

HOÀN THIỆN KỸ THUẬT NHÂN GIỐNG *IN VITRO* CÂY CỎ THI HẮT HƠI (*Achillea ptarmica*) Ở VIỆT NAM

Phạm Phương Thu^{1,2}, Chu Đức Hà²,
Phan Thị Trang¹, La Việt Hồng¹

TÓM TẮT

Cây cỏ thi hắt hơi (*Achillea ptarmica*) là một loại cỏ mới, thuộc họ Cúc, có giá trị kinh tế cao và được sử dụng để chiết xuất tinh dầu. Trong nghiên cứu này, quy trình nhân giống *in vitro* cây cỏ thi hắt hơi (*Achillea ptarmica*) đã được đề xuất và hoàn thiện. Hạt cây *A. ptarmica* được khử trùng bằng dung dịch NaClO 5% trong 15 phút. Công thức thích hợp để nhân nhanh chồi từ mẫu *A. ptarmica* là môi trường MS bổ sung 0,5 mg/l BAP. Hệ số nhân chồi cao nhất đạt 24,4 lần với chất lượng chồi đồng đều. Khi xử lý với NAA, số lượng rễ trung bình dao động từ 12,2 ÷ 16,0 rễ/mẫu. Trong đó, môi trường MS bổ sung 0,3 mg/l NAA đã được xác định là công thức thích hợp nhất cho sự ra rễ, tạo cây *A. ptarmica* hoàn chỉnh. Ở giai đoạn vườn ươm, cây *in vitro* thích hợp nhất với giá thể 100% cát.

Từ khóa: *Achillea ptarmica*, chất điều hòa sinh trưởng, nuôi cấy mô, *in vitro*

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Cỏ thi hắt hơi (*Achillea ptarmica*) là loài hoa thuộc chi Cỏ thi (*Achillea*), được phân bố chủ yếu ở châu Âu. Mang nhiều đặc điểm của họ Cúc như chùm hoa màu trắng đặc sắc, *A. ptarmica* được dùng chủ yếu làm cây cảnh. Bên cạnh đó, tinh dầu từ *A. ptarmica* có thể được sử dụng để chiết xuất một số loại thuốc chống côn trùng (Kindlovits and Nemeth, 2012; Kuroпка *et al.*, 1991). Một đặc tính quan trọng của *A. ptarmica* là có thể sinh trưởng tốt cho điều kiện khô hạn. Vì thế, đây được xem là đối tượng rất phù hợp để phát triển với điều kiện ở Việt Nam hiện nay.

Để cung ứng nguồn cây *in vitro* sạch bệnh, hoàn thiện quy trình nhân giống là rất cần thiết. Đây cũng là tiền đề quan trọng để góp phần bảo tồn nguồn gen và phục vụ công tác nhân nhanh giống hoa. Tuy nhiên, chưa có nhiều nghiên cứu trên thế giới về quy trình nhân nhanh *A. ptarmica* (Čellárová *et al.*, 1982) cũng như các loài *Achillea* spp. (Alvarenga *et al.*, 2015). Hầu hết nghiên cứu tập trung vào phân tích thành phần và xác định tính chất của hoạt chất trong cây (Althaus *et al.*, 2014, Kuroпка *et al.*, 1991).

Nghiên cứu này nhằm hoàn thiện kỹ thuật nhân giống *in vitro* cây cỏ thi hắt hơi (*A. ptarmica*) phục vụ cho phát triển cây hoa ở Việt Nam.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Nguồn hạt giống hoa *A. ptarmica* được nhập nội từ Viện Nghiên cứu Cây công nghiệp Vavilop - Nga (Vavilop Research Institute of Plant Industry).

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Các thí nghiệm được bố trí theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên với 3 lần nhắc lại gồm:

- Phương pháp khử trùng mẫu: Hạt được lãc với cồn 70% trong 10 giây (Alvarenga *et al.*, 2015); sau đó xử lý trong dung dịch NaClO 5% với các khoảng thời gian khác nhau (5; 10; 15; 20 phút) hoặc HgCl₂ 0,1% với các khoảng thời gian 3; 5; 7; 10 phút, rửa lại hạt bằng nước cất khử trùng 3 lần trước khi gieo trên môi trường MS (Murashige & Skoog) pH 5,7 ± 0,1 (Conn *et al.*, 2013). Bình nuôi cấy được giữ trong điều kiện ánh sáng nhân tạo với quang chu kỳ 14 h sáng/10 h tối, cường độ chiếu sáng 3000 lux, nhiệt độ 25°C.

- Phương pháp nhân nhanh chồi trong điều kiện *in vitro*: Sau 4 tuần nuôi cấy, những chồi thu được từ cây con được cắt thành các mẫu nhỏ có kích thước 1,5 ÷ 2 cm chứa mắt ngủ, được chuyển sang môi trường tái sinh chồi là MS bổ sung 6-Benzyl amino purine (BAP) pH 5,7 ± 0,1 với các nồng độ 0,1; 0,3; 0,5; 0,7; 1,0 mg/l. Các chỉ tiêu đánh giá sau 4 tuần nuôi cấy gồm: hệ số nhân nhanh, chiều cao chồi (mm), đặc điểm chồi tái sinh.

- Phương pháp tạo cây *in vitro* hoàn chỉnh: Các chồi đơn hữu hiệu có chiều cao ≥ 2 cm được tách ra khỏi cụm chồi và cấy chuyển vào môi trường kích thích ra rễ là MS bổ sung 1-Naphthaleneacetic acid (NAA), pH 5,7 ± 0,1 với các nồng độ 0,1; 0,3; 0,5; 0,7 mg/l. Sau 4 tuần nuôi cấy, xác định các chỉ tiêu: số rễ/chồi, chiều dài rễ trung bình (mm), chất lượng cây.

- Phương pháp rèn luyện cây *in vitro* thích nghi với điều kiện tự nhiên: Cây *in vitro* 4 tuần tuổi hoàn chỉnh được đưa vào nhà lưới theo dõi từ 5 - 7 ngày.

¹ Đại học Sư phạm Hà Nội 2

² Viện Di truyền nông nghiệp, Viện Khoa học Nông nghiệp Việt Nam

Cây được rửa sạch để loại bỏ thạch và cấy vào khay đã chuẩn bị giá thể gồm: CT1: 50% đất + 50% xơ dừa, CT2: 30% đất + 70% xơ dừa, CT3: 50% đất + 50% cát, CT4: 30% đất + 70% cát, CT5: 100% cát. Đánh giá tỷ lệ sống sót của cây sau 2 tuần rèn luyện.

- Phương pháp xử lý số liệu: Các số liệu được xử lý thống kê sinh học bằng chương trình Excel 2010 theo mô tả của Nguyễn Văn Mã và cộng tác viên (2013).

2.3. Thời gian và địa điểm nghiên cứu

Nghiên cứu được thực hiện từ tháng 8/2016 đến tháng 11/2017 tại Khoa Sinh, Đại học Sư phạm Hà Nội 2.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả khử trùng tạo mẫu sạch *in vitro*

Đầu tiên, hạt *A. ptarmica* được xử lý để tạo mẫu sạch *in vitro* trong dung dịch NaClO 5%, thời gian xử lý 5, 10, 15, 20 phút và HgCl₂ 0,1%, thời gian xử lý 3, 5, 7, 10 phút. Hạt đã khử trùng được nuôi cấy trên môi trường MS để theo dõi khả năng nảy mầm của từng công thức khử trùng. Kết quả theo dõi sau 4 tuần được thể hiện ở Bảng 1.

Bảng 1. Tỷ lệ nảy mầm của hạt *A. ptarmica* được khử trùng trong các công thức

TT	Công thức xử lý		Tỷ lệ nảy mầm trung bình (%)	Ghi chú
	Hóa chất	T*		
1	NaClO 5%	5	0,00	Tỷ lệ nhiễm 100%
2		10	6,67	
3		15	53,33	
4		20	0,00	
5	HgCl ₂ 0,1%	3	0,00	Tỷ lệ nhiễm 100%
6		5	2,22	
7		7	11,11	
8		10	0,00	

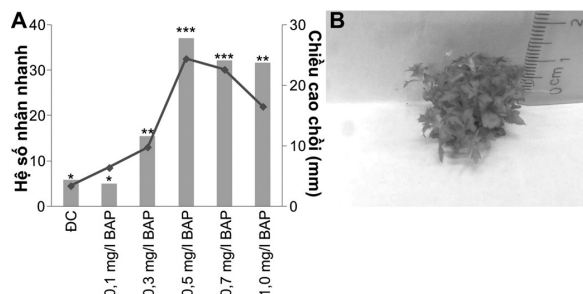
* Ghi chú: T - Thời gian xử lý (phút)

Có thể thấy rằng, tỷ lệ nảy mầm trung bình của hạt *A. ptarmica* khi khử trùng bằng NaClO 5% cao hơn HgCl₂ 0,1%. Cụ thể, tỷ lệ nảy mầm trung bình của hạt khi xử lý với HgCl₂ 0,1% trong khoảng thời gian khác nhau được ghi nhận dao động từ 2,22 ÷ 11,11%. Trong khi đó, với các công thức được xử lý với NaClO 5%, tỷ lệ này có giá trị cao hơn, đạt 6,66 ÷ 53,33%. Khi xử lý với NaClO 5% trong 5 phút hoặc HgCl₂ 0,1% trong 3 phút, hạt không nảy mầm và bị nhiễm hoàn toàn chỉ sau 3 - 5 ngày theo dõi (Bảng 1). Bên cạnh đó, kết quả nghiên cứu cho thấy: xử lý hạt

với NaClO 5% (20 phút) và HgCl₂ 0,1% (10 phút) tỷ lệ nảy mầm là 0%. Điều này có thể được giải thích do kích thước hạt *A. ptarmica* rất nhỏ, lớp vỏ mỏng nên NaClO và HgCl₂ nồng độ cao dễ dàng gây độc tế bào và ảnh hưởng đến tỷ lệ nảy mầm. Gần đây, một họ hàng của *A. ptarmica* là *A. millefolium* đã được tối ưu hóa quá trình vào mẫu bằng cách xử lý với NaClO và laccase với nồng độ 70% (Alvarenga *et al.*, 2015), cho kết quả nghiên cứu tương tự. Như vậy, điều kiện khử trùng được cho là tối ưu trong nghiên cứu này là công thức xử lý với NaClO 5% trong 15 phút.

3.2. Kết quả nhân nhanh chồi *in vitro* cây cỏ thi hắt hơi

Để nhân nhanh chồi *in vitro* cây *A. ptarmica*, BAP được bổ sung vào môi trường nuôi cấy ở các nồng độ khác nhau. Sau 4 tuần theo dõi, kết quả đã có sự chênh lệch về hệ số nhân nhanh giữa các công thức môi trường. Cụ thể, khi tăng dần nồng độ BAP từ 0,1 ÷ 1,0 mg/l, hệ số nhân nhanh và chiều cao chồi trung bình cũng tỷ lệ thuận, tương ứng tăng dần từ 3,4 ÷ 24,4 lần và 5,8 ÷ 37,0 mm (Hình 1A). Như vậy, môi trường MS bổ sung 0,5 mg/l BAP là công thức thích hợp, cho hệ số nhân nhanh cao nhất (24,4 lần) với chất lượng chồi tốt (chồi cao, mập, thân và lá xanh đồng đều) đạt tiêu chuẩn tạo cây *in vitro* hoàn chỉnh (Hình 1B).



Hình 1. A. Ảnh hưởng của BAP đến hệ số nhân nhanh và chiều cao chồi sau 4 tuần theo dõi. * chất lượng chồi kém; ** chất lượng chồi khá; *** chất lượng chồi tốt. B. Chất lượng chồi sau 2 tuần nuôi cấy trong công thức bổ sung 0,5 mg/l BAP

Trước đó, một số nghiên cứu cũng đã ghi nhận ảnh hưởng của chất điều tiết sinh trưởng đến khả năng nhân nhanh chồi của các loài *Achillea* spp. Năm 2010, Danial và cộng tác viên đã nghiên cứu ảnh hưởng của BAP đến khả năng nảy chồi của *A. biebersteinii* (Danial and Kahrizi, 2010) và nhận thấy khi tăng nồng độ BAP lên một mức nhất định sẽ gây tác động kìm hãm sự nảy chồi từ mẫu *A. biebersteinii*. Kết quả tương tự cũng được ghi nhận trong nghiên cứu này. Khi tăng nồng độ BAP lên 1 mg/l thì hệ số nhân nhanh và chiều cao chồi giảm xuống (Hình 1A).

Điều này có thể được giải thích do sự tái sinh chồi *in vitro* phụ thuộc vào hàm lượng cytokinin nội sinh và ngoại sinh. Khi nồng độ cytokinin cao có thể ức chế quá trình tái sinh chồi thông qua đó chiều cao chồi giảm xuống.

3.3. Kết quả tạo cây cỏ thi hắt hơi *in vitro* hoàn chỉnh

Trong số các chất điều tiết sinh trưởng, NAA, thuộc nhóm auxin, được coi là hợp chất kích thích quá trình ra rễ của chồi một cách hiệu quả trong nuôi cấy *in vitro* (Alvarenga *et al.*, 2015). Trong nghiên cứu này, để đánh giá khả năng ra rễ từ chồi *A. ptarmica*, NAA được bổ sung vào môi trường dinh dưỡng với các nồng độ khác nhau. Kết quả theo dõi sau 4 tuần nuôi cấy được trình bày ở Bảng 2.

Bảng 2. Ảnh hưởng của NAA đến khả năng ra rễ của chồi và tạo cây hoàn chỉnh

Môi trường	Số rễ	Chiều dài rễ (cm)	Chất lượng chồi
Đối chứng	13,00 ± 4,06 ^a	45,40 ± 15,10 ^b	***
0,1 mg/l NAA	16,00 ± 5,04 ^a	48,40 ± 11,94 ^b	***
0,3 mg/l NAA	14,00 ± 4,52 ^a	81,00 ± 20,12 ^a	***
0,5 mg/l NAA	12,40 ± 2,07 ^a	32,80 ± 6,83 ^{bc}	***
0,7 mg/l NAA	12,20 ± 1,09 ^a	25,40 ± 6,58 ^a	***
LSD _{0,05}	4,83	17,36	

Ghi chú: * chất lượng chồi kém (chồi mảnh, còi, yếu); ** chất lượng chồi khá (chồi trung bình, mỏng nước, xanh); *** chất lượng chồi tốt (chồi cao, mập, thân và lá xanh đồng đều). Số liệu thể hiện trong bảng là giá trị trung bình ± độ lệch chuẩn.

Kết quả cho thấy, khả năng tạo rễ của chồi ở môi trường có nồng độ NAA khác nhau không có sự biến động lớn. Cụ thể, số lượng rễ trung bình ở các công thức bổ sung NAA dao động từ 12,2 ÷ 16,0 rễ/mẫu (Bảng 2). Trong khi đó, sự khác biệt có ý nghĩa được ghi nhận rõ rệt nhất ở chỉ tiêu chiều dài rễ. Khi tăng dần nồng độ NAA từ 0,1 ÷ 0,3 mg/l, chiều dài rễ cũng tăng từ 45,4 ÷ 81,0 mm, mặc dù số chồi cao nhất ở nồng độ 0,1 mg/l NAA. Mặt khác, tiếp tục tăng nồng độ NAA đến 0,7 mg/l cho kết quả ngược lại, chiều dài rễ giảm. Như vậy, môi trường MS bổ sung 0,3 mg/l NAA là công thức thích hợp cho quá trình kích thích chồi ra rễ tạo cây *in vitro* hoàn chỉnh.

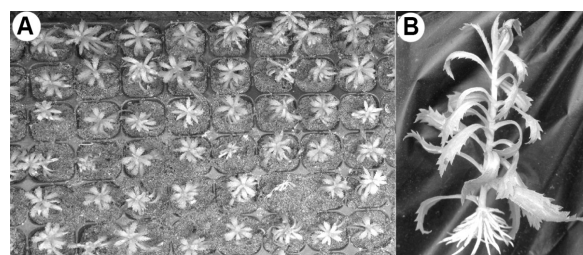
3.4. Kết quả rèn luyện cây cỏ thi hắt hơi *in vitro* thích nghi với điều kiện tự nhiên

Giai đoạn đưa cây *in vitro* ra vườn ươm được xem là hết sức quan trọng, có ý nghĩa quyết định đến khả năng ứng dụng quy trình nuôi cấy mô vào

thực tế sản xuất. Kết quả cho thấy, cây *A. ptarmica* ưa thích sinh trưởng trong giá thể cát, tỷ lệ cây sống sót trung bình trên giá thể 100% cát đạt khoảng 97,11% (Bảng 3).

Bảng 3. Ảnh hưởng của giá thể đến tỷ lệ sống của cây Cỏ thi hắt hơi (sau 2 tuần nuôi cấy)

Công thức	Loại giá thể	Tỷ lệ cây sống (%)
I	50% đất + 50% sơ dừa	0
II	30% đất + 70% sơ dừa	0
III	100% cát ẩm	97,11
IV	50% đất + 50% cát	57,60
V	30% đất + 70% cát	76,90



Hình 2. Khả năng sống sót của *A. ptarmica* trên giá thể cát sau 2 tuần

A. 2 tuần trong điều kiện vườn ươm;
B. Tình trạng cây khỏe mạnh sau 2 tuần

Kết quả này có thể được giải thích do bản chất *A. ptarmica* chịu được khô hạn, vì thế cây không yêu cầu cao đối với đất. Đây là những kết quả rất có giá trị nhằm hoàn thiện và khép kín quy trình nuôi cấy mô cây *A. ptarmica* cũng như cung cấp những dẫn liệu cần thiết cho nghiên cứu các loài *Achillea* spp. khác.

IV. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

4.1. Kết luận

- Công thức khử trùng tối ưu cho hạt *A. ptarmica* là NaClO 5% trong 15 phút. Ở công thức này tỷ lệ hạt nảy mầm cao nhất, đạt 53,33%.

- Môi trường MS bổ sung 0,5 mg/l BAP là công thức thích hợp nhất để nhân nhanh chồi từ mẫu *A. ptarmica*. Hệ số nhân nhanh đạt 24,4 lần với chất lượng chồi đồng đều và đạt tiêu chuẩn.

- Khi bổ sung NAA vào môi trường, số lượng rễ trung bình ở các công thức bổ sung NAA dao động từ 12,2 ÷ 16,0 rễ/mẫu. Kết quả đã xác định được môi trường MS bổ sung 0,3 mg/l NAA là công thức thích hợp nhất cho quá trình kích thích ra rễ tạo cây *in vitro* hoàn chỉnh.

- Trong giai đoạn vườn ươm, cây *A. ptarmica* sinh trưởng tốt trong giá thể 100% cát, tỷ lệ cây sống sót đạt khoảng 97,11%.

4.2. Đề nghị

Nghiên cứu này sẽ được tiếp tục nhằm đánh giá hoạt chất và hàm lượng tinh dầu trong cây *A. ptarmica* được nuôi cấy *in vitro*.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Nguyễn Văn Mã, La Việt Hồng, Ong Xuân Phong, 2013. Phương pháp nghiên cứu sinh lý học thực vật. NXB Đại học Quốc gia Hà Nội.

Althaus, J. B., Kaiser, M., Brun, R., Schmidt, T. J., 2014. Antiprotozoal activity of *Achillea ptarmica* (Asteraceae) and its main alkalamide constituents. *Molecules*, 19(5): 6428-6438.

Alvarenga, I. C., Pacheco, F. V., Silva, S. T., Bertolucci, S. K., Pinto, J. E., 2015. *In vitro* culture of *Achillea millefolium* L.: quality and intensity of light on growth and production of volatiles. *Plant Cell Tissue Organ Cult*, 122(2): 299-308.

Čellárová, E., Greláková, K., Repčák, M., Hončariv, R., 1982. Morphogenesis in callus tissue cultures of some *Matricaria* and *Achillea* species. *Biologia plantarum*, 24(6): 430-433.

Conn, S., Hocking, B., Dayod, M., Athman, A., Henderson, S., Aukett, L., Conn, V., Shearer, M., Fuentes, S., Tyerman, S., Gilliam, M., 2013. Protocol: optimising hydroponic growth systems for nutritional and physiological analysis of *Arabidopsis thaliana* and other plants. *Plant Methods*, 9(1): 4.

Danial, K., Kahrizi, M., 2010. Effect of 6-benzylaminopurine, 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and indole-3-butyric acid on micropropagation stages of *Achillea biebersteinii*. *Asian J Chem*, 22(3): 2383-2386.

Kindlovits, S., Németh, E., 2012. Sources of variability of yarrow (*Achillea* spp.) essential oil. *Acta Alimentaria*, 41(1): 92-103.

Kuroпка, G., Neugebauer, M., Glombitza, K. W., 1991. Essential oils of *Achillea ptarmica*. *Planta Medica*, 57(5): 492-494.

Study on micropropagation of *Achillea ptarmica* in Vietnam

Pham Phuong Thu, Chu Duc Ha, Phan Thi Trang, La Viet Hong

Abstract

A. ptarmica is known as a flowering plant, belonging to Asteraceae family, has high economic value and is used to isolate yarrow oil. In this study, the protocol of the micropropagation of *Achillea ptarmica* was proposed and completed. *A. ptarmica* seeds were highly recommended to be sterilized by immersing in NaClO 5% for 15 minutes. Formula for callus induction from *A. ptarmica* samples was found to be MS medium containing 0.5 mg/l BAP. The highest callus induction rate reached 24.4 times with good quality. In the treatment of NAA, the amount of roots ranged from 12.2 ÷ 16.0 roots per sample. Among them, MS medium containing 0.3 mg/l NAA was the most appropriate formula for root induction in *A. ptarmica* seedlings. In the greenhouse condition, *in vitro* plants could survive and develop in the 100% sand substrate.

Keywords: *Achillea ptarmica*, growth regulator, tissue culture, *in vitro*

Ngày nhận bài: 13/11/2017
Ngày phản biện: 18/11/2017

Người phản biện: TS. Trần Danh Sửu
Ngày duyệt đăng: 11/12/2017

NGHIÊN CỨU NHÂN GIỐNG VÔ TÍNH CÂY THÌA CANH (*Gymnema sylvestre*) BẰNG KỸ THUẬT GIÂM CÀNH TRÊN HỆ THỐNG KHÍ CANH

Trần Thị Quý¹, Nguyễn Quang Thạch¹, Trương Thanh Hưng¹,
Ngô Thị Lam Giang¹, Phạm Hữu Nhượng¹

TÓM TẮT

Cây thìa canh hay dây thìa canh (*Gymnema sylvestre* B.) là loại cây dược liệu quý ở nước ta có tác dụng rất tích cực trong việc điều trị cho bệnh tiểu đường. Công nghệ khí canh thích hợp để nhân giống nhiều loại cây trồng. Kết quả nghiên cứu nhân giống cây thìa canh bằng phương pháp khí canh đã xác định được một số thông số cần thiết để nhân giống vô tính cây thìa canh với hệ số nhân cao. Cành giâm cây thìa canh có 1 và 2 cặp lá khi giâm cành trên hệ thống khí canh là thích hợp nhất, sau 2 tuần tỷ lệ hom ra rễ đạt trên 96,6%, số rễ đạt 7,53 rễ/cây, rễ dài 42,07 cm. Sử

¹ Viện Sinh học Nông nghiệp Tất Thành - Đại học Nguyễn Tất Thành