

KHẢO SÁT CÁC YẾU TỐ ẢNH HƯỞNG ĐẾN NHÂN GIỐNG *IN VITRO* CÂY XUYÊN TÂM LIÊN (*Andrographis paniculata*)

Trần Thị Yên Nhi*, Phạm Trần Thủy Tiên, Nguyễn Thị Liên, Vũ Thị Thúy Hằng,
Trịnh Thị Minh Trâm, Dương Phú Tiến, Nguyễn Trần Phước Huy,
Nguyễn Văn Toàn, Nguyễn Thị Huệ, Nguyễn Thanh Thúy, Vương Thị Hồng Loan

Trung tâm Ươm tạo Doanh nghiệp Nông nghiệp Công nghệ cao

*Email: tty nhi.ahbi@gmail.com

Ngày nhận bài: 15/11/2024; Ngày nhận bài sửa: 06/12/2024; Ngày chấp nhận đăng: 12/12/2024

TÓM TẮT

Xuyên tâm liên đã được chứng minh có những tác dụng cơ bản như: kháng vi khuẩn, virus, bảo vệ gan, chống viêm, chống đái tháo đường, chống ung thư. Xuyên tâm liên thường được trồng bằng hạt giống. Tuy nhiên, sự ngủ đông của hạt là một hạn chế lớn trong canh tác xuyên tâm liên về mặt thương mại. Mặc dù đã sử dụng môi trường có hormone và xử lý hạt bằng nước nóng để khắc phục sự ngủ đông của hạt nhưng vẫn không đủ để đáp ứng số lượng cần thiết do sự khác nhau giữa các cây, sự ra rễ của cây con ít và chậm phát triển. Nghiên cứu này khảo sát ảnh hưởng của nồng độ các chất điều hoà sinh trưởng thực vật khác nhau (benzyladenine, kinetin) đến khả năng bật chồi và nhân chồi xuyên tâm liên từ mẫu đoạn thân mang mầm ngủ. Mẫu đoạn thân mang mầm ngủ được khử trùng với Javel 25% trong 7 phút để tạo nguồn mẫu *in vitro* ban đầu. Môi trường MS bổ sung 1,0 mg/L benzyladenine cho tỷ lệ bật chồi đạt 100%. Môi trường MS bổ sung 0,5 mg/L benzyladenine kết hợp 1,0 mg/L kinetin cho hệ số nhân chồi đạt cao nhất. Môi trường MS $\frac{1}{2}$ bổ sung 0,5 mg/L Indole-3-butyric acid thích hợp cho sự tạo rễ của xuyên tâm liên *in vitro*.

Từ khóa: *Andrographis paniculata*, nhân giống, *in vitro*, chất điều hoà sinh trưởng thực vật.

1. MỞ ĐẦU

Xuyên tâm liên hay còn gọi là công cộng, nguyên cộng, lam khái liên, khổ đảm thảo. Tên khoa học là *Andrographis paniculata*, thuộc họ Ô rô (Acanthaceae) [1]. Cây xuyên tâm liên có nhiều công dụng như kháng khuẩn [2], kháng virus sốt xuất huyết, HIV, SARS-CoV-2 [3-5], có tác dụng bảo vệ gan [6], chống viêm [7], chống đái tháo đường [8], chống ung thư [9]. Nhu cầu về xuyên tâm liên ngày càng tăng vì tầm quan trọng trong việc điều trị nhiều loại bệnh khác nhau do khả năng tăng cường miễn dịch mạnh mẽ [10]. Ở Việt Nam, xuyên tâm liên hiện nay chỉ được trồng nhỏ lẻ ở một số khu vực như Hà Nội, Bắc Giang, Thanh Hóa, Nghệ An, Quảng Bình...[11].

Xuyên tâm liên thường được trồng bằng hạt giống. Tuy nhiên, sự ngủ đông của hạt là một hạn chế lớn trong canh tác xuyên tâm liên [12]. Hạt rất nhỏ và ngủ đông từ 5 đến 6 tháng sau khi phát tán, tỷ lệ nảy mầm thấp [13]. Mặc dù đã sử dụng môi trường có hormone và xử lý hạt bằng nước nóng để khắc phục sự ngủ đông của hạt [13] nhưng vẫn không đủ để đáp ứng số lượng thương mại cần thiết do sự khác nhau giữa các cây, sự ra rễ của cây con ít và chậm phát triển [14, 15]. Hạt xuyên tâm liên chứa chủ yếu là alkaloid, saponin và acid béo không bão hòa đơn. Bảo quản hạt giống là một vấn đề lớn ở những nước có nhiệt độ và độ ẩm cao. Điều này có thể khiến hạt giống già đi nhanh chóng, khả năng sống kém [16].

Để khắc phục hạn chế trên, kỹ thuật nuôi cấy mô thực vật là phương pháp thay thế để tạo ra nhiều cây con trong thời gian ngắn, di truyền phẩm chất tốt của cây mẹ, không bị giới hạn về môi trường địa lý, thời tiết. Ngoài ra, tính đồng nhất của các hoạt chất là đặc điểm mong muốn trong ngành công nghiệp dược phẩm. Nuôi cấy mô thực vật giúp sản xuất số lượng lớn cây giống với chất lượng đồng đều, sạch bệnh với hàm lượng cao và ổn định của các hoạt chất.

Nghiên cứu này được thực hiện nhằm xác định các điều kiện tối ưu cho quá trình nhân giống *in vitro* cây xuyên tâm liên, từ đó tạo ra nguồn cây giống đạt chất lượng cao, góp phần quản lý và cải thiện chất lượng được liệu này.

2. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nguồn mẫu ban đầu

Cây xuyên tâm liên được thu thập tại xã Lạng Sơn, huyện Anh Sơn, tỉnh Nghệ An. Cây khỏe mạnh, không bị bệnh, cao 15 - 20 cm, có 6 - 8 cặp lá. Cây được chăm sóc ở vườn hậu nuôi cấy mô tại Trung tâm Ươm tạo Doanh nghiệp Nông nghiệp Công nghệ cao trong điều kiện nhà màng.

2.2. Môi trường nuôi cấy

Môi trường MS (Duchefa biochemie, Hà Lan) [17] bổ sung 8,25 g/L agar (Việt Nam), 30 g/L đường (Việt Nam) và các chất điều hòa sinh trưởng thực vật. Môi trường được điều chỉnh pH 5,8, hấp khử trùng ở 121 °C, áp suất 1 atm trong thời gian 20 phút.

2.3. Điều kiện nuôi cấy

Điều kiện phòng nuôi cấy: nhiệt độ 25 ± 2 °C, thời gian chiếu sáng 12 giờ/ngày, cường độ chiếu sáng 2.000 lux.

2.4. Phương pháp

2.4.1. Khảo sát thời gian khử trùng mẫu bằng thủy ngân clorua 0,1%, Javel 25%

Đoạn thân mang mầm ngủ có chiều dài 2 cm của cây xuyên tâm liên được rửa dưới vòi nước chảy trong 5 phút. Sau đó mẫu được rửa với xà phòng loãng trong 5 phút, rửa với nước máy đến khi sạch xà phòng và rửa lại bằng nước cất vô trùng. Mẫu được xử lý với cồn 70° trong 30 giây, rửa với nước cất vô trùng 3 lần. Sử dụng chất khử trùng là dung dịch thủy ngân clorua 0,1%, bổ sung 2 - 3 giọt Tween 20, trong 8 - 10 phút hoặc dung dịch Javel 25%, bổ sung 2 - 3 giọt Tween 20, trong 4 - 8 phút. Rửa mẫu với nước cất vô trùng 3 lần, loại bỏ phần bị tổn thương và cấy mẫu vào môi trường MS không bổ sung chất điều hòa sinh trưởng thực vật. Các chỉ tiêu tỷ lệ mẫu nhiễm (%), tỷ lệ mẫu sống và không nhiễm (%) được ghi nhận sau 2 tuần nuôi cấy.

2.4.2. Khảo sát ảnh hưởng của BA lên khả năng bật chồi của xuyên tâm liên

Các mẫu sống không nhiễm sau 2 tuần nuôi cấy được cấy chuyển vào môi trường MS có bổ sung các nồng độ BA khác nhau (0; 0,25; 0,5; 1,0; 2,0 mg/L). Nghiệm thức đối chứng là môi trường MS không bổ sung chất điều hòa sinh trưởng thực vật. Các chỉ tiêu tỷ lệ mẫu hình thành chồi (%), số chồi/mẫu (chồi) và chiều dài chồi (cm) được ghi nhận sau 4 tuần nuôi cấy.

2.4.3. Khảo sát ảnh hưởng của BA và kinetin lên sự nhân chồi của xuyên tâm liên

Các chồi xuyên tâm liên *in vitro* cao 1 cm được cấy chuyển sang môi trường MS có bổ sung các nồng độ BA khác nhau (0; 0,25; 0,5; 1,0 mg/L) kết hợp với kinetin (0; 0,5; 1,0 mg/L). Nghiệm thức đối chứng là môi trường MS không bổ sung chất điều hòa sinh trưởng thực vật. Các chỉ tiêu tỷ lệ mẫu bật cụm chồi (%), số chồi/mẫu, trung bình chiều dài chồi (cm), hình thái chồi được ghi nhận sau 4 tuần nuôi cấy.

2.4.4. Khảo sát ảnh hưởng của môi trường và IBA lên sự tạo rễ của xuyên tâm liên

Chồi *in vitro* cao 3 cm được cấy sang môi trường MS hoặc MS ½ (MS giảm ½ đa lượng, ½ vi lượng) có bổ sung các nồng độ IBA (0; 0,25; 0,5; 0,75 mg/L). Các chỉ tiêu tỷ lệ mẫu tạo rễ (%), số rễ, chiều dài rễ (cm) được ghi nhận sau 6 tuần nuôi cấy.

2.4.5. Xử lý số liệu

Các thí nghiệm được bố trí theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên, 3 lần lặp lại, 10 bình/nghiệm thức mỗi lần lặp lại, 1 mẫu/bình. Các số liệu được xử lý bằng phần mềm Excel. Phân tích phương sai ANOVA 1 yếu tố để xem xét sự khác biệt có ý nghĩa thống kê hay không giữa các nghiệm thức bằng phần mềm thống kê Statgraphics Centurion XV với $\alpha = 0,05$.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Ảnh hưởng của thời gian khử trùng mẫu bằng thủy ngân clorua 0,1%, Javel 25%

Bảng 1. Ảnh hưởng của thời gian khử trùng bằng HgCl_2 0,1%, Javel 25% đến tạo nguồn mẫu *in vitro* xuyên tâm liên

Nghiệm thức	Chất khử trùng	Thời gian (phút)	Tỷ lệ mẫu nhiễm (%)	Tỷ lệ mẫu sống và không nhiễm (%)
M1	Javel 25%	4	$76,7^a \pm 5,8$	$23,3^c \pm 5,8$
M2	Javel 25%	5	$66,7^b \pm 5,8$	$33,3^{de} \pm 5,8$
M3	Javel 25%	6	$43,3^c \pm 5,8$	$53,3^{bc} \pm 5,8$
M4	Javel 25%	7	$16,7^e \pm 5,8$	$73,3^a \pm 5,8$
M5	Javel 25%	8	$10,0^f \pm 0,0$	$56,7^b \pm 5,8$
M6	HgCl_2 0,1%	8	$43,3^c \pm 5,8$	$43,3^{cd} \pm 5,8$
M7	HgCl_2 0,1%	9	$26,7^d \pm 5,8$	$33,3^{de} \pm 5,8$
M8	HgCl_2 0,1%	10	$10,0^f \pm 0,0$	$13,3^f \pm 5,8$

* Các chữ cái a, b, ... trong cùng một cột thể hiện sự sai biệt có ý nghĩa ở độ tin cậy 95%.

* Số liệu đã được chuyển đổi sang $\text{Arcsin}(x)^{1/2}$ trước khi xử lý thống kê.

Theo kết quả Bảng 1, hóa chất khử trùng và thời gian khử trùng có ảnh hưởng đến khả năng tạo nguồn mẫu *in vitro* từ đoạn thân mang mầm ngủ cây xuyên tâm liên. Sử dụng chất khử trùng là dung dịch Javel 25%, khi tăng thời gian khử trùng từ 4 đến 7 phút, tỷ lệ mẫu nhiễm giảm từ 76,7% xuống 16,7%, tỷ lệ mẫu sống tăng từ 23,3% lên 73,3%. Khi tăng thời gian khử trùng lên 8 phút, tỷ lệ mẫu nhiễm giảm (10%), tuy nhiên tỷ lệ mẫu sống cũng giảm (56,7%) do có mẫu chết. Sử dụng chất khử trùng là dung dịch HgCl_2 0,1%, khi tăng thời gian khử trùng từ 8 đến 10 phút, tỷ lệ mẫu nhiễm giảm từ 43,3% xuống 10%, tỷ lệ mẫu sống cũng giảm từ 43,3% xuống 13,3% do có mẫu chết. Kết quả cho thấy thời gian khử trùng càng dài sẽ làm tăng khả năng chết mẫu. Việc tiếp xúc kéo dài với nồng độ cao của chất khử trùng sẽ tạo ra phenolic, mẫu chuyển sang màu nâu và chết. Do đó, cần cân nhắc sự cân bằng giữa nồng độ chất khử trùng và thời gian khử trùng khi tiến hành khử trùng bề mặt [18]. Nghiệm thức sử dụng dung dịch Javel 25%, thời gian khử trùng 7 phút cho kết quả tỷ lệ mẫu sống không nhiễm cao nhất (73,3%), tỷ lệ mẫu nhiễm thấp (16,7%). Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Abhilasha và Awasthi đã khử trùng các đoạn đốt thân xuyên tâm liên bằng dung dịch NaClO nồng độ 1,2% trong 5 - 7 phút [19]. Martin đã khử trùng các mẫu lá và đốt thân xuyên tâm liên với HgCl_2 0,1% (w/v) trong 8 - 10 phút, Dandin và Murthy đã khử trùng đốt thân xuyên tâm liên bằng NaClO 2% trong 3 phút, tiếp theo là HgCl_2 0,1% trong 2 phút để tạo nguồn mẫu *in vitro*, tuy nhiên các tác giả không đề cập đến kết quả khử trùng [14, 20]. Trong nghiên cứu này, các nghiệm thức khử trùng với dung dịch HgCl_2 0,1% từ 8 - 10 phút cho tỷ lệ mẫu sống không nhiễm thấp (<43,3%). Ngoài ra, đối tượng nhân giống là cây dược liệu cần hạn chế các chất độc hại có thể tồn dư và yêu cầu về độ an toàn trong quá trình thao tác, nên nghiên cứu này sử dụng dung dịch Javel (chứa NaClO) để khử trùng mẫu. Khử trùng bằng dung dịch Javel 25% trong 7 phút là thích hợp cho mẫu đoạn thân xuyên tâm liên để tạo nguồn mẫu ban đầu.

3.2. Ảnh hưởng của BA lên khả năng bật chồi của xuyên tâm liên

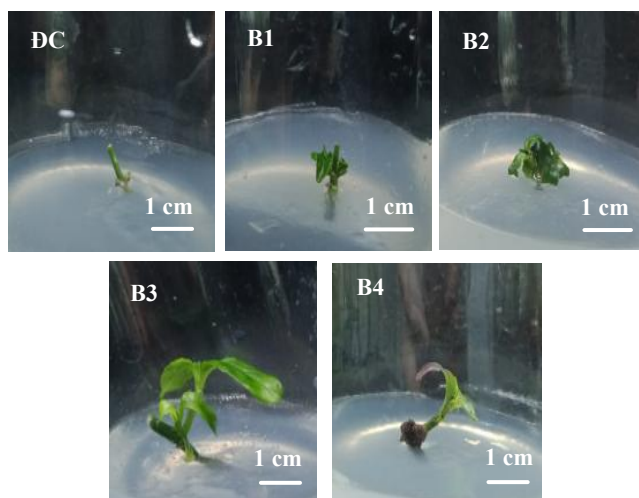
Bảng 2. Ảnh hưởng của BA đến khả năng bật chồi của xuyên tâm liên

Nghiệm thức	BA (mg/L)	Tỷ lệ mẫu hình thành chồi (%)	Số chồi/mẫu (chồi)	Chiều dài chồi (cm)
ĐC	0	$0^c \pm 0,0$	$0^d \pm 0,00$	$0^e \pm 0,00$
B1	0,25	$86,6^b \pm 5,7$	$1,33^c \pm 0,06$	$0,16^d \pm 0,02$
B2	0,5	$100,0^a \pm 0,0$	$1,73^b \pm 0,06$	$0,45^c \pm 0,07$
B3	1,0	$100,0^a \pm 0,0$	$1,93^a \pm 0,06$	$1,29^a \pm 0,06$
B4	2,0	$100,0^a \pm 0,0$	$1,76^b \pm 0,06$	$0,81^b \pm 0,01$

* Các chữ cái a, b, ... trong cùng một cột thể hiện sự sai biệt có ý nghĩa ở độ tin cậy 95%.

* Số liệu tỷ lệ mẫu hình thành chồi đã được chuyển đổi sang $\text{Arcsin}(x)^{1/2}$ trước khi xử lý thống kê.

Kết quả ghi nhận sau 4 tuần nuôi cấy cho thấy nghiệm thức đối chứng không bổ sung chất điều hòa sinh trưởng thực vật, mẫu không bật chồi. Ở các nghiệm thức có bổ sung BA, ghi nhận sự bật chồi ở tất cả các nghiệm thức. Tại nghiệm thức B3 có bổ sung 1,0 mg/L BA cho kết quả tỷ lệ mẫu hình thành chồi, số chồi cao nhất lần lượt đạt 100%, 1,93 chồi/mẫu, chiều dài chồi 1,29 cm. Cytokinin đóng vai trò quan trọng trong việc thúc đẩy phân chia tế bào, hình thành chồi và kéo dài chồi [21]. Nghiên cứu của Purkayastha và cộng sự cho thấy trong số các cytokinin khác nhau được thử nghiệm (BA, kinetin, TDZ và 2-iP), BA được chứng minh là hiệu quả nhất cho tăng sinh chồi xuyên tâm liên. Tuy nhiên, nhiều chồi thu được ở các nồng độ BA khác nhau không thể cao lên ngay cả sau khi chuyển sang môi trường MS không có chất điều hòa sinh trưởng thực vật [22]. BA được sử dụng để kích thích phân chia tế bào và biệt hóa chồi trong nuôi cấy mô thực vật. BA có hoạt tính cao do có sự đề kháng đối với sự suy thoái và biến đổi enzyme làm giảm nồng độ cytokinin, ức chế sự hình thành và phát triển của rễ [23]. Tính ưu việt của BA đối với việc tạo chồi có thể là do khả năng của mô thực vật chuyển hóa BA dễ dàng hơn các chất điều hòa sinh trưởng tổng hợp khác hoặc do khả năng của BA tạo ra sự sản xuất các hormone tự nhiên, chẳng hạn như zeatin trong mô [24]. BA thường được cho là có tác dụng kích thích chồi tăng sinh đồng thời ức chế sự kéo dài của chồi [25, 26]. Kết quả thí nghiệm cho thấy môi trường MS bổ sung 1,0 mg/L BA thích hợp cho sự bật chồi của xuyên tâm liên với 100% tỷ lệ mẫu hình thành chồi, 1,93 chồi/mẫu, chiều dài chồi 1,29 cm sau 4 tuần nuôi cấy.



Hình 1. Chồi xuyên tâm liên trong môi trường MS bổ sung BA sau 4 tuần nuôi cấy

ĐC: MS B1: MS + 0,25 mg/L BA B2: MS + 0,5 mg/L BA
B3: MS + 1,0 mg/L BA B4: MS + 2,0 mg/L BA

3.3. Ảnh hưởng của BA và kinetin lên sự nhân chồi của xuyên tâm liên

Kết quả Bảng 3 cho thấy sự kết hợp chất điều hòa sinh trưởng thực vật BA, kinetin ở các nồng độ khác nhau ảnh hưởng đến khả năng nhân chồi xuyên tâm liên. Nghiệm thức đối chứng không bổ sung chất điều hòa sinh trưởng thực vật, mẫu không phát sinh chồi mới. Môi trường MS bổ sung 0,5 mg/L BA, 1,0 mg/L kinetin cho tỷ lệ mẫu bật cụm chồi đạt 73,3%, số chồi/mẫu là 5,1 chồi, chồi phát triển bình thường, xanh tốt. Tại nghiệm thức C5, C6, khi tăng nồng độ BA lên 1 mg/L, 0,5 - 1,0 mg/L kinetin, chồi bị bất thường, bị xoắn lá, dày lá và cháy lá, có thể do nồng độ chất điều hòa sinh trưởng trong môi trường cao dẫn đến bất thường về hình thái chồi. BA được sử dụng để kích thích phân chia tế bào và biệt hóa chồi [23]. Kinetin làm giảm ưu thế đỉnh và kích thích hình thành chồi bên [27]. Môi trường được bổ sung kinetin kết hợp với BA để khởi tạo và kéo dài chồi [28]. Việc kết hợp các cytokinin trong môi trường nuôi cấy nhân chồi xuyên tâm liên đã được báo cáo. Các kết quả ghi nhận được cũng có sự khác biệt về số chồi/mẫu thu được giữa các nghiên cứu. Katakya và Handique đã nhân chồi xuyên tâm liên trên môi trường MS $\frac{1}{2}$ bổ sung 1 mg/L BA và 1,5 mg/L Adenine sulphate cho số lượng chồi trung bình tối đa là 18,36 sau 45 ngày nuôi cấy [15]. Dandin và Murthy ghi nhận trên môi trường MS có bổ sung 0,23 mg/L BA và 1,0 mg/L Kinetin cho số lượng tối đa 39 chồi trên mỗi mẫu cấy [20]. Do vậy, các nghiên cứu về tác động phối hợp của các chất điều hòa sinh trưởng thực vật khác nhau đến quá trình nhân chồi xuyên tâm liên vẫn cần được quan tâm nghiên cứu. Trong nghiên cứu này, môi trường MS

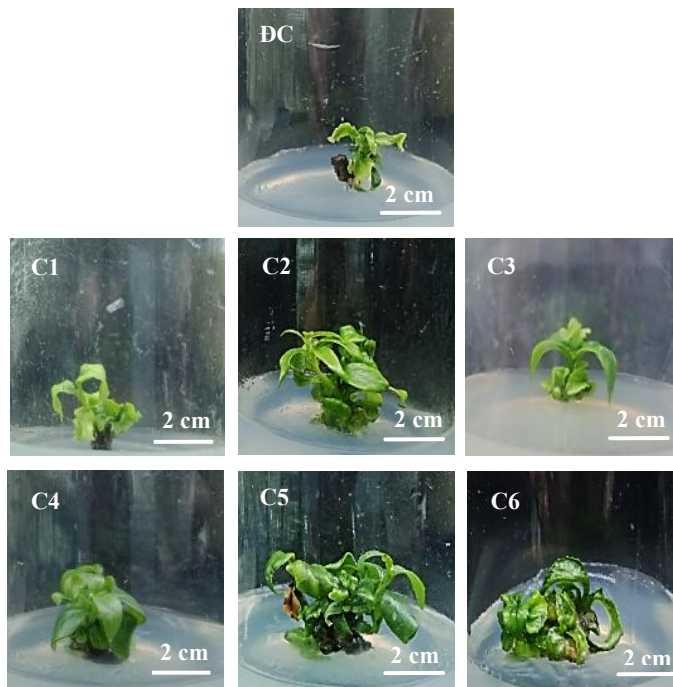
bổ sung 0,5 mg/L BA, 1,0 mg/L kinetin là môi trường phù hợp để nhân chồi xuyên tâm liên *in vitro* với tỷ lệ mẫu bật cụm chồi 73,3%, số chồi/mẫu là 5,1 chồi, trung bình chiều dài chồi 1,75 cm, chồi phát triển bình thường, xanh tốt sau 4 tuần nuôi cấy.

Bảng 3. Ảnh hưởng của BA và kinetin đến khả năng nhân chồi của xuyên tâm liên

Nghiệm thức	BA (mg/L)	Kinetin (mg/L)	Tỷ lệ mẫu bật cụm chồi (%)	Số chồi/mẫu (chồi)	Trung bình chiều dài chồi (cm)	Hình thái chồi
ĐC	0	0	0,0 ^f ± 0,0	1,00 ^f ± 0,00	1,43 ^c ± 0,01	Lá xếp sát nhau, không kéo dài lóng thân
C1	0,25	0,5	43,3 ^c ± 5,8	2,33 ^c ± 0,15	1,66 ^b ± 0,04	Chồi màu xanh, không bị dày lá
C2	0,25	1	56,7 ^d ± 5,8	3,63 ^d ± 0,21	2,26 ^a ± 0,07	Chồi màu xanh, không bị dày lá
C3	0,5	0,5	70,0 ^c ± 0,0	5,00 ^c ± 0,00	1,02 ^d ± 0,01	Chồi màu xanh, không bị dày lá
C4	0,5	1	73,3 ^{bc} ± 5,8	5,10 ^c ± 0,00	1,75 ^b ± 0,07	Chồi phát triển tốt, màu xanh, không bị dày lá
C5	1	0,5	86,7 ^a ± 5,8	9,37 ^a ± 0,51	1,44 ^c ± 0,11	Chồi bị xoắn lá, chậm phát triển
C6	1	1	80,0 ^b ± 0,0	6,20 ^b ± 0,10	1,44 ^c ± 0,03	Chồi bất thường, bị dày lá, cháy lá

* Các chữ cái a, b, ... trong cùng một cột thể hiện sự sai biệt có ý nghĩa ở độ tin cậy 95%.

* Số liệu tỷ lệ mẫu bật cụm chồi đã được chuyển đổi sang Arcsin (x)^{1/2} trước khi xử lý thống kê.



Hình 2. Cụm chồi xuyên tâm liên *in vitro* trên các môi trường nhân chồi sau 4 tuần nuôi cấy

ĐC: MS

C1: MS + 0,25 mg/L BA + 0,5 mg/L kinetin

C2: MS + 0,25 mg/L BA + 1,0 mg/L kinetin

C3: MS + 0,5 mg/L BA + 0,5 mg/L kinetin

C4: MS + 0,5 mg/L BA + 1,0 mg/L kinetin

C5: MS + 1,0 mg/L BA + 0,5 mg/L kinetin

C6: MS + 1,0 mg/L BA + 1,0 mg/L kinetin

3.4. Ảnh hưởng của môi trường và IBA lên sự tạo rễ của xuyên tâm liên

Kết quả thống kê tại Bảng 4 cho thấy môi trường và nồng độ IBA ảnh hưởng đến khả năng tạo rễ xuyên tâm liên *in vitro*. Nhìn chung, trên môi trường MS và MS ½, các chỉ tiêu theo dõi đều đạt mức cao nhất khi bổ sung IBA ở mức 0,5 mg/L, giảm dần khi tăng nồng độ IBA lên 0,75 mg/L, chứng tỏ tuy IBA là chất kích thích tạo rễ nhưng khi bổ sung quá mức so với yêu cầu lại gây ức chế sự tạo rễ. Auxin

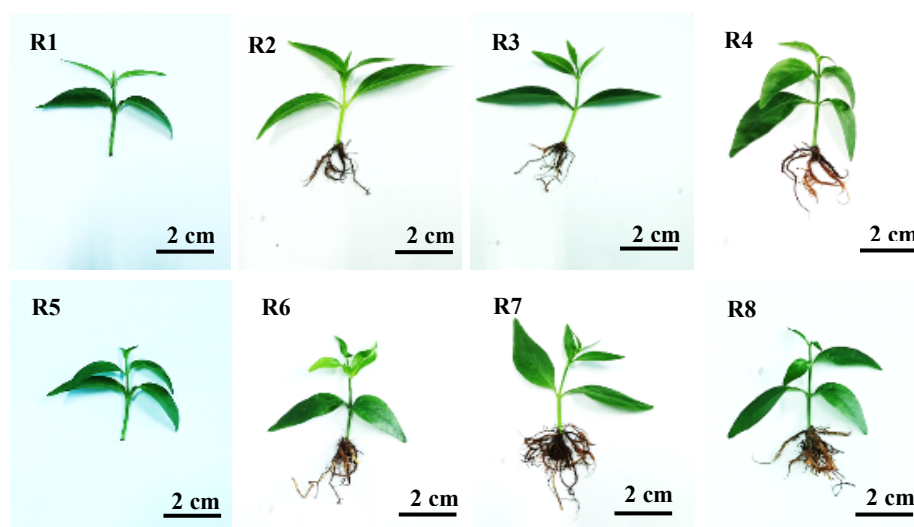
thúc đẩy sự phát triển của rễ bất định và kích thích sự mở rộng tế bào bằng cách cải thiện độ đàn hồi của thành tế bào. IBA đã được báo cáo là có tác động đáng kể đến quá trình ra rễ so với NAA và IAA vì không bị phân hủy bởi IAA oxidase hoặc các enzyme khác và tồn tại trong thời gian dài hơn, điều này làm cho IBA hiệu quả hơn [29]. Các nghiên cứu cho thấy trong số các auxin khác nhau được thử nghiệm (NAA, IAA, IBA), IBA hiệu quả nhất trong việc kích thích ra rễ xuyên tâm liên [20, 22]. Rễ được kích thích trực tiếp từ gốc chồi mà không có giai đoạn mô sẹo trên môi trường bổ sung IBA. Ngược lại, sự ra rễ của chồi xảy ra thông qua giai đoạn mô sẹo trên môi trường bổ sung IAA và NAA [22]. Ở các nghiệm thức có cùng nồng độ IBA, môi trường MS ½ cho kết quả các chỉ tiêu theo dõi đều đạt mức cao hơn so với trên môi trường MS. Việc giảm nồng độ muối trong môi trường MS có tác dụng thúc đẩy sự hình thành rễ tốt hơn ở xuyên tâm liên đã được báo cáo [20]. Kết quả thí nghiệm cho thấy môi trường MS ½ bổ sung 0,5 mg/L IBA thích hợp cho sự tạo rễ của xuyên tâm liên in vitro với 96,6% tỷ lệ mẫu tạo rễ, 9,86 rễ, chiều dài rễ là 2,87 cm sau 6 tuần nuôi cấy. Purkayastha và cộng sự đã ra rễ xuyên tâm liên trên môi trường MS được bổ sung IBA 0,5 mg/L cho kết quả 94% chồi ra rễ, 7,2 rễ/mẫu, chiều dài rễ 2,1 cm [22]. Dandin và Murthy đã ra rễ xuyên tâm liên trên môi trường MS ½ có bổ sung IBA 0,4 mg/L với tỷ lệ tạo rễ 100% [20], Katakya và Handique ra rễ xuyên tâm liên in vitro trên môi trường MS ½ bổ sung IAA 0,5 mg/L với số lượng rễ trung bình là 18,48 [15].

Bảng 4. Ảnh hưởng của môi trường và IBA lên sự tạo rễ của xuyên tâm liên

Nghiệm thức	Môi trường	Nồng độ IBA (mg/L)	Tỷ lệ mẫu tạo rễ (%)	Số rễ (rễ)	Chiều dài rễ (cm)
R1	MS	0	0,0 ^d ± 0,0	0,00 ^g ± 0,00	0,00 ^g ± 0,00
R2	MS	0,25	83,3 ^{bc} ± 5,8	4,28 ^f ± 0,19	2,19 ^f ± 0,02
R3	MS	0,5	90,0 ^b ± 0,0	6,15 ^d ± 0,06	2,35 ^e ± 0,01
R4	MS	0,75	76,7 ^c ± 5,8	5,48 ^e ± 0,10	2,73 ^b ± 0,02
R5	MS ½	0	0,0 ^d ± 0,0	0,00 ^g ± 0,00	0,00 ^g ± 0,00
R6	MS ½	0,25	86,6 ^{bc} ± 5,8	7,07 ^c ± 0,06	2,47 ^d ± 0,01
R7	MS ½	0,5	96,6 ^a ± 5,8	9,86 ^a ± 0,17	2,87 ^a ± 0,02
R8	MS ½	0,75	80,0 ^c ± 0,0	8,50 ^b ± 0,33	2,50 ^c ± 0,05

* Các chữ cái a, b, ... trong cùng một cột thể hiện sự sai biệt có ý nghĩa ở độ tin cậy 95%.

* Số liệu tỷ lệ mẫu tạo rễ được chuyển đổi sang $\text{Arcsin}(x)^{1/2}$ trước khi xử lý thống kê.



Hình 3. Chồi xuyên tâm liên in vitro trên các môi trường tạo rễ khác nhau sau 6 tuần nuôi cấy

R1: MS

R2: MS + 0,25 mg/L IBA

R3: MS + 0,5 mg/L IBA

R4: MS + 0,75 mg/L IBA

R5: MS ½

R6: MS ½ + 0,25 mg/L IBA

R7: MS ½ + 0,5 mg/L IBA

R8: MS ½ + 0,75 mg/L IBA

4. KẾT LUẬN

Kết quả cho thấy đoạn thân mang mầm ngủ cây xuyên tâm liên được khử trùng với dung dịch Javel 25% trong 7 phút cho tỷ lệ mẫu sống và không nhiễm cao nhất đạt 73,3% sau 2 tuần nuôi cấy. Môi trường MS bổ sung 1,0 mg/L BA thích hợp cho sự phát sinh chồi *in vitro* từ mẫu đoạn thân mang mầm ngủ. Môi trường MS bổ sung 0,5 mg/L BA kết hợp với 1,0 mg/L kinetin cho hệ số nhân chồi cao nhất. Môi trường MS $\frac{1}{2}$ bổ sung 0,5 mg/L IBA thích hợp cho sự tạo rễ của xuyên tâm liên *in vitro*. Các kết quả này có thể được sử dụng làm cơ sở cho các nghiên cứu tiếp theo và phục vụ cho việc nhân giống quy mô lớn cây được liệu xuyên tâm liên.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Đỗ Tất Lợi, *Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam*. Nhà xuất bản Y học, 2004.
- [2] P. K. Mishra *et al.*, “Antibacterial activity of *Andrographis paniculata* (Burm. f.) Wall ex Nees leaves against clinical pathogens,” *Journal of Pharmacy Research*, vol. 7, no. 5, pp. 459–462, 2013, doi: <https://doi.org/10.1016/j.jopr.2013.05.009>
- [3] L. I. Tang, A. P. Ling, R. Y. Koh, S. M. Chye, and K. G. Voon, “Screening of anti-dengue activity in methanolic extracts of medicinal plants,” *BMC Complementary and Alternative Medicine*, vol. 12, no. 3, pp. 1–10, 2012, doi: <https://doi.org/10.1186/1472-6882-12-3>
- [4] H.-X. Xu, M. Wan, B.-N. Loh, O.-L. Kon, P.-W. Chow, and K.-Y. Sim, “Screening of traditional medicines for their inhibitory activity against HIV-1 protease,” *Phytotherapy Research*, vol. 10, no. 3, pp. 207–210, 1996.
- [5] K. Sa-ngiamsuntorn *et al.*, “Anti-SARS-CoV-2 activity of *Andrographis paniculata* extract and its major component Andrographolide in human lung epithelial cells and cytotoxicity evaluation in major organ cell representatives,” *Journal of Natural Products*, vol. 84, no. 4, pp. 1261–1270, 2021, doi: <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.0c01324>
- [6] R. Nagalekshmi, A. Menon, D. K. Chandrasekharan, and C. K. K. Nair, “Hepatoprotective activity of *Andrographis paniculata* and *Swertia chirayita*,” *Food and Chemical Toxicology*, vol. 49, no. 12, pp. 3367–3373, 2011, doi: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2011.09.026>
- [7] A. A. Abu-Ghefreh, H. Canatan, and C. I. Ezeamuzie, “*In vitro* and *in vivo* anti-inflammatory effects of andrographolide,” *International Immunopharmacology*, vol. 9, no. 3, pp. 313–318, 2009, doi: <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2008.12.002>
- [8] B.-C. Yu, C.-R. Hung, W.-C. Chen, and J.-T. Cheng, “Antihyperglycemic effect of andrographolide in streptozotocin-induced diabetic rats,” *Planta Medica*, vol. 69, no. 12, pp. 1075–1079, 2003, doi: <https://doi.org/10.1055/s-2003-45185>
- [9] R. Ajaya Kumar, K. Sridevi, N. Vijaya Kumar, S. Nanduri, and S. Rajagopal, “Anticancer and immunostimulatory compounds from *Andrographis paniculata*,” *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 92, no. 2, pp. 291–295, 2004, doi: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2004.03.004>
- [10] J. S. Chauhan, Y. K. Tomar, N. Indrakumar Singh, S. Ali, A. Badoni, and A. Rana, “Assessment of compatible substratum for *Andrographis paniculata* standard seed germination testing,” *Journal of American Science*, vol. 5, no. 6, pp. 70–75, 2009.
- [11] T. N. H. Phạm, T. Đ. Trịnh., and R. F. William, “Xuyên tâm liên: Tổng quan về thành phần hóa học và tác dụng dược lý,” *Tạp chí Dược liệu*, vol. 26, no. 4, pp. 199–211, 2021.
- [12] D. Talei, A. Valdiani, and M. Abdullah, “A rapid and effective method for dormancy breakage and germination of king of bitters (*Andrographis paniculata* Nees.) seeds,” *Maydica*, vol. 57, pp. 98–105, 2012.
- [13] B. Kumar, S. K. Verma, and H. P. Singh, “Effect of temperature on seed germination parameters in Kalmegh (*Andrographis paniculata* Wall. ex Nees.),” *Industrial Crops and Products*, vol. 34, no. 1, pp. 1241–1244, 2011, doi: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2011.04.008>

- [14] K. P. Martin, "Plant regeneration protocol of medicinally important *Andrographis paniculata* (Burm. F.) Wallich ex Nees via somatic embryogenesis," *In vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, vol. 40, no. 2, pp. 204–209, 2004, doi: <https://doi.org/10.1079/IVP2003520>
- [15] A. Katakya and P. Handique, "Micropropagation and screening of antioxidant potential of *Andrographis paniculata* (Burm. f) Nees," *Journal of Hill Agriculture*, vol. 1, no. 1, pp. 13–18, 2010.
- [16] K. Shruthi, P. Balakrishna, and K. Naveena, "Seed quality enhancement techniques in Kalmegh (*Andrographis paniculata* Nees)," *Agricultural Research Journal*, vol. 55, no. 3, pp. 595–597, 2018, doi: <https://doi.org/10.5958/2395-146X.2018.00108.4>
- [17] T. Murashige and F. Skoog, "A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures," *Physiologia Plantarum*, vol. 15, pp. 473–497, 1962, doi: <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
- [18] A. Patuhai, P. E. M. Wahab, M. M. Yusoff, Y. H. Dewir, A. Alsughayyir, and M. Hakiman, "Plant growth regulator and elicitor mediated enhancement of biomass and Andrographolide production of shoot tip culture derived plantlets of *Andrographis paniculata* (Burm.f.) Wall. (*Hempedu bumi*)," *Plants*, vol. 12, no. 16, pp. 2953, 2023, doi: <https://doi.org/10.3390/plants12162953>
- [19] S. Abhilasha and A. D. Arpita, "Study of *in vitro* micropropagation of medicinally important plant *Andrographis paniculata* from its different parts," *International Journal of Science and Research (IJSR)*, vol. 6, no. 5, pp. 1060–1063, 2017.
- [20] V. S. Dandin and H. N. Murthy, "Regeneration of *Andrographis paniculata* Nees: Analysis of genetic fidelity and andrographolide content in micropropagated plants," *African Journal of Biotechnology*, vol. 11, no. 61, pp. 12464–12471, 2012.
- [21] M. C. San José, M. J. Cernadas, and L. V. Janeiro, "Optimization of micropropagation protocols in some woody plants using meta-topolin," in *Meta-topolin: A growth regulator for plant biotechnology and agriculture*, N. Ahmad and M. Strnad, Eds., Singapore: Springer, 2021, pp. 221–240. doi: https://doi.org/10.1007/978-981-15-9046-7_16
- [22] J. Purkayastha, T. Sugla, A. Paul, S. Solleti, and L. Sahoo, "Rapid *in vitro* multiplication and plant regeneration from nodal explants of *Andrographis paniculata*: A valuable medicinal plant," *In vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, vol. 44, no. 5, pp. 442–447, 2008, doi: <https://doi.org/10.1007/s11627-008-9156-8>
- [23] E. Savelieva *et al.*, "Cytokinin activity of N 6 -benzyladenine derivatives assayed by interaction with the receptors *in planta*, *in vitro*, and *in silico*," *Phytochemistry*, vol. 149, pp. 161–177, 2018. doi: <https://doi.org/10.1101/241281>
- [24] S. Malik, R. Chaudhury, and R. Kalia, "Rapid *in vitro* multiplication and conservation of *Garcinia indica*: A tropical medicinal tree species," *Scientia Horticulturae*, vol. 106, pp. 539–553, 2005, doi: <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2005.05.002>
- [25] N. Brassard, L. Brissette, D. Lord, and S. Laliberté, "Elongation, rooting and acclimatization of micropropagated shoots from mature material of hybrid larch," *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, vol. 44, no. 1, pp. 37–44, 1996, doi: <https://doi.org/10.1007/BF00045911>
- [26] S. F. L. Figueiredo, N. Albarello, and V. R. Campos Viana, "Micropropagation of *Rollinia mucosa* (Jacq.) Baill," *In vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, vol. 37, no. 4, pp. 471–475, 2001, doi: <https://doi.org/10.1007/s11627-001-0083-1>
- [27] K. Duszka, B. F. C. Clark, F. Massino, and J. Barciszewski, "Biological activities of kinetin," in *Herbal drugs: Ethnomedicine to modern medicine*, K. G. Ramawat, Ed., Berlin, Heidelberg: Springer, 2009, pp. 369–380. doi: https://doi.org/10.1007/978-3-540-79116-4_20
- [28] G. Renuga and S. N. Saravana Kumar, "Induction of vanillin related compounds from nodal explants of *Vanilla planifolia* using BAP and Kinetin," *Asian Journal of Plant Science and Research*, vol. 4, no. 1, pp. 53–61, 2014.
- [29] M. S. Ahmed, Z. M. Abdulrazzaq, M. M. Sharqi, and M. R. Al-Shaheen, "The effect of wounding, indole butyric acid levels, and cutting date on rooting ability of *Ficus*

ABSTRACT

EFFECT OF SOME FACTORS ON MICROPROPAGATION OF *Andrographis paniculata*

Tran Thi Yen Nhi*, Pham Tran Thuy Tien, Nguyen Thi Lien, Vu Thi Thuy Hang,
Trinh Thi Minh Tram, Duong Phu Tien, Nguyen Tran Phuoc Huy, Nguyen Van Toan,
Nguyen Thi Hue, Nguyen Thanh Thuy, Vuong Thi Hong Loan

Center for Business Incubation of Agricultural High Technology

*Email: ttynhi.ahbi@gmail.com

Andrographis paniculata has been shown to have various beneficial effects, including antibacterial, antiviral, hepatoprotective, anti-inflammatory, antidiabetic, and anticancer. It is typically grown from seeds, but seed dormancy is a major obstacle in commerce. Although hormonal treatments and hot water seed pretreatment have been applied to overcome dormancy, these methods remain insufficient to meet production demands due to plant-to-plant variability, low rooting rates, and slow seedling growth. This study investigated the effects of different concentrations of plant growth regulators (benzyladenine and kinetin) on shoot regeneration and multiplication of *Andrographis paniculata*. The nodal explants were sterilized with Javel 25% for 7 minutes for optimal efficiency in creating the initial material source. The MS medium supplemented with 1.0 mg.L⁻¹ benzyladenine resulted in a 100% shoot induction rate. The highest shoot multiplication rate was achieved on MS medium containing 0.5 mg.L⁻¹ benzyladenine combined with 1.0 mg.L⁻¹ kinetin. Half-strength MS medium supplemented with 0.5 mg.L⁻¹ Indole-3-butyric acid was suitable for *in vitro* rooting of *Andrographis paniculata*.

Keywords: *Andrographis paniculata*, propagation, *in vitro*, plant growth regulators.