

Khảo sát sự tạo chồi xạ đen (*Ehretia asperula* Zol. and Mor.) *in vitro*

Lê Thị Thủy Tiên

Tóm tắt—Mẫu cây từ thân non cây xạ đen ngoài vườn được khử trùng để làm nguyên liệu cho các thí nghiệm tạo chồi. Sự cảm ứng chồi được thực hiện với BA (benzyl adenine) và TDZ (thidiazuron) riêng rẽ. Chồi mới xuất hiện từ vị trí chồi ngủ trên mẫu cây với chiều cao chồi cao nhất trên môi trường MS (môi trường Murashige và Skoog) bổ sung BA 0,6 mg/L (2,02 cm) sau 3 tuần nuôi cấy. Số lượng lá/chồi cũng cao hơn các nghiệm thức còn lại (8,31 lá/chồi). Chồi *in vitro* tiếp tục được sử dụng cho các thí nghiệm khảo sát ảnh hưởng của độ tuổi mẫu cây, hàm lượng biotin, môi trường khoáng, loại và nồng độ cytokinin lên sự hình thành, kéo dài chồi cũng như tạo cụm chồi. Kết quả chồi trên môi trường có biotin 5 mg/L tăng trưởng tốt hơn so với các nồng độ còn lại. Môi trường khoáng MS tỏ ra thích hợp nhất cho hình thành và kéo dài chồi, tiếp theo là môi trường WPM (woody plant medium) và SH (môi trường Schenk và Hildebrandt), trong khi môi trường B5 (môi trường Gamborg B5) có hiệu quả thấp nhất. Mẫu cây 3 tuần tuổi có thời gian xuất hiện chồi sớm hơn mẫu cây ở các độ tuổi khác (4 và 5 tuần tuổi), từ đó ảnh hưởng đến sự kéo dài chồi. BA ở nồng độ 1,5 mg/L phù hợp để tạo cụm chồi từ đốt thân xạ đen với số lượng chồi trung bình 3,91 chồi/mẫu sau 4 tuần nuôi cấy.

Từ khóa—biotin, cảm ứng chồi, môi trường khoáng, xạ đen *Ehretia asperula* Zol. and Mor.

1 MỞ ĐẦU

Xạ đen phân bố ở vùng núi tỉnh Hòa Bình, thuộc nhóm cây bụi trườn, cao 3–5 m, lá đơn mọc so le, phiến lá hình bầu dục, cụm hoa hình xim ở đỉnh cành [1]. Xạ đen trước đây được biết đến với tên khoa học là *Celastrus hindsii*

Benth, được sử dụng như một vị thuốc trong hỗ trợ điều trị ung thư ở Việt Nam từ năm 1999 do có chứa những hợp chất tự nhiên có giá trị dược liệu cao [2]. Năm 2009, tên khoa học chính xác của xạ đen được xác định là *Ehretia asperula* Zol. and Mor. [1]. Xạ đen được trồng ở vùng núi các tỉnh phía Bắc (chủ yếu ở Hòa Bình) theo kiểu tự phát và chưa được quan tâm phát triển bởi nhà nước. Theo thống kê của Bộ Y tế, số người mắc bệnh ung thư ở Việt Nam ngày càng tăng dẫn đến sự gia tăng nhu cầu về loại thảo dược này. Để mở rộng diện tích trồng trọt, việc nghiên cứu quy trình nhân giống xạ đen *in vitro* cần thiết để cung cấp một lượng lớn cây giống chất lượng cao cho nông dân. Tạo chồi là giai đoạn quan trọng trong quy trình nhân giống, ảnh hưởng đến giá thành của cây con, từ đó ảnh hưởng đến hiệu quả kinh tế của người trồng ở quy mô lớn. Những nghiên cứu bước đầu về khả năng vi nhân giống cây xạ đen được thực hiện bởi một số tác giả như Vũ Quang Nam và cộng sự, Lê Thị Thủy Tiên và Trần Văn Minh [3, 4]. Trong sự tạo chồi thực vật *in vitro*, ngoài tác động của chất điều hoà sinh trưởng thực vật ngoại sinh, các yếu tố khác như thành phần khoáng, biotin hay độ tuổi sinh lý của mẫu cây cũng có những ảnh hưởng quan trọng. Vì vậy, nghiên cứu này được thực hiện nhằm ghi nhận những yếu tố có thể ảnh hưởng đến sự hình thành và tăng trưởng chồi xạ đen *in vitro* góp phần vào việc làm tăng hệ số vi nhân giống cũng như kích thước chồi của loài thảo dược có giá trị này.

2 VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu

Vật liệu sử dụng để tạo chồi *in vitro* là các đoạn thân không mang lá, dài 3–4 cm chứa 1 chồi ngủ, từ chồi 3 tuần tuổi của cây xạ đen giâm cành,

Ngày nhận bản thảo 17-01-2018, Ngày chấp nhận đăng: 15-7-2018, Ngày đăng: 31-12-2018.

Lê Thị Thủy Tiên – Trường Đại học Bách khoa, ĐHQG-HCM

*Email: ltttien@hcmut.edu.vn

được cung cấp bởi Vườn ươm Bắc Bộ thuộc Trung tâm Giống Cây trồng tỉnh Vĩnh Phúc.

Hóa chất sử dụng trong thí nghiệm gồm khoáng đa lượng và vi lượng; vitamin; amino acid; chất điều hòa sinh trưởng và agar.

Phương pháp

Tạo chồi *in vitro*

Chồi xạ đen sau bước rửa sạch bụi bẩn với xà bông được khử trùng lần lượt với javel 5% (v/v) trong 15 phút và HgCl₂ 0,1% (w/v) trong 5 phút rồi cấy vào môi trường khởi đầu. Môi trường sử dụng là môi trường khoáng và vitamin MS [5] bổ sung saccharose 30 g/L. pH môi trường được điều chỉnh ở mức 5,8 trước khi hấp tiệt trùng ở 121°C trong 20 phút. Sau 1 tuần nuôi cấy, những mẫu không nhiễm sẽ được chuyển sang môi trường MS bổ sung cytokinin với loại và nồng độ thay đổi (BA nồng độ 0,3; 0,5 và 0,6 mg/L; TDZ nồng độ 0,3; 0,5 và 0,7 mg/L). Chồi hình thành sau 3 tuần nuôi cấy trên môi trường có loại và nồng độ cytokinin thích hợp nhất sẽ được cắt thành từng đốt thân mang 1 lá và cấy chuyển sang môi trường tương tự để tạo nguồn nguyên liệu cho các thí nghiệm tiếp theo. Đốt thân thứ 3 và 4 (mang 1 chồi ngủ) trên chồi qua 3 lần cấy chuyển (mỗi lần cách nhau 3 tuần) được sử dụng làm nguyên liệu tạo chồi.

Khảo sát ảnh hưởng của biotin lên sự tăng trưởng chồi

Đốt thân mang một chồi ngủ từ chồi *in vitro* 3 tuần tuổi được cấy trên môi trường MS bổ sung saccharose 30 g/L, BA 0,6 mg/L và biotin 1; 3; 5 và 9 mg/L.

Khảo sát ảnh hưởng của tuổi nguyên liệu lên sự tăng trưởng chồi

Đốt thân mang một chồi ngủ từ chồi *in vitro* 3, 4 và 5 tuần tuổi được cấy trên môi trường MS bổ sung saccharose 30 g/L; BA 0,6 mg/L và biotin 5 mg/L.

Khảo sát ảnh hưởng của môi trường khoáng lên sự tăng trưởng chồi

Đốt thân mang một chồi ngủ từ chồi *in vitro* 3 tuần tuổi được cấy trên các môi trường khoáng MS, WPM [6], SH [7] và B5 [8] bổ sung saccharose 30 g/L; BA 0,6 mg/L và biotin 5 mg/L.

Khảo sát ảnh hưởng của cytokinin đến sự tăng trưởng chồi

Đốt thân mang một chồi ngủ từ chồi *in vitro* 3 tuần tuổi được cấy trên môi trường khoáng MS bổ sung saccharose 30 g/L; biotin 5 mg/L và cytokinin với loại và nồng độ thay đổi (BA 0,3; 0,6 và 0,9 mg/L; zeatin 0,05; 0,1; 0,3; 0,5; 0,7 và 1 mg/L và TDZ nồng độ 0,05; 0,1; 0,3 và 0,5 mg/L). Trong đó, zeatin được khử trùng bằng màng lọc vô trùng với đường kính lỗ 0,22 µm.

Khảo sát ảnh hưởng của BA lên sự hình thành cụm chồi từ đốt thân xạ đen

Đốt thân mang một chồi ngủ từ chồi *in vitro* 3 tuần tuổi được cấy trên môi trường khoáng MS bổ sung saccharose 30 g/L; biotin 5 mg/L và BA nồng độ 1,2; 1,5; 1,8 và 2,1 mg/L.

Điều kiện nuôi cấy

Mẫu cấy được nuôi trong phòng tăng trưởng ở 25°C, ẩm độ 60 ± 10%, cường độ ánh sáng 4.000 lux với thời gian chiếu sáng 12 giờ/ngày.

Chỉ tiêu theo dõi

Tăng trưởng chồi: các thông số liên quan đến sự tăng trưởng chồi (chiều cao chồi, số lượng lá, chiều dài và chiều rộng lá) được đánh giá sau 4 tuần nuôi cấy.

Tạo cụm chồi: số lượng chồi hình thành mới được xác định sau mỗi tuần nuôi cấy. Chiều cao chồi được đo ở tuần thứ 4 của quá trình nuôi cấy. Chồi được đếm khi có chiều dài từ 1 mm.

Chiều cao chồi được đo từ bề mặt môi trường nuôi cấy đến đỉnh chồi, số lượng lá được xác định với các lá mở, chiều dài lá được đo từ đáy lá đến chóp lá, chiều rộng lá được đo ở vị trí rộng nhất của lá và vuông góc với gân chính.

Các chỉ tiêu được đo, đếm trực tiếp sau khi đưa chồi/cụm chồi ra khỏi bình nuôi cấy vào các thời điểm khảo sát.

Bố trí thí nghiệm

Thí nghiệm được bố trí theo kiểu 1 yếu tố hoàn toàn ngẫu nhiên. Bình sử dụng trong nuôi cấy là bình thủy tinh thể tích 100 mL chứa 15 mL môi trường. Mỗi bình chứa 4 mẫu cấy. Mỗi thí nghiệm gồm 5 bình. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần.

Xử lý số liệu

Số liệu được xử lý thống kê bằng phần mềm SPSS phiên bản 19 dành cho Windows.

3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Ảnh hưởng của cytokinin lên sự tạo chồi của khúc cắt thân cây xạ đen từ vườn ươm sau 3 tuần nuôi cấy

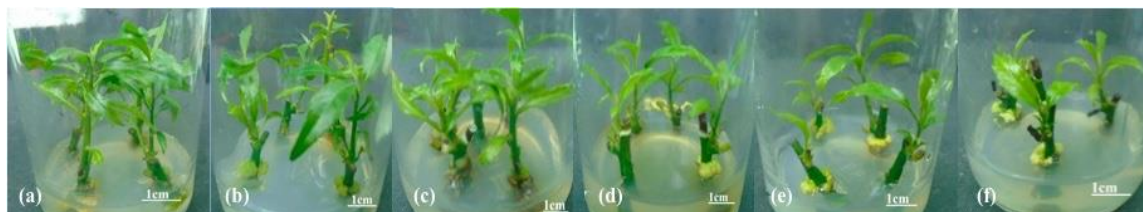
Sau 1 tuần nuôi cấy trên môi trường không có chất điều hòa sinh trưởng thực vật, những mẫu cấy vô trùng được chuyển sang môi trường MS bổ sung cytokinin để kích thích sự hình thành chồi

bên với tác động của BA và TDZ riêng rẽ. Hầu hết các mẫu cấy đều có sự xuất hiện chồi từ nách lá sau 1 tuần nuôi cấy tiếp theo, sau 3 tuần, chồi cao nhất trên môi trường có BA 0,6 mg/L (chiều cao chồi 2,02 cm với 8,31 lá) (Bảng 1). Lá nhỏ, màu xanh, có răng cưa tương tự như cây trồng ngoài vườn. Trên môi trường bổ sung TDZ, chồi phát triển chậm, nồng độ TDZ càng tăng, chiều cao chồi càng giảm, số lượng lá ít, kích thước lá nhỏ hơn (Hình 1). So với môi trường đối chứng không bổ sung cytokinin, TDZ dường như không có tác động rõ rệt trên sự cảm ứng tạo chồi xạ đen.

Bảng 1. Ảnh hưởng của cytokinin lên sự hình thành và tăng trưởng chồi từ mẫu cấy ban đầu

Cytokinin	Nồng độ mg/L	Số chồi hình thành	Chiều cao chồi (cm)	Số lượng lá
-	-	1	0,62 ± 0,15 ^c	4,38 ± 0,22 ^{de}
BA	0,3		1,13 ± 0,18 ^{cd}	5,19 ± 0,66 ^{cd}
	0,5		1,60 ± 0,06 ^b	7,02 ± 0,55 ^b
	0,6		2,02 ± 0,05 ^a	8,31 ± 0,31 ^a
TDZ	0,3		0,75 ± 0,17 ^{de}	4,24 ± 0,27 ^{de}
	0,5		0,72 ± 0,16 ^{de}	3,91 ± 0,25 ^{de}
	0,7		0,54 ± 0,11 ^e	3,53 ± 0,38 ^e

Chú thích: Các mẫu tự khác nhau (theo cột) thể hiện mức độ sai biệt có ý nghĩa ở độ tin cậy 95%



Hình 1. Ảnh hưởng của cytokinin lên sự hình thành và tăng trưởng chồi từ mẫu cấy ban đầu sau 3 tuần nuôi cấy

Chú thích: (a) BA 0,6 mg/L; (b) BA 0,5 mg/L; (c) BA 0,3 mg/L; (d) TDZ 0,3 mg/L; (e) TDZ 0,5 mg/L; (f) TDZ 0,7 mg/L

Cytokinin được bổ sung vào môi trường nuôi cấy để cảm ứng sự tạo chồi. Tuy nhiên, ảnh hưởng của loại và nồng độ cytokinin phụ thuộc vào khả năng hấp thu và đáp ứng của mẫu cấy. BA có tác động tích cực trong sự cảm ứng tạo chồi từ mẫu cấy ban đầu, đặc biệt ở nồng độ 0,6 mg/L. TDZ có hiệu quả kém hơn mặc dù đây là loại cytokinin được cho rằng có tác động cảm ứng chồi mạnh mẽ, giúp gỡ sự ngủ của chồi bên, kích

thích sự hình thành chồi ở nhiều loài thực vật bằng cách thúc đẩy các hoạt động sinh học tương tự như một sự phối hợp giữa cytokinin và auxin, hoặc có thể gây ra sự tổng hợp và tích lũy cytokinin nội sinh [9]. Tuy nhiên, TDZ không hiệu quả ở một số loài [10], điều này có lẽ đúng với xạ đen nên sự tạo chồi trên môi trường có TDZ không tốt như trên môi trường có BA.

Ảnh hưởng của biotin lên sự hình thành và tăng trưởng chồi

Khúc cắt thân từ chồi *in vitro* được nuôi cấy trên môi trường MS bổ sung BA 0,6 mg/L với sự hiện diện của biotin nồng độ biến thiên từ 3 đến 9 mg/L. Biotin ít có ảnh hưởng lên sự kéo dài chồi trừ nghiệm thức bổ sung biotin 5 mg/L, chiều cao chồi gấp đôi (2,64 cm) so với chồi ở những nghiệm thức còn lại. Sự hiện diện của biotin làm giảm số lượng lá trên chồi so với đối chứng nhưng không ảnh hưởng đáng kể đến kích thước lá (Bảng 2, Hình 2).

Biotin tham gia vào hoạt động sống của tế bào với vai trò là cofactor của các enzyme khử carboxyl và chuyển amine trong con đường sinh tổng hợp protein [11] hay có nhiều vai trò trong

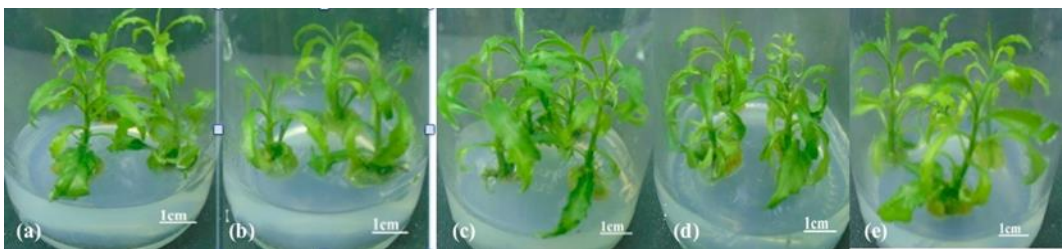
điều khiển biểu hiện gene ở thực vật, động vật như mã hóa glucokinase [12], phosphoenolpyruvate carboxykinase [13], holocarboxylase synthetase, acetyl-CoA carboxylase và propionyl-CoA carboxylase [14].

Về vai trò của biotin trong vi nhân giống, các tác giả cho rằng tác động của biotin trong sự kéo dài thân và rễ có lẽ phụ thuộc vào yếu tố “loài”. Ghi nhận này được làm rõ trong nghiên cứu của Samarina và cộng sự (2016) khi sự bổ sung 1–3 mg/L biotin làm tăng chiều dài trung bình của chồi *Gerbera jamesonii* nhưng ức chế sự tăng trưởng của chồi *Cordyline fruticosa* [15], sự hiện diện của biotin 1–9 mg/L không ảnh hưởng đáng kể đến chiều cao chồi nhưng làm giảm chiều dài rễ của chồi *Chrysanthemum hybridum*.

Bảng 2. Ảnh hưởng của biotin lên sự hình thành và tăng trưởng chồi xạ đen sau 4 tuần nuôi cấy

Biotin (mg/L)	Số chồi hình thành	Chiều cao chồi (cm)	Lá		
			Số lượng	Chiều dài (cm)	Chiều rộng (cm)
0	1	1,21 ± 0,04 ^b	10,24 ± 0,12 ^a	0,79 ± 0,01 ^a	0,23 ± 0,01 ^b
3		1,07 ± 0,05 ^b	8,44 ± 0,19 ^b	0,63 ± 0,01 ^c	0,19 ± 0,01 ^c
5		2,64 ± 0,06 ^a	9,20 ± 0,46 ^b	0,83 ± 0,01 ^a	0,27 ± 0,02 ^a
7		1,11 ± 0,02 ^b	8,50 ± 0,18 ^b	0,72 ± 0,02 ^b	0,22 ± 0,01 ^{bc}
9		1,04 ± 0,05 ^b	9,08 ± 0,18 ^b	0,78 ± 0,01 ^a	0,24 ± 0,01 ^{ab}

Chú thích: Các mẫu tự khác nhau (theo cột) thể hiện mức độ sai biệt có ý nghĩa ở độ tin cậy 95%



Hình 2. Ảnh hưởng của biotin lên sự hình thành và tăng trưởng chồi xạ đen sau 4 tuần nuôi cấy

Chú thích: (a) Biotin 0 mg/L; (b) Biotin 3 mg/L; (c) Biotin 5 mg/L; (d) Biotin 7 mg/L; (e) Biotin 9 mg/L

Ảnh hưởng của tuổi mẫu cây lên sự hình thành và tăng trưởng chồi

Tuổi mẫu cây ảnh hưởng quan trọng đến khả năng hình thành chồi từ chồi bên. Thật vậy, mẫu cây từ chồi *in vitro* 3 tuần tuổi có thời gian cảm ứng chồi ngắn hơn so với mẫu cây từ chồi 4 và 5 tuần tuổi. Vì vậy, sau 4 tuần nuôi cấy, chồi từ mẫu cây 3 tuần tuổi cao hơn chồi từ các mẫu cây còn lại nhưng số lượng lá, kích thước lá lại tương

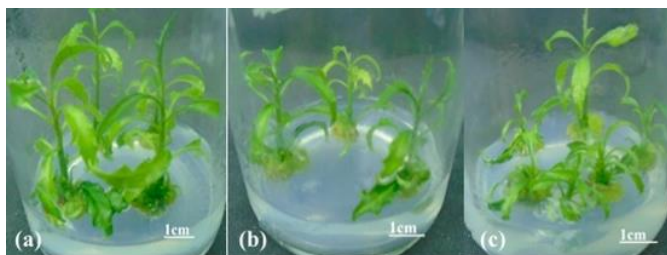
đương mẫu cây 4 tuần tuổi. Chồi từ mẫu cây 5 tuần tuổi có thời gian cảm ứng dài, chồi xuất hiện trễ hơn (sau 2 tuần nuôi cấy) nên chiều cao chồi thấp hơn so với các nghiệm thức còn lại (Bảng 3, Hình 3). Theo Edwin và cộng sự (2008), vật liệu thực vật ở các độ tuổi khác nhau có trạng thái sinh lý và sinh hóa khác nhau dẫn đến sự đáp ứng khác nhau với cùng điều kiện nuôi cấy. Đây có thể là nguyên nhân dẫn đến sự hình thành chồi từ mẫu

cây 5 tuần tuổi chậm hơn dẫn đến chồi thấp hơn so với chồi từ mẫu 3 và 4 tuần tuổi [16].

Bảng 3. Ảnh hưởng của độ tuổi mẫu cây lên sự tạo chồi sau 4 tuần nuôi cấy

Tuổi mẫu cây (tuần)	Số chồi hình thành	Chiều cao chồi (cm)	Lá		
			Số lượng	Chiều dài (cm)	Chiều rộng (cm)
3	1	2,64 ± 0,69 ^a	9,20 ± 0,46 ^a	0,83 ± 0,08 ^a	0,27 ± 0,02 ^a
4		1,37 ± 0,10 ^b	8,38 ± 0,38 ^a	0,71 ± 0,01 ^b	0,25 ± 0,01 ^a
5		1,10 ± 0,18 ^b	5,11 ± 0,35 ^b	0,52 ± 0,01 ^c	0,16 ± 0,01 ^b

Chú thích: Các mẫu tự khác nhau (theo cột) thể hiện mức độ sai biệt có ý nghĩa ở độ tin cậy 95%



Hình 3. Ảnh hưởng của độ tuổi mẫu cây lên sự tăng trưởng chồi sau 4 tuần nuôi cấy

Chú thích: (a) Chồi từ mẫu cây 3 tuần tuổi; (b) Chồi từ mẫu cây 4 tuần tuổi; (c) Chồi từ mẫu cây 5 tuần tuổi

Ảnh hưởng của môi trường khoáng lên sự kéo dài chồi

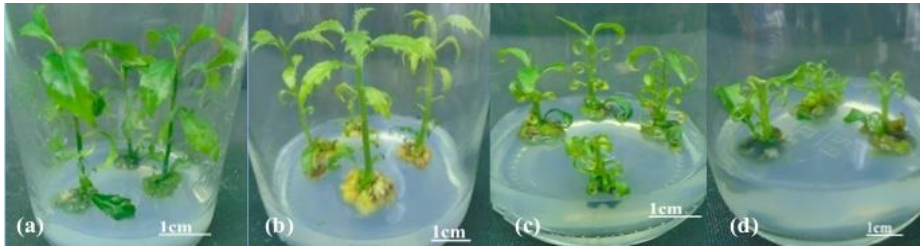
Môi trường khoáng ảnh hưởng quan trọng lên sự tăng trưởng chồi *in vitro*. Đây là yếu tố được lựa chọn đầu tiên để khởi đầu cho sự nuôi cấy tế bào thực vật *in vitro*. Nhu cầu về loại và hàm lượng khoáng khác nhau tùy theo loài thực vật cũng như tùy vào cơ quan nuôi cấy. Môi trường MS chứa đầy đủ các thành phần khoáng cần thiết cho sự tăng trưởng của nhiều loài thực vật trong khi môi trường WPM thích hợp hơn với các loài thực vật thân gỗ. Chồi xạ đen tăng trưởng trên môi trường MS tốt hơn các môi trường còn lại (bảng 4). Trên môi trường WPM, chồi kéo dài nhưng lá ngả vàng, trong khi trên môi trường SH và B5, chồi ngắn, lá xanh nhưng bị xoắn (hình 4). Như vậy, chồi xạ đen thích hợp với môi trường nuôi cấy có hàm lượng dinh dưỡng cao, đặc biệt

là hàm lượng nitrogen cao hơn so với các môi trường còn lại. Nitrogen trong môi trường nuôi cấy được chứng minh là yếu tố cảm ứng sự biểu hiện của những gen liên quan đến sự hấp thu và sử dụng nitrate. Đối với cây có nhu cầu nitrogen cao, khi tăng trưởng trên môi trường nghèo nitrogen, các enzyme nitrate reductase, nitrite reductase – enzyme cần thiết cho sự sử dụng nitrate – không được cảm ứng, chồi không sử dụng được nitrate nên chậm tăng trưởng [17]. Mặt khác, khi được nuôi cấy trên môi trường B5 và SH, lá nhỏ và cong, nguyên nhân có lẽ do sự thiếu hụt kẽm trong môi trường nuôi cấy [18]. Hàm lượng kẽm (ở dạng ZnSO₄.7H₂O) trong môi trường B5 và SH lần lượt là 2 và 1 mg/L, thấp hơn khá nhiều so với môi trường MS và WPM (8,6 mg/l).

Bảng 4. Ảnh hưởng của môi trường khoáng lên sự tăng trưởng chồi sau 4 tuần nuôi cấy

Môi trường khoáng	Số chồi hình thành	Chiều cao chồi (cm)	Lá		
			Số lượng	Chiều dài (cm)	Chiều rộng (cm)
MS	1	2,64 ± 0,69 ^a	9,20 ± 0,46 ^a	0,83 ± 0,02 ^a	0,27 ± 0,02 ^a
WPM		2,47 ± 0,18 ^a	8,80 ± 0,40 ^{ab}	0,40 ± 0,01 ^c	0,15 ± 0,01 ^b
SH		1,64 ± 0,01 ^b	7,80 ± 0,31 ^b	0,50 ± 0,02 ^b	0,16 ± 0,01 ^b
B5		0,57 ± 0,03 ^c	5,70 ± 0,18 ^c	0,39 ± 0,01 ^c	0,10 ± 0,00 ^c

Chú thích: Các mẫu tự khác nhau (theo cột) thể hiện mức độ sai biệt có ý nghĩa ở độ tin cậy 95%.



Hình 4. Ảnh hưởng của môi trường khoáng lên sự tăng trưởng chồi sau 3 tuần nuôi cấy
 Chú thích: (a) Môi trường MS; (b) Môi trường WPM; (c) Môi trường SH; (d) Môi trường B5

Ảnh hưởng của cytokinin lên sự tăng trưởng chồi từ chồi bên của khúc cắt thân *in vitro*

Cytokinin với loại và nồng độ khác nhau được bổ sung vào môi trường nuôi cấy để cảm ứng sự hình thành và kéo dài chồi từ khúc cắt thân xạ đen *in vitro*. Cytokinin cần thiết cho sự cảm ứng tạo chồi ở thực vật. Tuy nhiên, nhu cầu về loại và nồng độ cytokinin phụ thuộc vào đặc tính của từng loại thực vật. Hiệu quả tác động của cytokinin nói riêng hay chất điều hoà sinh trưởng thực vật nói chung khi áp dụng trong nuôi cấy tế bào thực vật phụ thuộc vào khả năng hấp thu và vận chuyển trong mẫu cấy [16]. Trong thí nghiệm này, nhiều nồng độ khác nhau của BA, zeatin và TDZ được áp dụng nhưng chỉ có sự hình thành một chồi duy nhất ở tất cả các nghiệm thức. Với môi trường có bổ sung BA, chồi cao hơn so với môi trường có zeatin và TDZ. Chồi dài nhất (2,64 cm) trên môi trường có BA 0,6 mg/L, tiếp theo là BA 0,3 mg/L (2,17 cm). Chồi ở các nghiệm thức

bổ sung BA có số lượng lá nhiều hơn so với các nghiệm thức khác, lá dài hơn, mềm mại hơn (Bảng 5, Hình 5). BA là loại cytokinin được áp dụng trong nhiều nghiên cứu để cảm ứng sự tạo chồi *in vitro* và trong thí nghiệm này, BA được chứng minh có hiệu quả hơn zeatin và TDZ.

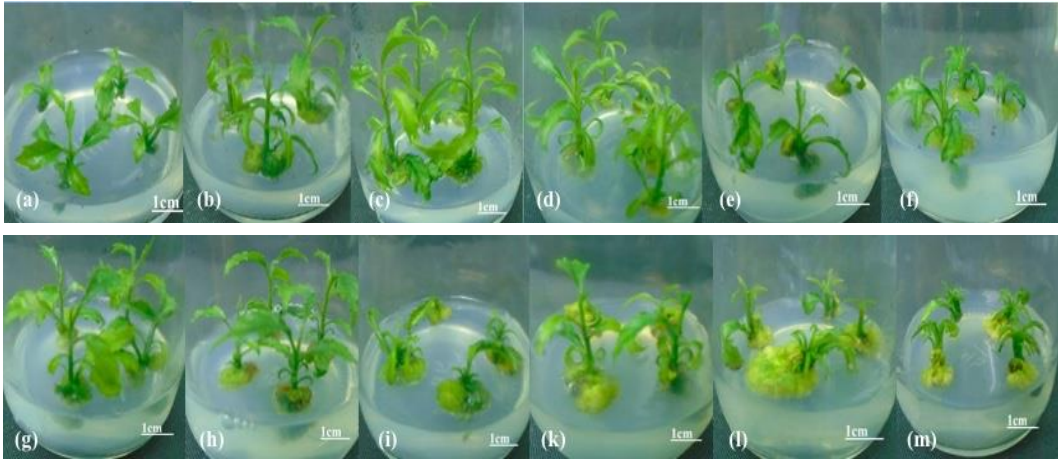
Zeatin ít có ảnh hưởng đến sự tạo chồi xạ đen. Chồi ở các nghiệm thức có zeatin cao hơn so với chồi ở các nghiệm thức có TDZ nhưng thấp hơn so với các nghiệm thức có BA. Số lượng lá của chồi trên môi trường có zeatin thấp hơn so với chồi môi trường có BA.

Chồi thấp nhất trên môi trường có TDZ 0,05 mg/L (0,15 cm sau 4 tuần nuôi cấy, trong khi chiều cao chồi không khác nhau ở các nghiệm thức có TDZ nồng độ 0,1; 0,3 và 0,5 mg/L. Chồi thấp, khoảng cách giữa các đốt thân ngắn, lá xếp sát nhau. Như vậy, TDZ dường như không có ảnh hưởng đến sự tăng trưởng chồi xạ đen (khi so sánh với nghiệm thức đối chứng).

Bảng 5. Ảnh hưởng của cytokinin lên sự hình thành và tăng trưởng chồi sau 4 tuần nuôi cấy

Cytokinin		Số chồi hình thành	Chiều cao chồi (cm)	Lá		
Loại	Nồng độ (mg/L)			Số lượng/chồi	Chiều dài (cm)	Chiều rộng (cm)
ĐC	0	1	0,26 ± 0,01 ^{ab}	5,11 ± 0,23 ^b	0,25 ± 0,01 ^{ab}	0,13 ± 0,00 ^{bc}
BA	0,3	1	2,17 ± 0,08 ^g	8,53 ± 0,08 ^f	0,81 ± 0,02 ^g	0,25 ± 0,02 ^{gh}
	0,6		2,64 ± 0,07 ^h	9,20 ± 0,46 ^{fg}	0,83 ± 0,02 ^g	0,27 ± 0,02 ^h
	0,9		1,26 ± 0,14 ^f	9,40 ± 0,51 ^g	0,67 ± 0,03 ^f	0,21 ± 0,01 ^f
Zeatin	0,05	1	0,37 ± 0,01 ^{bc}	4,95 ± 0,95 ^b	0,55 ± 0,01 ^e	0,24 ± 0,01 ^g
	0,1		0,47 ± 0,04 ^{cd}	5,60 ± 0,14 ^{bc}	0,44 ± 0,01 ^d	0,19 ± 0,00 ^{ef}
	0,3		0,90 ± 0,07 ^e	7,73 ± 0,29 ^c	0,44 ± 0,02 ^d	0,17 ± 0,00 ^{de}
	0,5		0,59 ± 0,03 ^d	6,85 ± 0,25 ^d	0,38 ± 0,01 ^c	0,15 ± 0,01 ^{cd}
	0,7		0,79 ± 0,09 ^e	6,16 ± 0,26 ^{cd}	0,37 ± 0,01 ^c	0,16 ± 0,01 ^d
	1,0		0,46 ± 0,01 ^{cd}	5,55 ± 0,14 ^{bc}	0,37 ± 0,01 ^c	0,16 ± 0,00 ^d
TDZ	0,05	1	0,15 ± 0,02 ^a	3,89 ± 0,21 ^a	0,23 ± 0,02 ^a	0,10 ± 0,01 ^a
	0,1		0,37 ± 0,01 ^{abc}	5,31 ± 0,29 ^b	0,23 ± 0,01 ^a	0,12 ± 0,01 ^{ab}
	0,3		0,30 ± 0,02 ^{abc}	5,64 ± 0,16 ^{bc}	0,28 ± 0,01 ^b	0,10 ± 0,00 ^a
	0,5		0,30 ± 0,01 ^{abc}	6,60 ± 0,06 ^d	0,29 ± 0,01 ^b	0,10 ± 0,00 ^a

Chú thích: Các mẫu tự khác nhau (theo cột) thể hiện mức độ sai biệt có ý nghĩa ở độ tin cậy 95%.



Hình 5. Ảnh hưởng của cytokinin lên sự hình thành và tăng trưởng của chồi xạ đen

Chú thích: (a) Đối chứng; (b) BA 0,3 mg/L; (c) BA 0,6 mg/L; (d) BA 0,9 mg/L; (e) Zeatin 0,05 mg/L; (f) Zeatin 0,1 mg/L; (g) Zeatin 0,3 mg/L; (h) Zeatin 0,5 mg/L; (i) TDZ 0,05 mg/L; (k) TDZ 0,1 mg/L; (l) TDZ 0,3 mg/L; (m) TDZ 0,5 mg/L

Ảnh hưởng của BA lên sự tạo cụm chồi

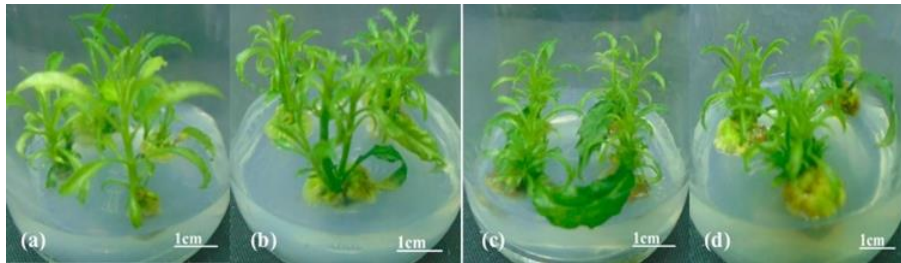
Khi áp dụng BA nồng độ cao (1,2; 1,5; 1,8 và 2,1 mg/L), chiều cao chồi thấp, lá nhỏ, đốt thân ngắn, chồi hình thành gần phần gốc của mẫu cây (Hình 6), số lượng chồi và chiều cao chồi càng giảm khi nồng độ BA càng tăng. Cùng với sự hình thành chồi là sự hình thành và phát triển của mô sẹo ở gốc thân. Ở môi trường có BA 1,2 mg/L, không có sự tạo chồi mới, duy chỉ 1 trường hợp có sự xuất hiện 1 chồi từ mô sẹo (Hình 6a) ở tuần nuôi cấy thứ 3. Số lượng chồi nhiều nhất ở môi trường có BA 1,5 mg/L (3,91 chồi/mẫu cây) và chiều cao trung bình của chồi là 1,35 cm (Bảng 6). Ở nồng độ BA 1,8 và 2,1 mg/L, số lượng chồi, chiều cao chồi và kích thước lá giảm (Hình 6c, 6d). BA nồng độ cao không những hạn chế sự tạo chồi mà còn hạn chế sự tăng trưởng của chồi. Ở *Boscia senegalensis* (Pers.) Lam. ex Poir, Hussien và cộng sự (2011) sử dụng BA nồng độ 1; 2; 3 và

5 mg/L để cảm ứng sự tạo chồi [19]. Số chồi tăng khi nồng độ BA tăng đến 3 mg/L và giảm ở BA 5 mg/L, chiều cao trung bình của chồi cũng giảm dần theo sự gia tăng nồng độ BA. Kết quả nghiên cứu của Lu Jinfeng và cộng sự (2013) trên cây trà cho thấy khi nồng độ BA vượt ngưỡng thích hợp, số lượng cũng như chất lượng chồi hình thành giảm, thậm chí dẫn đến sự bất thường về hình thái của chồi [20]. Theo Vũ Quang Nam và cộng sự (2013), sự tạo cụm chồi xạ đen tốt nhất ở môi trường MS bổ sung BA 5 mg/L với tỉ lệ mẫu cấy tạo cụm chồi là 81,98 % và số lượng chồi trung bình 2,95 chồi/ mẫu, chồi có chiều cao 2,84 cm sau 6 tuần nuôi cấy [3]. Cùng một đối tượng nuôi cấy là xạ đen, sự khác biệt về hiệu quả sử dụng BA có lẽ do sự khác biệt về nguồn gốc vật liệu nuôi cấy (cây mẹ được trồng ở các điều kiện môi trường khác nhau) và thành phần môi trường nuôi cấy (20 g/L saccharose).

Bảng 6. Ảnh hưởng của nồng độ BA lên sự tạo cụm chồi xạ đen

BA (mg/l)	Số lượng chồi hình thành mới				Chiều cao chồi (ở tuần thứ 4) (cm)
	Tuần 1	Tuần 2	Tuần 3	Tuần 4	
1,2	0	0	0	0	1,13 ± 0,05 ^b
1,5	0	2,71 ± 0,09 ^a	3,40 ± 0,31 ^a	3,91 ± 0,32 ^a	1,35 ± 0,05 ^a
1,8	0	1,89 ± 0,09 ^b	2,46 ± 0,06 ^b	2,57 ± 0,95 ^b	0,70 ± 0,02 ^c
2,1	0	2,03 ± 0,04 ^b	2,09 ± 0,01 ^b	2,19 ± 0,49 ^b	0,70 ± 0,03 ^c

Chú thích: Các ký hiệu mẫu tự khác nhau (theo cột) thể hiện mức độ sai biệt có ý nghĩa ở độ tin cậy 95%



Hình 6. Ảnh hưởng của BA lên sự tạo cụm chồi xạ đen

Chú thích: (a) BA 1,2 mg/L; (b) BA 1,5 mg/L; (c) BA 1,8 mg/L; (d) BA 2,1 mg/L

4 KẾT LUẬN

Chồi xạ đen hình thành và tăng trưởng tốt từ các đoạn thân mang chồi bên từ chồi 3 tuần tuổi mang 1 chồi ngủ trên môi trường MS bổ sung biotin 5 mg/L, saccharose 30 g/L và BA 0,6 mg/L. Để tạo cụm chồi, nồng độ BA thích hợp là 1,5 mg/L với số chồi trung bình là 3,91 chồi/mẫu sau 4 tuần nuôi cấy.

Lời cảm ơn: Nghiên cứu này được tài trợ bởi Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh trong khuôn khổ đề tài mã số C2015-20-36.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] H.Q. Hoa, T.C. Khánh, “Đặc điểm thực vật của ba loại cây thuốc thuộc chi Cườm rụng (*Ehretia P. BR.*), họ Vòi voi (*Boraginaceae*)”, *Tạp chí Dược liệu*, 4, 3, 137–141, 2009.
- [2] T.T. Thuý, N.H. Cường, P.T. Ninh, T.V. Sung. “Phân lập và xác định cấu trúc các hợp chất triterpene từ cây xạ đen”, *Tạp chí Hoá học*, vol. 46, no. 4, pp. 456–461, 2008.
- [3] V.Q. Nam, B.V. Thăng, N.T. Thờ, “Nhân giống cây xạ đen (*Celastrus hindsii* Benth.) bằng phương pháp nuôi cấy mô”, *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Lâm nghiệp*, 2, pp. 11–16, 2013.
- [4] L.T.T. Tien, T.V. Minh, “Tissue cultures of xa den (*Ehretia asperula* Zollinger and Moritzi)”. *Journal of Science, An Giang University*, 3, 3, 113–123, 2016.
- [5] T. Murashige, F. Skoog, A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15, pp. 473–497, 1962.
- [6] G. Lloyd, B.H. McCown, “Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, (*Kalmia latifolia*) by use of shoot tip culture”. *Int. Plant Prop. Soc., Comb. Proc.*, 30, pp. 421–427, 1980.
- [7] R.U. Schenk, A.C. Hildebrandt, “Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures”. *Canadian Journal of Botany*, 50, pp. 199–204, 1972.
- [8] O.L. Gamborg, R.A. Miller, O. Ojima, “Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cell”. *Exp. Cell Res.* 50: 151–158, 1968.
- [9] B. Guo, B. Haider, A.A. Zeb, L.L. Xu, Y.H. Wei, Thidiazuron: a multi-dimensional plant growth regulator, *African Journal of Biotechnology*, vol. 10, no. 45, pp. 8984–9000, 2011.
- [10] A.H. Carl, E.P. John, “Thidiazuron: a potent cytokinin for woody plant tissue culture”, *Plant Cell, Tissue and Organ culture*, vol. 33, no. 2, pp. 105–119, 1993.
- [11] H. Dass, R. Koul, S. Joshi, R. Bhansali, *In vitro* regeneration of date palm plantlets, *Current Science*, 58, pp. 22–24, 1989.
- [12] J. Chauhan, K. Dakshinamurti, “The *E. coli* bio operon: transcriptional repression by an essential protein modification enzyme”, *J. Biol. Chem.* 266, pp. 10035–10038, 1991.
- [13] K. Dakshinamurti, Li W., “Transcriptional regulation of liver phosphoenolpyruvate carboxykinase by biotin in diabetic rats” *Mol. Cell Biochem.* 132, pp. 127–132, 1994.
- [14] R.S.S.Vargas, D.P. Alvarez, A.L.D. Rio, “Holocarboxylase synthetase is an obligate participant in biotin-mediated regulation of its own expression and of biotin-dependent carboxylases mRNA levels in human cells”. *Proc Natl Acad Sci USA* 99, pp. 5325–5330, 2002.
- [15] L. Samarina, T. Kolomiets, V. Malyarovskaya, S. Gubaz, N. Platonova, “Effect of glutamine, biotin and ADP on micropropagation and growth of *Chrysanthemum hybridum*, *Gerbera jamesonii* and *Cordyline fruticosa* in vitro”, *Plant Tissue Culture and Biotechnology*, 26, 1, 97–104, 2016.
- [16] F. Edwin George, A. Michael, Hall and Geert-Jan De Klerk. *Plant propagation by tissue culture, 3, the back ground*. Springer, 2008.
- [17] J.J. Vidmar, D. Zhuo, M.Y. Siddiqi, J.K. Schjoerring, B. Touraine, A.D. Glass, “Regulation of high-affinity nitrate transporter genes and high-affinity nitrate influx by nitrogen pools in roots of barley”. *Plant Physiol.*, 123, pp. 307–318, 2000.
- [18] W.G. Hopkins, N.P.A. Hunner, *Introduction to plant physiology*, John Wiley & Sons, Inc., 2009.
- [19] H. Hussien, D. Eltayb, A.A. Elsadig Elhadi, M. Mutasim, M. Khalafalla, “Effect of growth regulators on *in vitro* morphogenic response of *Boscia senegalensis* (Pers.)

Lam. Poir. using mature zygotic embryos explants".
Biotechnology Research International, 3, 7–8, 2011.
[20] L. Jinfeng, R. Chen, M. Zhang, A. Jaime, Teixeira da
Silva, Guohua Ma, "Plant regeneration via somatic

embryogenesis and shoot organogenesis from immature
cotyledons of *C. nitidissima* Chi, *J. of Plant Physiol.*, vol.
170, no. 13, pp. 1202–1211, 2013.

The *in vitro* shoot regeneration of *Ehretia asperula* Zol. and Mor.

Le Thi Thuy Tien

Ho Chi Minh City University of Technology, VNUHCM

Corresponding author: lttien@hcmut.edu.vn

Received: 17-01-2018; Accepted: 15-7-2018; Published: 31-12-2018

Abstract—Xa den young branches in the orchard were sterilized and used as explants for shoot initiation and growth experiments. The shoot induction was carried out with BA (benzyl adenine) or TDZ (thidiazuron). New shoots sprouted after one week of culture and the highest shoots (2.02 cm) were on MS medium (Murashige and Skoog medium) with BA 0.6 mg/L after 3 weeks. Furthermore, the number of leaves per shoot was also higher than other treatments (8.31 leaves per shoot). *In vitro* shoots were used in other experiments to investigate the effects of explants, biotin concentrations, minerals, type and concentration of cytokinins on the formation and elongation of shoots and clusters.

When 5 mg/L biotin was added to MS medium, shoots grew better. The MS medium appeared to be most suitable for the initiation and elongating of shoots, followed by WPM (woody plant medium) and SH medium (Schenk and Hildebrandt medium), while B5 medium (Gamborg B5 medium) was the least effective. The spouting from three-week-old explants was earlier than others (4 and 5 weeks of age), which in turn affected on the shoot elongating. BA 1.5 mg/L was suitable to induce shoot clusters (3.91 shoots per explant) after 4 weeks.

Keywords—biotin, shoot induction, mineral nutrient medium *Ehretia asperula* Zol. and Mor.