

## NGHIÊN CỨU NHÂN GIỐNG *IN VITRO* RE HƯƠNG *CINNAMOMUM PARTHENOXYLON* (JACK) MEISN

Khuất Thị Hải Ninh<sup>1</sup>, Nguyễn Quỳnh Trang<sup>2</sup>, Bùi Văn Thắng<sup>3</sup>, Vũ Văn Thông<sup>4</sup>

<sup>1,2,3</sup>Trường Đại học Lâm nghiệp

<sup>4</sup>Trường Đại học Nông Lâm Thái Nguyên

### TÓM TẮT

Re hương là cây quý, đa tác dụng. Do có giá trị kinh tế cao nên hiện nay hoạt động khai thác trái phép loài cây này ở Việt Nam đang trở thành điểm nóng. Vì vậy, vấn đề nhân giống để bảo tồn loài cây này là hết sức cần thiết. Re hương khó tìm thấy cây mẹ trưởng thành để thu hái hạt nên nhân giống *in vitro* là có hiệu quả hơn cả trong việc nhân giống phục vụ trồng rừng bảo tồn cũng như trồng rừng diện lớn hơn sau này. Nhân giống Re hương bằng kỹ thuật nuôi cấy *in vitro* cho thấy khử trùng vật liệu nuôi cấy khởi đầu là chồi non bằng HgCl<sub>2</sub> 0,1% trong 5 phút chia 2 lần (lần 1: 3 phút, lần 2: 2 phút) cho tỉ lệ mẫu sạch nảy chồi đạt 38,9%. Môi trường MS + 0,5 mg/l BAP + 0,1 mg/l kinetin là thích hợp nhất để tái sinh chồi lần một (tỉ lệ mẫu nảy chồi đạt 100% (với 3,2 chồi/nách lá); môi trường MS + 2,2 mg/l BAP + 0,1 mg/l kinetin + 0,1 mg/l NAA thích hợp nhất cho tạo cụm chồi (hệ số nhân chồi 3,5 lần và chiều cao trung bình chồi 2,2 cm). Môi trường tạo rễ thích hợp cho chồi Re hương *in vitro* là MS+0,4 mg/l NAA (tỉ lệ chồi ra rễ trên 94,4%, rễ có chất lượng tốt).

**Từ khoá:** Họ Long não, *in vitro*, nhân giống, Re hương.

### I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Re hương (*Cinnamomum parthenoxylon* (Jack) Meisn) thuộc họ Long não (Lauraceae) là một loài cây quý, đa tác dụng. Hiện tại nó được xếp vào loại rất nguy cấp 34 (CR) ở cấp quốc gia trong danh lục đỏ của IUCN (Ver 2.3) và phân hạng CR A1a,c,d trong Sách đỏ Việt Nam (2007). Đây là loài cây có giá trị kinh tế, thân gỗ dùng cho chế biến các sản phẩm mỹ nghệ, gốc rễ dùng để sản xuất tinh dầu Re Hương. Do có giá trị kinh tế cao nên hiện nay hoạt động khai thác trái phép loài cây này ở Việt Nam đang trở thành điểm nóng. Vấn đề tái sinh tự nhiên của Re hương rất kém. Re hương phân bố rộng, nhưng bị săn tìm khai thác gỗ quá mức và gần đây lấy cả gỗ rễ để chưng cất tinh dầu, số lượng cây ngoài tự nhiên ngày càng giảm nên vấn đề nhân giống để bảo tồn loài này là rất cần thiết (Lê Thị Diên và cộng sự, 2010). Bên cạnh nhân giống bằng hạt thì nhân giống sinh dưỡng là một biện pháp hữu hiệu giúp có đủ nguồn giống cần thiết cho việc xây dựng các quần thể bảo tồn. Re hương khó tìm thấy cây mẹ trưởng thành để thu hái

hạt nên nhân giống *in vitro* là có hiệu quả hơn cả trong việc nhân giống phục vụ trồng rừng bảo tồn cũng như trồng rừng diện lớn hơn sau này khi có đủ điều kiện cần thiết.

### II. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

#### 2.1. Vật liệu

Vật liệu nghiên cứu là chồi non tái sinh từ gốc cây mẹ Re hương ở các huyện Đại Từ, Võ Nhai, Phú Lương, Định Hoà và Đồng Hỷ, thành phố Thái Nguyên, tỉnh Thái Nguyên.

#### 2.2. Phương pháp nghiên cứu

##### 2.2.1. Các bước nuôi cấy

Nghiên cứu được tiến hành theo các bước tạo mẫu sạch *in vitro*, tái sinh chồi, tạo cụm chồi và cho ra rễ.

##### *Tạo mẫu sạch in vitro*

Mẫu sau khi làm sạch sơ bộ được khử trùng bằng dung dịch HgCl<sub>2</sub> 0,1% trong tủ cấy vô trùng với chế độ khử trùng 1 lần hoặc 2 lần với thời gian khử trùng khác nhau, cụ thể như mô tả ở bảng 01. Sau đó, mẫu được rửa sạch HgCl<sub>2</sub> 0,1% bằng nước cất vô trùng 2 - 3 lần, mỗi lần rửa khoảng 2 - 3 phút.

##### *Tái sinh chồi in vitro*

Các mẫu sạch *in vitro* có khả năng tái sinh được cắt bỏ phần bị đen ở 2 đầu, sau đó cấy vào môi trường MS (Murashige and Skoog, 1962) có bổ sung BAP (nồng độ 0,1; 0,3 và 0,5 mg/l), hoặc kết hợp BAP ở các nồng độ trên với 0,1 mg/l kinetin để tái sinh chồi.

*Tạo cụm chồi (nhân nhanh chồi)*

Các chồi đã tái sinh được cấy chuyển sang môi trường tạo cụm chồi MS có bổ sung BAP (benzyl aninopurine), kinetin và NAA (naphtyl acetic acid) theo các nồng độ khác nhau.

*Tạo rễ (tạo cây hoàn chỉnh)*

Các chồi tái sinh từ mẫu sạch *in vitro* có chiều cao từ 2,5 - 3,0 cm, sinh trưởng tốt được cho ra rễ trên môi trường MS có bổ sung IBA (indole butiric acid) hoặc NAA (naphtyl acetic acid) ở các nồng độ khác nhau.

**2.2.2. Phương pháp bố trí thí nghiệm, thu thập và xử lý số liệu**

- *Bố trí thí nghiệm*: Thí nghiệm được bố trí 3 lần lặp, mỗi lần 30 mẫu.

- *Thu thập số liệu*

+ Tạo mẫu sạch *in vitro*: Sau 4 tuần nuôi cấy (số mẫu sạch nảy chồi, mẫu sạch chết và mẫu nhiễm).

+ Tái sinh chồi: sau 6 tuần nuôi cấy (số chồi tái sinh, số chồi/nách lá) và chất lượng chồi.

+ Tạo cụm chồi: sau 6 tuần nuôi cấy (số mẫu tạo cụm chồi, hệ số nhân chồi, chiều cao chồi, chất lượng chồi).

+ Ra rễ: Số ngày bắt đầu ra rễ, số chồi ra rễ, số lượng rễ/chồi, chiều dài rễ và chất lượng rễ (Đánh giá chất lượng rễ: *rễ tốt*: mập, trắng; *trung bình*: mập, hơi vàng, *xấu*: mảnh, đen).

- *Xử lý số liệu*: Số liệu đã thu thập được xử lý bằng phần mềm SPSS và phần mềm Excel.

**2.3. Địa điểm nghiên cứu**

Thí nghiệm được tiến hành tại phòng Nuôi cấy mô - tế bào thực vật thuộc Viện Công nghệ sinh học Lâm nghiệp, Trường Đại học

Lâm nghiệp.

Các môi trường nuôi cấy được điều chỉnh ở độ pH = 5,8, chế độ chiếu sáng 10 giờ trong ngày, với cường độ ánh sáng 2.000 – 3.000 lux, nhiệt độ phòng nuôi 25 ± 2<sup>0</sup>C.

**III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN**

**3.1. Tạo mẫu sạch *in vitro***

Kết quả ở bảng 1 cho thấy khi sử dụng HgCl<sub>2</sub> 0,1% để khử trùng mẫu với số lần và thời gian khử trùng khác nhau đã có ảnh hưởng rõ rệt đến khả năng tạo mẫu sạch (sig < 0,05). Cùng thời gian khử trùng nhưng chia làm 2 lần xử lý mẫu bằng HgCl<sub>2</sub> 0,1%, số lượng mẫu sạch nảy chồi tăng lên đồng thời số lượng mẫu sạch bị chết cũng giảm đi. Khi khử trùng mẫu bằng HgCl<sub>2</sub> 0,1% trong thời gian 4 phút cho tỉ lệ mẫu sạch thấp nhất (3,3%), nhưng cũng trong thời gian 4 phút khử trùng 2 lần lại cho tỉ lệ mẫu sạch nảy mầm tăng lên (6,7%) và không xuất hiện mẫu sạch bị chết. Tuy nhiên, xử lý mẫu trong thời gian này vẫn cho tỉ lệ mẫu nhiễm khá cao (96,7% ở 1 lần và 93,3% ở 2 lần). Khi tăng thời gian khử trùng mẫu bằng HgCl<sub>2</sub> 0,1% lên 5 phút tỉ lệ mẫu sạch nảy mầm tăng lên đáng kể (27,8% khi xử lý HgCl<sub>2</sub> 1 lần và 38,9% khi xử lý HgCl<sub>2</sub> 2 lần), tỉ lệ mẫu sạch nảy mầm lại tiếp tục bị giảm khi tăng thời gian khử trùng 6 - 7 phút (tỉ lệ mẫu sạch chỉ từ 8,9 - 18,9%). Nhưng khi tăng thời gian khử trùng HgCl<sub>2</sub> 0,1% đến 8 phút không thu được mẫu sạch nảy mầm, tỉ lệ mẫu sạch chết khá cao (60,3 - 63,3%). Như vậy, khi thời gian khử trùng mẫu cấy bằng HgCl<sub>2</sub> 0,1% quá lâu sẽ gây độc và làm chết mẫu, do đó để giảm mức độ nhiễm độc của mẫu cấy cần xử lý HgCl<sub>2</sub> 0,1% làm 2 lần. Công thức khử trùng đạt hiệu quả nhất đối với Re hương là sử dụng HgCl<sub>2</sub> 0,1%, trong vòng 5 phút chia làm 2 lần (3 phút lần đầu + 2 phút lần sau).

**Bảng 1. Ảnh hưởng của chế độ khử trùng bằng HgCl<sub>2</sub> 0,1% đến hiệu quả tạo mẫu sạch của Re hương (sau 4 tuần nuôi cấy)**

STT	Thời gian khử trùng bằng HgCl <sub>2</sub> 0,1%(phút)			Số mẫu thí nghiệm	Mẫu sạch nảy chồi		Mẫu sạch chết		Mẫu nhiễm		
	Tổng thời gian	Lần 1	Lần 2		Số mẫu (N)	Tỷ lệ (%)	Số mẫu (N)	Tỷ lệ (%)	Số mẫu (N)	Tỷ lệ (%)	
1	4	4	-	90	3	3,3	0	0,0	87	96,7	
2	4	2	2	90	6	6,7	0	0,0	84	93,3	
3	5	5	-	90	25	27,8	2	2,2	63	70,0	
4	5	3	2	90	35	38,9	0	0,0	55	61,1	
5	6	6	-	90	14	15,6	12	13,3	64	71,1	
6	6	4	2	90	17	18,9	8	8,9	65	72,2	
7	7	7	-	90	8	8,9	55	61,1	27	30,0	
8	7	4	3	90	12	13,3	47	52,2	31	34,4	
9	8	8	-	90	0	0,0	65	72,2	25	27,8	
10	8	5	3	90	0	0,0	57	63,3	33	36,7	
Sig							0,0001				



**Hình 1. Mẫu sạch Re hương nảy chồi sau 4 tuần nuôi cấy**

### 3.2. Tái sinh chồi

Số liệu ở bảng 2 cho thấy, các công thức thí nghiệm khác nhau đều cho 100% mẫu nảy chồi, điều này chứng tỏ Re hương có năng lực tái sinh chồi rất tốt. Mặc dù vậy, trong môi trường nuôi cấy khi sử dụng các chất điều hoà sinh trưởng riêng rẽ hay kết hợp ở các nồng độ khác nhau có ảnh hưởng rõ rệt đến số chồi tái sinh/nách lá (sig < 0,05) và chất lượng chồi. Trong môi trường nuôi cấy chỉ bổ sung BAP

chồi có chất lượng trung bình và có số chồi tái sinh (từ 1,2 - 1,6 chồi) thấp hơn so với việc kết hợp BAP và kinetin (2,2 - 3,2 chồi). Khi cố định 0,1 mg/l kinetin và tăng BAP từ 0,1 - 0,5 mg/l vào môi trường nuôi cấy làm tăng số chồi tái sinh/nách lá (từ 2,2 - 3,2 chồi). Công thức thích hợp nhất tái sinh chồi Re hương 0,5 mg/l BAP + 0,1 mg/l Kinetin cho số chồi trung bình tái sinh/nách lá cao nhất (3,2 chồi).

**Bảng 2. Ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng đến khả năng tái sinh chồi Re hương (sau 6 tuần nuôi cấy)**

STT	Công thức thí nghiệm		Số mẫu cấy	Số mẫu tái sinh	Tỉ lệ mẫu tái sinh (%)	Số chồi TB tạo ra/ nách lá	Chất lượng chồi
	BAP (mg/l)	Kinetin (mg/l)					
1	0,1		90	90	100	1,2	TB
2	0,3	0,0	90	90	100	1,5	TB
3	0,5		90	90	100	1,6	TB
4	0,1		90	90	100	2,2	Tốt
5	0,3	0,1	90	90	100	2,5	Tốt
6	0,5		90	90	100	3,2	Tốt
Sig						0,0001	



**Hình 2. Chồi Re hương tái sinh sau 6 tuần cấy chuyển sang các môi trường tái sinh chồi MS + 0,5 mg/l BAP + 0,1 mg/l kinetin**

### 3.3. Tạo cụm chồi

Số liệu bảng 3 cho thấy thay đổi nồng độ BAP (0,5 - 2,2 mg/l) đã có ảnh hưởng rõ rệt đến tỉ lệ mẫu tạo cụm chồi, hệ số nhân chồi, chiều cao chồi cũng như chất lượng chồi (sig < 0,05). BAP sử dụng ở nồng độ thấp (0,5 - 0,8 mg/l) cho tỉ lệ mẫu tạo cụm chồi (33,3 - 50,0%), hệ số nhân chồi (1,2 - 1,4 lần), chiều cao chồi (0,5 - 0,9 cm) đều thấp và chất lượng chồi xấu. Khi tăng nồng độ BAP (1,0 - 1,5 mg/l) tỉ lệ mẫu tạo cụm chồi (53,3 - 94,4%), hệ số nhân chồi (1,8 - 2,5 lần), chiều cao chồi (1,2 - 1,4 cm) đều tăng lên rõ rệt, chất lượng chồi khá hơn song chỉ ở mức độ trung bình. Đặc

biệt biệt BAP được sử dụng ở nồng độ 2,0 - 2,2 mg/l tỉ lệ mẫu tạo cụm chồi đạt 100%, hệ số nhân chồi cao (2,6 - 3,5 lần), chồi phát triển mạnh về chiều cao (1,5 - 2,5 cm) và chất lượng chồi tốt. Do vậy, môi trường MS có bổ sung 0,1 mg/l kinetin + 0,1 mg/l NAA + 2,2 mg/l BAP có thể coi đây là công thức có hiệu quả để nhân chồi Re hương. Một số kết quả nhân giống *in vitro* một số loài trong họ re cũng cho thấy nhân chồi Vù Hương trong môi trường MS + 0,2 mg/l IBA + 3 mg/l BAP (Nguyễn Thanh Danh và cộng sự, 2005) và nhân chồi Màng tang trong môi trường 0,2 mg/l NAA + 1,5 mg/l BAP (Lê Xuân Đắc và cộng sự,

2004), điều này cho thấy các loài cây này dễ nhân chồi nên cần sử dụng BAP ở nồng độ khá cao (trên 1,5 mg/l). Do đó, cần có các nghiên cứu tiếp về việc tăng độ BAP để tăng hiệu quả

tạo cụm chồi hơn nữa cho Re hương (vừa có hệ số nhân chồi cao và chiều cao đủ tiêu chuẩn tạo rễ).

**Bảng 3. Khả năng tạo cụm chồi của Re hương trong môi trường MS bổ sung 0,1 mg/l kinetin + 0,1 mg/l NAA và BAP (0,5 - 2,2 mg/l) (sau 6 tuần nuôi cấy)**

STT	BAP (mg/l)	Số mẫu thí nghiệm	Tỉ lệ mẫu tạo cụm chồi	Hệ số nhân	Chiều cao chồi (cm)	Chất lượng chồi
1	0,5	90	33,3	1,2	0,5	Xấu
2	0,8	90	50,0	1,4	0,9	Xấu
3	1,0	90	53,3	2,5	1,2	TB
4	1,2	90	94,4	2,2	1,1	TB
5	1,5	90	86,7	1,8	1,4	TB
6	2,0	90	100	2,6	1,5	Tốt
7	2,2	90	100	3,5	2,2	Tốt
	Sig		0,0001	0,0001	0,0001	



**Hình 3. Cụm chồi Re hương sau 6 tuần cấy chuyển sang môi trường nhân chồi MS + 2,2 mg/l BAP + 0,1 mg/l kinetin + 0,1 mg/l NAA**

### 3.4. Cho ra rễ

Kết quả kiểm tra thống kê cho thấy có sai khác giữa các công thức thí nghiệm ở tất cả các chỉ tiêu như tỉ lệ chồi ra rễ, số rễ/chồi, chiều dài rễ (sig < 0,05). Nhìn chung khả năng ra rễ của Re hương khá tốt. Sử dụng chất điều hòa sinh trưởng trong môi trường nuôi cấy cho kết quả tốt hơn so với đối chứng (chỉ có môi trường cơ bản MS, không có chất điều hòa sinh trưởng). Điều này thể hiện rõ ở chỗ thời gian ra rễ cũng sớm hơn (từ 22 đến 27 ngày), tỉ lệ chồi

ra rễ cũng được cải thiện đáng kể (từ 71,1% đến 94,4%) không còn thấy xuất hiện rễ xấu chỉ có loại rễ có chất lượng từ trung bình trở lên. Số liệu bảng 4 cũng cho thấy bổ sung IBA vào môi trường nuôi cấy tốt hơn NAA. Trong đó việc bổ sung 0,4 mg/l IBA vào môi trường nuôi cấy cho kết quả phù hợp nhất với thời gian ra rễ là 22 ngày, 2,8 rễ/chồi, chiều dài chồi đạt 4,3 cm, với tỉ lệ chồi ra rễ đạt 94,4 % và rễ có chất lượng tốt.

**Bảng 4. Khả năng ra rễ của chồi Re hương *in vitro* trên môi trường MS bổ sung NAA, IBA**

Chất ĐHST (mg/l)	Tỉ lệ ra rễ (%)	Số lượng Rễ (cái)	Chiều dài rễ (cm)	Thời gian ra rễ (ngày)	Chất lượng rễ	
NAA	0,3	66,7	1,5	3,2	27	TB
	0,4	77,8	2,3	3,7	23	TB
	0,5	71,1	1,9	3,5	30	TB
IBA	0,3	84,4	2,1	3,5	26	TB
	0,4	94,4	2,8	4,3	22	Tốt
	0,5	86,7	1,6	3,9	23	TB
ĐC	0	27,8	1,3	0,9	35	Xấu
Sig	0,0001	0,003	0,0001			



**Hình 4. Cây con Re hương hoàn chỉnh trong môi trường ra rễ MS + 0,4 mg/l IBA**

#### IV. KẾT LUẬN

- Công thức khử trùng vật liệu nuôi cấy khởi đầu đạt hiệu quả tạo mẫu sạch Re hương cao nhất là sử dụng HgCl<sub>2</sub> 0,1%, trong vòng 5 phút chia làm 2 lần (lần 1: 3 phút; lần 2: 2 phút), tỉ lệ mẫu sạch nảy chồi đạt 38,9%. Môi trường MS + 0,5 mg/l BAP + 0,1 mg/l kinetin cho tỉ lệ mẫu tái sinh chồi cao nhất (đạt 100%) và số chồi trung bình tái sinh/nách lá cũng cao nhất (đạt 3,2 chồi/nách lá).

- BAP có vai trò quyết định đến hệ số nhân chồi và chiều dài chồi. Trong giai đoạn tạo cụm chồi sử dụng công thức MS + 2,2 mg/l BAP + 0,1 mg/l kinetin + 0,1 mg/l NAA để tăng hệ số nhân chồi (3,5 lần và chiều cao chồi 2,2 cm).

- Môi trường tạo cây con hoàn chỉnh cho hiệu quả tốt nhất trong các công thức nghiên

cứu là: MS + 0,4 IBA (với thời gian ra rễ là 22 ngày, tỉ lệ chồi ra rễ đạt 94,4%, chất lượng rễ là tốt).

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bộ KH&CN (2007). *Sách đỏ Việt Nam*, phần Thực vật, trang 253.
2. Lê Thị Diên, Phạm Minh Toại, Lê Phú Ánh, (2010). Nghiên cứu một số đặc điểm tái sinh của loài Re Hương (*Cinnamomum parthenoxylon* (Jack) Meisn) tại vườn Quốc gia Bạch Mã. *Tạp chí khoa học*, Đại học Huế, (63).
3. Lê Xuân Đắc, Hà Hồng Hải, Đào Thị Thu Hà, Nguyễn Thanh Danh, Lê Thị Xuân, Nông Văn Hải, Lê Trần Bình (2004). Nhân nhanh và bảo tồn cây Màng tang (*Litsea verticillata*) được tìm thấy ở Vườn Quốc gia Cúc Phương bằng kỹ thuật nuôi cấy mô tế bào thực vật. *Tạp chí Công nghệ sinh học*, 2(4): 479-486.
4. Nguyễn Thanh Danh, Lê Xuân Đắc, Lê Thị Xuân (2005), Kết quả bước đầu nhân giống *in vitro* cây Vù hương (*Cinnamomum balanse* Lecomte.) bằng kỹ thuật

## **THE RESEARCH ON *IN VITRO* PROPAGATION OF *CINNAMOMUM PARTHENOXYLON* (JACK) MEISN**

**Khuat Thi Hai Ninh<sup>1</sup>, Nguyen Quynh Trang<sup>2</sup>, Bui Van Thang<sup>3</sup>, Vu Van Thong<sup>4</sup>**

<sup>1,2,3</sup>*Vietnam National University of Forestry*

<sup>4</sup>*Thainguyen University of Agriculture and Forest*

### **SUMMARY**

*Cinnamomum parthenoxylon* (Jack) Meisn is the multipurpose precious wood tree. Because of high valuable for this tree, so exploiting activity is being became to serious problems. Thus, the propagation for *Cinnamomum parthenoxylon* conservation is extremely necessary. *Cinnamomum parthenoxylon* is difficult to find the mature mother trees for seed harvesting, so the propagation by *in vitro* is the best methodology. Especially, the propagation serves to plant conservation forest and plant large areas of wood trees in the future. Research on *in vitro* propagation of *Cinnamomum parthenoxylon*, showed that in 0.1% HgCl<sub>2</sub> for 5 minutes in 2 times (5 + 2 minutes) the contaminated portion of clean sprouted explants is 38,9%. Most appropriate medium for shoot regeneration is MSsupplemented with 0.5mg l<sup>-1</sup> BAP + 0.1mg l<sup>-1</sup> kinetin (rate of regenerated shoot is 100% with 3.2 shoots per plantlet). In the multiplicationmost appropriate medium is MS medium supplemented with 2.2 mg l<sup>-1</sup> BAP + 0.1mg l<sup>-1</sup>kinetin + 0.1 NAA mg l<sup>-1</sup>. The best medium for shoot rooting is MS with supplement of 0.4 mg l<sup>-1</sup> IBA (rate of rooted shoots is over 94,4%, and roots having good quality).

**Keywords:** *Cinnamomum parthenoxylon*, *in vitro*, Lauraceae, propagation.

**Ngày nhận bài** : 15/7/2017

**Ngày phản biện** : 18/9/2017

**Ngày quyết định đăng** : 27/9/2017