

Ứng dụng kỹ thuật nuôi cấy *in vitro* trong nhân giống cây Lạc tiên
(*Passiflora foetida* L.)

Nguyễn Thị Huyền, Đoàn Thị Thu Hương, Bùi Thị Phương, Nguyễn Văn Việt*

Trường Đại học Lâm nghiệp

Application of *in vitro* culture techniques for *Passiflora foetida* L. propagation

Nguyen Thi Huyen, Doan Thi Thu Huong, Bui Thi Phuong, Nguyen Van Viet*

Vietnam National University of Forestry

*Corresponding author: vietnv@vnuf.edu.vn

<https://doi.org/10.55250/jo.vnuf.13.4.2024.003-010>

TÓM TẮT

Quy trình vi nhân giống cây Lạc tiên (*Passiflora foetida* L.) đã được phát triển, đóng góp vào việc tạo ra các cây khoẻ mạnh, sạch bệnh có thể làm nguồn cung cấp cây con cho việc sản xuất các sản phẩm dược phẩm từ loài cây này. Kết quả nghiên cứu nhân giống cây Lạc tiên cho thấy: khử trùng mẫu hạt bằng dung dịch NaClO 5% trong thời gian 7 phút, nuôi trên môi trường MS cho tỉ lệ mẫu sạch là 100% và tỉ lệ mẫu nảy mầm là 98,89% sau 4 tuần nuôi cấy. Kích thích tạo đa chồi trên môi trường 0,5 mg/l BAP, 0,3 mg/l kinentin, 0,1 mg/l NAA, 30 g/l sucrose, 6,5 g/l agar cho hệ số nhân chồi 9,94 lần/chu kỳ nhân (4 tuần), tỉ lệ chồi hữu hiệu đạt 98,88%. Chồi Lạc tiên được ra rễ trên môi trường MS bổ sung 0,3 mg/l NAA, 20 g/l sucrose và 6 g/l agar cho tỉ lệ chồi ra rễ đạt 99,44%, số rễ trung bình đạt 6,39 rễ/cây và chiều dài rễ trung bình đạt 3,2 cm. Cây Lạc tiên nuôi cấy *in vitro* hoàn chỉnh được huấn luyện 10 ngày trong nhà lưới cho thích nghi dần với điều kiện tự nhiên, cây được trồng trên giá thể 75% cát vàng phối trộn 25% đất tầng B đạt tỉ lệ sống 90,57%, chiều cao cây trung bình đạt 4,32 cm sau 4 tuần.

ABSTRACT

Procedure for micropropagation *Passiflora foetida* L. has developed. It may play an important role in the production of healthy and disease-free plants which can be a source of seedlings for the production of pharmaceutical products from these plants. The results showed that the most suitable method for seed surface sterilization was soaked in 5% NaClO for 7 minutes giving a germination rate of 98.89% after 4 weeks. MS basal medium supplemented with 0.7 mg/L BAP, 0.3 mg/L kinetin, 0.1 mg/L NAA, 30 g/L sucrose was the most effective medium for multi-shoot regeneration (9.94 shoots/explant). The percentage of potential shoots was 98.88%. The *in vitro* generated shoots were rooted on the MS medium containing 0.3 mg/L NAA, 20 g/L sucrose, and 6 g/L agar. By this method, 99.44% of shoots were rooted. The average number of roots was 6.39 roots/shoot, and the average length of roots was 3.2 cm after 4 weeks of culture. The survival rate archived at 90.57% after 4 weeks of ex-vitro acclimating and transplanting to pots of 75% sand and 25% B-layer soil. The plantlets grew and developed well with an average height of 4.32 cm.

Thông tin chung:

Ngày nhận bài: 09/04/2024

Ngày phản biện: 21/06/2024

Ngày quyết định đăng: 17/07/2024

Từ khóa:

Cây Lạc tiên, cụm chồi, *in vitro*,
Passiflora foetida L., vi nhân giống.

Keywords:

In vitro, micorpropagation, multi
– shoot, *Passiflora foetida* L.,
passion flower.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Các sản phẩm dược liệu có nguồn gốc thực vật như flavonoid, terpen, alkanoid... đã nhận được sự quan tâm ngày càng nhiều trong những năm gần đây vì sự an toàn cho sức khoẻ người sử dụng và thân thiện với môi trường [1]. Cây Lạc tiên (*Passiflora foetida* L.) thuộc họ Lạc tiên (Passifloraceae) là một loại cây dược liệu được sử dụng rộng rãi trong dân gian và các bài thuốc đông y. Trong điều kiện đất đai, khí hậu, thời tiết của nước ta, Lạc tiên có thể trồng được nhiều nơi, trừ vùng núi cao có sương muối. Cây Lạc tiên phân bố ở cả 3 miền: Bắc, Trung, Nam mọc thành bụi rậm ven đường, trên núi cao hoặc trong rừng. Ngoài ra, cây Lạc tiên còn phân bố ở Nam Mỹ, Mexico, Trung Mỹ và các nước Đông Nam Á [2]. Nước sắc của lá cây Lạc tiên được dùng để chữa rắn cắn, vô sinh, động kinh và rối loạn kinh nguyệt [3]. Bột lá được bôi lên đầu để trị chứng chóng mặt, nhức đầu, vàng da, viêm gan, táo bón... Cây Lạc tiên đã được nghiên cứu có tác dụng chống co thắt, an thần, giảm lo âu, chống kí sinh trùng, kháng khuẩn, kháng nấm và chống oxy hoá. Hơn nữa loại cây này còn có đặc tính bảo vệ gan, chống trầm cảm, chống ung thư, giảm đau và chống viêm [4].

Các hợp chất có hoạt tính sinh học quan trọng của cây Lạc tiên là passifloricin, polyketides, alkaloids, phenols, glycoside, flavonoids, hợp chất cyanogenic và alpha pyrones. Cho đến nay khoảng 294 hợp chất dễ bay hơi đã được phân lập chỉ từ chiết xuất quả của loại cây này.

Do có chứa các đặc tính y học quý nên cây Lạc tiên đã được khai thác, chế biến thành một số sản phẩm hỗ trợ sức khoẻ trên thị trường nhưng công tác gây trồng còn nhiều hạn chế nên quần thể tự nhiên của loài cây này đang giảm dần. Kỹ thuật nuôi cấy mô tế bào thực vật có thể được áp dụng để nhân giống nhanh chóng và đại trà các loài cây có giá trị kinh tế và dược liệu. Một số báo cáo nghiên cứu nhân giống *in vitro* loài cây Lạc tiên đã được công bố [3, 5-9], nhưng số lượng còn khá hạn chế. Vì vậy, kết quả nghiên cứu nhân giống thành công cây Lạc tiên bằng kỹ thuật

nuôi cấy *in vitro* đạt hệ số nhân giống cao, có thể áp dụng vào sản xuất cây con chất lượng cao phục vụ cho mục đích phát triển và thương mại.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu, hóa chất nghiên cứu

Hạt lấy từ cây mẹ Lạc tiên (*Passiflora foetida* L.) sinh trưởng tốt, không sâu bệnh được thu thập tại huyện Hoàn Bò, tỉnh Quảng Ninh.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Tạo mẫu sạch in vitro: Hạt Lạc tiên được rửa bằng xà phòng loãng trong 1 - 2 phút, sau đó tráng sạch xà phòng dưới vòi nước chảy. Tiếp tục rửa trong nước cất vô trùng 2 - 3 lần và khử trùng mẫu bằng NaClO 5% với các thời gian khác nhau (từ 3-9 phút). Cuối cùng, dùng nước cất vô trùng tráng mẫu nhiều lần để loại bỏ hóa chất khử trùng và tách vỏ hạt trước khi đưa vào môi trường MS để hạt tái sinh. Thu thập tỉ lệ mẫu sạch, tỉ lệ mẫu tái sinh sau 4 tuần nuôi cấy. Các mẫu tái sinh sẽ được sử dụng cho các thí nghiệm sau.

Nhân nhanh chồi: Các chồi Lạc tiên *in vitro* khỏe mạnh thu được từ thí nghiệm trước được tách thành các đoạn chứa mắt ngủ kích thước dài 1,5 - 2 cm và cấy vào môi trường nhân nhanh chồi có bổ sung các chất điều hòa sinh trưởng BAP (0,3 - 0,7 mg/l), NAA (0 - 0,1 mg/l) và kinetin (0,1 - 0,3) có nồng độ khác nhau. Sau 4 tuần nuôi cấy, thống kê số chồi tạo ra trên cụm chồi, số chồi hữu hiệu và tính hệ số nhân chồi.

Tạo cây hoàn chỉnh: chồi hữu hiệu thu được từ giai đoạn nhân nhanh chồi có chiều cao từ 2 - 3 cm được cấy vào vào môi trường ra rễ bổ sung chất điều hòa sinh trưởng NAA có nồng độ khác nhau (0,1 - 0,7 mg/l) để tạo cây hoàn chỉnh. Sau 4 tuần nuôi cấy thống kê chiều dài rễ trung bình, số rễ trung bình trên 1 cây và chất lượng rễ thu được.

Huấn luyện và ra ngôi: Các cây Lạc tiên hoàn chỉnh được huấn luyện ở nhà lưới dưới ánh sáng tán xạ với các thời gian 10 ngày. Sau đó, rửa sạch agar ở cây con và cấy vào bầu chứa giá thể phối trộn đất tầng B và cát vàng với các công thức khác nhau như mô tả ở Bảng

1. Các bầu cây được đặt trong vườn ươm có che lưới đen để tránh ánh sáng trực xạ, duy trì tưới phun sương 2 lần/ngày. Sau 4 tuần ra ngôi, thống kê tỉ lệ cây sống, chiều cao và chất lượng cây con.

Bố trí thí nghiệm: Các thí nghiệm nuôi cấy được bố trí trong bình tam giác thủy tinh (5 mẫu/ bình 250 ml), mỗi công thức thí nghiệm cấy 30 mẫu, lặp lại 3 lần.

Điều kiện nuôi cấy: Cường độ chiếu sáng

3000 lux, thời gian chiếu sáng 14 giờ/ngày, nhiệt độ phòng nuôi 25±2°C. Các loại môi trường nuôi cấy trong nghiên cứu dựa trên môi trường dinh dưỡng MS (Murashige & Skoog, 1962) và được điều chỉnh về pH 5,8, khử trùng ở 121°C trong 20 phút.

Xử lý số liệu: Số liệu được xử lý theo phương pháp thống kê sinh học ứng dụng các phần mềm đã lập trình trên máy tính điện tử như Excel và SPSS.

Bảng 1. Thành phần các loại môi trường nuôi cấy cây Lạc tiên *in vitro*

Giai đoạn nuôi cấy	Kí hiệu môi trường	Công thức môi trường
Nuôi cấy khởi động	NCKĐ	MS + 20 g/l sucrose + 6,5 g/l agar
Nhân nhanh chồi	N ₁ -N ₅	MS + 0,3 - 0,7 mg/l BAP + 0,1 - 0,3 mg/l kinetin + 0 - 0,1 mg/l NAA + 30 g/l sucrose + 6,5 g/l agar
Ra rễ tạo cây hoàn chỉnh	R ₁ -R ₄	MS + 0,1 - 0,7 mg/l NAA + 20 g/l sucrose + 6 g/l agar
Ra ngôi	B ₁ -B ₅	R ₁ : 100% đất tầng B; R ₂ : 25% cát vàng + 75% đất tầng B; R ₃ : 50% cát vàng + 50% đất tầng B; R ₄ : 75% cát vàng + 25% đất tầng B; R ₅ : 100% cát vàng

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Tạo mẫu sạch *in vitro*

Trong các giai đoạn của nhân giống *in vitro*, có thể nói tạo mẫu sạch là giai đoạn khởi đầu và cũng là quan trọng nhất. Bởi vì, chỉ khi có được nguồn mẫu sạch thì mới thực hiện được các giai đoạn tiếp theo của quá trình nhân giống. Tùy thuộc vào từng đối tượng, từng loài khác nhau mà sử dụng những hoá chất khử trùng, cũng như thời gian khử trùng khác nhau

nhằm hướng đến mục tiêu cuối cùng là tạo ra được nhiều mẫu sạch nhất có thể. Các hoá chất thường được sử dụng phổ biến trong khử trùng tạo mẫu sạch là H₂O₂, HgCl₂, NaClO, Sodium bromide... [10]. Trong nghiên cứu này sử dụng NaClO 5% với các thời gian khác nhau. Hiệu quả của thời gian khử trùng được đánh giá thông qua tỉ lệ mẫu sạch và tỉ lệ mẫu sạch nảy mầm sau 4 tuần theo dõi được thể hiện trong Bảng 2.

Bảng 2. Ảnh hưởng của thời gian khử trùng đến hiệu quả tạo mẫu sạch *in vitro*

CTTN	Thời gian khử trùng (phút)	Tỉ lệ mẫu sạch (%)	Tỉ lệ tái sinh chồi (%)
M ₁	3	75,56	53,33
M ₂	5	87,78	78,89
M₃	7	100	98,89
M ₄	9	100	62,22
	<i>Sig</i>	0,0001	0,0001

Ghi chú: *Sig* < 0,05 nghĩa là các chỉ tiêu quan sát trong thí nghiệm có sự sai khác giữa các thí nghiệm.

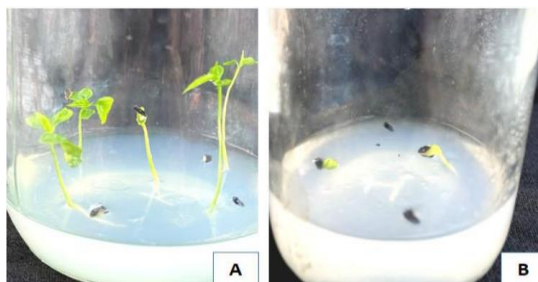
Từ Bảng 2 cho thấy khi khử trùng bằng NaClO 5% ở thời gian 3 phút thì chưa đủ để tạo mẫu sạch, cho nên số mẫu nhiễm nhiều trong các lần thí nghiệm. Khi tăng thời gian khử trùng lên 5 phút thì tỉ lệ mẫu sạch cũng tăng dần và đạt 100% ở thời gian 7 và 9 phút. Tỉ lệ mẫu sạch nảy mầm tăng dần từ 53,33 – 98,89% tương ứng với thời gian tăng dần từ 3

- 7 phút, sau đó giảm xuống 62,22% ở thời gian khử trùng 9 phút. Khi khử trùng với NaClO ở thời gian càng dài thì khả năng hoá chất ngấm vào bên trong ảnh hưởng đến sự nảy mầm của phôi càng cao. Do đó, càng khử trùng ở thời gian dài thì tỉ lệ mẫu sạch cao, tuy nhiên tỉ lệ mẫu nảy mầm lại giảm xuống. Từ kết quả thí nghiệm cho thấy công thức khử

trùng hạt cây Lạc tiên phù hợp là 7 phút cho tỉ lệ mẫu sạch 100% và tỉ lệ mẫu nảy mầm đạt 98,89% (Hình 1).

Kết quả phân tích so sánh các công thức thí

nghiệm về chỉ tiêu tỉ lệ mẫu sạch và tỉ lệ mẫu tái sinh có Sig < 0,05 nên kết quả nghiên cứu có ý nghĩa thống kê.



Hình 1. Hạt Lạc tiên được khử trùng bằng công thức M₁ (A) và M₂ (B) sau 4 tuần nuôi cấy

3.2. Nhân nhanh chồi *in vitro*

Môi trường dinh dưỡng đóng vai trò quan trọng trong việc thúc đẩy sự sinh trưởng và phát triển của mẫu cấy *in vitro*. Lựa chọn được loại và hàm lượng chất điều hòa sinh trưởng phù hợp giúp tăng nhanh số lượng mẫu trong giai đoạn tạo đa chồi nhằm phục vụ các thí nghiệm tiếp theo. Trong giai đoạn này, các chất điều hòa sinh trưởng thuộc nhóm Cytokinin thường được sử dụng vì khả năng

kích thích sự phân hoá, sinh trưởng và phát triển chồi của mẫu cấy *in vitro*. Chồi cây Lạc tiên *in vitro* thu được từ thí nghiệm trước có chiều cao 1,5 - 2 cm được cắt thành các đoạn chứa mắt ngủ cấy chuyển sang môi trường nhân nhanh chứa các chất điều hòa sinh trưởng khác nhau. Sau 4 tuần nuôi cấy bổ sung với các chất điều hòa sinh trưởng BAP, kinetin và NAA cho thấy kết quả ảnh hưởng rõ rệt tới khả năng nhân nhanh chồi.

Bảng 3. Ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng đến khả năng nhân nhanh chồi *in vitro*

CTTN	Chất ĐHST (mg/l)			Hệ số nhân nhanh chồi (lần)	Tỉ lệ chồi hữu hiệu (%)	Chất lượng chồi
	BAP	Kinetin	NAA			
ĐC	-	-	-	0,73	0	Chồi ngắn, thân nhỏ, không đồng đều
N ₁	0,3	0,1	0,1	3,83	79,81	Chồi ngắn, thân nhỏ, không đồng đều
N ₂	0,3	0,3	0,1	5,06	86,84	Chồi cao, thân nhỏ, lá nhỏ, không đồng đều
N ₃	0,5	0,3	0,1	9,94	98,88	Chồi cao, thân mập, đồng đều
N ₄	0,5	0,1	0,1	6,17	88,36	Chồi cao, thân nhỏ, lá nhỏ, không đồng đều
N ₅	0,7	0,2	0,1	2,61	68,06	Chồi ngắn, thân nhỏ, không đồng đều
	Sig			0,0001	0,0001	

Ghi chú: Sig < 0,05 nghĩa là các chỉ tiêu quan sát trong thí nghiệm có sự sai khác giữa các thí nghiệm.

Kết quả thu được như mô tả ở Bảng 3 cho thấy, công thức môi trường đối chứng N₁ chỉ sử dụng môi trường cơ bản MS không bổ sung chất điều hòa sinh trưởng nên các chồi hầu như không phát sinh thêm chồi mới, không có chồi hữu hiệu, chất lượng chồi kém, thân nhỏ, không đồng đều. Khi bổ sung chất điều hòa

sinh trưởng thuộc nhóm cytokinin (BAP và kinetin) kết hợp với NAA thì hệ số nhân chồi tăng lên rõ rệt từ 2,61 (công thức N₅) đến 9,94 lần (công thức N₃). Tỉ lệ chồi hữu hiệu cũng tăng nhanh tương ứng với sự tăng của hệ số nhân chồi từ 68,06% (công thức N₅) đến 98,88% (công thức N₃). Dựa vào kết quả thu

được với hệ số nhân nhanh chồi 9,94 lần và tỉ lệ chồi hữu hiệu 98,88% ở công thức thí nghiệm N₃ là thích hợp nhất đối với giai đoạn nhân nhanh cây Lạc tiên (Hình 2).

Mặc dù Trần Hiếu và cộng sự (2019) nghiên cứu tạo đa chồi cây Chanh dây tím (*P. edulis* Sims) trên môi trường MS có cải biên bổ sung 1 mg/l BA cho hiệu quả nhân nhanh chồi là 3,56 chồi/mẫu và chiều cao trung bình là 6,67 cm sau 8 tuần nuôi cấy [8], một nghiên cứu nhân giống vô tính *in vitro* cây Chanh dây (*P. Edulis* Sims) cho biết sử dụng môi trường MS bổ sung 0,5 mg/l BAP cho khả năng tạo chồi tốt nhất là 3,95 chồi/mẫu với chiều cao trung bình là 2,24 cm [11]. Ragavendran và cộng sự (2012) thu được hệ số nhân chồi 3,6 lần, với chiều dài chồi trung bình đạt 7,3 cm khi nghiên cứu tạo đa chồi từ chồi *P. foetida* L. trên môi trường MS bổ sung 1,5 mg/l BAP [6].

Anand và cs (2012) và Shekhawat và cộng sự (2015) cũng sử dụng BAP kết hợp với kinetin để cảm ứng tạo đa chồi cây Lạc tiên [5, 9]. Komathi và cộng sự (2011) đã sử dụng môi trường MS bổ sung BAP và NAA để kích thích tạo đa chồi *P. foetida* L. [7]. Kết quả từ nghiên cứu này cũng tương tự về việc sử dụng kết hợp các chất điều hòa sinh trưởng BAP, kinetin và NAA trong giai đoạn nhân nhanh chồi và số lượng chồi được tái sinh trong giai đoạn này cũng khá tương đồng so với kết quả của các công trình đã công bố trước đó. Phân tích so sánh giữa các công thức thí nghiệm về chỉ tiêu tỉ lệ chồi hữu hiệu có Sig < 0,05 nên các chỉ tiêu sinh trưởng có sự sai khác giữa các công thức và kết quả nghiên cứu có ý nghĩa thống kê.



Hình 2. Chồi Lạc tiên trên các công thức thí nghiệm nhân nhanh khác nhau sau 4 tuần nuôi cấy
 a: Công thức thí nghiệm ĐC; b: Công thức thí nghiệm N₁; c: Công thức thí nghiệm N₂;
 d: Công thức thí nghiệm N₃; e: Công thức thí nghiệm N₄; f: Công thức thí nghiệm N₅.

3.3. Ra rễ tạo cây hoàn chỉnh

Giai đoạn cây con hoàn chỉnh (cây có đầy đủ thân, lá và rễ) là một giai đoạn quan trọng trong quá trình nhân giống *in vitro*. Cây con có bộ rễ khoẻ mạnh sẽ có khả năng sống và sinh trưởng tốt khi đưa từ điều kiện phòng thí nghiệm ra trồng ngoài vườn ươm. Trong

nghiên cứu này, vai trò của auxin (NAA) trong quá trình ra rễ đã được thử nghiệm. Các chồi hữu hiệu thu được từ thí nghiệm nhân nhanh được chuyển sang môi trường ra rễ tạo cây *in vitro* hoàn chỉnh. Kết quả sau 4 tuần nuôi cấy cho thấy nồng độ NAA khác nhau có ảnh hưởng rõ rệt đến khả năng ra rễ của cây Lạc tiên.

Bảng 4. Ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng đến khả năng ra rễ *in vitro*

CTTN	Chất ĐHST (mg/l)	Tỉ lệ chồi ra rễ (%)	Số rễ TB/cây (rễ)	Chiều dài TB/cây (cm)	Đặc điểm rễ
	NAA				
ĐC	-	25,56	2,06	0,57	Rễ yếu, ngắn, ít
R ₁	0,1	88,89	3,61	1,73	Rễ nhỏ, ngắn, ít
R₂	0,3	99,44	6,39	3,2	Rễ mập, dài, nhiều rễ
R ₃	0,5	85,56	5,24	1,07	Rễ ngắn, nhiều rễ
R ₄	0,7	67,78	3,3	0,9	Rễ nhỏ, ngắn, ít rễ
	<i>Sig</i>	0,001	0,001	0,001	

Ghi chú: *Sig* < 0,05 nghĩa là các chỉ tiêu quan sát trong thí nghiệm có sự sai khác giữa các thí nghiệm.

Trong nuôi cấy mô tế bào thực vật, để có thể giúp tạo rễ cho chồi *in vitro* thì việc bổ sung chất điều hòa sinh trưởng với hàm lượng phù hợp là rất cần thiết do hầu hết các chồi không có khả năng tự tổng hợp chất điều hòa sinh trưởng như cây con ngoài tự nhiên. Trong nghiên cứu này sử dụng NAA với nồng độ khác nhau. Kết quả thu được ở Bảng 4 cho thấy bổ sung chất ĐHST có sự khác biệt rõ rệt so với công thức đối chứng. Không bổ sung chất điều hòa sinh trưởng khiến cho việc ra rễ tạo cây hoàn chỉnh gặp nhiều khó khăn. Bổ sung NAA nồng độ 0,1- 0,7 mg/l giúp ích cho việc hình thành rễ ở các chồi *in vitro*. Tuy nhiên, số lượng và chất lượng rễ là rất khác nhau ở các công thức thí nghiệm. Trong đó, ở công thức

R₂ bổ sung 0,3 mg/l NAA cho kết quả tốt nhất với số rễ trung bình/cây đạt 6,39 rễ, chiều dài rễ trung bình là 3,2 cm (Hình 3).

Mặc dù Sherawat và cộng sự (2015) đã báo cáo khoảng 63% chồi tạo rễ trên môi trường 1/2MS bổ sung 2,0 mg/l IBA [5], Komathi và cộng sự (2011) cho biết tạo rễ *in vitro* thành công trên cây *P. Foetida* L. khi nuôi cấy trên môi trường MS chứa 1,0 mg/l IBA và IAA [7]. Ragavendran và cộng sự (2012) cũng tạo rễ *P. foetida* L. *in vitro* trên môi trường MS bổ sung 1 mg/l IBA [6]. Như vậy có thể thấy, với cây Lạc tiên việc dùng các chất điều hòa sinh trưởng nhóm auxin là NAA và IBA đều cho kết quả tạo rễ *in vitro* khả quan.



Hình 3. Cây Lạc tiên ra rễ *in vitro* trên các công thức thí nghiệm khác nhau

3.4. Kết quả huấn luyện và ra ngôi

Cây con *in vitro* được huấn luyện sẽ có điều kiện để làm quen với môi trường bên ngoài như nhiệt độ, độ ẩm, ánh sáng. Trong thí nghiệm này, cây Lạc tiên *in vitro* được huấn luyện trong nhà lưới với thời gian 10 ngày. Sau khi huấn luyện, cây con được rửa thạch và trồng vào các giá thể với thành phần ruột bầu khác nhau. Ở giai đoạn đầu giá thể đóng vai

trò quan trọng vì vừa giúp cung cấp đủ nước, chất dinh dưỡng cho cây giai đoạn đầu vừa tạo độ thông thoáng cho rễ mới phát triển. Trong thí nghiệm này, thành phần ruột bầu trồng cây con Lạc tiên *in vitro* được bố trí với 5 công thức. Sau 4 tuần trồng, các chỉ tiêu để đánh giá tỉ lệ sống và sự sinh trưởng của cây con được thống kê và tổng hợp ở Bảng 5.

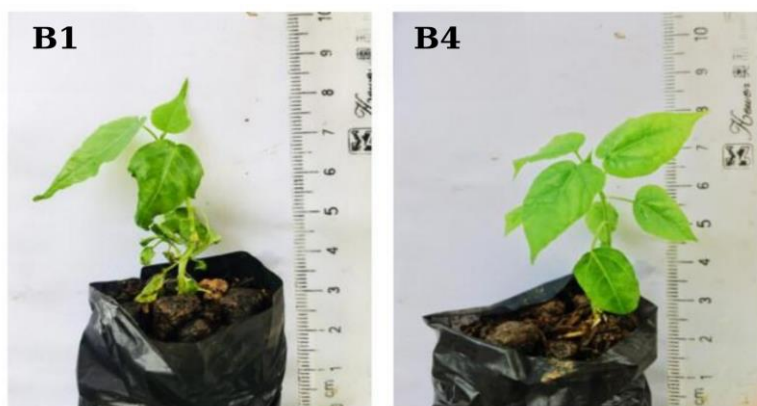
Bảng 5. Ảnh hưởng của thành phần ruột bầu đến khả năng sống của cây *in vitro*

CTTN	Thành phần ruột bầu	Tỉ lệ sống (%)	Chiều cao cây TB (cm)	Chất lượng cây con
B ₁	100% đất tầng B	67,75	2,13	+
B ₂	25% cát vàng - 75% đất tầng B	80,24	3,12	++
B ₃	50% cát vàng – 50% đất tầng B	85,67	3,48	++
B₄	75% cát vàng – 25% đất tầng B	90,57	4,32	+++
B ₅	100% cát vàng	70,25	2,57	+

Ghi chú: Sig < 0,05 nghĩa là các chỉ tiêu quan sát trong thí nghiệm có sự sai khác giữa các thí nghiệm. (+): cây phát triển kém, thân mảnh; (++): cây phát triển chậm, lá xanh tốt; (+++): cây phát triển nhanh, lá xanh tốt.

Kết quả thu được cho thấy rằng, 100% đất tầng B có độ xốp và thoát nước kém nên ở công thức B₁ (100% đất tầng B) tỉ lệ sống không cao (67,75%), cây kém phát triển, thân cây mảnh. Ngược lại, ở công thức B₅ (100% cát vàng) không có khả năng giữ nước và các chất dinh dưỡng nên cây mất nước và tỉ lệ cây chết cao, cây kém phát triển. Giá thể ruột bầu trồng Lạc tiên nuôi cấy *in vitro* giai đoạn 4 tuần đầu thích hợp nhất là 75% cát vàng – 25% đất tầng B cho tỉ lệ cây sống 90,57%, chiều cao cây trung bình 4,32 cm, cây có chất lượng tốt và có thể đưa ra trồng ngoài đồng ruộng (Hình 4). Tác giả Shekhawat và cộng sự (2015) sau khi tạo cây *P. foetida* L. *in vitro* hoàn chỉnh đã

huấn luyện trong nhà lưới từ 2-3 tuần sau đó, cây con được trồng vào bầu ươm chứa hỗn hợp cát, đất soilrite, phân hữu cơ và đất đen theo tỉ lệ 1:1:1:1 với tỉ lệ sống 100% [5]. Trong khi đó, Anand và cộng sự (2012) trồng cây con *P. foetida* L. vào bầu chứa đá khoáng (vermiculite) và đất theo tỉ lệ 1:1 và được che bằng túi nilon có lỗ thoáng khí đạt tỉ lệ cây sống 85% sau 15 ngày [9]. Từ các kết quả này có thể thấy rằng, thành phần ruột bầu trong giai đoạn đầu chuyển cây con từ điều kiện phòng thí nghiệm ra vườn ươm cần cung cấp đủ ẩm và dinh dưỡng để cây con thích nghi và đạt tỉ lệ sống cao.



Hình 4. Cây Lạc tiên sau khi ra ngôi 7 ngày ở công thức thí nghiệm B1 và B4

4. KẾT LUẬN

Mẫu hạt Lạc tiên khử trùng bằng dung dịch NaClO 5% trong thời gian 7 phút, nuôi trên môi trường MS cho tỉ lệ mẫu sạch là 100%, tỉ lệ mẫu nảy mầm là 98,89% sau 4 tuần nuôi cấy khởi động.

Môi trường nhân nhanh chồi Lạc tiên là MS bổ sung 0,5 mg/l BAP, 0,3 mg/l kinetin, 0,1 mg/l NAA, 30 g/l sucrose, 6,5 g/l agar cho hệ số nhân chồi 9,94 lần/chu kỳ nhân (4 tuần), tỉ lệ chồi hữu hiệu đạt 98,88%.

Môi trường nuôi cấy kích thích chồi Lạc tiên ra rễ: MS bổ sung 0,5 mg/l NAA, 20 g/l sucrose và 6 g/l agar cho tỉ lệ chồi ra rễ đạt 99,44%, số rễ trung bình đạt 6,39 rễ/cây và chiều dài rễ trung bình đạt 3,2 cm.

Cây Lạc tiên nuôi cấy *in vitro* hoàn chỉnh được huấn luyện 10 ngày trong nhà lưới cho thích nghi dần với điều kiện tự nhiên, cây được trồng trên giá thể 75% cát vàng – 25% đất tầng B đạt tỉ lệ sống 90,57%, chiều cao cây trung bình đạt 4,32 cm sau 4 tuần.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1]. Keith M Witherup, Sally A Look, Michael W Stasko, Thomas J Ghorzi, Gary M Muschik & Gordon M Cragg (1990). Taxus spp. needles contain amounts of taxol comparable to the bark of *Taxus brevifolia*: analysis and isolation. *Journal of Natural Products*. 53(5): 1249-1255.

[2]. Nguyễn Chí Bảo & Phạm Việt Tý (2017). Các hợp chất phân lập từ dịch chiết methanol cây lạc tiên (*Passiflora foetida* L.). *Tạp chí Khoa học Đại học Huế: Khoa học Tự nhiên*. 126(1A): 133-139.

[3]. Zhijun Liu & Zhanhai Li (2001). Micropropagation of *Camptotheca acuminata* Decaisne from axillary buds, shoot tips, and seed embryos in a tissue culture system. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*. 37: 84-88.

[4]. Kamaldeep Dhawan, Sanju Dhawan & Sumit Chhabra (2003). Attenuation of benzodiazepine dependence in mice by a tri-substituted benzoflavone moiety of *Passiflora incarnata* Linneaus: a non-habit forming anxiolytic. *J Pharm Pharm Sci*. 6(2): 215-22.

[5]. Mahipal S Shekhawat, N Kannan, M Manokari & CP Ravindran (2015). *In vitro* regeneration of shoots and ex vitro rooting of an important medicinal plant *Passiflora foetida* L. through nodal segment cultures. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*. 13(2): 209-214.

[6]. C Ragavendran, D Kamalanathan & G Reena (2011). *In vitro* propagation of nodal and shoot tip explants of *Passiflora foetida* L. An exotic medicinal plant. *Asian Journal of Plant Science & Research*.

[7]. S Komathi, G Rajalakshmi, S Savetha & MP Ayyappadas (2011). *In vitro* regeneration of *Passiflora foetida* L. *Journal of Research in Biology*. 1(8): 653-659.

[8]. Trần Hiếu, Hoàng Thanh Tùng, Cao Đăng Nguyên & Dương Tấn Nhật (2018). Tạo nguồn mẫu *in vitro* cho giống chanh dây tím (*Passiflora edulis* Sims.) và vàng (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*). *Tạp chí Khoa học Đại học Huế: Khoa học Tự nhiên*. 127(1C): 71-84.

[9]. SP Anand, E Jayakumar, R Jeyachandran, V Nandagobalan & A Doss (2012). Direct organogenesis of *Passiflora foetida* L. through nodal explants. *Plant Tissue Culture and Biotechnology*. 22(1): 87-91.

[10]. N Ramakrishna, J Lacey & JE Smith (1991). Effect of surface sterilization, fumigation and gamma irradiation on the microflora and germination of barley seeds. *International Journal of Food Microbiology*. 13(1): 47-54.

[11]. Lê Văn Tường, Vũ Huân & Phạm Quang (2010). Nhân giống vô tính *in vitro* cây Chanh dây (*Passiflora edulis* Sims.) sử dụng đoạn thân mang chồi nách. *Tạp chí Công nghệ Sinh học*. 8(3): 379-385.