

Nuôi cấy *in vitro* đốt thân cây Xạ đen (*Ehretia asperula* Zollinger et Moritzi)

Lê Thị Tâm Hồng¹, Lê Thị Thủy Tiên², Trần Văn Minh^{1*}

¹Trường Đại học Quốc tế, Đại học Quốc gia TP Hồ Chí Minh

²Trường Đại học Bách khoa, Đại học Quốc gia TP Hồ Chí Minh

Ngày nhận bài 23/10/2018; ngày chuyển phản biện 25/10/2018; ngày nhận phản biện 20/11/2018; ngày chấp nhận đăng 6/12/2018

Tóm tắt:

Cây Xạ đen (*Ehretia asperula* Zollinger et Moritzi) được coi là một dược liệu quý giúp phòng ngừa và hỗ trợ điều trị bệnh ung thư; có tác dụng làm giảm kích thước và sự phát triển của các khối u, bướu; và một số công dụng khác. Việc ứng dụng phương pháp nuôi cấy mô thực vật trong bảo tồn và phát triển cây Xạ đen là cần thiết nhằm phát triển nguồn dược liệu quý của vùng nhiệt đới, phục vụ nhu cầu nâng cao sức khỏe nhân dân. Trong nghiên cứu này, kỹ thuật nuôi cấy đoạn thân *in vitro* đã được sử dụng trong thời gian theo dõi là 12 tuần. Đoạn thân cây con trồng trong bầu đất được sử dụng làm vật liệu nuôi cấy ban đầu. Môi trường khoáng thích hợp cho quá trình nuôi cấy đoạn thân là 1/2MS có bổ sung BA (0,1 mg/l). Môi trường thích hợp cho vi nhân giống đoạn thân là 1/2MS có bổ sung BA (0,1 mg/l) cho tỷ lệ tạo chồi 97,20%, số chồi là 1,22 chồi/đốt, chiều cao chồi 116,67 mm và số lá là 8 lá/chồi. Vị trí đoạn thân đưa vào nuôi cấy có ảnh hưởng đến quá trình nhân giống, đoạn thân ở vị trí từ 1 đến 4 có sinh trưởng chồi không sai khác về thống kê so với chồi ngọn trên môi trường nhân giống. Nuôi cấy tạo rễ thích hợp trên môi trường 1/2MS có bổ sung IBA (0,25 mg/l) đạt chiều cao chồi 113,33 mm, số rễ 5,40 rễ/chồi và chiều dài rễ 10,33 mm. Khảo sát động thái sinh trưởng cho thấy, chồi *in vitro* phát triển đến tuần thứ 10 đạt chiều cao 95,00 mm. Nghiên cứu ảnh hưởng của số lần cấy chuyển đến nhân giống *in vitro* cho thấy, sau lần cấy chuyển thứ 6, sinh trưởng cây *in vitro* chậm lại, có chiều cao của chồi 90,33 mm và số lá 6,33. Cây cấy mô trồng trong bầu đất sinh trưởng bình thường, sau 8 tháng đạt chiều cao thân 25,6 cm.

Từ khóa: bảo tồn, đốt thân, *in vitro*, nuôi cấy mô, vi nhân giống, Xạ đen.

Chỉ số phân loại: 4.1

Đặt vấn đề

Theo Tổ chức Y tế thế giới [1], ung thư là nguyên nhân gây tử vong thứ hai trên toàn cầu. Trong hơn 4000 loài thực vật được sử dụng làm dược liệu trong y học cổ truyền ở Việt Nam, cây Xạ đen được biết đến rộng rãi với tác dụng hỗ trợ điều trị ung thư.

Cây Xạ đen (*Ehretia asperula* Zollinger et Moritzi) còn được gọi là cây đốt, dây gối Ấn Độ hoặc dây gối bắc. Gần đây, cây Xạ đen được xác định là *Ehretia asperula* Zoll. et Mor., họ vôi vôi (Boraginaceae) [2]. Trong cây Xạ đen có các hoạt chất flavonoid, quinone (có tác dụng phòng chống ung thư và làm cho tế bào ung thư hóa lỏng dễ tiêu), hợp chất saponin triterpenoid (có tác dụng chống nhiễm khuẩn), cây Xạ đen dùng để điều trị lở loét, kháng u và tiêu viêm [3], ung thư [4, 5]; được phân bố ở một số nước như Trung Quốc, Việt Nam, Myanmar, Thái Lan. Ở Việt Nam, phân bố chủ yếu ở vùng núi phía Bắc, đặc biệt ở các tỉnh Hòa Bình, Sơn La, Quảng Ninh, Nam Định và Quảng Bình [6].

Hiện nay, phương pháp nhân giống cây Xạ đen chủ yếu là giâm hom, cho số lượng cây giống còn hạn chế, mang nhiều bệnh từ cây mẹ. Các đề tài nghiên cứu quốc tế trên cây Xạ đen mới chỉ tập trung vào phân tích và khảo sát hoạt chất sinh học, trong khi số lượng nghiên cứu về nuôi cấy mô thực hiện trên

đối tượng Xạ đen còn hạn chế. Do vậy, nghiên cứu ứng dụng kỹ thuật nuôi cấy mô thực vật trong khâu nhân giống cây Xạ đen có ý nghĩa thiết thực, góp phần bảo tồn và phát triển vùng sản xuất nguyên liệu Xạ đen.

Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Vật liệu

Vật liệu nghiên cứu: cây Xạ đen cao 30 cm có nguồn gốc ở Hòa Bình. Các cành non được sử dụng trong nuôi cấy.

Môi trường nuôi cấy: môi trường MS (Murashige và Skoog, 1962), 1/2MS, WPM (Woody Plant Medium), B5 (Gamborg B5). Môi trường được bổ sung các chất sinh trưởng BA (6-benzylaminopurine), NAA (α -naphthaleneacetic acid), IAA (Indole-3-acetic acid) và IBA (Indole-3-butyric acid); nước dừa (5%), đường sucrose (30 g/l), than hoạt tính (1 g/l), agar (0,8%). Môi trường nuôi cấy được chỉnh ở pH 5,8 và được khử trùng ở 121°C, áp suất 1 at.

Điều kiện nuôi cấy: nhiệt độ phòng 24±2°C, cường độ bức xạ tại độ cao 350 mm: 22 μ mol/m²/s, thời gian chiếu sáng 12 giờ/ngày, độ ẩm tương đối 65%.

*Tác giả liên hệ: Email: drminh.ptntd@yahoo.com

In vitro nodal culture technique of *Ehretia asperula* Zollinger et Moritz

Thi Tam Hong Le¹, Thi Thuy Tien Le²,
Van Minh Tran^{1*}

¹International University, Vietnam National University Ho Chi Minh city

²University of Technology, Vietnam National University Ho Chi Minh city

Received 23 October 2018; accepted 6 December 2018

Abstract:

Ehretia asperula Zollinger et Moritz has been known as a valuable medicinal plant due to the ability to prevent and treat cancers, and reduce the expansion of tumours, etc. The application of plant tissue culture in preservation and development of *Ehretia asperula* Zollinger et Moritz is necessary to enlarge the medicine sources of tropical areas for improving human health. The *in vitro* node culture technique was applied, and the duration for carrying the experiments and recording data was 12 weeks. The nodes from the soil inoculated plantlets were used as explants. The appropriate medium for node culture was the half-strength MS supplemented with BA 0.1 mg/l, which showed the shoot induction rate at 97.20%, number of shoot/node as 1.22, shoot length of 116.67 mm, and number of leaves/shoot as 8.00. The node position affected the micropropagation of the plant. The nodes from the uppermost position to the fourth one had the shoot proliferation insignificantly different to those from the shoot terminal bud. The medium sufficient for rooting of this plant species was the half strength MS supplemented with IBA 0.25 mg/l; as the result, the shoot length was 113.33 mm, the root number was 5.44 roots/shoot, and the root length was 10.33 mm. Investigation of the growth dynamics showed that the *in vitro* shoot at the week 10 of culture reached 95.00 mm shoot length. By investigating the effect of subculture generation on shoot proliferation, after the 6th subculture, the *in vitro* plant growth was retarded, with the shoot length of 90.33 mm and leave number of 6.33 leaves/shoot. Acclimatised plantlets grew well and reached 25.6 cm plant height after 8 months.

Keywords: conservation, *Ehretia asperula* Zollinger et Moritz, *in vitro*, micropropagation, node, tissue culture.

Classification number: 4.1

Điều kiện vườn ươm ra cây bầu đất: che nắng trong thời gian một tháng, nhiệt độ $28 \pm 2^\circ\text{C}$, độ ẩm 100% (có phun sương). Cơ chất trong bầu đất: 1/3 đất sạch + 1/3 tro trấu + 1/3 phân hữu cơ hoai.

Phương pháp

Bố trí thí nghiệm: bố trí ngẫu nhiên theo khối đầy đủ, với 3 lần lặp lại, mỗi lần nuôi cấy 3 bình, mỗi bình cấy 4 mẫu. Số liệu được ghi nhận sau 12 tuần nuôi cấy và được phân tích ANOVA (single factor) bằng phần mềm SPSS 20.0

Vô trùng mẫu: đốt thân cây Xạ đen có kích thước 2 cm được khử trùng bề mặt với cồn 70% trong 2 phút, Javen 10% trong 20 phút, HgCl_2 0,1% trong 5 phút. Sau một tuần nuôi cấy, loại bỏ mẫu nhiễm, những mẫu sạch được sử dụng để tiến hành thí nghiệm.

Chỉ tiêu theo dõi: tỷ lệ mẫu tạo chồi (%), chiều cao chồi (mm), số lá, chiều dài lá (mm), chiều dài rễ (mm), số rễ, số chồi, hệ số nhân giống

Thiết kế thí nghiệm:

Thí nghiệm 1: ảnh hưởng của môi trường khoáng đến tái sinh chồi *in vitro*: mẫu nuôi cấy là đoạn thân non 2 cm, được nuôi cấy vào các môi trường khác nhau gồm MS, 1/2MS, WPM và B5, có bổ sung BA (0,1 mg/l).

Thí nghiệm 2: ảnh hưởng của các nồng độ BA khác nhau đến nhân giống Xạ đen *in vitro*: mẫu nuôi cấy là đoạn thân non 2 cm, được nuôi cấy vào môi trường 1/2MS, có bổ sung BA (0,05; 0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0 mg/l).

Thí nghiệm 3: ảnh hưởng của vị trí đoạn thân đến nhân giống *in vitro*: đốt thân ở vị trí chồi ngọn, đoạn thứ nhất, thứ hai, thứ ba và thứ tư, có kích thước 2 cm, được nuôi cấy vào môi trường 1/2MS có bổ sung BA (0,1 mg/l).

Thí nghiệm 4: ảnh hưởng của auxin đến hình thành rễ: chồi *in vitro* có kích thước 2 cm, được nuôi cấy vào môi trường 1/2MS, có bổ sung các loại auxin (NAA, IAA và IBA) ở các nồng độ khác nhau mỗi chất (0,1; 0,25; 0,5 và 1,0 mg/l) để theo dõi khả năng tạo rễ.

Thí nghiệm 5: động thái sinh trưởng của chồi *in vitro*: đoạn thân có kích thước 2 cm, được nuôi cấy vào môi trường 1/2MS có bổ sung BA (0,1 mg/l).

Thí nghiệm 6: ảnh hưởng của số lần cấy chuyển đến nhân chồi trực tiếp từ đoạn thân: mẫu nuôi cấy là đốt thân thể hệ F1, F2, F3, F4, F5, F6 có kích thước 2 cm; được cấy vào môi trường 1/2MS bổ sung BA (0,1 mg/l).

Thí nghiệm 7: sinh trưởng và phát triển của cây đưa ra bầu đất: chồi cao 10 cm đã hình thành rễ được chuyển sang nuôi trồng trong bầu đất, với cơ chất: 1/3 đất + 1/3 tro trấu + 1/3 phân hữu cơ hoai. Kết quả thí nghiệm được theo dõi 1 lần/

tháng trong vòng 8 tháng (tháng 11/2017-6/2018).

Nghiên cứu được thực hiện tại Phòng thí nghiệm công nghệ sinh học thực vật, Trường Đại học Quốc tế, Đại học Quốc gia TP Hồ Chí Minh trong thời gian 2017-2018.

Kết quả và thảo luận

Ảnh hưởng của môi trường khoáng đến tái sinh chồi *in vitro*

Đoạn thân cây trồng trong bầu đất 2 cm được nuôi cấy trong môi trường 1/2MS và WPM có bổ sung BA (0,1 mg/l) cho tỷ lệ tạo chồi và chiều cao chồi khác nhau không có ý nghĩa ($p < 0,05$), phát triển tốt hơn trên hai môi trường MS và B5. Môi trường 1/2MS thích hợp cho việc tái sinh chồi cây Xạ đen *in vitro*, với tỷ lệ tạo chồi đạt 97%, chiều cao chồi 121 mm, số lượng lá 8 lá/chồi và chiều dài lá 13,33 mm sau 12 tuần nuôi cấy (bảng 1). Kết quả nghiên cứu về ảnh hưởng của môi trường khoáng đến tái sinh chồi *in vitro* tương tự như kết quả của Tạ Như Thực Anh và Nguyễn Thị Bích Thu [7] nuôi cấy cây Xạ đen (*Ehretia asperula*) thích hợp trên môi trường MS có bổ sung BA hay kinetin (0,1-0,5 mg/l); Phulwaria và Shekhawat [8] tái sinh mô sẹo *Arnebia hispidissima* (Boraginaceae) trên môi trường MS có bổ sung BA (3,33 μ M) và 2,4D (4,52 μ M); Malik và đồng tác giả [9] nuôi cấy lá non *in vitro* *Arnebia euchroma* (Boraginaceae) tái sinh chồi trực tiếp trên môi trường MS có bổ sung TDZ (20 μ M).

Bảng 1. Ảnh hưởng của môi trường khoáng đến tái sinh chồi Xạ đen *in vitro* sau 12 tuần nuôi cấy.

Nghiệm thức	Môi trường khoáng	Tỷ lệ tạo chồi (%)	Chiều cao chồi (mm)	Số lá (/chồi)	Chiều dài lá (mm)
NT1	MS	82,67 $\pm$ 5,03 ^{ab}	66,00 $\pm$ 13,12 ^a	4,33 $\pm$ 0,58 ^a	7,00 $\pm$ 1,00 ^a
NT2	1/2MS	97,00 $\pm$ 2,65 ^c	121,00 $\pm$ 9,6 ^b	8,00 $\pm$ 1,00 ^b	13,33 $\pm$ 1,16 ^c
NT3	WPM	90,67 $\pm$ 6,11 ^{bc}	102,67 $\pm$ 6,43 ^b	5,33 $\pm$ 1,53 ^a	11,00 $\pm$ 1,00 ^b
NT4	B5	77,33 $\pm$ 5,03 ^a	77,00 $\pm$ 8,55 ^a	3,33 $\pm$ 1,53 ^a	6,67 $\pm$ 1,16 ^a
ANOVA		**	**	**	**
CV (%)		6,47	12,27	26,94	13,13

Ghi chú: trong cùng 1 cột, những số có chữ theo sau khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức (**): $p \leq 0,05$.

Ảnh hưởng của các nồng độ BA khác nhau đến nhân giống Xạ đen *in vitro*

Đoạn thân chồi *in vitro* 2 cm được nuôi cấy trên môi trường 1/2MS có bổ sung BA (0,1 mg/l), chồi phát triển mạnh nhất so với các nồng độ còn lại, đạt chiều cao chồi 116,67 mm, 8 lá/chồi, chiều dài 12,67 mm (bảng 2). Kết quả này tương tự với nghiên cứu của Sahoo và Chand [10] khi nuôi cấy đoạn thân cây hoàng kinh (*Vitex negundo*) trên môi trường MS có bổ sung BA (2 mg/l) cho quá trình cảm ứng tạo chồi; Tạ Như Thực Anh và Nguyễn Thị Bích Thu [7] nuôi cấy tạo cụm chồi cây Xạ đen (*Ehretia asperula*) trên môi trường MS có bổ sung BA (0,3 mg/l) hay kinetin (0,5 mg/l).

Bảng 2. Ảnh hưởng của nồng độ BA đến nhân giống Xạ đen *in vitro* sau 12 tuần nuôi cấy.

Nghiệm thức	BA (mg/l)	Tỷ lệ tạo chồi (%)	Số chồi (/đốt thân)	Chiều cao chồi (mm)	Số lá (/chồi)	Chiều dài lá (mm)
Đ/C	0,00	51,80 $\pm$ 4,47 ^a	0,40 $\pm$ 0,08 ^a	80,67 $\pm$ 11,02 ^d	3,33 $\pm$ 0,58 ^{ab}	6,00 $\pm$ 1,00 ^{ab}
NT1	0,05	61,37 $\pm$ 3,68 ^{ab}	0,55 $\pm$ 0,09 ^{ab}	85,00 $\pm$ 10,00 ^d	4,67 $\pm$ 0,58 ^{bc}	10,33 $\pm$ 1,53 ^c
NT2	0,10	97,20 $\pm$ 2,50 ^d	1,22 $\pm$ 0,04 ^c	116,67 $\pm$ 7,64 ^c	8,00 $\pm$ 1,00 ^d	12,67 $\pm$ 1,16 ^d
NT3	0,20	91,60 $\pm$ 4,08 ^d	1,07 $\pm$ 0,06 ^{bc}	104,00 $\pm$ 8,55 ^c	5,67 $\pm$ 0,58 ^c	9,67 $\pm$ 0,58 ^c
NT4	0,40	94,20 $\pm$ 5,14 ^d	1,02 $\pm$ 0,19 ^{cd}	76,67 $\pm$ 7,64 ^{cd}	4,33 $\pm$ 0,58 ^b	7,00 $\pm$ 1,00 ^b
NT5	0,60	88,40 $\pm$ 10,74 ^d	0,89 $\pm$ 0,06 ^{bc}	65,67 $\pm$ 6,03 ^{bc}	4,00 $\pm$ 1,00 ^b	4,67 $\pm$ 0,58 ^a
NT6	0,80	76,73 $\pm$ 5,88 ^c	0,76 $\pm$ 0,07 ^{cd}	57,00 $\pm$ 7,55 ^b	3,33 $\pm$ 0,58 ^{ab}	4,67 $\pm$ 0,58 ^a
NT7	1,00	60,00 $\pm$ 6,22 ^{bc}	0,68 $\pm$ 0,07 ^{bc}	41,67 $\pm$ 3,51 ^a	2,67 $\pm$ 0,58 ^a	4,67 $\pm$ 1,16 ^a
ANOVA		**	**	**	**	**
CV (%)		6,81	10,32	9,41	14,43	12,32

Ghi chú: trong cùng 1 cột, những số có chữ theo sau khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức (**): $p \leq 0,05$.

Ảnh hưởng của vị trí đoạn thân đến khả năng nhân giống Xạ đen *in vitro*

Vị trí đoạn thân *in vitro* đưa vào nuôi cấy có ảnh hưởng đến quá trình nhân giống, đoạn thân ở vị trí từ 1 đến 4 có sinh trưởng chồi không sai khác với chồi ngọn về thống kê so với chồi ngọn trên môi trường nhân giống (bảng 3). Đoạn thân ở vị trí thứ 2 và 3 cho kết quả phát triển tốt hơn so với đoạn 1 và 4, chồi cao hơn và lá dài hơn so với các vị trí còn lại, với chiều cao chồi lần lượt là 110,00 và 115,67 mm; chiều dài lá đạt 12,33 và 11,33 mm; hệ số nhân giống 6,67 và 6,33 sau 12 tuần nuôi cấy. Còn theo kết quả của Nagahatenna và Peiris [11] nuôi cấy *Hemidesmus indicus* tạo chồi ở vị trí đoạn thân 3 và 4 đạt số chồi cao nhất với 2,57 chồi/đốt thân, chiều cao chồi 3,32 cm.

Bảng 3. Ảnh hưởng của vị trí đoạn thân đến khả năng nhân giống Xạ đen *in vitro* sau 12 tuần nuôi cấy.

Nghiệm thức	Vị trí đoạn thân	Chiều cao chồi (mm)	Số lá (/chồi)	Chiều dài lá (mm)	Hệ số nhân giống
NT1	Chồi ngọn	95,00 $\pm$ 5,00 ^a	6,33 $\pm$ 1,16 ^a	9,33 $\pm$ 0,58 ^{ab}	5,33 ^a
NT2	Đoạn 1	93,33 $\pm$ 7,64 ^a	6,00 $\pm$ 1,00 ^a	9,00 $\pm$ 1,00 ^{ab}	5,00 ^a
NT3	Đoạn 2	110,00 $\pm$ 5,00 ^b	7,67 $\pm$ 0,58 ^b	12,33 $\pm$ 1,53 ^c	6,67 ^b
NT4	Đoạn 3	115,67 $\pm$ 6,03 ^b	7,33 $\pm$ 0,58 ^b	11,33 $\pm$ 1,53 ^{bc}	6,33 ^b
NT5	Đoạn 4	95,00 $\pm$ 10,00 ^a	6,33 $\pm$ 0,58 ^a	8,33 $\pm$ 1,53 ^a	5,33 ^a
ANOVA		**	*	**	*
CV (%)		5,32	9,39	9,93	6,72

Ghi chú: trong cùng 1 cột, những số có chữ theo sau khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức (*): $p \leq 0,01$; (**): $p \leq 0,05$.

Ảnh hưởng của auxin đến hình thành rễ Xạ đen *in vitro*

Môi trường 1/2MS có bổ sung IBA (0,25 mg/l) cải thiện đáng kể khả năng tạo rễ ở cây Xạ đen *in vitro* với chiều cao chồi 113,33 mm, số rễ 5,40 rễ/chồi và chiều dài rễ 10,33 mm (bảng 4). Chồi *in vitro* tạo sẹo ở gốc khi nuôi cấy trong môi trường bổ sung IAA (0,5 mg/l), IBA (0,5 và 1,0 mg/l) và NAA (0,5 và 1,0 mg/l). Kết quả này tương đồng với nghiên cứu của Nagahatenna và Peiris [11] khi nuôi cấy tạo rễ *Hemidesmus indicus* trên môi trường 1/2MS có bổ sung BA (1,5 mg/l); Tạ Như Thực Anh và Nguyễn Thị Bích Thu [7] nuôi cấy tạo rễ cây Xạ đen (*Ehretia asperula*) trên môi trường MS có bổ sung IBA hoặc NAA (0,01-0,1 mg/l).

Bảng 4. Ảnh hưởng của IAA, IBA, NAA đến sự hình thành và phát triển rễ Xạ đen *in vitro* sau 12 tuần nuôi cấy.

Nghiệm thức	Auxin (mg/l)	Chiều cao chồi (mm)	Số rễ (/chồi)	Chiều dài rễ (mm)	Tỷ lệ ra rễ sau 12 tuần nuôi cấy (%)
Đ/C	-	73,33±7,64 ^c	1,27±0,50 ^a	2,33±0,58 ^{ns}	100
IAA (mg/l)					
NT1	0,1	78,33±7,64 ^{ef}	3,53±0,61 ^{bc}	3,33±0,58 ^{ns}	100
NT2	0,25	85,00±5,00^{fe}	4,83±0,35^{de}	6,00±1,00^{cd}	100
NT3	0,5	58,33±7,64 ^{cd}	5,13±0,61 ^{de}	4,33±0,58 ^{bc}	100
NT4	1,0	50,67±4,16 ^{bcd}	8,70±1,37 ^s	2,33±0,58 ^{ns}	100
IBA (mg/l)					
NT5	0,1	92,67±6,43 ^s	5,10±0,56 ^c	8,00±2,00 ^c	100
NT6	0,25	113,33±7,64^b	5,40±0,72^c	10,33±1,53^f	100
NT7	0,5	56,67±7,64 ^{bcd}	6,67±0,61 ^f	7,00±1,00 ^{de}	100
NT8	1,0	45,00±5,00 ^{ab}	6,73±0,70 ^f	5,33±0,58 ^{cd}	100
NAA (mg/l)					
NT9	0,1	61,33±8,08^d	2,83±0,35^{bc}	4,33±1,53^{bc}	100
NT10	0,25	60,00±5,00 ^{cd}	3,93±0,70 ^d	2,67±1,16 ^{ab}	100
NT11	0,5	48,33±3,51 ^{abc}	2,97±0,4 ^{bc}	2,67±0,58 ^{ab}	100
NT12	1,0	37,67±7,50 ^a	2,67±0,50 ^b	1,33±0,58 ^a	100
ANOVA	**	**	**	**	ns
CV (%)		11,71	16,45	29,36	

Ghi chú: trong cùng 1 cột, những số có chữ theo sau khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức (**): $p \leq 0,05$; hoặc (ns): khác biệt không có ý nghĩa thống kê theo trắc nghiệm phân hạng Duncan.

Động thái sinh trưởng của chồi Xạ đen *in vitro*

Kết quả nghiên cứu cho thấy, chồi bắt đầu sinh trưởng từ tuần thứ 2 nuôi cấy trên môi trường 1/2MS có bổ sung BA (0,1 mg/l) (bảng 5). Trong 3 tuần đầu, chiều cao chồi thay đổi không đáng kể. Tuy nhiên, từ tuần thứ 4 đến tuần thứ 9, chiều cao chồi tăng dần, từ 21,33 đến 84,67 mm. Sau đó, chồi phát triển chậm dần,

đến tuần thứ 10 và 11 đạt chiều cao chồi 95,00 mm và 108,33 mm. Từ tuần thứ 12, chồi không cao lên nữa và cây bắt đầu ra lá.

Bảng 5. Động thái sinh trưởng của chồi cây Xạ đen *in vitro* trong 12 tuần nuôi cấy.

Thời gian	Chiều cao chồi (mm)
Tuần 1	-
Tuần 2	1,67±0,58 ^a
Tuần 3	6,00±2,00 ^a
Tuần 4	21,33±3,06 ^b
Tuần 5	32,67±3,06 ^c
Tuần 6	43,67±5,13 ^d
Tuần 7	60,00±5,00 ^e
Tuần 8	73,33±6,11 ^f
Tuần 9	84,67±5,03 ^s
Tuần 10	95,00±5,00^s
Tuần 11	108,33±7,64 ^b
Tuần 12	108,33±7,64 ^b
ANOVA	**
CV (%)	8,63

Ghi chú: trong cùng 1 cột, những số có chữ theo sau khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức (**): $p \leq 0,05$.

Ảnh hưởng của số lần cấy chuyển đến quá trình nhân giống *in vitro*

Từ lần cấy chuyển thứ nhất đến lần cấy chuyển thứ 5, chiều cao chồi không bị ảnh hưởng bởi số lần cấy chuyển và đạt chiều cao thân chồi 95-111 mm; số lá 7-8 lá/chồi; chiều dài lá dài nhất ở lần cấy chuyển thứ 4, đạt 13,00 mm (bảng 6). Từ lần cấy chuyển thứ 6, sinh trưởng chồi *in vitro* chậm lại, có chiều cao chồi 90,33 mm và có số lá 6,33 lá/chồi.

Bảng 6. Ảnh hưởng của số lần cấy chuyển đến khả năng nhân giống cây Xạ đen *in vitro*.

Nghiệm thức	Thế hệ	Chiều cao chồi (mm)	Số lá (/chồi)	Chiều dài lá (mm)	Hệ số nhân giống
NT1	F1	106,67±10,41 ^{bc}	7,00±1,00 ^{ab}	7,67±0,58 ^a	6,00 ^{ab}
NT2	F2	111,67±10,41 ^b	7,67±0,58 ^{bc}	10,33±0,58 ^{bc}	6,67 ^{bc}
NT3	F3	111,67±10,41^b	7,33±0,58^{abc}	10,67±1,16^b	6,33^{abc}
NT4	F4	110,00±8,66^{bc}	8,33±0,58^c	13,00±1,00^d	7,33^c
NT5	F5	95,00±5,00 ^{ac}	7,67±0,58 ^{bc}	9,00±1,00 ^{ab}	6,67 ^{bc}
NT6	F6	90,33±5,51 ^a	6,33±0,58 ^a	8,67±1,16 ^{ac}	5,33 ^a
ANOVA	**	**	**	**	**
CV (%)		6,90	7,44	7,87	7,28

Ghi chú: trong cùng 1 cột, những số có chữ theo sau khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức (**): $p \leq 0,05$.

Sinh trưởng và phát triển của chồi *in vitro* sau khi cho ra bầu đất

Cây Xạ đen cấy mô trồng trong bầu đất sinh trưởng và phát triển bình thường trong giai đoạn vườn ươm. Giai đoạn 3 tháng đầu phát triển chậm, có lẽ do bị ảnh hưởng của nhiệt độ vùng nhiệt đới TP Hồ Chí Minh. Sau 8 tháng, cây Xạ đen trồng trong bầu đất phát triển bình thường, mặc dù có chậm hơn so với thời tiết thuận lợi nơi bản địa (tỉnh Hòa Bình) (bảng 7).

Bảng 7. Sinh trưởng và phát triển cây Xạ đen cấy mô giai đoạn bầu đất.

Tháng	1	2	3	4	5	6	7	8
Chiều cao thân (cm)	8,5	9,1	10,6	12,8	15,2	18,4	22,6	25,6
Số lá	4,2	4,4	5,8	6,4	7,8	8,2	9,4	10,8
Chiều dài lá (cm)	1,4	1,6	2,2	2,8	3,6	5,8	7,4	9,2
Chiều ngang lá (cm)	0,6	0,7	0,8	1,2	1,6	2,2	2,7	3,1
Tỷ lệ sống (%)	96,8	94,2	90,8	88,2	88,4	87,6	86,2	84,8

Kết luận

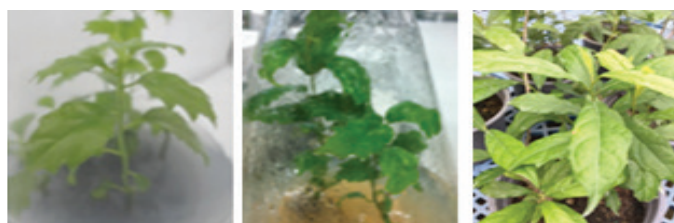
Kỹ thuật vi nhân giống qua nuôi cấy đoạn thân là một trong những phương pháp nâng cao hiệu suất sản xuất cây giống *in vitro* sạch bệnh và đảm bảo đặc điểm di truyền của bố mẹ, phục vụ công tác bảo tồn và phát triển nguồn gen cây thuốc Xạ đen. Môi trường thích hợp cho vi nhân giống cây Xạ đen là môi trường



(A)

(B)

(C)



(D)

(E)

(F)

Hình 1. Đoạn thân cây được sử dụng làm mẫu nuôi cấy (A), trên môi trường 1/2MS bổ sung BA (0,1 mg/l) 2 tuần sau cấy (B), 4 tuần sau cấy (C), 8 tuần sau cấy (D), 12 tuần sau cấy (E), và cây sau 8 tháng (F).

1/2MS có bổ sung BA (0,1 mg/l), cho tỷ lệ tạo chồi 97,20%, số chồi 1,22 chồi/đốt, chiều cao chồi 116,67 mm và số lá 8 lá/chồi. Vị trí đốt thân đưa vào nuôi cấy có ảnh hưởng đến quá trình nhân giống, đốt thân ở vị trí từ 1 đến 4 có sinh trưởng chồi không sai khác về thống kê so với chồi ngọn trên môi trường nhân giống. Môi trường 1/2MS có bổ sung IBA (0,25 mg/l) thích hợp cho tạo rễ, cây đạt chiều cao chồi 113,33 mm, số rễ 5,40 rễ/chồi và chiều dài rễ 10,33 mm. Khảo sát động thái sinh trưởng cho thấy, chồi *in vitro* phát triển đến tuần thứ 10 đạt chiều cao chồi 95 mm. Sau lần cấy chuyển thứ 6, sinh trưởng cây *in vitro* chậm lại, chiều cao chồi 90,33 mm, số lá 6,33. Cây từ nuôi cấy mô đưa ra bầu đất trong vườn ươm sinh trưởng bình thường, sau 8 tháng đạt chiều cao thân 25,6 cm.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] WHO (2015), *Annual Report*.
- [2] Trần Văn Sung, Nguyễn Huy Cường, Phạm Thị Ninh, Trịnh Thị Thuý (2009), “Phân lập, xác định cấu trúc và tổng hợp một số dẫn xuất của α -amyrin từ cây Cùm rậm răng (*Ehretia dentata*)”, *Tạp chí Hóa học*, **47(6)**, pp.691-697.
- [3] T.N. Ly, M. Shimoyamada, R. Yamauchi (2006), “Isolation and characterization of rosmarinic acid oligomers in *Celastrus hindsii* Benth leaves and their antioxidative activity”, *J. Agric. Food Chem.*, **54**, pp.3786-3793.
- [4] Nguyễn Huy Cường (2008), *Nghiên cứu thành phần hoá học và thăm dò hoạt tính sinh học cây Xạ đen (Celastrus hindsii Benth & Hook) và cây Cùm rậm răng (Ehretia dentata couch)*, Luận án tiến sĩ, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam.
- [5] Lê Thế Trung (1999), *Nghiên cứu về cây Xạ đen và hiệu quả điều trị ung thư*, Học viện Quân y.
- [6] T.T. Thuy, N.H. Cuong, T.V. Sung (2007), “Triterpenes from *Celastrus hindsii* Benth.”, *Journal of Chemistry*, **45(3)**, pp.373-376.
- [7] Tạ Như Thục Anh, Nguyễn Thị Bích Thu (2012), “Nghiên cứu nhân nhanh cây Xạ đen (*Ehretia asperula*)”, *Tạp chí Dược liệu*, **17(4)**, tr.244-247.
- [8] M. Phulwaria, N.S. Shekhawat (2013), “An efficient in vitro shoot regeneration from immature inflorescence and ex vitro rooting of *Arnebia hispidissima* (Lehm). DC. - a red dye (Alkannin) yielding plant”, *Physiol. Mol. Biol. Plants*, **19(3)**, pp.435-441.
- [9] S. Malik, S. Sharma, M. Sharma, P.S. Ahuja (2010), “Direct shoot regeneration from intact leaves of *Arnebia euchroma* (Royle) Johnston using thidiazuron”, *Cell Biol. Int.*, **34(5)**, pp.537-542.
- [10] Y. Sahoo, P.K. Chand (1998), “Micropropagation of *Vitex negundo* L., a woody aromatic medicinal shrub, through high-frequency axillary shoot proliferation”, *Plant Cell Rep.*, **18**, pp.301-307.
- [11] D.S.K. Nagahatenna, S.E. Peiris (2007), “In vitro propagation of *Femidesmus indicus* (L.) R. BR. (*Iramusu*) through nodal culture”, *Trop. Agric. Res.*, **19**, pp.181-192.