

**BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO  
TRƯỜNG ĐẠI HỌC NÔNG LÂM TP. HCM**

**TRỊNH VIỆT NGÀ**

**NGHIÊN CỨU NHÂN GIỐNG CÂY ĐÌNH LĂNG LÁ NHỎ  
(*Polyscias fruticosa* (L.) Harms) BẰNG PHƯƠNG PHÁP  
NUÔI CÂY PHÔI VÔ TÍNH**

Chuyên ngành: Khoa học Cây trồng

Mã số: 9.62.01.10

**TÓM TẮT LUẬN ÁN TIẾN SĨ NGÀNH NÔNG NGHIỆP**

**Thành phố Hồ Chí Minh, 2020**

**Công trình được hoàn thành tại:**

**TRƯỜNG ĐẠI HỌC NÔNG LÂM TP. HCM**

Người hướng dẫn khoa học: 1. PGS.TS. Phạm Thị Minh Tâm

2. TS. Nguyễn Hữu Hồ

Phản biện 1:

Phản biện 2:

Phản biện 3:

Luận án được bảo vệ trước Hội đồng chấm luận án cấp Trường họp  
tại Trường Đại học Nông Lâm TP. Hồ Chí Minh

Vào hồi .....giờ .... ngày ..... tháng ..... năm .....

Có thể tìm hiểu luận án tại:

- Thư viện Trường Đại học Nông Lâm TP. Hồ Chí Minh
- Thư viện Quốc gia Hà Nội

## MỞ ĐẦU

### Tính cấp thiết

Cây đinh lăng đã được sử dụng như một vị thuốc trong y học cổ truyền do chứa nhiều hợp chất có dược tính cao thuộc nhóm saponin như axit oleanolic, polyacetylene; riêng axit oleanolic có tác dụng chống oxy hóa, chống căng thẳng thần kinh và các triệu chứng trầm cảm (Vo Duy Huan và cs, 1998). Axit oleanolic còn có tiềm năng như một loại thuốc có khả năng hạn chế sự phát triển của tế bào ung thư và chống đông máu (Zhang và cs, 2017).

Trước đây và hiện nay cây giống đinh lăng được tạo ra chủ yếu bằng giâm cành theo phương pháp truyền thống với hệ số nhân giống thấp, cây con không có rễ chính và cây giống không đồng đều. Kỹ thuật giâm cành *in vitro* (nuôi cấy các đoạn cắt chồi ngọn, đoạn đốt thân) cũng đã được ứng dụng đạt được một số kết quả, nhưng vẫn chưa cải thiện được hệ số nhân giống. Nhân giống thông qua con đường tạo phôi vô tính (somatic embryo) là phương pháp được các nhà nghiên cứu đánh giá cao, có tiềm năng ứng dụng lớn do hệ số nhân giống rất cao, đồng thời khắc phục được các hạn chế của các phương pháp nhân giống truyền thống nêu trên. Các kết quả nghiên cứu về tạo phôi vô tính trên cây đinh lăng và quy trình nhân giống mới bằng phương pháp sử dụng phôi vô tính bắt đầu từ khâu tạo mô sẹo, tạo và nhân phôi *in vitro* đến xây dựng kỹ thuật trồng, chăm sóc cây từ phôi giai đoạn sau nuôi cấy mô (*ex vitro*) còn rất khiêm tốn. Vì vậy nghiên cứu này là rất cần thiết.

### Mục tiêu nghiên cứu

#### Mục tiêu tổng quát

Xây dựng quy trình nhân giống hoàn chỉnh cây ĐLLN thông qua con đường cảm ứng tạo phôi vô tính nhằm đạt được hệ số nhân cao, chất lượng cây giống đồng nhất.

#### Mục tiêu cụ thể

Xác định hàm lượng axit oleanolic của 18 mẫu giống đinh lăng và trình tự DNA barcode của 8 mẫu giống ĐLLN.

Xác định môi trường nuôi cấy thích hợp hình thành loại mô sẹo có khả năng phát sinh phôi vô tính.

Xác định môi trường và chế độ nuôi cấy phù hợp để cảm ứng, nhân sinh khối phôi và tạo cây hoàn chỉnh từ phôi.

Xác định điều kiện thuần dưỡng phù hợp đối với cây con được tạo ra từ phôi vô tính.

### **Đóng góp mới của luận án**

Xác định được vùng gen *trnH-psbA* là vùng DNA barcode tiềm năng ứng dụng trong việc nhận diện mẫu giống ĐLLN có hàm lượng axit oleanolic cao.

Nhân phôi vô tính cây đỉnh lãng lá nhỏ trong hệ thống bioreactor. Phương pháp tạo phôi vô tính có hệ số nhân giống cao hơn các phương pháp khác, cây từ phôi đồng nhất di truyền với cây mẹ và cây có rễ chính tạo nên giá trị thương phẩm cao.

Bước đầu xây dựng được một quy trình nhân giống từ khâu tạo phôi vô tính cho đến khi hình thành cây con giống xuất vườn. Đây là giải pháp hiệu quả trong nhân giống cây đỉnh lãng phục vụ cho sản xuất ở quy mô lớn.

### **Bố cục của luận án**

Luận án chính thức gồm 137 trang, có 3 chương, 53 bảng số liệu và 40 hình. Luận án đã tham khảo tổng cộng 120 tài liệu trong đó 47 tài liệu tiếng Việt và 73 tài liệu tiếng Anh.

## **Chương 1**

### **TỔNG QUAN**

Cây đỉnh lãng có nguồn gốc ở vùng đảo Polynésie thuộc Thái Bình Dương. Chi đỉnh lãng có gần 100 loài phân bố ở các vùng nhiệt đới, cận nhiệt đới. Ở Việt Nam, đỉnh lãng đã được trồng từ rất lâu trên khắp cả nước trong các vườn gia đình, đình chùa, trạm xá bệnh viện (Võ Văn Chi và Trần Hợp, 1999). Gần đây, đỉnh lãng đã trở thành một nguồn dược liệu quý, do vậy nhu cầu mở rộng diện tích trồng đang được quan tâm. Từ đó có nhiều vấn đề đặt ra như là chất lượng giống tốt ban đầu, khi đã

xác định được giống rồi thì vấn đề thứ hai đặt ra là làm sao cung cấp được lượng lớn giống cho sản xuất ở quy mô lớn.

Từ lâu người nông dân đã áp dụng kỹ thuật nhân giống vô tính cây đình lăng thông qua giâm cành, tuy nhiên chỉ phục vụ cho quy mô nhỏ. Kỹ thuật vi giâm cành cũng được áp dụng một thời gian, tuy nhiên để có được một lượng giống lớn, ổn định về chất lượng thì sử dụng công nghệ tạo và nhân phôi vô tính là thích hợp nhất. Phôi vô tính sẽ cho ra những cây con lý tưởng về độ đồng đều và chất lượng. Để đảm bảo được chất lượng thì cây đình lăng tùy theo từng kiểu tế bào mà có hai con đường tạo phôi vô tính (Pierik, 1987; Merkle và cs, 1995; Yeung, 1995). Thứ nhất là con đường tạo phôi vô tính trực tiếp, trong đó phôi hình thành từ tế bào hoặc mô mà không qua giai đoạn tạo mô sẹo, các tế bào này chính là PEDC (Pre-Embryogenic Determined Cell - tế bào được xác định có khả năng tiền phôi hóa). Thứ hai là con đường tạo phôi gián tiếp qua mô sẹo và các tế bào chuyển thành phôi chính là IEDC (Induced Embryogenic Determined Cell - tế bào được xác định có khả năng phôi hóa do cảm ứng) (Pierik, 1987). Trong hai con đường trên, kiểu phát sinh gián tiếp là phương pháp phổ biến hơn để sản xuất phôi vô tính, đáp ứng nhiều mục đích khác nhau và đã được mô tả ở hàng trăm loài thực vật. Trong đề tài luận án này kỹ thuật tạo phôi vô tính đã được sử dụng.

Ứng dụng kỹ thuật sinh học phân tử thông qua chỉ thị ISSR đã giúp xác định được chất lượng và độ đồng nhất về mặt di truyền của cây mẹ cũng như các cây con được tạo ra qua nhân giống phôi vô tính.

Các chất điều hòa sinh trưởng như auxin có tác dụng trong giai đoạn khởi đầu tạo mô sẹo và phôi (Lo Schiavo và cs, 1989; Dubits và cs, 1995; Kutschera, 1994). Cytokinin là chất điều hòa sinh trưởng thực vật cần thiết cho sự tạo phôi vô tính ở một số loài thực vật đã được sử dụng là tác nhân tạo phôi trong đề tài luận án.

Các kỹ thuật mới về nuôi cấy mô và tế bào trong dịch lỏng, nuôi cấy bằng bioreactor đã được sử dụng để thực hiện những nội dung nghiên cứu của đề tài và cho kết quả tốt.

Cuối cùng là khâu chuyển cây con từ phòng nuôi cấy mô *in vitro* ra vườn ươm. Đây là giai đoạn khó khăn nhất trong quá trình nhân giống vô tính bằng nuôi cấy mô. Cây con *in vitro* được nuôi cấy trong điều kiện ổn định về dinh dưỡng, ánh sáng, nhiệt độ, ẩm độ, môi trường sạch bệnh. Khi chuyển ra đất với điều kiện tự nhiên hoàn toàn khác hẳn như chất dinh dưỡng thấp, cường độ ánh sáng mạnh, nhiệt độ cao, ẩm độ thấp, cây con dễ bị stress mất nước và mau bị héo (Nguyễn Bảo Toàn, 2010). Mặt khác trong môi trường tự nhiên có rất nhiều vi khuẩn và nấm gây bệnh làm chết cây.

Các yếu tố tác động chính của môi trường ở đây đã được nghiên cứu, và kết quả cuối cùng là tỷ lệ cây xuất vườn đạt chuẩn cung cấp giống trên 90 %.

## Chương 2

### NỘI DUNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

#### 2.1 Vật liệu, môi trường/giá thể và điều kiện nuôi cấy

**Vật liệu:** Để tạo mô sẹo, sử dụng vật liệu là mẫu phiến lá và cuống lá của cây ĐLLN *in vitro* và cây vườn ươm. Để tạo phôi vô tính, sử dụng mô sẹo có khả năng sinh phôi hình thành từ nuôi cấy mô sẹo ở 50 NSC. Sử dụng cụm phôi vô tính để nhân sinh khối (qua nuôi cấy lỏng lác), dùng phôi vô tính trưởng thành để tạo cây. Sử dụng cây cao ~ 2,5 cm (vừa lấy ra khỏi bình) để trồng trong khay, cây cao ~ 3 cm (từ khay) để trồng vào bầu đất.

**Môi trường nuôi cấy:** Sử dụng môi trường khoáng MS (Murashige và Skoog, 1962), 1/2MS, SH (Schenk và Hildebrandt, 1972), Nitsch và Nitsch (1969), các loại đường: sucrose, glucose, fructose, maltose; nước dừa; adenine sulfate; agar; các chất điều hòa sinh trưởng (BA, kinetin, IBA, NAA) để tạo mô sẹo, tạo phôi, nhân phôi, tạo phôi trưởng thành

và tạo cây. Môi trường được điều chỉnh pH khoảng 5,7 - 6; hấp khử trùng ở 121°C với áp suất 1 atm trong 20 phút.

**Điều kiện nuôi cấy *in vitro*:** Nhiệt độ phòng nuôi cấy:  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , cường độ chiếu sáng: 0 lux (tối) - 3.000 lux, thời gian chiếu sáng: 0 - 12 h/ngày (tùy thí nghiệm).

**Giá thể sử dụng trong giai đoạn vườn ươm:** Cát, đất, mụn dừa, tro trấu, dớn, phân chuồng, phân hữu cơ vi sinh, phân đạm và lân.

**Điều kiện nuôi trồng giai đoạn *ex vitro*:** Thí nghiệm được tiến hành trong điều kiện nhà lưới, có mái che mưa. Dùng lưới đen làm giảm 50% cường độ ánh sáng.

## 2.2 Phương pháp nghiên cứu

### 2.2.1 Nội dung 1: Đánh giá hàm lượng axit oleanolic và xác định trình tự DNA barcode của các mẫu giống đinh lăng

Kỹ thuật sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) được sử dụng để xác định hàm lượng hoạt chất thuộc nhóm saponin là axit oleanolic của 18 mẫu lá từ cây đinh lăng 4 năm tuổi trong bộ sưu tập. Hàm lượng axit oleanolic của 18 mẫu giống đinh lăng được phân tích theo phương pháp HDPP/DL-08.

DNA của 8 mẫu giống ĐLLN được ly trích và tiến hành phản ứng PCR. Phản ứng PCR của từng mẫu phân tích được tiến hành 3 lần lặp lại, các mẫu có sản phẩm DNA khuếch đại có kích thước bằng nhau được sử dụng cho việc giải trình tự. Lựa chọn một sản phẩm PCR ở mỗi mẫu để tinh sạch và giải trình tự hai chiều nhằm đảm bảo tính chính xác của các nucleotide. Các trình tự được hiệu chỉnh bằng phần mềm Bioedit, so sánh với nhau bằng công cụ Clustal Omega (European Bioinformatics Institute, 2017) và so sánh với các trình tự tương đồng có sẵn trên cơ sở dữ liệu GenBank thông qua việc sử dụng công cụ BLAST.

### 2.2.2 Nội dung 2: Tạo mô sẹo và nuôi vô tính dòng ĐLLN ưu tú

**Thí nghiệm 1 và 2:** Thí nghiệm hai yếu tố, yếu tố A là 2 loại mẫu (phiến lá và cuống lá), yếu tố B là 4 nồng độ 2,4-D (0 mg/L (ĐC); 1

mg/L; 2 mg/L và 3 mg/L). Thí nghiệm được bố trí theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên, có 8 nghiệm thức, 3 lần lặp lại. Mỗi ô cơ sở gồm 3 bình tam giác (250 mL), 10 mẫu/bình, tổng số mẫu cấy là 720 mẫu.

**Thí nghiệm 3:** Thí nghiệm hai yếu tố, yếu tố E là 4 nồng độ BA (0 mg/L (ĐC); 0,5 mg/L; 1 mg/L và 1,5 mg/L), yếu tố F là 3 nồng độ IBA (0 mg/L (ĐC); 0,1 mg/L và 0,5 mg/L). Thí nghiệm được bố trí theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên, có 12 nghiệm thức, 3 lần lặp lại. Qui mô thí nghiệm tương tự Thí nghiệm 1 & 2.

**Thí nghiệm 4:** Thí nghiệm hai yếu tố, yếu tố G là 4 nồng độ BA (0 mg/L (ĐC); 0,5 mg/L; 1 mg/L và 1,5 mg/L), yếu tố H là 3 nồng độ NAA (0 mg/L (ĐC); 0,1 mg/L và 0,5 mg/L). Thí nghiệm được bố trí theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên, có 12 nghiệm thức, 3 lần lặp lại. Qui mô thí nghiệm tương tự Thí nghiệm 1 & 2.

**Thí nghiệm 5:** Thí nghiệm hai yếu tố, yếu tố A là 4 loại đường (sucrose; glucose; fructose và maltose), yếu tố B là 5 nồng độ đường (10 g/L (ĐC); 20 g/L; 30 g/L; 40 g/L và 50 g/L). Thí nghiệm được bố trí theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên, có 20 nghiệm thức, 3 lần lặp lại. Mỗi ô cơ sở gồm 3 đĩa petri, 5 mẫu/đĩa, tổng số mẫu cấy là 900 mẫu.

### **2.2.3 Nội dung 3: Nhân phôi vô tính, tạo phôi vô tính trưởng thành và tạo cây từ phôi vô tính DLLN**

**Thí nghiệm 6:** Thí nghiệm hai yếu tố, yếu tố T là hai khối lượng phôi [(0,5 g tương ứng 0,625% - w/v) và 1,0 g tương ứng 1,25% - w/v], yếu tố K là ba tốc độ lắc (80 vòng/ phút; 100 vòng/phút và 120 vòng/ phút). Thí nghiệm được bố trí theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên, có 6 nghiệm thức, 3 lần lặp lại. Mỗi ô cơ sở gồm 3 bình tam giác, tổng số là 36 bình.

**Thí nghiệm 7:** Thí nghiệm một yếu tố tốc độ sục khí gồm: 400, 600 và 800 mL/phút. Thí nghiệm được bố trí theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên, có 3 nghiệm thức, 3 lần lặp lại, mỗi nghiệm thức 1 bình, mỗi bình cấy 9,30 g phôi (0,62% - w/v).



**Thí nghiệm 8:** Thí nghiệm hai yếu tố, yếu tố K là 4 nồng độ kinetin (0 mg/L (ĐC), 0,5 mg/L, 1 mg/L và 1,5 mg/L), yếu tố I là 3 nồng độ IBA (0 mg/L (ĐC), 0,1 mg/L và 0,2 mg/L). Thí nghiệm được bố trí theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên, có 12 nghiệm thức, 3 lần lặp lại. Mỗi ô cơ sở gồm 3 bình tam giác, 1 g/bình, tổng số là 108 bình.

**Thí nghiệm 9:** Thí nghiệm một yếu tố môi trường gồm 4 loại: MS, 1/2 MS, SH, Nitsch & Nitsch. Thí nghiệm được bố trí theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên, có 4 nghiệm thức, 3 lần lặp lại, mỗi nghiệm thức 3 bình, mỗi bình cấy 10 mẫu. Tổng số mẫu cấy là 600 mẫu.

#### **2.2.4 Nội dung 4: Khảo sát sự sinh trưởng ở giai đoạn vườn ươm của dòng DLLN đã được nuôi cấy và đánh giá độ đồng nhất di truyền cây con**

**Thí nghiệm 10:** Thí nghiệm hai yếu tố, yếu tố A là 3 chế độ che sáng (Che sáng 3 ngày đầu; Che sáng 5 ngày đầu và Che sáng 7 ngày đầu), yếu tố B là 4 loại giá thể (100% cát; 80% cát : 20% mụn dừa; 80% cát : 20% tro trấu và 100% dớn). Thí nghiệm được bố trí theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên, có 12 nghiệm thức, 3 lần lặp lại. Mỗi ô cơ sở gồm 50 cây, tổng số cây là 1.800 cây.

**Thí nghiệm 11:** Thí nghiệm hai yếu tố, yếu tố C là 3 loại giá thể (1/3 mụn dừa : 1/3 đất : 1/3 phân chuồng; 1/2 mụn dừa : 1/4 tro trấu : 1/4 phân chuồng và 1/2 mụn dừa : 1/4 tro trấu : 1/4 phân hữu cơ vi sinh), yếu tố D là 4 mức bón phân urê (46% N) (0,3 g N/bầu; 0,6 g N/bầu; 0,9 g N/bầu và 1,2 g N/bầu). Thí nghiệm được bố trí theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên, có 12 nghiệm thức, 3 lần lặp lại. Mỗi ô cơ sở gồm 10 bầu, tổng số cây là 360 cây.

**Thí nghiệm 12:** Thí nghiệm hai yếu tố, yếu tố G là 3 loại giá thể (1/3 mụn dừa : 1/3 đất : 1/3 phân chuồng; 1/2 mụn dừa : 1/4 tro trấu : 1/4 phân chuồng và 1/2 mụn dừa : 1/4 tro trấu : 1/4 phân hữu cơ vi sinh), yếu tố H là 4 mức bón phân lân (0,3 g P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>/bầu; 0,6 g P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>/bầu; 0,9 g P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>/bầu và 1,2 g P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>/bầu). Thí nghiệm được bố trí theo kiểu hoàn

toàn ngẫu nhiên, có 12 nghiệm thức, 3 lần lặp lại. Mỗi ô cơ sở gồm 10 bầu, tổng số cây là 360 cây.

### **Đánh giá tính đồng nhất di truyền của cây con từ phôi vô tính**

Chọn ngẫu nhiên 4 cây đỉnh lăng lá nhỏ trong số 100 cây ở mỗi lần ra cây để thu được 20 cây từ 5 lần ra cây. Sử dụng mẫu DNA của 20 cây đỉnh lăng lá nhỏ tạo từ phôi sau khi đem trồng ngoài vườn ươm được 4 tháng ký hiệu N1 - N20 với chỉ thị ISSR để đánh giá di truyền. Các primer ISSR được sử dụng bao gồm UBC841, UBC844, UBC856.

### **2.2.5 Phương pháp xử lý số liệu**

Số liệu thí nghiệm được thu thập tổng hợp bằng phần mềm Microsoft Excel 2016 và xử lý thống kê theo phương pháp phân tích phương sai (ANOVA), kết quả phân hạng theo Duncan bằng chương trình SAS 9.1.

## **Chương 3**

### **KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN**

#### **3.1 Đánh giá hàm lượng axit oleanolic và xác định trình tự DNA barcode của các mẫu giống đỉnh lăng**

##### **3.1.1 Đánh giá hàm lượng axit oleanolic của 18 mẫu giống đỉnh lăng**

Kết quả phân tích cho thấy các mẫu đỉnh lăng có chứa hàm lượng axit oleanolic dao động từ 0,69 đến 1,18%. Nhóm đỉnh lăng lá to (D10 - D11) chứa hàm lượng axit oleanolic thấp nhất (0,69 - 0,78%) so với các nhóm mẫu đỉnh lăng khác; kế đến là nhóm đỉnh lăng lá răng (D13 - D14) chứa hàm lượng axit oleanolic dao động từ 0,87 đến 0,93%; nhóm đỉnh lăng lá tròn (D15 - D17) đạt 0,88 - 0,97%; nhóm đỉnh lăng lá đĩa (D12) đạt 1,01%; nhóm đỉnh lăng lá trở (D18) đạt 1,04%; và nhóm ĐLLN (D1 - D8) chứa hàm lượng axit oleanolic cao nhất so với các nhóm mẫu đỉnh lăng khác, dao động từ 1,07 đến 1,18%, trong đó Mẫu ĐLLN D7 có hàm lượng axit oleanolic cao nhất đạt 1,18%. Từ kết quả phân tích này, mẫu ĐLLN D7 được du nhập về Thủ Đức, TP Hồ Chí Minh (xuất xứ từ Thái Nguyên) được chọn làm vật liệu nghiên cứu nhân phôi vô tính.

### 3.1.2 Sự tương đồng và khác biệt trình tự nucleotide các vùng gen *matK*, *rbcL* và *trnH-psbA* của 8 mẫu giống ĐLLN

Ở vùng gen *matK* và *rbcL*, trình tự nucleotide hoàn toàn giống nhau 100%.

Kết quả so sánh bắt cặp cho thấy vùng *trnH-psbA* của 8 mẫu khác nhau ở 21 vị trí nucleotide. Trong đó, các vị trí 10, 20 và 31 cho thấy mẫu ĐLLN D7 có sự đặc trưng chứa Cytosine (C) khác biệt so với các mẫu khác.

**Bảng 3.1** Vị trí các nucleotide khác biệt trên vùng gen *trnH-psbA* của 8 mẫu giống ĐLLN

Mẫu đỉnh lăng	Vị trí vùng gen <i>trnH-psbA</i>		
	10	20	31
Đỉnh lăng lá nhỏ (D1)	A	T	C
Đỉnh lăng lá nhỏ (D2)	C	T	C
Đỉnh lăng lá nhỏ (D3)	A	C	C
Đỉnh lăng lá nhỏ (D4)	A	T	C
Đỉnh lăng lá nhỏ (D5)	A	T	G
Đỉnh lăng lá nhỏ (D6)	A	T	C
Đỉnh lăng lá nhỏ (D7)	C	C	C
Đỉnh lăng lá nhỏ (D8)	A	T	C

Nhìn chung vùng gen *trnH-psbA* có sự khác biệt nucleotide nhiều hơn so với hai vùng gen *matK* và *rbcL*.

Từ các kết quả trên, mẫu ĐLLN D7 phù hợp để lựa chọn thực hiện các nghiên cứu tạo mô sẹo và tạo phôi tiếp theo.

## 3.2 Cầm ứng tạo mô sẹo và tạo phôi vô tính cây ĐLLN

### 3.2.1 Ảnh hưởng của nồng độ 2,4-D đến sự cầm ứng tạo mô sẹo của mẫu phiến lá và cuống lá cây ĐLLN *in vitro*

Kết quả ở Bảng 3.2 cho thấy mẫu phiến lá nuôi cấy trên môi trường MS có bổ sung 2,4-D ở nồng độ 1 mg/L và 2 mg/L tạo mô sẹo sớm nhất vào thời điểm 21 NSC. Mẫu cuống lá phát sinh mô sẹo chậm hơn. Mẫu phiến lá hay mẫu cuống lá nuôi cấy trên môi trường MS không bổ sung 2,4-D không có biểu hiện hình thành mô sẹo. Ở nồng độ 1 - 2 mg/L 2,4-D không có sự khác biệt, tuy nhiên khi tăng lên 3 mg/L thì quá trình tạo mô sẹo bị ức chế.

**Bảng 3.2** Thời gian hình thành mô sẹo (NSC) và tỷ lệ tạo mô sẹo (%) của mẫu phiến lá và cuống lá cây ĐLLN *in vitro*

Chi tiêu theo dõi	Loại mẫu (A)	Nồng độ 2,4-D (mg/L) (B)				TB (A)
		0	1	2	3	
Thời gian hình thành mô sẹo (NSC)	Phiến lá	Không tạo mô sẹo	21	21	23	
	Cuống lá	Không tạo mô sẹo	23	22	24	
Tỷ lệ mẫu tạo mô sẹo (%)	Phiến lá	0,0 <sup>e</sup>	93,3 <sup>b</sup>	98,9 <sup>a</sup>	86,7 <sup>c</sup>	69,7 <sup>A</sup>
	Cuống lá	0,0 <sup>e</sup>	80,0 <sup>cd</sup>	97,8 <sup>a</sup>	74,4 <sup>d</sup>	63,1 <sup>B</sup>
	TB (B)	0,0 <sup>C</sup>	86,7 <sup>B</sup>	98,3 <sup>A</sup>	80,6 <sup>B</sup>	
CV = 6,7%; F <sub>A</sub> = 16,3 <sup>**</sup> ; F <sub>B</sub> = 613,8 <sup>**</sup> ; F <sub>A*B</sub> = 3,2 <sup>*</sup>						

Trong cùng một nhóm trung bình, các ký tự khác nhau theo sau các giá trị trung bình khác nhau thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê; \*: có ý nghĩa ở mức  $0,01 < P \leq 0,05$ ; \*\*: rất có ý nghĩa ở mức  $P \leq 0,01$  (Số liệu đã được chuyển đổi sang dạng  $\sqrt{x + 0,5}$  khi phân tích thống kê).

Tỷ lệ mẫu tạo mô sẹo ở mẫu phiến lá đạt 69,7% và có sự khác biệt rất có ý nghĩa so với mẫu cuống lá. Ảnh hưởng của 2,4-D đến tỷ lệ mẫu tạo mô sẹo cho thấy khi nuôi cấy mẫu phiến lá hay mẫu cuống lá thì ở nồng độ 2 mg/L cho tỷ lệ mẫu tạo mô sẹo cao nhất đạt 98,3% và khác biệt rất có ý nghĩa so với các nồng độ 2,4-D còn lại.

**Bảng 3.3** Đường kính mô sẹo và trọng lượng mẫu tươi của mẫu phiến lá và cuống lá cây ĐLLN *in vitro* thời điểm 60 NSC

Chi tiêu	Loại mẫu (A)	Nồng độ 2,4-D (mg/L) (B)				TB (A)
		0	1	2	3	
Đường kính (cm)	Phiến lá	0,0 <sup>c</sup>	1,3 <sup>a</sup>	1,4 <sup>a</sup>	1,1 <sup>a</sup>	0,9 <sup>A</sup>
	Cuống lá	0,0 <sup>c</sup>	0,7 <sup>b</sup>	0,7 <sup>b</sup>	0,6 <sup>b</sup>	0,5 <sup>B</sup>
	TB (B)	0,0 <sup>B</sup>	1,0 <sup>A</sup>	1,1 <sup>A</sup>	0,9 <sup>A</sup>	
CV = 5,3%; F <sub>A</sub> = 54,7 <sup>**</sup> ; F <sub>B</sub> = 112,1 <sup>**</sup> ; F <sub>A*B</sub> = 6,4 <sup>**</sup>						
Trọng lượng tươi (mg)	Phiến lá	30,0 <sup>e</sup>	88,3 <sup>a</sup>	95,3 <sup>a</sup>	60,0 <sup>b</sup>	68,4 <sup>A</sup>
	Cuống lá	37,0 <sup>de</sup>	46,7 <sup>cd</sup>	57,0 <sup>bc</sup>	45,3 <sup>cd</sup>	46,5 <sup>B</sup>
	TB (B)	33,5 <sup>C</sup>	67,5 <sup>A</sup>	76,2 <sup>A</sup>	52,7 <sup>B</sup>	
CV = 9,2%; F <sub>A</sub> = 103,7 <sup>**</sup> ; F <sub>B</sub> = 75,4 <sup>**</sup> ; F <sub>A*B</sub> = 27,7 <sup>**</sup>						

Trong cùng một nhóm trung bình, các ký tự khác nhau theo sau các giá trị trung bình khác nhau thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê; \*\*: rất có ý nghĩa ở mức  $P \leq 0,01$  (Số liệu đã được chuyển đổi sang dạng  $\sqrt{x + 0,5}$  khi phân tích thống kê)

Kết quả cho thấy đường kính trung bình của mô sẹo lớn hơn ở mẫu phiến lá đạt 0,9 cm và có sự khác biệt rất có ý nghĩa so với mẫu cuống lá. Mẫu phiến lá nuôi cấy trên môi trường MS có bổ sung 2,4-D ở các

nồng độ 1, 2 và 3 mg/L cho đường kính mô sẹo lớn nhất đạt lần lượt là 1,3; 1,4 và 1,1 cm; có sự khác biệt so với mẫu cuống lá.

Mẫu phiến lá từ cây *in vitro* nuôi cấy trên môi trường MS có bổ sung 2,4-D ở nồng độ 2 mg/L cho tỷ lệ tạo mô sẹo (98,9 %) tốt hơn mẫu phiến lá lấy từ cây ngoài vườn; có thể do cây *in vitro* với tế bào ở trạng thái sinh lý được “trẻ hóa” (juvenilization) nên đáp ứng tạo mô sẹo tốt hơn so với cây ngoài vườn ươm.

### 3.2.2 Ảnh hưởng của nồng độ BA và IBA đến tỷ lệ mẫu cấy tạo phôi vô tính ĐLLN từ mô sẹo

**Bảng 3.4** Ảnh hưởng của nồng độ BA và IBA đến tỷ lệ mẫu cấy tạo phôi vô tính (%) ĐLLN từ mô sẹo thời điểm 60 NSC

Nồng độ BA (mg/L) (A)	Nồng độ IBA (mg/L) (B)			
	0	0,1	0,5	TB (A)
0	10,0 <sup>f</sup>	36,7 <sup>e</sup>	43,3 <sup>de</sup>	30,0 <sup>C</sup>
0,5	46,7 <sup>c-e</sup>	50,0 <sup>b-e</sup>	53,3 <sup>b-e</sup>	50,0 <sup>B</sup>
1,0	56,7 <sup>b-d</sup>	63,3 <sup>a-c</sup>	63,3 <sup>a-c</sup>	61,1 <sup>AB</sup>
1,5	66,7 <sup>ab</sup>	76,7 <sup>a</sup>	66,7 <sup>ab</sup>	73,3 <sup>A</sup>
TB (B)	45,0 <sup>B</sup>	56,7 <sup>A</sup>	56,7 <sup>A</sup>	
CV = 12,3%; F <sub>A</sub> = 31,8 <sup>**</sup> ; F <sub>B</sub> = 7,3 <sup>**</sup> ; F <sub>A*B</sub> = 2,9 <sup>*</sup>				

*Trong cùng một nhóm trung bình, các ký tự khác nhau theo sau các giá trị trung bình khác nhau thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê; \*: có ý nghĩa ở mức 0,01 < P ≤ 0,05; \*\*: rất có ý nghĩa ở mức P ≤ 0,01 (Số liệu đã được chuyển đổi sang dạng arcsin √x khi phân tích thống kê).*

Tỷ lệ mẫu cấy tạo phôi cao nhất ở nồng độ BA 1,5 mg/L là 73,3 % và có sự khác biệt so với các nồng độ BA còn lại. Hai nồng độ IBA 0,1 mg/L và 0,5 mg/L cho tỷ lệ tạo phôi cao nhất đạt 56,7 %. Tổ hợp nồng độ BA 1,5 mg/L với IBA 0,1 mg/L cho tỷ lệ tạo phôi cao nhất đạt 76,7 % và có sự khác biệt rõ.

### 3.2.3 Ảnh hưởng của BA và IBA đến số phôi vô tính hình thành/mẫu cấy ĐLLN từ mô sẹo

Bảng 3.5 cho thấy có sự cảm ứng tạo phôi từ mô sẹo trên môi trường MS có bổ sung các chất điều hòa sinh trưởng BA và IBA. Sự tương tác giữa BA và IBA đến sự tạo phôi vô tính có sự khác biệt rõ.

Tại thời điểm 60 NSC, ở nồng độ BA 1,5 mg/L cho số lượng phôi hình thành cao nhất là 206 có sự khác biệt so với các nồng độ BA còn lại. IBA ở nồng độ 0,5 mg/L cho số lượng phôi hình thành cao nhất là 108 có sự khác biệt so với các nồng độ IBA còn lại. Ba tổ hợp nồng độ BA 1,5 mg/L với IBA 0 mg/L; BA 1,5 mg/L với IBA 0,1 mg/L và BA 1,5 mg/L với IBA 0,5 mg/L cùng cho số lượng phôi hình thành cao nhất đạt lần lượt là 183, 207 và 241 phôi có sự khác biệt rất có ý nghĩa so với tổ hợp các nồng độ BA còn lại.

**Bảng 3.5** Ảnh hưởng của nồng độ BA và IBA đến số phôi vô tính hình thành/mẫu cấy ĐLLN từ mô sẹo thời điểm 60 NSC

Nồng độ BA (mg/L) (A)	Nồng độ IBA (mg/L) (B)			
	0	0,1	0,5	TB (A)
0,0	2 <sup>c</sup>	5 <sup>e</sup>	18 <sup>d</sup>	8 <sup>D</sup>
0,5	42 <sup>c</sup>	56 <sup>c</sup>	48 <sup>c</sup>	49 <sup>C</sup>
1,0	64 <sup>bc</sup>	128 <sup>ab</sup>	125 <sup>ab</sup>	106 <sup>B</sup>
1,5	183 <sup>a</sup>	207 <sup>a</sup>	241 <sup>a</sup>	206 <sup>A</sup>
TB (B)	73 <sup>B</sup>	99 <sup>AB</sup>	108 <sup>A</sup>	

CV = 10,6%; F<sub>A</sub> = 138,0<sup>\*\*</sup>; F<sub>B</sub> = 10,5<sup>\*\*</sup>; F<sub>A\*B</sub> = 3,3<sup>\*</sup>

Trong cùng một nhóm trung bình, các ký tự khác nhau theo sau các giá trị trung bình khác nhau thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê; \*: có ý nghĩa ở mức  $0,01 < P \leq 0,05$ ; \*\*: rất có ý nghĩa ở mức  $P \leq 0,01$  (Số liệu đã được chuyển đổi sang dạng logarit khi phân tích thống kê)

### 3.2.4 Ảnh hưởng của nồng độ BA và NAA đến tỷ lệ tạo phôi vô tính ĐLLN từ mô sẹo

**Bảng 3.6** Ảnh hưởng của nồng độ BA và NAA đến tỷ lệ mẫu cấy tạo phôi vô tính (%) ĐLLN từ mô sẹo thời điểm 60 NSC

BA (mg/L)	Nồng độ NAA (mg/L)			
	0	0,1	0,5	TB
0	10,0 <sup>c</sup>	50,0 <sup>b</sup>	53,3 <sup>ab</sup>	37,8 <sup>C</sup>
0,5	53,3 <sup>ab</sup>	53,3 <sup>ab</sup>	56,7 <sup>ab</sup>	54,4 <sup>B</sup>
1,0	63,3 <sup>ab</sup>	66,7 <sup>ab</sup>	66,7 <sup>ab</sup>	65,6 <sup>AB</sup>
1,5	66,7 <sup>ab</sup>	80,0 <sup>a</sup>	70,0 <sup>ab</sup>	72,2 <sup>A</sup>
TB	48,3 <sup>B</sup>	62,5 <sup>A</sup>	61,7 <sup>A</sup>	

CV = 13,6%; F<sub>A</sub> = 17,9<sup>\*\*</sup>; F<sub>B</sub> = 7,4<sup>\*\*</sup>; F<sub>A\*B</sub> = 3,8<sup>\*\*</sup>

Trong cùng một nhóm trung bình, các ký tự khác nhau theo sau các giá trị trung bình khác nhau thể hiện sự khác biệt rất có ý nghĩa về mặt thống kê; \*\*: rất có ý nghĩa ở mức  $P \leq 0,01$  (Số liệu đã được chuyển đổi sang dạng arcsin  $\sqrt{x}$  khi phân tích thống kê).

Bảng 3.6 cho thấy tỷ lệ tạo phôi cao nhất ở nồng độ BA 1,5 mg/L đạt 72,2%. Khi xét đến ảnh hưởng của NAA, hai nồng độ NAA 0,1 mg/L và 0,5 mg/L đều cho tỷ lệ tạo phôi cao nhất đạt lần lượt là 62,5% và 61,7%. Tổ hợp nồng độ BA 1,5 mg/L với NAA 0,1 mg/L cho tỷ lệ tạo phôi cao nhất là 80,0%.

Cuối thời điểm nuôi cấy (60 NSC), tái sinh phôi ở tổ hợp BA với NAA tốt hơn ở tổ hợp BA với IBA ở cả hai chỉ tiêu số lượng phôi/mẫu và tỷ lệ mẫu cấy sinh phôi.

### 3.2.5 Ảnh hưởng của nồng độ BA và NAA đến số phôi vô tính hình thành/mẫu cấy ĐLLN từ mô sẹo

**Bảng 3.7** Ảnh hưởng của nồng độ BA và NAA đến số phôi vô tính hình thành/mẫu cấy ĐLLN từ mô sẹo thời điểm 60 NSC

Nồng độ BA (mg/L)	Nồng độ NAA (mg/L)			TB (A)
	0	0,1	0,5	
0	4 <sup>d</sup>	10 <sup>d</sup>	46 <sup>bc</sup>	20 <sup>C</sup>
0,5	47 <sup>bc</sup>	67 <sup>a-c</sup>	51 <sup>bc</sup>	55 <sup>B</sup>
1,0	82 <sup>a-c</sup>	99 <sup>a-c</sup>	93 <sup>a-c</sup>	92 <sup>AB</sup>
1,5	116 <sup>a-c</sup>	173 <sup>a</sup>	145 <sup>ab</sup>	144 <sup>A</sup>
TB (B)	62 <sup>B</sup>	87 <sup>A</sup>	84 <sup>A</sup>	
CV = 12,5%; F <sub>A</sub> = 47,1 <sup>**</sup> ; F <sub>B</sub> = 6,1 <sup>**</sup> ; F <sub>A*B</sub> = 4,3 <sup>**</sup>				

*Trong cùng một nhóm trung bình, các ký tự khác nhau theo sau các giá trị trung bình khác nhau thể hiện sự khác biệt rất có ý nghĩa về mặt thống kê; \*\*: rất có ý nghĩa ở mức  $P \leq 0,01$  (Số liệu đã được chuyển đổi sang dạng arcsin  $\sqrt{x}$  khi phân tích thống kê).*

Bảng 3.7 thể hiện kết quả về ảnh hưởng của BA và NAA đến quá trình tạo phôi vô tính từ mô sẹo có sự khác biệt rõ. Có sự tương tác giữa BA với NAA đến sự tạo phôi vô tính.

Tại thời điểm 60 NSC, ở nồng độ BA 1,5 mg/L cho số lượng phôi hình thành cao nhất đạt 144 phôi, có sự khác biệt so với các nồng độ BA còn lại trong thí nghiệm. NAA ở nồng độ 0,1 mg/L cho số lượng phôi hình thành cao nhất đạt 87 phôi và có sự khác biệt so với các nồng độ NAA còn lại. Tổ hợp nồng độ BA 1,5 mg/L với NAA 0,1 mg/L cho số lượng phôi hình thành cao nhất với số lượng là 173 phôi và có sự khác biệt rõ so với các nồng độ BA và NAA còn lại trong thí nghiệm.

### 3.2.6 Ảnh hưởng của loại và nồng độ đường khác nhau đến tỷ lệ mẫu cấy tạo phôi vô tính ĐLLN từ mô sẹo

Tại thời điểm 45 NSC, đường sucrose cho kết quả tốt nhất đạt 80,8% cao hơn đường glucose và đường maltose. Nồng độ đường, 40 g/L và 50 g/L cho kết quả về tỷ lệ tạo phôi tốt nhất lần lượt đạt 80,3% và 79,9%.

**Bảng 3.8** Ảnh hưởng của loại và nồng độ đường khác nhau đến tỷ lệ mẫu cấy (%) tạo phôi vô tính ĐLLN từ mô sẹo

Nồng độ đường (g/L)	Loại đường				TB (A)
	Su	Glu	Fru	Malt	
10	68,3 <sup>cd</sup>	63,2 <sup>d</sup>	68,3 <sup>cd</sup>	59,5 <sup>d</sup>	64,9 <sup>C</sup>
20	70,1 <sup>bc</sup>	68,3 <sup>cd</sup>	70,1 <sup>bc</sup>	68,3 <sup>cd</sup>	69,5 <sup>C</sup>
30	77,5 <sup>b</sup>	70,1 <sup>bc</sup>	77,5 <sup>b</sup>	70,1 <sup>bc</sup>	75,3 <sup>B</sup>
40	90,8 <sup>a</sup>	77,5 <sup>b</sup>	77,5 <sup>b</sup>	70,1 <sup>bc</sup>	80,3 <sup>A</sup>
50	89,6 <sup>a</sup>	77,5 <sup>b</sup>	77,5 <sup>b</sup>	70,1 <sup>bc</sup>	79,9 <sup>AB</sup>
TB (B)	80,8 <sup>A</sup>	72,2 <sup>BC</sup>	74,9 <sup>B</sup>	68,6 <sup>C</sup>	
CV = 8,0% F <sub>A</sub> = 20,8** F <sub>B</sub> = 26,3** F <sub>A*B</sub> = 2,3*					

Trong cùng một nhóm giá trị trung bình, các số có cùng ký tự đi kèm thể hiện sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê. ns: không khác biệt; \*: có ý nghĩa ở mức  $0,01 < P \leq 0,05$ ; \*\*: rất có ý nghĩa ở mức  $P \leq 0,01$  (Số liệu đã được chuyển đổi sang dạng arcsin  $\sqrt{x}$  khi phân tích thống kê).

### 3.2.7 Ảnh hưởng của loại và nồng độ đường khác nhau đến số phôi vô tính hình thành/mẫu cấy ĐLLN từ mô sẹo



**Hình 3.1** Một số dạng phôi vô tính phát triển khác nhau của cây ĐLLN



**Bảng 3.9** Ảnh hưởng của loại và nồng độ đường khác nhau đến số phôi vô tính hình thành/mẫu cây ĐLLN từ mô sẹo thời điểm 60 NSC

Hàm lượng đường (g/L)	Loại đường				TB (A)
	Su	Glu	Fru	Malt	
10	97,0 <sup>hi</sup>	88,3 <sup>ij</sup>	72,3 <sup>j</sup>	83,7 <sup>ij</sup>	85,3 <sup>D</sup>
20	136,3 <sup>c-f</sup>	117,0 <sup>fg</sup>	87,0 <sup>ij</sup>	96,7 <sup>hi</sup>	109,3 <sup>C</sup>
30	153,7 <sup>cd</sup>	143,0 <sup>b-d</sup>	112,3 <sup>gh</sup>	118,7 <sup>e-g</sup>	131,9 <sup>B</sup>
40	196,0 <sup>a</sup>	159,0 <sup>b</sup>	141,7 <sup>b-d</sup>	137,3 <sup>c-e</sup>	158,5 <sup>A</sup>
50	141,0 <sup>b-d</sup>	135,3 <sup>c-f</sup>	128,7 <sup>d-g</sup>	148,7 <sup>b-d</sup>	138,4 <sup>B</sup>
TB (B)	144,9 <sup>A</sup>	128,5 <sup>B</sup>	108,4 <sup>C</sup>	117,0 <sup>C</sup>	
CV = 6,6%; F <sub>A</sub> = 34,3 <sup>**</sup> ; F <sub>B</sub> = 139,2 <sup>**</sup> ; F <sub>A*B</sub> = 5,7 <sup>**</sup>					

*Trong cùng một nhóm giá trị trung bình, các số có cùng ký tự đi kèm thể hiện sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê. ns: không khác biệt; \*: có ý nghĩa ở mức  $0,01 < P \leq 0,05$ ; \*\*: rất có ý nghĩa ở mức  $P \leq 0,01$ .*

Tại thời điểm 60 NSC, đường sucrose cho kết quả tốt nhất đạt 144,9 phôi. Ở yếu tố nồng độ đường, 40 g/L cho kết quả tốt nhất đạt 158,5 phôi và thấp nhất ở nồng độ 10 g/L chỉ đạt 85,3 phôi. Sử dụng đường sucrose với nồng độ 40 g/L cho kết quả tốt nhất, thích hợp để nuôi cấy tăng số lượng phôi.

Kết quả nghiên cứu ở trường hợp ĐLLN cho thấy 40 g/L sucrose là nồng độ thích hợp đối với sự hình thành và phát triển phôi vô tính xét ở cả hai chỉ tiêu số phôi/mẫu và tỷ lệ mẫu tạo phôi. Glucose và fructose có tác động kém hơn.

### 3.3 Nhân phôi vô tính, tạo phôi trưởng thành và tạo cây từ phôi vô tính ĐLLN

#### 3.3.1 Ảnh hưởng của trọng lượng mô phôi nuôi cấy ban đầu và tốc độ lắc đến sự gia tăng sinh khối mô phôi vô tính trên hệ thống nuôi cấy lỏng lắc

Bảng 3.10 cho thấy khi nuôi phôi trên hệ thống nuôi cấy lỏng lắc, trọng lượng phôi nuôi cấy ban đầu ảnh hưởng đến sinh khối phôi tạo ra. Bên cạnh đó ảnh hưởng của tốc độ lắc đến khả năng tăng sinh phôi cũng rõ rệt.

Tại thời điểm 30 NSC, trọng lượng mô phôi nuôi cấy ban đầu 1 g đã làm gia tăng nhiều nhất và đạt 6,3 g; có sự khác biệt rõ so với trọng

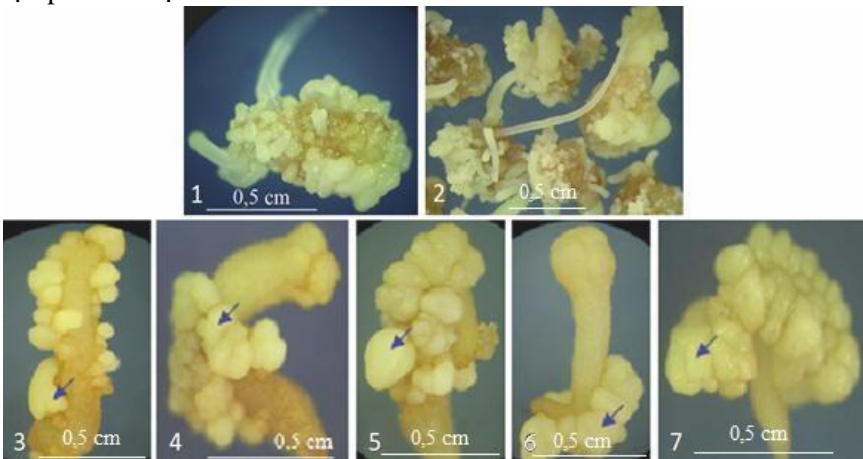
lượng mô phôi nuôi cấy là 0,5 g. Tốc độ lắc 100 vòng/ phút đã làm gia tăng trọng lượng nhiều nhất đạt 5,8 g có sự khác biệt so với các tốc độ lắc còn lại. Trọng lượng mô phôi nuôi cấy ban đầu 1 g và tốc độ lắc 100 vòng/ phút đã làm gia tăng trọng lượng nhiều nhất đạt 7,5 g.

**Bảng 3.10** Ảnh hưởng của trọng lượng mô phôi nuôi cấy ban đầu và tốc độ lắc đến sự gia tăng sinh khối của mô phôi vô tính ĐLLN (g) trên hệ thống nuôi cấy lỏng lắc

Trọng lượng mô phôi nuôi cấy ban đầu (g) (A)	Tốc độ lắc (vòng/ phút) (B)			
	80	100	120	TB (A)
0,5	2,5	4,1	3,5	3,3 <sup>B</sup>
1,0	5,2	7,5	6,2	6,3 <sup>A</sup>
TB (B)	3,8 <sup>C</sup>	5,8 <sup>A</sup>	4,9 <sup>B</sup>	
CV = 8,17%; F <sub>A</sub> = 258,7 <sup>**</sup> ; F <sub>B</sub> = 37,2 <sup>**</sup> ; F <sub>A*B</sub> = 1,7 <sup>ns</sup>				

*Trong cùng một nhóm giá trị trung bình, các số có cùng ký tự đi kèm thể hiện sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê. \*: có ý nghĩa ở mức  $0,01 < P \leq 0,05$ ; \*\*: rất có ý nghĩa ở mức  $P \leq 0,01$ ; ns: không có ý nghĩa thống kê.*

Quá trình nuôi lỏng lắc trong điều kiện thích hợp, phôi sơ cấp liên tục tạo phôi thứ cấp dẫn đến hình thành lượng lớn cụm phôi theo cơ chế tạo phôi bất định.



**Hình 3.2** Phôi vô tính nuôi cấy trên hệ thống lỏng lắc thời điểm 30 NSC

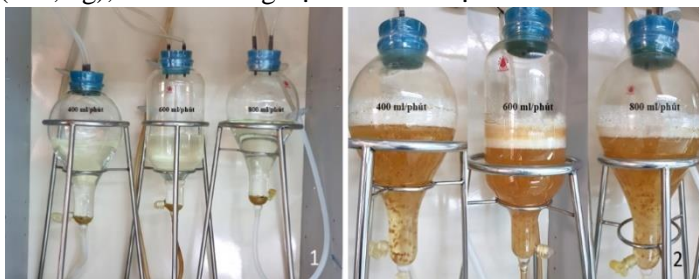
### 3.3.2 Ảnh hưởng của tốc độ sục khí đến sự gia tăng sinh khối phôi vô tính ĐLLN nhân nuôi bằng bioreactor

**Bảng 3.11** Ảnh hưởng của tốc độ sục khí đến sự gia tăng sinh khối (g) và hệ số nhân sinh khối phôi vô tính ĐLLN (lần) thời điểm 30 NSC

Tốc độ sục khí (mL/phút)	400	600	800
Sinh khối phôi sau nuôi cấy (g)	196,7 <sup>b</sup>	214,6 <sup>a</sup>	191,5 <sup>b</sup>
Hệ số nhân sinh khối phôi (lần)	21,0 <sup>b</sup>	22,9 <sup>a</sup>	20,4 <sup>b</sup>
CV = 3,9%    F = 7,3*			

*Trong cùng một hàng, những giá trị theo sau có cùng ký tự khác biệt không có ý nghĩa trong thống kê; \*: có ý nghĩa ở mức  $0,01 < P \leq 0,05$*

Ở thời điểm 30 NSC, các bioreactor chứa nhiều bọt khí nên thí nghiệm thu chỉ tiêu một lần và dừng lại. Kết quả ở thời điểm này cho thấy tốc độ sục khí 600 mL/ phút cho trọng lượng tươi của phôi cao nhất (214,6 g), so với các nghiệm thức còn lại.



**Hình 3.3** Nuôi nhân phôi vô tính ĐLLN bằng hệ thống bioreactor sục khí

Kết quả nghiên cứu nhân phôi thành công bằng phương pháp nuôi lỏng lắc và bằng bioreactor cho hệ số gia tăng cao.

### 3.3.3 Ảnh hưởng của nồng độ kinetin và IBA đến khả năng tạo phôi vô tính ĐLLN trưởng thành

Quá trình nuôi cụm phôi lỏng lắc và bằng bioreactor đã thu được lượng rất lớn phôi ở dạng cụm, các phôi trên cụm do ở giai đoạn chưa trưởng thành nên có kích thước nhỏ (~ 3 - 6 mm). Cũng ghi nhận được trường hợp phôi đơn treo vào môi trường tuy không nhiều, theo nghiên cứu do các phôi này đã đến giai đoạn có cấu trúc khá hoàn chỉnh và cũng do tác động cơ học của quá trình lắc hoặc sục khí.

Kinetin ở nồng độ 1,5 mg/L cho số phôi hữu hiệu thấp nhất chỉ đạt 66,5 phôi, trong khi ở các nồng độ khác đều đạt trên 70 phôi. Khi không bổ sung IBA thì số phôi hữu hiệu thấp nhất chỉ đạt 63,2 phôi. Khi kết hợp kinetin với IBA, cho thấy IBA 0,2 mg/L và kinetin 0,5 mg/L cho số phôi cao nhất đạt 93,3 phôi, khác biệt rất rõ so với các nghiệm thức còn lại.

**Bảng 3.12** Ảnh hưởng của nồng độ kinetin và IBA đến số phôi hữu hiệu, phôi vô hiệu và tỷ lệ phôi hữu hiệu (%) thời điểm 30 NSC

Chỉ tiêu	KIN (mg/L)	IBA (mg/L)			TB (KIN)
		0	0,1	0,2	
Số phôi hữu hiệu	0	73,3 <sup>bc</sup>	81,7 <sup>b</sup>	76,0 <sup>bc</sup>	77,0 <sup>A</sup>
	0,5	61,3 <sup>d</sup>	73,0 <sup>bc</sup>	93,3 <sup>a</sup>	75,9 <sup>A</sup>
	1,0	62,7 <sup>d</sup>	79,0 <sup>bc</sup>	75,7 <sup>bc</sup>	72,4 <sup>A</sup>
	1,5	55,3 <sup>d</sup>	71,7 <sup>c</sup>	72,7 <sup>bc</sup>	66,6 <sup>B</sup>
	TB (IBA)	63,2 <sup>B</sup>	76,3 <sup>A</sup>	79,4 <sup>A</sup>	
CV (%) = 5,0%		$F_A = 14,7^{**}$	$F_B = 66,2^{**}$	$F_{A*B} = 11,2^{**}$	
Số phôi vô hiệu	0	41,7 <sup>a</sup>	41,3 <sup>a</sup>	39,0 <sup>ab</sup>	40,7 <sup>A</sup>
	0,5	31,7 <sup>d</sup>	40,3 <sup>ab</sup>	36,7 <sup>bc</sup>	36,2 <sup>B</sup>
	1,0	29,7 <sup>de</sup>	38,0 <sup>ab</sup>	36,7 <sup>bc</sup>	34,8 <sup>B</sup>
	1,5	27,0 <sup>e</sup>	33,7 <sup>cd</sup>	32,7 <sup>cd</sup>	31,1 <sup>C</sup>
	TB (IBA)	32,5 <sup>C</sup>	38,3 <sup>A</sup>	36,3 <sup>B</sup>	
CV (%) = 4,7%		$F_A = 48,2^{**}$	$F_B = 36,0^{**}$	$F_{A*B} = 6,5^{**}$	
Tỷ lệ phôi hữu hiệu (%)	0	63,7 <sup>d</sup>	66,4 <sup>b-d</sup>	66,1 <sup>b-d</sup>	65,4 <sup>B</sup>
	0,5	65,9 <sup>b-d</sup>	64,4 <sup>cd</sup>	71,8 <sup>a</sup>	67,4 <sup>A</sup>
	1,0	67,9 <sup>bc</sup>	67,5 <sup>b-d</sup>	67,4 <sup>b-d</sup>	67,6 <sup>A</sup>
	1,5	67,2 <sup>b-d</sup>	68,0 <sup>bc</sup>	69,1 <sup>ab</sup>	68,1 <sup>A</sup>
	TB (IBA)	66,2 <sup>B</sup>	66,6 <sup>B</sup>	68,6 <sup>A</sup>	
CV (%) = 2,2%		$F_A = 5,7^{**}$	$F_B = 9,0^{**}$	$F_{A*B} = 5,4^{**}$	

*Trong cùng một nhóm giá trị trung bình, những giá trị theo sau có cùng ký tự sự khác biệt có ý nghĩa trong thống kê; \*\*: rất có ý nghĩa ở mức  $P \leq 0,01$ ; ns: không có ý nghĩa thống kê.*

Về tỷ lệ phôi hữu hiệu ở thời điểm 30 NSC, khi kết hợp IBA 0,2 mg/L và kinetin 0,5 mg/L cho kết quả cao nhất đạt 71,8%, khác biệt rất có ý nghĩa so với các nghiệm thức còn lại.

Phôi hữu hiệu phát triển thành cây sau ~ 84 ngày nuôi cấy; tỷ lệ phôi hữu hiệu tạo chồi và sau đó phát triển thành cây đạt 98%.

Bioreactor sục khí đã được sử dụng để nuôi cấy phôi. Kết quả theo dõi 216 phôi từ bioreactor thì có tới 192 là phôi hữu hiệu, chiếm tỷ lệ

~89% - cao hơn so với nuôi cấy lỏng lác (~ 72%), có thể là do trong điều kiện có sục khí tốt nên phôi phát triển theo hướng tích cực hơn kiểu hình bình thường.

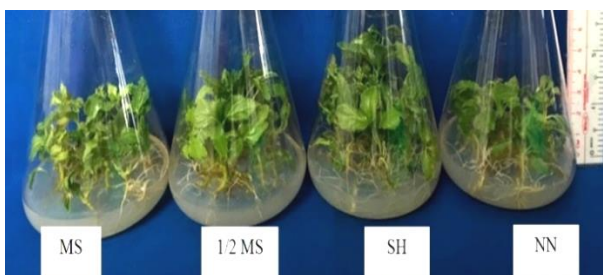
### 3.3.4 Ảnh hưởng của 4 môi trường khoáng đến sinh trưởng của phôi vô tính ĐLLN

Từ kết quả Bảng 3.13 cho thấy, số lá ở 21 NSC không có sự khác biệt giữa các môi trường nuôi cấy. Ở giai đoạn này, mẫu cây chỉ vừa bắt đầu ra lá mới, vì vậy ảnh hưởng của các loại môi trường đến sự ra lá của cây không rõ.

**Bảng 3.13** Ảnh hưởng của 4 môi trường khoáng đến chiều cao của cây ĐLLN (cm) từ phôi vô tính thời điểm 21 - 84 NSC

Môi trường nuôi cấy	Thời điểm theo dõi			
	21 NSC	42 NSC	63 NSC	84 NSC
MS	1,2	1,4	1,6	2,1 <sup>b</sup>
1/2 MS	1,2	1,5	1,7	2,3 <sup>ab</sup>
SH	1,4	1,7	1,9	2,5 <sup>a</sup>
Nitsch & Nitsch	1,4	1,5	1,6	2,0 <sup>b</sup>
CV (%)	13,8	11,4	11,4	7,6
F	1,4 <sup>ns</sup>	1,3 <sup>ns</sup>	2,2 <sup>ns</sup>	5,5 <sup>*</sup>

*Trong cùng một cột, những giá trị theo sau có cùng ký tự sự khác biệt có ý nghĩa trong thống kê; ns: không có ý nghĩa; \*: có ý nghĩa ở mức  $0,01 < P \leq 0,05$ .*



**Hình 3.4** Cây ĐLLN nuôi cấy trên 4 loại môi trường khoáng khác nhau thời điểm 84 NSC.

### 3.3.5 Ảnh hưởng của 4 môi trường khoáng đến trọng lượng tươi và trọng lượng khô của cây ĐLLN từ phôi vô tính

Kết quả Bảng 3.14 cho thấy trọng lượng tươi và khô của cây được nuôi cấy trên môi trường SH cho kết quả cao nhất lần lượt là 5,9 g và 0,3 g.

**Bảng 3.14** Ảnh hưởng của 4 môi trường khoáng đến trọng lượng tươi (g/cây) và trọng lượng khô (g/cây) của cây ĐLLN từ phôi vô tính thời điểm 84 NSC

Môi trường nuôi cây	Trọng lượng tươi (g)	Trọng lượng khô (g)
MS	4,5 <sup>b</sup>	0,3 <sup>b</sup>
1/2 MS	4,8 <sup>ab</sup>	0,3 <sup>b</sup>
SH	5,9 <sup>a</sup>	0,3 <sup>a</sup>
Nitsch & Nitsch	4,2 <sup>b</sup>	0,2 <sup>b</sup>
CV (%)	13,2	13,2
F	4,2*	6,3*

Trong cùng cột, các số có cùng ký tự đi kèm thể hiện sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê. \*: có ý nghĩa ở mức  $0,01 < P \leq 0,05$ .

Qua các kết quả trên cho thấy môi trường SH là môi trường thích hợp nhất cho sự phát triển tạo cây từ phôi ở giai đoạn đầu. Kết quả nghiên cứu tạo cây từ phôi ở ĐLLN cho thấy chồi sinh trưởng tốt nhất ở môi trường SH và thấp nhất ở môi trường Nitsch & Nitsch, nguyên nhân có thể do cây ĐLLN thích hợp với môi trường có tổng lượng khoáng ở mức trung bình (môi trường SH) ~ 3.183 mg/L.

### 3.4 Khảo sát sự sinh trưởng ở giai đoạn vườn ươm của dòng ĐLLN đã được nuôi cấy và đánh giá độ đồng nhất di truyền cây con

#### 3.4.1 Ảnh hưởng của giá thể và liều lượng đạm đến chiều cao và chiều dài rễ của cây ĐLLN trong vườn ươm

**Bảng 3.15** Ảnh hưởng của giá thể và liều lượng đạm đến chiều cao cây ĐLLN (cm) trong vườn ươm

Giá thể (C)	Liều lượng đạm (g/bầu) (D)				TB (C)
	0,3	0,6	0,9	1,2	
1/3 MD : 1/3 Đ : 1/3 PC	10,7 <sup>cde</sup>	11,4 <sup>b</sup>	10,5 <sup>de</sup>	11,3 <sup>bc</sup>	10,9
1/2 MD : 1/4 TT : 1/4 PC	10,9 <sup>bcd</sup>	10,9 <sup>b-e</sup>	11,4 <sup>b</sup>	10,9 <sup>bcd</sup>	11,0
1/2 MD : 1/4 TT : 1/4 PVS	10,6 <sup>de</sup>	12,3 <sup>a</sup>	11,1 <sup>bcd</sup>	10,2 <sup>e</sup>	11,1
TB (D)	10,7 <sup>B</sup>	11,5 <sup>A</sup>	10,9 <sup>B</sup>	10,8 <sup>B</sup>	
CV (%) = 2,3	F <sub>C</sub> = 0,4 <sup>ns</sup>	F <sub>D</sub> = 17,8 <sup>**</sup>	F <sub>C*D</sub> = 16,7 <sup>**</sup>		

Trong cùng một nhóm trung bình những giá trị có cùng ký tự theo sau khác biệt không có ý nghĩa thống kê; \*\*: rất có ý nghĩa ở mức  $P \leq 0,01$ ; ns: không có ý nghĩa thống kê.

Bảng 3.15 cho thấy cây định lãng từ phôi được trồng trên 3 loại giá thể trong thí nghiệm có chiều cao cây khác biệt không có ý nghĩa trong

suốt thời gian thí nghiệm, chiều cao cây dao động từ 10,9 đến 11,1 cm ở 70 NST. Trong khi đó, liều lượng bón phân đạm chỉ thể hiện rõ trên chiều cao cây ở 50 và 70 NST. Bón 0,6 g N/bầu làm tăng chiều cao cây đạt 9,4 cm ở 50 NST và 11,5 cm ở 70 NST, khác biệt rất có ý nghĩa so với chiều cao cây đỉnh lãng được bón ở các liều lượng phân đạm khác. Tương tự, trồng cây đỉnh lãng trên giá thể 1/2 mụn dừa : 1/4 tro trấu : 1/4 phân hữu cơ vi sinh kết hợp bón 0,6 g N/bầu cho cây cao nhất đạt 10,14 cm ở 50 NST và 12,3 cm ở 70 NST, khác biệt rất có ý nghĩa so với chiều cao cây đỉnh lãng được trồng ở 3 loại giá thể kết hợp bón những liều lượng đạm khác trong thí nghiệm. Như vậy cây đỉnh lãng được trồng trên giá thể 1/2 mụn dừa : 1/4 tro trấu : 1/4 phân hữu cơ vi sinh kết hợp với bón phân đạm 0,6 g N/bầu cho chiều cao nhất ở tất cả các thời điểm.



**Hình 3.5** Ảnh hưởng của giá thể và liều lượng đạm đến cây ĐLLN thời điểm 70 NST.

Bảng 3.16 cho thấy chiều cao cây đỉnh lãng được trồng trên các giá thể khác nhau khác biệt không có ý nghĩa, dao động từ 13,8 đến 15,3 cm. Tương tự, sự tương tác giữa giá thể trồng và liều lượng đạm bón ảnh hưởng đến chiều dài rễ cây đỉnh lãng cũng khác biệt không có ý

nghĩa giữa các nghiệm thức khác. Ngược lại, chiều dài rễ cây đỉnh lãng khi được bón 0,6 g N/bầu đạt cao nhất là 16,6 cm, khác biệt rất có ý nghĩa so với các nghiệm thức bón phân đậm khác.

**Bảng 3.16** Ảnh hưởng của giá thể và liều lượng đạm đến chiều dài rễ (cm) của cây ĐLLN trong vườn ươm thời điểm 70 NST

Giá thể (C)	Liều lượng phân đạm (g/bầu) (D)				TB (C)
	0,3	0,6	0,9	1,2	
1/3 MD : 1/3 Đ : 1/3 PC	13,5	14,0	14,0	13,7	13,8
1/2 MD : 1/4 TT : 1/4 PC	12,8	16,3	16,2	13,2	14,6
1/2 MD : 1/4 TT : 1/4 PVS	15,2	19,6	14,2	12,1	15,3
TB (D)	13,8 <sup>B</sup>	16,6 <sup>A</sup>	14,8 <sup>AB</sup>	13,0 <sup>B</sup>	
CV (%) = 16,7	F <sub>C</sub> = 1,1 <sup>ns</sup>		F <sub>D</sub> = 3,7 <sup>**</sup>		F <sub>C*D</sub> = 1,6 <sup>ns</sup>

Trong cùng một nhóm trung bình những giá trị có cùng ký tự theo sau khác biệt không có ý nghĩa thống kê; \*: có ý nghĩa ở mức  $0,01 < P \leq 0,05$ ; \*\*: rất có ý nghĩa ở mức  $P \leq 0,01$ ; ns: không có ý nghĩa thống kê.

### 3.4.2 Ảnh hưởng của giá thể và liều lượng đạm đến tỷ lệ xuất vườn của cây ĐLLN trong vườn ươm

**Bảng 3.17** Ảnh hưởng của giá thể và liều lượng đạm đến tỷ lệ xuất vườn (%) của cây ĐLLN trong vườn ươm thời điểm 70 NST

Giá thể (C)	Liều lượng phân đạm (g/bầu) (D)				TB (C)
	0,3	0,6	0,9	1,2	
1/3 MD : 1/3 Đ : 1/3 PC	55,6	70,4	81,5	63,0	67,6 <sup>B</sup>
1/2 MD : 1/4 TT : 1/4 PC	63,0	81,5	88,9	66,7	75,0 <sup>A</sup>
1/2 MD : 1/4 TT : 1/4 PVS	70,4	92,6	85,2	66,7	78,7 <sup>A</sup>
TB (D)	63,0 <sup>B</sup>	81,5 <sup>A</sup>	85,2 <sup>A</sup>	65,4 <sup>B</sup>	
CV (%) = 8,3	F <sub>C</sub> = 10,2 <sup>**</sup>		F <sub>D</sub> = 29,9 <sup>**</sup>		F <sub>C*D</sub> = 1,8 <sup>ns</sup>

Trong cùng một nhóm trung bình những giá trị có cùng ký tự theo sau khác biệt không có ý nghĩa thống kê; \*\*: rất có ý nghĩa ở mức  $P \leq 0,01$ ; ns: không có ý nghĩa thống kê.

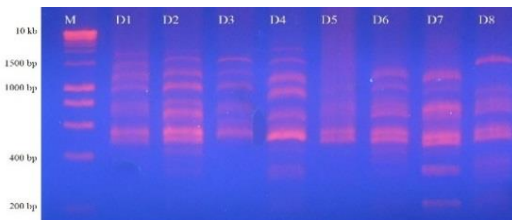
Bảng 3.17 cho thấy cây đỉnh lãng từ phối được trồng trên giá thể 1/2 mụn dừa : 1/4 tro trấu : 1/4 phân chuồng hay 1/2 mụn dừa : 1/4 tro trấu : 1/4 phân hữu cơ vi sinh đều cho tỷ lệ xuất vườn cao nhất dao động từ 75,0 đến 78,7 %. Riêng các nghiệm thức bón phân đậm với liều lượng 0,6 - 0,9 g N/bầu cho tỷ lệ xuất vườn cao nhất đạt 81,5 - 85,2%. Cây đỉnh lãng trồng trên giá thể 1/2 mụn dừa ; 1/4 tro trấu : 1/4 phân hữu cơ vi sinh kết hợp với bón 0,6 g N/bầu cho tỷ lệ xuất vườn cao nhất là 92,6 %.

Nghiên cứu về lân cũng cho kết quả tương tự như đối với đạm.



### 3.4.3 Đánh giá độ đồng nhất di truyền cây con bằng chỉ thị ISSR

Để chọn lựa primer dùng đánh giá tính đồng nhất di truyền của cây con, 12 primer ISSR được sử dụng khuếch đại DNA của 8 mẫu giống ĐLLN bằng kỹ thuật PCR. Tất cả các primer đều cho sản phẩm khuếch đại, các sản phẩm có kích thước nằm trong khoảng 200 - 3000 bp (Hình 3.6). Số băng tạo thành từ 6 - 12 cho mỗi primer, số băng đa hình dao động từ 2 đến 12.



**Hình 3.6** Sản phẩm PCR của primer UBC841 khuếch đại từ các mẫu lá ĐLLN D1 - D8, M: thang DNA 1 kb.

### Đánh giá tính đồng nhất di truyền của các mẫu cây từ phôi vô tính

Để đánh giá tính đồng nhất di truyền của cây con tạo thành từ phôi vô tính, DNA từ 20 mẫu cây con được tách chiết và thực hiện phản ứng PCR với 3 primer. Các sản phẩm khuếch đại tạo ra từ cây con hoàn toàn đồng hình với các sản phẩm khuếch đại từ mẫu giống ĐLLN D7 sử dụng tạo phôi, chứng tỏ các cây con tạo ra từ phôi vô tính vẫn ổn định, đồng nhất di truyền với nhau và đồng nhất hoàn toàn với cây mẹ ban đầu.

## KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

### Kết luận

Dòng ĐLLN D7 có hàm lượng axit oleanolic cao nhất (1,18%) thông qua phân tích HPLC được chọn làm vật liệu tạo phôi. Dòng D7 thể hiện sự khác biệt về mặt di truyền rõ nhất đối với các mẫu giống còn lại ở vùng *trnH-psbA*.

Mẫu phiến lá cây ĐLLN *in vitro* cho kết quả tạo mô sẹo tốt nhất, đặc biệt trên môi trường đặc MS có bổ sung 2,4-D 2 mg/L. Mô sẹo được

tiếp tục nuôi cấy trên môi trường MS có bổ sung BA 1,5 mg/L, NAA 0,1 mg/L và sucrose 40 g/L đã cho kết quả hình thành phôi tốt nhất.

Đã thực hiện thành công nghiên cứu nhân sinh khối phôi vô tính bằng phương pháp nuôi cấy lỏng lác và bằng hệ thống bioreactor sục khí dùng môi trường 1/2 MS có bổ sung sucrose 15 g/L, adenine sulfate 10 mg/L, kinetin 0,5 mg/L, IBA 0,2 mg/L; phôi trưởng thành chuyển vào môi trường SH đều tạo được cây hoàn chỉnh. Kết quả trên tạo cơ sở cho nhân giống quy mô lớn ĐLLN.

Cây đỉnh lãng lá nhỏ hình thành từ phôi vô tính sau khi lấy từ bình cấy mô được trồng trên giá thể 100 % cát kết hợp che sáng trong 7 ngày đầu tiên sinh trưởng tốt và cho tỷ lệ sống cao nhất; cây con sau khi thuần dưỡng được chuyển ra bầu phát triển tốt trên giá thể 1/2 mụn dừa : 1/4 tro trấu : 1/4 phân hữu cơ vi sinh có bổ sung 0,6 g N/bầu hoặc 0,6 g P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>/bầu kết hợp với 0,3 g K<sub>2</sub>O/bầu, tỷ lệ xuất vườn đạt trên 90%.

Đã xây dựng được quy trình nhân giống hoàn chỉnh đối với dòng ĐLLN D7 bằng phương pháp nuôi cấy tạo phôi vô tính.

Kết quả sử dụng chỉ thị ISSR cho thấy cây tạo thành từ phôi vô tính đồng nhất về mặt di truyền và hoàn toàn giống với cây mẹ.

### **Đề nghị**

Tiếp tục trồng và đánh giá chất lượng cây ở giai đoạn thu hoạch.

Có thể áp dụng kỹ thuật nhân giống phôi vô tính *in vitro* cây ĐLLN để tạo ra một quần thể cây đồng nhất.

Nghiên cứu sử dụng thêm một số loại giá thể và phân bón khác nhằm giúp cây con từ cấy mô sinh trưởng khỏe mạnh trong giai đoạn vườn ươm.

## DANH MỤC CÔNG TRÌNH CỦA TÁC GIẢ

1. Trịnh Việt Nga, Nguyễn Đức Minh Hùng, Phạm Thị Minh Tâm, Bùi Minh Trí, Ngô Thị Anh Khôi, Nguyễn Hữu Hồ, 2017. Ảnh hưởng của nồng độ BA, IBA và NAA đến sự cảm ứng tạo phôi vô tính ở cây đinh lăng lá nhỏ (*Polyscias fruticosa* (L.) Harms). *Kỷ yếu Hội nghị sinh lý thực vật lần thứ hai* (ISBN 978-604-60-2664-8). Trang 226-234.
2. Trịnh Việt Nga, Nguyễn Đức Minh Hùng, Bùi Minh Trí, Ngô Thị Anh Khôi, Triệu Thị Bích, Phạm Thị Minh Tâm, Nguyễn Hữu Hồ, 2019. Nuôi nhân *in vitro* phôi vô tính cây đinh lăng lá nhỏ (*Polyscias fruticosa* (L.) Harms) trên hệ thống nuôi cấy lỏng lác. *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển nông thôn* (ISSN 1859-4581). Số 05/2019. Trang 25-34.
3. Trịnh Việt Nga, Nguyễn Cao Kiệt, Bùi Minh Trí, Phạm Thị Minh Tâm, Nguyễn Hữu Hồ, Huỳnh Văn Biết, 2019. Phân tích trình tự DNA barcode của một số mẫu đinh lăng được thu thập tại Việt Nam. *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển nông thôn* (ISSN 1859-4581). Số 14/2019. Trang 25-34.
4. Trịnh Việt Nga, Nguyễn Cao Kiệt, Bùi Minh Trí, Phạm Thị Minh Tâm, Nguyễn Hữu Hồ, Huỳnh Văn Biết, 2020. Đánh giá hàm lượng axit oleanolic và đa dạng di truyền nguồn gen đinh lăng lá nhỏ (*Polyscias fruticosa* (L.) Harms) thu thập tại Việt Nam. *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển nông thôn* (ISSN 1859-4581). Số 10/2020.