

## NGHIÊN CỨU KHẢ NĂNG SINH TRƯỞNG CỦA CÂY HÚNG TÂY (*Thymus vulgaris* L.) DƯỚI TÁC ĐỘNG CỦA MỘT SỐ YẾU TỐ HÓA HỌC VÀ VẬT LÝ CỦA MÔI TRƯỜNG NUÔI CÂY

Nguyễn Thụy Phương Duyên, Hoàng Ngọc Nhung, Nguyễn Thị Quỳnh\*

Viện Sinh học nhiệt đới, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam, (\*)qtnguyen\_vn@yahoo.com

**TÓM TẮT:** Cây húng tây (*Thymus vulgaris* L.) thuộc họ Lamiaceae, được sử dụng nhiều trong chế biến thực phẩm và trong điều trị các bệnh về hệ hô hấp, hệ tiêu hóa, hệ thần kinh do có các hợp chất thứ cấp như thymol và carvarol trong tinh dầu ở lá. Tuy nhiên, sự hình thành và tích lũy tinh dầu của cây húng tây chịu ảnh hưởng nhiều bởi sự thay đổi môi trường và sinh thái. Nghiên cứu này được thực hiện nhằm tìm hiểu các điều kiện thích hợp cho sự tăng trưởng của cây húng tây nuôi cấy *in vitro* trong điều kiện nhiệt độ và ẩm độ tương đối ổn định và được kiểm soát ( $T 24 \pm 2^\circ\text{C}$ ,  $\text{RH } 50 \pm 5\%$ ). Sau 28 ngày nuôi cấy, đốt thân cây *T. vulgaris* mang chồi ngủ tạo chồi nhiều nhất (4,3 chồi/mẫu) trên môi trường MS có bổ sung  $1 \text{ mg L}^{-1}$  BA,  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$  IBA,  $30 \text{ g L}^{-1}$  đường sucrose dưới cường độ ánh sáng  $40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  và thời gian chiếu sáng 12 giờ/ngày. Ở ngày thứ 35, sự tăng trưởng của cây húng tây phát triển từ đốt thân tốt nhất khi được nuôi cấy trong điều kiện quang tự dưỡng (môi trường nuôi cấy không bổ sung đường, vitamin và chất điều hòa sinh trưởng thực vật) dưới cường độ ánh sáng  $95 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , thời gian chiếu sáng 12 giờ/ngày. Môi trường nuôi cấy bao gồm khoáng MS với thành phần đa lượng giảm 1/2, có bổ sung thêm  $200 \text{ mg L}^{-1}$   $\text{KNO}_3$ ,  $200 \text{ mg L}^{-1}$   $\text{KH}_2\text{PO}_4$ .

*Từ khóa:* *Thymus vulgaris* L., chất điều hòa sinh trưởng thực vật, nuôi cấy mô quang tự dưỡng, tinh dầu.

### MỞ ĐẦU

Cây húng tây (*Thymus vulgaris* L.), thuộc họ Lamiaceae, được sử dụng nhiều trong chế biến thực phẩm và trong điều trị các bệnh về hệ hô hấp, hệ tiêu hóa, hệ thần kinh do có chứa các hợp chất thứ cấp như thymol và carvarol trong tinh dầu ở lá. Hiện nay, các sản phẩm bào chế từ cây húng tây được xem như là các sản phẩm tiềm năng trong ngành công nghiệp thực phẩm, dược phẩm và mỹ phẩm. Nhu cầu thị trường đối với cây húng tây khá cao, ước tính vào khoảng 500 tấn/năm tại Hoa Kỳ và 1.000 tấn/năm ở châu Âu [13]. Xu hướng chung của xã hội ngày nay là sử dụng các chất tự nhiên để thay thế cho các hợp chất tổng hợp, vì vậy, nhu cầu sử dụng loài cây này theo dự báo có thể gia tăng [10]. Tuy nhiên, hàm lượng và thành phần tinh dầu của cây húng tây chịu ảnh hưởng bởi các yếu tố sinh thái và giai đoạn phát triển của cá thể. Mặt khác, điều kiện môi trường cũng ảnh hưởng đáng kể đến thời gian thu hoạch và sản lượng nguyên liệu [10]. Ngoài tự nhiên, cây húng tây được trồng từ hạt, tuy nhiên, hạt húng tây dễ mất sức nảy mầm sau một thời gian ngắn, đồng thời hạt húng tây thường được sản xuất bằng phương pháp thụ phấn chéo [13]. Vì vậy, nuôi cấy *in vitro* cây húng tây là yêu cầu cần thiết để

duy trì các dòng ưu việt. Vì nhân giống cây húng tây được biết đến đầu tiên qua công trình của Lê (1989) [5] khi khảo sát thành phần môi trường khoáng lên sự tăng trưởng của cây húng tây *in vitro*. Furmanowa & Olszowska (1992) [3] đã nghiên cứu việc sử dụng chất điều hòa sinh trưởng thực vật và chứng minh IBA thích hợp cho việc tạo chồi *in vitro* của cây húng tây. Sáez et al. (1994) [11] cũng công bố việc sử dụng BA và IAA trong vi nhân giống cây *Thymus piperella*. Cho đến nay, ở Việt Nam chưa có công trình nghiên cứu nào về nuôi cấy *in vitro* cây húng tây. Vì vậy, nghiên cứu này được thực hiện nhằm tìm hiểu các điều kiện thích hợp cho sự tăng trưởng của cây húng tây trong điều kiện nhiệt độ và ẩm độ tương đối của phòng nuôi cấy được kiểm soát để làm tiền đề cho việc xây dựng quy trình sản xuất cây húng tây *in vitro* cho ngành dược liệu.

### PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Các thí nghiệm trên cây húng tây (*Thymus vulgaris* L.) đều được tiến hành trong điều kiện nhiệt độ  $24 \pm 2^\circ\text{C}$  và ẩm độ tương đối  $50 \pm 5\%$ . Các cây húng tây dùng trong 2 thí nghiệm mô tả ở dưới có nguồn gốc từ hạt và trước đó đã được nuôi cấy *in vitro* trên môi trường MS

(Murashige & Skoog, 1962) [7], bổ sung vitamin Morel [6], 10 g L<sup>-1</sup> đường sucrose (Công ty Đường Biên Hòa), 7,5 g L<sup>-1</sup> agar (Công ty Cổ phần Đồ hộp Hạ Long) dưới cường độ ánh sáng 40 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, thời gian chiếu sáng 12 giờ/ngày.

### Ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng thực vật (CĐHSTTV) lên sự tạo chồi của cây húng tây

Vật liệu nuôi cấy là các đốt thân của cây húng tây *in vitro* ở vị trí thứ 2 hoặc thứ 3 (tính từ chồi ngọn), được loại bỏ 2 lá mở mọc đối xứng và nuôi cấy trong bình có thể tích 130 ml. Môi trường nuôi cấy được sử dụng là môi trường khoáng MS, vitamin Morel, 30 g L<sup>-1</sup> đường sucrose, giá thể được sử dụng là 7,3 g L<sup>-1</sup> agar. pH được điều chỉnh 5,8 trước khi khử trùng. Mỗi bình chứa 20 ml môi trường. Thí nghiệm này gồm 2 yếu tố, yếu tố thứ nhất là cytokinin (BA) với 2 mức nồng độ (1 hoặc 2 mg L<sup>-1</sup>), yếu tố thứ hai là auxin với 5 mức (0; 0,5; 1 mg L<sup>-1</sup> IBA hay 0,2; 0,5 mg L<sup>-1</sup> NAA). Mỗi công thức gồm 10 mẫu cây và được lặp lại 3 lần. Các bình nuôi cấy được đặt dưới cường độ ánh sáng 40 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, thời gian chiếu sáng 12 giờ/ngày trong 28 ngày.

### Ảnh hưởng của nồng độ đường và cường độ ánh sáng lên sự tăng trưởng của cây húng tây *in vitro*

Vật liệu nuôi cấy là các đốt thân cây húng tây *in vitro* ở vị trí thứ 2 hoặc thứ 3 tính từ ngọn mang 2 lá mở mọc đối xứng, trọng lượng tươi trung bình 8,8 mg/đốt và trọng lượng khô trung bình 1 mg/đốt. Các đốt thân được nuôi cấy trong hộp Magenta GA-7 (công ty Sigma, Hoa Kỳ) với nắp không có hoặc có đục 2 lỗ (φ = 1 cm) giúp trao đổi khí, nắp có lỗ được dán màng Millipore (φ = 0,45 μm, công ty Nihon Millipore Ltd., Nhật Bản). Môi trường được sử dụng là môi trường khoáng MS với thành phần đa lượng giảm 1/2, bổ sung 200 mg L<sup>-1</sup> KNO<sub>3</sub> và 200 mg L<sup>-1</sup> KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. pH của môi trường được điều chỉnh đến 5,8 trước khi khử trùng. Giá thể sử dụng là 7,5 mg L<sup>-1</sup> agar. Thí nghiệm gồm 2 yếu tố, yếu tố thứ nhất là phương pháp nuôi cấy với 2 mức độ là phương pháp nuôi cấy quang dị dưỡng (QDD) với môi trường có bổ sung 20 g L<sup>-1</sup> đường sucrose và vitamin Morel,

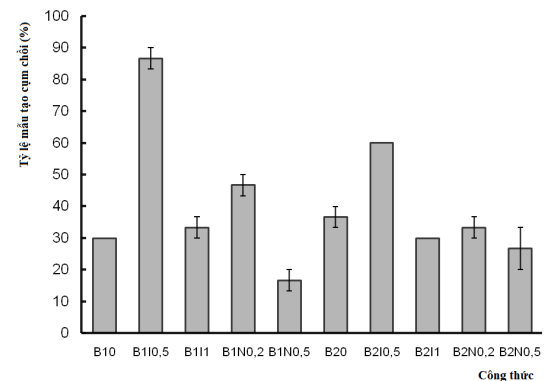
hoặc phương pháp nuôi cấy quang tự dưỡng (QTD) với môi trường không bổ sung đường và vitamin; yếu tố thứ hai là cường độ ánh sáng (CĐAS) với 3 mức độ 70, 95 hay 120 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>. Toàn bộ thí nghiệm được chiếu sáng 12 giờ/ngày trong 35 ngày. Thí nghiệm có 6 công thức, mỗi công thức gồm 4 hộp, mỗi hộp mang 4 đốt thân. Mỗi công thức được lặp lại 3 lần.

Các chỉ tiêu tăng trưởng của cây được phân tích thống kê bằng phần mềm MSTATC phiên bản 2.10 của Đại học bang Michigan, Hoa Kỳ và vẽ đồ thị bằng phần mềm Excel 2007. Ở mỗi thí nghiệm, sau khi phân tích ANOVA 2 yếu tố, nếu sự khác biệt giữa các công thức có ý nghĩa ở mức p ≤ 0,05 hay 0,01 thì sẽ tiếp tục được phân hạng theo Duncan's Multiple Range Test [2].

## KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### Ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng thực vật lên sự tạo chồi của cây húng tây

Sau 3 ngày nuôi cấy, chồi đã bắt đầu hình thành ở tất cả các công thức. Sự kết hợp CĐHSTTV ở các nồng độ khác nhau đã tác động rõ rệt lên sự tạo chồi. Ở ngày thứ 28, công thức B<sub>1</sub>I<sub>0,5</sub> (0,1 mg L<sup>-1</sup> BA và 0,5 mg L<sup>-1</sup> IBA) có tỷ lệ mẫu cây tạo cụm chồi cao nhất (87%), ngược lại công thức B<sub>1</sub>N<sub>0,5</sub> (1 mg L<sup>-1</sup> BA và 0,5 mg L<sup>-1</sup> NAA) cho tỷ lệ mẫu cây tạo cụm chồi thấp nhất (17%) (hình 1).



Hình 1. Ảnh hưởng của nồng độ BA và nồng độ auxin lên sự tạo cụm chồi từ đốt cắt thân nuôi cấy *in vitro* ở ngày thứ 28

Số chồi/mẫu, chiều cao cụm chồi, số lá

mở/mẫu đều đạt cao nhất khi đốt thân được nuôi cấy trên môi trường bổ sung 1 mg L<sup>-1</sup> BA và 0,5 mg L<sup>-1</sup> IBA. Ngược lại, khi môi trường nuôi cấy bổ sung nồng độ 1 mg L<sup>-1</sup> BA và 0,5 mg L<sup>-1</sup> NAA thì các chỉ tiêu đo được đều thấp nhất (bảng 1).

*Bảng 1.* Ảnh hưởng của BA và auxin lên sự tạo cụm chồi từ đốt cắt thân cây húng tây nuôi cấy *in vitro* ở ngày thứ 28

Công thức thí nghiệm			Số chồi/mẫu	Chiều cao cụm chồi (mm)	Số lá mở/mẫu
Tên <sup>z</sup>	Nồng độ BA (mg L <sup>-1</sup> )	Nồng độ auxin (mg L <sup>-1</sup> )			
B <sub>1</sub> 0	1	0	2,37 d <sup>x</sup>	11,57 g	12,23 e
B <sub>1</sub> I <sub>0,5</sub>	1	0,5 IBA	4,27 a	23,83 a	25,30 a
B <sub>1</sub> I <sub>1</sub>	1	1 IBA	2,07 e	13,20 f	10,90 f
B <sub>1</sub> N <sub>0,2</sub>	1	0,2 NAA	2,53 c	17,50 b	16,13 c
B <sub>1</sub> N <sub>0,5</sub>	1	0,5 NAA	1,50 g	9,50 h	7,80 i
B <sub>2</sub> 0	2	0	2,53 c	15,27 d	16,30 c
B <sub>2</sub> I <sub>0,5</sub>	2	0,5 IBA	2,73 b	15,30 d	17,67 b
B <sub>2</sub> I <sub>1</sub>	2	1 IBA	2,13 e	16,97 c	13,80 d
B <sub>2</sub> N <sub>0,2</sub>	2	0,2 NAA	1,80 f	13,17 f	10,47 g
B <sub>2</sub> N <sub>0,5</sub>	2	0,5 NAA	1,70 f	13,87 e	9,33 h
ANOVA <sup>y</sup>					
Nồng độ BA (A)			**	**	**
Nồng độ auxin (B)			**	**	**
A x B			**	**	**
CV (%)			2,79	0,52	0,77

<sup>z</sup>B tượng trưng cho BA, 0 tượng trưng không có auxin, I tượng trưng cho IBA, N tượng trưng cho NAA, các số bên cạnh tượng trưng cho các mức nồng độ; <sup>y</sup>\*\*\*: khác biệt có ý nghĩa ở p ≤ 0,01; <sup>x</sup>Các trị số có chữ cái giống nhau trên cùng một cột không có sự khác biệt theo phân hạng Duncan's Multiple Range Test.

BA phối hợp với auxin ngoại sinh ở nồng độ thấp (0,5 mg L<sup>-1</sup> IBA hay 0,2 mg L<sup>-1</sup> NAA) đã giúp hình thành nhiều chồi hơn so với khi không có auxin (bảng 1). Điều này cho thấy, IBA hay NAA hiện diện ở nồng độ thấp đã có thể kích thích các tế bào mô phân sinh ở chồi ngủ phân chia nhanh và mạnh mẽ hơn. Tuy nhiên, khi tăng nồng độ IBA từ 0,5 lên 1 mg L<sup>-1</sup> hay NAA từ 0,2 lên 0,5 mg L<sup>-1</sup> số chồi hình thành đã giảm. Kết quả này cũng tương tự với kết quả của Furmanowa & Olszowska (1992) [3]. Skoog & Miller (1955) [12] cho rằng, khi thêm cytokinin ngoại sinh vào môi trường nuôi cấy sẽ làm thay đổi gradient CĐHSTTV nội sinh bên trong mẫu, đồng thời thiết lập một gradient chất điều hòa sinh trưởng mới. Trong trường hợp của cây húng tây ở thí nghiệm này, sự thay đổi gradient đã giúp phá vỡ trạng thái ngủ của chồi bên và kích thích sự hình thành chồi mới. Tác giả Bùi Trang Việt (2000) [1] lại

cho rằng, auxin và cytokinin có tác động tương tác với nhau lên quá trình phát sinh hình thái ở thực vật nuôi cấy *in vitro*. Khi tỷ lệ auxin/cytokinin nghiêng về cytokinin thường kích thích sự tạo chồi, trong khi tỷ lệ auxin/cytokinin nghiêng về auxin, sự phát triển của các phác thể chồi sẽ bị ức chế. Ngoài ra, mỗi loại CĐHSTTV còn ảnh hưởng khác nhau lên sự phát sinh hình thái [1]. Trong thí nghiệm này, IBA có ảnh hưởng nhiều hơn NAA lên sự gia tăng số chồi. Điều này có thể giải thích là do tỷ lệ NAA/BA sử dụng trong thí nghiệm chưa phải là tối ưu để kích thích sự tạo chồi ở cây húng tây. Kết quả này cũng tương tự với kết quả của Furmanowa & Olszowska (1992) [3] khi chứng minh IBA thích hợp hơn so với NAA trong việc tạo chồi *in vitro* cây húng tây (*Thymus vulgaris* L.) từ đốt thân. Số chồi cao nhất đạt được khi kết hợp 0,3 hay 0,5 mg L<sup>-1</sup> IBA với 0,1 mg L<sup>-1</sup> Kin. Sáez et al. (1994) [11]

đã tiến hành nhân chồi cây *Thymus piperella* và cho thấy BA cũng có khả năng kích thích mầm cây tạo cụm chồi. Khi tăng dần nồng độ BA (từ 0 lên 1,5 mg L<sup>-1</sup>), số lượng chồi lớn hơn 5 mm cũng tăng, nhưng khi tăng nồng độ BA lên tới 2 mg L<sup>-1</sup> thì số lượng chồi lớn hơn 5 mm giảm dần. Mặt khác, BA kết hợp với IAA cũng đã cho kết quả tốt hơn so với sự kết hợp giữa BA và NAA trong việc kích thích tạo cụm chồi cây *Thymus piperella* [11]. Ở công thức B<sub>1</sub>I<sub>0,5</sub> trong thí nghiệm này, sự kết hợp giữa BA (1 mg L<sup>-1</sup>) và IBA (0,5 mg L<sup>-1</sup>) đã giúp cho tế bào phân chia mạnh mẽ dẫn đến số chồi ở công thức này nhiều nhất, chiều cao cụm chồi và số lá mở cũng lớn nhất (bảng 1).

**Ảnh hưởng của nồng độ đường và cường độ ánh sáng lên sự tăng trưởng của cây húng tây *in vitro***

Sự có mặt của đường, vitamin ở các mức CĐAS khác nhau đã ảnh hưởng rõ rệt lên sự tăng trưởng của cây húng tây trong giai đoạn *in vitro* (bảng 2, hình 2). Khi nuôi cấy ở cùng mức CĐAS, trên môi trường không đường, không

vitamin, sự gia tăng trọng lượng tươi và gia tăng trọng lượng khô của cây húng tây cao hơn so với khi nuôi cấy trên môi trường có bổ sung 20 g L<sup>-1</sup> đường sucrose và vitamin Morel. Sau 35 ngày nuôi cấy, gia tăng trọng lượng tươi (119,3 mg/cây), gia tăng trọng lượng khô (14,1 mg/cây) lớn nhất ở công thức nuôi cấy quang tự dưỡng (không đường, không vitamin) dưới CĐAS 95 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> (bảng 2). Chiều cao cây húng tây nuôi cấy trên môi trường có đường và vitamin hay không có đường và vitamin đều gia tăng khi CĐAS tăng từ 70 lên 95 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>. Tuy nhiên, dưới CĐAS 120 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> chiều cao cây giảm xuống đáng kể. Chiều cao cây thấp nhất (22,1 mm/cây) ở công thức QDD120 (nuôi cấy trên môi trường có đường và vitamin dưới CĐAS 120 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) (bảng 2). Cây húng tây ở công thức QTD95 (nuôi cấy trên môi trường không đường và vitamin dưới CĐAS 95 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) có chiều cao cây lớn nhất (79,5 mm/cây) dù sự tương tác giữa hai yếu tố của thí nghiệm không có ý nghĩa về phương diện thống kê (bảng 2).

*Bảng 2.* Gia tăng trọng lượng tươi, gia tăng trọng lượng khô, chiều cao cây, chiều dài rễ, số đốt của cây húng tây (*Thymus vulgaris* L.) nuôi cấy dưới các điều kiện nồng độ đường và cường độ ánh sáng khác nhau ở ngày thứ 35

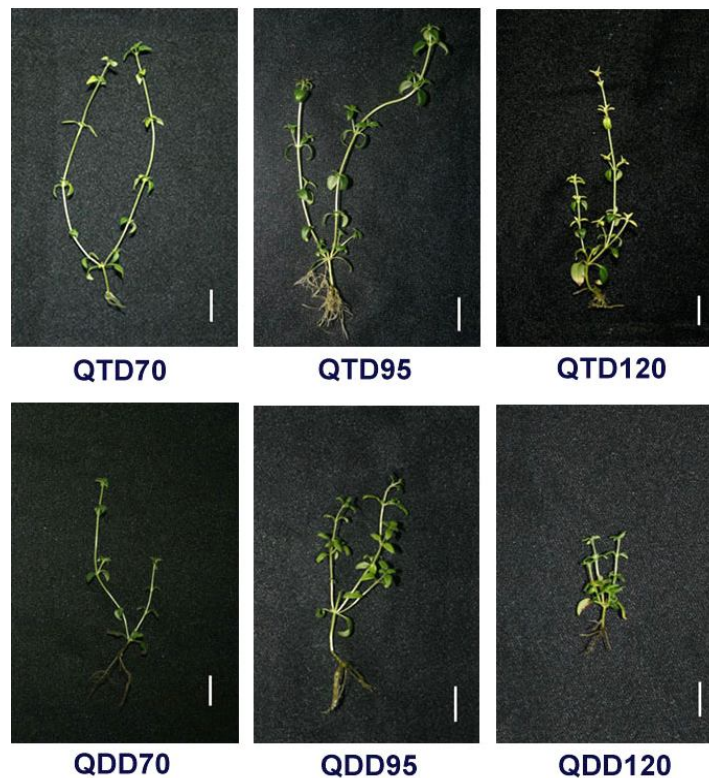
Công thức thí nghiệm			Gia tăng trọng lượng tươi (mg/cây)	Gia tăng trọng lượng khô (mg/cây)	Chiều cao cây (mm/cây)	Chiều dài rễ (mm/cây)	Số đốt/cây
Tên <sup>z</sup>	Nồng độ đường (g L <sup>-1</sup> )	CĐAS (μmol m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup> )					
QTD70	0	70	72,2 b <sup>x</sup>	9,07 b	56,2	8,1 bc	12,04
QTD95	0	95	119,3 a	14,1 a	79,5	13,0 a	17,59
QTD120	0	120	60,2 c	10,3 b	43,6	9,5 b	8,77
QDD70	20	70	42,2 d	5,9 c	30,8	10,2 b	8
QDD95	20	95	63,6 bc	6,4 c	52,9	14,4 a	13,61
QDD120	20	120	33,2 d	5,2 c	22,1	6,7 c	6,4
ANOVA <sup>y</sup>							
Nồng độ đường (A)			**	**	**	NS	**
CĐAS (B)			**	**	**	**	**
A x B			**	**	NS	**	NS
CV (%)			6,9	6,24	7,69	8,81	5,7

<sup>z</sup> QTD biểu thị cho môi trường nuôi cấy không đường và vitamin; QDD biểu thị cho môi trường có bổ sung đường và vitamin; các số 70, 95, 120 biểu thị cho các mức cường độ ánh sáng; <sup>y</sup> NS, \*\*: không khác biệt, khác biệt có ý nghĩa ở mức p ≤ 0,01; <sup>x</sup> Các trị số có chữ cái giống nhau trên cùng một cột thì không có sự khác biệt theo phân hạng Duncan's Multiple Range Test.

Rễ của cây húng tây nuôi cấy *in vitro* dài nhất dưới CĐAS 95  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  ở cả 2 công thức QDD95 (14,4 mm/cây) hay QTD95 (13 mm/cây) vào ngày thứ 35 (bảng 2). Tuy nồng độ đường (0 hay 20  $\text{g L}^{-1}$ ) không tạo sự khác biệt có ý nghĩa về chiều dài rễ ở các công thức, nhưng CĐAS có ảnh hưởng rõ rệt dẫn đến sự rất khác biệt về mật thống kê giữa các công thức ở mức  $p \leq 0,01$  (bảng 2). Chiều dài rễ gia tăng khi CĐAS tăng từ 70 lên 95  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  và giảm khi cây được nuôi cấy dưới cường độ ánh sáng 120  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  ở cả công thức nuôi cấy QTD hay QDD (bảng 2). Số đốt thân của cây húng tây giữa các công thức không khác biệt về thống kê khi dựa trên sự tương tác giữa hai yếu tố thí nghiệm, tuy nhiên ở từng yếu tố, phương pháp nuôi cấy hay CĐAS, sự khác biệt giữa các công thức rất rõ rệt với số đốt thân ở công thức QTD95 rất lớn (17,59 đốt/cây) so với các

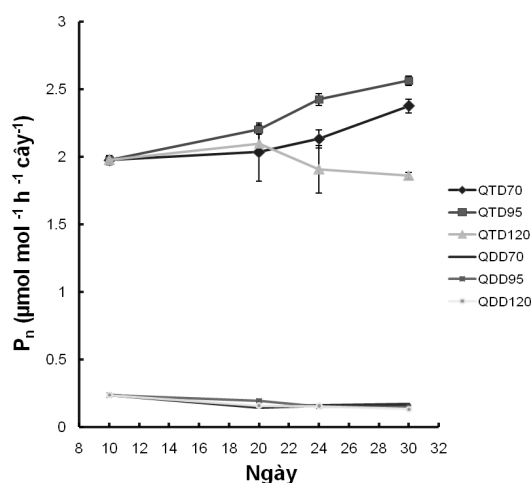
công thức còn lại (bảng 2).

Hiệu suất quang hợp thuần,  $P_n$ , của cây nuôi cấy trong cả ba công thức QDD rất thấp ( $\leq 0,2 \mu\text{mol mol}^{-1} \text{h}^{-1} \text{cây}^{-1}$ ) và giảm dần theo thời gian nuôi cấy. Trong khi đó từ ngày thứ 10 đến ngày thứ 20, hiệu suất quang hợp thuần của cây húng tây nuôi cấy QTD tăng dần theo thời gian nuôi cấy ở cả 3 công thức có CĐAS 70, 95 hay 120  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (hình 3). Ở ngày thứ 30, các cây nuôi cấy QTD trong hộp Magenta có 2 màng trao đổi khí ở cường độ ánh sáng 95  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  có hiệu suất quang hợp thuần lớn nhất (2,6  $\mu\text{mol mol}^{-1} \text{h}^{-1} \text{cây}^{-1}$ ), kể đến là  $P_n$  của cây tăng trưởng dưới CĐAS 70  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (2,4  $\mu\text{mol mol}^{-1} \text{h}^{-1} \text{cây}^{-1}$ ). Trong khi đó, hiệu suất quang hợp thuần của cây húng tây ở công thức QTD120 giảm dần từ ngày thứ 20 (2,1  $\mu\text{mol mol}^{-1} \text{h}^{-1} \text{cây}^{-1}$ ) đến ngày thứ 30 (1,9  $\mu\text{mol mol}^{-1} \text{h}^{-1} \text{cây}^{-1}$ ) của thí nghiệm (hình 3).



Hình 2. Cây húng tây (*Thymus vulgaris* L.) nuôi cấy ở các điều kiện nồng độ đường và cường độ ánh sáng khác nhau vào ngày thứ 35 (thước đo 1 cm)

QTD. Quang tự dưỡng (môi trường không đường, không vitamin); QDD. Quang dị dưỡng (môi trường có bổ sung đường và vitamin); các số 70, 95, 120 biểu thị cho mức CĐAS ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ).



Hình 3. Ảnh hưởng của nồng độ đường và cường độ ánh sáng lên hiệu suất quang hợp thuần ( $P_n$ ) của cây húng tây theo thời gian nuôi cấy

Cây húng tây nuôi cấy trong điều kiện nuôi cấy quang tự dưỡng (môi trường không đường, không vitamin) có sự tăng trưởng tốt hơn so với cây nuôi cấy quang dị dưỡng (môi trường có đường, có vitamin). Khả năng quang hợp của cây nuôi cấy quang dị dưỡng kém vì nồng độ  $CO_2$  trong hộp nuôi cấy kín ở giai đoạn chiếu sáng luôn luôn thấp (số lần trao đổi khí của hộp Magenta kín không lỗ là 0,2 lần/giờ), nên lượng  $CO_2$  cần thiết cho cây quang hợp không đủ. Mặt khác, nồng độ đường cao trong môi trường làm cho lục lạp phát triển không bình thường [16], hoạt động của enzyme RubisCO trong môi trường có nồng độ đường cao bị giới hạn dẫn đến hiệu suất quang hợp thuần thấp [4]. Hơn nữa, độ ẩm tương đối trong hộp nuôi cấy QDD cao tới mức bão hòa do hộp kín làm cho cây húng tây thoát hơi nước chậm dẫn đến tốc độ hấp thu nước và khoáng chất từ môi trường giảm sút, vì vậy cây nuôi cấy QDD tăng trưởng kém. Trong khi đó, cây nuôi cấy QTD có khả năng quang hợp tốt hơn do nhận được khí  $CO_2$  qua màng Millipore gắn trên nắp của bình nuôi cấy (số lần trao đổi khí của hộp Magenta 2 lỗ là 3,96 lần/giờ), với enzyme RubisCO hoạt động bình thường nên có sự tăng trưởng tốt hơn so với cây nuôi cấy QDD. Hiệu suất quang hợp thuần của cây húng tây nuôi cấy ở 3 công thức QDD rất thấp (thay đổi trong khoảng từ 0,13-0,23  $\mu\text{mol mol}^{-1} \text{h}^{-1} \text{cây}^{-1}$ ) và giảm dần theo thời

gian nuôi cấy (hình 3). Điều này cho thấy khả năng quang hợp của cây húng tây nuôi cấy trên môi trường có đường và vitamin đã không được phát huy. Để tăng trưởng, cây phải sử dụng nguồn đường có trong môi trường bằng cơ chế thẩm thấu qua vết cắt ở đốt thân. Trong khi đó hiệu suất quang hợp thuần của cây húng tây ở công thức QTD70 và QTD95 với 2 màng trao đổi khí tăng dần theo thời gian, từ 2  $\mu\text{mol mol}^{-1} \text{h}^{-1} \text{cây}^{-1}$  ở ngày thứ 10, sau đó tăng lên 2,4 (QTD70) hay 2,6 (QTD95)  $\mu\text{mol mol}^{-1} \text{h}^{-1} \text{cây}^{-1}$  ở ngày thứ 30. Vì nguồn carbon vô cơ là nguồn cơ chất duy nhất trong nuôi cấy quang tự dưỡng nên sự gia tăng hiệu suất quang hợp thuần của cây nuôi cấy QTD phản ánh khả năng tổng hợp chất hữu cơ từ nguồn carbon vô cơ trong không khí của cây húng tây rất hiệu quả.

Trong thí nghiệm này, CDAS được tăng dần theo thời gian nuôi cấy. Ở hai công thức QTD120 và QDD120, CDAS được nâng lên mức 120  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  vào ngày nuôi cấy thứ 17. Sau khi tăng CDAS lên 120  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  được 3 ngày thì hiệu suất quang hợp thuần giảm dần kể từ ngày nuôi cấy thứ 20. Theo Taiz & Zeiger (2002) [14], ánh sáng ảnh hưởng rất lớn đến quang hợp, năng lượng ánh sáng được tiếp nhận bởi cơ quan quang hợp (lá) của cây và thông qua quá trình cố định  $CO_2$  được chuyển thành năng lượng vật chất hữu cơ cho cây sử dụng. Tùy vào bản chất của thực vật và nồng độ  $CO_2$

trong không khí mà mỗi cây có mức cường độ ánh sáng giúp cây đạt quang hợp tối đa gọi là điểm bão hòa ánh sáng (light saturated point - LSP). Khi cường độ ánh sáng tăng vượt mức LSP trong lúc lượng CO<sub>2</sub> cung cấp cho thực vật không đổi sẽ làm cho bộ máy quang hợp bị phá hủy và hệ thống enzyme bị mất hoạt tính do sự dư thừa năng lượng ánh sáng [14]. Theo Vũ Văn Vụ (2009) [15], khi cây quang hợp bình thường sẽ không xảy ra quá trình quang oxid hóa. Nhưng điều kiện thừa năng lượng ánh sáng sẽ tạo nên tình trạng thừa phân tử chlorophyll bị kích thích và vì thực vật không dùng hết năng lượng vào quá trình đồng hóa CO<sub>2</sub>, nên năng lượng thừa sẽ được dùng vào phản ứng quang oxy hóa dẫn đến sự suy giảm hoạt động quang hợp và có thể đi đến ngừng hẳn. Như vậy, ở thí nghiệm này, CĐAS được tăng từ 95  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  lên 120  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  trong khi lượng CO<sub>2</sub> cung cấp cho cây húng tây qua 2 màng millipore không tăng có thể đã dẫn đến tình trạng thừa năng lượng ánh sáng ở cây và làm hư hỏng bộ máy quang hợp khiến các lá cây hóa vàng và sự tăng trưởng của cây húng tây bị chậm lại. Đồng thời ở CĐAS cao, môi trường bị bốc hơi nhanh dẫn đến việc hấp thu nước của cây bị cản trở, vì vậy, tỷ lệ chất khô cao ở 2 công thức nuôi cấy dưới cường độ ánh sáng cao.

Dựa trên sự gia tăng trọng lượng tươi và trọng lượng khô của cả cây, cây húng tây nuôi cấy QTD tăng trưởng tốt hơn so với cây nuôi cấy theo phương pháp truyền thống (nuôi cấy QDD). Kết quả này cũng tương tự với kết quả của Nguyễn Trí Minh & Nguyễn Thị Quỳnh (2008) [9] khi nuôi cấy cây dâu tây (*Fragaria ananassa* Duch.). Cây dâu tây nuôi cấy QTD (môi trường không bổ sung đường và vitamin với số lần trao đổi khí là 2,3 lần/giờ) đã tăng trưởng tốt hơn so với cây dâu tây nuôi cấy QDD (môi trường có 30 g L<sup>-1</sup> đường sucrose và vitamin MS, với số lần trao đổi khí 0,3 lần/giờ).

Khi CĐAS tăng lên 120  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  chiều cao cây húng tây giảm ở cả công thức nuôi cấy QDD lẫn nuôi cấy QTD (bảng 2). Nguyen & Kozai (2005) [8] cũng cho thấy khi nuôi cấy quang tự dưỡng cây Neem (*Azadirachta indica*), chiều cao cây Neem nhỏ nhất khi nuôi cấy dưới cường độ ánh sáng tăng đến 230  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ . Ngược lại, khi nuôi cấy cây Neem dưới cường

độ ánh sáng 70  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  thì chiều cao cây đạt lớn nhất.

## KẾT LUẬN

Khi nuôi cấy cây húng tây (*Thymus vulgaris*) trong điều kiện nhiệt độ  $24 \pm 2^\circ\text{C}$ , ẩm độ tương đối  $50 \pm 5\%$ , sự hình thành chồi và tăng trưởng của cây húng tây *in vitro* đã chịu ảnh hưởng bởi các yếu tố hóa học lẫn vật lý. Nồng độ và loại CĐHSTTV ảnh hưởng rõ rệt lên sự tạo cụm chồi ở cây húng tây *in vitro*. Đốt thân cây húng tây nuôi cấy trên môi trường khoáng cơ bản MS có bổ sung 30 g L<sup>-1</sup> đường sucrose, 1 mg L<sup>-1</sup> BA, 0,5 mg L<sup>-1</sup> IBA đã tạo nhiều chồi nhất. Cây húng tây hoàn toàn có thể phát triển trong điều kiện nuôi cấy QTD (môi trường không bổ sung đường và vitamin) và tăng trưởng tốt nhất dưới CĐAS 95  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ .

**Lời cảm ơn:** Nghiên cứu nhận được hỗ trợ trang thiết bị của Phòng Thí nghiệm Trọng điểm phía Nam về Công nghệ Tế bào Thực vật và kỹ thuật của cô Trịnh Thị Thanh Vân.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bùi Trang Việt, 2002. Sinh lý thực vật đại cương, Phần II: Phát triển. Nxb. Đại học quốc gia tp. Hồ Chí Minh, 78-121.
2. Duncan D. B., 1955. Multiple range and multiple F test. Biometrics, 11: 1-42.
3. Furmanowa M. and Olszowska O., 1992. Micropropagation of Thyme (*Thymus vulgaris* L.). In Bajaj Y. P. S. (ed.) Biotechnology in Agriculture and Forestry. Springer-Verlay, Berlin Heideberg, 19: 230-243.
4. Hdider C. and Dejardins Y., 1994. Effects of sugar on photosynthesis and phosphoenolpyruvate carboxylase activity of *in vitro* cultured strawberry plantlets. Plant Cell Tiss. Org. Cult., 36: 27-33.
5. Lê C. L., 1989. Microbouturage *in vitro* du thym (*Thymus vulgaris* L.). Revue suisse Vitic. Arboric. Hortic., 21: 355-358.
6. Morel G. and Wetmore R. H., 1951. Fern tissue culture. Am. J. Bot., 38: 141-143.

7. Murashige T. and Skoog E., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissues. *Physiol. Plant*, 15: 473-497.
8. Nguyen T. Q. and Kozai T., 2005. Photoautotrophic micropropagation of woody species. In Kozai T., Afreen F. and Zobayed S. M. A., eds. Photoautotrophic (sugar-free medium) micropropagation as new micropropagation and transplant production system. Springer, Dordrecht, The Netherlands, 123-146.
9. Nguyễn Trí Minh và Nguyễn Thị Quỳnh, 2008. Ảnh hưởng của đường, sự trao đổi khí và giá thể lên sự sinh trưởng của cây dâu tây con (*Fragaria ananassa* Duch.) *in vitro* và tỷ lệ sống của cây dâu tây con *ex vitro*. *Tạp chí Sinh học*, 30(2): 45-49.
10. Ozgen M. and Tansi S., 1996. Drug yield and essential oil of *Thymus vulgaris* L. as influenced by ecological and ontogenetical variation. *Trop. J. Agric. For.*, 22: 537-542.
11. Sáez F., Sánchez P. and Piqueras A., 1994. Micropagation of *Thymus piperella*. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 39: 269-272.
12. Skoog F., Miller C. O., Okumura F. S., Vo Saltza M. H. and Strong F. M., 1955. Structure and synthesis of Kinetin. *J. Am. Chem. Soc.*, 77: 2662-2665.
13. Stahl-Biskup E. and Sáez F., 2002. Thyme - The genus *Thymus*. Taylor & Francis, London, UK, 330.
14. Taiz L. and Zeiger E., 2002. Photosynthesis: Physiological and Ecological Considerations. *Physiol. Plant*, 3<sup>rd</sup> edition. Sinauer Associates, Sunderland, England, 171-190.
15. Vũ Văn Vụ, 2009. Sinh lý học thực vật. NXB Giáo Dục Việt Nam, 139-147.
16. Wetzstein H. I. and Sommer H. E., 1982. Leaf anatomy of tissue cultured *Liquidambar styraciflua* (Hamamelidaceae) during acclimatization. *Am. J. Bot.*, 69: 1579-1586.

## A STUDY ON GROWTH ABILITY OF *Thymus vulgaris* L. UNDER IMPACT OF CHEMICAL AND PHYSICAL FACTORS OF CULTURE MEDIUM

Nguyen Thuy Phuong Duyen, Hoang Ngoc Nhung, Nguyen Thi Quynh

Institute of Tropical Biology, VAST

### SUMMARY

Thyme plants (*Thymus vulgaris* L.) belonging to the family Lamiaceae have been used as ingredients in food processing and drugs in treating respiratory, gastrointestinal or nervous disorders, thanks to the secondary metabolites, such as thymol and carvacrol, existing in its leafy essential oils. However, the formation and accumulation of thyme oils are mostly affected by the variation of environmental and ecological systems. This study aimed to find appropriate conditions for the *in vitro* growth of thyme plants under stable and controlled temperature ( $T 24 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ) and relative humidity ( $\text{RH } 50 \pm 5\%$ ).

On day 28, the number of shoots was the largest (4.3 shoots/explants) when nodal explants containing dormant buds were cultured on the MS medium supplemented with  $1 \text{ mg L}^{-1}$  BA,  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$  IBA and  $30 \text{ g L}^{-1}$  sucrose under PPF of  $40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  and photoperiod of  $12 \text{ h d}^{-1}$ . When cultured photoautotrophically (on sugar-free medium), *in vitro* thyme plants derived from nodal cuttings grew significantly on MS salt medium having macro-elements 1/2 and supplemented with  $200 \text{ mg L}^{-1}$   $\text{KNO}_3$  and  $200 \text{ mg L}^{-1}$   $\text{KH}_2\text{PO}_4$  under the PPF of  $95 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  and photoperiod of  $12 \text{ h d}^{-1}$  on day 35.

*Key words:* *Thymus vulgaris* L., essential oil, plant growth substance, photoautotrophic culture.

Ngày nhận bài: 21-6-2012