo tiêu chuẩn và quy định kỹ thuật của phòng thí nghiệm

nuôi cấy mô tế bào: Số giờ chiếu sáng trong ngày là 10 - 12 h/ngày; Cường độ ánh sáng khoảng 2.000 - 3.000 lux; Nhiệt độ phòng nuôi là $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$; Môi trường nuôi cấy được khử trùng ở áp suất 1 atm, nhiệt độ 118°C trong thời gian từ 18 phút; Các dụng cụ được khử trùng ở áp suất 1 atm; nhiệt độ 120°C trong thời gian 40 phút; pH của môi trường nuôi cấy được điều chỉnh ở 5,8. Các thí nghiệm tiến hành với 3 lần lặp, 30 mẫu/lần lặp, số liệu được thu thập sau 4 tuần nuôi cấy.

2.2.2. Phương pháp bố trí thí nghiệm

1) Ảnh hưởng của kỹ thuật khử trùng đến hiệu quả tạo mẫu sạch và tái sinh chồi

Chồi bánh tẻ các dòng Keo lá tràm được rửa sạch bằng nước xà phòng loãng, tráng rửa lại bằng nước; sát khuẩn bề mặt bằng cồn 70% trong 1 phút. Tiếp tục khử trùng bằng HgCl_2 0,1% và HgCl_2 0,05% với thời gian 3; 5; 7 và 9 phút. Sau mỗi lần thực hiện công việc trên, đều tráng rửa mẫu 2 - 3 lần bằng nước cất. Sau khi khử trùng, cắt mẫu thành các đoạn dài 2 - 4 cm, có ít nhất 1 mắt ngủ rời cây trên môi trường dinh dưỡng cơ bản MS bổ sung 30 g/l sucrose và 6,5 g/l agar.

2) Ảnh hưởng của nồng độ các cytokinin đến hệ số nhân chồi và tỷ lệ chồi hữu hiệu

Các chồi mới tái sinh có kích thước lớn hơn 1,5 cm được tách ra và cấy chuyển sang môi trường nhân nhanh, là môi trường dinh dưỡng cơ bản MS* (Môi trường có sự điều chỉnh về nồng độ các chất đa lượng và vi lượng trong thành phần môi trường MS cho phù hợp với đối tượng nghiên cứu), bổ sung BAP (0,5 ÷ 2,0 mg/l); 30 g/l sucrose và 6,5 g/l agar. Sau khi tìm được nồng độ BAP phù hợp, tiếp tục bổ sung thêm Kinetin (0,25 ÷ 1,0 mg/l) vào môi trường nuôi cấy để nghiên cứu sự ảnh hưởng của tổ hợp chất điều hòa sinh trưởng đến hiệu quả nhân nhân nhanh.

3) Ảnh hưởng của hàm lượng than hoạt tính (AC) đến khả năng tái sinh chồi và chất lượng chồi

Từ môi trường nhân nhanh chồi tốt nhất của thí nghiệm trên, tiến hành bổ sung than hoạt tính (0,5 ÷ 2,0 g/l) vào môi trường nuôi cấy để nghiên cứu khả năng nhân nhanh và chất lượng chồi.

4) Ảnh hưởng của nồng độ IBA đến khả năng ra rễ tạo cây hoàn chỉnh

Các chồi hữu hiệu có kích thước ≥ 2 cm đã

hình thành bộ lá và thân lóng đầy đủ được tách ra từ cụm chồi trong môi trường nhân nhanh. Sau đó cấy chuyển trên môi trường cảm ứng tạo rễ là môi trường dinh dưỡng cơ bản $\frac{1}{2}$ MS* bổ sung chất điều hòa sinh trưởng IBA (1,0 ÷ 2,5 mg/l); 20 g/l sucrose và 6,5 g/l agar.

5) Ảnh hưởng của thời gian huấn luyện đến tỷ lệ sống chất lượng cây con

Sau khi ra rễ tạo cây hoàn chỉnh, tiến hành huấn luyện cây Keo lá tràm *in vitro* với thời gian khác nhau (0 ÷ 21 ngày), trong điều kiện ánh sáng tán xạ sau đó trồng ra bầu đất hỗn hợp (80% đất tầng B; 18% phân gà ủ hoai, 2% phân lân), tưới nước 2 lần/ngày, điều kiện ánh sáng trong nhà lưới.

2.2.3. Phương pháp thu thập và xử lý số liệu:

- Phương pháp thu thập số liệu: Tỷ lệ mẫu sống (%) = số mẫu sống * 100 / tổng số mẫu; tỷ lệ mẫu nhiễm (%) = số mẫu nhiễm * 100 / tổng số mẫu; tỷ lệ mẫu tái sinh chồi (%) = số mẫu tái sinh chồi * 100 / tổng số mẫu; hệ số nhân (lần) = tổng số chồi tạo mới / tổng số chồi cấy ban đầu; tỷ lệ chồi hữu hiệu (%) = số chồi đạt tiêu chuẩn * 100 / tổng số chồi tạo ra.

- Số liệu thu được ở các thí nghiệm được xử lý bằng phần mềm Excel và SPSS (Nguyễn Hải Tuất và cộng sự, 2005).

2.3. Thời gian và địa điểm nghiên cứu

Nghiên cứu tại Trung tâm thực nghiệm và chuyên gia giống cây rừng - Viện Nghiên cứu Giống và Công nghệ sinh học Lâm nghiệp từ tháng 2 năm 2017 đến tháng 10 năm 2018.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Ảnh hưởng của kỹ thuật khử trùng tới tạo mẫu sạch và tái sinh chồi Keo lá tràm

Để nhân giống *in vitro* thành công thì việc tạo mẫu sạch là khâu then chốt quyết định đến sự thành bại của quy trình nuôi cấy, yêu cầu mẫu sạch hoàn toàn. Đến nay, các dung dịch khử trùng thường dùng là HgCl_2 , NaClO , $\text{Ca}(\text{OCl})_2$, H_2O_2 , AgNO_3 ... Tuy nhiên, sự vô trùng thành công không những chỉ phụ thuộc vào loại chất khử trùng được sử dụng, mà còn phụ thuộc nồng độ và thời gian tiến hành, làm sao cho tỷ lệ mẫu nhiễm thấp, tỷ lệ mẫu sống và nảy chồi cao và chồi sinh trưởng phát triển tốt. Trong nghiên cứu này, đã sử dụng hóa chất là HgCl_2 (0,05%; 0,1%) với thời gian khác nhau để xác định được chế độ khử trùng thích hợp cho từng đối tượng. Kết quả nghiên cứu được thể hiện tại bảng 1.

Bảng 1. Ảnh hưởng của kỹ thuật khử trùng tới hiệu quả tạo mẫu sạch và tái sinh chồi

Dòng Keo lá trà	Nồng độ chất khử trùng	Thời gian (phút)	Tỷ lệ mẫu sống (%)		Tỷ lệ mẫu nhiễm (%)		Tỷ lệ tái sinh chồi (%)		
			TB	Sđ	TB	Sđ	TB	Sđ	
Cl43	HgCl ₂ 0,1%	3	88,89	1,53	80,00	3,61	2,5	1,15	
		5	82,22	2,08	57,78	3,06	10,81	0,58	
		7	72,22	2,52	44,44	2,52	33,85	1,15	
		9	65,56	2,08	40,00	1,73	30,51	3,00	
	HgCl ₂ 0,05%	3	95,56	1,15	81,11	0,58	2,33	0,50	
		5	93,33	1,00	78,89	2,08	3,57	1,00	
		7	87,78	1,15	72,22	0,58	13,92	0,58	
		9	82,22	1,53	64,44	3,06	4,05	1,00	
	<i>F_{tính}</i>			9,81		12,27		11,00	
	Cl98	HgCl ₂ 0,1%	3	91,11	0,58	55,56	1,53	12,2	3,06
5			84,44	0,58	42,22	4,16	17,11	1,53	
7			73,25	4,04	30,00	3,00	29,23	2,08	
9			60,00	1,00	22,22	3,51	16,67	1,00	
HgCl ₂ 0,05%		3	95,56	1,15	81,11	0,58	2,33	0,58	
		5	93,33	1,00	78,89	2,08	3,57	1,00	
		7	87,78	1,15	72,22	0,58	16,46	0,58	
		9	82,22	1,53	64,44	3,06	4,05	1,00	
<i>F_{tính}</i>			12,85		19,49		4,92		
<i>F_{0,05}</i>					<i>F_(.05;7;16) = 2,65</i>				

Kết quả nghiên cứu (Bảng 1) cho thấy, tỷ lệ mẫu sống, tỷ lệ mẫu nhiễm và tỷ lệ mẫu bất chồi ở các công thức thí nghiệm có sự sai khác rõ rệt ($F_{tính} > F_{0,05}$). Kết quả thí nghiệm hai dòng Keo lá trà Cl43 và Cl98 đều đạt hiệu quả khử trùng tốt nhất là HgCl₂ 0,1% trong thời gian 7 phút với tỷ lệ chồi hữu hiệu cho hai dòng Keo lá trà nghiên cứu lần lượt là 33,85% và 29,23%, trong khi tỷ lệ mẫu nhiễm dưới 50% và tỷ lệ mẫu sống đạt trên 70% (cho cả hai đối tượng). Kết quả khử trùng mẫu với hoá chất HgCl₂ 0,05% và các khoảng thời gian còn lại không cho kết quả mong muốn. Kết quả bảng 1, cho thấy, khi khử trùng trong thời gian ngắn (3 đến 5 phút) cho tỷ lệ mẫu sạch thấp, khi kéo dài thời gian khử trùng (9 phút) cho tỷ lệ mẫu sạch tăng lên nhưng khả năng tái sinh chồi có xu hướng ngược lại. Như vậy, tăng thời gian và nồng độ chất khử trùng lên quá cao sẽ tăng hiệu quả sát trùng nhưng làm tổn thương mẫu nhiều hơn do chất khử trùng làm tổn hại đến tế bào và mô thực vật làm cho khả năng tái sinh chồi giảm (Nguyễn Văn Việt và cộng sự, 2016). Kết quả của thí nghiệm cho thấy chế độ khử trùng thích hợp cho cả 2 dòng Keo lá trà (Cl43 và Cl98) là khử trùng bằng HgCl₂ 0,1% trong thời gian 7 phút (Hình 1a,b).

3.2. Ảnh hưởng của nồng độ các chất điều hòa sinh trưởng đến nhân nhanh chồi

3.2.1. Ảnh hưởng của nồng độ BAP đến nhân nhanh chồi 2 dòng Keo lá trà

Thành phần môi trường nuôi cấy là một trong những yếu tố quyết định sự sinh trưởng và phát triển 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 (Đoàn Thị Mai và cộng sự, 2000). Tuy nhiên, do đặc điểm di truyền không hoàn toàn đồng nhất của cây rừng, một đối tượng có chu kỳ sống dài ngày, hệ gen phức tạp, phản ứng của kiểu gen với điều kiện môi trường là rất khác nhau vì thế đòi hỏi có sự điều chỉnh về liều lượng, tỷ lệ các chất đa lượng và vi lượng trong thành phần môi trường MS cơ bản và được gọi là MS cải tiến (MS*) (Đoàn Thị Mai và cộng sự, 2009). Trong nghiên cứu này, đã sử dụng môi trường dinh dưỡng MS* bổ sung (0,5 ÷ 2,0 mg/l) BAP để đánh giá hiệu quả nhân chồi cho các dòng Keo lá trà. Kết quả được thể hiện trong bảng 2.

Bảng 2. Ảnh hưởng của nồng độ BAP đến nhân nhanh chồi 2 dòng Keo lá trà

Dòng Keo lá trà	Nồng độ BAP (mg/l)	Hệ số nhân chồi (lần)		Chiều dài TB/chồi (cm)		Chất lượng chồi
		TB	Sd	TB	Sd	
Cl43	0,0	1,03	0,10	1,41	0,16	+
	0,5	1,15	0,10	1,51	0,02	++
	1,0	1,40	0,18	1,85	0,09	+++
	1,5	1,27	0,02	1,70	0,06	++
	2,0	1,18	0,10	1,48	0,03	++
$F_{tính}$		4,47		15,50		
Cl98	0,0	1,05	0,03	1,35	0,27	+
	0,5	1,12	0,13	1,51	0,02	++
	1,0	1,37	0,11	1,77	0,14	+++
	1,5	1,20	0,02	1,66	0,14	++
	2,0	1,16	0,10	1,48	0,03	++
$F_{tính}$		5,66		4,62		
$F_{0,05}$				$F_{(0,05;4;10)} = 3,47$		

Ghi chú: (+) Màu sắc chồi xanh, thân chồi rất mảnh; (++) Màu sắc chồi xanh, thân chồi mảnh, thân phân lông rõ ràng; (+++) Màu sắc chồi xanh, chồi mập, thân phân lông rõ ràng.

Từ kết quả tại bảng 2 cho thấy, hệ số nhân chồi và chiều dài chồi của 2 dòng Keo lá trà đều có sự khác nhau giữa các công thức thí nghiệm ($F_{tính} > F_{0,05}$). Khi sử dụng BAP 1,0 mg/l đều cho hiệu quả nhân chồi tốt nhất đối với cả hai dòng Keo lá trà Cl43, Cl98 với hệ số nhân chồi đạt lần lượt 1,37 - 1,4 lần (Hình 1c,d). Trong đó, Dòng Cl43 đạt hệ số nhân chồi 1,4 lần và chiều dài chồi đạt 1,85 cm. Dòng Cl98: đạt hệ số nhân chồi 1,37 lần và chiều dài chồi đạt 1,77 cm. Khi tăng nồng độ BAP lớn hơn 1,0 mg/l thì lại cho hệ số nhân chồi giảm.

3.2.2. Ảnh hưởng nồng độ BAP và Kinetin đến nhân nhanh chồi 2 dòng Keo lá trà

Theo Sakakibara (2006), cytokinin có vai trò quan trọng trong phân chia tế bào và kích thích sự hình thành chồi, kích thích sự hình thành đỉnh sinh trưởng và được sử dụng phổ biến trong nuôi cấy mô tế bào thực vật. Để tăng hệ số nhân giống, người ta tăng nồng độ cytokinin trong môi trường nuôi cấy ở giai đoạn tạo chồi *in vitro*. Các loại cytokinin thường được sử dụng trong nuôi cấy *in vitro* như: BAP, Kinetin, BA, TDZ, Zeatin... Nghiên cứu này đã sử dụng môi trường dinh dưỡng MS* bổ sung 1,0 mg/l BAP và (0,25 ÷ 1,0 mg/l) Kinetin. Kết quả nghiên cứu được trình bày tại bảng 3.

Bảng 3. Ảnh hưởng của nồng độ BAP và Kinetin đến nhân nhanh chồi 2 dòng Keo lá trà

Dòng Keo lá trà	Chất ĐHST (mg/l)		Hệ số nhân chồi (lần)		Tỷ lệ chồi hữu hiệu (%)		Chất lượng chồi
	BAP	Kinetin	TB	Sd	TB	Sd	
Cl43	1,0	0,0	1,40	0,18	22,75	0,33	++
		0,25	2,02	0,09	27,72	0,54	++
		0,5	2,40	0,13	34,01	0,66	+++
		0,75	2,05	0,09	25,38	2,01	++
		1,0	1,94	0,12	25,99	1,20	+
$F_{tính}$		25,05		42,35			
Cl98	1,0	0,0	1,37	0,11	22,51	0,52	++
		0,25	1,78	0,15	26,92	1,33	++
		0,5	2,25	0,10	31,07	1,90	+++
		0,75	1,90	0,18	25,38	2,01	++
		1,0	1,94	0,12	24,88	2,17	+
$F_{tính}$		16,38		10,48			
$F_{0,05}$				$F_{(0,05;4;10)} = 3,47$			

Ghi chú: (+) Màu sắc chồi xanh, thân chồi rất mảnh, thân phân lông kém; (++) Màu sắc chồi xanh, thân chồi mảnh, thân phân lông rõ ràng; (+++) Màu sắc chồi xanh, chồi mập, thân phân lông rõ ràng.

Kết quả nghiên cứu (Bảng 3) cho thấy, khi tăng nồng độ Kinetin từ 0 đến 0,5 mg/l trong môi trường nuôi cấy; đối với dòng Clt43 cho hệ số nhân chồi tăng từ 1,40 đến 2,40 lần và tỷ lệ chồi hữu hiệu tăng từ 22,75% đến 34,01%; đối với dòng Clt98 thì hệ số nhân chồi đạt từ 1,37 đến 2,25 lần và tỷ lệ chồi hữu hiệu đạt từ 22,51% đến 31,07%. Kết quả tốt nhất khi bổ sung phối hợp giữa 1,0 mg/l BAP và 0,5 mg/l Kinetin vào môi trường nuôi cấy, cho hệ số nhân chồi và tỷ lệ chồi hữu hiệu của dòng Clt43 lần lượt là 2,40 và 34,01%; của dòng Clt98 là 2,25 lần; 31,07% (Hình 1e,f). Tiếp tục tăng nồng độ từ 0,75 lên đến 1 mg/l thì hệ số nhân chồi và tỷ lệ chồi hữu hiệu đều có xu hướng giảm. Phân tích phương sai cũng cho thấy, tổ hợp BAP và Kinetin giữa các công

thức thí nghiệm có ảnh hưởng rõ rệt tới hệ số nhân chồi cũng như tỷ lệ chồi hữu hiệu ($F_{tinh} > F_{0,05}$) của hai dòng Keo lá trà. Như vậy, môi trường nhân nhanh chồi thích hợp cho hai dòng Keo lá trà Clt43 và Clt98 là môi trường dinh dưỡng cơ bản MS* bổ sung 1,0 mg/l BAP và 0,5 mg/l Kinetin.

3.2.3. Ảnh hưởng của than hoạt tính đến nhân nhanh 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*. Thí nghiệm đã bổ sung than hoạt tính (0,5 ÷ 2 g/l) vào môi trường nuôi cấy MS* + 1,0 mg/l BAP và 0,5 mg/l Kinetin. Kết quả được trình bày ở bảng 4.

Bảng 4. Ảnh hưởng của hàm lượng than hoạt tính (AC) đến hiệu quả nhân chồi

Các dòng Keo	ĐHST (mg/l)		AC (g/l)	Hệ số nhân chồi (lần)		Tỷ lệ chồi hữu hiệu (%)		Chiều cao chồi (cm)	
	BAP	Kinetin		TB	Sđ	TB	Sđ	TB	Sđ
Clt43	1,0	0,5	0,0	2,40	0,13	34,01	0,66	1,80	0,05
			0,5	2,62	0,25	45,68	0,67	2,62	0,15
			1,0	2,75	0,10	61,77	0,56	3,22	0,21
			1,5	2,52	0,15	57,02	0,75	2,88	0,38
			2,0	2,55	0,10	50,65	1,57	2,95	0,10
F_{tinh}			9,48		321,94		18,89		
Clt98	1,0	0,5	0,0	2,25	0,10	31,07	1,90	1,80	0,05
			0,5	2,60	0,25	45,60	0,67	2,97	0,10
			1,0	2,62	0,06	53,83	0,80	3,25	0,20
			1,5	2,60	0,05	41,17	0,75	3,15	0,10
			2,0	2,55	0,10	41,60	1,57	3,02	0,15
F_{tinh}			7,09		39,7		60,27		
$F_{0,05}$			$F_{(05;4;10)} = 3,47$						

Kết quả nghiên cứu (Bảng 4) cho thấy ở cả 2 dòng Keo lá trà Clt43 và Clt98 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. Dòng Clt43 hệ số nhân chồi đạt 2,75 lần, tỷ lệ chồi hữu hiệu và chiều cao của chồi cao hơn hẳn so với các công thức thí nghiệm khác lần lượt là 61,77% và 3,22 cm. Ở dòng Clt98 đạt hệ số nhân chồi đạt 2,62 lần, tỷ lệ chồi hữu hiệu đạt 53,83% và chiều cao trung bình đạt 3,25 cm (Hình 1g,h). Kết quả trên là khả quan hơn so với nghiên cứu của Đoàn Thị Mai và cộng sự (2003) với hệ số nhân chồi đạt 2,12 - 4,34 lần; kết quả của Cán Thị Lan và cộng sự (2014), hệ số nhân chồi là 2,35 lần. Kết quả phân tích phương sai cũng cho thấy, hàm lượng than hoạt tính khi bổ sung vào môi

trường nuôi cấy ảnh hưởng rõ rệt đến hệ số nhân, tỷ lệ chồi hữu hiệu cũng như chiều cao chồi ($F_{tinh} > F_{0,05}$) của 2 dòng Keo lá trà.

3.3. Ảnh hưởng của nồng độ IBA đến khả năng ra rễ tạo cây hoàn chỉnh 2 dòng Keo lá trà

Giai đoạn cuối cùng của quá trình nhân giống *in vitro* là tạo cây con hoàn chỉnh, có bộ rễ cứng cáp để có thể sinh trưởng phát triển tốt tại vườn ươm. Một trong những chất kích thích tạo rễ thường được sử dụng hiệu quả trong nuôi cấy *in vitro* cho thực vật là IBA với các nồng độ khác nhau tùy từng đối tượng nghiên cứu. Trong thí nghiệm này môi trường nuôi cấy được sử dụng là môi trường dinh dưỡng cơ bản 1/2 MS* bổ sung (1,0 - 2,5 mg/l IBA); 20 g/l sucrose và 6,5 g/l agar. Kết quả được trình bày ở bảng 5.

Bảng 5. Ảnh hưởng của nồng độ IBA đến khả năng ra rễ của các dòng Keo lá tràm

Các dòng keo	IBA (mg/l)	Tỷ lệ chồi ra rễ (%)		Số rễ TB/cây (rễ)		Chiều dài TB/rễ (cm)	
		TB	Sd	TB	Sd	TB	Sd
Clt43	0,0	27,47	1,75	1,07	0,12	0,57	0,05
	1,0	65,87	0,69	1,49	0,09	1,00	0,18
	1,5	71,20	1,23	2,14	0,10	1,27	0,08
	2,0	88,52	2,61	2,60	0,22	1,43	0,13
	2,5	63,50	3,00	1,50	0,05	1,10	0,13
$F_{tính}$		102,61		67,03		21,75	
Clt98	0,0	30,83	2,33	0,83	0,29	0,89	0,24
	1,0	57,83	2,58	1,32	0,12	1,00	0,18
	1,5	68,88	2,93	2,02	0,45	1,37	0,13
	2,0	85,33	0,58	2,80	0,56	1,50	0,05
	2,5	67,48	1,76	1,72	0,29	1,10	0,13
$F_{tính}$		118,61		11,73		7,95	
$F_{0,05}$				$F_{(0,05;4;10)} = 3,47$			

Kết quả nghiên cứu (Bảng 5) cho ta thấy ở cả hai dòng Keo lá tràm nghiên cứu đều đạt tỷ lệ ra rễ cao nhất ở nồng độ IBA là 2,0 mg/l. Đối với dòng Clt43 cho kết quả tỷ lệ chồi ra rễ trung bình đạt 88,52%, số rễ trên chồi trung bình đạt 2,6 rễ/cây và chiều dài rễ trung bình đạt 1,43 cm. Tương tự đối với dòng Keo lá tràm Clt98 cho tỷ lệ chồi ra rễ trung bình đạt 85,33%, số rễ trung bình/cây và chiều dài rễ trung bình lần lượt đạt 2,8 rễ/cây và 1,5 cm (Hình 1i,k). Khi sử dụng IBA ở nồng độ thấp hơn (1 mg/l; 1,5 mg/l) và cao hơn (2,5 mg/l) thì tất các chỉ tiêu (Tỷ lệ ra rễ, số rễ trung bình và chiều dài trung bình của rễ) đều thấp hơn đáng kể so với công thức bổ sung 2,0 mg/l IBA. Kết quả phân tích phương sai cho thấy tỷ lệ chồi ra rễ, số rễ/cây và chiều dài rễ của 2 dòng Keo lá tràm nghiên cứu tại các công thức thí nghiệm có sự khác nhau rõ rệt ($F_{tính} >$

$F_{0,05}$), kết quả khác nhau giữa các công thức thí nghiệm là có ý nghĩa.

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

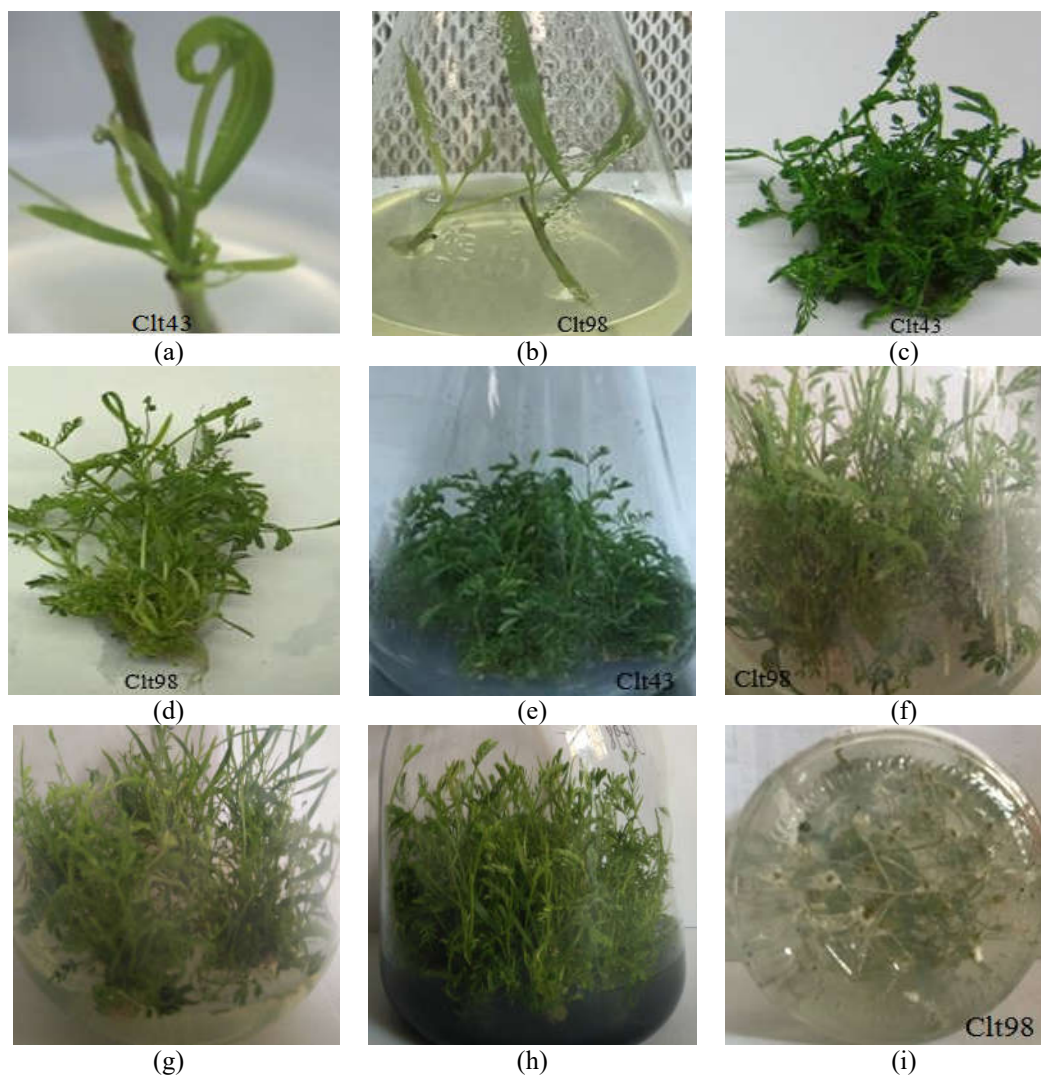
Huấn luyện cây nuôi cấy mô là giai đoạn tạo điều kiện cho cây con trong bình nuôi làm quen dần với môi trường tự nhiên bên ngoài để cây cứng cáp, khỏe mạnh. Khi đưa cây ra ngoài vườn đạt tỷ lệ cây sống cao, cây sinh trưởng đồng đều. Đây được coi là một bước thuần hóa trước khi tách khỏi điều kiện *in vitro* và là giai đoạn có ý nghĩa thiết thực trong thực tiễn sản xuất. Thí nghiệm bố trí với 3 công thức thí nghiệm với thời gian huấn luyện khác nhau (7, 14, 21 ngày) và 1 công thức đối chứng (không huấn luyện). Kết quả nghiên cứu được trình bày ở bảng 6.

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

Các dòng Keo	Thời gian huấn luyện (ngày)	Tỷ lệ sống (%)		Chiều cao TB/cây (cm)	
		TB	Sd	TB	Sd
Clt43	0	62,80	2,49	3,23	0,23
	7	70,52	1,62	4,47	0,20
	14	87,00	1,34	5,38	0,23
	21	74,00	1,29	5,98	0,33
$F_{tính}$		99,58		68,50	
Clt98	0	60,58	3,63	3,53	0,10
	7	68,02	2,25	4,40	0,13
	14	86,67	1,18	5,50	0,28
	21	72,35	1,99	5,84	0,34
$F_{tính}$		61,24		60,82	
$F_{0,05}$				$F_{(0,05;3;8)} = 4,07$	

Qua bảng kết quả thí nghiệm (Bảng 6) cho thấy, thời gian huấn luyện thực sự ảnh hưởng đến tỷ lệ cây sống của cây con tại vườn ươm. Khi kéo dài thời gian huấn luyện, tỷ lệ cây sống tăng lên và đạt cao nhất khi cây được huấn luyện trong ở thời gian 14 ngày đối với 2 dòng Keo lá tràm Clt43 và Clt98 có tỷ lệ cây

sống lần lượt là 87,0% và 86,67%, chiều cao trung bình/cây của 2 dòng keo lần lượt là 5,38 cm và 5,5 cm. Phân tích phương sai cũng cho thấy tỷ lệ sống và chiều cao cây ở các công thức huấn luyện khác nhau là có sự khác nhau rõ rệt ($F_{tính} > F_{0,05}$).



Hình 1. Một số hình ảnh trong quy trình nhân giống Keo lá tràm (Dòng Clt43 và Clt98)

Ghi chú: a,b Mẫu sạch tái sinh chồi; c,d) Cụm chồi trên môi trường bổ sung 1 mg/l BAP; e,f) Cụm chồi trên môi trường bổ sung 1mg/l BAP và 0,5 mg/l Kinetin; g) Cụm chồi trên môi trường không có AC; h) Cụm chồi trên môi trường bổ sung 1 g/l AC; i) Ra rễ trên môi trường bổ sung 2 mg/l BAP.

4. KẾT LUẬN

Từ các kết quả nghiên cứu nhân giống 2 dòng Keo lá tràm Clt43 và Clt98 bằng phương pháp nuôi cấy *in vitro*, chúng tôi rút ra một số kết luận sau:

Khử trùng tạo mẫu sạch đối với chồi bánh tẻ của các dòng Keo lá tràm, sử dụng dung dịch $HgCl_2$ 0,1% trong 7 phút đạt kết quả: Dòng Clt43 cho tỷ lệ mẫu sống đạt 72,22% và tỷ lệ bật chồi đạt 33,85%; dòng Clt98 cho tỷ lệ mẫu sống đạt 73,25% và tỷ lệ bật chồi đạt 29,23%.

Nhân nhanh chồi hai dòng Keo lá tràm dùng môi trường khoáng cơ bản MS* bổ sung 1,0 mg/l BAP; 0,5 mg/l Kinetin; 30 g/l đường; 6,5 g/l agar kết quả là: Dòng Clt43 cho hệ số nhân chồi đạt 2,4 lần, tỷ lệ chồi hữu hiệu đạt 34,01%; dòng Clt98 cho hệ số nhân chồi đạt 2,25 lần, tỷ lệ chồi hữu hiệu đạt 31,07%.

Nâng cao chất lượng chồi Keo lá tràm dùng môi trường khoáng cơ bản MS* bổ sung 1,0 mg/l BAP; 0,5 mg/l Kinetin; 1,0 g/l AC; 30 g/l đường; 6,5 g/l agar thu được kết quả: Dòng

ClT43 cho hệ số nhân chồi đạt 2,75 lần, tỷ lệ chồi hữu hiệu đạt 61,77% và chồi đạt tiêu chuẩn; dòng ClT98 cho hệ số nhân chồi đạt 2,62 lần, tỷ lệ chồi hữu hiệu đạt 53,83% và chồi đạt tiêu chuẩn.

Cảm ứng ra rễ tạo cây hoàn chỉnh các dòng Keo lá tràm trên môi trường khoáng cơ bản ½ MS* bổ sung 2,0 mg/l IBA; 20 g/l sucrose; 6,5 g/l agar đạt kết quả: Dòng ClT43 cho tỷ lệ ra rễ đạt 88,52%, trung bình số rễ của một cây đạt 2,6 rễ và chiều dài rễ trung bình đạt 1,43 cm; dòng ClT98 cho tỷ lệ ra rễ đạt 85,33%, số rễ/cây trung bình đạt 2,8 rễ và chiều dài rễ trung bình đạt 1,5 cm.

Thời gian huấn luyện phù hợp đối với hai dòng Keo lá tràm là 14 ngày cho tỷ lệ sống đạt trên 85% cụ thể: Đối với dòng ClT43 có tỷ lệ sống đạt 87% và chiều cao cây đạt 5,38 cm; dòng ClT98 có tỷ lệ sống đạt 86,67%, chiều cao cây đạt 5,5 cm.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Cán Thị Lan, Triệu Thị Thu Hà, Hà Huy Thịnh, Nguyễn Đức Kiên, Phí Hồng Hải, Đồng Thị Ung, Kiều Thị Hà, Nguyễn Thị Thu Dung, Trần Thị Thanh Hương, Văn Thu Huyền (2014). Nghiên cứu nhân nhanh một số giống Keo và Bạch đàn mới bằng công nghệ tế bào thực vật. *Báo cáo thống kê tổng kết đề tài, Viện Khoa học Lâm nghiệp Việt Nam.*

2. Đoàn Thị Mai, Nguyễn Thị Mỹ Hương, Vũ Thị Ngọc, Trần Thị Thanh Hương, Văn Thu Huyền (2009). Nuôi cấy một số giống Keo lai mới chọn tạo. *Tạp chí*

khoa học Lâm nghiệp, số 2/2009, trang 905 - 910.

3. Đoàn Thị Mai, Cán Thị Lan (2000). Kết quả bước đầu về nhân giống Bạch đàn lai bằng phương pháp nuôi cấy mô phân sinh. *Tạp chí khoa học Lâm nghiệp*, (10): trang 46-47.

4. Đoàn Thị Mai, Lê Sơn (2003). Nhân giống cho một số giống cây rừng mới chọn tạo bằng nuôi cấy mô. *Hội nghị CNSH toàn quốc*, Hà Nội tháng 11 năm 2003.

5. Haliza Ismail, Sures Kumar Muniandi, Aziah Mohd Yusoff, Nor Hasnida Hassan, Nor Aini Ab Shukor (2016). *In vitro* micropropagation of *Acacia auriculiformis* from selected juvenile sources. *Dendrobiology*, vol. 75: 157-165

6. Lê Đình Khả (2003). Chọn tạo giống và nhân giống cho một số loài cây trồng rừng chủ yếu ở Việt Nam. *Nxb Nông nghiệp, Hà Nội.*

7. Lê Đình Khả (2001). Chọn giống và nhân giống cho một số loài cây trồng rừng chủ yếu giai đoạn 1996 – 2000. *Báo cáo khoa học, Viện khoa học Lâm nghiệp Việt Nam.*

8. Murashige T. and Skoog F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol plant*, 15: 473 - 497.

9. Nguyễn Hải Tuất, Nguyễn Trọng Bình (2005). Khai thác và sử dụng SPSS xử lý số liệu trong Lâm nghiệp. *Nhà xuất bản Nông nghiệp, Hà Nội.*

10. Nguyễn Văn Việt, Nguyễn Thị Hương, Bùi Văn Thắng (2016). Nhân giống cây Khôi tia (*Ardisia sylvestris*) bằng kỹ thuật nuôi cấy *in vitro*. *Tạp chí Nông nghiệp & Phát triển nông thôn*, 12: 35-39.

11. Sakakibara H (2006). Cytokinins: activity, biosynthesis, and translocation. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 57: 431-449.

USING *IN VITRO* CULTURE TECHNIQUE FOR PROPAGATION OF *Acacia auriculiformis*

Nguyen Van Viet¹, Tran Viet Ha¹, Kieu Thi Ha², Nguyen Duc Kien²

¹ *Vietnam National University of Forestry*

² *Vietnamese Academy of Forest Sciences*

SUMMARY

Acacia auriculiformis is also called Yellow flower Melaleuca, with fine grain, beautiful texture and color, it's most popular plants in the furniture market in country and on the world. Thus, application of advanced method (*in vitro*) to propagate this high - value plant is extremely necessary. The result showed that the optimal method for bud sterilization was soaked in 70% ethanol for 1 minutes, in HgCl₂ 0.1% for 7 minutes. The explants were then grown *in vitro* on Murashige and Skoog's (MS) basal medium supplemented with sucrose 30 g/l and 6.5 g/l agar, shown regenerating shoots at 33.85% for *A. auriculiformis* (ClT43 clone); 29.23% for *A. auriculiformis* (ClT98 clones) after 4 weeks of culture. For multi-shoot stage, the highest number of shoot (2.62 ÷ 2.75 shoots/times) was obtained in MS* medium supplemented with Benzylaminopurine (BAP) 1.0 mg/l, Kinetin 0.5 mg/l, Activated charcoal (AC) 1 g/l for 2 clones of *A. Auriculiformis*. The ½ MS* medium supplemented with indole-3-butyric acid (IBA) 2.0 mg/l, sucrose 20 g/l, agar 6.5 g/l showed the most effective for the rooting in ClT43 clones, producing 88.52% of rooted shoots, an average of 2.6 roots/plant and 1.43 cm/root. ClT98 clones produced 85.33% of rooted shoots, an average of 2.8 roots/plant and 1.5 cm a root. The results indicated that *in vitro* culture technique could be usefully applied on propagation of *A. auriculiformis* to produce the number of seedling for *Acacia auriculiformis* in Vietnam.

Keywords: *Acacia auriculiformis*, *in vitro*, multi-shoot, propagation, tissue culture.

Ngày nhận bài : 02/7/2019

Ngày phản biện : 10/8/2019

Ngày quyết định đăng : 15/8/2019