Nhân giống cây Bình vôi (*stephania glabra* (roxb.) miers) *in vitro*

Nguyễn Thị Sen, Đỗ Tiến Vinh, Mai Thị Phương Hoa*

Khoa Công nghệ Sinh học, Đại học Nguyễn Tất Thành
*mtphoa@ntt.edu.vn

Tóm tắt

Bình vôi (*Stephania glabra* (roxb.) miers) là một loài cây dược liệu quí có tác dụng an thần, giảm đau, gây ngủ, hạ sốt, bảo vệ thần kinh, chống động kinh, hạ huyết áp. Ngoài tự nhiên, cây Bình vôi đang bị khai thác cạn kiệt, nguồn cung cây giống không đáp ứng nhu cầu phát triển diện tích trồng. Nghiên cứu nhân giống cây Bình vôi *in vitro* nhằm mục tiêu bảo tồn loài cây này. Kết quả đã xác định được chất khử trùng javel (75% trong thời gian 15 phút) và $HgCl_2$ (0,1% trong thời gian 5 phút) cho tỉ lệ vô trùng chồi cây bình vôi đạt 89,42%; môi trường MS có bổ sung BA 2mg/l thích hợp cho quá trình nhân chồi; tỉ lệ ra rễ đạt 64,86% trên môi trường MS có bổ sung NAA 1mg/l.

® 2020 Journal of Science and Technology - NTTU

Nhận 18.12.2019
Được duyệt 25.05.2020
Công bố 29.06.2020

Từ khóa
Stephania glabra (Roxb.) Miers, cây Bình vôi, nuôi cấy mô, vi nhân giống

1 Đặt vấn đề

Bình vôi (*Stephania glabra* (roxb.) miers) là loài cây dây leo có rễ củ thường gặp ở các vùng núi đá vôi: Tuyên Quang, Hoà Bình, Cao Bằng, Thanh Hoá, Lâm Đồng, Bà Rịa - Vũng Tàu... Thành phần hóa học chính của Bình vôi là alkaloid, trong đó hoạt chất chính có tác dụng là L-tetrahydropalmatin (rotundin), stepharin, roemerin, cycleanin, cepharanthin với hàm lượng rất khác nhau trong từng loài[1].

Tại Việt Nam, Rotundin từ cây Bình Vôi đã được chứng minh tác dụng an thần, giảm đau, gây ngủ, tác dụng hạ sốt, bảo vệ thần kinh, chống động kinh, hạ huyết áp, giãn cơ trơn. Học viện Quân Y đã tổng hợp thành công Rotundin sunfat từ Rotundin chiết xuất từ củ Bình Vôi để sản xuất thuốc tiêm. Hiện nay, trên thị trường có rất nhiều dược liệu chứa Rotundin và Rotundin sunfat như các sản phẩm viên Rotunda, Sen vông, Roxen, Nightqueen... Rotundin nguồn gốc tự nhiên có những ưu điểm nổi bật như độc tính thấp, sự dung nạp thuốc tốt, mang lại giấc ngủ sinh lí... Sau khi ngủ không bị mệt mỏi, nhức đầu, hoa mắt, buồn nôn, khô miệng, vụng về, giảm tập trung, không bị lệ thuộc thuốc, không giảm trí nhớ nếu sử dụng kéo dài như các loại thuốc tổng hợp từ hóa chất (Seduxen, Valium, Stinox, Xanax, Temesta…). Các nghiên cứu gần đây cho thấy Rotundin khi sử dụng với liều thấp còn có tác dụng làm giảm ảnh hưởng gây nghiện của cocain[1].

Nhu cầu củ Bình Vôi càng tăng với giá thành càng cao dẫn đến tình trang khai thác quá mức, không có qui hoạch làm cho loài cây này ngày càng cạn kiệt. Ngoài ra, hàm lượng dược chất có trong các loài Bình vôi là rất khác nhau, phương thức nhân giống truyền thống không đảm bảo số lượng, chất lượng cây giống cũng gây ảnh hưởng rất lớn đến việc qui hoạch trồng loài cây này.

Phương pháp nhân giống truyền thống là gì? Và nhược điểm của phương pháp này. Đã có nghiên cứu nhân in vtro cây bình vôi chưa? Nếu có các nghiên cứu này đã đạt được những kết quả già và vật liệu sử dụng để nghiên cứu là bộ phận nào

Vì vậy việc nghiên cứu nhân giống cây vôi là hoàn toàn cần thiết.

2 Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Vật liệu: Cây Bình vôi do Trung tâm Cây thuốc quí tỉnh Hòa Bình cung cấp

Thành phần khoáng cơ bản được sử dụng cho nghiên cứu là môi trường MS[2], LV[3], WPM[4]. Các chất bổ sung NAA (α - Naphthaleneacetic acid - Merck germany), IBA (Indol butyric acid- MB cell Korea), IAA (Indole-3-acetic acid - MB cell Korea), BA (6 - benzylaminopurine- Merck germany), Kinetin (MB cell Korea), đường sucrose 30g/l. Môi trường được khử trùng bằng nồi hấp tiệt trùng ở 121^0C, áp suất 1atm trong 20 phút.

Điều kiện nuôi cấy: thí nghiệm được thực hiện trong điều kiện nhiệt độ 26°C ± 2°C, cường độ ánh sáng 2000 - 3000lux, thời gian chiếu sáng 10 giờ/ngày.

Địa điểm nghiên cứu: Phòng nuôi cấy mô thực vật khoa Công nghệ Sinh học Đại học Nguyễn Tất Thành.

Phương pháp: Thí nghiệm được bố trí theo khối hoàn toàn ngẫu nhiên với 3 lần lặp lại, mỗi lần 5 bình thủy tinh chứa 50ml môi trường nuôi cấy, mỗi bình cấy 5 mẫu. Kết quả nghiên cứu được xử lí thống kê bằng phần mềm SAS 9.1 trắc nghiệm phân hạng LSD với độ tin cậy 99%.

Thiết kế thí nghiệm:

Thí nghiệm 1: Khảo sát ảnh hưởng của javel đến quá trình vô trùng mẫu cây Bình vôi *in vitro*: Chồi cây Bình vôi to khỏe không sâu bệnh sau khi thu thập được khử trùng hai lần bằng javel (50; 75 và 100%) với các khoảng thời gian (10 và 15 phút), và $HgCl_2$ (1‰) trong thời gian 5 phút. Mẫu sau đó được rửa sạch, loại bỏ những mẫu bị hoại và cấy vào môi trường MS có bổ sung đường sucrose 30g/l, agar 8g/l.

Thí nghiệm 2: Khảo sát ảnh hưởng của các loại môi trường khoáng đến sinh trưởng và phát triển của cây Bình vôi *in vitro:* chồi Bình vôi vô trùng được cắt thành các đoạn có chiều dài 2 - 3cm, có 1 - 2 lá. Sau đó cấy vào các bình môi trường thí nghiệm LV; MS và WPM có bổ sung đường sucrose 30g/l và agar 8g/l.

Thí nghiệm 3: Khảo sát sự ảnh hưởng của nồng độ BA và Kinetin đến quá trình nuôi cấy tạo chồi cây Bình vôi: chồi Bình vôi vô trùng được cắt thành các đoạn có chiều dài 2 - 3cm, có 1 - 2 lá. Sau đó cấy vào các bình môi trường MS có bổ sung BA; Kinetin theo các nồng độ thí nghiệm (0,5; 1; 2 và 3mg/l), đường sucrose 30g/l và agar 8g/l.

Thí nghiệm 4: Khảo sát ảnh hưởng của IBA, NAA, IAA đến quá trình tạo rễ cây Bình vôi *in vitro:* chồi Bình vôi vô trùng được cắt thành các đoạn có chiều dài 2 - 3cm, có 1 - 2 lá. Sau đó cấy vào các bình môi trường MS có bổ sung IBA, NAA, IAAvới các nồng độ thí nghiệm (0,5; 1 và 2mg/l), đường sucrose 30g/l và agar 8g/l.

Các chỉ tiêu theo dõi

- Tỉ lệ mẫu vô trùng (%) = (tổng số mẫu vô trùng/tổng số mẫu ban đầu) x 100.
- Tỉ lệ mẫu tạo chồi (%) = (tổng số mẫu vô trùng tạo chồi/tổng số mẫu vô trùng) x 100.
- Số lá phát sinh được tính bằng cách đếm số lá sau 4 tuần nuôi cấy trừ cho số lá ban đầu.
- Số chồi phát sinh được tính bằng cách lấy số chồi sau 4 tuần nuôi cấy trừ cho số chồi ban đầu.
- Chiều cao của chồi được tính từ phần tiếp giáp giữa thân với rễ tới đỉnh chồi cao nhất.
- Chiều cao trung bình của chồi (cm) = tổng chiều cao chồi/tổng số chồi đo đếm.
- Chiều dài rễ được tính từ phần tiếp giáp giữa thân với rễ đến chóp của rễ dài nhất.
- Chiều dài trung bình của rễ (cm) = tổng chiều dài rễ/tổng số rễ đo đếm.
- Số rễ được tính bằng cách đếm số rễ sau 6 tuần nuôi cấy

3 Kết quả và thảo luận

3.1 Kết quả thí nghiệm 1: Vô mẫu tạo nguyên liệu cây Bình Vôi *in vitro*

Trong thí nghiệm này hóa chất được sử dụng là cồn 70^0 và javel 50%, 75% và 100% khoảng thời gian 10 phút và 15 phút. Sau khi vô trùng, mẫu được cấy vào môi trường nuôi cấy MS. Sau một khoảng thời gian nhất định, từ 2 - 3 tuần, mẫu bắt đầu nảy mầm. Quan sát tỉ lệ nảy mầm, tỉ lệ nhiễm, xác định nồng độ javel thu được sau 30 ngày được thể hiện ở Bảng 1.

Bảng 1 Kết quả khảo sát nồng độ javel và thời gian vô trùng mẫu

Nghiệm thức	Nồng độ javel (%)	Thời gian (phút)	Tỉ lệ mẫu vô trùng (%)	Tỉ lệ mẫu tạo chồi (%)
1.1	50	10	$36,28^{e}$	$86,20^{a}$
1.2	50	15	$42,22^{d}$	$83,13^{a}$
1.3	75	10	$65,66^{c}$	$78,92^{b}$
1.4	**75**	**15**	**$89,42^{b}$**	**$77,31^{b}$**
1.5	100	10	$90,69^{ab}$	$46,95^{c}$
1.6	100	15	$93,28^{a}$	$44,86^{c}$

Các kí tự theo sau giá trị trung bình trong cùng một cột thể hiện sự khác biệt giữa các nghiệm thức với mức ý nghĩa P ≤ 0,01 bằng trắc nghiệm phân hạng LSD.

Có sự khác biệt rõ rệt ở các nghiệm thức với mức ý nghĩa P ≤ 0,01 nồng độ javel càng cao thì tỉ lệ mẫu vô trùng càng tăng, ngược lại tỉ lệ mẫu tạo chồi giảm ở các nghiệm thức. Cồn và javel là chất có tác dụng sát khuẩn cao nên khi tăng thời gian khử trùng thì tỉ lệ nhiễm sẽ giảm nhưng nếu thời gian khử trùng lâu thì dung dịch có thể xâm nhập vào bên trong gây độc với mẫu. Nghiệm thức 1.4 nồng độ javel 75% thời gian 15 phút tỉ lệ mẫu vô trùng 89,42%, ngược lại tỉ lệ mẫu tạo chồi 77,31% cao nhất (không khác biệt NT1.3). Javel 50% trong thời gian 10 phút (NT1.1) thì tỉ lệ mẫu vô trùng 36,28% - thấp nhất - mặc dù tỉ lệ mẫu tạo chồi là 86,20% cao nhất nhưng do thời gian chưa đủ để diệt các nguồn bệnh, nên sau 20 - 21 ngày xuất hiện một số mẫu bào tử nấm. Tăng thời gian khử trùng lên 10 phút, tỉ lệ nhiễm giảm nhưng khả năng tạo chồi giảm, thời gian mẫu tạo chồi kéo dài (15 - 20 ngày sau cấy ở NT javel 100% thời gian 15 phút mẫu vô trùng 93,28%; mẫu tạo chồi 44,86%). Chất lượng mẫu sống khi khử trùng bằng javel 50 - 75% trong thời gian 5 - 10 phút đều cho mẫu xanh và khỏe. Sau 12 - 15 ngày vô trùng có hiện tượng nhú mầm. Tăng javel 100% thời gian lên 10 phút thì mẫu có hiện tượng đen, yếu và thời gian nảy mầm chậm (20 ngày).

Hình 1 Mẫu bình vôi nảy chồi sau 12 - 15 ngày vô trùng với javel (75% trong thời gian 15 phút)

Hình 2 Mẫu Bình vôi được khử trùng bằng javel (75% trong thời gian 15 phút) sau 30 ngày nuôi cấy trên môi trường MS có bổ sung than hoạt tính (1g/l)

Như vậy, ở nồng độ Javel 75% thì thời gian khử trùng 15 phút là tốt nhất để tạo mẫu Bình vôi *in vitro*. Sau 30 ngày, chồi được chuyển sang môi trường MS có bổ sung than hoạt tính chuẩn bị làm nguyên liệu cho thí nghiệm tiếp theo.

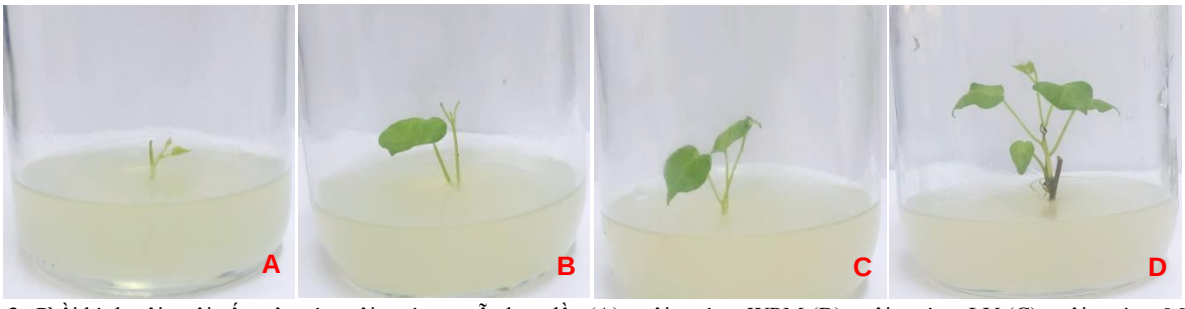
3.2 Kết quả thí nghiệm 2: Khảo sát môi trường khoáng cơ bản bảo quản nguồn gen cây Bình Vôi *in vitro*

Bảng 2 Kết quả khảo sát môi trường khoáng cơ bản nuôi cấy cây Bình vôi

Nghiệm thức	Môi trường nuôi cấy	Chiều cao chồi (cm)	Số lá (lá)	Số chồi phát sinh (chồi)
2.1	**MS**	**7,07^{a}**	**6,34^{a}**	**0,92^{a}**
2.2	LV	4,18^{b}	4,08^{b}	0,39^{ab}
2.3	WPM	3,90^{b}	3,68^{b}	0,31^{b}

Các kí tự theo sau giá trị trung bình trong cùng một cột thể hiện sự khác biệt giữa các nghiệm thức với mức ý nghĩa P ≤ 0,01 bằng trắc nghiệm phân hạng LSD.

Kết quả khảo sát môi trường khoáng cơ bản nuôi cấy cây Bình Vôi, môi trường được sử dụng là MS, WPM, LV có bổ sung đường sucrose 30g/l, agar 7,8g/l. Vật liệu sử dụng là kết quả ở thí nghiệm trước, đoạn thân được cắt thành các đoạn có chiều dài tương tự nhau, cấy vào môi trường nuôi cấy, thời gian 30 ngày khảo sát kết quả Bảng 2 có sự khác biệt rõ ràng về các chỉ tiêu khảo sát của các loại môi trường sử dụng trong thí nghiệm. Trên môi trường MS, nghiệm thức 2.1 chiều cao chồi 7,07cm cao hơn môi trường LV 4,18cm và môi trường WPM 3,90cm. So sánh về số lá, 30 ngày sau cấy, môi trường MS số lá cũng cao nhất là 6,34 lá và phiến lá to, xanh đậm. Số lá phát sinh thấp nhất trên môi trường WPM 3,68 lá. Số chồi phát sinh trong 30 ngày chưa cao 0,92 chồi cao nhất ở nghiệm thức MS còn môi trường LV và WPM không khác biệt nhiều (0,39 - 0,31 lá). Như vậy, qua thí nghiệm nuôi cấy cây Bình Vôi môi trường thích hợp nhất để nuôi cấy và nhân giống là môi trường MS.



Hình 3 Chồi bình vôi nuôi cấy trên các môi trường: mẫu ban đầu (A), môi trường WPM (B), môi trường LV (C), môi trường MS (D) Sau 30 ngày nuôi cấy

3.3 Kết quả thí nghiệm 3: Nhân nhanh chồi Bình Vôi *in vitro*

Trong thí nghiệm này, nồng độ BA và Kinetin được sử dụng với lần lượt là 0 - 0,5 - 1 - 2 - 3mg/l trên môi trường MS có bổ sung đường sucrose 30g/l, agar 7,8g/l và than hoạt tính 1g/l. Ở tất cả các nồng độ của BA và kinetin sử dụng cho thí nghiệm có số chồi phát sinh, chiều cao chồi và số lá đều có sự khác biệt về mặt thống kê giữa các nghiệm thức

Ở chỉ tiêu chất lượng chồi cho thấy, ở các nồng độ khác nhau thì cây sinh trưởng và phát triển theo các chiều hướng tăng trưởng khác nhau: BA ở nồng độ thích hợp không ảnh hưởng đến chất lượng chồi, chất lượng chồi đạt xanh, mập ở các NT từ 3.1 - 3.5 với các nồng độ BA tương ứng từ 0,5 - 3mg/l. Số chồi dao động 0,88 – 3,57 chồi, số chồi thấp nhất ở nghiệm thức đối chứng 3.1. (BA 0mg/l; kinetin 0mg/l) số chồi có phát sinh nhưng không nhiều, lá nhỏ, mỏng, hình thái lá không rõ ràng. Nghiệm thức 3.4 BA (2mg/l) 3,57 chồi; chồi xanh thân mập. Khi tăng BA lên 3mg/l số chồi bắt đầu giảm ở NT 3.5 3,35 chồi. Thân cây nhỏ và yếu, cây chậm phát triển về chiều cao khi tăng nồng độ BA nhưng lá nhiều và lớn, chồi nhiều. BA là cytokinin có vai trò trong việc hoạt hóa quá trình phân bào, nhờ đó sẽ có tác dụng cảm ứng cho việc tạo thành chồi và phân hóa chồi. Do đó, khi đưa BA vào môi trường nuôi cấy sẽ kích thích chồi phát triển. Tuy nhiên, tỉ lệ tái sinh chồi cao nhất ở nồng độ 2mg/l. Khi tăng lên nồng độ cao hơn, tỉ lệ tái sinh chồi giảm. Điều này chứng minh rằng hiệu quả tái sinh chồi phụ thuộc vào yếu tố nội sinh của mẫu, ở nồng độ phù hợp thì BA sẽ có hiệu quả tốt trong tái sinh chồi ở cây Bình Vôi, nồng độ quá cao có thể dẫn tới tác dụng ngược, gây độc đối với tế bào, hạn chế tỉ lệ tái sinh cũng như chất lượng chồi.

Bảng 3 Kết quả khảo sát ảnh hưởng nồng độ BA và Kinetin đến quá trình nuôi cấy tạo chồi cây Bình vôi

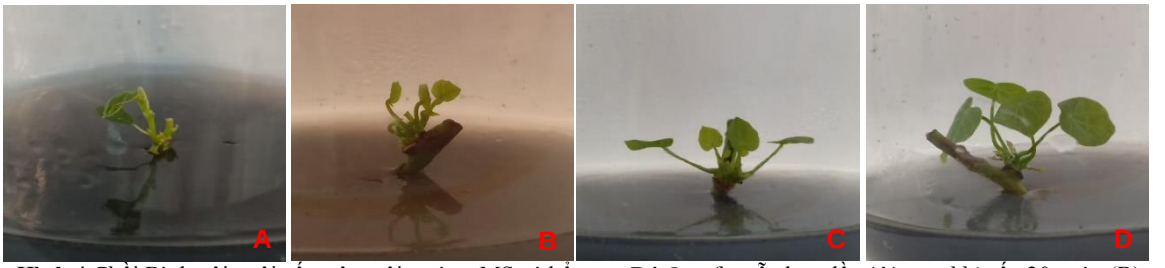
Nghiệm thức	BA (mg/l)	Kinetin (mg/l)	Số chồi phát sinh (chồi)	Chiều cao chồi (cm)	Số lá (lá)
ĐC 3.1	-	-	$0,88^{e}$	$6,99^{a}$	$6,28^{abc}$
3.2	0,5	-	$1,35^{de}$	$6,91^{a}$	$7,37^{a}$
3.3	1	-	$1,91^{d}$	$6,12^{ab}$	$7,07^{a}$
3.4	**2**	-	$\mathbf{3,57^{a}}$	$\mathbf{4,68^{cd}}$	$\mathbf{6,68^{ab}}$
3.5	3	-	$3,35^{ab}$	$4,32^{cde}$	$5,82^{bcd}$
3.6	-	0,5	$1,11^{e}$	$6,71^{a}$	$5,66^{bcd}$
3.7	-	1	$1,76^{d}$	$5,11^{bc}$	$5,34^{cd}$
3.8	-	2	$2,69^{c}$	$3,51^{de}$	$4,84^{de}$
3.9	-	3	$2,81^{bc}$	$3,20^{e}$	$3,91^{e}$

Các kí tự theo sau giá trị trung bình trong cùng một cột thể hiện sự khác biệt giữa các nghiệm thức với mức ý nghĩa P ≤ 0,01 bằng trắc nghiệm phân hạng LSD.

Môi trường MS bổ sung kinetine nồng độ biến thiên 0,5 - 3mg/l ở các nghiệm thức 3.6 -3.9 số chồi phát sinh thấp 1,11 chồi - 2,81 chồi, cao nhất ở nghiệm thức 2.9 kinetin 3mg/l. Chiều cao chồi ngược lại giảm dần theo nồng độ kinetin từ 6,71 - 3,2cm ở các nghiệm thức.

Theo nghiên cứu của Nguyễn Thị Mỹ Duyên (2014)[5], "Sự ảnh hưởng của auxin và cytokinin đến khả năng tạo và nhân chồi cây Bình vôi (*Stephania rotunda* Lour.)" đã xác định được BA nồng độ 2mg/l cho hệ số nhân chồi cao nhất là 4 chồi sau 5 tuần nuôi cấy. Kết quả nghiên cứu cho thấy việc sử dụng BA nồng độ 2mg/l là tốt nhất cho quá trình nhân nhanh cây Bình Vôi, giống với nghiên cứu trước đó, tuy nhiên hệ số nhân chồi lại thấp hơn có thể giải thích như sau: Ngoài ảnh hưởng của chất kích thích sinh trưởng cho vào môi trường nuôi cấy, thì các chất kích thích tố nội sinh trong mẫu cũng ảnh hưởng khá lớn đến sự hình thành chồi của mẫu cấy.

Qua số liệu thu được và quan sát thực tế, nhận thấy sử dụng BA cho hệ số nhân chồi cao hơn, chất lượng chồi tốt. Đối với cây Bình Vôi, BA cho kết quả sinh trưởng và phát triển chồi tốt hơn so với kinetin; nồng độ BA tạo chồi được lựa chọn là 2mg/l.



Hình 4 Chồi Bình vôi nuôi cấy trên môi trường MS có bổ sung BA 2mg/l: mẫu ban đầu (A); sau khi cấy 20 ngày (B), sau khi cấy 30 ngày (C) và sau khi cấy 45 ngày (D)

3.4 Kết quả thí nghiệm 4: nuôi cấy tạo cây Bình Vôi *in vitro* hoàn chỉnh

Thí nghiệm này nghiên cứu ảnh hưởng của các chất điều hòa sinh trưởng đến khả năng tạo rễ cây Bình Vôi *in vitro*. Auxin là nhóm chất điều hòa sinh trưởng thực vật được sử dụng thường xuyên trong nuôi cấy mô thực vật. Auxin kết hợp với các thành phần khác của môi trường dinh dưỡng để kích thích sự tăng trưởng mô sẹo, huyền phù tế bào và điều hòa sự phát sinh hình thái. Hormone auxin thúc đẩy sự phân chia, giãn dài tế bào và phân hóa rễ. 2 loại hormone được dùng phổ biến trong nuôi cấy mô kích thích sự ra rễ là IAA (auxin tự nhiên) và NAA (auxin nhân tạo).

Thí nghiệm sử dụng thân của cây Bình Vôi trên môi trường MS có bổ sung BA 2mg/l, đường sucrose 30g/l, agar 7,8g/l và than hoạt tính 1g/l dùng IAA, IBA, NAA với nồng độ lần lượt là 0,5 - 1 và 2mg/l. Kết quả được thể hiện ở Bảng 4 cho thấy, tất cả các công thức đều kích thích sự tạo rễ sau 30 ngày nuôi cấy trừ nghiệm thức đối chứng NT 4.1.

Bảng 4 Kết quả khảo sát ảnh hưởng của nồng độ IAA, IBA và NAA đến quá trình nuôi cấy tạo rễ cây Bình vôi

Nghiệm thức	Điều hòa sinh trưởng	Nồng độ (mg/l)	Chiều cao (cm)	Tỉ lệ tạo rễ (%)	Số rễ (rễ)
ĐC 4.1	-	-	$6,29^{cd}$	0^{g}	0^{e}
4.2	NAA	0,5	$7,55^{b}$	$33,11^{d}$	$2,86^{b}$
4.3	**NAA**	**1**	$\mathbf{8,96^{a}}$	$\mathbf{64,86^{a}}$	$\mathbf{3,70^{a}}$
4.4	NAA	2	$9,09^{a}$	$65,21^{a}$	$3,79^{a}$
4.5	IBA	0,5	$6,59^{bc}$	$26,92^{e}$	$1,34^{c}$
4.6	IBA	1	$6,85^{bc}$	$38,80^{c}$	$2,38^{b}$
4.7	IBA	2	$7,25^{bc}$	$48,04^{b}$	$2,64^{b}$
4.8	IAA	0,5	$6,44^{bcd}$	$16,10^{f}$	$0,70^{d}$
4.9	IAA	1	$7,49^{bc}$	$25,64^{e}$	$1,69^{c}$
4.10	IAA	2	$5,24^{d}$	$26,33^{e}$	$1,54^{c}$

Các kí tự theo sau giá trị trung bình trong cùng một cột thể hiện sự khác biệt giữa các nghiệm thức với mức ý nghĩa $P \leq 0,01$ bằng trắc nghiệm phân hạng LSD.

Hình 5 Chồi Bình vôi nuôi cấy trên môi trường MS có bổ sung NAA 1mg/l: mẫu ban đầu (A); sau khi nuôi cấy 45 ngày (B, C và D)

Tuy nhiên, ở môi trường nuôi cấy có bổ sung chất điều hòa sinh trưởng NAA với nồng độ 1mg/l cho thấy sự sinh trưởng và phát triển của cây Bình Vôi là tốt nhất. Chiều cao cây khi nuôi cấy ở môi trường này (NT4.3) đạt 8,96cm, cao hơn NT đối chứng 4.1 6,29cm. Tỉ lệ cây tạo rễ 64,86%, số rễ hình thành 3,7 rễ. Bên cạnh đó sự phát triển nhanh về chiều cao, thân cây cũng to hơn và chắc hơn. Lá xanh đậm, phiến lá to và dày ở nghiệm thức 4.3.

Nghiệm thức 4.5 - 4.7 bổ sung IBA 0,5 - 2mg/l chiều cao cây từ 6,59 - 7,25cm khả năng ra rễ 26,92 - 48,04%, số rễ 1,34 - 2,64 rễ. Cao nhất khi bổ sung IBA 2mg/l chiều cao 7,25cm; tỉ lệ tạo rễ 48,04%, số rễ 2,64 rễ. Nghiệm thức 4.8 - 4.10 bổ sung IAA 0,5 - 2mg, chiều cao giảm khi nồng độ tăng (6,44 - 5,24cm) tỉ lệ tạo rễ thấp hơn gần 3 lần so với nghiệm thức 4.3 bổ sung NAA 1mg/l. Trung bình thấp hơn so với các nghiệm thức bổ sung NAA.

Kết quả nghiên cứu này có thể giải thích như sau: NAA là một chất kích thích sinh trưởng thuộc nhóm auxin, thúc đẩy sự sinh trưởng và giãn nở của tế bào, tăng cường các quá trình sinh tổng hợp, trao đổi chất, kích thích hình thành rễ.

4 Kết luận

Đề tài đã thành công trong việc nuôi cấy cây Bình vôi *in vitro* với các kết quả sau:

Nồng độ javel 75% với thời gian ngâm mẫu 15 phút kết hợp với $HgCl_2$ 0,1% thời gian ngâm mẫu 5 phút là thích hợp để vô trùng mẫu chồi với tỉ lệ vô trùng đạt 89,42%

Môi trường MS có bổ sung BA 2mg/l, sucrose 30g/l và agar 8g/l là thích hợp để nhân chồi với số chồi phát sinh đạt 3,57 chồi/mẫu

Môi trường MS có bổ sung NAA 1mg/l, sucrose 30g/l và agar 8g/l là thích hợp để nuôi cấy tạo cây Bình vôi *in vitro* hoàn chỉnh với tỉ lệ tạo rễ 64,86%.

Lời cảm ơn Nghiên cứu này được tài trợ bởi Quĩ Phát triển Khoa học và Công nghệ Đại học Nguyễn Tất Thành, mã số đề tài 2019.01.40.

Tài liệu tham khảo

1. Nguyễn Viết Thân, 2003. *Kiểm nghiệm dược liệu bằng phương pháp hiển vi.* Nhà xuất bản Khoa học và Kĩ thuật. 57-59.

2. Murashige T.A and Skoog F.A, 1962. *Revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures.* Physiologia plantarum 15(3):473-497.

3. Litvay, J.D., D.C. Verma, and M.A. Johnson. *Influence of a loblolly pine (Pinus taeda L.). Culture medium and its components on growth and somatic embryogenesis of the wild carrot (Daucus carota L.).* Plant Cell Reports. 1985; 4(6): 325-328.

4. Lloyd G. & B. McCown, 1981. *Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, Kalmia latifolia, by use of shoot -tip culture.* In: Comb. Proc. Intl. Plant Prop. Soc., 30:421-426.

5. Trần Văn Minh, 2013. *Công nghệ sinh học thực vật.* Giáo trình cao học - nghiên cứu sinh. Đại học Nông Lâm TP. Hồ Chí Minh, 751 trang.

6. Hoàng Minh Tấn, Nguyễn Quang Thạch và Vũ Quang Sáng, 2006. *Giáo trình Sinh lí Thực vật.* Đại học Nông nghiệp I Hà Nội.

Micropropagation of *Stephania glabra* (Roxb.) Miers

Sen Nguyen-Thi, Vinh Do-Tien, Phuong-Hoa Mai-Thi*

Faculty of Biotechology, Nguyen Tat Thanh University
*mtphoa@ntt.edu.vn

Abstract *Stephania glabra* (Roxb.) Miers is a precious medicinal plant that has sedative, analgesic, sedative, antipyretic, protective, anti-epileptic, antihypertensive properties.In the wild, *Stephania glabra* (Roxb.) Miers are being exhaustedly exploited, and the supply of seedlings does not meet the needs of growing planted areas. This study aims to conserve this species *in vitro*. The research results have identified that javel and $HgCl_2$ have the best sterility with the rate of 89.42%.MS medium supplemented with BA is best suited for shoot multiplication. The rooting rate reached 64.86% on MS medium supplemented with NAA.

Keywords *Stephania glabra* (Roxb.) Miers, *micropropagation, tissue culture*