

Nhân giống *in vitro* Xáo tam phân (*Paramignya trimera* (Oliv.) Guill.)

- Trần Trung Hiếu
- Huỳnh Văn Chung
- Bùi Thị Linh Huệ
- Lương Thị Mỹ Ngân
- Bùi Lan Anh
- Bùi Văn Lệ

Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG-HCM

(Bài nhận ngày 22 tháng 08 năm 2016, nhận đăng ngày 03 tháng 05 năm 2017)

TÓM TẮT

Xáo tam phân (*Paramignya trimera*) được sử dụng trong dân gian như là một nguồn dược liệu quý cho việc chữa trị nhiều loại bệnh ung thư khác nhau. Sự truyền miệng trong dân gian về đặc tính thần kỳ của thân và rễ cây làm cho chúng bị khai thác cạn kiệt ở Phú Yên, Khánh Hòa và Ninh Thuận. Đề tài này được thực hiện nhằm thiết lập một quy trình nhân giống *in vitro* để bảo tồn loài được liệu này. Các cụm chồi bất định (5–8 chồi/cụm) được tái sinh từ các đoạn thân mang chồi bên (của cây 1–3 năm tuổi) sau 3 tháng nuôi cấy trên môi trường nuôi cấy cây thân gỗ WPM (Woody Plant Medium) có chứa STS (silver thiosulfate) 3 và BA 5–7 mg/L. STS được sử dụng để ngăn chặn sự rụng lá. Các cụm chồi

con tăng trưởng chậm và đạt chiều cao từ 1–3 cm sau 4 tháng nuôi cấy. Các cụm chồi này không thành lập rễ sau 2 tháng nuôi cấy trên môi trường tạo rễ chứa IBA và/hoặc NAA 1–5 mg/L. Có 51 % cụm chồi (đã được xử lý trên môi trường tạo rễ) có khả năng thích nghi và tạo thân và lá mới sau 2 tháng nuôi trồng trong vườn ươm. Môi trường WPM có STS 3, BA 5 và IBA 5 mg/L cho sự thành lập mô sẹo nhiều nhất từ các mẫu lá trưởng thành sau 3 tháng nuôi cấy. Trong số các loại mô sẹo, mô sẹo chắc màu trắng đục được tạo ra tại mặt cắt của mô lá sau 3 tháng nuôi cấy và phát triển thành mô sẹo chắc dạng nốt sau 4 tuần.

Từ khóa: mô sẹo, nhân giống *in vitro*, *Paramignya trimera*, sự tái sinh chồi, xáo tam phân

MỞ ĐẦU

Chi *Paramignya* thuộc họ Cam chanh (Rutaceae) gồm khoảng 15 loài cây thân gỗ nhỏ, dạng dây leo có nguồn gốc từ phía nam và đông nam châu Á và ở miền bắc nước Úc [1, 2]. Theo P.H. Hồ (2000), ở Việt Nam có 7 loài, trong đó cây Xáo tam phân (XTP) *Paramignya trimera* (Oliv.) Guill. được tìm thấy ở núi Lấp Vò, Tây Ninh [3]. Trước đây, hầu hết các loài trong chi *Paramignya* được xếp vào chi *Atalantia* nên XTP còn có 1 đồng danh khác là *A. trimera* (Oliv.) [1]. Tuy nhiên, theo Burkill (1931), chi *Paramignya* cho quả nhỏ chứa đầy chất keo nhầy và quả

không có các túi nhỏ chứa nước (pulp vesicles), do vậy *A. trimera* nên được gọi là *P. trimera* [4]. Chi *Paramignya* cũng rất gần gũi với chi *Luvunga* nên Mabberley (1998) đã xếp *P. trimera* vào chi *Luvunga* với tên khoa học là *L. monophylla* (DC.) Mabb. [5]. Ngoài ra, *P. trimera* còn có các tên đồng nghĩa khác như *Triphasia monophylla* DC. và *A. recurva* Benth. [4, 5].

Nhiều loài trong chi *Paramignya* được biết đến như là cây thuốc, ngoài ra còn có khả năng kháng lại bệnh thối mục và các loại nấm gây

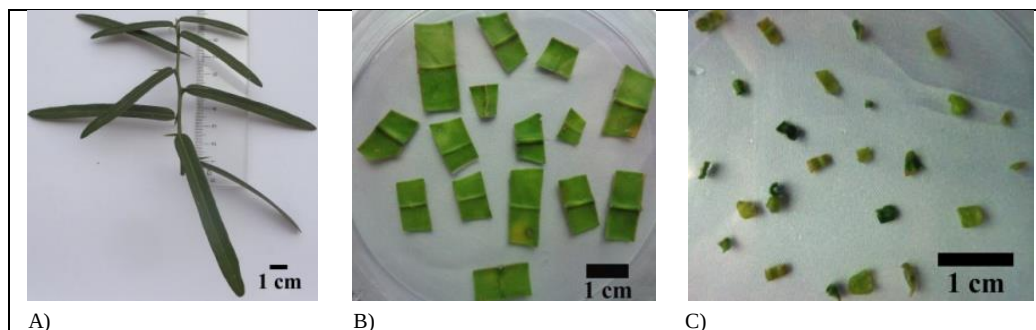
bệnh thực vật [1]. Xáo Griffithii (*P. griffithii*) phân bố ở Nha Trang, Lâm Đồng [3], vỏ thân của Xáo Griffithii được sử dụng để chữa trị viêm mũi ở Thái Lan [6]. Rễ của Xáo một hoa (*P. monophylla*) được sử dụng như một loại thuốc bổ, lá được vò dập để đắp bên ngoài vết thương do rắn cắn và cho vật nuôi ăn khi bị chứng huyết niệu hoặc xuất huyết tiêu hóa [7]. Xáo cựa gà (*P. armata* Oliv. var. *andamanica* King) ở Đà Nẵng, Nha Trang cho lá và trái dùng trị ho [3]. Ở Lâm Đồng, loài Xáo leo (*P. scandens*) đã được báo cáo có hoạt tính kháng viêm, kháng ung thư biểu mô và ung thư gan [8]. Theo Viện Dược Liệu Việt Nam, XTP được sử dụng như là cây thuốc ở tỉnh Khánh Hòa, có tác dụng ức chế viêm gan cấp trên chuột trắng và có hoạt tính kháng nhiều loại tế bào ung thư như ung thư gan, ung thư vú, ung thư đại tràng, ung thư buồng trứng và ung thư cổ tử cung [9]. Ngoài ra, rễ XTP còn chứa các hoạt chất kháng oxy hóa [10]. Trong những năm vừa qua, do sự thiếu nhận thức và thời phỏng giá trị y học của cây XTP đã tạo nên cơn sốt về giá cả và làm cho loài cây này và các loài tương tự đang bị khai thác tận kiệt ở Phú Yên, Khánh Hòa và Ninh

Thuận. Việc nhân giống cây XTP và thu nhận sinh khối *in vitro* chưa được quan tâm nghiên cứu trong và ngoài nước. Các nghiên cứu ở họ Cam chanh thường chỉ tập trung trên các loài thuộc các chi cho quả lớn và có giá trị thương mại, như *Citrus* spp. và *Citropsis* spp. [11-13]. Do đó, đề tài nhân giống vô tính *in vitro* Xáo tam phân được thực hiện nhằm góp phần vào việc xây dựng quy trình nhân giống giúp bảo tồn nguồn gene và nhân sinh khối mô sẹo *in vitro* giúp cho việc khảo sát các hợp chất có giá trị y học.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Chồi Xáo tam phân (XTP)

Mẫu cây là các đoạn chồi non dài 10–12 cm mang 8–10 chồi bên và lá, mỗi lá dài 5–10 cm rộng 0,5–1 cm (Hình 1A). Các đoạn chồi được thu nhận từ cây 1–3 năm tuổi do PGS.TS. Bùi Văn Lệ (Bộ môn CNSH Thực vật và Chuyển hóa Sinh học) sưu tập và nuôi trồng. Ngoài ra, chúng tôi cũng thu thập được một số mẫu chồi từ Trạm thực nghiệm CNSH Hòa Quang, Trung tâm Ứng dụng và Chuyển giao Công nghệ, Sở Khoa học và Công nghệ Tỉnh Phú Yên.



Hình 1. Mẫu cây chồi XTP (A) từ cây 1–3 năm tuổi. Mẫu lá trưởng thành (B) và mẫu lá non *in vitro* (C)

Môi trường và điều kiện nuôi cấy

Môi trường muối khoáng cơ bản MS (Murashige và Skoog, 1962) và môi trường nuôi cấy cây thân gỗ WPM (Woody Plant Medium) (Lloyd và McCown, 1981) được sử dụng. Tất cả các môi trường đều được bổ sung vitamine Morel

2 mL/L, inositol 100 mg/L, glycine 2 mg/L, malt extract 500 mg/L và saccharose 50 g/L ở pH 5,7. Các chất điều hòa sinh trưởng thực vật như BA (6-benzylaminopurine), IBA (indole-3-butyric acid), NAA (1-naphthaleneacetic acid) và 2,4-D

(2,4-dichlorophenoxyacetic acid) được thêm vào môi trường tùy theo mục đích thí nghiệm. Các mẫu cây được đặt trong phòng nuôi với điều kiện chiếu sáng 3.000–5.000 lux trong 16 giờ sáng và 8 giờ tối ở 25 ± 2 °C. Để ức chế sự rụng lá của chồi con *in vitro*, STS (silver thiosulfate, $\text{Ag}_2\text{O}_3\text{S}_2$) 3 mg/L được bổ sung vào môi trường nuôi cấy.

Phương pháp khử trùng mẫu cây chồi và lá

Các đoạn thân mang 3–4 chồi bên được cắt bỏ lá. Các đoạn thân và các mẫu lá này được ngâm trong nước xà bông loãng và được rửa sạch dưới vòi nước chảy. Trong tủ cấy vô trùng, các đoạn thân và lá được lặt 2 phút trong cồn 70 % và được khử trùng lần thứ nhất với dung dịch hypochloride calcium ($\text{Ca}(\text{OCl})_2$) 5 hoặc 10 % trong các khoảng thời gian khác nhau (15, 20 và 25 phút). Sau khi được rửa sạch 3 lần bằng nước cất vô trùng, các đoạn chồi được cắt thành từng đoạn thân mang 1 chồi bên, mẫu lá được cắt ngang thành các đoạn 1cm (Hình 1B). Sau đó, các mẫu cây này được khử trùng lần 2 ở nồng độ 2,5 hoặc 5 % trong 20, 25 hoặc 30 phút (Bảng 1).

Khảo sát môi trường nuôi cấy thích hợp cho sự tăng trưởng chồi và thành lập cụm chồi từ chồi bên

Nhằm khảo sát môi trường khoáng thích hợp cho sự tăng trưởng của chồi, các đoạn thân mang 1 chồi bên được nuôi cấy trên môi trường MS hoặc WPM bổ sung BA 1 mg/L.

Sự thành lập cụm chồi từ chồi bên được khảo sát trên môi trường khoáng thích hợp với các nồng độ BA khác nhau 1–7 mg/L.

Khảo sát sự thành lập mô sẹo từ lá

Sau khi được khử trùng và cắt bỏ phần mô chết, các mẫu cây lá từ chồi trưởng thành (Hình 1B) được cắt ngang thành các đoạn dài 2–3 mm. Các lá non (dài 20–30 mm) của các chồi *in vitro* cũng được thu nhận và cắt ngang thành các đoạn dài 2–3 mm (Hình 1C). Sự tái sinh mô sẹo từ các mẫu lá trưởng thành và lá non *in vitro* được khảo

sát trên các đĩa môi trường WPM có BA, IBA và 2,4-D 0–5 mg/L.

Khảo sát sự tăng trưởng và tạo rễ của cụm chồi con *in vitro* và *ex vitro*

Sự tăng trưởng và tạo rễ của các cụm chồi con *in vitro* được khảo sát trên môi trường nuôi cấy thích hợp bổ sung IBA và NAA 0–5 mg/L và được nuôi trồng trong vườn ươm, trong các chậu đất sạch gồm đất sơ dừa : tro trấu : cát với tỉ lệ 1:1:1 với điều kiện phun sương tự động trong 1 phút và phun cách khoảng 3 giờ/lần từ 6:00 đến 21:00 giờ để theo dõi sự tăng trưởng của cụm chồi và sự thành lập rễ *ex vitro*.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Khử trùng mẫu cây chồi và lá

Đối với mẫu chồi bên, kết quả ở Bảng 1 cho thấy với nồng độ khử trùng lần 1 (10 % trong 15 phút) và lần 2 (5 % trong 20 phút), 62 % mẫu chồi vô trùng và khỏe mạnh được ghi nhận. Trong khi đó, ở cùng nồng độ khử trùng nhưng với thời gian khử trùng dài hơn (20–30 phút), kết quả thu được 39–45 % mẫu chồi vô trùng và khỏe mạnh, số chồi còn lại không có khả năng tăng trưởng và chết do tác động của $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ sau 4 tuần nuôi cấy. Tuy nhiên, với nồng độ khử trùng thấp hơn (5 % ở lần 1 và 2,5 % ở lần 2) hầu hết các chồi bị nhiễm vi khuẩn và nấm mốc, số chồi vô trùng và khỏe mạnh chỉ đạt được từ 11–41 % tùy theo thời gian khử trùng.

Đối với mẫu lá, với nồng độ khử trùng lần 1 (5 % trong 25 phút) và lần 2 (2,5 % trong 30 phút) cho 76 % mẫu lá sống sót và vô trùng, các mẫu lá còn lại bị nhiễm vi khuẩn sau 1–4 tuần nuôi cấy. Tuy nhiên, ở cùng nồng độ khử trùng nhưng với thời gian khử trùng ngắn hơn (15–25 phút), hầu hết mẫu lá bị nhiễm, số mẫu lá sống sót và vô trùng chỉ đạt 34–52 %. Ở nồng độ khử trùng cao hơn (10 % ở lần 1 và 5 % ở lần 2) số mẫu lá sống và vô trùng chỉ đạt 8–17 %, đa số các mẫu lá chết do tác động của chất khử trùng (Bảng 1).

Bảng 1. Phần trăm mẫu chồi và lá vô trùng có khả năng tăng trưởng sau 4 tuần trên môi trường MS

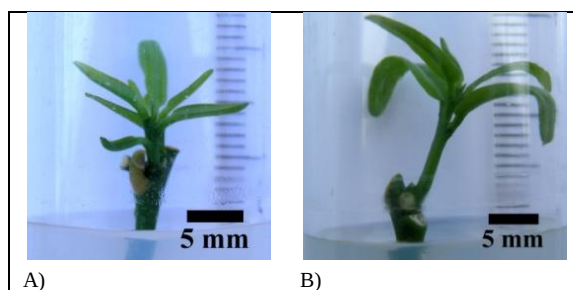
Thời gian khử trùng (phút): (lần 1)/(lần 2)	Phần trăm mẫu cấy vô trùng (% $\pm$ SE*)			
	Mẫu chồi bên		Mẫu lá	
	[5]/[2,5]**	[10]/[5]	[5]/[2,5]	[10]/[5]
(15)/(20)	10,7 $\pm$ 1,47	62,2 $\pm$ 8,73	34,4 $\pm$ 3,29	8,1 $\pm$ 1,01
(20)/(25)	33,0 $\pm$ 4,90	38,5 $\pm$ 4,50	52,3 $\pm$ 2,75	11,0 $\pm$ 1,82
(25)/(30)	40,7 $\pm$ 5,59	44,5 $\pm$ 5,17	76,0 $\pm$ 3,97	16,6 $\pm$ 2,00

*SE: Sai số chuẩn (Standard Error) **Nồng độ dung dịch khử trùng [% Ca(OCl)₂]: [lần 1]/[lần 2]

Môi trường nuôi cấy thích hợp cho sự tăng trưởng chồi

Các chồi bên đều có khả năng tăng trưởng tốt trên cả 2 môi trường MS và WPM. Tuy nhiên, trên môi trường WPM, các chồi con tăng trưởng

mạnh hơn trên môi trường MS. Chồi con đạt chiều cao từ 10–13 mm trên môi trường WPM và 5–8 mm trên môi trường MS sau 12 tuần nuôi cấy (Hình 2). Do đó, môi trường WPM được sử dụng cho các nghiên cứu tiếp theo.

**Hình 2.** Chồi con tăng trưởng trên môi trường MS (A) và trên môi trường WPM (B) sau 12 tuần nuôi cấy

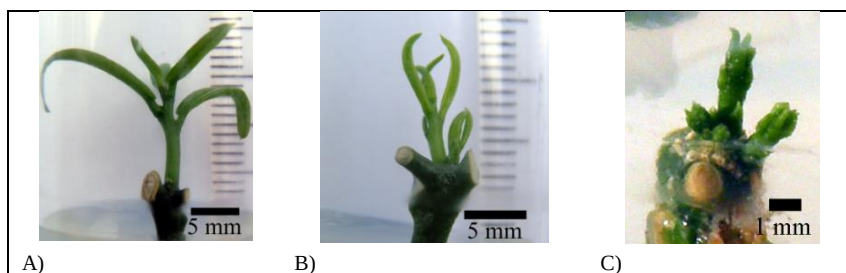
Sự thành lập cụm chồi từ chồi bên

Kết quả ở Bảng 2 cho thấy, trên các môi trường có BA 0–3 mg/L, chỉ có 1–3 chồi được thành lập sau 12 tuần nuôi cấy (Hình 3A và 3B). Trên các môi trường có BA 5 và 7 mg/L, có 5–8 chồi được thành lập (Hình 3C). Sự gia tăng nồng độ BA giúp ức chế ưu thế ngọn và kích thích tái

sinh chồi dẫn đến sự hình thành cụm chồi từ chồi bên. Tuy nhiên, do sự thành lập cụm chồi nên chiều cao chồi trung bình chỉ đạt 3–4 mm trên môi trường BA 5–7 mg/L so với các chồi (cao 9–13 mm) trên môi trường có BA 1–3 mg/L sau 12 tuần nuôi cấy.

Bảng 2. Sự thành lập cụm chồi từ chồi bên và tăng trưởng chồi trên môi trường WPM sau 12 tuần cấy

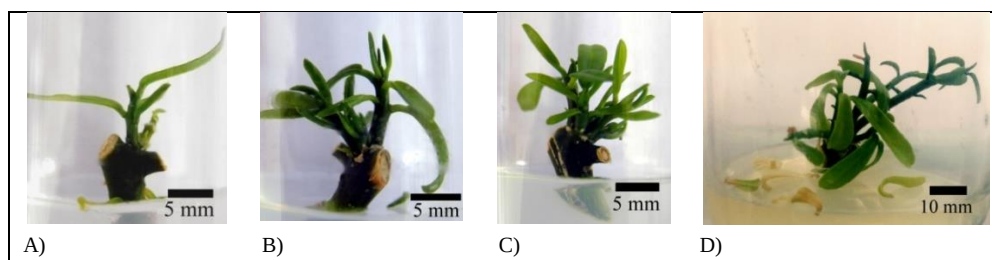
BA (mg/L)	Số mẫu cấy	Số chồi/mẫu cấy	Số chồi trung bình $\pm$ SE	Chiều cao chồi trung bình $\pm$ SE (mm)
1	17	1–2	1,2 $\pm$ 0,11	13,2 $\pm$ 0,48
3	25	2–3	2,4 $\pm$ 0,10	8,6 $\pm$ 0,30
5	21	5–7	5,5 $\pm$ 0,16	4,1 $\pm$ 0,26
7	19	5–8	5,8 $\pm$ 0,27	3,4 $\pm$ 0,18



Hình 3. Sự tái sinh và tăng trưởng cụm chồi từ chồi bên sau 12 tuần nuôi cấy trên môi trường WPM có BA 1 (A); BA 3 (B); và BA 5 mg/L (C)

Sau 8–12 tuần nuôi cấy, các cụm chồi con thường bị rụng lá khi được cấy chuyển sang môi trường mới. Sự rụng lá của các chồi con trong nuôi cấy *in vitro* là hiện tượng thường gặp ở nhiều loài cây thân gỗ, làm chậm sự tăng trưởng và khả năng thành lập rễ của chồi dẫn đến sự hoại tử và chết của chồi con khi bị tách ra khỏi cụm chồi [14-17]. Hiện tượng rụng lá trong nuôi cấy *in vitro* đã được báo cáo là do sự sản xuất ethylene của chồi và mô cây [18, 19]. Nhiều nghiên cứu cho thấy rằng việc thêm AgNO_3 hoặc STS vào môi trường có thể ức chế hoạt động của ethylene trong chồi và mô nuôi cấy giúp gia tăng chiều cao chồi và thúc đẩy sự sinh tạo hình thái

của mô [15, 16, 20-22]. Theo Lemos và Blake (1996), việc thêm STS 0,5 mg/L vào môi trường WPM giúp kiểm soát sự rụng lá của chồi na (*Annona squamosa*) [15]. Trong một nghiên cứu trước đây của chúng tôi, AgNO_3 3 mg/L cũng làm giảm sự rụng lá của chồi na [17]. Trong khi đó, theo Shukor và cộng sự (2008), cần AgNO_3 10 mg/L để vượt qua sự rụng lá của cây sầu đâu cao (*Azadirachta excelsa*) [16]. Trong nghiên cứu này, với STS 3 mg/L đã giúp khắc phục hiện tượng rụng lá của chồi con XTP đang tăng trưởng và kích thích sự tăng trưởng của cụm chồi sau 12–16 tuần nuôi cấy (Hình 4).



Hình 4. Các cụm chồi con bị rụng lá và được phục hồi trên môi trường WPM bổ sung STS 3 và BA 3 (A); BA 5 (B); BA 7 mg/L (C) sau 14 tuần nuôi cấy. Cụm chồi con tăng trưởng trên môi trường WPM có STS 3 và BA 5 mg/L (D) sau 16 tuần

Sau 16 tuần nuôi cấy trên môi trường WPM có STS 3 và BA 5–7 mg/L, các cụm chồi (5–8 chồi/cụm) đạt chiều cao từ 1–3 cm (Hình 4D) được cấy chuyển sang môi trường WPM có STS 3 và IBA kết hợp với NAA 1–5 mg/L để khảo sát sự tăng trưởng và thành lập rễ.

Sự thành lập mô sẹo từ mẫu cây lá

Sự tái sinh mô sẹo từ các mẫu lá trưởng thành và lá non *in vitro* được ghi nhận trên các

môi trường WPM có STS 3 và BA, IBA hoặc 2,4-D 0–5 mg/L (Bảng 3). Các mẫu lá non *in vitro* hóa nâu và chết sau 4–8 tuần trên các môi trường chỉ có BA, IBA hoặc 2,4-D. Trong khi đó, trên môi trường chứa BA 5 kết hợp với IBA 5 mg/L và môi trường chứa BA 2,5 kết hợp với IBA 2,5 mg/L có lần lượt 31 và 16 % mẫu lá non còn sống. Trên các môi trường chứa BA kết hợp với 2,4-D chỉ có 7–9 % mẫu lá non còn sống.

Tuy nhiên, không có sự tái sinh nào ở tất cả các mẫu lá non này được ghi nhận sau 16 tuần nuôi cấy.

Đối với các mẫu lá trưởng thành, lá hóa nâu dần và chết sau 8–12 tuần trên các môi trường chỉ chứa BA, IBA hoặc 2,4-D, hoặc BA kết hợp với 2,4-D. Trên môi trường chứa BA 5 kết hợp với IBA 5 mg/L và môi trường chứa BA 2,5 kết hợp với IBA 2,5 mg/L có lần lượt 47 và 12 % mẫu lá thành lập mô sẹo sau 12 tuần nuôi cấy (Hình 5A). Hầu hết là sự thành lập mô sẹo trắng xốp tại mặt cắt ở hai đầu gân chính (Hình 5B và 5C). Đầu tiên mô sẹo được tái sinh từ bó mạch trung tâm của gân chính (Hình 5B) sau 12 tuần, sau đó tiếp tục phát sinh và lan rộng ra toàn bộ bề mặt của gân chính (Hình 5C và 5D) và loại mô sẹo này cũng có thể được thành lập trên bề mặt của lá

(Hình 5E) sau 16 tuần nuôi cấy. Một dạng mô sẹo khác cũng được thành lập trên bề mặt biểu bì của lá, đó là các nốt mô sẹo nhỏ, màu trắng trong (Hình 5F) phát triển thành từng cụm nhỏ 0,5 mm có cấu trúc như một khối phôi (hoặc chồi) phát sinh từ các tế bào biểu bì lá sau 10–12 tuần cấy (Hình 5G). Ngoài ra, còn có một dạng mô sẹo chắc bóng, màu trắng đục được thành lập tại mặt cắt của phiến lá (Hình 5H) sau 12 tuần cấy. Tuy nhiên, chỉ có 21 % mẫu lá thành lập các khối mô sẹo này trong tổng số mẫu lá có khả năng thành lập mô sẹo. Các khối mô sẹo này tiếp tục phát triển và thành lập các cụm nhỏ (0,3–0,5 mm) có cấu trúc như một khối phôi (hoặc chồi) trên bề mặt của mô sẹo (Hình 5I) sau 16 tuần cấy. Sự phát sinh hình thái từ các khối mô sẹo này đang được tiếp tục theo dõi.

Bảng 3. Sự thành lập mô sẹo các mẫu lá trưởng thành trên môi trường WPM

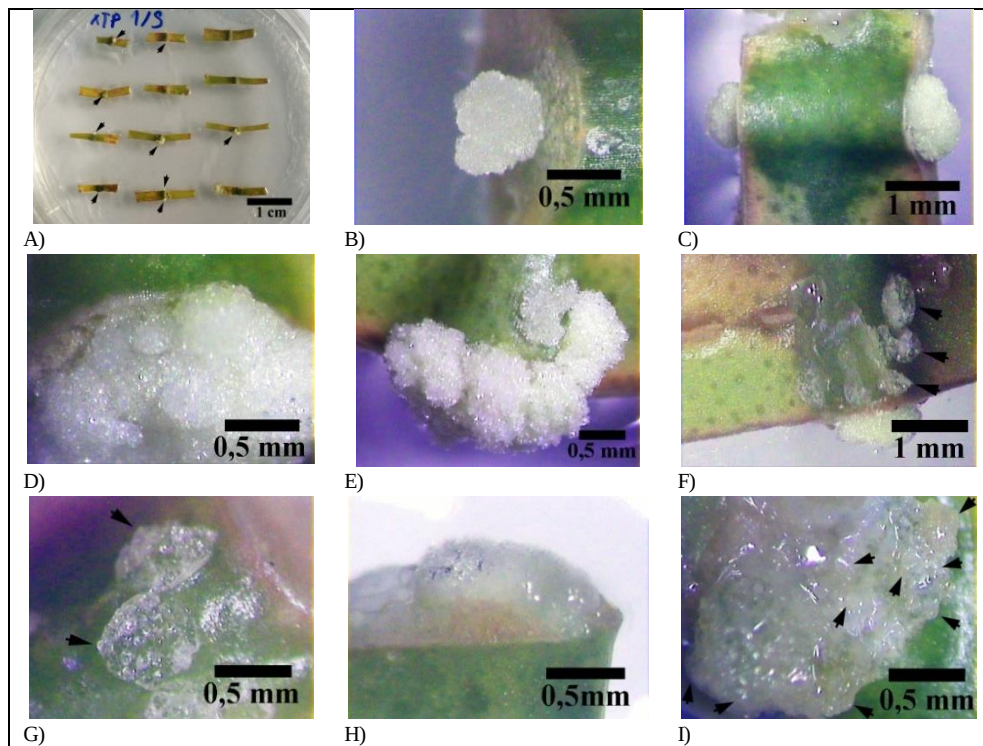
Nồng độ (mg/L)			% mẫu đáp ứng	Thời gian thành lập mô sẹo (ngày)	Hình thái mô sẹo
BA	IBA	2,4-D			
0	0	0	0	0	-
2,5	0	0	0	0	-
5	0	0	0	0	-
0	2,5	0	0	0	-
0	5	0	0	0	-
0	0	2,5	0	0	-
0	0	5	0	0	-
2,5	2,5	0	11,7±2,04	124,6±7,47	- Mô sẹo trắng xốp tại mặt cắt của gân lá và trên bề mặt lá. - Các nốt mô sẹo trắng trong và bóng trên bề mặt lá. - Mô sẹo chắc bóng, màu trắng đục tại mặt cắt của phiến lá
5	5	0	46,7±4,25	89,6±5,14	
2,5	0	2,5	0	0	-
5	0	5	0	0	-

Ethylene ảnh hưởng tiêu cực lên sự tăng sinh mô sẹo, quá trình tạo phôi và sự tái sinh chồi [23]. Khi có sự hiện diện của AgNO_3 hoặc STS, mô sẹo và phôi soma ở *Leucosium aestivum* không sản sinh ethylene [19]. Sự kết hợp AgNO_3 với BA và NAA đã thúc đẩy sự thành lập mô sẹo và tăng trưởng chồi ở lá sấu đầu cao (*A. excelsa*) [16]. Trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng

STS trong môi trường thành lập mô sẹo từ lá XTP. Trên các môi trường không có STS, mẫu lá hóa nâu và chết. Trong khi đó, trên môi trường có sự kết hợp STS với BA và IBA, mô sẹo được hình thành. Tuy nhiên, không có mẫu lá nào đáp ứng cho sự thành lập mô sẹo khi có sự kết hợp của STS với BA và 2,4-D. Sự thành lập mô sẹo từ lá rất khác nhau tùy theo loài. Theo Sree và

cộng sự (2016), các khối mô sẹo trắng được thành lập từ các mẫu lá trưởng thành của *A. monophylla* (một loài rất gần với XTP) trên môi trường chỉ có 2,4-D 0,5–5,0 mg/L, nhưng không có sự thành lập mô sẹo nào được ghi nhận khi có

sự kết hợp của BA với 2,4-D hoặc BA với IAA [24]. Các mô sẹo này cũng được thành lập từ các gân lá và trên bề mặt lá, nhưng chưa có sự tái sinh chồi được báo cáo [24].



Hình 5. Sự thành lập mô sẹo từ lá trưởng thành (A, mũi tên chỉ mô sẹo). Sự tái sinh mô sẹo trắng xốp từ bó mạch của gân lá (B) và ở cả hai đầu gân lá (C), mô sẹo tăng sinh tại mặt cắt của gân lá (D) và bề mặt lá (E). Sự thành lập các nốt mô sẹo nhỏ, màu trắng trong trên bề mặt biểu bì của lá (F, mũi tên) và phát triển thành từng cụm mô sẹo nhỏ có cấu trúc giống 1 khối phôi (G, mũi tên). Sự thành lập mô sẹo chắc bóng, màu trắng đục tại mặt cắt của phiến lá (H) và phát triển thành các cụm mô sẹo nhỏ có cấu trúc như các khối phôi tại bề mặt mô sẹo (I, mũi tên)

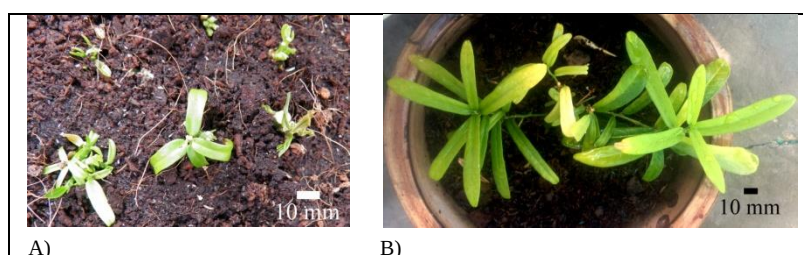
Sự tăng trưởng chồi và tạo rễ của cụm chồi con trong nuôi cấy *in vitro* và *ex vitro*

Sự tăng trưởng và sự thành lập rễ của cụm chồi con trên các môi trường WPM có STS 3 kết hợp với IBA và/hoặc NAA 1–5 mg/L được ghi nhận ở Bảng 4. Các cụm chồi con (cao 1–3 cm) tăng trưởng chậm và không thành lập rễ sau 8 tuần nuôi cấy. Do đó, các cụm chồi này được chuyển ra vườn ươm. Sau 4 tuần nuôi trồng với 45 cụm chồi được khảo sát, có 23 cụm (chiếm 51 %) có khả năng sống sót và tăng trưởng (Bảng

4, Hình 6A). Kết quả cho thấy các cụm chồi được nuôi cấy trên các môi trường có IBA, NAA, hoặc IBA kết hợp với NAA 3–5 mg/L cho các cụm chồi có khả năng tăng trưởng và thành lập rễ sau 8 tuần ngoài vườn ươm. Mặc dù tỉ lệ cụm chồi sống sót và thành lập rễ trong điều kiện *ex vitro* còn thấp, nhưng đây là bước đầu cho thấy có khả năng nhân giống cây XTP trong điều kiện *in vitro* và *ex vitro*. Sau 5 tháng nuôi trồng các cụm chồi con đạt chiều cao từ 8–15 cm với 5–12 lá mới (dài 3–5 cm) được thành lập (Hình 6B).

Bảng 4. Sự thành lập rễ của cụm chồi trên môi trường WPM trong nuôi cấy *in vitro* và *ex vitro*

Auxin (mg/L)		Số cụm chồi khảo sát	Số cụm chồi tạo rễ <i>in vitro</i>	Số cụm chồi tạo rễ <i>ex vitro</i>	Chiều cao chồi (mm)
IBA	NAA				
0	0	3	0	0	-
1	0	4	0	0	-
3	0	6	0	4	90
5	0	4	0	3	100
0	1	3	0	0	-
0	3	6	0	4	120
0	5	5	0	4	100
0,5	0,5	3	0	0	-
1,5	1,5	5	0	3	80
2,5	2,5	6	0	5	150
Tổng số:		45	0	23 (51 %)	

**Hình 6.** Cụm chồi (4 tháng tuổi) (A) và cây con 5 tháng tuổi (B) đang tăng trưởng trong điều kiện *ex vitro*

KẾT LUẬN

Quy trình nhân giống *in vitro* cây Xáo tam phân (*P. trimera*) đã được thiết lập từ các đoạn thân mang chồi bên của cây 1–3 năm tuổi ngoài vườn ươm. Môi trường WPM bổ sung STS 3 và BA 5 mg/L thích hợp cho sự tăng trưởng và hạn chế sự rụng lá của cụm chồi. Các cụm chồi (5–8 chồi/cụm, cao 1–3 cm) được tái sinh từ chồi bên sau 4 tháng nuôi cấy. Sau 2 tháng nuôi cấy trên môi trường WPM chứa STS 3 và IBA, NAA hoặc IBA kết hợp với NAA 3–5 mg/L, các cụm chồi con có khả năng thành lập rễ trong vườn

ươm sau 4 tháng trồng trên đất sạch. Ba hình thái phát sinh mô sẹo từ lá được ghi nhận trên môi trường WPM có STS 3 và BA kết hợp với IBA 2,5–5,0 mg/L sau 12–16 tuần nuôi cấy. Các nốt mô sẹo trắng bóng trên bề mặt lá và các mô sẹo chắc bóng, màu trắng đục tại mặt cắt của phiến lá có tiềm năng tái sinh chồi.

Lời cảm ơn: Nghiên cứu được tài trợ bởi Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh (ĐHQG-HCM) trong khuôn khổ Đề tài mã số C2015-18-24.

In vitro propagation of Xao tam phan (*Paramignya trimera* (Oliv.) Guill.)

- Tran Trung Hieu
- Huynh Van Chung
- Bui Thi Linh Hue
- Luong Thi My Ngan
- Bui Lan Anh
- Bui Văn Le

University of Science, VNU-HCM

ABSTRACT

Paramignya trimera (Oliv.) Guill., a woody climber commonly known as "Xao tam phan", has been used in Vietnamese folk for the treatment of numerous cancers. Due to word of mouth about the anticancer properties of this plant, its stems and roots have been overexploited leading to the serious decline of this species in Phu Yen, Khanh Hoa and Ninh Thuan provinces. The aim of the study was to establish an *in vitro* propagation protocol for the conservation of *P. trimera*. In this research shoot clusters (5–8 shoots/cluster) were regenerated from axillary bud explants of 1–3 year-old trees after 3 months of cultures on the WPM (woody plant medium) supplemented with STS 3 and BA 5–7 mg/L. STS (silver thiosulfate) was used to

prevent the leaf abscission. These shoot clusters grew slowly and reached 1–3 cm in heights after 4 months of the cultures. These shoot clusters did not form any roots after 2 months of culture on the rooting media with IBA and/or NAA 1–5 mg/L. However, there was 51 % of the treated shoot clusters acclimatized and produced new stem and leaves after 2 months growing in greenhouse. WPM supplemented with STS 3, BA 5 and IBA 5 mg/L showed the best response for callus induction in leaf explants after 3 months of cultures. Among the callus types, the milky white compact calli were induced at the cut surface of leaf explants after 3 months of the cultures and became the compact and nodulated calli within 4 weeks later.

Key words: callus, *in vitro* propagation, *Paramignya trimera*, shoot regeneration, Xao Tam Phan

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. R.R. Krueger, L. Navarro, *Citrus* germplasm resources (Chap. 4), In *Citrus Genetics, Breeding and Biotechnology*, ed. by I.A. Khan, CAB International, 45–140 (2007).
- [2]. D. Zhang, T.G. Hartley, *Paramignya* Wight, Ill. Ind. Bot. 1: 108. 1838., *Fl China*, 11, 88 (2008).
- [3]. P.H. Hộ, *Cây cỏ Việt Nam*, Vol. 2, Nxb. Trẻ TP. HCM (2000).
- [4]. I.H. Burkill, An enumeration of the species of *Paramignya*, *Atalantia* and *Citrus* found in Malaya, *Gard Bull Straits Settlem* 5, 212–223 (1931).
- [5]. D.J. Mabberley, Australian Citreae with notes on other Aurantioideae (Rutaceae), *Telopea* 7, 4, 333–344 (1998).
- [6]. C. Wattanapiromsakul, P.G. Waterman, Flavanone, triterpene and chromene derivatives from the stems of *Paramignya griffithii*, *Phytochem*, 55, 269–273 (2000).
- [7]. D.M.A. Jayaweera, Medicinal plants (indigenous and exotic) used in Ceylon: Rutaceae – Zygophyllaceae, *National Science Council of Sri Lanka* 5, 31 (1982).
- [8]. N.M. Khởi, P.TN. Hằng, Đ.T. Phương, Nghiên cứu độc tính cấp, tác dụng bảo vệ

- gan và tác dụng gây độc tế bào ung thư của Xáo tam phân, *Tạp chí Dược liệu*, 18, 1, 14–19 (2013).
- [9]. N.T.D. Thuần, Nghiên cứu thành phần hóa học và khảo sát hoạt tính sinh học của loài xáo leo (*Paramignya scandens* (Griff.) Craib.) ở Lâm Đồng, *Luận án Tiến sỹ khoa học*, Viện Hóa Sinh Biển, Viện Hàn Lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, 1–120 (2015).
- [10]. V.T Nguyen, M.C. Bowyer, Q.V. Vuong, I.A.V. Altena, C.J. Scarlett, Phytochemicals and antioxidant capacity of Xao tam phan (*Paramignya trimera*) root as affected by various solvents and extraction methods, *Ind Crop Prod.*, 67, 192–200 (2015).
- [11]. J.T. Ling, M. Iwamasa, Plant regeneration from embryogenic calli of six *Citrus* related genera, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 49, 145–148 (1997).
- [12]. D.T. Nhut, J.A.T. da Silva, B.V. Le, K.T.T. Van, Thin cell layer (TCL) morphogenesis as a powerful tool in woody plant and fruit crop micropropagation and biotechnology, floral genetics and genetic transformation. In *Micropropagation of Woody Trees and Fruits*, Springer, Netherlands, 783–814 (2003).
- [13]. M. Dutt, M. Vasconcellos, K.J. Song, F.G. Gmitter Jr, J.W. Grosser, *In vitro* production of autotetraploid Ponkan mandarin (*Citrus reticulata* Blanco) using cell suspension cultures, *Euphytica* 173, 2, 235–242 (2010).
- [14]. G.L. Sita, B.V.R. Swamy, Regeneration of plantlets from leaf disc cultures of rosewood: control of leaf abscission and shoot tip necrosis. *Plant Sci* 88, 1, 107–112 (1993).
- [15]. E.E.P. Lemos, J. Blake, Micropropagation of juvenile and adult *Annona squamosa*., *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 46, 77–79 (1996).
- [16]. N.A.A. Shukor, J.E. Jainol, A.M. Yusoff, MA. Kadir, Defoliation of *in vitro* shootlets of *Azadirachta excelsa* (Jack) M. Jacobs – a possible solution, *Malaysian Forester* 71, 1, 37–44 (2008).
- [17]. H.T.K. Yên. Nhân giống *in vitro* Cây Na (*Annona squamosa* L.) Khóa luận tốt nghiệp Cử nhân Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG TP. HCM, trang 32–43 (2015)
- [18]. E.C. Pua, G.L. Chi, *De novo* shoot morphogenesis and plant growth of mustard (*Brassica juncea*) *in vitro* in relation to ethylene, *Physiol. Plant* 88, 467–474 (1993).
- [19]. A. Ptak, A.E. Tahchy, G. Wyzgolik, M. Henry, D. Laurain-Mattar, Effects of ethylene on somatic embryogenesis and galanthamine content in *Leucojum aestivum* L. cultures, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 102, 1, 61–67 (2010).
- [20]. H. Telgen, V. Elagöz, A.V. Mil, A. Paffen, G. Klerk, Role of plant hormones in lateral bud growth of rose and apple *in vitro*. In *International Symposium on Transplant Production Systems* 319, 137–142 (1992).
- [21]. M.H.C. de Carvalho, B. Van Le, Y. Zuily-Fodil, A.T.P. Thi, K.T.T. Van, Efficient whole plant regeneration of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) using thin-cell-layer culture and silver nitrate. *Plant Sci*, 159, 2, 223–232 (2000).
- [22]. V. Kumar, G. Parvatam, G.A. Ravishankar, AgNO₃: a potential regulator of ethylene activity and plant growth modulator. *Electron J. Biotechnol.*, 12, 2, 8–9 (2009).
- [23]. N.L. Biddington, The influence of ethylene in plant tissue culture, *Plant Growth Regul.*, 11, 2, 173–178 (1992).
- [24]. S.J. Sree, N. Vijayakumar, K.S. Gomathi, Effect of plant growth regulators on callus induction in *Atalantia monophylla* and *Pamburus missionis*, *Int. J. Curr. Res. Biosci. Plant Biol.*, 3, 3, 21–25 (2016).