

## NGHIÊN CỨU NHÂN GIỐNG CÂY TRẠNG NGUYÊN (*EUPHORBIA PULCHERRIMA* WILLD.) *IN VITRO* VÀ *EX VITRO*

Nguyễn Thị Thanh Hằng\*, Phan Xuân Huyền, Đinh Văn Khiêm, Nguyễn Thị Phượng Hoàng

Viện Nghiên cứu Khoa học Tây Nguyên, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

### TÓM TẮT

Cây trạng nguyên (*Euphorbia pulcherrima* Willd.) là loại cây cảnh trồng chậu có giá trị kinh tế cao. Trong những năm gần đây, trạng nguyên trồng chậu đang rất được yêu thích đặc biệt trong dịp Giáng sinh và năm mới. Việc nhân giống theo phương pháp truyền thống bằng hạt hoặc cành giâm gặp hạn chế do cây con biến đổi lớn về di truyền và hệ số nhân giống thấp. Nghiên cứu này trình bày kết quả nhân giống *in vitro* cây trạng nguyên. Chồi bên của cây trạng nguyên được khử trùng với dung dịch  $HgCl_2$  0,1% và Tween 80 trong 10 phút thu được 80% mẫu sạch tái sinh. Quá trình nhân nhanh mẫu được thực hiện trên môi trường cơ bản MS (Murashige and Skoog, 1962) bổ sung 0,5 mg/L BA và 0,1 mg/L NAA tạo được 7,26 chồi/mẫu. Sau 20 ngày nuôi cấy, chồi trạng nguyên được cảm ứng tạo rễ dưới tác dụng của 1,5 mg/L NAA trên môi trường  $\frac{1}{2}$ MS và 1 g/L than hoạt tính. Ngoài vườn ươm, 80% cây con tiếp tục sống khi được ươm trên giá thể đất sạch phối trộn trấu đốt (7:3) có bổ sung dung dịch dinh dưỡng được điều chỉnh EC là 2 mS/cm và pH trong khoảng 5,5 - 6,5.

*Từ khóa:* Cây trạng nguyên, EC, chất điều hòa sinh trưởng thực vật, nhân nhanh chồi.

### MỞ ĐẦU

Kinh tế xã hội ngày càng phát triển, mức sống của con người ngày càng nâng lên, nhu cầu thưởng thức cũng được nâng cao. Cây cảnh là một trong những đối tượng được con người quan tâm dùng để trang trí và thư giãn, trong đó cây trạng nguyên (*Euphorbia pulcherrima* Willd) là một loại cây cảnh nhập nội, được ưa chuộng và có giá trị kinh tế cao, bởi vì cây có màu sắc đẹp và lâu tàn. Hiện nay, trên thế giới đã có nhiều công bố nghiên cứu nhân giống *in vitro* cây trạng nguyên (Yogesh *et al.*, 2003; Dinum, Brian, 2008; Marcos *et al.*, 2010; Gharbia *et al.*, 2016), nhưng ở nước ta chỉ mới có một công bố nguyên cứu nhân giống *in vitro* cây trạng nguyên (Tien *et al.*, 2017). Do đó, việc ứng dụng công nghệ sinh học - nuôi cấy mô tế bào thực vật tạo ra nguồn cây giống có chất lượng tốt phục vụ cho người trồng cây cảnh là vấn đề rất cần thiết.

Hiện nay, ở nước ta sản xuất cây giống trạng nguyên theo phương pháp nhân giống truyền thống bằng cách giâm cành ngoài vườn ươm tạo cây giống không đồng bộ, số lượng ít không đáp ứng nhu cầu trồng hoa trên qui mô công nghiệp, mặt khác, cây thường bị nhiễm bệnh, sinh trưởng, phát triển kém và cây bị thoái hóa. Ứng dụng kỹ thuật nhân giống vô tính *in vitro* khắc phục những hạn chế của phương pháp nhân giống truyền thống. Kết quả của nghiên cứu này góp phần xây dựng quy trình nhân giống *in vitro* cây trạng nguyên.

### VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

*Vật liệu:* Các chồi bên tái sinh có chiều cao 1,0 - 1,5 cm từ đốt thân được dùng làm nguồn vật liệu cho các thí nghiệm.

#### *Môi trường và điều kiện nuôi cấy*

Môi trường nuôi cấy là môi trường MS, tùy theo từng mục đích của các thí nghiệm mà bổ sung các chất BA (6-benzylaminopurine), IBA (Indole-3-butyric), NAA ( $\alpha$ -naphthalene acetic acid), sucrose và agar. Đối với nuôi cấy *in vitro*, thời gian chiếu sáng 10 giờ/ngày, cường độ ánh sáng  $34 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  bằng bóng đèn huỳnh quang, nhiệt độ  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ . Ở vườn ươm, giá thể nuôi trồng là đất sạch, đất mùn, trấu đốt (đã được đốt cháy 30% hóa than). Vườn ươm có mái che mưa và che lưới đen chắn 70% ánh sáng, nhiệt độ 20 - 25°C, độ ẩm 80 - 85%.

*Vô trùng mẫu cấy:* Những chồi bên được rửa sạch bằng nước máy sau đó ngâm trong dung dịch xà phòng 1% trong 20 phút cho chảy dưới vòi nước máy 30 phút. Khử trùng qua cồn 70% trong vòng 30 giây rồi rửa lại bằng nước cất. Khử trùng bằng  $HgCl_2$  0,1% và Tween 80 trong thời gian 10 phút. Các mẫu được rửa lại bằng nước cất từ 6 - 8 lần. Mẫu sau khi khử trùng xong tiến hành cắt các đốt thân đoạn từ 1 - 1,5 cm cấy trên môi trường MS bổ sung 0,2 mg/L BA (6-benzyl adenin), 30 g/L sucrose, 8 g/L agar.

*Nghiên cứu khả năng bật chồi của mẫu trạng nguyên in vitro:* Chồi bên trạng nguyên *in vitro* cao khoảng 1,0 - 1,5 cm được cấy trên môi trường MS bổ sung BA (0; 0,3; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 mg/L), 30 g/L sucrose, 8 g/L agar, pH được điều chỉnh về 6,0 trước khi khử trùng. Mỗi nghiệm thức cấy 45 mẫu sau 30 ngày nuôi cấy tiến hành thu số liệu. Chỉ tiêu theo dõi: Chiều cao chồi, số chồi/mẫu.

**Nghiên cứu ảnh hưởng của cytokinin kết hợp auxin đến khả năng nhân nhanh của chồi trạng nguyên:** Chồi bên trạng nguyên *in vitro* cao khoảng 1,0 - 1,5 cm được cấy trên môi trường MS bổ sung BA (tốt nhất của thí nghiệm trên) & NAA (0,1; 0,3; 0,5, 1,0 mg/L), 30 g/L sucrose, 8 g/L agar, pH được điều chỉnh về 6,0 trước khi khử trùng. Thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên. Mỗi nghiệm thức cấy 45 mẫu sau 30 ngày nuôi cấy tiến hành thu số liệu. Chỉ tiêu theo dõi: Chiều cao chồi, số chồi /mẫu

**Nghiên cứu ảnh hưởng của chất kích thích sinh trưởng đến sự tái sinh rễ của chồi trạng nguyên *in vitro* sau 20 ngày nuôi cấy:** Các chồi bên *in vitro* được cấy trên môi trường ½MS bổ sung 1g/L than hoạt tính, IBA (0; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 mg/L), NAA (0; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 mg/L), 20 g/L sucrose, 8 g/L agar, pH được điều chỉnh về 6,0 trước khi khử trùng. Thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên. Mỗi nghiệm thức cấy 30 mẫu sau 20 ngày nuôi cấy tiến hành thu số liệu. Chỉ tiêu theo dõi: Chiều cao chồi, số rễ/mẫu, chiều dài rễ

**Nghiên cứu ảnh hưởng của giá thể đối với cây hoa trạng nguyên *ex vitro*:** Các chồi bên *in vitro* 3 tháng tuổi, có màu xanh đậm, kích thước từ 8-10cm được dùng làm nguồn vật liệu cho thí nghiệm. Trồng trong các chậu có đường kính 16cm trên các loại giá thể khác nhau (xơ dừa, đất sạch, đất mùn, đất sạch và trấu đốt (7:3); đất mùn và trấu đốt (7:3); trấu đốt). Thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên. Mỗi nghiệm thức giám 30 chồi cây, sau 45 ngày chăm sóc tiến hành thu số liệu. Chỉ tiêu theo dõi: Chiều cao cây, chiều dài rễ, tỉ lệ sống.

**Nghiên cứu ảnh hưởng của EC và pH đối với cây hoa trạng nguyên *ex vitro*:** Các chồi *in vitro* 3 tháng tuổi, có màu xanh đậm, kích thước từ 8 - 10cm được dùng làm nguồn vật liệu cho thí nghiệm. Chồi cây được trồng trên giá thể tốt nhất của thí nghiệm trên. Dung dịch dinh dưỡng pha theo phương pháp Hoagland và Arnon (1950) được điều chỉnh các mức EC và pH khác nhau (EC: 1,5 - 3 mS/cm; pH 5,5-6,5). Dung dịch dinh dưỡng được cấp trực tiếp cho cây thông qua hệ thống tưới nhỏ giọt Isreal 2 ngày/lần, mỗi lần 10 phút với dung lượng 4 lít/giờ. Thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên. Mỗi nghiệm thức giám 15 chồi cây, sau 45 ngày chăm sóc tiến hành thu số liệu. Chỉ tiêu theo dõi: Chiều cao cây, số cặp lá/cây, tỉ lệ sống.

**Xử lý số liệu:** Xử lý số liệu thô bằng Excel 2007, xử lý thống kê bằng phần mềm thống kê SPSS (bản 15.0) theo phương pháp Duncan's test mức độ tin cậy  $P < 0,05$  (Duncan, 1955).

## KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### Vô trùng mẫu cấy

Những chồi bên của cây trạng nguyên sau khi rửa sạch và được khử trùng xong sẽ được cấy vào môi trường MS có bổ sung 0,2 mg/L BA nhằm tạo nguồn mẫu ban đầu, sau 30 ngày có thu được kết quả là 70% số mẫu sạch tái sinh (hình 1a). Kết quả này tốt hơn so với nghiên cứu nhân giống *in vitro* cây trạng nguyên của Tiên và đồng tác giả (2017). Trong nghiên cứu này, đoạn thân mang chồi ngủ được khử trùng với dung dịch javel: nước tỷ lệ 1:2 trong 15 phút thu được 53,3% mẫu sạch.

### Khả năng bật chồi của mẫu trạng nguyên *in vitro*

Khả năng tái sinh và sinh trưởng chồi từ đốt thân cây trạng nguyên sau 30 ngày nuôi cấy được thể hiện ở bảng 1.

**Bảng 1. Ảnh hưởng của BA đến khả năng bật chồi *in vitro***

Nghiệm thức	BA (mg/L)	Số chồi/mẫu	Chiều cao chồi (cm)	Hình thái mẫu
B0	0,0	1,16 <sup>f</sup>	4,40 <sup>p</sup>	Nhỏ, xanh
B1	0,3	1,32 <sup>e</sup>	4,98 <sup>a</sup>	Xanh
B2	0,5	2,80 <sup>c</sup>	3,70 <sup>c</sup>	Hơi vàng
B3	1,0	3,30 <sup>b</sup>	3,46 <sup>d</sup>	
B4	1,5	3,66 <sup>a</sup>	2,36 <sup>e</sup>	Chồi biến dị
B5	2,0	1,74 <sup>d</sup>	2,04 <sup>f</sup>	

\*Các giá trị trong cột với những chữ cái khác nhau chỉ sự khác biệt có ý nghĩa thống kê trong phép thử Duncan's test với độ tin cậy  $p < 0,05$ .

Kết quả cho thấy, BA có sự ảnh hưởng tích cực đến sự tái sinh và sinh trưởng chồi, tất cả các mẫu cấy đều tạo chồi mới tuy nhiên ở những nồng độ BA khác nhau thì sự tái sinh chồi khác nhau. Môi trường không bổ sung chất kích thích sinh trưởng chỉ tái sinh 1,16 chồi/mẫu, tăng nồng độ 0,3 - 1 mg/L BA thì đốt thân tái sinh nhiều chồi hơn, từ 1,32 - 3,30 chồi/mẫu và chiều cao chồi cây giảm đi 4,98 - 3,46 cm. Ở nồng độ 0,5 mg/L BA là tốt nhất đến sự tái sinh và sinh trưởng của chồi cây, với số chồi 2,80 chồi/mẫu, chiều cao chồi đạt 3,7 cm, các chồi xanh (hình 1b). Khi tăng nồng độ BA lên 1,5 và 2 mg/L thì khả năng tái sinh chồi của trạng nguyên giảm đi (tương ứng 3,66 và 1,74 chồi/mẫu), chiều cao chồi cũng giảm xuống (tương ứng 2,36 cm và 2,04 cm), chồi cây sinh trưởng xấu và có biểu hiện biến dị, chuyển màu vàng và có sẹo đặc hồng ở gốc. Điều này cho thấy, khi BA ở nồng độ thấp thì kích thích sự sinh trưởng và phát triển của chồi cây, nhưng khi tăng nồng độ BA thì ức chế sự tăng trưởng của chồi. Chất điều hòa sinh trưởng BA thuộc nhóm cytokinin, là một trong những chất được dùng phổ biến trong nuôi cấy mô thực vật. Trên thế giới đã có một số nghiên cứu sử dụng BA kết hợp với các chất kích thích sinh trưởng khác trên đối tượng cây trạng nguyên. Nghiên cứu của Gharbia và Diaa (2016) báo cáo rằng

## CÔNG NGHỆ TẾ BÀO

sử dụng 0,5 mg/L BA kết hợp 20 mg/L adenine sulfate cho tỉ lệ hình thành chồi là cao nhất với 100% tạo chồi, 10,6 chồi/mẫu.

Như vậy, môi trường MS bổ sung 0,5 mg/L BA là thích hợp nhất cho sự bật chồi của cây trạng nguyên.

### Ảnh hưởng của cytokinin kết hợp auxin đến khả năng nhân nhanh của chồi trạng nguyên

Chồi trạng nguyên được cấy trên môi trường MS bổ sung 0,5 mg/L BA (nồng độ tốt nhất của thí nghiệm trên) kết hợp với NAA. Kết quả sau 30 ngày cho thấy, tất cả các chồi cây cấy trên môi trường có bổ sung chất kích thích đều tái sinh chồi (bảng 2). Các chồi cây sinh trưởng tốt, tăng trưởng chiều cao và có màu xanh đậm.

**Bảng 2. Ảnh hưởng của BA kết hợp với NAA đến khả năng nhân nhanh chồi *in vitro***

Nghiệm thức	BA (mg/L)	NAA (mg/L)	Số chồi/mẫu	Chiều cao chồi (cm)
NB0		0	2,8 <sup>f</sup>	3,70 <sup>a</sup>
NB1		0,1	7,26 <sup>a</sup>	3,56 <sup>b</sup>
NB2	0,5	0,3	7,12 <sup>b</sup>	3,16 <sup>c</sup>
NB3		0,5	4,44 <sup>c</sup>	2,90 <sup>d</sup>
NB4		1,0	3,76 <sup>e</sup>	2,30 <sup>f</sup>

<sup>f</sup>Các giá trị trong cột với những chữ cái khác nhau chỉ sự khác biệt có ý nghĩa thống kê trong phép thử Duncan's test với độ tin cậy  $p < 0,05$ .

Quá trình hình thành chồi ở cây thường chịu tác động bởi 2 yếu tố (nội sinh và ngoại sinh), bên cạnh cytokinin thì auxin cũng có vai trò điều khiển sự tăng trưởng và phát triển của thực vật.

Khi bổ sung NAA vào môi trường nhân nhanh thì chồi trở nên xanh. Nghiệm thức NB1 bổ sung 0,5 mg/L BA và 0,1 mg/L NAA cho kết quả nhân chồi là tốt nhất, hệ số nhân chồi cao, chồi xanh và phát triển tốt (7,26 chồi/mẫu, chiều cao chồi 3,56cm). Kết quả này tốt hơn so với nghiên cứu của Tiên và đồng tác giả (2017), trên môi trường tương tự, hệ số nhân chồi là 4,8 chồi/mẫu. Kết quả nghiên cứu của Gharbia và Diaa (2016), môi trường MS bổ sung 0,5 mg/L BA và 0,1 mg/L NAA tái sinh 5,2 chồi/mẫu. Nghiên cứu của Rafail và Layla (2012), hệ số nhân chồi môi trường MS bổ sung 5,0 mg/L BA và 5,0 mg/L NAA là 6,16 chồi/mẫu.

Tuy nhiên, nồng độ NAA càng tăng thì hệ số nhân chồi trạng nguyên giảm xuống. Cụ thể khi tăng 0,3 - 1,0 mg/L NAA, hệ số nhân chồi giảm 7,12 - 3,76 chồi/mẫu, chiều cao chồi giảm 3,16 - 2,30 cm. Điều này chứng tỏ trên môi trường MS bổ sung 0,5 mg/L BA, nếu bổ sung NAA ở nồng độ cao sẽ gây ức chế sự sinh trưởng và phát triển của chồi trạng nguyên.

Tóm lại, môi trường MS bổ sung 0,5 mg/L BA kết hợp 0,1 mg/L NAA là thích hợp đến quá trình nhân chồi của cây trạng nguyên *in vitro*.

### Ảnh hưởng của auxin đến sự tái sinh rễ *in vitro*

Rễ đóng vai trò hấp thu nước và chất dinh dưỡng từ môi trường nuôi cấy đưa lên lá để tiến hành quá trình quang hợp và tổng hợp các chất hữu cơ. Do đó, số lượng và chất lượng rễ ảnh hưởng trực tiếp đến năng suất cây trồng. Auxin thường được sử dụng trong nuôi cấy mô tế bào thực vật nhằm kích thích sự phân chia tế bào và hình thành rễ. Mỗi loại cây thích hợp với một nồng độ auxin khác nhau. Kết quả sau 20 ngày nuôi cấy, NAA và IBA có ảnh hưởng rõ rệt đến khả năng hình thành rễ của mẫu trạng nguyên (bảng 3). Ở các nồng độ NAA và IBA khác nhau khả năng sinh trưởng của mẫu cấy có khác biệt đáng kể, NAA có hiệu quả tốt hơn rất nhiều so với IBA trên đối tượng là chồi trạng nguyên.

**Bảng 3. Ảnh hưởng của NAA và IBA đến sự tái sinh rễ *in vitro***

Nghiệm thức	Auxin	Nồng độ (mg/L)	Số rễ/chồi	Chiều dài rễ (cm)	Chiều cao chồi (cm)
A0		0,0	0	0	3,44 <sup>c</sup>
N1	NAA	0,5	1,04 <sup>e</sup>	1,80 <sup>e*</sup>	3,36 <sup>cd</sup>
N2		1,0	2,22 <sup>c</sup>	2,56 <sup>b</sup>	3,80 <sup>b</sup>
N3		1,5	4,04 <sup>a</sup>	3,21 <sup>a</sup>	3,96 <sup>a</sup>
N4		2,0	2,98 <sup>b</sup>	2,20 <sup>d</sup>	3,82 <sup>b</sup>
I1		IBA	0,5	0,98 <sup>e</sup>	1,00 <sup>f</sup>
I2	1,0		2,46 <sup>c</sup>	1,27 <sup>d</sup>	3,32 <sup>d</sup>
I3	1,5		0	0	3,13 <sup>e</sup>
I4	2,0		0	0	3,04 <sup>f</sup>

<sup>f</sup>Các giá trị trong cột với những chữ cái khác nhau chỉ sự khác biệt có ý nghĩa thống kê trong phép thử Duncan's test với độ tin cậy  $p < 0,05$ .

Đối với nghiệm thức bổ sung NAA, nồng độ 1,5 mg/L là cho kết quả tốt nhất với 4,04 rễ/chồi và chiều dài rễ 3,21cm (hình 1c), cây xanh, nhiều cặp lá. Môi trường bổ sung 0,5-1,0 mg/L NAA, cây sinh trưởng và phát triển

kém hơn so với môi trường bổ sung 1,5 mg/L NAA, số rễ ít (1,04 - 2,22 rễ/chồi), chiều dài rễ ngắn (1,80 - 2,56cm), cây xanh. Tuy nhiên, khi tăng nồng độ lên 2,0 mg/L NAA, chồi có biểu hiện sinh trưởng kém đi, lá vàng và rụng, số rễ và chiều dài rễ đều giảm (2,98 rễ/chồi, chiều dài rễ 2,02 cm). Điều này chứng tỏ, khi sử dụng NAA ở nồng độ cao gây ức chế quá trình sinh trưởng và phát triển của chồi trạng nguyên. Các nghiệm thức bổ sung IBA, nồng độ 1,0 mg/L là tốt nhất với 1,27 rễ/chồi, chiều dài rễ 2,46cm. Trên môi trường không bổ sung auxin hoặc bổ sung IBA 1,5 - 2,0 mg/L không thấy có sự tái sinh rễ, cây sinh trưởng kém, cao vống, hoặc vàng vọt, tạo sẹo ở gốc.

Gharbia và Dīaa (2016) báo cáo rằng rễ cây trạng nguyên tái sinh tốt nhất trên môi trường có 1,0 mg/L IAA (4,97 rễ/mẫu). Nghiên cứu của Tiên và đồng tác giả (2017), môi trường ½ MS bổ sung 2 mg/L IBA là thích hợp nhất cho sinh trưởng và phát triển của rễ trạng nguyên *in vitro* (38,9 rễ/mẫu). Kết quả nghiên cứu của Rafail và Layla (2012), môi trường MS bổ sung 0,2 mg/L IBA là thích hợp cho sự tái sinh rễ trạng nguyên (6,60 rễ/mẫu). Từ các kết quả trên chỉ ra rằng, khi có sự hiện diện của auxin có ảnh hưởng tích cực đến tính đàn hồi của thành tế bào, kích thích tế bào kéo dài và tái sinh rễ (Damiano et al., 2007).

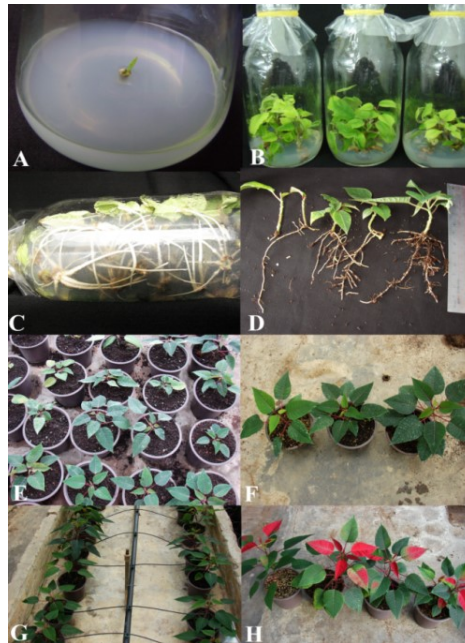
Như vậy, môi trường ½MS bổ sung 1,5 mg/L NAA là thích hợp nhất đến sự tái sinh và sinh trưởng rễ cây trạng nguyên *in vitro*.

### Ảnh hưởng của giá thể đến sự sinh trưởng, phát triển của cây trạng nguyên *ex vitro* sau 45 ngày nuôi trồng

Những cây trạng nguyên nuôi cấy *in vitro* có đầy đủ thân, lá, rễ được trồng trên 5 loại giá thể khác nhau: vụn xơ dừa, đất sạch, đất mùn, đất sạch phối trộn trấu đốt (7:3), đất mùn phối trộn trấu đốt (7:3). Khả năng thích nghi và sinh trưởng của cây trạng nguyên được thể hiện ở bảng 4. Việc chuyển cây con từ ống nghiệm ra vườn ươm là một công đoạn quan trọng trong nuôi cấy mô, cây *in vitro* thường nuôi cấy trên môi trường thạch, độ ẩm cao và ổn định, khi chuyển ra vườn ươm trồng trên giá thể mới, độ ẩm không khí thấp dẫn đến cây con dễ bị héo và chết.

Cây trạng nguyên *in vitro* sau khi trồng 10 ngày lá rụng dần, 30 ngày sau trồng cây sẽ phát lộc mới. Sau 45 ngày trồng cây sẽ cho từ 1-2 cặp lá thật tùy vào từng loại giá thể. Tỷ lệ sống của cây trên giá thể đất sạch phối trộn trấu đốt (7:3) là cao nhất đạt 80%. Cây sinh trưởng tốt (chiều cao cây 5,17 cm và chiều dài rễ 5,57 cm), cây xanh, phát triển lộc mới, nhiều lá, bộ rễ phát triển tốt với nhiều rễ phụ (hình 1). Điều này cho thấy, giá thể này có độ thông thoáng và giữ ẩm thích hợp đến sự thích nghi của cây trạng nguyên ở vườn ươm. Kết quả này tốt hơn so với nghiên cứu của Tiên và đồng tác giả (2017), trên giá thể đất sạch phối trộn vụn xơ dừa và tro trấu (1:2:3) cho tỷ lệ sống của cây trạng nguyên trong điều kiện *ex vitro* là 75%.

Cây trồng trên giá thể đất sạch, đất mùn và đất mùn phối trộn trấu đốt (7:3) có tỷ lệ sống thấp hơn (50, 65 và 75%), cây sinh trưởng và phát triển kém hơn so với cây trồng trên giá thể đất mùn phối trộn trấu đốt (7:3), chiều cao cây 4,55; 4,41 và 4,54 cm và chiều dài rễ 4,72; 4,15 và 3,58 cm. Ngược lại, cây trồng trên giá thể vụn xơ dừa có tỷ lệ sống thấp, chỉ đạt 30%, sinh trưởng và phát triển kém hơn cây trồng trên các giá thể khác (chiều cao cây 4,37 cm và chiều dài rễ 1,55 cm). Bên cạnh đó, cây còn có biểu hiện vàng lá, rễ ngắn, cây ẻo lợt (hình 1d, 1e).



Hình 1. Quy trình nhân giống cây trạng nguyên

## CÔNG NGHỆ TẾ BÀO

**Bảng 4. Ảnh hưởng của giá thể đến cây trạng nguyên *ex vitro* sau 45 ngày nuôi trồng**

Nghiệm thức	Giá thể	Chiều cao cây (cm)	Chiều dài rễ (cm)	Tỉ lệ sống (%)	Hình thái
G1	Xơ dừa	4,37 <sup>d</sup>	1,55 <sup>e</sup>	30	Cây vàng, ẻo uột, rễ ngắn
G2	Đất sạch	4,55 <sup>b</sup>	4,72 <sup>b</sup>	65	Cây xanh, phát đợt mới
G3	Đất sạch: trấu đốt (7:3)	5,17 <sup>a</sup>	5,57 <sup>a</sup>	80	Cây xanh, nhiều rễ phụ
G4	Đất mùn	4,41 <sup>c</sup>	4,15 <sup>c</sup>	50	Cây xanh, phát đợt mới
G5	Đất mùn: trấu đốt (7:3)	4,54 <sup>b</sup>	3,58 <sup>d</sup>	75	Cây xanh, phát đợt mới

<sup>a</sup>Các giá trị trong cột với những chữ cái khác nhau chỉ sự khác biệt có ý nghĩa thống kê trong phép thử Duncan's test với độ tin cậy  $p < 0,05$ .

Như vậy, giá thể đất sạch phối trộn trấu đốt (7:3) là thích hợp cho việc chuyển cây con ra vườn ươm.

### **Ảnh hưởng của EC và pH đến sự sinh trưởng, phát triển của cây trạng nguyên *ex vitro* sau 45 ngày nuôi trồng**

Kết quả thu được sau 45 ngày nuôi trồng thể hiện ở bảng 5, tỉ lệ sống của các nghiệm thức đều đạt trên 85%. Cây trạng nguyên có nguồn gốc *in vitro*, có chiều cao 8 - 10 cm, được trồng trên giá thể tốt nhất của thí nghiệm trên là giá thể đất sạch phối trộn với trấu đốt (7:3). Các chậu cây trạng nguyên được bổ sung dung dịch dinh dưỡng được pha theo phương pháp Hoagland và Arnol (1950) với các mức EC từ 1,5 - 3mS/cm và pH 5,5 - 6,5. Dung dịch dinh dưỡng được cấp trực tiếp cho cây thông qua hệ thống tưới nhỏ giọt Isreal 2 ngày/lần, mỗi lần 10 phút với dung lượng 4 lít/giờ (hình 1g). Nghiệm thức E<sub>5</sub> cho kết quả sinh trưởng và phát triển của cây *ex vitro* là tốt nhất với chiều cao cây 16,5cm và 6,02 cặp lá (hình 1f, 1h). Sau 3 tháng theo dõi, lá cây trạng nguyên bắt đầu chuyển sang màu đỏ. Khi EC được điều chỉnh tăng từ 1,5 - 2,0 mS/cm các chỉ tiêu sinh trưởng đều tăng, tuy nhiên khi tăng EC 2,5 - 3,0 mS/cm các dấu hiệu sinh trưởng của cây đều giảm xuống. EC (Electrical conductivity) trong dung dịch ảnh hưởng đến sự sinh trưởng và phát triển của cây trồng trong đất hoặc cây trồng trên dung dịch dinh dưỡng. Khi EC càng cao thì làm cây chậm phát triển và vàng lá, khi EC quá thấp sẽ làm cho cây rụng lá và chết.

pH rất quan trọng vì nó là một dự báo các hoạt động hóa học khác nhau trong đất hoặc dung dịch dinh dưỡng. pH trực tiếp ảnh hưởng đến độ hòa tan của nhiều chất dinh dưỡng cần thiết thích hợp cho sự sinh trưởng và phát triển của cây trồng. Nếu pH giảm xuống các chất dinh dưỡng như phot pho sẽ tạo kết tủa với sắt, nhôm... Tuy nhiên, pH thấp sẽ tạo điều kiện thuận lợi cho một số vi sinh vật yếm khí phát triển. Nhìn chung, nhiều loài thực vật sẽ phát triển tốt trong phạm vi pH từ 5,5 đến 7,5. Trong thí nghiệm này, pH thích hợp cho sự phát triển của cây trạng nguyên *ex vitro* là 5,5-6,5. Khi pH thấp sẽ làm cho bề mặt giá thể phủ rêu cây sẽ không thể phát triển, còn cao quá cây sẽ chậm phát triển.

**Bảng 5. Ảnh hưởng của EC và pH đến cây trạng nguyên *ex vitro***

Nghiệm thức	EC (mS/cm)	pH	Chiều cao cây (cm)	Số cặp lá
E1	1,5	5,0	11,92 <sup>h</sup>	4,00 <sup>c</sup>
E2		5,5	12,80 <sup>f</sup>	5,00 <sup>b</sup>
E3		6,5	13,72 <sup>c</sup>	5,00 <sup>b</sup>
E4	2,0	5,0	13,18 <sup>e</sup>	5,00 <sup>b</sup>
E5		5,5	16,50 <sup>a</sup>	6,02 <sup>a</sup>
E6		6,5	15,62 <sup>b</sup>	6,00 <sup>a</sup>
E7	2,5	5,0	13,52 <sup>d</sup>	4,98 <sup>b</sup>
E8		5,5	12,80 <sup>f</sup>	4,00 <sup>c</sup>
E9		6,5	12,20 <sup>g</sup>	3,92 <sup>cd</sup>
E10	3,0	5,0	11,60 <sup>i</sup>	3,06 <sup>e</sup>
E11		5,5	11,50 <sup>j</sup>	2,96 <sup>e</sup>
E12		6,5	11,52 <sup>i</sup>	3,84 <sup>d</sup>

<sup>a</sup>Các giá trị trong cột với những chữ cái khác nhau chỉ sự khác biệt có ý nghĩa thống kê trong phép thử Duncan's test với độ tin cậy  $p < 0,05$ .

Tóm lại, cây trạng nguyên có nguồn gốc *in vitro* sinh trưởng và phát triển tốt khi trồng trên giá thể đất sạch phối trộn trấu đốt (7:3) có bổ sung dung dịch dinh dưỡng được điều chỉnh EC là 2 mS/cm và pH trong khoảng 5,5 - 6,5.

### **KẾT LUẬN**

Những chồi bên của cây trạng nguyên khử trùng bằng HgCl<sub>2</sub> 0,1% và Tween 80 trong thời gian 10 phút có tỉ lệ tái sinh 70% trên môi trường MS bổ sung 0,2 mg/L BA. Môi trường MS bổ sung 0,5 mg/L BA và 0,1 mg/L NAA là thích hợp cho quá trình nhân nhanh chồi trạng nguyên. Môi trường thích hợp cho việc tái sinh rễ ở trạng nguyên là ½ MS có bổ sung 1,5 mg/L NAA và 1 g/L than hoạt tính. Chuyển cây con ra vườn ươm, trạng nguyên trồng

chậu có nguồn gốc *in vitro* sinh trưởng và phát triển tốt khi trồng trên giá thể đất sạch phối trộn trấu đốt (7:3) có bổ sung dung dịch dinh dưỡng được điều chỉnh EC là 2 mS/cm và pH trong khoảng 5,5 - 6,5.

**Lời cảm ơn:** Nhóm tác giả xin chân thành cảm ơn Viện Nghiên cứu Khoa học Tây Nguyên đã tạo điều kiện thuận lợi cho tôi hoàn thành nghiên cứu này.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

Damiano, CP Arias, M.D Starza, SR Ia and A Frattarelli (2007). Temporary immersion system for temperate fruit trees. *Acta Horti* 748:87-90.

Duncan DB (1955). Multiple range and F tests. *Biometrics* 11:1-42.

Perera D, Trader BW (2008). Poinsettia (*Euphorbia pulcherrima*) *in vitro* Propagation. *Combined Proceedings International Plant Propagators' Society* 58: 578-582.

Gharbia HD, Ibrahim DA (2016). Efficient protocol of micropropagation, and organogenesis of *Euphorbia pulcherrima* Willd. Plants via stem and leaf segments. *IJAERS* 3(8):131-137.

Hoagland DR, Arnon DI (1950). The water culture method for growing plants without soil. *California Agricultural Experimental Station Circular* 347:1-32.

Le Hong Thuy Tien, Nguyen Thi Diep, Nguyen Vu Phong (2017). *In vitro* propagation of Poinsettia. *JAST* 6: 1-6.

Murashige T, Skoog F (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol Plant* 15:473-497.

Rafail ST, Al-Mizory LSM (2012). *In vitro* micropropagation of Poinsettia (*Euphorbia pulcherrima* Willd.). University of Duhok Faculty of Agriculture and Forestry.

Yogesh TJ, Thaker KH, D'Souza MC (2003). *In vitro* propagation of *Euphorbia pulcherrima* Willd. through somatic embryogenesis. *Plant Tissue Cult* 13(1): 31-36.

Castellanos M, Power B, Davey M (2008). Tissue culture technologies for micropropagation, *in vitro* regeneration and genetic improvement of Poinsettia. *Propag Ornament Plant* 8(4): 173-185.

## STUDY ON *IN VITRO* PROPAGATION AND CULTIVATION OF POINSETTIA (*EUPHORBIA PULCHERRIMA* WILLD.) AT *EX VITRO* CONDITION

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

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

### SUMMARY

Poinsettia (*Euphorbia pulcherrima* Willd.) is a flowering potted plant with a high economic value. It is popularly used especially in Christmas and New Year time. Conventional propagation of poinsettia by seed and stem cuttings has several limitations due to genetic variability and a low rate of propagation. In this study, *in vitro* propagation of poinsettia was achieved by using nodal segments with axillary buds. Nodal segments with axillary buds were sterilized by using HgCl<sub>2</sub> 0.1% and Tween 80 in 10 minutes has the best results (70% survived). Full-strength Murashige and Skoog (MS) medium supplemented with 0.5 mg L<sup>-1</sup> BA and 0.1 mg/L NAA was the best medium for shooting of poinsettia (7.26 shoots per explant). The elongated shoots were rooted on half-strength MS medium supplemented with 1 g/L AC and 1.5 mg/L NAA. In the nursery stage, survival rate was 80% on soil mix rice husk substrate (7:3) supplemented with nutrient solution at the EC of 2 mS cm<sup>-1</sup> and the pH range from 5.5 to 6.5.

**Keywords:** EC, *Euphorbia pulcherrima* Willd., shoot propagation, plant growth regulators.

\* Author for correspondence: Tel: +84-916451165; Email: nguyenthanhhang08@gmail.com