

Nghiên cứu nhân giống *in vitro* cây Sâm cau (*Curculigo orchioides* Gaertn.) từ nuôi cấy đỉnh sinh trưởng

Nguyễn Thị Lại^{1*}, Phạm Hương Sơn¹, Bùi Thị Thanh Phương¹,
Phạm Minh Duy², Đỗ Thị Thơm¹, Nguyễn Thị Bình¹, Nguyễn Ích Tân³

¹Viện Ứng dụng Công nghệ

²Trường THPT chuyên Khoa học Tự nhiên

³Học viện Nông nghiệp Việt Nam

Ngày nhận bài 22/10/2018; ngày chuyển phản biện 26/10/2018; ngày nhận phản biện 26/11/2018; ngày chấp nhận đăng 29/11/2018

Tóm tắt:

Trong nghiên cứu này, các tác giả tiến hành nhân giống *in vitro* cây Sâm cau thông qua phương pháp nuôi cấy đỉnh sinh trưởng, kết quả cho thấy trên môi trường MS + 30 g/l sucrose + 5,5 g/l agar + 200 ml/l nước dừa + 1 g/l than hoạt tính + 1,5 mg/l TDZ + 0,5 mg/l IBA + 1,0 mg/l AgNO₃ + 50 mg/l tảo *Spirulina* là thích hợp nhất cho nhân nhanh chồi *in vitro*, với số chồi 20,8 chồi/mẫu và 5,2 lá/cây, sau 6 tuần nuôi cấy. Tỷ lệ chồi ra rễ cao nhất, chất lượng bộ rễ tốt nhất trong môi trường MS + 30 g/l sucrose + 5,5 g/l agar + 200 ml/l nước dừa + 1 g/l than hoạt tính + 0,5 mg/l IBA. Hỗn hợp đất mùn + vụn xơ dừa (tỷ lệ 70:30) được xác định là giá thể phù hợp nhất cho sinh trưởng của cây con trong vườn ươm, sau 10 tuần nuôi trồng, tỷ lệ sống đạt 98%, chiều cao cây đạt 16,6 cm, 6,9 lá/cây và 6,3 rễ mới/cây.

Từ khóa: cây thuốc, đỉnh sinh trưởng, giá thể, Sâm cau, số chồi.

Chỉ số phân loại: 4.6

Đặt vấn đề

Sâm cau (*Curculigo orchioides* Gaertn.) thuộc họ Sâm cau (Hypoxidaceae) là cây thuốc quý được sử dụng phổ biến trong y học cổ truyền Ấn Độ, Pakistan, Trung Quốc và Việt Nam. Sâm cau có tác dụng chữa bệnh vàng da, hen suyễn, làm thuốc bổ, ngăn ngừa loãng xương, trị đái tháo đường [1], chống ung thư [2]..., chữa bệnh huyết trắng [3]; chữa vô sinh, nam giới tinh lạnh, liệt dương, tê thấp, đau lưng, viêm thận mạn tính, viêm khớp, suy nhược cơ thể, loét dạ dày tá tràng, tiêu chảy, huyết áp cao... [4]. Do nhu cầu sử dụng dược liệu tăng mạnh trong thời gian gần đây nên cây Sâm cau bị khai thác ồ ạt, dẫn đến nguồn nguyên liệu đang trở nên cạn kiệt. Mặt khác, vùng phân bố của Sâm cau bị khai thác triệt để khiến loài cây này rơi vào tình trạng gần như mất dần trong tự nhiên, được đưa vào Sách Đỏ Việt Nam [5] và Danh lục đỏ của IUCN [6]. Vì vậy, việc tiến hành nghiên cứu nhân giống Sâm cau, sản xuất cây giống để tạo ra nguồn dược liệu phục vụ cho lĩnh vực y học và mỹ phẩm là vấn đề rất cần thiết.

Cho đến nay, các nghiên cứu về nuôi cấy Sâm cau chủ yếu từ mô lá, nuôi cấy từ đỉnh sinh trưởng vẫn còn rất hạn chế. Trong bài báo này, chúng tôi trình bày kết quả nghiên cứu nhân nhanh Sâm cau bằng phương pháp nuôi cấy từ đỉnh sinh trưởng, nhằm góp phần bảo tồn và phát triển loài dược liệu quý của Việt Nam.

Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Vật liệu, địa điểm nghiên cứu

Vật liệu nghiên cứu: nguyên liệu dùng trong nhân giống là cây Sâm cau được thu thập ở Sơn La, mẫu được rửa sạch bằng nước xà phòng, sau đó khử trùng bằng dung dịch NaOCl 2% trong 15 phút và rửa lại nhiều lần bằng nước cất vô trùng. Mẫu được cắt lấy đỉnh sinh trưởng và cấy trên môi trường MS (Murashige & Skoog, 1962) bổ sung 30 g/l sucrose, 5,5 g/l agar, 200 ml/l nước dừa, 1 g/l than hoạt tính, 1,5 mg/l TDZ, pH 5,5. Những chồi non tái sinh từ các đỉnh sinh trưởng được dùng làm nguồn vật liệu cho các thí nghiệm.

Địa điểm và thời gian nghiên cứu: Phòng nuôi cấy mô của Trung tâm Sinh học Thực nghiệm, Viện Ứng dụng Công nghệ, Bộ KH&CN. Thời gian nghiên cứu: 01/2017-8/2018.

Điều kiện nuôi cấy: thời gian chiếu sáng 10 giờ/ngày, cường độ ánh sáng 2.500 lux, nhiệt độ 25±2°C và độ ẩm không khí 70-80%. Trồng cây trong nhà lưới có mái che mưa và che lưới đen, độ che sáng >70%, tưới phun sương đều 2 lần/ngày.

Phương pháp nghiên cứu

Phương pháp nhân nhanh chồi: để khảo sát khả năng nhân nhanh chồi, các chồi non tái sinh từ các đỉnh sinh trưởng được cấy trên môi trường cơ bản MS + 30 g/l sucrose + 5,5 g/l agar

*Tác giả liên hệ: Email: orchidnlai@gmail.com

Study on *in vitro* propagation of *Curculigo orchoides* Gaertn. through apical meristem culture

Thi Lai Nguyen^{1*}, Huong Son Pham¹,
Thi Thanh Phuong Bui¹, Minh Duy Pham²,
Thi Thom Do¹, Thi Binh Nguyen¹, Ich Tan Nguyen³

¹National Center for Technological Progress

²HUS High School for Gifted Students

³Vietnam National University of Agriculture

Received 22 October 2018; accepted 29 November 2018

Abstract:

In this study, authors propagated *Curculigo orchoides* Gaertn plants using the apical meristem culture method. The results indicated that: the most appropriate medium for multiplication of shoots was the MS medium supplemented with 30 g/l sucrose + 5.5 g/l agar + 200 ml/l coconut water + 1 g/l activated charcoal + 1.5 mg/l TDZ + 0.5 mg/l IBA + 1.0 mg/l AgNO₃ + 50 mg/l *Spirulina* algae, with the results of 20.8 shoots/explant and 5.2 leaves/plantlet after 6 weeks of culture. Root formation of shoots carried out on the MS medium supplemented with 30 g/l sucrose + 5.5 g/l agar + 200 ml/l coconut water + 1 g/l activated charcoal + 0.5 mg/l IBA gave the best result. In nursery, a mixture of humus + coconut fiber powder (70:30 ratio) was regarded as the best substrate due to the high survival rate of plantlets (98%) and healthy plantlets (16.60 cm high with 6.9 leaves and 6.3 new roots/a plantlet) at 10 weeks after planting.

Keywords: apical meristem, *Curculigo orchoides* Gaertn., medicinal plant, shoot number, substrate.

Classification number: 4.6

+ 200 ml/l nước dừa + 1 g/l than hoạt tính + 1,5 mg/l TDZ, bổ sung IBA (0-2,0 mg/l); 0,5 mg/l IBA + phloroglucinol (PG) (0-2 mg/l); 0,5 mg/l IBA + AgNO₃ (0-2 mg/l); 0,5 mg/l IBA + 1,0 mg/l AgNO₃ + tảo *Spirulina* (0-100 mg/l).

Phương pháp nghiên cứu tạo cây *in vitro* hoàn chỉnh: các chồi Sâm cau *in vitro* có 2-3 lá, chồi chưa có rễ, chồi khỏe mạnh được tách ra và cấy sang môi trường ra rễ có bổ sung IBA ở các nồng độ 0; 0,5; 1,0; 1,5; 2 mg/l, 30 g/l sucrose, 5,5 g/l agar, 200 ml/l nước dừa, 1 g/l than hoạt tính, pH 5,5 để khảo sát khả năng hình thành rễ.

Phương pháp đưa cây *in vitro* ra vườn ươm: các cây *in vitro* sau khi nuôi cấy trong phòng thí nghiệm đạt chiều cao 6-7 cm, có 3-4 lá và 5-7 rễ để bình cây ra ngoài vườn ươm 5 ngày. Cây con được rửa hết thạch, rải đều trên khay sạch để trong 1 giờ, rồi trồng vào chậu nhựa kích thước 12x18 cm trên các giá thể: vụn xơ dừa, đất mùn, bã được liệu (cây Atiso), đất mùn + vụn xơ dừa (70:30), để khảo sát khả năng sinh trưởng của cây *in vitro* ở giai đoạn vườn ươm. Các thí nghiệm được bố trí theo kiểu khối ngẫu nhiên đầy đủ với 3 lần nhắc lại.

Theo dõi, đánh giá các chỉ tiêu: mỗi công thức thí nghiệm cấy 30 mẫu, sau 6 tuần nuôi cấy tiến hành thu thập số liệu, chỉ tiêu theo dõi là số chồi/mẫu, chiều cao chồi (cm), chiều cao cây (cm), số lá (lá), số rễ (rễ), chiều dài rễ (cm). Tỷ lệ sống (%), chiều cao cây (cm), số lá (lá) và số rễ mới (rễ) được đánh giá sau 10 tuần nuôi trồng.

Phương pháp xử lý số liệu: số liệu được xử lý theo phương pháp thống kê bằng phần mềm IRRISTAT 5.0 và phần mềm Excel 2007.

Kết quả nghiên cứu và thảo luận

Nghiên cứu nhân nhanh chồi

Ảnh hưởng của tổ hợp (TDZ + IBA) đến khả năng nhân nhanh chồi cây Sâm cau:

Bảng 1. Ảnh hưởng của tổ hợp (TDZ + IBA) đến khả năng nhân nhanh chồi Sâm cau (sau 6 tuần nuôi cấy).

Chất điều tiết sinh trưởng (mg/l)		Số chồi (chồi)	Số lá/chồi (lá)	Chất lượng chồi
TDZ	IBA			
1,5	0,0	4,9 ^d	2,6 ^b	Chồi nhỏ, lá bé
1,5	0,25	6,1 ^b	2,9 ^b	Chồi nhỏ, lá xanh
1,5	0,50	8,0^a	3,9^a	Chồi bình thường, lá xanh
1,5	0,75	6,3 ^b	3,5 ^a	Chồi nhỏ, lá xanh
1,5	1,0	5,6 ^c	2,7 ^b	Chồi nhỏ, lá màu vàng nhạt
LSD _{0,05}		0,41	0,43	
CV%		3,6	4,6	

Ghi chú: nền môi trường MS + 30 g/l sucrose + 5,5 g/l agar + 200 ml/l nước dừa + 1 g/l than hoạt tính + 1,5 mg/l TDZ. Trong cùng một cột, các công thức có chỉ số mũ khác nhau thì khác nhau có ý nghĩa ở mức độ tin cậy 95%.

Trong nhân giống *in vitro*, nhiều loại cây trồng chỉ phù hợp với các chất thuộc nhóm cytokinin, nhưng có nhiều loại khi kết hợp các chất điều hòa sinh trưởng giữa nhóm cytokinin và auxin thì nâng cao hiệu quả trong nhân giống. Để tìm hiểu ảnh hưởng của Auxin đến quá trình nhân nhanh chồi có sự tương tác với TDZ, đề tài tiến hành bổ sung IBA với các nồng độ khác nhau vào môi trường MS + 30 g/l sucrose + 5,5 g/l agar + 200 ml/l nước dừa + 1 g/l than hoạt tính. Kết quả được trình bày ở bảng 1 cho thấy, sự kết hợp giữa TDZ và IBA có ảnh hưởng tích cực lên quá trình hình thành chồi và sinh trưởng của chồi cây. IBA ở nồng độ 0,5 mg/l kết hợp với 1,5 mg/l TDZ là tốt nhất, với số chồi là 8 chồi/mẫu và 3,9 lá/cây, chồi cây xanh và sinh trưởng tốt. Điều này cho thấy, khi tăng nồng độ IBA kết hợp với 1,5 mg/l TDZ đã kích thích sự hình thành chồi cây và sinh trưởng của chồi cây, qua đây cũng cho thấy, sự kết hợp của TDZ và IBA có sự tương tác nâng cao hiệu quả trong nhân giống *in vitro* cây Sâm cau. Khi tăng nồng độ IBA lên 1 mg/l số chồi và số lá giảm dần, thậm chí những chồi tạo ra nhỏ, thấp và không đồng đều, có thể do IBA ở nồng độ cao sẽ gây ức chế sự tái sinh của mẫu.

Ảnh hưởng của phloroglucinol (PG) đến khả năng nhân nhanh chồi Sâm cau: theo Kim, et al. (2007) [7] khi bổ sung PG vào môi trường nuôi cấy đã giảm tỷ lệ mẫu hóa nâu và tăng số lượng chồi. Để ngăn ngừa hoặc giảm tỷ lệ mẫu tiết phenol và tăng số lượng chồi, chúng tôi tiến hành bổ sung PG vào môi trường nuôi cấy MS + 30 g/l sucrose + 5,5 g/l agar + 200 ml/l nước dừa + 1 g/l than hoạt tính + 1,5 mg/l TDZ + 0,5 mg/l IBA và bổ sung PG ở nồng độ (0-2 mg/l), kết quả được trình bày ở bảng 2.

Bảng 2. Ảnh hưởng của phloroglucinol (PG) đến khả năng nhân nhanh chồi Sâm cau (sau 6 tuần nuôi cấy).

Nồng độ PG (mg/l)	Số chồi (chồi)	Số lá/chồi (lá)	Chất lượng chồi
0,0 (Đ/C)	7,9 ^d	3,93 ^b	Chồi bình thường, lá xanh
0,5	10,8 ^b	4,2 ^{ab}	Chồi bình thường, lá xanh
1,0	13,1^a	4,5^a	Chồi to, lá xanh
1,5	10,1 ^c	3,9 ^b	Chồi bình thường, lá xanh
2,0	8,2 ^d	3,4 ^c	Chồi nhỏ, lá màu xanh nhạt
LSD _{0,05}	0,48	0,34	
CV%	2,6	4,7	

Ghi chú: nền môi trường MS + 30 g/l sucrose + 5,5 g/l agar + 200 ml/l nước dừa + 1 g/l than hoạt tính + 1,5 mg/l TDZ + 0,5 mg/l IBA. Trong cùng một cột, các công thức có chỉ số mũ khác nhau thì khác nhau có ý nghĩa ở mức độ tin cậy 95%.

Kết quả ở bảng 2 cho thấy, PG có tác dụng tốt đối với quá trình hình thành chồi và sinh trưởng của chồi cây. Bổ sung PG ở nồng độ 1 mg/l cho số chồi, chiều cao chồi, số lá/chồi đạt cao hơn cả với 13,1 chồi và 4,5 lá, trong khi đối chứng môi trường không bổ sung PG chỉ đạt 7,9 chồi và 3,93 lá. Khi tăng nồng độ lên quá 1 mg/l PG nhận thấy số chồi, chiều cao của chồi giảm xuống theo chiều tăng của PG. Điều này có thể do nồng độ PG cao quá đã gây ức chế đến khả năng nhân nhanh chồi Sâm cau. Cụ thể, ở nồng độ 2,0 mg/l tỷ lệ hình thành chồi giảm xuống chỉ đạt 8,2 chồi và 3,4 lá, chất lượng chồi kém, chồi mảnh.

Ảnh hưởng của AgNO₃ đến khả năng nhân nhanh chồi Sâm cau: các ion bạc dưới dạng nitrate (AgNO₃) có ảnh hưởng trực tiếp hoặc gián tiếp đến quá trình phát sinh cơ quan sinh phôi, ra rễ *in vitro*, cảm ứng ra hoa, ra hoa sớm, kiểm soát hiện tượng rụng lá thông qua việc ức chế hoạt động của ethylene và hạn chế mẫu tiết phenol [8]. Trong nghiên cứu này, đề tài đã bổ sung AgNO₃ ở các nồng độ (0,5; 1,0; 1,5; 2,0 mg/l) vào môi trường nuôi cấy MS + 30 g/l sucrose + 5,5 g/l agar + 200 ml/l nước dừa + 1 g/l than hoạt tính + 1,5 mg/l TDZ + 0,5 mg/l IBA. Số liệu ở bảng 3 cho thấy, bổ sung AgNO₃ đã khắc phục vấn đề tiết phenol và tăng số lượng chồi, ngăn ngừa hoặc giảm tỷ lệ mẫu hóa nâu.

Bảng 3. Ảnh hưởng của AgNO₃ đến khả năng nhân nhanh chồi Sâm cau (sau 6 tuần nuôi cấy).

Nồng độ AgNO ₃ (mg/l)	Số chồi (chồi)	Số lá/chồi (lá)	Chất lượng chồi
0,0 (Đ/C)	7,8 ^c	3,90 ^b	Chồi bình thường, lá màu xanh
0,5	15,1 ^b	4,6 ^{ab}	Chồi to, lá màu xanh
1,0	17,8^a	4,9^a	Chồi xanh đậm, khỏe mạnh
1,5	12,0 ^d	4,1 ^b	Chồi to, lá màu xanh
2,0	7,7 ^e	3,6 ^{bc}	Chồi yếu và có hiện tượng mọng nước
LSD _{0,05}	0,51	0,41	
CV%	2,1	5,0	

Ghi chú: nền môi trường MS + 30 g/l sucrose + 5,5 g/l agar + 200 ml/l nước dừa + 1 g/l than hoạt tính + 1,5 mg/l TDZ + 0,5 mg/l IBA. Trong cùng một cột, các công thức có chỉ số mũ khác nhau thì khác nhau có ý nghĩa ở mức độ tin cậy 95%.

Môi trường không bổ sung AgNO₃ thì mẫu chỉ tái sinh 7,8 chồi/mẫu và 3,9 lá/chồi, khi môi trường bổ sung 0,5 mg/l AgNO₃ thì mẫu tái sinh chồi tăng lên 15,1 chồi/mẫu và 4,6 lá/chồi. Khi tăng nồng độ AgNO₃ lên 1 mg/l thì mẫu tái sinh đạt cao nhất với 17,8 chồi/mẫu và 4,9 lá/chồi. Tuy nhiên, khi tiếp tục tăng cao nồng độ AgNO₃ lên 1,5 mg/l thì số chồi/mẫu và số lá/chồi có xu hướng giảm dần, chồi cây yếu và có hiện tượng mọng nước. Điều này cho thấy, AgNO₃ ở nồng độ cao

thì ức chế sự tái sinh chồi của mẫu. Như vậy, ở nồng độ 1 mg/l AgNO_3 thích hợp cho việc tái sinh chồi cũng như sinh trưởng phát triển của chồi.

Ảnh hưởng của tảo Spirulina đến khả năng nhân nhanh chồi Sâm cau:

Bảng 4. Ảnh hưởng của tảo Spirulina đến khả năng nhân nhanh chồi Sâm cau (sau 6 tuần nuôi cấy).

Hàm lượng tảo Spirulina (mg/l)	Số chồi (chồi)	Số lá/chồi (lá)	Chất lượng chồi
0	17,6 ^c	4,8 ^{bc}	Chồi xanh đậm, khỏe mạnh
50	20,8 ^a	5,2 ^a	Chồi mập, cứng cáp và lá xanh bóng
100	18,9 ^b	4,9 ^{ab}	Chồi xanh đậm, khỏe
150	14,0 ^d	4,5 ^c	Chồi xanh nhạt, lá nhỏ
200	10,7 ^e	4,1 ^d	Chồi có hiện tượng hóa vàng, lá nhỏ
LSD _{0,05}	0,6	0,39	
CV%	2,1	4,6	

Ghi chú: nền môi trường MS + 30 g/l sucrose + 5,5 g/l agar + 200 ml/l nước dừa + 1 g/l than hoạt tính + 1,5 mg/l TDZ + 0,5 mg/l IBA + 1,0 mg/l AgNO_3 . Trong cùng một cột, các công thức có chỉ số mũ khác nhau thì khác nhau có ý nghĩa ở mức độ tin cậy 95%.

Kết quả ở bảng 4 cho thấy, tảo Spirulina có tác dụng tốt đối với quá trình hình thành và sinh trưởng của chồi. Các nồng độ tảo Spirulina khác nhau, sự hình thành và sinh trưởng chồi cây cũng khác nhau, bột tảo Spirulina ở nồng độ 50 mg/l bổ sung vào môi trường MS + 30 g/l sucrose + 5,5 g/l agar + 200 ml/l nước dừa + 1 g/l than hoạt tính + 1,5 mg/l TDZ + 0,5 mg/l IBA + 1,0 mg/l AgNO_3 cho kết quả tốt nhất, với số chồi/mẫu là 20,8, số lá/chồi là 5,2. Điều này có thể do trong bột tảo Spirulina có chứa các nhóm chất cần thiết cho sự sinh trưởng và phát triển của cây như các vitamin, các amino acid, các chất khoáng đa lượng, vi lượng [9]. Kết quả này cũng phù hợp với nghiên cứu của Nguyễn Thị Cúc và cs (2014) [10] khi bổ sung bột tảo Spirulina ở nồng độ 50 mg/l có tác động hiệu quả đến tỷ lệ sống của chồi và sự hình thành số chồi của lan Hải (*Paphiopedilum delenatii*). Tuy nhiên, khi tăng nồng độ tảo Spirulina từ 100-200 mg/l thì sự hình thành chồi và sinh trưởng của chồi cây có xu hướng giảm dần, thậm chí còn thấp hơn so với đối chứng. Như vậy, nồng độ tảo Spirulina 50 mg/l là thích hợp nhất cho giai đoạn nhân nhanh chồi *in vitro* Sâm cau.

Nghiên cứu tạo cây in vitro hoàn chỉnh (nghiên cứu ảnh hưởng của IBA đến khả năng tạo rễ và sinh trưởng của chồi Sâm cau in vitro)

Bảng 5. Ảnh hưởng của IBA đến khả năng tạo rễ và sinh trưởng của chồi Sâm cau in vitro (6 tuần nuôi cấy).

Nồng độ IBA (mg/l)	Chiều cao của cây (cm)	Số lá (lá)	Số rễ (rễ)	Chiều dài rễ (cm)	Chất lượng rễ
0 (Đ/C)	7,5 ^c	6,3 ^c	4,1 ^e	2,7 ^d	Rễ ngắn
0,5	11,8 ^a	7,2 ^a	10,3 ^a	5,1 ^a	Rễ khỏe, trắng, mập và đều, nhiều lông hút
1	9,6 ^b	7,0 ^{ab}	8,2 ^b	4,3 ^b	Rễ khỏe, rễ trắng và nhiều lông hút
1,5	7,8 ^c	6,5 ^{bc}	7,1 ^c	3,4 ^c	Đầu rễ trắng và đều, nhiều lông hút
2	6,2 ^d	5,0 ^d	5,6 ^d	2,8 ^d	Rễ ngắn, mảnh
LSD _{0,05}	0,33	0,61	0,65	0,25	
CV%	2,1	5,3	5,0	3,7	

Ghi chú: nền môi trường MS + 30 g/l sucrose + 5,5 g/l agar + 200 ml/l nước dừa + 1 g/l than hoạt tính. Trong cùng một cột, các công thức có chỉ số mũ khác nhau thì khác nhau có ý nghĩa ở mức độ tin cậy 95%.

Kết quả ở bảng 5 cho thấy, trên môi trường không bổ sung IBA rễ vẫn hình thành. Điều này chứng tỏ auxin nội sinh được hình thành ở chồi và di chuyển xuống dưới gốc để cảm ứng tạo rễ. Tại nồng độ 0,5 mg/l IBA bổ sung vào môi trường MS + 30 g/l sucrose + 5,5 g/l agar + 200 ml/l nước dừa + 1 g/l than hoạt tính, sau 6 tuần nuôi cấy cây đạt các chỉ tiêu sinh trưởng tốt nhất, chiều cao cây đạt 11,8 cm, số lá đạt 7,2 lá/cây, số rễ đạt 10,3 rễ/cây, chiều dài rễ đạt 5,1 cm; chất lượng rễ rất tốt, rễ khỏe, trắng, mập đều và nhiều lông hút, thuận lợi cho sự phát triển của chồi và rễ ở giai đoạn vườn ươm. Tiếp tục tăng nồng độ IBA từ 1-2 mg/l, có sự ức chế kéo dài rễ và giảm số lượng rễ tạo thành. Kết quả này cũng phù hợp với nghiên cứu của Zuraida, et al. 2014) [11] khi sử dụng IBA ở nồng độ 0,5 mg/l cho quá trình ra rễ *in vitro* loài *Melicope lunuankenda*.

Nghiên cứu kỹ thuật đưa cây in vitro ra vườn ươm (nghiên cứu ảnh hưởng của giá thể trồng đối với sinh trưởng và phát triển của cây Sâm cau in vitro ở giai đoạn vườn ươm)

Khả năng thích nghi và sinh trưởng của cây Sâm cau cấy mô chuyển ra ngoài vườn ươm sau 10 tuần nuôi trồng trên giá thể vụn xơ dừa, đất mùn, bã được liệu, đất mùn + vụn xơ dừa (70:30) được thể hiện ở bảng 6.

Bảng 6. Ảnh hưởng của giá thể trồng khác nhau đến sự sinh trưởng phát triển của cây Sâm cau *in vitro* ở giai đoạn vườn ươm (sau 10 tuần).

Công thức giá thể	Tỷ lệ sống (%)	Chiều cao cây (cm)	Số lá (lá)	Số rễ mới xuất hiện (rễ)	Chất lượng cây
Vụn xơ dừa	86	10,8 ^d	5,5 ^c	4,5 ^c	Cây còi cọc, lá nhỏ
Đất mùn	95	13,5 ^b	6,2 ^b	5,9 ^b	Cây khỏe, lá to màu xanh
Bã dược liệu	90	11,68 ^c	5,9 ^{bc}	4,2 ^c	Cây khỏe, lá xanh
Mùn + vụn xơ dừa (70:30)	98	16,6 ^a	6,9 ^a	6,3 ^a	Cây khỏe, mập, lá to xanh đậm
<i>LSD</i> _{0,05}		0,42	0,51	0,36	
CV%		1,7	4,4	3,7	

Trong cùng một cột, các công thức có chỉ số mũ khác nhau thì khác nhau có ý nghĩa ở mức độ tin cậy 95%.

Kết quả cho thấy, tỷ lệ sống của cây trồng ở các loại giá thể đều đạt cao từ 86-98%, trên giá thể đất mùn phối trộn với vụn xơ dừa (70:30) cây sống và sinh trưởng tốt nhất, với tỷ lệ sống đạt (98%), chiều cao cây 16,6 cm, số lá 6,9, số rễ mới xuất hiện 6,3 rễ, là do đất mùn phối trộn với vụn xơ dừa (70:30) có độ thông thoáng và giữ ẩm thích hợp cho sinh trưởng của cây con trong giai đoạn đầu ở vườn ươm. Trên giá thể đất mùn, chiều cao cây, số lá và số rễ mới xuất hiện khá cao, tương ứng (13,5 cm, 6,2 lá; 5,9 rễ), điều này cho thấy đất mùn giàu chất khoáng và xốp thoáng phù hợp cho cây cấy mô sinh trưởng. Còn giá thể vụn xơ dừa và bã dược liệu, tuy tỷ lệ sống đạt khá cao nhưng chiều cao cây, số lá, số rễ của cây con đều thấp, có thể do bã dược liệu có khả năng giữ nước cao, dễ gây thối rễ. Còn vụn xơ dừa lại thoát nước nhanh, nên cây dễ héo.

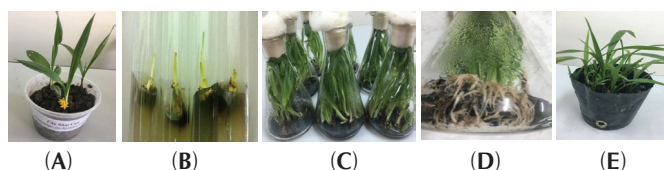
Như vậy, giá thể đất mùn phối trộn với vụn xơ dừa (70:30) thích hợp chuyển cây con Sâm cau ra giai đoạn vườn ươm.

Kết luận

- Môi trường MS bổ sung 30 g/l sucrose + 5,5 g/l agar + 200 ml/l nước dừa + 1 g/l than hoạt tính + 1,5 mg/l TDZ + 0,5 mg/l IBA + 1,0 mg/l AgNO₃ + 50 mg/l tảo *Spirulina* là thích hợp nhất cho khả năng nhân nhanh *in vitro* cây Sâm cau, với số chồi/mẫu là 20,8, số lá/chồi là 5,2 sau 6 tuần nuôi cấy.

- Môi trường MS bổ sung 30 g/l sucrose + 5,5 g/l agar + 200 ml/l nước dừa + 1 g/l than hoạt tính + 0,5 mg/l IBA thích hợp nhất cho sự hình thành rễ *in vitro* của cây Sâm cau, chiều cao cây đạt 11,8 cm, số lá đạt 7,2 lá/cây, số rễ đạt 10,3 rễ/cây, chiều dài rễ đạt 5,1 cm sau 6 tuần nuôi cấy.

- Hỗn hợp đất mùn + vụn xơ dừa (tỷ lệ 70:30) được xác định là giá thể phù hợp nhất cho sinh trưởng của cây con trong vườn ươm với tỷ lệ sống đạt (98%), chiều cao cây 16,6 cm, số lá 6,9, số rễ mới xuất hiện 6,3 rễ sau 10 tuần nuôi trồng.



Hình 1. Nhân giống *in vitro* cây Sâm cau (*C. orchoides* Gaertn.). (A) Cây Sâm cau (*C. orchoides* Gaertn.); (B) Chồi nảy mầm từ đỉnh sinh trưởng; (C) Nhân nhanh chồi; (D) Tạo cây *in vitro* hoàn chỉnh; (E) Cây Sâm cau ở vườn ươm.

LỜI CẢM ƠN

Chúng tôi chân thành cảm ơn Viện Ứng dụng Công nghệ, Bộ Khoa học và Công nghệ đã cấp kinh phí để chúng tôi thực hiện và hoàn thành nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] K.S. Nagesh and C. Shanthamma (2016), "An overview on tissue culture studies of *Curculigo orchoides* Gaertn: an endangered multi-potential medicinal herb", *Journal of Medicinal Plants Studies*, **4**(4), pp.119-123.
- [2] K. Rajagopalan, V.V. Sivarajan, P.R. Varier (1994), "*Curculigo orchoides* Gaertn", *Indian Medicinal Plants*, Orient Longman, Madras, pp.245-248.
- [3] H.A. Prajapathi, S.R. Mehta, R.B. Subramanian (2004), "*In vitro* regeneration in *Curculigo orchoides* Gaertn. - an endangered medicinal herb", *Phytomorphology*, **54**, pp.85-95.
- [4] Viện Dược liệu (2006), *Cây thuốc và động vật làm thuốc ở Việt Nam*, Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật, **tập II**, tr.693.
- [5] Bộ Khoa học và Công nghệ, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam (2007), *Sách Đỏ Việt Nam, phần II- Thực vật*, Nhà xuất bản Khoa học tự nhiên và Công nghệ, tr.396-397.
- [6] IUCN (2012), *Red List of IUCN*.
- [7] K.M. Kim, M.Y. Kim, P.Y. Yun, T. Chandrasekhar, H.Y. Lee, P.S. Song (2007), "Production of multiple shoots and plant regeneration from leaf segments of fig tree (*Ficus carica* L.)", *Journal of Plant Biology*, **50**, pp.440-446.
- [8] A. Sharma, V. Kumar, G. Parvatam, G.A. Ravishankar (2008), "Induction of *in vitro* flowering in *Capsicum frutescens* under the influence of silver nitrate and cobalt chloride and pollen transformation", *Electronic Journal of Biotechnology*, **11**(2), pp.1-6.
- [9] B. Dal, Zs. Gerencsér, Zs. Szendrő, C. Mugnai, M. Cullere, S. Ruggeri, S. Mattioli, C. Castellini, A. Dalle Zotte (2014), "Effect of dietary supplementation of *Spirulina* (*Arthrospira platensis*) and *Thyme* (*Thymus vulgaris*) on rabbit meat appearance, oxidative stability and fatty acid profile during retail display", *Meat Sci.*, **96**(1), pp.114-119.
- [10] Nguyễn Thị Cúc, Nguyễn Văn Kết, Dương Tấn Nhựt, Nguyễn Thị Kim Lý (2014), "Nghiên cứu ảnh hưởng của một số chất hữu cơ lên quá trình sinh trưởng và phát triển cây lan Hải hồng (*Paphiopedilum delenatii*) *in vitro*", *Tạp chí Sinh học*, **36**(1se), tr.250-256.
- [11] A.R. Zuraida, K. Fatin liyana izzati, O. Ayu nazreena (2014), "*In vitro* plant propagation for rapid multiplication of *Melicope lunu-ankenda*: a plant species of high medicinal value", *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, **5**(1), pp.1148-1156.