

NGHIÊN CỨU NHÂN NHANH GIẢO CỔ LAM (*Gynostemma Pentaphyllum* (Thunb.) Makino) BẰNG GIÂM CÀNH TRÊN HỆ THỐNG KHÍ CANH

Nguyễn Thanh Hải^{1*}, Phạm Thị Thu Hằng¹, Kim Thị Vân¹, Nguyễn Thị Ngọc Hân¹,
Đặng Thị Phương Anh², Đinh Trường Sơn¹, Nguyễn Thị Lâm Hải¹, Đặng Thị Thanh Tâm¹,
Ninh Thị Thảo¹, Nông Thị Huệ¹, Nguyễn Xuân Trường^{1,3*}

¹Khoa Công nghệ sinh học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

²Khoa Nông học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

³Viện Sinh học Nông nghiệp, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

*Tác giả liên hệ: nthaicnsh@vnua.edu.vn/nxtruongvsh@vnua.edu.vn

Ngày nhận bài: 13.04.2021

Ngày chấp nhận đăng: 28.06.2021

TÓM TẮT

Nghiên cứu này được tiến hành nhằm xác định ảnh hưởng của độ dẫn điện (với 3 giá trị EC: 800 μ S/cm, 1.000 μ S/cm và 1.200 μ S/cm), nhiệt độ (với 4 mức nhiệt độ: 15°C, 20°C, 25°C, đối chứng (27-29°C)) của dung dịch dinh dưỡng và số đốt của cành giâm (với 3 loại cành giâm: cành có 1 đốt mang mắt ngủ, cành có 2 đốt mang mắt ngủ và cành có 3 đốt mang mắt ngủ) đến khả năng nhân nhanh cũng như sinh trưởng của cây Giảo cổ lam từ cành giâm trên hệ thống khí canh. Kết quả cho thấy có thể sử dụng hệ thống khí canh cho việc nhân giống vô tính bằng giâm cành Giảo cổ lam *Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.) Makino. Dung dịch dinh dưỡng SH1 với giá trị EC 1.000 μ S/cm là dinh dưỡng tối ưu cho việc nhân nhanh cho hệ số nhân chồi cao nhất. Dung dịch dinh dưỡng cần duy trì ở nhiệt độ 25°C, sử dụng cành giâm bánh tẻ, số đốt/cành giâm là 2-3 đốt. Áp dụng quy trình nhân giống trên cho hệ số nhân chồi đạt 16,48-18,48 lần/cây mẹ/35 ngày. Cây giống tạo ra từ cành giâm có khả năng sinh trưởng và phát triển tốt trên hệ thống khí canh. Giảo cổ lam cho sinh khối cao nhất khi sử dụng dung dịch dinh dưỡng SH1 với EC 1.200 μ S/cm.

Từ khóa: Giảo cổ lam, *Gynostemma pentaphyllum*, khí canh, nhân nhanh.

Rapid Multiplication of *Gynostemma Pentaphyllum* (Thunb.) Makino by Cuttings by Aeroponic Systems

ABSTRACT

This study aimed to determine the influence of some aeroponics-growing factors such as: conductivity (800 μ S/cm, 1,000 μ S/cm, 1,200 μ S/cm), temperature (15°C, 20°C, 25°C, Control (27-29°C)) of the nutrient solution and the number of nodal of the cuttings (1 nodal; 2 nodal; 3 nodal) on the rapid multiplication and growth of the local medicinal plant *Gynostemma Pentaphyllum* (Thunb.) Makino. The results showed that it was possible to use aeroponics system for multiplication of *Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.) Makino by cuttings. The nutrition solution SH1 with EC of 1,000 μ S/cm was the optimal nutrient for rapid multiplication in terms of shoot induction. The nutrition solution should be maintained at 25°C. 2-3 nodal cuttings at middle age were suitable for multiplication. The above propagation protocol yielded the shoot multiplication rate of 16.48-18.48 times/mother plant/35 days. The plantlets derived from cuttings grew well on aeroponic system. Highest biomass yield was obtained when SH1 solution with EC of 1,200 μ S/cm was used.

Keywords: *Gynostemma pentaphyllum*; aeroponic; rapid multiplication.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Cùng với sự phát triển ngày càng cao của xã hội, xu hướng sử dụng dược liệu có nguồn gốc tự nhiên ngày càng được ưu tiên (Nguyễn & cs.,

2018). Nhiều dược liệu có nguồn gốc từ thực vật đã và đang được sử dụng rộng rãi như là nguồn cung cấp các thực phẩm chức năng cho đại đa số người dân trên thế giới (Nguyễn & cs., 2016). Giảo cổ lam (*Gynostemma pentaphyllum*) được

biết đến là loại thảo dược nổi tiếng từ lâu đời bởi đặc tính chống căng thẳng giúp khôi phục sự cân bằng của cơ thể và cải thiện trí nhớ (Keilhoff & cs., 2017). Giảo cổ lam có hàm lượng saponin cao gấp 3-4 lần so với nhân sâm (Phạm Cao Khải & cs., 2018). Nghiên cứu hoá sinh đã chỉ ra, ngoài saponin, Giảo cổ lam còn chứa flavonoid, polysacarit, axit amin, vitamin và một số yếu tố cần thiết khác. Ngoài ra, Giảo cổ lam còn có tác dụng hiệu quả khi chuyển hoá lipid giúp ổn định mức cholesterol trong máu và giảm béo hiệu quả; bình ổn huyết áp, bảo vệ hệ thần kinh (Keilhoff & cs., 2017), ngăn ngừa các biến chứng tim mạch (Shaito & cs., 2020), chống lão hoá (Razmovski & cs., 2005), giảm stress (Choi & cs., 2019), giúp ngủ ngon giấc (Liao & cs., 2018).

Với nhiều đặc tính dược học có giá trị như trên nên trong các năm gần đây, nguồn Giảo cổ lam trong tự nhiên đã và đang bị khai thác quá mức dẫn đến khan hiếm (Bùi Đình Lâm & cs., 2015; Zhang & cs., 2019). Chính vì thế nhân nhanh Giảo cổ lam đang là nhu cầu cần được ưu tiên hiện nay. Hiện đã có các nghiên cứu về nhân giống Giảo cổ lam sử dụng các kỹ thuật truyền thống như giâm hom, gieo hạt... nhưng hệ số nhân giống và độ đồng đều thấp. Đã có nhiều công bố về nhân giống *in vitro* Giảo cổ lam, tuy nhiên hệ số nhân chồi còn thấp 7,285 chồi/mẫu (Jala & Patchpoonporn, 2012), 4,36 chồi/mẫu (Bùi Đình Lâm & cs., 2015), 6,8 chồi/mẫu (Phạm Cao Khải & cs., 2018), 13,80 chồi/mẫu (Nguyễn Thị Thanh Hằng & cs., 2018), 7,72 chồi/mẫu (Quảng & cs., 2019).

Ở Việt Nam, nhân giống vô tính bằng công nghệ khí canh đã được áp dụng rất hiệu quả trên một số cây trồng với hệ số nhân cao như khoai tây 11,00 lần/30 ngày (Nguyễn Quang Thạch & cs., 2006), cây cà chua 11,44 lần/60 ngày (Hoàng Thị Nga & cs., 2010), cây Đinh lăng (*Polyscias fruticosa*) 29,40 lần/8 tuần (Trương Thanh Hưng & cs., 2018) và cây Thìa canh (*Gymnema sylvestre*) 20,00 lần/tháng (Trần Thị Quý & cs., 2018) đã cho tỉ lệ ra rễ và tỉ lệ sống đạt trên 90% với hệ số nhân cao.

Việc phát triển trồng cây dược liệu theo hướng nông nghiệp công nghệ cao là một xu hướng tất yếu đã và đang được triển khai mạnh mẽ ở nhiều vùng miền tại Việt Nam. Tuy nhiên

theo những tài liệu chúng tôi có thể tiếp cận được thì chưa có công bố nào về nghiên cứu và áp dụng kỹ thuật nhân giống Giảo cổ lam bằng giâm cành trên hệ thống khí canh. Chính vì vậy, việc nghiên cứu nhân giống Giảo cổ lam bằng kỹ thuật giâm cành trên hệ thống khí canh sẽ có ý nghĩa khoa học và thực tiễn nhằm nhân nhanh loại thảo dược này ở quy mô công nghiệp.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu và thiết kế thí nghiệm

Vật liệu nghiên cứu là cây Giảo cổ lam *Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.) Makino nuôi cấy mô. Sử dụng dung dịch dinh dưỡng SH1 (Nguyễn Quang Thạch & cs., 2006)

Cây nuôi cấy mô đạt tiêu chuẩn (cao 3cm, 3-4 lá, 4-5 rễ) được lấy ra khỏi bình nuôi cấy, rửa sạch môi trường dưới vòi nước, trồng trong hộp khí canh trong nhà màng cách ly. Hộp khí canh có diện tích 2m² (1m × 2m). Vùng rễ nằm trong hộp được phun nước và dinh dưỡng tự động, thời gian phun/ngỉ là 15 giây/20 phút. Nhà màng cách ly côn trùng, che mưa, lưới chắn nắng, có hệ thống quạt thông gió và làm mát chủ động, nhiệt độ trong nhà duy trì từ 27-29°C.

Các thí nghiệm được thiết kế theo phương pháp khối ngẫu nhiên hoàn chỉnh (RCB), mỗi công thức nhắc lại 3 lần, mỗi lần nhắc lại là 1 hộp khí canh (diện tích 2m²), mỗi lần nhắc lại 21 cây.

Thời gian nghiên cứu: Tháng 8-12/2020.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Thí nghiệm nghiên cứu xác định nồng độ dung dịch dinh dưỡng đến khả năng nhân giống vô tính cây Giảo cổ lam. Nồng độ dung dịch dinh dưỡng được xác định thông qua đo giá trị độ dẫn điện (electrical conductivity - EC). Thí nghiệm được tiến hành với 3 giá trị EC: 800 µS/cm, 1.000 µS/cm và 1.200 µS/cm.

Thí nghiệm nghiên cứu ảnh hưởng của nhiệt độ dung dịch dinh dưỡng đến khả năng nhân giống cây Giảo cổ lam được tiến hành với 4 mức nhiệt độ: 15°C, 20°C, 25°C, đối chứng (27-29°C).

Thí nghiệm nghiên cứu ảnh hưởng của số đốt mang mắt ngủ/cành giâm đến khả năng nhân giống cây Giảo cổ lam được tiến hành với 3

loại canh giám: canh có 1 đốt mang mắt ngủ, canh có 2 đốt mang mắt ngủ và canh có 3 đốt mang mắt ngủ.

2.3. Các chỉ tiêu theo dõi

Các chỉ tiêu theo dõi bao gồm: Số chồi/một lần cắt (Cắt 5 lần trong 35 ngày, thời gian giữa các lần cắt là 7 ngày), hệ số nhân giống (lần), tỉ lệ cây sống (%); tỉ lệ ra rễ (%) (theo dõi 3 đợt: 8 ngày sau trồng, 10 ngày sau trồng và 12 ngày sau trồng); chiều dài rễ (cm) (theo dõi 10 ngày sau trồng, 20 ngày sau trồng và 30 ngày sau trồng); chiều cao cây (cm), số lá/cây (lá); khối lượng tươi (gam), khối lượng khô (gam); thời gian từ khi trồng mẫu đến khi cắt ngọn (ngày), thời gian từ khi cắt ngọn đến bật mầm (ngày), thời gian kết thúc bật mầm (ngày), tỉ lệ bật mầm (%), số mắt ngủ trung bình/cây mẹ/1 lần cắt.

2.4. Xử lý số liệu

Số liệu được phân tích phương sai (ANOVA) một nhân tố và phân tích hậu kiểm Fisher's PLSD với mức $P \leq 0,05$ bằng phần mềm IRRISTAT 4.0.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Ảnh hưởng của độ dẫn điện (EC) của dung dịch dinh dưỡng đến khả năng nhân vô tính cây Giảo cổ lam trên hệ thống khí canh

EC dung dịch dinh dưỡng ở mức 800 $\mu\text{S/cm}$ có thể là mức thấp với cây Giảo cổ lam nên cây sinh trưởng kém, sự bật chồi của cây mẹ bị giảm, số chồi thu được ở mỗi lần thấp hơn so với hai giá trị EC dung dịch dinh dưỡng còn lại. Trong đó có 2 lần cắt đầu tiên có số chồi được ít hơn hoặc chỉ bằng số cây mẹ (17-21 chồi/21 cây mẹ). Khi EC của dung dịch tăng lên 1.000 $\mu\text{S/cm}$ thì số chồi thu được mỗi lần cắt đều tăng và tổng số chồi thu được cũng tăng lên cùng với sự tăng của EC (từ 273 lên 378 chồi/35 ngày). Tổng số chồi thu được đạt cao nhất (378 chồi) ở công thức có EC là 1.000 $\mu\text{S/cm}$. Tuy nhiên, khi EC tăng lên 1.200 $\mu\text{S/cm}$ thì số chồi thu được giảm đi, tổng số chồi thu được đạt 349 chồi. Hệ số nhân chồi ở công thức có EC 1.000 $\mu\text{S/cm}$ tăng

từ 13 lần (EC 800 $\mu\text{S/cm}$) lên 18 lần/35 ngày. Khi EC dung dịch tăng lên 1.200 $\mu\text{S/cm}$ thì hệ số nhân giảm còn 16,62 lần/35 ngày (Bảng 1).

Hệ số nhân giống đạt cao nhất khi giá trị EC là 1.000 $\mu\text{S/cm}$ và giảm đi khi độ dẫn điện tiếp tăng lên 1200 $\mu\text{S/cm}$. Điều này có thể được giải thích là chỉ số EC thấp gây ra hiện tượng thiếu dinh dưỡng, ảnh hưởng đến khả năng bật mầm, còn chỉ số EC cao sẽ ngăn cản sự hấp thu chất dinh dưỡng do áp suất thẩm thấu cao gây nên rối loạn sinh lí (Lam & cs., 2020).

Giá trị EC của dung dịch dinh dưỡng phản ánh tổng số ion chứa trong dung dịch dinh dưỡng (Calori & cs., 2017) và có ảnh hưởng lớn hệ số nhân giống vô tính Giảo cổ lam. Theo Calori & cs. (2017), Nguyễn Quang Thạch & cs. (2009) thì EC quá cao hoặc quá thấp sẽ làm giảm khả năng nhân chồi của khoai tây. Như vậy, kết quả nghiên cứu của chúng tôi có sự tương đồng với các nghiên cứu khác về ảnh hưởng của EC tới hệ số nhân giống.

Tiếp tục theo dõi các chỉ tiêu về tỉ lệ sống, tỉ lệ ra rễ và chất lượng rễ của cây Giảo cổ lam trên hệ thống khí canh cho thấy, tỉ lệ sống của cây đều đạt 100% ở cả 3 mức EC, tuy nhiên, tỉ lệ ra rễ và chiều dài rễ tăng đáng kể khi tăng độ dẫn điện (Bảng 2). Tỉ lệ ra rễ tăng dần theo thời gian. Sau 8 ngày, có thể thấy sự thay đổi về tỉ lệ ra rễ khác nhau ở các công thức môi trường. Tỉ lệ ra rễ đạt cao nhất ở EC 1.200 $\mu\text{S/cm}$ (33,67%) và thấp nhất ở EC 800 $\mu\text{S/cm}$ (19,00%). Sau 10 ngày, tỉ lệ ra rễ tăng lên nhanh so với 8 ngày ở tất cả các mức EC. Sau 12 ngày, canh giám đạt tỉ lệ ra rễ cao nhất là 100% khi giám trên dung dịch dinh dưỡng với EC 1.200 $\mu\text{S/cm}$. Bên cạnh đó, chiều dài rễ cũng tăng dần theo thời gian và theo độ dẫn điện EC. Sau 10 ngày, với EC 800 $\mu\text{S/cm}$, sự phát triển của rễ là chậm nhất (chiều dài rễ trung bình 1,88cm). Với EC 1.200 $\mu\text{S/cm}$, sự phát triển của rễ là nhanh nhất (chiều dài rễ trung bình 1,93cm). Sau 30 ngày, với EC 1.200 $\mu\text{S/cm}$, chiều dài rễ vượt trội hẳn so với EC 800 $\mu\text{S/cm}$ (84,87cm; 56,84cm, tương ứng). Ở EC 1.000 $\mu\text{S/cm}$, chiều dài rễ ở mức trung bình (68,43 cm). Ở mức EC là 1200 $\mu\text{S/cm}$, tỉ lệ ra rễ đạt tối đa và chiều dài rễ là cao nhất. Hiện nay chưa có nghiên cứu nào về ảnh hưởng của EC đến tỉ lệ sống, tỉ lệ ra rễ và chiều dài rễ của cây Giảo cổ lam.

Bảng 1. Ảnh hưởng của độ dẫn điện (EC) của dung dịch dinh dưỡng đến khả năng nhân chồi Giảo cổ lam trên hệ thống khí canh

EC ($\mu\text{S/cm}$)	Số chồi/một lần cắt (chồi/lần)					Tổng số chồi cắt/35 ngày	Hệ số nhân (lần/35 ngày)
	Lần 1	Lần 2	Lần 3	Lần 4	Lần 5		
800	17	21	44	66	125	273 ^a	13,0 ^a
1.000	22	23	62	88	183	378 ^c	18,0 ^c
1.200	21	25	53	84	166	349 ^b	16,6 ^b
CV%						4,34	4,30
LSD _{0,05}						8,56	1,37

Ghi chú: Tổng số chồi cắt từ 21 cây mẹ, thời gian giữa các đợt cắt là 7 ngày. Các giá trị trung bình kèm theo chữ cái khác nhau trên cùng 1 cột là sai khác có ý nghĩa ($P < 0,05$).

Bảng 2. Ảnh hưởng của độ dẫn điện (EC) của dung dịch dinh dưỡng đến tỉ lệ sống, tỉ lệ ra rễ và chất lượng rễ của cây Giảo cổ lam trên hệ thống khí canh

EC ($\mu\text{S/cm}$)	Tỉ lệ sống (%)	Tỉ lệ ra rễ (%)			Chiều dài rễ (cm)		
		8 NST	10 NST	12 NST	10 NST	20 NST	30 NST
800	100	19,00	76,00	85,67	1,68 ^a	23,87 ^a	56,84 ^a
1.000	100	28,67	85,67	95,33	1,80 ^{a,b}	27,25 ^b	68,43 ^b
1.200	100	33,67	90,67	100,00	1,93 ^{b,c}	37,62 ^c	84,87 ^c
CV%					6,80	3,10	3,70
LSD _{0,05}					0,28	2,10	5,80

Ghi chú: NST: Ngày sau trồng; Các giá trị trung bình kèm theo chữ cái khác nhau trên cùng 1 cột là sai khác có ý nghĩa ($P < 0,05$).

Nghiên cứu của Trần Thị Quý & cs. (2018) đối với cây Thìa canh (*Gymnema sylvestre*) cũng cho thấy, cây sinh trưởng chậm ở mức EC thấp 500 $\mu\text{S/cm}$ và 1.000 $\mu\text{S/cm}$. Nhưng khi tăng EC lên 1.500 $\mu\text{S/cm}$, cây Thìa canh có sự sinh trưởng tốt, số chồi và số lá trung bình trên cây lần lượt đạt 4,13 chồi/cây và 46,33 lá/cây, hệ số nhân đạt 19,5 cành/giâm/tháng/cây. Tuy nhiên, khi độ dẫn điện quá cao lại hạn chế sự sinh trưởng cây thìa canh, số chồi và số lá khi ở mức EC 2.000 $\mu\text{S/cm}$ giảm lại chỉ đạt trung bình 3,10 chồi/cây và 34,60 lá/cây, hệ số nhân đạt 13,5 cành/giâm/tháng/cây.

Nghiên cứu của Trương Thanh Hưng & cs. (2018) đối với cây Đinh lăng lá nhỏ (*Polyscias fruticosa*) cho thấy nồng độ dung dịch dinh dưỡng có ảnh hưởng rõ rệt đến sự sinh trưởng phát triển của cây đinh lăng trồng trên hệ thống khí canh. Tại mức EC là 1.500 $\mu\text{S/cm}$ cây có chiều cao là 30,33 cm/cây; số lá là 23 lá/cây và hệ số nhân là 16 cây. Khi tăng mức EC lên 2.000 $\mu\text{S/cm}$ thì

sự sinh trưởng của cây cũng tương tự như mức 1.500 $\mu\text{S/cm}$. Điều này chứng tỏ nồng độ dinh dưỡng tại mức EC = 1.500 $\mu\text{S/cm}$ là ngưỡng tối đa cho sinh trưởng của cây.

Tăng EC làm tăng đáng kể chiều cao cây, số lá, khối lượng tươi và khối lượng khô của cây Giảo cổ lam (Bảng 3). Mức EC 1.200 $\mu\text{S/cm}$ cho chỉ số về chiều cao cây, số lá, khối lượng tươi và khối lượng khô lớn hơn so với mức EC 800 và 1.000 $\mu\text{S/cm}$ (Hình 1). Với EC 1.200 $\mu\text{S/cm}$, khối lượng tươi, khô thu được khi kết thúc thí nghiệm là 11,5 g/cây và 1,34 g/cây, lớn hơn so với EC 1.000 $\mu\text{S/cm}$ (9,23 g/cây; 1,34 g/cây) và EC 800 $\mu\text{S/cm}$ (8,77 g/cây; 1,06 g/cây).

3.2 Ảnh hưởng của nhiệt độ dung dịch dinh dưỡng đến khả năng nhân giống cây Giảo cổ lam trên hệ thống khí canh

Giảo cổ lam được tìm thấy ở vùng núi phía Bắc nước ta là cây ưa nhiệt độ trung bình thấp.

Trong thời gian nghiên cứu từ tháng 8 đến tháng 10, nhiệt độ không khí thường khá cao dẫn đến nhiệt độ vùng rễ cũng cao, do vậy nếu không điều chỉnh nhiệt độ phù hợp thì tỉ lệ cành giâm ra rễ sẽ ảnh hưởng. Tiến hành thí nghiệm để nghiên cứu ảnh hưởng của nhiệt độ vùng rễ thông qua việc điều chỉnh nhiệt độ của dung dịch phun vào rễ. Kết quả theo dõi sự thay đổi nhiệt độ vùng rễ trong hệ thống khí canh khi có điều chỉnh nhiệt độ dung dịch sau khi phun được thể hiện trong hình 2.

Nhiệt độ môi trường trung bình của không khí trong nhà khí canh trong tháng 9 là cao, nhiệt biến đổi tăng dần từ 8h đến 14h và giảm khi 16h (Hình 2). Nhiệt độ này gây ảnh hưởng không nhỏ đến sự biến động nhiệt độ vùng rễ của cây trong bồn khí canh. Công thức đối chứng (không điều khiển nhiệt độ dung dịch dinh dưỡng) thì nhiệt độ trung bình của vùng rễ cây trong bồn khí canh biến đổi không nhiều từ 28,0°C đến 31,5°C sau khi phun dinh dưỡng 30 phút.

Đối với những công thức mà dung dịch dinh

dưỡng được làm mát ở 15°C, 20°C và 25°C, sau khi phun dung dịch 30 phút, nhiệt độ vùng rễ chỉ tăng thêm 2-3°C so với nhiệt độ dung dịch, không phụ thuộc vào nhiệt độ trong nhà trồng. Kết quả trên cho thấy nhiệt độ vùng rễ trong hệ thống khí canh có thể điều chỉnh thông qua điều chỉnh nhiệt độ của dung dịch dinh dưỡng phun vào rễ (Hình 2).

Nhiệt độ dung dịch dinh dưỡng khác nhau có ảnh hưởng khác nhau đến khả năng nhân chồi của cây Giảo cổ lam khi được trồng khí canh. Tăng nhiệt độ làm tăng đáng kể số chồi/một lần cắt (chồi/lần) dẫn đến hệ số nhân chồi tăng. Ở lần cắt đầu tiên, không có sự khác biệt nào về số chồi cắt khi tăng nhiệt độ từ 15°C đến 20°C. Tuy nhiên, khi tăng nhiệt độ lên 25°C thì đã có sự khác biệt ngay từ lần cắt đầu tiên. So với đối chứng, số chồi/1 lần cắt ở 25°C là cao nhất và hệ số nhân chồi ở mức 25°C (18,48 lần) thể hiện sự vượt trội so với các nhiệt độ khác. Tuy nhiên khi nhiệt độ tăng lên (27°C ~29°C) (công thức đối chứng) thì hệ số nhân chồi giảm xuống còn 15,62 lần (Bảng 4).

Bảng 3. Ảnh hưởng của độ dẫn điện (EC) của dung dịch dinh dưỡng đến chiều cao cây, số lá, khối lượng tươi và khối lượng khô của cây Giảo cổ lam trên hệ thống khí canh sau 60 ngày

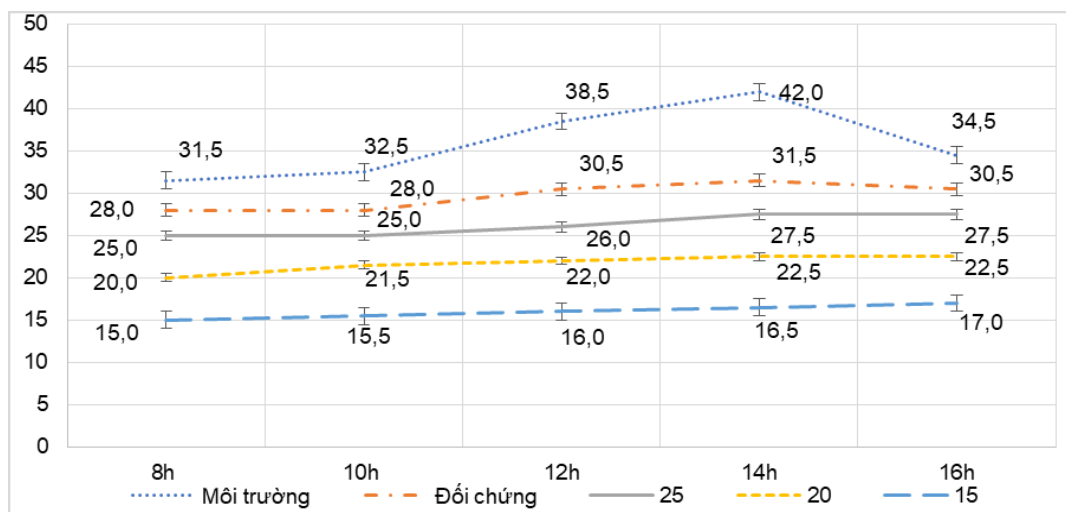
EC ($\mu\text{S/cm}$)	Chiều cao cây (cm)	Số lá (lá)	Khối lượng (g)	
			Tươi	Khô
800	26,08 ^a	25,19 ^a	8,77 ^a	1,06 ^a
1000	29,82 ^b	28,90 ^b	9,23 ^b	1,13 ^{a,b}
1200	37,87 ^c	36,33 ^c	11,5 ^c	1,34 ^c
CV%	4,20	4,10	4,20	5,20
LSD _{0,05}	1,58	1,40	0,26	0,19

Ghi chú: Các giá trị trung bình kèm theo chữ cái khác nhau trên cùng 1 cột là sai khác có ý nghĩa ($P < 0,05$).



Ghi chú: A - Mức EC = 800 $\mu\text{S/cm}$; B - Mức 1.000 $\mu\text{S/cm}$; C - Mức EC 1.200 $\mu\text{S/cm}$.

Hình 1. Ảnh hưởng của nồng độ dung dịch dinh dưỡng đến sự sinh trưởng và phát triển của cây Giảo cổ lam sau 60 ngày



Hình 2. Sự biến thiên nhiệt độ tháng 9 của môi trường và nhiệt độ vùng rễ của các công thức thí nghiệm ở các thời điểm khác nhau sau khi phun dinh dưỡng

Bảng 4. Ảnh hưởng của nhiệt độ dung dịch dinh dưỡng đến khả năng nhân chồi cây Giảo cổ lam

Nhiệt độ (°C)	Số chồi /mỗi lần cắt (chồi/lần)					Tổng số chồi cắt/35 ngày	Hệ số nhân (lần/35 ngày)
	Lần 1	Lần 2	Lần 3	Lần 4	Lần 5		
15	17	18	46	52	95	228 ^a	10,86 ^a
20	17	21	48	68	131	285 ^b	13,57 ^b
25	21	23	64	91	189	388 ^d	18,48 ^d
ĐC	20	21	49	74	164	328 ^c	15,62 ^c
CV%						4,60	4,50
LSD _{0,05}						15,18	1,45

Ghi chú: Tổng số chồi cắt /21 cây mẹ, thời gian giữa các đợt cắt là 7 ngày; Các giá trị trung bình kèm theo chữ cái khác nhau trên cùng 1 cột là sai khác có ý nghĩa ($P < 0,05$).

Nhiệt độ có ảnh hưởng rõ rệt đến tỉ lệ ra rễ và chất lượng rễ của cây Giảo cổ lam trên hệ thống khí canh. Tại thời điểm 8 ngày sau trồng, ở nhiệt độ 25°C, tỉ lệ ra rễ của cây là cao nhất (29%) (Hình 3), thấp hơn ở 20°C (24%), thấp nhất ở 15°C (19%) và ĐC (19%). Tuy nhiên, sau 10 và 12 ngày, tỉ lệ ra rễ thay đổi nhanh chóng. Sau 12 ngày, tỉ lệ ra rễ cao nhất của chồi là 100% khi ở nhiệt độ 25°C, sau đó là ở nhiệt độ đối chứng 27-29°C (95,33%) (Hình 3). Ra rễ với tỉ lệ thấp nhất là ở 15°C (81,00%). Chiều dài rễ thay đổi nhanh chóng từ 10 ngày đến 30 ngày sau trồng. Tại nhiệt độ 25°C, rễ phát triển tốt và cho độ dài cao nhất (86,85cm) (Bảng 5).

Tăng nhiệt độ làm tăng chiều cao cây, số lá và khối lượng tươi, khối lượng khô (Bảng 6). Tuy

nhien, khi tiếp tục tăng nhiệt độ đến nhiệt độ đối chứng (27°C~29°C) các chỉ tiêu theo dõi có xu thế giảm hơn so với mức nhiệt độ 25°C, khối lượng khô và khối lượng tươi có sai khác về mặt thống kê. Trong 3 mức nhiệt độ thì mức 25°C cây có chiều cao cao nhất, số lá nhiều nhất và khối lượng lớn nhất. Chang & cs. (2016) đã chỉ ra rằng tăng nhiệt độ làm tăng cả khối lượng tươi và khối lượng khô của Giảo cổ lam. Tuy nhiên, đối với dưa chuột thủy canh (cây cùng họ với Giảo cổ lam), nhiệt độ ở mức 22°C lại cho chiều cao cây, số lá, khối lượng tươi và khối lượng khô cao hơn ở mức 25°C (Muthir & cs., 2019). Đối với cây khoai tây trồng ở vụ hè thu, hệ số nhân đạt cao nhất khi nhiệt độ dung dịch duy trì ở ngưỡng 20°C (Nguyễn Quang Thạch & cs., 2009).

3.3. Ảnh hưởng của số đốt/cành giâm đến khả năng nhân giống cây Giảo cổ lam trên hệ thống khí canh

Số đốt/cành giâm có ảnh hưởng lớn tới việc nhân giống cây Giảo cổ lam. Việc cắt cành giâm với số đốt/cành giâm không hợp lý sẽ ảnh hưởng

tới khả năng ra rễ cũng như bật chồi tạo thành cây mới. Đối với cây thân leo như Giảo cổ lam thì việc cắt cành lại rất quan trọng. Trong khí canh, cây cần tối thiểu 2 đốt để cây ra rễ cũng như bật chồi. Ở vết cắt có sùi callus có thể ra rễ nhưng đa số rễ thường ra ở đốt.

Bảng 5. Ảnh hưởng của nhiệt độ dung dịch dinh dưỡng đến tỉ lệ sống, tỉ lệ ra rễ và chiều dài rễ cây Giảo cổ lam trên hệ thống khí canh

Nhiệt độ (°C)	Tỉ lệ sống (%)	Tỉ lệ ra rễ (%)			Chiều dài rễ (cm)		
		8 NST	10 NST	12 NST	10 NST	20 NST	30 NST
15	100	19	71,33	81,00	1,41 ^a	23,40 ^a	56,96 ^a
20	100	24	76,33	90,67	1,42 ^a	27,12 ^b	68,90 ^b
25	100	29	90,67	100,00	1,91 ^b	37,18 ^c	86,85 ^c
ĐC	100	19	85,67	95,33	1,81 ^b	36,97 ^c	84,99 ^c
CV%					11,40	1,60	3,70
LSD _{0,05}					0,37	1,00	5,47

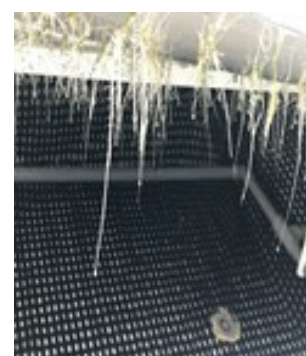
Ghi chú: NST: Ngày sau trồng; Các giá trị trung bình kèm theo chữ cái khác nhau trên cùng 1 cột là sai khác có ý nghĩa ($P < 0,05$).



Sau 1 ngày



Sau 4 ngày



Sau 8 ngày



Sau 15 ngày



Sau 25 ngày



Sau 35 ngày

Hình 3. Quá trình phát triển rễ của Giảo cổ lam trên hệ thống khí canh sử dụng môi trường dinh dưỡng SH1, nhiệt độ dinh dưỡng 25°C

Bảng 6. Ảnh hưởng của nhiệt độ dung dịch dinh dưỡng đến chiều cao cây, số lá và khối lượng của cây Giảo cổ lam trên hệ thống khí canh sau 60 ngày

Nhiệt độ (°C)	Chiều cao cây (cm)	Số lá (lá)	Khối lượng (g)	
			Tươi	Khô
15	25,89 ^a	24,71 ^a	8,77 ^a	1,02 ^a
20	29,44 ^b	28,52 ^b	9,27 ^a	1,12 ^a
25	37,63 ^c	36,19 ^c	11,39 ^c	1,33 ^b
ĐC	35,15 ^c	34,29 ^c	10,24 ^b	1,13 ^a
CV%	2,90	2,50	2,90	5,00
LSD _{0,05}	1,87	1,57	0,69	0,12

Ghi chú: Các giá trị trung bình kèm theo chữ cái khác nhau trên cùng 1 cột là sai khác có ý nghĩa ($P < 0,05$).

Bảng 7. Ảnh hưởng của số đốt/cành giâm đến tỉ lệ sống, tỉ lệ ra rễ và chiều dài rễ của cây Giảo cổ lam trên hệ thống khí canh

Số đốt (đốt)	Tỉ lệ sống (%)	Tỉ lệ ra rễ (%)			Chiều dài rễ (cm)		
		8 NST	10 NST	12 NST	10 NST	20 NST	30 NST
1 đốt	100	28,67	52,33	76,33	1,05 ^a	19,33 ^a	48,58 ^a
2 đốt	100	57,00	76,33	90,33	1,44 ^{a,b}	24,77 ^{a,b}	58,03 ^b
3 đốt	100	57,00	81,00	95,33	1,61 ^b	27,23 ^b	65,89 ^c
CV%					16,4	5,90	2,70
LSD _{0,05}					0,51	3,15	3,56

Ghi chú: NST Ngày sau trồng; Các giá trị trung bình kèm theo chữ cái khác nhau trên cùng 1 cột là sai khác có ý nghĩa ($P < 0,05$).

Tỉ lệ ra rễ tăng dần theo thời gian. Sau 8 ngày, có thể thấy sự thay đổi tỉ lệ ra rễ khác nhau ở các công thức. Khi tăng số đốt, tỉ lệ ra rễ cũng tăng lên. Tỉ lệ ra rễ đạt cao nhất (57,00%) ở cây từ cành giâm 2 đốt và 3 đốt; thấp nhất ở cây từ cành giâm 1 đốt (28,67%). Sau 10 ngày, tỉ lệ ra rễ tăng lên so với 8 ngày từ 13-24%, sau đó tăng chậm hơn. Sau 12 ngày, cây có tỉ lệ ra rễ cao nhất (95,33%) là cây từ cành giâm 3 đốt. Chiều dài rễ cao nhất thu được từ cành giâm 3 đốt (1,61cm sau 10 ngày; 27,23cm sau 20 ngày; 65,89cm sau 30 ngày) và thấp nhất ở cây từ cành giâm 1 đốt (1,05cm sau 10 ngày; 19,33cm sau 20 ngày; 48,58cm sau 30 ngày) (Bảng 7).

Số chồi thu được trên một lần cắt tăng dần theo thời gian cho tất cả các cành giâm trên hệ thống khí canh. Có sự sai khác rất nhỏ giữa số lượng chồi thu được sau 5 lần cắt giữa sử dụng cành giâm 2 đốt (346 chồi) và cành giâm 3 đốt (377 chồi). Tăng số đốt làm tăng đáng kể hệ số nhân của cây Giảo cổ lam trên hệ thống khí

canh. Sau 5 lần cắt, hệ số nhân khi sử dụng cành giâm 2 đốt (16,48 lần/35 ngày) và 3 đốt (17,95 lần/35 ngày) cho hệ số nhân cao vượt trội so với sử dụng cành giâm 1 đốt (5,33 lần/35 ngày) (Bảng 8).

Cây từ cành giâm 1 đốt có chiều cao cây và số lá thấp nhất (26,88cm và 25,67 lá). Trong khi đó, cành giâm 2 đốt có chiều cao cây trung bình (36,95cm) và số lá trung bình (35,67 lá) đạt giá trị cao nhất. Cây từ cành giâm 3 đốt có chiều cao trung bình (35,21cm) và số lá trung bình (34,19 lá), các chỉ số này không có sự sai khác về mặt thống kê so với cây từ cành giâm 2 đốt (Bảng 9). Khi thu sinh khối, cây từ cành giâm 1 đốt có khối lượng thu được thấp nhất (8,42g tươi và 0,96g khô) và cao nhất là cây từ cành giâm 2 đốt (13,52g tươi và 1,36g khô). Tuy nhiên, tỷ số khô/tươi của cây từ cành giâm 3 đốt là 11,97% lớn hơn so với cây cành giâm 2 đốt (10,06%) và cây từ cành giâm 1 đốt (11,40%) (Bảng 9).

Nghiên cứu nhân nhanh Giảo cổ lam (*Gynostemma Pentaphyllum* (Thunb.) Makino) bằng giám canh trên hệ thống khí canh

Bảng 8. Ảnh hưởng của số đốt/cành giám đến khả năng nhân chồi cây Giảo cổ lam trên hệ thống khí canh

Số đốt (đốt)	Số chồi /một lần cắt (chồi/lần)					Tổng số chồi cắt/35 ngày	Hệ số nhân (lần/35 ngày)
	Lần 1	Lần 2	Lần 3	Lần 4	Lần 5		
1 đốt	4	11	20	30	47	112 ^a	5,33 ^a
2 đốt	19	23	55	84	165	346 ^b	16,48 ^b
3 đốt	20	24	60	90	183	377 ^c	17,95 ^c
CV%						4,60	4,60
LSD _{0,05}						15,30	1,19

Ghi chú: Các giá trị trung bình kèm theo chữ cái khác nhau trên cùng 1 cột là sai khác có ý nghĩa ($P < 0,05$).

Bảng 9. Ảnh hưởng của số đốt/cành giám đến chiều cao cây, số lá và khối lượng của cây Giảo cổ lam trên hệ thống khí canh

Số đốt	Chiều cao cây (cm)	Số lá (lá)	Khối lượng (g)	
			Tươi	Khô
1 đốt	26,88 ^a	25,67 ^a	8,42 ^a	0,96 ^a
2 đốt	36,95 ^b	35,67 ^b	13,52 ^c	1,36 ^{b,c}
3 đốt	35,21 ^b	34,19 ^b	10,44 ^b	1,25 ^b
CV%	3,90	3,50	6,60	8,30
LSD _{0,05}	2,94	2,51	1,61	0,22

Ghi chú: Các giá trị trung bình kèm theo chữ cái khác nhau trên cùng 1 cột là sai khác có ý nghĩa ($P < 0,05$).



Ghi chú: A - Cây nuôi cấy mô; B - Cây nuôi cấy mô trên hệ thống khí canh; C - Cây sau trồng 15 ngày; D - Cây sau trồng 30 ngày; E - Cây sau trồng 60 ngày.

Hình 4. Quá trình nhân giống và phát triển của Giảo cổ lam trên hệ thống khí canh

Kết quả của chúng tôi khá tương đồng với nghiên cứu của Trần Thị Quý & cs. (2018) đối với cây Thìa canh (*Gymnema sylvestre*). Các cành giâm cây Thìa canh đã bắt đầu xuất hiện rễ ở ngày thứ 8 sau giâm. Sử dụng cành giâm có 1 cặp lá cho tỉ lệ ra rễ đạt 100% sau 11 ngày giâm cành, cành giâm có 2 cặp lá cho tỉ lệ ra rễ đạt 96,6% sau 13 ngày giâm cành. Trong khi đó, tỉ lệ ra rễ ở công thức cành giâm có 3 và 4 cặp lá thấp hơn, tỉ lệ này lần lượt là 80,0% và 76,6% sau 14 ngày theo dõi. Có sự vượt trội về số lượng rễ và chiều dài rễ của công thức cành giâm có 1 và 2 cặp lá so với cành giâm có 3 và 4 cặp lá

4. KẾT LUẬN

Hệ thống khí canh là phù hợp cho việc nhân giống vô tính bằng giâm cành cây Giảo cổ lam. Dung dịch dinh dưỡng với giá trị EC là 1.000 $\mu\text{S}/\text{cm}$ là dung dịch cho hệ số nhân chồi cao nhất. Dung dịch dinh dưỡng cần duy trì ở nhiệt độ 25°C, sử dụng cành giâm bánh tẻ, số đốt/cành giâm từ 2-3 đốt. Áp dụng quy trình nhân giống trên có thể cho hệ số nhân chồi đạt 16,48-18,48 lần/cây mẹ/35 ngày. Cây giống tạo ra từ cành giâm trên hệ thống khí canh có khả năng sinh trưởng và phát triển tốt trên hệ thống khí canh. Dung dịch dinh dưỡng với EC 1.200 $\mu\text{S}/\text{cm}$ là phù hợp nhất để thu sinh khối Giảo cổ lam trên hệ thống khí canh.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được thực hiện với sự hỗ trợ một phần kinh phí từ đề tài cấp Học viện: “Nghiên cứu nhân nhanh cây Giảo cổ lam (*Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.) Makino) bằng công nghệ khí canh”, mã số: T2020-12-17VB.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Bùi Đình Lâm, Nguyễn Thị Tình, Nguyễn Văn Duy, Nguyễn Văn Bảo, Lê Văn Hiền & Ngô Xuân Bình (2015). 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. 15: 249-256.
- Calori A.H., Factor T.L., Feltran J.C., Watanabe E.Y., Moraes C.C. & Purquerio L.F.V. (2017). Electrical conductivity of the nutrient solution and plant density in aeroponic production of seed potato under tropical conditions (winter/spring). *Bragantia*. 76(1): 23-32. DOI:10.1590/1678-4499.022.
- Chang J.D., Mantri N., Sun B., Jiang L., Chen P., Jiang B., Jiang Z.D., Zhang J., Shen J., Lu H. & Lia Z. (2016). Effects of elevated CO₂ and temperature on *Gynostemma pentaphyllum* physiology and bioactive compounds. *Journal of Plant Physiology*. 196-197: 41-52.
- Choi E.K., Won Y.H., Kim S.Y., Noh S.O., Park S.H., Jung S.J. & Chae S.W. (2019). Supplementation with extract of *Gynostemma pentaphyllum* leaves reduces anxiety in healthy subjects with chronic psychological stress: A randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial. *Phytomedicine*. 52: 198-205. DOI:10.1016/j.phymed.2018.05.002.
- Hoàng Thị Nga, Nguyễn Thị Phương Thảo, Trương Thị Lành & Trương Thị Vĩnh (2010). Nghiên cứu nhân giống cây cà chua F1 bằng kỹ thuật khí canh. Tạp chí Khoa học và Phát triển. 7(4): 408-415.
- Jala A. & Patchpoonporn W. (2012). Effect of BA, NAA and 2,4-D on micropropagation of Jiaogulan (*Gynostemma pentaphyllum* Makino). *International Transaction Journal of Engineering Management, Applied Sciences Technologies*. 3(4): 362-369.
- Keilhoff G., Esser T., Titze M., Ebmeyer U. Schild L. (2017). *Gynostemma pentaphyllum* is neuroprotective in a rat model of cardiopulmonary resuscitation. *Experimental and Therapeutic Medicine*. 14(6): 6034-6046. DOI: 10.3892/etm.2017.5315.
- Lam V.P., Kim S.J. & Park J.S. (2020). Optimizing the electrical conductivity of a nutrient solution for plant growth and bioactive compounds of agastache rugosa in a plant factory. *Agronomy*. 10(1): 76. DOI:10.3390/agronomy10010076.
- Liao L., He Y., Li L., Meng H., Dong Y., Yi F. & Xiao P. (2018). A preliminary review of studies on adaptogens: comparison of their bioactivity in TCM with that of ginseng-like herbs used worldwide. *Chinese Medicine*. pp. 13-57. DOI:10.1186/s13020-018-0214-9.
- Muthir S.A.R., Salim A.A.R., Yaseen A.A.M. & Saleem K.N. (2019). Influence of nutrient solution temperature on its oxygen level and growth, yield and quality of hydroponic cucumber. *Journal of Agricultural Science*. 11(3): 75-92.
- Nguyễn Quang Thạch, Lại Đức Lưu, Đinh Thu Lê, Đỗ Sinh Liêm & Nguyễn Văn Đức (2009). Ảnh hưởng của nhiệt độ dung dịch đến khả năng nhân giống và sản xuất củ khoai tây bằng công nghệ khí canh trong vụ hè. Tạp chí Khoa học và Phát triển. 7(4): 443-452.

- Nguyễn Quang Thạch, Nguyễn Xuân Trường, Lại Đức Lưu, Phạm Văn Tuấn, Hoàng Thị Giang, Nguyễn Thị Loan & Đinh Thị Thu Lê (2009). Ảnh hưởng của dung dịch dinh dưỡng đến khả năng sản xuất củ nhỏ (mini tuber) bằng kỹ thuật khí canh. Tạp chí Khoa học và Phát triển. 7(4): 543-549.
- Nguyễn Quang Thạch, Nguyễn Xuân Trường, Nguyễn Thị Lý Anh, Nguyễn Thị Hương & Lại Đức Lưu (2006). Bước đầu nghiên cứu ứng dụng công nghệ khí canh trong nhân giống khoai tây cây mô. Tạp chí Khoa học và Phát triển. 4+5: 73-78.
- Nguyen T.T.H, Nguyen T.H., Islam M.Z., Obi T., Pitchaya P., Nguyen V.T., Nguyen M.T., Dao V.C., Shiraishi M. & Miyamoto A. (2016). Antagonistic effects of ginkgo biloba and sophora japonica on cerebral vasoconstriction in response to histamine, 5-hydroxytryptamine, U46619 and bradykinin. The American Journal of Chinese Medicine. 44(8): 1607-1625.
- Nguyen Thanh Hai, Lua Thi Dang, Hanh Thi Nguyen, Hai Ha Hoang, Ha Thi Ngoc Lai & Ha Thi Thanh Nguyen (2018). Screening antibacterial effects of Vietnamese plant extracts against pathogens caused acute hepatopancreatic necrosis disease in shrimps. Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research. 11(5): 77-83.
- Nguyễn Thị Thanh Hằng, Lê Ái Vân, Đinh Văn Khiêm, Hoàng Văn Cương, Nguyễn Thị Phượng Hoàng & Phan Xuân Huyền (2018). 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. 8(3): 99-112.
- Phạm Cao Khải & Trần Văn Minh (2018). Vi nhân giống cây Giảo cổ lam (*Gynostemma pentaphyllum*) bằng kỹ thuật nuôi cấy đột thân. Tạp chí Công nghệ Sinh học. 16(3):459-464.
- Quang H.T., Nhu L.P.Q., Tri N.M., Nhan L.T.T., Cuong L.N., Hai T.T.H. & Sang Đ.N. (2019). *In vitro* propagation of *Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.) Makino via callus induction. Hue University Journal of Science: Natural Science. 128(1E): 59-68. DOI: <https://doi.org/10.26459/hueuni-jns.v128i1E.5406>.
- Razmovski N.V., Huang T.H.W., Tran V.H., Li G.Q., Duke C.C. & Roufogalis B.D. (2005). Chemistry and pharmacology of *Gynostemma pentaphyllum*. Phytochemistry Reviews. 4(2-3): 197-219. DOI:10.1007/s11101-005-3754-4.
- Shaito A., Thuan D.T.B., Phu H.T., Nguyen T.H.D., Hasan H., Halabi S. & Pintus G. (2020). Herbal medicine for cardiovascular diseases: efficacy, mechanisms and safety. Frontiers in Pharmacology. 11-422. DOI:10.3389/fphar.2020.00422
- Trần Thị Quý, Nguyễn Quang Thạch, Trương Thanh Hưng, Ngô Thị Lam Giang & Phạm Hữu Nhượng (2018). Nghiên cứu ứng dụng công nghệ khí canh trong nhân giống vô tính cây Thìa canh (*Gymnema sylvestre*) bằng kỹ thuật giảm cành trên hệ thống khí canh. Khoa học Công nghệ Nông nghiệp Việt Nam. 1(86): 97-101.
- Trương Thanh Hưng, Nguyễn Quang Thạch, Trần Thị Quý, Ngô Thị Lam Giang & Phạm Hữu Nhượng (2018). Nghiên cứu ứng dụng công nghệ khí canh trong nhân giống vô tính cây Đinh lăng lá nhỏ (*Polyscias fruticosa*). Khoa học Công nghệ Nông nghiệp Việt Nam. 1(86):102-106.
- Zhang X., Su H., Yang J., Feng L., Li Z. & Zhao G. (2019). Population genetic structure, migration, and polyploidy origin of a medicinal species *Gynostemma pentaphyllum* (Cucurbitaceae). Ecology and Evolution. 9(19): 11145-11170. DOI:10.1002/ece3.5618.