

NHÂN GIỐNG VÔ TÍNH CÂY NGƯU TẮT (*Achyranthes bidentata* Blume) TỪ CHỒI BẰNG KỸ THUẬT NUÔI CẤY MÔ

Nguyễn Thị Hồng Gấm¹, Bùi Văn Thăng¹

TÓM TẮT

Nhân giống cây Ngưu tất bằng kỹ thuật nuôi cấy mô đã được nghiên cứu thành công, với hệ số nhân giống cao: Chồi non chứa mắt ngủ khử trùng bằng 0,1% (w/v) HgCl₂ trong thời gian 4 phút và nuôi cấy trên môi trường MS + 0,3 mg/l BAP + 30 g/l sucrose cho tỷ lệ mắt sạch tái sinh chồi (72,5%) sau 4 tuần nuôi cấy; tỷ lệ chồi tái sinh tạo cụm chồi (95,7%), 12,2 số chồi/mẫu cấy và 92,5% chồi hữu hiệu sau 4 tuần nuôi cấy trên môi trường MS + 0,3 mg/l BAP + 0,1 mg/l Kin + 0,1 mg/l NAA + 30 g/l sucrose; tỷ lệ chồi ra rễ đạt 94,8% và trung bình 7,2 rễ/chồi sau 3 tuần nuôi cấy trên môi trường MS + 0,3 mg/l IBA + 0,2 mg/l NAA + 30 g/l sucrose. Cây hoàn chỉnh được huấn luyện 10 ngày trong nhà lưới cho thích nghi dần với điều kiện tự nhiên, cây con trồng trên giá thể đất đồi tầng B và cát (tỷ lệ 3:1), cho tỷ lệ cây sống đạt 83,3% sau 2 tuần ra ngôi. Quy trình này có thể áp dụng để sản xuất cây giống Ngưu tất chất lượng tốt phục vụ công tác bảo tồn nguồn gen và phát triển loài cây dược liệu quý này.

Từ khóa: Cây Ngưu tất, nhân giống vô tính, nuôi cấy mô

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Cây Ngưu tất (*Achyranthes bidentata* Blume) là một trong những loài cây thuốc quan trọng của họ Amaranthaceae. Ngưu tất là một loài cây thảo mộc, lâu năm được tìm thấy ở nhiều vùng nhiệt đới ở châu Á và châu Phi bao gồm Việt Nam, Trung Quốc, Ấn Độ, Java, Nhật Bản, v.v. (Chopra, 1958; Đỗ Tất Lợi, 1999). Cây này có chứa nhiều chất phytochemicals như alkaloids (achyranthine), rutin, axit oleanolic, axit caffeic, polysaccharides, saponin, terpenoids, triterpenoid, sitosterol, stigmasterol, ecdysterone, rubrosterone, v.v hầu hết đều có giá trị trị liệu (Nguyen *et al.*, 1995; Nguyen and Doan, 1989). Các bộ phận khác nhau của cây được sử dụng có hiệu quả để điều trị một số bệnh như ho, hen, sốt, phát ban da, tiêu chảy, tiểu đường, đau răng, viêm loét, viêm khớp, bệnh về gan và thận, giảm huyết áp, tăng cường tuần hoàn máu, kích thích miễn dịch (Chandra and Pandey 1983; Manandhar, 2002; Zhao *et al.*, 2004). Do có giá trị nên loài cây dược liệu này đã bị khai thác quá mức, dẫn đến khan hiếm ngoài tự nhiên. Vì vậy, việc nghiên cứu nhân giống, bảo tồn và phát triển nguồn gen loài cây Ngưu tất là cần thiết hiện nay.

Trong những năm gần đây, kỹ thuật nuôi cấy mô đã được áp dụng cho việc bảo tồn nguồn gen và nhân giống nhiều loài cây thuốc. Với sự hỗ trợ của phương pháp nuôi cấy mô, có thể tạo ra một số lượng lớn các cây giống từ một nguồn mẫu hạn chế trong khoảng thời gian ngắn nhất. Một số nghiên cứu về mô nuôi cấy cây Ngưu tất cũng được báo cáo, tuy nhiên tần suất tái sinh chồi từ các loại mẫu cấy là rất thấp; thậm chí có sự khác nhau về tỷ lệ tái sinh khi nuôi cấy cùng một loại mẫu (Dong *et al.*, 2002;

Li *et al.*, 2004; Wesely *et al.*, 2012; Md. Jakir *et al.*, 2013). Trong nhân giống *in vitro*, mỗi giống xuất xứ khác nhau thì hiệu suất nhân giống khác nhau. Do đó, đối với mỗi giống cần xác định được môi trường nhân giống phù hợp mới đem lại hiệu quả. Trong công trình này, thông báo kết quả nghiên cứu nhân giống thành công cho loài cây Ngưu tất thu mẫu tại tỉnh Hà Giang, Việt Nam bằng kỹ thuật nuôi cấy mô.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Vật liệu nghiên cứu là đoạn chồi non của cây Ngưu tất sinh trưởng, phát triển tốt và không bị sâu bệnh đã được tuyển chọn tại Hà Giang, do Trung tâm Giống cây trồng Đạo Đức, Hà Giang cung cấp.

Môi trường dinh dưỡng khoáng cơ bản MS, (Murashige and Skoog, 1962).

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Khử trùng và nuôi cấy khởi động

Các đoạn chồi (15 - 20 cm) được rửa sạch bằng nước máy, ngâm mẫu trong nước xà phòng loãng 5 - 10 phút và rửa sạch xà phòng. Sau đó, mẫu được cho vào các bình thủy tinh có nút vặn và đưa vào tủ cấy vô trùng; khử trùng bề mặt bằng dung dịch cồn 70% trong 30 giây; tiếp theo khử trùng mẫu bằng 0,1% (w/v) HgCl₂ trong các khoảng thời gian khác nhau (2; 3; 4; 5; 7 phút), tráng lại bằng nước cất vô trùng (5 lần) và thấm khô bằng giấy thấm. Các đoạn chồi sau khi khử trùng được cắt thành các đoạn ngắn (khoảng 2 cm) chứa mắt ngủ và cấy lên môi trường cơ bản MS bổ sung 0,3 mg/l BAP và 30 g/l sucrose, nuôi dưới ánh sáng gián đoạn trong 4 tuần để mẫu cấy tái sinh chồi.

¹ Viện Công nghệ sinh học Lâm nghiệp, Đại học Lâm nghiệp

2.2.2. Nhân nhanh chồi từ chồi chứa mắt ngủ

Các mẫu cấy tái sinh chồi sau 4 tuần nuôi cấy từ thí nghiệm trên được cắt thành các mẫu nhỏ (1,0 cm) chứa mắt ngủ và cấy lên môi trường MS bổ sung chất điều hòa sinh trưởng (ĐHST) với hàm lượng khác nhau (0,1 - 0,5 mg/l) BAP + (0,1 và 0,2 mg/l) NAA + (0,1 và 0,3 mg/l) Kinetin (bảng 2); nuôi trong 4 tuần dưới ánh sáng gián đoạn để khảo sát khả năng tái sinh chồi.

2.2.3. Ra rễ tạo cây hoàn chỉnh

Các cụm chồi được tạo ra từ thí nghiệm trên được sử dụng để làm vật liệu nghiên cứu. Dùng mũi dao tách các chồi đơn hữu hiệu có chiều cao $\geq 2,0$ cm ra khỏi cụm chồi và cấy lên môi trường kích thích chồi ra rễ tạo cây hoàn chỉnh, môi trường MS bổ sung chất ĐHST khác nhau (0,1 - 0,5 mg/l) IBA và (0,2 và 0,3 mg/l) NAA (Bảng 3). Các bình chồi được nuôi 3 tuần dưới ánh sáng gián đoạn, chồi ra rễ tạo cây con hoàn chỉnh.

2.2.4. Huấn luyện và ra ngoài

Các bình cây con ra rễ *in vitro* được đưa ra nhà lưới huấn luyện cây mô trong thời gian 10 ngày để cây thích nghi dần với điều kiện tự nhiên. Sau thời gian huấn luyện cây con cứng cáp lấy ra khỏi bình và rửa bộ rễ loại bỏ thạch bằng nước máy (rửa nhẹ nhàng tránh làm gãy rễ, dập thân). Sau đó, cây con được cấy vào 4 loại giá thể khác nhau để đánh giá tỷ lệ sống và chất lượng cây con (giá thể 100% đất đồi tầng B, 75% đất đồi tầng B và 25% cát, 50% đất đồi tầng B và 50% cát và 100% cát). Cây con được che chắn ánh sáng chiếu trực xạ bằng lưới đen, ngày tưới nước bằng cách phun sương 2 - 4 lần, đảm bảo độ ẩm $\geq 95\%$.

Tất cả các môi trường nuôi cấy được bổ sung thêm 30 g/l sucrose và 7 g/l agar, môi trường được chuẩn độ đến pH = 5,8; khử trùng ở 121°C trong 20 phút. Điều kiện phòng nuôi cấy: nhiệt độ phòng nuôi 25 \pm 2°C, cường độ ánh sáng dàn đèn 35 $\mu\text{Em}^{-2} \text{s}^{-1}$, thời gian chiếu sáng 14 h/ngày.

2.2.5. Phương pháp thu thập và xử lý số liệu

Mỗi thí nghiệm trên thực hiện ít nhất với 30 mẫu và 3 lần lặp lại; số liệu được xử lý thống kê bằng phần mềm SPSS (version 16.0) và phương pháp Duncan's test (Duncan, 1995) với mức sai khác có ý nghĩa $\alpha = 0,05$.

2.3. Thời gian và địa điểm nghiên cứu

Nghiên cứu được thực hiện từ tháng 2 năm 2016 đến 5 năm 2017 tại Phòng thí nghiệm Công nghệ nuôi cây mô tế bào và khu nhà lưới ra cây mô của Viện Công nghệ sinh học Lâm nghiệp, Đại học Lâm nghiệp.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Khử trùng tạo mẫu sạch *in vitro*

Các đoạn chồi non chứa mắt ngủ sau khi rửa sạch và sát khuẩn bề mặt bằng cồn 70% trong 30 giây và được khử trùng bằng 0,1% (w/v) HgCl_2 trong các khoảng thời gian khác nhau (2 - 7 phút), mẫu được nuôi cấy trên môi trường MS bổ sung 0,3 mg/l BAP + 30 g/l sucrose; sau 4 tuần nuôi cấy thu được kết quả như bảng 1. Tỷ lệ mẫu sạch và tái sinh chồi phụ thuộc vào nồng độ HgCl_2 và thời gian khử trùng. Kết quả thu được cho thấy ở cùng một nồng độ chất khử trùng HgCl_2 khi tăng (2 - 7 phút) thì tỷ lệ tạo mẫu sạch tăng (34 - 96,8%) theo tỷ lệ thuận, nhưng tỷ lệ mẫu sạch tái sinh chồi lại giảm mạnh theo tỷ lệ nghịch. Thời gian khử trùng trong 2 phút chỉ cho tỷ lệ mẫu sạch là 34% và tái sinh chồi là 32,2%; khi tăng thời gian khử trùng khoảng 3 - 4 phút cho tỷ lệ mẫu sạch (70,6 - 80,9%) và tái sinh chồi cao nhất (64,8 - 72,5%) (Hình 1A). Ngược lại, khi tăng thời gian khử trùng lên 5 - 7 phút thì cho tỷ lệ mẫu sạch đạt rất cao (92,9 - 96,8%) nhưng mẫu sạch lại mất khả năng tái sinh chồi, tỷ lệ mẫu tái sinh chồi chỉ đạt (4,0 - 17,6%), hầu hết chồi bị nâu đen và chết. HgCl_2 là một chất độc đối với tế bào sống, HgCl_2 không chỉ gây chết đối với vi sinh vật mà còn gây chết đối với mô - tế bào thực vật khi thời gian khử trùng kéo dài. Kết quả này phù hợp với quan sát của Wesely *et al.*, (2012) khi khử trùng tạo mẫu sạch từ chồi non *A. bidentata* sử dụng 0,1% (w/v) HgCl_2 , thời gian khử trùng 5 phút cho tỷ lệ mẫu sạch 100% nhưng 95 -100% chồi bị chết, thời gian khử trùng 3 phút là hiệu quả đối với chồi non; kết quả nghiên cứu cũng phù hợp với các báo cáo của Johnson *et al.* (2005) khi nghiên cứu tái sinh cây *Rhinacanthus nasutus*; Wesely *et al.* (2011) khi nhân giống cây *Alternanthera sessilis*. Các báo cáo cho thấy rằng việc khử trùng quá 5 phút sẽ gây chết mẫu, mẫu mất khả năng tái sinh chồi.

Bảng 1. Ảnh hưởng của thời gian khử trùng bằng 0,1% HgCl_2 đến tỷ lệ tạo mẫu sạch và tái sinh chồi

Thời gian khử trùng bằng 0,1% HgCl_2 (phút)	Tỷ lệ mẫu sạch (%) \pm SD	Tỷ lệ mẫu tái sinh chồi (%) \pm SD
2	34,0 \pm 4,2 d	32,2 \pm 3,5 c
3	70,6 \pm 6,3 c	64,8 \pm 4,0 b
4	80,9 \pm 4,7 b	72,5 \pm 3,8 a
5	92,9 \pm 2,3 a	17,6 \pm 4,3 d
7	96,8 \pm 2,9 a	4,0 \pm 1,5 e

Ghi chú: Trong phạm vi cùng một cột, các giá trị mang các chữ cái khác nhau chỉ sự sai khác có ý nghĩa thống kê ở mức $\alpha = 0,05$.

3.2. Nhân nhanh chồi cây Ngưu tất *in vitro*

Trong nuôi cấy mô tế bào thực vật, chất ĐHST thực vật ảnh hưởng rõ rệt và rất quan trọng đối với sự phát sinh hình thái của tế bào, kính thích hình thành chồi và rễ (Himanen *et al.*, 2002; Randy *et al.*, 2009). Trong nghiên cứu, các chất ĐHST thuộc nhóm cytokin (BAP, Kinetin) và auxin (NAA) đã được sử dụng bổ sung vào môi trường nuôi cấy để đánh giá khả năng tái sinh chồi từ đoạn chồi cây Ngưu tất chứa mắt ngủ nuôi cấy *in vitro*. Kết quả thu được cho thấy khi môi trường nuôi cấy MS bổ sung chất ĐHST ảnh hưởng rõ rệt đến tỷ lệ mẫu cảm ứng tái sinh chồi, số chồi/mẫu và tỷ lệ chồi hữu hiệu; cao hơn so với môi trường không bổ sung chất ĐHST. Đối với nuôi cấy chồi Ngưu tất chứa mắt ngủ trên môi trường MS không bổ sung chất ĐHST thì chồi vẫn tái sinh tạo cụm chồi nhưng chỉ đạt 12,9% và trung bình 4 chồi/mẫu cấy, chất lượng chồi kém (chồi mảnh, còi và yếu). Môi trường MS bổ sung chất ĐHST với hàm lượng khác nhau cho tỷ lệ mẫu cảm ứng tạo cụm chồi (61,5 - 95,7%), số chồi/mẫu cấy (5,8 - 12,2 chồi) và tỷ lệ chồi hữu hiệu (28 - 92,5%) (Bảng 2). Kết quả cho thấy khi sử dụng hàm lượng BAP khác nhau kết hợp với cùng một hàm lượng Kinetin (Kin) và NAA thì hiệu suất tái sinh chồi biến động lớn; hàm lượng (0,2 - 0,4 mg/l BAP) cho tỷ lệ mẫu tạo cụm chồi cao. Ở công thức môi trường bổ sung 0,2 mg/l NAA kết hợp với BAP và Kin cho tỷ lệ mẫu cảm ứng cụm chồi và số chồi/mẫu cấy khá cao nhưng tỷ lệ chồi hữu hiệu lại rất thấp,

chồi có chất lượng kém. Công thức môi trường MS bổ sung 0,3 mg/l BAP, 0,1 mg/l Kin và 0,1 mg/l NAA cho tỷ lệ mẫu tạo cụm chồi cao nhất (95,7%), 12,2 chồi/mẫu cấy và 92,5% chồi hữu hiệu (chồi ≥ 2 cm), chồi có chất lượng tốt (chồi cao, mập, thân và lá xanh đồng đều) đủ tiêu chuẩn cho ra rễ tạo cây hoàn chỉnh (Hình 1C). Trong nghiên cứu này, chúng tôi nhận thấy đối với chồi cây Ngưu tất sử dụng hàm lượng chất ĐHST (BAP, Kin, NAA) với hàm lượng thấp kích thích chồi tái sinh tốt, số chồi hữu hiệu cao, khi tăng hàm lượng chất ĐHST thì tỷ lệ chồi hữu hiệu giảm rõ rệt. Ngược lại, trong nghiên cứu của Wesely *et al.* (2012) khi chồi non *A. bidentata* trên môi trường chỉ bổ sung BAP hoặc Kin ở hàm lượng cao, kết quả cho thấy ở hàm lượng 3,0 mg/l BAP cho tỷ lệ mẫu cảm ứng tạo cụm chồi cao nhất (94,7%) và 4,6 chồi/mẫu cấy; ở hàm lượng 5,0 mg/l BAP cho tỷ lệ mẫu cảm ứng tạo cụm chồi (79,4%) và 9,5 chồi/mẫu cấy; Kinetin ở hàm lượng 2,0 mg/l cho tỷ lệ mẫu cảm ứng tạo cụm chồi (82,4%) và 2,7 chồi/mẫu cấy là cao nhất. Theo báo của Md. Jakir *et al.*, (2013) khi nghiên cứu tái sinh chồi *A. bidentata* từ đoạn chồi chứa mắt ngủ sử dụng BAP ở nồng độ cao kết hợp với NAA ở nồng độ thấp cho thấy công thức có 3,0 mg/l BAP + 0,5 mg/l NAA cho tỷ lệ tạo cụm chồi (96,67%) và chỉ đạt 5,6 chồi/mẫu cấy là công thức tốt nhất. Trong nghiên cứu này, việc kết hợp giữa 3 loại chất ĐHST (BAP, Kin và NAA) ở nồng độ thấp trong môi trường đã kích thích mẫu tái sinh chồi hiệu quả; điều này sẽ tiết kiệm được hóa chất trong sản xuất, giảm giá thành cây giống.

Bảng 2. Ảnh hưởng của chất ĐHST đến khả năng tái sinh chồi của đoạn chồi chứa mắt ngủ

Chất điều hòa sinh trưởng (mg/l)			Tỷ lệ mẫu tạo cụm chồi (%) \pm SD	Số chồi/mẫu cấy \pm SD	Tỷ lệ chồi hữu hiệu (%) \pm SD	Chất lượng chồi
BAP	Kin	NAA				
-	-	-	12,9 \pm 2,7 g	4,0 \pm 0,5 f	0,0 \pm 0,0 h	*
0,1	0,1	0,1	61,5 \pm 3,7 f	6,7 \pm 0,5 e	63,0 \pm 6,8 d	**
0,2			85,3 \pm 2,9 c	10,6 \pm 0,7 b	89,6 \pm 2,8 a	***
0,3			95,7 \pm 3,2 a	12,2 \pm 0,4 a	92,5 \pm 1,7 a	***
0,4			93,5 \pm 2,7 ab	9,2 \pm 0,6 c	79,5 \pm 3,6 b	**
0,5			90,6 \pm 2,2 abc	6,4 \pm 0,8 e	75,4 \pm 2,7 b	**
0,1	0,3	0,2	88,3 \pm 4,3 bc	5,8 \pm 0,3 e	68,9 \pm 3,3 c	**
0,2			92,7 \pm 2,3 ab	6,2 \pm 0,5 e	54,6 \pm 3,6 e	*
0,3			84,8 \pm 2,4 c	8,8 \pm 0,4 cd	35,3 \pm 2,7 f	*
0,4			78,8 \pm 3,6 d	8,1 \pm 0,5 d	30,6 \pm 3,5 fg	*
0,5			70,5 \pm 4,4 e	8,5 \pm 0,2 cd	28,0 \pm 2,3 g	*

Ghi chú: Trong phạm vi cùng một cột, các giá trị mang các chữ cái khác nhau chỉ sự sai khác có ý nghĩa thống kê ở mức $\alpha = 0,05$. * chất lượng chồi kém (chồi mảnh, còi, yếu); ** chất lượng chồi khá (chồi trung bình, mọng nước, xanh); *** chất lượng chồi tốt (chồi cao, mập, thân và lá xanh đồng đều).

3.3. Kích thích chồi ra rễ tạo cây hoàn chỉnh *in vitro*

Chất điều hòa sinh trưởng thực vật IBA và NAA thuộc nhóm auxin là các chất có hiệu quả cao trong việc ra rễ của chồi cây nuôi cấy *in vitro*. Nuôi cấy ra rễ chồi cây *A bidentata*, Wesely *et al.* (2012); Md. Jakir *et al.* (2013) chỉ sử dụng IBA ở nồng độ (1,0 - 1,5 mg/l) cho tỷ lệ chồi ra rễ cao. Trong nghiên cứu này, đánh giá khả năng ra rễ chồi Ngưu tất trên môi trường MS bổ sung IBA và NAA ở nồng độ thấp (0,1 - 0,5 mg/l IBA) và (0,2 hoặc 0,3 mg/l NAA). Kết quả cho thấy, ở các công thức môi trường bổ sung chất ĐHST (IBA và NAA) chồi ra rễ với tỷ lệ cao (77,5 - 94,8%), ngược lại ở công thức môi trường không bổ sung chất ĐHST thì chồi không có dấu hiệu ra rễ (bảng 3). Số rễ trung bình/chồi ở các công thức bổ sung chất ĐHST dao động từ 5,2 - 7,8 rễ. Công thức môi trường MS bổ sung 0,3 mg/l IBA và 0,2 mg/l NAA cho tỷ lệ chồi ra rễ cao nhất 94,8% và 7,2 rễ/chồi (hình 1 D,E). Theo báo cáo của Wesely *et al.*, (2012) khi môi trường nuôi cấy MS chỉ bổ sung IBA ở nồng độ 1,0 mg/l cho tỷ lệ chồi ra rễ là 74,7% và 9,4 rễ/chồi; Md. Jakir *et al.* (2013) nuôi cấy chồi *A bidentata* trên môi trường MS bổ sung 1,5 mg/l IBA cho tỷ lệ chồi ra rễ là 97,78% và 15,8 rễ/mẫu cấy; môi trường ½ MS bổ sung 1,5 mg/l IBA cho tỷ lệ chồi ra rễ là 77,33% và 10,6 rễ/mẫu cấy, cao nhất trong các công thức thí nghiệm. Trong nghiên cứu này, chúng tôi nhận thấy môi trường bổ sung kết hợp giữa IBA và NAA ở nồng độ thấp nhưng hiệu quả ra rễ cao. Khi sử dụng hàm lượng auxin cao gốc chồi thường bị mô sẹo hóa, ảnh hưởng đến tỷ lệ sống khi ra cây.

Bảng 3. Ảnh hưởng của chất ĐHST đến khả năng ra rễ *in vitro* của chồi

Chất điều hòa sinh trưởng (mg/l)		Tỷ lệ chồi ra rễ (%) ± SD	Số rễ trung bình/chồi ± SD
IBA	NAA		
-	-	0,0 ± 0,0 d	0,0 ± 0,0 e
0,1	0,2	77,5 ± 2,5 c	5,2 ± 0,4 d
0,3		94,8 ± 3,1 a	7,2 ± 0,4 ab
0,5		85,6 ± 2,6 b	7,3 ± 0,2 ab
0,1	0,3	85,7 ± 5,1 b	6,4 ± 0,6 c
0,3		90,3 ± 2,6 ab	7,8 ± 0,3 a
0,5		87,5 ± 2,5 b	6,6 ± 0,6 bc

Ghi chú: Trong phạm vi cùng một cột, các giá trị mang các chữ cái khác nhau chỉ sự sai khác có ý nghĩa thống kê ở mức $\alpha = 0,05$.

3.4. Trồng cây Ngưu tất nuôi cấy mô ra vườn ươm

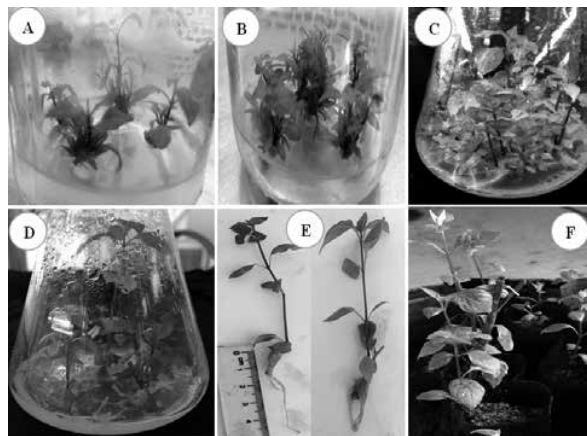
Sau khi chồi ra rễ tạo cây hoàn chỉnh, các bình

cây được huấn luyện trong nhà lưới có mát che (thời gian 10 ngày) để cây thích nghi dần với điều kiện môi trường tự nhiên. Sau thời gian huấn luyện, cây được rửa sạch loại bỏ thạch dưới vòi nước chảy và được cấy vào chậu đã chuẩn bị với các thành phần giá thể khác nhau (bảng 4) để đánh giá tỷ lệ sống của cây mô. Sau 2 tuần trồng, tỷ lệ cây sống ra lá mới trên các loại giá thể khác nhau dao động từ 56,7% đến 83,3%. Giá thể đất đồi tầng B phối trộn với cát tạo sự thông thoáng tốt nên cho tỷ lệ cây sống cao. Tỷ lệ cây sống cao nhất là 83,3% trồng trên giá thể 75% đất và 25% cát, cây sinh trưởng, phát triển tốt (hình 1F). Theo báo cáo của Md. Jakir *et al.* (2013) ra cây Ngưu tất nuôi cấy mô trên giá thể đất vườn và phân ủ (tỷ lệ 1: 1), đất được hấp vô trùng cho tỷ lệ cây sống gần 80% sau 28 ngày ra ngôi.

Bảng 4. Ảnh hưởng của thành phần giá thể ruột bầu đến tỷ lệ sống của cây Ngưu tất nuôi cấy mô

Loại giá thể	Tỷ lệ cây sống (%)	Chất lượng cây con
100% đất	66,7	*
75% đất - 25% cát	83,3	***
50% đất - 50% cát	80,6	***
100% cát	56,7	**

* Cây con có thân cứng cáp, lá và bộ rễ phát triển chậm; ** Cây con có thân yếu, bộ rễ phát triển tốt; *** Cây con có thân cứng cáp, lá và bộ rễ phát triển rất tốt



Hình 1. Nhân giống *in vitro* cây Ngưu tất (*A. bidentata*)

A: Chồi tái sinh trên môi trường MS + 0,3 mg/l BAP + 30 g/l sucrose sau 4 tuần nuôi cấy; B, C: Mẫu tái sinh tạo cụm chồi trên môi trường MS + 0,3 mg/l BAP + 0,1 mg/l Kin + 0,1 mg/l NAA + 30 g/l sucrose sau 4 tuần nuôi cấy; D: Chồi ra rễ trên môi trường MS + 0,3 mg/l IBA + 0,2 mg/l NAA + 30 g/l sucrose sau 3 tuần nuôi cấy; E: Cây hoàn chỉnh; F: Cây con trồng trên giá thể 75% đất đồi tầng B + 25% cát sau 2 tuần ra ngôi.

IV. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

4.1. Kết luận

Quy trình nhân giống vô tính cây Ngưu tất từ chồi bằng kỹ thuật nuôi cấy mô đã được nghiên cứu thành công, với hệ số nhân giống cao: Chồi non chứa mắt ngủ khử trùng bằng 0,1% (w/v) HgCl₂ trong thời gian 4 phút và nuôi cấy trên môi trường MS + 0,3 mg/l BAP + 30 g/l sucrose cho tỷ lệ mẫu sạch tái sinh chồi (72,5%) sau 4 tuần nuôi cấy; tỷ lệ chồi tái sinh tạo cụm chồi (95,7%), 12,2 số chồi/mẫu cấy và 92,5% chồi hữu hiệu sau 4 tuần nuôi cấy trên môi trường MS + 0,3 mg/l BAP + 0,1 mg/l Kin + 0,1 mg/l NAA + 30 g/l sucrose; tỷ lệ chồi ra rễ đạt 94,8% và trung bình 7,2 rễ/chồi sau 3 tuần nuôi cấy trên môi trường MS + 0,3 mg/l IBA + 0,2 mg/l NAA + 30 g/l sucrose. Cây hoàn chỉnh được huấn luyện 10 ngày trong nhà lưới cho thích nghi dần với điều kiện tự nhiên, cây con trồng trên giá thể đất đồi tầng B và cát (tỷ lệ 3:1), cho tỷ lệ cây sống đạt 83,3% sau 2 tuần ra ngôi.

4.2. Đề nghị

Đề nghị áp dụng quy trình nhân giống vô tính cây Ngưu tất bằng kỹ thuật nuôi cấy mô này để sản xuất cây giống.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Đỗ Tất Lợi**, 1999. *Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam*. NXB Y học.
- Chandra, K. H. Pandey**, 1983. Collection of plants around agora-Dodital in Uttarkashi district, at U.P., Medicinal value and folklore claim. *INT. J. Crude Drug Res.* 21: 21-28.
- Chopra, R.N.**, 1958. "Indigenous Drugs of India" Art Press, Calcutta, 457-462.
- Dong, C.M. L.P. Zhang, J. Liu**, 2002. Study on tissue culture of *Achyranthes Bidentata*. *Henan Tradit. Chin. Med.*, 22 (4): 63-64.

- Himanen, K. E. Boucheron, S. Vanneste, E.J. de Almeida, D. Inze, T. Beeckman**, 2002. Auxin-mediated cell cycle activation during early lateral root initiation. *Plant Cell*, 14: 2339-2351.
- Li, M.J. X.L. Yu, M.X. Chen, M.J. Yang, X.L. Zhang**, 2004. Induction of callus and plantlet regeneration of *Achyranthes bidentata*. *Plant Physiol. Commun.* 40(3): 343.
- Manandhar, N.P.**, 2002. *Plants and People of Nepal*. Timber Press. Oregon. ISBN 0-88192-527-6.
- Md. Jakir, H. K. Laila, Al-F. Mohammad**, 2013. Development of an efficient *in vitro* micropropagation protocol for medicinally important plant *Achyranthes bidentata* Blume. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 2(4): 6-13.
- Murashige, T. and F. Skoog**, 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. plant*, 15: 473-497.
- Nguyen, T. S. Nikolov, T.D. Nguyen**, 1995. Chemical research of the aerial parts of *Achyranthes bidentata* Blume. *Tạp chí Dược học*, 6:17-18.
- Nguyen, V.D. and T.N. Doan**, 1989. *Medicinal Plants in Vietnam*. World Health Organization. ISBN 92 9061 1014.
- Randy, O.C. C.C. Hexon Angel, M.R. Lourdes, L.B. Jose**, 2009. The role of microbial signals in plant growth and development. *Plant Signal Behav*, 4(8): 701-712.
- Wesely, E.G. M.A. Johnson, R.B. Mohanamathi, and M.S. Kavitha**, 2012. *In vitro* clonal propagation of *Achyranthes aspera* L. and *Achyranthes bidentata* Blume using nodal explants. *Asian Pac J Trop Biomed.*, 2(1): 1-5.
- Zhao, X.M. G.Z. Xu, J.L. Li**, 2004. Progress in modern pharmacological study of *radix cyathulae* and *Achyranthes bidentata*. *West China J Pharm Sci.* 19(3): 205-207.

***In vitro* clonal propagation of medicinally important plant *Achyranthes bidentata* Blume from nodal explants**

Nguyen Thi Hong Gam, Bui Van Thang

Abstract

Achyranthes bidentata Blume belongs to the family Amaranthaceae and are found to possess lots of medicinal properties. A procedure for *in vitro* clonal propagation of this plant has been developed. The result showed that the optimal method for young shoots sterilization was soaked in 0.1% HgCl₂ for 4 minutes. The nodal explants were then grown *in vitro* on MS medium supplemented with 0.3 mg/l BAP and 30 g/l sucrose, by which the regeneration rate achieved 72.5% after 4 weeks of culture. MS medium supplemented with 0.3 mg/l BAP, 0.1 mg/l kinetin, 0.1 mg/l NAA, and 30 g/l sucrose was the optimal medium for multi-shoot regeneration (95.7% and 12.2 shoots/nodal explant). The percentage of potential shoots (which are more than 2.0 cm in length) was 92.5% after 4 weeks of culture. 94.8% shoots have rooted on MS medium containing 0.3 mg/l IBA, 0.2 mg/l NAA, and 30 g/l sucrose, with the remarkable figures being 7.2 roots/shoot after 3 weeks of culture. The survival rate of plantlets archived 83.3% after transplanting to pots of 75% soil and 25% sand. This procedure can be applied for mass production of *A. bidentata* for conservation and the development of this medicinal plant.

Key words: *Achyranthes bidentata* Blume, clonal propagation, tissue culture

Ngày nhận bài: 12/6/2017

Người phản biện: TS. Trần Danh Sửu

Ngày phản biện: 17/6/2017

Ngày duyệt đăng: 25/6/2017

NGHIÊN CỨU SỬ DỤNG CHẾ PHẨM NANO TRONG NUÔI CẤY MÔ CÂY MÍA (*Saccharum officinarum* L.)

Đồng Huy Giới¹, Ngô Thị Ánh²

TÓM TẮT

Nghiên cứu này đã xác định được: (i) 150 ppm nano bạc để khử trùng mẫu Roc 22 với tỷ lệ mẫu sống sạch đạt trên 75%; (ii) tỷ lệ lớn các mảnh lá *in vitro* (96,70%) tạo mô sẹo ở môi trường có bổ sung 6 ppm nano bạc và 96,67% mẫu mô sẹo bật chồi trong môi trường bổ sung 4 ppm nano bạc; (iii) Môi trường nhân chồi bổ sung 4 ppm nano bạc cho tỷ lệ tái sinh cũng như chất lượng chồi cấp 1 từ mẫu ngọn mang chồi bên là tốt nhất, 100% mẫu bật chồi; bổ sung 4 ppm nano bạc vào môi trường nhân chồi với hệ số nhân chồi cấp 1 là 15,64 (lần) và 6 ppm vào môi trường nhân chồi từ chồi cấp 2 với hệ số nhân 9,43 (lần); (iv) Môi trường bổ sung 4 ppm nano bạc cho tỷ lệ chồi ra rễ 100%, 14,63 rễ/chồi.

Từ khóa: Giống mía Roc 22, nuôi cấy mô, nano bạc

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Cây mía (*Saccharum officinarum* L.) là nguồn nguyên liệu chính của ngành công nghiệp chế biến đường. Đường mía hiện chiếm trên 60% tổng sản lượng đường thô của toàn thế giới. Ngoài ra, mía còn là nguyên liệu hoặc trực tiếp hoặc gián tiếp của nhiều ngành công nghiệp. Ở Việt Nam, ngành mía đường đã và đang được ưu tiên đầu tư phát triển. Tuy nhiên, một trong những khó khăn cơ bản của ngành mía đường nước ta là các giống mía trồng hiện đang bị suy thoái, giảm năng suất và tăng chi phí thuốc phòng trừ sâu bệnh. Nuôi cấy mô là biện pháp an toàn nhất trong cung cấp giống sạch bệnh, làm phục tráng, trẻ hóa, sạch bệnh, tăng năng suất mía một cách đáng kể so với trồng bằng ngọn (Hoàng Thị Kim Hoa, 2004). Giống mía ROC22 có cây khỏe, cho năng suất cao, có khả năng thích nghi rộng với nhiều loại đất từ đất bãi ven sông đến đất pherarit ở vùng đồi thấp cho đến đất phù sa trong đê. Vì vậy, nó góp phần khai thác tốt hơn tiềm năng đất đai ở nhiều địa phương nhất (Phan Thị Thu Hiền và *ctv.*, 2009).

Tuy nhiên, nhân giống *in vitro* nói chung vẫn gặp phải thách thức là sự nhiễm nấm và vi khuẩn gây ảnh hưởng lớn tới hiệu suất và chất lượng cây. Hiện nay, người ta thường sử dụng một số chất khử trùng như $HgCl_2$, $CaClO_2$, gây độc hại cho người và các sinh vật khác. Ngoài ra, các hóa chất trên có hiệu quả chưa cao mà còn làm giảm hệ số nhân chồi và mô cấy chậm phát triển (Kharrazi *et al.*, 2011). Trong những năm gần đây, nhiều nghiên cứu đã chứng minh rằng vật liệu nano mà đặc biệt là nano bạc có khả năng diệt khuẩn một cách hiệu quả, ngoài ra nano bạc còn có tác động tích cực đến quá trình phát sinh hình thái của cây *in vitro* (Rostami A and Shahsavari A, 2012). Vì vậy, trong báo cáo này, nano

bạc đã được nghiên cứu sử dụng để nâng cao hiệu quả nhân giống mía ROC22.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

- Giống mía ROC22 (*Saccharum officinarum* L.) do Trung tâm khảo kiểm nghiệm giống, sản phẩm cây trồng và phân bón Quốc gia nhập nội và sản xuất thử từ năm 2004.

- Chế phẩm nano bạc kích thước 15 - 20 nm, được điều chế tại Bộ môn Sinh học, Khoa Công nghệ sinh học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam.

2.2. Thời gian và địa điểm nghiên cứu

- Thời gian nghiên cứu: Từ tháng 7 năm 2016 đến tháng 5 năm 2017.

- Địa điểm nghiên cứu: Phòng Công nghệ sinh học - Trung tâm Nghiên cứu ứng dụng và Phát triển Công nghệ sinh học Thanh Hóa.

2.3. Phương pháp nghiên cứu

2.3.1. Khử trùng mẫu tạo vật liệu khởi đầu:

- Khử trùng cơ bản: Ngọn mía được cắt bỏ phần lá, phần bẹ, lá già, lau sạch bằng cồn etanol 70°. Sau đó đưa ngọn vào box vô trùng, tách lấy phần ngọn với lá non.

- Khử trùng mẫu bằng chế phẩm nano: Sử dụng nano bạc với các nồng độ 50; 100; 150; 200 ppm lắc mẫu trong 60 phút. Lô đối chứng là các mẫu được lắc trong dung dịch nước cất vô trùng. Mẫu được nuôi cấy trong môi trường MS* là MS cơ bản (Murashige, T. and Skoog, F., 1962) có thiamin 1 mg/l và 150 ml/l nước dừa và ở thời điểm sau 9 ngày nuôi cấy xác định tỷ lệ mẫu sạch sống, tỷ lệ mẫu sống.

¹ Học viện Nông nghiệp Việt Nam

² Trung tâm Nghiên cứu ứng dụng và Phát triển Công nghệ sinh học Thanh Hóa