

NGHIÊN CỨU NHÂN GIỐNG *IN VITRO* CÂY HOÀNG CẨM (*Scutellaria baicalensis* Georgi.)

Đình Trường Sơn^{1*}, Bùi Huy Hoàng¹, Nguyễn Hải Ninh¹, Ninh Thị Phíp²,
Phạm Ngọc Khánh³, Đặng Thị Thanh Tâm¹, Nguyễn Thị Lâm Hải¹, Nguyễn Thanh Hải¹

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

²Khoa Nông học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

³Trạm Nghiên cứu trồng cây thuốc Sa Pa - Viện Dược liệu, Thị xã Sa Pa - Lào Cai

*Tác giả liên hệ: dtson@vnua.edu.vn

Ngày nhận bài: 18.05.2020

Ngày chấp nhận đăng: 28.12.2020

TÓM TẮT

Hoàng cầm (*Scutellaria baicalensis* Georgi.) là cây thuốc được sử dụng phổ biến trong dân gian. Hoàng cầm đã được di thực và trồng ở một số vùng trong nước ta. Tuy nhiên, do cây sinh trưởng và phát triển chậm nên cho đến nay vẫn chưa phát triển được vùng trồng. Cây Hoàng cầm hiện được nhân giống chủ yếu bằng phương pháp gieo hạt. Công trình này được tiến hành với mục tiêu xây dựng được quy trình nhân nhanh *in vitro* cây Hoàng cầm qua đó áp dụng trong nhân nhanh, cung cấp cây giống đầu dòng sạch bệnh và chủ động. Hạt Hoàng cầm sau khi khử trùng bằng dung dịch Presept 0,5% với thời gian 15 phút được gieo trên môi trường chỉ cần nước, đường và agar. Môi trường MS có bổ sung 1mg/l BA là phù hợp cho giai đoạn nhân nhanh chồi, hệ số nhân chồi Hoàng cầm đạt $7,47 \pm 0,57$ chồi/mẫu cấy, chất lượng chồi và cụm chồi tốt. Bổ sung sucrose ở nồng độ 20-30 g/l cho sự sinh trưởng và phát triển của các cụm chồi Hoàng cầm tốt. Môi trường MS có bổ sung IBA ở nồng độ từ 0,8-1,6 mg/l là thích hợp cho giai đoạn tạo cây hoàn chỉnh, tỷ lệ chồi ra rễ đạt 100%. Có thể áp dụng các kết quả nghiên cứu trên trong nhân nhanh *in vitro* cây giống Hoàng cầm cấy mô.

Từ khóa: Hoàng cầm, *Scutellaria baicalensis* Georgi., nuôi cấy mô, *in vitro*.

**Establishment of *in vitro* Propagation Protocol
for Baikal Skullcap (*Scutellaria baicalensis* Georgi.)**

ABSTRACT

Baikal skullcap (*Scutellaria baicalensis* Georgi.), a member of the Lamiaceae family has been commonly used in traditional medicine. Baikal skullcap (called "Hoang cam" in Vietnamese) was introduced into Vietnam and has been planted in some areas in this country. Due to its naturally slow growth and development, large growing areas have not been developed yet. Presently, the most common method of propagation of Baikal skullcap is using its seeds. This study was conducted to establish a rapid micropropagation protocol that can be applied for multiplication of elite strains and actively provide the disease-free seedlings. The seeds were sterilized using 0.5% Presept solution for 15 min, then placed on a medium containing water, sucrose, and agar for germination. Microshoots were highly induced and multiplied (7.47 ± 0.57 shoots/explant) on MS medium supplemented with 1mg/l BA. The suitable sucrose concentrations for the growth and development of microshoots were 20 g/l or 30 g/l. All shoots were rooted by 100% by adding MS medium supplemented with 0.8-1.6 mg/l IBA. Therefore, the established protocol can be applied for *in vitro* micropropagation of Baikal skullcap.

Keywords: Baikal skullcap, *Scutellaria baicalensis* Georgi., plant tissue culture, *in vitro*

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Hoàng cầm là thực vật thân thảo sống lâu năm, có nhiều hợp chất có hoạt tính sinh học

như baicalin, flavonoid, wogonosid, wogonin, aglycones baicalein có tác dụng chống ung thư, bảo vệ gan, kháng khuẩn, kháng virus, chống oxi hóa, chống co giật và có tác dụng bảo vệ thần

kinh. Thêm vào đó, Hoàng cầm cũng được sử dụng trong điều trị nhiều loại bệnh khác nhau như kết lỵ, tiêu chảy, cao huyết áp, xuất huyết, mất ngủ, viêm, nhiễm trùng đường hô hấp (Zhao & cs., 2016; Wang & cs., 2018). Trong giai đoạn từ 1969-1977, Viện Dược liệu đã thực hiện một số công trình nghiên cứu nhằm di thực Hoàng cầm về trồng ở một số vùng có khí hậu mát ở nước ta. Tuy nhiên, do Hoàng cầm sinh trưởng và phát triển chậm nên cho đến nay vẫn chưa phát triển được vùng trồng. Chính vì vậy, nguồn dược liệu Hoàng cầm vẫn phải nhập nội từ Trung Quốc.

Cây Hoàng cầm hiện nay được nhân giống chủ yếu bằng phương pháp gieo hạt. Đây là phương pháp nhân giống hiệu quả và có thể áp dụng trên diện rộng. Trên thế giới, quy trình nhân giống *in vitro* Hoàng cầm đã được nghiên cứu và công bố (Yamamoto & cs., 1986; Yamamoto, 1991; Stojakowska & cs., 1999). Hoàng cầm hiện là đối tượng đang được nghiên cứu nhằm chọn tạo được các giống mới phù hợp với điều kiện tự nhiên ở nước ta. Trong các phương pháp nhân giống hiện đang được áp dụng phổ biến, kỹ thuật nhân nhanh *in vitro* vừa cho hệ số nhân cao, cây giống đồng đều, sạch bệnh đồng thời vẫn duy trì được các đặc tính quý của cây mẹ. Tuy nhiên, quy trình nhân giống *in vitro* cây Hoàng cầm hiện vẫn chưa được công bố ở Việt Nam. Chính vì vậy, cần thiết phải nghiên cứu xây dựng quy trình nhân nhanh *in vitro* cây Hoàng cầm.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

Vật liệu dùng trong nuôi cấy tạo vật liệu ban đầu là hạt giống cây Hoàng cầm (*Scutellaria baicalensis* Georgi.) được cung cấp bởi Trạm Nghiên cứu trồng cây thuốc Sa Pa - Viện Dược liệu. Các vật liệu nuôi cấy trong giai đoạn nhân nhanh hoặc tạo cây hoàn chỉnh là chồi non, cụm vi chồi hoặc cụm chồi.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Môi trường cơ bản Murashige and Skoog (Murashige & Skoog, 1962) có bổ sung các chất

điều tiết sinh trưởng như: 6-Benzylaminopurine (BA), kinetin, α -Naphthaleneacetic acid (α -NAA) ở các nồng độ khác nhau được sử dụng trong nghiên cứu. Môi trường được bổ sung 6 g/l agar, điều chỉnh pH = 5,8 trước khi hấp khử trùng ở nhiệt độ 121° trong 20 phút.

Các thí nghiệm được thiết kế ngẫu nhiên hoàn toàn (CRD), 3 lần lặp lại, tối thiểu 10 mẫu/công thức. Mẫu cấy được nuôi ở nhiệt độ từ 27-28°C, quang chu kỳ 16 giờ sáng và 8 giờ tối, cường độ ánh sáng 2.500 lux, độ ẩm 60-70%.

Hạt Hoàng cầm được ngâm và lác nhẹ trong dung dịch nước xà phòng loãng (khoảng 0,01%) trong 10 phút để loại bỏ tạp chất dính trên bề mặt hạt. Sau đó, hạt được rửa lại 4-5 lần với nước máy cho đến khi hết sạch xà phòng và được khử trùng bằng Presept 0,5% (Sản phẩm của Johnson & Johnson, có chứa dichloroiso cyanurate). Sau khi rửa lại 3 lần bằng nước cất đã khử trùng, hạt được cấy lên môi trường hoặc được tiếp tục ngâm trong dung dịch GA3 nồng độ 500ppm trong 10 tiếng trước khi cấy vào môi trường. Dung dịch GA3 được khử trùng bằng lọc qua màng lọc vô trùng Sartorius Minisart, kích thước lọc 0,2 μ m.

Mẫu cấy trong giai đoạn nhân nhanh là các đoạn thân cắt từ cây *in vitro* 4-5 tuần tuổi được nuôi cấy trên môi trường MS và đang sinh trưởng tốt. Các đoạn thân được cắt theo chiều ngang có kích thước khoảng 1cm, mỗi mẫu cấy mang 1 mắt ngủ.

Mẫu cấy cụm vi chồi: do cụm vi chồi chứa chồi có kích thước rất nhỏ, chỉ khoảng 1-2mm nên chúng tôi đã không đếm được số vi chồi ban đầu. Chính vì vậy, mẫu cấy cụm vi chồi là một cụm các chồi nhỏ được cắt với kích thước khoảng 3 \times 3mm.

Vật liệu cho thí nghiệm tạo cây hoàn chỉnh là chồi đơn có chiều cao khoảng 2-3cm, 2-4 lá, chồi đang sinh trưởng tốt. Các thông tin cụ thể được trình bày ở từng thí nghiệm tương ứng.

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 SPSS (version 20).

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Tạo nguồn vật liệu ban đầu

3.1.1. Ảnh hưởng của thời gian khử trùng hạt Hoàng cầm với Presept 0,5% đến tỷ lệ mẫu sạch vi sinh vật và khả năng nảy mầm

Trước khi làm thí nghiệm này chúng tôi đã thử nghiệm gieo hạt không qua xử lý với GA3 trên môi trường MS và kết quả cho tỷ lệ nảy mầm chỉ khoảng dưới 1%. Chính vì vậy, ở thí nghiệm này chúng tôi đã thử nghiệm xử lý hạt với dung dịch presept nồng độ 0,5% trong thời gian từ 5-15 phút đồng thời có kết hợp với xử lý GA3 nồng độ 500ppm và gieo trên môi trường MS có nồng độ giảm đi một nửa (giảm tất cả các thành phần) (Bảng 1).

Kết quả ở bảng 1 cho thấy: xu hướng chung là khi tăng thời gian khử trùng đã làm tăng tỷ lệ mẫu sạch vi sinh vật. Thời gian khử trùng 15 phút cho tỷ lệ mẫu sạch cao nhất và đạt 68% (CT3) trong khi đó, nếu khử trùng trong 5 phút chỉ cho tỷ lệ mẫu sạch đạt 48% (CT1). Cùng một thời gian khử trùng với presept là 15 phút, nếu không xử lý với GA3 thì tỷ lệ mẫu sạch chỉ đạt 68% (CT3) trong khi đó nếu thêm công đoạn ủ với dung dịch GA3 500ppm thì tỷ lệ mẫu sạch đã tăng lên 84% (CT6). Có thể trong quá trình ngâm hạt trong dung dịch GA3, hạt được lác với thời gian 10 tiếng liên tục trong máy lác, sau đó lại được tráng lại 3 lần bằng nước cất vô trùng nên cũng làm tăng hiệu quả làm sạch vi sinh vật.

Trong khi thời gian khử trùng và ủ GA3 có

ảnh hưởng tới tỷ lệ hạt sạch vi sinh vật thì có thể nói các nhân tố này không ảnh hưởng tới tỷ lệ nảy mầm của hạt Hoàng cầm. Hạt Hoàng cầm chỉ nảy mầm với tỷ lệ khá thấp (chỉ tính tỷ lệ nảy mầm với các hạt sạch vi sinh vật) và dao động từ 4-8% trên các công thức. Điều này chứng tỏ tỷ lệ nảy mầm phụ thuộc vào nhân tố khác.

Có nhiều hóa chất thường hay sử dụng trong quá trình khử trùng mẫu như Presept, hydro peroxide (H_2O_2), thủy ngân clorua ($HgCl_2$), natri hypochloride ($NaOCl$)... Tùy từng loại mẫu cấy mà người ta chọn các loại chất khử trùng phù hợp. Sodium dichloroisocyanurate là hoạt chất khử trùng trong Presept, được sử dụng ở nồng độ từ 0,5-2,0%, trong thời gian dài từ 5-90 phút (Mihaljević & cs., 2013; Kendon & cs., 2017). Thêm vào đó, một số hạt giống có sự ngủ nghỉ vào cần thiết phải “phá ngủ” bằng xử lý với GA3. Đối với một số hạt giống như *Prunus yedoensis*, *Plantago lanceolata* L. thì việc phá ngủ cần sử dụng nồng độ GA3 tới hàng ngàn ppm và có thể kéo dài tới 24 tiếng (Sarihan & cs., 2005; Kim, 2019). Stojakowska & cs. (1999) đã sử dụng ethanol để rửa hạt Hoàng cầm và khử trùng hạt với dung dịch javen 15%. Mặc dù vậy, tác giả đã không nêu tỷ lệ hạt Hoàng cầm nảy mầm sau gieo hạt (Stojakowska & cs., 1999). Grzegorzczak-Karolak & cs. (2015) đã sử dụng nước javen 1% trong 10 phút để khử trùng bề mặt cây *Scutellaria alpina* trong nghiên cứu nhân giống *in vitro*. Trong khi tỷ lệ nảy mầm của hạt Hoàng cầm có thể đạt tới trên 90% (Chen & cs., 2002) thì tỷ lệ nảy mầm chỉ đạt từ 4-8% như kết quả của thí nghiệm này là rất thấp.

Bảng 1. Ảnh hưởng của thời gian khử trùng và GA3 tới tỷ lệ mẫu sạch vi sinh vật và tỷ lệ nảy mầm của hạt Hoàng cầm sau 2 tuần

Công thức	Thời gian khử trùng với presept (phút)	Thời gian ủ với GA3 nồng độ 500ppm (giờ)	Tỷ lệ mẫu sạch vi sinh vật (%)	Tỷ lệ nảy mầm (%)
CT1	5	0	48	4
CT2	10	0	40	4
CT3	15	0	68	8
CT4	5	10	68	8
CT5	10	10	88	6
CT6	15	10	84	6

Ghi chú: Môi trường nền: Môi trường nền: 1/2 MS, 30 g/l sucrose.

Bảng 2. Ảnh hưởng của nồng độ môi trường MS đến tỷ lệ nảy mầm và sinh trưởng của cây sau nảy mầm (sau 2 tuần nuôi cấy)

Công thức	Nồng độ môi trường MS	Tỷ lệ nảy hạt mầm (%)	Quan sát hình thái cây
CT1	1/4	3,4	Hạt bắt đầu nứt nanh, nảy mầm
CT2	1/8	20,0	Cây không rõ thân lá
CT3	1/16	26,7	Cây có thân lá rõ ràng
CT4	0	70,0	Cây có thân lá rõ ràng

Ghi chú: Môi trường nền: 30 g/l sucrose.

3.1.2. Ảnh hưởng của nồng độ môi trường MS tới tỷ lệ hạt Hoàng cầm nảy mầm

Từ kết quả của thí nghiệm thăm dò sử dụng môi trường MS và thí nghiệm sử dụng môi trường 1/2 MS để gieo hạt chúng tôi nhận thấy việc giảm nồng độ môi trường MS đã làm tăng tỷ lệ nảy mầm của hạt Hoàng cầm. Chính vì vậy, chúng tôi đặt giả thuyết là nồng độ môi trường MS có ảnh hưởng tới tỷ lệ nảy mầm của hạt Hoàng cầm. Do vậy, ở thí nghiệm này, chúng tôi tiến hành thử nghiệm gieo hạt trên các môi trường có nồng độ khoáng giảm dần (Bảng 2).

Kết quả ở bảng 2 cho thấy nồng độ môi trường MS ảnh hưởng rất mạnh tới tỷ lệ hạt Hoàng cầm nảy mầm. Trong khi môi trường 1/4 MS cho tỷ lệ nảy mầm chỉ 3,4% thì trên môi trường không MS (CT4 - chỉ có nước, đường và agar) đã tăng lên tới 70%. Như vậy, nồng độ môi trường MS cao đã ức chế khả năng nảy mầm của hạt Hoàng cầm.

Trong nuôi cấy mô, hiện tượng tỷ lệ nảy mầm cao khi giảm hàm lượng muối trong môi trường là khá phổ biến. Nishikawa & cs. (1999) đã sử dụng môi trường 1/2 MS để gieo hạt cho 9 loài thuộc chi *Scutellaria* (Nishikawa & cs., 1999). Lan hài *Paphiopedilum spicerianum* cho tỷ lệ nảy mầm cao hơn trên môi trường có hàm lượng muối thấp (Chen & cs., 2015). Thêm vào đó, việc điều chỉnh nồng độ môi trường MS phù hợp cũng có thể giúp chúng ta tối ưu hóa một số chỉ tiêu như số chồi, số rễ, chiều cao chồi, số lá, chiều dài rễ của cây Bạc hà (*Mentha spicata* L.) (Fadel & cs., 2010).

3.2. Giai đoạn nhân nhanh *in vitro* cây Hoàng cầm

3.2.1. Ảnh hưởng của 6-Benzylaminopurine đến hệ số nhân chồi

Ở thí nghiệm này, mẫu cấy là các đoạn thân cắt từ cây *in vitro* được cấy lên môi trường MS có bổ sung BA. Kết quả theo dõi sau 4 tuần được trình bày trên bảng 3.

Kết quả ở bảng 3 cho thấy bổ sung BA đã làm tăng tỷ lệ mẫu cấy tái sinh tạo chồi cũng như hệ số nhân chồi. Trên môi trường không bổ sung BA, tỷ lệ mẫu cấy tái sinh tạo cụm chồi chỉ đạt 26,7%, hệ số nhân chồi chỉ đạt 1,7 chồi/mẫu cấy. Trong khi đó, trên môi trường bổ sung 1 mg/l BA thì tỷ lệ mẫu cấy tạo cụm chồi đạt 100% và hệ số nhân chồi là cao nhất, đạt 7,47 chồi/mẫu cấy. Tuy nhiên, khi tăng nồng độ BA lên 2,0 mg/l thì tỷ lệ mẫu cấy tạo cụm chồi và hệ số nhân chồi giảm đi. Sau 4 tuần nuôi cấy, các cụm chồi tái sinh trên môi trường có bổ sung BA đều mang các cụm vi chồi rất nhỏ ngay trên bề mặt môi trường nuôi cấy.

Bổ sung BA vào môi trường nhân nhanh đã làm giảm chiều cao chồi tái sinh. Công thức không bổ sung BA cho chiều cao chồi là 4,08 cm trong khi đó khi bổ sung BA thì chiều cao chồi chỉ đạt từ 0,42-1,43cm (Bảng 3). Các công thức bổ sung BA ở nồng độ thấp (0,5 và 1,0 mg/l) cho hình thái chồi khỏe, lá xanh tốt. Trong khi đó ở các công thức bổ sung BA từ 1,5-2,0 mg/l cho chồi kém phát triển, lá và thân xanh nhạt, yếu, lá nhỏ. Như vậy, môi trường bổ sung 1 mg/l BA cho hệ số nhân chồi cao nhất, chất lượng chồi và cụm chồi có chất lượng tốt.

Bảng 3. Ảnh hưởng của BA đến hệ số nhân và sinh trưởng của chồi Hoàng cầm (sau 4 tuần)

Công thức	BA (mg/l)	Tỷ lệ tạo cụm chồi (%)	Hệ số nhân (chồi/mẫu)	Chiều cao chồi (cm)	Hình thái chồi
1	0	26,7	1,7 ^a ± 0,26	4,08 ^a ± 0,52	***
2	0,5	86,7	5,43 ^b ± 0,48	1,43 ^b ± 0,14	**
3	1,0	100	7,47 ^c ± 0,57	0,87 ^{cb} ± 0,09	**
4	1,5	100	5,73 ^b ± 0,45	0,52 ^c ± 0,06	*
5	2,0	93,3	5,93 ^b ± 0,66	0,42 ^c ± 0,06	*
			P < 0,001	P < 0,001	

Ghi chú: Trong cùng một chỉ tiêu theo dõi, các giá trị trung bình theo sau bởi cùng một chữ cái là khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở độ tin cậy 95% (LSD, P = 0,05); Môi trường nền: MS, 30 g/l đường sucrose; (*): Chồi kém phát triển, lá và thân xanh nhạt, yếu, lá rất nhỏ; (**): Chồi khỏe, lá xanh, ít đốt; (***): Cây phát triển tốt, thân và lá xanh to khỏe, nhiều đốt.

Bảng 4. Ảnh hưởng của kinetin đến hệ số nhân và sinh trưởng của chồi Hoàng cầm (sau 4 tuần)

Công thức	Kinetin (mg/l)	Tỷ lệ tạo cụm chồi (%)	Hệ số nhân (chồi/mẫu cấy)	Chiều cao chồi (cm)	Hình thái chồi
1	0	26,7	1,70 ± 0,26	4,08 ± 0,52	Cây sinh trưởng tốt, thân lá xanh, nhiều đốt
2	0,5	40,0	1,87 ± 0,32	6,79 ± 0,74	
3	1,0	33,3	1,43 ± 0,12	4,78 ± 0,58	
4	1,5	40,0	1,83 ± 0,24	5,13 ± 0,65	
5	2,0	23,3	1,40 ± 0,15	5,33 ± 0,72	
			P > 0,05	P > 0,05	

Ghi chú: Môi trường nền: MS, 30 g/l sucrose.

Kinetin và 6-Benzylaminopurine (BAP) là hai chất kích thích sinh trưởng thuộc nhóm cytokinin, có khả năng hoạt hóa, kích thích sự phân chia tế bào nên thường được sử dụng trong giai đoạn nhân nhanh chồi *in vitro*. Stojakowska & cs. (1999), thử nghiệm môi trường nhân nhanh có thành phần là MS có bổ sung BA ở các nồng độ từ 0,5-5,0μM BA và thu được hệ số nhân chồi chỉ đạt từ 1,4-2,3 chồi/mẫu cấy. Như vậy, kết quả nghiên cứu của công trình này cho hệ số nhân đạt 7,47 chồi/mẫu cấy, cao hơn hẳn so với kết quả nghiên cứu trên (Stojakowska & cs., 1999).

3.2.2. Ảnh hưởng của kinetin đến hệ số nhân chồi

Tương tự như thí nghiệm với BA, thí nghiệm này cũng sử dụng mẫu cấy là đoạn thân mang 1 mắt ngủ và cấy vào môi trường có bổ sung kinetin với nồng độ khác nhau. Kết quả thể hiện

ở bảng 4 cho thấy việc bổ sung kinetin cho tỷ lệ mẫu tạo cụm chồi tăng không đáng kể so với môi trường không bổ sung. Các chỉ tiêu hệ số nhân chồi, chiều cao chồi có sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê giữa các công thức (P > 0,05).

Stojakowska & cs. (1999) nhận thấy môi trường MS có bổ sung 5,0μM BA và 0,5μM αNAA cho số chồi tái sinh/mẫu cấy đạt 8,5 ± 3,5 chồi, tuy nhiên, tỷ lệ mẫu tái sinh tạo chồi chỉ đạt 35% trên môi trường này. Trong khi đó, môi trường MS có bổ sung 2,5μM kinetin và 0,5μM αNAA cho hệ số với hệ số nhân thấp hơn (3,8 ± 1,3) nhưng tỷ lệ mẫu tái sinh tạo chồi đạt 70% (Stojakowska & cs., 1999).

Kết quả nghiên cứu trên cho thấy kinetin không phải là chất điều tiết sinh trưởng phù hợp cho mục tiêu nhân nhanh *in vitro* cây Hoàng cầm. Thêm vào đó, hình thái chồi giữa các công thức là không có sự khác biệt. Như vậy,

kinetin không làm tăng hệ số nhân chồi *in vitro* cây Hoàng cầm.

3.2.3. Ảnh hưởng của nồng độ đường đến khả năng sinh trưởng của cụm vi chồi

Ở thí nghiệm nghiên cứu ảnh hưởng của BA đến hệ số nhân chồi, sau 8 tuần nuôi cấy, các cụm vi chồi hình thành rất nhiều và do vậy cần thiết phải xác định được môi trường phù hợp cho các cụm vi chồi này sinh trưởng phát triển từ đó nâng cao hệ số nhân chồi.

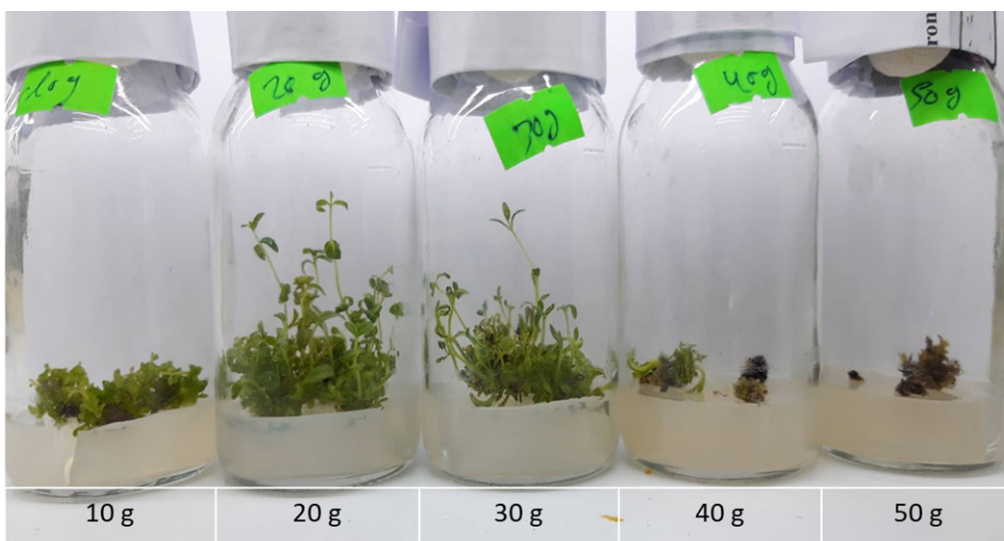
Ở thí nghiệm này, mẫu cấy là các cụm vi chồi mới tái sinh trên môi trường có bổ sung BA được cắt với kích thước khoảng 3 × 3mm và cấy vào môi trường có bổ sung đường với nồng độ từ 10-50 g/l.

Kết quả ở bảng 5 và hình 1 cho thấy: chỉ cần nhìn bằng mắt thường chúng ta cũng thấy rõ được sự khác biệt về sinh trưởng phát triển của chồi Hoàng cầm *in vitro* trên các môi trường có bổ sung đường với nồng độ khác nhau. Ở nồng độ đường thấp (10 g/l) mẫu cấy sinh trưởng rất chậm, chiều cao chồi chỉ đạt 2-4mm. Trong khi đó, khi bổ sung 20-30 g/l sucrose cho cụm vi chồi sinh trưởng phát triển mạnh tối ưu, chiều cao chồi đạt từ 8-20mm, chồi sinh trưởng khỏe mạnh, thân lá phát triển rõ ràng, không bị thủy tinh hóa, chất lượng chồi tốt. Sinh trưởng phát triển của cụm vi chồi rất kém và thậm chí một số mẫu cấy bị chết khi tăng lượng đường lên 40 hoặc 50 g/l.

Bảng 6. Ảnh hưởng của đường sucrose đến sinh trưởng phát triển của vi chồi Hoàng cầm (sau 4 tuần)

Công thức	Đường sucrose (g)	Chiều cao chồi (mm)	Hình thái
CT1	10	2-4	+++
CT2	20	8-20	++++
CT3	30	10-20	++++
CT4	40	1-2	++
CT5	50	< 1	+

Ghi chú: Môi trường nền: MS, 30g đường sucrose; (+): mẫu cấy bị đen không sinh trưởng phát triển; (++) : Cụm chồi gần như không sinh trưởng phát triển, chỉ một vài chồi phát triển rất chậm, lá có màu xanh nhạt; (+++): Cụm chồi phát triển rất chậm, chồi có hiện tượng thủy tinh thể rõ rệt, mọng nước, màu xanh nhạt hơi vàng; (++++): Cụm chồi phát triển tốt, thân và lá cứng cáp màu xanh, đồng đều, không có hiện tượng thủy tinh hóa.



Hình 1. Sinh trưởng của cụm vi chồi Hoàng cầm trên môi trường có hàm lượng đường sucrose khác nhau sau 4 tuần theo dõi

Do trong điều kiện nuôi cấy *in vitro*, chức năng quang hợp của chồi hoặc cây không tối ưu do vậy nồng độ đường và cường độ ánh sáng ảnh hưởng lớn tới sinh trưởng phát triển của chồi *in vitro* (Capellades & cs., 1990). Tùy vào mục đích và đối tượng nuôi cấy mà người ta bổ sung từ 2-3% đường sucrose vào môi trường nuôi cấy (Gago & cs., 2014). Việc bổ sung đường vào môi trường nuôi cấy *in vitro* không những đóng vai trò là nguồn carbohydrate mà còn ảnh hưởng tới khả năng hấp thu nước và dinh dưỡng của mẫu cấy *in vitro* (Williams, 1995). Chính vì vậy, việc nghiên cứu xác định nồng độ đường phù hợp đối với từng loại cây có ý nghĩa vô cùng quan trọng. Stojakowska & cs. (1999) đã sử dụng môi trường MS có bổ sung 30 g/l sucrose làm nguồn cacbon trong nghiên cứu vi nhân giống cây Hoàng cầm (Stojakowska & cs., 1999). Kết quả nghiên cứu

của Tascan (2007) cũng lựa chọn môi trường MS có bổ sung 30 g/l đường sucrose là phù hợp cho giai đoạn nhân nhanh và tạo cây hoàn chỉnh cây Hoàng cầm *in vitro*. Như vậy, có thể nói, kết quả nghiên cứu của chúng tôi về ảnh hưởng của nồng độ đường sucrose tới sinh trưởng phát triển của cây Hoàng cầm *in vitro* là tương đồng với một số công trình công bố trước đây.

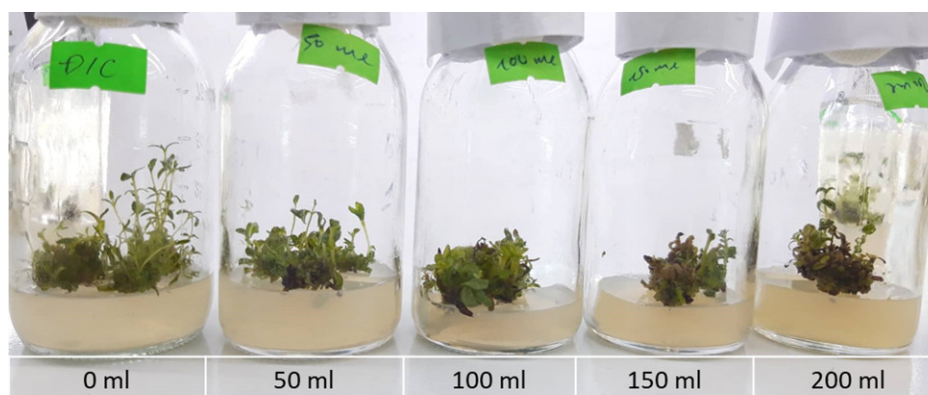
3.2.4. Ảnh hưởng của nước dừa đến khả năng sinh trưởng phát triển của cụm vi chồi

Với các cụm vi chồi Hoàng cầm, việc xác định được hàm lượng nước dừa phù hợp cho sinh trưởng phát triển, nâng cao hệ số nhân cũng như chất lượng chồi là rất cần thiết. Tương tự như với thí nghiệm với nồng độ đường, ở thí nghiệm này chúng tôi cũng sử dụng các cụm vi chồi nhỏ.

Bảng 7. Ảnh hưởng của nước dừa đến sinh trưởng phát triển của vi chồi Hoàng cầm (sau 4 tuần)

Công thức	Hàm lượng nước dừa (ml/l)	Chiều cao chồi (mm)	Hình thái cụm vi chồi
1	0	8-20	++++
2	50	5-10	+++
3	100	1-5	++
4	150	1-5	+
5	200	1-3	+

Ghi chú: Môi trường nền: MS + 7g agar + 30g đường sucrose, pH = 5,8; (++++): Cụm chồi phát triển khá đều, lá xanh, thân cứng cáp khỏe mạnh; (+++): Cụm chồi phát triển chậm, lá và thân có hiện tượng thủy tinh hóa nhưng không nhiều; (++) : Chồi sinh trưởng phát triển kém, lá và thân có hiện tượng thủy tinh hóa rõ rệt, mọng nước, màu sắc xanh vàng; (+): Hầu hết các chồi sinh trưởng phát triển rất chậm (chỉ một vài chồi phát triển), thân và lá biến dạng, nhiều chồi bị thui đen.



Hình 2. Sinh trưởng của cụm vi chồi Hoàng cầm trên môi trường có hàm lượng nước dừa khác nhau sau 4 tuần theo dõi

Bảng 7. Ảnh hưởng của α -NAA đến tỷ lệ tạo rễ của chồi Hoàng cầm sau 4 tuần nuôi cấy

Công thức	Nồng độ α -NAA (mg/l)	Tỷ lệ ra rễ (%)
CT1	0,0	70,0
CT2	0,2	33,3
CT3	0,4	13,3
CT4	0,6	10,0
CT5	0,8	16,7
CT6	1,0	16,7

Ghi chú: Môi trường nền: MS + 30 g/l sucrose + 7 g/l agar, pH = 5,8.

Kết quả ở bảng 6 và hình 2 cho thấy: Bổ sung nước dừa đã làm giảm sinh trưởng phát triển và chất lượng chồi Hoàng cầm *in vitro*. Trên công thức đối chứng (không bổ sung nước dừa), chồi Hoàng cầm phát triển khỏe mạnh, đồng đều, chiều cao chồi dao động trong khoảng 8-20cm. Trong khi đó, ở công thức bổ sung 50ml nước dừa, cây đã sinh trưởng phát triển chậm lại, chiều cao chồi chỉ đạt từ 5-10cm. Khi bổ sung 150-200ml nước dừa/lít môi trường, cụm vi chồi sinh trưởng phát triển rất chậm, sau đó thân và lá biến dạng và thậm chí bị chết (thân lá có màu đen). Trong khi hầu hết các vi chồi bị ảnh hưởng rõ rệt thì có một số ít chồi vẫn sinh trưởng và phát triển khá tốt (Hình 2). Như vậy, không nên bổ sung nước dừa trong quá trình nuôi cấy vi chồi Hoàng cầm.

3.3. Giai đoạn tạo cây hoàn chỉnh

Sau khi được nuôi cấy từ cụm vi chồi, các chồi Hoàng cầm dù khá cao nhưng vẫn không có rễ. Chính vì vậy, với mục tiêu tìm được môi trường phù hợp cho giai đoạn tạo cây hoàn chỉnh, ở các thí nghiệm dưới đây, chúng tôi lần lượt khảo sát tác động của hai chất thuộc nhóm auxin là α -NAA và IBA.

3.3.1. Ảnh hưởng của α -NAA đến khả năng tạo rễ *in vitro* cây Hoàng cầm

Kết quả ở bảng 7 cho thấy: Bổ sung α -NAA đã làm giảm tỷ lệ ra rễ của chồi Hoàng cầm *in vitro*. Ngay ở nồng độ α -NAA thấp nhất (0,2 mg/l) thì tỷ lệ ra rễ đã giảm mạnh và chỉ còn 33,3%, khi tăng α -NAA từ 0,4-1,0 mg/l thì tỷ lệ ra rễ chỉ còn 10-16,7%. Như vậy, chồi Hoàng cầm

in vitro chỉ cần nuôi cấy trên môi trường không bổ sung α -NAA đã cho tỷ lệ ra rễ tốt nhất.

Bổ sung chất điều tiết sinh trưởng thuộc nhóm auxin thường có hiệu quả nâng cao tỷ lệ ra rễ cũng như chất lượng bộ rễ. Tuy nhiên, khi nghiên cứu lựa chọn môi trường ra rễ phù hợp cho giống khoai tây Cardinal (*Solanum tuberosum*), Sayeed & cs. (2015) kết luận việc bổ sung IAA và α -NAA đã làm giảm tỷ lệ ra rễ, chiều dài rễ. Trong nghiên cứu nhân nhanh *in vitro* cây Hoàng cầm, Stojakowska & cs. (1999) đã lựa chọn môi trường 1/2 MS + 30 g/l sucrose, không bổ sung chất điều tiết sinh trưởng cho giai đoạn ra rễ. Kết quả cho thấy, sau 2 tuần có 80% chồi Hoàng cầm *in vitro* ra rễ (Stojakowska & cs., 1999). Như vậy, kết quả nghiên cứu của chúng tôi cũng có sự tương đồng với một số công bố trước.

3.3.2. Ảnh hưởng của IBA đến khả năng tạo cây Hoàng cầm *in vitro* hoàn chỉnh

Các chồi Hoàng cầm được cấy lên môi trường có bổ sung IBA với các nồng độ khác nhau. Kết quả theo dõi sau 6 tuần nuôi cấy được thể hiện trên bảng 8.

Kết quả ở bảng 8 cho thấy: công thức đối chứng không bổ sung IBA cho tỷ lệ ra rễ khá thấp (60%), ít rễ (1 rễ/cây) và rễ khá ngắn (0,76cm). Trong khi đó, bổ sung IBA đã làm tăng tỷ lệ ra rễ, số rễ và chiều dài rễ của chồi Hoàng cầm *in vitro*. Tỷ lệ ra rễ đạt 100% khi bổ sung IBA ở các nồng độ từ 0,8-1,6 mg/l. Số rễ/cây đạt lớn nhất khi chồi được cấy trên môi trường có bổ sung 1,6 mg/l IBA (4,2 rễ/cây), chiều cao trung bình đạt 12,07 cm/cây.

Bảng 8. Ảnh hưởng của IBA đến khả năng tạo cây Hoàng cầm *in vitro* hoàn chỉnh sau 6 tuần nuôi cấy

Công thức	Nồng độ IBA (mg/l)	Tỷ lệ ra rễ (%)	Chiều cao cây (cm)	Số rễ (rễ/cây)	Chiều dài rễ (cm)
CT1	0,0	60,0	8,45 ^a ± 0,80	1,0 ^a ± 0,16	0,76 ^a ± 0,15
CT2	0,4	90,0	11,20 ^{bc} ± 0,29	2,1 ^b ± 0,27	1,81 ^b ± 0,42
CT3	0,8	100	9,45 ^{ab} ± 0,67	2,6 ^b ± 0,20	2,50 ^b ± 0,17
CT4	1,2	100	8,90 ^{ab} ± 0,44	3,5 ^c ± 0,26	2,20 ^b ± 0,29
CT5	1,6	100	12,07 ^c ± 0,71	4,2 ^c ± 0,43	2,00 ^b ± 0,24
CT6	2,0	83,3	12,70 ± 0,90 ^c	3,9 ^c ± 0,44	2,45 ^b ± 0,48
	P		P <0,001	P <0,001	P <0,002

Ghi chú: Trong cùng một chỉ tiêu theo dõi, các giá trị trung bình theo sau bởi cùng một chữ cái là khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở độ tin cậy 95% (LSD, P = 0,05); Môi trường nền: MS + 30g đường sucrose + 7g agar.

Mặc dù vậy, khi tăng nồng độ IBA lên 2,0 mg/l thì tỷ lệ ra rễ của chồi Hoàng cầm đã giảm đi và chỉ còn 83,3%. Khi nghiên cứu trên cây *Scutellaria integrifolia*, Joshee & cs. (2007) cũng sử dụng IBA cho giai đoạn tạo cây hoàn chỉnh và nhận thấy: môi trường bổ sung 4,9µM IBA sẽ thuận lợi hơn cho quá trình ra rễ so với môi trường có nồng độ IBA là 9,8µM.

4. KẾT LUẬN

Nhóm nghiên cứu đã nghiên cứu và xây dựng được quy trình nhân nhanh *in vitro* cây Hoàng cầm từ các khâu tạo nguồn vật liệu ban đầu tối tạo cây hoàn chỉnh. Khử trùng hạt Hoàng cầm với dung dịch Presept 0.5% trong thời gian 10 hoặc 15 phút cho hiệu quả sạch vi sinh vật trên 80%. Hạt Hoàng cầm nảy mầm tốt trên môi trường chỉ cần nước, đường và agar. Hệ số nhân chồi Hoàng cầm đạt khá cao, chất lượng chồi và cụm chồi tốt trên môi trường MS có bổ sung 1 mg/l BA. Nồng độ đường sucrose thích hợp cho sự sinh trưởng và phát triển của các cụm vi chồi Hoàng cầm dao động từ 20 g/l đến 30 g/l. Môi trường thích hợp cho tạo cây hoàn chỉnh là MS + 0,8-1,6 mg/l IBA + 30 g/l sucrose + 7 g/l agar. Các kết quả của công trình có thể được áp dụng trong nhân nhanh cây giống Hoàng cầm cấy mô.

LỜI CẢM ƠN

Công trình này là kết quả nghiên cứu của đề tài cấp Học viện “Nghiên cứu nhân giống *in*

vitro cây Hoàng cầm (*Scutellaria baicalensis* Georgi.)”, mã số T2020-12-60.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Capellades M., Vanderschaeghe A., Lemeur R. & Debergh P. (1990) How important is photosynthesis in micropropagation? In The Impact of Biotechnology on Agriculture: Proceedings of the International Conference: “The Meeting Point Between Fundamental and Applied *in vitro* Culture Research”, held at Amiens (France), July 10-12, 1989 (Sangwan R.S. & Sangwan-Norreel B.S. eds). Dordrecht: Springer Netherlands. pp. 29-38.
- Chen J., Yang S., Ding W., Cheng H. & Cui B. (2002). Quality evaluation of seed of *Scutellaria baicalensis* from different habitats. Zhong Yao Cai. 25: 617-619.
- Chen Y., Goodale U.M., Fan X.L. & Gao J.Y. (2015). Asymbiotic seed germination and *in vitro* seedling development of *Paphiopedilum spicerianum*: An orchid with an extremely small population in China. Global Ecology and Conservation. 3: 367-378.
- Fadel D., Kintzios S., Economou A.S., Moschopoulou G. & Constantinidou H.I. (2010). Effect of different strength of medium on organogenesis, phenolic accumulation and antioxidant activity of spearmint (*Mentha spicata* L.). The Open Horticulture Journal. 3.
- Gago J., Martinez-Nunez L., Landin M., Flexas J. & Gallego P.P. (2014). Modeling the effects of light and sucrose on *in vitro* propagated plants: a multiscale system analysis using artificial intelligence technology. PLoS One. 9: e85989.
- Grzegorzczak-Karolak I., Kuźma Ł. & Wysokińska H. (2015). *In vitro* cultures of *Scutellaria alpina* as a

- source of pharmacologically active metabolites. *Acta Physiologiae Plantarum*. 38: 7.
- Joshee N., Mentreddy S.R. & Yadav A.K. (2007). Mycorrhizal fungi and growth and development of micropropagated *Scutellaria integrifolia* plants. *Industrial crops and products*. 25: 169-177.
- Kendon J.P., Rajaovelona L., Sandford H., Fang R., Bell J. & Sarasan V. (2017). Collecting near mature and immature orchid seeds for *ex situ* conservation: 'in vitro collecting' as a case study. *Botanical Studies*. 58: 34-34.
- Kim D.H. (2019). Practical methods for rapid seed germination from seed coat-imposed dormancy of *Prunus yedoensis*. *Scientia Horticulturae*. 243: 451-456.
- Mihaljević I., Dugalić K., Tomaš V., Viljevac M., Pranjic A., Čmelik Z., Puškar B. & Jurković Z. (2013). *In vitro* sterilization procedures for micropropagation of 'Oblačinska' sour cherry. *Journal of Agricultural Sciences*. 58: 117-126.
- Murashige T. & Skoog F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*. 15: 473-497.
- Nishikawa K., Furukawa H., Fujioka T., Fujii H., Mihashi K., Shimomura K. & Ishimaru K. (1999). Phenolics in tissue cultures of *Scutellaria*. *Natural Medicines*. 53: 209-213.
- Sarihan E., Ipek A., Khawar K.M., Atak M. & Gürbüz B. (2005). Role of GA₃ and KNO₃ in improving the frequency of seed germination in *Plantago lanceolata* L. *Pakistan Journal of Botany*. 37: 883-887.
- Sayed S., Soleh A., Koushik K., Md Faruk M. & Md Abdur S. (2015). *In vitro* plant regeneration of potato (*Solanum tuberosum* L.) at the rate of different hormonal concentration. *Asian Journal of Medical and Biological Research*. 1: 297-303.
- Stojakowska A., Malarz J. & Kohlmuenger S. (1999). Micropropagation of *Scutellaria baicalensis* Georgi. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*. 68: 103-107.
- Tascan A. (2007). *In vitro* liquid culture systems of *Scutellaria* species. In *Plant and Environmental Science*. All Theses: Clemson University. p. 95.
- Wang Z.L., Wang S., Kuang Y., Hu Z.M., Qiao X. & Ye M. (2018). A comprehensive review on phytochemistry, pharmacology, and flavonoid biosynthesis of *Scutellaria baicalensis*. *Pharm Biol*. 56: 465-484.
- Williams R.R. (1995). The chemical microenvironment. Kluwer, Amsterdam, Netherlands.
- Yamamoto H. (1991) *Scutellaria baicalensis* Georgi: *In vitro* culture and the production of flavonoids. In *Medicinal and Aromatic Plants III* (Bajaj, Y.P.S. ed. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. pp. 398-418.
- Yamamoto H., Chatani N., Kitayama A. & Tomimori T. (1986). Flavonoid production in *Scutellaria baicalensis* callus cultures. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 5: 219-222.
- Zhao Q., Chen X.Y. & Martin C. (2016). *Scutellaria baicalensis*, the golden herb from the garden of Chinese medicinal plants. *Sci Bull*. 61: 1391-1398.