

## BƯỚC ĐẦU TẠO PHÔI VÔ TÍNH TỪ MÔ SẸO LÁ CÂY XÁO TAM PHÂN (*Paramignya trimera* (Oliv.) Guillaum)

Nguyễn Thị Mỹ Duyên, Trương Phi Yến, Nguyễn Vũ Phong\*

Bộ môn Công nghệ Sinh học - Trường Đại học Nông Lâm Thành phố Hồ Chí Minh

### TÓM TẮT

Xáo tam phân (*Paramignya trimera* (Oliv.) Guillaum) là loài cây thân gỗ nhỏ, dạng bụi, được sử dụng như một nguồn dược liệu truyền thống điều trị bệnh tiểu đường và một số bệnh ung thư. Nghiên cứu này trình bày kết quả bước đầu cảm ứng tạo phôi vô tính thông qua mô sẹo cây xáo tam phân, phục vụ nhân giống vô tính và nghiên cứu hợp chất có hoạt tính sinh học. Lát cắt ngang mẫu lá vô trùng được đặt trên môi trường WPM (Woody Plant Medium) bổ sung 2,4-D riêng lẻ và NAA kết hợp BA để cảm ứng hình thành mô sẹo. Sau 6 tuần nuôi cấy trong điều kiện tối hoàn toàn, ở môi trường bổ sung 2,4-D tỷ lệ mẫu hình thành mô sẹo thấp (16%) mô sẹo xốp trắng, không tăng sinh. Trên môi trường bổ sung 2,0 mg/L NAA và 0,2 mg/L BA tỷ lệ mẫu hình thành mô sẹo cao (68%). Mô sẹo có màu vàng nhạt, rắn chắc và tăng sinh nhanh. Trên môi trường bổ sung 1,0 mg/L NAA kết hợp 0,2 mg/L BA mặc dù tỷ lệ mẫu hình thành mô sẹo thấp (27%) nhưng đã cảm ứng tạo phôi vô tính hình cầu. Nghiên cứu tạo phôi vô tính hoàn chỉnh đang được tiếp tục thực hiện.

*Từ khóa:* 6-benzyladenin,  $\alpha$ -naphthaleneacetic acid, mô sẹo, phôi vô tính, xáo tam phân.

### MỞ ĐẦU

Ngày nay, việc sử dụng cây dược liệu để điều trị một số bệnh nan y ngày càng phổ biến vì hiệu quả tốt và ít biểu hiện tác dụng phụ. Xáo tam phân (*Paramignya trimera* (Oliv.) Guillaum) là loài dược liệu quý, thuộc họ cam quýt (Rutaceae). Theo các bài thuốc dân gian, loài cây này có tác dụng giải nhiệt, bồi bổ sức khỏe, mát gan và đặc biệt là có khả năng trị ung thư (Trịnh Hoàng Dương *et al.*, 2016), nhờ sự hiện diện của các hợp chất như coumarin, alkaloid, saponin và flavonoid trong thân và rễ của cây.

Hiện tại, cây giống xáo tam phân chủ yếu từ giâm cành và việc trồng quy mô lớn gặp nhiều khó khăn do thiếu hụt nguồn giống. Xáo tam phân là loài thân gỗ nên tốc độ tăng trưởng chậm, giâm hom khó ra rễ, tỷ lệ cây chết do bệnh bong vỏ thối gốc thân chiếm từ 2 - 11% (Trần Nam Thắng, Trần Thị Thu Hà, 2016). Từ nhiều năm nay, công nghệ nuôi cấy mô tế bào thực vật góp phần rất lớn trong việc bảo tồn và nhân giống nhiều loài cây thuốc quý hiếm, đặc biệt là phương pháp nuôi cấy để tạo mô sẹo, phôi vô tính và rễ bất định đã được áp dụng ở các loài cây dược liệu như sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis*), thông đỏ (*Taxus wallichiana*), bá bệnh (*Eurycoma longifolia*). Riêng cây xáo tam phân, việc áp dụng phương pháp nuôi cấy mô sẹo từ lá trưởng thành đang trong quá trình nghiên cứu. Một số kết quả cho thấy, mô sẹo hình thành có dạng trắng xốp tại mặt cắt của gân lá, không có khả năng tăng sinh, thời gian cảm ứng hình thành mô sẹo dài (12 tuần) (Trần Trung Hiếu *et al.*, 2017) hoặc mô sẹo xốp màu vàng hình thành ở gân lá (Ngô Thị Xuyên *et al.*, 2018).

Phương pháp nhân giống bằng phôi vô tính đang ngày càng phát triển với hệ số nhân giống lớn, sạch bệnh, cây con đồng nhất về mặt di truyền, khắc phục được những khó khăn trong lưu trữ và bảo quản giống, tạo điều kiện thuận lợi chủ động về nguồn giống và năng suất. Phôi vô tính được tái sinh từ các tế bào mô sẹo phôi hoá in vitro, chứa một lượng chất dinh dưỡng tương tự với nội nhũ của phôi hữu tính, có mầm chóp rễ và chồi đỉnh, do vậy có thể nảy mầm trực tiếp thành cây. Khả năng nhân giống quy mô lớn, đặc biệt là nhân giống bằng bioreactor đối với phôi vô tính là rất lớn. Vì vậy, nghiên cứu này được thực hiện nhằm xác định thành phần và nồng độ các chất điều hòa sinh trưởng thực vật bổ sung vào môi trường nuôi cấy thích hợp cho sự hình thành mô sẹo và phôi vô tính từ mẫu lá cây xáo tam phân phục vụ nhân giống vô tính và nghiên cứu các hoạt chất sinh học.

### VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

#### Vật liệu nuôi cấy

Cây xáo tam phân hai năm tuổi được cung cấp từ Trang trại bảo tồn, nuôi trồng và phát triển nguồn cây dược liệu quý của ông Nguyễn Văn Khôn tại Trảng Bom - Đồng Nai.

### Môi trường nuôi cấy

Môi trường nuôi cấy cơ bản là môi trường WPM (Woody Plant Medium, Lloyd, McCown, 1981) và môi trường MS (Murashige, Skoog, 1962) bổ sung 8 g/L agar, 30 g/L sucrose. Các chất điều hòa sinh trưởng gồm  $\alpha$ -naphthaleneacetic acid (NAA), 2,4-dichlorophenoxy acetice acid (2,4-D), benzylaminopurine (BA) được bổ sung riêng lẻ hoặc kết hợp với các nồng độ khác nhau tùy công thức thí nghiệm. Môi trường được điều chỉnh pH về 5,8 và khử trùng bằng autoclave ở 1 atm, 121°C, trong 20 phút. Các mẫu cấy được nuôi cấy trong điều kiện tối hoàn toàn, nhiệt độ  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , độ ẩm 60 - 65%.

### Phương pháp khử trùng mẫu lá

Các mẫu lá ở vị trí thứ 3, 4, 5 được cắt ra từ mẫu đoạn cành được khử trùng sơ bộ trong xà phòng loãng 5% trong 15 phút, thuốc diệt nấm Bordeaux M 25 WP (3 g/L) trong 10 phút, rửa lại bằng nước máy. Trong tủ cấy vô trùng, các mẫu lá được khử trùng trong cồn 70° trong 30 giây, dung dịch Javel với các tỷ lệ 10%, 20%, 30%, 40% (v/v) trong 15 phút, kháng sinh tetracyclin kết hợp ampicilin tỷ lệ 1:1 trong 30 phút. Sau mỗi lần sử dụng hóa chất khử trùng, rửa lại mẫu với 3 lần nước cất vô trùng, mỗi lần 3 phút. Các mẫu lá được cắt thành những mảnh có kích thước khoảng 1 cm<sup>2</sup> và nuôi cấy trên môi trường MS.

### Cảm ứng tạo mô sẹo và phôi vô tính từ mẫu lá cây xáo tam phân

Mẫu lá xáo tam phân vô trùng được cắt ngang thành những mảnh có kích thước khoảng 2 mm x 10 mm. Sự cảm ứng hình thành mô sẹo được khảo sát trên môi trường WPM chỉ bổ sung 2,4-D ở các nồng độ khác nhau (0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1 mg/L) và môi trường WPM bổ sung NAA (1; 2 mg/L) kết hợp với BA (0; 0,2; 0,5; 1 mg/L) tùy theo công thức thí nghiệm. Chỉ tiêu theo dõi gồm tỷ lệ mẫu hình thành mô sẹo (%), hình thái mô sẹo, mẫu mô sẹo hình thành phôi vô tính, hình thái phôi vô tính được ghi nhận sau 6 tuần nuôi cấy.

### Bố trí thí nghiệm và xử lý số liệu

Các thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên, mỗi nghiệm thức gồm 3 bình môi trường, mỗi bình cấy 6 mẫu, mỗi nghiệm thức được lặp lại 3 lần. Số liệu được tính toán bằng phần mềm Exel và xử lý thống kê bằng phần mềm XLSTAT 2016. Số liệu được phân tích thống kê ANOVA, đọc kết quả dựa vào giá trị trung bình, trắc nghiệm phân hạng theo Tukey's HSD (nếu có). Số liệu phần trăm được chuyển đổi bằng công thức  $y = \arcsin\sqrt{(x/100)}$  hoặc  $y = \sqrt{(x+0,5)}$  trước khi xử lý thống kê.

## KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### Hiệu quả khử trùng mẫu lá của dung dịch Javel

Khi khử trùng mẫu lá với tỷ lệ 40% Javel cho số mẫu lá sống sót và vô trùng cao nhất đạt 100%. Tuy nhiên, với cùng thời gian khử trùng là 15 phút nhưng khi giảm tỷ lệ Javel sử dụng, số mẫu lá sống sót và vô trùng giảm đi. Sau 14 ngày nuôi trên môi trường MS, hầu hết các lá đều xanh, rất ít mẫu bị tổn thương và mẫu không có dấu hiệu nhiễm vi khuẩn, chỉ xuất hiện mẫu nhiễm nấm.

**Bảng 1. Hiệu quả khử trùng mẫu lá của dung dịch Javel sau 14 ngày nuôi cấy**

Tỷ lệ Javel (%)	Tỷ lệ mẫu nhiễm (%)	Tỷ lệ mẫu sống, vô trùng (%)
10	11,1	88,9
20	6,7	93,3
30	4,4	95,6
40	0,0	100,0

### Ảnh hưởng của 2,4-D đến sự hình thành mô sẹo từ lá cây xáo tam phân

Trong các nghiên cứu tạo mô sẹo thì lá được sử dụng như là một nguồn mẫu phổ biến do lá có thể tái sinh liên tục và đều đặn, việc thu mẫu lá không làm chết cây làm mẫu. Nhu mô thịt lá, phần chủ yếu của phiến lá, có vách sơ cấp mỏng còn tiềm năng phân chia tế bào. Nhờ tiềm năng này, các tế bào nhu mô có vai trò hàn gắn vết thương và thường được dùng trong nuôi cấy tế bào *in vitro* (Vũ Thị Hiền, 2018). Để cảm ứng hình thành mô sẹo thì các chất điều hòa sinh trưởng thực vật là thành phần quan trọng của môi trường nuôi cấy. Trong số các auxin, 2,4-D sử dụng rất có hiệu quả trong việc tạo mô sẹo ở nhiều loài thực vật. Theo Thomas và đồng tác giả (1996), chất điều hòa sinh trưởng 2,4-D mặc dù có hoạt tính rất yếu trong kích thích tạo chồi và rễ bất định nhưng lại là auxin kích thích tạo mô sẹo và phôi rất hiệu quả. Do đó, trong thí nghiệm này, sử dụng 2,4-D ở các nồng độ khác nhau để khảo sát quá trình hình thành mô sẹo từ lá cây xáo tam phân đã được thực hiện.

**Bảng 2. Ảnh hưởng của 2,4-D đến sự hình thành mô sẹo từ lá cây xáo tam phân sau 6 tuần nuôi cấy**

2,4-D (mg/L)	Tỷ lệ mẫu hình thành mô sẹo (%)	Hình thái mô sẹo
-	0,0 <sup>c</sup>	Mô sẹo không hình thành
0,2	5,6 <sup>b</sup>	Mô sẹo màu trắng, cứng, nhỏ
0,4	5,6 <sup>b</sup>	Mô sẹo màu trắng, cứng, nhỏ
0,6	7,4 <sup>b</sup>	Mô sẹo màu trắng, cứng, nhỏ
0,8	16,7 <sup>a</sup>	Mô sẹo màu trắng, cứng, nhỏ
1	9,3 <sup>ab</sup>	Mô sẹo màu trắng, cứng, nhỏ

Các giá trị trung bình trong cùng một cột có các kí tự khác nhau thì khác biệt có ý nghĩa thống kê ( $p \leq 0,05$ ).

Sau 4 tuần nuôi cấy, các mẫu cấy bắt đầu cảm ứng hình thành mô sẹo. Ứng với mỗi nồng độ 2,4-D khác nhau thì số mẫu hình thành mô sẹo khác nhau. Nhưng nhìn chung, tỷ lệ mẫu hình thành mô sẹo tương đối thấp ở tất cả các nghiệm thức được ghi nhận sau 6 tuần nuôi cấy. Tỷ lệ mẫu hình thành mô sẹo tăng dần theo nồng độ 2,4-D sử dụng từ 0,2 đến 0,8 mg/L, cao nhất ở nghiệm thức bổ sung 0,8 mg/L 2,4-D (tương ứng 16,7% mẫu hình thành mô sẹo). Nhưng khi gia tăng nồng độ 2,4-D lên 1 mg/L tỷ lệ mẫu hình thành mô sẹo giảm đi và mẫu cấy có hiện tượng vàng và hóa nâu sau 6 tuần nuôi cấy. Theo Bùi Trang Việt (2000) trong vài nhận xét về cách hoạt động của auxin thì đối với một quá trình sinh lý, auxin có thể có hiệu ứng đối nghịch nhau, kích thích hay cản trở tùy theo nồng độ. Nồng độ auxin tối ưu sẽ hoạt hóa một số enzyme, dẫn đến tăng hàm lượng DNA, RNA giúp cho sự phân chia của tế bào mô sẹo. Nồng độ auxin cao quá sẽ cảm ứng sinh tổng hợp ethylene, sự tích lũy ethylene dù chỉ một lượng nhỏ trong bình nuôi cấy có thể ức chế sự sinh trưởng và phát triển của nhiều mẫu cấy thực vật (Machakova *et al.*, 2008).



**Hình 1. Mô sẹo từ mẫu lá cây xáo tam phân sau 6 tuần nuôi cấy ở các nghiệm thức bổ sung 2,4-D**  
C1 (0,2 mg/L); C2 (0,4 mg/L); C3 (0,6 mg/L); C4 (0,8 mg/L) và C5 (1 mg/L).

Sau 6 tuần nuôi cấy, kết quả thể hiện không có sự khác biệt về hình thái giữa các nghiệm thức, hầu hết mô sẹo dạng xốp trắng hình thành tại gân chính và các gân phụ, kích thước mô sẹo nhỏ, mô sẹo không tăng sinh (Hình 1). Hình thái mô sẹo tương đồng với hình thái mô sẹo trong nghiên cứu của Trần Trung Hiếu và đồng tác giả (2017) khi nuôi cấy mẫu lá trưởng thành trên môi trường WPM có bổ sung 5 mg/L BA kết hợp 5 mg/L IBA. Mặc dù 2,4-D là auxin rất có hiệu quả trong sự cảm ứng hình thành mô sẹo ở nhiều loài thực vật nhưng đối với các mẫu lá cây xáo tam phân, môi trường nuôi cấy chỉ bổ sung 2,4-D thì không có ảnh hưởng nhiều đến khả năng hình thành mô sẹo.

### Ảnh hưởng của NAA và BA đến sự hình thành mô sẹo từ lá cây Xáo tam phân

Việc bổ sung NAA và BA vào trong môi trường nuôi cấy kích thích sự phân chia mạnh mẽ của tế bào. Tỷ lệ mẫu hình thành mô sẹo cao hơn hẳn so với môi trường chỉ bổ sung 2,4-D (Bảng 3). Sau 2 tuần nuôi cấy, hầu hết mẫu cấy ở các nghiệm thức chưa có sự đáp ứng hình thành mô sẹo, nhưng riêng ở các nghiệm thức có sự kết hợp 2 mg/L NAA và (0,2; 0,5 mg/L) BA mẫu cấy bắt đầu ngả vàng và phồng lên, hình thành các mô sẹo nhỏ màu trắng tại gân chính và vết cắt. Sau 4 tuần nuôi cấy, mô sẹo ở nghiệm thức bổ sung 2 mg/L NAA và 0,2 mg/L BA có sự tăng sinh rõ rệt, ở nghiệm thức có bổ sung 2 mg/L NAA và 0,5 mg/L BA mô sẹo ít tăng sinh và ở các nghiệm thức còn lại bắt đầu hình thành mô sẹo nhưng tăng trưởng rất chậm.

**Bảng 3. Tỷ lệ mẫu hình thành mô sẹo từ lá xáo tam phân sau 6 tuần nuôi cấy**

NAA (mg/L)	BA (mg/L)	Tỷ lệ mẫu hình thành mô sẹo (%)
-	-	0,0 <sup>d</sup>
1	-	13,0 <sup>bcd</sup>
1	0,2	27,8 <sup>bc</sup>
1	0,5	42,6 <sup>ab</sup>
1	1	29,6 <sup>bc</sup>
2	-	7,4 <sup>cd</sup>
2	0,2	68,5 <sup>a</sup>
2	0,5	68,5 <sup>a</sup>
2	1	38,9 <sup>ab</sup>

Các giá trị trung bình trong cùng một cột có các kí tự khác nhau thì khác biệt có ý nghĩa thống kê ( $p \leq 0,05$ ).

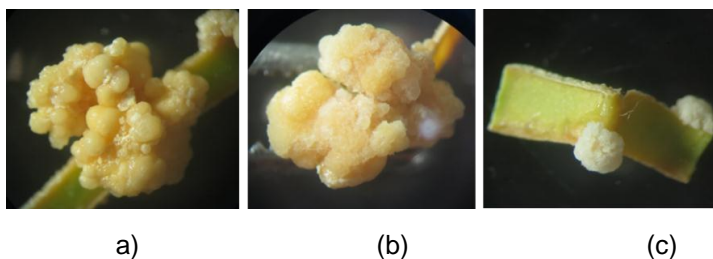
Tỷ lệ mẫu hình thành mô sẹo cao nhất quan sát được trên môi trường có bổ sung 2 mg/L NAA kết hợp với 0,2 hoặc 0,5 mg/L BA đều đạt 68,5%. Tỷ lệ mẫu hình thành mô sẹo tăng theo nồng độ auxin từ 1 mg/L đến 2 mg/L NAA có và bổ sung thêm một lượng nhỏ cytokinin (0,2 mg/L BA), hiệu suất mẫu hình thành mô sẹo tăng 2,47 lần. Sự gia tăng mô sẹo theo nồng độ NAA cũng được đề cập trong nghiên cứu của Kawochar và đồng tác giả (2017) trên đối tượng cây khoai tây khi tác giả gia tăng nồng độ NAA từ 2,0 mg/L đến 3,0 mg/l kết hợp với BA 0,5 mg/L tỷ lệ mô sẹo hình thành tăng từ 51,9% lên 83,2%. Điều này cho thấy, cytokinin được bổ sung ở nồng độ tối ưu có thể hợp lực, phát huy tác dụng của auxin ở mức cao nhất trong quá trình phân chia tế bào. Nhưng khi kết hợp NAA với BA 1 mg/L, lượng cytokinin vượt qua mức tối ưu làm hạn chế hoạt lực của auxin, tỷ lệ mẫu hình thành mô sẹo giảm. Riêng ở các nghiệm thức chỉ bổ sung 1 mg/L hoặc 2 mg/L NAA thì tỷ lệ mẫu hình thành mô sẹo thấp, thời gian hình thành mô sẹo kéo dài, mô sẹo hình thành nhỏ và không tăng sinh, hình thái mô sẹo xốp trắng giống mô sẹo được hình thành trên môi trường chỉ bổ sung 2,4-D ở thí nghiệm 2. Sau 6 tuần, các mẫu nuôi cấy ở các nghiệm thức có sự thay đổi rất rõ rệt về hình thái mô sẹo (Hình 2). Các nghiệm thức có bổ sung 1 mg/L NAA kết hợp với (0,2; 0,5; 1 mg/L) BA và môi trường có bổ sung 2 mg/L NAA kết hợp 0,2 mg/L BA mô sẹo tăng sinh nhanh, đặc biệt ở nghiệm thức có bổ sung 1 mg/L NAA kết hợp (0,2; 0,5 mg/L) BA có sự xuất hiện các mô sẹo ở dạng nốt.



**Hình 2. Mô sẹo xáo tam phân sau 6 tuần nuôi cấy**

D1 (1 mg/L NAA), D2 (1 mg/L NAA và 0,2 mg/L BA), D3 (1 mg/L NAA và 0,5 mg/L BA), D4 (1 mg/L NAA và 1 mg/L BA), D5 (2 mg/L NAA), D6 (2 mg/L NAA và 0,2 mg/L BA), D7 (2 mg/L NAA và 0,5 mg/L BA), D8 (2 mg/L NAA và 1 mg/L BA).

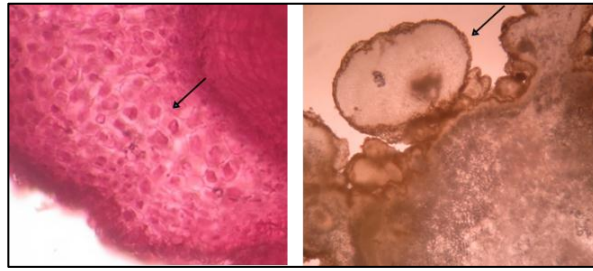
Nhìn chung, có ba dạng mô sẹo được hình thành khi khảo sát ảnh hưởng của NAA kết hợp với BA đối mẫu lá xáo tam phân (Hình 3). Đầu tiên, dạng mô sẹo có màu vàng sậm, mô sẹo có dạng nốt xuất hiện ở các nghiệm thức có bổ sung 1 mg/L NAA kết hợp (0,2; 0,5 mg/L) BA. Thứ hai, dạng mô sẹo có màu vàng nhạt, tăng sinh rất nhanh xuất hiện ở các nghiệm thức có bổ sung 1 mg/L NAA kết hợp 1 mg/L BA và 2 mg/L NAA kết hợp 0,2 mg/L BA. Cuối cùng là dạng mô sẹo xốp trắng, hình thành tại gân chính và mặt cắt của phiến lá, mô sẹo không tăng sinh xuất hiện ở các nghiệm thức chỉ bổ sung NAA hoặc môi trường có bổ sung 2 mg/L NAA kết hợp (0,5; 1 mg/L) BA.



**Hình 3. Các dạng mô sẹo của Xáo tam phân**

(a) Dạng nốt; (b) Dạng tăng sinh; (c) Dạng xốp trắng.

Qua quan sát giải phẫu mẫu mô sẹo có dạng nốt dưới kính hiển vi quang học ở môi trường có bổ sung 1 mg/L NAA và (0,2; 0,5 mg/L) BA cho thấy sự hiện diện các tế bào nhỏ đẳng kính, tế bào chất đậm đặc, nhân to thấy rõ hạch nhân (Hình 4a) đây là dạng tế bào trong khối mô sẹo rắn chắc có khả năng phát sinh phôi vô tính. Trên môi trường có bổ sung 1 mg/L NAA và 0,2 mg/L BA xuất hiện cấu trúc phôi hình cầu, tách biệt ra khỏi khối mô sẹo ban đầu (Hình 4b). Theo Bonnelle và đồng tác giả (1990), thì các tế bào đã được cảm ứng trong khối mô sẹo có thể tách khỏi các tế bào xung quanh bằng cách cắt đứt cầu sinh chất hoặc do sự chết của những mô xung quanh, làm gián đoạn tương tác tế bào với tế bào. Từ đó, kết thúc chương trình biểu hiện gen đã có sẵn và thiết lập chương trình phát sinh phôi.



(a)

(b)

**Hình 4. Giải phẫu mô sẹo có dạng nốt sau 6 tuần nuôi cấy**  
 (a) 1 mg/L NAA và 0,5 mg/L BA (10X), mũi tên: các tế bào đẳng kính, nhân to;  
 (b) 1 mg/L NAA và 0,2 mg/L BA (4X), mũi tên: cấu trúc phôi hình cầu.

Như vậy, môi trường được bổ sung 2 mg/L NAA kết hợp 0,2 mg/L BA là môi trường thích hợp cho sự hình thành mô sẹo từ lá xáo tam phân do tỷ lệ mẫu hình thành mô sẹo cao, mô sẹo tăng sinh nhanh trong 4 tuần. Sau đó, mô sẹo có thể cấy chuyển sang môi trường bổ sung 1 mg/L NAA kết hợp 0,2 mg/L BA để mô sẹo có thể phát sinh phôi hình cầu.

## KẾT LUẬN

Sự kết hợp giữa auxin và cytokinin trong quá trình hình thành mô sẹo là cần thiết. Không thể sử dụng chất điều hòa sinh trưởng 2,4-D hay NAA riêng lẻ để cảm ứng tạo mô sẹo. Kết quả cho thấy, môi trường WPM bổ sung 2 mg/L NAA kết hợp 0,2 mg/L BA là môi trường phù hợp cho sự hình thành mô sẹo từ mẫu lá cây xáo tam phân với mô sẹo phát triển nhanh. Môi trường WPM có bổ sung 1 mg/L NAA và 0,2 mg/L BA giúp mô sẹo phát sinh các phát thể phôi hình cầu. Nghiên cứu tạo phôi vô tính đang được tiếp tục thực hiện.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Bonnelle C, Lejeune F, Fournier D and Y Tourte (1990). Infrastructural modifications and acquisition of embryogenic properties in cotyledonary cells of leguminous species. *Compt Rend Acad Sci Paris* 310: 657-664.
- Bùi Trang Việt (2000). *Sinh lý thực vật đại cương*. NXB Đại học Quốc gia Tp. HCM.
- Kawochar MA, Ahmed NU, Hossain MI, Ferdous J (2017). Role of explants and NAA on callus induction of potato (*Solanum tuberosum*). *Ame J Life Sci* 5: 140-144.
- Lloyd G, McCown BH (1981). Commercially-feasible micropropagation of Mountain Laurel, *Kalmia latifolia*, by shoot tip culture. *Proc Int Plant Prop Soc* 30: 421-427.
- Machakova I, Zazimalova E, George EF (2008). Plant growth regulators I: introduction; Auxin, their Analogues and Inhibitor. *Plant Propagation by Tissue Culture 3rd Edition*. George EF, Hall MA, Klerk GD. Springer, Netherland, pp: 175 - 205.
- Thomas KA, Martin KP, Chandel KPS (1996). *In vitro* multiplication of Alpinla calcarata Rose. *Phytomorphol* 46: 133 - 138.
- Trịnh Hoàng Dương, Trần Thu Phương, Hà Diệu Ly, Nguyễn Thụy Vy, Đặng Văn Sơn, Nguyễn Diệu Liên Hoa (2016). Coumarin và acridon alkaloid từ rễ cây xáo tam phân (*Paramignya trimera*). *Tạp chí Khoa học Đạ học Quốc gia Hà Nội: Khoa học Tự nhiên và Công nghệ* 32: 115-123.
- Trần Nam Thắng, Trần Thị Thu Hà (2016). Thành phần sâu bệnh hại và nguyên nhân gây bệnh bong vỏ thối gốc thân cây xáo tam phân Khánh Hòa giảm hom. Trong: *Nghiên cứu - Trao đổi*. Tài nguyên và Môi trường, pp: 27-30.
- Trần Trung Hiếu, Huỳnh Văn Chung, Bùi Thị Linh Huệ, Lương Thị Mỹ Ngân, Bùi Lan Anh và Bùi Văn Lê. 2017. Nhân giống *in vitro* xáo tam phân (*Paramignya trimera* (Oliv.) Guill.). *Science and Teachology Development* 50: 48-57.
- Ngô Thị Xuyên, Nguyễn Thị Duyệt, Đặng Thị Kim Thúy, Nguyễn Thị Huyền Trang, Dương Đức Hiếu, Đỗ Đăng Giáp, Trần Trọng Tuấn (2018). Xác định thành phần hóa học và hoạt tính sinh học trong mẫu lá xáo tam phân (*Paramignya trimera* (Oliv.) Guill) và nghiên cứu sự phát sinh hình thái từ các nguồn mẫu khác nhau. *Tạp chí khoa học Đại học Văn Lang* 9: 30-39.
- Vũ Thị Hiền (2018). Nghiên cứu quá trình tái sinh và nhân giống *in vitro* cây sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis* Ha et grushv.) bằng kỹ thuật nuôi cấy lớp mỏng tế bào. Luận án Tiến sĩ Sinh học. Học viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

A PRELIMINARY STUDY ON SOMATIC EMBRYO FORMATION FROM  
LEAF DERIVED CALLUS OF XAO TAM PHAN  
(*Paramignya trimera* (Oliv.) Guillaum)

Nguyen Thi My Duyen, Trinh Phi Yen, Nguyen Vu Phong\*

Nong Lam University - Ho Chi Minh City

**SUMMARY**

Xao tam phan (*Paramignya trimera* (Oliv.) Guill), a woody climber has been used as a traditional medicinal source for the treatment of diabetes and some kinds of cancer diseases. In this study, we present the induction of somatic embryogenesis through callus for micropropagation and bioactive compounds research. Transverse slices of sterilized leaf samples were placed on WPM (Woody Plant Medium) medium supplemented with 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) alone or  $\alpha$ -naphthaleneacetic acid (NAA) combined with 6- benzyladenin (BA) to induce callus formation. After 6 weeks of culture under darkness condition, the percentage of callus formation was low (16%) in the presence of 2,4-D. In the medium supplemented with 2.0 mg/NAA and 0.2 mg/L BA, the percentage callus formation was 68%. The calli are light yellow, grew fast, no embryoid observed. Although the percentage callus formation was low (27%) on the medium supplemented with 1.0 mg/ NAA and 0.2 mg/L BA, it was induced to create globular embryoids. Research on complete embryogenesis is underway.

*Keywords:* 6- benzyladenin,  $\alpha$ -naphthaleneacetic acid, callus, *Paramignya trimera*, somatic embryo.

---

\* Author for correspondence: Tel. +84-28-37245163, Email: nvphong@hcmuaf.edu.vn