

**Nghiên cứu nhân giống Dó vân nam (*Aquilaria yunnanensis* S.C.Huang)
và Dó quả nhẵn (*Aquilaria rugosa* K.le-Cong & Kessler)
bằng kỹ thuật nuôi cấy *in vitro***

Hoàng Thị Hằng, Nguyễn Thị Thơ, Khuất Thị Hải Ninh*

Trường Đại học Lâm nghiệp

**Research on propagation of *Aquilaria yunnanensis* S.C.Huang
and *Aquilaria rugosa* K.le-Cong & Kessler by technique *in vitro***

Hoang Thi Hang, Nguyen Thi Tho, Khuat Thi Hai Ninh*

Vietnam National University of Forestry

*Corresponding author: ninhkth@vnuf.edu.vn

<https://doi.org/10.55250/jo.vnuf.14.7.2025.012-021>

TÓM TẮT

Nghiên cứu này trình bày quy trình nhân giống *in vitro* hai loài Dó quý là Dó vân nam (*Aquilaria yunnanensis* S.C.Huang) và Dó quả nhẵn (*Aquilaria rugosa* K.le-Cong & Kessler). Kết quả nghiên cứu cho thấy có hiệu quả cao trong việc khử trùng và nhân nhanh chồi. Việc xử lý mẫu chồi bằng $HgCl_2$ 0,1% trong 4 phút kết hợp với cefotaxime 200 mg/l trong 15 phút đạt tỉ lệ mẫu sạch nảy chồi cao nhất (28,89% đối với Dó vân nam và 37,78% đối với Dó quả nhẵn) sau 8 tuần nuôi cấy. Môi trường tạo cụm chồi và kích thích tăng trưởng chồi đối với loài Dó vân nam là WPM* + 0,1 mg/l BAP + 0,1 mg/l kinetin + 0,3 mg/l NAA + 0,4 mg/l GA₃ + 10 g/l Sucrose và 10 g/l Glucose đạt kết quả 6,59 chồi/mẫu; 3,68 chồi hữu hiệu/mẫu, với chiều cao chồi trung bình 3,38 cm, chồi có chất lượng tốt; đối với loài Dó quả nhẵn là WPM* + 0,1 mg/l BAP + 0,1 mg/l kinetin + 0,3 mg/l NAA + 0,6 mg/l GA₃ + 10 g/l Sucrose và 10g/l Glucose đạt 7,29 chồi/mẫu, 3,26 chồi hữu hiệu/mẫu với chiều cao chồi trung bình 3,61 cm, chồi có chất lượng tốt sau 8 tuần nuôi cấy. Môi trường tạo cây hoàn chỉnh là WPM* + 0,5 mg/l NAA + 0,25 mg/l IBA + 0,5 mg/l IAA + 1mg/l than hoạt tính với tỉ lệ chồi ra rễ đạt 88,9%, 4,15 rễ/chồi và chiều dài rễ đạt 3,57 cm đối với Dó vân nam và 87,78% chồi ra rễ, 4,35 rễ/chồi và chiều dài rễ đạt 3,78 cm đối với Dó quả nhẵn sau 8 tuần nuôi cấy. Nghiên cứu đã thiết lập thành công quy trình nhân giống *in vitro* cho cả hai loài Dó, cung cấp cơ sở khoa học quan trọng cho việc bảo tồn và phát triển nguồn gen quý hiếm này.

ABSTRACT

This study presents the *in vitro* propagation protocol for two valuable *Aquilaria* species: *Aquilaria yunnanensis* and *Aquilaria rugosa*, focusing on optimizing sterilization procedures and culture media formulations. The results of *in vitro* propagation of *A. yunnanensis* and *A. rugosa* demonstrated high efficiency in both sterilization and shoot multiplication. Sterilizing shoot explants with $HgCl_2$ 0.1% for 4 minutes, combined with 200 mg/L cefotaxime for 15 minutes, produced the highest rates of clean and sprouting explants after eight weeks of culture (28.89% for *A. yunnanensis* and 37.78% for *A. rugosa*). The optimal medium for inducing shoot clusters and promoting shoot development in *A. yunnanensis* was WPM supplemented with 0.1 mg/L BAP, 0.1 mg/L kinetin, 0.3 mg/L NAA, 0.4 mg/L GA₃, 10 g/L sucrose, and 10 g/L glucose, resulting in an average of 6.59 shoots/explant, 3.68 effective shoots/explant, and an average shoot height of 3.38 cm, with shoots characterized by good quality, thick stems, green leaves, and well-developed apical buds. For *A. rugosa*, the optimal medium was WPM + 0.1 mg/L BAP + 0.1 mg/L kinetin + 0.3 mg/L NAA + 0.6 mg/L GA₃ + 10 g/L sucrose + 10 g/L glucose*, yielding 7.29 shoots/explant, 3.26 effective shoots/explant, and an average shoot height of 3.61 cm, all exhibiting desirable morphological quality after eight weeks of culture. The best rooting medium for producing complete plantlets was WPM supplemented with 0.5 mg/L NAA, 0.25 mg/L IBA, 0.5 mg/L IAA, and 1 mg/L activated charcoal*. Under these conditions,

Thông tin chung:

Ngày nhận bài: 15/09/2025

Ngày phản biện: 17/10/2025

Ngày quyết định đăng: 19/11/2025

Từ khóa:

Dó quả nhẵn, Dó vân nam,
in vitro, nhân giống.

Keywords:

Aquilaria rugosa, *Aquilaria yunnanensis*, *in vitro*,
propagation.

A. yunnanensis achieved a rooting rate of 88.9%, with 4.15 roots/shoot and an average root length of 3.57 cm, while *A. rugosa* reached 87.78% rooting, 4.35 roots/shoot, and an average root length of 3.78 cm after eight weeks of culture. This research successfully established robust *In vitro* propagation protocols for both *Aquilaria* species, providing a crucial scientific basis for *ex situ* conservation and large-scale production of high-quality seedlings.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Chi Dó trầm được nhiều người biết đến nhờ loại sản phẩm ngoài gỗ nổi tiếng là trầm hương, trầm hương được coi là báu vật của nhân gian, được ví là gỗ của những vị thần, có lẽ vì trầm hương tích tụ tất cả sinh khí của trời đất. Trầm hương là chất nhựa thơm được sinh ra từ cây Dó khi bị tổn thương để bảo vệ vết thương, càng bị thương thì trầm càng được hình thành nhiều theo thời gian. Thế nhưng không phải cây Dó nào khi bị tổn thương là sinh ra trầm, chính vì thế trầm hương đã quý lại càng hiếm hơn. Trong tinh dầu trầm hương có chứa rất nhiều các hợp chất Sesquiterpene khác nhau, đây là các hợp chất có cấu trúc đặc biệt mà không thể tổng hợp nhân tạo được, ngoài ra còn có các axit hữu cơ có khả năng chống oxy hóa cao, có tính kháng viêm và kháng khuẩn rất mạnh, trầm hương còn có các hợp chất có tác dụng an thần làm giảm bớt sự căng thẳng khiến người sử dụng các sản phẩm trầm hương thấy sáng khoái và minh mẫn. Trầm hương được sử dụng trong rất nhiều lĩnh vực như công nghiệp hóa mỹ phẩm, hương liệu, đồ trang trí đặc biệt là đồ trang trí phong thủy với ý nghĩa xua đi những vận khí xấu và mang đến những trường năng lượng tích cực, sử dụng làm nguyên liệu sản xuất dược liệu...

Trong chi Dó trầm có loài Dó vân nam (*Aquilaria yunnanensis* S. C. Huang) bước đầu được xác định trầm hương của Dó vân nam là khá tốt, vì vậy đã bị người dân khai thác nghiêm trọng trong tự nhiên. Ở Việt Nam hiện nay chỉ còn khoảng 20 cá thể loài Dó vân nam tự nhiên ở Khu Bảo tồn thiên nhiên Đồng Sơn - Kỳ Thượng, Hoàng Bồ, Quảng Ninh, tất cả đều trong tình trạng bị đe dọa như chặt đứt thân, bóc vỏ... không phát hiện thấy cây tái sinh hạt. Đây là loài Dó trầm cần được bảo tồn và phát triển ở khu vực Đông Bắc Bộ (Hoàng Văn Sâm và cộng sự, 2019) [1]. Dó quả nhẵn (*Aquilaria*

rugosa) có khả năng hình thành trầm hương trong thân được xác định là khá tốt, vì vậy cũng đã bị khai thác nghiêm trọng trong tự nhiên. Tại Việt Nam quần thể Dó quả nhẵn tự nhiên có kích thước rất nhỏ, hầu như không còn, phân bố rải rác nên nguy cơ tuyệt chủng trong tự nhiên là rất cao. Trên thế giới cả 2 loài Dó vân nam và Dó quả nhẵn thuộc nhóm sẽ nguy cấp (VU) theo phân hạng của IUCN RED LISTS 2022. Vì vậy, nghiên cứu nhân giống Dó vân nam và Dó quả nhẵn bằng kỹ thuật nuôi cấy *in vitro* là cần thiết giúp tạo ra nguồn cây giống có độ đồng đều cao, sạch bệnh trong thời gian ngắn phục vụ tốt cho công tác bảo tồn và phát triển loài cây này.

Nghiên cứu nhân giống *in vitro* các loài trong chi *Aquilaria* đã được một số tác giả thực hiện như: Tran Van Minh (2005) [2] Nguyễn Thị Thơ và cộng sự (2018) [3]; Hoon (2014) [4]; Listiana và cộng sự (2018) [5]; Chandrarathne và cộng sự (2023) [6]; Debnath và cộng sự (2023) [7]; Li và cộng sự (2024) [8]; tuy nhiên, các nghiên cứu về nhân giống *in vitro* 2 loài Dó vân nam và Dó quả nhẵn còn rất hạn chế. Nhưng các nghiên cứu trên là cơ sở quan trọng để nhóm tác giả thực hiện đối với 2 loài cây này.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

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

- Đối tượng nghiên cứu: Dó vân nam (*Aquilaria yunnanensis* S.C.Huang) và Dó quả nhẵn (*Aquilaria rugosa* K.le-Cong & Kessler)

- Vật liệu nghiên cứu: Chồi non cây mẹ loài Dó vân nam được thu thập tại xã Tân Dân, thành phố Hạ Long, tỉnh Quảng Ninh và Dó quả nhẵn được thu thập từ Sa nhơn - Sa thầy – Kontum.

- Địa điểm nghiên cứu: Nghiên cứu được tiến hành tại phòng thí nghiệm 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 và thu thập số liệu

Các công thức thí nghiệm được bố trí 3 lần lặp, 30 mẫu/lặp

Các giai đoạn nuôi cấy trong điều kiện:

- Số giờ chiếu sáng trong ngày: 10 h/ngày.
- Cường độ ánh sáng 2000- 3000 lux
- Nhiệt độ phòng nuôi $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$

a) Tạo mẫu sạch và nuôi cấy khởi động (thí nghiệm 1)

- Chọn mẫu cấy: Là các chồi bên thân cây (dài 10 - 15 cm tính từ ngọn trở xuống, nách lá có chồi ngủ nhưng chưa phát triển) của hai loài Dó vân nam và Dó quả nhẵn được sử dụng làm vật liệu nghiên cứu cho thí nghiệm tạo vật liệu khởi đầu.

- Khử trùng sơ bộ mẫu cấy: Các đoạn chồi bên được cắt bỏ lá để lại cuống lá, rửa sạch mẫu cấy dưới vòi nước chảy, dùng chổi lông để rửa mẫu trong nước xà phòng loãng, sau đó rửa lại cho sạch dưới vòi nước chảy. Tráng nhiều lần bằng nước cất, đựng mẫu trong bình scott.

- Khử trùng trong box cấy: Đầu tiên mẫu được tráng bằng nước cất vô trùng 2-3 lần, mỗi lần lắc khoảng 2-3 phút. Sau đó, mẫu được khử trùng bằng HgCl_2 0,1% 4 phút trước khi được khử trùng bằng cồn 70% trong 0,5 và 1 phút giây hoặc bằng kháng sinh cefotaxime nồng độ 200 mg/l trong 10, 15 và 20 phút (Bảng 1). Cuối cùng, mẫu vật được rửa sạch bằng nước cất vô trùng từ 2-3 lần.

- Nuôi cấy khởi động: Mẫu được khử trùng, cắt thành các đoạn có ít nhất 1 chồi ngủ rồi cấy chuyển sang môi trường WPM* (WPM có bổ sung 0,2 mg/l mỗi loại Folic acid; Biotin và riboflavin) có bổ sung 0,5 mg/l BAP, 20 g/l sucrose, 7 g/l agar.

- Thu thập số liệu: Sau 8 tuần nuôi cấy, chỉ tiêu thu thập là số mẫu sạch nảy chồi.

b) Nhân nhanh chồi

Nghiên cứu ảnh hưởng của loại và nồng độ đường đến khả năng tạo cụm chồi (thí nghiệm 2)

Theo nghiên cứu của Nguyễn Thị Thơ và cộng sự (2018) [3] về nhân giống *in vitro* một số loài Dó trầm ở Việt Nam, giai đoạn nhân chồi tốt nhất trên môi trường WPM* có bổ sung 0,1 mg/l BAP, 0,1 mg/l kinetin, 0,3 - 0,5 mg/l NAA. Kế thừa kết quả này, môi trường WPM* có bổ sung 0,1 mg/l BAP, 0,1 mg/l

kinetin, 0,3 mg/l NAA được sử dụng để tiếp tục nghiên cứu loại và nồng độ đường đến khả năng tạo cụm chồi loài Dó vân nam và Dó quả nhẵn.

- Hai loại đường được sử dụng cho nghiên cứu này là glucose và sucrose ở các nồng độ từ 10, 20, 30, 40 và 50 g/l, hoặc kết hợp glucose, sucrose với nồng độ 10 và 20 g/l (Bảng 2).

- Thu thập số liệu: Kết quả được theo dõi, đánh giá sau 8 tuần nuôi cấy các chỉ tiêu thu thập gồm số chồi/mẫu, số chồi hữu hiệu/mẫu (chồi hữu hiệu là chồi có kích thước ≥ 1 cm), chiều cao chồi.

Nghiên cứu ảnh hưởng GA3 đến khả năng kích thích tăng trưởng chồi (thí nghiệm 3)

Để tăng kích thích sự tăng trưởng chồi *in vitro* môi trường nuôi cấy WPM* có chứa 0,1 mg/l BAP, 0,1 mg/l kinetin, 0,3 mg/l NAA, 7 g/l agar, loại và nồng độ đường được xác định ở thí nghiệm 2, bổ sung Gibberellin ở các nồng độ khác nhau 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 và 1 mg/l (Bảng 3).

- Thu thập số liệu: Kết quả được theo dõi, đánh giá sau 8 tuần nuôi cấy các chỉ tiêu thu thập gồm số chồi/mẫu, số chồi hữu hiệu/mẫu (chồi hữu hiệu là chồi có kích thước ≥ 1 cm), chiều cao chồi.

c) Tạo cây hoàn chỉnh

Nghiên cứu ảnh hưởng của NAA, IBA và IAA đến khả năng ra rễ của chồi in vitro (thí nghiệm 4)

- Các chồi *in vitro* có kích thước 2,5-3 cm được cấy chuyển vào môi trường WPM* có bổ sung 20 g/l sucrose, 7 g/l agar bổ sung phối hợp IBA, NAA, IAA ở các nồng độ 0,25; 0,5 và 1 mg/l với đối chứng là không bổ sung chất điều hòa sinh trưởng (Bảng 4), để đánh giá khả năng hình thành rễ và sự sinh trưởng của rễ *in vitro* Dó vân nam và Dó quả nhẵn.

- Thu thập số liệu: Kết quả được đánh giá sau 8 tuần nuôi cấy các chỉ tiêu thu thập gồm: số chồi ra rễ, số lượng rễ /chồi, chiều dài rễ.

Nghiên cứu ảnh hưởng của than hoạt tính đến khả năng ra rễ của chồi in vitro (thí nghiệm 5)

- Các chồi *in vitro* có kích thước 2,5- 3 cm được cấy chuyển vào môi trường ra rễ thích hợp nhất trong thí nghiệm 4 đồng thời bổ sung thêm than hoạt tính có từ 1; 2; 3; 4; 5 mg/l than hoạt tính (Bảng 5).

- Thu thập số liệu: Kết quả được đánh giá sau

8 tuần nuôi cấy các chỉ tiêu thu thập gồm: số chồi ra rễ, số lượng rễ/chồi, chiều dài rễ

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 VÀ THẢO LUẬN

3.1. Tạo mẫu sạch và nuôi cấy khởi động Dó vân nam và Dó quả nhãn

Để tạo mẫu sạch, vật liệu vào mẫu được sử dụng là đoạn chồi mang mắt ngủ được khử trùng trong box cấy bằng HgCl_2 0,1% trong thời gian 4 phút, kết hợp với khử trùng bằng cồn 70° hoặc cefotaxime trong những khoảng thời gian khác nhau. Mẫu khử trùng xong được cấy vào môi trường WPM* có bổ sung 0,5 mg/l BAP, 20 g/l sucrose, 7 g/l agar. Sau 8 tuần theo dõi theo dõi kết quả được tổng hợp tại Bảng 1.

Bảng 1. Kết quả tạo mẫu sạch từ vật liệu chồi loài Dó vân nam và Dó quả nhãn
(sau 8 tuần nuôi cấy)

Ký hiệu CTTN	Thời gian khử trùng (phút)			Tỷ lệ mẫu sạch nảy chồi (%)	
	HgCl ₂ 0,1%	Cồn 70 %	Cefotaxime (200mg/l)	Dó vân nam	Gió quả nhãn
KT1	4	0,5	0	6,67	18,89
KT2	4	1	0	10,00	27,78
KT3	4	0	10	20,00	31,11
KT4	4	0	15	28,89	37,78
KT5	4	0	20	16,67	30,00
	Sig			0,001	0,03

Bảng 1 cho thấy việc kết hợp HgCl_2 0,1% trong 4 phút với các biện pháp khử trùng bổ sung (cồn 70° hoặc cefotaxime) tạo ra sự khác biệt rõ rệt về tỷ lệ mẫu sạch có khả năng nảy chồi ở cả hai loài Dó vân nam và Dó quả nhãn (do sig đều < 0,05). Khi kết hợp HgCl_2 với cồn, tỷ lệ mẫu sạch nhìn chung thấp, chứng tỏ cồn chỉ hiệu quả với vi sinh vật trên bề mặt và không khống chế tốt nguồn nhiễm sâu trong mô chồi gỗ.

Ngược lại, việc bổ sung cefotaxime giúp tăng đáng kể tỷ lệ mẫu sạch nhờ khả năng ức chế mạnh nhóm vi khuẩn nội sinh – vốn là nguyên nhân phổ biến gây nhiễm trong nuôi cấy các loài gỗ. Ở Dó vân nam, công thức sử dụng cefotaxime trong thời gian thích hợp cho tỷ lệ mẫu sạch nảy chồi cao nhất, đạt 28,89%. Tuy nhiên, khi thời gian xử lý kéo dài hơn, tỷ lệ này lại giảm rõ rệt, cho thấy cefotaxime nồng độ cao có thể gây ức chế phân chia tế bào và làm giảm sức sống của mẫu. Xu hướng tương tự cũng được ghi nhận ở Dó quả

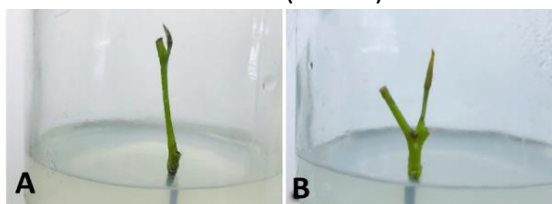
nhãn. Công thức hiệu quả nhất là xử lý mẫu chồi bằng HgCl_2 0,1% trong 4 phút kết hợp cefotaxime 200 mg/L trong thời gian phù hợp, cho tỷ lệ mẫu sạch nảy chồi cao nhất 37,38%.

Theo nghiên cứu của Nguyễn Thị Thơ và cộng sự (2018) [3] về nhân giống *in vitro* một số loài Dó trầm ở Việt nam, trong đó có sử dụng HgCl_2 0,1% trong thời gian 4 phút để khử trùng với tỷ lệ mẫu sạch nảy chồi cao nhất đạt 11,6-19,6%, nghiên cứu này tác giả không sử dụng kháng sinh trong quá trình khử trùng. So với nghiên cứu hiện tại của nhóm tác giả có xử lý mẫu bằng Cefotaxime đã cho tỷ lệ mẫu sạch cao hơn đạt 28,89-37,78%, do vậy Cefotaxime đã góp phần cải thiện rõ rệt tác dụng giảm thiểu nhiễm khuẩn là một yếu tố đặc biệt quan trọng khi nuôi cấy các mẫu dễ nhiễm như chồi Dó vân nam và Dó quả nhãn.

Như vậy với công thức khử trùng mẫu chồi bằng HgCl_2 0,1% trong 4 phút kết hợp với xử lý

cefotaxime nồng độ 200 mg/l trong 15 phút cho tỉ lệ mẫu sạch nảy chồi cao nhất ở loài Dó

vân nam (đạt 28,89%) và Dó quả nhãn (37,78%) (hình 1).



Hình 1. Mẫu sạch tái sinh chồi sau 8 tuần nuôi cấy
(A. mẫu Dó vân nam; B. mẫu Dó quả nhãn)

3.2. Kết quả nhân nhanh chồi Dó vân nam và Dó quả nhãn

3.2.1. Ảnh hưởng của loại và nồng độ đường đến khả năng tạo cụm chồi hai loài Dó.

Môi trường WPM* có bổ sung 0,1 mg/l BAP, 0,1 mg/l kinetin, 0,3 mg/l NAA được sử dụng để

tiếp tục nghiên cứu bổ sung vào môi trường nuôi cấy loại và nồng độ đường đến khả năng nhân nhanh chồi loài Dó vân nam và Dó quả nhãn. Kết quả được thể hiện ở Bảng 2.

3.2.1.1. Kết quả ảnh hưởng của loại và nồng độ đường lên khả năng tạo cụm chồi Dó vân nam

Bảng 2. Ảnh hưởng loại và nồng độ đường đến khả năng nhân nhanh chồi loài Dó vân nam (sau 8 tuần nuôi cấy)

Ký hiệu CTTN	Loại đường		Tỷ lệ mẫu tạo cụm chồi (%)	Số chồi TB/mẫu	Số chồi hữu hiệu/mẫu	Chiều cao TB/chồi (cm)	Đặc điểm chồi
	Sucrose (g/l)	Glucose (g/l)					
S1	10	-	100	4,25	1,82	1,95	++
S2	20	-	100	6,54	2,25	1,73	+++
S3	30	-	100	5,45	2,13	1,83	+
S4	40	-	100	5,04	1,68	1,38	+
S5	50	-	100	4,55	1,61	1,24	+
	TB		100	5,17	1,90	1,63	
	Sig			0,0001	0,0002	0,0001	
	Lsd			0,22	0,18	0,12	
G1	-	10	100	5,54	1,78	2,09	++
G2	-	20	100	6,52	2,45	2,02	+++
G3	-	30	100	6,25	1,98	1,87	+
G4	-	40	100	6,14	1,84	1,76	+
G5	-	50	100	4,97	1,64	1,55	+
	TB		100	5,89	1,94	1,86	
	Sig			0,0001	0,0001	0,0001	
	Lsd			0,27	0,13	0,14	
SG1	10	10	100	6,83	2,73	1,90	+++
SG2	20	10	100	6,41	2,10	1,84	++
SG3	10	20	100	6,03	2,08	1,76	+
	TB		100	6,42	2,30	1,83	
	Sig			0,007	0,0001	0,257	
	Lsd			0,27	0,14		

Ghi chú: Chồi tốt +++: Thân mập, lá xanh, ngọn chồi phát triển mạnh, Chồi Trung bình ++: Thân hơi mảnh, lá xanh nhạt, ngọn chồi phát triển chậm. Chồi xấu +: Thân mảnh, lá vàng, ngọn chồi phát kém.

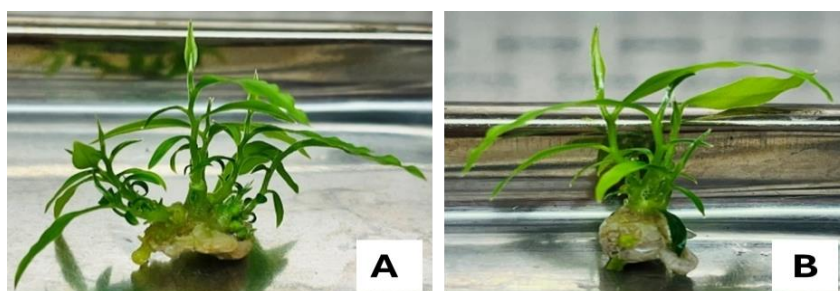
Tất cả các công thức thí nghiệm đều cho 100% mẫu hình thành cụm chồi, tuy nhiên nồng độ và loại đường sử dụng trong môi trường đã ảnh hưởng rõ rệt đến hiệu quả nhân chồi. Phân

tích thống kê cho thấy Sucrose, Glucose và các công thức phối hợp đường đều tác động đáng kể đến số chồi/mẫu, số chồi hữu hiệu và chiều cao chồi (sig < 0,05), ngoại trừ chiều cao chồi

của nhóm đường kết hợp chưa thể hiện khác biệt rõ rệt ($\text{sig} > 0,05$).

Trong nhóm sử dụng Sucrose và Glucose riêng rẽ, nồng độ 20 g/L cho hiệu quả nhân chồi cao nhất (S2 và G2). Ở nhóm công thức phối hợp 2 loại đường, công thức SG1 (10 g/L Sucrose + 10 g/L Glucose) cho kết quả vượt trội nhất với 6,83 chồi/mẫu, 2,73 chồi hữu hiệu/mẫu và chồi có hình thái khỏe, thân mập và lá xanh. So sánh giữa ba công thức tốt nhất (S2, G2 và SG1) cho thấy số chồi/mẫu không khác biệt rõ rệt, nhưng số chồi hữu hiệu và

chiều cao chồi khác biệt có ý nghĩa thống kê, trong đó công thức SG1 (10 g/L Sucrose + 10 g/L Glucose) cho kết quả tốt nhất. Sự phối hợp hai nguồn đường ở nồng độ thấp giúp cân bằng dinh dưỡng và giảm stress thẩm thấu, từ đó nâng cao hiệu quả nhân nhanh chồi. Ngược lại, khi tăng nồng độ đường lên ≥ 30 g/L, làm áp suất thẩm thấu cao có thể gây stress sinh lý, chồi dễ bị mọng nước, làm giảm chất lượng cụm chồi và hạn chế tốc độ nhân ở các chu kỳ tiếp theo (Hình 2B).



Hình 2. Cụm chồi Dó vân nam trong môi trường SG1 (A)
Và môi trường S5 (B) - chồi bị mọng nước

3.2.1.2. Ảnh hưởng của loại và nồng độ đường lên khả năng tạo cụm chồi Dó quả nhẵn

Bảng 3. Ảnh hưởng loại và nồng độ đường đến khả năng nhân nhanh chồi
loài Dó quả nhẵn (sau 8 tuần nuôi cấy)

Ký hiệu CTTN	Loại đường		Tỷ lệ mẫu tạo cụm chồi (%)	Số chồi TB/mẫu	Số chồi hữu hiệu/mẫu	Kích thước TB/chồi (cm)	Đặc điểm chồi
	Sucrose (g/l)	Glucose (g/l)					
S1	10	-	100	5,19	1,65	1,69	++
S2	20	-	100	7,60	2,25	1,97	+++
S3	30	-	100	6,14	2,03	1,83	+
S4	40	-	100	5,76	1,41	1,57	+
S5	50	-	100	4,15	1,51	1,38	+
	TB		100	5,77	1,77	1,69	
	Sig			0,0001	0,0001	0,0001	
	Lsd			0,36	0,16	0,10	
G1	-	10	100	5,74	1,78	1,82	++
G2	-	20	100	7,91	2,76	2,25	+++
G3	-	30	100	7,09	2,08	2,10	+
G4	-	40	100	6,37	1,83	1,94	+
G5	-	50	100	5,01	1,71	1,68	+
	TB		100	6,42	2,03	1,96	
	Sig			0,0001	0,0001	0,0001	
	Lsd			0,29	0,15	0,09	
SG1	10	10	100	8,56	2,97	1,93	+++
SG2	20	10	100	7,65	2,35	1,94	++
SG3	10	20	100	7,23	2,13	1,85	+
	TB		100	7,81	2,48	1,91	
	Sig			0,0001	0,0001	0,199	
	Lsd			0,26	0,13		

Ở loài Dó quả nhẵn, công thức SG1 (10 g/L Sucrose + 10 g/L Glucose) cho kết quả tối ưu với 8,56 chồi/mẫu, 2,97 chồi hữu hiệu/mẫu và chiều cao chồi 1,93 cm, chồi hình thái khỏe mạnh, thân mập, lá xanh và cụm chồi phát triển đều. Hiện tượng chồi mọng nước xuất hiện khi nồng độ đường tăng ≥ 30 g/L, tương tự như ở Dó vân nam.

So sánh với nghiên cứu của Li và cộng sự (2024) [8] trên loài *Aquilaria crassna*, nhóm tác giả chỉ sử dụng 30 g/L sucrose cố định trong

môi trường cảm ứng và nhân chồi, mà không khảo sát ảnh hưởng của loại hay nồng độ đường. Trong nghiên cứu đó, môi trường MS bổ sung 0,4 mg/L 6-BA và 30 g/L sucrose cho hệ số nhân chồi là 2,96. Như vậy, nghiên cứu hiện tại không chỉ đạt số lượng chồi cao hơn (6,82 chồi/mẫu ở SG1 đối với Dó vân nam và 8,67 chồi/mẫu đối với Dó quả nhẵn) mà còn làm rõ sự kết hợp 2 loại đường, cho thấy hiệu quả vượt trội.



Hình 3. Cụm chồi Dó quả nhẵn trong môi trường SG1; môi trường S5 (chồi bị mọng nước)

3.2.2. Ảnh hưởng của Gibberellin đến khả năng kích thích tăng trưởng chồi hai loài Dó

Từ kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của loại và nồng độ đường đến kết quả tạo cụm chồi loài Dó vân nam và Dó quả nhẵn cho thấy hiệu quả tạo cụm chồi rất tốt (100% mẫu tạo cụm chồi) tuy nhiên số chồi hữu hiệu và chiều cao chồi còn hạn chế. Để tạo ra các chồi có chất lượng cho giai đoạn tạo cây hoàn chỉnh cần có

giai đoạn kích thích tăng trưởng chồi nhằm tăng số chồi hữu hiệu trên cụm chồi. Môi trường WPM* có chứa 0,1 mg/l BAP, 0,1 mg/l kinetin, 0,3 mg/l NAA, 10g/l Sucrose và 10 g/l Glucose 7 g/l agar bổ sung Gibberellin ở các nồng độ khác nhau nhằm nghiên cứu khả năng kích thích tăng trưởng chồi. Số liệu được thể hiện ở Bảng 4.

Bảng 4. Ảnh hưởng của Gibberellin khả năng kích thích tăng trưởng chồi 2 loài Dó (sau 8 tuần nuôi cấy)

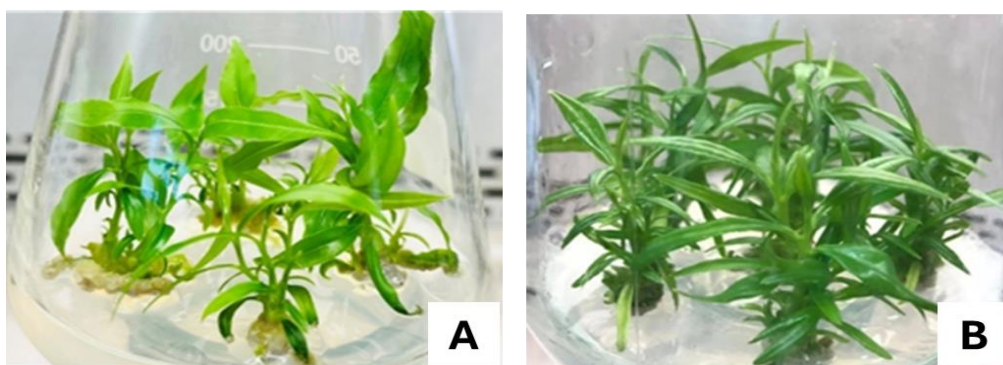
Ký hiệu CTTN	GA3 (mg/l)	Dó vân nam				Dó quả nhẵn			
		Số chồi TB/mẫu	Số chồi hữu hiệu/mẫu	Chiều cao TB/chồi (cm)	Đặc điểm chồi	Số chồi TB/mẫu	Số chồi hữu hiệu/mẫu	Chiều cao TB/chồi (cm)	Đặc điểm chồi
GB1	0,2	5,84	2,57	2,73	++	6,81	3,42	2,89	++
GB2	0,4	6,59	3,68	3,38	+++	6,84	4,08	3,27	++
GB3	0,6	6,53	3,22	3,08	++	7,29	4,26	3,61	+++
GB4	0,8	6,10	3,25	2,64	++	6,73	3,50	3,05	++
GB5	1,0	5,71	3,46	2,16	+	5,34	3,27	2,56	++
TB		6,15	3,24	2,80		6,60	3,71	3,08	
Sig		0,0003	0,0001	0,0002		0,0001	0,0001	0,0004	
Lsd		0,31	0,36	0,29		0,29	0,45	0,37	

Ghi chú: Chồi tốt +++: Thân mập, lá xanh, ngọn chồi phát triển mạnh, Chồi Trung bình ++: Thân hơi mảnh, lá xanh nhạt, ngọn chồi phát triển chậm. Chồi xấu +: Thân mảnh, lá vàng, ngọn chồi phát kém.

Hiệu quả tối ưu của GA3 được ghi nhận ở môi trường GB2 (0,4 mg/L GA3) với Dó vên nam (6,59 chồi/mẫu, 3,68 chồi hữu hiệu, chiều cao 3,38 cm) (hình 4a) và Môi trường GB3 (0,6 mg/L GA3) với Dó quả nhãn (7,29 chồi/mẫu, 3,26 chồi hữu hiệu, chiều cao 3,61 cm) (hình 4b). Ở nồng độ này, GA3 cung cấp cho môi trường nội bào để thúc đẩy phân chia và kéo dài tế bào, giúp chồi khỏe, thân mập, lá xanh và phát triển

cân đối. Khi GA3 thấp hơn, hiệu quả kích thích chồi kém; khi GA3 vượt quá mức tối ưu, hormone gây mất cân bằng nội tiết và stress sinh lý, dẫn đến giảm số lượng và chất lượng chồi.

Như vậy giai đoạn kích thích tăng trưởng chồi, đối với loài Dó vên nam bổ sung vào môi trường nuôi cấy 0,4 mg/l GA3 và đối với loài Dó quả nhãn bổ sung 0,6 mg/l GA3.



Hình 4. Cụm chồi Dó vên nam (A) trong môi trường GB3 và Dó quả nhãn (B) trong môi trường GB4

3.3. Kết quả tạo rễ *in vitro* Dó vên nam và Dó quả nhãn

3.3.1. Ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng đến khả năng ra rễ chồi *in vitro*

Bảng 5. Ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng đến khả năng ra rễ chồi *in vitro* của 2 loài Dó (sau 8 tuần nuôi cấy)

Ký hiệu CTTN	NAA (mg/l)	IBA (mg/l)	IAA (mg/l)	Dó vên nam			Dó quả nhãn		
				Tỷ lệ ra rễ (%)	Số rễ TB/chồi	Chiều dài TB rễ (cm)	Tỷ lệ ra rễ (%)	Số rễ TB/chồi	Chiều dài TB rễ (cm)
ĐC	0	0	0	44,44	1,28	1,51	48,89	1,38	1,57
R1	0,5	0,25	0,25	71,11	3,18	2,66	85,56	3,84	3,33
R2	0,5	0,25	0,50	86,67	3,66	3,04	81,11	3,21	2,94
R3	0,5	0,50	0,25	75,56	3,29	2,95	83,33	2,89	2,71
R4	1,0	0,25	0,25	72,22	2,98	2,86	72,22	2,56	2,39
R5	1,0	0,50	0,25	68,89	2,67	2,65	64,44	2,73	1,83
R6	1,0	0,25	0,50	61,11	2,34	2,12	68,89	2,64	1,62
Xtb				72,89	3,14	2,72	74,00	2,81	2,30
Sig				0,0001	0,0001	0,001	0,0001	0,0001	0,001
Lsd					0,52	0,49		0,55	0,65

Bảng 5 cho thấy khi phân tích thống kê về ảnh hưởng kết hợp NAA, IBA và IAA kết quả cho thấy nồng độ và loại chất điều hòa sinh trưởng có ảnh hưởng rõ tỷ lệ chồi ra rễ, số rễ/chồi, chiều dài rễ loài Dó vên nam và Dó quả nhãn.

Ở tất cả các công thức thí nghiệm có bổ sung kết hợp các chất điều hòa sinh trưởng đều có hiệu quả ra rễ tốt hơn so với đối chứng (không

sử dụng chất điều hòa sinh trưởng). Nhóm công thức kết hợp 3 loại chất điều hòa sinh trưởng công thức R2 (0,5 mg/l NAA + 0,25 mg/l IBA + 0,5 mg/l IAA) cho hiệu quả ra rễ tốt nhất với 86,67%, 3,66 rễ/chồi và rễ dài 3,04 cm đối với Dó vên nam và tỷ lệ chồi ra rễ đạt 86,56%, 3,84 rễ/chồi và chiều dài rễ đạt 3,33 cm đối với Dó quả nhãn

3.3.2. Ảnh hưởng của than hoạt tính đến khả năng ra rễ chồi *in vitro*

Để tiếp tục nâng cao khả năng ra rễ, đối với loài Dó vân nam sử dụng công thức tốt nhất R2 (WPM* + 0,5 mg/l NAA + 0,25 mg/l IBA + 0, 5

mg/l IAA) có bổ sung thêm than hoạt tính với nồng độ 1; 2; 3; 4 và 5 g/l và đối chứng là không bổ sung than hoạt tính. Kết quả được thể hiện ở Bảng 6.

Bảng 6. Ảnh hưởng của than hoạt tính đến khả năng ra rễ chồi *in vitro* 2 loài Dó (sau 8 tuần nuôi cấy)

Ký hiệu CTTN	Than hoạt tính (g/l)	Dó vân nam			Dó quả nhẵn		
		Tỷ lệ ra rễ (%)	Số rễ TB/chồi	Chiều dài TB rễ (cm)	Tỷ lệ ra rễ (%)	Số rễ TB/chồi	Chiều dài TB rễ (cm)
ĐC1	0,0	86,7	3,66	3,04	85,56	3,84	3,33
AC1	1,0	88,9	4,15	3,57	87,78	4,35	3,78
AC2	2,0	75,6	3,51	3,12	71,11	3,93	3,2
AC3	3,0	71,1	2,83	2,92	80,00	2,76	2,86
AC4	4,0	68,9	2,73	2,81	65,56	2,52	2,65
AC5	5,0	74,4	2,52	2,59	62,22	2,18	2,55
Xtb		77,6	3,2	3,0	75,4	3,2	3,0
Sig		0,003	0,001	0,255	0,0001	0,0001	0,005
Lsd			0,48	0,52		0,49	0,38

Đối với loài Dó vân nam, kết quả kiểm tra thống kê cho thấy có sự khác nhau rõ rệt về tỷ lệ chồi ra rễ, số rễ/chồi và chiều dài rễ giữa các công thức thí nghiệm (do sig đều nhỏ hơn 0,05). Kết quả ở Bảng 6 cho thấy công thức AC1 (bổ sung 1 mg/l than hoạt tính) với tỷ lệ chồi ra rễ đạt 88,9%, 4,15 rễ/chồi và chiều dài rễ đạt 3,57 cm tốt hơn so với đối chứng. Khi bổ sung vào môi trường nuôi cấy từ 2 mg/l than hoạt tính thì hiệu quả ra rễ giảm, thậm chí kém hơn so với đối chứng. Than hoạt tính giúp môi trường nuôi cấy có màu tối hơn, tương tự như điều kiện tự nhiên dưới đất, kích thích sự phát triển của rễ. Hơn nữa, bằng cách hấp thụ các hợp chất độc hại, than hoạt tính tạo môi trường thuận lợi cho rễ phát triển nhanh, dài và khỏe. Rễ mới thường nhạy cảm với môi trường xung quanh, và việc giảm stress từ các chất độc giúp rễ hình thành dễ dàng hơn. Tuy nhiên, than hoạt tính có bề mặt rất lớn và hoạt tính hấp phụ mạnh, cho phép nó hấp thụ không chọn lọc nhiều loại phân tử từ môi trường, khi nồng độ than hoạt tính trong môi trường quá cao chúng sẽ hấp phụ vượt mức cần thiết, dẫn đến môi trường thiếu các chất cần thiết cho sự phát triển của cây, khiến cây không đủ dinh dưỡng hoặc các hormone cần thiết để ra rễ. Như vậy, có thể thấy than hoạt tính nếu được sử dụng đúng nồng độ và kết hợp với các yếu tố khác

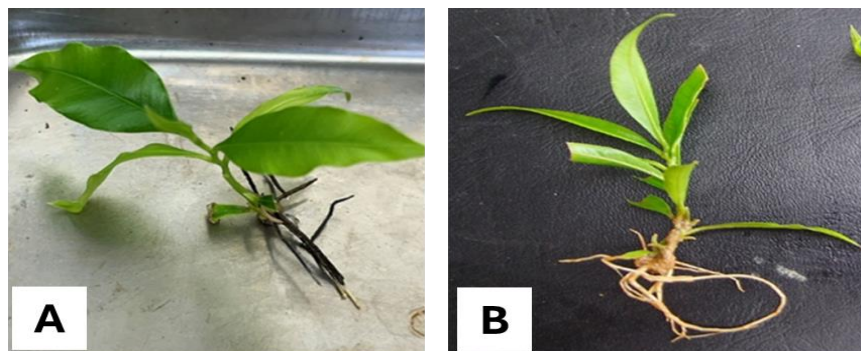
trong môi trường nuôi cấy sẽ hỗ trợ hiệu quả trong giai đoạn ra rễ của chồi *in vitro*. Đối với loài Dó vân nam bổ sung vào môi trường nuôi cấy 1 mg/l than hoạt tính (AC1) sẽ giúp tăng hiệu quả ra rễ của chồi *in vitro* (hình 5a).

Đối với loài Dó quả nhẵn, kết quả kiểm tra thống kê cho thấy có sự khác nhau rõ rệt tỷ lệ chồi ra rễ, số rễ/chồi và chiều dài rễ (sig đều nhỏ hơn 0,05). Công thức AC1 (bổ sung 1 mg/l than hoạt tính) cho hiệu quả tốt nhất với tỷ lệ chồi ra rễ đạt 87,78 %, 4,35 rễ/chồi và chiều dài rễ đạt 3,78 cm (hình 5b).

Theo nghiên cứu của Nguyễn Thị Thơ và cộng sự (2018) [3] về nhân giống *in vitro* một số loài gió trầm ở Việt nam kết quả cho thấy: Sự hình thành rễ *in vitro* tốt khi bổ sung 1,0 mg/l NAA, cho 86,7% số chồi ra rễ, $3,40 \pm 0,4$ rễ/chồi và kích thước rễ là $2,93 \pm 0,42$ cm đối với loài *A. rugosa*; *A. crassna* và *Aquilaira sp.* cùng thích hợp với môi trường có bổ sung 0,5 mg/l NAA, 0,25 mg/l IBA (cho tỷ lệ ra rễ tương ứng đạt 78,9 và 81,1%, số rễ trung bình 2,8 và 3,34, chiều dài rễ 2,3 và 2,57 cm. So sánh kết quả này với kết quả ra rễ của 2 loài Dó vân nam và Dó quả nhẵn cho thấy việc bổ sung 1 mg/l than hoạt tính vào môi trường ra rễ đã cải thiện được chất lượng ra rễ của chồi *in vitro*. Một nghiên cứu khác của Chandrarathne và cộng sự (2023) [6], nghiên cứu nhân giống *in vitro* loài *Aquilaria crassna*

giai đoạn ra rễ tác giả cũng bổ sung vào môi trường nuôi cấy 2 mg/l than hoạt tính hiệu quả ra rễ (tỉ lệ chồi ra rễ đạt 80%, 7 rễ/chồi và 3,8

cm sau 12 tuần nuôi cấy) tốt hơn so với công thức không có than hoạt tính.



Hình 5. Cây *in vitro* hoàn chỉnh loài Dó vân nam (A) và Dó quả nhăn (B) trong môi trường AC1

4. KẾT LUẬN

Tạo mẫu sạch: Xử lý chồi với 0,1% $HgCl_2$ trong 4 phút kết hợp cefotaxime 200 mg/l trong 15 phút cho tỉ lệ mẫu sạch nảy chồi cao nhất (28,89% đối với Dó vân nam và 37,78% đối với Dó quả nhăn).

Nhân nhanh chồi:

- **Dó vân nam:** Môi trường WPM* + 0,1 mg/l BAP + 0,1 mg/l kinetin + 0,3 mg/l NAA + 0,4 mg/l GA_3 + 10 g/l sucrose + 10 g/l glucose, cho 6,59 chồi/mẫu, 3,68 chồi hữu hiệu/mẫu, chiều cao chồi 3,38 cm.

- **Dó quả nhăn:** Môi trường WPM* + 0,1 mg/l BAP + 0,1 mg/l kinetin + 0,3 mg/l NAA + 0,6 mg/l GA_3 + 10 g/l sucrose + 10 g/l glucose, cho 7,29 chồi/mẫu, 4,26 chồi hữu hiệu/mẫu, chiều cao chồi trung bình đạt 3,61 cm.

Tạo cây hoàn chỉnh:

- Môi trường tạo cây con hoàn chỉnh là WPM* + 0,5 mg/l NAA + 0,25 mg/l IBA + 0,5 mg/l IAA + 1 mg/l than hoạt tính, đạt 88,9% chồi ra rễ, 4,15 rễ/chồi, 3,57 cm ở Dó vân nam và 87,78% chồi ra rễ, 4,35 rễ/chồi, 3,78 cm ở Dó quả nhăn.

Lời cảm ơn

Kết quả bài báo là một phần của Đề tài KH&CN: “Nghiên cứu bảo tồn và phát triển nguồn gen loài Dó vân nam (*Aquilaria yunnanensis* S.C.Huang) và Dó quả nhăn (*Aquilaria rugosa* K.le-Cong&Kessler) tại một số tỉnh Đông Bắc và Tây Nguyên”, mã số NVQG-2022/ĐT.11. Nhóm tác giả trân trọng cảm ơn Bộ Khoa học và Công nghệ đã hỗ trợ kinh phí để thực hiện nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. Hoang Van Sam, Nguyen The Nha, Tran Van Chu, Nguyen Thanh Tuan, Nguyen Thi Tho, Do Thanh Tam, Le Bao Thanh, Tran Ngoc Hai, Ha Van Huan, Hoang Thi Hang, Duong Trung Hieu, Claudio Cerboncini & Olarte Alexandra (2019). *Aquilaria yunnanensis* S.C. Huang (Thymelaeaceae), A New Record for the Flora of Vietnam. Forest and Society. 3(2): 202-208.
- [2]. T. Van Minh, (2001). Application of tissue culture techniques in woody species conservation, improvement and development in Vietnam: Agarwood (*Aquilaria crassna* Pierre ex Lecomte) via shoot-tip culture. II International Symposium on Biotechnology of Tropical and Subtropical Species. 692: 37-42.
- [3]. Nguyễn Thị Thơ, Phạm Thị Quỳnh, Nguyễn Thành Tuấn, Vũ Thị Phan, Bùi Văn Thắng, Hà Văn Huân, Phạm Bích Ngọc & Nguyễn Thế Nhã (2018). Nhân giống *in vitro* một số loài Dó trầm (*Aquilaria*) ở Việt Nam. Tạp chí Khoa học và Công nghệ Lâm nghiệp. 6: 24-31.
- [4]. Hoon S. J. C. S. (2014). *In vitro* cultures of *Aquilaria malaccensis* for agarwood production. Doc tor of Philosophy, School of Biosciences, University of Nottingham.
- [5]. Listiana B. E., Sumarjan, Schurr U. & Mulyaningsih T. (2018). *In vitro* regeneration of Agarwood plant (*Aquilaria filaria*). Proceedings of the 3rd International Conference on Science and Technology (ICST).
- [6]. Chandrarathne P., Attanayake A., Weerasinghe P. & Randeniya R. (2023). *In vitro* propagation of *Aquilaria crassna* Pierre. International Journal of Veterinary Science and Agriculture Research. Volume 5 Issue 6, November-December.
- [7]. Debnath B. (2023). *In vitro* response, growth and maintenance of callus of *Aquilaria agallocha* Roxb. (Thymelaeaceae). Bioscience Discovery. 4(2): 155-159.
- [8]. Li X., Chen Z., Hu B. & Zeng B. (2024). Establishment of a Highly Efficient Micropropagation System of *Aquilaria crassna* Pierre ex Lecomte. Forests. 15(10): 1774.
- [9]. Nguyễn Hải Tuất & Nguyễn Trọng Bình (2005). Khai thác và sử dụng SPSS để xử lý số liệu nghiên cứu trong lâm nghiệp. NXB Nông nghiệp, Hà Nội.