

NGHIÊN CỨU CẢM ỨNG VÀ NUÔI CẤY RỄ BẤT ĐỊNH CÂY BA KÍCH (*Morinda officinalis* How)

Ninh Thị Thảo*, Nguyễn Thị Phương Thảo, Nguyễn Thị Thuỳ Linh,
Nguyễn Tuấn Minh, Nguyễn Quỳnh Chi, Trần Thị Anh Đào

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

Email*: nttthao@vnua.edu.vn

Ngày gửi bài: 11.05.2015

Ngày chấp nhận: 28.06.2016

TÓM TẮT

Nghiên cứu này được tiến hành nhằm tạo nguồn rễ bất định cây ba kích *in vitro* và bước đầu khảo sát một số yếu tố đến sự tăng trưởng rễ bất định. Đoạn thân và lá cây ba kích được nuôi cấy trên môi trường MS bổ sung α -NAA, IAA và IBA với 5 nồng độ khác nhau (0,1-1,0 mg/l) để cảm ứng tạo rễ bất định. Kết quả cho thấy, α -NAA thể hiện hiệu quả tạo rễ bất định từ đoạn thân cây ba kích tốt hơn so với IAA và IBA. Tỷ lệ đoạn thân tạo rễ đạt cao nhất (100%) trên môi trường bổ sung 0,75 mg/l α -NAA. Khác với vật liệu đoạn thân, mô lá cây ba kích hoàn toàn không cảm ứng tạo rễ bất định trên môi trường MS + 0,75 mg/l α -NAA sau 4 tuần nuôi cấy. Khả năng tăng trưởng của rễ bất định cây ba kích trên môi trường nền B5 cao hơn so với môi trường nền MS. Bổ sung α -NAA, IAA và IBA vào môi trường nuôi cấy có tác dụng thúc đẩy sự tăng sinh khối rễ bất định ba kích. Môi trường B5 + 1,0 mg/l α -NAA là thích hợp nhất cho nuôi cấy rễ bất định ba kích, cho khối lượng rễ tươi đạt được cao nhất (1,264 g) sau 12 tuần nuôi cấy.

Từ khóa: Ba kích, rễ bất định, α -NAA, IAA, IBA.

Adventitious Root Induction and Culture of *Morinda officinalis* How

ABSTRACT

This paper presents the results on induction of adventitious roots of *Morinda officinalis* How and effect of some chemical factors on adventitious root growth. Stem and leaf explants were cultured on MS medium supplemented with α -NAA, IAA and IBA at five concentrations (0.1-1.0 mg/l) to regenerate adventitious roots. Among the auxins, α -NAA showed the highest adventitious root formation for stem explants, followed by IAA and IBA. The maximum percentage of stem explants induced root (100%) was obtained when cultured on MS medium supplemented with 0.75 mg/l α -NAA after 4 weeks of culture. However, adventitious root induction was not observed in leaf explants cultured on MS + 0.75 mg/l α -NAA. Of the two tested media, B5 medium sustained better root growth than MS medium. α -NAA, IAA and IBA had positive effect on adventitious root growth and development. After 12 weeks, the highest adventitious root biomass (1.264 g) was obtained on B5 medium supplemented with 1.0 mg/l α -NAA.

Keywords: Adventitious root, α -NAA, IAA, IBA, *Morinda officinalis* How.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Cây ba kích (*Morinda officinalis* How) là một cây dược liệu phân bố tự nhiên ở Lào, Việt Nam, Trung Quốc, Ấn Độ, Triều Tiên. Theo nghiên cứu của Zhang *et al.* (2013), củ cây ba kích chứa nhiều hoạt chất dược liệu quý như

anthranoid, physcion, rubiadin, daucosterol... Dịch chiết của cây ba kích đã được chứng minh có tác dụng bổ thận, tăng cường sức đề kháng, giảm huyết áp, bổ trí não, giúp ăn và ngủ ngon (Li *et al.*, 2003). Ở Việt Nam, ba kích được xếp đứng đầu trong nhóm các vị thuốc bổ dương khí (Quyết định số 05/2008/QĐ-BYT). Do có giá trị

dược liệu và nhu cầu sử dụng cao, cây ba kích trong tự nhiên đang bị khai thác kiệt quệ. Theo Nghị định số 48/2002/NĐ-CP ban hành ngày 22 tháng 04 năm 2002 của Chính phủ, cây ba kích được đưa vào sách đỏ Việt Nam cần phải được bảo vệ.

Hiện nay, nguồn cung cấp dược liệu vẫn chủ yếu bằng thu hái tự nhiên và nuôi trồng truyền thống. Tuy nhiên, việc nuôi trồng lại phụ thuộc rất nhiều vào các điều kiện sinh thái và trồng trọt. Cây ba kích có thời gian thu hoạch phải từ 3 - 5 năm. Hơn nữa, việc phòng trừ các loại dịch bệnh, tồn dư của thuốc bảo vệ thực vật cũng là một vấn đề khó khăn. Với các ưu điểm như năng suất cao hàm lượng, chủ động quá trình sản xuất, tối ưu hoá quá trình chiết xuất hợp chất mục tiêu, nhân nuôi sinh khối cây dược liệu bằng phương pháp công nghệ sinh học để thu hợp chất thứ cấp là một giải pháp triển vọng để khắc phục những hạn chế của phương pháp nuôi trồng truyền thống. Tuy nhiên, trên đối tượng cây ba kích, các nghiên cứu chỉ mới tập trung vào đánh giá tác dụng dược lý (Chen *et al.*, 2013), phân tích thành phần hoá học (Feng *et al.*, 2012) hay nhân giống *in vitro* (Hoàng Thị Thế và cs., 2013; Võ Châu Tuấn và Huỳnh Minh Tư, 2010) mà chưa có nghiên cứu nào liên quan đến cảm ứng và nhân nuôi sinh khối trong điều kiện *in vitro*. Do vậy, có thể nói, đây là công trình đầu tiên ở Việt Nam và trên thế giới áp dụng công nghệ sinh học để cảm ứng và nhân nuôi rễ bất định cây ba kích góp phần đáp ứng nguồn nguyên liệu dùng chế biến sản phẩm sử dụng trong lĩnh vực y dược.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Nghiên cứu sử dụng đoạn thân và lá từ cây ba kích *in vitro* sinh trưởng, phát triển khỏe mạnh để cảm ứng tạo rễ bất định. Đoạn thân không mang nách lá có chiều dài khoảng 1,0 cm được đặt theo phương ngang trên môi trường nuôi cấy. Lá có cuống và lá không có cuống được gây vết thương bằng cách dùng dao khía nhẹ nhàng (không làm rách lá) 3-5 đường trên bề mặt lá, sau đó đặt bề mặt lá có vết thương tiếp xúc với môi trường nuôi cấy. Ba chất điều tiết sinh trưởng thuộc nhóm auxin gồm α -NAA, IAA

và IBA ở các nồng độ khác nhau (0,1-1,0 mg/l) được bổ sung vào môi trường nuôi cấy để cảm ứng đoạn thân và lá ba kích ra rễ bất định.

Rễ bất định ba kích sau khi cảm ứng được cắt với kích thước khoảng 1,0 cm và nuôi cấy trên nền môi trường MS và B5 có hoặc không có bổ sung chất điều tiết sinh trưởng thuộc nhóm auxin (IAA, IBA và α -NAA) ở các nồng độ khác nhau (0,1-1,0 mg/l) để khảo sát sự tăng trưởng của rễ bất định cây ba kích.

Môi trường nuôi cấy bổ sung 30 g/l sucrose được điều chỉnh pH = 5,8 trước khi hấp khử trùng ở nhiệt độ 121°C trong 20 phút, 1,1 atm. Điều kiện nuôi cấy *in vitro* là 16h sáng/8h tối, cường độ ánh sáng 2.000-2.500 lux, nhiệt độ 25 ± 2°C.

Các thí nghiệm được bố trí nhắc lại 3 lần mỗi công thức, mỗi công thức 90 mẫu đối với thí nghiệm tạo rễ bất định và 27 mẫu đối với thí nghiệm nhân nuôi rễ. Các chỉ tiêu được theo dõi và đo đếm sau 4 - 12 tuần tùy từng thí nghiệm. Số liệu được xử lý thống kê bằng chương trình Excel và IRRISTAT 5.0.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Khả năng tạo rễ bất định cây ba kích

Sự hình thành rễ bất định bao gồm 4 giai đoạn: tạo tế bào hoạt hóa, hình thành vùng tế bào mô phân sinh, hình thành sơ khởi rễ và kéo dài rễ. Sự hình thành tế bào hoạt hóa xảy ra ở vùng tượng tầng. Bên cạnh vai trò của kiểu gen, loại mô, bản chất và nồng độ của auxin có vai trò rất quan trọng trong sự hình thành rễ bất định. Giai đoạn hoạt hóa tế bào cần auxin ở nồng độ cao, trong khi giai đoạn kéo dài rễ cần auxin ở nồng độ thấp hơn (Verstraeten *et al.*, 2013).

3.1.1. Ảnh hưởng của α -NAA đến khả năng tạo rễ bất định của đoạn thân cây ba kích

Nhiều nghiên cứu đã chứng minh α -NAA là auxin có khả năng cảm ứng sự tạo rễ bất định *in vitro* từ các loại vật liệu khác nhau của nhiều loài thực vật. Theo Trần Thanh Hương và cs. (2009), trong khi 2,4-D có vai trò trong giai đoạn hoạt hóa tế bào để hình thành vùng tế bào mô phân sinh và tạo sơ khởi rễ ở cây chuối thì

α -NAA kích thích mạnh sự tăng trưởng của vùng tế bào kéo dài dẫn đến số rễ ở trạng thái kéo dài cao nhất. Trong nghiên cứu này, α -NAA được bổ sung vào môi trường nuôi cấy với nồng độ dao động từ 0,1 đến 1,0 mg/l để cảm ứng tạo rễ bất định đoạn thân cây ba kích. Kết quả sau 4 tuần theo dõi cho thấy, đoạn thân ba kích hoàn toàn không tạo rễ trên môi trường MS không bổ sung α -NAA. Trong khi đó, bổ sung α -NAA vào môi trường nuôi cấy đã cảm ứng đoạn thân ba kích tạo rễ bất định với tỷ lệ mẫu tạo rễ

dao động từ 44 – 100%. Tỷ lệ mẫu tạo rễ tăng dần và đạt cao nhất (100%) khi bổ sung 0,75 mg/l α -NAA vào môi trường nuôi cấy. Trên môi trường này, số rễ chính và chiều dài rễ cũng đạt cao nhất, tương ứng 4,53 rễ và 1,58 cm. Tăng nồng độ α -NAA bổ sung vào môi trường nuôi cấy lên 1,0 mg/l, tỷ lệ mẫu ra rễ giảm xuống 81%, tuy nhiên tỷ lệ mẫu ra rễ nhánh lại đạt cao nhất (66%). Trong khi đó số nhánh/mẫu cao nhất (7,07 nhánh/mẫu) ghi nhận được trên môi trường bổ sung 0,5 mg/l α -NAA (Bảng 1).

Bảng 1. Ảnh hưởng của α -NAA tới khả năng tạo rễ bất định của đoạn thân cây ba kích sau 4 tuần nuôi cấy

α -NAA (mg/l)	Tỷ lệ mẫu tạo rễ (%)	Số rễ chính/mẫu (rễ)	Chiều dài rễ chính (cm)	Tỷ lệ mẫu ra rễ nhánh (%)	Số nhánh/mẫu (nhánh)
0	0	-	-	-	-
0,1	44	2,18	0,82	20	2,17
0,25	69	2,89	1,2	60	3,10
0,5	89	4,54	0,94	64	7,07
0,75	100	4,53	1,58	56	5,82
1,0	81	4,94	0,9	66	5,49
LSD _{0,05}		0,77	0,18		0,19
CV%		1,3	1,1		2,6



0 mg/l α -NAA



0,1 mg/l α -NAA



0,25 mg/l α -NAA



0,5 mg/l α -NAA



0,75 mg/l α -NAA



1,0 mg/l α -NAA

Hình 1. Sự hình thành rễ bất định từ đoạn thân ba kích trên môi trường bổ sung α -NAA sau 4 tuần nuôi cấy

Quan sát hình thái mẫu cho thấy, sau 5 ngày nuôi cấy, các mẫu đoạn thân có xu hướng cong lên phía trên môi trường, hai đầu vết cắt xuất hiện callus và callus xuất hiện càng nhiều khi lượng α -NAA bổ sung vào môi trường nuôi cấy càng lớn. Trên môi trường bổ sung α -NAA, rễ bất định xuất hiện tại vị trí hai đầu vết cắt của đoạn thân và phát triển trên bề mặt môi trường nuôi cấy, trong khi đó trên môi trường đối chứng đoạn thân ba kích hoàn toàn không cảm ứng tạo rễ (Hình 1).

Như vậy, có thể thấy α -NAA có ảnh hưởng tích cực đến cảm ứng tạo rễ bất định từ đoạn thân cây ba kích. Xét tất cả các chỉ tiêu theo dõi, nồng độ α -NAA thích hợp để cảm ứng tạo rễ bất định từ đoạn thân cây ba kích là 0,75 mg/l.

3.1.2. Ảnh hưởng của IAA đến khả năng tạo rễ bất định của đoạn thân cây ba kích

Tương tự như α -NAA, bổ sung IAA vào môi trường nuôi cấy cũng có tác dụng kích thích đoạn thân ba kích tạo rễ bất định, với tỷ lệ mẫu tạo rễ dao động từ 36-67%. Trong đó bổ sung IAA ở nồng độ 0,75 mg/l cho tỷ lệ mẫu tạo rễ đạt cao nhất (67%). Đây cũng là công thức cho số rễ/mẫu đạt cao nhất (3,83 rễ). Bổ sung IAA ở nồng độ thấp (0,1 mg/l) cho tỷ lệ mẫu tạo rễ (36%) và số rễ chính/mẫu thấp (2,28 rễ), nhưng chiều dài rễ chính đạt cao nhất (1,99 cm). Tuy nhiên, khác với trường hợp bổ sung α -NAA, rễ bất định tạo ra trên môi trường bổ sung IAA không ra rễ nhánh, tỷ lệ rễ nhánh là 0% ở tất cả các công thức bổ sung IAA (Bảng 2).

Quan sát hình thái mẫu cho thấy các đoạn thân ba kích cũng có xu hướng cong lên và tạo callus ở 2 đầu vết cắt sau 3 - 5 ngày nuôi cấy. Tuy nhiên lượng callus cảm ứng ít hơn so với trên môi trường chứa α -NAA. Callus từ hai đoạn thân trên môi trường chứa IAA có màu vàng nâu trong khi callus từ đoạn thân trên môi trường đối chứng có màu xanh. Sau 7 - 10 ngày nuôi cấy, rễ bất định bắt đầu hình thành từ vị trí đoạn thân gần với vị trí callus xuất hiện. Các rễ bất định có màu trắng, ăn lan xuống bề mặt môi trường và không phân nhánh (Hình 2).

Bên cạnh α -NAA và IAA, nghiên cứu còn sử dụng IBA để cảm ứng tạo rễ bất định từ đoạn thân cây ba kích. Tuy nhiên, IBA hoàn toàn

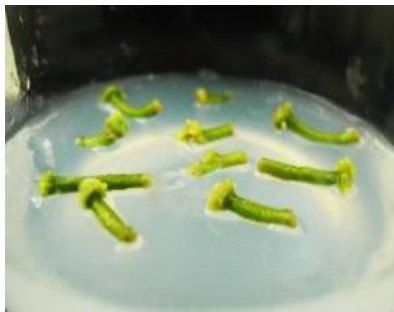
không có tác dụng cảm ứng tạo rễ bất định cây ba kích. Các mẫu đoạn thân ba kích trên môi trường bổ sung IBA tạo callus ở 2 đầu đoạn thân nhưng không tạo rễ. Mặc dù IBA không phải là auxin thích hợp cho tạo rễ bất định cây ba kích, nhưng trên một số đối tượng được liệu khác, IBA lại tỏ ra thích hợp cho sự hình thành và tăng trưởng rễ bất định như cây Nhân sâm (Nguyễn Trung Thành và Paek Kee Yoeup, 2008), cây sâm Ngọc Linh (Nguyễn Thị Liễu và cs., 2011).

So sánh ảnh hưởng của ba auxin gồm α -NAA, IAA và IBA đến sự tạo rễ bất định từ đoạn thân cây ba kích có thể thấy α -NAA có ảnh hưởng mạnh nhất đến sự cảm ứng tạo rễ bất định cây ba kích. Kết quả này cũng trùng với kết luận của Verstraeten *et al.* (2013) khi nghiên cứu sự tạo rễ bất định ở cây *Arabidopsis thaliana*. Verstraeten *et al.* (2013) đã bổ sung 5 auxin khác nhau gồm IAA, IBA, α -NAA, 2,4 D và picloram vào môi trường nuôi cấy để cảm ứng tạo rễ bất định từ đoạn thân cây *Arabidopsis* và nhận thấy, ở cùng nồng độ, trong khi IAA, IBA, α -NAA cảm ứng tạo rễ bất định thì 2,4 D và picloram hoàn toàn không cảm ứng rễ mà chỉ cảm ứng tạo callus từ mẫu cấy. Trong đó, α -NAA cho hiệu quả cảm ứng tạo rễ bất định cao hơn so với IAA và IBA. Theo Davies (1995), Litwack (2005), Taiz and Zeiger (2005), bên cạnh sự điều khiển hấp thu các chất hòa tan trong tế bào, auxin kích thích sự kéo dài tế bào thông qua sự tác động trực tiếp lên vách tế bào, do vậy kích thích sự kéo dài rễ bất định. Auxin kích thích hoạt động của bơm proton ở màng nguyên sinh chất, làm tăng nồng độ H^+ ở khoảng gian bào, khi đó pH giảm. Sự giảm pH của vách làm cho cầu nối giữa extensin, hemicellulose, các hợp chất pectin với cellulose bị phá vỡ; Ca^{2+} nối liền các chuỗi hợp chất pectin bị loại đi; một số enzym thủy phân được hoạt hóa giúp cho sự tổng hợp hoặc phân hủy polysaccharid và protein được thực hiện, giúp duy trì tính lỏng lẻo của vách tế bào.

Như vậy, có thể kết luận, môi trường MS + 0,75 mg/l α -NAA là tối ưu để cảm ứng tạo rễ bất định từ đoạn thân cây ba kích, cho tỷ lệ mẫu tạo rễ đạt 100% và số rễ/mẫu đạt 4,53 rễ sau 4 tuần nuôi cấy.

Bảng 2. Ảnh hưởng của IAA tới khả năng tạo rễ bất định của đoạn thân cây ba kích sau 4 tuần nuôi cấy

IAA (mg/l)	Tỷ lệ mẫu tạo rễ (%)	Số rễ chính/mẫu (rễ)	Chiều dài rễ chính (cm)	Tỷ lệ mẫu ra rễ nhánh (%)
0	0	-	-	-
0,1	36	2,28	1,99	0
0,25	49	2,41	1,79	0
0,5	48	2,21	1,66	0
0,75	67	3,83	1,41	0
1,0	39	2,32	0,98	0
LSD _{0,05}		0,76	0,46	
CV%		1,9	2,0	



0 mg/l IAA



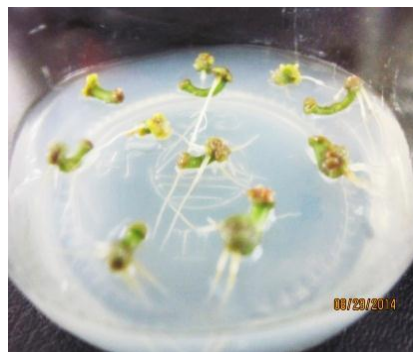
0,1 mg/l IAA



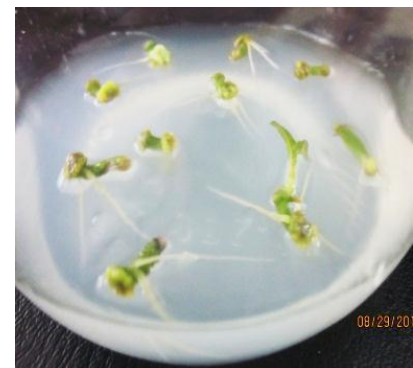
0,25 mg/l IAA



0,5 mg/l IAA



0,75 mg/l IAA



1 mg/l IAA

Hình 2. Sự hình thành rễ bất định từ đoạn thân ba kích trên môi trường bổ sung IAA sau 4 tuần nuôi cấy

Bảng 3. Ảnh hưởng của vật liệu đến khả năng tạo rễ bất định ba kích sau 4 tuần

Vật liệu	Tỷ lệ mẫu tạo rễ (%)	Số rễ chính/mẫu (rễ)	Chiều dài rễ chính (cm)	Tỷ lệ mẫu ra rễ nhánh (%)	Số nhánh/mẫu (nhánh)
Đoạn thân	100	4,48	1,55	56	5,85
Lá có cuống	0	-	-	-	-
Lá không có cuống	0	-	-	-	-

3.1.3. Ảnh hưởng của vật liệu nuôi cấy đến khả năng tạo rễ bất định của cây ba kích

Trong ba loại vật liệu sử dụng để cảm ứng tạo rễ bất định trên môi trường MS + 0,75 mg/l α -NAA (môi trường tối ưu cho tạo rễ bất định từ đoạn thân) gồm đoạn thân, lá có cuống và lá không có cuống, sau 4 tuần nuôi cấy, chỉ có đoạn thân cây ba kích cảm ứng tạo rễ bất định với tỷ lệ 100% với số rễ chính/mẫu đạt 4,48 rễ, trong khi đó mô lá có cuống và lá không có cuống hoàn toàn không tạo rễ bất định (Bảng 3). Quan sát trong quá trình làm thí nghiệm cho thấy, các mẫu cấy cũng có xu hướng cong lên trên bề mặt môi trường và tạo callus tại vị trí gây vết thương, ở đầu cuống lá và hai đầu đoạn thân sau khoảng 3 - 5 ngày nuôi cấy (Hình 3). Sau 7-10 ngày nuôi cấy, rễ bắt đầu xuất hiện từ mẫu đoạn thân, tại vị trí gần với vị trí xuất hiện callus. Sau 4 tuần nuôi cấy, 100% mẫu đoạn thân tạo rễ trong khi mô lá và lá có cuống vẫn chưa cảm ứng rễ (Hình 3A, B, C). Tuy nhiên, nếu nuôi cấy mẫu lá có cuống lâu hơn, cụ thể sau 6 tuần, một số mẫu rễ bất định bắt đầu xuất hiện tại vị trí đầu cuống lá nơi gần với vị trí của callus (Hình 3D).

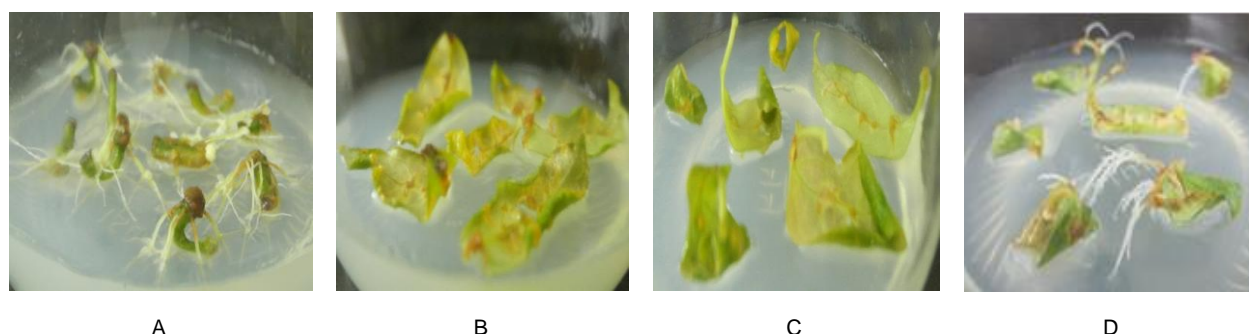
Sự hình thành rễ bất định không chỉ phụ thuộc vào kiểu gen, loại, nồng độ chất điều hòa sinh trưởng (Tiberiapop, 2001) mà còn phụ thuộc loại mô, cơ quan, tuổi và giai đoạn phát triển của cây (Võ Thị Bạch Mai, 2004). Nghiên cứu này ghi nhận sự khác nhau trong khả năng tạo rễ bất định giữa các vật liệu nuôi cấy khác nhau của cây ba kích. Khả năng tạo rễ bất định

của đoạn thân ba kích là cao hơn so với mô lá. Kết quả này cũng trùng với kết luận trong nghiên cứu của Ling *et al.* (2013). Ling *et al.* nghiên cứu tạo rễ bất định cây *Labisia pumila* var. *alata* từ vật liệu đoạn thân và lá và nhận thấy, khả năng tạo rễ bất định của đoạn thân cao hơn so với mô lá. Để giải thích cho điều này, nhóm tác giả cho rằng, sự có mặt của mô giống tiền tầng sinh gỗ (procambial-like tissue) ở các cấu trúc xung quanh mạch dẫn trong thân có vai trò lớn trong việc quyết định tạo rễ bất định. Theo Torres (1989), các tế bào có nguồn gốc khác nhau, trong các mô khác nhau sẽ có trạng thái sinh lý, sinh hóa khác nhau, do vậy mà khả năng hoạt hóa của các tế bào để hình thành mô phân sinh rễ và kéo dài rễ là khác nhau.

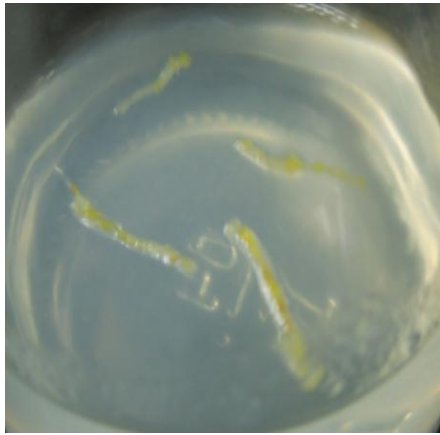
3.2. Khảo sát một số yếu tố ảnh hưởng đến sự tăng trưởng rễ bất định cây ba kích

3.2.1. Ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy đến sự tăng trưởng rễ bất định cây ba kích

Trong hai môi trường nên khảo sát là MS và B5, rễ bất định ba kích hoàn toàn không tăng trưởng trên môi trường nền MS. Sau 6 tuần nuôi cấy, tỷ lệ mẫu đẻ nhánh là 0%. Trong khi đó, trên môi trường nền B5, sau 6 tuần nuôi cấy tỷ lệ mẫu rễ đẻ nhánh là 44%, số nhánh/rễ đạt 1,88 rễ và chiều dài rễ đạt 0,32 cm (Bảng 4). Trong quá trình nuôi cấy, các mẫu rễ có xu hướng chuyển từ màu trắng sang màu vàng và trên môi trường B5, rễ bất định còn tạo callus đồng thời với sự phát sinh rễ nhánh (Hình 4).



Hình 3. Sự hình thành rễ bất định từ đoạn thân (A), lá không có cuống (B), lá có cuống (C) sau 4 tuần nuôi cấy và lá có cuống sau 6 tuần nuôi cấy (D) của cây ba kích trên môi trường MS + 0,75 mg/l



MS



B5

Hình 4. Rễ bất định cây ba kích trên môi trường MS và B5 sau 6 tuần nuôi cấy

Bảng 4. Ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy đến sự tăng trưởng rễ bất định cây ba kích sau 6 tuần nuôi cấy

Môi trường	Tỷ lệ rễ đẻ nhánh (%)	Số rễ nhánh (rễ)	Chiều dài rễ nhánh (cm)
MS	0	-	-
B5	44	1,88	0,32
LSD _{0,05}		0,13	0,84
CV%		4,4	4,7

Môi trường sử dụng trong thí nghiệm là môi trường MS và B5, đây là những môi trường được sử dụng phổ biến để nuôi cấy rễ *in vitro* nhiều đối tượng khác nhau như cây cà rốt (Lê Thị Thúy và cs., 2014); cây Nhân sâm (Nguyễn Trung Thành và Paek Kee Yoeup, 2008), cây nhàu (Nguyễn Thị Ngọc Hương và Võ Thị Bạch Mai, 2009)... Các môi trường trên chứa hầu hết các chất dinh dưỡng cần thiết, chủ yếu là khoáng cho sự sinh trưởng của rễ, tuy nhiên, hàm lượng khoáng trong các môi trường là khác nhau. Trong thành phần khoáng đa lượng của môi trường B5, hàm lượng NH_4^+ chỉ bằng 5% so với môi trường MS, nên tính đối kháng giữa sự đồng hoá đạm và hấp thu các cation đa lượng không cao, có thể vì thế mà rễ bất định cây ba kích tăng trưởng tốt hơn trên môi trường B5. Trong thành phần vitamin, thiamine đóng vai trò quan trọng trong sự chuyển hoá carbohydrate và trực tiếp tham gia vào quá trình sinh tổng hợp một số loại acid amin, cho nên thiamine cần được cung cấp liên tục trong

quá trình nuôi cấy. Thiamine hiện diện trong vitamin B5 với hàm lượng cao gấp 100 lần so với trong vitamin MS. Vì vậy, có thể thiamine cũng đã ảnh hưởng đến sự tăng trưởng của rễ bất định cây ba kích.

3.2.2. Ảnh hưởng của α -NAA/IAA/IBA đến sự tăng sinh khối rễ bất định cây ba kích

Nhiều nghiên cứu đã cho thấy các chất điều tiết sinh trưởng, đặc biệt là nhóm auxin, có ảnh hưởng đáng kể đến sự phát triển của rễ bất định trong điều kiện *in vitro*. Các loại auxin khác nhau với nồng độ khác nhau ảnh hưởng đến sự tăng trưởng của rễ và sự tổng hợp các hợp chất mục tiêu (Reis *et al.*, 2011; Amoo *et al.*, 2013). Trong nghiên cứu này ba auxin là α -NAA, IAA và IBA được bổ sung vào môi trường B5 ở các nồng độ khác nhau để khảo sát ảnh hưởng của chúng đến sự tăng trưởng của rễ bất định ba kích. Vật liệu nuôi cấy là đoạn thân ba kích có kích thước 1,0 cm. Kết quả sau 12 tuần nuôi cấy được trình bày ở bảng 5.

Bảng 5. Ảnh hưởng của α -NAA/IAA/IBA đến khả năng tăng sinh khối rễ bất định cây ba kích sau 12 tuần nuôi cấy

α -NAA/IAA/IBA (mg/l)	Khối lượng rễ tươi (g)		
	α -NAA	IAA	IBA
0	0,0853	0,0853	0,0853
0,1	0,823	0,19	0,682
0,25	0,979	0,181	0,573
0,5	1,106	0,279	0,882
1,0	1,264	0,358	1,149
LSD _{0,05}	0,014	0,017	0,03
CV%	0,9	4,3	2,5

Kết quả bảng 5 cho thấy, α -NAA, IAA và IBA có tác dụng tích cực trong tăng sinh khối rễ bất định. Ở tất cả các công thức bổ sung α -NAA, IAA, IBA đều cho thấy rễ bất định ba kích tăng trưởng mạnh hơn so với công thức đối chứng. Khối lượng rễ tươi thu được trên môi trường đối chứng đạt 0,0853 g sau 12 tuần nuôi cấy. Trong khi đó bổ sung auxin vào môi trường nuôi cấy làm tăng khối lượng rễ ba kích gấp từ 2,12 (môi trường chứa 0,25 mg/l IAA) đến 15,29 lần (môi trường chứa 1,0 mg/l α -NAA) so với công thức đối chứng. Trên môi trường bổ sung α -NAA, IAA và IBA, khối lượng rễ bất định tăng tỷ lệ thuận với nồng độ auxin và đạt cao nhất khi bổ sung 1,0 mg/l. Trên môi trường bổ sung 1,0 mg/l α -NAA, IAA và IBA, khối lượng rễ tươi đạt được lần lượt là 1,264 g; 0,358 g và 1,149 g sau 12 tuần nuôi cấy từ 1,0 cm rễ bất định ba kích (Bảng 5).

Quan sát hình thái cho thấy, trên môi trường không bổ sung auxin, số lượng nhánh thứ cấp sinh ra ít (khoảng 2-3 nhánh), các nhánh chủ yếu phát triển về chiều dài mà không phân nhánh phụ, các nhánh có màu trắng và chỉ phát triển lan trên bề mặt chứ không ăn sâu xuống môi trường nuôi cấy. Trong khi đó, ở môi trường bổ sung auxin, rễ ba kích có xu hướng chuyển sang màu vàng, để nhiều nhánh thứ cấp và có nhiều nhánh phụ phát triển từ nhánh thứ cấp. Rễ nhánh không chỉ phát triển lan rộng mà còn ăn sâu xuống môi trường nuôi cấy. Bổ sung auxin ở nồng độ cao, cụ thể bắt đầu từ nồng độ 0,5 mg/l α -NAA; 0,5 mg/l IBA và 1,0 mg/l IAA, callus xuất hiện từ rễ ba kích đồng thời với sự xuất hiện rễ thứ cấp (Hình 5).

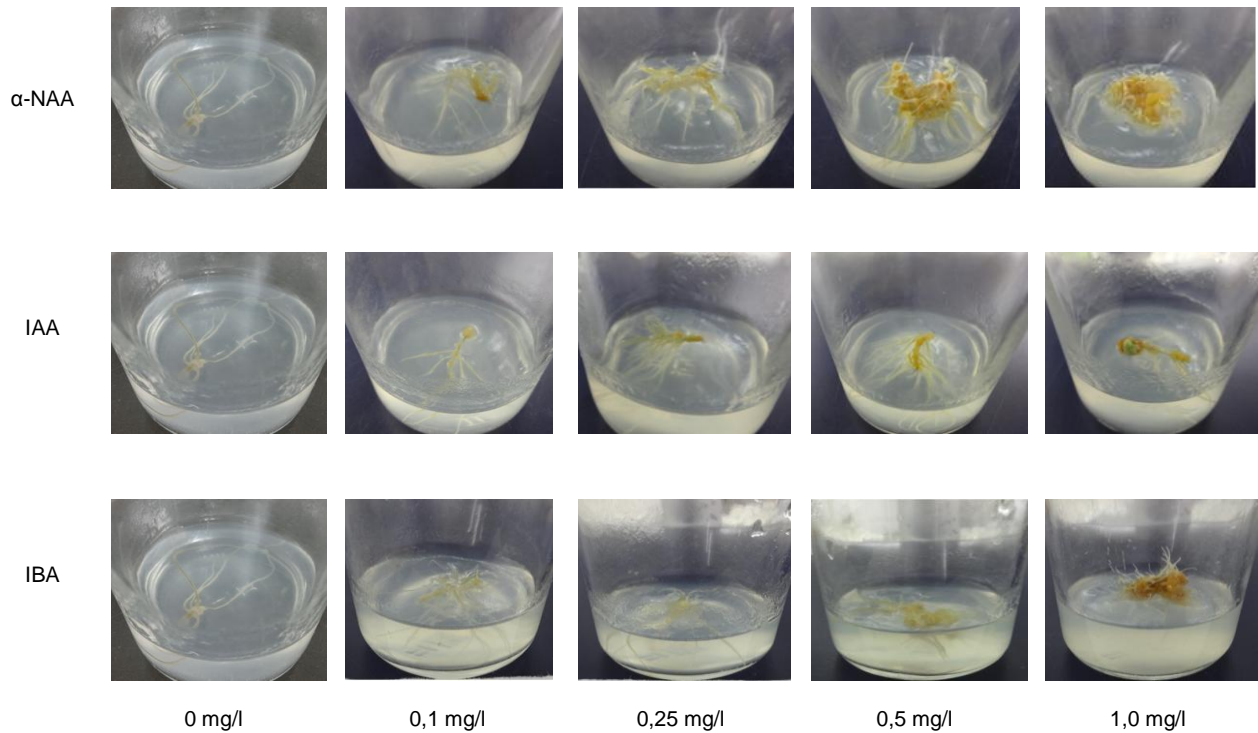
Như vậy, có thể thấy, bổ sung auxin vào môi trường nuôi cấy đã có tác dụng tích cực

trong việc làm gia tăng số lượng rễ nhánh, do vậy làm tăng sinh khối rễ bất định ba kích. Trong ba auxin sử dụng, α -NAA và IBA có ảnh hưởng mạnh mẽ hơn IAA đến sự tăng sinh khối rễ bất định ba kích. Kim *et al.* (2003) chứng minh IBA có ảnh hưởng mạnh mẽ đến sự hình thành rễ thứ cấp sau 7 ngày nuôi cấy rễ bất định của cây sâm *Panax ginseng*. San José *et al.* (2012) cũng đã chứng minh bổ sung 0,1 mg/l IBA vào môi trường nuôi cấy đã làm sự hình thành rễ thứ cấp của cây *Alnus glutinosa* gia tăng rõ rệt so với đối chứng trên môi trường không có IBA. Theo Abdullahil (2010), bổ sung α -NAA và IBA vào môi trường nuôi cấy làm gia tăng sinh khối rễ bất định cây *Morinda citrifolia*. Tuy nhiên nếu tăng nồng độ α -NAA vượt quá mức 0,5 mg/l hoặc nồng độ IBA vượt quá mức 1,0 mg/l thì xuất hiện callus từ rễ. Sự xuất hiện của callus không tăng khả năng tích lũy các hợp chất và làm giảm tính bền vững trong sản xuất hợp chất thứ cấp trong nuôi cấy rễ bất định (Abdullahil, 2010).

4. KẾT LUẬN

Đoạn thân là vật liệu thích hợp để tạo rễ bất định cây ba kích. Môi trường thích hợp nhất để tạo rễ bất định cây ba kích là MS + 0,75 mg/l α -NAA, cho tỷ lệ đoạn thân tạo rễ đạt 100%, số rễ/mẫu đạt 4,53 rễ và chiều dài rễ chính đạt 1,58 cm sau 4 tuần nuôi cấy.

Môi trường thích hợp cho sự tăng trưởng rễ bất định ba kích là B5 + 1,0 mg/l α -NAA, cho sinh khối rễ tươi đạt 1,264 g từ 1,0 cm rễ sau 12 tuần nuôi cấy.



Hình 5. Rễ bất định *in vitro* cây ba kích nuôi cấy trên môi trường MS bổ sung α -NAA/IAA/IBA sau 12 tuần nuôi cấy

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu được thực hiện với sự hỗ trợ kinh phí từ đề tài cấp trường, dự án Việt – Bỉ “Nghiên cứu tạo rễ bất định cây ba kích (*Morinda officinalis* How) và khảo sát một số yếu tố ảnh hưởng đến sự tăng sinh khối rễ bất định trong điều kiện *in vitro*”, mã số T2014-12-15-VB.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Abdullahil, B. (2010). Growth, secondary metabolite production and antioxidant enzyme response of *Morinda citrifolia* adventitious root as affected by auxin and cytokinin. *Plant Biotechnology Reports*, 4(2): 109-116.
- Amoo, S. O., Aremu, A. O., Staden, J. (2013) Shoot proliferation and rooting treatments influence secondary metabolite production and antioxidant activity in tissue culture-derived *Aloe arborescens* grown *ex vitro*. *Plant Growth Regulators*, 70: 115-122.
- Chen, D.L., Zhang, P., Lin, L., Shuai, O., Zhang, H.M., Liu, S.H., Wang J.Y. (2013). Protective effect of Bajijiasu against β -amyloid-induced neurotoxicity in PC12 cells. *Cell Molecules Neurobiological*, 33(6): 837-850.
- Davies, P.J. (1995). *Plant Hormones*. Kluwer Academic Publishers.
- Feng, F., Wang, L.L., Lai, X.P., Li, Y.B., Cao, Z.M., Zhou, Y.J. (2012). Study on oligosaccharides from *Morinda officinalis*. *Zhong Yao Cai*, 35(8): 1259-1262.
- Hoàng Thị Thế, Nguyễn Thị Phương Thảo, Ninh Thị Thảo, Nguyễn Thị Thủy (2013). Quy trình nhân giống *in vitro* cây ba kích (*Morinda officinalis* How). *Tạp chí Khoa học và Phát triển*, 11(3): 285-292.
- Kim, J. S., Hahn, E. J., Yeung, E. C., Paek, K. Y. (2003). Lateral root development and saponin accumulation as affected by IBA or NAA in adventitious root cultures of *Panax ginseng* C. A. Meyer. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, 39(2): 245-249.
- Lê Thị Thúy, Trịnh Mộng Nhi, Phạm Văn Lộc (2014). Khảo sát ảnh hưởng của chất điều hòa tăng trưởng thực vật và môi trường nuôi cấy đến khả năng tạo rễ cà rốt trong nuôi cấy *in vitro*. *Tạp chí Đại học Thủ Dầu Một*, 5(18): 62-67.
- Li, Y.F., Gong, D.H., Yang, M., Zhao, Y.M., Luo, Z.P. (2003). Inhibition of the oligosaccharides extracted

- from *Morinda officinalis*, a Chinese traditional herbal medicine, on the corticosteron induced apoptosis in PC12 cells. *Life Sciences*, 72(8): 933-942.
- Ling, A.P., 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(7): 621-631.
- Litwack, G. (2005). Plant hormone, Vitamins and Hormones. Elsevier locations, 72: 544.
- 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 nghiên cứu *in vitro*. *Tạp chí Khoa học, Đại học Quốc gia Hà Nội*, 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.
- Nguyễn Trung Thành, Paek Kee Yoeup (2008). Nhân nhanh rễ bất định Nhân sâm *Panax ginseng* C.A. Meyer: ảnh hưởng của một số nhân tố lý hóa lên sự tăng trưởng sinh khối và sản phẩm trao đổi chất ginsenosides. *Tạp chí Khoa học Tự nhiên và Công nghệ*, 24: 318-323.
- Reis, R., Borges, A., Chierrito, T., de Souto, E., de Souza, L., Iacomini, M., de Oliveira, A., Goncalves, R. (2011). Establishment of adventitious root culture of *Stevia rebaudiana* Bertoni in a roller bottle system. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 106: 329-335.
- San José, M. C., Romero, L., Janeiro, L.V. (2012). Effect of indole-3-butyric acid on root formation in *Alnus glutinosa* microcuttings. *Silva Fennica*, 46(5): 643-654.
- Taiz, L., Zeiger (2005). *Plant Physiology*. The Benjamin/Cummings Publishing Company.
- Tiberiapop, Doru, P., Catherine, B. (2001). Auxin control in the formation of adventitious roots. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 39(1): 307-316.
- Torres, K. C. (1989). *Tissue culture technique for horticultural crops*. Chapman and Hall, New York-London, America, p. 284.
- Trần Thanh Hương, Bùi Trang Việt, Feng Teng Yung (2009). Vai trò của các chất điều hòa tăng trưởng thực vật trong sự hình thành rễ bất định từ các khúc cắt mang chồi ở một vài giống chuối (*Musa* sp.). *Tạp chí Phát triển Khoa học và Công nghệ*, 12(9): 23-30.
- Verstraeten I., Beeckman T., Geelen D. (2013). Adventitious root induction in *Arabidopsis thaliana* as a model for *in vitro* root organogenesis. *Methods in Molecular Biology*, 959: 159-175.
- Võ Châu Tuấn, Huỳnh Minh Tư (2010). 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): 01-09.
- Võ Thị Bạch Mai (2004). *Sự phát triển chồi và rễ*. Nhà xuất bản Đại học Quốc gia TP HCM.
- Zhang, H., Li, J., Xia, J., Lin, S. (2013). Antioxidant activity and physicochemical properties of an acidic polysaccharide from *Morinda officinalis*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 58: 7-12.