

NGHIÊN CỨU ẢNH HƯỞNG CỦA CHẤT ĐIỀU HÒA SINH TRƯỞNG ĐẾN KHẢ NĂNG NHÂN CHỒI *IN VITRO* CÂY HÀ THỦ Ô TRẮNG (*Streptocaulon juvenas* Merr.)

Phạm Thị Diễm Thi¹, Hồ Thị Thúy Nhi^{1,2}, Nguyễn Minh Trí¹, Nguyễn Thị Mỹ Lệ³, Trương Thị Bích Phượng², Hoàng Tấn Quảng^{1*}

¹Viện Công nghệ sinh học, Đại học Huế

²Trường Đại học Khoa học, Đại học Huế

³Khoa Công nghệ sinh học, Đại học Tài nguyên môi trường, Đại học Quốc gia Jeonbuk, Hàn Quốc

TÓM TẮT

Hà thủ ô trắng (*Streptocaulon juvenas* Merr.) là một loài dược liệu có nguồn gốc ở Đông Dương, rễ cây được dùng làm thuốc bổ chữa thiếu máu, sốt rét, phong thấp, rối loạn kinh nguyệt, suy nhược thần kinh, ăn uống khó tiêu. Trong nghiên cứu này, sự trình nhân chồi *in vitro* của cây Hà thủ ô trắng đã được nghiên cứu. Kết quả nghiên cứu cho thấy đỉnh sinh trưởng và đoạn thân của cây Hà thủ ô trắng tự nhiên có thể được sử dụng làm vật liệu khởi đầu cho nhân giống *in vitro*. Mẫu thu hái ngoài tự nhiên được khử trùng với HgCl₂ 0,1% trong 4 phút cho tỷ lệ sống cao nhất đạt 70,37%. Môi trường MS bổ sung 30 g/L sucrose, 9,0 g/L agar, 1,0 mg/L Kin thích hợp nhất cho sự tạo chồi *in vitro* từ nguồn nguyên liệu ban đầu. Môi trường MS bổ sung 1,0 mg/L Kin và 0,5 mg/L BAP là môi trường thích hợp nhất để nhân nhanh chồi, với số chồi/mẫu đạt tương ứng là 3,23 chồi đối với mẫu đỉnh sinh trưởng và 4,13 chồi đối với đoạn thân sau 4 tuần nuôi cấy.

Từ khóa: hà thủ ô trắng, nhân giống *in vitro*, nhân nhanh chồi, *Streptocaulon juvenas* Merr

MỞ ĐẦU

Hà thủ ô trắng (*Streptocaulon juvenas* Merr) còn gọi là Hà thủ ô nam, hay là Dây sữa bò thuộc họ Thiên Lý, từ lâu đã được xem là loại cây dược liệu quý ở Việt Nam và một số nước khác thuộc châu Á như Trung Quốc, Ấn Độ.... Hà thủ ô trắng thường được biết đến với nhiều công dụng như bổ máu, bổ gan thận, tăng thị lực, trị thần kinh suy nhược, sốt rét kinh niên, phong thấp tê bại, đau nhức gân xương, đại tiện ra máu, bạc tóc sớm, bệnh ngoài da mẩn ngứa; giảm cholesterol; giúp nhuận tràng... [1, 2]. Dịch chiết của Hà thủ ô trắng có tác dụng ức chế mạnh một số dòng tế bào ung thư như ung thư phổi, ung thư bạch cầu, ung thư cổ tử cung [3-5]. Do Hà thủ ô trắng có giá trị dược liệu cao nên đây là loại cây trồng thích hợp để phát triển kinh tế ở các địa phương. Tuy nhiên, nguồn dược liệu này lại không được quan tâm phát triển và bảo tồn dẫn đến số lượng trong tự nhiên ngày càng ít đi.

Công nghệ nuôi cấy mô tế bào thực vật chỉ mới phát triển mạnh từ thế kỉ 20 nhưng lại có tầm ảnh hưởng lớn đến cả nông nghiệp và công nghiệp, thông qua việc cung cấp các loại cây trồng cần thiết để đáp ứng nhu cầu ngày càng tăng của thế giới. Ngày nay, công nghệ nuôi cấy mô tế bào thực vật đã trở thành một công cụ không thể thiếu trong nông nghiệp hiện đại. Nuôi cấy mô cho phép sản xuất và nhân giống cây trồng có chất lượng đồng đều về mặt di truyền, sạch bệnh với số lượng lớn trong một thời gian ngắn [6]. Hiện nay rất nhiều giống cây dược liệu quý hiếm có nguy cơ tuyệt chủng đang được bảo tồn và sản xuất bằng phương pháp nuôi cấy mô như giảo cổ lam [7], sâm Ngọc Linh [8], ...

Mặc dù vậy, cây Hà thủ ô trắng là một trong số nhiều loại dược liệu chưa được quan tâm nghiên cứu nhân giống bằng phương pháp nuôi cấy *in vitro*. Hiện nay, chưa có công trình nghiên cứu nào trên thế giới và ở Việt Nam công bố kết quả nhân giống *in vitro* cây Hà thủ ô trắng. Do đó, chúng tôi đã tiến hành nghiên cứu nhân nhanh *in vitro* cây Hà thủ ô trắng nhằm cung cấp các cơ sở khoa học ban đầu cho việc hoàn thiện quy trình nhân giống trong tương lai.

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Nguyên liệu nghiên cứu

Vật liệu nghiên cứu là mẫu cây Hà thủ ô trắng (*Streptocaulon juvenas* Merr.) được thu từ huyện Phú Lộc, tỉnh Thừa Thiên Huế.

Phương pháp nghiên cứu

Môi trường và điều kiện nuôi cấy

Môi trường và điều kiện được áp dụng cho tất cả thí nghiệm nuôi cấy là môi trường MS cơ bản (Murashige, Skoog, 1962) [9] có bổ sung 9,0 g/L agar, 30 g sucrose và các chất kích thích sinh trưởng với nồng độ khác nhau

tùy vào mục đích của từng thí nghiệm. Môi trường nuôi cấy có pH 5,8 được khử trùng ở nhiệt độ 121°C, áp suất 1,0 atm trong 15 phút.

Mẫu được nuôi ở nhiệt độ: 25 ± 2°C, cường độ ánh sáng: 2000 lux, thời gian chiếu sáng: 16 giờ/ngày.

Khử trùng mẫu cấy

Đỉnh chồi và đoạn thân mang chồi nách (3-4 cm) được rửa sạch bụi đất, lặt với nước xà phòng loãng 3 lần, mỗi lần 15 phút. Mẫu tiếp tục được khử trùng trong tủ cấy với cồn 70% trong 30 giây và lặt với dung dịch HgCl₂ 0,1% từ 2 - 5 phút để xác định thời gian khử trùng thích hợp. Mỗi công thức cấy 18 mẫu, lặp lại 3 lần. Hiệu quả của trình khử trùng được đánh giá thông qua tỷ lệ mẫu sống không nhiễm (mẫu sạch), mẫu nhiễm và mẫu chết sau 2 tuần theo dõi.

Tạo chồi *in vitro* từ mẫu nuôi cấy khởi đầu

Mẫu sau khi khử trùng được cắt thành đoạn 1,5 - 2,0 cm và cấy lên môi trường nuôi cấy bổ sung BAP (Benzylaminopurine) nồng độ 0,1 - 1,5 mg/L hoặc Kin (Kinetin) nồng độ 0,1 - 1,5 mg/L để thăm dò khả năng tái sinh chồi *in vitro* sau 4 tuần nuôi cấy. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần, mỗi công thức cấy 15 mẫu. Kết quả được đánh giá thông qua tỷ lệ mẫu tạo chồi (%), chiều cao chồi (cm) và số chồi/mẫu.

$$\text{Tỷ lệ mẫu tạo chồi (\%)} = \frac{\text{Tổng số mẫu tạo chồi}}{\text{Tổng số mẫu cấy}}$$

$$\text{Số chồi trung bình/mẫu} = \frac{\text{Tổng số chồi tạo thành}}{\text{Tổng số mẫu sống tạo chồi}}$$

Trong đó, số chồi/mẫu được đánh giá dựa trên tổng số chồi tạo thành/tổng số mẫu sống có tạo chồi, không bao gồm những mẫu không tái sinh chồi và chết hoặc tạo callus và mất khả năng tạo chồi.

Nhân chồi

Chồi *in vitro* kích thước 1,5 - 2,0 cm được cấy lên môi trường nuôi cấy có bổ sung Kin 1,0 mg/L kết hợp với NAA (Naphthaleneacetic acid) 0,1 - 0,5 mg/L hoặc BAP 0,1 - 0,75 mg/L. Mỗi công thức cấy 15 mẫu, lặp lại 3 lần. Khả năng nhân chồi được đánh giá thông qua tỷ lệ mẫu tạo chồi (%), chiều cao chồi (cm) và số chồi/mẫu sau 4 tuần nuôi cấy.

Xử lý thống kê

Các thí nghiệm khử trùng mẫu được bố trí theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên, lặp lại 3 lần. Kết quả thí nghiệm được xử lý để thu giá trị trung bình và phân tích Duncan's test bằng phần mềm SPSS 20.0 với mức xác suất có ý nghĩa $p < 0,05$.

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

Tạo vật liệu nuôi cấy khởi đầu

Kết quả khử trùng được thể hiện ở bảng 1 cho thấy, việc sử dụng dung dịch HgCl₂ 0,1% ở các khoảng thời gian khác nhau có ảnh hưởng lớn đến tỷ lệ mẫu sống không nhiễm, mẫu nhiễm và mẫu chết của Hà thủ ô trắng tự nhiên. Trong khoảng thời gian từ 2 - 4 phút, HgCl₂ 0,1% có tác dụng tích cực đến kết quả khử trùng, tỷ lệ mẫu nhiễm giảm từ 72,22% xuống còn 20,37%; tỷ lệ mẫu sống không nhiễm tăng từ 27,78 - 70,37%. Khi tiếp tục tăng thời gian khử trùng thì HgCl₂ 0,1% bắt đầu gây độc cho mẫu cấy làm cho sức sống của mẫu giảm, tỷ lệ mẫu chết tăng lên; ở thời gian 2 phút không có mẫu chết và ở thời gian 5 phút tỷ lệ mẫu chết là 29,63%. Như vậy, xử lý mẫu với HgCl₂ 0,1% trong 4 phút cho kết quả khử trùng đạt tối ưu nhất.

Bảng 1. Ảnh hưởng thời gian khử trùng mẫu bằng dung dịch HgCl₂ 0,1% sau 2 tuần nuôi cấy

Thời gian khử trùng (phút)	Tỷ lệ mẫu sạch (%)	Tỷ lệ mẫu nhiễm (%)	Tỷ lệ mẫu chết (%)
2	27,78 ^a	72,22 ^d	0,00 ^a
3	38,89 ^a	55,56 ^c	5,55 ^b
4	70,37^c	20,37^b	9,26^b
5	53,70 ^b	16,67 ^a	29,63 ^c

Tạo chồi *in vitro* từ mẫu nuôi cấy khởi đầu

Tạo chồi là giai đoạn nuôi cấy đầu tiên để tạo nguồn nguyên liệu *in vitro* từ các nguồn mẫu tự nhiên ban đầu đã được làm sạch cho các bước nuôi cấy tiếp theo, mẫu từ giai đoạn tự dưỡng ngoài tự nhiên chuyển sang dị dưỡng trong bình nuôi cấy. Do đó, việc xác định được môi trường thích hợp để mẫu phát triển tốt là rất quan trọng. Cytokinin là nhóm chất kích thích sinh trưởng có tác động mạnh mẽ đến khả năng phát triển của chồi ngủ, tăng cường sự phát sinh chồi phụ [10], vì vậy chúng tôi tiến hành thử nghiệm ảnh hưởng của hai loại cytokinin là BAP và Kin riêng lẻ đến sự tái sinh chồi của Hà thủ ô trắng từ nguyên liệu nuôi cấy khởi đầu.

Ảnh hưởng của BAP đến sự tạo chồi và phát triển chồi *in vitro*

Trong quy trình tạo chồi và nhân chồi *in vitro* ở nhiều loài thực vật, BAP là cytokinin được sử dụng nhiều nhất, với nồng độ đáp ứng tốt nhất trong khoảng 0,1-3,0 mg/L [11]. Tuy nhiên, ở cây hà thủ ô trắng, BAP sử dụng riêng lẻ lại không thích hợp cho việc tái sinh chồi từ nguồn mẫu ban đầu (Bảng 2). Đối với đỉnh sinh trưởng, BAP có tác dụng kích thích sự phát triển chồi đỉnh với tỷ lệ tái sinh ở tất cả các nồng độ sử dụng từ 0,1-1,5 mg/L là 100%, so với môi trường đối chứng không bổ sung BAP chỉ đạt 68,89%. Tuy nhiên, các chồi chỉ phát triển về chiều cao, số

chồi/mẫu không tăng thêm (1,00 chồi/mẫu). Đối với mẫu đoạn thân, tỷ lệ tái sinh chồi trên môi trường bổ sung BAP thấp hơn so với mẫu đỉnh sinh trưởng, chỉ đạt từ 62,22-75,56%; số chồi/mẫu là 1,00-1,33 chồi (sự sai khác về số chồi không có ý nghĩa về mặt thống kê).

Bảng 2. Ảnh hưởng của BAP đến khả năng tạo chồi và phát triển của chồi *in vitro* sau 4 tuần nuôi cấy

BAP (mg/L)	Đỉnh sinh trưởng			Đoạn thân		
	Tỷ lệ tái sinh chồi (%)	Số chồi/mẫu	Chiều cao chồi (cm)	Tỷ lệ tái sinh chồi (%)	Số chồi/mẫu	Chiều cao chồi (cm)
0,0	68,89	1,00 ± 0,00 ^a	1,80 ± 0,36 ^a	68,89	1,00 ± 0,00 ^a	1,74 ± 0,42 ^a
0,1	100	1,00 ± 0,00 ^a	2,74 ± 0,46 ^c	73,33	1,00 ± 0,00 ^a	2,17 ± 0,70 ^b
0,5	100	1,00 ± 0,00^a	3,08 ± 0,75^d	75,56	1,33 ± 0,48^b	2,63 ± 0,42^c
1,0	100	1,00 ± 0,00 ^a	2,49 ± 0,42 ^c	71,11	1,00 ± 0,00 ^a	1,98 ± 0,74 ^{ab}
1,5	100	1,00 ± 0,00 ^a	2,17 ± 0,27 ^b	62,22	1,00 ± 0,00 ^a	1,90 ± 0,51 ^{ab}

Các chữ cái khác nhau trên cùng một cột chỉ ra sự sai khác có ý nghĩa thống kê của trung bình mẫu với $p < 0,05$ (Duncan's test).

Ảnh hưởng của Kin đến sự tạo chồi và phát triển chồi *in vitro*

So với BAP, Kin có tác dụng tốt hơn đến sự tạo chồi và phát triển của chồi *in vitro* từ nguồn mẫu ban đầu. Kinetin có khả năng ức chế hiện tượng ưu thế ngọn và kích thích sự phát triển của các chồi bên của Hà thủ ô trắng. Do đó, mẫu đỉnh sinh trưởng khi nuôi cấy trên môi trường có 0,1-1,5 mg/L Kin có số chồi/mẫu đạt từ 1,00-2,33 chồi, tỷ lệ mẫu tái sinh chồi là 100%. Đối với mẫu đoạn thân, khi tăng nồng độ Kin từ 0,1-1,0 mg/L, tỷ lệ tái sinh chồi đạt 100% và số chồi/mẫu tăng từ 1,30-2,63 chồi. Tiếp tục tăng nồng độ Kin lên 1,5 mg/L tỷ lệ mẫu tái sinh chồi và số chồi/mẫu đều giảm, chỉ đạt 80% và 1,50 chồi/mẫu (Bảng 3). Các chồi sinh trưởng trên môi trường có Kin đều có màu xanh nhạt, kích thước chồi to và sinh trưởng mạnh (Hình 1B, 1C).

Bảng 3. Ảnh hưởng của Kin đến khả năng tạo chồi và phát triển của chồi *in vitro* sau 4 tuần nuôi cấy

Kin (mg/L)	Đỉnh sinh trưởng			Đoạn thân		
	Tỷ lệ tái sinh chồi (%)	Số chồi/mẫu	Chiều cao chồi (cm)	Tỷ lệ tái sinh chồi (%)	Số chồi/mẫu	Chiều cao chồi (cm)
0,0	68,89	1,00 ± 0,00 ^a	1,70 ± 0,43 ^a	66,67	1,00 ± 0,00 ^a	1,65 ± 0,44 ^a
0,1	100	1,00 ± 0,00 ^a	3,04 ± 0,73 ^d	100	1,30 ± 0,47 ^b	2,26 ± 0,72 ^c
0,5	100	1,33 ± 0,55 ^{ab}	2,24 ± 0,54 ^{bc}	100	1,78 ± 0,63 ^c	2,04 ± 0,70 ^{bc}
1,0	100	2,33 ± 0,80^c	2,53 ± 0,58^c	100	2,63 ± 0,67^d	2,20 ± 0,73^c
1,5	100	1,67 ± 0,66 ^b	1,97 ± 0,54 ^{ab}	80,00	1,50 ± 0,51 ^b	1,76 ± 0,55 ^{ab}

Các chữ cái khác nhau trên cùng một cột chỉ ra sự sai khác có ý nghĩa thống kê của trung bình mẫu với $p < 0,05$ (Duncan's test).

Nhân nhanh chồi *in vitro*

Sau khi xác định được nồng độ Kin tốt nhất trong giai đoạn tạo chồi ban đầu, chúng tôi tiếp tục sử dụng 1 mg/L Kin để phối hợp với một số loại kích thích sinh trưởng khác (NAA và BAP) nhằm tìm được môi trường nhân chồi tối ưu cho Hà thủ ô trắng.

Ảnh hưởng của Kin kết hợp NAA đến khả năng nhân nhanh chồi

Sự kết hợp giữa nhóm cytokinin và auxin với nồng độ và tỷ lệ thích hợp thường có tác dụng kích thích sự phát triển chồi mạnh [10]. NAA là một loại auxin tổng hợp nhưng được sử dụng rất phổ biến trong nuôi cấy mô để kích thích sự nhân chồi khi kết hợp với các hợp chất nhóm cytokinin. Do đó, chúng tôi chọn NAA để nghiên cứu ảnh hưởng phối hợp giữa cytokinin và auxin trong quá trình nhân chồi Hà thủ ô trắng.

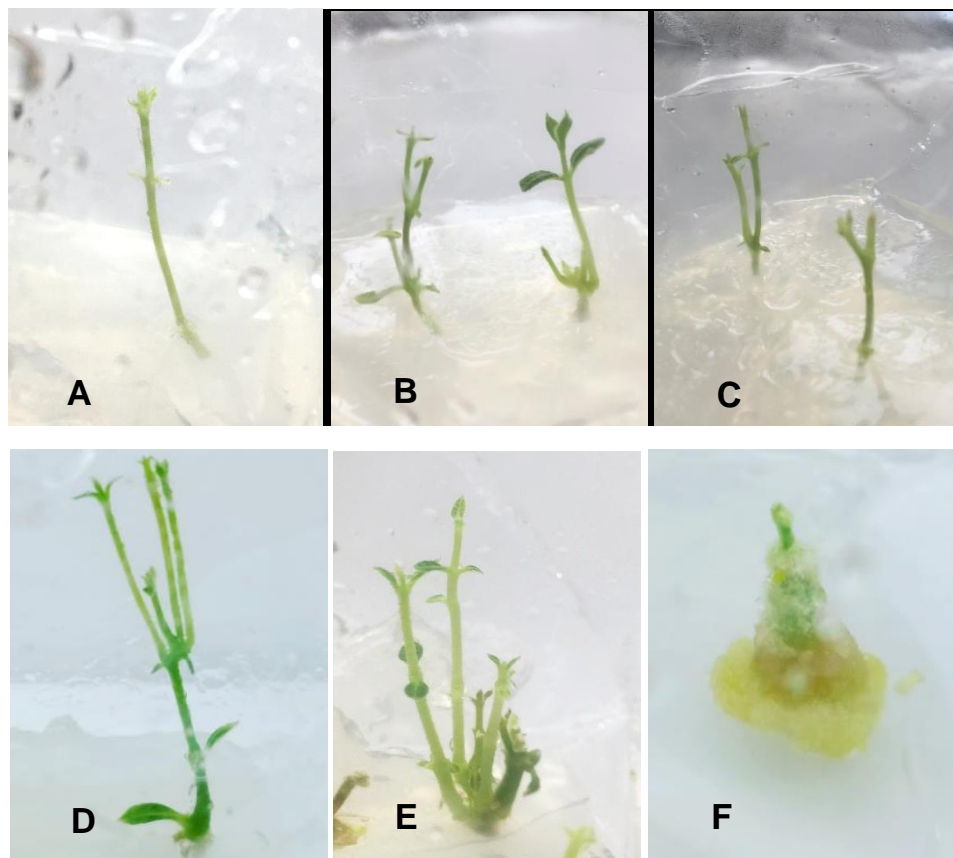
Kết quả nghiên cứu thể hiện ở bảng 4 cho thấy, NAA có tác dụng mạnh đến mẫu Hà thủ ô nuôi cấy nhưng theo hướng tạo callus. Tất cả các mẫu khi nuôi cấy trên môi trường có bổ sung Kin phối hợp với NAA nồng độ từ 0,1 - 0,5 mg/L đều hình thành callus màu xanh nhạt, cứng ở phần thân nằm chìm trong môi trường nuôi cấy. Ở các

môi trường có nồng độ NAA cao từ 0,3 - 0,5 mg/L, callus phát sinh gần như trên toàn bộ mẫu cấy sau 4 tuần làm mất khả năng phát triển chồi của nhiều mẫu nuôi cấy; dẫn đến làm giảm tỷ lệ mẫu tạo chồi và số chồi tạo thành. Khả năng tạo chồi của các mẫu đỉnh sinh trưởng cao hơn so với mẫu đoạn thân khi cấy trên cùng một loại môi trường. Đặc biệt các mẫu đoạn thân khi nuôi cấy trên môi trường có bổ sung 0,4 - 0,5 mg/L NAA và mẫu đỉnh sinh trưởng trên môi trường có 0,5 mg/L NAA không còn khả năng nhân chồi. Môi trường bổ sung 0,5 mg/L NAA cho khả năng phát sinh callus tốt nhất trong các môi trường. Nguyên có thể do nồng độ auxin nội sinh trong Hà thủ ô trắng cao, khi bổ sung thêm NAA trong môi trường nuôi cấy làm cho lượng auxin tích lũy trong mẫu quá cao dẫn đến sự phát sinh callus chứ không phải chồi. Như vậy, môi trường bổ sung 1,0 mg/L Kin và 0,5 mg/L NAA thích hợp cho hướng nghiên cứu phát sinh callus từ các mẫu mô Hà thủ ô trắng.

Bảng 4. Ảnh hưởng của Kin kết hợp NAA đến khả năng nhân nhanh chồi *in vitro* sau 4 tuần nuôi cấy

Kin (mg/L)	NAA (mg/L)	Đỉnh sinh trưởng			Đoạn thân			Tạo callus
		Tỷ lệ tạo chồi (%)	Số chồi /mẫu	Chiều cao chồi (cm)	Tỷ lệ tạo chồi (%)	Số chồi /mẫu	Chiều cao chồi (cm)	
1,0	0	100	2,47 ± 0,87 ^b	2,61 ± 0,78 ^c	100	2,75 ± 0,75 ^b	2,45 ± 0,84 ^d	Không
1,0	0,1	91,11	1,00 ± 0,00 ^a	2,16 ± 0,67 ^b	80,00	1,08 ± 0,29 ^a	1,91 ± 0,64 ^c	Tạo callus màu xanh nhạt, cứng
1,0	0,2	62,22	1,00 ± 0,00 ^a	1,78 ± 0,48 ^{ab}	46,67	1,00 ± 0,00 ^a	1,53 ± 0,53 ^b	
1,0	0,3	42,22	1,00 ± 0,00 ^a	1,62 ± 0,45 ^a	26,67	1,00 ± 0,00 ^a	1,28 ± 0,61 ^a	
1,0	0,4	37,78	1,00 ± 0,00 ^a	1,54 ± 0,43 ^a	0	0	0	
1,0	0,5	0	0	0	0	0	0	

Các chữ cái khác nhau trên cùng một cột chỉ ra sự sai khác có ý nghĩa thống kê của trung bình mẫu với $p < 0,05$ (Duncan's test).



Hình 1. Mẫu Hà thủ ô trắng *in vitro* sau 4 tuần nuôi cấy trên các môi trường khác nhau. A: Mẫu đỉnh sinh trưởng trên môi trường MS cơ bản; B: Mẫu đỉnh sinh trưởng tạo chồi trên môi trường MS + 1,0 mg/L Kin; C: Mẫu đoạn thân tạo chồi trên môi trường MS + 1,0 mg/L Kin; D: Mẫu đỉnh sinh trưởng nhân chồi trên môi trường MS + 1,0 mg/L Kin + 0,5 mg/L BAP; E: Mẫu

đoạn thân nhân chồi trên môi trường MS + 1,0 mg/L Kin + 0,5 mg/L BAP; F: Mẫu đoạn thân tạo callus trên môi trường MS + 1,0 mg/L Kin + 0,5 mg/L NAA.

Ảnh hưởng của Kin kết hợp BAP đến khả năng nhân nhanh chồi

Do sự kết hợp giữa Kin và NAA không thích hợp cho quá trình nhân chồi nên chúng tôi tiếp tục thử nghiệm ảnh hưởng của Kin ở nồng độ cố định 1,0 mg/L kết hợp với BAP ở các nồng độ 0,1; 0,25; 0,50; 0,75 mg/L. Sau 4 tuần nuôi cấy, kết quả trình bày ở bảng 5 cho thấy sự phối hợp giữa Kin và BAP thích hợp cho quá trình nhân nhanh chồi *in vitro* với tỷ lệ nhân chồi đạt 100% trên tất cả các loại mẫu cấy. Chồi to, sinh trưởng mạnh, tuy nhiên lá phát triển chậm. Khả năng nhân chồi của mẫu đoạn thân cao hơn so với mẫu đỉnh sinh trưởng. Môi trường bổ sung 1,0 mg/L Kin và 0,5 mg/L BAP là môi trường thích hợp nhất để nhân nhanh chồi Hà thủ ô trắng với số mẫu/chồi đạt tương ứng là 3,23 chồi đối với mẫu đỉnh sinh trưởng và 4,13 chồi đối với đoạn thân.

Bảng 5. Ảnh hưởng của Kin kết hợp BAP đến khả năng nhân nhanh chồi *in vitro* sau 4 tuần nuôi cấy

Kin (mg/L)	BAP (mg/L)	Đỉnh sinh trưởng		Đoạn thân	
		Số chồi/mẫu	Chiều cao chồi (cm)	Số chồi/mẫu	Chiều cao chồi (cm)
1,0	0,00	2,40 ± 0,67 ^{ab}	2,26 ± 0,69 ^{bc}	2,70 ± 0,65 ^a	2,57 ± 0,72 ^c
1,0	0,10	2,07 ± 0,58 ^a	2,47 ± 0,57 ^c	2,60 ± 0,56 ^a	2,00 ± 0,86 ^b
1,0	0,25	2,27 ± 0,64 ^a	2,06 ± 0,52 ^{ab}	3,07 ± 0,69 ^b	1,57 ± 0,58 ^a
1,0	0,50	3,23 ± 0,82^c	2,30 ± 0,74^{bc}	4,13 ± 0,86^c	1,59 ± 0,76^a
1,0	0,75	2,70 ± 0,60 ^b	1,89 ± 0,54 ^a	3,53 ± 0,78 ^b	1,44 ± 0,65 ^a

Các chữ cái khác nhau trên cùng một cột chỉ ra sự sai khác có ý nghĩa thống kê của trung bình mẫu với $p < 0,05$ (Duncan's test).

Thông thường, BAP là chất kích thích sinh trưởng có tác dụng kích thích sự nhân chồi *in vitro*; Kin cũng có tác dụng tương tự [12]. Rất nhiều đối tượng nghiên cứu cũng cho thấy kết quả nhân chồi *in vitro* đạt được là tối ưu nhất khi bổ sung kết hợp cả hai loại cytokinin là BAP và Kin. Môi trường thích hợp nhất cho nhân chồi *in vitro* cây lạc tiên (*Passiflora foetida*) là môi trường MS cơ bản bổ sung 0,5 mg/L BAP và 0,5 mg/L Kin [13].

KẾT LUẬN

Kết quả nghiên cứu bước đầu cho thấy đỉnh sinh trưởng và đoạn thân của cây Hà thủ ô trắng tự nhiên có thể được sử dụng làm vật liệu khởi đầu nhân giống, mẫu được khử trùng với cồn 70% trong 30 giây và HgCl₂ 0,1% trong 4 phút cho tỷ lệ sống cao nhất, đạt 70,37% sau 2 tuần nuôi cấy. Môi trường MS cơ bản bổ sung 30 g/L sucrose, 9,0 g/L agar, 1,0 mg/L Kin thích hợp nhất cho sự tạo chồi *in vitro* từ mẫu nuôi cấy khởi đầu; bổ sung 1,0 mg/L Kin và 0,5 mg/L BAP thích hợp nhất để nhân nhanh chồi.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] D. T. Loi, *Vietnamese medicinal plants and herbs*. Hanoi: Medicine Publishing House (in Vietnamese), 2004.
- [2] V. V. Chi, *Dictionary of Vietnamese medicinal plants*. Ho Chi Minh: Medicine Publishing House (in Vietnamese), 1996.
- [3] J. Y. Ueda *et al.*, "Antiproliferative activity of cardenolides isolated from *Streptocaulon juventas*," *Biol Pharm Bull*, vol. 26, no. 10, pp. 1431-5, Oct 2003, doi: 10.1248/bpp.26.1431.
- [4] Z. Liu, S. L. Li, N. Han, D. X. Sun, Y. Cao, and J. Yin, "Studies on the chemical constituents of the vines of *Streptocaulon juventas* (Lour.) Merr.," *Asian Journal of Traditional Medicines*, vol. 3, 5, pp. 193-198, 2008.
- [5] R. Xue *et al.*, "The cytotoxic activities of cardiac glycosides from *Streptocaulon juventas* and the structure-activity relationships," *Fitoterapia*, vol. 98, pp. 228-233, 2014/10/01/ 2014, doi: <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2014.08.008>.
- [6] A. Hussain, I. A. Qarshi, H. Nazir, and I. Ullah, *Plant Tissue Culture: Current Status and Opportunities*. United Kingdom: IntechOpen, 2012.
- [7] H. T. Quang *et al.*, "*In vitro* propagation of *Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.) Makino via callus induction," (in Vietnamese), *Journal of Science, Hue University: Natural Science*, vol. 128, no. 1E, pp. 59-68, 2019.
- [8] V. T. Hien *et al.*, "Application of Thin Cell Layer Technique in Studying Morphogenesis of *Panax vietnamensis* Ha et Grushv.," (in Vietnamese), *Journal of Science and Development*, vol. 13, 4, pp. 657-664, 2015.
- [9] T. Murashige and F. Skoog, "A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures," *Physiol. Plant.*, vol. 15, no. 3, pp. 473-497, 1962, doi: 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x.
- [10] N. B. Loc, *Textbook: Plant growth regulators*. University of Education, Hue University (in Vietnamese), 2006.
- [11] M. Posada, N. Ballesteros, W. Obando, and A. Angarita, "Micropropagation of *Gerbera* from floral buds," 1999: International Society for Horticultural Science (ISHS), Leuven, Belgium, 482 ed., pp. 329-332, doi: 10.17660/ActaHortic.1999.482.48. [Online]. Available: <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.1999.482.48>
- [12] N. Q. Thach, N. T. L. Anh, and N. T. P. Thao, *Textbook: Agricultural biotechnology*. Hanoi: Agriculture Publishing House (in Vietnamese), 2004.

- [13] M. S. Shekhawat, N. Kannan, M. Manokari, and C. P. Ravindran, "In vitro regeneration of shoots and ex vitro rooting of an important medicinal plant *Passiflora foetida* L. through nodal segment cultures," *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, vol. 13, no. 2, pp. 209-214, 2015/12/01/ 2015, doi: <https://doi.org/10.1016/j.jgeb.2015.08.002>.

EFFECT OF PLANT GROWTH REGULATORS ON *IN VITRO* SHOOT MULTIPLICATION OF *Streptocaulon juvenas* Merr. PLANTS

Pham Thi Diem Thi¹, Ho Thi Thuy Nhi^{1,2}, Nguyen Minh Tri¹, Nguyen Thi My Le³, Truong Thi Bich Phuong², Hoang Tan Quang^{1,*}

¹*Institute of Biotechnology, Hue University*

²*University of Sciences, Hue University*

³*Division of Biotechnology, College of Environmental and Bioresource Sciences, Jeonbuk National University, Republic of Korea*

SUMMARY

Streptocaulon juvenas Merr. is a plant in the *Asclepiadaceae* family which is native in Indochina. The roots of this plant are used as tonic for anemia, chronic malaria, rheumatism, menstrual disorders, neurasthenia, and dyspepsia. In this study, an *in vitro* shoot multiplication method for this plant was developed. The results showed that the shoot tip and node explants of *Streptocaulon juvenas* Merr. can be used as initial materials for the *in vitro* propagation. Sterilization of explants with HgCl₂ 0.1% for 4 min was found the highest survival rate of 70.37%. The optimal medium for shoot regeneration from initial explants was basic MS medium supplemented with 1.0 mg/L Kin. The MS medium containing 1.0 mg/L Kin and 0.5 mg/L BAP was the best for shoot multiplication, with 3.23 shoots per shoot tip and 4.13 shoots per stem node, respectively.

Keywords: *in vitro* propagation, shoot regeneration, growth regulators, *Streptocaulon juvenas* Merr.

* Author for correspondence: Tel: +84-983735509; Email: htquang@hueuni.edu.vn