

NHÂN GIỐNG *IN VITRO* CÂY DÀNH DÀNH (*Gardenia jasminoides* Ellis)**Đinh Thị Thu Lê¹, Bùi Thị Hải Hoà¹, Nguyễn Thị Mỹ Uyên², Đoàn Thị Thúy Hằng²,
Ninh Thị Phíp³, Nguyễn Xuân Trường^{2,5}, Phạm Văn Cường⁴, Đinh Trường Sơn^{2,5*}**¹*Viện Công nghệ sinh học và Công nghệ thực phẩm, Trường Đại học Mở Hà Nội*²*Khoa Công nghệ sinh học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam*³*Khoa Nông học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam*⁴*Phòng Đào tạo - Quản lý khoa học, Trường Đại học Hoa Lư*⁵*Viện Sinh học Nông nghiệp, Học viện Nông nghiệp Việt Nam*

*Tác giả liên hệ: dtson@vnua.edu.vn

Ngày nhận bài: 07.12.2022

Ngày chấp nhận đăng: 07.03.2023

TÓM TẮT

Cây dành dành không những có giá trị làm thực phẩm mà còn là một cây thuốc có nhiều công dụng trong chữa bệnh. Ở nước ta, đã có các công trình nghiên cứu thành phần hóa học và tác dụng dược lý, tuy nhiên vẫn chưa có công trình nghiên cứu nhân giống *in vitro* cây dành dành được công bố. Nghiên cứu này được thực hiện nhằm mục tiêu xây dựng quy trình nhân giống *in vitro* cây dành dành có hệ số nhân giống cao, cây *in vitro* sinh trưởng tốt. Quả dành dành bánh tẻ là phù hợp nhất để lấy hạt tạo nguồn vật liệu ban đầu. Khử trùng quả bằng dung dịch Presept 0,5% trong 10 phút cho hiệu quả khử trùng và sinh trưởng của cây tốt nhất (mẫu sạch là 94,67% và tỷ lệ nảy mầm là 90,59%). Môi trường phù hợp cho nhân nhanh *in vitro* cây dành dành là môi trường MS có bổ sung 1,5 mg/l BA cho hệ số nhân chồi đạt 7,29 chồi/mẫu. Đối với các vi chồi dành dành, sử dụng môi trường MS có bổ sung 30 g/l đường sucrose và 150ml nước dừa/lít cho vi chồi sinh trưởng mạnh, chất lượng chồi tốt. Môi trường ra rễ phù hợp cho chồi cây dành dành là môi trường MS có bổ sung 0,5 mg/l IBA hoặc môi trường ½ MS cho tỷ lệ ra rễ đạt 100%, hình thái rễ bình thường, cây sinh trưởng tốt.

Từ khoá: Cây dành dành, *Gardenia jasminoides* Ellis, *in vitro*, nuôi cấy mô.**In vitro Propagation of *Gardenia jasminoides* Ellis****ABSTRACT**

Gardenia (*Gardenia jasminoides* Ellis) is not only valuable as a food but also a medicinal plant used in the treatment of illnesses including jaundice, headaches, fever, inflammation, hepatic disorders, and hypertension. The current study aimed to establish an efficient protocol for *in vitro* propagation of *Gardenia jasminoides* Ellis with high multiplication rate and healthy plants. The pre-mature *Gardenia* fruits were the most suitable plant parts for initiation of *in vitro* culture. Seeds sterilized using 0.5% Presept solution for 10 minutes gave the highest sterilization (94.67%) and germination rate (90.59%). MS medium supplemented with 1.5 mg/l benzyladenine gave multiplication rate of 7.29 shoots/explant. MS medium supplemented with 30-40 g/l sucrose and 150ml of coconut water/l gave vigorous growth of microshoots and good shoot quality. MS medium supplemented with 0.5 mg/l IBA or half-strength of MS medium recorded 100% rooting rate, normal root morphology, and well growing plants.

Keywords: *Gardenia jasminoides* Ellis, *in vitro* propagation.**1. ĐẶT VẤN ĐỀ**

Cây dành dành (*Gardenia jasminoides* Ellis) là cây thuốc có nguồn gốc ở châu Á, thường mọc nhiều ở các nước như Trung Quốc,

Đài Loan, Nhật Bản, Myanmar, Ấn Độ, Việt Nam. Các bộ phận của cây như lá, thân, rễ, quả, hoa, vỏ thân đều có thể sử dụng để làm thuốc. Lá có thể sử dụng tươi và được thu hái quanh năm, rễ có thể được thái lát nhỏ, đem phơi hoặc

sấy khô để dùng dần. Quả chín được thu hoạch và sấy khô. Cho đến nay, có tới 162 hợp chất đã được phân lập và xác định từ cây thuốc này (Wang & cs., 2016; Le & cs., 2018; Chen & cs., 2020). Thêm vào đó, cây dành dành được sử dụng như một chất tạo màu tự nhiên ở nhiều quốc gia, bao gồm Trung Quốc, Nhật Bản, Hàn Quốc, Ấn Độ và Bắc Mỹ (Chen & cs., 2020). Chính vì vậy, cây dành dành không những có giá trị trong chế biến thực phẩm trong các món ăn (Giménez & cs., 2015; Le & cs., 2018) mà còn là một vị thuốc có nhiều công dụng như chứng xuất huyết, vàng da, vàng mắt, viêm gan, lở loét miệng, đau họng, nhức đầu, ù tai, chảy máu mũi... (Chen & cs., 2020).

Trên thế giới, đã có một số nghiên cứu nhân giống *in vitro* cây dành dành (Mosleh & Khetam, 2010; Salim & Hamza, 2017). Mặc dù vậy, cho đến nay vẫn chưa có công bố nào về nhân giống *in vitro* cây được liệu quý này ở nước ta. Một số nghiên cứu được thực hiện trong nước đã xác định được thành phần hóa học và tác dụng dược lý để sử dụng làm thuốc (Trần Trọng Biên & cs., 2017; Phạm Thị Nhật Trinh & cs., 2022) hay sử dụng làm thực phẩm (Nguyễn Thị Thanh Thủy & Nguyễn Thị Hiền, 2016; Le & cs., 2018) hoặc kỹ thuật nhân giống cây dành dành bằng phương pháp giâm hom (Hoang Vu Tho & Hoang Bích Ngọc, 2019). Kỹ thuật nhân giống *in vitro* có thể nhân nhanh với số lượng lớn cây giống đồng đều, sạch bệnh, hệ số nhân giống cao và khắc phục được một số hạn chế của các phương pháp nhân giống bằng hạt.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

Quả và hạt cây dành dành (*Gardenia jasminoides* Ellis) ngay sau khi hái được sử dụng làm vật liệu ban đầu. Chồi và cây *in vitro* sử dụng cho các nghiên cứu giai đoạn nuôi cấy *in vitro*.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Nghiên cứu sử dụng phương pháp nuôi cấy mô tế bào thực vật thông dụng. Các thí nghiệm

đều sử dụng môi trường cơ bản MS (Murashige & Skoog, 1962), 7 g/l agar, pH môi trường là 5,8; 30g đường/l; có hoặc không bổ sung chất điều tiết sinh trưởng như 6-Benzylaminopurine (BA); kinetin; indole butyric acid (IBA). Thể tích môi trường trong mỗi bình nuôi cấy là 40-50ml. Môi trường nuôi cấy được hấp khử trùng ở 121°C trong 20 phút. Mẫu cấy được nuôi trong phòng nuôi có cường độ ánh sáng là 2.500-3.000Lux, thời gian chiếu sáng: 16h sáng/8h tối, độ ẩm phòng nuôi cấy: 60-70%, nhiệt độ phòng nuôi: $25 \pm 2^\circ\text{C}$. Các thí nghiệm nếu có điều chỉnh các nhân tố trên (nồng độ đường, hàm lượng môi trường MS) sẽ được mô tả cụ thể ở từng thí nghiệm.

Các thí nghiệm được thiết kế ngẫu nhiên hoàn toàn (CRD), 3 lần lặp lại, mỗi lần lặp lại tối thiểu 10 mẫu cấy.

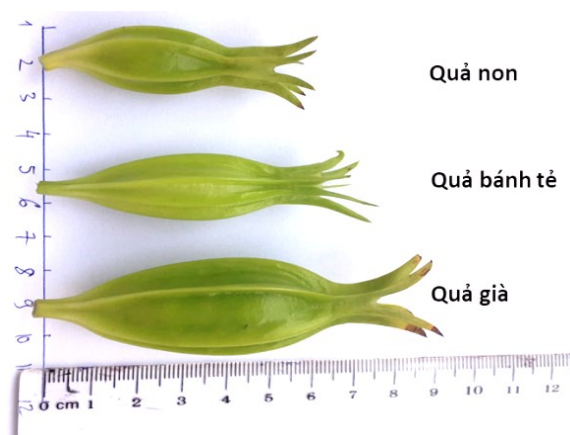
Phương pháp khử trùng quả: Quả dành dành được làm sạch bề mặt bằng nước xà phòng loãng sau đó loại bỏ phần vỏ có vết bệnh màu đen, xám, dập, rửa lại 4-5 lần với nước máy cho đến khi hết sạch xà phòng và được khử trùng bằng Presept 0,5% (Presept là sản phẩm của Johnson & Johnson, có chứa dichloroisocyanurate) trong thời gian 10 phút. Sau khi khử trùng, quả được rửa lại 3 lần bằng nước cất vô trùng. Hạt được tách và gieo lên trên môi trường.

Giai đoạn nhân nhanh: Mẫu cấy là đoạn thân có hai mầm ngủ, có chiều cao từ 0,5-0,7cm được sử dụng làm vật liệu cho nhân nhanh.

Các vi chồi (< 1cm) được cấy vào môi trường có bổ sung đường, nước dừa để xác định nồng độ đường cũng như lượng nước dừa phù hợp cho cây sinh trưởng nhanh, chất lượng chồi tốt.

Giai đoạn tạo cây hoàn chỉnh: chồi dành dành có chiều cao từ 2,5-3,0cm được cấy vào môi trường có bổ sung IBA hoặc có hàm lượng môi trường MS khác nhau để xác định môi trường tạo cây hoàn chỉnh phù hợp nhất.

Phương pháp xử lý số liệu: Các số liệu được xử lý thống kê theo chương trình Microsoft Excel và phần mềm thống kê InfoStat. Số liệu được phân tích phương sai (ANOVA) một nhân tố và phân tích hậu kiểm Fisher's PLSD với mức $P \leq 0,05$.



Hình 1. Trạng thái quả khi tạo nguồn vật liệu ban đầu

Bảng 1. Ảnh hưởng của giai đoạn sinh trưởng của quả tới kết quả tạo nguồn vật liệu ban đầu

Công thức	Giai đoạn sinh trưởng của quả	Tỷ lệ mẫu sạch vi sinh vật (%)	Tỷ lệ mẫu nảy mầm (%)	Chiều cao cây (cm)
CT1	Quả non	100	58,34	0,73
CT2	Quả bánh tẻ	100	92,74	1,02
CT3	Quả già	100	78,32	0,54
P-value			0,39	

Ghi chú: Môi trường nền là MS, 30 g/l sucrose, 7 g/l agar.

Bảng 2. Ảnh hưởng của thời gian khử trùng bằng Pesept tới kết quả tạo nguồn vật liệu ban đầu

Công thức	Thời gian (phút)	Tỷ lệ mẫu sạch (%)	Tỷ lệ mẫu nảy mầm (%)	Chiều cao cây (cm)
1	5	89,45	71,42	0,95
2	10	94,67	90,59	1,04
3	15	98,15	78,69	0,76

Ghi chú: Môi trường nền là MS, 30 g/l sucrose, 7 g/l agar.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Tạo nguồn vật liệu ban đầu

3.1.1. Ảnh hưởng của giai đoạn sinh trưởng của quả tới tạo nguồn vật liệu ban đầu

Một số hạt khi chín lại rơi vào trạng thái ngủ nghỉ dẫn đến khó nảy mầm. Chính vì vậy, việc xác định được giai đoạn sinh trưởng của hạt có ý nghĩa quan trọng. Ở thí nghiệm này, chúng tôi sử dụng quả ở các giai đoạn quả non, quả bánh tẻ và quả già (Hình 1) để tiến hành khử

trùng bề mặt. Kết quả gieo hạt sau 5 tuần được thể hiện ở bảng 1.

Kết quả trên bảng 1 cho thấy giai đoạn sinh trưởng của quả ảnh hưởng rõ rệt tới khả năng nảy mầm của hạt. Quả bánh tẻ cho tỷ lệ mẫu nảy mầm cao nhất và đạt 92,74%. Ở CT1 (quả non), tỷ lệ hạt nảy mầm chỉ đạt 58,34%, chiều cao cây đạt 0,73cm. Trong khi đó hạt thu được từ quả già cho tỷ lệ nảy mầm cao hơn và đạt 78,32% nhưng chiều cao cây lại thấp hơn so với hạt non (đạt 0,54cm). Như vậy quả bánh tẻ là phù hợp cho gieo hạt nhằm tạo nguồn vật liệu ban đầu.

3.1.2. Ảnh hưởng của thời gian khử trùng bằng Presept tới giai đoạn tạo nguồn vật liệu ban đầu

Một số tác nhân thường được sử dụng trong quá trình khử trùng mẫu như Presept, natri hypochloride (NaOCl), hydro peroxide (H₂O₂), thủy ngân clorua (HgCl₂)... Sodium dichloroisocyanurate là hoạt chất khử trùng có trong Presept. Presept có thể được sử dụng ở nồng độ từ 0,5-2,0%, trong thời gian từ 5-90 phút (Mihaljević & cs., 2013; Kendon & cs., 2017; Đinh Trường Sơn & cs., 2021). Hiệu quả khử trùng của hóa chất phụ thuộc vào nồng độ và thời gian xử lý. Thời gian xử lý càng lâu, nồng độ chất khử trùng càng cao thì tỷ lệ mẫu sạch càng cao, tuy nhiên nếu nồng độ cao và thời gian quá lâu có thể làm chết mẫu. Ở thí nghiệm này chúng tôi tiến hành khử trùng quả bánh tẻ bằng Presept với nồng độ là 0,5% ở 3 khoảng thời gian khác nhau là 5, 10 và 15 phút. Kết quả sau 5 tuần theo dõi được thể hiện ở bảng 2.

Kết quả trên bảng 2 cho thấy: Thời gian xử lý mẫu trong dung dịch Presept 0,5% ảnh hưởng tới hiệu quả tạo nguồn vật liệu sạch vi sinh vật. Thời gian khử trùng càng dài (tăng từ 5 phút đến 15 phút) thì tỷ lệ mẫu sạch vi sinh vật càng tăng, tăng từ 89,45% lên 98,15%. Khi xử lý quả trong dung dịch Presept 0,5% ở thời gian 15 phút (CT3) đã cho tỷ lệ mẫu sạch cao nhất (98,15%) tuy nhiên tỷ lệ nảy mầm và chiều cao cây lại thấp hơn so với hai công thức còn lại. Khử trùng quả dành dành ở thời gian 5 phút (CT1) là cho tỷ lệ mẫu sạch thấp nhất. Trong khi đó thời gian khử trùng 10 phút cho tỷ lệ mẫu mẫu sạch là 94,67% và tỷ lệ nảy mầm đạt cao nhất, đạt 90,59%. Như vậy chế độ khử trùng phù hợp là sử dụng dung dịch Presept 0,5% ở thời gian 10 phút cho tỷ lệ mẫu sạch đạt 94,67% và tỷ lệ mẫu nảy mầm cao nhất (90,59%).

Presept là tác nhân đã được sử dụng khá phổ biến để khử trùng mẫu cấy trong nuôi cấy mô. Thời gian khử trùng hạt hoàng cầm với dung dịch Presept nồng độ 0,5% tối ưu là 10 phút (Đinh Trường Sơn & cs., 2021). Như vậy, kết quả nghiên cứu của chúng tôi là tương đồng với kết quả nghiên cứu khử trùng hạt hoàng cầm. Tuy nhiên, đối với hạt cà chua Montavi thì khi khử trùng hạt bằng dung dịch Presept 0,5% với thời

gian khử trùng là 5, 10 hoặc 15 phút đều cho tỷ lệ mẫu sạch vi sinh vật và tỷ lệ nảy mầm đạt rất cao (89,7-93,3%) (Nguyễn Minh Chiến & cs., 2019). Như vậy, rõ ràng hiệu quả khử trùng phụ thuộc vào thời gian, nồng độ chất khử trùng.

3.2. Giai đoạn nhân nhanh

3.2.1. Ảnh hưởng của kinetin tới khả năng nhân nhanh cây dành dành

Các hormone thực vật auxin và cytokinin rất quan trọng đối với quá trình tái sinh thực vật trong nuôi cấy mô. Cytokinin như benzyl adenine (BA) hoặc kinetin tham gia vào quá trình điều hòa phân chia tế bào, hình thành chồi bất định. Bổ sung cytokinins phù hợp sẽ tối ưu quá trình hình thành chồi trong giai đoạn nhân nhanh. Tuy nhiên, nếu lượng BA và kinetin quá nhiều sẽ gây bất lợi tới mẫu cấy (Hill & Schaller, 2013; Mangena, 2020).

Kết quả ở bảng 3 và hình 2 cho thấy: Bổ sung kinetin không ảnh hưởng đến hệ số nhân chồi mà chỉ ảnh hưởng đến chiều cao chồi. Tất cả các công thức đều cho hệ số nhân chồi bằng 2. Như vậy, các chồi tái sinh đều từ hai mầm ngủ của mẫu cấy chứ không phải do tác động của kinetin.

3.2.2. Ảnh hưởng của BA tới khả năng nhân nhanh cây dành dành

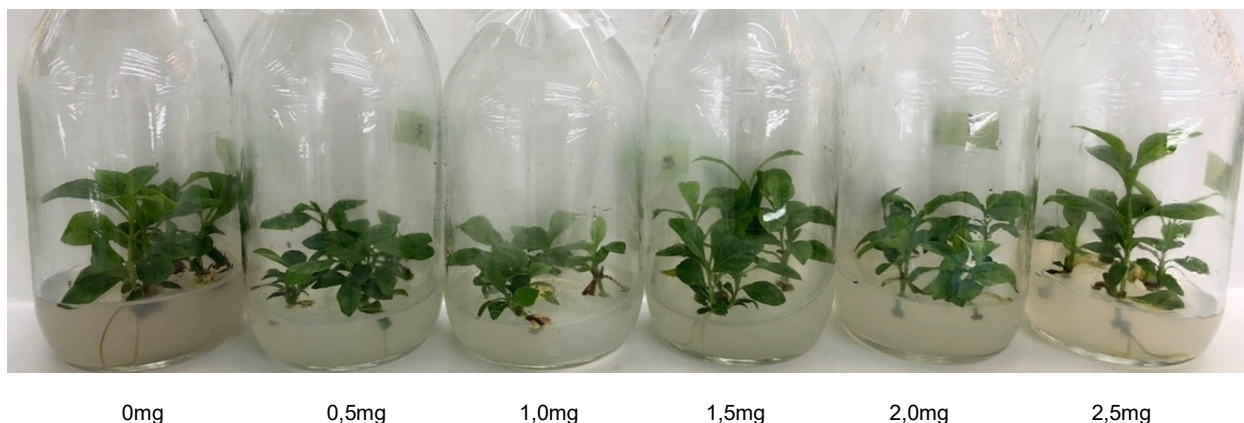
Thí nghiệm được thực hiện trên môi trường MS có bổ sung BA ở các nồng độ khác nhau. Kết quả sau 2 tháng theo dõi được thể hiện ở bảng 4 và hình 3.

Kết quả trên bảng 4 và hình 3 cho thấy: BA có ảnh hưởng lớn đến hệ số nhân chồi và chiều cao chồi ở cây dành dành. Nồng độ BA càng cao thì hệ số nhân chồi càng tăng nhưng chiều cao chồi lại giảm dần, do hình thành các cụm chồi nhỏ. Bổ sung BA nồng độ từ 1,5 mg/l đến 2,5 mg/l BA đều cho hệ số nhân chồi cao nhất, dao động từ 7,29-7,67 chồi/mẫu cấy. Trong khi đó bổ sung BA ở nồng độ 0,5 mg/l lại cho chiều cao chồi là cao nhất (3,82cm). Ở nồng độ này chồi phát triển tốt, chồi to khỏe, thân nhiều đốt. Như vậy dựa trên chỉ tiêu hệ số nhân chồi, môi trường nhân nhanh chồi tốt nhất ở thí nghiệm này là môi trường MS có bổ sung 1,5 mg/l BA, 30 g/l đường, 7 g/l agar, pH = 5,8.

Bảng 3. Ảnh hưởng của kinetin tới khả năng nhân nhanh cây dành dành (sau cấy 2 tháng)

Công thức	Nồng độ kinetin (mg/l)	Hệ số nhân chồi/mẫu (chồi)	Chiều cao chồi (cm)	Quan sát hình thái chồi
CT1	0,0	2,00	1,70 ^a	++
CT2	0,5	2,00	1,50 ^a	+
CT3	1,0	2,00	1,30 ^a	+
CT4	1,5	2,00	1,75 ^a	++
CT5	2,0	2,00	1,75 ^a	++
CT6	2,5	2,00	2,50 ^b	++
P-value			0,006	
LSD (0,05)			0,52	

Ghi chú: Môi trường nền là MS, 30 g/l sucrose, 7 g/l agar. +: Chồi nhỏ, sinh trưởng tốt. ++: Chồi to, sinh trưởng tốt. Trong cùng một chỉ tiêu theo dõi, các giá trị trung bình theo sau bởi cùng một chữ cái là khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở độ tin cậy 95% (LSD, $P = 0,05$).



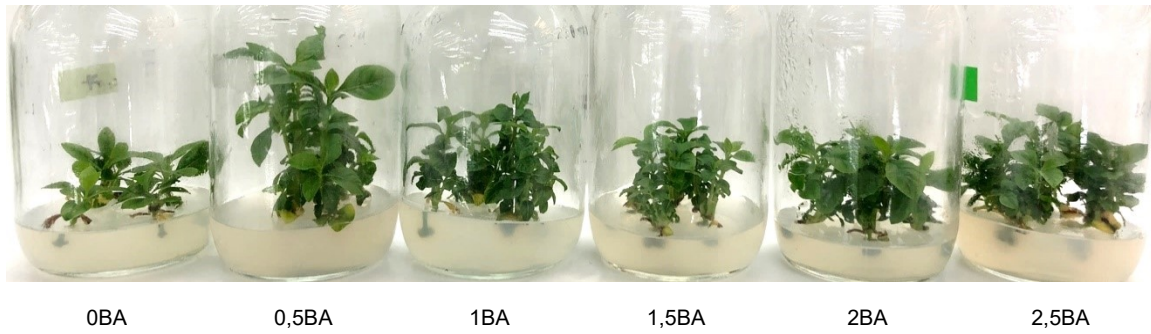
Hình 2. Cây dành dành sau 2 tháng nuôi cấy với các nồng độ kinetin khác nhau

Bảng 4. Ảnh hưởng của BA tới khả năng nhân nhanh cây dành dành (sau cấy 2 tháng)

Công thức	Nồng độ BA (mg/l)	Hệ số nhân chồi (chồi/mẫu)	Chiều cao chồi (cm)	Quan sát hình thái chồi
CT1	0,0	2,00 ^a	1,40 ^a	+
CT2	0,5	3,95 ^{ab}	3,82 ^c	+++
CT3	1,0	4,60 ^b	2,83 ^{bc}	++
CT4	1,5	7,29 ^c	2,48 ^{ab}	++
CT5	2,0	7,60 ^c	2,15 ^{ab}	++
CT6	2,5	7,67 ^c	1,92 ^{ab}	++
P-value		< 0,0001	0,02	
LSD (0,05)		2,12	1,31	

Ghi chú: Môi trường nền là MS, 30 g/l sucrose, 7 g/l agar; +: Chồi chậm phát triển, ít chồi, chồi thấp bé, ++: Chồi phát triển tốt, hình thành nhiều chồi và cụm chồi nhỏ, +++: Chồi phát triển tốt, chồi to khỏe;

Trong cùng một chỉ tiêu theo dõi, các giá trị trung bình theo sau bởi cùng một chữ cái là khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở độ tin cậy 95% (LSD, $P = 0,05$).



Hình 3. Cây dành dành sau 2 tháng nuôi cấy với các nồng độ BA khác nhau

Bảng 5. Ảnh hưởng của nồng độ đường đến khả năng sinh trưởng và phát triển của vi chồi dành dành (sau cấy 2 tháng)

Công thức	Hàm lượng đường (g/l)	Chiều cao chồi (cm)	Số lá (lá)	Số rễ (rễ)	Khối lượng tươi (mg)	Khối lượng khô (mg)	Hình thái
CT1	0	0,86 ^a	6,29 ^a	0 ^a	50,44 ^a	17,59 ^a	+
CT2	10	1,71 ^b	8,71 ^b	0 ^a	81,06 ^b	23,24 ^b	++
CT3	20	1,76 ^b	9,29 ^b	2,19 ^b	154,31 ^c	33,80 ^c	+++
CT4	30	2,24 ^b	9,71 ^b	2,58 ^b	195,44 ^d	40,04 ^d	++++
CT5	40	2,68 ^c	9,29 ^b	2,81 ^b	214,63 ^d	42,60 ^d	++++
<i>P-value</i>		< 0,0001	0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	
LSD (0,05)		0,38	1,37	1,01	29,01	4,39	

Ghi chú: Môi trường nền là MS, 7 g/l agar; (+): Chồi phát triển kém, lá cây bị thối dần, (++) : Chồi phát triển bình thường, (+++) : Chồi phát triển bình thường, có rễ, (++++): Chồi phát triển tốt, lá to, có rễ.

Trong cùng một chỉ tiêu theo dõi, các giá trị trung bình theo sau bởi cùng một chữ cái là khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở độ tin cậy 95% (LSD, $P = 0,05$).



Hình 4. Hình ảnh cây dành dành nuôi cấy ở các lượng đường khác nhau sau 2 tháng theo dõi

Các nghiên cứu vi nhân giống về cây dành dành (*Gardenia jasminoides*) đã được thực hiện trước đó. Mosleh & Khetam (2010) xác định được môi trường MS có bổ sung 5 mg/l BA là cho hệ số nhân chồi cao nhất và đạt 2,2 chồi/mẫu. Như vậy,

kết quả nghiên cứu của chúng tôi khi bổ sung bổ sung BA trong khoảng 1,5-2,5 mg/l đều cho hệ số nhân chồi dao động từ 7,29-7,67 chồi/mẫu cấy, gấp khoảng 3,3 lần so với kết quả của Mosleh & Khetam (2010). Salim & Hamza (2017) xác định

được môi trường cho hệ số nhân chồi cao nhất (3,8 chồi/mẫu) là môi trường MS có bổ sung 3,0 mg/l TDZ, 0,3 mg/l IAA. Như vậy, rõ ràng là có sự khác biệt khá lớn về hệ số nhân chồi cây dành dành *in vitro* ở các công bố.

Từ các kết quả thí nghiệm trên cho thấy: môi trường MS có bổ sung 1,5 mg/l BA, 30 g/l đường, 7 g/l agar, pH = 5,8 là phù hợp cho giai đoạn nhân nhanh và cho hệ số nhân đạt 7,29 chồi/mẫu, chiều cao chồi đạt 2,48cm.

3.3. Giai đoạn tạo cây hoàn chỉnh

3.3.1. Ảnh hưởng của nồng độ đường đến khả năng sinh trưởng và phát triển của các cụm vi chồi

Đường sucrose là một trong những yếu tố kiểm soát sự cảm ứng và tăng trưởng của chồi *in vitro*. Nồng độ đường tối ưu cho sự phát triển của chồi có thể khác nhau giữa các loài và kiểu gen. Nồng độ đường có tác động lớn đến khả năng quang hợp của cây con và ảnh hưởng lớn tới sự thành công của quá trình thích nghi của cây cấy mô giai đoạn vườn ươm (Jo & cs., 2009; Ndagijimana & cs., 2014; Đinh Trường Sơn & cs., 2021). Thí nghiệm này được tiến hành nhằm đánh giá ảnh hưởng của hàm lượng đường tới khả năng sinh trưởng của cụm vi chồi (cao khoảng 0,5-1cm) ở các nồng độ khác nhau để tìm ra hàm lượng đường phù hợp nhất. Kết quả theo dõi sau 2 tháng được thể hiện ở bảng 5 và hình 4.

Kết quả ở bảng 5 và hình 4 cho thấy: Nồng độ đường có ảnh hưởng lớn đến khả năng sinh trưởng và phát triển của các cụm chồi nhỏ ở cây dành dành. Nồng độ đường càng cao thì chiều cao chồi càng tăng. Bổ sung đường với hàm lượng 30-40 g/l cho hầu hết các chỉ tiêu quan sát như chiều cao chồi, khối lượng tươi và khối lượng khô là vượt trội so với các công thức khác.

Đối với cây *Alocasia amazonica*, bổ sung đường sucrose ở nồng độ 3% là tối ưu nhất cho sinh trưởng ở giai đoạn *in vitro* cũng như giai đoạn thích nghi ngoài vườn ươm (Jo & cs., 2009). Như vậy, có thể nói, kết quả nghiên cứu của chúng tôi về ảnh hưởng của nồng độ đường sucrose tới sinh trưởng phát triển của cây dành

dành *in vitro* là tương đồng với công trình nghiên cứu trên cây *A. amazonica*. Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của nồng độ đường tới sinh trưởng của cụm vi chồi cây hoàng cầm *in vitro* cho thấy ở nồng độ đường 40 hoặc 50 g/l đã làm giảm sinh trưởng phát triển và thậm chí gây chết cụm vi chồi. Mặc dù vậy, đối với cụm vi chồi hoàng cầm, bổ sung 20-30 g/l sucrose là nồng độ đường cho cụm vi chồi sinh trưởng phát triển tối ưu (Đinh Trường Sơn & cs., 2021).

3.3.2. Ảnh hưởng của hàm lượng nước dừa đến khả năng sinh trưởng và phát triển của các cụm chồi nhỏ

Trong nuôi cấy mô, nước dừa được sử dụng như một thành phần quan trọng bổ sung đường, vitamin, khoáng chất, axit amin và phytohormone (Yong & cs., 2009). Thí nghiệm này được tiến hành nhằm đánh giá ảnh hưởng của hàm lượng nước dừa tới sự sinh trưởng phát triển của vi chồi dành dành (cao khoảng 0,5-1cm) nhằm tìm ra hàm lượng nước dừa phù hợp nhất. Kết quả theo dõi sau 2 tháng được thể hiện ở bảng 6 và hình 5.

Kết quả ở bảng 6 và hình 5 cho thấy: Hàm lượng nước dừa có ảnh hưởng đến sự sinh trưởng và phát triển của các cụm vi chồi dành dành. Hàm lượng nước dừa càng cao thì chiều cao chồi càng tăng. Bổ sung 150 ml/l nước dừa cho chiều cao chồi, số lá, số rễ, khối lượng tươi và khối lượng khô là cao nhất (chiều cao 3,44cm, 9,75 lá/cây, 2,69 rễ/cây, khối lượng tươi là 430,08mg, khối lượng khô là 68,71mg).

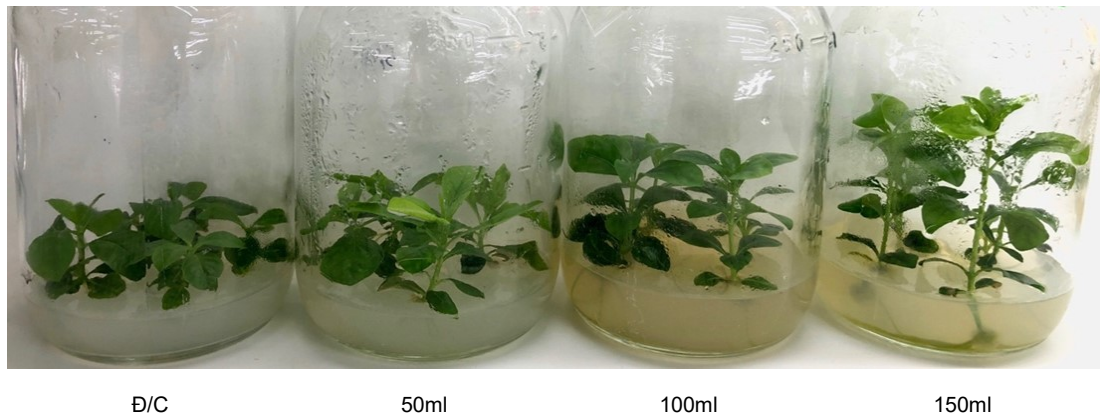
Đối với cây hoàng cầm, việc bổ sung nước dừa đã làm giảm sinh trưởng phát triển và chất lượng chồi Hoàng cầm *in vitro*. Thậm chí khi bổ sung nước dừa với hàm lượng 150-200 ml/lít môi trường có thể gây chết cụm vi chồi hoàng cầm (Đinh Trường Sơn & cs., 2021). Kết quả nghiên cứu nhân giống *in vitro* cây trà hoa vàng cho thấy khi bổ sung nước dừa với hàm lượng tăng dần từ 5-40% đã làm tăng hệ số nhân, chiều cao chồi đồng thời chất lượng chồi cũng được cải thiện hơn (Đặng Quang Bích & cs., 2017). Như vậy, tác động của nước dừa lên sinh trưởng của chồi dành dành và trà hoa vàng là khá tương đồng.

Bảng 6. Ảnh hưởng của hàm lượng nước dừa đến sinh trưởng và phát triển của chồi cây dành dành (sau cấy 2 tháng)

Công thức	Hàm lượng nước dừa (ml/l)	Chiều cao chồi (cm)	Số lá (lá/chồi)	Số rễ (rễ/cây)	Khối lượng tươi (mg/cây)	Khối lượng khô (mg/cây)	Hình thái
CT1	0	1,68 ^a	8,25	1,65	208,51 ^a	39,38 ^a	+
CT2	50	2,11 ^b	8,75	1,91	240,79 ^a	44,78 ^a	+
CT3	100	2,53 ^c	9,00	2,28	256,63 ^a	45,83 ^a	++
CT4	150	3,44 ^d	9,75	2,69	430,08 ^b	68,71 ^b	++
P-value		< 0,0001	0,18	0,20	0,0001	0,0004	
LSD (0,05)		0,41			91,77	12,95	

Ghi chú: Môi trường nền là MS, 30 g/l sucrose, 7 g/l agar; (+): Chồi phát triển bình thường, (++): Chồi phát triển tốt.

Trong cùng một chỉ tiêu theo dõi, các giá trị trung bình theo sau bởi cùng một chữ cái là khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở độ tin cậy 95% (LSD, $P = 0,05$).



Hình 5. Cây dành dành nuôi cấy ở các hàm lượng nước dừa khác nhau (sau cấy 2 tháng)

3.3.3. Ảnh hưởng của hàm lượng môi trường MS đến khả năng tạo rễ dành dành

Môi trường Murashige & Skoog (1962) là môi trường có chứa đầy đủ các loại khoáng đa lượng, vi lượng, vitamins, rất giàu chất dinh dưỡng, được ứng dụng phổ biến trong môi trường nuôi cấy mô tế bào thực vật (Murashige & Skoog, 1962). Kết quả nghiên cứu ở các thí nghiệm trên cho thấy một tỷ lệ không nhỏ chồi dành dành có khả năng ra rễ trên môi trường MS mà không bổ sung chất điều hoà sinh trưởng thuộc nhóm auxin. Tuy nhiên, việc giảm hàm lượng khoáng có thể làm tăng tỷ lệ ra rễ của một số cây trồng trong đó của chồi cây trà hoa vàng *in vitro* (Đặng Quang Bích & cs., 2017). Chính vì vậy, ở thí nghiệm này chúng tôi cũng thực hiện khảo sát ảnh hưởng của các hàm

lượng môi trường MS (giảm tất cả các thành phần có trong môi trường MS) đến khả năng tạo rễ cây dành dành. Kết quả theo dõi sau 2 tháng được thể hiện ở bảng 7 và hình 6.

Kết quả ở bảng 7 và hình 6 cho thấy: việc giảm hàm lượng môi trường MS đã làm tăng tỷ lệ chồi ra rễ nhưng lại không ảnh hưởng hưởng đến chỉ tiêu số rễ/cây và có ảnh hưởng tốt đến chiều cao và số lá của cây dành dành. Chồi cho tỷ lệ ra rễ cao nhất (đạt tỉ lệ 100%), hình thái rễ mập và phát triển tốt khi được nuôi cấy trên môi trường 1/2 MS. Mặc dù vậy, số rễ/cây ở công thức 1/2 MS và 1/4 MS là tương đương nhau (khác nhau không có ý nghĩa thống kê). Như vậy, có thể dùng môi trường 1/2 hoặc 1/4 MS ở giai đoạn tạo cây hoàn chỉnh. Việc giảm hàm lượng môi trường xuống còn 1/2 MS nguyên bản đã cho tỷ lệ ra rễ của chồi trà hoa vàng *in vitro*

đạt 62,5% trong khi đó tỷ lệ này là 0% trên môi trường MS. Khi giảm chỉ còn 1/4 MS nguyên bản, tỷ lệ ra rễ của chồi cây trà hoa vàng *in vitro* đạt 100% (Đặng Quang Bích & cs., 2017).

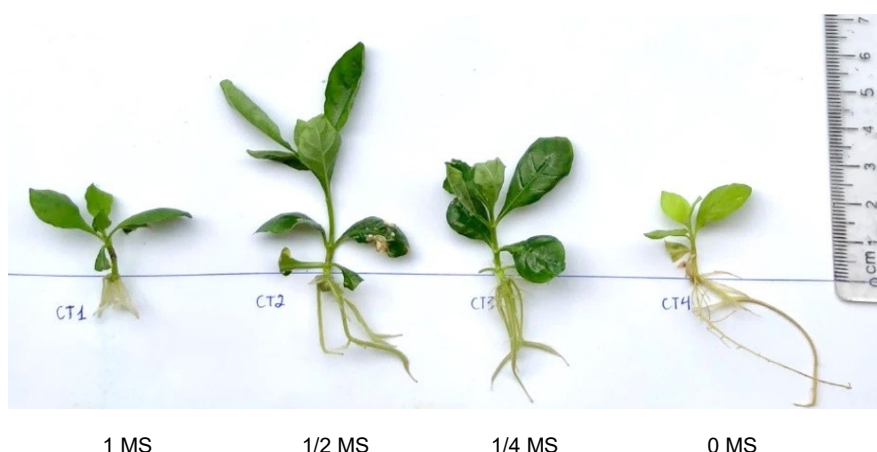
Như vậy, so với chồi trà hoa vàng, chồi dành dành có khả năng ra rễ trên môi trường MS cao hơn nhiều (đạt 75%) và đạt 100% khi giảm hàm lượng môi trường MS còn 1/2 MS.

Bảng 7. Ảnh hưởng của hàm lượng môi trường MS đến khả năng tạo cây dành dành hoàn chỉnh (sau cấy 2 tháng)

Công thức	Hàm lượng môi trường MS	Tỷ lệ ra rễ (%)	Số rễ/cây (rễ)	Chiều cao cây (cm)	Số lá/cây (lá)	Hình thái
CT1	1 MS	75%	2,42	2,25 ab	5,3 b	++
CT2	½ MS	100%	3,36	3,00 c	6,5 bc	++
CT3	¼ MS	95%	3,58	2,75 bc	6,8 c	++
CT4	0 MS	100%	2,04	1,75 a	2,7 a	+
<i>P-value</i>			0,06	0,004	<0,0001	
LSD (0,05)				0,66	1,5	

Ghi chú: Môi trường có bổ sung 30 g/l sucrose, 7 g/l agar; (+): Rễ nhỏ và dài, có nhiều rễ phụ, lá màu vàng nhạt, (++) : Cây có rễ cây mập; lá cây xanh; rễ phát triển tốt.

Trong cùng một chỉ tiêu theo dõi, các giá trị trung bình theo sau bởi cùng một chữ cái là khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở độ tin cậy 95% (LSD, $P = 0,05$).



Hình 6. Hình ảnh cây dành dành sau 2 tháng nuôi cấy ở các hàm lượng môi trường MS khác nhau

Bảng 8. Ảnh hưởng của IBA tới sự hình thành rễ của chồi dành dành (sau cấy 5 tuần)

Công thức	Nồng độ IBA (mg/l)	Tỷ lệ ra rễ (%)	Số rễ TB (rễ/cây)	Chiều dài rễ (cm)	Quan sát hình thái rễ
CT1	0	60	2,12	0,24	+
CT2	0,25	100	4,80	0,58	+
CT3	0,50	100	10,59	1,01	+++
CT4	0,75	100	6,90	1,08	++
<i>P-value</i>			0,37	0,96	

Ghi chú: Môi trường nền là MS, 30 g/l sucrose, 7 g/l agar; (+): Rễ ít, (++) : Rễ phát triển bình thường, (+++) : Rễ mập, phát triển tốt.



Hình 7. Ảnh hưởng của IBA tới sự hình thành rễ của cây dành dành (sau cấy 5 tuần)

3.3.4. Ảnh hưởng của IBA tới sự hình thành rễ của cây dành dành

Indole-3-butyric acid (IBA) là hormone điều hòa sinh trưởng thực vật thuộc nhóm auxin. Đây là auxin có tác động tích cực lên sự hình thành rễ và hay được sử dụng trong giai đoạn tạo cây hoàn chỉnh. Chính vì vậy, ở thí nghiệm này chúng tôi tiến hành nghiên cứu ảnh hưởng của IBA lên sự hình thành rễ. Kết quả theo dõi sau 5 tuần nuôi cấy được thể hiện ở bảng 8.

Từ kết quả trên bảng 8 và hình 7 cho thấy: Nồng độ IBA ảnh hưởng đến khả năng ra rễ của cây dành dành *in vitro*. Số rễ và chiều dài rễ tăng tỷ lệ thuận với nồng độ IBA bổ sung vào môi trường. Khi bổ sung IBA với nồng độ từ 0,25 lên 0,75 mg/l IBA thì số rễ trung bình tăng từ 4,8 lên 10,59 còn chiều dài rễ trung bình lại tăng từ 0,58 lên 1,08cm. Tuy nhiên, rễ trên môi trường có bổ sung 0,5 mg/l IBA có hình thái tốt nhất. Như vậy môi trường MS có bổ sung 0,5 mg/l IBA là môi trường tốt nhất để ra rễ cây dành dành, cho tỷ lệ ra rễ đạt 100% và số rễ lớn nhất (10,59 rễ/cây). Kết quả nghiên cứu của chúng tôi khá tương đồng với kết quả nghiên cứu trên cây thảo quả khi tác giả (Nguyễn Thanh Hải & cs., 2019) cũng kết luận môi trường ra rễ phù hợp cho chồi thảo quả là MS có bổ sung 0,5 mg/l IBA.

Từ hai thí nghiệm trên cho thấy có thể sử dụng môi trường MS, 30 g/l sucrose, có bổ sung 0,5 mg/l IBA hoặc môi trường 1/2 MS cho giai đoạn tạo cây hoàn chỉnh.

4. KẾT LUẬN

Quả dành dành bánh tẻ là phù hợp nhất để lấy hạt tạo nguồn vật liệu ban đầu. Khử trùng quả bằng dung dịch Presept 0,5% trong 10 phút cho hiệu quả khử trùng và sinh trưởng của cây tốt nhất (mẫu sạch là 94,67% và tỷ lệ nảy mầm là 90,59%). Môi trường phù hợp cho nhân nhanh *in vitro* cây dành dành là môi trường MS có bổ sung 1,5 mg/l BA cho hệ số nhân chồi đạt 7,29 chồi/mẫu. Đối với các vi chồi dành dành, sử dụng môi trường MS có bổ sung đường với hàm lượng 30-40 g/l và 150ml nước dừa/lít cho vi chồi sinh trưởng mạnh, chất lượng chồi tốt. Môi trường ra rễ phù hợp cho chồi cây dành dành là môi trường MS bổ sung 0,5 mg/l IBA hoặc môi trường 1/2 MS cho tỷ lệ ra rễ đạt 100%, rễ mập, cây sinh trưởng tốt.

LỜI CẢM ƠN

Tập thể tác giả cảm ơn Trường Đại học Mở Hà Nội đã tài trợ kinh phí cho công trình này (đề tài MHN 2022-02.04).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Chen L., Li M., Yang Z., Tao W., Wang P., Tian X., Li X. & Wang W. (2020). *Gardenia jasminoides* Ellis: Ethnopharmacology, phytochemistry, and pharmacological and industrial applications of an important traditional Chinese medicine, Journal of Ethnopharmacology. 257: 112829.
- Đặng Quang Bích, Nguyễn Thị Phương Thảo, Trần Văn Phú, Đinh Trường Sơn, Ninh Thị Thảo,

- Nguyễn Văn Huân, Trần Văn Lin & Nguyễn Thị Thùy Linh (2017). Quy trình nhân giống *in vitro* cây trà hoa vàng (*Camellia* sp.). Tạp chí Khoa học Nông nghiệp Việt Nam. 15(12): 1664-1678.
- Đinh Trường Sơn, Bùi Huy Hoàng, Nguyễn Hải Ninh, Ninh Thị Phíp, Phạm Ngọc Khánh, Đặng Thị Thanh Tâm, Nguyễn Thị Lâm Hải & Nguyễn Thanh Hải (2021). Nghiên cứu nhân giống *in vitro* cây hoàng cầm (*Scutellaria baicalensis* Georgi.), Tạp chí Khoa học Nông nghiệp Việt Nam. 19(3): 301-310.
- Giménez P.J., Fernández-López J.A., Angosto J.M. & Obón J.M. (2015). Comparative thermal degradation patterns of natural yellow colorants used in foods. Plant Foods for Human Nutrition. 70(4): 380-387.
- Hill K. & Schaller G.E. (2013). Enhancing plant regeneration in tissue culture: a molecular approach through manipulation of cytokinin sensitivity. Plant Signal Behav. 8(10): doi: 10.4161/psb.25709.
- Hoang Vu Tho & Hoang Bich Ngoc (2019). Research on cutting propagation of *Gardenia jasminoides*. Journal of forestry science and technology. 8: 21-30.
- Jo E.A., Tewari R.K., Hahn E.J. & Paek K.Y. (2009). In vitro sucrose concentration affects growth and acclimatization of *Alocasia amazonica* plantlets. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 96(3): 307-315.
- Kendon J.P., Rajaovelona L., Sandford H., Fang R., Bell J. & Sarasan V. (2017). Collecting near mature and immature orchid seeds for *ex situ* conservation: 'in vitro collecting' as a case study. Botanical studies. 58(1): 34-34.
- Le Q.U., Lay H.L., Wu M.C. & Nguyen T.H.H. (2018). Natural plant colorants widely used in Vietnam traditional food culture. Journal of Food, Nutrition and Agriculture. 1(1): 40-46.
- Mangena P. (2020). Benzyl adenine in plant tissue culture-succinct analysis of the overall influence in soybean [*Glycine max* (L.) Merrill.] seed and shoot culture establishment. Journal of Biotech Research. 11: 23-34.
- Mihaljević I., Dugalić K., Tomaš V., Viljevac M., Pranjic A., Čmelik Z., Puškar B. & Jurković Z. (2013). In vitro sterilization procedures for micropropagation of 'Oblačinska' sour cherry. Journal of Agricultural Sciences. 58(2): 117-126.
- Mosleh M.S.D. & Khetam A.R. (2010). Micropropagation of gardenia *Gardenia jasminoides*. Mesopotamia Journal of Agriculture. 37(3): 21-30.
- Murashige T. & Skoog F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum. 15(3): 473-497.
- Ndagijimana, V., Kahia, J., Asimwe, T., Sallah, P. Y., Waweru, B., Mushimiyimana, I., Ndirigwe, J., Kirimi, S., Shumbusha, D., Njenga, P., Kouassi, M., & Koffi, E. (2014). In vitro effects of gibberellic acid and sucrose concentration on micropropagation of two elite sweet potato cultivars in Rwanda. International Journal of Biotechnology and Molecular Biology Research. 5(1):1-6.
- Nguyễn Minh Chiến, Tráng A Chinh & Đinh Trường Sơn (2019). Xây dựng hệ thống tái sinh *in vitro* cho giống cà chua Montavi. Tạp chí Khoa học Công nghệ Nông nghiệp Việt Nam. 7(104): 48-53.
- Nguyễn Thanh Hải, Nguyễn Thị Dinh, Nguyễn Thị Thơm, Nguyễn Thị Ngọc Hân, Nguyễn Thị Lâm Hải, Đinh Trường Sơn, Đặng Thị Thanh Tâm, Nguyễn Thị Thùy Linh & Phạm Thị Thu Hằng (2019). Nghiên cứu nhân giống *in vitro* Thảo quả (*Amomum aromaticum* Roxb.). Tạp chí Khoa học Nông nghiệp Việt Nam. 17(7): 577-587.
- Nguyễn Thị Thanh Thủy & Nguyễn Thị Hiền (2016). Chiết tách và khảo sát độ bền của chất màu crocin từ quả dành dành. Tạp chí Khoa học Nông nghiệp Việt Nam, 14(12): 1978-1985.
- Phạm Thị Nhật Trinh, Hoàng Ngọc Anh, Phan Văn Tân, Tổng Thanh Danh, Trần Nguyễn Minh Ân, Phạm Thị Kim Trâm & Lê Tiến Dũng (2022). Thành phần hóa học và tác dụng kháng viêm của quả dành dành (*Gardenia jasminoides* Ellis). Tạp chí Phát triển Khoa học và Công nghệ - Khoa học Tự nhiên. 6(1): 1819-1826.
- Salim S.a.A. & Hamza S.Y. (2017). An efficient protocol for micro propagation of *Gardenia jasminoides* Ellis, Biosciences, Biotechnology Research Asia. 14(2): 757-766.
- Trần Trọng Biên, Lê Hữu Huy & Nguyễn Văn Hân (2017). Ứng dụng nhựa macroporous D101 trong phân lập geniposid từ quả dành dành (*Gardenia jasminoides* Ellis). Tạp chí Dược học. 57(4): 20-24.
- Wang L., Liu S., Zhang X., Xing J., Liu Z. & Song F. (2016). A strategy for identification and structural characterization of compounds from *Gardenia jasminoides* by integrating macroporous resin column chromatography and liquid chromatography-tandem mass spectrometry combined with ion-mobility spectrometry. Journal of Chromatography A. 1452: 47-57.
- Yong J.W.H., Ge L., Ng Y.F. & Tan S.N. (2009). The chemical composition and biological properties of coconut (*Cocos nucifera* L.) water. Molecules. 14(12): 5144-5164.