

ẢNH HƯỞNG CỦA CHẤT ĐIỀU HÒA TĂNG TRƯỞNG THỰC VẬT ĐẾN KHẢ NĂNG TẠO MÔ SẸO TỪ THÂN VÀ LÁ *IN-VITRO* CỦA CÂY OẢI HƯƠNG (*Lavandula dentata*)

Trần Thị Anh Thoa*, Trịnh Thị Hương,
Lê Thị Thúy, Nguyễn Thị Tuyết Nhung

Trường Đại học Công nghiệp Thực phẩm TP.HCM

*Email: thoatta@hufi.edu.vn

Ngày nhận bài: 28/6/2019; Ngày chấp nhận đăng: 06/9/2019

TÓM TẮT

Khả năng tạo mô sẹo và hình thái mô sẹo được tiến hành nghiên cứu trên cây oải hương *Lavandula dentata*. Mô sẹo được thu nhận từ lá và thân *in-vitro* trên môi trường MS (Murashige & Skoog, 1962) có bổ sung NAA (Naphthylacetic acid) và BA (Benzyl adenine). Sau 60 ngày nuôi cấy, mẫu lá nuôi trên môi trường MS bổ sung NAA 0,1 mg/L và BA 2,0 mg/L có khả năng tạo sẹo và phát sinh chồi. Với mẫu lá *in-vitro* nuôi cấy trên môi trường MS bổ sung NAA 1,0 mg/L và BA 2,0 mg/L cũng thu nhận được mô sẹo với tỷ lệ 100%. Thân *in-vitro* tạo được mô sẹo trên môi trường MS có bổ sung NAA 2,0 mg/L và BA 1,0 mg/L với tỷ lệ 100% thích hợp cho nguồn mẫu vi nhân giống *in vitro* cây oải hương *Lavandula dentata*.

Từ khóa: Benzyl adenine, Naphthylacetic acid, mô sẹo, *in-vitro*, cây oải hương, *Lavandula dentata*.

1. MỞ ĐẦU

Lavandula dentata còn được gọi là oải hương Pháp, là một loài thực vật có hoa trong họ hoa môi - Lamiaceae, có nguồn gốc từ vùng đảo Mediterranean, thuộc Đại Tây Dương. Thân cây cao khoảng 60 cm, lá màu xanh xám có lông tơ với các cạnh có dạng răng cưa. Cây ra hoa vào cuối mùa xuân, hoa có màu tím dài, hẹp, trên đỉnh có những cánh hoa xòe màu tím nhạt. Cây oải hương không chỉ được sử dụng để lấy hương vì cây có mùi thơm mạnh ở tất cả các bộ phận như thân lá rễ và hoa, mà còn được sử dụng như một phương thuốc thảo dược [1].

Tinh dầu oải hương được tách chiết từ hoa và lá với mùi hương quyến rũ được lưu giữ lâu, được dùng làm nước hoa. Mặt khác, với tính năng diệt khuẩn, kháng viêm mạnh mẽ, khi cơ thể bị tổn thương có thể sử dụng tinh dầu oải hương nguyên chất để cầm máu, làm sạch vết thương, diệt khuẩn, chống viêm nhiễm, giảm đau và sưng tấy rất hiệu quả [2]. Bên cạnh đó, tinh dầu oải hương còn giúp cho thần kinh được thư giãn, giảm căng thẳng, giảm áp lực tinh thần. Khi được uống như trà, hoa oải hương có thể giúp giảm bớt căng thẳng, lo âu và mất ngủ [3]. Thêm tinh dầu hoa tươi vào nước tắm có thể giúp thư giãn và giảm mệt mỏi cơ bắp. Dầu hoa oải hương cũng được sử dụng để điều trị các bệnh về da như *Candida* sp., nhiễm trùng, chàm [4]. Trong y học, dầu hoa oải hương thường được sử dụng làm dầu xoa bóp, chườm cứu. Hiện nay, tinh dầu oải hương cũng đang được nghiên cứu về đặc tính kháng khuẩn và virus [5].

Tinh dầu thực vật là một nhóm chất quan trọng trong các sản phẩm tự nhiên với lợi ích công nghiệp cao. Nuôi cấy tế bào thực vật đã được sử dụng để sản xuất các hợp chất này và

cũng là vấn đề đang được quan tâm nghiên cứu trong lĩnh vực công nghệ tế bào thực vật. Dưới tác dụng của các yếu tố môi trường và sự thay đổi về mặt di truyền của thực vật dẫn đến quá trình sản xuất các hợp chất chuyển hóa thứ cấp. Chính vì vậy, nuôi cấy tế bào và mô thực vật được sử dụng để nghiên cứu cơ chế hình thành các hợp chất thứ cấp [6]. Ngoài ra còn có mối tương quan chặt chẽ giữa sự khác biệt về hình thái, sinh hóa của các tế bào và khả năng thiết lập các con đường trao đổi chất thứ cấp. Nghiên cứu của Brent Tisserat đã chứng minh rằng khả năng tổng hợp chất carvone tinh dầu bạc hà là khác nhau trên các mẫu chồi, thân, rễ và mô sẹo [7].

Lá, thân cũng được biết là nguồn mẫu tạo ra mô sẹo, các mô sẹo này có khả năng tổng hợp và tích lũy các chất chuyển hóa thứ cấp tương tự như cây hoàn thiện được trồng trong tự nhiên. Vì lý do đó, mô sẹo từ lá thường được phân lập và nuôi cấy với giá trị thương mại và giá trị dược phẩm cao [8]. Do đó, nuôi cấy mô tế bào thực vật thực sự được coi là tiềm năng để tổng hợp các hợp chất thứ cấp. Nghiên cứu của Nikolakaki *et al* trên đối tượng *Phlomis fruticosa* cho thấy, tất cả các hợp chất thứ cấp được phát hiện trong mô lá, cũng được phát hiện trong các tế bào của mô sẹo. Các nghiên cứu trên mô sẹo được nuôi cấy trong điều kiện môi trường bình thường (25°C, độ ẩm cao và chiếu sáng 16 giờ trong ngày) [9]. Đáng chú ý là các hợp chất thứ cấp thường được sản xuất trong mô thực vật như một phản ứng của tế bào thực vật trước các điều kiện stress của môi trường. Tuy nhiên, trong nghiên cứu này, các hợp chất này vẫn được tạo ra trong các điều kiện môi trường bình thường dẫn đến giả thuyết về vai trò đa bảo vệ của các hợp chất này, điều này có nghĩa là các hợp chất thứ cấp cũng được sản xuất ngay trong điều kiện bình thường để thực hiện vai trò bảo vệ và hỗ trợ thực vật chống chịu khi cần thiết [10]. Ngoài vai trò tạo hợp chất thứ cấp, nguồn sẹo từ lá, thân cũng có được sử dụng để nghiên cứu quá trình tạo phôi và phát sinh chồi *in vitro*.

Quá trình phát sinh hình thái mô sẹo cũng đã được nghiên cứu trong nuôi cấy *Lavandula officinalis* để đánh giá sự hình thành các chất chuyển hóa thứ cấp trong mô sẹo và chồi tái sinh [11]. Mô sẹo được phát triển trong ống nghiệm từ các nguồn khác nhau gồm lá, thân và hoa trong vòng ba tuần nuôi cấy. Mô sẹo xuất hiện dọc theo cạnh bị cắt và tiếp tục phát triển sau đó trở thành màu nâu và chết. Tỷ lệ hình thành mô sẹo tương tự đối với chồi hoa và lá (30-40%) nhưng rất thấp đối với nút thân (6,6%) [12]. Tuy nhiên, các nghiên cứu về khả năng tạo mô sẹo trên đối tượng *Lavandula dentata* cũng chưa được công bố. Ngoài ra, đây còn là giống cây oải hương đang được trồng ở Việt Nam nên cần có những nghiên cứu mới để khai thác tiềm năng của giống cây này.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Vật liệu nghiên cứu là các đoạn thân và mảnh lá oải hương *in-vitro* (*Lavandula dentata*) với chiều dài đoạn thân 1-1,5 cm và kích thước mảnh lá có chiều dài 1-1,5 cm, chiều rộng 0,5-1 cm. Mẫu được lấy từ cây *in-vitro* 3 tháng tuổi tại Phòng Thí nghiệm Công nghệ Tế bào, Trường Đại học Công nghiệp Thực phẩm TP. Hồ Chí Minh.

Điều kiện nuôi cấy: trong tối, ở nhiệt độ 25 °C ± 2 °C.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Khảo sát ảnh hưởng của nồng độ BA lên khả năng tạo mô sẹo từ lá *in-vitro*

Thí nghiệm được thiết kế nhằm mục đích xác định nồng độ BA tối ưu cho sự hình thành mô sẹo và tăng sinh mô sẹo của lá *in-vitro* *Lavandula dentata*. Kích thước mẫu dài 1-1,5 cm và rộng 0,5-1 cm được nuôi cấy trên môi trường MS có bổ sung 30g/L đường saccharose, 8g/L agar, NAA 0,1 mg/L và BA với các nồng độ khác nhau gồm 0,0; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 mg/L. Các mảnh lá được chọn từ lá ở đoạn giữa của cây *in-vitro* ba tháng tuổi, mẫu lá được cắt bỏ

ở rìa và tạo vết thương bên trong để dễ dàng cho việc tạo mô sẹo. Thí nghiệm gồm có 5 nghiệm thức, mỗi nghiệm thức lặp lại ba lần, mỗi lần ba mẫu, mỗi mẫu trong một bình thủy tinh. Sau 60 ngày nuôi cấy, các mô được quan sát dưới kính lúp soi nổi để theo dõi tỷ lệ phần trăm tạo sẹo và hình thái mô sẹo.

2.2.2. Khảo sát ảnh hưởng của nồng độ NAA lên khả năng tạo mô sẹo từ lá *in-vitro*

Thí nghiệm được thiết kế nhằm mục đích xác định nồng độ NAA tối ưu cho sự hình thành mô sẹo và tăng sinh mô sẹo của lá *in-vitro Lavandula dentata*. Kích thước mẫu dài 1-1,5 cm và rộng 0,5-1 cm được nuôi cấy trên môi trường MS có bổ sung 30 g/L đường saccharose, 8 g/L Agar, BA 2,0 mg/L và NAA với các nồng độ khác nhau gồm 0,0; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 mg/L. Các mảnh lá được chọn từ lá ở đoạn giữa của cây *in-vitro* ba tháng tuổi, mẫu lá được cắt bỏ ở rìa và tạo vết thương bên trong để dễ dàng cho việc tạo mô sẹo. Sau 60 ngày nuôi cấy, các mô được quan sát dưới kính lúp soi nổi để theo dõi tỷ lệ phần trăm tạo sẹo và hình thái mô sẹo.

2.2.3. Khảo sát ảnh hưởng của nồng độ NAA và BA lên khả năng tạo mô sẹo từ thân *in-vitro*

Thí nghiệm được thiết kế nhằm mục đích xác định nồng độ NAA và BA tối ưu cho sự hình thành mô sẹo và tăng sinh mô sẹo của thân *in-vitro Lavandula dentata*. Mẫu gồm những đoạn thân *in-vitro* dài 1-1,5 cm được nuôi cấy trên môi trường MS có bổ sung 30 g/L đường saccharose, 8g/L Agar, NAA với các nồng độ khác nhau gồm 0,0; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 mg/L và BA với các nồng độ khác nhau gồm 0,0; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 mg/L. Các đoạn thân được chọn từ đoạn giữa của cây *in-vitro* 3 tháng tuổi. Sau 60 ngày nuôi cấy, các mô được quan sát dưới kính lúp soi nổi để theo dõi tỷ lệ phần trăm tạo mô sẹo và hình thái mô sẹo. Sau đó các mô sẹo này tiếp tục được cấy chuyển trên môi trường cũ và đồng thời cấy chuyển trên môi trường MS bổ sung 0,75 mg/L BA. Sau 45 ngày cấy chuyển, các chỉ tiêu về khối lượng và số chồi được ghi nhận.

2.3. Xử lý số liệu

Tất cả các thí nghiệm được lặp lại 3 lần, ghi nhận số liệu và xử lý thống kê bằng phần mềm Statgraphics Centurion XV, sự khác biệt có ý nghĩa ở mức $p \leq 0,05$.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Ảnh hưởng của nồng độ BA lên khả năng tạo mô sẹo từ lá *in vitro Lavandula dentata*

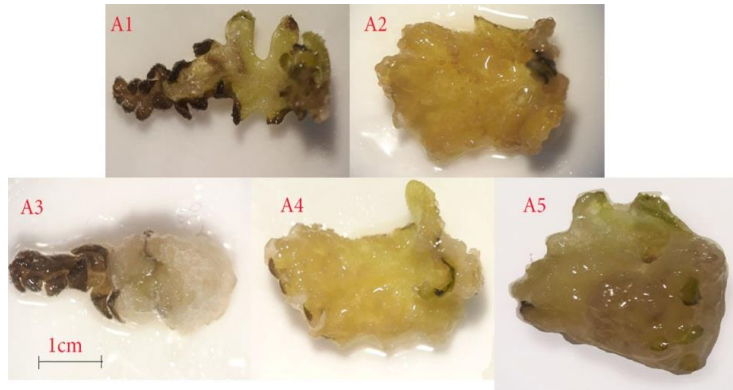
Sau 60 ngày nuôi cấy, tất cả các mẫu cấy trên môi trường MS có bổ sung 0,1 mg/L NAA kết hợp với BA 0; 0,5; 1,0; 1,5; 2 mg/L đều có cảm ứng tạo mô sẹo, lá uốn cong, sưng phồng. Tỷ lệ phần trăm tạo mô sẹo cao ở nghiệm thức A3, A4, A5 (tương đương 100%), trong đó ở nghiệm thức A3 bổ sung 1,0 mg/L BA mô sẹo có màu trắng, xốp hơn các nghiệm thức A4 và A5. Ở nghiệm thức A4 và A5, sẹo có màu vàng xanh, bóng nước. Nghiệm thức A5 có sự xuất hiện dấu hiệu hình thành chồi, đó là những vẩy có màu xanh lá. Ở nghiệm thức A1 và A2 cũng có cảm ứng tạo sẹo nhưng sau đó hóa nâu và chết (Bảng 1 và Hình 1).

Bảng 1. Ảnh hưởng của nồng độ BA đến tỷ lệ và hình thái sẹo từ lá *in-vitro Lavandula dentata*

Nghiệm thức	Nồng độ BA (mg/L)	Tỷ lệ tạo sẹo (%)	Hình thái sẹo
A ₁	0,00	0,00 ± 0,00 ^a	Chuyển nâu và chết
A ₂	0,50	55,56 ± 29,40 ^{ab}	Sẹo vàng, bóng, tăng sinh chậm
A ₃	1,00	100,00 ± 0,00 ^b	Sẹo trắng, xốp, tăng sinh mạnh
A ₄	1,50	88,89 ± 11,11 ^b	Sẹo vàng, bóng, tăng sinh mạnh
A ₅	2,00	100,00 ± 0,00 ^b	Sẹo vàng, bóng, có vẩy xanh lá.

^{a,b,c...}: thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa ở mức tin cậy $p \leq 0,05$ trong phép thử Duncan.

Nhóm auxin NAA được bổ sung để tăng khả năng hình thành mô sẹo và các hình thái khác nhau của mô sẹo ở thực vật. BA là một chất điều hòa sinh trưởng thực vật của nhóm cytokinin, giúp thực vật tăng cường khả năng tạo chồi. Trong nuôi cấy lá *in-vitro Lavandula*, một tỷ lệ thích hợp của auxin và cytokinin sẽ có hiệu quả đối với sự hình thành mô sẹo [13]. Tuy nhiên, trở ngại chính trong nuôi cấy mô sẹo là sự hóa nâu của các mẫu do sự sản xuất polyphenol. Nghiên cứu của Banthorpe về khả năng tạo mô sẹo trên thực vật cũng đã chứng minh kích thích mẫu ban đầu ảnh hưởng đến sự hóa nâu này [14]. Trong thí nghiệm này, kích thích ban đầu của các mảnh lá ban đầu được nuôi cấy dài 1-1,5 cm và rộng 0,5-1 cm phù hợp với việc tạo mô sẹo, hạn chế tối đa sự hóa đen của mẫu ban đầu. Ở nghiệm thức A3, mẫu sẹo trắng xốp phù hợp để tiếp tục nghiên cứu tăng sinh mô sẹo và nuôi cấy tạo hợp chất thứ cấp và ở nghiệm thức A5, mẫu mô sẹo phù hợp để tiếp tục nghiên cứu tạo chồi.



Hình 1. Mô sẹo *Lavandula dentata* nuôi cấy trong môi trường MS bổ sung NAA 0.1 mg/L và các nồng độ khác nhau của BA. A1, A2, A3, A4, A5 lần lượt là 0; 0,5; 1,0; 1,5; 2 mg/L BA

3.2. Ảnh hưởng của nồng độ NAA lên khả năng tạo mô sẹo từ lá *in vitro Lavandula dentata*

Sau 60 ngày nuôi cấy, kết quả cho thấy ở cả 4 nghiệm thức B2, B3, B4, B5 với sự bổ sung NAA 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 mg/L đều tác động mạnh đến khả năng tạo mô sẹo từ lá với tỷ lệ đạt 100%, kích thước mô sẹo phát triển mạnh, lan tỏa đều các hướng. Tuy nhiên có sự khác biệt về hình thái mô sẹo, ở nghiệm thức B2 và B3 mô sẹo xốp hơn so với nghiệm thức B3, B4. Trong khi đó, ở nghiệm thức B1 không bổ sung NAA mẫu lá không cảm ứng tạo sẹo và sau đó hóa đen rồi chết (Bảng 2 và Hình 2).

Bảng 2. Ảnh hưởng của nồng độ NAA đến tỷ lệ và hình thái mô sẹo từ lá *in-vitro Lavandula dentata*

Nghiệm thức	Nồng độ NAA (mg/L)	Tỷ lệ tạo sẹo (%)	Hình thái mô sẹo
B ₁	0,00	0,00 ± 0,00 ^a	Hóa đen
B ₂	1,00	100,00 ± 0,00 ^b	Xốp, vàng nhạt
B ₃	2,00	100,00 ± 0,00 ^b	Xốp, trắng
B ₄	3,00	100,00 ± 0,00 ^b	Cứng, trắng
B ₅	4,00	100,00 ± 0,00 ^b	Cứng, nâu nhạt

^{a,b}: thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa ở mức tin cậy $p \leq 0,05$ trong phép thử Duncan.

Kết quả này cho thấy, môi trường nuôi cấy chỉ bổ sung BA không có hiệu quả cho quá trình cảm ứng tạo mô sẹo và môi trường tạo mô sẹo cần bổ sung thêm NAA trong điều kiện không chiếu sáng. Điều này cũng đã được chứng minh trong nghiên cứu tạo mô sẹo trên đối tượng *Lavandula latifolia*, kết quả cũng chứng minh cần phải bổ sung auxin trong môi

trường nuôi cấy. Hơn nữa, sự tăng sinh và hình thái mô sẹo cũng phụ thuộc vào điều kiện chiếu sáng và nồng độ 2-4 D. Trong điều kiện có chiếu sáng và nồng độ 2,4-D thấp hơn 2,25 μM , khả năng tạo mô sẹo rất thấp trên đối tượng *Lavandula latifolia*. Trong khi đó, ở điều kiện trong tối, sự tăng sinh mô sẹo xảy ra mạnh với các nồng độ 2,4-D 0,34; 0,45 và 2,25 μM [15]. Như vậy, điều kiện trong tối cũng ảnh hưởng đến khả năng hình thành mô sẹo, điều này phù hợp với kết quả nghiên cứu, tức là có cảm ứng tạo mô sẹo tốt trong điều kiện không có chiếu sáng trong nghiệm thức B2, B3, B4, B5. Ngoài ra, hầu hết các mô sẹo được tạo ra ở nồng độ NAA thấp có hình thái xốp dễ vỡ và có màu trắng đến vàng, trong khi những loại mô sẹo thu được trên môi trường có nồng độ NAA cao hơn có độ cứng hơn, đặc, nhỏ gọn hơn và có màu nâu nhạt. Kết quả này cho thấy, mô sẹo thu được trong điều kiện bóng tối với sự hiện diện của 1,0 mg/L NAA là phù hợp để lựa chọn làm mẫu mô sẹo cho các nghiên cứu tiếp theo.



Hình 2. Mô sẹo *Lavandula dentata* nuôi cấy trong môi trường MS bổ sung BA 2,0 mg/L và các nồng độ khác nhau của NAA.

B1, B2, B3, B4, B5 lần lượt là 0; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 mg/L NAA.

3.3. Ảnh hưởng của nồng độ NAA và BA lên khả năng tạo mô sẹo từ thân *in-vitro* *Lavandula dentata*

Sau 60 ngày kết quả cho thấy tỷ lệ phần trăm tạo mô sẹo cao ở nghiệm thức C3, C4, C5, đạt tương đương 100%. Trong số đó, mô sẹo tăng sinh mạnh ở nghiệm thức C3 và C4, mô sẹo có hình thái xốp, dễ vỡ và có dấu hiệu bật chồi với các vẩy màu xanh xuất hiện. Nghiệm thức C5 mô sẹo cứng chắc, có màu nâu nhạt. Ở nghiệm thức C1 và C2 cũng có hiện tượng tạo mô sẹo nhưng với tỷ lệ thấp tương đương 55,56%, hình thái sẹo cũng xốp, mềm nhưng cũng có hiện tượng hóa đen (Bảng 3, Hình 3).

Bảng 3. Ảnh hưởng của nồng độ NAA và BA đến tỷ lệ và hình thái mô sẹo từ thân *in-vitro* *Lavandula dentata*

Nghiệm thức	NAA (mg/L)	BA (mg/L)	Tỷ lệ tạo sẹo (%)	Hình thái mô sẹo
C ₁	0,10	0,00	66,67 ± 0.00 ^a	Sẹo nhỏ, đen
C ₂	1,00	0,50	55,56 ± 11.11 ^a	Xốp, vàng nhạt
C ₃	2,00	1,00	100,00 ± 0.00 ^b	Xốp, trắng, sinh trưởng mạnh, dấu hiệu bật chồi
C ₄	3,00	1,50	88,89 ± 11.11 ^b	Xốp, vàng nhạt, dấu hiệu bật chồi
C ₅	4,00	2,00	100,00 ± 0.00 ^b	Chắc cứng, nâu nhạt

^{a,b,c...}: thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa ở mức tin cậy $p \leq 0,05$ trong phép thử Duncan.

Hoa oải hương không chỉ được vi nhân giống bằng cách sử dụng các chồi bên mà còn có thể sử dụng các mô sẹo để phát sinh chồi. Có nhiều loại mô sẹo khác nhau bao gồm mô sẹo có màu trắng, màu vàng nhạt hay nâu với độ xốp khác nhau. Các loại mô sẹo này thích hợp để nghiên cứu tạo ra các hợp chất chuyển hóa thứ cấp hoặc nhanh chóng phát triển bật chồi và nhân nhanh chồi. Theo nghiên cứu của Tsuru *et al.* ở *Lavandula vera* DC, sự hình thành mô sẹo đã được quan sát ở rìa của các mẫu khoảng 10 ngày sau khi bắt đầu nuôi cấy. Sau 40 ngày, mô sẹo trắng được hình thành trong tất cả các mẫu, và chúng được sử dụng cho cảm ứng tạo chồi. Trong môi trường có bổ sung BA, các đốm xanh xuất hiện trên bề mặt mô sẹo sau 4 tuần. Sau đó, một số chồi được tạo ra trên những đốm xanh đó, phát triển thành các chồi bình thường. Mặt khác vi nhân giống *Lavandula* thông qua mô sẹo cũng là nguồn phát sinh các biến đổi di truyền[16]. Như vậy, trong thí nghiệm này các mẫu sẹo đã có dấu hiệu bật chồi, đó là những vẩy màu xanh lá ở nghiệm thức C3 và C4. Nghiệm thức C5 có khối mô sẹo cứng chắc, có khả năng tiếp tục tăng sinh khối.



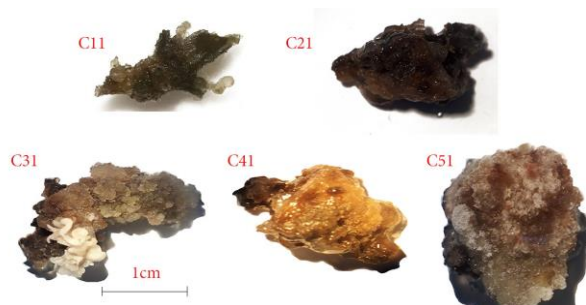
Hình 3. Mô sẹo *Lavandula dentata* nuôi cấy trong môi trường MS có bổ sung nồng độ khác nhau của NAA và BA. C1,C2, C3, C4, C5 lần lượt là 0,1; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 mg/L NAA và 0,0; 0,5; 1,0; 1,5; 2 mg/L BA.

Sau giai đoạn 60 ngày, các mẫu mô sẹo được cấy chuyển. Kết quả 45 ngày sau cấy chuyển, các mẫu mô sẹo có dấu hiệu hóa đen, không tăng khối lượng ở nghiệm thức C21, C31, C41. Các dấu hiệu bật chồi ở nghiệm thức C3 và C4 trước đó cũng không còn, các vẩy xanh chuyển thành màu trắng hoặc màu đen ở C31 và C41. Tuy nhiên, ở nghiệm thức C51, khối mô sẹo tăng sinh so với C5 trước đó, với khối lượng mô sẹo tăng lên đến 5,39 g (Bảng 4, Hình 4).

Bảng 4. Ảnh hưởng của nồng độ NAA và BA đến khối lượng mô sẹo từ thân *in-vitro* *Lavandula dentata*

Nghiệm thức	NAA (mg/L)	BA (mg/L)	Khối lượng ngày 60 (g)	Khối lượng ngày 45 sau cấy chuyển (g)
C ₁₁	0,10	0,00	3,1 ± 0,09 ^a	3,09 ± 0,08 ^a
C ₂₁	1,00	0,50	4,07 ± 0,04 ^b	4,06 ± 0,05 ^b
C ₃₁	2,00	1,00	4,11 ± 0,03 ^b	4,11 ± 0,04 ^b
C ₄₁	3,00	1,50	4,11 ± 0,06 ^b	4,12 ± 0,05 ^b
C ₅₁	4,00	2,00	4,00 ± 0,01 ^b	5,39 ± 0,3 ^c

^{a,b,c}: thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa ở mức tin cậy $p \leq 0,05$ trong phép thử Duncan.



Hình 4. Mô sẹo *Lavandula dentata* nuôi cấy trong môi trường MS có bổ sung nồng độ khác nhau của NAA và BA sau 45 ngày cấy chuyên.
C11, C21, C31, C41, C51 lần lượt là 0,1; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 mg/L NAA và 0,0; 0,5; 1,0; 1,5; 2 mg/L BA sau 45 ngày cấy chuyên.

Sau cấy chuyên 45 ngày, mô sẹo tại các nghiệm thức C2, C3, C4 có dấu hiệu hóa đen và ngừng tăng sinh nhưng nghiệm thức C5 vẫn tiếp tục tăng sinh. Điều này có thể kết luận rằng nghiệm thức C5 phù hợp cho mẫu tiếp tục nghiên cứu tạo các hợp chất thứ cấp trong điều kiện nuôi cấy tĩnh hoặc nuôi cấy lỏng lắc.

Đồng thời sau 60 ngày, các mẫu mô sẹo cũng được cấy chuyên sang môi trường MS bổ sung 0,75 mg/L BA. 45 ngày sau cấy chuyên, các vẩy xanh trên mô sẹo ở các nghiệm thức C3, C4 trước đó bật chồi và hình thành chồi mới, trong đó số chồi ở nghiệm thức C32 nhiều nhất với 5,32 chồi và hình thái chồi lớn, chắc khỏe (Bảng 5, Hình 5). Các chồi này cũng phát triển mạnh cho ra rễ trong môi trường MS bổ sung 0,75 mg/L NAA (Hình 6). Điều này phù hợp với nghiên cứu trước đó về khả năng tạo chồi và rễ *in vitro* cây oải hương *Lavandula dentata* [17]. Như vậy, nghiệm thức C3 cho mẫu mô sẹo thích hợp để tiếp tục nghiên cứu vi nhân giống *Lavandula dentata*.

Bảng 5. Số chồi từ mô sẹo *in-vitro* *Lavandula dentata*

Nghiệm thức	NAA (mg/L)	BA (mg/L)	Số chồi	Hình thái chồi
C ₁₂	0,10	0,00	0,00 ± 0,00 ^a	Không hình thành chồi
C ₂₂	1,00	0,50	0,00 ± 0,00 ^a	Không hình thành chồi
C ₃₂	2,00	1,00	5,32 ± 0,21 ^c	Chồi lớn, chắc khỏe
C ₄₂	3,00	1,50	2,11 ± 0,13 ^b	Chồi nhỏ, phát triển chậm
C ₅₂	4,00	2,00	0,00 ± 0,00 ^a	Không hình thành chồi

^{a,b,c}: thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa ở mức tin cậy $p \leq 0,05$ trong phép thử Duncan.



Hình 5. Chồi *Lavandula dentata* nuôi cấy trong môi trường MS có bổ sung nồng độ 0,75 mg/L BA sau 45 ngày cấy chuyên.
C12, C22, C32, C42, C52 lần lượt là 0,1; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 mg/L NAA và 0,0; 0,5; 1,0; 1,5; 2 mg/L BA sau 45 ngày cấy chuyên vào môi trường MS có bổ sung nồng độ 0,75 mg/L BA.



Hình 6. Hình thái rễ *Lavandula dentata in vitro* nuôi cấy trong môi trường MS có bổ sung nồng độ 0,75 mg/L NAA. D1, D2 là hình thái rễ sau 30, 45 ngày.

4. KẾT LUẬN

Sau 60 ngày nuôi cấy, kết quả đã xác định môi trường MS được bổ sung 0,1 mg/L NAA và 2,0 mg/L BA phù hợp để tạo mô sẹo từ lá *in-vitro* và sau đó có dấu hiệu bật chồi. Ngoài ra, môi trường MS được bổ sung 1,0 mg/L NAA và 2,0 mg/L BA phù hợp hình thành mô sẹo với tỷ lệ 100%, hình thái xốp, đặc trưng cho nguồn mẫu mô sẹo cần thiết trong các nghiên cứu tiếp theo. Trong nghiên cứu này cũng cho kết quả nuôi cấy *in-vitro* có thể tạo ra mô sẹo từ thân. Các mô sẹo này có khả năng tăng sinh nhanh và có dấu hiệu bật chồi trong môi trường MS được bổ sung 2,0 mg/L NAA và 1,0 mg/L BA. Kết quả nghiên cứu đã xác định các nguồn cytokinin và auxin ngoại sinh đã ảnh hưởng đến sự hình thành mô sẹo của cây oải hương, tăng khả năng hình thành mô sẹo để tiếp tục được sử dụng làm nguồn mẫu nghiên cứu về quá trình hình thành chồi từ mô sẹo và quá trình tạo các hợp chất thứ cấp từ mô sẹo. Đây là cơ sở để nghiên cứu sâu hơn về ảnh hưởng của sự kết hợp giữa auxin và cytokinin đối với khả năng tạo chồi và rễ để cải thiện hiệu quả của quá trình vi nhân giống *Lavandula dentata*.

Lời cảm ơn: Nghiên cứu này do Trường Đại học Công nghiệp Thực phẩm TP. Hồ Chí Minh bảo trợ và cấp kinh phí theo Hợp đồng số 59/HĐ-DCT.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Brickell C. - RHS A-Z encyclopedia of garden plants, Dorling Kindersley, United Kingdom (2008) 1136p.
2. Soltani R., Soheilipour S., Hajhashemi V., Asghari G., Bagheri M., Molavi M. - Evaluation of the effect of aromatherapy with lavender essential oil on post-tonsillectomy pain in pediatric patients: a randomized controlled trial, International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology **77** (9) (2013) 1579-1581.
3. Upson T., Andrews S. - The genus *Lavandula*. Botanical Magazine Monograph, 2004.
4. Anderson C., Lis-Balchin M., Kirk-Smith. - Evaluation of massage with essential oils in childhood atopic eczema, Phytotherapy Research **14** (6) (2000) 452-456.
5. Djenane D., Aider M., Yanguela J., Idir L., Gómez D., Roncalés P. - Antioxidant and antibacterial effects of *Lavandula* and *Mentha* essential oils in minced beef inoculated with *E. coli* O157: H7 and *S. aureus* during storage at abuse refrigeration temperature, Meat Science **92** (4) (2012) 667-674.
6. Passinho-Soares H.C., David J.P., de Santana J.R.F., David J.M., Rodrigues F.de M., Mesquita P.R.R., de Oliveira F.S., Bellintani M.C. - Influence of growth regulators on distribution of trichomes and the production of volatiles in micropropagated plants of *Plectranthus ornatus*, Revista Brasileira de Farmacognosia **27** (6) (2017) 679-690.

7. Tisserat B., Vaughn S.F. - Growth, morphogenesis, and essential oil production in *Mentha spicata* L. plantlets *in-vitro*, In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant **44** (2008) 40-50.
8. Dronne S., Jullien F., Caissard J.C., Faure O. - A simple and efficient method for *in-vitro* shoot regeneration from leaves of lavandin (*Lavandula x intermedia* Emmeric ex Loiseleur), Plant Cell Reports **18** (5) (1999) 429-433.
9. Nikolakaki A., Christodoulakis N.S. - Secretory structures and cytochemical investigation of the leaf of *Phlomis fruticosa*, a seasonally dimorphic subshrub. Secreting activity of the leaf-originating calluses. Flora-Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants **202** (6) (2007) 429-436.
10. Rosenthal G.A., Berenbaum M.R. (Eds.) - Herbivores: Their interactions with secondary plant metabolites (2nd Ed.), Vol.1: The chemical participants, Academic Press (1991) 221-296.
11. Webb J.K., Banthorpe D.V., Watson, D.G. - Monoterpene synthesis in shoots regenerated from callus cultures, Phytochemistry **23** (4) (1984) 903-904.
12. Panizza M., Tognoni F. - Clonal propagation, callus formation and plant regeneration of lavandin, Scientia Horticulturae **37** (1-2) (1988) 157-163.
13. Nguyễn Đức Lượng, Lê Thị Thủy Tiên – Công nghệ tế bào, NXB ĐH Quốc gia TP. HCM (2006) 136-142.
14. Banthorpe D.V., Branch S.A., Njar V.C.O., Osborne M.G., Watson, D.G. - Ability of plant callus cultures to synthesize and accumulate lower terpenoids, Phytochemistry **25** (3) (1986) 629- 636.
15. Jordan A.M., Calvo M.C., Segura J. - Morphogenesis in callus and single-cell cultures of *Lavandula latifolia* Medicus, Journal of Horticultural Science **65** (1) (1990) 49-53.
16. Tsuru M., Koda M., Inoue M. - Comparative effect of different types of cytokinin for shoot formation and plant regeneration in leaf-derived callus of lavender (*Lavandula vera* DC), Scientia Horticulturae **81** (3) (1999) 331-336.
17. Trần Thị Anh Thoa, Nguyễn Thị Tuyết Nhung, Trần Hoài Nam - Ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng thực vật lên khả năng tạo chồi và rễ *in vitro* cây oải hương *Lavandula dentata*, Tạp chí Khoa học Công nghệ và Thực phẩm **16** (1) (2018) 41-47.

ABSTRACT

EFFECT OF PHYTOHORMONES ON *IN-VITRO* CALLUS FORMATION FROM LEAVES AND STEMS OF LAVENDER (*Lavandula dentata*)

Tran Thi Anh Thoa*, Trinh Thi Huong, Le Thi Thuy, Nguyen Thi Tuyet Nhung
Ho Chi Minh City University of Food Industry
*Email: thoatta@hufi.edu.vn

Formations and morphogenesis in callus were investigated in *Lavandula dentata*. Callus was obtained from different parts of plants such as leaves and stems cultured on MS medium (Murashige & Skoog) supplemented with NAA (Naphthylacetic acid) and BA (Benzyl adenine). After 60 days of *in-vitro* culture, leaves culturing in MS medium with NAA 0.1 mg/L and BA 2.0 mg/L was most suitable for callus formation leading to shoot buds multiplication due to these calluses. On the other hand, MS medium supplemented with NAA 1.0 mg/L and BA 2.0 mg/L was also used to give callus which was 100% callus formation. Stem *in-vitro* was used as callus sources to culture on MS medium having phytohormones, the best result was 100% callus formation in MS medium with NAA 2.0 mg/L and BA 1.0 mg/L which allowed shoot buds to multiply.

Keywords: BA, NAA, callus, *in-vitro*, Lavender (*Lavandula dentata*).