

ẢNH HƯỞNG CỦA CHẤT ĐIỀU HOÀ SINH TRƯỞNG THỰC VẬT ĐẾN QUÁ TRÌNH NHÂN GIỐNG *IN VITRO* CÂY BA KÍCH (*Morinda officinalis* How.)

Trịnh Thị Hương^{1*}, Nguyễn Ngọc Hoàng Vân², Trần Trọng Tuấn³

¹Trường Đại học Công nghiệp Thực phẩm TP.HCM

²Trường Đại học Khoa học Tự nhiên - ĐHQG-HCM

³Viện Sinh học Nhiệt đới, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

*Email: huongtt@hufi.edu.vn

Ngày nhận bài: 12/8/2022; Ngày chấp nhận đăng: 31/10/2022

TÓM TẮT

Trong nghiên cứu này, ảnh hưởng của một số chất điều hoà sinh trưởng thực vật đến quá trình vi nhân giống cây ba kích (*Morinda officinalis* How.) từ đoạn đốt thân của cây *in vitro* được thực hiện. Kết quả thu được cho thấy, môi trường Murashige và Skoog (MS) bổ sung 1,5 mg/L benzyladenine (BA) kết hợp với 0,25 mg/L kinetin (KIN) là môi trường thích hợp cho quá trình nhân nhanh chồi, với số lượng chồi mới tạo thành 4,1 chồi/đốt thân sau 4 tuần nuôi cấy. Đối với giai đoạn ra rễ, việc bổ sung indole-3-butyric acid (IBA) vào môi trường nuôi cấy thích hợp hơn so với naphthaleneacetic acid (NAA). Các chồi nuôi cấy trên môi trường bổ sung NAA có sự hình thành mô sẹo ở phần gốc. Ở nồng độ IBA 0,5 mg/L, tỷ lệ mẫu ra rễ, số rễ/mẫu và chiều cao cây trung bình đạt được cao nhất, tương ứng là 100%, 6,2 rễ/mẫu và 5,8 cm sau 6 tuần nuôi cấy. Các cây con sinh trưởng tốt ở điều kiện vườn ươm, với tỷ lệ sống sót là 93,3% sau 4 tuần trồng. Các kết quả đạt được của nghiên cứu này góp phần xây dựng một quy trình vi nhân giống cây ba kích ổn định, có thể cung cấp nguồn cây giống cho thị trường cây dược liệu ở Việt Nam cũng như ứng dụng vào bảo tồn nguồn gen của loài cây dược liệu quý này.

Từ khoá: Auxin, cây ba kích, chất điều hoà sinh trưởng thực vật, cytokinin, vi nhân giống.

1. MỞ ĐẦU

Ba kích (*Morinda officinalis* How.) là một loài dược liệu quý. Trong rễ cây ba kích có chứa các hợp chất thứ cấp có tác dụng dược lý như: anthraquinones, phenolics, iridoid glucoside, các sterol, các khoáng chất (như K, Na, Mg, Fe, Cu, Zn), tinh bột, đường, acid hữu cơ, vitamin A và C, ... [1, 2]. Hiện nay, do nhu cầu sử dụng dược liệu nói chung và ba kích nói riêng ngày càng tăng mạnh, nên trữ lượng quần thể ba kích trong điều kiện tự nhiên đã giảm đi rõ rệt. Mặt khác, vùng phân bố của ba kích bị giảm khiến cho tính đa dạng nguồn gen của loài này đang bị suy giảm. Do đó, việc phát triển nuôi trồng cây ba kích đang trở thành một nhu cầu cấp thiết và ngày càng được quan tâm. Ba kích có thể được nhân giống bằng hạt hoặc giâm hom. Tuy nhiên, các phương pháp nhân giống này cho hệ số nhân giống thấp, chất lượng cây giống không cao, không hiệu quả đối với sản xuất thương mại [3, 4] nên việc mở rộng mô hình trồng gặp nhiều khó khăn do không chủ động được nguồn giống. Vi nhân giống đã được chứng minh là một kỹ thuật mạnh mẽ với tiềm năng to lớn không chỉ để nhân giống vô tính nhanh các loài thực vật mà còn bảo tồn các loài quý hiếm có nguy cơ tuyệt chủng [5, 6]. Kỹ thuật này cho phép sản xuất cây giống hàng loạt và nhanh chóng các loài thực vật quý hiếm, có giá trị kinh tế và làm thuốc. Do đó, việc phát triển quy trình vi nhân giống cây ba kích có

thể giảm bớt áp lực khai thác quá mức từ tự nhiên và giúp sử dụng bền vững loài cây này. Một số nghiên cứu về nhân giống vô tính các loài thuộc chi *Morinda* đã được báo cáo như *M. coreia* [7, 8], *M. officinalis* How. [9-12]; *M. citrifolia* [13-15]. Tuy nhiên, sự khác biệt về kiểu gen, nguồn mẫu, độ tuổi, nguồn gốc phân bố của mỗi loài khác nhau cũng có ảnh hưởng khác nhau đến quá trình nhân giống vô tính của chúng. Do vậy, nghiên cứu này được tiến hành nhằm xây dựng một quy trình nhân giống *in vitro* cây ba kích hiệu quả và ổn định, góp phần bảo tồn và cung cấp liên tục nguồn giống cho các vùng trồng dược liệu trong nước.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Vật liệu

Nghiên cứu sử dụng nguồn mẫu thực vật ban đầu là chồi nuôi cấy *in vitro* trong môi trường MS [16]. Chồi sau đó được cắt thành các đoạn đốt thân riêng lẻ và một đoạn chồi ngọn. Đoạn đốt thân được cắt bỏ hết lá, có kích thước 1,5 cm, mỗi đoạn đốt thân mang 1 mắt ngủ. Đoạn chồi ngọn được cắt với kích thước 3,0 cm, mỗi đoạn chồi có mang 3 cặp lá.

2.2. Môi trường và điều kiện nuôi cấy

Môi trường cơ bản sử dụng trong nghiên cứu là môi trường MS có bổ sung 30 g/L sucrose, 8,0 g/L agar, pH 5,8 trước khi hấp khử trùng ở nhiệt độ 121 °C, trong 15 phút. Tùy thuộc vào mục đích của mỗi thí nghiệm mà các chất điều hòa sinh trưởng thực vật khác nhau như 6-benzyladenine (BA), kinetin (KIN), naphthaleneacetic acid (NAA), indole-3-butyric acid (IBA) được bổ sung vào môi trường nuôi cấy ở các nồng độ khác nhau.

Thí nghiệm được đặt trong phòng nuôi có các điều kiện được thiết lập như sau: Thời gian chiếu sáng 12 giờ/ngày, nhiệt độ: 23 ± 2 °C, độ ẩm trung bình: 30-40%, cường độ chiếu sáng: 2.500 - 3.000 lux.

2.3. Bố trí thí nghiệm

Ảnh hưởng của BA lên khả năng nhân nhanh chồi từ đốt thân

Mẫu đốt thân được cấy vào chai thủy tinh thể tích 100 mL có chứa 20 mL môi trường MS bổ sung BA ở các nồng độ khác nhau: 0,5 - 3,0 mg/L. Đối chứng là môi trường không bổ sung BA.

Ảnh hưởng của KIN lên khả năng nhân nhanh chồi từ đốt thân

Mẫu đốt thân được cấy vào chai thủy tinh thể tích 100 mL có chứa 20 mL môi trường MS bổ sung BA (với nồng độ thích hợp thu nhận được ở thí nghiệm trên) kết hợp với KIN ở các nồng độ khác nhau: 0,25 - 1,0 mg/L. Đối chứng là môi trường không bổ sung KIN.

Ảnh hưởng của auxin (NAA, IBA) đến khả năng ra rễ của chồi

Mẫu chồi ngọn được cấy vào chai thủy tinh thể tích 250 mL có chứa 40 mL môi trường MS có bổ sung NAA hoặc IBA ở các nồng độ khác nhau: 0,25 - 1,0 mg/L. Đối chứng là môi trường không bổ sung auxin.

Sau 6 tuần nuôi cấy, các cây con tạo thành ở các nghiệm thức sẽ được đưa ra trồng ở vườn ươm. Tỷ lệ sống sót (%) của cây con được theo dõi và ghi nhận sau 4 tuần.

Quy trình đưa cây con ra vườn ươm:

(1) Các bình chứa cây con sau 6 tuần nuôi cấy ở điều kiện *in vitro* sẽ được chuyển ra khỏi phòng nuôi cấy và đặt ở vườn ươm trong 4-5 ngày để cây con thích nghi dần với điều kiện nhiệt độ, ánh sáng của vườn ươm.

(2) Nắp bình chứa cây con được mở và để trong 1 ngày để giảm độ ẩm trong bình, giúp cây con quen dần với độ ẩm của vườn ươm.

(3) Cây con được lấy ra khỏi các bình nuôi và rửa bằng nước để loại bỏ agar còn dính trên bề mặt rễ và ngâm với dung dịch thuốc tím 4 ppm trong 3-5 phút. Tiếp theo, cây được trồng vào chậu nhựa chứa giá thể là đất sạch. Cuối cùng, các chậu cây được đặt ở giàn có trang bị lưới che màu đen và tưới nước bằng hệ thống phun sương.

2.4. Chỉ tiêu theo dõi và xử lý thống kê

Chỉ tiêu theo dõi:

Đối với các thí nghiệm nhân nhanh chồi: Số chồi/mẫu, chiều cao chồi (cm); khối lượng tươi của chồi (g).

Đối với thí nghiệm ra rễ: Tỷ lệ mẫu ra rễ (%), số rễ/mẫu, chiều cao cây (cm).

Đối với giai đoạn đưa cây ra vườn ươm: tỷ lệ sống sót của cây con (%).

Xử lý thống kê:

Ở tất cả các thí nghiệm, mỗi chai môi trường được cấy 3 mẫu, mỗi thí nghiệm thực hiện 5 chai, mỗi thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Các chỉ tiêu theo dõi được ghi nhận sau 4 hoặc 6 tuần nuôi cấy. Số liệu thô sau đó được xử lý bằng phần mềm Statgraphics Centurion XV theo phân hạng LSD với độ tin cậy 95%.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Ảnh hưởng của BA lên khả năng nhân nhanh chồi từ đoạn đốt thân

Cytokinin đã được chứng minh là có vai trò quan trọng trong việc phân chia tế bào, kéo dài tế bào và tạo chồi. Trong vi nhân giống thực vật, BA là cytokinin được sử dụng phổ biến ở giai đoạn tạo chồi và nhân nhanh chồi [17]. Một số lý do cho tính ưu việt của BA có thể là do nó được chuyển hóa dễ dàng hơn so với các chất điều hòa sinh trưởng thực vật tổng hợp khác trong mô thực vật, hoặc khả năng của BA có thể tạo ra các hormone tự nhiên như zeatin trong mô thực vật [18]. Ngoài cytokinin thì loại mẫu nuôi cấy cũng có tác động mạnh đến hệ số nhân nhanh chồi trong vi nhân giống. Sử dụng mẫu đốt thân để làm vật liệu cho tạo chồi và nhân nhanh chồi đã được thực hiện ở nhiều loài thực vật [19-21]. Theo Faisal và cộng sự, tỷ lệ nhân chồi có thể được tăng cường đáng kể bằng cách thực hiện nuôi cấy mẫu đốt thân trong môi trường dinh dưỡng có chứa chất điều hòa sinh trưởng thực vật thích hợp [22]. Các chồi sinh ra từ các đoạn thân nhiều hơn các chồi từ các ngọn chồi [4]. Điều này là do các đoạn chồi đỉnh phát huy ưu thế ngọn làm ức chế sự phát triển của chồi bên [23]. Ngoài ra, việc sử dụng đốt thân thay vì chồi đỉnh để nhân nhanh chồi cũng tiết kiệm được nguồn vật liệu mẫu ban đầu, bởi vì từ một đoạn chồi nuôi cấy *in vitro* ban đầu có thể cắt thành nhiều đoạn đốt thân, trong khi mẫu chồi đỉnh thì chỉ thu được một mẫu. Trong nghiên cứu này, nhóm tác giả cắt mỗi chồi của cây ba kích thành 3-4 đoạn đốt thân và nuôi cấy trên môi trường có bổ sung BA để nhân nhanh chồi. Do vậy, hệ số nhân giống khi sử dụng mẫu đốt thân cũng được gia tăng gấp 3-4 lần so với việc sử dụng mẫu chồi ngọn. Kết quả thu được sau 4 tuần nuôi cấy cho thấy, tỷ lệ mẫu đốt thân tạo chồi đạt đều 100% ở tất cả các thí nghiệm thức. Trong đó, số chồi thu được ở các thí nghiệm thức có bổ sung BA đều cao hơn so với thí nghiệm thức đối chứng. Deng và cộng sự đã thử nghiệm các cytokinin khác nhau (BA, KIN, thidiazuron (TDZ)) trong nuôi cấy tăng sinh chồi từ mẫu đốt thân và chồi ngọn của *M. officinalis*, thì kết quả cho thấy BA là hiệu quả nhất. Trên môi trường đối chứng, chỉ thu được tỷ lệ mẫu tạo chồi là 86,11%, và số chồi đạt được là 1,8 chồi/mẫu. Việc bổ sung 1,0 mg/L BA đã thúc đẩy đáng kể sự hình thành chồi, với tỷ lệ mẫu tạo chồi đạt được là 96,7% [4]. Trong nghiên cứu của He và cộng sự, tỷ lệ đoạn

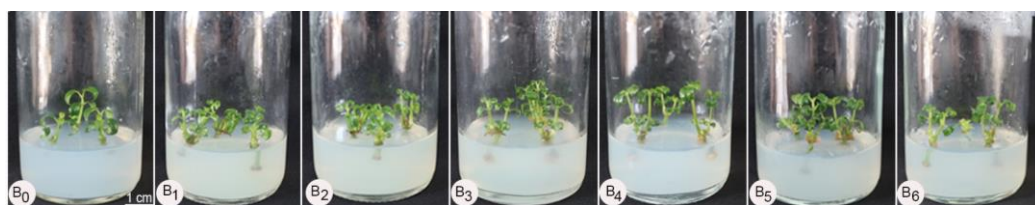
thân ba kích tạo chồi cao nhất (97,5%) đạt được trên môi trường MT (Murashige và Tucker) chứa 1,0 mg/L BA và tỷ lệ này giảm dần khi nồng độ BA tăng lên [9]. Khác với các nghiên cứu này, tỷ lệ mẫu tạo chồi và số chồi/mẫu đạt được trong thí nghiệm của chúng tôi cao hơn, tương ứng là 100% và 2,8 chồi/mẫu ở nồng độ 1,5 mg/L BA; và số chồi giảm dần khi tiếp tục gia tăng nồng độ BA lên 2,0 - 3,0 mg/L (Bảng 1). Như vậy, bổ sung cytokinin thúc đẩy sự tạo thành chồi ba kích, nhưng sự gia tăng nồng độ cytokinin vượt qua ngưỡng tối ưu, thì sự phát triển của chồi lại càng bị ức chế. Quan sát tương tự cũng được ghi nhận ở một số nghiên cứu khác [4, 24, 25].

Trong thí nghiệm này, ở nghiệm thức đối chứng vẫn ghi nhận có sự tạo thành chồi (1,83 chồi/mẫu). Nguyên nhân là do bản thân trong mẫu đốt thân có chứa hàm lượng cytokinin nội sinh, nên khi được loại bỏ ưu thế chồi ngọn do mẫu đốt thân đã được cắt tách khỏi chồi đỉnh, thì cytokinin nội sinh tích lũy trong đốt thân kích thích phá vỡ trạng thái ngủ của chồi nách, dẫn tới hình thành các chồi bên. Khối lượng tươi của cụm chồi thu được cao nhất ở nghiệm thức môi trường bổ sung 1,0 - 1,5 mg/L BA, và chiều cao chồi đạt cao nhất ở các nghiệm thức môi trường bổ sung 1,5 - 2,5 mg/L BA (Bảng 1, Hình 1). Do vậy, nồng độ BA thích hợp để nhân nhanh chồi từ mẫu đốt thân ba kích là 1,5 mg/L, với các chỉ tiêu theo dõi như: tỷ lệ mẫu tạo chồi, số chồi, trọng lượng tươi cụm chồi và chiều cao chồi đạt được ở nghiệm thức này lần lượt tương ứng là 100%; 2,8 chồi/mẫu; 0,24 g/cụm chồi và 1,95 cm sau 4 tuần nuôi cấy. So sánh với kết quả của một số nghiên cứu đã công bố trước đây cho thấy các chỉ tiêu như tỷ lệ mẫu tạo chồi (96,7 - 97,5%), số chồi/mẫu (2,43 chồi) và chiều cao chồi (0,59 cm) [4, 9] đều thấp hơn so với nghiên cứu của chúng tôi. Đặc biệt là chỉ tiêu chiều cao chồi thu được ở nghiên cứu của chúng tôi cao gấp khoảng 3 lần. Sự phát triển về chiều cao chồi sẽ mang tới ưu thế về số lượng mẫu đốt thân thu được, vì giúp gia tăng số lượng mẫu dùng làm nguồn vật liệu cho nhân nhanh chồi, từ đó gia tăng hệ số nhân giống. Như vậy có thể thấy kết quả nhân nhanh chồi ba kích đạt được ở nghiên cứu này đã được cải thiện hơn so với một số nghiên cứu trước đây.

Bảng 1. Ảnh hưởng của BA lên khả năng nhân nhanh chồi từ đoạn đốt thân cây ba kích sau 4 tuần nuôi cấy

Nồng độ BA (mg/L)	Số chồi/mẫu	Khối lượng tươi của cụm chồi (g)	Chiều cao chồi (cm)
0	1,8 ^d	0,13 ^e	1,74 ^{c*}
0,5	2,2 ^{cd}	0,16 ^{cd}	1,69 ^c
1,0	2,4 ^{bc}	0,22 ^a	1,72 ^c
1,5	2,8^a	0,24^a	1,95^{ab}
2,0	2,7 ^{ab}	0,19 ^b	2,05 ^a
2,5	2,3 ^{bc}	0,17 ^{bc}	1,97 ^{ab}
3,0	2,2 ^c	0,14 ^{de}	1,82 ^{bc}

a,b,c,d*: Các chữ cái khác nhau trong cùng một cột biểu diễn mức độ khác biệt có ý nghĩa theo LSD ở độ tin cậy 95%.



Hình 1. Ảnh hưởng của BA đến khả năng nhân nhanh chồi từ mẫu đốt thân sau 4 tuần nuôi cấy. B1-6: môi trường có bổ sung BA tương ứng các nồng độ: 0,5 - 3,0 mg/L. B0: đối chứng.

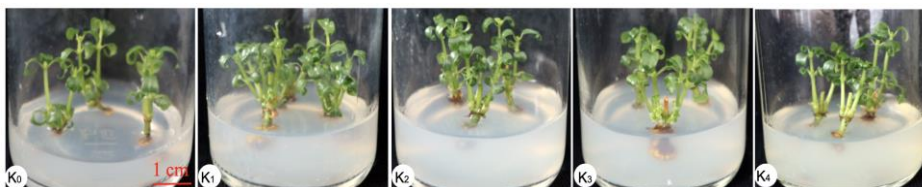
3.2. Ảnh hưởng của KIN đến khả năng nhân nhanh chồi từ đoạn đốt thân

KIN thuộc nhóm cytokinin, được bổ sung vào môi trường chủ yếu để kích thích sự phân chia tế bào và phân hóa chồi bất định, tăng cường khả năng tổng hợp chất diệp lục của cây [26]. Võ Châu Tuấn và Huỳnh Minh Tư đã sử dụng môi trường bổ sung 0,25 mg/L KIN để tái sinh chồi ba kích, tuy nhiên tác giả không đề cập đến tỷ lệ mẫu tạo chồi [12]. Trong nghiên cứu này, bổ sung BA với nồng độ 1,5 mg/L (nồng độ thích hợp nhất thu được từ kết quả của thí nghiệm 3.1) kết hợp với KIN ở các nồng độ khác nhau được sử dụng để khảo sát sự nhân nhanh chồi cây ba kích từ mẫu đốt thân. Kết quả thu được sau 4 tuần cho thấy, tỷ lệ mẫu đốt thân tái sinh chồi đều đạt 100%, và không có sự khác biệt thống kê về chiều cao chồi giữa tất cả các nghiệm thức. Tuy nhiên, số chồi/mẫu và khối lượng tươi của cụm chồi có sự khác biệt nhau giữa các nghiệm thức. Số chồi/mẫu và khối lượng tươi của mẫu thu được cao nhất tại nghiệm thức môi trường nuôi cấy bổ sung 0,25 mg/L KIN + 1,5 mg/L BA, tương ứng là 4,1 chồi/mẫu và 0,3 g sau 4 tuần nuôi cấy (Bảng 2, Hình 2). Do đó, môi trường thích hợp để nhân nhanh chồi cây ba kích từ mẫu đốt thân là môi trường MS bổ sung 1,5 mg/L BA kết hợp 0,25 mg/L KIN. Tương tự với kết quả của chúng tôi, Hoàng Thị Thế và cộng sự cũng báo cáo rằng, môi trường MS bổ sung 0,25 mg/L KIN + 1,0 mg/L BA thích hợp cho khả năng tái sinh chồi từ đoạn thân ba kích. Tuy nhiên, tỷ lệ mẫu tạo chồi thu được ở nghiên cứu của nhóm tác giả này đạt chỉ 96,6% với chồi/mẫu là 2,65 chồi sau 30 ngày nuôi cấy [11], thấp hơn kết quả đạt được ở nghiên cứu của chúng tôi. Việc kết hợp BA với KIN trong môi trường nuôi cấy nhân nhanh chồi từ mẫu đốt thân cũng đã được báo cáo trên loài *M. citrifolia* L. [13, 15]. Các kết quả ghi nhận được cũng có sự khác biệt về số chồi/mẫu thu được giữa các nghiên cứu. Tối đa 5 chồi được tạo thành từ mẫu đốt thân của *M. citrifolia* L. trên môi trường bổ sung BA và KIN [13], trong khi ở nghiên cứu khác có số chồi/mẫu đạt 10,6 chồi [15]. Ngoài ra, một số nghiên cứu khác cũng đã nghiên cứu ảnh hưởng của sự kết hợp cytokinin và auxin đến khả năng tạo chồi của ba kích [27], cũng như sử dụng các nguồn mẫu khác nhau như chồi ngọn và mẫu lá [28]. Tuy nhiên, hiệu quả đạt được từ mỗi đối tượng nghiên cứu là khác nhau. Do vậy, các nghiên cứu về tác động phối hợp của các chất điều hòa sinh trưởng thực vật khác nhau cũng như sử dụng các nguồn vật liệu mẫu khác nhau cho quá trình nhân nhanh chồi ba kích vẫn cần được quan tâm nghiên cứu.

Bảng 2. Ảnh hưởng của KIN và BA lên khả năng nhân nhanh chồi từ đoạn đốt thân sau 4 tuần nuôi cấy

Nồng độ cytokinin (mg/L)		Số chồi/mẫu	Khối lượng tươi của cụm chồi (g)	Chiều cao chồi (cm)
BA	KIN			
1,5	0	2,7 ^{bc}	0,21 ^c	1,92 ^{a*}
	0,25	4,1^a	0,30^a	1,90^a
	0,50	3,2 ^b	0,25 ^b	1,92 ^a
	0,75	2,6 ^c	0,24 ^b	1,98 ^a
	1,00	2,3 ^c	0,22 ^c	1,96 ^a

^{a,b,c*}: Các chữ cái khác nhau trong cùng một cột biểu diễn mức độ khác biệt có ý nghĩa theo LSD ở độ tin cậy 95%.



Hình 2. Ảnh hưởng của KIN lên khả năng nhân nhanh chồi từ đoạn đốt thân cây ba kích sau 4 tuần nuôi cấy. K₁-K₄: môi trường có bổ sung KIN tương ứng các nồng độ: 0,25-1,00 mg/L KIN. K₀: đối chứng.

3.3. Ảnh hưởng của NAA và IBA lên khả năng tạo rễ của chồi cây ba kích

Auxin thường được bổ sung vào môi trường để tăng cường khả năng tạo rễ cho chồi nuôi cấy *in vitro*. Tuy nhiên, với các loài cây khác nhau thì loại auxin và nồng độ là khác nhau. Trong nghiên cứu này, NAA và IBA được sử dụng để bổ sung vào môi trường cảm ứng tạo rễ *in vitro* cho chồi ba kích. Kết quả thu được sau 6 tuần cho thấy, tỷ lệ mẫu tạo rễ trên môi trường bổ sung IBA cao hơn so với môi trường bổ sung NAA. Ở tất cả các nghiệm thức môi trường nuôi cấy bổ sung IBA đều thu được tỷ lệ mẫu tạo rễ đạt 100%. Trong khi đó, ở môi trường bổ sung NAA, tỷ lệ mẫu tạo rễ thu được (37,7 - 75,6%) đều thấp hơn đối chứng (93,3%) (Bảng 3). Ngoài ra, các chồi nuôi cấy ở môi trường bổ sung NAA, có sự hình thành mô sẹo phần gốc của chồi; trong khi không quan sát thấy hiện tượng này ở các chồi nuôi cấy trên môi trường bổ sung IBA. Ở thực vật, chồi và lá non là cơ quan tổng hợp auxin chủ yếu [26]. Trong nghiên cứu này, đoạn chồi ngọn ba kích có mang 3 cặp lá do đó bản thân chồi vẫn có khả năng tự tổng hợp auxin nội sinh. Việc bổ sung thêm auxin ngoại sinh vào môi trường nuôi cấy giúp tăng cường khả năng hình thành rễ cho mẫu nuôi cấy, nhưng ở nồng độ cao lại kích thích sự hình thành mô sẹo. NAA và IBA đều là auxin tổng hợp, nhưng hoạt tính auxin của NAA mạnh hơn IBA; chính vì vậy đã dẫn tới sự cảm ứng tạo thành mô sẹo ở phần gốc của chồi ba kích khi sử dụng NAA ở thí nghiệm ngày. Tương tự với kết quả của chúng tôi, nghiên cứu của Deng và cộng sự cũng chỉ ra rằng, trong số ba loại auxin được sử dụng, IBA cho thấy phản ứng tích cực hơn về sự ra rễ của chồi cây *M. officinalis* so với NAA và IAA. Đặc biệt trong trường hợp IBA, 100% chồi ra rễ mà không hình thành mô sẹo trung gian [4]. Sự hình thành mô sẹo ở phần gốc đã ức chế quá trình tạo rễ của chồi, và cũng làm giảm tỷ lệ sống sót của cây con trồng ở vườn ươm, nên tỷ lệ mẫu ra rễ, số rễ/mẫu và tỷ lệ sống sót của cây con thu được ở môi trường bổ sung NAA đều thấp hơn so với môi trường bổ sung IBA (Bảng 3). Kết quả tương tự cũng được ghi nhận trong báo cáo của Shekhawat và cộng sự, đó là các cây con có nhiều mô sẹo và rễ nhỏ không thích nghi tốt trong quá trình trồng ở nhà kính [7]. Do đó, IBA thích hợp cho quá trình cảm ứng tạo rễ của chồi ba kích hơn NAA. Hoàng Thị Thế và cộng sự nghiên cứu ảnh hưởng của IBA và NAA đến khả năng ra rễ của chồi ba kích, kết quả cũng chỉ ra rằng IBA hiệu quả hơn NAA; tỷ lệ chồi ra rễ đạt cao nhất là 66,6% ở môi trường nuôi cấy bổ sung 0,4 mg/L NAA; trong khi ở môi trường bổ sung 0,2-0,3 mg/L IBA, tỷ lệ chồi ra rễ đạt 100% [11]. Sự ảnh hưởng tích cực đến khả năng tạo rễ của IBA cao hơn so với NAA cũng được ghi nhận ở một số loài cây khác như *Codonopsis javanica* (Blume) [29], *Ligusticum wallihii* Franch [30].

Ở nghiệm thức đối chứng, tỷ lệ mẫu tạo rễ đạt được là 93,3%; ngược lại, trong nghiên cứu của Sreeanjini & Siril, sự cảm ứng tạo rễ không xảy ra ở môi trường không bổ sung auxin [31]. Điều này có thể do sự khác biệt về chất lượng chồi thu nhận được từ giai đoạn nhân nhanh giữa hai nghiên cứu đã ảnh hưởng đến khả năng cảm ứng ra rễ. Chiều cao cây thu được không có sự khác biệt thống kê giữa các nghiệm thức; điều này chứng tỏ auxin không ảnh hưởng mạnh đến sự gia tăng chiều cao của mẫu nuôi cấy. Tại nồng độ 0,5 mg/L IBA, tất cả các chỉ tiêu theo dõi (tỷ lệ mẫu ra rễ, số rễ/mẫu, chiều cao cây và tỷ lệ sống sót) đều đạt cao nhất. Vì vậy, đối với giai đoạn ra rễ của chồi ba kích, bổ sung 0,5 mg/L IBA vào môi trường nuôi cấy là thích hợp nhất với tỷ lệ mẫu ra rễ đạt 100%, số rễ trung bình là 6,2 rễ/mẫu, và chiều cao cây 5,8 cm (Bảng 3). Trong nghiên cứu ra rễ từ chồi ba kích của Hoàng Thị Thế và cộng sự cũng như nghiên cứu của Deng và cộng sự cũng chỉ ra rằng, tỷ lệ chồi ra rễ đều đạt 100%, nhưng số rễ thu được ở hai nghiên cứu này đều thấp hơn nghiên cứu của chúng tôi, chỉ đạt 3,5 rễ/mẫu [11] và 5,05 rễ/mẫu [4] ở môi trường 1/2 MS bổ sung 0,2 mg/L IBA.

Tỷ lệ sống sót của cây con đạt cao nhất ở nghiên cứu này là 93,3% sau 4 tuần trồng ở vườn ươm. Trong nghiên cứu của Chen và cộng sự [10], Deng và cộng sự [4] đều ghi nhận kết quả tỷ lệ sống sót của cây ba kích đạt 90%. Như vậy, kết quả đạt được ở nghiên cứu của chúng

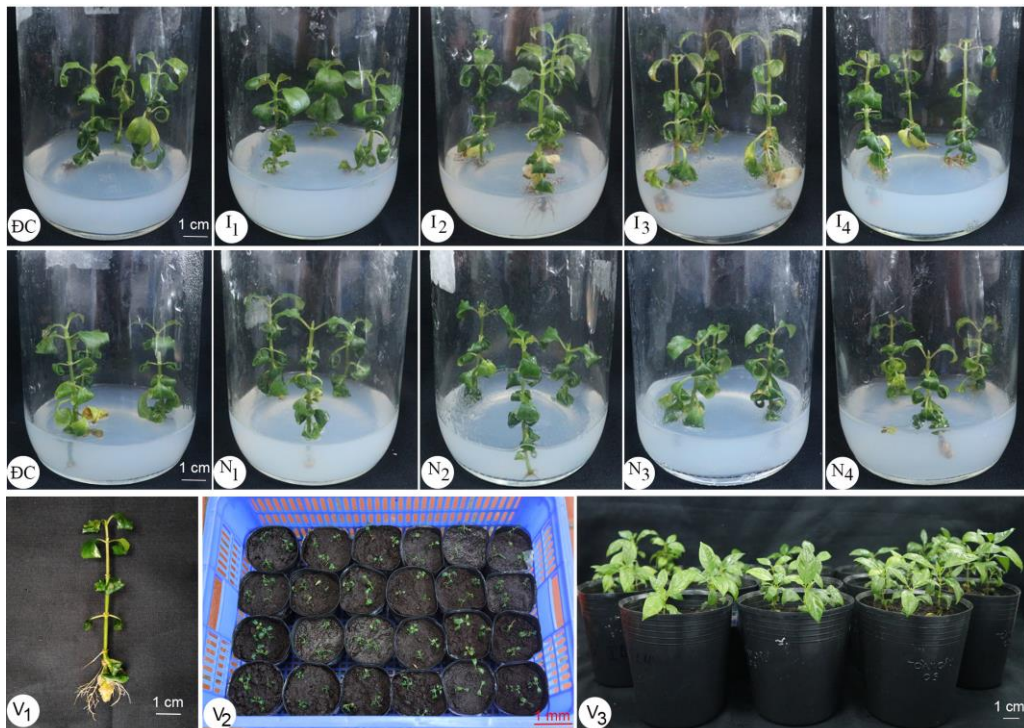
Ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng thực vật đến quá trình nhân giống in vitro...

tôi đã cải thiện được tỷ lệ chồi ra rễ cũng như tỷ lệ sống sót của của cây con so với một số nghiên cứu trước đây trên cây ba kích.

Bảng 3. Ảnh hưởng của NAA và IBA lên khả năng ra rễ của chồi sau 6 tuần nuôi cấy in vitro và khả năng sống sót của cây con ở vườn ươm sau 4 tuần trồng

Nồng độ auxin (mg/L)		Tỷ lệ chồi tạo rễ (%)	Số rễ/mẫu	Chiều cao cây in vitro (cm)	Tỷ lệ sống sót (%)
NAA	IBA				
-	-	93,3 ^{b*}	3,1 ^d	5,5 ^a	76,7 ^b
0,25	-	75,6 ^c	2,2 ^e	5,5 ^a	63,3 ^c
0,50	-	73,4 ^c	1,8 ^f	5,7 ^a	60,0 ^c
0,75	-	51,1 ^d	1,3 ^g	5,6 ^a	46,7 ^d
1,00	-	37,7 ^e	1,2 ^g	5,6 ^a	23,3 ^e
-	0,25	100 ^a	4,8 ^b	5,6 ^a	93,3 ^a
-	0,50	100^a	6,2^a	5,8^a	93,3^a
-	0,75	100 ^a	4,6 ^b	5,5 ^a	93,3 ^a
-	1,00	100 ^a	3,6 ^c	5,5 ^a	90,0 ^a

a,b,c,d : Các chữ cái khác nhau trong cùng một cột biểu diễn mức độ khác biệt có ý nghĩa theo LSD ở độ tin cậy 95%.*



Hình 3. Ảnh hưởng của IBA và NAA lên khả năng ra rễ của chồi ba kích. I1-I4: Cây con trên môi trường tương ứng nồng độ 0,25 - 1,0 mg/L IBA sau 6 tuần; N1-N4: Cây con trên môi trường tương ứng nồng độ 0,25 - 1,0 mg/L NAA sau 6 tuần; ĐC: Cây con ở môi trường không bổ sung auxin sau 6 tuần. V1: cây con ra rễ hoàn chỉnh được lấy ra khỏi bình nuôi cấy trước khi đem trồng. V2: Cây con sau khi được trồng trên giá thể ở ngày đầu tiên. V3: cây con sinh trưởng ở vườn ươm sau 4 tuần.

4. KẾT LUẬN

Chúng tôi đã xác định được các môi trường nuôi cấy thích hợp cho quá trình nhân giống *in vitro*. Môi trường để nhân nhanh chồi là MS bổ sung 1,5 mg/L BA kết hợp với 0,25 mg/L KIN, 30 g/L sucrose, 8 g/L agar, pH 5,8. Môi trường phù hợp để chồi ra rễ là MS bổ sung 0,5 mg/L IBA, 30 g/L sucrose, 8 g/L agar, pH 5,8. Sau 4 tuần trồng ở vườn ươm, cây con đạt tỷ lệ sống sót là 93,3%. Nghiên cứu này sử dụng vật liệu nhân nhanh chồi là đốt thân đã giúp nâng cao hiệu quả nhân giống nhờ vào sự tiết kiệm được nguồn vật liệu ở giai đoạn nhân nhanh chồi. Hệ số nhân chồi đạt được cao nhất ở quy trình nhân giống này là 4,1 sau 4 tuần nuôi cấy, và hệ số này vẫn còn gia tăng khi thời gian nuôi cấy kéo dài thêm. Quy trình vi nhân giống này sẽ hữu ích cho việc sản xuất các cây giống ba kích ổn định cũng như ứng dụng trong việc bảo tồn nguồn gen của loài cây quý giá này.

Lời cảm ơn: Đề tài được thực hiện bằng nguồn kinh phí hỗ trợ từ Chương trình Vườn ươm Sáng tạo Khoa học và Công nghệ Trẻ, được quản lý bởi Trung tâm Phát triển Khoa học và Công nghệ Trẻ - Thành Đoàn thành phố Hồ Chí Minh và Sở Khoa học và Công nghệ thành phố Hồ Chí Minh, theo hợp đồng số “22/2021/HĐ-KHCNT-VU”.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Yoshikawa M., Yamaguchi S., Nishisaka H., Yamahara J., Murakami N. - Chemical constituents of Chinese nature medicine, morindae radix, the dried roots of *Morinda officinalis* How: Structures of morindolide and morofficaloside, Chemical and Pharmaceutical Bulletin **43**(9) (1995)1462-1465.
2. Zhang H., Li J., Xia J., Lin S.K. - Antioxidant activity and physicochemical properties of an acidic polysaccharide from *Morinda officinalis*, International Journal of Biological Macromolecules **58** (2013) 7-12.
3. Triệu Văn Hùng - Lâm sản ngoài gỗ Việt Nam - Dự án hỗ trợ chuyên ngành lâm sản ngoài gỗ tại Việt Nam - Pha II, Nhà xuất bản Bản đồ Hà Nội (2007) 396-399.
4. Deng Z.C., Jin H., He H. - An efficient micropropagation system for *Morinda officinalis* How. (Rubiaceae), an endangered medicinal plant, Journal of Agricultural Science and Technology **17** (2015) 1609-1618.
5. Sarasan V., Cripps R., Ramsay M.M., Atherton C., McMichen M., Prendergast G., Rowntree J.K. - Conservation *in vitro* of threatened plants - Progress in the past decade, In vitro Cellular & Developmental Biology Plant **42** (2006) 206-214.
6. Engelmann F. - Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity, In vitro Cellular & Developmental Biology Plant **47** (1) (2011) 5-16.
7. Shekhawat M.S., Kannan N., Manokari M. - *In vitro* propagation of traditional medicinal and dye yielding plant *Morinda coreia* Buch-Ham, South African Journal of Botany **100** (2015) 43-50.
8. Shekhawat M.S., Manokari M., Kannan N. - Micromorphological response towards altered environmental conditions in subsequent stages of *in vitro* propagation of *Morinda coreia*, Environmental and Experimental Biology **15** (1) (2017) 37-46.
9. He H., Xiao S., Xian J., Xu H. - *In vitro* culture and plant regeneration of *Morinda officinalis* How, Journal of Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine **17** (4) (2000) 353-354.
10. Chen W., Xu L., Li Z., Li K. - Tissue culture and rapid propagation of *Morinda officinalis* How., Plant Physiology Communication **42** (3) (2006) 475.

11. Hoàng Thị Thế, Nguyễn Thị Phương Thảo, Ninh Thị Thảo, Nguyễn Thị Thủy - Quy trình nhân giống *in vitro* cây ba kích (*Morinda officenalis* How), Tạp chí Khoa học và Phát triển **11** (3) (2013) 285-292.
12. Võ Châu Tuấn, Huỳnh Minh Tư - Nghiên cứu nhân giống cây ba kích (*Morinda officinalis* How) bằng phương pháp nuôi cấy mô, Tạp chí Khoa học và Công nghệ, Đại học Đà Nẵng **5** (40) (2010) 1-9.
13. Subramani J., Antony S., Selvaraj D., Vijay M., Sakthivel M. - Micropropagation of *Morinda citrifolia* L., International Journal of Noni Research **2** (2007) 38-44.
14. Sreeranjini S., Siril E.A. - Field performance and genetic fidelity evaluation of micropropagated *Morinda citrifolia* L., Indian Journal of Biotechnology **13** (2014) 121-130.
15. Shekhawat M.S., Kannan N., Manokari M., Ravindran C.P. - Enhanced micropropagation protocol of *Morinda citrifolia* L. through nodal explants, Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants **2** (4) (2015) 174-181.
16. Murashige T., Skoog F. - A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures, Physiology Plant **15** (1962) 473-497.
17. Bairu M.W., Stirk W.A., Dolezal K., Van Staden J. - Optimizing the micropropagation protocol for the endangered *Aloe polyphylla*: Can meta-topolin and its derivatives serve as replacement for benzyladenine and zeatin?, Plant Cell, Tissue and Organ Culture **90** (2007) 15-23.
18. Zaerr J.B., Mapes M.O. - Action of growth regulators, In: Bonga J.M., Durzan D.J. (eds.) - Tissue culture in forestry, Martinus Nijhoff/ Dr. W. Junk Publishers, The Hague-Boston-London (1982) 231-255.
19. Rathore M.S., Rathore M.S., Shekhawat N.S. - *Ex vivo* implications of phytohormones on various *in vitro* responses in *Leptadenia reticulata* (Retz.) Wight. & Arn. - An endangered plant, Environmental and Experimental Botany **86** (2013) 86-93.
20. Phulwaria M., Shekhawat N.S., Rathore J.S., Singh R.P. - An efficient *in vitro* regeneration and *ex vitro* rooting of *Ceropegia bulbosa* Roxb. - A threatened and pharmaceutical important plant of Indian Thar Desert, Industrial Crops and Products **42** (2013) 25-29.
21. Patel A.K., Phulwaria M., Rai M.K., Gupta A.K., Shekhawat S., Shekhawat N.S. - *In vitro* propagation and *ex vitro* rooting of *Caralluma edulis* (Edgew.) Benth. & Hook. f.: An endemic and endangered edible plant species of the Thar Desert, Scientia Horticulturae **165** (2014) 175-180.
22. Faisal M., Ahmad N., Anis M. - An efficient micropropagation system for *Tylophora indica*: An endangered, medicinally important plant, Plant Biotechnology Reports **1** (2007) 155-161.
23. Lakshmanan P., Lee C.L., Goh C.J. - An efficient *in vitro* method for mass propagation of a woody ornamental *Ixora coccinea* L., Plant Cell Reports **16** (1997) 572-577.
24. Tefera W.W, Annakrairoj S. - Synergistic effects of some plant growth regulators on *in vitro* shoot proliferation of korarima (*Aframomum corrorima* (Braun) Jansen), African Journal of Biotechnology **5** (10) (2006) 1894-1901.
25. Kumar S., Tiwari R., Chandra A., Sharma A., Bhatnagar R.K. - *In vitro* direct plant regeneration and *Agrobacterium-mediated* transformation of lucerne (*Medicago sativa* L.), Grass and Forage Science **68** (2013) 459-468.

26. Hoàng Minh Tấn, Nguyễn Quang Thạch, Vũ Quang Sáng - Sinh lý thực vật, Nhà xuất bản Trường Đại học Nông nghiệp I Hà Nội (2006) 239.
27. Wei L.J., Lu P., Su W.P. - Tissue culture and rapid propagation of *Morinda citrifolia* L., Plant Physiology Communications **42** (2006) 475.
28. Gajakosh A.M., Jayaraj M., Mathad G.V., Patta P. - Organogenesis from shoot tip and leaf explants of *Morinda citrifolia* L. An important medicinal tree, Libyan Agriculture Research Centre Journal International **1** (2010) 250-254.
29. Phạm Hương Sơn, Nguyễn Thị Lại - Nghiên cứu ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng thực vật lên sự phát sinh hình thái của cây đấng sâm trong điều kiện *in vitro*, Tạp chí Khoa học và Công nghệ Việt Nam **2** (9) (2015) 55-59.
30. Cao Thị Thủy, Vũ Quang Sáng - Nghiên cứu nhân nhanh *in vitro* cây xuyên khung (*Ligusticum wallichii* Franch), Tạp chí Khoa học và Phát triển **9** (6) (2011) 920-927.
31. Sreeranjini S., Siril E.A. - Field performance and genetic fidelity evaluation of micropropagated *Morinda citrifolia* L., Indian Journal of Biotechnology **13** (2014) 121-130.

ABSTRACT

EFFECT OF PLANT GROWTH REGULATORS ON MICROPROPAGATION OF *Morinda officinalis* How.

Trình Thị Hương^{1*}, Nguyễn Ngọc Hoàng Vân², Trần Trọng Tuấn³

¹*Ho Chi Minh City University of Food Industry*

²*VNUHCM-University of Science*

³*Institute of Tropical Biology, VAST*

*Email: huongtt@hufi.edu.vn

In this study, the effect of plant growth regulators on micropropagation of *Morinda officinalis* through nodal explants was investigated. The results showed that Murashige and Skoog medium supplemented with 1.5 mg/L benzyladenine (BA) combined with 0.25 mg/L kinetin (KIN) was a suitable medium for the rapid multiplication of shoots. On this medium, the number of shoots was 4.1 shoots per nodal explant after 4 weeks of culture. For rooting, indole-3-butyric acid (IBA) was a more suitable auxin than naphthaleneacetic acid (NAA) because of the formation of callus at the base of the cultured shoots on media using NAA. At the concentration of 0.5 mg/L IBA, the maximum rate of rooting explants, number of roots per explant, and average height were 100%, 6.2 roots/explant, and 5.8 cm after 6 weeks of culture, respectively. The plantlets were acclimatized in the greenhouse with a 93.3% survival rate after 4 weeks. These results contribute to the development of a stable micropropagation protocol of *M. officinalis*, which can be successfully used for the production of plantlets for the medicinal plant market in Vietnam as well as for the conservation of this important medicinal plant.

Keywords: Auxin, cytokinin, *Morinda officinalis*, micropropagation, plant growth regulator.