

NHÂN *IN VITRO* RỄ BẤT ĐỊNH CÂY NGŨ GIA BÌ CHÂN CHIM *Schefflera octophylla* (Lour.) Harms BẰNG PHƯƠNG PHÁP NUÔI LÔNG LẮC

Huỳnh Thị Lúy^{1*}, Nguyễn Hữu Hổ¹, Bùi Văn Lệ²

TÓM TẮT

Ngũ gia bì chân chim (*Schefflera octophylla* (Lour.) Harms), thuộc họ Nhân sâm (Araliaceae), là loài thực vật chứa nhiều thành phần hóa học có tác dụng dược lý; các bộ phận của cây đều được sử dụng để làm thuốc trong Đông y với nhiều công dụng khác nhau. Trong nuôi cấy mô cây dược liệu, rễ bất định luôn được các nhà nghiên cứu quan tâm thực hiện. Nội dung bài này trình bày kết quả nghiên cứu nhân *in vitro* rễ bất định NGBCC thông qua sự phân nhánh của rễ dưới ảnh hưởng của một số yếu tố như loại và nồng độ chất điều hòa sinh trưởng, nồng độ đường saccharose, khối lượng rễ nuôi cấy ban đầu. Trong điều kiện nuôi lông lác, kết quả cho thấy rễ phân nhánh và tăng trưởng sinh khối mạnh nhất trong môi trường 1/2MS có 2 mg/L NAA so với 2 mg/L IBA, có 30 g/L đường; khối lượng rễ dùng nuôi cấy thích hợp là 2% (w/v) (hệ số nhân rễ cao nhất trong môi trường có 2 mg/L NAA, 2 mg/L IBA lần lượt là 13,04 và 12,08 ở 42 ngày sau cấy). Số liệu về sự tăng trưởng sinh khối rễ hàng tuần trong thời gian 49 ngày đã được thu thập. Đây là công trình đầu tiên về nhân rễ bất định ở NGBCC bằng phương pháp nuôi cấy lông lác, tạo tiền đề cho các nghiên cứu tiếp theo về sự tích lũy/sản xuất các hợp chất thứ cấp trong rễ.

Từ khóa: Chất điều hòa sinh trưởng thực vật, nhân rễ bất định, nuôi lông lác, *Schefflera octophylla*.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Ngũ gia bì chân chim (NGBCC), *Schefflera octophylla* (Lour.) Harms, là loài cây dược liệu thuộc họ Ngũ gia bì/Nhân sâm (Araliaceae). Tạo/nuôi cấy rễ bất định (RBD) *in vitro* trên môi trường đặc và trong môi trường lỏng các loài thực vật quan trọng thuộc họ này luôn được các nhà nghiên cứu quan tâm. Cụ thể là nghiên cứu về phát sinh hình thái RBD từ nuôi cấy mô lá, thân và rễ sâm *Panax notoginseng* (Gao và cs, 2005), mô sẹo thân rễ Tam thất hoang *Panax stipuleanatus* (Nguyễn Thị Ngọc Hương và cs, 2016); tạo rễ phục vụ nhân giống từ nuôi cấy *in vitro* chồi *Panax notoginseng* (Gao và cs, 2005), *Panax quinquefolius* (Uchendu và cs, 2011). RBD cũng là vật liệu được dùng trong nghiên cứu biến nạp gen (*gusA*) nhờ *Agrobacterium tumefaciens* (Han và Choi, 2009), tạo dòng cây đột biến bằng tia γ ⁶⁰Co (Zhang và cs, 2014) ở *Panax ginseng* và đặc biệt trong nghiên cứu nhân sinh khối phục vụ chiết xuất, thu nhận hợp chất thứ cấp ở *Panax ginseng* (Adil và Jeong, 2018), *Panax quinquefolius* (Qiang và cs, 2020). Các bộ phận khác nhau bao gồm rễ của

NGBCC đều hàm chứa các hợp chất thứ cấp có nhiều tác dụng như kháng virus (Li và cs, 2007), kháng một số dòng tế bào ung thư (Li và cs, 2009), kháng viêm (Liu và cs, 2019). Đến nay chỉ ghi nhận được một số công trình công bố có liên quan đến nuôi cấy *in vitro* NGBCC như nhân giống (Li và cs, 2004), biến nạp gen *rol* (từ *Agrobacterium tumefaciens*) nhằm tạo rễ tơ và thử nghiệm quá trình sản xuất sinh khối bằng bioreactor (Đặng Thị Thanh Tâm, 2012). Do vậy, nuôi cấy rễ bất định NGBCC là vấn đề cần được quan tâm nghiên cứu. Nuôi RBD NGBCC trên môi trường đặc đã được thực hiện, kết quả cho thấy rễ phát triển chậm, hiệu quả tạo rễ thứ cấp, tăng sinh khối thấp (số liệu cá nhân). Phương pháp nuôi cấy mô nói chung, rễ nói riêng trong môi trường lỏng (lắc/có sục khí) đã chứng tỏ có nhiều ưu điểm nổi bật so với nuôi cấy dùng môi trường đặc, đặc biệt đối với chỉ tiêu phát triển sinh khối (Ascough và Fennell, 2004).

Nội dung bài báo trình bày kết quả nghiên cứu nhân rễ bất định NGBCC bằng phương pháp nuôi lông lác phục vụ định hướng sử dụng nguồn rễ này cho các nghiên cứu tiếp theo về hợp chất thứ cấp.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

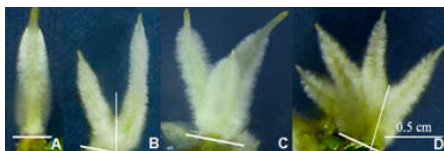
2.1. Ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng (ĐHST) đến sự phân nhánh của rễ

Sử dụng các rễ đơn (rễ sơ cấp, dài ~ 1 cm) tái sinh trực tiếp từ mảnh lá trên môi trường đặc 1/2MS

¹ Viện Sinh học nhiệt đới, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

² Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG TP. HCM
Email: luyhuynh79@gmail.com

(1/2 khoáng đa lượng; Murashige và Skoog, 1962) có 3 mg/L NAA ở thời điểm 20 ngày sau cấy (NSC) (Hình 1). Cây ~ 120 rễ đơn (~ 250 mg; 0,5% - w/v) vào bình tam giác V250 mL chứa 50 mL môi trường lỏng 1/2MS có bổ sung NAA/IBA với các nồng độ khác nhau 0 mg/L (ĐC); 1, 2, 3 mg/L (3 lần lặp lại). Thu thập số liệu về số rễ thứ cấp, cấp 1, cấp 2 hình thành, chiều dài rễ thứ cấp (sau đây gọi là rễ nhánh) cấp 1 và đặc điểm hình thái, màu sắc rễ ở 20 NSC.



Hình 1. Vật liệu rễ bất định sơ cấp NGBC (trên môi trường đặc 1/2MS có 3 mg/L NAA, ở 20 NSC) sử dụng trong thí nghiệm tạo rễ thứ cấp/nhân rễ trong môi trường lỏng lác

Ghi chú: A: Rễ đơn; B: Cụm 2 rễ; C: Cụm 3 rễ; D: Cụm 4 rễ (vạch ngang và dọc chỉ vị trí cắt thu rễ đơn làm thí nghiệm) (thanh ngang 1) (cm)

2.2. Ảnh hưởng của nồng độ đường saccharose đến sự tăng trưởng sinh khối rễ

Cây khối lượng rễ (KLR) ~ 300 mg (0,5% - w/v) vào bình tam giác V250 mL chứa 60 mL môi trường 1/2MS có bổ sung 2 mg/L NAA hoặc 2 mg/L IBA (kế thừa từ thí nghiệm trên); có 20 g/L (ĐC), 30 g/L, 40 g/L đường; nuôi lác 80 vòng/phút. Thu thập số liệu về khối lượng tươi (KLT) rễ (mg), hệ số nhân rễ (lần), đặc điểm hình thái, màu sắc rễ/cụm rễ ở 30 NSC.

2.3. Ảnh hưởng của khối lượng rễ nuôi cấy đến sự tăng trưởng sinh khối rễ

Cây KLR ~ 350 mg, 700 mg, 1.400 mg và 2.100 mg tương ứng với 0,5% (ĐC), 1%, 2% và 3% (w/v) vào bình tam giác V250 mL chứa 70 mL môi trường 1/2MS có bổ sung 2 mg/L NAA hoặc 2 mg/L IBA, 30 g/L đường. Thu thập số liệu về khối lượng tươi rễ (mg), hệ số nhân rễ (lần) và đặc điểm hình thái, màu sắc rễ, cụm rễ ở 30 NSC.

2.4. Khảo sát diễn biến tăng trưởng sinh khối rễ theo thời gian

Cây KLR ~ 1.400 mg (2% - w/v) vào bình tam giác V250 mL chứa 70 mL môi trường 1/2MS có bổ sung 2 mg/L NAA hoặc 2 mg/L IBA, 30 g/L đường. Thay môi trường 01 lần ở 28 NSC. Thu thập số liệu

về KLT rễ (mg), hệ số nhân rễ (lần) ở 7, 14, 21, 28, 35, 42 và 49 NSC.

2.5. Điều kiện nuôi cấy

Cường độ chiếu sáng 2.000 lux, nhiệt độ phòng nuôi cấy $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, độ ẩm phòng 55%, nuôi lác 80 vòng/phút.

2.6. Bố trí thí nghiệm và xử lý thống kê

Thí nghiệm được bố trí theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên. Cây 3 bình tam giác (~ 120 rễ/bình), đo đếm rễ tạo nhánh từ 30 rễ lấy ngẫu nhiên; 3 lần lặp lại (5 bình tam giác/lần lặp lại) ở các thí nghiệm còn lại. Số liệu thu được từ các thí nghiệm được xử lý bằng phần mềm SPSS 25.0 so sánh các giá trị trung bình.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Ảnh hưởng của chất ĐHST đến sự phân nhánh rễ

Ở thí nghiệm này, các sơ khởi (primordium) rễ cấp 1, cấp 2 mới hình thành được gọi là rễ nhánh (RN) cấp 1, cấp 2.

Kết quả ở bảng 1 cho thấy, nói chung rễ trong môi trường không bổ sung NAA/IBA (ĐC) không có khả năng phân nhánh (không đưa số liệu vào bảng), RN trong môi trường có bổ sung NAA hình thành tốt hơn so với rễ trong môi trường có IBA ở cả ba chỉ tiêu là số RN cấp 1, cấp 2 và chiều dài RN cấp 1 ở 20 NSC. Lông hút rễ bị thoái hóa trong môi trường có IBA. Ở môi trường có 3 mg/L NAA, số TB rễ nhánh cấp 1 là cao nhất - 12,9 so với số rễ trong hai môi trường có 1 mg/L, 2 mg/L NAA lần lượt là 10,3; 12,4. Đối với hai chỉ tiêu số RN cấp 1 và cấp 2, các giá trị ghi nhận được ở hai nghiệm thức 2 mg/L và 3 mg/L là tương đương nhau. Ở các nghiệm thức IBA, số RN cấp 1 ở nghiệm thức 3 mg/L là cao nhất - 5,2. Tuy nhiên, thực tế cho thấy rễ trong môi trường có NAA và IBA với 3 mg/L đều có hiện tượng phù ở gốc rễ (Hình 2D, I); riêng ở trường hợp 3 mg/L NAA, cũng ghi nhận được hiện tượng phù ở các đầu rễ (Hình 2D). Do vậy, nồng độ 2 mg/L NAA/IBA được sử dụng cho các thí nghiệm tiếp theo. Thời gian nuôi lâu hơn, 30 NSC và 45 NSC, ở cả hai nghiệm thức NAA/IBA (2 mg/L), rễ phân nhánh nhiều hơn (Hình 2E, J) và bước đầu hình thành dạng rễ cụm (Hình 2F, K), theo thứ tự.

Bảng 1. Ảnh hưởng của NAA, IBA đến sự hình thành RN từ rễ sơ cấp đơn qua nuôi lỏng lắc

Chất ĐHST	Nồng độ (mg/L)	CDR SC (mm)	Số RN cấp 1	Chiều dài RN cấp 1 (mm)	Số RN cấp 2	Đặc điểm hình thái, màu sắc rễ
NAA	1	18,2 ^d	10,3 ^b	3,4 ^c	0,2 ^c	RN cấp 1 to, ngắn; đầu tròn, có lông hút, rễ màu trắng xám.
	2	19,7 ^c	12,4 ^a	3,9 ^b	7,1 ^b	RN cấp 1 to, ngắn; đầu tròn, có lông hút, rễ màu trắng xám. Có sự hình thành RN cấp 2.
	3	20,1 ^c	12,9 ^a	4,2 ^a	7,33 ^a	RN cấp 1 to, ngắn; đầu tròn, có lông hút; gốc, thân rễ sơ cấp và đầu RN bị phù, rễ màu trắng xám. Có sự hình thành RN cấp 2.
IBA	1	15,3 ^e	2,6 ^e	2,0 ^e	0,1 ^e	RN cấp 1 nhỏ, dài; đầu RN thon, không có lông hút, rễ màu hơi vàng.
	2	21,1 ^b	4,4 ^d	3,0 ^d	3,3 ^d	RN cấp 1 nhỏ, dài, không có lông hút, rễ màu hơi vàng. Có sự hình thành RN cấp 2
	3	22,4 ^a	5,2 ^c	3,0 ^d	3,6 ^c	RN cấp 1 nhỏ, dài, không có lông hút; gốc và thân rễ sơ cấp bị phù, rễ hơi vàng. Có sự hình thành RN cấp 2

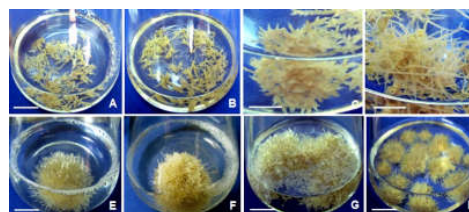
Các giá trị trung bình trong một cột mang các chữ cái khác nhau thì khác biệt có ý nghĩa ở mức $p \leq 0,05$ trong phép thử Duncan. (Do RN rễ nhánh cấp 2 rất ngắn nên không ghi nhận số liệu về chiều dài; CDRSC: chiều dài rễ sơ cấp).



Hình 2. Ảnh hưởng của NAA, IBA đến hình thành RN từ rễ đơn NGBCC

Ghi chú: A: Rễ DC; B, C, D: Hình thành RN trong môi trường có 1 mg/L, 2 mg/L, 3 mg/L NAA, ở 20 NSC (thanh ngang 0,5 cm); E: Rễ nhánh dài trong môi trường có 2 mg/L NAA ở 30 NSC; F: Cụm rễ nhỏ hình thành trong môi trường có 2 mg/L NAA ở 40 NSC; G, H, I: Hình thành RN trong môi trường có bổ sung 1 mg/L, 2 mg/L, 3 mg/L IBA, ở 20 NSC (thanh ngang 0,5 cm); J: Rễ nhánh dài trong môi trường có 2 mg/L IBA ở 30 NSC; K: Cụm rễ nhỏ hình thành trong môi trường có 2 mg/L IBA ở 45 NSC (Mũi tên chỉ lên: RN cấp 1, mũi tên chỉ ngang: RN cấp 2).

Quá trình phân nhánh dẫn đến tăng trưởng sinh khối trong môi trường có NAA/IBA tạo thành cụm rễ to (Hình 3 A, B, C, D, E, F). Các cụm rễ to tiếp theo được nhân lên trong cùng môi trường nhằm thu vật liệu cho các nghiên cứu tiếp theo (Hình 3 G, H).



Hình 3. Rễ tăng trưởng sinh khối liên tục thông qua quá trình phân nhánh của rễ đơn NGBCC

Ghi chú: A, B: Bình rễ sơ cấp nuôi trong môi trường có 2 mg/L NAA, 2 mg/L IBA, ở 20 NSC (thanh ngang 2 cm); C, D: Rễ đơn phân nhánh tạo cụm, sau cấy chuyển, trong môi trường có 2 mg/L NAA, 2 mg/L IBA ở 30 NSC, (thanh ngang 1 cm); E, F: Cụm rễ to, sau cấy chuyển, trong môi trường có 2 mg/L NAA, 2 mg/L IBA ở 60 NSC (thanh ngang 2 cm); G, H: Rễ được nhân sinh khối, sau cấy chuyển trong môi trường có 2 mg/L NAA, 2 mg/L IBA ở 60 NSC (thanh ngang 2 cm).

Trong nuôi cấy *in vitro*, khả năng nhân rễ bất định phụ thuộc vào việc bổ sung auxin (loại và nồng độ) vào môi trường nuôi cấy (Rahmat và Kang, 2019) trong đó các auxin như IBA và NAA được sử dụng phổ biến ở dạng riêng rẽ hoặc phối hợp với nhau; ngoài ra, nhân rễ còn phụ thuộc vào yếu tố quan trọng khác là họ/loài thực vật nghiên cứu (Baskaran và Jayalaban, 2009). Tác động lác cơ học tạo điều kiện cho mô hấp thu chất ĐHST, chất dinh dưỡng,

nước,... đồng đều (không tạo gradient phân bố), trao đổi khí đều hơn, khác với trường hợp mô nuôi cấy trên môi trường đặc (Ascough và Fennell, 2004). Đáp ứng phân nhánh của rễ trong nuôi cấy mang tính quyết định đối với tăng trưởng sinh khối (Nandagopal và Kumari, 2007). Hiện tượng phù ở gốc rễ hoặc/và đầu rễ trong trường hợp dùng NAA, IBA với nồng độ 3 mg/L ở nghiên cứu này, theo chúng tôi, sẽ dẫn đến giảm năng suất sinh khối rễ tương tự như kết quả ghi nhận được ở nuôi lỏng rễ *Cichorium intybus* (Nandagopal và Kumari, 2007). NAA được ghi nhận là thích hợp trong kích thích phân nhánh rễ đối với khá nhiều loài cây dược liệu như *Andrographis paniculata* (Praveen và cs, 2009), *Eurycoma longifolia* (Hussein và cs, 2012), *Rumex crispus* (Mahdiah và cs, 2015). NAA 1 mg/L, 2 mg/L là các nồng độ tối ưu cho nhân rễ *Fagonia indica* (Khan và cs, 2017), rễ *Boesenbergia rotunda* (Yusuf và cs, 2018), theo thứ tự. IBA cũng rất thích hợp cho nuôi cấy rễ bất định; nhận thấy 2 mg/L IBA là nồng độ tối ưu cho phát triển sinh khối rễ khá nhiều loài cây dược liệu như *Vernonia amygdalina* (Khalafalla và cs, 2009), *Silybum marianum* (Riasat và cs, 2015), *Couroupita guianensis* (Manokari và Shekhawat, 2016). Ở NGBCC, kết quả nghiên cứu ở thí nghiệm này phù hợp với kết quả công bố của một số tác giả đã sử dụng 2 mg/L NAA/IBA như đã nêu trên để nhân rễ thông qua hiện tượng tạo RN.

3.2. Ảnh hưởng của nồng độ đường saccharose đến sự tăng trưởng sinh khối rễ

Kết quả bảng 2 cho thấy trong môi trường có NAA, KLT rễ đạt giá trị cao 2,10 g, 2,16 g lần lượt ở hai nghiệm thức có 30 g/L, 40 g đường; hệ số nhân tương ứng là 7,00 và 7,20; tuy nhiên các giá trị sinh khối và hệ số nhân giữa hai nghiệm thức này khác biệt không có ý nghĩa về mặt thống kê. Khối lượng rễ, hệ số nhân thấp nhất lần lượt là 1,62 g; 5,40 ở nghiệm thức ĐC 20 g/L đường. Tương tự ở môi trường có IBA, KLT đạt 1,80 g; 1,86 g lần lượt ở hai nghiệm thức 30 g/L, 40 g/L đường; hệ số nhân tương ứng là 5,97; 6,21 – cao hơn so với nghiệm thức ĐC 20 g/L đường (1,45 g; 4,85). Tuy nhiên sự khác biệt giữa KLT, hệ số nhân là không có ý nghĩa giữa 02 nghiệm thức 30 g/L và 40 g/L đường ở cả 02 trường hợp NAA/IBA. Do vậy, 30 g/L đường được sử dụng cho các nghiên cứu tiếp theo. Có sự khác biệt về hình thái, màu sắc rễ/cụm rễ nuôi trong môi trường có NAA, IBA. Nói chung, ở cả hai trường hợp môi trường có NAA, IBA với nồng độ đường cao (30 - 40 g/L), sợi rễ to so với rễ ở môi trường có 20 g/L đường. Như đã nêu ở trên, rễ ở môi trường bổ sung NAA có nhiều lông hút ở phần đầu rễ; ngược lại, lông hút rễ khó quan sát ở môi trường có IBA; cụm rễ ở môi trường bổ sung NAA có màu trắng xám, cụm rễ ở môi trường chứa IBA có màu hơi vàng đục (Hình 4).

Bảng 2. Ảnh hưởng của nồng độ đường saccharose đến sự tăng trưởng sinh khối rễ NGBCC nuôi lỏng lác trong môi trường 1/2MS có 2 mg/L NAA và 2 mg/L IBA, 30 NSC

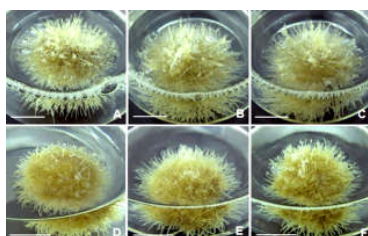
Chất ĐHST	Nồng độ đường (g/L)	Khối lượng tươi rễ thu nhận (g)	Hệ số nhân sinh khối (lần)	Đặc điểm hình thái, màu sắc rễ, cụm rễ
NAA	20	1,62 ^c	5,40 ^c	Rễ nhỏ, có lông hút; cụm rễ màu trắng xám, mềm
	30	2,10 ^a	7,00 ^a	Rễ to, có lông hút; cụm rễ màu trắng xám, mềm
	40	2,16 ^a	7,20 ^a	Rễ to, có lông hút; cụm rễ màu trắng xám, mềm
IBA	20	1,45 ^d	4,85 ^d	Rễ nhỏ, không có lông hút; cụm rễ màu hơi vàng đục, cứng
	30	1,80 ^b	5,97 ^b	Rễ to, không có lông hút; cụm rễ màu hơi vàng đục, cứng
	40	1,86 ^b	6,21 ^b	Rễ to, không có lông hút; cụm rễ màu hơi vàng đục, cứng

Các giá trị trung bình trong một cột mang các chữ cái khác nhau thì khác biệt có ý nghĩa ở mức $p \leq 0,05$ trong phép thử Duncan.

Ngoài môi trường khoáng và chất ĐHST, sự tăng trưởng của RBD còn chịu ảnh hưởng của đường - nguồn carbon quan trọng trong trao đổi chất nhằm tăng sinh khối thông qua sự hình thành rễ nhánh và nồng độ sử dụng thích hợp tùy thuộc vào loài thực vật. Theo nhiều tài liệu, nồng độ đường sử dụng dao

động từ 20 - 50 g/L, trường hợp cao hơn thường tạo áp suất thẩm thấu bất lợi cho tăng trưởng rễ (Cui và cs, 2010). Nồng độ 20 g/L là tối ưu đối với nuôi rễ *Gynura procumbens* (Saiman và cs, 2012), 30 g/L thích hợp cho nuôi rễ khá nhiều loài thực vật như *Hypericum perforatum* (Cui và cs, 2010), *Camellia*

sinensis (Kim và cs, 2013), *Psammosilene tunicoide* (Zhang và cs, 2017). Nồng độ đường saccharose khá cao (50 g/L) lại thích hợp cho nuôi lông rễ bất định *Eurycoma longifolia* (Hussein và cs, 2012), rễ *Boesenbergia rotunda* (Yusuf và cs, 2018).



Hình 4. Ảnh hưởng của nồng độ đường saccharose đến tăng trưởng sinh khối rễ NGBCC, ở 30 NSC

Ghi chú: A, B, C: Cụm rễ nuôi trong môi trường bổ sung 2 mg/L NAA, có 20 g/L, 30 g/L và 40 g/L đường saccharose; D, E, F: Cụm rễ nuôi trong môi trường bổ sung 2 mg/L IBA, có 20 g/L, 30 g/L và 40 g/L đường saccharose, theo thứ tự (thanh ngang 2 cm).

Rễ NGBCC tăng trưởng tốt trong môi trường có 30 g/L đường - phù hợp với kết quả công bố của một số tác giả trên. Ngoài ra, nồng độ đường khác nhau còn ảnh hưởng đến sinh tổng hợp hợp chất thứ cấp đối với cây dược liệu (Rahmat và Kang, 2019), do vậy kết quả này cũng tạo tiền đề cho nghiên cứu tiếp theo về hợp chất thứ cấp ở rễ NGBCC.

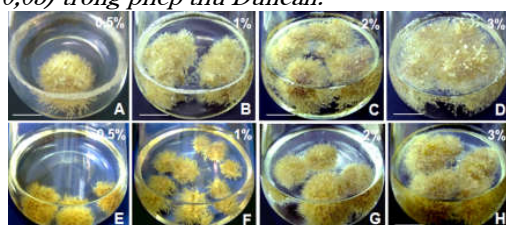
3.3. Ảnh hưởng của khối lượng rễ nuôi cấy đến sự tăng trưởng sinh khối của rễ

Kết quả ở bảng 3, hình 5 cho thấy trong môi trường có 2 mg/L NAA, ở nghiệm thức cấy 2% (w/v) rễ đạt hệ số nhân sinh khối cao nhất (9,96) so với các nghiệm thức cấy 0,5% (ĐC), 1% và 3% (hệ số nhân tương ứng là 6,74; 8,13 và 9,15). Ở nghiệm thức 3% tuy thu được KLT rễ cao nhất (19,22 g) nhưng hệ số nhân thấp hơn so với nghiệm thức cấy 2%. Tương tự, trong môi trường có 2 mg/L IBA, kết quả cũng cho thấy hệ số nhân sinh khối rễ đạt cao nhất ở trường hợp cấy 2% (KLT và hệ số nhân sinh khối lần lượt là 12,85 g và 9,18) so với các trường hợp còn lại.

Bảng 3. Ảnh hưởng của khối lượng rễ nuôi cấy đến tăng trưởng sinh khối rễ NGBCC nuôi lông lác trong môi trường 1/2MS có 2 mg/L NAA, 2 mg/L IBA, 30 NSC

Chất ĐHST	KLR nuôi cấy ban đầu (g)	KLT rễ thu nhận (g)	Hệ số nhân sinh khối (lần)	Đặc điểm hình thái, màu sắc rễ, cụm rễ
NAA	0,35 (0,5%)	2,36 ^g	6,74 ^g	Rễ dài, có lông hút; cụm rễ màu trắng xám, mềm
	0,70 (1%)	5,69 ^e	8,13 ^e	Rễ dài, có lông hút; cụm rễ màu trắng xám, mềm
	1,40 (2%)	13,95 ^c	9,96 ^a	Rễ dài, có lông hút; cụm rễ màu trắng xám, mềm
	2,10 (3%)	19,22 ^a	9,15 ^c	Rễ dài, có lông hút; cụm rễ màu trắng xám, mềm
IBA	0,35 (0,5%)	2,22 ^g	6,34 ^g	Rễ ngắn, không có lông hút; cụm rễ màu hơi vàng đục, cứng
	0,70 (1%)	5,16 ^f	7,37 ^f	Rễ ngắn, không có lông hút; cụm rễ màu hơi vàng đục, cứng
	1,40 (2%)	12,85 ^d	9,18 ^b	Rễ ngắn, không có lông hút; cụm rễ màu hơi vàng đục, cứng
	2,10 (3%)	18,03 ^b	8,58 ^d	Rễ ngắn, không có lông hút; cụm rễ màu hơi vàng đục, cứng

Ghi chú: Các giá trị trung bình trong một cột mang các chữ cái khác nhau thì khác biệt có ý nghĩa ở mức $p \leq 0,05$) trong phép thử Duncan.



Hình 5. Ảnh hưởng của khối lượng rễ nuôi cấy đến tăng trưởng sinh khối rễ NGBCC (nuôi lông lác)

trong môi trường 1/2MS có 2 mg/L NAA, 2 mg/L IBA, 30 NSC)

Ghi chú: A, B, C, D: Khối lượng rễ nuôi cấy ban đầu 0,5%, 1%, 2% và 3% (w/v) trong môi trường có 2 mg/L NAA (thanh ngang 2 cm); E, F, G, H: Khối lượng rễ nuôi cấy ban đầu 0,5%, 1%, 2% và 3% (w/v), trong môi trường có 2 mg/L IBA (thanh ngang 2 cm), theo thứ tự.

Khối lượng rễ ban đầu dùng nuôi cấy (inoculum density/size) là yếu tố quan trọng ảnh hưởng đến chỉ số tăng trưởng (growth index) của vật liệu nuôi cấy, chỉ số tăng trưởng giảm ở trường hợp dùng KLR cao không phù hợp (Silja và Satheeshkumar, 2015). Ngoài ra, KLR cấy còn ảnh hưởng đến sự tích lũy hợp chất thứ cấp trong điều kiện nuôi cấy nhất định (Wu và cs, 2006; Jeong và cs, 2009). Đối với nuôi lỏng lác, KLR sử dụng thường dao động từ 0,1% đến 5% (w/v) tùy thuộc vào loài thực vật nghiên cứu. Cụ thể KLR 0,1% là thích hợp để nuôi rễ *Mondia whitei* (Baskaran và cs, 2016), 1% cho nuôi rễ cây dược liệu *Echinacea angustifolia* (Wu và cs, 2006); 1,6% đối với rễ sâm *Panax ginseng* (Zhang và cs, 2011). Jeong và cs (2009), Saiman và cs (2012) kết luận KLR 2% là tốt nhất đối với nuôi rễ *Panax ginseng*, *Gynura procumbens*, theo thứ tự. Nhưng ở trường hợp *Curcuma amada*, rễ đạt tỷ lệ tăng trưởng sinh khối cao nhất khi được nuôi cấy với KLR cấy cao, 5% (Raju và cs, 2015). Kết quả KLR 2% là thích hợp đối với nhân rễ NGBC và cũng phù hợp với kết luận về thông số nuôi cấy này của một số tác giả đã nêu ở trên.

3.4. Khảo sát diễn biến tăng trưởng sinh khối rễ theo thời gian

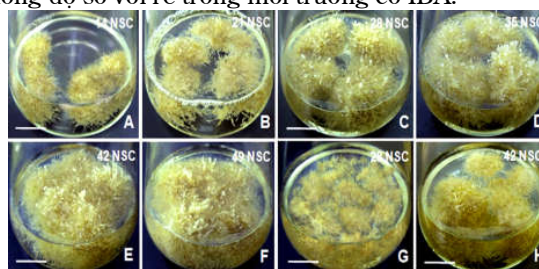
Bảng 4. Diễn biến tăng trưởng sinh khối rễ NGBC theo thời gian từ 7 NSC đến 49 NSC

Chất ĐHST	Thời gian (ngày)	KLT rễ thu nhận (g)	Hệ số nhân sinh khối (lần)
NAA	7	2,62 ^k	1,87 ^k
	14	5,13 ⁱ	3,66 ⁱ
	21	7,90 ^g	5,64 ^g
	28	13,92 ^e	9,94 ^e
	35	17,42 ^b	12,44 ^b
	42	18,26 ^a	13,04 ^a
	49	18,47 ^a	13,19 ^a
IBA	7	2,18 ^l	1,56 ^l
	14	4,52 ^j	3,23 ^j
	21	7,15 ^h	5,11 ^h
	28	12,83 ^f	9,16 ^f
	35	16,12 ^d	11,5 ^d
	42	16,91 ^c	12,08 ^c
	49	17,07 ^{bc}	12,19 ^{bc}

Ghi chú: Các giá trị trung bình trong một cột mang các chữ cái khác nhau thì khác biệt có ý nghĩa ở mức $p \leq 0,05$ trong phép thử Duncan.

Kết quả ở bảng 4, hình 6 cho thấy rễ nuôi trong môi trường NAA tăng sinh khối chậm ở giai đoạn 7

NSC (sinh khối đạt 2,62 g, hệ số nhân 1,87), tăng trưởng rất nhanh ở ba giai đoạn 21, 28 và 35 NSC, KLT của rễ đạt lần lượt 7,90 g; 13,92 g và 17,42 g; hệ số nhân tương ứng là 5,64; 9,94 và 12,44. Ở các thời điểm 42 và 49 NSC, rễ đạt giá trị khối lượng tối đa lần lượt là 18,26 g và 18,47 g, tuy nhiên KLR ở thời điểm 49 NSC khác biệt không có ý nghĩa về mặt thống kê so với KLR thu nhận ở 42 NSC (do đã ở thời kỳ ổn định); ngoài ra, nhận thấy ở giai đoạn 49 NSC, một số rễ có hiện tượng hóa nâu (Hình 6 F) có thể do hàm lượng dinh dưỡng môi trường đã giảm nhiều. Tương tự, rễ nuôi trong môi trường IBA cũng có xu hướng tăng sinh khối rất nhanh ở 28 NSC và đạt mức tối đa ở 42 NSC (Hình 6 G, H) (KLR lần lượt là 12,83 g và 16,91 g; hệ số nhân tương ứng là 9,16 và 12,08), sau đó rễ cũng phát triển chậm dần đến giai đoạn 49 NSC. Rễ nuôi trong môi trường có NAA phát triển nhanh hơn về khối lượng ở từng thời điểm và từng nồng độ so với rễ trong môi trường có IBA.



Hình 6. Diễn biến tăng trưởng sinh khối rễ bất định NGBC theo thời gian

Ghi chú: A, B: Sinh khối rễ trong môi trường có 2 mg/L NAA ở 14 NSC và 21 NSC; C, D: Sinh khối rễ trong môi trường có 2 mg/L NAA giai đoạn 28 NSC, 35 NSC; E, F: Sinh khối rễ trong môi trường có 2 mg/L NAA giai đoạn 42 NSC, 49 NSC; G, H: Sinh khối rễ trong môi trường có 2 mg/L IBA ở 28 NSC, 42 NSC, theo thứ tự (thanh ngang 2 cm).

Nhằm thu sinh khối ở mức tối ưu dùng cho các mục đích khác nhau, đối với bất kỳ hệ thống (lồng lác, bioreactor) và vật liệu nuôi cấy nào (tế bào, phôi, rễ,...), khảo sát động học tăng trưởng theo thời gian của vật liệu nuôi cấy là yêu cầu quan trọng. Trong điều kiện nuôi lỏng lác, tài liệu cho thấy giai đoạn rễ đạt giá trị khối lượng tối đa ở một thời điểm nuôi cấy nhất định tùy thuộc vào loài thực vật, cụ thể Ahmad và cs (2020) ghi nhận 3 pha tăng trưởng của rễ bao gồm pha mở đầu (7 – 9 ngày), pha tăng trưởng rất nhanh (12 – 27 ngày) và đạt mức ổn định từ 27 – 30 ngày qua nghiên cứu nuôi rễ bất định *Stevia rebaudiana*; cũng qua nghiên cứu sự phát triển sinh

khối theo thời gian (từ 7 – 49 ngày) của rễ bất định *Prunella vulgaris*, Fazal và cs (2014) cho thấy KLR đạt mức cao nhất chỉ sau 21 ngày nuôi. Sinh khối rễ *Psoralea corylifolia* đạt mức tối đa sau 4 tuần nuôi cấy (Baskaran và Jayabalan, 2009); cần 5 tuần đối với rễ *Panax notoginseng* (Gao và cs, 2005), *Vernonia amygdalina* (Khalafalla và cs, 2009) và đến 6 tuần đối với rễ chicory (*Cichorium intybus*), tuy nhiên rễ *Cichorium intybus* mất dần khả năng tạo rễ nhánh khi duy trì nuôi cấy dài hạn (Nandagopal và Kumari, 2007). Nói chung, rễ NGBCC đã thể hiện các pha tăng trưởng trong nuôi cấy như pha mở đầu, tăng trưởng rất nhanh, pha ổn định và cần thời lượng 5 – 6 tuần để đạt mức KLT cao nhất – phù hợp với nghiên cứu nuôi rễ của một số tác giả nêu trên. Qua nuôi cấy dài hạn rễ NGBCC, không ghi nhận được trường hợp hóa thủy tinh thể (vitrification/hyperhydricity) dẫn đến mô ở trạng thái bị ‘trong’ (glassy/translucent), có thể hoại tử (necrosis) sau đó – hiện tượng sinh lý thường gặp ở nuôi cấy mẫu ngập một phần/toàn phần (thường là chồi) trong môi trường lỏng (Ziv, 1991); cũng nhận thấy rễ NGBCC không giảm khả năng phát sinh rễ thứ cấp, tạo tiền đề thuận lợi cho thử nghiệm nuôi nhân rễ ở quy mô lớn hơn.

4. KẾT LUẬN

Đã nhân thành công sinh khối rễ bất định NGBCC thông qua sự hình thành rễ thứ cấp bằng phương pháp nuôi lỏng lắc dùng môi trường 1/2MS có bổ sung 2 mg/L NAA hoặc 2 mg/L IBA, 30 g/L đường saccharose; khối lượng tươi rễ trong môi trường có NAA cao hơn so với môi trường có IBA. Khối lượng rễ dùng nuôi cấy thích hợp là 2% (w/v); sinh khối rễ phát triển rất nhanh ở giai đoạn 21 – 35 ngày, đạt mức cao nhất ở giai đoạn 42 ngày sau cấy. Nghiên cứu diễn biến tăng trưởng sinh khối rễ bất định trong thời gian 7 tuần cũng đã được thực hiện có kết quả. Kết quả nhân rễ hiệu quả bằng phương pháp nuôi lỏng này tạo cơ sở thuận lợi cho nghiên cứu nuôi nhân rễ quy mô lớn (dùng bioreactor) nhằm thu hợp chất thứ cấp.

LỜI CẢM ƠN

Các tác giả chân thành cảm ơn Phòng Công nghệ gen thực vật – Viện Sinh học nhiệt đới đã tạo điều kiện rất thuận lợi cho NCS trong quá trình thực hiện nghiên cứu.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Ahmad A., Ali H., Khan H., Begam A., Khan S., Ali S. S., Ahmad N., Fazal H., Ali M., Hano C., Ahmad N., Abbasi B. H. (2020). Effect of gibberellic

acid on production of biomass, polyphenolics and steviol glycosides in adventitious root cultures of *Stevia rebaudiana* (Bert.). *Plants* 9, 420; <https://doi.org/10.3390/plants9040420>.

2. Ascough G. D., and Fennell C. W. (2004). The regulation of plant growth and development in liquid culture. *South African Journal of Botany* 70(2): 181–190.

3. Baskaran P. and Jayabalan N. (2009). Psoralen production in hairy roots and adventitious roots cultures of *Psoralea corylifolia*. *Biotechnol Lett* 31: 1073-1077.

4. Baskaran P., Kumari A., Ncube B., Staden J. V. (2016). Acetylcholinesterase-inhibition and antibacterial activity of *Mondia whitei* adventitious roots and *ex vitro* - grown somatic embryogenic-biomass. *Front Pharmacol* 7: 335; <https://doi.org/10.3389/fphar.2016.00335>.

5. Cui X. H., Murthy H. N., Wu C. H., Paek K. Y. (2010). Sucrose-induced osmotic stress affects biomass, metabolite, and antioxidant levels in root suspension cultures of *Hypericum perforatum* L. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 103: 7-14.

6. Đặng Thị Thanh Tâm (2012). Nghiên cứu tạo rễ tơ của cây Tam thất, Ngũ gia bì chân chim và thử nghiệm quá trình sản xuất sinh khối bằng bioreactor. Báo cáo tổng hợp đề tài KC.04.TN10/11-15 thuộc Chương trình KH&CN trọng điểm cấp Nhà nước (KC.04/11-15), Trường Đại học Nông nghiệp Hà Nội, 151 tr.

7. Fazal H., Abbasi B. H., Ahmad N. (2014). Optimization of adventitious root culture for production of biomass and secondary metabolites in *Prunella vulgaris* L. *Appl Biochem Biotechnol* 174: 2086–2095; <https://doi.org/10.1007/s12010-014-1190-x>.

8. Gao X., Zhu C., Jia W., Gao W., Qiu M., Zhang Y., Xiao P. (2005). Induction and characterization of adventitious roots directly from the explants of *Panax notoginseng*. *Biotechnol Lett* 27(22): 1771-1775.

9. Han J. Y. and Choi Y. E. (2009). Rapid induction of *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transgenic roots directly from adventitious roots in *Panax ginseng*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 96(2): 143-149.

10. Hussein S., Ling A. P. K., Ng T. H., Ibrahim R., Paek K. Y. (2012). Adventitious roots induction of recalcitrant tropical woody plant, *Eurycoma*

longifolia. *Romanian Biotechnological Letters* 17(1): 7026-7025.

11. Jeong C. S., Murthy H. N., Hahn E. J., Lee H. L., Paek K. Y. (2009). Inoculum size and auxin concentration influence the growth of adventitious roots and accumulation of ginsenosides in suspension cultures of ginseng (*Panax ginseng* C.A. Meyer). *Acta Physiol Plant* 31: 219-222.

12. Jeong G. T., Park D. H., Ryu H. W., Hwang B., Woo J. C. (2004). Effects of inoculum conditions on growth of hairy roots of *Panax ginseng* C. A. Meyer. *Appl Biochem Biotechnol* 116: 1193-1203; <https://doi.org/10.1385/ABAB:116:1-3:1193>.

13. Khalafalla M. M., Daffalla H. M., El-Shemy H. A., Abdellatef E. (2009). Establishment of *in vitro* fast-growing normal root culture of *Vernonia amygdalina* - a potent African medicinal plant. *African Journal of Biotechnology* 8(21): 5952-5957.

14. Khan T., Abbasi B.H., Khan M. A., Azeem M. (2017). Production of biomass and useful compounds through elicitation in adventitious root cultures of *Fagonia indica*. *Industrial Crops and Products* 108(1): 451-457.

15. Kim Y. D., Kim H. G., Sim S. J., Kim J. C., Min J. Y., Hwang J. G., Kang S. M., Moon H. S., Kim J. K., Choi M. S. (2013). Effects of culture media on catechins and caffeine production in adventitious roots of tea tree (*Camellia sinensis* L.). *J Agric Life Sci* 47(1): 11-20.

16. Li Y., Shi D. X., Wang M. L. (2004). Tissue culture and rapid propagation of *Schefflera octophylla* (Abstract). *Plant Physiology Communications* 40(2): 193. Science Press.

17. Li Y. L., Jiang R. W., Ooi L. S. M., But P. P. H., Ooi V. E. C. (2007). Antiviral triterpenoids from the medicinal plant *Schefflera heptaphylla*. *Phytother Res* 21: 466-470.

18. Li Y. L., Yeung C. M., Chiu L. C. M., Cen Y. Z., Ooi V. E. C. (2009). Chemical composition and antiproliferative activity of essential oil from the leaves of a medicinal herb, *Schefflera heptaphylla*. *Phytother Res* 23: 140-142.

19. Liu X., Niu Y., Liu J., Shi M., Xu R., Kang W. (2019). Efficient extraction of anti-inflammatory active ingredients from *Schefflera octophylla* leaves using ionic liquid-based ultrasonic-assisted extraction coupled with HPLC. *Molecules* 24(16), 2942; <https://doi.org/10.3390/molecules24162942>.

20. Mahdieh M., Noori M., Hoseinkhani S. (2015). Establishment of *in vitro* adventitious root cultures and analysis of flavonoids in *Rumex crispus*. *Plant Tissue Cult & Biotech* 25(1): 63-70.

21. Manokari M. and Shekhawat M. S. (2016). Implications of auxins in induction of adventitious roots from leaf explants of Cannon ball tree (*Couroupita guianensis* Aubl.). *World Scientific News* 33: 110-122.

22. Murashige T. and Skoog F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. *Physiol Plant* 15: 473-497.

23. Nandagopal S. and Kumari B. D. R. (2007). Effectiveness of auxin induced *in vitro* root culture in chicory. *J Cent Eur Agric* 8(1): 73-80.

24. Nguyễn Thị Ngọc Hương, Trần Hùng, Trương Thị Đẹp (2016). Tìm hiểu các biến đổi hình thái trong sự phát sinh rễ Tam thất hoang (*Panax stipuleanatus* H.T.Tsai et K.M.Feng) nuôi cấy *in vitro* và bước đầu định tính oleanolic acid trong rễ tạo thành. *Tạp chí Công nghệ Sinh học* 14(1): 49-54.

25. Praveen N., Manohar S. H., Naik P. M., Nayeem A., Jeong J. H., Murthy H. N. (2009). Production of andrographolide from adventitious root cultures of *Andrographis paniculata*. *Current Science* 96(5): 694-697.

26. Qiang B., Miao J., Phillips N., Wei K., Gao Y. (2020). Recent advances in the tissue culture of American ginseng (*Panax quinquefolius*). *Chemistry and Biodiversity* 17(10), e2000366, <https://doi.org/10.1002/cbdv.202000366>.

27. Rahmat E. and Kang Y. (2019). Adventitious root culture for secondary metabolite production in medicinal plants: A Review. *J Plant Biotechnol* 46: 143-157.

28. Raju C. S., Varutharaju K., Thilip C., Aslam A., Shajahan A. (2015). Rhizogenesis in cell suspension culture from Mango ginger: A source of isosorbide and n-Hexadecanoic acid. *Advances in Botany*, Article ID 942761; <https://doi.org/10.1155/2015/942761>.

29. Riasat R., Riasat Z., Abbasi B. H., Liu C., Khan M. A. (2015). *Silybum marianum*: adventitious roots induction along with free radical scavenging activity. *J Plant Biol Res* 4(1): 12-21.

30. Saiman M. Z., Mustafa N. R., Schulte A. E., Verpoorte R., Choi Y. H. (2012). Induction, characterization, and NMR-based metabolic profiling of adventitious root cultures from leaf explants of

Gynura procumbens. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 109: 465–475.

31. Silja P. K. and Satheeshkumar K. (2015). Establishment of adventitious root cultures from leaf explants of *Plumbago rosea* and enhanced plumbagin production through elicitation. *Industrial Crops and Products* 76: 479-486.

32. Uchendu E. E., Paliyath G., Brown D. C. W., Saxena P. K. (2011). *In vitro* propagation of North American ginseng (*Panax quinquefolius* L.). *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant* 47(6): 710-718.

33. Wu C. H., Dewir Y. H., Hahn E. J., Paek K. Y. (2006). Optimization of culturing conditions for the production of biomass and phenolics from adventitious roots of *Echinacea angustifolia*. *Journal of Plant Biology* 49(3): 193-199.

34. Yusuf N. A., Rahim N. S. M., Azhar S. Z. A., Ghani K. A., Sommano S., Khalid N. (2018). Adventitious root cultures of *Boesenbergia rotunda* as a source of pinostrobin. *International Journal on Advanced Science, Engineering and Information Technology* 8(2): 377-383.

35. Zhang J. Y., Bae T. W., Boo K. H., Sun H. J., Song I. J., Pham C. H., Ganesan M., Yang D. H., Kang H. G., Ko S. M., Riu K. Z., Lim P. O., Lee H. Y. (2011). Ginsenoside Production and morphological characterization of wild ginseng (*Panax ginseng* Meyer) mutant lines induced by g-irradiation (^{60}Co) of adventitious roots. *J Ginseng Res* 35(3): 283-293.

36. Zhang J. Y., Sun H. J., Song I. J., Bae T. W., Kang H. G., Ko S. M., Kwon Y. I., Kim I. W., Lee J., Park S. Y., Lim P. O., Kim Y. H., Lee H. Y. (2014). Plant regeneration of Korean wild ginseng (*Panax ginseng* Meyer) mutant lines induced by γ -irradiation (^{60}Co) of adventitious roots. *Journal of Ginseng Research* 38(3): 220-225.

37. Zhang Z., Zou D., Liu M., Cong M., Cheng N., Gao H., Wang S., Liu Z., Li G. (2017). Induction of *Psammosilene tunicoides* adventitious roots and the accumulation of triterpenoid saponins as affected by culture conditions. *Int J Agric Biol* 19: 1535-1540.

38. Ziv M. (1991). Quality of micropropagated plants — vitrification. *In Vitro Cellular Biology* 27: 64–69.

IN VITRO MULTIPLICATION OF ADVENTITIOUS ROOT OF *Schefflera octophylla* (Lour.) Harms USING SHAKE – FLASK METHOD

Huynh Thi Luy¹, Nguyen Huu Ho¹, Bui Van Le²

¹*Institute of Tropical Biology, Vietnam Academy of Science and Technology (VAST)*

²*University of Natural Sciences - Vietnam National University Ho Chi Minh city (VNUHCM)*

Summary

Schefflera octophylla (Lour.) Harms, belonging to the Araliaceae family, is a plant species containing many chemical ingredients with pharmacological effects. All parts of plant have been used to make medicine in Oriental medicine with many different uses. In tissue culture of medicinal plants, adventitious roots always have been studied. The content of this paper presents the results of study on the *in vitro* adventitious root multiplication of *S. octophylla* through root branching under the influence of several factors such as type and concentration of plant growth regulators, saccharose concentration, root inoculum density. In shaking culture, the results showed that root branching and biomass growth were best in 1/2MS medium containing 2 mg/L NAA compared with 2 mg/L IBA, plus 30 g/L saccharose; best root inoculum density for culture was 2% (w/v) (root multiplication rate in medium containing 2 mg/L NAA, 2 mg/L IBA reached 13.04 and 12.08, respectively, at 42 days after culturing). The data regarding biomass development (growth kinetics) of adventitious roots were recorded for 49 days with an interval of 7 days. This is the first report on the adventitious root multiplication in *S. octophylla* using shake-flask method, paving the way for further studies on the accumulation/production of secondary compounds in the roots.

Keywords: *Multiplication of adventitious root, plant growth regulator, Schefflera octophylla, shaking culture.*

Người phản biện: PGS.TS. Nguyễn Văn Đồng

Ngày nhận bài: 19/01/2021

Ngày thông qua phản biện: 19/02/2021

Ngày duyệt đăng: 26/02/2021