

NGHIÊN CỨU TẠO CHỒI *IN VITRO* CÂY SÂM CAU (*Curculigo orchioides* Gaertn.) Ở THỪA THIÊN HUẾ

Trương Thị Bích Phượng¹, Đỗ Thị Hoa Thảo¹, Bùi Lê Thanh Nhân², Nguyễn Đức Tuấn¹

(1) Trường Đại học Khoa học, Đại học Huế

(2) Trường Đại học Y Dược, Đại học Huế

Tóm tắt

Cây sâm cau (*Curculigo orchioides* Gaertn.) là một cây thuốc có giá trị. Trong bài báo chúng tôi trình bày kết quả về tạo chồi *in vitro* cây sâm cau ở thị xã Hương Thủy, tỉnh Thừa Thiên Huế. Đoạn thân (khoảng 2,0 cm) của cây sâm cau được khử trùng bằng HgCl_2 0,1% trong thời gian 15-18 phút, kết quả cho thấy khử trùng với thời gian 16 phút có hiệu quả tốt nhất, tỷ lệ mẫu sống đạt 69,08%. Mẫu đoạn thân sau khi khử trùng được cấy lên môi trường MS cơ bản bổ sung các chất kích thích sinh trưởng thuộc nhóm cytokinin là BAP hoặc kinetin. Bổ sung 3,5 mg/l BAP vào môi trường MS, thích hợp cho sự tái sinh chồi từ đoạn thân tự nhiên với tỷ lệ mẫu tái sinh là 96,46% và số chồi/mẫu cao nhất đạt 2,65. Môi trường MS bổ sung riêng lẻ 1,5 mg/l BAP; 1,5 mg/l KIN và 1,5 mg/l TDZ thích hợp cho sự tái sinh chồi từ mẫu lá cây sâm cau *in vitro*; với tỷ lệ mẫu tái sinh chồi lần lượt là 96,68%; 92,88% và 85,76%. Nồng độ chất kích thích sinh trưởng cao hơn và thấp hơn nồng độ này đều làm giảm tỷ lệ mẫu tái sinh chồi. Tiến hành nhân chồi từ chồi đỉnh *in vitro* trên môi trường riêng lẻ BAP và KIN. Sau 6 tuần nuôi cấy, môi trường MS bổ sung 3,0 mg/l BAP thích hợp nhất cho sự nhân chồi từ đỉnh chồi cây sâm cau *in vitro* có nguồn gốc từ đoạn thân tự nhiên với 7,44 chồi/mẫu và có nguồn gốc từ mẫu lá *in vitro* với 10,13 chồi/mẫu.

Từ khóa: đoạn thân, đỉnh chồi *in vitro*, mẫu lá, nhân chồi, tái sinh chồi *in vitro*, sâm cau

Abstract

IN VITRO SHOOT FORMATION OF *Curculigo orchioides* Gaertn. FROM THUA THIEN HUE PROVINCE

Truong Thi Bich Phuong¹, Do Thi Hoa Tham¹, Bui Le Thanh Nhan², Nguyen Duc Tuan¹

(1) University of Sciences, Hue University

(2) University of Medicine and Pharmacy, Hue University

Curculigo orchioides Gaertn is a valuable medicinal plant. This paper presents the obtained results of *in vitro* shoot formation of *Curculigo orchioides* Gaertn., originated in Huong Thuy district, Thua Thien Hue province. The node stems (2 cm in length) were sterilized with HgCl_2 0.15% in 10-18 minutes. Results indicated that highly effective sterilization occurred with HgCl_2 in 16 minutes for the highest rate of living explants was 69.08%. The node stem explants of *Curculigo orchioides* Gaertn. were cultured on Murashige and Skoog (MS) basal medium, supplemented with various concentrations of cytokinin (BAP or kinetin) as plant growth regulators. The addition of 3.5 mg/l BAP to the MS medium produced the highest rate of shoot induction explants (96.46%) and the highest number of shoots (2.56) per explants. MS medium supplemented alone with 1.5 mg/l BAP, 1.5 mg/l kinetin or 1.5 mg/l TDZ seem to be suitable for regeneration and obtained the percentage of shoot regenerating explants of 96.68%, 92.88% and 85.76%, respectively. As the concentrations of plant growth regulators above and below these levels reduce the percentage of shoot production. The shoot multiplication from *in vitro* shoot tip was achieved on MS medium supplemented alone with BAP, kinetin. After 6 weeks of culture, the multiplication coefficient was greatest on MS medium supplemented with 3.0 mg/l BAP. The average number of shoots per explants were 7.44 (from *in vitro* shoot tip derived natural stem explants) and 10.13 (from shoot tip derived *in vitro* leaf explants).

Key words: node stems, shoot tip, leaf explants, multiplication, regeneration, *Curculigo orchioides* Gaertn.

1. MỞ ĐẦU

Cây sâm cau (*Curculigo orchioides* Gaertn.) là một cây thuốc quý, hiện đang được quan tâm rất nhiều. Thân rễ cây sâm cau có các hợp chất có giá

trị như glucoside chlorophenolic, methanol, ethanol, steroid, flavonoid, saponin và tinh dầu, chất nhầy, tannin... Dịch chiết ethanol của sâm cau được đánh giá có tác dụng chống hen suyễn. Sâm cau được sử

Địa chỉ liên hệ: Trương Thị Bích Phượng, email: ttbphuongdt@gmail.com

Ngày nhận bài: 17/12/2017, Ngày đồng ý đăng: 12/1/2018; Ngày xuất bản: 18/1/2018

Kết quả trình bày ở Bảng 2 cho thấy, môi trường đối chứng có hệ số tái sinh chồi thấp chỉ đạt 1,0 chồi/mẫu, chồi nhỏ và yếu; tỷ lệ mẫu tái sinh chồi thấp (60,64%) (Hình 1.a). Môi trường MS cơ bản có bổ sung BAP (1,0 - 4,0 mg/l) đã kích thích phát sinh chồi *in vitro*. Khi tăng nồng độ BAP từ 1,0 - 3,0 mg/l, số chồi và chiều cao chồi thu được tăng, chất lượng chồi tốt, chồi xanh, khỏe, mập; tỷ lệ mẫu tái sinh chồi cao. Số chồi thu được cao nhất (2,65 chồi/mẫu), chiều cao chồi lớn nhất (4,86 cm), đường kính chồi lớn nhất (0,39 cm) và số lá nhiều nhất (3,99 lá/chồi) trên môi trường bổ sung 3,5 mg/l BAP (Hình

1.b) với tỷ lệ mẫu tái sinh chồi rất tốt đạt (96,46%). Tiếp tục tăng nồng độ BAP lên 4,0 mg/l sự tạo chồi của mẫu bị ức chế, số chồi, chiều cao chồi, số lá/chồi và đường kính chồi thu được đều giảm, đoạn thân có xu hướng phình ra hình thành các cấu trúc phôi.

3.3. Ảnh hưởng của KIN đến khả năng tái sinh chồi *in vitro*

Đoạn thân sâm cau (0,5 cm) được cấy lên môi trường MS có bổ sung 1,0 - 4,0 mg/l KIN. Kết quả ảnh hưởng của KIN đến khả năng tái sinh chồi từ mẫu đoạn thân qua 6 tuần theo dõi được trình bày ở Bảng 3.

Bảng 3. Ảnh hưởng của KIN lên khả năng tái sinh chồi của mô nuôi cấy

KIN (mg/l)	Tỷ lệ mẫu tạo chồi (%)	Số chồi (chồi/mẫu)	Chiều cao chồi (cm)	Đường kính chồi (cm)	Số lá (lá/chồi)
ĐC	60,64	1,00 ^d	3,07 ^c	0,19 ^d	2,50 ^c
1,0	73,64	1,04 ^c	3,36 ^b	0,21 ^c	2,73 ^b
2,0	80,24	1,12 ^{bc}	3,39 ^b	0,22 ^c	3,16 ^a
2,5	84,33	1,12 ^{bc}	3,44 ^b	0,25 ^b	3,16 ^a
3,0	92,16	1,19 ^b	3,68 ^a	0,25 ^b	3,20 ^a
3,5	95,84	1,34^a	3,74^a	0,27^a	3,36^a
4,0	92,04	1,05 ^c	3,28 ^b	0,28 ^a	2,64 ^b

Kết quả cho thấy, môi trường đối chứng có hệ số tái sinh chồi thấp chỉ đạt 1,00 chồi/mẫu, chiều cao chồi thấp (3,07 cm); chồi nhỏ và xanh nhạt. Môi trường MS cơ bản có bổ sung KIN (1,0 - 4,0 mg/l) đã kích thích phát sinh chồi *in vitro*. Khi tăng nồng độ KIN từ 1,0 - 3,0 mg/l, số chồi và chiều cao chồi thu được tăng. Chất lượng chồi tốt, chồi xanh, tỷ lệ mẫu tái sinh chồi tăng (92,16%). Số chồi thu được cao nhất (1,34 chồi/mẫu), chiều cao chồi lớn nhất (3,74 cm), đường kính chồi lớn nhất (0,27 cm) và số lá nhiều nhất (3,36 lá/chồi) trên môi trường bổ sung 3,5 mg/l KIN (Hình 1.c) với tỷ lệ mẫu tái sinh chồi rất tốt đạt (95,84%). Khi tiếp tục tăng nồng độ KIN lên 4,0 mg/l đã ức chế sự tạo chồi của mẫu, số chồi, chiều cao chồi, số lá/chồi đều giảm.

Shende và cs (2012) nghiên cứu khả năng tái sinh chồi *in vitro* từ đoạn thân cây sâm cau tự nhiên trên

môi trường MS có bổ sung riêng lẻ BAP (0,25 - 2,0 mg/l) và KIN (0,25 - 2,0 mg/l). Môi trường MS có bổ sung 0,5 mg/l BAP cho khả năng tái sinh chồi tốt nhất với 1,0 chồi/mẫu. Môi trường MS có bổ sung 0,5 mg/l KIN cho khả năng tái sinh chồi tốt nhất với 0,4 chồi/mẫu. Kết quả của chúng tôi cao hơn so với kết quả của Shende và cs (2012) nguyên nhân có thể do vật liệu nghiên cứu có nguồn gốc khác nhau, có thể do một số yếu tố thí nghiệm không hoàn toàn đồng nhất.

3.4. Ảnh hưởng của BAP đến khả năng tái sinh chồi từ mẫu lá *in vitro*

Lá thu được ở thí nghiệm tái sinh chồi từ đoạn thân cây sâm cau tự nhiên được cắt thành các đoạn ngắn (1,0 cm) và cấy vào môi trường MS có bổ sung BAP với nồng độ từ 0,5 - 2,0 mg/l. Kết quả ảnh hưởng của BAP đến khả năng tái sinh chồi từ mẫu lá *in vitro* qua 6 tuần theo dõi được trình bày ở bảng 4.

Bảng 4. Ảnh hưởng của BAP lên khả năng tái sinh chồi từ mẫu lá *in vitro*

BAP (mg/l)	Tỷ lệ mẫu tạo chồi (%)	Số chồi (chồi/mẫu)	Chiều cao chồi (cm)	Đường kính chồi (cm)	Số lá (lá/chồi)
ĐC	62,25	1,37 ^d	3,10 ^c	0,15 ^d	2,79 ^c
0,5	73,65	1,90 ^c	3,11 ^c	0,18 ^c	3,16 ^b
1,0	84,77	2,04 ^b	3,71 ^b	0,22 ^b	3,52 ^a
1,5	96,68	2,46^a	3,98^a	0,27^a	3,54^a
2,0	83,43	2,25 ^{ab}	3,76 ^b	0,25 ^a	3,23 ^b

Kết quả cho thấy, môi trường đối chứng có hệ số tái sinh chồi thấp chỉ đạt 1,37 chồi/mẫu, đường kính chồi nhỏ (0,15 cm), chồi yếu; tỷ lệ mẫu tái sinh chồi thấp (62,25%). Môi trường MS cơ bản có bổ sung BAP (0,5 - 2,0 mg/l) đã kích thích phát sinh chồi *in vitro*. Khi tăng nồng độ BAP từ 0,5 - 1,0 mg/l, số chồi và chiều cao chồi thu được tăng. Chất lượng chồi tốt, chồi xanh, khỏe; tỷ lệ mẫu tái sinh chồi cao. Số chồi thu được cao nhất (2,46 chồi/mẫu), chiều cao chồi lớn nhất (3,98 cm), đường kính chồi lớn nhất (0,27 cm) và số lá nhiều nhất (3,54 lá/chồi) trên môi trường bổ sung 1,5 mg/l BAP (Hình 2.a) với tỷ lệ mẫu tái sinh chồi rất tốt đạt 96,68%. Tiếp tục tăng nồng độ BAP lên 2,0 mg/l sự tạo chồi của mẫu bị ức chế, số chồi, chiều cao chồi, số lá/chồi và đường kính chồi thu được đều giảm, lá có xu hướng phình ra hình thành các cấu trúc phôi có màu trắng.

Thomas (2007) quan sát thấy rằng cấy trực tiếp mẫu lá trên môi trường MS có bổ sung BAP (2,0 - 8,0 μ mol/l) hoặc kết hợp với NAA (0,5 - 1,0 μ mol/l) tạo

ra chồi cảm ứng thấp cả về tỷ lệ phần trăm phản ứng và số lượng chồi trên mẫu cấy. Hiren và cs (2003) thấy rằng mẫu lá sâm cau có khả năng tái sinh trên môi trường MS có bổ sung BAP (0,2 - 1,0 mg/l), tốt nhất là môi trường MS có bổ sung 0,2 mg/l BAP với 1,44 chồi/mẫu. Khi tăng nồng độ BAP, không xảy ra tái sinh chồi, các mẫu lá sau 60 ngày bị hóa đen và chết. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cao hơn so với kết quả của Hiren và cs (2003), trên môi trường MS cơ bản bổ sung 1,5 mg/l BAP, chúng tôi đã thu được 2,46 chồi/mẫu sau 6 tuần nuôi cấy.

3.5. Ảnh hưởng của KIN đến khả năng tái sinh chồi từ mẫu lá *in vitro*

Lá thu được ở thí nghiệm tái sinh chồi từ đoạn thân cây sâm cau tự nhiên được cắt thành các đoạn 1,0 cm và cấy vào môi trường MS có bổ sung KIN với nồng độ từ (0,5 - 2,0 mg/l). Kết quả ảnh hưởng của KIN đến khả năng tái sinh chồi từ mẫu lá *in vitro* qua 6 tuần theo dõi được trình bày ở bảng 5.

Bảng 5. Ảnh hưởng của KIN lên khả năng tái sinh chồi từ mẫu lá *in vitro*

KIN (mg/l)	Tỷ lệ mẫu tạo chồi (%)	Số chồi (chồi/mẫu)	Chiều cao chồi (cm)	Đường kính chồi (cm)	Số lá (lá/chồi)
ĐC	62,25	1,37 ^d	3,11 ^c	0,15 ^c	2,79 ^c
0,5	72,67	1,79 ^c	3,27 ^{bc}	0,17 ^c	3,09 ^b
1,0	83,85	1,99 ^{bc}	3,27 ^{bc}	0,25 ^a	3,34 ^{ab}
1,5	92,88	2,37^a	4,24^a	0,28^a	3,53^a
2,0	80,46	2,18 ^{ab}	4,17 ^a	0,23 ^b	3,39 ^{ab}

Kết quả cho thấy, môi trường đối chứng có hệ số tái sinh chồi thấp chỉ đạt 1,37 chồi/mẫu, đường kính chồi nhỏ (0,15 cm), tỷ lệ mẫu tái sinh chồi thấp (62,25%). Môi trường MS cơ bản có bổ sung KIN (0,5 - 2,0 mg/l) đã kích thích phát sinh chồi *in vitro*. Khi tăng nồng độ KIN từ 0,5 - 1,5 mg/l, số chồi và chiều cao chồi thu được tăng dần. Số chồi thu được cao nhất (2,37 chồi/mẫu), chiều cao chồi lớn nhất (4,24 cm), đường kính chồi lớn nhất (0,28 cm) và số lá nhiều nhất (3,53 lá/chồi) trên môi trường bổ sung 1,5 mg/l KIN (Hình 2.b) với tỷ lệ mẫu tái sinh chồi rất tốt đạt (92,88%). Tiếp tục tăng nồng độ KIN lên 2,0 mg/l đã ức chế sự tạo chồi của mẫu, số chồi, chiều cao chồi, số lá/chồi và đường kính chồi thu được đều giảm, lá có xu hướng phình ra hình thành các cấu trúc phôi có màu trắng xám.

3.6. Ảnh hưởng của TDZ đến khả năng tái sinh chồi từ mẫu lá *in vitro*

Các lá thu được ở thí nghiệm tái sinh chồi từ đoạn thân cây sâm cau tự nhiên được cắt thành các đoạn 1,0 cm và cấy vào môi trường MS có bổ sung

TDZ với nồng độ từ (0,5 - 2,0 mg/l). Kết quả ảnh hưởng của TDZ đến khả năng tái sinh chồi từ lá *in vitro* qua 6 tuần theo dõi được trình bày ở bảng 6.

Kết quả cho thấy, môi trường đối chứng có hệ số tái sinh chồi thấp chỉ đạt 1,37 chồi/mẫu, đường kính chồi nhỏ (0,16 cm), chồi yếu; tỷ lệ mẫu tái sinh chồi thấp (62,25%). Môi trường MS cơ bản có bổ sung TDZ (0,5 - 2,0 mg/l) đã kích thích phát sinh chồi *in vitro*. Khi tăng nồng độ TDZ từ 0,5 - 1,0 mg/l, số chồi và chiều cao chồi thu được tăng. Chất lượng chồi tốt, chồi xanh, khỏe; tỷ lệ mẫu tái sinh chồi cao. Số chồi thu được cao nhất (1,87 chồi/mẫu), chiều cao chồi lớn nhất (3,29 cm), đường kính chồi lớn nhất (0,27 cm) và số lá nhiều nhất (3,37 lá/chồi) trên môi trường bổ sung 1,5 mg/l TDZ (Hình 2.c) với tỷ lệ mẫu tái sinh chồi đạt (85,76%). Tiếp tục tăng nồng độ TDZ lên 2,0 mg/l, sự tạo chồi của mẫu bị ức chế, số chồi, chiều cao chồi, số lá/chồi và đường kính chồi thu được đều giảm, mẫu lá có xu hướng phình ra tạo thành nhiều các cấu trúc phôi có màu trắng.

Bảng 6. Ảnh hưởng của TDZ lên khả năng tái sinh chồi từ mẫu lá *in vitro*

TDZ (mg/l)	Tỷ lệ mẫu tạo chồi (%)	Số chồi (chồi/mẫu)	Chiều cao chồi (cm)	Đường kính chồi (cm)	Số lá (lá/chồi)
ĐC	62,25	1,37 ^d	3,11 ^c	0,16 ^c	2,79 ^c
0,5	70,37	1,48 ^c	3,15 ^{bc}	0,21 ^b	2,95 ^c
1,0	78,88	1,55 ^{bc}	3,19 ^b	0,24 ^{ab}	3,24 ^{ab}
1,5	85,76	1,87^a	3,29^a	0,27^a	3,37^a
2,0	67,46	1,62 ^b	3,15 ^{bc}	0,24 ^{ab}	3,05 ^{bc}

Thomas (2007) quan sát thấy rằng cấy trực tiếp mẫu lá trên môi trường MS có bổ sung nồng độ khác nhau của BAP (2 - 8 $\mu\text{mol/l}$) hoặc TDZ (2 - 8 $\mu\text{mol/l}$) hoặc kết hợp với NAA (0,5 và 1,0 $\mu\text{mol/l}$) cảm ứng tạo chồi thấp cả về tỷ lệ phần trăm phản ứng và số lượng chồi trên mẫu cấy. Do đó, lá đã được tiền xử lý với 15, 25 hoặc 50 $\mu\text{mol/l}$ TDZ trong 6, 24 hoặc 48 giờ để tăng chồi từ nuôi cấy. Tiền xử lý mẫu cấy với 15 $\mu\text{mol/l}$ TDZ trong 24 giờ thúc đẩy lớn sự hình thành phát sinh chồi và đạt cao nhất trên môi trường MS có bổ sung TDZ 6 $\mu\text{mol/l}$. Như vậy, các chất kích thích sinh trưởng khác nhau thuộc nhóm

cytokinin sẽ ảnh hưởng khác nhau đến sự tạo chồi của mẫu vật.

3.7. Nhân chồi từ đỉnh chồi cây sâm cau *in vitro* phát sinh từ đoạn thân tự nhiên

Ảnh hưởng của BAP đến khả năng nhân chồi từ đỉnh chồi in vitro

Đỉnh chồi thu được ở thí nghiệm tái sinh chồi từ đoạn thân cây sâm cau tự nhiên được cắt ngắn (0,5 cm) và cấy vào môi trường MS có bổ sung BAP với nồng độ từ (1,0 - 4,0 mg/l). Kết quả ảnh hưởng của BAP đến khả năng nhân chồi từ đỉnh chồi *in vitro* qua 6 tuần theo dõi được trình bày ở bảng 7.

Bảng 7. Ảnh hưởng của BAP lên khả năng nhân chồi từ đỉnh chồi *in vitro*

BAP (mg/l)	Số chồi (chồi/mẫu)	Chiều cao chồi (cm)	Số lá (lá/chồi)
ĐC	2,31 ^d	12,47 ^d	3,84 ^c
1,0	4,27 ^c	13,65 ^c	4,20 ^{bc}
2,0	6,29 ^b	14,20 ^{bc}	4,20 ^{bc}
2,5	6,87 ^{ab}	16,08 ^a	4,83 ^{ab}
3,0	7,44^a	16,76^a	5,14^a
3,5	6,31 ^b	14,76 ^b	4,52 ^b
4,0	4,34 ^c	13,63 ^c	3,89 ^c

Kết quả cho thấy, môi trường đối chứng có hệ số nhân chồi thấp chỉ đạt 2,31 chồi/mẫu, chiều cao chồi nhỏ (12,47 cm), số lá ít (3,84 lá/chồi) (Hình 3.a). Môi trường MS cơ bản có bổ sung BAP (1,0 - 4,0 mg/l) đã kích thích phát sinh chồi *in vitro*. Khi tăng nồng độ BAP từ 1,0 - 2,5 mg/l, số chồi và chiều cao chồi thu được tăng. Chất lượng chồi tốt, chồi khỏe. Số chồi thu được cao nhất (7,44 chồi/mẫu), chiều cao chồi lớn nhất (16,76 cm), và số lá nhiều nhất (5,14 lá/chồi) trên môi trường bổ sung 3,0 mg/l BAP (Hình 3.b). Tiếp tục tăng nồng độ BAP lên 4,0 mg/l, sự tạo chồi của mẫu bị ức chế, số chồi, chiều cao chồi, số lá/chồi đều giảm.

Theo nghiên cứu của Nagesh và cs (2008) nhân chồi từ đỉnh chồi cây sâm cau *in vitro* sử dụng môi trường MS bổ sung BAP (2,0 mg/l) cho hệ số nhân chồi tốt nhất là 5,90 chồi/mẫu. Võ Châu Tuấn và cs

(2011) nghiên cứu nhân chồi từ đỉnh chồi cây sâm cau *in vitro* sử dụng BA từ 0,5 - 4,0 mg/l cho hệ số nhân chồi tốt nhất ở 2,5 mg/l với 8,25 chồi/mẫu. Kết quả nhân chồi từ đỉnh chồi cây sâm cau *in vitro* của chúng tôi cao hơn so với kết quả của Nagesh (2008) nhưng lại thấp hơn so với kết quả của Võ Châu Tuấn (2011), nguyên nhân có thể do vật liệu có nguồn gốc khác nhau, có thể do một số yếu tố thí nghiệm không hoàn toàn đồng nhất.

Ảnh hưởng của KIN đến khả năng nhân chồi từ đỉnh chồi in vitro

Đỉnh chồi thu được ở thí nghiệm tái sinh chồi từ đoạn thân cây sâm cau tự nhiên được cắt ngắn (0,5 cm) và cấy vào môi trường MS có bổ sung KIN với nồng độ từ (1,0 - 4,0 mg/l). Kết quả ảnh hưởng của KIN đến khả năng nhân chồi từ đỉnh chồi *in vitro* qua 6 tuần theo dõi được trình bày ở bảng 8.

Bảng 8. Ảnh hưởng của KIN lên khả năng nhân chồi từ đỉnh chồi *in vitro*

KIN (mg/l)	Số chồi (chồi/mẫu)	Chiều cao chồi (cm)	Số lá (lá/chồi)
ĐC	2,31 ^d	12,47 ^e	3,84 ^d
1,0	3,19 ^c	13,23 ^d	3,87 ^d
2,0	3,52 ^{bc}	14,20 ^c	4,15 ^c
2,5	3,82 ^b	15,42 ^b	4,46 ^b
3,0	5,31^a	16,57^a	4,88^a
3,5	4,82 ^a	14,27 ^c	4,14 ^c
4,0	3,48 ^{bc}	13,24 ^d	3,85 ^d

Kết quả cho thấy, môi trường đối chứng có hệ số nhân chồi thấp chỉ đạt 2,31 chồi/mẫu, chiều cao chồi nhỏ (12,47 cm), số lá ít (3,84 lá/chồi). Môi trường MS cơ bản có bổ sung KIN (1,0 - 4,0 mg/l) đã kích thích phát sinh chồi *in vitro*. Khi tăng nồng độ KIN từ 1,0 - 2,5 mg/l, số chồi và chiều cao chồi thu được tăng. Chất lượng chồi tốt, chồi khỏe. Số chồi thu được cao nhất (5,31 chồi/mẫu), chiều cao chồi lớn nhất (16,57 cm), và số lá nhiều nhất (4,88 lá/chồi) trên môi trường bổ sung 3,0 mg/l KIN (Hình 3.c). Khi tiếp tục tăng nồng độ KIN lên 4,0 mg/l đã ức chế sự tạo chồi của mẫu, số chồi, chiều cao chồi, số lá/chồi đều giảm.

3.8. Nhân chồi từ đỉnh chồi cây sâm cau phát sinh từ mẫu lá *in vitro*

Ảnh hưởng của BAP đến khả năng nhân chồi từ đỉnh chồi *in vitro*

Đỉnh chồi thu được ở thí nghiệm tái sinh chồi từ

lá cây sâm cau *in vitro* được cắt ngắn (0,5 cm) và cấy vào môi trường MS có bổ sung BAP với nồng độ từ (1,0 - 4,0 mg/l). Kết quả ảnh hưởng của BAP đến khả năng nhân chồi từ đỉnh chồi *in vitro* qua 6 tuần theo dõi được trình bày ở bảng 9.

Kết quả cho thấy, môi trường đối chứng có hệ số nhân chồi thấp chỉ đạt 2,49 chồi/mẫu, chiều cao chồi nhỏ (9,43 cm), số lá ít (3,61 lá/chồi) (Hình 4.a). Môi trường MS cơ bản có bổ sung BAP (1,0 - 4,0 mg/l) đã kích thích phát sinh chồi *in vitro*. Khi tăng nồng độ BAP từ 1,0 - 2,5 mg/l, số chồi và chiều cao chồi thu được tăng. Chất lượng chồi tốt, chồi khỏe. Số chồi thu được cao nhất (10,13 chồi/mẫu), chiều cao chồi lớn nhất (11,49 cm) và số lá nhiều nhất (5,09 lá/chồi) trên môi trường bổ sung 3,0 mg/l BAP (Hình 4.b). Tiếp tục tăng nồng độ BAP lên 4,0 mg/l sự tạo chồi của mẫu bị ức chế, số chồi, chiều cao chồi, số lá/chồi đều giảm.

Bảng 9. Ảnh hưởng của BAP lên khả năng nhân chồi từ đỉnh chồi *in vitro*

BAP (mg/l)	Số chồi (chồi/mẫu)	Chiều cao chồi (cm)	Số lá (lá/chồi)
ĐC	2,49 ^e	9,43 ^c	3,61 ^d
1,0	4,49 ^d	12,01 ^b	4,16 ^c
2,0	6,46 ^c	12,76 ^a	4,21 ^c
2,5	8,32 ^b	13,18 ^a	4,43 ^{bc}
3,0	10,13^a	11,49^b	5,09^a
3,5	8,21 ^b	10,60 ^c	4,66 ^b
4,0	6,41 ^c	9,40 ^d	4,17 ^c

Ảnh hưởng của KIN đến khả năng nhân chồi từ đỉnh chồi *in vitro*

Đỉnh chồi thu được ở thí nghiệm tái sinh chồi từ lá cây sâm cau *in vitro* được cắt ngắn (0,5 cm) và cấy vào môi trường MS có bổ sung KIN với nồng độ từ

(1,0 - 4,0 mg/l). Kết quả ảnh hưởng của KIN đến khả năng nhân chồi từ đỉnh chồi *in vitro* qua 6 tuần theo dõi được trình bày ở bảng 10.

Bảng 10. Ảnh hưởng của KIN lên khả năng nhân chồi từ đỉnh chồi *in vitro*

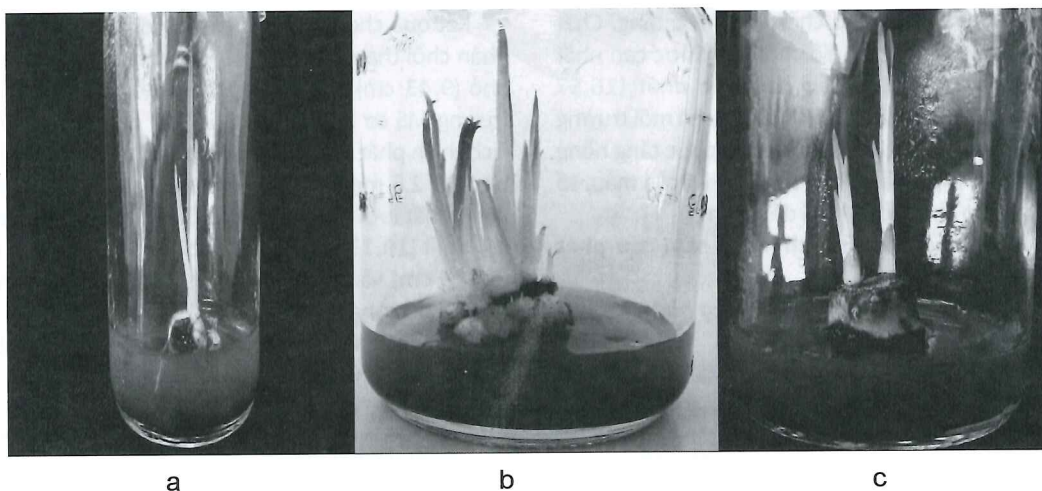
KIN (mg/l)	Số chồi (chồi/mẫu)	Chiều cao chồi (cm)	Số lá (lá/chồi)
ĐC	2,49 ^e	9,43 ^d	3,61 ^d
1,0	3,73 ^d	10,53 ^c	3,86 ^c
2,0	5,34 ^c	11,35 ^{bc}	4,28 ^b
2,5	7,02 ^b	12,20 ^{ab}	4,33 ^b
3,0	8,35^a	13,04^a	4,95^a
3,5	7,14 ^b	10,55 ^c	4,45 ^b
4,0	5,27 ^c	9,38 ^d	3,73 ^{cd}

Kết quả cho thấy, môi trường đối chứng có hệ số tái sinh chồi thấp chỉ đạt 2,49 chồi/mẫu, chiều cao chồi nhỏ (9,43 cm), số lá ít (3,61 lá/chồi). Môi trường MS cơ bản có bổ sung KIN (1,0 - 4,0 mg/l) đã kích thích phát sinh chồi *in vitro*. Khi tăng nồng độ KIN từ 1,0 - 2,5 mg/l, số chồi và chiều cao chồi thu được tăng. Chất lượng chồi tốt, chồi khỏe. Số chồi thu được cao nhất (8,35 chồi/mẫu), chiều cao chồi lớn nhất (13,04 cm) và số lá nhiều nhất (4,95 lá/chồi) trên môi trường bổ sung 3,0 mg/l KIN (Hình 4.c). Tiếp tục tăng nồng độ KIN lên 4,0 mg/l sự tạo chồi của mẫu ức chế, số chồi, chiều cao chồi, số lá/chồi đều giảm.

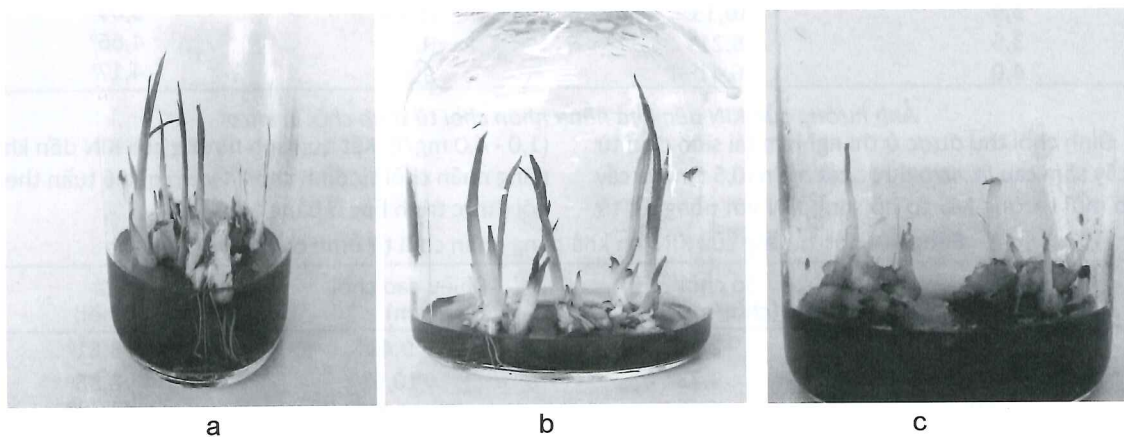
4. KẾT LUẬN

Đoạn thân tự nhiên cây sâm cau được khử trùng

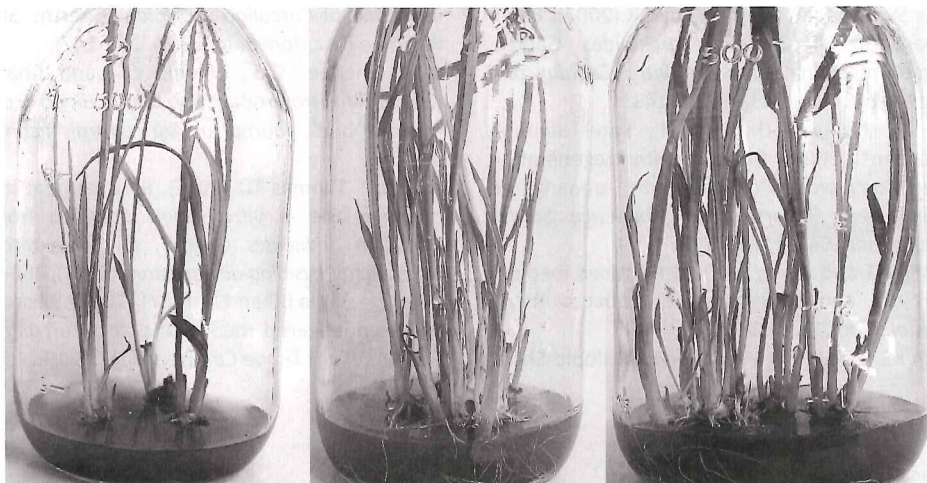
bằng HgCl_2 0,1% trong thời gian 16 phút có hiệu quả khử trùng tốt nhất với tỉ lệ mẫu sống đạt 69,08%. Môi trường bổ sung 3,5 mg/l BAP hoặc 3,5 mg/l KIN thích hợp cho sự tái sinh chồi từ đoạn thân tự nhiên với tỉ lệ mẫu tái sinh lần lượt là 96,46% và 95,84%. Môi trường MS bổ sung riêng lẻ 1,5 mg/l BAP, 1,5 mg/l KIN và 1,5 mg/l TDZ đều thích hợp cho sự tái sinh chồi từ mẫu lá cây sâm cau *in vitro*; với tỉ lệ mẫu tái sinh chồi theo thứ tự lần lượt là 96,68%, 92,88%, 85,76%. Môi trường MS bổ sung 3,0 mg/l BAP thích hợp nhất cho sự nhân chồi từ đỉnh chồi cây sâm cau *in vitro* có nguồn gốc từ đoạn thân tự nhiên với 7,44 chồi/mẫu và có nguồn gốc từ mẫu lá *in vitro* với 10,13 chồi/mẫu.



Hình 1. Chồi *in vitro* tái sinh từ đoạn thân trên môi trường MS bổ sung BAP sau 6 tuần nuôi cấy
a. Môi trường MS cơ bản
b. Môi trường bổ sung 3,5 mg/l BAP
c. Môi trường bổ sung 3,5 mg/l KIN



Hình 2. Chồi *in vitro* tái sinh từ mẫu lá trên môi trường MS bổ sung BAP sau 6 tuần nuôi cấy
a. Môi trường bổ sung 1,5 mg/l BAP
b. Môi trường bổ sung 1,5 mg/l KIN
c. Môi trường bổ sung 2,0 mg/l TDZ

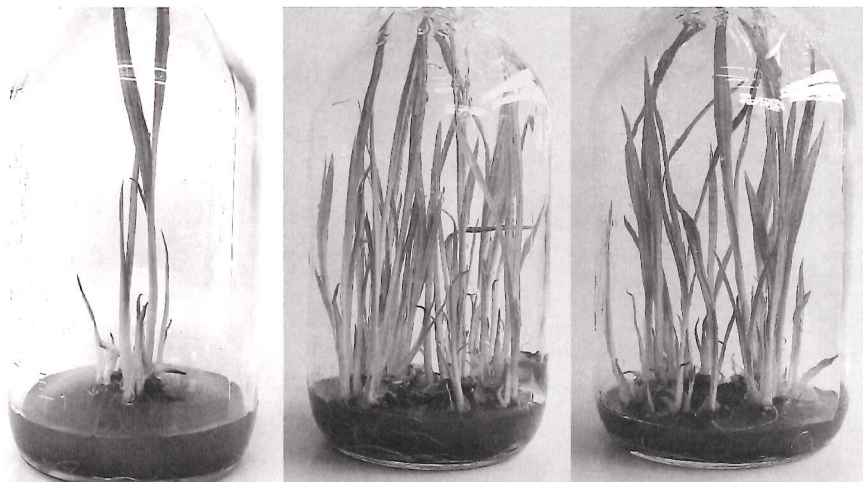


Hình 3. Nhân chồi từ đỉnh chồi *in vitro* phát sinh từ đoạn thân tự nhiên trên môi trường MS bổ sung chất KTST sau 6 tuần nuôi cấy

a. Môi trường MS cơ bản

b. Môi trường MS bổ sung 3,0 mg/l BAP

c. Môi trường MS bổ sung 3,0 mg/l KIN



Hình 4. Nhân chồi từ đỉnh chồi *in vitro* phát sinh từ mẫu lá *in vitro* trên môi trường MS bổ sung chất KTST sau 6 tuần nuôi cấy

a. Môi trường MS cơ bản

b. Môi trường MS bổ sung 3,0 mg/l BAP

c. Môi trường MS bổ sung 3,0 mg/l KIN

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Tài liệu tiếng Việt

1. Nguyễn Tập (2001), Áp dụng khung phân hạng mới của IUCN-1994 để đánh giá tình trạng bị đe dọa đối với các loài cây thuốc cần bảo tồn ở Việt Nam hiện nay, *Tạp chí Dược liệu*, 6 (2+3), tr 42 - 45.

2. Nguyễn Duy Thuần, Nguyễn Thị Phương Lan (2001), Bước đầu nghiên cứu cây sâm cau, *Tạp chí Dược Liệu*, 6 (6), 163-166.

3. Võ Châu Tuấn, Nguyễn Thị Út, Trần Quang Dân (2011), Nhân giống *in vitro* cây sâm cau (*Curculigo orchiodes* Gaertn.)- Một loài cây thuốc quý, *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Đại học Đà Nẵng*, 6(47), 163-169.

Tài liệu tiếng Anh

4. Augustine A.C. Souza L.D. (1997), Regeneration of an anticarcinogenic herb, *Curculigo orchiodes* (Gaertn.), *In vitro Cellular and Development Biology Plant* 33 (2), 111-113.

5. Francis SV, Senapati SK and Rout GR (2007), Rapid clonal propagation of *Curculigo orchioides* Gaertn. An endangered medicinal plant, *In vitro Cellular and Development Biology Plant*, 43(2), 140-143.

6. Hiren A., Prajapati Darshan H., Patel Saurabh RB., Subramanian* (2003), Direct *in vitro* regeneration of *Curculigo orchioides* Gaertn., an endangered anticarcinogenic herb, *Department of Biosciences Sardar Patel University, India*, 54 (2), 747- 748.

7. Murashige T and Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures, *Physiol. Plant* 15, 473-97.

8. Nagesh KS (2008), High Frequency Multiple Shoot

Induction of *Curculigo orchioides* Gaertn.: Shoot Tip V/S Rhizome Disc, *Taiwania*, 53(3), 242-247.

9. Shende, C.B., Undal, V.S. and Chaudhari, U.S. (2012), "In vitro propagation of *Curculago orchioides* from rhizome bud", *Journal of Agricultural Technology*, 8 (1), 353-362.

10. Thomas TD (2007), Pretreatment in thidiazuron improves the *in vitro* shoot induction from leaves in *Curculigo orchioides* Gaertn., an endangered medicinal plant, *Acta Physiologiae Plantarum*, 29(5), 455-461.

11. Wala BB and Jasrai YT (2003), Micropropagation of an endangered medicinal plant: *Curculigo orchioides* Gaertn., *Plant Tissue Culture* 13(1), 13-19.