

NGHIÊN CỨU MÔI TRƯỜNG NUÔI CÂY *IN VITRO* TỪ ĐOẠN THÂN CÂY SACHA INCHI (*Plukenetia volubilis* L.)

Lê Thị Thủy*, Nguyễn Thị Nhung
Trường Đại học Sư phạm Hà Nội

TÓM TẮT

Từ nguyên liệu ban đầu là hạt, nghiên cứu đã xác định được môi trường nuôi cây *in vitro* phù hợp cho việc tái sinh cây sacha inchi (*Plukenetia volubilis* L.) từ đoạn thân. Hạt sacha inchi được khử trùng bằng NaOCl 5% trong 30 phút cho tỉ lệ mẫu sạch nảy mầm cao nhất đạt 78,29%. Hạt có tốc độ nảy mầm nhanh khi gieo trên môi trường MS bổ sung 20 g/l sucrose + 7 g/l agar với chiều cao cây trung bình đạt 14,52 cm. Sử dụng đoạn thân giữa lá thật 1 và lá thật 2 của cây con *in vitro* nảy mầm từ hạt cho khả năng tái sinh cao nhất với tỉ lệ mẫu tạo chồi là 72,22%. Đoạn thân sau 4 tuần nuôi cấy trên môi trường MS bổ sung 0,1 mg/l BAP và 0,1 mg/l IBA đã tái sinh tạo trung bình 4,67 chồi/mẫu. Các chồi có chất lượng tốt đạt chiều cao 1,75 cm, số lá trung bình là 2,50. Chồi sau đó được chuyển sang môi trường ra rễ có bổ sung IBA 0,5 mg/l, tỉ lệ chồi ra rễ đạt 90%, số lượng rễ trung bình đạt 5,85 rễ/chồi.

Từ khóa: sinh lý thực vật; đoạn thân; *in vitro*; *Plukenetia volubilis* L.; tái sinh

Ngày nhận bài: 03/9/2019; **Ngày hoàn thiện:** 26/9/2019; **Ngày đăng:** 04/10/2019

STUDY ON THE SUITABLE MEDIUMS FOR *IN VITRO* CULTURE THE STEM SEGMENT OF SACHA INCHI (*Plukenetia volubilis* L.) PLANT

Le Thi Thuy*, Nguyen Thi Nhung
Hanoi National University of Education

ABSTRACT

From the initial material is seeds, the study identified a suitable *in vitro* medium for regenerating sacha inchi (*Plukenetia volubilis* L.) from the stem segment. The seeds of sacha inchi sterilized with 5% NaOCl for 30 minutes give the highest rate of clean germination samples reaching 78.29%. Seeds have the fastest germination rate when sown on MS medium supplemented with 20 g/l sucrose + 7 g/l agar with average tree height of 14.52 cm. Using stem segments between true leaves 1 and real leaves 2 of seedlings *in vitro* collected from seeds for maximum reproductive regeneration capacity of 72.22%. The stem segment after 4 weeks of growing on MS medium supplemented with 0.1 mg/l BAP and 0.1 mg/l IBA was regenerated 4.67 shoots/sample. These average height of the shoots reached 1.75cm, the number of leaves was 2.50 leaves/shoot. The shoots were then transferred to the rooting medium supplemented with an IBA of 0.5 mg / l, the rooting rate reached 90%, the average number of roots reached 5.85 roots/shoot.

Keywords: plant physiology; stem segment; *in vitro*; *Plukenetia volubilis* L.; regeneration

Received: 03/9/2019; **Revised:** 26/9/2019; **Published:** 04/10/2019

* Corresponding author. Email: hienthuy20@gmail.com

1. Giới thiệu

Sacha inchi (*Plukenetia volubilis* L.) là cây leo bán thân gỗ có nguồn gốc từ các nước Trung và Nam Mỹ, được đưa về trồng ở Việt Nam từ năm 2012. Cây cho thu quả lứa đầu sau 7-8 tháng trồng và chưa xuất hiện bệnh hại, cho đến nay, sacha inchi được đánh giá là cây trồng có thể sinh trưởng và phát triển tốt trong điều kiện khí hậu của nước ta. Ngoài protein (chiếm 27%), hạt sacha inchi được đặc trưng bởi hàm lượng cao omega 3 (45-53% tổng hàm lượng chất béo) và omega 6 (34-39% tổng hàm lượng chất béo), được ghi nhận là có tác dụng tốt với sức khỏe con người, đặc biệt trong việc ngăn ngừa các bệnh như viêm khớp, bệnh mạch vành, tiểu đường, tăng huyết áp, tăng động giảm chú ý và các bệnh viêm da [1, 2]. Khác với nhiều loại thực vật cung cấp dầu, hạt sacha inchi có hàm lượng chất chống oxy hóa tự nhiên rất cao, hàm lượng các axit béo bão hòa thấp (5,4%), bên cạnh đó là sự cân bằng về tỉ lệ của omega 3, omega 6 và omega 9 khiến sacha inchi được đánh giá là loại dầu thực vật lành mạnh nhất đối với sức khỏe con người [3, 4, 5].

Tạo cây giống từ hạt được xem là phương pháp nhân giống chính đối với cây sacha inchi, tiếp đến là phương thức giâm cành với việc sử dụng thêm chất kích thích ra rễ IBA 0,2% [6]. Tuy nhiên, với hàm lượng dầu cao, hạt sacha inchi thường nhanh chóng mất khả năng nảy mầm sau thời gian bảo quản. Do vậy, việc ứng dụng phương pháp nhân giống *in vitro* được xem là một giải pháp hỗ trợ và thay thế phù hợp cho phương pháp nhân giống truyền thống. Kỹ thuật này cho phép lựa chọn nguồn vật liệu di truyền, xử lý khối lượng lớn cây con trong không gian nhỏ và tạo ra nguồn cây giống sạch bệnh. Các nghiên cứu đã chỉ ra rằng đỉnh sinh trưởng, mô phân sinh đỉnh thu được từ hạt nảy mầm trong ống nghiệm hay các lá mầm sacha inchi có thể phát sinh chồi trực tiếp trên môi trường Murashige & Skoog (MS) có bổ sung BAP và IBA [7, 8, 9]. Theo nghiên cứu của Viegas và

cộng sự (2014) [10], thực nghiệm đồng ruộng cho thấy, không tìm thấy biến đổi di truyền nào ở cây *in vitro*, cây giống sinh trưởng tốt, cho năng suất cao và ổn định so với cây giống được trồng từ hạt.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu

Trong nghiên cứu này, hạt sacha inchi (*Plukenetia volubilis* L.) thu từ cây 1,5 năm tuổi trồng tại Vườn thực nghiệm Khoa Sinh học, Trường đại học Sư phạm Hà Nội được sử dụng làm vật liệu tạo cây con phục vụ nhân giống *in vitro* sacha inchi.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Nghiên cứu được thực hiện tại Bộ môn Sinh lý học thực vật và Ứng dụng, Bộ môn Di truyền-Hóa sinh, Khoa Sinh học, Trường đại học Sư phạm Hà Nội từ tháng 6 năm 2018 đến tháng 3 năm 2019.

2.2.1. Phương pháp khử trùng hạt

Hạt sacha inchi được rửa bằng xà phòng pha loãng, lắc đều 2-3 phút, sau đó vô trùng sơ bộ bằng cồn 70%. Tiếp theo, hạt được khử trùng bằng dung dịch NaOCl (javel) ở các nồng độ khác nhau (0,5%; 1,5%; 2,5%; 5% và 7,5%) trong 30 phút. Sau thời gian khử trùng, javel trên hạt được loại bỏ bằng nước vô trùng (5 lần). Hạt sau đó được ngâm trong nước cất vô trùng trong 3 giờ. Sau khi khử trùng hạt được tách vỏ và đưa vào môi trường nuôi cấy.

2.2.2. Phương pháp tạo vật liệu nhân giống *in vitro*

Sau khử trùng, tách bỏ lớp vỏ hạt và gieo trên môi trường MS có bổ sung được sucrose và agar với hàm lượng khác nhau. Hạt sau nảy mầm, cây con được sử dụng là vật liệu cho nghiên cứu tạo đa chồi từ đoạn thân.

2.2.3. Phương pháp tạo đa chồi từ đoạn thân

Đoạn thân (kích thước 1-1,5 cm) ở các vị trí khác nhau trên cây con được nuôi cấy và đánh giá chất lượng thông qua tỉ lệ mẫu tạo chồi. Đoạn thân phù hợp được cắt và nuôi trên môi trường tạo đa chồi (MS có bổ sung BAP và IBA với nồng độ khác nhau).

2.2.4. *Phương pháp tạo cây con hoàn chỉnh*
Sau 4-6 tuần nuôi cấy, các chồi tạo từ đoạn thân đạt chiều cao quy định được chuyển sang môi trường ra rễ có bổ sung IBA (0; 0,5 và 1 mg/l). Mức độ phù hợp của môi trường được đánh giá thông qua thời gian chồi ra rễ, số lượng chồi tạo rễ, số rễ/chồi, chiều dài rễ và chiều cao cây con.

Tất cả môi trường nuôi cấy được sử dụng là MS cơ bản, có bổ sung sucrose, agar, chất điều hòa sinh trưởng (BAP, IBA) với các nồng độ khác nhau tùy từng giai đoạn nuôi cấy. Môi trường nuôi cấy được điều chỉnh pH=5,8, khử trùng ở 121^oC, áp suất 1atm trong 20 phút. Điều kiện nuôi cấy: thời gian chiếu sáng là 16h/ngày; nhiệt độ 25± 2^oC.

2.2.5. *Phương pháp xử lý số liệu*

Số liệu được xử lý theo phương pháp thống kê sinh học trên phần mềm SPSS phiên bản 16.0. Sự sai khác giữa các giá trị trung bình được phân tích bằng One way – ANOVA theo kiểm định Turkey's – b ở mức ý nghĩa $\alpha = 0,05$. Trong các bảng số liệu, các chữ cái a, b, a, d, e khác nhau trong cùng một cột thể hiện sự sai khác có ý nghĩa thống kê với $\alpha = 0,05$.

3. Kết quả và bàn luận

3.1. *Ảnh hưởng của nồng độ javel đến khả năng tạo mẫu sạch từ hạt sacha inchi*

Trong nghiên cứu này, javel với 4 nồng độ khác đã được sử dụng để khử trùng hạt sacha inchi nguyên vỏ trong thời gian khử trùng là 30 phút. Kết quả thí nghiệm sau 6 tuần theo dõi được trình bày ở bảng 1.

Kết quả cho thấy, tỉ lệ mẫu nhiễm giảm dần khi tăng nồng độ javel từ 0,5% đến 7,5%. Cụ thể, ở nồng độ javel 0,5% (KT1) tỉ lệ mẫu

nhiễm lên tới 83,33%, tỉ lệ này giảm lần lượt là 6,94% và 29,16% khi tăng nồng độ javel lên 1,5% và 2,5%. Tỉ lệ hạt nhiễm là thấp nhất (9,22%) khi sử dụng javel 7,5% để khử trùng. Cùng với sự giảm tỉ lệ mẫu nhiễm, tỉ lệ mẫu sạch cũng tăng lên. Các hạt sacha inchi sạch (không nhiễm) sau khử trùng có thể nảy mầm hoặc không sau 6 tuần theo dõi. Kết quả ở Bảng 1 cho thấy, khi tăng nồng độ javel từ 0,5% lên 5%, tỉ lệ mẫu sạch bất mầm tăng dần và cao nhất ở công thức KT4 đạt 78,29% và thấp nhất là ở công thức KT1 là 11,11%. Khi tiếp tục tăng nồng độ javel lên 7,5% tỉ lệ mẫu sạch bất mầm lại giảm, đồng thời tỉ lệ mẫu không nảy mầm tăng lên. Cụ thể, tỉ lệ mẫu sạch không nảy mầm đạt giá trị cao nhất (41,67%) ở công thức KT5, tăng gấp gần 10 lần so với công thức KT4. Như vậy có thể thấy, với đặc tính oxi hóa mạnh, việc tăng nồng độ javel khi khử trùng đã làm tăng khả năng diệt nấm, vi khuẩn trên bề mặt hạt sacha inchi nhưng đồng thời cũng đã ảnh hưởng đến khả năng nảy mầm của hạt giống. Với kết quả này, javel nồng độ 5% được sử dụng để khử trùng hạt sacha inchi.

3.2. *Ảnh hưởng của hàm lượng sucrose và agar đến việc tạo cây con nguyên liệu từ hạt sacha inchi*

Đường sucrose được xem là nguồn cung cấp cacbon tốt nhất cho hoạt động nuôi cấy mô, tế bào thực vật. Trong khi agar đóng vai trò như giá thể, giúp cô đặc chất dinh dưỡng, có tác động trực tiếp đến đặc tính của môi trường nuôi cấy. Sự ảnh hưởng của hàm lượng sucrose và agar có trong môi trường nuôi cấy tới sự nảy mầm của hạt sacha inchi được thể hiện trong bảng 2.

Bảng 1. Ảnh hưởng của nồng độ javel đến tỉ lệ tạo mẫu sạch của hạt sacha inchi

Công thức	Nồng độ javel (%)	Tỉ lệ mẫu nhiễm (%)	Tỉ lệ mẫu sạch nảy mầm (%)	Tỉ lệ mẫu sạch không nảy mầm (%)
KT1	0,5	83,33 ^c ± 2,04	11,11 ^a ± 1,05	5,56 ^a ± 0,82
KT2	1,5	76,39 ^d ± 3,19	18,06 ^a ± 1,16	5,56 ^a ± 1,02
KT3	2,5	54,17 ^c ± 2,32	40,25 ^b ± 2,02	5,58 ^a ± 0,91
KT4	5,0	17,56 ^b ± 2,09	78,29 ^c ± 2,85	4,15 ^a ± 0,73
KT5	7,5	9,22 ^a ± 3,42	49,11 ^b ± 2,27	41,67 ^b ± 1,54

Bảng 2. Ảnh hưởng của hàm lượng sucrose và agar đến việc tạo cây con in vitro của hạt sacha inchi

Công thức	Sucrose (g/l)	Agar (g/l)	Thời gian TB xuất hiện rễ mầm (ngày)	Thời gian TB xuất hiện lá mầm (ngày)	Chiều cao TB cây con (cm)
CT1	10	4	2,61 ^{ab} ± 0,45	15,90 ^b ± 0,72	8,92 ^b ± 0,25
CT2	20	4	2,15 ^a ± 0,26	11,00 ^a ± 0,63	13,32 ^c ± 0,69
CT3	30	4	3,07 ^b ± 0,21	32,03 ^d ± 1,34	6,69 ^a ± 0,86
CT4	10	7	2,45 ^{ab} ± 0,50	15,93 ^b ± 0,60	8,89 ^b ± 0,40
CT5	20	7	2,11 ^a ± 0,26	11,23 ^a ± 0,80	14,52 ^c ± 1,14
CT6	30	7	3,01 ^b ± 0,19	26,33 ^c ± 0,93	9,86 ^a ± 1,18

Bảng 3. Ảnh hưởng của vị trí đoạn thân tới tỉ lệ mẫu bật chồi

Kí hiệu	Vị trí đoạn thân	Tỉ lệ mẫu bật chồi (%)
ĐT1	Đoạn thân già cách gốc 5cm	1,31 ^a ± 0,20
ĐT2	Đoạn thân dưới lá mầm	3,05 ^a ± 0,30
ĐT3	Đoạn thân giữa lá mầm và lá thật 1	51,67 ^b ± 3,05
ĐT4	Đoạn thân giữa lá thật 1 và lá thật 2	72,22 ^c ± 3,68

Từ kết quả của bảng 2 nhận thấy hàm lượng sucrose và hàm lượng agar ảnh hưởng đến thời gian trung bình xuất hiện rễ mầm, thời gian trung bình xuất hiện lá mầm và chiều cao trung bình cây con.

Hạt nảy mầm nhanh nhất, tương ứng với thời gian xuất hiện rễ mầm (2,11-2,15 ngày) và lá mầm (11-11,23 ngày) sớm nhất khi được gieo trong môi trường chứa 20g/l sucrose. Thời gian này kéo dài ra khi hàm lượng đường giảm xuống 10g/l hay tăng lên 30g/l. Cụ thể, thời gian xuất hiện lá mầm tăng thêm hơn 4 ngày trong môi trường chứa 10g/l sucrose và tăng lên 15-21 ngày khi môi trường chứa 30g/l sucrose.

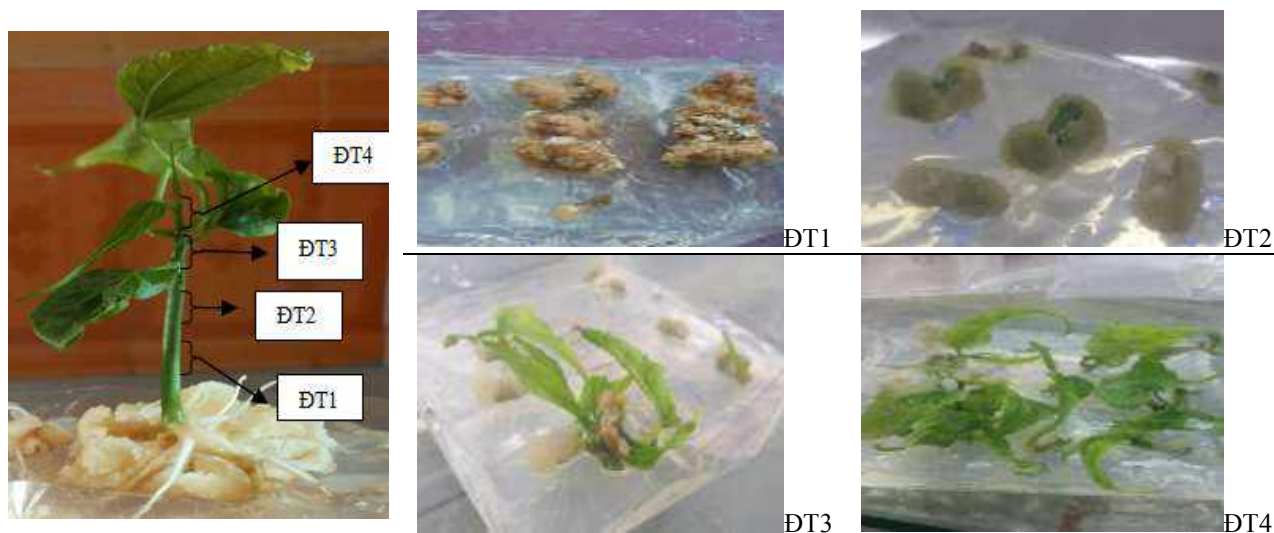
Kết quả nghiên cứu cũng chỉ ra rằng hàm lượng sucrose còn ảnh hưởng đến chiều cao trung bình của cây con sau 6 tuần theo dõi. Cụ thể, với hàm lượng đường là 10g/l ở công thức CT1 và CT4 thì chiều cao cây con dao động từ 8,89 cm đến 8,92 cm. Khi lượng đường tăng lên 20g/l thì chiều cao trung bình cây tăng lên từ 4,43 cm đến 5,6 cm. Tiếp tục tăng lượng đường lên 30g/l thì chiều cao trung bình cây con lại giảm xuống như ở công thức CT3 và CT6, với giá trị đo được dao động từ 6,69 cm đến 9,86 cm. Như vậy có thể thấy, việc tăng hàm lượng sucrose khiến thời gian trung bình xuất hiện rễ mầm và lá mầm

dài ra, đồng thời chiều cao cây con giảm xuống. Kết quả này có thể do việc tăng hàm lượng sucrose đã dẫn tới tăng khả năng giữ nước của môi trường, gây khó khăn cho việc hấp thụ nước của hạt và cây con trong quá trình nảy mầm.

Về ảnh hưởng của hàm lượng agar kết quả trong bảng 2 cho thấy, với cùng hàm lượng đường nhưng khác nhau về hàm lượng agar như các cặp công thức CT1 – CT3, CT2 – CT5, CT3 – CT6 thì không nhận thấy sự sai khác rõ ràng về mặt thống kê của các chỉ tiêu. Song việc bổ sung hàm lượng agar 7g/l vào môi trường nuôi cấy có xu hướng tạo ra cây con có chiều cao tốt hơn. Kết quả này có thể liên quan đến sự phát triển của hệ rễ cây con trong môi trường có hàm lượng agar khác nhau. Từ kết quả nghiên cứu thu được, chúng tôi lựa chọn công thức CT5 (MS chứa 20 g/l sucrose và 7 g/l agar) là môi trường để gieo hạt.

3.3. Ảnh hưởng của các vị trí đoạn thân tới tỉ lệ mẫu tái sinh tạo chồi

Tuổi của mô khác nhau ảnh hưởng đến khả năng tái sinh tạo chồi, thông thường, các mô còn non có khả năng tái sinh và phân chia tế bào cao hơn so với các mô già. Kết quả nghiên cứu về ảnh hưởng của vị trí đoạn thân sacha inchi đến khả năng tạo đã chồi được thể hiện trong bảng 3.



Hình 1. Đoạn thân ở các vị trí khác nhau tái sinh trên môi trường tạo chồi

Bảng 4. Ảnh hưởng của tỉ lệ IBA/BAP đến hiệu quả tạo chồi và chất lượng chồi từ đoạn thân của cây con *in vitro* sacha inchi

Công thức	Nồng độ BAP (mg/l)	Nồng độ IBA (mg/l)	Chỉ tiêu theo dõi			
			Tỉ lệ mẫu nảy chồi (%)	Số chồi TB trên 1 đoạn thân	Chiều cao chồi TB (cm)	Số lá TB/chồi
T1	0,1	0	63,33 ^{cd} ± 1,54	3,33 ^c ± 0,23	1,72 ^d ± 0,25	2,80 ^c ± 0,15
T2	0,1	0,1	76,67 ^d ± 1,85	4,67 ^d ± 0,61	1,75 ^d ± 0,26	2,50 ^c ± 0,17
T3	0,1	0,3	64,03 ^{cd} ± 1,12	3,29 ^c ± 0,31	1,69 ^d ± 0,36	2,59 ^c ± 0,24
T4	0,3	0	46,67 ^b ± 1,06	1,93 ^b ± 0,33	1,15 ^a ± 0,21	1,50 ^{ab} ± 0,17
T5	0,3	0,1	50,00 ^c ± 1,10	2,53 ^{bc} ± 0,21	1,35 ^b ± 0,04	1,49 ^{ab} ± 0,12
T6	0,3	0,3	47,05 ^b ± 1,18	2,05 ^b ± 0,40	1,16 ^a ± 0,04	1,50 ^{ab} ± 0,17
T7	0,5	0	23,33 ^a ± 2,01	1,20 ^a ± 0,30	1,13 ^a ± 0,07	1,81 ^b ± 0,17
T8	0,5	0,1	24,57 ^a ± 1,96	1,26 ^a ± 0,23	1,20 ^a ± 0,09	1,48 ^{ab} ± 0,16
T9	0,5	0,3	24,02 ^a ± 1,85	1,19 ^a ± 0,28	1,14 ^a ± 0,09	1,49 ^{ab} ± 0,10

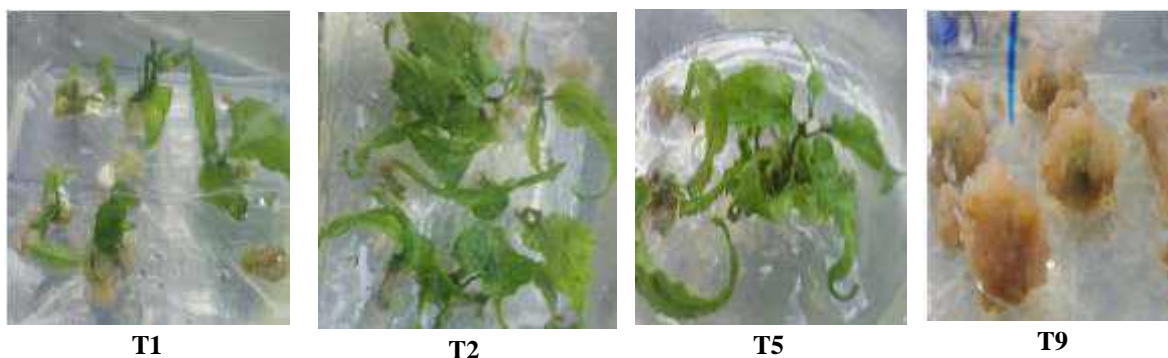
Kết quả nghiên cứu cho thấy, độ già của các đoạn thân tỉ lệ nghịch với số mẫu bật chồi. Trong cùng điều kiện và môi trường nuôi cấy, đoạn thân già cách gốc 5 cm và đoạn thân dưới lá mầm cho kết quả tỉ lệ mẫu bật chồi thấp, dao động từ 1,31% đến 3,05%. Trong khi, đoạn thân giữa lá mầm và lá thật 1 cho tỉ lệ mẫu bật chồi là 51,67%, cao hơn 48,62% so với đoạn thân ngay dưới lá mầm. Tỉ lệ mẫu bật chồi tiếp tục tăng, đạt giá trị cao nhất (72,22%) khi sử dụng đoạn thân giữa lá thật 1 và lá thật 2, cao gấp 55 lần so với đoạn ĐT1, cao gấp 23 lần so với đoạn ĐT2 và cao gấp 1,4 lần so với đoạn ĐT3.

Kết quả trên có thể giải thích như sau: Với vị trí đoạn ĐT1 và ĐT2 là những đoạn thân mà có chứa các mô già, mạch dẫn bắt đầu hóa gỗ, do đó khả năng phân hóa để tái sinh và phân chia kém nên cho tỉ lệ bật chồi thấp. Trong khi, đoạn thân giữa lá mầm và lá thật 1

và đoạn thân giữa lá thật 1 và lá thật 2 được hình thành sau, chứa các mô mềm và phần mô sinh cho nên nó dễ dàng phân chia và tái sinh, tạo chồi mới, đặc biệt là tại đoạn thân ĐT4 (Hình 1). Với kết quả này, đoạn thân giữa lá thật 1 và lá thật 2 được sử dụng làm vật liệu cho các bước tái sinh chồi *in vitro* sacha inchi tiếp theo.

3.4. Ảnh hưởng của tỉ lệ IBA/BAP đến hiệu quả tạo chồi và chất lượng chồi từ đoạn thân cây con sacha inchi

Auxin và cytokinin là nhóm hormone kích thích sự sinh trưởng của thực vật, chúng được sử dụng rộng rãi trong nuôi cấy mô tế bào nhằm thúc đẩy sinh trưởng của mẫu do hoạt hóa sự phân chia và giãn của tế bào. Trong nhân giống *in vitro* tỉ lệ auxin/cytokinin có ảnh hưởng lớn đến sự phân hóa, hình thành chồi từ mô nuôi cấy.



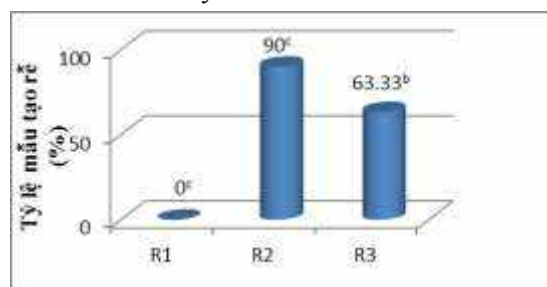
Hình 2. Hình ảnh các mẫu cấy sau 3 tuần nuôi trên môi trường tái sinh tạo đa chồi

Kết quả thu được trình bày trong bảng 4, hình 2 cho thấy, hàm lượng BAP ở nồng độ thấp có ảnh hưởng tích cực đến sự hình thành chồi của đoạn thân sachá inchi. Cụ thể, trong môi trường có bổ sung BAP với nồng độ 0,1 mg/l (T1, T2 và T3) tỉ lệ mẫu tạo chồi thu được dao động từ 63,33% đến 76,67%. Tuy nhiên, khi nồng độ BAP tăng lên, khả năng tạo chồi và chất lượng chồi tạo được lại giảm xuống, nói cách khác, BAP ở nồng độ cao đã ức chế sự hình thành chồi của đoạn thân sachá inchi. Ở nồng độ 0,5 mg/l BAP, đoạn thân có xu hướng bị mô sẹo hóa, mẫu hóa nâu và mất khả năng tái sinh. Kết quả là, mẫu tạo chồi chỉ đạt từ 23,33%-24,57%. Mặt khác, các đoạn thân tái sinh cũng cho số lượng chồi thấp (1,19-1,26 chồi/mẫu), chiều cao và số lá trung bình trên mẫu nhỏ. Kết quả này tương tự với kết quả đã được công bố trong nghiên cứu của Reynaldo và cộng sự (2018) [9] khi tiến hành nhân giống *in vitro* cây sachá inchi từ mô phân sinh đỉnh.

Nghiên cứu cũng cho thấy, việc bổ sung thêm IBA vào môi trường nuôi cấy có tác dụng hỗ trợ tích cực cho khả năng tái sinh của các đoạn thân. Song, với 3 nồng độ IBA nghiên cứu là 0; 0,1 và 0,3 mg/l thì nồng độ 0,1 mg/l cho kết quả tích cực nhất về các chỉ tiêu theo dõi. Cụ thể, trong môi trường có 0,1 mg/l IBA, số lượng mẫu tạo chồi và số chồi trung bình trên mẫu có xu hướng tăng lên so với môi trường chỉ có BAP và không có IBA, mặc dù chiều cao chồi và số lá/chồi không có sự khác biệt nhiều giữa các công thức môi

trường có bổ sung IBA trên cùng nền nồng độ BAP. Ví dụ như khi so sánh các chỉ tiêu nghiên cứu thu được ở công thức T1 với T2 hay công thức T4 với T5.

Nhận thấy, công thức môi trường T2 với 0,1 mg/IBAP và 0,1 mg/l IBA là công thức phù hợp nhất cho giai đoạn tái sinh tạo đa chồi từ đoạn thân sachá inchi. Cụ thể, trong môi trường T2, tỉ lệ mẫu tạo chồi là 76,67% cao gấp 3,12 lần môi trường T8 (có bổ sung 0,5 mg/l BAP và 0,1 mg/l IBA); số lượng chồi/mẫu là cao nhất, đạt 4,67 chồi; chiều cao chồi và số lá trên chồi tương đương với công thức môi trường T1 và T2 với giá trị thu được lần lượt là 1,75 cm và 2,50 lá/chồi. Trong một nghiên cứu khác, khi tiến hành nhân giống sachá inchi *in vitro* từ lá mầm, Dong và cộng sự (2016) [8] đã sử dụng môi trường MS có bổ sung BAP với nồng độ lên tới 5 mg/l kết hợp với 0,2 mg/l IBA cho việc tái sinh tạo chồi của mẫu cây.



Hình 3. Ảnh hưởng của IBA đến tỉ lệ mẫu tạo rễ của chồi sachá inchi sau 6 tuần nuôi cấy

3.5. Ảnh hưởng của chất kích thích sinh trưởng IBA đến hiệu quả tạo rễ và chất lượng rễ của cây sachá inchi

Bảng 5. Ảnh hưởng của IBA đến hiệu quả tạo rễ của chồi sachá inchi sau 6 tuần

Công thức	Nồng độ IBA (mg/l)	Thời gian trung bình bắt đầu ra rễ (ngày)	Số lượng rễ TB/chồi	Chiều dài rễ (cm)	Tăng chiều cao chồi (cm)
R1	0	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0,15 ^a ± 0,06
R2	0,5	15,07 ^b ± 0,15	5,85 ^c ± 0,05	3,19 ^c ± 0,04	2,36 ^c ± 0,72
R3	1,0	15,73 ^b ± 0,32	3,97 ^b ± 0,21	2,58 ^b ± 0,86	1,90 ^b ± 0,15

IBA thường được sử dụng làm chất điều hòa sinh trưởng để kích thích sự phát sinh rễ trong cả hình thức nhân giống sinh dưỡng [6] và nhân giống *in vitro* [8, 9]. Trong thí nghiệm này, chúng tôi tiến hành bổ sung IBA với nồng độ 0; 0,5 và 1 mg/l trên nền môi trường MS. Sau 6 tuần theo dõi, kết quả được mô tả trong hình 3.

Cụ thể, ở công thức R1 không bổ sung IBA thì mẫu cấy không tạo rễ (0%). Khi tăng nồng độ IBA lên 0,5 mg/l ở công thức R2 thì tỉ lệ mẫu tạo rễ tăng lên là 90%. Sau đó, khi tiếp tục tăng nồng độ IBA lên 1mg/l thì tỉ lệ mẫu tạo rễ giảm xuống còn 63,33%. Như vậy, có thể thấy ở nồng độ thích hợp, IBA đã kích thích khả năng tạo rễ của chồi.

Để xác định nồng độ IBA cho hiệu quả tạo rễ và chất lượng rễ cao nhất, ngoài tỉ lệ mẫu tạo rễ, một số chỉ tiêu khác đã được theo dõi như kết quả chỉ ra trong bảng 5 dưới đây.

Trong môi trường không có IBA (R1), chồi sachá inchi không phát sinh rễ sau 6 tuần nuôi cấy. Khi bổ sung IBA với nồng độ 0,5 mg/l vào môi trường nhận thấy, rễ xuất hiện sau 15,07 ngày, số rễ trung bình/chồi thu được là 5,85 rễ với chiều dài rễ là 3,19 cm và sau 60 ngày nuôi trên môi trường, chồi cao thêm 2,36 cm. Trong khi thời gian để chồi sachá inchi cảm ứng tạo rễ là gần như không đổi (15,73 ngày) khi tăng nồng độ IBA lên là 1 mg/l thì chất lượng cây con tạo được lại có xu hướng giảm xuống. Cụ thể, trên môi trường R3, số rễ/chồi chỉ đạt trung bình 3,97 rễ, thấp hơn 1,88 rễ so với chồi nuôi trên môi trường R2. Bên cạnh đó, chiều dài rễ cũng giảm, đạt 2,58 cm/rễ và sau 60 ngày nuôi cấy, chồi chỉ cao thêm 1,90 cm. Việc tăng nồng độ IBA (từ 0,2% đến 0,8%) cũng làm giảm tỉ lệ mẫu tạo

rễ, chiều dài rễ trên cành giâm sachá inchi như trong kết quả nghiên cứu của Cachique và cộng sự (2011) [6].

4. Kết luận

Hạt sachá inchi được khử trùng bằng NaOCl 5% trong 30 phút cho tỉ lệ mẫu sạch nấm cao nhất đạt 78,29%. Môi trường MS bổ sung 20 g/l sucrose +7 g/l agar cho thời gian trung bình xuất hiện rễ mầm và lá mầm ngắn nhất và chiều cao cây trung bình đạt 14,52 cm. Đoạn thân giữa lá thật 1 và lá thật 2 của cây con này mầm từ hạt sachá inchi cho khả năng tái sinh tạo đa chồi cao nhất trong 4 vị trí nghiên cứu, với tỉ lệ mẫu tái sinh là 72,22%. Sau 4 tuần nuôi cấy, môi trường MS có bổ sung 0,1 mg/l BAP kết hợp với 0,1 mg/l IBA là công thức tái sinh chồi phù hợp nhất cho đoạn thân, với tỉ lệ mẫu tạo chồi là 76,67%, số lượng chồi/mẫu là cao nhất, đạt 4,67 chồi; chiều cao chồi và số lá trên chồi lần lượt là 1,75 cm và 2,50 lá/chồi. Với môi trường tạo rễ, công thức MS có bổ sung 0,5 mg/l IBA là môi trường tối ưu với tỉ lệ chồi ra rễ đạt 90%, số lượng rễ trung bình đạt 5,85 rễ/chồi.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. Gogus U., Smith C., “3 Omega fatty acids: a review of current knowledge”, *Int. J. Food Sci. Technol.*, vol. 45, no. 3, pp. 417-436, 2010.
- [2]. Hanssen H., Schmitz-Hübsch M., “Sachá inchi (*Plukenetia volubilis* L.) nut oil and its therapeutic and nutritional uses”, *Academic Press, San Diego*, pp. 991-994, 2011.
- [3]. Cabral F. A., Follegatti-Romero L. A., Piantino C. R., Grimaldi R., “Supercritical CO2 extraction of omega-3 rich oil from Sachá inchi (*Plukenetia volubilis* L.) seeds”, *J Supercrit Fluid*, vol. 49, no. 3, pp. 323-329, 2009.
- [4]. Gonzales G. F., Gonzales C., “A randomized, double-blind placebo-controlled study on acceptability, safety and efficacy of oral

administration of sacha inchi oil (*Plukenetia volubilis* L.) in adult human subjects”, *Food Chem Toxicol.*, vol. 65, pp. 168-76, 2014.

[5]. Edwin D. B. H., Luz A. U. M., Luis F. R. B., “Effect of adding sacha inchi (*Plukenetia volubilis* L.) seeds to a prototype of convenience food draft, on the nutritional composition and sensory acceptance”, *Academic journals*, vol. 10, no. 29, pp. 435-441, 2016.

[6]. Cachique D., Rodriguez A., Ruiz-solsol H., Vallejos G., Solis R., “Vegetative propagation of sacha inchi (*Plukenetia volubilis* L.) by rooting of juvenile cuttings in sub-irrigated chamber in the Peruvian Amazon”, *Folia Amazónica*, vol. 20, pp. 95-100, 2011.

[7]. Bordignon S. R., Ambrosano G. B. M., Viegas rodrigues P. H., “In vitro propagation of Sacha

inchi”, *Ciência Rural*, vol. 42, pp. 1168-1172, 2012.

[8]. Dong Y., Chen M., Wang X., Niu L., Fu Q., Xu Z., “Establishment of In Vitro Regeneration System of Woody oil Crop *Plukenetia volubilis*”, *Molecular Plant Breeding*, vol. 14, no. 2, pp. 462-470, 2016.

[9]. Reynaldo S., Danter C., Juan C., Guerrero A., María E. R. S., Lourdes T. F., “In vitro propagation of sacha inchi through organogenesis”, *Pesq. agropec. bras.*, vol. 53, no. 11, pp.1285-1288, 2018.

[10]. Viegas P. H. R., Bordignon S. R., Ambrosano G. B. M., “Horticultural performance of in vitro propagated plants of Sacha inchi”, *Ciência Rural, Santa Maria*, vol. 44. no. 6, pp. 1050-1053, 2014.