

Ảnh hưởng của môi trường khoáng và chất kháng vi sinh vật trong nhân giống *in vitro* Thạch tùng răng cưa (*Huperzia serrata* Thunb.)

Phan Xuân Bình Minh*, Đỗ Thị Kim Trang, Nguyễn Thị Hiền
Nguyễn Phương Lan, Trần Bảo Trâm

Trung tâm Sinh học Thực nghiệm, Viện Ứng dụng Công nghệ

Ngày nhận bài 9/11/2018; ngày chuyển phản biện 12/11/2018; ngày nhận phản biện 6/12/2018; ngày chấp nhận đăng 10/12/2018

Tóm tắt:

Thạch tùng răng cưa (*Huperzia serrata* Thunb.) là loại dược liệu quý có chứa alkaloid huperzine - hoạt chất chính trong điều trị bệnh mất trí nhớ ở người cao tuổi. Nghiên cứu được thực hiện nhằm nhân giống *in vitro* cây dược liệu này. Nguyên liệu nuôi cấy là chồi ngọn chưa phân nhánh được khử trùng bề mặt mẫu bằng cách ngâm trong dung dịch NaOCl 3% trong 30 phút, sau đó tiếp tục xử lý với dung dịch H₂O₂ 30% trong 7 phút. Kết quả cho thấy, khi sử dụng môi trường khoáng MS2 (gồm MS + 0,3 mg/l BAP + 0,01 mg/l IBA) có bổ sung hỗn hợp các chất kháng vi sinh vật gồm: 0,5 mg/l malachite xanh và 100 ml/l kháng sinh AAS (gồm 30 mg/l penicillin, 50 mg/l streptomycin và 125 µg/l amphotericin B) cho tỷ lệ mẫu đạt yêu cầu cao nhất 56,67% sau 30 ngày nuôi cấy, chồi bắt đầu phân nhánh. Từ các mẫu ban đầu tiếp tục cấy chuyển sang môi trường MS1, sau 60 ngày nuôi cấy tỷ lệ mẫu phân nhánh đạt 34,11%, tỷ lệ mẫu ra rễ đạt 19,67% và sau 6 tháng nuôi cấy có hệ số nhân chồi là 3,48 và tỷ lệ cây ra rễ là 53,12%.

Từ khóa: chất kháng vi sinh vật, môi trường khoáng, nuôi cấy mô tế bào, Thạch tùng răng cưa.

Chỉ số phân loại: 4.1

Đặt vấn đề

Thạch tùng răng cưa (*Huperzia serrata* Thunb.) thuộc họ Thạch sam (Huperziaceae), là cây thân thảo mọc ở đất [1]. Cây sinh sản bằng hai hình thức hữu tính và vô tính. Bào tử là mầm sinh sản nhưng chúng thường không hoạt động hoặc hoạt động rất phức tạp, phải mất nhiều năm để có thể nảy mầm và phát triển. Theo nghiên cứu của Ma và cộng sự (2008) thì sự sinh sản của loài này rất chậm, phải mất 15 năm để một bào tử nảy mầm và phát triển thành cây trưởng thành có thể thu hoạch được [2], Wang và cộng sự (2011) cũng đã nghiên cứu quần thể của loài này trong tự nhiên tại khu Bảo tồn thiên nhiên của tỉnh Nam Hải, miền Nam Trung Quốc cho thấy, hầu hết các cây giống có nguồn gốc từ mầm [3]. Trên thế giới, Thạch tùng răng cưa được tìm thấy chủ yếu ở các khu rừng ẩm cận nhiệt đới và ôn đới với độ cao 900 đến 3.500 m ở Trung Quốc, Ấn Độ, Nepal, Myanmar, Sri Lanka, Nhật Bản, Hàn Quốc, Việt Nam, Úc và Cuba [4]. Ở Việt Nam, Thạch tùng răng cưa chỉ gặp trong những khu rừng quanh năm ẩm ướt, có tầng mùn dày ở vùng núi cao từ 1.000 m trở lên như Lào Cai, Cao Bằng, Hà Giang, Quảng Trị, Quảng Nam, Đà Nẵng, Khánh Hoà, Lâm Đồng. Thạch tùng răng cưa là loài dược

liệu quý hiếm, được đưa vào danh sách những loài dược liệu cần được bảo tồn và phát triển [5]. Trong y học cổ truyền, Thạch tùng răng cưa được sử dụng trong các bài thuốc chữa lợi tiểu, chống co thắt, giảm đau, cầm máu [1]. Năm 1986, các nhà khoa học Trung Quốc đã chiết xuất được huperzine A từ cây Thạch tùng răng cưa, đây là hoạt chất có tác dụng ức chế acetylcholinesterase thể hệ thứ hai để điều trị bệnh Alzheimer [6]. Nghiên cứu của Vũ Bích Ngọc và cộng sự (2016) cũng cho thấy, hàm lượng huperzine A có trong cây Thạch tùng răng cưa thu được ở Đà Lạt, Lâm Đồng vào mùa thu là 0,0925 mg/g mẫu khô, tương đương với mẫu Thạch tùng răng cưa của Trung Quốc [7]. Do điều kiện sống khắc khe, khả năng tái sinh trong tự nhiên kém cùng với sự khai thác quá mức vì mục đích thương mại dẫn đến nguy cơ tuyệt chủng của loài cây này [5]. Nghiên cứu nhân giống bằng phương pháp nuôi cấy *in vitro* là giải pháp được nhiều tác giả lựa chọn như Liang (2010) [8]; Wojciech, et al. (2013) [9]; Kannichiro, et al. (2013) [10]; Ying-Zi, et al. (2015) [11]. Ở Việt Nam, Lê Thị Lan Anh và cộng sự (2018) đã nghiên cứu kỹ thuật nhân giống Thạch tùng răng cưa bằng phương pháp giâm hom sau 4 tháng có tỷ lệ sống là 87,24% và tỷ lệ ra rễ là 30,32% [12]. Nhưng những kết quả nghiên cứu nhân giống *in vitro* Thạch tùng răng cưa phục vụ sản

*Tác giả liên hệ: Email: pxbminh@gmail.com.

Effect of mineral medium and antimicrobial mixture on the *in vitro* propagation of *Huperzia serrata* Thunb.

Xuan Binh Minh Phan*, Thi Kim Trang Do,
Thi Hien Nguyen, Phuong Lan Nguyen, Bao Tram Tran

Center for Experimental Biology,
National Center for Technological Progress

Received 9 November 2018; accepted 10 December 2018

Abstract:

Huperzia serrata Thunb. is a valuable medicinal plant containing alcaloid huperzine - a major active compound in the treatment of Alzheimer's disease in the elderly. The aim of this study is to propagate *H. serrata* using the *in vitro* methods. The samples (crown buds without branching) were sterilised by immersing in the solution of NaOCl 3% in 30 minutes, then treating with 30% H₂O₂ solution for 7 minutes. The results showed that using the MS2 medium (including MS + 0.3 mg/l BAP + 0.01 mg/l IBA) supplemented with a mixture of antimicrobial substances that consisted of 0.5 mg/l malachite green and 100 ml/l antibiotic AAS (including 30 mg/l penicillin, 50 mg/l streptomycin and 125 µg/l amphotericin B) gave the highest rate of the successful samples at 56.67% after 30 days of cultivation and shoots began to branch. The initial successful samples continued being transplanted into the MS1 medium, and then the branching rate and the rate of rooting reached 34.11% and 19.67%, respectively after 60 days of cultivation. After 6 months, shoots grew by 3.48 times and the rate of rooting was up to 53.12%.

Keywords: antimicrobial mixture, *Huperzia serrata* Thunb., *in vitro* propagation, mineral medium.

Classification number: 4.1

xuất được liệu còn hạn chế, vì vậy việc nhân giống *in vitro* được cây Thạch tùng răng cưa sẽ tạo hướng phát triển cho vùng trồng loài dược liệu này.

Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Vật liệu

Thạch tùng răng cưa (*Huperzia serrata* Thunb.) trường thành cao từ 10 đến 15 cm thu hái ngoài tự nhiên tại Sa Pa (Lào Cai) được đưa về trồng tại vườn ươm của Trung tâm Sinh học Thực nghiệm. Nguyên liệu sử dụng là các chồi ngọn chưa phân nhánh dài khoảng 3-4 cm.

Bố trí thí nghiệm

Điều kiện khử trùng: sử dụng 9 công thức như trong bảng 1.

Bảng 1. Các công thức khử trùng.

Công thức	Điều kiện khử trùng	Môi trường nuôi cấy
CT1		MS + 8 g agar + 30 g đường + 0,3 mg BAP
CT2	Dung dịch NaOCl 3% trong 40 phút	1/2 MS + 8 g agar + 30 g đường + 0,3 mg BAP
CT3		Mr + 8 g agar + 30 g đường + 0,3 mg BAP
CT4		MS + 8 g agar + 30 g đường + 0,3 mg BAP
CT5	Dung dịch H ₂ O ₂ 30% trong 10 phút	1/2 MS + 8 g agar + 30 g đường + 0,3 mg BAP
CT6		Mr + 8 g agar + 30 g đường + 0,3 mg BAP
CT7	Dung dịch NaOCl 3% trong 30 phút và Dung dịch H ₂ O ₂ 30% trong 7 phút	MS + 8 g agar + 30 g đường + 0,3 mg BAP
CT8		1/2 MS + 8 g agar + 30 g đường + 0,3 mg BAP
CT9		Mr + 8 g agar + 30 g đường + 0,3 mg BAP

Ghi chú: MS (Murashige and Skoog); Mr (Moore); BAP (6-Benzylaminopurine).

Môi trường nuôi cấy: sử dụng 6 công thức như trong bảng 2.

Bảng 2. Các môi trường nuôi cấy.

Công thức	Môi trường nuôi cấy
MS1	MS + 8 g agar + 30 g đường + 0,3 mg BAP + 0,01 mg IBA/L
MS2	MS + 8 g agar + 30 g đường + 0,3 mg BAP + 0,01 mg IBA + 100 ml hỗn hợp chất kháng vi sinh vật/L
1/2 MS1	1/2 MS + 8 g agar + 30 g đường + 0,3 mg BAP + 0,01 mg IBA/L
1/2 MS2	1/2 MS + 8 g agar + 30 g đường + 0,3 mg BAP + 0,01 mg IBA + 100 ml hỗn hợp chất kháng vi sinh vật/L
Mr1	Mr + 8 g agar + 30 g đường + 0,3 mg BAP + 0,01 mg IBA/L
Mr2	Mr + 8 g agar + 30 g đường + 0,3 mg BAP + 0,01 mg IBA + 100 ml hỗn hợp chất kháng vi sinh vật/L

Ghi chú: IBA (Indolbutylic acid).

Trong đó, hỗn hợp chất kháng vi sinh vật (/L) gồm: 0,5 mg malachite xanh (chất kháng nấm) và kháng sinh AAS (gồm 30 mg penicillin, 50 mg streptomycin và 125 µg amphotericin B) [11].

Thời gian nuôi cấy trong môi trường có bổ sung chất kháng vi sinh vật: sử dụng 3 công thức như trong bảng 3.

Bảng 3. Thời gian (TG) nuôi cấy.

Công thức	Thời gian nuôi cấy trong môi trường có bổ sung chất kháng vi sinh vật (ngày)
Đối chứng (Đ/C)	0
TG1	30
TG2	60

Các chỉ tiêu theo dõi: tỷ lệ mẫu không nhiễm, tỷ lệ mẫu sống, tỷ lệ mẫu phân nhánh, tỷ lệ mẫu ra rễ sau 30 ngày và 60 ngày nuôi cấy.

Ảnh hưởng chất điều hòa sinh trưởng: sử dụng 9 công thức như bảng 4.

Bảng 4. Các công thức sử dụng chất điều hòa sinh trưởng.

Công thức	Nồng độ BAP (mg/l)	Nồng độ IBA (mg/l)
ST1		0
ST2	0,1	0,01
ST3		0,02
ST4		0
ST5	0,3	0,01
ST6		0,02
ST7		0
ST8	0,5	0,01
ST9		0,02

Môi trường nuôi cấy là: MS + 8 g agar + 30 g đường, các chỉ tiêu theo dõi: hệ số nhân chồi, chiều cao cây, tỷ lệ cây ra rễ sau 60 ngày và 120 ngày nuôi cấy.

Mẫu thí nghiệm được nuôi cấy trong môi trường có pH 5,5, trong điều kiện nhiệt độ $25 \pm 2^\circ\text{C}$; cường độ chiếu sáng 2000 lux, thời gian chiếu sáng 12 h/ngày. Các thí nghiệm được bố trí theo thể thức hoàn toàn ngẫu nhiên, mỗi thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Các số liệu thu được là giá trị trung bình của 3 lần lặp lại.

Xử lý số liệu: số liệu được xử lý trên phần mềm IRISTAT 5.0.

Kết quả và thảo luận

Ảnh hưởng của điều kiện khử trùng và môi trường khoáng đến vật liệu nuôi cấy in vitro Thạch tùng răng cưa

Thạch tùng răng cưa là cây thân thảo mọc trên đất ẩm, hơn nữa thân lại có vẩy và lá mọc dày nên khả năng nhiễm vi sinh vật rất cao. Chính vì vậy việc làm sạch bề mặt mẫu là khâu hết sức quan trọng trước khi đưa mẫu vào nuôi cấy. Kết quả nghiên cứu về điều kiện khử trùng và môi trường khoáng được thể hiện ở bảng 5.

Bảng 5. Ảnh hưởng của chất khử trùng và môi trường khoáng đến quá trình tạo vật liệu khởi đầu trong nhân giống in vitro Thạch tùng răng cưa.

Công thức	Sau 30 ngày nuôi cấy		Sau 60 ngày nuôi cấy	
	Tỷ lệ mẫu không nhiễm (%)	Tỷ lệ mẫu sống (%)	Tỷ lệ mẫu không nhiễm (%)	Tỷ lệ mẫu sống (%)
CT1	12,43 ^b	8,15 ^d	3,17 ^d	2,33 ^d
CT2	11,67 ^{bc}	6,37 ^f	2,67 ^e	1,63 ^e
CT3	11,14 ^c	4,72 ^g	2,31 ^e	0 ^f
CT4	13,21 ^b	10,72 ^c	4,81 ^c	2,57 ^d
CT5	12,09 ^b	7,69 ^e	3,23 ^d	1,91 ^e
CT6	11,93 ^{bc}	4,06 ^g	2,14	0 ^f
CT7	18,87 ^a	18,83 ^a	14,67 ^a	13,33 ^a
CT8	18,89 ^a	17,27 ^b	14,33 ^a	11,22 ^b
CT9	17,33 ^{ab}	10,21 ^c	12,67 ^b	8,23 ^c
LSD _{0,05}	1,71	1,53	1,63	1,57

Ghi chú: LSD_{0,05} là sai số nhỏ nhất có ý nghĩa ở mức cho phép là 5%. Những chữ cái khác nhau (a, b, c...) trong các cột biểu diễn sự khác nhau có ý nghĩa ở mức LSD.

Kết quả cho thấy, sau 30 ngày nuôi cấy ở hầu hết các công thức thí nghiệm đều có tỷ lệ nhiễm nấm rất cao (80-90%), sau 60 ngày nuôi cấy mẫu vẫn tiếp tục bị nhiễm. Đối với các mẫu sử dụng một dung dịch khử trùng, tỷ lệ nhiễm nấm lên đến hơn 90% dẫn đến tỷ lệ mẫu sống cũng rất thấp hoặc chết toàn bộ (mẫu chỉ khử trùng bằng NaOCl hoặc H₂O₂ trong môi trường khoáng Mr). Chỉ có mẫu được khử trùng bằng dung dịch NaOCl 3% trong 30 phút và dung dịch H₂O₂ 30% trong 7 phút cho kết quả tốt nhất với tỷ lệ mẫu không nhiễm >10% và tỷ lệ mẫu sống cũng không thấp hơn nhiều (1-4%). Do Thạch tùng có thời gian tạo vật liệu khởi đầu kéo dài (30-60 ngày) nên khả năng nhiễm nấm nội sinh trong mẫu gây ra trong quá trình nuôi cấy rất cao. Chính vì vậy, nhóm nghiên cứu đã tiến hành bổ sung một số chất kháng vi sinh vật với nồng độ thấp nhằm kiểm soát hiệu quả hiện tượng nhiễm bệnh trong môi trường mà không gây bất lợi cho sự sinh trưởng của tế bào thực vật nuôi cấy. Khử trùng mẫu bằng dung dịch NaOCl 3% trong 30 phút và dung dịch H₂O₂ 30% trong 7 phút là lựa chọn của nghiên cứu này để tiếp tục thử nghiệm trong các môi trường nuôi cấy khác nhau. Kết quả được thống kê trong bảng 6.

Bảng 6. Ảnh hưởng của điều kiện môi trường đến khả năng kháng vi sinh vật trong nhân giống *in vitro* Thạch tùng răng cưa.

Công thức	Sau 30 ngày nuôi cấy		Sau 60 ngày nuôi cấy	
	Tỷ lệ mẫu không nhiễm (%)	Tỷ lệ mẫu sống (%)	Tỷ lệ mẫu không nhiễm (%)	Tỷ lệ mẫu sống (%)
MS1	18,31 ^d	17,63 ^d	14,74 ^d	13,07 ^d
MS2	65,56 ^a	62,43 ^a	64,89 ^a	56,67 ^a
1/2 MS1	18,27 ^d	15,25 ^e	13,41 ^{de}	11,65 ^e
1/2 MS2	63,84 ^b	52,67 ^b	48,22 ^b	37,78 ^b
Mr1	17,21 ^{de}	9,73 ^f	12,78 ^e	7,83 ^f
Mr2	62,33 ^c	47,23 ^c	42,56 ^c	32,73 ^c
LSD _{0,05}	1,54	1,84	1,49	1,72

Ghi chú: LSD_{0,05} sai số nhỏ nhất có ý nghĩa ở mức cho phép là 5%. Những chữ cái khác nhau (a, b, c...) trong các cột biểu diễn sự khác nhau có ý nghĩa ở mức LSD.

Kết quả cho thấy, sau 30 ngày nuôi cấy ở các công thức không bổ sung chất kháng vi sinh vật (MS1, 1/2 MS1, Mr1) tỷ lệ mẫu không nhiễm đều rất thấp (<20%) và sau 60 ngày nuôi cấy các mẫu này vẫn tiếp tục bị nhiễm (tỷ lệ mẫu không nhiễm còn dưới <15%), dẫn đến tỷ lệ mẫu sống cũng rất thấp, có mẫu dưới 10% (công thức Mr1). Trong khi đó, cả 3 thí nghiệm có bổ sung chất kháng vi sinh vật sau 30 ngày tỷ lệ mẫu không nhiễm đạt >60%, sau 60 ngày tỷ lệ mẫu không nhiễm vẫn đạt >40%. Bên cạnh đó, tỷ lệ mẫu sống sau 30 ngày nuôi cấy đều >40% và sau 60 ngày nuôi cấy đạt >30%. Kết quả này cho thấy, việc bổ sung chất kháng vi sinh vật vào môi trường nuôi cấy là phương pháp khá hiệu quả trong việc ức chế sự sinh trưởng của vi sinh vật, và nồng độ các chất kháng vi sinh vật được bổ sung vào môi trường cũng vừa đủ để hạn chế ảnh hưởng đến các tế bào thực vật. Kết quả này cũng hoàn toàn tương tự như nghiên cứu của nhóm tác giả Ying-Zi (2015) trong nhân giống *in vitro* Thạch tùng răng cưa của Trung Quốc [11].

Việc sử dụng môi trường khoáng thích hợp có tác dụng bổ sung nguồn khoáng kịp thời, giúp các tế bào đủ dinh dưỡng để hồi phục và phát triển sau những tổn thương do khử trùng và những hạn chế do sử dụng chất kháng vi sinh vật. Kết quả bảng 5 và bảng 6 đều cho thấy, môi trường MS là môi trường thích hợp cho sự hồi phục và tái sinh của chồi ngọn Thạch tùng răng cưa, trong đó môi trường MS2 cho kết quả cao nhất với tỷ lệ mẫu không nhiễm là 64,89 và tỷ lệ mẫu sống là 56,67%. So sánh với các nghiên cứu khác cho thấy: Liang (2010) khi nhân Thạch tùng răng cưa nuôi cấy trong môi trường 1/2 MS bổ sung IBA và BA ở nồng

độ thích hợp không những gia tăng về sinh khối mà còn gia tăng sự tổng hợp huperzine [8]; nghiên cứu của nhóm tác giả Wojciech J. Szypuła (2013) đã xác định môi trường Mr bổ sung 0,015 mg/l IBA và 0,3 mg/l kinetin là môi trường thích hợp cho sự gia tăng sinh khối của *Huperzia selago* khi nhân nuôi bằng bào tử [9], hay như nghiên cứu nhân giống *Huperzia serrata* của Ying-Zi và cộng sự (2015) lại cho rằng, môi trường MS thích hợp cho sự phân nhánh của chồi ngọn [11].

Ảnh hưởng của thời gian bổ sung chất kháng vi sinh vật đến sinh trưởng và phát triển của chồi Thạch tùng răng cưa nuôi cấy *in vitro*

Việc bổ sung chất kháng vi sinh vật trong thời gian bao lâu để vừa có tác dụng kháng vi sinh vật, vừa không ảnh hưởng nhiều đến sự sinh trưởng và phát triển của chồi là yếu tố cần được xem xét tiếp theo. Môi trường MS2 được lựa chọn trong nghiên cứu này để đánh giá ảnh hưởng của thời gian bổ sung chất kháng vi sinh vật vào môi trường nuôi cấy. Kết quả được thể hiện trong bảng 7.

Bảng 7. Ảnh hưởng của của thời gian bổ sung chất kháng vi sinh vật đến sinh trưởng và phát triển của chồi.

Công thức	Sau 30 ngày nuôi cấy			Sau 60 ngày nuôi cấy		
	Tỷ lệ chồi đạt (%)	Tỷ lệ chồi phân nhánh (%)	Tỷ lệ chồi ra rễ (%)	Tỷ lệ chồi đạt (%)	Tỷ lệ chồi phân nhánh (%)	Tỷ lệ chồi ra rễ (%)
Đ/C	17,63 ^b	2,31 ^a	0	13,07 ^c	4,47 ^c	2,09 ^c
TG1	62,34 ^a	1,78 ^{ab}	0	51,33 ^b	34,11 ^a	19,67 ^a
TG2	62,27 ^a	2,00 ^a	0	56,67 ^a	23,33 ^b	8,81 ^b
LSD _{0,05}	2,14	1,07	0	2,31	2,84	2,63

Ghi chú: LSD_{0,05} là sai số nhỏ nhất có ý nghĩa ở mức cho phép là 5%. Những chữ cái khác nhau (a, b, c...) trong các cột biểu diễn sự khác nhau có ý nghĩa ở mức LSD.

Kết quả thu được cho thấy tỷ lệ mẫu đạt ở công thức thí nghiệm sau 60 ngày nuôi cấy >50% không thấp hơn nhiều so với tỷ lệ mẫu đạt sau 30 ngày nuôi cấy tỷ lệ mẫu đạt là >60%, và sau 60 ngày nuôi cấy ở công thức không bổ sung chất kháng vi sinh vật tỷ lệ mẫu đạt cũng không thấp hơn nhiều so với công thức bổ sung chất kháng vi sinh vật (5,34%). Điều đó cho thấy, việc bổ sung chất kháng vi sinh vật trong vòng 30 ngày đầu đã ức chế được nấm nội sinh. Nhưng nếu tiếp tục bổ sung chất kháng vi sinh vật trong 30 ngày tiếp theo sẽ ức chế sự phát triển của tế bào, điển hình là tỷ lệ mẫu phân nhánh ở công thức TG1 cao hơn TG2 là 10,78% và tỷ lệ mẫu ra rễ cũng cao hơn là 10,86%. Vậy việc bổ sung chất kháng vi sinh vật là cần thiết, nhưng chỉ nên bổ sung trong giai đoạn tạo vật liệu khởi đầu (30 ngày đầu nuôi cấy).

Ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng đến sinh trưởng và phát triển của Thạch tùng răng cưa nuôi cấy *in vitro*

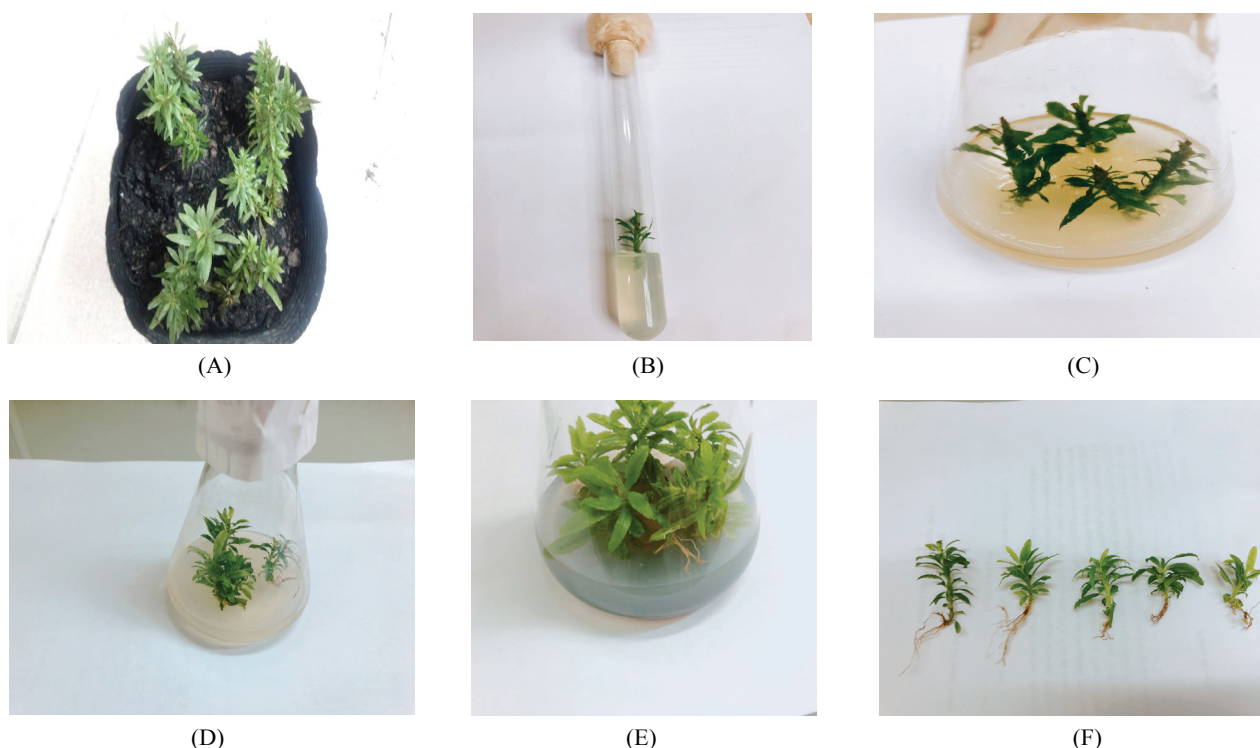
Vật liệu sau 60 ngày nuôi cấy được cấy chuyển sang môi trường có bổ sung nồng độ BAP và IBA khác nhau để đánh giá sự sinh trưởng và phát triển của chồi. Kết quả được thể hiện ở bảng 8.

Kết quả nghiên cứu cho thấy, BAP ảnh hưởng đến hệ số nhân và chiều cao của chồi, ở các công thức bổ sung 0,3 mg BAP/l môi trường thì hệ số nhân và chiều cao của chồi Thạch tùng răng cưa phát triển tốt hơn nhiều so với ở các công thức có nồng độ 0,1 mg BAP/l môi trường nhưng ở các công thức có nồng độ 0,5 mg BAP/l môi trường thì hệ số nhân chồi và chiều cao chồi lại không tăng do mẫu hình thành nhiều các mô sẹo. Kết quả này tương tự như kết quả nghiên cứu của Wojciech và cộng sự trên đối tượng *H. selago*. Còn IBA ảnh hưởng đến quá trình ra rễ và sự phát triển của lá, ở các công thức bổ sung 0,01 mg IBA/l môi trường cây phát triển đồng đều và có tỷ lệ ra rễ tốt nhất, ở các công thức không bổ sung 0,01 mg IBA cây ra rễ chậm hơn và sự phát triển của cây cũng kém hơn, còn ở các công thức có bổ sung 0,02 mg IBA/l môi trường không làm tăng tỷ lệ ra rễ cho cây mà làm tăng lượng rễ trên cây ở mức không cần thiết. Vậy môi trường thích hợp cho nhân giống *in vitro* Thạch tùng răng cưa là MS + 0,3 mg BAP + 0,01 mg IBA (trong 1l môi trường).

Bảng 8. Ảnh hưởng của nồng độ chất điều hòa sinh trưởng đến sự sinh trưởng và phát triển của Thạch tùng răng cưa nuôi cấy *in vitro*.

Công thức	Sau 60 ngày nuôi cấy			Sau 120 ngày nuôi cấy		
	Hệ số nhân chồi	Chiều cao Trung bình của chồi (mm)	Tỷ lệ chồi ra rễ (%)	Hệ số nhân chồi	Chiều cao Trung bình của chồi (mm)	Tỷ lệ ra rễ (%)
ST1	1,27 ^f	7,2 ^f	17,32 ^f	1,43 ^g	13,4 ^f	32,18 ^g
ST2	1,83 ^d	9,7 ^d	21,16 ^{de}	2,07 ^e	16,5 ^d	38,2 ^f
ST3	1,46 ^e	8,3 ^e	23,47 ^c	1,92 ^f	14,8 ^e	42,21 ^e
ST4	2,08 ^c	13,1 ^a	20,21 ^e	2,51 ^{cd}	21,3 ^a	47,62 ^{bc}
ST5	2,45 ^a	12,9 ^a	27,31 ^a	3,48 ^a	21,1 ^a	53,12 ^a
ST6	2,21 ^b	11,3 ^{bc}	24,63 ^{bc}	2,95 ^b	19,7 ^{bc}	48,31 ^b
ST7	2,36 ^{ab}	12,4 ^{ab}	22,72 ^{cd}	2,86 ^{bc}	20,3 ^b	44,72 ^d
ST8	2,14 ^{bc}	11,6 ^b	25,37 ^b	2,62 ^c	19,1 ^c	46,26 ^c
ST9	1,96 ^{cd}	10,7 ^c	21,87 ^d	2,31 ^d	18,6 ^{cd}	43,56 ^{de}
LSD _{0.05}	0,21	0,9	1,62	0,23	1,2	2,34

Ghi chú: LSD_{0.05} là sai số nhỏ nhất có ý nghĩa ở mức cho phép là 5%. Những chữ cái khác nhau (a, b, c...) trong các cột biểu diễn sự khác nhau có ý nghĩa ở mức LSD.



Hình 1. Thạch tùng răng cưa. **A)** Nguyên liệu ban đầu; **B)** Mẫu nuôi cấy trong môi trường MS2 sau 30 ngày; **C)** Mẫu nuôi cấy trong môi trường MS2 sau 30 ngày và cấy chuyển sang môi trường MS1 30 ngày; **D)** Mẫu nuôi cấy trong môi trường MS1 sau 60 ngày; **E)** Mẫu nuôi cấy trong môi trường MS1 sau 120 ngày; **F)** Cây con nuôi cấy *in vitro*.

Kết luận

Điều kiện khử trùng thích hợp cho mẫu Thạch tùng răng cưa là bằng dung dịch NaOCl 3% trong 30 phút và dung dịch H₂O₂ 30% trong 7 phút, nhưng để việc khử trùng đạt hiệu quả cao cần bổ sung chất kháng vi sinh vật vào môi trường nuôi cấy *in vitro* nhằm hạn chế sự phát triển của các vi sinh vật nội sinh. Môi trường thích hợp cho nhân giống *in vitro* Thạch tùng răng cưa là MS + 0,3 mg BAP + 0,01 mg IBA (trong 1l môi trường) có bổ sung hỗn hợp chất kháng vi sinh vật trong 30 ngày đầu nuôi cấy.

LỜI CẢM ƠN

Các tác giả trân trọng cảm ơn Trung tâm Sinh học Thực nghiệm, Viện Ứng dụng Công nghệ đã hỗ trợ kinh phí cho nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Nguyễn Tiến Bân (2005), *Danh lục các loài thực vật Việt Nam*, tập II, Nhà xuất bản Nông nghiệp.
- [2] X. Ma, C. Tan (2008), “In vitro production of Huperzine A, a promising drug candidate for Alzheimer’s disease”, *Phytochemistry*, **69**(10), pp.2022-2028.
- [3] Y. Wang, Q.G. Zeng (2011), “Isolation and characterization of endophytic huperzine A- producing fungi from *Huperzia serrata*”, *Plant Science*, **168**, pp.1443- 1452.
- [4] J.G. Ai, Y.Q. Zhang (2005), “Study on community property of *Huperzia serrata* habitat in Tianmushan nature reserves”, *J. Zhejiang Sci. Technol.*, **25**, pp.14-17.
- [5] Nông Văn Duy (2015), *Tình hình nghiên cứu Thạch tùng răng cưa tại Việt Nam*, Nhà xuất bản Tây Nguyên.
- [6] J.S. Liu, C.M. Yu, Y.Z. Zhou, Y.Y. Han, B.R. Qi, Y.L. Zhu

(1986), “Study on the chemistry of Huperzine A and B”. *Acta Chimica Sinica*, **44**, pp.1035-1040.

[7] Vũ Bích Ngọc, Phạm Thị Hạnh, Lê Thị Lan Anh, Nguyễn Tiến Đạt, Lê Thị Bích Thủy (2016), “Định tính và định lượng Huperzine A trong cây Thạch tùng răng cưa (*Huperzia serrata*) ở Đà Lạt, tỉnh Lâm Đồng”, *Tạp chí Công nghệ sinh học*, **14**(3), tr.473-478.

[8] H. Liang (2010), “Establishment of the tissue culture system of *Huperzia serrata* and effects of phytohormones on multiple shoot growth and Huperzine A accumulation”, *Thesis Master*, Hefei Univ. Tech., Hefei.

[9] Wojciech J. Szypuła, Paulina Mistrzak, Olga Olszowska (2013), “A new and fast method to obtain in vitro cultures of *Huperzia selago* (Huperziaceae) porophytes, a club moss which is a source of huperzine A”, *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, **82**(4), pp.313-320.

[10] Kanichiro Ishiuchi, Jeong-Jin Park, Robert M. Long, David R. Gang (2013), “Production of huperzine A and other Lycopodium alkaloids in *Huperzia* species grown under controlled conditions and in vitro”, *Phytochemistry*, **9**, pp.208-219.

[11] Ying-Zi MA, LIU Jiang-Hai, XU Huan, LIU Fen (2015), “In Vitro Culture of *Huperzia serrata*”, *Plant Physiology Journal*, **51**(4), pp.465- 470.

[12] Lê Thị Lan Anh, Nguyễn Thị Thanh Hằng, Bùi Tuấn Anh, Hồ Thị Hương, Ngô Thị Thùy Linh, Lê Thị Bích Thủy, Nguyễn Đức Thành (2018), “Nghiên cứu kỹ thuật nhân giống loài Thạch tùng răng cưa *Huperzia serrata* bằng phương pháp giảm cành”, *Kỷ yếu Hội thảo khoa học công nghệ sinh học toàn quốc*, tr.1411-1416.