

TÁI SINH CHỒI *IN VITRO* CÂY NHÂN TRẦN (*Adenosma indianum* (Lour.) Merr.)

Trương Thị Bích Phượng^{1,*}, Phan Thụy Trúc Như¹

Hoàng Tấn Quảng², Lê Thị Lệ Quyên²

¹Trường Đại học Khoa học, Đại học Huế

²Viện Công nghệ Sinh học, Đại học Huế

Tóm tắt

Trong bài báo này, chúng tôi trình bày kết quả thí nghiệm tái sinh chồi *in vitro* cây nhân trần (*Adenosma indianum* (Lour.) Merr.). Đỉnh chồi và đoạn thân của cây tự nhiên được khử trùng bằng $HgCl_2$ 0,1% trong 6 phút làm giảm tỷ lệ mẫu nhiễm và tăng tỷ lệ mẫu sống đạt cao nhất 60,35% đối với đoạn thân và 57,44% đối với đỉnh chồi. Sau 4 tuần nuôi cấy, khả năng tái sinh chồi tốt nhất đạt được trên môi trường bổ sung 0,5 mg/l BAP mg/l đạt 46,70% mẫu đoạn thân tái sinh chồi với 1,8 chồi/mẫu. Chồi *in vitro* được cấy lên môi trường nhân nhanh bổ sung riêng lẻ các chất kích thích sinh trưởng BAP và kinetin hoặc phối hợp 0,5 mg/l BAP với NAA hoặc IBA. Sau 6 tuần nuôi cấy, môi trường MS bổ sung kết hợp 0,5 mg/l BAP với 0,3 mg/l IBA, cho số chồi lớn nhất đạt 10,03 chồi/mẫu

Từ khóa: Cây dược liệu, chồi đỉnh, đoạn thân, tái sinh chồi *in vitro*, nhân trần.

Abstract

***In vitro* shoot regeneration of *Adenosma indiana* (Lour.) Merr.**

This paper presents the obtained results of *in vitro* shoot regeneration of *Adenosma indiana* (Lour.) Merr. Shoot tips and stem of native *Adenosma indiana* were sterilized with $HgCl_2$ 0.1% in 5-10 minutes. Results indicated that highly effective sterilization occurred with $HgCl_2$ in 5 to 10 minutes for reducing the contamination rate and increasing the survival rate to 60.35% for stem explants and 57.44% for shoot tips. After 4 weeks of culture, the best regeneration buds achieved on MS medium supplemented with 0.5 mg/l BAP (46.70% of stem explant regenerating shoots and 1.8 shoots/stem explant). The shoot multiplication from *in vitro* shoots achieved quickly on MS medium supplemented alone with BAP and kinetin or in combination with 0.5 mg/l BAP with NAA or IBA. After 6 weeks of culture, the multiplication coefficient was greatest on MS medium supplemented in combination 0.5 mg/l BAP with 0.3 mg/l IBA. The average number of shoots per explant was 10.03.

Key words: medicinal plant, shoot tip, stem explant, *in vitro* shoot regeneration, *Adenosma Indiana*

1. Mở đầu

Chi *Adenosma* gồm các loài thực vật có mùi thơm của họ Scrophulariaceae ở Nam và Đông Nam Á và cả Châu Đại Dương, bao gồm khoảng 15 loài (Hong và cs., 1998). Các loài thuộc chi *Adenosma* chứa các loại tinh dầu dễ bay hơi như eucalyptol, β -bisabolene, limoneneand, có vai trò quan trọng trong các lĩnh vực dược phẩm, có tác dụng chống lại nhiều bệnh, đặc biệt là bệnh thấp khớp, thải độc và giảm đau (Ji và Pu, 1985; Liang và

* Email: ttbphuongdt@gmail.com

Zhong, 2005; Wu và cs, 2010).

Nhân trần (*Adenosma indiana* (Lour.) Merr.) còn gọi là chè nội, chè cát, bồ bồ. Loại cây này được khai thác từ nguồn mọc hoang ở các tỉnh trung du. Tuy nhiên, gần đây do nhu cầu sử dụng tăng cùng với đó là việc khai thác đất đai, củi đốt ồ ạt nên số lượng giống thảo dược này ngày càng bị suy giảm. Nếu không có biện pháp nhân giống phù hợp sẽ dẫn đến cạn kiệt nguồn dược liệu quý này. Để nhân giống cây nhân trần *A. indianum*, một số nơi đã bắt đầu trồng thử nghiệm nhưng bằng các phương pháp nhân giống truyền thống như: gieo hạt, giâm cành... thường cho tỉ lệ sống của cây con không cao và nhiễm bệnh. Bằng phương pháp nuôi cấy mô, tế bào thực vật cho phép giải quyết những khó khăn mà các phương pháp cổ điển như: giâm cành, giâm chồi, chiết, ghép cành... không thể vượt qua được.

Đã có một số công trình nghiên cứu trên cây nhân trần nhưng chủ yếu tập trung phân tích đặc điểm sinh học và khả năng tái sinh tự nhiên của cây nhân trần (Lê Phương Nhật và cs, 2015), Nghiên cứu thành phần hóa học và hoạt tính sinh học của loài bồ bồ (*Adenosma indiana* (Lour.) Merr.) (Dương Hồng Nhung, 2015), Phân tích thành phần bay hơi của *Adenosma indiana* (Lour.) Merr. (Chunyan và cs, 2013), thành phần acid Betulinic (Cheng và cs, 2014), thành phần hóa học và hoạt tính kháng khuẩn của tinh dầu (En và cs, 2011)... Có rất ít công trình công bố kết quả nghiên cứu nuôi cấy *in vitro* chi *Adenosma*. Liu và cs (2010) đã nghiên cứu nuôi cấy mô và nhân nhanh cây *Adenosma glutinosum* (L.) Druce. Tu và cs (2012) nghiên cứu tái sinh chồi bất định hiệu quả cao của *Adenosma glutinosum* (L.) Druce từ mẫu lá.

Trong bài báo này, chúng tôi nghiên cứu tái sinh chồi cây nhân trần, nhằm góp phần bảo tồn tài nguyên di truyền thực vật và làm cơ sở cho việc cung cấp nguồn cây giống chất lượng cao để mở rộng vùng dược liệu nhân trần ở Thừa Thiên Huế và trong cả nước.

2. Nguyên liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Nguyên liệu

Đối tượng nghiên cứu là cây nhân trần (*Adenosma indianum* (Lour.) Merr.) thuộc Chi *Adenosma*, Họ Scrophulariaceae, Bộ Scrophulariales (Võ Văn Chi, 1997).

Mẫu được Khoa Lâm nghiệp, Trường Đại học Nông Lâm, Đại học Huế phân loại và cung cấp. Nguyên liệu nuôi cấy ban đầu là đỉnh chồi và đoạn thân mang chồi nách của cây nhân trần mọc tự nhiên.

2.2. Vô trùng mẫu nuôi cấy

Để tái sinh chồi *in vitro*, mẫu cần được vô trùng trước khi đưa vào nuôi cấy. Đoạn thân mang chồi nách (0,5 cm) và đỉnh chồi (0,5 cm) của cây nhân trần khỏe mạnh được rửa sạch bụi đất trong dung dịch xà phòng loãng 3 lần và rửa lại nhiều lần dưới vòi nước chảy. Mẫu được rửa lại bằng nước cất vô trùng 5 lần trước khi đưa vào tủ cấy. Trong tủ cấy, mẫu vật được lắc với dung dịch khử trùng HgCl_2 0,1% trong khoảng thời gian từ 5-10 phút, sau đó lắc kỹ bằng nước cất khử trùng để loại bỏ hết HgCl_2 còn bám trên mẫu, rồi cấy lên môi trường dinh dưỡng.

Hiệu quả của thời gian khử trùng được đánh giá thông qua tỷ lệ mẫu sống không nhiễm, tỷ lệ mẫu nhiễm và tỷ lệ mẫu chết sau 2 tuần theo dõi.

2.3. Tái sinh chồi *in vitro* từ mẫu tự nhiên

Đỉnh chồi và đoạn thân mang chồi nách (0,5 cm) được cấy lên môi trường cơ bản MS (Murashige and Skoog, 1962) có 3,0% sucrose, 0,8% agar và bổ sung riêng lẻ chất kích thích sinh trưởng BAP (0,25 – 1,00 mg/l) hoặc KIN (0,25 – 1,00 mg/l) để thăm dò khả năng tái sinh chồi của mẫu. Các chỉ tiêu theo dõi gồm tỷ lệ % tái sinh, số chồi và chiều cao chồi được thu sau 4 tuần nuôi cấy.

2.4. Tạo cụm chồi từ chồi *in vitro*

Chồi *in vitro* (0,5 cm) được cấy lên môi trường cơ bản MS có 3,0% sucrose, 0,8% agar và bổ sung riêng lẻ chất kích thích sinh trưởng BAP (0,25 – 1,00 mg/l), KIN (0,25 – 1,00 mg/l) hoặc bổ sung kết hợp 0,5 mg/l BAP với NAA (0,1 – 0,5 mg/l) hay bổ sung kết hợp 0,5 mg/l BAP với IBA (0,1 – 0,5 mg/l) để thăm dò khả năng tạo cụm chồi *in vitro* của mẫu. Các chỉ tiêu theo dõi gồm số chồi, chiều cao chồi và số lá/chồi được thu sau 6 tuần nuôi cấy.

2.5. Điều kiện nuôi cấy

Các thí nghiệm được tiến hành ở điều kiện nhiệt độ $25 \pm 2^\circ \text{C}$, cường độ ánh sáng 2000 - 3000 lux, thời gian chiếu sáng 16 giờ/ngày.

2.6. Xử lý thống kê

Các thí nghiệm được lặp lại 3 lần, mỗi lần lặp quan sát 15 mẫu/công thức. Kết quả thí nghiệm được phân tích Duncan's test bằng phần mềm SPSS 16.0 với mức xác suất có ý nghĩa $p < 0,05$.

3. Kết quả và thảo luận

3.1. Vô trùng mẫu nuôi cấy

Đỉnh chồi (0,5 cm) và đoạn thân (0,5 cm) của cây nhân trần sau khi khử trùng được cấy trên môi trường. Kết quả ảnh hưởng của thời gian khử trùng bằng HgCl_2 0,1% đến khả năng vô trùng mẫu sau 2 tuần nuôi cấy được trình bày ở bảng 1.

Bảng 1. Ảnh hưởng thời gian khử trùng đỉnh chồi và đoạn thân nhân trần bằng HgCl_2 0,1 %

Thời gian khử trùng bằng HgCl_2 (phút)	Đỉnh chồi			Đoạn thân		
	Tỷ lệ mẫu nhiễm (%)	Tỷ lệ mẫu chết (%)	Tỷ lệ mẫu sống (%)	Tỷ lệ mẫu nhiễm (%)	Tỷ lệ mẫu chết (%)	Tỷ lệ mẫu sống (%)
5	46,15	15,00	38,85	81,82	6,67	11,51
6	19,23	23,33	57,44	26,32	13,33	60,35
8	8,00	45,00	47,00	16,67	26,67	56,66
10	0,00	57,67	42,33	15,30	38,33	46,374

Kết quả trình bày ở bảng 1 cho thấy, công thức khử trùng HgCl_2 trong thời gian 6 phút cho tỷ lệ mẫu sống cao nhất, đạt 57,44% (đối với chồi đỉnh) và 60,35% (đối với đoạn thân). Khi tăng thời gian khử trùng, tỷ lệ mẫu nhiễm giảm, tỷ lệ mẫu chết tăng cao do HgCl_2 thâm sâu vào mẫu gây độc. Khử trùng thời gian dài (10 phút) làm tăng tỉ lệ mẫu chết (57,67%) đối với mẫu chồi đỉnh và 38,33% đối với mẫu đoạn thân).

Như vậy, khử trùng đỉnh chồi và đoạn thân cây nhân trần *A. indianum* bằng HgCl_2 0,1% trong thời gian 6 phút là thích hợp nhất.

3.2. Tái sinh chồi

Mẫu đoạn thân và chồi đỉnh sau khi khử trùng được cấy lên môi trường MS bổ sung

0,25-1,0 mg/l KIN. Trên môi trường tái sinh, mẫu chồi đỉnh không tái sinh thêm chồi chỉ có quá trình kéo dài chồi. Ở bảng 2, chúng tôi trình bày kết quả ảnh hưởng của nồng độ KIN đến khả năng tạo chồi từ đoạn thân sau 4 tuần theo dõi.

Bảng 2. Ảnh hưởng của KIN đến khả năng tái sinh chồi từ đoạn thân sau 4 tuần

Nồng độ KIN (mg/L)	Tỷ lệ tái sinh (%)	Số chồi/mẫu	Cao chồi (cm)
0,00	0	0	0
0,25	30	1,6 ^a	2,12 ^a
0,50	13,33	1,2 ^b	1,98 ^a
0,75	0	0	0
1,00	0	0	0

Chú thích: Từ bảng 2 đến bảng 6

Các chữ cái khác nhau trên cùng một cột chỉ ra sự sai khác có ý nghĩa thống kê của trung bình mẫu với $p < 0,05$ (Duncan's test).

Trong các môi trường bổ sung KIN khảo sát, chỉ có môi trường MS bổ sung 0,25 và 0,5 mg/l KIN ảnh hưởng tốt nhất đến khả năng tạo chồi *in vitro* từ đoạn thân nhân trần, đạt lần lượt 1,6 và 1,2 chồi/mẫu, chiều cao trên 2 môi trường này sai khác không đáng kể trung bình 1,98-2,12 cm, chồi khỏe.

Khi tăng nồng độ KIN lên 0,75 mg/l thì đoạn thân mất khả năng tái sinh chồi. Môi trường bổ sung KIN 0,25 mg/l, thích hợp cho gốc thân tái sinh chồi (1,6 chồi/mẫu đoạn thân) (Hình 1a).

Bảng 3. Ảnh hưởng của BAP đến khả năng tái sinh chồi sau 4 tuần

Nồng độ BAP (mg/L)	Tỷ lệ tái sinh (%)	Số chồi/mẫu	Cao chồi (cm)
0,00	0	0	0
0,25	20,00	1,11 ^b	1,74 ^a
0,50	46,70	1,80 ^a	2,26 ^a
0,75	13,33	1,27 ^b	1,95 ^a
1,00	0	0	0

Môi trường cơ bản MS bổ sung 0,5 mg/l BAP ảnh hưởng tốt nhất đến khả năng tạo chồi *in vitro*, có 46,7% mẫu đoạn thân nhân trần tái sinh chồi, với 1,8 chồi/mẫu, chiều cao trung bình 2,26 cm, chồi khỏe, màu xanh (Hình 1b). Khi tăng nồng độ BAP lên 0,75 mg/l thì tỷ lệ tái sinh chồi giảm (13,33%), chồi cao khoảng 1,27 cm. Tiếp tục tăng nồng độ BAP lên 1,0 mg/l, đoạn thân mất khả năng tái sinh chồi. Môi trường bổ sung BAP 0,5 mg/l, thích hợp cho đoạn thân nhân trần tái sinh chồi.

Khả năng tái sinh chồi trong nuôi cấy *in vitro* của các đối tượng thuộc Bộ Scrophulariales là khác nhau. Số chồi/mẫu của cây nhân trần tái sinh *in vitro* trong nghiên cứu của chúng tôi thấp hơn so với kết quả nghiên cứu trên một số loài trong Bộ Scrophulariales. Kết quả nghiên cứu của Macas-Palacios (2015) trên cây hoa chuông (*Sinningia speciosa* (Lodd.) Hiern.) giống Brocade thuộc Bộ Scrophulariales cho thấy chồi

đinh tái sinh tạo 13 chồi/mẫu trên môi trường MS bổ sung 0,5 mg/l KIN sau 2 tháng nuôi cấy.

3.3. Nhân chồi

Chồi *in vitro* kích thước 0,5 cm được sử dụng làm nguyên liệu cho quá trình nhân chồi. Chúng tôi nghiên cứu ảnh hưởng riêng lẻ của các chất KTST nhóm cytokinin (BAP, KIN) và ảnh hưởng của tổ hợp cytokinin kết hợp với auxin (BAP và NAA) đến khả năng nhân chồi *in vitro*.

Ảnh hưởng riêng lẻ của BAP, KIN đến khả năng nhân chồi

Kết quả ảnh hưởng riêng lẻ của BAP, KIN đến khả năng nhân chồi sau 10 tuần nuôi cấy được thể hiện ở bảng 4.

Bảng 4. Ảnh hưởng của KIN đến khả năng nhân chồi sau 6 tuần

Nồng độ KIN (mg/L)	Số chồi/mẫu	Chiều cao chồi (cm)	Số lá/chồi
0,00	1,33 ^b	1,79 ^b	2,19 ^{cd}
0,25	2,62 ^a	2,45 ^a	3,78 ^a
0,50	1,78 ^b	2,31 ^a	3,06 ^b
0,75	1,34 ^b	1,60 ^b	2,57 ^{bc}
1,00	0,58 ^c	0,86 ^c	1,89 ^d

Kết quả trình bày ở bảng 4 cho thấy, môi trường đối chứng có hệ số nhân chồi thấp chỉ đạt 1,33 chồi/mẫu, chồi nhỏ và yếu; có màu xanh nhạt (Hình 1i).

Môi trường cơ bản MS bổ sung 0,25 và 0,5 mg/l KIN đã kích thích phát sinh chồi *in vitro*. Môi trường bổ sung 0,25 mg/l KIN, số chồi thu được cao nhất đạt 2,62 chồi/mẫu. Chất lượng chồi tốt, chồi mập, khỏe; lá dày, xanh đậm, chồi cao nhất (2,45 cm) với 3,78 lá/chồi (Hình 1c). Khi tăng nồng độ KIN 0,5-1,0 mg/l, số chồi thu được giảm. Môi trường bổ sung 0,75 mg/l KIN số chồi thu được không sai khác so với đối chứng. Nồng độ KIN càng tăng, kích thước lá càng giảm.

Bảng 5. Ảnh hưởng của BAP đến khả năng nhân chồi sau 6 tuần

Nồng độ BAP (mg/L)	Số chồi/mẫu	Chiều cao chồi (cm)	Số lá/chồi
0,00	1,33 ^d	1,79 ^b	2,19 ^b
0,25	2,43 ^c	1,96 ^b	2,87 ^a
0,50	3,85 ^a	2,53 ^a	3,44 ^a
0,75	3,08 ^b	2,07 ^{ab}	2,13 ^b
1,00	2,25 ^c	1,36 ^c	1,32 ^c

Kết quả trình bày ở bảng 4 cho thấy, môi trường đối chứng có hệ số nhân chồi thấp chỉ đạt 1,33 chồi/mẫu, chồi nhỏ và yếu; có màu xanh nhạt.

Khác với môi trường bổ sung KIN, trên môi trường bổ sung BAP chồi tạo thành có thân chồi mập, lá dày, màu xanh đậm. Môi trường cơ bản MS bổ sung 0,25 -1,0 mg/l BAP đã kích thích phát sinh chồi *in vitro*. Môi trường bổ sung BAP 0,5 mg/l, số chồi thu được cao nhất đạt 3,85 chồi/mẫu, chồi cao nhất (2,53 cm) với 3,44 lá (Hình 1d). Khi tăng nồng độ BAP 0,75-1,0 mg/l, số chồi thu được giảm dần. Môi trường bổ sung BAP 1,0 mg/l, số chồi thu được thấp đạt 2,25 chồi/mẫu.

Ảnh hưởng của 0,5 mg/l BAP kết hợp với NAA đến khả năng nhân chồi

Kết quả ảnh hưởng của 0,5 mg/l BAP kết hợp với NAA đến khả năng nhân chồi sau 6 tuần nuôi cấy được trình bày ở bảng 6.

Kết quả trình bày ở bảng 6 cho thấy, môi trường bổ sung kết hợp NAA (0,1-0,5 mg/l) với BAP 0,5 mg/l đã kích thích tạo chồi *in vitro*.

Bảng 6. Ảnh hưởng của 0,5 mg/l BAP kết hợp với NAA lên khả năng nhân chồi sau 6 tuần

Nồng độ NAA (mg/L)	Số chồi/mẫu	Chiều cao chồi (cm)	Số lá/chồi
0,0	1,42 ^d	1,82 ^d	2,23 ^c
0,1	2,92 ^b	2,39 ^d	4,00 ^{bc}
0,2	4,54 ^a	2,56 ^{cd}	4,49 ^{ab}
0,3	3,40 ^b	3,35 ^a	4,80 ^a
0,4	2,44 ^c	3,19 ^{ab}	4,52 ^{ab}
0,5	1,40 ^d	2,90 ^c	3,80 ^c

Trên các môi trường nuôi cấy bổ sung kết hợp NAA (0,1-0,5 mg/l) với BAP 0,5 mg/l, các công thức môi trường có kết hợp 0,5 mg/l BAP với 0,2 mg/l NAA thích hợp cho nhân chồi, số chồi/mẫu cao nhất (4,54 chồi/mẫu). Chồi phát triển thành cụm; thân mập; lá dày, màu xanh đậm; chất lượng chồi tốt (Hình 1e). Trên môi trường bổ sung riêng lẻ 0,5 mg/l BAP (bảng 5), số chồi thu được chỉ đạt 3,85 chồi/mẫu, thấp hơn so với môi trường bổ sung kết hợp 0,5 mg/l BAP với 0,2 mg/l NAA. Tuy nhiên, chồi phát triển chiều cao nhanh nhất trên môi trường bổ sung kết hợp 0,5 mg/l BAP với 0,3 mg/l NAA. Khi tăng nồng độ NAA, số chồi/mẫu giảm. Môi trường bổ sung kết hợp 0,5 mg/l BAP và 0,5 mg/l NAA, mẫu tạo chồi kém (1,40 chồi/mẫu), tương đương đối chứng. Chất lượng chồi không tốt, đường kính thân nhỏ; lá dài mỏng, màu xanh nhạt. Trên môi trường này có khoảng 50% chồi tạo rễ với khoảng 10-15 rễ/cụm chồi. Rễ phát triển mạnh, màu xanh nhạt, tạo chùm (Hình 1g).

Tu và cs (2012) nghiên cứu tái sinh chồi *Adenosma glutinosum* (Linn.) Druce thông qua callus trên môi trường bổ sung kết hợp 6-BA 0,5 mg/l với NAA 0,1 mg/l cho số chồi bất định hình thành từ callus cao nhất gần 100% và đạt 7,2 chồi/mẫu.

Ảnh hưởng của 0,5 mg/l BAP kết hợp với IBA đến khả năng nhân chồi

Kết quả ảnh hưởng của 0,5 mg/l BAP kết hợp với IBA đến khả năng nhân chồi sau 6 tuần nuôi cấy được trình bày ở bảng 7.

Bảng 7. Ảnh hưởng của 0,5 mg/l BAP kết hợp với IBA lên khả năng nhân chồi sau 6 tuần

Nồng độ IBA (mg/L)	Số chồi/mẫu	Chiều cao chồi (cm)	Số lá/chồi
0,0	1,42 ^b	1,82 ^d	2,23 ^c
0,1	4,42 ^e	2,97 ^d	3,84 ^{bc}
0,2	6,14 ^d	4,34 ^c	4,40 ^{ab}
0,3	10,03 ^a	5,14 ^b	4,44 ^{ab}
0,4	8,90 ^b	5,59 ^a	4,88 ^a
0,5	7,32 ^c	4,53 ^c	3,92 ^{bc}

Kết quả trình bày ở bảng 7 cho thấy, môi trường bổ sung kết hợp IBA (0,1-0,5 mg/l) với BAP 0,5 mg/l đã kích thích nhân chồi *in vitro* rất tốt.

Trên các môi trường nuôi cấy bổ sung kết hợp IBA (0,1-0,5 mg/l) với BAP 0,5 mg/l, các công thức môi trường có kết hợp 0,5 mg/l BAP với 0,3 mg/l IBA thích hợp cho nhân chồi, số chồi/mẫu cao nhất (10,03 chồi/mẫu). Chồi phát triển thành cụm; phát triển nhanh về chiều cao, thân mảnh; lá nhỏ, màu xanh nhạt; chất lượng chồi khá tốt (Hình 1f).

Trên môi trường bổ sung riêng lẻ 0,5 mg/l BAP (bảng 4), số chồi thu được chỉ đạt 3,85 chồi/mẫu, thấp hơn nhiều so với môi trường bổ sung kết hợp 0,5 mg/l BAP với 0,3 mg/l IBA. Tuy nhiên, chồi phát triển chiều cao nhanh nhất trên môi trường bổ sung kết hợp 0,5 mg/l BAP với 0,4 mg/l IBA. Khi tăng nồng độ NAA, số chồi/mẫu giảm nhẹ. Môi trường bổ sung kết hợp 0,5 mg/l BAP và 0,5 mg/l IBA, thu được 7,32 chồi/mẫu. Chất lượng chồi tương đối tốt, đường kính thân nhỏ; lá nhỏ, màu xanh nhạt. Trên môi trường bổ sung kết hợp 0,5 mg/l BAP với 0,4-0,5 mg/l IBA, một số chồi tạo rễ với 1-2 rễ/chồi. Rễ phát triển nhanh, dài, không phân nhánh (Hình 1h).

Theo Liu và cộng sự (2010), môi trường MS với 0,25 mg/l BA và 0,5 mg/l IBA cho sinh sản chồi bất định từ đỉnh chồi của *Adenosma glutinosum* (L.) Druce.

4. Kết luận

Đỉnh chồi và đoạn thân cây nhân trần thu ngoài tự nhiên được khử trùng bằng HgCl₂ 0,1% trong 6 phút cho tỷ lệ mẫu sống cao (60,35% đối với đoạn thân và 57,44% đối với đỉnh chồi). Môi trường MS bổ sung 0,5 mg/l BAP thích hợp nhất cho giai đoạn tái sinh chồi, đạt 46,70% mẫu đoạn thân tái sinh chồi với 1,8 chồi/mẫu. Chồi *in vitro* được nhân nhanh tốt nhất trên môi trường MS bổ sung kết hợp 0,5 mg/l BAP với 0,3 mg/l IBA, chồi/mẫu cao nhất (10,03 chồi/mẫu) □

Lời cảm ơn

Công trình được thực hiện bằng một phần kinh phí của đề tài cấp Đại học Huế năm 2018-2019, mã số DHH2018-15-10.

Cám ơn Khoa Lâm nghiệp, Trường Đại học Nông Lâm, Đại học Huế đã cung cấp vật liệu cây nhân trần tự nhiên cho nghiên cứu này.



Hình 1. Tái sinh chồi *in vitro* cây nhân trần

- a. Tái sinh chồi từ đoạn thân trên môi trường MS có 0,25 mg/l KIN sau 4 tuần nuôi cấy
- b. Tái sinh chồi từ đoạn thân trên môi trường MS có 0,50 mg/l BAP 4 tuần nuôi cấy
- c. Nhân chồi trên môi trường MS có 0,25 mg/l KIN sau 6 tuần nuôi cấy
- d. Nhân chồi trên môi trường MS có 0,5 mg/l BAP sau 6 tuần nuôi cấy
- e. Nhân chồi trên môi trường MS có 0,5 mg/l BAP và 0,2 mg/l NAA sau 6 tuần nuôi cấy

- f. Nhân chồi trên môi trường MS có 0,5 mg/l BAP và 0,3 mg/l IBA sau 6 tuần nuôi cấy
- g. Cụm chồi tạo nhiều rễ trên môi trường MS có 0,5 mg/l BAP và 0,5 mg/l NAA sau 6 tuần nuôi cấy
- h. Cụm chồi tạo rễ trên môi trường MS có 0,5 mg/l BAP và 0,5 mg/l IBA sau 6 tuần nuôi cấy
- i. Nhân chồi trên môi trường MS sau 6 tuần nuôi cấy

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Cheng H.W., Jie H.Q., Jie L.W., Kang Y.Q., Shou L.G (2014), Separation and Determination of Betulinic Acid in *Adenosma indianum* (Lour.) Merr. by HPLC, *Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae*, 9, pp. 90-92.
- [2] Chunyan M., Xuening Y., Zhi Z., Zhuo Z. (2013), Analysis of Volatile Components of *Adenosma indianum* (Lour.) Merr. by Steam Distillation and Headspace Solid-Phase Microextraction, *Journal of Chemistry*, pp. 1-7.
- [3] En W.H., Fen X.Y., Ling Y.X., Yan H., Ying W.Z (2011), Chemical Constituents and Anti-bacterial Activity of Essential Oil from *Adenosma indianum*, *Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae*, 12, pp. 79-82.
- [4] Hong DY, Yang HB, Jin CL, Holmgren NH (1998). *Adenosma* R. Brown (Scrophulariaceae). In: Wu ZY, Raven PH. (eds), Flora of China. Science Press, Miss. Bot. Gard. Press. pp. 18.
- [5] Ji XD, Pu QL (1985). Studies on the components of the essential oil from *Adenosma indianum* (Lour.) Merr. *Acta Bot. Sin.* 27(1): 80-83.
- [6] Liang QC, Zhong M (2005). Zhuang folk Medicine of China. Guangxi Nationalities Publishing House, Nanning. pp. 188.
- [7] Liu CH, Lun X, Xia GH (2010). Tissue culture and rapid propagation of *Adenosma glutinosum* (L.) Druce. *Plant Physiol. Commun.* 46(6): 601-602.
- [8] Macas-Palacios GC, Pucha-Pauta EE, Delgado-Paredes GE, Rojas-Idrogo C and Minchala-Patiño J (2015). *In vitro* Plant Regeneration in Gloxinia (*Sinningia speciosa* (Lodd.) Hiern.). *Journal of Biology*, 3(1): 6-14.
- [9] Murashige T and Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures, *Physiol. Plant* 15, 473-97.
- [10] Lê Phương Nhật, Phạm Thị Lành, Trần Thị Ê Ly (2015), Nghiên cứu đặc điểm sinh học và khả năng tái sinh tự nhiên của cây nhân trần (*Adenosma indiana* (Lour.) Merr.) tại xã Hải Dương, huyện Hải Lăng, tỉnh Quảng Trị, *Kỷ yếu Hội nghị Khoa học sinh viên năm học 2015/2016*, Trường Đại học sư phạm, Đại học Huế, 61-68.
- [11] Dương Hồng Nhung (2015), *Nghiên cứu thành phần hóa học và hoạt tính sinh học của loài bồ bồ (*Adenosma indiana* (Lour.) Merr.) phân bố ở địa bàn huyện Đại Từ-tỉnh Thái Nguyên*, Luận văn Thạc sĩ Khoa học vật chất, Trường Đại học Sư phạm, Đại học Thái Nguyên.
- [12] Tu R.P., Hu J.Y., Ji Q.Q., Xia G.H., Zheng B.S. (2012). Highly efficient *in vitro* adventitious shoot regeneration of *Adenosma glutinosum* (Linn.) Druce using leaf

- explants. African Journal of Biotechnology 11(29): 7542-7548.
- [13] Wu HE, Liang CY, Li YH, Huang XQ, Zhu XY (2010). GC-MS analysis of chemical constituents of the essential oil from *Adenosma indianum* (Lour.) Merr. by different extraction methods. Chin. J. Pharm. Anal. 30(10): 1941-1946.

(Ngày nhận bài: 27/04/2018; ngày phản biện: 28/05/2018; ngày nhận đăng: 07/06/2018)