

NGHIÊN CỨU NHÂN GIỐNG CÂY KIM TIỀN THẢO
(*Desmodium styracifolium* (Osb.) Merr.)
BẰNG PHƯƠNG PHÁP NUÔI CÂY *IN VITRO*

Nguyễn Văn Việt¹, Nguyễn Thị Huệ¹, Đoàn Thị Thu Hương¹, Nguyễn Thị Hiền¹

¹Trường Đại học Lâm nghiệp

TÓM TẮT

Cây Kim tiền thảo (*Desmodium styracifolium* (Osb.) Merr.) là cây thuốc cần thiết cho người bệnh bởi mọi bộ phận của cây như: rễ, thân, lá đều có thể sử dụng được. Nhân giống cây Kim tiền thảo bằng phương pháp nuôi cấy *in vitro* đã được nghiên cứu thành công. Kết quả nghiên cứu cho thấy, sát khuẩn bề mặt mẫu hạt bằng ethanol 70% trong 1 phút, khử trùng bằng dung dịch Javen 8% trong 7 phút và nuôi cấy trên môi trường dinh dưỡng MS bổ sung 30 gr/l sucrose và 6,5 gr/l agar, cho tỷ lệ mẫu sạch là 87,12%, mẫu nảy mầm đạt 59,11%. Cầm ứng tạo đa chồi trên môi trường dinh dưỡng MS bổ sung 1,0 mg/l 6-BAP, 0,3 mg/l Kinetin, 0,1 mg/l α -NAA, 100 ml/l nước dừa, 30 gr/l sucrose và 6,5 gr/l agar, cho tỷ lệ chồi hữu hiệu là 74,09% và hệ số nhân chồi đạt 7,22 lần/chu kỳ nhân sau 7 tuần nuôi cấy. Tỷ lệ chồi ra rễ 95,66%, số rễ trung bình đạt 8,33 rễ/cây và chiều dài rễ trung bình là 3,41 cm khi nuôi trên môi trường MS cơ bản bổ sung 0,3 mg/l α -NAA, 0,1 gr/l than hoạt tính, 20 gr/l sucrose và 6,5 gr/l agar.

Từ khóa: Cầm ứng tạo đa chồi, hệ số nhân chồi, Kim tiền thảo, nuôi cấy *in vitro*.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Cây Kim tiền thảo (*Desmodium styracifolium* (Osb.) Merr.) là một loại dược liệu phân bố ở Đông Nam Á, Trung Quốc, Thái Lan, Malaysia, Indonesia, Việt Nam và Nhật Bản. Ở Việt Nam, cây phân bố rộng rãi ở vùng đồi núi, thường gặp ở những chỗ sáng, trên đất cát pha, vùng trung du Hà Tây, Lạng Sơn, Ninh Bình, Hải Phòng (Võ Văn Chi, 1997; Đỗ Tất Lợi, 1999)

Kim tiền thảo là cây thuốc cần thiết cho người bệnh bởi mọi bộ phận của cây như: rễ, thân, lá đều có thể sử dụng được. Các nghiên cứu dược lý hiện đại cho thấy Kim tiền thảo có tác dụng lợi tiểu, lợi mật, kháng sinh, kháng viêm, dẫn mạch, hạ huyết áp. Công dụng chủ yếu là lợi mật, thông tiểu tiện, thường dùng chữa sỏi thận, sỏi mật, sỏi bàng quang, sỏi đường tiết niệu, viêm gan vàng da, viêm thận phù thũng, chữa bệnh trĩ, chữa viêm mật (Đỗ Tất Lợi, 1999). Tuy nhiên, hiện nay hầu hết nguồn dược liệu đều được nhập từ nước ngoài và chưa có nghiên cứu đầy đủ về nhân giống, gieo trồng, chế biến Kim tiền thảo nên năng suất và chất lượng còn hạn chế. Hơn nữa, ở Việt Nam cũng như trên thế giới chưa có công bố nào về nghiên cứu nhân giống cây Kim tiền thảo bằng kỹ thuật nuôi cấy *in vitro*.

Để có nguồn dược liệu Kim tiền thảo chất

lượng tốt, bền vững đáp ứng nhu cầu chăm sóc sức khỏe con người đồng thời đảm bảo được hàm lượng và hoạt tính dược liệu trong sản phẩm sau thu hoạch, cần phải có biện pháp hữu hiệu trong bảo tồn và phát triển loài dược liệu quý này. Vì vậy, nhân giống loài Kim tiền thảo bằng phương pháp nuôi cấy *in vitro* sẽ giúp tạo ra số lượng lớn cây con trong thời gian ngắn, có thể đáp ứng nguồn giống cho các vùng sản xuất dược liệu, nhằm nâng cao thu nhập cho người dân và phục vụ công tác bảo tồn và phát triển nguồn gen cây thuốc quý.

Mặt khác, ở Việt Nam cũng như trên thế giới chưa có công bố nào về nhân giống cây Kim tiền thảo bằng kỹ thuật nuôi cấy *in vitro*. Do đó, việc tiến hành nghiên cứu nuôi cấy *in vitro* cây kim tiền thảo là một hướng nghiên cứu đầy triển vọng nhằm cung cấp cơ sở khoa học cho nghiên cứu và sản xuất giống cây dược liệu trong giai đoạn hiện nay.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Hạt của loài Kim tiền thảo được cung cấp bởi Trung tâm Nghiên cứu và Sản xuất thuốc Suối Hai của bệnh viện Y học cổ truyền Bộ Công an.

Các loại môi trường nuôi cấy được ghi ở bảng 1.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Tạo mẫu sạch và nuôi cấy khởi động: Mẫu

hạt Kim tiền thảo được rửa sạch bề mặt bằng xà phòng loãng, sau đó tráng sạch xà phòng dưới vòi nước chảy. Tiếp tục sát khuẩn bề mặt mẫu bằng cồn 70% trong 1 phút và khử trùng mẫu bằng Javen 8% với các thời gian khác nhau (5 đến 9 phút). Sau đó, dùng nước cất khử trùng tráng mẫu để loại bỏ hoàn toàn hóa chất. Sau khi khử trùng, cấy mẫu trên môi trường nuôi cấy khởi động có thành phần như ở bảng 1. Sau 7 tuần nuôi cấy, thống kê các mẫu sạch, mẫu nảy chồi và đặc điểm chồi tái sinh.

Nhân nhanh chồi: Các chồi Kim tiền thảo thu được từ thí nghiệm trên được cắt thành các đoạn có kích thước 2 - 3 cm có chứa mắt ngủ, loại bỏ bớt lá và nuôi cấy trên môi trường nhân nhanh chồi (NN₁₋₆) có nồng độ chất điều hòa sinh trưởng (6-BAP, Kinetin, α -NAA) khác nhau. Sau 7 tuần nuôi cấy, thống kê số mẫu tạo cụm chồi, số chồi trên cụm, số chồi hữu hiệu (chiều cao $\geq 2,5$ cm).

Ra rễ tạo cây hoàn chỉnh: Các chồi hữu hiệu (cao từ 2,5 - 4 cm), chứa 2 - 4 lá, sinh trưởng tốt được cấy trên môi trường kích thích ra rễ tạo cây hoàn chỉnh (R₁₋₆). Sau 7 tuần nuôi cấy,

thống kê số chồi ra rễ, số rễ/cây và đo chiều dài rễ (chi đo các rễ có chiều dài $> 0,5$ cm).

Huấn luyện và ra ngôi: Cây Kim tiền thảo *in vitro* được huấn luyện 10 ngày dưới ánh sáng tán xạ. Sau đó rửa sạch môi trường bám ở rễ và cấy cây vào bầu có thành phần giá thể khác nhau như ở bảng 1 (B₁₋₅). Các bầu cây được đặt trong vườn ươm có che lưới đen, tưới nước 2 lần/ngày. Sau 7 tuần ra ngôi, thống kê cây sống, đo chiều cao và đánh giá chất lượng cây.

Các mẫu được nuôi cấy trong các bình tam giác thủy tinh (5 - 10 mẫu/bình 250 ml), mỗi công thức thí nghiệm có 30 mẫu, lặp lại 3 lần. Môi trường nuôi cấy dựa trên môi trường dinh dưỡng cơ bản MS (Murashige and Skoog, 1962).

Điều kiện nuôi cấy: Cường độ chiếu sáng 2000 - 3000 lux; thời gian chiếu sáng 14 giờ/ngày; nhiệt độ phòng nuôi: $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$. Môi trường nuôi cấy được điều chỉnh về pH 5,8; khử trùng ở 118°C , trong 20 phút.

Xử lý số liệu 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 Kim tiền thảo

Giai đoạn nuôi cấy	Ký hiệu môi trường	Thành phần môi trường nuôi cấy
Nuôi cấy khởi động	MTKĐ	MS bổ sung 30 gr/l sucrose; 6,5 gr/l agar;
Nhân nhanh chồi	NN ₁₋₆	MS bổ sung (1,0 - 1,5 mg/l) 6-BAP; 0,3 mg/l Kinetin; 0,1 mg/l α -NAA; 30 g/l sucrose, 6,5 gr/l agar;
Bổ sung chất hữu cơ	NC ₁₋₃	Sử dụng môi trường tốt nhất ở thí nghiệm trên, bổ sung 100 gr/l khoai tây nghiền; 100 ml/l nước dừa.
Ra rễ tạo cây hoàn chỉnh	R ₁₋₆	MS bổ sung (0,1 - 0,5 mg/l) α -NAA; 0,1 gr/l than hoạt tính; 20 gr/l sucrose; 6,5 gr/l agar;
Huấn luyện và ra ngôi	B ₁₋₅	B ₁ : 100% đất tầng B; B ₂ : 25% cát vàng + 75% đất; B ₃ : 50% cát vàng + 50% đất tầng B; B ₄ : 75% cát vàng + 25% đất tầng B; B ₅ : 100% cát vàng.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

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

Trong các quy trình 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 hóa 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. Các hóa chất thường được sử dụng phổ biến trong khử trùng tạo mẫu sạch là: H₂O₂, HgCl₂, Javen,

nước bromine... Trong nghiên cứu này, đã sử dụng dung dịch Javen 8% để khử trùng mẫu hạt Kim tiền thảo với thời gian khác nhau (5

đến 9 phút). Sau 7 tuần nuôi cấy, kết quả được trình bày ở bảng 2.

Bảng 2. Ảnh hưởng của thời gian khử trùng đến tỷ lệ sống và tái sinh chồi

Công thức khử trùng	Thời gian khử trùng (phút)	Tỷ lệ mẫu sạch (%)	Tỷ lệ tái sinh chồi (%)	Đặc điểm chồi tái sinh
CT ₁	5	59,04	42,94	Mập, dài, sinh trưởng chậm
CT ₂	7	87,12	59,11	Mập, dài, sinh trưởng nhanh
CT ₃	9	91,22	37,31	Mập, ngắn, sinh trưởng chậm
Sig		0,0001	0,0001	

Từ kết quả thu được (Bảng 2) cho thấy tỷ lệ tạo mẫu sạch *in vitro* đều đạt trên 50%, bằng phương pháp khử trùng kép thì thời gian khử trùng càng dài thì tỷ lệ mẫu sạch càng cao (59,04 - 91,22%). Tuy nhiên, tỷ lệ mẫu sạch càng cao thì tỷ lệ mẫu tái sinh càng giảm, điều này cũng tương đối phù hợp bởi Javen 8% là chất rất độc, nếu khử trùng lâu hóa chất sẽ ngấm vào mô thực vật, làm hỏng hoặc gây độc cho mẫu do đó mẫu không thể tái sinh (Nguyễn Quỳnh Trang và cộng sự, 2013; Đoàn Thị Thu Hương và cộng sự, 2019).

Trong nhân giống *in vitro*, tỷ lệ nảy chồi cao mới có ý nghĩa nên có thể lựa chọn công thức khử trùng tạo mẫu sạch phù hợp là CT₂, với thời gian khử trùng là 7 phút, tỷ lệ mẫu sạch là 87,12% và tỷ lệ mẫu nảy chồi là 59,11% (Hình 1a). Kết quả phân tích thống kê cho thấy, khi sử dụng Javen 8% để khử trùng mẫu với thời gian khử trùng khác nhau đã có

ảnh hưởng rõ rệt đến khả năng tạo mẫu sạch và tỷ lệ tái sinh chồi (Sig = 0,0001 < 0,05).

3.2. Nhân nhanh chồi Kim tiền thảo

Giai đoạn nhân nhanh là giai đoạn chuyển tiếp giữa giai đoạn tạo mẫu sạch và giai đoạn ra rễ tạo cây hoàn chỉnh. Đây là giai đoạn quyết định đến số lượng chồi cũng như thời gian và hiệu quả của nhân giống *in vitro*. Các chất điều hòa sinh trưởng nhóm auxin và cytokinin đóng vai trò quyết định đến hệ số nhân nhanh trong nuôi cấy *in vitro*. Trong môi trường có cytokinin nếu bổ sung thêm auxin sẽ làm cho các chồi cứng cáp và phát triển hài hòa cả về số lượng và chất lượng. Nhân nhanh chồi Kim tiền thảo *in vitro* được thiết kế 6 công thức thí nghiệm với loại và hàm lượng chất điều hòa sinh trưởng khác nhau và 1 công thức đối chứng không bổ sung chất điều hòa sinh trưởng. Kết quả thu được trình bày ở bảng 3.

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

Ký hiệu môi trường	Chất ĐHST (mg/l)			Hệ số nhân chồi (lần)	Tỷ lệ chồi hữu hiệu (%)	Đặc điểm của chồi
	6-BAP	Kinetin	α -NAA			
ĐC	-	-	-	1,02 ± 0,02 ^a	4,17	+
NN ₁	1,0	0,3	0,1	4,37 ± 0,04 ^d	78,89	+++
NN ₂	1,5	0,3	0,1	3,59 ± 0,01 ^c	69,47	+++
NN ₃	1,0	0,3	-	2,49 ± 0,03 ^b	67,57	++
NN ₄	1,5	0,3	-	1,93 ± 0,02 ^b	55,91	++
NN ₅	1,0	-	0,1	1,45 ± 0,01 ^a	34,93	+
NN ₆	1,5	-	0,1	1,11 ± 0,01 ^a	28,67	+
Sig				0,0001	0,0001	

Chú thích: +: Chồi mảnh, còi, yếu; ++: Chồi mập, xanh, khỏe; +++: Chồi cao, thân mập, xanh tốt, nhiều chồi.

Kết quả thu được (Bảng 3) cho thấy, sau thời gian nuôi cấy trên các môi trường cảm ứng tạo cụm chồi có bổ sung chất điều hoà sinh trưởng, các mẫu cấy đều tái sinh chồi tốt nhưng với tỷ lệ khác nhau. Hệ số nhân nhanh dao động từ 1,11 đến 4,37 lần/chu kỳ nhân (7 tuần) và tỷ lệ chồi hữu hiệu dao động từ 28,67% đến 78,89% (Hình 1b,c). Trong khi đó, ở công thức đối chứng chỉ cho hệ số nhân chồi rất thấp (1,02 lần/chu kỳ nhân) và tỷ lệ chồi hữu hiệu chỉ đạt 4,17%. Từ kết quả ở các công thức thí nghiệm, nhận thấy ở môi trường NN₁ cho hệ số nhân chồi và tỷ lệ chồi hữu hiệu cao nhất (4,37 lần/chu kỳ nhân và 78,89% chồi hữu hiệu) (Hình 1c). Kết quả kiểm tra thống kê cũng cho thấy, chất điều hoà sinh trưởng có

ảnh hưởng rõ rệt đến hệ số nhân nhanh và tỷ lệ chồi hữu hiệu (Sig = 0,0001 < 0,05). Như vậy, có thể chọn công thức môi trường MS cơ bản bổ sung 1,0 mg/l 6-BAP; 0,3 mg/l Kinetin; 0,1 mg/l α -NAA) là môi trường thích hợp để nhân nhanh chồi loài Kim tiền thảo.

3.3. Ảnh hưởng của hàm lượng chất hữu cơ đến khả năng nhân nhanh chồi

Chồi Kim tiền thảo tốt nhất thu được ở thí nghiệm trên (Bảng 3) được sử dụng làm vật liệu cho thí nghiệm tiếp theo. Thí nghiệm này, bổ sung thêm chất hữu cơ là nước dừa và khoai tây nghiền để kích thích chồi sinh trưởng và phát triển nhanh nhằm rút ngắn quy trình nhân giống và nâng cao chất lượng chồi. Sau 7 tuần theo dõi, thu được kết quả như bảng 4.

Bảng 4. Ảnh hưởng của hàm lượng chất hữu cơ đến khả năng nhân nhanh chồi

Ký hiệu môi trường	Chất hữu cơ		Hệ số nhân chồi (lần)	Tỷ lệ chồi hữu hiệu (%)	Đặc điểm của chồi
	Khoai tây nghiền (gr/l)	Nước dừa (ml/l)			
NC ₁	-	100	7,22 ± 0,04 ^c	74,09	Chồi cao, mập, xanh, đồng đều
NC ₂	100	100	6,17 ± 0,02 ^b	70,72	Chồi cao, mập, xanh tốt
NC ₃	100	-	3,56 ± 0,03 ^a	72,93	Chồi cao, mập, xanh tốt
	Sig		0,0001	0,0025	

Từ kết quả ở bảng 4 cho thấy, khi nuôi cấy chồi Kim tiền thảo trên môi trường có chất điều hoà sinh trưởng giống nhau nhưng bổ sung các chất hữu cơ khác nhau thì số chồi trung bình/mẫu có sự thay đổi. Các công thức bổ sung chất hữu cơ đều cho số hệ số nhân cao hơn so với khi chỉ sử dụng chất điều hoà sinh trưởng. Công thức NC₃ chỉ bổ sung 100 gr/l khoai tây nghiền cho hệ số nhân chồi thấp (3,56 lần). Ở công thức NC₁, khi bổ sung 100 ml/l nước dừa cho hệ số nhân chồi và tỷ lệ chồi hữu hiệu đều cao nhất, lần lượt là 7,22 lần/chu kỳ nhân; 74,09% (Hình 1d). Như vậy, có thể lựa chọn môi trường MS cơ bản bổ sung 100 ml/l nước dừa; 1,0 mg/l 6-BAP; 0,3 mg/l

Kinetin; 0,1 mg/l α -NAA; 30 gr/l sucrose; 6,5 gr/l agar cho nhân nhanh chồi Kim tiền thảo. Phân tích thống kê cũng cho thấy sự ảnh hưởng rõ rệt của chất hữu cơ đến các chỉ số nhân nhanh là có ý nghĩa (Sig < 0,05).

3.4. Ra rễ tạo cây hoàn chỉnh

Chất điều hoà sinh trưởng auxin (β -IAA, β -IBA, α -NAA...) là chất có tác dụng nhiều mặt lên quá trình sinh trưởng của tế bào, hoạt động của tầng phát sinh và đặc biệt là kích thích sự hình thành rễ. Các chồi hữu hiệu có chiều cao $\geq 2,5$ cm được cấy trên môi trường ra rễ có bổ sung chất điều hoà sinh trưởng α -NAA với nồng độ khác nhau. Sau 7 tuần nuôi cấy, kết quả được trình bày ở bảng 5.

Bảng 5. Ảnh hưởng của nồng độ α -NAA và than hoạt tính đến khả năng ra rễ

Ký hiệu môi trường	α -NAA (mg/l)	Than hoạt tính (g/l)	Tỷ lệ chồi ra rễ (%)	Số rễ TB/cây (rễ)	Chiều dài TB/rễ (cm)
R ₀	-	-	14,5	1,02 ± 0,03 ^a	0,31 ± 0,02 ^a
R ₁	0,1	-	39,53	1,33 ± 0,02 ^a	0,55 ± 0,01 ^b
R ₂	0,3	-	50,57	5,33 ± 0,04 ^c	1,08 ± 0,03 ^b
R ₃	0,5	-	53,87	3,67 ± 0,03 ^b	1,02 ± 0,02 ^b
R ₄	0,1	0,1	61,11	5,67 ± 0,03 ^c	2,60 ± 0,02 ^c
R ₅	0,3	0,1	95,66	8,33 ± 0,05 ^d	3,41 ± 0,03 ^d
R ₆	0,5	0,1	69,94	6,67 ± 0,02 ^{cd}	3,22 ± 0,03 ^d
	Sig		0,0001	0,0001	0,0001

Qua kết quả ở bảng 5 cho thấy, ở tất cả các công thức môi trường đều cho ra rễ nhưng với tỷ lệ khác nhau kể cả môi trường không bổ sung chất điều hoà sinh trưởng (R₀). Ở các công thức môi trường R₁₋₆ cho tỷ lệ ra rễ tương đối cao, dao động từ 39,53% đến 95,66%, số rễ trung bình/cây đạt 1,33 - 8,33 rễ và chiều dài rễ trung bình đạt 0,55 - 3,41cm. Trong đó, tỷ lệ chồi ra rễ, chiều dài rễ và số rễ trung bình/cây đạt cao nhất là ở công thức môi trường R₅ bổ sung 0,3 mg/l α -NAA và 0,1 gr/l than hoạt tính (Hình 1e). Kết quả trên cũng phù hợp với nghiên cứu của Puspashree *et al* (2012) khi sử dụng môi trường MS bổ sung 0,5 mg/l β -IBA đạt hiệu quả ra rễ là 100%. Phân tích thống kê cũng cho thấy sự ảnh hưởng rõ rệt của nồng độ α -NAA và than hoạt tính đến các chỉ số ra rễ là có ý nghĩa (Sig = 0,0001 < 0,05). Như vậy, có thể chọn môi trường MS cơ bản bổ sung 0,3 mg/l α -NAA; 0,1 gr/l than hoạt tính; 20 gr/l sucrose; 6,5 gr/l agar cho việc kích thích ra rễ tạo cây hoàn chỉnh đối với Kim tiền thảo.

3.5. Ảnh hưởng của thành phần ruột bầu đến khả năng sống, sinh trưởng của cây con

Cây Kim tiền thảo *in vitro* được tạo ra trên môi trường cảm ứng ra rễ được huấn luyện trong nhà lưới 10 ngày để cây thích nghi dần với điều kiện tự nhiên trước khi ra ngôi. Sau thời gian huấn luyện, cây con được trồng vào bầu với các giá thể khác nhau để nghiên cứu ảnh hưởng của thành phần giá thể đến tỷ lệ cây sống và sinh trưởng của cây Kim tiền thảo *in vitro* tại vườn ươm. Đặc biệt ở giai đoạn đầu, thành phần ruột bầu phải vừa có khả năng giữ nước, tạo độ ẩm giúp cây con hút chất dinh dưỡng nhưng cũng cần thoáng khí để cây con không bị thối rễ (Bùi Văn Thắng và cộng sự, 2016).

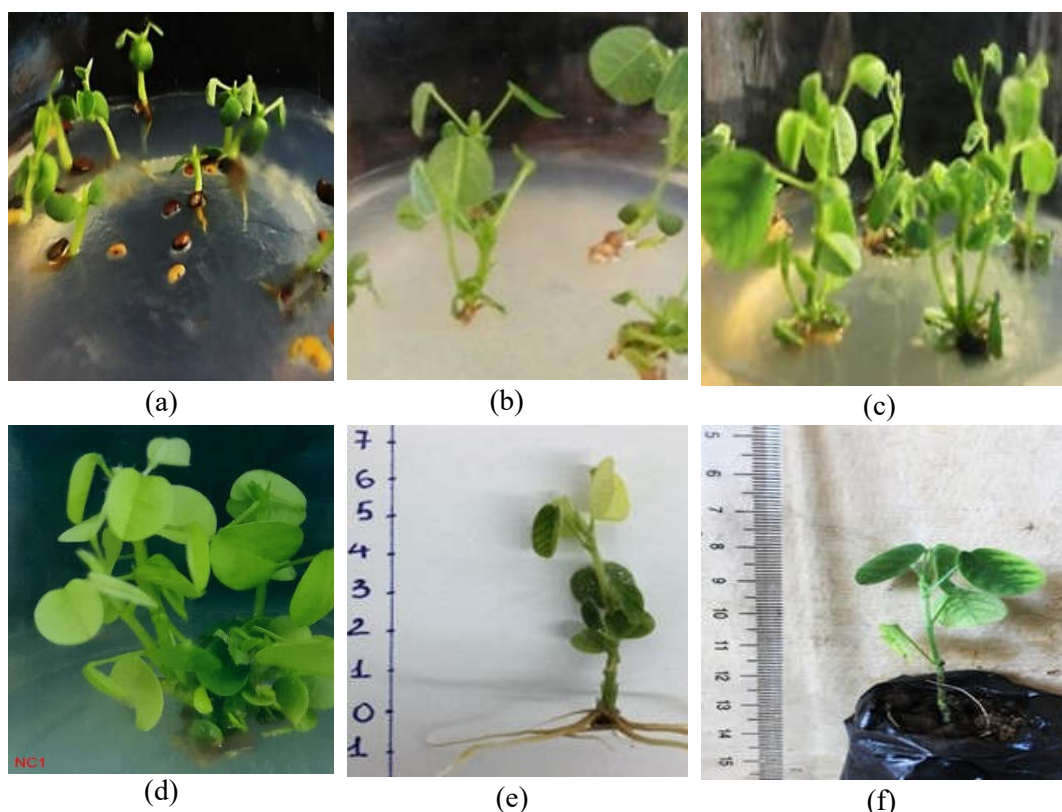
Trong nghiên cứu này, bố trí 5 công thức thí nghiệm có thành phần giá thể khác nhau (Bảng 6). Sau khi trồng cây vào bầu, xếp bầu theo luống trong nhà lưới có mái che, tưới nước 2 lần/ngày đảm bảo độ ẩm cao. Sau khi trồng 7 tuần, tiến hành thống kê các chỉ tiêu về tỷ lệ sống, chiều cao và đặc điểm sinh trưởng của cây con. Kết quả được trình bày ở bảng 6.

Bảng 6. Ảnh hưởng của thành phần giá thể đến tỷ lệ sống, sinh trưởng của Kim tiền thảo

Ký hiệu giá thể	Thành phần giá thể	Tỷ lệ sống (%)	Chiều cao TB/cây (cm)	Đặc điểm cây giống
B ₁	Đất tầng B	15,03	3,04 ± 0,04 ^a	Sinh trưởng kém, lá vàng
B ₂	25% cát vàng + 75% đất tầng B	18,07	3,49 ± 0,05 ^a	Sinh trưởng kém, lá vàng
B ₃	50% cát vàng + 50% đất tầng B	81,93	5,65 ± 0,02 ^c	Sinh trưởng tốt, lá xanh đậm
B ₄	75% cát vàng + 25% đất tầng B	52,69	4,19 ± 0,03 ^b	Sinh trưởng kém, lá xanh
B ₅	100% cát vàng	16,34	3,37 ± 0,02 ^a	Sinh trưởng kém, lá vàng
	Sig	0,0001	0,0001	

Kết quả nghiên cứu (Bảng 6) cho thấy công thức B₃ cho tỷ lệ cây sống và chiều cao cây trung bình lớn nhất, lần lượt là 81,93% và 5,65 cm. Ở công thức thí nghiệm B₁ cho tỷ lệ sống là thấp nhất (15,03%) và chiều cao trung bình của cây cũng kém (3,04 cm). Kết quả kiểm tra thống kê cho thấy các chỉ tiêu về tỷ lệ sống cũng như chiều cao cây trung bình có sự sai

khác giữa các công thức thí nghiệm là có ý nghĩa (Sig = 0,0001 < 0,05). Như vậy, khi thay đổi tỷ lệ các thành phần giá thể thì tỷ lệ cây sống cũng như chiều cao trung bình/cây đều có sự khác biệt giữa các công thức. Thành phần ruột bầu thích hợp nhất là ở công thức B₃ (50% cát vàng + 50% đất tầng B) (Hình 1f).



Hình 1. Cây Kim tiền thảo qua các giai đoạn trong quy trình nhân giống in vitro

Ghi chú: a) Mẫu sạch nảy chồi trên CT₂; b) Cụm chồi trên NN₅; c) Nhân nhanh chồi trên MN₂; d) Nhân nhanh chồi trên NC₁; e) Cây Kim tiền thảo hoàn chỉnh từ môi trường R₅; f) Cây Kim tiền thảo trồng trong bầu sau 7 tuần.

4. KẾT LUẬN

Từ các kết quả thu được trong quá trình nghiên cứu, rút ra một số kết luận sau: khử trùng mẫu hạt Kim tiền thảo bằng cồn 70% trong 1 phút, Javen 8% trong 7 phút cho tỷ lệ mẫu sạch đạt 87,12% và hạt nảy mầm đạt 59,11%. Nhân nhanh chồi bằng môi trường MS bổ sung 1 mg/l 6-BAP; 0,3 mg/l Kinetin; 0,1 mg/l α -NAA; 100 ml/l nước dừa; 30 gr/l sucrose; 6,5 gr/l agar cho hệ số nhân chồi đạt 7,22 lần/chu kỳ nhân; tỷ lệ chồi hữu hiệu đạt 74,09%. Ra rễ tạo cây hoàn chỉnh trên môi trường MS bổ sung 0,3 mg/l α -NAA; 0,1 gr/l than hoạt tính; 20 gr/l sucrose; 6,5 gr/l agar, với tỷ lệ ra rễ đạt 95,66%, 8,33 rễ/cây và chiều

dài trung bình của rễ là 3,41 cm. Thành phần ruột bầu thích hợp cho cây con Kim tiền thảo phát triển tốt là 50% cát vàng và 50% đất tầng B với tỷ lệ cây sống đạt 81,93%, chiều cao cây trung bình là 5,65 cm, cây phát triển khỏe mạnh, lá xanh tốt.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bùi Văn Thắng, Cao Thị Việt Nga, Vùi Văn Kiên, Nguyễn Văn Việt (2016). Nhân giống cây Đàng sâm (*Codonopsis javanica*) bằng kỹ thuật nuôi cấy mô. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Lâm nghiệp*, 4: 3 - 9.
2. Đoàn Thị Thu Hương, Nguyễn Văn Việt, Nguyễn Thị Huyền, Trần Việt Hà (2019). Hoàn thiện quy trình nhân giống cây Khôi tía (*Ardisia sylvestris*) bằng kỹ thuật nuôi cấy in vitro. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Lâm nghiệp*, 1: 25 - 31.

3. Đỗ Tất Lợi (1999). *Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam*. NXB Y học, Hà Nội.

4. Murashige T. and Skoog F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol plant*, 15: 473 - 497.

5. Nguyễn Quỳnh Trang, Vũ Thị Huệ, Khuất Thị Hải Ninh, Nguyễn Thị Thơ (2013). Nhân giống *in vitro* lan Phi điệp tím. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Lâm*

nghiệp, số 3(1): 16 - 21.

6. Puspashree P and Shiba P.R (2012). *In vitro* micropropagation of *Desmodium gangeticum* (L.) DC: A medicinal legume through axillary bud multiplication. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 15 (10): 477 - 483.

7. Võ Văn Chi (1997). *Từ điển cây thuốc Việt Nam*. NXB Y học, TP.Hồ Chí Minh.

STUDY ON MICROPROPAGATION OF *Desmodium styracifolium* (Osborne) Merr. BY IN VITRO CULTURE METHODS

Nguyen Van Viet¹, Nguyen Thi Hue¹, Doan Thi Thu Huong¹, Nguyen Thi Hien¹

¹*Vietnam National University of Forestry*

SUMMARY

Desmodium styracifolium (Osborne) Merr. is essential medicinal plants for patients because every part of the tree: roots, stems, leaves can be used. Micropropagation of *Desmodium styracifolium* by *in vitro* culture methods has been successfully studied. The results showed that the optimal method for seeds sterilization was soaked in ethanol 70% for 1 minutes, by Javen 8% solution for 7 minutes and then cultured in Murashige and Skoog (MS) medium with 30 gr/l sucrose và 6.5 gr/l agar, resulting in survival rate of 87.12% after 6 weeks of culture. MS medium supplemented with 1.0 mg/l 6-Benzylamino purine (6-BAP), 0.3 mg/l Kinetin, 0.1 mg/l α -naphthyl acetic acid (α -NAA), 100 ml/l coconut water, 30 gr/l sucrose and 6.5 gr/l agar the rate of effective buds forming was 74.09% and multiplication of 7.22 times after 6 weeks of culture. The MS medium containing 0.3 mg/l α -NAA, 0.1 mg/l activated carbon (AC), 20 gr/l sucrose and 6.5 gr/l agar was found to be suitable for root induction with resulted in 95.66% of shoots producing roots. The average number of roots and average root length per plantlet were respectively 8.33 and 3.41 cm.

Keywords: *Desmodium styracifolium*, *in vitro* culture, multi-shoot regeneration.

Ngày nhận bài : 02/7/2019

Ngày phản biện : 20/9/2019

Ngày quyết định đăng : 27/9/2019