

Nghiên cứu nhân giống *in vitro* cây Đổ trọng (*Eucommia ulmoides* Oliv.) từ hạt

Nguyễn Quỳnh Trang, Bùi Phương Anh

Trường Đại học Lâm nghiệp

Research on *in vitro* propagation of *Eucommia ulmoides* Oliv. from seeds

Nguyen Quynh Trang, Bui Phuong Anh

Vietnam National University of Forestry

<https://doi.org/10.55250/jo.vnuf.13.5.2024.020-031>

TÓM TẮT

Hạt Đổ trọng (*Eucommia ulmoides* Oliv.) có đặc điểm ngủ sâu, vỏ quả phát triển dày đặc là nguyên nhân chính khiến tỷ lệ nảy mầm hạt thấp. Để tìm hiểu nguyên nhân cản trở nảy mầm, hạt Đổ trọng được bóc sạch lớp vỏ quả, đưa vào khử trùng trong dung dịch $HgCl_2$ 0,1% trong 5 phút rồi đưa vào môi trường nuôi cấy mô. Sau 9 tuần tất cả mẫu hạt sạch đều không nảy mầm. Hướng khác, hạt Đổ trọng sau khi khử trùng bằng $HgCl_2$ 0,1% trong 5 phút được cắt bỏ $\frac{1}{4}$ chiều dài hạt để loại bỏ một phần lá mầm và lớp vỏ mượt bao ngoài lá mầm trước khi đưa vào môi trường nuôi cấy mô. Sau 5-6 tuần, tất cả các mẫu sạch đều nảy mầm tạo ra cây con hoàn chỉnh. Điều này chứng tỏ không chỉ lớp vỏ quả mà lớp vỏ mượt bao phủ rễ và lá mầm cũng ngăn cản sự nảy mầm của hạt. Để tạo cụm chồi nên cấy chuyển sang môi trường MS +1,2 mg/l BAP + 0÷0,2 mg/l NAA + 20 g/l sucrose + 10 g/l glucose + 7 g/l agar trong 4 tuần. Để tạo rễ tạo cây hoàn chỉnh sử dụng môi trường 2/3 MS + 1 mg/l NAA + 0,4 mg/l IBA + 30 g/l sucrose + 7 g/l agar. Từ kết quả đạt được có thêm hướng mới để xử lý nảy mầm với hạt giống, nhân giống *in vitro* từ chồi hoặc hạt Đổ trọng.

Thông tin chung:

Ngày nhận bài: 13/05/2024

Ngày phản biện: 14/06/2024

Ngày quyết định đăng: 16/07/2024

Từ khóa:

Chất điều hòa sinh trưởng, *Eucommia ulmoides* Oliv, hạt giống, *in vitro*, khử trùng, tái sinh.

ABSTRACT

Eucommia ulmoides seeds have the characteristics of deep dormancy, and dense development of the fruit coat is the main cause of low seed germination rate. To find out the cause of germination resistance, seeds are peeled off the coat, sterilized in 0.1% $HgCl_2$ solution for 5 minutes and then placed in a tissue culture medium. After 9 weeks, all clean seed samples did not germinate. Another research direction, after sterilization with 0.1% $HgCl_2$ for 5 minutes, *Eucommia* seeds were cut off $\frac{1}{4}$ of the seed length to remove part of the cotyledons and the silky crust on the cotyledons before being placed in the tissue culture medium. After 5-6 weeks, all clean samples germinated and created complete seedlings. This proves that not only the fruit coat but also the silky coat covering the roots and cotyledons also prevents seed germination. The optimal composition of the nutrient medium for regeneration of *Eucommia ulmoides* microshoots has been determined: MS +1.2 mg/l BAP + 0÷0.2 mg/l NAA + 20 g/l sucrose + 10 g/l glucose + 7 g/l agar. The best media for explant rooting are the following: 2/3 MS + 1 mg/l NAA + 0.4 mg/l IBA + 30 g/l sucrose + 7 g/l agar. From the results achieved, there are new directions for germination treatment with seeds, *in vitro* propagation from *Eucommia* buds or seeds.

Keywords:

Eucommia ulmoides Oliv, growth regulator, *in vitro*, regeneration, seeds, sterilization.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Đổ trọng là cây gỗ nhỏ, rụng lá theo mùa, có hoa đơn tính khác gốc và phân bố tự nhiên ở Trung Quốc [1, 2]. Trước đây, Đổ trọng là nguyên liệu chính để sản xuất gutta-percha – một loại cao su tự nhiên. Tuy nhiên hiện nay,

Đổ trọng được đánh giá cao hơn vì chất lượng dược phẩm của nó. Từ hàng trăm năm trước công nguyên Đổ trọng đã được sử dụng rộng rãi trong y học dân gian và y học cổ truyền Trung Quốc [1]. Đến những năm 1940, các nhà khoa học Liên Xô đã phát hiện ra tác dụng thần

kỳ của Đỗ trọng trong việc chống lại bệnh cao huyết áp. Chế phẩm Galenic thu được từ vỏ cây này có tác dụng hạ huyết áp mạnh, lợi tiểu, bổ, giảm đau, an thần và thuộc nhóm thuốc chống co thắt [3]. Hiện nay, các nhà nghiên cứu đã tìm ra 132 thành phần hóa dược được tách chiết từ lá, vỏ cây, hoa đực, rễ và hạt Đỗ trọng [4]. Gỗ của Đỗ trọng cũng có thể sử dụng để làm đồ nội thất và chất đốt. Đó là những lý do khiến diện tích rừng loài này bị suy giảm mạnh trong tự nhiên.

Vì là loài cây thân gỗ có giá trị lớn cả về y dược và kinh tế nên từ những năm 1950, Đỗ trọng đã được di thực gây trồng thành các đồn điền lớn ở nhiều nước trên thế giới như Nga, Canada... Tại Việt Nam năm 2013, Thủ tướng Chính phủ đã ra quyết định “Phê duyệt quy hoạch tổng thể phát triển dược liệu đến năm 2020 và định hướng đến năm 2030”. Trong đó, Đỗ trọng là một trong 36 loài cây dược liệu quý được định hướng phát triển ở Việt Nam [5].

Nhân giống bằng hạt Đỗ trọng theo phương pháp truyền thống gặp rất nhiều khó khăn. Đỗ trọng là loài đơn tính khác gốc nên khi trồng với tỉ lệ cây đực/cái không phù hợp hoặc khi khoảng cách trồng cây bố mẹ quá xa nhau thì tỉ lệ quả bất thụ rất cao (có quả nhưng không có hạt) [6]; hạt có tính ngủ sâu, cần đem gieo ngay khi thu hoạch vào tháng 11, hạt tươi có tỷ lệ nảy mầm cao lên đến 80% [1]. Nhưng nếu chưa gieo ươm, khi bảo quản khô, hạt nhanh chóng mất khả năng nảy mầm [7]. Để duy trì sức sống, hạt cần phân tầng ẩm lạnh nhưng khi này tỷ lệ nảy mầm hạt cũng rất thấp (5-20%) [2, 8]. Nhìn chung hạt Đỗ trọng khó nảy mầm do vỏ quả phát triển mạnh và dày đặc sau khi phát triển hoàn thiện cản trở sự trao đổi nước và oxy – là điều kiện cần thiết cho quá trình nảy mầm của hạt [7].

Vì vậy, “Nghiên cứu nhân giống *in vitro* cây Đỗ trọng (*Eucommia ulmoides* Oliv.) từ hạt” nhằm đánh giá khả năng nảy mầm của hạt khi loại bỏ hoàn toàn lớp vỏ quả trước khi vào mẫu nuôi cấy mô cũng như hoàn thiện kỹ thuật nhân giống tạo cây con *in vitro* hoàn chỉnh là phương

pháp hiệu quả nhằm xúc tiến khả năng nảy mầm của hạt, tạo ra số lượng cây con lớn, khắc phục được những khó khăn trong nhân giống truyền thống bằng hạt.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu, địa điểm nghiên cứu

- Vật liệu: quả Đỗ trọng được thu từ các cây trội tại Sa Pa – Lào Cai.

- Địa điểm: thí nghiệm được thực hiện tại Phòng thí nghiệm Viện Công nghệ Sinh học Lâm nghiệp – Trường Đại học Lâm nghiệp.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

*Xử lý nảy mầm trong nuôi cấy *in vitro*

- Chuẩn bị mẫu: bóc sạch lớp vỏ quả bên ngoài để thu hạt Đỗ trọng.

- Khử trùng mẫu ngoài box cấy: hạt Đỗ trọng được rửa hết bụi bẩn bằng nước sạch; tiếp tục rửa sạch bề mặt bằng nước xà phòng loãng trong 5 phút; tráng sạch xà phòng dưới vòi nước chảy. Mẫu được tiếp tục tráng lại 3 lần bằng nước cất, đựng mẫu trong bình có nắp xoáy đã được khử trùng qua nồi hấp vô trùng.

- Khử trùng mẫu trong box cấy: mẫu được tráng trong nước cất vô trùng 3 lần trước khi được khử trùng bằng HgCl₂ 0,1% với các thời gian khác nhau (4, 5 và 6 phút); tiếp tục tráng sạch mẫu bằng nước cất vô trùng 5 lần để rửa trôi toàn bộ HgCl₂ còn sót lại.

- Đưa mẫu vào môi trường nuôi cấy khởi đầu: hạt Đỗ trọng sau khi được khử trùng trong box cấy được xử lý theo 2 phương pháp:

+ PP1: hạt Đỗ trọng được cấy trực tiếp vào môi trường nuôi cấy khởi đầu;

+ PP2: dùng kéo đã vô trùng cắt bỏ ¼ chiều dài hạt ở phần chứa lá mầm rồi cấy vào môi trường nuôi cấy khởi đầu.

Trong đó: Môi trường nuôi cấy khởi đầu là môi trường MS (Murashige and Skoog, 1962) có bổ sung 30 g/l sucrose + 7 g/l agar + 0,5 mg/l BAP. Số liệu được thu thập sau 5 tuần nuôi cấy theo các chỉ tiêu: Tỷ lệ mẫu sạch, tỉ lệ mẫu sạch nảy chồi.

Tạo cụm chồi: Kết quả nghiên cứu nhân giống *in vitro* Đỗ trọng xuất xứ từ Lai Châu của

Zhigunov A. V. và Nguyen Quynh Trang (2020) cho thấy, giai đoạn tạo cụm chồi sử dụng môi trường MS + 1 mg/l BAP + (0÷0,2) mg/l NAA + 30 g/l Đường sucrose + 7 g/l Agar sau 4 tuần nuôi cấy cho kết quả tối ưu nhất [9]. Kế thừa kết quả nghiên cứu này, giai đoạn tạo cụm chồi cho Đổ trọng xuất xứ từ Lào Cai tiến hành với 3 thí nghiệm:

+ TN1: sử dụng môi trường MS có bổ sung 0,8÷1,4 mg/l BAP và 0÷0,2 mg/l NAA + 30 g/l đường sucrose và 7g/l agar trong 3 tuần để xác định nồng độ chất điều hòa sinh trưởng (chất đhst) tốt nhất đến khả năng tạo cụm chồi;

+ TN2: lựa chọn nồng độ BAP và NAA tối ưu nhất từ TN1 và tiến hành theo dõi sau 3, 4 và 5 tuần cấy chuyển để xác định thời gian cấy chuyển tối ưu trong giai đoạn tạo cụm chồi;

+ TN3: lựa chọn nồng độ BAP và NAA tối ưu nhất từ TN1, thời gian cấy chuyển tối ưu nhất từ TN2 và thay đổi hàm lượng 2 loại đường sucrose và glucose để xác định môi trường tối ưu nhất tạo cụm chồi Đổ trọng.

Số liệu được thu thập theo các chỉ tiêu: số mẫu tạo cụm chồi, số chồi/cụm, chiều cao chồi trung bình (cm) và chất lượng chồi.

Tạo rễ tạo cây hoàn chỉnh: kết quả nghiên cứu nhân giống *in vitro* Đổ trọng xuất xứ từ Lai Châu của Zhigunov A. V. và Nguyen Quynh Trang (2020) cho thấy, giai đoạn tạo tạo rễ tạo cây hoàn chỉnh sử dụng môi trường 2/3MS + 1,5 mg/l NAA + 30 g/l đường sucrose + 7 g/l Agar, hoặc 2/3MS + 1 mg/l NAA + 0,4 mg/l IBA

+ 30 g/l đường sucrose + 7 g/l Agar, pH = 5,8 [9]. Kế thừa kết quả nghiên cứu này, giai đoạn tạo rễ tiếp tục sử dụng môi trường 2/3 MS có bổ sung 0÷1,6 mg/l NAA kết hợp với 0÷0,4 mg/l IBA và 30 g/l sucrose, 7g agar. Số liệu được thu thập sau 4 tuần nuôi cấy, theo các chỉ tiêu: số chồi ra rễ, chiều dài rễ trung bình (cm), số rễ trung bình trên mẫu và chất lượng rễ.

Ở tất cả các thí nghiệm môi trường nuôi cấy được chuẩn độ bằng NaOH 1N đạt giá trị pH = 5,8±0,1. Thí nghiệm được thực hiện trong điều kiện nhiệt độ 25°C ± 2°C, cường độ chiếu sáng 2000 lux, thời gian chiếu sáng 12 giờ/ngày.

Các thí nghiệm được lặp lại 3 lần mỗi lần 20 mẫu.

** Xử lý số liệu*

So sánh giữa các công thức thí nghiệm về tỉ lệ mẫu sạch, tỉ lệ mẫu sạch nảy chồi, tỉ lệ mẫu tạo cụm chồi, tỉ lệ chồi ra rễ bằng tiêu chuẩn χ^2 .

So sánh giữa các công thức thí nghiệm về chiều cao chồi, số lượng chồi/cụm, chiều dài rễ và số lượng rễ/chồi bằng phân tích phương sai một nhân tố.

Số liệu thu thập được xử lý phần mềm Excel và bằng phần mềm SPSS [10].

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Xử lý nảy mầm hạt Đổ trọng trong nuôi cấy *in vitro*

Hạt Đổ trọng sau khi được bóc sạch khỏi vỏ quả (Hình 1), khử trùng bằng HgCl₂ 0,1% trong những khoảng thời gian khác nhau. Sau 5 tuần theo dõi kết quả được tổng hợp tại Bảng 1.

Bảng 1. Ảnh hưởng thời gian khử trùng đến khả năng tạo mẫu sạch *in vitro*

CTTN	Thời gian khử trùng (phút)	Số mẫu cấy (mẫu)	Số mẫu sạch		Số mẫu sạch nảy chồi	
			N (mẫu)	Tỉ lệ (%)	N (mẫu)	Tỉ lệ (%)
KT1	4	60	40	66,67	0	0
KT2	5	60	58	96,67	0	0
KT3	6	60	60	100	0	0
<i>Sig</i>			0,0001			

Từ Bảng 1 cho thấy, thời gian khử trùng có ảnh hưởng rõ rệt tới tỉ lệ mẫu sạch ($\chi_n^2=0,0001 < 0,05$). Khử trùng bằng $HgCl_2$ 0,1% trong 4 phút (KT1) tỉ lệ mẫu sạch đạt thấp nhất (67%) và có sai khác rõ rệt với hai công thức KT2 và KT3 tương ứng khử trùng trong 5 và 6 phút. Khử trùng trong 5÷6 phút tỉ lệ mẫu sạch tăng rõ rệt lên 97-100%. Tuy nhiên sau 5 tuần vào mẫu, mẫu sạch ở tất cả các công thức khử trùng đều không có dấu hiệu nảy mầm. Câu hỏi đặt ra là liệu lớp vỏ mượt bao phủ rễ mầm và lá mầm liệu có cản trở sự hấp thụ nước và oxy – là điều kiện cần thiết để nảy mầm của hạt Đỗ trọng không? Theo nghiên cứu của Chen R. và cộng sự (2008), mẫu hạt Đỗ trọng đưa vào nuôi cấy

in vitro sau khi khử trùng sạch được rạch bỏ lớp vỏ mềm để hạt nảy mầm [11]. Để trả lời cho câu hỏi đó, một phần mẫu hạt sạch được cắt bỏ một phần lá mầm để tạo khoảng hở giúp hạt hấp thụ nước và oxy tốt hơn. Kết quả chỉ sau 4÷6 ngày lá mầm bắt đầu nhú ra từ vết cắt và sau 4-5 tuần tiếp theo đã thu được cây mầm hoàn chỉnh trong bình nuôi. Trong khi phần mẫu sạch còn lại tiếp tục không nảy mầm sau 9 tuần nuôi cấy.

Để kiểm định lại, tiếp tục thử nghiệm khử trùng mẫu hạt Đỗ trọng bằng $HgCl_2$ 0,1% trong 4,5,6 phút rồi cắt bỏ một phần lá mầm xong mới đưa vào môi trường nuôi cấy khởi đầu. Kết quả được thể hiện tại Bảng 2.

Bảng 2. Ảnh hưởng thời gian khử trùng đến khả năng tạo mẫu sạch *in vitro* và mẫu sạch nảy chồi

CTTN	Thời gian khử trùng (phút)	Số mẫu cấy (mẫu)	Số mẫu sạch		Số mẫu sạch nảy chồi	
			N (mẫu)	Tỉ lệ (%)	N (mẫu)	Tỉ lệ (%)
KT4	4	60	41	68,33	41	68,33
KT5	5	60	59	98,33	59	98,33
KT6	6	60	60	100,00	55	91,67
<i>Sig</i>			0,0001		0,0001	

Kết quả sau 5 tuần cho thấy, tỉ lệ mẫu sạch ở cả 3 công thức khử trùng đều cho kết quả tỉ lệ mẫu sạch khá tương đồng với thí nghiệm trước đó. Khi cắt bỏ một phần lá mầm thì chỉ sau 3-5 ngày lá mầm bắt đầu nhú ra ngoài (Hình 2).

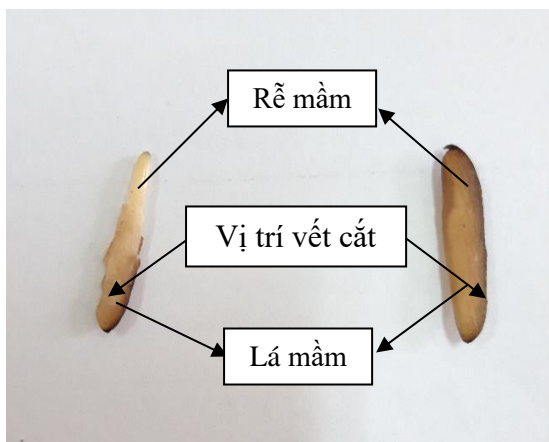
Công thức khử trùng trong 5 và 6 phút (tương ứng KT5 và KT6) tỉ lệ mẫu sạch đạt rất cao, tăng dần từ 5 phút (98%) lên 6 phút (100%) và vượt trội rõ rệt so với công thức KT4 khử trùng hạt trong 4 phút (68%). Tuy nhiên, tỷ lệ mẫu sạch nảy chồi lại đạt cao nhất khi khử trùng mẫu hạt trong 5 phút, tất cả mẫu hạt sạch đều nảy chồi (98%). Trong khi công thức khử trùng trong 6 phút tỉ lệ mẫu sạch nảy mầm giảm xuống 91,7% - chứng tỏ trong công thức khử

trùng này $HgCl_2$ 0,1% đã ảnh hưởng xấu gây ức chế nảy chồi hoặc chết mẫu hạt.

Như vậy, hạt Đỗ trọng sau khi khử trùng bằng $HgCl_2$ 0,1% trong 5 phút tiến hành cắt bỏ một phần lá mầm là thích hợp nhất cho quá trình nảy mầm hạt Đỗ trọng trong môi trường nuôi cấy *in vitro*. Với công thức này tỷ lệ mẫu sạch cao (98,3%), không gây ức chế nảy chồi hoặc chết mẫu, tất cả mẫu sạch đều nảy chồi (98,3%). Sau 4-5 tuần tất cả mẫu sạch đều hình thành cây mầm hoàn chỉnh (Hình 3). Điều này cũng chứng tỏ không chỉ lớp vỏ quả mà lớp vỏ lụa bao quanh hạt cũng cản trở sự nảy mầm của hạt Đỗ trọng chứ không phải vì hạt còn chưa phát triển hoàn thiện – là trường hợp thường

gặp đối với các loại hạt giống của các loài cây phân bố tự nhiên ở các nước ôn đới. Vì vậy, khi xử lý nảy mầm hạt Đỗ trọng bằng các biện pháp

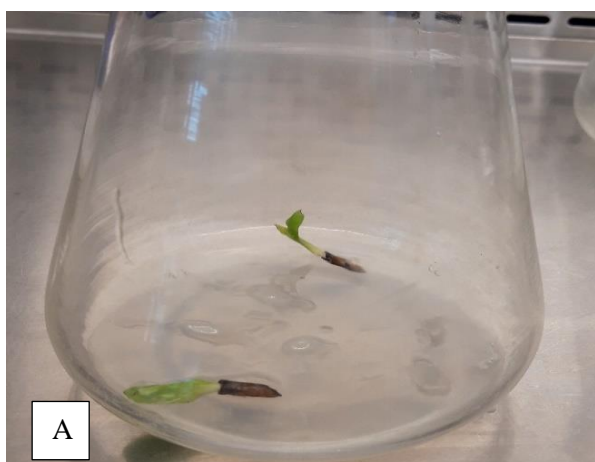
truyền thống cần tác động không chỉ tới vỏ quả mà tới cả lớp vỏ mềm bao quanh rễ và lá mầm.



Hình 1. Hạt Đỗ trọng sau khi được tách khỏi vỏ quả



Hình 2. Lá mầm bắt đầu nhú ra khỏi hạt sau 5 ngày đưa vào môi trường nuôi cấy khởi đầu



Hình 3. Chồi Đỗ trọng sau 2 tuần (A) và 5 tuần (B) đưa vào môi trường nuôi cấy khởi đầu

3.2. Ảnh hưởng của cđhst đến khả năng tạo cụm chồi Đỗ trọng

Theo nghiên cứu trước đó của Chen L. và cộng sự (1995) môi trường tạo cụm chồi cho Đỗ trọng tối ưu là MS có bổ sung 1 mg/l BAP cho hệ số nhân chồi rất cao (7,5 lần) [12]; còn Chen R. và cộng sự (2008) khẳng định môi trường MS có bổ sung 6 μ M BAP và 6 μ M GA₃ là thích hợp nhất cho quá trình nhân chồi [11]. Nghiên cứu của Zhigunov A. V. và Nguyen Quynh Trang (2020) đưa ra môi trường tạo cụm chồi thích hợp nhất Đỗ trọng xuất xứ Lai Châu là bổ sung

1 mg/l BAP + (0÷0,2) mg/l NAA với hệ số nhân chồi là 5,1÷5,7 lần, chồi mập, xanh đậm, cứng cáp, có độ đồng đều [9].

Trong nghiên cứu này, chồi Đỗ trọng xuất xứ Lào Cai nảy lên từ phôi hạt sau 5÷6 tuần nuôi cấy xuất hiện lá thật sẽ được chuyển sang môi trường tạo cụm chồi MS + 30 g/l sucrose + 7 g/l agar đồng thời bổ sung thêm chất điều hòa sinh trưởng (BAP, NAA) ở các nồng độ khác nhau. Sau 3 tuần cấy chuyển kết quả được thể hiện ở Bảng 3.

Bảng 3. Ảnh hưởng của nồng độ chất điều hòa sinh trưởng (ĐHST) đến khả năng tạo cụm chồi Đổ trọng

CTTN	Chất ĐHST (mg/l)		Số chồi TN (chồi)	Số mẫu tạo cụm chồi		Hệ số nhân chồi (lần)	Chiều cao chồi TB (cm)	Chất lượng chồi
	BAP	NAA		N	Tỉ lệ %			
ĐC	0	0	60	0	0	0	0	
NC1	0,8	-	60	38	63,33	1,46	1,27	+
NC2	1,0	-	60	54	90,00	2,98	2,36	++
NC3	1,2	-	60	59	98,33	3,20	2,60	++
NC4	1,4	-	60	47	78,33	2,32	1,91	+
NC5	0,8	0,2	60	35	58,33	1,27	1,30	+
NC6	1,0	0,2	60	52	86,67	3,13	2,23	++
NC7	1,2	0,2	60	57	95,00	3,86	2,70	+++
NC8	1,4	0,2	60	43	71,67	2,77	1,78	++
	Sig				0,0001	0,0001	0,0001	

Ghi chú:

+++ Chất lượng chồi tốt (chồi cao, mập và đồng đều, màu xanh đậm);

++ Chất lượng trung bình (chồi cao, mảnh, các chồi trong cụm không đồng đều, màu xanh);

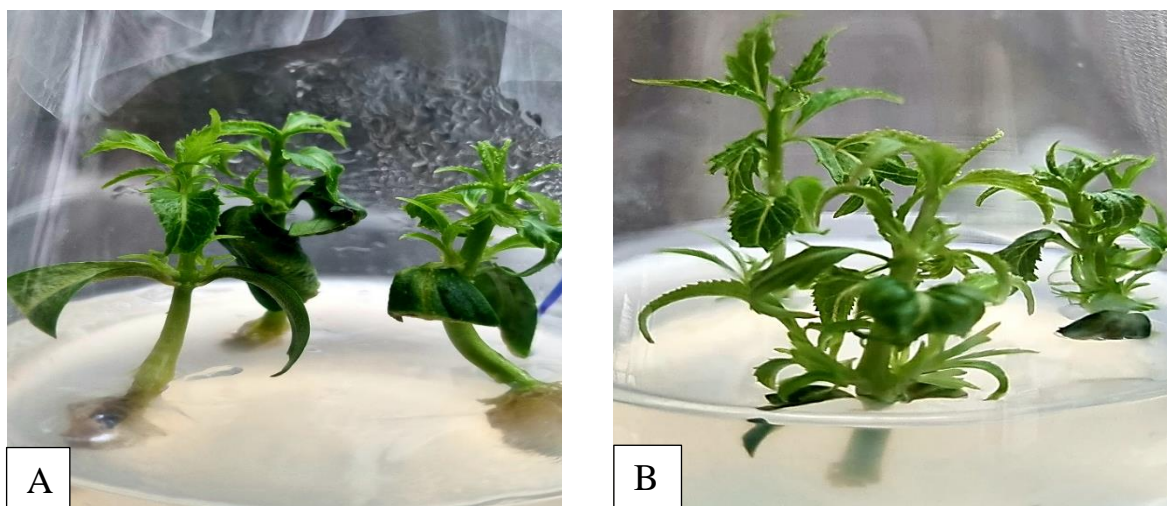
+ Chất lượng chồi kém (chồi thấp, không đồng đều, màu xanh nhạt).

Thay đổi nồng độ chất ĐHST có ảnh hưởng rõ rệt đến khả năng tạo cụm chồi, hệ số nhân chồi, chiều cao chồi cũng như chất lượng chồi (sig = 0,0001 < 0,05). Với công thức ĐC - không sử dụng chất ĐHST dễ dàng nhận thấy chồi Đổ trọng ở tất cả lần lặp đều không cảm ứng tạo cụm chồi. Các công thức có sử dụng chất ĐHST ở nồng độ khác nhau, các chỉ tiêu theo dõi như tỉ lệ chồi tạo cụm chồi, hệ số nhân chồi, chiều cao chồi đều tăng dần từ công thức sử dụng 0,8 mg/l BAP lên 1 mg/l BAP và đạt tối ưu ở công thức bổ sung 1,2 mg/l BAP. Tăng tiếp nồng độ BAP lên 1,4 mg/l cả ba chỉ tiêu theo dõi lại giảm dần. Như vậy, có thể thấy nồng độ 1,2 mg/l BAP + (0÷0,2 mg/l NAA) không chỉ tối ưu trong tạo cụm chồi, hệ số nhân chồi, chiều cao chồi mà cả chất lượng chồi. Trong công thức này, chồi to mập, cứng cáp và có màu xanh đậm.

Trong các công thức thí nghiệm có bổ sung chất ĐHST thì nhóm công thức bổ sung đơn lẻ BAP có nồng độ thay đổi từ 0,8÷1,4 mg/l không bổ sung NAA đều cho tỉ lệ tạo cụm chồi cao hơn với các công thức có cùng nồng độ BAP nhưng có bổ sung thêm 0,2 mg/l NAA. Tuy nhiên, hệ

số nhân chồi và chiều cao chồi thì ngược lại. Cùng nồng độ BAP nhưng ở các công thức có bổ sung 0,2 mg/l NAA hệ số nhân chồi và chiều cao chồi đều lớn hơn, chất lượng chồi cũng thường tốt hơn nhóm không bổ sung NAA.

Kết quả nghiên cứu cho thấy môi trường tạo cụm chồi tốt nhất đối với Đổ trọng xuất xứ từ Lào Cai là MS + 1,2 mg/l BAP + (0-0,2) mg/l NAA + 30 g sucrose + 7 g aga cho tỷ lệ tạo cụm chồi cao (95÷98%) nhưng hệ số nhân chồi (3,2÷3,9 lần) và chiều cao chồi (2,6÷2,7) cm sau 3 tuần nuôi cấy còn khá khiêm tốn so với nghiên cứu trước đó của Zhigunov A. V. và Nguyen Quynh Trang (2020): môi trường phù hợp để Đổ trọng xuất xứ Lai Châu nhân nhanh chồi và kích thích tăng trưởng chồi là MS + 1 mg/l BAP + (0-0,2) mg/l NAA + 30 g sucrose + 7 g agar. Trong các môi trường trên, Đổ trọng xuất xứ Lai Châu cho tỷ lệ tạo cụm chồi là 100%, hệ số nhân chồi 5,0÷5,7 lần, chiều cao chồi 4,1÷4,7 cm sau 4 tuần nuôi cấy [9]. Hình ảnh thể hiện khả năng tạo cụm chồi Đổ trọng xuất xứ Lào Cai được thể hiện trong Hình 4.



Hình 4. Cụm chồi Đổ trọng sau 2 tuần (A) và 3 tuần (B) cấy chuyển sang môi trường tạo cụm chồi

3.3. Ảnh hưởng của thời gian cấy chuyển đến khả năng tạo cụm chồi Đổ trọng

Sau thí nghiệm 2, đề tài sử dụng 2 công thức tốt nhất là NC3 (MS + 1,2 mg/l BAP) và NC7 (MS

+ 1,2 mg/l BAP + 0,2 mg/l NAA) để tiếp tục nghiên cứu ảnh hưởng của thời gian cấy chuyển đến khả năng tạo cụm chồi. Kết quả được tổng hợp tại Bảng 4.

Bảng 4. Ảnh hưởng của thời gian cấy chuyển đến khả năng tạo cụm chồi Đổ trọng

CTTN	Thời gian theo dõi (tuần)	Hệ số nhân chồi (lần)	Chiều cao chồi TB (cm)	Chất lượng chồi
NC3	3	3,2	2,6	++
	4	4,6	3,5	++
	5	4,7	3,5	+
NC7	3	3,9	2,7	+++
	4	5,1	3,6	++
	5	5,3	3,7	+
Sig		0,0001	0,0001	

Ghi chú:

+++ Chất lượng chồi tốt (chồi cao, mập và đồng đều, màu xanh đậm);

++ Chất lượng trung bình (chồi cao, mảnh, các chồi trong cụm không đồng đều, màu xanh);

+ Chất lượng chồi kém (chồi thấp, không đồng đều, màu xanh nhạt).

Kết quả tại Bảng 4 cho thấy, ở cả hai công thức tạo cụm chồi NC3 và NC7 hệ số nhân chồi, chiều cao chồi và chất lượng cụm chồi đều chịu ảnh hưởng của thời gian cấy chuyển. Sau 3 tuần cấy chuyển hệ số nhân chồi (3,2÷3,9 lần), chiều cao chồi (2,6÷2,7 cm) còn khá khiêm tốn nhưng thân cây cứng cáp, màu xanh đậm. Tăng thời gian theo dõi lên 4 tuần, hệ số nhân chồi tăng mạnh (4,6÷5,1 lần), chiều cao chồi tăng lên 3,5÷3,6 cm nhưng chồi mảnh hơn, bắt đầu có

dấu hiệu vàng lá. Sử dụng các chồi này cấy chuyển sang chu kỳ tạo cụm chồi tiếp thấy có dấu hiệu chồi dừng sinh trưởng, khả năng nhân chồi kém.

Theo dõi tiếp sang tuần thứ 5, chồi rụng lá và ngừng sinh trưởng, hệ số nhân chồi (4,7÷5,8 lần) và chiều cao chồi (3,5÷3,7 cm) gần như không tăng. Sử dụng các chồi này cấy chuyển sang chu kỳ tạo cụm chồi tiếp thấy chồi rụng hết lá, lụi dần và chết.

Như vậy, khi tăng thời gian theo dõi lên 4 tuần mặc dù hệ số nhân chồi và chiều cao chồi đều tăng rõ rệt nhưng chồi có dấu hiệu ngừng sinh trưởng, rụng lá ảnh hưởng đến chu kỳ tạo cụm chồi tiếp theo. Sự rụng lá của chồi dẫn đến chồi ngừng sinh trưởng trong vi nhân giống không phải là hiếm. Qua nhiều nghiên cứu có thể khẳng định Ethylene là yếu tố quan trọng liên quan đến sự rụng lá. Trong vi nhân giống với điều kiện nuôi cấy trong bình kín, độ ẩm cao cùng với hình thức sống dị dưỡng của thực vật nuôi cấy thì sự tích tụ khí ethylene trở thành một trong những yếu tố chính điều khiển sự rụng lá [13].

3.4. Ảnh hưởng của loại và hàm lượng đường đến khả năng tạo cụm chồi Đổ trọng

Trong nuôi cấy *in vitro*, mô và tế bào thực vật sống chủ yếu theo phương thức dị dưỡng, nên việc bổ sung đường vào môi trường nuôi

cấy là rất cần thiết. Đường không chỉ điều hòa áp suất thẩm thấu của môi trường mà còn là nguồn carbohydrate cung cấp cho mô và tế bào [14]. Đường glucose là đường đơn (monosaccharide) nên có thể giúp mô, tế bào hấp thụ dễ dàng hơn để cung cấp năng lượng cho hoạt động sống của cây. Trong khi sucrose là đường đôi (disaccharide), gồm 1 phân tử glucose kết hợp với 1 phân tử fructose. Để mẫu thuận lợi hấp thụ, đường sucrose cần bị thủy phân một phần thành glucose và fructose nên thường khó khăn hơn.

Tiếp tục sử dụng môi trường nhân nhanh MS + 1,2 mg/l BAP + (0÷0,2 mg/l) NAA + 7 g agar có bổ sung hai loại đường sucrose (20÷30 g) và glucose (0÷10 g) để tiếp tục nghiên cứu ảnh hưởng của hàm lượng đường sucrose và đến khả năng nhân chồi, chất lượng chồi Đổ trọng sau 3 tuần và 4 tuần theo dõi.

Bảng 5. Ảnh hưởng của loại và hàm lượng đường đến khả năng tạo cụm chồi Đổ trọng

CTTN	Loại và hàm lượng đường		Môi trường	Tỉ lệ chồi tạo cụm chồi (%)	Sau 3 tuần cấy chuyển			Sau 4 tuần cấy chuyển		
	Sucrose (g/l)	Glucose (g/l)			Hệ số nhân chồi (lần)	Chiều cao chồi TB (cm)	Chất lượng chồi	Hệ số nhân chồi (lần)	Chiều cao chồi TB (cm)	Chất lượng chồi
N1	20	10	NC3	98,33	3,9	2,9	+++	5,7	4,4	+++
N2			NC7	100,00	4,5	2,8	+++	5,9	4,6	+++
N3	25	5	NC3	96,67	3,5	2,7	+++	5,1	3,1	+++
N4			NC7	98,33	4,2	2,6	+++	5,3	3,9	++
N5	30	0	NC3	98,33	3,2	2,6	++	4,6	2,9	++
N6			NC7	95,00	3,9	2,7	+++	5,1	3,2	++
Sig				0,536	0,0001	0,077		0,0001	0,0001	

Ghi chú:

+++ Chất lượng chồi tốt (chồi cao, mập và đồng đều, màu xanh đậm);

++ Chất lượng trung bình (chồi cao, mảnh, các chồi trong cụm không đồng đều, màu xanh);

+ Chất lượng chồi kém (chồi thấp, không đồng đều, màu xanh nhạt).

Nhìn chung, khi thay thế một phần đường glucose (5÷10 g/l) tỉ lệ tạo cụm chồi và chiều cao chồi, chất lượng chồi sau 3 tuần không có sự sai khác rõ rệt giữa các công thức thí nghiệm (Sig > 0,05). Tỉ lệ chồi tạo cụm chồi đều đạt rất

cao 95-100%, chiều cao chồi sau 3 tuần cấy chuyển 2,6÷2,9 cm, hầu hết các công thức đều cho chất lượng chồi tốt. Giai đoạn này hệ số nhân chồi vẫn có sự sai khác giữa các công thức thí nghiệm. Hệ số nhân chồi đều tăng dần khi

tăng nồng độ đường glucose lên $5 \div 10$ g/l môi trường nuôi cấy ở cả công thức môi trường NC3 và NC7. Nhìn chung công thức N1, N2 (bổ sung 10 g/l đường glucose) cho hệ số nhân chồi cao nhất ($3,9 \div 4,5$ lần) và thấp nhất khi không bổ sung đường glucose ($3,2 \div 3,9$ lần).

Sau 4 tuần cấy chuyển, hệ số nhân chồi ($4,6 \div 5,9$ lần) và chiều cao chồi ($2,9 \div 4,6$ cm) đều tăng rõ rệt so với sau 3 tuần cấy chuyển. Trong giai đoạn này, sự thay đổi của hàm lượng đường glucose thể hiện rõ rệt lên cả 3 chỉ tiêu theo dõi là hệ số nhân chồi, chiều cao chồi và cả chất lượng chồi. Công thức N1, N2 (bổ sung 10 g/l đường glucose) cho hệ số nhân chồi ($5,7 \div 5,9$ lần) và chiều cao chồi ($4,4 \div 4,6$ cm) vượt trội và chất lượng chồi vẫn rất tốt, sai khác rõ rệt với các công thức còn lại (hệ số nhân chồi

$4,6 \div 5,1$ lần; chiều cao chồi $2,9 \div 3,9$ cm và chồi cũng bắt đầu gầy mảnh, bắt đầu có dấu hiệu vàng).

Như vậy để tạo cụm chồi Đổ trọng xuất xứ Lào Cai nên sử dụng công thức môi trường MS + 1,2 mg/l BAP + ($0 \div 0,2$) mg/l NAA + 7 g/l aga + 20 g/l sucrose + 10 g/l glucose với hệ số nhân chồi $5,7 \div 5,9$ lần và chiều cao chồi đạt $4,4 \div 4,6$ cm sau 4 tuần nuôi cấy, chồi to mập, xanh đậm, thân cứng cáp (Hình 5). Các chỉ tiêu đánh giá tạo cụm chồi này khá tương đồng với khả năng tạo cụm chồi xuất xứ từ Lai Châu. Tuy nhiên, với xuất xứ từ Lào Cai đòi hỏi bổ sung nồng độ BAP cao hơn và thay thế bằng 10 g/l đường glucose + 20 g/l đường sucrose trong môi trường nuôi cấy.



Hình 5. Cụm chồi Đổ trọng sau 4 tuần cấy chuyển sang môi trường tạo cụm chồi

3.5. Ảnh hưởng của cđhst đến khả năng ra rễ của chồi Đổ trọng

Theo nghiên cứu của Chen L. và cộng sự (1995) môi trường tạo rễ đòi hỏi sử dụng môi trường 2/3 MS có bổ sung 0,1 mg/l NAA [12]. Nghiên cứu của Chen R. và cộng sự (2008), Chồi Đổ trọng được nuôi cấy trên môi trường chứa 1/2 MS có bổ sung 0,5 μ M NAA cho tỷ lệ ra rễ cao nhất, với trung bình 8,50 rễ/chồi sau 4 tuần. Bổ sung thêm 1 μ M NAA cũng tạo rễ, nhưng số rễ giảm xuống còn 5,67 rễ/chồi và mô sẹo xuất hiện ở chóp rễ, trong khi môi trường bổ sung 0,1 μ M NAA chồi không ra rễ [11]. Kế thừa các nghiên cứu đó, trong nghiên cứu của Zhigunov A. V. và Nguyen Quynh Trang (2020) đã sử dụng môi trường 2/3 MS có bổ sung cả NAA và IBA ở các nồng độ $0,5 \div 2,0$ mg/l. Kết quả cho thấy với

các công thức sử dụng IBA nồng độ $> 0,5$ mg/l chồi Đổ trọng xuất hiện rất nhiều mô sẹo, chồi kém phát triển và hoàn toàn không ra rễ. Công thức tối ưu nhất là 2/3 MS có bổ sung 1,5 mg/l NAA với số rễ trung bình trên chồi là 2,9 rễ, chiều dài rễ trung bình là 1,8 cm sau 4 tuần cấy chuyển [9].

Vì vậy, trong nghiên cứu tạo rễ Đổ trọng xuất xứ Lào Cai, chồi Đổ trọng đạt chiều cao từ 1,5 cm trở lên, chồi to mập, thân cứng cáp và có màu xanh đậm được cấy chuyển vào môi trường 2/3 MS có bổ sung thêm các loại chất điều hòa sinh trưởng NAA ở nồng độ thay đổi từ 1,0 \div 1,6 mg/l, IBA ở nồng độ thay đổi từ 0,2 \div 0,4 mg/l. Sau 4 tuần cấy chuyển sang môi trường tạo rễ, kết quả thu được số liệu như Bảng 6.

Bảng 6. Ảnh hưởng của chất ĐHST đến khả năng ra rễ của chồi Đổ trọng

CTTN	Chất ĐHST (mg/l)		Tỉ lệ chồi ra rễ (%)	Số rễ TB/ chồi (rễ)	Chiều dài rễ TB (cm)	Chất lượng rễ
	NAA	IBA				
R1(ĐC)	0	0	0	0	0	
R2	1,0	-	21,67	0,83	0,82	++
R3	1,2	-	40,00	0,99	0,89	++
R4	1,4	-	70,00	1,91	1,83	+++
R5	1,6	-	66,67	1,55	1,28	+++
R6	1,0	0,2	88,33	2,28	1,69	+++
R7	1,0	0,4	93,33	2,48	1,96	+++
R8	1,2	0,2	76,67	2,22	1,19	++
R9	1,2	0,4	68,33	2,09	1,20	++
	<i>Sig</i>		<i>0,0001</i>	<i>0,0001</i>	<i>0,0001</i>	

Ghi chú:

+++ Chất lượng chồi tốt (chồi cao, mập và đồng đều, màu xanh đậm);

++ Chất lượng trung bình (chồi cao, mảnh, các chồi trong cụm không đồng đều, màu xanh);

+ Chất lượng chồi kém (chồi thấp, không đồng đều, màu xanh nhạt).

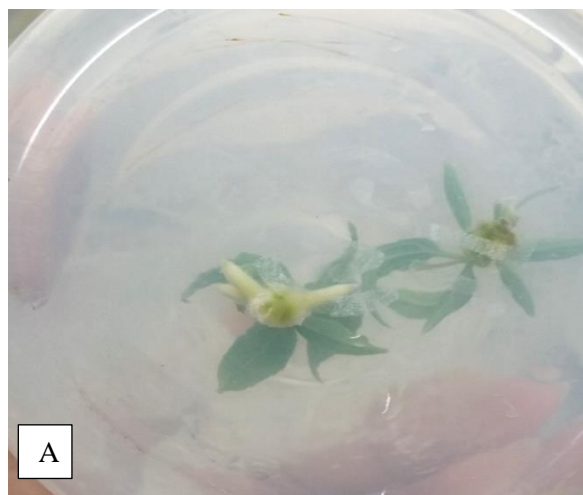
Với nhóm công thức sử dụng môi trường 2/3 MS có bổ sung riêng lẻ IBA ở các nồng độ 0,2÷0,4 mg/l không thích hợp cho sinh trưởng cũng như ra rễ loài Đổ trọng. Tại các thí nghiệm này, chồi Đổ trọng đều không ra rễ, mô sẹo phát triển lấn át sinh trưởng của chồi.

Môi trường 2/3 MS có bổ sung NAA ở các nồng độ khác nhau cho chồi Đổ trọng sinh trưởng tốt, thân mập mạp, xanh đậm, tỉ lệ chồi ra rễ thay đổi từ 21,7÷70,0%. Trong đó, công thức môi trường 2/3 MS + 1,4 mg/l NAA cho khả năng tạo rễ tối ưu nhất, tỉ lệ chồi ra rễ đạt cao nhất 70%, số rễ trung bình 1,9 rễ/chồi với chiều dài rễ là 1,8 cm, chất lượng rễ tốt (rễ trắng đục, mập và phân nhánh thứ cấp). Khi tăng nồng độ NAA lên 1,6 mg/l tỉ lệ chồi ra rễ giảm xuống 66,7%, số rễ (1,6 rễ/chồi) và chiều dài rễ (1,3cm) cũng có xu hướng giảm.

Nhóm công thức 2/3 MS có kết hợp cả NAA và IBA ở các nồng độ khác nhau cho tỉ lệ chồi ra rễ, số lượng rễ TB/chồi và chiều dài rễ trung bình đều vượt trội hơn so với chỉ bổ sung đơn

lẻ NAA. Trong đó, công thức R7 (2/3 MS+1 mg/l NAA + 0,4 mg/l IBA) cho tỉ lệ chồi ra rễ cao nhất 93,3%, số rễ TB/ chồi là 2,5 rễ/chồi, chiều dài rễ TB là 1,96 cm, chất lượng rễ tốt. Nhóm công thức này không chỉ cho khả năng tạo rễ tốt hơn mà thời gian chồi ra rễ khá sớm, chỉ cần sau 14 ngày cấy chuyển. Trong khi sử dụng riêng NAA phải mất tới 20 ngày rễ mới hình thành.

Như vậy, môi trường tạo rễ tạo cây hoàn chỉnh Đổ trọng xuất xứ Lào Cai khá tương đồng với xuất xứ Lai Châu (Zhigunov A. V. và Nguyen Quynh Trang, 2020) cả về môi trường tạo rễ là 2/3 MS + 1 mg/l NAA + 0,4 mg/l IBA + 30 g/l sucrose + 7 g/l agar, cả về khả năng tạo rễ thông qua các chỉ tiêu tỷ lệ chồi ra rễ, số rễ/chồi, chiều dài rễ. Nhìn chung với công thức này tỷ lệ chồi ra rễ khá cao 93% vượt trội hơn nghiên cứu trước đó, chất lượng rễ tốt (Hình 6). Trong nghiên cứu này chỉ có số lượng rễ còn thấp hơn so với nghiên cứu của Chen R. và cộng sự (2008) là 8,5 rễ sau 4 tuần nuôi cấy [11].



Hình 6. Cây Đổ trọng sau 2 tuần (A) và 4 tuần (B) cấy chuyển sang môi trường ra rễ

4. KẾT LUẬN

- Với hạt Đổ trọng, không chỉ vỏ quả mà lớp vỏ hạt bao phủ rễ mầm và lá mầm cũng ngăn cản sự nảy mầm của hạt. Từ đây mở ra hướng mới khi xử lý nảy mầm hạt Đổ trọng bằng các biện pháp truyền thống cần tác động không chỉ tới vỏ quả mà tới cả lớp vỏ mềm bao quanh rễ và lá mầm.

- Khi xử lý nảy mầm hạt giống Đổ trọng trong nuôi cấy *in vitro* nên khử trùng bằng $HgCl_2$ 0,1% trong 5 phút, sau khử trùng hạt được cắt bỏ $\frac{1}{4}$ chiều dài hạt ở phần chứa lá mầm rồi cấy vào môi trường nuôi cấy khởi đầu sẽ cho tỷ lệ mẫu sạch và mẫu tái sinh cao nhất (trung bình tỷ lệ mẫu sạch và tỷ lệ mẫu sạch nảy chồi là 98,3%).

- Môi trường dinh dưỡng để nhân nhanh chồi Đổ trọng: NC5: MS + 1,2 mg/l BAP + 0÷0,2 mg/l NAA + 20 g/l sucrose + 10 g/l glucose + 7 g/l agar với hệ số nhân chồi là 5,7÷5,9 lần, chiều cao chồi trung bình 4,4÷4,6 cm, chồi to mập, cứng cáp và có màu xanh đậm. Thời gian của một chu kỳ cấy chuyển là 4 tuần.

- Môi trường tạo rễ tạo cây hoàn chỉnh: 2/3 MS + 1 mg/l NAA + 0,4 mg/l IBA + 30 g/l sucrose + 7 g/l agar với tỉ lệ chồi ra rễ cao nhất 93,3%,

số rễ TB/ chồi là 2,5 rễ, chiều dài chồi TB là 1,96 cm, chất lượng rễ tốt sau 4 tuần cấy chuyển.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. Stratonovich A. I. & Sokolov S.Y. (1951). Trees and shrubs of the USSR. Moscow: Publishing House of the USSR Academy of Sciences.
- [2]. Tril A.V. (2005). Ecological and Biological Features of *Eucommia ulmoides* Oliv. introduced in the Northwest Caucasus and Prospects for Its . Abstract of the dissertation of the Candidate of agricultural Sciences. Maikop State University of Technology. 22p
- [3]. CHIEN T. H. (1957). Pharmacological action of *Eucommia ulmoides*, Oliv. The Japanese Journal of Pharmacology. 6(2): 122-137.
- [4]. Xin-Hui Xing, Akinori Ono, Kazuhiko Miyanaga, Yasunori Tanji & Hajime Unno (2001). A kinetic model for growth of callus derived from *Eucommia ulmoides* aiming at mass production of a factor enhancing collagen synthesis of animal cells. Mathematics and computers in simulation. 56(4-5): 463-474.
- [5]. Đinh Quốc Việt, Lê Thị Cẩm Nhung, Nguyễn Thị Thanh Bình, Đỗ Thị Nga, Phan Thị Thùy Trang, Phan Thị Diệu Phan, Nguyễn Trí Quốc, Nguyễn Thị Phương Lê Chi & Nguyễn Thị Bích Hường (2023). Hiện trạng sản xuất cây dược liệu tại vùng Nam Trung Bộ. Tạp chí Khoa học Tây Nguyên. 17(61): 68-76.
- [6]. Aleksandrovna S. G., Nguyen Quynh Trang & Grigorievna C.S. (2020). Features of the phenology of *Eucommia ulmoides* Oliv.(Eucommiaceae Van Tiegh.) in the humid subtropical zone of Russia. Bulletin of the Main Botanical Garden. (2): 31-38.

- [7]. Zheng G. H., Lin J. & Zhang Q. C. (1989). Study on the seed dormancy and germination of *Eucommia ulmoides*. Seed. 3: 8-10.
- [8]. Nguyen Quynh Trang & Zhigunov A.V. (2021). Cultivation of *Eucommia ulmoides* Oliv. in the nursery in St. Petersburg. Proceedings of the St. Petersburg Research Institute of Forestry. (1): 55-67.
- [9]. Zhigunov A. V. & Nguyen Quynh Trang (2020). Introduction *Eucommia ulmoides* Oliv. into *in vitro* culture. News of higher educational institutions. Forest Magazine. 5(377): 38-50.
- [10]. Nguyễn Hải Tuất & Nguyễn Trọng Bình (2005). Khai thác và sử dụng SPSS để xử lý số liệu nghiên cứu trong lâm nghiệp. NXB Nông nghiệp, Hà Nội.
- [11]. Namimatsu S., Chen R., Nakadozono Y., Bamba T., Nakazawa Y. & Gyokusen K. (2008). Efficient regeneration of *Eucommia ulmoides* from hypocotyl explant. Biologia plantarum. 52: 713-717.
- [12]. Chen L. J, Hu T. & Huang L. (1995). A protocol toward multiplication of the medicinal tree, *Eucommia ulmoides* Oliver. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*. 31: 193-198.
- [13]. Agusti J., Merelo P., Cercós M., Tadeo F. R. & Talón M. (2009). Comparative transcriptional survey between laser-microdissected cells from laminar abscission zone and petiolar cortical tissue during ethylene-promoted abscission in citrus leaves. *BMC Plant Biology*. 9: 1-20.
- [14]. Nguyễn Đức Lượng & Lê Thị Thủy Tiên (2002). Công nghệ tế bào. NXB Đại học Quốc Gia, TP. Hồ Chí Minh.