

Nghiên cứu cảm ứng và nhân nuôi sinh khối rễ cây Cát cánh (*Platycodon grandiflorum*)

Đinh Trường Sơn, Đỗ Thị Phương Thảo, Nguyễn Vũ Phương Thảo, Đặng Thị Thanh Tâm*
Học viện Nông nghiệp Việt Nam

Investigating the induction and culturing adventitious root of *Platycodon grandiflorum*

Đinh Truong Son, Do Thi Phuong Thao, Nguyen Vu Phuong Thao, Dang Thi Thanh Tam*
Vietnam National University of Agriculture
*Corresponding author: thanhtram@vnua.edu.vn

<https://doi.org/10.55250/jo.vnuf.14.3.2025.022-031>

TÓM TẮT

Cây Cát cánh (*Platycodon grandiflorum* (Jacq.) A.DC) là một loại thảo dược có hoa được ứng dụng nhiều trong y học truyền thống ở các nước Đông Á do có nhiều hợp chất, thứ có giá trị đặc biệt là các hợp chất saponin. Nghiên cứu được tiến hành nhằm xác định nguồn vật liệu phù hợp để cảm ứng rễ bất định in vitro và xác định một số thông số kỹ thuật trong quá trình nhân nuôi rễ in vitro. Kết quả nghiên cứu chỉ ra rằng, vật liệu đoạn chồi là vật liệu phù hợp để cảm ứng tạo rễ bất định ở cây Cát cánh. Trên môi trường MS có bổ sung 1 mg/l α -NAA, sau 5 tuần nuôi cấy, 83% mẫu đoạn chồi cảm ứng ra rễ. Rễ cảm ứng từ đoạn chồi có màu trắng ngà, phân nhánh và có sự tăng trưởng về chiều dài tốt. Môi trường giảm nồng độ khoáng còn 1/8 MS được xác định là phù hợp cho sự tăng trưởng, kéo dài của rễ bất định in vitro cây Cát cánh. Bên cạnh đó, nghiên cứu cũng xác định môi trường dạng lỏng (không chứa agar) kích thích rễ tăng trưởng sinh khối chất khô hơn môi trường bán rắn (bổ sung 6,5 g/l agar). Đây là những kết quả bước đầu cho hướng nghiên cứu ứng dụng công nghệ nuôi cấy mô tế bào cho quá trình nuôi cấy rễ bất định cây dược liệu Cát cánh nhằm thu các hợp chất thứ cấp mục tiêu có giá trị.

ABSTRACT

Platycodon grandiflorum is a flowering medicinal plant used widely in traditional medicine in East Asia because it contains a variety of valuable secondary compounds, especially saponins. The study aims to determine the technical parameters for adventitious root induction and root culturing conditions. The data showed that in vitro shoots are suitable material for adventitious root induction in *P. grandiflorum*. The MS medium supplemented with 1 mg/l α -NAA is suitable for adventitious root induction. In this medium, the induced adventitious roots exhibited healthy morphology with white color, branching, and growing. The medium with reduced mineral concentration to 1/8 MS induced the greatest root growth and elongation of in vitro adventitious roots of *P. grandiflorum*. In addition, the data also determined that the liquid medium (no agar) is better than the semi-solid medium (adding 6.5 g/l agar) for increasing the dry biomass of adventitious roots. These are primary data for applying plant tissue culture in the adventitious root culturing of *P. grandiflorum* to produce valuable secondary compounds.

Thông tin chung:

Ngày nhận bài: 20/12/2024

Ngày phản biện: 22/01/2025

Ngày quyết định đăng: 24/02/2025

Từ khóa:

IBA, α -NAA, *Platycodon grandiflorum*, rễ bất định.

Keywords:

Adventitious root, IBA, α -NAA, *Platycodon grandiflorum*.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Cát cánh (*Platycodon grandiflorum* (Jacq.) A.DC) là loài thuộc chi *Platycodon* (Campanulaceae) và phân bố chủ yếu ở vùng Đông Bắc Á [1]. Đây là loài dược liệu nổi tiếng được sử dụng nhiều trong y dược cổ truyền của nhiều nước như Trung Quốc, Nhật Bản và Hàn Quốc [1]. Trong những thập kỷ gần đây, các nghiên cứu về cây Cát cánh đã tập trung vào các hoạt tính sinh học và thành phần các hợp chất hóa học của nó. Cây Cát cánh được xác định là nguồn dược liệu có chứa ít nhất 100 hợp chất tự nhiên có giá trị bao gồm các nhóm chính triterpenoid saponins, flavonoid, axit phenolic, polyacetylene, sterol và các hợp chất khác [1, 2]. Các nghiên cứu về chức năng sinh học cũng chỉ ra rằng hoạt chất chính trong cây Cát cánh là triterpenoid saponins. Cát cánh có hiệu quả trị liệu trong hệ thống hô hấp với hiệu quả làm long đờm và hạn chế phản ứng ho [3], kích hoạt hệ miễn dịch [4, 5], có khả năng chống viêm [5, 6], chống oxy hóa [7], ức chế sự phát triển của khối u [8], ức chế tiểu đường, bảo vệ gan [1]. Với sự đa dạng các hoạt chất có giá trị và có tác dụng trong nhiều quá trình sinh học nên cây Cát cánh là một loại cây dược liệu có giá trị. Hiện nay nguồn dược liệu chính là khai thác trong tự nhiên và trồng thâm canh ở một số vùng dược liệu của các quốc gia. Phần được sử dụng để làm thuốc là phần rễ củ của cây Cát cánh. Rễ củ trong điều kiện thông thường được trồng từ hạt hay được giâm từ cành của cây Cát cánh. Rễ củ của Cát cánh trưởng thành được thu hoạch sau 2-3 năm trồng. Tuy nhiên, chất lượng nguồn dược liệu, hàm lượng các hoạt chất mục tiêu thường sẽ bị ảnh hưởng, biến động bởi điều kiện khí hậu, đất trồng và điều kiện canh tác. Hiện nay, nuôi cấy cảm ứng và nhân nuôi rễ bất định *in vitro* cây thuốc được xem là một giải pháp thay thế đầy tiềm năng nhờ khả

năng sản xuất sinh khối rễ sạch trong thời gian ngắn để thu nhận hợp chất thứ cấp. Rễ là bộ phận được xác định có sự tổng hợp các hợp chất thứ cấp lớn nhất trong cây. Gần đây, sự phát triển của công nghệ sinh học thực vật cho phép ứng dụng công nghệ nuôi cấy cơ quan, mô, tế bào của cây trồng để sản xuất các hợp chất thứ cấp có giá trị thay vì phải nuôi trồng cây thông thường [9]. Xu hướng nuôi cấy mô, tế bào, rễ bất định trong hệ thống bioreactor thể tích lớn ở cây dược liệu được ứng dụng trong sản xuất các chất chuyển hóa dược phẩm, thực phẩm chức năng là rất tiềm năng và hiệu quả [9]. Trong môi trường dinh dưỡng nhân tạo vô trùng kết hợp cùng nồng độ các chất điều tiết sinh trưởng có thể thu được sự tăng trưởng sinh khối rễ lớn và làm tăng quá trình tổng hợp các hợp chất mục tiêu [10]. Rễ của một số giống Cát cánh nuôi cấy *in vitro* cũng được chứng minh là nguồn vật liệu có hoạt chất và có khả năng kháng viêm [11]. Tiếp cận hướng nghiên cứu này, nhóm tác giả lần đầu tiên tiến hành thử nghiệm cảm ứng tạo rễ bất định cây thuốc Cát cánh thu thập ở Yên Bái, Việt Nam và xác định một số thông số kỹ thuật cho quá trình nhân nuôi rễ cây Cát cánh. Đây là nghiên cứu có ý nghĩa thực tiễn và khoa học cho hướng ứng dụng công nghệ nuôi cấy mô tế bào cây dược liệu để thu nhận các hợp chất thứ cấp có giá trị cho ngành dược phẩm phục vụ nhu cầu của con người.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Hạt cây hoa Cát cánh (*P. grandiflorum*) được thu thập từ Yên Bái, Việt Nam. Mẫu hạt được khử trùng và cho nảy mầm trong điều kiện *in vitro* trên môi trường MS (Murashige và Skoog) bổ sung 30 g/l sucrose, 6,5 g/l agar, pH=5,8. Cây Cát cánh nhân nuôi trong điều kiện *in vitro* được sử dụng làm vật liệu cho nghiên cứu.



Hình 1. Hình ảnh cây Cát cánh nuôi cấy trong điều kiện *in vitro*

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Nghiên cứu cảm ứng rễ bất định từ đoạn thân *in vitro* cây Cát cánh

Cắt các đoạn chồi với chiều dài 3 cm và cấy thẳng đứng trên môi trường MS bổ sung 30 g/sucrose; 6,5 g/l agar và một trong hai chất điều tiết sinh trưởng IBA (0,1; 0,25; 0,5; 1

mg/l) hoặc α -NAA (0,1; 0,25; 0,5; 1 mg/l), pH= 5,8. Sự cảm ứng và hình thành rễ bất định được đánh giá qua các chỉ tiêu: tỷ lệ chồi tạo rễ (%); số rễ/chồi; chiều dài rễ TB (cm).

2.2.2. Nghiên cứu cảm ứng rễ từ mô lá *in vitro* cây Cát cánh

Để cảm ứng tạo rễ *in vitro* từ mô lá *in vitro* cây Cát cánh, mô lá được lựa chọn là các lá to, sinh trưởng tốt, kích thước đồng đều nhau. Mô lá sau đó sẽ được cắt tạo vết thương trên bề mặt rồi cấy trên môi trường nền (MS + 30 g/l sucrose + 6,5 g/l agar; pH= 5,8) và bổ sung riêng rẽ hoặc phối hợp hai chất điều tiết sinh trưởng là IBA và α -NAA. Các chỉ tiêu theo dõi gồm: tỷ lệ mẫu tạo rễ (%); số rễ/mẫu cấy; chiều dài rễ TB (cm).

Bảng 1. Bố trí thí nghiệm cảm ứng rễ từ mô lá *in vitro* cây Cát cánh

Công thức	Môi trường
ĐC	Môi trường nền (MTN)
CT1	MTN + 0,25 mg/l IBA
CT2	MTN + 0,5 mg/l IBA
CT3	MTN + 1,0 mg/l IBA
CT4	MTN + 0,25 mg/l α -NAA
CT5	MTN + 0,5 mg/l α -NAA
CT6	MTN + 1,0 mg/l α -NAA
CT7	MTN + 0,25 mg/l IBA + 0,25 mg/l α -NAA
CT8	MTN + 0,25 mg/l IBA + 0,5 mg/l α -NAA
CT9	MTN + 0,5 mg/l IBA + 0,25 mg/l α -NAA
CT10	MTN + 0,5 mg/l IBA + 0,5 mg/l α -NAA

2.2.3. Nghiên cứu ảnh hưởng của nền môi trường đến khả năng tăng sinh khối rễ bất định *in vitro* cây Cát cánh

Để xác định được môi trường nuôi cấy thích hợp cho rễ bất định *in vitro* cây Cát cánh, chúng tôi tiến hành khảo sát lần lượt 4 môi trường là MS, 1/2 MS, 1/4 MS, 1/8 MS. Môi trường khoáng ở các công thức đều bổ sung 30 g/l sucrose, 6,5 g/l agar và kết hợp với chất điều tiết sinh trưởng α -NAA ở nồng độ 1 mg/l. Mỗi công thức được bố trí với 50 mẫu rễ *in vitro*

bất định cảm ứng từ đoạn chồi có kích thước 1 cm. Các chỉ tiêu theo dõi gồm: tỷ lệ rễ phân nhánh (%) = số mẫu rễ phân nhánh/tổng số mẫu, số nhánh rễ TB/mẫu cấy = tổng số nhánh rễ/tổng số mẫu; chiều dài rễ TB (cm) = tổng chiều dài rễ của mẫu cấy/tổng số rễ; khối lượng rễ tăng sau một chu kỳ nhân (mg) = khối lượng rễ sau khi nuôi – khối lượng rễ trước khi nuôi.

2.2.4. Nghiên cứu ảnh hưởng của dạng môi trường đến sự tăng sinh khối rễ bất định *in vitro* cây Cát cánh

Để xác định được trạng thái môi trường phù hợp để nhân nuôi rễ bất định *in vitro* cây Cát cánh, trên nền môi trường 1/8 MS + 30 g/l sucrose + 1 mg/l α -NAA, rễ Cát cánh được nuôi cấy trên hai trạng thái môi trường là môi trường bán rắn (bổ sung thêm 6,5 g/l agar) và môi trường lỏng không có agar. Vật liệu sử dụng cho thí nghiệm này là rễ bất định *in vitro* được nhân nuôi trên môi trường 1/8 MS + 30 g/l sucrose + 1 mg/l α -NAA + 6,5 g/l agar (pH=5,8). Sau một chu kỳ nhân, các chỉ tiêu sau được sử dụng để đánh giá tác động của dạng môi trường: khối lượng rễ tăng sau một chu kỳ nhân (mg) = khối lượng rễ sau khi nuôi – khối lượng rễ trước khi nuôi và khối lượng rễ khô (mg) của rễ sau quá trình nuôi cấy.

2.2.5. Điều kiện nghiên cứu và xử lý số liệu

- Môi trường nuôi cấy sử dụng môi trường MS pha sẵn hãng Duchefa Biochemie (M02220050). Các chất điều tiết sinh trưởng sử dụng IBA, α -NAA và IAA.

- Các thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên và được lặp lại 3 lần. Các chỉ tiêu được theo dõi trong 35-42 ngày phụ thuộc từng thí nghiệm. Điều kiện nuôi cấy: nhiệt độ phòng nuôi 22-25°C, cường độ ánh sáng 2000 lux, thời gian chiếu sáng 16 giờ sáng/8 giờ tối.

- Chỉ tiêu chiều dài rễ được đo nhờ phần mềm phân tích hình ảnh ImageJ. Số liệu được phân tích thống kê, phân tích phương sai ANOVA dựa trên sự khác biệt bình phương nhỏ nhất (LSD) với độ tin cậy $p < 0,05$ bằng phần mềm InfoStat.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Nghiên cứu cảm ứng tạo rễ bất định từ đoạn chồi *in vitro* cây Cát cánh

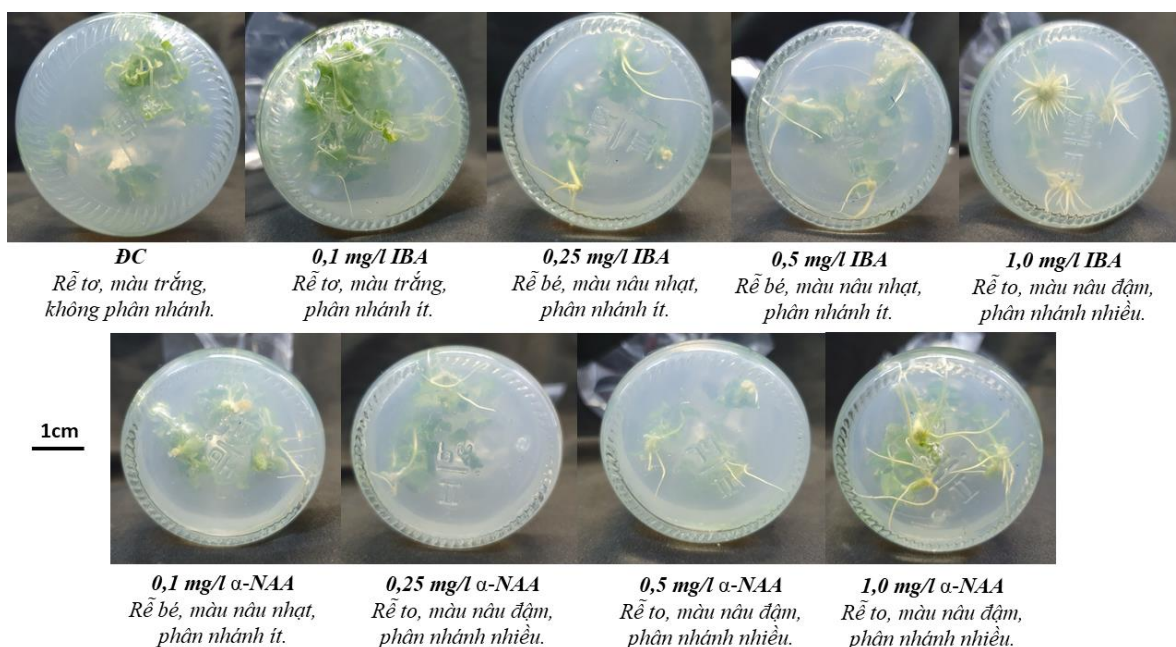
Tác động của hai hợp chất auxin IBA, α -NAA với các nồng độ khác nhau (0,1; 0,25; 0,5 và 1 mg/l) trong môi trường MS sau 5 tuần nuôi

cấy đến sự ra rễ bất định từ đoạn chồi *in vitro* cây Cát cánh thể hiện trong Bảng 2 và Hình 2. Kết quả cho thấy, khi tăng nồng độ auxin (IBA/ α -NAA) trong môi trường thì tỷ lệ tạo rễ của chồi *in vitro* tăng cao so với đối chứng. Ở nồng độ 1 mg/l IBA, tỷ lệ chồi tạo rễ đạt 97% và khi bổ sung 1 mg/l α -NAA tỷ lệ này đạt 83%. Đối với chỉ tiêu chiều dài rễ trung bình (TB), công thức môi trường MS + 0,1 mg/l IBA hoặc MS + 1 mg/l α -NAA cho chiều dài rễ cao nhất lần lượt đạt $2,53 \pm 0,37$ cm và $2,45 \pm 0,1$ cm. Tuy nhiên, đối với chỉ tiêu số rễ /chồi trung bình, tác động của IBA và α -NAA là khác nhau. Khi bổ sung IBA, số rễ cảm ứng từ chồi tăng và đạt giá trị cao ở nồng độ 0,5 - 1 mg/l là $4,86 \pm 0,68$ và $9,50 \pm 1,02$ rễ/chồi. Khi bổ sung α -NAA (0,1-1 mg/l) vào môi trường, chất α -NAA kích thích rễ tạo chồi, tuy nhiên chỉ ở nồng độ 1 mg/l chỉ tiêu này mới có sự sai khác có ý nghĩa thống kê so với đối chứng đạt $4,70 \pm 0,15$ rễ/chồi. So sánh tác động của hai hợp chất IBA và α -NAA, mặc dù α -NAA không kích thích mẫu tạo số rễ nhiều nhưng rễ cảm ứng trên môi trường có bổ sung 1mg/l α -NAA, kích thích mẫu cảm ứng rễ sớm, phát triển rất tốt, rễ to mập, dài phân nhánh nhiều hơn môi trường bổ sung 1 mg/l IBA (Hình 3). Kết quả nghiên cứu của nhóm tác giả cũng hoàn toàn phù hợp với kết quả nghiên cứu trước đây ở các giống Cát cánh khác nhau cho thấy tác động của các hợp chất auxin (α -NAA, IAA, BA) là khác nhau lên các kiểu gen khác nhau và nồng độ auxin thấp (≤ 1 mg/l) kích thích sự phân hóa và kéo dài rễ tốt hơn nồng độ cao [12]. Như vậy, trong nghiên cứu này với vật liệu cây Cát cánh, môi trường MS + 1,0 mg/l α -NAA là môi trường tối ưu để cảm ứng tạo rễ từ đoạn chồi *in vitro* cây Cát cánh.

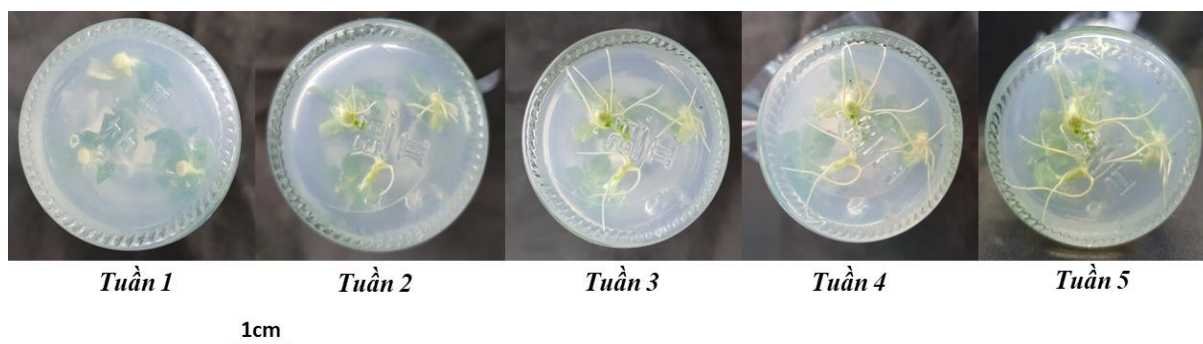
Bảng 2. Ảnh hưởng của hợp chất Auxin đến khả năng tạo rễ bất định từ đoạn chồi *in vitro* cây Cát cánh (sau 5 tuần nuôi cấy)

CT	Hợp chất Auxin	Nồng độ (mg/l)	Tỉ lệ chồi tạo rễ (%)	Chiều dài rễ TB $\pm$ SD (cm)	Số rễ/chồi TB $\pm$ SD
ĐC	0	0	29	$2,05 \pm 0,13^{abc}$	$2,28 \pm 0,42^{ab}$
CT1	IBA	0,1	33	$2,53 \pm 0,37^c$	$2,33 \pm 0,41^{ab}$
CT2	IBA	0,25	57	$1,91 \pm 0,15^{abc}$	$2,94 \pm 0,36^{ab}$
CT3	IBA	0,5	85	$1,85 \pm 0,19^{ab}$	$4,86 \pm 0,68^b$
CT4	IBA	1,0	97	$1,50 \pm 0,12^a$	$9,50 \pm 1,02^c$
CT5	α -NAA	0,1	42	$2,32 \pm 0,28^{bc}$	$1,90 \pm 0,31^a$
CT6	α -NAA	0,25	52	$1,96 \pm 0,24^{abc}$	$3,70 \pm 0,70^{ab}$
CT7	α -NAA	0,5	41	$1,89 \pm 0,31^{abc}$	$3,72 \pm 0,80^{ab}$
CT8	α -NAA	1,0	83	$2,45 \pm 0,1^c$	$4,70 \pm 0,15^b$

Ghi chú: Nền môi trường: MS + 30g/l sucrose + 6,5 g/l agar (pH= 5,8) SD: Độ lệch chuẩn. Trong cùng 1 cột, các chữ a, b, c... thể hiện sự sai khác có ý nghĩa giữa các công thức về mặt thống kê ở mức = 0,05.



Hình 2. Hình ảnh rễ bất định *in vitro* cây Cát cánh được nuôi cấy trên môi trường bổ sung IBA và α -NAA (sau 5 tuần nuôi cấy)



Hình 3. Hình ảnh rễ bất định *in vitro* cây Cát cánh được cảm ứng từ đoạn chồi trên môi trường tối ưu MS + 1,0 mg/l α -NAA

3.2. Nghiên cứu cảm ứng rễ từ mô lá *in vitro* cây Cát cánh

Mô lá là một trong các mô phổ biến và hiệu quả được sử dụng để cảm ứng tạo rễ bất định ở trên nhiều đối tượng cây thuốc [13, 14]. Sự cảm ứng rễ từ mô lá cây Cát cánh được tiến hành trên môi trường MS có bổ sung riêng rẽ hoặc kết hợp hai hợp chất auxin IBA và α -NAA.

Kết quả thể hiện ở Bảng 3 cho thấy, môi trường MS bổ sung các nồng độ khác nhau của IBA và α -NAA kích thích mẫu cấy cảm ứng hình thành tạo rễ ở các tỷ lệ khác nhau dao động từ 18-74%. Bên cạnh đó, ở công thức đối chứng, mẫu cấy không tạo cảm ứng tạo rễ khi môi trường không có bổ sung chất điều tiết sinh trưởng (Hình 4).

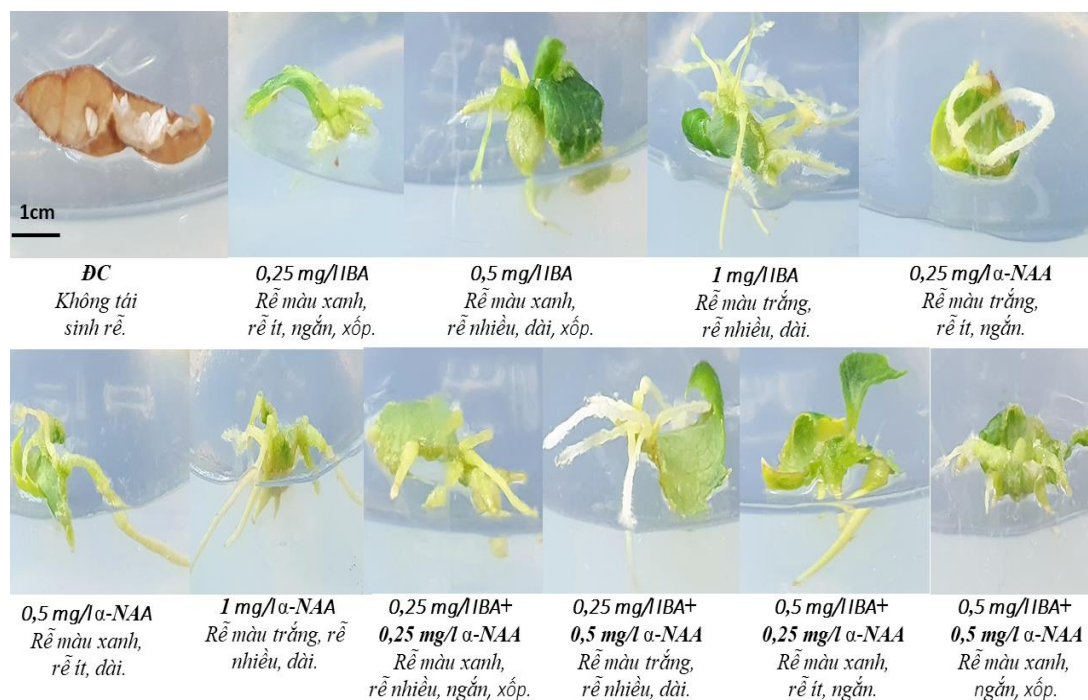
Bảng 3. Ảnh hưởng của các hợp chất auxin đến khả năng tạo rễ từ mô lá *in vitro* cây Cát cánh (sau 6 tuần nuôi cấy)

CT	Hợp chất auxin	Nồng độ (mg/ml)	Tỷ lệ mẫu tạo rễ (%)	Chiều dài rễ TB (cm)	Số rễ/mẫu TB
ĐC	0	0	-	-	-
1	IBA	0,25	29	$0,72 \pm 0,13^a$	$2,92 \pm 0,67^{abc}$
2	IBA	0,5	57	$0,74 \pm 0,1^a$	$4 \pm 0,57^{abcd}$
3	IBA	1,0	74	$2,09 \pm 0,12^{ab}$	$5,29 \pm 0,66^d$
4	α -NAA	0,25	18	$1,15 \pm 0,33^{ab}$	$1,71 \pm 0,57^a$
5	α -NAA	0,5	55	$0,91 \pm 0,12^{ab}$	$3,34 \pm 0,47^{abc}$
6	α -NAA	1,0	69	$1,25 \pm 0,12^b$	$4,74 \pm 0,6^{cd}$
7	IBA+ α -NAA	0,25 + 0,25	56	$0,95 \pm 0,12^{ab}$	$2,88 \pm 0,46^{ab}$
8	IBA+ α -NAA	0,25 + 0,5	71	$0,97 \pm 0,13^{ab}$	$3,31 \pm 0,44^{abc}$
9	IBA+ α -NAA	0,5 + 0,25	54	$0,90 \pm 0,11^{ab}$	$4,38 \pm 0,61^{bcd}$
10	IBA+ α -NAA	0,5 + 0,5	72	$0,85 \pm 0,1^a$	$5,28 \pm 0,65^d$

Ghi chú: Nền môi trường: MS + 30g/l sucrose + 6,5 g/l agar (pH= 5,8). SD: Độ lệch chuẩn. Trong cùng 1 cột, các chữ a, b, c... thể hiện sự sai khác có ý nghĩa giữa các công thức về mặt thống kê ở mức $p < 0,05$.

Tỷ lệ mô lá cảm ứng tạo rễ tăng dần lên khi tăng nồng độ các chất từ 0,25 mg/l đến 1,0 mg/l ở cả IBA và α -NAA cũng như kết hợp IBA và α -NAA. Môi trường ở nồng độ 1,0 mg/l IBA là môi trường tối ưu nhất để mô lá tạo rễ với tỷ lệ tạo rễ là 74%, chiều dài rễ là 2,91 cm và số rễ /mẫu cấy là $5,29 \pm 0,66$. Quan sát hình thái mô lá cũng thấy, mẫu cấy cảm ứng hình thành mô sẹo khi nuôi cấy trên môi trường các công thức có bổ sung chất điều tiết sinh trưởng. Ngoài ra, quan sát hình thái rễ cảm ứng từ mô lá ở các công thức đều cho thấy rễ cảm ứng có hiện tượng bị thủy tinh hóa, xộp và chiều dài rễ bị giới hạn (Hình 4). Hình thái rễ bất định cảm ứng từ mô lá khác với hình

thái rễ cảm ứng từ đoạn chồi của cây Cát cánh. Điều này cũng có thể giải thích do mô lá cây Cát cánh có hàm lượng hóc môn nội sinh khác với mô đoạn chồi, do đó khi nuôi cấy trên có bổ sung hóc môn ngoại sinh thì sự phát sinh hình thái cơ quan của hai loại mô này là khác nhau. Tuy nhiên, với đặc điểm rễ xộp và có hiện tượng thủy tinh hóa thì chất lượng rễ Cát cánh cảm ứng từ mô lá không phù hợp để nhân nuôi sinh khối. Đây là kết quả nghiên cứu có ý nghĩa, khẳng định được rễ bất định cảm ứng từ mô lá Cát cánh dễ bị phân hóa và không có cấu trúc rễ bền vững như rễ cảm ứng từ đoạn thân.



Hình 4. Hình ảnh mô lá *in vitro* cây Cát cánh được nuôi cấy trên môi trường bổ sung IBA và α-NAA (sau 6 tuần nuôi cấy)

3.3. Nghiên cứu ảnh hưởng của nền môi trường nuôi cấy đến khả năng tăng sinh khối rễ bất định *in vitro* cây Cát cánh

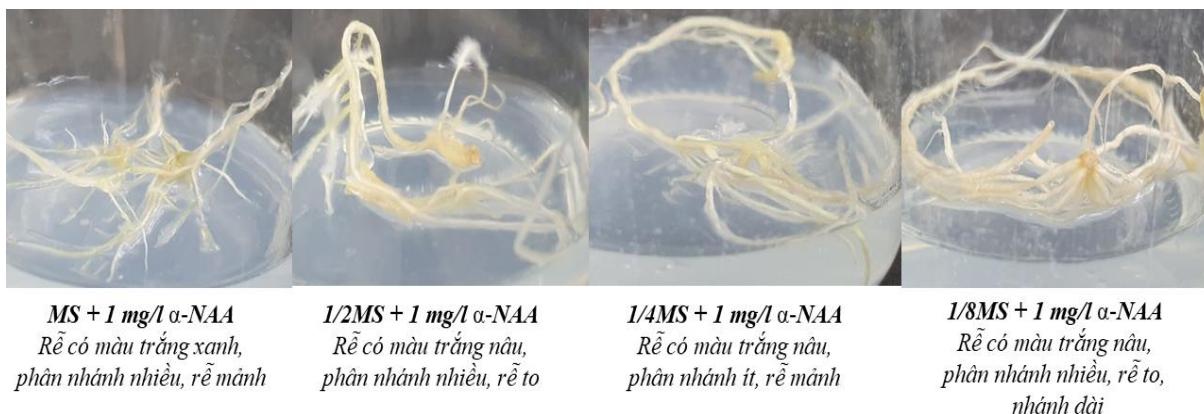
Trong nhân nuôi rễ *in vitro* của cây thuốc, môi trường nuôi cấy (MS/B5/SH) và nồng độ khoáng của môi trường ảnh hưởng rất lớn đến sự cảm ứng và sinh trưởng của rễ của rất nhiều đối tượng cây thuốc [13]. Trong nghiên cứu nhân nuôi tăng sinh khối rễ bất định *in vitro* cây Cát cánh, các nền môi trường được khảo sát lần lượt là MS, 1/2 MS, 1/4 MS, 1/8 MS được kết hợp với chất điều tiết sinh trưởng tối ưu thu được từ thí nghiệm 1 là 1,0 mg/l α-NAA. Kết quả thể hiện trong Bảng 4 cho thấy, rễ nuôi cấy trên các nền môi trường khoáng MS khác nhau có sự sinh trưởng khác

nhau thông qua các chỉ tiêu tỷ lệ rễ ra nhánh (%), số nhánh/mẫu cấy, chiều dài rễ TB (cm). Khi nuôi cấy rễ trên môi trường giảm nồng độ khoáng từ MS, 1/2 MS, 1/4 MS tỉ lệ rễ ra nhánh giảm từ 77% còn 43%. Tuy nhiên, trên nền môi trường 1/8 MS lại cho kết quả tốt nhất về chỉ tiêu tỷ lệ rễ ra nhánh đạt 87%. Tương tự trên môi trường giảm nồng độ khoáng còn 1/8 MS, các chỉ tiêu khác như số nhánh/mẫu cấy, chiều dài rễ và khối lượng rễ tăng đều có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với các công thức khác. Như vậy, có thể thấy rằng môi trường ít dinh dưỡng khoáng làm rễ Cát cánh có xu hướng kéo dài, kích thích rễ sinh trưởng (Hình 5).

Bảng 4. Ảnh hưởng của nền môi trường đến khả năng sinh trưởng của rễ bất định *in vitro* cây Cát cánh (sau 5 tuần nuôi cấy)

CT	Nền MT	Tỉ lệ rễ ra nhánh (%)	Số nhánh/mẫu cấy TB ± SD (rễ)	Chiều dài rễ TB ± SD (cm)
CT1	MS	77	1,83 ± 0,34 ^{bc}	1,97 ± 0,12 ^{ab}
CT2	1/2 MS	67	1,59 ± 0,36 ^{ab}	2,31 ± 0,11 ^b
CT3	1/4 MS	43	0,89 ± 0,22 ^a	1,86 ± 0,09 ^a
CT4	1/8 MS	87	2,38 ± 0,28 ^c	2,77 ± 0,15 ^c

Ghi chú: Tất cả các công thức được bổ sung 1 mg/l α-NAA + 30 g/l sucrose + 6,5 g/l agar (pH= 5,8).



Hình 5. Hình thái rễ bất định phát triển trên môi trường có nồng độ khoáng MS khác nhau (sau 5 tuần nuôi cấy)

Đặc biệt khi theo dõi khối lượng rễ tăng của mẫu cấy trên các môi trường khoáng khác nhau, môi trường nuôi cấy MS, 1/2 MS và 1/8 MS có sự sai khác nhưng không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê. Trong khi đó so sánh khối lượng rễ tăng ở môi trường khoáng 1/4 MS và 1/8 MS cho thấy sự khác biệt có ý nghĩa thống kê và môi trường 1/8 MS cho sự tăng trưởng rễ lớn hơn sau một chu kỳ nhân (Bảng 5). Trên nền môi trường 1/8 MS, rễ bất định *in vitro* cây Cát cánh tăng trưởng lớn nhất. Kết quả thí nghiệm cho thấy môi trường cắt giảm khoáng MS sẽ kích thích rễ Cát cánh tăng

trưởng tốt hơn. Kết quả nghiên cứu thu được của bài báo này, tương tự nghiên cứu của Kwon và cộng sự (2017) khi khẳng định môi trường 1/8 MS là môi trường khoáng phù hợp cho cây Cát cánh hoa kép cảm ứng tạo rễ [12]. Các nghiên cứu khác chỉ ra rằng, quá trình cảm ứng và hình thành rễ bất định ở cây thuốc phụ thuộc vào nhiều yếu tố của môi trường như: loại môi trường (MS/SH/B5), nồng độ khoáng trong môi trường sử dụng, độ pH [13, 15]. Và sự tác động của các yếu tố môi trường nuôi cấy này lại chịu ảnh hưởng của kiểu gen các loài [13].

Bảng 5. Ảnh hưởng của nền môi trường đến sự tăng sinh khối rễ bất định *in vitro* cây Cát cánh (sau 5 tuần nuôi cấy)

CT	Nền MT	Khối lượng rễ tăng TB ± SD (mg)
CT1	MS	245,3 ± 26,6 ^{ab}
CT2	1/2 MS	240,2 ± 23,9 ^{ab}
CT3	1/4 MS	190,0 ± 17,5 ^a
CT4	1/8 MS	259,7 ± 19,9 ^b

Ghi chú: Tất cả các công thức được bổ sung 1 mg/l α-NAA + 30g/l sucrose + 6,5 g/l agar (pH= 5,8).

3.4. Nghiên cứu ảnh hưởng của dạng môi trường đến khả năng tăng sinh khối rễ bất định *in vitro* cây Cát cánh

Trong nghiên cứu này, trên nền môi trường thích hợp cho rễ Cát cánh phát triển là 1/8 MS có bổ sung 30 g/l đường, 1 mg/l α-NAA, rễ *in vitro* Cát cánh được nuôi trong hai điều kiện môi trường có agar và không có agar. Kết quả cho thấy, rễ Cát cánh đều có thể tăng sinh trên

cả hai điều kiện (Bảng 6). Tuy nhiên, môi trường không bổ sung agar (lỏng) rễ có sự gia tăng về sinh khối lớn hơn rễ nuôi cấy trên môi trường rắn (có agar). Tuy nhiên, sinh khối rễ tươi tăng là không có sự khác biệt giữa hai điều kiện nuôi cấy. Đối với chỉ tiêu sinh khối rễ khô, điều kiện nuôi cấy lỏng cho khối lượng rễ tăng cao hơn điều kiện nuôi cấy rắn và sự sai khác này là có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$). Bên

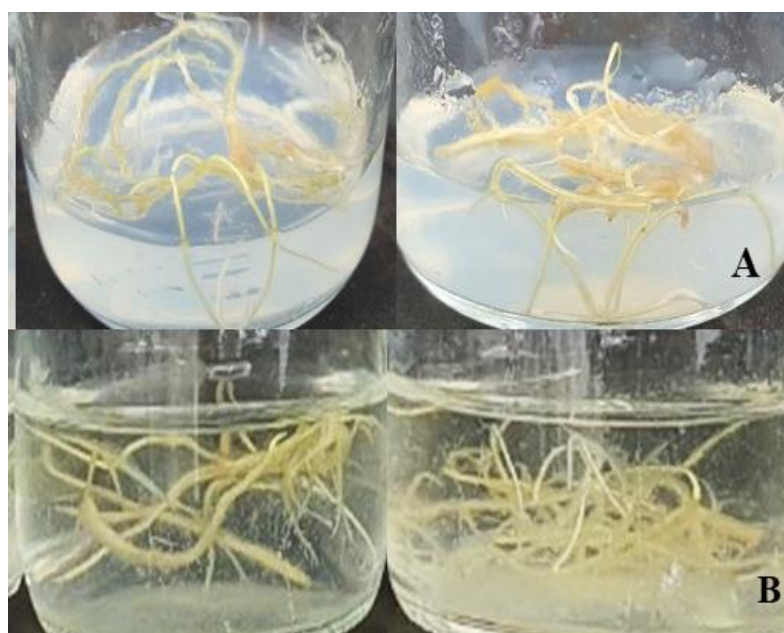
cạnh đó, quan sát hình thái rễ cho thấy khi nuôi cấy lỏng rễ có kích thước to hơn. Giải thích cho kết quả này có thể giả định, trên môi lỏng rễ bất định dễ dàng tiếp xúc với dinh dưỡng để tăng sinh khối. Kết quả nghiên cứu cho thấy rễ bất định cây Cát cánh thích hợp tăng trưởng trên môi trường lỏng hơn môi trường rắn là rất kết quả có ý nghĩa khi môi trường lỏng có nhiều ưu điểm trong hướng nghiên cứu nuôi cấy rễ bất định thu nhận hợp chất thứ cấp mục tiêu. Môi trường nuôi cấy

dạng lỏng là môi trường nuôi cấy rễ phù hợp cho nhiều cây thuốc vì dễ dàng bổ sung vào môi trường, có khả năng khuếch tán dinh dưỡng cao, giảm các stress do các chất oxy hóa trong quá trình nuôi cấy [16, 17]. Việc xác định được dạng môi trường nuôi cấy là môi trường lỏng cũng dễ dàng để tiếp tục triển khai các nghiên cứu tiếp theo cho quá trình tiến hành nhân nuôi sinh khối rễ cây Cát cánh trong tương lai.

Bảng 6. Ảnh hưởng của dạng môi trường đến khả năng tăng sinh khối rễ bất định *in vitro* cây Cát cánh (sau 6 tuần nuôi cấy)

CT	Dạng MT	Khối lượng rễ tươi tăng TB $\pm$ SD (mg)	Khối lượng rễ khô TB $\pm$ SD (mg)	Hình thái rễ
CT1	Bán rắn (6,5 g/l agar)	233 $\pm$ 29,8 ^a	129 $\pm$ 8,7 ^a	Rễ màu trắng xanh, phân nhánh ít, nhánh mảnh
CT2	Lỏng (không agar)	266 $\pm$ 36,8 ^a	168 $\pm$ 11,1 ^b	Rễ màu trắng nâu, phân nhánh ít, nhánh to mập

Ghi chú: Nền môi trường: 1/8MS +1 mg/l α -NAA + 30g/l sucrose (pH= 5,8). Các giá trị trung bình có chữ cái viết thường theo sau giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê.



Hình 6. Hình ảnh rễ bất định *in vitro* cây Cát cánh được nuôi cấy trên hai dạng môi trường rắn (A) và lỏng (B) (sau 6 tuần nuôi cấy)

4. KẾT LUẬN

Trên vật liệu cây Cát cánh *in vitro*, nghiên cứu đã xác định được một số thông số kỹ thuật cho quá trình cảm ứng và nhân nuôi rễ bất định. Rễ bất định *in vitro* ở cây Cát cánh cảm ứng từ đoạn chồi có chất lượng rễ (rễ dài,

có sự phân nhánh, không bị thủy tinh hóa, không ở dạng mô xộp) tốt hơn rễ cảm ứng từ mô lá. Với vật liệu là đoạn chồi Cát cánh, mẫu cấy được cảm ứng trên môi trường MS bổ sung 1 mg/l α -NAA là môi trường tối ưu với tỷ lệ ra rễ đạt 83%, số rễ/mẫu cấy đạt $4,7 \pm 0,15$

rễ, chiều dài trung bình rễ $2,45 \pm 0,1$ cm, rễ có màu trắng ngà và phân nhánh tốt. Môi trường nền phù hợp để nhân nuôi, tăng trưởng sinh khối rễ Cát cánh là môi trường 1/8 MS. Rễ cây Cát cánh có sự tăng trưởng sinh khối chất khô trong điều kiện môi trường lỏng tốt hơn trên môi trường bán rắn (bổ sung 6,5 g/l agar). Các kết quả nghiên cứu ban đầu về cảm ứng và nhân nuôi sinh khối rễ bất định cây Cát cánh là các thông tin có ý nghĩa. Đây là tiền đề cho các nghiên cứu tiếp theo phục vụ hướng nghiên cứu nhân nuôi sinh khối rễ cây thuốc Cát cánh để thu nhận các hợp chất thứ cấp có giá trị.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. Le Zhang, Yingli Wang, Dawei Yang, Chunhong Zhang, Na Zhang, Minhui Li & Yanze Liu (2015). *Platycodon grandiflorus* – An Ethnopharmacological, phytochemical and pharmacological review. *Journal of Ethnopharmacology*. 164: 147-161.
- [2]. Mina Kim, In-Guk Hwang, Sang-Bum Kim & Ae-Jin Choi (2020). Chemical characterization of balloon flower (*Platycodon grandiflorum*) sprout extracts and their regulation of inflammatory activity in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 murine macrophage cells. *Food Science & Nutrition*. 8(1): 246-256.
- [3]. C. Y. Shin, W. J. Lee, E. B. Lee, E. Y. Choi & K. H. Ko (2002). Platycodin D and D3 increase airway mucin release *in vivo* and *in vitro* in rats and hamsters. *Planta Med*. 68(3): 221-5.
- [4]. Yeo Dae Yoon, Sang Bae Han, Jong Soon Kang, Chang Woo Lee, Song-Kyu Park, Hyun Sun Lee, Jong Seong Kang & Hwan Mook Kim (2003). Toll-like receptor 4-dependent activation of macrophages by polysaccharide isolated from the radix of *Platycodon grandiflorum*. *International Immunopharmacology*. 3(13): 1873-1882.
- [5]. Yong Xie, Hangjun Pan, Hongxiang Sun & Duo Li (2008). A promising balanced Th1 and Th2 directing immunological adjuvant, saponins from the root of *Platycodon grandiflorum*. *Vaccine*. 26(31): 3937-3945.
- [6]. Kwang Ahn, Eun Noh, Hai Zhao, Soohwan Jung, Shichang Kang & Yonjung Kim (2005). Inhibition of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase II by *Platycodon grandiflorum* saponins via suppression of nuclear factor-KB activation in RAW 264.7 cells. *Life Sciences - LIFE SCI*. 76: 2315-2328.
- [7]. Ji-Young Lee, Jae-Wook Yoon, Cheong-Tae Kim & Seung-Taik Lim (2004). Antioxidant activity of phenylpropanoid esters isolated and identified from *Platycodon grandiflorum* A. DC. *Phytochemistry*. 65(22): 3033-3039.
- [8]. J. S. Yu & A. K. Kim (2010). Platycodin D induces apoptosis in MCF-7 human breast cancer cells. *J Med Food*. 13(2): 298-305.
- [9]. M. J. Hussain, Y. Abbas, N. Nazli, S. Fatima, S. Drouet, C. Hano & B. H. Abbasi (2022). Root Cultures, a Boon for the Production of Valuable Compounds: A Comparative Review. *Plants (Basel)*. 11(3): 439-477.
- [10]. S. Deepthi & K. Satheeshkumar (2017). Effects of major nutrients, growth regulators and inoculum size on enhanced growth and camptothecin production in adventitious root cultures of *Ophiorrhiza mungos* L. *Biochemical Engineering Journal*. 117: 198-209.
- [11]. Hee Ock Boo, Jeong Hun Park, Hag Hyun Kim, Soo Jeong Kwon & Sun Hee Woo (2018). Evaluation of Physiological Functionalities and Anti-inflammatory Activity on in vitro Cultured Adventitious Root of *Platycodon grandiflorum*. *Journal of Crop Science and Biotechnology*. 21(2): 183-191.
- [12]. Soo Kwon, Swapam Roy, Hye-Rim Kim, Young-Ja Moon, Ki-Hong Yoon, Sun-Hee Woo, Hee-Ock Boo, Jin-Woog Ko & Hag Kim (2017). Effects of Medium Compositions and Plant Growth Regulators on in vitro Organogenesis in Cultured Explants of *Platycodon grandiflorum* Species. *Korean Journal Crop Science*. 62(3): 259-274.
- [13]. Endang Rahmat & Youngmin Kang (2019). Adventitious root culture for secondary metabolite production in medicinal plants: A Review. *Journal of Plant Biotechnology*. 46(3): 143-157.
- [14]. P. K. Silja & K. Satheeshkumar (2015). Establishment of adventitious root cultures from leaf explants of *Plumbago rosea* and enhanced plumbagin production through elicitation. *Industrial Crops and Products*. 76: 479-486.
- [15]. Souhayla Kodad, Reda Melhaoui, Christophe Hano, Mohamed Addi, Nargis Sahib, Ahmed Elamrani, Malika Abid & Aatika Mihamou (2021). Effect of Culture Media and Plant Growth Regulators on Shoot Proliferation and Rooting of Internode Explants from Moroccan Native Almond (*Prunus dulcis* Mill.) Genotypes. *International Journal of Agronomy*. 2021(1): 9931574.
- [16]. S. M. Caplin & F. C. Steward (1949). A Technique for the Controlled Growth of Excised Plant Tissue in Liquid Media Under Aseptic Conditions. *Nature*. 163(4154): 920-921.
- [17]. M. R. Shukla, K. Piunno, P. K. Saxena & A. M. P. Jones (2020). Improved in vitro rooting in liquid culture using a two piece scaffold system. *Eng Life Sci*. 20(3-4): 126-132.