

Bùi Thị Mỹ Hồng, Trần Minh Trí và Nguyễn Minh Châu, 2003. Ảnh hưởng của boron và Gibberellin đến sự đậu quả, năng suất và phẩm chất nhân Tiêu da

bò. Báo cáo khoa học hằng năm. Viện nghiên cứu Cây ăn quả miền Nam.

## Effect of fruit pruning, gibberellic acid GA<sub>3</sub> and root fertilization on yield and fruit quality of hybrid longan variety LĐ11

Phan Chi Hieu

### Abstract

Longan variety LĐ11 is a hybrid between two species *Dimocarpus longan* and *Euphoria longana*. Experiments on the effect of pruning small and twin fruits in combination with spraying GA<sub>3</sub> and root fertilization in Tien Giang province showed that: fruit pruning to keep 25 fruits/inflorescence for getting large, even fruits with fruit diameter reaching 25.5 mm, weight of 13.9 g/fruit. Spraying GA<sub>3</sub> with a concentration of 40 ppm combined with intensive fertilizer application of 630 g N - 315 g P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> - 630 g K<sub>2</sub>O (g/plant/crop) + 20 kg of organic fertilizer had the best results, the yield reached 27.70 - 28.04 kg/tree; fruit pulp thickness of 6.58 mm; brix degree of 21.50 - 22.40%, percentage of fruit pulp 72.42 - 72.74%; the total number of flowers/cluster reached 861.14 flowers; the number of female and hermaphrodite flowers reached 456.32; the number of pods/bunch after fruit setting was 66.35 - 83.74; the total number of harvested fruits/bunch was 27.15 - 27.36; the fruit weight was 12.30 - 12.33 g/fruit.

**Keywords:** Longan variety LĐ11, GA<sub>3</sub>-containing preparations, fruit pruning

Ngày nhận bài: 08/01/2023

Người phản biện: TS. Bùi Quang Đăng

Ngày phản biện: 03/02/2023

Ngày duyệt đăng: 28/02/2023

## ẢNH HƯỞNG CỦA CÁC CHẤT KÍCH THÍCH SINH TRƯỞNG THỰC VẬT LÊN QUÁ TRÌNH HÌNH THÀNH CHỖI *IN VITRO* CÂY BÍ KỲ NAM (*Hydnophytum formicarum* Jack) Ở PHÚ QUỐC

Nguyễn Thị Thu Hậu<sup>1</sup>, Đinh Văn Khiêm<sup>2</sup>, Nguyễn Nhật Linh<sup>1</sup>

### TÓM TẮT

Bí kỳ nam (*Hydnophytum formicarum* Jack) là loài thực vật nằm trong danh mục bảo tồn gen thuộc nhóm nguy cấp (EN). Hạt bí kỳ nam trong tự nhiên có tỷ lệ nảy mầm thấp, cây giống chỉ được tìm thấy do sự nảy mầm từ hạt khi cây mẹ ra hoa, tạo quả và phát tán trong rừng. Nghiên cứu quá trình hình thành chồi *in vitro* nhằm cung cấp nguyên liệu cho quá trình nhân giống cây bí kỳ nam bằng phương pháp nuôi cấy mô. Kết quả nghiên cứu cho thấy, sử dụng calcium hypochlorite 10% để khử trùng mẫu trong thời gian 10 phút có tỷ lệ mẫu vô trùng là 96,67% và tỷ lệ mẫu vô trùng có khả năng tái sinh là 93,33%. Môi trường ½ MS bổ sung 30 g/L sucrose, 7,5 g/L agar và 0,5 mg/L thidiazuron (TDZ), sau 6 tuần nuôi cấy, cho tỷ lệ tạo mô sẹo 100%, mô sẹo xốp, có màu xanh cốm. Chồi *in vitro* bí kỳ nam được tái sinh trên môi trường ½ MS có bổ sung 2,5 mg/L BA và 0,3 mg/mL NAA cho tỷ lệ đạt 46,67% mô sẹo tạo chồi, số chồi/mẫu là 12, chiều cao chồi đạt trung bình 2,27 cm, chồi mang từ 2 - 6 lá, lá mở rộng, màu xanh đậm thích hợp để tái sinh cây hoàn chỉnh.

**Từ khóa:** Bí kỳ nam, chất kích thích sinh trưởng, chồi, *in vitro*

<sup>1</sup> Trường Đại học Kiên Giang

<sup>2</sup> Viện nghiên cứu Khoa học Tây Nguyên

\* Tác giả liên hệ, email: ntthau@vnkgu.edu.vn

## I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Vườn Quốc gia Phú Quốc thuộc huyện đảo Phú Quốc, tỉnh Kiên Giang có hệ thực vật và động vật phong phú và đa dạng được công nhận là một trong những trung tâm đa dạng sinh học của Việt Nam. Vườn Quốc gia Phú Quốc có nhiều loài có giá trị, quý hiếm về nguồn gen, trong đó có 11 loài trong danh mục cần được bảo tồn. Theo Sách Đỏ Việt Nam (2007), Bí kỳ nam (*Hydnophytum formicarum*) là một trong số 3 loài thực vật thuộc Vườn Quốc gia Phú Quốc đang có nguy cơ tuyệt chủng và xếp ở thứ hạng nguy cấp (EN) (Hoàng Văn Sâm và cs., 2017; Đặng Ngọc Thanh et al., 2007).

Cây Bí kỳ nam (*Hydnophytum formicarum* Jack.) thuộc họ cà phê (Rubiaceae), bộ long đởm (Gentianales), là loài vừa sống phụ sinh với thân cây chủ (cây gỗ lớn) vừa sống cộng sinh với kiến (Đặng Ngọc Thanh và cs., 2007). Thân phình to thành củ, mặt ngoài sần sùi, màu nâu xám, bên trong có những lỗ hổng chằng chịt là nơi sống của kiến, đây là hình thức sống cộng sinh giữa thực vật và côn trùng (rất hiếm gặp trong tự nhiên).

Bí kỳ nam chứa nhiều chất có hoạt tính sinh học quý như: flavonoid, phenolic, aldehyde, ketone, terpenoid, tannin, amino axit (Trac et al., 2019),... có tác dụng tốt đối với hệ tim mạch, kháng viêm, giúp giảm sự phát ban ở da (Lê Bích Tuyền cs., 2020), có hoạt tính gây độc tế bào ung thư (Abdullah et al., 2010), kháng oxy hóa, kháng khuẩn đồng thời có tác dụng tốt trong điều trị bệnh tiểu đường (Rachpirom et al., 2021).

Theo y học cổ truyền, Bí kỳ nam được sử dụng để chữa viêm gan, vàng da, đau nhức gân xương, bong gân, thấp khớp, đau bụng, tiêu chảy,... bằng cách sắc hoặc nấu cao uống. Một số nghiên cứu bước đầu cho thấy loài cây này có các thành phần polyphenol, có tác dụng chống oxy hóa *in vitro*, kháng khuẩn, ức chế  $\alpha$ -glucosidase, ức chế sự tăng trưởng của tế bào u xơ HT1080, tế bào ung thư cổ tử cung Hela và bảo vệ tế bào thần kinh (Trac et al., 2019).

Do cây Bí kỳ nam chứa nhiều chất có hoạt tính sinh học quý, đồng thời thân củ với hình dáng đặc biệt có thể làm cây cảnh, nên nhu cầu sử dụng về cây lớn và bị khai thác quá mức, khiến cây đang lâm vào tình trạng có nguy cơ tuyệt chủng và được liệt kê vào sách Đỏ Việt Nam (Đỗ Huy Bích và cs., 2006). Trong tự nhiên, cây Bí kỳ nam thường tái sinh tự nhiên từ hạt, tuy nhiên loài này ít ra hoa,

hạt rất nhỏ và sống trên cây chủ ở trên cao rất khó cho việc thu hái hạt. Nghiên cứu nhân giống cây Bí kỳ nam *in vitro* phục vụ cho công tác bảo tồn nguồn gen cũng như cung cấp cây giống cho các vườn được liệu là cần thiết. Tuy nhiên, Bí kỳ nam là một loài cây có đặc tính bảo lưu di truyền mạnh nên hiện nay trên thế giới vẫn chưa có một quy trình nhân giống *in vitro* hoàn chỉnh về loài cây này. Mô sẹo (callus) là nguyên liệu quan trọng để tái sinh cây hoàn chỉnh, chất điều hòa sinh trưởng thực vật lại quyết định khả năng hình thành mô sẹo. Nghiên cứu này thực hiện khảo sát môi trường, điều kiện khử trùng, chất kích thích sinh trưởng ảnh hưởng đến quá trình hình thành mô sẹo Bí kỳ nam nhằm cung cấp nguyên liệu cho quá trình nhân giống *in vitro* loài cây này.

## II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Vật liệu nghiên cứu

Mẫu nghiên cứu: Cặp lá non thứ 2 - 3 cây Bí kỳ nam (*Hydnophytum formicarum* Jack.) thu hái tại Vườn Quốc gia Phú Quốc, tỉnh Kiên Giang. Mẫu được Bộ môn Khoa học cây trồng, trường Đại học Kiên Giang định danh dựa vào đặc điểm hình thái theo Phạm Hoàng Hộ (1999).

Hóa chất: Calcium hypochlorite, Thidiazuron (TDZ) và Naphthalene acetic acid (NAA), Benzylaminopurine (BA) môi trường nuôi cấy là môi trường MS (Murashige and Skoog, 1962), đường sucrose và agar (Việt Nam).

### 2.2. Phương pháp nghiên cứu

#### 2.2.1. Phương pháp khử trùng mẫu

Phương pháp thu mẫu thực hiện theo Lê Hồng Giang và Nguyễn Bảo Toàn (2010), có hiệu chỉnh.

Thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên với 3 lần lặp lại, mỗi nghiệm thức là 1 mốc thời gian. Thu lá non (cặp lá thứ 2 - 3) của cây Bí kỳ nam Phú Quốc (Hình 1) thu tại vị trí GPS (Vĩ độ: 44°32'58"E; Kinh độ: 114°26'61"N). Cắt lấy cành Bí kỳ nam, cắt lá ra khỏi cành, loại bỏ lá xấu, sâu bệnh và hư hại. Mẫu lá Bí kỳ nam được đặt vào hộp nhựa có lót bông ẩm và đặt vào thùng xốp chứa đá khô đảm bảo nhiệt độ trong thùng xốp đạt  $15 \pm 3^{\circ}\text{C}$ , mẫu được vận chuyển từ Vườn Quốc gia Phú Quốc về Trường Đại học Kiên Giang trong vòng 12h (sau khi thu hái) để tiến hành khử trùng mẫu.

Mẫu được làm sạch sơ bộ bên ngoài bằng nước máy, sau đó ngâm mẫu bằng nước rửa chén pha với nước máy tỷ lệ 1 : 3 trong thời gian 15 phút, rửa lại bằng nước sạch rồi tiến hành vô trùng trong tủ cấy. Mẫu cấy được khử trùng bằng dung dịch calcium hypochlorite (Merck) nồng độ 10% với các mức thời gian: 0; 4; 6; 8; 10 phút, tiếp tục rửa lại bằng

nước cất vô trùng 3 lần. Cắt lá thành từng mảnh có kích thước 1 × 1 cm, cấy mỗi mẫu vào một chai thủy tinh 100 mL chứa 40 mL môi trường, lặp lại 3 lần, mỗi lần cấy 30 mẫu (30 chai). Tiếp đó cấy trên môi trường ½ MS có bổ sung 30 g/L sucrose, 7,5 g/L agar, pH 5,8 ± 0,02. Sau 21 ngày nuôi cấy các mẫu được lấy số liệu để tính và xử lý thống kê.



Hình 1. Mẫu lá cây Bí kỳ nam thu ở Vườn Quốc gia Phú Quốc

Chỉ tiêu theo dõi: Tỷ lệ mẫu vô trùng (%); tỷ lệ mẫu vô trùng và có khả năng tạo mô sẹo (%).

### 2.2.2. Phương pháp khảo sát khả năng hình thành mô sẹo Bí kỳ nam

Phương pháp thu mẫu thực hiện theo Lê Hồng Giang và Nguyễn Bảo Toàn (2010) và Sari *et al.* (2016) có hiệu chỉnh.

Vật liệu: Sử dụng lá (0,5 × 0,5 cm) mẫu vô trùng *in vitro*. Thí nghiệm bao gồm 10 nghiệm thức được bố trí theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên. Mỗi nghiệm thức bao gồm 10 bình và được lặp lại 3 lần, mỗi bình gồm 3 mẫu lá vô trùng (0,5 × 0,5 cm). Thời gian thí nghiệm là 6 tuần.

Mẫu cấy Bí kỳ nam vô trùng, cắt lá có kích thước 5 × 5 mm, cấy vào môi trường khoáng ½ MS có bổ sung 30 g/L đường sucrose, 7,5 g/L agar và bổ sung α-Naphthaleneacetic acid (NAA) và Thidiazuron (TDZ) nồng độ thay đổi từ 0; 0,1; 0,3; 0,5; 1 mg/L, pH 5,8 ± 0,02. Theo dõi và đánh giá khả năng hình thành mô sẹo sau 6 tuần nuôi cấy.

Chỉ tiêu theo dõi: Tỷ lệ mẫu cấy hình thành mô sẹo (%) = (Tổng số mô sẹo hình thành/tổng số mẫu cấy) × 100.

### 2.2.3. Phương pháp tạo chồi Bí kỳ nam

Phương pháp tạo chồi *in vitro* thực hiện theo Lê Hồng Giang và Nguyễn Bảo Toàn (2010) và Sari *et al.* (2016) có hiệu chỉnh.

Vật liệu: Mô sẹo Bí kỳ nam có màu vàng chanh không quá xốp hoặc quá đặc, kích thước 0,5 × 0,5 cm (kết quả từ thí nghiệm 2).

Thí nghiệm bao gồm 11 nghiệm thức và 1 nghiệm thức đối chứng được bố trí theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên. Mỗi nghiệm thức bao gồm 10 bình, mỗi bình gồm 3 mẫu và được lặp lại 3 lần. Môi trường nuôi cấy là môi trường khoáng ½ MS có bổ sung 30 g/L đường sucrose, 7,5 g/L agar và bổ sung Benzylaminopurine (BA) nồng độ thay đổi từ 0; 0,1; 0,3; 0,5; 1; 1,5; 2; 2,5; 3; 3,5; 4; 4,5; 5 mg/L kết hợp với Naphthaleneacetic acid nồng độ thấp (0,1 và 0,3 mg/L), pH 5,8 ± 0,02. Theo dõi và đánh giá khả năng tạo chồi sau 6 tuần nuôi cấy.

Chỉ tiêu theo dõi: Tỷ lệ hình thành chồi (%) = (Tổng số mô sẹo tạo chồi/tổng số mô sẹo đem cấy) × 100.

### 2.2.4. Phương pháp xử lý số liệu

Kết quả thực nghiệm được nhập liệu bằng Microsoft Excel và phân tích bằng phần mềm Minitab 16 để phân tích phương sai, hệ số biến động (CV) và so sánh trung bình các nghiệm thức bằng kiểm định phép thử Tukey.

## 2.3. Thời gian và địa điểm nghiên cứu

Thời gian nghiên cứu từ 13/9/2020 đến 15/12/2021.

Địa điểm nghiên cứu: Phòng nuôi cấy mô, Trường Đại học Kiên Giang và phòng Công nghệ thực vật, Viện Nghiên cứu Khoa học Tây Nguyên.

### III. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

#### 3.1. Kết quả khử trùng mẫu lá Bí kỳ nam

Sau 21 ngày nuôi cấy, tỷ lệ mẫu vô trùng (%), tỷ lệ mẫu vô trùng và có khả năng tái sinh (%) được thể hiện qua bảng 1 và hình 2.

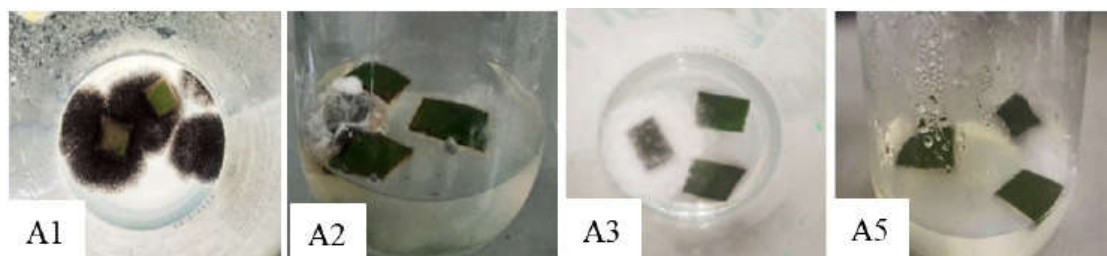
**Bảng 1.** Kết quả khử trùng mẫu từ mô lá non cây Bí kỳ nam ở các mốc thời gian khác nhau khi sử dụng calcium hypochlorite

Nghiệm thức	Thời gian (phút)	Tỷ lệ mẫu vô trùng (%)	Tỷ lệ mẫu có khả năng tái sinh (%)
A1	0	0 ± 0,00 <sup>c</sup>	0 ± 0,00 <sup>c</sup>
A2	4	10 ± 0,00 <sup>c</sup>	6,67 ± 5,77
A3	6	13,33 ± 5,77 <sup>c</sup>	10,00 ± 0,00
A4	8	80,00 ± 10,00 <sup>b</sup>	73,33 ± 11,55
A5	10	96,67 ± 5,77 <sup>a</sup>	93,33 ± 5,77
CV (%)		5,77	6,32

Ghi chú: Tỷ lệ mẫu vô trùng và tỷ lệ mẫu vô trùng có khả năng tái sinh được xử lý thống kê là kết quả của 3 lần lặp lại. Trong một cột, theo sau bởi một chữ cái khác nhau thì khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức 0,05% qua phép thử Tukey.

Qua kết quả bảng 1 cho thấy, khi sử dụng chất khử trùng là calcium hypochlorite ở nồng độ 10% với các mốc thời gian khác nhau ảnh hưởng đến tỷ lệ tạo mẫu vô trùng của mẫu cấy. Sử dụng mẫu cấy là mô lá non khử trùng ở mốc thời gian 10 phút cho kết quả khử trùng cao nhất với tỷ lệ mẫu vô trùng đạt 96,67% và tỷ lệ mẫu vô trùng có khả năng tái sinh là 93,33%. Kết quả này cao hơn nhiều so với nghiên cứu trước đây của Lê Hồng Giang

và Nguyễn Bảo Toàn (2010), khi khử trùng mẫu bằng dung dịch khử trùng sodium hypochloride và HgCl<sub>2</sub> 0,5‰ (tỷ lệ khử trùng đạt 75%). Đồng thời chất khử trùng là calcium hypochlorite là chất ít độc, ít gây đột biến gen hơn so với HgCl<sub>2</sub>, thêm vào đó các mẫu vô trùng ở nghiệm thức A5 cũng có màu sắc xanh lá cây đậm đáp ứng sử dụng làm nguyên liệu tái sinh mô sẹo ở thí nghiệm tiếp theo (Hình 2).



**Hình 2.** Ảnh hưởng của calcium hypochlorite 10% ở các mốc thời gian khác nhau đến khả năng khử trùng mẫu Bí kỳ nam

Qua kết quả bảng 1 cho thấy, cùng sử dụng chất khử trùng là calcium hypochlorite 10%, tỷ lệ mẫu vô trùng đã bắt đầu tăng lên từ 10% (ở mốc thời gian khử trùng là 4 phút) lên 96,67% (khi tăng thời gian khử trùng lên 10 phút). Ở mốc thời gian khử trùng 10 phút, mẫu chết với tỷ lệ là 3,33% điều này có thể do thời gian khử trùng mẫu đủ dài, chất khử trùng tác động làm chết tế bào. Vì thế, thời gian khử trùng 10 phút được lựa chọn để tạo mẫu Bí kỳ nam vô trùng cho các nghiên cứu tiếp theo.

#### 3.2. Kết quả tạo mô sẹo Bí kỳ nam

Sau 42 ngày nuôi cấy, kết quả tái sinh mô sẹo Bí kỳ nam trên môi trường ½ MS có bổ sung chất kích thích sinh trưởng khác nhau (NAA và TDZ) ở nồng độ từ 0; 0,1; 0,3; 0,5; 1 mg/L được trình bày ở bảng 2 và hình 3.

Trên môi trường nuôi cấy và các nồng độ khác nhau, kết quả hình thành mô sẹo Bí kỳ nam không giống nhau. Thêm vào đó, ở nghiệm thức B<sub>4</sub>

(nghiệm thức có bổ sung 0,5 mg/L NAA) và nghiệm thức B<sub>8</sub> (nghiệm thức có bổ sung 0,5 mg/L TDZ) tỷ lệ mẫu sạch hình thành mô sẹo cao và đều bằng nhau là 100%, hình 3.

**Bảng 2.** Kết quả tạo mô sẹo Bí kỳ nam trên môi trường nuôi cấy bổ sung NAA/TDZ

Nghiệm thức	Chất KTST	Nồng độ (mg/L)	Tỷ lệ mẫu hình thành mô sẹo (%)	Ghi chú
ĐC	-	-	-	-
B2	NAA	0,1	60,00 ± 10,00 <sup>e</sup>	Mô sẹo màu vàng chanh
B3		0,3	76,67 ± 5,77 <sup>cd</sup>	Mô sẹo màu vàng chanh
B4		0,5	100,00 ± 0,00 <sup>a</sup>	Mô sẹo màu vàng chanh
B5		1	86,67 ± 5,77 <sup>abc</sup>	Mô sẹo màu vàng chanh
B6	TDZ	0,1	66,67 ± 5,77 <sup>de</sup>	Mô sẹo màu vàng chanh
B7		0,3	83,33 ± 5,77 <sup>bc</sup>	Tốt, màu xanh
B8		0,5	100,00 ± 0,00 <sup>a</sup>	Mô sẹo màu vàng chanh
B9		1	93,33 ± 5,77 <sup>ab</sup>	Mô sẹo màu vàng chanh
CV (%)			5,44	

Ghi chú: Tỷ lệ mẫu hình thành mô sẹo được xử lý thống kê là kết quả của 3 lần lặp lại. Trong một cột, theo sau bởi một chữ cái khác nhau thì khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức 0,05% qua phép thử Tukey.



**Hình 3.** Mô sẹo Bí kỳ nam sau 42 ngày nuôi cấy trên các môi trường khác nhau

Kết quả từ bảng 2 và hình 3 cho thấy, ở môi trường ĐC (không bổ sung chất kích thích sinh trưởng) các mẫu cấy không hình thành mô sẹo. Trên môi trường có bổ sung chất kích thích sinh trưởng NAA hoặc TDZ ở nồng độ 0,1 mg/L thì sự hình thành mô sẹo đạt 60 và 66,67%. Nồng độ chất kích thích sinh trưởng tăng lên 0,1 - 0,5 mg/L thì tỷ lệ hình thành mô sẹo cũng tăng và đạt 100% các mẫu cấy tạo mô sẹo trên môi trường nuôi cấy có bổ sung 0,5 mg/L chất kích thích sinh trưởng. Tuy nhiên, khi nồng độ NAA và TDZ tăng lên 1 mg/L thì tỷ lệ hình thành mô sẹo giảm xuống và có hiện tượng chết mẫu.

Theo kết quả nghiên cứu của Lê Hồng Giang và Nguyễn Bảo Toàn (2010), môi trường MS chỉ bổ sung 0,5 mg/L NAA hoặc kết hợp với 2 mg/L BA cho kết quả hình thành mô sẹo Bí kỳ nam là 75%, mô sẹo có dạng mềm, rời và khi tăng nồng độ NAA lên 2 mg/L thì mô sẹo có hiện tượng tạo rỗ. Qua kết

quả thí nghiệm cho thấy, mô sẹo Bí kỳ nam nhạy với chất kích thích sinh trưởng thực vật, cụ thể NAA và TDZ khi sử dụng với nồng độ thấp đã cho kết quả hình thành mô sẹo cao (ở nồng độ NAA 0,1 mg/L cho tỷ lệ hình thành mô sẹo là 60%). Khi tăng nồng độ chất kích thích sinh trưởng (NAA hoặc TDZ) lên 1 mg/L thì đã xuất hiện mô sẹo chết. Tỷ lệ hình thành mô sẹo cao nhất và chất lượng mô sẹo tốt nhất khi sử dụng TDZ nồng độ 0,5 mg/L.

Chất điều hòa sinh trưởng thực vật NAA và TDZ đều ảnh hưởng rõ rệt lên quá trình hình thành mô sẹo Bí kỳ nam và có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê. Cả NAA và TDZ đều cho kết quả mẫu vô trùng cây Bí kỳ nam tái sinh mô sẹo. Tuy nhiên, trên môi trường có bổ sung NAA ngoài sự hình thành mô sẹo thì mẫu cấy có hình thành rễ, mô sẹo có màu vàng chanh, chất lượng mô sẹo đặc hơn khi sử dụng TDZ. Mô sẹo hình thành trên môi trường bổ sung TDZ có màu xanh, xốp, không tạo rỗ.

### 3.2. Kết quả tạo chồi *in vitro* Bí kỳ nam

Tỷ lệ chất kích thích sinh trưởng ảnh hưởng đến quá trình phát sinh hình thái của thực vật trong quá trình nuôi cấy mô. Quá trình phát sinh chồi trong nuôi cấy mô tế bào thực vật thường thành công trên môi trường có bổ sung chất kích

thích sinh trưởng của hai nhóm chất là cytokinin (BA)/auxin (NAA) với tỷ lệ lớn hơn 1.

Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của môi trường ½ MS bổ sung BA (nồng độ từ 0 - 5 mg/L) kết hợp với NAA (nồng độ 0,1 và 0,3 mg/L) đến sự hình thành chồi từ mô sẹo Bí kỳ nam thể hiện qua bảng 3.

**Bảng 3.** Ảnh hưởng của BA kết hợp với NAA đến khả năng tái sinh chồi từ mô sẹo Bí kỳ nam

Nghiệm thức	KTST		Tỷ lệ mô sẹo tạo chồi (%)	Số chồi/mẫu	Chiều cao chồi (cm)
	BA (mg/L)	NAA (mg/L)			
C1	0	0	0 <sup>e</sup>	0 <sup>e</sup>	0 <sup>e</sup>
C2	0,3	0,1	3,3 <sup>e</sup>	2,67 <sup>de</sup>	0,83 <sup>bc</sup>
C3	0,5	0,1	16,67 <sup>de</sup>	4,33 <sup>de</sup>	1,37 <sup>ab</sup>
C4	1	0,1	30,00 <sup>bc</sup>	5,33 <sup>cd</sup>	1,43 <sup>ab</sup>
C5	1,5	0,1	36,67 <sup>ab</sup>	7,67 <sup>bc</sup>	1,50 <sup>ab</sup>
C6	2	0,3	40,00 <sup>ab</sup>	8 <sup>bc</sup>	1,57 <sup>ab</sup>
C7	2,5	0,3	46,67 <sup>a</sup>	12 <sup>a</sup>	2,27 <sup>a</sup>
C8	3	0,3	43,33 <sup>ab</sup>	10,33 <sup>ab</sup>	1,73 <sup>ab</sup>
C9	3,5	0,3	30,00 <sup>bc</sup>	6,33 <sup>cd</sup>	1,8 <sup>ab</sup>
C10	4	0,3	23,33 <sup>cd</sup>	5 <sup>cd</sup>	1,63 <sup>ab</sup>
C11	4,5	0,3	13,33 <sup>de</sup>	3,33 <sup>cd</sup>	1,6 <sup>ab</sup>
C12	5	0,3	6,67 <sup>de</sup>	1,67 <sup>d</sup>	1,07 <sup>b</sup>
F			**	**	**
CV (%)			7,3	5,6	3,5

Ghi chú: Tỷ lệ mô sẹo tạo chồi, số chồi/mẫu, chiều cao chồi (cm) được xử lý thống kê là kết quả của 3 lần lặp lại. Trong một cột, theo sau bởi một chữ cái khác nhau thì khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức 0,05% qua phép thử Tukey.

Kết quả thống kê từ bảng 3 cho thấy, tỷ lệ mô sẹo Bí kỳ nam tạo chồi tăng lên từ 3,3% đến 46,67% khi nồng độ BA tăng từ 0,3 - 2,5 mg/mL và tỷ lệ tạo chồi bắt đầu giảm dần khi nồng độ BA tăng từ 2,5 mg/L lên 5 mg/mL. Kết quả nghiên cứu có tỷ lệ mô sẹo hình thành thấp hơn kết quả nghiên cứu trước đây của Lê Hồng Giang và Nguyễn Bảo Toàn (2010), khi ghi nhận tỷ lệ hình thành chồi là 54,1%. Tuy nhiên, kết quả nghiên cứu đã thành công khi tái sinh chồi khỏe mạnh đạt tiêu chuẩn để tái sinh rễ nhằm phát sinh cây hoàn chỉnh với số lá/chồi đạt 2 - 6 lá/chồi, số chồi/mẫu cấy đạt 12 chồi/mẫu, chiều cao chồi đạt trung bình 2,27 cm ở nghiệm thức bổ sung 2,5 mg/L BA kết hợp với 0,3 mg/L NAA bảng 3 và hình 4.

### IV. KẾT LUẬN

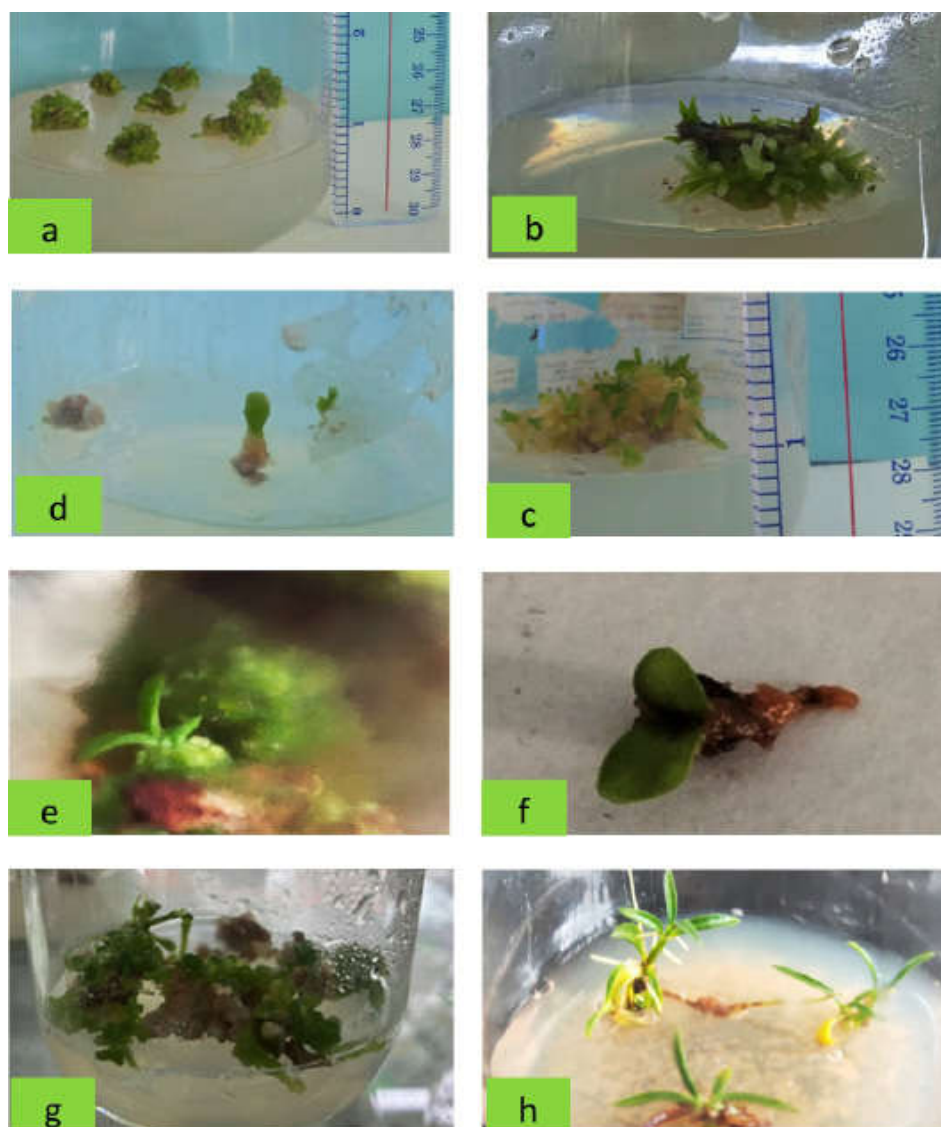
Khả năng tạo mẫu vô trùng có khả năng tái sinh ở mẫu cấy là mô lá non cây Bí kỳ nam đạt 93,33%

khi khử trùng mẫu bằng dung dịch calcium hypochlorite 10% trong thời gian 10 phút. Mô sẹo được hình thành tốt nhất trên môi trường ½ MS có bổ sung 30 g/L sucrose, 7,5 g/L agar, 0,5 mg/L TDZ (100% mẫu cấy hình thành mô sẹo).

Chồi tái sinh từ mô sẹo trên môi trường ½ MS có bổ sung 2,5 mg/L BA và 0,3 mg/L NAA cho tỷ lệ đạt 46,67%, số chồi/mẫu là 12, chiều cao chồi đạt trung bình 2,27 cm, chồi mang 2 - 6 lá, lá mở rộng, màu xanh đậm thích hợp để tái sinh cây hoàn chỉnh.

### LỜI CẢM ƠN

Chúng tôi xin chân thành cảm ơn phòng Công nghệ thực vật, Viện Nghiên cứu Khoa học Tây nguyên, Sở Khoa học và Công nghệ tỉnh Kiên Giang, Trường Đại học Kiên Giang, Ban quản lý Vườn Quốc gia Phú Quốc, tỉnh Kiên Giang đã hỗ trợ để chúng tôi hoàn thành nghiên cứu này.



**Hình 4.** Chồi *in vitro* Bí kỳ nam hình thành trên môi trường bổ sung 2,5 mg/L BA tại các mốc thời gian khác nhau  
 Ghi chú: a) mô sẹo sau 1 tuần nuôi cấy; b) chồi sau 3 tuần nuôi cấy; c) chồi sau 4 tuần nuôi cấy; d) chồi sau 5 tuần nuôi cấy; e) chồi sau 6 tuần nuôi cấy; f) chồi sau 7 tuần nuôi cấy; g) cụm chồi sau 7 tuần nuôi cấy; h) chồi sau 12 tuần nuôi cấy.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Đỗ Huy Bích, Đặng Quang Chung, Bùi Xuân Chương, Nguyễn Thương Dong, Đỗ Trung Đàm, Phạm Văn Hiến, Vũ Ngọc Lộ, Phạm Duy Mao, Phạm Kim Mãn, Đoàn Thị Nhu, Nguyễn Tập, Trần Hoàn, 2006. *Cây thuốc và động vật làm thuốc ở Việt Nam*. Tái bản lần thứ nhất. NXB Khoa học và Kỹ thuật, tập 1, tr. 201-202.
- Phạm Hoàng Hộ, 1999. *Cây Cỏ Việt Nam*. Tái bản lần 2. NXB trẻ, Tập 1, tr. 423-425.
- Lê Hồng Giang và Nguyễn Bảo Toàn, 2010. Tạo mô sẹo và tái sinh chồi từ mô lá non Bí kỳ nam (*Hydnophytum formicarum* Jack). *Tạp chí Khoa học Đại học Cần Thơ*, 16a: 216-222.
- Hoàng Văn Sâm, Trần Ngọc Hải, Hà Văn Long, Nguyễn Văn Trung, 2018. Đa Dạng Thực Vật Quý Hiếm Tại Vườn Quốc gia Phú Quốc, Tỉnh Kiên Giang. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ*, 4: 106-117.
- Đặng Ngọc Thanh, Trần Kiên, Đặng Huy Huỳnh, Nguyễn Cừ, Nguyễn Nhật Thi, Nguyễn Huy Yết Đặng Thị Đáp, 2007. *Sách Đỏ Việt Nam*. Tái bản lần thứ 3. NXB Khoa học Tự nhiên và Công nghệ, phần 2 (Thực vật), tr. 211-213.
- Lê Bích Tuyền, Huỳnh Kim Yến, Trương Thị Tú Trân,

- Nguyễn Thị Thu Hậu, Trần Hoàng Lâm, Nguyễn Thị Phường, Vũ Thị Yến, Vũ Thị Cẩm Tiên, 2020. Nghiên cứu chế biến trà túi lọc Bí kỳ nam (*Hydnophytum formicarum* Jack.) chứa hàm lượng polyphenol cao. *Tạp Chí Công Thương*, 5(3): 248-253.
- Abdullah, H., Pihie, A.H.L., Hohmann, J., & Molnár, J., 2010. A natural compound from *Hydnophytum formicarium* induces apoptosis of MCF-7 cells via up-regulation of Bax. *Cancer Cell International*, 10: 1-6. <https://doi.org/10.1186/1475-2867-10-14>.
- Murashige, T. and Skoog, F., 1962. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Plant Physiology*, 15: 473-497. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>.
- Paul, P., & Prakash, A. (2021). Recent trends in propagation of horticulture crops and application of Genomics tools in plant Breeding. *Taran Publication*, 03(6): 581-602.
- Rachpirom, M., Barrows, L.R., Thengyai, S., Ovatlarnporn, C., Sontimuang, C., Thiantongin, P., & Puttarak, P., 2021. Antidiabetic Activities of Medicinal Plants in Traditional Recipes and Candidate Antidiabetic Compounds from *Hydnophytum formicarum* Jack. Tubers. *Pharmacognosy Research*, 14(1): 89-99. <https://doi.org/10.5530/pres.14.1.13>.
- Sari, Y.P., Kustiawan, W., & Ruchaemi, A., 2016. Micropropagation of *Myrmecodia tuberosa* Jack.: A medicinal plant from Borneo. *International Journal of Science and Technology Research*, 5(09): 224-230.
- Trac, M.N.N., Dep, T., Anh, T.T.V.A., & Tuổi, D.T.H., 2019. Botanical, genetic characteristics and preliminary screening of the phytochemical constituents of *Hydnophytum formicarum* Jack. in Phu Quoc forest, Vietnam. *MedPharmRes*, 3(2): 8-14. <https://doi.org/10.32895/ump.mpr.3.2.2>.

## Effects of plant growth stimulators on *in vitro* shoot formation of *Hydnophytum formicarum* in Phu Quoc

Nguyen Thi Thu Hau, Dinh Van Khiem, Nguyen Nhut Linh

### Abstract

*Hydnophytum formicarum* Jack is a species of plant on the list of endangered genera (EN). *Hydnophytum formicarum* Jack seeds in nature have a low germination rate, seedlings are only found due to germination from seeds when the mother plant flowers, produces fruit and disperses in the forest. Research on the formation of *in vitro* shoots to provide raw materials for the propagation of male *H. formicarum* Jack by tissue culture method. The results showed that using 10% calcium hypochlorite for 10 minutes resulted in a sterile sample rate of 96.67% and a reproducible sterile sample rate of 93.33%. ½ MS medium supplemented with 30 g/L Sucrose, 7.5 g/L agar and 0.5 Thidiazuron, resulted in callus formation at the rate of 100% with friable and green tissue after 42 days of culture. The shoots of *H. formicarum* Jack were formed on ½ MS medium supplemented with 2.5 mg/L BA and 0.3 mg/L NAA with rate of 46.67%; the number of shoots/sample was 12; height of shoot was 2.27 cm with 2 - 6 leaves, the leaves were enlarged and dark green.

**Keywords:** *Hydnophytum formicarum*, growth stimulators, *in vitro* shoots

Ngày nhận bài: 20/12/2022

Ngày phản biện: 05/01/2023

Người phản biện: TS. Phạm Thị Lý Thu

Ngày duyệt đăng: 28/01/2023



# ẢNH HƯỞNG CỦA MỘT SỐ CHẤT ĐIỀU HÒA SINH TRƯỞNG VÀ THỜI GIAN HUẤN LUYỆN ĐẾN QUÁ TRÌNH NHÂN GIỐNG *IN VITRO* KEO LAI TẠI THANH HÓA

Phạm Hữu Hùng<sup>1</sup>, Lại Thị Thanh<sup>1</sup>, Nghiêm Thị Hương<sup>1</sup>

## TÓM TẮT

Nghiên cứu nhằm xác định môi trường thích hợp cho giai đoạn nhân nhanh, tạo cây hoàn chỉnh và thời gian huấn luyện tốt nhất cho 3 dòng Keo lai BV10, BV16, BV32. Các thí nghiệm đã sử dụng môi trường cơ bản MS bổ sung các chất kích thích sinh trưởng với các nồng độ khác nhau. Kết quả đã xác định môi trường thích hợp nhân nhanh chồi Keo lai BV10, BV16, BV32 là MS + 8 g/L agar + 30 g/L sucrose + 1,5 mg/L BAP đơn lẻ, bổ sung nồng độ TDZ hay NAA phù hợp là 0,2 mg/L. Môi trường ra rễ tốt nhất là ½ MS + 8 g/L agar + 30 g/L sucrose bổ sung 1,5 mg/L IBA đối với dòng Keo lai BV10 và BV32, bổ sung 1,0 mg/L IBA đối với dòng Keo lai BV16. Ngoài ra, có thể sử dụng môi trường ½ MS + 8 g/L agar + 30 g/L sucrose bổ sung 2 mg/L IAA cho cả 3 dòng. Kết quả nghiên cứu cũng xác định thời gian huấn luyện phù hợp là 14 ngày, với tỷ lệ sống đạt trên 85%.

**Keywords:** Keo lai dòng BV10, BV16, BV32, nuôi cấy mô, nhân giống *in vitro*

## I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Keo lai được tạo ra từ sự kết hợp giữa loài Keo tai tượng (*Acacia Mangium*) và Keo lá tràm (*Acacia Auriculiformis*). Từ những năm 2000, Lê Đình Khả và cs., đã tiến hành nghiên cứu về cải thiện dòng cây Keo lai đồng thời đưa vào khảo nghiệm một số dòng Keo lai có năng suất cao tại Ba Vì, được ký hiệu là BV, trong đó 3 dòng Keo lai BV10, BV16, BV32 có đặc điểm sinh trưởng nhanh, chất lượng tốt, thích nghi được trên nhiều điều kiện lập địa khác nhau đã được công nhận giống quốc gia và giống tiến bộ kỹ thuật. Các dòng này đã được xác định vừa là loài cây trồng chủ yếu vừa là cây chủ lực tại Thanh Hóa và nhiều địa phương khác nhằm phát huy vai trò phòng hộ của rừng và nhanh mang lại giá trị kinh tế cho người dân như cung cấp gỗ, nguyên liệu cho công nghiệp chế biến gỗ, sản xuất giấy, gỗ viên nén. Hiện nay trong công tác trồng rừng, tỉnh Thanh Hóa luôn ưu tiên và có chính sách khuyến khích các chủ rừng sử dụng giống cây có chất lượng, nguồn gốc rõ ràng, đặc biệt cây giống nuôi cấy mô.

Trong nhân giống bằng phương pháp nuôi cấy mô, Al-Wasel (2000) đã thử nghiệm Benzyl Adenine (BA) và N-phenyl-N<sup>0</sup> - (1,2,3-thiadiazol-5-yl) urea (TDZ) kết hợp với 1-Naphthalenacetic acid (NAA) để xác định khả năng nhân chồi của giống Keo (*Acacia seyal*), kết quả cho thấy, NAA không thể kích thích sự phát sinh chồi khi sử

dụng đơn lẻ và khi không bổ sung BA thì tạo ra rất ít chồi. Rout *et al.* (2008) thử nghiệm 20 cách kết hợp các chất điều tiết thực vật và phát hiện rằng công thức tốt nhất để kích thích sự tái sinh chồi và nhân chồi là BA 1,5 mg/L, indole-3-acetic acid (IAA) 0,05 mg/L với Adenine sulfate (AdS) 50 mg/L. Theo Dhabhai *et al.* (2010), chồi Keo có khả năng tái sinh trực tiếp trong môi trường MS chỉ bổ sung Kinetin 1,0 mg/L và không có khả năng phân hóa trong thời gian một tháng, nhưng khi bổ sung NAA 0,6 mg/L, chồi keo được nhân lên ngay lập tức. Một số nghiên cứu khác cũng cho thấy các chất điều tiết sinh trưởng thực vật đơn lẻ không gây ảnh hưởng lớn tới việc hình thành chồi. Tuy nhiên, khi tiến hành sử dụng kết hợp, hệ số tạo chồi tăng lên một cách đáng kể. Nghiên cứu của Abbas *et al.* (2010) cho thấy, khi sử dụng 2,0 mg/L BAP và 0,5 mg/L NAA, số lượng chồi và tỷ lệ tái sinh chồi cao nhất. Theo Đoàn Thị Mai và cs. (2009), do các loài cây rừng có đặc điểm di truyền khác nhau, một số loài có chu kỳ sống dài ngày, hệ gen phức tạp, phản ứng của kiểu gen với điều kiện môi trường khác nhau, vì thế trong nhân giống *in vitro* cần có sự điều chỉnh liều lượng, tỷ lệ các chất đa lượng và vi lượng trong thành phần môi trường MS cơ bản, được gọi là MS cải tiến. Vì vậy, ảnh hưởng của một số chất điều hòa sinh trưởng và thời gian huấn luyện đến quá trình nhân giống *in vitro* Keo lai dòng BV10, BV16 và BV32 trong điều kiện tại Thanh Hóa được nghiên cứu nhằm xác định môi

<sup>1</sup> Khoa Nông Lâm Ngư nghiệp, trường Đại học Hồng Đức

\*Tác giả liên hệ, email: phamhuuhung@hdu.edu.vn