

Ảnh hưởng của các chất điều hòa tăng trưởng thực vật lên sự nuôi cấy *in vitro* chồi Sa Kê (*Artocarpus altilis* (Park.) Fosberg)

- Hà Thị Tuyết Sương
- Võ Thị Bạch Mai

Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG-HCM

(Bài nhận ngày 12 tháng 11 năm 2015, nhận đăng ngày 06 tháng 05 năm 2016)

TÓM TẮT

Dưới ảnh hưởng của các chất điều hòa tăng trưởng thực vật, sau 8 tuần nuôi cấy *in vitro*, sự phát triển của chồi Sa Kê (*Artocarpus altilis* (Park.) Fosberg) rất khác nhau. Các chồi được nuôi cấy trên môi trường BA 1 mg/L sau 10 ngày được chuyển sang môi trường MS ½ bổ sung BA 10 mg/L, tỉ lệ phát triển của chồi là cao nhất (86,8 %), không có sự tiết phenol hay tạo mô sẹo. Trên môi trường MS ½ bổ sung BA 12 mg/L, chồi phát triển to khỏe song sự tiết phenol và tỉ lệ tạo mô sẹo cao làm ảnh hưởng đến khả năng phát triển của chồi. Trên hai môi trường MS ½ có bổ

sung BA 0,45 mg/L, Kinetin (Kin) 0,6 mg/L và môi trường MS ½ có bổ sung BA 0,45 mg/L, Kin 0,6 mg/L, GA₃ 0,35 mg/L tỉ lệ chồi phát triển thấp hơn so với môi trường MS ½ bổ sung BA 10 mg/L. Sự bổ sung GA₃ 0,35 mg/L vào môi trường nuôi cấy đã làm xuất hiện các thêm chồi bên so với những thí nghiệm còn lại. Kết quả đo hô hấp và hoạt tính chất điều hòa tăng trưởng thực vật cũng được thảo luận để làm rõ những thay đổi sinh lý trong quá trình nuôi cấy *in vitro* chồi Sa Kê.

Từ khóa: *Artocarpus altilis* (Park.) Fosberg, chất điều hòa tăng trưởng thực vật, nuôi cấy *in vitro*

MỞ ĐẦU

Sa Kê (*Artocarpus altilis* (Park.) Fosberg) thuộc họ Moraceae (Dâu tằm), là cây thân gỗ nhiệt đới. Ngoài giá trị về dinh dưỡng, Sa Kê còn là nguồn dược liệu quý giá vì mỗi bộ phận của nó chứa rất nhiều hợp chất tự nhiên có hoạt tính sinh học (terpenoid, flavonoid, chalcon, stilben, các acid béo...), các hợp chất này được sử dụng trong dược phẩm với nhiều chức năng như kháng lao, kháng khuẩn, vi rút, kháng nấm, kìm hãm hoạt động một số enzyme như tyrosinase, α -amylase và α -glucosidase, chống ung thư... [9].

Hiện nay, một số quốc gia trên thế giới xem cây Sa Kê là một trong những cây lương thực

chính [2]. Do đó, việc vi nhân giống cũng như cải thiện chất lượng và năng suất của Sa Kê ngày càng được đặc biệt quan tâm. Năm 2000, vi nhân giống Sa Kê từ chồi đỉnh của cây trưởng thành ở Caribbean được thực hiện bởi Duncan và Rouse-Miller [4]. Năm 2003, Cynthia nuôi cấy *in vitro* 12 giống Sa Kê ở Hawaii nhằm phục vụ cho công tác bảo tồn giống [7]. Nhưng nhìn chung việc vi nhân giống từ chồi đỉnh mang lại hiệu suất thấp do gặp phải một số vấn đề khó khăn như: sự nhiễm khuẩn do vi khuẩn nội cộng sinh trong chồi đỉnh của cây trưởng thành, sự tiết phenol của chồi ra môi trường nuôi cấy gây độc làm chồi

bị hoại tử, đặc biệt việc khử trùng chồi Sa Kê rất khó. Năm 2008, Murch cùng cộng sự nuôi cấy *in vitro* một số giống Sa Kê ở Trung tâm Vườn thực vật nhiệt đới Hawaii phục vụ cho việc nghiên cứu một số yếu tố di truyền nhằm cải thiện chất lượng và năng suất giống. Nghiên cứu cũng đã thiết lập được một số phương pháp nhằm tăng hệ số nhân giống của một vài giống Sa Kê [8]. Ở Việt Nam hiện nay chưa có công bố về nhân giống *in vitro* cây Sa Kê, việc nhân giống chủ yếu là giâm, chiết cành từ cây mẹ với thời gian kéo dài và thường làm ảnh hưởng đến đời sống cũng như năng suất của cây mẹ. Vì vậy, trong bài này chúng tôi tiến hành khảo sát sự ảnh hưởng của các chất điều hòa tăng trưởng thực vật ngoại sinh cũng như một số phương pháp nhằm cải thiện những khó khăn trong việc nuôi cấy *in vitro* chồi Sa Kê.

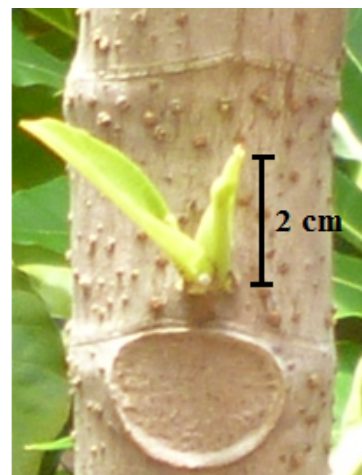
VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu

Các chồi con trên thân cây có chiều dài khoảng 2–3 cm, đường kính khoảng 0,3 cm được thu hái tại huyện Chợ Lách – Bến Tre và Thành phố Hồ Chí Minh (Hình 1).

Khử trùng mẫu vật

Mẫu vật *in vivo* được rửa sạch bằng xà phòng và nước vô trùng. Lắc nhẹ với cồn 70 % khoảng 1 phút. Loại bỏ lá kèm và các lá trưởng thành. Lắc nhẹ với cồn 70 % khoảng 30 giây. Loại bỏ các phần bị hóa nâu ngay sau khi lắc với cồn 70 % và rửa sạch bằng nước cất vô trùng. Ngâm mẫu vật với dung dịch vitamin C 50 mg/L và acid citric 150 mg/L khoảng 15 phút, sau đó rửa sạch bằng nước cất vô trùng. Trong tủ cấy vô trùng, xử lý mẫu vật bằng dung dịch HgCl_2 0,1 % hoặc dung dịch Javel thương phẩm (NaOCl 5 %) và 3 giọt Tween 20, sau đó rửa sạch nhiều lần bằng nước cất vô trùng.



Hình 1. Chồi Sa Kê ngoài tự nhiên dùng làm vật liệu nuôi cấy *in vitro*.

Ảnh hưởng của các chất điều hòa tăng trưởng thực vật lên sự nuôi cấy *in vitro* chồi Sa Kê

Mẫu vật sau khi được khử trùng, tiến hành loại bỏ lá kèm và các lá trưởng thành trong đĩa petri chứa 20 mL nước vô trùng cho đến khi chiều dài còn khoảng 0,8–1 cm. Sau đó, nuôi cấy trên các môi trường:

Thí nghiệm 1: MS $\frac{1}{2}$ có bổ sung BA 7,5 mg/L; 10 mg/L; 12 mg/L và than hoạt tính 1 g/L.

Thí nghiệm 2: MS $\frac{1}{2}$ có bổ sung BA 1 mg/L sau 10 ngày tiếp tục chuyển sang môi trường MS $\frac{1}{2}$ có bổ sung BA 7,5 mg/L; 10 mg/L; 12 mg/L, không bổ sung than hoạt tính.

Thí nghiệm 3: MS $\frac{1}{2}$ có bổ sung BA 0,45 mg/L, Kin 0,6 mg/L và MS $\frac{1}{2}$ có bổ sung BA 0,45 mg/L, Kin 0,6 mg/L, GA_3 0,35 mg/L.

Các mô cấy được đặt ngoài sáng trong phòng nuôi có nhiệt độ $27^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$, độ ẩm $55\% \pm 10\%$, ánh sáng $2000\text{ lux} \pm 200\text{ lux}$. Tỷ lệ mẫu phát triển, số lá của chồi, chiều cao chồi và sự xuất hiện của chồi bên cũng như các biến đổi khác: tỷ lệ tạo mô sẹo hoặc tiết phenol ra môi trường nuôi cấy (tỷ lệ tạo mô sẹo hoặc tiết phenol là số mẫu chồi có tạo mô sẹo hoặc có tiết phenol so với tổng số mẫu chồi phát triển trên mỗi môi trường) được ghi nhận sau 8 tuần nuôi cấy.

Quan sát hình thái giải phẫu

Chồi Sa Kê sau 1 tuần và 4 tuần nuôi cấy trên môi trường MS ½ có bổ sung BA 0,45 mg/L, Kin 0,6 mg/L, GA₃ 0,35 mg/L; được cắt theo chiều dọc; nhuộm hai màu đỏ carmin – xanh iod; quan sát dưới kính hiển vi và chụp ảnh.

Đo cường độ hô hấp

Cường độ hô hấp của chồi Sa Kê ở tuần 0 (đối chứng chưa cấy vào môi trường) và các chồi ở thí nghiệm 2 và 3 được xác định tại các thời điểm nuôi cấy khác nhau bằng máy đo sự trao đổi khí (Hansatech) ở 28 °C, trong tối. Kết quả thể hiện bằng lượng oxygen thoát ra/ gam trọng lượng tươi (TLT)/ giờ.

Ly trích và xác định hoạt tính chất điều hòa tăng trưởng thực vật nội sinh

Các chất điều hòa tăng trưởng thực vật nội sinh trong mẫu chồi tại các thời điểm nuôi cấy khác nhau ở thí nghiệm 2 và 3 được chiết xuất và phân tích trên bản mỏng silica gel, trong hệ dung môi là isopropanol: amon hydroxyde: H₂O theo tỉ lệ 10:1:1 (v/v). Hoạt tính của IAA, Zeatin, GA₃ và ABA được xác định bằng các sinh trắc nghiệm. Hoạt tính của IAA và ABA được đo bằng sinh trắc nghiệm với diệp tiêu lúa *Oryza sativa* L.. Sự gia tăng về chiều dài diệp tiêu lúa được đo sau 24 giờ, trong tối. Hoạt tính IAA tỉ lệ thuận với sự sai biệt chiều dài khúc cắt diệp tiêu

so với chuẩn (dung dịch IAA 1 mg/L). Hoạt tính ABA tỉ lệ nghịch với sự sai biệt chiều dài khúc cắt diệp tiêu so với chuẩn (dung dịch ABA 1 mg/L). Hoạt tính của Zeatin được đo bằng sinh trắc nghiệm với tử diệp dưa chuột *Cucumis sativus* L.. Hoạt tính của Zeatin tỉ lệ thuận với sự sai biệt trọng lượng tươi của các tử diệp so với chuẩn (dung dịch Zeatin 1 mg/L) sau 48 giờ chiếu sáng. Hoạt tính của GA₃ được đo bằng sinh trắc nghiệm với cây mầm xà lách *Lactuca sativa* L.. Hoạt tính của GA₃ tỉ lệ thuận với sự sai biệt chiều dài trụ hạ diệp so với chuẩn (dung dịch GA₃ 10 mg/L) sau 72 giờ chiếu sáng [6].

Xử lý số liệu

Các số liệu ghi nhận được xử lý thống kê bằng phần mềm Statistical Program Scientific System (SPSS), phiên bản 16.0 dành cho Windows. Sự sai biệt có ý nghĩa ở mức $p = 0,05$.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Khử trùng mẫu vật

Mẫu vật *in vivo* dùng để nuôi cấy được khử trùng bằng dung dịch HgCl₂ 0,1 % hoặc dung dịch Javel thương phẩm (NaOCl 5 %) và 3 giọt Tween 20 với các thời gian khác nhau. Kết quả sau 1 tuần nuôi cấy, ở nồng độ HgCl₂ 0,1 %, với thời gian khử trùng 13 phút cho tỉ lệ mẫu sống và không bị nhiễm cao nhất so với các thời gian còn lại (Bảng 1).

Bảng 1. Tỉ lệ mẫu chồi sống và không bị nhiễm sau 1 tuần nuôi cấy

Thời gian khử trùng (phút)	Tỉ lệ mẫu sống và không bị nhiễm (%)	
	HgCl ₂ 0,1 %	Javel thương phẩm (NaOCl 5 %)
5	0,0 ± 0,0 ^d	0,0 ± 0,0 ^c
10	9,7 ± 2,0 ^c	5,0 ± 0,6 ^b
13	65,3 ± 3,7^a	20,3 ± 3,4 ^a
16	32,0 ± 3,2 ^b	19,3 ± 1,7 ^a

Các số trong cùng một cột mang các chữ khác nhau thì khác biệt có ý nghĩa ở $p=0,05$

Ảnh hưởng của các chất điều hòa tăng trưởng thực vật lên sự nuôi cấy *in vitro* chồi Sa Kê

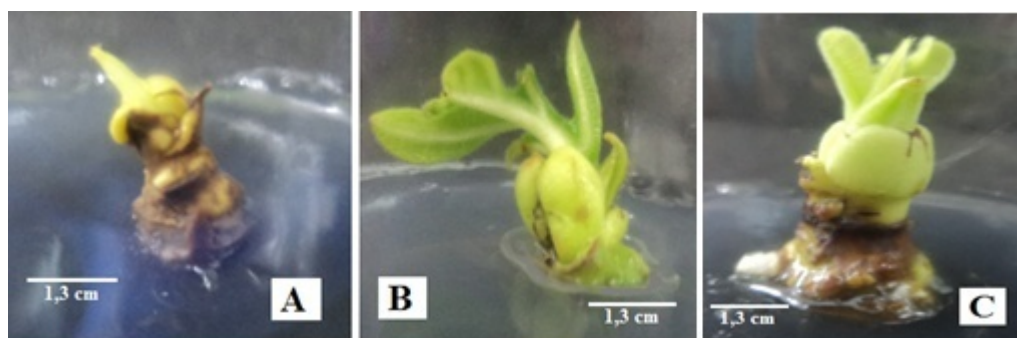
Thí nghiệm 1: Nuôi cấy trên môi trường MS ½ có bổ sung BA 7,5 mg/L; 10 mg/L; 12 mg/L và than hoạt tính 1 g/L.

Trên môi trường MS ½ có bổ sung BA 7,5 mg/L; 10 mg/L và 12 mg/L kết hợp với than hoạt tính 1 g/L, các mẫu cấy phát triển với tỉ lệ rất thấp, sau đó nhiễm khuẩn hoặc dần hóa nâu đen

và chết sau 4 tuần nuôi cấy. Trên môi trường bổ sung BA 10 mg/L lá xuất hiện sớm nhất so với các nghiệm thức còn lại (vào tuần thứ 10 sau khi nuôi cấy). Tuy nhiên, sự phát triển, số lá cũng như sự kéo dài của chồi rất chậm, chậm nhất là trên môi trường có bổ sung BA 7,5 mg/L (Hình 2). Trên môi trường BA 12 mg/L, tỉ lệ chồi tạo mô sẹo rất cao (Bảng 2).

Bảng 2. Sự phát triển của chồi Sa Kê nuôi cấy trên môi trường MS ½ có bổ sung BA và than hoạt tính 1 g/L

Nghiệm thức	Tỉ lệ chồi sống và xuất hiện lá sau 12 tuần nuôi cấy (%)	Tỉ lệ chồi tạo mô sẹo sau 8 tuần nuôi cấy (%)
MS ½ + BA 7,5 mg/L	5,2 %	6,4 %
MS ½ + BA 10 mg/L	30,0 %	10,7 %
MS ½ + BA 12 mg/L	23,8 %	68,5 %



Hình 2. Sự phát triển của chồi Sa Kê sau 12 tuần nuôi cấy trên môi trường MS ½ bổ sung BA 7,5 mg/L (A), 10 mg/L (B), 12 mg/L (C) và than hoạt tính 1 g/L.

Thí nghiệm 2: Nuôi cấy trên môi trường MS ½ có bổ sung BA 1 mg/L sau 10 ngày tiếp tục chuyển sang môi trường MS ½ bổ sung BA 7,5 mg/L; 10 mg/L; 12 mg/L, không bổ sung than hoạt tính.

Sau 10 ngày nuôi cấy trên môi trường BA 1 mg/L, những mẫu còn sống và không bị nhiễm sẽ được chuyển sang môi trường có bổ sung BA ở nồng độ cao hơn 7,5 mg/L; 10 mg/L và 12 mg/L. Việc đặt nuôi các mẫu chồi trên môi trường bổ sung BA 1 mg/L nhằm giảm bớt sự tiết phenol và tạo mô sẹo từ chồi [7].

Kết quả cho thấy sau 8 tuần nuôi cấy, trên môi trường có bổ sung BA ở các nồng độ khác nhau đều kích thích chồi phát triển. Môi trường bổ sung BA 10 mg/L cho tỉ lệ mẫu phát triển cao nhất và tốt nhất, lá xuất hiện ở tuần thứ 3. Ngược lại, trên môi trường BA 7,5 mg/L, tỉ lệ chồi phát triển thấp nhất, các lá của chồi hầu như dày lên, xốp hơn và nhiều nước. Ở môi trường BA 12 mg/L, kích thước của chồi to khỏe hơn (Bảng 3, Hình 3, Hình 4). Sự chuyển các chồi từ môi trường BA 1 mg/L sang môi trường có bổ sung

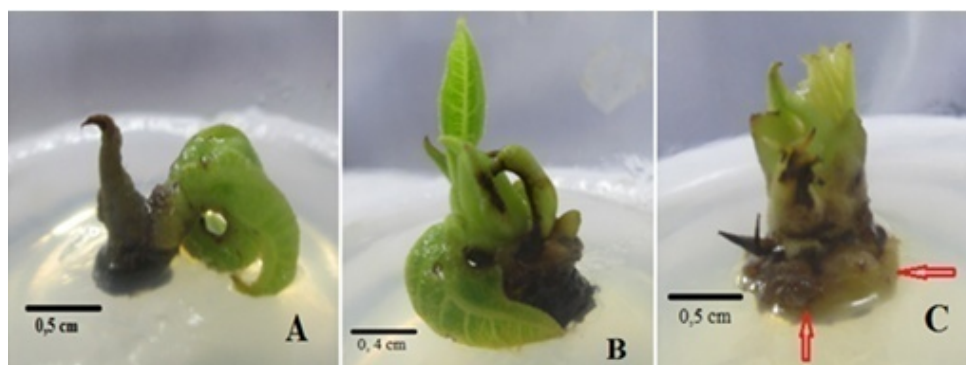
BA nồng độ cao hơn làm giảm sự tiết phenol, và sự hình thành mô sẹo của mẫu cấy rõ rệt. Trên môi trường BA 7,5 mg/L và 10 mg/L mẫu cấy hầu như không tạo mô sẹo hoặc tiết phenol ra

môi trường nuôi cấy. Tuy nhiên, trên môi trường BA 12 mg/L, một số chồi vẫn còn tạo mô sẹo và tiết phenol ra môi trường nuôi cấy (Bảng 3, Hình 3C, Hình 5).

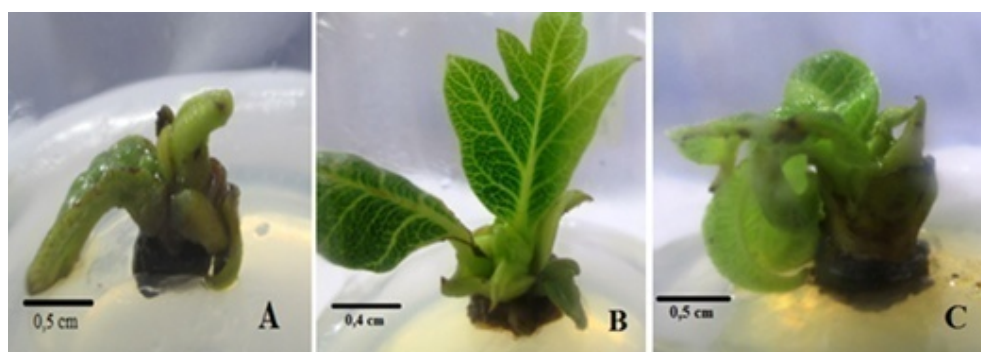
Bảng 3. Ảnh hưởng của BA ở các nồng độ khác nhau lên sự phát triển của chồi Sa Kê sau 8 tuần nuôi cấy

Chỉ tiêu theo dõi	Nghiệm thức		
	MS ½ + BA 7,5 mg/L	MS ½ + BA 10 mg/L	MS ½ + BA 12 mg/L
Tỉ lệ mẫu phát triển (%)	31,0 ± 5,5 ^c	86,8 ± 19,1 ^a	59,9 ± 0,5 ^b
Thời gian xuất hiện lá (tuần)	4	3	4
Số lá (sau 8 tuần)	1,0 ± 0,0 ^b	2,6 ± 0,3 ^a	1,1 ± 0,4 ^b
Chiều cao chồi (cm)	0,86 ± 0,06 ^b	1,3 ± 0,12 ^a	1,3 ± 0,12 ^a
Tỉ lệ tạo mô sẹo (%)	0,0 ± 0,0 ^b	0,0 ± 0,0 ^b	38,0 ± 2,1 ^a
Tỉ lệ hóa nâu (%)	0,0 ± 0,0 ^b	0,0 ± 0,0 ^b	10,3 ± 2,3 ^a

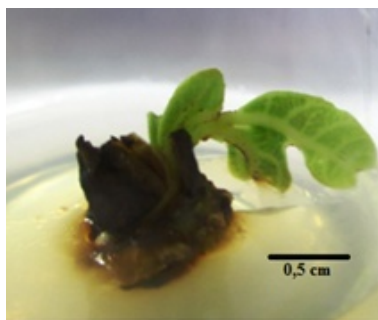
Các số trong cùng một hàng mang các chữ khác nhau thì khác biệt có ý nghĩa ở $p=0,05$



Hình 3. Chồi Sa Kê sau 3 tuần nuôi cấy trên môi trường MS ½ có bổ sung BA 7,5 mg/L (A); 10 mg/L (B) và 12 mg/L (C). (mũi tên chỉ sự hình thành mô sẹo trên chồi)



Hình 4. Chồi Sa Kê sau 8 tuần nuôi cấy trên môi trường MS ½ có bổ sung BA 7,5 mg/L (A); 10 mg/L (B) và 12 mg/L (C)



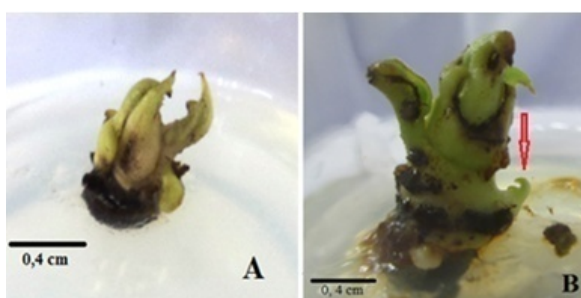
Hình 5. Sự tiết các hợp chất phenol và hóa nâu đen của chồi Sa Kê sau 8 tuần nuôi cấy trên môi trường MS $\frac{1}{2}$ bổ sung BA 12 mg/L

Thí nghiệm 3: Nuôi trên môi trường MS $\frac{1}{2}$ có bổ sung BA 0,45 mg/L, Kin 0,6 mg/L và MS $\frac{1}{2}$ có bổ sung BA 0,45 mg/L, Kin 0,6 mg/L, GA₃ 0,35 mg/L.

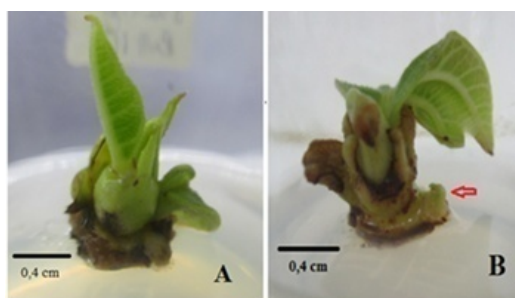
Dưới ảnh hưởng của BA, Kin và GA₃, sau 8 tuần nuôi cấy, các chồi đều phát triển tốt. Đặc biệt, trên môi trường có bổ sung GA₃ 0,35 mg/L kích thích sự phát triển của các chồi bên, lá xuất hiện ở tuần thứ 4 (Bảng 4, Hình 6 và 7). Tuy nhiên, tỉ lệ chồi phát triển thấp hơn so với môi trường bổ sung BA 10 mg/L (Bảng 4).

Bảng 4. Ảnh hưởng của BA, Kin và GA₃ lên sự phát triển của chồi Sa Kê sau 8 tuần nuôi cấy

Chỉ tiêu theo dõi	Thí nghiệm	
	MS $\frac{1}{2}$ + BA 0,45 mg/L + Kin 0,6 mg/L	MS $\frac{1}{2}$ + BA 0,45 mg/L + Kin 0,6 mg/L + GA ₃ 0,35 mg/L.
Tỉ lệ mẫu phát triển (%)	65,4 ± 2,9	68,1 ± 3,2
Thời gian xuất hiện lá (tuần)	4	4
Số lá (sau 8 tuần)	1	1
Chiều cao chồi (cm)	1,1 ± 0,0	1,4 ± 0,1
Số chồi bên xuất hiện (sau 8 tuần)	0	1, 2 hoặc 3



Hình 6. Chồi Sa Kê sau 4 tuần nuôi cấy trên môi trường MS $\frac{1}{2}$ có bổ sung BA 0,45 mg/L, Kin 0,6 mg/L (A) và MS $\frac{1}{2}$ bổ sung BA 0,45 mg/L, Kin 0,6 mg/L, GA₃ 0,35 mg/L (B). (mũi tên chỉ vị trí của chồi bên hình thành)

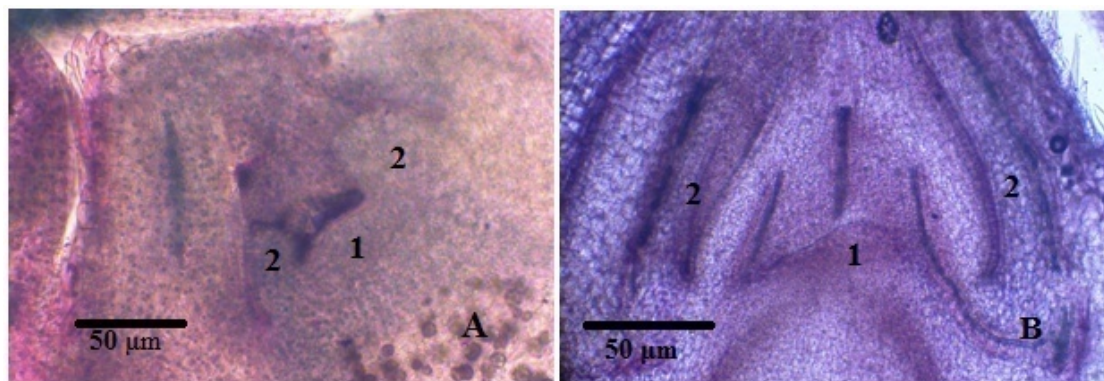


Hình 7. Chồi Sa Kê sau 8 tuần nuôi cấy trên môi trường MS $\frac{1}{2}$ bổ sung BA 0,45 mg/L, Kin 0,6 mg/L (A) và MS $\frac{1}{2}$ bổ sung BA 0,45 mg/L, Kin 0,6 mg/L, GA₃ 0,35 mg/L (B). (mũi tên chỉ vị trí của chồi bên hình thành)

Quan sát hình thái giải phẫu

Lát cắt dọc qua chồi Sa Kê sau 1 tuần nuôi cấy trên môi trường MS $\frac{1}{2}$ có bổ sung BA 0,45 mg/L, Kin 0,6 mg/L, GA₃ 0,35 mg/L cho thấy có

sự xuất hiện sơ khởi chồi bên (Hình 8A), sau 4 tuần nuôi cấy sơ khởi này đã phát triển thành chồi bên với các phát thể lá (Hình 8B).



Hình 8. Phẫu thức cắt dọc qua một sơ khởi chồi bên Sa Kê sau 1 tuần (A) và chồi bên sau 4 tuần (B) trên môi trường MS $\frac{1}{2}$ bổ sung BA 0,45 mg/L, Kin 0,6 mg/L, GA₃ 0,35 mg/L. (1): Vùng mô phân sinh ngọn chồi; (2): Các phát thể lá

Sự thay đổi cường độ hô hấp

Trên môi trường MS $\frac{1}{2}$ bổ sung BA 7,5 mg/L, cường độ hô hấp của chồi không thay đổi đáng kể qua các tuần. Trên môi trường bổ sung BA 10 mg/L; BA 0,45 mg/L, Kin 0,6 mg/L; cường độ hô hấp của chồi tăng sau 2 tuần nuôi cấy, tăng mạnh ở tuần thứ 4 và duy trì đến tuần thứ 8. Trên môi trường bổ sung BA 12 mg/L, sự

gia tăng cường độ hô hấp bắt đầu ở tuần thứ 2, tăng mạnh ở tuần thứ 4 sau đó giảm ở tuần thứ 8. Riêng trên môi trường bổ sung BA 0,45 mg/L, Kin 0,6 mg/L, GA₃ 0,35 mg/L, cường độ hô hấp tăng ở tuần thứ 2, sự gia tăng này mạnh dần ở tuần thứ 4 và tăng mạnh nhất sau 8 tuần nuôi cấy (Bảng 5).

Bảng 5. Cường độ hô hấp ($\mu\text{mol O}_2/\text{g TLT}/\text{giờ}$) của chồi Sa Kê qua các tuần nuôi cấy trên môi trường MS $\frac{1}{2}$ có bổ sung các chất điều hòa tăng trưởng thực vật khác nhau

Nghiệm thức MS $\frac{1}{2}$ bổ sung	Thời gian (tuần)			
	0	2	4	8
BA 7,5 mg/L	1,06 $\pm$ 0,11 ^a	1,19 $\pm$ 0,18 ^a	1,48 $\pm$ 0,10 ^a	1,35 $\pm$ 0,18 ^a
BA 10 mg/L	1,06 $\pm$ 0,11 ^c	9,21 $\pm$ 0,49^b	16,70 $\pm$ 0,85^a	16,14 $\pm$ 1,37^a
BA 12 mg/L	1,06 $\pm$ 0,11 ^c	9,35 $\pm$ 0,76^b	13,50 $\pm$ 0,53^a	7,66 $\pm$ 1,00^b
BA 0,45 mg/L, Kin 0,6 mg/L	1,06 $\pm$ 0,11 ^c	8,52 $\pm$ 1,45^b	16,89 $\pm$ 1,08^a	15,51 $\pm$ 1,66^a
BA 0,45 mg/L, Kin 0,6 mg/L, GA ₃ 0,35 mg/L	1,06 $\pm$ 0,11 ^d	13,23 $\pm$ 0,47^c	18,13 $\pm$ 1,17^b	27,79 $\pm$ 0,97^a

Các số trong cùng một hàng mang các chữ khác nhau thì khác biệt có ý nghĩa ở $p=0,05$

Sự thay đổi hoạt tính các chất điều hòa tăng trưởng thực vật nội sinh

Hoạt tính IAA trong chồi Sa Kê hầu như không thay đổi qua các tuần trên tất cả các môi

trường nuôi cấy, riêng trên môi trường MS $\frac{1}{2}$ bổ sung BA 12 mg/L, hoạt tính IAA bắt đầu tăng ở tuần 2, tăng cao nhất ở tuần 4 và giảm dần ở tuần 8 (Bảng 6, 7, 8 và 9). Trên tất cả các môi trường

nuôi cấy, hoạt tính Zeatin nội sinh trong chồi đều bắt đầu tăng mạnh ở tuần 2 cho tới tuần 4 sau đó hạ thấp dần ở tuần 8 (Bảng 6, 7, 8 và 9).

Hoạt tính GA₃ nội sinh bắt đầu tăng mạnh ở tuần 2, tiếp tục duy trì đến tuần 4 sau đó giảm xuống ở tuần 8 trên môi trường MS ½ bổ sung BA 10 mg/L; BA 12 mg/L; BA 0,45 mg/L, Kin 0,6 mg/L (Bảng 6, 7 và 8). Trong khi đó, trên môi trường MS ½ bổ sung BA 0,45 mg/L, Kin 0,6

mg/L, GA₃ 0,35 mg/L; hoạt tính GA₃ tăng ở tuần 2 sau đó tăng mạnh ở tuần 4 và 8 (Bảng 9). Hoạt tính ABA nội sinh hầu như không thay đổi sau 2 tuần nuôi cấy, tuy nhiên sau 4 hoặc 8 tuần nuôi cấy có sự tăng nhẹ (Bảng 6, 7 và 9). Riêng trên môi trường MS ½ bổ sung BA 0,45 mg/L, Kin 0,6 mg/L; hoạt tính ABA trong chồi hầu như không thay đổi (Bảng 8).

Bảng 6. Hoạt tính các chất điều hòa tăng trưởng thực vật nội sinh trong chồi Sa Kê qua các tuần nuôi cấy trên môi trường MS ½ bổ sung BA 10 mg/L

Hoạt tính (mg/L)	Tuần 0	Tuần 2	Tuần 4	Tuần 8
IAA	0,67 ± 0,07 ^a	0,83 ± 0,11 ^a	0,79 ± 0,19 ^a	0,63 ± 0,03 ^a
Zeatin	0,81 ± 0,12 ^d	2,63 ± 0,26^a	2,03 ± 0,11^b	1,37 ± 0,06^c
GA ₃	2,98 ± 0,18 ^b	6,04 ± 0,07^a	5,33 ± 0,42^a	3,63 ± 0,24 ^b
ABA	0,35 ± 0,05 ^{ab}	0,26 ± 0,07 ^b	0,50 ± 0,1^a	0,54 ± 0,03^a

Các số trong cùng một hàng mang các chữ khác nhau thì khác biệt có ý nghĩa ở p=0,05

Bảng 7. Hoạt tính các chất điều hòa tăng trưởng thực vật nội sinh trong chồi Sa Kê qua các tuần nuôi cấy trên môi trường MS ½ bổ sung BA 12 mg/L

Hoạt tính (mg/L)	Tuần 0	Tuần 2	Tuần 4	Tuần 8
IAA	0,67 ± 0,07 ^c	1,16 ± 0,09^b	1,63 ± 0,04^a	0,35 ± 0,08^d
Zeatin	0,81 ± 0,12 ^c	1,56 ± 0,13^b	2,14 ± 0,04^a	1,72 ± 0,11^b
GA ₃	2,98 ± 0,18 ^c	4,58 ± 0,25^b	5,46 ± 0,2^a	3,19 ± 0,09^b
ABA	0,35 ± 0,05 ^c	0,72 ± 0,06 ^b	1,26 ± 0,04^a	1,17 ± 0,1^a

Các số trong cùng một hàng mang các chữ khác nhau thì khác biệt có ý nghĩa ở p=0,05

Bảng 8. Hoạt tính các chất điều hòa tăng trưởng thực vật nội sinh trong chồi Sa Kê qua các tuần nuôi cấy trên môi trường MS ½ bổ sung BA 0,45 mg/L, Kin 0,6 mg/L

Hoạt tính (mg/L)	Tuần 0	Tuần 2	Tuần 4	Tuần 8
IAA	0,67 ± 0,07 ^a	0,59 ± 0,08 ^a	0,53 ± 0,08 ^a	0,49 ± 0,02 ^a
Zeatin	0,81 ± 0,12 ^c	1,44 ± 0,07^b	2,05 ± 0,21^a	1,74 ± 0,15^{ab}
GA ₃	2,98 ± 0,18 ^c	5,35 ± 0,33^a	4,70 ± 0,23^a	3,96 ± 0,06 ^b
ABA	0,35 ± 0,05 ^a	0,33 ± 0,04 ^a	0,36 ± 0,05 ^a	0,51 ± 0,08 ^a

Các số trong cùng một hàng mang các chữ khác nhau thì khác biệt có ý nghĩa ở p=0,05

Bảng 9. Hoạt tính các chất điều hòa tăng trưởng thực vật nội sinh trong chồi Sa Kê qua các tuần nuôi cấy trên môi trường MS ½ bổ sung BA 0,45 mg/L, Kín 0,6 mg/L, GA₃ 0,35 mg/L

Hoạt tính (mg/L)	Tuần 0	Tuần 2	Tuần 4	Tuần 8
IAA	0,67 ± 0,07 ^a	0,64 ± 0,08 ^a	0,67 ± 0,09 ^a	0,81 ± 0,05 ^a
Zeatin	0,81 ± 0,12 ^c	1,59 ± 0,15^b	2,36 ± 0,17^a	1,66 ± 0,18^b
GA ₃	2,98 ± 0,18 ^c	5,18 ± 0,37^b	7,67 ± 0,16^a	8,00 ± 0,39^a
ABA	0,35 ± 0,05 ^b	0,43 ± 0,06 ^b	0,39 ± 0,06 ^b	0,63 ± 0,03^a

Các số trong cùng một hàng mang các chữ khác nhau thì khác biệt có ý nghĩa ở $p=0,05$

Thảo luận

Than hoạt tính được bổ sung vào môi trường nuôi cấy có vai trò làm giảm sự tiết phenol của chồi, tuy nhiên, nó còn làm giảm sự hấp thu dinh dưỡng dẫn đến chồi chậm phát triển. Hơn nữa, sự nuôi cấy trực tiếp trên môi trường bổ sung BA nồng độ cao, các chồi thường tạo mô sẹo ngay trên các vết cắt làm ảnh hưởng đến sự phát triển của chồi. Chính vì vậy, trong 3 thí nghiệm chúng tôi khảo sát thì ở thí nghiệm 1 tỉ lệ phát triển cũng như chất lượng của chồi thấp nhất.

Các hợp chất phenol hiện diện ở môi trường nuôi cấy *in vitro* thường làm mẫu hóa nâu và hoại tử dẫn đến cản sự phát triển của mẫu cấy. Sự sinh tổng hợp phenol ở thực vật được cho là có liên quan đến BA, nồng độ BA càng cao thì lượng phenol tổng hợp được càng nhiều và ngược lại [7]. Chính vì thế, ở thí nghiệm 2 khi các chồi được nuôi trên môi trường BA 1 mg/L sau đó chuyển sang nuôi trên các môi trường bổ sung BA cao hơn (7,5 mg/L, 10 mg/L và 12 mg/L) đã làm giảm được hiện tượng này. Ngoài ra, ở thí nghiệm 3, việc giảm nồng độ BA cộng với sự kết hợp của Kín và GA₃ cũng tránh được sự tiết phenol và tạo mô sẹo từ chồi. Ở một số loài thân gỗ, trong nuôi cấy *in vitro*, để kích thích được chồi phát triển cần phải có cytokinin ở nồng độ khá cao. Do vậy, trong thí nghiệm 2, trên môi trường bổ sung BA 7,5 mg/L tỉ lệ phát triển của chồi là thấp nhất so với các nghiệm thức còn lại.

Các bước phát triển trong cơ thể thực vật là kết quả của hàng loạt phản ứng biến dưỡng. Các hoạt động biến dưỡng này chịu sự chi phối của

các chất điều hòa tăng trưởng thực vật được sinh ra trong quá trình đó [5]. Trong sự phát triển của chồi Sa Kê ở thí nghiệm 2 và 3, hoạt tính Zeatin và GA₃ nội sinh hầu như đều bắt đầu gia tăng ở tuần thứ 2, sau đó tăng mạnh ở tuần thứ 4. GA₃ có vai trò trong sự tăng trưởng của lá [1]; cytokinin thúc đẩy sự trưởng thành của diệp lục và là nhân tố chính điều khiển quá trình tái sinh mạch [5]. Ở tuần thứ 8, khi các chồi phát triển ổn định, lá trưởng thành có kích thước lớn hơn; hoạt động thúc đẩy sự trưởng thành diệp lục không còn mạnh mẽ như các tuần đầu, do đó cytokinin cũng như GA₃ nội sinh cũng giảm dần. Điều này cũng cho thấy rõ sự tương quan với cường độ hô hấp của chồi sau 8 tuần nuôi cấy. Nồng độ auxin cao có tác động hình thành mô sẹo. Do vậy, sự gia tăng hoạt tính IAA nội sinh trong tuần 2 và 4 cộng với nồng độ cao của BA (trên môi trường bổ sung BA 12 mg/L ở thí nghiệm 2) làm cho mô sẹo hình thành tại các vết cắt trên chồi. Qua thực nghiệm cho thấy các tế bào mô sẹo xốp, có đời sống ngắn sau đó hóa nâu đen làm ảnh hưởng xấu đến sự phát triển của chồi. Khi phối hợp ABA và BA trong môi trường nuôi cấy khúc cắt chồi cây cam vàng *Citrus sinensis* (L.) sẽ làm tăng sự hấp thu đường của mô cấy. Đặc biệt ABA còn thúc đẩy sự tích lũy đường bên trong chồi giúp chồi phát triển mạnh [3]. Vì vậy, sự tăng nhẹ hoạt tính ABA ở tuần thứ 4 hoặc thứ 8 ở hầu hết các môi trường nuôi cấy phần nào giúp mô cấy tăng hấp thu đường từ đó cung cấp nguồn carbon cho sự phát triển của chồi.

Ngoài sự kéo dài tế bào, kéo dài lông, GA₃ còn có tác động kích thích sự tăng trưởng chồi và gỡ sự ngủ của chồi [1]. Do đó, việc bổ sung GA₃ 0,35 mg/L vào môi trường nuôi cấy đã kích thích sự phát triển các chồi bên trên mẫu cây; điều này cũng phù hợp với nghiên cứu của Murch năm 2008, khi bổ sung GA 1 μ M vào môi trường nuôi cấy đã làm tăng hệ số nhân giống của chồi Sa Kê [8]. Sự gia tăng hoạt tính GA₃ nội sinh và cường độ hô hấp ở tuần 8 trong trường hợp này là cần thiết cho việc cung cấp năng lượng cho sự phát triển cũng như kéo dài các chồi bên ở giai đoạn sau này.

KẾT LUẬN

Sự bổ sung than hoạt tính 1 g/L với mục đích làm giảm sự tiết phenol của mẫu cây trong môi

trường nhưng nó làm chậm sự phát triển của chồi. Các chồi được nuôi trên môi trường MS ½ bổ sung BA 1 mg/L, sau 10 ngày chuyển sang môi trường bổ sung BA cao hơn (7,5 mg/L; 10 mg/L và 12 mg/L) đều phát triển sớm hơn. Tuy nhiên, trên môi trường bổ sung BA 10 mg/L cho tỉ lệ chồi phát triển cao nhất, chồi phát triển khỏe, không có sự tiết phenol hay tạo mô sẹo trên chồi.

Sự kết hợp BA 0,45 mg/L, Kin 0,6 mg/L và GA₃ 0,35 mg/L, cũng làm chồi phát triển sớm và giảm được sự tiết phenol hoặc tạo mô sẹo; tuy nhiên tỉ lệ chồi phát triển thấp hơn so với trường hợp bổ sung BA 10 mg/L. Sự bổ sung GA₃ vào môi trường đã kích thích sự phát triển các chồi bên của mẫu cây, góp phần làm tăng hệ số nhân giống.

Effect of plant hormones on the *in vitro* culture of breadfruit shoots (*Artocarpus altilis* (Park.) Fosberg)

- Ha Thi Tuyen Suong
- Vo Thi Bach Mai

University of Science, VNU – HCM

ABSTRACT

Under the influence of plant hormones, after 8 weeks of in vitro culture, the growth of breadfruit shoot (Artocarpus altilis (Park.) Fosberg) was very different. With shoots that were cultured on 1 mg/L BA medium after 10 days of being transferred to ½ MS supplemented with 10 mg/L BA medium, the percentage of shoot development was the highest (86.8 %), and the secretion of phenolic compounds or forming callus were not observed. On the ½ MS supplemented with 12 mg/L BA medium, shoots grew strongly and healthily but the secretion of phenolic compounds and the forming of callus

affected the ability of the shoot development. On the ½ MS supplemented with 0.45 mg/L BA, 0.6 mg/L Kinetin (Kin) medium and on the ½ MS supplemented with 0.45 mg/L BA, 0.6 mg/L Kin, 0.35 mg/L GA₃ medium, the percentage of shoot developed were lower than those on the ½ MS supplemented with 10 mg/L medium. The addition of 0.35 mg/L GA₃ in the culture medium help to appear the lateral more than the remaining experiments. Roles of respiration rate and endogenous hormones were discussed to understand the physiological changes in the in vitro culture shoots breadfruit.

Key words: *Artocarpus altilis* (Park.) Fosberg, in vitro culture, plant hormones

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. B.T. Việt, Sinh lý thực vật đại cương, phần II: Phát triển, Nhà xuất bản Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh (2000).
- [2]. FAO, The International Treaty on Plant Genetic Resources for Food and Agriculture, Food and Agricultural Organization of the United Nations, Rome, Italy (2009).
- [3]. I. Giladi, A. Altman, R. Goren, Differential effects of sucrose, abscisic acid, and benzyl adenine on shoot growth and callus formation in the abscission zone of excised Citrus Buds, *Plant Physiol*, 59, 1161-1164 (1997).
- [4]. J.E. Duncan, J. Rouse-Miller, *In vitro* propagation of *Artocarpus altilis* (Park.) Fosberg (breadfruit) from mature plant material, *In vitro Cell Dev Biol Plant*, 36, 115-117 (2000).
- [5]. L. Tait, E. Zeiger, Plant physiology, 3th edition, Sinauer Associates (2002).
- [6]. N.D. Sanh, Thực tập chuyên ngành Sinh lý thực vật, Nhà xuất bản Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh (2013).
- [7]. S.N. Cynthia, *In vitro* propagation of Breadfruit [*Artocarpus altilis* (Parkinson) Fosberg] for germplasm conservation and exchange. Master of Science. University of Hawaii (2003).
- [8]. S.J. Murch, D. Ragone, W.L. Shi, A.P. Alan, P.K. Saxena, *In vitro* conservation and sustained production of breadfruit (*Artocarpus altilis*, Moraceae): modern technologies for a traditional tropical crop, *Naturwissenschaften*, 95, 99-107 (2008).
- [9]. U.B. Jagtap, V.A. Bapat, Artocarpus: A review of its traditional use, phytochemistry and pharmacology, *Journal of Ethnopharmacology*, 12, 9, 143-144 (2014).