

NGHIÊN CỨU NHÂN GIỐNG IN VITRO CÂY SÙNG THẢO (*STACHYS AFFINIS* BUNGE)

Trần Thị Tâm¹, Vũ Thị Tư¹, Nguyễn Phú Hoài¹, Nông Thị Anh Trúc¹, Vũ Quốc Luận²

Ngày nhận bài: 20/11/2023; Ngày phản biện thông qua: 13/12/2023; Ngày duyệt đăng: 15/12/2023

TÓM TẮT

Cây Sùng thảo (*Stachys affinis* Bunge) là một trong những loài thảo dược quan trọng tại Trung Quốc, Nhật Bản, Pháp và nhiều nước Châu Âu khác. Do đó, chúng được dùng để làm thuốc chữa bệnh trong y học cổ truyền, làm thực phẩm chức năng và chế biến làm thực phẩm trong bữa ăn hàng ngày. Trong nghiên cứu này, chúng tôi nghiên cứu nhân giống *in vitro* nhằm tạo ra số lượng lớn cây giống thông qua nuôi cấy đốt thân. Kết quả cho thấy, môi trường MS được bổ sung 1 mg/L BA, 30 g/L sucrose, 8,5 g/L agar, pH 5,8 cho hệ số tái sinh chồi cao nhất từ mẫu đốt thân (45 chồi/mẫu) với khối lượng tươi trung bình (459,5 mg/cụm chồi). Môi trường MS có bổ sung 1 mg/L NAA thích hợp cho quá trình ra rễ và tạo cây hoàn chỉnh với số rễ trung bình 29,93 rễ/cây, chiều dài rễ 2,57 cm và chiều cao cây 2,17 cm. Hỗn hợp giá thể bao gồm xơ dừa: đất: đá perlite với tỷ lệ 7: 2: 1 cho tỉ lệ sống cao nhất 92,8% với chiều cao cây đạt 10,51 cm sau 60 ngày được trồng trên các vỉ xốp ngoài vườn ươm. Cây con tiếp tục sinh trưởng và nở hoa bình thường khi được trồng trong các chậu nhựa có đường kính 20 cm với hỗn hợp giá thể tương tự sau 90 ngày nuôi trồng trong điều kiện nhà kính.

Từ khóa: cây hoàn chỉnh, nuôi cấy đốt thân, Sùng thảo, *Stachys affinis*, tái sinh chồi.

1. MỞ ĐẦU

Cây Sùng thảo (*Stachys affinis* Bunge) là cây thảo dược quan trọng và còn được xem như loài Atiso (Chinese artichoke) tại Trung Quốc và Nhật Bản. Chúng được du nhập vào Châu Âu từ XIX và được gọi là “Crosnes” theo tên một thành phố thuộc nước Pháp (Lukasz et al., 2011). Củ Sùng thảo giàu protein, carbohydrate, vitamin nên có thể ăn sống, nấu, ngâm rượu, làm salad, chế biến súp, làm gia vị hoặc mài thành bột để chế biến bánh quy (Venditti et al., 2017). Củ Sùng thảo giàu sắt và năng lượng, do đó, chúng được sử dụng làm thực phẩm chức năng cho các bệnh nhân thiếu máu, tiểu đường và tim mạch. Chiết xuất từ các loài cây Sùng thảo được sử dụng trong y học cổ truyền để chữa một số bệnh như tiêu đờm, giảm ho, giảm các triệu chứng hen suyễn và đau tai ở nhiều nước Châu Âu (Lukasz et al., 2011), đặc biệt là chất stachyose chiếm 80% hàm lượng carbohydrate trong củ Sùng thảo (Keller và Matile, 1985) và thường được sử dụng làm chất tạo ngọt thay thế cho sucrose trong đồ uống (Nakakuki, 2002). Stachyose còn có tiềm năng cao trở thành chất tiền sinh học trong thực phẩm chức năng (Yıldız, 2010), nó có khả năng hạn chế sự gia tăng một số vi khuẩn có hại (Smith et al., 2002) và có tác dụng hạ đường huyết ở chuột nhắt (Zhang et al., 2004). Ngoài ra, cây Sùng thảo còn được sử dụng như một phương thuốc cổ truyền để điều trị nhiễm trùng, cảm lạnh, bệnh tim, bệnh lao và

viêm phổi tại Trung Quốc (Yamahara et al., 1980). Một số nghiên cứu cho thấy, dịch chiết xuất từ củ Sùng thảo giúp giảm bớt sự rối loạn trí nhớ liên quan đến chứng mất trí và bệnh Alzheimer ở chuột thông qua cơ chế chống oxy hóa (Harada et al., 2015). Bên cạnh đó những hoạt chất thứ cấp chính đặc trưng trong củ Sùng thảo gồm các glycosides phenylethanoid như acteoside và stachyoside C (Zhang et al., 2004), có khả năng ức chế di căn ung thư hiệu quả (Hayashi et al., 1996). Nhân giống *in vitro* cây Sùng thảo từ chồi ngọn đã được thực hiện bởi Hosoki và Yasufuku (1992), kết quả cho thấy, phương pháp nhân giống *in vitro* cho hệ số nhân giống cao hơn rất nhiều lần so với phương pháp tách củ thông thường. Tái sinh chồi trực tiếp từ mẫu củ với tần số cao cũng được thực hiện trong nghiên cứu của Li và cộng sự (2002). Tại Việt Nam, cho đến nay cũng có một số nghiên cứu về cây Sùng thảo, Nguyễn Thanh Hoàng và cộng sự (2022) đã nghiên cứu đặc điểm vi học, thành phần hóa học và hoạt tính gây độc trên một số dòng tế bào ung thư của thân rễ Sùng thảo. Khảo sát hàm lượng stachyose, polysaccharide và saponin của cao tống nước từ củ Sùng thảo (*Stachys affinis*) ở các điều kiện chiết khác nhau của Đoàn Thị Tâm và cộng sự (2020).

Nghiên cứu nhân giống *in vitro* cây Sùng thảo tại Việt Nam cũng đã được thực hiện, tuy nhiên, tỷ lệ tái sinh chồi từ nuôi cấy đốt thân thu được trong hai nghiên cứu này cho hệ số nhân giống

¹Trường Đại học Yersin Đà Lạt;

²Viện Nghiên cứu Khoa học Tây Nguyên;

Tác giả liên hệ: Vũ Quốc Luận; ĐT: 0948013224; Email: vuquoclun07@gmail.com

không cao (Nguyễn Thị Thanh Hằng, 2017; Trịnh Bá Uy, 2019). Chính vì vậy, mục đích của nghiên cứu này nhằm tối ưu hóa quy trình nhân giống *in vitro* thông qua nuôi cấy đốt thân nhằm tạo ra số lượng lớn cây giống có độ đồng đều cao, đảm bảo chất lượng với giá thành thấp nhằm mở rộng vùng trồng cây dược liệu quý này là rất cần thiết.

2. NỘI DUNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nội dung nghiên cứu

- Khảo sát ảnh hưởng của BA, TDZ lên khả năng nhân nhanh chồi từ đốt thân cây Sùng thảo.

- Khảo sát ảnh hưởng của NAA lên khả năng tạo ra rễ từ chồi cây Sùng thảo *in vitro*.

- Khảo sát ảnh hưởng của các loại giá thể lên khả năng sống sót và sinh trưởng tiếp theo ở giai đoạn vườn ươm.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Đối tượng nghiên cứu

Cây Sùng thảo được thu thập tại thôn Cầu Đất, xã Xuân Trường, thành phố Đà Lạt và được xác định bằng phương pháp so sánh hình thái với các tiêu bản mẫu cây Sùng thảo (*Stachys sieboldii* Miq.) tại Viện Dược liệu và có các đặc điểm nông sinh học tương tự với mẫu giống Sùng thảo tại Sa Pa, Lào Cai (Phạm Ngọc Khánh và cộng sự, 2022). Chồi non ngoài vườn ươm của cây Sùng thảo với chiều cao 5 - 7 cm được tách phần phiến lá bên ngoài, rửa sạch bề mặt mẫu cây bằng xà phòng và đặt dưới vòi nước chảy trong khoảng 2 - 3 giờ. Sau đó, các chồi non được rửa lại bằng cồn 70° trong 30 giây và rửa lại bằng nước cất vô trùng. Tiếp theo, mẫu cây được khử trùng mẫu bằng HgCl₂ 0,1% trong 7 phút và rửa lại bằng nước cất vô trùng 4 - 5 lần. Cuối cùng, mẫu cây được cắt thành từng đốt và cấy vào môi trường MS cơ bản (Murashige & Skoog, 1962) có 30 g/L saccharose, 8,5 g/L agar và không bổ sung chất kích thích sinh trưởng. Sau 6 tuần nuôi cấy, các chồi tái sinh từ mẫu cây đạt chiều cao từ 3 - 3,5 cm và có 5 - 7 lá phát triển, không bị nhiễm nấm, khuẩn được tiếp tục nhân lên và sử dụng để bố trí thí nghiệm trong các nghiên cứu tiếp theo.

2.2.2. Địa điểm nghiên cứu

Phòng thí nghiệm Công nghệ sinh học Thực vật, khoa Công nghệ ứng dụng, Trường Đại học Yersin Đà Lạt.

2.2.3. Vật liệu nghiên cứu và điều kiện thí nghiệm

Môi trường sử dụng trong nghiên cứu được pha theo công thức của Murashige và Skoog (1962) với thành phần các chất đa lượng tinh khiết (Xilong - Trung Quốc) và các chất vi lượng,

vitamin và chất hữu cơ (Merck - Đức) có bổ sung 30 g/L sucrose, 8,5 g/L agar, pH 5,8. Tùy thuộc vào mục đích của mỗi thí nghiệm mà các chất điều hòa sinh trưởng thực vật (Merck - Đức) khác nhau như 6-benzyladenine (BA), Thidiazuron (TDZ), Naphthaleneacetic acid (NAA) được bổ sung vào môi trường nuôi cấy với các nồng độ khác nhau và được hấp khử trùng ở nhiệt độ 121°C, trong 20 phút.

Các loại giá thể sử dụng: xơ dừa ECO N1 (Công ty Nguồn Sinh Thái) và đá perlite Namix nhập khẩu từ Trung Quốc được mua tại cửa hàng vật tư nông nghiệp.

Thí nghiệm được thực hiện trong điều kiện phòng nuôi có độ ẩm 50 - 60%, nhiệt độ 25 ± 2°C, sử dụng bóng đèn huỳnh quang, thời gian chiếu sáng 16 giờ/ngày với cường độ chiếu sáng: 2.000 - 2.500 lux.

Thí nghiệm trong vườn ươm có lưới đen che nắng 70% với các điều kiện như sau: nhiệt độ trung bình 27 ± 2°C, cường độ ánh sáng 1200 ± 200 lux, độ ẩm 50 - 60%.

2.2.4. Bố trí thí nghiệm

Thí nghiệm 1: Khảo sát ảnh hưởng BA, TDZ lên khả năng nhân nhanh chồi từ đốt thân cây Sùng thảo

Các đoạn đốt thân mang chồi nách cây Sùng thảo *in vitro* có kích thước khoảng 0,5 cm được cấy vào môi trường MS cơ bản bổ sung 30 g/L saccharose, 8,5 g/L agar, pH môi trường 5,8, được bổ sung với các nồng độ khác nhau: BA (0; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 mg/L), TDZ (0; 0,2; 0,4; 0,8; 1,0 mg/L). Sau 40 ngày nuôi cấy, các chỉ tiêu theo dõi như số chồi hình thành/mẫu, khối lượng tươi/chồi (mg), số lá/chồi và hình thái chồi.

Thí nghiệm 2: Khảo sát ảnh hưởng của NAA lên khả năng tạo ra rễ từ chồi cây Sùng thảo *in vitro*

Chồi đỉnh có chiều cao khoảng 1,0 cm chứa 2 - 4 lá được cấy vào môi trường MS cơ bản bổ sung 30 g/L saccharose, 8,5 g/L agar, than hoạt tính, pH môi trường 5,8 và có bổ sung NAA (0; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 mg/L). Sau 20 ngày nuôi cấy, các chỉ tiêu theo dõi như số rễ hình thành, chiều dài rễ (cm), số lá, chiều cao cây (cm).

Thí nghiệm 3: Khảo sát ảnh hưởng của các loại giá thể lên khả năng sống sót và sinh trưởng tiếp theo ở giai đoạn vườn ươm

Cây con *in vitro* khỏe mạnh sau 2 tuần nuôi cấy trên môi trường tạo rễ được đưa ra ngoài vườn ươm để tập thích nghi với điều kiện nhiệt độ, khí hậu trong 5 ngày. Sau đó, cây con rửa sạch agar và trồng vào vỉ xốp 84 lỗ có đường kính miệng lỗ

3,3 cm, đường kính đáy lỗ 1,6 cm, chiều cao lỗ 4 cm. Giá thể được sử dụng bao gồm: (1) đất; (2) xơ dừa; (3) xơ dừa + đất + đá perlite (tỷ lệ 7: 2: 1). Các khay cây được đặt trên giàn trong nhà kính có trang bị lưới đen che nắng 70% và được tưới nước phun sương hàng ngày.

Sau 60 ngày chăm sóc tại vườn ươm, các chỉ tiêu theo dõi như: tỷ lệ sống (%), chiều cao cây (cm), số lá/cây.

Cây con 60 ngày tuổi trong các vỉ xốp tiếp tục được trồng trong các chậu nhựa có đường kính 20 cm để tiếp tục sinh trưởng và phát triển trong điều kiện nhà kính sau 90 ngày với hỗn hợp giá thể đất + xơ dừa + đá perlite (tỷ lệ 2: 7: 1).

2.2.5. Xử lý thống kê

Các thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên. Mỗi thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Kết quả thí nghiệm được tính trung bình và phân tích ANOVA với Duncan's test ($p < 0,05$) bằng phần mềm SPSS 26.0 (IBM).

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Khảo sát ảnh hưởng của BA và TDZ lên khả năng hình thành cụm chồi từ mẫu đốt thân cây Sùng thảo *in vitro*.

Sự hình thành cụm chồi từ mẫu cây đốt thân trong điều kiện nuôi cấy *in vitro* là rất quan trọng vì chúng cho thấy tính hiệu quả hay không so với các phương pháp nhân giống khác trên đối tượng cây Sùng thảo. Các cụm chồi *in vitro* hình thành trong giai đoạn này sẽ là nguồn nguyên liệu cho quá trình nhân nhanh chồi nhằm tạo ra số lượng lớn cây giống trong thời gian ngắn phục vụ nhu cầu sản xuất cây dược liệu này. Hệ số nhân chồi cao hay thấp phụ thuộc rất lớn vào nồng độ hormone ngoại sinh bổ sung vào môi trường nuôi cấy, đặc biệt là nhóm Cytokinin. Sau 20 ngày nuôi cấy, các mẫu đốt thân trong tất cả các nghiệm thức đều cảm ứng hình thành chồi với tỷ lệ 100%. Tuy nhiên, chưa thể hiện rõ sự khác biệt về số chồi hình thành giữa các nồng độ cytokinin được bổ sung. Sau 40 ngày nuôi cấy, số chồi hình thành/mẫu, số lá và hình thái chồi có sự khác biệt rõ rệt được thể hiện qua (Bảng 1, Hình 1). Sau 40 ngày nuôi cấy, kết quả cho thấy, nghiệm thức đối chứng mẫu chỉ hình thành chồi đơn với lá lớn màu xanh thẫm. Trong khi đó, các nghiệm thức có bổ sung BA và TDZ ở các nồng độ khác nhau đều cho hệ số nhân chồi cao gấp nhiều lần so với đối chứng từ 33,47 - 72,00 chồi/mẫu. Trên môi trường có bổ sung nồng độ từ 0,5 - 1,0 mg/L BA, cụm chồi hình thành tương đối đồng đều, lá mở rộng với màu xanh đậm (Hình 1a). Kết quả cho thấy, sử dụng mẫu cây đốt thân cho hệ số nhân

chồi cao gấp 9 lần so với tái sinh chồi trực tiếp từ củ trên cùng nồng độ 1 mg/L BA trong nghiên cứu của Li và cộng sự (2002) và gấp 4,5 lần số chồi hình thành trong nghiên cứu của Nguyễn Thị Thanh Hằng (2017). Khi tăng nồng độ BA lên từ 1,5 - 2,0 mg/L, số lượng chồi tái sinh và khối lượng trung bình chồi đều tăng và đạt cao nhất (63,87 chồi/mẫu), khối lượng tươi trung bình (632,3 mg/cụm chồi) thu được ở nồng độ 2 mg/L BA. Tuy nhiên, số lá và chất lượng chồi thì giảm xuống: lá ít, nhỏ, màu xanh nhạt, chồi phát triển chậm, một số chồi có hiện tượng thủy tinh thể. Sự thay đổi về hình thái chồi *in vitro* của cây Sùng thảo ở nồng độ 1,5 - 2,0 mg/L trong nghiên cứu này cũng phù hợp với báo cáo của Legkobit và Khadeeva (2004), bổ sung nồng độ BA thấp sẽ gây ra ít biến đổi di truyền hơn so với nồng độ BA cao. Trong nghiên cứu của Hosoki và Yasufuku (1992) khi sử dụng mẫu chồi đỉnh *in vitro* cây Sùng thảo để nhân chồi trên môi trường MS có bổ sung nồng độ BA thấp (0,1 mg/L), kết quả cho thấy, hệ số nhân chồi chỉ gia tăng khoảng 2,5 lần sau 25 ngày cấy chuyển 1 lần.

Tương tự, đối với nghiệm thức bổ sung TDZ, số lượng chồi gia tăng khi nồng độ TDZ tăng từ 0,2 - 0,4 mg/L và thu được cao nhất ở nồng độ 0,4 mg/L với 72,00 chồi/mẫu, chồi khỏe với khối lượng trung bình 790,5 mg/cụm chồi (Hình 1b). Khi tăng nồng độ TDZ lên 0,8 - 1,0 mg/L thì số lượng chồi tái sinh có xu hướng giảm, khối lượng cụm chồi giảm xuống, chồi yếu, lá nhỏ bị biến dạng và có sự xuất hiện của mô sẹo.

Kết quả trong nghiên cứu của Li và cộng sự (2002) cho thấy, khi nồng độ TDZ tăng từ 0,1 - 2,0 mg/L thì hệ số nhân chồi tăng theo và đạt cao nhất 10,3 chồi/mẫu sau 4 tuần nuôi cấy. Sự khác biệt này có thể giải thích là do nguồn mẫu sử dụng trong hai nghiên cứu là khác nhau, nguồn mẫu chúng tôi sử dụng để tái sinh chồi là đốt thân, trong khi đó, nguồn mẫu trong nghiên cứu của Li và cộng sự (2002) là củ. TDZ là chất điều hòa sinh trưởng thuộc nhóm cytokinin, ở nồng độ thấp chúng kích thích sự tăng sinh của chồi bên. Tuy nhiên, khi bổ sung ở nồng độ cao, chúng có thể kích thích mẫu cây cảm ứng tạo *callus* hoặc phôi soma (Guo et al., 2013). Kết quả của nghiên cứu này cho thấy, bổ sung cytokinin vào môi trường nuôi cấy có hiệu quả rõ rệt trong việc gia tăng hệ số nhân chồi trong nhân giống *in vitro* cây Sùng thảo. Tuy nhiên, trong 2 loại cytokinin đã bổ sung thì môi trường MS có bổ sung 1,0 mg/L BA cho thấy phù hợp với hình thái chồi phát triển cân đối, chồi mập, lá to với màu xanh đậm.

Bảng 1. Ảnh hưởng của BA và TDZ lên khả năng nhân nhanh chồi từ mẫu cây đốt thân cây Sùng thảo

Cyto-kinin	Nồng độ (mg/L)	Số chồi/mẫu (\pm SE)	Số lá/chồi (\pm SE)	Khối lượng tươi/chồi (mg); (\pm SE)	Đặc điểm hình thái chồi
ĐC	0,0	1,00 ^a \pm 0,00	7,20 ^f \pm 0,32	167,6 ^a \pm 11,23	Một chồi cao, lá nhiều, to, màu xanh đậm
	0,5	33,47 ^b \pm 1,34	2,90 ^c \pm 0,26	453,9 ^c \pm 17,92	Chồi trung bình, lá ít, hơi nhỏ, màu xanh đậm
	1,0	45,00 ^c \pm 1,32	4,50 ^d \pm 0,19	459,5 ^c \pm 25,74	Chồi trung bình, lá nhiều, vừa, màu xanh đậm
	1,5	46,70 ^c \pm 1,66	2,00 ^b \pm 0,25	480,5 ^c \pm 20,10	Chồi nhiều, lá ít, nhỏ, màu xanh nhạt
	2,0	63,87 ^d \pm 1,80	2,67 ^{bc} \pm 0,01	632,3 ^d \pm 16,83	Chồi rất nhiều, lá ít, nhỏ, màu xanh nhạt, xuất hiện thủy tinh thể
BA	0,2	61,93 ^d \pm 3,73	2,67 ^{bc} \pm 0,25	620,1 ^d \pm 33,90	Chồi rất nhiều, lá ít, nhỏ, màu xanh nhạt
	0,4	72,00 ^c \pm 2,60	2,80 ^c \pm 0,32	790,5 ^c \pm 15,51	Chồi rất nhiều, lá ít, nhỏ, màu xanh nhạt
	0,8	64,27 ^d \pm 2,74	1,06 ^a \pm 0,26	424,7 ^c \pm 15,28	Chồi rất nhiều, lá ít, nhỏ, màu vàng nhạt, xuất hiện mô sẹo
	1,0	44,13 ^c \pm 3,00	1,20 ^a \pm 0,26	261,3 ^b \pm 12,28	Chồi biến dạng, lá ít, nhỏ, màu vàng nhạt, xuất hiện nhiều mô sẹo

*: Những chữ cái khác nhau (a, b, c...) được nêu trong các cột biểu diễn sự khác nhau có nghĩa với $\alpha = 0,05$ trong Duncan's test.

3.2. Khảo sát ảnh hưởng của NAA đến khả năng hình thành rễ của cây Sùng thảo *in vitro*

Các chồi đồng đều, khỏe mạnh thu được từ nghiệm thức bổ sung 1 mg/L BA được sử dụng để cắm ươm tạo rễ trên môi trường MS có bổ sung NAA với hàm lượng khác nhau: 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 mg/L. Sau 20 ngày nuôi cấy, ở tất cả các nghiệm thức đều thu được tỷ lệ mẫu tạo rễ đạt 100%. Kết quả được trình bày trong Bảng 2.

Kết quả thu nhận sau 20 ngày nuôi cấy cho thấy, nghiệm thức đối chứng chồi cây Sùng thảo có khả năng tự tạo rễ với số lượng trung bình 15,13 rễ/cây, với rễ thưa, dài, mảnh, có phân nhánh, trên rễ có nhiều lông tơ. Điều này chứng tỏ cây Sùng thảo có khả năng tự tái tạo rễ trong môi trường không có bổ sung chất điều hòa sinh trưởng và điều này đã được báo cáo bởi Hosoki và yasufuku (1992). Khi bổ sung NAA vào môi trường nuôi cấy với nồng độ 0,5 mg/L thì số lượng rễ hình thành có sự khác biệt so với đối chứng (21,67 rễ/cây), các chỉ tiêu khác như chiều cao cây và số lá đều cao hơn nghiệm thức đối chứng, hình thái rễ cứng cáp, không phân nhánh, lá nhiều, màu xanh nhạt. Sự hình thành rễ cao nhất (29,93 rễ/cây) thu được trên môi trường có

bổ sung 1 mg/L NAA, các chỉ tiêu khác về chiều cao cây và số lá đều cho kết quả tốt nhất với số lá trung bình 14,27 lá/cây và chiều cao cây trung bình 2,17 cm, cây khỏe mạnh, phù hợp để đưa ra ngoài vườn ươm (Hình 1c). Tiếp tục tăng nồng độ NAA lên từ 1,5 - 2,0 mg/L số lượng rễ giảm dần, rễ ngắn. Điều này cho thấy, sự hình thành rễ của cây Sùng thảo bị ức chế khi bổ sung NAA ở nồng độ cao. Thời gian ra rễ của chồi *in vitro* trong nghiên cứu là 20 ngày, ngắn hơn so với kết quả nghiên cứu của Nguyễn Thị Thu Hằng (2017) là 45 ngày và nghiên cứu của Trịnh Bá Uy (2019) là 56 ngày (8 tuần). Tóm lại, trong nghiên cứu này sử dụng môi trường MS bổ sung 1 mg/L NAA cho hiệu quả tạo rễ cây Sùng thảo tối ưu, rút ngắn thời gian ra rễ, cây phát triển cân đối, đồng đều, thân mập, lá to và cứng thuận tiện cho việc sinh trưởng tiếp theo ở giai đoạn vườn ươm.

Bảng 2. Kết quả khảo sát ảnh hưởng của NAA đến khả năng tạo rễ của chồi cây Sùng thảo

NAA (mg/L)	Chiều cao cây (cm); (\pm SE)	Số rễ/cây (\pm SE)	Chiều dài rễ (cm); (\pm SE)	Số lá/cây	Đặc điểm hình thái rễ
ĐC 0,0	1,40 ^{b*} \pm 0,03	15,13 ^{a*} \pm 0,61	4,69 ^{c*} \pm 0,22	7,20 ^{e*} \pm 0,32	Rễ thưa, dài, mảnh, phân nhánh, có lông tơ
0,5	1,70 ^{c*} \pm 0,07	21,67 ^{b*} \pm 0,89	1,66 ^{a*} \pm 0,11	10,40 ^{d*} \pm 0,40	Rễ ít, ngắn, cứng, không phân nhánh, lá trung bình, xanh
1,0	2,17 ^{d*} \pm 0,08	29,93 ^{c*} \pm 1,45	2,57 ^{b*} \pm 0,12	14,27 ^{e*} \pm 0,61	Rễ nhiều, dài, cứng, không phân nhánh, lá nhiều, màu xanh
1,5	1,36 ^{ab*} \pm 0,06	22,13 ^{b*} \pm 0,13	1,73 ^{a*} \pm 0,13	5,87 ^{b*} \pm 0,32	Rễ nhiều, ngắn, cứng, không phân nhánh, xuất hiện
2,0	1,83 ^{a*} \pm 0,06	20,27 ^{b*} \pm 1,20	1,52 ^{a*} \pm 0,10	4,00 ^{a*} \pm 0,33	Rễ ít, ngắn, cứng, màu trắng, phần gốc chồi tạo mô sẹo trắng xốp

*: Những chữ cái khác nhau (a, b, c...) được nêu trong các cột biểu diễn sự khác nhau có nghĩa với $\alpha = 0,05$ trong Duncan's test.

3.3. Khảo sát ảnh hưởng của các loại giá thể lên khả năng sinh trưởng của cây con Sùng thảo ở giai đoạn vườn ươm

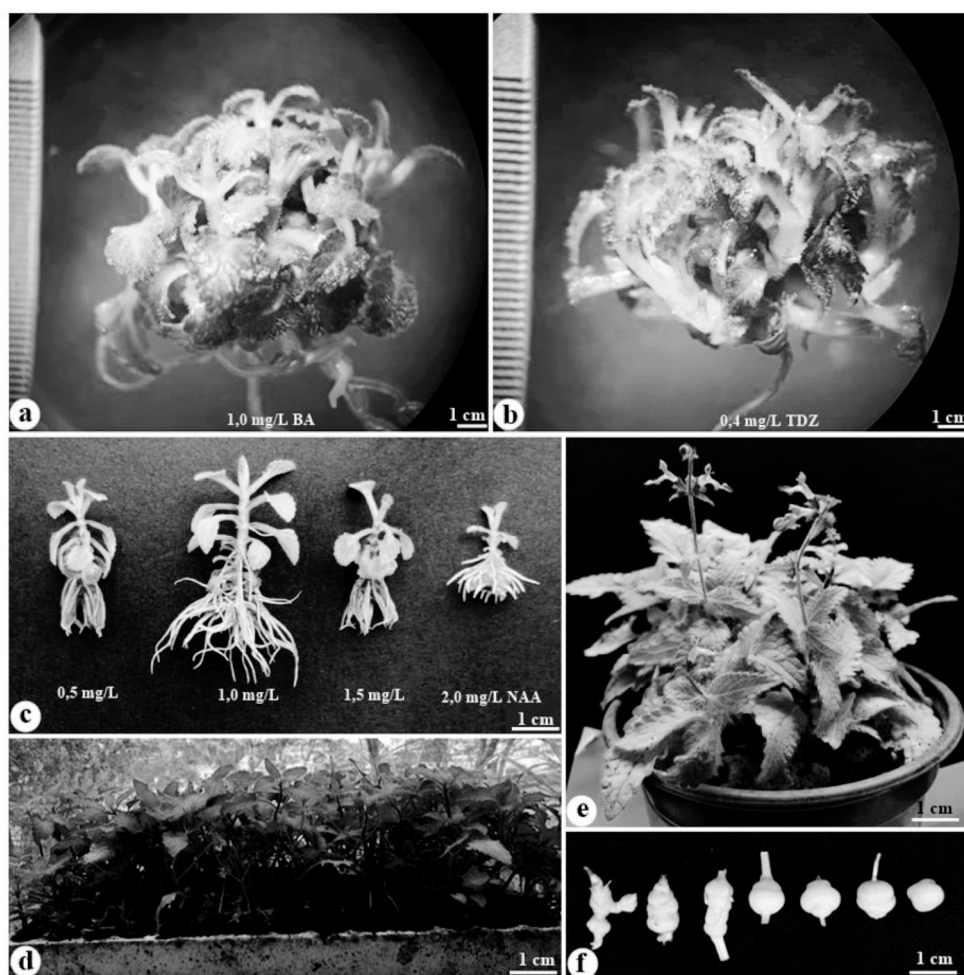
Giai đoạn chuyển cây *in vitro* từ phòng thí nghiệm ra vườn ươm thường gặp rất nhiều khó khăn như: tỷ lệ cây sống rất thấp, cây sinh trưởng kém và sâu bệnh tấn công... Vì vậy, khi đưa cây *in vitro* ra vườn ươm cần phải tạo cho cây sinh trưởng và thích nghi với điều kiện tự nhiên. Giá

thể cũng là một trong những nhân tố ảnh hưởng tới tỷ lệ ra rễ của cây con ngoài vườn ươm. Vì vậy, tìm được giá thể trồng phù hợp đóng một vai trò quan trọng trong việc chuyển cây Sùng thảo từ điều kiện *in vitro* đến *ex vitro*. Cây Sùng thảo *in vitro* khỏe mạnh có kích thước tương đồng được trồng trên khay xốp với 3 loại giá thể khác nhau, sau 60 ngày chăm sóc ngoài vườn ươm cho kết quả thể hiện qua Bảng 3.

Bảng 3. Ảnh hưởng của các loại giá thể lên khả năng sống và sinh trưởng tiếp theo ở giai đoạn vườn ươm

Giá thể	Tỷ lệ sống (%)	Chiều cao cây (cm); (\pm SE)	Số lá (\pm SE)	Đặc điểm hình thái cây
Đất	23,71 ^{a*}	3,68 ^{a*} \pm 0,14	9,40 ^{a*} \pm 0,30	Cây phát triển chậm, còi cọc; đốt thân ngắn; lá ít, nhỏ, màu vàng xanh.
Xơ dừa	51,20 ^{b*}	6,56 ^{b*} \pm 0,20	11,13 ^{b*} \pm 0,28	Cây phát triển bình thường; đốt thân trung bình, lá thưa, vừa, màu xanh.
Xơ dừa + đất + đá perlite (7:2:1)	92,80 ^{c*}	10,51 ^{c*} \pm 0,13	12,40 ^{c*} \pm 0,17	Cây phát triển nhanh, khỏe mạnh; đốt thân dài; lá to, nhiều, màu xanh.

*: Những chữ cái khác nhau (a, b, c...) được nêu trong các cột biểu diễn sự khác nhau có nghĩa với $\alpha = 0,05$ trong Duncan's test.



Hình 1. Các bước nhân giống cây Sùng thảo: a. Tái sinh chồi từ nuôi cấy đốt thân trên môi trường có bổ sung 1,0 mg/L BA; b. Tái sinh chồi từ nuôi cấy đốt thân trên môi trường có bổ sung 0,4 mg/L TDZ; c. Cắm úng ra rễ trên môi trường có bổ sung NAA; d. Cây con sinh trưởng trên hỗn hợp giá thể (xơ dừa + đất + đá perlite (7:2:1) sau 60 ngày ngoài vườn ươm; e, f. Cây sinh trưởng và phát triển bình thường, ra hoa và tạo củ giống như những cây được trồng theo phương pháp nhân giống thông thường sau 90 ngày chăm sóc ngoài vườn ươm;

Kết quả thu nhận sau 60 ngày thuần dưỡng ngoài vườn ươm cho thấy, trong 3 loại giá thể được khảo sát, giá thể đất (100%) cho tỷ lệ sống sót thấp nhất là 23,71%, cây còn có sức sống yếu, phát triển chậm, còi cọc, các chỉ tiêu sinh trưởng của cây như số lượng lá và chiều cao cây cũng thấp nhất (Bảng 3). Như vậy có thể thấy rằng tỷ lệ sống sót của cây con Sùng thảo có phụ thuộc nhiều vào độ xốp, tính thoát nước của giá thể sử dụng. Loại giá thể thứ 2 được khảo sát trong nghiên cứu là xơ dừa cho tỷ lệ sống sót 51,20%, các chỉ tiêu sinh trưởng về số lượng lá đạt trung bình 11,23 lá/cây và chiều cao cây trung bình là 6,56 cm. Cuối cùng là loại giá thể phối hợp giữa đất thịt; xơ dừa; đá perlite với tỷ lệ 7: 2: 1 cho tỷ lệ sống sót cao nhất 92,8%, các chỉ tiêu như đạt 12,4 lá/cây và chiều cao cây (10,51 cm).

Dựa vào kết quả trên, có sự khác biệt rõ rệt trong kết quả thu được khi khảo sát 3 loại giá thể do tính chất khác nhau của từng loại giá thể. Giá thể đất

mặc dù các thành phần dinh dưỡng cao nhưng khả năng thoát nước kém, trong khi ở giai đoạn đầu tại vườn ươm, cây giống *in vitro* không có nhu cầu cần nhiều chất dinh dưỡng mà yếu tố quyết định là độ ẩm, nhiệt độ và ánh sáng để cây có thể thích nghi và ra rễ mới (Nguyễn Thị Thanh Hằng, 2017). Giá thể xơ dừa khả năng thoát nước nhanh nhưng khả năng giữ ẩm chưa tốt lắm, hơi nước thoát nhanh nên cây con dễ bị mất nước. Hỗn hợp giá thể gồm xơ dừa: đất: đá perlite với tỷ lệ 7: 2: 1 vừa có tính tơi xốp, thoát nước tốt của xơ dừa, kích thích cây con phát triển, tránh được hiện tượng gây nghẹt rễ con. Đất trong hỗn hợp với tỷ lệ thích hợp có tính giữ ẩm tốt nên hạn chế được việc mất nước, nhất là lúc trưa nắng, tránh cho cây con bị chết vì mất nước. Ngoài ra, xơ dừa đã được xử lý nên hạn chế được các mầm bệnh tấn công cây con, trong xơ dừa và đất còn chứa các chất hữu cơ tự nhiên tốt cho cây trồng, giúp cây tăng trưởng nhanh. Đá perlite hay còn gọi là đá trân châu được bổ sung với tỷ lệ 1/10 trong hỗn hợp là

chất vô cơ, màu trắng, siêu nhẹ, trơ, trung tính về độ pH, ổn định về mặt sinh học, có dạng xốp nên có thể tích lớn nhưng cực kỳ nhẹ và được ứng dụng trong rất nhiều lĩnh vực như: nông nghiệp, công nghiệp và xây dựng. Đá Perlite có cấu trúc thể hang nên ngậm nước, giàu chất dinh dưỡng, điều hòa nhiệt độ, độ ẩm cho đất và giá thể trồng, tạo độ tơi xốp, thoáng khí giúp bộ rễ phát triển mạnh (Silber et al., 2010).

Cây con sau khi thích nghi trên giá thể hỗn hợp (xơ dừa: đất: đá perlite với tỷ lệ 7: 2: 1) tiếp tục được trồng sang các chậu nhựa có đường kính 20 cm với hỗn hợp giá thể tương tự để tiếp tục sinh trưởng tiếp theo ở giai đoạn vườn ươm. Kết quả cho thấy, cây sinh trưởng và phát triển bình thường, ra hoa và tạo củ giống như những cây được trồng theo phương pháp nhân giống thông thường sau 90 ngày chăm sóc ngoài vườn ươm (Hình 1e).

4. KẾT LUẬN

Bài báo đã nghiên cứu nhân giống cây Sùng

thảo thông qua nuôi cấy đốt thân với hệ số nhân cao. Môi trường MS bổ sung 1 mg/L BA, 30 g/L sucrose, 8,5 g/L agar, pH 5,8 thích hợp để nhân nhanh chồi từ mẫu cấy đốt thân với số chồi hình thành đạt 45 chồi/mẫu. Cắm ứng ra rễ và tạo cây con hoàn chỉnh trên môi trường MS bổ sung 1 mg/L NAA, 30 g/L sucrose, 8,5 g/L agar, pH 5,8. Cây con sinh trưởng tốt nhất và tỷ lệ sống sót đạt cao nhất 92,8% thu được trên hỗn hợp giá thể (sơ dừa: đất: đá perlite với tỷ lệ 7: 2: 1) với chiều cao cây (10,51 cm) và số lá (12,4 lá/cây). Cây con tiếp tục sinh trưởng và phát triển thường khi được trồng trong các chậu nhựa có đường kính 20 cm với hỗn hợp giá thể tương tự sau 90 ngày nuôi trồng trong điều kiện nhà kính.

Lời cảm ơn: Nghiên cứu này được thực hiện dựa vào nguồn kinh phí của Trường Đại học Yersin Đà Lạt cấp theo Quyết định số 262/QĐ-DYD ngày 12/9/2022.

STUDY ON IN VITRO MICROPROPAGATION OF STACHYS AFFINIS BUNGE

Tran Thi Tam¹, Vu Thi Tu¹, Nguyen Phu Hoai¹, Nong Thi Anh Truc¹, Vu Quoc Luan²

Received Date: 20/11/2023; Revised Date: 13/12/2023; Accepted for Publication: 15/12/2023

ABSTRACT

Stachys affinis bunge is one of the important herbs plant in China, Japan, France and many other European countries. Therefore, they are used as a traditional medicine, as nutritious product for healthcare and processed into food in daily meals. In this study, *in vitro* propagation was made for high efficiency through stem node culture. The results showed that MS medium supplemented with 1 mg/L BA, 30 g/L sucrose, 8.5 g/L agar, pH 5.8 gave the highest shoot regeneration coefficient from stem nodal culture (45 shoots/explant) with average fresh weight (459.5 mg/shoot cluster). The MS medium supplemented with 1 mg/L NAA was suitable for the rooting process and complete plantlets with an average number of roots (29.93 roots/plantlet), root length (2.57 cm) and plant height (2.17 cm). The substrate mixture includes coconut fiber: soil: perlite with a ratio of 7: 2: 1 brought the highest survival rate of 92.8% with plant height of 10.51 cm after 60 days of being planted in greenhouse. The plant continued to grow and bloom normally when planted in 20 cm diameter plastic pots with a similar substrate mixture after 90 days of cultivation in greenhouse conditions.

Keywords: complete plantlets, shoot regeneration, *Stachys affinis*, stem node culture.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Tài liệu tiếng Việt

Đoàn Thị Tám, Nguyễn Thị Dung, Phan Văn Hồ Nam, Ngô Thị Phương Anh, Phan Thị Lộc, Nguyễn Đăng Quân (2020). Khảo sát hàm lượng stachyose, polysaccharide và saponin của cao tổng nước từ củ Sùng thảo (*Stachys affinis*), *Hội nghị Công nghệ sinh học toàn quốc 2020, Đại học Huế*, 200-205.

¹Yersin University;

²Tay Nguyen Institute for Scientific Research (VAST);

Corresponding author: Vu Quoc Luan; Tel: 0948013224; Email: vuquocluan07@gmail.com.

Nguyễn Thanh Hoàng, Nguyễn Thị Vy Phương, Đặng Thị Xuân Quyên, Võ Văn Lẹo, Nguyễn Việt Kinh, Võ Thị Bạch Huệ, Mã Chí Thành (2022). Khảo sát đặc điểm vi học, thành phần hóa học và hoạt tính gây độc trên một số dòng tế bào ung thư của thân rễ Sùng thảo – *Rhizoma Stachydis affinis*, *Tạp chí khoa học đại học Đông Á*, 1(1): 57- 66.

Nguyễn Thị Thanh Hằng (2017). Xây dựng quy trình nhân giống *in vitro* cây Sùng thảo. *Đại học Công nghệ thành phố Hồ Chí Minh*.

Phạm Ngọc Khánh, Chu Thị Thúy Nga, Nguyễn Hải Văn, Đoàn Thị Huyền Trang (2022). Đánh giá đặc điểm nông sinh học của các mẫu giống Sùng thảo (*Stachys sieboldii* Miq.) tại Sa Pa, Lào Cai. *Nông nghiệp và Phát triển nông thôn*, 19: 27-31.

Trịnh Bá Uy (2019), Báo cáo nghiệm thu Quy trình nhân giống *in vitro* và trồng Sùng thảo trong điều kiện nhà màng. *Trung tâm Công nghệ sinh học thành phố Hồ Chí Minh*.

Tài liệu nước ngoài

Guo, B., Abbasi, B., Zeb, A., Xu, L., Wei, Y. (2013). Thidiazuron: A multi-dimensional plant growth regulator. *African Journal of Biotechnology*, 10(45): 8984-9000.

Harada, S., Tsujita, T., Ono, A., Miyagi, K., Mori, T., Tokuyama, S. (2015). *Stachys sieboldii* (Labiatae, Chorogi) protects against learning and memory dysfunction associated with ischemic brain injury. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, 61(2): 167-174.

Hayashi, K., Nagamatsu, T., Ito, M., Yagita, H., Suzuki, Y. (1996). Acteoside, a component of *Stachys Sieboldii* MIQ, may be a promising antinephritic agent (3): effect of acteoside on expression of intercellular adhesion molecule-1 in experimental nephritic glomeruli in rats and cultured endothelial cells. *The Japanese Journal of Pharmacology* 70(2): 157-168.

Hosoki, T., and Yasufuku, T. (1992). *In vitro* mass-propagation of Chinese Artichoke (*Stachys sieboldii* Miq.). *ISHS Acta Horticulturae*, 319: 149-152.

Keller, F. and Matile, P. (1985). The role of the vacuole in storage and mobilization of stachyose in tubers of *Stachys sieboldii*. *Journal of Plant Physiology*, 119(4): 369-380.

Legkobit, M. P., and Khadeeva, N. V. (2004). Variation and morphogenetic characteristics of different *Stachys* species during microclonal propagation *Russian Journal of Genetics*, 40(7): 743-750.

Li, W., Gao, H., Lu R., Guo, G. Q. (2002). Direct plantlet regeneration from the tuber of *Stachys sieboldii*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 71(3): 259-262.

Lukasz, J. L., Svanberg, I., Koehler, P. (2011). Marsh woundwort, *Stachys palustris* L. (Lamiaceae): an overlooked food plant. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 58(5): 783-793.

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

Nakakuki, T. (2002). Present status and future of functional oligosaccharide development in Japan. *Pure and Applied Chemistry*, 74(7):1245-1251.

Silber, A., Bar-Yosef, B., Levkovitch, I., Soryano, S. (2010). pH-Dependent surface properties of perlite: Effects of plant growth. *Geoderma Volume*, 158(3-4): 275-281.

Smith, A. W., Roche, H., Trombe, M. C., Briles, D. E., Håkansson A. (2002). Characterization of the dihydrolipoamide dehydrogenase from *Streptococcus pneumoniae* and its role in pneumococcal infection. *Molecular Microbiology*, 44(2): 431-448.

Venditti, A., Frezza, C., Celona, D., Bianco, A., Serafini, M., Cianfaglione, K., Fiorini, D., Ferraro, S., Maggi, F., Lizzi, A. R., Celenza, G. (2017). Polar constituents, protection against reactive oxygen species, and nutritional value of Chinese artichoke (*Stachys affinis* Bunge). *Food Chemistry*, 221: 473-481.

Yamahara, J., Kitani, T., Kobayashi, H., Kawahara, Y. (1990). Studies on *Stachys sieboldii* MIQ. II. Anti-anoxia action and the active constituents. *Yakugaku Zasshi*, 110(2): 932-935.

Yıldız, S. (2010). The metabolism of fructooligosaccharides and fructooligosaccharide-related compounds in plants. *Food Reviews International* 27(1): 16-50.

Zhang, R. X., Jia, Z. P., Kong, L. Y., Ma, H. P., Ren, J., Li, M. X., Ge, X. (2004). Stachyose extract from *Rehmannia glutinosa* Libosch. to lower plasma glucose in normal and diabetic rats by oral administration. *Pharmazie*, 59(7): 552-556.