

NGHIÊN CỨU NHÂN GIỐNG *IN VITRO* DÂY THÌA CANH (*Gymnema sylvestre* (Retz.) R. BR. Ex Schult)

Đào Thị Thúy Hằng¹, Nguyễn Văn Việt², Nguyễn Thị Huyền³, Đoàn Thị Thu Hương⁴
^{1,2,3,4}Trường Đại học Lâm nghiệp

TÓM TẮT

Cải tiến quy trình vi nhân giống Dây thìa canh (*Gymnema sylvestre*) đã được tối ưu hóa trong nghiên cứu này. Kết quả cho thấy, Dây thìa canh được sát trùng bề mặt bằng cồn 70⁰ trong 1 phút, khử trùng bằng dung dịch HgCl₂ 0,1% trong 7 phút đã được thiết lập thành công trên môi trường MS (Murashige et Skoog, 1962) bổ sung 0,2 mg/l BAP; 30 g/l sucrose với tỷ lệ mẫu sạch là 72,15% và tỷ lệ hình thành chồi đạt 68,26% sau 4 tuần nuôi cấy. Các chồi ban đầu được cảm ứng tạo đa chồi trên môi trường MS bổ sung 1,5 mg/l BAP; 0,5 mg/l Kinetin; 0,1 mg/l NAA; 100 ml/l nước dừa; 100 g/l khoai tây; 30 g/l sucrose, cho tỷ lệ mẫu tái sinh chồi và hệ số nhân chồi đạt cao nhất (96,66% và 3,45 lần) sau 6 tuần nuôi cấy. Chồi ra rễ đạt 96,54%, số rễ trung bình 3,56 rễ/cây và chiều dài rễ trung bình 3,9 cm, khi nuôi cấy trên môi trường khoáng cơ bản MS bổ sung 0,6 mg/l NAA; 100 ml/l nước dừa; 100 g/l khoai tây; 20 g/l sucrose, sau 6 tuần nuôi cấy. Kỹ thuật nhân giống này có thể áp dụng để tạo ra hàng loạt cây giống Dây thìa canh chất lượng tốt đáp ứng cho nhu cầu sản xuất hiện nay.

Từ khóa: Dây thìa canh, cụm chồi, *Gymnema sylvestre*, nuôi cấy mô, vi nhân giống.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Dây thìa canh (*Gymnema sylvestre*) được đánh giá là một trong những cây dược liệu quan trọng trong chiến lược phát triển thảo dược ở Việt Nam. Thành phần hóa học có hoạt tính sinh học chính của Dây thìa canh là axit gymnemic, một hoạt chất thuộc nhóm saponin triterpenoid. Ngoài ra, Dây thìa canh còn chứa các thành phần khác như flavone, anthraquinone, hentri-acontane, pentatriacontane, α và β -chlorophylls, phytin, resins, d-quercitol, axit tartaric, axit formic, axit butyric, lupeol. Axit gymnemic có tác dụng kích thích sản sinh tế bào beta của tuyến tụy, giúp cơ thể tái thiết lập được khả năng cân bằng đường huyết tự nhiên; ức chế hấp thu đường ở ruột; ức chế gan tân tạo glucose vào máu, đồng thời kích thích các enzyme chịu trách nhiệm tiêu thụ, sử dụng đường tại các mô cơ.

Lá của cây được sử dụng rộng rãi trong điều trị đái tháo đường và thuốc lợi tiểu. Ngoài ra còn có thể sử dụng lá và các hoạt chất tách chiết từ cây để chống đầy hơi khó tiêu, táo bón, vàng da, bệnh trĩ, bệnh tim, hen suyễn, viêm phế quản (Subramaniyan Vijayakumar et Srinivasan Prabhu, 2013).

Hiện nay nhu cầu của con người về nguồn dược liệu trên ngày càng tăng, bởi vậy Dây

thìa canh đã được trồng thâm canh rộng rãi ở nhiều địa phương. Tuy nhiên, sự nảy mầm của hạt Dây thìa canh có tỷ lệ thấp nên việc nghiên cứu nhân giống phục vụ sản xuất, bảo tồn và phát triển nguồn gen quý này là cần thiết.

Dây thìa canh có thể nhân giống bằng gieo hạt và giâm hom, những biện pháp nhân giống này đều có những ưu điểm nhất định nhưng không tránh khỏi những nhược điểm như cây sinh trưởng không đồng đều, hệ số nhân thấp, phụ thuộc mùa vụ... Để giải quyết những nhược điểm trên, phương pháp nuôi cấy mô tế bào đã rút ngắn được thời gian và cho phép nhân nhanh để tạo được số lượng rất lớn cây giống Dây thìa canh trong thời gian ngắn, vẫn đảm bảo hàm lượng hoạt chất ổn định, không nhiễm bệnh, ưu việt hơn so với các phương pháp truyền thống. Hiện nay, một số nghiên cứu đã bước đầu thành công trên đối tượng Dây thìa canh như nhân giống bằng hạt và hom của Vũ Thị Phương (2014); nhân giống *in vitro* Dây thìa canh bằng đỉnh chồi của Vũ Hoài Sâm (2014)...

Bài báo này công bố kết quả nghiên cứu nhân giống *in vitro* Dây thìa canh đạt hiệu quả cao góp phần tạo ra lượng lớn cây giống phục vụ sản xuất, bảo tồn và phát triển nguồn gen cây dược liệu có giá trị này.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

- Cành bánh tẻ của Dây thìa canh (*Gymnema sylvestre*) được thu nhận từ các cây khỏe mạnh, sinh trưởng tốt, không sâu bệnh, được cung cấp từ Viện Dược liệu, Bộ Y tế;

- Hóa chất khử là HgCl₂ 0,1%, các hóa chất pha môi trường MS (Murashige et Skoog, 1962).

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Tạo mẫu sạch: Các cành bánh tẻ Dây thìa canh được rửa sạch bằng nước máy, rồi tiếp tục ngâm trong dung dịch xà phòng loãng khoảng 5 - 10 phút và rửa kỹ dưới vòi nước chảy. Mẫu được sát khuẩn bề mặt bằng ethanol 70% trong 1 phút và khử trùng bằng dung dịch HgCl₂ 0,1%, với thời gian khác nhau (từ 5 - 9 phút, chia làm hai lần). Sau mỗi lần dùng hóa chất để khử trùng đều phải tráng rửa mẫu bằng nước cất vô trùng.

Nuôi cấy khởi động: Cành Dây thìa canh sau khi khử trùng, dùng dao hoặc kéo sắc cắt bớt 0,5 cm phần đầu ngọn và gốc (phần bị thấm chất khử trùng), tiếp tục cắt mẫu thành các đoạn có kích thước 3 - 4 cm, có ít nhất 01 mắt ngủ và nuôi trên trong bình thủy tinh hình tam giác 250 ml (3 - 5 mẫu/bình), có chứa môi trường MS bổ sung 0,2 mg/l BAP; 30 g/l sucrose; 6,5 g/l agar, pH = 5,8. Bình thí nghiệm được đặt dưới ánh sáng gián đèn neon, thời gian chiếu sáng 14 giờ/ngày, cường độ chiếu sáng 3000 lux, nhiệt độ phòng nuôi 24 ± 2°C. Tỷ lệ mẫu sạch và khả năng tái sinh chồi được đánh giá sau 4 tuần

Nhân nhanh chồi: Chồi hữu hiệu tái sinh từ đoạn cành được chuyển vào môi trường dinh dưỡng cơ bản ½ MS hoặc MS và WPM có bổ sung 0,5 - 2 mg/l BAP; 0,1 - 0,7 mg/l Kinetin; 0,1 mg/l NAA; 100 g/l khoai tây; 100 ml/l nước dừa; 30 g/l sucrose; 6,5 g/l agar. Ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy cùng nồng độ thích hợp các chất kích thích sinh trưởng được đánh giá thông qua số chồi trên cụm chồi, số chồi hữu hiệu (chiều cao ≥ 2 cm) và hệ số nhân

chồi sau 6 tuần nuôi cấy.

Tạo cây hoàn chỉnh: Các chồi hữu hiệu có chiều cao ≥ 2 - 2,5 cm, phát triển đồng đều, được tách và chuyển sang nuôi trên môi trường cảm ứng ra rễ là một trong những môi trường dinh dưỡng được lựa chọn từ thí nghiệm trên, bổ sung 0,2 - 0,6 mg/l IBA; 0,2 - 0,6 mg/l NAA; 100 g/l khoai tây; 100 ml/l nước dừa; 10 - 20 g/l sucrose; 6,5 g/l agar. Khả năng ra rễ được đánh giá sau 6 tuần.

Phương pháp xử lý số liệu: Các thí nghiệm được thiết kế theo phương pháp Sinh học thực nghiệm với số mẫu ≥ 30, lặp lại 3 lần. Số liệu được phân tích theo phương pháp thống kê sinh học ứng dụng các phần mềm đã lập trình trên máy tính điện tử như Excel và SPSS (Nguyễn Hải Tuất và cộng sự, 2005).

2.3. Thời gian và địa điểm nghiên cứu

Nghiên cứu được thực hiện tại Phòng Thí nghiệm Công nghệ tế bào, Viện Công nghệ sinh học Lâm nghiệp, Trường Đại học Lâm nghiệp từ 8/2017 đến 7/2018.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Tạo mẫu sạch và tái sinh chồi *in vitro*

Mẫu cành bánh tẻ Dây thìa canh sau khi rửa sạch được khử trùng bằng dung dịch HgCl₂ 0,1% với 3 công thức thí nghiệm, khác nhau về thời gian. Sau 4 tuần nuôi cấy, kết quả cho thấy (Bảng 1), tỷ lệ mẫu sạch cao nhất đạt 84,44% khi tiến hành khử trùng kép theo công thức (KT₃) với 3 phút + 6 phút. Khi thời gian khử trùng tăng thì tỷ lệ mẫu sạch được tăng lên (58,89% đối với 3 phút + 2 phút và 84,44% đối với 3 phút + 6 phút). Tuy nhiên, tỷ lệ mẫu tái sinh cao nhất lại từ mẫu xử lý theo KT₂ đạt đến 68,25%. Nguyên nhân có thể do thời gian khử trùng dài (9 phút) thì tỷ lệ mẫu sạch cao nhưng gây độc, làm giảm tỷ lệ tái sinh chồi xuống 48,89%. Điều này tương đối phù hợp, bởi dung dịch HgCl₂ là một loại hóa chất có tính độc đối với tế bào và mô, nếu thời gian khử trùng lâu, hóa chất sẽ ngấm vào mô và có thể làm chết tế bào thực vật (Nguyễn Văn Việt và cộng sự, 2016).

Bảng 1. Ảnh hưởng của thời gian khử trùng bằng HgCl₂ 0,1% đến hiệu quả tạo mẫu sạch

CTTN	Thời gian (phút)		Tỷ lệ mẫu sạch (%)	Tỷ lệ mẫu tái sinh (%)
	Lần 1	Lần 2		
KT1	3	2	58,89 ^a	51,44 ^{ac}
KT2	3	4	72,15 ^{bc}	68,25 ^{ba}
KT3	3	6	84,44 ^{cb}	48,89 ^{ca}

Ghi chú: Chữ cái khác nhau trong các bảng số liệu thể hiện sự sai khác có ý nghĩa thống kê $\alpha = 0,05$ trong phép phân tích SPSS.

Như vậy, công thức khử trùng tốt nhất đối với mẫu cành Dây thìa canh là công thức KT₂ với thời gian khử trùng 7 phút (lần 1: 3 phút; lần 2: 4 phút), cho tỷ lệ mẫu sạch là 72,15%, tỷ lệ mẫu sạch tái sinh 68,25% với thời gian bắt đầu tái sinh chồi là 8 ngày. Kết quả phân tích thống kê cho thấy, công thức khử trùng khác nhau có ảnh hưởng rõ rệt đến tỷ lệ mẫu sạch và khả năng tái sinh chồi.

3.2. Nhân nhanh chồi

3.2.1. Ảnh hưởng của môi trường dinh dưỡng đến khả năng nhân nhanh chồi

Môi trường dinh dưỡng quyết định tới khả năng nhân nhanh chồi. Với mỗi loài cây khác nhau sẽ phù hợp với từng môi trường dinh dưỡng dùng để nuôi cấy. Do vậy, thí nghiệm với 3 công thức môi trường khoáng cơ bản đã được sử dụng nhằm tìm ra môi trường dinh dưỡng thích hợp cho việc cảm ứng tạo cụm chồi của Dây thìa canh.

Bảng 2. Ảnh hưởng của môi trường dinh dưỡng đến khả năng nhân nhanh chồi

CTTN	Môi trường dinh dưỡng	Tỷ lệ tạo cụm chồi (%)	Số chồi TB/mẫu
MT1	1/2MS	57,79 ^a	0,67 ^c
MT2	MS	74,62 ^b	1,84 ^b
MT3	WPM	82,27 ^c	1,52 ^a

Ghi chú: Chữ cái khác nhau trong các bảng số liệu thể hiện sự sai khác có ý nghĩa thống kê $\alpha = 0,05$ trong phép phân tích SPSS.

Sau thời gian 6 tuần, phản ứng của chồi nuôi cấy trên 3 loại môi trường có sự khác nhau rõ rệt về tỷ lệ tạo cụm chồi và số chồi hình thành trên một mẫu (Bảng 2). Tỷ lệ tạo mẫu tạo cụm chồi cao nhất là 82,27% trên môi trường WPM. Tuy nhiên số chồi/mẫu cao nhất lại của mẫu được nuôi cấy trên môi trường MS. Kết quả của sự khác biệt này do giữa 3 loại môi trường có hàm lượng cacbon, khoáng đa lượng, vi lượng và vitamin khác nhau. Thành phần các chất dinh dưỡng sẽ ảnh hưởng trực tiếp tới các quá trình sinh lý, sinh hóa của thực vật từ đó cụm chồi sẽ phát triển khác biệt. Trong thí nghiệm này, môi trường MS là thích hợp nhất cho tái sinh chồi, chồi mập, khỏe tròn đều có màu xanh thẫm, tỷ lệ mẫu tái sinh chồi

đạt 74,62% và số chồi trung bình/mẫu đạt 1,84 chồi.

3.2.2. Ảnh hưởng của nồng độ BAP đến khả năng nhân nhanh chồi

Chất điều hòa sinh trưởng được sử dụng trong giai đoạn này là các chất thuộc nhóm cytokinin để kích thích sự phân hóa, sinh trưởng và phát triển chồi của mẫu cây *in vitro*. Tiến hành cắt chồi đạt chiều cao từ 2 - 2,5 cm, chứa 2 - 3 mắt ngủ, nuôi cấy trên môi trường nhân nhanh thích hợp là MS có bổ sung 0,5 - 2 mg/l BAP; 100 ml/l nước dừa; 100 g/l khoai tây; 30 g/l sucrose; 6,5 g/l agar. Kết quả nhân nhanh chồi Dây thìa canh sau 6 tuần nuôi cấy được thể hiện trong bảng 3.

Bảng 3. Ảnh hưởng của nồng độ BAP đến khả năng nhân nhanh chồi

CTTN	BAP (mg/l)	Tỉ lệ tạo cụm chồi (%)	Số chồi TB/mẫu	Chiều cao chồi TB/mẫu	Chất lượng chồi
ĐC	0,0	29,68 ^a	0,48 ^e	0,83 ^e	+
CT1	0,5	50,57 ^b	1,86 ^{da}	1,63 ^{ad}	+
CT2	1,0	63,43 ^{ce}	1,98 ^c	2,70 ^c	++
CT3	1,5	80,63 ^d	2,89 ^b	3,37 ^b	+++
CT4	2,0	62,70 ^{ce}	1,18 ^{ad}	2,03 ^{ad}	++

Ghi chú: +) Chồi thấp, mảnh, hơi vàng; ++) Chồi cao, mảnh, xanh; ++++) Chồi cao, mập, xanh; Chữ cái khác nhau trong các bảng số liệu thể hiện sự sai khác có ý nghĩa thống kê $\alpha = 0,05$ trong phép phân tích SPSS.

Kết quả ở bảng 3 cho thấy khi bổ sung BAP vào môi trường, tỷ lệ tạo chồi ở các công thức thí nghiệm đều đạt trên 50% (CT₁ - CT₄). Tuy nhiên, có sự khác nhau rõ rệt giữa các công thức thí nghiệm, điều đó nói lên các chỉ tiêu theo dõi phụ thuộc vào nồng độ BAP đã sử dụng. Trong đó công thức môi trường đối chứng N₀ (không bổ sung BAP) cho kết quả thấp nhất với tỷ lệ mẫu tái sinh chồi là 29,68%, số chồi trung bình trên mẫu đạt 0,48, chồi thấp, mảnh, lá có màu vàng xanh. Khi nồng độ BAP tăng từ 0,5 đến 2 mg/l thì tỷ lệ mẫu tái sinh chồi tăng từ 50,57 đến 80,63%, số chồi trung bình trên mẫu tăng từ 1,86 lên 2,89 chồi mẫu. Công thức CT₃ bổ sung 1,5 mg/l BAP cho kết quả tốt nhất tỷ lệ mẫu tái sinh chồi cao nhất 80,63%, số chồi trung bình trên mẫu 2,89 chồi, chiều cao chồi đạt 3,37 cm, chồi cao, mập và lá có màu xanh đậm. Vì thế, công thức CT₃ là công thức tốt nhất để nhân nhanh chồi Dây thìa canh. Kết quả phân tích số liệu cũng cho thấy

nồng độ BAP khác nhau ảnh hưởng rõ rệt đến khả năng nhân nhanh chồi.

3.2.3. Ảnh hưởng tổ hợp của nồng độ BAP, Kinetin và NAA đến nhân nhanh chồi

Trên cơ sở chọn được môi trường tốt nhất ở mục 3.2.2 là công thức CT₃ (1,5 mg/l BAP), tiếp tục tiến hành thí nghiệm với việc bổ sung giải nồng độ 0,1 - 0,7 mg/l Kinetin và 0,1 mg/l NAA. Việc bổ sung phối hợp Kinetin, BAP và NAA đã cho hệ số nhân chồi tăng lên rõ rệt. Các chất này được sử dụng để kích thích sự phân hóa, sinh trưởng và phát triển chồi của mẫu cây *in vitro*, có tác dụng kích thích sự phân chia tế bào, đặc biệt ảnh hưởng đến sự hình thành và phân hóa chồi.

Sau 6 tuần nuôi cấy, kết quả (Bảng 4) cho thấy khi bổ sung đồng thời BAP, Kinetin và NAA vào môi trường nuôi cấy, hệ số nhân chồi và chất lượng chồi thu được cao hơn hẳn so với chỉ bổ sung BAP (Bảng 3).

Bảng 4. Ảnh hưởng của nồng độ BAP, Kinetin và NAA đến nhân nhanh chồi

CTTN	Chất ĐHST (mg/l)			Tỉ lệ tạo cụm chồi (%)	Số chồi TB/mẫu	Chiều cao TB/chồi	Tỉ lệ chồi hữu hiệu (%)	Chất lượng chồi
	BAP	Kinetin	NAA					
ĐC		0	0	31,45 ^a	0,66 ^e	1,63 ^b	00 ^a	+
NT1		0,1	0,1	75,90 ^b	1,76 ^{da}	2,7 ^{ca}	30,38 ^b	++
NT2	1,5	0,3	0,1	87,55 ^c	2,67 ^c	3,57 ^d	40,83 ^c	++
NT3		0,5	0,1	96,66 ^d	3,45 ^b	4,23 ^e	68,17 ^{de}	+++
NT4		0,7	0,1	82,35 ^e	2,08 ^{ad}	2,93 ^{ac}	64,17 ^{ed}	++

Ghi chú: +) Chồi thấp, mảnh, hơi vàng; ++) Chồi cao, mảnh, xanh; ++++) Chồi cao, mập, xanh; Chữ cái khác nhau trong các bảng số liệu thể hiện sự sai khác có ý nghĩa thống kê $\alpha = 0,05$ trong phép phân tích SPSS.

Môi trường MS bổ sung 1,5 mg/l BAP; 0,1 mg/l Kinetin và 0,1 mg/l NAA cho kết quả thấp nhất với tỷ lệ mẫu tái sinh chồi chỉ đạt 75,90%, số chồi trung bình trên mẫu là 1,76

chồi và chiều cao chồi 2,7 cm. Khi tăng nồng độ các chất điều hòa sinh trưởng thì kết quả nhân chồi tăng lên, ở công thức NT₃ với môi trường MS bổ sung 1,5 mg/l BAP; 0,5 mg/l

Kinetin và 0,1 mg/l NAA cho kết quả cao nhất về tỷ lệ tái sinh chồi, số chồi trung bình/mẫu và chiều cao chồi đạt được lần lượt là 96,66%; 3,45 chồi; 4,23 cm. Tiếp tục tăng nồng độ chất điều hòa sinh trưởng (công thức NT₄) thì kết quả nhân chồi có xu hướng giảm, điều này nói lên rằng chất điều hòa sinh trưởng có nồng độ cao có tác dụng ngược đến sinh trưởng của thực vật. Như vậy, trong thí nghiệm này có thể chọn công thức NT₃ để nhân nhanh chồi Dây thìa canh là phù hợp, với tỷ lệ mẫu tái sinh chồi là 96,66%, số chồi trung bình trên mẫu đạt 3,45 chồi, chiều cao chồi đạt 4,23 cm (trương tự kết quả của Vũ Hoài Sâm và cộng sự, 2015), tỷ lệ chồi hữu hiệu đạt 68,17%, kích thước chồi cao, mập, lá màu xanh đậm.

3.3. Kích thích ra rễ tạo cây hoàn chỉnh

3.3.1. Ảnh hưởng của hàm lượng đường đến khả năng ra rễ

Khả năng quang hợp và sinh trưởng của cây *in vitro* bị hạn chế bởi nồng độ khí CO₂ cung cấp cho cây trong bình nuôi cấy không đủ trong suốt thời gian chiếu sáng (Desjardins và cộng sự, 1988; Fujiwara và cộng sự, 1987; Kozai, 1991). Nên khả năng quang hợp sẽ bị ảnh hưởng, do đó đòi hỏi phải cung cấp nguồn cacbon cho các hoạt động sinh trưởng của tế bào. Trong giai đoạn tạo rễ, chồi đã có lá đầy đủ và được nuôi cấy trong bình để dưới giàn đèn neon giúp cây có thể quang hợp để tạo ra lượng đường nhất định nên việc bổ sung thêm lượng đường vừa đủ cũng rất cần thiết đối với giai đoạn tạo rễ, nếu bổ sung quá nhiều đường sẽ lãng phí và môi trường có thể dễ bị nhiễm khuẩn. Trong nội dung nghiên cứu này, thí nghiệm được bố trí với môi trường MS bổ sung 0,1 mg/l IBA; 0,1 mg/l NAA; 10 - 20 g/l sucrose. Kết quả được trình bày ở bảng 5.

Bảng 5. Ảnh hưởng của hàm lượng đường sucrose đến khả năng ra rễ

CTTN	Lượng sucrose (g/l)	Tỷ lệ ra rễ (%)	Số rễ TB/cây	Chiều dài TB/rễ (cm)
ĐT1	10	62,33 ^c	1,21 ^c	1,9 ^{bc}
ĐT2	15	71,67 ^b	1,93 ^b	2,2 ^{cb}
ĐT3	20	78,33 ^a	2,70 ^a	3,1 ^d

Ghi chú: Chữ cái khác nhau trong các bảng số liệu thể hiện sự sai khác có ý nghĩa thống kê $\alpha = 0,05$ trong phép phân tích SPSS.

Kết quả thí nghiệm (Bảng 5) cho thấy, các công thức thí nghiệm với lượng đường khác nhau đã tạo sự khác biệt, trong công thức ĐT₃ bổ sung lượng đường sucrose 20 mg/l cho kết quả tạo rễ tốt nhất với tỷ lệ ra rễ, số rễ trung bình/cây, chiều dài rễ đạt được lần lượt là

78,33%; 2,7 rễ/cây; 3,1 cm. Kết quả xử lý thống kê cũng thể hiện sự khác nhau trên có ý nghĩa.

3.3.2. Ảnh hưởng của nồng độ chất điều hòa sinh trưởng đến khả năng ra rễ

Bảng 6. Ảnh hưởng của nồng độ IBA và NAA đến khả năng ra rễ

CTTN	Chất ĐHST (mg/l)		Tỷ lệ ra rễ (%)	Số rễ TB/cây	Chiều dài rễ (cm)
	IBA	NAA			
ĐC	00	00	19,68 ^a	0,40 ^{hgd}	0,63 ^a
RT1	0,2	00	67,06 ^{bef}	1,44 ^{ghd}	2,33 ^{bf}
RT2	0,4	00	86,51 ^{ch}	2,53 ^{fb}	3,40 ^{cd}
RT3	0,6	00	96,54 ^{dg}	3,56 ^c	3,90 ^{dc}
RT4	00	0,2	61,35 ^{ebf}	2,98 ^{dhg}	2,80 ^{egh}
RT5	00	0,4	76,67 ^{fbe}	1,97 ^c	2,33 ^{fb}
RT6	00	0,6	90,01 ^{gd}	2,26 ^{bf}	3,13 ^{ghe}
RT7	0,3	0,3	88,52 ^{hc}	2,11 ^a	2,87 ^{hge}

Ghi chú: Chữ cái khác nhau trong các bảng số liệu thể hiện sự sai khác có ý nghĩa thống kê $\alpha = 0,05$ trong phép phân tích SPSS.

Tạo cây hoàn chỉnh là bước cuối trong quy trình nuôi cấy *in vitro* trước khi đưa cây ra huấn luyện và trồng ngoài vườn ươm nên việc nghiên cứu cho ra rễ tạo cây hoàn chỉnh với tỷ lệ cao là quan trọng. Theo Farooq và cộng sự (2008), auxin có vai trò trong việc tạo rễ ở môi trường tạo rễ *in vitro*, thông qua ảnh hưởng của nó đến sự phân chia tế bào và hình thành rễ đầu tiên. Trong nội dung nghiên cứu này, các công thức thí nghiệm được bố trí với môi trường cơ bản MS có bổ sung hai chất điều hòa sinh trưởng nhóm auxin là 0,2 - 0,6 mg/l IBA và 0,2 - 0,6 mg/l NAA. Kết quả theo dõi trong 6 tuần được trình bày ở bảng 6.

Mẫu cấy ở các công thức môi trường đều ra rễ, trong đó chồi *in vitro* được cấy trên môi trường MS không bổ sung chất điều hòa sinh trưởng (RT₀), tỷ lệ ra rễ thấp chỉ đạt 19,68%, số rễ trung bình chỉ đạt 0,4 rễ/cây, chiều dài trung của rễ 0,63 cm, rễ màu trắng nhạt, mảnh. Các công thức môi trường có sử dụng chất điều hòa sinh trưởng thực vật với liều lượng khác nhau (0,2 - 0,6 mg/l) IBA (RT₁-RT₃) cho tỷ lệ ra rễ cao nhất ở RT₃ đạt 96,54%, số rễ trung bình đạt 3,56 rễ/cây và chiều dài rễ trung bình đạt 3,9 cm. Công thức môi trường bổ sung 0,2 - 0,6 mg/l NAA (RT₄ - RT₆) có tỷ lệ chồi ra rễ đạt 61,35 đến 90,01%, với số rễ trung bình/cây, chiều dài trung bình/rễ cao nhất lần lượt là 2,26 rễ; 3,13 cm (RT₆). Thí nghiệm bổ sung đồng thời cả IBA và NAA (RT₇) cho tỷ lệ ra rễ đạt

88,52%, với số rễ trung bình/cây, chiều dài trung bình/rễ lần lượt là 2,11 rễ; 2,87 cm. Như vậy, công thức môi trường RT₃ là môi trường MS bổ sung 0,6 mg/l IBA là phù hợp nhất cho nuôi cấy ra rễ tạo cây hoàn chỉnh đối với Dây thìa canh.

4. KẾT LUẬN

Trong nghiên cứu này, quy trình nhân nhanh giống *in vitro* Dây thìa canh đã thu được kết quả khả quan, các chỉ tiêu được cải thiện đáng kể so với các công trình liên quan đã được công bố.

Điều kiện vào mẫu sạch mẫu tốt nhất là Dây thìa canh được khử trùng kép bằng dung dịch HgCl₂ 0,1% trong 7 phút và nuôi cấy trên môi trường MS bổ sung 0,2 mg/l BAP; 30 g/l sucrose; 6,5 g/l agar đạt tỷ lệ mẫu sạch 72,15%, tỷ lệ tái sinh 68,25%.

Chồi được nhân nhanh trên môi trường khoáng cơ bản MS bổ sung 1,5 mg/l BAP; 0,5 mg/l Kinetin; 0,1 mg/l NAA; 100 ml/l nước dừa; 100 g/l khoai tây; 6,5 g/l agar; 30 g/l sucrose, cho tỷ lệ mẫu tạo cụm chồi là 96,66%, số chồi trung bình trên mẫu 3,45 chồi, chiều cao chồi 4,23 cm, chồi cao, mập, lá màu xanh đậm.

Cây tạo rễ hoàn chỉnh trên môi trường khoáng cơ bản MS bổ sung 0,6 mg/l IBA; 100 ml/l nước dừa; 100 g/l khoai tây; 20 g/l sucrose; 6,5 g/l agar. Tỷ lệ ra rễ đạt 96,54%, số rễ trung bình đạt 3,56 rễ/cây với chiều dài rễ 3,90 cm.



a) Mẫu sạch tái sinh chồi tại KT₂



b) Tạo chồi trên ở MT CT₃



c) Tạo chồi trên ở MT NT₂



d) Tạo chồi trên ở MT NT₃



e) Tạo chồi trên ở MT NT₄



f) Tạo rễ ở các MT khác nhau

Hình 1. Một số hình ảnh trong quy trình nhân giống *in vitro* Dây thìa canh

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Desjardins Y, Laforge F, Lussier C, Gosselin A (1988). Effect of CO₂ enrichment and high photosynthetic photon flux on the development of autotrophy and growth of tissue-cultured strawberry, raspberry and asparagus plants. *Acta Hort*, 230: 45-47.
2. Farooq A, B.B. Mandal, and G. Sandhya (2008). Effect of some growth regulators on rooting of carnation (*Dianthus caryophyllus*) under in vitro condition. *Appl. Biol. Res.*, 10: 193-201.
3. Fujiwara K, Kozai T, Watanabe I. (1987). Fundamental studies on environments in plant tissue culture. Measurements of carbon dioxide gas concentration in close vessels containing tissue culture plantlets and estimates of net photosynthetic rates of the plants. *Agr Meteorol*, 43: 21-30.
4. Kozai T. (1991). Photoautotrophic micropropagation. *In vitro Cell Dev Biol Plant*, 27: 47-51.
- Nguyễn Hải Tuất, Nguyễn Trọng Bình (2005). *Khai thác và sử dụng SPSS xử lý số liệu trong Lâm nghiệp*. Nhà xuất bản Nông nghiệp, Hà Nội.
5. Nguyễn Văn Việt, Nguyễn Thị Hương, Bùi Văn Thắng (2016). Nhân giống cây Khôi tía (*Ardisia sylvestris*) bằng kỹ thuật nuôi cấy in vitro. *Tạp chí Nông nghiệp & Phát triển nông thôn*, 12: 35-39.
6. Murashige, T. and F. Skoog (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant*, 15: 473-497.
7. Subramaniyan Vijayakumar and Srinivasan Prabhu (2013). *Gymnema sylvestre* - A Key for Diabetes Management - A Review. *Pharmacology & Toxicology Research*, PTR14, 06 (Vol 1): 1-10.
8. Vũ Hoài Sâm, Nguyễn Quang Hải, Dương Thị Phúc Hậu, Nguyễn Văn Khiêm (2015). Nghiên cứu nhân giống in vitro Dây thìa canh bằng nuôi cấy chồi đỉnh. *Tạp chí Dược học*, 1: 44 – 49.
9. Vũ Thị Phương, Đặng Ngọc Hùng, Ma Thị Tiệp (2013). Nghiên cứu nhân giống cây Thìa canh (*Gymnema sylvestre*) bằng phương pháp gieo hạt và giảm hom cảnh tại cơ sở nghiên cứu bảo tồn và phát triển cây dược liệu Tam Thái Yên – Thái Nguyên. *Tạp chí Khoa học & Công nghệ*, 108 (08): 127 – 133.

RESEARCH ON MICROPROPAGATION OF *Gymnema sylvestre* (RETZ.) R. BR. EX SCHULT

Dao Thi Thuy Hang¹, Nguyen Van Viet², Nguyen Thi Huyen³, Doan Thi Thu Huong⁴
^{1,2,3,4}Vietnam National University of Forestry

SUMMARY

A procedure for micropropagation of *Gymnema sylvestre* has been optimized using axillary buds from field grow plants as explants. The results showed that the optimal conditions for sample sterilization was soaked in ethanol 70% for 1 minutes following HgCl₂ 0.1% solution for 7 minutes. The explants were then cultured *in vitro* on Murashige et Skoog (MS) medium supplemented with 6-benzyl amino purine (BAP) 0.2 mg/l and sucrose 30 g/l. In which the regeneration rate achieved 72.15% after 4 weeks. Multi shoots were induced in MS supplemented with BAP 1.5 mg/l, Kinetin 0.5 mg/l, α -Naphthyl axetic acid (NAA) 0.1 mg/l, coconut water 100 ml/l, potatoes 100 g/l, sucrose 30g/l, the coefficient of formed buds and the samples regeneration rate were highest (96.66% and 3.45 times). There were 96.54% of tested shoots forming roots on MS medium supplemented add NAA 0.3 mg/l, coconut water 100 ml/l, potatoes 100 g/l, sucrose 20 g/l after 6 weeks with the average of 3.56 roots/shoot and 3.9 cm of root length of after 6 weeks. This procedure can be applied for mass production of *Gymnema sylvestre* to meet the commercial demand.

Keywords: *Gymnema sylvestre*, micropropagation, multi - shoot, tissue culture

Ngày nhận bài : 22/8/2018
Ngày phản biện : 13/11/2018
Ngày quyết định đăng : 22/11/2018