

ẢNH HƯỞNG CỦA NGUỒN MẪU, CHẤT ĐIỀU HÒA SINH TRƯỞNG VÀ HỆ THỐNG NUÔI CẤY LÊN KHẢ NĂNG NHÂN NHANH RỄ BẮT ĐỊNH CÂY HÀ THỦ Ô ĐỎ (*Polygonum multiflorum* Thunb.) NUÔI CẤY *IN VITRO*

Vũ Quốc Luận¹, Đỗ Thị Luyên¹, Hồ Hoàng Anh Kha¹, Hoàng Thanh Tùng¹, Vũ Thị Hiền¹, Đỗ Mạnh Cường¹, Bùi Văn Thế Vinh², Huỳnh Gia Bảo¹, Dương Tấn Nhựt^{1,✉}

¹Viện Nghiên cứu Khoa học Tây Nguyên, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

²Trường Đại học Công nghệ Thành phố Hồ Chí Minh (HUTECH)

✉Người chịu trách nhiệm liên lạc. E-mail: duongtannhut@gmail.com

Ngày nhận bài: 21.01.2019

Ngày nhận đăng: 10.4.2019

TÓM TẮT

Cây Hà Thủ Ô đỏ (*Polygonum multiflorum* Thunb.) thuộc họ rau Răm (Polygonaceae) là một loại cây dược liệu có giá trị kinh tế và cần được bảo vệ (sách đỏ Việt Nam). Nhiều nghiên cứu đã chỉ ra rằng Hà Thủ Ô đỏ có tác dụng với nhiều bệnh lý như rụng tóc, tóc bạc sớm, chữa đau lưng dưới, yếu khớp gối, yếu cơ, liệt nửa người, tinh thần hồi hộp, chóng mặt, mất ngủ... Nhân giống và bảo tồn loài thảo dược này có ý nghĩa rất quan trọng bởi vì nhu cầu sử dụng ngày càng gia tăng. Nuôi cấy sinh khối rễ bắt định đã thành công trên nhiều đối tượng dược liệu, đặc biệt có tiềm năng ở loài cây này. Trong nghiên cứu này, ảnh hưởng của nguồn mẫu, chất điều hòa sinh trưởng và hệ thống nuôi cấy được nghiên cứu nhằm đánh giá khả năng nhân nhanh rễ bắt định cây Hà Thủ Ô đỏ. Rễ bắt định được cảm ứng từ nguồn mẫu lá và môi trường nuôi cấy tối ưu được cấy chuyên vào 4 hệ thống (bình tam giác 3 lít, bình tam giác kết hợp lắc, bình tam giác kết hợp sục khí, bioreactor Hàn Quốc) có chứa 5 g/L mẫu rễ bắt định. Kết quả sau 6 tuần nuôi cấy cho thấy, mẫu lá trên môi trường SH có bổ sung 1,5 mg/L IBA, 30 g/L sucrose, 8,5 g/L agar và pH 5,8 tái sinh rễ bắt định (100%), số rễ/mẫu (25,33 rễ), khối lượng tươi (131,67 mg) và khối lượng khô (13,35 mg) cao hơn đáng kể so với các điều kiện nuôi cấy khác. Bên cạnh đó, nhân nhanh rễ bắt định trong hệ thống nuôi cấy bioreactor Hàn Quốc cho hiệu quả cao hơn các hệ thống nuôi cấy khác thể hiện ở các chỉ tiêu khối lượng tươi (17,04 g), khối lượng khô (1,56 g) và tỷ lệ tăng sinh (3,40 lần) sau 6 tuần nuôi cấy.

Từ khóa: Hà Thủ Ô đỏ, chất điều hòa sinh trưởng, hệ thống nuôi cấy, nguồn mẫu, rễ bắt định

MỞ ĐẦU

Cây Hà Thủ Ô đỏ (*Polygonum multiflorum* Thunb.) thuộc họ rau Răm (Polygonaceae) là một loại cây dược liệu có giá trị kinh tế; có tên trong sách đỏ Việt Nam cần được bảo vệ. Nhiều nghiên cứu đã chỉ ra rằng Hà Thủ Ô đỏ có tác dụng với nhiều bệnh lý như rụng tóc, tóc bạc sớm, chữa đau lưng dưới, yếu khớp gối, yếu cơ, liệt nửa người, tinh thần hồi hộp, chóng mặt, mất ngủ, suy nhược thần kinh, tăng cholesterol máu và xơ vữa động mạch. Ngoài ra, Hà Thủ Ô đỏ còn có thể giúp chống lão hóa, tăng cường hệ thống miễn dịch của cơ thể, giúp nhuận tràng, điều chỉnh lượng đường trong máu (Đỗ Tất Lợi, 1995). Những nghiên cứu về loài cây này còn rất ít, Chang và đồng tác giả (2003) đã nghiên cứu quy trình vi nhân giống cây Hà Thủ Ô đỏ, đồng thời phân

tích định lượng các anthraquinone gồm emodine và physcione từ chồi và cây Hà Thủ Ô đỏ *in vitro*. Dương Tấn Nhựt và đồng tác giả (2006) đã nghiên cứu tái sinh mô sẹo và tái sinh chồi *in vitro*. Trương Thị Bích Phượng và đồng tác giả (2008) đã thành công trong việc nghiên cứu nhân giống *in vitro* cây Hà Thủ Ô đỏ, kết quả của nghiên cứu này chỉ ra rằng môi trường MS có bổ sung 4,0 mg/L BA kết hợp 0,1 mg/L NAA kích thích đoạn thân tái sinh chồi tốt nhất. Li và đồng tác giả (2012) đã tái sinh mô sẹo và nuôi cấy dịch huyền phù tế bào để chiết xuất hoạt chất thứ cấp. Nghiên cứu hình thành rễ bắt định và nhân nhanh trong hệ thống bioreactor nhằm thu được các chất chuyển hóa thứ cấp phục vụ cho ngành công nghiệp dược phẩm (Tam *et al.*, 2017).

Trước đây, nguồn Hà Thủ Ô đỏ tự nhiên nước ta

khá dồi dào nhưng gần đây do bị khai thác quá mức và do nạn phá rừng lan tràn nên trữ lượng Hà Thủ Ô đỏ bị giảm sút nghiêm trọng, không cung cấp đủ nguồn dược liệu cho việc chế biến và sản xuất thuốc để chữa bệnh (Đỗ Tất Lợi, 1999). Nhu cầu về Hà Thủ Ô đỏ ngày càng tăng dẫn đến xu hướng nhân giống và bảo tồn loài thảo dược này, việc nuôi cấy sinh khối đang là vấn đề rất cần thiết; trong đó, nghiên cứu về rễ bất định có vai trò quan trọng và là một nguồn vật liệu ban đầu để nhân nhanh trong hệ thống bioreactor nhằm tách chiết những hợp chất có lợi.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu

Nguồn mẫu ban đầu là mô lá (1×1 cm), cuống lá và đốt thân (1 cm) của cây Hà Thủ Ô đỏ *in vitro* 1 tháng tuổi đã ổn định qua nhiều lần cấy chuyển hiện có tại Phòng Sinh học Phân tử và Chọn tạo giống cây trồng, Viện Nghiên cứu Khoa học Tây Nguyên.

Tái sinh rễ bất định

Các nguồn mẫu khác nhau (mẫu lá, cuống lá và đốt thân) được nuôi cấy trên môi trường cảm ứng rễ bất định là SH (Schenk, Hildebrandt, 1972) và MS (Murashige, Skoog, 1962) có bổ sung 30 g/L sucrose, 8,5 g/L agar với các chất điều hòa sinh trưởng ở các nồng độ khác nhau (IBA và NAA (0; 0,5; 1; 1,5; 2; 2,5; 3 mg/L); 2,4-D (0; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1 mg/L). Các chỉ tiêu theo dõi gồm tỷ lệ mẫu phát sinh mô sẹo (%), tỷ lệ mẫu phát sinh rễ (%), số lượng rễ (rễ/mẫu), chiều dài rễ (cm), khối lượng tươi (mg) và khối lượng khô (mg).

Nhân nhanh rễ bất định trong các hệ thống nuôi cấy khác nhau

Rễ bất định được cảm ứng từ nguồn mẫu và môi trường nuôi cấy tối ưu ở thí nghiệm trên được cấy chuyển vào 4 hệ thống nuôi cấy khác nhau (bình tam giác 3 lít, bình tam giác kết hợp lắc, bình tam giác kết hợp sục khí (bioreactor tự tạo), bioreactor Hàn Quốc có chứa 5 g mẫu rễ bất định trên 1 lít môi trường có bổ sung chất điều hòa sinh trưởng tối ưu thí nghiệm trên và pH = 5,8 (Trịnh Thị Hương *et al.*, 2012). Thí nghiệm lỏng lắc được thực hiện trên máy lắc Innova 2100 platform shaker (Hermle, Đức) ở tốc độ 100 vòng/phút. Các chỉ tiêu theo dõi bao gồm khối lượng tươi (mg), khối lượng khô (mg) và tỷ lệ tăng sinh (%).

Điều kiện nuôi cấy

Môi trường điều chỉnh về pH 5,8 và được hấp khử trùng ở 121°C, 1 atm trong 20 phút. Thời gian chiếu sáng 16 giờ/ngày, cường độ chiếu sáng 2.500 - 3.000 lux, nhiệt độ $25 \pm 3^\circ\text{C}$ với độ ẩm phòng là 55 - 60%.

Phương pháp xử lý số liệu

Mỗi thí nghiệm được lặp lại 3 lần, mỗi nghiệm thức cấy 6 bình, mỗi bình cấy 3 mẫu. Riêng với hệ thống nuôi cấy khác nhau, mỗi nghiệm thức cấy 1 bình, mỗi bình cấy 50 mẫu (5 g). Các số liệu được thu nhận sau 6 tuần nuôi cấy. Số liệu được xử lý và phân tích bằng phần mềm Microsoft Excel 2013 và SPSS 16.0 theo phép thử Duncan với $\alpha = 0,05$ (Duncan, 1955).

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

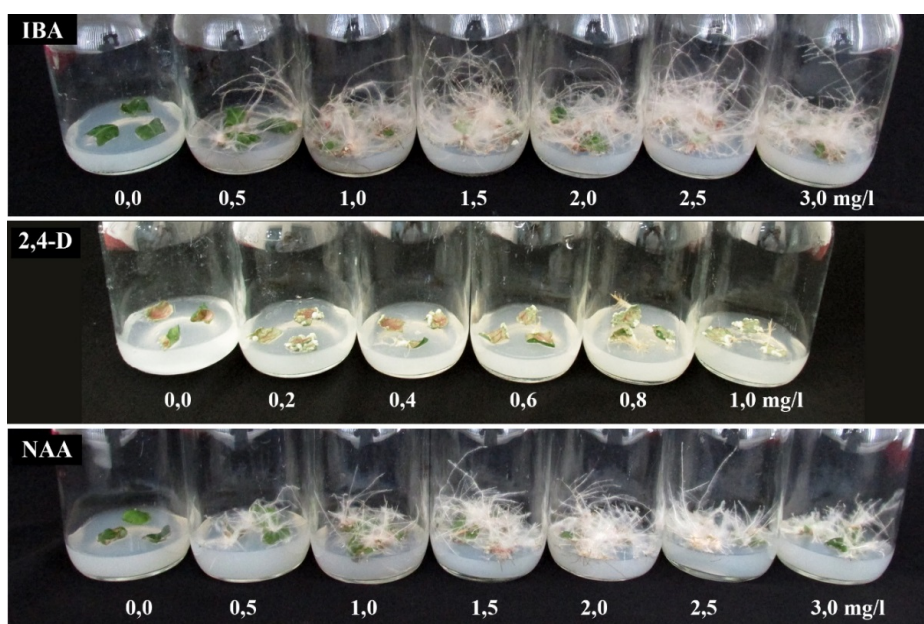
Ảnh hưởng của IBA, NAA, 2,4-D lên khả năng tái sinh rễ bất định cây Hà Thủ Ô đỏ từ nguồn mẫu lá

Đối với nguồn mẫu lá thì các nồng độ khác nhau của IBA, NAA và 2,4-D không ảnh hưởng đến tỷ lệ mẫu phát sinh mô sẹo, tất cả các nghiệm thức không ghi nhận có sự khác biệt về chỉ tiêu này (Bảng 1, Hình 1). Ở nghiệm thức đối chứng (không bổ sung auxin), không ghi nhận có sự hình thành mô sẹo cũng như rễ bất định. Tất cả các nghiệm thức còn lại đều hình thành mô sẹo rồi mới phát sinh rễ. Tuy nhiên, sự phát sinh rễ bất định gián tiếp thông qua mô sẹo lại có sự khác biệt giữa các nghiệm thức có bổ sung IBA, NAA so với nghiệm thức bổ sung 2,4-D. Tỷ lệ mẫu phát sinh rễ ở các nghiệm thức IBA, NAA đều đạt 100% nhưng đến những nghiệm thức bổ sung 2,4-D thì tỷ lệ này chỉ đạt 100% ở nghiệm thức bổ sung 0,8 mg/L 2,4-D, tỷ lệ này tăng khi nồng độ 2,4-D từ 0 - 0,8 mg/L rồi giảm khi nồng độ 1 mg/L 2,4-D. Khi bổ sung IBA vào môi trường nuôi cấy, kết quả sau 6 tuần cho thấy số rễ/mẫu và chiều dài rễ tăng dần khi nồng độ IBA biến thiên từ 0 - 1,5 mg/L rồi giảm dần khi nồng độ IBA cao hơn 1,5 mg/L. Xét về tất cả các chỉ tiêu thì nồng độ IBA bổ sung vào môi trường nuôi cấy tối ưu là 1,5 mg/L so với tất cả các nghiệm thức khác. Đối với môi trường nuôi cấy có bổ sung NAA, kết quả thu được sau 6 tuần nuôi cấy cho thấy, số rễ/mẫu và chiều dài rễ đều tăng dần khi tăng dần nồng độ NAA từ 0 - 1,5 mg/L. Tiếp tục tăng nồng độ NAA từ 1,5 - 3 mg/L thì tỷ lệ mẫu phát sinh rễ không có sự thay đổi, nhưng số rễ/mẫu và chiều dài rễ thì giảm dần, tương tự với kết quả của IBA. Tuy nhiên, các chỉ tiêu này thấp hơn so với IBA.

Bảng 1. Ảnh hưởng của các loại chất điều hòa sinh trưởng khác nhau (IBA, NAA, 2,4-D) lên khả năng tái sinh rễ bất định từ nguồn mẫu lá.

Chất ĐHST	Nồng độ (mg/L)	Tỷ lệ mô sẹo (%)	Tỷ lệ phát sinh rễ (%)	Số rễ/mẫu	Chiều dài rễ (cm)
IBA	0,0	0,00 ^b	0,00 ^c	0,00 ^g	0,00 ^g
	0,5	100 ^a	100 ^a	18,67 ^d	3,17 ^c
	1,0	100 ^a	100 ^a	22,33 ^c	5,83 ^a
	1,5	100^a	100^a	29,00^a	5,50^a
	2,0	100 ^a	100 ^a	23,33 ^{bc}	4,00 ^b
	2,5	100 ^a	100 ^a	18,67 ^d	2,67 ^{cd}
	3,0	100 ^a	100 ^a	14,00 ^g	2,62 ^{cd}
NAA	0,0	0,00 ^b	0,00 ^c	0,00 ^g	0,00 ^g
	0,5	100 ^a	100 ^a	17,00 ^d	2,33 ^{de}
	1,0	100 ^a	100 ^a	22,33 ^c	2,83 ^{cd}
	1,5	100 ^a	100 ^a	25,00 ^b	4,00 ^b
	2,0	100 ^a	100 ^a	23,00 ^{bc}	2,83 ^{cd}
	2,5	100 ^a	100 ^a	18,67 ^d	2,33 ^{de}
	3,0	100 ^a	100 ^a	13,33 ^e	1,93 ^{ef}
2,4-D	0,0	0,00 ^b	0,00 ^c	0,00 ^g	0,00 ^g
	0,2	100 ^a	0,00 ^c	0,00 ^g	0,00 ^g
	0,4	100 ^a	33,33 ^{bc}	0,33 ^g	0,23 ^g
	0,6	100 ^a	66,67 ^{ab}	1,00 ^g	0,38 ^g
	0,8	100 ^a	100 ^a	2,67 ^f	1,40 ^f
	1,0	100 ^a	66,67 ^{ab}	0,33 ^g	0,46 ^g

Ghi chú: Các ký tự a, b, c, d... trên cùng một cột thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê, khác biệt có ý nghĩa ở mức $\alpha = 0,05$.



Hình 1. Ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng IBA, NAA, 2,4-D lên khả năng tái sinh rễ bất định từ nguồn mẫu lá.

So với hai loại auxin là IBA và NAA, thì 2,4-D là loại auxin cho kết quả tất cả các chỉ tiêu thấp nhất (trừ tỷ lệ mẫu phát sinh mô sẹo). Các mẫu lá khi bổ sung 2,4-D sau 2 tuần mới bắt đầu phát sinh mô sẹo, còn IBA và NAA thì chỉ sau một tuần là mô sẹo đã hình thành, lá không có màu xanh và tươi như khi bổ sung IBA và NAA và mỗi mẫu lá ở nồng độ tốt nhất (0,8 mg/L) chỉ hình thành 2 - 3 rễ bất định, rễ ngắn, không có màu trắng mà hóa vàng sau 6 tuần nuôi cấy. Bảng 1 cho thấy, ở nghiệm thức bổ sung 1,5 mg/L IBA cho số rễ/mẫu cao nhất (29 rễ/mẫu) và chiều dài rễ cũng cao nhất (5,50 cm), rễ bất định hình thành có màu trắng mượt, khỏe và dài. Như vậy, nếu sử dụng lá làm nguồn mẫu cấy thì loại auxin bổ sung thích hợp nhất là IBA ở nồng độ 1,5 mg/L. Ngoài ra, khi quan sát sự hình thành rễ bất định từ mẫu lá, có thể thấy, rễ bất định chủ yếu hình thành ở vết cắt sát phần cuống lá. Sau 1 tuần nuôi cấy, mô sẹo phát triển nhanh và mạnh nhất, sau 2 tuần rễ bất định bắt đầu hình thành và tăng trưởng một cách nhanh chóng.

Ảnh hưởng của IBA, NAA, 2,4-D lên khả năng tái sinh rễ bất định từ nguồn mẫu cuống lá

Ảnh hưởng của các loại chất điều hòa sinh trưởng khác nhau (IBA, NAA, 2,4-D) lên khả năng tái sinh rễ bất định từ nguồn mẫu cuống lá sau 6 tuần nuôi cấy cho thấy sự khác biệt so với nguồn mẫu lá được thể hiện (Bảng 2, Hình 2). Đối với mẫu lá, khả

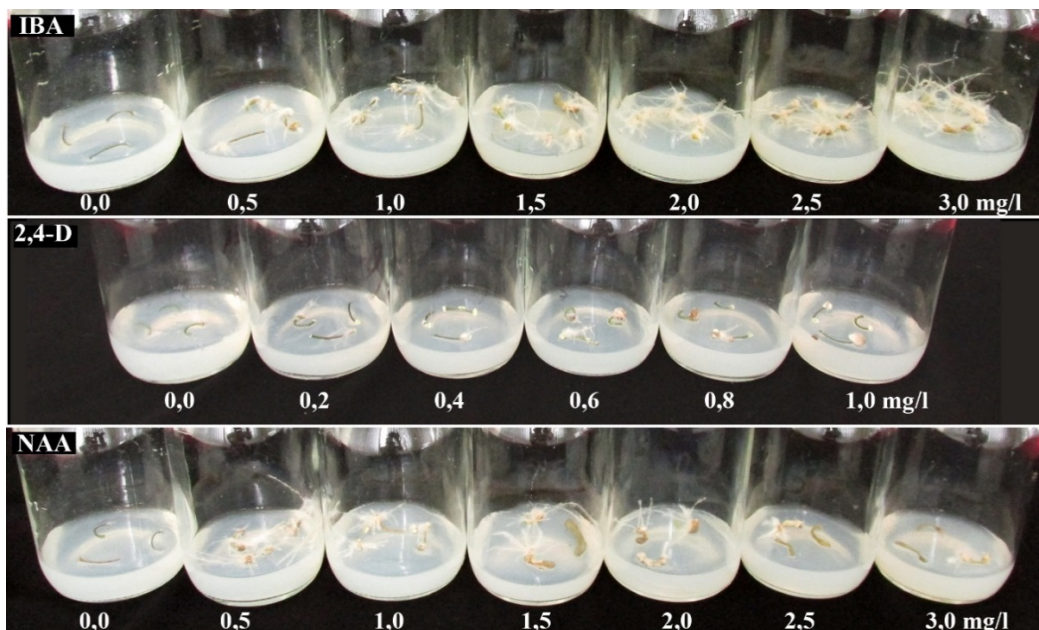
năng hình thành rễ bất định tối ưu nhất khi nuôi cấy trên môi trường bổ sung 1,5 mg/L, nhưng khi dùng nguồn mẫu là cuống lá thì nồng độ IBA thích hợp nhất cho sự hình thành rễ bất định lại là 3 mg/L. Trừ hai chỉ tiêu tỷ lệ mẫu phát sinh mô sẹo và tỷ lệ mẫu phát sinh rễ không có sự thay đổi, các chỉ tiêu còn lại như số rễ/mẫu và chiều dài rễ đều tăng dần khi tăng dần nồng độ IBA từ 0 - 3 mg/L (Bảng 2, Hình 2). Khi bổ sung NAA vào môi trường nuôi cấy, kết quả cũng có sự khác biệt về nồng độ NAA khi sử dụng lá và cuống lá làm nguồn mẫu. Ở lá, nồng độ NAA tốt nhất là 1,5 mg/L, còn cuống lá lại là 0,5 mg/L. Số rễ trên một mẫu ở nghiệm thức này đạt 21,33 rễ/mẫu và chiều dài là 2,53 cm, tốt hơn so với các nồng độ NAA còn lại. Số rễ/mẫu và chiều dài rễ tăng khi nồng độ NAA tăng từ 0 - 0,5 mg/L rồi sau đó giảm dần khi tăng dần nồng độ NAA từ 0,5 - 3 mg/L.

Tỷ lệ mẫu phát sinh rễ chỉ đạt 66,67 % ở nồng độ 0,2 mg/L 2,4-D mặc dù tại nồng độ này số rễ/mẫu (2 rễ/mẫu) và chiều dài rễ (0,98 cm) cao hơn so với các nồng độ 2,4-D còn lại. Có thể vì 2,4-D là loại auxin kìm hãm sự tái sinh rễ bất định do nó quá mạnh, nếu sử dụng các nồng độ thấp hơn trong thí nghiệm thì sẽ cho kết quả khả quan hơn. Ở nghiệm thức đối chứng và nghiệm thức sử dụng 1 mg/L 2,4-D, các chỉ tiêu tỷ lệ mẫu phát sinh rễ, số rễ/mẫu và chiều dài rễ giống nhau. Các chỉ tiêu này đạt tốt nhất ở nồng độ 0,2 mg/L 2,4-D và giảm dần khi tăng dần nồng độ từ 0,2 lên 1 mg/L.

Bảng 2. Ảnh hưởng của các loại chất điều hòa sinh trưởng IBA, NAA, 2,4-D lên khả năng tái sinh rễ bất định từ nguồn mẫu cuống lá.

Chất ĐHST	Nồng độ (mg/L)	Tỷ lệ mô sẹo (%)	Tỷ lệ phát sinh rễ (%)	Số rễ/mẫu	Chiều dài rễ (cm)
IBA	0,0	0,00 ^b	0,00 ^c	0,00 ^g	0,00 ⁱ
	0,5	100 ^a	100 ^a	9,67 ^e	0,84 ^{efgh}
	1,0	100 ^a	100 ^a	16,67 ^d	1,08 ^{ef}
	1,5	100 ^a	100 ^a	21,33 ^c	1,42 ^{de}
	2,0	100 ^a	100 ^a	25,00 ^b	2,08 ^{bc}
	2,5	100 ^a	100 ^a	28,00 ^b	2,20 ^{bc}
	3,0	100 ^a	100 ^a	37,00 ^a	3,00 ^a
NAA	0,0	0,00 ^b	0,00 ^c	0,00 ^g	0,00 ⁱ
	0,5	100 ^a	100 ^a	21,33 ^c	2,53 ^{ab}
	1,0	100 ^a	100 ^a	16,33 ^d	2,07 ^{bc}
	1,5	100 ^a	100 ^a	12,00 ^e	1,78 ^{cd}
	2,0	100 ^a	100 ^a	9,67 ^e	1,29 ^{de}
	2,5	100 ^a	100 ^a	9,00 ^e	0,93 ^{efg}
	3,0	100 ^a	100 ^a	4,00 ^f	0,54 ^{fghi}
2,4-D	0,0	0,00 ^b	0,00 ^c	0,00 ^g	0,00 ⁱ
	0,2	100 ^a	66,67 ^{ab}	2,00 ^{fg}	0,98 ^{egf}
	0,4	100 ^a	33,33 ^{bc}	0,67 ^{fg}	0,50 ^{fghi}
	0,6	100 ^a	33,33 ^{bc}	0,33 ^g	0,42 ^{ghi}
	0,8	100 ^a	33,33 ^{bc}	0,67 ^{fg}	0,25 ^{hi}
	1,0	100 ^a	0,00 ^c	0,00 ^g	0,00 ⁱ

Ghi chú: Các ký tự a, b, c, d... trên cùng một cột thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê, khác biệt có ý nghĩa ở mức $\alpha = 0,05$.



Hình 2. Ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng IBA, NAA, 2,4-D lên khả năng tái sinh rễ bất định từ nguồn mẫu cuống lá.

Kết quả Bảng 2 chỉ ra rằng, đối với nguồn mẫu cuống lá, thì loại auxin tốt nhất cho sự hình thành rễ bất định là IBA nồng độ 3 mg/L, điều này được thể hiện qua các chỉ tiêu về số rễ/mẫu (37 rễ/mẫu) và chiều dài rễ (3 cm).

Ảnh hưởng của IBA, NAA, 2,4-D lên khả năng tái sinh rễ bất định từ nguồn mẫu đốt thân

Đốt thân là nguồn mẫu cho sự tái sinh rễ bất định kém nhất, rễ bất định hình thành nhỏ, ngắn và có hiện tượng ngả vàng sau 6 tuần nuôi cấy. Ở các nghiệm thức khi bổ sung IBA vào môi trường nuôi cấy, tất cả các mẫu đốt thân đều hình thành mô sẹo rồi phát sinh rễ bất định, khi tăng dần nồng độ IBA từ 0 - 3 mg/L, số mẫu/rễ và chiều dài rễ đều tăng theo và đạt cao nhất ở nồng độ 3 mg/L với 32,33 rễ/mẫu cùng chiều dài là 2,45 cm (Bảng 3). Đối với các nghiệm thức NAA là chất điều hòa sinh trưởng, có thể thấy rằng, nồng độ tốt nhất để hình thành rễ bất định từ đốt thân là 1 mg/L, ở nồng độ này, số rễ/mẫu là 25,33 rễ/mẫu và chiều dài là 2,07 cm, số rễ/mẫu và chiều dài rễ tăng dần khi nồng độ NAA tăng dần từ 0 - 1 mg/L rồi giảm dần khi tiếp tục tăng nồng độ từ 1 - 3 mg/L. Riêng với 2,4-D chỉ cảm ứng tạo mô sẹo khi sử dụng đốt thân làm nguồn mẫu (Bảng 3, Hình 3). Như vậy, khi sử dụng đốt thân làm nguồn mẫu thì chất điều hòa sinh trưởng tốt nhất để hình thành rễ bất định là IBA ở nồng độ 3 mg/L.

Những loại auxin được sử dụng rộng rãi cho

việc hình thành rễ là IBA, NAA và 2,4-D. IBA được dùng để cảm ứng tạo rễ, NAA, 2,4-D và những chất tổng hợp hóa học khác hoạt động tương tự như chất điều hòa sinh trưởng (Tiberiapop *et al.*, 2001). Trong thí nghiệm trên, có thể thấy rằng IBA là loại auxin thích hợp cho việc nuôi cấy tạo rễ bất định Hà Thủ Ô đỏ.

Nếu hàm lượng auxin ban đầu quá thấp thì sự kích thích ra rễ sẽ không có hiệu quả, đôi khi còn kìm hãm quá trình hình thành rễ. Kết quả ghi nhận ở ba thí nghiệm trên cho thấy, nồng độ tối ưu của các auxin (IBA, NAA, 2,4-D) cần cho sự tái sinh rễ khá cao: 1,5 mg/L IBA đối với nguồn mẫu lá, 3 mg/L IBA đối với nguồn mẫu cuống lá và đốt thân. Ở nghiệm thức đối chứng (không bổ sung auxin) đều không ghi nhận thấy có sự phát sinh rễ bất định ở cả ba thí nghiệm (Bảng 1, 2, 3), điều này khẳng định lại một lần nữa về vai trò quan trọng của auxin trong quá trình phát sinh rễ bất định.

Kết quả thu được ở thí nghiệm cũng cho thấy, các chất auxin khác nhau thì nồng độ thích hợp (hay ngưỡng thích hợp) cho sự tái sinh rễ bất định cũng khác nhau. Trong 3 loại auxin được sử dụng trong nghiên cứu này thì nồng độ 2,4-D tối ưu cho sự phát sinh rễ bất định thấp hơn so với hai loại auxin còn lại, điều này có thể do 2,4-D là một loại auxin tổng hợp, ở nồng độ thấp nó có tác dụng kích thích sự sinh trưởng và phát triển của thực vật, nhưng ở nồng độ cao nó lại ức chế quang hợp, phá hoại các màng

tế bào và màng sinh chất, làm chậm quá trình phân bào, ngăn cản các quá trình sinh tổng hợp của thực vật. Nguyễn Thị Ngọc Hương và Võ Thị Bạch Mai (2009) cũng nhận thấy rằng IBA là loại auxin tốt nhất cho sự phát sinh rễ bất định ở cây Nhàu

(*Morinda citrifolia* L.). IBA cũng được chứng minh là hiệu quả cho việc hình thành rễ trên nhiều đối tượng khác như: *Panax ginseng* và *Chrysanthemum* sp. (Nguyễn Thị Liễu *et al.*, 2011; Hoàng Văn Long *et al.*, 2007).

Bảng 3. Ảnh hưởng của IBA, NAA, 2,4-D lên khả năng tái sinh rễ bất định từ nguồn mẫu cuống lá.

Chất ĐHST	Nồng độ (mg/l)	Tỷ lệ cảm ứng mô sẹo (%)	Tỷ lệ phát sinh rễ (%)	Số rễ/mẫu	Chiều dài rễ (cm)
IBA	0,0	0,00 ^b	0,00 ^b	0,00 ⁱ	0,00 ^k
	0,5	100 ^a	100 ^a	5,67 ^h	0,63 ⁱ
	1,0	100 ^a	100 ^a	8,67 ^{fg}	0,78 ^{ghi}
	1,5	100 ^a	100 ^a	16,00 ^d	1,00 ^{efg}
	2,0	100 ^a	100 ^a	18,67 ^c	1,08 ^{ef}
	2,5	100 ^a	100 ^a	20,33 ^c	1,32 ^{cd}
	3,0	100 ^a	100 ^a	32,33 ^a	2,45 ^a
NAA	0,0	0,00 ^b	0,00 ^b	0,00 ⁱ	0,00 ^k
	0,5	100 ^a	100 ^a	6,33 ^{gh}	1,36 ^c
	1,0	100 ^a	100 ^a	25,33 ^b	2,07 ^b
	1,5	100 ^a	100 ^a	13,33 ^e	1,13 ^{de}
	2,0	100 ^a	100 ^a	10,33 ^f	0,99 ^{efg}
	2,5	100 ^a	100 ^a	8,67 ^{fg}	0,89 ^{gh}
	3,0	100 ^a	100 ^a	6,00 ^h	0,77 ^{hi}
2,4-D	0,0	0,00 ^b	0,00 ^b	0,00 ⁱ	0,00 ^k
	0,2	100 ^a	0,00 ^b	0,00 ⁱ	0,00 ^k
	0,4	100 ^a	0,00 ^b	0,00 ⁱ	0,00 ^k
	0,6	100 ^a	0,00 ^b	0,00 ⁱ	0,00 ^k
	0,8	100 ^a	0,00 ^b	0,00 ⁱ	0,00 ^k
	1,0	100 ^a	0,00 ^b	0,00 ⁱ	0,00 ^k

Ghi chú: Các ký tự *a, b, c, d...* trên cùng một cột thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê, khác biệt có ý nghĩa ở mức $\alpha = 0,05$.

So sánh hiệu quả tác dụng của các loại nguồn mẫu khác nhau (lá, cuống lá, đốt thân) lên sự tái sinh rễ bất định cây Hà Thủ Ô đỏ

Sau khi xác định được IBA là loại auxin tốt nhất cho sự hình thành rễ bất định, ảnh hưởng của ba loại nguồn mẫu (lá, cuống lá, đốt thân) lên khả năng tái sinh rễ bất định Hà Thủ Ô đỏ được so sánh. Kết quả thu được của nghiên cứu này cũng phù hợp với nghiên cứu của Kull và Arditti (2002), đó là auxin kích thích sự phát triển của rễ và sự tăng khối lượng tươi của mẫu, trong đó IBA và NAA được nhận thấy là có hiệu quả hơn so với 2,4-D.

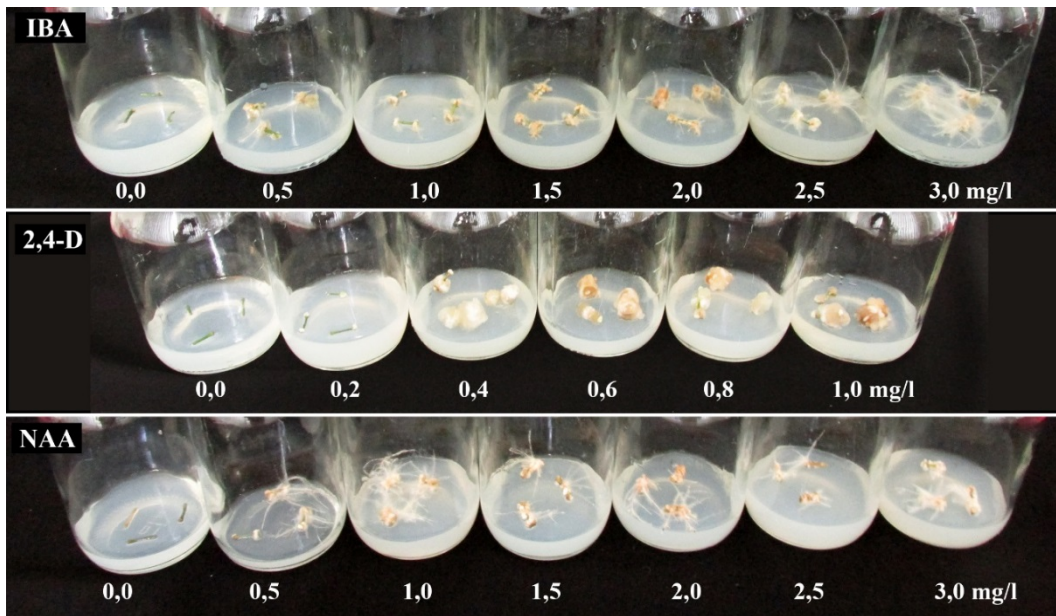
Cả 3 loại mẫu đều không có sự khác biệt nhiều

về tỷ lệ phát sinh mô sẹo và tỷ lệ mẫu phát sinh rễ, cho dù chúng được nuôi cấy ở môi trường có bổ sung các loại auxin khác nhau, điều này chứng tỏ nguồn mẫu ít có ảnh hưởng tới tỷ lệ phát sinh rễ bất định. Tuy nhiên, số rễ/mẫu và chiều dài rễ lại có sự khác biệt rõ ràng giữa các loại nguồn mẫu khác nhau. Trong ba loại nguồn mẫu được sử dụng: lá, cuống lá, đốt thân thì mẫu lá cho số rễ/mẫu (29 rễ/mẫu) thấp hơn so với mẫu là cuống lá (37 rễ/mẫu) và mẫu là đốt thân (32,33 rễ/mẫu); tuy nhiên, chiều dài rễ của nguồn mẫu lá (5,50 cm) lại cao vượt trội hơn hẳn hai nguồn mẫu còn lại (3 cm đối với nguồn mẫu cuống lá và 2,45 cm đối với nguồn mẫu đốt thân). Ngược lại, đốt thân cho sự tái sinh rễ bất định

kém nhất trong ba loại nguồn mẫu, điều này có thể do đốt thân có quá ít diện tích để hình thành rễ bất định (chỉ ở hai đầu đốt thân), và cũng cứng hơn cuống lá nên rễ khó đâm ra.

Sự hình thành rễ phụ thuộc vào kiểu gen, loại và nồng độ chất điều hòa sinh trưởng (Tiberiapop *et al.*, 2001), mô, cơ quan, tuổi và giai đoạn phát triển của cây (Võ Thị Bạch Mai, 2004). Trong nghiên cứu này, kết quả cho thấy lá là nguồn mẫu tốt nhất cho sự tái

sinh rễ bất định, mô lá mềm giúp dễ tạo mô sẹo và ra rễ, diện tích lá cũng lớn hơn so với cuống lá và đốt thân, giúp cho số rễ hình thành nhiều và dài, rễ to, khỏe, trắng mượt. Hơn nữa, khi sử dụng lá làm nguồn mẫu cho sự tái sinh rễ bất định sẽ giúp tiết kiệm nguồn giống Hà Thủ Ô đỏ *in vitro*, vì khi cắt lá để cấy cho ra rễ bất định, ta có thể tận dụng phần đốt thân để cấy chuyên tạo nguồn giống mới cho những nghiên cứu sau này.



Hình 3. Ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng IBA, NAA, 2,4-D lên khả năng tái sinh rễ bất định từ nguồn mẫu đốt thân.

Ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy lên khả năng hình thành rễ bất định

Sau 6 tuần nuôi cấy, rễ bất định hình thành trên tất cả các môi trường nuôi cấy được sử dụng với tỷ lệ mẫu hình thành rễ tương đương nhau; tuy nhiên, số lượng rễ và chiều dài rễ có sự khác biệt giữa các môi trường. Môi trường SH cho hiệu quả tái sinh rễ tốt nhất về số lượng rễ (25,33 rễ/mẫu), chiều dài rễ (4,47 cm), khối lượng tươi (131,33 mg), khối lượng khô (13,35 mg). Môi trường MS $\frac{1}{2}$ cho sự tái sinh rễ kém nhất. Đáng chú ý là trên môi trường MS, sự hình thành rễ kém hơn cả hai môi trường SH $\frac{1}{2}$ và $\frac{1}{2}$ SH, tuy nhiên, chiều dài rễ lại dài hơn hai môi trường trên và chỉ đứng sau môi trường SH là 3,37 cm. Rễ hình thành trên môi trường SH có độ đồng đều cao hơn so với các môi trường khác (Bảng 4).

Thành phần khoáng có ảnh hưởng rất lớn lên khả năng tái sinh cơ quan trong nuôi cấy *in vitro* cũng như sinh lý của cây ngoài tự nhiên, mỗi loài cây khác nhau thì có nhu cầu khoáng khác nhau. Do đó, việc tìm ra môi trường khoáng thích hợp cho việc tái sinh rễ bất định từ mô lá của Hà Thủ Ô đỏ là rất quan trọng. Han và đồng tác giả (2006) cũng đã báo cáo rằng việc loại bỏ NH $_4$ NO $_3$ ra khỏi môi trường nuôi cấy sẽ làm tăng tỷ lệ tạo rễ bất định trên mẫu cấy ở cây Nhân sâm. Bensaddek và đồng tác giả (2001) nhận thấy hàm lượng NH $_4$ NO $_3$ cao trong môi trường nuôi cấy rễ tơ cây *A. belladonna* làm giảm tốc độ tăng trưởng của rễ tơ, trong khi đó hàm lượng nitrate cao làm giảm sự sinh tổng hợp và tích lũy alkaloid. Trong nghiên cứu này, việc sử dụng môi trường SH cũng làm tăng hiệu quả tái sinh rễ bất định từ mô lá cây Hà Thủ Ô đỏ, điều này có thể giải thích là do môi trường SH không có

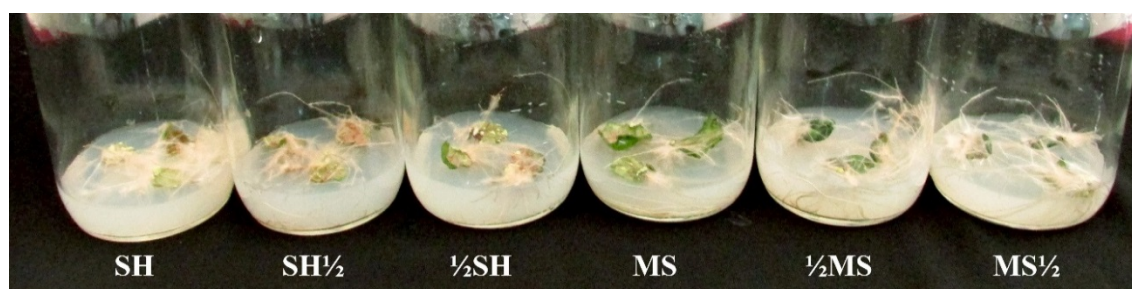
NH₄NO₃. Bên cạnh đó, vitamin cũng đóng vai trò quan trọng trong nuôi cấy *in vitro*, mà môi trường SH có hàm lượng vitamin cao hơn rất nhiều so với môi trường MS, đặc biệt là thiamine-HCl (B1) cao

gấp 50 lần và myo-inositol cao gấp 10 lần. Môi trường SH cũng được báo cáo là tốt nhất khi nuôi cấy rễ Nhân Sâm và Sâm Ngọc Linh (Kim *et al.*, 2003; Dương Tấn Nhựt, 2011).

Bảng 4. Ảnh hưởng của các môi trường khoáng khác nhau lên khả năng tái sinh rễ bất định Hà Thủ Ô đỏ.

Môi trường	Tỷ lệ phát sinh rễ (%)	Số mẫu/rễ	Chiều dài rễ (cm)	Khối lượng tươi (mg)	Khối lượng khô (mg)
SH	100 ^a	25,33 ^a	4,47 ^a	131,33 ^a	13,35 ^a
½SH	100 ^a	16,00 ^{bc}	2,80 ^{bc}	105,67 ^c	10,83 ^{bc}
SH½	100 ^a	18,67 ^b	2,12 ^{cd}	98,33 ^c	9,73 ^d
MS	100 ^a	15,67 ^c	3,37 ^b	115,67 ^b	11,77 ^b
½MS	100 ^a	12,00 ^d	2,26 ^{cd}	98,67 ^c	9,89 ^d
MS½	100 ^a	9,00 ^e	1,83 ^d	81,00 ^d	8,20 ^e

Ghi chú: Các ký tự a, b, c, d... trên cùng một cột thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê, khác biệt có ý nghĩa ở mức $\alpha = 0,05$.



Hình 4. Ảnh hưởng của các môi trường khoáng khác nhau lên khả năng tái sinh rễ bất định Hà Thủ Ô đỏ.

Tăng sinh rễ bất định trong các hệ thống nuôi cấy khác nhau

Kết quả thu nhận sau 6 tuần nuôi cấy cho thấy khả năng tăng sinh của rễ bất định phụ thuộc rất lớn vào loại bình nuôi cấy. Hệ thống bioreactor hàn quốc cho kết quả tăng sinh rễ tốt nhất về các chỉ tiêu theo dõi như khối lượng tươi (17,04 g), tỷ lệ tăng sinh (3,40 lần) cũng như khối lượng khô (1,56 g) (Bảng 5). Rễ được nuôi trong hệ thống bioreactor hàn quốc cho thấy các đầu rễ vẫn tiếp tục phát triển với nhiều lông hút màu trắng. Trong hệ thống bioreactor Hàn Quốc, rễ được đảo trộn liên tục do bình nuôi cấy có cấu trúc đáy hình phễu nên khi các cụm rễ lơ lửng xuống sẽ được dòng khí đẩy lên phía trên; do đó, chúng được cung cấp khí liên tục. Kết quả khi sử dụng bioreactor Hàn Quốc (3 lít) cho nghiên cứu nhân nhanh rễ bất định của nghiên cứu này cũng cho kết quả thấp hơn nhiều so với nghiên cứu của Tam và đồng tác giả (2017), điều này cũng có thể là do

nồng độ IBA và đường trong nghiên cứu của chúng tôi đã sử dụng với nồng độ thấp hơn. Trong khi đó, rễ được nuôi cấy trong bình bioreactor (3 lít) tự tạo cho khối lượng tươi thấp hơn (9,32 g) với tỷ lệ tăng sinh thấp hơn (1,8 lần) và khối lượng khô (0,81 g), điều này có thể là do các cụm rễ lơ lửng sau khi được cấy vào bình chúng chỉ nằm cố định, chính vì vậy, sự cung cấp không khí sẽ không được đầy đủ dẫn đến những cụm rễ ở phía xa trung tâm có biểu hiện bị trương nước. Tuy nhiên, Dương Tấn Nhựt và đồng tác giả (2015) lại cho kết quả tốt nhất khi nhân nhanh rễ bất định Sâm Ngọc Linh trong hệ thống bioreactor tự tạo (3 lít), điều này cũng có thể là do tính chất di truyền của từng loài đã ảnh hưởng tới khả năng thích ứng với từng loại bình nuôi cấy khác nhau. Rễ được nuôi trong hệ thống lồng tĩnh cho thấy không có sự tăng sinh đáng kể (1,4 lần) và không có sự khác biệt khi được nuôi trong điều kiện lồng lắc. Các rễ bất định khi mới được hình thành khi đưa sang điều kiện lồng lắc cho thấy chúng bị gãy vụn ra thành từng

đoạn nhỏ và mất khả năng kéo dài rễ, chính vì vậy, khả năng nhân nhanh rễ bất định trong điều kiện này là không khả thi. Kết quả này cũng cho thấy hệ

thống nuôi cấy lỏng lác cho kết quả thấp nhất khi nuôi cấy rễ bất định Sâm Ngọc Linh (Đương Tấn Nhựt *et al.*, 2015).

Bảng 5. Ảnh hưởng của hệ thống nuôi cấy khác nhau lên khả năng tăng sinh rễ bất định Cây Hà Thủ ô.

Hệ thống bình nuôi cấy (3 lít)	Khối lượng tươi (g)	Khối lượng khô (g)	Tỷ lệ tăng sinh (lần)
Lồng tĩnh	7,61 ^c	0,54 ^c	1,52 ^c
Lồng lác	5,09 ^d	0,37 ^d	1,01 ^d
Bioreactor tự tạo	9,32 ^b	0,81 ^b	1,86 ^b
Bioreactor Hàn Quốc	17,04^a	1,56^a	3,40^a

Ghi chú: Các ký tự a, b, c, ... trên cùng một cột thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê, khác biệt có ý nghĩa ở mức $\alpha = 0,05$.

KẾT LUẬN

Các kết quả thu được trong nghiên cứu này cho thấy, rễ bất định Hà Thủ ô tái sinh tốt nhất ở nguồn mẫu lá trên môi trường SH có bổ sung 30 g/L sucrose, 8,5 g/L agar, 1,5 mg/L IBA và điều chỉnh về pH = 5,8. Khả năng nhân nhanh rễ bất định trong các hệ thống nuôi cấy khác nhau cho thấy bioreactor Hàn Quốc cho kết quả tốt nhất về khối lượng tươi (17,04 g), khối lượng khô (1,56 g) và tỷ lệ tăng sinh (3,40 lần).

Lời cảm ơn: Nhóm tác giả xin cảm ơn Phòng Sinh học phân tử và Chọn tạo giống cây trồng, Viện nghiên cứu Khoa học Tây Nguyên đã hỗ trợ kinh phí cho chúng tôi thực hiện nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Bensaddek L, Gillet F, Nava-Saucedo JE, Fliniaux MA (2011) The effect of nitrate and ammonium concentrations on growth and alkaloid accumulation of *Atropa belladonna* hairy roots. *J Biotechnol* 85: 35-40.

Chang LL, Nalawede SM, Mulabagal V, Yeh MS, Tsay HS (2003) Micropagation of *Polygonum multiflorum* and quantitative analysis of the avthraquynones emodin and physcion formed in *in vitro* propagated shoots and plants. *Biol Pharm Bull* 1467-1471.

Đỗ Tất Lợi (1995) *Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam*. NXB Y học 900-903, 1035-1041.

Đỗ Tất Lợi (1999) *Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam*. NXB Y học 455-457, 506-507.

Duncan DB (1955) Multiple range and multiple F tests. *Biometrics* 11(1): 1-42.

Đương Tấn Nhựt (2011) *Công nghệ sinh học thực vật - Tập 3* NXB Nông nghiệp 228-245, 175-183.

Đương Tấn Nhựt, Nguyễn Ngọc Kim Vy, Nguyễn Như Hà Vy, Đinh Văn Khiêm (2006) Nghiên cứu khả năng hình thành mô sẹo, tái sinh chồi và nhân nhanh giống cây hà thủ ô đỏ (*Polygonum multiflorum* Thunb.). *Tạp chí Công nghệ Sinh học* 4(4): 507-518.

Đương Tấn Nhựt, Trần Hiếu, Nguyễn Thị Nhật Linh, Hoàng Thanh Tùng, Nguyễn Bá Nam, Nguyễn Phúc Huy, Vũ Quốc Luận, Vũ Thị Hiền (2015) Tối ưu hóa quá trình nhân nhanh và tích lũy saponin của rễ bất định sâm ngọc linh (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.) trong các hệ thống nuôi cấy. *Tạp chí Công nghệ Sinh học* 13(3): 853-864.

Han JY, Kwon YS, Yang DC, Jung YR, Choi YE (2006) Expression and RNA interference-induced silencing of damarediol synthase gene in *Panax ginseng*. *Plant Cell Physiol* 47: 1653-1662.

Hoàng Văn Long, Bùi Văn Thế Vinh, Đương Tấn Nhựt (2007) Giá thể nylon trong ra rễ cây hoa cúc (*Chrysanthemum* sp.). *Tuyển tập Hội nghị Khoa học Công nghệ sinh học trong nhân giống và chọn tạo giống hoa*. NXB. Nông nghiệp.

Kim YS, Hand EJ, Yeung EC, Peak KY (2003) Lateral root development and saponin accumulation as affected by IBA or NAA in adventitious root cultures of *Panax ginseng* C. A. Meyer. *In Vitro Cell Dev Biol - Plant* 39: 245-249.

Kull T, Arditti J (2002) Orchid biology reviews and perspective. *Kluwer Academic Publishers* 443-487.

Li S, Zhao SJ, Cui TB, Liu ZY, Zhao W (2012) 2,3,5,4'-Tetrahydroxystilbene-2-O- β -D-glycoside biosynthesis by suspension cells cultures of *Polygonum multiflorum* Thunb and production enhancement by methyl jasmonate and salicylic acid. *Molecules* 17: 2240-2247.

Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15: 473-497.

- Nguyễn Thị Liễu, Nguyễn Trung Thành, Nguyễn Văn Kết (2011) Nghiên cứu khả năng tạo rễ bất định của sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.) trong nghiên cứu *in vitro*. *Tạp chí Khoa học - Đại học Quốc gia Hà Nội* 27: 30-36.
- Nguyễn Thị Ngọc Hương, Võ Thị Bạch Mai (2009) Tìm hiểu sự phát sinh hình thái rễ trong nuôi cấy *in vitro* cây nhàu (*Morinda citrifolia* L.). *Tạp chí Phát triển Khoa học và Công nghệ* 17: 100-105.
- Schenk RU, Hidebrandt AC (1972) Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. *Can J Bot* 50: 199-204.
- Tam HT, Lee KJ, Lee JD, Bhushan S, Paek KY, Park SY (2017) Adventitious root culture of *Polygonum multiflorum* for phenolic compounds and its pilot-scale production in 500 L-tank. *Plant Cell Tiss Org Cult* 130: 167-181.
- Tiberiapop DP, Catherine B (2001) Auxin control in the formation of adventitious roots. *Not Bot Hort Agrobot Cluj* 39(1): 307-316.
- Trịnh Thị Hương, Hồ Thanh Tâm, Hà Thị Mỹ Ngân, Ngô Thanh Tài, Nguyễn Phúc Huy, Hoàng Xuân Chiến, Nguyễn Bá Nam, Vũ Quốc Luận, Vũ Thị Hiền, Nguyễn Thị Thúy Hương, Phạm Bích Ngọc, Chu Hoàng Hà, Dương Tấn Nhựt (2012) Ảnh hưởng của nguồn mẫu, kích thước mẫu và một số loại auxin lên khả năng tái sinh rễ bất định của sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.) nuôi cấy *in vitro*. *Tạp chí Công nghệ Sinh học* 10(4): 877-886.
- Trương Thị Bích Phượng, Trần Thị Kim Thu, Nguyễn Hoàng Lộc (2008) Nghiên cứu nhân giống *in vitro* cây Hà Thủ Ô đỏ (*Polygonum multiflorum* Thunb.). *Tạp chí Công nghệ Sinh học* 6(4B): 889-895.
- Võ Thị Bạch Mai (2004). *Sự phát triển chồi và rễ*. NXB Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh.

EFFECTS OF EXPLANT TYPE, PLANT GROWTH REGULATOR AND CULTIVATION SYSTEM ON MULTIPLICATION OF *Polygonum multiflora* Thunb. CULTURED *IN VITRO*

Vũ Quốc Luận¹, Đỗ Thị Luyen¹, Hồ Hoàng Anh Kha¹, Hoàng Thanh Tung¹, Vũ Thị Hiền¹, Đỗ Mạnh Cường¹, Bùi Văn Thế Vinh², Huỳnh Gia Bảo¹, Dương Tấn Nhựt¹

¹Tay Nguyen Institute for Scientific Research, VAST

²Ho Chi Minh City Univeristy of Technology (HUTECH)

SUMMARY

Polygonum multiflora Thunb. (Belongs to Polygonaceae family) is a medicinal plant of economic value and should be protected, according to the Red Book of Vietnam. Many studies have shown that *P. multiflora* Thunb. was effective for many diseases such as hair loss, premature gray hair, lower back pain, knee weakness, muscle weakness, hemiplegia, nervousness, dizziness, insomnia, etc. Propagation and preservation of this herbal species are significantly important because of increased demand. Adventitious root biomass culture has been successful on a number of plant species, and that it has potential for *P. multiflorum* breeding. In this study, the effect of explants, plant growth regulators and different culture systems on adventitious root formation was investigated. The adventitious roots were induced from the explants and the optimum culture medium were transferred to four different culture systems (3-liter triangular flask, shaking triangle, bioreactor self-made and Korean bioreactor) containing 5 g adventitious roots per 1 liter medium. The results showed that the leaf cultured on SH medium supplemented with 1.5 mg L⁻¹ IBA, 30 g L⁻¹ sucrose, 8.5 g L⁻¹ agar and pH 5.8 gave the higher of adventitious root regeneration rate (100%), root number/explant (25.33 roots), fresh weight (131.67 mg) and dry weight 13.35 mg) compared to those cultured on other condition after 6 weeks of culture. The adventitious root multiplication in the Korea bioreactor system is more effective than other culture systems shown in the fresh biomass (17.04 g), dry biomass (1.56 g) and proliferation rate (3.40 fold) after 6 weeks of culture.

Keywords: *adventitious root, culture system, explant, plant growth regulators, Polygonum multiflora Thunb.*