

ẢNH HƯỞNG CỦA HÓA CHẤT KHỬ TRÙNG VÀ CHẤT ĐIỀU HÒA SINH TRƯỞNG TRONG NHÂN GIỐNG *IN VITRO* CÂY KEO LAI DÒNG BV10, BV16, BV32 TẠI TỈNH THANH HÓA

Phạm Hữu Hùng¹, Nguyễn Hữu Hào¹, Lại Thị Thanh¹, Nghiêm Thị Hương¹

TÓM TẮT

Kết quả thí nghiệm cho thấy, khử trùng bằng HgCl₂ 0,1% trong thời gian 8 phút cho hiệu quả tốt nhất: Keo lai dòng BV10 đạt 29,5%, dòng BV16 đạt 28,16%, dòng BV32 đạt 26,38%. Trong giai đoạn nhân nhanh chồi, môi trường dinh dưỡng tốt nhất cho cả 3 dòng Keo lai BV10, BV16 và BV32 là MS + 30 g/l sucrose + 8 g/l agar bổ sung 1,5 mg/l BAP: Keo lai dòng BV10 cho hệ số nhân chồi là 2,79 lần và chiều cao chồi là 3,8 cm, tương ứng đối với Keo lai dòng BV16 là 3,2 lần và đạt 4,13 cm; Keo lai dòng BV32 là 2,73 lần và đạt 3,97 cm. Khi bổ sung Kinetin thì công thức MS+30 g/l sucrose + 8 g/l agar + 1,5 mg/l Kinetin cho hiệu quả cao nhất: dòng BV10 có hệ số nhân chồi lớn nhất là 2,36 lần, chiều cao chồi đạt 3,8 cm; tương ứng đối với dòng BV16 là 2,56 lần và đạt 3,7 cm; dòng BV32 là 2,32 lần và đạt 3,5 cm.

Từ khoá: Keo lai dòng BV10, BV16, BV32, nuôi cấy mô, nhân giống *in vitro*.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Keo lai là loài cây trồng chủ lực, không chỉ cung cấp gỗ, nguyên liệu giấy, ván nhân tạo mà còn là loài cây có vai trò cải tạo đất, phòng hộ, bảo vệ môi trường sinh thái. Diện tích trồng rừng Keo lai lên đến hàng nghìn héc ta mỗi năm nên nhu cầu cây giống có chất lượng cao phục vụ trồng rừng là rất lớn. Chính vì vậy, việc nghiên cứu tuyển chọn giống mới cũng như ứng dụng tiến bộ kỹ thuật nuôi cấy mô nhân giống các loài Keo lai có ý nghĩa thực tiễn vô cùng lớn, nhằm nâng cao năng suất, chất lượng di truyền cũng như đảm bảo tính an toàn sinh học của hệ sinh thái rừng trồng.

Gần đây nhiều dòng Keo lai có tiềm năng sinh trưởng và sức chống chịu đã được chọn lọc. Một số dòng keo lai đã được công nhận là giống tiến bộ kỹ thuật hoặc giống có triển vọng, bao gồm các giống AH1, AH7, TB1, TB11, BV10, BV16, BV32, AA1, AA9, Clt26, Clt7, Clt18, Clt57 của Keo lá tràm và Keo lai. Đây là nguồn giống cây trồng quý phục vụ trồng rừng kinh tế cho năng suất cao và ổn định. Cho đến nay, ở nhiều nơi phương pháp nhân giống chủ yếu là giâm hom hoặc uơm từ hạt, trong khi công nghệ nuôi cấy mô tế bào giúp tạo cây hoàn chỉnh với độ trẻ hoá và đồng đều cao, sạch bệnh, thân dẻo và bộ rễ phát triển để tạo lập rừng keo có năng suất cao, chất lượng tốt thì chưa được chú ý nhiều. Nghiên cứu này nhằm xác định loại hóa chất, nồng độ và thời gian khử trùng phù hợp trong nhân giống *in vitro* cây Keo lai dòng BV10, BV16, BV32 là rất cần thiết, nhằm tạo nguồn giống có chất lượng cao, phục vụ công tác trồng rừng.

¹ Khoa Nông - Lâm - Ngư nghiệp, Trường Đại học Hồng Đức; Email: phamhuuhung@hdu.edu.vn

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Vật liệu thực vật: đỉnh sinh trưởng lấy từ các cây Keo lai BV10, BV16, BV32, sạch bệnh, sinh trưởng tốt, trồng trong vườn cây đầu dòng của Công ty Lâm nghiệp Hòa Bình (VINAFOR Hòa Bình).

Hóa chất khử trùng: Cồn 70°, HgCl₂ 0,1%, Ca(ClO)₂ 10%, NaOCl 10%, xà phòng, nước cất. Môi trường MS cơ bản, đường Saccharose, Agar, nước dừa.

Các chất kích thích sinh trưởng: BAP, Kinetine.

Thiết bị: Cân phân tích, máy khuấy từ, máy đo pH, bếp ga, tủ sấy, nồi hấp vô trùng, box cấy vô trùng;

Dụng cụ: kéo, pank, dao, đĩa inox, găng tay, khẩu trang, bình tam giác, ca, ống đong.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Thí nghiệm được tiến hành theo kiểu ngẫu nhiên hoàn toàn, 3 lần lặp lại, mỗi công thức 30 mẫu.

Nghiên cứu ảnh hưởng của thời gian khử trùng đến khả năng sống của mẫu nuôi cấy

Sau khi lựa chọn chồi, tiến hành cắt bỏ phần lá của chồi, dùng chổi rửa chuyên dụng rửa sạch chất bám trên bề mặt chồi bằng dung dịch nước xà phòng loãng. Sau đó rửa sạch mẫu dưới vòi nước chảy cho hết xà phòng rồi tráng lại 2 - 3 lần bằng nước cất. Tiếp tục rửa chồi bằng nước cất vô trùng 3 - 5 lần, lắc mạnh mỗi lần trong khoảng từ 3 - 5 phút để loại bỏ các chất bám còn bám trên bề mặt. Chuyển mẫu vào tủ cấy vô trùng và tiến hành thao tác khử trùng mẫu.

Khử trùng mẫu: Khử trùng bề mặt bằng dung dịch cồn 70% bổ sung Tween 20 (4 giọt/100 ml dung dịch) trong 1 phút (lắc nhẹ), tiếp tục rửa sạch bằng nước cất 3 - 4 lần và khử trùng mẫu theo các công thức như sau.

CT1: HgCl₂ 0,1% trong 8 phút; CT2: HgCl₂ 0,1% trong 10 phút; CT3: HgCl₂ 0,1% trong 12 phút; CT4: Ca(ClO)₂ 10% trong 15 phút; CT5: Ca(ClO)₂ 10% trong 20 phút; CT6: Ca(ClO)₂ trong 25 phút; CT7: NaOCl 10% trong 8 phút; CT8: NaOCl 10% trong 10 phút; CT9: NaOCl 10% trong 12 phút; Sau đó rửa lại bằng nước cất từ 2 - 3 lần.

Sau khi khử trùng, dùng mũi dao cấy cắt chồi thành các đoạn có chiều dài (2 - 2,5 cm) có chứa ít nhất một mắt ngủ rồi cấy vào môi trường nuôi cấy khởi động: môi trường dinh dưỡng cơ bản MS bổ sung 8 g/l agar + 30 g/l sucrose + 0,5 mg/l BAP.

Chỉ tiêu theo dõi:

Tỷ lệ mẫu chết (%) = số mẫu chết x 100/tổng số mẫu;

Tỷ lệ mẫu sống bị nhiễm (%) = Số mẫu sống bị nhiễm x 100/tổng số mẫu;

Tỷ lệ mẫu sống không bị nhiễm (%) = Số mẫu sống không bị nhiễm x 100/tổng số mẫu.

Nghiên cứu ảnh hưởng của BAP và Kenetin đến khả năng nhân nhanh chồi

Phương pháp nhân nhanh chồi in vitro

Sử dụng chồi sạch bệnh có chiều dài 1 - 1,5 cm sinh trưởng tốt, cấy vào môi trường dinh dưỡng: MS + 30 g/l sucrose + 8 g/l agar bổ sung chất điều hòa sinh trưởng BAP và

Kinetin với các hàm lượng khác nhau: 0,0 mg/l đến 2,0 mg/l để tìm công thức thích hợp. Mật độ 5 chồi/cụm, 5 cụm/bình trụ. Sau khi cấy xong đưa vào phòng nuôi.

CT	Ảnh hưởng của BAP	CT	Ảnh hưởng của nồng độ Kinetin
1	MS* = MS + 30 g/l sucrose + 8 g/l agar	1	MS* = MS + 30 g/l sucrose + 8 g/l agar
2	MS* + 1.0 mg/l BAP	2	MS* + 0.5 mg/l Kinetin
3	MS* + 1.5 mg/l BAP	3	MS* + 1.0 mg/l Kinetin
4	MS* + 2.0 mg/l BAP	4	MS* + 1.5 mg/l Kinetin
		5	MS* + 2.0 mg/l Kinetin

Sau 4 tuần đánh giá các chỉ tiêu

Hệ số nhân (lần) = tổng số chồi tạo mới/tổng số chồi cấy ban đầu;

Chiều cao chồi: Tổng chiều cao của các chồi/ tổng số chồi;

Chất lượng chồi được đánh giá theo 3 mức

Kém: Màu sắc chồi xanh, thân chồi rất mảnh, thân phân lóng kém (+);

Trung bình: Màu sắc chồi xanh, thân chồi mảnh, thân phân lóng rõ ràng (++);

Tốt: Màu sắc chồi xanh, chồi mập, thân phân lóng rõ ràng (+++).

Xử lý số liệu: Sử dụng phần mềm SPSS 20.0 để phân tích phương sai một nhân tố.

Giá trị thể hiện trong bảng số liệu là giá trị trung bình, sự khác biệt giữa các giá trị trung bình được kiểm định, so sánh bằng tiêu chuẩn Duncan với mức xác suất có ý nghĩa $p < 0,05$.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

3.1. Ảnh hưởng của kỹ thuật khử trùng đối với Keo lai dòng BV10, BV16 và BV32

Keo lai dòng BV10

Kết quả thí nghiệm 3 loại hoá chất: HgCl₂ nồng độ 0,1%, Ca(ClO)₂ nồng độ 10%, NaOCl nồng độ 10% với thời gian khử trùng khác nhau được thể hiện tại bảng 1. Kết quả cho thấy, ảnh hưởng của loại hóa chất và thời gian khử trùng khác nhau đến tỷ lệ mẫu chết, tỷ lệ mẫu sống bị nhiễm và tỷ lệ mẫu sống không bị nhiễm là có sự sai khác rõ rệt vì Sig F_{tính} đều nhỏ hơn 0,05. Khi tăng thời gian khử trùng thì tỷ lệ mẫu chết tăng, tỷ lệ mẫu sống bị nhiễm giảm. Trong đó, công thức 1 (HgCl₂ 0,1% thời gian khử trùng 8 phút) cho tỷ lệ mẫu sống không bị nhiễm cao nhất với tỷ lệ 29,5% và có sự sai khác rõ rệt với các công thức khác.

Nhóm có ảnh hưởng tốt xếp thứ 2 theo tiêu chuẩn Duncan sau công thức 1 gồm các công thức 8, 2, 6 có tỷ lệ mẫu sống không bị nhiễm dao động từ 15,83% đến 19,64%.

Bảng 1. Ảnh hưởng của hóa chất và thời gian khử trùng đến Keo lai dòng BV10

Hóa chất	Thời gian (phút)	CT	Tỷ lệ mẫu chết (%)		Tỷ lệ mẫu sống bị nhiễm (%)		Tỷ lệ mẫu sống không bị nhiễm (%)	
			TB	Sd	TB	Sd	TB	Sd
HgCl ₂ 0,1%	8	1	10,50	4,75	60,00	0,00	29,50*	4,75
	10	2	26,50	8,55	56,93	6,09	16,57	3,19

Hóa chất	Thời gian (phút)	CT	Tỷ lệ mẫu chết (%)		Tỷ lệ mẫu sống bị nhiễm (%)		Tỷ lệ mẫu sống không bị nhiễm (%)	
			TB	Sd	TB	Sd	TB	Sd
	12	3	46,67*	4,11	43,33*	5,77	10,00	3,25
Ca(ClO) ₂ 10%	15	4	22,20	7,45	66,67	5,77	11,20	2,01
	20	5	27,73	0,06	60,00	0,00	12,27	0,06
	25	6	20,83	8,00	63,33	5,77	15,83	2,23
NaOCl 10%	8	7	20,73	10,05	70,00	10,00	9,27	0,21
	10	8	27,07	4,74	53,33	5,77	19,67	1,80
	12	9	29,77	5,11	56,67	5,77	13,57	1,45
<i>F_{tính}</i>			6,67		5,42		18,52	
<i>Sig F</i>			0,00		0,001		0,00	

Keo lai dòng BV16

Kết quả thí nghiệm 3 loại hoá chất: HgCl₂ nồng độ 0,1%; Ca(ClO)₂ nồng độ 10%; NaOCl nồng độ 10% với thời gian khử trùng khác nhau đối với Keo lai dòng BV16 được thể hiện tại bảng 2.

Bảng 2. Ảnh hưởng của hóa chất và thời gian khử trùng đến Keo lai dòng BV16

Hóa chất	Thời gian (phút)	CT	Tỷ lệ mẫu chết (%)		Tỷ lệ mẫu sống bị nhiễm (%)		Tỷ lệ mẫu sống không bị nhiễm (%)	
			TB	Sd	TB	Sd	TB	Sd
HgCl ₂ 0,1%	8	1	11,83	3,81	60,00	0,00	28,17*	3,81
	10	2	29,53	6,56	53,33	5,77	17,13	3,61
	12	3	49,60*	7,85	41,10*	8,40	9,30	1,90
Ca(ClO) ₂ 10%	15	4	22,90	5,38	66,67	5,77	10,43	1,51
	20	5	32,30	6,58	53,33	5,77	14,37	1,27
	25	6	23,57	1,60	60,00	0,00	16,43	1,60
NaOCl 10%	8	7	19,47	10,53	70,00	10,00	10,53	1,72
	10	8	22,40	2,33	60,00	0,00	17,60	2,33
	12	9	34,33	5,81	53,33	5,77	12,33	1,66
<i>F_{tính}</i>			9,17		6,44		18,5	
<i>SigF</i>			0,00		0,01		0,00	

Kết quả từ bảng 2 cho thấy, ảnh hưởng của loại hóa chất và thời gian khử trùng khác nhau đến tỷ lệ mẫu chết, tỷ lệ mẫu sống bị nhiễm và tỷ lệ mẫu sống không bị nhiễm là có sự sai khác rõ rệt vì SigF đều nhỏ hơn 0,05. Công thức 1 với hóa chất HgCl₂ 0,1% khử trùng trong thời gian 8 phút cho tỷ lệ mẫu sống không bị nhiễm cao nhất với tỷ lệ 28,17%. Công thức 8 và công thức 2 có tỷ lệ mẫu sống không bị nhiễm xếp cao thứ 2 sau công thức 1.

Kết quả nghiên cứu cũng cho thấy, khi khử trùng bằng các hóa chất, nếu thời gian khử trùng ít hơn mức thời gian thích hợp hoặc lâu hơn đều làm cho tỷ lệ mẫu sống không bị nhiễm giảm. Thời gian khử trùng quá ít tỷ lệ mẫu bị nhiễm sẽ cao và ngược lại, thời gian khử trùng kéo dài sẽ có tác dụng khử trùng tốt hơn, mẫu bị nhiễm ít hơn nhưng lại gây độc cho mẫu, mẫu bị thâm đen và chết, khả năng sống sót, tái sinh thấp.

Keo lai dòng BV32

Kết quả thí nghiệm 3 loại hoá chất: HgCl₂ 0,1%, Ca(ClO)₂ 10%, NaOCl 10% với thời gian khử trùng khác nhau đối với Keo lai dòng BV32 được thể hiện tại bảng 3.

Bảng 3. Ảnh hưởng của hóa chất và thời gian khử trùng đối với Keo lai dòng BV32

Hóa chất	Thời gian (phút)	CT	Tỷ lệ mẫu chết (%)		Tỷ lệ mẫu sống bị nhiễm (%)		Tỷ lệ mẫu sống không bị nhiễm (%)	
			TB	Sđ	TB	Sđ	TB	Sđ
HgCl ₂ 0,1%	8	1	10,29	5,06	63,33	5,77	26,38*	3,87
	10	2	31,94	3,94	53,33	5,77	14,73	2,18
	12	3	41,98*	3,79	46,67	5,77	11,35	2,00
Ca(ClO) ₂ 10%	15	4	24,44	4,86	66,67	5,77	8,89	1,12
	20	5	26,44	0,75	60,00	0,00	13,56	0,75
	25	6	30,39	6,20	53,33	5,77	16,28	1,86
NaOCl 10%	8	7	21,59	1,12	70,00	0,00	8,41	1,12
	10	8	17,77	7,19	66,67	5,77	15,56	2,43
	12	9	30,61	3,85	56,67	5,77	12,72	1,94
<i>F_{tính}</i>			12,13		6,89		19,19	
<i>Sig_F</i>			0,00		0,00		0,00	

*Ghi chú: * Thể hiện công thức đó có sự sai khác rõ rệt với các công thức khác*

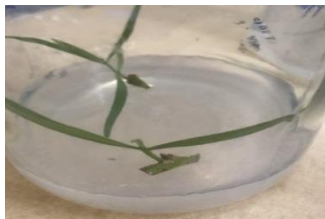
Kết quả từ bảng 3 cho thấy, ảnh hưởng của loại hóa chất và thời gian khử trùng khác nhau đến tỷ lệ mẫu chết, tỷ lệ mẫu sống bị nhiễm và tỷ lệ mẫu sống không bị nhiễm là có sự sai khác rõ rệt vì Sig_F đều nhỏ hơn 0,05.

Đối với chỉ tiêu mẫu sống không bị nhiễm ảnh hưởng của các công thức được xếp thành 4 nhóm với mức độ ảnh hưởng tăng dần từ nhóm 1 đến nhóm 4 theo tiêu chuẩn Duncan. Công thức cho tỷ lệ mẫu sống không bị nhiễm lớn nhất là công thức 1 (hóa chất HgCl₂ 0,1% khử trùng trong thời gian 8 phút) cho tỷ lệ mẫu sống không bị nhiễm 26,38%. Nhóm cho tỷ lệ mẫu sống không bị nhiễm cao thứ 2 và 3 gồm các công thức 6, 8, 2, 5 và 9, trong đó 2 công thức 6, 8 xếp ở nhóm 3 còn công thức 2, 5 và 9 xếp cả ở nhóm 2 và 3. Như vậy, ảnh hưởng của các công thức này đến tỷ lệ mẫu sống không bị nhiễm chưa có sự sai khác nhau rõ rệt. Nhóm 1 cho tỷ lệ mẫu sống không bị nhiễm thấp nhất gồm công thức 3, 4 và 7.

Kết quả nghiên cứu trên phù hợp với nghiên cứu của Đoàn Thị Mai và cộng sự (2009), khi khử trùng mẫu cho 3 dòng keo lai BV71, BV73, BV75, cho thấy sử dụng hóa chất HgCl₂ trong khoảng thời gian từ 8 đến 10 phút là thích hợp nhất.



Dòng Keo BV10



Dòng Keo BV16



Dòng Keo BV32

Hình 1. Kết quả tái sinh chồi sau 4 tuần vào mẫu

Trong nghiên cứu nhân giống bằng phương pháp nuôi cấy mô tế bào đối với các dòng keo lai mới BV350 và BV523 ở giai đoạn khử trùng, Tạ Thu Trang và cộng sự (2021), đã sử dụng hóa chất $HgCl_2$ 0,1% để khử trùng, kết quả cho thấy trong thời gian 7 phút cho hiệu quả cao nhất [2]. Nhưng đối với các dòng BV376, BV586, BV055, kết quả của Văn Thu Huyền và cộng sự (2021), cho rằng khử trùng bằng hóa chất $HgCl_2$ 0,1% trong vòng 5 phút cho tỷ lệ bật chồi cao nhất đạt 37,5% [3]. Như vậy với những dòng keo lai khác nhau cần có những thí nghiệm nghiên cứu cụ thể với các hóa chất và thời gian khử trùng phù hợp để đạt được tỷ lệ mẫu sạch tái sinh chồi cao nhất phục vụ cho các thí nghiệm tiếp theo.

3.2. Ảnh hưởng của BAP và Kenetin đến khả năng nhân nhanh chồi của 3 dòng Keo lai BV10, BV16, BV32

Ảnh hưởng của nồng độ BAP đến khả năng nhân nhanh chồi Keo lai dòng BV10, BV16 và BV32

BAP là chất điều hoà sinh trưởng tổng hợp nhân tạo thuộc nhóm Cytokinin, có vai trò rất quan trọng trong việc kích thích mạnh mẽ sự hình thành các chồi non, có ảnh hưởng quyết định đến hệ số nhân và chất lượng chồi. Để có được kết quả tốt nhất trong giai đoạn nhân nhanh, cần xác định nồng độ BAP phù hợp bổ sung vào môi trường nuôi cấy. Trên cơ sở đó chúng tôi tiến hành thí nghiệm bổ sung chất điều hòa sinh trưởng BAP nồng độ từ 0,0 đến 2,0 mg/l vào môi trường nuôi cấy. Tiến hành theo dõi khả năng nhân nhanh chồi trong vòng 30 ngày. Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của BAP được thể hiện ở bảng 4.

Kết quả cho thấy, nồng độ BAP khác nhau có ảnh hưởng rõ rệt đến hiệu quả nuôi cấy ở cả 3 dòng Keo ($Sig_F < 0,05$). Môi trường không bổ sung BAP mẫu cấy vẫn tái sinh chồi với hệ số nhân chồi là 1,61 ở Keo lai dòng BV10; 1,64 lần ở dòng BV16 và 1,53 lần ở dòng BV32. Các công thức bổ sung BAP đều có hệ số nhân chồi cao hơn so với công thức đối chứng.

Trong các thí nghiệm theo dõi, công thức 3 có hệ số nhân chồi, chiều cao chồi cao nhất, chất lượng chồi tốt và sai khác rõ rệt với các công thức 1, 2 và công thức 4. Hệ số nhân chồi, chiều cao chồi công thức 3 ở dòng Keo lai BV10 là 2,79 lần và đạt chiều cao 3,8 cm, Keo lai BV16 là 3,2 lần và đạt chiều cao 4,13 cm và Keo lai BV32 là 2,73 lần, đạt chiều cao 3,97 cm. Trong khi đó, công thức 2 và 4 không có sự sai khác nhau rõ rệt.

Bảng 4. Ảnh hưởng của nồng độ BAP đến hiệu quả nhân nhanh chồi Keo lai dòng BV10, BV16 và BV32

Dòng	Công thức	Hệ số nhân chồi (Sau 4 tuần)	S_d	Chiều cao chồi (cm)	S_d	Chất lượng chồi
BV10	1	1,61*	0,08	2,90	0,10	+
	2	2,38	0,08	3,20	0,10	+++
	3	2,79*	0,29	3,80*	0,36	+++
	4	2,16	0,13	3,27	0,12	++
$F_{tính}$		26,4		10,31		
Sig_F		0,000		0,004		
BV16	1	1,64*	0,06	2,97*	0,21	+

	2	2,51	0,12	3,50	0,30	++
	3	3,20*	0,07	4,13*	0,21	+++
	4	2,25	0,15	3,50	0,10	+++
$F_{tính}$		111,92		14,64		
$SigF$		0,00		0,01		
BV32	1	1,53*	0,16	2,83*	0,15	+
	2	2,24	0,12	3,30	0,20	+++
	3	2,73*	0,13	3,97*	0,15	+++
	4	2,08	0,11	3,50	0,26	++
$F_{tính}$		41,99		16,9		
$SigF$		0,00		0,01		

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

Như vậy ở giai đoạn nhân nhanh chồi, trong số các công thức môi trường thí nghiệm như trên công thức môi trường tốt nhất cho cả 3 dòng Keo lai BV10, BV16 và BV32 là công thức môi trường dinh dưỡng MS + 30 g/l sucrose + 8 g/l agar bổ sung 1,5 mg/l BAP.

Kết quả nghiên cứu của Đoàn Thị Mai và cộng sự (2009) đối với 3 dòng keo lai BV71, BV73, BV75, cho thấy công thức BAP nồng độ 1,5 mg/l có số lượng chồi đạt cao nhất từ 7,5 đến 8,2 chồi/cụm. Riêng dòng BV71 chỉ tiêu hệ số chồi/cụm cao nhất ở công thức BAP nồng độ 2,0 mg/l nhưng chiều cao chồi chỉ đạt trung bình từ 4,1 đến 4,3 cm và khi giảm nồng độ BAP xuống 1,5 mg/l thì chiều cao chồi tăng lên, đạt từ 4,4 đến 4,6 cm.

Ảnh hưởng của nồng độ Kinetin đến khả năng nhân nhanh chồi Keo lai dòng BV10, BV16 và BV32

Cùng với BAP thì Kinetin thuộc nhóm Cytokinin là chất điều hòa sinh trưởng được sử dụng phổ biến trong nuôi cấy mô tế bào thực vật 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. Để xác định hệ số nhân chồi, chiều cao chồi và chất lượng chồi. Thí nghiệm được bố trí trên môi trường dinh dưỡng MS + 30 g/l sucrose + 8 g/l agar bổ sung Kinetin (0,5 - 2,0 mg/l). Kết quả được trình bày ở ở bảng 5.

Bảng 5. Ảnh hưởng nồng độ Kinetin giai đoạn nhân nhanh chồi

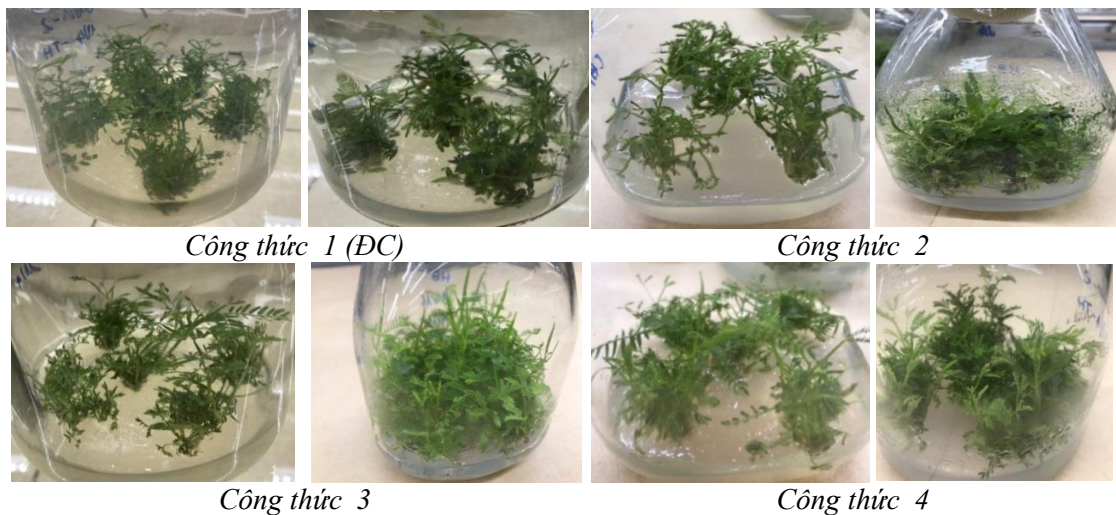
Dòng Keo lai	Kinetin (mg/l)	CT	Hệ số nhân chồi (Sau 4 tuần)	Sd	Chiều cao chồi (cm)	Sd	Chất lượng chồi
BV10	0	1	1,41	0,07	2,70*	0,17	+
	0.5	2	1,48	0,16	3,20	0,10	++
	1	3	1,83	0,15	3,50	0,10	+++
	1.5	4	2,36*	0,11	3,80*	0,17	+++
	2	5	1,95	0,22	3,40	0,10	++
$F_{tính}$			20,51		27,83		
$SigF$			0,00		0,00		
BV16	0	1	1,45	0,09	2,80	0,09	+
	0.5	2	1,54	0,07	3,00	0,09	++

	1	3	1,75	0,12	3,20	0,17	+++
	1.5	4	2,56*	0,24	3,70*	0,26	+++
	2	5	2,06	0,17	3,40	0,10	++
$F_{tính}$			27,03		14,6		
Sig_F			0,00		0,00		
BV32	0	1	1,33	0,06	2,50*	0,10	+
	0.5	2	1,41	0,18	2,80	0,17	+++
	1	3	1,67	0,18	3,00	0,10	+++
	1.5	4	2,32*	0,14	3,50*	0,20	+++
	2	5	1,83	0,13	3,10	0,20	++
$F_{tính}$			22,08		15,81		
Sig_F			0,00		0,00		

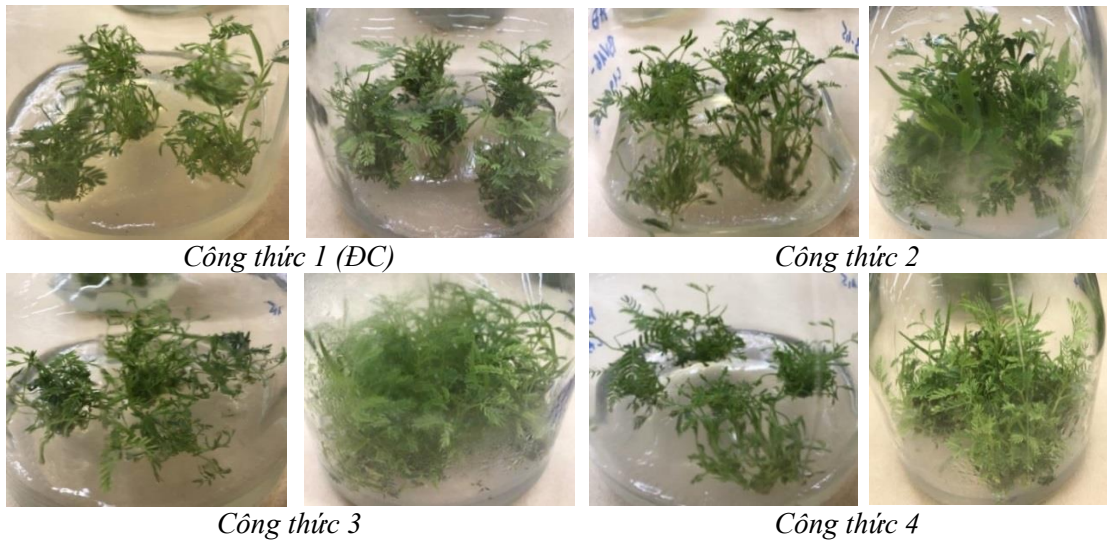
Kết quả cho thấy, tất cả các công thức bổ sung Kinetin ở các dòng Keo lai đều cho kết quả hệ số nhân chồi, chiều cao chồi cao hơn và chất lượng chồi tốt hơn so với công thức đối chứng. Kết quả phân tích phương sai cho thấy ảnh hưởng của nồng độ Kinetin đến hệ số nhân chồi, chiều cao chồi là rõ rệt vì Sig F đều nhỏ hơn 0,05.

Ở cả 3 dòng Keo lai công thức 1 (không bổ sung Kinetin) đều có hệ số nhân chồi thấp hơn so với các công thức nghiên cứu. Công thức 4 có hệ số nhân chồi lớn nhất và có sự sai khác hoàn toàn với các công thức còn lại. Hệ số nhân chồi ở dòng BV10 lớn nhất là 2,36 lần, chiều cao chồi đạt 3,8cm; Hệ số nhân chồi ở dòng BV16 lớn nhất là 2,56 lần, chiều cao chồi đạt 3,7cm. Hệ số nhân chồi ở dòng BV32 lớn nhất là 2,32 lần, chiều cao chồi đạt 3,5cm. Ảnh hưởng của các công thức 1, 2, 3, 5 chưa có sự sai khác nhau rõ rệt.

Như vậy, trong các công thức nghiên cứu bổ sung 1,5 mg/l Kinetin (CT4) trong nhân nhanh chồi Keo lai ở 3 dòng BV10, BV16, BV32 cho hiệu quả nhân chồi tốt hơn các công thức khác. Kết quả này cũng phù hợp với Đoàn Thị Mai và cs (2009) [1], khi bổ sung Kinetin 1,0mg/l; 1,5mg/l và 2,0mg/l cho 3 dòng keo lai BV71, BV73, BV75 vào môi trường nhân nhanh, kết quả cho thấy Kinetin nồng độ 1,5mg/l có hiệu quả cao nhất.



Hình 2. Nhân nhanh Keo lai dòng BV10 bổ sung BAP
(Bên trái: Mẫu sạch tái sinh chồi; bên phải: Chồi nhân nhanh sau 4 tuần)



Hình 3. Nhân chồi keo lai dòng BV16 bổ sung BAP
(Bên trái: Mẫu sạch tái sinh chồi; bên phải: Chồi nhân nhanh sau 4 tuần)

So với kết quả nghiên cứu nhân giống các dòng Keo lai BV350 và BV523 bằng phương pháp nuôi cấy mô của Tạ Thu Trang và cộng sự (2021), thì hệ số nhân chồi cao nhất đạt được trong môi trường MS* +1,0 mg/l BAP + 0,5 mg/l kinetin (BV350 có hệ số nhân chồi là 2,66 lần; BV523 có hệ số nhân chồi là 2,78 lần).

4. KẾT LUẬN

Khử trùng bằng HgCl_2 0,1 % trong thời gian 8 phút cho hiệu quả khử trùng tốt nhất: Keo lai dòng BV10 đạt 29,5%, dòng BV16 đạt 28,16%, dòng BV32 đạt 26,38%.

Trong giai đoạn nhân nhanh chồi, môi trường dinh dưỡng tốt nhất cho cả 3 dòng Keo lai BV10, BV16 và BV32 là MS + 30g/l sucrose + 8g/l agar bổ sung 1,5 mg/l BAP: Hệ số nhân chồi, chiều cao chồi ở dòng Keo lai BV10 là 2,79 lần và đạt chiều cao 3,8 cm, tương ứng với Keo lai BV16 là 3,2 lần và 4,13 cm; Keo lai BV32 là 2,73 lần và 3,97 cm. Đối với công thức bổ sung Kinetin thì công thức MS + 30 g/l sucrose + 8 g/l agar bổ sung 1,5 mg/l Kinetin cho hiệu quả cao nhất. Hệ số nhân chồi ở dòng BV10 lớn nhất là 2,36 lần, chiều cao chồi đạt 3,8 cm; dòng BV16 có hệ số nhân chồi là 2,56 lần, chiều cao đạt 3,7 cm và dòng BV32 có hệ số nhân chồi là 2,32 lần, chiều cao đạt 3,5 cm.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Đoàn Thị Mai, Nguyễn Thị Mỹ Hương, Vũ Thị Ngọc, Trần Thanh Hương, Văn Thu Huyền (2009), *Nuôi cấy mô một số giống keo lai mới chọn tạo*, Tạp chí Khoa học Lâm nghiệp, (2):905-910.
- [2] Tạ Thu Trang, Khuất Thị Hải Ninh, Đỗ Hữu Sơn, Cấn Thị Lan, Kiều Thị Hà, Nguyễn Thị Thu Dung (2021), *Nghiên cứu nhân giống các dòng keo lai mới (acacia mangium acacia auriculiformis) BV350 và BV523 bằng phương pháp nuôi cấy mô tế bào*, Tạp chí Khoa học Lâm nghiệp, số 3.

- [3] Văn Thu Huyền, Mai Thị Phương Thúy, Đồng Thị Ứng, Nguyễn Anh Dũng Lê Thị Hoa, Lưu Thị Quỳnh, Hoàng Thị Hồng Hạnh, Đỗ Hữu Sơn, Nguyễn Đức Kiên, Đỗ Tiến Phát, Lê Sơn (2021), *Nghiên cứu nhân giống các dòng keo lai năng suất cao BV376, BV586, BV055 bằng phương pháp nuôi cấy mô*, Tạp chí Khoa học Lâm nghiệp, Số 3/2021.
- [4] Nguyễn Văn Việt, Trần Việt Hà, Kiều Thị Hà, Nguyễn Đức Kiên (2019), *Ứng dụng kỹ thuật nuôi cấy in vitro trong nhân giống một số dòng keo lá tràm (Acacia auriculiformis)*, Tạp chí Khoa học và Công nghệ lâm nghiệp, số 4.

EFFECT OF CHEMICAL STERILIZATION AND PLANT GROWTH PROMOTERS ON IN VITRO PROPAGATION OF HYBRID ACACIA VARIETIES BV10, BV16 AND BV32 IN THANH HOA PROVINCE

Pham Huu Hung, Nguyen Huu Hao, Lai Thi Thanh, Nghiem Thi Huong

ABSTRACT

Results from an experiment showed that sterilization with HgCl₂ at a concentration of 0.1% for 8 minutes was the most efficient method, with survival rates of 29.5% for acacia varieties BV10, 28.16% for BV16, and 26.38% for BV32. The best culture medium for the rapid shoot multiplication stage for all three acacia hybrid varieties (BV10, BV16, and BV32) is MS supplemented with 30 g/l sucrose and 8 g/l agar, along with 1.5 mg/l BAP. The shoot multiplication rate and shoot height were observed to be 2.79 times and 3.8 cm for BV10, 3.2 times and 4.13 cm for BV16, and 2.73 times and 3.97cm for BV32, respectively. Among treatments supplemented with Kinetin, the treatment with 1.5 mg/l of Kinetin yielded the highest results, with shoot multiplication rates and shoot heights of 2.36 times and 3.8 cm for BV10, 2.56 times and 3.7 cm for BV16, and 2.2 times and 3.5 cm for BV32, respectively.

Keywords: *Acacia hybrid varieties BV10, BV16, BV32, tissue culture, in vitro propagation.*

* Ngày nộp bài: 16/3/2023; Ngày gửi phản biện: 22/5/2024; Ngày duyệt đăng: 8/10/2024

* Bài báo là kết quả nghiên cứu từ đề tài NCKH cấp Tỉnh “Nghiên cứu hoàn thiện quy trình sản xuất giống Keo lai dòng BV10, BV16, BV32 bằng phương pháp nuôi cấy mô tại Thanh Hóa” theo Hợp đồng số 2330/2021/HĐKH-CN-ĐTKHCN ngày 21/12/2021 ký kết giữa Sở Khoa học và Công nghệ với Trường Đại học Hồng Đức.