

và hiệu quả kinh tế của cây bông nhờ nước trời. Báo cáo nghiệm thu đề tài khoa học Bộ Công thương, năm 2009.

Gomez, K.A. and Gomez, A.A., 1984. *Statistical Procedures for Agricultural Research*. 2nd Edition,

John Wiley and sons Inc., New York, 680 p.

R.S. Sarlach, R.S. Sohu AND M.S. Gill, 2010. Effect of Ethrel on yield and fibre quality traits in upland cotton. *Crop Improvement* 37 (1): 83-86

Determination of appropriate time for spraying ethrel on inbred cotton variety NH14-5

Mai Van Hao, Nguyen Van Chinh, Tran Thi Hong, Le Ba Tin, Truong Cong Kien Quoc

Abstract

Two experiments were carried out with the treatment of Ethrel 0.08% on inbred cotton variety NH14-5 at Dak Lak and Ninh Thuan. The results showed that, spray Ethrel help to to concentrate and shorten the growth time. In which, Spray Ethrel at 50% tree has fruit hatched helped to shorten the growth time from 8 - 9 days but the reduce yield, fiber quality and economic efficiency. Spray Ethrel at 25% of fruit hatched on the tree helped to concentrate and shorten the growth time of about 7 days but reduces yield and fiber quality but the economic efficiency is comparable to the control. Spraying Ethrel at 50% of fruit hatched on the tree helped to concentrate and shorten the growth time of about 5 days but not affect the yield, fiber quality and economic efficiency by reducing the cost of harvesting.

Keywords: Inbred cotton, early ripening, Ethrel

Ngày nhận bài: 12/9/2018
Ngày phản biện: 18/9/2018

Người phản biện: TS. Nguyễn Văn Thường
Ngày duyệt đăng: 15/10/2018

ẢNH HƯỞNG CỦA MÔI TRƯỜNG NUÔI CẤY *IN VITRO* ĐẾN TÁI SINH CHỒI CỦA BA LOÀI CÂY DƯỢC LIỆU PHỤC VỤ CÔNG TÁC BẢO TỒN

Lương Thị Hoan¹, Tạ Như Thục Anh¹, Dương Thị Phúc Hậu¹, Hoàng Thị Như Nụ¹, Vũ Hoài Sâm¹, Vũ Thị Hồng Trang¹

TÓM TẮT

Bảo tồn nguồn gen dược liệu quý hiếm có giá trị kinh tế cao như thạch斛 rỉ sắt, kim tuyết liên, húng chanh Ấn Độ trong điều kiện *in vitro* có vai trò quan trọng nhằm đảm bảo lưu giữ nguồn giống có giá trị trong tương lai. Mục tiêu của nghiên cứu này là duy trì và bảo tồn nhân giống ba nguồn gen cây dược liệu quý trên bằng phương pháp nuôi cấy mô. Kết quả chỉ ra rằng, thành phần môi trường ảnh hưởng đến tái sinh chồi của các loài cây. Tái sinh chồi nhanh hay chậm phụ thuộc vào thành phần môi trường và chất điều hòa sinh trưởng như: thạch斛 rỉ sắt đạt trung bình 9,7 chồi/mẫu, và chiều dài chồi 3,26 cm trong môi trường MS + 20 g/l saccarose + 10% nước dừa + 60 g/l chuối + 0,75 mg/l BA + 0,5 mg/l α -NAA (CT3) cho tái sinh tốt nhất, lan kim tuyết liên trung bình 8,74 chồi/mẫu, chiều cao đạt 3,7 cm trong môi trường MS + 30 g/l saccarose + 10% nước dừa + 1,5 mg/l kinetin (CT5), trong khi húng chanh Ấn Độ đạt ở công thức CT8 (30 g/l Sacarose + 0,25 mg/l BA) cho số chồi trung bình cao nhất đạt 7,8 chồi/mẫu và 2,8 cm. Kết quả này cho thấy rằng tùy thuộc vào loài cây việc bổ sung chất phụ gia và điều hòa sinh trưởng khác nhau để phù hợp với thích nghi tái sinh chồi của từng cây ở điều kiện *in vitro*. Kết quả này làm cơ sở để duy trì, lưu giữ và nhân giống trong điều kiện nhiệt độ ánh sáng trong phòng.

Từ khóa: Bảo tồn nguồn gen, nhân giống, tái sinh chồi, điều kiện chiếu sáng, *in vitro*

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Nhân giống *in vitro* là phương pháp đã được áp dụng hiệu quả trên nhiều đối tượng cây nông nghiệp, lâm nghiệp, và cây dược liệu nhằm cung cấp một lượng giống lớn, đúng thời vụ và đáp ứng được

nhu cầu của sản xuất, khắc phục vấn đề trong việc cải thiện giống trồng.

Thực tế đã chứng minh được khả năng tái sinh một cơ thể thực vật hoàn chỉnh từ một tế bào riêng rẽ. Hàng trăm loài cây trồng đã được nhân giống trên

¹ Viện Dược liệu

quy mô thương mại bằng cách nuôi cấy trong môi trường nhân tạo vô trùng và tái sinh chúng thành cây với hệ số nhân giống vô cùng lớn (Nguyễn Thị Lý Anh và Đinh Thị Phòng, 2007). Ở Thái Lan, 90% hoa lan thương mại được nhân bằng phương pháp nuôi cấy *in vitro* (Dương Công Kiên, 2002).

Ở nhiều nước trên thế giới, loài lan thạch học rỉ sắt, kim tuyến liên đã nhân giống bằng phương pháp nuôi cấy mô nhằm mục tiêu bảo tồn và lưu giữ nguồn gen như Trung Quốc, Nepal, Bangladesh (Liu *et al.*, 2012; Hou *et al.*, 2012; Ye *et al.*, 2015; Zhanga *et al.*, 2015).

Thạch học rỉ sắt, kim tuyến liên, húng chanh Ấn Độ là loài cây quý hiếm, có giá trị dược liệu và mang lại hiệu quả kinh tế cao. Ở Việt Nam, ba loài cây này đang đứng trước thách thức do các hệ sinh thái đang bị phá vỡ và tốc độ tuyệt chủng của các loài này nói riêng và thực vật nói chung ngày càng tăng (FAO, 2011). Tái sinh chồi trong điều kiện nuôi cấy *in vitro* của ba loài này để bảo tồn nguồn gen là việc cần thiết phục vụ cho khai thác sử dụng có hiệu quả quỹ gen và các nguồn gen quý hiếm, đặc hữu.

Đặc biệt, các đối tượng nguồn gen bản địa có giá trị kinh tế và khoa học cao (ví dụ: thạch học rỉ sắt, kim tuyến liên) và nguồn gen nhập nội (húng chanh Ấn Độ) là quan trọng trong việc bảo tồn cây dược liệu (Vũ Văn Liết, 2009).

Trong nghiên cứu này, tái sinh chồi các loài cây như thạch học rỉ sắt, kim tuyến liên, húng chanh Ấn Độ đang là loài dược liệu quý hiếm và đặc hữu có nguy cơ tuyệt chủng có giá trị kinh tế cao trong phát triển y dược đối loài cây bản địa và cây nhập nội. Việc nghiên cứu tìm ra môi trường tái sinh chồi để lưu giữ và bảo tồn trong điều kiện *in vitro* là cần thiết nhằm đảm bảo cho việc phát triển giống trong tương lai. Mục tiêu của nghiên cứu này là duy trì và bảo tồn nhân giống ba nguồn gen cây dược liệu quý (thạch học rỉ sắt, kim tuyến liên, húng chanh Ấn Độ) có giá trị kinh tế cao bằng phương pháp nuôi cấy mô.

* Một vài đặc điểm của các loài dược liệu nghiên cứu

- Thạch học rỉ sắt (*Dendrobium officinale* Kimura et Migo).

Thạch học rỉ sắt thuộc chi Thạch học họ Lan (Orchidaceae), có tên thường gọi là Thạch học rỉ sắt hay Thiết bì thạch học. Cây thường mọc tự nhiên ở vùng rừng núi có độ cao từ 1.000 - 3.400 m so với mặt nước biển, sống phụ sinh trên thân gỗ hay vách đá có mọc rêu dưới tán rừng, hoặc ở phần dốc núi râm mát, độ ẩm cao. Chúng được

phân bố rộng rãi ở nhiều nước trên thế giới tập trung châu Á như Lào, Trung Quốc, Myanma... (Hou *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2008). Cây sinh trưởng trong điều kiện môi trường tự nhiên độ ẩm 70%, nhiệt độ bình quân năm 12 - 18°C, lượng mưa 900 - 1.500 mm).

Thạch học rỉ sắt là loại dược liệu quý hiếm được các chuyên gia về dược liệu đánh giá cao, là loài cây giàu polysacarit, ancaloit (0,05%), các axit amin và nhiều chất khoáng như Ca, Mg, Mn, Cu, Ti, và các nguyên tố vi lượng khác. Ngoài ra thạch học rỉ sắt còn có một số hợp chất đặc thù như phenanthryl, bibenzyl, keton, ester và các chất nhầy, hợp chất amidon... Với các thành phần như vậy, thạch học rỉ sắt có tác dụng chống ung thư, chống lão hóa, tăng sức đề kháng của cơ thể, giảm đường huyết, mỡ máu, làm giãn mạch máu và chống đông máu (Lü G, 2013; Luo *et al.*, 2016; He *et al.*, 2016).

Ở Việt Nam, thạch học rỉ sắt là thích hợp với điều kiện khí hậu. Tuy nhiên, hiện nay loài dược liệu này là một trong danh sách thực vật có nguy cơ tuyệt chủng và được đưa vào "sách đỏ" (Sách đỏ Việt Nam, 2007). Để bảo tồn loại thạch học quý hiếm này cần phải nhân giống và có kế hoạch sản xuất dược liệu nhằm đem lại giá trị kinh tế cho người dân.

Bảo tồn nguồn gen thạch học rỉ sắt dựa trên nghiên cứu nhân giống *in vitro* ở nghiên cứu trước.

- Kim tuyến liên [*Anoectochilus roxburghii* (Wall.) Lindl].

Kim tuyến liên (*Anoectochilussetaceus* Blume) thuộc họ lan (Orchidaceae), chi *Anoectochilus* (Nguyễn Tập, 2006). Ngoài ra trong dân gian còn gọi kim tuyến liên, kim tuyến tơ, giải thủy tơ, lan gấm, cỏ nhung, kim cương... Cây sinh sống trên núi đá vôi, nhìn bề ngoài thân và lá màu tím trên mỗi chiếc lá có từ 3 - 5 lá sọc. Theo tài liệu y học thế giới, lan kim tuyến là loài cây thuốc rất đặc biệt có tác dụng tăng cường sức khỏe, làm khí huyết lưu thông, có tính kháng khuẩn, chữa các bệnh viêm khí quản, viêm gan mãn tính, chữa suy nhược thần kinh.

Hiện nay, loài lan dược liệu này có nguy cơ tuyệt chủng, vì chúng thường mọc rải rác mà số lượng không nhiều và đang bị khai thác cạn kiệt, mặt khác khả năng tái sinh của loài lan này trong tự nhiên rất thấp, đặc biệt là nơi môi trường sinh thái bị tàn phá. Lan kim tuyến được cấp báo thuộc nhóm IA của Nghị định 32/2006/CP, nghiêm cấm khai thác vì mục đích thương mại và nhóm thực vật rừng đang nguy cấp EN A1a,c,d, trong Sách Đỏ Việt Nam (Bộ Khoa học và Công nghệ, 2010). Vì vậy, việc bảo tồn và lưu giữ là việc cần thiết.

- Húng chanh Ấn Độ (*Coleus forskohlii*)

Húng chanh (*C. forskohlii*) là cây lâu năm nhưng được trồng hàng năm để làm dược liệu, có nguồn gốc ở Ấn Độ, mọc tự nhiên ở độ cao 600 - 1.800 m, trên sườn đồi có nắng và cao nguyên khô cần và bán khô cần ở các vùng ôn đới, cận nhiệt đới (Praveena R *et al.*, 2012). Cây sinh trưởng và phát triển thích hợp ở đất cát pha hoặc sét pha, có cấu trúc nhẹ, giàu dinh dưỡng, pH 5,5 - 7,0, độ ẩm từ 83% đến 95%, lượng mưa hàng năm 100 - 160 mm, và nhiệt độ từ 10 đến 25°C. Năng suất củ khô trung bình từ 800 đến 1.000 kg/ha. Trong trường hợp canh tác tốt, năng suất củ khô có thể đạt tới 2.000 - 2.200 kg/ha (Rajamani *et al.*, 2009). *C. forskohlii* là loài duy nhất của chi này có rễ củ có hoạt chất forskolin. Toàn bộ cây có mùi thơm. Lá và củ có mùi khá khác nhau. Một cây có thể cho từ 100 đến 500 g rễ củ, hàm lượng forskolin dao động trong khoảng 0,07% đến 0,58% chất khô. Hàm lượng tinh dầu trong rễ củ khô (12% độ ẩm) cao nhất có thể đạt được vào tháng thứ năm là 1,4%. Lá húng chanh được dùng chữa cảm cúm, ho hen, viêm họng ho ra máu, sốt cao, sốt không ra mồ hôi, nôn ra máu, chảy máu cam. Chúng là loài cây nhập

nội, cần được duy trì nhân giống nhằm mục tiêu bảo tồn và phát triển nguồn giống hiện có.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Vật liệu nghiên cứu: 03 loài thạch học ri sắt, kim tuyến liên và húng chanh Ấn Độ là các đoạn chồi được tạo ra từ các mắt hoặc đỉnh sinh trưởng của chồi cây được kế thừa các bình mẫu đã có trong phòng thí nghiệm của những đề tài nghiên cứu trước và tiếp tục nhân giống để duy trì, lưu giữ các loài cây này để đảm bảo nhân rộng các mẫu giống khi cần.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phương pháp tái sinh chồi các loài cây

Môi trường nuôi cấy cơ bản là môi trường MS (Murashige and Skoog, 1962) có bổ sung thạch agar (6,5 g/lít), đường (20 đến 30 g/lít), các chất kích thích sinh trưởng với nhiều nồng độ khác nhau, và nhiều chất phụ gia khác, pH môi trường được điều chỉnh tới 5,8 và khử trùng dưới áp suất 1,2 atm ở nhiệt độ 121°C trong 15 phút. Trong nghiên cứu này tùy thuộc vào từng loài cây mà có thể sử dụng thành phần môi trường khác nhau.

Bảng 1. Các loại công thức thí nghiệm được duy trì lưu giữ để nhân giống đối với từng loài cây

TT	Loài cây	Công thức MT	Môi trường- Nuôi cấy	Chất phụ gia	Nồng độ chất ĐHST
1	Thạch học ri sắt	CT1	MS	20 g/l saccarose + 10% nước dừa + 60 g/l chuối	0
		CT2			0,75 mg/l BA
		CT3			0,75 mg/l BA + 0,5 mg/l α-NAA
2	Kim tuyến liên	CT4	MS	30 g/l saccarose + 10% nước dừa	0
		CT5			1,5 mg/l Kinetin
		CT6			1,5 mg/l Kinetin + 0,75 mg/l BA
3	Húng chanh Ấn Độ	CT7	MS	30 g/l Sacarose	0
		CT8			0,25 mg/l BA
		CT9			0,5 mg/l BA

- Phương pháp lấy mẫu: Chọn bình mẫu để lấy là những bình không bị nấm bệnh, có khả năng tái sinh chồi tốt.

- Điều kiện nuôi cấy: Nhiệt độ trong các phòng nuôi cấy *in vitro* thường được duy trì bảo tồn trong điều kiện nhiệt độ khoảng $25 \pm 2^\circ\text{C}$. Ở nhiệt độ này, phù hợp với các thực vật sinh trưởng, phát triển.

2.2.3. Phương pháp xử lý số liệu

Các số liệu phân tích được thực hiện trên máy tính theo chương trình Excel.

2.3. Thời gian và địa điểm nghiên cứu

Thời gian thực hiện từ tháng 11 năm 2017 đến tháng 6 năm 2018 tại phòng thí nghiệm của Viện Dược liệu.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3. 1. Ảnh hưởng của thành phần môi trường đến khả năng nhân chồi của các loài cây

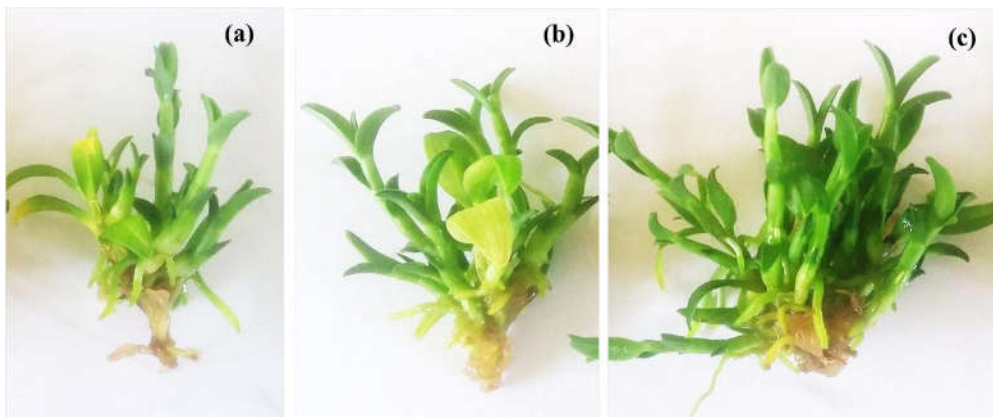
Môi trường cơ bản bao gồm các thành phần khoáng vi lượng và đa lượng, vitamin, các amino

acid, nguồn các carbon và các chất phụ gia khác là một trong những yếu tố quan trọng nhất trong sự sinh trưởng, phát triển hình thái của tế bào, mô thực vật thay đổi tùy theo loài và bộ phận nuôi cấy (Ngô Xuân Bình, 2009). Bên cạnh các khoáng chất, các chất phụ gia cung cấp dinh dưỡng cho nuôi cấy *in vitro*, việc bổ sung một hoặc nhiều chất điều hòa sinh trưởng như auxin, cytokinin là rất cần thiết để kích thích tăng trưởng, phát triển và phân hóa cơ quan, cung cấp sức sống tốt cho mô và các tổ chức.

Trong nghiên cứu này môi trường MS và chất phụ gia không thay đổi trong từng loài cây chỉ thay đổi trong việc bổ sung các chất điều hòa sinh trưởng (Bảng 2).

Kết quả này chỉ ra tùy từng cây sử dụng các chất điều hòa sinh trưởng khác nhau để phù hợp với sinh

trưởng và phát triển của từng cây: Thạch học ri sắt môi trường lựa chọn là MS + các chất phụ gia (20 g/l saccarose + 10% nước dừa + 60 g/l chuối) được duy trì, chỉ bổ sung các chất điều hòa sinh trưởng thay đổi trong cây. Trong cả 3 loại môi trường duy trì, lưu giữ trong quá trình nhân chồi, kết quả cho thấy sau 8 tuần nuôi cấy môi trường để nhân nhanh chồi cần bổ sung 0,75 mg/l BA + 0,5 mg/l α -NAA thích hợp cho tăng sinh và chồi trong ống nghiệm đạt trung bình 9,7 chồi/mẫu và chiều cao 3,26 cm/chồi, tuy nhiên ở môi trường bổ sung 0,75 mg/l BA và môi trường không bổ sung chất điều hòa sinh trưởng hệ số nhân chồi giảm 1/2 đến 1/3 số chồi chỉ đạt trung bình 5,53 chồi/mẫu và 3,35 chồi/mẫu, nhưng chiều cao của cây ở môi trường CT1 cao gấp đôi so với CT3 do các vitamin cung cấp lượng dinh dưỡng tạo cây kéo dài chồi và kìm hãm tái sinh chồi (Hình 1).



Hình 1. Thạch học ri sắt: (a) Môi trường MS; (b) MS + 0,75 mg/l BA và (c) MS + 0,75 mg/l BA + 0,5 mg/l α -NAA

Đối với kim tuyến liên, môi trường nuôi cấy MS + 30 g/l saccarose + 10% nước dừa, thay đổi khi bổ sung các chất điều hòa sinh trưởng, sau 8 tuần nuôi cấy môi trường phù hợp cho trong quá trình nhân chồi sử dụng môi trường bổ sung 1,5 mg/l Kinetin đạt trung bình 8,7 chồi/mẫu và chiều cao 3,7 cm/chồi. Nhưng khi kết hợp với BA 1 mg/l thì số lượng chồi giảm đạt trung bình 6,43 chồi/mẫu và chiều cao 2,08 cm/chồi. Đặc biệt trong quá trình không bổ sung các chất điều hòa sinh trưởng hệ số nhân chồi giảm sâu hơn đạt được 4,18 chồi/mẫu và chiều cao đạt 2,53 cm/chồi (Hình 2).

Húng chanh Ấn Độ, môi trường nuôi cấy sử dụng MS + 30 g/l sacarose và bổ sung ở BA ở các nồng độ 0,25 mg/l và 0,5 mg/l, kết quả chỉ ra ở công thức CT8 (MS + 0,25 mg/l BA) cho hệ số nhân chồi trung bình cao nhất đạt 7,8 chồi/mẫu và chiều cao trung bình là 2,27 cm, trong khi ở nồng độ CT9

(MS + 0,5 mg/l BA) hệ số nhân chồi và chiều cao giảm xuống trung bình 6,7 chồi /mẫu và 1,5 cm, các chồi tạo thành callus. Ngược lại, trong môi trường MS không bổ sung các chất điều hòa sinh trưởng hệ số nhân chồi giảm, chiều cao chồi tăng nhanh, cây xuất hiện rễ trung bình 4 rễ trên/cây, rễ nhỏ mảnh và có chiều dài trung bình 5 cm sau 8 tuần nuôi cấy. Điều này chứng tỏ rằng khi cây trong môi trường nhân chồi tích tụ các auxin/cytokine trong cây cao, khi chuyển sang môi trường MS, chúng tự tổng hợp, cân bằng quá trình trao đổi các chất dinh dưỡng trong cây tạo ra rễ, đặc biệt trong việc tự tổng hợp cân bằng chất auxin/cytokine húng chanh tạo cảm ứng sự hình thành và phát triển của cấu trúc lưu giữ rễ và củ, hình thành rễ bất định (Ngô Xuân Bình, 2009; Kim *et al.*, 2005) (Hình 2).

Kết quả này chứng tỏ rằng theo loài thực vật mà bổ sung các chất phụ gia như vitamin, và điều hòa

sinh trưởng khác nhau, do yêu cầu hàm lượng chất điều hòa sinh trưởng nội sinh của loài khác nhau. Như thạch học rỉ sắt thích hợp với việc kết hợp giữa cytokinin/auxin để tăng cường sinh trưởng của mẫu, điều này chứng tỏ rằng tỷ BA và NAA kết hợp với nhau tạo nồng độ thích hợp tạo nên sự cân bằng giữa cytokinin và auxin trong tạo chồi. Điều này đóng một vai trò quan trọng trong việc tái sinh chồi và sự phát sinh hình thái trong hệ thống nuôi cấy mô (Lương Thị Hoan và *ctv.*, 2017; Hoàng Minh Tấn và *ctv.*, 2006). Nhưng với loài kim tuyến liên và húng chanh Ấn Độ môi trường thích hợp khi bổ sung riêng rẽ chất cytokinin (Kinetin và BA) do các

chất này là chất hormone quan trọng trong sự hình thành và phát sinh chồi trong nuôi cấy mô, tạo chồi bất định, kéo dài chồi trong cây (Hoàng Minh Tấn và *ctv.*, 2006). Tuy nhiên thạch học rỉ sắt kim hãm hệ số nhân chồi và chiều cao cây khi môi trường chỉ bổ sung cytokinin (BA). Ở môi trường không bổ sung chất điều hòa sinh trưởng hệ nhân chồi trong các loài này giảm nguyên nhân do thiếu chất dinh dưỡng cho việc hình thành cơ quan sinh sản và dự trữ, nên không thể tái sinh chồi và sinh trưởng được (Hoàng Minh Tấn và *ctv.*, 2006). Ngoài ra, tùy thuộc vào thời gian để duy trì, lưu giữ trong điều kiện phòng thí nghiệm.



Hình 2. (a) Kim tuyến liên trong môi trường MS và (b) Húng chanh Ấn Độ trong môi trường MS + 0,25 mg/l BA

Kết quả này cũng khẳng định rằng môi trường nuôi cấy *in vitro* phù hợp cho việc nhân chồi của mỗi loài cây khác nhau như: thạch học rỉ sắt ở môi trường MS + 0,75 mg/l BA + 0,5 mg/l α -NAA, kim tuyến liên sử dụng môi trường MS + 0,25 mg/l BA là thích hợp cho tái sinh chồi khi cần nhân giống đây là môi trường để duy trì, lưu trữ trong phòng thí nghiệm (Bảng 2).

3.2. Vai trò của ánh sáng ảnh hưởng đến việc duy trì, bảo tồn nhân chồi các loài cây

Nguồn ánh sáng được sử dụng thông dụng trong nuôi cấy *in vitro* là ánh sáng huỳnh quang. Ánh sáng này điều khiển sự sinh trưởng và phát triển của thực vật thông qua hai con đường quang hợp và phát sinh hình thái. Ở các mô nuôi cấy, có ba yếu tố ánh sáng

tác động đến sinh trưởng của phát sinh hình thái đó là bước sóng, cường độ và thời gian chiếu sáng. Một số nghiên cứu chỉ ra ánh sáng có tác động đáng kể đến sự sinh trưởng, phát sinh hình thái và sự hình thành của các enzyme đặc hiệu cho quá trình hình thành các hợp chất thứ cấp flavonoid glycosides (George *et al.*, 2008).

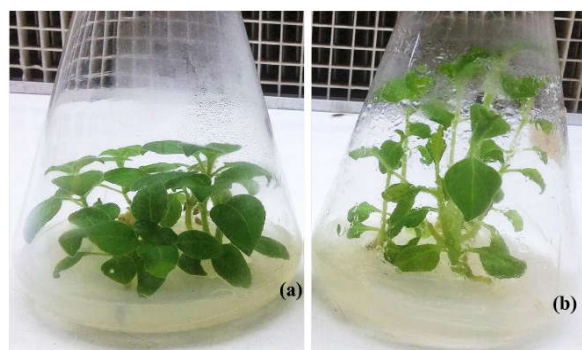
Trong nghiên cứu này, qua quá trình quan sát cho thấy ánh sáng có vai trò khác nhau trong quá trình hình thành chồi, kéo dài thân, chồi, rễ và việc tích lũy hoạt chất trong các cây húng chanh Ấn Độ, thạch học rỉ sắt, và kim tuyến liên. Nghiên cứu này duy trì và bảo tồn các loài thông thường trong điều kiện nhiệt độ 25 - 27°C, cường độ chiếu sáng đạt khoảng 2000 Lux, chu kì chiếu sáng là 14 giờ/ngày.

Tuy nhiên, khi giảm cường độ ánh sáng 1.500 lux chu kì chiếu sáng 12 giờ/ngày cây sinh trưởng và phát triển khác so chế độ chiếu sáng thông thường như thân cây gầy, lông thân các chồi dài, màu sắc lá cây xanh nhạt. Ngược lại tăng cường độ ánh sáng 2.500 lux; chu kì chiếu sáng chiếu sáng 16 giờ/ngày, thân cây mập, lá xanh đậm, lông thân ngắn (Hình 3).

Kết quả này chứng tỏ rằng ánh sáng có vai trò quan trọng trong quá trình tổng hợp các sắc tố, và quang hợp cây (Ngô Xuân Bình, 2009; George *et al.*, 2008). Vì vậy thời gian, cường độ và chu kì chiếu sáng ảnh hưởng trực tiếp đến sinh trưởng, phát triển chồi, hình thành màu sắc lá cây.

Bảng 2. Ảnh hưởng của thành phần môi trường đến khả năng nhân chồi của các loài cây sau 8 tuần nuôi cấy

TT	Loại cây	Công thức MT	Môi trường nuôi cấy	Chất phụ gia	Nồng độ chất ĐHST	Số chồi TB/mẫu	Chiều cao TB/chồi (cm)	Số rễ TB/cây	Chiều dài rễ TB/cây (cm)
1	Thạch học rỉ sắt	CT1	MS	20 g/l saccharose + 10% nước dừa + 60 g/l chuối	0	3,35	6,55	0	0
		CT2			0,75 mg/l BA	5,53	2,55	0	0
		CT3			0,75 mg/l BA + 0,5 mg/l α -NAA	9,76	3,26	2	1,5
2	Kim tuyến liên	CT4	MS	30 g/l saccharose + 10% nước dừa	0	4,18	2,53	0	0
		CT5			1,5 mg/l Kinetin	8,74	3,70	0	0
		CT6			1,5 mg/l Kinetin+ 0,75 mg/l BA	6,43	2,08	0	0
3	Húng chanh Ấn Độ	CT7	MS	30 g/l Sacarose	0	2,3	7,9	4	5,15
		CT8			0,25 mg/l BA	7,8	2,27	0	0
		CT9			0,5 mg/l BA	6,7	1,52	0	0



Hình 3. Húng chanh Ấn Độ: (a) chế độ chiếu sáng 16 giờ/ngày; (b) chế độ chiếu sáng 12 giờ/ngày



Hình 4. Kim tuyến liên: (a) chế độ chiếu sáng 16 giờ/ngày; (b) chế độ chiếu sáng 12 giờ/ngày

IV. KẾT LUẬN

Bảo tồn và lưu giữ ba loài cây dược liệu có giá trị kinh tế như thạch học rỉ sắt, kim tuyến liên, và húng chanh Ấn Độ trong điều kiện *in vitro* là cần thiết vì chúng là loài cây bản địa quý hiếm và nhập nội mang lại giá trị trong y dược. Việc duy trì trong điều kiện môi trường MS bổ sung các vitamin và chất điều hòa sinh trưởng phụ thuộc vào từng loại cây. Mỗi loài duy trì thích hợp với chất điều hòa sinh trưởng riêng rẽ khác nhau ví dụ thạch học rỉ sắt phù hợp với

phối hợp cytokine và auxin (0,75 mg/l BA + 0,5 mg/l α -NAA) và thêm số vitamin và chất phụ gia khác để đạt được hệ số nhân chồi cao 9,7 chồi. Nhưng đối với lan kim tuyến môi trường MS bổ sung thêm 1,5 mg/l kinetin là thích hợp cho việc nhân chồi đạt (8,7 chồi/mẫu), húng chanh Ấn Độ khi cần nhân nhanh có thể sử dụng môi trường MS bổ sung 0,25 mg/l BA đạt hệ số nhân chồi cao (7,8 chồi/mẫu). Tuy nhiên việc duy trì, lưu giữ trong phòng nên sử dụng môi trường MS bổ sung chất phụ gia thích hợp với các

để loài kéo dài chu kỳ cấy chuyển. Khi có nhu cầu về giống và nhân nhanh chúng ta có thể bổ sung các chất điều hòa sinh trưởng để phù hợp đáp ứng việc cung cấp giống cần.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Nguyễn Thị Lý Anh, Đinh Thị Phòng**, 2007. *Công nghệ nuôi cấy mô*. NXB Nông nghiệp. Hà Nội.
- Ngô Xuân Bình**, 2009. *Nuôi cấy tế bào thực vật cơ sở lý luận và ứng dụng*. Nhà xuất bản Khoa học kỹ thuật.
- Bộ Khoa học và Công nghệ**, 2010. Thông tư 18/2010/TT- BKHCN về việc quản lý nhiệm vụ khoa học và công nghệ quỹ gen.
- Lương Thị Hoan, Phan Thị Hương Trà, Hoàng Thị Như Nụ, Lê Việt Dũng, Dương Thị Phúc Hậu, Nguyễn Đăng Minh Chánh**, 2017. Nghiên cứu tổng quan nhân giống Sâm Ngọc Linh (*Panax Vietnamensis* Ha et Grush.) trong điều kiện *in vitro*. *Tạp chí Khoa học Lâm nghiệp*, số 4, trang 26-36.
- Dương Công Kiên**, 2002. *Nuôi cấy mô thực vật*. NXB Đại học Quốc gia TP. Hồ Chí Minh.
- Vũ Văn Liết**, 2009. *Giáo trình Quỹ gen và Bảo tồn Quỹ gen*. Trường Đại học Nông nghiệp I, trang 124-162.
- Hoàng Minh Tấn, Nguyễn Quang Thạch, Vũ Quang Sáng**, 2006. *Giáo trình sinh lý thực vật*. Nhà xuất bản Nông Nghiệp.
- Nguyễn Tập**, 2006. Danh lục đỏ cây thuốc Việt Nam. *Tạp chí Dược liệu*, 11(3): 97-105.
- Sách đỏ Việt Nam**, 2007. *Thực vật*. Nhà xuất bản Khoa học tự nhiên và Công nghệ.
- FAO**, 2011. Kế hoạch hành động toàn cầu lần thứ 2 về bảo tồn tài nguyên di truyền thực vật phục vụ mục tiêu lương thực và nông nghiệp.
- George E. F., Hall M. A., De Klerk G. J.**, 2008. Plant propagation by tissue culture. *Springer*, Dordrecht, The Netherlands 1: 501.
- He T.B, Huang Y.P, Yang L., Liu T.T., Gong W.Y., Wang X.J, Sheng J., Hu J.M.**, 2016. Structural characterization and immunomodulating activity of polysaccharide from *Dendrobium officinale*. *International Journal of Biological Macromolecules*; 83: 34-41.
- Hou B, Tian M, Luo J, Ji Y, Xue Q, Ding X.**, 2012. Genetic diversity assessment and *ex situ* conservation strategy of the endangered *Dendrobium officinale* (Orchidaceae) using new trinucleotide microsatellite markers. *Plant Systematics and Evolution*: 1483-1491.
- Kim Y. S.**, 2005. *Production of ginsenosides through bioreactor cultures of adventitious roots in ginseng (Panax ginseng C. A. Meyer)*. Ph.D thesis, Chungbuk National University, Chenogju, South Korea, 1-137.
- Li X, Ding X, Chu B, Zhou Q, Ding G, Gu S.**, 2008. Genetic diversity analysis and conservation of the endangered Chinese endemic herb *Dendrobium officinale* Kimura et Migo (Orchidaceae) based on AFLP. *Genetica*: 159-166.
- Liu J, Zhang L, Shen L, Wang F, Zhu H, Zhang G, Huang J, Yan Q.**, 2012. The adventitious bud induction and multiplication techniques of *Dendrobium officinale*: 14-16.
- Lü G. Y., Yan M. Q., Chen S. H.**, 2013. Review of pharmacological activities of *Dendrobium officinale* based on traditional functions. *China Journal of Chinese Materia Medica*; 38(4), 489-493.
- Luo Q. L., Tang Z. H., Zhang X. F., Zhong Y.H., Yao S.Z., Wang L.S., Lin C. W., Luo X.**, 2016. Chemical properties and antioxidant activity of a water-soluble polysaccharide from *Dendrobium officinale*. *International Journal of Biological Macromolecules*; 89:219-227.
- Pravveena R, Pandian A. S., Jagedeesan M.**, 2012. *In vitro* Culture Studies On medicinal herb - *Coleus forskohlii* Briq. Libyan Agriculture Research Center International 3: 30- 35.
- Rajamani K, Vadivel E**, 2009. Marunthu Kurkan - Medicinal Coleus. In: *Naveena Mulikai Sagupaddi Thozhil Nuttpangal*, Tamil Nadu Agricultural university, Coimbatore, pp. 17- 22.
- Zhanga A, Wanga H, Shaoa Q, Xua M, Zhang W, Li M.**, 2015. Large scale *in vitro* propagation of *Anoectochilus roxburghii* for commercial application: Pharmaceutically important and ornamental plant. *Industrial Crops and Products* 70: 158-162.
- Ye M, Hou B, Luo J, Yana W, Liu W, Dinga X**, 2015. Genetics diversity and conservation of the endangered herb *Dendrobium moniliforme* based on amplified fragment length polymorphism markers. *Journal of Scientia Horticulturae*, (189) 51- 58.

Effect of *in vitro* culture medium on shoot regeneration of three medicinal species for conservation

Luong Thi Hoan, Ta Nhu Thuc Anh, Duong Thi Phuc, Hoang Thi Nhu Nu, Vu Hoai Sam, Vu Thi Hong Trang

Abstract

Genetic conservation of endemic, rare and high economic valuable medicinal plants such as *Dendrobium officinale*, *Anoectochilus roxburghii* and *Coleus forskohlii* in *in vitro* condition plays an important role to maintain and conserve valuable materials for the future. The objective of this study was to maintain, conserve and propagate the above

three medicinal species by tissue culture. The results indicated that the medium composition affected the shoot regeneration. The fast or slow process of shoot regeneration depended on the cultural medium and supplemented plant growth regulators as: *Dendrobium officinale* reached 9.7 shoots/sample on average; 3.26 cm of shoot length in medium of MS+ 20 g/l saccharose + 10% coconut water + 60 g/l banana + 0.75 mg/l BA + 0.5 mg/l α -NAA (CT3) which gave the best shoot regeneration. For *Anoetochilus roxburghii*, an average shoot per sample and height were 8.74 and 3.7 cm, respectively, in the medium of MS + 30 g/l saccharose + 10% of coconut water + 1.5 mg/l Kinetin (CT5) while *Coleus forskohlii* was cultured in MS media and supplemented with 30 g/l Sacarose + 0.25 mg/l BA (CT8); the best number of average shoots per sample reached 7.8 and the height was 2.8 cm. These results suggested that the growth regulators and various additives need to be appropriately supplemented depending on shoot regeneration of each plant species in invitro condition. The study result can be used as a basis to maintain and propagate the medical plants under temperature and light conditions of the laboratory.

Keywords: Genetic conservation, propagation, shoot regeneration, light condition, *in vitro*

Ngày nhận bài: 17/7/2018

Ngày phản biện: 24/7/2018

Người phản biện: TS. Trần Thị Thu Hoài

Ngày duyệt đăng: 18/9/2018

ĐẶC ĐIỂM SINH HỌC CỦA CHỦNG VI KHUẨN ĐỐI KHÁNG NẤM *Neoscytalidium dimidiatum* GÂY BỆNH ĐỐM NÂU TRÊN CÂY THANH LONG

Nguyễn Văn Giang¹, Phùng Thị Lệ Quyên¹, Nguyễn Văn Thành²

TÓM TẮT

Nghiên cứu này được thực hiện với mục đích phân lập và tuyển chọn chủng vi khuẩn có khả năng đối kháng nấm *Neoscytalidium dimidiatum* gây bệnh trên cây Thanh long. Từ các mẫu đất vùng rễ cây Thanh long thu từ tỉnh Lạng Giang, Tiên Giang và Long An, 3 chủng vi khuẩn đối kháng mạnh với nấm *N. dimidiatum* được tuyển chọn. Chủng YMĐ1 có khả năng đối kháng mạnh nhất trong ba chủng, hiệu lực đối kháng dao động từ 60 - 67,5% sau 7 ngày và từ 58,9 - 64,4% sau 12 ngày đồng nuôi cấy. Chủng YMĐ1 có khả năng sinh tổng hợp các enzyme cellulase, amylase, protease, chitinase, tổng hợp siderophores, IAA và phân giải phosphate khó tan. Kết quả so sánh trình tự nucleotide 16S rRNA của chủng YMĐ1 với dữ liệu trên ngân hàng NCBI cho thấy chủng này có quan hệ gần gũi với loài *Bacillus vezenensis*.

Từ khóa: Thanh long, bệnh trên cây thanh long, *Neoscytalidium dimidiatum*, *Bacillus* sp.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Cây thanh long (*Hylocereus undulatus* Haw.) thuộc họ Xương rồng, đây là cây ăn quả nhiệt đới, thích hợp khí hậu nắng nóng, chịu hạn tốt, không chịu được úng; sau khi trồng một năm cây bắt đầu cho quả. Việt Nam là nước nhiệt đới, có khí hậu nóng ẩm, thích hợp với sự phát triển và sinh trưởng của cây thanh long. Tuy nhiên, nhiệt độ cao, lượng mưa lớn cũng là điều kiện thuận lợi cho vi sinh vật phát triển và gây hại. Vi nấm là một trong những tác nhân gây nhiều bệnh trên thanh long như bệnh đốm nâu (do nấm *Neoscytalidium dimidiatum*), bệnh thán thư (do nấm *Coletotrichum gloeosporioides*), bệnh thối đầu cành (do nấm *Alternaria* sp.). Các bệnh này ảnh hưởng đến sinh trưởng phát triển của cây, giảm năng suất, chất lượng quả, giá trị thương phẩm, gây thiệt hại lớn cho người trồng thanh long.

Bệnh đốm nâu do nấm *Neoscytalidium dimidiatum* gây ra là một trong những bệnh hại nghiêm trọng nhất. Bệnh gây hại làm cho cành thanh long bị sần sùi, gây thối khô từng mảng. Trên quả, những đốm làm cho vỏ quả trở nên sần sùi, thối khô làm giảm giá trị thương phẩm nghiêm trọng.

Các biện pháp canh tác, biện pháp hóa học đã được đưa vào áp dụng để phòng trừ các bệnh nấm gây ra trên thanh long, tuy nhiên các biện pháp này vẫn còn những hạn chế như chưa tiêu diệt triệt để nguồn bệnh, việc sử dụng các loại thuốc hóa học, thuốc bảo vệ thực vật gây tác động xấu đến môi trường, ảnh hưởng đến sức khỏe con người. Biện pháp sinh học sử dụng các vi sinh vật đối kháng được xem là biện pháp hiệu quả, thân thiện, an toàn với môi trường. Hiện nay, các nghiên cứu về vi sinh vật đối kháng nấm gây bệnh trên thanh long chưa

¹ Khoa Công nghệ sinh học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

² Viện Di truyền Nông nghiệp