

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

BỘ NÔNG NGHIỆP VÀ PTNT

VIỆN KHOA HỌC LÂM NGHIỆP VIỆT NAM

KHUẤT THỊ HẢI NINH

**NGHIÊN CỨU CHỌN GIỐNG VÀ NHÂN GIỐNG TRÀM
CÓ HÀM LƯỢNG TINH DẦU VÀ TỶ LỆ 1,8-CINEOLE CAO**

LUẬN ÁN TIẾN SĨ LÂM NGHIỆP

Hà Nội – 2016

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

BỘ NÔNG NGHIỆP VÀ PTNT

VIỆN KHOA HỌC LÂM NGHIỆP VIỆT NAM

KHUẤT THỊ HẢI NINH

**NGHIÊN CỨU CHỌN GIỐNG VÀ NHÂN GIỐNG TRÀM
CÓ HÀM LƯỢNG TINH DẦU VÀ TỶ LỆ 1,8-CINEOLE CAO**

Chuyên ngành đào tạo: Di truyền và Chọn giống cây Lâm nghiệp

Mã số: 62-62-02-07

LUẬN ÁN TIẾN SĨ LÂM NGHIỆP

Người hướng dẫn khoa học: GS.TS. Lê Đình Khả

TS. Phí Hồng Hải

Hà Nội – 2016

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan công trình nghiên cứu khoa học này là do tôi thực hiện. Các số liệu trong luận án hoàn toàn trung thực và chưa được người khác công bố trong bất kỳ tài liệu hay công trình nào khác, nếu sai tôi hoàn toàn chịu trách nhiệm.

Công trình này là một phần trong đề tài *"Nghiên cứu chọn giống, kỹ thuật gây trồng và chế biến trà có năng suất và chất lượng tinh dầu cao"* giai đoạn 1 (2008 - 2012) và giai đoạn 2 (2013 - 2017) do GS.TS Lê Đình Khả làm chủ nhiệm, nghiên cứu sinh là cộng tác viên chính. Các số liệu thu thập và trình bày trong luận án do nghiên cứu sinh thu thập và kế thừa một số kết quả nghiên cứu được chủ nhiệm đề tài cho phép.

Hà Nội, ngày 2 tháng 5 năm 2016

Tác giả

Khuất Thị Hải Ninh

LỜI CẢM ƠN

Luận án được hoàn thành tại Viện Khoa học Lâm nghiệp Việt Nam năm 2015. Có được kết quả này ngoài sự nỗ lực của nghiên cứu sinh (NCS) không thể thiếu sự giúp đỡ của cơ sở đào tạo là Viện Khoa học Lâm nghiệp Việt Nam, Viện Cải thiện Giống và Phát triển lâm sản - đơn vị trực tiếp hỗ trợ nghiên cứu sinh về nhân lực, vật lực và hiện trường thí nghiệm, Trường đại học Lâm nghiệp nơi NCS công tác và Viện Nghiên cứu giống và Công nghệ sinh học Lâm nghiệp nơi NCS sinh hoạt chuyên môn, nhân dịp này NCS xin chân thành cảm ơn về sự quan tâm và giúp đỡ quý báu đó.

NCS xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc và kính trọng đến GS.TS. Lê Đình Khả và TS. Phí Hồng Hải là những người thầy hướng dẫn khoa học đã dành nhiều thời gian, công sức giúp đỡ nghiên cứu sinh hoàn thành luận án trong 4 năm qua.

Xin chân thành cảm ơn ThS. Nguyễn Thị Thanh Hương và tập thể cán bộ Viện Cải thiện giống và Phát triển lâm sản, Trung tâm Thực nghiệm và chuyển giao giống cây rừng (Viện Nghiên cứu giống và Công nghệ sinh học lâm nghiệp), đã giúp đỡ nghiên cứu sinh trong việc chuẩn bị hiện trường, bố trí thí nghiệm và thu thập số liệu.

Xin chân thành cảm ơn sự động viên, giúp đỡ của gia đình và bạn bè đồng nghiệp.

Hà Nội, 2 tháng 5 năm 2016

MỤC LỤC

	TRANG
LỜI CAM ĐOAN	i
LỜI CẢM ƠN	ii
MỤC LỤC	iii
DANH MỤC CÁC BẢNG.....	vii
DANH MỤC CÁC BIỂU ĐỒ.....	ix
DANH MỤC CÁC HÌNH.....	ix
DANH MỤC CÁC TỪ VIẾT TẮT.....	x
MỞ ĐẦU	1
CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN VẤN ĐỀ NGHIÊN CỨU	5
1.1. Tinh dầu trà và một số loài trà giàu 1,8-cineole	5
1.1.1. <i>Giá trị sử dụng tinh dầu trà</i>	5
1.1.2. <i>Một số loài trà giàu 1,8-cineole</i>	8
1.1.2.1. <i>Tiêu chuẩn chất lượng tinh dầu giàu 1,8-cineole</i>	8
1.1.2.2. <i>Trà năm gân</i>	9
1.1.2.3. <i>Trà cajuput</i>	11
1.2. Các nghiên cứu chọn giống và nhân giống sinh dưỡng trà trên thế giới.....	12
1.2.1. <i>Nghiên cứu chọn giống</i>	12
1.2.2. <i>Nghiên cứu nhân giống sinh dưỡng</i>	15
1.2.3. <i>Các yếu tố ảnh hưởng đến năng suất và chất lượng tinh dầu trà.....</i>	17
1.2.4 <i>Kỹ thuật trồng trà lấy tinh dầu.....</i>	19
1.2.5. <i>Tình hình gây trồng, sản xuất và tiêu thụ tinh dầu trà</i>	21
1.3. Các nghiên cứu chọn giống và nhân giống sinh dưỡng trà ở Việt Nam	22
1.3.1. <i>Nghiên cứu chọn giống</i>	22
1.3.2. <i>Nghiên cứu nhân giống sinh dưỡng.....</i>	26
1.3.3. <i>Các yếu tố ảnh hưởng đến năng suất và chất lượng tinh dầu trà.....</i>	29
1.3.4. <i>Tình hình sản xuất tinh dầu trà</i>	30

1.4 Một số nhận định chính	31
CHƯƠNG 2. NỘI DUNG, VẬT LIỆU, PHƯƠNG PHÁP VÀ ĐỊA ĐIỂM	
NGHIÊN CỨU	33
2.1. Nội dung nghiên cứu	33
2.1.1. <i>Nghiên cứu biến dị sinh trưởng, hàm lượng và chất lượng tinh dầu của</i>	
<i>Tràm năm gân và Tràm cajuput</i>	<i>33</i>
2.1.2. <i>Nghiên cứu kỹ thuật nhân giống Tràm năm gân bằng nuôi cấy mô</i>	<i>33</i>
2.1.3. <i>Nghiên cứu một số biện pháp kỹ thuật nhằm tăng năng suất và chất</i>	
<i>lượng tinh dầu Tràm năm gân</i>	<i>34</i>
2.2. Vật liệu nghiên cứu	34
2.2.1. <i>Vật liệu khảo nghiệm giống</i>	<i>34</i>
2.2.2. <i>Vật liệu nghiên cứu nuôi cấy mô</i>	<i>36</i>
2.2.3. <i>Vật liệu nghiên cứu bón phân, chiều cao gốc chặt và mùa vụ</i>	<i>36</i>
2.3. Phương pháp nghiên cứu	36
2.3.1. <i>Phương pháp bố trí thí nghiệm</i>	<i>36</i>
2.3.1.1. <i>Bố trí thí nghiệm trong các khảo nghiệm giống</i>	<i>36</i>
2.3.1.2. <i>Bố trí thí nghiệm nuôi cấy mô</i>	<i>37</i>
2.3.1.3. <i>Bố trí thí nghiệm trong nghiên cứu một số biện pháp kỹ thuật</i>	<i>40</i>
2.3.2. <i>Phương pháp thu thập số liệu</i>	<i>41</i>
2.3.2.1. <i>Thu thập số liệu trong khảo nghiệm giống</i>	<i>41</i>
2.3.2.2. <i>Thu thập số liệu trong nuôi cấy mô</i>	<i>42</i>
2.3.2.3. <i>Thu thập số liệu trong nghiên cứu một số biện pháp kỹ thuật</i>	<i>42</i>
2.3.3. <i>Phương pháp xử lý số liệu</i>	<i>43</i>
2.4. Đặc điểm tự nhiên khu vực nghiên cứu	46
2.4.1. <i>Điều kiện khí hậu Ba Vì và Phú Lộc</i>	<i>46</i>
2.4.2. <i>Đặc điểm đất đai Ba Vì và Phú Lộc</i>	<i>47</i>
CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN	49

3.1. Biến dị sinh trưởng, hàm lượng và chất lượng tinh dầu giữa các xuất xứ Tràm cajuput.....	49
3.1.1. <i>Biến dị sinh trưởng.....</i>	49
3.1.2. <i>Biến dị hàm lượng và chất lượng tinh dầu</i>	51
3.2. Biến dị sinh trưởng, hàm lượng và chất lượng tinh dầu giữa các xuất xứ, dòng vô tính Tràm năm gân	54
3.2.1. <i>Biến dị sinh trưởng, hàm lượng và chất lượng tinh dầu giữa các xuất xứ Tràm năm gân khảo nghiệm tại Ba Vì</i>	54
3.2.1.1. <i>Biến dị sinh trưởng.....</i>	55
3.2.1.2. <i>Biến dị hàm lượng và chất lượng tinh dầu.....</i>	57
3.2.2. <i>Biến dị sinh trưởng, hàm lượng và chất lượng tinh dầu giữa các dòng vô tính Tràm năm gân</i>	59
3.2.2.1. <i>Biến dị sinh trưởng, hàm lượng và chất lượng tinh dầu giữa các dòng vô tính Tràm năm gân khảo nghiệm tại Ba Vì</i>	59
3.2.2.2. <i>Biến dị sinh trưởng, hàm lượng và chất lượng tinh dầu giữa các dòng vô tính Tràm năm gân khảo nghiệm tại Phú Lộc</i>	62
3.3. Nghiên cứu kỹ thuật nhân giống Tràm năm gân bằng nuôi cấy mô.....	70
3.3.1. <i>Ảnh hưởng của thời gian và số lần khử trùng bằng $HgCl_2$ 0,1% đến tỷ lệ mẫu sạch nảy chồi hữu hiệu.</i>	70
3.3.2. <i>Nghiên cứu ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy , chất điều hoà sinh trưởng và hàm lượng đường đến khả năng tái sinh chồi.....</i>	72
3.3.2.1. <i>Ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy và chất điều hoà sinh trưởng đến khả năng tái sinh chồi lần 1 (tái sinh chồi trực tiếp từ mẫu cấy)</i>	72
3.3.2.2. <i>Ảnh hưởng của nồng độ các loại đường đến khả năng tái sinh chồi lần 2.</i>	73
3.3.3. <i>Ảnh hưởng của chất điều hoà sinh trưởng đến khả năng tạo cụm chồi</i>	75
3.3.4. <i>Ảnh hưởng của nồng độ NAA và IBA đến khả năng tạo rễ in vitro.....</i>	77
3.3.5. <i>Huấn luyện cây mô.....</i>	79

3.4. Nghiên cứu một số biện pháp kỹ thuật nhằm tăng năng suất và chất lượng tinh dầu Tràm năm gân.....	81
3.4.1. <i>Ảnh hưởng của bốn thúc đến sinh trưởng, hàm lượng và chất lượng tinh dầu..</i>	81
3.4.1.1. Ảnh hưởng của bốn thúc đến sinh trưởng.....	82
3.4.1.2. Ảnh hưởng của bốn thúc đến hàm lượng tinh dầu và chất lượng tinh dầu.....	83
3.4.2. <i>Ảnh hưởng của chiều cao gốc chặt đến khả năng ra chồi.....</i>	86
3.4.3. <i>Ảnh hưởng của mùa vụ đến hàm lượng và chất lượng tinh dầu.....</i>	89
KẾT LUẬN, TỒN TẠI VÀ KIẾN NGHỊ	94
1. Kết luận	94
2. Tồn tại	97
3. Kiến nghị.....	97
TÀI LIỆU THAM KHẢO	99

DANH MỤC CÁC BẢNG

	TRANG
Bảng 2.1. Các xuất xứ Tràm cajuput của Indonesia và Việt Nam	34
Bảng 2.2. Các xuất xứ Tràm năm gân.....	35
Bảng 2.3. Các dòng vô tính Tràm năm gân (26 dòng).....	35
Bảng 2.4. Các công thức bón thúc Tràm năm gân tại khu khảo nghiệm xuất xứ Ba Vĩ (trồng 8/2008).....	40
Bảng 2.5. Đặc điểm khí hậu tại Ba Vĩ và Phú Lộc	47
Bảng 2.6. Lượng mưa trung bình tháng (mm) tại Ba Vĩ và Phú Lộc	47
Bảng 2.7. Tính chất của đất tại các địa điểm xây dựng khảo nghiệm ở Ba Vĩ (Hà Nội) và Phú Lộc (Thừa Thiên – Huế)	48
Bảng 3.1. Sinh trưởng của các xuất xứ Tràm cajuput khảo nghiệm tại Ba Vĩ (6/2012 - 6/2015)	50
Bảng 3.2. Hàm lượng và thành phần tinh dầu của các xuất xứ Tràm cajuput khảo nghiệm tại Ba Vĩ (6/2012 - 4/2013 và 6/2015)	51
Bảng 3.3. Sinh trưởng các xuất xứ Tràm năm gân khảo nghiệm tại Ba Vĩ	55
Bảng 3.4. Hàm lượng và thành phần tinh dầu các xuất xứ Tràm năm gân khảo nghiệm tại Ba Vĩ (8/2008 - 12/2010 và 12/2011)	57
Bảng 3.5. Sinh trưởng các dòng vô tính của xuất xứ Gympie Qld (Q4) Tràm năm gân khảo nghiệm tại Ba Vĩ (8/2008 - 10/2010)	60
Bảng 3.6. Hàm lượng và thành phần tinh dầu các dòng vô tính của xuất xứ Gympie Qld (Q4) Tràm năm gân khảo nghiệm tại Ba Vĩ.....	61
Bảng 3.7. Sinh trưởng các dòng vô tính của xuất xứ West Malam PNG (Q15) và Bribie Island Qld (Q8) Tràm năm gân khảo nghiệm tại Phú Lộc (3/2011 - 6/2014)	63
Bảng 3.8. Hàm lượng và thành phần tinh dầu các dòng vô tính của xuất xứ West Malam PNG (Q15) và Bribie Island Qld (Q8) Tràm năm gân khảo nghiệm tại Phú Lộc (2/2011 - 11/2013, 6/2014)	65
Bảng 3.9. Hệ số tương quan về các chỉ tiêu sinh trưởng, tinh dầu các xuất xứ Tràm năm gân giữa giữa Ba Vĩ và Phú Lộc ở giai đoạn 2 tuổi	67

Bảng 3.10. Tỷ lệ (%) mẫu sạch nảy chồi mẫu sạch chết và mẫu bị nhiễm của các dòng vô tính Q4.44, Q15.38 và Q23.21 khi khử trùng bằng HgCl_2 0,1%	71
Bảng 3.11. Tỷ lệ mẫu nảy chồi (%) và số chồi/nách lá của các dòng vô tính Q 4.44, Q15.38 và Q23.21 trên môi trường MS và MS* có bổ sung BAP và Kinetin (sau 6 tuần nuôi cấy)	73
Bảng 3.12. Khả năng tái sinh chồi của các dòng vô tính trên môi trường MS* + 0,5 mg/l BAP + 0,2 mg/l Kinetin có bổ sung đường glu(G) và sucrose (S).....	74
Bảng 3.13. Khả năng tạo chồi ở Q4.44 và Q23.21 trong môi trường MS* có bổ sung 20g/l G + 10g/l S + 0,2 mg/l Kinetin + 0,1 mg/l NAA và BAP (0,2 - 2 mg/l)	76
Bảng 3.14. Khả năng ra rễ của chồi in vitro các dòng vô tính Q 4.44 và Q23.21 trên môi trường MS* bổ sung NAA, IBA (sau 6 tuần nuôi cấy)	78
Bảng 3.15. Ảnh hưởng thời gian huấn luyện đến khả năng sống của cây mô Tràm năm gân	79
Bảng 3.16. Sinh trưởng của một số xuất xứ Tràm năm gân tại các công thức bón phân khác nhau (trồng 8/2008, chặt gốc 3/2012, thu số liệu 3/2013).....	82
Bảng 3.17. Hàm lượng tinh dầu và tỷ lệ 1,8-cineole của một số xuất xứ Tràm năm gân tại các công thức bón phân khác nhau (trồng 8/2008, chặt gốc 3/2012, thu số liệu 3/2013)	84
Bảng 3.18. Ảnh hưởng chiều cao gốc chặt đến khả năng ra chồi của một số xuất xứ Tràm năm gân tại Ba Vì (trồng 8/2008, chặt gốc 3/2013, thu số liệu 3/2014)	87
Bảng 3.19. Hàm lượng và thành phần tinh dầu của một số dòng vô tính và xuất xứ Tràm năm gân tại Phú Lộc ở các mùa vụ khác nhau	90

DANH MỤC CÁC BIỂU ĐỒ

TRANG

Biểu đồ 3.1. Chỉ số thể tích (Iv) các xuất xứ Tràm năm gân và Tràm cajuput (C) tại Ba Vì và Phú Lộc	69
Biểu đồ 3.2. Hàm lượng tinh dầu các xuất xứ Tràm năm gân (Q) và Tràm cajuput (C) tại Phú Lộc và Ba Vì ở giai đoạn 2 năm tuổi.....	69
Biểu đồ 3.3. Tỷ lệ 1,8-cineole các xuất xứ Tràm năm gân (Q) và Tràm cajuput (C) tại Phú Lộc và Ba Vì ở giai đoạn 2 năm tuổi	69

DANH MỤC CÁC HÌNH

TRANG

Hình 1.1. Phân bố tự nhiên của Tràm năm gân ở Australia và PNG.....	10
Hình 1.2. Phân bố tự nhiên các phân loài Tràm cajuput trên thế giới	12
Biểu đồ 3.1. Chỉ số thể tích (Iv) các xuất xứ Tràm năm gân	69
và Tràm cajuput (C) tại Ba Vì và Phú Lộc	69
Biểu đồ 3.2. Hàm lượng tinh dầu các xuất xứ Tràm năm gân (Q) và.....	69
Tràm cajuput (C) tại Phú Lộc và Ba Vì ở giai đoạn 2 năm tuổi	69
Biểu đồ 3.3. Tỷ lệ 1,8-cineole các xuất xứ Tràm năm gân (Q) và.....	69
Tràm cajuput (C) tại Phú Lộc và Ba Vì ở giai đoạn 2 năm tuổi	69
Hình 3.1. Mẫu sạch Tràm năm gân nảy chồi sau 4 tuần nuôi cấy	72
Hình 3.2. Chồi Q4.44 tái sinh lần 2 trên môi trường có chứa 20 g glucose + 10 g sucrose (hình A-chồi tái sinh tốt) và 30 g sucrose (hình B – xuất hiện chồi bị chết) sau 6 tuần nuôi cấy.....	75
Hình 3.3. Chồi Q4.44 trong MS* + 0,2 mg/l BAP + 0,2 mg/l Kinetin + 0,1 mg/l NAA (hình A) và chồi Q23.21 trong MS* + 0,5 mg/l BAP + 0,2 mg/l Kinetin + 0,1 mg/l NAA (hình B) sau 6 tuần nuôi cấy	77
Hình 3.4. Cây con Tràm năm gân trước khi cấy vào bầu đất (hình A), sau khi cấy vào bầu đất 1 tháng (hình B) và đủ tiêu chuẩn trồng rừng (hình C)	80

Hình 3.5. Chồi 1 năm tuổi của xuất xứ West Malam PNG chặt gốc ở độ cao 5cm89

DANH MỤC CÁC TỪ VIẾT TẮT

STT	Ký hiệu	Tên đầy đủ
1	BAP	Benzyl aninopurine
2	Cgdl	Tràm gió ở Đại Lải
3	Cgpl	Tràm gió ở Phú Lộc
4	Cgth	Tràm gió ở Thanh Hóa
5	ĐC	Đối chứng
6	Do	Đường kính gốc
7	Dc	Đường kính chồi
8	Dt	Đường kính tán
9	DVT	Dòng vô tính
10	G	Đường glucoza (Glucose)
11	H	Chiều cao cây
12	Hc	Chiều cao chồi
13	Hlt	Hàm lượng tinh dầu tính theo khối lượng tươi
14	IBA	Indole butiric acid
15	Iv	Chỉ số thể tích (Volume index)
16	Isl	Đảo (Island)
17	Wlá	Khối lượng lá
18	Lgtd	Lượng tinh dầu
19	LSD	Khoảng sai dị tối thiểu (Least significant difference)
20	MS	Murashige and Skoog (một loại môi trường nuôi cấy mô)
21	MS*	Môi trường Murashige and Skoog cải tiến
22	NAA	Naphtyl acetic acid
23	NSW	Bang New South Wales - Australia
24	PNG	Papua New Guinea
25	Qld	Bang Queensland - Australia
26	S	Đường sacaroza, đường mía (Sucrose)
27	Sig	Mức ý nghĩa (Significant)
28	TB	Trung bình
29	TCTB	Tối cao trung bình
30	TTTB	Tối thấp trung bình
31	V%	Hệ số biến động (variation)
32	WPM	Woody plant medium (môi trường trong nuôi cấy mô cây thân gỗ)

MỞ ĐẦU

1. Đặt vấn đề

Tinh dầu tràm là hợp chất thiên nhiên, có tính sát trùng mạnh, có tác dụng kháng khuẩn, kháng nấm, kháng virus, chống ung thư, chữa đau bụng, cảm cúm, hen suyễn, co thắt dạ dày, chống viêm, chữa vết bỏng, xoa bóp trị đau nhức khớp xương v.v..., cũng như được sử dụng làm spa ở các khách sạn, khu nghỉ dưỡng và là mặt hàng có giá trị trên thị trường quốc tế.

Tinh dầu tràm gồm hai nhóm chính là giàu terpinen-4-ol (tea tree oil) và giàu 1,8-cinole (cajuput oil và niaouli oil). Các loài tràm chủ yếu để sản xuất tinh dầu giàu 1,8-cineole là Tràm năm gân (*Melaleuca quinquenervia*), Tràm cajuput (*Melaleuca cajuputi*) và một số loài tràm khác trong đó có Tràm trà (*Melaleuca alternifolia* - loại giàu 1,8-cineole). Đây là những loài có khả năng sinh trưởng và phát triển tốt ở Việt Nam, trong đó Tràm cajuput là loài cây có phân bố tự nhiên ở nhiều vùng ven biển nước ta.

Nghiên cứu chọn giống tràm lấy tinh dầu trong giai đoạn 1 (2008 - 2012) do GS.TS Lê Đình Khả làm chủ nhiệm đề tài, cho thấy Tràm cajuput của ta có năng suất và chất lượng tinh dầu thấp hơn rất nhiều so với Tràm năm gân được nhập từ Australia. Vì thế trong giai đoạn 2 (2013 - 2017) đề tài đã tập trung nghiên cứu cải thiện giống đối với Tràm năm gân, Tràm trà và khảo nghiệm thêm các giống Tràm cajuput nhập từ Indonesia (nước chủ yếu sản xuất tinh dầu Tràm cajuput) để nâng cao năng suất và chất lượng tinh dầu tràm ở nước ta.

Nhằm nghiên cứu và đánh giá một cách đầy đủ hơn về khả năng cải thiện giống tràm nghiên cứu sinh thực hiện đề tài **“Nghiên cứu chọn giống và nhân giống tràm có hàm lượng tinh dầu và tỷ lệ 1,8-cineole cao”** cho cả Tràm năm gân, Tràm cajuput và nhóm Tràm trà giàu 1,8 - cineole. Trong quá trình thực hiện thấy Tràm năm gân là loài có triển vọng nhất nên đã tập

trung cho Tràm năm gân. Đây là một phần trong đề tài "*Nghiên cứu chọn giống, kỹ thuật gây trồng và chế biến tràm có năng suất và chất lượng tinh dầu cao*" do GS.TS Lê Đình Khả làm chủ nhiệm.

2. Ý nghĩa khoa học và thực tiễn

Ý nghĩa khoa học

Đã nghiên cứu xác định được một số cơ sở khoa học bổ sung cho cải thiện giống tràm theo hướng nâng cao năng suất và chất lượng tinh dầu tràm giàu 1,8-cineole.

Ý nghĩa thực tiễn

Đã xác định được một số giống Tràm năm gân sinh trưởng nhanh, có hàm lượng và chất lượng tinh dầu cao.

Xác định được các biện pháp kỹ thuật nhân giống Tràm năm gân bằng nuôi cấy mô và một số biện pháp kỹ thuật nâng cao năng suất, chất lượng tinh dầu (phân bón, chiều cao gốc chặt và mùa vụ).

3. Mục tiêu nghiên cứu

**** Về lý luận***

Xác định được khả năng cải thiện giống theo các chỉ tiêu về sinh trưởng, hàm lượng và chất lượng tinh dầu của Tràm năm gân và Tràm cajuput làm cơ sở cho chọn giống.

Xác định khả năng nhân giống một số dòng vô tính Tràm năm gân bằng nuôi cấy mô.

**** Về thực tiễn***

Xác định được một số giống tràm có hàm lượng và chất lượng tinh dầu cao để sản xuất tinh dầu.

Hoàn thiện được kỹ thuật nhân giống Tràm năm gân bằng nuôi cấy mô, tạo được cây con đủ tiêu chuẩn trồng rừng.

Xác định được một số biện pháp kỹ thuật nhằm tăng hàm lượng và tỷ lệ 1,8-cineole trong tinh dầu Tràm năm gân.

4. Những đóng góp mới của luận án

Đã đánh giá được sinh trưởng, hàm lượng và tỷ lệ 1,8-cineole trong tinh dầu của một số xuất xứ và dòng vô tính Tràm năm gân.

Nhân giống thành công Tràm năm gân bằng nuôi cấy mô.

Xác định được ảnh hưởng của phân bón, chiều cao gốc chặt và mùa vụ đến năng suất và tỷ lệ 1,8-cineole trong tinh dầu Tràm năm gân.

5. Đối tượng nghiên cứu

11 xuất xứ Tràm năm gân, 10 xuất xứ Tràm cajuput.

26 dòng vô tính Tràm năm gân bao gồm 7 dòng vô tính của xuất xứ Gympie Qld, 7 dòng vô tính của xuất xứ Bribie Island Qld và 12 dòng vô tính của xuất xứ West Malam PNG.

6. Phạm vi nghiên cứu

- Nội dung

+ Đánh giá biến dị sinh trưởng, hàm lượng tinh dầu và tỷ lệ 1,8-cineole trong tinh dầu của Tràm năm gân và Tràm cajuput.

+ Nghiên cứu kỹ thuật nhân giống Tràm năm gân bằng nuôi cấy mô.

+ Nghiên cứu một số biện pháp kỹ thuật nhằm tăng năng suất và chất lượng tinh dầu Tràm năm gân như phân bón, chiều cao gốc chặt và mùa vụ.

- Địa điểm

+ Khảo nghiệm xuất xứ Tràm năm gân và Tràm cajuput được tiến hành tại Ba Vì (Hà Nội).

+ Khảo nghiệm dòng vô tính Tràm năm gân được tiến hành tại Ba Vì (Hà Nội) và Phú Lộc (Thừa Thiên - Huế).

+ Nghiên cứu nuôi cấy mô Tràm năm gân thực hiện tại Viện Công nghệ Sinh học Lâm nghiệp (Trường Đại học Lâm nghiệp).

- + Chung cất tinh dầu tại Viện Cải thiện giống và Phát triển lâm sản.
- + Phân tích thành phần tinh dầu tại Viện Hóa học các hợp chất thiên nhiên.

7. Thời gian

Nghiên cứu được thực hiện trong 4 năm (2011 - 2015)

8. Bố cục

Luận án gồm 97 trang, 25 bảng, 3 biểu đồ, 8 hình. Kết cấu của luận án gồm các phần chính sau:

- Mở đầu (4 trang)
- Chương 1: Tổng quan vấn đề nghiên cứu (28 trang)
- Chương 2: Nội dung, vật liệu, phương pháp và địa điểm nghiên cứu (16 trang)
- Chương 3: Kết quả nghiên cứu và thảo luận (45 trang)
- Kết luận, tồn tại và khuyến nghị (4 trang)

Tài liệu tham khảo: 100 tài liệu (gồm 34 tài liệu tiếng Việt và 66 tài liệu tiếng Anh).

Phụ lục: 49 phụ biểu và 3 sơ đồ bố trí khảo nghiệm giống.

CHƯƠNG 1.

TỔNG QUAN VẤN ĐỀ NGHIÊN CỨU

1.1. Tinh dầu tràm và một số loài tràm giàu 1,8-cineole

1.1.1. Giá trị sử dụng tinh dầu tràm

Tràm (*Melaleuca*) là chi thực vật có đến 290 loài, đa số các loài tràm là cây đa tác dụng, có thể để lấy gỗ, tinh dầu, nuôi ong, làm cây bảo vệ đất nông nghiệp, cây đường phố và cây trong công viên (Brophy và cs., 2013)[39]. Tinh dầu tràm là sản phẩm có giá trị dược phẩm và mỹ phẩm đang được chú ý khai thác. Khả năng cung cấp tinh dầu của tràm phụ thuộc vào từng loài, từng xuất xứ, từng cá thể, cũng như phụ thuộc vào tuổi cây và điều kiện lập địa (Brophy và Doran, 1996)[38].

Tinh dầu tràm là tên gọi chung cho các loại tinh dầu được chưng cất từ lá tràm, gồm nhiều hợp chất thiên nhiên có giá trị như 1,8-cineole, terpinen-4-ol, nerolidol và linalool v.v..., trong đó 1,8-cineole, terpinen-4-ol là những loại tinh dầu được tiêu thụ nhiều nhất, tiếp đến là nerolidol và linalool có giá trị dược liệu và hương liệu cao được dùng trong sản xuất nước hoa và mỹ phẩm.

Nhóm tinh dầu giàu terpinen-4-ol được sản xuất từ cây Tràm trà nên có tên là "tea tree oil" có tỷ lệ terpinen-4-ol 30 - 48%, tỷ lệ 1,8-cineole không quá 15% (ISO 7730, 2004)[58].

Nhóm tinh dầu giàu 1,8-cineole ban đầu được sản xuất từ Tràm cajuput ở Indonesia nên có tên là "cajuput oil". Các loài tràm sản xuất tinh dầu giàu 1,8-cineole chủ yếu là Tràm cajuput, Tràm năm gân và một số loài tràm khác, trong đó có Tràm trà loại giàu 1,8-cineole.

Tinh dầu tràm giàu terpinen-4-ol của Tràm trà đã được sử dụng trong chữa bệnh của thổ dân Australia, như chữa vết thương và chống viêm trong nhiều thế kỷ (Drury, 1989; Lassak và McCarthy, 1990)[53, 66]. Các hoạt tính kháng khuẩn của tinh dầu Tràm trà chủ yếu do sự hiện diện của terpinen-4-ol

mặc dù các thành phần khác đóng góp đáng kể đến hoạt động kháng khuẩn (Carson và Riley, 1995; Southwell và cs., 1993)[42, 84]. Đánh giá khả năng kháng vi trùng và đặc tính chữa bệnh khác của tinh dầu Tràm trà cho thấy có ít nhất 27 loài vi khuẩn và 24 loài nấm đã được báo cáo là nhạy cảm với loại tinh dầu Tràm trà giàu terpinen-4-ol (Carson và cs., 2006)[43]. Tinh dầu Tràm trà được dùng nguyên chất hoặc là thành phần trong các loại sản phẩm như chất bảo quản, kháng nấm, thuốc khử trùng hoặc tác nhân kháng khuẩn. Sản phẩm từ tinh dầu tràm gồm dầu gội, dầu dưỡng tóc, xà phòng, nước súc miệng, kem đánh răng, chất khử mùi, kem dưỡng ẩm, sữa rửa mặt và sữa tắm, sản phẩm cạo râu, son dưỡng môi, kem trị mụn, kem và bột chữa nấm da, kem bôi chữa viêm âm đạo và các sản phẩm y tế khác (Brophy và cs., 2013; Colton và cs., 2000; Rirdc và Attia, 2007; Southwell và Lowe, 1999; Wrigley và Fagg, 1993)[39, 47, 79, 85, 97].

Tinh dầu tràm giàu 1,8-cineole chủ yếu ở Tràm năm gân và Tràm cajuput có tác dụng diệt khuẩn, kháng virus (Harris, 2007; Vokovic và cs., 2010)[64, 94], được sử dụng trong ngành công nghiệp dược như thuốc chống xung huyết, chống ho, tác dụng giảm đau và chống viêm. Ngoài ra, 1,8-cineole còn dùng trong hương liệu, chữa bệnh hen suyễn, viêm xoang và bệnh phổi tắc nghẽn mạn tính (Juergens và cs., 2003, 2004; Santos và Rao, 2000; Santos và cs., 2004) [59, 60, 81, 82], thậm chí có người cho rằng 1,8-cineole có thể góp phần kiểm soát viêm tụy cấp tính (Bae và cs., 2012)[35].

1,8-cineole là chất thơm tự nhiên có trong tinh dầu một số loài thực vật (Tschiggerl và Bucar, 2010)[90], đặc biệt ở nhiều loài bạch đàn do đó còn có tên là eucalyptol, cũng vì thế eucalyptol và 1,8-cineole được coi là synonym của nhau, đôi khi được viết là 1,8-cineole (eucalyptol) (Santos, 2004)[82].

Ngoài ra, 1,8-cineole cũng có trong Tràm trà với hàm lượng và tỷ lệ 1,8-cineole rất cao, song tỷ lệ limonene (chất làm hại da) cũng cao (hơn 6%), nên ít được sử dụng (Lê Đình Khả, 2012)[21].

1,8-cineole cũng có trong một số loài cây thảo dược như Húng quế (*Ocimum basilic*), Hương thảo (*Rosmarinus officinalis*), cây Xô thơm (*Salvia officinalis*), Bạch đậu khấu (*Amomum cardamomu*), Gừng (*Zingiber zerumbe*), và Bạc hà (*Mentha piperita*) được sử dụng trong nấu ăn và trong các loại thực phẩm (Opdyke và cs., 1975; SCF, 2002; Vincenzi và cs., 2002)[74, 86, 91].

Tinh dầu giàu 1,8- cineole ở Tràm năm gân (ở Papua New Guinea được gọi là tinh dầu Niaouli oil) có tác dụng chữa ho, cảm lạnh, thấp khớp, đau dây thần kinh và sử dụng làm hương liệu (Elliot và Jones, 1993)[54] hoặc dùng như một chất thơm trong thực phẩm (bánh ngọt, kẹo, đồ gia vị, món ăn ngọt tráng miệng, sản phẩm từ thịt, đồ uống không cồn) và mỹ phẩm (mỹ phẩm bôi da, nước hoa, chất súc miệng và xà phòng). Tinh dầu Tràm năm gân được dùng như một loại thuốc truyền thống và đôi khi được thay cho tinh dầu Tràm cajuput hoặc tinh dầu bạch đàn để chữa ho, chữa thấp khớp, đau dây thần kinh viêm màng nhầy mạn tính, vv... Niaouli oil được coi như một loại tinh dầu không độc có mùi thơm mạnh được dùng làm thuốc thông mũi, diệt khuẩn và những thuốc có tính kích thích (http://www.essortment.com/all/niaouli_rst.htm, 2009)[65]. Một công bố khác về cajuput oil (được ghi là Tràm năm gân) từ nghiên cứu cho động vật đã thấy có tác dụng làm tăng huyết áp, chữa mụn nhọt, ức chế vi khuẩn *Helicobacter pylori* (loại vi khuẩn gây đau dạ dày) ([www.Natural Standard Botton](http://www.NaturalStandardBotton.com), 2008)[99].

Tinh dầu giàu 1,8-cineole ở Tràm cajuput là loại không độc hại, có tác dụng trị ho, cảm lạnh, giảm đau, thường ở dạng thuốc mỡ hoặc dầu xoa bóp. Ngoài ra còn có tác dụng tốt trong việc điều trị giun tròn và nhiễm trùng

đường tiết niệu. Tinh dầu Tràm cajuput còn được sử dụng trong xà phòng, chất tẩy rửa, mỹ phẩm và nước hoa (Brophy và cs., 2013) [39].

Trong y học cổ truyền ở Việt Nam tinh dầu Tràm cajuput thường được dùng nguyên chất để xoa bóp chữa đau nhức, tê thấp, ho, cũng như chữa đau bụng, co thắt dạ dày, làm thuốc bôi chống viêm, chữa vết bỏng, xoa bóp trị đau nhức khớp xương và đau dây thần kinh. Dung dịch 5 - 10% hay 20% còn được dùng để nhỏ mũi, chống cúm, ngạt mũi hoặc pha với nước ở nồng độ 0,2% để rửa vết thương (Võ Văn Chi, 1997; Đỗ Tất Lợi, 1995)[3, 22].

Hiện nay, tinh dầu Tràm năm gân là một mặt hàng có giá trị trên thị trường. Theo hãng Nature's Gift Aromatherapy Products (2009)[99] tinh dầu Tràm năm gân (Niaouli oil) giàu cineole sản xuất ở Madagasca có giá 75,79 USD/kg, trong khi tinh dầu Tràm cajuput ở Australia giá 30,84 USD/kg. Bảng chào giá của Hãng Wholesale Aromatherapy năm 2014 cũng ghi tinh dầu Niaouli cineole của Madagasca giá 66,83 USD/kg; trong khi tinh dầu Tràm cajuput của Việt Nam là 39,42 USD/kg, của Australia là 60,68 USD/kg (Wholesale Aromatherapy Ltd, 2014)[100].

1.1.2. Một số loài tràm giàu 1,8-cineole

1.1.2.1. Tiêu chuẩn chất lượng tinh dầu giàu 1,8-cineole

Tiêu chuẩn chất lượng tinh dầu Tràm cajuput được quy định tại Dược điển Việt Nam là tỷ lệ 1,8-cineol hơn 60% *mà không cần tinh chế* (Bộ Y tế Việt Nam, 2002)[2]. Theo các chuyên gia EU dùng phương pháp tinh chế để nâng cao tỷ lệ 1,8-cineole sẽ làm mất đi sự phối hợp các chất như vốn có trong tự nhiên (trích dẫn từ Bùi Thị Bằng, 2007)[1]. Vì thế việc chọn giống cần phải theo hướng nâng cao tỷ lệ 1,8-cineole tự nhiên. Một số giống Tràm năm gân loại giàu 1,8-cineole được công nhận là giống tiến bộ kỹ thuật và giống Quốc gia đều có tỷ lệ 1,8-cineole > 65%, tỷ lệ limonene < 5% (Lê Đình Khả, 2012)[21].

Tinh dầu Tràm cajuput ở Indonesia có tỷ lệ 1,8-cineole từ 62,8 - 66,5% với tỷ lệ limonene từ 5,2 - 5,6% được coi là tinh dầu loại một (Brophy và Doran, 1996)[38].

Tuy vậy, đến nay vẫn chưa có một tiêu chuẩn quốc tế nào về loại tinh dầu tràm giàu 1,8-cineole, mặc dù theo "Từ điển bách khoa các hợp chất thiên nhiên thông thường" thì tinh dầu tràm cajuput (tên chung cho các loại tinh dầu giàu 1,8-cinole) có tỷ lệ 1,8-cineole từ 3 - 60%, tỷ lệ limonene dưới 5% (Khan và Abourashed, 2010)[63], song tinh dầu Tràm năm gân (còn gọi là niaouli oil) của Madagascar (loại có giá cao) cũng có tỷ lệ limonene trung bình 7,5%, biến động trong khoảng 0,0% - 11,72%, 1,8-cineole 34,9 - 71,1% (trung bình là 55,4%) (Ramanoelina và cs., 2008)[78].

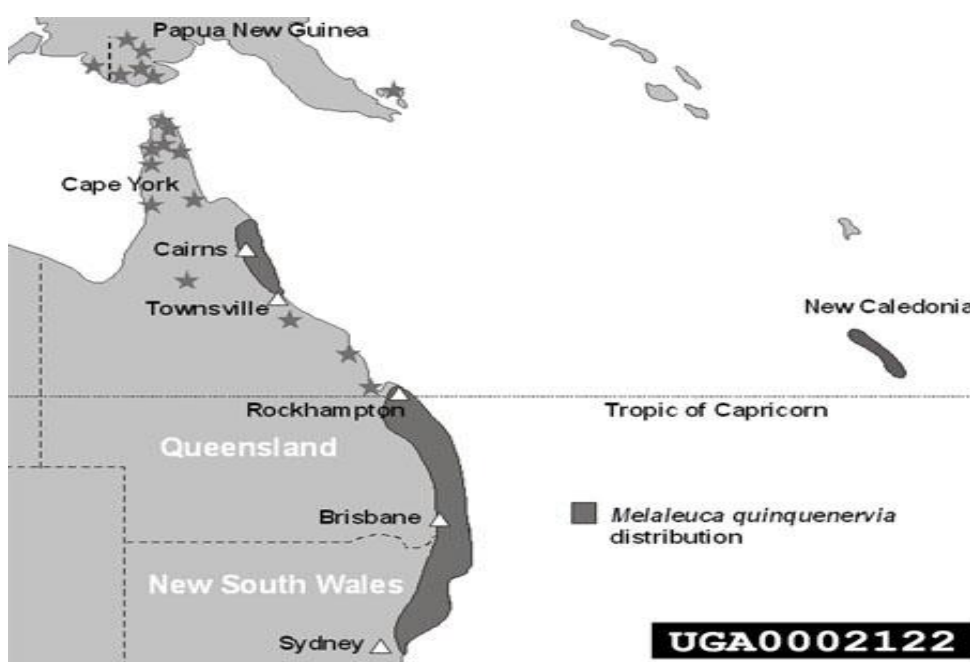
Vì thế, giống tràm giàu 1,8-cineole được chọn cần có tỷ lệ 1,8-cineole $\geq 65\%$, tỷ lệ limonene $< 5\%$, đồng thời sinh trưởng tốt.

1.1.2.2. Tràm năm gân

Tràm năm gân là loài cây thân gỗ có kích thước từ nhỏ đến trung bình, thường cao 8 - 12 m nhưng khoảng biến động là 4 - 25 m tùy thuộc vào điều kiện đất đai, khí hậu và lập địa của từng địa phương. Lá màu xanh thẫm có năm gân khá rõ nên có tên tiếng Anh là "Five - veined Paperbark" và cũng là tên khoa học của loài cây này (Boland và cs., 2006; Doran và Turnbull, 1997)[36, 49].

Tràm năm gân có phân bố tự nhiên ở vùng duyên hải miền Đông Australia, Papua New Guinea, Irian Jaya (Indonesia) và New Caledonia. Ở Australia và Papua New Guinea loài này chỉ xuất hiện ở những vùng đất thấp có độ cao so với mực nước biển dưới 100 m, vĩ độ 8 - 34° Nam (hình 1.1). Nhiệt độ trung bình tối cao của tháng nóng nhất là 26°C ở phía Nam và 34°C ở phía Bắc, khu vực duyên hải có một số ngày nhiệt độ lên tới trên 38°C. Nhiệt độ trung bình tối thấp của tháng lạnh nhất là 4 - 20°C. Lượng mưa hàng năm 900 - 1250 mm Tràm năm gân có thể sống ở nơi có lượng mưa 400 - 650

mm/năm. Ở Papua New Guinea Tràm năm gân thường xuất hiện trên đất sét phù sa giàu hữu cơ và nghèo dinh dưỡng. Vào mùa ẩm những đồng bằng này thường bị ngập lũ sâu hơn 1m. Ở New Caledonia Tràm năm gân thường xuất hiện trên những đồi dốc và các mỏm núi ở vùng cao. Loài tràm này phát triển ở hầu hết các loại đất nhưng ít khi xuất hiện trên những loại đất hình thành từ đá bazơ (Boland và cs., 2006)[36].



Hình 1.1. Phân bố tự nhiên của Tràm năm gân ở Australia và PNG
(Boland và cs., 2006)[36]

Thành phần tinh dầu Tràm năm gân ở Australia và Papua New Guinea có khác biệt lớn, song chỉ có 2 chemotype: Chemotype 1 gồm E-nerolidol (74 - 95%) và linalool (14 - 30%) được tìm thấy từ Sydney theo dọc ven biển miền đông lên vùng Selection Flat ở New South Wales và đảo Maryborough (Queensland); Chemotype 2 chứa 1,8-cineole (10 - 75%), viridiflorol (13 - 66%), alpha-terpineol (0,5 - 14%) và beta-caryophyllene (0,5 - 28%) theo tỷ lệ khác nhau được tìm thấy ở Sydney, Papua New Guinea và New Caledonia. Nghiên cứu cũng chỉ ra rằng Tràm năm gân xuất hiện ở vĩ độ 25°Nam có hàm lượng tinh dầu 1 - 3% (tính theo khối lượng lá tươi) bao gồm

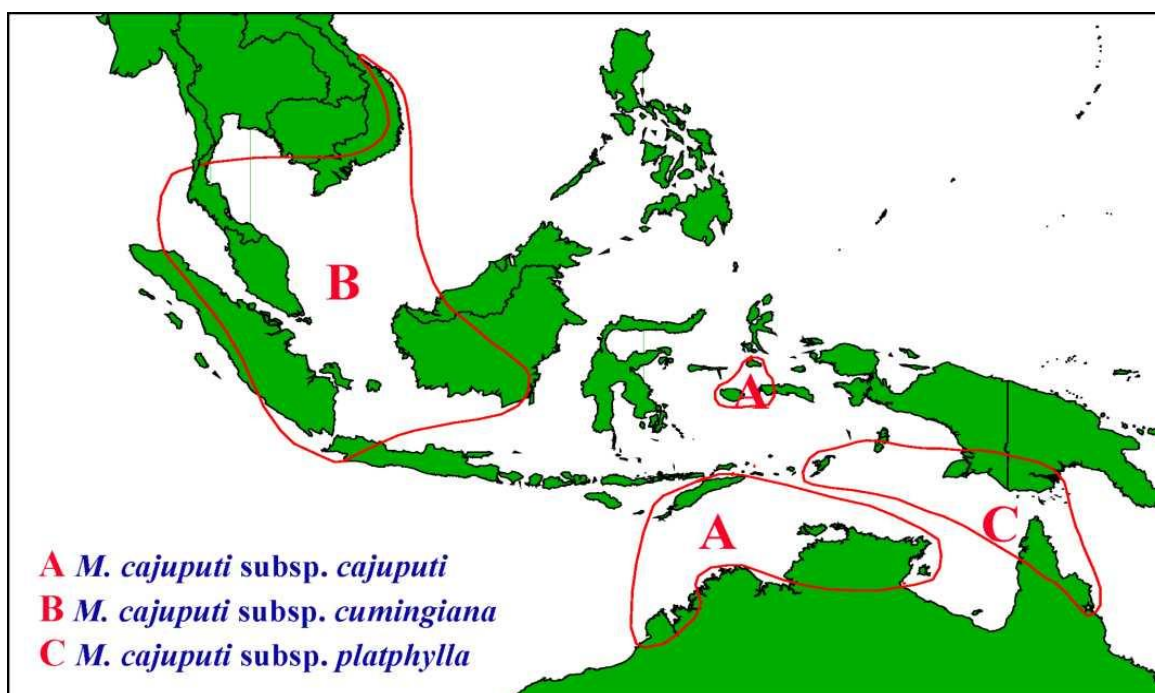
chemotype 1 và 2. Ở vĩ độ 25⁰ Bắc hàm lượng tinh dầu thấp chỉ từ 0,1 - 0,2% (tính theo khối lượng lá tươi) chỉ xuất hiện chemotype 1 (Ireland và cs., 2002)[57]. Thành phần hóa học của tinh dầu Tràm năm gân phân bố ở Madagascar đã được nghiên cứu hơn 10 năm trên 159 mẫu đại diện. Sử dụng phương pháp GC/MS để phân tích thành phần tinh dầu cho thấy các thành phần chính là: α -pinen (0,1 - 17%), limonene (< 12%), 1,8-cineole (có thể đến 71%), α -terpineol (< 12%), (E)-nerolidol (có thể đến 95%) và viridiflorol (0,1 - 36%). Tinh dầu Tràm năm gân từ Madagascar phân thành 3 chemotype: chemotype 1 gồm 1,8-cineole (49 - 62%); chemotype 2 gồm viridiflorol (21 - 36%) và chemotype 3 gồm (E)-nerolidol (56 - 95%). Trong đó, loại giàu 1,8-cineole khá phổ biến (chiếm 92% mẫu điều tra) (Panja và cs., 2008)[76].

1.1.2.3. Tràm cajuput

Tràm cajuput đa dạng về hình thái, có thể là cây bụi hay cây gỗ, thường đơn thân có chiều cao trung bình 25 m, thậm chí ở Northern Territory (Australia) cây có thể đạt chiều cao tới 40 m và đường kính ngang ngực 1,2 m bộ rễ rộng đôi khi có rễ bất định.

Tràm cajuput gồm có 3 phân loài là *Melaleuca cajuputi* subsp. *cajuputi* Power phân bố ở Indonesia và Australia; *M. cajuputi* subsp. *cumingiana* Barlow phân bố ở Myanma, Thái Lan, Malaysia, Indonesia và Việt Nam; *M. cajuputi* subsp. *platyphylla* Barlow phân bố nhiều ở Indonesia, Papua New Guinea và Australia (hình 1.2, Doran, 2013)[51].

Tràm cajuput phân bố chủ yếu trên các bãi cửa sông, các bãi ven bờ biển trong vùng nhiệt đới nóng ẩm (hình 2.1), sinh trưởng tốt nhất ở những khu vực có nhiệt độ tối cao trung bình của tháng nóng nhất là 31 - 33°C, kể cả các khu vực có tới 230 ngày nóng trên 32°C trong năm (trong đó có một số ít ngày mà nhiệt độ vượt quá 38°C) và tối thấp trung bình của tháng lạnh nhất là 17 - 22°C, lượng mưa hàng năm 600 - 4000mm (Brophy và cs., 2013)[39].



Hình 1.2. Phân bố tự nhiên các phân loài Tràm cajuput trên thế giới

(Doran, 2013)[51]

Tràm cajuput ở Indonesia được xác định bao gồm 3 chemotype: chemotype 1 có 1,8-cineole cao (50-70%), chemotype 2 có tỷ lệ 1,8-cineole thấp (31%) và chemotype 3 không có 1,8-cineole (Sakasegawa, 2003)[80].

Cây tràm bản địa Việt Nam đã được xác định là *Melaleuca cajuputi* Powell. Tràm cajuput của ta gồm cả hai phân loài là Tràm gió (*Melaleuca cajuputi* subsp. *cajuputi*) có tỷ lệ 1,8-cineole 7,18% - 60,07% và Tràm cừ (*M. cajuputi* subsp. *cumingiana*) có tỷ lệ 1,8-cineole từ dạng vết đến 0,89% (Lê Đình Khả, 2012)[21].

1.2. Các nghiên cứu chọn giống và nhân giống sinh dưỡng tràm trên thế giới

1.2.1. Nghiên cứu chọn giống

1.2.1.1. Chọn xuất xứ, dòng vô tính và khảo nghiệm hậu thế

Cây được coi là lý tưởng để trồng tràm lấy tinh dầu là có sinh khối lớn, hàm lượng tinh dầu cao, đạt chất lượng tinh dầu theo yêu cầu thị trường, có

khả năng thích ứng với các điều kiện sinh thái và có khả năng chống sâu bệnh (Doran và cs., 2002)[50].

Ở Indonesia nghiên cứu chọn giống Tràm cajuput lấy tinh dầu đã cho thấy hàm lượng tinh dầu tính theo khối lượng lá khô của 7 xuất xứ gốc ban đầu (lấy từ cây tự nhiên ở rừng) thay đổi từ 1,41 đến 4,85% (tương đương 0,52 đến 1,80% tính theo khối lượng lá tươi) với tỷ lệ 1,8-cineole từ 32 - 67%. Tuy vậy, những xuất xứ có hàm lượng tinh dầu tính theo khối lượng lá khô 4,85% tương đương 1,80% tính theo khối lượng lá tươi (như Beagle Bay của Australia) hoặc 3,88% tương đương 1,44% tính theo khối lượng lá tươi (như Ratgelombeng của Indonesia) lại chỉ có tỷ lệ 1,8-cineole là 47% không đạt yêu cầu về chất lượng xuất khẩu. Xuất xứ có tỷ lệ 1,8-cineole 67% như Pelita Jaya từ Indonesia nhưng hàm lượng tinh dầu tính theo khối lượng lá khô chỉ đạt 1,82% (tương đương 0,68% tính theo khối lượng lá tươi) và thuộc nhóm có hàm lượng thấp. Khảo nghiệm hậu thế ở giai đoạn 2 năm tuổi tại Paliyan (Indonesia) cũng cho thấy các xuất xứ này có hàm lượng tinh dầu theo lá khô từ 1,4 - 2,3% (tương đương 0,52 - 0,86% tính theo khối lượng lá tươi), thấp hơn rất nhiều so với xuất xứ gốc ban đầu từ 1,41 - 4,85% (tương đương 0,52 đến 1,80% tính theo khối lượng lá tươi). Hơn nữa, từ 25 gia đình đã chọn được một gia đình có hàm lượng tinh dầu tính theo lượng lá khô 1,8% (tương đương 0,67% tính theo khối lượng lá tươi) với tỷ lệ 1,8-cineole 60,2% (Susanto và cs., 2003)[88].

Năm 1994, các khảo nghiệm hậu thế Tràm trà đã được xây dựng tại Wyrallah và Teven ở New South Wales (Australia). Kết quả nghiên cứu tại 2 khảo nghiệm ở Wyrallah (khảo nghiệm cây chồi 19 tháng tuổi và vườn giống hữu tính thế hệ một 25 tháng tuổi) cho thấy hàm lượng tinh dầu trung bình tính theo khối lượng lá khô đạt 4,52% (tương đương 1,68% tính theo khối lượng lá tươi), tỷ lệ 1,8-cineole 4,3%, terpinen-4-ol 35,6%. Trong đó 2 xuất xứ vượt trội cả về hàm lượng và chất lượng tinh dầu là Candole (hàm lượng

tinh dầu theo khối lượng lá khô 5,11% - tương đương 1,9% tính theo khối lượng lá tươi; tỷ lệ 1,8-cineole 3,2%; terpinen-4-ol 36,7%) và Devils (có các chỉ tiêu trên tương ứng 5,2%; 2,2% và 36,3%). Hai xuất xứ này đều có tỷ lệ cây sống đạt 80%, chiều cao tương ứng 1,76 m và 1,88 m (Doran và cs., 2002)[50].

Sau 5 năm chọn lọc và nhân giống Williams (1997)[96] đã chọn được siêu dòng “88” (supper clone "88") Tràm trà với tỷ lệ terpinen-4-ol từ 42 - 44% và tỷ lệ 1,8-cineole từ 0,5 - 1%, vượt yêu cầu chất lượng tinh dầu Tràm trà trên thị trường lúc đó (là terpinen-4-ol 35,5% và 1,8-cineole 5,5%) (Burfield và Hanger, 2000)[41]. Năm 1998, siêu dòng “88” đã được đưa vào sản xuất trên quy mô thương mại ở Artheton và Queensland.

1.2.1.2. Khả năng di truyền của các tính trạng tinh dầu

Nghiên cứu Tràm cajuput ở Paliyan (Indonesia) cho thấy tương quan kiểu hình và tương quan kiểu gen giữa 2 tính trạng chiều cao và đường kính là rất chặt (tương ứng 0,81 và 0,95). Tuy nhiên tương quan kiểu hình và tương quan kiểu gen giữa các tính trạng sinh trưởng và các tính trạng về tinh dầu (hàm lượng và tỉ lệ 1,8-cineole) lại rất yếu (từ -0,15 đến 0,1). Đồng thời, tương quan kiểu hình và tương quan kiểu gen giữa hàm lượng tinh dầu và tỉ lệ 1,8-cineole cũng thấp (tương ứng 0,18 và -0,25). Hệ số di truyền về chiều cao (0,38), đường kính ở vị trí 30 cm (0,47), tỷ lệ 1,8- cineole (0,54) và hàm lượng tinh dầu (0,40) chỉ ở mức độ trung bình (Susanto và cs., 2003)[88].

Nghiên cứu tại Australia cũng thấy hàm lượng tinh dầu của các xuất xứ Tràm trà thay đổi khi khảo nghiệm trên các địa điểm có vị trí địa lý khác nhau như Bắc Queensland, Bắc New South Wales (Australia), song những xuất xứ có hàm lượng tinh dầu cao hoặc thấp khi khảo nghiệm ở đâu cũng vẫn giữ được đặc điểm này một cách ổn định, chứng tỏ ở Tràm trà có hàm lượng tinh dầu cao không có tương tác di truyền - hoàn cảnh. Ở Tràm trà hệ số di truyền theo nghĩa hẹp (h^2) của tính trạng hàm lượng tinh dầu từ cao đến rất cao (0,51 - 0,93),

của terpinen-4-ol rất cao (0,81), của 1,8-cineole từ trung bình tới cao (0,37 - 0,43), trong khi của các tính trạng sinh trưởng có hệ số di truyền thấp (chiều cao 0,11 - 0,36; đường kính gốc 0,14 - 0,18 và khối lượng chất khô 0,25) (Bucher và cs., 1996, Doran và cs., 2002)[47,60]. Hệ số tương quan giữa hàm lượng tinh dầu với tỷ lệ 1,8-cineole và terpinen-4-ol là rất yếu (tương ứng 0,15 và -0,14). Hệ số tương quan giữa tỷ lệ 1,8-cineole và terpinen-4-ol tương đối chặt nhưng là tương quan nghịch (-0,66) (Doran và cs., 2002)[50].

Các kết quả nghiên cứu ở trên cho thấy, chọn giống trầm lấy tinh dầu trên thế giới đã theo hướng từ chọn xuất xứ đến khảo nghiệm hậu thế và dòng vô tính. Tuy nhiên, các nghiên cứu chọn giống mới chỉ tập trung chủ yếu đối với Tràm trà (một loại trầm giàu Terpinen-4-ol) và Tràm cajuput, trong khi Tràm năm gân chủ yếu nghiên cứu về thành phần hoá học trong tinh dầu, các nghiên cứu chọn giống cho loài cây này còn rất hạn chế.

1.2.2. Nghiên cứu nhân giống sinh dưỡng

1.2.2.1. Nhân giống bằng hom

Nghiên cứu giâm hom Tràm trà ở Australia cho thấy sau 41 ngày hom bắt đầu ra rễ và tỷ lệ hom ra rễ tăng dần đến 69 ngày, hom đã được trẻ hoá có tỷ lệ ra rễ (đạt 26,1%) cao hơn hom được lấy từ cây trưởng thành (chỉ đạt 11,2%). Trẻ hoá cây mẹ lấy hom vào cuối mùa đông và lấy hom vào giữa mùa hè là thích hợp, hom được xử lý IBA ở nồng độ 3 g/l (3000 ppm) để tạo rễ (Mervyn và cs., 2013)[70].

1.2.2.2. Nhân giống bằng nuôi cấy mô

Nghiên cứu nuôi cấy mô Tràm trà được thực hiện từ năm 1996, chồi non (từ cây trưởng thành đã được trẻ hoá) được sử dụng để tạo mẫu sạch, với độ dài 1,5 - 3 cm cấy vào môi trường MS bổ sung 1mg/l BAP để nhân chồi trong 12 tuần, sau đó cấy chuyển sang môi trường tạo rễ MS bổ sung 0,15 mg/l IAA trong 8 tuần (List và cs., 1996)[69]. Một nghiên cứu khác cho Tràm trà sử dụng

môi trường MS và WPM ở dạng rắn và lỏng, bổ sung BAP ở các nồng độ khác nhau (từ 0; 0,125; 0,25; 0,5; 0,75 và 1 mg/l) để nghiên cứu khả năng nhân chồi. Công thức tốt nhất cho nhân chồi là môi trường MS rắn có bổ sung 0,125 mg/l BAP hoặc MS lỏng bổ sung 0,25 mg/l BAP với số chồi tạo ra tương ứng 5,6 và 11,8 chồi/mẫu cấy ban đầu. Trên môi trường WPM rắn bổ sung 0,125 mg/l BAP và môi trường WPM lỏng bổ sung 0,125 mg/l BAP số chồi tạo ra tương ứng là 5,5 và 4,7 chồi/mẫu cấy ban đầu. Ba loại chất điều hoà sinh trưởng khác nhau (NAA, IAA và IBA) đã được thử nghiệm ở nồng độ 0,1 mg/l và 0,5 mg/l trong giai đoạn tạo rễ *in vitro* và công thức đối chứng là không sử dụng chất điều hoà sinh trưởng, kết quả là khi sử dụng chất điều hoà sinh trưởng rễ xuất hiện sau 8 ngày nuôi cấy, môi trường không sử dụng chất điều hoà sinh trưởng rễ xuất hiện sau 12 ngày. Tuy nhiên tác giả cũng kết luận chất điều hoà sinh trưởng bổ sung vào môi trường nuôi cấy không cần thiết khi ra rễ *in vitro*. Nghiên cứu ảnh hưởng của nồng độ đường sucrose (15; 30 và 45 g/l) và loại môi trường nuôi cấy (MS; ½ MS; MS + than hoạt tính và ½ MS + than hoạt tính) đến khả năng tạo rễ cho thấy môi trường MS + 30 g/l sucrose và không có chất điều hoà sinh trưởng cho tỷ lệ chồi ra rễ đạt 100%, trung bình đạt 3 rễ/chồi, chiều dài rễ đạt 2,2 cm. Than hoạt tính được thêm vào môi trường nuôi cấy làm giảm tỷ lệ chồi ra rễ (Yohana de Oliveira và cs., 2010)[98].

Nghiên cứu nuôi cấy mô Tràm trà từ chồi nách cây trưởng thành, chồi được cắt và rửa sạch dưới vòi nước chảy trong 15 phút một cách cẩn thận, sau đó lắc cồn 70% trong 30 giây, rồi khử trùng bằng natri hypochlorite 10% trong 10 phút, sau đó rửa nhiều lần bằng nước cất vô trùng. Mẫu tiệt trùng được thấm khô trên giấy lọc vô trùng trước khi cấy trên môi trường MS có bổ sung 0,5 mg/l BAP + 0,1 mg/l NAA với 77% mẫu đẻ chồi và 23 chồi/mẫu cấy. Giai đoạn tạo rễ *in vitro* sử dụng môi trường MS bổ sung 1 mg/l IBA tỷ lệ chồi ra rễ 33,3% (Nadia và cs., 2012)[73].

Nghiên cứu nuôi cấy mô loài *M.bracteata* cho thấy giai đoạn nhân nhanh chồi sử dụng môi trường MS bổ sung 0,5 mg/l BAP + 0,01 mg/l NAA thu được 45,5 chồi đủ tiêu chuẩn để ra rễ/bình nuôi cấy, giai đoạn tạo rễ sử dụng môi trường MS bổ sung 1 - 1,5 mg/l IBA với tỷ lệ chồi ra rễ cao (đạt 96%) (Gong Zheng và cs., 2009)[56].

Các nghiên cứu về nhân giống sinh dưỡng trà cho thấy giâm hom và nuôi cấy mô Trà trà khá thành công và được nhiều tác giả nghiên cứu. Song nghiên cứu về nuôi cấy mô đối với Trà năm gân còn rất hạn chế.

1.2.3. Các yếu tố ảnh hưởng đến năng suất và chất lượng tinh dầu trà

a) Ảnh hưởng mật độ

Nghiên cứu ảnh hưởng khoảng cách trồng khác nhau như 1m x 30 cm (33.333 cây/ha), 1m x 45 cm (22.222 cây/ha) và 1m x 60 cm (16.667 cây/ha) đến sinh trưởng và tinh dầu của Trà trà ở Bungawalbin (NSW) cho thấy khoảng cách trồng không ảnh hưởng đến tỷ lệ cây sống. Trồng khoảng cách rộng hơn (60 cm) cây thường có tán lá dày hơn so với trồng khoảng cách hẹp, do chúng có nhiều không gian sống hơn và ít bị cạnh tranh về ánh sáng. Cây trồng khoảng cách hẹp (30 cm) có hàm lượng tinh dầu cao hơn cây trồng khoảng cách rộng (45 cm và 60 cm). Giải thích cho điều này khi cây trồng có không gian sống rộng có xu hướng tăng trưởng hơn là tích lũy các sản phẩm thứ cấp như tinh dầu, trong khi tỷ lệ 1,8-cineole và terpinen-4-ol không bị ảnh hưởng bởi khoảng cách trồng. Trong mỗi ô thí nghiệm khối lượng khô của cả cây và lượng tinh dầu/cây tăng lên cùng với sự tăng lên của khoảng cách trồng từ 30 cm (33.333 cây/ha) tới 60 cm (16.667 cây/ha). Nhưng tính trên 1 ha số lượng cây tăng lên do đó khối lượng của gốc, thân và lá trên một đơn vị diện tích tăng hơn (45%). Kết hợp các yếu tố này cho thấy sản lượng tinh dầu cao hơn khi trồng rừng ở mật độ cao hơn, chẳng hạn như trong ngành công

nghiệp sản xuất tinh dầu Tràm trà thường trồng với mật độ > 30.000 cây/ha (Prastyono, 2008)[77].

b) Ảnh hưởng mùa vụ

Một số nghiên cứu đã được tiến hành để xác định sự thay đổi hàm lượng và thành phần tinh dầu theo thời gian. Phản ứng với những thay đổi theo mùa xuất hiện khác nhau giữa các loài, loại chất hóa học (Li, 1993; Simmons và Parsons, 1987)[67, 87].

Thu thập 144 mẫu lá Tràm năm gân ngẫu nhiên trên 48 cây ở gần Toamasina (phía đông của Madagascar) vào các thời điểm tháng 7 (mùa đông), tháng 12 (mùa xuân/mùa hè) và tháng 3 (mùa thu) để nghiên cứu ảnh hưởng của mùa vụ đến chất lượng tinh dầu. Kết quả là các mùa vụ thu hoạch khác nhau độ biến động về tỷ lệ các chất trong tinh dầu rất thấp, (E)-nerolidol dao động 85,9 - 87,3%, và 1,8-cineole dao động 36,4% - 38,0% do đó tác giả kết luận thành phần tinh dầu Tràm năm gân là khá ổn định trong năm (Panja và cs., 1994)[75].

Mùa vụ đã ảnh hưởng đến hàm lượng tinh dầu Tràm trà ở Australia, hàm lượng tinh dầu thấp nhất vào cuối mùa đông đầu mùa xuân từ tháng 9 đến tháng 10 và cao nhất vào mùa hè từ tháng 11 đến tháng 5 năm sau (Drinnan, 1997; Murtagh, 1999; Williams và Home, 1988) [52, 72, 95]. Nghiên cứu gần đây khẳng định rằng hàm lượng và thành phần tinh dầu của loài này trồng ở Nam Phi thay đổi theo các mùa trong năm (Figueiredo, 2006)[55]. Biến đổi hàm lượng tinh dầu theo mùa không chỉ xảy ra đối với các loài tràm mà cũng xảy ra ở các loài khác trong họ Sim, loài mà có tuyến tinh dầu dưới biểu bì như *Eucalyptus camldulensis*, *E. kochii*, *E. plenissima* và *E. radiata* (Brooker và cs., 1988; Doran và cs., 1995; Kar, 2003)[37, 48, 61]).

Hàm lượng, chất lượng và năng suất tinh dầu Tràm trà trồng ở New South Wales thay đổi khi thu hoạch chồi ở tháng khác nhau. Hàm lượng tinh

dầu thấp khi thu hoạch từ tháng 7 đến tháng 9, nhưng năng suất sinh khối lại cao hơn. Do đó, không thấy nhất quán giữa tháng thu hoạch với sản lượng tinh dầu. Sản lượng tinh dầu thay đổi nhiều giữa các tháng cùng tên ở các năm khác nhau cũng như giữa các tháng trong một năm. Hàm lượng tinh dầu trong một vụ thu hoạch liên quan mật thiết đến năng suất sinh khối ở vụ thu hoạch trước đó. Hàm lượng tinh dầu liên quan đến nhiệt độ không khí trung bình trong 3 tháng trước khi thu hoạch. Những biến động về thành phần chính của các chất trong tinh dầu là rất nhỏ và không liên quan đến sự thay đổi theo mùa của hàm lượng tinh dầu trong lá (Murtagh và Smith, 1996)[71]. Nghiên cứu trong các năm 1993 - 1995 ở 74 cây Tràm trà được chọn cho thấy hàm lượng tinh dầu tính theo khối lượng lá khô biến đổi trong các năm là 7,3% (1993), 6,7% (1994) và 6,2% (1995) trong khi trị số trung bình của 783 cây trong quần thể nền là 5,8% (1993); còn tỷ lệ terpinen-4-ol và 1,8-cineole về cơ bản không thay đổi trong 3 năm (tương ứng là 37,1 - 38,4% và 3,3 - 4,1%) (Doran và cs., 2002)[50].

b) Ảnh hưởng phân bón

Hiện nay có rất ít nghiên cứu về ảnh hưởng của phân bón đến hàm lượng và chất lượng tinh dầu tràm. Sử dụng phân bón làm tăng sản lượng tinh dầu bằng cách nâng cao năng suất sinh khối lá trên một đơn vị diện tích. Phân đạm và phân lân dường như không ảnh hưởng tới hàm lượng tinh dầu trong lá và thành phần tinh dầu (List và cs., 1995; Sangwan và cs., 2001)[68, 83]. Tràm trà tăng trưởng nhanh hơn khi một lượng nhỏ phân bón (tức là nitơ, kali và photpho) được sử dụng thường xuyên (Drinnan, 1997)[52].

1.2.4 Kỹ thuật trồng tràm lấy tinh dầu

Mật độ trồng Tràm năm gân tại công ty Dyason ở Australia là 1,2 m x 0,6 m (tức 13.890 cây/ha). Sau khi trồng 2 năm có thể thu hoạch lá bằng cách chặt sát đất, sau đó chăm sóc cho cây ra chồi và thu hoạch hàng năm. Thu

hoạch cả cây để chưng cất tinh dầu được tiến hành sau khi trồng 1 - 2 năm tùy điều kiện sống và sinh trưởng của cây ở từng nơi. Sau đó tùy theo điều kiện đất đai và tình hình sinh trưởng của cây ở từng nơi mà tiến hành cắt chồi sau 12 - 24 tháng một lần. Chặt thu hoạch chồi được tiến hành vào các tháng 7 - 8 (từ cuối mùa đông đầu mùa xuân) hoặc tháng 2 - 3 (cuối mùa hè đầu mùa thu) hàng năm, lúc thu hoạch cây chồi chiều cao đạt 1,2 - 1,8 m. Ba tháng cây chồi cao 30 - 50 cm, sau một năm cây chồi cao 1,2 - 1,5 m. Trồng một lần có thể thu hoạch đến 30 năm. Tất cả các khâu từ làm đất, bón phân, chăm sóc đến thu hoạch đều được tiến hành bằng phương tiện cơ giới và hợp lý hóa tối đa, thậm chí thùng chở cành khi thu hoạch cũng là thùng để chưng cất tinh dầu (trích dẫn từ Lê Đình Khả, 2009)[20].

Ở Indonesia thu hoạch Tràm cajuput lần đầu tiên khi cây được 4 tuổi, chặt cách mặt đất 1,1 m sau đó khai thác hàng năm khi đường kính chồi lớn hơn 1 cm. Thời điểm thu hoạch ở Java từ tháng 6 đến tháng 10 khi sản lượng tinh dầu cao nhất. Thời gian chưng cất thường là 4 giờ. Tinh dầu nên được cất trữ trong bóng tối, điều kiện không khí mát mẻ, khô để giảm thiểu quá trình oxy hóa. Năng suất lá đạt 7,5 tấn/ha, lượng tinh dầu đạt 60 - 65 kg/ha. Thông qua việc sử dụng các giống được chọn lọc từ năm 2002 sản lượng dầu trong tương lai dự kiến sẽ cải thiện hơn 20% (Brophy và cs., 2013)[49].

Tràm trà thường được trồng bằng cây con từ hạt (Colton và cs., 2000)[47]. Cây được trồng với mật độ cao để tối đa hóa năng suất sinh khối, năng suất lá/ha có xu hướng tăng với sự gia tăng mật độ cây trồng. Tràm trà có thể được trồng với mật độ cao mà không có bất kỳ ảnh hưởng xấu đến tăng trưởng của cây, tuy nhiên mật độ cây tối ưu là 27.000 cây/ha (Small, 1981)[89]. Dựa trên kinh nghiệm thương mại ở New South Wales và Queensland mật độ 35.000 cây/ha được cho là tối ưu. Để đạt được mật độ này có thể trồng với khoảng cách 38 cm x 75 cm hoặc 28 cm x 1 m hoặc trồng hàng đôi cách nhau 38 cm

và khoảng cách giữa các hàng đôi là 150 cm. Tuy nhiên, cách bố trí trồng phổ biến nhất là khoảng cách hàng 1m. Lợi thế của việc trồng mật độ dày là độ che phủ cao sau khi trồng và sau thu hoạch do đó hạn chế được cỏ dại phát triển (Colton và Murtagh, 1999; Colton và cs., 2000)[46,47]. Việc lựa chọn khoảng cách trồng phụ thuộc vào kích thước của máy móc được sử dụng trong khi trồng ví dụ máy kéo, máy cắt, người trồng, bình xịt và việc thu hoạch. Năng suất tinh dầu của rừng trồng ảnh hưởng bởi điều kiện sinh trưởng như lượng mưa, dinh dưỡng trong đất. Một yếu tố khác làm hạn chế sinh trưởng và tinh dầu của các lâm phần Tràm trà là cỏ dại cạnh tranh. Sự can thiệp cỏ dại làm giảm sản lượng dầu qua hai cơ chế cạnh tranh của cỏ dại và chất đối kháng thực vật. Năng suất lá cây Tràm trà trung bình giảm 25% do cỏ dại xâm lấn (Virtue, 1999; Virtue và cs., 2000)[92, 93].

Trong kinh doanh Tràm trà vụ thu hoạch đầu tiên khi tán phát triển đầy đủ và năng suất lá cao nhất. Cây trồng thường được thu hoạch bằng cách chặt sát mặt đất (Colton và Murtagh, 1999)[46]. Khoảng thời gian từ khi trồng đến vụ thu hoạch đầu tiên khác nhau giữa các điều kiện lập địa, tuy nhiên 12 tháng sau khi trồng là điển hình (Colton và Murtagh, 1999; Colton và cs., 2000; Kernot, 1994)[46, 47, 62]. Vụ thu hoạch tiếp theo thường 8 - 12 tháng sau khi cắt chồi đối với Bắc Queensland và khoảng 12 tháng ở khu vực phía bắc sông New South Wales và lên đến 15 - 24 tháng về khu vực phía nam của con sông này (do chồi sinh trưởng chậm vì nhiệt độ thấp). Cây trồng đạt đến độ trưởng thành khi thu hoạch ở vụ thứ ba sau đó có xu hướng ổn định. Vụ thu hoạch đầu tiên và thứ hai sản lượng thu hoạch thường 50% và 75% sản lượng lúc cây trưởng thành (Colton và cs., 2000)[47].

1.2.5. Tình hình gây trồng, sản xuất và tiêu thụ tinh dầu tràm

Tràm cajuput (*Melaleuca cajuputi* subsp. *cajuputi*) là cây trồng chính lấy tinh dầu ở Indonesia. Tổng sản lượng hàng năm của Tràm cajuput loại giàu 1,8-

cineole trên thế giới được ước tính là 600 tấn/năm trong đó Indonesia 390 tấn (300 tấn từ rừng trồng và 90 tấn từ rừng tự nhiên), Việt Nam 100 tấn (từ rừng tự nhiên) và những nơi khác. Thị trường tiêu thụ chính của loại tinh dầu này là Đông Nam Á. Ở Indonesia Tràm cajuput được trồng trên diện tích 20.000 ha, ở các vùng đất bị suy thoái của Java với mật độ trung bình 2.000 cây/ha (Brophy và cs., 2013)[39].

Tổng sản lượng hàng năm của các loại tinh dầu Tràm trà trên thế giới hơn 600 tấn (Australia 400 tấn; Trung Quốc 200 tấn và những quốc gia khác...). Các thị trường tiêu thụ chính là Bắc Mỹ và châu Âu. Trung tâm sản xuất tinh dầu loài cây này là Đông Bắc New South Wales và Cao nguyên Atherton Queensland với tổng diện tích 3.000 ha, mật độ 30.000 - 35.000 cây/ha, quản lý cỏ dại, côn trùng gây hại và phân bón kết hợp với việc sử dụng giống tốt là rất quan trọng để tối ưu hóa sản xuất (Brophy và cs., 2013)[39].

Trung Quốc đã nhập giống Tràm trà của Australia đầu những năm 2000 để nghiên cứu chọn giống. Viện Nghiên cứu Lâm nghiệp Quảng Tây đã chọn được các dòng vô tính Tràm trà có chất lượng tinh dầu cao. Đến năm 2005 Trung Quốc đã trồng 200 - 300 ha Tràm trà, sản lượng tinh dầu hàng năm đã đạt 60 - 80 tấn/năm, trong đó có 40 - 50 tấn đạt chất lượng cao với tỷ lệ terpinen-4-ol 40 - 50%, tỷ lệ 1,8-cineole dưới 3% có khả năng cạnh tranh với tinh dầu Tràm trà của Australia do giá thành thấp hơn (Chumao, 2005)[44].

1.3. Các nghiên cứu chọn giống và nhân giống sinh dưỡng tràm ở Việt Nam

1.3.1. Nghiên cứu chọn giống

1.3.1.1. Chọn giống tràm lấy gỗ

Năm 1994 Trung tâm Nghiên cứu Giống cây rừng (nay là Viện nghiên cứu Giống và Công nghệ sinh học Lâm nghiệp) và Phân Viện Lâm Nghiệp Nam Bộ (nay là Viện Khoa học Lâm nghiệp Nam Bộ) đã phối hợp với Cơ

quan Khoa học và Công nghệ (CSIRO) Australia tiến hành khảo nghiệm xuất xứ cho bộ giống gồm 46 xuất xứ thuộc 11 loài của chi *Melaleuca* và 2 xuất xứ của *Asteromyrtus brassii* tại Thạnh Hoá (Long An), tại Kinh Đứng, huyện Trần Văn Thời và Tiểu khu 048, huyện U Minh (Cà Mau). Các khảo nghiệm này đã cho thấy Tràm lá dài (*M. leucadendra*) có sinh trưởng nhanh nhất, tiếp đó là một số xuất xứ của Tràm viridiflora (*M. viridiflora*) và Tràm cajuput (Lê Đình Khả và cs, 1999; 2003; Nguyễn Trần Nguyên và Hoàng Chương, 1998; Nguyễn Trần Nguyên, 1999) [16, 18, 26, 27]. Những xuất xứ Cambridge Gulf, Weipa Qld và Rifle Creek Qld của Tràm lá dài; xuất xứ Benbash PNG và Kuru Oriomo PNG của Tràm cajuput đã được Bộ Nông Nghiệp và Phát triển nông thôn công nhận là giống tiên bộ kỹ thuật.

Ngoài ra, Viện Nghiên cứu Giống và Công nghệ sinh học Lâm nghiệp tiến hành thử nghiệm trồng Tràm lá dài và Tràm cajuput trên đất đồi trọc Ba Vì (Hà Nội) vào năm 1993, trên đất bán ngập theo mùa ở vùng núi đá vôi Gia Viễn (Ninh Bình) vào năm 2000 nhằm đánh giá khả năng sinh trưởng của chúng. Đánh giá các khảo nghiệm xuất xứ tràm tại Ba Vì (Hà Nội) và Gia Viễn (Ninh Bình) vào năm 2006 cho thấy một số xuất xứ của Tràm lá dài có sinh trưởng nhanh nhất và có tiềm năng bột giấy cao hơn Tràm cajuput (Nguyễn Việt Cường và Phạm Đức Tuấn, 2006)[4].

Trong các năm 2001 - 2005 nghiên cứu lai giống tràm cũng được thực hiện và đã chọn được một số tổ hợp lai có sinh trưởng nhanh. Các tổ hợp lai được tiến hành là *M. leucadendra* x *M. cajuputi*, *M. cajuputi* x *M. leucadendra*, *M. quinquenervia* x *M. leucadendra* và một số tổ hợp lai trong loài của *M. leucadendra*. Kết quả cho thấy hầu hết các cây lai đều sinh trưởng tốt hơn bố mẹ của chúng (Nguyễn Việt Cường và cs., 2007)[5].

Khảo nghiệm tràm lai tự nhiên giữa Tràm cajuput của Việt Nam với Tràm lá dài của Australia (tổ hợp lai CH1 - L1) đã được xây dựng trên đất

rừng ngập nước theo mùa ở Việt Nam. Khảo nghiệm được xây dựng tháng 11/2000 với các giống tham gia khảo nghiệm gồm có tổ hợp lai CH1 - L1, Tràm lá dài xuất xứ Weipa 14147 và giống Tràm cajuput tại Hòn Đất (Kiên Giang). Theo dõi sinh trưởng sau 2 năm cho thấy giống lai khi trồng trên diện hẹp cho sinh trưởng rất có triển vọng so với hai giống bố mẹ về các chỉ tiêu sinh trưởng chiều cao, đường kính thân cây và chất lượng thân cây. Với triển vọng này cho phép triển khai trồng đại trà trên diện rộng đối với đất phèn ngập nước theo mùa ở miền Nam nước ta. Trữ lượng ban đầu sau 2 năm khảo nghiệm giống CH1 - L1 đạt năng suất $20 \text{ m}^3/\text{ha}/\text{năm}$ trong khi loài nhập nội là $12 \text{ m}^3/\text{ha}/\text{năm}$ và loài cây bản địa chỉ có $8,7 \text{ m}^3/\text{ha}/\text{năm}$ (Trần Thị Thu Hằng và Thái Thành Lượm, 2006)[9].

1.3.1.2. Chọn giống tràm lấy tinh dầu

Nghiên cứu chọn giống tràm lấy tinh dầu cho các loài tràm được thực hiện tại Thạnh Hóa (Long An) từ năm 1994. Kết quả nghiên cứu đã cho thấy ở giai đoạn 6 năm tuổi trong 12 xuất xứ của 7 loài tràm được nghiên cứu chỉ có 3 xuất xứ của Tràm năm gân, 1 xuất xứ của *M. stenostachya* và 1 xuất xứ của *M. fluvialis* có hàm lượng tinh dầu tương đối cao. Trong đó hàm lượng tinh dầu tính theo khối lượng lá tươi của xuất xứ 1601 loài *M. stenostachya* và xuất xứ 1101 loài *M. fluvialis* tương ứng là 1,66% và 1,15% với tỷ lệ 1,8-cineole tương ứng là 8,12% và 34,12% (không đạt tiêu chuẩn chất lượng cần thiết để sản xuất tinh dầu). Các xuất xứ Tràm năm gân và Tràm lá dài của Australia đều có hàm lượng tinh dầu tính theo khối lượng lá tươi thấp (0,65 - 0,80%). Trong 3 xuất xứ của Tràm năm gân, xuất xứ Tozer's gap 1302 Qld có hàm lượng tinh dầu 0,86% và có tỷ lệ 1,8-cineole 72,06% hai xuất xứ còn lại đều có tỷ lệ 1,8-cineole thấp hơn. Từ đó xuất xứ Tozer's gap 1302 Qld của Tràm năm gân được chọn làm giống để sản xuất tinh dầu tràm ở nước ta (Phùng Cẩm Thạch, 2000)[29]. Tuy vậy, khảo nghiệm xuất xứ sau này tại Ba

Vì trong các năm 2005 lại thấy những xuất xứ này đều có hàm lượng tinh dầu và tỷ lệ 1,8-cineole trong tinh dầu kém các xuất xứ khác của Tràm năm gân (Lê Đình Khả và cs., 2008)[19].

Năm 2005, tại Ba Vì (Hà Nội) 14 xuất xứ của Tràm năm gân đã được khảo nghiệm với giống đối chứng là Tràm cajuput của Việt Nam. Đánh giá ở giai đoạn 2,5 tuổi các xuất xứ có triển vọng là Gympie Qld (Q4) và Bribie Island Qld (Q8) có hàm lượng tinh dầu tương ứng 1,79% và 1,86%, tỷ lệ 1,8 cineole tương ứng 75,72% và 78,59%, tỷ lệ limonene tương ứng 2,77% và 2,55%. (Nguyễn Thị Thanh Hương, 2008)[11].

Năm 2008 và 2009, khảo nghiệm xuất xứ và dòng vô tính bổ sung cho Tràm năm gân tại Phú Lộc (Thừa Thiên - Huế), Thanh Hóa (Long An) đã cho thấy ở giai đoạn 2 - 3 năm tuổi các xuất xứ và dòng vô tính có triển vọng tại Phú Lộc là Casino NSW, West Malam PNG và một số dòng vô tính của xuất xứ Gympie Qld, tại Thanh Hoá là Casino NSW, West Malam PNG, Gympie Qld; Bribie Island Qld; Wasua Road PNG và một số dòng vô tính của xuất xứ Gympie Qld, Bribie Island Qld (các xuất xứ và dòng vô tính có triển vọng này đều có hàm lượng tinh dầu hơn 1,44% và tỷ lệ 1,8-cineole trên 65%, tỷ lệ limonene nhỏ hơn 5%), các xuất xứ và dòng vô tính nêu trên đã được công nhận là giống tiến bộ kỹ thuật và giống quốc gia (Lê Đình Khả, 2012)[21].

Bộ giống gồm 15 lô hạt cây trội Tràm trà giàu terpinen -4-ol có nguồn gốc từ Candole (NSW) đã được CSIRO cung cấp để khảo nghiệm hậu thế tại Ba Vì (Hà Nội) năm 2009, kết quả khảo nghiệm giống sau 2 năm đã xác định được các gia đình Tràm trà A26, A32 và A38 thuộc nhóm có sinh trưởng nhanh nhất, hàm lượng tinh dầu (2,07 - 3,39%) và tỷ lệ terpinen-4-ol (43,11 - 50,0%) rất cao, đồng thời tỷ lệ 1,8-cineole (0,61 - 0,82%) thấp và đặc biệt là không có limonene hoặc tỷ lệ limonene rất thấp, tương đương siêu dòng "88" của Australia. Ngoài ra, A30 cũng là gia đình có triển vọng (hàm lượng tinh

dầu 2,27%, tỷ lệ terpinen-4-ol 42,13%, tỷ lệ 1,8-cineole 0,83%, không có limonene) (Lê Đình Khả, 2012)[21].

Nghiên cứu lai giống giữa Tràm năm gân (Q40) có hàm lượng tinh dầu tính theo khối lượng lá khô 1,6%, tỷ lệ 1,8-cineole 58,3% với Tràm cajuput (Ca33) có các chỉ tiêu này tương ứng là 1,2% và 10,3%, cây lai Q40Ca33 có các chỉ tiêu trên tương ứng chỉ đạt 1,15% và 6,8% nghĩa là hàm lượng tinh dầu và tỷ lệ 1,8-cineole ở cây lai đều kém hơn các cây bố mẹ. Tổ hợp lai L18Ca61 (giữa Tràm lá dài với Tràm cajuput) cũng có hàm lượng tinh dầu, tỷ lệ 1,8-cineole trung gian giữa bố và mẹ. Tổ hợp lai khác Ca33L8 (giữa Tràm cajuput với Tràm lá dài) có hàm lượng tinh dầu tính theo khối lượng lá khô là 0,85% và tỷ lệ 1,8-cineole 18,7%, trong khi cây mẹ Ca33 có các chỉ tiêu này tương ứng là 1,2% và 10,3% (Nguyễn Việt Cường và cs., 2008)[6]. Điều đó chứng tỏ lai giống chưa đem lại kết quả như mong muốn trong chọn giống tràm lấy tinh dầu.

Các nghiên cứu về chọn giống tràm trong nước cho thấy trong giai đoạn đầu chủ yếu là về sinh trưởng; các nghiên cứu về chọn giống lấy tinh dầu mới tiến hành trong những năm gần đây, tuy đã có một số kết quả, song mới ở giai đoạn đầu. Tràm cajuput của Việt Nam có hàm lượng và chất lượng tinh dầu rất thấp, hiệu quả kinh tế không cao. Vì vậy, tiếp tục các nghiên cứu chọn loài, xuất xứ và khảo nghiệm dòng vô tính nhằm lựa chọn các giống tràm có năng suất và chất lượng tinh dầu cao phục vụ trồng rừng để nâng cao hiệu quả kinh tế là hết sức cần thiết.

1.3.2. Nghiên cứu nhân giống sinh dưỡng

1.3.2.1. Nhân giống tràm bằng hom

Nhân giống bằng hom một số loài tràm (Tràm năm gân, Tràm cajuput và Tràm trà) đã được nhiều tác giả trong nước nghiên cứu, trong đó có sử

dùng các chất điều hoà sinh trưởng IBA, IAA và ABT dạng bột hoặc dạng nước ở các nồng độ khác nhau và rất thành công.

Xử lý hom Tràm năm gân bằng IBA nồng độ 0,5% và 1,5% tỷ lệ ra rễ cao nhất (93,3%). Khả năng ra rễ của hom giâm phụ thuộc vào từng xuất xứ. Xử lý hom giâm của 14 xuất xứ Tràm năm gân bằng IBA (dạng bột) nồng độ 0,5% cho thấy 8 xuất xứ tỷ lệ ra rễ trên 90%. Trong đó xuất xứ Caloundra Qld và Tozer's gap 1302 Qld có tỷ lệ hom ra rễ cao nhất đều đạt 98,9%, xuất xứ Kiriwo PNG có tỷ lệ hom ra rễ đạt 92,2% (Nguyễn Thị Thanh Hương, 2008) [11]. Thời kỳ giâm hom Tràm năm gân thích hợp nhất là tháng 5 (tỷ lệ hom ra rễ 80%, chỉ số rễ 32,33) (Khuất Thị Hải Ninh, 2009)[25].

Xử lý hom Tràm trà bằng IAA và IBA (dạng nước) nồng độ 500 ppm, ABT nồng độ 1000 ppm vào mùa xuân sau 50 - 70 ngày có tỷ lệ ra rễ 90 - 100% (Nguyễn Văn Nghi, 2000)[24], hoặc hom lấy từ chồi vượt của cây mẹ 1 năm tuổi rồi xử lý IBA (dạng bột) nồng độ 0,25% và 0,75% cũng cho tỷ lệ ra rễ 90 - 93%, chiều dài rễ 7,6 - 7,7 cm (Hà Thị Kim Thoa, 2010)[31].

Xử lý hom Tràm cajuput bằng IBA hoặc NAA nồng độ 0,5 - 1% trên giá thể là cát (Nguyễn Thị Hải Hồng, 2006)[10] hoặc bằng IBA nồng độ 1000 ppm cho tỷ lệ ra rễ 75% (Phạm Đức Tuấn và Hoàng Vũ Thơ, 2008)[34].

Xử lý hom tràm lai L2 - CV1 (giữa Tràm lá dài và Tràm cajuput) bằng IBA nồng độ 2% trong điều kiện che sáng 75%, trên nền hỗn hợp cát và tro trấu sau 30 ngày tỷ lệ ra rễ đạt 95% (Thái Thành Lượm, 2006)[23].

1.3.2.2. Nhân giống tràm bằng nuôi cấy mô

Một số loài tràm cũng đã được nghiên cứu nhân giống bằng nuôi cấy mô và đã có những kết quả nhất định.

Nghiên cứu nuôi cấy mô Tràm năm gân và Tràm trà bước đầu cho thấy thời kỳ vào mẫu thích hợp từ tháng 4 – 9, chồi non (của cây đã được trẻ hoá) được xử lý bằng HgCl_2 0,1% trong vòng 4 - 5 phút. Môi trường nhân nhanh chồi

Tràm trà MS bổ sung 2 mg/l BAP + 1,5 mg/l GA3 + 2 g/l than hoạt tính và đối với Tràm năm gân MS bổ sung 2g/l than hoạt tính + 2 mg/l BAP + 1 mg/l GA3 (Lê Sơn, 2011)[28].

Nghiên cứu nuôi cấy mô Tràm cajuput cho thấy khử trùng bề mặt mẫu cây bằng cồn 70° trong 30 giây, dung dịch Clorox 20% trong 30 phút, HgCl₂ 0,05 % trong 30 phút. Môi trường tốt nhất để nhân chồi trực tiếp từ đoạn thân MS có bổ sung 2 mg/l BAP. Tạo rễ chồi *in vitro* trên môi trường MS có bổ sung 2,0 mg/l NAA sau 75 ngày đạt 5,6 rễ/chồi (Phùng Thị Hằng và Nguyễn Bảo Toàn, 2011)[8].

Nghiên cứu khác đối với Tràm trà cho thấy sử dụng chồi đỉnh của cây 4 năm tuổi, mẫu được khử trùng với HgCl₂ 0,1% trong 10 phút, sau đó khử trùng bằng dung dịch javel (75%) trong 15 phút cho tỷ lệ mẫu sạch nảy chồi 70,59%. Môi trường thích hợp tái sinh chồi và nhân chồi là LV (môi trường cơ bản của Litvay, 1985) có bổ sung 0,5 mg/l BAP (tạo 1,1 chồi/mẫu cây trong giai đoạn tái sinh chồi, tạo 13,2 chồi/cụm trong giai đoạn nhân nhanh chồi). Trong môi trường LV có bổ sung 1 - 2 mg/l BAP mẫu cây có xu hướng tạo chồi song kim hãm chồi phát triển chiều cao (thân lá nhỏ). Môi trường LV có bổ sung 2 mg/l NAA cho tỷ lệ chồi ra rễ cao nhất đạt 60,42% (Mai Thị Phương Hoa và cs., 2013)[14].

Nghiên cứu nuôi cấy mô Tràm lá dài cho thấy môi trường thích hợp để nhân nhanh chồi là MS bổ sung 0,1 mg/l Kinetin + 0,2 mg/l BAP + 0,1 mg/l NAA + 20 g/l sucrose + 7 g/l agar (với hệ số nhân chồi đạt 4,3 lần, chiều cao chồi trung bình đạt 1,3 cm và 10 lá/chồi), môi trường nuôi cấy thích hợp cho ra rễ chồi *in vitro* là ½ MS bổ sung 0,2 mg/l IBA +15 g/l sucrose + 7 g/l agar với 4,7 rễ/cây; chiều dài rễ là 1,2 cm và chiều cao cây trung bình đạt 2,8 cm (Đinh Thị Huyền, 2006)[15].

Nghiên cứu nhân giống sinh dưỡng tràm ở trong nước đã đạt được những thành công nhất định. Trong đó, nhân giống bằng giâm hom rất thành

công đôi với Tràm năm gân, Tràm cajuput và Tràm trà. Nhân giống bằng nuôi cấy mô có những ưu điểm vượt trội, như có hệ số nhân cao có thể cho phục vụ cho sản xuất qui mô lớn trong một thời gian ngắn; chủ động về thời điểm cung cấp giống; cây trồng có độ trẻ cao, sức sống cao và tuổi thọ lớn, do vậy cho sinh khối sản phẩm cao. Điều này đặc biệt quan trọng đối với những loài cây trồng lấy lá để chưng cất tinh dầu như tràm. Tuy nhiên, phương pháp nhân giống này mới chỉ khá thành công với loài Tràm trà và Tràm cajuput, song với loài Tràm năm gân mới chỉ ở giai đoạn nhân chồi, do vậy cần tiếp tục nghiên cứu để hoàn thiện qui trình nuôi cấy mô loài cây này nhằm tạo cây con đủ số lượng và chất lượng cao cho trồng rừng.

1.3.3. Các yếu tố ảnh hưởng đến năng suất và chất lượng tinh dầu tràm

Nghiên cứu Tràm cajuput tại Bình Trị Thiên cho thấy hàm lượng tinh dầu và tỷ lệ 1,8-cineole tăng dần từ khi cây 2 tuổi đến 5 tuổi và ổn định giai đoạn 6 - 8 tuổi. Ở giai đoạn 2 năm tuổi hàm lượng tinh dầu tính theo khối lượng lá tươi là 0,26%, tỷ lệ 1,8-cineole là 46,66%, ở giai đoạn 4 tuổi cây có hàm lượng tinh dầu và tỷ lệ 1,8-cineole tương ứng là 0,46% và 54,70%, đến 7 tuổi cây có các trị số trên tương ứng là 0,71 và 71,19%. Quá trình tích lũy tinh dầu của Tràm cajuput phụ thuộc nhiều vào các điều kiện sinh thái nơi gây trồng. Hàm lượng tinh dầu và tỷ lệ 1,8-cineole của cây tràm mọc trên đất đồi laterit cao hơn ở cây tràm mọc ở đầm lầy, thung lũng và trên đất cát (Đào Trọng Hưng, 1995)[12]. Một nghiên cứu khác cũng cho thấy hàm lượng tinh dầu loài Tràm cajuput cao hay thấp tùy theo mùa, theo thời tiết. Hàm lượng tinh dầu cao nhất (đạt 0,5%) từ tháng 4 đến tháng 8, thấp nhất trong mùa mưa (chỉ đạt 0,25 - 0,3%), tỷ lệ 1,8-cineole trong tinh dầu ở lá già cao hơn lá non (Vũ Ngọc Lễ, 1977- trích dẫn từ Nguyễn Việt Cường và Phạm Đức Tuấn 2008)[7].

Nghiên cứu về tinh dầu trong lá Tràm trà tại một số địa điểm ở miền Bắc nước ta cho thấy sau 3 năm hàm lượng tinh dầu đã khá ổn định, tỷ lệ

terpinen-4-ol có thể đạt 33 - 43%. Hàm lượng tinh dầu tính theo khối lượng lá tươi có thể đạt 1,75 - 2,20% thay đổi theo mùa, tuổi cây và theo điều kiện sinh thái nơi gây trồng (Nguyễn Văn Nghi, 2000)[24].

Nghiên cứu tại Thạnh Hoá (Long An) cho thấy thời gian thu hái lá tốt nhất của mỗi loài và xuất xứ trà có khác nhau. Trong các tháng rừng bị ngập nước vẫn có thể thu hái lá để chưng cất tinh dầu. Mùa khô chất lượng tinh dầu thường tốt hơn mùa ngập nước. Khuyến cáo tháng 6 và 7 thích hợp để thu hái lá chưng cất tinh dầu đối với xuất xứ có triển vọng Tozer 's gap 1302 Qld của Trà năm gân (Phùng Cẩm Thạch và cs., 2000)[29].

Nghiên cứu ảnh hưởng của mùa vụ thu hoạch đến hàm lượng và chất lượng tinh dầu Trà năm gân tại Ba Vì (Hà Nội) cho thấy chủ yếu là do nhiệt độ và lượng mưa. Trong đó lượng mưa là nhân tố biểu hiện rõ hơn. Lượng mưa có ảnh hưởng lớn đến hàm lượng và chất lượng tinh dầu trà, trong khi ảnh hưởng của nhiệt độ đến hàm lượng và chất lượng tinh dầu biểu hiện không rõ ràng. Lượng mưa thấp làm tăng hàm lượng tinh dầu và tỷ lệ 1,8-cineole, lượng mưa cao làm giảm hàm lượng và tỷ lệ 1,8-cineole trong lá Trà năm gân (Khuất Thị Hải Ninh, 2009)[25].

Nghiên cứu ảnh hưởng của tuổi lá đến hàm lượng và chất lượng tinh dầu của xuất xứ Kiriwo PNG Trà năm gân tại Ba Vì (Hà Nội) cũng thấy hàm lượng tinh dầu trong lá non cao hơn hoặc tương đương hàm lượng tinh dầu trong lá già (tương ứng là 1,26 và 1,22%), nhưng tỷ lệ 1,8-cineole trong lá non thấp hơn trong lá già (tương ứng là 41,82 và 62,31%) và tỷ lệ limonene trong lá non lại cao hơn trong lá già (tương ứng là 8,09% và 4,48%) (Khuất Thị Hải Ninh, 2009)[25].

1.3.4. Tình hình sản xuất tinh dầu trà

Chưng cất tinh dầu trà ở nước ta chủ yếu được người dân thực hiện theo phương pháp lôi cuốn hơi nước kiểu thủ công như nấu rượu. Cành lá

tràm tươi được cho vào thùng phuy có nước ở phần dưới, đáy chặt nắp có dạng cổ ngỗng nối với ống thông để chuyển hơi nước có tinh dầu sang bể làm lạnh. Tinh dầu tràm cùng hơi nước bốc lên qua ống hơi được chuyển vào bể làm lạnh. Ở đây tinh dầu được ngưng tụ và chảy vào dụng cụ chứa (thường là chai nhựa), trong đó tinh dầu có tỷ trọng thấp hơn nước nên nằm ở phần trên và nước có tỷ trọng cao hơn nằm ở phần dưới. Tinh dầu được tách ra bằng cách rút hết nước ở phía dưới.

Tràm cajuput ở nước ta có hàm lượng tinh dầu thấp nên nhiều gia đình ở Phú Lộc (Thừa Thiên - Huế) đã dùng cây Chổi xẻ (*Baekkea frutescens*), một loài cây dạng bụi nhỏ, hàm lượng tinh dầu có thể đạt đến 4%, song tỷ lệ 1,8-cineole trong tinh dầu chỉ đạt 10,25% (Trần Duy Thái, 2002)[30], để trộn lẫn với Tràm cajuput (giống Tràm gió) của Phú Lộc có hàm lượng tinh dầu thấp (cao nhất chỉ là 0,71%) để chưng cất. Vì thế chất lượng tinh dầu tràm của ta rất thấp, không có giá trị trao đổi trên thị trường quốc tế. Trong một số trường hợp người dân còn cho dầu hỏa vào để tăng lượng tinh dầu lấy ra, chất lượng dầu càng kém, khó tiêu thụ trên thị trường (Lê Đình Khả, 2012)[21].

1.4 Một số nhận định chính

Từ những kết quả nghiên cứu chọn giống, nhân giống tràm trên thế giới và trong nước cho thấy:

Chọn giống tràm lấy tinh dầu trên thế giới đã theo hướng từ chọn xuất xứ đến khảo nghiệm hậu thế và dòng vô tính; cũng như nghiên cứu các yếu tố ảnh hưởng đến hàm lượng và chất lượng tinh dầu. Tuy vậy, các nghiên cứu chọn giống tập trung chủ yếu đối với Tràm trà (một loại tràm giàu Terpinen-4-ol) và Tràm cajuput, trong khi Tràm năm gân chủ yếu nghiên cứu thành phần hoá học trong tinh dầu, các nghiên cứu chọn giống cho loài cây này còn rất hạn chế, tinh dầu được chưng cất chủ yếu từ rừng tự nhiên. Ở Việt Nam các nghiên cứu về cây tràm giai đoạn trước năm 2005 chủ yếu về sinh trưởng; các

ngiên cứu về chọn giống và thâm canh trà lấy tinh dầu mới tiến hành trong những năm gần đây, tuy đã có một giống trà được công nhận, song mới ở giai đoạn đầu, sản xuất tinh dầu trà chủ yếu vẫn là khai thác trong rừng tự nhiên. Trà cajuput của Việt Nam có hàm lượng và chất lượng tinh dầu rất thấp, hiệu quả kinh tế không cao.

Nhân giống bằng giâm hom đã có những kết quả khá rõ nét đối với Trà năm gân, Trà cajuput và Trà trà. Nhân giống bằng nuôi cấy mô mới chỉ khá thành công với loài Trà trà và Trà cajuput, song với loài Trà năm gân mới ở giai đoạn nhân chồi, do vậy cần tiếp tục nghiên cứu để hoàn thiện qui trình nuôi cấy mô nhằm tạo cây con đủ số lượng, chất lượng cao cho trồng rừng.

Nghiên cứu các nhân tố ảnh hưởng đến hàm lượng và chất lượng tinh dầu cũng như các biện pháp kỹ thuật để nâng cao năng suất và chất lượng tinh dầu trà là rất cần thiết, song được tiến hành chưa nhiều.

Từ đó, có thể thấy tiếp tục các nghiên cứu chọn giống, nhân giống bằng nuôi cấy mô và các biện pháp kỹ thuật nhằm nâng cao năng suất, chất lượng tinh dầu trà là hết sức cần thiết.

CHƯƠNG 2.

NỘI DUNG, VẬT LIỆU, PHƯƠNG PHÁP VÀ ĐỊA ĐIỂM NGHIÊN CỨU

2.1. Nội dung nghiên cứu

2.1.1. Nghiên cứu biến dị sinh trưởng, hàm lượng và chất lượng tinh dầu của Tràm năm gân và Tràm cajuput

- Nghiên cứu biến dị sinh trưởng, hàm lượng và chất lượng tinh dầu giữa các xuất xứ Tràm cajuput.

- Nghiên cứu biến dị sinh trưởng, hàm lượng và chất lượng tinh dầu giữa các xuất xứ, các dòng vô tính Tràm năm gân.

+ Nghiên cứu biến dị sinh trưởng, hàm lượng và chất lượng tinh dầu giữa các xuất xứ Tràm năm gân.

+ Nghiên cứu biến dị sinh trưởng, hàm lượng và chất lượng tinh dầu giữa các dòng vô tính Tràm năm gân.

+ Nghiên cứu tương quan về các tính trạng sinh trưởng, hàm lượng, chất lượng tinh dầu của các xuất xứ Tràm năm gân giữa các nơi khảo nghiệm.

2.1.2. Nghiên cứu kỹ thuật nhân giống Tràm năm gân bằng nuôi cấy mô

- Nghiên cứu ảnh hưởng của thời gian và số lần khử trùng mẫu bằng HgCl_2 0,1% đến tỷ lệ mẫu sạch bột chồi hữu hiệu.

- Nghiên cứu ảnh hưởng của môi trường dinh dưỡng, chất điều hoà sinh trưởng và hàm lượng các loại đường đến khả năng tái sinh chồi.

- Nghiên cứu ảnh hưởng của chất điều hoà sinh trưởng đến khả năng tạo cụm chồi.

- Nghiên cứu ảnh hưởng của nồng độ IBA và NAA đến khả năng tạo rễ *in vitro*.

- Nghiên cứu thời gian huấn luyện cây mô

2.1.3. Nghiên cứu một số biện pháp kỹ thuật nhằm tăng năng suất và chất lượng tinh dầu Tràm năm gân

- Nghiên cứu ảnh hưởng của bón thúc đến sinh trưởng, hàm lượng và chất lượng tinh dầu.
- Nghiên cứu ảnh hưởng của chiều cao gốc chặt đến khả năng ra chồi.
- Nghiên cứu ảnh hưởng của thời vụ đến hàm lượng và chất lượng tinh dầu.

2.2. Vật liệu nghiên cứu

2.2.1. Vật liệu khảo nghiệm giống

- 10 xuất xứ Tràm cajuput (*Melaleuca cajuputi* Powell) gồm 7 xuất xứ (*M. cajuputi* subsp. *cajuputi*) được nhập từ Indonesia (do CSIRO của Australia cung cấp) và 3 xuất xứ Tràm gió của Việt Nam từ Thanh Hóa (Long An), Phú Lộc (Thừa Thiên - Huế), Đại Lải (Hà Nội) (bảng 2.1).

- 11 xuất xứ Tràm năm gân (*Melaleuca quinquenervia* (Cav.) S.T.Blake) gồm 2 xuất xứ từ Papua New Guinea (PNG), 3 xuất xứ từ Queensland (Qld), 6 xuất xứ từ New South Wales (NSW) (bảng 2.2).

- 26 dòng vô tính của các xuất xứ Tràm năm gân gồm 12 dòng vô tính của xuất xứ West Malam PNG, 7 dòng vô tính của xuất xứ Bribie Island Qld và 7 dòng vô tính của xuất xứ Gympie Qld (bảng 2.3).

Bảng 2.1. Các xuất xứ Tràm cajuput của Indonesia và Việt Nam

TT	Tên xuất xứ	Lô hạt	Vĩ độ	Kinh độ	Độ cao so với mực nước biển (m)
1	Samalagi Buru Isl.	19535	3 ⁰ 3'S	126 ⁰ 48'E	40
2	Gogoria Buru Isl.	19536	3 ⁰ 19'S	127 ⁰ 0'E	40
3	Ykasar Buru Isl.	19537	3 ⁰ 20'S	126 ⁰ 57'E	60
4	Wai Geren Buru Isl.	19538	3 ⁰ 23'S	126 ⁰ 55'E	70
5	Masarete Buru Isl.	19539	3 ⁰ 22'S	127 ⁰ 8'E	20
6	Cotonea W Ceram Isl.	19540	3 ⁰ 4'S	128 ⁰ 6'E	30
7	Pelita Jaya Ceram Isl.	19541	3 ⁰ 2'S	128 ⁰ 7'E	110
8	Tràm gió Đại Lải	-	21 ⁰ 20'N	105 ⁰ 43'E	30
9	Tràm gió Phú Lộc	-	16 ⁰ 15'N	07 ⁰ 30'E	5
10	Tràm gió Thanh Hoá	-	10 ⁰ 38'N	106 ⁰ 10'E	5

Bảng 2.2. Các xuất xứ Tràm năm gân

TT	Tên xuất xứ	Ký hiệu	Lô hạt	Vĩ độ	Kinh độ	Độ cao so với mực nước biển (m)
1	Gympie Qld	Q4	15583	25 ⁰ 47'S	152 ⁰ 50'E	40
2	West Malam PNG	Q15	19634	8 ⁰ 45'S	142 ⁰ 35' E	45
3	Bribie Island Qld	Q8	17517	27 ⁰ 04S	153 ⁰ 11E	10
4	Wasua Road PNG	Q16	19641	8 ⁰ 04'S	142 ⁰ 55' E	0
5	Cardwell Qld	Q17	20861	18 ⁰ 15'S	146 ⁰ 00'E	5
6	Worrel Creek NSW	Q18	20591	30 ⁰ 45'S	152 ⁰ 57'E	20
7	Howks Nest NSW	Q19	20593	32 ⁰ 40'S	152 ⁰ 10'E	6
8	Sydney planted NSW	Q20	20459	33 ⁰ 52'S	151 ⁰ 12'E	90
9	Long Jetty NSW	Q21	20424	33 ⁰ 21'S	151 ⁰ 28'E	5
10	Macquarie NSW	Q22	15936	31 ⁰ 30'S	152 ⁰ 40'E	1
11	Casino NSW	Q23	-	28 ⁰ 52'S	153 ⁰ 03'E	25

Bảng 2.3. Các dòng vô tính Tràm năm gân (26 dòng)

TT	DVT của xuất xứ West Malam PNG (Q15)	TT	DVT của xuất xứ Bribie Island Qld (Q8)	TT	DVT của xuất xứ Gympie Qld (Q4)
1	Q15.01	1	Q8.13	1	Q4.19
2	Q15.013	2	Q8.22	2	Q4.40
3	Q15.09	3	Q8.33	3	Q4.41
4	Q15.11	4	Q8.35	4	Q4.44
5	Q15.13	5	Q8.36	5	Q4.45
6	Q15.15	6	Q8.43	6	Q4.48
7	Q15.21	7	Q8.44	7	Q4.50
8	Q15.32				
9	Q15.34				
10	Q15.38				
11	Q15.39				
12	Q15.42				

2.2.2. Vật liệu nghiên cứu nuôi cấy mô

Ba dòng vô tính Tràm năm gân gồm Q4.44, Q15.38 và Q23.21.

2.2.3. Vật liệu nghiên cứu bón phân, chiều cao gốc chặt và mùa vụ

Vật liệu nghiên cứu bón phân và chiều cao gốc chặt là 3 xuất xứ Tràm năm gân gồm West Malam PNG, Wasua Road PNG và Casino NSW.

Vật liệu nghiên cứu mùa vụ là các dòng vô tính và cây hạt của 3 xuất xứ Tràm năm gân gồm West Malam PNG, Gympie Qld và Bribie Island Qld.

2.3. Phương pháp nghiên cứu

2.3.1. Phương pháp bố trí thí nghiệm

2.3.1.1. Bố trí thí nghiệm trong các khảo nghiệm giống

Luận án kế thừa hiện trường nghiên cứu đã có do Viện Cải thiện giống và Phát triển Lâm sản thực hiện để triển khai các nội dung nghiên cứu.

- *Khảo nghiệm xuất xứ*

+ Khảo nghiệm xuất xứ Tràm cajuput tại Ba Vì (Hà Nội) được bố trí theo khối ngẫu nhiên đầy đủ, với 3 lần lặp, số cây của mỗi xuất xứ trong một lần lặp là 16 (trồng theo khối 4 x 4) khoảng cách trồng 1 m x 1 m, bón lót 2kg phân gà + 200g NPK/hố (tỷ lệ phân NPK 5:10:3). Bao gồm 11 công thức thí nghiệm trong đó 7 xuất xứ Tràm cajuput từ Indonesia (bảng 2.1), 4 giống đối chứng gồm 3 xuất xứ Tràm gió (từ Đại Lải, Phú Lộc và Thanh Hoá; bảng 2.1) và 01 xuất xứ West Malam PNG của Tràm năm gân (bảng 2.2). Thời gian trồng tháng 6/2012.

+ Khảo nghiệm xuất xứ Tràm năm gân tại Ba Vì (Hà Nội) được bố trí theo khối ngẫu nhiên đầy đủ, với 4 lần lặp, số cây của mỗi xuất xứ trong một lần lặp là 49 (trồng theo khối 7 x 7), khoảng cách trồng 2 m x 1 m, bón lót hỗn hợp 10g DAP + 10g NPK (tỷ lệ phân NPK 5:10:3) + 40g Lân /hố (super lân Lâm Thao). Bao gồm 12 công thức thí nghiệm trong đó 10 xuất xứ Tràm năm gân (trừ

xuất xứ Q8- bảng 2.2) và đối chứng là 2 xuất xứ Tràm gió (Phú Lộc và Thanh Hoá; bảng 2.1). Thời gian trồng tháng 8/2008.

- Khảo nghiệm dòng vô tính

+ Khảo nghiệm dòng vô tính Tràm năm gân tại Ba Vì (Hà Nội) được bố trí theo khối ngẫu nhiên đầy đủ, với 4 lần lặp, số cây trong mỗi dòng vô tính ở một lần lặp là 10 (trồng theo hàng 10 x 1), khoảng cách trồng 2 m x 1 m, bón lót hỗn hợp 10g DAP ($(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$) + 10g NPK (tỷ lệ phân NPK 5:10:3) + 40g Lân/hố (super lân Lâm Thao). Bao gồm 10 công thức thí nghiệm trong đó 7 dòng vô tính (bảng 2.3) và cây hạt của xuất xứ Gympie Qld (Q4), 2 giống đối chứng là Tràm gió (từ Phú Lộc và Thanh Hoá, bảng 2.1). Thời gian trồng tháng 8/2008.

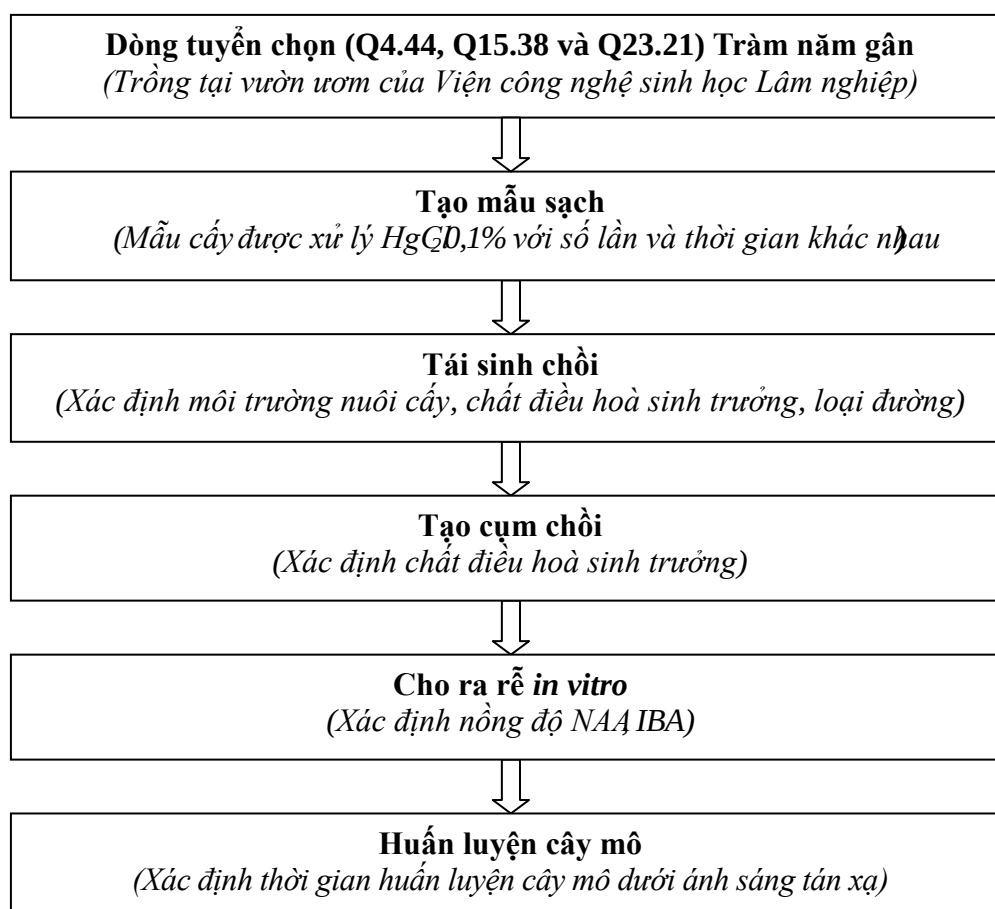
+ Khảo nghiệm dòng vô tính Tràm năm gân tại Phú Lộc (Thừa Thiên - Huế) được bố trí theo khối ngẫu nhiên đầy đủ, với 4 lần lặp, số cây của mỗi dòng vô tính trong một lần lặp là 8 (trồng theo hàng 8 x 1), khoảng cách trồng 0,6 x 1,5 m, bón lót 200g NPK (tỷ lệ NPK 5:10:3). Bao gồm 21 công thức thí nghiệm trong đó 12 dòng vô tính và cây hạt của xuất xứ West Malam PNG (Q15); 7 dòng vô tính và cây hạt của xuất xứ Bribie Island Qld (Q8) (bảng 2.3). Thời gian trồng tháng 3/2011.

2.3.1.2. Bố trí thí nghiệm nuôi cấy mô

- Nghiên cứu nuôi cấy mô Tràm năm gân được thực hiện tại Viện Công nghệ sinh học Lâm nghiệp (Trường Đại học Lâm nghiệp) trong điều kiện chiếu sáng 10h giờ/ngày, cường độ ánh sáng 2000 - 3000 lux; nhiệt độ phòng nuôi $25 \pm 2^\circ\text{C}$, các môi trường nuôi cấy được điều chỉnh ở độ pH = 5,8.

- Mỗi công thức thí nghiệm được bố trí 3 lần lặp, mỗi lặp 30 mẫu.

- Nghiên cứu nuôi cấy mô được tiến hành theo các bước như sau:



a) Ảnh hưởng của thời gian và số lần khử trùng bằng HgCl_2 0,1% đến tỷ lệ mẫu sạch nảy chồi hữu hiệu

Mẫu nuôi cấy được thu thập trong các tháng 8 – 9, sử dụng chồi bên thân cây đã được trẻ hóa (trước thời điểm lấy chồi khoảng 1-1,5 tháng) ở vườn vật liệu, nách lá có chồi ngủ nhưng chưa phát triển, cắt bỏ lá để lại cuống lá. Mẫu đã thu, được phân loại mẫu non (thân mềm, có nhiều lông tơ và có màu xanh) và mẫu bánh tẻ (thân cứng hơn, ít lông tơ và có màu xanh tím). Sau đó, mẫu được rửa sạch dưới vòi nước chảy rồi dùng chổi lông để rửa mẫu trong nước xà phòng loãng và rửa lại bằng nước sạch, tiếp tục ngâm và lắc đều mẫu 2 - 3 phút trong nước xà phòng loãng, cuối cùng tráng lại nhiều lần bằng nước sạch và 2 - 3 lần bằng nước cất.

Khử trùng trong box cấy vô trùng: Mẫu đã rửa sạch, tiếp tục được rửa bằng nước cất vô trùng 2-3 lần (mỗi lần lắc 2-3 phút), sau đó khử trùng bằng HgCl_2 0,1% trong thời gian 4; 5; 6 và 7 phút, tiến hành theo 1 - 2 lần. Sau mỗi lần xử lý mẫu bằng cồn tráng mẫu bằng nước cất vô trùng 2 - 3 lần, mỗi lần từ 2 - 3 phút.

b) Nghiên cứu ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy, chất điều hoà sinh trưởng và hàm lượng các loại đường đến khả năng tái sinh chồi

- Tái sinh chồi lần một (tái sinh chồi trực tiếp từ mẫu cấy) bằng cách cắt bỏ phần gỗ bị đen ở 2 đầu mẫu sạch, sau đó cấy sang môi trường tái sinh chồi MS và MS* (hàm lượng nitơ bằng $\frac{1}{2}$ so với môi trường MS) + 30 g/l sucrose bổ sung riêng rẽ BAP (nồng độ 0,5; 1 và 2 mg/l) hoặc BAP (nồng độ 0,5; 1 và 2 mg/l) kết hợp với 0,2 mg/l Kinetin.

- Tái sinh chồi lần hai trong môi trường MS* + 0,5 mg/l BAP + 0,2 mg/l Kinetin có bổ sung các loại đường glucose và sucrose ở các nồng độ 10 g/l, 20 g/l và 30 g/l.

c) Ảnh hưởng của chất điều hoà sinh trưởng đến khả năng tạo cụm chồi

Các chồi đã tái sinh được cấy chuyển sang môi trường tạo cụm chồi MS* + 20g/l glucose + 10g/l sucrose có bổ sung BAP (nồng độ 0,2; 0,5; 1 và 2 mg/l) kết hợp 0,2 mg/l Kinetin và 0,1 mg/l NAA.

d) Ảnh hưởng của nồng độ NAA và IBA đến khả năng tạo rễ chồi in vitro

Chồi có chiều cao từ 2,5 - 3 cm, sinh trưởng tốt được cho ra rễ trên môi trường MS* có bổ sung IBA (nồng độ 0,1; 0,3 và 0,5 mg/l) hoặc NAA (nồng độ 0,1; 0,3 và 0,5 mg/l).

e) Huấn luyện cây mô và cấy cây vào bầu

Cây con có rễ hoàn chỉnh trong bình được huấn luyện dưới ánh sáng tán xạ (ở hành lang) trong 1 tuần, 2 tuần và 3 tuần, sau đó được rửa sạch thạch bám ở rễ rồi cấy vào bầu đất, với độ che sáng 50% ở ngoài vườn ươm.

2.3.1.3. Bố trí thí nghiệm trong nghiên cứu một số biện pháp kỹ thuật

a) Bố trí thí nghiệm bón thúc

Thí nghiệm bón thúc được tiến hành trên nền của khu khảo nghiệm xuất xứ Tràm năm gân ở Ba Vì (Hà Nội) trồng 8/2008. Nghiên cứu đối với các xuất xứ West Malam PNG, Wasua Road PNG và Casino NSW, bố trí 7 công thức thí nghiệm (bảng 2.4), mỗi công thức bố trí 4 lần lặp, 7 cây/lặp.

Thời điểm thí nghiệm bón thúc tháng 3/2012.

Thời điểm thu thập số liệu tháng 3/2013.

Bảng 2.4. Các công thức bón thúc Tràm năm gân tại khu khảo nghiệm xuất xứ Ba Vì (trồng 8/2008)

STT	Ký hiệu công thức bón phân	Lượng phân bón (g/cây)		
		NPK	Phân hữu cơ vi sinh	Vôi bột
1	CT1.1	200	0	50
2	CT1.2	200	0	100
3	CT2.1	100	200	50
4	CT2.2	100	200	100
5	CT3.1	200	200	50
6	CT3.2	200	200	100
7	ĐC (Đối chứng)	0	0	0

Tỷ lệ phân NPK là 5:10:3

b) Bố trí thí nghiệm về chiều cao gốc chặt đến khả năng ra chồi

Thí nghiệm được thực hiện với xuất xứ West Malam PNG, Wasua Road PNG và Casino NSW của Tràm năm gân, trong khu quần thể chọn giống Tràm năm gân (được trồng 8/2008) theo các công thức chặt cây ở các độ cao khác nhau: 0 cm (chặt sát mặt đất), 5 cm, 10 cm, 15 cm, 30 cm và 50 cm. Mỗi công thức thí nghiệm bố trí 3 lần lặp, mỗi lần 5 cây.

Thời điểm chặt chồi vào tháng 3/2013,

Thời điểm thu thập số liệu tháng 3/2014.

c) Thí nghiệm thời vụ

Tại khu khảo nghiệm dòng vô tính và xuất xứ ở Phú Lộc (trồng năm 2011) tiến hành lấy mẫu chung cất tinh dầu và phân tích thành phần tinh dầu vào thời điểm tháng 11/2013 (mùa mưa) và tháng 6/2014 (mùa khô).

2.3.2. Phương pháp thu thập số liệu

2.3.2.1. Thu thập số liệu trong khảo nghiệm giống

Bao gồm các chỉ tiêu tỷ lệ cây sống, chiều cao cây (H), đường kính gốc (Do), đường kính tán lá (Dt), hàm lượng tinh dầu (Hlt) và thành phần tinh dầu. Các chỉ tiêu sinh trưởng được đo cho tất cả các cây trong toàn khảo nghiệm. Phương pháp cụ thể như sau:

- *Các chỉ tiêu sinh trưởng:* Đường kính gốc đo bằng thước pa nme ở độ cao cách mặt đất 10 cm. Chiều rộng tán đo ở điểm rộng nhất của tán và chiều cao cây (H) đo bằng sào có độ chính xác đến 0,1m.

- *Xác định hàm lượng tinh dầu trong lá (Hlt)*

Thu thập mẫu lá để xác định hàm lượng tinh dầu: Mẫu cành có lá được lấy gộp tất cả các cây trong mỗi lần lặp , mỗi cây lấy cành ở giữa tán cả bốn hướng, sau đó tuốt lấy toàn bộ lá (lá già và lá non) trộn đều, cân 200 g/mẫu.

Hàm lượng tinh dầu được xác định bằng phương pháp lôi cuốn bằng hơi nước trên thiết bị chưng cất tinh dầu có hồi lưu của Hiệp hội Dược phẩm Châu Âu theo phương pháp được giới thiệu trong Dược điển Việt Nam (2002)[2]. Các mẫu lá tươi (200g/mẫu) được cho vào bình cầu, đổ 100 - 200 ml nước, đun sôi trên bếp điện, tinh dầu được kéo theo hơi nước sau khi qua hệ thống làm lạnh được ngưng tụ trên buret, tiếp tục đun cho đến lúc lượng tinh dầu thu được không tăng thêm nữa (khoảng 2 giờ sau khi nước trong bình cầu sôi), đọc lượng tinh dầu (ml) trên buret, mở khoá buret để thu tinh dầu vào lọ thủy tinh và tách nước trong tinh dầu bằng ống hút.

- *Xác định thành phần tinh dầu*

Thành phần tinh dầu được xác định theo phương pháp sắc ký khối phổ (GC/MS) và do Viện Hóa học Các hợp chất thiên nhiên thực hiện. Thiết bị phân tích là Máy sắc ký khí HP 6890 nối ghép với khối phổ (agilent mass spectrum detector - MSD) 5973. Tỷ lệ thành phần các chất trong tinh dầu được xác định theo ngân hàng dữ liệu Wiley 275 và Nist 98.

2.3.2.2. Thu thập số liệu trong nuôi cấy mô

+ Tạo mẫu sạch : Mẫu cây sau 4 tuần được xác định số mẫu sạch nảy chồi, mẫu sạch chết và mẫu nhiễm.

+ Tái sinh chồi: Mẫu cây sau 6 tuần đếm số chồi tái sinh, số chồi/nách lá, số chồi bị chết.

+ Tạo cụm chồi : Mẫu cây sau 6 tuần đếm số mẫu tạo cụm chồi, số chồi/mẫu cây ban đầu, đo chiều cao chồi và đánh giá chất lượng chồi (*tốt*: màu xanh non và mập khỏe; *trung bình*: màu vàng và mập; *xấu*: màu vàng nhạt và nhỏ).

+ Cho ra rễ *in vitro*: Xác định số ngày chồi bắt đầu ra rễ, đếm số chồi ra rễ, số lượng rễ/chồi, đo chiều dài rễ và đánh giá chất lượng rễ (*tốt* : mập - trắng; *trung bình*: mập - hơi vàng, *xấu*: mảnh - đen).

+ Huấn luyện cây mô: Số cây sống sau thời gian huấn luyện và số cây sống ngoài vườn ươm.

2.3.2.3. Thu thập số liệu trong nghiên cứu một số biện pháp kỹ thuật

a) Thu thập số liệu bón phân

Bao gồm chiều cao cây, đường kính gốc, đường kính tán lá, hàm lượng tinh dầu, thành phần tinh dầu và khối lượng lá.

Khối lượng lá/cây được xác định chung cho 4 lần lặp của mỗi công thức bón phân, căn cứ vào giá trị trung bình của các chỉ tiêu sinh trưởng (đường kính gốc, chiều cao và chiều rộng tán) và quan sát hiện trường để chọn cây có sinh trưởng trung bình rồi cắt cây và tuốt toàn bộ lá đem cân.

b) Thu thập số liệu về chiều cao gốc chặt

Bao gồm chiều cao chồi (Hc), đường kính gốc chồi (Dc), đường kính tán lá và khối lượng lá.

Khối lượng lá/cây được xác định cho từng cây bằng cách cắt toàn bộ chồi, tuốt toàn bộ lá đem cân.

c) Thu thập số liệu ảnh hưởng của mùa vụ

Bao gồm hàm lượng tinh dầu và thành phần tinh dầu

2.3.3. Phương pháp xử lý số liệu

a) *Xác định chỉ số thể tích Iv*: Chỉ số thể tích Iv (đánh giá tương đối về khả năng sinh trưởng) đã được dùng để tiện cho việc xác định khả năng sinh trưởng của từng xuất xứ và dòng vô tính $Iv = D_0^2 H$ (Lê Đình Khả và Dương Mộng Hùng, 2003)[17].

b) Xác định hàm lượng tinh dầu và lượng tinh dầu

- Hàm lượng tinh dầu tính theo khối lượng lá tươi (Hlt):

$$Hlt(\%) = \frac{M \times 0,9}{Wt} \times 100 \text{ Trong đó:}$$

+ M là lượng tinh dầu chưng cất được (ml)

+ 0,9 là khối lượng riêng của tinh dầu tràm

+ Wt là khối lượng lá tươi được chưng cất (g)

- Lượng tinh dầu/cây (Ltd)

$$Ltd = Hlt \times \text{Khối lượng lá /cây (g)}$$

c) Nuôi cấy mô

- Tỷ lệ mẫu sạch nảy chồi (%) = $\frac{\text{Số mẫu sạch nảy chồi}}{\text{Tổng số mẫu cấy}} \times 100$

- Hệ số nhân chồi (lần) = $\frac{\text{Số chồi tạo thành}}{\text{Tổng số chồi cấy ban đầu}}$

- Tỷ lệ ra rễ (%) = $\frac{\text{Số chồi ra rễ}}{\text{Tổng số chồi cấy ban đầu}} \times 100$

d) Các đặc trưng mẫu và kiểm tra sai dị

- Các đặc trưng mẫu

+ Trung bình mẫu $\bar{X} = \frac{\sum_{i=1}^n X_i}{n}$ Trong đó: X_i là giá trị quan sát của mẫu i

+ Sai tiêu chuẩn mẫu $S_x = \pm \sqrt{\frac{Q_x}{n-1}}$ Trong đó:

$$Q_x = \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2, \text{ } x_i \text{ là giá trị quan sát mẫu thứ } i$$

+ Hệ số biến động $V\% = \frac{S_x}{\bar{x}} \times 100$

- Kiểm tra sai dị

* So sánh sai dị giữa các công thức thí nghiệm về các chỉ tiêu sinh trưởng bằng phân tích phương sai một nhân tố theo tiêu chuẩn F của Fisher (đối với khảo nghiệm xuất xứ và dòng vô tính) hoặc bằng tiêu chuẩn K của Kruskal – Wallis (đối với thí nghiệm bón phân và chiều cao gốc chặt). So sánh giữa các công thức thí nghiệm các chỉ tiêu về chất (tỷ lệ cây sống, tỷ lệ mẫu sạch, tỷ lệ mẫu nảy chồi...) bằng tiêu chuẩn χ^2_n của Pearson. Cụ thể:

+ Phương trình mô hình cơ bản của phân tích phương sai một nhân tố như sau:

$$X_{ij} = \mu + \alpha_i + \varepsilon_{ij} \quad \text{Trong đó:}$$

μ là số trung bình chung của tổng thể đối với tất cả các cấp

α_i là tham số đặc trưng ảnh hưởng của nhân tố A ($\alpha_i = \mu_i - \mu$)

ε_{ij} là một biến ngẫu nhiên độc lập, đặc trưng cho sai số thí nghiệm.

+ Tiêu chuẩn H của Kruskal – Wallis

$$H = \frac{12}{n(n+1)} \sum_i \frac{R_i^2}{n_i} - \frac{3(n+1)}{2} \quad \text{Trong đó:}$$

$n = \sum n_i$ (n_i là phân tử quan sát của công thức i),

R_i : Tổng hạng của công thức i

+ Tiêu chuẩn χ^2_n của Pearson

$$\chi^2_n = N \left(\sum_{i,j} \frac{m_{ij}^2}{t_j \cdot n_i} - 1 \right) \quad \text{Trong đó:}$$

K : Số công thức, r : Số cấp chất lượng

m_{ij}^2 : là tần số quan sát thực nghiệm ở công thức thứ i và đặc trưng định tính thứ j

t_j : tổng tần số quan sát của các công thức đối với cấp j

n_i : dung lượng mẫu của công thức thứ i

N là tổng số các quan sát; $N = n_1 + n_2 + \dots + n_k = t_1 + t_2 + \dots + t_r$

Số liệu được xử lý bằng phần mềm SPSS (15.0), kết quả kiểm tra sai dị được thể hiện bằng trị số sig:

+ Nếu sig (xác suất của F , H và χ^2) nhỏ hơn 0,05 các chỉ tiêu nghiên cứu có sự sai khác giữa các công thức thí nghiệm.

+ Nếu sig (xác suất của F , H và χ^2) lớn hơn 0,05 các chỉ tiêu nghiên cứu không có sự sai khác giữa các công thức thí nghiệm.

* Khoảng sai dị tối thiểu có ý nghĩa (least significant difference - LSD)

$$LSD = t_{\alpha} * S_N * \sqrt{\frac{2}{r}} \quad \text{Trong đó:}$$

+ S_N là phương sai chung ước lượng bằng bình phương trung bình trong nội bộ nhóm,

+ t_{α} là giá trị t của bảng Student với bậc tự do của sai số $t(r-1)$.

+ r là số lần lặp trong thí nghiệm, t là số công thức thí nghiệm

d) Hệ số tương quan được (r)

$$r = \frac{Q_{xy}}{\sqrt{Q_x \cdot Q_y}} \quad \text{Trong đó:}$$

$$+ Q_{xy} = \sum xy - (\sum x) \times (\sum y)/n$$

$$+ Q_x = \sum x^2 - (\sum x)^2/n, \quad Q_y = \sum y^2 - (\sum y)^2/n$$

+ x và y là 2 đại lượng sát từng cặp ở mẫu.

Qui ước trị tuyệt đối của r (Nguyễn Hải Tuất và Nguyễn Trọng Bình, 2005)[32] như sau:

$0 \leq r < 0,3$	Tương quan yếu
$0,3 \leq r < 0,5$	Tương quan vừa phải
$0,5 \leq r < 0,7$	Tương quan tương đối chặt
$0,7 \leq r < 0,9$	Tương quan chặt
$0,9 \leq r < 1$	Tương quan rất chặt

- Xử lý số liệu theo các phần mềm EXCEL, SPSS (Nguyễn Hải Tuất và Ngô Kim Khôi, 1996; Nguyễn Hải Tuất và Nguyễn Trọng Bình, 2005)[32,33].

2.4. Đặc điểm tự nhiên khu vực nghiên cứu

Khảo nghiệm giống được bố trí tại thôn Cẩm Quỳ, xã Cẩm Lĩnh, huyện Ba Vì, thành phố Hà Nội và thôn Bến Vân, xã Lộc Bõ, huyện Phú Lộc, tỉnh Thừa Thiên - Huế. Để tiện theo dõi các bảng biểu dưới đây, tên địa điểm khảo nghiệm được lấy theo cấp huyện là Ba Vì (Hà Nội) và Phú Lộc (Thừa Thiên-Huế).

2.4.1. Điều kiện khí hậu Ba Vì và Phú Lộc

Số liệu khí hậu tại các địa điểm khảo nghiệm được lấy từ trạm khí tượng gần nhất (tại Ba Vì là Trạm Ba Vì, tại Phú Lộc là Trạm Huế) theo công bố của Bộ Xây Dựng năm 2009 [13] bảng 2.5 và 2.6.

Bảng 2.5. Đặc điểm khí hậu tại Ba Vì và Phú Lộc

Địa điểm	Vĩ độ	Kinh độ	Lượng mưa (mm/năm)	Tháng mưa >100mm	lượng bốc hơi (mm)	Nhiệt độ (°C)		
						TB năm	TCTB tháng nóng nhất	TTTB tháng lạnh nhất
Ba Vì	21 ⁰ 27'S	105 ⁰ 19'E	2004	IV - X	960	23,3	32,9	13,8
Phú Lộc ⁽¹⁾	16 ⁰ 30'S	107 ⁰ 42'E	2798	IX - I sau	1000	25,2	34,7	17,6

Bảng 2.6. Lượng mưa trung bình tháng (mm) tại Ba Vì và Phú Lộc

Địa điểm	Tháng											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Ba Vì	27	34	53	104	268	295	351	343	242	207	63	20
Phú Lộc ⁽¹⁾	126	65	43	58	102	113	92	117	394	757	621	311

Ghi chú ⁽¹⁾ theo trạm khí tượng Huế

2.4.2. Đặc điểm đất đai Ba Vì và Phú Lộc

Đặc điểm đất ở khu khảo nghiệm xã Cẩm Quỳnh, huyện Ba Vì, thành phố Hà Nội là đất đồi feralit phát triển trên sa thạch, đất sau khai thác rừng Keo tai tượng, cây bụi thảm tươi mọc đại chủ yếu là Thầu dầu (*Aporosa dioica*), Thành ngạnh (*Cratoxylum cochinchinense*), Màng tang (*Litsea cubeba*), Bực bực (*Malotus barbatus*) v.v... Đất có pH_{KCl} = 3,5 - 3,7; hàm lượng mùn 1 – 2,56%; đạm tổng số < 0,1%; lân dễ tiêu từ 0,65-3,88 mg/100g đất; kali dễ tiêu 142 - 169 mg/100 g đất; hàm lượng canxi và magiê thấp; hàm lượng nhôm tương đối cao (4,87 - 5,90 ldl/100 g đất), thành phần cơ giới thịt nhẹ đến thịt trung bình (bảng 2.6). Nhìn chung, đất ở khu vực Cẩm Quỳnh có độ phì kém, đất bị đá ong hoá nặng nên cây sinh trưởng không thật thuận lợi. Khu khảo nghiệm xuất xứ Tràm cajuput, khảo nghiệm xuất xứ và dòng vô tính Tràm năm gân đều được bố trí trên đất đồi khá bằng phẳng, có độ dốc thấp từ 5⁰ - 7⁰, ở độ cao 40 m so với mặt nước biển.

Bảng 2.7. Tính chất của đất tại các địa điểm xây dựng khảo nghiệm ở Ba Vi (Hà Nội) và Phú Lộc (Thừa Thiên – Huế)

Tên phẫu diện	Độ sâu (cm)	pH (KCl)	Mùn (%)	Đạm (%)	Chất dễ tiêu (mg/100g)		Cation trao đổi (ldl/100g)			Thành phần cơ giới (% hạt đường kính tính bằng mm)		
					P ₂ O ₅	K ₂ O	Ca ²⁺	Mg ²⁺	Al ³⁺	2-0,02	0,02- 0,002	< 0,002
Ba Vi	0-10	3,52	2,56	0,111	3,88	142,0	0,51	0,46	5,90	32,28	38,99	28,73
	10-20	3,53	1,78	0,094	2,37	159,9	0,15	0,26	5,01	34,40	36,90	28,70
	20-30	3,56	1,18	0,090	0,86	151,0	0,26	0,36	4,87	36,51	34,82	28,67
	30-40	3,59	1,00	0,086	0,65	169,0	0,31	0,15	5,04	38,38	26,70	34,92
	40-50	3,66	0,45	0,030	3,18	11,84	0,13	0,10	2,04	63,68	20,18	16,14
Phú Lộc	0-10	3,72	0,87	0,038	13,7	79,6	0,20	0,3	0,65	81,89	12,07	6,04
	10-20	3,79	0,57	0,020	8,44	105,27	0,15	1,21	0,78	81,91	10,05	8,04
	20-30	3,88	0,45	0,023	3,38	135,30	0,20	0,25	0,60	77,89	12,06	10,05
	30-40	3,89	0,46	0,021	2,33	99,0	0,30	0,20	0,77	75,83	8,06	16,11

Đất ở thôn Bến Vân, xã Lộc Bồn, huyện Phú Lộc, tỉnh Thừa Thiên-Huế thuộc nhóm đất đồi cát - cát pha. Đây là đất sau khai thác rừng Keo lai, thực bì là cây bụi thảm tươi như Ba soi (*Macaranga denticulata*), Chổi xẻ (*Baeckea frutescens*), Tràm cajuput, v.v... Đất có pH_{KCl} = 3,7 - 3,9, nghèo mùn (< 1%), đạm tổng số < 0,1%, ka li dễ tiêu 79,6 – 135,3 mg/100 g đất, lân dễ tiêu 2,33 - 13,7 mg/100 g đất, hàm lượng canxi và magiê thấp, hàm lượng nhôm thấp (0,60 - 0,78 mg/100 g đất). Theo phân loại của Hội Khoa học Đất Việt Nam (2000) thì đất có tỷ lệ sét vật lý 10 - 20% được cho là cát pha, trong khi tại khu khảo nghiệm có tỷ lệ cát 75 - 82%, có thể coi đất là đất đồi cát - cát pha, tương đối bằng phẳng độ dốc thấp từ 7° - 10°, ở độ cao 5 m so với mực nước biển, có độ phì không cao, thành phần cơ giới nhẹ.

CHƯƠNG 3.

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

3.1. Biến dị sinh trưởng, hàm lượng và chất lượng tinh dầu giữa các xuất xứ Tràm cajuput

Tràm cajuput là một trong những loài tràm chính sản xuất tinh dầu giàu 1,8-cineole ở Indonesia. Đây cũng là quốc gia có sản lượng tinh dầu Tràm cajuput loại giàu 1,8-cineole lớn nhất thế giới. Do đó, một bộ giống gồm 7 xuất xứ Tràm cajuput từ Indonesia (do CSIRO của Australia cung cấp), cùng với các giống Tràm gió của Việt Nam và Tràm năm gân đã được khảo nghiệm tại Ba Vì trong năm 2012. Khảo nghiệm này nhằm xác định được các giống Tràm cajuput giàu 1,8-cineole có triển vọng để gây trồng tại Việt Nam.

3.1.1. Biến dị sinh trưởng

Qua 3 năm trồng tỷ lệ sống, sinh trưởng đường kính gốc, chiều cao, chỉ số thể tích và đường kính tán của các xuất xứ Tràm cajuput từ Indonesia và các giống đối chứng là xuất xứ West Malam PNG của Tràm năm gân, 3 xuất xứ Tràm gió của Việt Nam từ Thanh Hoá (Long An), Phú Lộc (Thừa Thiên - Huế) và Đại Lải (Hà Nội) đã có sự khác biệt rõ rệt (bảng 3.1). Các xuất xứ Tràm cajuput từ Indonesia đạt tỷ lệ sống khá cao (biến động từ 83,3 - 100%, trung bình đạt 89%), trong đó xuất xứ có tỷ lệ sống cao nhất là Ykasar Buru Isl. (đạt 100%). Điều này cho thấy các xuất xứ Tràm cajuput từ Indonesia có thể thích ứng tốt với điều kiện đất đồi Ba Vì. Biến dị giữa các xuất xứ Tràm cajuput về đường kính, chiều cao và chỉ số thể tích (Iv từ 85,1 tới 214,4) giai đoạn 3 tuổi là khá lớn. Ở Palian (Indonesia) trong khảo nghiệm các gia đình thuộc các xuất xứ trên đảo Buru và Ceram ở giai đoạn 2 năm tuổi có tỷ lệ cây sống chỉ 41 - 74% (Susanto và cs., 2003)[86].

**Bảng 3.1. Sinh trưởng của các xuất xứ Tràm cajuput
khảo nghiệm tại Ba Vì (6/2012 - 6/2015)**

Xuất xứ	Tỷ lệ sống (%)	Do (cm)		H (m)		Iv	Dt (m)	
		$\bar{x}$	V%	$\bar{x}$	V%		$\bar{x}$	V%
Samalagi Buru Isl.	85,4	5,20	23,6	3,34	22,7	101,2	1,46	27,4
Gogoria Buru Isl.	89,6	5,87	15,7	3,85	20,7	140,1	1,80	18,5
Ykasar Buru Isl.	100,0	5,77	21,1	4,07	23,3	150,1	1,97	18,3
Wai Geren Buru Isl.	91,7	4,97	19,8	4,08	16,1	108,0	1,75	14,4
Masarete Buru Isl.	89,6	5,03	28,0	3,60	27,3	112,1	1,56	19,9
Cotonea W Ceram Isl.	83,3	6,23	24,5	4,67	22,6	214,4	1,87	27,4
Pelita Jaya Ceram Isl.	83,3	5,57	30,0	4,45	24,1	163,0	1,53	20,1
TB	89,0	5,52	23,2	4,01	22,4	141,3	1,71	20,9
Tràm gió Đại Lải	79,2	4,47	41,1	3,04	47,0	95,0	1,27	33,8
Tràm gió Phú Lộc	93,8	4,60	25,0	3,64	20,2	85,1	1,54	17,9
Tràm gió Thanh Hoá	95,8	5,85	22,5	4,57	15,9	171,5	1,68	17,7
Tràm năm gân (West Malam PNG)	93,8	5,20	21,4	4,49	20,3	133,5	1,69	21,7
Sig	0,015	0,001		0,0001		0,001	0,003	
LSD		0,65		0,56		47,18	0,24	

Tinh dầu tràm được chưng cất từ lá nên đường kính tán là chỉ tiêu quan trọng. Kết quả phân tích phương sai cũng cho thấy đường kính tán lá của các xuất xứ có sự sai khác rõ rệt ($\text{sig} < 0,05$). Nhóm xuất xứ có đường kính tán lá lớn nhất thuộc về xuất xứ Ykasar, Gogoria, Wai Geren (trên đảo Buru), Cotonea (trên đảo Ceram) (1,75 - 1,97m), tiếp đến West Malam PNG của Tràm năm gân và Tràm gió Thanh Hoá (tương ứng 1,69 m và 1,68 m). Nhóm các xuất xứ còn lại có đường kính tán phát triển kém hơn, biến động từ 1,27 m đến 1,56m.

Như vậy, có thể thấy rằng các xuất xứ Tràm cajuput từ đảo Ceram (Cotonea, Pelita Jaya), đảo Buru (Gogoria, Ykasar), Tràm gió Thanh Hoá và

West Malam PNG của Tràm năm gân là các xuất xứ sinh trưởng tốt. Tràm gió Đại Lải và Phú Lộc đều có các chỉ tiêu sinh trưởng kém nhất.

3.1.2. Biến dị hàm lượng và chất lượng tinh dầu

Hàm lượng và chất lượng tinh dầu của các xuất xứ Tràm cajuput và Tràm năm gân tham gia khảo nghiệm tại Ba Vì được thể hiện trong bảng 3.2.

**Bảng 3.2. Hàm lượng và thành phần tinh dầu
của các xuất xứ Tràm cajuput khảo nghiệm tại Ba Vì
(trồng 6/2012, đánh giá 4/2013 và 6/2015)**

Xuất xứ	2 tuổi (4/2013)					3 tuổi (6/2015)				
	Hlt (%)		Thành phần chính (%)			Hlt (%)		Thành phần chính (%)		
	$\bar{X}$	V%	1,8-cineole	Limonene	Terpi-4-ol	$\bar{X}$	V%	1,8-cineole	Limonene	Terpi-4-ol
Samalagi Buru Isl.	0,77	5,9	40,58	4,27	0,93	0,81	5,5	49,92	2,96	1,04
Gogoria Buru Isl.	0,63	7,1	2,91	1,78	3,47	0,72	6,2	3,61	1,75	4,30
Ykasar Buru Isl.	0,68	6,7	24,44	2,72	2,63	0,72	6,2	31,52	2,35	2,77
Wai Geren Buru Isl.	0,68	6,7	5,36	1,65	2,55	0,90	5,0	2,20	1,51	3,70
Masarete Buru Isl.	0,77	5,9	38,11	5,05	1,24	0,90	5,0	43,93	3,65	1,21
Cotonea W Ceram Isl.	0,86	8,8	38,75	8,01	1,22	0,81	11,1	47,98	5,12	1,47
Pelita Jaya Ceram Isl.	0,86	13,7	36,73	4,42	1,73	0,81	5,5	49,95	3,27	1,33
TB	0,75	7,8	26,70	3,99	1,97	0,81	6,4	32,73	2,94	2,26
Tràm gió Đại Lải	0,63	7,1	26,70	3,19	0,98	0,54	20,7	33,68	1,89	1,33
Tràm gió Phú Lộc	0,59	7,7	18,28	3,06	1,40	0,63	19,1	28,46	2,98	1,46
Tràm gió Thanh Hoá	0,50	18,0	7,30	1,15	1,25	0,63	19,1	16,04	1,59	1,90
Tràm năm gân (West Malam PNG)	1,04	7,2	59,56	5,49	1,41	1,17	7,7	70,81	3,98	0,93
Sig	0,0001					0,0001				
LSD	0,09					0,12				

Số liệu trong bảng 3.2 cho thấy hàm lượng tinh dầu giữa các xuất xứ có sự sai khác nhau rõ rệt ($\text{sig} < 0,05$). Hàm lượng tinh dầu của hầu hết các xuất xứ tham gia khảo nghiệm đều tăng lên theo tuổi cây. Đánh giá ở giai đoạn 3 năm tuổi các xuất xứ Tràm cajuput từ Indonesia có hàm lượng tinh dầu (0,72 - 0,90%) cao hơn các giống Tràm gió của Việt Nam (0,54 - 0,63%), song vẫn kém xuất xứ West Malam PNG của Tràm năm gân (1,17%).

Biến dị về tỷ lệ 1,8-cineole của các xuất xứ Tràm cajuput từ Indonesia ở giai đoạn 2 tuổi khá lớn dao động từ 2,91% đến 40,58%. Trong đó xuất xứ Gogoria và Wai Geren (trên đảo Buru) có tỷ lệ 1,8-cineole (tương ứng chỉ đạt 2,91% và 5,36%) kém hơn các giống Tràm gió Đại Lải, Phú Lộc và Thanh Hoá (tương ứng 26,7%; 18,28% và 7,3%). Các xuất xứ khác trên đảo Buru (như Samalagi và Masarete) và đảo Ceram (như Cotonea và Pelita Jaya) có tỷ lệ 1,8-cineole tương ứng 40,58%; 38,11%, 38,75%, 36,73% và đều thuộc nhóm có tỷ lệ 1,8-cineole cao nhất trong các xuất xứ từ Indonesia, song vẫn kém xuất xứ West Malam PNG của Tràm năm gân (59,56%). Đến giai đoạn 3 năm tuổi, tỷ lệ 1,8-cineole của các giống tràm khảo nghiệm đều tăng lên rõ rệt. Tuy vậy, các giống Tràm gió của Việt Nam có tỷ lệ 1,8-cineole chỉ đạt 16,04 - 33,68%, Tràm cajuput từ Indonesia có tỷ lệ 1,8-cineole cao nhất cũng chỉ đạt 49,95% (xuất xứ Pelita Jaya Ceram Isl.), ở giai đoạn này xuất xứ West Malam PNG của Tràm năm gân vẫn có tỷ lệ 1,8-cineole cao nhất đạt 70,81% và tỷ lệ limonene chỉ 3,98% ($< 5\%$).

Đánh giá tổng hợp các chỉ tiêu sinh trưởng, hàm lượng và chất lượng tinh dầu của các xuất xứ Tràm cajuput và Tràm năm gân khảo nghiệm ở Ba Vì tại tuổi 3 có thể nhận định rằng: Mặc dù một số xuất xứ Tràm cajuput ở Indonesia (Cotonea W Ceram Isl., Pelita Jaya Ceram Isl., Gogoria Buru Isl., Ykasar Buru Isl.) thuộc nhóm có sinh trưởng nhanh nhất, đồng thời hàm lượng và tỷ lệ 1,8-cineole trong tinh dầu cao hơn các giống Tràm gió của Việt

Nam, song không có xuất xứ nào có tỷ lệ 1,8-cineole đạt đến 50%. Trong khi xuất xứ West Malam PNG của Tràm năm gân vẫn có hàm lượng , chất lượng tinh dầu tốt nhất và đạt yêu cầu (tỷ lệ 1,8-cineole > 65%, limonene < 5%).

So sánh hàm lượng tinh dầu và tỷ lệ 1,8-cineole của các xuất xứ Tràm cajuput từ Indonesia khảo nghiệm ở Ba Vì với các xuất xứ này khảo nghiệm các tại Paliyan (Indonesia) ở giai đoạn 2 năm tuổi có sự khác biệt rất lớn . Khảo nghiệm tại Paliyan (Indonesia) các gia đình Tràm cajuput thuộc xuất xứ Masarete (trên đảo Buru) có tỷ lệ 1,8-cineole 50,9 - 60,2% (trung bình đạt 53,95%), các gia đình thuộc xuất xứ Cotonea (trên đảo Ceram) có tỷ lệ 1,8-cineole 49,2 - 53,9% (trung bình đạt 52,13%) và các gia đình thuộc xuất xứ Pelita Jaya (trên đảo Ceram) có tỷ lệ 1,8-cineole 47,2 - 57,6% (trung bình đạt 50,43%) (Susanto và cs., 2003)[88]. Trong khi khảo nghiệm ở Ba Vì, các xuất xứ này có tỷ lệ 1,8-cineole tương ứng chỉ đạt 38,11%; 38,75%; 36,73%. Trái lại, hàm lượng tinh dầu tính theo khối lượng lá khô của các gia đình này khảo nghiệm tại Paliyan (Indonesia) tương ứng là 1,5%; 1,7% và 1,7% (tương đương với 0,57%, 0,65% và 0,65% tính theo khối lượng lá tươi). Trong khi khảo nghiệm ở Ba Vì , các xuất xứ này có hàm lượng tinh dầu tính theo khối lượng lá tươi cao hơn tương ứng 0,77; 0,86 và 0,86%. Sự khác biệt này có thể là do biến dị di truyền về hàm lượng và tỷ lệ 1,8-cineole trong tinh dầu giữa các cây mẹ cung cấp vật liệu giống hoặc sự khác biệt về điều kiện lập địa giữa 2 nơi khảo nghiệm.

Như vậy, các xuất xứ Tràm cajuput ở Indonesia được khảo nghiệm ở Ba Vì đánh giá ở tuổi 3 đều có hàm lượng g và chất lượng tinh dầu không đạt yêu cầu và kém hơn nhiều so với xuất xứ West Malam PNG của Tràm năm gân. Tuy nhiên, để có thể lựa chọn xuất xứ Tràm cajuput từ Indonesia có triển vọng cần tiếp tục đánh giá ở tuổi lớn hơn và tiếp tục khảo nghiệm ở các vùng sinh thái khác.

3.2. Biến dị sinh trưởng, hàm lượng và chất lượng tinh dầu giữa các xuất xứ, dòng vô tính Tràm năm gân

Tràm năm gân là một trong những loài tràm có hàm lượng và tỷ lệ 1,8-cineole trong tinh dầu cao nhất trong hơn 42 loài tràm được nghiên cứu về tinh dầu (Boland và cs., 2006)[36]. Hiện nay tinh dầu Tràm năm gân là một mặt hàng có giá trên thị trường, được coi là loài rất có triển vọng trong sản xuất tinh dầu ở Papua New Guinea, Australia....

Khả năng cung cấp tinh dầu của tràm phụ thuộc vào từng loài, từng xuất xứ, từng cá thể trong các xuất xứ, cũng như phụ thuộc vào tuổi cây và điều kiện lập địa (Brophy và Doran, 1996)[38]. Vì vậy, việc nghiên cứu lợi dụng các biến dị có sẵn trong tự nhiên để chọn ra các xuất xứ và các dòng vô tính có khả năng cung cấp tinh dầu với số lượng lớn và chất lượng tốt nhất cho mỗi dạng lập địa là hết sức cần thiết cho chương trình trồng trọt lấy tinh dầu.

Nghiên cứu chọn giống Tràm năm gân lấy tinh dầu được thực hiện thông qua khảo nghiệm xuất xứ và khảo nghiệm dòng vô tính tại Ba Vì (năm 2008) và Phú Lộc (2011) nhằm chọn lọc các xuất xứ và dòng vô tính ưu việt.

3.2.1. Biến dị sinh trưởng, hàm lượng và chất lượng tinh dầu giữa các xuất xứ Tràm năm gân khảo nghiệm tại Ba Vì

Năm 2005, một khảo nghiệm đồng bộ gồm 14 xuất xứ của Tràm năm gân và các đối chứng là một số xuất xứ Tràm cajuput của Việt Nam đã được xây dựng tại Ba Vì. Đánh giá khảo nghiệm ở giai đoạn 2,5 tuổi đã chọn được hai xuất xứ triển vọng có hàm lượng tinh dầu và tỷ lệ 1,8-cineole trong tinh dầu cao đó là xuất xứ Gympie Qld (Q4) và xuất xứ Bribie Island Qld (Q8) (Nguyễn Thị Thanh Hương, 2008)[11].

Trên cơ sở khảo nghiệm xuất xứ năm 2005, đến năm 2008 một số xuất xứ khác (9 xuất xứ) của Tràm năm gân tiếp tục được xây dựng tại Ba Vì cùng các giống đối chứng là xuất xứ Gympie Qld (Q4) (tốt nhất trong các xuất xứ

Tràm năm gân qua khảo nghiệm năm 2005), 2 giống Tràm gió của Việt Nam từ Thanh Hoá và Phú Lộc để tiếp tục lựa chọn các xuất xứ Tràm năm gân có triển vọng.

3.2.1.1. Biến dị sinh trưởng

Mặc dù mục tiêu chọn giống Tràm năm gân không phải lấy gỗ nhưng các chỉ tiêu sinh trưởng vẫn là những chỉ tiêu quan trọng thể hiện khả năng thích ứng và năng suất sinh khối của giống với điều kiện lập địa gây trồng. Điều tra về sinh trưởng của các xuất xứ Tràm năm gân ở khảo nghiệm tại Ba Vì giai đoạn 3 tuổi được thể hiện trong bảng 3.3.

Bảng 3.3. Sinh trưởng các xuất xứ Tràm năm gân khảo nghiệm tại Ba Vì (8/2008 - 12/2011)

Xuất xứ	Tỷ lệ sống (%)	Do(cm)		H (m)		Iv	Dt(m)	
		$\bar{X}$	V%	$\bar{X}$	V%		$\bar{X}$	V%
West Malam PNG	89,4	5,38	26,8	3,06	20,5	89,9	1,43	22,3
Wasua Road PNG	97,9	5,02	26,6	2,73	25,7	70,8	1,43	24,8
Cardwell Qld	96,9	6,13	27,8	3,51	22,6	133,3	1,09	25,5
Worrel Creek NSW	96,4	5,51	27,2	2,90	23,5	89,6	1,06	23,6
Howks Nest NSW	95,9	5,77	28,3	2,46	27,9	82,5	1,05	25,6
Sydney planted NSW	97,9	5,38	22,7	3,03	20,8	88,0	1,00	19,4
Long Jetty NSW	94,9	5,77	27,6	2,97	23,9	100,6	1,01	24,6
Port Macquarie NSW	95,9	5,96	27,8	2,90	26,8	102,6	1,07	27,4
Casino NSW	94,9	5,13	26,9	2,92	22,1	77,7	1,43	24,5
Gympie Qld	94,4	5,56	28,2	3,11	22,5	96,8	1,04	25,7
TB	95,6	5,56	27,0	2,94	28,4	92,8	1,17	24,3
Tràm gió Phú Lộc	94,4	4,48	31,2	1,51	22,8	30,6	1,05	28,9
Tràm gió Thanh Hoá	93,9	6,06	28,5	2,81	29,2	103,5	1,47	25,2
Sig	0,008	0,0001		0,0001		0,0001	0,0001	
LSD		0,62		0,45		28,97	0,11	

Các xuất xứ Tràm năm gân tham gia khảo nghiệm đều có tỉ lệ cây sống rất cao sau 3 năm trồng (từ 89,4 - 97,9%) điều này chứng tỏ chúng có khả năng thích ứng tốt trên đất đồi Ba Vì. Sinh trưởng đường kính gốc, chiều cao và chỉ

số thể tích giữa các xuất xứ có sự sai khác rõ rệt ($\text{sig} < 0,05$). Biến dị giữa các xuất xứ về sinh trưởng là khá lớn, với Iv từ 70,8 đến 133,3. Xuất xứ có sinh trưởng nhanh nhất là Cardwell Qld (với Iv = 133,3) tiếp theo là giống Tràm gió Thanh Hoá, Port Macquarie NSW, Long Jetty NSW và Gympie Qld (Iv = 96,8 - 103,5). Nhóm thứ ba có sinh trưởng nhanh là các xuất xứ West Malam PNG, Worrel Creek NSW, Sydney NSW, Hawks Nest NSW, Casino NSW và Wasua Road PNG (Iv = 70,8 - 89,9). Sinh trưởng chậm nhất là giống Tràm gió Phú Lộc (Iv = 30,6). Tuy vậy, những xuất xứ Tràm năm gân có đường kính tán lớn nhất lại là West Malam PNG, Wasua Road PNG, Casino NSW và Tràm gió Thanh Hoá (1,43 - 1,47 m). Mặt khác, đường kính tán có tương quan rất chặt với khối lượng lá nên những xuất xứ có đường kính tán lớn sẽ góp phần tăng năng suất tinh dầu (Khuất Thị Hải Ninh và Nguyễn Thị Thanh Hường, 2011). Các xuất xứ còn lại đều có đường kính tán lá nhỏ hơn, thay đổi trong khoảng 1,00 - 1,09 m.

Qua điều tra ngoài hiện trường cũng như kết quả xử lý số liệu các chỉ tiêu sinh trưởng cho thấy biến động giữa các cá thể trong một xuất xứ Tràm năm gân là tương đối lớn, với hệ số biến động (V%) về đường kính tán từ 19,4 - 25,7%, chiều cao 22,7 - 28,3%, đường kính gốc 20,5 - 26,8%. Độ biến động lớn giữa các cá thể phản ánh mức độ phân hóa rõ rệt giữa các cá thể trong cùng một xuất xứ. Đây là cơ sở quan trọng để chọn cây cá thể có khối lượng lá lớn trong những xuất xứ có sinh trưởng nhanh và hàm lượng tinh dầu cao sau này.

Để có thể lựa chọn được những xuất xứ vừa sinh trưởng tốt, đồng thời phải có hàm lượng và chất lượng tinh dầu cao (cụ thể là 1,8-cineole $\geq 65\%$ và limonene $< 5\%$) phát triển vào sản xuất cần đánh giá tiếp chúng theo các chỉ tiêu khác nữa như hàm lượng và chất lượng tinh dầu.

3.2.1.2. Biến dị hàm lượng và chất lượng tinh dầu

Tương tự như các chỉ tiêu sinh trưởng, ở giai đoạn 2 năm tuổi mức độ biến dị giữa các xuất xứ về hàm lượng tinh dầu và tỷ lệ thành phần các chất của tinh dầu cũng tương đối lớn. Hàm lượng tinh dầu giữa các xuất xứ biến động từ 0,32 - 1,33%, trong khi biến động về tỷ lệ 1,8-cineole, terpinen-4-ol và limonene lần lượt là 5,11 - 71,50%; 0,33 - 2,69% và 1,43 - 7,31% (bảng 3.4).

**Bảng 3.4. Hàm lượng và thành phần tinh dầu các xuất xứ
Tràm năm gân khảo nghiệm tại Ba Vì
(trồng 8/2008, đánh giá 12/2010 và 12/2011)**

Xuất xứ	2 tuổi (12/2010)						3 tuổi (12/2011)		
	Hlt (%)		Thành phần chính (%)				Hlt (%)	Thành phần (%)	
	$\bar{X}$	V%	1,8-cineole	Terpi-4-ol	Nero-lidol	Limo-nene		1,8-cineole	Limo-nene
West Malam PNG	1,19	7,2	69,09	1,74		0,00	1,44	75,07	2,44
Wasua Road PNG	1,09	3,9	64,04	2,64		2,70	1,35	65,48	3,20
Cardwell Qld	0,88	5,1	67,30	1,26		3,21			
Worrel Creek NSW	0,96	4,5	48,70	0,78	-	7,31			
Howks Nest NSW	0,47	9,5	14,30	0,33	65,97	2,08			
Sydney planted NSW	0,69	12,4	35,80	1,70		6,30			
Long Jetty NSW	0,32	11,7	5,11	0,35	78,62	1,43			
Port Macquarie NSW	0,82	30,5	50,10	0,82		5,47			
Casino NSW	1,14	6,2	71,05	2,04		3,49	1,49	72,44	2,76
Gympie Qld	1,33	7,1	57,30	0,98	-	5,40			
TB	0,89	9,8	48,28	1,26	72,30	3,74	1,43	71,00	2,80
Tràm gió Phú Lộc	0,87	7,8	14,30	2,60		1,97			
Tràm gió Thanh Hoá	0,71	10,8	9,59	2,69	-	2,50			
Sig	0,0001								
LSD	0,14								

Các xuất xứ West Malam PNG và Casino NSW ở giai đoạn 2 năm tuổi đáp ứng các tiêu chuẩn vừa có sinh trưởng nhanh vừa có hàm lượng tinh dầu tương đối lớn (1,14 - 1,19%) và tỷ lệ 1,8-cineole > 65%. Hai xuất xứ này cũng có tỷ lệ limonene (tương ứng 0,00 và 3,49%) đáp ứng yêu cầu dưới 5% của tinh dầu trầm (bảng 3.4). Ngoài ra, Wasua Road PNG cũng là một xuất xứ rất có triển vọng với tỷ lệ 1,8-cineole 64,04% và hàm lượng tinh dầu 1,09%. Gympie Qld (là xuất xứ có triển vọng trong khảo nghiệm năm 2005) có hàm lượng tinh dầu cao nhất (1,33%), song tỷ lệ 1,8-cineole chỉ đạt 57,29% và tỷ lệ limonene 5,4%, cao hơn mức 5% theo giới thiệu tinh dầu cajuput (Khan và Abourashed, 2010)[63]. Trái lại, xuất xứ Cardwell Qld có tỷ lệ 1,8-cineole cao (67,3%) song hàm lượng tinh dầu thấp (chỉ đạt 0,88%). Các xuất xứ còn lại của Tràm năm gân có hàm lượng tinh dầu thấp (0,32 - 0,82%), đồng thời có tỷ lệ 1,8-cineole nhỏ hơn 65%. Tuy nhiên, 2 xuất xứ Hawks Nest NSW và Long Jetty NSW có hàm lượng tinh dầu (tương ứng đạt 0,47 và 0,32%) và tỉ lệ 1,8-cineole (tương ứng 14,33 và 5,11%) thấp nhất trong các xuất xứ khảo nghiệm, nhưng lại có tỷ lệ nerolidol rất cao (tương ứng đạt 65,97% và 78,62%). Nerolidol là một loại hương liệu mới được phát hiện trong một chemotype của Tràm năm gân tại Australia (Ireland và cs., 2002)[57], là chất rất phổ biến trong các loại hương liệu nước hoa và các loại kem dưỡng da. Ở Australia Tràm năm gân được một số cơ sở trồng để sản xuất nerolidol và linalool. Do vậy, nếu phát triển Tràm năm gân theo hướng nâng cao tỷ lệ nerolidol thì đây là những xuất xứ cần được quan tâm. Giống Tràm gió Phú Lộc và Thanh Hóa có cả hàm lượng tinh dầu (tương ứng 0,87 và 0,71%) và tỷ lệ 1,8-cineole (tương ứng 14,32% và 9,59%) đều thấp hơn so với các xuất xứ Tràm năm gân (trừ Long Jetty NSW và Hawks Nest NSW).

Để xác định tính ổn định về hàm lượng và tỷ lệ 1,8-cineole trong tinh dầu của các xuất xứ có triển vọng West Malam PNG, Wasua Road PNG và

Casino NSW, việc xác định hàm lượng và thành phần tinh dầu của các xuất xứ này tiếp tục được thực hiện ở tuổi 3. Kết quả phân tích tinh dầu cho thấy các xuất xứ này đều có hàm lượng và tỷ lệ 1,8-cineole trong tinh dầu tăng lên đáng kể, trong đó West Malam PNG có hàm lượng tinh dầu tăng từ 1,19% lên 1,44%, tỷ lệ 1,8-cineole từ 69,09% lên 75,07%, tỷ lệ limonene 2,44%. Tại tuổi 3, xuất xứ Casino NSW có các chỉ tiêu trên tương ứng là 1,49%, 72,44% và 2,76%, Wasua Road PNG có các chỉ tiêu trên tương ứng là 1,35%, 65,48% và 3,20%.

Như vậy, tại Ba Vì 3 xuất xứ West Malam PNG, Wasua Road PNG và Casino NSW của Tràm năm gân đều có hàm lượng và tỷ lệ 1,8-cineole trong tinh dầu cao nhất, có thể coi đây là các xuất xứ rất có triển vọng theo mục tiêu cung cấp tinh dầu giàu 1,8-cineole để phát triển vào sản xuất.

3.2.2. Biến dị sinh trưởng, hàm lượng và chất lượng tinh dầu giữa các dòng vô tính Tràm năm gân

3.2.2.1. Biến dị sinh trưởng, hàm lượng và chất lượng tinh dầu giữa các dòng vô tính Tràm năm gân khảo nghiệm tại Ba Vì

Khảo nghiệm xuất xứ Tràm năm gân (năm 2005) tại Ba Vì đánh giá ở giai đoạn 2,5 tuổi cho thấy Gympie Qld (Q4) là xuất xứ có triển vọng và chọn được 7 cây trội là Q4.19, Q4.40, Q4.41, Q4.44, Q4.45, Q4.48 và Q4.50 đều có hàm lượng tinh dầu trên 1,8%, tỉ lệ 1,8-cineole trên 65% (Nguyễn Thị Thanh Hương, 2008)[11]. Các cây trội này sau đó được dẫn, nhân giống và trồng khảo nghiệm tại Ba Vì vào tháng 8/2008. Kết quả đánh giá qua 2 lần ở tuổi 2 và 3 đã khẳng định mức độ biến dị lớn giữa các dòng và việc chọn lọc các dòng ưu việt sẽ đem lại tăng thu di truyền cao cho sản xuất sau này. Kết quả cụ thể như sau:

a) Biến dị sinh trưởng

Đánh giá khảo nghiệm dòng vô tính Tràm năm gân tại Ba Vì ở giai đoạn 2 năm tuổi cho thấy tỷ lệ cây sống rất cao (77,5 - 95,0%), với tỷ lệ sống trung bình

toàn khảo nghiệm đạt 89,6%. Trong 7 dòng vô tính tham gia khảo nghiệm chỉ dòng vô tính Q4.40 có tỷ lệ cây sống đạt 77,5%, các dòng vô tính khác đều có tỷ lệ cây sống trên 85%. Sinh trưởng giữa các dòng vô tính cũng có sự phân hoá rõ nét ($\text{sig} < 0,05$), với Iv biến động từ 8,2 đến 22,1. Năm dòng vô tính Q4.19, Q4.40, Q4.50, Q4.45 và Q4.44 thuộc nhóm dòng vô tính có sinh trưởng nhanh nhất ($\text{Iv} = 14,41 - 22,14$) và đường kính tán rộng nhất (0,85 - 1,03 m). Hai dòng vô tính Q4.48 và Q4.41 có chỉ số Iv tương đương trị số trung bình của cây hạt Q4 (8,09). Trầm gió Thanh Hoá và Phú Lộc đều có sinh trưởng chậm (Iv tương ứng 5,10 và 8,13).

**Bảng 3.5. Sinh trưởng các dòng vô tính của xuất xứ Gympie Qld (Q4)
Trầm năm gần khảo nghiệm tại Ba Vì
(8/2008 - 10/2010)**

Dòng vô tính	Tỷ lệ sống (%)	Do (cm)		H (m)		Iv	Dt (m)	
		$\bar{X}$	V %	$\bar{X}$	V%	$\bar{X}$	$\bar{X}$	V %
Q4.19	95,0	3,23	7,4	2,10	5,6	22,1	1,03	8,4
Q4.40	77,5	3,03	9,1	2,13	4,5	19,9	0,85	10,4
Q4.45	92,5	2,80	15,4	2,13	10,6	17,4	0,96	4,6
Q4.50	92,5	2,89	14,5	2,00	6,7	17,2	1,00	17,4
Q4.44	95,0	2,75	9,9	1,87	11,3	14,4	0,84	14,4
Q4.48	90,0	2,18	9,8	1,75	8,9	8,5	0,83	19,4
Q4.41	85,0	2,16	10,4	1,74	3,7	8,2	0,69	8,4
TB	89,6	2,72	10,9	1,96	7,3	15,4	0,89	11,9
Cây hạt Q4	55,0	2,19	16,7	1,61	11,7	8,1	0,65	14,6
Trầm gió Thanh Hoá	75,0	2,28	17,3	1,47	19,3	8,1	0,91	22,7
Trầm gió Phú Lộc	75,0	2,06	5,3	1,20	6,9	5,1	0,74	9,8
Sig	0,0001	0,0001		0,0001		0,0001	0,002	
LSD		0,66		0,46		7,90	0,22	

b) Biến dị hàm lượng và chất lượng tinh dầu

Hàm lượng và chất lượng tinh dầu của các dòng vô tính của xuất xứ Gympie Qld (Q4) Tràm năm gân được thể hiện trong bảng 3.6.

Bảng 3.6. Hàm lượng và thành phần tinh dầu các dòng vô tính của xuất xứ Gympie Qld (Q4) Tràm năm gân khảo nghiệm tại Ba Vì (trồng 8/2008, đánh giá 10/2010 và 5/2011)

Dòng vô tính	2 tuổi (10/2010)				2,5 tuổi (5/2011)		
	Hlt (%)		Thành phần chính (%)		Hlt (%)	Thành phần chính (%)	
	$\bar{X}$	V%	1,8-cineole	Limonene		1,8-cineole	Limonene
Q4.40	1,69	8,3	64,70	3,80	1,85	65,36	3,68
Q4.45	1,45	6,4	64,68	4,23	1,53	64,98	4,30
Q4.41	1,54	2,8	63,30	4,27	1,67	63,19	3,89
Q4.44	1,47	5,2	65,17	4,82	1,62	61,21	5,60
Q4.50	1,61	4,8	61,07	4,40	1,76	60,32	4,21
Q4.19	1,43	4,0	62,70	4,04	1,40	56,94	4,94
Q4.48	1,31	2,8	63,54	3,76			
TB	1,50	4,9	63,59	4,19	1,64	62,00	4,44
Cây hạt Q4	1,35	5,7	60,50	5,44	-	64,61	5,20
Tràm gió Phú Lộc	0,54	10,5	30,39	3,30			
Tràm gió Thanh Hoá	0,68	8,1	12,94	1,96			
Sig	0,0001						
LSD	0,11						

Hàm lượng tinh dầu các giống Tràm năm gân giai đoạn 2 năm tuổi có sự khác nhau rõ rệt ($\text{sig} < 0,05$), biến động từ 0,54% đến 1,69%. Các dòng vô tính (ngoại trừ Q4.48) đều có hàm lượng tinh dầu (1,43-1,69%) cao hơn cây hạt Q4 (1,35%), Tràm gió Thanh hoá và Tràm gió Phú Lộc có hàm lượng tinh dầu tương ứng chỉ đạt 0,68% và 0,54%. Tỷ lệ 1,8-cineole có biến động nhỏ giữa các dòng vô tính (61,07 - 65,36%). Trong đó, Q4.44 có tỷ lệ 1,8-cineole 65,17% đạt

yêu cầu về chất lượng tinh dầu, song không ổn định vì số liệu chung cất tinh dầu vào tháng 5 năm 2011 lại cho thấy dòng vô tính này có hàm lượng tinh dầu 1,62%, tỷ lệ 1,8-cineole 61,21% (không đạt $\geq 65\%$), tỷ lệ limonene 5,6% (vượt mức 5%). Trái lại, các dòng vô tính Q4.40 và Q4.45 có hàm lượng tinh dầu (tương ứng là 1,85% và 1,53%), tỷ lệ 1,8-cineole (tương ứng là 65,36% và 64,98%) và tỷ lệ limonene (tương ứng là 3,68% và 4,30%) khá ổn định. Như vậy, Q4.40 và Q4.45 là hai dòng vô tính có giá trị tại Ba Vì (bảng 3.6).

3.2.2.2. *Biến dị sinh trưởng, hàm lượng và chất lượng tinh dầu giữa các dòng vô tính Tràm năm gân khảo nghiệm tại Phú Lộc*

Khảo nghiệm xuất xứ Tràm năm gân tại Ba Vì năm 2005 và 2008, đã chọn được một số xuất xứ có triển vọng trong đó có xuất xứ Bribie Island Qld (Q8) và West Malam PNG (Q15). Các cây trội của xuất xứ Bribie Island Qld như Q8.13, Q8.22, Q8.23, Q8.35, Q8.36, Q8.43 và Q8.44 và xuất xứ West Malam PNG như Q15.01, Q15.013, Q15.09, Q15.11, Q15.13, Q15.15, Q15.21, Q15.32, Q15.34, Q15.38, Q15.39 và Q15.42 đã được nhân giống và khảo nghiệm tại Phú Lộc tháng 3 năm 2011. Kết quả đánh giá biến dị giữa các dòng đã được tiến hành tại 3,5 tuổi và cụ thể như sau:

a) *Biến dị sinh trưởng*

Ở giai đoạn 3,5 tuổi, đường kính tán giữa các dòng vô tính của xuất xứ West Malam PNG (Q15) chưa có sự khác nhau rõ rệt ($\text{sig} > 0,05$), tuy nhiên đường kính gốc, chiều cao và chỉ số thể tích giữa các dòng vô tính lại có sự khác nhau rõ rệt ($\text{sig} < 0,05$). Biến dị giữa các dòng vô tính về sinh trưởng là khá lớn, với phạm vi biến động của Iv từ 107,3 đến 235,5. Nhóm dòng vô tính có sinh trưởng nhanh nhất là Q15.013, Q15.21 và Q15.32 (Iv = 198,3 - 235,5), tiếp đó là cây hạt Q15 và dòng vô tính Q15.13 (Iv tương ứng 187,6 và 181,1). Các dòng vô tính còn lại (Iv = 107,3 - 168,8) đều có sinh trưởng kém hơn cây hạt Q15 (bảng 3.7).

Bảng 3.7. Sinh trưởng các dòng vô tính và xuất xứ West Malam PNG (Q15) và Bribie Island Qld (Q8) Trăm năm gần khảo nghiệm tại Phú Lộc (3/2011 - 6/2014)

Dòng vô tính	Tỷ lệ sống (%)	Do (cm)		H (m)		Iv	Dt (m)	
		$\bar{X}$	V%	$\bar{X}$	V%		$\bar{X}$	V%
Q15.013	75,0	7,01	7,8	4,62	5,9	235,5	1,30	15,7
Q15.21	81,3	6,57	12,5	4,68	6,6	218,7	1,18	9,2
Q15.32	78,1	6,39	11,6	4,40	6,2	198,3	1,24	14,1
cây hạt Q15	81,3	6,22	6,6	4,33	5,9	187,6	1,15	9,1
Q15.13	78,1	6,44	6,2	4,21	5,2	187,1	1,31	12,2
Q15.42	84,4	6,19	5,9	4,20	5,5	168,8	1,08	12,4
Q15.11	90,6	5,71	13,3	4,40	14,8	156,9	1,18	7,8
Q15.15	90,6	5,73	6,7	4,20	9,0	151,5	1,16	6,8
Q15.39	62,5	5,87	20,1	3,89	7,0	146,9	1,19	24,6
Q15.09	90,6	5,91	6,3	4,02	6,5	144,2	1,45	12,8
Q15.01	81,3	5,38	19,6	3,87	6,8	119,1	1,12	10,0
Q15.38	78,1	5,15	10,4	4,03	4,3	116,9	1,22	9,0
Q15.34	59,4	4,99	9,5	4,15	1,8	107,3	1,16	5,8
TB	79,3	5,97	10,5	4,23	6,6	164,5	1,21	11,5
Sig	0,04	0,005		0,009		0,0001	0,141	
LSD		0,96		0,44		77,87		
Q8.36	75,0	6,05	5,1	4,06	5,1	158,6	1,02	3,6
Q8.44	68,8	5,39	11,7	4,21	12,2	131,4	1,08	14,0
Cây hạt Q8	93,8	5,53	14,2	3,77	9,5	124,7	0,82	9,0
Q8.23	84,4	5,32	4,9	4,03	4,1	120,5	0,92	5,1
Q8.43	81,3	4,74	9,8	4,47	8,1	106,2	0,90	9,1
Q8.22	100	5,22	10,0	3,70	10,0	105,6	0,95	3,3
Q8.13	87,5	5,07	15,1	3,58	11,1	101,1	0,90	14,0
Q8.35	78,1	4,10	17,3	3,58	8,6	69,1	0,81	16,7
TB	83,6	5,18	11,0	3,93	8,6	114,6	0,93	9,4
Sig	0,02	0,006		0,012		0,013	0,006	
LSD		0,93		0,51		41,58	0,14	

Đánh giá về sinh trưởng đường kính gốc, chiều cao, chỉ số thể tích và đường kính tán các dòng vô tính của xuất xứ Bribie Island Qld (Q8) cũng thấy ở tuổi 3,5 đều có sự khác nhau rõ rệt ($\text{sig} < 0,05$). Nhóm dòng vô tính có sinh trưởng nhanh là Q8.36 và Q8.44 (Iv tương ứng đạt 158,6 và 131,4), tiếp theo là cây hạt Q8 (Iv = 124,7). Các dòng còn lại như Q8.23, Q8.43, Q8.22, Q8.13 và Q8.35 (Iv = 69,1 - 120,5) đều có sinh trưởng kém hơn cây hạt Q8. Mặc dù, Q8.36 và Q8.44 sinh trưởng nhanh nhất trong các dòng vô tính của xuất xứ Bribie Island Qld, nhưng chỉ cùng nhóm với các dòng vô tính của xuất xứ West Malam PNG có sinh trưởng trung bình (bảng 3.7).

Nhìn chung, các dòng vô tính của xuất xứ West Malam PNG (Q15) (Iv trung bình đạt 164,5, trong đó dòng vô tính sinh trưởng nhanh nhất đạt 235,5) có sinh trưởng nhanh hơn các dòng vô tính của xuất xứ Bribie Island Qld (Q8) (Iv trung bình chỉ đạt 114,6 trong đó dòng vô tính sinh trưởng nhanh nhất chỉ đạt 158,6).

b) Biến dị hàm lượng và chất lượng tinh dầu

Ở giai đoạn 3 và 3,5 tuổi hàm lượng tinh dầu của các dòng vô tính của xuất xứ West Malam PNG (Q15) đều cao hơn cây hạt Q15. Dòng vô tính Q15.32 có hàm lượng tinh dầu cao nhất ở cả 2 giai đoạn (tương ứng đạt 1,89% và 1,62%), đây cũng là dòng vô tính nằm trong nhóm sinh trưởng tốt nhất, tiếp đó là Q15.38 (1,8% và 1,62%) và Q15.39 (1,8% và 1,53%) (bảng 3.8). Ở giai đoạn 3 tuổi, những dòng vô tính có hàm lượng tinh dầu lớn hơn 1,67% được phân tích thành phần tinh dầu, kết quả phân tích cho thấy hầu hết các dòng vô tính và cây hạt Q15 đều có tỉ lệ 1,8-cineole $< 65\%$, đồng thời tỉ lệ limonene $> 5\%$. Sang đến giai đoạn 3,5 tuổi, các dòng vô tính được phân tích thành phần tinh dầu đều có tỉ lệ 1,8-cineole $> 65\%$ và tỉ lệ limonene $< 5\%$ (ngoại trừ Q15.39). Trong đó Q15.013, Q15.32 và Q15.38 có tỉ lệ 1,8-cineole cao nhất (tương ứng đạt 69,99%; 69,42% và 67,05%) đây cũng là

những dòng vô tính có hàm lượng tinh dầu khá cao . Như vậy, Q15.013, Q15.32 và Q15.38 là 3 dòng vô tính có triển vọng tại Phú Lộc.

Bảng 3.8. Hàm lượng và thành phần tinh dầu các dòng vô tính của xuất xứ West Malam PNG (Q15) và Bribie Island Qld (Q8) Trăm năm gần khảo nghiệm tại Phú Lộc (Trồng 2/2011, đánh giá 11/2013 và 6/2014)

Dòng vô tính	3 tuổi (11/2013)				3,5 tuổi (6/2014)			
	Hlt (%)		Thành phần chính(%)		Hlt (%)		Thành phần chính(%)	
	$\bar{X}$	V%	1,8-cineole	Limonene	$\bar{X}$	V%	1,8-cineole	Limonene
Q15.013	1,53	11,2			1,44	19,7	69,99	4,10
Q15.32	1,89	7,1	58,84	5,78	1,62	9,5	69,42	4,25
Q15.38	1,80	2,0	58,61	5,78	1,62	9,3	67,05	4,08
Q15.39	1,80	9,9	63,45	6,14	1,53	17,3	62,01	5,04
Q15.13	1,58	8,5			1,53	12,9		
Q15.11	1,89	5,1	56,40	5,91	1,44	11,0		
Q15.15	1,62	7,2			1,44	6,8		
Q15.21	1,62	12,5			1,44	9,3		
Q15.34	1,71	5,6			1,35	12,8		
Q15.01	1,67	9,7	60,19	6,27	1,35	15,4		
Q15.42	1,49	19,1			1,35	7,9	66,39	3,94
Q15.09	1,44	18,0			1,17	17,6		
Cây hạt Q15	1,26	22,1	62,67	6,27	1,08	21,5	70,83	3,24
TB	1,64	10,6	60,03	6,03	1,41	13,2	67,62	4,11
Sig	0,0001				0,008			
LSD	0,26				0,27			
Q8.35	1,89	1,9			1,98	16,1		
Q8.13	1,80	5,3	55,16	7,32	1,53	12,0	60,33	5,87
Q8.23	1,80	4,6	50,35	4,90	1,53	10,5	59,72	3,63
Q8.43	1,80	3,4	51,54	5,97	1,53	12,9	55,42	5,69
Cây hạt Q8	1,80	6,2	53,04	6,68	1,53	4,2	58,85	5,14
Q8.36	1,71	6,8	53,14	7,56	1,44	7,7	52,92	6,08
Q8.22	1,62	8,0			1,35	9,8		
Q8.44	1,53	7,6			1,08	18,0		
TB	1,74	5,5	52,65	6,49	1,50	11,4	57,45	5,28
Sig	0,001				0,0001			
LSD	0,14				0,27			

Đánh giá hàm lượng tinh dầu các dòng vô tính của xuất xứ Bribie Island Qld (Q8) giai đoạn 3 và 3,5 tuổi cũng cho thấy mặc dù Q8.35 có giá trị cao nhất (tương ứng đạt 1,89% và 1,98%) song lại có sinh trưởng kém nhất trong các dòng vô tính khảo nghiệm. Trái lại, Q8.44 mặc dù có sinh trưởng nhanh, song có hàm lượng tinh dầu thấp nhất (tương ứng là 1,53% và 1,08%). Các dòng vô tính còn lại đều có hàm lượng tinh dầu tương đương hoặc kém hơn cây hạt Q8. Ở giai đoạn 3 tuổi, những dòng vô tính có hàm lượng tinh dầu lớn hơn 1,7% được phân tích thành phần tinh dầu (trừ dòng Q8.35 vì sinh trưởng kém), kết quả cho thấy hầu hết chúng đều có tỉ lệ 1,8-cineole thấp (50,35 - 55,16%; trung bình đạt 52,65%), đồng thời tỉ lệ limonene lại tương đối cao (4,90 - 7,32%; trung bình đạt 6,49%). Sang đến giai đoạn 3,5 tuổi, tỉ lệ 1,8-cineole có dấu hiệu cao hơn (52,92% - 60,33%; trung bình đạt 57,45%), tỉ lệ limonene giảm hơn (5,14% - 6,08%; trung bình đạt 5,28%) song vẫn ở mức trên 5%. Ở giai đoạn này duy nhất có dòng vô tính của xuất xứ Q 8.13 có tỉ lệ 1,8-cineole 60,33% đạt tiêu chuẩn chất lượng tinh dầu trầm của Việt Nam ($> 60\%$), song tỉ lệ limonene của dòng vô tính này rất cao (6,08%), cao hơn mức 5% theo giới thiệu tinh dầu trầm cajeput (Khan và Abourashed, 2010)[63]. Như vậy, kết quả khảo nghiệm 7 dòng vô tính của xuất xứ Bribie Island Qld chưa có dòng vô tính nào đạt tiêu chuẩn chất lượng tinh dầu (có tỉ lệ 1,8-cineole $\geq 65\%$, tỉ lệ limonene $< 5\%$).

Qua nghiên cứu biến dị sinh trưởng và tinh dầu các dòng vô tính của xuất xứ West Malam PNG và Bribie Island Qld khảo nghiệm tại Phú Lộc cho thấy, chỉ xác định được 3 dòng vô tính có triển vọng Q15.013, Q15.32 và Q15.38. Các dòng vô tính còn lại của đều không đáp ứng được yêu cầu.

3.2.3. *Tương quan về tình trạng sinh trưởng, hàm lượng và chất lượng tinh dầu các xuất xứ Tràm năm gân giữa Ba Vì và Phú Lộc*

Tháng 1 năm 2009, các xuất xứ Tràm năm gân tiếp tục được xây dựng tại Phú Lộc (Thừa Thiên Huế) và đã được đánh giá sau 2 năm trồng (Lê Đình Khả, 2012)[21]. Kế thừa các kết quả này và kết quả khảo nghiệm xuất xứ Tràm năm gân tại Ba Vì tháng 8/2008, để tìm hiểu tương quan các tính trạng sinh trưởng, hàm lượng và chất lượng tinh dầu của các xuất xứ giữa 2 nơi khảo nghiệm là hết sức quan trọng trong chiến lược chọn giống Tràm năm gân ở Việt Nam.

Hệ số tương quan cặp đôi giữa các xuất xứ được khảo nghiệm ở 2 lập địa, theo các chỉ tiêu nghiên cứu quan trọng nhất như đường kính, chiều cao, chỉ số thể tích, hàm lượng tinh dầu và tỷ lệ 1,8-cineole trong tinh dầu ở Ba Vì và Phú Lộc giai đoạn 2 tuổi được thể hiện ở bảng 3.9.

Bảng 3.9. Hệ số tương quan về các chỉ tiêu sinh trưởng, tinh dầu các xuất xứ Tràm năm gân giữa Ba Vì và Phú Lộc ở giai đoạn 2 tuổi

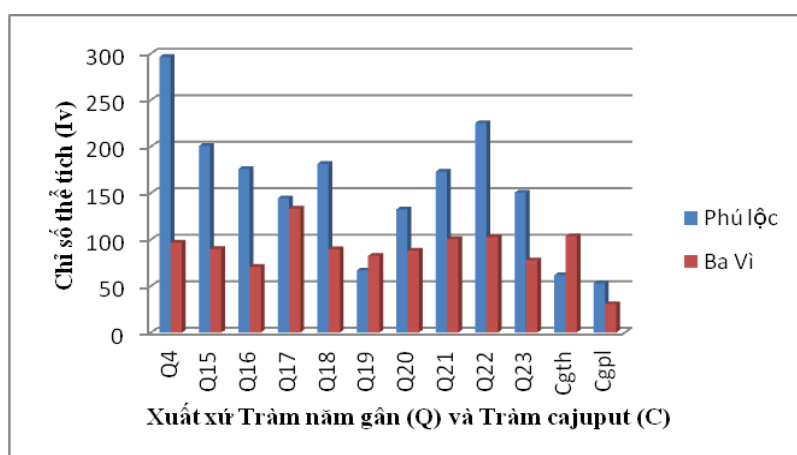
STT	Chỉ tiêu	Hệ số tương quan (r)
1	Đường kính gốc (Do)	0,12
2	Chiều cao (H)	0,54
3	Chỉ số thể tích (Iv)	0,20
4	Hàm lượng tinh dầu	0,86
5	Tỷ lệ 1,8-cineole	0,97

Số liệu ở bảng 3.9 cho thấy hệ số tương quan về tính trạng chiều cao giữa 2 nơi khảo nghiệm tương đối chặt (0,54), trong khi tính trạng đường kính gốc và chỉ số thể tích lại yếu (tương ứng 0,12 và 0,2). Hàm lượng và tỷ lệ 1,8-cineole trong tinh dầu, chỉ tiêu quan trọng nhất trong chọn giống Tràm năm gân, có tương quan chặt hoặc rất chặt giữa 2 nơi khảo nghiệm (tương ứng 0,86 và 0,97). Điều này chứng tỏ những xuất xứ có hàm lượng và tỷ lệ 1,8-cineole cao ở Ba Vì cũng có hàm lượng và tỷ lệ 1,8-cineole cao ở Phú Lộc.

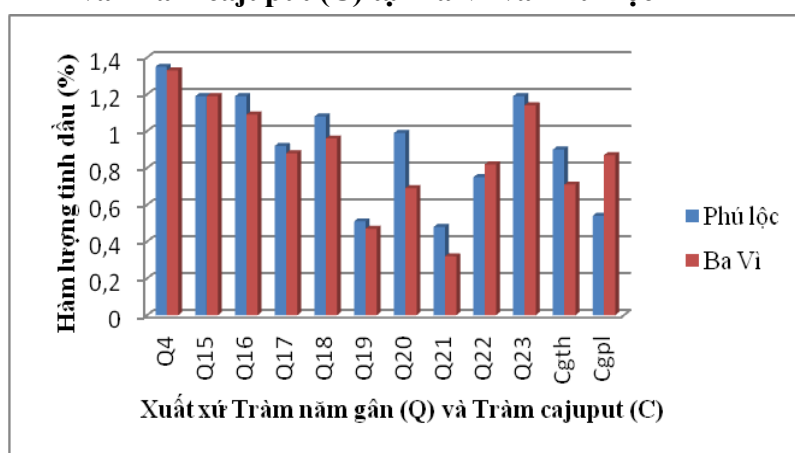
Nghiên cứu chọn giống Tràm trà tại Queensland và New South Wales cũng thấy những lô hạt cũng có tương tác xuất xứ - lập địa rất cao về hàm lượng tinh dầu và chất lượng tinh dầu, hệ số di truyền theo nghĩa hẹp (h^2) của hàm lượng tinh dầu 0,51-0,93, tỷ lệ terpinen-4-ol 0,81 (Doran, 2002)[50].

Từ khảo nghiệm xuất xứ Tràm năm gân có đối chứng với các xuất xứ Tràm gió điển hình của Việt Nam tại Phú Lộc (Lê Đình Khả, 2012)[21] và Ba Vì có thể thấy sinh trưởng (Iv) các xuất xứ Tràm năm gân khảo nghiệm ở Ba Vì kém hơn các xuất xứ Tràm năm gân khảo nghiệm ở Phú Lộc (biểu đồ 3.1). Tuy nhiên, Hàm lượng tinh dầu và tỷ lệ 1,8-cineole trong tinh dầu các xuất xứ Tràm năm gân tại Phú Lộc và Ba Vì khá tương đồng.

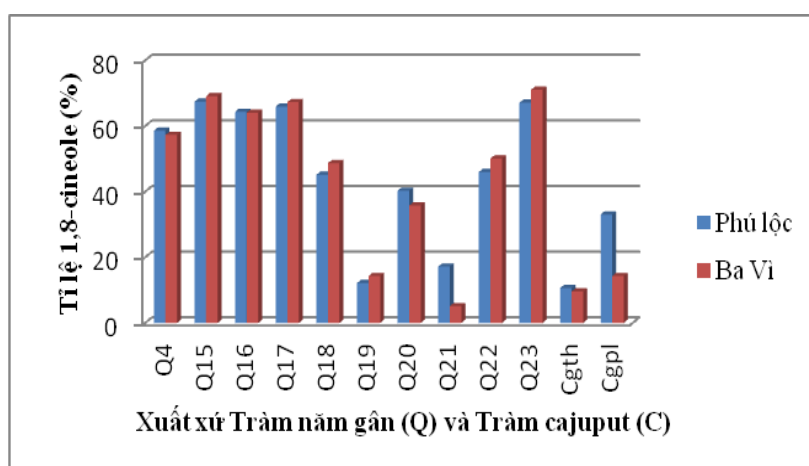
Tràm gió của Việt Nam vừa sinh trưởng chậm (biểu đồ 3.1), vừa có hàm lượng tinh dầu (biểu đồ 3.2) và tỷ lệ 1,8-cineole trong tinh dầu đều thấp (biểu đồ 3.3). Các nghiên cứu trước đây cho thấy Tràm gió lấy từ cây tự nhiên lâu năm ở các tỉnh Bình Trị Thiên cũng thấy tỷ lệ 1,8-cineole là 46,9 - 72%, song hàm lượng tinh dầu chỉ đạt 0,33 - 0,78% (Đào Trọng Hưng, 1995)[12], Tràm gió lấy từ cây tự nhiên lâu năm tại Long An tuy tỷ lệ 1,8-cineole có thể 64 - 68%, song hàm lượng tinh theo lá khô chỉ đạt 2,05 - 2,57% (tương đương 0,74 - 0,92% tính theo khối lượng lá tươi), còn Tràm gió tại Đại Lải tuy có tỷ lệ 1,8-cineole 52,2 - 69,3%, hàm lượng tinh dầu tính theo khối lượng lá khô 1,82 - 3,6% (tương đương 0,66 - 1,3% tính theo khối lượng lá tươi) (Nguyễn Việt Cường và Phạm Đức Tuấn, 2008)[7], song tỷ lệ limonene > 5% cây chỉ ở dạng bụi nhỏ sinh trưởng rất chậm không thể coi là giống cây trồng lấy tinh dầu có hiệu quả. Kết quả phân tích tỷ lệ 1,8-cineole ở Tràm gió của các tác giả trên đều cao hơn so với kết quả khảo nghiệm các xuất xứ Tràm gió tại Ba Vì, sự khác biệt này là do tuổi cây (giống Tràm gió mà các tác giả trên nghiên cứu là cây tự nhiên lâu năm, ở Ba vì cây được đánh giá ở tuổi 2-3).



Biểu đồ 3.1. Chỉ số thể tích (Iv) các xuất xứ Trà năm gân và Trà cajuput (C) tại Ba Vì và Phú Lộc



Biểu đồ 3.2. Hàm lượng tinh dầu các xuất xứ Trà năm gân (Q) và Trà cajuput (C) tại Phú Lộc và Ba Vì ở giai đoạn 2 năm tuổi



Biểu đồ 3.3. Tỷ lệ 1,8-cineole các xuất xứ Trà năm gân (Q) và Trà cajuput (C) tại Phú Lộc và Ba Vì ở giai đoạn 2 năm tuổi

3.3. Nghiên cứu kỹ thuật nhân giống Tràm năm gân bằng nuôi cấy mô

Nghiên cứu chọn giống Tràm năm gân lấy tinh dầu đã xác định được một số dòng vô tính như Q 4.44, Q15.38, Q23.21, v.v... có hàm lượng và chất lượng tinh dầu cao gấp đôi so với các giống Tràm gió của Việt Nam (Lê Đình Khả và cs, 2012)[21]. Nhân giống bằng nuôi cấy mô cho các dòng vô tính này là biện pháp góp phần nhân nhanh giống tốt cho sản xuất qui mô lớn.

Nhân giống bằng nuôi cấy mô Tràm năm gân và Tràm trà đã được Viện Nghiên cứu Giống và Công nghệ Sinh học Lâm nghiệp thực hiện. Tuy vậy, khi cấy chuyển lần 2 (sang môi trường nhân chồi mới) khả năng đẻ chồi ít, lại dễ bị nhiễm khuẩn (Lê Sơn, 2011)[28].

Nhân giống bằng nuôi cấy mô Tràm năm gân lần này đã khắc phục được các hiện tượng nói trên, tạo được cây ra rễ hoàn chỉnh với tỷ lệ cao và đủ tiêu chuẩn trồng rừng.

3.3.1. Ảnh hưởng của thời gian và số lần khử trùng bằng $HgCl_2$ 0,1% đến tỷ lệ mẫu sạch nảy chồi hữu hiệu.

Nghiên cứu tạo mẫu sạch các dòng vô tính Tràm năm gân được thực hiện theo 2 giai đoạn khử trùng sơ bộ mẫu cấy và khử trùng bằng $HgCl_2$ 0,1% theo các thời gian và số lần khử trùng khác nhau. Kết quả thu được sau 4 tuần nuôi cấy được thể hiện ở bảng 3.10.

Số liệu ở bảng 3.10 cho thấy khử trùng chồi non 2 lần trong 5 phút (lần đầu 3 và lần sau 2 phút) có tỷ lệ mẫu sạch nảy chồi 66,7 - 80,0%, trong khi khử trùng chồi bánh tẻ 2 lần trong 6 phút (lần đầu 4 phút và lần sau 2 phút) có tỷ lệ mẫu sạch nảy chồi 70,0 - 83,3%. Tăng thời gian khử trùng lên 7 phút thì tỷ lệ mẫu sạch nảy chồi đối với loại mẫu bánh tẻ chỉ còn 43,3 - 46,7%, thậm chí đối với loại mẫu non không thu được mẫu sạch nảy chồi. Chứng tỏ sử dụng chồi bánh tẻ Tràm năm gân khử trùng bằng $HgCl_2$ 0,1% trong 6 phút thành 2 lần (lần đầu 4 phút và lần sau 2 phút) cho kết quả tốt nhất (hình 3.1).

Bảng 3.10. Tỷ lệ(%) mẫu sạch nảy chồi, mẫu sạch chết và mẫu bị nhiễm của các dòng vô tính Q4.44, Q15.38 và Q23.21 khi khử trùng bằng HgCl₂ 0,1% (sau 4 tuần nuôi cấy)

Thời gian (phút) xử lý HgCl ₂ 0,1%			Q4.44			Q15.38			Q23.21		
Tổng thời gian	Lần 1	Lần 2	Sạch nảy chồi	Sạch chết	Nhiễm	Sạch nảy chồi	Sạch chết	Nhiễm	Sạch nảy nhồi	Sạch chết	Nhiễm
Chồi non											
4	4	-	23,3	0,0	76,7	16,7	0,0	83,3	10,0	0,0	90,0
4	2	2	33,3	0,0	66,7	23,3	0,0	76,7	16,7	0,0	83,3
5	5	-	60,0	10,0	30,0	50,0	16,7	33,3	53,3	16,7	30,0
5	3	2	80,0	6,7	13,3	66,7	10,0	23,3	73,3	13,3	13,3
6	6	-	40,0	23,3	36,7	33,3	26,7	40,0	30,0	26,7	43,3
6	4	2	46,7	13,3	40,0	40,0	20,0	40,0	36,7	16,7	46,7
7	7	-	0,0	66,7	33,3	0,0	73,3	26,7	0,0	66,7	33,3
7	4	3	0,0	60,0	40,0	0,0	66,7	33,3	0,0	56,7	43,3
Sig			0,0001			0,0001			0,0001		
Chồi bánh tẻ											
4	4	-	16,7	0	83,3	10	6,7	83,3	13,3	3,4	83,3
4	2	2	26,7	0	73,3	20	6,7	73,3	16,7	10	73,3
5	5	-	50,0	6,7	43,3	46,7	10	43,3	43,3	13,4	43,3
5	3	2	56,7	3,3	40,0	53,3	6,7	40,0	50,0	10	40,0
6	6	-	66,7	16,7	16,7	60,0	23,3	16,7	56,7	26,6	16,7
6	4	2	83,3	13,4	3,3	76,7	20	3,3	70,0	26,7	3,3
7	7	-	40,0	16,7	43,3	36,7	20	43,3	36,7	20	43,3
7	4	3	46,7	10,0	43,3	43,3	13,4	43,3	43,3	13,4	43,3
Sig			0,0001			0,0001			0,0001		

Mặt khác, tuy cùng thời gian khử trùng , song khử trùng 2 lần thì tỷ lệ mẫu sạch nảy chồi tăng lên, tỷ lệ mẫu bị nhiễm giảm xuống so với khử trùng 1 lần.



Hình 3.1. Mẫu sạch Tràm năm gân nảy chồi sau 4 tuần nuôi cấy

3.3.2. Nghiên cứu ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy, chất điều hoà sinh trưởng và nồng độ đường đến khả năng tái sinh chồi

3.3.2.1. Ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy và chất điều hoà sinh trưởng đến khả năng tái sinh chồi lần 1 (tái sinh chồi trực tiếp từ mẫu cấy)

Nghiên cứu tái sinh chồi lần một cho thấy sau 6 tuần tỷ lệ mẫu nảy chồi và số chồi/nách lá ở các công thức có bổ sung cả BAP và Kinetin đều cao hơn so với các công thức chỉ bổ sung BAP (bảng 3.11). Trong đó, công thức sử dụng môi trường MS* + 30g/l sucrose bổ sung 0,5 mg/l BAP + 0,2 mg/l Kinetin cho tỷ lệ mẫu nảy chồi (93,3 - 100%) và số chồi/nách lá (3,5 - 4 chồi) cao nhất. Trong khi, một nghiên cứu khác trên Tràm cajuput giai đoạn tái sinh chồi thành công lại sử dụng MS chỉ cần bổ sung BAP nồng độ 2 mg/l (Phùng Thị Hằng, Nguyễn Bảo Toàn, 2011)[8]. Tuy nhiên, phối hợp BAP và Kinetin có tác dụng kích thích quá trình tổng hợp diệp lục (Trần Văn Minh và cs., 1994) và làm giảm quá trình lão hoá của chồi (Coke, 1996). Số liệu ở bảng

3.11 cũng cho thấy sai khác giữa các công thức về tỷ lệ nảy chồi và số chồi/nách lá là rất rõ rệt (sig < 0,05).

Bảng 3.11. Tỷ lệ mẫu nảy chồi (%) và số chồi/nách lá của các dòng vô tính Q4.44, Q15.38 và Q23.21 trên môi trường MS và MS* có bổ sung BAP và Kinetin (sau 6 tuần nuôi cấy)

Môi trường cơ bản	BAP (mg/l)	Kinetin (mg/l)	Tỷ lệ nảy chồi (%) và số chồi/nách lá của các dòng vô tính					
			Q4.44		Q15.38		Q23.21	
			Tỷ lệ	Số chồi /nách lá	Tỷ lệ	Số chồi /nách lá	Tỷ lệ	Số chồi /nách lá
MS	0,5	0,0	36,7	1,4	30,0	1,5	36,7	1,7
	1,0	0,0	43,3	1,6	36,7	1,2	46,7	1,4
	2,0	0,0	46,7	1,8	31,1	1,2	50,0	1,3
	0,5	0,2	83,3	3,0	76,7	2,4	83,3	2,5
	1,0	0,2	70,0	3,2	63,3	2,7	66,7	2,8
	2,0	0,2	40,0	3,2	43,3	2,3	63,3	2,1
	TB		53,3	2,2	48,9	1,5	57,8	2,0
	Sig		0,0001	0,035	0,0001	0,026	0,0001	0,045
	LSD			1,21		0,84		0,95
MS*	0,5	0,0	43,3	2,0	46,7	1,8	50,0	2,1
	1,0	0,0	53,3	2,7	56,7	1,5	66,7	1,7
	2,0	0,0	60,0	2,5	43,3	1,5	56,7	1,4
	0,5	0,2	93,3	4,0	100,0	3,5	100,0	3,7
	1,0	0,2	80,0	3,2	86,7	2,2	93,3	2,1
	2,0	0,2	50,0	2,8	56,7	1,6	70,0	1,7
	TB		63,3	2,87	68,3	2,6	75,6	3,1
	Sig		0,0001	0,028	0,0001	0,033	0,0001	0,032
	LSD			0,94		1,11		1,15

3.3.2.2. Ảnh hưởng của nồng độ các loại đường đến khả năng tái sinh chồi lần 2

Các chồi tái sinh lần một được tách khỏi phần gỗ của mẫu cây ban đầu để tiếp tục tái sinh lần 2 trong môi trường MS* + 0,5 mg/l BAP + 0,2 mg/l Kinetin

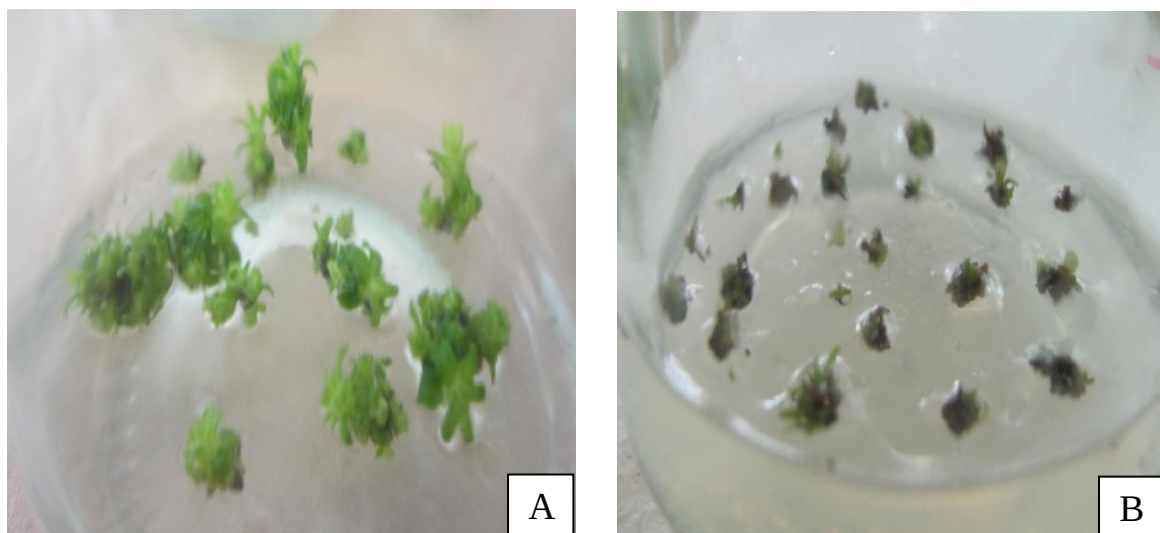
có bổ sung đường glucose (G) và sucrose (S). Chồi tái sinh lần 2 sau 6 tuần nuôi cấy được thể hiện ở bảng 3.12.

Bảng 3.12. Khả năng tái sinh chồi của các dòng vô tính trên môi trường MS* +0,5 mg/l BAP+ 0,2 mg/l Kinetin có bổ sung đường glucose và sucrose (S) (sau 6 tuần nuôi cấy)

Loại đường	Tỷ lệ (%) chồi tái sinh, bị chết và hệ số nhân của các dòng vô tính								
	Q4.44			Q15.38			Q23.21		
	Chồi bị chết	Chồi tái sinh	Hệ số nhân (lần)	Chồi bị chết	Chồi tái sinh	Hệ số nhân (lần)	Chồi bị chết	Chồi tái sinh	Hệ số nhân (lần)
30g/l G	0,0	100	5,2	0,0	100	3,5	0,0	100	4,8
20g/l G + 10g/l S	0,0	100	5,3	0,0	100	3,8	0,0	100	4,5
30g/l S	43,3	56,7	1,8	46,7	53,3	2,1	33,3	63,3	2,3
Sig	0,0001		0,021	0,0001		0,042	0,0001		0,018
LSD			2,1			1,08			1,38

Số liệu trong bảng 3.12 cho thấy sử dụng các loại đường khác nhau đã có ảnh hưởng rõ rệt đến kết quả tái sinh chồi về các chỉ tiêu tỷ lệ chồi bị chết, chồi tái sinh và hệ số nhân chồi cả 3 dòng vô tính nghiên cứu (hình 3.2). Bổ sung 30 g/l sucrose vào môi trường nuôi cấy tỷ lệ mẫu để chồi tối đa chỉ đạt 63,3%, hệ số nhân 1,8 - 2,3 lần với tỷ lệ chồi bị chết 33,3 - 46,7%. Tuy vậy, bổ sung chỉ 30g/l glucose hoặc 20 g/l glucose + 10 g/l sucrose vào môi trường nuôi cấy thì 100% số mẫu đã nảy chồi (cả 3 dòng vô tính nghiên cứu), với hệ số nhân chồi 3,5 - 5,3 lần, chất lượng chồi rất tốt. Chứng tỏ trong môi trường đường glucose (đường đơn) chồi non Tràm năm gân hấp thu chất dinh dưỡng tốt hơn trong môi trường đường sucrose (đường đôi). Theo tác giả Lê Sơn (2011)[28] nghiên cứu nhân giống bằng nuôi cấy mô Tràm năm gân và Tràm trà khi cây chuyển lần 2 (sang môi trường nhân chồi mới) khả năng để chồi ít,

lại dễ bị nhiễm khuẩn. Có thể, thay đổi thành phần các loại đường trong giai đoạn tái sinh chồi lần 2 khắc phục được hiện tượng trên, có tính chất quyết định đến khả năng nhân chồi Tràm năm gân.



Hình 3.2. Chồi Q4.44 tái sinh lần 2 trên môi trường có chứa 20 g glucose + 10 g sucrose (hình A-chồi tái sinh tốt) và 30 g sucrose (hình B – xuất hiện chồi bị chết) sau 6 tuần nuôi cấy

3.3.3. Ảnh hưởng của chất điều hoà sinh trưởng đến khả năng tạo cụm chồi

Tiếp tục sử dụng môi trường MS* + 20g/l glucose + 10g/l sucrose có bổ sung cố định 0,2 mg/l Kinetin; 0,1 mg/l NAA và thay đổi BAP ở các nồng độ 0,2; 0,5; 1,0 và 2,0 mg/l để nghiên cứu khả năng tạo cụm chồi. Kết quả sau 6 tuần nuôi cấy được tổng hợp ở bảng 3.13.

Số liệu trong bảng 3.13 cho thấy, chồi của dòng vô tính Q 4.44 sinh trưởng trong môi trường MS * + 0,2 mg/l Kinetin + 0,2 mg/l NAA bổ sung thêm BAP ở các nồng độ 0,2 - 2 mg/l có ảnh hưởng rõ rệt đến hiệu quả tạo cụm chồi. Bổ sung 1 - 2 mg/l BAP tuy làm tăng hệ số nhân chồi (5,5 - 6,1 lần) song chồi sinh trưởng kém (chiều cao chồi chỉ 0,7 - 0,4 cm), chất lượng chồi rất xấu (chồi vàng, nhỏ). Công thức 0,2 mg/l BAP + 0,2 mg/l Kinetin + 0,1 mg/l NAA có tỷ lệ mẫu tạo cụm chồi 90%, hệ số nhân chồi 3,1 lần, chiều cao

chồi 3,5 cm, chồi xanh và mập, tiếp đó là công thức 0,5 mg/l BAP + 0,2 mg/l Kinetin+0,1 mg/l NAA (tỷ lệ tạo chồi 93,7%; hệ số nhân chồi 4,7 lần; chiều cao chồi 1,4 cm và chất lượng chồi trung bình). Như vậy, công thức thích hợp nhất để tạo cụm chồi dòng Q 4.44 là 0,2 - 0,5 mg/l BAP + 0,2 mg/l Kinetin +0,1 mg/l NAA.

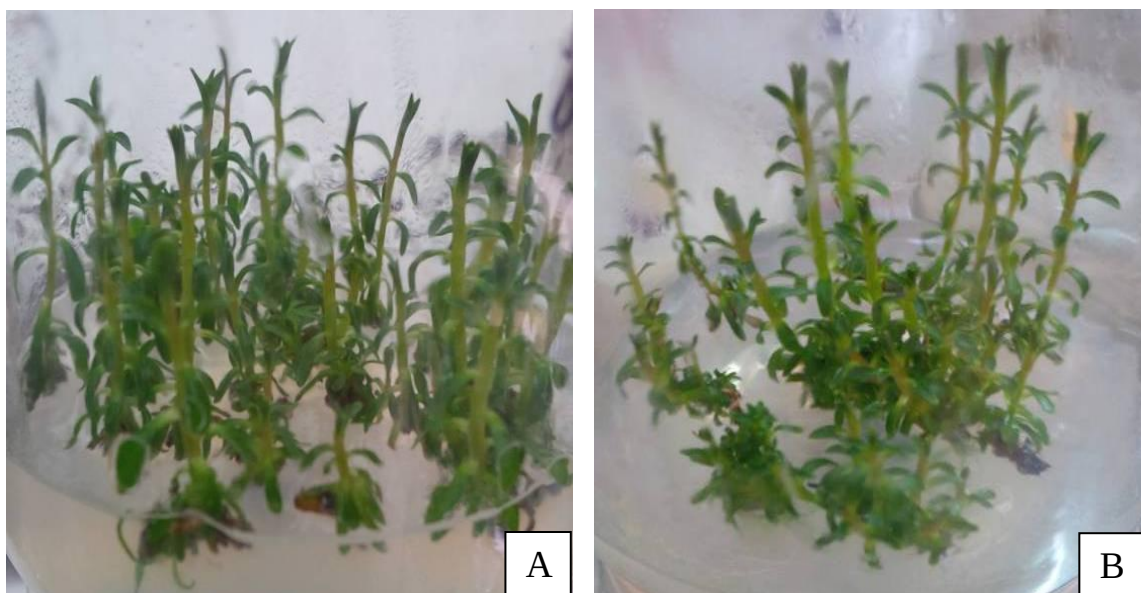
Bảng 3.13. Khả năng tạo chồi ở Q4.44 và Q23.21 trong môi trường MS* có bổ sung 20g/l G + 10g/l S + 0,2 mg/l Kinetin + 0,1 mg/l NAA và BAP (0,2 - 2 mg/l) (sau 6 tuần nuôi cấy)

BAP (mg/l)	Q4.44				Q23.21			
	Tạo cụm chồi (%)	Hệ số nhân (lần)	Chiều cao chồi (cm)	Chất lượng chồi	Tạo cụm chồi (%)	Hệ số nhân (lần)	Chiều cao chồi (cm)	Chất lượng chồi
0,2	90,0	3,1	3,5	Tốt	83,3	1,5	3,7	Tốt
0,5	93,7	4,7	1,4	TB	93,3	3,7	3,2	Tốt
1,0	83,3	5,5	0,7	Xấu	96,7	4,8	0,8	TB
2,0	73,3	6,1	0,4	Xấu	76,7	5,5	0,5	TB
Sig	0,002	0,046	0,001		0,0001	0,003	0,002	
LSD		1,75	0,98			1,5	1,08	

Kết quả tương tự cũng thu được ở dòng vô tính Q23.21, khi sử dụng 1- 2 mg/l BAP hệ số nhân chồi 4,8 - 5,5 lần, song chồi sinh trưởng kém (chiều cao chồi chỉ đạt 0,5 - 0,8 cm) chất lượng chồi trung bình . Bổ sung 0,2 mg/l BAP vào môi trường MS * tuy chồi cao 3,7 cm, chất lượng chồi tốt , song hệ số nhân chồi chỉ 1,5 lần, trong khi ở nồng độ BAP 0,5 mg/l chồi phát triển tốt (cao 3,2 cm) hệ số nhân chồi 3,7 lần (hình 3.3). Như vậy, công thức tạo cụm

chồi đối với Q23.21 là môi trường MS * bổ sung 0,5 mg/l BAP + 0,2 mg/l Kinetin + 0,1 mg/l NAA.

Nghiên cứu Tràm cajuput và Tràm trà của một số tác giả khác cũng cho thấy bổ sung BAP nồng độ trên 1 mg/l vào môi trường nuôi cấy trong giai đoạn nhân chồi tỷ lệ mẫu tạo cụm chồi cao, hệ số nhân chồi lớn, song chồi màu xanh nhạt, lá bị biến dạng, sinh trưởng chậm (Phùng Thị Hằng và Nguyễn Bảo Toàn, 2011; Mai Thị Phương Hoa và cs., 2013)[8, 14]. Như vậy, nhân chồi tràm sử dụng BAP ở nồng độ lớn hơn 1mg/l tuy làm tăng hệ số nhân chồi, song kìm hãm chồi sinh trưởng chiều cao.



Hình 3.3. Chồi Q4.44 trong MS* + 0,2 mg/l BAP + 0,2 mg/l Kinetin + 0,1 mg/l NAA (hình A) và chồi Q23.21 trong MS* + 0,5 mg/l BAP + 0,2 mg/l Kinetin + 0,1 mg/l NAA (hình B) sau 6 tuần nuôi cấy

3.3.4. Ảnh hưởng của nồng độ NAA và IBA đến khả năng tạo rễ *in vitro*

Nghiên cứu khả năng ra rễ *in vitro* Tràm năm gân bằng cách sử dụng môi trường MS * có bổ sung riêng rẽ NAA (nồng độ 0,1; 0,3 và 0,5), IBA (nồng độ 0,1; 0,3 và 0,5 mg/l) và đối chứng (không bổ sung IBA và NAA). Kết quả tạo rễ *in vitro* được thể hiện ở bảng 3.14.

Bảng 3.14. Khả năng ra rễ của chồi in vitro các dòng vô tính Q4.44 và Q23.21 trên môi trường MS* bổ sung NAA, IBA
(sau 6 tuần nuôi cấy)

Chất ĐHST (mg/l)	Q4.44					Q23.21				
	Tỷ lệ ra rễ (%)	Số lượng rễ (cái)	Chiều dài rễ (cm)	Thời gian ra rễ (ngày)	Chất lượng rễ	Tỷ lệ ra rễ (%)	Số lượng rễ (cái)	Chiều dài rễ (cm)	Thời gian ra rễ (ngày)	Chất lượng rễ
NAA										
0,1	90,0	4,7	1,5	12	TB	86,6	4,3	1,3	15	TB
0,3	93,3	6,5	1,6	10	Tốt	90,0	5,6	1,5	13	Tốt
0,5	91,1	6,1	1,7	10	Tốt	90,0	5,8	1,5	13	Tốt
TB	91,5	5,8	1,6	10,7		88,9	5,2	1,5	13,7	
IBA										
0,1	83,3	3,5	1,1	13	TB	80,3	2,8	0,9	17	TB
0,3	86,7	4,2	1,5	11	TB	86,6	3,7	1,3	15	TB
0,5	86,7	4,3	1,4	11	TB	84,4	3,5	1,2	15	TB
TB	85,7	4,0	1,3	11,7		83,8	3,3	1,1	15,7	
ĐC	75,6	1,9	0,9	15	Xấu	70,0	1,5	0,7	20	Xấu
Sig	0,012	0,017	0,038			0,03	0,0001	0,008		
LSD		2,08	0,44				0,75	0,4		

Kết quả kiểm tra thống kê cho thấy có sai khác giữa các công thức thí nghiệm ở tất cả các chỉ tiêu như tỷ lệ chồi ra rễ, số rễ/chồi, chiều dài rễ (sig < 0,05). Trong khi công thức đối chứng có tỷ lệ chồi ra rễ chỉ 70 - 75,6% với 1,5 - 1,9 rễ/chồi, chiều dài rễ 0,7 - 0,9 cm, thời gian ra rễ 15 - 20 ngày; thì bổ sung NAA 0,3 - 0,5 mg/l có tỷ lệ chồi ra rễ 90 - 93,3% với 5,6 - 6,5 rễ/chồi, chiều dài rễ 1,5 - 1,6 cm, thời gian ra rễ rút ngắn 10 - 13 ngày, rễ mập và trắng; còn bổ sung IBA 0,3 - 0,5 mg/l cho các chỉ tiêu trên tương ứng là 84,4 - 86,7%; 3,5 - 4,2 rễ/chồi; 1,2 - 1,5 cm và 11 - 15 ngày. Chứng tỏ, môi trường MS* có bổ sung 0,3 mg/l hoặc 0,5 mg/l NAA vào môi trường nuôi cấy là phù hợp nhất để cho ra rễ cây mô Tràm năm gân ; khác với Tràm cajuput ở giai

đoạn ra rễ cần đến 2 mg/l NAA trong môi trường MS (Phùng Thị Hằng, Nguyễn Bảo Toàn, 2011)[8]. Khả năng ra rễ tốt của Tràm năm gân giúp cho nhân giống *in vitro* ở qui mô sản xuất rất triển vọng.

3.3.5. Huấn luyện cây mô

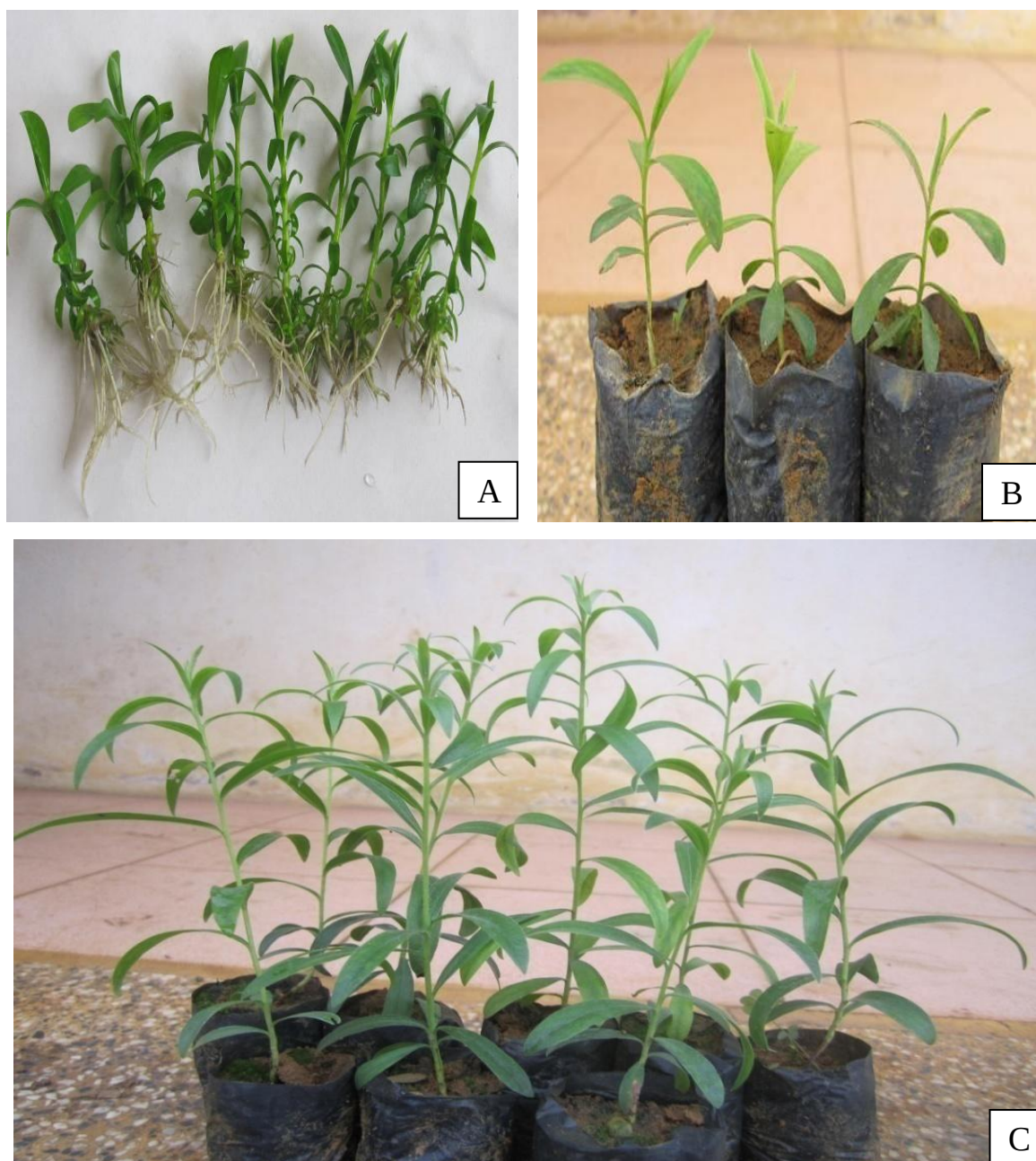
Cây mô đủ tiêu chuẩn được đặt dưới ánh sáng tán xạ (ngoài hành lang) trong 1 - 3 tuần, sau đó được lấy khỏi bình, rửa sạch thạch bám ở rễ và cấy vào bầu đất đặt dưới lưới nylon có độ che sáng 50% ngoài vườn ươm, tưới nước 2 - 3 lần/ngày. Tỷ lệ cây sống sau thời gian huấn luyện và sau khi cấy vào bầu đất trong vườn ươm được thể hiện ở bảng 3.15.

Bảng 3.15. Ảnh hưởng thời gian huấn luyện đến khả năng sống của cây mô Tràm năm gân

Thời gian huấn luyện (tuần)	Tỷ lệ sống cây mô dòng vô tính Q4.44 (%)		Tỷ lệ sống cây mô dòng vô tính Q23.21 (%)	
	Sau thời gian huấn luyện	Sau khi cấy vào bầu đất 4 tuần	Sau thời gian huấn luyện	Sau khi cấy vào bầu đất 4 tuần
1	100	66,6	100	60,0
2	100	86,7	100	91,1
3	100	71,1	100	68,8
Sig		0,005		0,0001

Sau khi đưa bình cây mô huấn luyện ngoài ánh sáng tán xạ 1, 2 và 3 tuần, đều cho 100% cây sống. Tuy nhiên, kết quả theo dõi tỷ lệ cây sống ngoài vườn ươm sau 4 tuần cho thấy có sự khác nhau rõ rệt giữa các khoảng thời gian huấn luyện khác nhau. Khi thời gian huấn luyện ngắn (1 tuần) tỷ lệ cây sống ở vườn ươm chỉ đạt 60,0 - 66,6%, huấn luyện trong 2 tuần tỷ lệ cây sống tăng lên 86,7 - 91,1%, thời gian huấn luyện 3 tuần tỷ lệ cây sống lại giảm xuống 68,8 - 71,1%. Điều này có thể do huấn luyện trong 1 tuần cây mô chưa kịp thích ứng với điều kiện tự nhiên, huấn luyện cây mô trong 3 tuần dinh dưỡng trong môi trường bị cạn kiệt, đồng thời tăng nguy cơ nhiễm nấm,

khuẩn môi trường dinh dưỡng trong bình nuôi do đó sẽ ảnh hưởng đến tỉ lệ sống và sinh trưởng của cây con ở giai đoạn vườn ươm. Chính vì thế, cây *in vitro* Tràm năm gân hoàn chỉnh được huấn luyện dưới ánh sáng tán xạ 2 tuần cây sẽ cứng cáp và cho tỷ lệ sống cao ở ngoài vườn ươm.



Hình 3.4. Cây con Tràm năm gân trước khi cấy vào bầu đất (hình A), sau khi cấy vào bầu đất 1 tháng (hình B) và đủ tiêu chuẩn trồng rừng (hình C)

Tóm lại, nhân giống một số dòng vô tính Tràm năm gân Q 4.44, Q15.38 và Q23.21 bằng nuôi cấy mô cho thấy sử dụng chồi bánh tẻ khử trùng bằng HgCl_2 0,1% trong 6 phút chia 2 lần (lần đầu 4 phút và lần sau 2 phút) tỉ lệ mẫu nhiễm chỉ 3%, trong khi tỷ lệ mẫu sạch nảy chồi 70,0 - 83,3%. Môi trường $\text{MS}^* + 0,5 \text{ mg/l BAP} + 0,2 \text{ mg/l Kinetin}$ thích hợp nhất để tái sinh chồi lần một (tỷ lệ mẫu nảy chồi 93,3 - 100% với 3,5 - 4 chồi/nách lá); môi trường $\text{MS}^* + 0,5 \text{ mg/l BAP} + 0,2 \text{ mg/l Kinetin} + 30 \text{ g/l đường glucose}$ (hoặc $20 \text{ g/l glucose} + 10 \text{ g/l sucrose}$) thích hợp nhất để tái sinh chồi lần hai. Môi trường tạo cụm chồi tốt nhất $\text{MS}^* + 0,2 - 0,5 \text{ mg/l BAP} + 0,2 \text{ mg/l K} + 0,1 \text{ mg/l NAA}$. Môi trường ra rễ *in vitro* thích hợp là $\text{MS}^* + 30 \text{ g/l sucrose}$ (hoặc $20 \text{ g/l glucose} + 10 \text{ g/l sucrose}$) + 0,3 - 0,5 mg/l NAA (tỷ lệ ra rễ trên 90%, rễ có chất lượng tốt). Huân luyện cây mô dưới ánh sáng tán xạ trong 2 tuần trước khi cấy cây ở vườn ươm cho tỉ lệ cây sống 86,7 - 91,1%.

3.4. Nghiên cứu một số biện pháp kỹ thuật nhằm tăng năng suất và chất lượng tinh dầu Tràm năm gân

3.4.1. Ảnh hưởng của bón thúc đến sinh trưởng, hàm lượng và chất lượng tinh dầu.

Khảo nghiệm xuất xứ Tràm năm gân tại Ba Vì tháng 8/2008 đã xác định được 3 xuất xứ có sinh trưởng nhanh, hàm lượng tinh dầu cao và tỷ lệ 1,8-cineole hơn 65% là West Malam PNG, Wasua Road PNG và Casino NSW. Vì vậy, các xuất xứ này được lựa chọn để thử nghiệm ảnh hưởng của phân bón (giai đoạn bón thúc) đến hàm lượng và chất lượng tinh dầu tràm. Thí nghiệm bón thúc được tiến hành vào tháng 3 năm 2012, với 3 công thức chính là CT1: 200 g NPK/cây, CT2: 100 g NPK + 200 g phân hữu cơ vi sinh/cây, CT3: 200g NPK + 200 g phân hữu cơ vi sinh/cây. Mỗi công thức này lại bón thêm 50g vôi bột/cây (CT1.1, CT2.1, CT3.1) và 100 g vôi bột/cây (CT1.2, CT2.2, CT3.2).

Sau bốn thúc 1 năm (tháng 3 năm 2013) thí nghiệm được đánh giá theo các chỉ tiêu sinh trưởng, khối lượng lá/cây (vì cần duy trì thí nghiệm nên mỗi công thức thí nghiệm ở từng xuất xứ chỉ cắt một cây có trị số trung bình về đường kính, chiều cao và chiều rộng tán để xác định), hàm lượng tinh dầu (Hlt), lượng tinh dầu/cây (Lgtd) và tỷ lệ 1,8-cineole.

3.4.1.1. Ảnh hưởng của bốn thúc đến sinh trưởng

Số liệu trong bảng 3.16 cho thấy xuất xứ West Malam PNG sau 1 năm bốn thúc có sinh trưởng (Iv) khác nhau rõ rệt giữa các công thức bốn thúc ($\text{sig} < 0,05$) và các công thức bốn thúc đều tốt hơn công thức đối chứng (không bốn thúc). Trong đó, các công thức bốn phân làm xuất xứ West Malam PNG có sinh trưởng tốt hơn như CT3.2 (200 g NPK + 200 g phân hữu cơ vi sinh + 100 g vôi bột) Iv cao nhất đạt 283,4, CT1.2 (200 g NPK + 100 g vôi bột) với Iv đạt 283,4 và CT2.2 (100 g NPK + 200 g phân hữu cơ vi sinh + 100 g vôi bột) Iv đạt 266,2.

Bảng 3.16. Sinh trưởng của một số xuất xứ Tràm năm gân tại các công thức bón phân khác nhau
(trồng 8/2008, chặt gốc 3/2012, thu số liệu 3/2013)

CTTN	Xuất xứ West Malam PNG				Xuất xứ Wasua Road PNG				Xuất xứ Casino NSW			
	Iv		Dt (cm)		Iv		Dt (cm)		Iv		Dt (cm)	
	$\bar{x}$	V%	$\bar{x}$	V%	$\bar{x}$	V%	$\bar{x}$	V%	$\bar{x}$	V%	$\bar{x}$	V%
CT1.1	162,2	14,4	1,88	16,7	132,3	53,1	1,81	20,3	282,3	78,8	1,97	18,4
CT1.2	280,9	21,2	1,97	30,8	253,7	80,5	2,00	22,2	205,0	60,8	1,98	19,3
CT2.1	257,8	20,5	1,95	21,0	184,6	77,4	1,67	22,6	200,7	78,3	1,81	20,9
CT2.2	266,2	18,8	1,96	20,4	150,7	73,7	1,78	18,5	154,3	64,6	1,67	28,1
CT3.1	212,4	26,6	1,73	30,1	172,9	64,0	1,75	12,4	229,3	75,6	1,87	24,1
CT3.2	283,4	22,1	2,04	27,8	161,3	61,7	1,87	29,6	174,3	73,1	1,78	20,5
ĐC	157,9	23,1	1,77	30,5	152,3	68,9	1,79	17,4	145,6	75,5	1,77	19,8
Sig	0,016		0,157		0,317		0,171		0,094		0,170	

Các xuất xứ Wasua Road PNG và Casino NSW sau 1 năm bón thúc chưa có sự khác nhau rõ rệt về sinh trưởng giữa các công thức thí nghiệm.

3.4.1.2. Ảnh hưởng của bón thúc đến hàm lượng tinh dầu và chất lượng tinh dầu

Số liệu trong bảng 3.17 cho thấy thử nghiệm các công thức bón phân khác nhau đối với xuất xứ West Malam PNG không làm thay đổi lớn về hàm lượng tinh dầu (1,24 - 1,39%) và tỉ lệ 1,8-cineole (đều đạt yêu cầu > 65%). Song các công thức bón phân có ảnh hưởng lớn đến khối lượng lá/cây, chính điều này đã làm cho lượng tinh dầu /cây thay đổi khá lớn giữa các công thức bón phân, giữa các công thức bón phân với công thức đối chứng. Đặc biệt cây ở công thức CT2.1 (100 g NPK + 200 g phân hữu cơ vi sinh + 50 g vôi bột) có lượng tinh dầu/cây (41,58g) gấp 2,7 lần so với công thức đối chứng (15,66). Khi so sánh công thức CT1.1 (200 g NPK + 50 g vôi bột) và công thức CT3.1 (200 g NPK + 200 g phân hữu cơ vi sinh + 50 g Vôi bột) cho thấy cùng sử dụng 200 g NPK + 50 g vôi bột, nhưng thêm 200 g phân hữu cơ vi sinh không làm thay đổi đáng kể lượng tinh dầu/cây. Cụ thể, cây ở công thức bón phân CT1.1 có lượng tinh dầu đạt 18,27 g/cây và công thức bón phân CT 3.1 đạt 20,25 g/cây. Mặt khác, cũng so sánh công thức CT 1.2 (200 g NPK + 100 g vôi bột) với công thức CT3.2 (200 g NPK + 200 g phân hữu cơ vi sinh + 100 g vôi bột) cho thấy cùng 200 g NPK + 100 g vôi bột nhưng thêm 200 g phân hữu cơ vi sinh cũng không làm thay đổi đáng kể lượng tinh dầu /cây, cụ thể cây ở công thức CT 1.2 có lượng tinh dầu đạt 28,22 g/cây và cây ở công thức CT3.2 đạt 28,46 g/cây. Do đó, cùng sử dụng 200 g NPK+ 50 - 100 g vôi/cây bón thêm 200 g phân hữu cơ vi sinh /cây không làm thay đổi lớn lượng tinh dầu/cây của xuất xứ West Malam PNG. Như vậy, khi nghiên cứu ảnh hưởng của các công thức bón phân đến sinh trưởng, hàm lượng và tỷ lệ 1,8-cineole của xuất xứ West Malam PNG cho thấy có thể sử dụng công thức bón phân

CT2.1 (100 g NPK + 200 g phân hữu cơ vi sinh + 50 g vôi bột) là phù hợp (do có lượng tinh dầu/cây cao nhất).

Bảng 3.17. Hàm lượng tinh dầu và tỷ lệ 1,8-cineole của một số xuất xứ Tràm năm gân tại các công thức bón phân khác nhau (trồng 8/2008, bón thúc 3/2012, thu số liệu 3/2013)

Chỉ tiêu		Công thức thí nghiệm						
Xuất xứ		CT1.1	CT1.2	CT2.1	CT2.2	CT3.1	CT3.2	ĐC
	Hlt (%)	1,31	1,28	1,26	1,39	1,35	1,24	1,31
West	Wlá (kg/cây)	1,4	2,2	3,3	1,4	1,5	2,3	1,2
Malam	Lgtd (g/cây)	18,27	28,22	41,58	19,40	2 0,25	28,46	15,66
PNG	Độ vượt (lần)	1,2	1,8	2,7	1,2	1,3	1,8	1,0
	1,8- cineole (%)	65,1	66,9	65,6	67,4	66,3	66,1	67,0
	Limonen (%)	4,77	4,71	5,09	4,73	4,95	4,72	4,77
Wasua	Hlt (%)	1,08	0,90	0,90	0,99	0,99	0,95	0,95
Road	Wlá (kg/cây)	2,2	0,9	0,4	0,7	1,3	1,0	1,1
PNG	Lgtd(g/cây)	23,76	8,10	3,60	6,93	12,87	9,45	10,40
	Độ vượt (lần)	2,3	0,8	0,3	0,7	1,2	0,9	1,0
	Hlt (%)	1,24	1,26	1,33	1,24	1,35	1,22	1,26
	Wlá (kg/cây)	1,4	2,2	0,8	1,0	2,8	2,6	0,6
Casino	Lgtd(g/cây)	17,3	27,7	10,6	12,4	37,8	31,6	7,6
NSW	Độ vượt (lần)	2,3	3,7	1,4	1,6	5,0	4,2	1,0
	1,8-cineole (%)	66,5	63,3	64,4	64,1	66,9	65,7	66,0
	Limonen (%)	4,53	4,41	4,74	4,74	4,59	4,96	4,27

Độ vượt về lượng tinh dầu trên cây của các công thức bón phân so với công thức đối chứng

Đối với xuất xứ Wasua Road PNG, hàm lượng tinh dầu trong lá không có sự biến động lớn giữa các công thức bón phân khác nhau, song khối lượng lá/cây và lượng tinh dầu/cây biến động khá lớn. Lượng tinh dầu/cây của công thức bón thúc C1.1 cao nhất (23,76 g) vượt công thức đối chứng 2,3 lần. Mặt khác, lượng tinh dầu/cây của công thức CT3.1 (12,87 g) vượt công đối chứng

(10,4 g) không đáng kể (1,2 lần) và có đến 4 công thức bón thúc (CT1.2, CT2.1; CT2.2 và CT3.2) đều lượng tinh dầu/cây nhỏ hơn công thức đối chứng. Tuy nhiên, có một hiện tượng cần xem xét trước khi có những kết luận cụ thể đó là tại thời điểm tháng 3 năm 2013 (sau một năm bón thúc), qua thu thập số liệu và quan sát ngoài thực địa cho thấy xuất xứ Wasua Road PNG ra quả rất nhiều và quả xuất hiện ở vị trí giữa cành, lá chỉ có ở vị trí đầu cành và gốc cành, do đó có ảnh hưởng đến khối lượng lá/cây. Như vậy, khi khai thác lá lần đầu (trước khi chuyển đến thời kỳ kinh doanh chồi), để nâng cao năng xuất tinh dầu, cần tránh khai thác vào thời điểm cây đang ra quả. Do hiện tượng này xuất xứ Wasua Road PNG không được phân tích thành phần tinh dầu.

Đối với xuất xứ Casino NSW, cây của các công thức bón phân đều có khối lượng lá và lượng tinh dầu cao hơn so với công thức đối chứng. Đặc biệt cây của công thức bón thúc CT3.1 (200g NPK + 200g phân hữu cơ vi sinh + 50 g vôi bột) có lượng tinh dầu cao nhất (đạt 37,8 g/cây) và gấp 5 lần so với công thức đối chứng (7,6g/cây), tiếp đến là công thức CT3.2 (200 g NPK + 200 g phân hữu cơ vi sinh + 100g vôi bột) cho lượng tinh dầu (đạt 31,6 g/cây) gấp 4,2 lần so với công thức đối chứng, đồng thời cả 2 công thức bón phân này đều có tỷ lệ 1,8-cineole trong tinh dầu trên 65% đạt tiêu chuẩn chất lượng tinh dầu theo yêu cầu (tương ứng đạt 66,94% và 65,71%). Các công thức bón phân CT1.2, CT2.1 và CT2.2 đều có tỷ lệ 1,8-cineole trong tinh dầu (tương ứng 63,31%, 64,38% và 64,98%) không đạt tiêu chuẩn chất lượng tinh dầu theo yêu cầu. Như vậy, mặc dù phân bón chưa ảnh hưởng rõ rệt đến sinh trưởng, hàm lượng tinh dầu trong lá của xuất xứ Casino NSW, song có ảnh hưởng đến khối lượng lá/cây, do đó ảnh hưởng lớn đến lượng tinh dầu/cây. Công thức bón phân có hiệu quả nhất đối với xuất xứ Q23 là CT3.1 (200 g NPK + 200 g phân hữu cơ vi sinh + 50 g vôi bột/cây).

Như vậy, bón phân đã có ảnh hưởng rõ rệt đến các chỉ tiêu sinh trưởng của xuất xứ West Malam PNG, nhưng chưa có ảnh hưởng rõ rệt đến sinh trưởng của xuất xứ Wasua Road PNG và Casino NSW. Mặt khác, phân bón không làm thay đổi hàm lượng tinh dầu và tỷ lệ 1,8-cineole trong cây, song ảnh hưởng đến khối lượng lá/cây do đó có ảnh hưởng đến năng suất tinh dầu. Công thức bón thúc sử dụng hiệu quả nhất cho xuất xứ West Malam PNG là CT2.1 (100 g NPK + 200 g phân hữu cơ vi sinh + 50 g vôi bột/cây), xuất xứ Wasua Road PNG là CT1.1 (100g NPK + 50 g vôi bột/cây) và xuất xứ Casino NSW là CT3.1 (200 g NPK + 200 g phân hữu cơ vi sinh + 50 g vôi bột/cây) Điều này cho thấy cả 3 xuất xứ nghiên cứu ngoài NPK được bón thì thêm 50g vôi bột/cây có hiệu quả hơn 100g vôi bột/cây.

3.4.2. Ảnh hưởng của chiều cao gốc chặt đến khả năng ra chồi

Trong kinh doanh trầm lấy tinh dầu, khai thác lần đầu được tiến hành sau khi trồng 1 - 4 năm. Chu kỳ khai thác các lần sau 12 - 24 tháng tùy theo điều kiện đất đai và tình hình sinh trưởng của cây ở từng nơi, cây trồng một lần có thể thu hoạch đến 30 năm (Brophy và cs., 2013; Colton và cs., 2000)[39, 47]. Khả năng ra chồi của cây sau khi chặt gốc chịu ảnh hưởng của nhiều nhân tố khác nhau, trong đó có chiều cao gốc chặt.

Nghiên cứu ảnh hưởng của chiều cao gốc chặt đến khả năng ra chồi của Tràm năm gân có tính chất thăm dò, chủ yếu là giúp định hướng nghiên cứu về sau. Thí nghiệm được thực hiện đối với 3 xuất xứ có triển vọng gồm West Malam PNG, Wasua Road PNG và Casino NSW trong khu quần thể nền chọn giống ở Ba Vì (trồng tháng 8 năm 2008). Thời gian được tiến hành vào tháng 3 năm 2013 theo các công thức 0 cm (chặt sát mặt đất), 5 cm, 10 cm, 15 cm, 30 cm và 50 cm. Số liệu thu thập sau 1 năm thí nghiệm (tháng 3 năm 2014) được thể hiện bảng 3.18.

**Bảng 3.18. Ảnh hưởng chiều cao gốc chặt đến khả năng ra chồi
của một số xuất xứ Tràm năm gân tại Ba Vì
(trồng 8/2008, chặt gốc 3/2013, thu số liệu 3/2014)**

Xuất xứ	H gốc chặt (cm)	Số chồi/cây		Dc (cm)		Hc (m)		Dt (m)		W lá kg/cây	
		$\bar{X}$	V%	$\bar{X}$	V%	$\bar{X}$	V%	$\bar{X}$	V%	$\bar{X}$	V%
West Malam PNG	5	6,75	19,0	2,05	26,9	2,45	23,5	2,09	14,4	1,35	26,39
	50	6,29	28,6	2,04	18,9	2,34	23,9	1,94	18,9	1,30	22,2
	15	6,33	29,5	1,74	21,3	2,15	19,0	1,79	7,8	1,28	36,6
	30	6,00	27,2	1,74	10,8	1,92	11,8	1,65	11,9	1,21	28,6
	10	4,50	33,6	1,63	16,3	2,29	22,2	1,58	10,8	1,18	30,8
	0	3,63	38,8	1,59	16,3	1,90	16,8	1,45	14,7	0,78	22,5
	TB	5,58	29,5	1,80	18,4	2,17	19,5	1,75	13,1	1,18	28,0
	Sig	0,04		0,067		0,162		0,0001		0,023	
Wasua Road PNG	15	5,50	19,6	1,59	18,3	2,54	24,4	1,67	22,9	1,05	31,1
	50	4,78	29,2	1,49	16,6	1,96	28,0	1,49	12,6	0,87	29,6
	5	4,67	21,4	1,50	14,7	1,99	19,5	1,41	5,5	0,78	26,6
	30	3,88	21,5	1,30	12,3	2,30	27,9	1,34	18,9	0,73	32,3
	10	4,13	27,3	1,55	34,6	2,41	13,1	1,21	48,4	0,66	33,9
	0	3,50	34,2	1,40	35,3	2,21	20,7	1,15	22,7	0,60	20,2
	TB	4,41	25,5	1,47	22,0	2,23	22,3	1,38	21,8	0,78	28,9
	Sig	0,02		0,185		0,058		0,029		0,008	
Casino NSW	15	7,38	33,2	1,95	31,3	2,65	26,5	1,76	20,1	1,22	19,6
	50	6,63	44,9	1,88	33,6	2,38	23,8	1,70	21,9	1,14	24,3
	5	6,00	44,9	1,67	42,2	2,40	18,2	1,49	19,6	0,82	18,1
	10	3,88	25,6	1,33	24,6	2,32	25,5	1,42	11,1	0,74	37,9
	30	3,75	34,2	1,47	36,9	2,08	30,9	1,26	11,8	0,68	32,6
	0	3,25	45,8	1,28	41,3	2,17	16,1	1,29	10,5	0,62	30,4
	TB	5,15	38,1	1,60	35,0	2,33	23,5	1,49	15,8	0,86	26,9
	Sig	0,01		0,06		0,425		0,007		0,003	

Kết quả kiểm tra thống kê cho thấy cả 3 xuất xứ nghiên cứu (West Malam PNG, Wasua Road PNG và Casino NSW) chiều cao gốc chặt khác nhau chưa có ảnh hưởng rõ rệt đến đường kính chồi và chiều cao chồi ($\text{sig} > 0,05$). Tuy nhiên, có ảnh hưởng rõ rệt đến các chỉ tiêu quan trọng như số chồi/cây, đường kính tán và khối lượng lá/cây ($\text{sig} < 0,05$). Độ cao gốc chặt để cây đẻ chồi nhiều nhất, đường kính tán lá lớn nhất và có khối lượng lá nhiều nhất thay đổi theo các xuất xứ. Xuất xứ West Malam PNG chặt gốc ở độ cao 5 cm là thích hợp nhất với 6,75 chồi/gốc, đường kính tán 2,09 m và khối lượng lá đạt 1,35 kg/cây (hình 3.5). Hai xuất xứ Wasua Road PNG và Casino NSW chặt gốc ở độ cao 15 cm là thích hợp. Xuất xứ Wasua Road PNG chặt ở độ cao 15 cm đạt 5,5 chồi/gốc, đường kính tán 1,67 m và khối lượng lá đạt 1,05 kg/cây, xuất xứ Casino NSW chặt ở độ cao này đạt 7,38 chồi/gốc, đường kính tán 1,76 m và khối lượng lá đạt 1,22 kg/cây.

Trong cả 3 xuất xứ được nghiên cứu, số chồi và khối lượng lá thấp nhất khi chặt gốc ở độ cao sát mặt đất (0 cm). Số liệu ở bảng 3.18 còn cho thấy có khác biệt rất rõ rệt giữa các xuất xứ về khả năng ra chồi và khối lượng lá/cây, trong đó xuất xứ West Malam PNG có khối lượng lá/cây lớn nhất, sau khi chặt gốc 1 năm khối lượng lá trung bình đạt đến 1,18 kg/cây (công thức chặt gốc cao nhất có thể đạt 1,35 kg/cây), tiếp đến là xuất xứ Casino NSW khối lượng lá trung bình đạt 0,86 kg/cây, thấp nhất là xuất xứ Wasua Road PNG có khối lượng lá trung bình chỉ đạt 0,78 kg/cây (công thức thấp nhất chỉ đạt 0,60 kg/cây). Biến động về khả năng ra chồi giữa các độ cao gốc chặt khác nhau chưa thể hiện tính qui luật sinh học, có thể do số mẫu thí nghiệm chưa nhiều (5 cây/lặp, 3 lặp), song kết quả trên có tính chất thăm dò cho các nghiên cứu tiếp theo.



Hình 3.5. Chồi 1 năm tuổi của xuất xứ West Malam PNG chặt gốc ở độ cao 5cm

3.4.3. Ảnh hưởng của mùa vụ đến hàm lượng và chất lượng tinh dầu

Xác định thời vụ cắt lá để chưng cất tinh dầu là một trong những vấn đề quan trọng ảnh hưởng đến năng suất và chất lượng tinh dầu. Nghiên cứu ảnh hưởng của nhiệt độ, lượng mưa đến hàm lượng và chất lượng tinh dầu các xuất xứ Tràm năm gân có triển vọng tại Ba Vì cho thấy lượng mưa có ảnh hưởng lớn đến hàm lượng và chất lượng tinh dầu tràm, trong khi ảnh hưởng của nhiệt độ đến hàm lượng và chất lượng tinh dầu biểu hiện không rõ ràng. Lượng mưa thấp làm tăng hàm lượng tinh dầu và tăng tỷ lệ 1,8-cineole, lượng mưa cao làm giảm hàm lượng và giảm tỷ lệ 1,8-cineole trong lá Tràm năm gân (Khuất Thị Hải Ninh, 2009)[25].

Tiếp tục tìm hiểu ảnh hưởng của thời vụ thu hoạch đến hàm lượng và chất lượng tinh dầu Tràm năm gân tại Phú Lộc, số liệu tổng hợp qua các thời điểm thu thập khác nhau (tháng 11 năm 2013 và tháng 6 năm 2014) từ khảo nghiệm dòng vô tính năm 2011. Kết quả được thể hiện ở bảng 3.19

Bảng 3.19. Hàm lượng và thành phần tinh dầu của một số dòng vô tính và xuất xứ Tràm năm gân tại Phú Lộc ở các mùa vụ khác nhau

Tên dòng vô tính và xuất xứ	Mùa mưa (11/2013 - 3 tuổi)			Mùa khô (6/2014 - 3,5 tuổi)		
	Hlt (%)	1,8-cineole (%)	Limonene (%)	Hlt (%)	1,8-cineole (%)	Limonene (%)
Q4.50	1,94			2,16	55,37	4,48
Q4.44	1,53			1,44	53,49	2,92
Q4.40	1,53			1,35		
Q4.45	1,67			1,26		
TB	1,67			1,55	54,43	3,70
Q8.13	1,80	55,16	7,32	1,53	60,33	5,87
Q8.23	1,80	50,35	4,9	1,53	59,72	3,63
Q8.36	1,71	53,14	7,56	1,44	52,92	6,08
Q8.43	1,80	51,54	5,97	1,53	55,42	5,69
TB	1,78	52,55	6,44	1,51	57,10	5,32
Q15.32	1,89	58,84	5,78	1,62	69,42	4,25
Q15.38	1,80	58,61	5,78	1,62	67,05	4,08
Q15.39	1,80	63,45	6,14	1,53	62,01	5,04
TB	1,83	60,30	5,90	1,59	66,16	4,46
Gympie Qld (Q4)	1,40	57,39	6,18	1,44	59,52	4,69
Bribie Island Qld (Q8)	1,80	53,04	6,68	1,53	58,85	5,14
West Malam PNG (Q15)	1,26	62,67	6,27	1,08	70,83	3,24
TB	1,49	57,70	6,38	1,35	63,07	4,36

Số liệu ở bảng 3.19 cho thấy mùa vụ thu hoạch lá để chưng cất tinh dầu có ảnh hưởng rất lớn đến hàm lượng và chất lượng tinh dầu . Hàm lượng tinh dầu trung bình của các dòng vô tính của xuất xứ West Malam PNG (Q15) thu hoạch vào mùa mưa (trung bình đạt 1,83%) cao hơn khi thu hoạch vào mùa khô (trung bình đạt 1,59%). Kết quả này cũng giống với các dòng vô tính của

xuất xứ Gympie Qld (Q4) , Bribie Island Qld (Q8) và các xuất xứ West Malam PNG (Q15), Gympie Qld (Q4), Bribie Island Qld (Q8). Tuy nhiên, nghiên cứu Tràm năm gân tại Ba Vì lại cho thấy lượng mưa thấp (mùa khô) làm tăng hàm lượng tinh dầu và lượng mưa cao (mùa mưa) làm giảm hàm lượng tinh dầu (Khuất Thị Hải Ninh, 2009)[25].

Sự khác biệt này có thể là do ở Phú Lộc vào thời điểm tháng 11/2013 các dòng vô tính và xuất xứ khảo nghiệm đều xuất hiện lá non và lá bánh tẻ ở đầu cành, trong khi tháng 6/2014 lá non không xuất hiện và lá trên cây chủ yếu là lá già (hình 3.6). Cũng vào thời điểm tháng 11/2013 mẫu lá non và lá già được thu thập để xác định hàm lượng tinh dầu, kết quả cho thấy hàm lượng tinh dầu trong lá non cao hơn trong lá già (phụ biểu 48), do vậy làm cho hàm lượng tinh dầu trong lá thu hoạch vào khoảng tháng 6/2013 thấp hơn thu hoạch vào khoảng tháng 11/2014. Tuy nhiên, tỷ lệ 1,8-cineole tăng lên đồng thời limonene giảm khi thu hoạch lá vào tháng 6, tỷ lệ 1,8-cineole giảm và limonene tăng khi thời điểm thu hoạch vào tháng 11 (bảng 3.19). Kết quả này cũng giống với các dòng vô tính của xuất xứ Gympie Qld và các xuất xứ Tràm năm gân khảo nghiệm tại Phú lộc (năm 2009) khi thu thập vào mùa khô (tháng 5/2011) và mùa mưa (tháng 12/2010) (Lê Đình Khả, 2012)[21].

Như vậy, ở Phú Lộc (Thừa Thiên - Huế) nên thu hoạch lá để chưng cất tinh dầu vào khoảng tháng 6 (gần cuối mùa khô) vì cho tỷ lệ 1,8-cineole cao hơn và tỷ lệ limonene giảm. Nghiên cứu Tràm cajuput tại Bình Trị Thiên cũng cho thấy quá trình tích lũy tinh dầu của Tràm cajuput phụ thuộc nhiều vào các điều kiện sinh thái nơi gây trồng. Hàm lượng tinh dầu và tỷ lệ 1,8-cineole của cây tràm mọc trên đất đồi laterit cao hơn ở cây tràm mọc ở đầm lầy, thung lũng và trên đất cát (Đào Trọng Hưng, 1995)[12]. Một nghiên cứu khác trên một số loài tràm tại Thạnh Hoá (Long An) cũng cho thấy vào mùa khô chất lượng tinh dầu thường tốt hơn mùa ngập nước, tháng 6 và 7 thích

hợp để thu hái lá chưng cất tinh dầu đối với xuất xứ có triển vọng Tozer 's gap 1302 Qld của Tràm năm gân (Phùng Cẩm Thạch và cs., 2000)[29]. Tuy nhiên, cũng nghiên cứu đối với Tràm năm gân ở Toamasina (phía đông của Madagascar) cho thấy ở các mùa vụ thu hoạch khác nhau, độ biến động về tỷ lệ các chất trong tinh dầu là rất thấp coi như khá ổn định trong năm (Ramanoelina và cs., 2008)[78]. Do đó, có thể thấy sự biến đổi hay ổn định thành phần tinh dầu Tràm năm gân trong năm cũng có thể phụ thuộc vào rất nhiều yếu tố như mùa vụ, vị trí gây trồng, thời tiết....

Như vậy, hàm lượng tinh dầu và tỷ lệ 1,8-cineole trong tinh dầu Tràm năm gân tại Phú Lộc ảnh hưởng rõ rệt bởi thời vụ thu hoạch, nên khai thác lá để chưng cất tinh dầu vào mùa khô (lượng mưa thấp) và thời điểm lá trưởng thành để tăng tỷ lệ 1,8-cineole đồng thời giảm tỷ lệ limonene.



Hình 3.6. Lá non dầu càn (tháng 11/2013- hình A) và lá trưởng thành (tháng 6/2014 – hình B) tại khu khảo nghiệm dòng vô tính Tràm năm gân tại Phú Lộc(trồng năm 2011)

Nhận định chung về ảnh hưởng của phân bón, mùa vụ đến hàm lượng, chất lượng tinh dầu và chiều cao gốc chặt đến khả năng ra chồi Tràm năm gân.

- Phân bón

Nghiên cứu ảnh hưởng của bón thúc đến sinh trưởng và tinh dầu của xuất xứ West Malam PNG, Wasua Road PNG, Casino NSW của Tràm năm gân tại Ba Vì cho thấy phân bón đã có ảnh hưởng rõ rệt đến sinh trưởng của xuất xứ West Malam PNG, nhưng chưa có ảnh hưởng rõ rệt đến sinh trưởng của xuất xứ Wasua Road PNG, Casino NSW, phân bón không làm thay đổi hàm lượng tinh dầu và tỷ lệ 1,8-cineole song ảnh hưởng đến khối lượng lá/cây do đó có ảnh hưởng đến năng suất tinh dầu. Công thức bón thúc sử dụng hiệu quả nhất đối với xuất xứ West Malam PNG là 100 g NPK + 200 g phân hữu cơ vi sinh + 50 g vôi bột, xuất xứ Casino NSW là 200 g NPK+200 g phân hữu cơ vi sinh + 50 g vôi bột, xuất xứ Wasua Road PNG là 100g NPK + 50g vôi bột/cây.

- Chiều cao gốc chặt (0 cm, 5 cm, 10 cm, 15 cm, 30 cm và 50 cm) có ảnh hưởng rõ rệt đến khả năng ra chồi của các xuất xứ Tràm năm gân. Xuất xứ West Malam PNG chặt gốc ở độ cao 5 cm, xuất xứ Wasua Road PNG và Casino NSW chặt gốc ở độ cao 15 cm là thích hợp.

- Mùa vụ

Hàm lượng tinh dầu và tỷ lệ 1,8-cineole trong tinh dầu Tràm năm gân tại Phú Lộc ảnh hưởng rõ rệt bởi thời vụ thu hoạch, nên khai thác tinh dầu vào mùa khô (lượng mưa thấp) và thời điểm lá trưởng thành để tăng tỷ lệ 1,8-cineole đồng thời giảm tỷ lệ limonene.

KẾT LUẬN, TỒN TẠI VÀ KIẾN NGHỊ

1. Kết luận

1.1. Biến dị sinh trưởng, hàm lượng và chất lượng tinh dầu giữa các xuất xứ, các dòng vô tính

Biến dị giữa các xuất xứ Tràm cajuput từ Indonesia

Ở giai đoạn 3 tuổi các xuất xứ Tràm cajuput từ Indonesia khảo nghiệm tại Ba Vì có tỉ lệ sống cao và ít khác biệt nhau (83,3 - 100%), trong lúc sinh trưởng có khác biệt rõ rệt (Iv thay đổi từ 101,2 đến 214,4). Hàm lượng tinh dầu giữa các xuất xứ thay đổi không lớn (0,72 - 0,90%), trong lúc tỷ lệ 1,8-cineole có thể chia thành hai nhóm rõ rệt: nhóm có tỷ lệ 1,8-cineole thấp là các xuất xứ Gogoria và Wai Geren trên đảo Buru (2,2 - 3,61%) và nhóm có tỷ lệ 1,8-cineole cao là các xuất xứ còn lại trên đảo Buru và đảo Ceram (31,52- 49,95%). Chất lượng tinh dầu của 7 xuất xứ Tràm cajuput từ Indonesia ở tuổi 3 chưa đạt tiêu chuẩn chất lượng tinh dầu theo yêu cầu.

Tràm gió của Việt Nam từ Đại Lải, Phú Lộc và Thanh Hoá có hàm lượng tinh dầu (0,54 - 0,63%) và tỷ lệ 1,8-cineole (16,04- 33,68%) không đạt yêu cầu như dược điển Việt Nam.

Xuất xứ West Malam PNG của Tràm năm gân có hàm lượng tinh dầu (1,17%) và tỷ lệ 1,8-cineole (70,81%) cao hơn các giống Tràm gió của Việt Nam và Tràm cajuput từ Indonesia.

Biến dị giữa các xuất xứ, dòng vô tính Tràm năm gân

Ở giai đoạn 2 - 3 năm tuổi biến dị giữa các xuất xứ Tràm năm gân ở Ba Vì về sinh trưởng, hàm lượng và tỷ lệ 1,8-cineole là khá lớn, Iv thay đổi từ 70,8 đến 133,3, hàm lượng tinh dầu từ 0,32 đến 1,33% và tỷ lệ 1,8-cineole từ 5,11 đến 71,05%. Trong đó 3 xuất xứ có triển vọng vừa có sinh trưởng nhanh, vừa có hàm lượng tinh dầu cao và tỷ lệ 1,8-cineole lớn hơn 65% là West Malam PNG (tương ứng 1,44 và 75,7%), Wasua Road PNG (tương ứng

1,35% và 65,48%) và Casino NSW (1,49% và 72,00%), tỷ lệ limonene đều nhỏ hơn 5%.

Các dòng vô tính của xuất xứ Gympie Qld (Q4) khảo nghiệm tại Ba Vì, ở giai đoạn 2 tuổi có biến dị khá lớn về sinh trưởng ($I_v = 8,22 - 22,14$) và đường kính tán (0,69 - 1,03 m). Tuy nhiên, hàm lượng tinh dầu (từ 1,4 - 1,85%) và tỷ lệ 1,8-cineole (56,94 - 65,36) có khoảng biến dị nhỏ hơn. Tại Ba Vì 2 dòng vô tính Q4.40 và Q4.45 là có triển vọng (hàm lượng tinh dầu tương ứng 1,85%, 1,53% và tỷ lệ 1,8-cineole tương ứng 65,36% và 64,98%, tỷ lệ limonene đều nhỏ hơn 5%).

Các dòng vô tính của xuất xứ Bribie Island Qld (Q8) và các dòng vô tính của xuất xứ West Malam PNG (Q15) khảo nghiệm tại Phú Lộc ở giai đoạn 3,5 tuổi có biến động rất lớn về sinh trưởng (với $I_v = 69,1 - 235,5$) và hàm lượng tinh dầu (1,08 - 1,98%). Trong khi tỷ lệ 1,8-cineole biến động nhỏ (từ 52,92 - 69,99%). Q15.013, Q15.32 và Q15.38 là 3 dòng có triển vọng tại Phú Lộc (hàm lượng tinh dầu ở giai đoạn 3,5 tuổi tương ứng là 1,44%, 1,62% và 1,62%, tỷ lệ 1,8-cineole tương ứng 69,99%; 69,42% và 67,05%, tỷ lệ limonene tương ứng là 4,1%, 4,25% và 4,08%).

Tương quan về các tính trạng sinh trưởng, hàm lượng và chất lượng tinh dầu các xuất xứ Tràm năm gân giữa Ba Vì và Phú Lộc

Hệ số tương quan về các tính trạng sinh trưởng các xuất xứ Tràm năm gân giữa Ba Vì và Phú Lộc từ yếu đến tương đối chặt (0,12 - 0,54). Hàm lượng và tỷ lệ 1,8-cineole trong tinh dầu có tương quan chặt và rất chặt giữa 2 nơi khảo nghiệm (0,86 và 0,97), cho phép áp dụng kết quả chọn giống xuất xứ lấy tinh dầu từ lập địa này cho lập địa khác.

1.2. Nhân giống bằng nuôi cấy mô Tràm năm gân

Khử trùng chồi nửa hóa gỗ bằng $HgCl_2$ 0,1% trong 6 phút chia thành 2 lần (lần đầu 4 phút, lần sau 2 phút) có tỷ lệ mẫu bị nhiễm chỉ 3,3%, tỷ lệ mẫu

sạch nảy chồi 70 - 83,3%. Môi trường tái sinh chồi lần một MS* bổ sung 0,5 mg/l BAP + 0,2 mg/l Kinetin (tỷ lệ mẫu nảy chồi 93,3 - 100% với 3,5 - 4 chồi/nách lá). Môi trường tái sinh chồi lần hai MS* bổ sung 0,5 mg/l BAP + 0,2 mg/l Kinetin + 30 g/l glucose (hoặc 20 g/l glucose + 10 g/l sucrose). Môi trường tạo cụm chồi là MS* bổ sung 0,2 - 0,5 mg/l BAP + 0,2 mg/l Kinetin + 0,1 mg/l NAA. Môi trường ra rễ *in vitro* là MS* bổ sung 30g/l đường sucrose (hoặc 20 g/l glucose + 10 g/l sucrose) + 0,3 - 0,5 mg/l NAA (tỷ lệ ra rễ trên 90%, rễ có chất lượng tốt). Huân luyện bằng cách đặt bình cây mô ở hành lang dưới ánh sáng tán xạ trong 2 tuần trước khi cấy vào bầu ở vườn ươm có lưới che sáng 50% sau 4 tuần tỉ lệ sống 86,7 - 91,1%.

1.3. Ảnh hưởng của phân bón, mùa vụ đến hàm lượng, chất lượng tinh dầu và chiều cao gốc chặt đến khả năng ra chồi Tràm năm gân.

- *Bón thúc*: Bón thúc ít ảnh hưởng đến hàm lượng tinh dầu và tỷ lệ 1,8-cineole, song ảnh hưởng đến khối lượng lá/cây do đó có ảnh hưởng đến năng suất tinh dầu. Công thức bón thúc 100 g NPK+200 g phân hữu cơ vi sinh +50 g vôi bột/cây tốt nhất đối với xuất xứ West Malam PNG (Wlá đạt 3,3 kg/cây và lượng tinh dầu 41,58 g/cây gấp 2,7 lần so với đối chứng), công thức 200 g NPK+200 g phân hữu cơ vi sinh + 50 g vôi bột/cây tốt nhất đối với xuất xứ Casino NSW (Wlá 2,8 kg/cây và lượng tinh dầu 37,8 g/cây gấp 5 lần so với đối chứng) và công thức 100g NPK + 50g vôi bột/cây tốt nhất đối với xuất xứ Wasua Road PNG (Wlá 2,2 kg/cây và lượng tinh dầu 23,76 g/cây gấp 2,3 lần so với đối chứng).

- *Chiều cao gốc chặt* (0 cm, 5 cm, 10 cm, 15 cm, 30 cm và 50 cm): Xuất xứ West Malam PNG chặt gốc ở độ cao 5 cm, xuất xứ Wasua Road PNG và Casino NSW chặt gốc ở độ cao 15 cm cây ra chồi nhiều nhất và có khối lượng lá/cây nhiều nhất.

- *Mùa vụ*: Hàm lượng tinh dầu và tỷ lệ 1,8-cineole trong tinh dầu Tràm năm gân tại Phú Lộc - Thừa Thiên Huế chịu ảnh hưởng rõ rệt của thời vụ thu hoạch. Thu hoạch trong mùa khô (lượng mưa thấp), khi không còn lá non, thì tỷ lệ 1,8-cineole cao hơn, tỷ lệ limonene thấp hơn thu hoạch vào mùa mưa.

2. Tồn tại

- Đánh giá kết quả khảo nghiệm xuất xứ Tràm cajuput mới được thực hiện tại Ba Vì, không có điều kiện đánh giá các nơi khác.

- Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của bốn phân đến hàm lượng và chất lượng tinh dầu của các xuất xứ có triển vọng (West Malam PNG, Wasua Road PNG và Casino NSW) được thí nghiệm tại Ba Vì ở giai đoạn bón thúc, chưa có điều kiện thí nghiệm ở giai đoạn kinh doanh chồi.

- Thí nghiệm chiều cao gốc chặt dựa trên nền khu khảo nghiệm xuất xứ Tràm năm gân, số cây chưa đủ lớn, nên chưa thể hiện tính qui luật như mong muốn.

3. Kiến nghị

Tiếp tục đánh giá về sinh trưởng, hàm lượng và chất lượng tinh dầu của 7 xuất xứ Tràm cajuput từ Indonesia ở các giai đoạn tuổi cao hơn và các nơi khác để có kết luận chính xác hơn.

Tiếp tục nghiên cứu nuôi cấy mô Tràm năm gân làm tài liệu tham khảo để hoàn thiện qui trình nhân các giống có triển vọng nhằm cung cấp giống tốt cho sản xuất.

NHỮNG CÔNG TRÌNH LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN ĐÃ CÔNG BỐ

- 1. Khuất Thị Hải Ninh**, Nguyễn Thị Thanh Hương (2011), Đánh giá khảo nghiệm xuất xứ và nhân giống hom Tràm năm gân (*Melaleuca quinquenervia*) tại Ba Vì - Hà Nội. *Tạp chí Khoa học Lâm nghiệp (Viện Khoa học Lâm nghiệp)*, số 3/2011, tr.1849-1856.
- 2. Khuất Thị Hải Ninh**, Nguyễn Thị Thanh Hương (2013), Ảnh hưởng của bón phân đến sinh trưởng, hàm lượng và chất lượng tinh dầu một số xuất xứ Tràm năm gân (*Melaleuca quinquenervia*) tại Ba Vì - Hà Nội. *Tạp chí Khoa học và công nghệ Lâm nghiệp (Trường Đại học Lâm nghiệp)*, số 4/2013, tr. 3-8.
- 3. Khuất Thị Hải Ninh**, Lê Đình Khả, Vũ Thị Huệ, Nguyễn Thị Thanh Hương (2015), Nghiên cứu nhân giống một số dòng vô tính Tràm năm gân (*Melaleuca quinquenervia*) bằng phương pháp nuôi cấy mô. *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn, chuyên đề Giống cây trồng vật nuôi*, tập 1, tháng 6/2015, tr.220-226.
- 4. Lê Đình Khả, K. Pinyopusarek, Nguyễn Thị Thanh Hương, Hồ Hải Ninh, Khuất Thị Hải Ninh** (2016), Khảo nghiệm xuất xứ Tràm cajuput tại Ba Vì và đa dạng di truyền các dạng tràm ở Việt Nam. *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn, chuyên đề Giống cây trồng vật nuôi*, tập 1, tháng 6/2016.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

I. Tiếng Việt

1. Bùi Thị Bằng (2007), *Nhận xét bản thảo đề cương nghiên cứu chọn giống Tràm có hàm lượng và chất lượng tinh dầu cao*. (Không công bố).
2. Bộ Y tế Việt Nam (2002), *Dược điển Việt Nam 3*, Nhà xuất bản Y học, Hà Nội.
3. Võ Văn Chi (1997), *Từ điển cây thuốc Việt Nam*, NXB Y học.
4. Nguyễn Việt Cường, Phạm Đức Tuấn (2006), “Khả năng phát triển một số giống tràm ở các tỉnh miền Bắc và tiềm năng bột giấy của gỗ tràm”, *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển nông thôn*, Số 1, tr.87-89.
5. Nguyễn Việt Cường, Phạm Đức Tuấn, Nguyễn Minh Chí, Nguyễn Xuân Quát, (2007), *Cây Tràm Việt Nam, Chọn giống, lai tạo và kỹ thuật gây trồng*. Nhà xuất bản Nông nghiệp Hà Nội.
6. Nguyễn Việt Cường, Phạm Đức Tuấn, Nguyễn Xuân Quát (2008), *Cây tràm Việt Nam. Từ nghiên cứu đến sản xuất, sinh thái-công dụng- chọn giống-lai tạo giống và kỹ thuật gây trồng*. Nhà xuất bản Nông nghiệp, Hà Nội.
7. Nguyễn Việt Cường, Phạm Đức Tuấn (2008), “Tinh dầu tràm – Tiềm năng phát triển ở các vùng đất có vấn đề”, *Tạp chí nông nghiệp và phát triển nông thôn*, (6).
8. Phùng Thị Hằng, Nguyễn Bảo Toàn (2011), “Nhân giống cây Tràm (*Melaleuca cajuputi*) bằng phương pháp nuôi cấy mô”, *Tạp chí khoa học Trường đại học Cần Thơ*, (20), tr. 89-96.
9. Trần Thị Thu Hằng, Thái Thành Lượm (2006), “Kết quả trồng khảo nghiệm trên diện tích rộng Tràm cừ lai *Melaleuca cajuputi* Việt Nam và *Melaleuca leucadendra* (Australia) trên đất rừng ngập nước theo mùa ở Nam Việt Nam”, *Tạp chí nông nghiệp và phát triển nông thôn*, (5), tr. 72-74
10. Nguyễn Thị Hải Hồng (2006), *Kỹ thuật sản xuất cây tràm giống (Melaleuca sp.) phát triển rừng tràm (Melaleuca) ở đồng bằng Sông Cửu Long*, NXB Văn hoá dân tộc, TP Hồ Chí Minh.

11. Nguyễn Thị Thanh Hương, (2008), *Khảo nghiệm xuất xứ, chọn giống và nhân giống trà có hàm lượng và chất lượng tinh dầu cao tại Ba Vì - Hà Nội*, Luận văn thạc sỹ Trường Đại học Lâm nghiệp.
12. Đào Trọng Hưng (1995), *Nghiên cứu đặc điểm sinh thái, sinh học và tinh dầu của cây Tràm (Melaleuca cajuputi Powell) ở vùng Bình Trị Thiên*, Tóm tắt luận án phó tiến sĩ sinh học.
13. QCVN 02: 2009/BXD, *Quy chuẩn kỹ thuật Quốc gia số liệu điều kiện tự nhiên dùng trong xây dựng*.
14. Mai Phương Hoa, Đỗ Tiến Vinh, Trần Văn Minh (2013), “Nhân giống cây Tràm trà (*Melaleuca alternifolia*) nhập nội từ Úc bằng kỹ thuật nuôi cấy chồi đỉnh”, *Báo cáo Hội nghị Khoa học Công nghệ sinh học Toàn quốc*, tr. 822-825.
15. Đinh Thị Huyền (2006), *Nghiên cứu nhân giống Vù Hương (Cinamomum balansae) và Tràm lá dài (Melaleuca leucadendra) bằng phương pháp nuôi cấy in vitro*, Khóa luận tốt nghiệp, Trường Đại học Lâm nghiệp.
16. Lê Đình Khả, Hoàng Chương, Nguyễn Trần Nguyên, K. Pinyopusarerk (1999), *Chọn giống trà cho trồng rừng ở đồng bằng Sông Cửu Long*. Hội thảo "Kỹ thuật trồng rừng trên đất phèn ở đồng bằng Sông Cửu Long", TP Hồ Chí Minh, tr. 243 - 266.
17. Lê Đình Khả, Dương Mộng Hùng (2003), *Giống cây rừng*, Nhà xuất bản Nông nghiệp
18. Lê Đình Khả và các cộng tác viên (2003), *Chọn tạo giống và nhân giống một số loài cây trồng rừng chủ yếu ở Việt Nam*, NXB Nông nghiệp, tr. 142-152.
19. Lê Đình Khả, Nguyễn Thị Thanh Hương, Mai Trung Kiên, K. Pinyopusarerk (2008), “Biến dị sinh trưởng, hàm lượng và chất lượng tinh dầu của một số loài trà hiện có ở Việt Nam”, *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển nông thôn*, (11), tr. 68-76.
20. Lê Đình Khả (2009), *Báo cáo tham quan khảo sát về trồng và chưng cất tinh dầu trà tại Australia*, Viện Cải thiện giống và Phát triển lâm sản.
21. Lê Đình Khả (2012), *Nghiên cứu chọn giống, kỹ thuật gây trồng và chế biến trà có năng suất và chất lượng tinh dầu cao*, Báo cáo tổng kết đề tài.
22. Đỗ Tất Lợi (1995), *Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam*, NXB. Y học.

23. Thái Thành Lượm (2006), “Kết quả nhân giống vô tính Tràm cừ lai bằng chất kích thích sinh trưởng AIB”, *Tạp chí nông nghiệp và phát triển nông thôn*, 2 (5), tr.22-26.
24. Nguyễn Văn Nghi (2000), *Nghiên cứu một số đặc điểm sinh trưởng, tích lũy tinh dầu và khả năng nhân giống vô tính cây Tràm lá hẹp (Melaleuca alternifolia) ở Việt Nam*, Luận án tiến sỹ sinh học - Trường Đại học khoa học tự nhiên, Hà Nội.
25. Khuất Thị Hải Ninh (2009), *Nghiên cứu khảo nghiệm và chọn lọc một số xuất xứ mới có hàm lượng và chất lượng tinh dầu cao và khả năng nhân giống hom của Tràm năm gân (Melaleuca quinquenervia) tại Ba Vì - Hà Nội*, Luận văn Thạc sỹ Lâm nghiệp – Trường Đại học Lâm nghiệp
26. Nguyễn Trần Nguyên, Hoàng Chương (1998), *Báo cáo kết quả khảo nghiệm các xuất xứ Tràm tại đồng bằng Sông Cửu Long*, Phân viện lâm nghiệp Nam Bộ.
27. Nguyễn Trần Nguyên (1999), “Bước đầu khảo nghiệm các xuất xứ Tràm tại đồng bằng Sông Cửu Long”, *Thông tin chuyên đề Khoa học, Công nghệ và Kinh tế nông nghiệp và phát triển nông thôn*, (7), tr. 20 - 24.
28. Lê Sơn (2011), *Báo cáo nhân giống tràm bằng nuôi cấy mô*, Trung tâm nghiên cứu Giống cây rừng (nay là Viện Nghiên cứu Giống và Công nghệ sinh học Lâm nghiệp).
29. Phùng Cẩm Thạch, Nguyễn Thị Hải Hồng, Phạm Thị Thuỳ Hương (2000), *Đánh giá hàm lượng và chất lượng dầu tràm theo loài và xuất xứ - Kết quả nghiên cứu khoa học công nghệ lâm nghiệp giai đoạn 1996-2000*. NXB Nông nghiệp, tr. 290-295.
30. Trần Duy Thái (2002), *Cây Chối xể (Baeckea frutescens L.) - Tài nguyên thực vật có tinh dầu ở Việt Nam*. Nhà xuất bản Nông nghiệp. Hà Nội, Tập II, tr.28-33.
31. Hà Thị Kim Thoa (2010), *Chọn giống và khảo nghiệm giống Tràm trà (Melaleuca alternifolia) có năng suất và chất lượng tinh dầu cao tại Ba Vì*, Luận văn thạc sỹ - Trường Đại học Nông lâm Thái Nguyên.
32. Nguyễn Hải Tuất, Ngô Kim Khôi (1996), *Xử lý thống kê kết quả nghiên cứu thực nghiệm trong nông lâm nghiệp trên máy vi tính*, Nhà xuất bản Nông nghiệp. Hà Nội, 128 trang.

33. Nguyễn Hải Tuất, Nguyễn Trọng Bình (2005), *Khai thác và sử dụng SPSS để xử lý số liệu trong lâm nghiệp*, NXB Nông nghiệp.
34. Phạm Đức Tuấn, Hoàng Vũ Thor (2008), “Nghiên cứu khả năng ra rễ của Tràm (*Melaleuca cajuputi* Powell) bằng phương pháp giâm hom”, *Tạp chí nông nghiệp và phát triển nông thôn*, số 6, tr. 82-86

II. Tiếng Anh

35. Bae G.S, Park K.C, Choi SB, Jo I.J, Choi M.O, Hong S.H, et al (2012), “Protective effects of alpha-pinene in mice with cerulein-induced acute pancreatitis”, *Life Sci*, 012 (91), pp. 866–71.
36. Boland D.J., Brooker M.I.H., Chippendanle G.M., Hall H., Hyland B.P.M., Johnston R.D., Kleinig D.A. and Turer J.D. (2006), *Forestry of Australia*. CSIRO-ensis.
37. Brooker M.I.H., Barton A.F.M., Rochel B.A. & Tjandra J. (1988), “The cineole content and taxonomy of *Eucalyptus kochii* Maiden and Blakely and *E. plenissima* (Gardner) Brooker, with an appendix establishing these two taxa as subspecies”, *Australian Journal of Botany*, (36), pp. 119-129.
38. Brophy J.J., Doran J.C. (1996), *Essential Oils of Tropical Asteromyrtus, Callistemon and Melaleuca Species*, ACIAR Canberra, Australia.
39. Brophy J.J, Caraven L.A. and Doran J.C. (2013), *Melaleucas their botany, essential oils and use*, pp 50-53.
40. Bucher P.A, Matheson A.C., Slee M.U. (1996), “Potential for genetic improvement of oil production in *Melaleuca alternifolia* and *M. Linariifolia*”, *New Forest*, (2), pp 31-51.
41. Burfield T., Hanger S. (2000), Super Clone “88” *Melaleuca alternifolia*-what is its value?, *First International Phyto-Aromatic Conference, Nice, France*.
42. Carson C.F. & Riley T.V. (1995), “Antimicrobial activity of the major components of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*”, *Journal of Applied Bacteriology*, (78), pp. 264-269.

43. Carson C.F., Hammer K.A. & Riley T.V. (2006), “*Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) oil: a review of antimicrobial and other medicinal properties”, *Clinical Microbiology Reviews*, 19(1), pp. 50-62.
44. Chumao H., (2005), “The developeping Tea tree Oil Industry in Guangxi Province”, *P.R. China Perf & Flav*, 30 (7), pp. 14-19.
45. Colton R.T., Murtagh G.J. (1990), Tea Tree Oil Plantation Production. *AGFACT Agdex*, 184 (10), pp. 1-10.
46. Colton R..T. & Murtagh G.J. (1999), “*Cultivation of tea tree*” *Tea Tree: the genus Melaleuca*, pp.63-80.
47. Colton R..T., Murtagh G.J., Drinnan J. & Clarke, B. (2000), Tea tree oil, *Agfact P6.4.6. Second ed.* NSW Agriculture, Orange.
48. Doran J.C., Caruhapattana B., Namsavat S. & Brophy, J. J. (1995), “Effect of harvest time on the leaf and essential oil yield of *Eucalyptus camaldulensis*”, *Journal of Essential Oil Research*, (7), pp. 627-632.
49. Doran J.C., and Turnr B.J., (1997), *Australia tree and Shrubs: Species for land rehabilitation and farm planting in tropics*. ACIAR Monograpt.
50. Doran J.C., Baker G.R., Williams E.R. and Southwell I.A. (2002), *Improving Australian Tea Tree though selecting and Bereeding*. RIRDC Publication No 02/017.
51. Doran J.C. (2013), *Essential oil an additional product from bioenergy plantions*
52. Drinnan J.E. (1997), *Development of the North Queensland tea tree industry*, Final report to project DAQ-184A. RIRDC, Canberra.
53. Drury S. (1989), *Tea Tree Oil: nature's miracle healer*, Unity Press, Lindfield.
54. Elliot W.R., Jones D.L. (1993), *Encyclopaedia of Australian Plants Suitable for Cultivation*. Thomas CLothian Pty. Ltd, Melbo urne.
55. Figueiredo D.M (2006), “Chemical composition and oil concentration of tea tree leaf oil grown in South Africa during a one-year vegetative cycle”, *Journal of Essential Oil Research*, (18), pp. 52-53.

56. Gong Zheng, Zhou Lihua, Zhang Weihua, Xu Liping (2009), "Rapid Propagation of *Melaleuca bracteata* F.Muell.via Tissue Culture", *Journal of Guangdong Forestry Science and Technology*, (5), pp.50-53.
57. Ireland B..F., Hibbert D.B., Goldsack R.J., Doran J.C., Brophy J.J. (2002), "Chemical variation in the leaf essential oil of *Melaleuca Quinquenervia* (Cav.) S.T. Blake", *Biochemical Systematics and Ecology*, (30), pp. 457-470.
58. ISO-4730 (International Organisation for Standardisation) (2004), *Oil of Melaleuca, Terpinen-4-ol type (Tea tree Oil)*, Geneve, Switzerland.
59. Juergens U.R, Dethlefsen U., Steinkamp G., Gillissen A., Repges R., Vetter H. (2003), *Anti-inflammatory activity of 1,8-cineol (eucalyptol) in bronchial asthma:a double-blind placebo-controlled trial*, *Respir Med*;97:250–6.
60. Juergens U.R., Engelen T., Racké K, Stöber M., Gillissen A., Vetter H.. (2004), *Inhibitory activity of 1,8-cineol (eucalyptol) on cytokine production in cultured human lymphocytes and monocytes*, *Pulm Pharmacol Ther*;17:281 –7.
61. Kar A.K. (2003), *Optimizing medicinal oil yield from Eucalyptus radiata plantations in northern New South Wales*. PhD Thesis, University of New England, Armidale.
62. Kernot I. (1994), "Growing tea tree in North Queensland", *Report of The Choices Seminar Series No. 5: Tea Tree. DPI Queensland*.
63. Khan I.A., Abourashed E.A. (2010), "Leung's Encyclopedia of Common Natural Integridients. Used in Food, Drugs, and Cosmetics". *Third edition by John Wiley and Sons, Inc..publication, Hoboken, NewJersey. Printed in the United States of America*, pp. 124-126.
64. Harris B., (2007), "1,8 cineole – a component of choice for respiratory pathologies", *International Journal of Clinical Aromatherapy* Vol4 (2), pp.3-8.
65. http://www.essortment.com//all/niauli_rst.htm, 2009.
66. Lassak E.V. & Mccarthy T. (1990), *Australian Medicinal Plants*. Mandarin, Port Melbourne.

67. Li H. (1993), *Phytochemistry of Eucalyptus spp. and its role in insect-host-tree Selection*, PhD Thesis, University of Tasmania, Hobart.
68. List, S., Brown, P. H. & Wals, K. B. (1995), "Functional anatomy of the oil glands of *Melaleuca alternifolia* (Myrtaceae)". *Australian Journal of Botany*, (43), pp. 629- 641.
69. List, S.E., Brown, P.H., Low, C.S. and Walsh, K.B. (1996), "A micro-propagation protocol for *Melaleuca alternifolia* tea tree", *Australian journal of Experimental Agriculture*, (36), pp. 755-760.
70. Mervyn Shepherd, Terry Rose, and Carolyn Raymond (2013), "Ejuveniation of mature native tee tree (*Melaleuca alternifolia*)", *Propagation of Ornamental Plant*, 13(3), pp. 103-111.
71. Murtagh G.J and Smith G.R, (1996), "Month of harvest and yield components of tea tree. II. Oil concentration, composition, and yield", *Australian Journal of Agricultural Research*, 47(5), pp. 817 – 827.
72. Murtagh G. J. (1999), " Biomass and oil production of tea tree", *Tea Tree: the genus Melaleuca*, pp. 109-134.
73. Nadia Mohd Tasriba, Alina Wagiranb, Zaidah Rahmatb, (2012), "Improvement of Shoot Regeneration of Potentially Medicinal Plant *Melaleuca alternifolia* Via Axillary Shoot, *Malaysia Jurnal of Teknologi (Sciences & Engineering)* 59. Pp. 3-33.
74. Opdyke, D.L.J. (1975), *Monographs of fragrance raw materials: Eucalyptol*. Food Cosmet. Toxicol.,13, 105–106. 2.
75. Panja A. R., Viano J., Bianchini J.P. and Gaydou E.M. (1994), "Occurrence of Various Chemotypes in Niaouli (*Melaleuca quinquenervia*) Essential Oils from Madagascar Using Multivariate Statistical Analysis?", *J. Agric. FoodChem*, (42), pp. 1177-1182.
76. Panja A.R., Bianchini J.P, Gaydou E.M. (2008), "Main Industrial Niaouli (*Melaleuca quinquenervia*) Oil Chemotype Productions from Madagascar", *Journal of Essential Oil Research*, (20), pp 261- 266.

77. Prastyono (2008), *Potential of Clones to Boost Yields in Tea Tree Plantations*. Southern Cross University, Master of Science.
78. Ramanoelina P.A., Bianchinin J.P., Gaydou E.M. (2008), “Main Industrial Niaouli (*Melaleuca quinquenervia*) Oil Chemotype Productions from Madagascar”, *Journal of Essential oil Research*, (20), pp. 261- 266.
79. RIRDC & ATTIA (2007), *The effectiveness and safety of Australian tea tree oil*, RIRDC Publication No. 07143. RIRDC, Canberra.
80. Sakasegawa M., Hori K., Yatagai M. (2003), “Composition and antitermite activities of essential oils from *Melaleuca* species”, *Journal of Wood Science* (49), pp 181-187.
81. Santos FA, Rao VS. (2000), *Antiinflammatory and antinociceptive effects of 1,8-cineole a erpenoid oxide present in many plant essential oils*, *Phytother Res* ;14:240–4.
82. Santos FA, Silva RM, Campos AR, De Araújo RP, Lima Júnior RC, Rao VS. (2004), *1,8-cineole (eucalyptol), a monoterpene oxide attenuates the colonic damage in rats on acute TNBS-colitis*. *Food Chem Toxicol*, 42:579–84.
83. Sangwan, N. S., Farooqi, A. H. A., Shabih, F. & Sangwan, R. S. (2001), *Regulation of essential oil production in plants*, *Plant Growth Regulation*, 34(1), 3-21.
84. Southwell I.A., Hayes A.J., Markham J. & Leach D. N. (1993), *The search for optimally bioactive Australian tea tree oil*, *Acta Horticulturae*, pp.256-265.
85. Southwell I. & Lowe R. (Eds)(1999), *Tea Tree: the genus Melaleuca*, Harwood Academic Publishers, Amsterdam.
86. SCF-Scientific Committee on Food (2002), *Opinion of the scientific committee on food on eucalyptol*.
87. Simmons D. & Parsons R. F. (1987), “Seasonal variation in the volatile leaf oils of two *Eucalyptus* species”, *Biochemical Systematics and Ecology*,(15), pp. 209-210.
88. Susanto M., Doran J., Arnold A., Rimbawarto A. (2003), “Genetic variation in growth and oil chracteristic of *Melaleuca cajuputi* subsp. *cajuputi* and potential for genetic improvement”, *Journal of Tropical Forest S cience*, (15), pp. 469-482.

89. Small B.E.J. (1981), "Effects of plant spacing and season on growth of *Melaleuca alternifolia* and yield of tea tree oil", *Australian Journal of Experimental Agriculture and Animal husbandry*, 21(111), 439-442.
90. Tschiggerl C., Bucar F. (2010), *Investigation of the volatile fraction of rosemary infusion extracts*, *Sci Pharm*, 78:483–92.
91. Vincenzi, D.M.; Silano, M.; de Vincenzi, A.; Maialetti, F.; Scazzocchio, B. (2002), Constituents of aromatic plants: Eucalyptol. *Fitoterapia*, (73), pp. 269–275.
92. Virtue J.G. (1999), "Weed management in tea tree plantations", *Tea Tree: the genus Melaleuca*, pp. 81-96.
93. Virtue J.G., Sutton B.G., Murtagh G.J. & Cousens R.D (2000), *Weed interference reduces yield of coppiced tea tree (Melaleuca alternifolia)*.
94. Vokovic M., Glamoclija J., Marin P.D., Brkic D. and van Griensven L.J.L.D. (2010), Antibacterial effects of essential oils of commonly consumed medicinal herbs using an In Vitro model. *Molecules* (15), pp.7532-7546.
95. Williams L.R. & Home, V.N. (1988) "Plantation production of oil of *Melaleuca* (tea tree oil) - a revitalised Australian essential oil industry", *Search*, 19(5/6), pp. 294-297.
96. Williams L.R. (1997), *The selection of superior trees of Melaleuca species to Provide Tea Tree Oil for Therapeutic Use. Abstract*, IFEAT conference, Seville.
97. Wrigley J. W. & Fagg M. (1993), *Bottlebrushes, Paperbarks and Tea Trees and All Other Plants in the Leptospermum Alliance*. Angus & Robertson, Pymble.
98. Yohana de Oliveira, Fernanda Pinto, André Luís Lopes da Silva, Ivan Guedes, Luiz Antonio Biasi, Marguerite Quoirin (2010), "An efficient protocol for micropropagation of *Melaleuca alternifolia* Cheel", *In Vitro Cell.Dev.Biol.—Plant*, (46), pp.192–197.
99. www.naturalstandard.com (2008), *Natural Standard Bottom Line Monograph*, copyright 2008. (<http://www.naturalstandard.com/index-abstract>, 2009)
100. Wholesale Aromatherapy ltd. (2014). Pure Natural Aromatherapy Products, http://www.pureessentialoils.com/essential_oils.php.

PHỤ LỤC

**Phụ biểu 01. Kết quả kiểm tra tỷ lệ cây sống giữa các xuất xứ Tràm cajuput
khảo nghiệm tại Ba Vì
(6/2012- 6/2015)**

Chi-Square Tests

	Value	Df	Asymp. Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square	21.990 ^a	10	.015
Likelihood Ratio	26.715	10	.003
Linear-by-Linear Association	.033	1	.856
N of Valid Cases	528		

**Phụ biểu 02. Kết quả phân tích phương sai về các chỉ tiêu sinh trưởng
các xuất xứ Tràm cajuput khảo nghiệm tại Ba Vì
(6/2012- 6/2015)**

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Doo	Between Groups	10.168	10	1.017	5.022	.001
	Within Groups	5.062	25	.202		
	Total	15.230	35			
Hvn	Between Groups	9.583	10	.958	6.440	.000
	Within Groups	3.720	25	.149		
	Total	13.303	35			
Iv	Between Groups	48125.188	10	4812.519	4.587	.001
	Within Groups	26230.655	25	1049.226		
	Total	74355.843	35			
Dtan	Between Groups	1.064	10	.106	3.791	.003
	Within Groups	.702	25	.028		
	Total	1.766	35			

Phụ biểu 03. Kết quả phân tích phương sai về các chỉ tiêu hàm lượng tinh dầu các xuất xứ Tràm cajuput khảo nghiệm tại Ba Vì giai đoạn 2 tuổi và 3 tuổi (6/2012- 4/2014 và 6/2015)

ANOVA						
		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Hltcajuput2tuoi	Between Groups	.679	10	.068	15.791	.000
	Within Groups	.095	22	.004		
	Total	.774	32			
Hltcajuput3tuoi	Between Groups	.755	10	.075	11.042	.000
	Within Groups	.150	22	.007		
	Total	.905	32			

Phụ biểu 04. Kết quả kiểm tra tỷ lệ cây sống giữa các xuất xứ Tràm năm gần khảo nghiệm tại Ba Vì (8/2008-12/2011)

Chi-Square Tests			
	Value	Df	Asymp. Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square	25.500 ^a	11	.008
Likelihood Ratio	23.487	11	.015
Linear-by-Linear Association	.079	1	.779
N of Valid Cases	2352		

**Phụ biểu 05. Kết quả phân tích phương sai về các chỉ tiêu sinh trưởng
của các xuất xứ Tràm năm gặt tại Ba Vì (8/2008-12/2011)**

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
DooXXB V	Between Groups	10.155	11	0.923	4.728	.000
	Within Groups	6.84	36	0.19		
	Total	16.995	47			
HvnXXB V	Between Groups	10.594	11	0.963	9.63	.000
	Within Groups	3.6	36	0.1		
	Total	14.194	47			
IvXXBV	Between Groups	25906.521	11	2355.138	5.75	.000
	Within Groups	14.737.56	36	409.38		
	Total	40644.076	47			
DtanXX BV	Between Groups	1.673	11	0.152	25.287	.000
	Within Groups	0.217	36	0.006		
	Total	1.8900	47			

**Phụ biểu 06. Kết quả phân tích phương sai về hàm lượng tinh dầu
giữa các xuất xứ Tràm năm gặt 2 tuổi tại Ba Vì (8/2008-12/2010)**

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	3.879	11	.353	35.747	.000
Within Groups	.355	36	.010		
Total	4.235	47			

**Phụ biểu 07. Kết quả kiểm tra tỷ lệ cây sống giữa các dòng vô tính của xuất xứ Gympie Qld
Trăm năm gần khảo nghiệm tại Ba Vì
(8/2008-10/2010)**

Chi-Square Tests

	Value	Df	Asymp. Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square	41.970 ^a	9	.000
Likelihood Ratio	39.635	9	.000
Linear-by-Linear Association	11.082	1	.001
N of Valid Cases	400		

**Phụ biểu 08. Kết quả phân tích phương sai về các chỉ tiêu sinh trưởng
các dòng vô tính của xuất xứ Gympie Qld Trăm năm gần tại Ba Vì
(8/2008-10/2010)**

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
DooDVTBVi	Between Groups	6.582	9	0.731	3.481	.000
	Within Groups	6.3	30	0.21		
	Total	12.882	39			
HvnDVTBVi	Between Groups	3.461	9	0.385	3.850	.000
	Within Groups	3.000	30	0.1		
	Total	6.461	39			
IvDVTBVi	Between Groups	1290.83	9	143.426	4.782	.000
	Within Groups	899.700	30	29.99		
	Total	2190.530	39			
DtanDVTBVi	Between Groups	0.525	9	0.058	2.900	.002
	Within Groups	0.600	30	0.02		
	Total	1.125	39			

**Phụ biểu 09. Kết quả phân tích phương sai về hàm lượng tinh dầu
các dòng vô tính của xuất xứ Gympie Qld Tràm năm gần 2 tuổi tại Ba Vì
(8/2008-10/2010)**

ANOVA					
HltDVTQ4bavi					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	5.360	9	.596	101.279	.000
Within Groups	.176	30	.006		
Total	5.536	39			

**Phụ biểu 10. Kết quả kiểm tra tỷ lệ cây sống giữa các dòng vô tính của
xuất xứ Bribie Island Qld Tràm năm gần khảo nghiệm tại Phú Lộc
(3/2009-6/2014)**

Chi-Square Tests			
	Value	Df	Asymp. Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square	17.396 ^a	7	.015
Likelihood Ratio	21.810	7	.003
Linear-by-Linear Association	11.914	1	.001
N of Valid Cases	256		

**Phụ biểu 11. Kết quả phân tích phương sai về các chỉ tiêu sinh trưởng
các dòng vô tính của xuất xứ Bribie Island Qld Tràm năm gặt tại Phú Lộc
(3/2011-6/2014)**

ANOVA						
		Sum ofSquares	df	MeanSquare	F	Sig.
Doo	BetweenGroups	9.197	7	1.314	3.820	.006
	WithinGroups	8.254	24	.344		
	Total	17.451	31			
Hvn	BetweenGroups	2.910	7	.416	3.379	.012
	WithinGroups	2.953	24	.123		
	Total	5.864	31			
Iv	BetweenGroups	19039.835	7	2719.976	3.338	.013
	WithinGroups	19558.916	24	814.955		
	Total	38598.751	31			
Dtan	BetweenGroups	.245	7	.035	3.816	.006
	WithinGroups	.220	24	.009		
	Total	.466	31			

**Phụ biểu 12. Kết quả phân tích phương sai về hàm lượng tinh dầu
các dòng vô tính của xuất xứ Bribie Island Qld Tràm năm gặt 3 tuổi và 3,5 tuổi tại
Phú Lộc (3/2011-11/2013 và 6/2014)**

ANOVA						
		Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
HltDVTQ8Ploc3tuoi	Between Groups	.386	7	.055	5.677	.001
	Within Groups	.233	24	.010		
	Total	.619	31			
HltDVTQ8Ploc3,5 tuoi	Between Groups	1.746	7	.249	7.352	.000
	Within Groups	.814	24	.034		
	Total	2.560	31			

Phụ biểu 13. Kết quả kiểm tra tỷ lệ cây sống giữa các dòng vô tính của xuất xứ West Malam PNG Tràm năm gần khảo nghiệm tại Phú Lộc (3/2011-6/2014)

Chi-Square Tests			
	Value	Df	Asymp. Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square	21.929 ^a	12	.038
Likelihood Ratio	21.431	12	.044
Linear-by-Linear Association	3.394	1	.065
N of Valid Cases	416		

Phụ biểu 14. Kết quả phân tích phương sai về các chỉ tiêu sinh trưởng các dòng vô tính của xuất xứ West Malam PNG Tràm năm gần tại Phú Lộc (3/2011-6/2014)

ANOVA						
		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Do	Between Groups	16.233	12	1.353	3.003	.005
	Within Groups	17.567	39	.450		
	Total	33.800	51			
Hvn	Between Groups	3.059	12	.255	2.719	.009
	Within Groups	3.655	39	.094		
	Total	6.714	51			
Iv	Between Groups	74948.861	12	6245.738	4.203	.000
	Within Groups	57951.377	39	1485.933		
	Total	132900.237	51			
Dt	Between Groups	.439	12	.037	1.571	.141
	Within Groups	.908	39	.023		
	Total	1.346	51			

**Phụ biểu 15 Kết quả phân tích phương sai về hàm lượng tinh dầu
các dòng vô tính của xuất xứ West Malam PNG Trăm năm gần 3 tuổi và 3,5 tuổi tại Phú Lộc
(3/2011-11/2013 và 6/2014)**

ANOVA

		Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
HltDVTQ15Ploc3tuoi	Between Groups	1.619	12	.135	4.133	.000
	Within Groups	1.273	39	.033		
	Total	2.892	51			
HltDVTQ15Ploc3tuoiruoi	Between Groups	1.196	12	.100	2.747	.008
	Within Groups	1.415	39	.036		
	Total	2.610	51			

**Phụ biểu 16. Kết quả kiểm tra tỷ lệ mẫu sạch nảy chồi. mẫu sạch chết. mẫu
nhiễm loại mẫu non dòng Q4.44**

	Value	Df	Asymp. Sig. (2- sided)
Pearson Chi-Square	3.934E2 ^a	14	.000
Likelihood Ratio	442.817	14	.000
Linear-by-Linear Association	.111	1	.739
N of Valid Cases	720		

Phụ biểu 17. Kết quả kiểm tra tỷ lệ mẫu sạch nẩy chồi. mẫu sạch chết. mẫu nhiễm loại mẫu già dòng Q4.44

Chi-Square Tests			
	Value	Df	Asymp. Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square	1.953E2 ^a	14	.000
Likelihood Ratio	228.205	14	.000
Linear-by-Linear Association	53.932	1	.000
N of Valid Cases	720		

Phụ biểu 18. Kết quả kiểm tra tỷ lệ mẫu sạch nẩy chồi. mẫu sạch chết. mẫu nhiễm loại mẫu non dòng Q15.38

	Value	Df	Asymp. Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square	4.280E2 ^a	14	.000
Likelihood Ratio	477.155	14	.000
Linear-by-Linear Association	4.864	1	.027
N of Valid Cases	720		

Phụ biểu 19. Kết quả kiểm tra tỷ lệ mẫu sạch nẩy chồi. mẫu sạch chết. mẫu nhiễm loại mẫu già dòng Q15.38

	Value	Df	Asymp. Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square	1.891E2 ^a	14	.000
Likelihood Ratio	215.066	14	.000
Linear-by-Linear Association	60.092	1	.000
N of Valid Cases	720		

Phụ biểu 20. **Kết quả kiểm tra tỷ lệ mẫu sạch nẩy chồi. mẫu sạch chết. mẫu nhiễm loại mẫu non dòng Q23.21**

	Value	Df	Asymp. Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square	4.032E2 ^a	14	.000
Likelihood Ratio	443.769	14	.000
Linear-by-Linear Association	4.693	1	.030
N of Valid Cases	720		

Phụ biểu 21. **Kết quả kiểm tra tỷ lệ mẫu sạch nẩy chồi. mẫu sạch chết. mẫu nhiễm loại mẫu già dòng Q23.21**

Chi-Square Tests

	Value	Df	Asymp. Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square	1.843E2 ^a	14	.000
Likelihood Ratio	209.906	14	.000
Linear-by-Linear Association	59.540	1	.000
N of Valid Cases	720		

Phụ biểu 22. **Kết quả kiểm tra tỷ lệ mẫu tái sinh chồi dòng Q4.44 trên môi trường MS kết hợp các chất điều hoà sinh trưởng**

	Value	Df	Asymp. Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square	64.286 ^a	5	.000
Likelihood Ratio	68.182	5	.000
Linear-by-Linear Association	9.167	1	.002
N of Valid Cases	540		

Phụ biểu 23. Kết quả kiểm tra tỷ lệ mẫu tái sinh chồi dòng Q15.38 trên môi trường MS kết hợp các chất điều hoà sinh trưởng

	Value	Df	Asymp. Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square	65.363 ^a	5	.000
Likelihood Ratio	67.376	5	.000
Linear-by-Linear Association	19.043	1	.000
N of Valid Cases	540		

Phụ biểu 24. Kết quả kiểm tra tỷ lệ mẫu tái sinh chồi dòng Q23.21 trên môi trường MS kết hợp các chất điều hoà sinh trưởng

	Value	Df	Asymp. Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square	51.377 ^a	5	.000
Likelihood Ratio	54.096	5	.000
Linear-by-Linear Association	27.028	1	.000
N of Valid Cases	540		

Phụ biểu 25. Kết quả kiểm tra tỷ lệ mẫu tái sinh chồi dòng Q4.44 trên môi trường MS* kết hợp các chất điều hoà sinh trưởng

	Value	Df	Asymp. Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square	72.344 ^a	5	.000
Likelihood Ratio	82.134	5	.000
Linear-by-Linear Association	11.888	1	.001
N of Valid Cases	540		

Phụ biểu 26. Kết quả kiểm tra tỷ lệ mẫu tái sinh chồi dòng Q15.38 trên môi trường MS* kết hợp các chất điều hoà sinh trưởng

	Value	Df	Asymp. Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square	1.044E2 ^a	5	.000
Likelihood Ratio	134.710	5	.000
Linear-by-Linear Association	21.818	1	.000
N of Valid Cases	540		

Phụ biểu 27. Kết quả kiểm tra tỷ lệ mẫu tái sinh chồi dòng Q23.21 trên môi trường MS* kết hợp các chất điều hoà sinh trưởng

	Value	Df	Asymp. Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square	90.266 ^a	5	.000
Likelihood Ratio	115.749	5	.000
Linear-by-Linear Association	32.309	1	.000
N of Valid Cases	540		

Phụ biểu 28. Kết quả phân tích phương sai kiểm tra số chồi tái sinh/nách lá các dòng Q4.44, Q15.38 và Q23.21 trong môi trường MS kết hợp các chất điều hoà sinh trưởng

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Q4.44	Between Groups	10.971	5	2.194	3.549	.035
	Within Groups	7.420	12	.618		
	Total	18.391	17			
Q15.38	Between Groups	5.819	5	1.164	3.890	.026
	Within Groups	3.590	12	.299		
	Total	9.409	17			
Q23.21	Between Groups	6.064	5	1.213	3.178	.045
	Within Groups	4.580	12	.382		
	Total	10.644	17			

Phụ biểu 29. Kết quả phân tích phương sai kiểm tra số chồi tái sinh/nách lá các dòng Q4.44, Q15.38 và Q23.21 trong môi trường MS* kết hợp các chất điều hoà sinh trưởng

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Q4.44	Between Groups	6.891	5	1.378	3.685	.028
	Within Groups	4.488	12	.374		
	Total	11.379	17			
Q15.38	Between Groups	9.138	5	1.828	3.522	.033
	Within Groups	6.227	12	.519		
	Total	15.364	17			
Q23.21	Between Groups	10.336	5	2.067	3.684	.032
	Within Groups	6.733	12	.561		
	Total	17.069	17			

Phụ biểu 30. Kết quả kiểm tra tỷ lệ chồi tái sinh, chồi bị chết dòng Q4.44 trong môi trường có chứa hàm lượng các loại đường khác nhau

	Value	Df	Asymp. Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square	91.169 ^a	2	.000
Likelihood Ratio	99.831	2	.000
Linear-by-Linear Association	68.123	1	.000
N of Valid Cases	270		

Phụ biểu 31. Kết quả kiểm tra tỷ lệ chồi tái sinh, chồi bị chết dòng Q15.38 trong môi trường có chứa hàm lượng các loại đường khác nhau

	Value	Df	Asymp. Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square	99.474 ^a	2	.000
Likelihood Ratio	109.036	2	.000
Linear-by-Linear Association	74.329	1	.000
N of Valid Cases	270		

Phụ biểu 32. Kết quả kiểm tra tỷ lệ chồi tái sinh, chồi bị chết dòng Q23.21 trong môi trường có chứa hàm lượng các loại đường khác nhau

	Value	Df	Asymp. Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square	75.190 ^a	2	.000
Likelihood Ratio	82.229	2	.000
Linear-by-Linear Association	56.184	1	.000
N of Valid Cases	270		

Phụ biểu 33. Kết quả phân tích phương sai kiểm tra hệ số nhân chồi lá các dòng Q4.44. Q15.38 và Q23.21 trong môi trường có chứa hàm lượng các loại đường khác nhau

ANOVA						
		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Q4.44	Between Groups	22.676	2	11.338	7.730	.021
	Within Groups	8.800	6	1.467		
	Total	31.476	8			
Q15.38	Between Groups	4.409	2	2.204	5.669	.042
	Within Groups	2.333	6	.389		
	Total	6.742	8			
Q23.21	Between Groups	11.309	2	5.654	8.142	.018
	Within Groups	4.167	6	.694		
	Total	15.476	8			

Phụ biểu 34. Kết quả kiểm tra tỷ lệ chồi cây ban đầu tạo cụm chồi dòng Q4.44 trong môi trường có chứa hàm lượng các loại chất điều hoà sinh trưởng khác nhau

Chi-Square Tests			
	Value	Df	Asymp. Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square	16.471 ^a	3	.001
Likelihood Ratio	16.262	3	.001
Linear-by-Linear Association	12.671	1	.000
N of Valid Cases	360		

Phụ biểu 35. Kết quả kiểm tra tỷ lệ chồi cây ban đầu tạo cụm chồi dòng Q23.21 trong môi trường MS* kết hợp các loại chất điều hoà sinh trưởng với nồng độ khác nhau

Chi-Square Tests			
	Value	Df	Asymp. Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square	20.800 ^a	3	.000
Likelihood Ratio	21.991	3	.000
Linear-by-Linear Association	1.140	1	.286
N of Valid Cases	360		

Phụ biểu 36. Kết quả phân tích phương sai kiểm tra hệ số nhân chồi, chiều dài chồi các dòng Q4.44 và Q23.21 trong môi trường MS* kết hợp các loại chất điều hoà sinh trưởng với nồng độ khác nhau

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
HsnhanchoiQ4.44	Between Groups	14.993	3	4.998	4.340	.045
	Within Groups	9.213	8	1.152		
	Total	24.207	11			
LchoiQ4.44	Between Groups	17.910	3	5.970	16.660	.001
	Within Groups	2.867	8	.358		
	Total	20.777	11			
HsnhanchoiQ23.21	Between Groups	27.882	3	9.294	11.054	.003
	Within Groups	6.727	8	.841		
	Total	34.609	11			
LchoiQ23.21	Between Groups	23.562	3	7.854	17.136	.002
	Within Groups	3.667	8	.458		
	Total	27.229	11			

Phụ biểu 37. Kết quả kiểm tra tỷ lệ ra rễ chồi in vitro dòng Q4.44 khi huấn luyện dưới ánh sáng tán xạ với thời gian khác nhau

Chi-Square Tests			
	Value	Df	Asymp. Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square	16.346 ^a	6	.012
Likelihood Ratio	15.604	6	.016
Linear-by-Linear Association	10.372	1	.001
N of Valid Cases	630		

Phụ biểu 38. Kết quả kiểm tra tỷ lệ ra rễ chồi in vitro dòng Q23.21 khi huấn luyện dưới ánh sáng tán xạ với thời gian khác nhau

Chi-Square Tests			
	Value	Df	Asymp. Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square	19.594 ^a	6	.003
Likelihood Ratio	17.325	6	.008
Linear-by-Linear Association	10.326	1	.001
N of Valid Cases	624		

Phụ biểu 39. Kết quả phân tích phương sai một nhân tố về số lượng rễ, chiều dài rễ cây in vitro dòng Q4.44 và Q23.21 khi xử lý chất điều hoà sinh trưởng các nồng độ khác nhau

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Sore4.44	Between Groups	44.170	6	7.362	3.895	.017
	Within Groups	26.460	14	1.890		
	Total	70.630	20			
LreQ4.44	Between Groups	1.528	6	.255	3.076	.038
	Within Groups	1.159	14	.083		
	Total	2.687	20			
SoreQ23.21	Between Groups	41.253	6	6.876	28.256	.000
	Within Groups	3.407	14	.243		
	Total	44.660	20			
LreQ23.21	Between Groups	1.982	6	.330	4.694	.008
	Within Groups	.985	14	.070		
	Total	2.967	20			

Phụ biểu 40. Kết quả kiểm tra tỷ lệ cây sống ngoài vườn ươm dòng Q4.44 khi huấn luyện dưới ánh sáng tán xạ với thời gian khác nhau

	Value	Df	Asymp. Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square	10.536 ^a	2	.005
Likelihood Ratio	11.293	2	.004
Linear-by-Linear Association	.470	1	.493
N of Valid Cases	270		

a. 0 cells (.0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 22.67.

Phụ biểu 41. Kết quả kiểm tra tỷ lệ cây sống ngoài vườn ươm dòng Q23.21 khi huấn luyện dưới ánh sáng tán xạ với thời gian khác nhau

Chi-Square Tests

	Value	Df	Asymp. Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square	23.636 ^a	2	.000
Likelihood Ratio	26.422	2	.000
Linear-by-Linear Association	1.811	1	.178
N of Valid Cases	270		

a. 0 cells (.0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 24.00.

Phụ biểu 42. Kết quả kiểm tra bằng tiêu chuẩn K của Kruskal Wallis về các chỉ tiêu sinh trưởng xuất xứ West Malam PNG Tràm năm gần ở các công thức bón phân khác nhau thí nghiệm tại Ba Vì

Test Statistics^{a,b}

	Hvn	Dtan	Dgoc	Iv
Chi-Square	14.635	9.316	13.665	15.692
df	6	6	6	6
Asymp. Sig.	.023	.157	.034	.016

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: CTTN

Phụ biểu 43. Kết quả kiểm tra bằng tiêu chuẩn K của Kruskal Wallis về các chỉ tiêu sinh trưởng xuất xứ Wasua Road PNG Tràm năm gần ở các công thức bón phân khác nhau thí nghiệm tại Ba Vì

	Hvn	Doo	Iv	Dtan
Chi-Square	7.813	6.656	7.040	9.051
df	6	6	6	6
Asymp. Sig.	.252	.354	.317	.171

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: CTTN

Phụ biểu 44. Kết quả kiểm tra bằng tiêu chuẩn K của Kruskal Wallis về các chỉ tiêu sinh trưởng xuất xứ Casino NSW Tràm năm gân ở các công thức bón phân khác nhau thí nghiệm tại Ba Vì

	Hvn	Doo	Iv	Dtan
Chi-Square	10.835	9.069	10.835	9.880
df	6	6	6	6
Asymp. Sig.	.094	.170	.094	.130

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: CTTN

Phụ biểu 45. Kết quả kiểm tra bằng tiêu chuẩn K của Kruskal Wallis về số chồi, Do, Hvn, Dt và Khối lượng lá ở chiều cao gốc cắt khác nhau West Malam PNG Tràm năm gân tại Ba Vì

	sochoi	DoQ15	HvnQ15	DtanQ15	WLaQ15
Chi-Square	17.098	10.364	7.902	22.853	12.993
df	5	5	5	5	5
Asymp. Sig.	.004	.066	.162	.000	.023

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: Q15

Phụ biểu 46. Kết quả kiểm tra bằng tiêu chuẩn K của Kruskal Wallis về số chồi, Do, Hvn, Dt và Khối lượng lá ở chiều cao gốc cắt khác nhau Wasua Road PNG Tràm năm gân tại Ba Vì

Test Statistics^{a,b}

	sochoiQ16	DQ16	HQ16	DtanQ16	WlaQ16
Chi-Square	13.631	7.512	10.667	12.421	15.702
df	5	5	5	5	5
Asymp. Sig.	.018	.185	.058	.029	.008

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: Q16

Phụ biểu 47. Kết quả kiểm tra bằng tiêu chuẩn K của Kruskal Wallis về số chồi, Do, Hvn, Dt và Khối lượng lá ở chiều cao gốc cắt khác nhau Casino Qld Tràm năm gân tại Ba Vì

	sochoiQ23	DQ23	HQ23	DtanQ23	WlaQ23
Chi-Square	16.537	10.599	4.923	15.991	18.354
df	5	5	5	5	5
Asymp. Sig.	.005	.060	.425	.007	.003

b. Grouping Variable: Q23

Phụ biểu 48. Hàm lượng tinh dầu trong lá non và lá già xuất xứ Q15, Q23 thời điểm chưng cất 11/2013 ở Ba Vì – Hà Nội

STT	xuất xứ	Loại lá	Hlt (%)
1	Q15	Non	1,54
2		Già	1,29
3	Q23	Non	1,67
4		Già	1,29

Phụ biểu 49. **THÀNH PHẦN CÁC CHẤT TRONG MÔI TRƯỜNG MS VÀ MS***

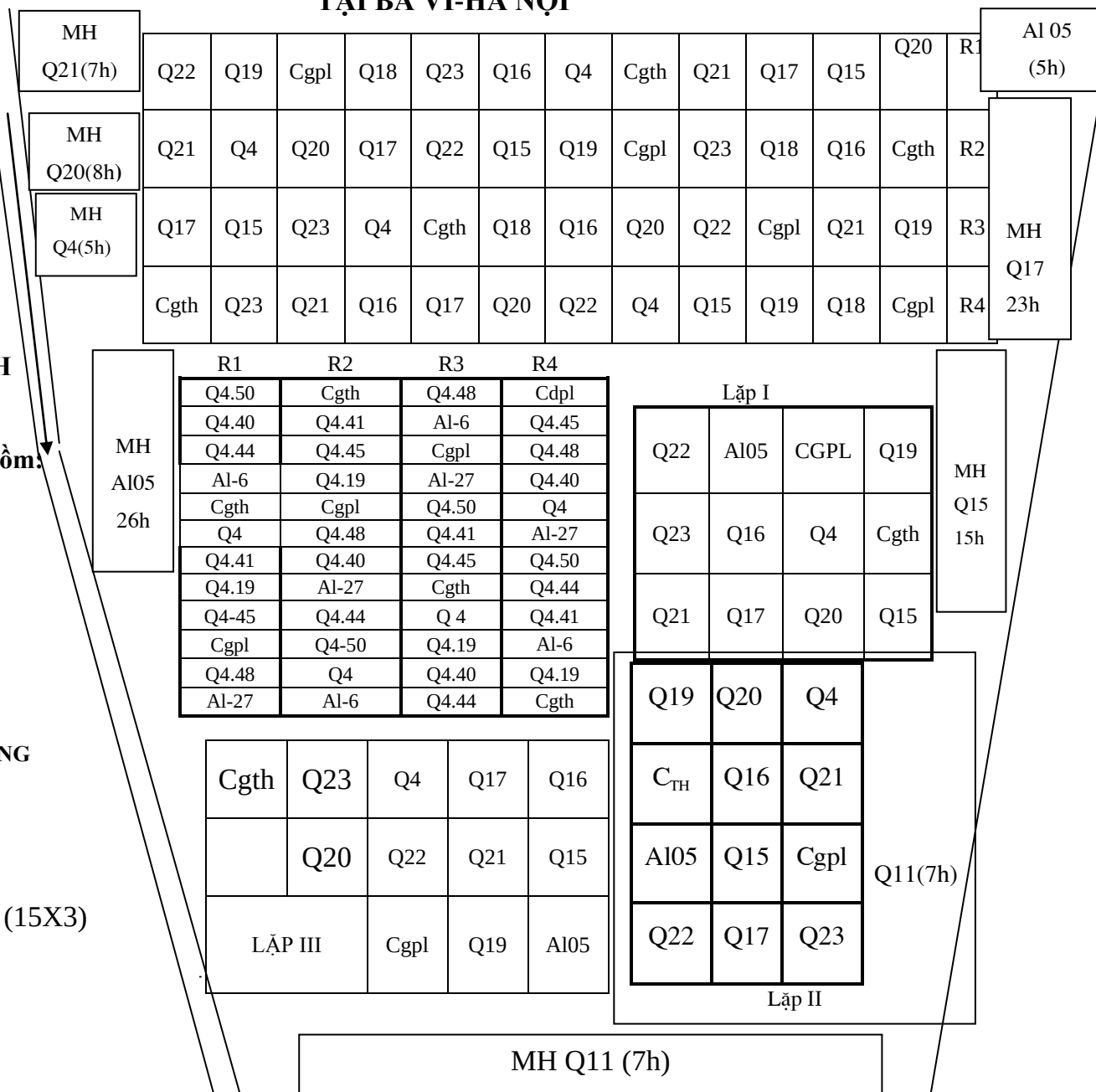
TT	Thành phần	Murashige-Skoog (MS) (mg/l)	Murashige-Skoog (MS*) (mg/l)
	Muối khoáng		
1	NH ₄ NO ₃	1650,00	825,00
2	KNO ₃	1900,00	950,00
3	CaCl ₂ .2H ₂ O	440,00	440,00
4	KH ₂ PO ₄	170,00	170,00
5	MgSO ₄ .7H ₂ O	370,00	370,00
6	MnSO ₄ .H ₂ O	16,90	16,90
7	ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,60	8,60
8	CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025	0,025
9	KI	0,83	0,83
10	CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025	0,025
11	H ₃ BO ₃	6,20	6,20
12	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25	0,25
13	FeSO ₄ .7H ₂ O	27,84	27,84
14	Na ₂ EDTA	37,24	37,24
	Vitamin và các chất hữu cơ		
15	B ₁	1,00	1,00
16	Nicotinic axit	0,50	0,50
17	B ₆	0,50	0,50
18	Glyxin	2,00	2,00
19	Myo-inositol	100,0	100,0

**SƠ ĐỒ 01. KHẢO NGHIỆM XUẤT XỨ, DÒNG VÔ TÍNH VÀ QUẦN THỂ NỀN CHỌN GIỐNG TRÀM NĂM GÂN
TẠI BA VÌ-HÀ NỘI**

KHẢO NGHIỆM XUẤT XỨ
 Thời gian trồng: 8/2008
 Khoảng cách trồng: 2m X 1m
 Bón lót: 60g phân hỗn hợp gồm DAP+NPK+ lân
 Số công thức tham gia thí nghiệm: 12
 Số cây trồng mỗi công thức: 49 cây (7X7)
 Số lần lặp: 4

KHẢO NGHIỆM DÒNG VÔ TÍNH
 Thời gian trồng: 10/2008
 Khoảng cách trồng: 2mX1m
 Bón lót: 60g phân hỗn hợp gồm: DAP+NPK+Lân
 Số công thức thí nghiệm: 12
 Số cây trồng mỗi công thức: 10 cây (10X1)
 Số lần lặp: 4

QUẦN THỂ NỀN CHỌN GIỐNG
 Thời gian trồng: 8/2008
 Khoảng cách trồng: 2m X 0,5m
 Bón lót: 2kg phân chuồng+ 0,2 NPK
 Số công thức thí nghiệm: 12
 Số cây trồng mỗi công thức: 45 cây (15X3)
 Số lần lặp: 3



SƠ ĐỒ 02. KHẢO NGHIỆM DÒNG VÔ TÍNH TRÀM NĂM GÂN TẠI PHÚ LỘC – THỪA THIÊN HUẾ

Đường khai thác

Thời gian trồng: 3/2011

Khoảng cách trồng: 0,6 x 1,5 m

Bón lót: 200g NPK/hố

Số công thức thí nghiệm: 12

Số cây trồng mỗi công thức: 8cây (8 x 1)

Số lần lặp: 4

	KN dòng VT Tràm năm gân 8 cây/lặp/công thức			
	Lặp 4	Lặp 3	Lặp 2	Lặp 1
1	Q8.44	Q8.22	Q15.11	Q15.09
	Q15.15	Q15.42	Q8	Q15.21 + Q15.01
	Q8.35	Q4.45	Q15.13	Q8.22
	Q15.39	Q4	Q15.39	Q15
5	Q8.23	Q4.40	Q4.45	Q8.35
	Q15.32	Q8.44	Q15.34	Q15.13
	Q15.013	Q15.38	Q4.50	Q4
	Q8.36	Q8.35	Q15.32	Q15.15
	Q15.34	Q8	Q15.09	Q8.23
10	Q15.11	Q8.43	Q15	Q15.42
	Q15.21 + Q15.01	Q15.32	Q15.38	Q8.44
	Q4	Q15.13	Q4.44	Q8.36
	Q4.45	Q15.21 + Q15.01	Q8.43	Q4.50
	Q15.42	Q15.39	Q8.36	Q15.34

SƠ ĐỒ 03. KHẢO NGHIỆM TRÀM CAJUPUT TẠI BA VỊ HÀ NỘI

Thời gian trồng: 6/2012

Khoảng cách trồng: 1 x 1 m

Bón lót: 2kg phân gà + 200 gNPK

Số công thức thí nghiệm: 11

Số cây trồng mỗi công thức: 16 cây (4 x 4)

Số lần lặp: 4

Lặp 1	1	7	11	5	3	9	6	2	10	4	8
Lặp 2	6	8	9	10	2	5	4	3	7	1	11
Lặp 3	5	4	2	7	1	10	11	8	6	9	3
	Mh- 2				Mh- 3				Mh- 4		

Công Thức	Tên loài	Xuất xứ	Lô hạt
1	<i>M. cajpuputi</i>	Samalagi Buru Isla	19535
2	<i>M. cajpuputi</i>	Gogoria Buru Isla	19536
3	<i>M. cajpuputi</i>	Ykasar Buru Isl	19537
4	<i>M. cajpuputi</i>	Wai Geren Buru Isl	19538
5	<i>M. cajpuputi</i>	Masarete Buru Isl	19539
6	<i>M. cajpuputi</i>	Cotonea W Ceram Isl	19540
7	<i>M. cajpuputi</i>	Pelita Jaya Ceram Isl	19541
9	<i>M. cajpuputi</i>	Phú Lộc (Tràm gió)	-
10	<i>M. cajpuputi</i>	Đại Lải (Tràm gió)	-
11	<i>M. cajpuputi</i>	Thanh Hoá (Tràm gió)	-
8	<i>M. quinquenervia</i>	West Malam PNG	19634