

## HIỆU QUẢ TÁI SINH CHỒI VÀ VI NHÂN GIỐNG CÂY CHANH DÂY TÍM (*Passiflora edulis* Sims.) THÔNG QUA NUÔI CÂY LỚP MỎNG TẾ BÀO ĐOẠN THÂN CẮT THEO CHIỀU DỌC

Trần Hiếu<sup>1,2,3</sup>, Hoàng Thanh Tùng<sup>1</sup>, Cao Đăng Nguyên<sup>2</sup>, Dương Tấn Nhựt<sup>1,✉</sup>

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

<sup>2</sup>Trường Đại học Khoa học, Đại học Huế

<sup>3</sup>Trường Cao đẳng Sư phạm Ninh Thuận

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

Ngày nhận bài: 24.7.2019

Ngày nhận đăng: 30.8.2019

### TÓM TẮT

Kỹ thuật nuôi cấy lớp mỏng tế bào (TCL) đã được sử dụng hiệu quả cho nuôi cấy mô của vài chục cây trồng có tầm quan trọng về mặt thương mại như cây trồng trên đồng ruộng (gao, ngũ cốc), cây nông nghiệp (cây ăn quả, rau, cây cảnh), cây thuốc và thảo dược (cây sâm Ngọc Linh), thậm chí cả cây lâm nghiệp (cây thông) và cây ăn quả thân gỗ (cây cam quýt, cây táo). Trong nghiên cứu này, TCL được sử dụng để đánh giá hiệu quả tái sinh chồi và nhân giống cây chanh dây tím (*Passiflora edulis* Sims.). Mẫu đoạn thân được cắt theo chiều dọc (ITCL) và được sử dụng làm vật liệu cho nghiên cứu. Kết quả cho thấy, tỷ lệ tái sinh chồi và số lượng chồi thông qua nuôi cấy mẫu ITCL đoạn thân phụ thuộc vào vị trí đốt thân (1, 2, 3, 4 và 5) và chất điều hòa sinh trưởng thực vật (BA và NAA) được bổ sung vào môi trường nuôi cấy. Sau 8 tuần nuôi cấy, kết quả ghi nhận được cho thấy, ITCL đoạn thân (đốt thân thứ 3) của cây chanh dây tím *in vitro* nuôi cấy trên môi trường MS có bổ sung 1,5 mg/L BA kết hợp với 1,0 mg/L NAA cho tỷ lệ tái sinh chồi là 83,33% và số chồi cao nhất là 3,00 chồi. Những chồi này được nuôi cấy trên môi trường MS cải biên (MSM) có bổ sung 1,0 mg/L BA cho hiệu quả nhân nhanh chồi (số chồi/mẫu là 3,56 chồi và chiều cao chồi là 6,67 cm) cao hơn so với các nghiệm thức bổ sung nồng độ khác của BA. Ngoài ra, khi chồi được chuyển sang môi trường MSM có bổ sung 2,0 mg/L IBA cho tỷ lệ ra rễ là 76,67% và tỷ lệ sống sót của cây con cao nhất là 83,33% sau 10 tuần thích nghi ngoài vườn ươm. Kết quả của nghiên cứu này là thành công bước đầu trong việc thiết lập một phương thức tái sinh và nhân giống *in vitro* hiệu quả của cây chanh dây tím thông qua nuôi cấy ITCL đoạn thân.

**Từ khóa:** Cây chanh dây tím, đoạn thân, lớp mỏng tế bào, tái sinh chồi, vị trí đốt thân

### GIỚI THIỆU

Hiện nay, gieo hạt và giâm hom là 2 phương pháp nhân giống truyền thống phổ biến ở các loài chanh dây. Giâm hom (nhân giống sinh dưỡng) là phương pháp phổ biến nhất trên toàn thế giới nhằm duy trì tất cả các đặc tính tốt cần thiết của kiểu gen từ cây mẹ như khả năng kháng bệnh, kích thước của quả, hàm lượng nước, thời gian trưởng thành,... Hơn nữa, cây chanh dây dễ bị ảnh hưởng bởi một số bệnh do virus, vi khuẩn và nấm gây thiệt hại nặng nề cho người trồng. Vì vậy, phương pháp nhân giống sinh dưỡng dễ gây ra sự lây nhiễm mầm bệnh từ cây mẹ sang thế hệ tiếp theo (Fischer, Rezende, 2008). Vi nhân giống các loài chanh dây đóng một vai trò quan trọng trong việc tạo giống cây khỏe mạnh, sạch bệnh và đồng nhất về mặt di truyền, có thể được sử dụng

để cung cấp các sản phẩm thảo dược, trái cây dinh dưỡng và làm cảnh (Ozarowski, Thiem, 2013). Đã có nhiều báo cáo về vi nhân giống thành công trên cây chanh dây sử dụng chồi đỉnh, đốt thân, đoạn thân, lá hình đĩa, trụ dưới lá mầm và rễ (Fernando *et al.*, 2007; Prammanee *et al.*, 2011; Rocha *et al.*, 2012); tuy nhiên, hiệu quả của sự tái sinh là thấp trong hầu hết các trường hợp. Vì vậy, cần tìm ra một phương thức nuôi cấy *in vitro* phù hợp để ứng dụng cho đối tượng này.

Kỹ thuật nuôi cấy lớp mỏng tế bào (TCL) ban đầu được phát triển bởi Trần Thanh Vân cho "chương trình phát sinh hình thái khác nhau" ở cây thuốc lá (Tran Thanh Van, 1981). Kỹ thuật TCL sau đó được áp dụng thành công trong phát sinh phôi vô tính và tái sinh chồi ở nhiều loài cây hai lá mầm và

cây một lá mầm, bao gồm một vài giống Lan và các giống cây trồng khác như *Dendrobium aqueum* (Parthibhan *et al.*, 2018), cây sâm Ngọc Linh (Vu Thi Hien *et al.*, 2016). Nó cũng được ứng dụng thành công trong tái sinh một số cây thân gỗ bao gồm cọ dầu, táo (Scherwinski-Pereira *et al.*, 2010; DobrÁnszki, Teixeira da Silva, 2013). Đối với giống cây chanh dây tím (*Passiflora edulis* Sims.), kỹ thuật TCL (cắt theo chiều dọc và chiều ngang) ở mẫu lá cũng đã được sử dụng; tuy nhiên, nguồn mẫu đoạn thân cho đến nay chưa được nghiên cứu. Do đó, nghiên cứu hiệu quả tái sinh chồi và nhân giống cây chanh dây tím bằng kỹ thuật TCL đoạn thân cắt theo chiều dọc (ITCL) được thực hiện.

Mục tiêu của nghiên cứu này là nhằm thiết lập một phương thức mới cho sự tái sinh chồi và nhân giống cây chanh dây tím đối với mẫu đoạn thân thông qua kỹ thuật ITCL dưới ảnh hưởng của các yếu tố khác nhau như chất điều hòa sinh trưởng thực vật và vị trí đốt thân. Từ đó, nó có thể được ứng

dụng trong nhân nhanh giống thương mại, cung cấp nguồn cành ghép phong phú cho phương pháp ghép cành và các ứng dụng thực tế khác.

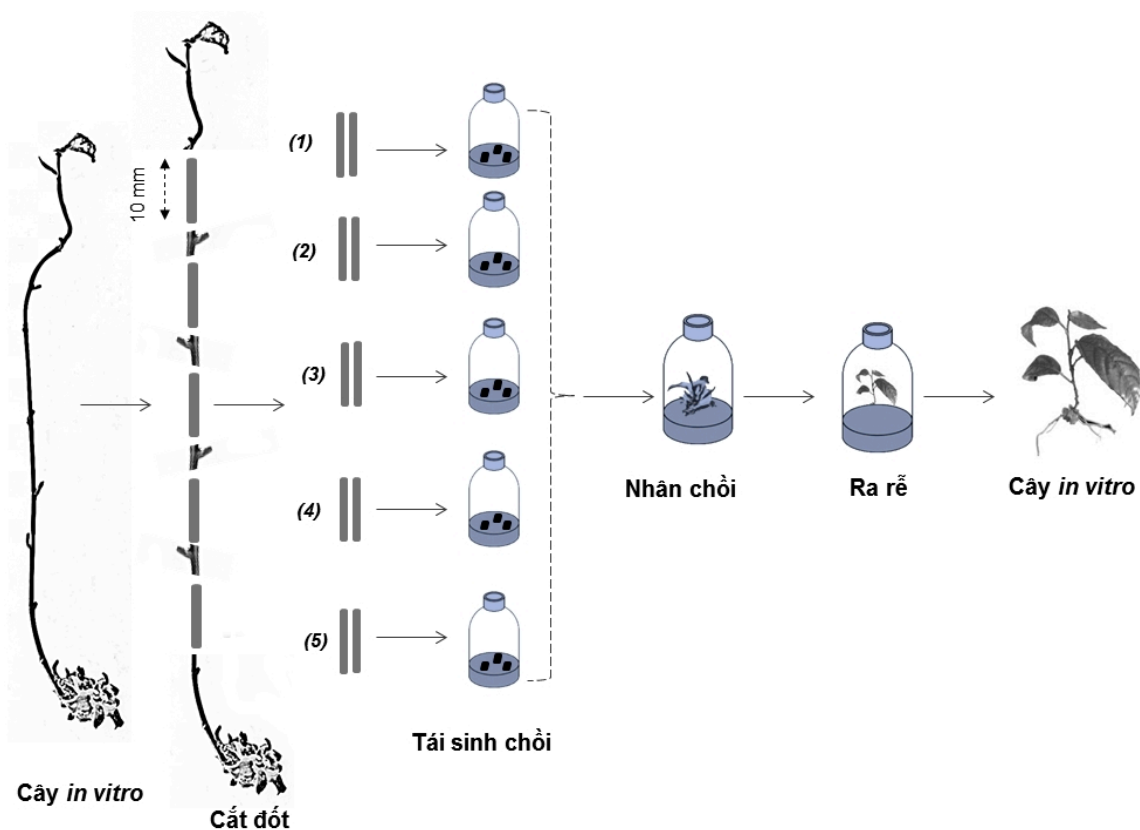
## VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

### Vật liệu

#### Nguồn mẫu

Đoạn thân từ chồi *in vitro* (1,5 tháng tuổi) của cây chanh dây tím (hiện có tại Phòng Sinh học phân tử và Chọn tạo giống cây trồng, Viện Nghiên cứu Khoa học Tây Nguyên) được sử dụng làm nguồn mẫu trong nghiên cứu này.

Đoạn thân (đường kính 1 mm, dài 10 mm) thu được từ các vị trí đốt khác nhau tính từ đoạn thân thứ 2 (trừ chồi đỉnh) trở xuống (1; 2; 3; 4 và 5) của các chồi *in vitro* được cắt đôi theo chiều dọc tạo thành 2 mẫu ITCL, mỗi ITCL có kích thước (0,5 mm x 10 mm) được mô tả ở Hình 1.



**Hình 1.** Sơ đồ tái sinh chồi và nhân giống cây chanh dây tím có nguồn gốc từ ITCL đoạn thân. (1), (2), (3), (4) và (5): ITCL đoạn thân có nguồn gốc từ các vị trí đốt thân khác nhau được đánh số thứ tự từ 1-5 từ trên xuống.

### Môi trường nuôi cấy

Môi trường nuôi cấy *in vitro* được sử dụng trong nghiên cứu này là môi trường MS (Murashige, Skoog, 1962) và MSM (Monteiro *et al.*, 2000) có bổ sung 30 g/L sucrose, 8 g/L agar và chất điều hòa sinh trưởng thực vật được bổ sung vào môi trường tùy thuộc vào mục đích thí nghiệm. Môi trường được điều chỉnh về pH = 5,8 trước khi hấp khử trùng ở 121°C, 1 atm trong 30 min.

### Phương pháp

#### Tái sinh chồi

*Ảnh hưởng của BA riêng lẻ và kết hợp với NAA lên khả năng tái sinh chồi từ ITCL đoạn thân*

Mẫu ITCL đoạn thân (vị trí đốt số 2 và 3) được cấy trên môi trường MS bổ sung benzyladenine (BA) riêng lẻ với các nồng độ (0; 0,5; 1,0; 1,5 và 2 mg/L) hoặc kết hợp  $\alpha$ -naphthaleneacetic acid (NAA) với nồng độ (0,5 và 1,0 mg/L) để xác định nồng độ của chất điều hòa sinh trưởng thực vật thích hợp cho khả năng tái sinh chồi *in vitro*. Sau 8 tuần nuôi cấy, các chỉ tiêu theo dõi như tỷ lệ tái sinh chồi (%), số chồi/mẫu, chiều cao chồi (cm) được ghi nhận.

Hiệu quả của kỹ thuật nuôi cấy ITCL đoạn thân được so sánh với nuôi cấy nguyên mẫu đoạn thân trên cùng môi trường tái sinh chồi tốt nhất ở trên thông qua hệ số nhân chồi. Hệ số nhân chồi được tính bằng công thức:

$$\text{Hệ số nhân chồi} = \text{Tỷ lệ tái sinh chồi (\%)} \times \text{Số mẫu đoạn thân} \times \text{Số chồi/mẫu}$$

*Ảnh hưởng của vị trí đốt thân lên khả năng tái sinh chồi từ ITCL đoạn thân*

Những mẫu ITCL đoạn thân có nguồn gốc từ các vị trí đốt khác nhau (1, 2, 3, 4 và 5) được nuôi cấy trên môi trường tái sinh chồi tốt nhất đã khảo sát ở thí nghiệm trên nhằm xác định vị trí đốt thân cho hiệu quả tái sinh chồi cao nhất. Sau 8 tuần nuôi cấy, tỷ lệ tái sinh chồi (%), số chồi/mẫu, chiều cao chồi (cm) được ghi nhận.

#### Nhanh chồi

Chồi *in vitro* (kích thước 1,5 cm) có nguồn gốc từ ITCL đoạn thân được nuôi cấy trên môi trường MSM có bổ sung BA với các nồng độ khác nhau (0; 0,5; 1,0; 1,5 và 2 mg/L) nhằm xác định nồng độ BA thích hợp cho khả năng nhân nhanh chồi *in vitro*. Sau 8 tuần nuôi cấy, số chồi/mẫu, chiều cao chồi (cm), số lá/chồi và chỉ số SPAD - tổng hàm lượng

chlorophyll đo bằng máy SPAD-502 (Minolta Co., Ltd., Osaka, Japan) được ghi nhận.

#### Ra rễ và thích nghi ngoài vườn ươm

Chồi *in vitro* (kích thước 2 cm) có nguồn gốc từ ITCL đoạn thân được nuôi cấy trên môi trường ra rễ. Môi trường ra rễ *in vitro* trong thí nghiệm này là môi trường MSM có bổ sung IBA với các nồng độ khác nhau (0; 0,5; 1,0; 1,5; 2; 2,5 và 3,0 mg/L). Sau 8 tuần ra rễ *in vitro*, tỷ lệ ra rễ (%), số rễ/cây, chiều dài rễ (cm), chiều cao chồi (cm), số lá/chồi và chỉ số SPAD được ghi nhận.

Những cây con ở giai đoạn ra rễ được thu nhận và rửa lại bằng nhiều lần với nước để loại bỏ agar trên bề mặt rễ. Sau đó, cây con được trồng vào chậu nhựa chứa hỗn hợp đất và xơ dừa (tỷ lệ 1:1) vô trùng. Trong 1 tuần đầu, cây con được giữ ẩm bằng cách che phủ kín bởi màng nhựa polyetylen. Sau 1 tuần giữ ẩm, cây con được chuyển ra nhà kính trong 9 tuần tiếp theo để thích nghi ở điều kiện *ex vitro*. Các chỉ tiêu theo dõi như tỷ lệ sống sót (%), chiều cao cây (cm), số lá/cây, chiều dài lá (cm) và chiều rộng lá (cm) được ghi nhận.

#### Điều kiện nuôi cấy

Điều kiện *in vitro*: các bình nuôi cấy được đặt ở 25±2°C, độ ẩm 55-60%, thời gian chiếu sáng 16 giờ/ngày với cường độ chiếu sáng 40-45  $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  dưới ánh sáng huỳnh quang.

Điều kiện *ex vitro*: nhiệt độ 18-25°C, độ ẩm trung bình 70-75% và sử dụng ánh sáng tự nhiên có che sáng 40%.

#### Xử lý số liệu

Thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên, với 3 lần lặp lại. Mỗi lần lặp lại cấy 20 bình/nghiệm thức với 3 mẫu/bình nuôi cấy (trừ thí nghiệm nhân nhanh chồi và ra rễ *in vitro*, 1 mẫu/bình nuôi cấy). Các số liệu thu được xử lý bằng phần mềm Microsoft Excel® 2010 và phần mềm SPSS 20.0 với phép thử Duncan ở mức  $\alpha = 0,05$  (Duncan, 1955).

### KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

#### Tái sinh chồi

*Ảnh hưởng của BA riêng lẻ và kết hợp với NAA lên khả năng tái sinh chồi từ ITCL đoạn thân*

Sau 8 tuần nuôi cấy, kết quả ghi nhận được cho thấy mẫu ITCL đoạn thân của cây chanh dây tím trên môi trường MS bổ sung BA ở nồng độ riêng lẻ hoặc

kết hợp với NAA có sự khác biệt giữa các nghiệm thức về các chỉ tiêu theo dõi như tỷ lệ tái sinh chồi, số chồi/mẫu và chiều cao chồi (Bảng 1). Tỷ lệ tái sinh chồi (78,33%), số chồi/mẫu (3,00 chồi) và chiều cao chồi (1,83 cm) thu được là cao nhất khi mẫu ITCL đoạn thân nuôi cấy trên môi trường MS bổ sung 1,5 mg/L BA kết hợp với 1,0 mg/L NAA (Bảng 1, Hình 3a). Khả năng tái sinh chồi không được ghi nhận ở những mẫu ITCL đoạn thân nuôi cấy trên môi trường không bổ sung chất điều hòa sinh trưởng (đối chứng) và môi trường bổ sung 0,5 mg/L BA kết hợp 0,5 mg/l NAA. Kết quả trên Bảng 1 còn cho thấy ở tất cả các nghiệm thức bổ sung BA riêng lẻ (trừ đối chứng) hoặc kết hợp với NAA (trừ nghiệm thức bổ sung 0,5 mg/L BA kết hợp 0,5 mg/L NAA) đều kích thích sự tái sinh chồi từ ITCL đoạn thân. Tại các nghiệm thức kết hợp BA với NAA, kết quả đều cho thấy khi tăng nồng độ của BA từ 0,5 đến 1,5 mg/L thì hiệu quả tái sinh chồi tăng, nhưng khi nồng độ BA tăng lên 2,0 mg/L thì hiệu quả tái sinh chồi giảm (Bảng 1). Hơn nữa, chồi hình thành ở các nghiệm thức bổ sung BA kết hợp với NAA là những chồi

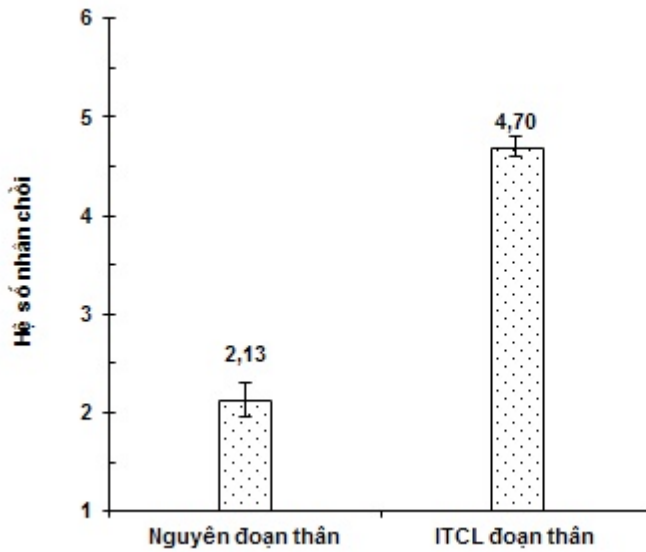
đơn với kích thước lớn hơn và hình thái chồi biểu hiện rõ rệt hơn so với chồi được hình thành trong các nghiệm thức bổ sung BA đơn lẻ (chồi hình thành với các cụm chồi có kích thước nhỏ hơn 1 mm).

Bổ sung BA riêng lẻ hoặc kết hợp với NAA, TDZ hoặc Kinetin vào môi trường nuôi cấy các loài *Passiflora* đều cho khả năng cảm ứng chồi bất định (Becerra *et al.*, 2004; Hall *et al.*, 2000; Trevisan, Mendes, 2005). Theo kết quả nghiên cứu của Prammanee và đồng tác giả (2011) trên đối tượng cây chanh dây tím cho thấy, những chồi nhỏ được tái sinh từ mẫu chồi đỉnh trên môi trường MS bổ sung 1,5 mg/L BA; trong khi những chồi lớn lại được tái sinh ở nồng độ 1,0 mg/L BA. Nghiên cứu của Garcia và đồng tác giả (2011) cũng cho thấy, khi kết hợp giữa BA và NAA trong môi trường MS đều cho sự tái sinh hình thành chồi của cây *Passiflora suberosa* từ mô sẹo mặc dù hiệu quả tái sinh giảm. Trong nghiên cứu này, mẫu ITCL đoạn thân nuôi cấy trên môi trường MS bổ sung BA kết hợp với NAA cho hiệu quả tái sinh chồi cao (78,33%).

**Bảng 1.** Ảnh hưởng của BA đơn lẻ hoặc kết hợp với NAA lên khả năng tái sinh chồi từ ITCL đoạn thân của cây chanh dây tím sau 8 tuần nuôi cấy.

BA (mg/L)	NAA (mg/L)	Tỷ lệ tái sinh chồi (%)	Số chồi/mẫu	Chiều cao chồi (cm)
0	-	0,00 i <sup>x</sup>	0,00 e	0,00 f
0,5	-	11,67 g	- <sup>1</sup>	-
1,0	-	51,67 c	2,67 ab	0,57 d
1,5	-	38,33 d	2,00 c	0,53 d
2,0	-	25,00 e	- <sup>1</sup>	-
0,5	0,5	0,00 i	0,00 e	0,00 f
1,0	0,5	18,33 f	2,67 ab	0,53 d
1,5	0,5	48,33 c	3,00 a	1,16 bc
2,0	0,5	16,67 f	- <sup>1</sup>	-
0,5	1,0	5,00 h	0,67 d	0,30 e
1,0	1,0	58,33 b	2,33 bc	1,27 b
<b>1,5</b>	<b>1,0</b>	<b>78,33 a</b>	<b>3,00 a</b>	<b>1,83 a</b>
2,0	1,0	36,67 d	1,00 d	1,03 c

Ghi chú: <sup>x</sup> Những chữ cái khác nhau trên cùng 1 cột thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ở  $\alpha = 0,05$  theo phép thử Duncan. <sup>1</sup> là cụm chồi gồm các chồi có kích thước rất nhỏ (< 1 mm).



**Hình 2.** Biểu đồ so sánh hệ số nhân chồi của kỹ thuật nuôi cấy ITCL đoạn thân với nuôi cấy nguyên đoạn thân.

Mặt khác, khi so sánh hệ số nhân chồi của kỹ thuật nuôi cấy ITCL đoạn thân (đường kính 0,5 mm, dài 10 mm) với nuôi cấy nguyên đoạn thân (đường kính 1 mm, dài 10 mm) của cây chanh dây tím trên cùng môi trường tái sinh chồi tối ưu, kết quả cho thấy nuôi cấy mẫu ITCL đoạn thân cho hệ số nhân chồi (4,70) cao gấp 2,2 lần so với nuôi cấy nguyên đoạn thân (2,13) (Hình 2).

**Ảnh hưởng của vị trí đốt thân lên khả năng tái sinh chồi từ ITCL đoạn thân**

Vị trí đốt thân trên cây có ảnh hưởng đến hiệu quả tái sinh chồi từ ITCL đoạn thân của cây chanh dây tím sau 8 tuần nuôi cấy (Bảng 2).

Những mẫu ITCL đoạn thân có nguồn gốc từ các

vị trí đốt khác nhau được nuôi cấy trên môi trường tái sinh chồi (MS bổ sung 1,5 mg/L BA và 1 mg/L NAA), kết quả cho thấy hiệu quả tái sinh chồi cao nhất thu được từ ITCL đoạn thân có nguồn gốc từ vị trí đốt thân thứ 3 thông qua các chỉ tiêu như tỷ lệ tái sinh chồi (83,33%), số chồi/mẫu (3,00 chồi/mẫu) và chiều cao chồi (1,43 cm). Tuy nhiên, hiệu quả tái sinh chồi thấp ở những mẫu ITCL đoạn thân rất non (đốt thân thứ 1) hoặc những mẫu ITCL đoạn thân già (đốt thân thứ 5) (Bảng 2). Kết quả của nghiên cứu này tương tự như nghiên cứu của Chattopadhyaya và đồng tác giả (2010) trên đối tượng *Sesamum indicum* L., những mẫu đoạn thân thứ 3 được cắt theo chiều ngang (tTCL) cho hiệu quả tái sinh chồi cao hơn so với tTCL đoạn thân có nguồn gốc từ đốt thân 1, 2 và 4.

**Bảng 2.** Ảnh hưởng của vị trí đốt thân lên khả năng tái sinh chồi từ ITCL đoạn thân của cây chanh dây tím sau 8 tuần nuôi cấy.

Vị trí đốt thân	Tỷ lệ tái sinh chồi (%)	Số chồi/mẫu	Chiều cao chồi (cm)
1	20,00 d <sup>x</sup>	1,33 bc	0,27 c
2	36,67 b	2,00 b	0,87 b
3	<b>83,33 a</b>	<b>3,00 a</b>	<b>1,43 a</b>
4	25,00 c	1,67 bc	0,30 c
5	16,67 d	1,00 c	0,23 c

Ghi chú: <sup>x</sup> Những chữ cái khác nhau trên cùng 1 cột thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ở  $\alpha = 0,05$  theo phép thử Duncan.

### Nhanh chóng

Sau 8 tuần nuôi cấy kết quả ghi nhận được cho thấy, sự nhân nhanh chồi từ các chồi có nguồn gốc từ ITCL đoạn thân của cây chanh dây tím chịu ảnh hưởng bởi sự tác động BA ở các nồng độ khác nhau (Bảng 3). Số lượng chồi không thay đổi được ghi nhận trên môi trường không bổ sung chất điều hòa sinh trưởng (đối chứng); trong khi đó, số chồi (6,67 chồi/mẫu), chiều cao chồi (3,56 cm), số lá/chồi (6,67 lá) và chỉ số SPAD (27,10) là cao nhất khi chồi được nuôi cấy trên môi trường MSM bổ sung 1,0 mg/L

BA (Bảng 3, Hình 3b). Tuy nhiên, khi tăng nồng độ BA lớn hơn 1 mg/L, số chồi/mẫu, chiều cao chồi và số lá/chồi giảm (Bảng 3).

Kết quả nghiên cứu này cũng tương tự với nghiên cứu của Banu và đồng tác giả (2007) trên đối tượng cây chanh dây tím, tỷ lệ tăng sinh chồi tối đa (3,1 chồi/mẫu) thu được khi các đoạn thân mang chồi nách nuôi cấy trên môi trường MS bổ sung 1,0 mg/L BA và ở nồng độ BA lớn hơn 1,0 mg/L thì tỷ lệ tăng sinh chồi và số chồi/mẫu giảm.

**Bảng 3.** Ảnh hưởng BA lên khả năng nhân nhanh chồi từ các chồi có nguồn gốc từ ITCL đoạn thân của cây chanh dây tím sau 8 tuần nuôi cấy.

BA (mg/L)	Số chồi/mẫu	Chiều cao chồi (cm)	Số lá/chồi	SPAD
0	1,00 d	1,53 e	3,00 d	25,30 b
0,5	3,33 c	2,07 d	4,33 b	25,07 b
<b>1,0</b>	<b>6,67 a</b>	<b>3,56 a</b>	<b>6,67 a</b>	<b>27,10 a</b>
1,5	4,33 b	2,47 b	4,00 bc	24,00 c
2,0	3,00 c	2,27 c	3,33 cd	24,80 b

Ghi chú: <sup>x</sup> Những chữ cái khác nhau trên cùng 1 cột thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ở  $\alpha = 0,05$  theo phép thử Duncan.

### Ra rễ *in vitro* và thích nghi ngoài vườn ươm của cây con có nguồn gốc từ ITCL đoạn thân

Kết quả ghi nhận ở Bảng 4 cho thấy ảnh hưởng của IBA lên khả năng ra rễ *in vitro* của những chồi có nguồn gốc từ ITCL đoạn thân cây chanh dây tím sau 8 tuần nuôi cấy. Tỷ lệ hình thành rễ cao nhất (76,67%), số rễ/ chồi (4,33 rễ), chiều dài rễ (3,77 cm), chiều cao chồi (9,63 cm), số lá/chồi (8,00 lá) và chỉ số SPAD (35,40) đạt được khi các chồi được nuôi cấy trên môi trường MSM bổ sung 2,0 mg/L IBA cao hơn so với các nghiệm thức bổ sung IBA khác (Hình 3c). Tuy nhiên, khi tăng nồng độ IBA lớn hơn 2,0 mg/L, tỷ lệ hình thành rễ cũng như các chỉ tiêu theo dõi khác giảm (Bảng 4).

Ngoài ra, khi quan sát sự hình thành rễ ở tất cả các nghiệm thức bổ sung IBA đều cho thấy có xuất hiện khối mô sẹo ở phần gốc của chồi và ở nồng độ IBA cao thì mô sẹo hình thành nhiều hơn. Kết quả của nghiên cứu này tương tự với nghiên cứu của Jafari và đồng tác giả (2017) trên đối tượng *Passiflora caerulea* L., nhóm tác giả cho rằng việc hình thành mô sẹo trong giai đoạn hình thành rễ có thể được tăng theo cấp số nhân khi tăng cao nồng độ IBA; do đó, có thể

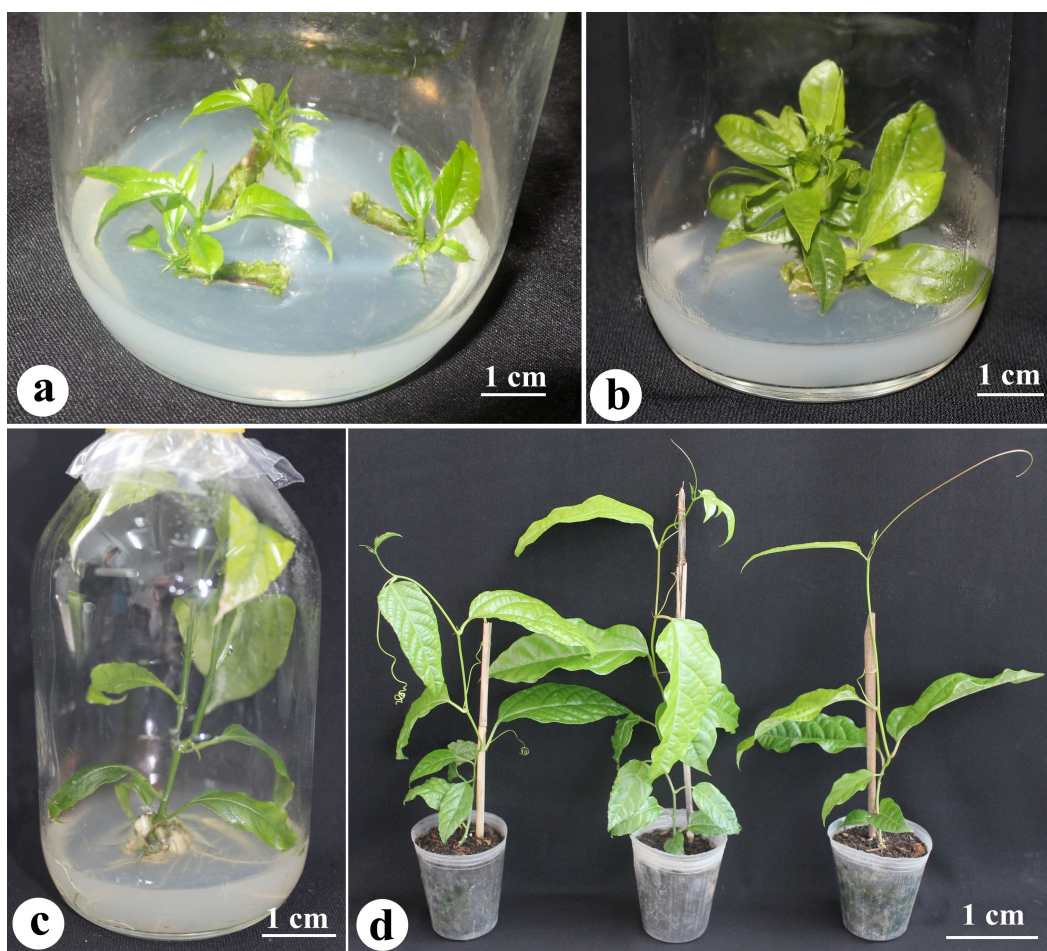
tác động tiêu cực đến rễ. Một số nghiên cứu trước đây chỉ ra rằng, môi trường MS bổ sung 0,5 mg/L và 1,0 mg/L IBA là thích hợp cho sự ra rễ của *P. foetida* L. (Anand *et al.*, 2012; Ragavendran *et al.*, 2012). Bellamine và đồng tác giả (1998) cũng báo cáo rằng IBA phù hợp hơn NAA và IAA trong việc cảm ứng quá trình ra rễ. IBA ổn định hơn và ít nhạy cảm hơn với sự phân hủy và được chuyển hóa chậm bởi enzyme peroxidase, mà điều đó có thể là một trong những nguyên nhân làm cho hiệu quả ra rễ tốt hơn của IBA so với các loại auxin khác (Dobrąnszki, Teixeira da Silva, 2010).

Sau 1 tuần giữ ẩm, cây con được chuyển ra ngoài vườn ươm trong thời gian 9 tuần tiếp theo để thích nghi, kết quả ghi nhận cho thấy cây con ở nghiệm thức bổ sung 2 mg/L IBA cho tỷ lệ sống sót cao nhất (83,33%) và cây sinh trưởng và phát triển tốt thông qua các chỉ tiêu như chiều cao cây (15,50 cm), số lá/cây (10,33 lá), chiều dài lá (8,73 cm) và chiều rộng lá (3,57 cm) (Bảng 5, Hình 3d). Theo nghiên cứu của Teixeira da Silva và đồng tác giả (2011) cho rằng, cây con *in vitro* của *P. edulis* được thích nghi và sinh trưởng tốt trên hỗn hợp giá thể xơ dừa và plantmax (1:1) ở giai đoạn vườn ươm.

**Bảng 4.** Ảnh hưởng của IBA lên khả năng ra rễ của chồi có nguồn gốc từ ITCL đoạn thân của cây chanh dây tím sau 8 tuần nuôi cấy.

IBA (mg/L)	Tỷ lệ ra rễ (%)	Số rễ/chồi	Chiều dài rễ (cm)	Chiều cao chồi (cm)	Số lá/chồi	SPAD
0	0,00 g <sup>x</sup>	0,00 f	0,00 f	2,17 f	3,67 d	27,03 e
0,5	28,33 f	1,33 e	1,03 e	2,93 e	4,67 c	24,63 g
1,0	33,33 e	2,00 de	1,47 d	3,10 e	5,33 bc	25,50 f
1,5	51,67 c	3,00 bc	2,30 c	3,90 d	5,33 bc	30,10 c
<b>2,0</b>	<b>76,67 a</b>	<b>4,33 a</b>	<b>3,77 a</b>	<b>9,63 a</b>	<b>8,00 a</b>	<b>35,40 a</b>
2,5	66,67 b	3,33 b	3,13 b	7,33 b	6,33 b	34,80 b
3,0	43,33 d	2,33 cd	2,17 c	6,13 c	5,33 bc	29,37 d

Ghi chú: <sup>x</sup> Những chữ cái khác nhau trên cùng 1 cột thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ở  $\alpha = 0,05$  theo phép thử Duncan.



**Hình 3.** Sự tái sinh chồi và nhân giống cây chanh dây tím có nguồn gốc từ ITCL đoạn thân. **a:** Chồi tái sinh từ ITCL đoạn thân trên môi trường MS bổ sung 1,5 mg/L IBA và 1,0 mg/L NAA sau 8 tuần nuôi cấy; **b:** Chồi được nhân nhanh trên môi trường MSM bổ sung 1,0 mg/L IBA sau 8 tuần nuôi cấy; **c:** Ra rễ trên môi trường MSM bổ sung 2,0 mg/L IBA sau 8 tuần nuôi cấy; **d:** Cây con sau 10 tuần thích nghi ngoài vườn ươm.

**Bảng 5.** Thích nghi của cây con có nguồn gốc từ ITCL đoạn thân của cây chanh dây tím sau 10 tuần ngoài vườn ươm.

IBA (mg/L)	Tỷ lệ sống sót (%)	Chiều cao cây (cm)	Số lá/cây	Chiều dài lá (cm)	Chiều rộng lá (cm)
0	0,00f	0,00g	0,00f	0,00f	0,00d
0,5	23,33e	5,33f	5,33e	5,17e	2,43c
1,0	33,33d	5,97e	6,33cd	5,67d	2,47c
1,5	56,67b	10,67c	7,67b	6,67c	2,90b
<b>2,0</b>	<b>83,33a</b>	<b>15,50a</b>	<b>10,33a</b>	<b>8,73a</b>	<b>3,57a</b>
2,5	53,33b	11,63b	6,67c	7,17b	2,67bc
3,0	43,33c	9,17d	5,67de	6,33c	2,43c

Ghi chú: <sup>x</sup> Những chữ cái khác nhau trên cùng 1 cột thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ở  $\alpha = 0,05$  theo phép thử Duncan.

## KẾT LUẬN

Nghiên cứu này đã thành công trong việc thiết lập được phương thức tái sinh và nhân giống *in vitro* cây chanh dây tím thông qua kỹ thuật nuôi cấy ITCL đoạn thân. Kết quả của nghiên cứu này cho thấy, hiệu quả tái sinh chồi cao nhất thu được khi những mẫu ITCL đoạn thân có nguồn gốc từ vị trí đốt thân thứ 3 của cây chanh dây tím *in vitro* được nuôi cấy trên môi trường MS có bổ sung 1,5 mg/L BA và 1,0 mg/L NAA. Chồi này được nhân nhanh hiệu quả trên môi trường MSM bổ sung 1,0 mg/L BA. Sự hình thành rễ tốt nhất đạt được trên môi trường MSM có chứa 2,0 mg/L IBA và 83,33% cây con được sống sót ngoài vườn ươm sau 10 tuần thích nghi.

**Lời cảm ơn:** Nghiên cứu này được hỗ trợ bởi Phòng Sinh học phân tử và Chọn tạo giống cây trồng, Viện Nghiên cứu Khoa học Tây Nguyên.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

Anand SP, Jayakumar E, Jeyachandran R, Nandagobalan V, Doss A (2012) Direct organogenesis of *Passiflora foetida* L. through nodal explants. *Plant Tissue Cult Biotech* 22(1): 87-91.

Banu GS, Kumar G, Pandian MR (2007) Establishment of shoot cultures and plant regeneration of *Passiflora edulis* Sims. *Indian J Plant Physiol* 12(1): 23-27.

Becerra DC, Forero AP, Góngora GA (2004) Age and physiological condition of donor plants affect *in vitro* morphogenesis in leaf explants of *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*. *Plant Cell Tiss Org Cult* 79(1): 87-90.

Bellamine J, Penel C, Greppin H, Gaspar T (1998) Confirmation of the role of auxin and calcium in the late

phases of adventitious root formation. *Plant Growth Regul* 26(3): 191-194.

Chattopadhyaya B, Banerjee J, Basu A, Sen SK, Maiti MK (2010) Shoot induction and regeneration using internodal transverse thin cell layer culture in *Sesamum indicum* L. *Plant Biotechnol Rep* 4(2): 173-178.

Da Silva CV, De Oliveira LS, Loriato VAP, Da Silva LC, De Campos JMS, Viccini LF, Otoni WC (2011) Organogenesis from root explants of commercial populations of *Passiflora edulis* Sims. and a wild passion fruit species, *Passiflora cincinnata* Masters. *Plant Cell Tiss Org Cult* 107(3): 407-416.

Dobránszki J, Teixeira da Silva JA (2010) Micropropagation of an apple a review. *Biotechnol Adv* 28(4): 462-488.

Dobránszki J, Teixeira da Silva JA (2013) *In vitro* shoot regeneration from transverse thin cell layers of apple leaves in response to various factors. *J Horticult Sci Biotechn* 88(1): 60-66.

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

Fernando JA, Vieira MLC, Machado SR, Da Gloria BA (2007) New insights into the *in vitro* organogenesis process: the case of *Passiflora*. *Plant Cell Tiss Org Cult* 91(1): 37-44.

Fischer IH, Rezende JAM (2008) Diseases of Passion lower (*Passiflora* spp.). *Pest Technol* 2(1): 1-19.

Garcia R, Pacheco G, Falcao E, Borges G, Mansur E (2011) Influence of type of explant, plant growth regeneration, salt composition of basal medium, and light on callogenesis and regeneration in *Passiflora suberosa* (Passifloraceae). *Plant Cell Tiss Org Cult* 106(1): 47-54.

Hall RM, Drew RA, Higgins CM, Dietzgen RG (2000) Efficient organogenesis of an Australian passion fruit



- hybrid (*Passiflora edulis* × *Passiflora edulis* var. *flavicarpa*) suitable for gene delivery. *Aust J Bot* 48(5): 673-680.
- Jafari M, Daneshvar MH, Lotfi A (2017) *In vitro* shoot proliferation of *Passiflora caerulea* L. via cotyledonary node and shoot tip explants. *Biotechnol* 98(2): 113-119.
- Monteiro ACB de A, Higashi EN, Goncalves AN, Rodriguez APM (2000) A novel approach for the definition of the inorganic medium components for micropropagation of yellow passion fruit (*Passiflora edulis* Sims. f. *flavicarpa* Deg.). *In Vitro Cell Dev Biol -Plant* 36(6): 527-531.
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15: 473-497.
- Ozarowski M, Thiem B (2013) Progress in micropropagation of *Passiflora* spp. to produce medicinal plants: a mini-review. *Rev Bras Farmacogn* 23(6): 937-947.
- Prammanee S, Thumjamras S, Chiemsombat P, Pipattanawong N (2011) Efficient shoot regeneration from direct apical meristem tissue to produce virus-free purple passion fruit plants. *Crop Prot* 30(11): 1425-1429.
- Ragavendran C, Kamalanathan D, Reena G, Natarajan D (2012) *In vitro* propagation of nodal and shoot tip explants of *Passiflora foetida* L. An exotic medicinal plant. *Asian J Plant Sci Res* 2(6): 707-711.
- Rocha DI, Vieira LM, Tanaka FAO, Da Silva LC, Otoni WC (2012). Anatomical and ultrastructural analyses of *in vitro* organogenesis from root explants of commercial passion fruit (*Passiflora edulis* Sims.). *Plant Cell Tiss Org Cult* 111(1): 69-78.
- Scherwinski-Pereira JE, Da Guedes RS, Fermino PCP, Silva TL, Costa F (2010) Somatic embryogenesis and plant regeneration in oil palm using the thin cell layer technique. *In Vitro Cell Dev Biol - Plant* 46(4): 378-385.
- Texeira da Silva JA (2003) Thin cell layer technology in ornamental plant micropropagation and biotechnology. *Afr J Biotechnol* 12: 683-691.
- Tran Thanh Van K (1981) Control of morphogenesis in *in vitro* cultures. *Annu Rev Plant Physiol* 32: 291-311.
- Trevisan F, Mendes BMJ (2005) Optimization of *in vitro* organogenesis in passion fruit (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*). *Sci Agric* 62(4): 346-350.
- Vu Thi Hien, Nguyen Phuc Huy, Bui Van Vinh, Hoang Xuan Chien, Hoang Thanh Tung, Nguyen Ba Nam, Vu Quoc Luan, Duong Tan Nhut (2016) Somatic embryogenesis from leaf transverse thin cell layer derived-callus of Vietnamese ginseng (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.). *Tap chí Công nghệ Sinh học* 14(1): 63-73.
- Parthibhan S, Venkateswara RM, Teixeira Da Silva JA, Kumar TS (2018) Somatic embryogenesis from stem thin cell layers of *Dendrobium aqueum*. *Biol Plantarum* 62(3): 439-450.

## EFFICIENCY OF SHOOT REGENERATION AND MICROPROPAGATION OF PURPLE PASSION FRUIT (*Passiflora edulis* Sims.) VIA INTERNODAL LONGITUDINAL THIN CELL LAYER CULTURE

Tran Hieu<sup>1,2,3</sup>, Hoang Thanh Tung<sup>1</sup>, Cao Dang Nguyen<sup>2</sup>, Duong Tan Nhut<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Tay Nguyen Institute for Scientific Research, Vietnam Academy of Science and Technology

<sup>2</sup>University of Sciences, Hue University

<sup>3</sup>Pedagogical College of Ninh Thuan

### SUMMARY

The thin cell layer culture technique (TCL) has been used for the effective tissue culture of several dozen plants with commercial importance such as field crops (rice, cereals), horticultural commodities (fruits, vegetables, ornamental plants), medicinal plants and herbs (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.), and even forestry trees (*Pinus* sp.), and woody fruit plants (*Citrus* spp., apple). In the present, TCL was used to evaluate the efficiency of shoot regeneration and propagation for purple passion fruit (*Passiflora edulis* Sims.). The internodes were cut longitudinally (ITCL) and was used as an initial material. The results showed that the shoot regeneration rate and number of shoots from internode-ITCL depended on position of internodes (1, 2, 3, 4 and 5) and the plant growth regulator (BA and NAA). After 8 weeks of culture, internode-ITCL derived from 3<sup>rd</sup> internode of *P. edulis* cultured on MS medium supplemented with 1.5 mg/L BA in combination with 1.0 mg/L NAA gave the highest shoot regeneration rate (83.33%), and number of shoots (3.00 shoots/explant). These shoots were cultured on modified MS (MSM) medium supplemented with 1.0 mg/L BA showed higher efficiency of shoot multiplication (3.56 shoots/explant and 6.67 cm height) than the other BA treatments. In addition, the highest rooting rate was 76.67% when cultured on MSM medium containing 2.0 mg/L IBA. The

survival rate of plantlets was 83.33% when transferred into greenhouse condition after 10 weeks. The results of this study were the initial success in establishing an effective *in vitro* regeneration and propagation of *Passiflora edulis* Sims. through internode-ITCL.

**Keywords:** *Internodes, Passiflora edulis Sims., position of internode, shoot regeneration, thin cell layer*