

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**

**TÓM TẮT LUẬN ÁN TIẾN SĨ LÂM NGHIỆP**

**Hà Nội – 2016**

**Công trình được hoàn thành tại: Viện Khoa học Lâm nghiệp Việt Nam**

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

**TS. Phí Hồng Hải**

**Chủ tịch hội đồng:**

**Phản biện 1: GS. TS. Nguyễn Xuân Quát**

**Phản biện 2: TS. Hà Huy Thịnh**

**Phản biện 3: GS. TSKH. Đỗ Đình Sâm**

**Luận án được bảo vệ trước hội đồng chấm luận án cấp Viện họp tại:**

**Viện Khoa học Lâm nghiệp Việt Nam**

**Vào hồi 8 giờ 30 phút, ngày 24 tháng 6 năm 2016**

## 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.

## MỞ ĐẦU

### 1. Tính cấp thiết của đề tài

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-cineole (cajeput 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 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. Mục tiêu, đối tượng và phạm vi nghiên cứu

#### 2.1. 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.

#### 2.2. 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.

### **2.3. 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.

### **3. 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.

### **4. Bố cục luận án**

Luận án gồm 106 trang với 25 bảng, 3 biểu đồ, 8 hình: Mở đầu (4 trang), tổng quan vấn đề nghiên cứu (28 trang), nội dung, vật liệu, phương pháp và địa điểm nghiên cứu (16 trang), kết quả nghiên cứu và thảo luận (45 trang), kết luận, tồn tại và khuyến nghị (4 trang) và 100 tài liệu tham khảo (9 trang gồm 34 tài liệu tiếng Việt và 66 tài liệu tiếng Anh).

## **CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN VẤN ĐỀ NGHIÊN CỨU**

### **1.1. Tinh dầu tràm giàu 1,8-cineole**

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 *et al.*, 2013). 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 and Doran, 1996).

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).

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 1,8-cineole chủ yếu ở Tràm năm gân và Tràm cajuput có tác dụng diệt khuẩn, kháng virus (Harris, 2007; Vokovic *et al.*, 2010), 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 *et al.*, 2003, 2004; Santos and Rao, 2000; Santos *et al.*, 2004), thậm chí có người cho rằng 1,8-cineole có thể góp phần kiểm soát viêm tụy cấp tính (Bae *et al.*, 2012).

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). 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 theo Bùi Thị Bằng, 2007). 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).

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 and Doran, 1996).

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-cineole) là có tỷ lệ 1,8-cineole từ 3 - 60%, tỷ lệ limonene dưới 5% (Khan and Abourashed, 2010), 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% - 11,7%, 1,8-cineole 34,9 - 71,1% (trung bình là 55,4%) (Ramanoelina *et al.*, 2008).

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

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

### **1.2.1. Chọn giống**

Ở Indonesia nghiên cứu chọn giống Tràm cajuput lấy tinh dầu đã chọn được một gia đình có hàm lượng tinh dầu tính theo lượng lá khô 1,8% (tương ứng 0,67% tính theo khối lượng lá tươi) với tỷ lệ 1,8-cineole 60,2%. Nghiên cứu ở Tràm cajuput cũng 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 *et al.*, 2003)

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) đã chọn 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%). 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 cao (0,81) và 1,8-cineole từ trung bình đến 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 *et al.*, 1996, Doran *et al.*, 2002). 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 *et al.*, 2002).

Sau 5 năm chọn lọc và nhân giống Williams (1997) đã chọn được siêu dòng "88" (super clone "88") Tràm trà với tỷ lệ terpinen-4-ol 42 - 44% và tỷ lệ 1,8-cineole 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 and Hanger, 2000). Năm 1998, siêu dòng "88" đã được đưa vào sản xuất trên quy mô thương mại ở Artheton và Queensland.

Các kết quả nghiên cứu ở trên 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. Tuy nhiên, các nghiên cứu chọn giống mới chỉ tập trung chủ yếu đối với Tràm trà (một loại tràm giàu Terpinen-4-ol) và Tràm cajuput, trong khi các nghiên cứu chọn giống Tràm năm gân còn rất hạn chế.

### **1.2.2. Nghiên cứu nhân giống**

Các nghiên cứu về nhân giống bằng nuôi cấy mô tràm trên thế giới khá thành công với Tràm trà và được nhiều tác giả nghiên cứu. Song nghiên cứu về nuôi cấy mô đối với Tràm năm gân cũng còn rất hạn chế.

## **1.3. Các nghiên cứu chọn giống, nhân giống sinh dưỡng tràm ở Việt Nam**

### **1.3.1. Nghiên cứu chọn giống**

Nghiên cứu chọn giống tràm lấy tinh dầu cho các loài tràm được thực hiện tại Thanh Hóa (Long An) từ năm 1994. Kết quả nghiên cứu đã chọn xuất xứ Tozer's gap 1302 Qld của Tràm năm gân để sản xuất tinh dầu tràm ở nước ta (Phùng Cẩm Thạch, 2000). 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 *et al.*, 2008).

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 xuất xứ triển vọng là Gympie Qld và Bribie Island Qld 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).

Năm 2008 và 2009, khảo nghiệm xuất xứ và dòng vô tính bổ sung cho Tràm năm gân tại Phú Lộc (Thừa Thiên - Huế), Thạnh 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 Thạnh 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 và Bribie Island Qld (các xuất xứ và dòng vô tính có triển vọng nêu 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).

### **1.3.2. Nghiên cứu nhân giống bằng nuôi cấy mô**

Nhân giống bằng nuôi cấy mô trong nước 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.

### **1.4. Một số nhận định**

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 là về sinh trưởng; các nghiên cứu về chọn giống và thâm canh tràm lấy tinh dầu mới tiến hành trong những năm gần đây, tuy đã có một giống tràm được công nhận, song mới ở giai đoạn đầu, sản xuất tinh dầu tràm chủ yếu vẫn là khai thác trong rừng tự nhiên. Tràm 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 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.

Nghiên cứu các nhân tố ảnh hưởng đến hàm lượng và chất lượng tinh dầu cũng như và các biện pháp kỹ thuật để nâng cao năng suất và chất lượng tinh dầu tràm 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 tràm là hết sức cần thiết.



## CHƯƠNG 2. NỘI DUNG, VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Nội dung nghiên cứu

#### 2.1.1. Nghiên cứu biến dị sinh trưởng, hàm lượng, 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 và 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 gồm 7 xuất xứ (*Melaleuca 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)
- 11 xuất xứ Tràm năm gân bao gồm 2 xuất xứ từ Papua New Guinea (PNG), 3 xuất xứ từ Queensland (Qld), 6 xuất xứ từ New South Wales (NSW)
- 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

#### 2.2.2. Vật liệu nghiên cứu nuôi cấy mô

Ba dòng vô tính Tràm năm gân là 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: Các dòng vô tính và cây hạt của 3 xuất xứ Tràm năm gân gồm Gympie Qld, Bribie Island Qld và West Malam PNG

### **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*

- *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, đối chứng là 3 xuất xứ Tràm gió (từ Đại Lải, Phú Lộc và Thanh Hoá) và xuất xứ West Malam PNG của Tràm năm gân. 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 + 40g Lân/hố. Bao gồm 12 công thức thí nghiệm trong đó: 10 xuất xứ Tràm năm gân và đối chứng là 2 xuất xứ Tràm gió (Phú Lộc và Thanh Hoá). 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 + 10g NPK + 40g Lân/hố. Bao gồm 10 công thức thí nghiệm trong đó: 7 dòng vô tính và cây hạt của xuất xứ Gympie Qld (Q4), 2 giống Tràm gió (từ Phú Lộc và Thanh Hoá). 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). 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, với 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 tạo mẫu sạch, tái sinh chồi, tạo cụm chồi, ra rễ và huấn luyện cây mô.

##### *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, mỗi công thức bố trí 4 lần lặp, 7 cây/lặp. Thí nghiệm bón thúc bố trí 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).

Thời điểm thí nghiệm bón thúc vào tháng 3/2012.

Thời điểm thu thập số liệu vào tháng 3/2013.

*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 (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 đồng vô tính và xuất xứ ở Phú Lộc (trồng năm 2011) tiến hành lấy mẫu chưng 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**

- *Các chỉ tiêu sinh trưởng*: Đường kính gốc đo bằng thước panme 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. Đo tất cả các cây trong toàn khảo nghiệm.

- *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). Các mẫu lá tràm 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.

- *Khối lượng lá/cây*

+ *Trong nghiên cứu bón thúc*: Khối lượng lá trung bình/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 tước toàn bộ lá đem cân.

+ *Trong nghiên cứu chiều cao góc chặt*: cắt toàn bộ chồi/góc và cân lá.

- *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 nhỏ; *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.

### **2.3.3. Phương pháp xử lý số liệu**

- 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).

## **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**

Các xuất xứ Tràm cajuput từ Indonesia đạt tỷ lệ sống khá cao (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 giai đoạn 3 tuổi là khá lớn, với phạm vi biến động Iv từ 85,1 tới 214,4. Các xuất xứ Tràm cajuput từ đảo Ceram (như Cotonea; Pelita Jaya), đảo Buru (như Gogoria; Ykasar), Tràm gió Thạnh 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 tinh dầu và tỷ lệ 1,8-cineole 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%) (bảng 3.2).

Các giống Tràm gió của Việt Nam có tỷ lệ 1,8-cineole chỉ đạt từ 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), 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%).

Như vậy, các xuất xứ Tràm cajuput ở Indonesia được khảo nghiệm ở Ba Vì đánh giá ở tuổi 3 đều có hàm lượng 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

**Bảng 3.2. Hàm lượng và thành phần tinh dầu của các xuất xứ Tràm cajuput khảo nghiệm tại Ba Vì (6/2012 - 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
Ykassar 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
<b>TB</b>	<b>0,75</b>	<b>7,8</b>	<b>26,70</b>	<b>3,99</b>	<b>1,97</b>	<b>0,81</b>	<b>6,4</b>	<b>32,73</b>	<b>2,94</b>	<b>2,26</b>
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 Thạnh Hoá	0,50	18,0	7,30	1,15	1,25	0,63	19,1	16,04	1,59	1,90
West Malam PNG (Tràm năm gân)	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				

### 3.2. Biến dị sinh trưởng, hàm lượng và chất lượng tinh dầu giữa 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 *et al.*, 2006). 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....

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 và xuất xứ Bribie Island Qld (Nguyễn Thị Thanh Hương, 2008).

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 (tốt nhất trong các xuất xứ Tràm năm gân 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

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 của 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 phạm vi biến động Iv từ 70,8 đến 133,3. Xuất xứ có đường kính tán lớn nhất (1,43-1,47m) và sinh trưởng tốt là West Malam PNG, Casino NSW, Wasua Road PNG và Tràm gió Thanh Hoá.

#### 3.2.1.2. Biến dị hàm lượng và chất lượng tinh dầu

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

Xuất xứ	2 tuổi (12/2010)						3 tuổi (12/2011)		
	Hlt (%)		Thành phần chính (%)				Hlt (%)	Thành phần (%)	
	Xtb	V%	1,8-cineole	Terpi-4-ol	Nerolidol	Limonene		1,8-cineole	Limonene
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			
<b>TB</b>	<b>0,89</b>	<b>9,8</b>	<b>48,28</b>	<b>1,26</b>	<b>72,30</b>	<b>3,74</b>	<b>1,43</b>	<b>71,00</b>	<b>2,80</b>
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								

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 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).

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 trà (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%.

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 phân tích 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 Trà 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 Trà năm gân**

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

Khảo nghiệm xuất xứ Trà 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 Q 4.19, Q4.40, Q4.41, Q4.44, Q4.45, Q4.48 và Q 4.50 đều có hàm lượng tinh dầu trên 1,8%, tỉ lệ 1,8-cineole trên 65% (Nguyễn Thị Thanh Hương, 2008). 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 Trà năm gân tại Ba Vì ở giai đoạn 2 năm tuổi cho thấy các dòng vô tính của xuất xứ Q4 đều có tỷ lệ cây sống rất cao (77,5 - 95,0%), với tỷ lệ sống trung bình toàn khảo nghiệm đạt 89,6%. Sinh trưởng giữa các dòng vô tính cũng có sự phân hoá rõ nét ( $\text{sig} < 0,05$ ), 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 sinh trưởng nhanh nhất ( $Iv = 14,41 - 22,14$ ) 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). Trà năm gân Thanh Hoá và Phú Lộc đều có sinh trưởng chậm ( $Iv$  tương ứng 5,10 và 8,13).

#### b) Biến dị hàm lượng và chất lượng tinh dầu

Hàm lượng tinh dầu các giống Tràm năm gần giai đoạn 2 năm tuổi có sự khác nhau rõ rệt (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 Thạnh hoá (0,68%) và Tràm gió Phú Lộc (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 5/2011 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 (trung ứng là 1,85% và 1,53%), tỷ lệ 1,8-cineole (trung ứng là 65,36% và 64,98%) và tỷ lệ limonene (trung 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).

**Bảng 3.6. Hàm lượng và thành phần tinh dầu các dòng vô tính của xuất xứ Gympie Qld (Q4) Tràm năm gần khảo nghiệm tại Ba Vì (8/2008 - 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 (%)	
	Xtb	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			
<b>TB</b>	<b>1,50</b>	<b>4,9</b>	<b>63,59</b>	<b>4,19</b>	<b>1,64</b>	<b>62,00</b>	<b>4,44</b>
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 Thạnh Hoá	0,68	8,1	12,94	1,96			
Sig	0,0001						
LSD	0,11						

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

Khảo nghiệm xuất xứ Tràm năm gần 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 3/2011. Để lựa chọn dòng vô tính có triển vọng cần tiếp tục đánh giá sinh trưởng, hàm lượng và chất lượng tinh dầu.

#### a) Biến dị sinh trưởng



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). 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. Nhóm dòng vô tính có sinh trưởng nhanh nhất là Q15.013, Q15.21 và Q15.32 (Iv = 198,3 - 235,5).

b) Biến dị hàm lượng và chất lượng tinh dầu

Trong 12 dòng vô tính của xuất xứ West Malam PNG (Q15) có 3 dòng vô tính triển vọng 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. Kết quả khảo nghiệm 7 dòng vô tính của xuất xứ Bribie Island Qld (Q8) chưa có dòng vô tính nào đạt tiêu chuẩn chất lượng tinh dầu theo yêu cầu (có tỷ lệ 1,8-cineole  $\geq$  65%, tỷ lệ limonene < 5%) (bảng 3.8).

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

Dòng vô tính	3 tuổi (11/2013)				3,5 tuổi (6/2014)			
	Hlt (%)		Thành phần chính(%)		Hlt (%)		Thành phần chính(%)	
	Xtb	V%	1,8-cineole	Limonene	Xtb	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
<b>TB</b>	<b>1,64</b>	<b>10,6</b>	<b>60,03</b>	<b>6,03</b>	<b>1,41</b>	<b>13,2</b>	<b>67,62</b>	<b>4,11</b>
<b>Sig</b>	<b>0,0001</b>				<b>0,008</b>			
<b>LSD</b>	<b>0,26</b>				<b>0,27</b>			
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		
<b>TB</b>	<b>1,74</b>	<b>5,5</b>	<b>52,65</b>	<b>6,49</b>	<b>1,50</b>	<b>11,4</b>	<b>57,45</b>	<b>5,28</b>
<b>Sig</b>	<b>0,001</b>				<b>0,0001</b>			
<b>LSD</b>	<b>0,14</b>				<b>0,27</b>			

Qua nghiên cứu biến dị sinh trưởng và tinh dầu các dòng vô tính của xuất xứ West Malam PNG (Q15) và Bribie Island Qld (Q8) 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 tính trạng sinh trưởng, hàm lượng và chất lượng tinh dầu các xuất xứ Tràm năm gân giữa Ba Vì và Phú Lộc

Tháng 1/2009, 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). Kế thừa các kết quả này và kết quả khảo nghiệm xuất xứ Tràm năm gân tại Ba Vì 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 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 tương đối chặt (0,54) giữa 2 nơi khảo nghiệm, trong khi tính trạng đường kính gốc và chỉ số thể tích lại có mức tương quan 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 rằng những xuất xứ có hàm lượng và tỷ lệ 1,8-cineole cao ở Ba Vì cũng là những xuất xứ 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).

### 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 Q4.44, 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 *et al*, 2012). 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).

Nhân giống bằng nuôi cây 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<sub>2</sub> 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 cây và khử trùng bằng HgCl<sub>2</sub> 0,1% theo các thời gian và số lần khử trùng khác nhau. Khử trùng chồi non 2 lần trong 5 phút (lần đầu 3 phút 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<sub>2</sub> 0,1% trong 6 phút thành 2 lần (lần đầu 4 phút và lần sau 2 phút) cho kết quả tốt nhất 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.

### 3.3.2. Nghiên cứu ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy, chất điều hoà sinh trưởng và nồng độ đường trong 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)

Các mẫu đã khử trùng, khoẻ mạnh (từ giai đoạn tạo mẫu sạch) được cắt bỏ phần gỗ bị đen ở 2 đầu, sau đó cấy chuyển sang môi trường tái sinh chồi.

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

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). 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).

### 3.3.2.2. Ảnh hưởng của nồng độ các loại đường đến 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 (G) 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. 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) 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 đẻ 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.

### 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.

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 dòng vô tính Q4.44. Bổ sung 1 - 2 mg/l BAP tuy làm tăng hệ số nhân chồi (5,5 - 6,1 lần) song chồi tăng trưởng kém (0,4 - 0,7 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) (bảng 3.13). Như vậy, công thức thích hợp nhất để tạo cụm chồi dòng Q4.44 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	83,3	5,5	0,7	Xấu	96,7	4,8	0,8	TB
2	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 Q 23.21, 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. Như vậy, công thức tạo cụm chồi cho Q 23.21 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). Như vậy, nhân chồi tràm sử dụng BAP ở nồng độ lớn hơn 1mg/l tuy làm tăng hệ số nhân chồi, song giảm tỷ lệ chồi sinh trưởng chiều cao

#### 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 mg/l), 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.

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). Khả năng ra rễ tốt của Tràm năm gân giúp cho nhân giống *in vitro* ở qui mô sản xuất rất triển vọng.

**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
<b>NAA</b>										
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	
<b>IBA</b>										
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		

### 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 bầu đất 4 tuần	Sau thời gian huấn luyện	Sau khi cấy 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 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 cạnh kiệt, đồng thời tăng nguy cơ nhiễm nấm, khuẩn môi trường 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.

### **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 Vi 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. Sau bón thúc 1 năm (tháng 3 năm 2013) thí nghiệm được đánh giá theo các chỉ tiêu sinh trưởng, khối lượng lá/cây, lượng tinh dầu/cây (Ltd) và tỷ lệ 1,8-cineole.

##### **3.4.1.1. Ảnh hưởng của bón thúc đến sinh trưởng**

Xuất xứ West Malam PNG sau 1 năm bón thúc có sinh trưởng (Iv) khác nhau rõ rệt giữa các công thức bón thúc ( $\text{sig} < 0,05$ ) và các công thức bón thúc đều tốt hơn công thức đối chứng (không bón thúc). 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 không làm thay đổi lớn về hàm lượng tinh dầu và tỉ lệ 1,8-cineole. 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. Đối với xuất xứ West Malam PNG 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 (đạt 41,58 g/cây) gấp 2,7 lần so với cây ở công thức đối chứng. Xuất xứ Wasua Road PNG sử dụng công thức bón thúc C1.1 (100g NPK + 50g vôi bột/cây tốt) với lượng dầu đạt 23,76 g/cây gấp 2,3 lần công thức đối chứng. Xuất xứ Casino NSW sử dụng 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) gấp 5 lần công thức đối chứng.

**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)**

Xuất xứ	Chỉ tiêu	Công thức thí nghiệm						ĐC
		CT1.1	CT1.2	CT2.1	CT2.2	CT3.1	CT3.2	
West	Hlt (%)	1,31	1,28	1,26	1,39	1,35	1,24	1,31
Malam	Wlá (kg/cây)	1,4	2,2	3,3	1,4	1,5	2,3	1,2
PNG	Ltd (g/cây)	18,27	28,22	41,58	19,40	20,25	28,46	15,66
	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	Ltd(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
Casino	Wlá (kg/cây)	1,4	2,2	0,8	1,0	2,8	2,6	0,6
NSW	Ltd(g/cây)	17,3	27,7	10,6	12,4	37,8	31,6	7,6
	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*

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

Trong kinh doanh tràm 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 *et al.*, 2013; Colton *et al.*, 2000). 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 Vi (trồng tháng 8 năm 2008). Thời gian được tiến hành vào tháng 3 năm 2013 theo các công thức chặt sát mặt đất (0 cm), 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 bằng bảng 3.18.



Bảng 3.18. Ảnh hưởng chiều cao góc 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 góc chặt (cm)	Số chồi/cây		Dc (cm)		Hc (m)		Dt (m)		W lá kg/cây	
		Xtb	V%	Xtb	V%	Xtb	V%	Xtb	V%	Xtb	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
	<b>TB</b>	<b>5,58</b>	<b>29,5</b>	<b>1,80</b>	<b>18,4</b>	<b>2,17</b>	<b>19,5</b>	<b>1,75</b>	<b>13,1</b>	<b>1,18</b>	<b>28,0</b>
	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
	<b>TB</b>	<b>4,41</b>	<b>25,5</b>	<b>1,47</b>	<b>22,0</b>	<b>2,23</b>	<b>22,3</b>	<b>1,38</b>	<b>21,8</b>	<b>0,78</b>	<b>28,9</b>
	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
	<b>TB</b>	<b>5,15</b>	<b>38,1</b>	<b>1,60</b>	<b>35,0</b>	<b>2,33</b>	<b>23,5</b>	<b>1,49</b>	<b>15,8</b>	<b>0,86</b>	<b>26,9</b>
	Sig	0,01		0,06		0,425		0,007		0,003	

Kết quả kiểm tra thống kê cho thấy ở cả 3 xuất xứ nghiên cứu (West Malam PNG, Wasua Road PNG và Casino NSW) chiều cao góc chặt khác nhau chưa có ảnh hưởng rõ rệt đến đường kính chồi và chiều cao chồi (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 (sig < 0,05). Độ cao góc 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. 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. 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/lấp, 3 lặp), song kết quả trên có tính chất thăm dò cho các nghiên cứu tiếp theo.

### **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). 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 11/2013 và 6/2014) từ khảo nghiệm dòng vô tính năm 2011. 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.

## **KẾT LUẬN, TỒN TẠI VÀ KIẾN NGHỊ**

### **1. Kết luận**

#### **1.1. Chọn giống**

Đánh giá tổng hợp các tính trạng sinh trưởng, hàm lượng và chất lượng tinh dầu của một số xuất xứ và dòng vô tính cho thấy Tràm năm gân biến dị khá lớn về sinh trưởng, hàm lượng và chất lượng tinh dầu. Đã xác định được các xuất xứ West Malam PNG (Q15), Wasua Road PNG (Q16), Casino NSW (Q23), cùng các dòng vô tính Q4.40 Q4.45, Q15.013, Q15.32 và Q15.38 (có hàm lượng tinh dầu > 1,4% và tỷ lệ 1,8-cineole > 65%).

#### **1.2. Nhân giống bằng nuôi cấy mô.**

Nhân giống Tràm năm gân bằng nuôi cấy mô đạt kết quả tốt nhất khi khử trùng chồi nửa hóa gỗ bằng HgCl<sub>2</sub> 0,1% trong 6 phút chia thành 2 lần (lần đầu 4 phút và lần sau 2 phút); sau đó tái sinh chồi lần một trong môi trường MS\* (Nitor = 1/2 MS) bổ sung 0,5 mg/l BAP + 0,2 mg/l Kinetin + 30 g/l đường sucrose; tái sinh chồi lần hai là 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); tạo cụm chồi là MS\* bổ sung 0,2 - 0,5 mg/l BAP + 0,2 mg/l K + 0,1 mg/l NAA; cho ra rễ *in vitro* là MS\* bổ sung 0,3 - 0,5 mg/l NAA + 30 g/l đường sucrose (hoặc 20 g/l glucose + 10 g/l sucrose). Theo phương pháp này thì tỷ lệ mẫu bị nhiễm 3,3%, trong khi tỷ lệ mẫu sạch là 70 - 83,3%, tỷ lệ mẫu tái sinh chồi 93,3 - 100% với 3,5 - 4 chồi/nách lá;

tỷ lệ ra rễ >90%, rễ có chất lượng tốt. Huấn luyện cây mô dưới ánh sáng tán xạ trong 2 tuần trước khi cấy vào bầu đất ở vườn ươm thì cây mô có tỷ lệ sống 86,7 - 91,1%.

### **1.3. Ảnh hưởng của phân bón, chiều cao gốc chặt và mùa vụ đến năng suất và chất lượng tinh dầu**

Thí nghiệm bón thúc Tràm năm gân sau một năm cho thấy công thức 100 g NPK+200 g phân hữu cơ vi sinh +50 g vôi bột/cây tốt nhất đối với xuất xứ West Malam PNG (lượng tinh dầu/cây bằng 2,7 lần so với đối chứng), công thức 200 g NPK+200 g phân hữu cơ vi sinh + 50 g vôi bột/cây là tốt nhất với xuất xứ Casino NSW (lượng tinh dầu/cây bằng 5 lần so với đối chứng) và công thức 100g NPK + 50g vôi bột/cây là tốt nhất đối với xuất xứ Wasua Road PNG (lượng tinh dầu/cây bằng 2,3 lần so với đối chứng).

Thí nghiệm độ cao gốc chặt sau khi trồng 4 năm và thu thập số liệu sau đó 1 năm cho thấy 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 có nhiều chồi và có khối lượng lá/cây nhiều nhất.

Tại Phú Lộc (Thừa Thiên Huế) hàm lượng tinh dầu và tỷ lệ 1,8-cineole trong tinh dầu Tràm năm gân cao nhất và tỷ lệ limonene thấp nhất trong mùa khô (lượng mưa thấp).

## **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 bón 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.