

STUDY ON *IN VITRO* REGENERATION SYSTEM AND HAIRY ROOT INDUCTION IN CHINESE ACONITE (*ACONITUM CARMICHAELII* DEBEAUX) PLANT

Hoang Thi Thu Hoan^{1,2}, Tran Thi Hong¹, Nguyen Huu Quan¹, Nguyen Thi Ngoc Lan^{1*}, Chu Hoang Mau¹

¹TNU - University of Education

²Tan Trao University, Tuyen Quang

ARTICLE INFO	ABSTRACT
<p>Received: 11/3/2021</p> <p>Revised: 18/4/2021</p> <p>Published: 23/4/2021</p>	<p>In this study, Chinese aconite (<i>Aconitum carmichaelii</i> Debeaux), a precious medicinal plant, collected from Quan Ba, Ha Giang province, Vietnam, was investigated for in vitro regeneration and hairy root induction. The optimal medium for multi-shoot induction from stem segments was MS + 30 g L⁻¹ saccharose + 9 g L⁻¹ agar + 1.5 mg L⁻¹ BAP with the result of 4.57 shoots per explants. The maximum roots per shoot after 8 weeks of culture was achieved with MS medium supplemented with 0.5 mg L⁻¹ IBA at 2.70 ± 0.04 (roots /a shoot). Hairy roots were produced from root explants of <i>A. carmichaelii</i> infected by <i>Agrobacterium rhizogenes</i> strain ATTC 15834 and cultured on MS + 30 g L⁻¹ saccharose + 500 mg L⁻¹ cefotaxime + 100 µmol L⁻¹ AS. The highest fresh weight of hairy roots was obtained in liquid medium under shaking conditions, with 3.22 g of fresh weight. After 6 weeks, the hairy root mass was increased 5.85-fold compared to the initial mass. In vitro regeneration system will be used for gene expression analysis, and hairy root lines will be used to obtain bioactive compounds.</p>
<p>KEYWORDS</p> <p><i>Aconitum carmichaelii</i></p> <p>Hairy root induction</p> <p><i>In vitro</i> regeneration.</p> <p>Multiple shoots</p> <p>Stem segments</p>	

NGHIÊN CỨU HỆ THỐNG TÁI SINH *IN VITRO* VÀ CẢM ỨNG RỄ TƠ Ở CÂY Ô ĐÀU (*ACONITUM CARMICHAELII* DEBEAUX)

Hoàng Thị Thu Hoàn^{1,2}, Trần Thị Hồng¹, Nguyễn Hữu Quân¹, Nguyễn Thị Ngọc Lan^{1*}, Chu Hoàng Mậu¹

¹Trường Đại học Sư phạm - ĐH Thái Nguyên

²Trường Đại học Tân Trào, Tuyên Quang

THÔNG TIN BÀI BÁO	TÓM TẮT
<p>Ngày nhận bài: 11/3/2021</p> <p>Ngày hoàn thiện: 18/4/2021</p> <p>Ngày đăng: 23/4/2021</p>	<p>Trong nghiên cứu này, loài Ô đầu (<i>Aconitum carmichaelii</i> Debeaux), một cây dược liệu quý, thu thập từ Quan Ba, tỉnh Hà Giang, Việt Nam được khảo sát khả năng tái sinh <i>in vitro</i> và cảm ứng rễ tơ. Môi trường tối ưu cho cảm ứng đa chồi từ đoạn thân là MS + saccharose 30 g L⁻¹ + agar 9 g L⁻¹ + BAP 1,5 mg L⁻¹ cho 4,57 chồi/mẫu cấy. Số rễ tối đa trên mỗi chồi sau 8 tuần nuôi cấy đạt được ở môi trường MS có bổ sung IBA 0,5 mg L⁻¹ là 2,70 ± 0,04 (rễ /chồi). Rễ tơ được tạo ra từ đoạn rễ <i>in vitro</i> sau khi được nhiễm bởi <i>Agrobacterium rhizogenes</i> ATTC 15834 và nuôi cấy trên MS + saccharose 30 g L⁻¹ + cefotaxime 500 mg L⁻¹ + AS 100 µmol L⁻¹. Khối lượng rễ tơ tươi cao nhất thu được trong môi trường lỏng ở điều kiện nuôi lắc là 3,22 g. Sau 6 tuần, khối lượng rễ tơ đã tăng gấp 5,85 lần so với khối lượng ban đầu. Hệ thống tái sinh <i>in vitro</i> sẽ được sử dụng trong phân tích biểu hiện gen, và các dòng rễ tơ sẽ được sử dụng để thu nhận các hợp chất có hoạt tính sinh học.</p>
<p>TỪ KHÓA</p> <p><i>Aconitum carmichaelii</i></p> <p>Cảm ứng rễ tơ</p> <p>Đa chồi</p> <p>Đoạn thân</p> <p>Tái sinh <i>in vitro</i></p>	

* Corresponding author. Email: ntnlan.dhsptn@tnu.edu.vn

1. Giới thiệu

Việt Nam được biết đến là một quốc gia đa dạng sinh học, nơi có tiềm năng cao về nguồn dược liệu. Do áp lực khai thác không bền vững để đáp ứng nhu cầu dược liệu ngày càng cao, nhiều loài cây thuốc quý đã bị đe dọa và đang biến mất với tốc độ nhanh. Loài Ô đầu (*A. carmichaelii*) thuộc chi *Aconitum*, họ Ranunculaceae, thường mọc hoang trên các vùng núi cao phía Bắc Việt Nam [1], nhưng hiện nay rất khó tìm thấy cây Ô đầu trong tự nhiên. Ô đầu là loại dược liệu quý trong y học cổ truyền phương Đông. Các hợp chất trong Ô đầu như aconitin, flavonoid, polysaccharid và các axit hữu cơ khác chủ yếu tập trung ở rễ và củ. Các chất này có tác dụng giảm đau, chống oxy hóa, tăng cường miễn dịch, chúng cũng có thể ngăn chặn sự gia tăng của tế bào ung thư và sự phá hủy do chất pentobarbital natri gây ra trong tế bào cơ tim [2]-[5]. Ngoài ra, cây Ô đầu được người dân địa phương trồng rộng rãi và theo truyền thống như một loại rau ăn củ ở Trung Quốc [6]. Ở Việt Nam, cháo Ô đầu là món ăn ưa thích của người miền núi phía Bắc Việt Nam và hiện nay, Ô đầu được trồng để chiết xuất các hợp chất có hoạt tính sinh học và cung cấp nguyên liệu để làm dược phẩm [7]. Vì vậy, thiết lập hệ thống tái sinh *in vitro* và cảm ứng tạo rễ tơ được quan tâm nhiều hơn cho mục đích tăng thu nhận các chất có hoạt tính sinh học. Một số loài thuộc chi *Aconitum* đã được nhân giống *in vitro* thành công như *Aconitum balfourii* [8], *Aconitum heterophyllum* [9], *Aconitum violaceum* [10] và *Aconitum ferox* [11]. Tuy nhiên, đến nay chưa tìm được báo cáo về kết quả tái sinh đa chồi và nuôi cấy rễ tơ ở cây Ô đầu được công bố. Nghiên cứu này trình bày kết quả khảo sát khả năng tái sinh *in vitro* phục vụ chuyển gen và cảm ứng rễ tơ ở cây Ô đầu.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu thực vật để nuôi cấy *in vitro* và khử trùng mẫu

Củ Ô đầu thu tại huyện Quán Bạ, tỉnh Hà Giang được trồng trong chậu tại vườn thí nghiệm Khoa Sinh học, Trường Đại học Sư phạm - Đại học Thái Nguyên. Khi cây Ô đầu được 4 - 7 đốt thân, tiến hành thu các đoạn thân chứa đốt để sử dụng làm mẫu cây (Hình 1). Mẫu cây được ngâm trong xà phòng loãng trong 15 - 30 phút, tráng bằng nước cất vô trùng. Sau đó mẫu cây được khử trùng bằng cồn 70% trong 2 phút và tráng bằng nước cất vô trùng. Tiếp tục khử trùng bề mặt bằng $HgCl_2$ 0,1% (w/v) trong 3, 5, 7, 9 và 11 phút. Cuối cùng mẫu cây được rửa lại 3 - 4 lần bằng nước cất vô trùng.



Hình 1. Cây Ô đầu trồng từ củ thu tại huyện Quán Bạ, tỉnh Hà Giang tại vườn thí nghiệm Khoa Sinh học, Trường Đại học Sư phạm - Đại học Thái Nguyên (Ảnh chụp của tác giả)

2.2. Thiết lập hệ thống nuôi cấy và cảm ứng tạo đa chồi

Các đoạn thân mang mắt được tái sinh trên môi trường MS cơ bản [12], bổ sung kích thích sinh trưởng. Tái sinh *in vitro* trong điều kiện của phòng nuôi cấy với nhiệt độ $25 \pm 2^\circ\text{C}$ và độ ẩm 60 - 80%, dưới cường độ chiếu sáng 2000 lux, với chu kỳ quang 16 giờ. Tái sinh đa chồi trong môi trường MS cơ bản bổ sung saccharose 30g L^{-1} và agar 9g L^{-1} cùng BAP và kinetin (Kin) với các nồng độ từ 0,5 đến $2,0\text{mg L}^{-1}$. Các mẫu đối chứng được nuôi cấy trên môi trường MS cơ bản bổ sung saccharose 30g L^{-1} và agar 9g L^{-1} , không có BAP và Kin. Mỗi thí nghiệm nuôi cấy được thực hiện trên 30 mẫu. Đánh giá khả năng tạo chồi sau 2, 4, 6, 8 tuần nuôi cấy.

2.3. Tạo rễ *in vitro*

Các chồi sinh trưởng và đạt kích thước khoảng 2 - 3 cm, có 3 - 5 lá được chuyển trên môi trường tạo rễ (MS cơ bản bổ sung saccharose 30g L^{-1} và agar 9g L^{-1} và IAA hoặc IBA dao động từ 0,3 đến $0,9\text{mg L}^{-1}$). Khả năng cảm ứng tạo rễ *in vitro* được đánh giá sau 4, 6, 8 tuần nuôi cấy.

2.4. Cầm ứng rễ tơ

Lá, cuống lá, đoạn rễ của cây Ô đầu *in vitro* sau 4 tuần nuôi cấy được dùng làm nguyên liệu để tạo rễ tơ. Chủng *A. rhizogenes* ATTC 15834 được nuôi phục hồi bằng nuôi cấy trên môi trường rắn trong 48 giờ ở 28°C , sau đó các khuẩn lạc đơn lẻ được chuyển sang nuôi lắc trong môi trường LB lỏng ở 28°C với 200 vòng/phút lắc trong 16 giờ. Dung dịch *A. rhizogenes* ATTC 15834 được ly tâm để thu sinh khối. Hỗn dịch của chủng *A. rhizogenes* ATTC 15834 được pha loãng với môi trường MS0 lỏng và xác định mật độ vi khuẩn bằng máy quang phổ ở bước sóng 600 nm, sau đó thêm acetosyringone (AS) 100mmol L^{-1} . Các mẫu cấy được gây tổn thương và ngâm trong dung dịch *A. rhizogenes* trong 15 phút và lắc nhẹ, sau đó chuyển sang môi trường đồng nuôi cấy (môi trường MS + 30g L^{-1} saccharose) trong tối trong 2 ngày. Tiếp theo, các mẫu cấy được chuyển sang môi trường rắn MS0 có bổ sung cefotaxime 500mg L^{-1} (MS + saccharose 30g L^{-1} + cefotaxime 500mg L^{-1}). Các mẫu được ủ ở 28°C trong tối trong 6 tuần. Rễ tơ được nuôi tăng trưởng trong môi trường MS với các trạng thái khác nhau bao gồm rắn (0,9% thạch), bán lỏng (0,45% thạch) và lỏng (không có thạch) để khảo sát khả năng sinh trưởng của chúng.

Môi trường nuôi cấy có pH = 5,8 được giữ ở $25 \pm 2^\circ\text{C}$, trong chu kỳ quang 14 h với cường độ ánh sáng 2000 - 2500 lux. Rễ tơ sau khi thu hoạch được sấy khô đến khối lượng không đổi và cân để xác định khối lượng khô.

2.5. Phân tích số liệu

Các số liệu được xử lý thống kê bằng phần mềm SPSS, sử dụng Test Duncan với $P < 0,05$.

3. Kết quả và thảo luận

3.1. Thiết lập môi trường nuôi cấy, cầm ứng tạo chồi và rễ *in vitro* ở cây Ô đầu

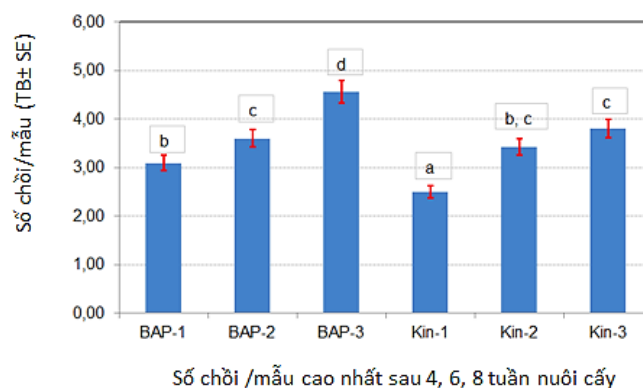
Các đoạn thân Ô đầu được khử trùng bề mặt bằng 0,1% (w/v) HgCl_2 trong 9 phút. Kết quả tái sinh đã chồi được trình bày ở bảng 1. Bảng 1 cho thấy, số lượng chồi/mẫu cấy cao nhất sau 4, 6 và 8 tuần nuôi cấy trên môi trường MS được bổ sung BAP $1,5\text{mg L}^{-1}$ tương ứng là $3,10 \pm 0,15$; $3,60 \pm 0,13$; $4,57 \pm 0,14$ (chồi/mẫu) ($P < 0,05$). Trong khi ở công thức thí nghiệm bổ sung Kin, số lượng chồi cao nhất đạt được là $2,50 \pm 0,12$; $3,43 \pm 0,16$ và $3,80 \pm 0,14$ (chồi/mẫu) sau 4, 6 và 8 tuần nuôi cấy trên môi trường MS được bổ sung Kin $1,0\text{mg L}^{-1}$ ($P < 0,05$).

Như vậy, môi trường MS bổ sung saccharose 30g L^{-1} + agar 9g L^{-1} + BAP $1,5\text{mg L}^{-1}$ cho số lượng chồi/mẫu cấy là cao nhất sau 8 tuần nuôi cấy ($4,57 \pm 0,14$). Trong số hai cytokinin được thử nghiệm, BAP cho hiệu quả tạo chồi cao hơn Kin ($P < 0,05$) (Hình 2).

Bảng 1. Ảnh hưởng của BAP và Kin đến cảm ứng tạo chồi từ đoạn thân Ó đầu

BAP			Kin		
BAP (mg L ⁻¹)	Số chồi/mẫu $\bar{X} \pm SE$	Chất lượng chồi	Kin (mg L ⁻¹)	Số chồi/mẫu $\bar{X} \pm SE$	Chất lượng chồi
Sau 4 tuần					
0,0	1,07 ^a ± 0,05	+	0,0	1,13 ^A ± 0,06	+
0,5	1,63 ^b ± 0,10	++	0,5	1,53 ^B ± 0,06	++
1,0	1,93 ^c ± 0,12	++	1,0	2,50 ^C ± 0,12	+++
1,5	3,10 ^d ± 0,15	+++	1,5	1,67 ^B ± 0,09	++
2,0	2,07 ^c ± 0,10	+	2,0	1,57 ^B ± 0,10	+
Sau 6 tuần					
0,0	1,33 ^a ± 0,09	+	0,0	1,50 ^A ± 0,09	+
0,5	2,00 ^b ± 0,12	+	0,5	2,10 ^B ± 0,11	+
1,0	2,57 ^c ± 0,10	++	1,0	3,43 ^D ± 0,16	+++
1,5	3,60 ^d ± 0,13	+++	1,5	2,70 ^C ± 0,10	++
2,0	2,50 ^c ± 0,09	++	2,0	2,60 ^C ± 0,09	++
Sau 8 tuần					
0,0	1,80 ^a ± 0,10	+	0,0	1,87 ^A ± 0,08	+
0,5	2,67 ^b ± 0,10	+	0,5	2,57 ^B ± 0,10	+
1,0	3,13 ^c ± 0,10	++	1,0	3,80 ^D ± 0,14	+++
1,5	4,57 ^d ± 0,14	+++	1,5	3,20 ^C ± 0,09	++
2,0	3,10 ^c ± 0,10	++	2,0	3,00 ^C ± 0,11	++

Ghi chú: $\bar{X} \pm SE$: Số trung bình \pm sai số chuẩn; +++: Chồi tái sinh sinh trưởng mạnh, màu xanh đậm, hình thái bình thường; ++: Chồi tái sinh sinh trưởng khá, có màu xanh lục và hình thái bình thường; +: Các chồi tái sinh sinh trưởng kém và có màu xanh nhạt với các lá nhỏ. Các chữ cái khác nhau trong mỗi cột chỉ ra sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($P < 0,05$) được Test bằng Duncan; $n = 30$.



Hình 2. Biểu đồ so sánh khả năng tạo chồi đa chồi sau 4, 6, 8 tuần nuôi cấy trên môi trường MS có bổ sung BAP 1,5 mg L⁻¹ và Kin 1,0 mg L⁻¹. **BAP-1:** BAP 1,5 mg L⁻¹ sau 4 tuần; **BAP-2:** BAP 1,5 mg L⁻¹ sau 6 tuần; **BAP-3:** BAP 1,5 mg L⁻¹ sau 8 tuần; **Kin-1:** Kin 1,0 mg L⁻¹ sau 4 tuần; **Kin-2:** Kin 1,0 mg L⁻¹ sau 6 tuần; **Kin-3:** Kin 1,0 mg L⁻¹ sau 8 tuần. Các chữ cái khác nhau phía trên các cột chỉ ra sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($P < 0,05$) được kiểm tra bằng Duncan; $n = 30$.

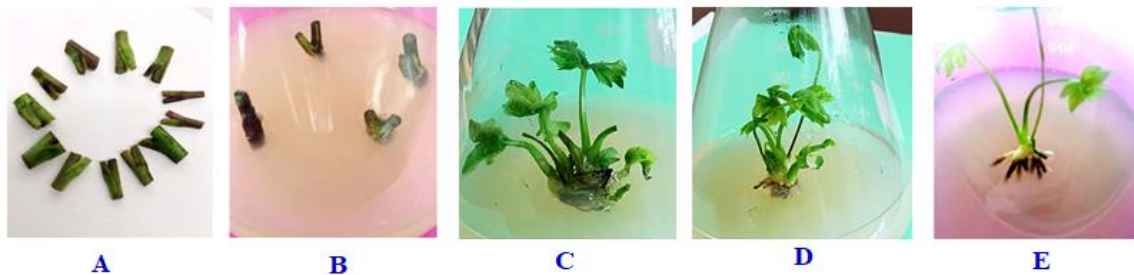
Trong nghiên cứu cảm ứng tạo rễ, hiệu quả của IBA và α -NAA trong cảm ứng tạo rễ đã được khảo sát. Các chồi tái sinh được chuyển sang môi trường MS, bổ sung IBA và α -NAA ở các nồng độ khác nhau. Trong số các nồng độ IBA khác nhau được thử nghiệm, kết quả cho thấy sau 8 tuần nuôi cấy, số lượng rễ cao nhất trên môi trường MS được bổ sung IBA 0,5 mg L⁻¹ ($3,60 \pm 0,16$ rễ/chồi), rễ có kích thước dài, dày và phân nhiều nhánh; trong khi ở môi trường MS có bổ sung α -NAA 0,7 mg L⁻¹ có số rễ/chồi cao nhất là $3,07 \pm 0,07$ (Bảng 2).

Bảng 2. Ảnh hưởng của α -NAA và IBA đến cảm ứng tạo rễ từ chồi Ô đầu

α -NAA (mg L ⁻¹)	Số rễ/chồi $\bar{X} \pm SE$	Chất lượng rễ	IBA (mg L ⁻¹)	Số rễ/chồi $\bar{X} \pm SE$	Chất lượng rễ
Sau 4 tuần					
0,0	0		0,0	0	
0,3	0,60 ± 0,13	+	0,3	0,60 ± 0,13	+
0,5	1,13 ± 0,13	++	0,5	1,87 ± 0,17	++
0,7	1,40 ± 0,16	+++	0,7	1,40 ± 0,17	+
0,9	1,07 ± 0,15	+	0,9	1,20 ± 0,11	+
Sau 6 tuần					
0,0	0		0,0	0	
0,3	1,07 ± 0,12	++	0,3	1,20 ± 0,20	++
0,5	2,33 ± 0,25	++	0,5	2,53 ± 0,13	+++
0,7	2,40 ± 0,13	+++	0,7	1,47 ± 0,19	++
0,9	1,27 ± 0,12	+	0,9	1,93 ± 0,15	+
Sau 8 tuần					
0,0	0		0,0	0	
0,3	1,53 ± 0,17	++	0,3	1,73 ± 0,21	++
0,5	2,73 ± 0,12	++	0,5	3,60 ± 0,16	+++
0,7	3,07 ± 0,07	+++	0,7	2,27 ± 0,15	++
0,9	1,87 ± 0,17	++	0,9	2,87 ± 0,13	+

Ghi chú: $\bar{X} \pm SE$: Số trung bình \pm sai số chuẩn; +++: Rễ tái sinh dài, dày và phân nhánh nhiều; ++: Rễ tái sinh dài, mảnh và ít phân nhánh; +: Rễ tái sinh ngắn và mảnh.

Như vậy, môi trường thích hợp cho tái sinh đa chồi từ đoạn thân Ô đầu là MS bổ sung BAP 1,5 mg L⁻¹ hoặc Kin 1,0 mg L⁻¹. Tuy nhiên, môi trường MS + saccharose 30 g L⁻¹ + agar 9 g L⁻¹ + BAP 1,5 mg L⁻¹ cho số chồi/ mẫu nhiều hơn môi trường MS + saccharose 30 g L⁻¹ + agar 9 g L⁻¹ + Kin 1,0 mg L⁻¹. Môi trường thích hợp cảm ứng tạo rễ của cây *in vitro* là MS bổ sung IBA 0,5 mg L⁻¹ và MS có bổ sung α -NAA 0,7 mg L⁻¹ (Hình 3).



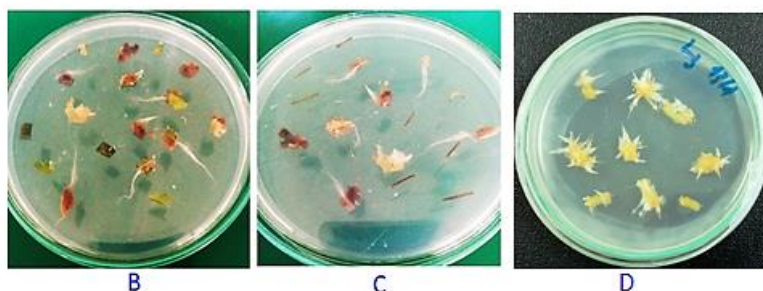
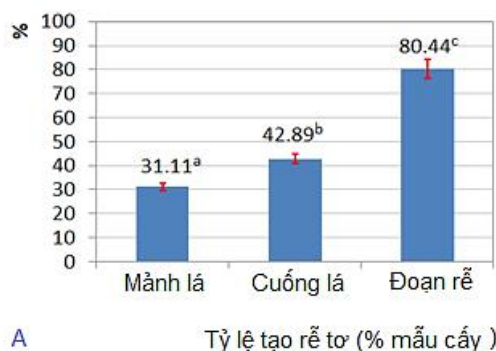
Hình 3. Cảm ứng tạo đa chồi từ đoạn thân và tạo cây Ô đầu *in vitro*. A: Các đoạn thân đã được khử trùng; B: Mẫu cây trên môi trường đặc; C: MS + saccharose 30 g L⁻¹ + agar 9 g L⁻¹ + BAP 1,5 mg L⁻¹; D: MS + saccharose 30 g L⁻¹ + agar 9 g L⁻¹ + Kin 1,0 mg L⁻¹. E: Cảm ứng tạo rễ từ chồi tái sinh trên môi trường MS + saccharose 30 g L⁻¹ + agar 9 g L⁻¹ + IBA 0,5 mg L⁻¹.

Để tạo sinh khối cây thuốc, phương pháp nhân bản vô tính *in vitro* từ mẫu cây đã được phát triển. Các đoạn thân mang đốt chứa mô phân sinh được sử dụng làm mẫu cây [13], hoặc tái sinh từ mô sẹo [8], [11]. Đối với một số loài thuộc chi *Aconitum*, đã có một số kết quả nghiên cứu về nuôi cấy *in vitro* được báo cáo. Trong báo cáo của Rawat và cs (2013), một hệ thống tái sinh *in vitro* của cây *Aconitum violaceum* đã được phát triển từ các đoạn thân mang đốt. Sự cảm ứng tạo chồi đạt được trên môi trường MS cơ bản bổ sung BAP 0,5 μ M và α -NAA 0,1 μ M với tỷ lệ tái sinh thành công khoảng 85,43% [10]. Singh và cs (2019) đã có báo cáo đầu tiên về việc nhân

giống *in vitro* cây *Aconitum ferox*, một loại cây thuốc đang bị đe dọa tuyệt chủng ở vùng Himalaya. Chóp rễ *A. ferox* được sử dụng tạo mô sẹo và các chồi được tạo ra từ mô sẹo khi chuyển sang môi trường MS có bổ sung BAP [11]. Trong nghiên cứu của chúng tôi, đa chồi được tái sinh từ các đoạn thân mang đốt của cây Ô đầu (*A.carmichaelii*) trên môi trường MS cơ bản bổ sung BAP 1,5 mg L⁻¹ (MS + saccharose 30 g L⁻¹+ agar 9 g L⁻¹+ BAP 1,5 mg L⁻¹), đạt trung bình 4,57 chồi/mẫu.

3.2. Cảm ứng tạo rễ *in vitro* ở cây Ô đầu

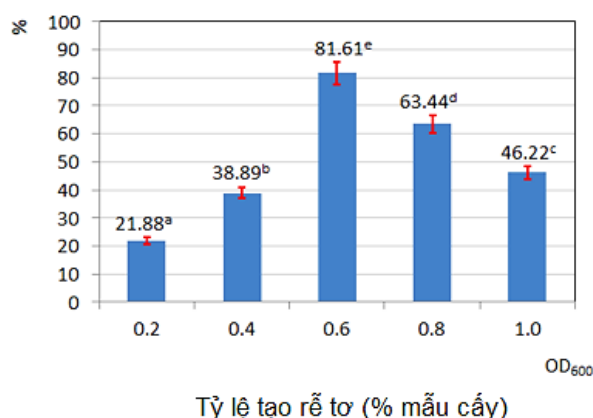
Các mảnh lá, cuống lá và đoạn rễ của cây Ô đầu *in vitro* được lây nhiễm bởi chủng *A. rhizogenes* ATTC 15834, kết quả cho thấy trong 3 loại mẫu cấy, sau 6 tuần đoạn rễ có tỷ lệ tạo rễ tơ cao nhất (80,44% mẫu cấy) với $P < 0,05$ (Hình 4).



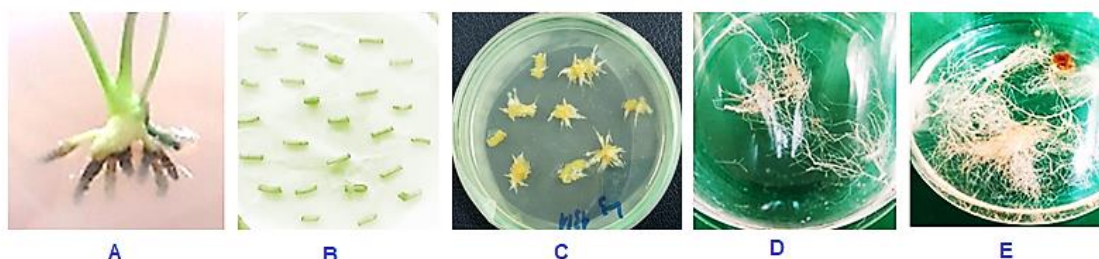
Hình 4. A: Tỷ lệ tạo rễ tơ của mẫu cấy từ mảnh lá, cuống lá và đoạn rễ được lây nhiễm bởi chủng *A. rhizogenes* ATTC 15834 ($OD_{600} = 0,6$ và $AS\ 100\ \mu\text{mol}\ L^{-1}$) trong 15 phút và đồng nuôi cấy trong 3 ngày. Các thanh dọc trên các cột thể hiện sai số tiêu chuẩn (SE); các số trên các cột là tỷ lệ tạo rễ tơ (% mẫu cấy). Các chữ cái khác nhau phía trên các cột chỉ ra sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($P < 0,05$) được kiểm tra bằng Duncan; $n = 30$. B: Rễ tơ hình thành từ các mảnh lá; C: Rễ tơ hình thành từ cuống lá; D: Rễ tơ hình thành từ các đoạn rễ.

Khảo sát các giá trị OD_{600} (0,2, 0,4, 0,6, 0,8, 1,0) với AS 100 $\mu\text{mol}\ L^{-1}$, thời gian nhiễm khuẩn là 15 phút và sau đó là đồng nuôi cấy trong 3 ngày, kết quả đã xác định được mật độ *A. rhizogenes* ATTC 15834 thích hợp để tạo rễ tơ từ các đoạn rễ *in vitro* là $OD_{600} = 0,6$, đạt 81,61% mẫu cấy tạo rễ tơ ($P < 0,05$) (Hình 5).

Như vậy, điều kiện thích hợp cho cảm ứng tạo rễ tơ ở cây Ô đầu từ các đoạn rễ *in vitro* thông qua lây nhiễm chủng *A. rhizogenes* ATTC 15834 là $OD_{600} = 0,6$, thời gian nhiễm là 15 phút sau đó được đồng nuôi cấy trong 3 ngày trên MS + saccharose 30 g L⁻¹ + cefotaxime 500 mg L⁻¹ được bổ sung với 1 AS 00 $\mu\text{mol}\ L^{-1}$. Hình 6 mô tả tóm tắt quá trình cảm ứng tạo rễ tơ và nhân sinh khối rễ tơ.



Hình 5. Cảm ứng tạo rễ tơ từ các đoạn rễ *in vitro* được lây nhiễm *A. rhizogenes* trong thời gian 6 tuần tại giá trị $OD_{600} = 0,6$ và $AS\ 100\ \mu\text{mol}\ L^{-1}$ trong 15 phút, đồng nuôi cấy trong 3 ngày. Các thanh dọc trên các cột thể hiện sai số chuẩn; các số trên các cột là tỷ lệ tạo rễ tơ (% mẫu cấy). Các chữ cái khác nhau phía trên các cột chỉ ra sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($P < 0,05$) được kiểm tra bằng Duncan; $n = 30$.



Hình 6. Cảm ứng tạo rễ tơ trong môi trường MS0 từ các đoạn rễ của cây Ô đầu *in vitro*. A: Rễ cây Ô đầu *in vitro*; B: Các đoạn rễ được nhiễm chủng *A. rhizogenes* ATTC 15834 trên môi trường đồng nuôi cấy; C: Các dòng rễ tơ sau 6 tuần; D: Rễ tơ 4 tuần nhân sinh khối trong môi trường lỏng chứa cefotaxime $500\ \text{mg}\ L^{-1}$; E: Rễ tơ 6 tuần tuổi trong môi trường lỏng.

Khảo sát môi trường nhân nuôi sinh khối rễ tơ ở trạng thái rắn, nửa lỏng và lỏng trong điều kiện nuôi lác sau 6 tuần cho thấy rễ tơ mọc trên môi trường lỏng có sinh khối cao nhất (3,22 g khối lượng tươi), tiếp theo là môi trường nửa lỏng (2,26 g khối lượng tươi) và cuối cùng là môi trường rắn (1,64 g khối lượng tươi). So với khối lượng ban đầu, sau 6 tuần, khối lượng rễ tơ được tạo ra trong môi trường lỏng, nửa lỏng và rắn lần lượt tăng 5,85 lần, 4,11 lần và 2,98 lần. Khối lượng rễ tơ khô trong môi trường nuôi lác lỏng là 0,339 g, đối với g, ở môi trường bán lỏng là 0,213 g và môi trường rắn chỉ đạt 0,151 g (Bảng 3).

Bảng 3. Sự tăng sinh khối rễ tơ Ô đầu sau 6 tuần trên môi trường rắn, bán lỏng và lỏng nuôi lác

Môi trường	Tăng sinh khối rễ tơ sau 6 tuần			Khối lượng rễ tơ sau 6 tuần (g khối lượng khô)
	Khối lượng rễ tơ ban đầu (g khối lượng tươi)	Khối lượng rễ tơ sau 6 tuần (g khối lượng tươi)	Tỷ lệ tăng (lần)	
Lỏng	0.55	$3.22^a \pm 0.33$	5.85	$0.339^A \pm 0.013$
Bán lỏng	0.55	$2.26^b \pm 0.02$	4.11	$0.213^B \pm 0.006$
Rắn	0.55	$1.64^c \pm 0.04$	2.98	$0.151^C \pm 0.002$

Ghi chú: Các chữ cái khác nhau trong mỗi cột chỉ ra sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($P < 0,05$) được kiểm tra bằng Duncan; $n = 30$.

4. Kết luận

Trong nghiên cứu này, đoạn thân mang đốt là vật liệu thích hợp cho cảm ứng tạo đa chồi *in vitro* ở cây Ô đầu. Môi trường thích hợp cho cảm ứng đa chồi là MS + saccharose 30 g L⁻¹ + agar 9 g L⁻¹ bổ sung BAP 1,5 mg L⁻¹ hoặc Kin 1,0 mg L⁻¹. Môi trường ra rễ thích hợp là MS bổ sung IBA 0,5 mg L⁻¹ hoặc α -NAA 0,7 mg L⁻¹. Vật liệu thích hợp cho cảm ứng tạo rễ tơ là đoạn rễ của cây Ô đầu *in vitro* trên môi trường MS + saccharose 30 g L⁻¹ + cefotaxime 500 mg L⁻¹ + AS 100 μ mol L⁻¹. Khối lượng rễ tơ tươi cao nhất sau 6 tuần là 3,22 g nuôi trong môi trường lỏng ở điều kiện lắc, tăng gấp 5,85 lần so với khối lượng ban đầu.

Lời cảm ơn

Nghiên cứu này được tài trợ bởi Bộ Giáo dục và Đào tạo thông qua đề tài cấp Bộ mã số B2020-TNA-11. Các tác giả xin chân thành cảm ơn sự hỗ trợ này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO/ REFERENCES

- [1] T. L. Do, *Vietnamese medicinal plants and medicine taste*. Medical Publishing House, Hanoi, 2004.
- [2] L. Xiong, C. Peng, X. F. Xie, L. Guo, C. J. He, Z. Geng, F. Wan, O. Dai, and Q. M. Zhou, "Alkaloids isolated from the lateral root of *Aconitum carmichaelii*," *Molecules*, vol. 17, pp. 9939-9946, 2012, doi: 10.3390/molecules17089939.
- [3] G. Zhou, L. Tang, X. Zhou, T. Wang, Z. Kou, and Z. Wang, "A review on phytochemistry and pharmacological activities of the processed lateral root of *Aconitum carmichaelii* Debeaux," *J. Ethnopharmacol.*, vol. 160, pp. 173-193, 2015, doi: 10.1016/j.jep.2014.11.043.
- [4] W. Xu, M. Zhang, H. Liu, K. Wei, M. He, X. Li, D. Hu, S. Yang, and Y. Zheng, "Antiviral activity of aconite alkaloids from *Aconitum carmichaelii* Debx.," *Nat Prod Res.*, vol. 33, pp. 1486-1490, 2019, doi: 10.1080/14786419.2017.1416385.
- [5] Y. N. He, S. P. Ou, X. Xiong, Y. Pan, J. Pei, R. C. Xu, F. N. Geng, L. Han, D. K. Zhang, and M. Yang, "Stems and leaves of *Aconitum carmichaelii* Debx. as potential herbal resources for treating rheumatoid arthritis: Chemical analysis, toxicity and activity evaluation," *Chin. J. Nat. Med.*, vol. 16, pp. 644-652, 2018, doi: 10.1016/S1875-5364(18)30104-3.
- [6] Y. Kang, L. J. Luczaj, and S. Ye, "The highly toxic *Aconitum carmichaelii* Debeaux as a root vegetable in the Qinling Mountains (Shaanxi, China)," *Genet. Resour. Crop. Evol.*, vol. 59, pp. 1569-1575, 2012, doi: 10.1007/s10722-012-9853-3.
- [7] D. L. Vu, "Research on chemical composition and some biological effects of *A. carmichaelii* Debx. Grown in Ha Giang province," Pharmacist doctoral thesis, National Institute of Medicinal Materials, 2014, pp. 1-21, 43-51.
- [8] H. Pandey, S. K. Nandi, A. Kumar, U. T. Palni, B. Chandra, and L. M. S. Palni, "*In vitro* propagation of *Aconitum balfourii* Stapf; an important aconite of Himalayan alpine," *J. Hort. Sci. Biotechnol.*, vol. 21, pp. 69-84, 2004, doi: 10.1080/14620316.2004.11511733.
- [9] N. Jabeen, A. S. Shawl, G. H. Dar, A. Jan, and P. Sultan, "Callus induction and organogenesis from explants of *Aconitum heterophyllum*," *Biotechnol.*, vol. 5, pp. 287-291, 2006, doi: 10.3923/biotech.2006.287.291.
- [10] J. M. Rawat, R. K. Agnihotri, S. Nautiyal, B. Rawat, and A. Chandra, "In vitro propagation, genetic and secondary metabolite analysis of *Aconitum violaceum* Jacq.: a threatened medicinal herb," *Acta Physiol. Plant*, vol. 35, pp. 2589-2599, 2013, doi: 10.1007/s11738-013-1294-x.
- [11] M. Singh, A. Chettri, A. Pandey, S. Sinha, K. K. Singh, and H. K. Badola, "In Vitro Propagation and Phytochemical Assessment of *Aconitum ferox* Wall: A Threatened Medicinal Plant of Sikkim Himalaya," *Proc. Natl. Acad. Sci., India, Sect. B Biol. Sci.*, vol. 7, pp. 313-321, 2019, doi: 10.1007/s40011-019-01104-x.
- [12] T. Murashige and F. A. Skoog, "A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture," *Physiol. Plant.*, vol. 15, pp. 473-497, 1962, doi: 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x.
- [13] S. M. Shekhawat, N. Kannanb, M. Manokari, and C. P. Ravindran, "In vitro regeneration of shoots and ex vitro rooting of an important medicinal plant *Passiflora foetida* L. through nodal segment cultures," *J. Genet. Eng. Biotechnol.*, vol. 13, pp. 209-214, 2015, doi: 10.1016/j.jgeb.2015.08.002.