

## NGHIÊN CỨU NHÂN GIỐNG CÁC DÒNG TRÀM NĂM GÂN Q15.38, Q15.013, Q16.427 (*Melaleuca quinquenervia* (Cav.) S.T.Blake) BẰNG KỸ THUẬT NUÔI CẤY *IN VITRO*

Khuất Thị Hải Ninh<sup>1</sup>, Hoàng Thị Thu<sup>1</sup>, Nguyễn Thị Thơ<sup>1</sup>, Đào Thị Thanh Mai<sup>1</sup>  
Vũ Quang Nam<sup>1</sup>, Nguyễn Thị Thanh Hương<sup>2</sup>, Lê Đình Khã<sup>2</sup>, Hoàng Thanh Lộc<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Trường Đại học Lâm nghiệp, <sup>2</sup>Viện Cải thiện giống và Phát triển lâm sản

### TÓM TẮT

Các dòng vô tính Tràm năm gân gồm Q15.38, Q15.013, Q16.427 có hàm lượng và chất lượng tinh dầu cao, đã được Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn công nhận là giống tiến bộ kỹ thuật. Do đó, xác định và tối ưu hóa phương pháp nhân giống *in vitro* cho các dòng vô tính trên là cần thiết và có ý nghĩa thực tiễn trong việc tăng tính đa dạng sinh học, độ an toàn trong trồng rừng công nghiệp, cũng như để đưa nhanh các giống tốt vào sản xuất cung cấp với số lượng lớn cây giống ổn định cho người trồng rừng. Kết quả nhân giống *in vitro* các dòng Tràm năm gân trên cho thấy tạo mẫu sạch thông qua khử trùng mẫu chồi bằng Javen 5% trong thời gian 10 phút với tỷ lệ mẫu sạch này chồi đạt 44,44 - 64,4%. Môi trường tạo cụm chồi MS\* + 0,7 mg/l BAP + 0,2 mg/l Kinetin + 0,1 mg/l NAA (với 100% mẫu tạo cụm chồi; 3,5 - 6,7 chồi/cụm). Kích thích tăng trưởng chồi trên môi trường có sử dụng 0,3 - 0,4 mg/l Kinetin + 0,7 mg/l BAP + 0,1 mg/l NAA (với tỷ lệ chồi hữu hiệu đạt trên 84,44%, hệ số nhân chồi đạt trên 3,7 lần, chiều cao chồi trên 2,73 cm) sau 3 tuần nuôi cấy. Các bình chồi trong giai đoạn nhân nhanh được đặt dưới cường độ chiếu sáng 1.000 lux trong 1 chu kỳ nuôi là phù hợp nhất. Môi trường ra rễ *in vitro* các dòng Tràm năm gân là MS\* + 1,5 mg/l NAA (100% chồi ra rễ; 2,4 - 3,8 rễ/chồi, chiều dài rễ 1,7 - 2,2 cm sau 3 tuần nuôi cấy). Giá thể 30% trấu hun và 70% đất tầng B thích hợp để ra ngôi các dòng vô tính Tràm năm gân với tỷ lệ cây sống đạt trên 95%, chiều cao cây đạt 21,67 - 25,49 cm, cây có chất lượng tốt sau 3 tháng trồng ở vườn ươm.

**Từ khóa:** Dòng vô tính, *in vitro*, Tràm năm gân, tinh dầu

### Research on propagation Q15.38, Q15.013, Q16.427 clones of *Melaleuca quinquenervia* by technique *in vitro*

Q15.38, Q15.013, Q16.427 clones of *Melaleuca quinquenervia* (Cav.) S.T. Blake have high content and quality of essential oils, recognized as technically advanced varieties by the Ministry of Agriculture and Rural Development. Therefore, identification and optimization of the *in vitro* propagation method for the above clones by *in vitro* culture method are necessary and have practical significance in increasing the biodiversity and safety in the industrial afforestation, as well as to quickly put good varieties into production and provide large quantities of stable seedlings to forest growers. The results of *in vitro* propagation of these *Melaleuca* clone lines showed that cleaned samples by disinfecting with Javen 5% for 10 minutes are shooting with 44.44 - 64.4%. The medium to create shoot cluster is MS\* + 0.7 mg/l BAP + 0.2 mg/l Kinetin + 0.1 mg/l NAA, with 100% of

**Keywords:** Clones, essential oil, *in vitro*, *Melaleuca quinquenervia*

created shoot cluster and 3.5 - 3.6 shoots per cluster. Stimulating shoot growth on medium of 0.3 - 0.4 mg/l Kinetin + 0.7 mg/l BAP + 0.1 mg/l NAA is resulted with effective shoot rate of over 84.44%, coefficient shoot multiplication of over 3.7 times, shoot height of over 2.73 cm after 3 weeks of tissue culture. The shoot pots in the rapid multiplication period placed under 1,000 lux light intensity for 1 culture cycle are most suitable. The rooting medium of these *Melaleuca* clone lines is MS\* + 1.5 mg/l NAA (100% rooting shoots, 2.4 - 3.8 roots/shoot, 1.7 - 2.2 cm root length after 3 culture weeks). The substrate of 30% hunk rice husk and 70% of soil from layer B is suitable for the crowning of these *Melaleuca* clones, with a survival rate of over 95%, the tree height of 21.67 - 25.49 cm, the plants with good quality after 3 months of planting in the nursery.

## I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Tràm năm gân (*Melaleuca quinquenervia*) là loài cây giàu tinh dầu 1,8 - cineole (Khan, *et al.*, 2010). Tác dụng kháng khuẩn là tác dụng nổi bật của tinh dầu giàu 1,8 - cineole (Trịnh Thị Diệp *et al.*, 2012). Ngoài 1,8 - cineole trong tinh dầu Tràm năm gân còn một số chất có giá trị hương liệu được dùng trong sản xuất nước hoa và mỹ phẩm như nerolidol, linalool, v.v., trong đó nerolidol có thể đến 82% ở xuất xứ Moreton của Queensland (Lê Đình Khả *et al.*, 2008). Hiện tại, nhu cầu về tinh dầu tràm tự nhiên trong nước và trên thế giới đều rất lớn, nguồn cung chưa đáp ứng được nhu cầu thị trường. Các dòng vô tính Q15.38, Q15.013, Q16.427 Tràm năm gân có hàm lượng và chất lượng tinh dầu cao. Các giống tràm này đã được Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn công nhận là giống tiến bộ kỹ thuật 14erp, Quyết định số 3229/QĐ-BNN-TCLN ngày 01 tháng 8 năm 2017.

Nghiên cứu nhân giống *in vitro* các loài tràm đã được công bố bởi các tác giả như Yohana de Oliveira và đồng tác giả (2010) đối với Tràm trà (*Melaleuca alternifolia*), Phùng Thị Hằng và Nguyễn Bảo Toàn (2011) đối với Tràm cajuput (*M. cajuputi*), Khuất Thị Hải Ninh và đồng tác giả (2015) đối với dòng vô tính Q4.44, Q23.21 Tràm năm gân (*M. quinquenervia*). Tuy nhiên, đối với các dòng mới được công nhận không

thể áp dụng hoàn toàn các quy trình sẵn có mà vẫn cần có một số thay đổi nhất định để nâng cao hiệu quả nhân giống tốt hơn. Do đó, xác định và tối ưu hóa phương pháp nhân giống *in vitro* cho các dòng vô tính Tràm năm gân (Q15.38, Q15.013, Q16.427) bằng phương pháp nuôi cấy *in vitro* là cần thiết và có ý nghĩa thực tiễn trong việc tăng tính đa dạng sinh học và độ an toàn trong trồng rừng công nghiệp, cũng như để đưa nhanh các giống tốt vào sản xuất và cung cấp với số lượng lớn cây giống ổn định cho người trồng rừng.

## II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Đối tượng, vật liệu và địa điểm nghiên cứu

- **Đối tượng:** Các dòng vô tính Tràm năm gân gồm Q15.38, Q15.013, Q16.427.

- **Vật liệu:** Chồi nửa hóa gỗ từ thân cây giống 2 - 3 tuổi ở vườn vật liệu đã được trẻ hóa trước thời điểm lấy mẫu 1 - 1,5 tháng do Viện Cải thiện giống và Phát triển Lâm sản cung cấp.

- **Địa điểm:** Thí nghiệm được thực hiện tại phòng thí nghiệm Viện Công nghệ Sinh học - Trường Đại học Lâm nghiệp.

### 2.2. Phương pháp nghiên cứu

#### 2.2.1. Phương pháp bố trí thí nghiệm

Nghiên cứu được tiến hành theo các bước tạo mẫu sạch, tạo cụm chồi, kích thích tăng trưởng

chồi, tạo cây con hoàn chỉnh và trồng cây mô ra vườn ươm. Mỗi công thức thí nghiệm được bố trí 3 lần lặp, mỗi lặp 30 mẫu. Nhiệt độ phòng nuôi  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ .

#### a) Tạo mẫu sạch

##### - Chọn mẫu:

Mẫu được sử dụng là chồi của thân cây 2 - 3 tuổi ở vườn vật liệu đã được trẻ hóa trước thời điểm lấy mẫu khoảng 1 - 1,5 tháng, lấy đoạn chồi dài 7 - 10 cm, chồi mập, có mắt ngủ ở nách lá, cắt bỏ lá, để lại cuống lá.

##### - Khử trùng mẫu ngoài box cấy:

Mẫu được rửa dưới vòi nước chảy trong 5 phút. Ngâm mẫu trong nước xà phòng loãng, dùng chổi lông mềm để cọ rửa mẫu, rửa sạch xà phòng dưới vòi nước chảy. Tráng mẫu lại 5 lần bằng nước cất, đựng mẫu trong bình có nắp xoáy đã được khử trùng qua nồi hấp vô trùng.

##### - Khử trùng mẫu trong box cấy:

+ Mẫu được tiếp tục được rửa bằng nước cất vô trùng 3 lần, mỗi lần 2 - 3 phút.

+ Lắc mẫu trong dung dịch Javen nồng độ 5% trong thời gian 5; 10; 15 và 20 phút (Bảng 1). Sau đó đổ bỏ dung dịch Javen, tiếp tục lắc mẫu bằng nước cất vô trùng 5 lần, mỗi lần từ 3 - 5 phút.

##### - Nuôi cấy khởi động

+ Sau khử trùng, dùng panh và kéo cắt bỏ những phần bị thâm do ngâm dung dịch Javen hoặc những phần mẫu quá già, cắt thành các đoạn mẫu dài 2 - 3 cm, có ít nhất 1 mắt ngủ, cắm phần gốc ngập 4 - 5 mm vào môi trường theo phương thẳng đứng.

+ Môi trường tái sinh chồi Tràm năm gân: MS + đường sucrose 30 g/l + agar 6 g/l, pH = 5,8.

+ Chế độ ánh sáng: 10 - 15 ngày đầu che sáng hoàn toàn, khi mắt ngủ đã bắt đầu nảy chồi chuyển ra nuôi dưới ánh sáng 1.000 lux.

- Theo dõi sự phát triển của chồi, loại bỏ mẫu nhiễm.

- Sau khi mẫu cấy vào môi trường tái sinh chồi khoảng 25 - 30 ngày, mẫu đã bật chồi mới đạt chiều cao từ 1 cm trở lên, tiến hành cắt chồi và cấy vào môi trường tạo cụm chồi.

- Thu thập số liệu: Sau 4 tuần, số mẫu sạch nảy chồi, mẫu sạch chết và số mẫu nhiễm.

#### b) Tạo cụm chồi

- Kết quả nghiên cứu nhân giống *in vitro* các dòng vô tính Q4.44, Q23.21 Tràm năm gân của Khuất Thị Hải Ninh và đồng tác giả (2015), cho thấy giai đoạn tạo cụm chồi sử dụng môi trường MS\* (nồng độ  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  giảm đi 1/2 so với MS) + 0,2 - 0,5 mg/l BAP + 0,2 mg/l Kinetin + 0,1 mg/l NAA + đường sucrose 20 g/l + đường glucose 10 g/l + agar 6 g/l, pH = 5,8. Kế thừa kết quả nghiên cứu này, giai đoạn tạo cụm chồi cho các dòng Q15.38, Q15.013, Q16.427 tiếp tục sử dụng môi trường MS\* (nồng độ  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  giảm đi 1/2 so với MS) + 0,2mg/l Kinetin + 0,1 mg/l NAA + đường sucrose 20 g/l + đường glucose 10 g/l + agar 6 g/l, pH = 5,8 nghiên cứu mở rộng thang nồng độ BAP với 0,1; 0,3; 0,5; 0,7 và 1 mg/l.

- Chế độ ánh sáng: 1.000 lux trong cả chu kỳ nuôi.

- Thu thập số liệu: Sau 4 tuần nuôi cấy về số mẫu tạo cụm chồi, số chồi/cụm, chiều cao chồi.

#### c) Kích thích tăng trưởng chồi

\* Ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng

- Sử dụng công thức tốt nhất ở thí nghiệm tạo cụm chồi tiếp tục điều chỉnh nồng độ Kinetin 0,1 - 0,5 mg/l.

- Môi trường MS\* bổ sung 20 g/l đường sucrose + 10 g/l đường glucose + 6 g/l agar, pH = 5,8.

- Ánh sáng được sử dụng là 1.000 lux trong suốt chu kỳ nuôi.

## \* Ảnh hưởng của ánh sáng

Sử dụng công thức thí nghiệm tốt nhất thí nghiệm kích thích tăng trưởng chồi tiếp tục nghiên cứu ảnh hưởng của ánh sáng đến khả năng phát triển chồi.

- AS1: Cường độ chiếu sáng 2.000 lux trong 1 chu kỳ nuôi

- AS2: Cường độ chiếu sáng 1.000 lux trong 1 chu kỳ nuôi

- AS3: Che tối hoàn toàn trong 1 tuần đầu sau khi cấy chuyển 1 tuần sau đó chiếu sáng ở cường độ 1.000 lux.

- *Thu thập số liệu*: Sau 3 tuần nuôi cấy về chiều cao chồi, số chồi hữu hiệu (chồi có chiều cao 2 - 3 cm) và đặc điểm chồi.

d) *Kích thích ra rễ tạo cây hoàn chỉnh*

Chọn những chồi khỏe mạnh, xanh, mập, cứng cáp, có từ 2 đốt lá trở lên, có chiều cao từ 2 - 2,5 cm để cấy chuyển sang môi trường ra rễ. Môi trường ra rễ Tràm năm gân MS\* + 20 g/l đường sucrose + 10 g/l đường glucose + 6 g/l agar, pH = 5,8, bổ sung chất điều hòa sinh trưởng NAA với nồng độ 0,5; 1; 1,5 và 2 mg/l.

2.2.2. *Phương pháp xử lý số liệu*

$$+ \text{Tỷ lệ mẫu sạch nảy chồi} = \frac{\text{Số mẫu sạch nảy chồi}}{\text{Tổng số mẫu cấy}} \times 100\% + \text{Tỷ lệ ra rễ} = \frac{\text{Số cây ra rễ}}{\text{Tổng số cây}} \times 100\%$$

$$+ \text{Hệ số nhân chồi} = \frac{\text{Số chồi tạo thành}}{\text{Tổng số chồi ban đầu}} (\text{lần}) + \text{Tỷ lệ cây sống} = \frac{\text{Số cây sống}}{\text{Tổng cây cấy ban đầu}} \times 100\%$$

So sánh giữa các công thức thí nghiệm về tỷ lệ mẫu sạch nảy chồi, tỷ lệ mẫu tạo cụm chồi, tỷ lệ chồi ra rễ, tỷ lệ cây sống ngoài vườn ươm bằng tiêu chuẩn khi bình phương ( $\chi^2$ ).

So sánh giữa các công thức thí nghiệm về chiều cao cây, số lượng chồi/cụm, chiều dài chồi, chiều dài rễ và số lượng rễ/cây bằng phân tích phương sai một nhân tố.

Số liệu đã thu thập được xử lý bằng phần mềm SPSS (Nguyễn Hải Tuất và Nguyễn Trọng Bình, 2005) và phần mềm Excel.

Chế độ ánh sáng: 1.000 lux trong cả chu kỳ nuôi.

- *Thu thập số liệu*: Số liệu thu thập sau 3 tuần nuôi cấy gồm: Số chồi ra rễ, số rễ/cây và chiều dài rễ.

e) *Huấn luyện và ra ngôi*

- Cây mô đã ra rễ trong bình được huấn luyện dưới ánh sáng tán xạ trong thời gian 2 tuần sau đó được rửa sạch agar cắt bớt rễ nếu rễ quá dài và ngâm trong dung dịch Viben C nồng độ 3% hoặc các loại dung dịch chống nấm khác từ 3 - 5 phút.

- Từng cây được cấy trực tiếp vào bầu; kích thước túi bầu 7 × 12 cm hoặc 8 × 12 cm, dán đáy, đục lỗ xung quanh. Thành phần ruột bầu:

GT1: 100% là đất tầng B sàng kỹ;

GT2: 30% xơ dừa + 70% đất tầng B sàng kỹ;

GT3: 30% trấu hun và 70% đất tầng B sàng kỹ.

- Số liệu thu thập sau 3 tháng: Tỷ lệ cây sống, chiều cao cây, chất lượng cây (Tốt: Ngọn chính phát triển tốt, lá xanh, thân mập; Trung bình: Ngọn chính phát triển tốt, lá xanh, thân mảnh; Xấu: Lá vàng, thân mảnh).

## III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

3.1. *Tạo mẫu sạch và nuôi cấy khởi động*

Các nghiên cứu trước đây về tạo mẫu sạch cho một số dòng Tràm năm gân (như Q4.44, Q23.21 và Q15.38) bằng việc sử dụng HgCl<sub>2</sub> 0,1% đã cho hiệu quả khá tốt. Tuy nhiên, để giảm mức độ độc hại cho người sử dụng và môi trường, Javen 5% đã được sử dụng để nghiên cứu tiếp cho các dòng có triển vọng Q15.38, Q15.013 và Q16.427.

Kết quả về nghiên cứu ảnh hưởng của thời gian khử trùng mẫu bằng Javen 5% với thời gian khác nhau (5, 10, 15, 20, 25 phút) được thể hiện ở bảng 1.

**Bảng 1.** Ảnh hưởng thời gian khử trùng mẫu chồi bằng Javen 5% đến khả năng tạo mẫu sạch dòng Q15.38, Q15.013, Q16.427 Tràm năm gân (sau 4 tuần nuôi cấy)

Thời gian sử dụng Javen 5% (phút)	Tỷ lệ mẫu ở các dòng dòng vô tính Tràm năm gân (%)								
	Q15.38			Q15.013			Q16.427		
	Sạch nảy chồi	Sạch chết	Nhiễm	Sạch nảy chồi	Sạch chết	Nhiễm	Sạch nảy chồi	Sạch chết	Nhiễm
5	5,56	0,00	94,44	16,67	0,00	83,33	15,56	0,00	84,44
10	64,44	22,23	13,33	50,00	16,67	33,33	44,44	13,33	42,23
15	24,44	38,89	36,67	22,22	55,56	22,22	16,67	50,00	33,33
20	5,56	66,67	27,77	7,77	55,56	36,67	8,89	72,22	18,89
<i>sig</i>	0,0001			0,0001			0,0001		

Từ bảng 1 cho thấy khi sử dụng Javen 5% với thời gian khử trùng khác nhau đã có ảnh hưởng rõ rệt đến khả năng tạo mẫu sạch ( $sig = 0,0001 < 0,05$ ). Khi khử trùng mẫu bằng Javen 5% trong thời gian 5 phút, cả 3 dòng đều cho tỷ lệ mẫu sạch nảy chồi thấp nhất (5,56 - 16,67%), không xuất hiện mẫu sạch bị chết và tỷ lệ mẫu nhiễm rất cao (83,33 - 94,44%). Khi thời gian khử trùng mẫu bằng Javen 5% với thời gian 10 phút tỷ lệ mẫu sạch nảy chồi tăng lên đáng kể (44,44 và 64,44%), xuất hiện mẫu sạch bị chết (16,67 - 22,22%). Nhưng khi thời gian khử trùng bằng Javen 5% lên 15 và 20 phút tỷ lệ mẫu sạch chết khá cao.

Công thức khử trùng đạt hiệu quả nhất đối với các dòng Tràm năm gân khi sử dụng Javen 5% với thời gian 10 phút là phù hợp với tỷ lệ mẫu sạch nảy chồi đạt 44,44 - 64,44%. So sánh với kết quả nhân giống bằng nuôi cấy mô Tràm năm gân được thực hiện cho một số dòng vô tính Q4.44, Q15.38, Q23.21, khử trùng mẫu bằng  $HgCl_2$  0,1% trong 6 phút cho tỷ lệ mẫu sạch nảy chồi đạt 70,0 - 83,3% (Khuất Thị Hải Ninh *et al.*, 2015). Sử dụng  $HgCl_2$  0,1% để khử trùng cho hiệu quả tạo mẫu sạch cao hơn, tuy nhiên để giảm thiểu sự gây độc cho người sử dụng và môi trường thì việc sử dụng Javen 5% để khử trùng nên được khuyến cáo sử dụng.



**Hình 1.** Mẫu sạch Tràm năm gân nảy chồi sau 4 tuần nuôi cấy

### 3.2. Tạo cụm chồi

Kết quả nhân giống *in vitro* một số dòng vô tính Tràm năm gân (Q4.44 và Q23.21), giai đoạn nhân chồi đã sử dụng cố định 0,2 mg/l Kinetin + 0,1 mg/l NAA thay đổi BAP ở các nồng độ 0,3; 0,5; 1 và 2 mg/l. Kết quả cho thấy với nồng độ > 1 mg/l các chồi hạn chế phát triển chiều cao (Khuất Thị Hải Ninh *et al.*, 2015). Vì vậy, trong nghiên cứu tạo cụm chồi

các dòng Q15.38, Q15.013 và Q16.427, nồng độ BAP 0,1 mg/l; 0,3 mg/l; 0,5 mg/l; 0,7 mg/l và 1 mg/l tiếp tục được sử dụng.

Các chồi được tạo ra ở giai đoạn tạo mẫu sạch được cấy chuyển sang môi trường MS\* bổ sung các chất điều hòa sinh trưởng khác nhau để tiếp tục nghiên cứu khả năng tạo cụm chồi và trưởng chồi. Kết quả được thể hiện ở bảng 2.

**Bảng 2.** Khả năng tạo cụm chồi của Q15.38; Q15.013 và Q16.427 trong môi trường MS\* bổ sung 0,2 mg/l Kinetin + 0,1 mg/l NAA + (0,1 - 1,0 mg/l BAP) (sau 4 tuần nuôi cấy)

BAP (mg/l)	Các dòng Tràm năm gân								
	Q15.38			Q15.013			Q16.427		
	Tỷ lệ mẫu tạo cụm chồi TB (%)	Hệ số nhân TB (lần)	Chiều cao chồi TB (cm)	Tỷ lệ mẫu tạo cụm chồi TB (%)	Hệ số nhân TB (lần)	Chiều cao chồi TB (cm)	Tỷ lệ mẫu tạo cụm chồi TB (%)	Hệ số nhân TB (lần)	Chiều cao chồi TB (cm)
0,1	88,9	2,4	2,23	81,1	1,5	2,62	74,4	1,3	2,27
0,3	91,1	3,2	2,55	83,3	2,1	2,84	80,0	1,7	2,49
0,5	100	3,8	1,84	100	2,7	1,56	100	3,2	2,75
0,7	100	6,7	1,56	100	3,5	1,15	100	5,2	1,21
1,0	100	5,7	0,61	100	2,6	0,57	100	4,7	0,76
Sig	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001
Lsd		0,57	0,40		0,33	0,16		0,42	0,75

Ghi chú: TB: Trung bình.

Số liệu bảng 2 cho thấy, khả năng tạo cụm chồi của các dòng vô tính Tràm năm gân có sự khác nhau, Q15.38 có sinh trưởng tốt nhất với hệ số nhân chồi đạt 2,4 - 6,7 lần, chiều cao chồi đạt 0,61 - 2,55 cm. Tiếp đến là Q16.427 tương ứng đạt 1,7 - 5,2 lần và 0,76 - 2,75 cm. Cuối cùng là Q15.013 tương ứng đạt 1,5 - 3,5 lần và 0,57 - 2,84 cm.

Dòng Q15.38, trong môi trường nuôi cấy giữ nguyên 0,2 mg/l Kinetin + 0,1 mg/l NAA, bổ sung BAP ở các nồng độ từ 0,1 - 1 mg/l đã cho thấy có ảnh hưởng rõ rệt đến hiệu quả tạo cụm chồi. Bổ sung ≤ 0,5 mg/l BAP đã làm tăng

chiều cao chồi (1,8 - 2,55 cm) nhưng hệ số nhân chồi chỉ đạt 2,4 - 3,8 lần, bổ sung ≥ 0,7 mg/l BAP mặc dù chiều cao chồi giảm (0,61 - 1,56 cm) nhưng đã làm hệ số nhân chồi (3,8 - 6,7 lần). Đặc biệt công thức 0,7 mg/l BAP + 0,2 mg/l Kinetin + 0,1 mg/l NAA với 100% mẫu đẻ chồi, hệ số nhân chồi cao nhất đạt 6,7 lần, chiều cao chồi trung bình đạt 1,55 cm.

Kết quả tương tự cũng xảy ra đối với dòng Q15.013 và Q16.427, môi trường tạo cụm chồi cho hệ số nhân cao nhất là 0,7 mg/l BAP + 0,2 mg/l Kinetin + 0,1 mg/l NAA (đối với dòng Q15.013 đạt 3,5 lần và chiều cao chồi đạt 1,15 cm,

đối với dòng Q16.427 tương ứng đạt 5,2 lần và 1,21 cm).

So sánh với kết quả nhân chồi các dòng Q4.44 và Q23.21, môi trường phù hợp để nhân nhanh chồi và kích thích tăng trưởng chồi là MS\* + (0,2 - 0,5) mg/l BAP + 0,2 mg/l Kinetin + 0,1 mg/l NAA (Khuất Thị Hải Ninh *et al.*, 2015). Tuy nhiên, các dòng Q15.38, Q15.013 và Q16.427 trong nghiên cứu này để tăng hệ số nhân chồi cần nuôi cấy trong môi trường MS\* + 0,7 mg/l BAP + 0,2 mg/l Kinetin + 0,1 mg/l NAA là thích hợp.

### 3.3. Kích thích tăng trưởng chồi

#### 3.3.1. Ảnh hưởng của Kinetin đến khả năng tăng trưởng chồi

Từ kết quả thí nghiệm tạo cụm chồi cho thấy môi trường 0,7 mg/l BAP + 0,2 mg/l Kinetin + 0,1 mg/l NAA cho hệ số nhân chồi khá cao, nhưng chồi chưa phát triển mạnh về chiều cao. Vì vậy, tiếp tục cố định 0,7 mg/l BAP + 0,1 mg/l NAA điều chỉnh nồng độ Kinetin (0,1 - 0,5 mg/l) để kích thích tăng trưởng chồi. Kết quả được thể hiện ở bảng 3.

**Bảng 3.** Khả năng tăng trưởng chồi của Q15.38; Q15.013 và Q16.427 trong môi trường MS\* bổ sung 0,7mg/l BAP + 0,1 mg/l NAA + (0,1 - 0,5 mg/l) Kinetin (sau 3 tuần nuôi cấy)

Kinetin (mg/l)	Các dòng Tràm năm gân								
	Q15.38			Q15.013			Q16.427		
	Tỷ lệ chồi hữu hiệu TB (%)	Hệ số nhân TB (lần)	Chiều cao chồi TB (cm)	Tỷ lệ chồi hữu hiệu TB (%)	Hệ số nhân TB (lần)	Chiều cao chồi TB (cm)	Tỷ lệ chồi hữu hiệu TB (%)	Hệ số nhân TB (lần)	Chiều cao chồi TB (cm)
0,1	52,2	4,8	1,54	57,8	2,7	1,08	53,3	4,8	1,34
0,2	66,7	6,4	1,53	74,4	3,3	1,12	68,9	5,1	1,21
0,3	86,7	6,7	2,67	66,7	2,6	2,15	88,9	5,4	2,73
0,4	68,9	5,8	2,15	84,4	3,7	2,96	76,7	4,1	2,13
0,5	64,4	4,9	1,72	60,0	2,1	1,87	61,1	3,2	1,85
Sig	0,0001	0,0001	0,0001	0,001	0,0001	0,0001	0,001	0,0001	0,001
Lsd		0,30	0,28		0,31	0,29		0,31	0,33

Ghi chú: TB: Trung bình.

Từ bảng 3 cho thấy, trong môi trường nuôi cấy khi cố định 0,7 mg/l BAP + 0,1 mg/l NAA thay đổi nồng độ kinetin từ 0,1 - 0,5 mg/l đã có ảnh hưởng rõ rệt đến khả năng kích thích tăng trưởng chồi.

Công thức 0,3 mg/l Kinetin + 0,7 mg/l BAP + 0,1 mg/l NAA vừa có tác dụng nhân nhanh chồi và kích thích tăng trưởng chồi đối với dòng Q15.38 và dòng Q16.427 (với tỷ lệ chồi hữu hiệu tương ứng đạt 86,7 và 88,9%, hệ số nhân chồi đạt 6,7 và 5,4 lần, chiều cao chồi đạt

2,67 và 2,73 cm). Riêng đối với dòng Q15.013 công thức 0,4 mg/l Kinetin + 0,7 mg/l BAP + 0,1 mg/l NAA lại cho kết quả tốt nhất (với tỷ lệ chồi hữu hiệu đạt 84,4, hệ số nhân chồi đạt 3,7 lần, chiều cao chồi đạt 2,96 cm).

#### 3.3.2. Ảnh hưởng của ánh sáng đến khả năng kích thích tăng trưởng chồi

Sử dụng môi trường nhân chồi MS + 0,7 mg/l BAP + 0,3 mg/l Kinetin + 0,1mg/l NAA tốt nhất cho dòng Q15.38 và dòng Q16.427, môi

trường chồi MS + 0,7 mg/l BAP + 0,4 mg/l để tiếp tục thử nghiệm ảnh hưởng của ánh sáng đến khả năng tăng trưởng chồi. Kinetin + 0,1 mg/l NAA cho dòng Q15.013,

**Bảng 4.** Ảnh hưởng của ánh sáng đến khả năng tăng trưởng chồi Các dòng Q15.38; Q15.013 và Q16.427 (sau 3 tuần nuôi cấy)

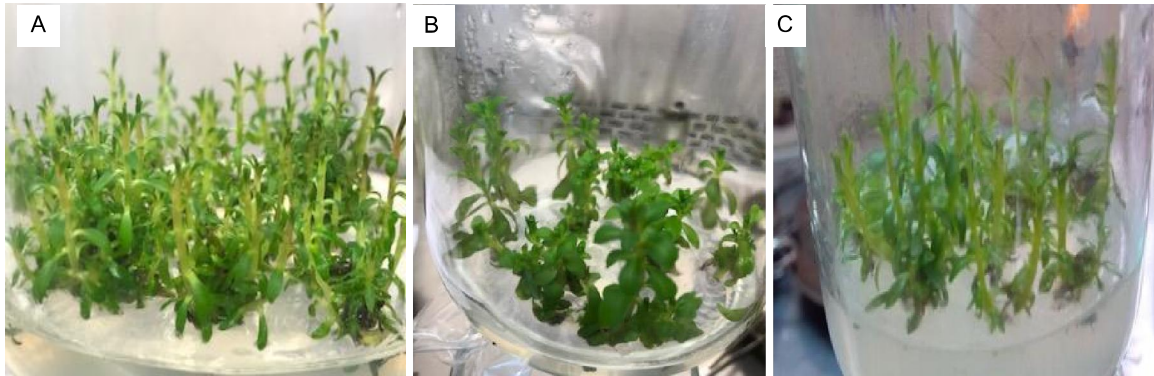
CTTN	Các dòng Tràm năm gân								
	Q15.38			Q15.013			Q16.427		
	Tỷ lệ bật chồi hữu hiệu TB (%)	Chiều cao chồi TB (cm)	Đặc điểm chồi	Tỷ lệ bật chồi hữu hiệu TB (%)	Chiều cao chồi TB (cm)	Đặc điểm chồi	Tỷ lệ bật chồi hữu hiệu TB (%)	Chiều cao chồi TB (cm)	Đặc điểm chồi
AS1	70,0	2,26	Chồi hơi vàng, mảnh	65,6	2,14	Chồi hơi vàng, mảnh	74,4	2,31	Chồi hơi vàng, mảnh
AS2	87,8	2,77	Chồi xanh, mập	83,3	2,86	Chồi xanh, mập	90,0	2,75	Chồi xanh, mập
AS3	61,1	1,84	Chồi xanh, mảnh	55,6	1,87	Chồi xanh, mảnh	64,4	1,96	Chồi xanh, mảnh
Sig	0,0001	0,0001		0,0001	0,0001		0,0001	0,008	
Lsd		0,23			0,21			0,33	

Ghi chú: AS1: Cường độ chiếu sáng 2.000 lux trong chu kỳ nuôi, AS2: Cường độ chiếu sáng 1.000 lux trong 1 chu kỳ nuôi, AS3: Che tối hoàn toàn trong 1 tuần đầu sau khi cấy, sau đó chiếu sáng ở cường độ 1.000 lux thời gian nuôi còn lại. TB: Trung bình.

Số liệu ở bảng 4 cho thấy ánh sáng có ảnh hưởng đến khả năng phát triển chồi của các dòng nghiên cứu. Chế độ chiếu sáng AS1 (cường độ chiếu sáng 2.000 lux trong suốt chu kỳ nuôi) chồi đều bị vàng mảnh, chồi sinh trưởng kém (chiều cao chồi chỉ 2,14 - 2,31 cm, tỷ lệ chồi hữu hiệu thấp 65,6 - 74,4%). Như vậy, khi cường độ ánh sáng quá mạnh làm cho cấu trúc của bộ máy quang hợp bị thương tổn, hệ thống sắc tố bị phá hủy, phản ứng sáng và quá trình photphoryl hóa quang hóa bị ức chế, đồng thời các phản ứng tối cũng bị ức chế do protein bị biến tính... điều này làm cho các chồi bị vàng mảnh và sinh trưởng kém. Chế độ ánh sáng AS3 (Che tối hoàn toàn trong 1 tuần đầu sau khi cấy, sau đó chiếu sáng ở cường độ 1.000 lux thời gian nuôi còn lại), cũng không phù hợp cho sinh trưởng của chồi (chiều cao chồi chỉ 1,84 - 1,96 cm, tỷ lệ chồi hữu hiệu

thấp 55,6 - 64,4%), thậm chí xuất hiện các chồi bị chết trong quá trình che sáng trong 1 tuần đầu. Có thể thấy, thí nghiệm khi che sáng các bình nhân chồi trong giai đoạn đầu với mục đích kích thích kéo dài chồi trong giai đoạn này (điều này đã được thực hiện khi nhân giống *in vitro* đối với bạch đàn). Tuy nhiên, khi thử nghiệm với Tràm năm gân lại xuất hiện hiện tượng chồi bị chết điều này có thể giải thích do đặc tính di truyền của loài với ánh sáng quá yếu thì cường độ quang hợp thấp, sản phẩm quang hợp tạo ra không đủ bù cho lượng chất bị phân hủy do hô hấp đã gây nên hiện tượng trên. Chế độ ánh sáng AS2 (cường độ chiếu sáng 1.000 lux trong 1 chu kỳ nuôi) là phù hợp nhất để tăng trưởng chồi (với tỷ lệ chồi hữu hiệu cao từ 83,3 - 90%, chiều cao chồi chỉ 2,75 - 2,86 cm).





**Hình 2.** Dòng Q15.38 (hình A), Q15.013 (hình B) và dòng Q16.427 (hình C) với chế độ ánh sáng 1.000 lux trong cả chu kỳ nuôi

**3.4. Tạo cây *in vitro* hoàn chỉnh**

Các chồi có chiều cao từ 2 - 2,5 cm được cấy chuyển sang môi trường tạo cây con hoàn

chỉnh gồm MS\* có bổ sung NAA ở các nồng độ khác nhau (bảng 5).

**Bảng 5.** Ảnh hưởng của NAA đến khả năng ra rễ của chồi *in vitro* (sau 3 tuần nuôi cấy)

NAA (mg/l)	Các dòng Tràm năm gân								
	Q15.38			Q15.013			Q16.427		
	Tỷ lệ ra rễ TB (%)	số lượng rễ TB (cái)	chiều dài rễ TB (cm)	Tỷ lệ ra rễ TB (%)	số lượng rễ TB (cái)	chiều dài rễ TB (cm)	Tỷ lệ ra rễ TB (%)	số lượng rễ TB (cái)	chiều dài rễ TB (cm)
0,5	55,6	2,4	1,5	50,0	1,3	0,8	62,2	0,9	0,6
1,0	86,7	3,2	1,8	80,0	1,9	1,2	84,4	1,6	1,4
1,5	100	3,8	2,2	100	2,5	1,7	100	2,4	1,8
2,0	94,0	2,3	1,2	87,0	2,1	1,1	90,0	1,5	1,3
Sig	0,0001	0,0001	0,012	0,0001	0,001	0,0001	0,0001	0,0001	0,001
Lsd		0,37	0,46		0,33	0,16		0,33	0,33

Ghi chú: TB: Trung bình.

Kết quả ở bảng 5 cho thấy tỷ lệ ra rễ dòng vô tính khi sử dụng NAA ở các nồng độ 0,5 - 2 mg/l biến động rất lớn giữa các công thức thí nghiệm cả 3 dòng vô tính nghiên cứu. Hiệu quả ra rễ tăng dần khi sử dụng NAA từ 0,5 - 1,5 mg/l ở các chỉ tiêu tỷ lệ ra rễ, chiều dài rễ và số lượng rễ. Khi nồng độ NAA 2 mg/l thì hiệu quả ra rễ giảm rõ rệt. Cả 3 dòng nghiên cứu sử dụng công thức 1,5 mg/l NAA cho hiệu quả tạo cây con hoàn chỉnh tốt nhất 100% chồi ra rễ, số lượng rễ đạt 2,4 - 3,8 rễ/cây, chiều dài rễ đạt 1,8 - 2,2 cm (kích thước rễ trong khoảng

này rất phù hợp để ra ngôi cây con ở giai đoạn vườn ươm).

So sánh với kết quả ra rễ các dòng Q4.44 và Q23.21 trong môi trường bổ sung 0,3 - 0,5 mg/l NAA với tỷ lệ ra rễ trên 90% và rễ có chất lượng tốt (Khuất Thị Hải Ninh, 2015), có thể thấy việc sử dụng NAA nồng độ 1,5 mg/l lại cho hiệu quả rõ rệt đối với các dòng Q15.38, Q15.013 và Q16.427 với tỷ lệ ra rễ đạt 100% và rễ có chất lượng tốt (rễ mập, trắng và khỏe).



**Hình 3.** Cây *in vitro* hoàn chỉnh các dòng Q15.38, Q15.013 và Q16.427 (từ trái qua phải) trên môi trường MS\* + 1,5 mg/l NAA

**3.5. Huấn luyện và ra ngôi**

Cây mô ra rễ trong bình được huấn luyện dưới ánh sáng tán xạ 2 tuần trước khi cây ngoài vườn ươm. Sau đó, những cây con *in vitro* có bộ rễ phát triển hoàn chỉnh, cây cứng cáp được

rửa sạch agar bám ở rễ và trồng trong các loại giá thể khác nhau. Ba loại giá thể gồm GT1: 100% là đất tầng B sàng kỹ, GT2: 30% xơ dừa và 70% đất, GT3: 70% đất tầng B sàng kỹ + 30% trấu hun. Kết quả được thể hiện ở bảng 6.

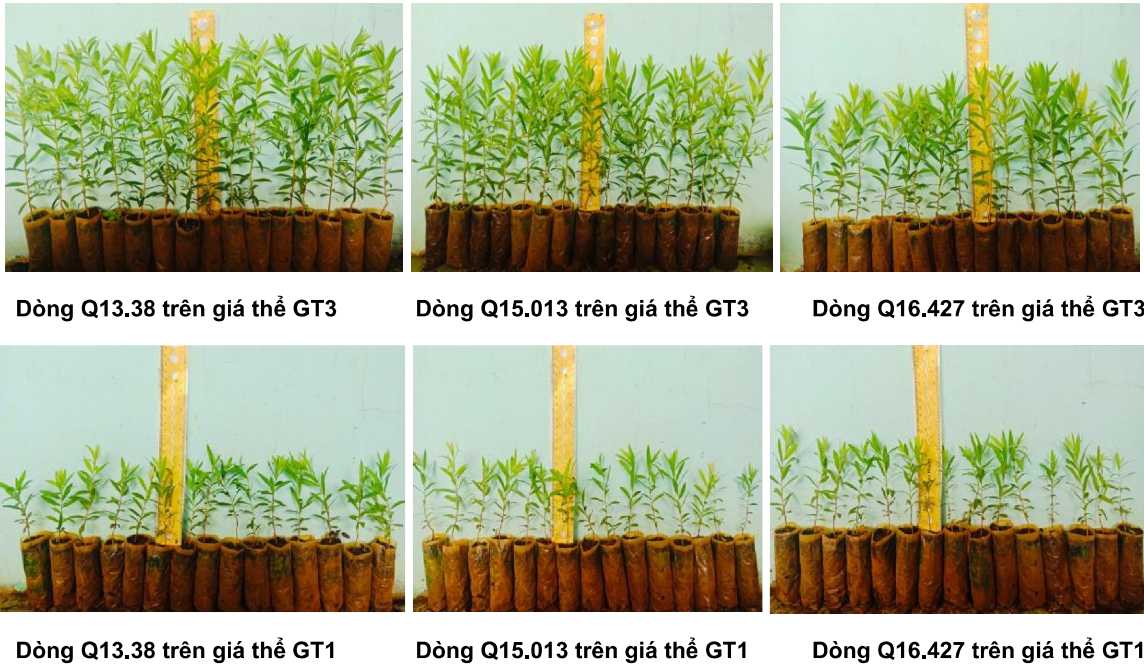
**Bảng 6.** Ảnh hưởng của giá thể đến khả năng sống và sinh trưởng của cây *in vitro* các dòng Tràm năm gân ở vườn ươm (sau 3 tháng ra ngôi)

CTTN	Các dòng Tràm năm gân								
	Q15.38			Q15.013			Q16.427		
	Tỷ lệ sống TB (%)	Chiều cao TB (cm)	Chất lượng cây	Tỷ lệ sống TB (%)	Chiều cao TB (cm)	Chất lượng cây	Tỷ lệ sống TB (%)	Chiều cao TB (cm)	Chất lượng cây
GT1	93,33	11,98	xấu	91,11	12,25	xấu	91,11	11,75	xấu
GT2	96,67	19,87	TB	93,33	18,84	TB	94,44	17,94	TB
GT3	97,78	25,49	Tốt	97,78	23,15	Tốt	95,56	21,67	Tốt
Sig	0,292	0,0001		0,156	0,0001		0,442	0,0001	
Lsd		1,85			1,37			2,33	

Ghi chú: TB: Trung bình.

Kết quả đánh giá sinh trưởng của các dòng vô tính Tràm năm gân giai đoạn vườn ươm sau 3 tháng trồng cho thấy các dòng đều có tỷ lệ cây sống rất cao (đều trên 91%) và không có sự sai khác về tỷ lệ cây sống giữa các công thức thí nghiệm (sig đều > 0,05). Tuy nhiên, có sự sai khác giữa các loại giá thể khác nhau về chất lượng cây con và sinh trưởng chiều cao cây (sig đều < 0,05). Cả 3 dòng vô tính, cây đều sinh trưởng kém trên giá thể GT1 100% đất tầng B sau 3 tháng trồng cây chỉ đạt chiều cao trung bình từ 11,75 - 12,25 cm và cây có chất lượng xấu

(còi cọc chậm phát triển, lá vàng). Cây sinh trưởng khá hơn ở giá thể GT2 30% xơ dừa và 70% đất tầng B chiều cao cây từ 17,94 - 19,87 cm nhưng chất lượng cây chỉ ở mức trung bình. Trong khi đó ở công thức GT3 30% trấu hun và 70% đất chiều cao trung bình đạt từ 21,67 - 25,49 cm (sinh trưởng chiều cao cây vượt gấp 2 lần so với công thức GT1) và cây có chất lượng tốt (lá xanh, mập, ngọn chính phát triển tốt). Như vậy, trên giá thể có thành phần trấu hun giúp cho đất tơi xốp giúp cây phát triển tốt hơn so với giá thể 100% đất hoặc trộn xơ dừa.



**Hình 4.** Cây mô các dòng vô tính Tràm năm gân sau 3 tháng trồng ở giai đoạn vườn ươm trên giá thể GT3 (GT3 70% đất tầng B sàng kỹ + 30% trấu hun) và GT1 (GT1 100% là đất tầng B sàng kỹ)

**IV. KẾT LUẬN**

- Tạo mẫu sạch các dòng Tràm năm gân khử trùng mẫu chồi bằng Javen 5% trong thời gian 10 phút với tỷ lệ mẫu sạch này chồi đạt 44,44 - 64,4%.
- Môi trường tạo cụm chồi các dòng Tràm năm gân: MS\* + 0,7 mg/l BAP + 0,2 mg/l Kinetin + 0,1 mg/l NAA + 20 g/l đường sucrose + 10 g/l đường glucose + 6 g/l Agar, pH = 5,8; đạt tỷ lệ mẫu tạo cụm chồi 100%, số chồi trung bình/cụm: 3,5 - 6,7 chồi.
- Công thức 0,3 mg/l Kinetin + 0,7 mg/l BAP + 0,1 mg/l NAA + 20 g/l đường sucrose + 10 g/l đường glucose + 6 g/l agar, pH = 5,8 vừa có tác dụng nhân nhanh chồi và kích thích tăng trưởng chồi đối với dòng Q15.38 và dòng Q16.427 (với tỷ lệ chồi hữu hiệu tương ứng đạt 86,7 và 88,9%, hệ số nhân chồi đạt 6,7 và 5,4 lần, chiều cao chồi đạt 2,67 và 2,73 cm). Riêng đối với dòng Q15.013 công thức 0,4

- mg/l Kinetin + 0,7 mg/l BAP + 0,1 mg/l NAA + 20 g/l đường sucrose + 10 g/l đường glucose + 6 g/l agar, pH = 5,8 cho kết quả tốt nhất (với với tỷ lệ chồi hữu hiệu đạt 84,4, hệ số nhân chồi đạt 3,7 lần, chiều cao chồi đạt 2,96 cm) sau 3 tuần nuôi cấy.
- Các bình chồi trong giai đoạn nhân nhanh được đặt dưới cường độ chiếu sáng 1.000 lux trong 1 chu kỳ nuôi là phù hợp nhất để tăng trưởng chồi (với tỷ lệ chồi hữu hiệu cao từ 83,3 - 90%, chiều cao chồi chỉ 2,75 - 2,86 cm) sau 3 tuần nuôi cấy.
- Môi trường ra rễ các dòng Tràm năm gân là MS\* + 1,5 mg/l NAA + 20 g/l đường sucrose + 10 g/l đường glucose + 6 g/l Agar, pH = 5,8; đạt tỷ lệ chồi ra rễ 100%, số rễ/chồi: 2,4 - 3,8, chiều dài rễ 1,7 - 2,2 cm sau 3 tuần nuôi cấy.
- Giá thể 30% trấu hun và 70% đất tầng B thích hợp để ra ngôi các dòng vô tính Tràm năm gân, với tỷ lệ cây sống đạt trên 95%,

chiều cao cây đạt 21,67 - 25,49 cm, cây có chất lượng tốt sau 3 tháng trồng ở vườn ươm.

### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Trịnh Thị Điệp, Trần Thanh Hà, Lê Đình Khả, 2012. Tác dụng sinh học của các loại tinh dầu trầm giàu terpinene-4 - ol và 1,8 - cineole (tổng quan). Tạp chí Dược liệu, số 4 - 2012, tập 17, trang 203 - 211.
2. Lê Đình Khả, Nguyễn Thị Thanh Hương, Mai Trung Kiên, K. Pinyopusarerk, 2008. Biến dị sinh trưởng, hàm lượng và chất lượng tinh dầu một số loài trầm hiện có ở Việt Nam. Tạp chí Khoa học và công nghệ Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn, số 11, trang 68 - 76.
3. Phùng Thị Hằng, Nguyễn Bảo Toàn, 2011. Nhân giống cây Tràm (*Melaleuca cajuputi*) bằng phương pháp nuôi cấy mô. Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ, số 20b, tr. 89 - 96.
4. Khuất Thị Hải Ninh, 2015. Nghiên cứu nhân giống một số dòng vô tính Tràm năm gân (*Melaleuca quiquenervia*) bằng nuôi cấy mô. Tạp chí Nông nghiệp và PTNT, chuyên đề giống cây trồng, vật nuôi tập 1, tháng 6.2015, tr. 220 - 226.
5. Nguyễn Hải Tuất, Nguyễn Trọng Bình, 2005. Khai thác và sử dụng SPSS để xử lý số liệu trong lâm nghiệp, NXB Nông nghiệp.
6. Khan Ikhlas A., Ehab A. Abourashed, 2010. Leung's Encyclopedia of Common Natural Integrredients. Used in Food, Drugs, and Cosmetics. Third edition by John Wiley and Sons, Inc..publication, Hoboken, NewJersey. Printed in the United States of America, 833 pp. (124 - 126 pp).
7. Yohana de Oliveira, Fernanda Pinto, André Luís Lopes da Silva, Ivan Guedes, Luiz Antonio Biasi, Marguerite Quoirin, 2010. An efficient protocol for micropropagation of *Melaleuca alternifolia* Cheel, In Vitro Cell.Dev. Biol.- Plant, No46, pp.192 -197.

**Email tác giả chính:** khuatthihaininh@gmail.com

**Ngày nhận bài:** 12/01/2023

**Ngày phản biện đánh giá và sửa chữa:** 03/02/2023

**Ngày duyệt đăng:** 20/02/2023