



Bài báo nghiên cứu

**NGHIÊN CỨU ẢNH HƯỞNG CỦA CHẤT ĐIỀU HÒA SINH TRƯỞNG
IBA VÀ BA ĐẾN KHẢ NĂNG NẤY MẦM
CỦA HẠT GAI MA VƯƠNG (*Tribulus terrestris* L.) TRONG ĐIỀU KIỆN *IN VITRO***

**Lê Nguyễn Thu Ngân¹, Trần Thanh Thúc², Hoàng Thị Mỹ Ngọc²,
Võ Nguyễn Tú Anh², Trần Thị Tường Linh², Quách Văn Toàn Em^{2*}**

¹Trường THCS – THPT Lương Thế Vinh, Quận 1, Thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam

²Trường Đại học Sư phạm Thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam

*Tác giả liên hệ: Quách Văn Toàn Em – Email: emqvt@hcmue.edu.vn

Ngày nhận bài: 22-9-2022; ngày nhận bài sửa: 13-10-2022; ngày duyệt đăng: 19-11-2022

TÓM TẮT

Gai ma vương (Tribulus terrestris L.) là loại cây thuốc thường dùng trong y học cổ truyền, đã được ghi trong Sách Đỏ Việt Nam và Danh lục Đỏ thế giới ở hạng cực kỳ nguy cấp (CR). Bài báo này, nghiên cứu về khả năng khử trùng của HgCl₂ và NaClO với nồng độ và thời gian khác nhau lên hạt cây Gai ma vương; tác động của IBA, BA lên khả năng nảy mầm và hình thái cây con trong điều kiện nuôi cấy in vitro. Kết quả cho thấy NaClO 1% trong 1 phút, tỉ lệ vô trùng và tỉ lệ sống của mẫu đều đạt 100%. Đối với HgCl₂, nồng độ 0,1% trong 20 giây tỉ lệ vô trùng đạt 66,67% và tỉ lệ sống đạt 80% là kết quả tối ưu nhất. Trong môi trường MS có bổ sung NAA, BA thì thời gian, tỉ lệ nảy mầm cũng như hình thái cây con có nhiều biến đổi. Sự nảy mầm trong điều kiện in vitro của loài Gai ma vương thích hợp trong các điều kiện môi trường có bổ sung BA với nồng độ 2,0 mg/L, IBA với nồng độ 1,0 mg/L, sự kết hợp IBA và BA với nồng độ 0,25 mg/L IBA và 0,5 mg/L BA.

Từ khóa: IBA; BA; khử trùng hạt; in vitro; nảy mầm; Gai ma vương (*Tribulus terrestris* L.)

1. Mở đầu

Cây Gai ma vương (*Tribulus terrestris* L.) thuộc họ Quỳ kiến sần (Zygophyllaceae) là loài cây thảo hằng năm mọc bò lan, phân nhiều nhánh. Gai ma vương là một trong những cây có vị thuốc đắng, tính ôn, vào hai kinh bình can và phế, có tác dụng chữa trị các bệnh như nhức đầu, mắt đỏ... đặc biệt là cải thiện tình trạng sinh lí ở nam và điều hòa sinh lí ở nữ (Do, 2004). Ở Việt Nam, loài này phân bố ở các tỉnh Quảng Bình, Quảng Trị, Bình Thuận... đang có nguy cơ tuyệt chủng, được ghi trong Sách Đỏ Việt Nam và Danh lục Đỏ thế giới ở hạng Cực kỳ nguy cấp (CR) (Bo, 2007; IUCN, 2020). Loài *T. terrestris* chứa các hợp chất quý như flavonoid, glycoside flavonoid, saponin steroid, ancaloit và saponin... có tác dụng

Cite this article as: Le Nguyen Thu Ngan, Tran Thanh Thuc, Hoang Thi My Ngoc, Vo Nguyen Tu Anh, Tran Thi Tuong Linh, & Quach Van Toan Em (2022). A study on the effects of IBA and BA growth regulators on germination of *Tribulus terrestris* L. seeds in vitro. *Ho Chi Minh City University of Education Journal of Science*, 19(12), 2076-2089.

chữa bệnh hen suyễn, lợi tiểu, kích thích tình dục, chống ung thư, điều hòa miễn dịch, chống đái tháo đường, giảm đau tim, hệ thần kinh trung ương, bảo vệ gan, chống viêm, chống ung thư, kháng khuẩn, tẩy giun sán, diệt ấu trùng... (Phillips et al., 2006; Pandey et al., 2007; Hu & Yao, 2002; Perrone et al., 2005; Neychev et al., 2006; Zhang et al., 2005). Mặc dù, loài Gai ma vương xuất hiện trong nhiều loại thuốc và dược phẩm trong cuộc sống hàng ngày nhưng chưa có nhiều công trình nghiên cứu về phương diện trồng của loài Gai ma vương. Do đó các sản phẩm sử dụng chiết xuất từ Gai ma vương đều được khai thác từ tự nhiên, dẫn đến các sản phẩm này trở nên khan hiếm.

Ngày nay, nuôi cấy mô thực vật được nghiên cứu và phát triển rộng rãi để vi nhân giống một cách nhanh chóng các loài thực vật có giá trị hay quý hiếm. Nhằm mục đích nhân nhanh nguồn nguyên liệu sạch, cung cấp các sản phẩm thứ cấp đạt chất lượng cao phục vụ cho ngành y học cổ truyền và y học hiện đại, vì vậy chúng tôi tiến hành “Nghiên cứu ảnh hưởng của IBA và BA lên khả năng nảy mầm của hạt cây Gai ma vương (*Tribulus terrestris* L.) trong điều kiện *in vitro*” để xác định nồng độ của IBA và BA thích hợp cho sự nảy mầm của hạt và phát triển của cây con trong điều kiện nuôi cấy *in vitro*.

2. Địa điểm, thời gian và phương pháp nghiên cứu

2.1. Địa điểm và thời gian nghiên cứu

- *Địa điểm thu mẫu*: tiến hành thu quả Gai ma vương tại thôn Lạc Trị, xã Phú Lạc, huyện Tuy Phong, tỉnh Bình Thuận.

- *Thí nghiệm in vitro*: tiến hành ở Phòng Thí nghiệm Sinh thái – Thực vật (M203), Khoa Sinh học, Trường Đại học Sư phạm Thành phố Hồ Chí Minh.

- *Thời gian nghiên cứu*: từ tháng 5/2021 đến tháng 5/2022.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Khảo sát khả năng khử trùng của $HgCl_2$ và $NaClO$ lên hạt Gai ma vương

- *Thu quả và xử lí quả*: Chọn quả chín, màu xanh hơi vàng, khi chạm vào quả dễ rụng và tách thành 5 mảnh quả rời nhau. Quả lấy về phơi khô tự nhiên, sau đó đem bóc lớp vỏ quả (sợi và vỏ hạch cứng), tách lấy hạt, chọn lấy các hạt chắc, loại bỏ các hạt lép, hư.

- *Chọn hạt*: lấy các hạt chắc, không bị tổn thương; loại bỏ các hạt lép, hư; ngâm hạt trong nước xà phòng 2 - 3 phút, rửa sạch dưới vòi nước chảy.

- *Thao tác trong tủ cấy*: khử trùng bề mặt với cồn 70° trong 10 giây. Rửa lại 5 lần với nước cất vô trùng. Thực hiện thí nghiệm khả năng khử trùng của $HgCl_2$ và $NaClO$ lên hạt Gai ma vương trong điều kiện *in vitro*.

+ *Thí nghiệm khả năng khử trùng hạt Gai ma vương bằng $HgCl_2$* : ngâm và lắc hạt trong $HgCl_2$ với nồng độ là 0,1% và 0,2% cùng với thời gian là 10 giây, 20 giây, 30 giây, 60 giây và 90 giây (9 nghiệm thức). Rửa lại 5 lần với nước cất vô trùng và tiến hành cấy mẫu.

+ *Thí nghiệm khả năng khử trùng hạt Gai ma vương bằng $NaClO$* : ngâm và lắc hạt trong $NaClO$ với nồng độ 1%, 3% và 5 % trong thời gian 1, 5 và 10 phút (9 nghiệm thức). Rửa lại 5 lần với nước cất vô trùng và tiến hành cấy mẫu.

Các nghiệm thức khử trùng được tiến hành 10 hạt/lần, lặp lại 3 lần. Theo dõi thí nghiệm trong 4 tuần nuôi cấy trên môi trường MS, ở nhiệt độ $25 \pm 2^\circ\text{C}$, độ ẩm $55\% \pm 10\%$, cường độ ánh sáng 2000 ± 200 lux. Với các chỉ tiêu theo dõi là tỉ lệ nhiễm và tỉ lệ sống:

$$\text{Tỉ lệ nhiễm} = (\Sigma \text{số mẫu nhiễm} / \Sigma \text{số mẫu theo dõi}) \times 100 (\%)$$

$$\text{Tỉ lệ sống} = (\Sigma \text{số mẫu sống} / \Sigma \text{số mẫu theo dõi}) \times 100 (\%)$$

Bảng 1. Bố trí TN khảo sát khả năng khử trùng HgCl_2 và NaClO lên hạt Gai ma vương

Nghiệm thức	Chất khử trùng	Nồng độ (%)	Thời gian (giây)	Nghiệm thức	Chất khử trùng	Nồng độ (%)	Thời gian (giây)
1			10	11			60
2			20	12		1	300
3		0,1	30	13			600
4			60	14	NaClO		60
5			90	15		3	300
6	HgCl_2		10	16			600
7			20	17			60
8		0,2	30	18		5	300
9			60	19			600
10			90				

2.2.2. Ảnh hưởng của IBA và BA lên thời gian, tỉ lệ nảy mầm và phát sinh hình thái cây con

Hạt Gai ma vương sau khi được vô trùng với nghiệm thức khử trùng tốt nhất sẽ được cấy vào môi trường MS có bổ sung IBA và BA riêng lẻ hoặc kết hợp ở các nồng độ khác nhau (Bảng 2). Mỗi nghiệm thức khảo sát được tiến hành 10 hạt/lần, lặp lại 3 lần. Thời gian theo dõi trong 4 tuần nuôi cấy, ở nhiệt độ $25^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$, độ ẩm $55\% \pm 10\%$, cường độ chiếu sáng $2000 \text{ lux} \pm 200 \text{ lux}$. Một số chỉ tiêu theo dõi:

- Thời gian nảy mầm = Σ số ngày nảy mầm / Σ số mẫu theo dõi (ngày)
- Tỉ lệ nảy mầm = $(\Sigma \text{số mẫu nảy mầm} / \Sigma \text{số mẫu theo dõi}) \times 100 (\%)$
- Phát sinh hình thái:
 - + Tỉ lệ tạo sẹo = $(\Sigma \text{số tạo sẹo} / \Sigma \text{số mẫu theo dõi}) \times 100 (\%)$
 - + Số chồi (chồi/mẫu) = $\Sigma \text{số chồi thu được} / \Sigma \text{số cây hình thành (chồi)}$
 - + Số lá đầu tiên (lá/mẫu) = $\Sigma \text{số lá thu được} / \Sigma \text{số cây hình thành (lá)}$.

Bảng 2. Bố trí thí nghiệm ảnh hưởng của IBA và BA lên sự nảy mầm của hạt

Nghiệm thức	IBA (mg/L)	BA (mg/L)
1 (ĐC)	0,0	0,0
2	0,25	
3	0,5	
4	1,0	0,0
5	2,0	
6		0,25
7		0,5
8	0,0	1,0
9		2,0

10		0,25
11	0,25	0,5
12		1,0
13		0,25
14	0,5	0,5
15		1,0

2.2.3. Phương pháp cắt và nhuộm mẫu

Tiến hành giải phẫu các mẫu nuôi cấy, nhuộm kép theo Tran (1981) rồi quan sát dưới kính hiển vi.

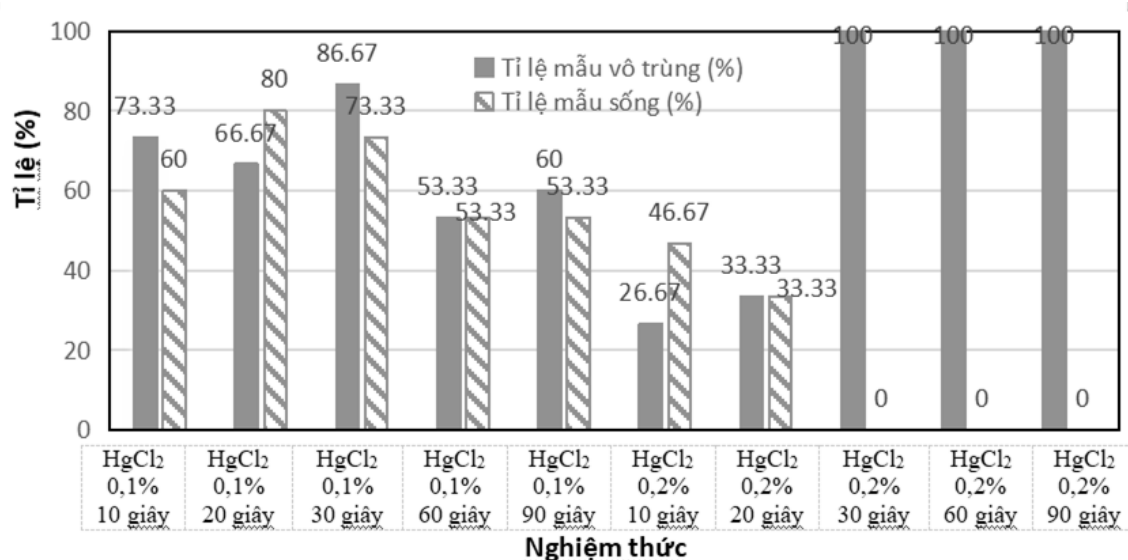
2.2.4. Phương pháp xử lý số liệu

Dùng toán thống kê để xử lý các số liệu thu được và ứng dụng thống kê toán học trong sinh học, sử dụng phần mềm Excel 2016 và Statgraphics plus 3.0 để xử lý số liệu thu được.

3. Kết quả và thảo luận

3.1. Kết quả khảo sát khả năng khử trùng của HgCl₂ và NaClO lên hạt Gai ma vương

Hạt cây Gai ma vương được khử trùng bằng dung dịch khử trùng NaClO và HgCl₂ với các nồng độ và thời gian khác nhau. Kết quả khả năng khử trùng và sống của mẫu được trình bày ở Hình 1 và Hình 2.



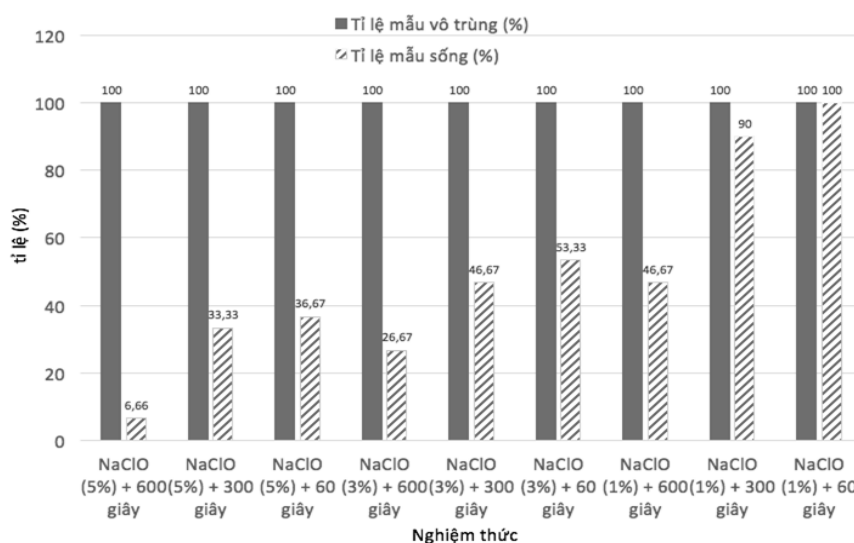
Hình 1. Ảnh hưởng của nồng độ và thời gian xử lý HgCl₂ đến tỉ lệ vô trùng và tỉ lệ sống của hạt Gai ma vương

Qua kết quả ở Hình 1, cho thấy khi tăng nồng độ HgCl₂ và thời gian khử trùng sẽ ảnh hưởng đến sự sống của hạt, thời gian càng lâu và nồng độ cao sẽ làm chết hạt. Đối với nồng độ 0,1%, trong thời gian 10 giây đến 30 giây cho tỉ lệ mẫu vô trùng khá cao (từ 73,33% đến 86,67%). Tuy nhiên, trong thời gian 20 giây, tỉ lệ mẫu vô trùng đạt (66,67%) và tỉ lệ mẫu sống cao nhất (80%). Khi tăng thời gian khử trùng thì tỉ lệ nhiễm sẽ giảm nhưng thời gian khử trùng lâu thì sẽ gây tác dụng ngược đối với mẫu khảo sát, dung dịch có thể xâm nhập vào tế bào gây độc đối với mẫu thí nghiệm. Chính vì vậy, nghiệm thức 2 (khử trùng hạt trong

HgCl₂ 0,1%, thời gian 20s) cho kết quả khử trùng hạt tốt nhất với tỉ lệ mẫu vô trùng là 66,67% và tỉ lệ sống của hạt là 80%.

Khi sử dụng dung dịch HgCl₂ 0,2% trong thời gian 30 giây, 60 giây và 90 giây tỉ lệ mẫu vô trùng đều đạt 100%, nhưng tất cả các mẫu nuôi cấy đều không bật chồi hoặc nảy mầm và tỉ lệ sống của cây là không có. Nguyên nhân là do HgCl₂ là một chất khử trùng mạnh, nên không chỉ gây chết đối với vi sinh vật mà còn gây chết đối với mẫu mô tế bào thực vật. Kết quả này cũng tương tự với quan sát của Wesely và cộng sự (2012) khi khử trùng tạo mẫu sạch từ chồi non cây Nguru tất (*Achyranthes bidentata*) sử dụng HgCl₂ 0,1% trong thời gian 5 phút cho tỉ lệ mẫu sạch đạt 100%, nhưng có đến 95-100% mẫu bị chết. Đặng và cộng sự (2017) (Dang et al., 2017) khi khử trùng mẫu hạt cây Trà hoa vàng (*Camellia* sp.) bằng HgCl₂ thì thời gian khử trùng càng ngắn tỉ lệ mẫu sống càng cao.

Nồng độ và thời gian sử dụng của NaClO đã ảnh hưởng mạnh đến khả năng khử trùng của hạt Gai ma vương được thể hiện qua Hình 2, với nồng độ thấp và thời gian ngắn thì tỉ lệ mẫu vô trùng đã đạt tối đa. Ở các nghiệm thức có nồng độ NaClO cao với thời gian dài đã gây ngộ độc hạt, ảnh hưởng đến hình thái trụ mầm và lá mầm. Vì vậy, nghiệm thức 19 với nồng độ NaClO 1% trong thời gian 1 phút đã cho kết quả tốt nhất với tỉ lệ mẫu vô trùng, tỉ lệ mẫu sống đạt 100%.



Hình 2. Ảnh hưởng của nồng độ và thời gian xử lí NaClO đến tỉ lệ vô trùng và tỉ lệ sống của hạt Gai ma vương

Dựa trên kết quả nghiên cứu cho thấy thời gian và nồng độ của NaClO có ảnh hưởng nhiều đến hiệu quả khử trùng và khả năng sống sót của mẫu nuôi cấy. Theo nghiên cứu của Yildiz và Er (2002), hạt của cây Lanh (*Linum usitatissimum*) được khử trùng bằng NaClO kết hợp với nhiệt độ 10°C sẽ cho hiệu quả tối ưu nhất với tỉ lệ nảy mầm của hạt là 100%. Trinh và cộng sự (2019) cũng cho kết quả tương tự khi tăng thời gian khử trùng bằng NaClO thì tỉ lệ mẫu vô trùng đạt kết quả cao nhưng khả năng nảy mầm lại rất thấp trên hạt cây Sâm bố chính (*Hibiscus sagittifolius* Kurz).

Từ kết quả nghiên cứu trên, chúng tôi tiến hành sử dụng nghiệm thức NaClO 1% trong 1 phút để khử trùng hạt Gai ma vương cho các thí nghiệm ảnh hưởng của IBA và BA lên thời gian, tỉ lệ nảy mầm và phát sinh hình thái cây con.

3.2. Ảnh hưởng của IBA lên thời gian, tỉ lệ nảy mầm và phát sinh hình thái cây con Gai ma vương

Bảng 3. Ảnh hưởng của IBA đến thời gian, tỉ lệ nảy mầm và phát sinh hình thái cây con

Nghiệm thức	IBA (mg/L)	Số ngày nảy mầm (ngày)	Tỉ lệ nảy mầm (%)	Số lá (lá/mẫu)	Tỉ lệ tạo sẹo (%)
NT 1-ĐC	0,0	4,38 ± 0,77 ^c	86,67	3,46 ± 1,90 ^a	0,00
NT 2	0,25	3,69 ± 1,03 ^b	86,67	2,85 ± 1,86 ^a	84,62
NT 3	0,5	3,14 ± 0,95 ^{ab}	93,33	2,43 ± 1,91 ^a	78,57
NT 4	1,0	2,60 ± 0,83^a	100,00	3,80 ± 2,37 ^a	73,33
NT 5	2,0	3,31 ± 0,75 ^b	86,67	3,31 ± 2,25 ^a	76,92

*Chú thích: a, b, c theo cột khác nhau có độ tin cậy 95%

3.2.1. Ảnh hưởng của IBA lên thời gian và tỉ lệ nảy mầm của hạt Gai ma vương

Theo kết quả Bảng 3 cho thấy, nồng độ auxin ảnh hưởng hưởng đến khả năng nảy mầm của hạt. Trong nghiệm thức đối chứng không có IBA cần 4,38 ngày để hạt nảy mầm. Tất cả các nghiệm thức có bổ sung IBA đều nảy mầm nhanh hơn nghiệm thức đối chứng. Nồng độ auxin càng tăng số ngày nảy mầm càng giảm, đặc biệt nghiệm thức 4 (1,0 mg/L IBA) có thời gian nảy mầm hạt ngắn nhất là 2,6 ngày. Tuy nhiên, ở nồng độ cao sẽ làm chậm khả năng nảy mầm của hạt Gai ma vương, cụ thể là nghiệm thức 5 (2,0 mg/L IBA) có thời gian nảy mầm trung bình là 3,31 ngày.

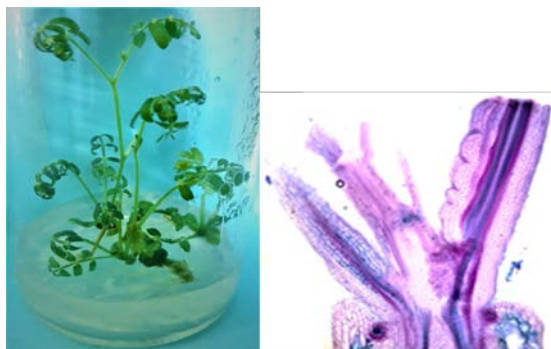
Cùng với thời gian nảy mầm thì tỉ lệ nảy mầm cũng tỉ lệ thuận với nồng độ auxin trong các nghiệm thức, qua đó cho thấy, nồng độ auxin 1,0 mg/L ảnh hưởng mạnh nhất đến tỉ lệ nảy mầm của hạt. Tuy nhiên, ở nồng độ 2,0 mg/L IBA tỉ lệ này lại giảm còn 86,67%, điều này cho thấy nồng độ auxin cao có thể làm ảnh hưởng đến tỉ lệ nảy mầm của hạt. Như vậy, trong các thí nghiệm với IBA, môi trường MS bổ sung 1,0 mg/L IBA thích hợp cho sự nảy mầm của hạt Gai ma vương. Peyghamzadeh và cộng sự (2010) cũng nhận thấy điều tương tự khi nảy mầm hạt cây Óc chó (*Juglans regia* L.) trong môi trường bổ sung IBA thì các hạt cây nảy mầm nhanh hơn hẳn, các lá mầm và lá mầm của phôi chuyển sang màu xanh lục và cặp lá đầu tiên xuất hiện sau hai tuần nhưng ở các nghiệm thức có nồng độ IBA cao (1,0 - 1,5 mg/L IBA) cây con bắt đầu rụng các lá chết và cho thấy sự phát triển không bình thường.

3.2.2. Ảnh hưởng của IBA lên sự tạo sẹo từ trụ dưới lá mầm cây con Gai ma vương

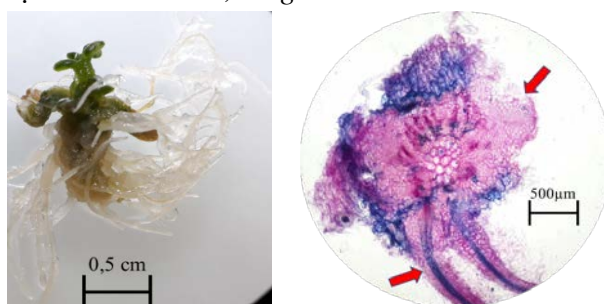
Trong quá trình phát triển, các nghiệm thức đều có sự xuất hiện sẹo ở lá mầm và trụ dưới lá mầm. Các khối sẹo này phát triển, có màu trắng hoặc vàng, khi phát triển sẹo làm hạn chế quá trình phân hóa chồi và lá. Quan sát sự phát triển khối sẹo sau 4 tuần, các khối sẹo ở trụ dưới lá mầm phân hóa và hình thành rễ. Ở nghiệm thức 5 (nồng độ 2,0 mg/L IBA), sự ra rễ diễn ra tốt nhất so với các nghiệm thức còn lại. Sự hình thành khối mô sẹo do nhiều nguyên nhân khác nhau, có thể kể đến như cách thức nảy mầm của hạt, khi hạt nảy mầm không thể đứng được trong môi trường làm cho trụ dưới lá mầm hoặc lá mầm tiếp xúc trực

tiếp với môi trường hoặc do thao tác cấy hoặc do sự khác biệt trong độ tuổi sinh lí của hạt. Cùng với tác dụng của IBA, các khối mô sẹo phân hóa, gia tăng kích thước và khối lượng sẹo, sau một thời gian từ khối mô sẹo phát triển thành các rễ và lan rộng.

Về mặt giải phẫu, sự phát triển khối sẹo là do khối nhu mô vỏ phát triển, trung trụ phân hóa thành rễ bên kéo dài.



Hình 3. Nghiệm thức MS + 1,0 mg/L IBA sau 4 tuần nuôi cấy và sự hình thành chồi ở nghiệm thức MS + 1,0 mg/L IBA sau 2 tuần nuôi cấy



Hình 4. Mô sẹo ở môi trường MS + 2,0 mg/L IBA sau 4 tuần nuôi cấy

3.3. Ảnh hưởng của BA lên thời gian, tỉ lệ nảy mầm và phát sinh hình thái cây con Gai ma vương

Bảng 4. Ảnh hưởng của BA đến đến thời gian, tỉ lệ nảy mầm và phát sinh hình thái cây con

Nghiệm thức	BA (mg/L)	Số ngày nảy mầm (ngày)	Tỉ lệ nảy mầm (%)	Số lá (lá/mẫu)	Tỉ lệ tạo sẹo (%)
NT 1-ĐC	0,0	4,38 ± 0,77 ^c	86,67	3,46 ± 1,90 ^c	0,00
NT 6	0,25	3,54 ± 0,52 ^b	86,67	1,38 ± 0,77 ^a	92,31
NT 7	0,5	3,42 ± 0,90 ^b	80,00	2,00 ± 1,86 ^{abc}	83,33
NT 8	1,0	3,38 ± 1,04 ^b	86,67	1,69 ± 1,25 ^{ab}	92,31
NT 9	2,0	2,54 ± 0,66 ^a	86,67	2,85 ± 2,82 ^{bc}	92,31

*Chú thích: a, b, c theo cột khác nhau có độ tin cậy 95%

3.3.1. Ảnh hưởng của BA lên thời gian và tỉ lệ nảy mầm của hạt Gai ma vương

Theo Bảng 4 cho thấy, các nghiệm thức 6, 7, 8 (0,25 mg/L BA, 0,5 mg/L BA, 1,0 mg/L BA) có thời gian nảy mầm sớm với thời gian của nghiệm thức đối chứng, các nghiệm thức này có số ngày nảy mầm trung bình từ 3,38 đến 3,54 ngày. Tuy nhiên, ở nghiệm thức 9 (2,0 mg/L BA), thời gian nảy mầm nhanh hơn (2,54 ngày). So với các nghiệm thức khảo sát thì nghiệm thức 9 có ý nghĩa về mặt thống kê.

Tỉ lệ nảy mầm của các nghiệm thức tương đối cao và đồng đều với nhau. Tỉ lệ nảy mầm trung bình là 86,67% ở các nghiệm thức 6, 8, 9. Tỉ lệ nảy mầm ở nghiệm thức 7 chỉ đạt 80%. Tuy nhiên, không có sự sai khác về mặt thống kê trong các nghiệm thức đã tiến hành. Kết quả này cũng giống với của Nguyen và cộng sự (2012) khi nghiên cứu khả năng nảy mầm của hạt cây lan Hoàng long (*Coelogyne lawrenceana* Rolfe) sử dụng 2 chất điều hòa sinh trưởng là BA và kinetin thì cho thấy môi trường MS bổ sung 2,0 mg/L BA là cho kết quả tốt nhất về thời gian nảy mầm.

3.3.2. Ảnh hưởng của BA lên phát sinh hình thái cây con Gai ma vương

Theo dõi sự phát triển của các mẫu trong môi trường MS bổ sung BA với các nồng độ khác nhau trong 4 tuần nhận thấy các nghiệm thức đều có sự phát triển về chiều cao, phát triển phần trụ dưới lá mầm, kéo dài phần trụ và phình to tạo thành các khối mô sẹo xốp có màu vàng nhạt, đôi lúc có màu trắng. Đa số các nghiệm thức khảo sát đều xuất hiện lá và số chồi, đặc biệt ở nghiệm thức 9 có số lá và số chồi cao nhất trong các nghiệm thức thí nghiệm với BA (trung bình 2,85 lá/mẫu và 0,77 chồi/mẫu). Samanhudi và cộng sự (2021) khi nghiên cứu sự nảy mầm của hạt cây Gai ma vương bằng cách phối hợp giữa IAA và BA cũng cho rằng việc sử dụng BA một cách độc lập mà không cần bổ sung IAA có thể mang lại hiệu quả tốt hơn về hệ số nhân chồi so với việc bổ sung IAA. Đồng thời kết quả nghiên cứu này cũng chỉ ra rằng việc bổ sung 0,5 mg/L BA cũng cho thời gian xuất hiện của lá nhanh nhất và số lá nhiều nhất so với các nghiệm thức còn lại.

Tiến hành giải phẫu cắt dọc cho thấy vùng đỉnh sinh trưởng phân hóa phát triển kéo dài hình thành các lá đầu tiên và hình thành nhiều chồi.

BA là chất điều hòa sinh trưởng thuộc nhóm cytokinin, ngoài kích thích khả năng nảy mầm của hạt còn kích thích đỉnh sinh trưởng phân hóa tạo nhiều chồi bên phát triển. Cytokinin đóng vai trò chính trong sự thành lập chồi và cơ quan trong nuôi cấy mô, đồng thời nó còn kích thích chồi nách, phân chia tế bào, ức chế sự lão hóa lá, thành lập mô sẹo và tăng trưởng. Với sự hiện diện của cytokinin còn gỡ bỏ hiện tượng ưu thế ngọn kích thích phân hóa chồi bên (Nguyen, 2004). Do đó BA là chất điều hòa sinh trưởng thực vật được dùng nhiều trong các thí nghiệm nhân nhanh chồi trong nuôi cấy *in vitro* đoạn thân của nhiều loài thực vật quan trọng hơn các loại cytokinin khác (Antony et al., 2010; Mazri, 2015).

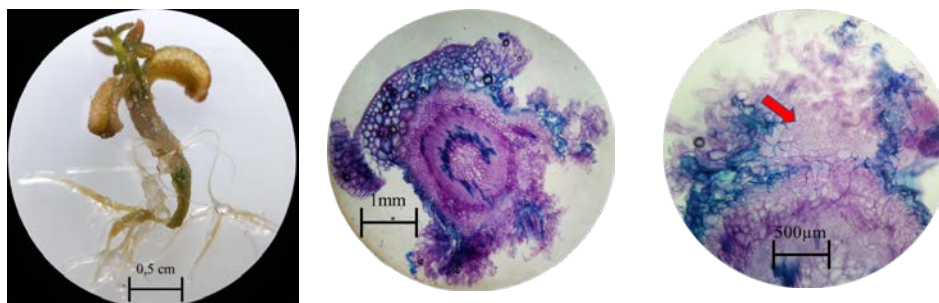


Hình 5. NT MS + 2,0 mg/L BA sau 4 tuần nuôi cấy và sự hình thành chồi ở NT MS + 2,0 mg/L IBA sau 2 tuần nuôi cấy

3.3.3. Ảnh hưởng của BA lên sự tạo sẹo từ trụ dưới lá mầm cây con Gai ma vương

Trong các thí nghiệm khảo sát ảnh hưởng nồng độ của BA đều có sự tạo sẹo, các khối sẹo này xốp, có màu trắng hoặc vàng, thông thường sẹo sẽ hình thành ở phần trụ dưới lá mầm hoặc các lá mầm. Theo phân tích ở Bảng 4 cho thấy, nồng độ càng tăng thì sự tạo sẹo càng nhiều, ở nghiệm thức 6, 8 và 9, tỉ lệ tạo sẹo lên đến 92,31%. Một số nguyên nhân dẫn đến sự tạo sẹo đó là hạt khi nảy mầm không có khả năng mọc thẳng đứng mà uốn cong làm trụ dưới lá mầm tiếp xúc với môi trường hoặc do 2 lá mầm tiếp xúc trực tiếp với môi trường làm cây không phát triển bình thường.

Về mặt giải phẫu khối sẹo xuất phát từ sự phân chia và phát triển của vùng nhu mô vỏ với các tế bào nhu mô có kích thước to, dày. Phần bó dẫn bị phân hóa với tầng libe và tầng gỗ phát triển mạnh.



Hình 6. Mô sẹo ở môi trường MS + 2 mg/L BA sau 4 tuần nuôi cấy

3.4. Ảnh hưởng của IBA và BA lên thời gian, tỉ lệ nảy mầm và phát sinh hình thái cây con Gai ma vương

Bảng 5. Ảnh hưởng của IBA và BA đến thời gian, tỉ lệ nảy mầm và phát sinh hình thái cây con

Nghiệm thức	IBA (mg/L)	BA (mg/L)	Số ngày nảy mầm (ngày)	Tỉ lệ nảy mầm (%)	Số lá (lá/mẫu)	Tỉ lệ sẹo (%)
NT 1-ĐC	0,0	0,0	4,38 ± 0,77 ^d	86,67	3,46 ± 1,90 ^{ab}	0,00
10		0,25	2,80 ± 0,68 ^{ab}	100,00	3,13 ± 3,29 ^{ab}	40,00
11	0,25	0,5	2,67 ± 0,82 ^a	100,00	4,33 ± 2,44 ^b	40,00
12		1,0	3,07 ± 0,92 ^{ab}	93,33	3,00 ± 2,83 ^{ab}	35,71
13		0,25	3,42 ± 1,00 ^{bc}	80,00	2,92 ± 2,43 ^{ab}	50,00
14	0,5	0,5	3,92 ± 0,86 ^{cd}	86,67	1,77 ± 2,92 ^a	84,62
15		1,0	3,71 ± 0,91 ^c	93,33	1,64 ± 1,22 ^a	85,71

*Chú thích: a, b, c, d theo cột khác nhau có độ tin cậy 95%

3.4.1. Ảnh hưởng của IBA và BA lên thời gian và tỉ lệ nảy mầm của hạt Gai ma vương

IBA và BA có ảnh hưởng tích cực đến sự nảy mầm của phôi ở tất cả các giống cây trồng (Peyghamzadeh et al., 2010). Dựa vào Bảng 5, ta thấy rằng khi kết hợp giữa auxin và cytokinin với các nồng độ khác nhau sẽ ảnh hưởng đến thời gian và tỉ lệ nảy mầm của hạt Gai ma vương. Các nghiệm thức khảo sát có sự chênh lệch về thời gian nảy mầm, ở nghiệm

thức 14 (0,5 mg/L IBA và 0,5 mg/L BA) có thời gian nảy mầm trung bình là 3,92 ngày gần với nghiệm thức đối chứng nhất.

Tỉ lệ nảy mầm của các nghiệm thức phối hợp tương đối cao, dao động từ 80% đến 100%. Sự kết hợp giữa auxin và cytokinin kích thích sự nảy mầm nhanh chóng. Ở nghiệm thức 10 (0,25 mg/L IBA và 0,25 mg/L BA) và 11 (0,25 mg/L IBA và 0,5 mg/L BA) có tỉ lệ nảy mầm cao nhất. Nhìn chung, các nghiệm thức phối hợp có tỉ lệ nảy mầm gần tương đồng với các nghiệm thức sử dụng auxin hoặc cytokinin riêng lẻ. Khi kết hợp hai chất kích thích này chỉ ảnh hưởng nhiều đến thời gian nảy mầm của hạt. Ta nhận thấy rằng, nghiệm thức 10 và 11 có tỉ lệ nảy mầm tương đồng với nghiệm thức 4, tỉ lệ này đều là 100%. Tuy nhiên, các nghiệm thức còn lại vẫn có hạt không nảy mầm, nguyên nhân có thể kể đến là sự chênh lệch về tuổi sinh lí của hạt hoặc do trong quá trình khử trùng mẫu làm cho mẫu bị ảnh hưởng.

3.4.2. Ảnh hưởng của IBA và BA lên phát sinh hình thái cây con Gai ma vương

BA và IBA gây ra sự tăng sinh chồi, rễ và mô sẹo và sự nảy mầm của phôi, nhưng nó phụ thuộc vào kiểu gen và nồng độ hormone (Peyghamzadeh et al., 2010). Theo Bảng 5 ta thấy, có sự sai khác rõ rệt ở hai nhóm nghiệm thức, đối với nhóm các nghiệm thức sử dụng 0,25 mg/L IBA với nồng độ BA 0,25 mg/L, 0,5 mg/L, 1,0 mg/L cho thấy số lượng lá cao hơn nghiệm thức đối chứng, đặc biệt ở nghiệm thức 11 (0,25 mg/L IBA và 0,5 mg/L BA) có số lá cao nhất là 4,33 lá/mẫu. Nghiệm thức 0,5 mg/L phối hợp với BA ở các nồng độ (0,25 mg/L, 0,5 mg/L, 1,0 mg/L) cho thấy sự hình thành số lá và số chồi thấp hơn với nghiệm thức đối chứng và thấp hơn nhóm còn lại.

Tiến hành giải phẫu cắt dọc cho thấy vùng đỉnh sinh trưởng phân hóa phát triển kéo dài hình thành các lá đầu tiên và hình thành nhiều chồi.



Hình 7. NT MS + 0,25 mg/L IBA + 0,5 mg/L BA sau 4 tuần nuôi cấy

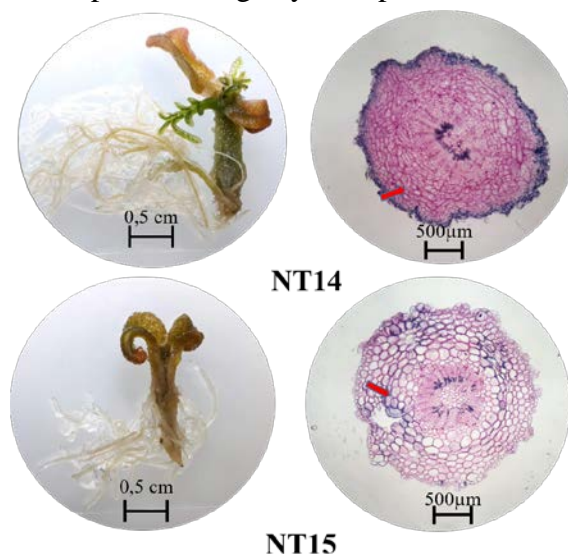
và sự hình thành chồi ở NT MS + 0,25 mg/L IBA + 0,5 mg/L BA sau 2 tuần nuôi cấy

3.4.3. Ảnh hưởng của IBA và BA lên sự tạo sẹo từ trụ dưới lá mầm cây con Gai ma vương

Theo Bảng 5 cho thấy, tỉ lệ tạo sẹo khác nhau giữa hai nhóm nghiệm thức. Đối với nhóm các nghiệm thức 10, 11 và 12, tỉ lệ tạo sẹo rất thấp (từ 35,71% đến 40%). Tuy nhiên, ở nhóm nghiệm thức 13, 14 và 15 tỉ lệ tạo sẹo cao (từ 50% đến 85,71%), gấp đôi tỉ lệ tạo sẹo ở nhóm nghiệm thức 10, 11, 12. Hai nghiệm thức 10 và 14 cùng có tỉ lệ IBA:BA = 1:1. Tuy nhiên, ở hai nghiệm thức có khả năng tạo sẹo và phát sinh hình thái khác nhau. Đối với

nghiệm thức 10 (0,25 mg/L IBA và 0,25 mg/L BA) khả năng tạo sẹo ở trụ dưới lá mầm thấp chỉ 40%, sự phát sinh hình thái là tốt nhất. Đối với nghiệm thức 15 (0,5 mg/L IBA và 1,0 mg/L BA), sự tạo sẹo ở trụ dưới lá mầm lên đến 85,71%. Sự khác biệt này chứng minh được ở nồng độ 0,5 mg/L IBA và 0,5 mg/L BA là tốt nhất cho việc tạo sẹo.

Về mặt giải phẫu cho thấy, sự phát sinh sẹo xuất phát từ việc phân chia và phát triển mạnh mẽ của vùng nhu mô vỏ, các tế bào nhu mô to, chứa nước, xếp xít nhau. Phần bó dẫn phân hóa, gỗ nhỏ và nhiều, xếp thành từng dãy, libe phân hóa mạnh mẽ.



Hình 8. Mô sẹo ở môi trường MS + 0,5 mg/L IBA + 0,5 mg/L BA và MS + 0,5 mg/L IBA + 1,0 mg/L BA sau 4 tuần nuôi cấy

Như vậy, trong các nghiệm thức sử dụng auxin kết hợp cytokinin cho thấy rằng khi MS có bổ sung 0,25 (mg/L) IBA phối hợp 0,5 (mg/L) BA là thích hợp nhất cho sự nảy mầm, phát sinh chồi loài Gai ma vương. Môi trường MS bổ sung 0,5 mg/L IBA và 0,5 mg/L BA thích hợp cho sự phát sinh sẹo ở trụ dưới lá mầm loài Gai ma vương. Kết quả này gần tương đồng với công trình nghiên cứu của Enik Akhiriana và cộng sự (2018), Sara Sharifi và cộng sự (2012) khi nghiên cứu về ảnh hưởng của các chất điều hòa sinh trưởng thực vật lên loài Gai ma vương (*Tribulus terrestris* L.). Trong quá trình nuôi cấy việc bổ sung BA và IBA là cần thiết và thu được kết quả khả quan sau khi sử dụng các nồng độ BA và IBA khác nhau. Hơn nữa, tỉ lệ auxin hoặc cytokinin đóng một vai trò quan trọng hơn trong việc nuôi cấy. Điều hòa sự phân chia tế bào và sự hình thành được coi là chức năng quan trọng nhất của cytokinin chúng giúp ức chế sự phát sinh hình thái các lá mầm theo trục phôi có thể bị suy yếu do sự hiện diện của auxin trong môi trường (Nig et al., 2007).

4. Kết luận và kiến nghị

4.1. Kết luận

Khử trùng của hạt Gai ma vương: Ở nồng độ HgCl_2 0,1% trong thời gian 30 giây là tốt nhất, tỉ lệ mẫu vô trùng là 66,67%, tỉ lệ sống là 80%. Ở nồng độ NaClO 0,1% trong thời gian 60 giây là tốt nhất, tỉ lệ mẫu vô trùng là 100%, tỉ lệ sống là 100%.

Sự nảy mầm trong điều kiện *in vitro* của hạt Gai ma vương thích hợp trong các điều kiện môi trường có bổ sung chất kích thích sinh trưởng với nồng độ thích hợp nhất là: bổ sung IBA 1,0 mg/L cho tỉ lệ nảy mầm là 100%, số ngày nảy mầm trung bình là 2,60 ngày, số lá đầu tiên trung bình là 3,80 lá, tỉ lệ tạo sẹo ở phần trụ dưới lá mầm là 73,33%; bổ sung BA 2,0 mg/L cho tỉ lệ nảy mầm là 86,67%, số ngày nảy mầm trung bình là 2,54 ngày, số lá đầu tiên trung bình là 2,85 lá, tỉ lệ tạo sẹo ở phần trụ dưới lá mầm là 92,31%. bổ sung 0,25 mg/L IBA và 0,5 mg/L BA cho tỉ lệ nảy mầm trung bình là 100%, số ngày nảy mầm trung bình là 2,67 ngày, số lá trung bình là 4,33 lá, nồng độ thích hợp cho việc tạo sẹo ở phần trụ dưới lá mầm là 0,5 mg/L IBA và 1,0 mg/L BA với tỉ lệ là 85,71%.

4.2. Kiến nghị

Nghiên cứu thành phần môi trường và nồng độ chất kích thích sinh trưởng thích hợp cho giai đoạn nhân nhanh chồi, rễ, xử lí đưa ra vườn ươm, từ đó hoàn thiện quy trình nhân giống loài cây này trong tương lai.

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

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Antony, C. S., Lenin, M. S., Bhargav, P. K., Karthigan, M., & Ignacimuthu, S. (2010). Highly efficient shoot regeneration of *Bacopa monnieri* (L.) using a two-stage culture procedure and assessment of genetic integrity of micropropagated plants by RAPD. *Acta Physiologiae Plantarum*; 32(3), 443-452.
- Dang, Q. B., Nguyen, T. P. T., Tran, V. P., Dinh, T. S., Ninh, T. T., Nguyen, V. H., Tran, V. L., & Nguyen, T. T. L. (2017). Quy trình nhân giống cây ra hoa vàng (*Camellia* sp.) [Establishment of In vitro Propagation Protocol for Golden Camellia (*Camellia* sp.)]. *Vietnam Agricultural Science Journal*, 12, 1657-1669.
- Do, T. L. (2004). *Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam* [Vietnamese medicinal plants and herbs]. Medical Publishing House.
- Enik, A., & Samanhudi, A. Y. (2018). Coconut water and IAA effect on the in-vitro growth of *Tribulus terrestris* L. *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis*, 67(1), 9-18.
- Hu, K. & Yao, X. (2002). Its spectrum of cytotoxicity against sixty human cancer cell lines in an anticancer drug screen panel. *Planta Med.*, (68), 297-301.

- Mazri, M. A. (2015). Role of cytokinins and physical state of the culture medium to improve in vitro shoot multiplication, rooting and acclimatization of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cv. Boufeggous. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, 24(3), 268-275.
- National Agency for Science and Technology Information (2007). *Sach Do Viet Nam [Viet Nam Red book]*. Hanoi: Vietnam Journal of Science and Technology.
- Neychev, V., & Mitev, V. (2016). Pro-sexual and androgen enhancing effects of *Tribulus terrestris* L.: fact or fiction. *Journal of ethnopharmacology*, 179, 345-355.
- Nguyen, B. T. (2004). *Nuoi cay mo te bao thuc vat [Plant cell and tissue culture]*. Can Tho: Can Tho University Publishing House, 28-32.
- Nguyen, T. T., Nguyen, T. H. G., & Le, T. H. (2012). *Nghien cuu kha nang nay mam va nhan nhanh in vitro cay lan Hoang Long (Coelogyne lawrenceana Rolfe) [Study on the in vitro seed germination ability and rapid propagation of Coelogyne lawrenceana Rolfe]*. [Yearbook post] The 8th Conference of Scientific Research Students University of Da Nang.
- Nig, G. G., Bai, S. P., Bao, M. Z., & Liu, L. (2007). Factors affecting plantlet regeneration from in vitro cultured immature embryos and cotyledons of *Prunus mume* "Xue mei". *In vitro cell Dev. Biol Plant*, 43, 225-230.
- Pandey, R., Shankar, B. S., & Sainis, K. B. (2007). *Tribulus terrestris* fruit extract protects against oxidative stress-induced apoptosis. *Pharmaceutical Biology*, 45(8), 619-625.
- Perrone, A., Plaza, A., Bloise, E., Nigro, P., Hamed, A. I., Belisario & Piacente, S. (2005). Cytotoxic furostanol saponins and a megastigmane glucoside from *Tribulus terrestris* parvispinus. *Journal of natural products*, 68(10), 1549 - 1553.
- Peyghamzadeh, K., & Kazemi, T. S. (2010). The effects of BA, IBA and genotypes on in vitro germination of immature walnut embryos. *International Journal of Plant Production*, 4(4), 1735-8043.
- Phillips, O. A., Mathew, K. T., & Oriowo, M. A. (2006). Antihypertensive and vasodilator effects of methanolic and aqueous extracts of *Tribulus terrestris* in rats. *J Ethnopharm*, 104, 351-355.
- Roland, C. (2020). *Tribulus terrestris*. *The IUCN Red List of Threatened Species* 2020.
- Samanhudi, S., Pujiasmanto, B., Yunus, A., & Majid, N. (2021). Pertumbuhan *in vitro* *Tribulus terrestris* dengan perlakuan indole butyric acid (IBA) dan benzyl amino purine (BA). *AGRIUM: Jurnal Ilmu Pertanian*, 24(1), 40-47.
- Sara, S., Taheer, N. S., Aliraza, Z. A., Majid, H., & Reza, G. (2012). Enhanced callus induction and high-efficiency plant regeneration in *Tribulus terrestris* L., an important medicinal plant. *Journal of Medicinal Plants Research*, 6(27), 4401-4408. Doi:10.5897/JMPR12.260
- Tran, C. K. (1981). *Thuc tap hinh thai va giai phau thuc vat [Morphology and Anatomy of Seed Plant]*. Professional University and High School Publishing House.
- Trinh, T. H., Vo, P. N. K., Le, T. M. C., Van, M. H., Tran, T. T. (2019). *Nghien cuu nhan giong in vitro cay Sam bo chinh (Hibiscus sagittifolius Kurz) thong qua nuoi cay tu hat va dot than [Study on in vitro propagation of Hibiscus sagittifolius Kurz through Stem Node Culture]*. *Can Tho University Journal of Science*, 55, 216-221.
- Wesely, E. G., Johnson, M.A., Mohanamathi, R. B., & Kavitha, M. S. (2012). *In vitro* clonal propagation of *Achyranthes aspera* L. and *Achyranthes bidentata* Blume using nodal explants. *Asian pacific journal of tropical biomedicine*, 2(1), 1-5.

- Yildiz, M., & Er, C. (2002). The effect of sodium hypochlorite solutions on in vitro seedling growth and shoot regeneration of flax (*Linum usitatissimum*). *Naturwissenschaften*, 89(6), 259-261.
- Zhang, J. D., Xu, Z., Cao, Y. B., Chen, H. S., Yan, L., An, M. M., & Jiang, Y. Y. (2006). Antifungal activities and action mechanisms of compounds from *Tribulus terrestris* L. *Journal of ethnopharmacology*, 103(1), 76-84.

**A STUDY ON THE EFFECTS OF IBA AND BA GROWTH REGULATORS
ON GERMINATION OF *Tribulus terrestris* L. SEEDS IN VITRO**

**Le Nguyen Thu Ngan¹, Tran Thanh Thuc², Hoang Thi My Ngoc²,
Vo Nguyen Tu Anh², Tran Thi Tuong Linh², Quach Van Toan Em^{2*}.**

¹Junior high school – High school Luong The Vinh, District 1, Ho Chi Minh City, Vietnam

²Ho Chi Minh City University of Education, Vietnam

*Corresponding author: Quách Văn Toàn Em – Email: emqvt@hcmue.edu.vn

Received: September 22, 2022; Revised: October 13, 2022; Accepted: November 19, 2022

ABSTRACT

Tribulus terrestris L. is a medicinal plant commonly used in traditional medicine, recorded in the Vietnam Red Book and the IUCN Red List of Threatened Species on the critically endangered (CR). This paper studies the sterilization ability of HgCl₂ and NaClO with different concentrations and times on *Tribulus terrestris* seeds and the effects of IBA and BA on germination and seedling morphology under in vitro culture conditions. The results showed that with NaClO of 1% for one minute, the sterility rate and the survival rate of the samples both reached 100%. For HgCl₂ of 0,1% concentration in 20 seconds, the sterility rate reached 66,67%, and survival rate reached 80%. They were the most optimal result. In the MS medium supplemented with NAA and BA, the time germination rate and seedling morphology had many changes. Germination in vitro of *Tribulus terrestris* was suitable in environmental conditions supplemented with BA at a concentration of 2,0 mg/L, IBA at a concentration of 1,0 mg/L, and a combination of IBA and BA at concentrations of 0,25 mg/L IBA and 0,5 mg/L BA.

Keywords: Axit Indole-3-butyric; BA- Benzyl adenine; *in vitro*; seed sterilization; seed germination; *Tribulus terrestris*