

## NHÂN GIỐNG *IN VITRO* ĐÌNH LĂNG LÁ NHỎ (*Polycias fruticosa* L. Harms)

Nguyễn Thị Tho<sup>1</sup>, Khuất Thị Hải Ninh<sup>2</sup>, Vũ Thị Phan<sup>3</sup>, Lê Việt Việt<sup>4</sup>, Bùi Văn Thắng<sup>5</sup>  
<sup>1,2,3,4,5</sup>Trường Đại học Lâm nghiệp

### TÓM TẮT

Đình lăng lá nhỏ (*Polycias fruticosa* L. Harms) là cây đa tác dụng, có thể dùng làm gia vị, làm cảnh, đặc biệt được sử dụng làm thuốc trong y học cổ truyền. Trong Đình lăng có nhiều hợp chất quý trong đó có saponin và polyacetylen là những chất có mặt trong Nhân sâm. Hiện nay, nhu cầu trồng và phát triển loài cây dược liệu quý này ngày càng cao. Vì vậy, việc sử dụng phương pháp nhân giống tiên tiến - nhân giống *in vitro* loài cây này là vô cùng cần thiết. Đoạn thân Đình lăng lá nhỏ được khử trùng bằng cồn 70% trong 1 phút, HgCl<sub>2</sub> 0,1% trong 8 phút, cho tỷ lệ mẫu sạch và tỷ lệ mẫu sạch tái sinh chồi là 41,7%. Khả năng nhân nhanh chồi đạt cao nhất (5,47 chồi/mẫu) trên môi trường MS (Murashige và Skoog, 1962) cơ bản bổ sung 1,5 mg/l BAP, 0,5 mg/l kinetin, 0,5 mg/l IBA, 3% sucrose và 0,7% agar. Sự hình thành rễ, tạo cây *in vitro* hoàn chỉnh tốt trên môi trường MS bổ sung 1,0 mg/l NAA, 3% sucrose, 0,7% agar và 0,1% than hoạt tính, cho 100% số chồi ra rễ, 11 rễ/chồi và kích thước rễ trung bình là 5,1 cm. Kết quả nghiên cứu cho thấy có thể ứng dụng phương pháp nuôi cấy *in vitro* vào nhân giống cây Đình lăng lá nhỏ, tạo ra số lượng cây giống lớn, chất lượng cao cung ứng cho nhu cầu trồng và phát triển loài cây quý này.

**Từ khóa:** Đình lăng lá nhỏ, nhân giống *in vitro*, *Polycias fruticosa*.

### I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Đình lăng lá nhỏ hay còn gọi là cây Gỏi cá thuộc họ Nhân sâm (Araliaceae) - là cây thuốc quý, được ví như nhân sâm của người nghèo. Đình lăng lá nhỏ là cây đa tác dụng: làm thuốc, làm cảnh, làm gia vị. Bộ phận giá trị nhất của Đình lăng lá nhỏ là rễ củ, rễ củ 3 năm tuổi trở lên có giá trị như Nhân sâm. Trong Đình lăng lá nhỏ có nhiều hợp chất quý trong đó có saponin và polyacetylen (Vo D.H. và cộng sự, 1998). Saponin, đặc biệt loại triterpen có tác dụng chống oxy hóa, chống stress và các triệu chứng trầm cảm (Bensita và cộng sự, 1998). Hợp chất polyacetylen có vai trò chống ung thư, chống oxy hóa, kháng khuẩn và kháng nấm (Lutomski và cộng sự, 1992). Hiện nay, cây Đình lăng lá nhỏ được trồng tập trung với diện tích lớn ở nhiều vùng trong cả nước để cung cấp nguyên liệu cho các công ty dược phẩm nên nhu cầu về cây giống có chất lượng tốt là rất lớn. Hiện tại, giống cây Đình lăng lá nhỏ chủ yếu được sản xuất bằng phương pháp truyền thống (giam cành) phụ thuộc vào mùa vụ và thời tiết nên số lượng cây giống tạo ra hạn chế, chất lượng cây giống thấp dẫn đến cây

sinh trưởng - phát triển chậm và năng suất rễ củ không cao.

Để nhân nhanh nguồn giống của một loài cây trồng hiện nay kỹ thuật nuôi cấy *in vitro* thường được áp dụng, mang lại hiệu quả cao. Bởi vì, nuôi cấy *in vitro* có thể tạo ra một số lượng lớn cây giống sạch bệnh, tương đối đồng nhất về mặt di truyền từ một nguồn mẫu rất ít và trong thời gian ngắn; ngoài ra, kỹ thuật này còn khắc phục được những nhược điểm của phương thức nhân giống truyền thống là không phụ thuộc vào thời tiết, mùa vụ... Đến nay, đã có một số công trình công bố về kết quả nghiên cứu tái sinh và nhân giống cây Đình lăng (Trần Thị Liên và cộng sự, 2005; Lê Thị Như Thảo và cộng sự, 2014; Salwa et al., 2014; Phạm Thị Thị và cộng sự, 2016); tuy nhiên, các kết quả thông báo cho thấy hiệu quả nhân giống là rất khác nhau, có thể phụ thuộc vào nguồn vật liệu, thành phần môi trường nuôi cấy, chất điều hòa sinh trưởng và kỹ thuật nuôi cấy.

Bài báo này trình bày quy trình nhân giống cây Đình lăng lá nhỏ bằng phương pháp nuôi cấy *in vitro* đạt hệ số nhân giống cao; quy trình đang được áp dụng để sản xuất cây giống Đình

lăng lá nhỏ chất lượng tốt tại Viện Công nghệ sinh học Lâm nghiệp, Trường Đại học Lâm nghiệp.

## **II. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU**

### **2.1. Nguyên liệu**

Vật liệu nghiên cứu là đoạn chồi non của cây Đinh lăng lá nhỏ sinh trưởng, phát triển tốt và không bị sâu bệnh đã được tuyển chọn và trồng tại Vườn cây thuốc của Viện Công nghệ sinh học Lâm nghiệp.

### **2.2. Phương pháp**

**Tạo mẫu sạch Đinh lăng lá nhỏ:** Mẫu vật ban đầu là ngọn Đinh lăng lá nhỏ (tính từ đỉnh sinh trưởng xuống khoảng 10 cm), được làm sạch sơ bộ bằng nước xà phòng loãng. Tiếp theo, mẫu được chuyển vào tủ cấy vô trùng và được cắt thành những đoạn có kích thước khoảng 3 cm (có chứa 1 - 2 mắt ngủ). Mẫu vật được rửa 2 lần bằng nước cất vô trùng trước khi được khử trùng bằng cồn 70% trong 1 phút và  $HgCl_2$  0,1% ở các thời gian từ 4 - 10 phút. Tiếp theo mẫu được rửa lại 4 - 5 lần bằng nước cất vô trùng. Sau khi khử trùng, mẫu được cấy vào môi trường MS (Murashige và Skoog, 1962) có bổ sung 0,5 mg/l 6-Benzylaminopurine (BAP), 20 g/l sucrose và 7 g/l agar. Kết quả được theo dõi sau 6 tuần vào mẫu, theo các chỉ tiêu tỷ lệ mẫu sạch, tỷ lệ mẫu sạch tái sinh chồi.

**Nhanh chồi Đinh lăng lá nhỏ:** Vật liệu nhân giống là những chồi *in vitro* tái sinh trên môi trường tạo mẫu sạch có kích thước từ 1 - 1,5 cm được cấy vào các môi trường dinh dưỡng MS, WPM (McCown and Lloyd, 1981) và B5 (Gamborg, 1968); cả 3 môi trường đều bổ sung 2 mg/l BAP, 30 g/l sucrose, 7 g/l agar. Các chồi *in vitro* thu được từ các thí nghiệm trên có độ đồng đều cao (khoảng 1 - 1,5 cm, khỏe mạnh) sẽ được cấy chuyển sang các công thức môi trường nhân nhanh chồi mới: môi trường MS chứa 2 mg/l BAP, 7 g/l agar và bổ sung (20 g/l, 30 g/l và 40 g/l) sucrose; môi trường MS bổ sung tổ hợp các chất điều hòa sinh trưởng (1,0 - 2,5 mg/l) BAP, 0,5 mg/l

kinetin, (0,5 - 1,0 mg/l) indole-3-butyric acid (IBA), 30 g/l sucrose và 7 g/l agar. Kết quả thí nghiệm được thu thập sau 8 tuần nuôi cấy. Các chỉ tiêu được đánh giá: tỷ lệ mẫu tạo đa chồi, số chồi tái sinh và chiều cao chồi.

**Tạo cây hoàn chỉnh từ chồi Đinh lăng lá nhỏ *in vitro*:** Chồi *in vitro* đạt tiêu chuẩn (mập, lá xanh đậm, kích thước từ 3 - 4 cm) được chuyển sang môi trường ra rễ là môi trường MS bổ sung 0,5 - 2 mg/l  $\alpha$  - naphthaleneacetic acid (NAA), 30 g/l sucrose, 7 g/l agar và 0,1% than hoạt tính). Kết quả thí nghiệm được thu thập sau 8 tuần nuôi cấy.

**Huấn luyện và ra ngôi:** Các bình cây con ra rễ *in vitro* được đưa ra nhà lưới huấn luyện trong thời gian 7 ngày để cây thích nghi dần với điều kiện tự nhiên. Sau thời gian huấn luyện cây con cứng cáp lấy ra khỏi bình và rửa bộ rễ loại bỏ thạch bằng nước máy (rửa nhẹ nhàng tránh làm gãy rễ, dập thân). Sau đó, cây con được cấy vào giá thể đất đồi tầng B và trâu hun toàn tính, tỷ lệ 3:1. Cây con được che chắn ánh sáng chiếu trực xạ bằng lưới đen, ngày tưới nước bằng cách phun sương 2 - 4 lần, đảm bảo độ ẩm  $\geq 90\%$ , trong 2 tuần đầu; sau đó chăm sóc bình thường như cây giâm hom.

Tất cả các môi trường nuôi cấy được chuẩn độ đến pH = 5,8; khử trùng ở 118°C, áp suất 1,5 atm trong 20 phút. Nuôi mẫu ở điều kiện: nhiệt độ phòng nuôi 25  $\pm$  2°C, cường độ chiếu sáng 3.000 lux, thời gian chiếu sáng 16 giờ/ngày. Các thí nghiệm được bố trí trong các bình trụ 200 ml (5 mẫu/bình). Mỗi công thức thí nghiệm lặp lại 3 lần. Số liệu được xử lý bằng phần mềm Microsoft Excel và phần mềm SPSS version 18 với mức sai khác có ý nghĩa p = 0,05.

## **III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN**

### **3.1. Kết quả tạo mẫu sạch Đinh lăng lá nhỏ**

Những đoạn thân Đinh lăng lá nhỏ được khử trùng bằng cồn 70% trong 1 phút kết hợp với  $HgCl_2$  0,1% với thời gian khử trùng khác nhau và thu được kết quả sau 6 tuần theo dõi như ở bảng 1.

**Bảng 1. Kết quả tạo mẫu sạch Đỉnh lăng lá nhỏ**

Thời gian khử trùng HgCl <sub>2</sub> 0,1% (phút)	Tỷ lệ mẫu sạch (%)	Tỷ lệ mẫu sạch tái sinh chồi (%)
4	17,6	17,6
6	29,0	29,0
8	41,7	41,7
10	63,3	13,3
Sig.	0,001	0,037

Từ kết quả trên cho thấy thời gian khử trùng bằng HgCl<sub>2</sub> 0,1% trong 4 phút thu được tỷ lệ mẫu sạch rất thấp (17,6%), dẫn đến số mẫu có khả năng tái sinh chồi cũng thấp, các mẫu Đỉnh lăng thường xuất hiện nấm trắng ở phần gốc bẹ lá và nhiễm khuẩn ở vị trí tiếp xúc với môi trường. Khi tăng thời gian khử trùng lên 6 và 8 phút, tỷ lệ mẫu sạch và tỷ lệ mẫu sạch tái sinh chồi đều tăng lên (100% mẫu sạch tái sinh chồi). Ở công thức thời gian khử trùng 8 phút, thu được tỷ lệ mẫu sạch có khả năng tái sinh chồi cao nhất (41,7%). Khi tăng thời gian khử trùng lên 10 phút tỷ lệ mẫu sạch tăng (63,3%) nhưng tỷ lệ mẫu sạch có khả năng tái sinh chồi lại giảm rõ rệt, chỉ còn 13,3%. Điều này có thể do với 4 phút thời gian ngắn chưa đủ để tiêu diệt nấm, khuẩn trên mẫu vật dẫn đến tỷ lệ mẫu sạch thấp; nhưng khử trùng trong 10 phút đảm bảo có khả năng tiêu diệt và hạn chế sự phát triển của vi sinh vật trên mẫu vật nhưng lại gây độc hại cho một số mẫu vật làm cho mẫu bị thâm đen và chết, mất khả năng tái sinh. Như vậy, với mẫu vật là các đoạn chồi

Đỉnh lăng tính từ đỉnh sinh trưởng xuống khoảng 10 cm, có thể sử dụng còn 70% trong 1 phút kết hợp khử trùng bằng HgCl<sub>2</sub> 0,1% trong 8 phút và nuôi cấy trên môi trường MS bổ sung 0,5 mg/l BAP, 20 g/l sucrose và 7 g/l agar, cho tỷ lệ mẫu sạch tái sinh chồi đạt cao nhất trong các công thức thí nghiệm.

**3.2. Kết quả nhân nhanh chồi Đỉnh lăng lá nhỏ**

**3.2.1. Ảnh hưởng của môi trường dinh dưỡng đến khả năng nhân nhanh chồi**

Trong nuôi cấy mô tế bào thực vật, một trong những yếu tố hết sức quan trọng có ảnh hưởng lớn đến sự sinh trưởng phát triển, hình thái và khả năng tái sinh chồi của mẫu cấy là môi trường dinh dưỡng. Môi trường dinh dưỡng cung cấp các muối khoáng đa lượng, vi lượng và các vitamin cần thiết cho tế bào, mô thực vật sinh trưởng, phát triển *in vitro*. Lê Thị Như Thảo và cộng sự (2014) khi nghiên cứu nhân giống cây Đỉnh lăng lá nhỏ đã cho thấy môi trường dinh dưỡng có ảnh hưởng đến khả năng nhân chồi.

**Bảng 2. Kết quả nhân nhanh chồi Đỉnh lăng lá nhỏ trên môi trường dinh dưỡng khác nhau**

Môi trường dinh dưỡng	Tỷ lệ mẫu tạo cụm chồi (%)	Số chồi/mẫu	Chiều cao chồi (cm)
WPM	73,3	2,03 ± 0,15 <sup>b</sup>	2,07 ± 0,09 <sup>a</sup>
B5	86,7	2,67 ± 0,03 <sup>ab</sup>	2,13 ± 0,23 <sup>a</sup>
MS	96,7	3,13 ± 0,38 <sup>a</sup>	2,24 ± 0,04 <sup>a</sup>
Sig.	0,036	0,046	0,729

Ghi chú: Trong phạm vi cùng một cột, các giá trị mang các chữ cái khác nhau chỉ sự sai khác có ý nghĩa thống kê ở mức P = 0,05.

Trong nghiên cứu này, kết quả thu được (bảng 2) cho thấy rằng tỷ lệ mẫu tạo cụm chồi và số chồi/mẫu chịu ảnh hưởng rõ rệt của môi trường dinh dưỡng. Trong 3 loại môi trường MS, WPM và B5, MS là môi trường dinh dưỡng thích hợp nhất đối với giai đoạn chồi Đỉnh lăng lá nhỏ trong *in vitro*, thể hiện ở tỷ lệ

mẫu tái sinh chồi và số chồi/mẫu đạt giá trị cao nhất lần lượt là 96,7% và 3,13 chồi/mẫu. Hai môi trường WPM và B5 có tỷ lệ mẫu tạo cụm chồi thấp, cũng như số chồi/mẫu không cao. Tuy nhiên, về kích thước chồi giữa 3 công thức môi trường dinh dưỡng không có sự khác biệt có ý nghĩa, chiều cao chồi đạt từ 2,07 - 2,24

cm. Kết quả nghiên cứu này cũng phù hợp với nghiên cứu trước đây của Phạm Thị Thị và cộng sự (2016); ngược lại khi Lê Thị Như Thảo và cộng sự (2014) nghiên cứu nhân giống Đinh lăng lá nhỏ trên 3 loại môi trường dinh dưỡng MS, WPM và LV (Litvay et al., 1985) thì kết quả cho thấy môi trường LV là hiệu quả nhất; Salwa et al., (2014) lại cho thấy môi trường B5 là tốt nhất. Điều này có thể giải thích rằng do trên các môi trường dinh dưỡng cơ bản bổ sung các chất điều hòa sinh trưởng với hàm lượng khác nhau hoặc cũng có thể do kiểu gen của mẫu cấy khác nhau.

**3.2.2. Ảnh hưởng của hàm lượng đường sucrose tới khả năng nhân nhanh chồi**

Trong nuôi cấy *in vitro*, đường là nguồn cung cấp carbon để mô, tế bào thực vật tổng hợp nên các chất hữu cơ, giúp tế bào phân chia, tăng sinh khối khi tế bào chưa có khả năng quang hợp hoặc chưa đảm nhận hoàn toàn chức năng quang hợp. Sucrose là loại đường được sử dụng phổ biến trong nuôi cấy mô tế bào. Để đánh giá mức độ ảnh hưởng của sucrose lên khả năng nhân nhanh và sinh trưởng chồi Đinh lăng lá nhỏ, 3 công thức thí nghiệm được bố trí trên môi trường MS chứa 2 mg/l BAP, 7 g/l agar và bổ sung (20 g/l, 30 g/l và 40 g/l) sucrose. Kết quả thu được sau 8 tuần

nuôi cấy được thể hiện trong bảng 3.

Hàm lượng sucrose được bổ sung vào môi trường nuôi cấy từ 20 - 40 g/l không có tác dụng rõ rệt lên chỉ tiêu tỷ lệ mẫu tạo cụm chồi. Tuy nhiên, về chỉ tiêu số chồi trung bình/mẫu cấy giữa 3 công thức thí nghiệm có sự khác biệt có ý nghĩa. Khi bổ sung 30 g/l sucrose thu được số chồi/mẫu cao nhất 3,43 chồi/mẫu, các chồi có lá mở rộng và có màu xanh đậm, chồi cao và đặc biệt thân cứng và có nhiều đốt. Chồi phân hóa nhiều đốt là một điểm thuận lợi cho việc nhân chồi tiếp nếu sử dụng chúng làm nguồn vật liệu. Khi quan sát kết quả, chúng tôi nhận thấy Đinh lăng lá nhỏ thường bị mô sẹo hóa ở gốc chồi, phần nằm chìm trong môi trường và từ đó tái sinh nên những chồi mới. Ngoài ra, sự tăng sinh chồi cũng nhận được từ những chồi nách. Ở công thức có chứa 20 g/l sucrose chồi cũng khá cao, đốt thân cứng và cũng mang nhiều đốt, tuy nhiên lá nhỏ, không mở rộng và xanh bằng nghiệm thức chứa 30 g/l sucrose. Ở môi trường có bổ sung 40 g/l sucrose kích thước chồi ngắn hơn, lá to, hơi vàng, số đốt ít và chồi non, không cứng cáp như ở các công thức khác. Từ kết quả trên cho thấy rằng, môi trường nuôi cấy bổ sung 30 g/l sucrose là thích hợp cho nhân chồi Đinh lăng lá nhỏ.

**Bảng 3. Ảnh hưởng của hàm lượng sucrose tới khả năng nhân nhanh chồi**

Sucrose (g)	Tỷ lệ mẫu tạo cụm chồi (%)	Số chồi/mẫu	Chiều cao chồi (cm)
20	83,3	2,67 ± 0,27 <sup>ab</sup>	2,18 ± 0,07 <sup>ab</sup>
30	93,3	3,43 ± 0,36 <sup>a</sup>	2,3 ± 0,10 <sup>a</sup>
40	76,7	2,00 ± 0,10 <sup>b</sup>	1,92 ± 0,08 <sup>b</sup>
Sig.	0,2	0,024	0,044

Ghi chú: Trong phạm vi cùng một cột, các giá trị mang các chữ cái khác nhau chỉ sự sai khác có ý nghĩa thống kê ở mức P = 0,05.

**3.2.3. Ảnh hưởng kết hợp của BAP, kinetin và IBA lên khả năng nhân nhanh chồi**

Chất điều hòa sinh trưởng thích hợp là một trong những yếu tố quan trọng nhất quyết định khả năng nhân nhanh chồi *in vitro*. Khả năng biệt hóa chồi thường xảy ra khi có sự cân bằng hàm lượng cytokine và auxin, trong đó cytokine lớn hơn auxin. Vì vậy, sự tổ hợp hai nhóm chất này ở các nồng độ khác nhau sẽ cho

hiệu quả nhân chồi khác nhau. Kết quả đánh giá ảnh hưởng tổng hợp của BAP, kinetin và IBA lên khả năng nhân chồi Đinh lăng lá nhỏ sau 8 tuần nuôi cấy được thể hiện trong bảng 4.

Kết quả thu được cho thấy: Các tổ hợp chất điều hòa sinh trưởng trong nghiên cứu này không có sự khác biệt nhau về tỷ lệ mẫu tạo cụm chồi. Tuy nhiên, chúng có ảnh hưởng rõ rệt lên khả năng nhân chồi Đinh lăng lá nhỏ.

Cụ thể: Ở công thức thứ nhất có hàm lượng BAP 1 mg/l số chồi thu được là 4,2 chồi/mẫu cấy, khi BAP được tăng lên 1,5 mg/l (CT 2) số chồi TB/mẫu tăng mạnh lên 5,47 chồi. Tuy nhiên, khi tiếp tục tăng BAP lên 2 và 2,5 mg/l thì khả năng nhân chồi giảm xuống, phần mô sẹo ở gốc chồi to hơn, nhưng số chồi được biệt hóa ít hơn. Điều này cho thấy, nếu hàm lượng BAP cao cảm ứng hình thành mô sẹo nhiều và gây ức chế biệt hóa chồi.

Ngược lại, ở CT 5, 6 có hàm lượng BAP và kinetin tương tự CT 1, 2 nhưng tăng hàm lượng IBA từ 0,5 mg/l lên 1 mg/l đã làm thay đổi tỷ lệ cytokine và auxin, giảm hàm lượng cytokine nên đã làm cho khả năng nhân chồi giảm xuống. Tuy nhiên, khi giữa nguyên IBA (1 mg/l) tăng BAP lên 2 và 2,5 như ở CT 7 và CT 8 thì khả năng nhân chồi lại được tăng lên. Bên cạnh số chồi tạo ra, chỉ tiêu chiều cao chồi cũng được theo dõi để đánh giá mức độ tăng trưởng của chồi; sự tăng trưởng chiều cao chồi có sự khác biệt giữa các nghiệm thức, tuy

nhiên sự tăng trưởng chồi là không lớn, kích thước chỉ dao động từ 1,90 - 2,53 cm trong 8 tuần. Ở những công thức có khả năng nhân chồi lớn thì đều giảm khả năng tăng trưởng chồi, ngược lại kích thước chồi tăng mạnh hơn ở những nghiệm thức có số chồi ít hơn.

Như vậy, so với kết quả nghiên cứu của tác giả Lê Thị Như Thảo và cộng sự (2014), trong giai đoạn nhân nhanh chồi, nuôi cấy chồi trên môi trường LV bổ sung thêm 0,3 mg/l BAP, 30 g/l sucrose cho hệ số nhân 4,36 chồi/mẫu cấy sau 40 ngày nuôi cấy; Phạm Thị Thi và cộng sự (2016) trên môi trường MS có bổ sung 2 mg/l BAP, 30 g/l sucrose và 10 g/l agar thu được 2,8 chồi/mẫu thì kết quả của nghiên cứu này có sự cải tiến đáng kể (5,47 chồi/mẫu) trên môi trường MS có bổ sung 1,5 mg/l BAP, 0,5 mg/l Kinetin và 0,5 mg/l IBA, 30 g/l sucrose và 7 g/l agar. Khả năng nhân nhanh chồi Đinh lăng lá nhỏ trong nghiên cứu này tương đồng với kết quả của Salwa et al., (2014).

**Bảng 4. Ảnh hưởng tổ hợp của BAP, kinetin và IBA đến khả năng nhân nhanh chồi**

CT TN	Chất điều hòa sinh trưởng (mg/l)			Tỷ lệ mẫu tạo cụm chồi (%)	Số chồi/mẫu	Chiều cao chồi (cm)
	BAP	Kinetin	IBA			
CT1	1	0,5	0,5	96,7	4,20 ± 0,42 <sup>bc</sup>	2,01 ± 0,08 <sup>b</sup>
CT2	1,5	0,5	0,5	96,7	5,47 ± 0,72 <sup>a</sup>	1,97 ± 0,16 <sup>b</sup>
CT3	2	0,5	0,5	80,0	3,37 ± 0,42 <sup>bcd</sup>	2,29 ± 0,15 <sup>ab</sup>
CT4	2,5	0,5	0,5	80,0	2,53 ± 0,03 <sup>d</sup>	2,53 ± 0,12 <sup>a</sup>
CT5	1	0,5	1	90,0	2,50 ± 0,06 <sup>d</sup>	2,29 ± 0,15 <sup>ab</sup>
CT6	1,5	0,5	1	93,3	3,23 ± 0,13 <sup>cd</sup>	2,17 ± 0,04 <sup>ab</sup>
CT7	2	0,5	1	93,3	4,50 ± 0,26 <sup>ab</sup>	1,90 ± 0,17 <sup>b</sup>
CT8	2,5	0,5	1	90,0	3,67 ± 0,43 <sup>bcd</sup>	2,49 ± 0,03 <sup>a</sup>
	Sig.			0,169	0,001	0,016

Ghi chú: Trong phạm vi cùng một cột, các giá trị mang các chữ cái khác nhau chỉ sự sai khác có ý nghĩa thống kê ở mức P = 0,05.

### 3.3. Kết quả tạo cây Đinh lăng lá nhỏ hoàn chỉnh

Sự hình thành rễ của chồi *in vitro* Đinh lăng lá nhỏ được đánh giá thông qua 4 công thức khác nhau về hàm lượng auxin (NAA). Kết quả được đánh giá sau 8 tuần cảm ứng rễ và được thể hiện trong bảng 5. NAA có ảnh hưởng lớn đến khả năng ra rễ của chồi Đinh lăng lá nhỏ *in vitro*; cả 3 chỉ tiêu theo dõi đều có sự sai khác có ý nghĩa giữa các công thức

thí nghiệm. Ở nồng độ NAA thấp (0,5 mg/l) chỉ có 70% số chồi nuôi cấy có khả năng tạo rễ, số rễ TB/chồi thấp (4,5 rễ) và rễ có kích thước ngắn 1,95 cm. Mặt khác, các rễ không đồng đều và có mức độ phân nhánh thành rễ bên ít. Khi tăng hàm lượng NAA lên 1 mg/l tỷ lệ chồi ra rễ đạt 100%, rễ ra đều ở các chồi, số lượng rễ lớn (11 rễ/chồi), rễ trắng khỏe, dài đều và có mức độ phân nhánh rễ bên rất mạnh. Ở công thức có hàm lượng NAA tăng lên 1,5

và 2 mg/l khả năng ra rễ lại giảm xuống. Kết quả này tương tự với kết quả được công bố bởi

Trần Thị Liên và cộng sự (2005) và Phạm Thị Thi và cộng sự (2016).

**Bảng 5. Kết quả tạo cây Đinh lăng lá nhỏ hoàn chỉnh**

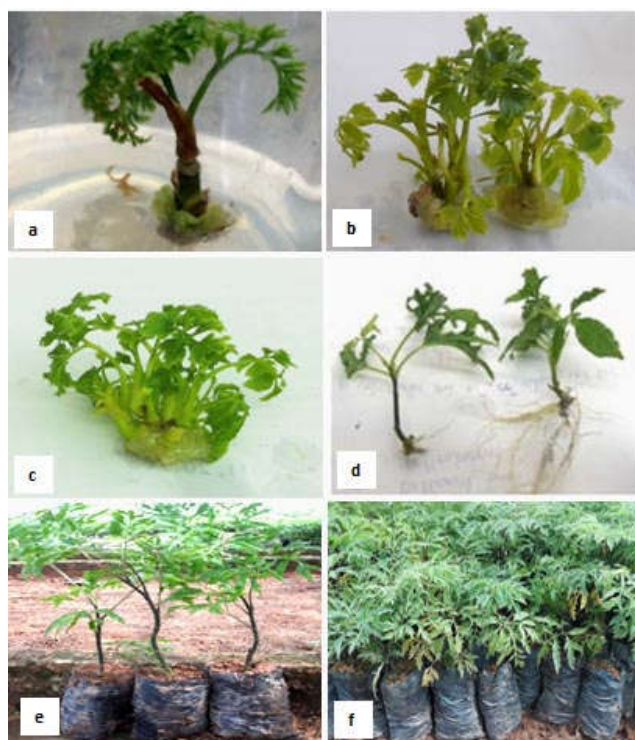
NAA (mg/l)	Tỷ lệ chồi ra rễ (%)	Số rễ /chồi	Kích thước/rễ (cm)	Đặc điểm rễ
0,5	70,0	4,50 ± 0,36 <sup>d</sup>	1,95 ± 0,18 <sup>c</sup>	+
1,0	100	11,00 ± 0,64 <sup>a</sup>	5,10 ± 0,35 <sup>a</sup>	+++
1,5	93,3	9,13 ± 0,19 <sup>b</sup>	4,33 ± 0,19 <sup>b</sup>	++
2,0	86,7	7,33 ± 0,49 <sup>c</sup>	3,92 ± 0,05 <sup>b</sup>	++
Sig.	0,004	0,0001	0,0001	

*Ghi chú: Trong phạm vi cùng một cột, các giá trị mang các chữ cái khác nhau chỉ sự sai khác có ý nghĩa thống kê ở mức P = 0,05; + rễ thưa, ít thậm chí không phân nhánh thành các rễ bên; ++ rễ trung bình, phân nhánh vừa phải; +++ rễ mập, trắng, phân nhánh nhiều.*

### 3.4. Ra ngôi cây Đinh lăng lá nhỏ nuôi cấy mô

Sau khi chồi ra rễ tạo thành cây hoàn chỉnh (cây cao ≥ 3 cm, có lá và bộ rễ phát triển), các bình cây được huấn luyện trong nhà lưới có mát che (thời gian 7 ngày) để cây thích nghi dần với điều kiện môi trường tự nhiên. Sau thời gian huấn luyện, cây được rửa sạch loại bỏ thạch dưới vòi nước chảy và được cấy vào túi bầu đã chuẩn bị giá thể (đất đồi tầng B và trấu hun toàn tính, tỷ lệ 3:1). Cây

con được che chắn ánh sáng chiếu trực xạ bằng lưới đen, ngày tưới nước bằng cách phun sương 2 - 4 lần, đảm bảo độ ẩm ≥ 90%, trong 2 tuần đầu, sau đó chăm sóc bình thường như cây giâm hom. Đinh lăng lá nhỏ nuôi cấy mô ra ngôi cho tỷ lệ sống đạt khoảng 90%, cây sinh trưởng - phát triển tốt, chăm sóc cây ở giai đoạn vườn ươm khoảng 3 tháng, cây cao khoảng 25 - 30 cm là đủ tiêu chuẩn xuất vườn.



**Hình 1: Các giai đoạn nhân giống cây Đinh lăng lá nhỏ**

(a - mẫu sạch tái sinh chồi in vitro; b - cụm chồi tái sinh trên môi trường MS + 0,5 mg/l BAP; c - cụm chồi tái sinh trên môi trường MS + 1,5 mg/l BAP + 0,5 mg/l kinetin + 0,5 mg/l IBA; d - chồi ra rễ tạo cây hoàn chỉnh in vitro; e, f - cây con trồng ra giá thể ở vườn ươm (4 tuần tuổi)).

#### IV. KẾT LUẬN

Công thức khử trùng thích hợp nhất cho tạo mẫu sạch *in vitro* Đỉnh lã lá nhỏ từ chồi là cồn 70% trong 1 phút, HgCl<sub>2</sub> 0,1% trong 8 phút, cho tỷ lệ mẫu sạch và tỷ lệ mẫu sạch tái sinh chồi là 41,7%. Tổ hợp các thành phần môi trường thích hợp nhất cho nhân nhanh chồi Đỉnh lã lá nhỏ là môi trường MS cơ bản bổ sung, 1,5 mg/l BAP, 0,5 mg/l Kinetin, 0,5 mg/l IBA, 30 g/l sucrose và 7 g/l agar; cho 5,47 chồi/mẫu cấy. Môi trường thích hợp nhất cho sự hình thành rễ, tạo cây *in vitro* hoàn chỉnh là MS bổ sung 1 mg/l NAA, 30 g/l sucrose, 7 g/l agar và 0,1% than hoạt tính, cho 100% số chồi ra rễ, 11 rễ/chồi và kích thước rễ đạt trung bình 5,1 cm.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bensita M., Bernard NP., Venkataswamy R., Divakar CM (1998). Department of pharmacognosy, college of pharmacy, Sri Ramakrishna institute of paramedical science Coimbatore. 8 (2): 165-172.
2. Gamborg O, Miller R and Ojima K (1968). Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp. Cell. Res.*, 50:105-116.
3. Lê Thị Như Thảo, Hoàng Hữu Tuấn, Mai Thị Phương Hoa, Đỗ Tiến Vinh, Trần Văn Minh (2014). Nhân giống cây Đỉnh lã lá nhỏ bằng kỹ thuật nuôi cấy

chồi đỉnh. Tạp chí Dược liệu, 19: 46 – 52.

4. Lutomski J, Luan TC, Hoa TT (1992). Polyacetylenes in the Araliaceae family, Part IV. The antibacterial and antifungal activities of two main polyacetylenes from *Panax vietnamensis* Ha et Grushv and *Polyscias fruticosa* (L.) Harms. *Herba Pol.*, 38: 137-140.
5. McCown BH. and G. Lloyd (1981). Woody plant medium (WPM) – a mineral nutrient formulation for microculture of woody plant species. *HortScience*. 16: 453-453.
6. Murashige T and Skoog F (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant*, 15: 473-497.
7. Phạm Thị Thì, Đoàn Thị Quỳnh Hương, Dương Ngọc Kiều Thi, Phạm Văn Thắng và Nguyễn Thoại Ân (2016). Xây dựng quy trình nhân nhanh cây Đỉnh lã có hàm lượng Saponin cao bằng phương pháp *in vitro*. Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ, 44: 104-112.
8. Salwa SS, Saad SM, El-Shamy MA and Abd Elhafez AE (2014). *In vitro* Propagation of *Polyscias fruticosa* Plant. *International Journal of Plant & Soil Science*, 3(10): 1254-1265.
9. Trần Thị Liên, Nguyễn Văn Thuận và Đoàn Thị Thanh Nhân (2005). Nghiên cứu nhân nhanh cây Đỉnh lã *Polyscias fruticosa* L. Harms. *Tạp chí nông nghiệp và phát triển nông thôn*, 14: 39.
10. Vo DH, Yamamura S, Ohtani K, Kasai R, Yamasaki K, Nham NT, Chau HM (1998). Oleane saponins from *Polyscias fruticosa* L. Harms. *Phytochemistry* 47: 451-457.

### IN VITRO PROPAGATION OF *Polyscias fruticosa* L. Harms

Nguyen Thi Tho<sup>1</sup>, Khuat Thi Hai Ninh<sup>2</sup>, Vu Thi Phan<sup>3</sup>,  
Le Viet Viet<sup>4</sup>, Bui Van Thang<sup>5</sup>

<sup>1,2,3,4,5</sup> Vietnam National University of Forestry

#### SUMMARY

*Polyscias fruticosa* L. Harms, belonging to the family Araliaceae, is a small shrub plant with multi-purposes such as a type of spice, an ornamental plant, and a traditional medicine, especially in its tuber root. *P. fruticosa* consists of many valuable compounds as saponin and polyacetylene, which commonly appear in the *Panax ginseng*. Nowadays, the need for planting *P. fruticosa* in Vietnam is high, while the resource of seedlings or cuttings is limited. Thus, application of advanced method (*in vitro*) to propagate this high - value plant is extremely necessary. The result of this research showed that the nodal segments of *P. fruticosa* sterilized by rinsing for 1 minute with 70% alcohol and 8 minutes with 0.1% HgCl<sub>2</sub> have resulted in the highest rate for survival (41.7%). For multi-shoot stage, the highest number of shoot (5.47 shoots/explant) was obtained at Murashige and Skoog's (MS) base medium supplemented with 3% sucrose; 0.7% agar; 1.5 mg/l BAP; 0.5 mg/l kinetin and 0.5 mg/l IBA. For root stage, the number of roots (11 roots per shoot) and root length (5.1 cm per root) were the best on the MS medium supplemented with 3% sucrose; 0.7% agar, 1 mg/l α-NAA and 0.1% activated carbon. The result of this research is recognized that the method of *in vitro* can be used to develop the suitable protocol for propagation of *P. fruticosa* and to propagate the number of seedlings with high quality for development of *P. fruticosa* in Vietnam.

**Keywords:** *In vitro* propagation, *Polyscias fruticosa*, tissue culture.

Ngày nhận bài : 30/5/2018  
Ngày phản biện : 08/6/2018  
Ngày quyết định đăng : 15/6/2018