

## XÂY DỰNG HỆ THỐNG TÁI SINH TỪ NUÔI CÂY LÁT MỎNG TẾ BÀO CÂY CỬ DÒM (*Stephania dielsiana* Y. C. Wu)

Nguyễn Văn Việt<sup>1</sup>, Nguyễn Thị Thùy Dương<sup>2</sup>, Trần Việt Hà<sup>3</sup>, Phạm Thị Huyền<sup>4</sup>

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

<sup>4</sup>Trường Cao đẳng Y tế Ninh Bình

### TÓM TẮT

Củ dòm (*Stephania dielsiana* Y. C. Wu) là cây dược liệu phổ biến có thể mang lại giá trị kinh tế cao. Nhân giống *in vitro* thông qua nuôi cấy lát mỏng tế bào là một phương pháp tiềm năng cho phép tạo ra lượng lớn cây con có năng suất và chất lượng tốt. Tuy nhiên, phương pháp này vẫn còn khá hạn chế ở Việt Nam. Kết quả nghiên cứu cho thấy, sát khuẩn bề mặt mẫu thân non bằng ethanol 70% trong 1 phút, sau đó khử trùng bằng dung dịch HgCl<sub>2</sub> 0,1% trong 7 phút và nuôi cấy trên môi trường dinh dưỡng MS (Murashige T. và Skoog F., 1962) bổ sung 0,3 mg/l 6-benzylaminopurine (BAP); 30 g/l sucrose và 6,5 g/l agar cho tỉ lệ mẫu sạch là 85,96%, tái sinh chồi đạt 70,84% sau thời gian 4 tuần nuôi cấy. Cầm ứng tạo mô sẹo và tái sinh chồi trên môi trường MS bổ sung 1,2 mg/l BAP; 0,2 mg/l Kinetin; 0,3 mg/l NAA cho tỷ lệ mẫu tạo mô sẹo 80,83%, mẫu tái sinh chồi đạt tỷ lệ 78,30% với thời gian tái sinh 19,13 ngày. Cầm ứng tạo đa chồi trên môi trường MS bổ sung 0,7 mg/l BAP; 0,2 mg/l Kinetin; 0,3 mg/l NAA cho hiệu quả nhân nhanh và kích thích tăng trưởng chồi tốt nhất, hệ số nhân chồi đạt 3,3 lần, chiều cao chồi đạt 3,83 cm, chồi mập, khỏe và có màu xanh. Chồi ra rễ đạt 96,68% và chiều dài rễ trung bình 2,74 cm khi nuôi trên môi trường MS bổ sung 0,2 mg/l NAA; 0,3 mg/l IBA sau 4 tuần.

**Từ khóa:** Cây dược liệu, Củ dòm, mô sẹo, nuôi cấy *in vitro*, nuôi cấy lát mỏng, vi nhân giống.

### 1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Loài Củ dòm (*Stephania dielsiana* Y. C. Wu) là một vị thuốc nam mang nguồn gen quý đã được phát hiện ở Việt Nam được ghi trong Sách đỏ Việt Nam (2007), thuộc họ Tiết dê (Menispermaceae) là một loài thực vật có hoa trong họ Biền bức cát, chứa nhiều hoạt chất dược liệu quý. Nhiều nghiên cứu đã chỉ ra rằng trong loài Củ dòm có chứa alkaloid bao gồm: L-tetrahydropalmin (rotundian), stephrin, roemerin có tác dụng giảm đau, an thần hiệu quả, gây tê niêm mạc, giãn mạch, hạ huyết áp, điều hòa hô hấp và tim mạch. Cepharanthin được tìm thấy trong Củ dòm có tác dụng kích thích miễn dịch và làm giảm nhẹ một cách hữu hiệu những tác dụng phụ của thuốc chống ung thư (Nguyễn Thượng Dong và cộng sự, 2006). Ở Củ dòm còn phát hiện cepharanthin có tác dụng ức chế 2 dòng tế bào ung thư đại trực tràng và ung thư gan, ức chế sự phát triển của trực khuẩn lao. Ngoài ra, Củ dòm còn làm vật trang trí, làm cảnh được nhiều người ưa chuộng. Hiện nay, loài Củ dòm đang ở mức cảnh báo tuyệt chủng ở cấp VU b1+ 2 b,c (Sách đỏ Việt Nam, 2007) nên cần được bảo tồn và phát triển nguồn gen quý hiếm này. Nhân giống bằng phương pháp nuôi cấy *in vitro* đặc biệt là nuôi cấy lát mỏng tế bào (TCL) có thể giải quyết nhanh chóng bài toán trên.

Kỹ thuật nuôi cấy lát mỏng tế bào đã được phát triển hơn 30 năm được áp dụng thành công đối với nhiều loài thực vật (Da Silva, 2003) hoặc tạo giống cây trồng chuyển gen (Nhut và cộng sự, 2001) mà những phương pháp nuôi cấy truyền thống khác còn gặp khó khăn. Trong vài năm trở lại đây, phương pháp này được nghiên cứu ứng dụng tại một số phòng nuôi cấy mô ở Việt Nam và đã đem lại hiệu quả đáng kể trong quá trình nhân nhanh một số đối tượng như: Phong lan (Nguyễn Quang Thạch và cộng sự, 2000), Dứa (Nguyễn Quang Thạch và cộng sự, 2004), *Dendrobium aducum* (Nguyễn Thanh Tùng và cộng sự, 2010), *Spilanthus acmella* (Singh và cộng sự, 2009), *Sesamum indicum* (Chattopadhyaya và cộng sự, 2010), *Lilium* (Nhut và cộng sự, 2001; 2002), Hoa cúc vàng (Nguyen Van Viet, 2017).

Bài báo này, công bố kết quả nghiên cứu tái sinh chồi *in vitro* loài Củ dòm từ vật liệu lát mỏng tế bào đạt hiệu quả cao nhằm cải tiến quy trình nhân giống loài Củ dòm phục vụ thương mại hóa giống cây dược liệu có giá trị kinh tế cao này.

### 2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

#### 2.1. Vật liệu nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu: Cây Củ dòm (*Stephania dielsiana* Y. C. Wu) khỏe mạnh, không sâu bệnh được thu thập ngoài tự nhiên

tại Vườn quốc gia Ba Vì và trồng tại vườn ươm Viện Công nghệ sinh học Lâm nghiệp;

Vật liệu nghiên cứu: Thân non cây Củ dòm được dùng làm vật liệu khởi đầu;

Hóa chất dùng để khử trùng mẫu: dung dịch  $HgCl_2$  0,1%; cồn 96<sup>0</sup>;

Môi trường sử dụng trong thí nghiệm nuôi cấy lát mỏng cây Củ dòm là môi trường MS (Murashige và Skoog, 1962), đây là môi trường giàu dinh dưỡng đã được dùng tương đối phổ biến trong nuôi cấy mô tế bào thực vật. Các loại vitamin ( $B_1$ ,  $B_2$ ,  $B_6$ ,  $B_{12}$ ); các chất điều hòa sinh trưởng thực vật (ĐHST): Benzyl amino purine (BAP), Kinetin, Naphthyl acetic acid (NAA).

## 2.2. Phương pháp nghiên cứu

*Tạo mẫu sạch:* Mẫu thân non được rửa sạch bằng nước máy, đem lặt rửa bằng dung dịch xà phòng loãng 3 - 4 lần rồi loại bỏ hết xà phòng, tráng lại thật sạch bằng nước cất, sát khuẩn bề mặt mẫu thân non bằng ethanol 70% trong 1 phút. Khử trùng mẫu bằng  $HgCl_2$  0,1%, với các thời gian khác nhau (5 - 8 phút). Sau mỗi lần dùng hóa chất để khử trùng đều phải tráng rửa mẫu bằng nước cất vô trùng.

*Nuôi cấy khởi động:* Sau khi khử trùng, dùng dao hoặc kéo sắc cắt phần bột hai đầu của mẫu (phần bị thối hóa chất). Phần còn lại cắt thành các đoạn có hích thước 3 - 5 cm (có ít nhất 01 mắt ngủ). Cây mẫu trên môi trường nuôi cấy khởi động là môi trường dinh dưỡng cơ bản MS bổ sung 0,3 mg/l BAP nhằm kích thích tái sinh chồi nhanh cung cấp vật liệu cho nghiên cứu tiếp theo (Nguyễn Quang Thạch và cộng sự, 2000; 2004; Nguyen Van Viet và cộng sự, 2017; Nguyễn Thanh Tùng và cộng sự, 2010).

*Nuôi cấy lát mỏng:* Các chồi *in vitro* thu thập ở thí nghiệm trên được dùng để cắt lát mỏng, dùng dao sắc cắt ngang chồi thành các lát mỏng (độ dày lát mỏng được kiểm tra bằng dụng cụ panme có giá trị 0,4 - 1,6 mm) và cấy lên môi trường dinh dưỡng cơ bản MS bổ sung 0,5 mg/l BAP; 0,2 mg/l NAA; 30 g/l sucrose; 6,5 g/l agar, theo dõi kết quả trong 5 tuần (Nguyễn Quang Thạch và cộng sự, 2000; 2004; Nguyen Van Viet và cộng sự, 2017; Nguyễn

Thanh Tùng và cộng sự, 2010).

*Tạo mô sẹo và tái sinh chồi:* Các mẫu sạch được cấy chuyển sang môi trường tạo mô sẹo và tái sinh chồi là môi trường khoáng cơ bản MS bổ sung 0,4 - 1,2 mg/l BAP; 0 - 0,3 mg/l NAA; 0 - 0,2 mg/l Kinetin; 30 g/l sucrose; 6,5 g/l agar. Sau 5 tuần nuôi cấy, thống kê số mẫu tạo mô sẹo, số mẫu tái sinh chồi và thời gian mẫu tái sinh chồi (Nguyễn Van Viet và cộng sự, 2017).

*Nhân nhanh chồi:* Các chồi tái sinh từ lát cắt được cấy lên môi trường nhân nhanh chồi với thành phần môi trường khoáng cơ bản MS bổ sung 0,3 - 1,1 mg/l BAP; 0,3 mg/l NAA; 0,2 mg/l Kinetin; 30 g/l sucrose; 6,5 g/l agar. Sau 5 tuần nuôi cấy, thống kê tổng số chồi tạo thành và chiều cao chồi (Nguyễn Quang Thạch và cộng sự, 2000; 2004; Nguyen Van Viet và cộng sự, 2017; Nguyễn Thanh Tùng và cộng sự, 2010).

*Tạo cây hoàn chỉnh:* Các chồi có chiều cao từ 3 - 4 cm thu được từ quá trình nhân nhanh sẽ được chuyển sang môi trường kích thích ra rễ tạo cây hoàn chỉnh với thành phần môi trường khoáng cơ bản MS bổ sung 0 - 0,5 mg/l IBA; 0 - 0,5 mg/l NAA; 30 g/l sucrose; 6,5 g/l agar. Sau 4 tuần khi chồi đã ra rễ, thống kê số chồi ra rễ, số rễ, chiều dài rễ (Nguyễn Van Viet và cộng sự, 2017).

Tất cả các môi trường nuôi cấy được điều chỉnh pH = 5,8 và khử trùng ở nhiệt độ 118<sup>0</sup> C trong 17 phút, mẫu được nuôi dưới ánh sáng đèn neon, thời gian chiếu sáng 14 giờ/ngày, cường độ chiếu sáng 2000 - 3000 lux, nhiệt độ phòng nuôi 25 ± 2<sup>0</sup> C.

Các thí nghiệm được bố trí trong các bình thủy tinh hình trụ (3 - 5 mẫu/bình 200 ml), mỗi công thức thí nghiệm sử dụng ≥ 30 mẫu, lặp lại 3 lần. Số liệu được xử lý bằng phần mềm Excel.

## 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### 3.1. Tạo mẫu sạch *in vitro*

Mẫu thân non loài Củ dòm sau khi làm sạch và khử trùng bằng dung dịch  $HgCl_2$  0,1% với 5 công thức khác nhau về thời gian. Sau 4 tuần nuôi cấy trên môi trường nuôi cấy khởi động, kết quả nghiên cứu được trình bày ở bảng 1.

**Bảng 1. Ảnh hưởng của thời gian khử trùng bằng HgCl<sub>2</sub> 0,1% đến hiệu quả tạo mẫu sạch**

CTTN	Thời gian (phút)		Tỷ lệ mẫu sạch (%)	Tỷ lệ tái sinh (%)
	Lần 1	Lần 2		
KT <sub>1</sub>	3	2	32,04	22,06
KT <sub>2</sub>	4	2	62,01	48,67
KT <sub>3</sub>	5	2	72,45	61,85
KT <sub>4</sub>	4	3	85,96	70,84
KT <sub>5</sub>	4	4	89,26	28,67

$$F_{tính} = 128,93 > F_{0,05} = 4,66$$

Qua kết quả (Bảng 1) cho thấy, với thân non loài Củ dòm, khi khử trùng trong thời gian 5 phút thì tỉ lệ mẫu sạch rất thấp chỉ đạt 32,04%, mẫu có màu xanh. Khi tăng thời gian khử trùng lên 6 đến 7 phút (KT<sub>2</sub>, KT<sub>3</sub>, KT<sub>4</sub>) tỉ lệ mẫu sạch tăng lên rõ rệt (62,01 - 85,96%), tái sinh chồi cũng tăng theo tỷ lệ thuận (48,67 - 70,84%), mẫu xanh đều, đẹp. Khi thời gian khử trùng tăng lên 8 phút (KT<sub>5</sub>) thì tỉ lệ mẫu sạch tăng lên (89,26%), nhưng mẫu lại có màu thâm đen, khả năng tái sinh chồi kém (28,67%). Điều này cũng tương đối phù hợp bởi chất khử trùng là hóa chất rất độc, nếu khử trùng lâu hóa chất sẽ ngấm vào mô thực vật sẽ làm hỏng hoặc gây độc do đó chồi không thể phát sinh (Jaime A. và cộng sự, 2015).

Như vậy với thân non loài Củ dòm có thể dùng công thức khử trùng bằng HgCl<sub>2</sub> 0,1%

trong thời gian 7 phút (chia thành hai lần) cho hiệu quả tốt. Kết quả phân tích phương sai cũng cho thấy sự khác nhau ( $F_{tính} > F_{0,05}$ ), như vậy thời gian khử trùng khác nhau đã ảnh hưởng đến khả năng tạo mẫu sạch là có ý nghĩa.

### 3.2. Ảnh hưởng của môi trường dinh dưỡng đến khả năng tái sinh chồi từ lát mỏng

Môi trường dinh dưỡng là nhân tố quan trọng quyết định tới khả năng tạo mô sẹo và tái sinh chồi từ nuôi cấy lát mỏng. Với mỗi loài cây khác nhau, môi trường dinh dưỡng dùng để nuôi cấy cũng cần phải phù hợp. Do vậy, để phát huy tối đa khả năng tái sinh chồi, thí nghiệm tiến hành nuôi cấy chồi dựa trên 3 loại môi trường dinh dưỡng khác nhau. Kết quả nghiên cứu được trình bày ở bảng 2.

**Bảng 2. Ảnh hưởng của môi trường dinh dưỡng đến khả năng tái sinh chồi**

CTTN	Môi trường	Tỷ lệ tái sinh (%)	Chiều cao TB (cm)	Đặc điểm chồi
MT <sub>1</sub>	MS	43,33	1,0	+++
MT <sub>2</sub>	½ MS	30,00	0,5	++
MT <sub>3</sub>	WPM	20,00	0,3	+

$$F_{tính} = 104,75 > F_{0,05} = 4,06$$

Ghi chú: (+) xấu, đen, nhỏ, xốp; (++) trung bình, xanh, nhỏ, cứng; (+++) tốt, xanh, mập, cứng.

Từ kết quả thu được (Bảng 2), cho thấy tỷ lệ tái sinh chồi trung bình trên một mẫu lát mỏng ở các công thức môi trường khác nhau cho hiệu quả tái sinh khác nhau. Khi sử dụng môi trường MS các mẫu cho tỷ lệ tái sinh cao nhất (43,33%), với 2 môi trường còn lại là ½MS cho tỷ lệ 30% và WPM cho tỷ lệ 20%. Có thể lý giải, môi trường MS có hàm lượng các gốc kim loại như Mg<sup>++</sup>, K<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup>, Zn<sup>++</sup>, Mn<sup>++</sup>... ảnh hưởng đến cảm ứng tái sinh chồi từ các lát

mỏng. Môi trường ½ MS và WPM có hàm lượng kim loại thấp hơn so với MS nên cho tỷ lệ tái sinh không cao. Vì vậy, sử dụng môi trường MS thích hợp cho tái sinh chồi từ lát mỏng loài Củ dòm. Kết quả phân tích phương sai về ảnh hưởng của môi trường dinh dưỡng đến khả năng tái sinh chồi từ lát mỏng là khác nhau ( $F_{tính} > F_{0,05}$ ), chứng tỏ kết quả nghiên cứu có sự khác biệt giữa các công thức thí nghiệm là có ý nghĩa.

**3.3. Ảnh hưởng của kích thước lát mỏng đến khả năng tái sinh chồi**

Lát mỏng được cắt ra từ đoạn chồi *in vitro* với các kích thước khác nhau (0,4 - 1,6 mm),

sau đó được cấy trên môi trường khoáng cơ bản MS bổ sung 0,5 mg/l BAP; 0,2 mg/l NAA. Theo dõi thí nghiệm sau 5 tuần nuôi cấy, kết quả được trình bày ở bảng 3.

**Bảng 3. Ảnh hưởng của kích thước lát mỏng đến khả năng tái sinh chồi**

CTTN	Kích thước lát mỏng (mm)	Tỷ lệ tái sinh chồi (%)	Chiều cao TB/chồi (cm)	Đặc điểm chồi
MT <sub>4</sub>	0,4	41,11	1,00	+
MT <sub>5</sub>	0,7	51,11	1,20	++
MT <sub>6</sub>	1,0	61,10	1,80	+++
MT <sub>7</sub>	1,3	40,00	1,30	++
MT <sub>8</sub>	1,6	28,90	0,80	++

$$F_{\text{tính}} = 46,82 > F_{0,05} = 3,14$$

Ghi chú: (+) chồi xanh, nhỏ, cứng cáp; (++) chồi xanh, trung bình, cứng cáp; (+++) chồi xanh, mập, cứng cáp.

Mẫu lát mỏng loài Củ dòm có kích thước 0,4 mm (MT4) và 1,6 mm (MT8) cho tỷ lệ tái sinh thấp nhất lần lượt là 41,11%; 28,90% điều này cho thấy khi cắt lát quá mỏng mô bị tổn thương nhiều, còn khi cắt quá dày lát cắt khó tiếp xúc với môi trường dinh dưỡng để cảm ứng tạo mô sẹo và chồi. Khi tăng độ dày lát cắt thì tỷ lệ tái sinh tăng từ 41,11% đến 61,11% sau đó bắt đầu giảm xuống, chồi có đặc điểm tốt xanh, mập, cứng cáp. Như vậy, kích thước lát cắt từ 0,7 - 1,3 mm cho tỷ lệ tái sinh có thể chấp nhận được, tỷ lệ tái sinh cao nhất ở kích thước độ dày lát cắt là 1 mm (61,1%). Qua thí nghiệm, có thể lựa chọn lát cắt phù hợp cho tái sinh Củ dòm từ 0,7 - 1,3 mm. Kết quả phân tích phương sai về khả năng tái sinh chồi từ các lát cắt có kích thước khác nhau cho kết quả

khác biệt ( $F_{\text{tính}} > F_{0,05}$ ), chứng tỏ kết quả có sự khác nhau giữa các công thức thí nghiệm là có ý nghĩa.

**3.4. Tạo mô sẹo và tái sinh chồi**

Việc bổ sung Kinetin, BAP và NAA kích thích sự phân chia mạnh mẽ của tế bào, đặc biệt ảnh hưởng rõ rệt lên sự hình thành và phân hóa chồi (Nguyễn Văn Kết và cộng sự, 2010), dẫn đến hệ số nhân của chồi tăng lên rõ rệt. Thí nghiệm này được thiết kế với 9 công thức, trong đó có sự thay đổi về nồng độ chất điều hòa sinh trưởng thực vật. Môi trường sử dụng là môi trường dinh dưỡng cơ bản MS bổ sung 0,4 - 1,2 mg/l BAP; 0,2 mg/l Kinetin; 0,3 mg/l NAA. Kết quả thu được sau 5 tuần nuôi cấy được trình bày ở bảng 4.

**Bảng 4. Ảnh hưởng của chất ĐHST đến khả năng tạo mô sẹo và tái sinh chồi**

CT TN	ĐHST (mg/l)			Tỷ lệ mẫu tạo mô sẹo (%)	Tỷ lệ mẫu tái sinh chồi (%)	Thời gian tái sinh chồi (ngày)
	BAP	Kinetin	NAA			
ĐC	0,0	0,0	0,0	15,57	13,26	-
MC <sub>1</sub>	0,4	0,2	-	75,27	73,86	21,13
MC <sub>2</sub>	0,8	0,2	-	78,60	69,08	24,80
MC <sub>3</sub>	1,2	0,2	-	80,81	66,86	28,13
MC <sub>4</sub>	0,4	-	0,3	70,82	67,30	22,47
MC <sub>5</sub>	0,8	-	0,3	77,49	61,30	25,47
MC <sub>6</sub>	1,2	-	0,3	78,60	60,19	28,13
MC <sub>7</sub>	0,4	0,2	0,3	90,82	69,08	22,80
MC <sub>8</sub>	0,8	0,2	0,3	86,38	72,63	21,47
MC <sub>9</sub>	1,2	0,2	0,3	80,83	78,30	19,13

$$F_{\text{tính}} = 147,81 > F_{0,05} = 3,45$$

Qua kết quả ở bảng 4 cho thấy, khi bổ sung BAP (từ 0,4 mg/l lên 1,2 mg/l), có kết hợp hoặc không kết hợp với Kinetin (0,2 mg/l) và NAA (0,3 mg/l) cho tỷ lệ mẫu tạo mô sẹo giảm và tỷ lệ mẫu tái sinh chồi lại khác nhau. Các số liệu cho thấy, khi bổ sung BAP với nồng độ tăng cao và khi có mặt Kinetin có thể gây tác động kìm hãm hình thành mô sẹo, ưu tiên phân hóa tái sinh chồi.

Cụ thể là, nhóm công thức bổ sung đầy đủ cả 3 chất BAP, Kinetin và NAA (MC<sub>7-9</sub>) cho hiệu quả tạo mô sẹo và tái sinh chồi tốt hơn cả, tỷ lệ mẫu tạo mô sẹo đạt giá trị 80,83% (MC<sub>9</sub>) đến 90,82% (MC<sub>7</sub>), đồng thời thời gian mẫu tái sinh chồi giảm từ 22,8 ngày xuống 19,13 ngày. Tỷ lệ mẫu tạo mô sẹo giảm nhưng tỷ lệ mẫu tái sinh chồi lại tăng từ 69,08% (MC<sub>7</sub>) đến 78,3% (MC<sub>9</sub>), công thức MC<sub>9</sub> cho hiệu quả tái sinh chồi tốt, ở công thức này cho tỷ lệ tạo mô sẹo đạt 80,83%, tỷ lệ mẫu tái sinh chồi 78,3%, thời gian mẫu tái sinh chồi 19,13 ngày. Với nhóm công thức môi trường bổ sung thiếu NAA hoặc Kinetin (MC<sub>1</sub> đến MC<sub>6</sub>) đều cho tỷ lệ mẫu tạo mô sẹo và tái sinh chồi thấp hơn so với nhóm công thức bổ sung đầy đủ cả 3 loại chất điều hòa sinh trưởng (BAP, Kinetin, NAA), tỷ lệ mẫu tạo mô sẹo tại công thức MC<sub>1-6</sub> đạt 70,82% đến 80,81%, tỷ lệ mẫu tái sinh chồi đạt 60,19% đến 73,86%, thời gian tái sinh chồi từ 21,13

ngày đến 28,13.

Như vậy, công thức môi trường cho khả năng tạo mô sẹo và tái sinh chồi hiệu quả là công thức MC<sub>9</sub>, với môi trường dinh dưỡng cơ bản MS bổ sung 1,2 mg/l BAP; 0,2 mg/l Kinetin; 0,3 mg/l NAA, tỷ lệ mẫu tạo mô sẹo đạt 80,83%, tỷ lệ mẫu tái sinh đạt 78,30%, thời gian mẫu tái sinh nhanh 19,13 ngày. Kết quả phân tích phương sai cho thấy khả năng tái sinh chồi từ các công thức môi trường khác nhau ( $F_{tính} > F_{0,05}$ ), chứng tỏ kết quả có sự khác biệt giữa các công thức thí nghiệm là có ý nghĩa.

**3.5. Ảnh hưởng của nồng độ chất ĐHST đến khả năng nhân nhanh chồi**

Giai đoạn nhân nhanh và kích thích tăng trưởng chồi là giai đoạn quan trọng, then chốt quyết định hiệu quả và tốc độ của cả một quy trình nhân giống *in vitro*. Vì vậy, nghiên cứu kết hợp chất điều hòa sinh trưởng thuộc nhóm Cytokinin (BAP, Kinetin) và Auxin (NAA) vào môi trường nuôi cấy để kích thích chồi phân hóa nhanh và nhiều đồng thời kích thích chồi tăng trưởng về chiều cao. Thí nghiệm này được thiết kế với 5 công thức, trong đó dùng môi trường dinh dưỡng cơ bản MS bổ sung 0,3 - 1,1 mg/l BAP; 0,2 mg/l Kinetin; 0,3 mg/l NAA. Kết quả thu được sau 5 tuần nuôi cấy được trình bày ở bảng 5.

**Bảng 5. Ảnh hưởng của nồng độ chất ĐHST đến khả năng nhân nhanh chồi**

CTTN	Chất ĐHST (mg/l)			Tỷ lệ tạo chồi (%)	Số chồi TB (chồi)	Chiều cao chồi (cm)	Đặc điểm chồi
	Kinetin	NAA	BAP				
ĐC	0,0	0,0	0,0	10,00	0,65	0,78	+
NN <sub>1</sub>	0,2	0,3	0,3	40,67	1,67	2,83	++
NN <sub>2</sub>	0,2	0,3	0,5	61,67	2,30	3,30	++
NN <sub>3</sub>	0,2	0,3	0,7	91,67	3,30	3,83	+++
NN <sub>4</sub>	0,2	0,3	0,9	71,67	2,30	3,00	+++
NN <sub>5</sub>	0,2	0,3	1,1	42,67	1,78	2,50	++

$F_{tính} = 64,78 > F_{0,05} = 3,21$

Ghi chú: (+) chồi xấu, vàng, nhỏ, mềm; (++) TB, xanh, nhỏ, cứng; (+++) tốt, xanh, mập, cứng.

Từ kết quả bảng 5 cho thấy, nồng độ các chất ĐHST khác nhau ảnh hưởng tạo sự khác biệt đối với nhân nhanh chồi Củ dòm. Trong 5 công thức thí nghiệm ở giai đoạn nhân nhanh

chồi Củ dòm thì hệ số nhân chồi dao động khoảng 1,67 - 3,30. Công thức NN<sub>3</sub> cho hệ số nhân chồi cao nhất (3,30 lần), các chồi tạo thành đều có đặc điểm mập, xanh, khỏe, nhiều

lá và đồng đều. Kết quả trên cũng tương đồng với các nghiên cứu của Nguyễn Văn Vinh và cộng sự (2011). Vì vậy, sử dụng công thức môi trường MS bổ sung 0,2 mg/l Kinetin; 0,3 mg/l NAA; 0,7 mg/l BAP thích hợp cho nhân nhanh chồi cây Củ dòm. Kết quả phân tích phương sai cho thấy ảnh hưởng của tổ hợp chất ĐHST đến khả năng nhân nhanh chồi có sự khác nhau ( $F_{tính} > F_{0,05}$ ), chứng tỏ các công thức thí nghiệm khác nhau cho kết quả sai khác có ý nghĩa.

### 3.6. Kích thích ra rễ tạo cây hoàn chỉnh

Giai đoạn cuối cùng là tạo cây hoàn chỉnh, điều khiển biệt hóa chồi ra rễ tạo cây con (có

thân, lá và rễ đầy đủ). Hầu hết đều sử dụng chất điều hòa sinh trưởng thuộc nhóm auxin (NAA, IBA...) để kích thích ra rễ. Tuy nhiên, mỗi loài cây trồng lại có sự tích lũy hàm lượng auxin nội sinh khác nhau, vì vậy cần xác định được hàm lượng auxin bổ sung phù hợp cho ra rễ *in vitro* từng loài cây cụ thể. Trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng môi trường dinh dưỡng MS bổ sung các chất ĐHST có nồng độ khác nhau. Những chồi Củ dòm khỏe mạnh, xanh, mập, có chiều cao từ 3 - 4 cm, thu được từ quá trình nhân nhanh sẽ được chuyển sang môi trường tạo rễ. Kết quả thí nghiệm thu được sau 4 tuần theo dõi được trình bày trong bảng 6.

**Bảng 6. Ảnh hưởng của chất ĐHST đến khả năng ra rễ tạo cây hoàn chỉnh**

CTTN	Chất ĐHST (mg/l)		Tỷ lệ chồi ra rễ (%)	Số rễ TB/cây	Chiều dài rễ (cm)	Chất lượng cây con
	NAA	IBA				
R <sub>0</sub>	-	-	0,00	0,00	0,00	-
R <sub>1</sub>	0,3	-	65,00	2,80	1,60	+
R <sub>2</sub>	0,5	-	78,88	3,13	2,34	++
R <sub>3</sub>	-	0,3	88,89	3,18	2,33	++
R <sub>4</sub>	-	0,5	92,22	3,67	2,56	+++
R <sub>5</sub>	0,2	0,3	96,68	3,70	2,74	+++
R <sub>6</sub>	0,2	0,5	94,33	3,63	2,67	+++

$$F_{tính} = 199,61 > F_{0,05} = 3,15$$

Ghi chú: (+++) rễ phát triển tốt, trắng, mập, nhiều rễ phụ; (++) rễ phát triển khá, trắng, ít rễ phụ; (+) rễ phát triển kém.

Kết quả (Bảng 6) cho thấy, tất cả các công thức thí nghiệm đều cho kết quả cao, tỷ lệ chồi ra rễ đạt từ 65% trở lên. Tuy nhiên, công thức môi trường R<sub>5</sub> bổ sung đầy đủ cả IBA và NAA cho hiệu quả tạo rễ tốt nhất, tỷ lệ chồi ra rễ đạt 96,68%, số rễ TB/cây đạt 3,7 rễ, rễ dài 2,74 cm. Các công thức môi trường chỉ bổ sung riêng rẽ IBA hoặc NAA cho hiệu quả kém hơn so với các công thức bổ sung đầy đủ cả 2 loại, tỷ lệ chồi ra rễ đạt từ 65% (R<sub>1</sub>) đến 92,22% (R<sub>4</sub>); số rễ TB/cây đạt từ 2,8 rễ (R<sub>1</sub>) và 3,67 rễ (R<sub>4</sub>); chiều dài rễ cũng ngắn hơn chỉ đạt 1,6 cm (R<sub>1</sub>) đến 2,56 cm (R<sub>4</sub>).

Như vậy, công thức môi trường cho hiệu quả tạo rễ tốt là môi trường MS có bổ sung 0,2 mg/l IBA, 0,3 mg/l NAA, tỷ lệ chồi ra rễ đạt 96,68%, số rễ TB/chồi đạt 3,7 rễ, chiều dài rễ 2,74 cm, rễ dài và có màu trắng xanh. Kết quả

phân tích phương sai cho thấy sự khác nhau ( $F_{tính} > F_{0,05}$ ), nghĩa là nồng độ các chất ĐHST khác nhau có ảnh hưởng rõ rệt đến khả năng tạo rễ.

### 4. KẾT LUẬN

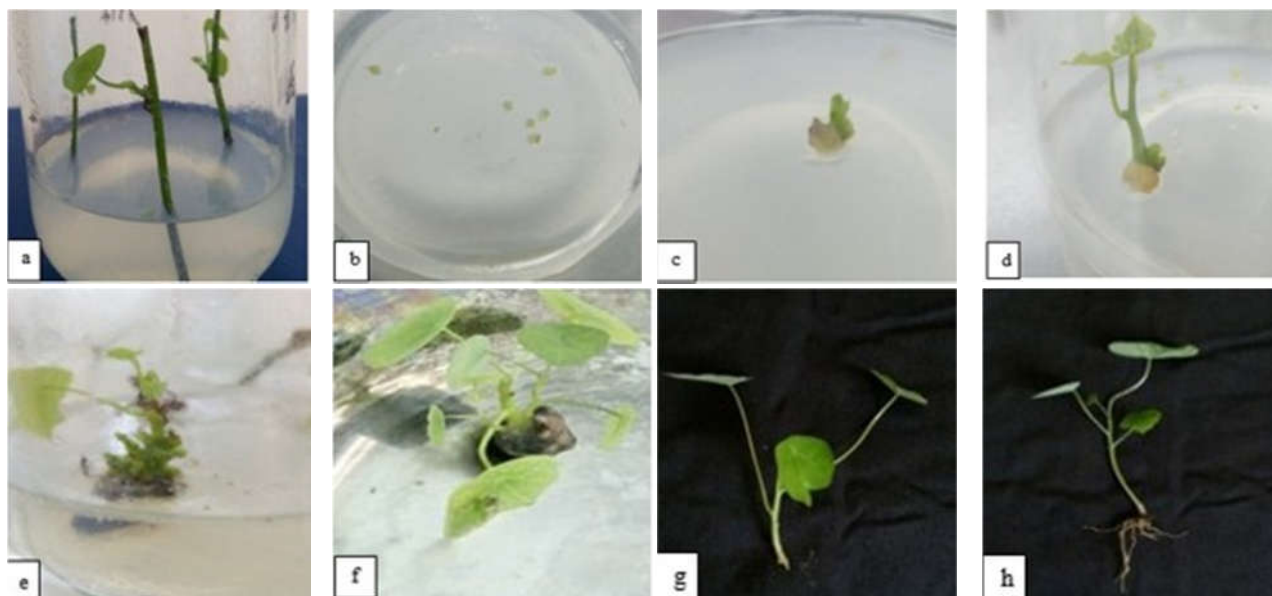
Nghiên cứu tái sinh chồi bằng phương pháp nuôi cấy lát mỏng tế bào loài Củ dòm đã bước đầu thành công với kết quả cụ thể như sau:

Khử trùng mẫu bằng HgCl<sub>2</sub> 0,1% trong thời gian 7 phút cho tỷ lệ mẫu sạch đạt 85,96%, mẫu sạch tái sinh chồi đạt 70,84%, mẫu có màu xanh tươi.

Nuôi cấy tái sinh chồi bằng môi trường dinh dưỡng cơ bản MS bổ sung 1,2 mg/l BAP; 0,2 mg/l Kinetin; 0,3 mg/l NAA; 30 g/l sucrose; 6,5 g/l agar, tỷ lệ tạo mô sẹo đạt 80,83%, tỷ lệ mẫu tái sinh chồi đạt 78,30%, thời gian mẫu tái sinh chồi là 19,13 ngày.

Nhân nhanh chồi bằng môi trường dinh dưỡng cơ bản MS bổ sung 0,7 mg/l BAP; 0,2 mg/l Kinetin; 0,3 mg/l NAA; 30 g/l sucrose; 6,5 g/l agar, hiệu quả nhân nhanh chồi đạt trung bình 3,3 chồi/mẫu, chiều cao trung bình của chồi đạt 3,83 cm, chồi mập, khỏe, có màu xanh đậm.

Kích thích ra rễ tạo cây hoàn chỉnh với môi trường dinh dưỡng cơ bản MS bổ sung 0,3 mg/l IBA; 0,2 mg/l NAA; 30 g/l sucrose; 6,5 g/l agar, chồi ra rễ đạt 96,68%, số rễ TB/cây đạt 3,7 rễ, chiều dài trung bình rễ là 2,74 cm, rễ nhiều và màu trắng sáng.



**Hình 1. Các giai đoạn trong quy trình nhân giống loài Củ dờm từ vật liệu lát mỏng**

a) Mẫu cây ban đầu, tái sinh chồi; b) Mẫu lát mỏng sau 5 ngày; c) Mẫu tạo mô sẹo và tái sinh chồi; d) Chồi hữu hiệu sau 5 tuần; e) Nhân nhanh chồi ở công thức NN3 sau 5 tuần; f) Nhân nhanh chồi ở NN4 sau 5 tuần; g) Ra rễ tại R<sub>0</sub>; h) Ra rễ tại R<sub>2</sub>.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chattopadhyaya B, Banerjee J, Basu A, Sen SK, Maiti MK (2010). Shoot induction and regeneration using intermodal transverse thin cell layer culture in *Sesamum indicum* L. *Plant Biotechnol Rep* 4(2): 173-178.
2. Da Silva J.A.T. (2003). Thin cell layer technology in ornamental plant micropropagation and biotechnology. *Afr J Biotechnol* 2 (12): 683-691.
3. Jaime A, Teixeira da Silva, Jean Carlos Cardoso, Judit Dobranszki, Songjun Zheng (2015). *Dendrobium* micropropagation/ a review. *Plant Cell Rep*, 34: 671-704.
4. Murashige T. and Skoog F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol plant*, 15: 473-497.
5. Nguyễn Quang Thạch, Đinh Trường Sơn, Nguyễn Thị Hương (2004). Nhân nhanh giống dưa Đài nông 4 bằng kỹ thuật nuôi cấy mô. *Tạp chí Khoa học kỹ thuật Nông nghiệp*, số 3/2004: 185-90.
6. Nguyễn Quang Thạch, Hoàng Thị Nga (2000). Nghiên cứu ứng dụng nuôi cấy lát mỏng trong nhân nhanh các giống Vanda, Cattleya và Phalaenopsis. *Tạp chí Nông nghiệp - Công nghiệp thực phẩm* (12): 546-548.
7. Nguyễn Thượng Dong, Bùi Thị Băng (2006).

*Nghiên cứu thuốc từ thảo dược*. Nxb. Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội.

8. Nguyễn Văn Kết, Nguyễn Văn Vinh (2010). Nghiên cứu khả năng nhân giống loài Lan Hoàng Thảo Sáp (*Dendrobium crepidatum* Lindl. & Paxt.) *in vitro*. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ*, 48 (5): 89-95.

9. Nguyễn Văn Vinh, Trịnh Ngọc Nam (2011). Nghiên cứu nhân giống *in vitro* và khảo sát hợp chất alkaloid rotundine từ cây Bình Vôi (*Stephania Rotunda Lour*). *Tạp chí Khoa học và Công nghệ* số 49: 51-58.

10. Nguyen Van Viet (2017). Study on application of thin cell layer culture for *in vitro* propagation of yellow daisy (*Chrysanthemum indicum* L.). *Journal of Forestry Science and Technology*, No 5: 37-42.

11. Nguyễn Thanh Tùng, Lê Văn Điệp, Nguyễn Minh Trung, Trương Thị Bích Phượng (2010). Áp dụng phương pháp nuôi cấy lát mỏng tế bào trong nhân giống *in vitro* cây lan Hoàng thảo thân gầy (*Dendrobium aducum*). *Tạp chí Công nghệ sinh học*, 8 (3): 361-367.

12. Nhut D.T., Bui V.L., Teixeira da Silva J.A., Aswth C.R. (2001). Thin cell layer culture system in *Lilium*: regeneration and transformation perspectives. *In vitro Cell Dev Biol*, (37): 516-523.

13. Nhut D.T, Le B.V, Minh N.T, de Silva J.T, Fukai S., Tanaka M., Van T.T.K. (2002). Somatic embryogenesis through pseudo-bulblet transverse thin cell layer of *Lilium longiflorum*. *Plant Growth Regu* 37(2): 193-198.
14. *Sách Đỏ Việt Nam, Phần II - Thực vật* (2007). Nxb. Khoa học Kỹ thuật và Công nghệ Hà Nội.
14. Singh S.K., Rai M.K., Asthana P, Sahoo L. (2009). An improved micropropagation of *Spilanthes acmella* L. through transverse thin cell layer culture. *Acta Physiol Plant* 31(4): 693-698.

## **AN EFFICIENT REGENERATION SYSTEM THROUGH THIN CELL LAYER CULTURE OF *Stephania dielsiana* Y.C. WU**

**Nguyen Van Viet<sup>1</sup>, Nguyen Thi Thuy Duong<sup>2</sup>, Tran Viet Ha<sup>3</sup>, Pham Thi Huyen<sup>4</sup>**

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

<sup>4</sup>*Ninh Binh Medical College*

### **SUMMARY**

*Stephania dielsiana* Y.C. Wu is a Medicinal plant which can bring highly economic and medicinal value. Thin cell layer (TCL) culture is a potential method for *in vitro* propagation of *S. dielsiana*. However, this method is still limited in Vietnam. After sterilization with HgCl<sub>2</sub> 0.1% solution for 7 minutes and being cultured on Murashige T. and Skoog F. (1962) medium supplemented with 6-benzyl amino purine (BAP) 0.3 mg/l, sucrose 30 g/l, agar 6.5 g/l, the cultured samples were recorded with clean materials percentage of 85.96%, shoots were generated of 70.84% after 4 weeks. Callus induction and shoot regeneration on MS medium supplemented with BAP 1.2 mg/l, Kinetin 0.2 mg/l,  $\alpha$ -naphthaleneacetic acid (NAA) 0.3 mg/l were obtained with 80.83% and 78.30%, respectively. Shoots were generated after 19.13 days on average. Multi shoots were generated by culturing on MS medium supplemented with BAP 0.7 mg/l; Kinetin 0.2 mg/l; NAA 0.3 mg/l, the result was indicated by multi shoot rate reaching 3.3 and the average length of the shoot being 3.83 cm. Shoots were green and healthy. Highest rooting rate (96.68%) was obtained on MS medium supplemented with NAA 0.2 mg/l, IBA 0.3 mg/l, and root length reaching 2.74 cm after 4 weeks of culture.

**Keywords:** Callus, *in vitro*, medicinal plants, micropropagation, *Stephania dielsiana*, thin cell layer.

**Ngày nhận bài** : 14/9/2018  
**Ngày phản biện** : 26/11/2018  
**Ngày quyết định đăng** : 03/12/2018