

VI NHÂN GIỐNG CÂY RUSCUS (*RUSCUS ACULEATUS* L.)

Đinh Văn Khiêm[✉], Hoàng Văn Cương, Nguyễn Thị Thanh Hằng, Phan Xuân Huyền, Nguyễn Thị Phượng Hoàng

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: dvankhiem@gmail.com

Ngày nhận bài: 21.11.2016

Ngày nhận đăng: 23.10.2017

TÓM TẮT

Ruscus (Ruscus aculeatus L.) là cây thường xanh, nhỏ, được sử dụng như cây cảnh hoặc làm thuốc. *Ruscus* được sử dụng làm cây trang trí vì các cành cây *Ruscus* có thể giữ trong một thời gian dài mà không bị héo. Hiện nay, số lượng loài này đang suy giảm đáng kể do thiếu sự sản xuất hạt cũng như việc khai thác cho mục đích y học và cắt cành trang trí. Vi nhân giống mở ra các hướng mới về bảo tồn *ex situ* cũng như tạo ra nguồn vật liệu trong sản xuất thương mại loại cây này. Trong nghiên cứu này, ảnh hưởng của BA, NAA và nước dừa lên quá trình nhân nhanh chồi cũng như IBA lên quá trình ra rễ, các loại giá thể khác nhau lên sự thích nghi và sinh trưởng của cây con ở điều kiện vườn ươm đã được thực hiện. Kết quả thu được cho thấy môi trường $\frac{1}{2}$ MS có bổ sung 4 mg/l BA, 0,5 mg/l NAA, 15% (v/v) nước dừa, 30 g/l sucrose, pH 5,8 là thích hợp cho quá trình nhân nhanh chồi cây *Ruscus in vitro* (20,2 chồi, chiều cao chồi đạt 6,0 cm). Trong khi đó, môi trường $\frac{1}{2}$ MS có bổ sung 1,5 mg/l IBA, 30 g/l sucrose, pH 5,8 phù hợp cho quá trình ra rễ *in vitro* của cây *Ruscus* (tỷ lệ ra rễ 100%, 16,66 rễ, chiều dài rễ đạt 1,9 cm). Giá thể xơ dừa cũng phù hợp cho sự thích nghi và sinh trưởng của cây *Ruscus* sau 2 tháng trồng ở vườn ươm (tỷ lệ sống sót đạt 85%, 8,7 rễ và chiều cao cây đạt 7,6 cm). Nghiên cứu đã hoàn thiện quy trình nhân giống cây *Ruscus* phục vụ cho sản xuất thương mại.

Từ khóa: *In vitro*, nhân nhanh chồi, *Ruscus*, sự ra rễ, vi nhân giống

ĐẶT VẤN ĐỀ

Ruscus aculeatus L. là cây thường xanh, lâu năm mọc thành bụi, có nguồn gốc từ châu Âu, cao khoảng 1m, nhánh cây giống như lá, có gai ở cuối nhánh, hoa màu trắng xanh, quả láng màu đỏ, thường được trồng làm cây trang trí. Ngoài ra, loài *Ruscus aculeatus* L. có chứa chất saponin glucosides gồm có ruscogenin và neoruscogenin có cấu trúc tương tự như của diosgenin được tìm thấy trong cây khoai mỡ (*Dioscorea villosa*) có tác dụng kháng viêm và làm co tĩnh mạch đối với các bệnh nhân bị chứng giãn tĩnh mạch (Martinez-Palle, Aronne, 2000; De, De, 2005).

Thành công nhân giống loài cây này khá thấp, chủ yếu là do thiếu khả năng thụ phấn (Martinez-Palle, Aronne, 2000), dẫn tới nguy cơ tuyệt chủng trong tương lai gần. *Ruscus* được nhân giống bằng hạt hoặc tách các thân rễ ngầm trong đất. Việc gieo hạt phải tốn nhiều thời gian, khoảng 12 tháng mới có thể có cây trồng ra ngoài đồng ruộng; việc tách các

thân ngầm thì hệ số nhân thấp, dễ bị nhiễm bệnh, ảnh hưởng đến chất lượng cây giống. Để có thể đáp ứng nhu cầu thực tế về cây giống và khắc phục các nhược điểm của các phương pháp nhân giống truyền thống, cây *Ruscus* đã được nhân giống bằng kỹ thuật nuôi cấy *in vitro*. Trên thế giới, đã có một số nghiên cứu trên đối tượng *Ruscus aculeatus* L. đã được thực hiện. Trong đó, Plazon *et al.*, (2006) đã nuôi cấy thành công callus từ lớp cắt ngang thân rễ của *Ruscus aculeatus* L. nhằm chiết xuất saponin. Moyano *et al.*, (2006) cũng đã trình bày ba phương pháp nuôi cấy cây *Ruscus*: từ phôi chưa trưởng thành, từ thân rễ và phát sinh cơ quan từ callus. Kết quả đã tạo được cây hoàn chỉnh đưa trồng trong điều kiện vườn ươm. Manole và Banciu (2015) đã nghiên cứu quá trình nhân nhanh chồi cây *Ruscus aculeatus* L. trên môi trường có bổ sung BA và NAA, kết quả thu được một số lượng lớn chồi sau ba lần cấy chuyển. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã tìm hiểu ảnh hưởng của các chất điều hòa sinh trưởng khác nhau (bổ sung riêng lẻ hoặc kết hợp) lên sự nhân nhanh chồi và ra rễ tạo cây hoàn chỉnh, từ đó hoàn

thiện quy trình nhân giống *in vitro* cây *Ruscus aculeatus* L. Bên cạnh đó, chúng tôi cũng nghiên cứu ảnh hưởng của nước dừa lên sự nhân nhanh chồi và giá thể lên khả năng thích nghi của loài cây này tại vườn ươm, chưa được thực hiện ở các nghiên cứu trước đây. Bên cạnh đó, nghiên cứu vi nhân giống cây *Ruscus* nhằm tạo ra nguồn cây giống để đáp ứng nhu cầu sản xuất thương mại cũng rất cần thiết.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu

Mẫu cây được sử dụng trong nghiên cứu này là các chồi có sẵn trong phòng thí nghiệm có nguồn gốc từ nuôi cấy mẫu thân rễ cây *Ruscus aculeatus* L.) 1 năm tuổi khoẻ mạnh, không có biểu hiện bệnh được trồng tại vườn ươm của Viện Nghiên cứu Khoa học Tây Nguyên (Hình 1a).

Mẫu thân rễ được làm sạch sơ bộ bên ngoài bằng dung dịch xà phòng loãng, rửa lại bằng nước sạch rồi tiến hành vô trùng trong tủ cấy. Mẫu cây được khử trùng bằng dung dịch $HgCl_2$ nồng độ 0,1% trong 10 phút và rửa lại mẫu bằng nước vô trùng.

Mẫu thân rễ sau khi khử trùng được nuôi cấy trên môi trường $\frac{1}{2}MS$ (Murashige, Skoog, 1962) có bổ sung 1 mg/l BA (Benzyladenine, Merck, Đức), 30 g/l sucrose (Công ty cổ phần Đường Biên Hòa, Việt Nam), 8 g/l agar (Việt Nam), pH = 5,8. Các chồi thu được từ giai đoạn này được sử dụng làm vật liệu ban đầu cho các thí nghiệm của nghiên cứu này (Hình 1b).

Môi trường và điều kiện nuôi cấy

Môi trường được sử dụng trong tất cả các thí nghiệm là môi trường $\frac{1}{2}MS$ có bổ sung 30 g/l sucrose, 8 g/l agar, pH = 5,8 và các chất điều hòa sinh trưởng khác nhau.

Điều kiện nuôi cấy *in vitro*: thời gian chiếu sáng 8 giờ/ngày, cường độ chiếu sáng 2.500 - 3.000 lux, nhiệt độ $25 \pm 2^\circ C$, độ ẩm trung bình khoảng 75 - 80%.

Các cây con *in vitro* được chuyển ra điều kiện ngoài vườn ươm với nhiệt độ 18 - 25°C, độ ẩm trung bình khoảng 80 - 85% và sử dụng ánh sáng tự nhiên.

Ảnh hưởng của BA lên khả năng nhân nhanh chồi cây *Ruscus in vitro*

Các chồi cây *Ruscus* được cấy vào môi trường có bổ sung BA tại các nồng độ: 0, 1, 2, 3, 4, 5 mg/l. Mục đích của thí nghiệm này nhằm xác định nồng độ

BA phù hợp trong việc nhân nhanh chồi. Chỉ tiêu theo dõi là số chồi và chiều cao chồi.

Ảnh hưởng của BA và NAA lên khả năng nhân nhanh chồi cây *Ruscus in vitro*

Trên cơ sở của thí nghiệm trước, chúng tôi tiếp tục nghiên cứu ảnh hưởng của BA (ở nồng độ tốt nhất thu được từ thí nghiệm trên) kết hợp với NAA (naphthalene acetic acid, Merck, Đức) ở các nồng độ: 0,3; 0,5; 0,7; 1,0 mg/l. Chỉ tiêu theo dõi là số chồi và chiều cao chồi.

Ảnh hưởng của nước dừa lên khả năng nhân nhanh chồi cây *Ruscus in vitro*

Trong thí nghiệm tiếp theo, chúng tôi tiếp tục nghiên cứu ảnh hưởng của nước dừa lên quá trình tăng sinh chồi. Các chồi được nuôi cấy trên môi trường tốt nhất thu được từ thí nghiệm trên có bổ sung nước dừa tại các nồng độ: 5, 10 và 15% (v/w).

Ảnh hưởng của NAA và IBA lên khả năng ra rễ cây *Ruscus in vitro*

Chồi thu được từ giai đoạn nhân nhanh được sử dụng làm nguyên liệu cho quá trình ra rễ, tạo cây hoàn chỉnh. Các chồi cây *Ruscus* được nuôi cấy trên môi trường có bổ sung NAA hoặc IBA (indole-3-butyric acid, Merck, Đức) ở các nồng độ: 0,5; 1,0; 1,5 mg/l. Các chỉ tiêu theo dõi là tỷ lệ ra rễ, số rễ, chiều dài rễ.

Ảnh hưởng của giá thể lên sự thích nghi và sinh trưởng của cây con ở giai đoạn vườn ươm

Các cây *Ruscus* con hoàn chỉnh từ nuôi cấy *in vitro* được đưa ra ngoài điều kiện vườn ươm và được trồng trên giá thể: xơ dừa (100%); xơ dừa có bổ sung 10% trấu hun; xơ dừa bổ sung 20% trấu hun để tạo thêm sự thông thoáng. Các chỉ tiêu theo dõi bao gồm tỷ lệ sống sót, số rễ và chiều cao cây sau 2 tháng trồng ở vườn ươm.

Phân tích và xử lý số liệu

Mỗi nghiệm thức được bố trí với 10 bình nuôi cấy. Mỗi thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Số liệu được xử lý và phân tích bằng phép thử Duncan (Duncan, 1995) với $P < 0,05$.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Ảnh hưởng của BA lên khả năng nhân nhanh chồi cây *Ruscus in vitro*

Trong thí nghiệm này, các mẫu chồi cây *Ruscus* được nuôi cấy trên môi trường có bổ sung BA ở các nồng độ khác nhau. Sau 2,5 tháng nuôi cấy, kết quả thu được cho thấy chồi cây *Ruscus* trên môi trường ½MS có bổ sung BA ở các nồng độ khác nhau cho sự nhân nhanh chồi khác nhau (Bảng 1).

Số lượng chồi thu được tăng dần khi nồng độ BA bổ sung trong môi trường tăng từ 1 - 4 mg/l; tuy

nhiên, khi nồng độ BA lên đến 5 mg/l, số lượng chồi thu được bắt đầu giảm (Bảng 1, Hình 1c). Kết quả thu được cũng cho thấy môi trường ½MS có bổ sung 4 mg/l BA cho số lượng chồi (9,7 chồi) cũng như chiều cao chồi (3,1 cm) là phù hợp nhất trong thí nghiệm này. Bên cạnh đó, trên môi trường đối chứng và bổ sung BA ở nồng độ thấp, các chồi *Ruscus* nuôi cấy hầu như không sinh trưởng hoặc sinh trưởng kém, thu được số lượng chồi ít.

Bảng 1. Ảnh hưởng của BA lên khả năng nhân nhanh chồi cây *Ruscus in vitro*.

BA (mg/l)	0	1	2	3	4	5
Số chồi	1,3d*	2,6d	5,3c	7,6b	9,7a	9,0ab
Chiều cao chồi (cm)	1,5b	2,5ab	2,4ab	3,0a	3,1a	3,4a

Ghi chú: *Những ký tự khác nhau (a, b, c,...) trong cùng một hàng thể hiện sự sai khác có ý nghĩa với độ tin cậy P < 0,05 trong phép thử Duncan's test.*

BA thường được sử dụng để kích thích sự phân hóa, sinh trưởng và phát triển chồi của mẫu cây *in vitro*. Tác dụng chủ yếu BA là kích thích sự phân chia mạnh mẽ của tế bào, đặc biệt ảnh hưởng rõ rệt lên sự hình thành và phân hoá chồi (Nguyễn Văn Kết, Nguyễn Văn Linh, 2010). Trong nghiên cứu này, BA thể hiện vai trò trong việc kích thích sự nhân nhanh các chồi cây *Ruscus* nuôi cấy *in vitro*.

Như vậy, trong điều kiện thí nghiệm này môi trường ½MS có bổ sung 4 mg/l BA cho hệ số nhân nhanh chồi cây *Ruscus in vitro* cao nhất.

Ảnh hưởng của BA và NAA lên khả năng nhân nhanh chồi cây *Ruscus in vitro*

Từ kết quả của thí nghiệm trên, chúng tôi tiến hành sử dụng nghiệm thức tốt nhất cho khả năng nhân chồi (4 mg/l BA) và bổ sung thêm NAA ở các nồng độ khác nhau nhằm nghiên cứu sự gia tăng hệ số nhân nhanh chồi cây *Ruscus in vitro*.

Sau 2,5 tháng nuôi cấy, kết quả thu được cho thấy khi bổ sung kết hợp BA và NAA thì có tác dụng kích thích sự nhân nhanh và phát triển của chồi tốt hơn sử dụng BA độc lập (Bảng 2, Hình 1d). Điều

này cho thấy bổ sung phối hợp BA và NAA phù hợp cho sự nhân nhanh và phát triển chồi cây *Ruscus in vitro*. Khi gia tăng nồng độ NAA từ 0 - 0,5 mg/l kết hợp với BA thì số chồi cũng như chiều cao chồi tăng. Tuy nhiên, khi nồng độ NAA cao hơn 0,5 mg/l thì khả năng nhân nhanh chồi cây *Ruscus* giảm dần. Kết quả thu được cũng cho thấy môi trường có bổ sung 4 mg/l BA và 0,5 mg/l NAA cho khả năng nhân nhanh chồi là tốt nhất với 15 chồi và chiều cao chồi đạt 4,8 cm.

Kết quả ở thí nghiệm này tương tự với kết quả của một số nghiên cứu trước đây. Manole và Banciu (2015) cho rằng sự nhân nhanh chồi của cây *Ruscus* là tốt nhất trên môi trường có bổ sung BA ở nồng độ cao và NAA ở nồng độ thấp (22,2 µM BA và 5,37 µM NAA). Dưới tác động của sự kết hợp giữa hai loại chất điều hòa sinh trưởng này đã làm gia tăng sự nhân nhanh chồi một cách hiệu quả. Nghiên cứu của Banciu và Brezeanu (2008) cũng cho thấy khả năng nhân nhanh mẫu cây tốt hơn trên môi trường có bổ sung kết hợp giữa BA và NAA.

Như vậy, trong điều kiện thí nghiệm này, môi trường ½MS có bổ sung 4 mg/l BA và 0,5 mg/l NAA cho hệ số nhân nhanh chồi cây *Ruscus in vitro* cao nhất.

Bảng 2. Ảnh hưởng của BA và NAA lên khả năng nhân nhanh chồi cây *Ruscus in vitro*

BA (mg/l)	4				
NAA (mg/l)	0	0,3	0,5	0,7	1
Số chồi	9,7c*	11,3bc	15,0a	13,0b	10,7bc
Chiều cao chồi (cm)	3,1b	3,7b	4,8ab	5,7a	3,3b

Ghi chú: *Những ký tự khác nhau (a, b, c,...) trong cùng một hàng thể hiện sự sai khác có ý nghĩa với độ tin cậy P < 0,05 trong phép thử Duncan's test.*

Ảnh hưởng của nước dừa lên khả năng nhân nhanh chồi cây *Ruscus in vitro*

Nước dừa đã được Van Overbeek sử dụng đầu tiên trong nuôi cấy mô thực vật vào năm 1941 trong việc phát triển phôi của *Datura Stramonium* và sau đó, nước dừa cũng đã được sử dụng trong nuôi cấy mô một số loài cây khác nhau. Nước dừa đã được chứng minh là chứa một số amino acid, các phức hợp của nitrogen, các chất vô cơ, các acid hữu cơ, các đường và rượu của chúng, các vitamin, chất điều hòa sinh trưởng (cytokinin, auxin) và một số hợp chất khác chưa được biết đến (George, 1993).

Kết quả thu được trong nghiên cứu này thể hiện ở Bảng 3, cho thấy nước dừa kích thích đáng kể sự nhân nhanh chồi của cây *Ruscus*, khi so sánh với môi trường đối chứng không bổ sung nước dừa (Bảng 3, Hình 1e). Trong đó, số lượng chồi tăng khi tăng nồng độ nước dừa bổ sung vào môi trường nuôi cấy. Môi trường có bổ sung 15% nước dừa tốt hơn so với các nghiệm thức còn lại cho sự nhân nhanh chồi cây *Ruscus*, với số chồi thu được là nhiều nhất (20,2 chồi).

Ảnh hưởng của nước dừa lên sự tăng nhanh quá trình nhân giống *in vitro* đã được nghiên cứu. Trước tiên, việc thêm nước dừa đã giúp cho môi trường nuôi cấy tăng khoảng 95% tổng lượng photpho (Mezzetti *et al.*, 1991). Hiệu quả quan trọng thứ hai của nước dừa đã được chứng minh là rất hữu ích trong việc giúp cho cây lớn và khỏe mạnh hơn. Kết quả của việc thêm nước dừa vào môi trường nuôi cấy là cây tích lũy nhiều dinh dưỡng và đường hơn. Cây khỏe và tỷ lệ sống sót cao của cây *in vitro* có thể là do nồng độ carbohydrate cao của chúng (Mezzetti *et al.*, 1991). Việc sử dụng nước dừa đã ảnh hưởng gián tiếp đến khả năng ra rễ *in vitro* và trong suốt quá trình nhân nhanh chồi. Thêm nước dừa vào trong môi trường nuôi cấy cho kết quả tốt về chiều dài chồi và kích thích việc hình thành rễ. Sự tăng cường hình thành rễ lại cho tỷ lệ sống sót cao hơn của cây *in vitro*.

Như vậy, trong điều kiện thí nghiệm này, môi trường ½MS có bổ sung 4 mg/l BA, 0,5 mg/l NAA và 15% nước dừa cho hệ số nhân nhanh chồi cây *Ruscus in vitro* cao nhất sau 2,5 tháng nuôi cấy.

Bảng 3. Ảnh hưởng của nước dừa lên khả năng nhân nhanh chồi cây *Ruscus in vitro*.

Nước dừa (% v/w)	0	5	10	15
Số chồi	15,0bc*	16,0b	17,0b	20,2a
Chiều cao chồi (cm)	4,8b	5,8a	6,2a	6,0a

Ghi chú: * Những ký tự khác nhau (a, b, c,...) trong cùng một hàng thể hiện sự sai khác có ý nghĩa với độ tin cậy $P < 0,05$ trong phép thử Duncan's test.

Bảng 4. Ảnh hưởng của NAA và IBA lên khả năng ra rễ cây *Ruscus in vitro*.

Chất ĐHST (mg/l)	Tỷ lệ ra rễ (%)	Số rễ	Chiều dài rễ (cm)
0	0	0	0
0,5	85	4,67d*	3,00a
IBA	1,0	95	9,33c
	1,5	100	16,66a
	0,5	100	9,33c
NAA	1,0	100	11,67bc
	1,5	100	13,00b

Ghi chú: * Những ký tự khác nhau (a, b, c,...) trong cột thể hiện sự sai khác có ý nghĩa với độ tin cậy $P < 0,05$ trong phép thử Duncan's test.

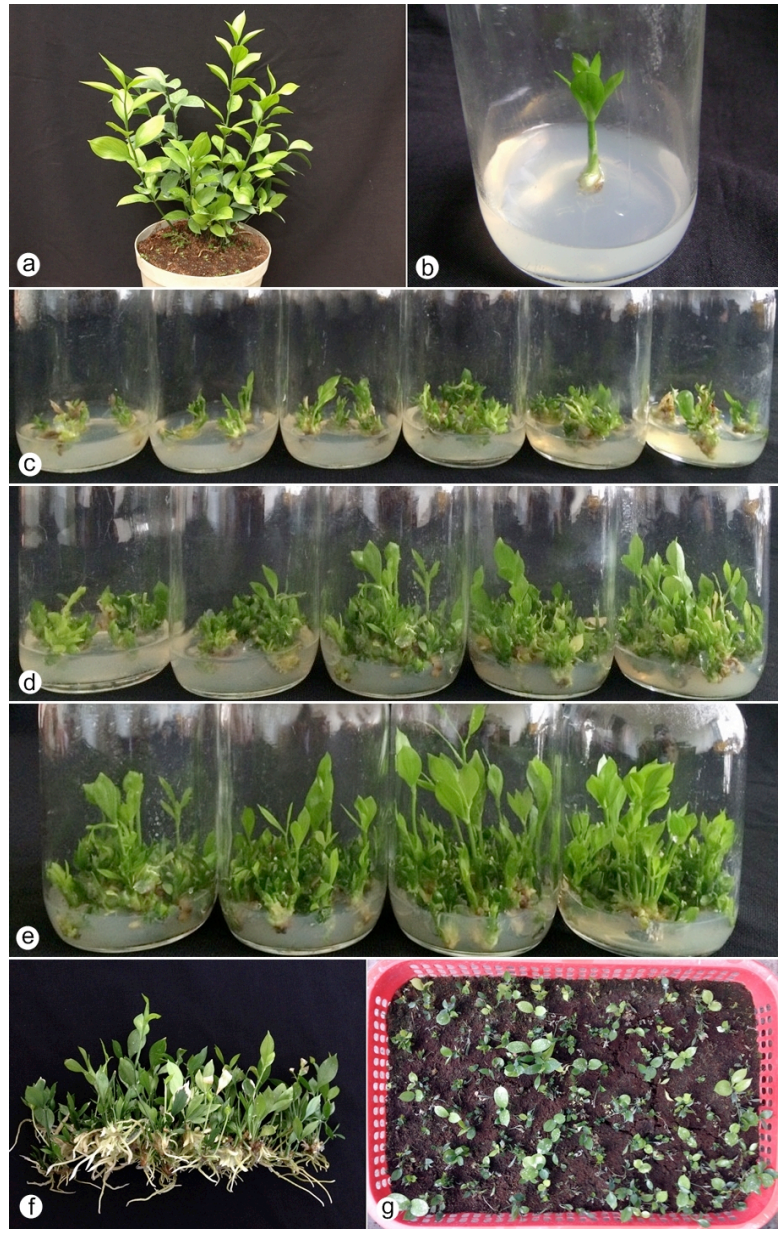
Ảnh hưởng của các chất điều hòa sinh trưởng lên khả năng ra rễ cây *Ruscus in vitro*

Các chồi ở thí nghiệm trên được thu nhận và cho tạo rễ trên môi trường ½MS có bổ sung NAA

và IBA ở các nồng độ khác nhau. Sau 2 tháng nuôi cấy, kết quả cho thấy khi nồng độ NAA và IBA tăng lên thì số rễ tăng dần lên, nhưng chiều dài rễ lại giảm dần (Bảng 4). Trong đó, môi trường có bổ sung 1,5 mg/l IBA cho số lượng rễ là cao nhất

(16,66 rễ). Khi tăng nồng độ từ 0,5 đến 1,0 mg/l, các kết quả trên môi trường có bổ sung NAA tốt hơn IBA (tỷ lệ ra rễ và số rễ), tuy nhiên ở nồng độ 1,5 mg/l IBA cho sự ra rễ tốt hơn so với NAA và tại nồng độ này, rễ ngắn và có dấu hiệu bị dị dạng khi sử dụng NAA. Ở môi trường đối chứng không

bổ sung chất điều hòa sinh trưởng, các chồi cây Ruscus đã không ra rễ, cây sinh trưởng và phát triển chậm. Kết quả thí nghiệm này cũng phù hợp với nghiên cứu của Banciu và Aiftimie-Paunescu (2012), nồng độ IBA thích hợp cho sự ra rễ cây Ruscus là 1,8 mg/l.



Hình 1. Vi nhân giống cây Ruscus *in vitro*. a. Cây Ruscus ban đầu sử dụng trong nghiên cứu; b. Chồi phát sinh từ mẫu thân rễ; c. Ảnh hưởng của BA (0, 1, 2, 3, 4, 5 mg/l) lên khả năng nhân nhanh chồi cây Ruscus *in vitro* sau 2,5 tháng nuôi cấy (từ trái qua phải); d. Ảnh hưởng của BA (4 mg/l) và NAA (0; 0,3; 0,5; 0,7; 1 mg/l) lên khả năng nhân nhanh chồi cây Ruscus *in vitro* sau 2,5 tháng nuôi cấy (từ trái qua phải); e. Ảnh hưởng của nước dừa (0, 5, 10, 15% v/w) lên khả năng nhân nhanh chồi cây Ruscus *in vitro* sau 2,5 tháng nuôi cấy (từ trái qua phải); f. Cây Ruscus đã ra rễ hoàn chỉnh; g. Cây Ruscus *in vitro* được trồng ngoài vườn ươm.

Bảng 5. Ảnh hưởng của các loại giá thể lên sự thích nghi và sinh trưởng cây con ở giai đoạn vườn ươm.

Giá thể	Tỷ lệ sống sót	Số rễ	Chiều cao cây (cm)
Xơ dừa	85,0a*	8,7a	7,6a
Xơ dừa + 10% trấu hun	76,6b	8,5a	5,6b
Xơ dừa + 20% trấu hun	72,3b	7,6a	5,3b

Ghi chú: * Những ký tự khác nhau (a, b, c, ...) trong cột thể hiện sự sai khác có ý nghĩa với độ tin cậy $P < 0,05$ trong phép thử Duncan's test.

Ảnh hưởng của giá thể lên sự thích nghi và sinh trưởng của cây con ở giai đoạn vườn ươm

Khả năng thích nghi và sinh trưởng của cây *Ruscus* từ nuôi cấy *in vitro* ở giai đoạn vườn ươm sau 2 tháng trồng được thể hiện ở bảng 5. Kết quả thu được cho thấy các cây con trồng trên giá thể xơ dừa có tỷ lệ sống sót (85%), số rễ (8,7) và chiều cao cây (7,6 cm) cao nhất (Bảng 5, Hình 1g). Trong khi đó, các cây con trồng trên giá thể xơ dừa có bổ sung trấu hun (10 và 20%) thu được tỷ lệ sống sót, số rễ và chiều cao cây thấp hơn sau 2 tháng trồng ở vườn ươm. Điều này cho thấy giá thể xơ dừa phù hợp hơn đối với cây con *Ruscus in vitro*, giúp cho các cây con thích nghi và sinh trưởng tốt hơn khi bổ sung trấu hun. Quá trình chuyển cây con ra vườn ươm là giai đoạn quan trọng quyết định thành công trong vi nhân giống, cây con từ nuôi cấy *in vitro* trên môi trường nhân tạo trong bình nuôi cấy với độ ẩm gần như bão hòa, do vậy khi chuyển cây con ra ngoài điều kiện vườn ươm với độ ẩm thấp nên cây con thường bị chết; bên cạnh đó, khả năng thích nghi và phục hồi bộ rễ của cây con trên các giá thể khác nhau là khác nhau dẫn đến tỷ lệ sống sót khác nhau. Như vậy, khi bổ sung trấu hun vào giá thể thì tạo được sự thông thoáng tốt nhưng có thể khả năng giữ nước thấp hơn nên cây dễ bị héo dẫn đến chết.

Như vậy, giá thể xơ dừa là thích hợp hơn cho sự thích nghi và sinh trưởng của cây *Ruscus* sau 2 tháng trồng tại vườn ươm.

KẾT LUẬN

Kết quả thu được trong nghiên cứu này cho thấy môi trường $\frac{1}{2}$ MS bổ sung có bổ sung 4 mg/l BA, 0,5 mg/l NAA, 15% (v/v) nước dừa cho hệ số nhân nhanh chồi cây *Ruscus in vitro* cao nhất sau 2,5 tháng nuôi cấy. Bên cạnh đó, môi trường $\frac{1}{2}$ MS có bổ sung 1,5 mg/l IBA phù hợp cho quá trình ra rễ *in vitro* của cây *Ruscus*. Các cây *Ruscus* con hoàn chỉnh sinh trưởng và phát triển tốt trên giá thể xơ dừa. Việc bổ sung trấu

hun vào giá thể không phù hợp cho giai đoạn huấn luyện cây *in vitro* ở vườn ươm.

Lời cảm ơn: Các tác giả xin chân thành cảm ơn Phòng Công nghệ thực vật, Viện Nghiên cứu Khoa học Tây Nguyên đã tạo điều kiện cho chúng tôi hoàn thành nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Banciu C, Aiftimie-Paunescu A (2012) *In vitro* propagation of rare species *Ruscus aculeatus* L., and histological peculiarities of the regenerants. *Analele Universității din Oradea, fascicula Biologie* 19(1): 67-73.
- Banciu C, Brezeanu A (2008) Potencialul regenerativ *in vitro* al explantelor de țesut somatic, de diferite origini la *Ruscus aculeatus* L., în vol. Biotehnologii vegetale pentru secolul XXI, Lucrările celui de-al XVII-lea Simpozion Național de Cultură de Țesuturi și Celule Vegetale, Ed. Risoprint, Cluj-Napoca, pp: 62-68.
- Boase MR, Wright S, Mcleay (1993) Coconut milk enhancement of axillary shoots growth in vitro of Kiwifruit. *New Zealand J Crop Hort Sci* 21: 171-176.
- De D, De B (2005) Elicitation of diosgenin production in *Dioscorea floribunda* by ethylene-generating agent. *Fitoterapia* 76: 153-156.
- Duncan DB (1995) Multiple range and multiple F test. *Biometrics* 11:1-42.
- George EF (1993) *Plant propagation by tissue culture. 2nd Edn.*, Exegetics Ltd., London, UK, p. 457.
- Manole A, Banciu C (2015) Optimization of shoot multiplication in *Ruscus aculeatus* L. from long term cultures. *Romanian Biotechnological Letters* 20(20): 10200-10204.
- Martinez-Palle E, Aronne G (2000) Pollination failure in Mediterranean *Ruscus aculeatus*. *Bot J Linn Soc* 13: 443-452
- Mezzetti, Claudio, Dinopoulos, Elias (1991) Domestic unionization and import competition. *J Inter Economics* 31(1-2): 78-100.

Tạp chí Công nghệ Sinh học **16**(1): 99-105, 2018

Moyano E, Montero M, Bonifill M, Cusido RM, Palazon J, Pinol MT (2006) *In vitro* micorpropagation of *Ruscus aculeatus*. *Biol Plant* 50(3): 441-443.

Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco cultures. *Physiol Plant* 15: 73-97.

Nguyễn Văn Kết, Nguyễn Văn Linh (2010) Nghiên cứu

khả năng nhân giống loài Lan Hoàng Thảo Sáp (*Dendrobium crepidatum* Lindl. & Paxt.). *in vitro*. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ* 48(5): 89-95.

Palazon J, Moyano E, Bonifill M, Lidia T, Osuna, Rosa, Cusido M, Teresa Pinol M (2006) Effect of organogenesis on steroidal saponin biosynthesis in calli cultures of *Ruscus aculeatus*. *Fitoterapia* 76: 216-220.

MICROPROPAGATION OF *RUSCUS ACULEATUS* L.

Dinh Van Khiem, Hoang Van Cuong, Nguyen Thi Thanh Hang, Phan Xuan Huyen, Nguyen Thi Phuong Hoang

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

SUMMARY

Ruscus aculeatus L. is a small evergreen perennial species, is commonly used either as medicinal or ornamental plant thanks to its evergreen long-lasting branches. Currently, the species is endangered by population reductions due to habitat alteration, the lack of seed production caused by pollination failure and also because of the intense harvesting for medicinal uses or for floral bouquets. Micropropagation opens new directions for its *ex situ* conservation, as well as to generate large scale material for natural population reinforcement or for commercial purposes. In this study, effects of BA, NAA and coconut water on shoot regeneration, IBA on root formation of *Ruscus aculeatus* L., and type of substrates on acclimatization and growth of seedlings were investigated. The results showed that ½MS medium supplemented with 4 mg/l BA, 0.5 mg/l NAA and 15% (v/v) coconut water, 30 g/l sucrose, and pH 5.8 was the most suitable for shoot regeneration of *Ruscus aculeatus* L. *in vitro* (20.2 shoots, shoot length of 6.0 cm). Root formation of *Ruscus aculeatus* L. was optimal on ½MS supplemented with 1.5 mg/l IBA, 30 g/l sucrose, and pH 5.8 (frequency of rooting 100%, shoot length of 1.9 cm with 16.66 roots per seedling). Finally, the sufficiently rooted plantlets were transferred to greenhouse for hardening. After 2 months, coconut fiber substrate was the most suitable for seedling growth and development (with survival rate of 85%, root number of 8.7 and shoot length of 7.6 cm). We have developed protocol for the rapid micropropagation of *Ruscus aculeatus* L. in order to create a large number of seedlings for commercial production.

Keywords: *in vitro*, micropropagation, root formation, *Ruscus aculeatus* L., shoot proliferation