

VI NHÂN GIỐNG CÂY GIÁO CỔ LAM (*GYNOSTEMMA PENTAPHYLLUM*) BẰNG KỸ THUẬT NUÔI CÂY ĐÓT THÂN

Phạm Cao Khải¹, Trần Văn Minh^{2, ✉}

¹Trung tâm Nghiên cứu và Phát triển Nông nghiệp công nghệ cao, Khu Nông nghiệp công nghệ cao thành phố Hồ Chí Minh

²Trường Đại học Quốc tế, Đại học Quốc gia thành phố Hồ Chí Minh

✉ Người chịu trách nhiệm liên lạc. E-mail: drminh.ptntd@yahoo.com

Ngày nhận bài: 05.4.2016

Ngày nhận đăng: 15.4.2018

TÓM TẮT

Giáo cổ lam (*Gynostemma pentaphyllum*) là một cây thuốc quý hiếm, đã được dân gian sử dụng trong thời gian dài trong điều trị bệnh. Theo các nghiên cứu y học hiện đại, Giáo cổ lam thể hiện nhiều thuộc tính dược học như: kháng viêm, chống oxy hóa, điều hòa chuyển hóa lipid, ức chế khối u, bảo vệ thần kinh, chống căng thẳng. Tuy nhiên, vấn đề bảo tồn và khai thác loài dược liệu này vẫn chưa được quản lý chặt chẽ và việc ứng dụng công nghệ sinh học trong nghiên cứu loài cây này vẫn còn khá hạn chế. Ứng dụng công nghệ tế bào trong bảo tồn và phát triển loài cây dược liệu quý hiếm này mang tính cấp thiết. Đốt thân Giáo cổ lam được khử trùng bằng dung dịch javel pha loãng với nước cất theo tỷ lệ 50% trong 20 min cho tỷ lệ mẫu cấy vô trùng đạt cao nhất (73,33%). Các chồi đỉnh và khúc cắt thân *in vitro* được cấy trên môi trường MS bổ sung BA (0,1; 0,5; 1,0; 1;5; 2,0 mg/L) kết hợp NAA (0; 0,1; 0,2; 0,3 mg/L). Sau 6 tuần nuôi cấy, các chồi mới tái sinh và môi trường bổ sung 1,0 mg/L BA và 0,1 mg/L NAA cho số chồi cao nhất (6,8 chồi/mẫu cấy). Để xác định môi trường khoáng phù hợp cho sự sinh trưởng của chồi Giáo cổ lam, các chồi tái sinh được cấy trên các môi trường khoáng khác nhau và kết quả tốt nhất thu được trên môi trường MS 1/2 với chiều cao và số lá lần lượt đạt 5,2 cm và 4 lá. Đối với sự tạo rễ, môi trường MS 1/2 bổ sung 0,25 mg/L IBA cho chiều dài rễ 7,6 cm. Kết quả này có thể được sử dụng cho việc nhân nhanh cây Giáo cổ lam trên quy mô lớn bằng kỹ thuật nuôi cấy mô.

Từ khóa: Cây dược liệu, Giáo cổ lam, nhân giống *in vitro*, tăng sinh chồi

MỞ ĐẦU

Loài Giáo cổ lam (*Gynostemma pentaphyllum*) được biết đến là loại thảo dược nổi tiếng từ lâu đời bởi đặc tính chống căng thẳng giúp khôi phục sự cân bằng của cơ thể và cải thiện trí nhớ. Giáo cổ lam chứa hơn 100 loại saponin cấu trúc triterpen kiểu damaran, trong đó có 4 saponin có cấu trúc giống và 11 saponin gần giống với nhân sâm và tam thất. Saponin của Giáo cổ lam nhiều gấp 3 - 4 lần so với saponin của nhân sâm. Ngoài ra, Giáo cổ lam có chứa nhiều vitamin, các chất khoáng, nguyên tố vi lượng, amino acid và protein (Razmovski-Naumovski *et al.*, 2005; Huang *et al.*, 2008). Theo Phan Văn Kiểm và đồng tác giả (2009), Giáo cổ lam có tác dụng tăng cường chuyển hóa lipid giúp ổn định mức cholesterol trong máu và làm giảm béo hiệu quả; bình ổn huyết áp, chống huyết khối, ngăn ngừa biến chứng tim mạch, não, chống lão hóa, ngăn

ngừa stress, giúp ăn ngon miệng, ngủ ngon giấc. Ngoài ra, Giáo cổ lam làm tăng khả năng miễn dịch và nâng cao sức đề kháng của cơ thể, có tác dụng kìm hãm sự phát triển của khối u một cách rõ rệt (Blumert, Liu, 1999).

Kết quả nghiên cứu phối hợp giữa các nhà khoa học của Viện Dược liệu (Việt Nam) và Viện Karolinska (Thụy Điển) về cây Giáo cổ lam Việt Nam đã tìm thấy một hoạt chất mới được đặt tên là phanoside. Chất này có tác dụng hạ đường huyết mạnh đồng thời kích thích tụy tăng tiết insulin và làm tăng sự nhạy cảm của tế bào đích với insulin (Norberg *et al.*, 2004). Ngoài ra, Phan Văn Kiểm *et al.*, (2009) tại Hàn Quốc đã chiết tách được thành phần hoạt chất gypenosides trong cây Giáo cổ lam Việt Nam và thử nghiệm trên khối u phổi, đại tràng, vú, tử cung, tiền liệt tuyến cho kết quả rất tốt. Hoạt chất mới này có khả năng kìm hãm và tiêu diệt các tế

bào ung thư nói trên đồng thời nâng cao hệ miễn dịch của cơ thể.

Với nhiều đặc tính dược học có giá trị nên Giảo cổ lam được khai thác quá mức làm nguyên liệu trong sản xuất thuốc và thực phẩm chức năng. Đã có một số nghiên cứu về nhân giống Giảo cổ lam ứng dụng các kỹ thuật truyền thống như giâm hom, gieo hạt...nhưng hệ số nhân giống và độ đồng đều thấp. Kỹ thuật nuôi cấy mô thực vật đóng vai trò quan trọng trong việc bảo tồn và nhân giống các loại cây trồng, đặc biệt là cây dược liệu có giá trị. Một số nghiên cứu nhân giống *in vitro* cây Giảo cổ lam đã xác định môi trường MS bổ sung BA kết hợp với NAA, IAA hoặc kinetine là thích hợp cho sự tạo và nhân nhanh chồi; môi trường MS bổ sung IBA hoặc NAA là thích hợp cho sự hình thành rễ (Zhang *et al.*, 1989; Shi, 2007; Bùi Đình Lãm *et al.*, 2015). Tuy nhiên, hệ số nhân chồi còn thấp, khả năng sống sót ở giai đoạn hậu nuôi cấy mô chưa được đánh giá. Nghiên cứu này nhằm mục tiêu hoàn thiện quy trình kỹ thuật vi nhân giống cây Giảo cổ lam, là một nguồn dược liệu quý để sản xuất nguyên liệu thuốc.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu

Các đốt thân của cây Giảo cổ lam 1 năm tuổi, có xuất xứ từ Lạng Sơn di thực trồng tại Củ Chi, thành phố Hồ Chí Minh.

Môi trường sử dụng thành phần gồm: Khoáng đa, vi lượng MS (Murashige, Skoog, 1962), vitamin, đường sucrose, agar, BA (benzyl aminopurin), NAA (naphthalenetic acid) và IBA (indolbutyric acid). Môi trường được điều chỉnh pH 5,8 trước khi hấp khử trùng ở 121°C, 1 atm trong 20 min.

Điều kiện thí nghiệm: Chiếu sáng 16 h/ngày, cường độ ánh sáng 2.000 lux, nhiệt độ phòng 24 ± 2°C; độ ẩm trung bình: 75 - 80%.

Phương pháp

Thí nghiệm, được bố trí theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên (randomized complete design), lặp lại 3 lần, mỗi nghiệm thức bố trí 5 bình cấy, mỗi bình nuôi cấy 3 mẫu. Số liệu được ghi nhận sau 6 tuần nuôi cấy và xử lý bằng phần mềm MSTATC.

Thiết kế thí nghiệm

Thí nghiệm 1. Ảnh hưởng của nồng độ chất khử trùng javel và thời gian khử trùng đến tỷ lệ mẫu sống vô trùng

Các đốt thân khô, dài 3 cm được đưa vào tủ cấy lắc nhẹ với nước rửa chén pha loãng trong 10 min, sau đó rửa lại 3 - 4 lần với nước cất vô trùng. Tiếp theo lắc nhẹ với cồn 70° trong 1 min, rửa sạch và lắc với dung dịch javel pha loãng với nước cất vô trùng ở các nồng độ khác nhau (50% và 100%) trong các khoảng thời gian khác nhau (10, 15 và 20 min) và rửa lại 3 - 4 lần bằng nước cất vô trùng. Các đốt thân sau khi khử trùng sẽ được cắt bỏ phần bị chết hoại có kích thước 1,0 - 1,5 cm và cấy trên môi trường MS không chứa chất điều hòa sinh trưởng. Các nghiệm thức khử trùng mẫu được bố trí theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên, lặp lại 3 lần. Thí nghiệm gồm 6 nghiệm thức, mỗi nghiệm thức bố trí 5 bình cấy. Chỉ tiêu theo dõi là tỷ lệ mẫu sống vô trùng (%) được ghi nhận sau 2 tuần nuôi cấy.

Thí nghiệm 2. Khảo sát ảnh hưởng của các nồng độ BA và NAA lên sự nhân chồi

Các đốt thân in vitro khoảng 1,5-2 cm được cấy trên môi trường MS bổ sung đường 20 g/L, agar 8 g/L, BA (0,1; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 mg/L) kết hợp với NAA (0; 0,1; 0,2; 0,3 mg/L). Thí nghiệm được bố trí theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên, lặp lại 3 lần, gồm 20 nghiệm thức, mỗi nghiệm thức cấy 5 bình. Chỉ tiêu theo dõi là tỷ lệ mẫu tạo chồi (%), số chồi/ mẫu được ghi nhận sau 6 tuần nuôi cấy.

Thí nghiệm 3. Khảo sát ảnh hưởng môi trường khoáng đến khả năng sinh trưởng của chồi Giảo cổ lam

Chồi Giảo cổ lam in vitro có kích thước đồng nhất khoảng 2 cm được cấy vào môi trường với các thành phần khoáng khác nhau gồm: MS, MS ½ (1/2 khoáng đa lượng), ½ MS (1/2 khoáng đa lượng và vi lượng), KC (Knudson C) và bổ sung đường 20 g/L, agar 8 g/L. Thí nghiệm gồm 4 nghiệm thức, được bố trí theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên, lặp lại 3 lần, mỗi nghiệm thức bố trí 5 bình cấy. Chỉ tiêu theo dõi là chiều cao cây (cm) và số lá (cái) được ghi nhận sau 6 tuần nuôi cấy.

Thí nghiệm 4. Khảo sát ảnh hưởng của các nồng độ IBA đến sự ra rễ của cây

Các chồi Giảo cổ lam có kích thước đồng nhất khoảng 2 cm được cấy vào môi trường khoáng tốt nhất (khảo sát ở Thí nghiệm 3) có bổ sung đường 20 g/L, agar 8 g/L và IBA (0; 0,25; 0,5; 1,0 mg/L). Thí nghiệm gồm 4 nghiệm thức, được bố trí theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên, lặp lại 3 lần, mỗi nghiệm thức bố trí 5 bình cấy. Chỉ tiêu theo dõi là chiều dài rễ (cm) và số rễ (cái) được ghi nhận sau 6 tuần nuôi cấy.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Ảnh hưởng của nồng độ chất khử trùng javel và thời gian khử trùng đến tỷ lệ mẫu sống vô trùng

Khử trùng mẫu bằng javel (50% và 100%) trong 3 khoảng thời gian 10 min, 15 min và 20 min, cho tỷ lệ mẫu sống vô trùng đạt từ 0 - 73,33%. Mẫu được khử trùng với dung dịch javel ở nồng độ 50% trong

thời gian 20 min cho tỉ lệ mẫu chết thấp nhất (26,67%) và tỉ lệ mẫu sống vô trùng đạt cao nhất (73,33%) so với các nghiệm thức khác (Bảng 1). Dung dịch javel thương mại (có thành phần hoạt chất hypochlorite - Na 5%) thích hợp dùng để khử trùng các loài nấm và một phần khuẩn xâm nhập trên bề mặt và mô của mẫu cây. Khử trùng mẫu ở nồng độ javel 50% trong 20 min thích hợp cho các mẫu thân cắt khúc của cây Giảo cổ lam.

Bảng 1. Ảnh hưởng của nồng độ javel và thời gian khử trùng đến tỷ lệ mẫu sống vô trùng.

Nồng độ Javel	Thời gian khử trùng (min)	Tỷ lệ mẫu sống vô trùng (%)
50%	10	20,00 ^{bc}
	15	60,00 ^{ab}
	20	73,33 ^a
100%	10	20,00 ^{bc}
	15	6,67 ^c
	20	0,00 ^c
CV (%)		7,536

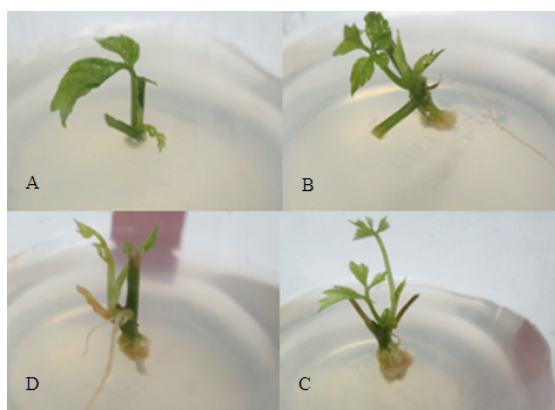
Ghi chú: Trong cùng 1 cột, các chữ số có cùng ký tự theo sau khác biệt không có ý nghĩa về mặt thống kê.

Ảnh hưởng của các nồng độ BA và NAA lên sự nhân chồi Giảo cổ lam

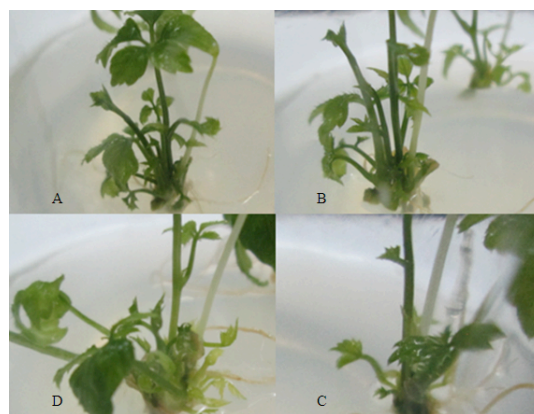
Các đốt thân mang chồi *in vitro* được nuôi cấy trên môi trường MS bổ sung BA kết hợp NAA ở các nồng độ khác nhau cho thấy: Tất cả các nghiệm thức bổ sung chất điều hòa sinh trưởng đều cảm ứng tạo chồi, sau đó mô sẹo và rễ hình thành ở tuần nuôi cấy thứ 3. Số chồi trung bình trên mẫu phát sinh cao nhất (6,8 chồi/mẫu) ở nghiệm thức có bổ sung 1,0 mg/L BA kết hợp với 0,1 mg/L NAA (Bảng 2) (Hình 1, 2). Ở nghiệm thức này, mẫu phát sinh rễ và mô sẹo ít

hơn so với các nghiệm thức còn lại.

Kết quả này tương tự nghiên cứu của Zhang *et al.*, (1989) về nồng độ BA, các đốt thân mang chồi của cây Giảo cổ lam cảm ứng tạo chồi tốt nhất trên môi trường MS có bổ sung BA 1,0 mg/L và IAA 0,05 mg/L. Theo kết quả nghiên cứu của Bùi Đình Lâm *et al.*, (2015), nhân giống *in vitro* cây Giảo cổ lam tốt nhất trên môi trường MS bổ sung kinetine 0,4 mg/L và BA 0,5 mg/L cho hệ số nhân nhanh chồi đạt 4,36 lần; tuy nhiên hệ số nhân chồi thấp hơn so với nghiên cứu này.



Hình 1. Sự cảm ứng của các đốt thân Giảo cổ lam trên các môi trường có bổ sung BA kết hợp NAA ở các nồng độ khác nhau sau 2 tuần nuôi cấy. (A) Đối chứng; (B) BA 1 mg/L + NAA 0,1 mg/L; (C) BA 1 mg/L + NAA 0,3 mg/L; (D) BA 2 mg/L + NAA 0,1 mg/L.



Hình 2. Sự cảm ứng của các đốt thân Giảo cổ lam trên các môi trường có bổ sung BA kết hợp NAA ở các nồng độ khác nhau sau 6 tuần nuôi cấy. (A) BA 1 mg/L + NAA 0,1 mg/L; (B) BA 1,5 mg/L + NAA 0,1 mg/L; (C) BA 1,5 mg/L + NAA 0,2 mg/L; (D) BA 2 mg/L + NAA 0,3 mg/L.

Bảng 2. Ảnh hưởng của BA và NAA đến sự nhân chồi Giảo cổ lam.

NAA	BA	Tỷ lệ mẫu tạo chồi (%)	Số chồi (chồi/mẫu)
0	0,1	49,7 ^{fg}	1,0 ^{ij}
0	0,5	86,3 ^{bc}	4,2 ^{cd}
0	1,0	80,3 ^d	3,0 ^e
0	1,5	53,3 ^f	2,7 ^e
0	2,0	41,7 ^{hi}	0,6 ^{ij}
0,1	0,1	39,7 ^{ij}	0,6 ^{ij}
0,1	0,5	96,3 ^a	4,4 ^c
0,1	1,0	100,0^a	6,8^a
0,1	1,5	78,7 ^d	3,0 ^e
0,1	2,0	51,3 ^{fg}	1,5 ^{gh}
0,2	0,1	35,7 ^j	0,5 ^j
0,2	0,5	76,3 ^d	3,0 ^e
0,2	1,0	80,0 ^d	3,8 ^d
0,2	1,5	88,7 ^b	5,2 ^b
0,2	2,0	49,3 ^{fg}	1,8 ^{fg}
0,3	0,1	45,7 ^{gh}	1,1 ^{hi}
0,3	0,5	46,3 ^{gh}	2,7 ^e
0,3	1,0	78,0 ^d	3,2 ^e
0,3	1,5	80,7 ^{cd}	5,4 ^b
0,3	2,0	59,3 ^e	2,2 ^f
CV (%)		3,95	7,48

Ghi chú: Trong cùng 1 cột, các chữ số có cùng ký tự theo sau khác biệt không có ý nghĩa về mặt thống kê.

Ảnh hưởng môi trường khoáng đến khả năng sinh trưởng của chồi Giảo cổ lam

Thí nghiệm được tiến hành bằng cách chọn chồi cao khoảng 2 cm và cấy trên các môi trường thí nghiệm, sau 6 tuần nuôi cấy những kết quả thu thập được trình bày ở bảng 3.

Ở nghiệm thức M1, chiều cao cây và số lá trung bình của chồi Giảo cổ lam nuôi cấy trên môi trường khoáng MS ½ đạt cao nhất cao nhất (5,2 cm, 4

lá/cây), cây khỏe và lá phát triển. Chiều cao cây và số lá trung bình đạt thấp nhất ở nghiệm thức M0 với môi trường khoáng MS cho thân mảnh và phát sinh mô sẹo. Các nghiên cứu trên cây dưa lê đã xác định môi trường tăng trưởng tối ưu là môi trường ½ MS không bổ sung chất điều hòa sinh trưởng thực vật cho tỉ lệ sống ngoài vườn ươm lên đến 100% (Wei *et al.*, 2005; Huijun *et al.*, 2011). Tuy nhiên, trong nghiên cứu này môi trường MS ½ là phù hợp cho sự sinh trưởng của chồi Giảo cổ lam.

Bảng 3. Ảnh hưởng môi trường khoáng đến khả năng sinh trưởng của chồi *in vitro*.

NT	Môi trường khoáng	Chiều cao cây (cm)	Số lá
M0	MS	3,4 ^b	2,8 ^b
M1	MS 1/2	5,2^a	4,0^a
M2	1/2 MS	4,8 ^{ab}	3,3 ^{ab}
M3	KC	4,0 ^b	2,7 ^b
CV (%)		4,20	4,54

Ghi chú: Trong cùng 1 cột, các chữ số có cùng ký tự theo sau khác biệt không có ý nghĩa về mặt thống kê.

Ảnh hưởng của các nồng độ IBA đến sự ra rễ của cây

Thí nghiệm được tiến hành bằng cách chọn các cây con cao khoảng 2 cm và nuôi cây trên các môi trường thí nghiệm, kết quả sau 6 tuần nuôi cây được thể hiện qua bảng 5: chiều dài rễ và số rễ

trung bình cao nhất ở nghiệm thức R1 (7,6 cm; 6,4 rễ/cây). Số rễ và chiều dài rễ ở nghiệm thức không bổ sung IBA thấp hơn ở các nghiệm thức có bổ sung IBA ở nồng độ 0,25 mg/L và 0,5 mg/L. Tuy nhiên, nghiệm thức có bổ sung IBA ở nồng độ cao hơn (1,0 mg/L) thì số rễ và chiều dài rễ thấp hơn đối chứng.

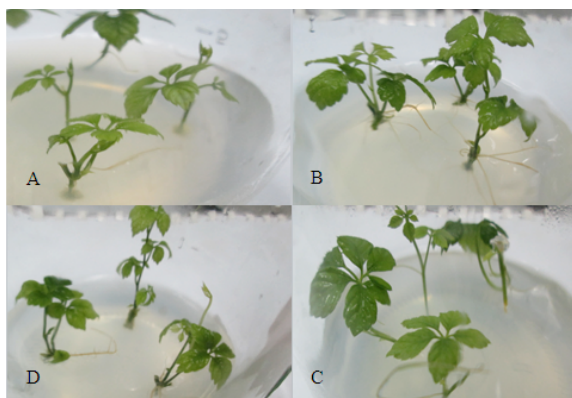
Bảng 4. Ảnh hưởng của các nồng độ IBA đến sự ra rễ của cây Giảo cổ lam *in vitro*.

NT	Nồng độ IBA (mg/L)	Chiều dài rễ (cm)	Số rễ
R0	0,00	4,5 ^c	3,2 ^c
R1	0,25	7,6^a	6,4^a
R2	0,50	5,4 ^{ab}	5,2 ^{ab}
R3	1,00	4,2 ^c	2,8 ^c
CV (%)		6,61	10,07

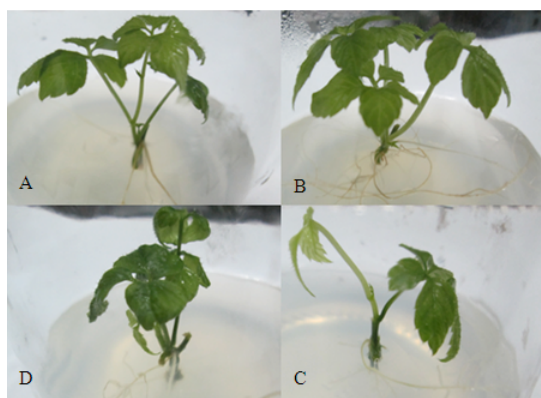
Ghi chú: Trong cùng 1 cột, các chữ số có cùng ký tự theo sau khác biệt không có ý nghĩa về mặt thống kê.

Theo Zhang *et al.*, (1989), Wang *et al.*, (1992), các chồi được nuôi cấy trên môi trường ½ MS có bổ sung IBA 1 mg/L là phù hợp cho sự hình thành rễ. Một nghiên cứu khác của Bùi Đình Lâm *et al.*, (2015), môi trường thích hợp là MS bổ sung IBA 0,1 mg/L cho tỷ lệ ra rễ của cây Giảo cổ lam đạt 100%,

số rễ/chồi đạt 4,16 rễ. Các nghiên cứu trên cho thấy sự kết hợp các chất điều hòa sinh trưởng khác nhau ảnh hưởng đến sự hình thành rễ của cây Giảo cổ lam. Trong nghiên cứu này, môi trường MS ½ bổ sung IBA ở nồng độ 0,25 mg/L cho số rễ và chiều dài rễ cao hơn so với các báo cáo trước.



Hình 3. Sự sinh trưởng của các chồi Giảo cổ lam trên các môi trường bổ sung khác nhau. (A) MS, (B) MS 1/2, (C) 1/2 MS, (D) KC.



Hình 4. Sự cảm ứng tạo rễ của các chồi Giảo cổ lam trên các môi trường bổ sung IBA ở các nồng độ khác nhau. (A) Đối chứng; (B) IBA 0,25 mg/L; (C) IBA 0,5 mg/L; (D) IBA 1,0 mg/L.

KẾT LUẬN

Nồng độ Javel 50% và thời gian khử trùng trong 20 min là hiệu quả nhất để vô trùng mẫu với tỷ lệ mẫu sống vô trùng đạt 73,33%. Môi trường hiệu quả nhất cho sự phát sinh và tăng sinh chồi Giảo cổ lam (6,8 chồi/mẫu) là môi trường MS có bổ sung 1 mg/L BA và 0,1 mg/L NAA. Môi trường hiệu quả nhất cho sự phát triển của chồi Giảo cổ lam là môi trường MS

½ với chiều cao cây là 5,2 cm và số lá là 4,0 lá/chồi. Môi trường hiệu quả nhất cho sự ra rễ của chồi Giảo cổ lam *in vitro* là môi trường MS ½ có bổ sung 0,25 mg/L IBA với 6,4 rễ/cây và chiều dài rễ đạt 7,6 cm.

Lời cảm ơn: Xin chân thành cảm ơn Trung tâm Nghiên cứu và Phát triển Nông nghiệp Công nghệ cao đã tạo điều kiện về cơ sở vật chất, trang thiết bị, hóa chất, vật tư để hoàn thành tốt nội dung nghiên cứu này

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Blumert M, Liu JL (1999) *Jiaogulan China's "Immortality" Herb*, Torchlight Publishing Inc., Badger, USA.
- Bùi Đình Lâm, Nguyễn Thị Tình, Nguyễn Văn Duy, Nguyễn Văn Bảo, Lê Văn Hiền, Ngô Xuân Bình Trường (2015) Nghiên cứu khả năng nhân giống cây Giảo cổ lam (*Gynostemma pentaphyllum* Thunb) bằng phương pháp *in vitro*. *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn* 21(7): 249–256.
- Huang SC, Hung CF, Wu WB, Chen BH (2008) Determination of chlorophylls and their derivatives in *Gynostemma pentaphyllum* Makino by liquid chromatography–mass spectrometry. *Pharma Biomed Anal* 48(1): 105–112.
- Huijun Z, Gao P, Luan F (2011) Efficient plant regeneration from cotyledonary node explants of *Cucumis melo* L. *Afr Biotechnol* 10(35): 6757–6761.
- Norberg A, Hoa NK, Liepinsh E, Van Phan D, Thuan ND, Jornvall H, Sillard R, Ostenson CG (2004) A novel insulin-releasing substance, phanoside, from the plant *Gynostemma pentaphyllum*. *Biol Chem* 279(40): 41361–41367.
- Phan Văn Kiệt, Phạm Thanh Kỳ, Phạm Thanh Hương, Phan Kiều My, Phạm Tuấn Anh, Châu Văn Minh, Nguyễn Xuân Cường, Nguyễn Xuân Nhiệm, Jae-Hee Hyun, Hee-Kyoung Kang, Young Ho Kim (2009) Phân lập và hoạt tính độc tế bào của các saponin dạng dammarane từ cây Giảo cổ lam (*Gynostemma pentaphyllum*). *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Việt Nam* 72A: 71–78.
- Razmovski-Naumovski V, Huang T, Tran V, Li G, Duke C, Roufogalis B (2005) Chemistry and pharmacology of *Gynostemma pentaphyllum*. *Phytochem Rev* 4(2): 197–219.
- Shi XG (2007) Fast propagation and polyploidy induction of *Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.) Makino. *Thesis of Master*. Southwestern University, Texas, USA.
- Wei X, Wei J, Jiang Y, Tang H, Li F, Ye W (2005) Study on the cultivation of *Gynostemma pentaphyllum* with plantlets of tissue culture. *Guangxi Acad Sci* 2: 253–261.
- Wang L, Yang M, Li K (1992) Tissue culture and cytohistology studies in *Gynostemma pentaphyllum* (Thunb) Makino. *Beijing Univ* 1: 149–158.
- Zhang ZH, Liu H, Zhao LH, Han XZ (1989) Clonal propagation of *Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.) Makino in test tubes. *Chinese Mat Med* 4(6): 335–336.

MICROPROPAGATION OF *GYNOSTEMMA PENTAPHYLLUM* BY INTERNODE CULTURE TECHNIQUESPhạm Cao Khải¹, Trần Văn Minh²¹Research and Development Center for High-Tech Agriculture, Agricultural High-Tech Park of Ho Chi Minh City²International University, Vietnam National University Ho Chi Minh City

SUMMARY

Gynostemma pentaphyllum is a rarely valuable medicinal plant that people has been traditionally used for disease treatment in a long time. The modern medical studies have also shown that it exhibits a variety of pharmacological properties including anti-inflammatory, antioxidative, lipid metabolism regulatory, antiproliferative, neuroprotective and anxiolytic activities. However, conservation and exploiting this medicinal plant were not managed properly and studies of biotechnology on this medicinal plant were till limited. Therefore, the application of plant cell biotechnology in conservation and development of *G. pentaphyllum* is necessary. The internode segments of *G. pentaphyllum* were sterilized with diluted solution of javel (50%) for 20 minutes. The rate of sterile explants reached to 73.33%. *In vitro* shoots tips and cutting stem segments of *G. pentaphyllum* were used as explants and cultured on MS medium supplemented with BA (0.1; 0.5; 1.0; 1.5; 2.0 mg/L) combined with NAA (0; 0.1; 0.2; 0.3 mg/L) for shoot proliferation. After 6 weeks, new shoots were generated and the MS medium containing 1.0 mg/L BA and 0.1 mg/L NAA gave the highest shoot induction (6.8 shoots/explant). To determine the mineral media suitable for growth of *G. pentaphyllum*, regenerated shoots were cultured on different mineral media. The MS ½ medium was suitable for growth of shoots with 5.2 cm height and 4.0 leaves/plantlet. For root induction, the MS ½ medium supplemented with 0.25 mg/L IBA was optimal, the root length could be in 7.6 cm in this medium. This system could be utilized for large-scale multiplication of *G. pentaphyllum*.

Keywords: *Gynostemma pentaphyllum*, multiplication of *G. pentaphyllum*, medicinal plant, shoot proliferation