

NGHIÊN CỨU ẢNH HƯỞNG CỦA MỘT SỐ CHẤT KÍCH THÍCH SINH TRƯỞNG ĐẾN KHẢ NĂNG NHÂN NHANH CHỒI KEO LAI DÒNG BV75 TRONG NHÂN GIỐNG BẰNG PHƯƠNG PHÁP IN VITRO

Nguyễn Thanh Bình¹, Nghiêm Thị Hương²

TÓM TẮT

Với các ưu điểm vượt trội của cây Keo lai so với các loài cây lâm nghiệp khác mà hiện nay loài cây này chiếm phần lớn trên diện tích trồng rừng của Việt Nam. Từ đó nhu cầu về giống cho trồng rừng là vô cùng lớn. Tuy nhiên việc nhân giống bằng các phương pháp truyền thống như giâm hom, gieo hạt không đáp ứng được nhu cầu về cây giống sạch bệnh, đồng đều về phẩm chất. Cùng với những kết quả về cải thiện giống, công nghệ nhân giống bằng phương pháp nuôi cấy mô (tissue culture) được xem là giải pháp công nghệ hàng đầu để duy trì chất lượng di truyền của cây giống. Việc sử dụng các chất kích thích sinh trưởng trong nhân giống in vitro là một phương tiện hữu hiệu và nhanh chóng. Cytokinin N⁶-benzyladenine (BA) hay N⁶-benzylaminopurine (BAP) cho khả năng kích thích nhân chồi Keo lai dòng BV75 với hệ số nhân chồi cao (7,7 chồi/cụm, hệ số nhân chồi là 2,96 lần) ở nồng độ 1,5mg/l trong môi trường MS*. Khi kết hợp Cytokinin và Auxin trong nhân nhanh chồi thì tổ hợp phù hợp nhất để nhân chồi là 1,5mg/l BAP và 1,0mg/l NAA (Naphthalen acetic acid) trong môi trường MS* (đạt 7,8 chồi/cụm và hệ số nhân chồi 3,0 lần, chiều cao chồi là 4,5 cm, chồi sinh trưởng tốt). Đây cũng là môi trường cho chất lượng chồi tốt nhất để phục vụ giai đoạn nghiên cứu tiếp theo là ra rễ. Như vậy, môi trường phù hợp để nhân giống Keo lai dòng BV75 là MS* + 1,5mg/l BAP và 1,0mg/l NAA.

Từ khóa: Keo lai, nhân giống in vitro, chất kích thích sinh trưởng, cytokinin, auxin.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Cây Keo lai (*Acacia hybrid*) có một số đặc điểm vượt trội so với các cây rừng khác như khả năng sinh trưởng nhanh giúp làm giảm sức ép lên rừng tự nhiên về nhu cầu gỗ cho sản xuất công nghiệp. Nó cũng có khả năng cố định đạm khí quyển từ đó cải tạo đất tốt, tạo điều kiện thuận lợi trong việc luân canh cây Keo lai với các cây trồng khác, giảm nhu cầu sử dụng phân bón, hạ giá thành sản phẩm trong sản xuất nông lâm nghiệp. Với các ưu điểm vượt trội của cây Keo lai so với các loài cây lâm nghiệp khác mà hiện nay loài cây này chiếm phần lớn trên diện tích trồng rừng của Việt Nam. Với diện tích trồng lên đến 400.000 ha, bao gồm hơn 220.000 ha cây keo lai (*Acacia mangium* × *Acacia auriculiformis*), cây Keo đang được trồng phổ biến ở Việt Nam, và trở thành một cây trồng chính trong rừng sản xuất ở Việt Nam [3, 4]. Từ đó nhu cầu về giống cho trồng rừng là vô cùng lớn. Tuy nhiên việc nhân giống bằng các phương pháp truyền thống như giâm hom, gieo hạt không đáp ứng được nhu cầu về cây

^{1,2} Khoa Nông - Lâm - Ngư nghiệp, Trường Đại học Hồng Đức

giống sạch bệnh, đồng đều về phẩm chất. Cùng với những kết quả về cải thiện giống, công nghệ nhân giống bằng phương pháp nuôi cấy mô (tissue culture) được xem là giải pháp công nghệ hàng đầu để duy trì chất lượng di truyền của cây giống. Nuôi cấy mô tế bào là phương pháp nhân giống được thực hiện bằng nuôi cấy cơ quan, mô, tế bào trong môi trường dinh dưỡng đặc biệt, hoàn toàn vô trùng và được kiểm soát. Vật liệu được sử dụng nuôi cấy thường rất nhỏ và các thao tác thí nghiệm thực hiện trong môi trường nhân tạo nên phương pháp nhân giống này còn được gọi là vi nhân giống (*Micropropagation*) hay nhân giống in vitro. Phương pháp nhân giống in vitro đã được sử dụng có hiệu quả trong ngành công nghệ sinh học rừng do có thể tạo ra một số lượng lớn các cây giống giống hệt nhau kể cả kiểu gen và kiểu hình, đồng thời không chứa mầm bệnh, hỗ trợ tiết kiệm về không gian và thời gian [1; tr.574]. Nhiều loài keo khác nhau (*A. senegal*, *A. nilotica*, *A. auriculiformis*, *A. sinuata* và *A. mangium*) đã được nhân giống bằng kỹ thuật in vitro thành công [2; tr.663-671]. Tuy nhiên, do cây rừng có chu kỳ sống dài ngày, hệ gen phức tạp, phản ứng của kiểu gen với điều kiện môi trường là rất khác nhau và thực tế cũng cho thấy các giống khác nhau thì hiệu quả nhân giống hoàn toàn khác nhau cho dù là cùng loài, do đó không thể áp dụng một quy trình chung cho tất cả các giống. Keo lai dòng BV75 do Trung tâm nghiên cứu giống cây rừng thuộc Viện Khoa học Lâm nghiệp Việt Nam chọn tạo, đã được công nhận là giống tiến bộ kỹ thuật, có tiềm năng sinh trưởng tốt và thích nghi trên nhiều loại lập địa khác nhau, đặc biệt thích hợp cho lập địa miền Bắc.

Để tái sinh chồi ở cây keo, các loại mẫu cây khác nhau được sử dụng và nuôi cấy trong môi trường nuôi cấy có bổ sung các chất điều tiết sinh trưởng khác nhau. Trong đó nồng độ của các chất sinh trưởng có vai trò quyết định đến hệ số nhân chồi. Hơn nữa bản chất của các chất kích thích sinh trưởng khác nhau cũng ảnh hưởng khác nhau đến hệ số nhân chồi. Nghiên cứu của chúng tôi nhằm xác định loại chất và nồng độ phù hợp của chất điều tiết sinh trưởng cho hệ số nhân chồi cao nhất trong nhân giống in vitro keo lai dòng BV75.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Chồi Keo lai in vitro dòng BV75 do Trung tâm nghiên cứu giống cây rừng Ba Vì cung cấp.

Các chất kích thích sinh trưởng được sử dụng trong nhân giống in vitro thuộc nhóm Cytokinin, bao gồm: N⁶-benzyladenine (BA, BAP), 6-furfurylaminopurine (kinetin), và các chất thuộc nhóm auxin, bao gồm: Acid indolacetic (IAA) và Naphtalen acetic acid (NAA).

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Thí nghiệm thuộc loại thí nghiệm trong phòng. Tất cả thí nghiệm trong phòng sử dụng môi trường: MS + 7,5 g/l agar + 30g/l saccarose, pH = 5,8. Thí nghiệm gồm 4 công thức, nhắc lại 3 lần, 30 mẫu/lần, được theo dõi 7 ngày/lần, theo dõi liên tục trong 6 tuần. Các thí nghiệm được tiến hành trong điều kiện nhân tạo. Các mẫu được nuôi cấy dưới bóng đèn neol, thời gian chiếu sáng là 16h/ngày, điều kiện tối 8h/ngày, nhiệt độ 22 - 24⁰C, độ ẩm từ 70 - 80%.

Thu thập số liệu và xử lý bằng phần mềm Microsoft Excel.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

3.1. Ảnh hưởng của một số cytokinin đến khả năng nhân nhanh Keo lai dòng BV75

Cytokinin là chất kích thích sinh trưởng được dùng phổ biến trong nhân giống in vitro. Chúng có khả năng kích thích sự phân chia tế bào mạnh mẽ ở thực vật. Cytokinin ảnh hưởng rõ rệt và rất đặc trưng lên sự phân hóa cơ quan của thực vật, đặc biệt là sự phân hóa chồi. Để tăng hệ số nhân giống, người ta tăng nồng độ cytokinin trong môi trường nuôi cấy ở giai đoạn tạo chồi in vitro. Một trong những cytokinin được dùng chủ yếu trong nhân nhanh in vitro là N⁶ - Benzylaminopurine (BAP). Ảnh hưởng của BAP đến khả năng nhân nhanh của chồi Keo lai BV75 được thể hiện trong bảng 1.

Bảng 1. Ảnh hưởng của BAP đến khả năng nhân chồi Keo lai dòng BV75

BAP (mg/l)	Số chồi/ cụm TB	Chiều cao chồi (cm)	Chất lượng chồi
0	4,3 ± 0,28	3,0 ± 0,12	+++
1	6,8 ± 0,12	3,7 ± 0,16	+++
1,5	7,7 ± 0,28	4,0 ± 0,12	++
2,0	7,6 ± 0,28	3,8 ± 0,16	+

Ghi chú: (+) chồi sinh trưởng kém; (++) chồi sinh trưởng trung bình; (+++) chồi sinh trưởng tốt.

Khi nồng độ BAP tăng lên từ 0 đến 2,0 thì số chồi trên cụm cũng tăng dần theo nồng độ từ 4,3 đến 7,6 chiều cao chồi cũng phát triển tăng từ 3,0 đến 3,8 và chất lượng chồi phát triển tốt hơn.

Số chồi/cụm và hệ số nhân chồi của Keo lai dòng BV75 đều có sự khác biệt rõ rệt giữa các công thức thí nghiệm. Môi trường MS* bổ sung 1,5 mg/l BAP là công thức thích hợp nhất để nhân nhanh số lượng chồi cho Keo lai dòng BV75. Với nồng độ này, có thể đạt 7,7 chồi/cụm và hệ số nhân chồi đạt 2,96 (cao hơn công thức đối chứng 1,31 lần), chiều dài chồi 4,0 cm; chồi sinh trưởng tốt.

Ngoài BAP, các loại cytokinin khác cũng được sử dụng để đánh giá khả năng kích thích nhân chồi Keo lai dòng BV75. Trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng kinetin để kích thích nhân chồi keo lai.

Các nghiên cứu chứng minh, khi trong mô nuôi cấy có đủ hàm lượng BAP thì việc bổ sung kinetin vào môi trường nuôi cấy có thể kích thích tạo ra số lượng chồi nhiều hơn so với việc bổ sung BAP [2]. Do đó trong thí nghiệm của chúng tôi đã sử dụng Kinetin với các nồng độ khác nhau để kích nhân nhanh chồi Keo lai.

Bảng 2. Ảnh hưởng của nồng độ kinetin đến khả năng nhân chồi

Kinetin (mg/l)	Số chồi/ cụm TB	Chiều cao chồi (cm)	Chất lượng chồi
0	4,3 ± 0,2	3,0 ± 0,12	+++
1,0	4,8 ± 0,24	3,6 ± 0,16	+++
1,5	5,7 ± 0,28	3,8 ± 0,16	++
2,0	5,5 ± 0,36	3,7 ± 0,24	++

Ghi chú: (+) chồi sinh trưởng kém; (++) chồi sinh trưởng trung bình; (+++) chồi sinh trưởng tốt.

Từ kết quả ở bảng 2 cho thấy khi nồng độ kinetin tăng lên từ 0 đến 2,0 thì số chồi trên cụm cũng tăng dần theo nồng độ (tăng 4,3 đến 5,5), chiều cao chồi cũng phát triển (tăng 3,0 đến 3,7) và chất lượng chồi phát triển tốt hơn.

Số chồi/cụm và hệ số nhân chồi của các giống Keo lai dòng BV75 đều có sự khác biệt rõ rệt giữa các công thức thí nghiệm. Môi trường MS* bổ sung 1,5 mg/l kinetin là công thức thích hợp để nhân nhanh số lượng chồi. Với nồng độ này, có thể đạt 5,7 chồi/cụm, chiều dài chồi 3,8 cm, chồi sinh trưởng tốt. Việc kết hợp BAP và kinetin trong nuôi cấy mô có thể cho hệ số nhân chồi đạt kết quả cao hơn đã được chứng minh ở một số nghiên cứu trước đây, từ đó chúng tôi tiến hành thí nghiệm nhân nhanh chồi Keo lai dòng BV75 với sự kết hợp của BAP và kinetin ở các nồng độ khác nhau. Kết quả thể hiện ở bảng 3.

Bảng 3. Ảnh hưởng của tổ hợp BAP và kinetin đến khả năng nhân chồi

BAP (mg/l)	Kinetin (mg/l)	Số chồi/ cụm TB	Chiều cao chồi (cm)	Chất lượng chồi
0	0	4,3 ± 0,2	3,0 ± 0,12	+++
1,5	0,5	7,1 ± 0,12	4,4 ± 0,16	+++
1,5	1,0	6,8 ± 0,08	4,3 ± 0,2	++
1,5	1,5	6,5 ± 0,12	4,2 ± 0,08	+

Ghi chú: (+) chồi sinh trưởng kém; (++) chồi sinh trưởng trung bình; (+++) chồi sinh trưởng tốt.

Số chồi/cụm và của các giống Keo lai dòng BV75, đều có sự khác biệt rõ rệt giữa các công thức thí nghiệm. Môi trường MS* bổ sung 1,5 mg/l BAP và 0,5 kinetin là công thức thích hợp nhất để nhân nhanh số lượng chồi cho các giống Keo lai dòng BV75. Với nồng độ này có thể đạt 7,1 chồi/cụm (cao hơn công thức đối chứng 1,08 lần), chiều dài chồi 4,4 cm, chồi sinh trưởng tốt.

3.2. Ảnh hưởng của các tổ hợp cytokinin và auxin đến khả năng nhân nhanh của chồi Keo lai dòng BV75

Vai trò quan trọng của cytokinin là kích thích mạnh mẽ sự phân hóa chồi. Chính vì vậy cùng với auxin, cytokinin điều chỉnh hiện tượng ưu thế ngọn, giải phóng các chồi bên khỏi sự ức chế tương quan của chồi ngọn. Hiệu quả này phụ thuộc vào tỷ lệ giữa auxin/cytokinin. Sự kết hợp giữa auxin và cytokinin trong môi trường nhân chồi với liều lượng và tỷ lệ hợp lý có tác dụng kích thích các chồi phát triển hài hòa cả về số lượng và chất lượng chồi, thân chồi sẽ cứng cáp hơn, hàm lượng xenlulo tăng, diện tích, số đốt lá trên thân cũng tăng lên.

Nhiều nghiên cứu khác nhau cho thấy các chất điều tiết sinh trưởng thực vật đơn lẻ không gây ảnh hưởng lớn đến sự hình thành chồi. Tuy nhiên, khi tiến hành sử dụng kết hợp, hệ số tạo chồi tăng lên một cách đáng kể. Al-Wasel (2000) thử nghiệm BAP hoặc N-phenyl-N⁰-(1,2,3-thiadiazol-5-yl) urea (Thidiazuron hoặc TDZ) kết hợp với NAA để kiểm tra ảnh hưởng sự kết hợp này đến khả năng nhân chồi của giống keo *Acacia seyal*. Kết quả nghiên cứu cho thấy, NAA không thể kích thích sự phát sinh chồi khi sử dụng đơn lẻ, và khi không bổ sung BAP thì tạo ra rất ít chồi. Tuy nhiên, số lượng chồi keo lớn được tạo ra khi sử dụng kết hợp BAP và NAA.

Bảng 4. Ảnh hưởng của tổ hợp BAP và NAA đến khả năng nhân chồi

BAP (mg/l)	NAA (mg/l)	Số chồi/ cụm TB	Chiều cao chồi (cm)	Chất lượng chồi
0	0	4,3 ± 0,2	3,0 ± 0,12	+++
1,5	0,5	7,1 ± 0,16	4,4 ± 0,2	++
1,5	1,0	7,8 ± 0,12	4,5 ± 0,12	+++
1,5	1,5	6,8 ± 0,12	4,4 ± 0,16	++

Ghi chú: (+) chồi sinh trưởng kém; (++) chồi sinh trưởng trung bình; (+++) chồi sinh trưởng tốt.

Kết quả nghiên cứu cho thấy sự khác biệt về số chồi/cụm của giống Keo lai (BV75) trong các công thức thí nghiệm, thể hiện các công thức thí nghiệm ảnh hưởng không đồng nhất đến kết quả nghiên cứu. Nuôi cấy mẫu của các giống Keo lai BV75 trong môi trường nhân chồi MS* được bổ sung phối hợp giữa 1,5 mg/l BAP và 1,0 mg/l NAA cho số chồi/cụm là 7,8 chồi/cụm, chất lượng chồi sinh trưởng tốt nhất.

Bảng 5. Ảnh hưởng của tổ hợp kinetin và NAA đến khả năng nhân chồi

Kinetin (mg/l)	NAA (mg/l)	Số chồi/ cụm TB	Chiều cao chồi (cm)	Chất lượng chồi
0	0	4,3 ± 0,2	3,0 ± 0,12	++
1,5	0,5	4,68 ± 0,04	3,3 ± 0,12	++
1,5	1,0	4,94 ± 0,05	3,2 ± 0,08	++
1,5	1,5	4.42 ± 0,07	3,4 ± 0,12	++

Ghi chú: (+) chồi sinh trưởng kém; (++) chồi sinh trưởng trung bình; (+++) chồi sinh trưởng tốt.

Nuôi cấy mẫu của các giống Keo lai BV75 trong môi trường nhân chồi MS* được bổ sung phối hợp giữa 1,5 mg/l kinetin và 1,0 mg/l NAA cho hệ số nhân chồi và số chồi/cụm lần lượt là 1,9 lần - 4,94 chồi/cụm (đạt giá trị cao nhất) nhưng không cho chất lượng chồi sinh trưởng tốt nhất.

So sánh ảnh hưởng của các tổ hợp này đến khả năng nhân nhanh chồi Keo lai dòng BV75 bằng phương pháp in vitro cho kết quả thể hiện ở bảng 6.

Bảng 6. Ảnh hưởng của một số tổ hợp cytokinin và auxin đến khả năng nhân chồi Keo lai dòng BV75

BAP (mg/l)	Kinetin (mg/l)	NAA (mg/l)	IAA (mg/l)	HSNC (lần)
0	0	0	0	4,30
1,5	0	0,5	0	7,10
1,5	0	1	0	7,80
1,5	0	1,5	0	6,80
0	1,5	0,5	0	4,68
0	1,5	1	0	4,94
0	1,5	1,5	0	4,42
1,5	0	0	0,5	6,05
1,5	0	0	1	2,97
1,5	0	0	1,5	1,68
0	1,5	0	0,5	4,46
0	1,5	0	1	3,04
0	1,5	0	1,5	0,82

Kết quả thể hiện ở bảng 6 cho thấy, tổ hợp của BAP và kinetin với NAA cho kết quả cao hơn so với khi kết hợp với IAA. Đồng thời việc bổ sung auxin vào trong môi trường nuôi cấy chỉ thích hợp với nồng độ thấp. Các công thức với nồng độ auxin cao cho kết quả hệ số nhân chồi thấp hơn nhiều, điều này cho thấy nồng độ auxin cao trong môi trường nuôi cấy có sẵn cytokinin không chỉ không kích thích mà còn kìm hãm khả năng tạo chồi của Keo lai dòng BV75, trong một số mẫu có thấy xuất hiện tạo mô sẹo, tương tự với một số nghiên cứu trước đó [5; tr.381-368].

Kết quả tại bảng 4 cho thấy môi trường MS* có bổ sung 1,5 mg/l BAP và 1,0 mg/l NAA tạo được số chồi có đủ tiêu chuẩn phục vụ cho giai đoạn ra rễ in vitro tiếp theo.

4. KẾT LUẬN

Cytokinin N⁶ - benzylaminopurine (BAP) cho khả năng kích thích nhân chồi Keo lai dòng BV75 với hệ số nhân chồi cao (7,7 chồi/cụm) ở nồng độ 1,5mg/l trong môi trường MS*.

Khi kết hợp cytokinin và auxin trong nhân nhanh chồi thì tổ hợp phù hợp nhất để nhân chồi là 1,5mg/l BAP và 1,0mg/l NAA trong môi trường MS* (đạt 7,8 chồi/cụm, chiều cao chồi là 4,5 cm, chồi sinh trưởng tốt). Đây cũng là môi trường cho chất lượng chồi tốt nhất để phục vụ cho giai đoạn nghiên cứu tiếp theo, ra rễ.

Như vậy, môi trường phù hợp cho nhân giống Keo lai dòng BV75 là MS* + 1,5mg/l BAP và 1,0mg/l NAA.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Aitken-Christie, J., Kozai, T., Smith, M.A.L., (1995), *Automation and Environmental Control in Plant Tissue Culture*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, p. 574.
- [2] G. Vengadesan, A. Ganapathi, S. Amutha, N. Selvaraj (2002), *In vitro propagation of Acacia species a review*, Plant Science, 163.
- [3] Kha, L.D. (2001), *Studies on the use of natural hybrids between Acacia mangium and Acacia auriculiformis*, Vietnam, Agricultural Publishing House, Hanoi, Vietnam.
- [4] Kha, L.D. (2006), *Role of Acacia hybrids in the reforestation programme in Vietnam*, Research Centre for Forest Tree Improvement, Forest Science Institute of Vietnam, Hanoi, Vietnam.
- [5] Rashmi Nanda, Premananda Das, Gyana Rout (2004), *In vitro clonal propagation of Acacia mangium Willd, and its evaluation of genetic stability through RAPD marker*, Annals of Forest Science, Springer Verlag/EDP Sciences, 61 (4).

THE STUDY OF THE AFFECTION OF PLANT GROWTH REGULATORS ON SHOOT MULTIPLICATION OF ACACIA HYBRID BV75 SUBSPECIES BY IN VITRO METHOD

Nguyen Thanh Binh, Nghiem Thi Huong

ABSTRACT

With the outstanding advantages of Acacia hybrid compared to other forest species, this species currently occupies a large part of Vietnam's afforestation area. However, propagation by traditional methods such as cuttings and seeding does not meet the demand for disease-free seedlings, uniform in quality. Breeding technology by tissue culture method is considered the leading technology solution to maintain the genetic quality of seedlings.

*Plant Growth Regulators are an important factor in increasing shoot multiplier. Cytokinin N6-benzyladenine (BAP) has the ability to stimulate the Acacia hybrid BV75 subspecies shoot buds with high shoot multiplier (7.7 shoots/clump, shoot multiplier is 2.96 times) at 1.5mg/L in MS * media. When using Cytokinin and Auxin combination, the most suitable combination for multiplication is 1.5mg/L BAP and 1.0mg/L NAA in MS * medium (7.8 buds/clump and multiplier buds 3.0 times, bud height is 4.5 cm, buds grow well). This is also the environment for the best quality shoots to serve the next phase of research, rooting.*

Keywords: *Acacia hybrid, in vitro method, plant growth regulator, cytokinin, auxin.*

* Ngày nộp bài: 8/7/2019; Ngày gửi phản biện: 19/7/2019; Ngày duyệt đăng: 4/3/2020