

TÁI SINH CÂY *IN VITRO* LOÀI *BOSWELLIA SERRATA* ROXB NHẬP NỘI

Nguyễn Văn Khiêm¹, Lê Huy Hàm¹, Đỗ Năng Vịnh¹, Bernd Buter²

¹Viện Di truyền Nông nghiệp, Việt Nam

²Công ty Vita Plant, Thụy sỹ

TÓM TẮT

Boswellia serrata là loài cây hương liệu và dược liệu, thân gỗ, cao khoảng 20 m, phân bố ở vùng cận nhiệt đới, nhiệt đới khô nóng có gió mùa lạnh hàng năm như Ấn Độ, Trung Quốc, Pakistan, và Trung Đông. Đây là một trong số các loài cây sản sinh nhựa mủ quan trọng và chủ yếu trên thế giới. Gỗ cây được sử dụng để làm giấy, đóng tàu. Các chất chiết xuất từ nhựa cây được sử dụng để sản xuất hóa mỹ phẩm như nước hoa, kem dưỡng da cao cấp và điều trị bệnh như ung thư máu, thấp khớp mãn tính, tim mạch, ngoài da, dạ dày, viêm gan virus.

Các quy trình tái sinh cây *in vitro* từ lá *B. serrata* nhập nội đã được tạo ra bằng nuôi cấy bản lá, cuống lá, đốt thân và đỉnh chồi của cây 5 tháng tuổi có nguồn gốc từ hạt trồng trong nhà kính. Chồi đỉnh được khử trùng bề mặt bằng NaOCl 1%. Bản lá và cuống lá được nuôi cấy trên môi trường MS (1962) bổ sung 0,02 mg/l TDZ, 0,05 mg/l NAA, 3% đường sucrose, 5,5 g/l agartagel ở 32°C, 1200 lux, với chu kỳ 14 h chiếu sáng: 8 h tối. 84,29% mẫu cuống lá và 76,5% mẫu bản lá tạo mô sẹo sau 4 tuần nuôi cấy. Mô sẹo tạo ra được cấy chuyển sang môi trường mới cứ sau 4 tuần nuôi cấy. Trung bình 1,1 chồi/mẫu cuống lá và 0,54 chồi/mẫu bản lá thu được sau 20 tuần nuôi cấy. Hầu hết các chồi tái sinh thu nhận đều mọc nước. Chúng được nuôi cấy trong đĩa petri chứa môi trường MS/2 bổ sung 1,5% sucrose để kéo dài chồi. Chồi không còn mọc nước với tỷ lệ 84,84% thu được bằng cấy chuyển chồi mọc nước nuôi cấy trong bình nuôi thoáng khí chứa môi trường MS/2 bổ sung 1,5% sucrose sau 6 tuần. Đốt thân và ngọn chồi được khử trùng bề mặt và nuôi cấy trên môi trường tái sinh chồi MS bổ sung 0,5 mg/l BA, 0,1 mg/l NAA, 3% đường sucrose, 5,5 g/l agartagel. Hệ số nhân chồi đạt 4,38 (lần) sau 4 tuần nuôi cấy.

Để tạo rễ, chồi tái sinh được nuôi cấy trong môi trường MS/4 bổ sung 0,5 mg/l IBA, 0,25 mg/l IAA, 1% đường sucrose. 62% chồi tái sinh được tạo rễ sau 4 tuần nuôi cấy. Tất cả mẫu nuôi cấy được duy trì trong buồng nuôi có điều khiển ánh sáng, nhiệt độ ở 32°C, 1200 lux, với chu kỳ 14 h chiếu sáng, 8 h tối. Các cây hoàn chỉnh được cấy chuyển trồng trong bầu chứa tỷ lệ đất và đất mùn (1:1) ở 25°C trong nhà kính cho tỷ lệ 68% cây sống, sinh trưởng và phát triển tốt sau 8 tuần.

Từ khóa: *Boswellia serrata*, mô sẹo, tái sinh cây, cây nuôi cấy mô, TDZ, cuống lá, bản lá.

MỞ ĐẦU

Boswellia serrata Roxb thuộc họ Burseraceae, bộ Sapindales trong lớp 2 lá mầm (Blaschek *et al.*, 1998). *B. serrata* là cây hương liệu, dược liệu, thân gỗ cao khoảng 20 m, phân bố ở vùng nhiệt đới, cận nhiệt đới nơi có khí hậu khô nóng và có gió mùa lạnh hàng năm như ở Ấn Độ, Trung Quốc, Pakistan, Trung Đông (Sunnichan, 1998).

B. serrata là loài cây có ý nghĩa kinh tế xã hội to lớn, được chính phủ Ấn Độ xếp vào danh mục các loài cây quý cần được bảo tồn và phát triển (Sunnichan, 1998). Gỗ cây được sử dụng để làm giấy, đóng tàu. Nhựa và tinh dầu là hai thành phần quan trọng chiết xuất từ nhựa cây được sử dụng để

sản xuất nước hoa cao cấp, kem dưỡng da, điều trị bệnh như ung thư máu, thấp khớp mãn tính, tim mạch, ngoài da, dạ dày, viêm gan virus (Anonymous, 1988).

B. serrata là loài cây sinh sản hữu tính, hạt có tỷ lệ nảy mầm dưới 40%, sức nảy mầm của hạt chỉ duy trì trong 6 tháng ở điều kiện nhiệt độ phòng. Nhân giống bằng giâm cành cho tỷ lệ ra rễ thành công thấp, chỉ khoảng 5% (Sunnichan, 1998). Việt Nam với hơn 10 triệu ha rừng đồi núi phía Tây Bắc có khí hậu khô nóng vẫn đang cần có nhiều loài cây trồng có ý nghĩa kinh tế. Năm 2003, loài cây này đã được chúng tôi nhập nội từ Ấn Độ và phương pháp nuôi cấy mô tế bào được sử dụng để nhân nhanh, tạo nguyên liệu cho trồng khảo nghiệm.

Cho đến nay, mới chỉ có một bài báo đề cập đến quy trình nhân nhanh bằng nuôi cấy mô đoạn thân cây *in vitro* một tháng tuổi của Purohit và đồng tác giả (1995). Nghiên cứu tái sinh *in vitro* loài *B. serrata* sử dụng mẫu chồi bên của các cây trưởng thành chưa thành công. Chồi tái sinh bị héo và chết sau 4 - 5 tuần nuôi cấy. Tuy nhiên, chỉ tái sinh được cây *in vitro* loài *B. serrata* từ bản lá, cuống lá, đốt thân và chồi ngọn của các cây 5 tháng tuổi từ hạt trồng trong nhà kính.

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Nguyên liệu

Hạt sử dụng trong nghiên cứu có nguồn gốc từ các cây ưu tú. Hạt được nảy mầm, cây non trồng trong bầu đất ở nhà kính với nhiệt độ 25 - 32°C, ánh sáng 1500 lux, độ ẩm 40 - 80%. Chồi đỉnh (2 cm) của các cây 5 tháng tuổi được thu nhận làm nguyên liệu thí nghiệm. Mẫu được khử trùng bề mặt 10 phút bằng NaOCl 1%, bổ sung Tween 20 và rửa bằng nước cất vô trùng 5 lần để loại bỏ chất khử trùng.

Chồi đỉnh mang 2 lá đầu được cấy vào môi trường Murashige và Skoog (1962) không có chất điều hoà sinh trưởng. Sau 4 tuần nuôi cấy, những mẫu không bị nhiễm vi khuẩn và nấm được cắt làm hai phần: đốt thân (gồm 1 mắt), ngọn chồi (mang 1 mắt và phần đỉnh chồi) và cấy chuyển sang các môi trường tạo chồi.

Lá thứ 3 - 5 của chồi đỉnh (2 cm × 1 cm = dài × rộng) được cắt thành các đoạn cuống lá và bản lá dài 0,8 cm. Bản lá được cắt qua gân chính. Các đoạn cắt được phân bổ ngẫu nhiên trong đĩa petri (3 - 5 mảnh/petri) đường kính 6 - 9 cm chứa môi trường tạo mô sẹo có bổ sung các chất điều hoà sinh trưởng với các nồng độ khác nhau. Để tạo chồi, mô sẹo được cấy chuyển sang môi trường mới. Sau 4 tuần nuôi cấy, chồi tạo ra được cấy chuyển sang bình nuôi (hoặc đĩa petri để kéo dài chồi) không chứa các chất điều hoà sinh trưởng.

Chồi không mọc nước tái sinh từ phần chồi ngọn có hơn 2 lá cao trên 1,5 cm được cấy chuyển sang môi trường tạo rễ. Các cây hoàn chỉnh được cấy chuyển ra bầu đất chứa đất và đất mùn (1:1) trồng trong nhà kính ở 25°C. Độ ẩm được duy trì 90% trong 2 tuần đầu, sau đó giảm dần xuống 40 - 70%.

Tất cả các mẫu nuôi cấy được thực hiện trong buồng nuôi Rumed, được duy trì ở nhiệt độ 32°C, cường độ ánh sáng 1200 lux, chu kỳ 16 h sáng, 8 h

tối. Các số liệu được xử lý theo các phương pháp thống kê toán học và chương trình Excel.

Phương pháp

Chuẩn bị môi trường nuôi cấy

Các môi trường cơ bản được sử dụng trong thí nghiệm là MS (Murashige, Skoog, 1962), B5 (Gamborg *et al.*, 1968), WP (Lloyd, McCown, 1980) và DFH (De Fossard *et al.*, 1974). Tất cả các môi trường đều được điều chỉnh pH đến 5,8 và khử trùng ở 121°C, 0,8 atm trong 20 phút.

Môi trường sau khử trùng được đưa vào các đĩa petri (đường kính 6 - 9 cm với 10 - 15 ml/petri) hoặc các bình nuôi (60 ml/bình). Tuy nhiên, chỉ có TDZ được khử trùng bằng màng lọc mà không khử trùng bằng nhiệt và bổ sung vào môi trường sau khử trùng. Các chất điều hoà sinh trưởng khác được bổ sung vào môi trường trước khi điều chỉnh pH và khử trùng môi trường.

Độ khô của chồi được đánh giá theo 5 mức (0 - 4): 0, chồi chết; 1 > 50% lá và thân chồi nâu đen; 2, 20 - 49% lá và thân chồi nâu đen; 3, 1 - 19% lá và thân chồi nâu đen; 4, 0% lá và thân nâu đen.

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

Ảnh hưởng của các môi trường nền đến tạo mô sẹo

Các môi trường cơ bản MS, B5, WP bổ sung 0,01 mg/l TDZ và 0,05 mg/l NAA được sử dụng để nghiên cứu ảnh hưởng của chúng đến khả năng tạo mô sẹo. Kết quả nghiên cứu từ bảng 1 cho thấy môi trường cơ bản MS là môi trường thích hợp nhất để tạo mô sẹo. Tại môi trường này, tỷ lệ mẫu cấy tạo mô sẹo, số mô sẹo/mẫu cấy và tỷ lệ mô sẹo rắn chắc đạt cao hơn so với môi trường B5 và WP.

Ảnh hưởng của các chất điều hoà sinh trưởng đến tạo mô sẹo

Môi trường MS được sử dụng để nghiên cứu ảnh hưởng của các chất điều hoà sinh trưởng đến khả năng tạo mô sẹo. Mười một môi trường (M1 - M11) chứa các chất điều hoà sinh trưởng BAP, TDZ, kinetin, NAA ở các nồng độ khác nhau đã được sử dụng để nghiên cứu ảnh hưởng của các chất điều hoà sinh trưởng đến tạo mô sẹo (Bảng 2).

Mô sẹo điển hình được hình thành sau 7 ngày nuôi cấy. Sắc tố phốt hồng và tím hoa cà được quan

sát thấy trên một số mô sẹo. Trong môi trường không được bổ sung các chất điều hoà sinh trưởng, chỉ có cuống lá tạo mô sẹo với tỷ lệ 5,71%, 0,06 mô sẹo/mảnh cây và cường độ sinh trưởng của mô sẹo nhỏ (0,16). Môi trường M2 - M4 chứa tổ hợp BAP (0,5 - 5 mg/l) với NAA (0,05 - 0,1 mg/l) cho khả năng tạo mô sẹo kém nhất. Mô sẹo tạo thành thường có màu nâu đen và chết với tỷ lệ lớn. Các môi trường M9 - M11 chứa tổ hợp kinetin (1 - 3 mg/l) với NAA (0,1 mg/l) cho kết quả tốt hơn so với các môi trường M2 - M4 chứa tổ hợp BAP và NAA. Môi trường M5-M8 chứa tổ hợp TDZ (0,01 - 0,1 mg/l) với NAA (0,05 - 0,1 mg/l) thích hợp nhất cho việc tạo mô sẹo so với các môi trường chứa BAP, kinetin với NAA. Môi trường M6 chứa tổ hợp 0,02 mg/l TDZ và 0,05 mg/l NAA là môi trường tốt nhất để tạo mô sẹo. Trong môi trường này, tỷ lệ mẫu cây tạo mô sẹo, số mô sẹo/mẫu cây, tỷ lệ mô sẹo rắn chắc và sinh trưởng của mô sẹo đạt cao nhất. Thí nghiệm cũng cho thấy mảnh cuống lá tỏ ra ưu việt hơn so với bản lá về tạo mô sẹo.

Như vậy, kết quả nghiên cứu từ thí nghiệm 1 và 2 cho thấy môi trường Murashige và Skoog (1962) bổ sung 0,02 mg/l TDZ và 0,05 mg/l NAA là môi trường tốt nhất để tạo mô sẹo.

Tái sinh chồi từ mô sẹo

Bước đầu tiên trong tái sinh chồi, các mô sẹo tạo ra trong các môi trường M1 - M11 được cấy chuyển lên môi trường mới có cùng thành phần môi trường. Các mô sẹo nâu đen chết được loại bỏ trước khi cấy chuyển.

Tất cả các mô sẹo nuôi cấy trên môi trường M1 - M4 không xuất hiện chồi. Sau một số lần cấy chuyển chúng đều chuyển màu nâu đen và chết. Ở lần cấy chuyển thứ 4, chồi mới được tái sinh từ mô sẹo có nguồn gốc từ cuống lá trên môi trường M9, M10 và từ bản lá trên môi trường M10. Các môi trường M5 - M8 chứa tổ hợp TDZ với NAA tỏ ra có hiệu quả tái

sinh chồi từ mô sẹo có nguồn gốc từ cuống lá và bản lá. Môi trường M6 chứa tổ hợp TDZ 0,02 mg/l và NAA 0,05 mg/l là môi trường tốt nhất cho tái sinh chồi từ mô sẹo. Mô sẹo có nguồn gốc từ cuống lá cũng tỏ ra ưu việt hơn so với bản lá về tạo chồi. Trung bình 1,1 chồi/mẫu cây cuống lá và 0,54 chồi/bản lá được tạo ra sau 5 lần cấy chuyển. Kết quả tái sinh chồi từ mô sẹo có nguồn gốc từ cuống lá và bản lá trên môi trường M1 - M11 được thể hiện qua Bảng 3.

Chồi xuất hiện đầu tiên được quan sát thấy sau 6 tuần nuôi cấy. Số chồi tái sinh đạt cao nhất ở lần cấy chuyển thứ 3 sau đó giảm xuống. Hầu hết mô sẹo bị chết hoặc không có khả năng tái sinh chồi sau lần cấy chuyển thứ 8.

Thí nghiệm tiếp theo là nghiên cứu kiểm tra ảnh hưởng của NAA, BAP, kinetin đến khả năng tái sinh chồi từ mô sẹo có nguồn gốc từ cuống lá và bản lá trên môi trường MS bổ sung 0,02 mg/l TDZ + 0,05 mg/l NAA. Kết quả thí nghiệm cho thấy chồi được tạo ra trong tất cả các môi trường chứa tổ hợp 0,02 mg/l TDZ + 0,05 mg/l NAA; 0,02 mg/l TDZ; 0,5 - 1,0 mg/l BAP; 1 - 2 mg/l kinetin. Môi trường chứa tổ hợp 0,02 mg/l TDZ và 0,05 mg/l NAA cho tỷ lệ tái sinh chồi cao nhất. Loại bỏ NAA trong môi trường trên làm tỷ lệ mô sẹo tạo chồi và số chồi/mô sẹo giảm đáng kể. Như vậy tổ hợp 0,02 mg/l TDZ cùng với 0,05 mg/l NAA đã thể hiện tác dụng kích thích tái sinh chồi. Kết quả nghiên cứu này phù hợp với kết luận của Purohit và đồng tác giả (1995) rằng NAA có tác dụng kích thích tái sinh chồi từ mô sẹo của đoạn trên và dưới lá mầm *B. serrata in vitro* 1 tháng tuổi.

Như vậy, kết quả nghiên cứu từ các thí nghiệm trên cho thấy môi trường Murashige và Skoog (1962) bổ sung 0,02 mg/l TDZ và 0,05 mg/l NAA là môi trường tốt nhất cho tạo mô sẹo, nhân mô sẹo và tái sinh chồi. Môi trường MS được bổ sung 3% sucrose, 2,5 g/l phytigel.

Bảng 1. Ảnh hưởng của các môi trường khác nhau bổ sung 0,01 mg/l TDZ, 0,05 mg/l NAA, 3% đường sucrose, 2,5g/l phytigel đến tạo mô sẹo sau 4 tuần nuôi cấy.

Môi trường	Mô cấy	Số mẫu cây	Số mẫu tạo mô sẹo (%)	Mô sẹo /mẫu cấy	Sinh trưởng mô sẹo (0 - 3)	Mô sẹo rắn chắc (%)
MS	Cuống lá	60	75,0	0,98	1,85	18,5
	Bản lá	90	66,67	0,90	1,58	7,05
B5	Cuống lá	60	63,33	0,75	1,82	15,72
	Bản lá	90	50,0	0,70	1,60	7,25
WP	Cuống lá	60	58,33	0,68	1,70	14,82
	Bản lá	90	46,67	0,60	1,55	5,72

Bảng 2. Ảnh hưởng của các chất điều hòa sinh trưởng đến tạo mô sẹo từ cuống lá và bản lá sau 4 tuần nuôi cấy. Môi trường MS được bổ sung 3% sucrose, 2,5 g/l phytagel. Ký hiệu B: Bản lá; C: cuống lá.

Môi trường	Chất điều hòa sinh trưởng (mg/l)	Mô cấy	Số mẫu cấy	Mẫu cấy tạo mô sẹo (%)	Mô sẹo /mẫu cấy	Sinh trưởng mô sẹo (0 - 3)	Mô sẹo rắn chắc (%)
M1	0	C	70	5,71	0,06	0,16	0,00
		B	70	0,00	0,00	0,00	0,00
M2	0,5BAP + 0,05 NAA	C	100	35,00	0,35	0,70	5,71
		B	220	41,82	0,31	0,58	4,41
M3	2,0 BAP + 0,1 NAA	C	75	9,33	0,09	0,25	0,00
		B	180	22,77	0,33	0,47	0,00
M4	5,0 BAP + 0,1 NAA	C	100	7,00	0,09	0,23	0,00
		B	155	7,74	0,09	0,18	0,00
M5	0,01 TDZ + 0,05 NAA	C	90	76,67	1,02	1,85	20,65
		B	120	64,17	1,10	1,45	6,81
M6	0,02 TDZ + 0,05 NAA	C	70	84,29	1,21	2,58	41,18
		B	200	76,50	1,26	2,04	11,55
M7	0,05 TDZ + 0,1 NAA	C	75	72,00	1,01	2,25	28,94
		B	170	60,59	1,12	1,44	8,51
M8	0,1 TDZ + 0,1 NAA	C	90	68,89	1,11	1,69	15,15
		B	180	52,78	1,15	1,21	4,35
M9	1,0 K + 0,1 NAA	C	80	68,75	0,99	1,29	34,18
		B	150	48,67	0,78	0,85	22,22
M10	2,0 K + 0,1 NAA	C	70	45,71	0,79	0,85	47,27
		B	120	39,17	0,68	0,68	13,41
M11	3,0 K + 0,1 NAA	C	70	52,86	0,09	0,88	8,93
		B	100	38,00	0,84	0,62	0,00

Sinh trưởng của chồi tái sinh từ mô sẹo

Hầu hết chồi tái sinh từ các mô sẹo ở trạng thái mộng nước, có chiều cao khoảng 1 - 1,5 cm và thân chồi mảnh, mềm không thích hợp cho sinh trưởng chồi và tạo rễ. Nhiều nghiên cứu cho thấy có sự khác nhau về cấu trúc tế bào ở cây mộng nước và cây không mộng nước. Ở các cây mộng nước, diện tích nội bì lá tăng, hệ mạch của gân lá có ít lignin, lá dày do tăng lên của tế bào thịt lá, trong khi số lượng các loại tế bào giảm. Kích thước tế bào biểu bì, khí khổng và gian bào đều tăng lên. Sự mộng nước có liên quan đến nhiều nhân tố và phụ thuộc vào các phản ứng sinh lý đặc biệt với môi trường nuôi cấy và loài thực vật nuôi cấy (Edgard

et al., 2001; George *et al.*, 1996). Về bản chất, các chồi mộng nước tích lũy nhiều protein liên kết (BiP) liên quan đến nhận biết thay đổi cấu trúc tế bào cao hơn chồi không mộng nước. Để thu được chồi không mộng nước, theo George và đồng tác giả (1996) có nhiều con đường. Trong nghiên cứu này, các môi trường khác nhau không bổ sung chất điều hòa sinh trưởng, giảm hàm lượng đường đã được sử dụng để nuôi cấy chồi tái sinh thu được nhằm tăng cường sinh trưởng thêm của chồi. Kết quả nghiên cứu ở bảng 4 cho thấy, chồi nuôi cấy trong đĩa petri chứa các môi trường MS/2, B5/2 chiều cao chồi, số lá, chồi bên tăng lên đáng kể sau 3 tuần nuôi cấy. Môi trường MS/2 tỏ ra ưu việt hơn so với môi trường B5/2. Sinh trưởng và phát triển

của chồi tăng lên không đáng kể khi chuyển chồi tái sinh từ mô sẹo nuôi cấy trong đĩa petri sang bình nuôi cấy. Như vậy, nuôi cấy chồi tái sinh thu được

trong đĩa petri chứa môi trường MS/2 không có chất điều hoà sinh trưởng và giảm đường còn 1,5 % trong 3 tuần là cần thiết.

Bảng 3. Ảnh hưởng của một số môi trường nuôi cấy đến tái sinh chồi từ mô sẹo sau 5 lần cấy chuyển. Ký hiệu B: Bàn lá; C: cuống lá.

	Mô cấy	Số mẫu cấy	Mẫu cấy tạo chồi (%)	Số chồi /mẫu cấy	Mô sẹo tạo chồi (%)	Số chồi/ mô sẹo	Độ khoẻ của chồi (0-4)
M1	C	70	0,00	0,00	0,00	0,00	-
	B	70	0,00	0,00	0,00	0,00	-
M2	C	100	0,00	0,00	0,00	0,00	-
	B	220	0,00	0,00	0,00	0,00	-
M3	C	75	0,00	0,00	0,00	0,00	-
	B	180	0,00	0,00	0,00	0,00	-
M4	C	100	0,00	0,00	0,00	0,00	-
	B	155	0,00	0,00	0,00	0,00	-
M5	C	90	6,67	0,47	6,52	0,46	3,18
	B	120	4,17	0,32	3,79	0,29	2,82
M6	C	70	17,14	1,10	16,47	0,90	3,23
	B	200	10,50	0,54	8,77	0,35	3,16
M7	C	75	9,33	0,54	9,21	0,54	2,98
	B	170	7,65	0,38	6,92	0,35	2,66
M8	C	90	3,33	0,91	3,03	0,83	2,80
	B	180	2,78	0,42	2,42	0,36	2,55
M9	C	80	2,50	0,05	2,53	0,05	2,41
	B	150	0,67	0,08	0,86	0,10	2,06
M10	C	70	1,43	0,13	1,82	0,16	2,52
	B	120	0,00	0,00	0,00	0,00	-
M11	C	70	0,00	0,00	0,00	0,00	-
	B	100	0,00	0,00	0,00	0,00	-

Bảng 4. Sinh trưởng và phát triển của chồi tái sinh từ mô sẹo trong petri sau 3 tuần nuôi cấy. Chồi tái sinh thu được trên môi trường M6 ở lần thứ 3 có độ khoẻ 2 - 4. Môi trường được bổ sung 2,5 g/l phytigel, 1,5% sucrose.

Môi trường nuôi cấy	Số chồi nuôi cấy	Chiều cao/chồi (cm)	Số lá/chồi	Số chồi bên/chồi	Tăng chiều cao/chồi (cm)	Tăng số lá/chồi	Tăng chồi bên/chồi	Độ khoẻ chồi (0 - 4)	Chồi chết (%)
B5/2	114	1,05	5,43	0,23	1,04	2,61	0,39	3,36	10,53
MS/2	92	1,18	5,30	0,27	1,49	3,08	0,58	3,49	5,43

Một loạt các môi trường và phương án cấy chuyển khác nhau được thực hiện để nuôi cấy chồi mọc nước nhằm thu được những chồi bình thường không còn mọc nước với tỷ lệ cao. Chúng tôi sử dụng các môi trường không có các chất điều hòa sinh trưởng, giảm thành phần dinh dưỡng, đường và nuôi cấy thoáng khí trong bình nuôi cấy. Chồi tái sinh tạo ra từ mô sẹo nuôi cấy trong đĩa petri chứa môi trường MS/2; sau đó chuyển sang bình nuôi cấy thoáng khí cũng chứa MS/2 là phương án tốt nhất: 86,84% chồi

được phục hồi (cao nhất), chỉ có 20,18% chồi chết (thấp nhất) sau 6 tuần nuôi cấy (Bảng 5).

Chồi tái sinh từ mô sẹo sau đó được: i) cấy chuyển nuôi cấy trong đĩa petri chứa môi trường MS/2, B5/2 sau đó chuyển đến các bình nuôi cấy chứa các môi trường MS/2, B5/2, DFH/2, hoặc ii) cấy chuyển trực tiếp đến các bình nuôi cấy chứa các môi trường MS/2, B5/2. Tất cả các môi trường được bổ sung 5,5 g/l agargel, 1,5% sucrose.

Bảng 5. Phục hồi trở lại bình thường của các chồi mọc nước ở một số môi trường sau 3 và 6 tuần nuôi cấy. Tất cả môi trường được bổ sung 5,5 g/l agargel, 1,5% sucrose.

Môi trường nuôi cấy chồi trong đĩa petri	Môi trường nuôi cấy chồi trong bình nuôi	Số chồi nuôi cấy	Chồi phục hồi bình thường sau 3 tuần (%)	Chồi chết sau 3 tuần (%)	Chồi phục hồi bình thường sau 6 tuần (%)	Chồi chết sau 6 tuần (%)
MS/2	MS/2	114	77,19	11,40	86,84	20,18
MS/2	B5/2	136	54,41	15,44	60,29	40,44
MS/2	DFH/2	85	21,53	40,0	27,69	49,23
B5/2	MS/2	86	70,93	23,26	76,74	37,21
B5/2	B5/2	84	54,0	7,10	61,91	34,52
B5/2	DFH/2	100	18,0	38,0	30,0	48,0
	MS/2	102	62,5	2,78	83,33	24,0
	B5/2	114	76,07	11,75	68,0	26,0

Tái sinh chồi từ ngọn

Ảnh hưởng của kinetin và NAA lên tái sinh chồi

Kinetin và NAA có ảnh hưởng đến tái sinh chồi từ chồi ngọn của *B. serrata*. Trong môi trường không có chất điều hòa sinh trưởng, khả năng tái sinh chồi rất kém (hệ số nhân đạt 1,18 lần). Hệ số nhân chồi tăng theo nồng độ kinetin bổ sung vào môi trường (0 - 3 mg/l) và đạt cao nhất (2,90 lần) ở nồng độ kinetin 3 mg/l. Bổ sung 0,1 mg/l NAA vào môi trường chứa kinetin không làm tăng hệ số nhân chồi (Bảng 6).

Ảnh hưởng của BAP và NAA lên tái sinh chồi

BAP và NAA có ảnh hưởng lớn đến tái sinh chồi *B. serrata*. Hệ số nhân chồi tăng lên và đạt cao nhất ở nồng độ 1,5 mg/l BAP sau đó giảm xuống ở nồng độ 2 mg/l BAP. Ở nồng độ 0,5 mg/l BAP chiều dài chồi, số lá/chồi và tỉ lệ chồi có hơn 2 lá cao trên 1,5 cm đạt cao nhất. Đồng thời chồi tạo ra khỏe, cứng, lá

to, phát triển cân đối. Ở nồng độ BAP cao hơn, chiều dài chồi, số lá/chồi và tỉ lệ (%) chồi có hơn 2 lá cao trên 1,5 cm giảm dần, chồi tạo ra mềm yếu, lá nhỏ và bề rộng bị thu hẹp hoặc không có lá.

Sinh trưởng của mô sẹo tạo ra từ gốc chồi tăng lên theo nồng độ BAP bổ sung vào môi trường. Mô sẹo bị nâu đen và chết sau 3 - 4 tuần tạo chồi, những chồi này cũng bị héo chết nếu không được cấy chuyển sang môi trường mới. Bổ sung 0,1 mg/l NAA vào môi trường chứa BAP (0,25 - 2,0 mg/l) có tác dụng làm tăng hệ số nhân chồi, chiều dài lá, số lá và % chồi có hơn 2 lá, cao trên 1,5 cm (Bảng 7).

Môi trường MS chứa tổ hợp 0,5 mg/l BAP + 0,1mg/l NAA là môi trường thích hợp hơn cả để tạo chồi. Trong môi trường này hệ số nhân đạt khá cao 4,38 lần, chiều dài chồi đạt 3,60 cm với 3,77 lá/chồi và 65,5% chồi tạo ra có độ dài trên 1,5 cm có ít nhất 2 lá. Chồi tạo ra khỏe, lá xanh, cân đối. Khi chuyển sang môi trường mới chồi ít bị héo và ít bị chết hơn so với các môi trường có nồng độ BAP cao hơn 0,5 mg/l.

Bảng 6. Ảnh hưởng của kinetin và NAA lên tái sinh chồi từ chồi ngọn *B. serrata* sau 4 tuần nuôi cấy. Môi trường sử dụng là MS bổ sung 3% sucrose. Tổng cộng 60 mẫu/thí nghiệm.

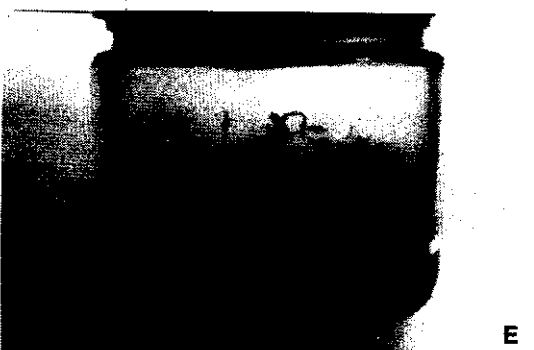
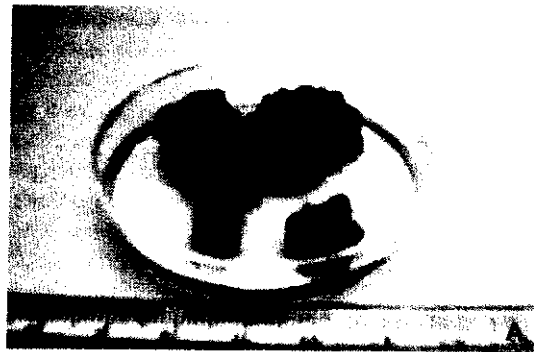
Kinetin (mg/l)	NAA (mg/l)	Hệ số nhân (lần)	Dài chồi (cm)	Lá/ chồi	% chồi dài hơn 1,5 cm có ít nhất hai lá	Mô sẹo
0,00	0,0	1,18	0,25	1,20	0,00	–
0,50	0,0	1,50	1,21	2,50	50,00	+
0,50	0,1	1,58	1,25	2,50	57,14	+
1,00	0,0	2,08	1,33	3,26	56,92	+
1,00	0,1	2,28	1,35	3,28	54,55	+
1,50	0,0	2,40	1,25	2,50	47,62	++
1,50	0,1	2,45	1,20	2,70	51,72	++
2,00	0,0	2,63	1,11	1,98	50,00	++
2,00	0,1	2,68	1,18	1,75	54,46	++
3,00	0,0	2,85	0,85	1,25	39,64	+++
3,00	0,1	2,90	0,75	1,38	42,11	+++

Ghi chú: –: không tạo mô sẹo; +: mô sẹo nhỏ; ++: mô sẹo trung bình; +++: mô sẹo lớn;

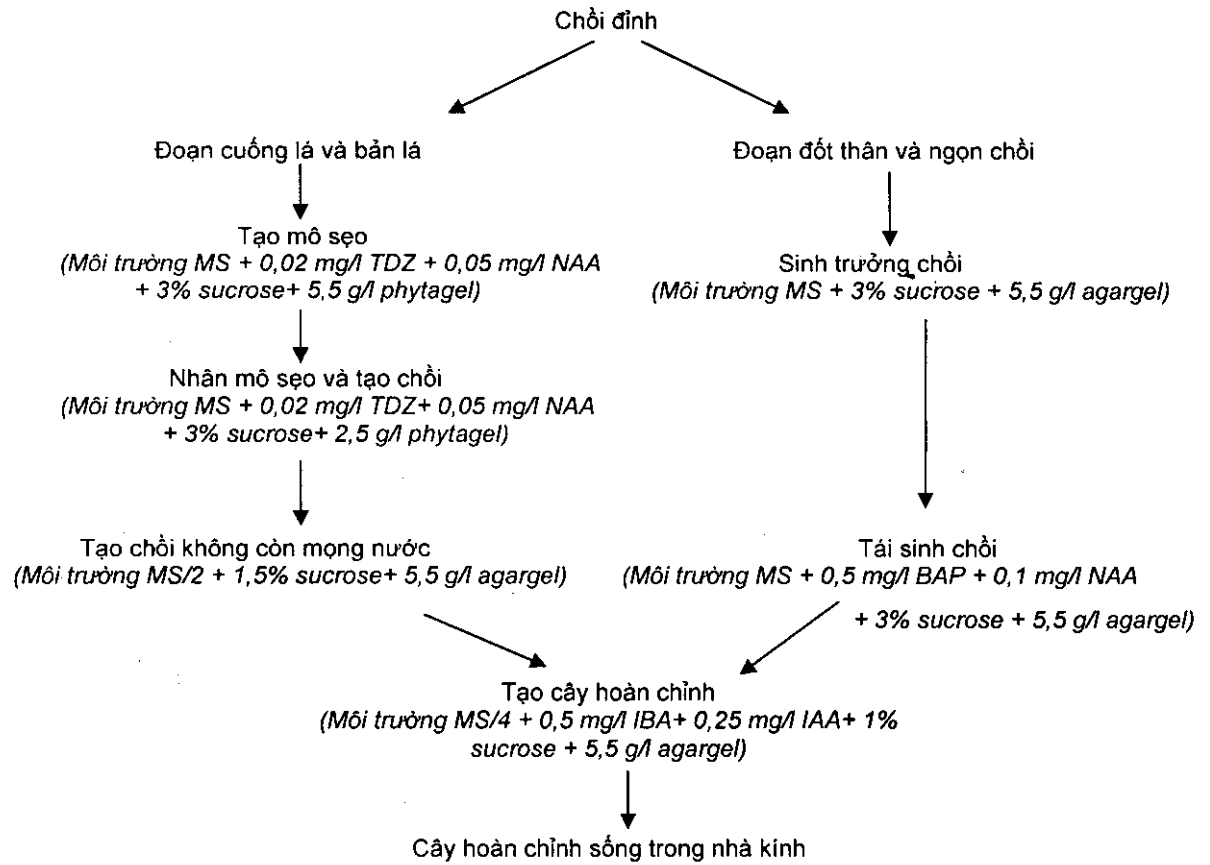
Bảng 7. Ảnh hưởng của bổ sung BAP và NAA lên tái sinh chồi từ chồi ngọn *B. serrata* sau 4 tuần nuôi cấy trên môi trường MS có bổ sung 3% sucrose. Tổng cộng 60 mẫu/thí nghiệm.

BAP (mg/l)	NAA (mg/l)	Hệ số nhân (lần)	Dài chồi (cm)	Lá/ chồi	% chồi dài hơn 1.5cm có ít nhất hai lá	Mô sẹo
0,00	0,0	1,18	0,25	1,20	0,00	–
0,25	0,0	3,23	1,49	1,64	52,24	+
0,25	0,1	3,42	1,90	2,90	58,17	+
0,50	0,0	4,10	2,25	3,11	55,38	++
0,50	0,1	4,38	2,60	3,77	65,50	++
1,00	0,0	4,60	1,43	1,47	37,96	+++
1,00	0,1	4,75	1,63	1,60	42,22	+++
1,50	0,0	5,00	1,11	1,40	28,33	+++
1,50	0,1	5,25	1,39	1,62	25,49	+++
2,00	0,0	3,52	0,68	0,85	9,27	++++
2,00	0,1	3,65	0,80	0,92	14,47	++++

Ghi chú: –: không tạo mô sẹo; +: mô sẹo nhỏ; ++: mô sẹo trung bình; +++: mô sẹo lớn; ++++: mô sẹo rất lớn.



Hình 1. Một số hình ảnh về tái sinh *in vitro* cây *B. serrata* từ mô lá và chồi đỉnh. A, Mô sẹo tạo thành từ mảnh cuống lá; B, chồi tái sinh từ mô sẹo; C, chồi tái sinh từ mô sẹo trên môi trường kéo dài chồi; D, Tạo chồi tái sinh không còn mọng nước; E, Chồi tái sinh từ mô sẹo trong môi trường nhân; F, Chồi tái sinh từ đốt thân và ngọn chồi trong môi trường nhân; G, Tạo rễ chồi tái sinh; H, Cây hoàn chỉnh trong bầu đất trong nhà kính sau 2 tháng trồng.



Sơ đồ 1. Quy trình tái sinh cây *B. serrata* *in vitro* từ bản lá, cuống lá, đốt thân và ngọn chồi cây 5 tháng tuổi.

Bảng 8. Ảnh hưởng của các IBA và IAA thêm vào môi trường MS/4 chứa 5,5 g/l agargel và 1% đường sucrose lên tạo rễ của các chồi tái sinh sau 4 tuần nuôi cấy.

IBA (mg/l)	NAA (mg/l)	Số chồi nuôi cấy	Chồi tạo rễ (%)	Rễ/chồi	Chiều dài rễ (cm)
0,0	0,0	100	0	0,0	0,0
0,5	0,0	100	37	2,2	2,5
1,0	0,0	100	28	1,2	1,7
2,0	0,0	100	20	1,0	1,5
3,0	0,0	100	20	1,0	1,2
0,0	0,5	100	30	1,8	1,8
0,0	1,0	100	20	1,5	1,2
0,0	2,0	100	15	1,5	1,0
0,0	3,0	100	10	1,2	1,0
0,5	0,1	100	48	2,0	2,7
0,5	0,25	100	62	2,4	3,5
0,5	0,5	100	40	2,1	2,2

Tạo rễ chồi tái sinh và đưa cây ra bầu đất

IBA và IAA đã được sử dụng trong thí nghiệm tạo rễ các chồi tái sinh. Rễ được hình thành sau 7 ngày nuôi cấy chồi trên môi trường tạo rễ. Phần lớn các chồi tại chỗ cắt gốc thân mô sẹo được hình thành, sau đó rễ xuất hiện. Cường độ sinh trưởng mô sẹo tỷ lệ thuận với nồng độ auxin bổ sung trong môi trường. IBA tạo rễ tốt hơn IAA trong tạo rễ của chồi tái sinh thu được. Ở nồng độ 0,5 mg/l tỷ lệ chồi ra rễ cao nhất 37% đối với IBA và 30% đối với IAA. Ở nồng độ cao hơn 0,5 mg/l, IBA và IAA có xu hướng kìm hãm tạo chồi. Để cải thiện khả năng tạo rễ của chồi, tổ hợp IBA và IAA được bổ sung vào môi trường. Tỷ lệ ra rễ tăng lên đáng kể trong các môi trường được bổ sung tổ hợp IBA và IAA. Hiệu quả ra rễ đạt cao nhất tại môi trường bổ sung tổ hợp IBA 0,5 mg/l với IAA 0,25 mg/l với tỷ lệ ra rễ 62%, số rễ/chồi là 2,4 và chiều dài rễ đạt 3,5 cm (Bảng 8). Sinh trưởng của các cây hoàn chỉnh tăng lên mạnh mẽ về chiều cao, số lá sau khi rễ xuất hiện.

Các cây hoàn chỉnh đã được trồng trong bầu đất trong điều kiện nhà kính. Tỷ lệ cây sống đạt 68% sau 8 tuần. Ở những cây sống, các lá non xuất hiện sau một tuần trồng. Sau 8 tuần, 3 - 4 lá/cây xuất hiện. Chiều cao cây tăng lên 1 - 3 cm.

KẾT LUẬN

Quy trình tái sinh cây *in vitro* từ cuống lá, bản lá, đốt thân và ngọn chồi *Boswellia serrata* 5 tháng tuổi đã được xây dựng.

Môi trường thích hợp nhất cho tạo mô sẹo từ bản lá và cuống lá, nhân mô sẹo và tái sinh chồi là môi trường MS (1962) bổ sung 0,02 mg/l TDZ, 0,05 mg/l NAA, 3 % đường sucrose, và 5,5 g/l agar, pH 5,8. Đoạn cuống lá phản ứng tốt hơn về tạo mô sẹo (84,29%) và tạo chồi (1,1 chồi/mẫu cây) so với bản lá 76,5% tạo mô sẹo và 0,54 chồi/mẫu cây sau 20 tuần nuôi cấy.

Môi trường MS/2 không có chất điều hòa sinh trưởng, bổ sung 1,5% đường sucrose, 5,5 g/l agar là môi trường tối ưu nhất để thu chồi bình thường từ các chồi mọng nước tái sinh qua mô sẹo với tỉ lệ 84,84% chồi mọng nước được phục hồi bình thường sau 6 tuần nuôi cấy.

Môi trường thích hợp nhất để tái sinh và nhân chồi từ chồi ngọn là MS bổ sung 0,5 mg/l BAP + 0,1 mg/l NAA + 3% đường sucrose + 5,5 g/l agar, pH 5,8. Hệ số nhân chồi đạt 4,38 (lần) sau 4 tuần nuôi cấy.

Môi trường tối ưu nhất để tạo rễ cho chồi tái sinh là môi trường MS/4 bổ sung tổ hợp auxin IBA 0,5 mg/l và IAA 0,25 mg/l, 1% đường sucrose + 5,5 g/l agar. 62% chồi được tạo rễ trên môi trường này sau 4 tuần nuôi cấy. 68% cây sống, sinh trưởng và phát triển tốt sau 8 tuần trong bầu đất chứa tỉ lệ đất và mùn (1:1) ở nhà kính.

Lời cảm ơn: *Tập thể tác giả xin cảm ơn Viện Dược liệu (Đại học Tổng hợp Basel, Thụy Sĩ) đã cung cấp vật liệu cho nghiên cứu này, Quỹ học bổng Liên bang Thụy Sĩ đã tài trợ kinh phí cho cán bộ Viện Di truyền Nông nghiệp thực tập khoa học tại Viện Dược liệu, Đại học Tổng hợp Basel, Thụy Sĩ.*

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Anonymous (1988) The Wealth of India, a dictionary of Indian raw materials and industrial products. Publications and information Directorate, Council of scientific and Industrial Research, New Delhi 2: 203-209.
- Blaschek W, Honsel R, Keller K, Reichling J, Rimpler H, Schneider G (1998) Drogen A-K (Forlgeband 2). Springer.
- De Fossard RA, Myint A, Lee ECM (1974) A broad spectrum tissue culture experiment with tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) pith callus. *Physiol Plant* 31: 125-130.
- Edgard ATP, Wagner CO, Maira LF, Soonia MBC, Raul SA, Eldo AMS, Carlos RC, Elizabeth PBF (2001) Hyperhydricity in *in vitro* eggplant regeneration plants: structural characteristics and involvement of BiP (Binding protein). *Plant Sci* 160(5): 857-868.
- Gamborg OL, Miller RA, Ojima K (1968) Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp Cell Res* 50: 151-158.
- George EF (1996) Plant propagation by tissue culture, Part 2: In practice. Exegitcs, Edington, England: 654-669.
- Lloyd G, McCown B (1980) Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. *International Plant Propagators Society. Proceedings* 30: 421-427.
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15: 473-497.
- Pachnanda VK, Shashikant V, Singh GB, Gupta OP, Atal CK (1980) Chemical evaluation of salai guggal in patients of arthritis. *Ind J Pharmacol Soc* 13: 63.
- Purohit SD, Tak K, Kukda G (1995) *In vitro*

propagation of *Boswellia serrata* Roxb. *Biol Plant* 37: 335-340.

Sunnichan VG (1998) Reproductive biology of two

forest trees of India: *Sterculia urens* (Gum karaya) and *Boswellia serrata* (Salai gugul). PhD thesis. University of Delhi.

IN VITRO PLANT REGENERATION OF *BOSWELLIA SERRATA* ROXB

Nguyen Van Khiem¹, Le Huy Ham^{1,*}, Do Nang Vinh¹, Bernd Buter²

¹Institute of Agricultural Genetics

²VitaPlant GmbH

SUMMARY

B. serrata is a woody medicinal aromatic tree species. It is one of the most important gum and gum-resin yielding forest tree species in the world. Gum-resin is used in calico-printing and textile industry, in the manufacture of agarbattis for worship or in social ceremonies, and perfume. In recent years, gum-resin of *B. serrata* has found out an important use in pharmaceutical formulations for relieving pains and aches, particularly associated with arthritis, and for treatment of other diseases such as leukemia, rheumatism, ulcers, tumours, diarrhoea and dysentery, and skin diseases.

Protocol for *in vitro* plant regeneration of exotic *B. serrata* has been developed using leaf, petiole, apical shoot and nodal explants of 5 month old seedlings growing in the green house.

Leaf and petiole explants were surface-sterilised and cultured on MS (1962) medium supplemented 0.02 mg/l TDZ, 0.05 mg/l NAA, 3% sucrose, 2.5 g/l phytagel for callus induction and proliferation and shoot regeneration. Calli were induced from 84.29% of petiole explant and 76.5% of leaf explant after 4 weeks of culture. Average of 1.1 shoots and 0.54 shoot were developed per petiole and leaf explant after 20 weeks of culture, respectively. Most of regenerated shoots were hyperhydric. They were inoculated in Petri dishes containing MS/2 medium, 1.5% sucrose for more growth shoots. Non-hyperhydric shoots with frequency of 84.84% were obtained by shoot subculture on culture bottles containing MS/2 medium, 1.5% sucrose after 6 weeks of inoculation.

Apical shoots and nodal explant were surface-sterilised and cultured on MS (1962) medium supplemented 0.5 mg/l BAP, 0.1 mg/l NAA, 3% sucrose, and 5.5 g/l agargel for shoot proliferation. Shoot multiplication rate reaches 4.38 fold after 4 weeks of culture. 62 % of regenerated shoots were rooted after 4 weeks of culture on MS/4 medium supplemented 0.5 mg/l IBA and 0.25 mg/l IAA, 1% sucrose, 5.5 g/l agargel. All cultures were maintained in the RUMED chamber at 32°C, 1200 lux, 14 h light: 8 h dark. Whole plants were transferred to greenhouse with survival rate of 68% after 8 weeks.

Keywords: *Boswellia serrata*, callus, leaf explant, petiole explant, plant regeneration, TDZ, tissue culture

* Author for correspondence: Tel: 84-4-7542023; Fax: 84-4-7543196; E-mail: lhham@agi.ac.vn