

# NHÂN GIỐNG CÂY GIẢO CỔ LAM (*Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.) Makino) BẰNG NUÔI CÂY CALLUS

## *In vitro* propagation of *Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.) Makino via callus induction

Hoàng Tấn Quảng<sup>1\*</sup>, Lê Phổ Quỳnh Như<sup>2</sup>, Nguyễn Minh Trí<sup>1</sup>, Lê Thị Tuyết Nhân<sup>1</sup>, Lê Như Cường<sup>2</sup>,  
Trương Thị Hồng Hải<sup>1</sup>, Đặng Ngọc Sáng<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Viện Công nghệ sinh học, Đại học Huế, Tinh lộ 10, Phú Thượng, Phú Vang, Thừa Thiên Huế, Việt Nam

<sup>2</sup> Trường đại học Nông Lâm, Đại học Huế, 102 Phùng Hưng, tp. Huế, Việt Nam

<sup>3</sup> Trường THPT Chuyên Võ Nguyên Giáp, Tiểu khu 10, Nam Lý, Đồng Hới, Quảng Bình, Việt Nam

\* Tác giả liên hệ Hoàng Tấn Quảng (Thư điện tử: htquang@hueuni.edu.vn)  
(Ngày nhận bài (received): 30–8–2019; Ngày chấp nhận đăng (accepted): 16–10–2019)

**Tóm tắt.** Giảo cổ lam (*Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.) Makino) từ lâu đã được sử dụng làm thuốc dân gian cũng như được dùng để chế biến thành trà ở các nước châu Á. Đây là cây thân thảo lâu năm thuộc họ bầu bí chứa saponin, flavonoid, polysaccharide, vitamin và các amino acid. Trong nghiên cứu này, nhân giống *in vitro* loài cây này thông qua giai đoạn callus đã được thực hiện. Kết quả cho thấy môi trường cảm ứng sinh callus hiệu quả nhất đối với mẫu lá là MS cơ bản có bổ sung 1,5 mg/L NAA (naphthaleneacetic acid), đối với mẫu cuống lá là 0,2 mg/L 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid), tỷ lệ mẫu có cảm ứng tạo callus tương ứng là 100% và 97,8%. Môi trường tái sinh chồi từ callus cho hiệu quả cao nhất là MS cơ bản có bổ sung 2,0 mg/L BAP (6-Benzylaminopurine) và 0,2 mg/L NAA, tỷ lệ tái sinh chồi đạt 55,6%. Môi trường MS cơ bản bổ sung 1,0 mg/L BAP cho hiệu quả nhân chồi cao nhất đối với chồi đỉnh (6,17 chồi/mẫu) trong khi bổ sung 0,3 mg/L BAP cho hiệu quả cao nhất đối với chồi bên (7,72 chồi/mẫu). Môi trường tạo rễ tốt nhất đối với cây Giảo cổ lam là MS bổ sung 0,5 mg/L NAA với số lượng rễ là 7,22 rễ/chồi.

**Từ khóa:** callus, chất điều hòa sinh trưởng, giảo cổ lam, *Gynostemma pentaphyllum*, nhân giống *in vitro*

**Abstract.** *Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.) Makino (Jiaogulan) has long been used as folk medicine and tea in Asia. *G. pentaphyllum* is a perennial creeping herb belonging to the *Cucurbitaceae* family. It contains saponins, flavonoids, polysaccharides, vitamins, and amino acids. In this study, the *in vitro* propagation capacity of this species via callus induction was investigated. The results show that suitable media for callus induction are basal MS with 1.5 mg/L NAA (naphthaleneacetic acid) (for leaf) and 0.2 mg/L 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid) (for petiole), and the ratio of callus induction was 100% and 97.8%, respectively. Shoots grow from callus on the MS medium with 2.0 mg/L BAP (6-Benzylaminopurine) and 0.2 mg/L NAA at a rate of 55.6%. MS medium containing 1.0 mg/L BAP has the highest shoot multiplication efficiency for apical buds (6.17 shoots/sample) while MS with 0.3 mg/L BAP has the highest efficiency for lateral buds (7.72 shoots/sample). The MS medium with 0.5 mg/L NAA is suitable for rooting at a rate of 7.22 roots/shoot.

**Keywords:** callus, *Gynostemma pentaphyllum*, *in vitro* propagation, jiaogulan, plant growth regulator

## 1 Đặt vấn đề

Giáo cổ lam còn được gọi là cỏ trường sinh, cỏ thần kỳ, nhân sâm phương nam hay ngũ diệp sâm, có tên khoa học là *Gynostemma pentaphyllum* thuộc họ Bầu bí (*Cucurbitaceae*). Cây mọc ở độ cao 200–2.000 m, trong các rừng thưa và ẩm ở Trung Quốc, Nhật Bản, Ấn Độ, Indonesia, Triều Tiên và một số nước châu Á khác trong đó có Việt Nam [1]. Tại Việt Nam, giáo cổ lam phân bố khắp các vùng núi thuộc miền Bắc và miền Trung, chủ yếu ở các vùng có núi đá vôi. Cây mọc nhiều trong rừng, rừng thưa, lùm bụi từ vùng đồng bằng đến độ cao 2.000 m như ở Lào Cai, Lạng Sơn, Cao Bằng, Hòa Bình và Bắc Kạn [2].

Trong Giáo cổ lam có hơn 100 loại saponin, trong đó có nhiều loại saponin giống với saponin nhân sâm và tam thất. Ngoài ra, Giáo cổ lam còn chứa flavonoid, một chất có tác dụng sinh học tốt và chống lão hóa mạnh. Số saponin trong Giáo cổ lam nhiều gấp 3–4 lần so với trong nhân sâm. Trong đó, một số có cấu trúc hóa học giống như cấu trúc có trong nhân sâm (gisenoside) [3].

Với các tác dụng như trên nên hiện nay Giáo cổ lam được sử dụng làm nguyên liệu cho các sản phẩm thuốc, trà và thực phẩm chức năng, do đó nguồn Giáo cổ lam trong tự nhiên đã và đang bị khai thác quá mức dẫn đến khan hiếm [4]. Theo sách đỏ Việt Nam năm 2007, Giáo cổ lam được xếp vào nhóm nguy cấp (EN A1a, c, d).

Vì vậy, việc nghiên cứu nhân giống cây Giáo cổ lam phục vụ cho sản xuất là rất cần thiết. Nhân giống Giáo cổ lam có thể được tiến hành thông qua đoạn thân hay hạt. Tuy nhiên, tạo ra một lượng giống lớn, đồng đều và sạch bệnh trong thời gian ngắn để phục vụ cho sản xuất và bảo tồn thì nuôi cấy mô tế bào là phương pháp có nhiều lợi thế. Hiện nay, một số nghiên cứu về nhân giống *in vitro* cũng đã được thực hiện [5–7]. Tuy nhiên, nghiên cứu nhân giống *in vitro* thông qua giai đoạn phát sinh callus chưa được nghiên cứu nhiều. Trong bài báo này, chúng tôi trình bày những kết quả nghiên cứu về nhân giống *in vitro* cây giáo cổ lam thông qua nuôi cấy callus.

## 2 Đối tượng và phương pháp

### 2.1 Đối tượng

Đối tượng nghiên cứu là cây Giáo cổ lam 5 lá (*Gynostemma pentaphyllum* (Thunb) Makino) *in vitro* do Trung tâm Ứng dụng và Thông tin Khoa học công nghệ Quảng Nam cung cấp. Mẫu được lưu giữ ở 25 °C và cường độ ánh sáng 2.000 lux (sử dụng ánh sáng trắng từ đèn neon).

### 2.2 Phương pháp

#### Điều kiện nuôi cấy

Tất cả các thí nghiệm nuôi cấy được tiến hành trong phòng nuôi cấy mô tế bào thực vật tại 25±27°C. Thời gian chiếu sáng là 16 giờ/ngày. Cường độ chiếu sáng là 2.000±2.500 lux.

Môi trường nuôi cấy là MS (Murashige và Skoog, 1962) [8] cơ bản chứa 3% đường sucrose, 0,8% agar, bổ sung các chất điều hòa sinh trưởng khác nhau tùy theo từng thí nghiệm, pH 5,8–5,9 và được hấp khử trùng ở 121 °C trong 15 phút. Môi trường được giữ trong các túi nhựa PE thay cho chai thủy tinh.

### **Ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng lên khả năng tạo callus**

Mẫu lá (lá non, kích thước 0,5 × 0,5 cm) và cuống lá (0,5–1 cm) *in vitro* được tạo vết thương nhẹ bằng dao cấy, sau đó cấy lên môi trường MS cơ bản có bổ sung NAA (từ 0,2 đến 2,0 mg/L) hoặc 2,4-D (từ 0,2 đến 2,0 mg/L) để cảm ứng tạo callus [5]. Các chỉ tiêu được ghi nhận sau 30 ngày nuôi cấy, bao gồm tỷ lệ tạo callus (%) và mức độ phát sinh callus (không phát sinh, có phát sinh từ yếu đến mạnh).

### **Ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng lên khả năng tái sinh chồi từ callus**

Callus sinh trưởng tốt trên môi trường cảm ứng được cấy chuyển lên môi trường tái sinh chồi. Thành phần môi trường bao gồm MS cơ bản có bổ sung BAP (từ 0,5 đến 2,5 mg/L) và NAA (0,2 mg/L). Các chỉ tiêu được ghi nhận sau 30 ngày nuôi cấy, bao gồm tỷ lệ mẫu tái sinh chồi (%), số chồi trung bình (cm) và chiều cao chồi trung bình (cm).

### **Ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng lên khả năng nhân chồi**

Chồi đỉnh được chọn trong nghiên cứu này là các chồi khỏe, cao từ 1 đến 1,5 cm, có nguồn gốc tái sinh từ callus. Đoạn thân sau khi cắt phần chồi đỉnh tiếp tục được cắt nhỏ, mỗi đoạn có 1 mắt lá chứa chồi bên, cao từ 1 đến 1,5 cm được sử dụng trong nghiên cứu khả năng nhân chồi. Mẫu được cấy lên môi trường MS có bổ sung BAP ở các nồng độ từ 0,1 đến 1,5 mg/L [5, 9]. Các chỉ tiêu được ghi nhận sau 60 ngày nuôi cấy, bao gồm số chồi/mẫu và chiều cao chồi trung bình (cm).

### **Ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng lên khả năng tạo rễ**

Chồi đơn *in vitro* khỏe mạnh, có chiều cao từ 4 đến 5 cm (5–7 lá) được lựa chọn làm nguyên liệu để nghiên cứu. Chồi đỉnh từ các chồi đơn khỏe mạnh này (cao 1–2 cm và có 2–3 lá) được cấy lên môi trường MS có bổ sung các chất NAA (từ 0,1 đến 1,0 mg/L) hoặc IBA (từ 0,1 đến 1,0 mg/L) và than hoạt tính với các nồng độ khác nhau để kích thích tạo rễ [3, 6]. Các chỉ tiêu được ghi nhận sau 30 ngày nuôi cấy, bao gồm tỷ lệ chồi tạo rễ (%), số rễ trung bình/chồi, chiều dài rễ và chiều cao cây trung bình (cm).

### **Xử lý số liệu**

Các thí nghiệm được bố trí theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên 1 nhân tố, 3 lần lặp lại, cỡ mẫu  $\geq 30$ . Kết quả thí nghiệm được tính trung bình và phân tích ANOVA với Duncan's test ( $p < 0,05$ ) bằng phần mềm SPSS 17.0.

## **3 Kết quả và thảo luận**

### **3.1 Ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng đến khả năng tạo callus**

Mẫu lá và cuống lá của cây Giảo cổ lam *in vitro* được sử dụng làm nguyên liệu nghiên cứu. Mẫu được cấy vào môi trường dinh dưỡng cơ bản MS có bổ sung các chất điều hòa sinh trưởng là NAA và 2,4-D để thăm dò khả năng tạo callus. Kết quả nghiên cứu được trình bày ở Bảng 1 và 2 và Hình 1.

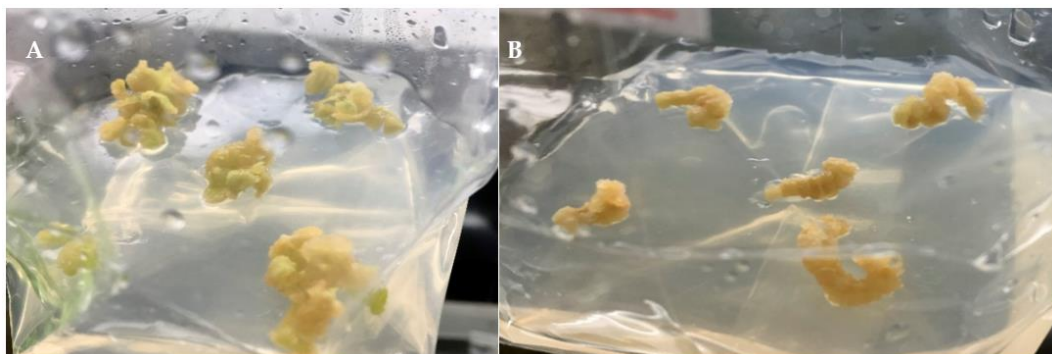
**Bảng 1.** Ảnh hưởng của nồng độ NAA đến khả năng tạo callus

NAA (mg/L)	Mẫu lá		Mẫu cuống lá	
	Tỉ lệ mẫu tạo callus (%)	Mức độ phát sinh callus	Tỉ lệ mẫu tạo callus (%)	Mức độ phát sinh callus
0,0	0,0 <sup>d</sup>	–	0,0 <sup>d</sup>	–
0,2	80,0 <sup>c</sup>	+	100 <sup>a</sup>	++
0,5	84,4 <sup>c</sup>	+	95,6 <sup>b</sup>	++
1,0	86,7 <sup>c</sup>	+	88,9 <sup>c</sup>	++
1,5	100 <sup>a</sup>	+	86,7 <sup>c</sup>	++
2,0	95,6 <sup>b</sup>	+	80,0 <sup>c</sup>	++

Chú thích: Mức độ phát sinh callus: (–) không cảm ứng tạo callus, (+) khả năng tạo callus yếu; (++) khả năng tạo callus trung bình (Chú thích này dùng chung cho Bảng 2). Các chữ cái khác nhau trên cùng một cột chỉ sự sai khác có ý nghĩa thống kê của các trung bình mẫu với  $p < 0,05$  (Duncan's test) (Chú thích này dùng chung cho tất cả các bảng).

**Bảng 2.** Ảnh hưởng của 2,4-D đến khả năng tạo callus

2,4-D (mg/L)	Mẫu lá		Mẫu cuống lá	
	Tỉ lệ mẫu tạo callus	Mức độ phát sinh callus	Tỉ lệ mẫu tạo callus (%)	Mức độ phát sinh callus
0,0	0,0 <sup>d</sup>	–	0,0 <sup>c</sup>	–
0,2	84,4 <sup>a</sup>	++	97,8 <sup>a</sup>	++
0,5	80,0 <sup>ab</sup>	++	93,3 <sup>a</sup>	++
1,0	73,3 <sup>b</sup>	+	26,7 <sup>b</sup>	+
1,5	17,8 <sup>c</sup>	+	22,2 <sup>b</sup>	+
2,0	15,6 <sup>c</sup>	+	20,0 <sup>b</sup>	+



**Hình 1.** Callus hình thành từ mẫu lá trên môi trường chứa 0,5 mg/L NAA (A) và hình thành từ cuống lá trên môi trường chứa 0,2 mg/L 2,4-D (B)

### Ảnh hưởng của nồng độ NAA đến khả năng tạo callus

Sau 30 ngày nuôi cấy, kết quả thu được ở Bảng 1 cho thấy ở đối chứng (0 mg/L NAA), cả lá và cuống lá đều không có khả năng tạo callus. Đối với lá, việc bổ sung NAA vào môi trường nuôi cấy tăng sẽ dẫn đến sự gia tăng mẫu tạo callus. Mẫu không tạo callus ở công thức đối chứng, tiếp theo là công thức 0,2 mg/L NAA có tỷ lệ mẫu tạo callus là 80%, tỷ lệ mẫu cấy tạo callus cao nhất (100%) ở công thức 1,5 mg/L NAA và giảm khi nồng độ NAA cao hơn (2 mg/L NAA). Đối với cuống lá, NAA có tác dụng ngược lại, khi nồng độ NAA bổ sung vào môi trường nuôi cấy tăng sẽ dẫn đến sự giảm tạo callus. Tỷ lệ mẫu tạo callus cao nhất (100%) ở công thức 0,2 mg/L NAA sau đó giảm dần khi nồng độ NAA tăng, ở công thức 2,0 mg/L NAA số mẫu cấy tạo callus chỉ còn 80%. Nhìn chung, tỷ lệ mẫu tạo callus từ lá và cuống lá đều cao (>80%).

### Ảnh hưởng của 2,4-D đến khả năng tạo callus

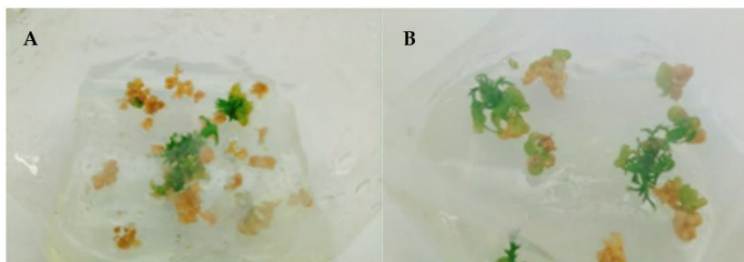
Ảnh hưởng của 2,4-D lên khả năng tạo callus của lá và cuống lá khá tương đồng với nhau. Nồng độ 2,4-D càng cao khả năng tạo thành callus càng giảm. Sau 30 ngày nuôi cấy, kết quả thu được ở Bảng 2 cho thấy khi bổ sung 2,4-D vào môi trường nuôi cấy, tỷ lệ mẫu tạo callus ở lá và cuống lá cũng đều cao hơn đối chứng. Mẫu tạo callus cao nhất ở công thức 0,2 mg/L 2,4-D với tỷ lệ mẫu tạo callus là 97,8% đối với cuống lá và 84,4% đối với lá. Khả năng tạo callus của lá và cuống lá giảm mạnh khi 2,4-D được bổ sung vào môi trường nồng độ từ 1,0 mg/L trở lên. Theo Jala và cs., môi trường MS có bổ sung 2,4-D với nồng độ 1,0 mg/L thích hợp để callus Giáo cổ lam hình thành, đường kính đạt 0,9375 cm [5]. Nồng độ này cao hơn so với nồng độ chúng tôi sử dụng.

### 3.2 Ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng đến khả năng tái sinh chồi từ callus

Trong quá trình theo dõi sự hình thành và sinh trưởng của callus, chúng tôi nhận thấy callus phát sinh từ lá sinh trưởng không mạnh bằng callus phát sinh từ cuống lá, nhưng quá trình tái sinh chồi tự nhiên lại xảy ra mạnh hơn. Vì vậy, chúng tôi lựa chọn các mẫu callus có nguồn gốc từ lá trên môi trường có bổ sung NAA để nghiên cứu khả năng tái sinh chồi. Mẫu được cấy vào môi trường dinh dưỡng cơ bản MS có bổ sung BAP và NAA để thăm dò khả năng tái sinh chồi từ callus. Kết quả sau 30 ngày nuôi cấy được trình bày ở Bảng 3 và Hình 2.

**Bảng 3.** Ảnh hưởng của nồng độ BAP và NAA đến khả năng tái sinh chồi từ callus

BAP (mg/L)	NAA (mg/L)	Tỷ lệ tái sinh chồi (%)	Số chồi/callus	Chiều cao chồi (cm)
0,5	0,2	24,4 <sup>b</sup>	2,28 <sup>ab</sup>	0,28 <sup>ab</sup>
1,0	0,2	37,8 <sup>ab</sup>	2,78 <sup>a</sup>	0,29 <sup>ab</sup>
1,5	0,2	51,1 <sup>a</sup>	2,17 <sup>ab</sup>	0,33 <sup>ab</sup>
2,0	0,2	55,6 <sup>a</sup>	2,71 <sup>a</sup>	0,37 <sup>a</sup>
2,5	0,2	22,2 <sup>b</sup>	1,2 <sup>b</sup>	0,21 <sup>b</sup>



**Hình 2.** Kết quả ảnh hưởng của 0,5 mg/L BAP (A) và 2,0 mg/L BAP (B) kết hợp với 0,2 mg/L NAA đến khả năng tái sinh chồi từ callus

Kết quả cho thấy cả 5 công thức thí nghiệm mẫu đều có khả năng tái sinh chồi và có sự khác biệt ý nghĩa thống kê về số lượng chồi hình thành giữa các công thức. Nồng độ BAP càng cao hiệu quả tái sinh chồi càng cao. Tỷ lệ tái sinh chồi đạt cao nhất là 55,6% khi bổ sung 2,0 mg/L BAP sau đó giảm mạnh, tương ứng với số lượng chồi/callus là 2,71 và chiều cao trung bình của chồi tạo thành là 0,37 cm. Như vậy, nồng độ thích hợp để tái sinh chồi từ callus là BAP 2,0 mg/L và NAA 0,2 mg/L. Nồng độ này sẽ được sử dụng để làm các thí nghiệm tái sinh chồi tiếp theo.

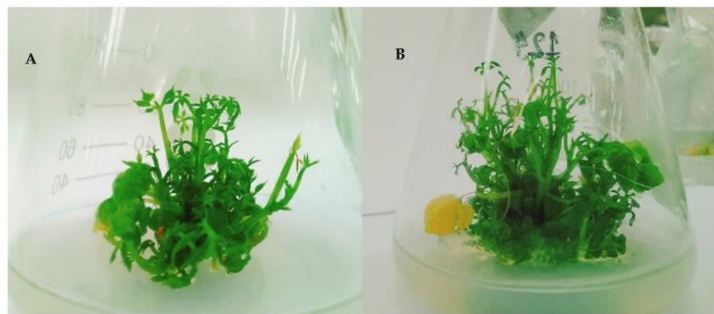
### 3.3 Ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng đến khả năng nhân chồi

Sau khi thu được chồi tái sinh từ callus, chúng tôi tiếp tục nghiên cứu khả năng nhân chồi của cây Giảo cổ lam. Chồi *in vitro* được cấy trên môi trường dinh dưỡng cơ bản MS bổ sung BAP có nồng độ từ 0,1 đến 1,5 mg/L để thăm dò khả năng nhân chồi. Kết quả thu được sau 60 ngày nuôi cấy được trình bày ở Bảng 4 và Hình 3.

Đối với chồi đỉnh, số chồi trung bình ở các công thức có sự sai khác về cả giá trị tuyệt đối và ý nghĩa thống kê, dao động từ 4,50 (1,5 mg/L BAP) đến 6,17 (1,0 mg/L BAP). Công thức 1,0 mg/L BAP tuy cho số chồi nhiều nhất, nhưng chiều cao chồi lại rất thấp, chỉ 1,23 cm/mẫu. Trong khi đó, ở công thức 0,1 mg/L BAP số chồi chỉ đạt 5,50 chồi/mẫu nhưng chiều cao trung bình đạt giá trị cao nhất (1,85 cm/mẫu). Ở công thức đối chứng, tất cả các mẫu đều không tạo thêm chồi mới. Vì vậy, tùy vào mục đích thí nghiệm cần hệ số nhân chồi lớn hay kéo dài chồi mà có thể sử dụng các công thức môi trường khác nhau.

**Bảng 4.** Ảnh hưởng của BAP lên khả năng nhân chồi sau 60 ngày nuôi cấy

BAP (mg/L)	Chồi đỉnh		Chồi bên	
	Số chồi trung bình	Chiều cao chồi trung bình (cm)	Số chồi trung bình	Chiều cao chồi trung bình (cm)
0,0	0,0	0,0	1,58 <sup>c</sup>	1,30 <sup>ab</sup>
0,1	5,50 <sup>ab</sup>	1,85 <sup>a</sup>	7,17 <sup>ab</sup>	1,58 <sup>a</sup>
0,3	5,72 <sup>ab</sup>	1,51 <sup>b</sup>	7,72 <sup>a</sup>	1,55 <sup>a</sup>
0,5	5,67 <sup>ab</sup>	1,56 <sup>b</sup>	6,72 <sup>ab</sup>	1,61 <sup>a</sup>
1,0	6,17 <sup>a</sup>	1,23 <sup>c</sup>	5,44 <sup>b</sup>	0,74 <sup>c</sup>
1,5	4,50 <sup>b</sup>	1,17 <sup>c</sup>	6,33 <sup>ab</sup>	1,09 <sup>bc</sup>



**Hình 3.** Chồi đỉnh sinh trưởng trên môi trường chứa 1,0 mg/L BAP (A) và chồi bên sinh trưởng trên môi trường chứa 0,3 mg/L BAP (B)

Khác với chồi đỉnh, chồi bên có hệ số nhân cao nhất ở môi trường có bổ sung 0,3 mg/L BAP. Số chồi trung bình đạt 7,72 chồi/mẫu, nhưng chiều cao chồi trung bình chỉ đạt ở mức 1,55 cm/mẫu. So sánh với chồi đỉnh, chúng tôi nhận thấy khả năng nhân chồi bên cho hiệu quả cao hơn: tại công thức cho hệ số nhân tốt nhất, số chồi trung bình đạt 7,72 chồi/mẫu ở chồi bên so với 6,17 chồi/mẫu ở chồi đỉnh.

Hiện nay, nhân giống *in vitro* cây Giảo cổ lam đã được một số tác giả trong nước và trên thế giới thực hiện. Theo Bùi Đình Lâm và cs., môi trường MS bổ sung Kinetin 0,4 mg/L và BA 0,5 mg/L cho hệ số nhân nhanh chồi đạt 4,36 lần, chồi nhỏ, xanh đậm sau 4 tuần nuôi cấy [3]. Mongkolchaipak và cs. nhận thấy môi trường nhân nhanh thích hợp là MS cơ bản có bổ sung 0,1 mg/L BAP, 5 mg/L GA3 và 150 mg/L citric acid; hệ số nhân chồi cao nhất đạt 4,3 và chiều cao đạt 2,4 cm [9]. So với nghiên cứu của chúng tôi, các kết quả nghiên cứu đã công bố trên đều cho hiệu quả thấp hơn. Jala và cs. thu được kết quả nghiên cứu tương tự với kết quả của chúng tôi: môi trường MS có bổ sung 1,0 mg/L BAP sau 12 tuần hệ số nhân chồi cao nhất, đạt 7,28 lần và chiều cao trung bình chồi đạt 2,22 cm [5].

### 3.4 Ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng đến khả năng tạo rễ

Sau khi có chồi *in vitro* từ quá trình nhân chồi, chúng tôi tiếp tục nghiên cứu khả năng ra rễ để tạo được cây *in vitro* hoàn chỉnh. Chồi *in vitro* khoảng 2–3 lá được chuyển lên môi trường dinh dưỡng MS có bổ sung NAA, IBA và than hoạt tính để thăm dò khả năng tạo rễ. Kết quả thu được sau 30 ngày nuôi cấy được trình bày ở Bảng 5 và 6.

#### Ảnh hưởng của nồng độ NAA đến khả năng tạo rễ

Ảnh hưởng của các nồng độ NAA khác nhau và than hoạt tính đến sự hình thành và phát triển rễ cây Giảo cổ lam *in vitro* sau 30 ngày nuôi cấy được trình bày ở Bảng 5 và Hình 4. Kết quả nghiên cứu cho thấy không có sự sai khác có ý nghĩa thống kê giữa các công thức thí nghiệm. Ở môi trường đối chứng không có NAA, rễ cũng đã hình thành, khi bổ sung NAA vào môi trường số lượng rễ có tăng lên nhưng sai khác không có ý nghĩa thống kê. Ở nồng độ 0,5 mg/L NAA, số rễ hình thành đạt cao nhất (7,22 rễ/mẫu), chiều dài rễ TB đạt 1,46 cm/mẫu và chiều cao cây trung bình đạt 4,83 cm/mẫu, sự khác biệt này có ý nghĩa thống kê ở mức  $p < 0,01$  so với đối chứng và các công thức khác. Đối với chiều dài rễ, công thức môi trường có bổ sung 0,3 mg/L NAA đạt cao nhất (2,13 cm/mẫu), khác biệt có ý nghĩa ở mức thống kê so với các công thức còn lại.

**Bảng 5.** Ảnh hưởng của NAA lên khả năng ra rễ của Giảo cổ lam

NAA (mg/L)	Số lượng rễ	Chiều dài rễ (cm)	Chiều cao cây
0,0	5,67 <sup>a</sup>	1,16 <sup>b</sup>	4,39 <sup>a</sup>
0,1	5,89 <sup>a</sup>	1,45 <sup>b</sup>	4,86 <sup>a</sup>
0,3	6,78 <sup>a</sup>	2,13 <sup>a</sup>	4,44 <sup>a</sup>
0,5	7,22 <sup>a</sup>	1,46 <sup>b</sup>	4,83 <sup>a</sup>
0,7	5,89 <sup>a</sup>	1,36 <sup>b</sup>	3,47 <sup>b</sup>
1,0	5,44 <sup>a</sup>	1,21 <sup>b</sup>	2,78 <sup>b</sup>



**Hình 4.** Rễ hình thành trên môi trường chứa NAA

#### Ảnh hưởng của nồng độ IBA đến khả năng tạo rễ

Kết quả trình bày ở Bảng 6 cho thấy cũng tương tự như NAA, các công thức môi trường chứa IBA ở các nồng độ khác nhau đều không có sự sai khác về khả năng hình thành rễ, chỉ có sự sai khác về chiều dài rễ và chiều cao cây. Nhìn chung, môi trường có bổ sung IBA không tốt cho sự hình thành rễ và sự phát triển của cây, trong thí nghiệm này, công thức đối chứng cho hiệu quả cao nhất.

Những kết quả trên cho thấy khả năng tạo rễ của chồi Giảo cổ lam ít bị phụ thuộc vào chất kích sinh trưởng NAA hay IBA. Rễ có thể hình thành trên môi trường MS cơ bản chứa than hoạt tính.

**Bảng 6.** Ảnh hưởng của IBA lên khả năng ra rễ của Giảo cổ lam

IBA (mg/L)	Số lượng rễ	Chiều dài rễ (cm)	Chiều cao cây (cm)
0,0	6,00 <sup>a</sup>	2,58 <sup>a</sup>	4,86 <sup>a</sup>
0,1	5,89 <sup>a</sup>	1,80 <sup>b</sup>	2,73 <sup>b</sup>
0,3	4,56 <sup>ab</sup>	1,78 <sup>b</sup>	2,36 <sup>b</sup>
0,5	4,44 <sup>b</sup>	1,53 <sup>bc</sup>	2,86 <sup>b</sup>
0,7	5,33 <sup>ab</sup>	1,49 <sup>bc</sup>	2,86 <sup>b</sup>
1,0	4,44 <sup>b</sup>	1,27 <sup>c</sup>	2,60 <sup>b</sup>





Hình 5. Rễ hình thành trên môi trường chứa IBA

So với các nghiên cứu khác đã công bố, kết quả thu được của chúng tôi có chút khác biệt. Theo Bùi Đình Lâm và cs., môi trường MS có 0,1 mg/L IB cho tỷ lệ ra rễ 100%, số rễ/chồi đạt 4,16, rễ đạt tiêu chuẩn ra cây [3]. Theo Nguyễn Thị Thanh Hằng và cs., nồng độ IBA từ 0 đến 1,0 mg/L đều thích hợp cho sự tái sinh rễ *in vitro* của cây Giáo cổ lam với tỷ lệ tái sinh rễ đạt 100% [6]. Trong khi đó, Mongkolchaipak và cs. cho rằng môi trường ra rễ thích hợp là MS bổ sung 1 mg/L IAA, sau 30–45 ngày có số rễ đạt 7,4 rễ/cây, chiều dài rễ đạt 4,2 cm và tỷ lệ ra rễ cao nhất đạt 92,8% [9]. Nhìn chung, tuy sử dụng các công thức môi trường nuôi cấy khác nhau, nhưng hiệu quả thu được của chúng tôi không khác biệt lớn với các nghiên cứu đã được công bố.

Trong các nghiên cứu nhân giống *in vitro* đã công bố, các tác giả chủ yếu tạo chồi trực tiếp từ mẫu nuôi cấy chứ không thông qua giai đoạn tạo callus. Ở Việt Nam, Nguyễn Thị Thanh Hằng và cs. [6] hay Phạm Cao Khải và Trần Văn Minh [7] đều sử dụng đoạn thân làm vật liệu nghiên cứu. Một số tác giả khác trên thế giới cũng đã nuôi cấy callus cây giáo cổ lam, nhưng mục đích không phải để nhân giống mà để sản xuất hợp chất thứ cấp như Jala và cs. [5] hay Ao và cs. [10]. Ngoài ra, theo Zhang và cs., callus còn được sử dụng để là nguyên liệu tạo protoplast, từ đó mới tái sinh cây từ protoplast [11]. Trong nghiên cứu của chúng tôi, callus được sử dụng làm nguồn nguyên liệu để nhân giống. Nguồn vật liệu ban đầu để tạo callus là lá. Đây là phần vật liệu không được sử dụng cho nhân giống trong các nghiên cứu trước đây.

#### 4 Kết luận

Môi trường tạo callus có hiệu quả nhất đối với mẫu lá là MS cơ bản có bổ sung 1,5 mg/L NAA và đối với mẫu cuống lá là 0,2 mg/L 2,4-D; tỷ lệ mẫu có cảm ứng tạo callus tương ứng là 100% và 97,8%. Môi trường tái sinh chồi từ callus cho hiệu quả cao nhất bao gồm MS cơ bản có bổ sung 2,0 mg/L BAP và 0,2 mg/L NAA; tỷ lệ tái sinh chồi đạt 55,6%. Môi trường MS cơ bản bổ sung 1,0 mg/L BAP cho hiệu quả nhân chồi cao nhất đối với chồi đỉnh (6,17 chồi/mẫu) trong khi bổ sung 0,3 mg/L BAP cho hiệu quả cao nhất đối với chồi bên (7,72 chồi/mẫu). Môi trường tạo rễ tốt nhất đối với cây Giáo cổ lam là môi trường MS bổ sung 0,5 mg/L NAA, số lượng rễ tạo thành đạt 7,22 rễ/chồi.

## Lời cảm ơn

Công trình được thực hiện bằng kinh phí của đề tài cấp Bộ Giáo dục và Đào tạo năm 2019–2021, mã số B2019-DHH-562-09.

## Tài liệu tham khảo

1. Chen JC, Tsai CC, Chen LD, Chen HH, Wang WC. Therapeutic effect of gypenoside on chronic liver injury and fibrosis induced by CCl<sub>4</sub> in rats. *Am J Chin Med.* 2000;28(2):175-85.
2. Viện Dược Liệu. *Cây thuốc Việt Nam.* Hà Nội: NXB Khoa Học kỹ thuật; 1996.
3. Lâm BD, Tinh NT, Duy NV, Bảo NV, Hiền LV, Bình NX. Nghiên cứu khả năng nhân giống cây Giảo cổ lam (*Gynostemma pentaphyllum* Thunb) bằng phương pháp *in vitro*. *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn.* 2015;15:249-56.
4. Bộ môn Thực vật. *Thực vật Dược và phân loại thực vật:* Trường Đại học Dược Hà Nội; 2004.
5. Jala A, Patchpoonporn W. Effect of BA NAA and 2,4D on Micropropagation of Tiaogulan (*Gynostemma pentaphyllum* Makino). *International Transaction Journal of Engineering, Management, & Applied Sciences & Technologies.* 2012;3(4):363-70.
6. Hằng NTT, Vân LA, Khiêm ĐV, Cương HV, Hoàng NTP, Huyền PX. Nghiên cứu nhân giống *in vitro* và sự sinh trưởng phát triển cây giảo cổ lam (*Gynostemma pubescens*) trong nhà kính. *Tạp chí khoa học Đại học Đà Lạt.* 2018;8(3):99-112.
7. Khải PC, Minh TV. Vi nhân giống cây giảo cổ lam (*Gynostemma pentaphyllum*) bằng kỹ thuật nuôi cấy đốt thân. *Tạp chí Công nghệ Sinh học.* 2018;16(3):459-64.
8. Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant.* 1962;15(3):473-97.
9. Mongkolchaipak N, Boonruad T. Plant Tissue Culture of *Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.) Makino and its constituents. *Journal of Thai Traditional & Alternative Medicine.* 2006.
10. Ao Z, Qin Z. Effect of some stress factors on gypenosides accumulation in callus of *Gynostemma pentaphyllum*. *Chinese Journal of Applied & Environmental Biology.* 1998;4(2):10-4.
11. Zhang H, Wu Q, Liu D. Protoplast culture and plant regeneration from the suspension cells of *Gynostemma pentaphyllum* (Thumb) Mak. *Chinese Journal of Biotechnology.* 1995;11(3):207-11.