

NGHIÊN CỨU TẠO VÀ NHÂN NUÔI RỄ BẤT ĐỊNH CÂY LẠC LÀM NGUỒN NGUYÊN LIỆU THU NHẬN HỢP CHẤT RESVERATROL

Đình Trường Sơn, Chử Thị Thu Huyền, Nguyễn Thị Hạnh, Ninh Thị Thảo*

Khoa Công nghệ sinh học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

*Tác giả liên hệ: ntthao@vnua.edu.vn

Ngày nhận bài: 22.08.2022

Ngày chấp nhận đăng: 22.11.2022

TÓM TẮT

Resveratrol là một hợp chất có khả năng chống oxy hoá cao được tìm thấy trong một số loại quả mọng và trong rễ cây lạc. Nghiên cứu này được tiến hành nhằm cảm ứng tạo rễ bất định cây lạc và bước đầu khảo sát một số yếu tố ảnh hưởng đến sự sinh trưởng rễ bất định làm nguồn nguyên liệu thu nhận hợp chất resveratrol. Mô lá cây lạc được nuôi cấy trên môi trường MS chứa α -NAA, IBA và IAA (1-10 mg/l), đường sucrose (20-50 g/l) ở điều kiện chiếu sáng và điều kiện tối hoàn toàn nhằm cảm ứng tạo rễ bất định. Rễ bất định tái sinh trực tiếp từ mô lá tốt nhất trên môi trường MS bổ sung 5 mg/l α -NAA, 30 g/l đường, nuôi cấy trong tối hoàn toàn, với tỉ lệ mẫu tạo rễ đạt 87,5% và số rễ/mẫu đạt 5,5 rễ sau 6 tuần nuôi cấy. Sự tăng trưởng của đoạn rễ bất định cây lạc (có chiều dài 1,0cm) khi nuôi cấy trên môi trường MS tốt hơn so với môi trường 1/2 MS, B5 và 1/2 B5. Bổ sung α -NAA, IBA và IAA có tác dụng tích cực thúc đẩy sự sinh trưởng rễ bất định cây lạc. Tỉ lệ đoạn rễ phân nhánh và số nhánh/rễ đạt cao nhất, tương ứng đạt 100% và 4,9 rễ, khi nuôi cấy trên môi trường MS + 1 mg/l α -NAA sau 6 tuần nuôi cấy.

Từ khoá: Auxin, lạc, rễ bất định, resveratrol, sucrose.

Induction and Culture of Adventitious Peanut Roots as a Source of Resveratrol

ABSTRACT

Resveratrol as a phytochemical with strong antioxidant properties was found in certain berries and in peanut roots. This study was conducted to induce adventitious roots of peanut and investigate some factors affecting the growth of adventitious roots as a source of resveratrol. Leaf explants were cultured on MS medium supplemented with α -NAA, IBA and IAA (1-10 mg/l), sucrose (20-50 g/l) under light and dark culture conditions to induce formation of adventitious roots. The results showed that direct formation of adventitious roots from peanut leaves was best on MS medium containing 5 mg/l α -NAA and 30 g/l sucrose cultured in full darkness with 87.5% rooting rate and 5.5 roots per explant after 6 weeks of culture. The growth of adventitious roots (1.0cm in length) when cultured on MS medium sustained better than 1/2 MS, B5 and 1/2 B5 media. A positive effect of auxin including α -NAA, IBA and IAA on adventitious root growth was found. The maximum percentage of adventitious root segment producing lateral roots and highest number of lateral roots/segment, (100% and 4.9 roots, respectively) were obtained on MS + 1 mg/l α -NAA after 6 weeks of culture.

Keywords: Adventitious roots, auxin, peanuts, resveratrol, sucrose.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Resveratrol là một phytoalexin được tổng hợp bởi một số loài thực vật để bảo vệ chúng chống lại các điều kiện bất lợi sinh học và phi sinh học (Gligorijević & cs., 2021). Các nghiên cứu đã chỉ ra rằng resveratrol có rất nhiều được tính tốt như kháng oxy hóa, kháng viêm, tăng

cường miễn dịch, ngăn ngừa ung thư, bảo vệ tim mạch, chống lão hóa, giảm mỡ máu, trị chứng cao huyết áp (Salehi & cs., 2018; Khatat & cs., 2022). Do vậy, hoạt chất này có mặt trong nhiều các loại thuốc và thực phẩm tăng cường, bảo vệ sức khỏe. Nhu cầu sử dụng và thương mại hóa hoạt chất resveratrol ngày càng tăng, trong khi hàm lượng resveratrol trong cây trồng tự nhiên

lại rất thấp. Vì vậy, tăng năng suất thu nhận resveratrol từ các nguồn có sẵn là một giải pháp hiệu quả. Trong tự nhiên, resveratrol được tìm thấy nhiều trong vỏ quả nho đỏ, quả dâu tây, rễ cây lạc (đậu phộng), quả việt quất và một số loại hoa quả khác (Tian & cs., 2019). Mặc dù hàm lượng resveratrol trong rễ cây lạc khá thấp, chỉ 1,19 μ g trong 1g chất tươi, so với 50,01 μ g/g quả mâm xôi hay 24,06 μ g/g vỏ quả nho (Khattar & cs., 2022), rễ cây lạc lại là nguồn nguyên liệu tiềm năng để thu nhận resveratrol do giá thành thấp và dồi dào.

Nuôi cấy rễ *in vitro* được xem là một giải pháp thay thế đầy tiềm năng, khắc phục được những hạn chế của phương pháp nuôi trồng truyền thống để thu nhận hoạt chất thứ cấp từ thực vật, do khả năng sản xuất ổn định được một lượng lớn sinh khối sạch trong thời gian ngắn (Hussain & cs., 2022). Mặt khác, trong nuôi cấy rễ *in vitro*, việc bổ sung các chất kích hoạt (elicitor) giúp tăng đáng kể khả năng tích lũy các hợp chất thứ cấp trong quá trình nhân nhanh sinh khối rễ. Bên cạnh đó, nuôi cấy rễ *in vitro* còn giúp tối ưu hóa quá trình chiết xuất hoạt chất mục tiêu (Khanam & cs., 2022). Đã có rất nhiều nghiên cứu sử dụng vi khuẩn *Agrobacterium rhizogenes* để cảm ứng tạo rễ tơ cây lạc, sau đó nhân nuôi tăng sinh khối rễ nhằm thu nhận hợp chất resveratrol (Yang & cs., 2015; Kim & cs., 2008; Park & cs., 2021; Medina-Bolivar & cs., 2007). Tuy nhiên, cho đến nay, chưa có công bố nào liên quan đến tạo và nhân nuôi rễ bất định cây lạc trong điều kiện *in vitro*. Nghiên cứu này được tiến hành nhằm cảm ứng tạo rễ bất định cây lạc trong điều kiện *in vitro* và bước đầu khảo sát một số yếu tố đến sự sinh trưởng rễ bất định làm tiền đề cho việc thiết lập quy trình sản xuất các hợp chất thứ cấp phục vụ công nghiệp dược liệu ở Việt Nam.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

Vật liệu sử dụng trong nghiên cứu là hạt lạc giống L14 do Trung tâm Nghiên cứu và Phát triển Đậu đỗ cung cấp.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Phương pháp khử trùng hạt: Hạt lạc sau khi rửa sạch bằng nước trong 3-5 phút được khử trùng bằng cồn 70% trong 1 phút và HgCl₂ 0,1% trong 15 phút, rồi rửa sạch bằng nước cất vô trùng 5 lần, mỗi lần 1 phút. Tiếp theo, ngâm hạt trong nước vô trùng trong 12 giờ. Hạt lạc sau đó được gieo trên môi trường MS (Murashige & Skoog, 1962) bổ sung 30 g/l đường sucrose, đặt trong điều kiện 16h sáng/8h tối, nhiệt độ 25 \pm 2°C trong 2 tuần để kích thích hạt nảy mầm.

Phương pháp tạo rễ bất định: Lá của hạt lạc nảy mầm trên môi trường gieo hạt được gây vết thương bằng cách dùng dao cắt hai đầu lá, sau đó đặt mặt dưới lá tiếp xúc với môi trường MS bổ sung auxin α -NAA/IBA/IAA (0; 1; 2,5; 5 và 10 mg/l), đường sucrose (0, 20, 30, 40 và 50 g/l) và nuôi cấy ở hai điều kiện chiếu sáng (16h sáng/8h tối và tối hoàn toàn). Đánh giá thí nghiệm trong 6 tuần. Các chỉ tiêu theo dõi bao gồm tỉ lệ mầm tạo rễ (%), số rễ/mầm (rễ) và tỉ lệ mầm tạo callus (%).

Phương pháp nhân nuôi rễ bất định: Sau 6 tuần nuôi cấy, các rễ bất định hình thành từ mô lá cây lạc được cắt thành các đoạn mầm có kích thước khoảng 1,0cm và nuôi cấy trên môi trường MS hoặc môi trường Gamborg B5 (Gamborg & cs., 1968) với hàm lượng muối khoáng đầy đủ hoặc giảm 1/2, bổ sung 30 g/l đường sucrose, có hoặc không có bổ sung chất điều tiết sinh trưởng thuộc nhóm auxin (α -NAA/IBA/IAA) ở các nồng độ khác nhau (0,1-1 mg/l) để khảo sát khả năng tăng trưởng của rễ cây lạc. Đánh giá thí nghiệm trong 6 tuần. Các chỉ tiêu theo dõi bao gồm tỉ lệ rễ phân nhánh (%) và số rễ nhánh/mầm (rễ).

Môi trường và điều kiện nuôi cấy: Môi trường nuôi cấy được điều chỉnh pH = 5,8 trước khi hấp khử trùng ở nhiệt độ 121°C trong 20 phút, 1,1atm. Điều kiện nuôi cấy *in vitro* là 16h sáng/8h tối, cường độ ánh sáng 2.000-2.500lux, nhiệt độ 25 \pm 2°C.

Bố trí thí nghiệm: Các thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên, nhắc lại 3 lần, mỗi lần 30 mẫu với thí nghiệm tạo rễ bất định và 40 mẫu đối với thí nghiệm nhân nuôi rễ.

Xử lý thống kê: Số liệu được xử lý bằng phần mềm thống kê InfoStat. Phân tích phương sai (ANOVA) và so sánh các giá trị trung bình bằng phương pháp kiểm định LSD ở mức ý nghĩa 5%.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Khả năng tạo rễ bất định từ mô lá cây lạc

3.1.1. Ảnh hưởng của α -NAA/IBA/IAA đến khả năng tạo rễ bất định từ mô lá cây lạc

Sự hình thành rễ bất định *in vitro* là quá trình được điều khiển bởi môi trường nuôi cấy và các yếu tố nội sinh như nhiệt độ, ánh sáng, chất kích thích sinh trưởng, đường, chất khoáng và các phân tử khác. Chất kích thích sinh trưởng auxin vừa có ảnh hưởng trực tiếp (tham gia vào quá trình phân chia và tăng trưởng tế bào), vừa có ảnh hưởng gián tiếp (tương tác với các chất kích thích và các phân tử khác) đến sự hình thành rễ bất định (Pop & cs., 2011). Bổ sung auxin vào môi trường nuôi cấy được chứng minh là có hiệu quả tích cực trong cảm ứng tạo rễ bất định nhiều loài thực vật như ở cây ba kích (Ninh Thị Thảo & cs., 2016), cây nhàu (Nguyễn Thị Ngọc Hương & Võ Thị Bạch Mai, 2009).

Kết quả ở bảng 1 cho thấy ba auxin gồm α -NAA/IBA/IAA có tác dụng kích thích sự hình thành rễ bất định ở cây lạc với tỉ lệ mẫu tạo rễ và số rễ/mẫu biến động tùy thuộc vào loại auxin và nồng độ sử dụng (Bảng 1). Cụ thể, ở công thức môi trường không bổ sung auxin, mô lá cây

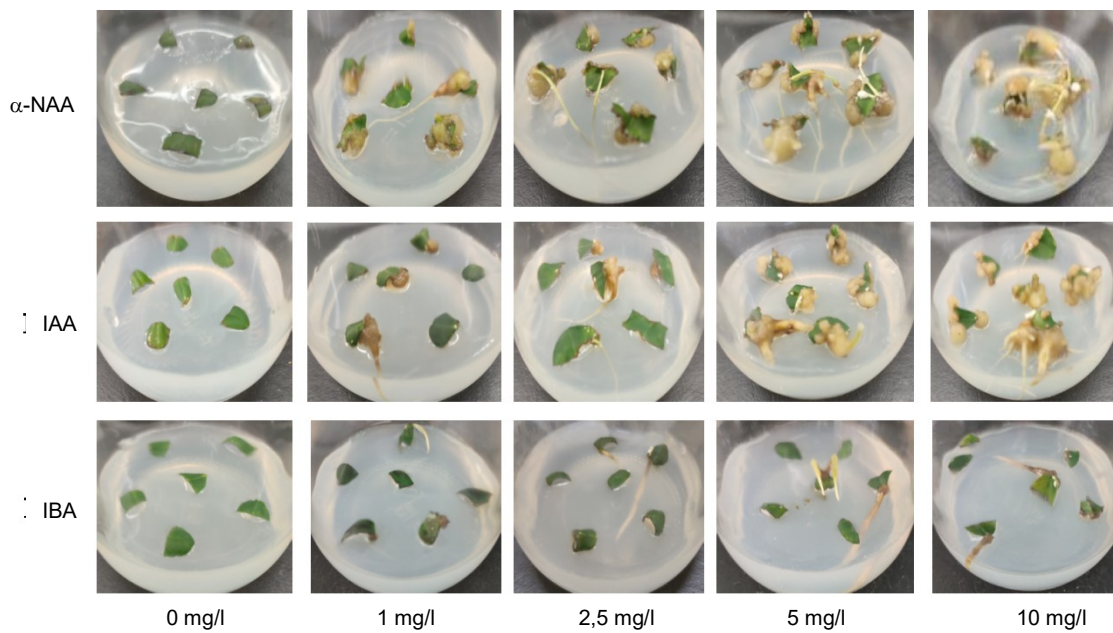
lạc hoàn toàn không tạo rễ (Bảng 1). Trên môi trường bổ sung α -NAA, tỉ lệ mô lá cây tạo rễ bất định dao động 20-76,7%. Tỉ lệ mẫu tạo rễ tăng dần và đạt cao nhất ở công thức môi trường bổ sung 5 mg/l và 10 mg/l α -NAA, tương ứng đạt 70% và 76,7%. Đồng thời, số lượng rễ/mẫu cao nhất cũng ghi nhận được trên môi trường chứa 5 mg/l và 10 mg/l α -NAA, tương ứng đạt 4,1 và 3,6 rễ (Bảng 1). Quan sát hình thái mẫu cho thấy, sau 5-7 ngày nuôi cấy, các mẫu lá có xu hướng cong lên trên bề mặt môi trường và sau 7-10 ngày, callus bắt đầu xuất hiện tại vị trí vết cắt với tỉ lệ mẫu tạo callus tăng tỉ lệ thuận với nồng độ α -NAA sử dụng và đạt cao nhất (90%) khi bổ sung 5-10mg/ α -NAA vào môi trường nuôi cấy (Bảng 1, Hình 1). Sau 15-20 ngày, rễ bắt đầu hình thành, các rễ có màu trắng hoặc vàng nâu, ăn sâu xuống môi trường và không phân nhánh (Hình 1).

Tương tự như α -NAA, IAA và IBA cũng có tác dụng kích thích mẫu lá cây lạc tạo rễ bất định với tỉ lệ dao động từ 3,3-66,7% và số rễ/mẫu đạt dao động 0,2-2,6 rễ (Bảng 1). Tỉ lệ mẫu tạo rễ tăng tỉ lệ thuận với nồng độ IAA/IBA và đạt cao nhất ở công thức bổ sung 10 mg/l IAA (66,7%) và 5-10 mg/l IBA (16,7-26,7%). Số rễ/mẫu trên các công thức môi trường bổ sung IAA/IBA ở nồng độ $\geq 2,5$ mg/l là không có sự sai khác ở mức ý nghĩa $P < 5\%$. Trên môi trường bổ sung IBA, mẫu mô lá cây lạc hoàn toàn không tạo callus trong khi đó tỉ lệ mẫu tạo callus trên môi trường bổ sung IAA dao động từ 46,7-100% (Bảng 1, Hình 1).

Bảng 1. Ảnh hưởng của α -NAA/IBA/IAA đến khả năng tạo rễ bất định của mô lá cây lạc sau 6 tuần nuôi cấy

Nồng độ (mg/l)	Tỉ lệ mẫu tạo rễ (%)			Số rễ/mẫu (rễ)			Tỉ lệ mẫu tạo callus (%)		
	α -NAA	IAA	IBA	α -NAA	IAA	IBA	α -NAA	IAA	IBA
0	0 ^a	0 ^a	0 ^a	-	-	-	0 ^a	0 ^a	0
1	20 ^b	16,7 ^b	3,3 ^a	1,0 ^a	1,2 ^a	0,2 ^a	56,7 ^b	46,7 ^b	0
2,5	33,3 ^b	23,3 ^b	6,7 ^{ab}	1,3 ^a	1,6 ^{ab}	0,8 ^{ab}	86,1 ^c	76,7 ^c	0
5	70 ^c	40,0 ^c	16,7 ^{bc}	4,1 ^b	1,6 ^{ab}	0,7 ^{ab}	90 ^c	100 ^d	0
10	76,7 ^c	66,7 ^d	26,7 ^c	3,6 ^b	2,6 ^b	1,0 ^b	90 ^c	100 ^d	0

Ghi chú: 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 1. Sự hình thành rễ bất định từ mô lá cây lạc trên môi trường MS + 30 g/l đường + α -NAA/IBA/IAA ở các nồng độ khác nhau sau 6 tuần nuôi cấy

Hiện tượng mô lá cây lạc không phản ứng phát sinh hình thái trên môi trường đối chứng chứng tỏ hàm lượng auxin nội sinh có trong mẫu là không đủ để cảm ứng tạo rễ và callus ở cây lạc. Do vậy, bổ sung các auxin ngoại sinh vào môi trường nuôi cấy là yếu tố quyết định, kích thích mô lá cây lạc tạo rễ bất định. Trong 3 auxin khảo sát, α -NAA có ảnh hưởng mạnh nhất và IBA ít có tác động nhất đến sự cảm ứng tạo rễ bất định cây lạc. Sự phản ứng khác nhau với các chất điều tiết sinh trưởng của mô thực vật trong nuôi cấy tạo rễ bất định đã được chứng minh ở khá nhiều nghiên cứu trước đây. Ví dụ, α -NAA có hiệu quả hơn IAA và IBA đến sự tạo rễ bất định ở cây ba kích (Ninh Thị Thảo & cs., 2016), cây *Andrographis paniculata* (Sharma & cs., 2013), cây *Eurycoma longifolia* (Hussein & cs., 2012), cây *Gynura procumbens* (Saiman & cs., 2012). Ngược lại, ở cây sâm Ngọc Linh (Son & cs., 1999), cây ngũ gia bì chân chim (Huỳnh Thị Lữ & cs., 2021), cây dứa cựa (Trương Quỳnh Như & cs., 2015), cây *Labisia pumila* (Ling & cs., 2013), cây *Vernonia amygdalina* (Khalafalla & cs., 2009), cây *Diospyros crassiflora* (Tchouga & cs., 2020) thì IBA lại tỏ ra là auxin thích hợp hơn để cảm ứng hình thành rễ bất định.

3.1.2. Ảnh hưởng của nồng độ đường sucrose đến khả năng tạo rễ bất định từ mô lá cây lạc

Trong nuôi cấy rễ *in vitro*, nguồn carbon bổ sung vào môi trường dưới dạng đường sucrose giúp hỗ trợ quá trình phân bào và phát sinh hình thái (Ling & cs., 2009; Sumaryono & cs., 2012). Mặt khác, nồng độ đường thích hợp còn làm tăng sự tích lũy hợp chất mục tiêu trong rễ (Rahmat & cs., 2019). Nhằm khảo sát ảnh hưởng của đường sucrose đến sự cảm ứng tạo rễ bất định cây lạc, trong thí nghiệm này mô lá cây lạc được nuôi cấy trên môi trường không bổ sung đường hoặc bổ sung đường ở nồng độ 20 g/l, mô lá lạc hoàn toàn không cảm ứng tạo rễ bất định. Trong khi đó, bổ sung đường vào môi trường nuôi cấy ở nồng độ 30-50 g/l đã kích thích mô lá tạo rễ bất định với tỉ lệ dao động từ 36,7-66,7%. Tỉ lệ mẫu tạo rễ (66,7%) và số rễ/mẫu (4,1 rễ) đạt cao nhất trên môi trường bổ sung 30 g/l đường. Ở các công thức bổ sung đường ở nồng độ cao, 40 g/l và 50 g/l, cho tỉ lệ mẫu tạo rễ (36,7-43,3%) và số

rễ/mẫu (2,2-2,8 rễ) thấp hơn so với công thức chứa 30 g/l đường (Bảng 2). Trên môi trường có bổ sung đường sucrose, mô lá lạc tạo callus sau 7-10 ngày và rễ hình thành sau khoảng 2 tuần nuôi cấy xung quanh vết cắt (Hình 2). Tỷ lệ mẫu tạo callus ở các công thức bổ sung đường với nồng độ khác nhau không có sự sai khác có ý nghĩa thống kê, dao động từ 86,7-100% (Bảng 2).

Như vậy từ thí nghiệm này, chúng tôi rút ra kết luận nồng độ đường sucrose thích hợp để cảm ứng tạo rễ bất định cây lạc là 30 g/l. Kết quả này cũng phù hợp với một số kết quả nghiên cứu sử dụng đường sucrose ở nồng độ 30 g/l để tạo rễ bất định từ mô lá cây ngũ gia bì chân chim (Huỳnh Thị Lữ & cs., 2021), cây nhân sâm (Nguyễn Thị Liễu & cs., 2011), cây *Centella asiatica* (Ling & cs., 2009).

3.1.3. Ảnh hưởng của điều kiện chiếu sáng đến khả năng tạo rễ bất định của mô lá cây lạc

Trong nuôi cấy tạo rễ bất định, ánh sáng có ảnh hưởng mạnh mẽ đến sự hình thành rễ, đặc biệt là ở giai đoạn đầu khi hình thành sơ khởi rễ

(Alallaq & cs., 2020). Nhiều loài thực vật yêu cầu điều kiện tối hoàn toàn để tạo rễ bất định như cây *Cichorium intybus* L. (Nandagopal & Kumari, 2007), cây *Centella asiatica* (Ling & cs., 2009) trong khi một số loài lại tạo rễ tốt hơn khi được nuôi cấy ở điều kiện chiếu sáng như cây ngũ gia bì chân chim (Huỳnh Thị Lữ & cs., 2021), cây *Artemisia amygdalina* (Taj & cs., 2019). Mô lá cây lạc khi nuôi cấy trong tối hoàn toàn và ở điều kiện 16h sáng/8h tối, sau 6 tuần mặc dù cho tỷ lệ mẫu tạo rễ (73,3-86,7%) và tạo callus (93,3-100%) không khác biệt ở mức ý nghĩa $LSD_{0,05}$ nhưng số rễ/mẫu khi nuôi cấy trong tối (5,5 rễ) cao hơn so với công thức nuôi cấy ở 16h sáng/8h tối (3,9 rễ) (Bảng 3).

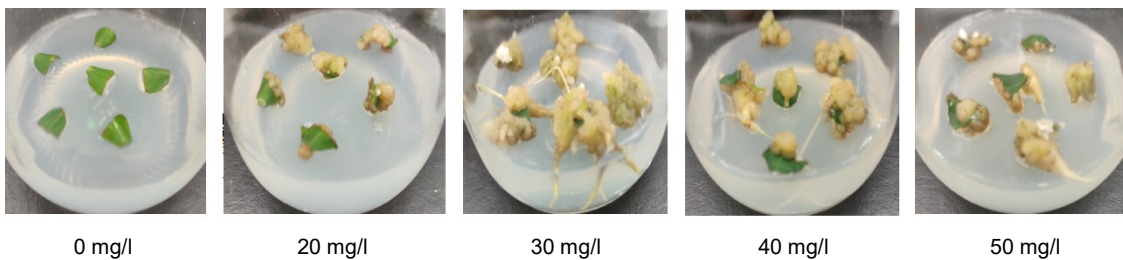
Quan sát trong quá trình nuôi cấy nhận thấy rễ xuất hiện sớm, sau 7-10 ngày và phát triển nhanh trong bóng tối, các rễ có màu trắng sữa. Trong khi đó, ở chế độ nuôi cấy 16h sáng/8h tối, rễ xuất hiện muộn hơn, sau 2 tuần, rễ có màu vàng nhạt (Hình 3). Kết quả nghiên cứu này cho thấy mô lá lạc phát sinh tạo rễ bất định ở điều kiện nuôi cấy tối hoàn toàn là tốt hơn so với ở điều kiện 16h sáng/8h tối.

Bảng 2. Ảnh hưởng của nồng độ đường đến khả năng tạo rễ bất định của mô lá cây lạc sau 6 tuần nuôi cấy

Đường (g/l)	Tỷ lệ mẫu tạo rễ (%)	Số rễ/mẫu (rễ)	Tỷ lệ mẫu tạo callus (%)
0	0 ^a	-	0 ^a
20	0 ^a	-	90 ^b
30	66,7 ^c	4,1 ^c	96,7 ^b
40	43,3 ^b	2,8 ^b	100 ^b
50	36,7 ^b	2,2 ^b	86,7 ^b

Chú thích: Nền môi trường: MS + 5 mg/l α -NAA;

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. Sự hình thành rễ bất định từ mô lá cây lạc trên môi trường MS bổ sung 5 mg/l α -NAA và đường sucrose ở các nồng độ khác nhau sau 6 tuần nuôi cấy

Bảng 3. Ảnh hưởng của chế độ chiếu sáng đến khả năng tạo rễ bất định của mô lá cây lạc sau 6 tuần nuôi cấy

Chế độ chiếu sáng	Tỉ lệ mẫu ra rễ (%)	Số rễ/mẫu (rễ)	Tỉ lệ mẫu tạo callus (%)
16h sáng/8h tối	73,3 ^a	3,9 ^a	93,3 ^a
24h tối	86,7 ^a	5,5 ^b	100 ^a

Chú thích: Môi trường nuôi cấy: MS + 5 mg/l α -NAA + 30 g/l sucrose;

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).



16h sáng/8h tối



24h tối

Hình 3. Sự hình thành rễ bất định từ mô lá cây lạc sau 6 tuần nuôi cấy trên môi trường MS + 5 mg/l α -NAA + 30 g/l sucrose ở hai chế độ chiếu sáng

3.2. Khảo sát một số yếu tố ảnh hưởng đến sự sinh trưởng rễ bất định cây lạc

3.2.1 Ảnh hưởng của α -NAA/IBA/IAA đến sự sinh trưởng rễ bất định cây lạc

Kết quả khảo sát ảnh hưởng của 3 auxin α -NAA, IBA và IAA đến khả năng tăng trưởng của rễ bất định cây lạc ở bảng 4 cho thấy cả ba auxin đều có ảnh hưởng tích cực. Trên môi trường đối chứng không bổ sung auxin, đoạn rễ bất định có kích thước 1,0cm hoàn toàn không phân nhánh và không có sự phát triển (Bảng 4, Hình 4). Ở các công thức bổ sung auxin, tỉ lệ rễ phân nhánh dao động từ 7,5-100% và số rễ nhánh/mẫu dao động từ 1,56-4,9 rễ tùy thuộc vào loại auxin và nồng độ sử dụng. Tỉ lệ rễ phân nhánh và số rễ nhánh/mẫu tăng tỉ lệ thuận với nồng độ auxin và đạt cao nhất khi bổ sung 1 mg/l với tỉ lệ mẫu tạo rễ đạt tương ứng 100%, 60% và 20%; số rễ nhánh/mẫu đạt 4,9; 2,46 và 2,16 rễ sau 4 tuần nuôi cấy (Bảng 4).

Trên môi trường không bổ sung auxin các mẫu đoạn rễ bất định không sinh nhánh, rễ chuyển màu nâu đen và có xu hướng dừng phát triển sau khoảng 2 tuần nuôi cấy. Ngược lại,

trên môi trường bổ sung auxin, rễ bất định cây lạc chuyển sang màu vàng, phân nhánh sau khoảng 10 ngày, rễ nhánh phát triển lan rộng và ăn sâu xuống môi trường. Trên môi trường có chứa auxin ở nồng độ cao (0,5-1,0 mg/l) nhiều rễ nhánh phát triển rễ phụ. Môi trường bổ sung IAA và IBA không quan sát thấy hiện tượng callus xuất hiện từ rễ lạc, tuy nhiên trên môi trường bổ sung α -NAA ở nồng độ $\geq 0,25$ mg/l, callus xuất hiện đồng thời với sự xuất hiện rễ nhánh (Hình 4).

Có thể thấy, bổ sung auxin vào môi trường nuôi cấy có ảnh hưởng tích cực trong việc làm gia tăng tỉ lệ rễ phân nhánh cũng như số rễ nhánh, do vậy làm tăng sinh khối rễ bất định cây lạc. Trong 3 auxin khảo sát, α -NAA có ảnh hưởng mạnh mẽ hơn IAA và IBA đến sự tăng trưởng rễ bất định cây lạc với nồng độ tối ưu là 1 mg/l.

3.2.2. Ảnh hưởng của nền môi trường nuôi cấy đến sự sinh trưởng của rễ bất định cây lạc

Theo kết quả nghiên cứu của Sivakumar & cs. (2005), dinh dưỡng khoáng là một trong

những yếu tố quan trọng ảnh hưởng đến sự sinh trưởng và tăng sinh khối rễ *in vitro*. Kế thừa kết quả của thí nghiệm trên, bốn nền môi trường gồm MS, 1/2 MS, B5 và 1/2 B5 bổ sung 1 mg/l α -NAA được sử dụng để khảo sát ảnh hưởng của nền môi trường nuôi cấy đến sự tăng sinh khối rễ bất định cây lạc. Kết quả sau 6 tuần nuôi cấy cho thấy tỉ lệ mẫu rễ phân nhánh và số nhánh/rễ đạt cao nhất, tương ứng đạt 95% và 4,53 rễ, khi nuôi cấy rễ lạc trên môi trường nền MS (Bảng 5). Giảm hàm lượng khoáng còn 1/2 MS làm giảm tỉ lệ mẫu rễ phân nhánh (52,5%) và số rễ nhánh/mẫu (2,05 rễ). Môi trường nền B5 với hàm lượng khoáng đầy đủ hay giảm 1/2 đều làm giảm sự tăng trưởng rễ lạc so với môi trường nền MS và 1/2 MS. Cụ thể, tỉ lệ

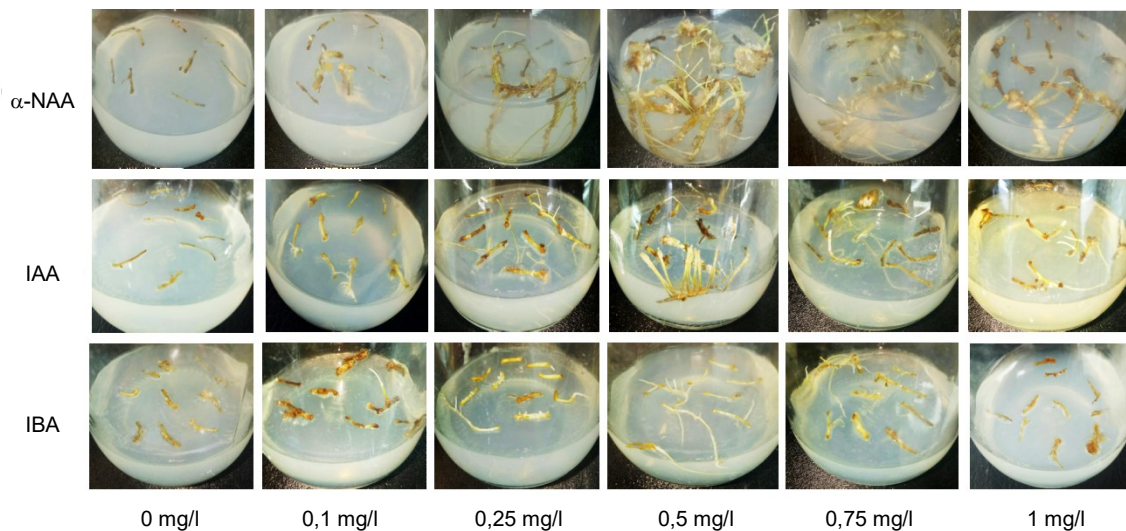
rễ phân nhánh trên môi trường B5 và 1/2 B5 đạt tương ứng 17,5% và 10% với số nhánh/mẫu lần lượt đạt 1,71 và 1,25 rễ (Bảng 5).

Các mẫu rễ trên môi trường nền MS và 1/2 MS trong quá trình nuôi cấy chuyển từ màu trắng sang màu vàng, rễ phân nhánh sau khoảng một tuần, các rễ nhánh phát triển mạnh, lan rộng trên bề mặt và sau đó ăn sâu xuống môi trường. Trong khi đó, rễ lạc trên môi trường B5 và 1/2 B5 có xu hướng chuyển màu nâu và đen, rễ nhánh hình thành chậm và ít hơn (Hình 5). Trên cả bốn nền môi trường khảo sát các mẫu rễ đều tạo callus từ vị trí hai đầu vết cắt đồng thời với thời điểm rễ nhánh xuất hiện.

Bảng 4. Ảnh hưởng của α -NAA/IBA/IAA đến sự tăng trưởng rễ bất định cây lạc sau 6 tuần nuôi cấy

Nồng độ (mg/l)	Tỉ lệ rễ phân nhánh (%)			Số rễ nhánh/mẫu (rễ)		
	α -NAA	IAA	IBA	α -NAA	IAA	IBA
0	0 ^a	0 ^a	0 ^a	-	-	-
0,1	22,5 ^b	17,5 ^a	0 ^a	1,8 ^a	1,43 ^a	-
0,25	25 ^b	22,5 ^{ab}	7,5 ^{ab}	2,38 ^{ab}	1,56 ^{ab}	1,67 ^a
0,5	40 ^b	40 ^b	12,5 ^{ab}	2,63 ^b	1,75 ^{ab}	1,8 ^a
0,75	80 ^c	50 ^{bc}	15 ^{ab}	3,89 ^c	2,1 ^{bc}	1,83 ^a
1	100 ^c	60 ^c	20 ^b	4,9 ^d	2,46 ^c	2,16 ^a

Chú thích: 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).

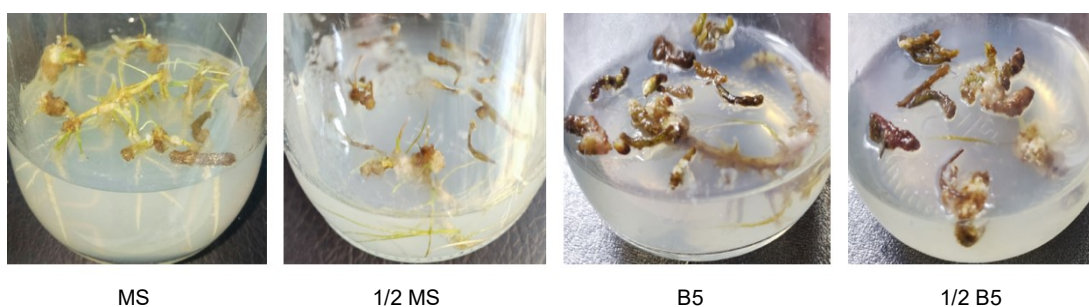


Hình 4. Rễ bất định cây lạc trên môi trường MS bổ sung auxin ở các nồng độ khác nhau sau 6 tuần nuôi cấy

Bảng 5. Ảnh hưởng của nền môi trường nuôi cấy đến sự sinh trưởng của rễ bất định cây lạc sau 6 tuần nuôi cấy

Môi trường nền	Tỉ lệ rễ phân nhánh (%)	Số rễ nhánh/mẫu (rễ)
MS	97,5 ^c	4,53 ^c
½ MS	52,5 ^b	2,05 ^b
B5	17,5 ^a	1,71 ^{ab}
½ B5	10 ^a	1,25 ^a

Chú thích: Môi trường nuôi cấy: Môi trường nền + 1 mg/l α -NAA + 30 g/l sucrose; 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. Rễ bất định cây lạc trên bốn nền môi trường bổ sung 1 mg/l α -NAA sau 6 tuần nuôi cấy

Theo nghiên cứu của Cui & cs. (2010), tỉ lệ $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ trong môi trường nuôi cấy là yếu tố quyết định đến sự tăng trưởng rễ bất định cũng như sự tích lũy hợp chất mục tiêu. Tỉ lệ $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ trong môi trường MS cao gấp 16 lần so với môi trường B5, có thể vì thế mà sự tăng trưởng rễ bất định cây lạc trên hai môi trường này có sự khác biệt. Qua nghiên cứu này, nền môi trường MS được xác định là phù hợp để nuôi cấy rễ bất định cây lạc.

4. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã xác định được môi trường và điều kiện nuôi cấy thích hợp để cảm ứng tạo rễ bất định *in vitro* từ mô lá cây lạc là MS + 30 g/l sucrose + 5 mg/l α -NAA, nuôi cấy trong tối hoàn toàn, cho tỉ lệ mẫu tạo rễ đạt 87,5% và số rễ/mẫu đạt 5,5 rễ sau 6 tuần. Môi trường thích hợp để nhân nuôi rễ bất định *in vitro* cây lạc là MS + 30 g/l sucrose + 1 mg/l α -NAA, cho rễ bất định phân nhánh với tỉ lệ 100%, số rễ nhánh/mẫu đạt 4,9 rễ sau 6 tuần nuôi cấy.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Alallaq S., Ranjan A., Brunoni F., Novák O., Lakehal A. & Bellini C. (2020). Red light controls adventitious root regeneration by modulating hormone homeostasis in *Picea abies* seedlings. *Frontiers in Plant Science*. 11: 586140.
- Cui X.H., Murthy H.N., Wu C.H. & Paek K.Y. (2010). Adventitious root suspension cultures of *Hypericum perforatum*: effect of nitrogen source on production of biomass and secondary metabolites. *In vitro culture and Developmental Biology Plant*. 46(5): 437-444.
- Gamborg O.L., Miller R.A. & Ojima K. (1968). Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research*. 50(1): 151-158.
- Gligorijević N., Stanić-Vučinić D., Radomirović M., Stojadinović M., Khulal U., Nedić O. & Ćirković Veličković T. (2021). Role of resveratrol in prevention and control of cardiovascular disorders and cardiovascular complications related to COVID-19 disease: Mode of action and approaches explored to increase its bioavailability. *Molecules*. 26: 2834.
- Hussain M.J., Abbas Y., Nazli N., Fatima S., Drouet S., Hano C. & Abbasi B.H. (2022). Root cultures, a

- boon for the production of valuable compounds: A comparative review. *Plants*. 11: 439.
- Hussein S., Ling A.P.K., Ng T.H., Ibrahim R. & Paek K.Y. (2012). Adventitious roots induction of recalcitrant tropical woody plant, *Eurycoma longifolia*. *Romanian Biotechnological Letters*. 17(1): 7026-7025.
- Huỳnh Thị Luỹ, Nguyễn Hữu Hồ & Bùi Văn Lê (2021). Tạo rễ bất định trực tiếp từ mô lá cây ngũ gia bì chân chim (*Schefflera octophylla* (Lour). Harms) nuôi cấy *in vitro*. *Tạp chí Công nghệ sinh học*. 19(3): 495-507.
- Khalafalla M.M., Daffalla H.M., El-Shemy H.A. & Abdellatef E. (2009). Establishment of *in vitro* fast-growing normal root culture of *Vernonia amygdalina*- a potent African medicinal plant. *Journal of Central European Agriculture*. 8(21): 5952-5957.
- Khanam M.N., Anis M., Javed S.B., Mottaghipisheh J. & Csupor D. (2022). Adventitious root culture an alternative strategy for secondary metabolite production: A review. *Agronomy*. 12: 1178.
- Khattar S., Khan S.A., Zaidi S.A.A., Darvishikolour M., Farooq U., Naseef P.P., Kurunian M.S., Khan M.Z., Shamim A., Khan M.M.U., Iqbal Z. & Mirza M.A. (2022). Resveratrol from dietary supplement to a drug candidate: An assessment of potential. *Pharmaceuticals*. 15(8): 957.
- Kim J.S., Lee S.Y. & Park S.U. (2008). Resveratrol production in hairy root culture of peanut, *Arachis hypogaea* L. transformed with different *Agrobacterium rhizogenes* strains. *African Journal of Biotechnology*. 7(20): 3788-3790.
- Ling A., Chin M.F. & Hussein S. (2009). Adventitious root production of *Centella asiatica* in response to plant growth regulators and sucrose concentrations. *Medicinal and Aromatic Plant Science and Biotechnology*. 3(1): 36-41.
- Ling A.P.K., Tan K.P. & Hussein S. (2013). Comparative effects of plant growth regulators on leaf and stem explants of *Labisia pumila* var. *alata*. *Journal of Zhejiang University SCIENCE B*. 14: 621-631.
- Medina-Bolivar F., Condori J., Rimando A.M., Hubstenberger J., Shelton K., O'Keefe S.F., Bennett S. & Dolan M.C. (2007). Production and secretion of resveratrol in hairy root cultures of peanut. *Phytochemistry*. 68(14): 1992-2003.
- Murashige T. & Skoog F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Plant Physiology*. 15: 473-497.
- Nandagopal S. & Kumari B.D.R. (2007). Effectiveness of auxin induced *in vitro* root culture in chicory. *Journal of Central European Agriculture*. 8(1): 73-80.
- Ninh Thị Thảo, Nguyễn Thị Phương Thảo, Nguyễn Thị Thùy Linh, Nguyễn Tuấn Minh, Nguyễn Quỳnh Chi & Trần Thị Anh Đào (2016). Nghiên cứu cảm ứng và nuôi cấy rễ bất định cây Ba kích (*Morinda officinalis* How). *Tạp chí Khoa học Nông nghiệp Việt Nam*. 14(6): 921-930.
- Nguyễn Thị Liễu, Nguyễn Trung Thành & Nguyễn Văn Kết (2011). Nghiên cứu khả năng tạo rễ bất định của sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis*, Ha et Grushv.) trong nuôi cấy *in vitro*. *Tạp chí Khoa học ĐHQGHN, Khoa học Tự nhiên và Công nghệ*. 27: 30-36.
- Nguyễn Thị Ngọc Hương & Võ Thị Bạch Mai (2009). Tìm hiểu sự phát sinh hình thái rễ trong nuôi cấy *in vitro* cây nhàu (*Morinda citrifolia* L.). *Tạp chí Phát triển Khoa học và Công nghệ*. 12(17): 100-105.
- Park Y.-E., Park C.-H., Yeo H.-J., Chung Y.-S. & Park S.-U. (2021). Resveratrol biosynthesis in hairy root cultures of tan and purple seed coat peanuts. *Agronomy*. 11: 975.
- Pop T.I., Pamfil D. & Bellini C. (2011). Auxin control in the formation of adventitious roots. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*. 39(1): 307-316.
- Rahmat E. & Kang Y. (2019). Adventitious root culture for secondary metabolite production in medicinal plants: A Review. *Plant Biotechnology Journal*. 46: 143-157.
- Saiman M.Z., Mustafa N.R., Schulte A.E., Verpoorte R. & Choi Y.H. (2012). Induction, characterization, and NMR-based metabolic profiling of adventitious root cultures from leaf explants of *Gynura procumbens*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 109(3): 465-475.
- Salehi B., Mishra A.P., Nigam M., Sener B., Kilic M., Sharifi-Rad M., Fokou P.V.T., Martins N. & Sharifi-Rad J. (2018). Resveratrol: A double-edged sword in health benefits. *Biomedicines*. 6(3): 91.
- Sharma S.N., Jha Z. & Sinha R.K. (2013). Establishment of *in vitro* adventitious root cultures and analysis of andrographolide in *Andrographis paniculata*. *Natural Product Communications*. 8(8): 1045-1047.
- Sivakumar G., Yu K.W. & Paek K.Y. (2005). Production of biomass and ginsenosides from adventitious roots of *Panax ginseng* in bioreactor cultures. *Engineering in Life Sciences*. 5(4).
- Son S.H., Choi S.M., Hyung S.J., Yun S.R., Choi M.S., Shin E.M. & Hong Y.P. (1999). Induction and cultures of mountain ginseng adventitious roots and AFLP analysis for identifying mountain ginseng. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. 4: 119-123.
- Sumaryono Wirdhatul M. & Diah R. (2012). Effect of carbohydrate source on growth and performance of

- in vitro* sago palm (*Metroxylon sagu* Rottb.) plantlets. HAYATI Journal of Biosciences. 19(2): 88-92.
- Taj F., Khan M.A., Ali H. & Khan R.S. (2019). Improved production of industrially important essential oils through elicitation in the adventitious roots of *Artemisia amygdalina*. Plants. 8: 430.
- Tchouga A.O, Deblauwe V., Djabou S.A.M., Forgione G., Hanna R. & Niemenak N. (2020). Micropropagation and effect of phloroglucinol on rooting of *Diospyros crassiflora* Hiern. HortScience. 55(4): 424-428.
- Tian L., Zeng Y., Zheng X. & Liu T. (2019). Detection of peanut oil adulteration mixed with rapeseed oil using gas chromatography and gas chromatography-ion mobility spectrometry. Food Analytical Methods. 12(9).
- Trương Quỳnh Như, Võ Thanh Phúc & Lê Thị Thuý Tiên (2015). Khảo sát ảnh hưởng của auxin lên sự hình thành và tăng sinh rễ bất định dứa cạn (*Catharanthus roseus* (L.) G. Don). Tạp chí Phát triển Khoa học và Công nghệ. 18: 75-86.
- Yang T., Fang L., Nopo-Olazabal C., Condori J., Nopo-Olazabal L., Balmaceda C. & Medina-Bolivar F. (2015). Enhanced production of resveratrol, piceatannol, arachidin-1, and arachidin-3 in hairy root cultures of peanut co-treated with Methyl Jasmonate and Cyclodextrin. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 63(15): 3942-3950.