

NGHIÊN CỨU NHÂN GIỐNG *IN VITRO* CÂY KHÔI NHUNG (*ARDISIA SILVESTRIS* PITARD.)

Nguyễn Văn Toàn, Phan Thị Hồng Thủy, Dương Phú Tiến, Phạm Trần Thủy Tiên,
Vũ Thị Thúy Hằng, Trần Thị Yên Nhi, Nguyễn Trần Phước Huy¹, Trịnh Thị Minh Trâm,
Nguyễn Thị Huệ, Nguyễn Thanh Thúy, Vương Thị Hồng Loan

Trung tâm Ươm tạo Doanh nghiệp Nông nghiệp Công nghệ cao

TÓM TẮT

Khôi nhung (*Ardisia silvestris* Pitard.), một loài dược liệu truyền thống ở Việt Nam, thường được sử dụng để chữa đau bụng và đau dạ dày hiệu quả. Lá cây khôi nhung có chứa thành phần chính là tannins chiếm 8,8% chất khô, ngoài ra còn có các hợp chất như alkaloid, anthocyanoid, proanthocyanidins, anthraquinone ... có khả năng chống lão hóa và bảo vệ tế bào keratinocytes ở người. Mục đích của nghiên cứu nhằm thiết lập một quy trình nhân giống *in vitro* để bảo tồn và phát triển loài cây dược liệu này. Kết quả cho thấy môi trường Murashige & Skoog (MS) bổ sung 0,2 mg/L TDZ và 0,5 mg/L NAA là tối ưu cho hiệu quả tạo cụm chồi *in vitro* cây khôi nhung với 6,69 chồi/mẫu. Môi trường MS được bổ sung 1,5 mg/L BAP kết hợp 0,5 mg/L NAA cho số lượng chồi đơn *in vitro* phát sinh từ cụm chồi cao nhất với 6,82 chồi/cụm. Các chồi đơn *in vitro* ra rễ tối ưu trên môi trường MS giảm ½ hàm lượng khoáng đa lượng kết hợp với 1,0 mg/L IBA. Các kết quả này có thể được sử dụng làm cơ sở cho các nghiên cứu tiếp theo và phục vụ cho việc nhân giống quy mô lớn cây dược liệu khôi nhung.

Từ khóa: Dược liệu, khôi nhung, môi trường Murashige & Skoog, nhân giống *in vitro*, tannins.

MỞ ĐẦU

Chi *Ardisia* là chi lớn nhất trong họ Primulaceae, được tìm thấy ở các vùng nhiệt đới và cận nhiệt trên khắp thế giới (Kobayashi & de Meija, 2005; Nguyen *et al.*, 1996). Ở Việt Nam, cây khôi nhung (*A. silvestris* Pitard.) mọc hoang tại những khu rừng rậm miền thượng du các tỉnh Thanh Hóa, Nghệ An, Ninh Bình, Hà Tây. Tuy có vùng phân bố rộng nhưng số lượng cây khôi nhung hiện nay không nhiều do tái sinh hạt kém, kèm theo bị khai thác với số lượng lớn nên mất nguồn hạt để tái sinh. Mặt khác, những nơi có cây con mọc lại bị khai thác phá rừng mạnh nên có thể bị tuyệt chủng vì không còn môi trường sống thích hợp. Khôi nhung là cây thuốc quý được liệt kê trong Sách Đỏ Việt Nam với mức độ VU - mức độ loài sẽ nguy cấp (Bản *et al.*, 2007).

Trong dân gian, khôi nhung được dùng để chữa bệnh dạ dày. Rễ khô còn được sắc uống bổ huyết, chữa lỵ ra máu và đau yết hầu. Lá khôi nhung có tác dụng chống viêm, giảm đau, trung hòa acid, chống loét dạ dày, làm lành vết loét dạ dày tá tràng (Lợi, 2011). Về thành phần hóa học, dịch chiết lá cây khôi nhung có chứa các hợp chất như alkaloid, anthocyanoid, proanthocyanidins, anthraquinone, tannins, flavonoid...; trong đó hàm lượng tannins là 8,8% chất khô (Hồng *et al.*, 2020). Gần đây, nghiên cứu của Huang và đồng tác giả cho thấy dịch chiết ethanol của *Ardisia silvestris* có khả năng chống lão hóa và bảo vệ tế bào keratinocytes ở người (Huang *et al.*, 2023).

Để có thể cung cấp nguồn dược liệu cây khôi nhung với chất lượng tốt và đồng đều, đồng thời đảm bảo được hàm lượng và hoạt tính của dược liệu, cần thiết phải có những biện pháp hữu hiệu trong bảo tồn và phát triển loài dược liệu quý này. Tuy nhiên, việc nhân giống bằng phương pháp truyền thống gặp một số khó khăn như thời gian trồng kéo dài, chất lượng cây không đồng đều. Để rút ngắn quá trình nhân giống, cần phát triển và áp dụng kỹ thuật mới, trong đó có kỹ thuật nuôi cấy mô tế bào thực vật. Kỹ thuật này có thể nhanh chóng tạo ra các bản sao của những cá thể đã chọn mang tính trạng mong muốn, từ đó tiết kiệm nhiều về thời gian sản xuất và thương mại hoá. Hiện chưa có nhiều nghiên cứu về nhân giống *in vitro* cây khôi nhung, các nghiên cứu chủ yếu tập trung vào nhân giống *in vitro* thông qua con đường phát sinh mô sẹo từ các bộ phận của cây như nghiên cứu của Duc và đồng tác giả (2021) hay nghiên cứu của Hương và đồng tác giả (2019) chỉ thực hiện nhân giống *in vitro* cây khôi nhung trên môi trường MS, chưa tiến hành khảo sát trên các môi trường có thành phần khoáng khác nhau.

Mục đích của nghiên cứu này là thiết lập quy trình nhân giống *in vitro* cây khôi nhung từ đoạn thân mang chồi ngủ bằng cách sử dụng nồng độ các chất điều hoà sinh trưởng thực vật và môi trường khoáng khác nhau, nhằm tạo nguồn cây con khoẻ mạnh, đáp ứng được nhu cầu của thị trường tiêu thụ.

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Vật liệu

Cây khôi nhung được cung cấp từ bộ sưu tập cây dược liệu của Trung tâm Sâm và Dược liệu TP. Hồ Chí Minh được chọn làm cây đầu dòng. Vật liệu cho nuôi cấy là đoạn thân mang chồi nách được lấy từ các cây đầu dòng 01 năm tuổi.

Hoá chất: Môi trường MS (Murashige & Skoog, 1968), BAP (6-benzylaminopurine), NAA (naphthalene acetic acid), TDZ (thidiazuron), IBA (indole butyric acid) được sản xuất bởi Công ty Duchefa Biochemie (Hà Lan).

Phương pháp nghiên cứu

Tạo vật liệu khởi đầu

Đoạn thân mang chồi ngủ, kích thước 1,0 - 1,5 cm từ cây đầu dòng được rửa dưới vòi nước chảy trong 10 phút, ngâm trong dung dịch xà phòng loãng 20 phút, sau đó rửa sạch với nước máy và nước cất vô trùng. Chuyển vào tủ cấy, rửa sạch với nước cất vô trùng, sau đó lắc mẫu với cồn 70° trong 30 giây, rửa lại 3 - 5 lần bằng nước cất khử trùng. Mẫu được khử trùng với dung dịch NaOCl 3% trong 10 phút, có bổ sung vài giọt Tween 20. Rửa sạch lại bằng nước cất vô trùng, loại bỏ những phần bị tổn thương và cấy mẫu vào môi trường nuôi cấy khởi động (môi trường MS cơ bản bổ sung 30 g/L sucrose, 8 g/L agar). Sau 6 tuần nuôi cấy, chồi *in vitro* sạch đạt kích thước khoảng 2,0 - 2,5 cm, chồi xanh, khoẻ được sử dụng để bố trí các thí nghiệm tiếp theo.

Ảnh hưởng của nồng độ TDZ và NAA đến sự cảm ứng tạo cụm chồi cây khô nhưng *in vitro*

Các mẫu sống và không bị nhiễm sau khi khử trùng được cấy lên môi trường MS có bổ sung nồng độ TDZ (0,05; 0,1; 0,2 mg/L) đơn lẻ hoặc kết hợp nồng độ NAA (0,5; 1,0 mg/L) để xác định môi trường thích hợp khả năng phát sinh hình thái, bật chồi từ chồi ngủ của đoạn thân cây khô nhưng. Kết quả tỷ lệ mẫu hình thành cụm chồi (%) và số chồi (chồi/mẫu) được theo dõi và ghi nhận sau 8 tuần nuôi cấy.

Ảnh hưởng của nồng độ BAP và NAA đến sự tái sinh cây từ cụm chồi cây khô nhưng *in vitro*

Cụm chồi khô nhưng *in vitro* được tách ra thành các cụm nhỏ (5 chồi/cụm) và đặt lên môi trường MS có bổ sung nồng độ BAP (0,0; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 mg/L) đơn lẻ hoặc kết hợp với nồng độ NAA (0,5; 1,0 mg/L) để xác định sự tái sinh cây từ cụm chồi *in vitro*. Kết quả tỷ lệ mẫu tái sinh cây (%) và số cây (cây/mẫu) được thu nhận và phân tích sau 8 tuần nuôi cấy.

Ảnh hưởng của nồng độ NAA và IBA đến sự hình thành rễ cây khô nhưng *in vitro*

Các chồi có chiều cao đồng đều khoảng 1,0 cm, có 2 - 3 lá mở thu được ở giai đoạn tái sinh từ cụm chồi được tách riêng rẽ và cấy trên môi trường MS bổ sung IBA (0,0; 0,1; 0,5; 1,0 mg/L) riêng rẽ với NAA (0,0; 0,1; 0,5; 1,0 mg/L) để thăm dò khả năng hình thành và phát triển của rễ *in vitro*. Kết quả tỷ lệ mẫu hình thành rễ (%), số rễ (rễ/chồi), chiều dài rễ (cm), số lá (lá/chồi), chiều cao cây (cm) được theo dõi và ghi nhận sau 8 tuần nuôi cấy.

Ảnh hưởng của môi trường khoáng đến sự tạo cây khô nhưng *in vitro* hoàn chỉnh

Các chồi có chiều cao khoảng 2,0 cm, có 2 - 3 lá mở được cấy chuyển sang các môi trường MS có hàm lượng khoáng khác nhau gồm môi trường MS cơ bản, môi trường ½ MS (môi trường MS giảm ½ nồng độ đa lượng), môi trường ¼ MS (môi trường MS cơ bản giảm ¼ nồng độ đa lượng). Hàm lượng auxin được bổ sung vào môi trường theo kết quả của thí nghiệm hình thành rễ. Kết quả số rễ (rễ/chồi), chiều dài rễ (cm), số lá (lá/chồi), chiều cao cây (cm) được theo dõi và ghi nhận sau 8 tuần nuôi cấy.

Điều kiện nuôi cấy

Các thí nghiệm được nuôi cấy ở điều kiện nhiệt độ: 25 ± 2°C; cường độ ánh sáng: 50 μmol/m²/s; thời gian chiếu sáng: 12 giờ/ngày.

Phương pháp xử lý số liệu

Các thí nghiệm được bố trí theo kiểu ngẫu nhiên hoàn toàn (CRD) với 3 lần lặp lại. Các số liệu được xử lý thống kê bằng phần mềm Microsoft Excel và Statgraphics Centurion XV với độ tin cậy 95%.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Ảnh hưởng của nồng độ TDZ và NAA đến sự cảm ứng tạo cụm chồi cây khô nhưng *in vitro*

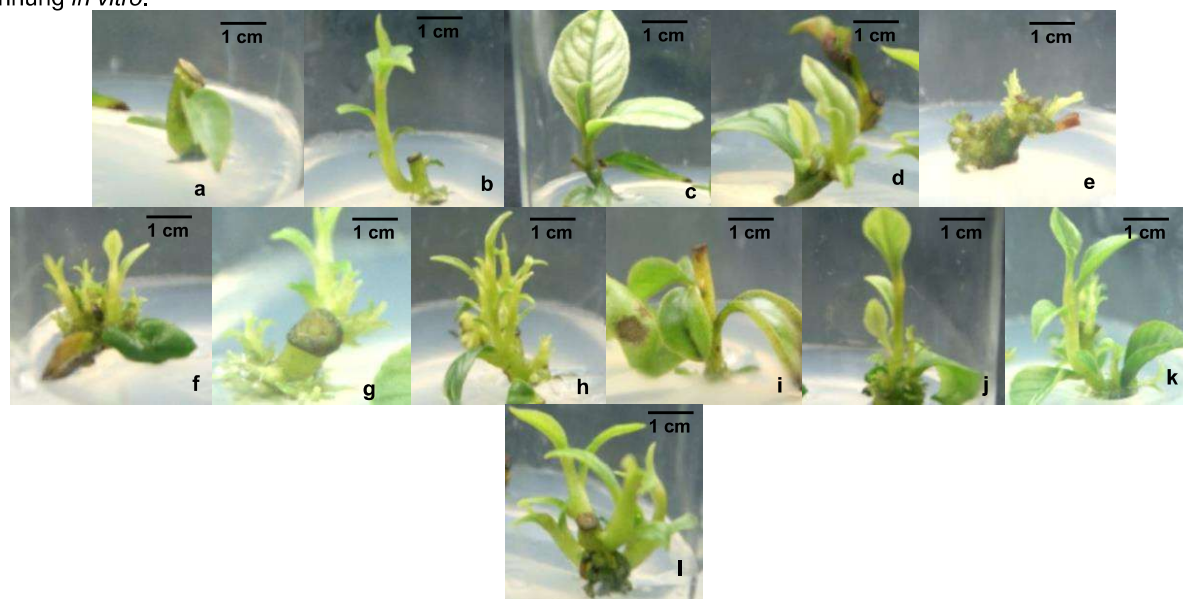
Bảng 1. Kết quả ảnh hưởng của nồng độ TDZ và NAA đến sự cảm ứng tạo cụm chồi cây khô nhưng *in vitro*

Nghiệm thức	Nồng độ TDZ (mg/L)	Nồng độ NAA (mg/L)	Tỷ lệ mẫu hình thành cụm chồi (%)	Số chồi (chồi/mẫu)
DC	-	-	0,83 ^d	0,00 ^g
C1	0,05	-	57,61 ^c	1,07 ^f
C2	0,1	-	62,23 ^{bc}	1,38 ^f
C3	0,2	-	63,94 ^b	2,27 ^e
C4	-	0,5	0,83 ^d	0,00 ^g
C5	0,05	0,5	89,14 ^a	2,64 ^e

C6	0,1	0,5	89,14 ^a	4,38 ^d
C7	0,2	0,5	89,14^a	6,69^a
C8	-	1,0	0,83 ^d	0,00 ^g
C9	0,05	1,0	89,14 ^a	4,93 ^{cd}
C10	0,1	1,0	89,14 ^a	5,47 ^{bc}
C11	0,2	1,0	89,14 ^a	5,80 ^b
	CV (%)		5,65	4,48

*Các giá trị theo sau bởi chữ cái khác nhau trong cùng một cột biểu hiện sự khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê ở mức độ 0,05.

Kết quả Bảng 1 cho thấy, ở các nghiệm thức không bổ sung TDZ, tỷ lệ hình thành cụm chồi thấp nhất (dưới 1,0%). Khi tăng dần nồng độ TDZ, tỷ lệ hình thành cụm chồi tăng dần, điều này cho thấy TDZ có vai trò quan trọng trong việc cảm ứng tạo cụm chồi cây khô nhưng. Ở các môi trường có bổ sung nồng độ NAA, số chồi ở các nghiệm thức có chiều hướng tăng dần theo chiều tăng của tỷ lệ nồng độ TDZ : NAA trong môi trường nuôi cấy, nghiệm thức C7 (bổ sung 0,2 mg/L TDZ kết hợp 0,5 mg/L NAA) cho kết quả tốt nhất với tỷ lệ hình thành cụm chồi đạt 89,14% và số chồi đạt 6,69 chồi/mẫu. Tuy nhiên, so sánh kết quả số chồi giữa môi trường C7 và môi trường C11 cho thấy số chồi giảm khi tăng tỷ lệ TDZ : NAA trong môi trường nuôi cấy. Điều này chứng minh ở một tỷ lệ nồng độ thích hợp, TDZ và NAA có sự tương tác hỗ trợ nhau trong sự cảm ứng tạo chồi, khi tỷ lệ nồng độ TDZ và NAA vượt ngưỡng sẽ gây ức chế sự hình thành chồi mới. Kết quả này cũng phù hợp với nghiên cứu của Lee và đồng tác giả khi tiến hành cảm ứng chồi cây *Ardisia pusilla* de Candolle trên môi trường MS bổ sung 0,25 mg/L TDZ kết hợp 0,5 mg/L IBA (Lee *et al.*, 2008). Như vậy, trong nghiên cứu này, môi trường MS bổ sung 0,2 mg/L TDZ kết hợp 0,5 mg/L NAA là tốt nhất cho sự cảm ứng hình thành cụm chồi và tạo chồi mới ở cây khô nhưng *in vitro*.



Hình 1. Sự hình thành chồi cây khô nhưng trên các môi trường cảm ứng hình thành cụm chồi khác nhau

- a. 0 mg/L TDZ + 0 mg/L NAA d. 0,2 mg/L TDZ g. 0,1 mg/L TDZ + 0,5 mg/L NAA j. 0,05 mg/L TDZ + 0,1 mg/L NAA
 b. 0,05 mg/L TDZ e. 0,5 mg/L NAA h. 0,2 mg/L TDZ + 0,5 mg/L NAA k. 0,05 mg/L TDZ + 0,1 mg/L NAA
 c. 0,1 mg/L TDZ f. 0,05 mg/L TDZ + 0,5 mg/L NAA i. 0,1 mg/L NAA l. 0,05 mg/L TDZ + 0,1 mg/L NAA

Ảnh hưởng của nồng độ BAP và NAA đến sự tái sinh cây từ cụm chồi cây khô nhưng *in vitro*

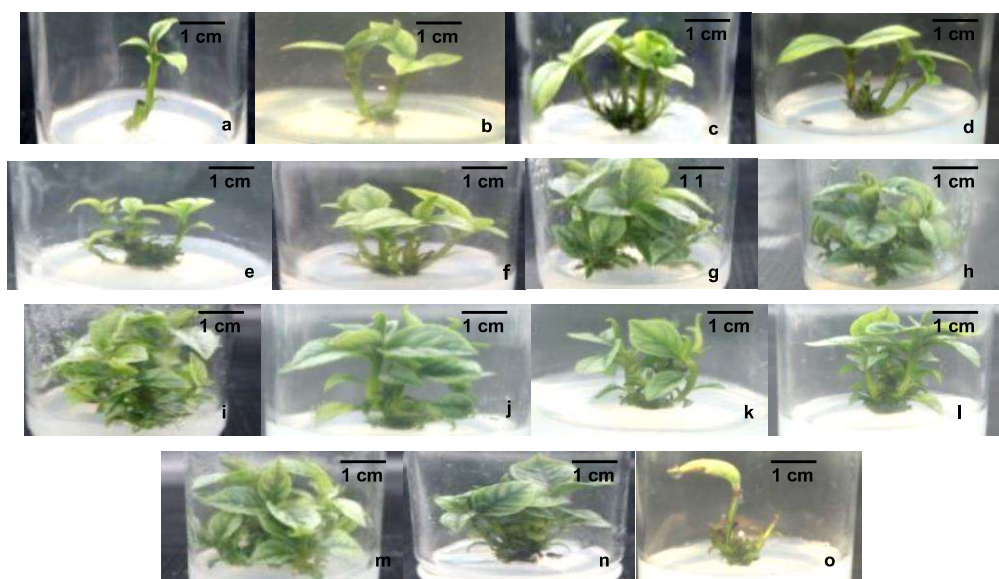
Bảng 2. Kết quả ảnh hưởng của nồng độ BAP và NAA đến sự tái sinh cây từ cụm chồi cây khô nhưng *in vitro*

Nghiệm thức	Nồng độ BAP (mg/L)	Nồng độ NAA (mg/L)	Tỷ lệ mẫu tái sinh cây (%)	Số cây (cây/mẫu)
DC1	-	-	34,45 ^c	0,76 ^g
T1	0,5	-	89,22 ^a	2,16 ^f
T2	1,0	-	89,22 ^a	2,60 ^f
T3	1,5	-	89,22 ^a	3,80 ^{cde}

CÔNG NGHỆ TẾ BÀO

T4	2,0	-	84,49 ^a	3,02 ^{ef}
T5	-	0,5	89,22 ^a	2,84 ^{ef}
T6	0,5	0,5	89,22 ^a	4,27 ^{bcd}
T7	1,0	0,5	89,22 ^a	5,36 ^b
T8	1,5	0,5	89,22^a	6,82^a
T9	2,0	0,5	79,11 ^b	2,07 ^f
T10	-	1,0	89,22 ^a	3,38 ^{de}
T11	0,5	1,0	84,49 ^a	3,44 ^{de}
T12	1,0	1,0	89,22 ^a	4,84 ^{bc}
T13	1,5	1,0	89,22 ^a	4,98 ^{bc}
T14	2,0	1,0	82,33 ^a	1,96 ^{fg}
	CV (%)		12,26	12,66

*Các giá trị theo sau bởi chữ cái khác nhau trong cùng một cột biểu hiện sự khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê ở mức độ 0,05.



Hình 2. Sự hình thành cây khô nhưng *in vitro* trên các môi trường tái sinh cây

- | | | | |
|----------------------------|--------------------------------|--------------------------------|------------------------------|
| a. 0 mg/L BAP + 0 mg/L NAA | e. 2,0 mg/L BAP | i. 1,5 mg/L BAP + 0,5 mg/L NAA | m. 1,0 mg/L BAP + 0 mg/L NAA |
| b. 0,5 mg/L BAP | f. 0,5 mg/L NAA | j. 2,0 mg/L BAP + 0,5 mg/L NAA | n. 1,5 mg/L BAP + 0 mg/L NAA |
| c. 1,0 mg/L BAP | g. 0,5 mg/L BAP + 0,5 mg/L NAA | k. 1,0 mg/L NAA | o. 2,0 mg/L BAP + 0 mg/L NAA |
| d. 1,5 mg/L BAP | h. 1,0 mg/L BAP + 0,5 mg/L NAA | l. 0,5 mg/L BAP + 1,0 mg/L NAA | |

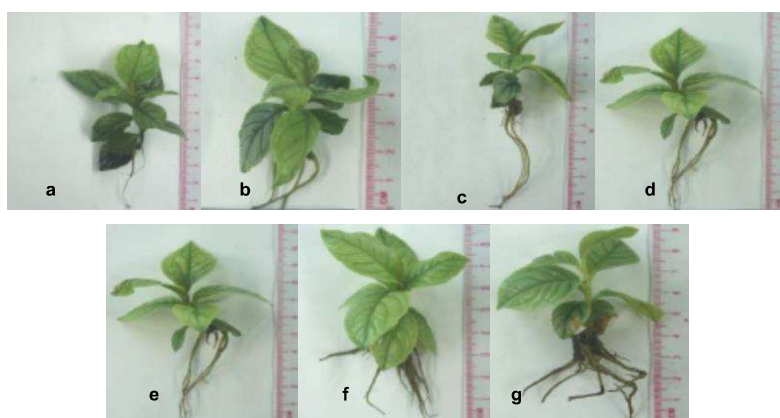
Kết quả Bảng 2 cho thấy ở nghiệm thức DC1 không bổ sung chất điều hoà sinh trưởng thực vật (CĐHSTTV), tỷ lệ tái sinh cây từ cụm chồi và số cây hình thành thấp (34,45% và 0,76 cây/mẫu). Ở các nghiệm thức bổ sung BAP riêng lẻ, không có sự khác biệt về mặt thống kê ở chỉ tiêu tỷ lệ mẫu tái sinh cây, số cây được tái sinh tăng dần tỷ lệ thuận với chiều tăng của nồng độ BAP và đạt cao nhất ở 1,5 mg/L BAP, tiếp tục tăng đến nồng độ 2,0 mg/L BAP nhận thấy số cây được tái sinh giảm. Điều này cho thấy BAP có vai trò quan trọng trong sự cảm ứng tái sinh cây từ cụm chồi cây khô nhưng *in vitro* ở một nồng độ nhất định, khi hàm lượng cytokinin cao sẽ gây nên sự ức chế sinh trưởng của chồi (Cường *et al.*, 2015).

Ở các nghiệm thức có bổ sung đồng thời BAP và NAA cho kết quả tốt hơn so với các nghiệm thức bổ sung riêng lẻ, cho thấy có sự tương tác giữa BAP và NAA trong quá trình tái sinh cây từ cụm chồi khô nhưng *in vitro*. Nghiệm thức T8 (môi trường bổ sung 1,5 mg/L BAP và 0,5 mg/L NAA) cho kết quả tốt nhất với tỷ lệ mẫu tái sinh cây đạt 89,22% và số cây được tái sinh đạt 6,82 cây/mẫu. Kết quả này cũng phù hợp với các nghiên cứu về tác động tương hỗ giữa auxin và cytokinin trong quá trình kích thích sự hình thành chồi và tái sinh cây con *in vitro* trên các cây khác thuộc chi *Ardisia* như nghiên cứu của Goo (2008) đối với cây *A. japonica* hay nghiên cứu của Ma và đồng tác giả (2009) trên cây *A. crenate*.

Ảnh hưởng của nồng độ NAA và IBA đến sự hình thành rễ cây khôi nhung *in vitro*
Bảng 3. Kết quả ảnh hưởng của nồng độ NAA và IBA đến sự hình thành rễ cây khôi nhung *in vitro*

Nồng độ NAA (mg/L)	Nồng độ IBA (mg/L)	Tỷ lệ mẫu hình thành rễ (%)	Số rễ (rễ/mẫu)	Chiều dài rễ (cm)	Số lá (lá/mẫu)	Chiều cao cây (cm)
-	-	98,33 ^b	2,03 ^d	1,57 ^e	5,43 ^e	2,67 ^a
0,1	-	100,00 ^a	2,70 ^{cd}	7,07 ^a	6,93 ^b	1,70 ^{ab}
0,5	-	100,00 ^a	2,27 ^d	4,40 ^d	6,17 ^d	1,17 ^b
1,0	-	100,00 ^a	4,77 ^b	4,93 ^c	6,90 ^{bc}	1,60 ^{ab}
-	0,1	100,00 ^a	3,37 ^c	6,03 ^b	7,83 ^a	1,90 ^{ab}
-	0,5	100,00 ^a	5,57 ^a	4,30 ^d	6,23 ^{cd}	1,73 ^{ab}
-	1,0	100,00^a	5,27^{ab}	5,40^c	7,60^a	2,27^{ab}
CV (%)		0,44	9,56	6,10	5,33	12,24

*Các giá trị theo sau bởi chữ cái khác nhau trong cùng một cột biểu hiện sự khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê ở mức độ 0,05.


Hình 3. Sự hình thành rễ cây khôi nhung *in vitro* trên các môi trường khác nhau

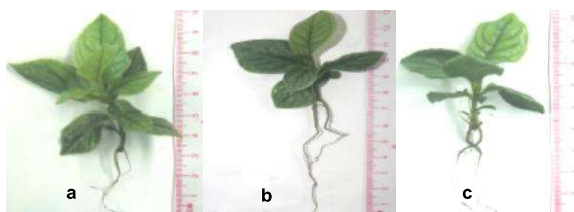
a. Không bổ sung CDHSTTV c. 1,0 mg/L NAA e. 0,5 mg/L IBA g. 1,5 mg/L IBA
 b. 0,5 mg/L NAA d. 1,5 mg/L NAA f. 1,0 mg/L IBA

Dựa vào kết quả Bảng 3 cho thấy, khi không bổ sung auxin vào môi trường nuôi cấy, vẫn có sự hình thành rễ ở cây khôi nhung *in vitro*, tuy nhiên các chỉ tiêu về số rễ, chiều dài rễ và số lá đều đạt thấp nhất (lần lượt 2,03 rễ/mẫu, 1,57 cm và 5,43 lá/mẫu). Đối với các môi trường có bổ sung thành phần auxin, môi trường bổ sung 1,0 mg/L NAA và môi trường bổ sung 1,0 mg/L IBA đều cho kết quả các chỉ tiêu theo dõi đạt tốt hơn so với các môi trường còn lại, chứng tỏ IBA và NAA đều có ảnh hưởng đến sự hình thành rễ cây khôi nhung *in vitro*. Tuy nhiên, xét ở cùng nồng độ 1,0 mg/L, IBA cho hiệu quả cảm ứng hình thành rễ và phát triển cây tốt hơn so với NAA (thể hiện qua các thông số 5,27 rễ/mẫu, rễ dài trung bình 5,4 cm, 7,60 lá/mẫu, cây cao trung bình 2,27 cm). Do đó, môi trường MS bổ sung 1,0 mg/L IBA là thích hợp cho cảm ứng hình thành rễ cây khôi nhung *in vitro*.

Ảnh hưởng của môi trường khoáng đến sự tạo cây khôi nhung *in vitro* hoàn chỉnh
Bảng 4. Kết quả ảnh hưởng của môi trường khoáng đến sự tạo cây khôi nhung *in vitro* hoàn chỉnh

Môi trường khoáng	Tỷ lệ mẫu hình thành rễ (%)	Số rễ (rễ/mẫu)	Chiều dài rễ (cm)	Số lá (lá/mẫu)	Chiều cao cây (cm)
MS	98,00 ^b	2,80 ^b	1,73 ^b	5,33 ^b	3,47 ^a
1/2 MS	100,00 ^a	3,97 ^a	4,30 ^a	6,70 ^a	3,00 ^{ab}
1/3 MS	100,00 ^a	2,63 ^b	3,73 ^a	5,30 ^b	2,50 ^b
CV (%)	0,58	17,05	16,98	8,79	12,11

*Các giá trị theo sau bởi chữ cái khác nhau trong cùng một cột biểu hiện sự khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê ở mức độ 0,05.



Hình 4. Cây khô nhung *in vitro* hoàn chỉnh trên các môi trường khoáng khác nhau

a. Môi trường MS; b. Môi trường $\frac{1}{2}$ MS; c. Môi trường $\frac{1}{3}$ MS

Kết quả Bảng 4 cho thấy có sự hình thành rễ ở hầu hết các môi trường khoáng, không có sự khác biệt về mặt thống kê ở tỷ lệ mẫu hình thành rễ giữa môi trường $\frac{1}{2}$ MS và $\frac{1}{3}$ MS. Môi trường $\frac{1}{2}$ MS cho kết quả các chỉ tiêu sinh trưởng về số rễ, chiều dài rễ, số lá đạt cao nhất (lần lượt 3,97 rễ/mẫu, rễ dài trung bình 4,30 cm, có 6,70 lá/mẫu). Các môi trường khoáng trong thí nghiệm này tương đồng về chủng loại, và hàm lượng các thành phần khoáng vi lượng và vitamin, do đó sự cảm ứng hình thành rễ của cây khô nhung *in vitro* có thể do sự khác biệt về hàm lượng khoáng đa lượng. Schwambach và đồng tác giả đã chứng minh Ca, Zn và N trong môi trường nuôi cấy có ảnh hưởng đáng kể đến số lượng rễ hình thành trên đối tượng *Eucalyptus globulus* Labill (Schwambach et al., 2005). Trong thành phần khoáng đa lượng của môi trường $\frac{1}{2}$ MS, hàm lượng NH_4^+ chỉ bằng $\frac{1}{2}$ so với môi trường MS, do đó tính đối kháng giữa sự đồng hóa đạm và hấp thu các cation đa lượng không cao, vì thế sự cảm ứng tạo rễ tốt hơn. Trong khi đó, cây được nuôi cấy trên môi trường $\frac{1}{3}$ MS cho số lượng rễ và chiều cao cây thấp nhất. Có thể giải thích do môi trường $\frac{1}{3}$ MS là môi trường nuôi cấy nghèo dinh dưỡng đối với cây khô nhung nên vẫn có sự hình thành rễ nhưng số lượng rễ không nhiều và cây phát triển kém. Như vậy, môi trường $\frac{1}{2}$ MS là môi trường thích hợp cho sự tạo cây khô nhung *in vitro* hoàn chỉnh.

KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã tiến hành khảo sát một vài thông số môi trường trong nhân giống *in vitro* cây khô nhung. Cụm chồi *in vitro* được cảm ứng trên môi trường MS bổ sung 0,2 mg/L TDZ kết hợp 0,5 mg/L NAA. Cây con *in vitro* được tái sinh từ cụm chồi trên môi trường MS bổ sung 1,5 mg/L BAP kết hợp 0,5 mg/L NAA. Các cây *in vitro* được hình thành rễ và tạo cây hoàn chỉnh trên môi trường $\frac{1}{2}$ MS bổ sung 1,0 mg/L IBA.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Bân NT, Lý TĐ, Tập N, Dũng VV, Thìn NN, Tiến NV, Khôi NK (2007). Sách đỏ Việt Nam. Nhà xuất bản Khoa học tự nhiên và Công nghệ, Hà Nội.
- Cường ĐM, Luận VQ, Cường NV, Sang NT, Hoàng NH, Tâm HT, Tuấn NX, Hiếu T, Tùng HT, Loan NTK, Nhật DT (2015). Ảnh hưởng của một số yếu tố lên quá trình sinh trưởng và phát triển của cây lan gấm (*Anoectochilus setaceus* Blume) nuôi cấy *in vitro*. *Tạp chí Khoa học và Phát triển*, 13(3): 337-344.
- Duc TM, Quỳnh NT, Thanh P (2021). Regeneration of plants via callus-mediated organogenesis from leaf, petiole, and inter nodal segment of *Ardisia silvestris* Pitard. *Propagation of Ornamental Plants*, 21(3): 96-103.
- Goo D (2008). Establishment of Primary and Sub-culture Conditions of *Ardisia pusilla* and *Ardisia japonica* *in vitro*. *Korean Journal of Horticultural Science Technology*, 26(4): 471-475.
- Hồng PVC, Biết HV, Toàn TQ, Nga NTT, Phương NTN (2020). Phân tích thành phần hóa thực vật và xác định khả năng chống oxy hóa và kháng khuẩn của dịch chiết từ lá của cây khô nhung (*Ardisia silvestris* Pitard). *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển*, 19(4): 28-35. DOI:10.52997/jad.4.04.2020.
- Huang L, You L, Aziz N, Yu SH, Lee JS, Choung ES, Luong VD, Jeon MJ, Hur M, Lee S, Kim HG, Cho JY (2023). Antiphotaging and Skin-Protective Activities of *Ardisia silvestris* Ethanol Extract in Human Keratinocytes. *Plants (Basel)*, 12(5): DOI:10.3390/plants12051167.
- Hương ĐTT, Việt NV, Huyền NT, Hà TV (2019). Hoàn thiện quy trình nhân giống cây khô tía (*Ardisia silvestris* Pitard) bằng kỹ thuật nuôi cấy *in vitro*. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Lâm nghiệp*, 1: 25-31.
- Kobayashi H, de Mejia E (2005). The genus *Ardisia*: a novel source of health-promoting compounds and phytopharmaceuticals. *J Ethnopharmacol*, 96(3): 347-354. DOI:10.1016/j.jep.2004.09.037.
- Lee SY, Kim YS, Han BH (2008). Shoot regeneration from internode sections of *Ardisia pusilla* DC. *Journal of Plant Biotechnology*, 35(3): 209-213.
- Lợi, ĐT (2011). *Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam*. Nhà xuất bản Thời đại, Hà Nội.
- Ma M, Liu J, Pu S (2009). Tissue culture and plant regeneration of *Ardisia crenata*. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*, 34(16): 2043-2046.
- Nguyen HA, Ripberger H, Schmidt J, Porzel A, Tran VS, Adam G (1996). Resorcinol derivatives from two *Ardisia* species. *Planta Med*, 62(5): 479-480. DOI:10.1055/s-2006-957947.
- Schwambach J, Fadanelli C, Fett-Neto AGJTP (2005). Mineral nutrition and adventitious rooting in microcuttings of *Eucalyptus globulus*. *Tree Physiology*, 25(4): 487-494. DOI: 10.1093/treephys/25.4.487.

STUDY ON *IN VITRO* PROPAGATION OF *ARDISIA SILVESTRIS* PITARD.

Toan Nguyen Van, Thuy Phan Thi Hong, Tien Duong Phu, Tien Pham Tran Thuy,
Hang Vu Thi Thuy, Nhi Tran Thi Yen, Huy Nguyen Tran Phuoc, Tram Trinh Thi Minh,
Hue Nguyen Thi, Thuy Nguyen Thanh, Loan Vuong Thi Hong

Center for Business Incubation of Agricultural High Technology

SUMMARY

Ardisia silvestris Pitard. is a traditional medicinal plant of Vietnam, commonly used to effectively treat abdominal and stomach pain. The main component in *A. silvestris* leaves is tannins, which constitutes 8.8% of the dry matter, along with compounds such as alkaloids, anthocyanins, proanthocyanidins, anthraquinones, which have anti-aging properties and protect human keratinocytes. The purpose of the study was established an *in vitro* propagation protocol for the conservation and development of *A. silvestris* species. The results showed that the MS medium combined with 0.2 mg/L TDZ and 0.5 mg/L NAA was optimal for the *in vitro* formation of shoot clusters in *A. silvestris*, with 6.69 shoots per explant. The MS medium supplemented with 1.5 mg/L BAP and 0.5 mg/L NAA yielded the highest number of single *in vitro* shoots derived from the shoot clusters, with 6.82 shoots per cluster. The optimal root induction for single *in vitro* shoots was achieved on the Murashige & Skoog medium with half-strength macronutrients combined with 1.0 mg/L IBA. These results can be used as a basis for further research and to facilitate large-scale propagation of the medicinal plant *A. silvestris*.

Keywords: Medicinal plant, *Ardisia silvestris*, Murashige & Skoog medium, *in vitro* propagation, tannins.