

PHÁT SINH PHÔI SOMA CÂY ĐÌNH LĂNG LÁ XẺ NHỎ (*Polyscias fruticosa* L. Harms) THÔNG QUA NUÔI CÂY MẪU LÁ *EX VITRO*

Tô Thị Nhã Trâm¹, Trương Phi Yên¹, Tôn Trang Ánh¹, Hoàng Thanh Tùng², Hà Thị Mỹ Ngân², Dương Tấn Nhựt² ✉

¹ Trường Đại học Nông lâm Thành phố Hồ Chí Minh

² Viện Nghiên cứu khoa học Tây Nguyên, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

✉ Người chịu trách nhiệm liên lạc. E-mail: duongtannhut@gmail.com

Ngày nhận bài: 18.01.2020

Ngày nhận đăng: 23.4.2020

TÓM TẮT

Cây Đinh lăng (*Polyscias fruticosa* L. Harms) là loại cây dược liệu chứa alkaloid, glycosid, saponin, các vitamin và các phytosterin với nhiều tác dụng dược lý giống nhân sâm như tăng cường thể lực, tăng sức đề kháng và tăng sự dẻo dai của cơ thể. Tuy nhiên, những nghiên cứu về vi nhân giống trên đối tượng này vẫn còn nhiều hạn chế. Trong nghiên cứu này, mẫu lá Đinh lăng *ex vitro* sau khi khử trùng được sử dụng để làm vật liệu ban đầu trong nuôi cấy tạo mô sẹo có khả năng phát sinh phôi soma (bao gồm hình thái các giai đoạn phát triển phôi soma), tạo cây hoàn chỉnh và đánh giá khả năng thích nghi và sinh trưởng ở giai đoạn vườn ươm. Kết quả ghi nhận được cho thấy, mẫu mô sẹo có đường kính 0,5 cm cho tỉ lệ phát sinh phôi soma tối ưu (75,53%) trên môi trường MS bổ sung 100 mL/L nước dừa kết hợp với 0,5 mg/L BA sau 6 tuần nuôi cấy. Phôi soma phát sinh từ nuôi cấy mô sẹo mẫu lá trên môi trường MS có bổ sung 0,1 mg/L Kin kết hợp với 150 mL/L nước dừa cho tỉ lệ tái sinh chồi (83,30%) và số chồi (6,30 chồi/mẫu) cao hơn các nghiệm thức khác sau 8 tuần nuôi cấy. Ngoài ra, cây *in vitro* được nuôi cấy trên môi trường có bổ sung 30 g/L đường và 100 mL/L nước dừa cho số rễ cao nhất (3,02 rễ/cây) và khả năng thuần hóa cây đinh lăng ngoài vườn ươm với giá thể là 30 đất sạch + 20 phân trùn + 30 mụn xơ dừa + 20 tro trấu cho tỉ lệ sống cao nhất (85,20%).

Từ khóa: Đinh lăng, mẫu lá, nước dừa, phát sinh phôi

GIỚI THIỆU

Đinh lăng (*Polyscias fruticosa*) đồng nghĩa với *Panax fruticosum*, là một loài cây thân bụi nhỏ thuộc chi Đinh lăng, họ Ngũ gia bì (Araliaceae). Thành phần dược chất tiêu biểu trong cây Đinh lăng bao gồm alkaloid, glycosid, saponin, các vitamin tan trong nước (B1, B2, B6, C) và các phytosterin. Rễ Đinh lăng có chứa tới 20 loại acid amin. Vỏ rễ và lá Đinh lăng có chứa saponin, trong đó lá chứa triterpene saponin với tỉ lệ 1,65%, đây là một genin dạng acid oleanolic (Bích *et al.*, 2004).

Tác dụng dược lý của Đinh lăng có nguồn

gốc nuôi cấy mô so với Đinh lăng trồng tự nhiên đã được đánh giá. Kết quả nghiên cứu của Nguyễn Trần Châu và đtg (2007) cho thấy rễ Đinh lăng tái sinh từ mô sẹo trong môi trường *in vitro* lỏng có khả năng sản xuất hàm lượng saponin (0,6%) cao hơn Đinh lăng trồng tự nhiên (0,49%). Thời gian nuôi cấy 8 - 10 tháng giúp cung cấp nguồn dược liệu để chiết xuất saponin hiệu quả hơn so với rễ cây Đinh lăng 3 - 5 năm tuổi trồng trong điều kiện tự nhiên. Cây Đinh lăng có nhiều tác dụng dược lý giống nhân sâm, đặc biệt dược liệu từ cây Đinh lăng có tác dụng tăng cường thể lực, tăng sức đề kháng và tăng sự dẻo dai của cơ thể (Nguyễn Ngọc Dung, 1998).

Hiện nay, diện tích trồng cây Đinh lăng ngày càng được mở rộng khắp cả nước. Để đáp ứng nguồn cây giống Đinh lăng phục vụ cho sản xuất đại trà, đảm bảo chất lượng và tiêu chuẩn cây con thì kỹ thuật nuôi cấy mô tế bào thực vật đã được ứng dụng. Nuôi cấy mô cây Đinh lăng bằng hình thức tái sinh chồi trực tiếp, tái sinh đa chồi (Hà Bích Hồng *et al.*, 2013), một số biện pháp kỹ thuật nhằm tăng khả năng nhân giống của cây Đinh lăng lá nhỏ *ex vitro* (Ninh Thị Phấp, 2013), nuôi cấy mô lá Đinh lăng tạo rễ tơ và định lượng hoạt chất saponin tích lũy (Nguyễn Trung Hậu *et al.*, 2015). Tuy nhiên, hiệu quả nhân giống của những nghiên cứu trên chưa cao, hệ số nhân giống thấp, tỷ lệ sống sót và khả năng thích nghi của cây giống khi chuyển ra vườn ươm không cao.

Trong khi đó, nuôi cấy mô thông qua con đường nuôi cấy tế bào phôi soma cho hệ số nhân giống và tỉ lệ sống sót của cây con ngoài vườn ươm cao, làm nguồn vật liệu cho chuyển gen và phát triển hạt nhân tạo. Hệ thống phôi soma vừa là mục tiêu vừa là vật liệu đối với các nghiên cứu có đích là phát sinh hình thái, nhân giống, tạo giống và thu nhận hợp chất thứ cấp (Hussein *et al.*, 2006; Ozlem *et al.*, 2010; Sun, Hong, 2012). Chính vì vậy, nghiên cứu “Phát sinh phôi soma cây Đinh lăng lá xẻ nhỏ (*Polyscias fruticosa* L. Harms) thông qua nuôi cấy mẫu lá *ex vitro*” là vấn đề cấp thiết.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu

Thực vật

Mẫu lá *ex vitro* cây đinh lăng lá xẻ nhỏ 2 năm tuổi (Bộ môn Công nghệ sinh học, Trường Đại học Nông lâm Thành phố Hồ Chí Minh) được khử trùng để tạo nguồn vật liệu cho quá trình nghiên cứu. Những mẫu lá vô trùng được nuôi cấy trên môi trường tạo mô sẹo MS (Murashige, Skoog, 1962) + 0,3 mg/L 2,4-D + 2 mg/L BA (6-benzylaminopurine) + 7 mL/L nước dừa (CW) (Ngô Thị Tú Trinh, 2010). Các mẫu mô sẹo với kích thước đồng nhất được sử dụng làm vật liệu cho các thí nghiệm tiếp theo.

Phương pháp nghiên cứu

Phát sinh phôi soma từ mô sẹo mẫu lá

Mẫu mô sẹo phát sinh từ lá đinh lăng có kích thước đồng đều (0,5 cm) nuôi cấy trên môi trường cảm ứng tạo phôi soma (môi trường MS bổ sung CW 100 mL và 150 mL) kết hợp với BA ở các nồng độ: 0; 0,1; 0,5 và 1,0 mg/L. Chỉ tiêu tỉ lệ mẫu phát sinh phôi được ghi nhận sau 4 và 6 tuần nuôi cấy.

Tái sinh chồi từ phôi soma

Phôi soma (0,5 cm) ở thí nghiệm trên được nuôi cấy trên môi trường MS bổ sung Kin (Kinetin - 0,1 và 0,5 mg/L) kết hợp với CW ở các nồng độ khác nhau (0; 50; 100 và 150 mL/L). Các chỉ tiêu: tỉ lệ mẫu tái sinh chồi; số chồi mới hình thành được ghi nhận sau 6 và 8 tuần nuôi cấy.

Tạo cây hoàn chỉnh

Chồi Đinh lăng *in vitro* (1 - 2 cm) nuôi cấy trên môi trường có bổ sung đường saccharose (30 và 40 g/L) kết hợp với CW (0; 50; 70 và 100 mL/L) cho thí nghiệm tạo cây hoàn chỉnh. Các chỉ tiêu: chiều cao cây (cm); số lá; số rễ được ghi nhận sau 4 tuần nuôi cấy.

Thích nghi ở điều kiện vườn ươm

Những cây đinh lăng từ thí nghiệm tạo cây hoàn chỉnh được trồng ra vườn ươm với giá thể gồm đất sạch, phân trùn, mụn xơ dừa và tro trấu được phối trộn với tỉ lệ khác nhau. Các chỉ tiêu: tỉ lệ mẫu sống (%); chiều cao cây (cm); số lá mới được ghi nhận sau 8 tuần nuôi cấy.

Quan sát hình thái giải phẫu

Mẫu phôi sẽ được vi phẫu và quan sát hình thái phôi bằng phương pháp nhuộm tế bào: Ngâm lát cắt mẫu vào dung dịch javen (5%) trong 10 - 15 min, rửa mẫu lát cắt bằng nước cất 5 - 6 lần; Tiếp theo ngâm mẫu lát cắt trong dung dịch acid acetic 1% trong 2 min để trung hòa sạch javen còn sót lại và rửa mẫu bằng nước cất 5 - 6 lần; Sau đó, ngâm mẫu lát cắt trong dung dịch xanh iod từ 5 - 10 sec và rửa mẫu bằng nước cất từ 4 - 6 lần; Ngâm tiếp vào dung dịch acetocarmin khoảng 3 min và hơ nhẹ trên ngọn

đèn còn, rửa lại mẫu bằng nước cất từ 4 - 6 lần. Mẫu vi phẫu sau khi nhuộm được quan sát dưới kính hiển vi với các vật kính $\times 4$, $\times 10$ và $\times 40$.

Điều kiện thí nghiệm

In vitro: Nhiệt độ nuôi cấy: $25 \pm 2^\circ\text{C}$, thời gian chiếu sáng 12 h/ngày, cường độ chiếu sáng 2000 - 3000 lux. Môi trường khoáng dinh dưỡng được điều chỉnh ở pH trước hấp khử trùng là 5,7 - 5,8. Các dụng cụ và môi trường nuôi cấy được tiệt trùng bằng autoclave ở nhiệt độ 121°C và 1 atm trong 20 min.

Ex vitro: Các cây khi chuyển ra ngoài vườn ươm được che phủ 70% ánh sáng trong ba tuần đầu và tiếp theo cây sẽ được che phủ 50% ánh sáng, nhiệt độ vườn ươm 28 - 32°C , độ ẩm 70 - 80%.

Xử lý số liệu

Số liệu thu thập được sẽ được xử lý trên máy tính bằng phần mềm xử lý thống kê Excel 2010 và Mini Tab. Kết quả được đọc dựa vào bảng ANOVA, bảng trung bình và so sánh sự khác biệt giữa các nghiệm thức.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Phát sinh phôi soma từ mẫu mô sẹo lá cây Đinh lăng *in vitro*

Kết quả về tỉ lệ phát sinh phôi thông qua nuôi cấy mẫu mô sẹo có nguồn gốc từ mẫu lá được ghi nhận sau 4 tuần và 6 tuần nuôi cấy (Bảng 1). Kết quả cho thấy, nghiệm thức A1 -

A6 cho tỉ lệ mẫu phát sinh phôi đạt từ 24,47 - 51,17% sau 4 tuần và 51,10 - 75,53% sau 6 tuần và cao hơn so với đối chứng (A0) (Bảng 1). Ngoài ra, ở nghiệm thức A0 mẫu vẫn cảm ứng phát sinh phôi sau 4 tuần nuôi cấy với tỉ lệ phát sinh phôi đạt 15,53%. Điều này có thể giải thích là trong thành phần của CW có chứa các acid amin, khoáng chất, đường... Theo Dương Tấn Nhựt và đtg (2012), sucrose có vai trò trong tăng cường khả năng phát sinh phôi đối với Sâm Ngọc Linh. Sucrose là loại đường thường được sử dụng để cung cấp nguồn carbohydrate cho sự phát sinh phôi vô tính.

Sau 6 tuần nuôi cấy, hầu hết các nghiệm thức đều cho tỉ lệ mẫu phát sinh phôi soma tỉ lệ thuận với thời gian nuôi cấy. Cụ thể, nghiệm thức A2 cho tỉ lệ mẫu phát sinh phôi là cao nhất, đạt 75,53% (Bảng 1, Hình 1a, b), tiếp theo đó là nghiệm thức A5 cho tỉ lệ mẫu phát sinh phôi đạt 64,43%. Tuy nhiên, nghiệm thức A4 cho kết quả tỉ lệ mẫu phát sinh phôi đạt 57,77% cao hơn hẳn so với môi trường nuôi cấy bổ sung 1,0 mg/L BA và có sự khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê so với các nghiệm thức còn lại. Điều này chứng tỏ CW có ảnh hưởng lớn đến quá trình phát sinh phôi soma từ mẫu mô sẹo lá Đinh lăng, phù hợp với kết quả của Dương Tấn Nhựt (2007) về sự phát sinh phôi soma Sâm Ngọc Linh trên môi trường nuôi cấy có bổ sung sucrose. Mặt khác, BA cũng đóng vai trò quan trọng trong việc phân biệt hóa mô để tạo thành phôi vô tính (Li, 2011).

Bảng 1. Ảnh hưởng của CW kết hợp với BA lên tỉ lệ (%) mẫu phát sinh phôi soma từ mô sẹo lá cây Đinh lăng sau 4 và 6 tuần nuôi cấy.

| CW (mL/L) | BA (mg/L) | Nghiệm thức | 4 tuần | 6 tuần |
|-----------|-----------|-------------|---------|---------|
| 100 | 0 | A0 | 15,53c* | 31,10c |
| 100 | 0,1 | A1 | 24,47b | 53,33b |
| 100 | 0,5 | A2 | 44,47a | 75,53a |
| 100 | 1,0 | A3 | 46,70a | 55,53b |
| 150 | 0,1 | A4 | 28,90b | 57,77a |
| 150 | 0,5 | A5 | 42,23a | 64,43a |
| 150 | 1,0 | A6 | 51,17a | 51,10a |
| Giá trị F | | | 99,84** | 62,36** |

* Các chữ cái khác nhau (a, b, c...) trong cùng một cột biểu diễn sự khác biệt có ý nghĩa về thống kê với $p < 0,01$. Tỉ lệ mẫu được chuyển đổi sang $\arcsin(x)^{1/2}$ để xử lý thống kê.

Trong nghiên cứu này, BA thể hiện tác động trong quá trình phát sinh phôi soma cả về hình thái và tỉ lệ mẫu phát sinh phôi. Sau 6 tuần nuôi cấy, có thể dễ dàng nhận thấy các phôi phát triển ở từng giai đoạn: phôi hình cầu, hình tim, hình thủy lôi và hai lá mầm (Hình 1c, d). Bên cạnh việc nuôi cấy mô tế bào thực vật thì phát sinh phôi vô tính là một phương pháp đầy hứa hẹn để cải thiện giống cây trồng. Sự phát sinh phôi vô tính là một cách thức phát sinh hình thái để khảo sát những cơ chế ở mức phân tử và biệt hóa tế bào (Benelli *et al.*, 2001). Như vậy, môi trường MS có bổ sung 100 mL/L CW kết hợp với 0,5 mg/L BA là môi trường thích hợp nhất cho sự phát sinh phôi soma từ mô sẹo lá Đinh lăng.

Quan sát phôi dưới kính hiển vi soi nổi và vi phẫu phôi soma quan sát dưới kính hiển vi huỳnh quang cho thấy trong hầu hết hệ thống sinh phôi được mô tả đến nay, tế bào sinh phôi có những đặc điểm thông thường giống của tế bào mô phân sinh như có kích thước nhỏ, đẳng kính, hoạt động biến dưỡng mạnh mẽ, tốc độ phân chia cao, tế bào chất đậm đặc với những hạt tinh bột, nhân lớn, hạch nhân giãn nở, không bào nhỏ, vách tế bào mỏng (Francisco *et al.*, 2006). Những đặc điểm trên được sử dụng để phân biệt các tế bào có khả năng sinh phôi với các tế bào không có khả năng sinh phôi.

Sau 6 tuần quan sát mẫu mô sẹo lá được nuôi cấy trên môi trường cảm ứng phát sinh phôi, kết quả cho thấy hầu hết các công thức môi trường nuôi cấy đều có mẫu biểu hiện sinh phôi và sự phát sinh hình thái rõ rệt. Những mẫu có phát sinh hình thái phôi được chọn để soi dưới kính hiển vi soi nổi nhằm quan sát rõ hơn về hình thái cũng như các giai đoạn phát triển của phôi soma (Hình 1).

Rất khó để phân biệt các tế bào có khả năng phát sinh phôi và các tế bào không phát sinh phôi trong khối tiền phôi. Một phương pháp nhuộm kép đã phát triển để phân biệt hai loại tế bào này (Gupta, Holmstrom, 2005). Quan sát hình thái giải phẫu cho thấy khối tế bào có màu đỏ phát sáng và các tế bào kéo dài trục phôi trong giai đoạn hình tim muộn cho thấy phôi có

cấu trúc lưỡng cực (Hình 2). Điều này chứng minh, phôi được phát sinh từ mẫu mô sẹo lá Đinh lăng là phôi soma với các giai đoạn trưởng thành khác nhau.

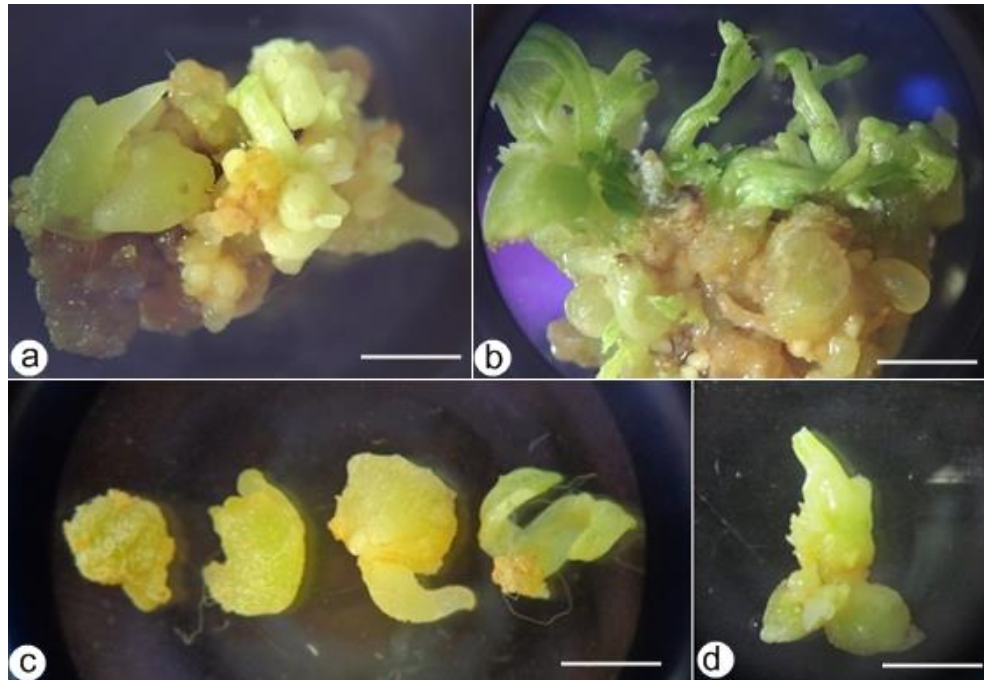
Tóm lại, phôi soma chứa chất sinh dưỡng tương tự phôi hữu tính, có mầm chóp rễ và chồi đỉnh nên có thể nảy mầm trực tiếp thành cây không qua giai đoạn phát sinh chồi, rễ. Các mô và tế bào sinh dưỡng nuôi cấy *in vitro* trực tiếp tạo ra phôi vô tính thông qua một quá trình tạo mô sẹo trung gian. Tế bào mô sẹo có thể phân chia theo cấp số nhân, nhờ vậy, chỉ sau một thời gian ngắn có thể tạo được một số lượng phôi đáng kể. Cho đến nay, có rất nhiều loài cây trồng đã được nhân giống thành công bằng công nghệ phôi vô tính (Loyola-Vargas, Ochoa-Alejo, 2016; Jain, Gupta, 2018).

Tái sinh chồi từ phôi soma Đinh lăng *in vitro*

Sau 8 tuần nuôi cấy, hầu hết các nghiệm thức nuôi cấy đều có tỉ lệ mẫu tái sinh chồi tăng lên so với thời điểm 6 tuần nuôi cấy (Bảng 2).

Trong đó, nghiệm thức B3 cho tỉ lệ mẫu tái sinh chồi cao nhất đạt 83,30%. Tỉ lệ tái sinh chồi thấp nhất sau 8 tuần nuôi cấy thu được ở nghiệm thức B0 với tỉ lệ 33,30%, tiếp theo là nghiệm thức B1 (36,10%). Tỉ lệ tái sinh chồi ở nghiệm thức B3 (83,30%) và B6 (77,77%) cao hơn so với các nghiệm thức còn lại sau 8 tuần nuôi cấy (Bảng 2).

Trong nghiên cứu của Choi và đtg (2001), lá cây *Diospyros kaki* tái sinh tối ưu trên môi trường $\frac{1}{2}$ MS bổ sung 5 mg/L zeatin và 0,1 mg/L IBA. Kết quả tương tự cũng được ghi nhận trên các đối tượng: *Lycopersicon esculentum* tỉ lệ tái sinh chồi đạt 42,3% trên môi trường MS bổ sung 0,05 mg/L NAA và 4,0 mg/L BA (Zubeda *et al.*, 2001); *Zantedeschia albomaculata* bổ sung 2,0 mg/L BA cho kết quả 3,8 chồi/mẫu, kết quả này cao hơn khi bổ sung thêm 0,5 mg/L IBA (Chang *et al.*, 2003). Babu và đtg (2003) cũng nhận thấy trong các môi trường có nồng độ cytokinin cao, chỉ có một chồi phát triển, không có sự hình thành cụm chồi.



Hình 1. Mẫu phôi soma được quan sát dưới kính hiển vi soi nổi ($\times 4$). **a, b:** cụm phôi soma trên môi trường MS bổ sung 100 ml/L nước dừa kết hợp với 0,5 mg/L BA sau 6 tuần nuôi cấy (thước đo: 1 cm); **c, d:** các giai đoạn phát triển của phôi soma (thước đo: 0,7 cm): Phôi hình cầu, hình tim, hình thủy lô và hai lá mầm.



Hình 2. Tế bào phôi soma được quan sát dưới kính hiển vi. **a, b:** tổng thể tế bào phôi soma ($\times 10$); **c, d:** sự phân chia nhân về hai cực của tế bào ($\times 40$), thước đo: 1 cm

Bảng 2. Ảnh hưởng của Kin kết hợp với CW lên tỉ lệ tái sinh chồi (%) từ phôi soma sau 6 và 8 tuần nuôi cấy.

| Kin (mg/L) | CW (mL/L) | Nghiệm thức | 6 tuần | 8 tuần |
|------------|-----------|-------------|---------|---------|
| 0,1 | 0 | B0 | 30,53c* | 33,30d |
| 0,1 | 50 | B1 | 33,30c | 36,10d |
| 0,1 | 100 | B2 | 47,23b | 52,77c |
| 0,1 | 150 | B3 | 80,53a | 83,30a |
| 0,5 | 50 | B4 | 38,90bc | 41,70d |
| 0,5 | 100 | B5 | 69,47a | 72,23b |
| 0,5 | 150 | B6 | 77,77a | 77,77ab |
| Giá trị F | | | 68,90** | |

* Các chữ cái khác nhau (a, b, c...) trong cùng một cột biểu diễn sự khác biệt có ý nghĩa về thống kê với $p < 0,01$.

Bảng 3. Ảnh hưởng của Kin kết hợp với CW lên số chồi TB (chồi) phát sinh từ phôi sau 6 và 8 tuần nuôi cấy.

| Kin (mg/L) | CW (mL/L) | Nghiệm thức | 6 tuần | 8 tuần |
|------------|-----------|-------------|----------|--------|
| 0,1 | 0 | B0 | 2,33f | 2,67e |
| 0,1 | 50 | B1 | 2,67e | 3,00e |
| 0,1 | 100 | B2 | 3,67c | 3,67d |
| 0,1 | 150 | B3 | 5,57a | 6,30a |
| 0,5 | 50 | B4 | 3,33d | 3,63d |
| 0,5 | 100 | B5 | 4,67b | 4,67c |
| 0,5 | 150 | B6 | 5,33a | 5,37b |
| Giá trị F | | | 461,18** | |

* Các chữ cái khác nhau (a, b, c...) trong cùng một cột biểu diễn sự khác biệt có ý nghĩa về thống kê với $p < 0,01$.

Ngoài ra, Sau 6 tuần nuôi cấy cho thấy, tất cả các nghiệm thức môi trường nuôi cấy đều có phôi soma nảy mầm thành cụm chồi. Chồi có màu xanh đậm và xuất hiện nhiều chồi nhất là nghiệm thức môi trường có 0,1 mg/L Kin và 150 mL/L CW (Bảng 3). Ở nghiệm thức B0, mẫu có xu hướng bị xộp mặc dù vẫn tái sinh chồi. Mặt khác, song song với quá trình phát sinh chồi, khi quan sát mẫu luôn nhìn thấy rễ và chồi mọc đồng hành vì các chồi này được phát sinh từ phôi soma là quá trình biệt hóa các tế bào sinh dưỡng thành phôi vô tính. Các phôi vô tính này tương tự như phôi hữu tính về mặt hình thái. Chúng có cấu trúc lưỡng cực và chứa đầy đủ các bộ phận của một phôi, bao gồm mầm chóp rễ và chồi đỉnh (Dương Tấn Nhựt, 2011).

Sau 8 tuần nuôi cấy, số chồi mới hình thành tỉ lệ thuận với thời gian nuôi cấy, số chồi trung bình có xu hướng tăng so với thời điểm quan sát

lúc 6 tuần nuôi cấy. Trong đó, nghiệm thức B3 vẫn là môi trường tối ưu nhất cho sự phát sinh chồi với số chồi trung bình đạt 6,30 chồi. Ở các nghiệm thức còn lại, mẫu có hiện tượng bị xộp và hóa nâu tại những vị trí không tái sinh chồi. Những mẫu bị hóa nâu và xộp không có khả năng tái sinh chồi cũng như tăng sinh phôi vì sau 10 tuần nuôi cấy các mẫu này đã bị chết dần.

Qua đó, chứng tỏ các mô phôi soma nếu không được nảy mầm sẽ tiếp tục biệt hóa hoặc không được cấy chuyển sang môi trường giảm chất điều hòa sinh trưởng sẽ làm cho mẫu nuôi cấy có hiện tượng bị xộp và hóa nâu. Dương Tấn Nhựt (2007) cũng chỉ ra rằng sự biệt hóa mô của phôi vô tính sau giai đoạn tiền phôi hay giai đoạn hình cầu cần có sự loại bỏ các chất điều hòa sinh trưởng khỏi môi trường, hoặc ít nhất là phải làm giảm chất điều hòa sinh trưởng

đến một nồng độ cho phép để có thể đáp ứng cho sự tăng sinh của phôi và sự phát triển hoàn chỉnh sau đó. Như vậy, môi trường có bổ sung 0,1 mg/L Kin kết hợp với 150 mL/L CW là môi trường nuôi cấy phù hợp nhất cho sự tái sinh chồi và hình thành cụm chồi với các chỉ tiêu về tỉ lệ mẫu tái sinh chồi cao nhất (88,30%) và số chồi trung bình hình thành là 6,30 chồi sau 8 tuần nuôi cấy (Hình 3a).

Tạo cây đỉnh lăng *in vitro* hoàn chỉnh

Kết quả nghiên cứu cho thấy, số rễ (3,67 rễ), chiều cao cây (5,13 cm) và số lá trung bình (3,33 lá) thu nhận được ở nghiệm thức C5 là tối ưu sau 8 tuần nuôi cấy (Bảng 4). Ở nghiệm thức C0 chiều cao cây (5,27 cm), số lá trung bình (3,33 lá) tương đương nghiệm thức C5; tuy nhiên, số rễ trung bình lại thấp nhất 1,35 rễ. Do đó, cho thấy ngoài sự tác động của đường còn có sự tác động chủ yếu của CW đến sự phát sinh hình thái lá và chiều cao cây cũng như số rễ. Môi trường thích

hợp nhất cho việc tạo rễ cây Đỉnh lăng *in vitro* là môi trường ở nghiệm thức C5 (Hình 3b).

Thuần hóa cây Đỉnh lăng nuôi cấy mô ngoài vườn ươm

Cây Đỉnh lăng *in vitro* đạt tiêu chuẩn, chiều cao khoảng 3 - 5 cm, có từ 2 - 4 lá thật và 4 rễ trở lên được tiến hành thuần hóa trên các loại giá thể trồng khác nhau. Thành phần giá thể rất quan trọng, góp phần vào sự sống sót của cây trong quá trình thuần hóa, đảm bảo cây có tỉ lệ sống cao, sinh trưởng tốt. Các thành phần giá thể được sử dụng để thuần hóa cây Đỉnh lăng gồm: đất sạch, phân trùn, mụn xơ dừa và tro trấu được phối trộn theo công thức tổng là 100. Việc đánh giá sự thích nghi của cây thông qua chỉ tiêu tỉ lệ sống, số lá mới và chiều cao cây (Bảng 5, Hình 3c). Các nghiên cứu trước đây cho thấy rằng, các cây hai lá mầm và cây thuộc họ xương rồng đều dễ sống sót khi đưa ra ngoài vườn ươm (Estrada-Luna *et al.*, 2008).

Bảng 4. Ảnh hưởng của đường kết hợp với CW lên sự sinh trưởng của cây Đỉnh lăng sau 8 tuần nuôi cấy.

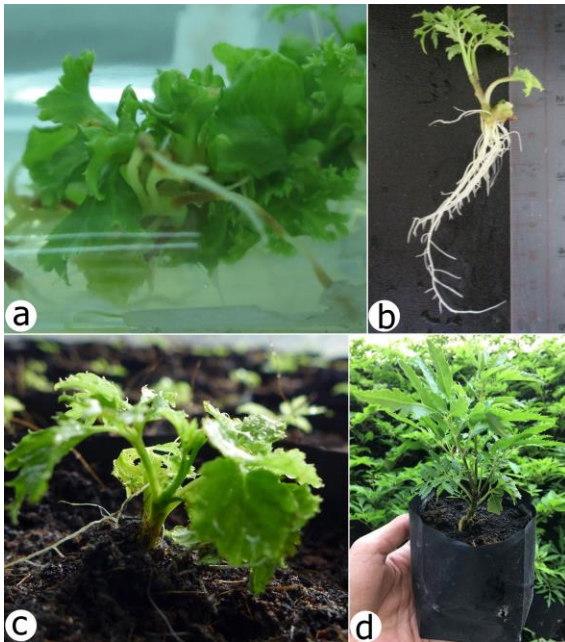
| Đường (g/L) | CW (mL/L) | Nghiệm thức | Chiều cao TB (cm) | Số lá TB (lá) | Số rễ TB (rễ) |
|-------------|-----------|-------------|-------------------|---------------|---------------|
| 30 | 0 | C0 | 5,27a* | 3,33a | 1,35f |
| 30 | 50 | C1 | 4,13cd | 2,64b | 1,67ef |
| 30 | 70 | C2 | 3,83d | 2,39bc | 2,02de |
| 30 | 100 | C3 | 3,37e | 2,07c | 3,02b |
| 40 | 50 | C4 | 4,20c | 2,66b | 2,33cd |
| 40 | 70 | C5 | 5,13a | 3,33a | 3,67a |
| 40 | 100 | C6 | 4,70b | 2,67b | 2,67bc |
| Giá trị F | | | 101,96** | 20,73** | 119,50** |

*Các chữ cái khác nhau (a, b, c...) trong cùng một cột biểu diễn sự khác biệt có ý nghĩa về thống kê với $p < 0,01$.

Bảng 5. Sự sinh trưởng của cây Đỉnh lăng *in vitro* được thuần hóa sau 4 tuần trồng ở điều kiện vườn ươm.

| Đất sạch | Phân trùn | Mụn xơ dừa | Tro trấu | Nghiệm thức | Tỉ lệ sống (%) | Chiều cao TB (cm) | Số lá TB (lá) |
|-----------|-----------|------------|----------|-------------|----------------|-------------------|---------------|
| 30 | 10 | 0 | 60 | D0 | 40,70d* | 5,07e | 0,67f |
| 30 | 10 | 10 | 50 | D1 | 51,87cd | 5,47d | 1,33e |
| 30 | 10 | 20 | 40 | D2 | 70,40ab | 6,30b | 1,67d |
| 30 | 20 | 30 | 20 | D3 | 85,20a | 7,67a | 2,67a |
| 30 | 20 | 40 | 10 | D4 | 74,10ab | 6,57b | 2,37b |
| 30 | 20 | 50 | 0 | D5 | 59,23bc | 5,87c | 2,00c |
| Giá trị F | | | | | 18,94** | 157,05** | 146,79** |

*Các chữ cái khác nhau (a, b, c...) trong cùng một cột biểu diễn sự khác biệt có ý nghĩa về thống kê với $p < 0,01$.



Hình 3. Nhân giống cây Đinh lăng lá xẻ thông qua phát sinh phôi soma. **a:** cụm chồi nuôi cấy trên môi trường MS + 0,1 mg/L Kin + 150 mL/L CW; **b:** cây hoàn chỉnh nuôi cấy trên môi trường MS + 40 g/L đường + 70 mL/L CW; **c, d:** cây trồng trên giá thể 30 đất sạch + 20 phân trùn + 30 mụn xơ dừa + 20 tro trấu sau 4 và 12 tuần.

Quan sát và ghi nhận chỉ tiêu sau 4 tuần thuần hóa ngoài vườn ươm cho thấy, giá thể ở nghiệm thức D3 cho tỉ lệ sống của cây Đinh lăng là cao nhất (85,20%) và có sự khác biệt so với các nghiệm thức còn lại. Trong khi đó, nghiệm thức D0 có tỉ lệ cây sống sót sau 4 tuần thuần hóa ngoài vườn ươm đạt thấp nhất 40,70%. Ở nghiệm thức D5 trong thành phần giá thể không có tro trấu nhưng tỉ lệ sống sót của cây đạt 59,23% khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê so với nghiệm thức F1.

Như vậy, trên giá thể có chứa mụn xơ dừa sẽ cho tỉ lệ cây sống sót cao. Kết quả đạt được tương tự trong nghiên cứu của Nguyễn Ngọc Phương (2006), thành phần mụn xơ dừa trong giá thể trồng là rất quan trọng. Mụn xơ dừa là một sản phẩm phụ từ việc chế biến chỉ xơ dừa, là phần còn lại sau khi tước lấy chỉ xơ dừa, mụn xơ dừa có khả năng giữ một trữ lượng nước rất lớn. Trong vỏ dừa, tính theo trọng lượng khô có 19% là lớp vỏ ngoài, 34% mụn dừa và 47% là xơ dừa. Cây Tam thất Nam *in vitro* được trồng

trong giá thể với tỉ lệ phối trộn gồm 10% phân trùn, 30% đất, 30% tro trấu và 30% mụn xơ dừa là loại giá thể tốt nhất cho cây sinh trưởng ở điều kiện môi trường nhà lưới với hệ rễ mới của cây ổn định và sau 5 ngày trồng, cây có số rễ mới trung bình nhiều: đạt 11,80 rễ mới với chiều dài trung bình của rễ đạt 3,09 cm.

Trong nghiên cứu này, chiều cao cây (7,67 cm) và số lá (2,67) đạt cao nhất sau 4 tuần thuần hóa vườn ươm trên giá thể D3. Công thức giá thể này cũng cho kết quả tỉ lệ cây sống đạt 85,20%. Đây là giá thể thích hợp nhất cho việc thuần hóa cây Đinh lăng ngoài vườn ươm (Hình 3c). Sau 12 tuần thuần hóa ở điều kiện vườn ươm, cây Đinh lăng cho sự sinh trưởng và phát triển tốt (Hình 3d).

KẾT LUẬN

Kết quả nghiên cứu này cho thấy, nhân giống *in vitro* cây đinh lăng lá xẻ nhỏ thông qua phát sinh phôi vô tính từ những mô sẹo có nguồn gốc nuôi cấy mẫu lá *in vitro* có thể thực hiện được. Kin kết hợp với nước dừa có ảnh hưởng đến tỉ lệ tái sinh chồi và số chồi. Ngoài ra, cây *in vitro* được nuôi cấy trên môi trường có bổ sung 30 g/L đường và 100 mL/L nước dừa cho số rễ cao nhất và khả năng thuần hóa cây đinh lăng ngoài vườn ươm trên giá thể kết hợp (30 đất sạch + 20 phân trùn + 30 mụn xơ dừa + 20 tro trấu) cho tỉ lệ sống cao nhất (85,20%).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Babu K, Sajina A, Mino D, Mini PM, Tushar KV, Rema J, Ravindran PN (2003) Micropropagation of camphor tree (*Cinnamomum camphora*). *Plant Cell Tiss Org Cult* 74: 179-183.
- Benelli C, Fabbri A, Grassi S, Lambardi M, Rugini E. (2001) Histology of somatic embryogenesis in mature tissue of olive (*Olea europaea* L.). *J Hort Sci Biot* 76: 112-119.
- Bhaskaran S, Smit RH (1990) Regeneration in cereal tissue culture. *Crop Sci* 30: 1328-1337.
- Chang H, Charkabarty D, Hahn E, Paek K (2003) Micropropagation of calla lily (*Zantedeschia*

- albomaculata*) via *in vitro* shoot tip proliferation. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 39(2): 129-134.
- Choi J, Kim H, Lee C, Bae L, Chung Y, Shin J, Hyung N (2001) Efficient and simple plant regeneration via organogenesis from leaf segment culture of persimmon (*Diospyros kaki* Thunb.). *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 37(2): 274-279.
- Dương Tấn Nhựt (2007) *Công nghệ sinh học thực vật*. Tập 1. Nhà xuất bản Nông nghiệp, Thành phố Hồ Chí Minh.
- Dương Tấn Nhựt (2011) *Công nghệ sinh học thực vật: Nghiên cứu cơ bản và ứng dụng*. Nhà xuất bản Nông nghiệp, Thành phố Hồ Chí Minh.
- Dương Tấn Nhựt, Nguyễn Cửu Thành Nhân, Hoàng Xuân Chiến, Nguyễn Phúc Huy, Nguyễn Bá Nam, Trần Xuân Ninh, Phạm Phong Hải, Vũ Quốc Luận, Phan Quốc Tâm, Vũ Thị Hiền, Trịnh Thị Hương, Trần Công Luận, Paek Kee Yoeup (2012) Một số hệ thống nuôi cấy trong nghiên cứu nhân nhanh rễ bất định và rễ thứ cấp cây Sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.). *Tạp chí Công nghệ Sinh học* 10(4A): 887-897.
- Đỗ Huy Bích, Đặng Quang Chung, Bùi Xuân Chương, Nguyễn Thượng Đông, Đỗ Trung Đàm, Phạm Văn Hiến, Vũ Ngọc Lộ, Phạm Duy Mai, Phạm Kim Mãn, Đoàn Thị Nhu, Nguyễn Tập, Trần Toàn (2004) *Cây thuốc và động vật làm thuốc ở Việt Nam*. Tập 1. Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật: 215-217.
- Estrada-Luna AA, Torres-Torres ME, Chable-Moreno F (2008) *In vitro* micropropagation of the ornamental prickly pear cactus *Opuntia lanigera* Salm-Dyck and effects of sprayed GA3 after transplantation to *ex vitro* conditions. *Sci Hort* 117: 378-385.
- Gupta PK, Holmstrom D (2005) *Double staining technology for distinguishing embryogenic culture*. In Jain SM, Gupta PK, eds: *Protocol for somatic embryogenesis in woody plants*. Springer Publishers: 573-575.
- Hà Bích Hồng, Vũ Thị Thơm, Vũ Đức Lợi, Lê Anh Tuấn, Nguyễn Thanh Hải (2013) Bước đầu xây dựng quy trình nhân giống *in vitro* cây Đinh lăng lá nhỏ (*Polyscias fruticosa* L. Harms). *Tạp chí Dược học* 53: 10.
- Haliloglu K (2006) Efficient regeneration systems from wheat leaf base segments. *Biol Plant* 50(3): 326-330.
- Hussein S, Ibrahim R, Kiong ALP (2006) Somatic embryogenesis: An alternative method for *in vitro* micropropagation. *Iran J Biotechnol* 4(3): 156-161.
- Jain SM (2018) *Step wise protocols for somatic embryogenesis of important woody plants*. Springer International Publishing, Singapore. doi: 10.1007/978-3-319-89483-6.
- Li S, Li J, Yang XL, Cheng Z, Zhang WJ (2011) Genetic diversity and differentiation of cultivated ginseng (*Panax ginseng* C.A. Meyer) populations in North-east China revealed by inter simple sequence repeat (ISSR) markers. *Genet Resour Crop Evol* 58: 815-824.
- Lizt RE, Gray DJ (1995) Somatic embryogenesis for agriculture improvement. *World J Microbiol Biotechnol* 11: 416-425.
- Loyola-Vargas V, Ochoa-Alejo N (2016) *Somatic embryogenesis: Fundamental aspects and applications*. Springer International Publishing Switzerland. doi: 10.1007/978-3-319-33705-0.
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures. *Physiol Plant* (15): 473-497.
- Ngô Thị Tú Trinh (2010) Nghiên cứu tạo phôi vô tính và thử nghiệm chuyển gen tạo rễ tốc thông qua vi khuẩn *Agrobacterium rhizogenes* ở cây Đinh lăng (*Polyscias fruticosa* L. Harms). *Khóa luận Kỹ sư Công nghệ sinh học*. Trường Đại học Nông Lâm Thành phố Hồ Chí Minh.
- Nguyễn Ngọc Dung (1998) *Nhân giống cây Đinh lăng (Polyscias fruticosa L. Harms) thông qua con đường tạo phôi soma trong nuôi cấy in vitro*. Trung tâm Khoa học tự nhiên và Công nghệ quốc gia. Viện Sinh học nhiệt đới. Nhà xuất bản Nông nghiệp, Thành phố Hồ Chí Minh.
- Nguyễn Ngọc Phương (2006) Xác định một số điều kiện hoạt động tối ưu cho các chủng xạ khuẩn có khả năng phân giải lignin và cellulose trong mật dừa. *Luận văn Thạc sĩ, chuyên ngành Sinh hóa*. Trường Đại học Khoa học Tự nhiên Thành phố Hồ Chí Minh.
- Nguyễn Trần Châu, Đỗ Mai Anh, Nguyễn Phương Dung (2007) Nghiên cứu tác dụng dược lý thực nghiệm của sản phẩm nuôi cấy mô từ cây Đinh lăng *Polyscias fruticosa* L. Harms họ Araliaceae. *Tạp chí nghiên cứu Y học – Khoa Y học cổ truyền, Đại học Y dược Thành phố Hồ Chí Minh* 11(2): 126-131.

- Nguyễn Trung Hậu, Lê Thị Như Thảo, Trần Văn Minh (2015) Nuôi cấy mô lá Đinh lăng (*Polyscias fruticosa* L. Harms) tạo rễ tơ và định lượng hoạt chất saponin tích lũy. *Tạp chí Sinh học* 37(1se): 184-189.
- Ninh Thị Pháp (2013) Một số biện pháp kỹ thuật tăng khả năng nhân giống của cây Đinh lăng lá nhỏ. *Tạp chí Khoa học và Phát triển* 11(2): 168-173
- Ozlem YC, Gurel A, Fazilet VS (2010) *Large scale cultivation of plant cell and tissue culture in bioreactors*. Transworld Research Network, Kerala, India: 1-54.
- Phạm Hoàng Hộ (2000) *Cây cỏ Việt Nam*. Quyển III. Nhà xuất bản Trẻ: 516-518.
- Sharma AK, Sharma A (1980) *Chromosome techniques*. Theory and practice, 3rd ed. Butterworths, London.
- Sun YL, Hong SK (2012) *Recent advances of in vitro embryogenesis of monocotyledon and dicotyledon*. In Sato KI, ed. *Embryogenesis*. Intech BKCI: 269-296
- Wang HQ, Yu JT, Zhong JJ (1999) Significant improvement of taxane production in suspension cultures of *Taxus chinensis* by sucrose feeding strategy. *Pro Biochem* 35: 479-483.
- Yong JWH, Ng YF, Tan SN (2009) The chemical composition and biological properties of coconut (*Cocos nucifera* L.) water. *Molecules* 14: 5144-5164.
- Zubeda C, Imran F, Waseem A, Hamid R, Bushra M, Azra Q (2001) Varietal response of *Lycopersicon esculentum* L. to callogenesis and regeneration. *J Biol Sci* 1(12): 1138-1140.

SOMATIC EMBRYOGENESIS OF *Polyscias fruticosa* L. Harms VIA CULTURING EX VITRO LEAF EXPLANT

To Thi Nha Tram¹, Truong Phi Yen¹, Ton Trang Anh¹, Hoang Thanh Tung², Ha Thi My Ngan², Duong Tan Nhut²

¹*Nong Lam University, Ho Chi Minh City*

²*Tay Nguyen Institute for Scientific Research, Vietnam Academy of Science and Technology*

SUMMARY

Polyscias fruticosa L. Harms is a medicinal plant containing alkaloids, glycosides, saponins, vitamins and phytosterols with many ginseng-like pharmacological effects such as strengthening fitness, increasing resistance and flexibility. However, the research on micropropagation on this plant is still limited. In this study, post-sterile leaf explants were used as initial culture material for the embryogenic- calli capable of producing somatic embryos (including morphology of somatic embryonic development stages), rooting and evaluation of acclimatization and growth at the greenhouse. The results showed that calli 0.5 cm gave optimum somatic embryos rate (75.53%) on MS medium supplemented with 100 mL/L of coconut water and 0.5 mg/L BA after 6 weeks of culture. The somatic embryo culture on MS medium added 0.1 mg/L Ki combined with 150 mL/L coconut water gave higher shoots regeneration rate (83.30%) and the number of shoots (6.30 shoots) than those cultured on other treatments after 8 weeks of culture. Besides, the *in vitro* plants were cultured on MS medium supplemented with 30 g/L sucrose and 100 mL/L coconut water for the highest number of roots (3.02 roots) and the ability to tame in the greenhouse (30 soil + 20 vermicomposts + 30 coconut husk + 20 husk ash) for high survival rate of 85.20%.

Keywords: *Coconut water, embryogenesis, leaf explant, Polyscias fruticosa*.