

NGHIÊN CỨU NHÂN GIỐNG *IN VITRO* CÂY KHÔI NHUNG (*ARDISIA SILVESTRIS* PIT.) THÔNG QUÁ PHÁT SINH CƠ QUAN TỪ MÔ SẼO RESEARCH ON *IN VITRO* PROPAGATION OF *ARDISIA SILVESTRIS* PIT. THROUGH CALLUS-MEDIATED ORGANOGENESIS

Võ Châu Tuấn¹, Vũ Đức Hoàng¹, Trà Thanh Lin¹, Ngô Thị Vân Hồng², Trần Quang Dân^{1*}

¹Trường Đại học Sư phạm – Đại học Đà Nẵng, Việt Nam

²Trường THPT Sơn Trà, Đà Nẵng, Việt Nam

*Tác giả liên hệ / Corresponding author: tqdan@ued.udn.vn

(Nhận bài / Received: 27/3/2025; Sửa bài / Revised: 12/7/2025; Chấp nhận đăng / Accepted: 09/7/2025)

DOI: 10.31130/ud-jst.2025.23(7).166

Tóm tắt - Khôi nhung (*Ardisia silvestris* Pit.) là loài cây thuốc có giá trị cao. Do đó, nghiên cứu các phương thức nuôi cấy *in vitro* khác nhau nhằm bảo tồn và phát triển bền vững loài cây này là cần thiết. Mục tiêu nghiên cứu là thiết lập quy trình nhân giống *in vitro* thông qua phát sinh cơ quan từ mô sẹo dựa vào kết quả khảo sát ảnh hưởng của các điều kiện nuôi cấy. Kết quả cho thấy các chất điều hòa sinh trưởng TDZ, BAP, NAA, IBA có ảnh hưởng tích cực đến mẫu nuôi cấy. Một quy trình nuôi cấy đã được thiết lập với các điều kiện như sau: (1) Cầm ứng mô sẹo từ đoạn thân non trên môi trường MS cơ bản; (2) tái sinh chồi từ mô sẹo trên môi trường với 0,25 mg/L TDZ + 0,5 mg/L IBA; (3) nhân nhanh chồi với 1,0 mg/L BAP; (4) tạo rễ trên môi trường với 0,75 mg/L IBA; (5) cây con *in vitro* có thể được huấn luyện ở điều kiện vườn ươm với giá thể là hỗn hợp đất sét: đất cát: bột xơ dừa: phân hoai mục (1:1:1:1).

Từ khóa - Khôi nhung; nhân giống *in vitro*; phát sinh cơ quan từ mô sẹo; nuôi cấy *in vitro*

1. Đặt vấn đề

Khôi nhung (*A. silvestris*), còn có các tên gọi khác như Khôi tía, Cơm nguội rừng, Đơn tướng quân, là một loài cây bụi, thân gỗ, sống lâu năm thuộc chi *Ardisia*, họ Đơn nem (Primulaceae). Loài này được ghi nhận phân bố ở Việt Nam và Trung Quốc (Đảo Hải Nam). Ở nước ta, cây phân bố rải rác ở các tỉnh như Lào Cai, Lạng Sơn, Quảng Ninh, Vĩnh Phúc, Hà Tây, Hòa Bình, Ninh Bình, Thanh Hóa, Nghệ An, Quảng Nam, Đà Nẵng [1, 2]. Trong y học cổ truyền, Khôi nhung được đánh giá là vị thuốc quý. Các bộ phận của cây, thường lá và rễ, được sử dụng để điều trị chứng bệnh đau dạ dày do viêm, chống viêm, giảm đau [1]. Nhiều nhóm hợp chất có hoạt tính sinh học như alkaloids, flavonoids, coumarins, tannins, anthocyanoids, carotenoids, proanthocyanidins, saponins và anthraquinones đã được phát hiện trong dịch chiết từ lá cây [3]. Hoạt tính kháng oxy hóa, kháng khuẩn, chống lão hóa và bảo vệ tế bào keratinocytes ở người cũng đã được quan sát qua các nghiên cứu gần đây [4]. Một số sản phẩm nghiên cứu dạng viên nén làm từ cao chiết cũng đã cho thấy tác dụng bảo vệ dạ dày [5]. Tuy có vùng phân bố rộng nhưng số lượng cây Khôi nhung trong tự nhiên hiện nay vẫn còn hạn chế do khả năng tái sinh

Abstract - *Ardisia silvestris* Pit. is a high-value medicinal plant. Therefore, it is necessary to establish various methods in vitro culture for conserving and cultivating this species. The present research aims to establish an in vitro propagation protocol through organogenesis from callus, based on evaluating effects of different culture conditions. The results showed that the plant growth regulators (TDZ, BAP, NAA, and IBA) had a positive effect on the cultured samples. A culture protocol was established under the following conditions: (1) Callus induction from young stem segments on basic MS medium; (2) Shoot regeneration from callus on MS with 0.25 mg/L TDZ + 0.5 mg/L IBA; (3) Shoot multiplication on MS with 1.0 mg/L BAP; (4) Root induction on MS with 0.75 mg/L IBA; (5) *In vitro* plantlets can be acclimatized under nursery conditions using a substrate mixture of clay soil, sandy soil, coconut fiber powder, and decomposed organic fertilizer (1:1:1:1).

Key words - *Ardisia silvestris*; *in vitro* propagation; callus-mediated organogenesis; *in vitro* culture

thấp vì tác động của việc khai thác quá mức và các điều kiện môi trường bất lợi [6]. Nó đã được xếp vào danh mục Sách đỏ Việt Nam (2007) với mức độ sẽ nguy cấp và khuyến cáo “chi khai thác có mức độ hạn chế”. Trước yêu cầu bảo tồn và phát triển bền vững loài cây thuốc này, trong những năm gần đây đã có một số nghiên cứu tái sinh và nhân giống bằng kỹ thuật nuôi cấy mô với những kết quả thành công bước đầu [7, 8, 13]. Các nghiên cứu này chủ yếu tái sinh cây *in vitro* thông qua hình thức phát sinh chồi trực tiếp từ mẫu cấy ban đầu là đoạn thân mang chồi ngủ. Cụ thể, nghiên cứu của Nguyễn Văn Việt và cộng sự đã cho thấy khả năng tái sinh và nhân chồi trong môi trường có bổ sung BA và tạo rễ của chồi với sự có mặt của NAA và IBA [13]. Sau đó, Đoàn Thị Thu Hương và cộng sự [7] và Nguyễn Văn Toàn và cộng sự [8] đã thiết lập các điều kiện nuôi cấy ở các mức nồng độ và chất điều hòa sinh trưởng khác nhau (ví dụ TDZ) để nâng cao hiệu quả nhân chồi, tạo rễ và hoàn thiện quy trình nhân giống *in vitro* [7, 8]. Bên cạnh chồi ngủ, các phôi soma hoặc mô sẹo có khả năng phát sinh phôi là những nguồn vật liệu có giá trị để tái sinh chồi *in vitro* nhằm nâng cao hiệu quả nhân chồi, được áp dụng thành công ở nhiều loài cây thực vật. Tuy nhiên, ở loài Khôi nhung, khả năng nhân giống theo

¹ The University of Danang – University of Science and Education, Vietnam (Tuan Vo Chau, Hoang Vu Duc, Lin Tra Thanh, Dan Tran Quang)

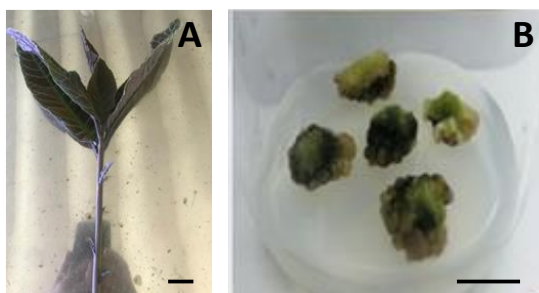
² Son Tra High School of Danang, Vietnam (Hong Ngo Thi Van)

các phương thức tái sinh này vẫn chưa được nghiên cứu đầy đủ. Lần đầu tiên, nghiên cứu của Minh và cộng sự đã cho thấy, khả năng tái sinh chồi của mô sẹo cảm ứng từ mẫu lá Khôi nhung trên môi trường nuôi cấy bổ sung TDZ kết hợp với NAA và IAA, nhưng vẫn chưa đánh giá khả năng nhân chồi và tạo rễ của chồi tái sinh [9]. Ở một loài khác cùng chi, Hua và cộng sự đã thiết lập được quy trình tái sinh và nhân chồi thông qua mô sẹo loài *A. mamillata* với nguồn mẫu ban đầu là chồi đỉnh [14]. Những điều này thể hiện tiềm năng của phương thức nhân giống thông qua mô sẹo của loài Khôi nhung. Do đó, mục tiêu của nghiên cứu này là thiết lập một quy trình nhân giống thông qua phương thức tái sinh chồi từ mô sẹo với nguồn mẫu là đoạn thân. Quy trình được thiết lập dựa vào kết quả nghiên cứu ảnh hưởng các điều kiện nuôi cấy, tập trung vào ảnh hưởng của các chất điều hòa sinh trưởng (TDZ, BAP, NAA, IBA) ở các bước tái sinh chồi, nhân chồi, tạo rễ và huấn luyện cây con.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu

Vật liệu là phần đoạn thân non, khỏe mạnh có chiều dài khoảng 20-30 cm tính từ chồi đỉnh (Hình 1A) được thu thập từ các cây Khôi nhung phân bố tại Khu bảo tồn thiên nhiên Sơn Trà – Đà Nẵng. Sau khi thu, mẫu được bảo quản cẩn thận và vận chuyển về phòng thí nghiệm để xử lý ở bước tiếp theo.



Hình 1. Chồi cây Khôi nhung với đoạn thân non (A) và mô sẹo cảm ứng từ mẫu đoạn thân (B). Thanh kích thước = 2,0 cm

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Khử trùng mẫu ban đầu và cảm ứng mô sẹo

Đoạn thân non được cắt thành các đoạn ngắn và rửa sạch dưới vòi nước chảy trong 60 phút, sau đó ngâm trong dung dịch xà phòng loãng khoảng 25-30 phút và rửa sạch lại dưới vòi nước chảy khoảng 15 phút, cắt thành các đoạn mẫu ngắn (dài khoảng 5 cm) rồi chuyển vào trong tủ cấy vô trùng. Khử trùng đoạn thân bằng ethanol 70% trong 01 phút; sau đó khử trùng bằng dung dịch NaOCl 5% ở các khoảng thời gian 4-10 phút; sau đó mẫu được rửa sạch lại bằng nước cất vô trùng 03 lần, cắt lát dày 1 mm và cấy trên môi trường MS [10] có bổ sung 30 g/L sucrose và 3 g/L agar để cảm ứng mô sẹo. Ảnh hưởng của thời gian xử lý đến hiệu quả khử trùng và cảm ứng mô sẹo đã được xác định qua các chỉ tiêu: tỷ lệ mẫu sạch, tỷ lệ mẫu cảm ứng mô sẹo, thời gian cảm ứng sau 4 tuần nuôi cấy.

2.2.2. Tái sinh chồi từ mô sẹo

Mô sẹo cảm ứng từ đoạn thân được tách thành các khối có đường kính khoảng 3 mm và nuôi cấy trên môi trường MS có bổ sung TDZ (0,1; 0,25; 0,5 và 1,0 mg/L) phối hợp

với IBA (0,3; 0,5; 0,7 và 1,0 mg/L). Ảnh hưởng của TDZ và IBA đến khả năng tái sinh chồi từ mô sẹo được xác định thông qua các thông số: thời gian và tỷ lệ mẫu phát sinh chồi (%), đặc điểm hình thái của chồi sau 6 tuần nuôi cấy.

2.2.3. Nhân nhanh chồi in vitro

Cụm chồi tái sinh từ mô sẹo sau 6 tuần nuôi cấy được tách ra thành các mẫu (3 mm) và nuôi cấy trên môi trường MS có bổ sung 0,5-2,0 mg/L BAP để nhân nhanh chồi. Ảnh hưởng của BAP đến năng suất nhân nhanh chồi được xác định thông qua các chỉ tiêu: số chồi/mẫu, chiều cao chồi, số lá/chồi sau 4 tháng nuôi cấy.

2.2.4. Tạo rễ

Các chồi tái sinh khỏe có chiều cao từ 3-4 cm, 4-5 lá được tách ra từ cụm chồi và nuôi cấy trên môi trường MS có bổ sung riêng rẽ IBA (0,1; 0,25; 0,5 và 0,75 mg/L) và NAA (0,1; 0,25; 0,5 và 0,75 mg/L để cảm ứng rễ. Ngoài ra, chồi cũng được nuôi cấy trên môi trường MS có bổ sung than hoạt tính với các mức 0,5; 1,0; 1,5 và 2,0 g/L; và môi trường ½ MS và ¼ MS để khảo sát khả năng tạo rễ. Ảnh hưởng của IBA, NAA, MS và than hoạt tính đến khả năng tạo rễ được đánh giá thông qua các chỉ tiêu: thời gian chồi bắt đầu hình thành rễ, tỷ lệ chồi ra rễ, số rễ/chồi, chiều dài rễ sau 4 tuần nuôi cấy.

2.2.5. Huấn luyện thích nghi ở vườn ươm

Cây hoàn chỉnh sau tạo rễ ở trong bình nuôi cấy được cho thích nghi 15 ngày ở vườn ươm, sau đó chuyển sang các túi bầu ươm có kích thước (8x12 cm) có chứa hỗn hợp các hỗn hợp cơ chất với tỉ lệ: đất sét:đất cát (3:1); đất sét: đất cát (2:1); đất sét: đất cát (1:1); đất sét: đất cát: phân chuồng mục (1:1:1); đất sét: đất cát: xơ dừa: phân chuồng mục (1:1:1:1). Đất sét sử dụng là loại đất sét thu thập ở Khu Bảo tồn thiên nhiên Sơn Trà-Đà Nẵng. Các túi bầu ươm được phủ bằng ly nhựa trong suốt có lỗ thông khí trong các khoảng thời gian 7-20 ngày để giữ ẩm giai đoạn đầu, sau đó loại bỏ khỏi túi bầu ươm. Các bầu ươm được tưới phun để giữ ẩm hàng ngày. Ảnh hưởng của giá thể đến khả năng thích nghi và sinh trưởng của cây được đánh giá thông qua tỷ lệ cây sống, chiều cao chồi, số lá/cây, đặc điểm chồi sau 03 tháng ươm trồng. Quá trình huấn luyện được thực hiện ở điều kiện vườn ươm tại Khu Bảo tồn thiên nhiên Sơn Trà-Đà Nẵng ở độ cao 150 m so với mặt nước biển, nhiệt độ khoảng 25-32°C, độ ẩm không khí 70-80%.

2.2.6. Chuẩn bị môi trường và điều kiện nuôi cấy in vitro

Sau khi phối trộn đầy đủ các thành phần dinh dưỡng [10] (hóa chất xuất xứ từ Trung Quốc) và chất điều hòa sinh trưởng (hóa chất xuất xứ từ Ấn Độ), môi trường nuôi cấy được điều chỉnh giá trị pH=5,8 trước khi phân phối vào bình nuôi và hấp khử trùng ở điều kiện: 121°C, áp suất 1,0 atm và 20 phút. Các mẫu sau khi cấy trên môi trường được duy trì ở nhiệt độ 25 ± 2°C, chiếu sáng bằng đèn huỳnh quang với cường độ 3.000 lux và thời gian chiếu sáng 12 giờ/ngày.

2.2.7. Bố trí thí nghiệm và xử lý số liệu

Ở mỗi thí nghiệm nuôi cấy *in vitro*, mỗi nghiệm thức bao gồm 10-15 mẫu cây với 3-5 mẫu/bình nuôi. Mỗi nghiệm thức được thực hiện lặp lại 03 lần. Riêng thí nghiệm khảo sát khả năng tái sinh chồi từ mô sẹo sử dụng

30 mẫu/lần lặp lại. Các giá trị thống kê mô tả (giá trị trung bình±độ lệch chuẩn) của các chỉ tiêu quan sát và sự khác biệt có ý nghĩa giữa các nghiệm thức (theo phép phân tích hậu định Duncan's test) được thực hiện bằng phần mềm SAS với mức ý nghĩa $\alpha=0,05$.

3. Kết quả và thảo luận

3.1. Ảnh hưởng của thời gian xử lý Javen đến hiệu quả khử trùng và khả năng tái sinh chồi

Xử lý để loại bỏ các vi sinh vật bám ở mẫu vật ban đầu là bước quan trọng để tạo nguồn mẫu nuôi cấy vô trùng. Ở nghiên cứu này, nhóm tác giả lựa chọn mẫu đoạn thân non vì mẫu ít bị tạp nhiễm và khả năng cảm ứng phát sinh mô sẹo của phần mô non thường tốt hơn so với các phần khác (Hình 1A). Một số nghiên cứu trước đây đã sử dụng Javen 3% (w/w) hoặc HgCl₂ 0,1% (w/w) để khử trùng mẫu cấy ban đầu [7, 8]. Việc lựa chọn các tác nhân tùy thuộc vào tính chất môi trường cây mẹ và loại mẫu sử dụng. Trong nghiên cứu này đã sử dụng Javen 5% với các khoảng thời gian xử lý khác nhau. Kết quả cho thấy, khi thời gian xử lý tăng dần trong khoảng 4-10 phút thì tỷ lệ mẫu sạch có xu hướng tăng lên với tỷ lệ cao nhất (83,33%) ở 10 phút (Bảng 1). Bên cạnh đó, thời gian xử lý cũng ảnh hưởng đến khả năng tái sinh mô sẹo. Thời gian xử lý 8-10 phút đã cho hiệu quả cảm ứng mô sẹo tốt hơn so với các mức còn lại. Như vậy, xử lý mẫu bằng Javen 5% trong khoảng 8-10 phút có thể giúp đạt được cả mục tiêu khử trùng và tái sinh mô sẹo. Hình thái và cấu trúc mô sẹo (màu xanh đậm, các khối cầu nhỏ) phát triển trên môi trường nuôi cấy MS cho thấy có khả năng phát sinh cơ quan, từ đó hình thành cây hoàn chỉnh (Hình 1B).

Bảng 1. Hiệu quả khử trùng với Javen ở các mức thời gian xử lý khác nhau

Thời gian xử lý (phút)	Hiệu quả khử trùng		
	Tỷ lệ mẫu không nhiễm (%)	Tỷ lệ mẫu tái sinh (%)	Thời gian cảm ứng (ngày)
4	50,33	46,67	15
6	60,67	56,67	17
8	66,67	63,33	20
10	83,33	60,67	20

* Giá trị tỷ lệ là trung bình của ba lần lặp lại (n=3).

3.2. Ảnh hưởng của TDZ và IBA đến khả năng tái sinh chồi từ mô sẹo

Các khối mô sẹo cảm ứng từ đoạn thân (Hình 1B) đã có những phản ứng khác nhau khi nuôi trên môi trường MS có bổ sung TDZ kết hợp với IBA (Bảng 2). Hầu hết các môi trường bổ sung TDZ và IBA các mô sẹo đều có phát sinh chồi sau 6 tuần nuôi cấy; tuy nhiên mức độ phát sinh là khác nhau giữa các nghiệm thức. Nghiên cứu trước đây cho thấy TDZ chỉ thể hiện khả năng cảm ứng chồi khi kết hợp với auxin [9]. Kết quả nghiên cứu, chứng tỏ khi kết hợp với một mức nồng độ IBA nhất định, nếu tăng nồng độ TDZ từ 0,25 đến 1,0 mg/L thì tỷ lệ mô sẹo tạo chồi có xu hướng giảm dần từ 44,44-55,55% đến 2,22-6,66%. Tỷ lệ tạo chồi cao nhất ở nồng độ 0,25 mg/L TDZ và giảm rõ rệt khi nồng độ TDZ từ 0,5 mg/L trở lên, các chồi hình thành chuyển từ màu xanh đậm sang màu hồng nhạt (Bảng 2). Tuy nhiên, ảnh hưởng tạo chồi của TDZ chỉ thể hiện khi kết hợp với auxin [9]. Một

xu hướng tương tự cũng được quan sát khi thay đổi nồng độ IBA ở cùng một nồng độ TDZ, tỷ lệ mẫu tạo chồi có xu hướng giảm dần khi tăng dần nồng độ IBA trong môi trường nuôi cấy. Điển hình ở 0,25 mg/L TDZ, tỷ lệ mẫu tạo chồi giảm 55,55% đến 44,44% khi tăng nồng độ IBA từ 0,5 đến 2,0 mg/L, tuy nhiên mức độ giảm không lớn so với trường hợp thay đổi nồng độ TDZ. Điều này cho thấy vai trò quan trọng của TDZ trong cảm ứng chồi ở cây Khôi nhung. Vai trò của TDZ trong việc cảm ứng chồi cũng đã được khẳng định thông qua nghiên cứu của Trần Đức Minh và cộng sự với các mô sẹo từ lá; nồng độ 1,0 mg/L TDZ đã được sử dụng để cảm ứng chồi từ dòng mô sẹo này [9]. Bên cạnh ảnh hưởng riêng lẻ, sự kết hợp TDZ và IBA cũng mang lại tác động đáng kể đến cảm ứng chồi từ mô sẹo. Khả năng cảm ứng chồi có xu hướng giảm dần (từ 55,55% đến 2,22%) khi tăng dần nồng độ TDZ và IBA. Trong đó, mô sẹo thể hiện tỷ cảm ứng chồi tốt nhất ở 0,25 mg/L TDZ + 0,5-1,0 mg/L IBA (Bảng 2). Mặc dù phân tích thống kê không thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa giữa môi trường bổ sung 0,25 mg/L TDZ + 0,5 mg/L IBA và 0,25 mg/L TDZ + 1,0 mg/L IBA nhưng với giá trị tỷ lệ cao hơn và trạng thái chồi tái sinh cho thấy môi trường đầu tiên có hiệu quả tạo chồi tốt hơn. Các chồi hình thành trên các môi trường này có màu xanh đậm, chồi khỏe mạnh (Hình 2A). Trong nghiên cứu trước đây, Trần Đức Minh và cộng sự đã kết hợp TDZ với IAA hoặc NAA ở các nồng độ khác nhau để tạo chồi từ mô sẹo của lá cây Khôi nhung, với tỷ lệ cảm ứng tăng cao khi IAA/NAA ở mức 0,3-0,5 mg/L [9]. Kết quả nghiên cứu cho thấy, ngoài IAA và NAA thì IBA cũng có ảnh hưởng đến khả năng tái sinh chồi từ mô sẹo ở loài cây này với mức nồng độ tương đương; đồng thời khẳng định vai trò của nóm auxin này đối với cảm ứng chồi. Ở loài *A. mamillata*, 0,2 mg/L NAA cũng đã được sử dụng để tăng hiệu quả cảm ứng chồi từ mô sẹo khi kết hợp với 0,4 mg/L forchlorfenuron [14].

Bảng 2. Ảnh hưởng của TDZ và IBA đến khả năng tái sinh chồi từ mô sẹo sau 6 tuần nuôi cấy

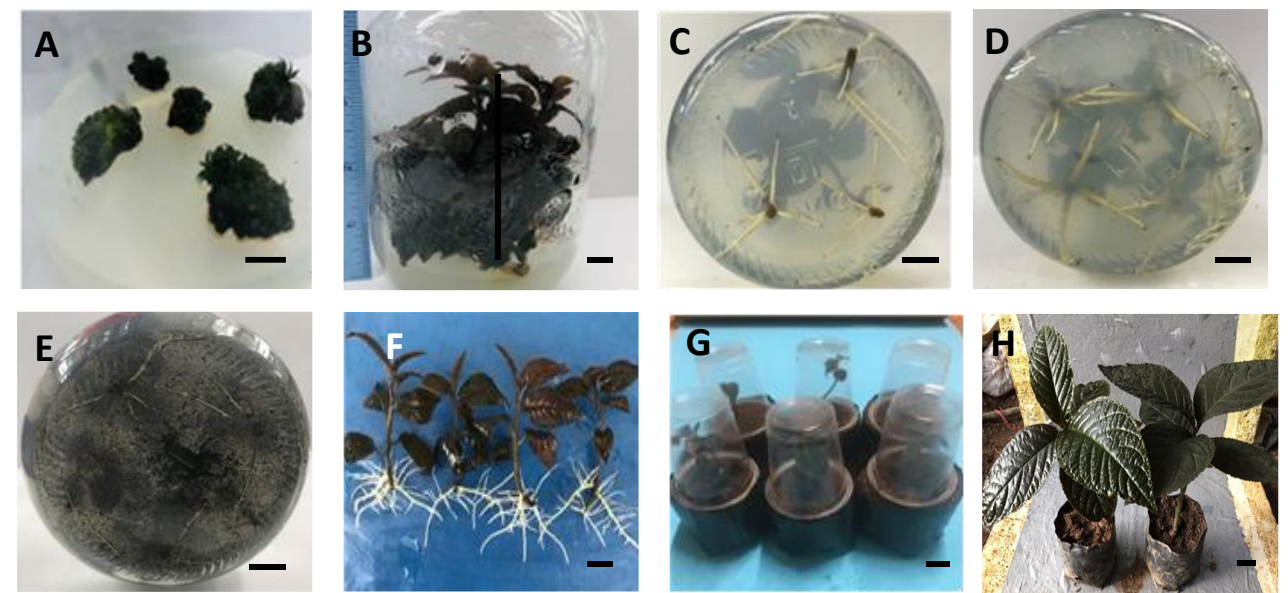
Chất điều hòa sinh trưởng (mg/L)		Tỷ lệ mẫu tái sinh chồi (%)	Hình thái chồi
TDZ	IBA		
0,25	0,5	55,55±3,84 ^a	Xanh đậm
	1,0	48,88±5,09 ^{ab}	Xanh đậm
	2,0	44,44±1,92 ^b	Xanh nhạt
0,5	0,5	11,10±5,09 ^c	Xanh nhạt
	1,0	8,88±1,92 ^c	Hồng nhạt
	2,0	6,66±3,33 ^{cd}	Hồng nhạt
1,0	0,5	4,44±1,93 ^d	Hồng nhạt
	1,0	6,66±3,33 ^{cd}	Hồng nhạt
	2,0	2,22±1,92 ^d	Hồng nhạt

* Các chữ cái khác nhau (^{a, b, ...}) trong cùng một cột thể hiện sự sai khác có ý nghĩa thống kê với giá trị $p < 0,05$ (n=3).

3.3. Ảnh hưởng của BAP đến khả năng nhân nhanh chồi

Việc xác định được môi trường tối ưu để nuôi cấy nhân nhanh chồi, làm tăng số lượng chồi/mẫu, đồng thời các chồi đều đạt chất lượng tốt trước khi chuyển sang môi trường tạo rễ và cây hoàn chỉnh là một yêu cầu cần thiết trong quy trình nhân giống *in vitro* [11]. Căn cứ các nghiên cứu trước đây, nhóm tác giả đã sử dụng BAP, một cytokinin điển hình, với các mức nồng độ 0,5-2,0 mg/L để đánh giá ảnh

hường của nó đến khả năng nhân chồi từ các chồi tái sinh. Kết quả cho thấy BAP có ảnh hưởng rõ ràng đến khả năng nhân chồi với hiệu quả nhân cao nhất ở nồng độ 1,0 mg/L không cần thiết, thay vào đó nồng độ auxin cao hơn cần được duy trì trong môi trường nuôi cấy. Các auxin có tác động thúc đẩy sự sinh trưởng và kéo giãn của tế bào, tăng



Hình 2. Hình thái của các mẫu nuôi cấy/cây ở các giai đoạn khác nhau. A, Tái sinh chồi từ mô sẹo trên môi trường MS có bổ sung 0,25 mg/L TDZ + 0,5 mg/L IBA; B, Nhân nhanh chồi trên môi trường MS có bổ sung 1,0 mg/L BAP; C-E, Chồi tạo rễ trên môi trường MS tương ứng có bổ sung 0,75 mg/L IBA (C), 0,75 mg/L NAA (D) và 1,5 g/L than hoạt tính (E); F, Cây in vitro trước khi vào bầu ươm; G, Cây in vitro trồng trong bầu ươm ở giai đoạn huấn luyện ở vườn ươm; H, Cây giống in vitro sau 6 tháng ươm trồng. Thanh kích thước = 1,0 cm

(Bảng 3). Các chỉ tiêu theo dõi đều đạt giá trị cao nhất ở nồng độ này; tỷ lệ mẫu cảm ứng 91,10%, số chồi/mẫu đạt 8,2 chồi, chiều cao chồi đạt 5,42 cm, số lá/chồi đạt 8,86 sau 4 tháng nuôi cấy (Hình 2B). Khi tăng hoặc giảm nồng độ BAP thì hiệu quả nhân chồi có xu hướng giảm xuống. Sự hình cụm chồi ở điều kiện môi trường có BAP hoặc BAP+NAA cũng đã được báo cáo ở một nghiên cứu gần đây của Nguyễn Văn Toàn và cộng sự. (2024); với tỷ lệ mẫu nhân chồi (89,22%) không khác biệt đáng kể so với kết quả nghiên cứu [8]. Ở một nghiên cứu khác, môi trường MS có bổ sung kết hợp 1,0 mg/L BAP, 0,3 mg/L kinetin và 0,1 mg/L NAA đã cho tỷ lệ tái sinh cao hơn (99,31%) từ mẫu chồi bên [7]. Sự khác biệt này có thể do khác nhau về nguồn mẫu chồi tái sinh ban đầu.

Bảng 3. Ảnh hưởng của BAP đến khả năng nhân nhanh chồi sau 4 tháng nuôi cấy

BAP (mg/L)	Tỷ lệ mẫu tạo cụm chồi (%)	Số chồi/mẫu	Chiều cao chồi (cm)	Số lá/chồi
0,5	64,44	4,80±0,53 ^c	2,15±0,26 ^c	5,42±0,59 ^b
1,0	91,10	8,20±0,90 ^a	5,42±0,65 ^a	8,68±0,78 ^a
1,5	88,88	6,40±0,70 ^b	3,84±0,46 ^b	7,45±0,82 ^{ab}
2,0	68,88	3,40±0,37 ^d	3,42±0,61 ^b	5,54±0,61 ^b

* Các chữ cái khác nhau (^{a, b, ...}) trong cùng một cột thể hiện sự sai khác có ý nghĩa thống kê với giá trị $p < 0,05$ ($n=30-45$).

3.4. Ảnh hưởng của các chất điều hòa sinh trưởng và môi trường nuôi cấy đến khả năng tạo rễ

3.4.1. Ảnh hưởng của NAA và IBA đến khả năng tạo rễ

Trong giai đoạn nhân chồi, hàm lượng cytokinin thường cao hơn so với auxin; tuy nhiên, trong giai đoạn ra rễ, việc sử dụng cytokinin trong một số trường hợp là

cường các quá trình tổng hợp và trao đổi chất, kích thích hình thành rễ [12]. Trong nghiên cứu này, nhóm tác giả đã khảo sát ảnh hưởng của 2 loại auxin (IBA và NAA) ở mức nồng độ thấp đến khả năng tạo rễ của chồi cây Khôi nhưng.

Ở điều kiện có IBA, kết quả cho thấy tỷ lệ 100% chồi đã cảm ứng rễ sau khoảng 14-15 ngày nuôi cấy trên các môi trường khảo sát (Bảng 4). Khi nồng độ IBA tăng từ 0,1 đến 0,75 mg/L thì khả năng tạo rễ có xu hướng tăng dần. Số lượng rễ từ 2,5 đến 3,75 rễ/chồi, chiều dài rễ 1,69-2,22 cm. Khả năng tạo rễ tốt nhất ở điều kiện 0,5-0,75 mg/L IBA với số rễ đạt 3,75 rễ/chồi, chiều dài rễ 2,22 cm sau 4 tuần nuôi cấy. Rễ khỏe, có màu trắng xanh, có nhiều rễ phụ, có độ bám gốc thân khá tốt (Hình 2C, F).

Bảng 4. Ảnh hưởng của IBA đến khả năng tạo rễ sau 4 tuần nuôi cấy

IBA (mg/L)	Thời gian ra rễ (ngày)	Khả năng tạo rễ		
		Số rễ/chồi	Chiều dài rễ (cm)	Tỷ lệ phát sinh rễ (%)
0,10	14	2,50±0,38 ^b	1,69±0,19 ^b	100
0,25	15	2,75±0,41 ^b	1,93±0,21 ^b	100
0,50	15	3,30±0,50 ^{ab}	2,51±0,28 ^a	100
0,75	14	3,75±0,56 ^a	2,22±0,24 ^a	100

*Các chữ cái khác nhau (^{a, b, ...}) trong cùng một cột thể hiện sự sai khác có ý nghĩa thống kê với giá trị $p < 0,05$ ($n=30-45$).

Ở điều kiện bổ sung NAA, các chồi đã cảm ứng tạo rễ sau khoảng 20-30 ngày nuôi cấy với tỷ lệ cảm ứng 21-100% sau 04 tuần (Bảng 5). Tương tự IBA, tăng dần nồng độ NAA trong môi trường nuôi cấy đã làm tăng hiệu quả cảm ứng rễ của chồi, tuy nhiên thời gian tạo rễ dài hơn và

tỷ lệ tạo rễ thấp hơn so với IBA (Bảng 4; Bảng 5). Trong đó, khả năng tạo rễ tốt nhất ở điều kiện bổ sung 0,75 mg/L NAA với thời gian cảm ứng là 20 ngày; tỷ lệ mẫu cảm ứng 100%, hình thành 4,85 rễ/chồi, chiều dài rễ 2,58 cm sau 4 tuần nuôi cấy. Ở điều kiện này, rễ phình to, có màu trắng xanh, ít rễ phụ, rễ dễ đứt gãy, độ bám vào thân không chắc chắn (Hình 2D). Trong số các auxin, NAA là chất tổng hợp có hoạt tính mạnh so với IBA/IAA. Sự có mặt có của nó trong môi trường ở nồng độ cao có thể gây ra một số hiệu ứng khác thay vì kích thích sự kéo dài tế bào bình thường để tạo rễ, ví dụ như cảm ứng phân chia tế bào bất thường, gây ức chế lignin hóa, tăng hấp thu nước,... dẫn đến làm cho đường kính rễ tăng, giòn và dễ đứt gãy (hiện tượng thủy tinh hóa). Hiện tượng tương tự đã được quan sát bởi Cui và cộng sự khi nuôi cấy tạo rễ cây *Broussonetia papyrifera* với nồng độ NAA lớn hơn 0,8 mg/L [15].

Bảng 5. Ảnh hưởng của NAA đến khả năng tạo rễ sau 4 tuần nuôi cấy

Khả năng tạo rễ <i>in vitro</i>				
NAA (mg/L)	Thời gian bắt đầu ra rễ (ngày)	Số rễ/chồi	Chiều dài rễ (cm)	Tỷ lệ phát sinh rễ (%)
0,10	30	0,25±0,04 ^d	0,24±0,03 ^c	21
0,25	20	1,65±0,25 ^c	0,85±0,10 ^b	75
0,50	20	3,85±0,58 ^{ab}	2,37±0,26 ^a	100
0,75	20	4,85±0,73 ^a	2,58±0,28 ^a	100

* Các chữ cái khác nhau (^{a, b, ...}) trong cùng một cột thể hiện sự sai khác có ý nghĩa thống kê với giá trị $p < 0,05$ ($n=30-45$).

Sự hình thành rễ của chồi trên môi trường IBA và NAA cho thấy vai trò thúc đẩy của các auxin này đối với quá trình tạo rễ của cây Khôi nhưng. Tuy nhiên, ở cùng một nồng độ thì IBA có xu hướng kích thích tạo rễ sớm hơn so với NAA, trong khi đó, số rễ/chồi ở môi trường NAA cao hơn so với IBA (Bảng 4; Bảng 5). Căn cứ vào thời gian cảm ứng và chiều dài rễ thì môi trường có bổ sung 0,75 mg/L IBA cho hiệu quả cảm ứng rễ tốt hơn so với NAA. Đoàn Thị Thu Hương và cộng sự. (2019) cũng đã báo cáo về hiệu quả tạo rễ của IBA ở nồng độ 0,5 mg/L, với tỷ lệ chồi tạo rễ đạt 83,17%, số rễ/chồi đạt 3,53 rễ [7]. Kết quả nghiên cứu cho thấy, khả năng tạo rễ có thể được tăng lên khi tăng nồng độ IBA ở mức 0,75 mg/L.

3.4.2. Ảnh hưởng của than hoạt tính và môi trường MS đến khả năng tạo rễ

Than hoạt tính thường được bổ sung vào môi trường nuôi cấy để làm môi trường tối hơn; hấp phụ các chất không mong muốn hoặc các chất bất lợi trong môi trường; qua đó thúc đẩy sự sinh trưởng và phát triển của mô cây. Trong nghiên cứu này, đã khảo sát ảnh hưởng của than hoạt tính ở nồng độ 0,5-2,0 mg/L đến hiệu quả cảm ứng rễ *in vitro*. Kết quả cho thấy, việc bổ sung than hoạt tính vào môi trường nuôi cấy đã ảnh hưởng tích cực đến quá trình hình thành rễ. Tỷ lệ chồi cảm ứng rễ đạt 100% với với số rễ/chồi đạt 3,50 rễ (Bảng 6) sau 12 ngày nuôi cấy trên môi trường bổ sung 2,0 g/L than hoạt tính. Rễ hình thành chắc khỏe, có màu trắng, có nhiều rễ phụ ngắn, có khả năng sinh trưởng tốt (Hình 2E).

Bên cạnh than hoạt tính, các khoáng chất là thành phần

đinh dưỡng quan trọng của môi trường nuôi cấy. Môi trường MS được phân loại là môi trường giàu dinh dưỡng cho nuôi cấy *in vitro*. Tuy nhiên, việc giảm hàm lượng dinh dưỡng khoảng này trong môi trường nuôi cấy nhưng vẫn duy trì hoặc tạo ra được hiệu quả tạo rễ tốt hơn là điều cần thiết vì nó sẽ mang lại hiệu quả kinh tế cho các quy trình nhân giống ứng dụng thực tiễn. Trong nghiên cứu này, đã so sánh hiệu quả tạo rễ giữa các môi trường MS, ½ MS, ¼ MS. Kết quả cho thấy, khi giảm MS ở mức ½ MS thì hiệu quả tạo rễ tốt hơn so với MS đầy đủ. Thời gian bắt đầu cảm ứng là 10 ngày, với tỷ lệ chồi tạo rễ đạt 100% với số rễ/chồi đạt 3,37 rễ, chiều dài rễ 4,73 cm (Bảng 7). Kết quả tương tự cũng được báo cáo trong một nghiên cứu gần đây bởi Nguyễn Văn Toàn và cộng sự [8]. Từ hiệu quả tạo rễ của chồi *in vitro* trên các môi trường bổ sung than hoạt tính và giảm hàm lượng khoáng MS (Bảng 6; Bảng 7), cho thấy việc sử dụng các điều kiện này kết hợp với nồng độ 0,75 mg/L mg/L IBA (Bảng 5) có thể sẽ tạo ra điều kiện môi trường thích hợp mang lại hiệu quả tạo rễ cao hơn.

Bảng 6. Ảnh hưởng của than hoạt tính đến khả năng tạo rễ sau 4 tuần nuôi cấy.

Than hoạt tính (g/L)	Khả năng tạo rễ <i>in vitro</i>			
	Thời gian ra rễ (ngày)	Số rễ/chồi	Thời gian ra rễ (ngày)	Tỷ lệ phát sinh rễ (%)
0,5	12	2,89±0,32 ^c	2,05±0,23 ^b	100
1,0	12	2,25±0,25 ^b	2,25±0,25 ^b	100
1,5	12	3,35±0,37 ^a	2,95±0,32 ^{ab}	100
2,0	12	3,50±0,39 ^a	3,35±0,37 ^a	100

Ghi chú: Các chữ cái khác nhau (^{a, b, ...}) trong cùng một cột thể hiện sự sai khác có ý nghĩa thống kê với giá trị $p < 0,05$ ($n=30-45$).

Bảng 7. Ảnh hưởng của dinh dưỡng MS đến khả năng tạo rễ sau 4 tuần nuôi cấy

Môi trường MS	Khả năng tạo rễ <i>in vitro</i>			
	Thời gian ra rễ (ngày)	Số rễ/chồi	Chiều dài rễ (cm)	Tỷ lệ phát sinh rễ (%)
MS	10	2,91±0,44 ^b	4,33±0,39 ^{ab}	100
½ MS	10	3,37±0,50 ^a	4,73±0,23 ^a	100
¼ MS	12	2,60±0,39 ^b	4,09±0,37 ^b	100

* Các chữ cái khác nhau (^{a, b, ...}) trong cùng một cột thể hiện sự sai khác có ý nghĩa thống kê với giá trị $p < 0,05$ ($n=30-45$).

3.5. Ảnh hưởng của giá thể đến khả năng thích nghi và sinh trưởng của cây *in vitro*

Huấn luyện cây ở điều kiện vườn ươm phù hợp là giai đoạn quan trọng để đảm bảo tỷ lệ cây sống và khả năng sinh trưởng về sau của cây. Ở giai đoạn ra bầu, cây *in vitro* rất dễ bị mất nước và nhạy cảm trước điều kiện môi trường bên ngoài. Do đó, ngoài việc duy trì độ ẩm, nhiệt độ ở mức thích hợp thì giá thể ươm trồng là một trong những yếu tố quan trọng ảnh hưởng đến thích nghi và khả năng sinh trưởng thành cây giống. Do đó, giá thể được lựa chọn vừa là nơi cung cấp dinh dưỡng, duy trì độ ẩm vừa là môi trường có cấu trúc phù hợp để hệ rễ có thể thích nghi. Trong nghiên cứu này, đã sử dụng các hỗn hợp giá thể khác nhau dựa trên hai thành phần chính là đất sét và đất cát để huấn luyện cây. Kết quả cho thấy, các loại giá thể sử dụng đã ảnh hưởng đến thích nghi của cây (Bảng 8).

Bảng 8. Ảnh hưởng của giá thể đến khả năng thích nghi và sinh trưởng của cây *in vitro* sau 6 tháng ở điều kiện vườn ươm

Giá thể	Tỷ lệ cây sống sót (%)	Khả năng sinh trưởng của cây <i>in vitro</i>		
		Chiều cao chồi (cm)	Số lá/chồi	Tình trạng thể chồi
Đất sét: đất cát (3:1)	60,25	8,06±0,48 ^c	4,01±0,20 ^c	Sinh trưởng chậm
Đất sét: đất cát (2:1)	62,50	8,62±0,51 ^{bc}	4,98±0,45 ^b	Sinh trưởng khá
Đất sét: đất cát (1:1)	85,33	9,56±0,57 ^b	5,06±0,46 ^b	Sinh trưởng khá
Đất sét: đất cát: phân chuồng hoai mục (1:1:1)	90,75	9,23±0,55 ^b	6,56±0,60 ^a	Sinh trưởng tốt
Đất sét: đất cát: bột xơ dừa: phân hoai mục (1:1:1:1)	93,50	12,72±0,76 ^a	6,53±0,59 ^a	Sinh trưởng tốt

* Các chữ cái khác nhau (^{a, b, ...}) trong cùng một cột thể hiện sự sai khác có ý nghĩa thống kê với giá trị $p < 0,05$ ($n=30-45$).

Trên các cơ chất chỉ có phối hợp giữa đất sét và đất cát theo tỉ lệ giảm sét đến cân bằng tỷ lệ sét và cát (từ tỷ lệ 3:1 đến 1:1), khả năng sống của cây tăng dần từ 60,25 đến 62,5% sau 4 tuần ươm trồng. Khi giảm tỷ lệ đất sét và cát bằng việc bổ sung phân chuồng hoặc phân chuồng kết hợp với mụn dừa thì tỷ lệ sống có xu hướng cao hơn, từ 90,75 đến 93,5%. Cây con *in vitro* khi được trồng trên cơ chất đất sét: đất cát: bột xơ dừa: phân hoai mục (1:1:1:1) cho thấy khả năng thích nghi tốt với tỷ lệ sống sót cao nhất (93,5%) (Hình 2F). Những cây sống vẫn tiếp tục sinh trưởng ở các điều kiện khảo sát với khả năng sinh trưởng theo một xu hướng tương tự. Các chỉ tiêu phản ánh sinh trưởng như số lá/chồi, chiều cao chồi đạt giá trị cao nhất ở hỗn hợp cơ chất đất sét: đất cát: bột xơ dừa: phân hoai mục (1:1:1:1) (Hình 2H). Cây có dấu hiệu sinh trưởng tốt, lá xanh có nhúng tía như lá cây ở ngoài tự nhiên. Ngoài giá thể ở trên, một hỗn hợp giá thể khác gồm 50% đất tầng B + 50% đất cát vàng cũng có thể sử dụng để ươm cây [7].

4. Kết luận

Từ kết quả nghiên cứu cho thấy, các yếu tố khảo sát đã có ảnh hưởng theo những cách khác nhau, phụ thuộc vào nồng độ, đến các giai đoạn cảm ứng mô sẹo, nhân chồi, tạo rễ và thích nghi của cây *in vitro*. Với nguồn mẫu ban đầu là đoạn thân non, những cây giống *in vitro* có thể được tạo ra theo phương thức phát sinh cơ quan từ mô sẹo. Căn cứ vào điều kiện tốt nhất ở mỗi giai đoạn, một quy trình nhân giống *in vitro* được thiết lập với các thông số điều kiện nuôi cấy như sau:

- Mẫu đoạn thân non được lựa chọn làm mẫu cấy ban đầu;
- Khử trùng mẫu bằng dung dịch Javen 5% trong 10 phút và cảm ứng mô sẹo trên môi trường MS;
- Tái sinh chồi từ mô sẹo trên môi trường MS có bổ sung 0,25 mg/L TDZ + 0,5 mg/L IBA;
- Nhân nhanh chồi *in vitro* trên môi trường MS có bổ sung 1,0 mg/L BAP;
- Tạo rễ trên môi trường MS có bổ sung 0,75 mg/L IBA;

- Cây con *in vitro* có thể được huấn luyện ở điều kiện vườn ươm với giá thể là hỗn hợp đất sét: đất cát: bột xơ dừa: phân hoai mục (1:1:1:1).

Quy trình nhân giống *in vitro* được thiết lập có thể ứng dụng để tạo nguồn giống *in vitro* đảm bảo chất lượng.

Lời cảm ơn: Tác giả chân thành cảm ơn sự tài trợ kinh phí thực hiện nghiên cứu này từ nhiệm vụ NCKH cấp Thành phố Đà Nẵng năm 2021 với tên đề tài “Nghiên cứu bảo tồn và phát triển nguồn gen cây Khô nhung (*Ardisia silvestris* Pit.) tại Khu bảo tồn thiên nhiên Sơn Trà, Tp. Đà Nẵng”.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] D. T. Loi, *Vietnamese Medicinal Plants*. Hanoi: Medical Publishing House, 2004 (Translated).

[2] Institute of Medicinal Materials, *Catalogue of Vietnamese Medicinal Plants*. Hanoi: Science and Technology Publishing House, 2016 (Translated).

[3] P. V. C. Hong, H. V. Biet, T. Q. Toan, N. T. T. Nga, and N. T. N. Phuong, “Phytochemical analysis of *Ardisia silvestris* leaf extracts and their antioxidant and antibacterial activities”, *The Journal of Agriculture and Development*, vol. 19, no. 4, pp. 28-35, 2020.

[4] L. Huang *et al.*, “Antiphototoaging and skin-protective activities of *Ardisia silvestris* ethanol extract in human keratinocytes”, *Plants*, vol. 12, no. 5, pp. 1-22, 2023.

[5] P. T. V. Anh *et al.*, “Gastroprotective effect of Vien Khoi Tim capsules on indomethacin-induced gastric ulcers in rats”, *Journal of Medical Research*, vol. 173, no. 12E13, pp. 70-78, 2023.

[6] L. V. Manh, N. T. K. Yen, and T. N. Toan, “Study on distribution and regeneration characteristics of *Ardisia silvestris* Pit.in Son Tra nature reserve, Da Nang city”, *Vietnam Journal of Forest Science*, vol. 2018, no. 2, pp. 43-49, 2018.

[7] D. T. T. Huong, N. V. Viet, N. T. Huyen, and T. V. Ha, “Establishment of an *in vitro* propagation protocol for *Ardisia sylvestris* Pitard”, *Vietnam National University of Forestry*, vol. 2019, no. 1, pp. 25-31, 2019.

[8] N. V. Toan *et al.*, “Study on *in vitro* propagation of *Ardisia silvestris* Pitard”, in *National Conference on Bioetchnology*, Hue city, Vietnam, 2024, pp. 453-459.

[9] D. T. Minh, Q. T. Nguyen, and T. Pham, “Regeneration of plants via callus-mediated organogenesis from leaf, petiole, and inter nodal segment of *Ardisia silvestris* Pitard”, *Propagation of Ornamental Plants*, vol. 3, pp. 96-103, 2021.

[10] T. Murashige and F. Skoog, “A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures”. *Physiologia Plantarum*, vol. 15, no. 3, pp. 473-497,1962.

[11] D. Q. Lien, D. T. T. Huong, N. V. Viet, and V. T. Hung, “Using *in vitro* culture technique in propagation of *Dendrobium anosmum* Lindley”, *Journal of Forestry Science and Technology*, vol. 2019, no. 6, pp. 9-16, 2019.

[12] F. Skoog and C. O. Miller, “Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissue cultured *in vitro*”, *Symp. Soc. Exp. Biol.*, vol. 11, pp. 118-131, 1957.

[13] N. V. Viet, N. T. Huong, and B. V. Thang, “Propagation of *Ardisia sylvestris* Pitard through *in vitro* culture technique”, *Science and Technology Journal of Agriculture and Rural Development*, vol. 2016, no. 12, pp. 35-39, 2016 (Translated).

[14] D. M. Hua, L. Y. Ying, T. Long, and C. C. Yue, “Establishment of high-frequency regeneration system for stem apexes of *Ardisia mamillata* Hance”, *Journal of Northeast Forestry University*, vol. 35, no. 3, pp. 21-22, 2007.

[15] S. Cui, Y. Ren, H. Yao, J. Zhang, Z. Chen, J. Zou, W. Zhou, and X. Chen, “An efficient protocol for regenerating shoots from paper mulberry (*Broussonetia papyrifera*) leaf explants”, *Open Life Sciences*, vol. 15, no. 1, pp. 318-325, 2020.