



## NGHIÊN CỨU CẢI THIẾN HỆ SỐ NHÂN GIỐNG *IN VITRO* CÂY TRÀM NĂM GÂN (*Melaleuca quinquenervia*)

Nguyễn Thị Nguyên Mẫn<sup>1</sup>, Phạm Thị Diễm Thi<sup>2</sup>, Nguyễn Thị Khánh Quỳnh<sup>1</sup>,  
Tạ Đặng Ý Vi<sup>3</sup>, Nguyễn Đức Chung<sup>4</sup>, Hoàng Tấn Quảng<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup> Công ty trách nhiệm hữu hạn một thành viên Công nghệ sinh học QueenLabs,  
116/2/27 Ngự Bình, Huế, Việt Nam

<sup>2</sup> Viện Công nghệ sinh học, Đại học Huế, Nguyễn Đình Tú, Huế, Việt Nam

<sup>3</sup> Trường Đại học Sư phạm, Đại học Huế, 34 Lê Lợi, Huế, Việt Nam

<sup>4</sup> Trường Đại học Nông Lâm, Đại học Huế, 102 Phùng Hưng, Huế, Việt Nam

\* Tác giả liên hệ: Hoàng Tấn Quảng <htquang@hueuni.edu.vn>

(Ngày nhận bài: 8-6-2024; Ngày chấp nhận đăng: 1-7-2024)

**Tóm tắt.** Tràm năm gân (*Melaleuca quinquenervia* (Cav) S.T. Blake, 1958) là loài nhập nội được trồng phổ biến ở nước ta với mục đích lấy gỗ và chiết xuất tinh dầu. Sản xuất cây giống Tràm năm gân bằng phương pháp nuôi cấy mô sẽ giúp giữ được các đặc tính tốt như sinh trưởng mạnh, hàm lượng tinh dầu cao từ các giống đã được tuyển chọn. Mẫu đoạn thân Tràm năm gân thu nhận từ tự nhiên được rửa sạch và khử trùng với HgCl<sub>2</sub> 0,1% trong 16 phút. Sau 3 tuần nuôi cấy, tỷ lệ mẫu sống và không nhiễm là 83,33%. Môi trường MS bổ sung 30 g/L sucrose, 8,0 g/L agar, 1,5 mg/L BAP là môi trường thích hợp nhất để nuôi cấy mẫu đoạn thân Tràm năm gân với số chồi tái sinh là 2,13 chồi/mẫu, chiều cao chồi 1,49 cm. Môi trường tối ưu cho nhân nhanh chồi là môi trường MS bổ sung 2,5 mg/L BAP + 1,0 mg/L KIN + 0,5 mg/L NAA + 0,2 mg/L GA3 + 0,2 mg/L B2 với số chồi là 15,93 chồi/mẫu, chiều cao trung bình của cụm chồi là 2,53 cm. Rễ hình thành và phát triển tốt nhất trên môi trường ½ MS bổ sung 1,5 mg/L IBA với số rễ /chồi là 3,03 rễ và chiều dài rễ là 3,47 cm.

**Từ khóa:** nhân chồi, nhân giống *in vitro*, *Melaleuca quinquenervia*, tạo rễ, Tràm năm gân

# Study for enhancing the *in vitro* shoot multiplication rate of *Melaleuca quinquenervia*

Nguyen Thi Nguyen Man<sup>1</sup>, Pham Thi Diem Thi<sup>2</sup>, Nguyen Thi Khanh Quynh<sup>1</sup>,  
Ta Dang Y Vi<sup>3</sup>, Nguyen Duc Chung<sup>4</sup>, Hoang Tan Quang<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup> QueenLabs Biotechnology One Member Company, 116/2/27 Ngu Binh St., Hue, Vietnam

<sup>2</sup> Institute of Biotechnology, Hue University, Nguyen Dinh Tu St., Hue, Vietnam

<sup>3</sup> University of Education, Hue University, 34 Le Loi St., Hue, Vietnam

<sup>4</sup> University of Agriculture and Forestry, Hue University, 102 Phung Hung St., Hue, Vietnam

\* Correspondence to Hoang Tan Quang <htquang@hueuni.edu.vn>

(Submitted: June 8, 2024; Accepted: July 1, 2024)

**Abstract.** *Melaleuca quinquenervia* (Cav) S.T. Blake, 1958) is an imported species that is commonly grown for wood and essential oil production. The micropropagation method produces seedlings with fast growth and high oil yield characteristics similar to the selected original plants. Stem segments were collected from natural sources were washed and disinfected with 0.1% HgCl<sub>2</sub> for 16 minutes. After three weeks of culture, the survival rate without contamination reached 83.33%. Additionally, the MS medium supplemented with 30 g/L sucrose, 8.0 g/L agar, and 1.5 mg/L BAP proved to be the most suitable for culturing stem segments, yielding 2.13 shoots per segment with an average shoot height of 1.49 cm. The optimal medium for shoot proliferation was MS supplemented with 2.5 mg/L BAP + 1.0 mg/L KIN + 0.5 mg/L NAA + 0.2 mg/L GA3 + 0.2 mg/L vitamin B2, resulting in 15.93 shoots per segment with an average cluster height of 2.53 cm. Root formation and development thrive best on ½ MS medium supplemented with 1.5 mg/L IBA, yielding of 3.03 roots per shoot with an average length of 3.47 cm.

**Keywords:** broad-leaved paperbark, *in vitro* culture, *Melaleuca quinquenervia*, shoot multiplication, root production

## 1 Đặt vấn đề

Chi Tràm (*Melaleuca*) là một chi thực vật có hoa trong họ Đào kim nương (Myrtaceae), ước tính chi này có 236 loài, chủ yếu phân bố tại Úc, ngoài ra còn một số nước như Malaysia, Indonesia, New Guinea, quần đảo Solomon và Nouvelle-Calédonie [1]. Ở Việt Nam, các loài Tràm được du nhập từ năm 1993, các loài phổ biến trong chi này hiện nay là Tràm lá dài (*M. leucadendra*), Tràm gió (*M. cajuputi*), Tràm năm gân (*M. quinquenervia*) hay Tràm trà (*M. viridiflora*). Cây Tràm được dùng làm củi, cừ Tràm được dùng trong xây dựng và vỏ Tràm dùng để trám ghe, thùng. Trong lá và cành non của cây Tràm chứa tinh dầu Tràm có tính sát trùng dùng để trị bệnh hô hấp. Tinh dầu Tràm chiết xuất từ các loài Tràm khác nhau có thể được sử dụng trong công nghiệp thực phẩm, mỹ phẩm hay trong y học [1–3]. Theo y học cổ truyền, tinh dầu Tràm có tác dụng kháng khuẩn phổ rộng, giúp tăng sức đề kháng, làm giảm các triệu chứng ho và cảm lạnh, giúp nhuận tràng, giãn cơ và làm thuốc an thần. Đặc biệt, tinh dầu Tràm rất hữu ích trong việc chăm sóc cho phụ nữ và trẻ sơ sinh [1, 4]. Tinh dầu Tràm đã được chứng

minh có tác dụng chống oxy hoá, chống viêm [5], chống tăng sinh của các sinh vật kí sinh và các dòng tế bào ác tính [6].

Hiện nay, tinh dầu Tràm là mặt hàng rất được ưa chuộng, đặc biệt là tinh dầu Tràm có nguồn gốc từ tinh Thừa Thiên Huế. Tuy nhiên, vùng nguyên liệu Tràm chưa được quản lý hợp lý, nhiều vùng Tràm gió tự nhiên (huyện Phú Lộc, Hương Trà, Hương Thủy, Quảng Điền, Phong Điền của tỉnh Thừa Thiên Huế) hầu như đã biến mất [7]. Việc khôi phục và phát triển nguồn nguyên liệu hiện nay được tập trung vào cây Tràm gió, nhiều địa phương như huyện Phú Lộc và Phong Điền đã nhân giống và trồng mới nhiều diện tích cây này. Bên cạnh đó, một số giống Tràm khác như Tràm năm gân, Tràm lá dài cũng được giới thiệu về trồng ở một số nơi ở tỉnh Thừa Thiên Huế nhằm đa dạng hóa nguồn nguyên liệu sản xuất tinh dầu Tràm [2].

Tràm năm gân (*Melaleuca quinquenervia*) thuộc chi *Melaleuca*, họ Myrtaceae, có nguồn gốc phân bố ở Australia, New Caledonia, Papua New Guinea, Indonesia và được di thực vào nước ta từ lâu [1, 8]. Tràm năm gân có hàm lượng tinh dầu chiếm từ 1–3%, cao hơn nhiều so với giống Tràm bản địa là Tràm gió (*M. cajuputi*) (0,4–1,2%) [1]. Thành phần tinh dầu Tràm năm gân có 1,8-cineole là hợp chất chính, chiếm 10–75% [6]. Theo Lê Đình Khả và cs., các dòng trội Tràm năm gân (*M. quinquenervia*) trồng tại huyện Phú Lộc, tỉnh Thừa Thiên Huế giai đoạn 2015–2016 có hàm lượng tinh dầu trung bình là 1,83% (1,8-cineole chiếm 60,41%), trồng tại huyện Thanh Hóa, tỉnh Long An có hàm lượng tinh dầu trung bình là 1,96% (1,8-cineole chiếm 60,18%) [4].

Tuy nhiên, vấn đề đặt ra là việc nhân giống vô tính cây Tràm như gieo hạt hay giâm hom rất khó để sản xuất số lượng lớn các giống có năng suất và chất lượng tinh dầu cao đã được tuyển chọn. Nuôi cấy mô thực vật là phương pháp thích hợp nhất để giải quyết vấn đề trên. Hiện nay, quy trình nhân giống *in vitro* đã được thực hiện trên cây Tràm gió [9, 10] và cây Tràm lá dài [3, 11]. Đối với Tràm năm gân, Khuất Thị Hải Ninh và cs. nghiên cứu nhân giống *in vitro* 3 dòng Tràm năm gân Q15.38, Q15.013 và Q16.427. Tuy nhiên, hệ số nhân mà tác giả thu được là 5,4–6,7 chồi/cụm, chưa cao so với các nghiên cứu trên cây Tràm khác [12]. Do đó, nghiên cứu này được thực hiện với mục tiêu nâng cao hệ số nhân chồi của loài cây này, góp phần nâng cao hiệu quả sản xuất cây giống Tràm năm gân phục vụ trồng rừng trong thời gian tới.

## 2 Vật liệu và phương pháp

### 2.1 Vật liệu

Vật liệu nghiên cứu là cây Tràm năm gân (*Melaleuca quinquenervia* (Cav) S.T. Blake, 1958) được thu mua tại huyện Phú Lộc, tỉnh Thừa Thiên Huế, cây đã được định danh bằng phân tích trình tự đoạn ITS [2].

### 2.2 Phương pháp

#### Môi trường và điều kiện nuôi cấy

Môi trường nuôi cấy là môi trường cơ bản MS [13] có bổ sung 9,0 g/L agar, 30 g/L sucrose và các chất điều hòa sinh trưởng thực vật khác nhau. Môi trường nuôi cấy có pH = 5,8 và được

khử trùng ở nhiệt độ 121 °C, áp suất 1,0 atm trong 15 phút.

Mẫu được nuôi ở nhiệt độ:  $25 \pm 2$  °C, cường độ ánh sáng:  $2.000 \pm 500$  lux, thời gian chiếu sáng: 16 giờ/ngày.

### **Khử trùng mẫu cấy**

Đoạn thân mang chồi nách (3–4 cm) được rửa sạch bụi đất, lặt với nước xà phòng loãng 3 lần, mỗi lần 15 phút. Mẫu tiếp tục được khử trùng trong tủ cấy với cồn 70° trong 30 giây và lặt với dung dịch HgCl<sub>2</sub> 0,1% từ 12–18 phút để xác định thời gian khử trùng thích hợp. Hiệu quả của quá trình khử trùng được đánh giá thông qua tỷ lệ mẫu sống không nhiễm, mẫu nhiễm và mẫu chết sau thời gian 3 tuần theo dõi.

### **Tạo chồi *in vitro***

Mẫu sau khi khử trùng với công thức tối ưu được cắt thành đoạn 2,0 cm và cấy lên môi trường MS cơ bản bổ sung 6-benzylaminopurine (BAP) ở các nồng độ 0,0; 0,5; 1,0; và 1,5 mg/L để xác định khả năng tái sinh chồi sau 4 tuần nuôi cấy. Chỉ tiêu đánh giá bao gồm số chồi/mẫu nuôi cấy và chiều cao trung bình chồi (cm).

### **Nhân chồi *in vitro***

Chồi *in vitro* kích thước 1,5–2,0 cm được cấy lên môi trường MS có bổ sung BAP riêng lẻ ở các nồng độ 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5 và 3,0 mg/L hay kết hợp với 1,0–1,5 mg/L Kinetin (KIN); 0,5 mg/L Naphthaleneacetic acid (NAA); 0,2 mg/L Gibberilic acid (GA3) và 0,2 mg/L vitamin B2 (riboflavin) [14–16]. Chỉ tiêu đánh giá sau 6 tuần nuôi cấy bao gồm số chồi/mẫu, chiều cao trung bình của chồi (cm).

### **Tạo rễ *in vitro***

Chồi *in vitro* khỏe mạnh (2,0 cm) được cấy chuyển lên môi trường ½ MS có bổ sung IBA ở các nồng độ 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 và 2,5 mg/L để thăm dò khả năng tạo rễ. Chỉ tiêu đánh giá sau 4 tuần nuôi cấy bao gồm tỷ lệ chồi tạo rễ (%), số rễ/chồi, chiều dài trung bình của rễ (cm).

### **Xử lý thống kê**

Các thí nghiệm được bố trí theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên. Đối với thí nghiệm khử trùng mẫu được thực hiện với 45 mẫu/nghiệm thức; đối với các thí nghiệm còn lại được thực hiện với 30 mẫu, với 3 lần lặp lại. Kết quả thí nghiệm được xử lý để thu giá trị trung bình và phân tích Duncan's test bằng phần mềm SPSS 20.0 với mức xác suất có ý nghĩa  $p < 0,05$ .

### 3 Kết quả và thảo luận

#### 3.1 Ảnh hưởng của thời gian khử trùng

Thời gian khử trùng mẫu Tràm tự nhiên bằng HgCl<sub>2</sub> 0,1% có ảnh hưởng lớn đến kết quả nuôi cấy. Khử trùng mẫu từ 12–16 phút, hiệu quả tăng lên rõ rệt với tỷ lệ mẫu sống không nhiễm tăng từ 40–83,33%, tỷ lệ mẫu nhiễm giảm từ 51,67% xuống còn 6,67%. Khi tiếp tục tăng thời gian khử trùng, tỷ lệ mẫu nhiễm giảm không đáng kể trong khi mẫu chết tăng cao do HgCl<sub>2</sub> thấm sâu vào bên trong gây độc cho mẫu xử lý. Tỷ lệ mẫu chết tăng từ 10% lên 28,33% và mẫu sạch giảm còn 66,67%. Như vậy, khử trùng mẫu bằng HgCl<sub>2</sub> 0,1% trong 16 phút là phương thức xử lý tối ưu với tỷ lệ mẫu sống thu được cao nhất là 83,33% (Bảng 1). Thời gian khử trùng trong nghiên cứu của chúng tôi tương tự như thời gian khử trùng đối với cây tràm lá dài [3] và cao hơn nghiên cứu nhân giống tràm năm gân của Khuất Thị Hải Ninh và cs. là 10 phút [12].

#### 3.2 Tạo chồi *in vitro* từ mẫu nuôi cấy khởi đầu

Kết quả nghiên cứu thể hiện ở Bảng 2 cho thấy, mẫu đoạn thân tự nhiên khi nuôi cấy trên môi trường MS không bổ sung BAP và có bổ sung 0,5 mg/L BAP cho số chồi tái sinh là tương đương nhau, đạt từ 1–1,27 chồi/mẫu (không có sự sai khác về mặt thống kê). Tuy nhiên, chiều cao chồi khi nuôi cấy trên môi trường bổ sung 0,5 mg/L BAP cao hơn trên môi trường MS cơ bản, với chiều cao chồi tương ứng là 1,26 cm và 1,09 cm. Khi tăng nồng độ BAP lên 1,0–1,5 mg/L BAP, số chồi tạo thành tăng từ 1,63–2,13 chồi/mẫu. Môi trường MS bổ sung 1,5 mg/L BAP cho số chồi tạo thành cao nhất; chồi to, khá dài; thân, lá màu xanh đậm; lá to (Hình 1). So với nghiên cứu trên cây tràm năm gân của Khuất Thị Hải Ninh và cs., số cụm chồi ban đầu của chúng tôi thu được thấp hơn (2,13 chồi/cụm) so với 3,5–6,7 chồi/cụm [12], số chồi chúng tôi thu được cũng thấp hơn so với khi nuôi cấy cây tràm lá dài (3,0 chồi/cụm) [3]. Tuy nhiên, đây là các kết quả tạo chồi bước đầu, các thí nghiệm về nâng cao hệ số nhân chồi sẽ được thực hiện ở các bước tiếp theo.

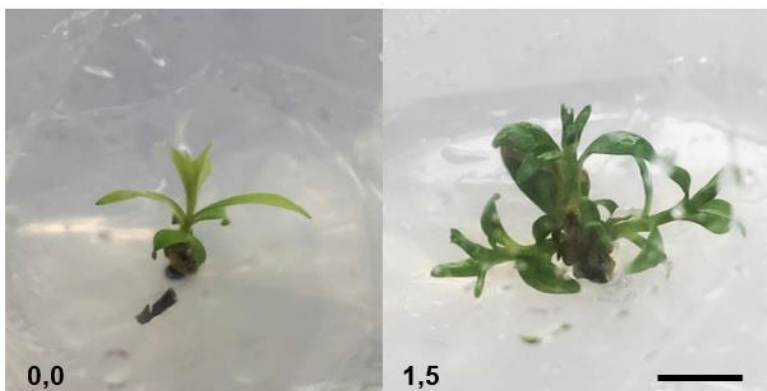
**Bảng 1.** Ảnh hưởng của thời gian khử trùng mẫu bằng dung dịch HgCl<sub>2</sub> 0,1% sau 3 tuần nuôi cấy

Thời gian (phút)	Tỷ lệ mẫu sống (%)	Tỷ lệ mẫu nhiễm (%)	Tỷ lệ mẫu chết (%)
12	40,00 ± 8,66 <sup>c</sup>	51,67 ± 7,64 <sup>a</sup>	8,33 ± 5,77 <sup>b</sup>
14	48,33 ± 10,41 <sup>c</sup>	41,67 ± 2,89 <sup>b</sup>	10,00 ± 8,66 <sup>b</sup>
16	83,33 ± 5,77 <sup>a</sup>	6,67 ± 2,89 <sup>c</sup>	10,00 ± 5,00 <sup>b</sup>
18	66,67 ± 5,77 <sup>b</sup>	5,00 ± 2,89 <sup>c</sup>	28,33 ± 7,64 <sup>a</sup>

*Chú thích:* Các chữ cái khác nhau trên cùng một cột chỉ ra sự sai khác có ý nghĩa thống kê của trung bình mẫu với  $p < 0,05$  (Duncan's test). Chú thích này được dùng cho tất cả các bảng số liệu tiếp theo.

**Bảng 2.** Ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy đến khả năng tạo chồi từ vật liệu khởi đầu sau 4 tuần

BAP (mg/L)	Số chồi/mẫu	Chiều cao chồi (cm)	Mô tả
0,0	1,00 ± 0,00 <sup>c</sup>	1,09 ± 0,37 <sup>c</sup>	Chồi nhỏ, ngắn; thân, lá màu xanh nhạt; lá nhỏ
0,5	1,27 ± 0,52 <sup>c</sup>	1,26 ± 0,39 <sup>b</sup>	Chồi nhỏ, ngắn; thân, lá màu xanh đậm; lá nhỏ
1,0	1,63 ± 0,61 <sup>b</sup>	1,39 ± 0,44 <sup>ab</sup>	Chồi nhỏ, ngắn; thân, lá màu xanh đậm; lá nhỏ
1,5	2,13 ± 0,78 <sup>a</sup>	1,49 ± 0,53 <sup>a</sup>	Chồi to, khá dài; thân, lá màu xanh nhạt; lá to



**Hình 1.** Ảnh hưởng của BAP đến khả năng tạo chồi từ vật liệu khởi đầu sau 4 tuần nuôi cấy (bar = 1 cm)

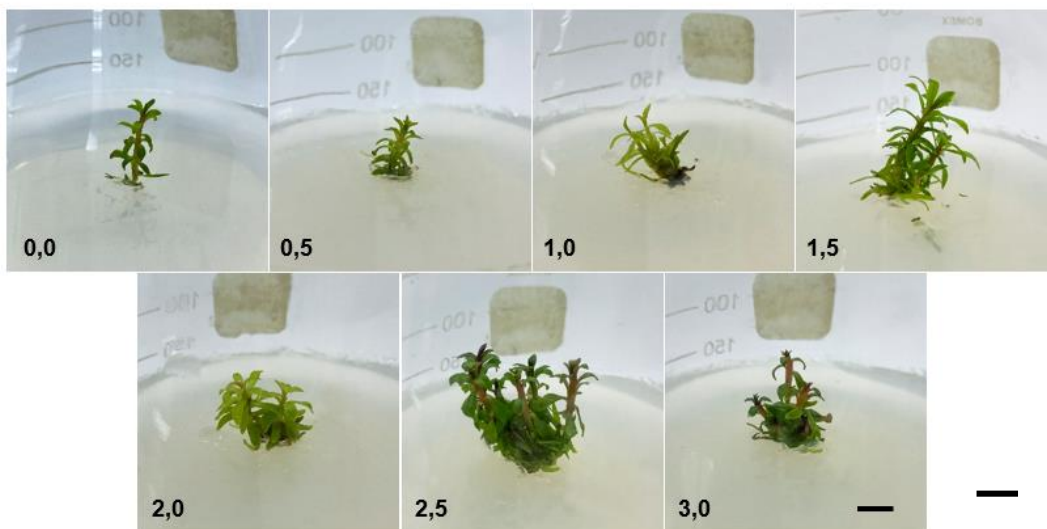
### 3.3 Nhân nhanh chồi *in vitro*

#### Ảnh hưởng của BAP đến khả năng nhân chồi

Chồi *in vitro* khi nuôi cấy trên môi trường MS bổ sung BAP từ 0,5–2,5 mg/L sinh trưởng mạnh và kích thích tạo nhiều chồi hơn (với số chồi/mẫu đạt từ 1,37–4,73 chồi) so với khi không bổ sung BAP (số chồi/mẫu chỉ đạt 1,0 chồi). Tuy nhiên, khi tiếp tục tăng nồng độ BAP lên 3,0 mg/L thì khả năng nhân chồi giảm. Môi trường MS bổ sung 2,0–2,5 mg/L BAP cho kết quả nhân chồi tốt nhất, đạt từ 4,4–4,73 chồi/mẫu và chiều cao chồi trung bình là 1,49–1,59 cm (Bảng 3) và Hình 2. Các môi trường này tiếp tục được sử dụng để nghiên cứu ảnh hưởng của BAP phối hợp với các chất điều hoà sinh trưởng (ĐHST) khác nhau đến khả năng nhân chồi *in vitro* của mẫu Tràm năm gân. So với cây tràm lá dài, lượng chồi tạo thành khi sử dụng riêng lẻ BAP là tương đương, trong khi cây tràm năm gân sử dụng nồng độ BAP cao hơn (2,5 mg/L so với 1,5 mg/L) [3].

**Bảng 3.** Ảnh hưởng của BAP đến khả năng nhân nhanh chồi *in vitro* sau 6 tuần nuôi cấy

BAP (mg/L)	Số chồi/mẫu	Chiều cao chồi (cm)	Mô tả
0,0	1,00 ± 0,00 <sup>e</sup>	1,99 ± 0,28 <sup>a</sup>	Chồi nhỏ, ngắn; thân lá màu xanh nhạt; lá nhỏ
0,5	1,37 ± 0,61 <sup>e</sup>	2,05 ± 0,53 <sup>a</sup>	Chồi nhỏ, ngắn; thân lá màu xanh nhạt; lá nhỏ
1,0	1,87 ± 0,97 <sup>d</sup>	2,09 ± 0,62 <sup>a</sup>	Chồi nhỏ, ngắn; thân lá màu xanh nhạt; lá nhỏ
1,5	2,70 ± 0,92 <sup>c</sup>	2,18 ± 0,49 <sup>a</sup>	Chồi to, dài; thân hơi ngả màu đỏ; lá to, màu xanh
2,0	4,40 ± 1,00 <sup>a</sup>	1,49 ± 0,49 <sup>b</sup>	Chồi to, ngắn; thân hơi ngả màu đỏ; lá to, màu xanh
2,5	4,73 ± 1,11 <sup>a</sup>	1,59 ± 0,54 <sup>b</sup>	Chồi to, ngắn; thân hơi ngả màu đỏ; lá nhỏ, màu xanh
3,0	3,37 ± 0,76 <sup>b</sup>	1,55 ± 0,47 <sup>b</sup>	Chồi nhỏ, ngắn; thân hơi ngả màu đỏ; lá to, màu xanh

**Hình 2.** Ảnh hưởng của BAP đến khả năng nhân nhanh chồi *in vitro* sau 6 tuần nuôi cấy (bar = 1 cm)

### Ảnh hưởng của BAP kết hợp với các chất ĐHST khác đến khả năng nhân nhanh chồi *in vitro*

Chồi *in vitro* Tràm năm gân sau khi tách khỏi cụm chồi thường có kích thước rất khác nhau trong khi chồi *in vitro* cần phải đạt chiều cao đủ tiêu chuẩn mới chuyển sang giai đoạn tạo cây con hoàn chỉnh. Do đó, để có thể tạo được số lượng chồi lớn và đạt chiều cao tiêu chuẩn, tiến hành đánh giá ảnh hưởng của BAP kết hợp với các chất khác đến khả năng nhân chồi *in vitro* cây Tràm năm gân. Kết quả khảo sát sau 6 tuần nuôi cấy được trình bày ở Bảng 4 và Hình 3. Khi kết hợp 1,0 mg/L KIN với BAP, số chồi tăng lên không nhiều nhưng chồi tạo thành cao to, sinh trưởng mạnh. Bổ sung 0,5 mg/L NAA có tác dụng tăng khả năng nhân chồi tuy nhiên chồi nhỏ và sinh trưởng chậm. Môi trường có bổ sung 0,2 mg/L GA3 và 0,2 mg/L B2 vừa làm tăng số chồi tạo thành vừa kích thích chồi phát triển tốt, đạt tiêu chuẩn để tạo cây *in vitro* hoàn chỉnh. Trong đó, môi

trường MS bổ sung 2,5 mg/L BAP + 1,0 mg/L KIN + 0,5 mg/L NAA + 0,2 mg/L GA3 + 0,2 mg/L B2 cho kết quả tốt nhất với số chồi là 15,93 chồi/mẫu, chiều cao trung bình của cụm chồi là 2,53 cm.

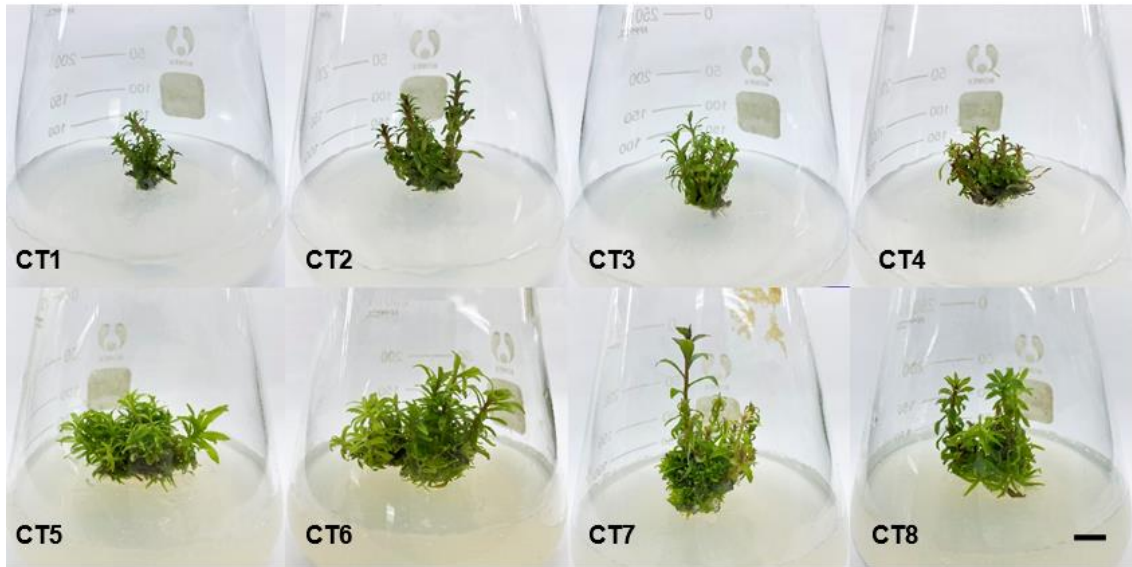
Kết quả nghiên cứu cho thấy, sử dụng kết hợp nhiều hợp chất khác nhau cho khả năng tạo chồi cao hơn sử dụng BAP riêng lẻ. Chồi *in vitro* nuôi cấy trên môi trường có bổ sung GA3, B2 hình thành cụm chồi lớn với số chồi trung bình từ 12,70–15,93 chồi/mẫu. Để tăng cường khả năng nhân chồi ở cây thân gỗ, các nhà khoa học thường có xu hướng kết hợp đồng thời nhiều chất điều hòa sinh trưởng. Chẳng hạn, kết hợp 1,0 mg/L BAP và 0,5 mg/L NAA để nhân nhanh chồi cây keo [17], kết hợp đồng thời 0,3 mg/L BAP + 0,05 mg/L NAA + 0,1 mg/L IBA + 0,3 mg/L Vitamin B2 và 0,075 mg/L folic acid để nhân nhanh chồi Bạch đàn urô [18], kết hợp 1 mg/L BAP + 0,5 mg/L NAA + 0,1 mg/L GA3 để nhân nhanh chồi bạch đàn lai [19]. Nguyễn Thị Minh Nguyệt và cs. sử dụng 0,2 mg/L GA3 để tăng trưởng chồi cây keo lá tràm dòng Clt43 nhằm nâng cao chất lượng chồi trước khi bước vào giai đoạn ra rễ trong quá trình nuôi cấy [16].

So với kết quả nhân chồi *in vitro* các loài Tràm đã công bố từ trước đến nay, hiệu quả nhân chồi trong nghiên cứu này của chúng tôi cao hơn khoảng 1,5 đến hai lần. Khuất Thị Hải Ninh và cs. nghiên cứu nhân giống *in vitro* 3 dòng Tràm năm gân Q15.38, Q15.013 và Q16.427, thu được cụm chồi có 5,4–6,7 chồi/cụm khi sử dụng môi trường MS bổ sung 0,7 mg/L BAP kết hợp với 0,3 mg/L KIN và 0,1 mg/L NAA [12]. Đối với cây Tràm gió (*M. cajuputi*), Phùng Thị Hằng và cs. nhân chồi trên môi trường MS bổ sung 2,0 mg/L trong 6 tuần chỉ thu được 6,2 chồi/mẫu [10]. Theo Hoàng Huy Tuấn và cs., môi trường MS bổ sung 1 mg/L BA, 1 mg/L KIN và 1 mg/L BAP thu được 6,5 chồi/cụm với chiều cao chồi đạt 3,7 cm [9]. Đối với Tràm trà (*M. alternifolia*), nghiên cứu của Jala và cs. cho thấy môi trường thích hợp nhất để nhân chồi là môi trường MS bổ sung 3,0 mg/L BAP với số chồi thu được là 7,6 chồi/mẫu sau 8 tuần nuôi cấy [20]. Chen và cs. xác định môi trường nhân chồi là môi trường MS có 0,3 mg/L BA và 0,15 mg/L NAA với hệ số nhân là 4,3 [21]. De Oliveira và cs. thu được số chồi là 11,8 chồi/mẫu trên môi trường MS lỏng có 1,11  $\mu$ M BA trong 8 tuần [22].

**Bảng 4.** Ảnh hưởng của các chất ĐHST phối hợp đến khả năng nhân nhanh chồi *in vitro* sau 6 tuần nuôi cấy

Công thức	Chất ĐHST (mg/L)					Số chồi/mẫu	Chiều cao chồi (cm)	Mô tả
	BAP	KIN	NAA	GA3	B2			
CT1	2,0	1,0	-	-	-	5,10 ± 0,29 <sup>f</sup>	1,82 ± 0,97 <sup>cde</sup>	Chồi to, khoẻ, hơi ngả đỏ, lá xanh đậm
CT2	2,5	1,0	-	-	-	5,63 ± 0,26 <sup>f</sup>	2,30 ± 0,11 <sup>ab</sup>	Chồi to, khoẻ, hơi ngả đỏ, lá xanh đậm
CT3	2,0	1,0	0,5	-	-	7,17 ± 0,28 <sup>e</sup>	1,94 ± 0,10 <sup>cd</sup>	Chồi vừa và nhỏ, lá nhỏ, xanh nhạt
CT4	2,5	1,0	0,5	-	-	8,70 ± 0,38 <sup>d</sup>	1,75 ± 0,12 <sup>de</sup>	Chồi vừa và nhỏ, lá nhỏ, xanh nhạt
CT5	2,0	1,0	0,5	0,2	0,2	12,70 ± 0,39 <sup>b</sup>	1,54 ± 0,08 <sup>e</sup>	Chồi to, xanh nhạt, lá vừa, xanh nhạt
CT6	2,5	1,0	0,5	0,2	0,2	15,93 ± 0,96 <sup>a</sup>	2,53 ± 0,08 <sup>a</sup>	Chồi to khoẻ, hơi ngả đỏ, lá dài, to xanh nhạt
CT7	2,0	1,5	0,5	0,2	0,2	10,83 ± 0,46 <sup>c</sup>	2,08 ± 0,12 <sup>bc</sup>	Chồi to, hơi ngả đỏ, lá nhỏ, xanh đậm
CT8	2,5	1,5	0,5	0,2	0,2	9,30 ± 0,54 <sup>d</sup>	1,77 ± 0,10 <sup>de</sup>	Chồi vừa, hơi ngả đỏ, lá vừa, xanh nhạt





**Hình 3.** Ảnh hưởng của các chất ĐHST phối hợp đến khả năng nhân nhanh chồi *in vitro* sau 6 tuần nuôi cấy (bar = 1 cm)

### 3.4 Tạo rễ

Chồi *in vitro* to khỏe được chuyển sang môi trường  $\frac{1}{2}$  MS bổ sung IBA từ 0–2,5 mg/L để nghiên cứu khả năng tạo rễ. Kết quả sau 4 tuần nuôi cấy ở Bảng 5 và Hình 4 cho thấy, môi trường  $\frac{1}{2}$  MS không bổ sung ĐHST không có khả năng tạo rễ. Khi tăng nồng độ IBA từ 0–1,5 mg/L làm tăng số rễ từ 0–3,03 rễ/chồi. Khi tiếp tục tăng nồng độ IBA lên 2,0–2,5 mg/L thì khả năng tạo rễ giảm. Nồng độ IBA 1,5 mg/L cho kết quả tạo rễ tốt nhất với số rễ/chồi là 3,03 rễ và chiều dài rễ là 3,47 cm.

Kết quả nghiên cứu tạo rễ của chúng tôi tương tự các công bố trên các loài Tràm khác nhau. Khuất Thị Hải Ninh và cs. nghiên cứu nhân giống *in vitro* 3 dòng Tràm năm gân, tác giả thu được 2,4–3,8 rễ/chồi khi sử dụng môi trường MS bổ sung 1,5 mg/L NAA [12]. Theo Hoàng Huy Tuấn và cs., môi trường  $\frac{1}{2}$  MS bổ sung 1,0 mg/L NAA và 1 mg/L IBA cho tỷ lệ ra rễ trên 96,3% trên cây Tràm gió với 3,7 rễ/cây và chiều dài rễ 2,0 cm [9]. Theo De Oliveira và cs., rễ *in vitro* của loài Tràm trà phát sinh tốt trên môi trường MS không bổ sung kích thích sinh trưởng [22]. Trong khi Jala và cs. lại nhận thấy rễ phát triển tốt nhất trên môi trường MS bổ sung 2,0 mg/L NAA với số rễ tạo thành là 7,3 rễ/chồi [20]. Sự khác nhau trong kết quả thăm dò khả năng tạo rễ có thể liên quan đến sự khác nhau giữa các giống và các loài nghiên cứu cũng như ở thành phần chất kích thích sinh trưởng có trong môi trường nhân chồi mà mẫu được nuôi cấy trước đó. Theo nhiều nghiên cứu đã được công bố, nồng độ chất kích thích sinh trưởng nội sinh hay nồng độ chất kích thích sinh trưởng tích lũy trong mẫu có ảnh hưởng lớn đến khả năng phát sinh cơ quan từ mẫu nuôi cấy.

**Bảng 5.** Ảnh hưởng của môi trường ½ MS bổ sung IBA đến khả năng hình thành rễ *in vitro* sau 4 tuần nuôi cấy

IBA (mg/L)	Tỷ lệ tạo rễ (%)	Số rễ/chồi (rễ)	Chiều dài rễ (cm)	Mô tả
0,0	0,0 <sup>c</sup>	0,0 <sup>d</sup>	0,0 <sup>e</sup>	Chồi to vừa, hơi ngả đỏ, lá vừa, rụng nhiều
0,5	70 ± 10,0 <sup>b</sup>	1,20 ± 0,89 <sup>c</sup>	0,65 ± 0,48 <sup>d</sup>	Chồi to vừa, hơi ngả đỏ, lá nhỏ, xanh đậm, rễ to
1,0	80 ± 17,3 <sup>b</sup>	2,33 ± 1,34 <sup>b</sup>	1,68 ± 0,80 <sup>c</sup>	Chồi to khỏe, hơi ngả màu đỏ, lá dài, to xanh, rễ to, nhiều rễ phụ
1,5	100 ± 0,0 <sup>a</sup>	3,03 ± 0,99 <sup>a</sup>	3,47 ± 0,54 <sup>a</sup>	Chồi to, dài, xanh nhạt, lá to, có màu xanh, rễ to dài, khỏe nhiều rễ phụ
2,0	100 ± 0,0 <sup>a</sup>	2,43 ± 0,77 <sup>b</sup>	2,25 ± 0,74 <sup>b</sup>	Chồi to, hơi ngả đỏ, lá dài to, màu xanh đậm, rễ vừa, có rễ phụ
2,5	80 ± 10,0 <sup>b</sup>	1,40 ± 1,00 <sup>c</sup>	0,72 ± 0,46 <sup>d</sup>	Chồi vừa, thấp, hơi ngả đỏ, lá hơi ngả đỏ, rễ nhỏ



**Hình 4.** Ảnh hưởng của môi trường ½ MS bổ sung 0,5–2,5 mg/L IBA đến khả năng hình thành rễ *in vitro* sau 4 tuần nuôi cấy

#### 4 Kết luận

Từ những kết quả thu được, chúng tôi đã tìm ra các công thức môi trường để nhân giống *in vitro* cây Tràm năm gân với hệ số nhân chồi cao (15,93 chồi/mẫu), cao hơn khoảng 1,5 lần so với công bố trước đây. Chồi *in vitro* tái sinh trên môi trường MS bổ sung 30 g/L sucrose, 8,0 g/L agar, 1,5 mg/L BAP cho kết quả tốt nhất với số chồi tái sinh là 2,13 chồi/mẫu, chiều cao chồi 1,49 cm. Môi trường tối ưu cho nhân nhanh chồi là môi trường MS bổ sung 2,5 mg/L BAP + 1,0 mg/L KIN + 0,5 mg/L NAA + 0,2 mg/L GA3 mg/L + 0,2 mg/L B2 với số chồi là 15,93 chồi/mẫu, chiều cao trung bình của cụm chồi là 2,53 cm. Rễ hình thành và phát triển tốt nhất trên môi trường ½ MS bổ sung 1,5 mg/L IBA, đạt 3,03 rễ/chồi với chiều dài 3,47 cm.

## Thông tin tài trợ

Công trình được thực hiện với sự tài trợ kinh phí của nhóm Nghiên cứu mạnh, Đại học Huế (mã số NCM.DHH2020.12).

## Tài liệu tham khảo

1. Brophy, J. J., Craven, L. A., Doran, J. C. (2013), *Melaleucas: their botany, essential oils and uses*. ACIAR Monograph No. 156, Australian Centre for International Agricultural Research, Canberra, 415 pp.
2. Trần Thị Ngọc Trâm, Phan Thị Thúy Hằng, Phạm Thị Diễm Thi, Trần Thúy Lan, Trương Thị Phương Lan, Hoàng Tấn Quảng (2021), Nghiên cứu đa dạng di truyền các loài trầm (*Melaleuca* spp.) trên địa bàn tỉnh Thừa Thiên Huế, *Báo cáo toàn văn Hội nghị Công nghệ sinh học toàn quốc năm 2021, Thái Nguyên 24/10/2021*, 9–15.
3. Thi, P. T. D., Man, N. T. N., Quynh, N. T. K., Hoa, T. T., Thuy, P. M. T., Quang, H. T. (2023), Micropropagation of Long-Leaved Paperbark (*Melaleuca leucadendra* (L.) L.), *Journal Propagation of Ornamental Plants*, 23(4), 91–98.
4. Lê Đình Khả, Nguyễn Thị Thanh Hương, Nguyễn Văn Dư (2017), Một số dòng vô tính Tràm năm gân có triển vọng trong sản xuất tinh dầu ở Việt Nam, *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Việt Nam*, 23, 31–36.
5. Surh J., Yun J. M. (2012), Antioxidant and anti-inflammatory activities of butanol extract of *Melaleuca leucadendron* L., *Prev Nutr Food Sci*, 17(1), 22–28.
6. Monzote, L., Scherbakov, A. M., Scull, R., Satyal, P., Cos, P., Shchekotikhin, A. E., Gille, L., Setzer, W. N. (2020), Essential oil from *Melaleuca leucadendra*: Antimicrobial, antikinetoplastid, antiproliferative and cytotoxic assessment, *Molecules*, 25(23), 5514.
7. Lê Thị Phương Thảo, Châu Thị Thanh, Nguyễn Duy Phong, Ngô Thị Phương Anh, Phạm Thị Phương Thảo (2019), Thực trạng canh tác cây trầm gió (*Melaleuca cajuputi* Powell) tại một số địa phương trên địa bàn tỉnh Thừa Thiên Huế, *Tạp chí Nông nghiệp & Phát triển Nông thôn*, 18, 102–108.
8. Phạm Hoàng Hộ (1999), *Cây cỏ Việt Nam*, Nxb. Trẻ, Hà Nội.
9. Hoàng Huy Tuấn, Phạm Cường, Lê Thị Thúy Nga, Tống Phước Bình, Nguyễn Cao Danh, Tôn Thất Ái Tín (2023), Nghiên cứu hoàn thiện kỹ thuật nhân giống *in vitro* cây Tràm gió (*Melaleuca cajuputi* Powell) ở tỉnh Thừa Thiên Huế, *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn*, 23, 22–31.
10. Phùng Thị Hằng, Nguyễn Bảo Toàn (2011), Nhân giống cây trầm (*Melaleuca cajuputi* Powell) bằng phương pháp nuôi cấy mô, *Tạp chí Khoa học Đại học Cần Thơ*, 20, 89–96.
11. Phạm Thị Mận, Vũ Đình Hương, Nguyễn Xuân Hải, Kiều Mạnh Hà, Trương Thị Thùy Trang, Nguyễn Thị Linh, Vũ Thị Thu Thanh, Ninh Văn Tuấn (2022), Nghiên cứu nhân giống trầm

- lá dài (*Melaleuca leucadendra* L.) bằng phương pháp nuôi cấy mô tế bào, *Tạp chí Khoa học Kỹ thuật Lâm nghiệp*, 6, 41–50.
12. Khuất Thị Hải Ninh, Hoàng Thị Thu, Nguyễn Thị Thơ, Đào Thị Thanh Mai, Vũ Quang Nam, Nguyễn Thị Thanh Hương, Lê Đình Khả, Hoàng Thanh Lộc (2024), Nghiên cứu nhân giống các dòng trà 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* 1(1), 13–24.
  13. Murashige, T., Skoog, F. (1962), A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures, *Physiologia Plantarum*, 15(3), 473–497.
  14. Lê Thị Như Nguyệt, Nguyễn Thị Thanh Nga, Phan Thị Phương Nhi (2019), Quy trình nhân giống *in vitro* cây keo lá trà (*Acacia auriculiformis* A. Cunn. ex Benth) dòng Clt43, *Tạp chí Khoa học Đại học Huế: Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn*, 128(3D), 33–41.
  15. Neelamathi D., Ramya P., Mallika S. (2005), Effect of riboflavin on initiation and multiplication of shoot cultures of sugarcane, *Sugar Tech*, 7(1), 83–85.
  16. Lê Thị Như Nguyệt, Nguyễn Thị Thanh Nga, Phan Thị Phương Nhi (2020), Nghiên cứu quá trình khử trùng và nhân nhanh trong nhân giống *in vitro* cây keo lá trà (*Acacia auriculiformis* A. Cunn. ex Benth) dòng Clt43, *Báo cáo toàn văn Hội nghị Công nghệ sinh học toàn quốc năm 2020, ngày 27 tháng 10 năm 2020*, 909–913.
  17. Triệu Thị Thu Hà, Cấn Thị Lan, Đông Thị Ứng (2014), Nghiên cứu nhân giống keo lá trà (*Acacia auriculiformis* A. Cunn. ex Benth) bằng phương pháp nuôi cấy mô tế bào, *Tạp chí Khoa học Lâm nghiệp*, 4, 3508–3515.
  18. Bùi Văn Thắng, Nguyễn Thị Hồng Gấm, Ngô Văn Thanh, Chu Hoàng Hà (2014), Nghiên cứu hệ thống tái sinh cây bạch đàn urô (*Eucalyptus urophylla*) thông qua phôi soma phục vụ chuyển gen, *Tạp chí Nông nghiệp & Phát triển Nông thôn, Chuyên đề Trường đại học Lâm nghiệp - 50 năm Xây dựng và Phát triển*, 11/2014, 155–1594.
  19. Lê Thị Hoa, Mai Thị Phương Thúy, Đỗ Hữu Sơn, Văn Thu Huyền, Hoàng Thị Hồng Hạnh, Ngô Thu Hào, Nguyễn Thị Hồng (2023), Nghiên cứu nhân giống một số dòng bạch đàn lai (*Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis*) UG105, UG111, UG117 bằng kỹ thuật nuôi cấy *in vitro*, *Tạp chí Khoa học Lâm nghiệp*, 6, 37–52.
  20. Jala, A., Chanchula, N. (2014), Effect of BA and NAA on micropropagation of tea tree (*Melaleuca alternifolia* Cheel) *in vitro*, *Thai Journal of Agricultural Science*, 47(1), 37–43.
  21. 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), 1265–1269.
  22. De Oliveira, Y., Pinto, F., da Silva, A. L. L., Guedes, I., Biasi, L. A., Quoirin, M. (2010), An efficient protocol for micropropagation of *Melaleuca alternifolia* Cheel, *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 46(2), 192–197.