Ảnh hưởng của sucrose và môi trường khoáng lên sự tạo mô sẹo và tái sinh chồi cây Ngà voi (*Sansevieria cylindrica* Bojer ex Hook)

Nguyễn Văn Long, Nguyễn Thị Dương, Nguyễn Xuân Dũng*
Trung tâm Công nghệ Sinh học Thành phố Hồ Chí Minh

TÓM TẮT

Trong một bài báo trước đây, chúng tôi đã báo cáo về nhân giống in vitro cây Ngà voi (Sansevieria cylindrica Bojer ex Hook) từ mô lá. Trong nỗ lực nâng cao hiệu quả nhân giống, bài báo này trình bày kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của sucrose và môi trường khoáng lên sự tái sinh chồi từ mô rễ và tăng trưởng của cây in vitro. Nghiên cứu sử dụng mô rễ in vitro làm nguồn vật liệu nuôi cấy. Các yếu tố ảnh hưởng đến sự tạo mô sẹo và tái sinh chồi (sucrose, môi trường khoáng) cũng đồng thời được khảo sát. Kết quả cho thấy, môi trường MS bổ sung 0.5 mg/L BA kết hợp 0.5 mg/L 2,4-D thích hợp cho sự tạo mô sẹo từ mô rễ in vitro. Môi trường MS và sucrose ở nồng độ 20 g/L giúp nâng cao khả năng tăng trưởng và tái sinh chồi của mô sẹo.

***Từ khóa**: mô rễ, mô sẹo, tái sinh chồi, sucrose*

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Ngà voi (*Sansevieria cylindrica* Bojer ex Hook) là một trong các loài có giá trị của họ *Agavaceace* [1]. Ở nhiều nước trên thế giới, đặc biệt là các nước châu Phi, cây Ngà voi có giá trị kinh tế rất cao [2]. Bên cạnh các tác dụng dược lý như làm tan huyết, trị đau nhức xương khớp, kháng viêm [3] và chống oxy hóa [4], loài cây này còn giá trị thẩm mỹ và khả năng thanh lọc không khí nên nhu cầu sử dụng ngày càng gia tăng. Cây Ngà voi có thể được sản xuất bằng các phương pháp truyền thống (tách bụi hay tách các đoạn rễ mang chồi), tuy nhiên hệ số nhân giống rất thấp [5]. Phương pháp nuôi cấy *in vitro* đã được áp dụng để nâng cao hệ số nhân giống cây Ngà voi trên thế giới thông qua hệ thống tái sinh chồi từ mô lá [1] hay mô sẹo có nguồn gốc từ mô lá [6], tuy nhiên hiện vẫn chưa được phổ biến ở Việt Nam. Quy trình nhân giống cây Ngà voi bằng phương pháp nuôi cấy *in vitro* lần đầu tiên được chúng tôi thực hiện thành công ở Việt Nam vào năm 2019 [7] và đã được áp dụng vào thực tế sản xuất. Với mục tiêu cải thiện hiệu quả nuôi cấy *in vitro* cây Ngà voi, nghiên cứu này được thực hiện để đa dạng hóa nguồn vật liệu cũng như xác định môi trường khoáng phù hợp cho nuôi cấy.

Tác giả liên hệ: TS. Nguyễn Xuân Dũng
Email: nxdung.snn@tphcm.gov.vn

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Vật liệu

Cây Ngà voi *in vitro* 8 tuần tuổi được nuôi cấy tại Phòng Công nghệ Sinh học Thực vật - Trung tâm Công nghệ Sinh học Thành phố Hồ Chí Minh.

2.2. Phương pháp

2.2.1. Khảo sát ảnh hưởng của BA và 2,4-D lên sự tạo mô sẹo từ rễ in vitro

Rễ từ cây Ngà voi *in vitro* được cô lập, cắt thành các đoạn có kích thước 1 cm và cấy vào môi trường MS bổ sung BA kết hợp với 2,4-D ở các nồng độ khác nhau thành 7 nghiệm thức. Trong đó, gồm 6 nghiệm thức có bổ sung 0.5 mg/L BA kết hợp 2,4-D ở các nồng độ 0.5; 1.0; 1.5; 2.0; 2.5; 3.0 mg/L và một nghiệm thức đối chứng không bổ sung chất điều hòa sinh trưởng thực vật. Các mẫu cấy được đặt nuôi trong điều kiện tối, nhiệt

độ 25 ± 2°C, ẩm độ 55 ± 5%. Thí nghiệm được bố trí theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên, một yếu tố, lặp lại 3 lần. Mỗi nghiệm thức bao gồm 3 bình nuôi cấy có chứa 9 đoạn rễ/bình. Theo dõi và ghi nhận tỷ lệ mẫu tạo mô sẹo (%) và đặc điểm mô sẹo theo thời gian nuôi cấy.

2.2.2. Khảo sát ảnh hưởng của sucrose lên khả năng tăng trưởng và tái sinh chồi của mô sẹo

Mô sẹo có đường kính 0.5 cm được cấy vào môi trường MS bổ sung 2.0 mg/L NAA, 0.5 mg/L BA và sucrose ở nồng độ 10; 20; 30 và 40 g/L thành 4 nghiệm thức. Các mẫu cấy được đặt nuôi trong điều kiện tối, nhiệt độ 25 ± 2°C, ẩm độ 55 ± 5%. Thí nghiệm được bố trí theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên, một yếu tố, lặp lại 3 lần. Mỗi nghiệm thức bao gồm 3 bình nuôi cấy có chứa 5 mẫu mô sẹo/bình. Theo dõi và ghi nhận tỷ lệ mẫu mô sẹo tăng sinh (%), trọng lượng tươi và đặc điểm mô sẹo theo thời gian nuôi cấy.

2.2.3. Khảo sát ảnh hưởng của môi trường khoáng lên sự tái sinh chồi từ mô sẹo

Mô sẹo có đường kính 0.5 cm và tăng trưởng bình thường trên môi trường tạo mô sẹo, được cấy vào các môi trường khoáng MS [8], MS 1/2 đa lượng, MS 1/4 đa lượng, Knudson C [9] và Gamborg B5 [10] bổ sung 2.0 mg/L BA kết hợp với 0.5 mg/L NAA thành 5 nghiệm thức. Các mẫu cấy được đặt nuôi trong điều kiện ánh sáng 2500 ± 500 lux, nhiệt độ 25 ± 2°C, ẩm độ 55 ± 5% và thời gian chiếu sáng 12 giờ/ngày. Thí nghiệm được bố trí theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên, một yếu tố, lặp lại 3 lần, Mỗi nghiệm thức bao gồm 3 bình nuôi cấy có chứa 5 mẫu mô sẹo/bình. Theo dõi và ghi nhận tỷ lệ mẫu mô sẹo tạo chồi (= [số mẫu có xuất hiện chồi/tổng số mẫu nuôi cấy] x 100), số chồi/mẫu và đặc điểm chồi theo thời gian.

2.2.4. Xử lý số liệu

Các số liệu thí nghiệm được xử lý thống kê bằng phần mềm Statgraphics Centurion v15.1, sử dụng trắc nghiệm đa biên độ Duncan với $p \leq 0.05$.

3. KẾT QuẢ

3.1. Ảnh hưởng của BA và 2,4-D lên sự tạo mô sẹo từ rễ *in vitro*

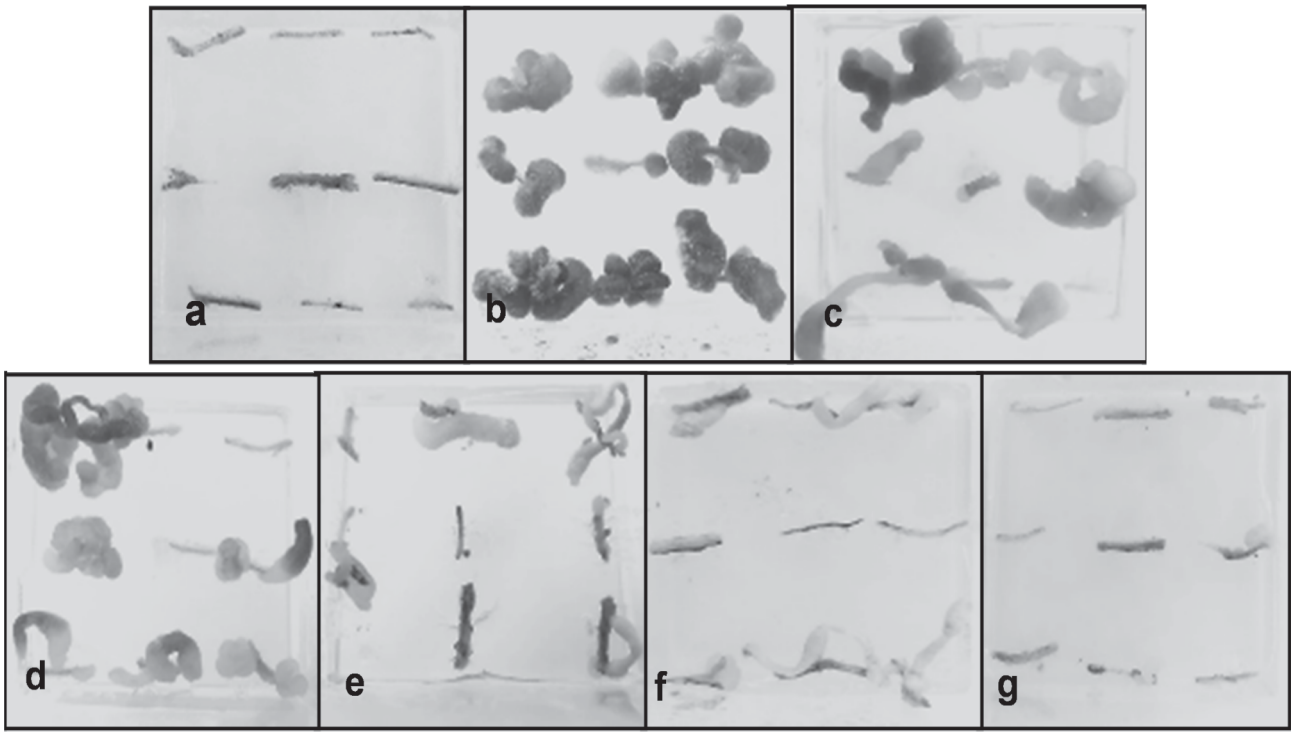
Sau 4 tuần nuôi cấy, mẫu rễ trên các môi trường MS bổ sung chất điều hòa sinh trưởng đều có sự tạo mô sẹo. Tỷ lệ tạo mô sẹo đạt mức cao nhất (100%) trên môi trường có bổ sung 0.5 mg/L BA kết hợp với 0.5 mg/L 2,4-D, sau đó giảm dần theo sự gia tăng nồng độ 2,4-D và đạt mức thấp nhất trên môi trường có bổ sung 0.5 mg/L BA kết hợp với 3.0 mg/L 2,4-D (**Bảng 1, Hình 1**).

Bảng 1. *Tỷ lệ tạo mô sẹo từ rễ cây Ngà voi in vitro trên môi trường MS bổ sung BA và 2,4-D ở các nồng độ khác nhau sau 4 tuần nuôi cấy*

Môi trường	Nghiệm thức chất điều hòa sinh trưởng	Tỷ lệ tạo mô sẹo (%)
MS	-	0^{e}
	BA 0.5 mg/L + 2,4-D 0.5 mg/L	100^{a}
	BA 0.5 mg/L + 2,4-D 1.0 mg/L	81.48^{ab}
	BA 0.5 mg/L + 2,4-D 1.5 mg/L	74.08^{ab}
	BA 0.5 mg/L + 2,4-D 2.0 mg/L	59.26^{bc}
	BA 0.5 mg/L + 2,4-D 2.5 mg/L	44.45^{cd}
	BA 0.5 mg/L + 2,4-D 3.0 mg/L	18.52^{de}

Các mẫu tự khác nhau trong cùng một cột biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức $p \leq 0.05$

Quá trình cảm ứng tạo mô sẹo xảy ra khi có sự hiện diện của auxin và cytokinin ngoại sinh ở một tỷ lệ nhất định [11]. Kết quả này cho thấy auxin (2,4-D) và cytokinin (BA) ở cùng nồng độ 0.5 mg/L thích hợp nhất cho sự tạo mô sẹo từ mô rễ của cây Ngà voi *in vitro*. Việc gia tăng nồng độ auxin (2,4-D) lên mức quá cao (3.0 mg/L) đã làm cho quá trình tạo mô sẹo bị ức chế và do đó dẫn đến kết quả làm giảm tỷ lệ tạo mô sẹo.



Hình 1. *Sự cảm ứng tạo mô sẹo từ mô rễ in vitro sau 4 tuần nuôi cấy. a: MS; b; c; d; e; f; g: MS + 0.5 mg/L BA + 0.5; 1.0; 1.5; 2.0; 2.5; 3.0 mg/L 2,4-D. Thanh ngang: 1 cm*

3.2. Ảnh hưởng của nồng độ sucrose lên sự tăng sinh mô sẹo

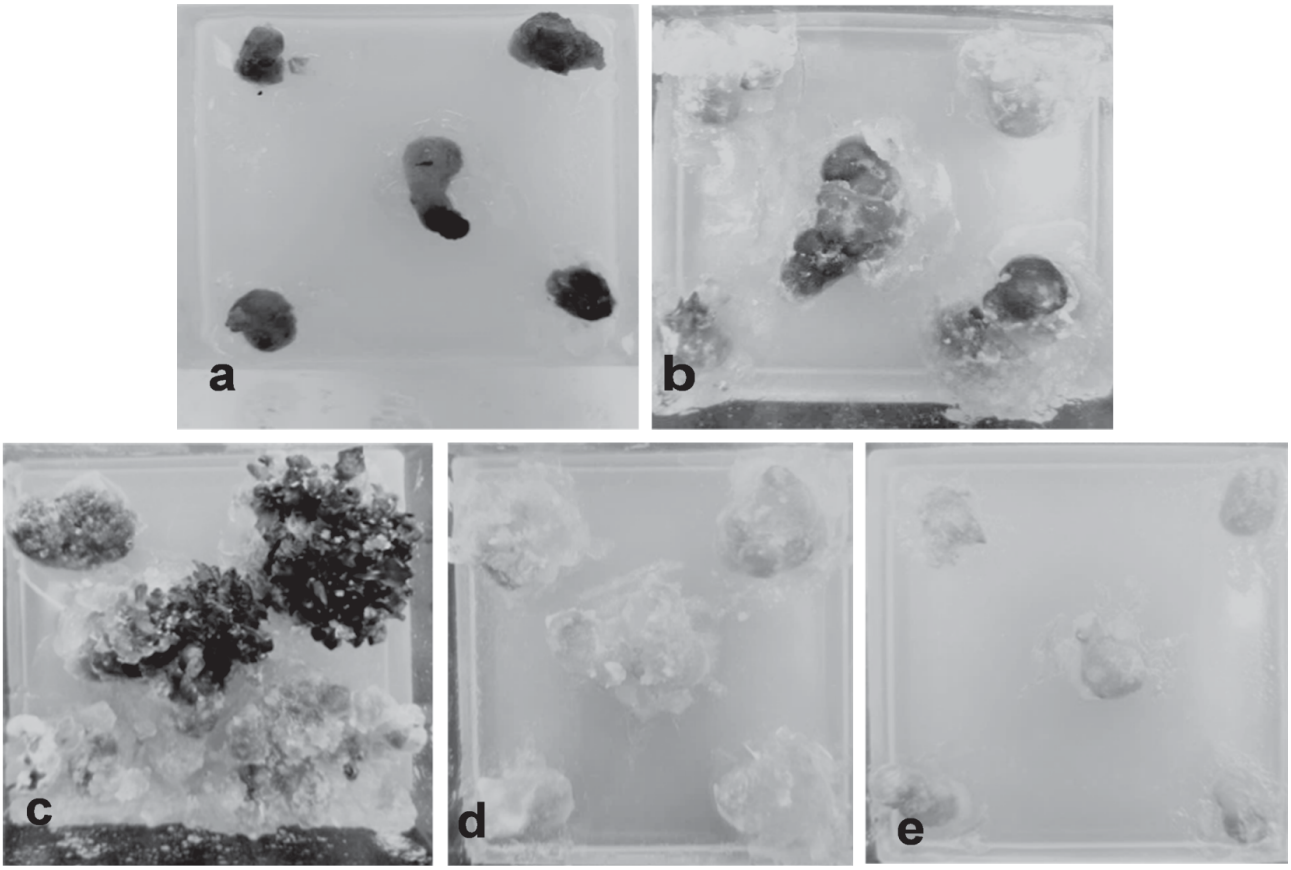
Các mẫu mô sẹo được nuôi cấy trên môi trường (MS + 0.5 mg/L BA + 2.0 mg/L NAA) có bổ sung sucrose ở các nồng độ đều có sự tăng sinh sau 4 tuần nuôi cấy; sinh khối mô sẹo gia tăng, đạt mức cao nhất (3.29 g) ở nồng độ sucrose 20 g/L. Trái lại, mô sẹo được nuôi cấy trên môi trường không bổ sung sucrose tăng sinh chậm và dần hóa nâu sau 4 tuần nuôi cấy (**Bảng 2, Hình 2**).

Bảng 2. *Ảnh hưởng của nồng độ sucrose lên sự tăng sinh mô sẹo sau 4 tuần nuôi cấy*

Môi trường	Nồng độ sucrose (g/L)	Trọng lượng tươi (g)
MS + 0.5 mg/L BA + 2.0 mg/L NAA	-	0.54^{b}
	10	1.18^{b}
	20	3.29^{a}
	30	1.46^{b}
	40	1.11^{b}

Các mẫu tự khác nhau trong cùng một cột biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức $p \leq 0.05$

Sucrose là nguồn cung cấp năng lượng chủ yếu cho sự tích lũy sinh khối của tế bào thực vật trong nuôi cấy *in vitro* [12]. Nồng độ sucrose trong môi trường nuôi cấy ảnh hưởng đến sự tích lũy sinh khối của mô cấy. Sucrose ở nồng độ quá thấp hay quá cao đều tác động tiêu cực đến sự tăng trưởng của mô cấy do gây ra sự thiếu hụt năng lượng hay stress thẩm thấu [13]. Do đó, cần có một nồng độ sucrosse phù hợp cho sự tăng trưởng của mô cấy đối với mỗi loài thực vật và loại mô cấy cụ thể. Kết quả nghiên cứu này cho thấy sucrose ở nồng độ 20 g/L thích hợp nhất cho sự tăng sinh mô sẹo cây Ngà voi. Việc gia tăng nồng độ sucrose vượt trên mức 20 g/L không những không thúc đẩy mà còn làm giảm sự tăng sinh của mô sẹo.



Hình 2. *Sự tăng sinh của mô sẹo cây Ngà voi trên môi trường (MS + 0.5 mg/L BA + 2.0 mg/L NAA) bổ sung sucrose ở các nồng độ khác nhau sau 4 tuần nuôi cấy. a: 0 mg/L sucrose, b: 10 g/L sucrose; c: 20 g/L sucrose; d: 30 g/L sucrose; e: 40 g/L sucrose. Thanh ngang: 0.5 cm*

3.3. Ảnh hưởng của dinh dưỡng khoáng lên sự tái sinh chồi từ mô sẹo

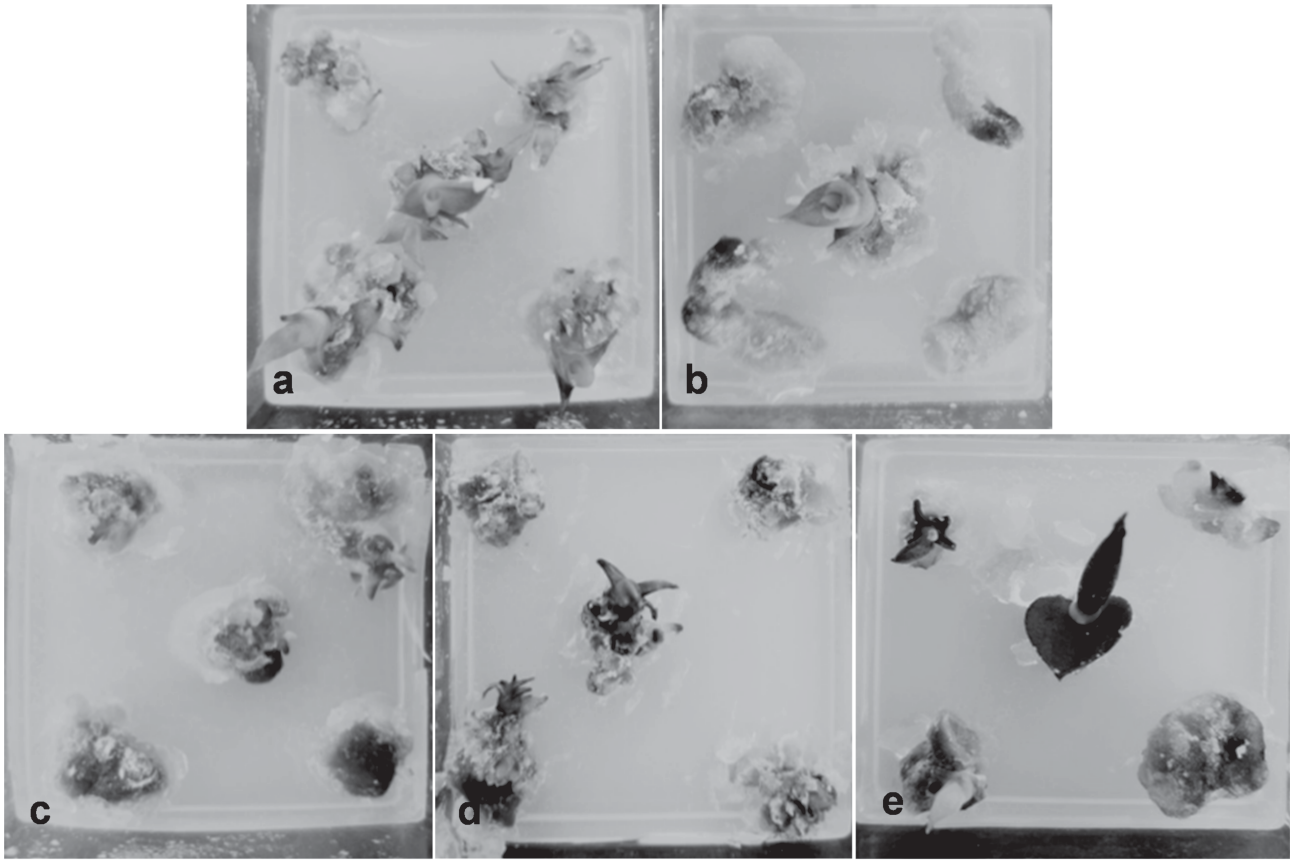
Mô sẹo nuôi cấy với các môi trường có thành phần khoáng khác nhau đều có sự tái sinh chồi. Tỷ lệ tái sinh chồi và số chồi tạo ra trên môi trường khoáng MS cao hơn so với môi trường Knudson C và Gamborg B5. Việc giảm nồng độ khoáng đa lượng của môi trường MS xuống mức ½ và ¼ làm giảm tỷ lệ tái sinh cũng như số chồi tạo ra từ mô sẹo (**Bảng 3, Hình 3**).

Bảng 3. *Sự tái sinh chồi từ mô sẹo của cây Ngà voi trên các môi trường khoáng bổ sung 2.0 mg/L BA kết hợp với 0.5 mg/L NAA sau 8 tuần nuôi cấy*

Môi trường khoáng	BA (mg/L)	NAA (mg/L)	Tỷ lệ tái sinh chồi (%)	Số chồi/mẫu
MS	2.0	0.5	64.45^{a}	3.70^{a}
1/2 MS			42.22^{bc}	2.40^{b}
1/4 MS			35.56^{bc}	1.60^{c}
Knudson C			46.67^{b}	1.87^{c}
Gamborg B5			31.11^{c}	2.07^{bc}

Ghi chú: các mẫu tự khác nhau trong cùng một cột biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức $p \leq 0.05$

Thành phần khoáng trong môi trường nuôi cấy giữ vai trò quan trọng đối với sự tăng trưởng và phát triển của thực vật [14]. Nghiên cứu này cho thấy sự hiện diện của thành phần khoáng MS trong môi trường nuôi cấy đã thúc đẩy khả năng tái sinh chồi của mô sẹo cây Ngà voi. Thành phần khoáng MS đã được sử dụng cho nuôi cấy *in vitro* nhiều loài thực vật [15] và kết quả này cho thấy thành phần khoáng này cũng phù hợp cho nuôi cấy cây Ngà voi.



Hình 3. *Sự tái sinh chồi từ mô sẹo trên các môi trường có thành phần khoáng khác nhau sau 8 tuần nuôi cấy. a: MS + 2 mg/L BA + 0.5 mg/L NAA; b; c; d; e: 1/2 MS; 1/4 MS; Knudson C; Gamborg B5 + 2 mg/L BA + 0.5 mg/L NAA. Thanh ngang: 0.5 cm.*

4. KẾT LUẬN

Mô rễ của cây Ngà voi *in vitro* cảm ứng tạo mô sẹo tốt nhất trên môi trường MS bổ sung 0.5 mg/L 2,4-D và 0.5 mg/L BA. Sự tăng sinh của mô sẹo bị ảnh hưởng bởi nồng độ sucrose và đạt mức cao nhất ở nồng độ sucrose 20 g/L. Sự tái sinh chồi từ mô sẹo đạt hiệu quả cao nhất khi môi trường MS được sử dụng làm nền môi trường tái sinh.

5. TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] M. Anis and A. Shahzad, "Micropropagation of *Sansevieria cylindrica* Bojer ex Hook through leaf dics culture", *Propagation of Ornamental Plants*, Vol. 5, No. 3, pp. 119-123, 2005.

[2] M. A. Kumar, G. R. Reddy, G. H Reddy, K. H Reddy, Y. Reddy, "Fabrication and performance of hybrid betel nut (*Areca catechu*), short fiber (*Sansevieria cylindrica*: *Agavaceae*) epoxy composites", *Journal of Metallurgy and Materials Science*, Vol 53, No. 4, pp. 375-386, 2011.

[3] S. A. Alexandra, "A New Bioactive Steroidal Saponin from *Sansevieria cylindrica*". *Phytotherapy research*, Vol 17, pp. 179-182, 2003.

[4] M. A. Raslan, F. R. Melek, A. A. Said, A. I. Elshamy, A. Umeyama, M. M. Mounier, "New cytotoxic dihydrochalcone and steroidal saponins from the aerial parts of *Sansevieria cylindrica* Bojer ex Hook", *Phytochemistry Letters*, Vol 22, pp. 39-43, 2017.

[5] E. Wisdawati and Z. D. M. Sitti Inderiati, "Indirect organogenesis and induction of morphogenic callus for in vitro propagation of *Sansevieria masoniana*", *Journal Agrotan* Vol 1, No. 2, pp. 1- 8, 2015.

[6] A. Shahzad, "Improved shoot regeneration system through leaf derived callus and nodule culture of *Sansevieria cylindrica*", *Biologia PlanTarum* Vol 53, No. 4, pp. 745-749, 2009.

[7] N. V. Long, T. T. K. Chung, D. H. Xô, N. X. Dũng,

"Nghiên cứu nhân giống *in vitro* cây Ngà voi (*Sansevieria cylindryca* Bojer ex Hook)", Tuyển tập Báo cáo toàn văn Hội nghị Công nghệ Sinh học Toàn Quốc năm 2019. Nhà xuất bản Đại học Quốc gia TP. Hồ Chí Minh, tr. 534-538, 2019.

[8] T. Murashige, F. Skoog, "A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures", *Physiologia Plantarum,* Vol 15, pp. 473-497, 1962.

[9] L. Knudson, "A new nutrient solution for germination of orchid seeds", *American Orchid Society Bulletin*, No 15, pp. 214–217, 1946.

[10] O. L. Gamborg, R. A. Miller, K. Ojima, "Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells", *Experimental Cell Research*, Vol 50, No. 1, pp.151-158, 1968.

[11] M. Ikeuchi, K. Sugimoto, and A. Iwase, "Plant Callus: Mechanisms of Induction and Repression", *Plant Cell*, Vol. 25, pp. 3159–3173, 2013.

[12] Nguyễn Đức Lượng, "Công nghệ tế bào", Nhà xuất bản Đại học Quốc gia TP. Hồ Chí Minh, pp. 1-253, 2011.

[13] C. Praveena and C. Veeresham, "Multiple shoot regeneration and effect of sugars on growth and nitidine accumulation in shoot cultures of *Toddalia asiatica*". *Pharmacognosy Magazine*, Vol 10, pp. 480-486, 2014.

[14] W. C. Anderson, "Tissue culture propagation of red and black raspberries, *Rubus idaeus* and *R. occidentalis*", *Acta Horticulturae*, Vol 112, pp. 13-20, 1980.

[15] S. Poothong, T. Khen, O. Chumphukam, "*In vitro* mineral nutrition for improving growth and multiplication of stevia", *Agriculture and Natural Resources,* Vol 52, pp. 477-483, 2018.

Effects of sucrose and mineral medium on callus induction and shoot regeneration of *Sansevieria cylindrica* Bojer ex Hook

Nguyen Van Long, Nguyen Thi Duong, Nguyen Xuan Dung*

ABSTRACT

In a previous paper, we reported the micropropagation of Sansevieria cylindrica Bojer ex Hook using leaf tissues. In an effort to improve propagation efficiency, this paper reports the results of effects of sucrose and mineral medium on callus induction and shoot regeneration from root tissue of in vitro plant. The research used root tissue as a material culture. The factors effect on callus induction and shoot regeneration (sucrose, mineral medium) were also surveyed. The results showed that MS medium supplemented with 0.5 mg/L BA combined with 0.5 mg/L 2,4-D was suitable for inducing callus from in vitro root tissue. MS medium and sucrose at a concentration of 20 g/L improved the growth and shoot regeneration from callus.

Keywords: *callus, root tissue, shoot regeneration, sucrose*

Received: 21/09/2020
Revised: 09/11/2020
Accepted for publication: 16/11/2020