

ẢNH HƯỞNG CỦA CHẤT ĐIỀU HÒA SINH TRƯỞNG LÊN SỰ TĂNG SINH VÀ PHÁT SINH HÌNH THÁI CỦA MÔ SẸO CÓ NGUỒN GỐC TỪ TỬ DIỆP CÂY BÁ BỆNH (*Eurycoma longifolia*)

Nguyễn Thị Dược¹, Đỗ Đăng Giáp¹,
Trịnh Thị Hương², Trần Trọng Tuấn^{1*}

¹Viện Sinh học Nhiệt đới, VAST

²Trường Đại học Công nghiệp Thực phẩm TP.HCM

*Email: trantrongtuan.com@gmail.com

Ngày nhận bài: 20/4/2018; Ngày chấp nhận đăng: 05/6/2018

TÓM TẮT

Bá bệnh hay còn gọi là mật nhân (*Eurycoma longifolia*) là loại dược liệu quý thuộc họ thanh thất (Simaroubaceae). Công dụng chính yếu của cây này là điều trị sốt rét và tăng cường chức năng sinh lý nam. Cây bá bệnh có chứa nhiều hợp chất có hoạt tính sinh học như quassinoid, alkaloid, các dẫn chất squalene và steroid. Hiện nay, nhiều nghiên cứu về hợp chất thứ cấp và công dụng của cây này đã được thực hiện. Tuy nhiên, các nghiên cứu về nuôi cấy *in vitro* vẫn còn hạn chế. Trong nghiên cứu này, ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng lên sự tăng sinh khối mô sẹo và sự phát sinh hình thái của mẫu mô sẹo có nguồn gốc từ tử diệp cây bá bệnh được khảo sát. Kết quả thí nghiệm khảo sát sự tăng sinh mô sẹo cho thấy, các mẫu mô sẹo bá bệnh tăng sinh khối cao nhất trong môi trường MS có bổ sung 3,0 mg/L 2,4-D kết hợp với 2,0 mg/L thidiazuron (TDZ) (3,86 g/mẫu). Ở nghiệm thức sử dụng 2,4-D kết hợp với IBA, các mẫu cây mô sẹo được nuôi cấy trên môi trường có bổ sung 2,4-D kết hợp với IBA đều có sự phát sinh rễ và cảm ứng hình thành phôi vô tính. Kết quả ở nghiệm thức này cho thấy, sự hình thành rễ ở các mẫu mô sẹo cao nhất ở nghiệm thức có bổ sung 0,5 mg/L 2,4-D kết hợp với 4,0 mg/L IBA (5,3 rễ/mẫu). Với chỉ tiêu về số lượng phôi, sự phát sinh phôi vô tính cao nhất ở nghiệm thức chỉ bổ sung 3,0 mg/L IBA (14,3 phôi/mẫu).

Từ khoá: Auxin, cây bá bệnh, lá mầm, mô sẹo, sự phát sinh hình thái.

1. MỞ ĐẦU

Nuôi cấy tế bào thực vật là con đường được dùng để thu nhận các chất chuyển hóa thứ cấp hữu ích và đã được nghiên cứu ở nhiều loài thực vật. Kỹ thuật nuôi cấy biệt hóa các cơ quan, đặc biệt là nuôi cấy để tạo mô sẹo, phôi và rễ bất định đã được áp dụng trong nhiều cây dược liệu do sự tăng trưởng nhanh và có khả năng sản xuất số lượng sinh khối lớn và ổn định các chất chuyển hóa thứ cấp [1]. Một số loại cây như sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv), báy lá một hoa (*Paris* sp.), bá bệnh (*Eurycoma longifolia*),... là những loài cây có giá trị dược liệu và thương mại cao. Tuy nhiên, các loài này có vùng phân bố hẹp, thời gian sinh trưởng kéo dài, việc khai thác quá mức dẫn đến quần thể trong tự nhiên ngày càng bị thu hẹp. Việc ứng dụng nuôi cấy mô tế bào thực vật mở ra giải pháp giúp bảo tồn nguồn gen, chủ động trong việc kiểm soát và sản xuất sinh khối các nguồn dược liệu này.

Cây bá bệnh được biết đến như một loại sâm của Malaysia, là cây dược liệu quý thuộc họ thanh thất (Simaroubaceae), phân bố ở Việt Nam và các nước khu vực Đông Nam Á. Trong cây bá bệnh có chứa các hợp chất quý như quassinoid, triterpen, alkaloid... Ở Việt Nam, cây bá bệnh được tìm thấy chủ yếu ở các vùng núi phía Bắc, Tây Nguyên và Đông Nam Bộ. Với nhiều công dụng như tăng cường sinh lý, cải thiện chức năng sinh lý ở nam giới, điều trị ung thư, sốt rét, tiểu đường, huyết áp cao... [2]. Trên đối tượng cây bá bệnh, các nghiên cứu về tạo phôi và rễ bất định trên loại cây này cũng đã được thực hiện như Aziv *et al.*, Hussein *et al.*, Mahmood *et al.* đã nghiên cứu cảm ứng tạo mô sẹo từ các cơ quan khác nhau của cây như lá, cuống lá, thân, rễ và lá mầm trên môi trường bổ sung 2,4-D, IAA, NAA, picloram và dicamba [3-5]. Kết quả nghiên cứu cho thấy, các mẫu lá được nuôi cấy trên môi trường có bổ sung 1,0 mg/L 2,4 - D cho sự hình thành mô sẹo tốt nhất (81,76%). Đối với mẫu cuống lá, tỷ lệ hình thành mô sẹo ở nghiệm thức sử dụng 4,0 mg/L 2,4-D hay 4,0 mg/L picloram (78,33%) cho kết quả cao hơn so với các nghiệm thức còn lại. Đối với mẫu thân, kết quả tốt nhất thu được ở nghiệm thức sử dụng 2,4-D ở nồng độ 2,0 mg/L (88,33%). Ở mẫu lá mầm, tỷ lệ hình thành mô sẹo đạt được 85% ở nghiệm thức sử dụng 4,0 mg/L 2,4-D. Nghiên cứu về quá trình phát sinh mô sẹo từ mẫu lá cây bá bệnh của Đỗ Quốc Trường cho thấy, trong môi trường có bổ sung auxin kết hợp với cytokinin cho tỷ lệ mẫu tạo mô sẹo và khối lượng tươi cao hơn so với môi trường chỉ bổ sung auxin [6].

Nghiên cứu này được thực hiện nhằm khảo sát sự ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng thực vật lên quá trình cảm ứng và tăng sinh mô sẹo nhằm tạo nguồn nguyên liệu cho các nghiên cứu tiếp theo.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Vật liệu

Mô sẹo cây bá bệnh được cảm ứng từ lớp mỏng lá mầm hạt bá bệnh trên môi trường Murashige và Skoog (MS) [7] bổ sung 2,4-D và kinetin (KIN) được sử dụng làm vật liệu nuôi cấy.

Môi trường nuôi cấy MS bổ sung 30 g/L sucrose, chất điều hòa sinh trưởng thực vật (CĐHSTTV) (tùy thuộc vào từng nghiệm thức của từng thí nghiệm) và 8 g/L agar, pH môi trường được chỉnh ở 5,8, hấp khử trùng ở 121 °C áp suất 1 atm. Các mẫu được nuôi cấy trên đĩa petri có đường kính 8 cm chứa 30 mL môi trường. Các bình mẫu được đặt trong phòng thí nghiệm có cường độ ánh sáng $45 \pm 2 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ với nhiệt độ được duy trì ở $24 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ và độ ẩm của phòng thí nghiệm đảm bảo trong khoảng 70-80%, thời gian chiếu sáng 12 giờ/ngày.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Khảo sát khả năng kết hợp giữa 2,4-D và TDZ lên sự tăng sinh và phát sinh hình thái của mô sẹo cây bá bệnh

Mẫu mô sẹo có khối lượng 0,1 g được cấy lên môi trường MS có bổ sung TDZ (0; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 mg/L) kết hợp với 2,4-D (0; 1,0; 2,0; 3,0 mg/L). Các chỉ tiêu theo dõi như khối lượng mẫu, hình thái mô sẹo và quan sát màu sắc, cấu trúc của mô sẹo được ghi nhận sau 45 ngày nuôi cấy.

2.2.2. Khảo sát ảnh hưởng của 2,4-D và IBA lên sự tăng sinh và phát sinh hình thái của mô sẹo cây bá bệnh

Mẫu mô sẹo được có khối lượng 0,1 g được cấy lên môi trường MS có bổ sung 2,4-D (0; 0,5; 1,0 mg/L) kết hợp với IBA (0; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0 mg/L). Các chỉ tiêu theo dõi như

khối lượng mẫu, hình thái mô sẹo và quan sát màu sắc, cấu trúc của mô sẹo được ghi nhận sau 45 ngày nuôi cấy.

2.2.3. Xử lý số liệu

Số liệu được ghi nhận và xử lý bằng Microsoft Excel® 2007. Các giá trị được so sánh trung bình bằng phương pháp phân tích ANOVA và xử lý trắc nghiệm phân hạn theo phương pháp Duncan bằng phần mềm thống kê SAS 9.1.

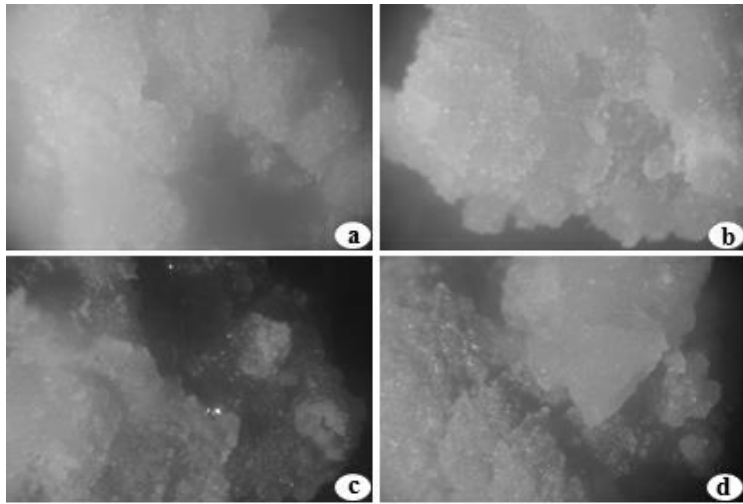
3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Ảnh hưởng của 2,4-D và TDZ trong quá trình tăng sinh và phát sinh hình thái khối mô sẹo bá bệnh

Sau 45 ngày nuôi cấy, kết quả cho thấy có sự khác biệt về hình thái mô sẹo trong các nghiệm thức bổ sung nồng độ 2,4-D và TDZ khác nhau (Bảng 1). Hầu hết mô sẹo trong các nghiệm thức đều có cấu trúc xốp, bờ, có màu vàng xanh và màu vàng nâu. Các mô sẹo trong các nghiệm thức chỉ bổ sung TDZ riêng lẻ, màu sắc của mô sẹo chuyển từ màu vàng sang màu vàng xanh ở các nghiệm thức sử dụng TDZ nồng độ thấp (0,5 - 1,5 mg/L) (Hình 1b). Tuy nhiên, khi nồng độ TDZ bổ sung vào môi trường cao (2,0 mg/L) thì mô sẹo chuyển sang màu vàng nâu (Hình 1d). Tương tự đối với các nghiệm thức bổ sung 1,0 mg/L 2,4-D, khi thay đổi nồng độ của TDZ bổ sung vào môi trường nuôi cấy màu sắc của mô sẹo cũng bị thay đổi từ màu vàng sang màu vàng xanh và màu vàng nâu. Môi trường chứa các chất điều hòa sinh trưởng ở nồng độ cao đã ảnh hưởng đến sức sống của mô sẹo, do đó các mô sẹo có xu hướng hóa nâu và chết trong các nghiệm thức bổ sung 2,4-D ở nồng độ 3,0 mg/L. Từ kết quả trên cho thấy, nồng độ TDZ và 2,4-D ảnh hưởng đến cấu trúc và màu sắc của mô sẹo bá bệnh.

Bảng 1. Ảnh hưởng của 2,4-D và TDZ lên tỷ lệ sống và hình thái mô sẹo của cây bá bệnh sau 45 ngày nuôi cấy

Nồng độ 2,4-D (mg/L)	Nồng độ TDZ (mg/L)	Hình thái mẫu cấy
0,0	0,0	Mô sẹo xốp, bờ, có màu vàng
0,0	0,5	Mô sẹo xốp, bờ, có màu vàng và màu xanh
0,0	1,0	Mô sẹo rắn, chắc, có màu vàng và màu xanh
0,0	1,5	Mô sẹo rắn, chắc, có màu vàng và màu xanh
0,0	2,0	Mô sẹo xốp, bờ, có màu vàng nâu
1,0	0,0	Mô sẹo xốp, bờ, có màu vàng
1,0	0,5	Mô sẹo rắn, chắc, có màu vàng và màu xanh
1,0	1,0	Mô sẹo rắn, chắc, có màu vàng và màu xanh
1,0	1,5	Mô sẹo xốp, bờ, màu vàng
1,0	2,0	Mô sẹo xốp, bờ, màu vàng nâu
2,0	0,0	Mô sẹo xốp, bờ, màu vàng
2,0	0,5	Mô sẹo xốp, bờ, màu vàng
2,0	1,0	Mô sẹo xốp, bờ, có màu xanh và màu vàng
2,0	1,5	Mô sẹo xốp, bờ, màu vàng
2,0	2,0	Mô sẹo xốp, bờ, màu vàng nhạt
3,0	0,0	Mô sẹo xốp, bờ, màu vàng nhạt
3,0	0,5	Mô sẹo xốp, bờ, có màu xanh và màu vàng
3,0	1,0	Mô sẹo xốp, bờ, có màu vàng nâu
3,0	1,5	Mô sẹo xốp, bờ, có màu xanh và màu nâu
3,0	2,0	Mô sẹo xốp, bờ, có màu vàng nâu



Hình 1. Hình thái mô sẹo được bổ sung 2,4-D và TDZ sau 45 ngày nuôi cấy;
a: Mô sẹo màu vàng; **b:** Mô sẹo có màu vàng và màu xanh; **c:** Mô sẹo có màu xanh;
d: Mô sẹo màu vàng nâu.

Bảng 2. Ảnh hưởng của 2,4-D và TDZ lên khối lượng mô sẹo sau 45 ngày nuôi cấy
 (Đơn vị tính: g)

Nồng độ TDZ (mg/L) (T)	Nồng độ 2,4-D (mg/L) (D)				Trung bình (T)
	0,0	1,0	2,0	3,0	
0,0	0,27 ^{hi}	0,43 ^{f-i}	0,28 ^{hi}	0,16 ⁱ	0,29 ^D
0,5	0,30 ^{hi}	2,54 ^b	0,37 ^{ghi}	0,36 ^{ghi}	0,89 ^C
1,0	1,18 ^d	0,70 ^{e-h}	0,66 ^{fh}	0,63 ^{fh}	0,79 ^C
1,5	1,72 ^c	0,67 ^{e-h}	1,13 ^{dc}	0,90 ^{def}	1,11 ^B
2,0	0,73 ^{d-h}	2,88 ^b	0,83 ^{d-g}	3,86 ^a	2,08 ^A
Trung bình D	0,84 ^C	1,45 ^A	0,66 ^C	1,18 ^B	
F _D = 52,6*		F _T = 146,2**	F _{DT} = 69,0**	CV = 18,3%	

^{a,b,c,...}: thể hiện sự khác biệt về mặt thống kê giữa các nghiệm thức ở mức xác suất $p < 0,01$ (**), và ^{A, B, C,...} thể hiện sự khác biệt về mặt thống kê giữa các giá trị trung bình theo hàng (Yếu tố T), theo cột (Yếu tố D).

Kết quả nghiên cứu cho thấy, khối lượng của mô sẹo trong các nghiệm thức chịu ảnh hưởng bởi nồng độ 2,4-D và TDZ bổ sung vào môi trường nuôi cấy (Bảng 2). Đối với yếu tố nồng độ 2,4-D thì nồng độ 2,4-D ở mức 1,0 mg/L cho khối lượng mô sẹo cao nhất. Xét yếu tố nồng độ TDZ thì nồng độ TDZ ở mức 2,0 mg/L cho khối lượng mô sẹo cao nhất. Trong tất cả các nghiệm thức, nghiệm thức có giá trị khối lượng mô sẹo cao nhất (3,86 g) là nghiệm thức bổ sung kết hợp 3,0 mg/L 2,4-D với 2,0 mg/L TDZ. Nghiệm thức có giá trị khối lượng mô sẹo thấp nhất (0,16 g) là nghiệm thức bổ sung 3,0 mg/L 2,4-D riêng lẻ.

Sự tương tác giữa auxin và cytokinin đặc biệt quan trọng để kiểm soát một số quá trình hình thành, phát triển và duy trì các mô phân sinh cần thiết để tạo nên cơ thể thực vật [8]. Nitsch khẳng định rằng chỉ khi tác dụng đồng thời của auxin và cytokinin thì mới kích thích mạnh mẽ sự tổng hợp DNA và cảm ứng cho sự phân chia tế bào [9]. Điều này giải thích kết quả của thí nghiệm, khi kết hợp TDZ và 2,4-D đã giúp cho việc gia tăng khối lượng của mô sẹo. Trong môi trường có bổ sung TDZ ở mức 0,5 mg/L kết hợp với 2,4-D ở các nồng độ

khác nhau, khối lượng mẫu mô sẹo thu được ở nghiệm thức sử dụng 1,0 mg/L 2,4-D cao hơn so với các nghiệm thức còn lại. Tuy nhiên, trong điều kiện môi trường bổ sung TDZ ở nồng độ 1,0-1,5 mg/L khối lượng mô sẹo giảm khi bổ sung 2,4-D vào môi trường nuôi cấy. Khi tăng mức nồng độ TDZ lên 2,0 mg/L, khối lượng mô sẹo đạt giá trị cao nhất khi bổ sung 3,0 mg/L 2,4-D vào môi trường nuôi cấy.

Theo Gautheret, khả năng tái sinh sẽ vẫn được duy trì lâu hơn ở mô sẹo rắn chắc và sẽ mất đi ở mô sẹo rời rạc, nguyên nhân có thể do mô sẹo mất khả năng tổng hợp một số chất chủ yếu cho sự tái sinh của nó khi số lần cấy chuyển tăng lên [10]. Bên cạnh đó, những mô sẹo có khả năng sinh phôi ít nhiều có sắc tố xanh lục [11]. Kết quả thí nghiệm cho thấy môi trường MS bổ sung 2,0 mg/L TDZ và 3,0 mg/L 2,4-D cho mô sẹo có cấu trúc rắn chắc và màu xanh lục thích hợp cho tăng sinh mô sẹo.

3.2. Ảnh hưởng của 2,4-D và IBA lên sự tăng sinh và phát sinh hình thái từ mô sẹo cây bá bệnh

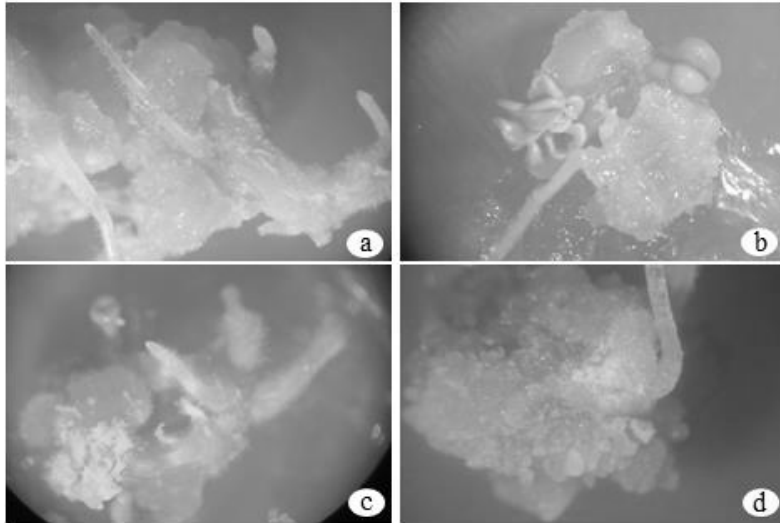
Trong môi trường nuôi cấy, thành phần và nồng độ các chất điều hòa sinh trưởng thực vật có ảnh hưởng rất lớn đối với sự phát triển của mẫu cấy. Auxin thường được bổ sung vào môi trường nuôi cấy trong những nghiên cứu về phát sinh cũng như tăng sinh mô sẹo. Trong nghiên cứu này, mô sẹo từ lá mầm của cây bá bệnh được cấy lên môi trường chứa 2,4-D với nồng độ 0,5-1,0 mg/L kết hợp với IBA nồng độ 1,0-5,0 mg/L để khảo sát sự cảm ứng và tăng sinh của mô sẹo. Sau 45 ngày nuôi cấy, tỷ lệ sống của mô sẹo trong tất cả các nghiệm thức đều đạt 100%. Sự phát triển của mô sẹo được thể hiện thông qua sự phát sinh hình thái, màu sắc, cấu trúc và khối lượng mô sẹo, số lượng phôi và rễ hình thành.

3.2.1. Ảnh hưởng của 2,4-D và IBA lên tỷ lệ sống và hình thái mô sẹo sau 45 ngày nuôi cấy

Bảng 3. Ảnh hưởng của 2,4-D và IBA lên tỷ lệ sống và hình thái mô sẹo sau 45 ngày nuôi cấy

Nồng độ 2,4-D (mg/L)	Nồng độ IBA (mg/L)	Hình thái mẫu cấy	Phát sinh hình thái	
			Phôi	Rễ
0,0	0,0	Mô sẹo xốp bờ có màu vàng	+	+
0,0	1,0	Mô sẹo xốp bờ có màu vàng	-	+
0,0	2,0	Mô sẹo xốp bờ có màu vàng và màu xanh	+	+
0,0	3,0	Mô sẹo xốp bờ có màu vàng	+	+
0,0	4,0	Mô sẹo xốp bờ có màu vàng và màu xanh	+	+
0,0	5,0	Mô sẹo xốp bờ có màu vàng và màu xanh	+	+
0,5	0,0	Mô sẹo xốp bờ có màu vàng và màu xanh	+	+
0,5	1,0	Mô sẹo xốp bờ có màu vàng	+	+
0,5	2,0	Mô sẹo xốp bờ có màu vàng và màu xanh	+	+
0,5	3,0	Mô sẹo xốp bờ có màu vàng và màu xanh	+	+
0,5	4,0	Mô sẹo xốp bờ có màu vàng	-	+
0,5	5,0	Mô sẹo xốp bờ có màu vàng và màu xanh	+	+
1,0	0	Mô sẹo xốp bờ có màu vàng và màu xanh	+	+
1,0	1,0	Mô sẹo xốp bờ có màu vàng và màu xanh	-	-
1,0	2,0	Mô sẹo xốp bờ có màu vàng và màu xanh	+	+
1,0	3,0	Mô sẹo xốp bờ có màu vàng và màu xanh	+	+
1,0	4,0	Mô sẹo xốp bờ có màu vàng và màu xanh	+	+
1,0	5,0	Mô sẹo xốp bờ có màu vàng	-	+

Từ kết quả Bảng 3 cho thấy các mô sẹo sau khi nuôi cấy trong môi trường bổ sung 2,4-D (nồng độ 0,0-1,0 mg/L) và IBA (nồng độ 0,0-5,0 mg/L) sau 45 ngày nuôi cấy đã có sự cảm ứng phát sinh rễ và phôi vô tính (Hình 2), ngoại trừ nghiệm thức bổ sung kết hợp 1,0 mg/L 2,4-D với 1,0 mg/L. Trong cùng một nghiệm thức có thể xuất hiện đồng thời cả phôi vô tính và rễ (Hình 2b, 2c, 2d) hoặc chỉ hình thành phôi vô tính, hoặc chỉ hình thành rễ (Hình 2a). Phần mô sẹo còn lại có cấu trúc xốp bở và có màu vàng xanh.



Hình 2. Một số hình thái mô sẹo trong thí nghiệm bổ sung IBA và 2,4-D sau 45 ngày nuôi cấy;

- a:** Mô sẹo màu vàng có phát sinh rễ; **b:** Mô sẹo màu vàng có phát sinh phôi vô tính;
c: Mô sẹo màu vàng phát sinh rễ và phôi vô tính và **d:** Mô sẹo mà vàng nhạt màu xanh.

3.2.2 Ảnh hưởng của 2,4-D và IBA lên số lượng rễ hình thành từ mô sẹo bá bệnh

Auxin có vai trò quan trọng trong sự hình thành rễ. Sự phát sinh và phân nhánh rễ bị ảnh hưởng trực tiếp từ nguồn auxin nội sinh và ngoại sinh [12]. Bellamine *et al.* đã chỉ ra rằng auxin đóng vai trò chính trong sự tạo rễ bất định bởi sự tham gia của nó vào các quá trình liên tiếp và phụ thuộc vào nhau [13]. Trong thí nghiệm này, khi nuôi cấy trên môi trường bổ sung 2,4-D và IBA đã có sự hình thành rễ từ mô sẹo ban đầu với số lượng rễ hình thành phụ thuộc vào nồng độ 2,4-D và IBA bổ sung vào môi trường nuôi cấy. Kết quả được ghi nhận ở Bảng 4.

Kết quả Bảng 4 cho thấy, có sự khác biệt về mặt thống kê (ở mức xác suất $p < 0,01$) ở các nghiệm thức sử dụng IBA ở các nồng độ khác nhau, điều này cho thấy IBA ảnh hưởng đến số lượng rễ hình thành từ mô sẹo. Khi bổ sung IBA vào môi trường nuôi cấy, số lượng rễ hình thành từ mô sẹo tăng dần tỷ lệ thuận với nồng độ IBA khi bổ sung từ 1,0-4,0 mg/L IBA vào môi trường nuôi cấy và bắt đầu giảm khi tăng nồng độ IBA lên cao vượt quá 5,0 mg/L. Số lượng rễ trung bình đạt giá trị cao nhất tại nồng độ 4,0 mg/L IBA. Còn đối với các nghiệm thức sử dụng 2,4-D ở các nồng độ khác nhau thì không có sự khác biệt về mặt thống kê. Theo nghiên cứu của Yun *et al.* trên cây nha đam (*Aloe vera*), khi khảo sát hầu hết các loại auxin khác nhau như IBA, NAA, 2,4-D, IAA thì NAA có khả năng cảm ứng tạo rễ bất định loại cây này tốt hơn IBA, IAA [14]. Và các mẫu được nuôi cấy trên môi trường bổ sung 2,4-D thì không có khả năng tạo rễ. Trong thí nghiệm này, kết quả cho thấy khi bổ sung IBA quá cao (ở nồng độ 5,0 mg/L) thì tỷ lệ tạo rễ giảm xuống rõ rệt. Trong nghiên cứu của Baque *et al.* trên cây *Morinda citrifolia*, khi bổ sung IBA ở nồng độ cao từ 5 mg/L đến 9 mg/L đã ức chế sự hình thành rễ bất định [15].

Bảng 4. Ảnh hưởng của 2,4-D và IBA lên số lượng rễ hình thành từ mô sẹo sau 45 ngày nuôi cấy (Đơn vị tính: số rễ/mẫu)

Nồng độ IBA (mg/L) (I)	Nồng độ 2,4-D (mg/L) (D)			Trung bình (I)
	0,0	0,5	1,0	
0,0	3,3 ^{ab}	1,0 ^c	1,7 ^{bc}	2,0 ^{BC}
1,0	2,0 ^{bc}	0,3 ^c	0,0 ^c	0,8 ^D
2,0	2,0 ^{bc}	0,7 ^c	0,3 ^c	1,0 ^{CD}
3,0	0,3 ^c	3,7 ^{ab}	4,0 ^{ab}	2,7 ^B
4,0	1,7 ^{abc}	5,3 ^a	5,0 ^a	4,0 ^A
5,0	0,7 ^c	0,3 ^c	0,3 ^c	0,4 ^D
Trung bình (D)	1,7	1,9	1,9	
	$F_I = 23,2^{**}$	$F_D = 0,3^{ns}$	$F_{DI} = 9,5^{**}$	CV = 46,6%

^{a,b,c,...} thể hiện sự khác biệt về mặt thống kê giữa các nghiệm thức ở mức xác suất $p < 0,01$ (**), và ^{A, B, C,...} thể hiện sự khác biệt về mặt thống kê giữa các giá trị trung bình theo hàng (Yếu tố I), theo cột (Yếu tố D).

Khi bổ sung kết hợp 2 chất điều hòa sinh trưởng này với nhau, kết quả cho thấy 2 chất điều hòa này ảnh hưởng đến sự hình thành rễ từ mô sẹo. Các mẫu mô sẹo đạt số lượng ra rễ cao nhất khi được nuôi cấy trên môi trường MS có bổ sung 4,0 mg/L IBA kết hợp với 0,5 mg/L 2,4-D và nghiệm thức sử dụng kết hợp 4,0 mg/L IBA và 1,0 mg/L 2,4-D (số rễ hình thành lần lượt ở 2 môi trường này là 5,3 rễ/mẫu và 5 rễ/mẫu).

3.2.3. Ảnh hưởng của 2,4-D và IBA lên số lượng phôi vô tính hình thành từ mô sẹo sau 45 ngày nuôi cấy

Trong môi trường nuôi cấy bổ sung 2,4-D và IBA, mô sẹo không chỉ cảm ứng hình thành rễ mà còn cảm ứng hình thành phôi vô tính. Mặc dù, sự hình thành phôi vô tính trong các nghiệm thức không cao, tuy nhiên số lượng phôi vô tính đếm được có sự khác biệt trong các nghiệm thức khác nhau. Số lượng phôi vô tính hình thành từ mô sẹo thay đổi tùy thuộc vào nồng độ IBA và 2,4-D bổ sung vào môi trường nuôi cấy.

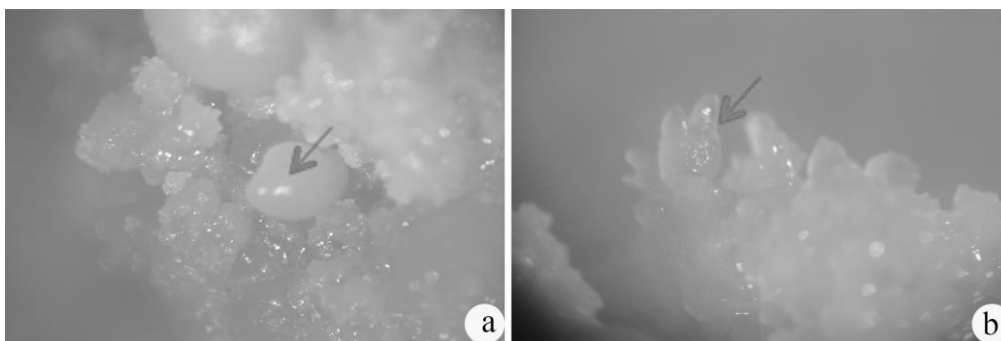
Bảng 5. Ảnh hưởng của 2,4-D và IBA lên số lượng phôi vô tính hình thành từ mô sẹo sau 45 ngày nuôi cấy (Đơn vị tính: số phôi/mẫu)

Nồng độ IBA (mg/L) (I)	Nồng độ 2,4-D (mg/L) (D)			Trung bình (I)
	0,0	0,5	1,0	
0,0	2,3 ^{bc}	0,3 ^c	0,7 ^c	1,1 ^B
1,0	0,0 ^c	2,7 ^{bc}	0,0 ^c	0,9 ^B
2,0	2,0 ^c	1,0 ^c	2,0 ^c	1,7 ^B
3,0	14,3 ^a	2,7 ^{bc}	4,7 ^b	7,2 ^A
4,0	2,7 ^{bc}	0,0 ^c	0,7 ^c	1,1 ^B
5,0	1,0 ^c	1,0 ^c	0,0 ^c	0,7 ^B
Trung bình (D)	3,7 ^A	1,3 ^B	1,3 ^B	
	$F_D = 31,6^*$	$F_I = 51,7^{**}$	$F_{DI} = 18,0^{**}$	CV = 49,9%

^{a,b,c,...} thể hiện sự khác biệt về mặt thống kê giữa các nghiệm thức ở mức xác suất $p < 0,01$ (**), và ^{A, B, C,...} thể hiện sự khác biệt về mặt thống kê giữa các giá trị trung bình theo hàng (Yếu tố I), theo cột (Yếu tố D).

Dựa vào kết quả Bảng 5, xét về yếu tố nồng độ IBA, số lượng phôi vô tính hình thành trong điều kiện có bổ sung IBA sự khác biệt rõ rệt so với nghiệm thức đối chứng (không bổ sung IBA). Khi bổ sung IBA với nồng độ ở mức 1,0-3,0 mg/L, số lượng phôi vô tính tăng dần theo nồng độ IBA và số lượng phôi giảm dần khi nồng độ IBA tăng cao với mức từ 4,0 mg/L đến 5,0 mg/L. Số lượng phôi vô tính hình thành từ mô sẹo đạt giá trị cao nhất khi bổ sung IBA vào môi trường với nồng độ ở mức 3,0 mg/L và số lượng phôi vô tính có giá trị thấp nhất khi bổ sung 5,0 mg/L IBA.

Đối với yếu tố nồng độ 2,4-D, khi được bổ sung vào môi trường nuôi cấy với mức nồng độ 0,5-1,0 mg/L, số lượng phôi vô tính hình thành từ mô sẹo thấp hơn so với môi trường không bổ sung 2,4-D. Số lượng phôi vô tính không có sự khác biệt về mặt thống kê khi bổ sung 2,4-D với nồng độ ở mức 0,5-1,0 mg/L. Nghiệm thức có số lượng phôi vô tính đạt giá trị cao nhất (14,3 phôi/mẫu) khi bổ sung 3,0 mg/L IBA. Trong hình thái mẫu, các mẫu mô sẹo cảm ứng tạo nhiều dạng phôi khác nhau như phôi hình cầu (Hình 3a), phôi hình tim (Hình 3b). Theo Dương Tấn Nhựt, quá trình nuôi cấy tạo phôi được khởi phát bằng cách đưa mẫu cấy vào môi trường có chứa auxin cao sau đó chuyển mẫu cấy sang môi trường mới không chứa auxin hoặc chứa auxin ở nồng độ thấp để thúc đẩy quá trình phát triển phôi [16]. Do đó, nồng độ IBA bổ sung vào môi trường ở mức cao không thích hợp cho sự phát sinh phôi của mô sẹo.



Hình 3. Phôi vô tính phát sinh từ mô sẹo trong môi trường bổ sung IBA và 2,4-D;
a: phôi hình tim; b: phôi hình thủy lôi.

3.2.4 Ảnh hưởng của 2,4-D và IBA lên khối lượng mẫu cấy mô sẹo

Sau 45 ngày nuôi cấy trong môi trường bổ sung IBA và 2,4-D, kết quả cho thấy khối lượng của mẫu cấy đã gia tăng về khối lượng so với khối lượng mẫu cấy ban đầu (Bảng 6). Khối lượng của mẫu cấy thay đổi phụ thuộc vào nồng độ IBA và 2,4-D bổ sung vào môi trường nuôi cấy. Nồng độ IBA ở mức 4,0 mg/L cho khối lượng mẫu cao nhất, trong khi đó nồng độ 2,4-D ở mức 1,0 mg/L cho khối lượng mẫu cao nhất. Tuy nhiên, ở mức 0,5 mg/L và 1,0 mg/L khối lượng mẫu là không có sự khác biệt về mặt thống kê. Nghiệm thức có khối lượng mẫu đạt giá trị cao nhất (0,55 g) khi được bổ sung kết hợp 0,5 mg/L 2,4-D với 4,0 mg/L IBA.

Kết quả Bảng 6 cho thấy, có sự khác biệt về mặt thống kê (ở mức xác suất $p < 0,01$) ở các nghiệm thức sử dụng 2,4-D ở các nồng độ khác nhau, điều này cho thấy 2,4-D ảnh hưởng đến sự gia tăng khối lượng mô sẹo. Khối lượng mô sẹo trung bình ở nghiệm thức sử dụng 2,4-D (0,5 mg/L và 1,0 mg/L) cao hơn so với nghiệm thức không sử dụng 2,4-D. Ở nghiệm thức sử dụng 0,5 mg/L 2,4-D kết hợp với IBA (với các nồng độ khác nhau), kết quả cho thấy ở nồng độ 4,0 mg/L IBA các mẫu cấy đạt khối lượng mô sẹo cao nhất (0,55 g/mẫu).

Bảng 6. Ảnh hưởng của 2,4-D và IBA lên khối lượng mô sẹo sau 45 ngày nuôi cấy (Đơn vị tính: g)

Nồng độ IBA (mg/L) (I)	Nồng độ 2,4-D (mg/L) (D)			Trung bình (I)
	0,0	0,5	1,0	
0,0	0,21 ^{efg}	0,18 ^{fg}	0,25 ^{def}	0,21 ^B
1,0	0,31 ^{def}	0,37 ^{fgh}	0,39 ^{cde}	0,35 ^A
2,0	0,15 ^{bcd}	0,16 ^{bc}	0,24 ^{fed}	0,19 ^B
3,0	0,13 ^{fgh}	0,16 ^{fgh}	0,29 ^{def}	0,19 ^B
4,0	0,24 ^{gh}	0,55 ^a	0,33 ^{bcd}	0,37 ^A
5,0	0,08 ^h	0,18 ^{fg}	0,11 ^{gh}	0,13 ^C
Trung bình (D)	0,19 ^B	0,27 ^A	0,27 ^A	
F _D = 27,7**		F _I = 61,1**	F _{DI} = 11,4**	CV = 16,01%

^{a,b,c,...} thể hiện sự khác biệt về mặt thống kê giữa các nghiệm thức ở mức xác suất $p < 0,01$ (**), và ^{A, B, C,...} thể hiện sự khác biệt về mặt thống kê giữa các giá trị trung bình theo hàng (Yếu tố I), theo cột (Yếu tố D).

Hơn nữa, khi kết hợp IBA với 2,4-D, kết quả cũng cho thấy có sự khác biệt về mặt thống kê giữa các nghiệm thức khác nhau. Các mẫu mô sẹo được nuôi cấy trong môi trường có bổ sung 0,5 mg/L 2,4-D kết hợp với IBA ở nồng độ 4,0 mg/L cho khối lượng mẫu đạt cao hơn so với các nghiệm thức còn lại. Từ kết quả của thí nghiệm cho thấy, loại và nồng độ auxin bổ sung vào môi trường nuôi cấy có ảnh hưởng khác nhau đến sự tăng sinh và phát sinh hình thái của mô sẹo.

4. KẾT LUẬN

Từ những kết quả đạt được cho thấy, loại và nồng độ auxin bổ sung vào môi trường nuôi cấy có ảnh hưởng đến sự tăng sinh và phát sinh hình thái của mô sẹo cây bá bệnh. Môi trường thích hợp cho sự tăng sinh mô sẹo là môi trường có bổ sung 3,0 mg/L 2,4-D kết hợp với 2,0 mg/L TDZ (3,86 g/mẫu). Trong quá trình khảo sát ảnh hưởng của 2,4-D kết hợp IBA lên khả năng phát sinh hình thái của mô sẹo, sự cảm ứng hình thành rễ từ mô sẹo bá bệnh đạt giá trị cao nhất khi môi trường nuôi cấy có bổ sung 0,5 mg/L 2,4-D kết hợp với 4,0 mg/L IBA (5,3 rễ/mẫu). Sự phát sinh phôi vô tính đạt cao nhất ở nghiệm thức chỉ bổ sung 3,0 mg/L IBA (14,3 phôi/mẫu).

Lời cảm ơn: Nhóm tác giả xin chân thành cảm ơn Phòng Thí nghiệm Trọng điểm phía Nam về Công nghệ tế bào thực vật - Viện Sinh học Nhiệt đới đã hỗ trợ kinh phí để thực hiện nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Murthy H. N., Hahn E. J., Paek K. Y. - Adventitious roots and secondary metabolism, Chinese Journal of Biotechnology **24** (2008) 711- 716
2. Shaheed U. R., Kevin Ch. and Hye H. Y. - Review on a traditional herbal medicine: *Eurycoma longifolia* Jack (Tongkat Ali): Its traditional uses, chemistry, evidence-based pharmacology and toxicology, Molecules **21** (2016) 331.

3. Aziz S., Akeng G. and Kandasamy K. - Induction of somatic embryos from cotyledonary tissue of Tongkat Ali (*Eurycoma longifolia*), Journal of Tropical Medicinal Plants **1** (2000) 53-59.
4. Hussein S., Ibrahim R., Kiong A. L. P., Fadzillah N. M. and Daud S. K. - Multiple shoots formation of an important tropical medicinal plant, *Eurycoma longifolia* Jack, Plant Biotechnology **22** (2005) 349-351.
5. Mahmood M., Normi R. and Subramaniam S.- Optimization of suitable auxin application in arecalcitrant woody forest plant of *Eurycoma longifolia* (Tongkat Ali) for callus induction, African Journal of Biotechnology **9** (2010) 8417-8428.
6. Đỗ Quốc Trường - Nghiên cứu quá trình phát sinh mô sẹo từ mẫu lá cây bá bệnh (*Eurycoma longifolia* Jack), Khóa luận tốt nghiệp Kỹ sư Công nghệ Sinh học, Đại Học Nông Lâm Tp. Hồ Chí Minh, 2012.
7. Murashige T. and Skoog F. - A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue culture, Physiologia plantarum **15** (1992) 473-497.
8. Su K.C., Takaki T., and Petronczki M. - Targeting of the RhoGEF Ect2 to the equatorial membrane controls cleavage furrow formation during cytokinesis, Developmental Cell **21** (2011) 1104-1115.
9. Nitsch C. - Induction *in vitro* de la floraison chez une plante de jours courts: *Plumbago indica* L., Annales des sciences naturelles Botanique, Paris **9** (1968) 1-91.
10. Gautheret R. J. - Factors affecting differentiation of plant tissues grown *in vitro*. In: Cell Differentiation and Morphogenesis (Beermann W. ed.), North-Holland Publishing Co. Amsterdam (1966) 55-95.
11. Mai Trường, Trần Thị Ngọc Hà, Phan Tường Lộc, Lê Tấn Đức, Trần Trọng Tuấn, Đỗ Đăng Giáp, Bùi Đình Thạch, Phạm Đức Trí, Nguyễn Đức Minh Hùng, Nguyễn Thị Thanh, Nguyễn Văn Kết, Trần Công Luận, Nguyễn Hữu Hồ. - Nghiên cứu nuôi cấy mô sẹo có khả năng sinh phôi và mô phôi soma sâm ngọc linh (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.), Tạp chí Công nghệ Sinh học **35** (3se) (2013) 145-157.
12. Baque M.A., Hahn E.J. and Paek K.Y. - Induction mechanism of adventitious root from leaf explants of *Morinda citrifolia* as affected by auxin and light quality. *In vitro* Cellular and Developmental Biology - Plant **46** (2009) 71- 80.
13. Bellamine J., Penel C., Greppin H. and Gaspar T. - Confirmation of the role of auxin and calcium in the late phases of adventitious root formation, Journal Plant Growth Regulation **26** (1998) 191-194.
14. Yun S. L., Yang T. J., Park S. U., Bae J. H., Wu S. Q., Lim K. B. - Induction and proliferation of adventitious roots from *Aloe vera* leaf tissues for *in vitro* production of aloe-emodin, Plant Omics Journal **4** (4) (2011) 190-194.
15. Baque M.A., Hahn E.J., Paek K.Y. - Growth, secondary metabolite production and antioxidant enzyme response of *Morinda citrifolia* adventitious root as affected by auxin and cytokinin, Plant Biotechnology Reports **4** (2010) 109-116.
16. Dương Tấn Nhựt. - Công nghệ sinh học thực vật, Tập 1, Nhà xuất bản Nông nghiệp, TP.Hồ Chí Minh, 2007, tr. 103-130.

ABSTRACT

EFFECTS OF PLANT GROWTH REGULATORS ON PROLIFERATION AND MORPHOGENESIS OF CALLUS DERIVED FROM COTYLEDON OF *EURYCOMA LONGIFOLIA*

Nguyen Thi Duoc¹, Do Dang Giap¹, Trinh Thi Huong², Tran Trong Tuan^{1*}

¹*Institute of Tropical Biology, VAST*

²*Ho Chi Minh City University of Food Industry*

*Email: trantrongtuan.com@gmail.com

‘Ba benh’ or ‘Mat nhan’, which is a common name of *Eurycoma longifolia* in Vietnam, is a medicinal herb of the Simaroubaceae family. The main uses of this species are malaria treatment and physiological enhancement. There are many biologically active compounds in this plant, such as quassinoid, β -carboline alkaloid, canthin-6-1 alkaloid, tirucallane triterpene, squalene derivatives, eurycolactone, eurycomalactone, laurycolactone, biphenyl neolignan and steroids. Currently, many studies on secondary compounds and their uses have been done, however, studies on morphogenesis and soma embryogenesis are still limited. In this study, the effects of plant growth regulators on proliferation and morphogenesis of callus derived from cotyledon of *Eurycoma longifolia* were investigated. The results showed that calli proliferation cultured in 3.0 mg/L 2,4-D combined with 2.0 mg/L TDZ MS medium reach the highest fresh weight (3.86 g/explant). Almost callus explants were cultured in MS medium supplemented with 2,4-D along with IBA also induce roots and somatic embryos. The results of this experiment showed that 0.5 mg/L 2,4-D combined with 4.0 mg/L IBA was suitable for root induction with 5.3 roots per explant. The medium supplemented with 3.0 mg/L IBA was the most suitable medium for somatic embryogenesis with 14.3 embryos per explant.

Keywords: Auxin, *Eurycoma longifolia*, cotyledon, callus, morphogenesis.