



DOI:10.22144/ctujos.2026.207

NHÂN GIỐNG IN VITRO CÂY BÌM BỊP (*Clinacanthus nutans* (Burm. F.) Lindau)

Nguyễn Văn Ấy¹, Trần Nguyễn Phương Nguyên², Lê Thị Mỹ Hạnh³ và Trần Ngọc Quý^{4,*}

¹Trường Nông nghiệp, Đại học Cần Thơ, Việt Nam

²Trung tâm Nghiên cứu - Phát triển, Tổng Công ty Phân bón Dầu khí Cà Mau, Việt Nam

³Trường Cao Đẳng Y tế Tiền Giang, Việt Nam

⁴Viện Công nghệ Sinh học và Thực phẩm, Đại học Cần Thơ, Việt Nam

*Tác giả liên hệ (Corresponding author): tnquy@ctu.edu.vn

Thông tin chung (Article Information)

Nhận bài (Received): 09/06/2026

Sửa bài (Revised): 03/07/2026

Duyệt đăng (Accepted): 22/08/2026

Title: In vitro propagation of *Clinacanthus nutans* (Burm. f.) Lindau

Author(s): Nguyen Van Ay¹, Nguyen Phuong Nguyen², Le Thi My Hanh³ and Tran Ngoc Quy^{4,*}

Affiliation(s): ¹College of Agriculture, Can Tho University, Viet Nam;

²Research and Development Center, Petrovietnam Ca Mau Fertilizer Corporation, Viet Nam;

³College of Tien Giang Medical, Viet Nam;

⁴Institute of Food and Biotechnology, Can Tho University, Viet Nam

TÓM TẮT

Nghiên cứu được thực hiện nhằm xác định môi trường nhân giống in vitro cây bìm bịp phục vụ bảo tồn và phát triển nguồn dược liệu có giá trị. Nghiên cứu gồm ba nội dung chính: khảo sát ảnh hưởng của Benzyl adenine (BA) đến sự phát sinh chồi, đánh giá tác động của α -Naphthalene acetic acid (NAA) kết hợp than hoạt tính đến khả năng hình thành rễ và xác định giá thể thích hợp cho cây con ex vitro. Kết quả cho thấy môi trường MS bổ sung BA ở nồng độ 0,5 - 0,75 mg/L kết hợp NAA 0,05 mg/L cho hiệu quả nhân chồi cao, đạt 3,78 - 4,00 chồi/mẫu sau 8 tuần nuôi cấy. Trong giai đoạn tạo rễ, môi trường MS bổ sung NAA 0,5 mg/L kết hợp than hoạt tính 2 g/L cho tỷ lệ ra rễ đạt 100% sau 4 tuần. Cây con sau thuần dưỡng trong nhà lưới đạt tỷ lệ sống 93,33%, sinh trưởng tốt và thích nghi tốt với trong điều kiện đất + tro trấu (1:1). Về mặt lý thuyết, một chồi in vitro ban đầu sau một năm được nhân giống bằng kỹ thuật nuôi cấy mô có thể tạo ra trung bình từ 5.200 đến 7.600 cây con.

Từ khóa: BA, cây bìm bịp, *Clinacanthus nutans*, ex vitro, NAA

ABSTRACT

The study was conducted to develop an efficient propagation protocol for the conservation and development of this valuable medicinal plant. The study consisted of three main objectives: evaluating the effect of Benzyl adenine BA on shoot induction, assessing the influence of α -Naphthalene acetic acid (NAA) combined with activated charcoal on root formation, and determining suitable substrates for ex vitro plantlets. Results indicated that MS medium supplemented with 0.5 - 0.75 mg/L BA combined with 0.05 mg/L NAA produced the highest shoot multiplication rate, with 3.78 - 4.00 shoots per explant after 8 weeks of culture. For rooting, MS medium supplemented with 0.5 mg/L NAA and 0 - 2 g/L activated charcoal achieved 100% rooting after 4 weeks. Acclimatized plantlets grown under greenhouse conditions exhibited a 93.33% survival rate, vigorous growth, and good adaptation. Hypothetically, one original explant can produce 5.200 - 7.600 plantlets within one year.

Keywords: Acclimatization, BA, *Clinacanthus nutans*, ex vitro plantlets, NAA

1. GIỚI THIỆU

Trong những năm gần đây, nhu cầu sử dụng dược liệu có nguồn gốc thực vật ngày càng gia tăng do xu hướng ưu tiên các sản phẩm tự nhiên, an toàn và có giá trị sinh học cao. Nhiều loài cây dược liệu đã và đang được nghiên cứu nhằm khai thác các hợp chất có hoạt tính sinh học phục vụ cho y học và công nghiệp dược phẩm. Đặc biệt, khu vực nhiệt đới là nguồn tài nguyên phong phú về các loài thực vật có giá trị dược liệu nhờ điều kiện sinh thái thuận lợi cho sinh trưởng và tích lũy các hợp chất thứ cấp. Bìm bịp (*Clinacanthus nutans* (Burm.f.) Lindau), thuộc họ Ô rô (*Acanthaceae*), là loài cây dược liệu được sử dụng phổ biến ở nhiều quốc gia Đông Nam Á (Zulkipli et al., 2017). Các nghiên cứu đã ghi nhận sự hiện diện của nhiều hợp chất sinh học quan trọng như flavonoid, phenolic, triterpen và các glucoside chứa sulfur, góp phần tạo nên các hoạt tính chống viêm, kháng khuẩn, kháng virus và chống oxy hóa (Arullappan et al., 2014; Alam et al., 2016; Linh và ctv., 2019). Ngoài ra, dịch được chiết từ cây bìm bịp còn được báo cáo có tiềm năng hỗ trợ điều trị bệnh ngoài da, đái tháo đường, nhiễm virus herpes và một số bệnh ung thư. Do đó, nhu cầu sử dụng và phát triển nguồn nguyên liệu cây bìm bịp ngày càng tăng.

Hiện nay, cây bìm bịp chủ yếu được nhân giống bằng giâm cành hoặc gieo hạt (Chen et al., 2015). Tuy nhiên, các phương pháp này thường có hệ số nhân thấp, chất lượng cây giống không đồng đều và tiềm ẩn nguy cơ lây truyền mầm bệnh từ cây mẹ. Bên cạnh đó, việc khai thác nguồn cây từ tự nhiên trong thời gian dài có thể làm suy giảm nguồn gen và ảnh hưởng đến khả năng phát triển bền vững của loài (Debergh & Zimmerman, 1991). Trong bối cảnh đó, kỹ thuật nuôi cấy mô thực vật được xem là giải pháp hiệu quả nhằm tạo nguồn cây giống sạch bệnh, đồng nhất và có khả năng nhân nhanh với số lượng lớn. Vì vậy, việc xây dựng quy trình nhân giống *in vitro* cây bìm bịp là cần thiết, góp phần bảo tồn nguồn gen và cung cấp nguồn vật liệu phục vụ sản xuất dược liệu theo hướng bền vững.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Phương tiện

2.1.1. Địa điểm và thời gian thí nghiệm

Các thí nghiệm được thực hiện tại Phòng thí nghiệm Công nghệ mô và tế bào thực vật (nhiệt độ $25 \pm 2^\circ\text{C}$, độ ẩm 68 - 72%, cường độ sáng 1.500 - 2.000 lux, thời gian chiếu sáng là 16 giờ/ngày) thuộc Khoa Sinh lý - Sinh hóa, Trường Nông nghiệp, Đại

học Cần Thơ. Nghiên cứu được thực hiện trong thời gian từ tháng 01/2024 đến tháng 06/2025.

2.1.2. Vật liệu thí nghiệm

Mẫu thí nghiệm là các đoạn thân mang mầm ngủ của cây bìm bịp được trồng tại nhà lưới Khoa Sinh lý - Sinh hóa, Trường Nông nghiệp, Đại học Cần Thơ.

2.1.3. Hóa chất

Khoáng đa lượng và vi lượng (Murashige & Skoog, 1962).

Chất điều hòa sinh trưởng thực vật: Benzyl adenine (BA), α -Naphthalene acetic acid (NAA).

Các vitamin: B1 (Thiamine), B3 (Nicotinic acid), B6 (Pyridoxine) (Merck).

Hoá chất khử trùng: nước rửa chén, cồn 70° , Javel, HgCl_2 1‰. Ngoài ra còn có các thành phần quan trọng khác: sucrose, agar, Fe-EDTA, nước cất,...

2.2. Phương pháp thí nghiệm

2.2.1. Chuẩn bị môi trường và mẫu thí nghiệm

Môi trường nuôi cấy là môi trường cơ bản gồm: khoáng đa lượng và vi lượng được chuẩn bị theo công thức của Murashige and Skoog (1962) (MS) và bổ sung thêm: 30 g/L sucrose, 8,0 g/L agar, thiamin 1 mg/L, nicotinic acid 1 mg/L, pyridoxin 1 mg/L. Tùy theo thí nghiệm, việc bổ sung vào chất điều hòa sinh trưởng thực vật được thực hiện khác nhau. Môi trường được điều chỉnh pH trong khoảng 5,7 - 5,8. Mỗi keo chứa 40 mL môi trường, sau đó được hấp khử trùng nhiệt ướt (nhiệt độ 121°C , áp suất 1 atm trong 20 phút).

Từ cây mẹ, việc cắt thành đoạn 2 cm mang mầm ngủ đã được tiến hành và rửa lại bằng nước máy. Sau đó, mẫu được ngâm trong dung dịch xà phòng 10% trong 15 phút. Tiếp theo, mẫu được rửa lại dưới vòi nước máy. Mẫu được ngâm với cồn 70° trong 45 - 60 giây, tráng lại với nước cất thanh trùng 2 lần. Mẫu tiếp tục được lắc nhẹ trong dung dịch Javel 30%, thời gian 12 phút và tráng lại với nước cất vô trùng 3 lần. Mẫu được ngâm trong dung dịch HgCl_2 1‰ trong 10 phút rồi rửa lại với nước cất vô trùng 4 lần. Sau khi khử trùng, mẫu được cấy vào môi trường MS + BA 0,25 mg/L để tạo đủ số lượng mẫu cấy cho các thí nghiệm.

2.2.2. *Thí nghiệm 1: Ảnh hưởng của nồng độ BA lên sự tái sinh chồi in vitro Bìm bịp in vitro*

Thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên 1 nhân tố gồm 7 nghiệm thức. Mỗi nghiệm thức có 7 lần lặp lại, mỗi lần lặp lại là một keo chứa 3 mẫu. Mẫu cấy là những chồi *in vitro* có chiều cao 1,5 - 2,0 cm.

Nghiệm thức 1: Đối chứng (MS, không bổ sung chất điều hòa sinh trưởng).

Nghiệm thức 2: BA 0,25 mg/L + NAA 0,05 mg/L.

Nghiệm thức 3: BA 0,5 mg/L + NAA 0,05 mg/L.

Nghiệm thức 4: BA 0,75 mg/L + NAA 0,05 mg/L.

Nghiệm thức 5: BA 1 mg/L + NAA 0,05 mg/L.

Nghiệm thức 6: BA 1,25 mg/L + NAA 0,05 mg/L.

Nghiệm thức 7: BA 1,5 mg/L + NAA 0,05 mg/L.

Các chỉ tiêu theo dõi: Số chồi hình thành (chồi), chiều cao chồi (cm), số lá mới (lá) được ghi nhận theo thời gian nuôi cấy.

2.2.3. *Thí nghiệm 2: Ảnh hưởng của nồng độ NAA và than hoạt tính lên sự tạo rễ từ chồi cây bìm bịp in vitro.*

Mẫu thí nghiệm là các chồi *in vitro* phát triển tốt được cho từ nghiệm thức tốt nhất của thí nghiệm 1 (Bảng 1). Thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên 2 nhân tố gồm 6 nghiệm thức (nồng độ NAA và than hoạt tính). Mỗi nghiệm thức có 7 lần lặp lại, mỗi lần lặp lại là một keo chứa 3 chồi.

Bảng 1. Các nghiệm thức của thí nghiệm tạo rễ của cây bìm bịp

Than hoạt tính (g/L)	Nồng độ NAA (mg/L)		
	0	0,25	0,5
0	NT1 (Đối chứng)	NT2	NT3
2	NT4	NT5	NT6

Ghi chú: NT là nghiệm thức.

Các chỉ tiêu theo dõi:

Tỷ lệ tạo rễ (%), số rễ và chiều dài rễ, số lá của chồi theo thời gian (tuần) sau khi cấy.

2.2.4. *Thí nghiệm 3: Khảo sát ảnh hưởng của loại giá thể lên sự sinh trưởng và phát triển của cây bìm bịp in vitro trong giai đoạn thuần dưỡng*

Thí nghiệm gồm 3 nghiệm thức được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên 1 nhân tố, mỗi nghiệm thức có 15 lần lặp, mỗi lần lặp lại là 5 cây.

Nghiệm thức 1: đất (đối chứng).

Nghiệm thức 2: đất + vỏ trấu (1:1).

Nghiệm thức 3: đất + xơ dừa (1:1).

Cách tiến hành: Cây bìm bịp được chọn từ thí nghiệm tạo rễ được rửa sạch agar. Sau đó, cây được trồng vào lỗ của khay gieo giống có chuẩn bị sẵn giá thể của các nghiệm thức. Trước khi trồng, giá thể xơ dừa được ngâm với 5% vôi trong 48 giờ và xả lại với nước sạch. Đất là loại đất thịt được xử lý với thuốc Ridomil phòng trừ nấm bệnh. Sau khi trồng, cây được phủ nylon trong tuần đầu thuần dưỡng và phun sương 2 - 3 lần/ngày cho bề mặt giá thể luôn ở trạng thái ẩm. Thời gian thuần dưỡng nhiệt độ dao động từ 29 đến 33°C, cường độ sáng 5.000 lux và ẩm độ 70 - 80%.

Chỉ tiêu theo dõi: chiều cao cây, số lá, tỷ lệ sống (%) được theo dõi và ghi nhận kết quả sau 10, 20 và 30 ngày sau khi thuần dưỡng.

2.3. Phương pháp phân tích số liệu

Các số liệu thu thập được phân tích bằng phần mềm Microsoft Excel và SPSS 20.0. Việc phân tích phương sai (ANOVA), giá trị trung bình được thực hiện bằng phép kiểm định DUNCAN ở mức ý nghĩa 5% hay 1% để so sánh sự khác biệt giữa các nghiệm thức.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Ảnh hưởng của nồng độ BA lên sự tái sinh chồi bìm bịp in vitro

3.1.1. Số chồi

Trong nuôi cấy mô thực vật, cytokinin là nhóm chất điều hòa sinh trưởng đóng vai trò quan trọng trong cảm ứng tạo chồi và phát sinh hình thái. Hiệu quả của cytokinin phụ thuộc vào loại chất, nồng độ sử dụng và đặc tính của mẫu cấy. Sự phối hợp giữa cytokinin và auxin ở tỷ lệ thích hợp, đặc biệt là cytokinin cao kết hợp auxin thấp, có khả năng kích thích phân chia tế bào tại mô phân sinh, từ đó thúc đẩy hình thành và nhân nhanh chồi. Đối với chồi bìm bịp *in vitro*, từ 1 đến 4 tuần sau khi cấy (TSKC), mẫu cấy chưa xuất hiện chồi mới, cho thấy phản ứng cảm ứng với chất điều hòa sinh trưởng diễn ra tương

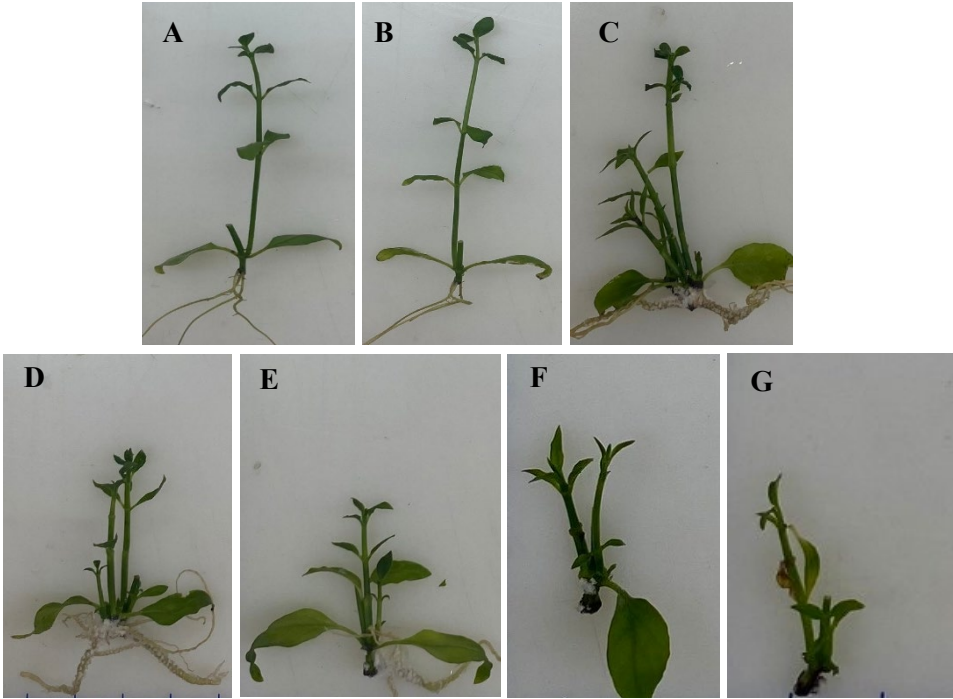
đối chậm. Đến tuần thứ 5, các nghiệm thức MS + BA 0,5 mg/L + NAA 0,05 mg/L và MS + BA 0,75 mg/L + NAA 0,05 mg/L cho số chồi cao nhất, lần lượt đạt 2,17 và 1,95 chồi/mẫu, cao hơn có ý nghĩa thống kê ($P < 0,01$) so với các nghiệm thức còn lại.

Trong khi đó, các nghiệm thức đối chứng và các mức BA từ 0,25 đến 1,5 mg/L chỉ đạt từ 1,00 đến 1,29 chồi/mẫu và không khác biệt thống kê (Bảng 2).

Bảng 2. Khả năng tạo chồi theo thời gian của bím bíp *in vitro* khi sử dụng nồng độ BA kết hợp NAA (tuần sau cấy)

Nghiệm thức (mg/L)	Số chồi mới hình thành (chồi) theo thời gian (tuần)			
	5	6	7	8
MS (đối chứng)	1,00 ^b	1,00 ^c	1,00 ^d	1,00 ^d
BA 0,25 + NAA 0,05	1,00 ^b	1,00 ^c	1,00 ^d	1,00 ^d
BA 0,5 + NAA 0,05	2,17 ^a	2,93 ^a	3,95 ^a	4,00 ^a
BA 0,75 + NAA 0,05	1,95 ^a	2,71 ^a	3,78 ^a	3,78 ^a
BA 1 + NAA 0,05	1,29 ^b	1,83 ^b	2,12 ^b	2,12 ^b
BA 1,25 + NAA 0,05	1,21 ^b	1,36 ^{bc}	1,38 ^c	1,38 ^c
BA 1,5 + NAA 0,05	1,12 ^b	1,14 ^c	1,14 ^{cd}	1,14 ^{cd}
F	**	**	**	**
CV (%)	24,9	19,9	10,09	9,7

Ghi chú: Những số trong cùng 1 cột có chữ theo sau giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê qua phép thử Duncan, (**): khác biệt có ý nghĩa 1%.



Hình 1. Sự sinh trưởng của chồi bím bíp *in vitro* sau 8 tuần nuôi cấy

Ghi chú: (A): đối chứng, (B): MS + BA 0,25 mg/L + NAA 0,05 mg/L, (C): MS + BA 0,5 mg/L + NAA 0,05 mg/L, (D): MS + BA 0,75 mg/L + NAA 0,05 mg/L, (E): MS + BA 1 mg/L + NAA 0,05 mg/L, (F): MS + BA 1,25 mg/L + NAA 0,05 mg/L và (G): MS + BA 1,5 mg/L + NAA 0,05 mg/L.

Đến tuần thứ 6, số chồi ở các nghiệm thức tăng rõ rệt khi mẫu cây đã thích nghi với môi trường nuôi cấy. Hai nghiệm thức BA 0,5 mg/L và BA 0,75 mg/L tiếp tục cho số chồi cao nhất, lần lượt đạt 2,93

và 2,71 chồi/mẫu, khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức 1% so với các nghiệm thức khác. Các nghiệm thức BA 1,0 mg/L và BA 1,25 mg/L cũng cho số chồi cao hơn đối chứng nhưng thấp hơn đáng kể so

với hai nghiệm thức tối ưu. Số chồi tiếp tục tăng từ tuần 5 đến tuần 8, trong đó tốc độ tăng mạnh nhất ghi nhận từ tuần 5 đến tuần 7. Đến tuần thứ 8, nghiệm thức MS + BA 0,5 mg/L + NAA 0,05 mg/L và MS + BA 0,75 mg/L + NAA 0,05 mg/L vẫn duy trì số chồi cao nhất, đạt lần lượt 4,00 và 3,78 chồi/mẫu. Kết quả này cho thấy BA ở mức 0,5 – 0,75 mg/L kết hợp với NAA 0,05 mg/L là thích hợp cho quá trình nhân nhanh chồi cây bìm bịp trong điều kiện thí nghiệm (Hình 1). Mặc dù số chồi giữa hai nghiệm thức tương đương nhau, chồi ở nghiệm thức BA 0,5 mg/L có hình thái mập và xanh hơn, cho thấy chất lượng chồi tốt hơn. Kết quả nghiên cứu phù hợp với báo cáo của Hồng và ctv. (2019) về hiệu quả của BAP kết hợp NAA trong nhân giống *in vitro* cây bìm bịp từ đốt thân.

Kết quả thí nghiệm khẳng định vai trò của sự cân bằng giữa cytokinin và auxin trong điều khiển phát sinh chồi *in vitro*. BA kích thích phân chia tế bào và hình thành chồi, trong khi NAA hỗ trợ điều hòa sinh trưởng khi được bổ sung ở nồng độ thích hợp. Việc tăng BA từ 1,0 đến 1,5 mg/L làm giảm số chồi, cho thấy nồng độ cytokinin quá cao có thể gây mất cân bằng hormone, ức chế sinh trưởng chồi hoặc làm giảm chất lượng chồi. Ngoài ra, thời gian nuôi cấy 7 - 8 tuần được xem là phù hợp để đạt hệ số nhân chồi cao nhất.

3.1.2. Chiều cao chồi

Chiều cao chồi là chỉ tiêu phản ánh khả năng sinh trưởng và chất lượng chồi *in vitro*, đồng thời đánh giá mức độ đáp ứng của mẫu cây đối với chất điều hòa sinh trưởng. Sự gia tăng chiều cao chồi cho thấy

quá trình phân chia, kéo dài tế bào và tích lũy sinh khối diễn ra thuận lợi, góp phần tạo tiền đề cho sự phát triển thành cây hoàn chỉnh (Ây và ctv., 2019). Kết quả thí nghiệm được ghi nhận ở Bảng 3 cho thấy, chiều cao chồi tăng dần theo thời gian nuôi cấy ở tất cả các nghiệm thức. Tuy nhiên, tốc độ tăng trưởng có xu hướng giảm khi nồng độ BA tăng, đặc biệt từ tuần thứ 4 - 5 trở đi. Trong nuôi cấy *in vitro*, mẫu cây thường chứa hàm lượng chất điều hòa sinh trưởng nội sinh đủ để duy trì quá trình phân chia và kéo dài tế bào. Do đó, trong môi trường không bổ sung chất điều hòa sinh trưởng thực vật, sự cân bằng giữa các hormone nội sinh được duy trì, tạo điều kiện thuận lợi cho sự sinh trưởng và kéo dài chồi. Ngược lại, việc bổ sung chất điều hòa sinh trưởng vào môi trường nuôi cấy có thể làm thay đổi trạng thái cân bằng hormone nội sinh – ngoại sinh, từ đó ảnh hưởng đến quá trình sinh trưởng của chồi (George et al., 2008; Taiz et al., 2018). Môi trường đối chứng (MS không bổ sung chất điều hòa sinh trưởng) cho chiều cao chồi cao nhất trong suốt thời gian theo dõi và đạt 5,94 cm ở tuần thứ 8, khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức 1% so với các nghiệm thức còn lại (Bảng 3). Kết quả này cho thấy cây bìm bịp có khả năng vươn dài thân tốt trong điều kiện không bổ sung cytokinin. Việc bổ sung BA làm giảm chiều cao chồi so với đối chứng, và mức độ ức chế tăng theo nồng độ BA. Nghiệm thức BA 1,5 mg/L + NAA 0,05 mg/L cho chiều cao chồi thấp nhất (1,65 cm ở tuần thứ 8). Điều này cho thấy BA ở nồng độ cao kết hợp với NAA nồng độ thấp đã làm hạn chế sự kéo dài lông, tạo các chồi ngắn và thấp, đặc trưng cho tác động của cytokinin trong nuôi cấy mô.

Bảng 3. Chiều cao chồi (cm) theo thời gian nuôi cấy

Nghiệm thức (MS bổ sung BA, mg/L)	Chiều cao chồi (cm) theo thời gian (tuần)							
	1	2	3	4	5	6	7	8
MS (đối chứng)	0,00 ^d	1,04 ^{cd}	1,74 ^a	2,42 ^a	3,55 ^a	4,74 ^a	5,60 ^a	5,94 ^a
BA 0,25+NAA 0,05	0,68 ^b	1,32 ^{ab}	1,88 ^a	2,13 ^{ab}	3,11 ^b	4,02 ^b	5,17 ^b	5,53 ^b
BA 0,5+NAA 0,05	1,00 ^a	1,52 ^a	1,64 ^{ab}	1,92 ^b	2,61 ^c	3,77 ^b	4,26 ^c	4,27 ^c
BA 0,75+NAA 0,05	0,80 ^b	1,22 ^{bc}	1,35 ^{bc}	1,38 ^d	1,83 ^d	2,33 ^c	2,75 ^d	3,04 ^d
BA 1 +NAA 0,05	0,44 ^c	0,88 ^{de}	1,10 ^{cd}	1,40 ^d	1,51 ^{de}	1,88 ^{cd}	2,14 ^e	2,33 ^e
BA 1,25+NAA 0,05	0,29 ^c	0,76 ^{ef}	0,94 ^c	1,16 ^d	1,37 ^{ef}	1,44 ^{de}	1,71 ^f	1,73 ^f
BA 1,5+NAA 0,05	0,00 ^d	0,62 ^f	0,99 ^c	1,14 ^d	1,19 ^f	1,22 ^e	1,48 ^f	1,65 ^f
F	**	**	**	**	**	**	**	**
CV (%)	29,3	16,5	14,9	14,4	10,9	12,6	7,1	6,4

Ghi chú: Những số trong cùng 1 cột có chữ theo sau giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê qua phép thử Duncan, (**): khác biệt có ý nghĩa 1%.

Nghiệm thức BA 0,25 mg/L + NAA 0,05 mg/L cho chiều cao chồi đạt 5,53 cm ở tuần thứ 8, tương đương đối chứng, cho thấy nồng độ BA thấp ít ảnh hưởng đến khả năng vươn dài của chồi. Ngược lại, hai nghiệm thức BA 0,5 mg/L + NAA 0,05 mg/L và BA 0,75 mg/L + NAA 0,05 mg/L mặc dù cho hệ số nhân chồi cao nhất nhưng chiều cao chồi chỉ đạt 4,27 cm và 3,04 cm. Kết quả này cho thấy môi trường thích hợp cho nhân nhanh chồi chưa hẳn là môi trường tối ưu cho sinh trưởng chiều cao. Nhìn chung, BA kết hợp NAA ảnh hưởng rõ rệt đến sự sinh trưởng của chồi bím búp *in vitro*. Nồng độ BA từ 0,5 đến 0,75 mg/L thúc đẩy hình thành nhiều chồi nhưng đồng thời làm giảm chiều cao chồi do ưu tiên quá trình phân hóa chồi bên hơn là kéo dài thân. Ngược lại, môi trường không bổ sung chất điều hòa sinh trưởng giúp chồi phát triển chiều cao tốt hơn nhưng khả năng nhân chồi thấp. Do đó, để đạt hiệu quả nhân giống cao và tạo chồi có chất lượng tốt, các giai đoạn nuôi cấy riêng biệt với chế độ điều hòa sinh trưởng phù hợp cho từng mục tiêu sinh trưởng cần được áp dụng.

3.1.3. Số lá

Sự kết hợp giữa BA và NAA có vai trò quan trọng trong quá trình hình thành và phát triển lá của cây bím búp *in vitro*. Hiệu quả tạo lá phụ thuộc vào

sự cân bằng nồng độ giữa cytokinin và auxin, trong đó nồng độ thích hợp giúp gia tăng số lá, còn nồng độ quá cao có thể làm giảm sinh trưởng và chất lượng cây con (George et al., 2008). Kết quả cho thấy việc bổ sung BA kết hợp với NAA 0,05 mg/L đã thúc đẩy sự hình thành lá rõ rệt so với đối chứng. Trong suốt thời gian nuôi cấy, các nghiệm thức BA 0,5 mg/L và BA 0,75 mg/L luôn duy trì số lá cao hơn đối chứng, phù hợp với vai trò của cytokinin trong việc kích thích phân chia tế bào và phát triển số lượng chồi, từ đó làm tăng số lượng lá (Bảng 4). Sự hình thành chồi và lá trong nuôi cấy mô thực vật được điều hòa chủ yếu bởi sự tương tác giữa cytokinin và auxin. Cytokinin (đặc biệt là BA) kích thích phân chia tế bào, cảm ứng hình thành mô phân sinh chồi thông qua hoạt hóa các gen như WUSCHEL (WUS) và SHOOT MERISTEMLESS (STM), từ đó thúc đẩy tái sinh chồi. Sau khi chồi được hình thành, auxin phân bố theo cơ chế vận chuyển phân cực, tạo các vùng tích lũy cục bộ để cảm ứng sự hình thành mầm lá và biệt hóa mô lá. Vì vậy, tỷ lệ cân bằng giữa cytokinin và auxin đóng vai trò quyết định trong quá trình tái sinh chồi và phát triển lá trong nuôi cấy mô thực vật (Skoog & Miller, 1957; George et al., 2008; Hwang et al., 2012; Taiz et al., 2018).

Bảng 4. Số lá trên chồi bím búp *in vitro* theo thời gian nuôi cấy

Nghiệm thức (mg/L)	Số lá trên chồi (lá) theo thời gian (tuần)							
	1	2	3	4	5	6	7	8
MS (đối chứng)	2,00 ^b	3,81 ^a	5,14 ^c	5,90 ^{cd}	7,00 ^b	7,57 ^c	9,00 ^b	9,57 ^c
BA 0,25 + NAA 0,05	2,00 ^b	4,00 ^a	4,95 ^c	5,62 ^d	6,48 ^b	8,05 ^c	8,48 ^c	9,52 ^c
BA 0,5 + NAA 0,05	3,71 ^a	4,00 ^a	5,29 ^{bc}	8,57 ^a	9,57 ^a	11,67 ^a	12,48 ^a	15,33 ^a
BA 0,75 + NAA 0,05	2,00 ^b	3,43 ^b	6,10 ^a	7,24 ^b	8,71 ^a	10,57 ^c	12,38 ^a	13,00 ^b
BA 1 + NAA 0,05	2,00 ^b	3,71 ^b	6,00 ^a	6,57 ^{bc}	6,95 ^b	9,86 ^b	12,10 ^a	13,00 ^b
BA 1,25 + NAA 0,05	2,00 ^b	4,00 ^a	5,90 ^{ab}	6,10 ^{cd}	6,48 ^b	8,00 ^c	9,52 ^b	9,62 ^c
BA 1,5 + NAA 0,05	2,00 ^b	4,00 ^a	5,81 ^{ab}	6,00 ^{cd}	6,24 ^b	7,14 ^c	8,48 ^c	9,38 ^c
F	**	**	**	**	**	**	**	**
CV (%)	6,0	6,5	7,5	7,5	8,6	7,4	5,9	7,1

Ghi chú: Những số trong cùng 1 cột có chữ theo sau giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê qua phép thử Duncan, (**): khác biệt có ý nghĩa 1%.

Sau 8 tuần nuôi cấy, nghiệm thức BA 0,5 mg/L + NAA 0,05 mg/L cho số lá cao nhất (15,33 lá/chồi), tiếp theo là BA 0,75 mg/L và BA 1,0 mg/L (13 lá/chồi), cao hơn có ý nghĩa thống kê so với đối chứng. Trong khi đó, các nghiệm thức BA 0,25 mg/L, BA 1,25 mg/L và BA 1,5 mg/L cho số lá tương đương đối chứng, cho thấy hiệu quả kích thích giảm khi nồng độ BA thấp hoặc vượt quá ngưỡng tối ưu. Mặc dù các nghiệm thức BA 0,5 – 1,0 mg/L tạo được nhiều lá hơn nhưng việc quan sát hình thái cho thấy lá có kích thước nhỏ hơn và khoảng cách

giữa các đốt ngắn hơn so với đối chứng. Ngược lại, nghiệm thức đối chứng và BA 0,25 mg/L + NAA 0,05 mg/L cho lá lớn, xanh và phát triển cân đối hơn. Điều này cho thấy nồng độ BA cao có xu hướng thúc đẩy sự gia tăng số lượng lá nhưng hạn chế sự phát triển kích thước lá (Skoog & Miller, 1957). Kết quả khẳng định rằng việc sử dụng BA cần được tối ưu về nồng độ để đạt được sự cân bằng giữa số lượng và chất lượng lá trong quá trình nhân giống *in vitro* cây bím búp.

3.2. Ảnh hưởng của nồng độ NAA và than hoạt tính lên sự tạo rễ từ chồi cây bìm bịp *in vitro*

3.2.1. Tỷ lệ tạo rễ

Giai đoạn tạo rễ là bước quan trọng trong quy trình nhân giống *in vitro*, quyết định khả năng sinh trưởng và tỷ lệ sống của cây con trong giai đoạn thuần dưỡng. Đối với cây bìm bịp, thí nghiệm được thực hiện trong 4 tuần nhằm đánh giá ảnh hưởng của NAA kết hợp với than hoạt tính đến khả năng ra rễ của chồi *in vitro*. Rễ đầu tiên xuất hiện sau 7 ngày nuôi cấy, cho thấy chồi có khả năng đáp ứng nhanh với môi trường tạo rễ. Kết quả cho thấy đến 2 tuần sau khi cấy, tất cả các nghiệm thức đều đạt tỷ lệ ra rễ 100%, với chiều dài rễ lớn hơn hoặc bằng 0,5 cm. Kết quả này tương đồng với nghiên cứu của Hồng và ctv. (2019), trong đó môi trường bổ sung NAA (0 – 0,5 mg/L) cũng cho tỷ lệ ra rễ đạt 100%.

Hiệu quả tạo rễ cao có thể được giải thích bởi tác động kết hợp của NAA và than hoạt tính. NAA là auxin có khả năng kích thích hình thành rễ bất định, thúc đẩy phân chia và kéo dài tế bào tại vùng khởi phát rễ. Trong khi đó, than hoạt tính có khả năng hấp phụ các hợp chất phenolic và chất ức chế sinh trưởng, góp phần cải thiện điều kiện môi trường nuôi cấy. Ngoài ra, đặc tính làm tối môi trường của than hoạt tính cũng được ghi nhận là yếu tố thuận lợi cho quá trình cảm ứng và phát triển rễ ở nhiều loài thực vật (George et al., 2008; De Klerk et al., 1999).

Sự hình thành bộ rễ hoàn chỉnh giúp cây bìm bịp tăng khả năng hấp thụ nước và dinh dưỡng, tạo điều kiện cho sinh trưởng ổn định trước khi chuyển sang giai đoạn thuần dưỡng. Do đó, giai đoạn tạo rễ không chỉ hoàn thiện cấu trúc cây con mà còn đóng vai trò quyết định đến khả năng thích nghi và tỷ lệ sống của cây sau khi chuyển ra điều kiện nhà lưới.

3.2.2. Số rễ

Kết quả ở Bảng 5 cho thấy nồng độ NAA và than hoạt tính có ảnh hưởng đáng kể đến khả năng tạo rễ của chồi bìm bịp *in vitro* tại thời điểm 4 tuần sau khi cấy. Khi than hoạt tính được bổ sung từ 0 lên 2 g/L, số rễ trung bình tăng từ 3,86 lên 5,29 rễ/chồi, khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức 1%. Tương tự, khi nồng độ NAA được tăng từ 0 lên 0,5 mg/L, số rễ

trung bình tăng từ 4,21 lên 5,13 rễ/chồi. Nghiệm thức MS + NAA 0,5 mg/L + than hoạt tính 2 g/L cho số rễ cao nhất (6,26 rễ/chồi), trong khi nghiệm thức đối chứng thấp nhất (3,52 rễ/chồi). Sự gia tăng số rễ khi bổ sung than hoạt tính có thể liên quan đến khả năng hấp phụ các hợp chất phenolic và các chất ức chế sinh trưởng được giải phóng trong quá trình nuôi cấy, từ đó tạo môi trường thuận lợi cho sự hình thành và phát triển rễ. Ngoài ra, than hoạt tính còn làm giảm cường độ ánh sáng trong môi trường, tạo điều kiện tương tự môi trường đất, góp phần thúc đẩy quá trình phát sinh rễ. NAA là auxin tổng hợp có vai trò quan trọng trong cảm ứng và phát triển rễ bất định (Debergh & Zimmerman, 1991). Kết quả cho thấy nồng độ 0,5 mg/L thích hợp hơn so với 0 và 0,25 mg/L trong việc kích thích tạo rễ, thể hiện qua số rễ hình thành cao hơn. Điều này cho thấy NAA ở nồng độ thích hợp đã thúc đẩy quá trình phân chia và biệt hóa tế bào tại vùng khởi phát rễ. NAA là một auxin tổng hợp được sử dụng phổ biến trong nuôi cấy mô do có khả năng cảm ứng mạnh sự hình thành rễ bất định. Dưới tác động của NAA, các tế bào nhu mô có khả năng phát sinh rễ, chủ yếu nằm gần hệ mạch ở gốc chồi hoặc mô thân, trải qua quá trình khử biệt hóa, tái phân chia và hình thành mô phân sinh rễ mới, sau đó phát triển thành rễ hoàn chỉnh (De Klerk et al., 1999; Bellini et al., 2014). Auxin cũng kích thích biểu hiện của nhiều gen liên quan đến sự khởi phát rễ và thúc đẩy quá trình phân chia, kéo dài tế bào trong giai đoạn phát triển rễ (Taiz et al., 2018). Vì vậy, việc bổ sung NAA ở nồng độ thích hợp thường làm tăng tỷ lệ ra rễ, số lượng rễ và chất lượng hệ rễ trong nuôi cấy *in vitro* (George et al., 2008). Sự kết hợp giữa NAA và than hoạt tính cho hiệu quả tạo rễ cao hơn khi sử dụng riêng lẻ từng yếu tố. Than hoạt tính có thể góp phần duy trì môi trường nuôi cấy ổn định và giảm tác động của các chất ức chế sinh trưởng, từ đó tăng hiệu quả của auxin trong quá trình hình thành rễ (Ây và ctv., 2019). Việc quan sát hình thái cho thấy rễ ở nghiệm thức đối chứng tuy xuất hiện sớm nhưng dài, mảnh và ít rễ phụ. Ngược lại, các nghiệm thức bổ sung NAA và than hoạt tính hình thành bộ rễ phát triển hơn, với nhiều rễ phụ và rễ bất định, tạo tiền đề thuận lợi cho quá trình thuần dưỡng. Kết quả này cho thấy môi trường MS bổ sung NAA 0,5 mg/L kết hợp than hoạt tính 2 g/L là phù hợp cho giai đoạn tạo rễ của cây bìm bịp *in vitro*.

Bảng 5. Số rễ của chồi bím búp vào thời điểm 4 tuần sau khi cấy

Than hoạt tính (g/L)	Số lá trên chồi (lá)			
	Nồng độ NAA (mg/L)			Trung bình của than hoạt tính (A)
	0	0,25	0,5	
0 g/L	3,52 ^b	4,05 ^b	4,00 ^b	3,86 ^b
2 g/L	4,90 ^{ab}	4,69 ^{ab}	6,26 ^a	5,29 ^a
Trung bình của NAA (B)	4,21 ^b	4,37 ^b	5,13 ^a	
F (A)				**
F (B)				**
F (AxB)				**
CV (%)				12,6

Ghi chú: Trong cùng 1 cột hoặc hàng, số có có chữ theo sau giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê qua phép thử Duncan, (**): khác biệt có ý nghĩa 1%.

3.2.3. Chiều dài rễ

Kết quả ở Bảng 6 cho thấy việc bổ sung than hoạt tính có ảnh hưởng tích cực đến chiều dài rễ của cây bím búp *in vitro*. Cụ thể, các nghiệm thức có than hoạt tính cho chiều dài rễ trung bình đạt 3,39 cm, cao hơn và có ý nghĩa thống kê ($P < 0,01$) so với nghiệm thức không bổ sung than (2,94 cm). Điều này cho thấy than hoạt tính góp phần cải thiện điều kiện môi trường nuôi cấy, giúp rễ phát triển tốt hơn về chiều dài. Ngược lại, NAA có xu hướng làm giảm chiều dài rễ khi tăng nồng độ quá mức. Chiều dài rễ giảm từ 4,37 cm (không bổ sung NAA) xuống 2,80 cm ở 0,25 mg/L và tiếp tục giảm còn 2,33 cm ở 0,5 mg/L. Sự gia tăng NAA thường đi kèm với xu hướng hình thành rễ mập và nhiều rễ phụ hơn. Hiệu ứng ức chế kéo dài rễ của NAA phù hợp với đặc tính

của auxin, trong đó nồng độ tối ưu cho cảm ứng tạo rễ thường cao hơn so với nồng độ tối ưu cho sự kéo dài rễ. Trong nghiên cứu này, nghiệm thức không bổ sung NAA cho chiều dài rễ lớn nhất, có thể do ảnh hưởng của auxin nội sinh đã đủ để thúc đẩy sự kéo dài rễ trong điều kiện nuôi cấy.

Kết quả cũng cho thấy than hoạt tính giúp tăng chiều dài rễ nhờ khả năng hấp phụ các chất ức chế sinh trưởng trong môi trường, từ đó cải thiện điều kiện phát triển của rễ. Xu hướng này phù hợp với các nghiên cứu trước đây của Hồng và ctv. (2019), trong đó auxin được sử dụng để kích thích tạo cây *in vitro* hoàn chỉnh. Nhìn chung, sự kết hợp giữa điều kiện môi trường có than hoạt tính và nồng độ auxin phù hợp đóng vai trò quan trọng trong việc tối ưu hóa sự phát triển hệ rễ *in vitro*.

Bảng 6. Chiều dài rễ của chồi bím búp *in vitro* ở 4 tuần SKC

Than hoạt tính (g/L)	Chiều dài rễ (cm)			
	Nồng độ NAA (mg/L)			Trung bình của than hoạt tính (A)
	0	0,25	0,5	
0 g/L	5,12 ^a	2,12 ^c	1,59 ^c	2,94 ^b
2 g/L	3,63 ^b	3,48 ^b	3,07 ^{bc}	3,39 ^a
Trung bình của NAA (B)	4,37 ^a	2,80 ^b	2,33 ^c	
F (A)			**	
F (B)			**	
F (AxB)			**	
CV (%)			14,5	

Ghi chú: Trong cùng 1 cột hoặc hàng, số có có chữ theo sau giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê qua phép thử Duncan, (**): khác biệt có ý nghĩa 1%.

3.2.4. Số lá gia tăng

Kết quả cho thấy than hoạt tính và NAA ảnh hưởng rõ đến sự gia tăng số lá của cây bím búp *in vitro* trong 3 tuần đầu sau cấy, nhưng đến tuần thứ 4 thì sự khác biệt giữa các nghiệm thức không còn có ý nghĩa thống kê (Bảng 7). Việc bổ sung than hoạt tính (2 g/L) giúp số lá tăng cao hơn so với không bổ

sung trong giai đoạn đầu (1 - 3 tuần), chứng tỏ than hoạt tính cải thiện điều kiện môi trường nuôi cấy và thúc đẩy sinh trưởng chồi. Việc bổ sung than hoạt tính vào môi trường nuôi cấy làm tăng số lá so với nghiệm thức không bổ sung cho thấy than hoạt tính có vai trò cải thiện điều kiện môi trường, từ đó tạo thuận lợi cho sự sinh trưởng và phát triển của chồi. Than hoạt tính có khả năng hấp phụ các hợp chất

phenolic, các sản phẩm trao đổi chất và một số chất ức chế sinh trưởng được giải phóng từ mẫu cấy, góp phần hạn chế hiện tượng hóa nâu và giảm độc tính trong môi trường nuôi cấy. Ngoài ra, than hoạt tính còn có thể điều hòa nồng độ các chất điều hòa sinh trưởng thông qua khả năng hấp phụ một phần hormone dư thừa, giúp duy trì điều kiện thích hợp cho sự phát triển của chồi và lá. Nhờ đó, chồi sinh

trưởng khỏe hơn, khả năng hình thành và phát triển lá được cải thiện, dẫn đến số lá tăng cao hơn so với môi trường không bổ sung than hoạt tính (Pan & Van Staden, 1998; George et al., 2008; Thomas, 2008). Ngược lại, khi nồng độ NAA được tăng lên thì số lá có xu hướng giảm, đặc biệt rõ ở tuần đầu, cho thấy auxin ở nồng độ cao có thể ức chế sự hình thành lá trong giai đoạn sớm sau cấy.

Bảng 7. Số lá trên chồi bím búp theo thời gian

Than (g/L) (A)	NAA (mg/L) (B)	Số lá trên chồi (lá)			
		1 tuần SKC	2 tuần SKC	3 tuần SKC	4 tuần SKC
0	0	1,62 ^a	1,81 ^a	3,43 ^a	4,00
0	0,25	0,00 ^b	1,43 ^b	3,43 ^a	3,71
0	0,5	0,00 ^b	0,29 ^b	2,00 ^b	3,81
2	0	1,43 ^a	1,43 ^b	2,86 ^a	3,71
2	0,25	1,62 ^a	1,52 ^a	2,19 ^b	3,62
2	0,5	0,38 ^{ab}	1,62 ^a	3,05 ^a	3,81
Trung bình (A)	0	0,54 ^b	1,18 ^b	2,54 ^b	3,84
(g/L)	2	1,14 ^a	1,52 ^a	2,70 ^a	3,71
Trung bình (B)	0	1,52 ^a	1,62 ^a	3,14 ^a	3,86
(mg/L)	0,25	0,81 ^b	1,48 ^{ab}	2,19 ^b	3,67
	0,5	0,19 ^c	0,95 ^b	2,52 ^b	3,81
	F _(A)	**	*	**	ns
	F _(B)	**	**	**	ns
	F _(AxB)	**	**	**	ns
	CV	48,6	38,7	16,9	8,3

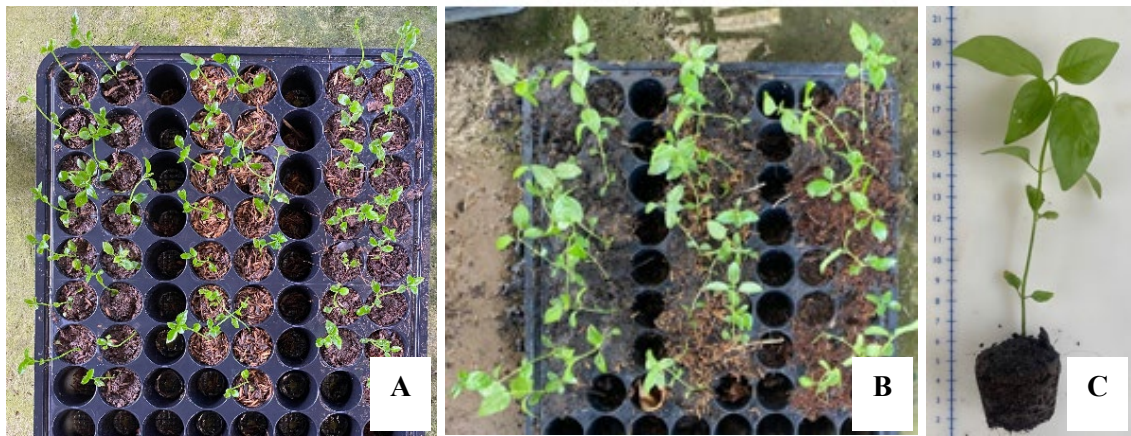
Ghi chú: Trong cùng 1 cột hoặc cùng 1 hàng, số có chữ theo sau giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê qua phép thử Duncan, (**): khác biệt có ý nghĩa 1%, (*): khác biệt có ý nghĩa 5%, ns: không có ý nghĩa thống kê.

Xét về tương tác, các nghiệm thức được bổ sung than hoạt tính thường cho số lá cao hơn trong 2 - 3 tuần đầu, trong khi các nghiệm thức không bổ sung than hoặc có NAA cao cho giá trị thấp hơn. Tuy nhiên, đến tuần thứ 4, số lá giữa các nghiệm thức dao động hẹp và không khác biệt thống kê, cho thấy cây đã đạt trạng thái ổn định về sinh trưởng lá. Nhìn chung, tác động của than hoạt tính và NAA chủ yếu thể hiện trong giai đoạn đầu, còn về sau ít ảnh hưởng và giai đoạn 3 - 4 tuần sau cấy có thể xem là thời điểm thích hợp để chuẩn bị cho bước thuần dưỡng.

3.3. Khảo sát ảnh hưởng của loại giá thể lên sự sinh trưởng và phát triển của cây bím búp ex vitro trong giai đoạn thuần dưỡng

3.3.1. Tỷ lệ cây sống

Tỷ lệ sống của cây nuôi cấy mô trong giai đoạn vườn ươm chịu ảnh hưởng phức tạp từ nhiều yếu tố, trong đó có hai nhóm chính: Thứ nhất là chất lượng sinh lý và hình thái của cây con (như sự phát triển đầy đủ của rễ, thân, lá) và thứ hai là các thông số môi trường *ex vitro* (ngoài bình nuôi cấy) bao gồm nhiệt độ, độ ẩm và chế độ chiếu sáng. Kết quả ở Bảng 8 cho thấy giá thể đất + vỏ trấu (1:1) cho tỷ lệ sống cao nhất (93,33%), tiếp đến là đất (80%) và thấp nhất là đất + xơ dừa (73,33%). Điều này cho thấy thành phần giá thể có ảnh hưởng rõ rệt đến khả năng thích nghi của cây bím búp *in vitro* trong giai đoạn thuần dưỡng (Hình 2).



Hình 2. Cây bìm bịp nuôi cấy mô trong giai đoạn thuần dưỡng

Ghi chú: (A): cây vừa đem ra thuần dưỡng ban đầu, (B): cây được trùm bọc, (C) cây bìm bịp sau 4 tuần thuần dưỡng.

Tỷ lệ sống cao của cây bìm bịp trên giá thể đất phối trộn với vỏ trấu có thể liên quan trực tiếp đến những yêu cầu sinh lý đặc thù của cây con nuôi cấy mô trong giai đoạn thuần dưỡng. Sau khi chuyển từ điều kiện in vitro ra môi trường ex vitro, cây con phải thích nghi với sự thay đổi đột ngột về cường độ ánh sáng, độ ẩm không khí và điều kiện trao đổi khí. Ở giai đoạn này, lá thường có lớp cutin mỏng, khí khổng hoạt động chưa hoàn chỉnh, trong khi hệ rễ còn non và khả năng hấp thu nước, khoáng chất còn hạn chế, khiến cây rất dễ mất cân bằng nước và bị tổn thương nếu điều kiện vùng rễ không thuận lợi (Hazarika, 2003; Pospíšilová et al., 1999). Việc bổ sung vỏ trấu vào đất giúp tăng độ rỗng và khả năng thông khí của giá thể, tạo điều kiện thuận lợi cho quá trình hô hấp của rễ mới hình thành. Hệ rễ của cây nuôi cấy mô trong những tuần đầu sau thuần dưỡng có nhu cầu oxy cao để cung cấp năng lượng cho quá trình phát triển rễ mới, hình thành lông hút và phục hồi chức năng hấp thu. Nếu vùng rễ được cung cấp đủ oxy, cây nhanh chóng thiết lập khả năng hấp thu nước và dinh dưỡng, từ đó nâng cao tỷ lệ sống và thúc đẩy sinh trưởng. George et al. (2008) cho rằng một trong những yếu tố quyết định thành công của giai đoạn thuần dưỡng là sử dụng giá thể có khả năng duy trì đồng thời độ ẩm và độ thông khí thích hợp để hỗ trợ sự phục hồi của hệ rễ sau khi chuyển khỏi môi trường nuôi cấy. Ngược lại, khi giá thể đất được sử dụng thì giá thể này dễ bị nén chặt sau quá trình tưới, làm giảm khoảng trống chứa không khí trong vùng rễ. Điều kiện này hạn chế sự khuếch tán oxy đến rễ, làm giảm cường độ hô hấp và ảnh hưởng đến quá trình hình thành rễ mới. Đối với cây nuôi cấy mô có hệ rễ còn yếu, sự thiếu oxy kéo dài có thể làm giảm khả năng thích nghi với điều kiện ex vitro,

dẫn đến tỷ lệ sống thấp hơn so với giá thể có độ thông khí tốt (Hartmann et al., 2018).

Bảng 8. Tỷ lệ sống ở giai đoạn thuần dưỡng sau 4 tuần của cây bìm bịp in vitro

Nghiệm thức	Tỷ lệ cây sống (%)
Đất	80,0
Đất + vỏ trấu (1:1)	93,33
Đất + xơ dừa (1:1)	73,33
F	ns
CV (%)	17,0

Ghi chú: Những số trong cùng 1 cột có chữ theo sau giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê qua phép thử Duncan, (**): khác biệt có ý nghĩa 1%, (*): khác biệt có ý nghĩa 5%, ns: không có ý nghĩa thống kê.

Đối với giá thể đất phối trộn với xơ dừa, mặc dù xơ dừa có khả năng giữ ẩm tốt nhưng đặc điểm này không phải lúc nào cũng có lợi trong giai đoạn thuần dưỡng cây nuôi cấy mô. Khi giá thể giữ nước quá lâu, lượng oxy trong vùng rễ giảm, trong khi hệ rễ của cây con vẫn chưa phát triển đầy đủ để thích nghi với điều kiện thiếu khí. Đồng thời, môi trường ẩm kéo dài cũng làm tăng nguy cơ phát sinh các bệnh thối rễ do nấm hoặc oomycete, ảnh hưởng đến khả năng sống sót của cây. Hazarika (2003) nhấn mạnh rằng thất bại trong giai đoạn thuần dưỡng thường không xuất phát từ sự thiếu nước mà chủ yếu do cây chưa thiết lập được cân bằng nước và hoạt động bình thường của hệ rễ trong điều kiện ex vitro. Như vậy, kết quả nghiên cứu cho thấy giá thể đất phối trộn với vỏ trấu đáp ứng tốt hơn các yêu cầu sinh lý của cây bìm bịp nuôi cấy mô trong giai đoạn thuần dưỡng, vừa đảm bảo độ ẩm cần thiết vừa duy trì khả năng thông khí thích hợp cho vùng rễ. Điều này tạo điều kiện để cây nhanh chóng phục hồi chức năng sinh lý, hình thành hệ rễ hoạt động hiệu quả và nâng cao

tỷ lệ sống sau khi chuyển ra khỏi môi trường nuôi cấy.

4. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

Môi trường tối ưu để nhân chồi bìm bịp tối ưu là MS + BA 0,5 mg/L + NAA 0,05 g/L ở thời điểm 8 tuần SKC cho số chồi trung bình là 4 chồi, chiều cao giá tăng là 4,27 (cm), số lá trung bình là 15,33 lá.

Môi trường có bổ sung than hoạt tính ở nồng độ 2 g/L kết hợp NAA 0,5 mg/L là môi trường tối ưu cho sự ra rễ với tỷ lệ ra rễ là 100%, số rễ trung bình đạt 6,26 rễ vào thời điểm 4 tuần SKC.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Alam, A., Ferdosh, S., Ghafoor, K., Hakim, A., Juraimi, A. S., Khatib, A., & Sarker, Z. I. (2016). *Clinacanthus nutans*: A review of the medicinal uses, pharmacology and phytochemistry. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 9(4), 402-409. <https://doi.org/10.1016/j.apjtm.2016.03.011>
- Ây, N. V., Bé, L. V., & Mến, T. T. (2019). *Nuôi cấy mô thực vật nguyên lý và thực hành*. Nhà xuất bản Đại học Cần Thơ
- Arullappan, S., Rajamanickam, P., Thevar, N., & Kodimani, C. C. (2014). In vitro screening of cytotoxic, antimicrobial and antioxidant activities of *Clinacanthus nutans* (Acanthaceae) leaf extracts. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 13(9), 1455-1461. <http://dx.doi.org/10.4314/tjpr.v13i9.11>
- Chen, B., Zhang, J., Zhang, W., Zhang, C., & Xiao, Y. (2015). The rapid propagation technique of the medicinal plant *Clinacanthus nutans* by tissue culture. *New York Science Journal*, 8(2), 23-27. <https://doi.org/10.7537/j.issn.1554-0200>
- Debergh, P. C., & Zimmerman, R. H. (1991). Micropropagation: *Technology and Application* (pp. 1-13). Springer Netherlands. <https://doi.org/10.1007/978-94-009-2075-0>
- Hồng, L. V., Hà, C. Đ., & Đình, N. V. (2019). Nhân giống *in vitro* cây Bìm bịp (*Clinacanthus nutans* (Burm. F.) Lindau) từ đốt thân. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Đại học Thái Nguyên*, 207(14), 47-52.
- Linh, L. N. T., Đạo, V. Q., Thạch, B. Đ., Bền, T. T., Giang, T. T. L., & Thạch, L. K. (2019). Góp phần xây dựng tiêu chuẩn cao dược liệu từ lá bìm bịp *Clinacanthus nutans* (Burm. F.) Lindau. *Tạp chí Công nghệ Sinh học*, 17(3), 499-504.
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum*, 15(3), 473-497.
- Trong điều kiện nhà lưới, cây bìm bịp *in vitro* có thể được thuần dưỡng trong điều kiện giá thể là đất + tro trấu (1:1) cho kết quả 93,33% cây sống sót. Cây con sinh trưởng và phát triển tốt sau 4 tuần thuần dưỡng.
- Nghiên cứu tiếp theo nên tiếp tục trồng và theo dõi sự sinh trưởng của cây bìm bịp trong điều kiện tự nhiên, để có thể hoàn chỉnh quy trình vì nhân giống cây bìm bịp phục vụ cho yêu cầu ứng dụng và nghiên cứu.
- <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
- Zulkiply, I. N., Rajabalaya, R., Idris, A., Sulaiman, N. A., & David, S. R. (2017). *Clinacanthus nutans*: a review on ethnomedicinal uses, chemical constituents and pharmacological properties. *Pharmaceutical Biology*, 55(1), 1093-1113. <https://doi.org/10.1080/13880209.2017.1288749>
- George, E. F., Hall, M. A., & De Klerk, G. J. (2008). *Plant Propagation by Tissue Culture* (3rd ed., Vol. 1: The Background). Springer, Dordrecht.
- Taiz, L., Zeiger, E., Møller, I. M., & Murphy, A. (2018). *Plant Physiology and Development* (6th ed.). Oxford University Press.
- Hwang, I., Sheen, J., & Müller, B. (2012). Cytokinin signaling networks. *Annual Review of Plant Biology*, 63, 353-380. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042811-105503>
- Skoog, F., & Miller, C. O. (1957). Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured in vitro. *Symposia of the Society for Experimental Biology*, 11, 118-131.
- De Klerk, G. J., Van der Krieken, W., & De Jong, J. C. (1999). The formation of adventitious roots: new concepts, new possibilities. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*, 35, 189-199. <https://doi.org/10.1007/s11627-999-0076-z>
- Bellini, C., Pacurar, D. I., & Perrone, I. (2014). Adventitious roots and lateral roots: similarities and differences. *Annual Review of Plant Biology*, 65, 639-666. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050213-035645>
- Pan, M. J., & Van Staden, J. (1998). The use of charcoal in in vitro culture – A review. *Plant Growth Regulation*, 26, 155-163. <https://doi.org/10.1023/A:1006119015972>
- Thomas, T. D. (2008). The role of activated charcoal in plant tissue culture. *Biotechnology Advances*,

- 26(6), 618–631.
<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2008.08.003>
- Hazarika, B.N. (2003). Acclimatization of tissue-cultured plants. *Current Science*, 85(12), 1704–1712.
- Hartmann, H.T., Kester, D.E., Davies, F.T., & Geneve, R.L. (2018). *Hartmann and Kester's Plant Propagation: Principles and Practices* (9th ed.). Pearson.
- Pospíšilová, J., Tichá, I., Kadleček, P., Haisel, D., & Plzáková, Š. (1999). Acclimatization of micropropagated plants to ex vitro conditions. *Biologia Plantarum*, 42(4), 481–497.
<https://doi.org/10.1023/A:1002688208758>