

NHÂN GIỐNG CÂY TRÀM (*MELALEUCA CAJUPUTI* POWELL) BẰNG PHƯƠNG PHÁP NUÔI CÂY MÔ

Phùng Thị Hằng¹ và Nguyễn Bảo Toàn²

ABSTRACT

Research on micropropagation of *Melaleuca cajuputi* Powell was conducted to aim evaluation of some stages of micropropagation. Three experiments were carried out to be surface sterilization, shoot multiplication and rooting. Results of experiments showed that surface sterilization stage of explants used alcohol 70% for 30 second, rinsed with sterilized distilled water for 3 times and explants immersed in Clorox 20% for 30 minutes, rinsed again with sterilized distilled water for 3 times and then immersed in HgCl₂ 0,5‰ for 30 minutes. Stage of shoot multiplication was conducted in MS medium added 2 mg/l BA and stage of rooting in MS medium supplemented 2,0 mg/l of NAA

Keywords: Micropropagation, *Melaleuca cajuputi* Powell, surface sterilization, shoot multiplication, rooting

Title: Micropropagation of *Melaleuca cajuputi* Powell

TÓM TẮT

Nghiên cứu về vi nhân giống cây Tràm được thực hiện nhằm mục đích đánh giá một số giai đoạn của vi nhân giống. Ba thí nghiệm được thực hiện bao gồm khử trùng bề mặt, nhân chồi và tạo rễ. Kết quả thí nghiệm cho thấy rằng khử trùng bề mặt mẫu cấy: sử dụng cồn 70^o trong 30 giây, dung dịch Clorox 20% trong 30 phút, HgCl₂ 0,5‰ trong 30 phút là thích hợp cho việc khử trùng đoạn thân mang mầm chồi. Môi trường tốt nhất để nhân chồi trực tiếp từ đoạn thân là môi trường MS có bổ sung 2 mg/l BA. Tạo rễ cho cụm chồi bằng môi trường MS có bổ sung 2,0 mg/l NAA.

Từ khóa: Vi nhân giống, Tràm *Melaleuca cajuputi* Powell, khử trùng, nhân chồi, tạo rễ

1 GIỚI THIỆU

Cây Tràm (*Melaleuca cajuputi* Powell) là một loại thực vật có sức sống mạnh thích nghi ở các vùng đất nghèo dinh dưỡng như vùng đất phèn. Ngoài ra cây Tràm còn có giá trị kinh tế cao như sử dụng làm vật liệu xây dựng, sản xuất bột giấy và khai thác tinh dầu làm dược liệu. Tinh dầu Tràm là một loại nguyên liệu rất có giá trị kinh tế được sử dụng rộng rãi trong các ngành dược phẩm, hương liệu và mỹ phẩm. Hiện nay, nhu cầu về tinh dầu Tràm tự nhiên với hàm lượng cineole cao (từ 65% trở lên) là rất lớn, nguồn cung cấp dạng tinh dầu này vẫn chưa đáp ứng được nhu cầu của thị trường. Tràm là cây nở hoa theo mùa, các cây Tràm thụ phấn chéo nên cây con có sự phân hóa về di truyền, làm cho hàm lượng tinh dầu rất biến động ở từng cây. Vì vậy việc chọn giống Tràm có hàm lượng tinh dầu cao là cần thiết. Tuy nhiên, khi chọn được giống Tràm có hàm lượng tinh dầu cao làm thế nào để nhân vô tính giống được, tuyển chọn đạt được hệ số nhân giống cao và đồng nhất về mặt di truyền... đây là vấn đề cần được quan tâm. Trong các kỹ thuật nhân vô tính, vi nhân giống hay nhân giống in vitro là kỹ thuật tạo được số lượng

¹ Khoa Sư phạm, Trường Đại học Cần Thơ

² Khoa Nông nghiệp và Sinh học Ứng dụng, Trường Đại học Cần Thơ

cây con nhiều trong thời gian ngắn, giữ được các đặc tính di truyền tốt của cây mẹ. Trong vi nhân giống trải qua 4 giai đoạn (Debergh and Zimmermann, 1991) mỗi giai đoạn có một số yêu cầu riêng. Nghiên cứu này nhằm mục đích đánh giá một số giai đoạn của vi nhân giống như khử trùng bề mặt, nhân và tạo rễ.

2 VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1 Vật liệu

2.1.1 Mẫu cây

Đối tượng nghiên cứu là cây Tràm (*Melaleuca cajuputi* Powell) 5 - 6 tháng tuổi (Tràm non) và cây Tràm trên 1 năm tuổi (Tràm già) được thu mẫu từ tại Trung tâm Nghiên cứu Thực nghiệm Đa dạng Sinh học Hòa An, Trường Đại học Cần Thơ.

Các thí nghiệm vi nhân giống được tiến hành tại phòng Thí nghiệm thuộc Trại nghiên cứu và thực nghiệm nông nghiệp, Khoa Nông nghiệp và Sinh học ứng dụng, Trường Đại học Cần Thơ. Với các điều kiện: nhiệt độ: $32 \pm 3^{\circ}\text{C}$, cường độ ánh sáng: 2000 - 3000 lux, thời gian chiếu sáng: 16 giờ/ngày.

2.1.2 Môi trường nuôi cấy

Môi trường khoáng đa lượng và vi lượng theo Murashige and Skoog (1962), ký hiệu MS, có bổ sung đường sucrose 30g/l; agar: 7g/l; pH được hiệu chỉnh ở 5,8.

2.2 Phương pháp

Nghiên cứu được thực hiện dựa trên các thí nghiệm

2.2.1 Thí nghiệm 1: Hiệu quả của phương pháp khử trùng mẫu cây và tuổi mẫu cây

Thí nghiệm được thực hiện để xác định thời gian khử trùng bề mặt lên mức độ vô trùng mẫu cây và sự hình thành chồi từ đoạn thân thích hợp trong quá trình khử mẫu. Tiền xử lý: các đoạn chồi non (1 - 2 cm) mang búp chồi được rửa sạch với xà phòng và nước máy. Kế tiếp mẫu cây được khử trùng trong tủ cấy theo các phương pháp khác nhau (Bảng 1). Sau đó, các đoạn chồi được cắt bỏ phần mô chết, cấy vào môi trường MS. Thí nghiệm được bố trí theo thể thức hoàn toàn ngẫu nhiên hai nhân tố gồm 10 nghiệm thức với 3 lần lặp lại, mỗi lần lặp lại là 4 keo, mỗi keo có 4 đoạn thân. Nhân tố 1 là các phương pháp khử trùng bề mặt khác nhau (Bảng 1). Nhân tố 2 là tuổi của mẫu cây: Mẫu đoạn thân của cây con (5 - 6 tháng tuổi) và mẫu đoạn thân lấy từ nhánh của cây già (1 năm tuổi).

Bảng 1: Các phương pháp khử trùng mẫu cây

	PP 1	PP 2	PP 3	PP 4	PP 5
Cồn 70⁰			Thời gian 30 giây		
NCVT			Rửa lại 2 lần		
Clorox	10%, 10 phút	10%, 15 phút	10%, 20 phút	20%, 20 phút	20%, 30 phút
NCVT			Rửa lại 3 lần		
HgCl₂	0,5 ‰, 10 phút	0,5 ‰, 15 phút	0,5 ‰, 20 phút	0,5 ‰, 20 phút	0,5 ‰, 30 phút
NCVT			Rửa lại 5 lần		

PP: phương pháp; NCVT: nước cất vô trùng; Clorox (%) và HgCl₂ (‰) có nồng độ và thời gian khử trùng (phút) khác nhau ở từng phương pháp theo bảng

Chỉ tiêu theo dõi: tỉ lệ mẫu sạch, tỉ lệ mẫu nhiễm, tỉ lệ mẫu sống.

- Tỷ lệ mẫu nhiễm (%) = (Số mẫu nhiễm/Tổng số mẫu cấy) x 100
- Tỷ lệ mẫu sạch (%) = (Số mẫu sạch/Tổng số mẫu cấy) x 100
- Tỷ lệ mẫu sống (%) = (Số mẫu tái sinh chồi/Tổng số mẫu cấy) x 100

Thời gian lấy chỉ tiêu: 7, 15, 30 ngày sau khi cấy mẫu.

2.2.2 Thí nghiệm 2: Hiệu quả của Benzyl adenin (BA) lên sự nhân chồi từ đoạn thân

Thí nghiệm được thực hiện với mục đích xác định hiệu quả của Benzyl adenin (BA) lên sự nhân chồi. Đoạn thân sạch đã được khử trùng ở Thí nghiệm 1 sau 15 ngày nuôi dưỡng trong môi trường MS hình thành một chồi được bố trí vào các nghiệm thức ở Thí nghiệm 2, môi trường MS với các nồng độ BA tăng dần. Thí nghiệm được bố trí theo thể thức hoàn toàn ngẫu nhiên gồm 7 nghiệm thức với 7 lần lặp lại, mỗi lần lặp lại là 1 keo, mỗi keo có 1 chồi.

Ký hiệu các nghiệm thức:

1. Nghiệm thức 1: MS (đối chứng)
2. Nghiệm thức 2: MS + BA 0,2 mg/l
3. Nghiệm thức 3: MS + BA 0,5 mg/l
4. Nghiệm thức 4: MS + BA 0,7 mg/l
5. Nghiệm thức 5: MS + BA 1,0 mg/l
6. Nghiệm thức 6: MS + BA 1,5 mg/l
7. Nghiệm thức 7: MS + BA 2,0 mg/l

Chỉ tiêu theo dõi:

- Số chồi gia tăng: Đếm số chồi hình thành/mẫu cấy.
- Số lá gia tăng/mẫu cấy: Lá đã xòe ra

Thời gian lấy chỉ tiêu: 45, 60, 75 ngày sau khi cấy

2.2.3 Thí nghiệm 3: Hiệu quả của Naphthalen acetic acid (NAA) lên sự hình thành rễ

Thí nghiệm được thực hiện với mục tiêu xác định hiệu quả của NAA lên sự tạo rễ. Thí nghiệm được bố trí theo thể thức hoàn toàn ngẫu nhiên gồm 5 nghiệm thức với 7 lần lặp lại, mỗi lần lặp lại là 1 keo, mỗi keo có 1 chồi.

Ký hiệu các nghiệm thức:

1. Nghiệm thức 1: MS (đối chứng)
2. Nghiệm thức 2: MS + NAA 0,5 mg/l
3. Nghiệm thức 3: MS + NAA 1,0 mg/l
4. Nghiệm thức 4: MS + NAA 1,5 mg/l
5. Nghiệm thức 5: MS + NAA 2,0 mg/l

Chỉ tiêu theo dõi:

- Số rễ hình thành/mẫu cấy: Rễ dài từ 0,3 cm
- Chiều cao gia tăng: Đo từ mặt môi trường đến lá cao nhất

Thời gian lấy chỉ tiêu: 45, 60, 75 ngày sau khi cấy.

2.3 Xử lý số liệu

Số liệu được phân tích thống kê bằng phần mềm SPSS với phép thử Duncan

Số liệu phần trăm biến động từ 0 - 100% được chuyển đổi sang dạng $\text{Arcsin} \sqrt{x}$ theo công thức trong bảng tính excel: $\text{ASIN}(\text{SQRT}(x)/10)*180/3.1416$, với x là giá trị phần trăm cần đổi (%), nếu giá trị x là 0% sẽ được thay thế bởi $1/4n$ với n là số

mẫu dựa trên để tính phần trăm, nếu x là 100% sẽ được thay thế bởi $1 - 1/4n$ (Gomez and Gomez, 1994).

Các số liệu là chiều cao gia tăng tương đối (%) được tính như sau:
 (Giá trị sau – Giá trị đầu)

$$\text{Giá trị gia tăng tương đối (\%)} = \frac{\text{Giá trị sau} - \text{Giá trị đầu}}{\text{Giá trị đầu}} \times 100$$

3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Hiệu quả của các phương pháp vô trùng mẫu cây và tuổi mẫu cây

Kết quả Bảng 2 cho thấy rằng 15 ngày sau khi cấy (NSKC) trên môi trường cơ bản MS, xét chỉ tiêu về tỉ lệ mẫu sạch tất cả các phương pháp (PP) vô trùng mẫu cây đều đạt tỉ lệ mẫu sạch. Các phương pháp vô trùng khác nhau đạt tỉ lệ mẫu sạch khác nhau. Không có sự khác biệt mẫu sạch ở Tràm non và Tràm già. Không có sự tương tác giữa tuổi mẫu cây và phương pháp vô trùng.

Bảng 2: Tỉ lệ (%) mẫu sạch của các phương pháp khử trùng theo độ tuổi mẫu cây ở 15 ngày sau khi cấy

Phương pháp (A)	Tuổi mẫu cây (B)		Trung bình
	Tràm non	Tràm già	
PP 1	5,6	0,8	3,2 ^c
PP 2	19,7	8,6	14,2 ^{bc}
PP 3	33,5	23,6	28,5 ^{ab}
PP 4	41,7	38,5	40,1 ^a
PP 5	69,8	60,3	65,1 ^a
Trung bình	34,1	26,4	
F (A)		**	
F (B)		ns	
F (A x B)		ns	
CV (%)		40,1	

Ghi chú: Trong cùng 1 cột, những số có chữ theo sau giống nhau khác biệt không có ý nghĩa thống kê khi dùng phép kiểm định Duncan, (**): khác biệt có ý nghĩa thống kê 1%, (ns): khác biệt không có ý nghĩa thống kê. Các giá trị đã được biến đổi dưới dạng \sqrt{x} để xử lý thống kê, các giá trị trên bảng là giá trị trung bình gốc

Bảng 2 cũng cho thấy ở các nồng độ và thời gian khử trùng khác nhau dẫn đến tỉ lệ sạch khác biệt ở mức ý nghĩa 1%. Tỉ lệ mẫu sạch cao nhất 65,1% khi sử dụng PP 5 và tỉ lệ mẫu sạch thấp nhất 3,2% khi sử dụng PP 1. Tỉ lệ mẫu sạch nhất chỉ đạt 65,1% được giải thích là do thời gian khử mẫu lâu nhất hoặc do mẫu vật là những đoạn thân có mắt lá mang mầm ngủ, phần mắt lá của cây tràm nằm sát thân gây bất lợi cho việc xâm nhập sâu của hóa chất để khử trùng sạch hoàn toàn mẫu vật, hầu hết các mẫu nhiễm phát sinh ở vị trí nách lá, một số mẫu phát sinh ngay vị trí cắt của đoạn thân.

Từ kết quả bảng 1 cho thấy phương pháp khử trùng thích hợp nhất cho cả 2 độ tuổi cây Tràm là Clorox 20% trong 20 phút + HgCl₂ 0,5‰ trong 20 phút (PP 4) vì ở nồng độ hóa chất và thời gian khử trùng này vừa giảm được tỉ lệ nhiễm vừa có tỉ lệ tạo chồi của mẫu cây cao.

3.2 Hiệu quả của nồng độ Benzyl adenine (BA) lên sự nhân chồi từ đoạn thân

Đoạn thân sạch đã được khử trùng ở Thí nghiệm 1 sau 15 ngày nuôi dưỡng trong môi trường MS hình thành một chồi được bố trí vào các nghiệm thức ở Thí nghiệm 2, môi trường MS với các nồng độ BA tăng dần.

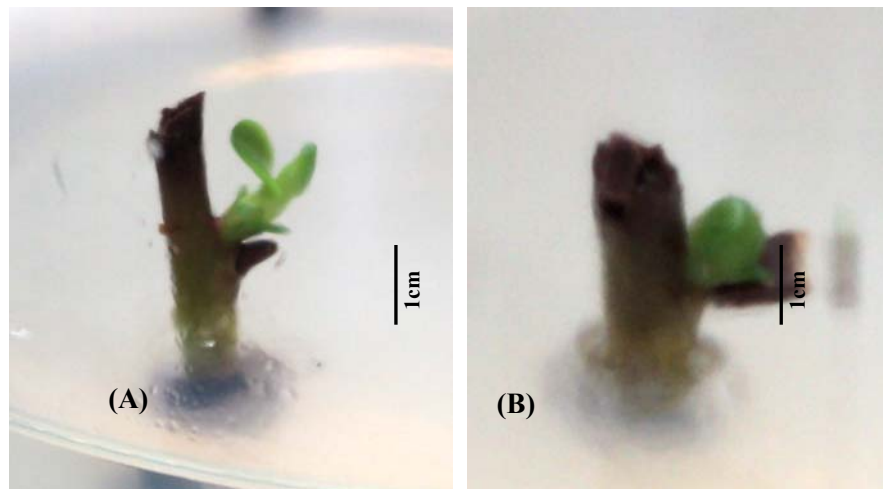
3.2.1 Số chồi gia tăng

Kết quả Bảng 3 cho thấy số chồi gia tăng giữa các nghiệm thức khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở 75 NSKC. Ở 75 NSKC, hầu hết các nghiệm thức đều xuất hiện chồi mới trừ nghiệm thức đối chứng (Hình 1). Theo thời gian số chồi gia tăng ở tất cả nghiệm thức và đạt cao nhất ở 75 NSKC. Khi hàm lượng BA gia tăng có khuynh hướng gia tăng số chồi. Điều này cho thấy sự nhân chồi chịu ảnh hưởng của BA. Theo Nguyễn Đức Lượng và Lê Thị Thủy Tiên (2002) vai trò cytokinin có tác động nhân chồi ở các cây lá rộng.

Bảng 3: Số chồi từ đoạn thân trên môi trường MS dưới ảnh hưởng của các nồng độ BA khác nhau theo thời gian

Hàm lượng BA (mg/l)	Ngày sau khi cấy (NSKC)		
	45	60	75
0	0,0	0,0	0,0 ^c
0,2	2,4	3,6	3,9 ^{bc}
0,5	4,5	7,2	11,3 ^{ab}
0,7	3,3	4,3	4,8 ^{bc}
1,0	4,3	7,0	8,4 ^{ab}
1,5	6,0	8,0	9,8 ^{ab}
2,0	5,2	6,4	15,5 ^a
F	ns	ns	**
CV (%)	109,1	98,7	82,7

*Ghi chú: Trong cùng 1 cột, những số có chữ theo sau giống nhau khác biệt không có ý nghĩa thống kê khi dùng phép kiểm định Duncan (**): khác biệt có ý nghĩa thống kê 1%, (ns): khác biệt không có ý nghĩa thống kê*



Hình 1: Chồi xuất hiện trên đoạn thân tại vị trí nách lá 15 ngày sau khi cấy (A) đoạn thân non, (B) đoạn thân già

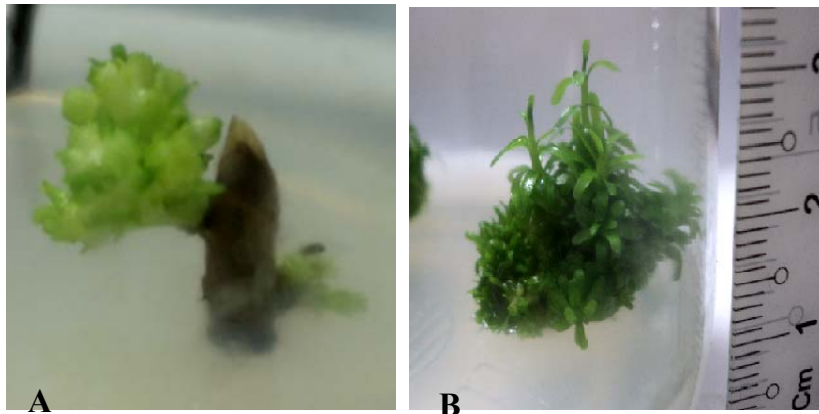
3.2.2 Số lá gia tăng

Kết quả của Bảng 4 cho thấy số lá/ chồi qua các giai đoạn 45, 60, 75 NSKC khác biệt có ý nghĩa thống kê ở 45 và 60 NSKC, nhưng không khác biệt ở 75 NSKC. Ở 45, 60 NSKC, số lá gia tăng ở các nghiệm thức. Ở nghiệm thức đối chứng tăng cao nhất 6,3 lá và khác biệt với nghiệm thức có bổ sung 0,2 mg/l, 1,5 mg/l, 2,0 mg/l BA ở mức ý nghĩa 5%. Trong giai đoạn này, nồng độ BA tác động lên mẫu đã nhiều kéo theo sự gia tăng số lá khác nhau ở các nồng độ khác nhau. Tương tự ở 60 NSKC, số lá gia tăng cao nhất ở nghiệm thức đối chứng 6,9 lá và thấp nhất ở nghiệm thức có bổ sung 0,5 mg/l BA.

Bảng 4: Số lá /chồi từ đoạn thân dưới ảnh hưởng của các nồng độ BA khác nhau theo thời gian

Hàm lượng BA (mg/l)	NSKC		
	45	60	75
0	6,3 ^a	6,9 ^a	6,2
0,2	3,3 ^{bc}	3,7 ^b	4,1
0,5	2,3 ^{abc}	3,0 ^b	4,0
0,7	5,5 ^{ab}	6,0 ^{ab}	6,0
1,0	4,1 ^{abc}	4,6 ^{ab}	4,8
1,5	3,0 ^{bc}	3,4 ^b	3,6
2,0	3,6 ^{bc}	3,8 ^b	4,0
F	*	*	ns
CV (%)	33,0	38,7	35,3

Ghi chú: Trong cùng 1 cột, những số có chữ theo sau giống nhau khác biệt không có ý nghĩa thống kê khi dùng phép kiểm định Duncan ,(ns): Khác biệt không có ý nghĩa thống kê. (*): Khác biệt ở mức ý nghĩa 5%.



Hình 2: Chồi sạch sau khi vô trùng (A), nhân chồi trên môi trường MS có bổ sung 2 mg/l BA ở 75 NSKC (B)

Khi sử dụng nồng độ BA từ 0,5 mg/l trở lên các chồi bên được tạo thành với số lượng nhiều nhưng chồi có kích thước rất nhỏ, không thể kéo dài được, lá bị biến dạng có dạng vẩy xếp khít nhau, chồi có màu xanh nhạt (Hình 2).

3.3 Hiệu quả nồng độ NAA lên sự hình thành rễ

3.3.1 Số rễ tạo thành

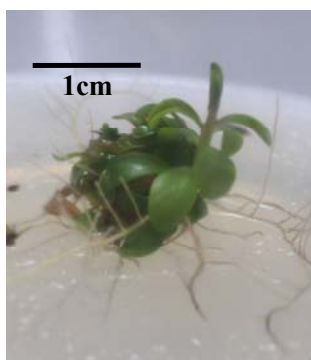
Kết quả bảng 5 cho thấy số rễ tạo ra giữa các nghiệm thức khác biệt có ý nghĩa 1%. Ở 75 NSKC số rễ được tạo ra cao nhất ở nghiệm thức có bổ sung 2,0 mg/l NAA là 5,6 rễ, ở nghiệm thức đối chứng và 0,5 mg/l NAA không có xuất hiện rễ.

Số rễ tạo ra tăng theo nồng độ NAA bổ sung vào môi trường (Hình 3). Số rễ bắt đầu hình thành vào giai đoạn 45 NSKC ở nghiệm thức có bổ sung 1,0 mg/l NAA trở lên do NAA là chất điều hòa sinh trưởng có tác dụng tạo rễ.

Bảng 5: Tỷ lệ (%) số chồi tạo rễ trên môi trường có bổ sung NAA ở các nồng độ khác nhau theo thời gian

Hàm lượng NAA (mg/l)	NSKC		
	45	60	75
0	0,0 ^b	0,0 ^c	0,0 ^b
0,5	0,0 ^b	0,0 ^c	0,0 ^b
1,0	0,4 ^b	0,9 ^b ^c	1,3 ^b
1,5	1,0 ^b	1,9 ^b	2,0 ^b
2,0	2,4 ^a	4,1 ^a	5,6 ^a
F	**	**	**
CV(%)	140,9	101,9	118,9

Trong cùng 1 cột, những số có chữ theo sau giống nhau khác biệt không có ý nghĩa thống kê khi dùng phép kiểm định Duncan, (**): khác biệt có ý nghĩa thống kê 1%.



Hình 3: Sự hình thành rễ của chồi trên môi trường MS + 2,0 mg/l NAA

3.3.2 Chiều cao gia tăng

Kết quả bảng 6 cho thấy chiều cao gia tăng tương đối của mẫu giữa các nghiệm thức khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở các giai đoạn 45, 60 và 75 ngày sau khi cấy. Tỷ lệ gia tăng chiều cao ở nghiệm thức đối chứng không khác biệt so với các nghiệm thức có bổ sung NAA chứng tỏ sự gia tăng chiều cao chồi không chịu ảnh hưởng của NAA.

Bảng 6: Tỷ lệ (%) chiều cao gia tăng tương đối của chồi trên môi trường dưới ảnh hưởng của NAA ở 45, 60, 75 ngày sau khi cấy

Hàm lượng NAA (mg/l)	NSKC		
	45	60	75
0	102,7	138,9	185,1
0,5	65,5	69,6	81,8
1,0	74,2	90,8	136,0
1,5	59,7	75,0	83,6
2,0	71,1	127,7	164,8
F	ns	ns	ns
CV (%)	68,1	90,6	93,6

Trong cùng 1 cột, những số có chữ theo sau giống nhau khác biệt không có ý nghĩa thống kê khi dùng phép kiểm định Duncan, (ns): khác biệt không có ý nghĩa thống kê.

4 KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

4.1 Kết luận

Kết quả vi nhân giống cây Tràm (*Melaleuca cajuputi* Powell) đã đạt được một số kết quả sau:

- Khử trùng bề mặt mẫu cây: sử dụng cồn 70⁰ trong 30 giây, dung dịch Clorox 20% trong 30 phút, HgCl₂ 0,5‰ trong 30 phút là thích hợp cho việc khử trùng đoạn thân mang mầm chồi.
- Môi trường tốt nhất để nhân chồi trực tiếp từ đoạn thân là môi trường MS có bổ sung 2 mg/l BA.
- Tạo rễ cho chồi bằng môi trường MS có bổ sung 2,0 mg/l NAA.

4.2 Đề nghị

- Tiếp tục các thí nghiệm để xác định hệ số nhân chồi.
- Xác định giá thể phù hợp để thuần dưỡng cây con trong nhà lưới.
- Hoàn thiện quy trình vi nhân giống cây Tràm.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Debergh P. and Zimmerman. R.H. 1991. *Micropropagation*. Kluwer Academic Publishers. The Netherland, 71 – 93.
- Gomez, Kwanchai A. and Arturo A. Gomez. 1984. *Statistical procedures for agricultural research, 2nd Edition*. John Wiley & Sons, Inc., pp. 306-308.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Plant Physiol.*, 15, pp. 473 - 74.
- Nguyễn Đức Lượng và Lê Thị Thùy Tiên. 2002. *Công nghệ tế bào*. NXB Đại Học Quốc Gia, TP Hồ Chí Minh.