

VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ QUỐC GIA
VIỆN CÔNG NGHỆ SINH HỌC

ĐỀ TÀI NCKH CẤP NHÀ NƯỚC
NGHIÊN CỨU CÔNG NGHỆ TẾ BÀO VÀ KỸ THUẬT CHỈ THỊ PHÂN TỬ
PHỤC VỤ CHỌN TẠO GIỐNG CÂY TRỒNG
(thuộc Chương trình KC 04, mã số KC 04.08)

ĐỀ TÀI NHÁNH
**SỬ DỤNG CÔNG NGHỆ TẾ BÀO THỰC VẬT
ĐỂ PHỤC TRÁNG, NHÂN NHANH VÀ XÂY DỰNG HỆ THỐNG
SẢN XUẤT GIỐNG BA KÍCH VÀ NGUỒN TẤT
CÓ CHẤT LƯỢNG CAO BẮT NGUỒN TỪ IN VITRO**

CNĐT: TS PHẠM VĂN HIỂN

Hà Nội - 2005

BỘ Y TẾ
VIỆN DƯỢC LIỆU

BÁO CÁO KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU ĐỀ TÀI NHÁNH
CẤP NHÀ NƯỚC

Tên đề tài nhánh: Sử dụng công nghệ tế bào thực vật để phục tráng, nhân nhanh và xây dựng hệ thống sản xuất giống ba kích (*Morinda officinalis* How-Rubiaceae) và ngưu tất (*Achyranthes bidentata* Blume- Amaranthaceae) có chất lượng cao bắt nguồn từ *in vitro*.

Thuộc đề tài: Nghiên cứu sử dụng công nghệ tế bào và kỹ thuật chỉ thị phân tử phục vụ chọn tạo giống cây trồng

Mã số: KC 04-08

Thuộc chương trình: Nghiên cứu KHCN và phát triển công nghệ sinh học (2001-2005).

Chủ trì đề tài: PGS. TSKH. Lê Thị Muội

Cơ quan chủ trì đề tài: Viện Công nghệ sinh học – Viện KH &CN quốc gia

Chủ trì đề tài nhánh: TS. Phạm Văn Hiến

Cơ quan chủ trì đề tài nhánh: Viện Dược liệu- 3B Quang Trung, Hà Nội.

Điện thoại: 8 252 644 - 8 247 057 - 8 257 904. Fax: 84-4- 8 254 357. E-mail: imm@fpt.vn

Thời gian thực hiện: 1/2001- 9/2004.

Tổng kinh phí được cấp: 120 triệu VND

Những người thực hiện chính:

CN. Vũ Hoài Sâm

ThS. Nguyễn Trần Hy

CN. Tạ Như Thục Anh

KS. Trần Thị Liên

A. TÓM TẮT KẾT QUẢ NỔI BẬT CỦA ĐỀ TÀI

1. Kết quả chính

- + Đã xây dựng được quy trình nhân nhanh *in vitro* cây ba kích từ lát cắt đốt thân và ngọn chồi với hệ số nhân 20^4 /năm, tỷ lệ ra rễ *in vitro* đạt >90%, tỷ lệ ra rễ *ex vitro* đạt 100%, tỷ lệ sống sau khi ra bầu đạt 70-80%.
- + Đã xây dựng được quy trình nhân nhanh *in vitro* cây ngưu tất từ đốt thân và ngọn chồi, với hệ số nhân 6^9 /năm, tỷ lệ ra rễ *in vitro* đạt 90%, tỷ lệ sống sau khi ra bầu đạt 70-90% tùy thời vụ.
- + Đã tạo được mô sẹo cây ngưu tất từ gốc thân và trực dưới lá mầm.
- + Đào tạo: 2 kỹ sư đã tốt nghiệp (Trương Thị Duyên, Tăng Bá Dương, ĐHNHI) và 1 cao học đang viết (Vũ Hoài Sâm, ĐHKHTN HN).
- + Đã có 2 bài báo được đăng { 1. Vũ Hoài Sâm et al. Nghiên cứu nhân nhanh *in vitro* cây ba kích. Báo cáo khoa học, Hội nghị CNSH toàn quốc 2003, NXB KH&KT, tr, 795-798. 2. Vu Hoai Sam et al. *In vitro* propagation of *Morinda officinalis* How (Rubiaceae). The Fifth Princess Chulabhorn International Science Congress: Evolving Genetics and Its Global Impact, Aug 16-20, 2004, Bangkok. Amarin Printing and Publishing Public Company Limited, Bangkok, Thailand. Vol. II, p. 141 }.

2. Đánh giá thực hiện đề tài đối chiếu với đề cương nghiên cứu đã được duyệt

a. Tiến độ thực hiện

Đã triển khai thực hiện tất cả các nội dung nghiên cứu đúng tiến độ là 36 tháng.

b. Thực hiện các mục tiêu đề ra

+Đối với cây ba kích: đã hoàn thành mục tiêu là xây dựng được quy trình nhân nhanh *in vitro*.

+Đối với cây ngưu tất: mới hoàn thành khoảng 40% mục tiêu. Cụ thể, đã xây dựng được quy trình nhân nhanh bảo toàn (true-to-type) và tạo được mô sẹo từ các bộ phận khác nhau (gốc thân, hypocotyl); chưa chọn được

dòng tế bào và tái sinh thành cây. Lý do: mô sẹo ngưng tất tạo từ các nguyên liệu có tuổi sinh lý khác nhau đều bị browning; mặc dù đã xử lý bằng nhiều cách nhưng vẫn chưa khắc phục được.

c. Đánh giá về sử dụng kinh phí

Tổng kinh phí được cấp: 120 triệu VND

Đã quyết toán: 110 triệu (còn 10 triệu kinh phí 2004 sắp quyết toán)

Việc chi tiêu và thanh quyết toán đã tuân thủ đúng các quy định hiện hành. Tuy nhiên, kinh phí được cấp so với khối lượng công việc là quá nhỏ, các mục ngân sách được phân bổ lại không cân đối, gây nhiều trở ngại trong việc chi tiêu.

d. Đề xuất liên quan đến đề tài

+Quy trình nhân nhanh in vitro cây ba kích là công trình lần đầu tiên được xây dựng ở Việt Nam (chúng tôi chưa tìm được tài liệu nào công bố trên thế giới về vấn đề này) và có thể ứng dụng vào sản xuất. Đề nghị được thử nghiệm trong khuôn khổ một dự án P trong thời gian tới để hoàn thiện và khẳng định

+Đối với cây ngưng tất, vấn đề già hoá của giống là một hiện tượng đặc thù của Việt Nam (do di thực từ vùng ôn đới) và vì vậy chưa được nghiên cứu ở nước ngoài. Đề nghị cần có những nghiên cứu cơ bản sâu hơn về công nghệ tế bào và có thể ứng dụng cả công nghệ gen nhằm tạo ra một giống ngưng tất phù hợp với điều kiện khí hậu của nước ta.

B. NỘI DUNG BÁO CÁO KẾT QUẢ

Đặt vấn đề

1. Cây ba kích

Theo y học cổ truyền, ba kích là vị thuốc có tác dụng bổ trí não, trợ dương, ích tinh, mạnh gân cốt, chữa các bệnh về tình dục, người già mệt mỏi, kém ăn, ít ngủ nhưng không có biểu hiện về bệnh lý. Đặc biệt, tuy giúp bình thường hoá và cải thiện tình dục nhưng ba kích không kích dục, không có tác dụng kiểu androgen và không độc [9]. Gần đây, thành phần hoá học [11] và nhiều tác dụng dược lý mới của ba kích đã được phát hiện như chống stress [4], chống trầm cảm [5,12] và chống oxy hoá [8].

Với phương châm “phòng bệnh hơn chữa bệnh” của ngành y tế, việc nghiên cứu sản xuất các loại thuốc bổ để tăng cường sức khoẻ thường xuyên của cộng đồng, góp phần ngăn ngừa bệnh tật ngày càng tăng được đẩy mạnh. Trong bối cảnh đó, ba kích đang trở thành một trong những cây thuốc bản địa độc đáo của nước ta. Mặt khác, ba kích lại là cây chỉ thích hợp để trồng xen ở đất đồi, không cạnh tranh về đất với các cây trồng khác, vì vậy, nó có ý nghĩa to lớn cho việc tăng thu nhập cho đồng bào vùng cao.

Trước những năm 1970, nguồn ba kích chỉ dựa vào việc khai thác tự nhiên từ rừng thuộc một số tỉnh phía Bắc như Tuyên Quang, Yên Bái, Phú Thọ, Lạng Sơn, Hà Bắc, Quảng Ninh, Hoà Bình và Hà Tây [2]. Do nhu cầu trong nước và thế giới ngày càng tăng nên ba kích mọc hoang bị khai thác ngày càng kiệt quệ. Mặt khác, rừng ở vùng phân bố của ba kích bị tàn phá nghiêm trọng khiến cây lâm vào tình trạng gần như tuyệt chủng và bị liệt vào sách đỏ Việt Nam [1]. Vì vậy, việc nghiên cứu trồng cây ba kích là con đường duy nhất để duy trì và phát triển nguồn thuốc quý này.

Nhưng hiện nay, việc nhân giống là một tồn tại, cản trở việc mở rộng diện tích trồng ba kích. Cây trồng sau 15 tháng mới có 3,5% số cây ra hoa và sau 22 tháng mới có 1,2% số cây đậu quả. Sau 3 năm, tỷ lệ này cũng chỉ đạt khoảng 30% và hệ số nhân giống bằng hạt chỉ đạt 1,1/năm. Ba kích cũng có thể nhân giống bằng cành giâm, nhưng hệ số nhân của phương pháp này chỉ đạt 0,61/năm, mặc dù đã sử dụng các chất kích thích sinh trưởng [3]. Tóm lại, các phương pháp nhân giống truyền thống như gieo hạt, giâm cành không thể đáp ứng nhu cầu về cây giống để phát triển trồng ba kích, ít nhất trong vòng 15 - 20 năm tới, chưa kể đến những hạn chế của phương pháp này đối với sự sinh trưởng, phát triển, năng suất và chất lượng của cây trồng. Vì

vậy, việc sử dụng công nghệ tế bào thực vật để nhân nhanh ba kích là yêu cầu rất cấp bách.

2. Cây ngưư tất

Rễ củ ngưư tất là vị thuốc quan trọng và phổ biến trong y học cổ truyền, rất công hiệu đối với các bệnh có căn nguyên từ gan, thận, đau lưng, mỏi gối, viêm thấp đa khớp, chân tay co quắp, bại liệt...Ngưư tất có mặt trong hàng trăm bài thuốc đông y khác nhau và đã được bào chế thành các dạng thuốc lưu hành rộng rãi trên thị trường như viên Bidentin dùng để chữa tăng cholesterol máu, rối loạn lipoprotein máu, cao huyết áp, viên Dentonin chữa viêm lợi và viêm quanh răng [10].

Là một cây di thực (1960) đã trở thành cây bản địa, ngưư tất được trồng trên quy mô lớn ở đồng bằng và trung du Bắc bộ trong cơ cấu cây trồng vụ đông với sản lượng hàng ngàn tấn, đạt hiệu quả cao hơn nhiều cây rau màu vụ đông khác. Tuy nhiên, mấy năm gần đây, trong khi nhu cầu trong nước và thế giới ngày càng tăng thì diện tích trồng ngưư tất lại dần bị thu hẹp. Nguyên nhân dẫn đến tình trạng này là giống ngưư tất bị thoái hoá theo chiều hướng ra hoa sớm, củ nhỏ, nhiều xơ, năng suất giảm và vì vậy làm nản lòng người trồng do hiệu quả kinh tế thấp.

Bình thường, ngưư tất gieo trồng vào tháng 9-10, đến khi sắp thu hoạch (tháng 4-5 năm sau) mới ra hoa. Nhưng hiện nay, cây trồng sau 2-3 tháng đã ra hoa (tháng 12-1) thậm chí có năm cây ra hoa vào tháng 11. Việc phục tráng và thiết lập một hệ thống sản xuất hạt giống ngưư tất có chất lượng cao là một nhu cầu bức xúc. Cho đến nay, chưa có công trình nào nghiên cứu để giải quyết vấn đề này một cách triệt để để ứng dụng vào sản xuất.

Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

1. Đối tượng nghiên cứu:

Giống ba kích (3 năm tuổi) được lấy từ vườn giống ở Thanh Hoá thuộc đề tài KHYD 02-21R do Bộ Y tế quản lý. Giống ngưu tất được lấy từ Trung tâm nghiên cứu trồng và chế biến cây thuốc Hà Nội – Viện Dược liệu. Giống này đang được dùng trong sản xuất dược liệu ở đồng bằng và trung du Bắc bộ.

2. Phương pháp nghiên cứu:

Là những phương pháp phổ biến trong nuôi cấy mô - tế bào thực vật.

a. Ba kích: Ngọn chồi và đốt thân (dài 1-1,5 cm) lấy từ cây ba kích 3 năm tuổi trồng ngoài đồng được rửa sạch bằng nước xà phòng loãng, ngâm thuốc diệt nấm và khử trùng bề mặt bằng HgCl_2 0,07% trong 10 phút, tráng lại nhiều lần bằng nước cất vô trùng, rồi cấy vào môi trường dinh dưỡng Murashige và Skoog (MS) [6]. Các chất điều hoà sinh trưởng được bổ sung vào môi trường cơ bản với các tổ hợp và nồng độ khác nhau. Nồng độ thạch được dùng ở 6,5 g/l. Tất cả các môi trường đều được điều chỉnh đến pH=5,8 trước khi cho thạch và hấp vô trùng ở 116 C°, áp suất 0,8kg/cm² trong 40 phút. Mỗi công thức thí nghiệm được quan sát ít nhất 12 mẫu.

b. Ngưu tất: Đoạn gốc thân (thường gọi là vùng *mắt cua*) được lấy trước khi mầm ngủ phát động, khử trùng và nuôi cấy tương tự như ba kích. Riêng hypocotyl được tạo ra như sau: Hạt ngưu tất được cho nảy mầm trên giấy ẩm trong đĩa petri đặt trong tối hoàn toàn. Khi cây con dài 1,5-2 cm, tách lấy các đoạn hypocotyl, mỗi đoạn dài 0,3-0,4 cm, khử trùng bề mặt và cấy vào môi trường dinh dưỡng.

c. Phòng nuôi: Được duy trì ở nhiệt độ 25-27°C, độ ẩm $\leq 70\%$, cường độ chiếu sáng 2000 lux với chu kỳ chiếu sáng 14 giờ/ngày. Số liệu được xử lý theo Microsoft Excel (Anova).

Kết quả nghiên cứu

I. Cây ba kích

1. Tái sinh chồi sơ cấp *in vitro*

Không có ngọn chồi nào lấy từ cây *in vivo* 3 năm tuổi sống sót sau khi khử trùng ở các nồng độ HgCl_2 và thời gian khác nhau. Chỉ có 20-30% số đốt thân (single-node stem cuttings) sống và tái sinh được 1-2 chồi nách trong môi trường MS có agar chứa 0.5 mg/l kinetin (Kin) (ảnh 1). Môi trường này được sử dụng để tạo ra số chồi sơ cấp đủ lớn để phục vụ cho các nghiên cứu tiếp theo.

Ảnh 1. Chồi ba kích sơ cấp tái sinh từ lát cắt đốt thân trên môi trường MS + 0,5 mg/l Kin. Ảnh chụp 4 tuần sau khi cấy.

2. Nhân nhanh chồi

Ngọn chồi và đốt thân dài khoảng 1 cm lấy từ chồi *in vitro* được cấy vào môi trường dinh dưỡng gồm khoáng, vitamin, đường, thạch theo MS có bổ sung BAP với các nồng độ 0,5; 1; 2; 3 và 5 mg/l. Kết quả theo dõi 75 ngày sau khi cấy được trình bày ở bảng 1.

Bảng 1: Ảnh hưởng của BAP đến khả năng tái sinh cụm chồi của ngọn chồi và đốt thân ba kích in vitro trong môi trường MS có thạch

BAP (mg/l)	Tỷ lệ hình thành cụm chồi (%)	Số chồi/lát cắt	Độ dài chồi (cm)
Ngọn chồi			
0,5	100	6,92 ±3,58 ^a	5,50±2,61
1,0	100	9,75 ±4,45 ^b	4,64±2,86
2,0	100	8,38 ±4,96 ^a	4,04±2,15
3,0	100	18,80 ±8,99 ^c	3,76±1,93
5,0	100	9,69 ±6,96 ^b	3,35±2,37
Lát cắt đốt thân			
0,5	100	8,87 ±4,12 ^a	5,62±2,01
1,0	100	12,22 ±4,89 ^b	4,54±1,94
2,0	100	10,60 ±4,72 ^{ab}	4,10±1,76
3,0	100	23,52 ±9,26 ^c	3,68±1,32
5,0	100	14,00 ±6,71 ^b	3,21±2,08

Các số trung bình trong cùng một cột được đánh dấu bằng cùng một chữ cái khác nhau không có ý nghĩa thống kê ở mức xác suất 5% theo Duncan's multiple range test.

Cụm chồi hình thành ở tất cả các môi trường nuôi cấy sau khoảng 20 ngày nuôi cấy. Lúc đầu, một khối mô sẹo nhỏ xuất hiện ở mặt dưới của lát cắt, sau đó nhiều chồi bắt đầu hình thành từ nách của lát cắt đốt thân hoặc nách thấp nhất của ngọn chồi. Sau đó, chồi cũng được tái sinh từ những chồi phụ trong khối mô sẹo (adventitious shoots). Như vậy, chồi được hình thành cả bằng con đường trực tiếp từ chồi nách và con đường gián tiếp thông qua mô sẹo. Số chồi/lát cắt cao nhất (18.80 ± 8.99 chồi từ ngọn chồi và 23.52 ± 9.26 chồi từ lát cắt đốt thân) đạt được ở môi trường MS chứa 3.0 mg/l BAP. Ngọn chồi tỏ ra kém hơn lát cắt đốt thân trong việc tái sinh chồi (ảnh 2). Điều này có thể do ngọn chồi còn chịu ảnh hưởng của ưu thế ngọn.

Ảnh 2. Cụm chồi ba kích tái sinh từ đốt thân (hàng trên) và từ ngọn chồi (hàng dưới) trong môi trường MS + 3,0 mg/l BAP.

Ảnh chụp 60 ngày sau khi cấy.

Khi tăng nồng độ BAP lên ngưỡng tối ưu (3mg/l), chiều cao của chồi giảm dần, nhưng vẫn đạt chiều cao cần thiết cho việc tách chồi để cấy truyền. Vượt quá ngưỡng này, cả số chồi/mẫu lẫn chiều cao của chồi đều giảm và bắt đầu có hiện tượng mọng nước (vitrification). Căn cứ vào kết quả thí nghiệm này, chúng tôi đã chọn môi trường MS + 3mg/l BAP để tạo cụm chồi ba kích. Ở môi trường này, tuy hệ số nhân chồi đạt cao nhất nhưng độ biến động giữa các mẫu tương đối lớn, thể hiện ở độ lệch chuẩn cao. Thực tế có những mẫu cho đến 40 chồi, nhưng có mẫu chỉ đạt 5-7 chồi. Muốn tăng hệ số nhân, cần nghiên cứu tăng độ đồng đều của mẫu.

Sau khi thu hoạch tất cả các đốt thân và ngọn chồi, phần gốc còn lại của cụm cũng được cấy truyền ở mỗi lần cấy. Đáng chú ý là khối mô này ngày càng to và cho nhiều chồi hơn. Cụm chồi tái sinh từ các gốc này thường sinh trưởng nhanh, khỏe, lá to hơn so với chồi tái sinh từ đốt thân và ngọn chồi (ảnh 3).

Ảnh 3. Cụm chồi ba kích tái sinh từ ngọn chồi (trái), đốt thân (giữa) và phần gốc (phải) trong môi trường MS + 3,0 mg/l BAP.

Ảnh chụp 60 ngày sau khi cấy.

3. Tạo rễ

Các chồi đơn (đều không có rễ) dài ít nhất 3 cm, có 3 đôi lá trở lên được tách từ cụm chồi *in vitro* để nghiên cứu tạo rễ.

a/ Tạo rễ *in vitro*

Tác dụng của các chất điều tiết sinh trưởng: Trong môi trường MS cò thạch, cả α -naphthaleneacetic acid (NAA) và indole 3-butyric acid (IBA) đều ức chế sự ra rễ của ba bích tùy thuộc vào nồng độ (bảng 2). Phối hợp cả hai auxin cũng có tác dụng tương tự (bảng 3). Hiện tượng dường như trái quy luật này được khẳng định thông qua việc bổ sung một lượng nhỏ kinetin, khi tỷ lệ ra rễ được cải thiện (hai tổ hợp cuối bảng 3). Điều này có thể do lượng cytokinin nội sinh của chồi ba kích *in vitro* khá cao. Trong môi trường MS không chứa auxin, tỷ lệ ra rễ đạt cao nhất, nhưng cũng chỉ nằm trong khoảng 50-60%.

Bảng 2. Tác dụng của NAA và IBA đối với quá trình ra rễ *in vitro* của ba kích

Thành phần môi trường	Tỷ lệ ra rễ (%), 30 ngày sau cấy	Tỷ lệ ra rễ (%), 60 ngày sau cấy,
MS	56,3	66,7
MS + 0,1mg/l NAA	47,1	64,7
MS + 0,5mg/l NAA	31,3	43,8
MS + 0,1mg/l IBA	56,3	56,3
MS + 0,5mg/l IBA	50,0	50,0

Bảng 3. Kiểm tra tác dụng ức chế ra rễ ba kích *in vitro* của NAA và IBA

Thành phần môi trường	Tỷ lệ ra rễ (%), 30 ngày sau cấy
MS	62,5
MS + 0,05 mg/l NAA + 0,05 mg/l IBA	58,8
MS + 0,05 mg/l NAA + 0,1 mg/l IBA	47,1
MS + 0,1 mg/l NAA + 0,05 mg/l IBA	42,4
MS + 0,1 mg/l NAA + 0,1 mg/l IBA	33,3
MS + 0,1 mg/l NAA + 0,1 mg/l IBA + 0,05 mg/l Kin	42,1

Tác dụng của nồng độ khoáng: Bảng 4 cho thấy, trong môi trường không có auxin, giảm nồng độ khoáng đa lượng làm tăng tỷ lệ ra rễ một cách có ý nghĩa thống kê tùy theo nồng độ. Ở môi trường 1/4MS đã có hơn 90% số chồi ra rễ (ảnh 4).

Bảng 4. Tác dụng của nồng độ khoáng đối với quá trình ra rễ ba kích *in vitro*

Thành phần môi trường	Tỷ lệ ra rễ (%), trung bình của 4 lần thí nghiệm), 30 ngày sau cấy
MS	78.8 ± 10.3^a
1/ 2 MS	85.3 ± 5.3^b
1/ 4 MS	94.5 ± 3.9^c

Ảnh 4. Tạo rễ *in vitro* chồi ba kích trong môi trường 1/4MS không bổ sung auxin. Ảnh chụp 30 ngày sau khi cấy.

Sau khi rửa sạch môi trường, cây con *in vitro* được chuyển vào bầu nylon chứa hỗn hợp đất màu, trấu hun và phân mục (6:2:1) và nuôi trong lồng nylon tự tạo có phun sương với tần suất 15 phút, giờ. Trung bình, số cây sống đạt 70 – 80% tùy theo thời điểm ra cây, từ tháng 3 đến tháng 9 trong điều kiện thời tiết ở Hà Nội.

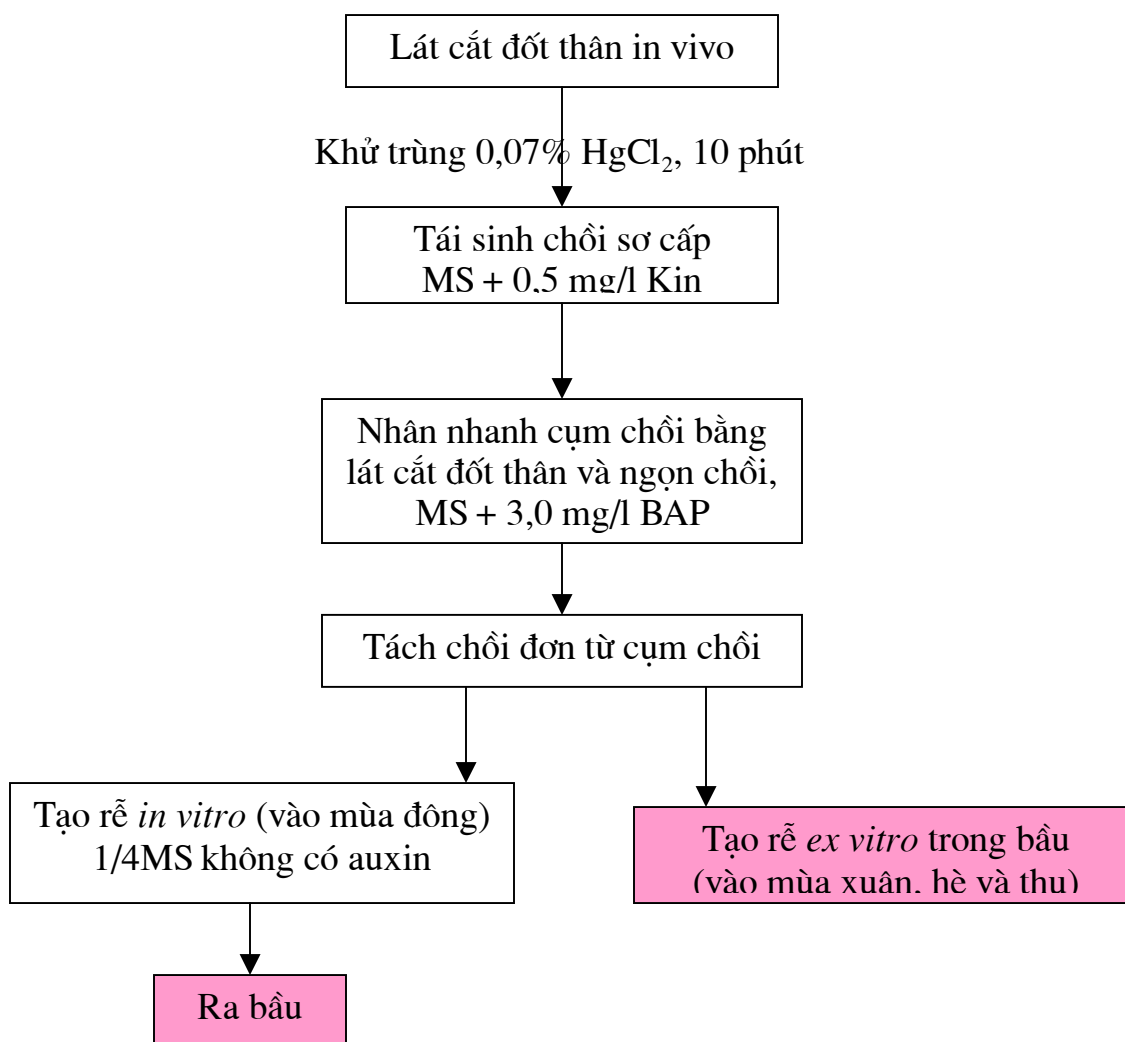
b/ Tạo rễ *ex vitro*

Chồi *in vitro* xử lý với dung dịch 1,000 mg/l IBA bằng phương pháp nhúng nhanh (quick-deep) được cấy vào bầu nylon và nuôi trong điều kiện như trên. Trong thời gian từ tháng 3 đến tháng 5 ở Hà Nội, 100% số chồi ra rễ chỉ sau 7-10 ngày và tiếp tục sinh trưởng, phát triển tốt (ảnh 5).

Ảnh 5. Cây ba kích ra rễ *ex vitro* và sinh trưởng trong bầu. Ảnh chụp 90 ngày sau khi cấy

Quy trình nhân nhanh *in vitro* cây ba kích

Từ những kết quả nghiên cứu trên đây, chúng tôi đề xuất một quy trình nhân nhanh *in vitro* cây ba kích theo sơ đồ sau:



Theo tính toán, hệ số nhân của quy trình này đạt trung bình 20⁴/năm.

II. Cây ngưu tất

1. Nhân nhanh *in vitro* bằng phương pháp tái sinh trực tiếp

Ngưu tất là cây có nhiều hạt và nhân giống khá dễ dàng bằng hạt. Mục tiêu của chúng tôi là thiết lập quy trình nhân nhanh *in vitro* không phải để trồng lấy dược liệu mà để phục vụ cho việc nhân nhanh các cá thể đầu dòng được chọn tạo sau này. Các cá thể này sẽ được trồng để thu hạt giống, sau đó dùng hạt giống để trồng lấy dược liệu theo cách làm thông thường.

a. Tạo cây *in vitro* sơ cấp

Để tạo cây *in vitro* sơ cấp phục vụ cho những thí nghiệm này, chúng tôi đã dùng đoạn gốc thân (dài 1-1,5 cm) có chứa chồi ngủ (mắt cua) lấy từ cây *in vivo* trước khi chồi phát lộ, khử trùng và cấy vào các môi trường khác nhau. Kết quả được trình bày trong bảng 5.

Bảng 5: Sự phát sinh hình thái của chồi gốc, 40 ngày sau khi cấy

Thành phần môi trường	Tỷ lệ chồi (%)	Tỷ lệ rễ (%)	Tỷ lệ mô sẹo (%)	Ghi chú
MS + 0,1 mg/l IBA	100	100	20	Chồi nhỏ dần theo nồng độ của IBA và BAP
MS + 0,5 mg/l IBA	100	100	35	
MS + 1 mg/l IBA	100	100	60	
MS+1 mg/l IBA+0,2 mg/lBAP	90	80	100	
MS+1 mg/l IBA+0,5 mg/lBAP	75	40	100	

Bảng 5 cho thấy:

-IBA có tác dụng kích thích sinh trưởng của chồi ngủ, tác dụng này giảm theo nồng độ trong khoảng đã thử. Không thấy xuất hiện các chồi mới mà chỉ có các chồi sẵn có ở gốc (mắt cua) tiếp tục sinh trưởng với mức độ khác nhau tùy theo nồng độ của IBA.

-Khi bổ sung BAP vào môi trường có IBA, chồi không những không sinh trưởng mạnh thêm mà có chiều hướng giảm đi. Điều này cho thấy tác dụng kích thích sinh trưởng chồi của IBA thực chất là hệ quả của việc kích thích hình thành rễ. Đầu tiên, IBA phát động sự hình thành rễ (từ khối mô sẹo), sau đó các rễ này tổng hợp nên cytokinin nội sinh để kích thích sinh trưởng của chồi. Quy luật có vẻ bất thường này cũng đã được quan sát thấy trên các đối tượng khác như *Dioscorea floribunda* [], *Solanum hainanense* [].

-IBA cũng có tác dụng kích thích hình thành mô sẹo. Nhưng mô sẹo thực chất được hình thành từ gian đốt (internode) ở phần gốc. Bổ sung thêm BAP, mô sẹo hình thành và phát triển mạnh hơn. Đây là tác dụng cộng

hưởng (synergic action) giữa hai nhóm auxin và cytokinin đối với quá trình phát sinh mô sẹo.

Tóm lại, chồi trong các môi trường nói trên đều được tái sinh trực tiếp từ những chồi ngủ sẵn có trong mô cấy nên về nguyên tắc, các chồi này đều true-to-type. Tuy nhiên, môi trường thích hợp nhất để tạo chồi sơ cấp là MS + 0,1mg/l IBA. Ở môi trường này, chồi sinh trưởng mạnh nhất và ít mô sẹo nhất.

b. Nhân nhanh

Ngọn chồi và đốt thân của cây ngưu tất *in vitro* (dài 1-1,5 cm) được cấy vào các môi trường chứa IBA ở những nồng độ khác nhau. Thông thường, độ mất cảm đối với chất ĐTST của mô thực vật tăng lên trong quá trình nuôi cấy. Vì vậy, ở giai đoạn này chúng tôi đã giảm nồng độ của IBA nhằm hạn chế khả năng hình thành mô sẹo. Kết quả thí nghiệm được trình bày ở bảng 6.

Bảng 6: Sự phát sinh hình thái của đốt thân và ngọn chồi lấy từ cây ngưu tất in vitro sơ cấp (quan sát 40 ngày sau khi cấy)

Môi trường	Tỷ lệ ra rễ (%)	Chiều cao cây (cm)	Số mầm/cây	Số đốt/cây	Tỷ lệ mô sẹo (%)
Đốt thân					
MS + 0,05 mg/l IBA	100	-	2	-	100
MS + 0,025 mg/l IBA	100	-	2	-	100
MS	90	7,65±0,6	2	6,0±0,8	0
Ngọn chồi					
MS + 0,05 mg/l IBA	100	-	1	-	100
MS + 0,025 mg/l IBA	100	-	1	-	100
MS	90	9,65±0,7	1	3,2±0,5	0

Bảng 6 cho thấy để nhân nhanh *in vitro* ngưu tất, tốt nhất chỉ nên dùng môi trường MS không có chất điều tiết sinh trưởng. Ở môi trường này, tuy tỷ lệ ra rễ chỉ đạt 90% nhưng cây hoàn toàn không có mô sẹo (ảnh 6). Đây là yêu cầu quan trọng nhất trong việc nhân bảo toàn các tính trạng ban đầu của giống. Cây nhân trong môi trường này không cần phải qua giai đoạn tạo rễ và có thể chuyển thẳng ra bầu.

Ảnh 6. Cây ngưi tất *in vitro* nhân từ đốt thân trong môi trường MS không có chất ĐTST. Ảnh chụp 20 ngày sau khi cấy.

c. Chuyển cây ra vườn ươm

Sau 30 ngày nuôi trong ống nghiệm, cây ngưi tất con được chuyển ra vườn ươm theo phương pháp như sau: Cây con được rửa sạch khỏi môi trường bám trên rễ, sau đó trồng trên giá thể gồm cát + đất + phân mục (1:1:1) trong khay và đặt trong nhà lưới, tưới ẩm hàng ngày.

Sau 7-8 ngày, cây bắt đầu hồi xanh, ra rễ mới và tiếp tục sinh trưởng bình thường. Ngay cả khi đưa cây vào thời điểm (mùa hè) không phù hợp với thời vụ bình thường của ngưi tất nhưng cây vẫn sống với tỷ lệ >70%, chứng tỏ cây nhân theo phương pháp trình bày trên đây có sức sống rất tốt (ảnh 7).

Ảnh 7. Cây ngưi tất *in vitro* ngoài vườn ươm (75 ngày tuổi)

2. Nghiên cứu tạo mô sẹo ngưi tất

a/ Từ gian đốt thân

Đoạn giữa đốt thân (gian đốt, internode) không chứa chồi nách dài 0,3-0,5cm lấy từ phần gốc cây ngoài đồng ruộng trước giai đoạn “mất cu” được cấy vào các môi trường khác nhau để tạo mô sẹo. Kết quả được trình bày ở bảng 7 và ảnh 8.

Bảng 7. Ảnh hưởng của các chất ĐTST đến sự hình thành mô sẹo từ gian đốt thân ngưi tất (30 ngày sau cấy)

Thành phần môi trường	Tỷ lệ hình thành mô sẹo (%)	Ghi chú
MS+1mg/lNAA	100	Xốp
MS+1mg/lNAA+0,2mg/lBAP	100	Rắn, nổi cục
MS+1mg/l 2,4-D	100	Mọng nước
MS+1mg/l 2,4-D+0,2mg/lBAP	100	Xốp

Kết quả cho thấy cả 4 môi trường trên đều có tác dụng kích thích hình thành mô sẹo. Với mục đích tạo ra mô sẹo để tái sinh thành cây sau này, chúng tôi đã chọn môi trường MS + 1 mg/l NAA +0,2 mg/l BAP. Ở môi trường này, mô sẹo rắn hơn và có những cấu trúc dạng cục. Theo kinh nghiệm, đây là dạng mô sẹo có khả năng tái sinh cao.

Ảnh 8. Ảnh hưởng của các chất ĐTST đến sự hình thành mô sẹo từ gian đốt thân ngưi tất. Từ trái sang phải: MS+1mg/lNAA; MS + 1 mg/l NAA + 0,2 mg/l BAP; MS+1mg/l 2,4-D; MS + 1mg/l 2,4-D + 0,2 mg/l BAP.

Tuy nhiên, mô sẹo ngưng tất nhanh chóng bị hoá nâu trong quá trình cấy chuyền, mặc dù đã thử bổ sung các chất chống oxy hoá như acid ascorbic, acid citric, thay saccharose bằng glucose và các chất hấp phụ như than hoạt và polyvinylpyrrolidon với các nồng độ khác nhau. Vì vậy, chúng tôi đã thử tạo mô sẹo từ hypocotyl – loại mô có tính chất phôi sinh cao hơn.

b/ Từ hypocotyl

Hạt ngưng tất được ủ nảy mầm trên giấy thấm trong đĩa petri đặt trong buồng tối. Sau 15 ngày, khi cây con dài 2-2,5 cm, cắt lấy các đoạn hypocotyl dài 0,3-0,5 cm, xử lý vô trùng và cấy vào các môi trường khác nhau. Mỗi công thức gồm 20 mẫu. Kết quả được trình bày ở bảng 8.

Bảng 8. Tác dụng của IBA tới quá trình hình thành mô sẹo từ hypocotyl ngưng tất (30 ngày sau khi cấy).

Thành phần môi trường	Tỷ lệ hình thành mô sẹo (%)	Ghi chú
MS + 0,5mg/l IBA	100	Màu nâu đen, nhỏ như hạt đậu
MS +1mg/l IBA	100	Màu vàng nâu, to bằng hạt lạc, có 1 mẫu tái sinh thành 1 cây
MS +1,5mg/l IBA	100	Màu nhạt, to bằng hạt lạc, hơi mọng nước
MS + 2mg/l IBA	100	Màu sẫm, to bằng hạt lạc, mọng nước, nhiều rễ

Bảng 8 cho thấy môi trường MS +1mg/l IBA là môi trường thích hợp nhất để tạo mô sẹo từ hypocotyl ngưng tất. Chúng tôi đã dùng môi trường này để tạo ra mô sẹo phục vụ cho việc cấy truyền. Nhưng chỉ sau 12-15 ngày, các khối mô sẹo này đều bị hoá nâu (ảnh 9). Áp dụng tất cả các biện pháp như đã dùng đối với mô sẹo từ gian đốt thân đều không khắc phục được hiện tượng này.

Ảnh 9. Mô sẹo ngưng tất từ hypocotyl trong môi trường MS +1mg/l IBA
(20 ngày sau cấy)

Kết luận chung

Cây ba kích

1. Chồi in vitro tái sinh thuận lợi nhất từ lát cắt đốt thân trong môi trường MS + 0,5 mg/l Kin.
2. Môi trường tốt nhất để nhân nhanh cụm chồi từ ngọn chồi và lát cắt đốt thân là MS + 3,0 mg/l BAP.
3. Chồi in vitro ra rễ in vitro tốt nhất (>90%) trong môi trường 1/4MS không chứa chất ĐTST. Từ tháng 3 đến tháng 5 ở điều kiện thời tiết Hà Nội, chồi in vitro có thể xử lý cho ra rễ ex vitro đạt 100%.
4. Cây in vitro đạt tỷ lệ sống 70-80% tùy theo thời điểm ra cây, cây ra rễ ex vitro đạt tỷ lệ sống 100%.

Cây ngư tấu

5. Môi trường tạo chồi in vitro sơ cấp tốt nhất là MS + 0,1 mg/l IBA.
6. Môi trường tốt nhất để nhân nhanh và tạo rễ từ lát cắt đốt thân và ngọn chồi là MS không có chất ĐTST. ở môi trường này, tỷ lệ ra rễ chỉ đạt 90% nhưng cây khỏe, không kèm theo mô sẹo và đạt tỷ lệ sống 100% khi chuyển ra vườn ươm.
7. Có thể tạo mô sẹo từ gian đốt thân trong môi trường MS + 1mg/l NAA + 0,2mg/l BAP và từ hypocotyl trong môi trường MS + 1mg/l IBA.
8. Mô sẹo ngư tấu từ cả hai nguồn nguyên liệu đều bị hoá nâu trong quá trình cấy chuyển. Chưa tìm được biện pháp khắc phục.

Tài liệu tham khảo

1. Bộ KHCN & MT. *Sách đỏ Việt Nam*. NXB KHKT, Hà Nội, 1996.
2. Nguyễn Chiêu et al. *Phân bố ba kích ở miền Bắc Việt Nam*. Thông báo dược liệu 10, 30, 1978.
3. Nguyễn Chiêu. *Báo cáo nghiệm thu đề tài cấp Bộ KHYD 02-21R - Viện Dược liệu*, 2001.
4. Li YF, Yuan L, Xu YK, Yang M, Zhao YM, Luo ZP. *Antistress effect of oligosaccharides extracted from Morinda officinalis in mice and rats*. Acta Pharmacol. Sin. 2001, 22(12):1084-8.
5. Li YF, Gong DH, Yang M, Zhao YM, Luo ZP. *Inhibition of the oligosaccharides extracted from Morinda officinalis, a Chinese traditional herbal medicine, on the corticosteron induced apoptosis in PC12 cells*. Life Sci. 2003, 72(8): 933-42.
6. Murashige, T. and F. Skoog. 1962. *A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures*. Physiol. Plant. 15: 473-97.
7. Pierik, R. L. M. *In vitro culture of Higher Plants*. Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht, 1987, p.206.
8. Soon, Y. Y., Tan, B. K. H. *Evaluation of the hypoglycemic and anti-oxydant activities of Morinda officinalis in the streptozotoin-induced diabetic rats*. Singapore Medical Journal 2002, 43(2): 77-85.
9. Viện Dược liệu, *Tài nguyên cây thuốc Việt Nam*. NXB KHKT, Hà Nội, 1993.
10. Viện Dược liệu. *Selected Medicinal Plants in Vietnam*, NXB KHKT, 1999 (in English).
11. Yoshikawa M, Yamaguchi S, Nishisaka H, Yamahara J, Murakami N. *Chemical constituents of Chinese natural medicine, morindae radix, the dried roots of Morinda officinalis How: structures of morindolide and morofficinaloside*. Chem. Pharm. Bull. (Tokyo) 1995, 43(9): 1462-5.
12. Zhang ZQ, Yuan L, Yang M, Luo ZP, Zhao YM. *The effect of Morinda officinalis How, a Chinese traditional medicinal plant, on the DRL 72-s schedule in rats and the forced swimming test in mice*. Pharmacol. Biochem. Behav. 2002, 72(1-2): 39-34.

I - Giới thiệu chung

1. Cây ba kích (*Morinda officinalis*. How – Rubiaceae)

Theo y học cổ truyền, ba kích là vị thuốc có tác dụng bổ trí não, trợ dương, ích tinh, mạnh gân cốt, chữa các bệnh về tình dục, người già mệt mỏi, kém ăn, ít ngủ nhưng không có biểu hiện về bệnh lý. Đặc biệt, tuy giúp bình thường hóa và cải thiện tình dục nhưng ba kích không kích dục, không có tác dụng kiểu androgen và không độc. Gần đây, thành phần hóa học và nhiều tác dụng dược lý mới của ba kích đã được phát hiện như chống stress, chống trầm cảm, và chống oxy hóa.

Với phương châm “phòng bệnh hơn chữa bệnh” của ngành y tế, việc nghiên cứu sản xuất các loại thuốc bổ để tăng cường sức khỏe thường xuyên của cộng đồng, góp phần ngăn ngừa bệnh tật ngày càng được đẩy mạnh. Trong bối cảnh đó, ba kích đang trở thành một trong những cây thuốc bản địa độc đáo của nước ta. Mặt khác, ba kích lại là cây chỉ thích hợp để trồng xen ở đất đồi, không cạnh tranh về đất với các cây trồng khác, vì vậy, nó có ý nghĩa to lớn trong việc tăng thu nhập cho đồng bào vùng cao.

Trước những năm 1970, nguồn ba kích chỉ dựa vào việc khai thác tự nhiên từ rừng thuộc một số tỉnh phía Bắc như Tuyên Quang, Yên Bái, Phú Thọ, Lạng Sơn, Hà Bắc, Quảng Ninh, Hoà Bình và Hà Tây. Do nhu cầu trong nước và thế giới ngày càng tăng nên ba kích mọc hoang bị khai thác ngày càng kiệt quệ. Mặt khác, rừng ở vùng phân bố của ba kích bị tàn phá nghiêm trọng khiến cây lâm vào tình trạng gần như tuyệt chủng và bị liệt vào sách đỏ Việt Nam. Vì vậy, việc nghiên cứu trồng cây ba kích là con đường duy nhất để duy trì và phát triển nguồn thuốc quý này.

Nhưng hiện nay, việc nhân giống là một tồn tại, cản trở việc mở rộng diện tích trồng ba kích. Cây trồng sau 15 tháng mới có 3,5 % số cây ra hoa và sau 22 tháng mới có 1,2 % số cây đậu quả. Sau 3 năm, tỷ lệ này cũng chỉ đạt khoảng 30 % và hệ số nhân giống bằng hạt chỉ đạt 1,1/năm (thu hạt của 1 ha đủ để trồng 1,1 ha). Ba kích cũng có thể nhân giống bằng cành giâm, nhưng hệ số nhân của phương pháp này chỉ đạt 0,61/năm (thu cành của 1 ha đủ để trồng 0,65 ha), mặc dù đã sử dụng các chất kích thích sinh trưởng. Tóm lại, các phương pháp nhân giống truyền thống như gieo hạt, giâm cành không thể đáp ứng nhu cầu về cây giống để phát triển trồng ba kích, ít nhất trong vòng 15 – 20 năm tới, chưa kể đến những hạn chế của phương pháp này đối với sự sinh trưởng, phát triển, năng suất và chất lượng của cây giống. Vì vậy, việc sử dụng công nghệ tế bào thực vật để nhân nhanh ba kích là yêu cầu rất cấp bách.

2. Cây nguru tất (*Achyranthes bidentata* Blume – Amaranthaceae)

Rễ củ nguru tất là vị thuốc quan trọng và phổ biến trong y học cổ truyền, rất công hiệu đối với các bệnh có căn nguyên từ gan, thận như đau lưng, mỏi gối, viêm thấp đa khớp, chân tay co quắp, bại liệt... Nguru tất có mặt trong hàng trăm bài thuốc đông y khác nhau và đã được bào chế thành các dạng thuốc lưu hành rộng rãi trên thị trường như viên Bidentin dùng để chữa tăng cholesterol máu, rối loạn lipoprotein máu, cao huyết áp; viên Dentonin chữa viêm lợi và viêm quanh răng.

Là một cây di thực (1960) đã trở thành cây bản địa, nguru tất được trồng trên quy mô lớn ở đồng bằng và trung du Bắc bộ trong cơ cấu cây trồng vụ đông với sản lượng hàng ngàn tấn, đạt hiệu quả cao hơn nhiều cây rau màu vụ đông khác. Tuy nhiên, mấy năm gần đây, trong khi nhu cầu trong nước và thế giới ngày càng tăng thì diện tích trồng nguru tất lại giảm dần do cây bị thoái hóa theo chiều hướng ra hoa sớm, củ nhỏ, nhiều xơ, năng suất giảm và vì vậy, hiệu quả kinh tế thấp.

Bình thường, nguru tất gieo trồng vào tháng 9 – 10, đến khi sắp thu hoạch (tháng 4-5 năm sau) mới ra hoa. Nhưng hiện nay, cây trồng sau 2-3 tháng đã ra hoa (tháng 12-1) thậm chí có năm cây ra hoa vào tháng 11. Việc phục tráng và thiết lập một hệ thống sản xuất hạt giống nguru tất có chất lượng cao là một nhu cầu bức xúc. Cho đến nay, chưa có công trình nào nghiên cứu để giải quyết vấn đề này một cách triệt để để ứng dụng vào sản xuất.

II - Địa chỉ áp dụng

Các đơn vị sản xuất giống, sản xuất dược liệu. Đặc biệt thích hợp với các phòng nuôi cấy mô của các tỉnh miền núi và trung du Việt Nam.

III – Trang thiết bị, hoá chất

1. Trang thiết bị:

Trang thiết bị của một phòng nuôi cấy mô cơ bản gồm tủ cấy laminar, nồi hấp, máy cất nước, máy đo pH, ống nghiệm và bình tam giác thủy tinh chịu nhiệt, và các dụng cụ để thao tác khi pha môi trường (ống đong) và khi cấy mẫu trong tủ cấy (dao, kéo, panh, đĩa petri).

Phòng nuôi được duy trì ở nhiệt độ 25-27⁰C, độ ẩm ≤ 70 %, cường độ chiếu sáng 2000 lux với chu kỳ chiếu sáng 14 giờ/ngày.

2. Thành phần môi trường: theo môi trường của Murashige và Skooge năm 1962 (MS).

Chuẩn bị các dung dịch mẹ: Các chất khoáng được pha thành các dung dịch mẹ:

MS1	NH ₄ NO ₃	33 g	} Pha trong 2 lít
	KNO ₃	38 g	
	CaCl ₂ .2H ₂ O	8,8 g	
	MgSO ₄ .7H ₂ O	9,2 g	
	KH ₂ PO ₄	3,4 g	
MS2	FeSO ₄ .7H ₂ O	2,785 g	} Pha trong 0,5 lít
	EDTA	3,725 g	
MS3	H ₃ BO ₃	310 mg	} Pha trong 0,5 lít
	MnSO ₄	1115 mg	
	ZnSO ₄	430 mg	
	KI	41,5 mg	
	Na ₂ MoO ₄	12,5 mg	
	CuSO ₄	1,25 mg	
	CoCl ₂	1,25 mg	

Các dung dịch mẹ được bảo quản trong tủ lạnh. Khi pha môi trường, đổ một lượng nước cất bằng 2/3 thể tích cần pha vào một cốc, bình thủy tinh hoặc nồi nhôm/inox, rồi cho thêm các dung dịch mẹ với lượng như sau:

MS1: 100 ml

MS2: 5 ml

MS3: 10 ml

Sau đó, cho vào mỗi lít môi trường các chất với nồng độ tương ứng dưới đây:

Pyridoxin (VTM B ₆)	0,5 mg	} VTM
A. nicotinic	0,5 mg	
Thiamin (VTM B ₁)	0,1 mg	
Glicin	3 mg	
Adenin	5 mg	
Inositol	100 mg	

Đường sucrose Tùy theo giai đoạn (sẽ ghi cụ thể ở phần sau).

Các chất điều tiết sinh trưởng (với nồng độ tùy theo giai đoạn):

Cytokinin: 6- benzyladenin purin (BAP); kinetin (Kn)

Auxin: β -indol butiric acid (IBA); α -naphtyl acetic acid (α – NAA)

Dùng dung dịch 0,1N HCl hoặc 0,1 KOH chỉnh độ pH đến 5,8.

Sau đó, thêm:

Thạch (agar) 7 g/l

Than hoạt tính (THT) 0,5 g/l.

Đun sôi nhỏ lửa và khuấy thường xuyên đến khi tan hết thạch. Đổ môi trường vào ống nghiệm hoặc bình cấy với lượng theo yêu cầu, nút lại và khử trùng ở 116°C, áp suất 0,8 kg/cm² trong 40 phút. Khi hết thời gian khử trùng, lấy môi trường ra khỏi nồi hấp, mang vào phòng cấy để cố định cho môi trường nguội dần và đông lại.

IV – Qui trình

1- Cây ba kích

Bước 1: Lấy mẫu:

Chọn cành non, khỏe, không bị sâu bệnh, bỏ lá. Nếu mang đi xa, phải nhúng vào nước sạch, bọc trong giấy báo, bỏ vào túi nylon buộc kín để giữ cho cành không bị héo. Tránh làm dập nát cành.

Bước 2: Trước khi khử trùng mẫu, cần khởi động tủ cấy (laminair) để máy làm việc ít nhất 30 phút. Các dụng cụ dùng để thao tác trong tủ cấy như cốc thủy tinh hoặc bình tam giác miệng rộng, dao, kéo, panh phải được hấp vô trùng.

Khử trùng mẫu:

Lóng của ba kích khá dài, vì vậy, nên cắt cành thành những đoạn dài 3-4cm, mỗi đoạn chứa một đốt ở khoảng giữa. Rửa sạch bụi đất bằng nước máy, ngâm trong nước xà phòng loãng từ 10 -12 phút và lắc đều, sau đó, tráng sạch bằng nước vô trùng. Đưa mẫu vào tủ cấy, chuyển sang cốc thủy tinh hoặc bình tam giác miệng rộng, tráng mẫu bằng cồn 75%, đổ dung dịch HgCl₂ 0,07 % vào và ngâm trong 10 phút, sau đó, tráng lại nhiều lần bằng nước cất vô trùng. Khi cấy, cắt bỏ hai đầu mẫu (và phần ngoài cọng lá, gần sát đến đốt thân), chỉ để lại một đoạn dài 1-1,5cm chứa đốt thân/mắt ngủ ở khoảng giữa rồi cấy vào môi trường dinh dưỡng.

Bước 3: Cấy khởi động

Mẫu sau khi được khử trùng cấy vào môi trường :**(BS1)**

MS + VTM + 30 g/l đường + 0,7 g/l thạch + 0,5 mg/l Kn + pH 5,8.

Sau 8 tuần , từ mỗi đốt thân phát sinh ra 2 chồi nách ở 2 nách lá của đốt thân . Sau 16 tuần chồi đủ lớn để cấy truyền.

Bước 4: Giai đoạn nhân nhanh

Cắt các chồi thu được ở giai đoạn khởi động thành từng ngọn và từng đốt thân riêng lẻ (khoảng 1cm), cấy cả 3 loại mẫu: ngọn, đốt và phần gốc còn lại vào môi trường **BS2**:

MS + VTM + 3 mg/l BAP + 30 g/l đường + 7mg/l thạch + pH 5,8

Sau 12 tuần nuôi cấy, trung bình mỗi mẫu cho khoảng 20 chồi, với chiều cao mỗi chồi từ 2-5cm.

Bước 5: Giai đoạn tạo cây hoàn chỉnh

Tách các chồi đạt tiêu chuẩn từ 3-4 đốt thân trở lên cấy vào môi trường tạo rễ, (**BS3**):

1/4 MS + VTM + 0,5 g/l THT + 7 g/l thạch + pH 5,8

Nuôi ở giai đoạn này 1 – 1,5 tháng.

Các chồi không đạt tiêu chuẩn để tạo rễ tiếp tục được cấy chuyển vào môi trường nhân nhanh như bước 4.

Bước 6: Giai đoạn đưa cây ra vườn ươm

Thường tiến hành vào mùa xuân, hè và thu rồi nuôi tiếp đến tháng 2 năm sau.

Cho cây làm quen dần với môi trường tự nhiên bằng cách đưa bình nuôi ra khỏi phòng nuôi, đặt ở điều kiện nhiệt độ và ánh sáng phòng.

Có hai cách tạo cây giống ngoài vườn ươm, đó là:

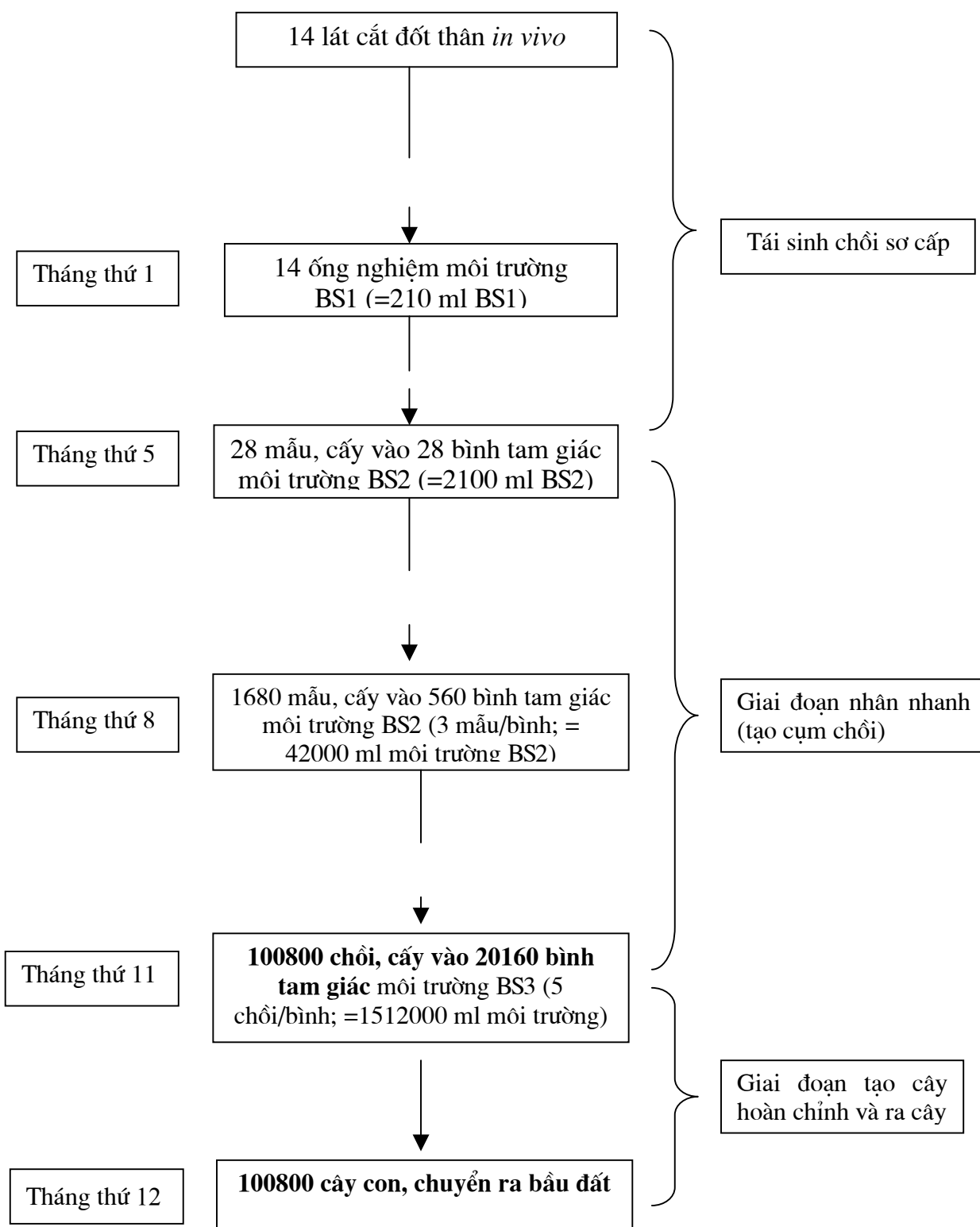
Cách 1: Tạo rễ *ex vitro*

Tách các chồi *in vitro* có từ 4 đốt trở lên (≥ 4 cm) khỏi cụm, rửa sạch môi trường bằng nước thường, nhúng nhanh (quick-deep) vào dung dịch IBA (1 mg/l), rồi cấy vào bầu nylon chứa hỗn hợp đất màu, trấu hun và phân mục (6:2:1) và nuôi ở điều kiện phun sương với tần suất 15 phút/giờ. Sau 7 –10 ngày các chồi hình thành rễ.

Cách 2: Đưa cây con ra bầu

Rút cây con *in vitro* ra khỏi bình, rửa sạch thạch bám ở rễ rồi cũng cấy vào bầu nylon và nuôi trong điều kiện môi trường như trên. Thời điểm thích hợp cho phương pháp này là từ tháng 3 đến tháng 5 trong điều kiện thời tiết ở Hà Nội.

Các bước tiến hành trên được mô tả bằng qui trình sau:



2. Cây nguru tắt

a) Nhân nhanh *in vitro* bằng phương pháp tái sinh trực tiếp

Bước 1: Lấy mẫu

Lấy đoạn gốc thân (thường được gọi là mắt cua) trước khi mầm ngủ phát động, dài 1- 1,5cm từ cây đã được chọn lọc.

Bước 2: Khử trùng

Khử trùng các đoạn gốc thân trên tương tự như đòi với ba kích

Bước 3: Cây khởi động (Tạo cây *in vitro* sơ cấp)

Các mẫu sau khi khử trùng được cấy vào môi trường NS1, bao gồm các thành phần sau:

MS + 0,1 mg/l IBA + VTM + 20 g/l đường + pH 5,8 (NS1)

Sau 40 ngày, 2 chồi ngủ phát sinh ở mắt cua, cao tới 11cm nhưng chỉ có trung bình 2-3 đốt.

Bước 4: Nhân nhanh

Cắt ngọn chồi và đốt thân cây nguru tắt *in vitro* (dài 1- 1,5cm) cấy vào môi trường:

MS + VTM + 20 g/l đường + 7g/l thạch + pH 5,8 (NS2)

Cấy truyền nhiều lần để nhân được số cây cần thiết. Cứ sau mỗi 30 ngày cấy chuyển một lần. Cây nhân trong môi trường này không cần phải qua giai đoạn tạo rễ và có thể đưa thẳng ra bầu.

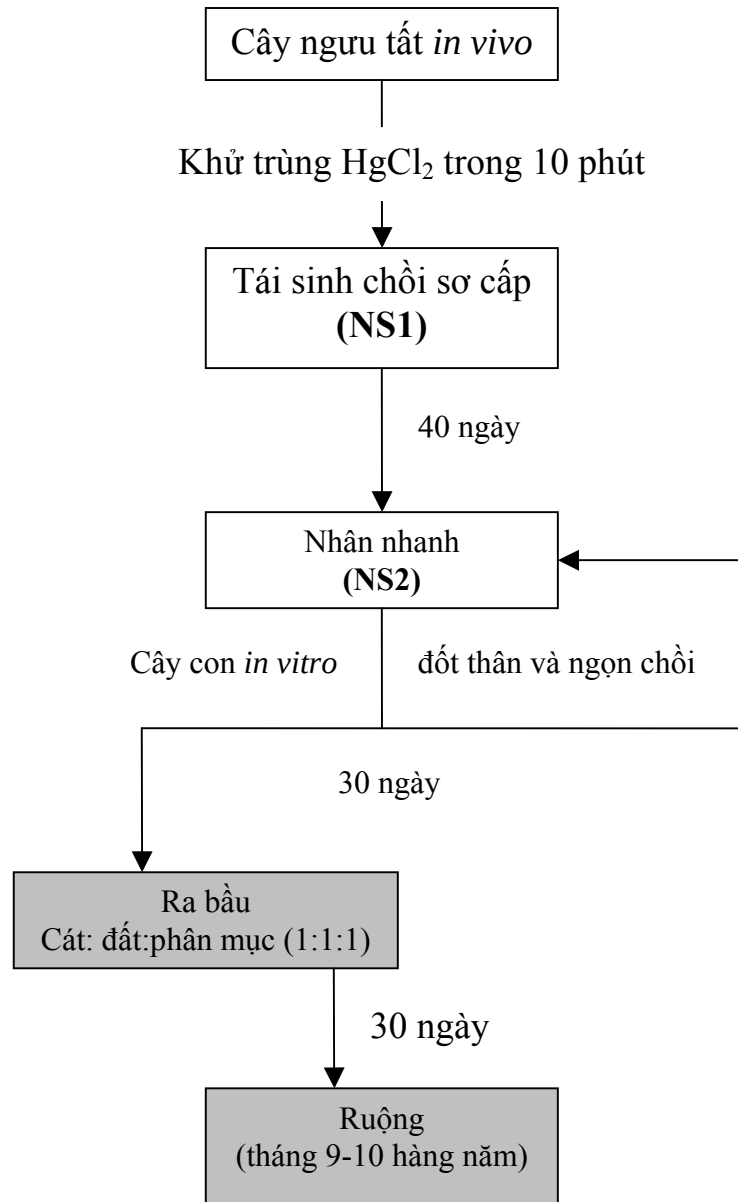
Bước 5: Đưa cây ra vườn ươm (thường thực hiện vào tháng 9- tháng 10 hàng năm)

Sau 30 ngày nuôi trong ống nghiệm, cây nguru tắt con được chuyển ra vườn ươm theo phương pháp như sau: Cây con được rửa sạch khỏi môi trường nuôi cấy bám trên rễ, sau đó trồng vào bầu nylon chứa cát + đất + phân mục (1:1:1). Đặt các bầu này trong điều kiện vườn ươm và tưới ẩm hàng ngày. Sau 30 ngày đưa cây ra ruộng trồng để thu hạt.

b) Nhân *in vitro* bằng con đường gián tiếp:

Mô sẹo tạo được từ gian đốt thân (internode) cây *in vivo* và từ hypocotyl đều bị hóa nâu trong quá trình cấy truyền. Chưa tìm được biện pháp khắc phục.

Quy trình nhân nhanh cây ngư tử:



V- Một số điều cần lưu ý:

1. Cây ba kích:

- Quy trình được hoàn thiện trong khoảng thời gian 1 đến 1,5 năm, với hệ số nhân là $(3 \times 20)^4$ / năm.

- Giai đoạn tạo rễ *in vitro* nên được thực hiện vào mùa đông để đến mùa xuân có thể đưa cây ra bầu.

- Để tạo ra 10 vạn cây một năm cần đưa vào khử trùng 14 mẫu từ *in vivo*, và cần 210 ml = 0,21 lít môi trường tái sinh (BS1); 44100 ml = 44,1 lít môi trường nhân nhanh (BS2); 1512000 ml = 1.512 lít môi trường tạo rễ (BS3).

2. Cây ngư tử:

- Vì ngư tử là cây có nhiều hạt và nhân giống khá dễ dàng bằng hạt, nên phương pháp này chỉ áp dụng cho việc nhân nhanh những cá thể đầu dòng đã được chọn lọc. Đó là những cá thể có thời gian sinh trưởng sinh dưỡng kéo dài, chậm ra hoa và cho năng suất củ cao.

- Vào thời vụ của ngư tử (tháng 9- 10 hàng năm), tạo cây con *in vitro* để đưa ra ngoài.

- Quy trình nhân nhanh *in vitro* ngư tử kéo dài trong 1 năm, với hệ số nhân là 12^9 /năm.