

NGHIÊN CỨU HOÀN THIỆN CÔNG NGHỆ NUÔI CÂY *IN VITRO* QUY MÔ SẢN XUẤT CÁC DÒNG KEO LAI TAM BỘI (DÒNG X101, X102)

Hà Thị Lệ¹, Cấn Thị Lan¹, Khuất Thị Hải Ninh², Đào Thị Thanh Mai²,

Kiều Thị Hà¹, Lê Thị Xuân Quỳnh¹, Tạ Thu Trang¹, Đỗ Hữu Sơn¹

¹Viện Nghiên cứu Giống và Công nghệ Sinh học Lâm nghiệp

²Trường Đại học Lâm nghiệp

*Email: lehathi.vfu@gmail.com

TÓM TẮT

Nghiên cứu hoàn thiện công nghệ nuôi cấy *in vitro* quy mô sản xuất được thực hiện cho các dòng Keo lai tam bội (Dòng X101 và X102). Kết quả nghiên cứu cho thấy, giai đoạn tạo mẫu sạch, chồi vượt hay chồi nách được khử trùng bằng NaClO 5,0% trong thời gian 8 phút cho tỷ lệ nảy chồi hữu hiệu là 20% đối với dòng X101 và X102. Số chồi/cụm cao nhất đạt được trong môi trường Murashige và Skoog cải tiến (MS*) + 1,0 mg/l BAP + 30 mg/l Ads (Dòng X101 có 5,54 chồi/cụm, dòng X102 có 5,07 chồi/cụm). Môi trường MS* + 1,0 mg/l BAP + 0,25 mg/l GA₃ + 0,05 mg/l NAA được sử dụng cho giai đoạn nâng cao chất lượng chồi (Dòng X101 có 6,65 chồi/cụm, tỷ lệ chồi hữu hiệu (TLCHH): 87,78%, chiều cao chồi: 4,52 cm; dòng X102 có 5,56 chồi/cụm, TLCHH: 87,78%, chiều cao chồi: 4,65 cm). Chồi hữu hiệu đạt tiêu chuẩn được ra rễ trong môi trường ½ MS* + 2 mg/l IBA + 0,25 mg/l ABT, tỷ lệ ra rễ dòng X101 đạt 97,78% và dòng X102 đạt 98,89%. Thời gian huấn luyện 10 ngày cho tỷ lệ cây con sống ở ngoài vườn ươm cao với dòng X101 đạt 83,33% và dòng X102 đạt 81,11%. Trên giá thể 42% trấu + 43% xơ dừa + 15% than bùn (vỏ bầu tự tiêu) cây sống đạt tỷ lệ 95%. Cây sinh trưởng và phát triển tốt với chế độ chăm sóc là bón phân NPK (13: 13: 13 TE) 1,0%, liều lượng nước tưới là 100 lít/20.000 cây, tưới 15 ngày/lần.

Từ khóa: Keo lai tam bội, keo lai, nuôi cấy *in vitro*.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Keo là loài cây sinh trưởng nhanh, luân kỳ kinh doanh ngắn, năng suất cao góp phần cải tạo đất vì vậy keo là loài cây chủ yếu trong trồng rừng tại Việt Nam. Tính đến năm 2019, đã có 54 giống các loài keo đã được Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn công nhận là giống Quốc gia và giống tiến bộ kỹ thuật. Tuy nhiên, số lượng các giống keo được áp dụng vào trồng rừng sản xuất còn hạn chế, bên cạnh đó việc trồng rừng keo thuần loài trên diện tích lớn qua nhiều chu kỳ tiềm ẩn nhiều nguy cơ về an toàn sinh học và sâu, bệnh hại [1].

Năm 2020, 4 dòng Keo lai tam bội (Dòng X101, X102, X201, X205) đã được Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn công nhận là giống mới [1]. Những giống này thể hiện vượt hoặc tương đương về năng suất và 1 số chỉ tiêu chất lượng thân cây so với giống đã được công nhận (Dòng

BV10 và BV16) và vượt tối thiểu 32% về năng suất so với giống sản xuất đại trà. Do Keo lai tam bội có hệ gen phức tạp, đặc điểm di truyền không đồng nhất việc nhân lên về số lượng nhiễm sắc thể dẫn đến tăng liều lượng gen, tăng mức độ dị hợp tử, tăng mức độ tương tác thông tin di truyền. Ngoài ra, các dòng Keo lai tam bội thường khả năng sinh sản hữu tính yếu hoặc thậm chí bất thụ được xem là một trong những cách tiếp cận hiệu quả để thay thế các dòng Keo nhị bội có khả năng sinh sản hữu tính tốt, tái sinh tự nhiên cao, cần kiểm soát để hạn chế sự xâm lấn. 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 *in vitro* tế bào là tối ưu nhất. Bên cạnh đó, các giống keo có phản ứng với điều kiện nuôi cấy khác nhau, do đó cần tiến hành nghiên cứu nhân giống cho từng giống cụ thể. Giai đoạn 2019 - 2020, Viện Nghiên cứu Giống và Công nghệ sinh

học Lâm nghiệp bước đầu đã xây dựng được quy trình nhân giống *in vitro* ở quy mô phòng thí nghiệm cho 2 dòng Keo lai tam bội (Dòng X101 và X102). Tuy nhiên, để phát triển 2 dòng Keo lai tam bội này vào sản xuất, nghiên cứu hoàn thiện công nghệ nuôi cấy *in vitro* quy mô sản xuất 2 dòng Keo lai tam bội là rất cần thiết nhằm hoàn thiện quy trình nuôi cấy trên quy mô sản xuất.

2. 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 tam bội (Dòng X101 và X102) 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. Điều kiện thí nghiệm cho nuôi cấy *in vitro*

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 chế độ nuôi mẫu được thực hiện với cường độ chiếu sáng 2.000 - 3.000 lux, thời gian chiếu sáng 10 giờ, nhiệt độ phòng nuôi cây 25 ± 2°C và chu kỳ cấy chuyển 20 - 25 ngày. Môi trường nuôi cấy được bổ sung 5,5 g/l agar + 30 g/l đường với pH từ 5,7 - 5,8.

2.3. Phương pháp nghiên cứu

2.3.1. Phương pháp bố trí thí nghiệm

Trong nghiên cứu này với các giai đoạn khử trùng, nhân chồi, nâng cao chất lượng chồi, ra rễ sử dụng kết quả nghiên cứu Đồng Thị Ung và cs (2020) [2] làm đối chứng.

- *Giai đoạn tạo mẫu sạch*: Mẫu vật nuôi cấy là các đoạn chồi đỉnh sinh trưởng có kích thước 10 - 15 cm lấy từ cây mẹ đã được xử lý tạo chồi; chồi được rửa dưới vòi nước chảy; sau đó cọ rửa bằng nước rửa chén Sunlight 50% tráng sạch dưới vòi nước chảy rồi tráng lại với nước cất vô trùng. Dùng cồn 70° lắc mẫu trong vòng 30 giây - 1 phút; ngâm lắc trong Javen (NaClO) 5% trong thời gian 4; 8; 12; 16 phút hoặc thủy ngân clorua (HgCl₂) 0,05% trong thời gian 5 phút. Mẫu nuôi cấy trong môi trường MS* (môi trường Murashige và Skoog có sự thay đổi các vi lượng) [2 - 8].

Thu thập số liệu: Tỷ lệ % mẫu nảy chồi hữu hiệu (nảy chồi hữu hiệu là bất chồi bất định ở các đoạn mẫu nuôi cấy mà không bị nhiễm) sau 30 ngày.

- *Giai đoạn tạo cụm chồi*: Các chồi bất định không bị nhiễm ở giai đoạn tạo mẫu sạch được sử dụng làm nguồn mẫu cho giai đoạn tạo cụm chồi. Giai đoạn nhân chồi sử dụng môi trường MS* + 1,0 mg/l BAP (6- benzyl amino purine) + Ads (Adenine sulfate) ở nồng độ 30 mg/l; 60 mg/l; 90 mg/l; 120 mg/l, với pH từ 5,7 - 5,8.

Số liệu thu thập: Số chồi/cụm, tỷ lệ % chồi hữu hiệu (chồi hữu hiệu là chồi có chiều cao trên 1,5 cm thân lá và ngọn rõ ràng, có nhiều hơn 2 cặp lá không có hình thành mô sẹo ở mẫu cấy), chiều cao chồi, chất lượng chồi: (+) 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) sau 30 ngày nuôi cấy.

- *Giai đoạn nâng cao chất lượng chồi*: Các cụm chồi được hình thành trong giai đoạn tạo cụm chồi không bị nhiễm được sử dụng làm nguồn mẫu cho giai đoạn nâng cao chất lượng chồi. Giai đoạn nâng cao chất lượng chồi sử dụng môi trường MS* + 1,0 mg/l BAP + 0,25 mg/l GA3 (Gibberellic acid) + NAA (Naphthaleneacetic) ở các nồng độ 0,5 mg/l; 1 mg/l; 1,5 mg/l; 2,0 mg/l và so sánh với công thức đối chứng là MS* + 1,0 mg/l BAP + 0,25 mg/l GA3. Số liệu thu thập: Số chồi/cụm, tỷ lệ % chồi hữu hiệu, chiều cao chồi sau 30 ngày nuôi cấy.

- *Giai đoạn tạo cây hoàn chỉnh*: Các chồi đạt tiêu chuẩn (chồi xanh, thân mập, phân lông rõ ràng, có nhiều hơn 2 cặp lá, kích thước từ 1,5 cm) được nuôi cấy trong môi trường ra rễ ½ MS* + 2 mg/l IBA (Indol butyric acid) + ABT (Transplantone) ở các nồng độ 0,25 mg/l; 0,5 mg/l; 0,75 mg/l; 1,0 mg/l so sánh với công thức đối chứng ½ MS* + 2 mg/l IBA.

Số liệu thu thập: Tỷ lệ % chồi ra rễ, số rễ/chồi, chiều dài trung bình của rễ (chiều dài rễ được đo trên các rễ có chiều dài lớn hơn hoặc bằng 0,5 cm và chồi có rễ như vậy được coi là ra rễ, ngược lại chồi có rễ < 0,5 cm được coi là không ra rễ) sau 10

ngày nuôi cấy.

- *Giai đoạn vườn ươm:*

+ Nghiên cứu thời gian huấn luyện cây mô: Các bình cây mô ra rễ được đặt trong nhà lưới có nắp được vận lỏng trong thời gian 5; 10; 15; 20 ngày trước khi cấy cây ra vườn ươm. Cây được cấy vào giá thể 85% đất đồi + 14% phân hữu cơ + 1% phân lân. Số liệu thu thập: Tỷ lệ % cây sống, chiều cao cây sau 1 tháng.

+ Nghiên cứu thành phần giá thể: Cây mô sau khi huấn luyện được cấy vào các loại giá thể sau:

Công thức (CT) 1: Bào đất theo tỷ lệ 85% đất đồi + 14% phân hữu cơ + 1% phân lân với vỏ bào polyester (PE).

CT2: 50% than trâu + 50% xơ dừa, sử dụng với vỏ bào tự tiêu.

CT3: 42% trấu + 43% xơ dừa + 15% than bùn, sử dụng với vỏ bào tự tiêu. Số liệu thu thập: Tỷ lệ % cây sống, chiều cao cây sau 1 tháng.

+ Nghiên cứu chế độ bón thúc. Cây con sau 20 ngày tuổi ở vườn ươm được bón thúc, công thức thí nghiệm được bố trí như sau:

+ CT4 : NPK (5: 10: 3) 0,5%.

+ CT5: NPK (5: 10: 3) 1,0%.

+ CT6: NPK (13: 13: 13 TE) 0,5%, TE là Trace Elements (phân NPK Đầu Trâu).

+ CT7: NPK (13: 13: 13 TE) 1,0%.

Với lượng tưới nước là 100 lít cho 20.000 cây, 15 ngày tưới 1 lần.

Số liệu thu thập: Tỷ lệ % cây sống, chiều cao cây sau 1 tháng bón thúc.

2.3.2. Phương pháp xử lý số liệu

So sánh giữa các công thức thí nghiệm về tỷ lệ mẫu nảy chồi hữu hiệu, tỷ lệ chồi hữu hiệu, tỷ lệ ra rễ bằng tiêu chuẩn khi bình phương (χ^2). So sánh giữa các công thức thí nghiệm về số lượng chồi/cụm, chiều dài chồi, chiều dài rễ và số lượng rễ/cây bằng phân tích phương sai một nhân tố. Các thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên với 3 lần lặp, 30 mẫu/lặp. Số liệu đã thu thập được xử lý bằng phần mềm Excel 5.0.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

3.1. Xác định chế độ khử trùng thích hợp cho các dòng Keo lai tam bội

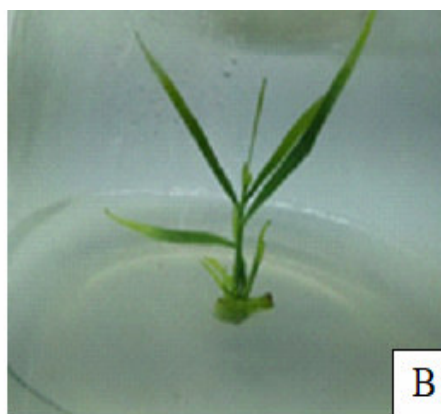
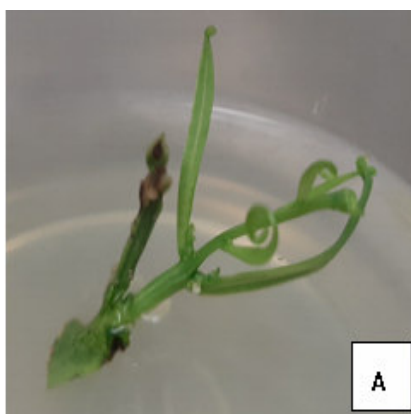
Bảng 1. Kết quả khử trùng các dòng Keo lai tam bội

TT	Loại hóa chất	Thời gian khử trùng (phút)	Tỷ lệ mẫu nảy chồi hữu hiệu (%)	
			Dòng X101	Dòng X102
1	HgCl ₂ 0,05% (Đối chứng)	5	24,44	25,56
2	NaClO 5%	4	11,11	10,00
3		8	22,22	21,11
4		12	13,33	14,14
5		16	10,00	11,11
χ_n^2			11,71	11,71
χ_{05}^2 (k=4)			9,48	9,48

Trong quy trình nhân giống *in vitro*, khử trùng mẫu vật thường được tiến hành với hóa chất khử trùng là $HgCl_2$, đây là loại hóa chất rất thích hợp đối với khử trùng cho nhiều đối tượng cây trồng. Tuy nhiên, đây cũng là hóa chất có độc tính khá cao đối với môi trường và con người. Vì vậy, $NaClO$ 5% được sử dụng với các thời gian 4, 8, 12 và 16 phút để nghiên cứu tạo mẫu sạch các dòng

Keo lai tam bội. Kết quả nghiên cứu được thể hiện ở bảng 1.

Kết quả phân tích thống kê cho thấy, khi sử dụng $HgCl_2$ 0,05% và $NaClO$ 5% với thời gian khử trùng khác nhau có ảnh hưởng rõ rệt tới tỷ lệ mẫu nảy chồi hữu hiệu ($\chi^2_{\text{tính}} > \chi^2_{\text{tra bảng}}$). Điều đó chứng tỏ công thức khử trùng khác nhau sẽ ảnh hưởng rõ rệt đến khả năng nảy chồi hữu hiệu của dòng X101 và X102.



Hình 1. Chồi Keo lai tam bội: Dòng X101 (hình A), dòng X102 (hình B)

Khi sử dụng $NaClO$ 5% khử trùng mẫu chồi với thời gian 4, 8, 12 và 16 phút kết quả cho thấy, thời gian 8 phút cho hiệu quả tốt nhất với tỷ lệ mẫu nảy chồi hữu hiệu đối với dòng X101 là 22,22%, dòng X102 là 21,11%.

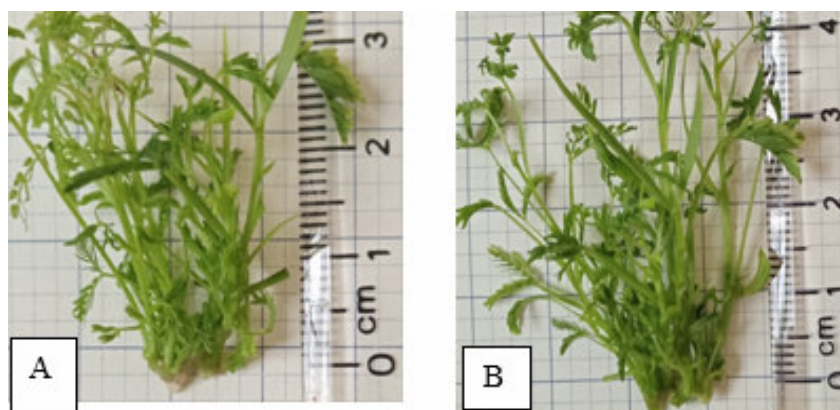
3.2. Xác định môi trường nhân chồi và nâng cao chất lượng chồi thích hợp cho 2 dòng Keo lai tam bội

3.2.1. Ảnh hưởng của Adenin sulphate (Ads) đến khả năng tạo cụm chồi

Bảng 2. Ảnh hưởng của Ads đến khả năng tạo cụm chồi của hai dòng Keo lai tam bội (Dòng X101 và X102)

CT	Môi trường	Keo lai tam bội (Dòng X101)				Keo lai tam bội (Dòng X102)			
	MS ⁺ + BAP 1,0 mg/l + ADS	Chồi/cụm	Chiều dài chồi trung bình (cm)	Tỷ lệ chồi hữu hiệu (%)	Chất lượng chồi	Chồi/cụm	Chiều dài chồi trung bình (cm)	Tỷ lệ chồi hữu hiệu (%)	Chất lượng chồi
1	0 (Đối chứng)	4,93	2,77	42,22	+++	4,53	2,63	40,00	+++
2	30	5,54	3,17	46,67	+++	5,07	3,02	45,56	+++

3	60	5,37	2,83	44,44	+++	4,86	2,72	44,44	+++
4	90	5,27	2,83	42,22	++	4,77	2,70	41,11	++
5	120	5,16	2,07	40,00	++	4,67	2,63	38,89	++
χ_n^2				0,94				1,22	
$\chi_{0,5}^2 (k=4)$				9,48				9,48	



Hình 2. Cụm chồi Keo lai tam bội: Dòng X101 (hình A), dòng X102 (hình B)

Adenin sulphate thường được chú ý khi được kết hợp với ammonium nitrate hoặc với cytokinin như BAP hoặc kinetin. Một đặc tính nữa về hoạt động của adenin sulphate như là một chất hỗ trợ các cytokinin như kinetin và zeatin.

Hiệu quả bổ sung Ads trong môi trường tạo cụm chồi cũng được Saker và cs (1999) [9] thực hiện ở cây Đu đủ với công thức môi trường MS + 2 mg/l NAA + 0,6 IBA + 60 mg/l Ads là tốt nhất. Trên đối tượng cây tiêu đen, Philip và cs (1992) cũng chỉ ra, Ads làm tăng số lượng chồi trên một mẫu [10]. Theo Delgado-Shanchez và cs (2006), việc sử dụng Ads ở những nồng độ khác nhau cũng tạo ra sự tăng nhanh trong nuôi cấy cụm chồi trên 2 loài đậu [11]. Trong nhân giống *in vitro* Keo lá tràm, Cấn Thị Lan và cs (2020) cũng sử dụng Ads nồng độ 30 mg/l cho hệ số nhân chồi là 3,3 lần, chồi xanh, lá mở, phân lóng rõ ràng [12].

Trong nghiên cứu tạo cụm chồi các dòng Keo lai tam bội, môi trường MS* + BAP 1,0 mg/l đã được sử dụng, bổ sung thêm Ads ở các nồng độ 30, 60, 90 và 120 mg/l, sử dụng công thức đối chứng là MS* bổ sung 1,0 mg/l BAP. Kết quả được thể hiện ở bảng 2.

Kết quả phân tích phương sai một nhân tố và tiêu chuẩn khi bình phương ảnh hưởng phối hợp của BAP + Ads đến khả năng nhân nhanh của Keo lai tam bội đều có kết quả $F_{(a)} > F_{(05)}$ và $(\chi_n^2 \text{ tính} < \chi_n^2 \text{ tra bảng})$. Điều đó chứng tỏ hàm lượng Ads khác nhau sẽ ảnh hưởng rõ rệt đến số chồi/cụm và chiều dài chồi của hai dòng Keo lai tam bội (Dòng X101 và X102) nhưng không ảnh hưởng rõ rệt đến tỷ lệ chồi hữu hiệu.

Bảng 2 cho thấy công thức tạo cụm chồi tốt nhất là MS* + BAP 1,0 mg/l bổ sung 30 mg/l Ads cho dòng X101 (với số chồi/cụm là 5,54 và chiều

dài chồi đạt 3,17 cm) và dòng X102 (với số chồi/cụm là 5,07 và chiều dài chồi đạt 3,02 cm).

Kết quả nghiên cứu của Đoàn Thị Mai và cs (2005, 2009, 2011) [6 - 8] cho thấy, nhân giống *in vitro* Keo lai (Dòng BV10 và BV16) giai đoạn tạo cụm chồi có sử dụng môi trường MS* + 1,5 - 2 mg/l BAP cho hiệu quả tốt nhất. Kết quả nghiên cứu của Lê Sơn và cs (2023) [13] cho thấy, nhân chồi 2 dòng Keo lai tam bội (Dòng X201 và X205) trong môi trường MS* + 1,5 mg/l BAP cho hệ số nhân chồi tương ứng đạt 2,6 và 2,9. Như vậy, trong nghiên cứu này bổ sung 30 g/l Ads vào môi trường nuôi cấy MS* + 1,0 mg/l BAP cho hiệu quả tạo cụm chồi tốt nhất (với 5,07 - 5,54 chồi/cụm) và tốt hơn so với công thức đối chứng điều này có thể giải thích là do tác động tổng hợp của BAP + Ads.

3.2.2. Ảnh hưởng của NAA đến khả năng kích thích tăng trưởng chồi

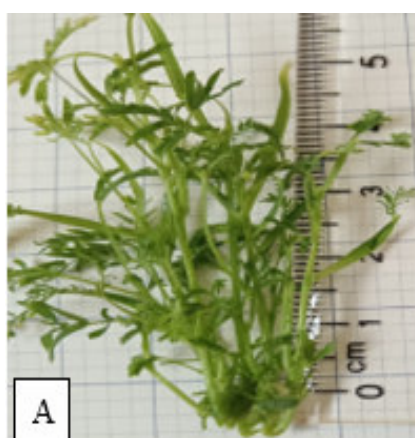
Kết quả nghiên cứu đã tạo được nhiều cụm chồi của 2 dòng Keo lai tam bội (Dòng X101 và X102), nhưng tỷ lệ chồi hữu hiệu chưa cao. Vì vậy, bên cạnh việc cấy chuyển các chồi nhỏ, những chồi hữu hiệu cũng được cắt ngắn và cấy chuyển sang môi trường kích thích tăng trưởng chồi với mục đích tạo số lượng lớn chồi có độ đồng đều cao và đủ tiêu chuẩn ra rễ. Thí nghiệm kích thích tăng trưởng chồi sử dụng môi trường MS* + BAP 1,0 mg/l + 0,25 mg/l GA3 bổ sung NAA mg/l ở các nồng độ khác nhau. Kết quả được thể hiện ở bảng 3.

Kết quả phân tích thống kê cho ảnh hưởng của hàm lượng NAA đến số chồi/cụm, tỷ lệ chồi hữu hiệu, chiều dài trung bình chồi Keo lai tam bội đều có kết quả $\chi_n^2 > \chi_{05}^2$. Điều đó chứng tỏ hàm lượng NAA ảnh hưởng rõ rệt đến số chồi/cụm, tỷ lệ chồi hữu hiệu, chiều dài chồi của cả 2 dòng Keo lai tam bội.

Bảng 3. Ảnh hưởng NAA đến khả năng kích thích tăng trưởng chồi

TT	Môi trường	Keo lai tam bội (Dòng X101)			Keo lai tam bội (Dòng X102)		
	MS* + 1,0 mg/l BAP + 0,25 mg/l GA3 + NAA mg/l	Chồi/cụm	Tỷ lệ chồi hữu hiệu (%)	Chiều dài chồi trung bình (cm)	Chồi/cụm	Tỷ lệ chồi hữu hiệu (%)	Chiều dài chồi trung bình (cm)
1	0,00 (Đối chứng)	5,53	52,00	3,58	5,00	48,89	3,6
2	0,05	6,65	87,78	4,52	5,56	87,78	4,65
3	0,10	6,42	77,78	4,33	5,37	80,00	4,45
4	0,15	5,40	70,00	4,23	4,86	72,22	4,23
5	0,20	5,25	64,44	3,95	4,63	66,67	4,25
χ_n^2			31,23			38,19	
$\chi_{05}^2 (k=4)$			9,48			9,48	

Bảng 3 cho thấy, ở cả 2 dòng Keo lai tam bội trong môi trường nuôi cấy có bổ sung NAA nồng độ 0,05 - 0,1 mg/l đạt số chồi/cụm, tỷ lệ chồi hữu hiệu và chiều cao của chồi cao hơn đối chứng. Nhưng khi nồng độ NAA > 0,1 mg/l thì chồi/cụm và tỷ lệ chồi hữu hiệu giảm dần điều này có thể giải thích là do tác động tổng hợp của chất điều hòa sinh trưởng. Hai dòng Keo lai tam bội trong môi trường nuôi cấy có bổ sung NAA nồng độ 0,05 mg/l đạt số chồi/cụm, tỷ lệ chồi hữu hiệu và chiều cao của chồi đáp ứng với yêu cầu của chồi trước khi ra rễ là cao nhất.



Hình 3. Cụm chồi Keo lai tam bội: Dòng X101 (hình A), dòng X102 (hình B)

3.3. Xác định môi trường ra rễ thích hợp cho các dòng Keo lai tam bội

Bảng 4 cho thấy, kết quả phân tích khi bình phương ảnh hưởng của nồng độ ABT đến khả năng

So với công thức đối chứng MS* + 1 mg/l BAP + 0,25 mg/l GA3 của Đồng Thị Ung và cs (2020) [3] số chồi/cụm chỉ đạt 5 - 5,5 chồi/cụm, tỷ lệ chồi hữu hiệu là 48,6% - 51,9%. Như vậy, khi bổ sung 0,05 mg/l NAA vào môi trường nuôi cấy MS* + 1 mg/l BAP + 0,25 mg/l GA3 đạt 5,56 - 6,65 chồi/cụm và tỷ lệ chồi hữu hiệu là 87,78% là có hiệu quả hơn.

Như vậy, môi trường MS* + 1,0 mg/l BAP + 0,25 mg/l GA3 + 0,05 mg/l NAA là môi trường cho số chồi/cụm, tỷ lệ chồi hữu hiệu cũng như chiều cao chồi tốt nhất phục vụ cho giai đoạn ra rễ.

ra rễ của 2 dòng Keo lai tam bội đều có kết quả $\chi^2_n > \chi^2_{05}$. Điều đó chứng tỏ nồng độ ABT ảnh hưởng rõ rệt đến khả năng ra rễ đối với cả 2 dòng Keo lai tam bội.

Bảng 4. Ảnh hưởng của ABT đến khả năng ra rễ của dòng X101, X102

TT	Môi trường	Nồng độ ABT (mg/l)	Dòng Keo lai tam bội						Thời gian ra rễ (ngày)
			Dòng X101			Dòng X102			
			Tỷ lệ chồi ra rễ (%)	Số rễ/ chồi trung bình (cái)	Chiều dài trung bình của rễ (cm)	Tỷ lệ chồi ra rễ (%)	Số rễ/ chồi trung bình (cái)	Chiều dài trung bình của rễ (cm)	
1	½ MS* + 2,0 mg/l IBA	0,00 (Đối chứng)	72,22	2,48	1,00	75,56	2,50	1,07	8 - 10
2	½ MS* + 2,0	0,25	97,78	3,15	1,55	98,89	3,10	1,55	7

3	mg/l IBA + ABT mg/l	0,50	90,00	2,93	1,42	91,11	2,90	1,40	7
4		0,75	8,89	2,65	1,33	88,89	2,68	1,32	7
5		1	75,56	2,50	1,30	77,78	2,57	1,28	7
χ_n^2			<i>31,98</i>			<i>28,90</i>			
χ_{05}^2 (k=4)			<i>9,48</i>			<i>9,48</i>			

Kết quả nghiên cứu cho thấy, khi bổ sung ABT vào môi trường ra rễ thì hiệu quả cao hơn hẳn so với môi trường không sử dụng ABT. Môi trường có bổ sung 0,25 mg/l ABT cho hiệu quả ra rễ cao nhất. Trong môi trường có bổ sung 0,25 mg/l ABT với dòng X101 cho kết quả tỷ lệ chồi ra rễ trung bình đạt 97,78%, đối với dòng X102 cho tỷ lệ chồi ra rễ trung bình đạt 98,89%. Nhưng khi tăng nồng độ trên 0,25 mg/l thì hiệu quả ra rễ lại giảm đi. 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. Do vậy, môi trường $\frac{1}{2}$ MS* + 2,0 mg/l IBA + 0,25 mg/l ABT là môi trường thích hợp nhất cho ra rễ Keo lai tam bội: Dòng X101 và X102 cho tỷ lệ ra rễ, số rễ/chồi cao nhất và thời gian ra rễ ngắn nhất.

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

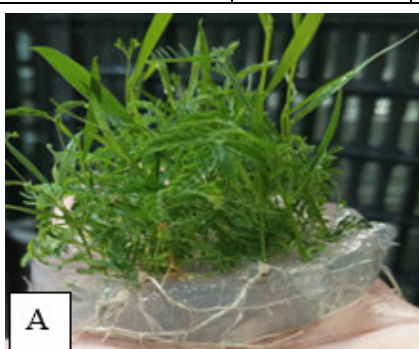
Huấn luyện cây mô là giai đoạn tạo điều kiện cho cây con trong bình nuôi làm quen dần với môi trường tự nhiên bên ngoài để cây cứng cáp, khỏe mạnh. Khi đưa cây ra ngoài vườn đạt tỷ lệ cây sống cao, cây sinh trưởng đồng đều. Kết quả về ảnh hưởng của thời gian huấn luyện cây mô đến tỷ lệ cây sống ngoài vườn ươm được thể hiện ở bảng 5.

Bảng 5 cho thấy, thời gian huấn luyện đã có ảnh hưởng rõ rệt đến tỷ lệ sống và chiều cao đối với cả hai dòng Keo lai tam bội ở giai đoạn vườn ươm $\chi_n^2 > \chi_{05}^2$. Tỷ lệ cây sống tăng lên khi kéo dài thời gian huấn luyện và đạt tỷ lệ sống cao khi cây được huấn luyện trong ở thời gian 10 và 15 ngày cho cả 2 dòng Keo lai tam bội. Qua phân tích thống kê tỷ lệ cây sống 10 và 15 ngày không có sự sai khác ($U < 1,96$). Nên để rút ngắn thời gian sản xuất khuyến khích nên huấn luyện thời gian 10 ngày thay vì 15 ngày.

Bảng 5. Ảnh hưởng của thời gian huấn luyện đến tỷ lệ sống và chiều cao

TT	Thời gian huấn luyện (ngày)	Các dòng Keo lai tam bội			
		Dòng X101		Dòng X102	
		Tỷ lệ sống (%)	Chiều cao (cm)	Tỷ lệ sống (%)	Chiều cao (cm)
1	0	55,56	5,00	54,44	5,55
2	5	77,78	6,21	77,78	6,50
3	10	83,33	6,95	81,11	7,00

4	15	84,44	7,15	83,33	7,20
5	20	82,22	7,30	80,00	7,25
χ_n^2		33,46		27,19	
$\chi_{05}^2 (k=4)$		9,48		9,48	
U		0,20		0,39	



Hình 4. Keo lai tam bội huấn luyện 10 ngày (hình A) và Keo lai tam bội 1 tháng vườn ươm với thời gian huấn luyện 10 ngày (hình B)

3.5. Ảnh hưởng của giá thể đến tỷ lệ sống và chiều cao cây ngoài vườn ươm

Kết quả nghiên cứu của Cấn Thị Lan và cs (2020) [12] cho thấy, cây *in vitro* của keo sau khi được huấn luyện từ 6 - 10 ngày sẽ được rửa sạch thạch, ngâm trong dung dịch Benlat C 0,3% trong vòng 2 - 3 phút rồi cấy vào giá thể bầu đất công thức là 85% đất đồi + 14% phân hữu cơ + 1% phân lân (với vỏ bầu PE). Loại giá thể này cho tỷ lệ sống đạt trên 80%, cây sinh trưởng, phát triển tốt. Tuy nhiên, mặt hạn chế là bầu cây nặng gây tốn chi phí vận chuyển

khi trồng rừng. Vì vậy cần phải nghiên cứu bổ sung loại giá thể cải tiến với vỏ bầu tự tiêu có khối lượng nhẹ hơn.

Bảng 6 cho thấy, công thức giá thể 42% trấu + 43% xơ dừa + 15% than bùn có khối lượng bầu cây nhẹ, giúp vận chuyển trồng rừng dễ dàng, giảm chi phí trồng rừng lại cho giá trị về cả 2 chỉ tiêu là tỷ lệ sống và chiều cao cây con tốt. Với loại giá thể này, tỷ lệ sống và chiều cao của các giống Keo lai tam bội có chiều cao cây sau 1 tháng: Dòng X101 là 7,13 cm và dòng X102 là 7,24 cm.

Bảng 6. Ảnh hưởng của giá thể đến tỷ lệ sống và chiều cao

TT	Loại giá thể	Keo lai tam bội (Dòng X101)		Keo lai tam bội (Dòng X102)	
		Tỷ lệ sống (%)	Chiều cao (cm)	Tỷ lệ sống (%)	Chiều cao (cm)
1	85% đất đồi + 14% phân hữu cơ + 1% phân lân	83,33	6,95	81,11	7,00

2	50% than trâu + 50% xơ dừa	86,67	7,12	83,33	7,20
3	42% trâu + 43% xơ dừa + 15% than bùn	95,56	7,13	94,44	7,24
χ_n^2		7,07		7,77	
$\chi_{05}^2 (k=2)$		5,99		5,99	

3.6. Ảnh hưởng của chế độ bón phân đến tỷ lệ sống và chiều cao cây ngoài vườn ươm

Chế độ dinh dưỡng cho cây trong giai đoạn vườn ươm có vai trò hết sức quan trọng. Thí nghiệm được thực hiện nhằm xác định công thức

bón thích hợp sau 20 ngày tuổi tại vườn ươm. Kết quả nghiên cứu 1 tháng thể hiện tại bảng 7 cho thấy, có sự sai khác rõ rệt về tỷ lệ sống và chiều cao cây ở các công thức bón phân khác nhau.

Bảng 7. Tỷ lệ sống và sinh trưởng về chiều cao

TT	Loại phân bón	Keo lai tam bội (Dòng X101)		Keo lai tam bội (Dòng X102)	
		Tỷ lệ sống (%)	Chiều cao (cm)	Tỷ lệ sống (%)	Chiều cao (cm)
1	NPK (5: 10: 3) 0,5%	83,33	7,13	81,11	7,24
2	NPK (5: 10: 3) 1,0%	88,89	7,97	88,89	7,98
3	NPK (13: 13: 13 TE) 0,5%	93,33	9,02	92,22	9,13
4	NPK (13: 13: 13 TE) 1,0%	95,56	10,20	95,56	10,17
χ_n^2		8,96		10,94	
$\chi_{05}^2 (k=3)$		7,81		7,81	

Công thức bón phân NPK (13: 13: 13 TE) 1,0% với liều lượng nước tưới là 100 lít/20.000 cây, 15 ngày tưới 1 lần là công thức có tỷ lệ sống cao nhất (95,56%) và cây sinh trưởng và phát triển tốt, đạt chiều cao tới 10 cm trong tháng đầu. Việc tìm chế độ chăm sóc thích hợp quan trọng trong việc rút ngắn thời gian chăm sóc ngoài vườn ươm.

4. KẾT LUẬN

Sử dụng Javen 5,0% trong thời gian 8 phút

thích hợp cho khử trùng mẫu, với tỷ lệ nảy chồi hữu hiệu tương ứng của Keo lai tam bội: Dòng X101 là 22,22% và dòng X102 là 21,11%.

Môi trường tạo cụm chồi thích hợp cho 2 dòng Keo lai tam bội: MS* + 1,0 mg/l BAP + 30 mg/l Ads + 30 g/l đường + 5,5 g/l agar, cho kết quả dòng X101 có 5,54 chồi/cụm, dòng X102 có 5,07 chồi/cụm.

Môi trường nâng cao chất lượng chồi hữu hiệu

cho 2 dòng Keo lai tam bội: MS* + 1,0 mg/l BAP + 0,25 mg/l GA₃ + 0,05 mg/l NAA + 30 g/l đường + 5,5 g/l agar, cho kết quả dòng X101 có 6,65 chồi/cụm, chiều cao chồi là 4,52 cm; dòng X102 có 5,56 chồi/cụm, chiều cao chồi là 4,65 cm, màu sắc chồi xanh, chồi mập mạp và thân phân lóng rõ ràng.

Môi trường ra rễ thích hợp cho 2 dòng Keo lai tam bội: ½ MS* + 2,0 mg/l IBA + 0,25 mg/l ABT cho tỷ lệ ra rễ với dòng X101 là 97,78% và dòng X102 là 98,89%.

Thời gian huấn luyện tốt nhất cho 2 dòng Keo lai tam bội đem lại tỷ lệ sống cao là 10 ngày với dòng X101 đạt 83,33% và dòng X102 đạt 81,11%.

Trên giá thể 42% trấu + 43% xơ dừa + 15% than bùn (vỏ bầu tự tiêu) cây sống đạt tỷ lệ 94,44 - 95,56%.

Cây sinh trưởng và phát triển tốt với chế độ chăm sóc NPK (13: 13: 13 TE) 1,0%, với liều lượng tưới nước 100 lít/20.000 cây, 15 ngày/lần.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Nghiêm Quỳnh Chi (2020). Nghiên cứu chọn tạo giống Keo tam bội sinh trưởng nhanh phục vụ trồng rừng gỗ lớn. Báo cáo tổng kết đề tài. Viện Khoa học Lâm nghiệp Việt Nam.

2. Đồng Thị Ứng, Nghiêm Quỳnh Chi, Lưu Thị Quỳnh, Văn Thu Huyền, Nguyễn Đức Kiên, Đỗ Hữu Sơn (2020). Nghiên cứu nhân giống cho một số dòng Keo tam bội X101, X102 mới được công nhận bằng phương pháp nuôi cấy mô tế bào. *Tạp chí Khoa học Lâm nghiệp*, số 6, trang 22 - 25.

3. Darus H. Ahmad (1989). A note on the Acacia hybrid in forest plantation in peninsular Malaysia. *J. Tropical Forest Science*, 170 - 171.

4. Darus H. Ahmad (1994). Multiplication of *Acacia mangium* by stem cutting and tissue culture techniques. *Advances in tropical acacia research*, pp. 32 - 34.

5. Cấn Thị Lan, Đồng Thị Ứng, Phan Chính, Nguyễn Thị Thu Dung, Hà Thị Lệ (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. Viện Khoa học Lâm nghiệp Việt Nam.

6. 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, trang 31 - 38.

7. 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.

8. Đoàn Thị Mai, Lê Sơn, Nguyễn Thị Mỹ Hương, Hà Huy Thịnh, Cấn Thị Lan (2011). Nhân nhanh giống Keo lai tự nhiên, Keo lai nhân tạo, Bạch đàn u rô, Bạch đàn lai nhân tạo và Lát hoa mới chọn tạo bằng công nghệ tế bào. Báo cáo tổng kết đề tài. Viện Khoa học Lâm nghiệp Việt Nam.

9. Saker MM, Bekheet SA, Taha HS, Reda AA (1999). *In vitro* propagation of papaya (*Carica papaya* L). www.acgssr.org/Biotechnology/V2N2December1999/fullpaper/p22. Accessed on April 19, 2024.

10. M. M. Philip V. J., Joseph D., Triggs G. S., Dickinson N. M. (1992). Micropropagation of black pepper (*Piper nigrum* Linn.) through shoot tip cultures. *Plant Cell Rep.*, 12(1): 41 - 44.

11. Delgado-Sanchez P., Saucedo-Ruiz M., Guzmán-Maldonado S. H., Villordo-Pineda E., González-Chavira M., Fraire-Velázquez S., Acosta-Gallegos J. A., Mora-Avilés A. (2006). An organogenic plant regeneration system for common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Sci.*, 170(4): 822 - 827.

12. Cấn Thị Lan, Nguyễn Thị Thu Dung, Phan Đức Chính, Kiều Thị Hà, Hà Thị Lệ, Lê Thị Xuân Quỳnh, Đỗ Hữu Sơn, Ngô Văn Chính, Triệu Thị Thu Hà (2020). Hoàn thiện công nghệ vi nhân giống quy mô công nghiệp và sản xuất các giống Keo lá tràm Clt18, Clt57 và Clt98. Báo cáo tổng kết dự án. Viện Khoa học Lâm nghiệp Việt Nam.

13. Lê Sơn, Mai Thị Phương Thúy, Trương Thị Thùy Linh, Nguyễn Thị Kim Thanh, Lưu Thị Quỳnh, Nguyễn Thị Bích Ngọc (2023). Nghiên cứu nhân giống bằng phương pháp nuôi cấy mô các dòng Keo tam bội X201 và X205. *Tạp chí Khoa học Lâm nghiệp*, số 6, trang 28 - 36.

RESEARCH TO PERFECT *IN VITRO* CULTURE TECHNOLOGY FOR LARGE - SCALE PRODUCTION OF TRIPLOID ACACIA HYBRID CLONES (X101, X102)

**Ha Thi Le¹, Can Thi Lan¹, Khuat Thi Hai Ninh², Dao Thi Thanh Mai²,
Kieu Thi Ha¹, Le Thi Xuan Quynh¹, Ta Thu Trang¹, Do Huu Son¹**

¹*Institute of Forest Tree Improvement and Biotechnology*

²*Vietnam National University of Forestry*

Summary

Studying on *in vitro* culture technology for the triploid Acacia X101 and X102 clones at the production scale was conducted. The research results showed that: During the clean explant stage, the use of excess or axillary buds sterilized with 5.0% NaClO in 8 minutes resulted in an effective budding rate of around 20% for both clones X101 and X102 was. The highest shoot/cluster was achieved in the improved Murashige and Skoog (MS*) medium + 1.0 mg/l BAP + 30 mg/l Ads (clone X101 had 5.54 shoots/cluster, clone X102 had 5.07 shoots/cluster). The highest effective shoot rate was achieved in MS* + 1.0 mg/l BAP + 0.25 mg/l GA3 + 0.05 mg/l NAA (clone X101 had 6.65 shoots/cluster, effective shoot rate: 87.78%, shoot height: 4.52 cm; X102 had 5.56 shoots/cluster, effective shoot rate: 87.78%, shoot height: 4.65 cm). The effective shoots qualified for root induction were in the ½ MS* medium + 2 mg/l IBA + 0.25 mg/l ABT with the rooting rate of 98% for both X101 and X102. After a 10 - days acclimatization period in the nursery, the survival rate of seedlings was 83.3% for X101 and 81.1% for X102. On the substrate consisting of 42% rice husk + 43% coconut fiber + 15% peat (self - digesting gourd shell), the survival rate was around 95%. Seedlings grew and developed well with NPK (13: 13: 13 TE) fertilizer at 1.0% concentration, diluted in 100 liters for 20,000 plants each 15 days.

Keywords: *Triploid Acacia hybrid (X101, X102), Acacia hybrid, in vitro culture.*

Ngày nhận bài: 22/4/2024

Ngày chuyển phản biện: 10/5/2024

Ngày thông qua phản biện: 21/5/2024

Ngày duyệt đăng: 26/6/2024