

Nghiên cứu qui trình nhân giống *in vitro* cây Xương rồng lê gai *Opuntia ficus indica* (L.) Mill.

Nguyễn Thị Cẩm Duyên^{1,*}, Bùi Trang Việt², Trần Thanh Hương²

¹Khoa Dược, Đại học Nguyễn Tất Thành

²Khoa Sinh học - Công nghệ Sinh học, Đại Học Khoa học Tự nhiên Tp.Hồ Chí Minh

*ntcduyen@ntt.edu.vn

Tóm tắt

Trong nghiên cứu này, khi nuôi cấy khúc cắt mang mô phân sinh ngọn chồi cây *Opuntia ficus-indica* trên môi trường Murashige và Skoog (MS) có sự phối hợp bổ sung 6-Benzylaminopurine (BA) 5mg/l, vị trí mang mô phân sinh ngọn chồi ở mặt chính diện thuộc phần ngọn của nhánh cho hiệu quả tạo chồi cao nhất. Sự phát sinh chồi đạt cao nhất trên môi trường MS có sự phối hợp bổ sung BA 5mg/l và 1-naphtalene acetic acid (NAA) 0,5mg/l. Việc hủy mô phân sinh ngọn chồi đỉnh bằng cách cắt bỏ bề mặt cho số chồi tạo thành cao nhất. Môi trường MS có bổ sung indol butyric acid (IBA) 0,5mg/l kích thích tạo rễ từ chồi *in vitro* rõ nhất. Mối liên hệ giữa vị trí mẫu cấy, sự phát sinh chồi và rễ được thảo luận.

Nhận 04.10.2018

Được duyệt 28.11.2018

Công bố 25.12.2018

Từ khóa

Opuntia ficus-indica,
xương rồng, cụm chồi,
mô phân sinh, *in vitro*

© 2018 Journal of Science and Technology - NTTU

1 Giới thiệu

Xương rồng lê gai *Opuntia ficus-indica* được biết đến như một cây đa chức năng, có thể được sử dụng làm cây cảnh và thuốc, trong khi cành và quả của nó được dùng làm thức ăn cho con người và gia súc. Cây còn được trồng làm hàng rào, giúp chống sự xâm lấn cát ở những khu vực hoang mạc và bán hoang mạc[1].

Thành phần chính trong nhánh *Opuntia ficus-indica* là nước (80-85%), carbohydrate (3-7%), chất xơ (1-2%), protein (0,5-1%). Ngoài ra xương rồng cũng chứa một lượng lớn chất nhầy với các liên kết (1-4)- β -D-acid galacturonic và R(1-2)-L-rhamnose. Bên cạnh đó, *Opuntia ficus-indica* còn có nhiều hợp chất có hoạt tính sinh học. Hàm lượng các hợp chất hóa thực vật khác nhau giữa các loài *Opuntia*. Ví dụ, những quả xương rồng màu đỏ chứa lượng taurine (7,7-11,2mg/100g quả tươi) như nhau đối với các giống ở Sicily, nhưng hàm lượng taurine thấp hơn đối với các giống ở châu Mỹ và châu Phi. Hàm lượng phenol và polyphenol tổng (đạng tự do hay liên kết) là 80-90mg/100g ở quả khô, bao gồm aromadendrin, taxifolin hay dihydroquercetin, isorhamnetin, vitexin, kaempferol, quercetin, betalain, betacyanin, rutin, isorhamnetin và dẫn xuất như myricetin, orientin, cũng như vài dẫn xuất pyrone[2].

Opuntia ficus-indica chứa một lượng lớn acid ascorbic, vitamin E, carotenoid, chất xơ, amino acid và các hợp chất chống oxy hóa (phenol, flavonoid, betaxanthin và betacyanin). Đây là các chất có lợi cho sức khỏe, thể hiện ở khả năng làm hạ đường huyết, hạ lipid máu và đặc tính chống oxy hóa. Xương rồng cũng dồi dào vitamin và khoáng chất, đáng kể nhất là quả chứa nhiều chất dinh dưỡng và chất chống viêm loét dạ dày, chống oxy hóa, chống ung thư, bảo vệ thần kinh, bảo vệ gan và chống khối u. Hoa *Opuntia ficus-indica* chứa nhiều loại flavonoid như kaempferol và quercetin. Vỏ và hạt cây cũng được dùng để sản xuất dầu, lipid trong vỏ cây làm giàu thêm acid béo và các chất chống oxy hóa béo hòa tan. Cành chứa các vitamin, chất chống oxy hóa và nhiều loại flavonoid, đặc biệt là quercetin 3-methyl ether, một chất chống gốc tự do hiệu quả. Chất chiết từ cành cây làm hạ cholesterol và truyền tín hiệu chống viêm loét dạ dày và chống viêm. Dịch chiết nước cải thiện khả năng làm lành vết thương [3].

Opuntia ficus-indica được nhập từ Mexico và được trồng thử nghiệm tại vùng sa mạc của Ninh Thuận và Bình Thuận, Việt Nam. Đây là loài sinh trưởng nhanh và rất thích hợp với điều kiện đất khô hạn, ít dinh dưỡng, lại có độ che phủ cao, góp phần cải tạo đất, chống xói mòn [3]. Tuy nhiên, các phương pháp nhân giống Xương rồng lê gai thông thường chiếm nhiều diện tích nhưng hiệu suất nhân

giống không cao. Chính vì vậy, vi nhân giống nhằm tạo ra số lượng lớn cây giống có chất lượng (sạch bệnh, năng suất cao, phẩm chất tốt, ...). [4]. Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành tìm hiểu vật liệu nuôi cấy và môi trường thích hợp nhất cho sự tạo chồi từ khúc cắt mang mô phân sinh ngọn chồi cây *Opuntia ficus-indica* đồng thời bước đầu khảo sát môi trường tạo rễ phù hợp để tạo cây con hoàn chỉnh.

2 Vật liệu và phương pháp

2.1 Vật liệu

Nhánh cây *O. ficus-indica* giống không gai, 2 năm tuổi được cung cấp bởi Trung tâm Ứng dụng Tiến bộ Khoa học và Công nghệ tỉnh Ninh Thuận. Sau 1 tháng được trồng trong vườn thực nghiệm, nhánh non phát triển từ một chồi ở vùng đỉnh của nhánh này, có chiều cao 20 ± 5 cm được sử dụng làm vật liệu thí nghiệm.

2.2 Phương pháp

2.2.1 Khảo sát ảnh hưởng của vị trí mẫu cây lên khả năng tạo chồi

Nhánh mang các mô phân sinh ngọn chồi cây trong vườn được rửa sạch với nước và xà phòng (10 phút), sau đó lãc với cồn 70% (1 phút), dung dịch $HgCl_2$ 0,1% (5 phút) và rửa sạch với nước cất vô trùng. Nhánh mang các mô phân sinh ngọn chồi cây Xương rồng lê gai *O. ficus-indica* được chia làm 4 phần, 2 phần ở mặt hông và 2 phần ở mặt chính diện. Các khúc cắt mang mô phân sinh ngọn chồi được cô lập từ nhánh, có kích thước 1×1 cm và cấy vào Erlen 100ml chứa 25ml môi trường MS có bổ sung BA 5mg/l. Thí nghiệm được bố trí theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên với bốn nghiệm thức là khúc cắt mang mô phân sinh ngọn chồi ở vị trí 1.1; 1.2; 2.1; 2.2. Mỗi nghiệm thức được lặp lại 5 lần trong 5 Erlen, mỗi Erlen gồm 3 mẫu cây. Sự phát sinh chồi từ khúc cắt mang mô phân sinh ngọn chồi được theo dõi theo thời gian. Tỷ lệ mẫu cây có chồi phát triển (chồi có chiều cao ≥ 1 mm) và chiều cao chồi được xác định sau 2 và 4 tuần nuôi cấy.

2.2.2 Khảo sát ảnh hưởng của sự phối hợp cytokinin và auxin lên sự phát triển chồi *in vitro*

Các chồi *in vitro* 4 tuần tuổi có chiều cao 5mm, bề rộng 2-3mm tăng trưởng trên môi trường MS có bổ sung BA 5mg/l có nguồn gốc từ khúc cắt mang mô phân sinh ngọn chồi ở vị trí 2.2 được cấy chuyển vào môi trường MS có bổ sung BA 5mg/l và NAA (0,5; 1 và 1,5mg/l) hoặc IAA (0,5 và 1mg/l). Các mẫu cây được đặt nuôi ở nhiệt độ $27 \pm 2^\circ C$, độ ẩm $55 \pm 10\%$, ánh sáng 2000 ± 100 lux (12/24 giờ). Mỗi nghiệm thức được lặp lại 15 lần trong 5 Erlen, mỗi Erlen gồm 3 mẫu cây. Quan sát các biến đổi hình thái của chồi theo thời gian. Số chồi trên mỗi mẫu cây (chồi có chiều cao ≥ 1 mm) và chiều cao chồi được xác định sau 8 tuần nuôi cấy.

2.2.3 Khảo sát ảnh hưởng của sự hủy mô phân sinh ngọn chồi chính trong sự phát sinh chồi *in vitro*

Chồi *in vitro* 4 tuần tuổi có chiều cao 5mm được nuôi cấy trên môi trường MS có bổ sung BA 5mg/l và NAA 0,5mg/l có nguồn gốc từ khúc cắt mang mô phân sinh ngọn chồi ở vị trí 2.2 được sử dụng làm vật liệu thí nghiệm. Dưới kính hiển vi soi nổi, sự tác động lên mô phân sinh ngọn chồi được thực hiện theo hai cách sau:

Dùng kim có đường kính mũi 200 μ m đâm vào vùng trung tâm của ngọn chồi chính với độ sâu khoảng 2mm.

Dùng dao cắt bỏ phần bề mặt của của mô phân sinh ngọn chồi chính với bề dày 1mm.

Chồi sau đó được đặt nuôi trên môi trường MS có bổ sung BA 5mg/l và NAA 0,5mg/l. Các mẫu cây được đặt nuôi ở nhiệt độ $27 \pm 2^\circ C$, độ ẩm $55 \pm 10\%$, ánh sáng 2000 ± 100 lux (12/24 giờ). Thí nghiệm được bố trí theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên với ba nghiệm thức là đối chứng (không hủy mô phân sinh ngọn chồi), hủy mô phân sinh bằng kim và cắt bỏ bề mặt mô phân sinh ngọn chồi chính. Mỗi nghiệm thức được lặp lại 15 lần trong 5 Erlen, mỗi Erlen gồm 3 mẫu cây.

Quan sát các biến đổi hình thái của chồi theo thời gian. Số chồi trên mỗi mẫu cây (chồi có chiều cao ≥ 1 mm) và chiều cao chồi được xác định sau 4 tuần nuôi cấy.

2.2.4 Khảo sát sự tạo rễ từ chồi *in vitro*

Những chồi *in vitro* 8 tuần tuổi có chiều cao khoảng 2 - 3cm có nguồn gốc từ sự nuôi cấy chồi trên môi trường MS có bổ sung BA 5mg/l và NAA 0,5mg/l được tách ra khỏi cụm chồi và được chuyển sang môi trường MS có bổ sung IAA hoặc IBA ở nồng độ 0,5mg/l.

Các mẫu cây được đặt nuôi ở nhiệt độ $27 \pm 2^\circ C$, độ ẩm $55 \pm 10\%$, ánh sáng 2000 ± 100 lux (12/24 giờ). Thí nghiệm được bố trí theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên với ba nghiệm thức là đối chứng (môi trường MS), môi trường MS có bổ sung IAA 0,5mg/l và môi trường MS có bổ sung IBA 0,5mg/l. Mỗi nghiệm thức được lặp lại 5 lần trong 5 Erlen và mỗi Erlen gồm 3 mẫu cây.

Quan sát các biến đổi hình thái của chồi theo thời gian. Số rễ và chiều dài rễ trung bình trên mỗi mẫu cây được xác định sau 3 tuần nuôi cấy.

2.2.5 Xử lý thống kê

Số liệu trong bảng kết quả được phân tích thống kê bằng phần mềm Statistical Package Social Sciences (SPSS) phiên bản 20.0 cho Windows. Các số trung bình trong cột với các ký tự khác nhau kèm theo thì khác biệt có ý nghĩa ở mức $P \leq 0,05$

3 Kết quả

3.1 Ảnh hưởng của vị trí mẫu cây lên khả năng tạo chồi

Sau 2 tuần nuôi cấy, các mẫu cây được lấy từ mặt chính diện của nhánh (vị trí 1.2 và 2.2) có tỷ lệ mẫu tạo chồi cao hơn so với các mẫu cây ở mặt hông (vị trí 1.1 và 2.1) cho

dù mẫu cây được cô lập từ phần ngọn hay phần gốc của nhánh. Ở cùng một mặt chính diện, các mẫu cây ở ngọn nhánh có tỉ lệ mẫu tạo chồi cao hơn các mẫu cây ở gốc

nhánh. Sau 4 tuần nuôi cấy, tất cả các mẫu cây đều có khả năng tạo chồi. Chiều cao chồi đạt cao nhất ở mẫu cây trên vị trí mặt chính diện thuộc phần ngọn nhánh (Bảng 1).

Bảng 1 Ảnh hưởng của vị trí mẫu cây lên sự hình thành chồi cây *O. ficus-indica*

Vị trí mẫu cây		Ký hiệu	Tỉ lệ mẫu tạo chồi (%)		Chiều cao chồi sau 4 tuần (mm)
			Tuần 2	Tuần 4	
Ngọn	Chính diện	2.2	66,67 ± 0,71 ^a	100	7,30 ± 0,47 ^a
	Hông	2.1	0 ^d	100	2,10 ± 0,68 ^d
Gốc	Chính diện	1.2	33,33 ± 0,71 ^b	100	5,80 ± 0,35 ^b
	Hông	1.1	13,33 ± 0,55 ^c	100	3,90 ± 0,45 ^c

(*) Các số trung bình trong cột có khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức $P \leq 0,05$ (T-test)

3.2. Ảnh hưởng của sự phối hợp cytokinin và auxin lên sự phát triển chồi *in vitro*

Tất cả các xử lí tạo chồi (môi trường có bổ sung BA và IAA hay NAA ở các nồng độ khác nhau) đều làm tăng chiều cao chồi so với đối chứng. Nếu cố định nồng độ BA 5mg/l đồng thời gia tăng nồng độ IAA (0,5; 1mg/l) thì số chồi tăng lên so với môi trường chỉ chứa BA 5mg/l, tuy nhiên không có sự khác biệt giữa số chồi tạo thành và chiều

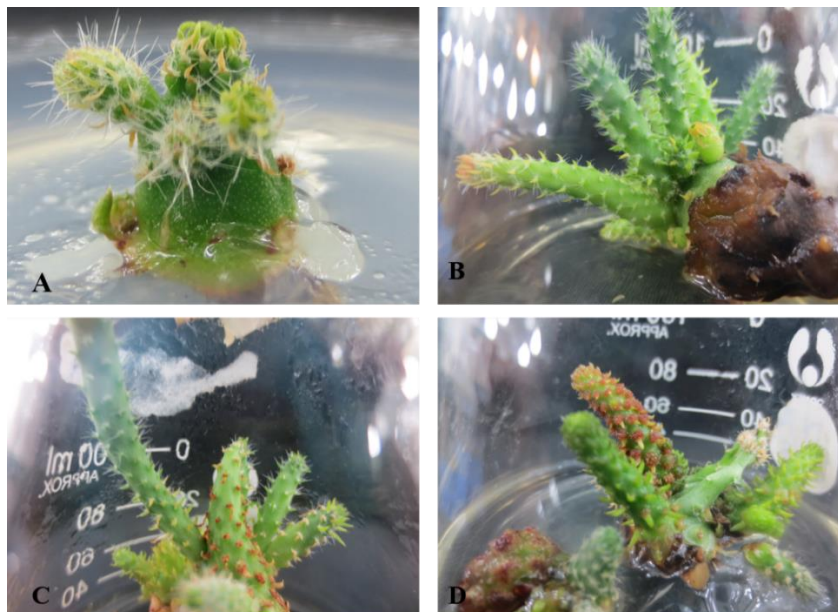
cao chồi ở hai nồng độ IAA được khảo sát là 0,5 và 1mg/l (Bảng 2).

Mặt khác, nếu cố định nồng độ BA 5mg/l đồng thời tăng nồng độ NAA (0,5; 1; 1,5mg/l) thì số chồi và chiều cao chồi tăng so với môi trường chỉ chứa BA 5mg/l, tuy nhiên khi tăng nồng độ NAA, số chồi và chiều cao chồi càng giảm đi (Bảng 2). Như vậy, môi trường MS có bổ sung BA 5mg/l và NAA 0,5mg/l thích hợp để cảm ứng tạo chồi.

Bảng 2 Sự phát triển chồi từ chồi *in vitro* 4 tuần tuổi sau 8 tuần nuôi cấy trên môi trường MS có bổ sung BA 5 mg/L và IAA hoặc NAA ở các nồng độ khác nhau

Thử nghiệm		Số chồi/Mẫu cây	Chiều cao trung bình của chồi (mm)
Đối chứng (MS có bổ sung BA 5 mg/l)		1,58 ± 0,25 ^d	6,30 ± 0,26 ^c
IAA (mg/l)	0,5	3,09 ± 0,27 ^c	7,80 ± 0,18 ^b
	1	3,25 ± 0,25 ^c	6,90 ± 0,28 ^{bc}
NAA (mg/l)	0,5	6,27 ± 0,29 ^a	9,10 ± 0,33 ^a
	1	5,15 ± 0,26 ^b	6,70 ± 0,37 ^c
	1,5	3,86 ± 0,34 ^c	7,10 ± 0,17 ^{bc}

(*) Các số trung bình trong cột có khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức $P \leq 0,05$ (T-test)



Hình 3.1 Sự hình thành cụm chồi từ chồi *in vitro* 4 tuần tuổi sau 8 tuần nuôi cấy trên môi trường MS có bổ sung BA 5mg/l và NAA ở các nồng độ khác nhau. Thanh ngang 2mm.

(A) NAA 0mg/l, (B) NAA 0,5mg/l, (C) NAA 1mg/l, (D) NAA 1,5mg/l

3.3. Ảnh hưởng của sự hủy mô phân sinh ngọn chồi chính trong sự phát sinh chồi *in vitro*

Tất cả các xử lý tác động lên mô phân sinh ngọn chồi được thực hiện đều giúp gia tăng số lượng chồi hình thành. Số chồi hình thành cao nhất trên mẫu cây được cắt bỏ phần bề mặt mô phân sinh ngọn chồi đỉnh ($2,90 \pm 0,35$ chồi/mẫu cây), thấp hơn ở mẫu cây được hủy mô phân sinh ngọn chồi đỉnh bằng kim ($2,20 \pm 0,32$ chồi/mẫu cây). Sự khác biệt có

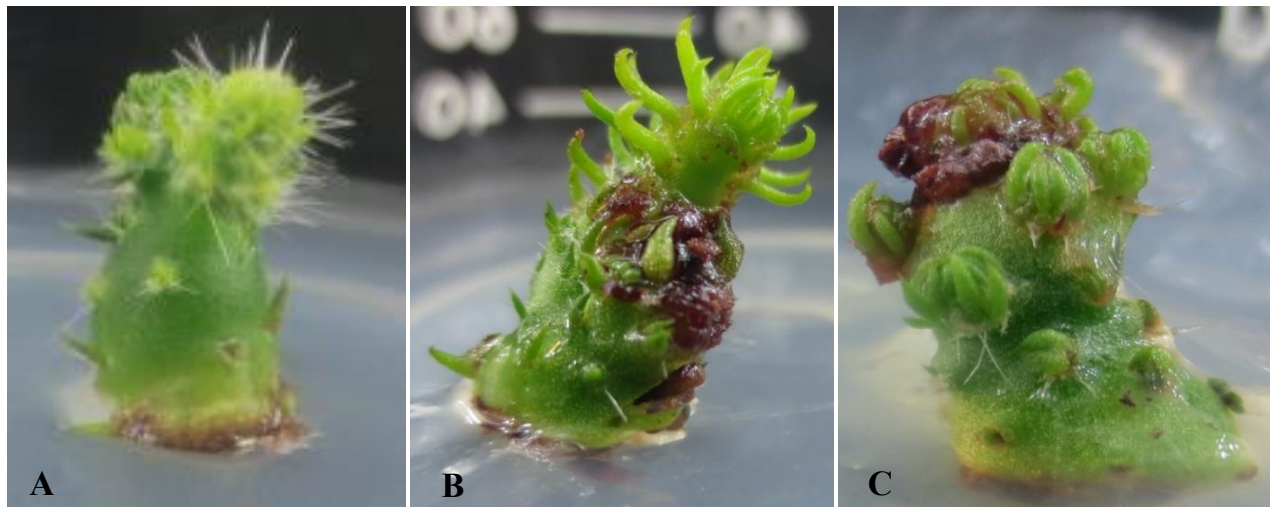
ý nghĩa so với đối chứng: $1,50 \pm 0,21$ chồi/mẫu cây (Bảng 3).

Tương tự đối chứng (Hình 3.2 A), trong trường hợp dùng dùng kim hủy mô phân sinh ngọn chồi đỉnh, một số chồi mới hình thành tại các vị trí chồi nách (Hình 3.2 B). Khi cắt bỏ phần bề mặt của mô phân sinh ngọn chồi đỉnh, sự hình thành chồi mới xảy ra tại vùng gốc của vết cắt và các vị trí chồi nách (Hình 3.2 C).

Bảng 3 Sự phát sinh chồi từ các mẫu cây chịu ảnh hưởng bởi sự hủy mô phân sinh ngọn chồi sau 4 tuần nuôi cấy trên môi trường MS có bổ sung BA 5mg/l và NAA 0,5mg/l

Nghiệm thức	Số chồi/mẫu cây
Đối chứng (không tác động lên mô phân sinh ngọn)	$1,50 \pm 0,21^c$
Dùng kim hủy mô phân sinh ngọn chồi đỉnh	$2,20 \pm 0,32^b$
Cắt bỏ phần bề mặt mô phân sinh ngọn chồi đỉnh	$2,90 \pm 0,35^a$

(*) Các số trung bình trong cột có khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức $P \leq 0,05$ (T-test)



Hình 3.2 Sự phát sinh chồi từ các mẫu cây chịu ảnh hưởng bởi các kiểu tác động khác nhau lên mô phân sinh ngọn chồi từ chồi *in vitro* 4 tuần tuổi sau 4 tuần nuôi cấy trên môi trường MS có bổ sung BA 5mg/l và NAA 0,5mg/l. Thanh ngang 2mm. Đối chứng, (B) Dùng kim hủy mô phân sinh ngọn, (C) Cắt bỏ phần bề mặt của mô phân sinh ngọn

3.4 Sự tạo rễ từ chồi *in vitro*

Chồi trên các môi trường có hay không bổ sung auxin đều có sự tăng trưởng chiều ngang và chiều cao, không có sự hình thành mô sẹo ở góc khúc cắt, có rễ hình thành và kéo dài (Hình 3). Ở cùng nồng độ xử lý (0,5mg/l), sau 3 tuần nuôi cấy, số rễ trên chồi đạt cao nhất ở mẫu cây tăng trưởng trên môi trường có bổ sung IBA ($7,57 \pm 1,29$ rễ/chồi), thấp hơn trên môi trường có bổ sung IAA ($5,67 \pm 1,43$ rễ/chồi).

Sự khác biệt có ý nghĩa so với đối chứng: $4,33 \pm 1,67$ rễ/chồi (Bảng 4).

Sau 3 tuần nuôi cấy, rễ được hình thành với chiều dài không có sự khác biệt trên các môi trường bổ sung auxin ở nồng độ giống nhau (Bảng 4).

Bảng 4 Sự tạo rễ từ chồi *in vitro* 8 tuần tuổi sau 3 tuần nuôi cấy trên môi trường MS có bổ sung IAA 0,5mg/l hoặc IBA 0,5mg/l

Nghiệm thức	Số rễ/chồi	Chiều dài rễ
Đối chứng	$4,33 \pm 1,67^c$	$1,81 \pm 0,92^a$
IAA 0,5mg/l	$5,67 \pm 1,43^b$	$1,74 \pm 0,58^a$
IBA 0,5mg/l	$7,57 \pm 1,29^a$	$1,68 \pm 0,46^a$

(*) Các số trung bình trong cột có khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức $P \leq 0,05$ (T-test)



Hình 3.3. Sự hình thành rễ từ chồi *in vitro* 8 tuần tuổi sau 3 tuần nuôi cấy trên môi trường có bổ sung auxin. Thanh ngang 5mm. Đối chứng, (B) IAA 0,5 mg/l (C) IBA 0,5mg/l

4 Thảo luận

Vị trí 2.2 cho tỉ lệ mẫu tạo chồi sau 2 tuần nuôi cấy trên môi trường MS có bổ sung BA 5mg/l là cao nhất (66,67%) so với các vị trí 2.1; 1.1; 1.2 (lần lượt là 0; 13,33 và 33,33%). Tương tự sau 4 tuần nuôi cấy, vị trí 2.2 có chiều cao chồi cao nhất (7,30mm) so với các vị trí 2.1; 1.1; 1.2 (lần lượt là 2,1; 3,9; 5,8 mm). Trong nghiên cứu này, khi nuôi cấy *in vitro* trên môi trường MS có bổ sung BA 5mg/l, các khức cắt mang mô phân sinh ở phần ngọn (vị trí 2.2) nhìn chung tạo sơ khởi chồi sớm hơn và có chiều cao chồi lớn hơn so với phần gốc có vị trí 1.2 (Bảng 3). Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Stambouli-Essassi và cộng sự (2015) khi khảo sát sự tạo rễ *in situ* nhánh xương rồng *Opuntia ficus-indica* ở Tunisia: cành giâm cho các chồi ở vùng ngọn và cho rễ ở vị trí gốc. Trong thân, auxin di chuyển hữu cực từ ngọn đến gốc [9]. Nhánh non phát triển từ chồi nách mà khởi sự là sự biệt hóa của mô phân sinh ngọn chồi ở vị trí nách lá. Mô phân sinh (có thể là chồi hoặc rễ) hiện diện ở các loài thuộc chi *Opuntia* tại vị trí núp được bảo vệ bởi túm lông [14].

Tất cả các nồng độ IAA (0,5; 1mg/l) và NAA (0,5; 1; 1,5mg/l) kết hợp với BA 5 mg/l đều thúc đẩy sự tạo chồi và gia tăng chiều cao chồi. Tuy nhiên sau 8 tuần, môi trường có bổ sung BA 5mg/l và NAA 0,5mg/l cho hiệu quả tăng sinh chồi cao nhất (Bảng 6). Như vậy, trong nghiên cứu này, NAA 0,5mg/l có tác động mạnh hơn IAA 0,5mg/l khi kết hợp với BA 5mg/l trong sự tăng sinh chồi. Các nghiên cứu trước đây đã chứng minh auxin tác động trên sự tạo chồi khi phối hợp với cytokinin và tác dụng phụ thuộc vào bản chất và nồng độ auxin [7]. Escobar và cộng sự (2002) ghi nhận có thể phá vỡ trạng thái ngủ của nụ nách ở nhiều loài thuộc chi *Opuntia* thông qua việc sử dụng cytokinin riêng lẻ hay phối hợp với các nhân tố khác. Nhiều loại cytokinin thích hợp để khởi phát và tăng sinh chồi ở Xương rồng lê gai, trong đó, BA có hiệu quả hơn kinetin và 2iP [4]. Trong sự tăng sinh chồi Xương rồng lê gai *Opuntia ficus-indica*, auxin ảnh hưởng khác nhau lên sự tăng sinh chồi. BA 5mg/l riêng lẻ cho hiệu quả tạo chồi tốt nhất [4],

trong khi sự phối hợp BA và NAA không có hiệu quả rõ rệt trên sự tăng sinh chồi [13].

Đến 2013, El Finti và cộng sự ghi nhận, sự thêm BA vào môi trường nuôi cấy sẽ làm tăng số chồi, nhưng có sự khác biệt ở 3 giống xương rồng Maroc khác nhau. Tuy nhiên, Ghaffari và cộng sự (2013) [14] chứng minh có sự khác biệt về số chồi tạo mới ở những môi trường bổ sung các chất điều hòa tăng trưởng thực vật khác nhau. Trong giai đoạn phát triển chồi, phối hợp IAA 0,5mg/l với BA 5mg/l cho hiệu quả nhân chồi cao nhất, trong khi sự phối hợp NAA 0,25mg/l với BA 5mg/l cho chiều cao chồi lớn nhất. Từ đó các tác giả kết luận sự biệt hóa chồi là quá trình tương tác giữa auxin và cytokinin. Do đó, tùy thuộc vào giống và điều kiện sinh lí của mẫu cây mà có sự phối hợp các chất điều hòa tăng trưởng thực vật khác nhau để tăng sinh chồi [7]. Sự phối hợp với BA 5mg/l với IAA ở hai nồng độ 0,5 và 1mg/l đều làm tăng số chồi và chiều cao trung bình của chồi so với môi trường chỉ chứa BA 5mg/l (Bảng 6). Bởi vì IAA là một auxin nội sinh có tác động yếu hơn NAA – một auxin tổng hợp. Vì vậy, với hai nồng độ IAA được sử dụng (0,5 và 1mg/l) khi phối hợp với BA 5mg/l không làm thay đổi đáng kể số chồi và chiều cao chồi. Việc xử lí auxin chỉ có tác dụng kích thích tăng trưởng ở nồng độ tối hảo thường gặp trong chính cơ thể thực vật, ở nồng độ cao trái lại sẽ ức chế tăng trưởng và có thể trở thành độc tố [7]. Do đó, khi auxin (NAA 0,5; 1; 1,5mg/l) hiện diện, sự phối hợp hoạt động giữa một cytokinin tổng hợp (BA 5mg/l) có hiệu quả hơn trong cả sự tăng sinh chồi lẫn sự kéo dài chồi. Tuy nhiên, khi gia tăng nồng độ NAA, số chồi và chiều cao chồi giảm đi rõ rệt (Bảng 6).

Tất cả các xử lí tác động lên mô phân sinh ngọn chồi được thực hiện đều giúp gia tăng số lượng chồi hình thành. Số chồi hình thành cao nhất trên mẫu cây được cắt bỏ phần bề mặt mô phân sinh ngọn chồi đỉnh ($2,90 \pm 0,35$ chồi/mẫu cây), thấp hơn ở mẫu cây hủy mô phân sinh ngọn chồi đỉnh bằng kim ($2,20 \pm 0,32$ chồi/mẫu cây). Sự khác biệt có ý nghĩa so với đối chứng: $1,50 \pm 0,21$ chồi/mẫu cây (Bảng 7). Bình thường, nhu cầu đường cao của ngọn chồi hạn chế đường chuyển vị tới nụ (nụ nách), do đó, cản nụ nách tăng vọt. Khi cắt ngọn, nụ bắt đầu thoát ưu tính ngọn trước khi

lượng auxin thay đổi trong thân ở cạnh nụ, trong khi đường nhanh chóng phân phối lại và tích tụ trong nụ. Như vậy, đường liên quan trong sự bắt đầu thoát ưu tính ngọn, trong khi auxin trong sự tăng trưởng nụ sau đó. Sau khi cắt ngọn, cạnh kiệt auxin dọc theo thân không như nhau theo thời gian và không gian, nên các nụ ở phần trên của thân thoát hiệu ứng auxin trước các nụ ở phần dưới [7]. Khi gia tăng mức độ tổn thương, số chồi nách sẽ giảm do sự giới hạn của mô phân sinh chồi nách. Trong khi đó, số chồi bất định (thường được cảm ứng do vết thương) sẽ tăng lên [15]. Do đó, khi dùng kim hủy mô phân sinh ngọn chồi, sự hình thành chồi chỉ ra tại vị trí chồi nách, thay thế cho mô phân sinh ngọn chồi đã bị phá hủy, và khi cắt bỏ bề mặt của mô phân sinh ngọn chồi, các chồi mới hình thành tại vị trí gốc của vết cắt và các vị trí chồi nách.

Khi cấy chồi vào môi trường có hay không có auxin, 100% mẫu cấy đều tạo rễ (Bảng 4). Sự hình thành rễ tùy thuộc vào kiểu gen, bản chất và nồng độ của chất điều hòa tăng trưởng thực vật trong môi trường nuôi cấy [5]. Trong nghiên cứu này, cùng một nồng độ nhưng IBA cho hiệu quả tạo rễ cao hơn IAA. Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Elfinti và cộng sự (2011), IBA 0,5mg/l cho số rễ tạo ra nhiều hơn so với IAA 0,5mg/l và đối chứng MS. Shehu và cộng sự (2016) khi xử lý nhánh cây *Opuntia ficus-indica* ngoài tự nhiên với các loại auxin ghi nhận IBA cho hiệu quả tốt [6]. IBA là chất kích thích tạo rễ ở nhiều loài so với IAA và NAA. Khi xử lý với IAA hoặc IBA cùng nồng độ 0,5mg/l, số rễ tạo ra nhiều hơn so với đối chứng không có

auxin. Auxin kích thích phân hóa rễ và phát triển rễ nhánh [7]. IBA có tác động mạnh hơn IAA trong sự tạo rễ. Tương tự trong sự tạo chồi, bản chất của auxin cũng ảnh hưởng đến hiệu quả tạo rễ [8]. Tuy nhiên, IAA và IBA ở nồng độ 0,5mg/l không kích thích sự kéo dài rễ so với đối chứng bởi vì ở một nồng độ nhất định, một auxin có thể kích thích sự tạo sơ khởi rễ nhưng ngăn cản kéo dài rễ [7]. Mặt khác, chiều dài trung bình của rễ khi xử lý auxin không có sự khác biệt so với đối chứng. Đó là do khi xử lý auxin sẽ tạo ra nhiều sơ khởi chưa kéo dài sau 3 tuần nuôi cấy. Thông thường rễ bất định phát triển theo hai giai đoạn chính: (1) Tạo sơ khởi rễ từ các tế bào của tầng sinh mạch hay gần tầng sinh mạch. (2) Tăng trưởng (kéo dài) sơ khởi rễ được kích thích bởi auxin ở nồng độ thấp. Như vậy, ở nồng độ cao, auxin kích thích tạo sơ khởi rễ nhưng cản tăng trưởng sơ khởi rễ. Kéo dài rễ cần auxin ở nồng độ thấp hơn. Yếu tố giúp giai đoạn một có thể cản giai đoạn hai, và ngược lại [7].

5 Kết luận

Vị trí mang mô phân sinh ngọn chồi ở mặt chính diện thuộc phần ngọn của nhánh cho hiệu quả tạo chồi cao nhất. Môi trường MS có bổ sung BA 5mg/l và NAA 0,5mg/l kích thích mạnh tạo cụm chồi. Việc hủy mô phân sinh ngọn chồi đỉnh bằng cách cắt bỏ bề mặt cho số chồi tạo thành cao nhất. Môi trường MS có bổ sung indol butyric acid (IBA) 0,5mg/l kích thích tạo rễ từ chồi *in vitro* rõ nhất.

Tài liệu tham khảo

1. A. El Finti, R. El Boullani, F. El Ayadi, N. Ait Aabd, A. El Mousadik, Micropropagation in vitro of *Opuntia ficus-indica* in south of Morocco, IJCBS. 1 (2012) 6–10.
2. U. Osuna-Martínez, J. Reyes-Esparza, L. Rodríguez-Fragoso, Cactus (*Opuntia ficus-indica*): a review on its antioxidants properties and potential pharmacological use in chronic diseases, Nat. Prod. Chem. Res. (2014).
3. T. T. O. Yên, Nghiên cứu tính đa dạng di truyền của các chi *Opuntia* và *Hylocereus* và ứng dụng chỉ thị phân tử trong chọn tạo giống *Hylocereus* có hàm lượng Betalain cao, Đại học Khoa học Tự nhiên Tp.HCM, 2014.
4. M.O.F. CACTUS, C. DESERTIFICATION, List of papers: V2 I4 September (Fast Track)-2007, Int. J. Sust. Crp. Prodn. 1 (2006) 1.
5. E.C.P. de Arruda, G.F. Melo-De-Pinna, Areolar structure in some Opuntioideae: occurrence of mucilage cells in the leaf-glochid transition forms in *Opuntia microdasys* (Lhem.) Pfeiff., *Adansonia*. 38 (2016) 267–274.
6. P.A. García-Saucedo, M. Valdez-Morales, M.E. Valverde, A. Cruz-Hernandez, O. Paredes-Lopez, Plant regeneration of three *Opuntia* genotypes used as human food, *Plant Cell. Tissue Organ Cult.* 80 (2005) 215–219.
7. B. T. Việt, Sinh lý Thực vật đại cương, NXB Đại học Quốc gia thành phố Hồ Chí Minh, 2016.
8. G. Litwack, Plant hormones, Gulf Professional Publishing, 2005.
9. I. Bohn-Courseau, Auxin: a major regulator of organogenesis, C. R. Biol. 333 (2010) 290–296.
10. E.F. George, M.A. Hall, G.-J. De Klerk, The components of plant tissue culture media I: macro-and micro-nutrients, in: *Plant Propag. by Tissue Cult.*, Springer, 2008: pp. 65–113.
11. V. T. B. Mai, Sự phát triển chồi và rễ, NXB Đại học Quốc gia thành phố Hồ Chí Minh, 2004.
12. T.T. Hương, B.T. Việt, T.-Y. Feng, Vai trò của các chất điều hòa tăng trưởng thực vật trong sự hình thành rễ bất định từ các khúc cắt mang chồi ở một vài giống Chuối (*Musa sp.*), Tạp chí Phát triển Khoa học và Công nghệ. 12 (n.d.) 23–30.

13. A. El Finti, R. El Boullani, A.I.T. Naima, F. Msanda, M.A. Serghini, A. El Mousadik, In Vitro Propagation of Three Moroccan Prickly Pear Cactus *Opuntia* and Plant Establishment in Soil, *Not. Sci. Biol.* 5 (2013) 39–44.
14. A. Ghaffari, T. Hasanloo, M.K. Nekouei, Micropropagation of tuna (*Opuntia ficus-indica*) and effect of medium composition on proliferation and rooting, *Int J Biosci.* 3 (2013) 129–139.
15. Klimešová, L. Malíková, J. Rosenthal, P. Šmilauer, Potential bud bank responses to apical meristem damage and environmental variables: matching or complementing axillary meristems?, *PLoS One.* 9 (2014) e88093.

In vitro propagation of *Opuntia ficus indica* (L.) Mill

Nguyen Thi Cam Duyen^{1,*}, Bui Trang Viet², Tran Thanh Huong²

¹Faculty of Pharmacy, Nguyen Tat Thanh University

²Faculty of Biology and Biotechnology, Ho Chi Minh University of Science

*ntcduyen@ntt.edu.vn

Abstract In this study, explants containing one *Opuntia ficus-indica* apical meristem shoot were cultured on Murashige and Skoog medium (MS) supplemented with 6-Benzylaminopurine (BA) 5mg/l medium. The maximum number of shoots per explant were obtained from the main face of the tops of the branches. Best multiplication rates were gained on MS medium supplemented with BA 5mg/l and 1-naphthalene acetic acid (NAA) 0.5mg/l. Use of indol butyric acid (IBA) 0.5mg/l gave the highest root inducing. The correlation of the material, root and shoot formation was discussed.

Key words *Opuntia ficus-indica*, cactus, shoot, *in vitro*