

NGHIÊN CỨU NHÂN GIỐNG *IN VITRO* CÂY BÁCH HỢP (*LILIUM BROWNII* F.E. BROWN)

Vũ Hoài Sâm¹, Bùi Đức Quỳnh², Nguyễn Thị Hương¹, Nguyễn Văn Khiêm¹

¹Viện Dược liệu - Bộ Y tế

²Trường Đại học Nông lâm Thái Nguyên

Ngày nhận bài: 17.01.2016

Ngày nhận đăng: 20.3.2016

TÓM TẮT

Chi *Lilium* (họ *Liliaceae*) là loài vừa có hoa đẹp làm cảnh, làm thực phẩm, vừa có tác dụng làm thuốc chữa bệnh. Tuy nhiên hiện nay ở Việt Nam, trong tự nhiên Bách hợp chỉ còn thấy mọc ở một vài nơi thuộc vùng khí hậu á cận nhiệt, ở độ cao từ 1300 đến 2000 mét, như Sa Pa, Bát Xát, Mù Cang Chải, Sin Hồ, Phong Thổ, Quan Ba, Đồng Văn và vùng đèo Gió do khai thác quá mức. Vì thế gần đây, Bách hợp đã được đưa vào danh sách một trong những cây thuộc danh lục đỏ cây thuốc Việt Nam. Biện pháp nhân giống duy nhất và hiệu quả để bảo tồn và phát triển nguồn gen cây thuốc quý đang bị đe dọa này là phương pháp nuôi cấy mô. Trong nghiên cứu này, cây bách hợp đã được nhân giống *in vitro* thành công sử dụng vật liệu ban đầu là mẫu đốt thân và vảy củ. Vật liệu sau khi khử trùng 10 phút bằng dung dịch HgCl₂ trên môi trường 0,5 mg/l BAP và 0,5 mg/l NAA tương ứng với mỗi loại mẫu. Môi trường tốt nhất để tạo củ là MS + 0,5 mg/l α -NAA. Số củ mới tạo thành trên một mẫu đạt cao nhất (4,5 củ) thu được trên môi trường MS + 60 đường + 0,5 mg/l NAA + 0,2 mg/l BAP sau 60 ngày nuôi cấy. Môi trường thích hợp để tạo rễ là 1/2 MS có bổ sung tổ hợp 1,0 mg/l NAA và 0,2 mg/l BAP. Cây bách hợp *in vitro* được đưa thành công ra vườn ươm trên nền giá thể TN1.

Từ khóa: Nhân giống *in vitro*, *Lilium brownii* Brown, BAP, α -NAA, giá thể TN1

ĐẶT VẤN ĐỀ

Bách hợp còn gọi là Tỏi rừng, Khèo ma, Suôn pha (Tày), Kíp pá (Thái), Cà ngái dôi (Dao), có tên khoa học là *Lilium brownii* Brown var. *viridulum* Baker, 1885, tên đồng danh là *Lilium brownii* Brown var. *colchesteri* Wils.ex Stapf., 1921., thuộc họ hành tỏi (liliaceae) là cây thuốc phổ biến và quan trọng trong Đông y (Nguyễn Tập, 2007). Bách hợp có dạng cây cỏ, cao 0,5 - 1m, thân hành to màu trắng, dọc thân có nhiều vảy xếp chồng lên nhau. Cây thường mọc hoang ở các trảng cỏ và bờ nương rẫy vùng núi cao. Vảy thân hành của cây thường được dùng làm thuốc giảm đau, chống ho, chống viêm hoặc như một nguồn dinh dưỡng. Theo tài liệu cổ, Bách hợp có tác dụng bổ phổi, trừ ho, định tâm, an thần, thanh nhiệt, lợi tiểu, chữa ho lao thổ huyết, ho có đờm, viêm phế quản, hư phiền hồi hộp, tim đập mạnh, phù thũng (Đỗ Huy Bích, 2004). Ở Trung Quốc, Bách hợp thường được dùng làm thuốc nhuận phế, chỉ khái, an thần bình tâm. Ở Việt Nam, Bách hợp có mặt trong thành phần của nhiều loại thuốc trị ho đang có mặt trên thị trường như Bách hợp chỉ khái lộ, An khái hoa, Côm ho Ma hạnh Vinet....Ngoài các tác dụng làm thuốc kể trên, Bách

hợp còn là cây cho hoa đẹp để làm cảnh.

Với những đặc tính như trên từ những năm 1980 cây đã bị khai thác quá mức để lấy nguyên liệu làm thuốc và xuất khẩu tiêu ngạch qua biên giới. Thêm vào đó nguồn Bách hợp tự nhiên còn bị thu hẹp do nạn phá rừng ngày càng gia tăng. Mặc dù cây có thể tái sinh tự nhiên bằng hạt, nhưng chỉ có những hạt khi phát tán, được tiếp xúc được với mặt đất ẩm hay hốc đá có mùn mới có cơ hội nảy mầm (Đỗ Huy Bích, 2004). Nhiều nghiên cứu nhân giống hoa lily thương mại cắt cành thuộc chi *Lilium* đã được thực hiện cả trong và ngoài nước (Nguyễn Quang Thạch, 1996; Nguyễn Thị Lý Anh, 2005; Nguyễn Thị Phương Thảo, 2007; Nhut Duong Tan, 2000, 2001b; Pelkonen V.P., 2005). Tuy vậy, nghiên cứu nhân giống *Lilium brownii* – loài hoang dại được dùng làm thuốc còn rất hạn chế. Ở Trung Quốc, Ping đã nghiên cứu nuôi cấy mô loài *Lilium brownii* var. *viridulum*, đồng danh với bách hợp (Ping, 2008). Tác giả kết luận môi trường nhân nhanh tốt nhất từ mẫu vảy củ là môi trường MS có bổ sung 1 mg/l BA cho hệ số nhân 5,02 lần sau 30 ngày nuôi cấy. Sau qua giai đoạn nuôi lớn củ trên môi trường 1/2 MS có bổ sung 6% đường và 5,1 g/l KH₂PO₄, các củ nhỏ thu được được tạo rễ trên môi trường 1/2MS có bổ

sung 6% đường và tổ hợp cả 3 chất thuộc nhóm auxin là NAA, IBA và IAA với các nồng độ tương ứng là 0,33mg/l, 0,27 mg/l và 0,3 mg/l. Cho đến nay, chưa có nghiên cứu nhân giống cây bách hợp được công bố ở Việt Nam. Nhằm bảo tồn nguồn gen và nhân rộng giống cây thuốc đang bị đe dọa này chúng tôi đã tiến hành đề tài: "Nghiên cứu nhân giống *in vitro* cây bách hợp (*Lilium brownii* F.E.Brown).

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Cây bách hợp (*Lilium brownii* F.E. Brown) có nguồn gốc từ Hà Giang do đề tài Bảo tồn nguồn gen cây thuốc, Khoa Tài nguyên Dược liệu (Viện Dược liệu) cung cấp. Vật liệu khởi đầu cho nhân giống là vẩy thân hành và đốt thân cây bách hợp.

Vẩy thân hành và đốt thân cây *in vivo* được rửa sạch đất cát dưới vòi nước máy, sau đó chúng được ngâm trong nước xà phòng loãng 10 phút, rồi tráng lại nhiều lần bằng nước máy. Tiếp đó, ngâm mẫu trong thuốc diệt nấm 20 phút rồi tráng lại bằng nước cất. Sau đó đưa mẫu vào phòng cấy, trong tủ cây laminar các mẫu được tráng bằng cồn 70⁰ trong 30 giây, liền đó mẫu được xử lý với HgCl₂ 0,1% với các khoảng thời gian khác nhau (8 phút, 10 phút, 12 phút và 15 phút), sau đó tráng lại nhiều lần bằng nước cất vô trùng. Rồi cấy vào môi trường dinh dưỡng có chứa thành phần muối cơ bản của môi trường MS (Murashige và Skoog, 1962) có chứa 20g/l đường nhưng không có chất điều hòa sinh trưởng.

Giai đoạn tái sinh chồi:

15 ngày sau khi khử trùng, vẩy hành và đốt thân sạch nấm khuẩn được cấy vào môi trường MS có bổ sung NAA (0 - 1 mg/l) và BAP (0 -1 mg/l) để nghiên cứu khả năng tái sinh *in vitro*.

Giai đoạn tạo củ sơ cấp:

Chồi sau 30 ngày nuôi cấy trên môi trường tái sinh được cắt bỏ lá và phần đế cũ, hồng (chỉ để lại 0,7-1,0 cm tính từ phần gốc lên), được cấy vào môi trường khoáng MS chứa 60 g/l đường và có bổ sung Kinetin (0 - 1,0 mg/l) hoặc NAA (0 - 1,0 mg/l) để tạo củ nhỏ sơ cấp.

Giai đoạn nhân nhanh củ nhỏ từ củ nhỏ sơ cấp:

Củ nhỏ *in vitro* được hình thành sau 2 tháng được dùng làm mẫu cho nghiên cứu nhân nhanh củ tiếp theo. Thí nghiệm nghiên cứu ảnh hưởng của 4 loại mẫu (củ đơn sơ cấp, vẩy củ, 1/2 củ sơ cấp, 1/4 củ sơ cấp (bổ theo chiều dọc) được nuôi cấy trên môi

trường khoáng MS chứa 0,5 mg/l NAA, 60g/l đường. Bổ củ theo chiều dọc 1/2 hoặc 1/4 tùy củ to nhỏ được dùng làm mẫu cấy cho thí nghiệm nghiên cứu ảnh hưởng của chất điều hòa sinh NAA (0 - 1 mg/l) và BAP (0,3 mg/l) trên nền môi trường MS có bổ sung 60 g/l đường.

Giai đoạn tạo cây hoàn chỉnh:

Củ thứ cấp được tách khỏi cụm, cắt bỏ lá được cấy vào các môi trường 1/2 MS chứa 30 g/l đường có bổ sung 0,2 mg/l BAP và dải nồng độ NAA (0 - 1,0 mg/l) để nghiên cứu tạo rễ.

Tất cả các môi trường đều được bổ sung 6 g/l agar và được chỉnh pH ở mức 5,8 trước khi khử trùng và được hấp khử trùng ở 121⁰C, áp suất 1 atm trong 20 phút. Phòng nuôi được duy trì ở nhiệt độ 25⁰C ± 2; Cường độ ánh sáng là 2000 lux; thời gian chiếu sáng 14h sáng/ 10 giờ tối. Thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên. Môi công thức thí nghiệm nhắc lại 3 lần, mỗi lần 10 mẫu.

Các chỉ tiêu được theo dõi định kỳ 2 tuần/lần, bao gồm: tỷ lệ tái sinh (%); tỉ lệ tạo củ nhỏ (%); Tỷ lệ tạo cụm chồi (%); Tỷ lệ tạo rễ (%); Tỷ lệ sống khi đưa ra ngoài nhà lưới (%); Chiều cao cây trung bình (cm); Số lá/cây (lá); Số rễ/cây (rễ); Số chồi/mẫu (chồi). Số liệu được xử lý thống kê bằng phần mềm excel (Data Analysis/Anova) với mức ý nghĩa $\alpha = 0,05$.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Nghiên cứu khử trùng mẫu và tái sinh *in vitro*

Ảnh hưởng của thời gian khử trùng

Khử trùng mẫu là giai đoạn tiên quyết, là nền tảng tạo nên sự thành công của quá trình nuôi cấy *in vitro*. Quá trình này cần đảm bảo các yêu cầu như tỷ lệ mẫu sống cao, tỷ lệ mẫu nhiễm thấp, mô nuôi cấy sinh trưởng tốt và tạo chồi phát triển khỏe mạnh. HgCl₂ là hóa chất có tính khử trùng mạnh, hiệu quả và được sử dụng phổ biến với hầu hết các mẫu nhân giống *in vitro*. Kết quả khử trùng vẩy hành và đốt thân bách hợp bằng HgCl₂ 0,1% sau 15 ngày được thể hiện ở bảng 1.

Kết quả cho thấy, thời gian xử lý bằng HgCl₂ 0,1% có ảnh hưởng đáng kể đến hiệu quả của quá trình khử trùng vẩy hành và đốt thân cây bách hợp. Cả 2 loại mẫu đều cho kết quả tỷ lệ nhiễm giảm dần và tỷ lệ chết tăng dần khi thời gian xử lý mẫu càng kéo dài. Các chỉ số về tỷ lệ sống của mẫu là vẩy củ thấp hơn đáng kể so với mẫu là đốt thân. Điều này có

thể được giải thích rằng đốt thân là phần trên mặt đất sạch hơn phần vẩy thân hành là bộ phận nằm dưới mặt đất. Bên cạnh đó, còn do cấu tạo của các tế bào vẩy hành tạo nên nhiều mô mềm dẫn đến nó dễ bị tổn thương hơn so đốt thân. Cả 2 loại mẫu là vẩy hành và đốt thân, tỷ lệ mẫu sống đều tăng và đạt cao nhất lần lượt là 70% và 80% ở công thức thứ 2 (KT2) khi xử lý HgCl₂ trong 10 phút. Vượt qua thời

gian này, tỷ lệ sống của cả hai loại mẫu đều có xu hướng giảm dần. Và ở công thức thời gian xử lý lâu nhất KT4 (15 phút) tỷ lệ mẫu sống của đốt thân giảm xuống còn 30%, cao gấp đôi so với mẫu là vẩy hành (15%). Như vậy, trong các công thức thí nghiệm thời gian thích hợp nhất để khử trùng vẩy thân hành và đốt thân cây bách hợp bằng HgCl₂ là 10 phút.

Bảng 1. Ảnh hưởng của thời gian xử lý HgCl₂ 0,1%.

TT	HgCl ₂ (%)	Thời gian (Phút)	Tỷ lệ sống (%)		Tỷ lệ chết (%)		Tỷ lệ nhiễm (%)	
			Vẩy	Đốt thân	Vẩy	Đốt thân	Vẩy	Đốt thân
KT1	0,1	8	30	40	10	10	60	50
KT2		10	70	80	10	0	20	20
KT3		12	35	50	50	30	15	20
KT4		15	15	30	75	50	10	20

Ảnh hưởng của nồng độ BAP và NAA đến tái sinh cây từ đốt thân và vẩy củ

Trong nuôi cấy mô, tế bào thực vật để điều khiển sự phát sinh hình thái thì việc bổ sung chất điều hòa sinh trưởng có vai trò đặc biệt quan trọng. Trong các chất điều hòa sinh trưởng có hai nhóm được sử dụng nhiều là cytokinin và auxin. 2 loại mẫu là vẩy hành và đốt thân bách hợp sạch nấm khuẩn thu được sau quá trình khử trùng được cấy vào môi trường MS có bổ sung nồng độ BAP (cytokinin) và NAA (auxin) khác nhau để tiến hành nghiên cứu khả năng tái sinh *in vitro*. Kết quả sau 45 ngày nuôi cấy được trình bày ở bảng 2.

Nghiên cứu tác động của BAP và NAA ở 2 nồng độ khác nhau cho thấy cả 2 loại vật liệu ban đầu là vẩy hành và đốt thân cây *in vivo* đều có khả năng tái sinh *in vitro* sau 45 ngày. Tuy vậy, khả năng tái sinh của mỗi loại vật liệu cây lại phụ thuộc vào loại và

nồng độ chất điều hòa sinh trưởng nhất định. Kết quả thể hiện trên bảng 2 cho thấy khả năng tái sinh cây của vẩy hành là cao hơn đốt thân dưới sự tác động của NAA. Ngược lại phản ứng tái sinh của đốt thân lại tốt hơn so với vẩy hành trong môi trường có mặt của BAP. Đốt thân đạt tỷ lệ tái sinh cao nhất là 70% trên môi trường có bổ sung 0,5 mg/l BAP. Trong khi đó, tỷ lệ tái sinh của mẫu từ vẩy hành đạt cao hơn so với đốt thân (86,67%) trong môi trường có bổ sung 0,5 mg/l NAA.

Các giống/loài hoa ly lai và thường chủ yếu được tái sinh và nhân giống từ vẩy củ. Nghiên cứu của Ping (2008) cũng chỉ ra rằng số lượng cây lớn nhất thu được từ nuôi cấy vẩy thân trên môi trường có bổ sung 1,5 mg/l BAP và 0,5 mg/l NAA. Kết quả bài báo này cho thấy cây bách hợp hoang dại có khả năng tái sinh *in vitro* từ đốt thân hoặc vẩy củ trên môi trường MS có bổ sung 0,5mg/l BAP hoặc 0,5 mg/l NAA.

Bảng 2. Ảnh hưởng của BAP và NAA đến tái sinh *in vitro*.

Công thức	Chất ĐHST (mg/l)		Tỷ lệ tái sinh (%)		Chiều cao chồi (cm)	
	BAP	NAA	Vẩy hành	Đốt thân	Vẩy hành	Đốt thân
ST1 (ĐC)	-	-	-	23,33 ± 5,774	-	-
ST2	0,5	-	16,67 ± 5,774	70,00 ± 10,000	2,10 ± 0,026	3,71 ± 0,119
ST3	1,0	-	6,67 ± 5,774	53,33 ± 5,774	3,00 ± 0,074	5,39 ± 0,259
ST4	-	0,5	86,67 ± 5,774	23,33 ± 5,774	3,96 ± 0,156	4,23 ± 0,119
ST5	-	1,0	60,00 ± 10,00	13,33 ± 5,774	2,85 ± 0,112	2,99 ± 0,094

Nghiên cứu tạo củ nhỏ *in vitro* từ chồi tái sinh

Kết quả hình thành củ nhỏ được đánh giá sau 45

ngày nuôi cấy và được thể hiện ở bảng 3.

Với kinetin, tỉ lệ hình thành củ nhỏ tăng dần ở các

mẫu cấy khi nồng độ tăng từ 0 đến 1,0 mg/l. Tuy nhiên, tỷ lệ tạo củ cao nhất chỉ đạt 40% ở mức nồng độ cao nhất 1 mg/l kinetin tỉ lệ củ nhỏ tạo thành chỉ đạt dưới 40%. Như vậy, có thể kết luận Kinetin không thích hợp cho nuôi cấy tạo củ nhỏ *in vitro* cây bách hợp.

Phản ứng tạo củ trong môi trường có mặt của NAA cũng giống như với kinetin. Củ nhỏ chỉ được hình thành từ chồi nếu môi trường có bổ sung NAA. Tỷ lệ hình thành củ nhỏ tăng từ 40% ở nồng độ 0,2 mg/l NAA lên 86,67% ở nồng độ NAA ở mức 0,5 mg/l. Vượt qua ngưỡng này, tỉ lệ tạo củ nhỏ có xu hướng giảm và giảm xuống 43,33% ở mức nồng độ 1,0 mg/l NAA. Như vậy, có thể thấy cả kinetin và NAA đều có khả năng kích thích sự hình thành củ nhỏ từ chồi *in vitro* của cây bách hợp. Tuy nhiên chất điều hòa sinh trưởng nhóm auxin NAA tỏ rõ sự vượt trội so với kinetin (thuộc nhóm cytokinin) và nồng độ thích hợp nhất để sử dụng là 0,5 mg/l (Hình 1). Kết quả này tương tự với thông báo trong nghiên

cứu tạo củ *in vitro* của cây trinh nữ hoàng cung và cây hoa lay ơn, trong đó các chất kích thích sinh trưởng thuộc nhóm auxin như IBA hoặc NAA đã được sử dụng hiệu quả (Nông Thị Huệ và Nguyễn Thị Phương Thảo, 2010).



Hình 1. Củ hình thành trên môi trường, MS bổ sung 60g/l đường và 0,5 mg/l α -NAA.

Bảng 3. Ảnh hưởng của Kinetin và NAA đến sự hình thành củ nhỏ.

STT	Nồng độ Kinetin (mg/l)	Nồng độ NAA (mg/l)	TL tạo củ (%)	Số củ/mẫu (củ)	Chiều cao chồi (cm)
TS1	0,0		-	-	4,08 ± 0,107
TS2	0,2		13,33 ± 5,774	0,80 ± 0,010	4,48 ± 0,185
TS3	0,5		20,00 ± 10,00	1,03 ± 0,093	5,01 ± 0,594
TS4	1,0		36,67 ± 5,774	1,37 ± 0,083	5,46 ± 0,156
TS5		0,2	40,00 ± 10,00	1,73 ± 0,063	6,26 ± 0,275
TS6		0,5	86,67 ± 5,774	2,67 ± 0,083	7,05 ± 0,109
TS7		1,0	43,33 ± 15,275	2,00 ± 0,070	6,63 ± 0,178

Nghiên cứu nhân nhanh củ nhỏ *in vitro*

*Ảnh hưởng của loại vật liệu đến khả năng nhân nhanh củ *in vitro**

Để hệ số nhân nhanh *in vitro* đạt hiệu quả tối đa,

chúng tôi tiến hành nghiên cứu ảnh hưởng của các loại lát cắt khác nhau đến khả năng nhân nhanh củ nhỏ *in vitro* cây bách hợp với 4 loại công thức. Kết quả theo dõi sau 60 ngày nuôi cấy được thể hiện ở bảng 4.

Bảng 4. Ảnh hưởng của các loại lát cắt đến khả năng nhân nhanh củ *in vitro*.

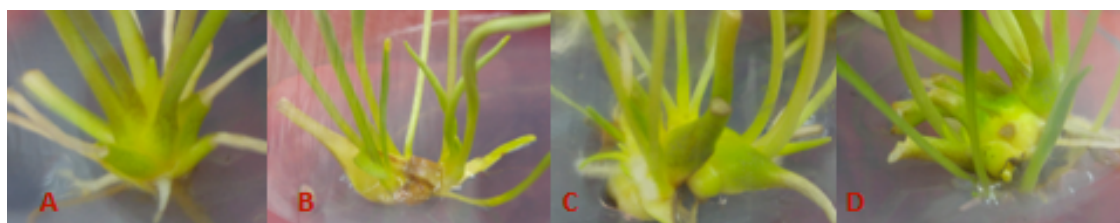
STT	Loại cắt	Số củ/mẫu (củ)	Số lá/củ (lá)	Chiều cao chồi (cm)
LC1	Vây củ	1,73 ± 0,013	3,73 ± 0,013	6,16 ± 0,072
LC2	Củ đơn	1,13 ± 0,013	4,40 ± 0,040	7,15 ± 0,033
LC3	1/2 củ	3,27 ± 0,093	3,47 ± 0,053	6,43 ± 0,207
LC4	1/4 củ	3,40 ± 0,040	3,00 ± 0,120	6,04 ± 0,004

Kết quả cho thấy, các loại mẫu cấy khác nhau có ảnh hưởng đáng kể đến khả năng nhân nhanh củ

in vitro, đặc biệt là hệ số nhân củ (số củ/mẫu) (Hình 2). Mẫu cày có nhiều củ được tạo thành thì kích

thước củ càng nhỏ. Mẫu cây là vẩy củ cho hệ số nhân củ thấp, điều này cũng thấy ở công thức 2 là mẫu từ củ đơn. Mẫu cây từ củ đơn theo thời gian chỉ gia tăng về số lá và chiều cao chồi mà gần như không tăng sinh về số củ/mẫu. Dường như điều này là thường xảy ra đối với việc nhân nhanh các cây dạng củ/thân hành. nuôi cấy hay lay ơn, mẫu cây là củ đơn cũng không sản sinh củ mới (Nguyễn Thị Huệ và Nguyễn Thị Phương Thảo, 2010). Ở thí nghiệm này, số củ/mẫu của mẫu là củ đơn là thấp nhất (1,47

củ) so với các công thức còn lại, song số lá/củ (4,40 củ) và chiều cao chồi (7,17) lại đạt cao nhất so với các công thức khác trong thí nghiệm. Ở LC3 và LC4 cho thấy tuy số lá/củ và chiều cao chồi có chỉ số là kém nhất, song số củ/mẫu lại đạt cao nhất, lần lượt là 2,97 và 2,90. Đây mới là chỉ số quan trọng để đánh giá hiệu quả của quá trình nhân nhanh. Như vậy, nên bỏ nhỏ theo chiều dọc để nhân nhanh từ củ vitro cây bách hợp.



Hình 2. Nhân nhanh củ nhỏ từ các loại lát cắt khác nhau. A: Củ đơn; B: Vẩy củ; C: 1/2 củ; D: 1/4 củ.

Ảnh hưởng của tổ hợp NAA và BAP đến khả năng nhân nhanh củ nhỏ

Nhiều thí nghiệm đã chứng minh khả năng nhân nhanh đạt hiệu quả khi phối hợp hai nhóm auxin và cytokinin hơn là chỉ sử dụng một loại riêng rẽ. Theo Muashige (1962) quá trình phân hóa

chồi phụ thuộc vào tỷ lệ cytokinin và auxin trong môi trường nuôi cấy. Để tìm ra môi trường tối ưu cho giai đoạn nhân nhanh củ nhỏ *in vitro*, chúng tôi đã tiến hành nuôi cấy mẫu (LC3 hoặc LC4, bảng 5) trên môi trường MS có bổ sung NAA và BAP với 5 loại công thức, sau 60 ngày nuôi cấy, kết quả thí nghiệm thu được như sau (Bảng 5).

Bảng 5. Ảnh hưởng của NAA và BAP đến khả năng nhân nhanh củ nhỏ.

STT	ĐHST (mg/l)		Số củ/mẫu (củ)	Số lá/củ (lá)	Chiều cao chồi (cm)
	NAA	BAP			
NC1	-	-	1,27 ± 0,003	3,73 ± 0,013	5,23 ± 0,106
NC2	0,5	-	2,57 ± 0,043	4,07 ± 0,013	6,97 ± 0,023
NC3	1,0	-	2,43 ± 0,063	3,67 ± 0,093	7,22 ± 0,008
NC4	0,5	0,3	4,50 ± 0,130	3,27 ± 0,053	7,09 ± 0,001
NC5	1,0	0,3	3,07 ± 0,023	3,60 ± 0,160	7,20 ± 0,016

Như vậy, số củ/mẫu giữa các công thức có sự khác biệt lớn với khoảng dao động từ 1,27 củ/mẫu đến 4,5 củ/mẫu. Trong đó, cao nhất là ở NC4 (0,5 mg/l NAA + 0,3 mg/l BAP) và thấp nhất ở NC1 (không sử dụng chất điều hòa sinh trưởng). Công thức NC4 và công thức NC5 là tổ hợp của hai loại NAA và IBA tỏ ra hiệu quả hơn so với chỉ sử dụng đơn chất NAA trong việc nhân nhanh củ bách hợp *in vitro*. Điều này cũng tương tự với kết quả nghiên cứu của Đỗ Minh Phú và cộng sự trong nhân giống *in*

vitro cây hoa lily. Tác giả cũng khẳng định việc bổ sung với tỷ lệ thích hợp của tổ hợp BAP và NAA vào môi trường nuôi cấy đã có tác động rất mạnh mẽ đến mẫu cây (Đỗ Minh Phú *et al.*, 2009). Đây cũng là kết luận của Ranjana Kapoor, bổ sung 2 mg/l NAA + 0,5 mg/l BA là hiệu quả nhất để sản xuất củ nhỏ từ tất cả các loại mẫu cây (vẩy củ, đốt thân, đoạn giữa đốt thân, lá và rễ) của 5 giống hoa ly lai là Alaska, Apeldoorn, Beartix, Siberia và Marco Polo (Ranjana Kapoor *et al.*, 2008). Trong nghiên cứu

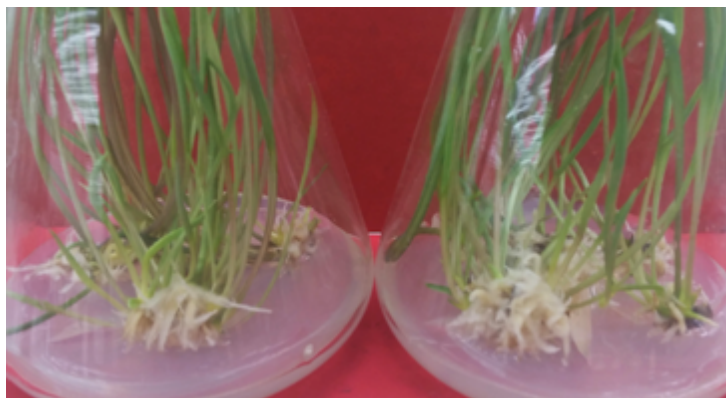
này, kết quả cho thấy bổ sung 0,5 mg/l NAA + 0,3 mg/l BAP vào môi trường nền MS + 60g/l đường là môi trường thích hợp nhất để nhân nhanh củ nhỏ *in vitro* cây bách hợp (Hình 3).

Nghiên cứu tạo cây hoàn chỉnh

Trong thí nghiệm này, chúng tôi nghiên cứu ảnh hưởng của tổ hợp giữa 0,2mg/l BAP với các nồng độ NAA khác nhau từ 0 - 1,5 mg/l trong môi trường nền 1/2 MS nhằm xác định được môi trường thích hợp để tạo ra bộ rễ cây bách hợp, sẵn sàng cho việc chuyển cây ra ngoài môi trường.

Kết quả ghi nhận sau 45 ngày ở bảng 6 cho thấy, ở công thức đối chứng, không có chất điều hòa sinh trưởng tỉ lệ ra rễ là thấp nhất (16,67%); đồng thời chất lượng rễ của cây ở công thức này cũng kém nhất với số rễ/cây và chiều dài rễ trên cây có chỉ số thấp nhất so với các công thức khác. Kết hợp giữa nồng độ BAP là 0,2 mg/l với các nồng độ khác nhau

của NAA cho thấy tỉ lệ tạo rễ của cây có xu hướng tăng dần khi nồng độ NAA tăng dần và đạt tỉ lệ cao nhất (86,67%) ở nồng độ 1,0 mg/l (TR4) (Hình 4). Ở mức nồng độ cao hơn (TR5) tỉ lệ tạo rễ này lại giảm từ 86,67% xuống còn 60%. Quy luật tương tự này cũng xuất hiện ở chỉ tiêu theo dõi là chiều dài rễ. Ở công thức TR4, chiều dài rễ cũng đạt cao nhất (4,14 cm), vượt qua ngưỡng nồng độ tối ưu này rễ sinh trưởng kém đi. Không giống như chỉ tiêu về tỉ lệ tạo rễ và chiều dài rễ, chỉ tiêu về số rễ/cây lại có xu hướng tăng liên tục từ nồng độ NAA thấp đến nồng độ cao. Ở công thức đối chứng (TR1) số rễ trung bình trên cây là 1,13 thì số rễ trung bình đạt 4,13 rễ/cây ở nồng độ NAA cao nhất (TR5) và là cao nhất so với các công thức còn lại. Như vậy, tổ hợp NAA và BAP trong môi trường nuôi cấy có tác động đáng kể đến sự hình thành rễ *in vitro* của cây bách hợp và môi trường 1/2 MS có bổ sung 1,0mg/l NAA và 0,2 mg/l BAP tỏ ra là công thức thích hợp nhất.



Hình 3. Nhân nhanh bách hợp trên môi trường, MS + 60 g/l đường 0,5 mg/l α -NAA + 0,3 mg/l BAP.



Hình 4. Cây bách hợp trên môi trường tạo rễ, MS + 1,0 mg/l α -NAA + 0,2 mg/l BAP.

Bảng 6. Ảnh hưởng của NAA và BAP đến sự tạo rễ *in vitro*.

STT	DHST (mg/l)		TL tạo rễ (%)	Số rễ/cây (rễ)	Chiều dài rễ (cm)
	NAA	BAP			
TR1	-	-	16,67 ± 5,774	1,13 ± 0,093	0,91 ± 0,132
TR2	0,2		26,67 ± 5,774	1,77 ± 0,043	2,09 ± 0,002
TR3	0,5	0,2	33,33 ± 5,775	2,90 ± 0,010	3,37 ± 0,017
TR4	1,0		86,67 ± 5,774	3,90 ± 0,090	4,14 ± 0,037
TR5	1,5		60,00 ± 10,00	4,13 ± 0,103	3,85 ± 0,124

Giai đoạn tạo rễ có tính quyết định cho việc sống sót cây ở ngoài vườn ươm. Trong giai đoạn này, auxin thường giúp hoạt hóa sự phân bào, sinh trưởng kéo dài, cần cho sự tạo mạch rễ, tăng trưởng của quả, tạo quả không hạt, kích thích sinh trưởng của ống phần. Việc bổ sung các tổ hợp BAP và NAA với các nồng độ tương ứng khác nhau cũng được cho là hiệu quả đối với khả năng phát sinh hình thái trong điều kiện *in vitro* đối với nhiều loại dòng/giống khác nhau như hoa ly, hoa loa kèn....(Nông Thị Huệ, 2010; Nguyễn Thị Phương Thảo *et al.*, 2011; Azadi, 2007).

Nghiên cứu đưa cây ra vườn ươm

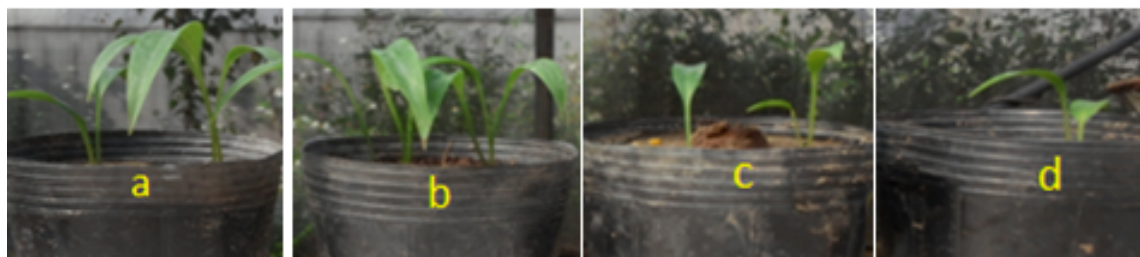
Hiệu quả của toàn bộ quá trình nhân giống *in vitro*

phụ thuộc phần lớn vào tỉ lệ sống của cây khi đưa từ điều kiện *in vitro* ra ngoài vườn ươm. Trong thí nghiệm này, cây con đạt tiêu chuẩn (dạng củ, có từ 3 - 4 rễ) sẽ được chuyển ra khỏi bình nuôi cấy, loại bỏ sạch môi trường thạch ở rễ và được giâm cây vào cát sạch. Cây được huấn luyện thích nghi bằng cách che phủ nilon để tránh thoát hơi nước trong 15 ngày. Sau đó, cây được trồng trên các giá thể khác nhau như (1) bột xơ dừa, (2) đất trộn bột xơ dừa với tỉ lệ 1:1, (3) đất trộn, phân vi sinh và trấu hun với tỉ lệ 6:1:2, (4) Giá thể TN1 (thành phần gồm hữu cơ chất lượng cao, chất giữ ẩm, dinh dưỡng khoáng: đa, trung, vi lượng). Tỉ lệ sống và sinh trưởng của cây bách hợp được đánh giá sau 30 và 60 ngày. Kết quả nghiên cứu được trình bày ở bảng 7.

Bảng 7. Ảnh hưởng của giá thể đến sinh trưởng của cây bách hợp trong vườn ươm.

STT	Giá thể	TL tạo sống (%)		Chiều cao cây (cm)		Số lá/cây (lá)	
		30 ngày	60 ngày	30 ngày	60 ngày	30 ngày	60 ngày
		1	VU1	53,33±5,774	53,33±5,774	4,32±0,052	7,47±0,281
2	VU2	70,00±0,000	70,00±0,000	4,77±0,730	8,98±0,065	2,27±0,093	3,52±0,129
3	VU3	36,67±5,774	36,67±5,774	3,9± 0,050	7,22±0,139	1,53±0,013	2,37±0,054
4	VU4	93,33±5,774	93,33±5,774	5,9 ± 0,063	9,32±0,008	2,40±0,120	3,89±0,012

Ghi chú: CT1: Bột xơ dừa; CT2: Đất:bột xơ dừa (1:1); CT3: Đất: Phân vi sinh: trấu hun (6:1:2); CT4: Giá thể TN1.



Hình 5. Cây bách hợp trên các giá thể khác nhau ở vườn ươm. a: TN1; b: Đất: bột xơ dừa; c: Xơ dừa; d: Đất:phân vi sinh: trấu hun (6:1:2).

Bảng kết quả cho thấy giá thể có ảnh hưởng rõ rệt đến tất cả các chỉ tiêu theo dõi. Tỷ lệ sống của cây được duy trì theo thời gian, chứng tỏ khi cây đã

thích nghi và sống sót ở điều kiện *ex vitro* thì sẽ tiếp tục sinh trưởng và phát triển (Hình 5). Các chỉ tiêu về chiều cao và số lá theo thời gian cũng gia

tăng. Các công thức VU2 và VU4 cho tỉ lệ sống đạt cao nhất. Đặc biệt ở công thức 4 (VU4), tỉ lệ sống gần đạt mức tối đa, với chỉ số là 93,33%. Trên công thức này các chỉ tiêu về chiều cao và số lá cũng đều tỏ ra vượt trội so với các giá thể khác. Công thức 3 (VU3) là công thức kém nhất thể hiện ở tất cả các chỉ số theo dõi đều thấp nhất trong bảng kết quả. Kết quả nghiên cứu của Đỗ Minh Phú về ảnh hưởng của giá thể ra cây đối với giống hoa lily thương mại Sorbone nhập khẩu từ Hà Lan cho rằng giá thể thích hợp nhất là xơ dừa nghiền nhỏ với tỷ lệ sống là 85,4% (Đỗ Minh Phú, 2009). Song ở thí nghiệm này, giá thể là xơ dừa chỉ đạt 53,33%. Kết luận, giá thể tối ưu để đưa cây bách hợp *in vitro* ra vườn ươm là giá thể TN1 - là loại giá thể thoáng khí, giữ ẩm tốt tạo điều kiện thuận lợi cho bộ rễ cây phát triển.

KẾT LUẬN

Nghiên cứu của chúng tôi đã đưa ra được quy trình nhân nhanh cây bách hợp *in vitro*. Vật liệu ban đầu được sử dụng là đốt thân và vảy củ bách hợp *in vivo*. Vật liệu ban đầu được khử trùng bề mặt bằng dung dịch $HgCl_2$ 0,1% trong thời gian 10 phút và được tái sinh trong môi trường MS có bổ sung 30 g/l đường và 0,5 mg/l NAA đối với vảy thân và là MS bổ sung 30 g/l đường và 0,5 mg/l BAP đối với đốt thân. Môi trường MS có bổ sung 60 g/l đường và 0,5 mg/l NAA là môi trường thích hợp để tạo củ nhỏ *in vitro* từ chồi. Môi trường thích hợp để nhân nhanh củ nhỏ *in vitro* là MS + 60 đường + 0,5 mg/l NAA + 0,2 mg/l BAP. Tỷ lệ tạo rễ bách hợp đạt cao nhất (86,67%) trên môi trường 1/2 MS có bổ sung tổ hợp 1,0 mg/l NAA và 0,2 mg/l BAP. Giá thể TN1 là giá thể tốt nhất cho cây bách hợp giai đoạn vườn ươm.

Lời cảm ơn: Chúng tôi xin chân thành cảm ơn Ban Giám đốc và Hội đồng Khoa học Viện Dược liệu đã phê duyệt và tài trợ kinh phí để thực hiện nghiên cứu này. Xin chân thành cảm ơn Khoa Tài nguyên Viện Dược liệu đã cung cấp mẫu cây bách hợp.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Nguyễn Thị Lý Anh (2005). Sự tạo củ *in vitro* và sự sinh trưởng của cây lily trồng từ củ *in vitro*. Tạp chí Khoa học và Phát triển 3(5): 27 - 30.

Đỗ Huy Bích và công sự (2004), Cây thuốc và động vật làm thuốc ở Việt Nam, NXB KHK, tr 803-807.

Nguyễn Thái Hà (2003). Nghiên cứu sự phát sinh củ *in vitro* các giống hoa *Lilium* spp. Báo cáo khoa học Hội nghị sinh học toàn quốc. Nxb Khoa học và kỹ thuật, tr. 875-879

Nông Thị Huệ, Nguyễn Thị Phương Thảo (2010). Nghiên cứu tạo củ *in vitro* ở cây hoa lay ơn *Gladiolus* 'Cartago'. Tạp chí Khoa học và phát triển: Tập 8, số 2: 209-216.

Đỗ Minh Phú, Đoàn Thị Thùy Vân, Đặng Văn Đông, Trịnh Khắc Quang (2009). Nghiên cứu hoàn thiện quy trình công nghệ nhân giống hoa lily bằng phương pháp nuôi cấy *in vitro*. Báo cáo tổng kết đề tài - Viện Nghiên cứu rau quả.

Nguyễn Tập (2007), *Cẩm nang cây thuốc cần bảo vệ ở Việt Nam*: 41- 42.

Nguyễn Thị Phương Thảo, Nguyễn Quang Thạch, Hoàng Thị Mai (2005), Nghiên cứu nhân nhanh giống hoa loa kèn *Lilium formolongo* bằng kỹ thuật nuôi cấy *in vitro*. Tạp chí công nghệ sinh học 4 (1), tr 117-123

Nguyễn Thị Phương Thảo, Nông Thị Huệ, Vũ Quang Khánh, Nguyễn Hữu Cường (2011). Nghiên cứu nhân nhanh *in vitro* cây hoa loa kèn (*Lilium pollanell* Gapnep). Tạp chí Khoa học và phát triển, tập 9, số 5: 743-750.

Nguyễn Quang Thạch, Nguyễn Thị Nhẫn, Nguyễn Thị Phương Thảo (1996), Nghiên cứu ứng dụng kỹ thuật nuôi cấy mô trong công tác nhân giống cây hoa loa kèn. Kết quả nghiên cứu khoa học nông nghiệp 1995-1996, Trường Đại Học Nông Nghiệp I Hà Nội, Nhà Xuất Bản Nông Nghiệp

Murashige, T, and R. Skoog (1962), "A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures". *Physiol Plant* 15: 473-479.

Nhut Duong Tan, Le Bui Van, Michico Tanaka, K. Tran Thanh Van (2000), Shoot induction and plan regeneration from receptacle tissue of *Lilium longiflorum*. Institute of Biology in Dalat, 116 Xo Viet Nghe Tinh, Da Lat, Lam Dong, Viet Nam.

Nhut D.T., Le B.V., Fukai S., Tanaka M. and Van T.T.K. (2001b), Effects of activated charcoal, explant size, explant position and sucrose concentration on plant and shoot regeneration of *Lilium longiflorum* via young stem culture, *Plant Growth Regulation*, 33, pp. 59-65.

Pejman Azadi, Morteza Khosh-Khui (2007). Micropropagation of *Lilium ledebourii* (Barker) Boiss as affected by plant growth regulator, sucrose concentration, harvesting season and cold treatments. *Electron J Biotechnol*, 10 (4): 582-591.

Ping Shi Yun (2008). Research on optimization of the tissue culture of *Lilium Brownii* var. *viridulum*. Master dissertation. Crop Cultivation and Farming system, Guangxi University, China (Abstract in English).

Ranjana Kapoor, Surinder Kumar, Jitender Kumar Kanwar, Pawan Kumar Mahajan (2008). *In vitro* bulblet productivity in different explants of hybrid lilies. *J Fruit Ornamental Plant Res* Vol. 16 : 345-352.

RESEARCH ON *IN VITRO* MICROPROPAGATION OF *LILIUM BROWNII* F.E. BROWN

Vu Hoai Sam^{1,✉}, Bui Duc Quynh², Nguyen Thi Huong¹, Nguyen Van Khiem¹

¹National Institute of Medicinal Materials - Ministry of Health

²Thai Nguyen University of Agriculture and Forestry

SUMMARY

Lilium brownii Brown belonging *Lilium* genus and Liliaceae family is well-known as a popular medicinal species, as well as food source and beautiful ornamental flowers. The specie has unique and ornamental floral characteristics such as light and elegant fragrance and perianth color rapidly changing from yellowish cream to white during anthesis. In traditional medicine, it is used for treatment cough, sedation diuretic, bronchitis... In nature, it can be found in subtropical climate mountainous areas in the North such as Sa Pa, Bat Xat, Mu Cang Chai; Sin Ho and Phong Tho, Quang Ba and Dong Van. In recent years, this species has been listed in the Red List for medicinal plants in Vietnam due to over-exploitation. The only effective strategy for sustainable conservation this species is *in vitro* micropropagation. In this study, *in vitro* plant regeneration and micropropagation of *L. brownii* was established from bubbles and stem nodes. After surface sterilization with 0.1% HgCl₂ in 10 minutes, healthy young shoots were obtained from initial bubbles and stem nodes on MS medium supplemented with 0.5 mg/l BAP or 0.5 mg/l NAA, respectively. Bulblets also were formed from young shoot on MS supplemented with 0.5 mg/l NAA. The highest number of 4.5 bulblets per an explant was recorded from longitude-divided bubbles on MS medium containing 0.5 mg/l NAA and 0.2 mg/l BAP after 60 days in culture. The regenerated plants produced quality roots on half strength MS supplemented with the combination of 1.0 mg / l NAA and 0.2 mg / l BAP. More than 90% of rooted plants *in vitro* were survival on artificial soil TN1 in the nursery.

Keywords: *Micropropagation, Lilium brownii* Brown, BAP, α -NAA, TN1 substrate

✉ Author for correspondence: E-mail: samthavn@yahoo.com