

NGHIÊN CỨU NHÂN GIỐNG *IN VITRO* CÂY SÂM BỐ CHÍNH (*Hibicus sagittifolius* Kurz) THÔNG QUA NUÔI CẤY ĐỐT THÂN

Phan Xuân Huyền*, Huỳnh Thị Ngoan, Nguyễn Thị Phượng Hoàng,

*Viện Nghiên cứu Khoa học Tây Nguyên,
Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam*

*Email**: phanxuanhuyen1974@gmail.com

Ngày gửi bài: 20.12.2015

Ngày chấp nhận: 22.05.2017

TÓM TẮT

Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành nhân giống *in vitro* cây sâm bố chính thông qua phương pháp nuôi cấy đốt thân. Sau 30 ngày nuôi cấy, kết quả cho thấy rằng môi trường MS có bổ sung 0,3 mg/l BA, 0,1 mg/l NAA, 30 g/l sucrose, 8 g/l agar, pH 5,8 là tốt nhất đến sự tái sinh và sinh trưởng chồi cây (5,00 chồi/mẫu; chiều cao chồi 3,65 cm). Vị trí đốt thứ nhất đến đốt thứ tư đều có thể sử dụng làm nguồn vật liệu nhân giống *in vitro* cây sâm bố chính (3,00 - 6,90 chồi/mẫu). Trên cùng một môi trường nuôi cấy, môi trường không bổ sung than hoạt tính thì tất cả các mẫu không tái sinh rễ, khi bổ sung than hoạt tính thì 100% mẫu tái sinh rễ và sự sinh trưởng chồi cây trên hai môi trường này không có sự khác biệt. Môi trường MS bổ sung 0,1 - 1 mg/l IBA, 30 g/l sucrose, 8 g/l agar, pH 5,8 đều thích hợp đến sự tái sinh rễ *in vitro* với tỉ lệ tái sinh rễ đạt 100%. Vụn xơ dừa là giá thể thích hợp chuyển cây cấy mô ra ngoài vườn ươm (chiều cao cây 8,74 cm; chiều dài rễ 2,48 cm; tỷ lệ sống 95%). Cây cấy mô sâm bố chính ra hoa sau 80 ngày nuôi trồng và chăm sóc trên giá thể vụn xơ dừa.

Từ khóa: Chiều cao chồi, đốt thân, sâm bố chính, số chồi, tái sinh chồi.

Study on *In vitro* Propagation of *Hibicus sagittifolius* Kurz through Stem Node Culture

ABSTRACT

In the present study, we propagated *Hibicus sagittifolius* Kurz plants using stem nodal culture. After 30 days of culture, the results showed that MS medium supplemented with 0.3 mg/l BA, 0.1 mg/l NAA, 30 g/l sucrose, 8 g/l agar, pH 5.8 was the best medium for shoot regeneration and growth (5.00 shoots at the height of 3.65 cm). First stem nodes to fourth stem nodes were suitable materials for *in vitro* culture of *Hibicus sagittifolius* Kurz (3.00 - 6.90 shoot/explant). In the same culture medium, all samples did not regenerate the root in medium without activated charcoal, but when supplemented with activated charcoal, 100% samples regenerated root and shoot growth. MS medium containing 0.1 - 1 mg/l IBA, 30 g/l sucrose, 8 g/l agar, pH 5.8 was suitable for root regeneration. Coconut fiber powder was suitable substrate for the transfer of plantlets to greenhouse. *Hibicus sagittifolius* Kurz plantlets flowered after 80 days cultivation when grown on coconut fiber powder substrate.

Keyword: *Hibicus sagittifolius* Kurz, height of shoot, stem node, shoot regeneration, shoot number

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Sâm bố chính là cây dược liệu quý, có thể trồng được nhiều nơi ở nước ta. Nó có tác dụng làm thuốc bổ, chữa bệnh suy nhược cơ thể, ít ngủ, lao phổi, sốt, ho dai dẳng, viêm họng, viêm phế quản,... (Võ Văn Chi, 1997; Phạm Hoàng

Hộ, 1999; Đỗ Tất Lợi, 2013). Hiện nay, cây sâm bố chính trong tự nhiên đang bị thu hái một cách triệt để từ củ già đến củ non, thêm vào đó, nạn phá rừng làm nương rẫy làm cho khu phân bố bị thu hẹp, dẫn đến số lượng sâm bố chính trong tự nhiên ngày càng giảm dần và cạn kiệt. Vì vậy, việc tiến hành nghiên cứu nhân giống

cây được liệu quý sâm bố chính, sản xuất cây giống để trồng tạo ra nguồn nguyên liệu được liệu phục vụ cho lĩnh vực y học, thực phẩm và mỹ phẩm là vấn đề rất cần thiết.

Phương pháp nhân giống truyền thống bằng gieo hạt thường có những nhược điểm như sự phân li tính trạng, tạo ra cây giống không đồng nhất, tỉ lệ nảy mầm của hạt thấp. Phương pháp nhân giống bằng giâm cành, cây con thường dễ bị nhiễm bệnh, sinh trưởng phát triển kém và dẫn đến thoái hóa, hệ số nhân giống thấp và cây con không đồng nhất. Ứng dụng kỹ thuật nuôi cấy mô thực vật có thể khắc phục những hạn chế của phương pháp nhân giống truyền thống đó là tạo được cây giống đồng nhất, sạch bệnh, cây sinh trưởng phát triển tốt, cho năng suất cao, có thể tạo ra một số lượng lớn cây giống trong thời gian ngắn, đáp ứng nhu cầu trồng cây trên qui mô lớn. Kết quả của nghiên cứu này góp phần xây dựng qui trình nhân giống *in vitro* cây được liệu quý sâm bố chính.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Đốt thân của cây sâm bố chính gieo hạt (Hình 1a) trồng tại Phòng Công nghệ thực vật - Viện Nghiên cứu Khoa học Tây Nguyên được rửa sạch bằng nước xà phòng, sau đó khử trùng bằng cồn 70° trong 1 phút và cuối cùng khử trùng bằng dung dịch HgCl₂ 0,1% trong 9 phút. Các đốt thân sau khi khử trùng xong được cấy trên môi trường MS (Murashige and Skoog, 1962) có bổ sung 30 g/l sucrose, 8 g/l agar, pH 5,8. Những chồi cây hình thành từ đốt thân sau khi khử trùng (Hình 1b) cấy chuyển trên môi trường MS có bổ sung 0,1 mg/l BA (6-benzyl adenin), 30 g/l sucrose, 1 g/l than hoạt tính, 8 g/l agar, pH 5,8 tạo ra nguồn vật liệu cho các thí nghiệm (Hình 1c).

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Môi trường và điều kiện nuôi cấy: Môi trường được sử dụng trong nghiên cứu này là môi trường MS, tùy theo mục đích của các thí nghiệm mà bổ sung độc lập hay phối hợp giữa các chất kích thích sinh trưởng BA, NAA (α-

naphthalene acetic acid), IBA (Indole-3-butyric), sucrose, agar, pH. Thời gian chiếu sáng 10 giờ/ngày, cường độ ánh sáng 2.500 lux, nhiệt độ 25 ± 2°C và độ ẩm không khí 75 - 85%. Ở giai đoạn *ex vitro*, cây được trồng trong nhà kính, nhiệt độ 20 - 25°C, độ ẩm 80 - 85%.

Thí nghiệm 1: Khảo sát ảnh hưởng của BA đến sự tái sinh và sinh trưởng chồi cây

Đốt thân của cây sâm bố chính nuôi cấy *in vitro* (Hình 1c) được cấy lên môi trường MS có bổ sung BA (0; 0,1; 0,5; 0,7 và 1 mg/l), 30 g/l sucrose, 8 agar g/l, pH 5,8. Mỗi nghiệm thức cấy 20 mẫu, sau 30 ngày nuôi cấy tiến hành thu số liệu, chỉ tiêu theo dõi là số chồi tái sinh và chiều cao chồi cây (cm).

Thí nghiệm 2: Khảo sát ảnh hưởng của BA và NAA đến sự tái sinh và sinh trưởng chồi cây

Đốt thân của cây sâm bố chính nuôi cấy *in vitro* (Hình 1c) được cấy lên môi trường MS có bổ sung BA (0; 0,1; 0,5; 0,7 và 1 mg/l) kết hợp NAA (0,1 mg/l), 30 g/l sucrose, 8 agar g/l, pH 5,8. Mỗi nghiệm thức cấy 20 mẫu, sau 30 ngày nuôi cấy tiến hành thu số liệu, chỉ tiêu theo dõi là số chồi tái sinh và chiều cao chồi cây (cm).

Thí nghiệm 3: Khảo sát ảnh hưởng của vị trí đốt thân đến sự tái sinh và sinh trưởng chồi cây

Kế thừa kết quả của thí nghiệm trên, chọn môi trường thích hợp đến sự tái sinh và sinh trưởng chồi cây để thực hiện thí nghiệm này. Vật liệu thí nghiệm là những chồi cây sâm bố chính *in vitro* (Hình 1c) được cắt thành đốt thứ nhất, đốt thứ 2, đốt thứ 3 và đốt thứ 4 (từ ngọn đến gốc). Mỗi nghiệm thức cấy 20 mẫu, sau 30 ngày nuôi cấy tiến hành thu số liệu, chỉ tiêu theo dõi là số chồi tái sinh và chiều cao chồi cây (cm).

Thí nghiệm 4: Khảo sát ảnh hưởng của than hoạt tính đến sự tái sinh và sinh trưởng chồi cây

Kế thừa kết quả của thí nghiệm trên chọn môi trường thích hợp đến sự tái sinh và sinh trưởng chồi cây để thực hiện thí nghiệm này. Đốt thân của cây sâm bố chính nuôi cấy *in vitro* (Hình 1c) được cấy lên môi trường có và không có bổ sung 1 g/l than hoạt tính. Mỗi nghiệm thức cấy 20 mẫu, sau 30 ngày nuôi cấy tiến hành thu số liệu, chỉ tiêu theo dõi là tỉ lệ tái sinh rễ (%), số chồi tái sinh và chiều cao chồi cây (cm).

Thí nghiệm 5: Khảo sát ảnh hưởng của IBA đến sự tái sinh rễ in vitro

Chồi ngọn của cây sâm bố chính nuôi cấy *in vitro* (Hình 1c) được cấy lên môi trường MS có bổ sung IBA (0; 0,1; 0,5 và 1 mg/l), 30 g/l sucrose, 8 agar g/l, pH 5,8. Mỗi nghiệm thức cấy 20 mẫu, sau 30 ngày nuôi cấy tiến hành thu số liệu, chỉ tiêu theo dõi là số rễ tái sinh, chiều dài rễ (cm) và tỉ lệ tái sinh rễ (%).

Thí nghiệm 6: Khảo sát ảnh hưởng của giá thể đến sự thích nghi và sinh trưởng của cây con ở giai đoạn ex vitro

Cây con sâm bố chính nuôi cấy *in vitro* đồng đều về chiều cao và số rễ được trồng trên giá thể vụn xơ dừa và giá thể 50% vụn xơ dừa phối trộn 50% cát. Mỗi nghiệm thức trồng 60 cây, sau 30 ngày nuôi trồng tiến hành thu số liệu, chỉ tiêu theo dõi là chiều cao (cm), chiều dài rễ (cm) và tỉ lệ sống của cây (%).

Xử lý số liệu: Số liệu của các thí nghiệm được xử lý bằng phần mềm thống kê SPSS (bản 15.0) theo phương pháp Duncan's test (Duncan, 1955) đối với thí nghiệm từ 3 nghiệm thức trở lên, theo phương pháp T-test đối với những thí nghiệm có 2 nghiệm thức, mức độ tin cậy $P < 0,05$.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Khảo sát ảnh hưởng của BA đến sự tái sinh và sinh trưởng chồi cây

Khả năng tái sinh và sinh trưởng chồi cây từ các đốt thân cây sâm bố chính sau 30 ngày nuôi cấy được thể hiện trên bảng 1. Kết quả cho thấy, BA có sự ảnh hưởng tích cực lên sự tái

sinh và sinh trưởng chồi cây, tuy nhiên ở các nồng độ BA khác nhau thì có sự ảnh hưởng khác nhau. BA ở nồng độ 0,3 mg/l cho thấy chồi cây sinh trưởng tốt nhất (Hình 1d₃), chiều cao cây đạt 3,61 cm, số chồi tái sinh là 4 chồi/mẫu. Khi tăng nồng độ BA lên 0,5; 0,7 và 1 mg/l thì đốt thân tái sinh chồi nhiều hơn (tương ứng 4,30; 4,80 và 5,10 chồi/mẫu), nhưng chất lượng chồi không tốt và có biểu hiện biến dị ở nồng độ 1 mg/l BA (Hình 1d₄, 1d₅, 1d₆). Điều này cho thấy, khi nồng độ BA thấp thì kích thích sự sinh trưởng của chồi cây (Hình 1d₁, 1d₂, 1d₃), nhưng khi nồng độ BA tăng cao thì có tác dụng ngược lại ức chế sự sinh trưởng của chồi. Kết quả này cũng cho thấy, khi tăng nồng độ BA từ 0 - 0,3 mg/l thì chiều cao của chồi tăng lên, nhưng khi tăng 0,5 - 1,0 mg/l thì chiều cao chồi lại giảm xuống. Điều này có thể giải thích BA ở nồng độ thấp thì kích thích tăng chồi tăng trưởng chiều cao, nhưng khi nồng độ BA tăng cao thì tác dụng ngược lại.

Hiện nay trên thế giới chưa thấy công bố nào nghiên cứu nhân giống *in vitro* loài *Hibiscus sagittifolius*, chỉ thấy công bố một số loài khác thuộc chi *Hibiscus*. Ở nước ta, nghiên cứu nhân giống *in vitro* cây sâm bố chính vẫn còn rất ít, kết quả của nghiên cứu này tương đồng với kết quả nghiên cứu của Phan Duy Hiệp và cs. (2014) khi nghiên cứu ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng thực vật lên sự phát sinh hình thái loài *Hibiscus sagittifolius* Kurz (hệ số nhân chồi cao nhất là 4,5 chồi/mẫu). Điểm khác biệt là chúng tôi chỉ sử dụng BA độc lập, trong khi tác giả này kết hợp với GA₃ và nước dừa.

Bảng 1. Ảnh hưởng của BA đến sự tái sinh và sinh trưởng của chồi cây

Nồng độ BA (mg/l)	Chiều cao chồi cây (cm)	Số chồi/mẫu
0	2,67 ^c	1,00 ^e
0,1	3,29 ^b	2,40 ^d
0,3	3,61 ^a	4,00 ^c
0,5	2,70 ^c	4,30 ^{bc}
0,7	1,61 ^d	4,80 ^{ab}
1	1,10 ^e	5,10 ^a

Ghi chú: Những ký tự , b, c,... trong cột thể hiện sự sai khác có ý nghĩa với độ tin cậy $P < 0,05$ trong phép thử Duncan's test.

Như vậy, môi trường MS bổ sung 0,3 mg/l BA là tốt nhất đến sự tái sinh và sinh trưởng chồi cây từ đốt thân cây sâm bố chính.

3.2. Khảo sát ảnh hưởng của BA và NAA đến sự tái sinh và sinh trưởng chồi cây

Qua khảo sát các nồng độ BA kết hợp với NAA, khả năng tái sinh và sinh trưởng chồi cây từ đốt thân cây sâm bố chính sau 30 ngày nuôi cấy được thể hiện trên bảng 2. Kết quả thí nghiệm cho thấy, khi kết hợp giữa BA và NAA thì có sự thúc đẩy tái sinh chồi cây cao hơn khi sử dụng BA độc lập (Bảng 1). Môi trường bổ sung 0,3 mg/l BA kết hợp 0,1 mg/l NAA là tốt nhất đến sự phát sinh và sinh trưởng chồi cây (Hình 1e₃), số chồi tái sinh là 5 chồi/mẫu, chiều cao chồi đạt 3,65 cm. Trong thí nghiệm này, sự tái sinh và sự sinh trưởng của các chồi cây cũng tương tự như thí nghiệm sử dụng BA độc lập ở trên, khi tăng nồng độ BA lên 0,5; 0,7 và 1 mg/l kết hợp với 0,1 mg/l NAA thì mẫu tái sinh nhiều chồi hơn, nhưng chất lượng chồi không tốt (Hình 1e₄; 1e₅ và 1e₆). Điều này cho thấy, khi nồng độ BA thấp sẽ kích thích sự sinh trưởng chồi cây, khi nồng độ BA cao sẽ ức chế sự sinh trưởng chồi cây. Tương tự, khi tăng nồng độ BA thì số chồi tái sinh tăng dần nhưng chiều cao chồi cây lại giảm đi.

Hiện nay chưa thấy công bố nào nghiên cứu kết hợp BA và NAA đến sự tái sinh và sinh trưởng chồi cây *in vitro* cây sâm bố chính. Trong nuôi cấy mô thực vật, một số giả đã nghiên cứu cho thấy chất điều hòa sinh trưởng BA kết hợp

với NAA nâng cao hiệu quả trong nhân giống *in vitro*: Sunitibala và Kishor (2009) đã nghiên cứu nhân giống *in vitro* *Dendrobium transparens* L. và chứng minh BA kết hợp với NAA tốt hơn BA kết hợp với IBA và IAA. Hoàng Thị Kim Hồng (2011) nghiên cứu nhân nhanh *in vitro* cây hà thủ ô đỏ, sử dụng BA kết hợp với NAA đã nâng cao hiệu quả trong việc tạo cụm chồi từ nuôi cấy đoạn thân (8,54 chồi/mẫu).

Như vậy, môi trường MS có bổ sung 0,3 mg/l BA kết hợp với 0,1 mg/l NAA là tốt nhất đến sự tái và sinh trưởng chồi cây sâm bố chính thông qua nuôi cấy đốt thân.

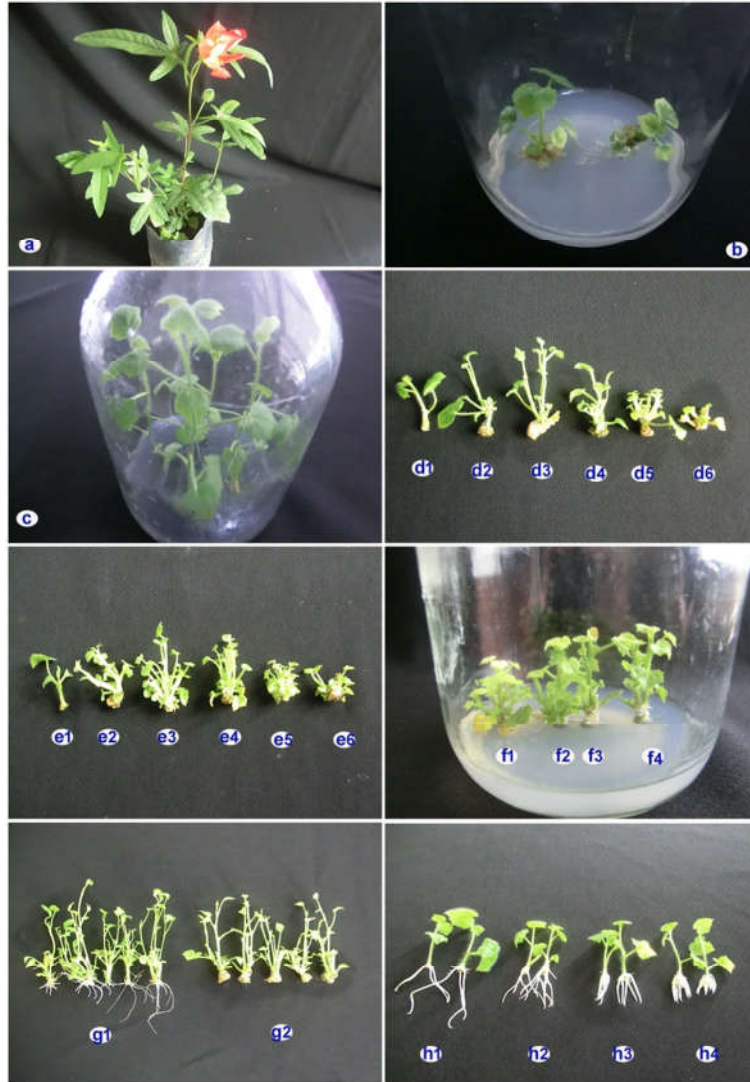
3.3. Khảo sát ảnh hưởng của vị trí đốt thân đến sự tái sinh và sinh trưởng chồi cây

Vị trí đốt thân thứ nhất, thứ hai, thứ ba và thứ tư được nuôi cấy trên môi trường MS có bổ sung 0,3 mg/l BA, 0,1 mg/l NAA, 30 g/l sucrose, 8 g/l agar, pH 5,8. Khả năng tái sinh và sinh trưởng chồi cây từ các vị trí đốt thân sau 30 ngày nuôi cấy được thể hiện trên bảng 3. Kết quả thí nghiệm cho thấy, sự tái sinh và sinh trưởng của chồi cây ở các vị trí đốt khác nhau thì khác nhau, sự tái sinh chồi ở vị trí đốt thứ nhất cao nhất, sau đó giảm dần đến vị trí đốt thứ tư (tương ứng 6,90; 5,80; 3,20 và 3,00 chồi/mẫu), nhưng chiều cao của chồi cây thì tăng dần ở vị trí đốt thứ nhất đến đốt thứ tư (Hình 1f₁, 1f₂, 1f₃ và 1f₄). Điều này có thể giải thích, các chất kích thích sinh trưởng thuộc nhóm cytokinin nói chung và chất BA nói riêng được tổng hợp từ rễ và vận chuyển lên ngọn nên

Bảng 2. Ảnh hưởng của BA và NAA lên sự tái sinh và sinh trưởng chồi cây

Nồng độ		Chiều cao chồi cây (cm)	Số chồi/mẫu
BA (mg/l)	NAA (mg/l)		
0	0	2,57 ^c	1,00 ^d
0,1	0,1	3,12 ^b	3,10 ^c
0,3	0,1	3,65 ^a	5,00 ^b
0,5	0,1	3,35 ^b	5,30 ^b
0,7	0,1	1,90 ^d	6,00 ^a
1	0,1	1,68 ^d	6,30 ^a

Ghi chú: Những ký tự a, b, c,... trong cột thể hiện sự sai khác có ý nghĩa với độ tin cậy $P < 0,05$ trong phép thử Duncan's test.



Hình 1. Nhân giống *in vitro* cây sâm bố chính

Ghi chú: a. Cây gieo hạt đã ra hoa; b. Chồi cây tái sinh từ đốt thân của cây bố mẹ *ex vitro*; c. Chồi cây *in vitro* làm vật liệu cho các thí nghiệm; d₁, d₂, d₃, d₄, d₅ và d₆. Chồi cây trên môi trường bổ sung 0; 0,1; 0,3; 0,5; 0,7 và 1 mg/l BA; e₁, e₂, e₃, e₄, e₅ và e₆. Chồi cây trên môi trường bổ sung 0; 0,1; 0,3; 0,5; 0,7 và 1 mg/l BA kết hợp với 0,1 mg/l NAA; f₁, f₂, f₃ và f₄. Chồi cây tái sinh từ vị trí đốt thân thứ nhất, thứ hai, thứ 3 và thứ 4; g₁ và g₂. Chồi cây trên môi trường có và không có than hoạt tính; h₁, h₂, h₃ và h₄. Chồi cây tái sinh rễ *in vitro* trên môi trường bổ sung 0; 0,1; 0,5 và 1 mg/l IBA.

nên chồi ngọn tập trung chất kích thích sinh trưởng cao nhất và giảm dần ở những những vị trí đốt phía dưới, do đó, vị trí đốt ngọn sẽ kích thích tái sinh chồi nhiều nhất và giảm dần ở những vị trí đốt phía dưới. Hiện nay chưa thấy công bố nào nghiên cứu ảnh hưởng của vị trí đốt thân đến sự tái sinh và sinh trưởng chồi cây *in vitro* cây sâm bố chính, nhưng đã có một số tác

giả đã nghiên cứu trên một số đối tượng khác như: Nguyễn Thị Uyển Dung (2012) nghiên cứu các vị trí đốt thân cây đẳng sâm (*Codonopsis javanica* Blume) đến sự tái sinh và sinh trưởng chồi, kết quả đã cho thấy, vị trí đốt thân thứ nhất và thứ ba thích hợp trong nhân giống *in vitro* cây đẳng sâm; Phan Xuân Huyền và Triệu Ngọc Hải Yến (2008) cũng đã nghiên cứu các vị

Bảng 3. Ảnh hưởng của vị trí đốt thân đến sự tái sinh và sinh trưởng chồi cây

Vị trí đốt thân	Chiều cao chồi cây (cm)	Số chồi/mẫu
Đốt thứ nhất	3,10 ^b	6,90 ^a
Đốt thứ hai	3,50 ^a	5,80 ^b
Đốt thứ ba	3,61 ^a	3,20 ^c
Đốt thứ tư	3,70 ^a	3,00 ^c

Ghi chú: Những ký tự a, b, c,... trong cột thể hiện sự sai khác có ý nghĩa với độ tin cậy $P < 0,05$ trong phép thử Duncan's test.

trí đốt thân cây nho Mỹ lên quá trình tái sinh và sinh trưởng chồi, kết quả đã chỉ ra rằng, từ vị trí đốt thứ nhất đến vị trí đốt thứ năm đều thích hợp làm nguồn vật liệu trong nhân giống *in vitro* cây nho Mỹ.

Như vậy, vị trí đốt thân thứ nhất đến đốt thứ tư đều thích hợp làm nguồn vật liệu trong nhân giống *in vitro* cây sâm bố chính.

3.4. Ảnh hưởng của than hoạt tính lên sự tái sinh và sinh trưởng của chồi cây

Đốt thân cây sâm bố chính *in vitro* được cấy trên môi trường MS có các thành phần 0,3 mg/l BA, 30 g/l sucrose, 8 g/l agar, pH 5,8 và có bổ sung thêm 1 g/l than hoạt tính. Khả năng tái sinh và sinh trưởng chồi cây sâm bố chính sau 30 ngày nuôi cấy được thể hiện trên bảng 4. Kết quả cho thấy, môi trường có bổ sung than hoạt tính thì 100% mẫu tái sinh rễ, trong khi đó, môi trường không có than hoạt tính thì không tái sinh rễ (Hình 1g₁, 1g₂). Sự tái sinh và sinh trưởng của chồi cây trên môi trường có than hoạt tính thu được 4,50 chồi/mẫu và chiều cao chồi đạt 3,83 cm, trong khi đó, trên môi trường không có than hoạt tính thu được 4,10 chồi/mẫu và chiều cao chồi đạt 3,65 cm. Về mặt số liệu, chiều cao chồi và số chồi tái sinh trên hai môi trường này có sự khác nhau nhưng kết quả xử lý thống kê cho thấy số chồi tái sinh và chiều cao chồi ở hai môi trường này không có sự khác biệt. Kết quả này cũng cho thấy, than hoạt tính có tác dụng kích thích chồi cây sâm bố chính tái sinh rễ *in vitro*. Trên thế giới và trong nước đã có nhiều công bố chứng minh than hoạt tính có tác dụng kích thích tái sinh rễ cũng như sinh trưởng của chồi cây *in vitro*. Đoàn Trọng Đức (2014) đã cho thấy loài *Codonopsis* sp. tái sinh

rễ trên môi trường MS có bổ sung 0,5 mg/l BA, 0,7 mg/l IBA và 1 g/l than hoạt tính. Phạm Thị Thu Hằng và cs. (2013) đã nghiên cứu ảnh hưởng của than hoạt tính lên quá trình tạo rễ *in vitro* cây trâu bà cánh phượng, kết quả cho thấy, 100% mẫu cấy tái sinh rễ khi môi trường có bổ sung 0,5 - 2 mg/l than hoạt tính. Chapla *et al.* (2009) đã chỉ ra rằng, nồng độ than hoạt tính 1 - 2 g/l thích hợp cho sự tái sinh rễ *in vitro* và sinh trưởng của loài *Miltonia flavescens* Lindl.

Như vậy, môi trường có bổ sung thêm 1 g/l than hoạt tính thì 100% mẫu cấy tái sinh rễ, sự tái sinh và sinh trưởng chồi cây ở môi trường có và không có than hoạt tính không có sự khác biệt.

3.5. Khảo sát ảnh hưởng của IBA đến sự tái sinh rễ *in vitro* cây sâm bố chính

Khả năng tái sinh rễ *in vitro* của các chồi sâm bố chính sau 30 ngày nuôi cấy trên môi trường MS có bổ sung các nồng độ IBA được thể hiện trên bảng 5. Kết quả cho thấy, 100% chồi đều tái sinh rễ trên tất cả các môi trường (Hình 1h₁, 1h₂, 1h₃, 1h₄). Trên môi trường đối chứng không bổ sung IBA, tất cả các chồi đều tái sinh rễ, 3 rễ/mẫu và chiều dài rễ là 2,75 cm, qua đây cho thấy cây sâm bố chính là đối tượng cây trồng dễ dàng tái sinh rễ *in vitro* trên môi trường không bổ sung những chất kích thích tạo rễ. Hiện nay cũng đã có nhiều tác giả công bố khi nghiên cứu tái sinh rễ *in vitro* của một số giống cây trồng không cần sử dụng các chất kích thích sinh trưởng thuộc nhóm auxin (Chapla *et al.*, 2009; Besson *et al.*, 2010; Stefanello *et al.*, 2010). Khi nồng độ IBA tăng 0,1; 0,5 và 1 mg/l thì số rễ tăng lên (tương ứng 5,50, 6,50 và 7,40 rễ/chồi), nhưng chiều dài rễ lại giảm dần. Kết quả này có phần tương đồng với nghiên cứu của

Bảng 4. Ảnh hưởng của than hoạt tính đến sự tái sinh và sinh trưởng của chồi cây

Môi trường nuôi cấy	Chiều cao chồi cây (cm)	Số chồi/mẫu	Tỉ lệ tạo tế (%)
Có than hoạt tính (1 g/l)	3,83 ^a	4,50 ^a	100
Không than hoạt tính	3,65 ^a	4,10 ^a	0

Ghi chú: Những ký tự a, b,... trong cột thể hiện sự sai khác có ý nghĩa với độ tin cậy $P < 0,05$ trong phép thử T-test.

Bảng 5. Ảnh hưởng của IBA đến sự tái sinh rễ *in vitro* cây sâm bố chính

IBA (mg/l)	Số rễ/chồi	Chiều dài rễ (cm)	Tỷ lệ tạo rễ (%)
0	3,00 ^d	2,75 ^a	100
0,1	5,50 ^c	1,81 ^b	100
0,5	6,50 ^b	1,65 ^b	100
1	7,40 ^a	1,07 ^c	100

Ghi chú: Những ký tự a, b, c,... trong cột thể hiện sự sai khác có ý nghĩa với độ tin cậy $P < 0,05$ trong phép thử Duncan's test.

Phan Duy Hiệp và cs. (2014) khi bổ sung vào môi trường nuôi cấy 0,5 mg/l IBA (tỉ lệ tái sinh rễ đạt 100%). Sự khác biệt là trong nghiên cứu của chúng tôi, với nồng độ 0; 0,1; 1 mg/l IBA 100% chồi cây tái sinh rễ, trong khi đó kết quả của Phan Duy Hiệp và cs. (2014) chỉ đạt tỉ lệ 30,7 - 73,5% tái sinh rễ khi IBA ở nồng độ 0; 1; 1,5 mg/l.

Như vậy, môi trường MS có bổ sung 0,1 - 1 mg/l IBA đều thích hợp đến sự tái sinh rễ *in vitro* cây sâm bố chính.

3.6. Khảo sát ảnh hưởng của giá thể đến sự thích nghi và sinh trưởng của cây con ở giai đoạn *ex vitro*

Khả năng thích nghi và sinh trưởng của cây sâm bố chính ở giai đoạn vườn ươm sau 30 ngày nuôi trồng và chăm sóc trên giá thể vụn xơ dừa và giá thể 50% vụn xơ dừa phối trộn 50% cát được thể hiện trên bảng 6. Kết quả cho thấy, tỉ lệ sống của cây trên giá thể vụn xơ dừa (95%) cao hơn giá thể 50% vụn xơ dừa phối trộn 50% cát (91,67%). Việc chuyển cây con từ ống nghiệm ra ngoài vườn ươm là một công đoạn quan trọng trong nuôi cấy mô thực vật, cây con *in vitro* thường nuôi cấy trên môi trường thạch nên khi chuyển ra vườn ươm bộ rễ phải thích nghi trên những giá thể mới. Hơn nữa, độ ẩm ở môi trường tự nhiên thấp và dao động trong ngày, dẫn đến cây con dễ bị héo và chết. Vì vậy, trong

thời gian đầu chuyển cây con ra ngoài vườn ươm cần phải phun sương giữ ẩm cho cây. Qua đây cũng cho thấy, giá thể vụn xơ dừa xốp, có độ thông thoáng và giữ ẩm tốt nên thích hợp cho sự thích nghi và sinh trưởng của cây con trong giai đoạn đầu ở điều kiện vườn ươm. Cây trồng ở hai giá thể trên đều sinh trưởng tốt, lá có màu xanh tốt (Hình 2a₁, 2a₂) nhưng chiều cao và chiều dài rễ của cây trồng trên giá thể vụn xơ dừa tốt hơn giá thể 50% vụn xơ dừa phối trộn 50% cát (Hình 2b₁, 2b₂). Qua phân tích thống kê cũng cho thấy, chiều cao và chiều dài rễ của cây trồng ở hai giá thể trên đã thể hiện sự sai khác có ý nghĩa. Hiện này nhiều công bố cho thấy, vụn xơ dừa là một giá thể được sử dụng phổ biến để chuyển cây cấy mô ra giai đoạn vườn ươm: Stefanello *et al.* (2009) đã nghiên cứu chuyển cây *Miltonia flavescens* Lindl. ra ngoài vườn ươm trồng trên giá thể vụn xơ dừa có tỉ lệ sống đạt 100% sau 30 ngày chăm sóc. Phan Xuân Huyền và Nguyễn Lâm Thanh (2014) nghiên cứu cây dược liệu đẳng sâm đã sử dụng giá thể vụn xơ dừa để chuyển cây cấy mô ra ngoài vườn ươm, kết quả cho thấy, tỉ lệ sống của cây đạt 100% và cây con sinh trưởng tốt sau 20 ngày nuôi trồng. Một nghiên cứu khác của Phan Xuân Huyền và cs. (2016) cũng đã sử dụng vụn xơ dừa để chuyển cây dược liệu cấy mô lan gấm (*Anoectochilus lylei* Rolfe ex Downies) ra ngoài vườn ươm cho tỉ lệ sống đạt 100% và cây sinh trưởng tốt sau 60 ngày nuôi trồng.

Bảng 6. Ảnh hưởng của giá thể đến sự thích nghi và sinh trưởng của cây con ở giai đoạn *ex vitro*

Giá thể trồng	Chiều cao cây (cm)	Chiều dài rễ (cm)	Tỉ lệ sống (%)
Vụn xơ dừa	8,74 ^a	2,48 ^a	95,00
50% vụn xơ dừa + 50% cát	7,65 ^b	1,42 ^b	91,67

Ghi chú: Những ký tự a, b,... trong cột thể hiện sự sai khác có ý nghĩa với độ tin cậy $P < 0,05$ trong phép thử T-test.



Hình 2. Nhân giống *in vitro* cây sâm bố chính

Ghi chú: a₁, a₂ và b₁, b₂. Cây cấy mô trồng trên giá thể vụn xơ dừa và giá thể 50% vụn xơ dừa phối trộn 50% cát; c. Cây cấy mô 40 ngày tuổi trồng trên giá thể vụn xơ dừa; d. Cây cấy mô 80 ngày tuổi trồng trên giá thể vụn xơ dừa.

Cây sâm bố chính cấy mô 30 ngày tuổi đã thích nghi ở điều kiện *ex vitro* được trồng vào chậu với giá thể vụn xơ dừa. Tưới 100 ml phân Nitrophoska Foliar (nồng độ 2 g/l) theo định kỳ một tuần một lần vào giá thể. Phun thuốc trừ sâu sinh học AMECTIN AIC 36 EC (3 ml/l) theo định kỳ một tuần một lần. Phun thuốc nấm Kasuran 47WP (3 g/l) theo định kỳ 1 - 2 tuần một lần để phòng ngừa và trị nấm bệnh trên cây sâm bố chính. Sau 40 ngày nuôi trồng và chăm sóc, cây sinh trưởng và phát triển tốt, chiều cao cây đạt 19,96 cm (Hình 2c). Sau 80 ngày nuôi

trồng và chăm sóc, cây tiếp tục sinh trưởng và phát triển tốt, chiều cao cây đạt 60,82 cm và tất cả các cây đều ra hoa (Hình 2d).

Như vậy, vụn xơ dừa là giá thể thích hợp để chuyển cây sâm bố chính cấy mô ra ngoài vườn ươm

4. KẾT LUẬN

Từ các kết quả thu được, chúng tôi kết luận: i) Môi trường MS có bổ sung 0,3 mg/l BA, 0,1 mg/l NAA, 30 g/l sucrose, 8 g/l agar, pH 5,8 là tốt nhất đến sự tái sinh và sinh trưởng chồi cây;

ii) Vị trí đốt thân thì vị trí đốt thứ nhất đến đốt thứ tư đều thích hợp làm nguồn vật liệu nhân giống *in vitro* cây sâm bố chính; iii) Trên cùng một môi trường nuôi cấy, môi trường có bổ sung thêm 1 g/l than hoạt tính thì 100% mẫu đều tái sinh rễ, nhưng môi trường không bổ sung than hoạt tính thì mẫu không tái sinh rễ nhưng sự sinh trưởng của chồi cây ở hai môi trường này không có sự khác biệt; iv) Môi trường MS bổ sung 0,1 - 1 mg/l IBA, 30 g/l sucrose, 8 g/l agar, pH 5,8 đều thích hợp đến sự tái sinh rễ *in vitro* cây sâm bố chính; v) Vụn xơ dừa là giá thể thích hợp để chuyển cây sâm bố chính cấy mô ra ngoài vườn ươm; vi) Cây sâm bố chính cấy mô có thể ra hoa sau 80 ngày nuôi trồng và chăm sóc.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Besson J.C.F., Oliveira L.K. and Bonett L.P. (2010). Source and concentration of carbohydrates on shoot growth and rooting of *Miltonia flavescens* Lindl. R. Bra. Bioci., 8(1): 9-13.
- Chapla P.I., Besson J.C.F., Olivera L.K., Silva J.M.D., Rocha A.C.D.S. and Stefanello S. (2009). pH, activated charcoal and gelling agents of the culture medium on the *in vitro* growth of *Miltonia flavescens* Lindl. Plant Cell Cult. Micropropag., 5(2): 87-93.
- Duncan D. B. (1955). Multiple range and F tests. Biometrics, 11: 1-42.
- Đoàn Trọng Đức (2014). Tập san Xuân Giáp Ngọ - Sở Khoa học và Công nghệ tỉnh Kon Tum. Quy trình nhân giống cây đảng sâm bằng phương pháp nuôi cấy mô, tr. 53-55.
- Đỗ Tất Lợi (2013). Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam. Nhà xuất bản Hồng Đức, tr. 813-815.
- Hoàng Thị Kim Hồng (2011). Nghiên cứu khả năng tái sinh chồi và cụm chồi trong nuôi cấy *in vitro* cây hà thủ ô đỏ (*Polygonum multiflorum* Thunb.). Tạp chí Khoa học, Đại học Huế, 64: 23-32.
- Murashige T, Skoog F (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue. Plant Physiol., 15: 473-497.
- Nguyễn Văn Uyên (1984). Nuôi cấy mô thực vật phục vụ công tác giống cây trồng. Nhà xuất bản Tp. Hồ Chí Minh, tr. 33.
- Nguyễn Hoàng Uyển Dung (2012). Vi nhân giống cây đảng sâm (*Codonopsis javanica* Blume). Luận án thạc sĩ Sinh học thực nghiệm, tr. 43-53.
- Phạm Hoàng Hộ (1999). Cây cỏ Việt Nam. Nhà xuất bản Trẻ, quyển I, tr. 525.
- Phan Xuân Huyền và Triệu Ngọc Hải Yến (2008). Nhân nhanh giống nho mỹ (*vitis* sp.) bằng phương pháp nuôi cấy đốt thân *in vitro*. Tuyển tập công trình nghiên cứu khoa học công nghệ của Viện Nghiên cứu Khoa học Tây Nguyên, tr. 64-72.
- Phan Xuân Huyền và Nguyễn Lâm Thanh (2014). Nghiên cứu nhân giống *in vitro* cây đảng sâm (*Codonopsis javanica* Blume) thông qua nuôi cấy chồi ngủ. Tạp chí Công nghệ Sinh học, 12(4): 659-666.
- Phan Xuân Huyền, Nguyễn Thị Thanh Hằng, Phùng Quang Vinh và Vũ Thị Hà (2016). Nghiên cứu nhân giống và nuôi trồng cây lan gấm (*Anoectochilus lylei* Rolfe ex Downies). Tạp chí Khoa học, Trường đại học Tây Nguyên, 20: 68-74.
- Phan Duy Hiệp, Nguyễn Trí Minh, Phan Xuân Huyền, Cao Đình Hùng, Đinh Văn Khiêm và Nguyễn Thị Thanh Hằng (2014). Nghiên cứu ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng thực vật lên sự phát sinh hình thái của một số giống sâm bố chính (*Hibiscus sagittifolius* Kurz) trong điều kiện *in vitro*. Tạp chí Sinh học, 36(1se): 266-271.
- Phạm Thị Thu Hằng, Nguyễn Thanh Hải, Nguyễn Thị Thùy Linh, Nguyễn Thị Thủy, Đặng Thị Thanh Tâm và Nguyễn Thị Phương Thảo (2013). Nhân nhanh *in vitro* cây trâu bò cánh phượng (*Philodendron xanadu*). Tạp chí Khoa học và Phát triển, 11(6): 826-832.
- Sunitibala H. and Kishor R. (2009). Micropropagation of *Dendrobium transparens* L. from axenic pseudobulb segments. Ind. J. Biotechnol., 8: 448-452.
- Stefanello S., Silveira E.V., Oliveira L.K., Besson J.C.F. and Dutra G.M.N. (2009). Efficiency of substrates on acclimatization of *in vitro* propagated *Miltonia flavescens* Lindl. Revista em Agronegócios e Meio Ambiente, 2(3): 467-476.
- Stefanello S., Karsten J., Müller T.S., Tomczak A.P., Bonett L.P. and Schuelter A.R. (2009). *In vitro* conversion of *Miltonia flavescens* Lindl. roots and leaf tip cells in protocorm like bodies and plant regeneration. Ciência & Agrotecnologia, 33(1): 53-59.
- Võ Văn Chi (1997). Từ điển cây thuốc Việt Nam. Nhà xuất bản Y học, tr. 1334-1335.
- Vijayakumar S., Rajalkshmi G. and Kalimuthu K. (2012). Propagation of *Dendrobium aggregatum* through the culture of immature seeds from green capsules. Lankesteriana, 12(2): 131-135.