

NGHIÊN CỨU NHÂN GIỐNG CÁC DÒNG VÔ TÍNH TRÀM TRÀ (*Melaleuca alternifolia* Maiden & E. Betcher ex Cheel) A32.23 VÀ A26.218 BẰNG KỸ THUẬT NUÔI CẤY *IN VITRO*

Khuất Thị Hải Ninh¹*, Nguyễn Thị Thơ¹, Nguyễn Hoàng Anh¹,

Nguyễn Thị Thanh Hương², Hoàng Thanh Lộc²

¹ Trường Đại học Lâm nghiệp

² Viện Cải thiện giống và Phát triển lâm sản

* Email: khuatthihaininh@gmail.com

TÓM TẮT

Tràm trà (*Melaleuca alternifolia* Maiden & E. Betcher ex Cheel) là loài có thể sản xuất tinh dầu giàu terpinen-4-ol. Các dòng vô tính Tràm trà A26.218 và A32.23 có hàm lượng và chất lượng tinh dầu cao đã được Bộ Nông nghiệp và PTNT công nhận là giống tiến bộ kỹ thuật. Để đưa nhanh các giống có triển vọng này vào sản xuất cần tiếp tục nghiên cứu và hoàn thiện kỹ thuật nhân giống *in vitro*. Kết quả nhân giống *in vitro* các dòng vô tính Tràm trà A26.218 và A32.23 cho thấy: Khử trùng mẫu chồi bằng Javel 5% trong thời gian 10 phút (với tỷ lệ mẫu sạch nảy chồi đạt 74,44 - 77,78% sau 3 tuần nuôi cấy). Môi trường thích hợp tạo cụm chồi là MS* (nồng độ NH_4NO_3 giảm đi 1/2 so với MS) + 1,0 mg/l BAP + 0,2 mg/l kinetin + 0,1 mg/l NAA với tỷ lệ mẫu tạo cụm chồi đạt 98,9 - 100%, hệ số nhân chồi 5,05 - 5,16 lần; chiều cao chồi 1,56 - 1,61 cm sau 4 tuần nuôi cấy). Môi trường kích thích tăng trưởng chồi là MS* + 0,5 mg/l kinetin + 1,0 mg/l BAP + 0,1 mg/l NAA với chế độ che sáng hoàn toàn trong 1 tuần đầu, sau đó chiếu sáng 1.000 lux (cho tỷ lệ chồi hữu hiệu đạt 96,7 - 100%, chiều cao chồi đạt 2,58 - 2,71 cm, chồi có chất lượng tốt sau 4 tuần nuôi cấy). Môi trường ra rễ thích hợp là MS* + 1,0 mg/l IBA (với tỷ lệ chồi ra rễ 96,7 - 98,9%, số rễ trên chồi từ 4,17 - 4,73, chiều dài rễ từ 1,59 - 1,65 cm sau 3 tuần nuôi cấy). Cây mô các dòng vô tính Tràm trà A26.218 và A32.23 được cấy vào giá thể gồm hỗn hợp 30% trấu hun + 70% đất tầng B sàng kỹ (đạt tỷ lệ cây sống 94,4 - 95,6%, chiều cao cây đạt 25,23 - 25,70 cm và chất lượng cây tốt sau 3 tháng ra ngôi ở vườn ươm).

Từ khoá: Dòng vô tính, *in vitro*, nhân giống, Tràm trà, tinh dầu.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Tràm trà (*Melaleuca alternifolia* Maiden & E. Betcher ex Cheel) là loài có thể sản xuất tinh dầu giàu terpinen-4-ol, một số cây có tỷ lệ terpinen-4-ol cao hơn 75%. Tinh dầu từ Tràm trà là một nguồn hương liệu rất tốt, có giá trị cả về mỹ phẩm và dược phẩm (có tác dụng kháng sinh, kháng khuẩn vì thế có khả năng chữa trị các bệnh gây ra bởi nấm, vi khuẩn, virus...) [1]. Do đó, hoạt động cải thiện giống đang rất được quan tâm để phát triển vào sản xuất. Ở Việt Nam, các nghiên cứu về chọn giống Tràm lấy tinh dầu đã được tiến hành trong những

năm gần đây, nhiều giống Tràm trà có hàm lượng và chất lượng tinh dầu cao đã được chọn lọc. Từ năm 2005 - 2017, Viện Cải thiện giống và Phát triển lâm sản đã khảo nghiệm các gia đình Tràm trà (có nguồn gốc từ Australia) tại huyện Ba Vì, thành phố Hà Nội và một số nơi khác với mục tiêu lấy tinh dầu giàu terpinene-4-ol. Kết quả đã chọn được 2 giống Tràm trà A26.218 và A32.23 là những dòng vô tính có hàm lượng và chất lượng tinh dầu cao đã được Bộ Nông nghiệp và PTNT công nhận là giống tiến bộ kỹ thuật theo Quyết định số 3229/QĐ-BNN-TCLN [2].

Nhân giống *in vitro* Tràm trà đã được Mai Thị Phương Hoa và cs (2013), List và cs (1996), Nadia và cs (2012), Chen và cs (2016), Yohana de Oliveira và cs (2010), Carla Midori và Jean Carlos (2021) [3 - 8] nghiên cứu, tuy nhiên mỗi giống Tràm trà đều thích ứng với những môi trường nuôi cấy khác nhau. Chính vì vậy, nghiên cứu nhân giống các dòng vô tính Tràm trà A26.218 và A32.23 bằng kỹ thuật nuôi cấy *in vitro* là rất cần thiết nhằm góp phần đưa nhanh các giống Tràm trà có triển vọng vào sản xuất.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

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

- Đối tượng: Các dòng vô tính Tràm trà A32.23 và A26.218.

- Vật liệu: Chồi non mọc từ cây mẹ đã tiến hành 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 tiến hành tại Phòng Nuôi cấy mô - tế bào thực vật, Viện Công nghệ Sinh học Lâm nghiệp, 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, huấn luyện và ra ngôi cây mô. Mỗi công thức thí nghiệm được bố trí 3 lần lặp, mỗi lặp 30 mẫu. Điều kiện nuôi cấy: Số giờ chiếu sáng 10 giờ/ngày, nhiệt độ phòng nuôi từ $25 \pm 20^\circ\text{C}$

- *Tạo mẫu sạch và nuôi cấy khởi động (Thí nghiệm 1)*

+ Chọn mẫu cấy: Mẫu được sử dụng là chồi bên thân cây đã được trẻ hoá (chồi 1 - 1,5 tháng tuổi), độ dài mẫu cấy 7 - 10 cm, chồi mập, có mắt ngủ ở nách lá, cắt bỏ lá, để lại cuống lá.

+ Khử trùng sơ bộ mẫu cấy: Cắt bỏ lá để lại một phần lá và cuống lá, loại bỏ chồi ngọn đỉnh trên cùng quá non. Sau đó, ngâm cành vào dung dịch xà phòng loãng, dùng chổi lông để cọ sạch bề mặt ngoài của mẫu. Rửa cành dưới vòi nước chảy cho sạch hết dung dịch xà phòng rồi dùng

nước cất tráng sạch mẫu chuyển vào trong phòng để thực hiện kỹ thuật trong tủ cấy vô trùng.

+ Khử trùng trong tủ cấy vô trùng: Đầu tiên mẫu được rửa bằng nước cất vô trùng 2 - 3 lần, mỗi lần rửa khoảng 2 - 3 phút. Sau đó mẫu được khử trùng bằng Javel 5%, với thời gian 5, 10, 15, 20 phút. Cuối cùng, mẫu được rửa lại bằng nước cất vô trùng từ 2 - 3 lần để loại bỏ Javel còn bám trên mẫu cấy.

+ Mẫu sau khi cắt bỏ bớt những phần mô bị tổn thương do ngâm dung dịch Javel (mẫu cấy có chiều dài 2 - 3 cm, có ít nhất 1 mắt ngủ) được cấy vào môi trường MS + 30 g đường sucrose + 7 g/l agar, pH môi trường = 5,8.

+ Thu thập số liệu: Số mẫu sạch nảy chồi sau 3 tuần nuôi cấy.

- *Phương pháp tạo cụm chồi và kích thích tăng trưởng chồi*

+ Ảnh hưởng của BAP đến khả năng tạo cụm chồi (Thí nghiệm 2)

Kế thừa kết quả nghiên cứu trong giai đoạn tạo cụm chồi của Lê Đình Khả (2017) [1], các dòng vô tính Tràm trà A32.23 và A26.218 trong nghiên cứu này sẽ sử dụng môi trường cơ bản gồm MS* (nồng độ NH_4NO_3 giảm đi 1/2 so với MS) + 1 mg/l NAA + 0,2 mg/l kinetin + 30 g/l đường sucrose + 6 g/l agar, pH môi trường = 5,8 và thay đổi nồng độ BAP 0,2 - 1,5 mg/l.

Cường độ ánh sáng được sử dụng trong suốt chu kỳ nuôi là 1.000 lux.

Thu thập số liệu: Tỷ lệ mẫu tạo cụm chồi, hệ số nhân chồi, chiều cao chồi (đo những chồi có chiều cao trên 0,5 cm) sau 4 tuần nuôi cấy.

+ *Ảnh hưởng của kinetin đến khả năng kích thích tăng trưởng chồi (Thí nghiệm 3)*

Sử dụng công thức tốt nhất ở thí nghiệm 2 tiếp tục điều chỉnh nồng độ kinetin từ 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 môi trường = 5,8.

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

Thu thập số liệu: Số chồi hữu hiệu (chồi có chiều cao từ 1,5 cm), hệ số nhân chồi và chiều cao

chồi (đo những chồi có chiều cao trên 0,5 cm) sau 4 tuần nuôi cấy.

+ *Ảnh hưởng của ánh sáng đến khả năng kích thích tăng trưởng chồi (Thí nghiệm 4)*

Môi trường dinh dưỡng: Sử dụng công thức tốt nhất của thí nghiệm 3, chế độ ánh sáng (AS) thí nghiệm gồm:

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 sáng hoàn toàn trong 1 tuần đầu sau khi cấy, sau đó chiếu sáng ở cường độ 1.000 lux thời gian nuôi còn lại của chu kỳ nuôi.

Thu thập số liệu: Số chồi hữu hiệu (chồi có chiều cao từ 1,5 cm), chiều cao chồi (đo những chồi có chiều cao trên 0,5 cm), chất lượng chồi sau 4 tuần nuôi cấy.

- *Phương pháp tạo cây hoàn chỉnh*

Các chồi có chiều cao từ 2 - 3 cm được cấy chuyển sang môi trường MS* + 30 g/l đường sucrose + 7 g/l agar, pH môi trường = 5,8 và thay đổi nồng độ bổ sung IBA (0,5; 1; 1,5; 2 mg/l) để tạo cây con hoàn chỉnh.

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

- *Phương pháp huấn luyện và ra ngôi cây mô*

Cây mô sau khi được huấn luyện dưới ánh sáng tán xạ trong thời gian 15 ngày, 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. Cấy từng cây trực tiếp vào bầu; kích thước túi bầu 7 x 12 cm, dán đáy, đục lỗ xung quanh. Thí nghiệm thành phần ruột bầu gồm các loại giá thể (GT) sau đây:

+ GT1: 100% là đất tầng B sàng kỹ.

+ GT2: 30% trấu hun và 70% đất tầng B sàng kỹ.

+ GT3: 30% giá thể trồng nấm linh chi sau khi thu hoạch quả thể (gồm mùn cưa keo trộn cám ngô, cám gạo) và 70% đất tầng B sàng kỹ.

Thu thập số liệu: Tỷ lệ cây sống, chiều cao cây, chất lượng cây (cây tốt: Lá xanh đậm, tươi, thân mập khỏe; cây trung bình: Lá xanh nhạt, tươi, thân mập khỏe; cây xấu: Lá xanh nhạt, thân mảnh yếu) sau 3 tháng ra ngôi trong vườn ươm.

2.2.2. Phương pháp xử lý số liệu

So sánh giữa các công thức thí nghiệm về tỷ lệ mẫu sạch, tỷ lệ mẫu tạo cụm chồi, tỷ lệ chồi ra rễ bằng tiêu chuẩn khi bình phương (χ^2), đồng thời tìm công thức tốt nhất bằng tiêu chuẩn U (so sánh 2 mẫu về chất).

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. Sự sai khác giữa các công thức thí nghiệm thông qua khoảng sai dị tối thiểu (Lsd).

Số liệu đã thu thập được xử lý bằng phần mềm SPSS và phần mềm Excel [9].

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

3.1. Tạo mẫu sạch và nuôi cấy khởi động (Thí nghiệm 1)

Javel 5% được sử dụng để khử trùng mẫu chồi trong các khoảng thời gian 5; 10; 15; 20 phút. Sau 3 tuần nuôi cấy, kết quả thí nghiệm được thể hiện trong bảng 1.

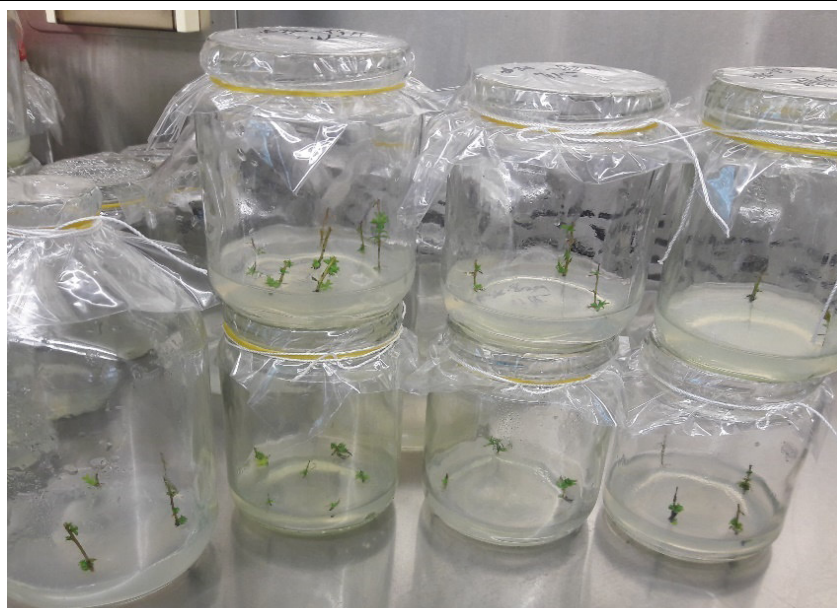
Bảng 1 cho thấy, khi thời gian khử trùng mẫu chồi 5 phút tỷ lệ mẫu sạch nảy chồi chỉ đạt 34,44 - 35,56%, thấp hơn so với công thức khử trùng mẫu 10 phút (với tỷ lệ mẫu sạch nảy chồi 74,44 - 77,78%). Tăng thời gian khử trùng lên 15 phút thì tỷ lệ mẫu sạch nảy chồi chỉ còn 30,00 - 31,11%, thậm chí khi tăng thời gian khử trùng lên 20 phút thì tỷ lệ mẫu sạch nảy chồi là thấp nhất chỉ đạt 23,33% ở cả 2 dòng vô tính Tràm trà. Như vậy, khử trùng mẫu bằng Javel 5% trong 10 phút cho kết quả tốt nhất (Hình 1).

Kết quả nghiên cứu của Lê Đình Khả (2017) [1] cho thấy, khử trùng mẫu bằng $HgCl_2$ 0,1% trong 5 phút chia thành 2 lần (3 + 2 phút) cho tỷ lệ mẫu sạch và mẫu sạch nảy chồi cao nhất (tỷ lệ mẫu sạch nảy chồi 67,8%). Trong nghiên cứu này, sử dụng Javel 5% trong 10 phút để khử trùng mẫu cũng có kết quả khả quan, với tỷ lệ mẫu sạch nảy chồi đạt 74,44 - 77,78%. Vì vậy, Javel cũng là một

loại hóa chất khuyến cáo nên sử dụng để giảm dụng và giảm ô nhiễm môi trường so với sử dụng thuốc diệt cỏ cho con người trong quá trình sử dụng HgCl₂.

Bảng 1. Ảnh hưởng thời gian khử trùng mẫu chồi bằng Javel 5% đến khả năng tạo mẫu sạch các dòng vô tính Tràm trà A32.23 và A26.218 (Sau 3 tuần nuôi cấy)

Thời gian sử dụng Javel 5% (phút)	Số mẫu thí nghiệm	Các dòng vô tính Tràm trà			
		A32.23		A26.218	
		Số mẫu sạch nảy chồi	Tỷ lệ mẫu sạch nảy chồi (%)	Số mẫu sạch nảy chồi	Tỷ lệ mẫu sạch nảy chồi (%)
5	90	32	35,56	31	34,44
10	90	67	74,44	70	77,78
15	90	28	31,11	27	30,00
20	90	21	23,33	21	23,33
Sig			0,0001		0,0001



Hình 1. Mẫu sạch các dòng vô tính Tràm trà khi khử trùng Javel 5% trong thời gian 10 phút

3.2. Nghiên cứu ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng và ánh sáng đến khả năng nhân nhanh chồi

3.2.1. Ảnh hưởng của BAP đến khả năng tạo cụm chồi (Thí nghiệm 2)

Sau 3 tuần nuôi cấy khởi đầu, tiến hành tách chồi *in vitro* tái sinh và cấy chuyển sang môi trường MS* bổ sung BAP, NAA, kinetin ở các nồng độ khác nhau để thăm dò khả năng tạo cụm chồi. Bảng 2 thể hiện kết quả theo dõi thí nghiệm sau 4 tuần nuôi cấy.

Kết quả phân tích thống kê cho thấy, giữa các công thức thí nghiệm đều có sự sai khác nhau rõ rệt về hệ số nhân chồi, chiều cao chồi (do sig < 0,05), khi cố định 0,2 mg/l kinetin và 0,1 mg/l NAA tăng nồng độ BAP từ 0,2 - 1,5 mg/l hệ số nhân chồi dòng vô tính Tràm trà A32.23 tăng dần từ nồng độ BAP 0,2 - 1,0 mg/l tương ứng với hệ số nhân chồi đạt 2,17 - 5,05 lần, nhưng khi tăng nồng độ lên 1,2 - 1,5 mg/l thì hệ số nhân chồi giảm xuống.

Kết quả tương tự nhận được ở dòng vô tính Tràm trà A26.218 đạt hệ số nhân chồi lớn nhất ở nồng độ 1 mg/l BAP. Chiều cao chồi ở cả 2 dòng vô tính Tràm trà đều ghi nhận chiều cao chồi đạt giá trị lớn hơn ở những công thức có hệ số nhân chồi thấp và chiều cao chồi giảm dần ở những công thức có hệ số nhân chồi cao. Tỷ lệ mẫu tạo cụm chồi tăng tỷ lệ thuận với nồng độ BAP, ở dòng vô tính Tràm trà A32.23 đạt 100% mẫu tạo cụm chồi từ nồng độ BAP 1,0 - 1,5 mg/l, dòng vô tính Tràm trà A26.218 có khả năng tạo cụm chồi từ nồng độ BAP 1,2 - 1,5 mg/l với 100% số mẫu tạo cụm chồi. Khi nồng độ BAP lớn hơn 1 mg/l hệ số nhân chồi và chiều cao chồi đều giảm. Như vậy, với nồng độ BAP lớn hơn 1 mg/l gây ức chế khả năng sinh trưởng của chồi. Điều này cũng được ghi nhận trong nghiên cứu nhân giống *in vitro* các dòng vô tính Tràm năm gần Q4.44 và Q23.21 của Khuất Thị Hải Ninh và cs (2015) [10].

Bảng 2. Khả năng tạo cụm chồi ở các dòng vô tính Tràm trà A32.23 và A26.218 trong môi trường MS* bổ sung 0,2 mg/l kinetin + 0,1 mg/l NAA + (0,2 - 1,5 mg/l BAP) (Sau 4 tuần nuôi cấy)

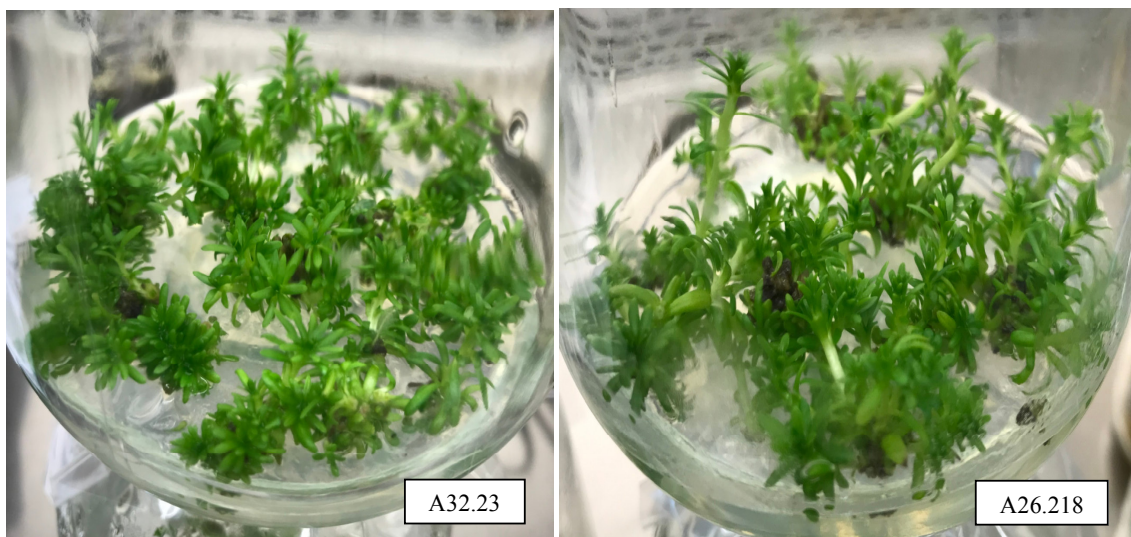
BAP (mg/l)	Các dòng vô tính Tràm trà					
	A32.23			A26.218		
	Tỷ lệ mẫu tạo cụm chồi (%)	Hệ số nhân (lần)	Chiều cao chồi (cm)	Tỷ lệ mẫu tạo cụm chồi (%)	Hệ số nhân (lần)	Chiều cao chồi (cm)
0,2	78,9	2,17	2,19	71,0	2,15	2,08
0,4	82,2	2,71	1,96	83,3	2,85	1,87
0,6	90,0	3,40	1,72	88,9	3,52	1,66

KHOA HỌC CÔNG NGHỆ

0,8	96,7	4,03	1,65	96,7	4,13	1,58
1,0	100	5,05	1,61	98,9	5,16	1,57
1,2	100	4,14	1,53	100	4,66	1,45
1,5	100	3,61	1,34	100	4,19	1,17
Sig	0,0001	0,0001	0,007	0,0001	0,0001	0,023
Lsd		0,36	0,33		0,34	0,41

Như vậy, giai đoạn tạo cụm chồi 2 dòng vô tính Tràm trà A32.23 và A26.218 dựa trên cả 3 tiêu chí tỷ lệ tái sinh chồi, hệ số nhân chồi và chiều cao

chồi sử dụng công thức môi trường MS* bổ sung 1,0 mg/l BAP + 0,2 mg/l kinetin + 0,1 mg/l NAA là phù hợp.



Hình 2. Cụm chồi ở 2 dòng vô tính Tràm trà A32.23 và A26.218 trong môi trường MS* bổ sung 0,2 mg/l kinetin + 0,1 mg/l NAA + 1,0 mg/l BAP (Sau 4 tuần nuôi cấy)

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

Kết quả của thí nghiệm 2 cho thấy, trên môi trường MS* bổ sung 0,2 mg/l kinetin + 0,1 mg/l NAA + 1,0 mg/l BAP khả năng tạo cụm chồi tốt,

hệ số nhân cao nhưng chiều cao chồi còn khá hạn chế. Cố định nồng độ 0,1 mg/l NAA + 1,0 mg/l BAP tiếp tục điều chỉnh nồng độ kinetin từ 0,1 - 0,5 mg/l để kiểm tra sự tăng trưởng chồi của 2 dòng vô tính Tràm trà. Kết quả sau 4 tuần thử nghiệm được thể hiện ở bảng 3.

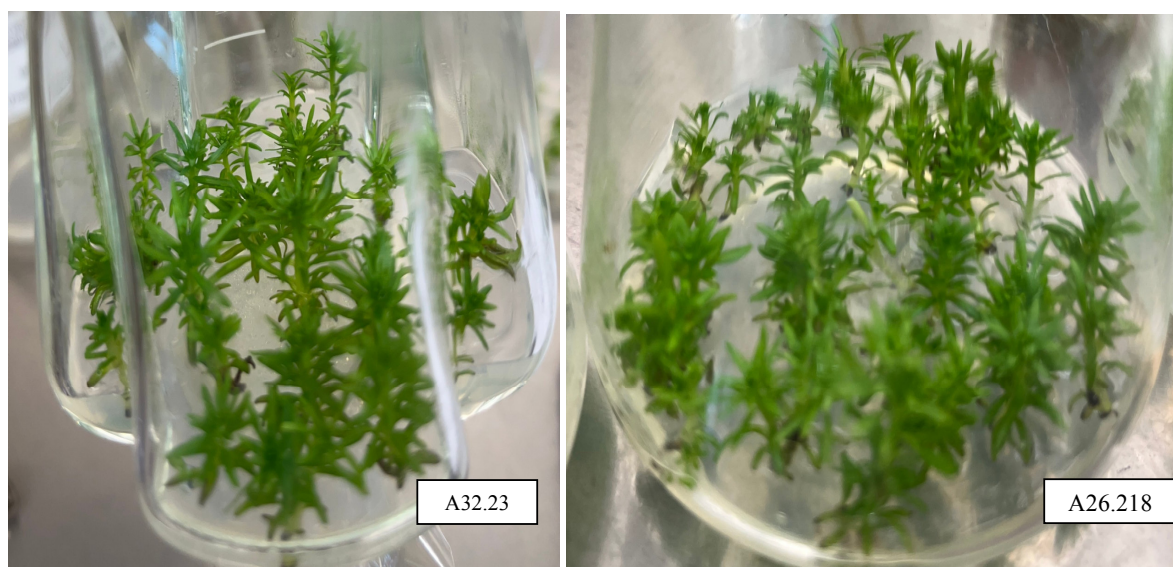
Bảng 3. Kết quả kích thích tăng trưởng chồi các dòng vô tính Tràm trà A32.23 và A26.218 trong môi trường MS* bổ sung 1 mg/l BAP + 0,1 mg/l NAA + (0,1 - 0,5 mg/l) kinetin (Sau 4 tuần nuôi cấy)

Kinetin (mg/l)	Các dòng vô tính Tràm trà					
	A32.23			A26.218		
	Tỷ lệ chồi hữu hiệu (%)	Hệ số nhân (lần)	Chiều cao chồi (cm)	Tỷ lệ chồi hữu hiệu (%)	Hệ số nhân (lần)	Chiều cao chồi (cm)
0,1	87,7	4,19	1,54	82,2	4,73	1,49
0,2	91,1	5,02	1,65	86,7	5,11	1,63
0,3	92,2	5,17	2,01	90,0	5,24	1,97
0,4	96,7	5,45	2,09	94,4	5,37	2,16
0,5	98,9	5,82	2,15	97,8	5,93	2,49
Sig	0,022	0,0001	0,0001	0,004	0,002	0,001
Lsd		0,38	0,40		0,39	0,33

Khi bổ sung kinetin từ 0,1 - 0,5 mg/l cho thấy, ở cả 2 dòng vô tính Tràm trà đều thu được kết quả hệ số nhân chồi, tỷ lệ chồi hữu hiệu đều tăng tỷ lệ thuận với nồng độ kinetin. Dòng vô tính Tràm trà A32.23 đạt tỷ lệ chồi hữu hiệu là 98,9%, hệ số nhân chồi 5,82 lần; dòng vô tính Tràm trà A26.218 tương ứng 97,8% và 5,93 lần. Đặc biệt, chiều cao chồi ở 2 dòng vô tính tương ứng đạt 2,15 cm và 2,49 cm, kích thước chồi đã tăng hơn nhiều so với những công thức có hệ số nhân chồi tối ưu ở thí nghiệm 2. Như vậy, với các công thức thí nghiệm đã bố trí

đối 2 dòng vô tính Tràm trà trên có thể sử dụng công thức môi trường MS* bổ sung 0,5 mg/l kinetin + 0,1 mg/l NAA + 1,0 mg/l BAP để vừa nhân chồi hiệu quả đồng thời kích thích tăng trưởng chồi, giúp chồi có đủ kích thước để chuyển sang giai đoạn ra rễ.

Tuy nhiên, khi các bình chồi được chiếu sáng với cường độ 1.000 lux trong cả chu kỳ nuôi, vẫn xuất hiện các chồi bị chết. Do đó, cường độ chiếu sáng tiếp tục được nghiên cứu ở thí nghiệm tiếp theo.



Hình 3. Chồi các dòng vô tính Trà trà A32.23 và A26.218 trong môi trường kích thích tăng trưởng chồi MS* bổ sung 0,5 mg/l kinetin + 0,1 mg/l NAA + 1,0 mg/l BAP

3.2.3. Ảnh hưởng của ánh sáng đến khả năng kích thích tăng trưởng chồi (Thí nghiệm 3) kinetin + 0,1 mg/l NAA + 1,0 mg/l BAP cho các thí nghiệm liên quan đến ánh sáng. Kết quả sau 4 tuần nuôi cấy được thể hiện ở bảng 4.

Sử dụng công thức tối ưu MS* bổ sung 0,5 mg/l

Bảng 4. Kết quả ảnh hưởng của ánh sáng đến khả năng tăng trưởng chồi các dòng vô tính Trà trà A32.23 và A26.218 (Sau 4 tuần nuôi cấy)

Công thức thí nghiệm	Các dòng vô tính Trà trà					
	A32.23			A.26.218		
	Tỷ lệ bật chồi hữu hiệu (%)	Chiều cao chồi (cm)	Đặc điểm chồi	Tỷ lệ bật chồi hữu hiệu (%)	Chiều cao chồi (cm)	Đặc điểm chồi
AS1	81,1	2,06	Chồi vàng, gầy có hiện tượng chết ngọn	77,8	1,98	Chồi vàng, gầy có hiện tượng chết ngọn
AS2	91,1	2,42	Chồi xanh, mảnh	84,4	2,35	Chồi xanh, mảnh

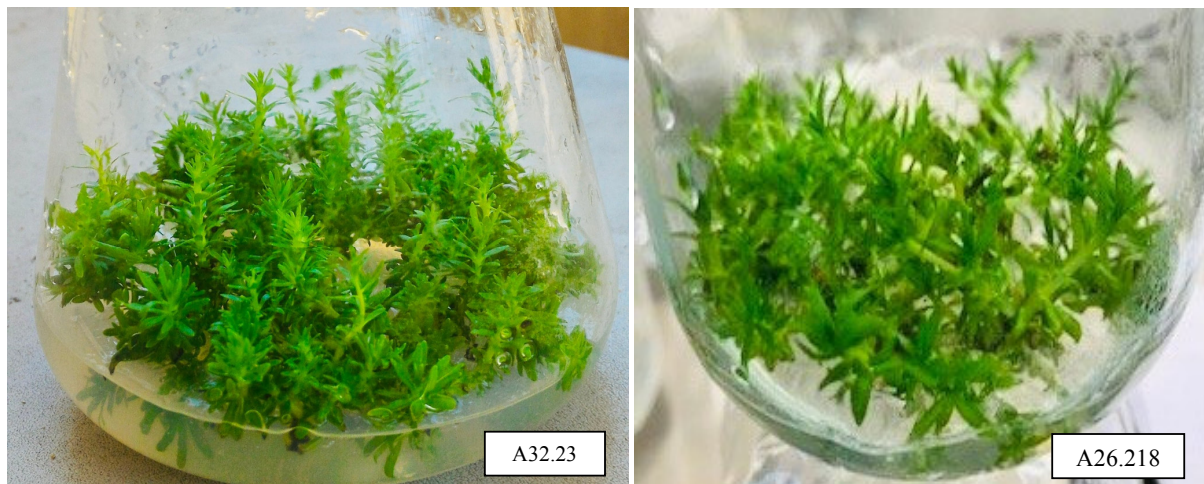
KHOA HỌC CÔNG NGHỆ

AS3	98,9	2,71	Chồi xanh, cao, mập	96,7	2,58	Chồi xanh, cao, mập
Sig	0,0001	0,005		0,0001	0,001	
Lsd		0,26			0,17	

Ghi chú: 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 sáng hoàn toàn trong 1 tuần đầu sau khi cấy, sau đó chiếu sáng ở cường độ 1.000 lux thời gian nuôi còn lại của chu kỳ nuôi.

Ánh sáng ảnh hưởng rất lớn đến khả năng tăng trưởng của chồi. Ở điều kiện AS1 cho tỷ lệ bật chồi hữu hiệu 77,8 - 81,1%, chồi cao 1,98 - 2,06 cm, tuy nhiên, chất lượng chồi kém (chồi vàng, gầy, có hiện tượng chết ngọn). Đây cũng là điều kiện ánh sáng cho hiệu quả tăng trưởng chồi kém nhất trong các công thức thử nghiệm. Ở điều kiện AS2, các chỉ tiêu theo dõi cải thiện hơn với tỷ lệ bật chồi đạt 84,4 - 91,1%, chiều cao chồi 2,35 - 2,42 cm, chồi xanh, mập. Các chỉ tiêu theo dõi đạt giá trị tốt nhất trong điều kiện AS3, tỷ lệ bật chồi hữu hiệu 96,7 - 98,9%, chất lượng chồi tốt, chiều cao chồi đạt

2,58 - 2,71 cm, chồi xanh, cao, mập. Như vậy, với các dòng vô tính Tràm trà, nên che sáng tuần đầu tiên sau khi cấy, sau đó chiếu sáng với cường độ 1.000 lux thời gian còn lại của chu kỳ nuôi là thích hợp nhất. Theo Khuất Thị Hải Ninh và cs (2022) [11], giai đoạn kích thích tăng trưởng chồi đối với các dòng vô tính Tràm năm gân các bình chồi được đặt dưới cường độ chiếu sáng 1.000 lux trong cả chu kỳ nuôi là phù hợp nhất. Sự khác biệt giữa các dòng vô tính Tràm trà trong giai đoạn kích thích tăng trưởng chồi có thể do đặc tính di truyền khác nhau giữa chúng.



Hình 4. Cụm chồi các dòng vô tính Tràm trà A32.23 và A26.218 trong điều kiện chiếu sáng tối ưu AS3

3.3. Nghiên cứu ảnh hưởng của IBA đến khả năng tạo cây hoàn chỉnh

Để cải thiện sự hình thành và phát triển rễ của

2 dòng vô tính Tràm trà, môi trường MS* bổ sung IBA ở các nồng độ từ 0,5 - 2,0 mg/l được sử dụng. Kết quả được thể hiện ở bảng 5.

Bảng 5. Ảnh hưởng của IBA đến khả năng ra rễ của chồi *in vitro* các dòng vô tính Tràm trà A32.23 và A26.218 (Sau 3 tuần nuôi cấy)

IBA (mg/l)	Các dòng vô tính Tràm trà					
	A32.23			A26.218		
	Tỷ lệ chồi ra rễ (%)	Số lượng rễ (cái)	Chiều dài rễ (cm)	Tỷ lệ chồi ra rễ (%)	Số lượng rễ (cái)	Chiều dài rễ (cm)
0,5	85,6	3,11	1,73	83,3	3,67	1,74
1,0	98,9	4,17	1,59	96,7	4,73	1,65
1,5	94,6	3,41	1,48	85,6	3,58	1,54
2,0	90,0	3,04	1,37	84,4	3,14	1,44
Sig	0,006	0,01	0,037	0,024	0,0001	0,011
Lsd		0,35	0,21		0,33	0,11

Kết quả bảng 5 cho thấy, nồng độ IBA 0,5 mg/l cho hiệu quả ra rễ của chồi thấp nhất ở cả 2 dòng vô tính Tràm trà, đạt từ 83,3 - 85,6%. Khi tăng nồng độ IBA lên 1 mg/l hiệu quả ra rễ của chồi tăng lên rõ rệt cụ thể: Ở dòng vô tính Tràm trà A32.23 tỷ lệ chồi ra rễ đạt 98,9%, số lượng rễ trung bình 4,17 rễ/chồi, chiều dài rễ đạt 1,59 cm, dòng vô tính Tràm trà A26.218 tương ứng đạt 96,7%, 4,73 rễ/chồi và chiều dài rễ 1,65 cm. Khi tăng nồng độ IBA lên 1,5 và 2 mg/l cho thấy, cả 3 chỉ số theo dõi đều giảm ở 2 dòng vô tính Tràm trà. Điều này cho thấy, nồng độ IBA cao có thể gây ức chế sự phát sinh và phát triển của rễ Tràm trà. Như vậy, môi trường MS* bổ sung 1,0 mg/l IBA là thích hợp cho sự hình thành và phát triển rễ các dòng vô tính Tràm trà A32.23 và A26.218.

Kết quả nghiên cứu của Chen và cs (2016) [6] đã ghi nhận môi trường ra rễ tối ưu cho *M. alternifolia* là 1/2MS + 0,1 - 0,25 mg/l IBA + 15 g/l sucrose, cho tỷ lệ ra rễ đạt 100%, số lượng rễ 2,9 - 3,3 rễ/chồi và chiều dài rễ 1,36 - 1,44 cm. Theo Mai Thị Phương Hoa và cs (2013) [3], Tràm trà sử dụng môi trường LV có bổ sung 2 mg/l NAA cho tỷ lệ chồi ra rễ đạt 60,42%. Trong nghiên cứu này, sử dụng môi trường MS* bổ sung 1,0 mg/l IBA cho hiệu quả ra rễ tốt hơn các nghiên cứu trước đó với tỷ lệ ra rễ 96,7 - 98,9%, số lượng rễ 4,17 - 4,73 rễ/chồi và chiều dài rễ 1,59 - 1,65 cm. Khả năng ra rễ tốt của các dòng vô tính Tràm trà A32.23 và A26.218 giúp cho nhân giống *in vitro* ở qui mô sản xuất rất triển vọng.



Hình 5. Cây mô hoàn chỉnh dòng vô tính Tràm trà A32.23 (Hình a) và A26.218 (Hình b) trên môi trường MS + 1 mg/l BAP

3.4. Nghiên cứu ảnh hưởng của loại giá thể đến khả năng sinh trưởng của cây mô giai đoạn vườn ươm

Cây mô đủ tiêu chuẩn được đặt dưới ánh sáng tán xạ trong 1 - 3 tuần, sau đó được lấy khỏi

bình, rửa sạch thạch bám ở rễ và cấy vào các giá thể khác nhau, tưới nước 2 - 3 lần/ngày. Tỷ lệ cây sống, chiều cao và chất lượng cây sau 3 tháng ra ngôi trong vườn ươm được thể hiện ở bảng 6.

Bảng 6. Ảnh hưởng của giá thể đến khả năng sống và sinh trưởng của cây mô các dòng vô tính Tràm trà A32.23 và A26.218 ở vườn ươm sau 3 tháng ra ngôi

Công thức thí nghiệm	Các dòng vô tính Tràm trà					
	A32.23			A26.218		
	Tỷ lệ sống trung bình (%)	Chiều cao trung bình (cm)	Chất lượng cây	Tỷ lệ sống trung bình (%)	Chiều cao trung bình (cm)	Chất lượng cây
GT1	93,3	19,87	Thân mập, lá xanh, tươi	92,2	19,27	Thân mập, lá xanh, tươi
GT2	95,6	25,70	Thân mập, lá xanh đậm, tươi	94,4	25,23	Thân mập, lá xanh đậm, tươi

KHOA HỌC CÔNG NGHỆ

GT3	94,4	13,10	Thân gầy, lá xanh hơi ngả vàng	93,3	12,37	Thân gầy, lá xanh hơi ngả vàng
Sig	0,809	0,0001		0,836	0,0001	
Lsd		1,12			0,82	

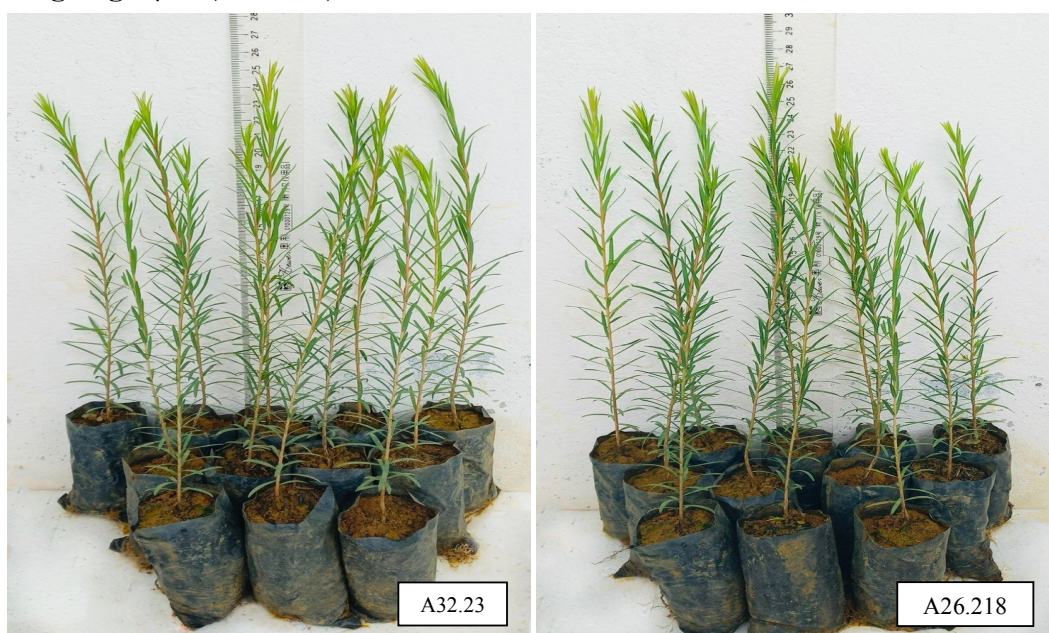
Ghi chú: GT1: 100% là đất tầng B sàng kỹ, GT2: 30% trấu hun và 70% đất tầng B sàng kỹ, GT3: 30% giá thể trồng nấm linh chi sau khi thu hoạch quả thể (gồm mùn cưa keo trộn cám ngô, cám gạo) và 70% đất tầng B sàng kỹ.

Bảng 6 cho thấy, tỷ lệ sống của cây con các dòng vô tính Tràm trà A32.23 và A26.218 trồng trên 3 giá thể khác nhau chưa có sự sai khác rõ rệt (do sig > 0,05). Cả 2 dòng vô tính Tràm trà có tỷ lệ sống rất cao ở các giá thể thí nghiệm (trên 92,2%). Tuy nhiên, ở cả 2 dòng vô tính Tràm trà đều có sự khác nhau rõ rệt về sinh trưởng chiều cao và chất lượng cây ở các giá thể khác nhau.

Cây mô dòng vô tính Tràm trà A32.23 và A26.218 đều sinh trưởng tốt nhất trên giá thể GT2, chiều cao cây tương ứng đạt 25,70 cm và 25,23 cm cây có chất lượng tốt (lá xanh, tươi, thân mập khỏe), tiếp đến là giá thể GT1, chiều cao cây trung bình tương ứng đạt 19,87 và 19,27 cm với chất

lượng cây trung bình (lá xanh nhạt, thân mập khỏe). Cây mô sinh trưởng kém nhất khi trồng trên GT3, chiều cao cây tương ứng chỉ đạt 13,10 và 12,37 cm, đồng thời cây có chất lượng kém (lá vàng, thân mảnh yếu). Từ kết quả trên có thể thấy, thành phần giá thể được trộn thêm trấu hun hoặc giá thể 100% đất tầng B làm giá thể tối xốp giúp cây sinh trưởng tốt hơn các giá thể còn lại.

Như vậy, giá thể ra ngôi cây mô thích hợp cho các dòng vô tính Tràm trà A32.23 và A26.218 là GT2 đây cũng là giá thể phù hợp khi ra ngôi các dòng vô tính Tràm trà năm gần Q15.38, Q15.013, Q16.427 được Khuất Thị Hải Ninh và cs (2023) [10] nghiên cứu.



Hình 6. Cây con các dòng vô tính Tràm trà trên giá thể GT2 (Sau 3 tháng trồng)

4. KẾT LUẬN

Khử trùng mẫu chồi bằng Javel 5% trong thời gian 10 phút với tỷ lệ mẫu sạch nảy chồi đạt 74,44% (dòng vô tính Tràm trà A32.23) và 77,78% (dòng vô tính Tràm trà A26.218) sau 3 tuần nuôi cấy.

Môi trường tạo cụm chồi các dòng vô tính Tràm trà là MS* (nồng độ NH_4NO_3 giảm đi 1/2 so với MS) + 1,0 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 với tỷ lệ mẫu tạo cụm chồi đạt 98,9 - 100%, hệ số nhân chồi 5,05 - 5,16 lần; chiều cao chồi 1,56 - 1,61 cm sau 4 tuần nuôi cấy.

Môi trường kích thích tăng trưởng chồi các dòng vô tính Tràm trà là MS* + 0,5 mg/l kinetin + 1,0 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; 1 tuần đầu che sáng hoàn toàn, sau đó cường độ chiếu sáng 1.000 lux cho tỷ lệ chồi hữu hiệu đạt 96,7 - 100%, chiều cao chồi đạt 2,58 - 2,71 cm, chồi có chất lượng tốt sau 4 tuần nuôi cấy.

Môi trường ra rễ các dòng vô tính Tràm trà là MS* + 1,0 mg/l IBA + 20 g/l đường sucrose + 10 g/l đường glucose + 6 g/l agar, pH môi trường = 5,8, với tỷ lệ chồi ra rễ 96,7 - 98,9%, số rễ/chồi 4,17 - 4,73, chiều dài rễ 1,59 - 1,65 cm sau 3 tuần nuôi cấy.

Cây mô các dòng vô tính Tràm trà được cấy vào giá thể GT2 gồm hỗn hợp 30% trấu hun + 70% đất tầng B, sau 3 tháng ra ngôi ở vườn ươm đạt tỷ lệ cây sống từ 94,4 - 95,6%, chiều cao cây đạt 25,20 - 25,70 cm và chất lượng cây tốt (thân mập, lá xanh đậm, tươi).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Lê Đình Khả (2017). *Nghiên cứu chọn giống, nhân giống và kỹ thuật trồng tràm có năng suất và chất lượng tinh dầu cao*. Nxb Nông nghiệp.
2. Bộ Nông nghiệp và PTNT (2017). *Quyết định số 3229/QĐ-BNN-TCLN ngày 01 tháng 8 năm 2017 về việc công nhận giống cây trồng lâm nghiệp*.
3. Mai Thị Phương Hoa, Đỗ Tiến Vinh, Trần Văn Minh (2013). Nhân giống cây Tràm Trà (*Melaleuca alternifolia*) nhập nội từ Úc bằng kỹ thuật nuôi cấy chồi đỉnh. Kỷ yếu Hội nghị Công

nghệ Sinh học toàn quốc, Quyển VI: Công nghệ gen, Công nghệ enzyme và Hóa sinh, Công nghệ sinh học Y - dược, Công nghệ sinh học động vật, tr. 822 - 825.

4. List, S. E., Brown P. H., Low C. S., Walsh K. B. (1996). A micropropagation protocol for *Melaleuca alternifolia* (Tea tree). *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 36(6), p. 755.
5. Nadia, M. T., Alina, W. and Zaidah, R. (2012). Improvement of shoot regeneration of potentially medicinal plant *Melaleuca alternifolia* via axillary shoot. *Jurnal Teknologi*, 59, Suppl 2, 33 - 35.
6. Chen B., Li J., Zhang J., Fan H., Wu L., Li Q. (2016). Improvement of the tissue culture technique for *Melaleuca alternifolia*. *Journal of Forestry Research*, 27(6), pp. 1265 - 1269.
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 Cellular & Developmental Biology - Plant*, 46(2), pp. 192 - 197. DOI 10.1007/s11627-010-9287-6.
8. Carla Midori I., Jean Carlos C. (2021). Micropropagation of *Melaleuca alternifolia* by shoot proliferation from apical segments. *Trees*, 35: 1497 - 1509.
9. Nguyễn Hải Tuất, Nguyễn Trọng Bình (2005). *Khai thác và sử dụng SPSS để xử lý số liệu trong lâm nghiệp*. Nxb Nông nghiệp.
10. Khuất Thị Hải Ninh, Lê Đình Khả, Vũ Thị Huệ, Nguyễn Thị Thanh Hường (2015). Nghiên cứu nhân giống một số dòng vô tính Tràm năm gân (*Melaleuca quinquenervia*) bằng nuôi cấy mô. *Tạp chí Nông nghiệp và PTNT*, Chuyên đề giống cây trồng, vật nuôi, tập 1, tháng 6, tr. 220 - 226.
11. Khuất Thị Hải Ninh, Hoàng Thị Thu, Nguyễn Thị Thơ, Đào Thị Thanh Mai, Vũ Quang Nam, Nguyễn Thị Thanh Hường, Lê Đình Khả, Hoàng Thanh Lộc (2023). 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*. *Tạp chí Khoa học Lâm nghiệp*, số 1, tr. 13 - 24.

RESEARCH ON PROPAGATION *Melaleuca alternifolia* Maiden & E. Betcher ex Cheel A32.23 AND A26.218 CLONES BY TECHNIQUE *IN VITRO*

Khuat Thi Hai Ninh¹, Nguyen Thi Tho¹, Nguyen Hoang Anh¹

Nguyen Thi Thanh Huong², Hoang Thanh Loc²

¹ Vietnam National University of Forestry

² Institute for Improvement of Forestry Genetic Resources and Products Development

Summary

Melaleuca alternifolia is a species that have essential oil rich in terpinene-4-ol. *Melaleuca alternifolia* A26.218 and A32.23 clones of have high content and quality of essential oils, recognized as technically advanced varieties by the Ministry of Agriculture and Rural Development. To quickly provide these clones into production, it is necessary to continue research and perfect *in vitro* propagation technique. The results of *in vitro* propagation of these clones showed that shoots explant were disinfested with Javel 5% for 10 minutes (the portion of clean sprouted explants is 74.44 - 77.78% after 3 culture weeks. The most appropriate medium for create shoot cluster is MS* (the concentration of NH_4NO_3 in MS* media is half MS media) + 1.0 mg/l BAP + 0.2 mg/l kinetin + 0.1 mg/l NAA (with 98.9 - 100% created shoot cluster, coefficient shoot multiplication of 5.05 - 5.16 times, 1.56 - 1.61 cm shoot height after 4 weeks of tissue culture). The most appropriate medium for stimulating shoot growth is MS* + 0.5 mg/l kinetin + 1.0 mg/l BAP + 0.1 mg/l NAA, the shoot jars is shaded for first one week, then illuminated at 1000 lux for remainder of the culture cycle (with 96.7 - 100% effective shoot rate, 2.58 - 2.71 cm shoot height, the shoot with good quality, after 4 weeks of tissue culture). The rooting medium is MS* + 1.0 mg/l IBA (96.7 - 98.9% rooting shoots, 4.17 - 4.73 roots per shoot, 1.59 - 1.65 cm root length after 3 weeks of tissue culture). *In vitro* plantlet of *Melaleuca alternifolia* clones are growed on substrate of 30% hunk rice husk and 70% of soil from layer B (rate of survival tree was 94.4 - 95.6%, with 25.23 - 25.70 cm height of tree, good quality tree after 3 months culture in nursery).

Keywords: Clones, essential oil, *in vitro*, *Melaleuca alternifolia*, propagation.

Ngày nhận bài: 22/4/2024

Ngày chuyển phản biện: 15/5/2024

Ngày thông qua phản biện: 27/5/2024

Ngày duyệt đăng: 8/7/2024