

RESEARCH ON *IN VITRO* CULTURE OF *HOYA MULTIFLORA* SPECIES

Nguyen Thi Thu Nga*, Soneseo SYHALAHT, Tran Thi Hong

TNU – University of Education

ARTICLE INFO	ABSTRACT
Received: 31/5/2021	<i>Hoya multiflora</i> is a beautiful ornamental plant decoration. In addition, <i>Hoya multiflora</i> also works very well in treating a number of diseases, which has been scientifically proven. The conservation of medicinal plants in general and <i>Hoya multiflora</i> in particular can be done by many traditional methods such as sowing seeds after harvesting old ripe fruits and choosing leaves or old stalks with roots to planted to the ground. However, the achieved effect is not high, rarely has ripe fruit to get seeds. In this study, we used <i>in vitro</i> culture method to find a culture medium suitable for plant growth and development <i>in vitro</i> . The results showed that the medium supplemented with BAP 1.0 mg/l gave the best multi-shoot efficiency in the <i>in vitro</i> concentrations of <i>Hoya multiflora</i> . In this medium, green shoots, well developed (3.28 shoots/sample). Optimal medium for the elongation of shoots supplemented with GA3 0.5 mg/l (4.84 cm/sample). The complete plant formation is most suitable on basal MS medium supplemented with α -NAA at a concentration of 0.5 mg/l. The number of roots obtained was 4.83 roots/sample after 8 weeks. The survival rate of seedlings when planted on natural substrates reached 88.3%.
Revised: 28/6/2021	
Published: 02/7/2021	
KEYWORDS	
Cam cu ten lua	
<i>Hoya multiflora</i>	
<i>In vitro</i>	
Tissue culture	
Multi-shoots	

NGHIÊN CỨU NUÔI CẤY *IN VITRO* CÂY CẨM CÙ TÊN LỬA (*Hoya multiflora*)

Nguyễn Thị Thu Nga*, Soneseo SYHALAHT, Trần Thị Hồng

Trường Đại học Sư phạm – ĐH Thái Nguyên

THÔNG TIN BÀI BÁO	TÓM TẮT
Ngày nhận bài: 31/5/2021	Lan Cẩm cù tên lửa (<i>Hoya multiflora</i>) là cây cảnh trang trí rất đẹp. Ngoài ra cây còn có tác dụng rất tốt trong chữa một số bệnh, đã được khoa học các nước chứng minh. Việc bảo tồn các giống cây được liệu nói chung và cây Cẩm cù tên lửa nói riêng có thể thực hiện bằng nhiều biện pháp truyền thống như gieo hạt sau khi thu hái trái chín già, có thể chọn lá hoặc thân già đã có rễ để giâm xuống đất. Tuy nhiên hiệu quả đạt được chưa cao do ít khi cây tạo quả chín để lấy hạt. Trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng phương pháp nuôi cấy <i>in vitro</i> nhằm tìm ra môi trường nuôi cấy thích hợp cho sự sinh trưởng và phát triển của cây trong ống nghiệm. Kết quả thu được, môi trường có bổ sung BAP 1,0 mg/l cho tỷ lệ tạo đa chồi tốt nhất trong các nồng độ thử nghiệm. Trên môi trường này, chồi xanh đậm, phát triển tốt (3,28 chồi/mẫu). Môi trường tối ưu cho quá trình kéo dài chồi là MS bổ sung GA3 0,5 mg/l (4,84 cm/mẫu). Môi trường thích hợp nhất cho tạo cây hoàn chỉnh là MS bổ sung α -NAA với nồng độ 0,5 mg/l. Số rễ thu được đạt 4,83 rễ/chồi sau 8 tuần. Tỷ lệ cây con sống sót khi trồng trên giá thể ngoài tự nhiên đạt 88,3%.
Ngày hoàn thiện: 28/6/2021	
Ngày đăng: 02/7/2021	
TỪ KHÓA	
Cẩm cù tên lửa	
<i>Hoya multiflora</i>	
<i>In vitro</i>	
Môi trường nuôi cấy mô	
Tạo đa chồi	

DOI: <https://doi.org/10.34238/tnu-jst.4571>

* Corresponding author. Email: ngantt.bio@tnue.edu.vn

1. Đặt vấn đề

Lan Cẩm cù tên lửa là loại hoa thuộc họ Thiên lý (Asclepiadaceae), có tên khoa học là *Hoya multiflora*. Người ta còn biết tới loại cây này với những tên gọi khác như lan sao, lan anh đào, trái tim tình nhân, lan cầu lông... Cẩm cù tên lửa thuộc loại cây bụi nhỏ gọn, sống lâu năm. Cây có thân mềm, trên các đốt có rễ. Lá mọc đối, hình bầu dục với đầu hơi thuôn nhọn. Hiện nay có loại Cẩm cù tên lửa lá hình trái tim rất được ưa chuộng. Cẩm cù tên lửa có hoa mọc ở nách lá nên rất sai hoa, hoa có hình cầu gọi là lan cầu. Có loại màu trắng, nhụy đỏ nhạt, tràng hoa hình tán, xếp tựa như hoa anh đào, có hương thơm, được gọi là lan anh đào [1]-[4].

Cẩm cù tên lửa là cây cảnh trang trí rất đẹp. Ngoài ra, đây còn là loài cây có tác dụng rất tốt trong chữa một số bệnh, đã được khoa học các nước chứng minh. Loài cây hay gặp ở vùng Ấn Độ – Malaysia, thường gặp mọc leo trên các cây to, gặp ở chỗ nắng khu vực núi đá vôi, một số nơi ở Bà Rịa (Núi Dinh) và Lâm Đồng (Đà Lạt) [5]. Cẩm cù thu hái toàn cây quanh năm, dùng tươi hay phơi khô. Bộ phận dùng: toàn cây, dùng tươi hoặc phơi khô đều được. Thành phần hóa học, các bộ phận của cây đều phủ sáp, thân và lá chứa sterol glucosid là hoyin (0,76 - 0,83%). Tính vị, tác dụng: vị đắng, tính bình, có tác dụng khứu phong trừ thấp, tiêu ung, giải độc, hạ sốt, long đờm. Công dụng, chỉ định và phối hợp: chữa trị các bệnh viêm phổi nhẹ, viêm phế quản; viêm não B, trẻ em sốt cao; viêm kết mạc, sung amygdal; thấp khớp tạng khớp; viêm vú, viêm tinh hoàn. Liều dùng 60-90 gram cây tươi giã lấy nước chiết uống. Dùng ngoài trị đinh nhọt, viêm mủ da, tổn thương. Giã cây tươi và đắp vào chỗ đau [1], [2], [6], [7].

Việc bảo tồn các giống cây dược liệu nói chung và cây Cẩm cù tên lửa nói riêng có thể thực hiện bằng nhiều biện pháp truyền thống như gieo hạt sau khi thu hái trái chín già và có thể chọn lá hoặc thân già đã có rễ để giâm xuống đất. Tuy nhiên hiệu quả đạt được chưa cao, ít khi có quả chín để lấy hạt. Sự phát triển của ngành công nghệ sinh học, đặc biệt là việc áp dụng kỹ thuật nuôi cấy mô tế bào thực vật sẽ giúp cho việc bảo tồn, tạo nguồn sản phẩm đáp ứng cho thị trường trong nước và tiến tới xuất khẩu. Nghiên cứu nuôi cấy *in vitro* cây Cẩm cù cho đến nay chưa có công trình nào được công bố trên thế giới và tại Việt Nam. Ngoài ra, việc lưu giữ *in vitro* còn nhằm bảo tồn nguồn gen quý, nâng cao chất lượng và phẩm chất cây Cẩm cù tên lửa.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu và môi trường nuôi cấy

Mẫu nuôi cấy mô cây Cẩm cù tên lửa *in vitro* do phòng Công nghệ tế bào thực vật, Khoa Sinh học, Trường Đại học Sư phạm – Đại học Thái Nguyên cung cấp.

Thí nghiệm được tiến hành trên nền môi trường MS cơ bản (Murashige và Skoog, 1962). Các chất kích thích sinh trưởng sử dụng trong nghiên cứu: BAP, Kinetin, GA₃, IBA, NAA. Cồn 90°, cồn 70°, thạch agar, đường sucrose, nước cất khử trùng. Các loại hóa chất tinh khiết và thông dụng có nguồn gốc từ Đức, Trung Quốc, Ấn Độ, Việt Nam,...

2.2. Phương pháp nuôi cấy *in vitro*

2.2.1. Phương pháp tạo đa chồi

Để thăm dò ảnh hưởng của BAP và kinetin đến sự tạo đa chồi của mẫu nuôi cấy, chúng tôi đã sử dụng môi trường MS cơ bản có bổ sung sucrose 30 g/l, agar 9 g/l và chất kích thích tạo đa chồi BAP, kinetin với các nồng độ thay đổi (0,5; 1,0; 1,5; 2,0 mg/l). Mỗi công thức thí nghiệm tiến hành trên 40 mẫu cấy. Đánh giá kết quả sau 2 tuần, 4 tuần, 6 tuần, 8 tuần nuôi cấy. Theo dõi: Số chồi, chiều cao chồi (cm) và chất lượng chồi.

Số chồi trung bình = Tổng số chồi / Tổng số mẫu thí nghiệm

Chiều cao chồi = Tổng kích thước của các chồi / Tổng số mẫu thí nghiệm

2.2.2. Phương pháp kéo dài chồi

Nghiên cứu đã sử dụng GA₃ để kéo dài chồi mẫu cây thí nghiệm, tất cả các công thức nuôi cấy đều sử dụng môi trường MS cơ bản có bổ sung sucrose 30 g/l, agar 9 g/l và chất kích thích kéo dài chồi GA₃ với các nồng độ 0,3; 0,5; 0,7; 0,9 mg/l. Công thức thí nghiệm tiến hành trên 40 mẫu cấy. Thu thập số liệu sau 2 tuần, 4 tuần, 6 tuần, 8 tuần nuôi cấy. Các chỉ tiêu theo dõi: Chiều cao chồi (cm); Chất lượng chồi.

Chiều cao chồi = Tổng kích thước của các chồi/ Tổng số mẫu thí nghiệm

2.2.3. Phương pháp tạo cây hoàn chỉnh

Cầm cù tên lửa được tạo rễ *in vitro* khi bổ sung nhóm chất kích thích ra rễ α -NAA và IBA vào môi trường nuôi cấy. Thí nghiệm sử dụng môi trường MS cơ bản có bổ sung sucrose 30 g/l, agar 9 g/l và chất kích thích ra rễ α -NAA, IBA với các nồng độ 0,3; 0,5; 0,7; 0,9 mg/l. Mỗi công thức thí nghiệm tiến hành trên 40 mẫu cấy. Theo dõi, đánh giá kết quả sau 2 tuần, 4 tuần, 6 tuần, 8 tuần nuôi cấy. Các chỉ tiêu theo dõi: Số rễ/chồi; Chiều dài rễ (cm); Chất lượng rễ.

Số rễ trung bình = Tổng số rễ/ Tổng số mẫu theo dõi

Chiều dài rễ trung bình = Tổng kích thước của các rễ/ Tổng số mẫu theo dõi

2.2.4. Phương pháp đưa cây ra ngoài vườn ươm

Sau khi tạo được cây *in vitro* hoàn chỉnh (cây ra hơn 5 rễ) sẽ được đưa ra môi trường tự nhiên và thử nghiệm trồng trên giá thể ở bầu. Theo dõi và đánh giá khi đưa cây ra vườn ươm. Giá thể chỉ chứa xơ dừa đã được ngâm khử trùng. Tưới nước sạch 2 ngày/lần. Theo dõi, đánh giá kết quả sau 2 tuần, 4 tuần, 6 tuần, 8 tuần. Các chỉ tiêu theo dõi: Tỷ lệ sống sót, Chiều cao cây (cm); Số lá trên cây.

Tỷ lệ cây sống = Tổng số cây sống/ Tổng số cây theo dõi; Chiều cao cây trung bình = Tổng chiều cao cây/ Tổng số cây

2.2.5. Phương pháp xử lý số liệu

Các số liệu nghiên cứu được phân tích và xử lý thống kê với phần mềm hỗ trợ trên máy tính (SPSS). Sử dụng toán thống kê để xác định các chỉ số thống kê như: Trung bình mẫu, phương sai, độ lệch chuẩn và sai số trung bình mẫu với $n \geq 30$, $\alpha = 0,05$. Các số liệu được xử lý trên máy tính bằng chương trình SPSS [8].

3. Kết quả và thảo luận

3.1. Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của BAP, kinetin đến khả năng tạo đa chồi mẫu nuôi cấy

BAP, kinetin là chất kích thích sinh trưởng (KTST) thuộc nhóm cytokinin và được sử dụng phổ biến trong nuôi cấy mô tế bào thực vật. Các chất này ảnh hưởng rõ rệt và đặc trưng đến sự cảm ứng tạo chồi, kéo dài thời gian hoạt động của mô phân sinh, hạn chế sự hóa già của tế bào; đồng thời thúc đẩy sự phân hóa chồi, kích thích chồi phát triển ở nhiều loài thực vật khác nhau.

Trong thí nghiệm này, chúng tôi sử dụng đoạn thân của các cây *in vitro*. Cây *in vitro* sử dụng trong thí nghiệm khoảng 60 ngày tuổi (tính từ thời điểm vào mẫu *in vitro*), trong giai đoạn này mô chưa hóa gỗ hoàn toàn, phần mô phân sinh sẽ tiếp xúc với chất KTST và biệt hóa tạo các chồi bất định. Thân mầm cắt thành từng đoạn có chiều dài từ 1 cm trước khi chuyển vào môi trường nuôi cấy có bổ sung KTST với các nồng độ khác nhau. Theo dõi thí nghiệm và đánh giá kết quả sau các khoảng thời gian nuôi cấy. Kết quả theo dõi các chỉ tiêu thí nghiệm được trình bày ở bảng 1 và hình 1.

Kết quả nghiên cứu sau 8 tuần cho thấy, môi trường nuôi cấy có bổ sung BAP và kinetin ở các nồng độ khác nhau cho kết quả theo dõi khác nhau. Số chồi thu được cao nhất là ở nồng độ BAP 1,0 mg/l với tỷ lệ 3,28 chồi/mẫu cấy, khi tăng nồng độ BAP lên thành 1,5 mg/l số chồi giảm còn 2,86 chồi/mẫu, nồng độ 2,0 mg/l là 2,46 chồi/mẫu. Tất cả các công thức thí nghiệm trên môi trường có BAP đều cho kết quả cao hơn so với môi trường bổ sung kinetin và so với môi trường đối chứng.

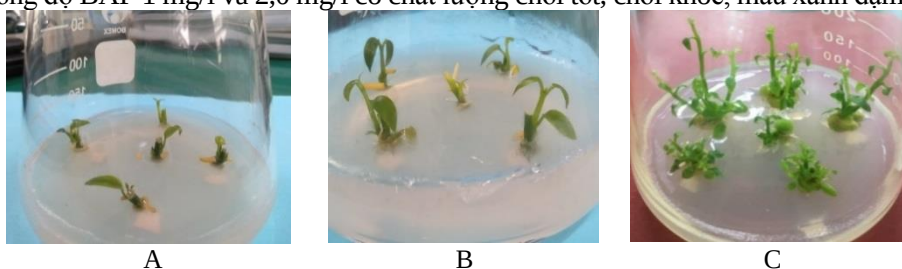
Bảng 1. Ảnh hưởng của BAP và kinetin đến sự tạo đa chồi mẫu nuôi cấy

Công thức	Nồng độ (mg/l)	Số chồi/mẫu (Chồi)		Chất lượng chồi	
		Sau 2 tuần			
		BAP	Kinetin	BAP	Kinetin
ĐC	0	1,02 ± 0,59 ^a	1,02 ± 0,59 ^a	+	+
CT1	0,5	1,25 ± 0,28 ^a	1,25 ± 0,03 ^a	+	++
CT2	1,0	1,45 ± 0,05 ^b	1,27 ± 0,14 ^a	++	++
CT3	1,5	1,10 ± 0,07 ^a	1,12 ± 0,03 ^a	+	++
CT4	2,0	1,41 ± 0,08 ^b	1,12 ± 0,03 ^a	++	+
Sau 4 tuần					
		BAP	Kinetin	BAP	Kinetin
ĐC	0	1,57 ± 0,84 ^a	1,07 ± 0,84 ^a	+	+
CT1	0,5	2,35 ± 0,14 ^b	1,26 ± 0,07 ^b	+	+
CT2	1,0	2,79 ± 0,00 ^b	1,29 ± 0,07 ^b	+++	++
CT3	1,5	2,51 ± 0,02 ^b	1,17 ± 0,03 ^a	+	+
CT4	2,0	2,69 ± 0,03 ^b	1,18 ± 0,02 ^a	+++	+
Sau 6 tuần					
		BAP	Kinetin	BAP	Kinetin
ĐC	0	1,62 ± 0,82 ^a	1,07 ± 0,82 ^a	+	+
CT1	0,5	2,57 ± 0,03 ^b	1,26 ± 0,07 ^b	+	+
CT2	1,0	2,93 ± 0,19 ^b	1,29 ± 0,03 ^b	+++	++
CT3	1,5	2,51 ± 0,02 ^b	1,17 ± 0,03 ^a	+	+
CT4	2,0	2,88 ± 0,07 ^b	1,18 ± 0,14 ^a	+++	++
Sau 8 tuần					
		BAP	Kinetin	BAP	Kinetin
ĐC	0	1,62 ± 0,82 ^a	1,08 ± 0,82 ^a	++	++
CT1	0,5	2,48 ± 0,02 ^b	1,27 ± 0,07 ^b	+	+
CT2	1,0	3,28 ± 0,16^c	1,31 ± 0,07^b	+++	++
CT3	1,5	2,86 ± 0,09 ^a	1,18 ± 0,03 ^{ab}	++	++
CT4	2,0	2,46 ± 0,09 ^b	1,19 ± 0,08 ^{ab}	+++	+

Ghi chú: (+): chồi nhỏ, xanh nhạt; (++) : chồi mập, xanh nhạt; (+++) : chồi mập, xanh đậm.

a, b, c: kí hiệu chỉ có hay không sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) giữa các giá trị trung bình.

Khi quan sát chất lượng và màu sắc chồi ở các công thức môi trường khác nhau thấy rằng, ở môi trường có nồng độ BAP 0,5 và 1,5 mg/l có chồi hơi nhỏ màu xanh nhạt. Các công thức môi trường có bổ sung nồng độ BAP 1 mg/l và 2,0 mg/l có chất lượng chồi tốt, chồi khỏe, màu xanh đậm.

**Hình 1.** Cây Cẩm cù tên lửa *in vitro* trên môi trường tạo đa chồi

A. Mẫu cây trên môi trường đối chứng; B. Mẫu cây trên môi trường có nồng độ kinetin 1,0 mg/l;

C. Mẫu cây trên môi trường có nồng độ BAP 1,0 mg/l

Như vậy, trong nghiên cứu của chúng tôi, môi trường thích hợp cho sự tạo đa chồi ở cây lan Cẩm cù là môi trường có bổ sung BAP 1 mg/l. Trên thế giới cũng đã có một số công trình công bố về môi trường nuôi cấy *in vitro* các loài thuộc chi Cẩm cù (*Hoya*). Nghiên cứu của Lakshmi và cộng sự (2010) trên đối tượng loài *Hoya wightii* ssp. *palniensis* K.T. Mathew (*Asclepiadaceae*)

– một loài thực vật đặc hữu của vùng Western Ghats, Tamil Nadu, Ấn Độ đã cho thấy, hiệu quả cảm ứng tạo đa chồi cao đạt được trên môi trường MS có bổ sung acid ascorbic (100 mg/l) cùng với KN (4,65 μ M) + IBA (1,47 μ M) [9]. Subbaiah và cộng sự đã nghiên cứu “Sự phát sinh cơ quan từ mẫu lá và lóng thân có nguồn gốc *in vitro* của loài *Hoya wightii* ssp. *palniensis* - một loài nhạy cảm của Western Ghats”. Kết quả cho thấy, sự cảm ứng tạo đa chồi tốt nhất được quan sát trên môi trường MS với BA (1,0 mg/l) và IBA (0,5 mg/l). Chồi sinh trưởng, phát triển tốt [10].

Có thể thấy, tùy thuộc vào từng loài sẽ thích nghi với điều kiện nuôi cấy *in vitro* khác nhau. Mỗi đối tượng thực vật sẽ có những đáp ứng nhất định trên môi trường dinh dưỡng nhân tạo có bổ sung các chất kích thích sinh trưởng với nồng độ phù hợp.

3.2. Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của GA₃ đến khả năng kéo dài chồi mẫu nuôi cấy

Axit gibberillic (GA₃) là một loại hormone kích thích sinh trưởng thuộc nhóm gibberellin có tác động làm tế bào giãn ra và phân chia, do đó làm gia tăng chiều cao cho cây. Thí nghiệm đã sử dụng môi trường MS cơ bản có bổ sung sucrose 30 g/l, agar 9 g/l và chất kích thích kéo dài chồi GA₃ với các nồng độ 0,3; 0,5; 0,7; 0,9 mg/l. Theo dõi thí nghiệm sau 2 tuần, 4 tuần, 6 tuần, 8 tuần nuôi cấy. Kết quả được trình bày chi tiết ở bảng 2 và hình 2.

Bảng 2. Ảnh hưởng của GA₃ đến khả năng kéo dài chồi mẫu nuôi cấy

Công thức	Nồng độ GA ₃ (mg/l)	Số chồi/mẫu (chồi)	Chiều cao chồi (cm)	Chất lượng chồi
Sau 2 tuần				
ĐC	0	1,15 ± 0,54	0,42 ± 0,50 ^b	+
CT1	0,3	1,05 ± 0,07^b	0,64 ± 0,08^c	++
CT2	0,5	1,07 ± 0,35 ^b	0,46 ± 0,02 ^b	+
CT3	0,7	0,36 ± 0,06 ^a	0,37 ± 0,00 ^a	+
CT4	0,9	1,40 ± 0,07 ^a	0,31 ± 0,02 ^a	++
Sau 4 tuần				
ĐC	0	1,15 ± 0,60	1,39 ± 0,82 ^a	+
CT1	0,3	1,27 ± 0,03^a	2,14 ± 0,06^c	++
CT2	0,5	1,32 ± 0,03 ^{ab}	1,82 ± 0,00 ^b	+
CT3	0,7	1,42 ± 0,03 ^b	1,12 ± 0,00 ^a	++
CT4	0,9	1,36 ± 0,03 ^b	1,05 ± 0,06 ^a	+
Sau 6 tuần				
ĐC	0	1,15 ± 0,60	1,86 ± 1,08 ^a	+
CT1	0,3	1,40 ± 0,07^a	3,22 ± 0,11^b	++
CT2	0,5	1,37 ± 0,03 ^a	3,03 ± 0,16 ^b	+
CT3	0,7	1,45 ± 0,09 ^a	1,71 ± 0,86 ^a	++
CT4	0,9	1,44 ± 0,05 ^a	1,68 ± 0,00 ^a	+
Sau 8 tuần				
ĐC	0	1,15 ± 0,60	1,94 ± 0,91 ^a	+
CT1	0,3	1,40 ± 0,00^a	4,84 ± 0,07^d	++
CT2	0,5	1,37 ± 0,03 ^a	4,22 ± 0,18 ^c	+
CT3	0,7	1,45 ± 0,00 ^b	3,16 ± 0,04 ^b	++
CT4	0,9	1,45 ± 0,00 ^b	2,18 ± 0,08 ^a	++

Ghi chú: (+): chồi gầy, nhỏ ; (++): chồi mập, khỏe

Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của GA₃ đến khả năng kéo dài chồi mẫu nuôi cấy sau 8 tuần cho thấy, các công thức thí nghiệm đều cho kết quả kéo dài chồi tốt hơn trên môi trường đối chứng. Kết quả kéo dài chồi tốt nhất trong các công thức thí nghiệm là môi trường có bổ sung GA₃ 0,3 mg/l. Chiều cao chồi đạt 4,84 cm sau 8 tuần nuôi cấy. Khi tiếp tục tăng nồng độ GA₃ trong môi trường nuôi cấy, quan sát thấy chiều cao chồi giảm xuống (GA₃ 0,5 mg/l - 4,22 cm; GA₃ 0,7 mg/l - 3,16 cm; GA₃ 0,9 mg/l - 2,18 cm). Về chỉ tiêu chất lượng chồi thấy rằng, ở môi trường có nồng độ GA₃ 0,5 mg/l, 1,5 mg/l và 2,0 mg/l chồi mập, khỏe, xanh thẫm. Chỉ có nồng độ GA₃ 1,0 mg/l là chồi khá nhỏ.

**A****B****Hình 2.** Cây Cẩm cù tên lửa *in vitro* trên môi trường GA₃ sau 8 tuần

A. Mẫu cây trên môi trường đối chứng; B. Mẫu cây trên môi trường có nồng độ GA₃ 0,3 mg/l

Kết quả theo dõi về sự sinh trưởng của mẫu cây Cẩm cù cho thấy, khi tăng nồng độ GA₃ (từ 0,3 mg/l đến 0,9 mg/l), chiều cao chồi có sự thay đổi, cao nhất là môi trường MS có bổ sung GA₃ 0,3 mg/l.

3.3. Kết quả nghiên cứu tạo cây *in vitro* hoàn chỉnh

Khi chồi đạt đến một kích thước nhất định, mẫu được chuyển sang môi trường tạo rễ. Chất kích thích sinh trưởng được dùng chủ yếu ở giai đoạn này thuộc nhóm auxin. IBA và NAA là những chất kích thích chủ yếu tác động lên quá trình phân chia tế bào và sự hình thành rễ. Để chồi *in vitro* phát triển thành cây hoàn chỉnh trong ống nghiệm, chúng tôi thăm dò ảnh hưởng riêng rẽ của IBA và NAA đến sự phát sinh rễ ở cây Cẩm cù tên lửa.

Bảng 3. Ảnh hưởng của NAA và IBA đến khả năng tạo rễ cây Cẩm cù tên lửa

Công thức		Nồng độ (mg/l)		Số lượng rễ		Chiều dài rễ (cm)		Chất lượng rễ	
				Sau 2 tuần					
				NAA	IBA	NAA	IBA	NAA	IBA
ĐC	0	0		0	0	0	0		
CT1	0,3	1,32 ± 0,03 ^b		1,20 ± 0,00 ^b	0,23 ± 0,04 ^a	0,54 ± 0,11 ^a	+	+	
CT2	0,5	0,55 ± 0,07 ^{ab}		0,76 ± 0,23 ^a	0,18 ± 0,00 ^a	0,34 ± 0,09 ^a	+	+	
CT3	0,7	0,62 ± 0,07 ^b		1,16 ± 0,14 ^b	0,19 ± 0,01 ^a	0,41 ± 0,04 ^a	+	+	
CT4	0,9	0,47 ± 0,36 ^a		1,17 ± 0,03 ^b	0,20 ± 0,03 ^a	0,36 ± 0,04 ^a	+	+	
				Sau 4 tuần					
				NAA	IBA	NAA	IBA	NAA	IBA
ĐC	0	1,53 ± 1,72 ^a		0,53 ± 1,72 ^a	1,76 ± 0,99	0,53 ± 1,72 ^a	+	+	
CT1	0,3	2,25 ± 0,07 ^a		1,30 ± 0,14 ^a	2,41 ± 0,07 ^b	1,30 ± 0,14 ^a	+	+	
CT2	0,5	3,02 ± 0,03 ^b		1,14 ± 0,26 ^a	2,43 ± 0,03 ^b	1,14 ± 0,26 ^a	++	++	
CT3	0,7	2,97 ± 0,17 ^b		1,90 ± 0,04 ^b	1,87 ± 0,05 ^a	1,90 ± 0,04 ^b	++	++	
CT4	0,9	2,87 ± 0,10 ^b		2,07 ± 0,10 ^b	2,45 ± 0,04 ^b	2,07 ± 0,10 ^b	++	++	
				Sau 6 tuần					
				NAA	IBA	NAA	IBA	NAA	IBA
ĐC	0	1,56 ± 1,71		0,56 ± 1,71 ^a	2,45 ± 1,26	2,45 ± 1,26 ^a	+	+	
CT1	0,3	2,30 ± 0,00 ^a		1,45 ± 0,07 ^b	3,68 ± 0,10 ^{ab}	4,97 ± 0,46 ^b	++	++	
CT2	0,5	3,72 ± 0,67 ^b		1,50 ± 0,07 ^b	3,93 ± 0,16 ^b	4,89 ± 1,09 ^b	++	++	
CT3	0,7	3,27 ± 0,17 ^a		2,16 ± 0,04 ^c	4,00 ± 0,12 ^b	5,12 ± 0,24 ^b	++	++	
CT4	0,9	2,72 ± 0,04 ^a		2,37 ± 0,10 ^c	3,63 ± 0,08 ^{ab}	5,22 ± 0,34 ^b	++	++	
				Sau 8 tuần					
				NAA	IBA	NAA	IBA	NAA	IBA
ĐC	0	1,56 ± 1,75		1,16 ± 1,75 ^a	3,39 ± 2,65	3,39 ± 2,65 ^a	++	++	
CT1	0,3	2,37 ± 0,03 ^a		1,55 ± 0,07 ^b	6,04 ± 0,17 ^b	7,45 ± 0,30 ^c	++	++	
CT2	0,5	4,83 ± 0,42 ^c		1,66 ± 0,09 ^b	6,15 ± 0,12 ^b	6,38 ± 0,32 ^b	+++	++	
CT3	0,7	3,29 ± 0,84 ^{ab}		2,00 ± 0,56 ^b	5,89 ± 0,03 ^b	6,96 ± 1,08 ^b	+++	++	
CT4	0,9	2,90 ± 0,07 ^{ab}		2,45 ± 0,14 ^c	5,28 ± 0,01 ^b	7,46 ± 0,82 ^c	+++	+++	

Ghi chú: (+) rễ ngắn, nhỏ, màu vàng; (++) rễ bình thường, màu vàng hơi xanh; (+++): rễ mập, dài, có rễ phụ, màu xanh nhạt.

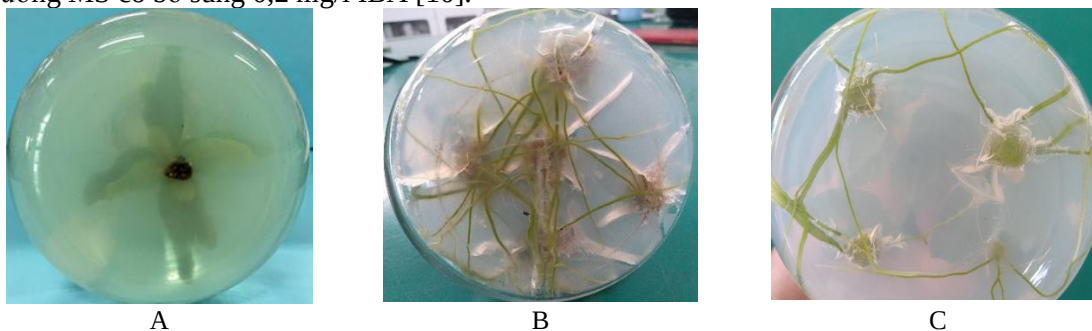
Dựa trên những đặc tính của NAA, chúng tôi tiến hành nghiên cứu ảnh hưởng của NAA đến sự phát sinh rễ cây Cẩm cù tên lửa. Cây cắt bỏ bớt lá, cấy vào môi trường MS cơ bản có bổ sung IBA và NAA với nồng độ thay đổi. Thí nghiệm được tiến hành trên 4 công thức có bổ sung NAA, IBA ở các nồng độ khác nhau. Kết quả thu được sau nuôi cấy 2, 4, 6 và 8 tuần được thể hiện chi tiết trong bảng 3 và hình 3.

Kết quả đánh giá sau 8 tuần nuôi cấy cho thấy, môi trường thích hợp nhất cho sự tạo rễ khi bổ sung NAA trong 4 công thức thí nghiệm là môi trường có NAA 0,5 mg/l. Với số rễ thu được cao nhất trên môi trường này là 4,83 rễ/mẫu, chiều dài rễ đạt 6,15 cm. Quan sát về chất lượng và màu sắc rễ thấy rằng, trên các môi trường nghiên cứu, đa số rễ được tạo ra có màu xanh nhạt. Tất cả các công thức môi trường thí nghiệm đều quan sát thấy kết quả chỉ tiêu theo dõi cao hơn so với đối chứng.

Đối với môi trường có bổ sung IBA, kết quả đánh giá sau 8 tuần cho thấy, số rễ thu được nhiều nhất trên môi trường có nồng độ IBA 0,9 mg/l đạt 2,45 rễ/mẫu, khi giảm nồng độ kích thích sinh trưởng, tỷ lệ tạo rễ giảm xuống lần lượt theo nồng độ như IBA 0,7 mg/l với 2,00 rễ/mẫu, nồng độ 0,5 mg/l tạo được 1,66 rễ/mẫu và IBA 0,3 mg/l với 1,55 rễ/mẫu. Chỉ tiêu chiều dài rễ thu được tốt nhất trên môi trường có IBA 0,9 mg/l đạt 7,46 cm, giảm dần với các nồng độ thấp hơn. Tất cả các công thức môi trường thí nghiệm đều có kết quả chỉ tiêu theo dõi cao hơn so với đối chứng. Khi quan sát chất lượng và màu sắc rễ ở các công thức môi trường khác nhau thấy rằng, ở cả 4 công thức môi trường, rễ được tạo ra đều có màu vàng và xanh nhạt.

Từ kết quả thí nghiệm bổ sung NAA và IBA vào môi trường tạo cây hoàn chỉnh chúng tôi nhận thấy, cây trên môi trường có NAA phát triển tốt hơn với số rễ nhiều hơn. Do đó, trong phạm vi thí nghiệm của bài báo, môi trường có bổ sung NAA 0,5 mg/l là môi trường thích hợp cho sự tạo rễ đối với cây Cẩm cù tên lửa.

Lakshmi và cộng sự trong công bố của mình về “Nhân giống *in vitro* loài *Hoya wightii* ssp. *palniensis* K.T. Mathew, một loài đặc hữu và nhạy cảm vùng Tây Ghats, Tamil Nadu, Ấn Độ” đã nhận thấy, sự hình thành rễ được quan sát trên môi trường MS có bổ sung IBA (0,98 μ M). Cây con với bộ rễ khỏe đủ điều kiện đưa ra trồng ngoài tự nhiên [9]. Subbaiah và cộng sự khi nghiên cứu “Sự phát sinh cơ quan từ mẫu lá và lóng có nguồn gốc *in vitro* của loài *Hoya wightii* ssp. *palniensis* - một loài nhạy cảm phía Tây Ghats” đã công bố, các chồi dài 3 cm được ra rễ trên môi trường MS có bổ sung 0,2 mg/l IBA [10].



Hình 3. Cây Cẩm cù tên lửa *in vitro* trên môi trường ra rễ sau 8 tuần

A. Mẫu cây trên môi trường đối chứng; **B.** Mẫu cây trên môi trường có nồng độ NAA 0,5 mg/l;

C. Mẫu cây trên môi trường có nồng độ IBA 0,9 mg/l

3.4. Kết quả nghiên cứu trồng trên giá thể ngoài vườn ươm

Việc đưa cây ra ngoài vườn ươm là khâu cuối cùng và quan trọng trong quá trình nhân giống *in vitro*. Cần phải thực hiện thật cẩn thận vì đây là khâu quyết định đến sự thành công của quá trình nuôi cấy. Giá thể phù hợp là giá thể cho tỷ lệ cây sống cao, sinh trưởng phát triển tốt. Cây *in vitro* được nuôi cấy trong điều kiện ổn định về nguồn dinh dưỡng, ánh sáng, nhiệt độ... Khi chuyển ra ngoài môi trường tự nhiên hoàn toàn khác nên cây con dễ bị chết do mất nước, nhiệt độ

cao... Vì thế, cây con phải được thích nghi dần với điều kiện ngoài tự nhiên. Trước khi đem cây ra trồng ngoài vườn ươm, đưa cây ra khỏi phòng sinh trưởng, đặt trong điều kiện nhiệt độ phòng bình thường, để khoảng 2 ngày. Sau đó lấy cây ra khỏi bình, rửa sạch agar bám trên rễ. Đem trồng trên giá thể nghiên cứu. Chúng tôi lựa chọn giá thể bằng xơ dừa để trồng cây *in vitro* ngoài tự nhiên. Trong thời gian cây con thích nghi với điều kiện môi trường được chăm sóc, bảo vệ cẩn thận và tưới nước 2 ngày 1 lần. Kết quả theo dõi thí nghiệm và số liệu sau 2 tháng trồng ngoài tự nhiên thể hiện ở bảng 4.

Bảng 4. Kết quả trồng cây ngoài vườn ươm

Số cây ban đầu	Thời gian	Tỷ lệ cây sống (%)	Chiều cao cây	Số lá trên cây
104	Sau 2 tuần	99,0	2,72	4,14
	Sau 4 tuần	92,0	3,80	4,52
	Sau 6 tuần	89,0	5,07	4,87
	Sau 8 tuần	88,3	7,54	5,89

Ghi chú: (+): cây nhỏ, thấp, lá nhỏ và xanh nhạt; (++) : Cây thấp, lá xanh đậm; (+++) : Cây to, phiến lá rộng, lá xanh đậm.

Kết quả trồng 104 cây con trên giá thể với lô thí nghiệm thu được sau 2 tháng cho thấy, tỷ lệ cây sống đạt 88,3%. Cây sinh trưởng tốt, chiều cao đạt khoảng 7,54 cm/cây. Xuất hiện nhiều lá mới, lá có màu xanh đậm. Quan sát thấy thân có sự phát triển to ra. Kích thước thân lá đều thấy có sự thay đổi rõ rệt. Hình ảnh trồng ngoài vườn ươm thể hiện trên hình 4.



Hình 4. Cây Cẩm cù tên lửa trên giá thể ngoài vườn ươm sau 8 tuần

4. Kết luận

Trên môi trường MS cơ bản có bổ sung BAP 1,0 mg/l cho hiệu quả tạo đa chồi tốt nhất trong các nồng độ thí nghiệm nuôi cấy *in vitro* cây Cẩm cù tên lửa. Trên môi trường này chồi xanh đậm, phát triển tốt (đạt 3,28 chồi/mẫu sau 8 tuần nuôi cấy). Môi trường tối ưu cho quá trình kéo dài chồi cây Cẩm cù tên lửa *in vitro* là MS cơ bản có bổ sung GA3 0,3 mg/l (chồi đạt kích thước 4,84 cm sau 8 tuần nuôi cấy). Cây Cẩm cù tên lửa *in vitro* tạo cây hoàn chỉnh phát triển tốt trên môi trường MS cơ bản có bổ sung α -NAA với nồng độ 0,5 mg/l (Số rễ tạo ra đạt 4,83 rễ/mẫu sau 8 tuần nuôi cấy). Khi đưa cây ra ngoài điều kiện tự nhiên ở giai đoạn bầu đất, tỷ lệ cây sống trên giá thể xơ dừa sau 2 tháng đạt 88,3%.

TÀI LIỆU THAM KHẢO/ REFERENCES

- [1] G. David, "Hoya multiflora: asclepiadaceae, curtis'," *Botanical magazine*, vol. 7, no. 1, pp. 3-6, 2008.
- [2] S. Rahayu, F. Yulian, and F. Hirmas, "Hoya species of belitung island, indonesia, utilization and conservation," *Biodiversitas*, vol. 19, no. 2, pp. 369-376, 2018.
- [3] Plants of the World online, "Hoya multiflora blume, Plants of the world online", 2017. [Online]. Available: <http://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:98577-1>. [Accessed Apr. 26, 2020].

-
- [4] Nparks. Flora & fauna web, “*Hoya multiflora* blume (classifications and characteristics)”, 2019. [Online]. Available: <https://www.nparks.gov.sg/florafaunaweb/flora/1/4/1416>. [Accessed Apr. 26, 2020].
- [5] Green Library, “Cẩm cù (Hoya)”, 2018, [Online]. Available: <http://thuvienxanh.com/thu-vien/hoa/cam-cu-238>. [Accessed June 18, 2021].
- [6] S. Rahayu, M. Jusuf, O. Suharson, C. Kusmana, and R. Abdulhadi, “Morphological variation of *Hoya multiflora blume* at different habitat type of bodogol research station of gunung gede pangrango national park, Indonesia,” *Biodiversitas journal of biological diversity*, vol. 11, no. 4, pp. 187-193, 2010.
- [7] D. J. Virgilio, S. Chien-chang, and Y. R. Consolacion, “Terpenoids and sterols from *Hoya multiflora blume*,” *Journal of applied pharmaceutical science*, vol. 5, no. 04, pp. 033-039, 2015.
- [8] C. H. Mau, H. P. Hiep, and N. H. Quan, *Bioinformatics*. Thai Nguyen University Publishing House, 215 pp, 2019.
- [9] S. R. Lakshmi, J. H. F. Benjamin, T. S. Kumar, G. V. S. Murthy, and M. Rao, “In vitro propagation of *Hoya wightii* ssp. *palniensis* K.T. Mathew, a highly vulnerable and endemic species of Western Ghats of Tamil Nadu, India,” *African Journal of Biotechnology*, vol. 9, no. 5, pp. 620-627, 2010.
- [10] R. L. Subbaiah, J. H. F. Benjamin, T. S. Kumar, G. V. S. Murthy, and M. Rao, “Organogenesis from in vitro-derived leaf and internode explants of *Hoya wightii* ssp. *palniensis* -a vulnerable species of Western Ghats,” *Braz. arch. biol. technol.*, vol. 56, no. 3, 2013, doi: <https://doi.org/10.1590/S1516-89132013000300010>.