

NHÂN GIỐNG *IN VITRO* MỘT SỐ LOÀI DÓ TRÂM (*Aquilaria*) Ở VIỆT NAM

Nguyễn Thị Tho¹, Phạm Thị Quỳnh², Nguyễn Thành Tuấn³, Vũ Thị Phan⁴
Bùi Văn Thắng⁵, Hà Văn Huân⁶, Phạm Bích Ngọc⁷, Nguyễn Thế Nhã⁸

^{1,2,3,4,5,6,8}Trường Đại học Lâm nghiệp

⁷Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

TÓM TẮT

Chi Dó trầm (*Aquilaria*) là nhóm cây có khả năng tạo trầm hương. Trầm hương có chứa tinh dầu trầm - là loại dầu thượng hạng dùng làm hương liệu hay mỹ phẩm cao cấp, trầm hương còn dùng chữa bệnh, làm nhang trầm. Áp dụng phương pháp nhân giống tiên tiến - nhân giống *in vitro* những loài cây này đã thu được một số kết quả nhất định. Quả Dó trầm tươi được lau bằng cồn 70%, khử trùng bằng HgCl₂ 0,1% trong 5 phút, kết hợp với NaClO 5% trong 10 phút cho tỷ lệ hạt sạch và hạt nảy mầm là 84,6 % ở loài *A. crassna*; 72,7% ở *A. rugosa* và *Aquilaria sp.* Khả năng nhân nhanh chồi đạt cao nhất (6,27±1,07 - 6,8±0,87 chồi/mẫu) trên môi trường WPM* có bổ sung 0,1 mg/l BAP, 0,1 mg/l kinetin, 0,3 - 0,5 mg/l NAA, 2% sucrose và 0,7% agar đối với cả 3 loài. Sự hình thành rễ *in vitro* tốt khi bổ sung 1,0 mg/l NAA, 2% sucrose, 0,7% agar, cho 86,7% số chồi ra rễ, 3,40±0,4 rễ/chồi và kích thước rễ là 2,93±0,42 cm đối với loài *A. rugosa*; *A. crassna* và *Aquilaria sp.* cùng thích hợp với môi trường có bổ sung 0,5 mg/l NAA, 0,25 mg/l IBA. Kết quả nghiên cứu cho thấy có thể ứng dụng phương pháp nuôi cấy *in vitro* vào nhân giống 3 loài Dó trầm trên, tạo ra số lượng cây giống lớn, chất lượng cao cung ứng cho nhu cầu trồng và phát triển các loài cây quý này.

Từ khóa: *Aquilaria*, Dó trầm, nhân giống *in vitro*.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Chi Dó trầm (*Aquilaria*) thuộc họ Trâm (Thymelaeaceae) phân bố trong rừng tự nhiên ở các tỉnh miền Trung và miền Nam, nhiều nhất là Gia Lai, Kon Tum, Phú Quốc, Hòn Chông - Kiên Giang và vùng đồi núi An Giang (Thái Thành Luợm, 2009). Ở nước ta hiện đã phát hiện 6 loài thuộc chi *Aquilaria* được gây trồng do có khả năng tạo trầm tốt. Sản phẩm thương mại của Trâm hương gọi là Agarwood và Agar wood oil. Trâm hương và tinh dầu trầm là những sản phẩm quý đa tác dụng, dùng làm hương liệu, mỹ phẩm cao cấp, thuốc chữa bệnh (trúng gió, đau ngực, đau bụng, đau dạ dày, hen suyễn...) và làm hương nhang phục vụ tín ngưỡng tôn giáo. Phần quý hiếm của Dó trầm là trầm hương - phần gỗ trong thân hoặc rễ bị tích tụ nhựa và nhiều hợp chất quý được hình thành do những tổn thương cơ học hoặc sự xâm nhiễm của một số loài nấm, côn trùng gây nên. Đây là lý do khiến người dân săn lùng hầu hết các vùng rừng tự nhiên để tìm trầm và kết quả tất cả các cây nghi có trầm đều bị người tìm trầm chặt nhỏ, đào rễ dẫn đến chúng có nguy cơ tuyệt chủng ngoài tự nhiên. Vì vậy, gây trồng và phát triển cây Dó trầm, tạo những vùng trồng trầm là việc làm cần thiết.

Việc nhân giống Dó trầm chủ yếu bằng hạt, song hạt Dó trầm mất sức nảy mầm rất nhanh, mặt khác mỗi quả thường chỉ có từ 1- 2 hạt. Vì vậy, nguồn cung cấp giống từ hạt gặp nhiều khó khăn. Ngày nay, kỹ thuật nuôi cấy *in vitro* thường được áp dụng, mang lại hiệu quả cao đối với nhân giống một loài cây hoặc là nguồn cung cấp vật liệu cho những nghiên cứu *in vitro* khác.

Trong bài báo này, trình bày kết quả nhân giống cây 3 loài Dó trầm bằng phương pháp nuôi cấy *in vitro* đạt hệ số nhân giống cao.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nguyên liệu

Vật liệu nghiên cứu là đoạn cành non và quả tươi (hạt bên trong có vỏ màu nâu đen) của ba loài Dó trầm: *Aquilaria crassna*, *Aquilaria rugosa* và *Aquilaria sp.* sinh trưởng, phát triển tốt và không bị sâu bệnh đã được tuyển chọn, thu thập tại: Rừng thực nghiệm của Đại học Lâm nghiệp, Quảng Ninh, Hà Tĩnh và Kon Tum.

2.2. Phương pháp

Tạo mẫu sạch Dó trầm:

Đối với mẫu vật là cành: mẫu được làm sạch sơ bộ bằng dung dịch xà phòng loãng và được khử trùng bằng HgCl₂ 0,1% từ 2 - 5 phút. Môi trường MS (Murashige và Skoog, 1962)

có bổ sung 0,1 mg/l Benzylaminopurine (BAP), 20 g/l sucrose và 7 g/l agar được sử dụng làm môi trường nuôi cấy khởi động. Kết quả được theo dõi sau 8 tuần vào mẫu, theo các chỉ tiêu tỷ lệ mẫu sạch, tỷ lệ mẫu sạch tái sinh chồi

Đối với mẫu vật là quả: quả tươi được lau sạch bề mặt vỏ quả bằng cồn 70⁰ kết hợp với HgCl₂ 0,1% trong 5 phút. Tiếp theo, quả được tách vỏ, thu hạt và xử lý hạt theo các cách sau:

CT A: hạt được cấy ngay vào môi trường nuôi cấy; CT B: hạt được khử trùng tiếp bằng NaClO 5% (10 phút); CT C: Kết hợp khử trùng bằng NaClO 5% (10 phút) với tách vỏ hạt.

Môi trường gieo hạt là MS cơ bản. Kết quả được theo dõi sau 4 tuần vào mẫu, theo các chỉ tiêu tỷ lệ hạt sạch, tỷ lệ hạt nảy mầm và thời gian nảy mầm của hạt.

Nhân nhanh chồi Dó trầm *in vitro*: Vật liệu cho nội dung nghiên cứu này là các đoạn thân, chồi *in vitro* có kích thước khoảng 1,5 cm được cấy vào môi trường dinh dưỡng MS, WPM (McCown and Lloyd, 1981) và WPM* (WPM có bổ sung 0,2 mg/l mỗi loại Folic acid; Biotin và riboflavin), cùng được bổ sung 0,1 mg/l BAP, 20 g/l sucrose và 7 g/l agar. Các chồi *in vitro* thu được từ các thí nghiệm trên có độ đồng đều cao 1,5 cm, khỏe mạnh sẽ được cấy chuyển sang các công thức môi trường nhân nhanh chồi mới: WPM* có bổ sung 0,1-0,4 mg/l BAP, kết hợp với 0,1 mg/l kinetin và 0,1 - 0,5 mg/l α - naphthaleneacetic acid (NAA), 20 g/l sucrose và 7 g/l agar. Kết quả

thí nghiệm được thu thập sau 6 tuần nuôi cấy, theo các chỉ tiêu: tỷ lệ mẫu tạo đa chồi, số chồi tái sinh/mẫu và số chồi hữu hiệu.

Tạo cây hoàn chỉnh từ chồi Dó trầm *in vitro*: Chồi *in vitro* đạt tiêu chuẩn (mập, lá xanh đậm, kích thước từ 3 - 4 cm) được chuyển sang môi trường cảm ứng rễ là môi trường WPM* có bổ sung, 0,5 - 1,0 mg/l NAA riêng lẻ hoặc kết hợp với 0,25 mg/l indole-3-butyric acid (IBA), 20 g/l sucrose, 7 g/l agar. Kết quả được thu thập sau 8 tuần nuôi cấy, theo các chỉ tiêu: tỷ lệ chồi ra rễ, số rễ trung bình/chồi và kích thước rễ.

Tất cả các môi trường nuôi cấy được chuẩn độ đến pH = 5,7; khử trùng ở 121°C, áp suất 1,5 atm trong 20 phút. Nuôi mẫu ở điều kiện: nhiệt độ phòng nuôi 25±2°C, cường độ chiếu sáng 3.000 lux, thời gian chiếu sáng 16 giờ/ngày. Các thí nghiệm được bố trí trong các bình trụ 200 ml (5 mẫu/bình). Mỗi công thức thí nghiệm lặp lại 3 lần. Số liệu được xử lý bằng phần mềm Microsoft Excel và phần mềm SPSS version 20 với mức sai khác có ý nghĩa p = 0,05.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả tạo mẫu sạch Dó trầm

3.1.1. Kết quả tạo mẫu sạch Dó trầm từ mẫu vật đoạn cành

Những đoạn cành Dó trầm được khử trùng bằng HgCl₂ 0,1% với thời gian khác nhau và thu được kết quả sau 8 tuần theo dõi như ở bảng 1.

Bảng 1. Kết quả tạo mẫu sạch Dó trầm từ vật liệu đoạn cành

| Loài Dó trầm | Thời gian khử trùng (phút) | Tỷ lệ mẫu sạch (%) | Tỷ lệ mẫu tái sinh chồi (%) |
|----------------------|----------------------------|--------------------|-----------------------------|
| <i>A. crassna</i> | 2 | 5,0 | 5,0 |
| | 3 | 14,5 | 14,5 |
| | 4 | 20,8 | 19,4 |
| | 5 | 27,7 | 16,9 |
| <i>A. rugosa</i> | 2 | 2,2 | 2,2 |
| | 3 | 6,7 | 4,4 |
| | 4 | 14,0 | 11,6 |
| | 5 | 15,0 | 5,0 |
| <i>Aquilaria sp.</i> | 2 | 4,8 | 2,4 |
| | 3 | 8,9 | 6,7 |
| | 4 | 11,6 | 11,6 |
| | 5 | 15,6 | 6,7 |
| Sig. | | 0,002 | 0,013 |

Từ kết quả trên cho thấy việc tạo mẫu sạch từ đoạn cành Dó trầm gặp rất nhiều khó khăn, tỷ lệ mẫu sạch ở tất cả các công thức thí nghiệm đều rất thấp, dẫn đến số mẫu có khả năng tái sinh chồi cũng thấp. Cụ thể, khi sử dụng HgCl₂ 0,1% trong 2 phút ở cả 3 loài đều cho tỷ lệ mẫu sạch cũng như tỷ lệ mẫu sạch tái sinh chồi chỉ từ 2,2 - 5,0%, mẫu xanh không bị tổn thương bởi hóa chất khử trùng nhưng bị nhiễm nấm và vi khuẩn rất nhiều trong khoảng 3 - 5 ngày kể từ khi vào mẫu. Khi tăng thời gian khử trùng lên 3 - 5 phút, tỷ lệ mẫu sạch tăng lên ở cả 3 loài nghiên cứu, cao nhất chỉ đạt 27,7% ở loài *A. crassna* ở công thức 5 phút. Tuy nhiên, thời gian khử trùng 5 phút lại gây ảnh hưởng lớn đến khả năng tái sinh chồi của mẫu cây (đạt 5,0% ; 5,6% và 16,9% lần lượt ở *A. rugosa*, *Aquilaria sp.* và *A. crassna*), nhiều mẫu sạch không có khả năng tái sinh chồi do bị thâm, đen sau khoảng 7 - 10 ngày nuôi cấy. Ở những nghiệm thức sử dụng thời gian khử trùng 4 phút có tỷ lệ mẫu sạch cao hơn ở công thức 2 - 3 phút, thấp hơn công thức 5 phút nhưng tỷ lệ mẫu có khả năng tái sinh chồi lại cao nhất. Đối

với hai loài *A. rugosa* và *Aquilaria sp.* có tỷ lệ tái sinh chồi bằng nhau đạt 11,6%, *A. crassna* là 19,4% khi dùng HgCl₂ 0,1% trong 4 phút.

Khả năng nhiễm nấm bệnh lớn và tỷ lệ tái sinh chồi không cao của các mẫu cây có thể do các mẫu được thu thập từ những cây Dó trầm ngoài rừng tự nhiên hoặc rừng trồng, mặt khác mẫu được vận chuyển một quãng đường dài về nơi nghiên cứu nên có thể làm giảm sức sống của mẫu vật. Thực tế, ở cả 4 công thức thí nghiệm của loài *A. crassna* các chỉ số theo dõi đều cao hơn so với hai loài còn lại do một phần mẫu vật của loài này được thu thập tại khu rừng thực nghiệm của Trường Đại học Lâm nghiệp, mẫu được xử lý ngay sau thu thập nên có phân sạch và sức tái sinh chồi tốt hơn. Như vậy, việc sử dụng HgCl₂ 0,1% ít có hiệu quả đối với mẫu vật là các đoạn cành Dó trầm.

3.1.2. Kết quả tạo mẫu sạch từ quả tươi (hạt)

Quả tươi Dó trầm được khử trùng bằng HgCl₂ 0,1% có hoặc không kết hợp với NaClO 5%, có hoặc không tách vỏ hạt và thu được kết quả sau 4 tuần theo dõi như ở bảng 2.

Bảng 2. Kết quả tạo mẫu sạch Dó trầm từ quả (hạt)

| Loài | Công thức thí nghiệm | Tỷ lệ hạt sạch (%) | Tỷ lệ hạt nảy mầm (%) | Thời gian nảy mầm (ngày) |
|--------------------------|----------------------|--------------------|-----------------------|--------------------------|
| <i>Aquilaria crassna</i> | CT A | 60,7 | 17,0 | 25 - 28 |
| | CT B | 89,9 | 59,7 | 15 - 17 |
| | CT C | 84,6 | 84,6 | 5 - 7 |
| <i>Aquilaria rugosa</i> | CT A | 40,6 | 15,6 | 25 - 30 |
| | CT B | 77,1 | 60,0 | 15 - 17 |
| | CT C | 72,7 | 72,7 | 5 - 7 |
| <i>Aquilaria sp.</i> | CT A | 50,0 | 20,0 | 25 - 28 |
| | CT B | 80,0 | 65,7 | 15 - 17 |
| | CT C | 75,8 | 72,7 | 5 - 7 |
| Sig. | | 0,0001 | 0,0001 | |

Từ kết quả trên cho thấy, sử dụng quả tươi làm mẫu vật nghiên cứu cho kết quả tương đối khả quan. Tuy nhiên, tùy mức độ xử lý quả tươi mà tỷ lệ mẫu sạch cũng như tỷ lệ hạt nảy mầm có sự khác biệt rõ rệt. Cụ thể, CT A thu được tỷ lệ mẫu sạch ở cả 3 loài đều thấp nhất chỉ đạt từ 40,6 - 60,7%, tỷ lệ nảy mầm rất thấp chỉ đạt 15,6 - 20%. Ngoài ra, thời gian hạt bắt đầu nảy mầm dài nhất (từ 25 - 30 ngày), sau

thời gian theo dõi 4 tuần, một số hạt tiếp tục nảy mầm rải rác. Ngược lại, ở CT B - sau khi hạt được thu từ quả đã khử trùng sẽ được khử trùng tiếp bằng NaClO 5% trong 10 phút cho tỷ lệ mẫu sạch vượt hẳn ở cả 3 loài (77,1 - 89,9%), tỷ lệ nảy mầm cũng tăng lên rõ rệt (59,7 - 65,7%), đặc biệt thời gian hạt bắt đầu nảy mầm đã được rút ngắn còn 15 - 17 ngày. Điều này có thể giải thích, nhờ được khử trùng

thêm bằng NaClO đã làm giảm bớt nguồn bệnh tạp nhiễm trên hạt, đồng thời lớp cutin bao ngoài vỏ hạt bị bong tróc trong quá trình lắc mẫu nên đã làm cho các hạt dễ hút nước từ môi trường và tốc độ nảy mầm của hạt được cải thiện đáng kể. Đối với CT C - hạt được tách vỏ trước khi cấy vào môi trường nên phần phôi tiếp xúc trực tiếp với môi trường hút nước một cách dễ dàng nên khả năng nảy mầm rất nhanh, phần lớn hạt nảy mầm sau 5 ngày và gần như 100% số hạt sạch có khả năng nảy mầm trong 4 tuần theo dõi ở cả ba loài Dó trầm nghiên cứu.

3.2. Kết quả nhân nhanh chồi Dó trầm

3.2.1. Ảnh hưởng của môi trường dinh dưỡng đến khả năng nhân nhanh chồi

Trong nuôi cấy *in vitro*, môi trường dinh dưỡng là một trong số những nhân tố quan trọng có ảnh hưởng lớn đến sự sinh trưởng phát triển, phát sinh hình thái và khả năng tái sinh chồi của mẫu cấy. Môi trường dinh dưỡng cung cấp các muối khoáng đa lượng, vi lượng và các vitamin cần thiết cho tế bào, mô thực vật sinh trưởng, phát triển *in vitro*. Lê Văn Thành và cộng sự (2010) và Tran Van Minh (2005), khi nghiên cứu nhân giống *in vitro* loài *A. crassna* đã cho thấy môi trường dinh dưỡng có ảnh hưởng đến khả năng nhân và sinh trưởng chồi.

Bảng 3. Ảnh hưởng của môi trường dinh dưỡng đến khả năng nhân nhanh chồi

| Loài Dó trầm | Môi trường dinh dưỡng | Tỷ lệ mẫu tạo cụm chồi (%) | Số chồi trung bình/mẫu | Số chồi hữu hiệu/mẫu | Đặc điểm chồi |
|--------------------------|-----------------------|----------------------------|-------------------------|--------------------------|---------------|
| <i>Aquilaria crassna</i> | MS | 72,2 | 5,83±1,22 ^{ab} | 0,97±0,25 ^d | + |
| | WPM | 86,7 | 4,90±0,66 ^{bc} | 1,23±0,25 ^{cd} | ++ |
| | WPM* | 96,7 | 5,67±0,35 ^{ab} | 1,70±0,10 ^{ab} | +++ |
| <i>Aquilaria rugosa</i> | MS | 74,4 | 6,27±0,61 ^a | 1,37±0,21 ^{bcd} | + |
| | WPM | 90,0 | 4,83±0,78 ^{bc} | 1,27±0,40 ^{bcd} | ++ |
| | WPM* | 98,9 | 6,23±0,45 ^a | 1,90±0,20 ^a | +++ |
| <i>Aquilaria sp.</i> | MS | 71,1 | 4,07±0,74 ^c | 1,03±0,21 ^d | + |
| | WPM | 86,7 | 4,87±0,40 ^{bc} | 1,30±0,26 ^{bcd} | ++ |
| | WPM* | 94,4 | 5,33±0,67 ^{ab} | 1,63±0,15 ^{abc} | +++ |
| | Sig. | 0,0001 | 0,016 | 0,002 | |

Ghi chú: Trong phạm vi cùng một cột, các giá trị mang các chữ cái khác nhau chỉ sự sai khác có ý nghĩa thống kê theo Duncan's test ở mức P = 0,05, +: xấu, ++: trung bình, +++: tốt.

Kết quả thu được (bảng 3) cho thấy rằng tỷ lệ mẫu tạo cụm chồi, số chồi trung bình/mẫu và số chồi hữu hiệu/mẫu (chồi hữu hiệu là những chồi có kích thước từ 1 cm trở lên, khỏe mạnh) đều chịu ảnh hưởng rõ rệt của môi trường dinh dưỡng. Trong 3 loại môi trường: MS, WPM và WPM*, WPM* là môi trường thích hợp đối với giai đoạn nhân nhanh chồi Dó trầm *in vitro*, thể hiện ở tỷ lệ mẫu tạo cụm chồi, số chồi trung bình/mẫu và số chồi hữu hiệu ở cả ba loài đều đạt giá trị cao. Đối với hai loài *A. crassna* và *A. rugosa* số chồi trung bình/mẫu của công thức WPM* và MS là tương đương nhau, nhưng số chồi hữu hiệu ở công thức WPM* cao hơn rõ rệt, chồi có độ

đồng đều cao, lá xanh và gốc cụm chồi hóa mô sẹo ít hơn. Ở môi trường MS, phần gốc chồi của nhiều mẫu bị phình to lên bất thường, từ đó mọc ra nhiều chồi nhưng các chồi sinh trưởng kém và có biểu hiện của sự mọng nước. Trong khi, các mẫu cấy ở môi trường WPM khắc phục được hiện tượng trên, chồi sinh trưởng tốt hơn ở môi trường MS, nhưng khả năng tái sinh chồi thấp hơn. Để cải thiện khả năng tái sinh chồi của mẫu cấy trên môi trường WPM, một số vitamin đã được bổ sung thêm (WPM*) và kết quả thu được cho thấy WPM* là thích hợp nhất: ở cả 3 loài tỷ lệ tạo cụm chồi đạt từ 94,4 - 98,9%, số chồi trung bình/mẫu (5,33 - 6,23) và số chồi hữu hiệu (1,63 - 1,9).

Trong đó, loài *A. rugosa* có các chỉ số theo dõi cao hơn hai loài còn lại. Kết quả nghiên cứu này phù hợp với Tran Van Minh (2005) và Lê Văn Thành và cộng sự (2010) khi nghiên cứu nuôi cấy *in vitro* loài *A. crassna*, môi trường WPM hay WPM biến đổi là thích hợp cho giai đoạn nhân chồi. Nhưng với loài *A. hirta* (Nor Hasnida Hassan và cộng sự, 2011) môi trường MS lại thích hợp hơn đối với nhân chồi (6,1 chồi/cụm), song WPM có khả năng kích thích tăng trưởng chồi tốt hơn. Điều này cho thấy nguồn gen khác nhau của các loài Dó trăm có phản ứng khác nhau với cùng môi trường dinh dưỡng.

3.2.2. Ảnh hưởng của nồng độ BAP, kinetin và NAA đến khả năng nhân nhanh chồi

Một trong những yếu tố có ảnh hưởng mạnh mẽ nhất đến khả năng nhân nhanh chồi *in vitro* là chất điều hòa sinh trưởng. Sự cân bằng tỷ lệ cytokine và auxin trong đó cytokine lớn hơn auxin quyết định sự biệt hóa chồi. Vì vậy, sự tổ hợp hai nhóm chất này ở các nồng độ khác nhau sẽ cho hiệu quả nhân chồi khác nhau. Kết quả đánh giá sự tác động tổng hợp của BAP, kinetin và NAA lên khả năng nhân chồi Dó trăm sau 6 tuần được thể hiện trong bảng 4.

Bảng 4. Ảnh hưởng của nồng độ BAP, kinetin và NAA đến nhân nhanh chồi

| Loài Dó trăm | Công thức nghiên cứu | Chất điều hòa sinh trưởng (mg/l) | | | Số chồi trung bình/mẫu | Số chồi hữu hiệu/mẫu | Đặc điểm chồi |
|--------------------------|----------------------|----------------------------------|---------|-----|-------------------------|----------------------------|---------------|
| | | BAP | Kinetin | NAA | | | |
| <i>Aquilaria crassna</i> | AC1 | 0,1 | | | 5,63±1,49 ^c | 2,00±0,20 ^{cdef} | ++ |
| | AC2 | 0,2 | | 0,1 | 6,17±0,76 ^{bc} | 2,10±0,20 ^{bcde} | ++ |
| | AC3 | 0,3 | 0,1 | | 7,10±1,21 ^{bc} | 1,80±0,62 ^{def} | ++ |
| | AC4 | 0,4 | | | 9,20±1,18 ^a | 1,40±0,50 ^d | + |
| | AC5 | 0,1 | | 0,3 | 6,70±0,80 ^{bc} | 2,47±0,46 ^{abcd} | +++ |
| | AC6 | 0,1 | | 0,5 | 6,80±0,87 ^{bc} | 2,33±0,45 ^{abcde} | +++ |
| <i>Aquilaria rugosa</i> | AR1 | 0,1 | | | 6,57±0,61 ^{bc} | 2,70±0,26 ^{abc} | +++ |
| | AR2 | 0,2 | | | 6,70±0,53 ^{bc} | 2,27±0,31 ^{bcde} | ++ |
| | AR3 | 0,3 | 0,1 | 0,1 | 6,70±0,72 ^{bc} | 2,20±0,10 ^{bcde} | ++ |
| | AR4 | 0,4 | | | 7,50±1,05 ^b | 2,20±0,10 ^{bcde} | ++ |
| | AR5 | 0,1 | | 0,3 | 6,73±0,47 ^{bc} | 2,97±0,32 ^a | +++ |
| | AR6 | 0,1 | | 0,5 | 6,77±1,00 ^{bc} | 2,77±0,45 ^{ab} | +++ |
| <i>Aquilaria sp.</i> | AS1 | 0,1 | | 0,1 | 5,40±0,82 ^c | 2,13±0,15 ^{bcde} | ++ |
| | AS2 | 0,2 | | 0,1 | 5,60±0,56 ^c | 2,07±0,32 ^{bcdef} | ++ |
| | AS3 | 0,3 | 0,1 | 0,1 | 6,40±0,75 ^{bc} | 1,80±0,30 ^{def} | + |
| | AS4 | 0,4 | | | 6,37±0,55 ^{bc} | 1,70±0,53 ^{ef} | + |
| | AS5 | 0,1 | | 0,3 | 5,63±0,31 ^c | 2,20±0,40 ^{bcde} | +++ |
| | AS6 | 0,1 | | 0,5 | 6,27±1,07 ^{bc} | 2,23±0,15 ^{bcde} | +++ |
| | | Sig. | | | 0,003 | 0,001 | |

Ghi chú: Trong phạm vi cùng một cột, các giá trị mang các chữ cái khác nhau chỉ sự sai khác có ý nghĩa thống kê theo Duncan's test ở mức P = 0,05; +: xấu, ++: trung bình, +++: tốt.

Kết quả nghiên cứu cho thấy, các tổ hợp chất điều hòa sinh trưởng có ảnh hưởng rõ rệt lên quá trình nhân nhanh chồi của hai loài *A. crassna* và *Aquilaria sp.* ở cả hai chỉ tiêu: số chồi trung bình/mẫu và số chồi hữu hiệu/mẫu. Ở hai loài này, có chung một quy luật là: ở

nồng độ BAP 0,1 và 0,2 mg/l số chồi trung bình/mẫu thấp hơn hai công thức có bổ sung 0,3 và 0,4 mg/l BAP, nhưng số chồi hữu hiệu lại cao hơn. Đặc biệt đối với loài *A. crassna*, khi bổ sung BAP 0,4 mg/l kết hợp với 0,1 mg/l kinetin và 0,1 mg/l NAA đã làm tăng số

chồi/mẫu lên đến 9,2 nhưng các chồi ngắn, lá nhỏ nên số chồi hữu hiệu chỉ đạt 1,4 chồi/mẫu (hình 1.g). Khi giữ nồng độ BAP 0,1 mg/l kết hợp với 0,1 mg/l kinetin và 0,3 - 0,5 mg/l NAA đã làm tăng số chồi hữu hiệu/mẫu lên, chồi tăng trưởng mạnh về chiều cao, lá mở rộng, xanh mượt hơn trong khi số chồi/mẫu tăng không đáng kể thậm chí giảm gặp ở loài *A. crassna*.

Đối với loài *A. rugosa* giữa các tổ hợp chất điều hòa sinh trưởng thử nghiệm, gần như không có sự khác biệt rõ rệt về số chồi trung bình/mẫu (kết quả dao động từ 6,57 - 7,5 chồi/mẫu), nhưng số chồi hữu hiệu/mẫu có sự khác biệt (giá trị cao nhất 2,97 chồi/mẫu thu nhận được khi bổ sung 0,1 mg/l BAP, 0,1 mg/l kinetin và 0,3 mg/l NAA). Như vậy, ba loài *Aquilaria* nghiên cứu có phản ứng khác nhau chút ít với chất điều hòa sinh trưởng trong quá trình nhân nhanh chồi *in vitro*. Tuy nhiên, xu hướng chung sử dụng hàm lượng BAP và kinetin thấp (0,1 mg/l), kết hợp với từ 0,3 - 0,5 mg/l NAA thu được trên 6 chồi cho mỗi mẫu

và số chồi hữu hiệu cao hơn (trung bình từ 2,2 - 2,97), chồi nhiều lá, xanh tăng trưởng chiều cao tốt, có thể sử dụng cho các nghiên cứu tiếp theo. Như vậy, xét trên cả 3 chỉ tiêu theo dõi đối với các loài *Aquilaria* nghiên cứu nên sử dụng công thức môi trường WPM* có bổ sung 0,1 mg/l BAP; 0,1 mg/l kinetin và 0,3 - 0,5 mg/l NAA cho quá trình nhân nhanh chồi. Kết quả nghiên cứu này khá tương đồng với tác giả Tran Van Minh (2005) thu được 5 - 6 chồi/cụm trên môi trường WPM có bổ sung 0,1 mg/l BA và 0,1 mg/l NAA hay Debnath B. và cộng sự (2013) thu được hệ số nhân chồi *A. agallocha* tăng lên 18 lần khi cây chuyển các chồi mới tái sinh sang môi trường MS có bổ sung nồng độ BAP thấp (0,2 mg/l).

3.3. Kết quả tạo cây Dó trầm hoàn chỉnh

Cảm ứng rễ *in vitro* của 3 loài Dó trầm được đánh giá qua 4 công thức sử dụng NAA riêng lẻ và kết hợp với IBA ở các nồng độ khác nhau. Kết quả được ghi nhận sau 8 tuần nuôi cấy và được thể hiện trong bảng 5.

Bảng 5. Ảnh hưởng của nồng độ NAA và IBA đến hiệu quả ra rễ của 3 loài Dó trầm

| Loài | Chất điều hòa sinh trưởng (mg/l) | | Tỷ lệ ra rễ (%) | Số rễ TB/chồi | Kích thước rễ (cm) |
|----------------------|----------------------------------|------|-----------------|----------------------------|-----------------------------|
| | NAA | IBA | | | |
| <i>A. crassna</i> | 0,5 | - | 47,8 | 1,93 ± 0,32 ^e | 2,33 ± 0,15 ^{cd} |
| | 1,0 | - | 62,2 | 2,30 ± 0,44 ^{cde} | 2,53 ± 0,12 ^{abcd} |
| | 0,5 | 0,25 | 78,9 | 2,80 ± 0,40 ^{bc} | 2,30 ± 0,17 ^{cd} |
| | 1,0 | 0,25 | 53,3 | 2,33 ± 0,15 ^{cde} | 2,20 ± 0,10 ^d |
| <i>A. rugosa</i> | 0,5 | - | 61,1 | 2,60 ± 0,17 ^{bcd} | 2,43 ± 0,15 ^{bcd} |
| | 1,0 | - | 86,7 | 3,40 ± 0,40 ^a | 2,93 ± 0,42 ^a |
| | 0,5 | 0,25 | 75,6 | 2,93 ± 0,25 ^{ab} | 2,50 ± 0,20 ^{abcd} |
| | 1,0 | 0,25 | 66,7 | 2,20 ± 0,26 ^{de} | 2,23 ± 0,21 ^{cd} |
| <i>Aquilaria sp.</i> | 0,5 | - | 62,2 | 2,50 ± 0,26 ^{bcd} | 2,30 ± 0,36 ^{cd} |
| | 1,0 | - | 72,2 | 2,43 ± 0,21 ^{bcd} | 2,80 ± 0,36 ^{ab} |
| | 0,5 | 0,25 | 81,1 | 3,34 ± 0,15 ^a | 2,57 ± 0,15 ^{abcd} |
| | 1,0 | 0,25 | 68,9 | 2,67 ± 0,15 ^{bcd} | 2,67 ± 0,15 ^{bc} |
| | Sig. | | 0,0001 | 0,0001 | 0,015 |

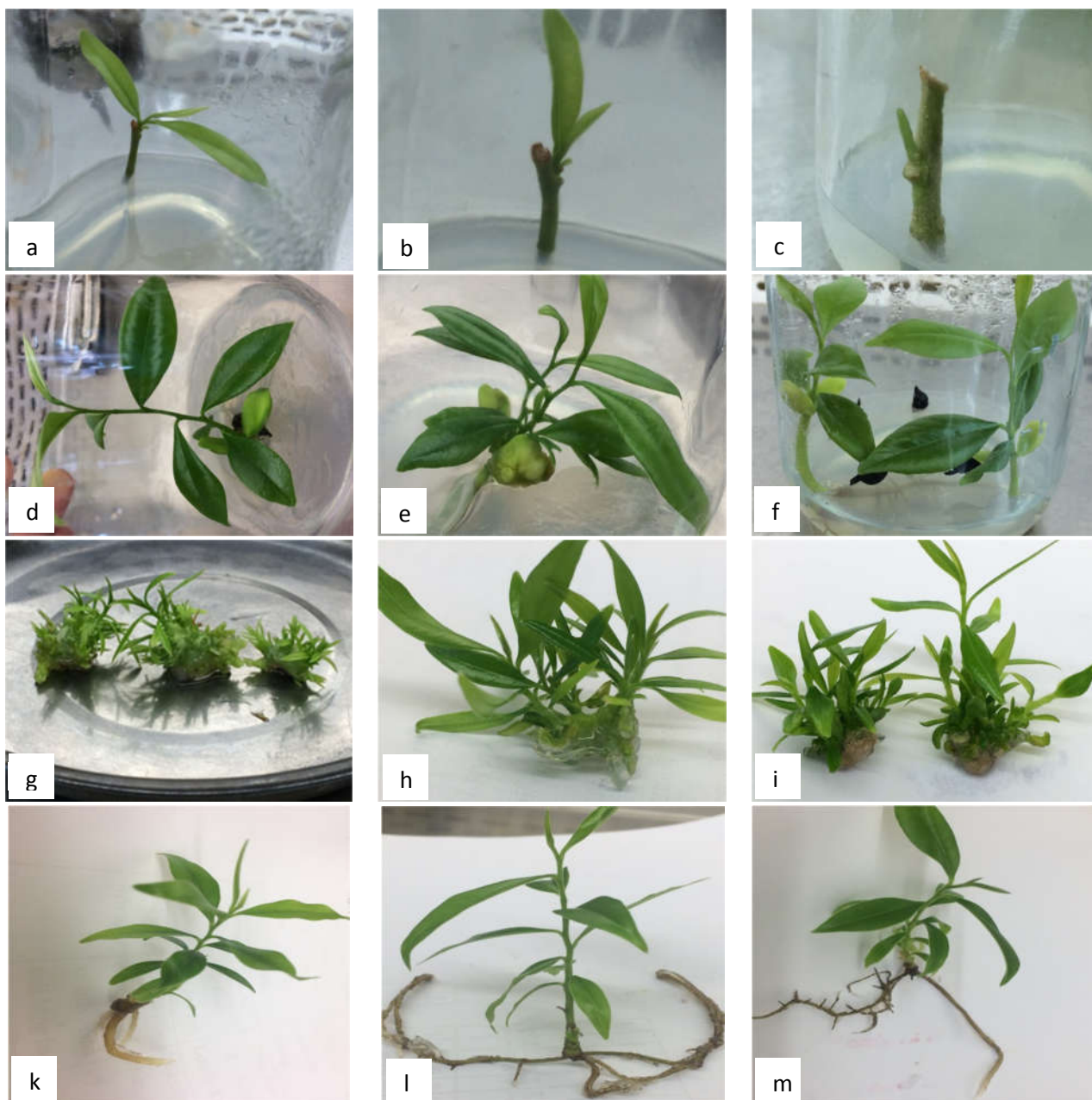
Ghi chú: Trong phạm vi cùng một cột, các giá trị mang các chữ cái khác nhau chỉ sự sai khác có ý nghĩa thống kê theo Duncan's test ở mức P = 0,05.

Số liệu ở bảng 5 cho thấy: NAA và IBA có ảnh hưởng đến khả năng hình thành rễ *in vitro* các loài Dó trầm nghiên cứu, cả 3 chỉ tiêu nghiên cứu có sự sai khác có ý nghĩa ở các công thức của cả 3 loài. Trong đó, *A. crassna* và *Aquilaria sp.* đều nhận được kết quả tốt nhất với tỷ lệ ra rễ lần lượt 78,9 và 81,1%; số rễ trung bình/chồi 2,8 và 3,34 ở tổ hợp 0,5 mg/l

NAA kết hợp 0,25 mg/l IBA. Kết quả này có chút khác biệt với của Lê Văn Thành và cộng sự (2010) thu được 60,2% chồi *A. crassna* ra rễ trên môi trường ¾ WPM có bổ sung 0,25 mg/l NAA; 0,25 mg/l IBA hay Tran Van Minh (2005) chỉ thu được 1 rễ/chồi; 2,4 - 3,8 cm/rễ trên môi trường WPM có bổ sung 0,3 IBA hoặc IAA (indole acetic acid).

Đối với loài *A. rugosa*, môi trường có bổ sung 1 mg/l NAA là thích hợp nhất (tỷ lệ chồi ra rễ, số rễ trung bình và kích thước rễ trung bình lần lượt là 86,7%; 3,4 và 2,93 cm). Tuy nhiên, qua kết quả nghiên cứu cho thấy khả năng hình thành rễ *in vitro* của ba loài Dó trầm nghiên cứu không đều, tỷ lệ ra rễ không cao, số

lượng rễ trung bình cũng như kích thước rễ trung bình tương đối tốt, nhưng thiếu sự đồng đều giữa các mẫu. Một số mẫu khả năng cảm ứng rễ sớm, rễ sinh trưởng nhanh, có kích thước dài (hình 1. l, m); ngược lại cùng thời gian nuôi cấy một số mẫu hình thành rễ muộn, số rễ ít hơn nhưng rễ mập hơn (hình 1. k).



Hình 1. Hình ảnh cây Dó trầm ở các giai đoạn trong quy trình nhân giống

Ghi chú: Các giai đoạn nuôi cấy *in vitro* 3 loài Dó trầm lần lượt *A. crassna*, *A. rugosa* và *Aquilaria sp.*: a, b, c - mẫu sạch tái sinh chồi *in vitro*; d, e, f - cây hạt *in vitro*; g - cụm chồi *A. crassna* (AC4); h - cụm chồi *A. rugosa* (AR5); i - cụm chồi *Aquilaria sp.* (AS6); k, l, m: cây *in vitro* hoàn chỉnh.

4. KẾT LUẬN

Công thức khử trùng thích hợp nhất cho tạo mẫu sạch *in vitro* Dó trầm từ quả (hạt) là lau quả bằng cồn 70%, HgCl₂ 0,1% trong 5 phút,

NaClO 5% trong 10 phút cho hạt tách từ quả sau khử trùng và cần tách vỏ hạt trước khi cấy vào môi trường dinh dưỡng cho tỷ lệ hạt sạch và tỷ lệ hạt nảy mầm từ 72,7 - 84,6%, thời gian

hạt bắt đầu nảy mầm 5 - 7 ngày. Tổ hợp các thành phần môi trường thích hợp nhất cho nhân nhanh chồi 3 loài Dó trầm là môi trường WPM* (có cải tiến) bổ sung 0,1 mg/l BAP, 0,1 mg/l kinetin, 0,3 - 0,5 mg/l NAA, 20 g/l sucrose và 7 g/l agar; cho (6,27±1,07 - 6,8±0,87 chồi/mẫu, số chồi hữu hiệu 2,23±0,15 - 2,97±0,32). Môi trường thích hợp nhất cho sự hình thành rễ, tạo cây *in vitro* hoàn chỉnh ở loài *A. rugosa* là WPM* bổ sung 1 mg/l NAA, 20 g/l sucrose, 7 g/l agar, cho 86,7% số chồi ra rễ, 3,4 rễ/chồi và kích thước rễ đạt trung bình 2,93 cm.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Debnath B., Sinha S. and Sinha R. K (2013). *In vitro* multication of shoot buds of *Aquilaria agallocha* RoxB. (Thymelaeaceae). *CIBTech Journal of Biotechnology*, Vol. 2(2) pp. 7-10.
2. Lê Văn Thành, Nguyễn Thị Hiền (2010). Kết quả nghiên cứu nhân giống cây Dó trầm (*Aquilaria crassna* Pierre) bằng nuôi cấy mô. *Tạp chí Khoa học Lâm nghiệp*, Số 4.
3. McCown BH. and G. Lloyd (1981). Woody plant medium (WPM) - a mineral nutrient formulation for microculture of woody plant species. *HortScience*, 16: pp.453-453.
4. Meng-ling He, Shu-yuan Qi and Lan-juan Hu (2005). Rapid *in vitro* propagation of medicinally important *Aquilaria agallocha*. *J Zhejiang Univ Sci B*, 6(8): pp. 849-852.
5. Moitreyee Saikia and Karuna Shrivastava (2015). Direct shoot organogenesis from leaf explants of *Aquilaria malaccensis* Lam. *Indian Journal of Research in Pharmacy and Biotechnology* 3 (2). pp. 2321-5674 (Print); 2320 -3471(Online).
6. Murashige T and Skoog F (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant*, 15: pp. 473-497.
7. Nor Hasnida Hassan, Nor Azah Mohd Ali, Fadhilah Zainudin and Haliza Ismail (2011). Effect of 6-benzylaminopurine (BAP) in different basal media on shoot multiplication of *Aquilaria hirta* and detection of essential oils in the *in vitro* shoots. *African Journal of Biotechnology* Vol. 10 (51), pp. 10500-10503.
8. Paporí Phukan Borpuzari and Jonaki Kachari (2018). Effect of glutamine for high frequency *In-vitro* regeneration of *Aquilaria malaccensis* Lam. through nodal culture. *Journal of Medicinal Plants Studies*, 6 (2):pp. 09-16.
9. Thái Thành Lượm (2009). Kết quả nghiên cứu giống cây Trầm hương 20 năm tuổi (Dó Bầu) *Aquilaria crassna* Pierre trên những dòng cây mẹ có khả năng tự nhựa trầm trên vùng đảo Phú Quốc. *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển nông thôn*, Số 4.
10. Tran Van Minh (2005). Application of Tissue Culture Techniques in Woody Species Conservation, Improvement and Development in Vietnam: Agarwood (*Aquilaria crassna* Pierre ex LeComte) via Shoot-tip Culture. Proc. IInd IS on Biotech of Trop & Subtrop, pp.37-42.

IN VITRO PROPAGATION OF *Aquilaria* IN VIETNAM

Nguyen Thi Tho¹, Pham Thi Quynh², Nguyen Thanh Tuan³, Vu Thi Phan⁴,
Bui Van Thang⁵, Ha Van Huan⁶, Pham Bich Ngoc⁷, Nguyen The Nha⁸

^{1,2,3,4,5,6,8} Vietnam National University of Forestry

⁷ Vietnam Academy of Science and Technology

SUMMARY

Aquilaria genus is a group of plant that has capability to form agarwood. Agarwood consists of essential oil which is ranked the best oil for flavouring, high-grade cosmetic, traditional medicine and making incense. Application of advanced method (*in vitro*) to propagate 3 *Aquilaria* species obtained several results. Fresh fruits of *Aquilaria* cleaned by 70% alcohol and sterilized in 5 minutes with 0.1% HgCl₂, 5% NaClO in 10 minutes have resulted in the highest rate for germinating (84.6% for *A. crassna*; 72.7% for *A. rugosa* and *Aquilaria sp.*). For multi-shoot stage, the highest number of shoots (6.27±1.07 - 6.8±0.87 shoots per explant) was obtained in WPM* medium supplemented with 0.1 mg/l BAP, 0.1 mg/l kinetin, 0.3 - 0.5 mg/l NAA, 2% sucrose and 0.7% agar for all of 3 *Aquilaria* species. The WPM* medium supplemented with 1,0 mg/l NAA, 2% sucrose, 0.7% agar was the most effective for the rooting in *A. rugosa*, producing 86,7% of rooted shoots, an average of 3.40±0.4 roots per culture and 2.93±0.42 cm a root. The highest results of root formation for *A. crassna* and *Aquilaria sp.* were found in WPM* containing 0.5 mg/l NAA, 0.25 mg/l IBA. The result of this research indicated that the method of *in vitro* can be used to develop the suitable protocol for propagation of *Aquilaria* and to propagate the number of seedlings with high quality for development of *Aquilaria* in Vietnam.

Keywords: *Aquilaria*, *in vitro* propagation, tissue culture.

Ngày nhận bài : 30/8/2018

Ngày phản biện : 02/11/2018

Ngày quyết định đăng : 10/11/2018