



NHÂN GIỐNG *IN VITRO* CÂY RAU MÁ (*CENTELLA ASIATICA* L.) TẠI QUẢNG THỌ, THỪA THIÊN HUẾ

Trương Thị Hồng Hải*, Phạm Thị Diễm Thi,
Hoàng Tấn Quảng, Nguyễn Quang Cơ

Viện Công nghệ sinh học, Đại học Huế, Nguyễn Đình Tú, Huế, Việt Nam

* Tác giả liên hệ: Trương Thị Hồng Hải <tthhai@hueuni.edu.vn>
(Ngày nhận bài: 11-5-2023; Ngày chấp nhận đăng: 15-6-2023)

Tóm tắt. Tại xã Quảng Thọ, huyện Quảng Điền, tỉnh Thừa Thiên Huế, rau má được xem là một sản phẩm chủ lực đem lại nguồn thu nhập cao cho người nông dân. Để sản xuất cây giống sạch bệnh phục vụ cho sản xuất rau má hữu cơ, chúng tôi đã xây dựng quy trình nhân giống *in vitro* cây rau má tại địa phương. Định chồi rau má tự nhiên khử trùng bằng HgCl₂ 0,1% trong tám phút cho kết quả tốt nhất, với 66,67% số mẫu sống không nhiễm. Môi trường SH bổ sung 1 mg/L BAP là môi trường thích hợp nhất cho nuôi cấy khởi đầu với 3,37 chồi/mẫu chồi tái sinh. Môi trường tốt nhất cho quá trình nhân nhanh chồi là môi trường SH bổ sung 2 mg/L BAP kết hợp với 0,1 mg/L TDZ và 1 mg/L KIN với 7,7 chồi/mẫu tạo thành. Môi trường tạo rễ thích hợp nhất là môi trường ½ SH bổ sung 1 mg/L IBA với 14,83 rễ/chồi tạo thành. Giá thể cho kết quả tốt nhất đối với ra ngôi cây *in vitro* là hỗn hợp 50% đất và 50% trấu với tỷ lệ sống 92,24%.

Từ khoá: môi trường SH, nhân giống *in vitro*, nhân nhanh chồi, Quảng Thọ, rau má

In vitro propagation of Centella (*Centella asiatica* L.), in Quang Tho, Thua Thien Hue

Truong Thi Hong Hai*, Pham Thi Diem Thi,
Hoang Tan Quang, Nguyen Quang Co

Institute of Biotechnology, Hue University, Nguyen Dinh Tu St., Hue, Vietnam

* Correspondence to Truong Thi Hong Hai <tthhai@hueuni.edu.vn>
(Submitted: May 11, 2023; Accepted: June 15, 2023)

Abstract. In Quang Tho commune, Quang Dien district, Thua Thien Hue province, Centella is a primary product to increasing farmers' income. To provide disease-free plantlets for organic cultivation, we developed a micropropagation method for this culture. The stem explants washed and sterilized with 0.1% HgCl₂ for 8 min exhibit the highest survival rate of 66.67%. The SH salt medium supplemented with 30 g/L sucrose, 9 g/L agar, and 1 mg/L BAP is suitable for culturing stem segments, with 3.37 regenerated shoots per sample. The medium for shoot multiplication is SH supplemented with 2 mg/L BAP, 0.2 mg/L TDZ, and 1 mg/L

KIN, providing 7.7 shoots per sample. The roots form and develop well on the $\frac{1}{2}$ SH medium supplemented with 1 mg/L IBA, with 14.83 roots per shoot. The suitable substrate for *in vitro* plant growth is a mixture of 50% soil and 50% rice husk, with a 92.24% survival rate.

Keywords: Centella, *in vitro* propagation, Quang Tho, SH medium, shoot multiplication

1 Đặt vấn đề

Rau má (*Centella asiatica* L.) là cây thân thảo, thường mọc ở những nơi ẩm ướt và những vùng nhiệt đới như Đông Nam Á, Trung Quốc, Ấn Độ, Srilanka, Trung Phi... [1]. Ngoài công dụng chính là làm thực phẩm, rau má còn được xem là một cây thuốc dùng để chữa các bệnh khác nhau như điều trị hen suyễn, viêm loét, bệnh phong, bệnh lupus, bệnh tĩnh mạch, cải thiện trí nhớ. Ngoài ra, rau má còn được biết đến như là một thuốc chống trầm cảm, có khả năng chống nhiễm độc gan, kháng khuẩn, kháng nấm, bệnh vẩy nến và kháng một số dòng tế bào ung thư. Trong rau má chứa nhiều hợp chất có tác dụng dược lý quan trọng. Các triterpenoid của rau má chủ yếu là centelloside (asiaticoside, asiatic acid, madecassoside, và madecassic acid), có nhiều ứng dụng trong y dược nhờ các tính chất như: có khả năng hủy tiểu cầu, giảm cholesterol trong máu, chống khối u, kháng HIV, miễn dịch tá dược, kháng viêm, kháng khuẩn, kháng ký sinh trùng leishmania; hoặc trong bảo vệ thực vật như làm thuốc trừ sâu và trừ nấm [2–4].

Trước đây, rau má thường được khai thác tự nhiên hoặc được trồng nhỏ lẻ ở quy mô hộ gia đình. Ngày nay, trước nhu cầu của thị trường, nhiều vùng chuyên canh cây rau má đã được hình thành trong cả nước, trong đó nổi bật nhất là các mô hình ở tỉnh Thanh Hoá và Thừa Thiên Huế. Tại tỉnh Thừa Thiên Huế, Hợp tác xã nông nghiệp Quảng Thọ II, xã Quảng Thọ, huyện Quảng Điền là đơn vị tiên phong đưa rau má thành sản phẩm có thương hiệu và giúp bà con nông dân nâng cao thu nhập. Năm 2013, quy trình sản xuất rau má VietGAP chính thức được áp dụng tại Quảng Thọ.

Hiện nay, địa phương đang có nhu cầu mở rộng thêm diện tích trồng, xây dựng mới các mô hình canh tác hữu cơ, phát triển thêm các sản phẩm, đồng thời phát triển thương hiệu để rau má trở thành một sản phẩm chủ lực của tỉnh Thừa Thiên Huế. Rau má tại Quảng Thọ hiện được nhân giống chủ yếu bằng hạt kết hợp với giâm hom, canh tác qua nhiều thế hệ dẫn đến hiện tượng thoái hóa giống. Bên cạnh đó, tình trạng bệnh rỉ sắt xuất hiện khá phổ biến làm giảm chất lượng sản phẩm. Nuôi cấy mô thực vật có thể tạo ra được lượng cây giống lớn sạch bệnh trong thời gian ngắn. Vì vậy, nhân giống cây rau má tại Quảng Thọ bằng kỹ thuật nuôi cấy *in vitro* là một giải pháp góp phần giải quyết bài toán giống cho địa phương, đặc biệt là cung cấp cây giống sạch bệnh để triển khai canh tác hữu cơ.

2 Vật liệu và phương pháp

2.1 Vật liệu

Vật liệu nghiên cứu là cây rau má (*Centella asiatica* (L.) Urban) thuộc họ Hoa tán (Apiaceae), thu từ vùng trồng rau má của Hợp tác xã nông nghiệp Quảng Thọ II, xã Quảng Thọ, huyện Quảng Điền, tỉnh Thừa Thiên Huế, tại tọa độ 16°31'59.2"N 107°31'34.1"E. Cây tự nhiên sử dụng cho nuôi cấy khoảng ba tháng tuổi, cao 10 cm, có năm lá.

2.2 Phương pháp

Môi trường và điều kiện nuôi cấy

Môi trường nuôi cấy là môi trường cơ bản MS Murashige, Skoog [5] hoặc SH (Schenk & Hildebrandt Salt Medium) [6] có bổ sung 9,0 g/L agar, 30 g sucrose và các chất điều hoà sinh trưởng với nồng độ khác nhau tùy vào mục đích của từng thí nghiệm. Môi trường nuôi cấy có pH = 5,8 được khử trùng ở nhiệt độ 121°C, áp suất 1,0 atm trong 15 phút. Mẫu được nuôi ở nhiệt độ: 25 ± 1°C; chiếu sáng bằng đèn led với cường độ ánh sáng: 2000 ± 500 lux, thời gian: 10 giờ/ngày.

Khử trùng mẫu cấy

Cây rau má tự nhiên được rửa sạch bụi đất, cắt bỏ lá và rễ. Mẫu được tách bỏ bớt cuống lá già và thu nhận phần đỉnh chồi kích thước 3–4 cm với hai cuống lá non bên ngoài. Mẫu được lặt với nước xà phòng loãng (Lifebuoy 0,1%) trong 20 phút, với thuốc diệt nấm Ridomil Gold của hãng Syngenta (chứa 40 g/L Metalaxyl M và 640 g/L Mancozeb) 0,2% trong 30 phút. Mẫu tiếp tục được khử trùng trong tủ cấy với cồn 70° trong 30 giây và dung dịch HgCl₂ 0,1% từ 1–10 phút (mỗi công thức cách nhau hai phút) để xác định thời gian khử trùng thích hợp. Hiệu quả của quá trình khử trùng được đánh giá thông qua tỷ lệ mẫu sống không nhiễm, mẫu nhiễm và mẫu chết sau bốn tuần nuôi cấy.

Tạo chồi *in vitro*

Để khảo sát môi trường phù hợp cho quá trình tạo chồi *in vitro*, chúng tôi sử dụng hai loại môi trường là MS và SH, chất điều hòa sinh trưởng là BAP với các nồng độ 0,5 và 1 mg/L. Các chỉ tiêu theo dõi bao gồm số chồi tạo mới, số lá/chồi, chiều cao sau bốn tuần.

Nhân chồi

Chồi được chọn trong nghiên cứu này là các chồi khỏe, cao từ 1,5–2,5 cm, 2–3 lá. Mẫu được cấy lên môi trường SH có bổ sung BAP riêng lẻ (ở các nồng độ 0,5; 1,0; 2,0; 3,0, 4,0 và 5,0) hoặc kết hợp giữa BAP (nồng độ tốt nhất) với TDZ (nồng độ 0,05; 0,1 và 0,2 mg/L) và KIN (nồng độ 0,5 và 1,0 mg/L). Các chỉ tiêu được ghi nhận sau bốn tuần nuôi cấy, bao gồm số chồi/mẫu, số

lá/chồi và chiều cao cuống lá.

Tạo rễ

Chồi đơn *in vitro* khỏe mạnh, cao từ 2–3 cm, có 2–3 lá được lựa chọn làm nguyên liệu để nghiên cứu. Chồi được cấy lên môi trường $\frac{1}{2}$ SH có bổ sung IBA (nồng độ 0,25; 0,5; 1,0; 1,5 và 2,0 mg/L) để kích thích tạo rễ. Các chỉ tiêu được ghi nhận sau bốn tuần nuôi cấy, bao gồm số rễ tạo thành và chiều dài rễ.

Huấn luyện ra ngôi

Cây rau má *in vitro* khỏe mạnh sau bốn tuần nuôi cấy trên môi trường tạo rễ, có số rễ đạt từ 8–12 rễ, 2–3 lá, chiều cao cuống lá từ 2–3 cm, được đưa ra khỏi phòng nuôi 3–5 ngày để huấn luyện thích nghi trong vườn ươm. Cây con *in vitro* sau đó được chuyển ra bầu với các loại giá thể khác nhau, bao gồm đất thịt (lấy tại khu vực trồng rau má của xã Quảng Thọ), đất thịt pha trấu và đất thịt pha cát. Vườn ươm sử dụng có lưới che nắng 50%, ánh sáng và nhiệt độ tự nhiên. Các chỉ tiêu theo dõi sau bốn tuần, bao gồm tỷ lệ sống, động thái tăng số lá, động thái tăng chiều dài phiến lá, động thái tăng chiều rộng phiến lá và động thái tăng độ dài cuống lá.

Xử lý thống kê

Các thí nghiệm nuôi cấy được bố trí theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên, các thí nghiệm khử trùng mẫu, nuôi cấy và ra ngôi được thực hiện với 30 mẫu, chia làm 3 lần lặp lại. Kết quả thí nghiệm được xử lý để thu giá trị trung bình và phân tích Duncan's test bằng phần mềm SPSS 20.0 với mức xác suất có ý nghĩa $p < 0,05$.

3 Kết quả và thảo luận

3.1 Khử trùng mẫu cấy

Đinh chồi rau má sau khi khử trùng với các công thức khác nhau được cấy lên môi trường MS. Bảng 1 trình bày ảnh hưởng thời gian khử trùng mẫu bằng dung dịch HgCl_2 0,1%. Kết quả cho thấy, sau bốn tuần nuôi cấy, xử lý HgCl_2 0,1% trong 1–2 phút mẫu nhiễm 100%. Xử lý HgCl_2 0,1% trong 4 phút, tỷ lệ mẫu nhiễm cao 66,67% nhưng không có mẫu chết. Tăng thời gian khử trùng từ 4–8 phút, tỷ lệ mẫu nhiễm giảm xuống, tỷ lệ mẫu sống tăng lên, đồng thời tỷ lệ mẫu chết cũng tăng do HgCl_2 0,1% thấm sâu vào trong mẫu trong thời gian dài gây chết các mô thực vật. Tăng thời gian khử trùng (10 phút), tỷ lệ mẫu nhiễm giảm không nhiều nhưng tỷ lệ mẫu chết lại tăng mạnh. Vì vậy, khử trùng mẫu với HgCl_2 0,1% trong 8 phút cho kết quả tốt nhất với tỷ lệ mẫu sống không nhiễm đạt 66,67%.

Bảng 1. Ảnh hưởng thời gian khử trùng mẫu bằng dung dịch HgCl₂ 0,1%

Thời gian khử trùng (phút)	Tỷ lệ mẫu sống (%)	Tỷ lệ mẫu nhiễm (%)	Tỷ lệ mẫu chết (%)
1	0	100	0
2	0	100	0
4	33,33	66,67	0
6	47,22	50	2,78
8	66,67	27,78	5,56
10	61,11	22,22	16,67

3.2 Tạo chồi *in vitro* từ mẫu nuôi cấy khởi đầu

Để tạo nguồn nguyên liệu *in vitro* cho quá trình nhân nhanh, chúng tôi tiến hành nghiên cứu điều kiện nuôi cấy tốt nhất để tái sinh chồi từ mẫu đỉnh chồi ban đầu. Môi trường cơ bản trong nuôi cấy mô có ảnh hưởng rất lớn đến khả năng sinh trưởng và phát triển của chồi *in vitro*. Do đó, trong bước nuôi cấy khởi đầu chúng tôi thăm dò hai loại môi trường cơ bản thường được sử dụng để xác định môi trường thích hợp nhất trong nuôi cấy cây rau má. Kết quả nuôi cấy sau bốn tuần cho thấy, chồi rau má khi nuôi cấy trên môi trường MS có đặc điểm chung là lá nhỏ, ngắn, màu xanh nhạt, số chồi tái sinh ít. So với môi trường MS, môi trường cơ bản SH có số lượng chồi tái sinh/mẫu nhiều hơn; chồi to, lá to, dài màu xanh đậm. Môi trường SH bổ sung 1 mg/L BAP tốt nhất cho quá trình nuôi cấy khởi đầu với số chồi/mẫu là 3,37 chồi, số lá/chồi là 3,40 và chiều cao cuống lá là 2,62 cm. So với môi trường MS, môi trường SH có hàm lượng khoáng đa lượng thấp và hàm lượng vitamin cao hơn nên nó kích thích chồi rau má phát triển tốt hơn. Vì vậy, chúng tôi sử dụng môi trường cơ bản SH làm môi trường nuôi cấy trong các thí nghiệm tiếp theo.

Bảng 2. Ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy đến khả năng phát triển chồi từ mẫu nuôi cấy khởi đầu

Môi trường	BAP (mg/L)	Số chồi/mẫu	Số lá/chồi	Chiều cao cuống lá (cm)	Mô tả
MS	0,0	1,00 ^a	2,83 ^{bc}	2,27 ^{ab}	Chồi nhỏ, phát triển chậm; lá nhỏ, ngắn, màu xanh nhạt
MS	0,5	1,33 ^b	2,33 ^a	2,11 ^a	Chồi to, phát triển chậm; lá nhỏ, ngắn, màu xanh nhạt
MS	1,0	1,60 ^b	2,37 ^a	2,08 ^a	Chồi to, phát triển chậm; lá nhỏ, ngắn, màu xanh nhạt
SH	0,0	2,13 ^c	2,57 ^{ab}	3,16 ^d	Chồi nhỏ, phát triển nhanh; lá to, dài, màu xanh đậm
SH	0,5	3,07 ^d	3,10 ^{cd}	2,78 ^c	Chồi to, phát triển nhanh; lá to, dài, màu xanh đậm
SH	1,0	3,37 ^e	3,40 ^d	2,62 ^{bc}	Chồi to, phát triển nhanh; lá to, dài, màu xanh đậm

Chú thích: Các chữ cái khác nhau trên cùng một cột chỉ ra sự sai khác có ý nghĩa thống kê của trung bình mẫu với $p < 0,05$ (Duncan's test). (Chú thích này được sử dụng chung cho các bảng tiếp theo).

3.3 Nhân nhanh chồi

Ảnh hưởng của BAP đến sự tạo chồi và phát triển chồi *in vitro*

Sau bốn tuần nuôi cấy, môi trường SH bổ sung 0,5–2 mg/L BAP khả năng nhân chồi tăng, chồi sinh trưởng mạnh, lá to, nhiều, cuống lá to, dài, màu xanh nhạt (Bảng 3). Môi trường bổ sung 2 mg/L BAP cho kết quả nhân chồi tốt nhất với 3,73 chồi/mẫu nuôi cấy, số lá/chồi là 3,53 và chiều cao cuống lá là 3,31. Khi tiếp tục tăng nồng độ BAP (3–5 mg/L), số chồi tạo thành giảm, chồi sinh trưởng chậm, lá nhỏ, ít, cuống lá phình to, màu xanh đậm.

Ảnh hưởng của BAP kết hợp với các chất điều hòa sinh trưởng khác nhau đến sự tạo chồi và phát triển chồi *in vitro*

Chúng tôi tiếp tục sử dụng môi trường SH bổ sung 2 mg/L BAP để phối hợp với các chất điều hòa sinh trưởng khác nhau nhằm tìm được môi trường nhân nhanh tốt hơn. Kết quả Bảng 4 cho thấy, BAP phối hợp với TDZ ở các nồng độ khác nhau (0,05–0,2 mg/L) không có tác dụng làm tăng khả năng nhân chồi. Số chồi tạo thành từ 3,97–4,23 chồi/mẫu, không sai khác nhiều so với khi nuôi cấy trên môi trường không có TDZ. Khi kết hợp giữa BAP, TDZ và KIN, khả năng nhân chồi của mẫu nuôi cấy tăng lên đáng kể. Ở các công thức bổ sung 0,5 mg/L KIN, số chồi tạo thành gần tương đương nhau (đạt từ 4,67–4,93 chồi/mẫu), các chồi có đặc điểm chung là chồi nhỏ, phát triển nhanh, lá to, cuống lá nhỏ, màu xanh nhạt. Khi bổ sung 1 mg/L KIN, khả năng nhân chồi tăng mạnh. Trên các môi trường bổ sung 0,05–0,1 mg/L TDZ và 1 mg/L KIN, số chồi tạo thành tăng từ 6,37–7,70 chồi/mẫu, các chồi sinh trưởng tốt. Trên môi trường có 0,2 mg/L TDZ và 1 mg/L KIN, số chồi tạo thành giảm, chồi phát triển chậm; lá gần như không phát triển, cuống lá phình to bất thường; phần gốc tạo khối callus lớn màu xanh. Các hiện tượng trên là do nồng độ TDZ sử dụng cao, làm giảm khả năng tạo chồi và kích thích sự phát sinh callus. Theo Guo và cs. [7], TDZ là

Bảng 3. Ảnh hưởng của BAP đến khả năng tạo chồi và phát triển của chồi *in vitro*

BAP (mg/L)	Số chồi/mẫu (chồi)	Số lá/chồi (lá)	Chiều cao cuống lá (cm)	Đặc điểm chồi
0,0	1,00 ^a	2,53 ^{bc}	2,61 ^{ab}	Chồi to, phát triển nhanh; lá to, ít, cuống lá nhỏ, dài, màu xanh nhạt
0,5	1,83 ^c	2,73 ^{cd}	2,92 ^b	Chồi to, phát triển nhanh; lá to, ít, cuống lá nhỏ, dài, màu xanh nhạt
1,0	2,47 ^d	2,93 ^d	3,48 ^c	Chồi to, phát triển nhanh; lá to, nhiều, cuống lá nhỏ, dài, màu xanh nhạt
2,0	3,73 ^e	3,53 ^e	3,31 ^c	Chồi to, phát triển nhanh; lá to, nhiều, cuống lá to, dài, màu xanh nhạt
3,0	1,60 ^{bc}	2,27 ^b	2,42 ^a	Chồi to, phát triển chậm; lá nhỏ, ít, cuống lá phình to, màu xanh đậm
4,0	1,33 ^b	1,93 ^a	2,25 ^a	Chồi to, phát triển chậm; lá nhỏ, ít, cuống lá phình to, màu xanh đậm
5,0	1,27 ^b	1,89 ^a	2,15 ^a	Chồi to, phát triển chậm; lá nhỏ, ít, cuống lá phình to, màu xanh đậm

chất kích thích sinh trưởng thực vật tổng hợp. Nó vừa thể hiện hiệu quả của nhóm cytokinin vừa có tác động như nhóm auxin. Ở nồng độ thấp, TDZ thường kích thích sự phát triển chồi nhưng ở nồng độ cao nó có thể kích thích tạo callus hoặc phôi soma.

Theo Nath Tiwari và cs. [8]; Das và cs. [9], môi trường MS bổ sung 4,0 mg/L BAP + 0,1 mg/L NAA là môi trường nhân chồi tốt nhất với số chồi tương ứng là 3,38 chồi và 10,2 chồi. Như vậy, tuy môi trường tối ưu trong hai nghiên cứu trên là giống nhau nhưng có thể các giống rau má sử dụng trong nghiên cứu là khác nhau, dẫn đến số chồi thu được cũng khác nhau. Trong nghiên cứu này, chúng tôi thu được số chồi cao nhất là 7,70 chồi.

Bảng 4. Ảnh hưởng của 2,0 mg/L BAP kết hợp các chất kích thích sinh trưởng đến khả năng tạo chồi và phát triển của chồi *in vitro*

TDZ (mg/L)	KIN (mg/L)	Số chồi/mẫu (chồi)	Số lá/chồi (lá)	Chiều cao cuống lá (cm)	Đặc điểm chồi
0,05	-	3,97 ^a	2,77 ^{cd}	2,69 ^b	Chồi to khoẻ, phát triển nhanh; lá to, cuống lá nhỏ, dài, xanh nhạt
0,1	-	4,23 ^{ab}	2,87 ^{cd}	2,91 ^{bc}	Chồi to khoẻ, phát triển nhanh; lá to, cuống lá nhỏ, dài, xanh nhạt
0,2	-	4,17 ^{ab}	2,13 ^a	2,08 ^a	Chồi to, phát triển chậm; lá nhỏ, cuống lá to ngắn, xanh đậm
0,05	0,5	4,67 ^{bc}	2,80 ^{cd}	3,37 ^d	Chồi nhỏ, phát triển nhanh; lá to, cuống lá nhỏ, xanh nhạt
0,1	0,5	4,77 ^c	2,97 ^d	3,15 ^{cd}	Chồi nhỏ, phát triển nhanh; lá to, cuống lá nhỏ, xanh nhạt
0,2	0,5	4,93 ^c	2,63 ^{bc}	2,21 ^a	Chồi to, phát triển khá nhanh; lá nhỏ, cuống lá to ngắn, xanh đậm; phần gốc chồi phát sinh callus
0,05	1,0	6,37 ^e	3,23 ^e	2,98 ^{bcd}	Chồi nhỏ, phát triển nhanh; lá và cuống lá nhỏ, xanh nhạt
0,1	1,0	7,70 ^f	3,53 ^f	2,81 ^{bc}	Chồi nhỏ, phát triển nhanh; lá và cuống lá nhỏ, xanh nhạt
0,2	1,0	5,63 ^d	2,43 ^b	2,17 ^a	Chồi to, phát triển chậm; lá không phát triển, cuống lá phình to ngắn, xanh đậm; phần gốc chồi phát sinh callus

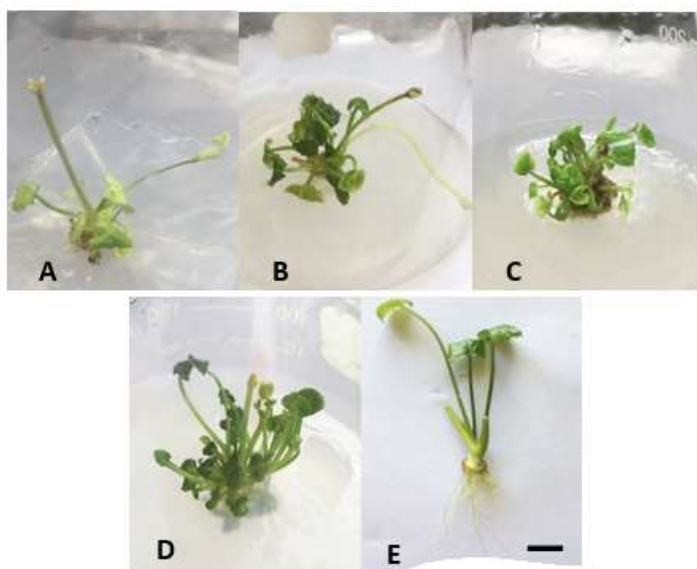
3.4 Tạo rễ

Chồi rau má *in vitro* khoẻ mạnh với 2–3 lá được cấy chuyển lên các môi trường ½ SH bổ sung 0–2,0 mg/L IBA để thăm dò khả năng tạo rễ. Kết quả trình bày ở Bảng 5 cho thấy, môi trường ½ SH cơ bản không bổ sung chất điều hòa sinh trưởng, chồi vẫn có khả năng tạo rễ với số rễ là 4,2 rễ/chồi. Môi trường bổ sung 1,5 mg/L IBA cho số rễ tạo thành nhiều nhất, 15,47 rễ/chồi. Tuy nhiên, ngoài tạo rễ, phần gốc chồi còn tạo các khối callus nhỏ xốp, màu trắng quanh gốc, các môi trường nồng độ IBA càng cao lượng callus tạo thành càng nhiều. Điều này sẽ làm ảnh hưởng đến chất lượng cây con và khả năng sống sót khi đưa ra trồng ở ngoài. Môi trường bổ sung 1 mg/L IBA cho khả năng tạo rễ tốt với số rễ tạo thành là 14,83 rễ/chồi; chồi sinh trưởng tốt, lá to, cuống lá dài; rễ nhỏ, thẳng dài, không phân nhánh, màu xanh vàng nhạt.

Do đó, chúng tôi chọn môi trường ½ SH bổ sung 1 mg/L IBA là môi trường tốt nhất cho sự tạo rễ của chồi *in vitro* rau má, không lựa chọn các công thức môi trường có nồng độ IBA cao. Theo Nath Tiwari và cs. [8], môi trường MS bổ sung 2 mg/L IBA tạo rễ tốt nhất với số rễ đạt 46,8 rễ/chồi, cây con sau đó được trồng ra vườn thành công. Trong nghiên cứu của chúng tôi, môi trường ½ SH bổ sung 2,0 mg/L IBA cho số rễ trung bình chỉ đạt 13,86 rễ/chồi. Sự khác biệt lớn trong nghiên cứu của Tiwari và nghiên cứu của chúng tôi có thể là do sự khác nhau về giống nuôi cấy và môi trường khoáng sử dụng. Theo Das và cs. [9], IBA ở nồng độ 1 mg/L thích hợp nhất cho sự tạo rễ từ chồi *in vitro* giống như kết quả của chúng tôi. Tuy nhiên, môi trường cơ bản mà các tác giả sử dụng là môi trường MS trong khi chúng tôi dùng môi trường ½ SH.

Bảng 5. Ảnh hưởng của IBA đến khả năng tạo rễ từ chồi *in vitro* sau 4 tuần nuôi cấy

Môi trường	IBA (mg/L)	Số rễ/mẫu (rễ)	Chiều dài rễ (cm)	Mô Tả
½ SH	0,0	4,20 ^a	2,08 ^a	Rễ nhỏ, ngắn, thẳng, không phân nhánh, màu trắng ngà; lá nhỏ, cuống lá ngắn
½ SH	0,25	6,23 ^b	3,22 ^b	Rễ nhỏ, dài, màu xanh nhạt; một số rễ có phân nhánh; lá to, cuống lá ngắn
½ SH	0,5	10,47 ^c	4,02 ^c	Rễ nhỏ, dài, màu xanh nhạt; một số rễ có phân nhánh; lá to, cuống lá dài
½ SH	1,0	14,83 ^d	4,40 ^c	Rễ nhỏ, thẳng dài, không phân nhánh, màu xanh vàng nhạt; lá to, cuống lá dài
½ SH	1,5	15,47 ^e	3,48 ^b	Rễ nhỏ, thẳng dài, màu vàng nhạt; lá to, cuống lá dài; phần gốc chồi tạo callus nhẹ màu trắng xốp
½ SH	2,0	13,86 ^d	3,37 ^b	Rễ nhỏ, thẳng dài, màu vàng; lá to, cuống lá dài; phần gốc chồi tạo callus màu trắng xốp



Hình 1. Sự phát sinh hình thái của cây rau má *in vitro* trên các môi trường nuôi cấy khác nhau

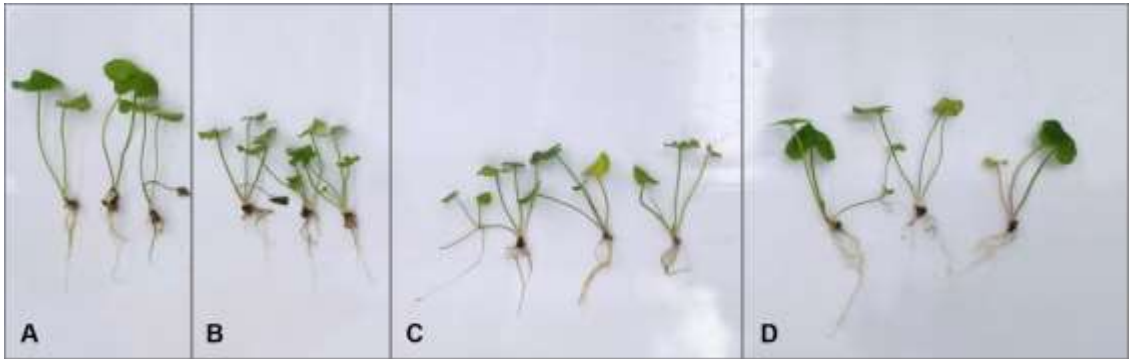
Chú thích: A: Chồi *in vitro* tái sinh từ mẫu tự nhiên trên môi trường MS + 1,0 mg/L BAP. B: Chồi *in vitro* tái sinh từ mẫu tự nhiên trên môi trường SH + 1,0 mg/L BAP. C: Cụm chồi hình thành trên môi trường SH + 2,0 mg/L BAP. D: Cụm chồi hình thành trên môi trường SH + 2,0 mg/L BAP + 0,1 mg/L TDZ + 1,0 mg/L KIN. E: Rễ hình thành từ chồi *in vitro* khi nuôi cấy trên môi trường ½ SH + 1,0 mg/L IBA (Bar: 1 cm).

3.5 Huấn luyện ra ngôi

Cây rau má *in vitro* khoẻ mạnh sau bốn tuần nuôi cấy trên môi trường tạo rễ, có số rễ đạt từ 8–12 rễ, 2–3 lá, chiều cao cuống lá từ 2–3 cm được đưa ra khỏi phòng nuôi 3–5 ngày để huấn luyện thích nghi sau đó được chuyển ra bầu với các loại giá thể khác nhau ở vườn ươm. Kết quả đánh giá sau bốn tuần cho thấy, giá thể cho kết quả tốt nhất là hỗn hợp 50% đất và 50% trấu, các chỉ số như số lá 3,17, chiều dài phiến lá 1,43 cm, chiều rộng phiến lá 2,44 cm, số rễ 14,33, chiều dài rễ 8,23 cm và tỷ lệ sống 92,24% đều có giá trị cao nhất và khác biệt có ý nghĩa

Bảng 6. Ảnh hưởng của giá thể đến sinh trưởng của cây rau má nuôi cấy mô

Công thức	Số lá/cây (lá)	Chiều dài phiến lá (cm)	Chiều rộng phiến lá (cm)	Chiều dài cuống lá (cm)	Số rễ/cây (rễ)	Chiều dài rễ (cm)	Tỷ lệ sống (%)
75 đất - 25 trấu	2,72 ^{ab}	1,16 ^a	1,80 ^a	3,53 ^a	7,67 ^a	6,77 ^{ab}	92,42
50 đất - 50 trấu	3,17 ^b	1,43 ^b	2,44 ^b	3,31 ^a	14,33 ^b	8,23 ^b	92,42
100 đất	2,28 ^a	1,16 ^a	1,96 ^a	3,77 ^{ab}	11,33 ^{ab}	5,37 ^a	87,88
50 đất - 50 cát	2,28 ^a	1,24 ^a	1,88 ^a	4,28 ^b	10,67 ^{ab}	5,37 ^a	90,91



Hình 2. Hình thái cây rau má sinh trưởng trên các loại giá thể khác nhau

Chú thích: A: 50% đất + 50% cát, B: 75% đất + 25% trấu hun, C: 100% đất thịt, D: 50% đất + 50% trấu hun.

với các công thức khác (chi tiết được trình bày ở Bảng 6). Ở công thức này, chiều dài cuống lá là chỉ tiêu duy nhất không đạt giá trị cao nhất. Tuy nhiên, để đánh giá tiềm năng năng suất thì các chỉ tiêu như số lá, diện tích lá,... lại đóng vai trò quan trọng hơn. Vì vậy, giá thể gồm 50% đất và 50% trấu được lựa chọn để ra ngôi cây rau má Quảng Thọ nuôi cấy mô.

Theo Das và cs. [9], cây con *in vitro* đã được cho thích nghi khí hậu và đem trồng thành công trong điều kiện tự nhiên với tỷ lệ sống sót 80%. Kumar và cs. đã nghiên cứu nhân giống cây rau má với nguồn vật liệu khởi đầu là lá. Cây con *in vitro* đã được chuyển ra đất thành công với giá thể là hỗn hợp vermiculite: cát: đất (1: 1: 1). Sau đó, cây con được trồng ở đồng ruộng với tỷ lệ sống là 78% [10]. So với các nghiên cứu đã công bố, nghiên cứu của chúng tôi có tỷ lệ sống ra ngôi cao hơn, với 92,42%.

4 Kết luận

Chúng tôi đã xây dựng thành công quy trình nhân giống *in vitro* cây rau má Quảng Thọ nhằm cung cấp cây giống sạch bệnh cho địa phương triển khai canh tác rau má theo hướng hữu cơ. Đỉnh chồi rau má tự nhiên khử trùng với HgCl_2 0,1% trong 8 phút cho kết quả tốt nhất với tỷ lệ mẫu sống không nhiễm đạt 66,67%. Môi trường SH bổ sung 1,0 mg/L BAP thích hợp nhất cho nuôi cấy khởi đầu với số chồi tái sinh là 3,37 chồi/mẫu. Môi trường tốt nhất cho quá trình nhân nhanh chồi là SH bổ sung 2 mg/L BAP kết hợp với 0,1 mg/L TDZ và 1 mg/L KIN, với số chồi tạo thành là 7,7 chồi/mẫu. Môi trường tạo rễ thích hợp nhất là môi trường $\frac{1}{2}$ SH bổ sung 1,0 mg/L IBA với số rễ tạo thành là 14,83 rễ/chồi. Giá thể cho kết quả tốt nhất đối với ra ngôi cây *in vitro* là hỗn hợp 50% đất và 50% trấu với tỷ lệ sống 92,24%.

Lời cảm ơn

Đây là kết quả của đề tài Khoa học và công nghệ cấp tỉnh (Mã số: TTH.2020-KC.09) được ngân sách nhà nước tỉnh Thừa Thiên Huế đầu tư.

Tài liệu tham khảo

1. Rosalizan, M. S., Rohani, M. Y., Khatijah, I., Shukri, M. A. (2008), Physical characteristics, nutrient contents and triterpene compounds of ratoon crops of *Centella asiatica* at three different stages of maturity, *Journal of Tropical Agriculture and Food Science*, 36(1), 43–51.
2. Đỗ Huy Bích (2006), *Cây thuốc và động vật làm thuốc ở Việt Nam*, Hà Nội: Nxb. Khoa học và kỹ thuật 2006.
3. Aziz, Z. A., Davey, M. R., Power, J. B., Anthony, P., Smith, R. M., Lowe, K. C. (2007), Production of asiaticoside and madecassoside in *Centella asiatica* *in vitro* and *in vivo*, *Biol Plant*, 51(1), 34–42. 10.1007/s10535-007-0008-x.
4. Loc, N. H., Nhat, N. T. D. (2013), Production of asiaticoside from centella (*Centella asiatica* L. Urban) cells in bioreactor, *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 3(10), 806–10.
5. Murashige, T., Skoog, F. (1962), A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures, *Physiologia Plantarum*, 15(3), 473–97. 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x.
6. Schenk, R. U. and Hildebrandt, A. C. (1972), Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures, *Canadian Journal of Botany*, 50, 199–204.
7. Guo, B., Abbasi, B., Zeb, A., Xu, L., Wei, Y. (2013), Thidiazuron: A multi-dimensional plant growth regulator, *African Journal of Biotechnology*, 10(45), 8984–9000.
8. Nath Tiwari, K., Chandra Sharma, N., Tiwari, V., Deo Singh, B. (2000), Micropropagation of *Centella asiatica* (L.), a valuable medicinal herb, *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 63(3), 179–85. 10.1023/A:1010690603095.
9. Das, R., Hasan Faruk, Md., Hossain, M. S., Rahman, M. (2013), Micropropagation of *Centella asiatica* L. An Important Medicinal Herb, *Progressive Agriculture*, 19, 51–6.
10. Kumar, M. S. (2017), Rapid *in Vitro* Multiplication of *Centella asiatica* (L.) Urban. Through Multiple Shoots from Leaf explants, *European Journal of Biotechnology and Bioscience*, 5, 41–7.