



NGHIÊN CỨU TÁI SINH CHỒI CÂY NHÂN TRẦN CÁT (*Adenosma indianum* (Lour.) Merr.) THÔNG QUA NUÔI CẤY CALLUS

Hoàng Tấn Quang^{1,*}, Trần Thị Diệu², Lê Thị Lệ Quyên³, Phạm Thị Diễm Thi¹,
Trương Thị Hồng Hải¹, Trần Quốc Dung³

¹ Viện Công nghệ sinh học, Đại học Huế, Tỉnh lộ 10, Phú Thượng, Phú Vang, Thừa Thiên Huế, Việt Nam

² Trường đại học Nông Lâm, Đại học Huế, 102 Phùng Hưng, Huế, Việt Nam

³ Trường đại học Sư phạm, Đại học Huế, 32 Lê Lợi, Huế, Việt Nam

Tóm tắt. Nhân trần cát (*Adenosma indianum* (Lour.) Merr.) là một loại cây dược liệu có giá trị phân bố ở một số vùng đất cát ven biển nhưng hiện nay đã không còn phổ biến. Để duy trì nguồn giống loại cây này, chúng tôi đã tiến hành nghiên cứu tái sinh chồi *in vitro* cây nhân trần cát thông qua sự phát sinh callus. Kết quả nghiên cứu cho thấy thời gian thích hợp để khử trùng mẫu lá, thân cây nhân trần cát là 10 phút, mẫu cuống lá là 6 phút với tỷ lệ mẫu nhiễm lần lượt là 18,52 %; 7,04 % và 0,00 %. Môi trường thích hợp để tạo callus từ lá là MS cơ bản có bổ sung 0,30 mg/l NAA, tạo callus từ cuống lá 0,20 mg/l IBA và từ đoạn thân là 0,50 mg/l NAA; tỷ lệ tạo callus lần lượt là 80,55 %, 66,67 % và 76,39 %. Môi trường MS cơ bản bổ sung 0,50 mg/l BAP và 0,10 mg/l NAA thích hợp để tạo chồi từ callus, tỷ lệ tạo chồi là 43,52 % và số chồi/callus là 3,43.

Từ khóa: *Adenosma indianum*, callus, cây dược liệu, khử trùng, tái sinh chồi

1 Đặt vấn đề

Cây nhân trần cát (*Adenosma indianum* (Lour.) Merr.), tên thường gọi là chè nội, chè cát, chè tạng, bồ bồ, nhân trần ta... là một loài thực vật có hoa trong họ hoa mõm sói (*Scrophulariaceae*). Đây là một loại dược liệu có vị cay, hơi đắng, mùi thơm, tính ôn nhẹ, có tác dụng diệt giun, gây tăng tiết mật, tăng cường chức năng thải chất độc ở gan. Bên cạnh đó, cây còn có tác dụng kháng viêm, kháng khuẩn, ức chế sự phát triển của các khuẩn *Shigella dysenteriae*, *Sh. shigae*, *Staphylococcus aureus* 209P và *Streptococcus hemolyticus* S84, giảm sự phân tiết dịch vị, giảm độ acid tự do và acid toàn phần ở dạ dày. Cây này cũng được dùng để chữa sốt, cảm cúm, viêm gan vàng da, tiêu hóa kém, viêm ruột, đau bụng, thuốc kích thích ăn ngon cho phụ nữ sau khi sinh [1, 4, 6].

Cây nhân trần cát trước đây khá phổ biến trên đất nước ta, thường gặp ở bờ ruộng, các rừng thưa cây rụng lá, nơi đất trống có cát và cỏ, trong các đầm lầy và đất ẩm. Tuy nhiên, trong những năm gần đây, số lượng cây này giảm mạnh do một số hoạt động của con người như mở

* Liên hệ: htquang@hueuni.edu.vn

rộng đất canh tác, chuyển đổi cây trồng... đã làm mất đi môi trường sống của cây. Nhân trần cát trở thành một loại dược liệu cần được bảo vệ để tránh nguy cơ trở nên khan hiếm [3].

Để nhân giống cây nhân trần cát, một số nơi đã bắt đầu trồng thử nghiệm bằng các phương pháp nhân giống truyền thống như gieo hạt, giâm cành... nhưng thường cho tỷ lệ sống của cây con không cao và nhiễm bệnh. Hơn nữa, sự hạn chế về nguồn giống cũng góp phần làm giảm hiệu quả của các phương pháp nhân giống truyền thống. Đối với cây nhân trần cát, việc nhân giống bằng kỹ thuật nuôi cấy mô tế bào chưa có nhiều nghiên cứu được công bố. Trên các đối tượng nhân trần khác, Tu và cs. đã thành công khi nhân giống *in vitro* cây nhân trần *A. glutinosum* thông qua giai đoạn callus [7]. Do đó, chúng tôi thực hiện nghiên cứu này nhằm xác định khả năng nhân giống cây nhân trần cát thông qua giai đoạn callus.

2 Đối tượng và phương pháp

2.1 Đối tượng liệu

Đối tượng nghiên cứu của chúng tôi là cây nhân trần cát (*A. indianum*) được thu thập tại vùng đất cát Hải Dương, Hải Lăng, Quảng Trị (Hình 1).

Mẫu vật sử dụng trong nghiên cứu là lá, cuống lá và đoạn thân từ cây tự nhiên khỏe mạnh.

2.2 Phương pháp

Ảnh hưởng của thời gian khử trùng mẫu đến tỷ lệ sống của cây nhân trần cát

Lá, cuống lá và đoạn thân (1–2 cm) của cây nhân trần cát được rửa nhiều lần dưới vòi nước chảy, cắt bỏ lá bị hỏng và những phần không cần thiết, chỉ lấy lá, cuống lá và đoạn thân dài 1–2 cm cho vào bình. Rửa sạch bằng nước cất 3 lần, 1 lần/2 phút. Tiếp tục khử trùng bằng HgCl₂ 0,10 % 5–10 phút. Rửa sạch bằng nước cất vô trùng 3–4 lần trước khi cấy vào môi trường cơ bản MS (Murashige và Skoog) [5] có bổ sung các chất điều hòa sinh trưởng theo từng công thức thí nghiệm cụ thể. Tỷ lệ mẫu nhiễm được đánh giá sau 1 tuần nuôi cấy.

Ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng lên khả năng cảm ứng tạo callus

Lá, cuống lá và đoạn thân sau khi được khử trùng được đặt lên giấy thấm vô trùng, dùng dụng cụ vô trùng cắt bỏ phần bị tổn thương do hóa chất. Cấy mẫu lên môi trường dinh dưỡng cơ bản MS bổ sung IBA nồng độ 0,10–0,50 mg/l; NAA nồng độ 0,10–0,50 mg/l riêng lẻ hoặc phối hợp với BAP nồng độ 0,50 mg/l để thăm dò khả năng tạo callus của mẫu nuôi cấy [7]. Khả năng tạo callus được đánh giá sau 8 tuần nuôi cấy.

Các loại môi trường sử dụng cho nuôi cấy được điều chỉnh pH đến 5,8 và khử trùng ở nhiệt độ 121 °C, áp suất 1 atm trong 15 phút. Các thí nghiệm nuôi cấy được thực hiện ở 25±2 °C, cường độ chiếu sáng khoảng 2000 lux và thời gian chiếu sáng 10–12 giờ/ngày.

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

Callus có nguồn gốc từ lá (khoảng 0,5 cm) được cấy chuyển lên môi trường MS bổ sung BAP nồng độ 0,50 mg/l và NAA ở các nồng độ 0,10–0,50 mg/l [7]. Số chồi tái sinh được ghi nhận sau 8 tuần nuôi cấy.

Xử lý số liệu

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

3 Kết quả và thảo luận

3.1 Ảnh hưởng của thời gian khử trùng mẫu đến tỷ lệ sống của cây nhân trần cát

Mẫu (lá, cuống lá, đoạn thân) của cây nhân trần cát được cấy lên môi trường cơ bản MS bổ sung 0,10–0,50 mg/l IBA và 0,10–0,50 mg/l NAA để tạo callus. Sau 1 tuần theo dõi với các khoảng thời gian khử trùng khác nhau, chúng tôi đã thu được kết quả về tỷ lệ nhiễm của mẫu. Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của thời gian khử trùng mẫu được trình bày Bảng 1.

Kết quả nghiên cứu cho thấy tỷ lệ mẫu nhiễm ở lá ở 5 phút cao nhất (61,11 %), giảm đáng kể khi tăng thời gian khử trùng lên 6 phút và có tỷ lệ nhiễm thấp nhất khi được khử trùng trong 10 phút (18,52 %), lúc này mẫu bắt đầu có dấu hiệu chết (chiếm 5,56 %). Đối với mẫu thân, kết quả tốt nhất cũng thu được sau 10 phút khử trùng, tỷ lệ mẫu nhiễm thấp (7,40 %) và không có mẫu chết. Đối với cuống lá, thời gian khử trùng 6 phút là phù hợp.

Bảng 1. Ảnh hưởng thời gian khử trùng mẫu đến tỷ lệ sống của cây nhân trần cát

Thời gian khử trùng (phút)	Lá		Thân		Cuống lá	
	Tỷ lệ mẫu nhiễm (%)	Tỷ lệ mẫu chết (%)	Tỷ lệ mẫu nhiễm (%)	Tỷ lệ mẫu chết (%)	Tỷ lệ mẫu nhiễm (%)	Tỷ lệ mẫu chết (%)
5	61,11 ^a	0,00 ^a	55,56 ^a	0,00	11,11 ^a	0,00 ^b
6	24,07 ^b	0,00 ^a	31,48 ^b	0,00	0,00 ^b	0,00 ^b
8	21,30 ^{bc}	0,00 ^a	27,78 ^b	0,00	0,00 ^b	0,00 ^b
10	18,52 ^c	5,56 ^a	7,40 ^c	0,00	0,00 ^b	13,89 ^a

Chú thích: Các chữ cái khác nhau trên cùng một cột chỉ sự sai khác có ý nghĩa thống kê của các trung bình mẫu với $p < 0,05$ (Duncan's test). Các chú thích này dùng chung cho các bảng 2–5.

3.2 Ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng lên khả năng hình thành callus

Ảnh hưởng của các loại chất điều hòa sinh trưởng riêng lẻ

Sau khi khử trùng mẫu bằng HgCl_2 , mẫu được cấy lên môi trường MS chứa các chất điều hòa sinh trưởng nhóm auxin là IBA và NAA có nồng độ là 0,10–0,50 mg/l để thăm dò khả năng tạo callus. Kết quả trình bày ở Bảng 2 và 3 cho thấy ở tất cả các môi trường thử nghiệm callus đều bắt đầu hình thành sau gần 3 tuần cảm ứng. Callus ban đầu xuất hiện tại các vết cắt, có màu vàng nhạt sau đó chuyển sang màu xanh lục (Hình 1).

So với IBA, NAA có khả năng cảm ứng tạo callus ở cây nhân trần cát tốt hơn. Đối với mẫu lá, tỷ lệ tạo callus lên tới 80,55 % (NAA nồng độ 0,30 mg/l), mẫu cuống lá là 58,93 % và mẫu thân là 76,39 % (NAA nồng độ 0,50 mg/l).

Như vậy, ở môi trường MS có bổ sung 0,30 mg/l NAA cho tỷ lệ tạo callus tốt nhất đối với lá và đoạn thân, môi trường có 0,3 mg/l IBA tạo callus tốt nhất đối với mẫu cuống lá.

Bảng 2. Ảnh hưởng của nồng độ IBA lên khả năng cảm ứng tạo callus

Nồng độ IBA (mg/l)	Tỷ lệ tạo callus (%)		
	Lá	Cuống lá	Thân
0,10	33,33 ^b	50,00 ^c	41,67 ^b
0,20	44,44 ^{ab}	63,89 ^a	44,44 ^b
0,30	59,72 ^a	66,67 ^a	35,00 ^b
0,40	56,94 ^a	61,11 ^a	38,89 ^b
0,50	51,39 ^{ab}	58,33 ^b	66,67 ^a

Đối với chất điều hòa sinh trưởng là IBA, mẫu lá cho tỷ lệ tạo callus cao nhất là 59,72 % ở nồng độ IBA 0,30 mg/l, mẫu cuống lá là 66,67 % ở nồng độ 0,30 mg/l trong khi mẫu thân cũng là 66,67 % ở nồng độ 0,50 mg/l.

Bảng 3. Ảnh hưởng của nồng độ NAA lên khả năng cảm ứng tạo callus

Nồng độ NAA (mg/l)	Tỷ lệ tạo callus (%)		
	Lá	Cuống lá	Thân
0,10	72,22 ^a	45,44 ^q	38,08 ^b
0,20	74,45 ^a	48,61 ^a	44,44 ^{ab}
0,30	80,55 ^a	48,61 ^a	51,11 ^{ab}
0,40	78,89 ^a	51,81 ^a	56,94 ^{ab}
0,50	49,44 ^b	58,93 ^a	76,39 ^a



Hình 1. Cây nhân trần cát tự nhiên (A) và callus hình thành trên các môi trường tối ưu (B. từ đoạn thân, C. từ mảnh lá, D. từ cuống lá)

Ảnh hưởng của sự phối hợp các chất điều hòa sinh trưởng

Tu và cs. đã nghiên cứu khả năng tạo callus của cây nhân trần *A. glutinosum*. Kết quả nghiên cứu cho thấy môi trường MS bổ sung BAP nồng độ 0,50 mg/l và NAA ở 2 nồng độ 0,10 mg/l và 0,50 mg/l có tỷ lệ cảm ứng callus đạt 98,90 %, bổ sung 0,50 mg/l BAP và NAA ở nồng độ 0,30 mg/l tỷ lệ cảm ứng đạt 100 % [7]. Trong khi đó, He và cs. nhận thấy BAP kết hợp với IBA cho kết quả tốt trong quá trình nhân giống *in vitro* cây nhân trần *A. glutinosum* [2]. Dựa trên các kết quả này, chúng tôi đã tiến hành nghiên cứu khả năng cảm ứng tạo callus khi kết hợp giữa BAP 0,50 mg/l với NAA và IBA ở các nồng độ khác nhau, kết quả được trình bày ở Bảng 4.

Kết quả nghiên cứu cho thấy khả năng cảm ứng tạo callus khi kết hợp các chất điều hòa sinh trưởng thấp hơn khi sử dụng riêng lẻ. Trong các loại mẫu nuôi cấy, mẫu lá có khả năng tạo callus nhiều nhất, đạt cao nhất khi kết hợp giữa BAP 0,50 mg/l và NAA 0,20 mg/l, tỷ lệ tạo callus là 42,86 %. Mẫu thân cũng có khả năng tạo callus cao, tuy nhiên chỉ có 2 công thức tạo callus.

Bảng 4. Ảnh hưởng của sự kết hợp giữa BAP với NAA và IBA lên khả năng cảm ứng tạo callus

Chất điều hòa sinh trưởng (mg/l)			Tỷ lệ tạo callus (%)		
BAP	NAA	IBA	Lá	Cuống lá	Thân
0,50	0,10	–	41,18 ^a	16,67 ^b	37,50 ^b
0,50	0,20	–	42,86 ^a	0,00 ^c	50,00 ^a
0,50	0,30	–	23,53 ^b	0,00 ^c	0,00 ^c
0,50	0,50	–	20,00 ^b	0,00 ^c	0,00 ^c
0,50	–	0,10	16,67 ^b	27,27 ^a	0,00 ^c
0,50	–	0,30	0,00 ^c	0,00 ^c	0,00 ^c
0,50	–	0,50	0,00 ^c	0,00 ^c	0,00 ^c

So với nghiên cứu của Tu và cs. [7], tỷ lệ cảm ứng callus của cây *A. glutinosum* khi nuôi cấy trên môi trường MS cơ bản bổ sung BAP 0,50 mg/l và NAA 0,10–0,50 mg/l cao hơn ở cây *A. indianum* trong nghiên cứu của chúng tôi.

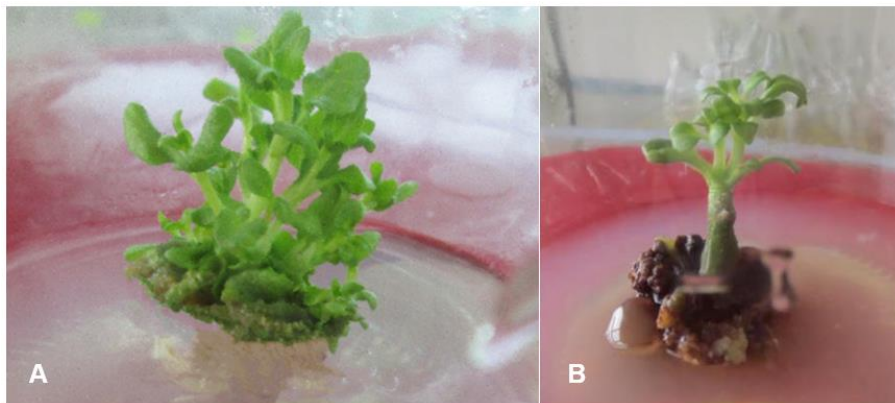
3.3 Tái sinh chồi từ callus có nguồn gốc từ lá

Trong nghiên cứu này, chúng tôi nhận thấy lá là mẫu có tỷ lệ tạo callus cao nhất, vì vậy, chúng tôi tiếp tục sử dụng callus có nguồn gốc từ lá để tái sinh chồi *in vitro*. Callus được tạo thành trong quá trình nuôi cấy *in vitro* được cấy lên môi trường dinh dưỡng cơ bản MS, bổ sung BAP với nồng độ 0,50 mg/l và NAA có nồng độ 0,10–0,50 mg/l để khảo sát sự tái sinh chồi từ callus. Kết quả nuôi cấy sau 8 tuần được trình bày ở Bảng 5.

Kết quả trình bày ở Bảng 5 cho thấy callus ở tất cả các công thức thí nghiệm đều có khả năng tái sinh thành chồi. Môi trường bổ sung 0,50 mg/l BAP và 0,10 mg/l NAA có khả năng tạo chồi từ callus cao hơn hẳn so với các môi trường còn lại: tỷ lệ là 43,52 %, số chồi/callus là 3,43. Chồi tạo thành sinh trưởng tốt, lá có màu xanh đậm (Hình 2). Các môi trường có nồng độ NAA cao hơn cho khả năng tái sinh chồi thấp hơn, nồng độ NAA càng cao khả năng tái sinh càng thấp, chồi sinh trưởng kém, lá màu xanh nhạt.

Bảng 5. Ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng lên khả năng tái sinh chồi từ callus

Chất điều hòa sinh trưởng (mg/l)		Khả năng tái sinh chồi	
BAP	NAA	Tỷ lệ mẫu tạo chồi (%)	Số chồi/callus (chồi)
0,50	0,10	43,52 ^a	3,43 ^a
0,50	0,20	22,22 ^{ab}	1,83 ^{ab}
0,50	0,30	13,89 ^b	1,60 ^{ab}
0,50	0,50	6,48 ^b	0,49 ^b



Hình 2. Chồi tái sinh trên môi trường MS bổ sung 0,50 mg/l BAP và 0,10 mg/l NAA (A) hay 0,30 mg/l NAA (B)

Trong nghiên cứu trên cây nhân trần *A. glutinosum* của mình, Tu và cs. nhận thấy công thức bổ sung 0,50 mg/l BAP và 0,01 mg/l NAA thu được 7,2 chồi/callus, cao gấp đôi nghiên cứu của chúng tôi [7]. Như vậy, có thể thấy trong cùng điều kiện nuôi cấy, khả năng nhân giống *in vitro* của cây *A. glutinosum* cao hơn cây *A. indianum*.

4. Kết luận

Chúng tôi đã thành công trong việc tái sinh chồi cây nhân trần cát thông qua giai đoạn callus. Thời gian thích hợp để khử trùng mẫu lá, thân cây nhân trần cát là 10 phút, mẫu cuống lá là 6 phút. Môi trường thích hợp để tạo callus từ lá là MS cơ bản có bổ sung 0,30 mg/l NAA, tạo callus từ cuống lá 0,20 mg/l IBA và từ đoạn thân là 0,50 mg/l NAA. Môi trường MS cơ bản bổ sung 0,50 mg/l BAP và 0,10 mg/l NAA thích hợp để tạo chồi từ callus.

Tài liệu tham khảo

1. Đỗ Huy Bích, Đặng Quang Chung, Bùi Xuân Chương, Nguyễn Thượng Dong, Đỗ Trung Đàm, Phạm Văn Hiền, Vũ Ngọc Lộ, Phạm Duy Mai, Phạm Kim Mân, Đoàn Thị Nhu, Nguyễn Tập, Trần Toàn (2006), *1000 cây thuốc và động vật làm thuốc ở Việt Nam*, Nxb. Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội.
2. He L. C., Xuan L., Hua X. G. (2010), Tissue culture and rapid propagation of *Adenosma glutinosum* (L.) Druce. *Plant Physiology Journal*, 46(6): 601–602.
3. Phạm Thị Lành, Trần Thị Ê Ly, Lê Phương Nhật (2015), Nghiên cứu đặc điểm sinh học và khả năng tái sinh tự nhiên của cây nhân trần (*Adenosma indiana* (Lour.) Merr.) tại xã Hải Dương, huyện Hải Lăng, tỉnh Quảng Trị. Kỷ yếu hội nghị khoa học sinh viên năm học 2015–2016, Trường Đại học Sư phạm, Đại học Huế: 61–62.
4. Đỗ Tất Lợi, (2004), *Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam*, Nxb. Y học, Hà Nội.
5. Murashige T., Skoog F. (1962), A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3): 473–497.

6. Dương Thị Hồng Nhung (2015), Nghiên cứu thành phần hóa học và hoạt tính sinh học của loài bò bô (*Adenosma indiana* (Lour) Merr.) phân bố ở địa bàn huyện Đại Từ – tỉnh Thái Nguyên. Luận văn Thạc sĩ Khoa học vật chất, Trường đại học Sư phạm, Đại học Thái Nguyên.
7. Tu R. P., Hu J. Y., Ji Q. Q., Xia G. H., Zheng B. S. (2012), Highly efficient in vitro adventitious shoot regeneration of *Adenosma glutinosum* (Linn.) Druce using leaf explants. *African Journal of Biotechnology*, 11(29): 7542–7548.

IN VITRO SHOOT REGENERATION OF *Adenosma indiana* (Lour.) Merr. THROUGH CALLUS INDUCTION

**Hoang Tan Quang^{1,*}, Tran Thi Dieu², Le Thi Le Quyen³, Pham Thi Diem Thi¹,
Truong Thi Hong Hai¹, Tran Quoc Dung³**

¹Institute of Biotechnology, Hue University, Road No. 10, Phu Vang, TTHue, Vietnam

²University of Agriculture and Forestry, Hue University, 102 Phung Hung St., Hue, Vietnam

³University of Education, Hue University, 32 Le Loi St., Hue, Vietnam

Abstract. *Adenosma indiana* (Lour.) Merr. is a valuable medicinal plant distributed in coastal sandy areas but is no longer popular. This paper presents the results of *in vitro* shoot regeneration of *Adenosma indiana* (Lour.) Merr. through callus induction. The samples (leaf pieces, petioles and stems) were sterilized with HgCl₂ 0.1 % from 5 to 10 minutes. The suitable effective sterilization time is 10 min for leaves and stems and 6 min for petioles with the contamination rate of 18.52 %, 7.04 % and 0.00 %, respectively. The medium for callus formation from leaves was basal MS supplemented with 0.30 mg/l NAA, from petioles was 0.20 mg/l IBA and from stems was 0.50 mg/l NAA with the ratio of callus formation of 80.55 %, 66.67 % and 76.39 %, respectively. The basal MS medium supplemented with 0.50 mg/l BAP and 0.10 mg/l NAA was suitable for shoot generation from callus. The shoot forming ratio was 43.52 % with an average of 3.43 shoots/callus.

Keywords: *Adenosma indiana*, callus, medicinal plant, shoot regeneration, sterilization