

Bài báo nghiên cứu**KHẢO SÁT ẢNH HƯỞNG CỦA AIA VÀ BA ĐẾN QUÁ TRÌNH
HÌNH THÀNH CHỒI VÀ MÔ SẸO TỪ ĐOẠN THÂN MANG CHỒI CÂY KINH GIỚI
(*Elsholtzia ciliata* (Thunb.) Hyl.) TRONG ĐIỀU KIỆN NUÔI CÂY *IN VITRO*****Lương Thị Lệ Thơ*, Lưu Tăng Phúc Khang, Nguyễn Xuân Hiếu,****Đinh Thị Bích Thủy, Võ Ngọc Khôi Nguyên, Châu Minh Hải Đăng***Trường Đại học Sư phạm Thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam***Tác giả liên hệ: Lương Thị Lệ Thơ – Email: tholtl@hcmue.edu.vn**Ngày nhận bài: 10-5-2022; ngày nhận bài sửa: 28-6-2022; ngày duyệt đăng: 09-9-2022***TÓM TẮT**

Kinh giới (Elsholtzia ciliata (Thunb.) Hyl.) là một cây dược liệu quý nhưng việc nhân giống cây và tạo nguồn cây sạch bệnh hiện nay còn hạn chế. Sự tạo chồi hay tạo mô sẹo để biệt hóa thành rễ, chồi và phôi để phát triển thành cây hoàn chỉnh nhằm tạo nguyên liệu khởi đầu cho quá trình nhân nhanh cây giống Kinh giới bằng phương pháp nuôi cấy in vitro. Kết quả nghiên cứu cho thấy, sự phối hợp giữa AIA 0,5 mg/L và BA 1,0 mg/L giúp cho sự phát triển chồi từ đoạn thân mang chồi cây Kinh giới đạt tốt nhất và sự phối hợp giữa AIA 1,0 mg/L và BA 1,0 mg/L giúp cho quá trình cảm ứng hình thành sẹo từ đoạn thân mang chồi cây Kinh giới tốt nhất sau 4 tuần nuôi cấy.

Từ khóa: cây Kinh giới; giống; sạch bệnh; nuôi cấy *in vitro*; mô sẹo

1. Mở đầu

Kinh giới (*Elsholtzia ciliata* (Thunb.) Hyl.) là một loài cây thuộc họ Hoa môi (Lamiaceae) có nguồn gốc từ châu Á và được phân bố rộng rãi trên nhiều nước như: Ấn Độ, Trung Quốc, Việt Nam... (Guo et al., 2011). Đây là một loại rau thơm có mùi vị cay, có tính ấm, đồng thời còn là nguồn nguyên liệu quan trọng trong các ngành y học, thực phẩm, mỹ phẩm và dược phẩm (La, 2002; Chen et al., 2007).

Cho đến nay, ở Việt Nam và trên thế giới đã có rất nhiều công trình nghiên cứu về cây Kinh giới, tuy nhiên các nghiên cứu này thường chỉ tập trung vào việc chiết xuất, phân tích thành phần hóa học từ dịch chiết các bộ phận của cây (Choi et al., 2015; Tran, 2016), còn các nghiên cứu về kỹ thuật nhân giống và đánh giá tác động của các chất điều hòa sinh trưởng thực vật đến quá trình nhân giống sinh dưỡng, nhất là công nghệ nuôi cấy mô tế bào còn hạn chế. Bên cạnh đó, việc nhân giống cây hiện nay chủ yếu được thực hiện bằng cách gieo hạt với thời gian nảy mầm kéo dài và cây con rất dễ bị sâu bệnh tấn công.

Cite this article as: Lương Thị Lệ Thơ, Lưu Tăng Phúc Khang, Nguyễn Xuân Hiếu, Đinh Thị Bích Thủy, Võ Ngọc Khôi Nguyên, & Châu Minh Hải Đăng (2022). The effect of AIA and BA on *in vitro* shoot and callus induction of *Elsholtzia ciliata* (Thunb.) Hyl.. *Ho Chi Minh City University of Education Journal of Science*, 19(9), 1461-1471.

Mô sẹo là một đám tế bào không phân hóa, có đặc tính phân chia mạnh thường được tạo ra do những xáo trộn trong quá trình tạo cơ quan. Mô sẹo phát triển không theo quy luật nhưng có khả năng biệt hóa thành rễ, chồi và phôi để tạo cây hoàn chỉnh. Do đó, cây non hay những mảnh thân non của cây trưởng thành để cho mô sẹo trong điều kiện nuôi cấy mô (Bui, 2000; Vu et al., 2012).

Trong nghiên cứu này, chúng tôi khảo sát ảnh hưởng của AIA và BA lên sự tạo chồi và tạo sẹo từ đoạn thân mang chồi cây Kinh giới trong điều kiện nuôi cấy *in vitro* với mục đích nhân nhanh giống cây Kinh giới *in vitro* nhằm tạo nguồn cây giống có chất lượng cao, cung cấp nguồn nguyên liệu được an toàn và rút ngắn thời gian thu hoạch.

2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Các đoạn thân mang chồi có kích thước 2/1 (dài/rộng; cm) được tách ra từ các nhánh cây Kinh giới thu tại Vườn cây mẹ của Công ty Natulism thuộc phường Thảo Điền, Quận 2, Thành phố Hồ Chí Minh.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Khử trùng mẫu cấy

Các đoạn thân mang chồi nách dài khoảng 4 cm, được cắt rời khỏi nhánh, tia bỏ bớt lá, được khử trùng bằng dung dịch NaClO và HgCl₂ ở nồng độ và thời gian khác nhau, sau đó mẫu cấy được cắt bỏ các phần mô bị tổn thương và cấy vào môi trường nuôi cấy MS.

Mẫu chồi sau khi cấy được đặt trên kệ trong phòng nuôi ở điều kiện chiếu sáng 2500 ± 500 lux 12 giờ/ngày, độ ẩm 60% ± 5%, nhiệt độ 22°C ± 2°C.

2.2.2. Phương pháp khảo sát ảnh hưởng của AIA và BA riêng lẻ và kết hợp đến quá trình tạo chồi của đoạn thân mang chồi cây Kinh giới ở các nồng độ khác nhau

Các đoạn thân mang chồi cây Kinh giới sau khi khử trùng được nuôi cấy trên môi trường MS có bổ sung AIA, BA (0,5 mg/L; 1,0 mg/L; 2,0 mg/L) riêng lẻ và kết hợp AIA ở các nồng độ (0,5 mg/L; 1,0 mg/L; 2,0 mg/L) với BA ở các nồng độ (0,5 mg/L; 1,0 mg/L; 2,0 mg/L). Sau đó tiến hành theo dõi số chồi, số lá/chồi, màu sắc lá, từ tuần 1 đến tuần 4 ở các nghiệm thức trong quá trình nuôi cấy.

Mẫu đoạn thân mang chồi sau khi cấy được đặt trên kệ trong phòng nuôi ở điều kiện chiếu sáng 2500 ± 500 lux 12 giờ/ngày, độ ẩm 60% ± 5%, nhiệt độ 22°C ± 2°C.

2.2.3. Phương pháp khảo sát ảnh hưởng của AIA và BA riêng lẻ và kết hợp đến quá trình tạo sẹo của đoạn thân mang chồi cây Kinh giới ở các nồng độ khác nhau

Các đoạn thân mang chồi cây Kinh giới sau khi khử trùng được nuôi cấy trên môi trường MS có bổ sung AIA, BA (0,5 mg/L; 1,0 mg/L; 2,0 mg/L) riêng lẻ và kết hợp AIA ở các nồng độ (0,5 mg/L; 1,0 mg/L; 2,0 mg/L) với BA ở các nồng độ (0,5 mg/L; 1,0 mg/L; 2,0 mg/L). Sau đó tiến hành theo dõi số mẫu tạo sẹo, màu sắc sẹo từ tuần 1 đến tuần 4 ở các nghiệm thức trong quá trình nuôi cấy.

Mẫu đoạn thân mang chồi sau khi cấy được đặt trên kệ trong phòng nuôi ở điều kiện tối, độ ẩm $60\% \pm 5\%$, nhiệt độ $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$.

2.2.4. Phương pháp quan sát hình thái giải phẫu

Những biến đổi tế bào học trong quá trình cảm ứng tạo sẹo được theo dõi sau khi thực hiện các lát cắt bằng tay, nhuộm kép với đỏ carmin và xanh methylene và quan sát dưới kính hiển vi quang học từ tuần 1 đến tuần 4 sau khi nuôi cấy.

2.2.5. Phương pháp xử lý số liệu

Các số liệu được xử lý thống kê bằng chương trình Statistical Product and Services Solutions (SPSS), phiên bản 20 dùng cho Windows. Sự khác biệt có ý nghĩa ở mức xác suất $P \leq 0,05$ (P: probability) của giá trị được biểu hiện bằng các mẫu tự khác nhau.

3. Kết quả

3.1. Kết quả khử trùng mẫu cấy

Đoạn thân mang chồi cây Kinh giới sau khi được khử trùng với dung dịch NaClO và dung dịch HgCl₂ được cấy vào môi trường MS (giai đoạn vào mẫu) và nuôi trong điều kiện *in vitro* ghi ở mục 3.1. Kết quả sau 4 tuần nuôi trong điều kiện *in vitro* ghi nhận: Nghiệm thức 12 khử trùng mẫu bằng dung dịch HgCl₂ 0,1% trong 5 phút cho tỉ lệ sống cao nhất đạt 94,44%. Cao hơn và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với các nghiệm thức còn lại ở mức ý nghĩa 0,05 (Bảng 1). Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Ngo (2009).

Bảng 1. Kết quả khảo sát sự ảnh hưởng của NaClO và HgCl₂ đến tỉ lệ sống của đoạn thân mang chồi cây Kinh giới

Dung dịch	Nghiệm thức	Nồng độ (%)	Thời gian (phút)	Tỉ lệ mẫu sống (%)
NaClO	NT ĐC	0	0	$0 \pm 0,00^a$
	NT1	0,25	1	$1,39 \pm 0,41^a$
	NT2	0,5	1	$1,17 \pm 2,41^a$
	NT3	0,25	3	$2,02 \pm 1,39^a$
	NT4	0,5	3	$3,28 \pm 2,78^{ab}$
	NT5	0,25	5	$3,83 \pm 2,41^{ab}$
	NT6	0,5	5	$4,05 \pm 2,78^{ab}$
HgCl ₂	NT ĐC	0	0	$0 \pm 0,00^a$
	NT7	0,05	1	$15,28 \pm 2,78^a$
	NT8	0,1	1	$19,44 \pm 2,78^b$
	NT9	0,05	3	$27,78 \pm 5,01^b$
	NT10	0,1	3	$48,61 \pm 5,01^c$
	NT11	0,05	5	$63,89 \pm 5,01^c$
	NT12	0,1	5	$94,44 \pm 1,39^d$

Các chữ cái a, b, c, d trong cùng một cột chỉ sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p = 0,05$

3.2. Kết quả khảo sát ảnh hưởng của AIA và BA riêng lẻ đến quá trình tạo chồi của đoạn thân mang chồi cây Kinh giới ở các nồng độ khác nhau

Đoạn thân mang chồi cây Kinh giới khi nuôi cấy trên môi trường MS có bổ sung AIA (0,5; 1,0 và 2,0 mg/L) và BA (0,5; 1,0 và 2,0 mg/L) đều có tác dụng tăng sinh chồi và tăng số lá/chồi sau thời gian 4 tuần sau cấy (Bảng 2 và 3); trong đó nghiệm thức NT13 (AIA 0,5 mg/L) và NT17 (BA 1,0 mg/L) cho số chồi và số lá/chồi đạt cao nhất, cao hơn và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với các nghiệm thức còn lại. Về mặt cảm quan, có thể thấy chồi ở hai nghiệm thức này phát triển xanh tốt và khỏe mạnh hơn (Hình B và F). Khi tăng nồng độ AIA lên 1,0 mg/L (NT14), số chồi và số lá vẫn tăng nhưng thấp hơn có ý nghĩa thống kê so với NT13 và đến NT14 (2,0 mg/L) thì số chồi và số lá/chồi đều giảm so với nghiệm thức NT13. Điều này có thể giải thích bởi mỗi một giai đoạn sinh trưởng của cơ thể thực vật đều có nhu cầu sử dụng mức nồng độ hormone sinh trưởng nhất định, thấp hơn hoặc cao hơn mức đó đều ảnh hưởng không tốt đến sinh trưởng và phát triển của nó.

Bảng 2. Ảnh hưởng của AIA đến sự phát triển của đoạn thân mang chồi cây Kinh giới

Chỉ tiêu sinh trưởng	Nghiệm thức	Nồng độ AIA (mg/L)	Sự phát triển chồi			
			Tuần 1	Tuần 2	Tuần 3	Tuần 4
Số chồi	ĐC	0,0	0,00 ± 0,00 ^{a1}	0,84 ± 0,03 ^{a2}	1,03 ± 0,14 ^{a3}	1,21 ± 0,09 ^{a4}
	NT13	0,5	1,03 ± 0,07^{d1}	1,33 ± 0,09^{d2}	1,66 ± 0,25^{c3}	2,08 ± 0,07^{d4}
	NT14	1,0	0,95 ± 0,11 ^{c1}	1,18 ± 0,12 ^{c2}	1,45 ± 0,08 ^{b3}	1,93 ± 0,11 ^{c4}
	NT15	2,0	0,27 ± 0,08 ^{b1}	0,89 ± 0,08 ^{b2}	1,12 ± 0,12 ^{a3}	1,27 ± 0,06 ^{b4}
Số lá/chồi	ĐC	0,0	0,00 ± 0,00 ^{a1}	0,68 ± 0,03 ^{a2}	0,88 ± 0,07 ^{a3}	0,99 ± 0,12 ^{a4}
	NT13	0,5	0,48 ± 0,08^{c1}	0,93 ± 0,11^{c2}	1,48 ± 0,19^{d3}	1,62 ± 0,18^{d4}
	NT14	1,0	0,44 ± 0,05 ^{b1}	0,88 ± 0,14 ^{c2}	1,09 ± 0,12 ^{c3}	1,25 ± 0,14 ^{c4}
	NT15	2,0	0,00 ± 0,00 ^{a1}	0,72 ± 0,10 ^{b2}	0,96 ± 0,08 ^{b3}	1,05 ± 0,11 ^{b4}

Các chữ cái a, b, c, d trong cùng một cột chỉ sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p = 0,05$

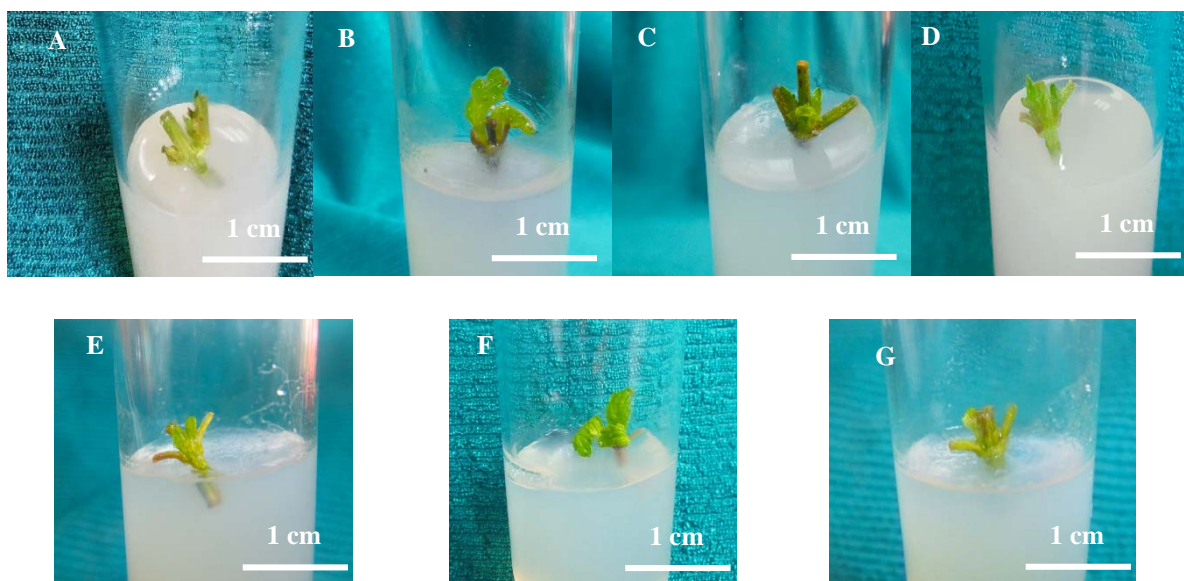
Các chữ số 1, 2, 3, 4 trong cùng một hàng chỉ sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p = 0,05$

Bảng 3. Ảnh hưởng của BA đến sự phát triển của đoạn thân mang chồi cây Kinh giới

Chỉ tiêu sinh trưởng	Nghiệm thức	Nồng độ BA (mg/L)	Sự phát triển chồi			
			Tuần 1	Tuần 2	Tuần 3	Tuần 4
Số chồi	ĐC	0,0	0,00 ± 0,00 ^{a1}	0,84 ± 0,03 ^{a2}	1,03 ± 0,14 ^{a3}	1,21 ± 0,09 ^{a4}
	NT16	0,5	0,98 ± 0,11 ^{c1}	1,34 ± 0,09 ^{c2}	1,84 ± 0,21 ^{b3}	2,07 ± 0,06 ^{b4}
	NT17	1,0	1,14 ± 0,17^{d1}	1,63 ± 0,12^{d2}	2,05 ± 0,18^{c3}	2,20 ± 0,11^{c4}
	NT18	2,0	0,85 ± 0,13 ^{b1}	0,98 ± 0,06 ^{b2}	1,03 ± 0,19 ^{a2}	1,21 ± 0,08 ^{a3}
Số lá/chồi	ĐC	0,0	0,00 ± 0,00 ^{a1}	0,68 ± 0,03 ^{a2}	0,88 ± 0,07 ^{a3}	0,99 ± 0,12 ^{a4}
	NT16	0,5	0,82 ± 0,08 ^{c1}	1,07 ± 0,12 ^{c2}	1,18 ± 0,14 ^{b3}	1,29 ± 0,09 ^{c4}
	NT17	1,0	1,01 ± 0,06^{d1}	1,24 ± 0,08^{d2}	1,55 ± 0,06^{c3}	1,59 ± 0,15^{d3}
	NT18	2,0	0,55 ± 0,15 ^{b1}	0,77 ± 0,05 ^{b2}	1,23 ± 0,05 ^{b4}	1,09 ± 0,07 ^{b3}

Các chữ cái a, b, c, d trong cùng một cột chỉ sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p = 0,05$

Các chữ số 1, 2, 3, 4 trong cùng một hàng chỉ sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p = 0,05$



Hình 1. Sự phát triển chồi của đoạn thân mang chồi cây Kinh giới sau 4 tuần nuôi cấy trong điều kiện in vitro trong môi trường MS ở các nồng độ AIA hoặc BA khác nhau

A. Đối chứng; B. Nồng độ AIA 0,5 mg/L; C. Nồng độ AIA 1,0 mg/L; D. Nồng độ AIA 2 mg/L. E. Nồng độ BA 0,5 mg/L; F. Nồng độ BA 1,0 mg/L; G. Nồng độ BA 2 mg/L.

3.3. Ảnh hưởng của hỗn hợp AIA và BA đến quá trình sinh chồi của đoạn thân mang chồi cây Kinh giới ở các nồng độ khác nhau

Khi phối hợp AIA (0,5 mg/L; 1,0 mg/L; 2,0 mg/L) và BA (0,5 mg/L; 1,0 mg/L; 2,0 mg/L) ở các nồng độ khác nhau vào môi trường MS sau 4 tuần nuôi cấy đều giúp chồi phát triển tốt. Số chồi, số lá/chồi tăng hơn rất nhiều so với đối chứng (Bảng 4 và Bảng 5). Chồi xuất hiện sớm từ tuần thứ 2 sau khi nuôi cấy và phát triển mạnh, duy trì ổn định đến tuần 4 nên số chồi nhiều, các lá trên chồi to và có màu xanh đậm (Hình 3). Đặc biệt trên môi trường MS có bổ sung AIA 0,5 mg/L và BA 1,0 mg/L cho sự phát triển chồi từ đoạn thân mang chồi cây Kinh giới tốt nhất đạt 2,62 chồi/mẫu và 1,65 lá/chồi (Bảng 4, Bảng 5 và Hình 3C).

Bảng 4. Kết quả khảo sát sự ảnh hưởng của AIA kết hợp với BA

đến sự phát triển của đoạn thân mang chồi cây Kinh giới thông qua tiêu chí về số chồi

Chỉ tiêu sinh trưởng	Nghiệm thức	Nồng độ AIA (mg/L)	Nồng độ BA (mg/L)	Sự phát triển chồi			
				Tuần 1	Tuần 2	Tuần 3	Tuần 4
Số chồi	ĐC	0,0	0,0	0,00 ± 0,00 ^{a1}	0,84 ± 0,03 ^{a2}	1,03 ± 0,14 ^{a3}	1,21 ± 0,09 ^{a4}
	NT19	0,5	0,5	1,05 ± 0,09 ^{f1}	1,35 ± 0,12 ^{d2}	1,73 ± 0,03 ^{d3}	2,08 ± 0,07 ^{f4}
	NT20	0,5	1,0	1,18 ± 0,05^{g1}	1,67 ± 0,21^{e2}	2,08 ± 0,13^{e3}	2,62 ± 0,04^{g4}
	NT21	1,0	0,5	0,96 ± 0,04 ^{e1}	1,25 ± 0,23 ^{c1}	1,62 ± 0,12 ^{c3}	1,95 ± 0,12 ^{e4}
	NT22	1,0	1,0	1,04 ± 0,07 ^{f1}	1,24 ± 0,15 ^{c2}	1,57 ± 0,19 ^{c3}	1,71 ± 0,16 ^{d4}
	NT23	1,0	2,0	0,82 ± 0,02 ^{d1}	1,03 ± 0,11 ^{b2}	1,39 ± 0,15 ^{b3}	1,52 ± 0,04 ^{c4}
	NT24	2,0	1,0	0,49 ± 0,03 ^{c1}	0,86 ± 0,17 ^{a2}	1,34 ± 0,16 ^{b3}	1,46 ± 0,12 ^{b4}
	NT25	2,0	2,0	0,25 ± 0,07 ^{b1}	0,87 ± 0,13 ^{a1}	1,32 ± 0,14 ^{b3}	1,44 ± 0,08 ^{b4}

Các chữ cái a, b, c, d trong cùng một cột chỉ sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p = 0,05$

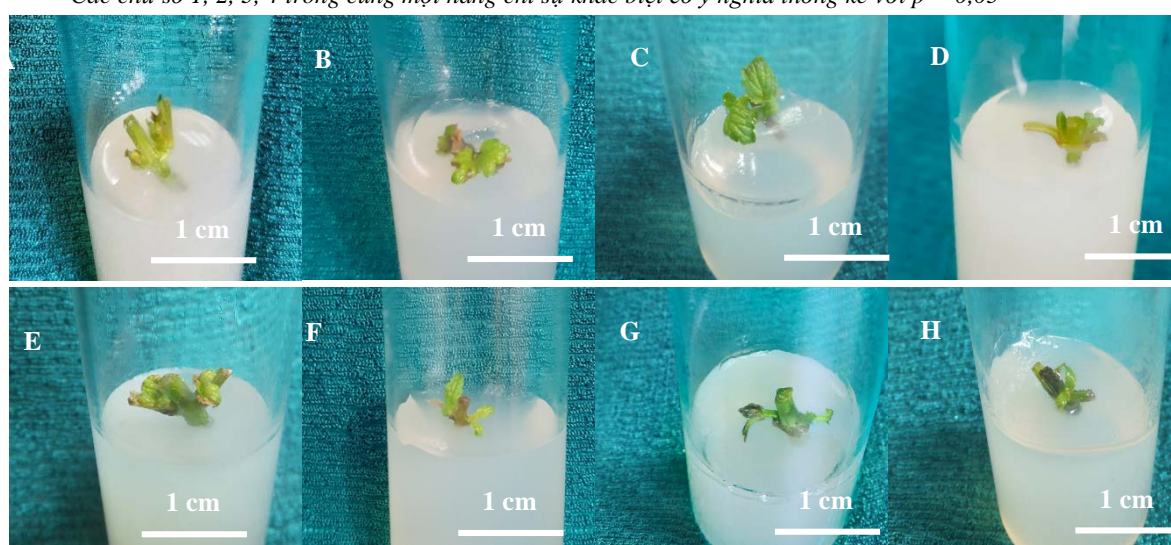
Các chữ số 1, 2, 3, 4 trong cùng một hàng chỉ sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p = 0,05$

Bảng 5. Kết quả khảo sát sự ảnh hưởng của AIA kết hợp với BA đến sự phát triển của đoạn thân mang chồi cây cây Kinh giới thông qua tiêu chí về số lá/chồi

Chỉ tiêu sinh trưởng	Nghiệm thức	Nồng độ AIA (mg/L)	Nồng độ BA (mg/L)	Sự phát triển chồi			
				Tuần 1	Tuần 2	Tuần 3	Tuần 4
Số lá/chồi	ĐC	0,0	0,0	0,00 ± 0,00 ^{a1}	0,68 ± 0,03 ^{a2}	0,88 ± 0,07 ^{a3}	0,99 ± 0,12 ^{a4}
	NT19	0,5	0,5	0,74 ± 0,08 ^{f1}	1,15 ± 0,08 ^{d2}	1,32 ± 0,19 ^{e3}	1,59 ± 0,03 ^{e4}
	NT20	0,5	1,0	0,92 ± 0,05^{g1}	1,25 ± 0,06^{f2}	1,38 ± 0,06^{f3}	1,65 ± 0,02^{f4}
	NT21	1,0	0,5	0,69 ± 0,03 ^{e1}	1,19 ± 0,07 ^{e2}	1,29 ± 0,08 ^{de3}	1,27 ± 0,03 ^{d3}
	NT22	1,0	1,0	0,55 ± 0,01 ^{d1}	1,11 ± 0,03 ^{c2}	1,24 ± 0,13 ^{cd3}	1,55 ± 0,12 ^{e4}
	NT23	1,0	2,0	0,47 ± 0,06 ^{c1}	1,09 ± 0,06 ^{bc2}	1,25 ± 0,09 ^{d3}	1,29 ± 0,09 ^{d3}
	NT24	2,0	1,0	0,27 ± 0,02 ^{b1}	1,07 ± 0,05 ^{b2}	1,18 ± 0,03 ^{c3}	1,22 ± 0,04 ^{c3}
	NT25	2,0	2,0	0,25 ± 0,02 ^{b1}	1,01 ± 0,03 ^{b2}	1,07 ± 0,12 ^{b3}	1,08 ± 0,12 ^{b3}

Các chữ cái a, b, c, d trong cùng một cột chỉ sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p = 0,05$

Các chữ số 1, 2, 3, 4 trong cùng một hàng chỉ sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p = 0,05$



Hình 3. Sự phát triển chồi của đoạn thân mang chồi cây Kinh giới sau 4 tuần nuôi cấy trong điều kiện in vitro trong môi trường MS ở các nồng độ AIA và BA phối hợp

A. Nồng độ AIA 0 mg/L, BA 0 mg/L (đối chứng); B. Nồng độ AIA 0,5 mg/L, BA 0,5 mg/L; C. Nồng độ AIA 0,5 mg/L, BA 1,0 mg/L; D. Nồng độ AIA 1,0 mg/L, BA 0,5 mg/L; E. Nồng độ AIA 1,0 mg/L, BA 1,0 mg/L; F. Nồng độ AIA 1,0 mg/L, BA 2,0 mg/L; G. Nồng độ AIA 2,0 mg/L, BA 1,0 mg/L; H. Nồng độ AIA 2,0 mg/L, BA 2,0 mg/L

Sự phối hợp của chất điều hòa tăng trưởng thực vật nội sinh và ngoại sinh có vai trò rất lớn trong sự phát triển của chồi. Khi bổ sung AIA hay BA riêng lẻ trong môi trường nuôi cấy, ở nồng độ thấp, AIA kích thích sự phát triển chồi, kích thích kéo dài tế bào và phân chia tế bào, BA làm gia tăng vùng mô phân sinh ngọn chồi, thúc đẩy quá trình sinh tổng hợp protein. Tuy nhiên, ở nồng độ cao, AIA hoặc BA cản sự phát triển của phát thể chồi được thành lập hay chuyển các chồi vào trạng thái tiềm sinh hoặc kích thích tạo sẹo (Bui, 2000; Taiz & Zeiger, 2002). Tuy nhiên, khi phối hợp hỗn hợp AIA và BA với nhau, AIA không những làm tăng hoạt tính BA mà còn giúp cho hoạt tính của AIA tăng lên rất mạnh (Bui, 2000). Điều này phù hợp với kết quả nuôi cấy đoạn thân mang chồi cây Kinh giới sau 4 tuần trên môi trường MS có bổ sung AIA phối hợp với BA phát triển tốt hơn khi bổ sung AIA hay BA riêng lẻ và ở môi trường MS có bổ sung AIA 0,5 mg/L và BA 1,0 mg/L, với sự phối hợp nồng độ hợp lí nên đoạn thân phát triển tốt nhất.

3.4. Ảnh hưởng của AIA hay BA riêng lẻ đến quá trình tạo mô sẹo của đoạn thân mang chồi cây cây Kinh giới ở các nồng độ khác nhau

Đoạn thân mang chồi cây Kinh giới khi nuôi cấy trên môi trường MS có bổ sung AIA (0,5; 1,0 và 2,0 mg/L) hoặc BA (0,5; 1,0 và 2,0 mg/L) đều có tác dụng hình thành mô sẹo rõ rệt hơn so với đối chứng không tạo sẹo (Bảng 6, 7 và Hình 4). Đặc biệt ở môi trường MS có bổ sung AIA 2,0 mg/L hoặc BA 2,0 mg/L giúp cho sự phát triển sẹo tốt hơn các nghiệm thức còn lại đạt lần lượt là 81,48% và 67,90% (Hình 4 D, G).

Bảng 6. Kết quả khảo sát ảnh hưởng của AIA đến khả năng tạo mô sẹo từ đoạn thân mang chồi cây cây Kinh giới sau 4 tuần nuôi cấy

Nghiệm thức	Nồng độ AIA (mg/L)	Tỉ lệ mẫu tạo sẹo (%)			
		Tuần 1	Tuần 2	Tuần 3	Tuần 4
ĐC	0,0	0,00 ± 0,00 ^{a1}	0,00 ± 0,00 ^{a1}	0,00 ± 0,00 ^{a1}	0,00 ± 0,00 ^{a1}
NT26	0,5	0,00 ± 0,00 ^{a1}	22,22 ± 3,70 ^{b2}	40,74 ± 3,70 ^{b3}	53,09 ± 7,71 ^{b4}
NT27	1,0	0,00 ± 0,00 ^{a1}	25,92 ± 3,71 ^{b2}	44,44 ± 3,71 ^{b3}	62,69 ± 3,71 ^{b4}
NT28	2,0	0,00 ± 0,00 ^{a1}	32,10 ± 2,14 ^{c2}	67,90 ± 7,71 ^{c3}	81,48 ± 9,80 ^{c4}

Các chữ cái a, b, c, d trong cùng một cột chỉ sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với p = 0,05

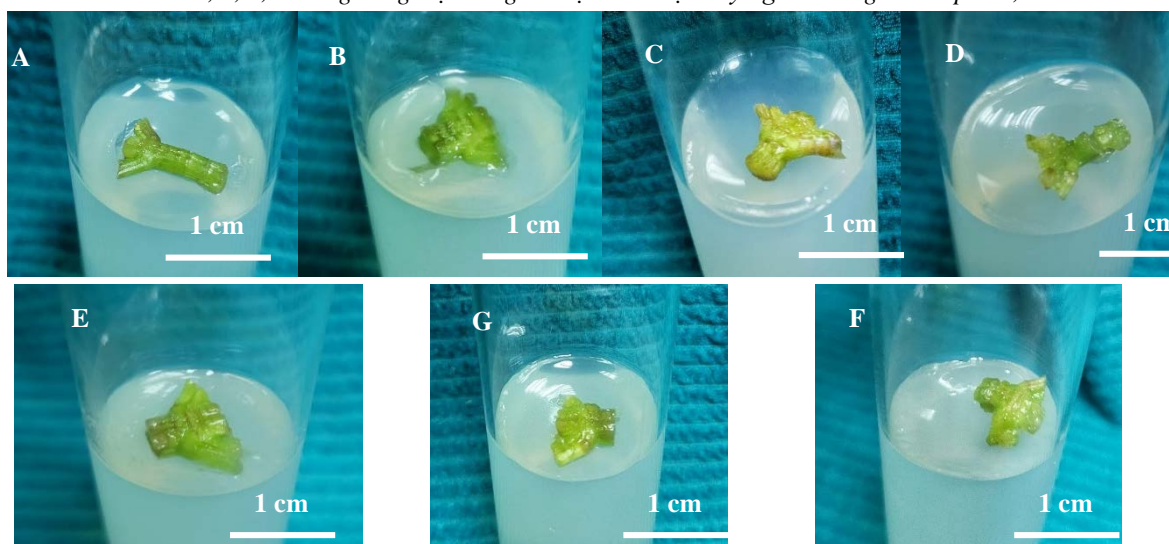
Các chữ số 1, 2, 3, 4 trong cùng một hàng chỉ sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với p = 0,05

Bảng 7. Kết quả khảo sát sự ảnh hưởng của BA đến khả năng tạo mô sẹo từ đoạn thân mang chồi cây cây Kinh giới sau 4 tuần nuôi cấy

Nghiệm thức	Nồng độ BA (mg/L)	Tỉ lệ mẫu tạo sẹo (%)			
		Tuần 1	Tuần 2	Tuần 3	Tuần 4
ĐC	0,0	0,00 ± 0,00 ^{a1}	0,00 ± 0,00 ^{a1}	0,00 ± 0,00 ^{a1}	0,00 ± 0,00 ^{a1}
29	0,5	0,00 ± 0,00 ^{a1}	16,05 ± 2,14 ^{b2}	30,86 ± 2,16 ^{b3}	53,09 ± 5,66 ^{b4}
30	1,0	0,00 ± 0,00 ^{a1}	19,73 ± 5,66 ^{b2}	41,98 ± 5,66 ^{c3}	59,26 ± 4,28 ^{c4}
31	2,0	0,00 ± 0,00 ^{a1}	27,16 ± 4,27 ^{c2}	53,09 ± 4,28 ^{d3}	67,90 ± 4,28 ^{d4}

Các chữ cái a, b, c, d trong cùng một cột chỉ sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với p = 0,05

Các chữ số 1, 2, 3, 4 trong cùng một hàng chỉ sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với p = 0,05



Hình 4. Khả năng tạo sẹo của đoạn thân mang chồi cây Kinh giới sau 4 tuần nuôi cấy trong điều kiện in vitro trong môi trường MS ở các nồng độ AIA hoặc BA khác nhau

A. Đối chứng; B. Nồng độ AIA 0,5 mg/L; C. Nồng độ AIA 1,0 mg/L; D. Nồng độ AIA 2 mg/L; E. Nồng độ BA 0,5 mg/L; F. Nồng độ BA 1,0 mg/L; G. Nồng độ BA 2,0 mg/L.

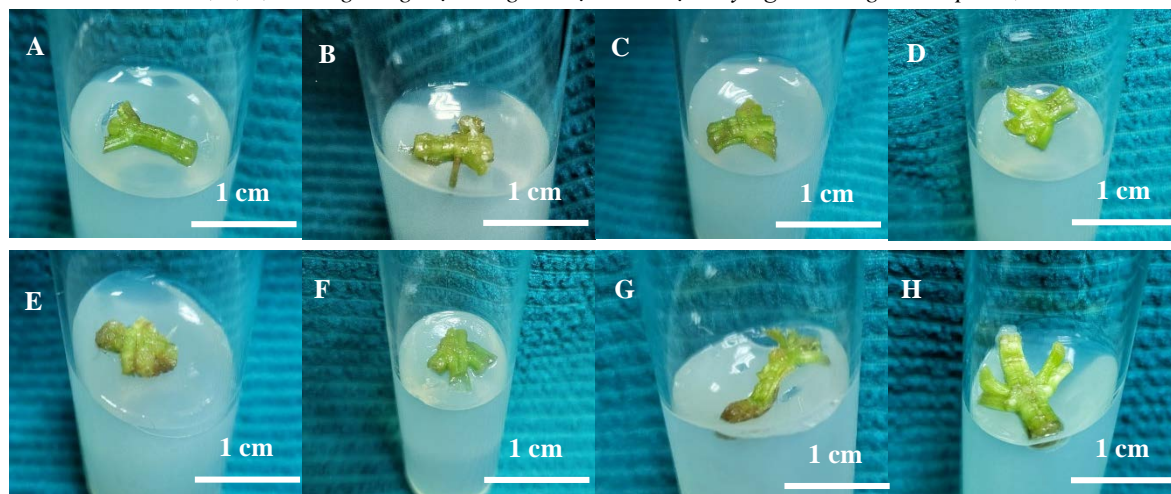
3.5. Ảnh hưởng của hỗn hợp AIA và BA đến quá trình hình thành mô sẹo của đoạn thân mang chồi cây cây Kinh giới ở các nồng độ khác nhau

Các mẫu cấy trên môi trường MS có bổ sung AIA (0,5; 1,0 và 2,0 mg/L) phối hợp với BA (0,5; 1,0 và 2,0 mg/L) đều có tác dụng tạo sẹo tốt hơn khi bổ sung AIA hay BA riêng lẻ (Bảng 8 và Hình 5). Đặc biệt ở môi trường MS có bổ sung AIA 1,0 mg/L và BA 1,0 mg/L giúp cho sự phát triển sẹo tốt nhất: sẹo xuất hiện sớm, có màu trắng trong, mềm và đạt 85,18% sau 4 tuần nuôi cấy (Hình 5E).

Bảng 8. Kết quả khảo sát ảnh hưởng của AIA kết hợp với BA đến khả năng tạo mô sẹo từ đoạn thân mang chồi cây cây Kinh giới sau 4 tuần nuôi cấy

NT	Nồng độ AIA (mg/mL)	Nồng độ BA (mg/mL)	Tỷ lệ mẫu tạo sẹo (%)			
			Tuần 1	Tuần 2	Tuần 3	Tuần 4
ĐC	0,0	0,0	0,00 ± 0,00 ^{a1}	0,00 ± 0,00 ^{a1}	0,00 ± 0,00 ^{a1}	0,00 ± 0,00 ^{a1}
NT32	0,5	0,5	0,00 ± 0,00 ^{a1}	16,04 ± 2,14 ^{b2}	38,27 ± 2,14 ^{b3}	53,09 ± 2,14 ^{b4}
NT33	0,5	1,0	0,00 ± 0,00 ^{a1}	19,75 ± 2,14 ^{bc2}	43,21 ± 5,66 ^{bc3}	54,32 ± 5,66 ^{b4}
NT34	1,0	0,5	0,00 ± 0,00 ^{a1}	23,46 ± 2,13 ^{cd2}	48,15 ± 6,41 ^{cd3}	58,02 ± 5,66 ^{b4}
NT35	1,0	1,0	0,00 ± 0,00^{a1}	39,50 ± 5,66^{f2}	60,50 ± 5,66^{e3}	85,18 ± 3,71^{d4}
NT36	1,0	2,0	0,00 ± 0,00 ^{a1}	27,16 ± 2,13 ^{d2}	41,97 ± 4,27 ^{bc3}	62,96 ± 3,71 ^{b4}
NT37	2,0	1,0	0,00 ± 0,00 ^{a1}	28,40 ± 2,13 ^{d2}	40,74 ± 3,70 ^{bc3}	64,20 ± 2,13 ^{b4}
NT38	2,0	2,0	0,00 ± 0,00 ^{a1}	34,57 ± 2,14 ^{e2}	50,62 ± 2,14 ^{d3}	70,07 ± 3,70 ^{c4}

Các chữ cái a, b, c, d, e, f trong cùng một cột chỉ sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p = 0,05$
 Các chữ số 1, 2, 3, 4 trong cùng một hàng chỉ sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p = 0,05$



Hình 5. Khả năng tạo sẹo của đoạn thân mang chồi cây Kinh giới sau 4 tuần nuôi cấy trong điều kiện in vitro trong môi trường MS ở các nồng độ AIA phối hợp với BA khác nhau

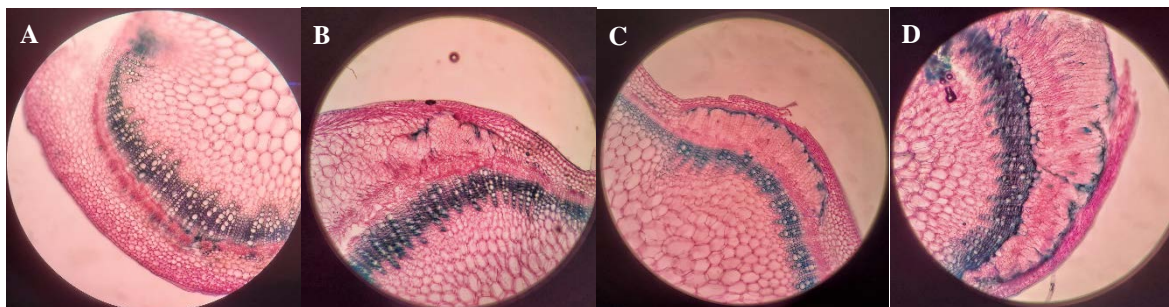
A. Nồng độ AIA 0 mg/L, BA 0 mg/L (đối chứng); B. Nồng độ AIA 0,5 mg/L, BA 0,5 mg/L; C. Nồng độ AIA 0,5 mg/L, BA 1,0 mg/L; D. Nồng độ AIA 1,0 mg/L, BA 0,5 mg/L; E. Nồng độ AIA 1,0 mg/L, BA 1,0 mg/L; F. Nồng độ AIA 1,0 mg/L, BA 2,0 mg/L; G. Nồng độ AIA 2,0 mg/L, BA 1,0 mg/L; H. Nồng độ AIA 2,0 mg/L, BA 2,0 mg/L.

Theo Hopkins (1995), khả năng tạo sẹo còn chịu ảnh hưởng của các chất điều hòa tăng trưởng thực vật nội sinh có nguồn gốc từ sản phẩm trung gian của chu trình đường phân. Do

vậy, ngoài nồng độ auxin và cytokinin ở mức quá thấp hoặc quá cao không có tác dụng tạo chồi hoặc ức chế quá trình tạo sẹo, phải chú ý đến sự phối hợp giữa tỉ lệ auxin và cytokinin. Tỉ lệ auxin/cytokinin cao kích thích tạo rễ, trong khi tỉ lệ này thấp kích thích tạo chồi, ở mức trung gian sẽ kích thích tạo mô sẹo (Zakizadeh và cộng sự, 2008). Điều này lí giải tại sao trên môi trường MS có bổ sung AIA 1,0 mg/L phối hợp với BA 1,0 mg/L cho tỉ lệ ra sẹo và trọng lượng sẹo đạt cao nhất và hiệu quả hơn khi bổ sung AIA 2,0 mg/L phối hợp với BA 2,0 mg/L (Bảng 8).

Song song đó, trở ngại chính trong nuôi cấy mô sẹo là sự hóa nâu của các mẫu do sự sản xuất các hợp chất thứ cấp như polyphenol. Nghiên cứu của Banthorpe và cộng sự (1986) về khả năng tạo mô sẹo trên thực vật cũng đã chứng minh kích thước mẫu ban đầu ảnh hưởng đến sự hóa nâu này. Trong thí nghiệm này, kích thước của các đoạn thân ban đầu được nuôi cấy dài 2 cm và rộng 1 cm phù hợp với việc tạo mô sẹo, hạn chế tối đa sự hóa nâu của mẫu ban đầu.

3.6. Quan sát hình thái giải phẫu



Hình 6. Hình ảnh vi phẫu của sẹo cắt ngang từ thân cây Kinh giới trên môi trường MS có bổ sung AIA 1 mg/L và BA 1 mg/L qua 4 tuần nuôi cấy

A. Sau 1 tuần nuôi cấy; B. Sau 2 tuần nuôi cấy; C. Sau 3 tuần nuôi cấy; D. Sau 4 tuần nuôi cấy

Kết quả ảnh vi phẫu của mô sẹo cây kinh giới (Hình 6) cho thấy, ở tuần thứ 2, sự phát triển của mô bị xáo trộn, các tế bào nhu mô và biểu bì phân hóa, phân chia nhiều lần tạo nên các khối sẹo rõ rệt. Đến tuần thứ 3 và 4, sự tăng sinh của tế bào mô sẹo diễn ra mạnh và nhanh. Kết quả này có thể được giải thích như sau: Dưới tác động của auxin, quá trình tạo mô sẹo *in vitro* gồm một trong ba tiến trình: (i) sự phân chia của tế bào tầng, (ii) tế bào biểu bì hay dưới biểu bì phản ứng mạnh nhất với auxin; (iii) sự xáo trộn của các mô phân sinh sơ khởi. Trong khi đó, cytokinin tác động lên cả hai bước của sự phân chia tế bào: phân nhân và phân bào. Điều này được thấy rõ trong hình thái giải phẫu của sẹo qua các tuần nuôi cấy: đầu tiên là các tế bào biểu bì cảm ứng tạo sẹo, các tế bào này phân hóa sau đó tiến hành phân chia nhiều lần, gây xáo trộn mô, hình thành sẹo.

4. Kết luận

Đoạn thân mang chồi cây Kinh giới được khử trùng bằng HgCl₂ 0,1% trong 5 phút khi nuôi cấy *in vitro* có tỉ lệ sống cao nhất đạt 94,44%.

Nồng độ AIA 0,5 mg/L và BA 1,0 mg/L giúp cho sự phát triển của chồi từ đoạn thân mang chồi cây Kinh giới tốt hơn so với các nồng độ còn lại. Số chồi/mẫu lần lượt đạt 2,08 và 2,20, số lá/chồi lần lượt đạt 1,62 và 1,59.

Sự phối hợp giữa AIA 0,5 mg/L và BA 1,0 mg/L giúp cho sự phát triển chồi từ đoạn thân mang chồi cây Kinh giới tốt nhất đạt 2,62 chồi/mẫu, số lá/chồi đạt 1,65.

Nồng độ AIA 2,0 mg/L và BA 2,0 mg/L giúp cho quá trình cảm ứng tạo sẹo từ đoạn thân mang chồi cây Kinh giới tốt hơn so với các nồng độ còn lại, lần lượt đạt 81,48% và 67,90%.

Sự phối hợp giữa AIA 1,0 mg/L và BA 1,0 mg/L giúp cho quá trình cảm ứng tạo sẹo từ đoạn thân mang chồi cây Kinh giới tốt nhất đạt 85,18%.

❖ **Tuyên bố về quyền lợi:** Các tác giả xác nhận hoàn toàn không có xung đột về quyền lợi.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Banthorpe, D. V., Branch, S. A., Njar, V. C. O., Osborne M. G., & Watson, D. G. (1986). Ability of plant callus cultures to synthesize and accumulate lower terpenoids. *Phytochemistry*, 25(3), 629-636.
- Bui, T. V. (2000). *Sách Sinh lý thực vật đại cương. Phần II: Phát triển [Plant physiology. Part II: Development]*. Ho Chi Minh City National University Publishing House, 333 pages.
- Chen, H. Y., Fan, J. & Cao, J. X. (2007). Determination of flavones in *Elsholtzia bodinieri* by HPLC. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 32, 2385-2387.
- Choi, M. S., Choi, B., Kim, S. H., Pak, S. C., Jang, C. H., Chin, Y., Kim, ... Koo B. (2015). Essential oils from the medicinal herbs upregulate dopamine transporter in rat pheochromocytoma cells. *Journal of Medicinal Food*, 18, 1-9.
- Guo, Z., Liu, Z., Wang, X., Liu, W., Jiang, R., Cheng, R., & She, G. (2012). Elsholtzia: phytochemistry and biological activities. *Chemistry Central Journal*, 6(1), 1-8.
- Hopkins, W. G. (1995). *Introduction to Plant Physiology*. The University of Westther Ontario, 323-350.
- La, D. M., Luu, D. C., Tran, M. H., Tran, H. T., & Ninh, K. B. (2002). *Tai nguyên thực vật có tinh dầu ở Việt Nam, Tập II. [Essential oil plant resources in Vietnam. Ep. II]*. Agricultural Publishing House, 443 pages.
- Ngo, X. B. (2009). *Nuôi cấy mô tế bào thực vật. Cơ sở lý luận và ứng dụng [Plant tissue culture. Theoretical foundations and applications]*. Science and Technics Publishing House, 296 pages.
- Taiz, L., & Zeiger, E. (2002). *Plant Physiology, 3rd Edition*. Benjamin Cummings Publishing Company, California.

- Tran, P. D. (2016). *Nghien cuu thanh phan hoa hoc va hoat tinh sinh hoc cua cay Kinh gioi o Viet Nam [Study on the chemical components and bioactivities of Elsholtzia ciliata in Vietnam]*. Master thesis of science. VNU University of Science.
- Vu, V. V., Vu, V. T., & Hoang, M. T. (2012). *Sinh ly hoc thuc vat [Plant physiology]*. Vietnam Education Publishing House, 312 pages.
- Zakizadeh, H., Debener, T., Sriskandarajah, S., Frello, S. & Serek, M. (2008), Regeneration of miniature potted rose (*Rosa hybrida* L.) via somatic Embryogenesis. *European Journal of Horticultural Science*, 73(3), 111-117.

**THE EFFECT OF AIA AND BA ON *IN VITRO* SHOOT
AND CALLUS INDUCTION OF *Elsholtzia ciliata* (Thunb.) Hyl.
Luong Thi Le Tho*, Luu Tang Phuc Khang, Nguyen Xuan Hieu,
Dinh Thi Bich Thuy, Vo Ngoc Khoi Nguyen, Chau Minh Hai Dang
Ho Chi Minh City University of Education, Vietnam**

*Corresponding author: Luong Thi Le Tho – Email: tholtl@hcmue.edu.vn
Received: May 10, 2022; Revised: June 28, 2022; Accepted: September 09, 2022

ABSTRACT

Marjoram (Elsholtzia ciliata (Thunb.) Hyl.) is a valuable medicinal plant, but the propagation and creation of disease-free plants are currently limited. Shooting or callus formation to differentiate into roots, shoots, and embryos to develop into complete plants to create starting materials for rapid multiplication of marjoram seedlings by in vitro culture method. Results of this study show that the combination of AIA 0.5 mg/L and BA 1.0 mg/L promotes shoot growth from the best Elsholtzia ciliata stem, and the combination of AIA 1.0 mg/L and BA 1.0 mg/L helps the process of induction of scar formation from the stem bearing the best Elsholtzia ciliata buds after four weeks of culture.

Keywords: callus; disease-free; *Elsholtzia ciliata*; in vitro; seed