Tạp chí Công nghệ Sinh học **18**(3): 507-516, 2020

NGHIÊN CỨU TẠO CỦ *IN VITRO* CÂY ĐỊA HOÀNG (*REHMANNIA GLUTINOSA* (GAERTN.) LIBOSCH.)

Vũ Hoài Sâm[1,✉], Nguyễn Thị Xuyên[1], Nguyễn Thị Hương[1], Dương Thị Ngọc Anh[1], Nguyễn Minh Tuyên[1], Nguyễn Duy Phương[2], Phan Thúy Hiền[1]

[1]*Viện Dược liệu, Bộ Y tế*
[2]*Viện Di truyền Nông nghiệp, Viện Khoa học Nông nghiệp Việt Nam*

✉Người chịu trách nhiệm liên lạc. E-mail: samthavn@yahoo.com

Ngày nhận bài: 23.10.2019
Ngày nhận đăng: 10.02.2020

TÓM TẮT

Địa hoàng là một loại thảo dược thuộc họ Hoa Mõm chó, chứa các dược chất chính là catalpol và verbacoside trong rễ củ. Trong y học cổ truyền, rễ củ Địa hoàng được sử dụng dưới dạng tươi, khô hoặc được chế biến thành thục địa. Chúng có tác dụng toàn diện đối với hệ thống máu, hệ thống nội tiết, lợi tiểu, chống viêm, tăng cường miễn dịch, chống ung thư và chữa tiểu đường... Địa hoàng có phân bố tự nhiên ở Trung Quốc, Hàn Quốc và Nhật Bản. Cây được nhập nội vào Việt Nam từ năm 1958, thích hợp trồng ở các tỉnh đồng bằng và trung du Bắc Bộ. Ở Việt Nam, cây có ra hoa nhưng hầu như không kết hạt, nhân giống chủ yếu bằng lát cắt củ. Nghiên cứu này đánh giá ảnh hưởng của một số chất điều hòa sinh trưởng đến khả năng tạo củ trong điều kiện *in vitro* trên nền khoáng 1/4 MS có bổ sung 50 g/L đường sucrose, phục vụ công tác nhân nhanh giống Địa hoàng chất lượng cao. Kết quả nghiên cứu cho thấy, auxin (IBA và NAA) không có tác dụng tạo củ *in vitro*. Các đơn chất BAP và PP_{333} cho hiệu quả tạo củ kém. Tỷ lệ tạo củ đạt cao nhất (83,33%) trên môi trường có bổ sung tổ hợp BAP (1,0 mg/L) và PP_{333} (0,3 mg/L) và số củ/cây là 5,58. Nồng độ đường sucrose tối ưu để tăng đường kính và trọng lượng củ là 70g/L. 100% cây có bộ rễ củ sống sót ngoài vườn ươm, sinh trưởng và phát triển tốt trên đồng ruộng.

Từ khóa: auxin, Địa hoàng, *in vitro*, PP_{333}, *Rehmannia glutinosa*, tạo củ

ĐẶT VẤN ĐỀ

Địa hoàng (*Rehmannia glutinosa* (Gaertn.) Libosch.) thuộc họ Hoa Mõm chó (Scrophulariaceae) là cây thuốc quý được sử dụng phổ biến trong y học cổ truyền. Cây được nhập nội vào Việt Nam năm 1958 và được trồng phổ biến ở một số tỉnh thuộc đồng bằng và trung du Bắc bộ nhiều năm sau đó (Đỗ Huy Bích, 2004). Rễ củ Địa hoàng là bộ phận được sử dụng làm thuốc dưới dạng tươi, khô hoặc chế thành thục địa (cửu chưng, cửu sái). Tác dụng chủ yếu của Địa hoàng là được dùng làm thuốc bổ, tăng cường sinh lực, chống viêm, chống thiếu máu và chữa bệnh tiểu đường... (Zhang, 2008). Diện tích trồng Địa hoàng ngày càng được mở rộng.

Nhân giống vô tính bằng cách cắt củ là biện pháp nhân giống phổ biến đối với Địa hoàng. Vì cây nhân vô tính nhanh được thu hoạch và hơn nữa ở Việt Nam cây Địa hoàng có ra hoa nhưng không kết hạt (Viện Dược liệu, 2004). Củ Địa hoàng không có thời gian ngủ nghỉ, thường nảy mầm ngay cả khi đang trồng trên đồng ruộng nếu gặp ẩm (Phạm Văn Hiển, 1994). Ngoài ra, do hàm lượng đường trong củ tương đối cao nên việc bảo quản trong kho lạnh hoặc trong cát ẩm dễ gây thối hỏng. Người dân thường phải trồng thêm 1 vụ xuân hè để giữ giống. Tuy nhiên, vụ này năng suất kém hoặc thậm chí là mất trắng nếu thời tiết không thuận lợi (Phạm Văn Hiển, 1994). Gần đây, nhiều công trình trong nước và

quốc tế về nhân giống Địa hoàng bằng phương pháp nuôi cấy mô đã được công bố. Hầu hết các nghiên cứu đều tiến hành tái sinh *in vitro* qua callus từ lá và từ rễ (Park, 2009). Hình thức tái sinh này dễ gây ra các biến dị di truyền. Vi nhân giống từ ngọn chồi cũng đã được nghiên cứu bởi Ewelina với kết quả là 8,2 chồi/mẫu sau 4 tuần nuôi cấy (Eweilia, 2015). Kết quả nghiên cứu của Vũ Hoài Sâm và đồng tác giả (2018) đã xác định được môi trường MS + 1,0 mg/L BAP + 50 g/L sucrose là tối ưu để nhân nhanh Địa hoàng bằng phương pháp nuôi cấy mô cho hệ số nhân nhanh đạt 31,53 lần từ một lát cắt ban đầu sau 2 tháng nuôi cấy (Vũ Hoài Sâm, 2018).

Hiệu quả của quá trình nhân giống *in vitro* ở Việt Nam đối với hầu hết các đối tượng cây trồng đều chưa được đánh giá cao là do tỷ lệ sống của cây khi đưa ra ngoài đồng ruộng thường thấp. Tạo củ *in vitro* đối với những cây thân rễ là kỹ thuật khá phổ biến. Mục đích tạo củ nhằm nâng cao khả năng sống sót của cây khi đưa ra điều kiện *ex vitro*, vì cây đã được tích lũy chất dinh dưỡng trong củ tạo được nên khả năng thích nghi với điều kiện bên ngoài thuận lợi hơn. Địa hoàng thuộc dạng cây có rễ củ, do vậy, mục đích thực hiện nghiên cứu nhân giống Địa hoàng thông qua tạo củ *in vitro* một mặt nhằm thăm dò khả năng cung ứng giống Địa hoàng dưới dạng củ nhỏ (tương tự như đối với khoai tây bi), mặt khác nhằm nâng cao tỷ lệ sống của cây khi đưa ra đồng ruộng.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu

Ngọn chồi và đốt thân, có chiều dài 0,5 - 1,0 cm chứa ít nhất một chồi ngủ của giống Địa hoàng tuyển chọn (*Rehmannia glutinosa* (Gaernt) Libosch.) (Vũ Hoài Sâm, 2018).

Thí nghiệm nghiên cứu ảnh hưởng của các chất điều hòa sinh trưởng

Mẫu cấy được nuôi trên nền môi trường 1/4MS + 50 g/L đường sucrose có bổ sung auxin (IBA hoặc NAA) ở nồng độ 0 mg/L, 0,5 mg/L, 1,0 mg/L; PP_{333} hoặc BAP ở các nồng độ 0 mg/L, 0,5 mg/L, 1 mg/L, 1,5 mg/L, 2 mg/L và tổ hợp BAP với auxin/ PP_{333}, tùy từng thí nghiệm để xác định được nồng độ và loại chất điều hòa sinh trưởng thực vật thích hợp nhất đến khả năng tạo củ *in vitro* đối với Địa hoàng.

Thí nghiệm nghiên cứu ảnh hưởng của nồng độ đường sucrose

Mẫu được cấy trên nền môi trường chứa 1/4 MS + chất điều hòa sinh trưởng tốt nhất từ kết quả thí nghiệm trên với các mức nồng độ đường là 50 g/L, 70 g/L và 90 g/L.

Đánh giá hiệu quả của việc tạo củ *in vitro*

Hiệu quả tạo củ được đánh giá thông qua các chỉ tiêu đường kính củ (mm), khối lượng củ (mg), tỷ lệ nảy mầm của củ (%) và tỷ lệ sống của cây có rễ củ (%) ở vườn ươm.

Môi trường nuôi cấy được điều chỉnh pH đến 5,8, hấp trong bình tam giác 250 mL, có đậy nút bông, ở 121^0C trong 20 phút. Phòng nuôi được duy trì ở điều kiện nhiệt độ trung bình là 25 ± 2^0C, thời gian chiếu sáng 16h/ngày bằng đèn huỳnh quang với cường độ ánh sáng khoảng 2000 lux, độ ẩm trung bình từ 75 - 80%.

Xử lý số liệu

Số liệu được phân tích sau 60 ngày nuôi cấy. Mỗi nghiệm thức được lặp lại 3 lần, mỗi lần 30 mẫu. Xử lý số liệu bằng phần mềm SPSS và được trình bày trong bảng kết quả dưới dạng (Mean ± SD và Duncan's Test).

KẾT QUẢ

Ảnh hưởng của các chất điều hòa sinh trưởng tới khả năng tạo củ *Địa hoàng in vitro*

Ảnh hưởng của auxin (IBA, NAA)

Auxin có vai trò quan trọng trong việc phát sinh hình thái rễ của cây *in vitro*. Củ Địa hoàng là một loại rễ bên đã biến đổi thành, vì thế chúng tôi nghiên cứu ảnh hưởng của nồng độ IBA và NAA tới khả năng hình thành củ nhỏ trên nền môi trường. Kết quả theo dõi sau 8 tuần được thể hiện ở Bảng 1.

Bảng 1. Ảnh hưởng của nồng độ IBA và NAA đến tạo củ nhỏ *in vitro.*

Công thức	NAA (mg/L)	IBA (mg/L)	Tỷ lệ tạo củ (%)	Tỷ lệ tạo rễ (%)	Chiều dài rễ/củ (cm)	Trạng thái rễ/củ
ĐC	0	0	0	100	2,34 ± 0,12^{d}	Rễ chùm, rễ mảnh
AX1	0,5	-	0	100	3,62 ± 0,11^{a}	Rễ chùm, không rõ số rễ
AX2	1	-	0	100	2,86 ± 0,17^{c}	Rễ chùm, không rõ số rễ
AX3	-	0,5	0	100	3,26 ± 0,17^{b}	Rễ chùm, không rõ số rễ
AX4	-	1	0	100	2,65 ± 0,08^{c}	Rễ chùm, không rõ số rễ

Ghi chú: *Các chữ cái khác nhau trong cùng một cột thể hiện sự khác nhau có ý nghĩa (α = 0,05)*

Kết quả cho thấy, rễ ở công thức đối chứng (ĐC) dài nhưng mảnh và yếu. Cả IBA và NAA ở các nồng độ 0,5 mg/L và 1,0 mg/L không hiệu quả trong việc tạo củ *in vitro* cây Địa hoàng. Sau 8 tuần nuôi cấy, ở tất cả các công thức trong thí nghiệm 100% mẫu cấy đều phát sinh rễ. Tuy nhiên, rễ hình thành đều là rễ chùm và không công thức nào có sự hình thành củ (Hình 1).

Ảnh hưởng của PP_{333}

Do cây Địa hoàng nuôi trong môi trường *in vitro* phát sinh hình thái phân đốt, khác so với bên ngoài (lá mọc xít nhau quanh gốc), nên chúng tôi sử dụng PP_{333} để ức chế sự phát triển của thân, lá và rễ cây trong ống nghiệm. Để tiến hành thí nghiệm này, chúng tôi thực hiện 5 công thức với các nồng độ khác nhau trong khoảng 0 - 2 mg/L. Kết quả sau 8 tuần nuôi cấy được thể hiện ở Bảng 2.

Kết quả cho thấy, không giống kết quả thử nghiệm với auxin, tỷ lệ tạo rễ và trạng thái rễ khi được nuôi cấy trên các môi trường có bổ sung PP_{333} có sự khác biệt rõ rệt. Trong thí nghiệm này, lóng thân có xu hướng mập chắc và ngắn lại. Rễ tạo thành ở các công thức PP1-PP3 có dạng rễ củ có màu vàng, rễ chắc khỏe, chóp rễ tròn, đường kính lớn (Hình 2b, 2c và 2d). Nhưng tỷ lệ tạo rễ dạng này có xu hướng giảm khi nồng độ PP_{333} tăng từ 0,5 mg/L đến 1,5 mg/L. Kết quả Bảng 2 cho thấy, ở công thức có bổ sung 0,5 mg/L PP_{333} tỷ lệ tạo rễ củ đạt cao nhất (73,33%). Ở nồng độ PP_{333} cao hơn (công thức PP4), rễ hình thành tuy mập chắc hơn so với đối chứng, nhưng lại có dạng sợi dài, chóp nhọn, màu trắng như dạng rễ thông thường, không phải dạng củ (Hình 2e).

Như vậy, công thức PP1 chứa 1/4 MS + 50g/L sucrose + 0,5 mg/L PP_{333} là công thức tốt nhất trong thí nghiệm này, đem lại tỷ lệ tạo củ là 73,77%, chiều dài củ là 1,05 cm.

Bảng 2. Ảnh hưởng của nồng độ PP_{333} tới khả năng hình thành củ nhỏ.

STT	PP_{333} (mg/L)	Tỷ lệ tạo rễ (%)	Tỷ lệ tạo củ (%)	Chiều dài rễ/củ (cm)	Trạng thái rễ/củ
ĐC	0	100	-	2,34 ± 0,12^{b}	Rễ mảnh, dài, dạng chùm
PP1	0,5	26,67	73,33	1,05±0,07^{c}	Rễ củ, dạng chùm
PP2	1,0	46,67	53,33	0,97±0,98^{c}	Rễ củ, dạng chùm
PP3	1,5	70,00	30,00	0,46±0,04^{d}	Rễ củ, dạng chùm
PP4	2,0	100	-	2,72±0,09^{a}	Rễ chùm, sợi rễ mập chắc

Ghi chú: *Các chữ cái khác nhau trong cùng một cột thể hiện sự khác nhau có ý nghĩa (α = 0,05)*.

Ảnh hưởng của BAP

BAP là một loại cytokinin có khả năng kích thích chồi rất mạnh. Tuy nhiên, bên cạnh đó, nhiều kết quả nghiên cứu đã chứng minh với nồng độ thích hợp BAP dùng đơn lẻ hay kết hợp có tác động tích cực đến quá trình hình thành củ trong điều kiện *in vitro*. Do đó, chúng tôi tiến hành thí nghiệm về ảnh hưởng của BAP trên các dải nồng độ 0 - 2 mg/L. Kết quả nghiên cứu sau 8 tuần được trình bày ở Bảng 3.

Kết quả Bảng 3 cho thấy, mẫu vừa tạo rễ vừa tạo củ sau 8 tuần nuôi cấy tùy theo nồng độ BAP. Khi nồng độ BAP là 0 - 0,5 mg/L, mẫu cấy không tạo củ. Với nồng độ BAP là 1 mg/L, 23,33% mẫu cấy có xuất hiện củ ở gốc (Hình 3c). Khi nồng độ BAP tăng lên mức 1,5 mg/L thì tỷ lệ tạo củ giống như vậy giảm xuống, chỉ còn 6,67%. Kết quả cho thấy, khi nồng độ BAP bổ sung vào môi trường nuôi cấy vượt quá ngưỡng 1,0 mg/L, mẫu cấy không còn xuất hiện rễ sợi. Theo nhận định của chúng tôi, mẫu cấy Địa hoàng khá nhạy cảm với mức nồng độ BAP trong môi trường nuôi cấy. Ở mỗi mức nồng độ, mẫu cấy có sự phát sinh hình thái khác nhau. Trong thí nghiệm này, nồng độ BAP từ 1,5 mg/L - 2,0 mg/L, mẫu cấy phát sinh dạng cụm chồi (Hình 3d, 3e). Như vậy, công thức tốt nhất trong thí nghiệm này để tạo củ Địa hoàng *in vitro* là 1/4 MS + 50 g/L sucrose + 1 mg/L BAP.

Bảng 3. Ảnh hưởng của nồng độ BAP tới khả năng hình thành củ nhỏ.

STT	Nồng độ BAP (mg/l)	Tỷ lệ tạo củ (%)	Tỷ lệ tạo rễ (%)	Chiều dài rễ/củ (cm)	Số củ/cây (củ)	Trạng thái rễ/củ
ĐC	0	-	100	2,34 ± 0,12^{a}	-	Rễ mảnh, dài
BA1	0,5	-	46,67	2,05 ± 0,10^{b}	-	Rễ chùm, chắc
BA2	1	23,33	-	0,97 ± 0,03^{c}	2,02 ± 0,03^{a}	Rễ dạng củ, nhỏ
BA3	1,5	6,67	-	0,53 ± 0,08^{d}	1,13 ± 0,13^{b}	Rễ dạng củ, nhỏ
BA4	2	-	-	-	-	Không tạo rễ

Ghi chú: *Các chữ cái khác nhau trong cùng một cột thể hiện sự khác nhau có ý nghĩa (α = 0,05)*

Ảnh hưởng của tổ hợp BAP + PP_{333}

PP_{333} và BAP đơn chất có tác động rõ rệt đến hệ rễ *in vitro* cây Địa hoàng, tuy nhiên hiệu quả tạo củ chưa cao. Vì vậy, để xác định môi trường tối ưu tạo củ nhỏ Địa hoàng *in vitro*, chúng tôi tiếp tục bố trí trên môi trường 1/4 MS có bổ sung 1 mg/L BAP, kết hợp với PP_{333} với các nồng độ thay đổi trong khoảng 0 - 1 mg/L. Sau 8 tuần theo dõi, kết quả được thể hiện ở Bảng 4.

Kết quả Bảng 4 cho thấy, các nồng độ PP_{333} khác nhau thì các chỉ số các chỉ tiêu theo dõi về khả năng tạo củ nhỏ Địa hoàng *in vitro* cũng khác nhau. Tỷ lệ tạo củ tăng dần khi nồng độ PP_{333} tăng từ 0 - 0,3 mg/L, mức cao nhất đạt 83,33% ở công thức BP2 (1,0 mg/L BAP + 0,3 mg/L PP_{333}). Khi nồng độ PP_{333} cao trên mức 0,3 mg/L, tỷ lệ tạo củ có xu hướng giảm và ở công thức BP4 (1 mg/L PP_{333}) bộ rễ của mẫu cấy không hình thành củ (Hình 4e). Công thức BP2 và BP3 là 2 công thức có hình thái củ tốt nhất (dạng củ đơn, mập) (Hình 4c, 4d).

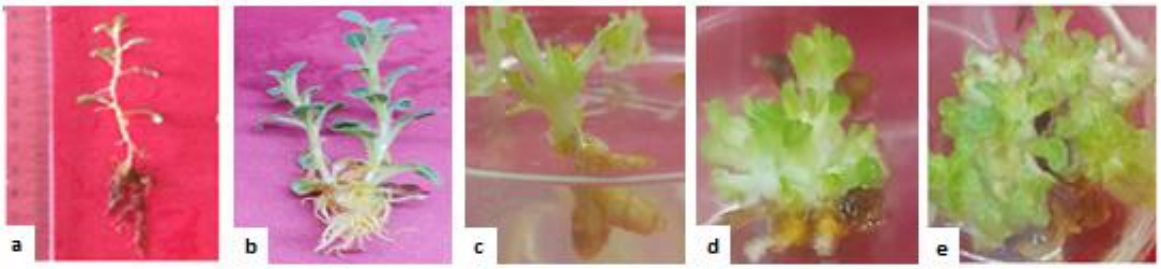
Từ kết quả trên đây, chúng tôi kết luận, tổ hợp BAP (1,0 mg/L) và PP_{333} (0,3 mg/L) là tổ hợp chất điều hòa sinh trưởng tốt nhất để tạo củ *in vitro* cây Địa hoàng do thu được tỷ lệ tạo củ cao nhất (83,33%).

Ảnh hưởng của nồng độ sucrose tới khả năng tạo củ Địa hoàng *in vitro*

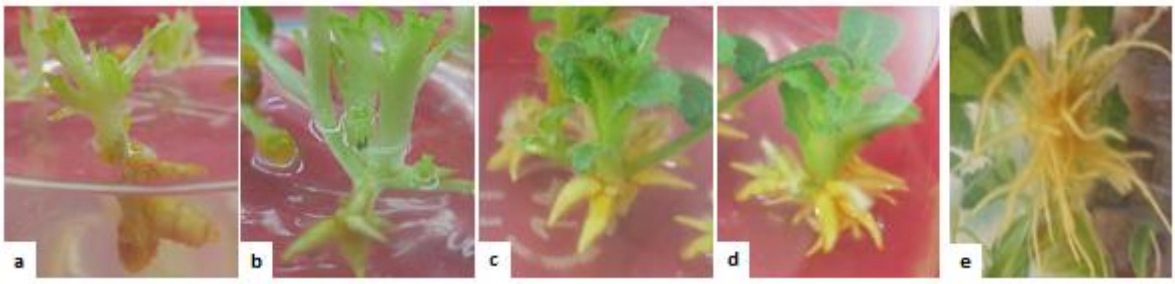
Để nâng cao chất lượng củ tạo thành, thí nghiệm nghiên cứu hàm lượng sucrose với các nồng độ đường 50 g/L, 70 g/L, 90 g/L, 120 g/L được thực hiện. Sau 8 tuần nuôi cấy, kết quả được thể hiện ở Bảng 5.

Hình 1. Rễ Địa hoàng *in vitro* trên các công thức auxin. Trên công thức đối chứng ĐC (a); Công thức AX1(b); Công thức AX2(c); Công thức AX3 (d); Công thức AX4(e)

Hình 2. Ảnh hưởng của nồng độ PP_{333} tới khả năng hình thành củ nhỏ. Trên công thức đối chứng ĐC (a); Công thức PP1 (b); Công thức PP2 (c); Công thức PP3 (d); Công thức PP4 (e).



Hình 3. Ảnh hưởng của nồng độ BAP tới khả năng hình thành củ nhỏ. Trên công thức đối chứng ĐC (a); Công thức BA1 (b); Công thức BA2 (c); Công thức BA3 (d) Công thức BA4 (e).



Hình 4. Ảnh hưởng của tổ hợp BAP và PP33 đến khả năng tạo củ nhỏ. Trên công thức đối chứng ĐC (a); Công thức BP1 (b); Công thức BP2 (b); Công thức BP3 (c); Công thức BP4 (d); Công thức BP5 (e).

Bảng 4. Ảnh hưởng của tổ hợp BAP và PP_{333} đến khả năng tạo củ nhỏ.

STT	BAP (mg/L)	PP_{333} (mg/L)	Tỷ lệ tạo củ (%)	Chiều dài rễ/củ (cm)	Số củ/cây (củ)	Trạng thái rễ/củ
ĐC	1	0	23,33	0,72 ± 0,17^{c}	2,52 ± 0,28^{c}	Dạng củ, nhỏ
BP1	1	0,1	33,33	1,02 ± 0,02^{b}	2,39 ± 0,14^{c}	Dạng củ, nhỏ
BP2	1	0,3	83,33	1,21 ± 0,14^{b}	5,58 ± 0,33^{b}	Dạng củ, mập
BP3	1	0,5	46,67	1,27 ± 0,19^{b}	7,52 ± 0,25^{a}	Dạng củ, mập
BP4	1	1	-	2,22 ± 0,19^{a}	-	Dạng rễ chùm, sợi rễ mập

Ghi chú: *Các chữ cái khác nhau trong cùng một cột thể hiện sự khác nhau có ý nghĩa (α = 0,05)*

Bảng 5. Ảnh hưởng của hàm lượng sucrose đến tạo củ Địa hoàng *in vitro.*

STT	Hàm lượng sucrose (g/L)	Tỷ lệ tạo củ (%)	Chiều dài rễ/củ (cm)	Số củ/cây (củ)	Đường kính củ (mm)	Khối lượng củ/cây (g)	Trạng thái rễ/củ
SR1	50	83,33	1,29 ± 0,09^{a}	5,52 ± 0,26^{a}	3,18 ± 0,21^{b}	0,172 ± 0,01^{b}	Củ TB
SR2	70	93,33	1,25 ± 0,06^{a}	4,94 ± 0,17^{b}	3,78 ± 0,18^{a}	0,225 ± 0,01^{a}	Củ mập, chắc
SR3	90	66,67	0,87 ± 0,18^{b}	4,02 ± 0,11^{c}	2,89 ± 0,13^{c}	0,139 ± 0,02^{c}	Củ nhỏ, không đồng đều
SR4	120	26,67	0,54 ± 0,05^{c}	2,76 ± 0,10^{d}	2,14 ± 0,02^{d}	0,079 ± 0,00^{d}	Củ nhỏ, nhiều rễ

Ghi chú: *Các chữ cái khác nhau trong cùng một cột thể hiện sự khác nhau có ý nghĩa (α = 0,05).*

Kết quả Bảng 5 cho thấy hàm lượng sucrose trong môi trường nuôi cấy không những có tác động đến tỷ lệ tạo củ Địa hoàng *in vitro* mà nó còn tác động mạnh đến chỉ số số củ/cây và chất lượng củ tạo thành. Số củ trên cây tỷ lệ nghịch với nồng độ đường sucrose trong môi trường nuôi cấy, hàm lượng đường sucrose trong môi trường càng cao thì số củ/cây càng giảm. Số củ/cây cao nhất là 5,52 củ thu được ở công thức SR1 chứa 50 g/L đường sucrose và giảm mạnh chỉ còn 2,76 củ ở công thức SR4 chứa 120 g/L sucrose. Tỷ lệ hình thành củ, đường kính củ và khối lượng củ ở công thức SR2 (70 g/L sucrose) tỏ ra vượt trội hơn so với các công thức khác trong thí nghiệm, với các chỉ số tương ứng 93,33%, 3,78 mm và 0,225 mg củ/cây. Tỷ lệ tạo củ ở các nồng độ đường sucrose cao hơn (90 g/L và 120 g/L) có xu hướng giảm. Ở 2 mức hàm lượng này, chiều dài củ có xu hướng dài ra và đường kính củ thì nhỏ lại (Hình 6c, 6d). Như vậy, hàm lượng sucrose tốt nhất để tạo củ *in vitro* Địa hoàng là 70 g/L. Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Xue (2012), trong đó tác giả đã nghiên cứu ảnh hưởng của nồng độ đường đến sự tạo thành rễ củ *in vitro* và đưa ra kết luận về nồng độ đường tối ưu là 7%.

Đánh giá hiệu qua tạo củ *in vitro* ngoài vườn ươm

Theo dõi khả năng sống sót của 2 loại sản phẩm từ quá trình tạo củ *in vitro* là cây con có bộ rễ củ và củ nhỏ tạo thành.

Đánh giá tỷ lệ sống của củ tạo thành trong *in vitro* trên giá thể cát: Tribat (3:1, v/v) cho thấy tỷ lệ nẩy mầm còn rất thấp và thời gian lâu (5 tuần sau ươm mới bật mầm) (Hình 6).

Hình 5. Ảnh hưởng của nồng độ đường đến khả năng hình thành củ nhỏ. Cây và củ trên công thức SR1 (a); Cây và củ trên công thức SR2 (b); Cây và củ trên công thức SR3 (c); Cây và củ trên công thức SR4 (d).

Hình 6. Củ Địa hoàng *in vitro* ngoài vườn ươm.

Hình 7. Cây Địa hoàng có bộ rễ dạng củ ngoài vườn ươm. A: Cây mới giâm; B, C: Sau 2 tháng giâm; D: Phát sinh củ sau 2 tháng trong vườn ươm.

Tuy vậy, theo đánh giá của chúng tôi, tỷ lệ sống ngoài vườn ươm của cây con có bộ rễ dạng củ tăng vượt trội so với cây con *in vitro* có bộ rễ thông thường. Cây đưa ra ngoài có bộ rễ dạng củ không cần chăm sóc tỉ mỉ, cầu kì mà vẫn có tỷ lệ sống đạt xấp xỉ 100%, cây sinh trưởng và phát triển tốt, bộ rễ củ phát triển thành củ sau 2 tháng ở vườn ươm (Hình 7).

THẢO LUẬN

Trong sự phát triển và tăng trưởng của thực vật, nitrogen có vai trò chung là nguyên liệu để tổng hợp nên các amino acid, nucleotide, hormone và coenzyme. Tuy nhiên, trong sự hình thành và phát triển củ, nitrogen lại có tác động như một chất ức chế quá trình tạo củ và tăng trưởng củ. Ở giai đoạn tạo củ, nếu nitrogen hiện diện ở hàm lượng cao sẽ làm tăng nồng độ GA nội sinh trong thực vật vì GA ức chế quá trình tạo củ (Xue, 2002). Hơn nữa, khi nitrogen hiện diện ở nồng độ cao sẽ tạo thành nhiều NH_3 trong lá, từ đó tổng hợp nên các amino acid là những hợp chất rất cần cho sự tăng trưởng của các cơ quan sinh dưỡng hơn là tạo củ (Hoàng Xuân Chiến, 2011). Nồng độ các chất khoáng trong môi trường MS cũng đóng vai trò quan trọng đến sinh trưởng của cây trong điều kiện *in vitro*, cũng như quá trình sinh tổng hợp và tích lũy các chất chuyển hóa do nó tác động đến sự thay đổi cường độ ion và áp suất thẩm thấu của môi trường. Vì vậy, môi trường giảm hàm lượng khoáng luôn tỏ ra thích hợp ở giai đoạn tạo rễ hoặc tạo củ đối với nhiều loại cây trồng. Từ các kết quả nghiên cứu trước đây, chúng tôi tiến hành tạo củ trên nền môi trường môi trường 1/4 MS (Vũ Hoài Sâm, 2018).

Sau giai đoạn cảm ứng củ, cơ quan tiền tạo củ thực vật bắt đầu phân chia và gia tăng kích thước tế bào đồng thời tích trữ chất dự trữ. Lúc này, thông thường auxin có vai trò rất quan trọng trong việc kích thích sự phân chia và tăng rộng của các tế bào vùng tượng tầng, tạo không gian tích trữ chất dự trữ. Đồng thời, auxin còn giúp cho tế bào tập trung chất dinh dưỡng, thu hút chất dinh dưỡng và gia tăng áp suất thẩm thấu trong tế bào.

Trong nghiên cứu này, tác động của auxin (NAA và IBA) ở các nồng độ thí nghiệm đã không theo quy luật trên, không có sự phát sinh hình thái dạng rễ củ đối với Địa hoàng. Nhiều kết quả nghiên cứu tạo củ *in vitro* trước đây cho thấy cytokinin có hoạt tính kích thích tạo củ mạnh hơn auxin và có vai trò quan trọng trong tạo củ ở các loài thực vật có củ (Hoàng Xuân Chiến, 2011). Điều này được giải thích là do cytokinin kích thích tổng hợp enzyme tổng hợp tinh bột (starch synthase) hay UDPG-udophosphoglyco, đồng thời ức chế hoạt tính của enzyme phân giải tinh bột.

PP_{333} (Paclobutrazole) là chất điều hòa sinh trưởng có tác dụng hạn chế tăng trưởng mầm lá, đẩy nhanh quá trình hình thành và phân hóa mầm hoa, là một chất đối kháng với gibberellin, vì vậy có tác dụng ức chế chiều cao của cây. Nhiều nghiên cứu đã chứng minh khi bổ sung paclobutrazol vào môi trường nuôi cấy, có thể có ảnh hưởng đến tác động của các phytohormone khác như ABA, ethylene, cytokinin và auxin. PP_{333} cũng đã được chứng minh là có tác dụng tạo củ *in vitro* ở nhiều loại cây trồng. Theo Simko, nồng độ PP_{333} từ 0,01 -1,0 mg/L là tối ưu để tạo củ khoai tây *in vitro* (Simko, 1994); PP_{333} cũng là nhân tố chính và quan trọng (chỉ sau đường sucrose) tác động đến sự tạo củ gừng trong điều kiện *in vitro* theo công bố của Xue và đồng tác giả (2007). Môi trường có bổ sung 0,1mg/L PP_{333} cũng được xác định là môi trường thích hợp để tạo củ Hoài sơn (Li, 2014). Đối với Địa hoàng, Tao Xue (2012) đã chứng minh vai trò quan trọng của PP_{333} trong việc cảm ứng củ *in vitro*, nồng độ thích hợp để bổ sung vào môi trường nuôi cấy là 1,0 mg/L.

Trong nghiên cứu này, nuôi cấy tạo củ trên môi trường có chứa BAP hay PP_{333} đơn chất có hiện tượng phát sinh hình thái dạng rễ củ, nhưng không rõ ràng hoặc tỷ lệ còn thấp. Nghiên cứu ảnh hưởng của tổ hợp BAP và PP_{333}, chúng tôi đã xác định được tổ hợp 1,0 mg/L BAP + 0,3 mg/L PP_{333} là thích hợp nhất để tạo củ *in vitro* cây Địa hoàng.

Trong chu trình tăng trưởng và phát triển của thực vật, quá trình quang hợp tạo các sản phẩm

đồng hóa. Một phần tham gia vào cấu trúc tăng trưởng thực vật, một phần được tích lũy trong các cơ quan dự trữ như trái, hột, thân hoặc củ (do tự tích lũy chất đồng hóa) (Nguyễn Du Sanh, 1998). Những cấu trúc củ đặc biệt này mang một hoặc hai chức năng sinh học. Trước hết, chúng là cơ quan dự trữ carbon và nitrogen, cung cấp dinh dưỡng cho cây khi cần thiết. Chức năng thứ hai, chúng đóng vai trò là cơ quan sinh sản. Với vai trò là cơ quan sinh sản, củ sẽ tích trữ đầy đủ lượng sinh dưỡng cần thiết cho nhu cầu sống độc lập của cây sau này.

Vai trò của đường đối với sự hình thành củ đã được nghiên cứu trên nhiều đối tượng cây trồng. Kết quả cho thấy, đường là nguồn carbon cần thiết trong môi trường nuôi cấy và đồng thời là nguồn nguyên liệu quan trọng trong việc tích lũy tinh bột dẫn đến sự tạo củ và sự phình to của củ *in vitro*. Đường sucrose được hấp thụ nhanh hơn và tập trung ở rễ nhiều hơn, thích hợp cho sự tạo củ hơn các loại đường khác. Sucrose có vai trò điều chỉnh lượng GA nội sinh trong cây thân củ (Xu, 1998). Hàm lượng đường cao có ảnh hưởng tích cực đến sự hình thành và sinh trưởng phát triển của củ (Staikidou, 2005). Hàm lượng thích hợp cho phản ứng tạo củ *in vitro* đối với nhiều loại cây trồng thường dao động từ 9 - 12%. Tuy nhiên, đối với Địa hoàng hàm lượng sucrose thích hợp để tạo củ *in vitro* trong nghiên cứu này được xác định là 70 g/L. Đây cũng là nồng độ đường tối ưu theo kết quả nghiên cứu của Xue và đồng tác giả (2012) đối với Địa hoàng.

Kết quả nghiên cứu đã thiết lập thành công quy trình tạo củ Địa hoàng *in vitro*. Cây có bộ rễ củ có tỷ lệ sống 100% khi đưa ra vườn ươm và cây sinh trưởng và phát triển tốt ngoài đồng ruộng.

KẾT LUẬN

Đã xác định được môi trường thích hợp để tạo củ *in vitro* cây Địa hoàng là 1/4MS + 1,0 mg/L BAP + 0,3 mg/L PP_{333}. Nồng độ đường sucrose tối ưu để tạo củ Địa hoàng *in vitro* là 70 g/L, cho hệ số tạo củ đạt 4,94 lần. Cây được tạo củ trong *in vitro* cho tỷ lệ sống đạt 100% khi đưa ra vườn ươm và sinh trưởng, phát triển tốt.

Lời cảm ơn: *Công trình được hoàn thành với sự hỗ trợ kinh phí của đề tài cơ sở Viện Dược liệu: "Tuyển chọn và nhân nhanh giống Địa hoàng cho năng suất và hàm lượng catalpol cao". Nhóm thực hiện xin trân trọng cảm ơn Ban Giám đốc và Hội đồng Khoa học Viện Dược liệu đã phê duyệt nội dung, cấp kinh phí thực hiện.*

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Hoàng Xuân Chiến, Ngô Thanh Tài, Nguyễn Bá Trực, Trần Xuân Tỉnh, Lâm Bích Thảo, Trần Công Luận, Dương Tấn Nhựt (2011) Nghiên cứu một số yếu tố tạo củ Sâm ngọc linh (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.) *in vitro* và xác định hàm lượng saponin trong cây tạo từ củ trồng thử nghiệm ở núi Ngọc Linh. *Tạp chí Công nghệ Sinh học* 9(3): 317-331.

Phạm Văn Hiển (1994) Nghiên cứu một số biện pháp nâng cao chất lượng và số lượng giống cây Địa hoàng (*Rehmannia glutinosa* Libosch.) ở dồng bằng và trung du Bắc bộ. Luận án Phó tiến sĩ, Trường Đại học Nông nghiệp I.

Viện Dược liệu (2004) Cây thuốc và động vật làm thuốc ở Việt Nam. *Nhà xuất bản Khoa học và kỹ thuật*. Tập 1: 774-781.

Vũ Hoài Sâm, Nguyễn Thị Xuyên, Dương Thị Ngọc Anh, Hoàng Thị Như Nụ, Nguyễn Thị Hương, Lê Xuân Thảo, Ngô Thị Mai Anh, Phan Thúy Hiền (2018) Nghiên cứu nhân giống *in vitro* cây Địa hoàng (*Rehmannia glutinosa* (Gaertn.) Libosch.). *Tạp chí Dược liệu* 23(6): 374-380.

Ewelina P, Łukasz K, Przemysław S, Halina W (2015) Shoot organogenesis, molecular analysis and secondary metabolite production of micropropagated *Rehmannia glutinosa* Libosch. *Plant Cell Tis Org Cult* 120(2): 539-549.

Li M., Li J, Liu W, Liu L, Lu J, Niu J, Liu X, Yang Q (2014) A protocol for *in vitro* production of microtubers in Chinese yam (*Dioscorea opposita*). *Biosci Biotechnol Biochem* 78(6): 1005-1009.

Park SU, Kim YK, Lee SY (2009) Improved *in vitro* plant regeneration and micro propagation of *Rehmannia glutinosa* L. *J Med Plant Res* 3(1): 031-034.

Xue JP, Huang YQ, Zhang AM (2007) Study on technique of inducing microrhizome in *Zingiber officinale*. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi* 32(16): 1621-4.

Xue JP, Xue T, Guo L, hu YF, Lu HD, Zhang AM,

Sheng W (2012) Study on optimization of induction system of test-tube tuberous roots from leaves of *Rehmannia glutinosa*. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi* 37(24): 3812-4.

Xue JP, Shi LY, Zhang AM (2002) Microtuber induction *in vitro* from *Rehmannia glutinosa*. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi* 27(11):824-7

Zhang RX, Li MX, Jia ZP (2008) *Rehmannia glutinosa*: review of botany, chemistry and pharmacology. *J Ethnopharmacol* 117:199–214

STUDY ON TUBERIZATION OF *REHMANNIA GLUTINOSA* (GAERTN.) LIBOSCH.

Vu Hoai Sam[1], Nguyen Thi Xuyen[1], Nguyen Thi Huong[1], Nguyen Minh Tuyen[1], Nguyen Duy Phuong[2], Phan Thuy Hien[1]

[1]*National Institute of Medicinal Materials, Ministry of Health*
[2]*Agricultural Genetics Institute, Vietnam Academy of Agricultural Sciences*

SUMMARY

Rehmannia glutinosa (Gaertn.) Libosch. is an herbal plant, which belongs to the Srcophulariaceae family, containing the main active ingredients such as catalpol and verbacoside in its root tubers. In traditional medicine, *R. glutinosa* tubers have been used in the fresh or dried tuber root or the prepared rehamannia root. They not only possess the comprehensive pharmacological actions in the blood system, endocrine system but also used mainly for anti-tumor treament, immune-enhancement, anti-diabetes, treament for concretion in the urinary tract, etc. *R. glutinosa* is naturally distributed in China, Korea and Japan. This species was introduced into Viet Nam since 1958 and then planted widely in many the Northern plain and midland provinces. In Vietnam, *R. glutinosa* produces flowers without seeds, therefore the plant has been mainly propagated by slicing tubers. In this work, we investigated the effect of some plant hormones and sucrose contents on the ability to producing microtubers of *R. glutinosa*. Experiments were establishmented on the 1/4 MS medium supplemented with 50g/L sucrose. Results showed that auxin (IBA, NAA) had no effect on the *in vitro* tuber formation of *R. glutinosa*. The efficiency of using the single BAP or PP_{333} was low. The highest *in vitro* tuberization rate of *R. glutinosa* obtained on the medium supplemented with the combination of BAP (1.0 mg/L) and PP_{333} (0.3 mg/L), reached 83.33% and the number of tubers/plant was 5.58. The optimal sucrose concentration for increasing the diameter and weight of microtubers was 70 g/L. 100% of plants with tuber-roots survived in the nursery and thrived on the field.

Keywords: *Rehmannia glutinosa*, auxin, *in vitro*, microtuber, PP_{333}, tuberization.