

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

La Việt Hồng^{1*}, Chu Đức Hà², Nguyễn Văn Đình¹

¹Trường Đại học Sư phạm Hà Nội 2

²Viện Di truyền Nông nghiệp - Viện Khoa học Nông nghiệp Việt Nam

TÓM TẮT

Cây Bìm bịp (*Clinacanthus nutans* (Burm. F.) Lindau) được biết đến là một loại dược liệu truyền thống ở nhiều nước Châu Á do chúng có khả năng ngăn ngừa ung thư. Tuy nhiên, chưa có thông tin về nuôi cấy mô đối tượng này tại Việt Nam. Trong nghiên cứu này, đốt thân cây Bìm bịp từ đã được sử dụng làm mẫu cho nhân giống *in vitro*. Kết quả cho thấy môi trường MS bổ sung BAP 0,5 mg.L⁻¹ là thích hợp để tái sinh chồi *in vitro*, số chồi trung bình/mẫu là 5,00 (chồi/mẫu), chiều cao chồi trung bình là 3,79 (cm), số lá/chồi trung bình là 7,50 (lá/chồi) sau 8 tuần nuôi cấy. Chồi tái sinh sinh trưởng tốt. Môi trường MS bổ sung IAA 0,2 mg.L⁻¹ là thích hợp để ra rễ, số rễ trung bình trên chồi là 3,20 (rễ/chồi) và chiều dài rễ trung bình là 5,05 (cm) sau 4 tuần nuôi cấy. Cây *in vitro* được chuyển lên hỗn hợp trấu hun + đất (1:1) để rèn luyện cho tỉ lệ sống sót cao nhất, đạt 100%. Kết quả nghiên cứu này mở ra cơ hội lớn để phát triển cây Bìm bịp ở ngoài đồng ruộng.

Từ khóa: Bìm bịp; chồi; đốt thân; *in vitro*; tái sinh

Ngày nhận bài: 09/7/2019; **Ngày hoàn thiện:** 12/8/2019; **Ngày đăng:** 09/9/2019

IN VITRO PROPAGATION OF THE SNAKE GRASS (*Clinacanthus nutans* (Burm. F.) Lindau) FROM STEM SEGMENTS

La Viet Hong^{1*}, Chu Duc Ha², Nguyen Van Dinh¹

¹Hanoi Pedagogical University 2

²Agricultural Genetics Institute - Vietnam Academy of Agricultural Sciences

ABSTRACT

The snake grass (*Clinacanthus nutans* (Burm. F.) Lindau) is known as the traditional medicinal plant in many Asia countries due to their ability to prevent of cancer. However, no information of tissue culture of this plant was recorded in Vietnam. In this study, stem segments of *Clinacanthus nutans* (Burm. F.) Lindau were used as explants for *in vitro* propagation. Results showed that the Murashige and Skoog (MS) medium added 0.5 mg.L⁻¹ BAP was a suitable medium for generated microshoots, the average shoot number per explants was 5.00, the average length of the shoots was 3.79 (cm), the average leaf number per shoots was 7.50 after cultured 8 weeks. Regenerating shoots grown strongly. The rooting medium was MS supplemented 0.2 mg.L⁻¹ IAA, the average root number of *in vitro* shoots was 3.20 and the average length of roots was 5.05 cm after 4-weeks culture. *In vitro* plants were transferred into mixture of rice husks and soil (1:1) to harden, the survival percentage reached 100%. This results could provide a bright opportunity to develop the snake grass in the field.

Keywords: *Clinacanthus nutans*; shoot; *in vitro*; stem segment; regeneration

Received: 09/7/2019; **Revised:** 12/8/2019; **Published:** 09/9/2019

* Corresponding author. Email: laviethong.sp2@gmail.com

1. Giới thiệu

Cây Bìm bịp hay còn gọi là dây rắn (*Clinacanthus nutans* (Burm. F.) Lindau) là một loại dược liệu phổ biến ở các nước nhiệt đới và cận nhiệt đới như Thái Lan, Indonesia, Malaysia, Việt Nam và Trung Quốc. Cây Bìm bịp được sử dụng rất đa dạng trong y học cổ truyền như điều trị phát ban ngoài da, rắn cắn, côn trùng cắn, các tổn thương do virus herpes, do đái tháo đường và do Gout. Trong dịch chiết từ cây bìm bịp chứa nhiều hợp chất có hoạt tính sinh học kháng viêm, kháng virus, chống ôxi hóa và bệnh tiểu đường [1], dịch chiết cây Bìm bịp bằng cồn còn có tác dụng ức chế sự tăng sinh của tế bào ung thư gan ở chuột thực nghiệm thông qua điều hòa ngược dòng hệ miễn dịch, có tiềm năng sử dụng làm thuốc điều trị và phòng ngừa ung thư [2].

Với tiềm năng ứng dụng lớn trong y học, cây Bìm bịp đã được các nhà nghiên cứu tiến hành nhân giống thông qua nuôi cấy mô sẹo, nhưng việc tái sinh cây con từ mô sẹo là không dễ dàng. Năm 2018, Phua và cộng sự đã nuôi cấy dịch huyền phù cây Bìm bịp từ lá non, phân tích các dòng mô sẹo và huyền phù tế bào đều phát hiện các hợp chất quercetin, catechin và luteolin, là những hợp chất quan trọng chống ung thư và chống ôxi hóa [3]. Một hạn chế lớn của quá trình sử dụng sinh khối mô sẹo hoặc huyền phù tế bào để làm thuốc là sự tồn dư các chất trong môi trường nuôi cấy trong sinh khối. Trong một nghiên cứu khác, Chen và cộng sự (2015) [4] đã tiến hành nhân nhanh cây Bìm bịp bằng nuôi cấy mô để thay thế cho phương pháp nhân giống truyền thống bằng giâm hom. Tuy nhiên, hệ số nhân giống của nghiên cứu này chưa cao. Xuất phát từ những vấn đề trên, bài báo này thực hiện nghiên cứu hoàn thiện quy trình nhân nhanh *in vitro* cây Bìm bịp từ đốt thân nhằm góp phần tạo ra nguồn giống cây sạch, chất lượng cao cho sản xuất, góp phần bảo tồn nguồn dược liệu.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Cây Bìm bịp được thu tại xã Ngọc Thanh, thành phố Phúc Yên, tỉnh Vĩnh Phúc, mẫu thu về được định loại tại Phòng thí nghiệm Thực vật học, Khoa Sinh - Kỹ thuật Nông nghiệp, trường Đại học Sư phạm Hà Nội 2.

Môi trường nuôi cấy là MS cơ bản (Murashige và Skoog) [5] gồm các nguyên tố đa lượng, vi lượng, vitamin (Xilong, Trung Quốc). Đường sucrose (Công ty Mía đường I, Việt Nam), agar (Công ty TNHH Hải Long, Việt Nam). Các chất điều hòa sinh trưởng 6-benzyl amino purin (BAP), α -naphthalene axetic acid (NAA) và Indole-3-acetic acid (IAA) (Dulcheffa, Hà Lan).

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Tái sinh và nhân nhanh chồi *in vitro*

Đốt thân cây Bìm bịp được khử trùng bề mặt theo mô tả trước đây [6]: đốt thân dài 3-4 (cm) chứa mắt ngủ được lắc trong cồn 70^o/5 phút, dung dịch javen 10% (v/v)/10 phút, sau đó rửa lại bằng nước cất khử trùng 2-3 lần, nuôi cấy lên môi trường MS, 30 g.L⁻¹ saccarozơ, 7 g.L⁻¹ agar, pH 5,8 (môi trường MS cơ bản). Tái sinh và nhân nhanh chồi *in vitro* được tiến hành theo mô tả gần đây có cải tiến [4] bằng cách nuôi cấy chồi có kích thước 1-2 (cm) chứa 1 mắt ngủ, nuôi cấy trên môi trường MS cơ bản có nồng độ hoặc BAP hoặc BAP kết hợp với NAA, cụ thể nồng độ BAP gồm: 0,25; 0,5; 0,75 và 1,0 (mg.L⁻¹) và mỗi nồng độ BAP riêng lẻ kết hợp với NAA nồng độ 0,05 (mg.L⁻¹). Công thức (CT) đối chứng là môi trường cơ bản không bổ sung chất điều hòa sinh trưởng. Thí nghiệm được bố trí theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên với 3 lần nhắc lại. Xác định các chỉ tiêu số chồi/mẫu, chiều cao chồi (cm) và số lá/chồi sau 8 tuần nuôi cấy.

2.2.2. Tạo cây *in vitro* hoàn chỉnh

Chồi *in vitro* có chiều cao 2,5-3 (cm) được nuôi cấy trên môi trường MS cơ bản bổ sung chất điều hòa sinh trưởng theo mô tả gần đây có cải tiến [4], cụ thể trong thí nghiệm này, IAA được sử dụng để kích thích sự ra rễ, gồm

các nồng độ 0,1; 0,2; 0,3, 0,4 và 0,5 (mg.L⁻¹). Thí nghiệm được bố trí theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên với 3 lần nhắc lại. Xác định các chỉ tiêu tỉ lệ ra rễ (%), số rễ/chồi, chiều dài rễ (cm) sau 4 tuần nuôi cấy.

2.2.3. Rèn luyện cây con *in vitro* thích nghi với điều kiện tự nhiên

Các bình nuôi chứa cây *in vitro* hoàn chỉnh (số rễ/chồi đạt 3-4, chiều cao đạt 4-5 cm) được đặt ra vườn ươm 3-5 ngày, tháo lỏng nắp bình nuôi. Sau đó, lấy cây ra và rửa nhẹ nhàng thạch bám ở rễ. Cây được trồng vào chậu chứa giá thể: cát sạch, cát sạch + đất Tribat (công ty TNHH Công nghệ Sinh học Sài Gòn xanh, Việt Nam) tỉ lệ 1:1, trấu hun + đất Tribat tỉ lệ 1:1, đất Tribat. Các chậu cây được đảm bảo che sáng và độ ẩm như nhau. Mỗi công thức thí nghiệm 10 cây. Xác định tỉ lệ sống sót (%) sau 2 tuần rèn luyện.

2.2.4. Phân tích thống kê

Số liệu thực nghiệm được xử lý theo các tham số thống kê trên phần mềm Excel 2010 [7]. Kiểm tra sự sai khác giữa giá trị trung bình bằng phương pháp LSD của Fisher (Fisher's Least Significant Difference). Số liệu thể hiện trong bảng là giá trị trung bình, trong cùng một cột, các chữ theo sau khác nhau thể hiện sự sai khác có ý nghĩa thống kê với $\alpha = 0,05$.

3. Kết quả và thảo luận

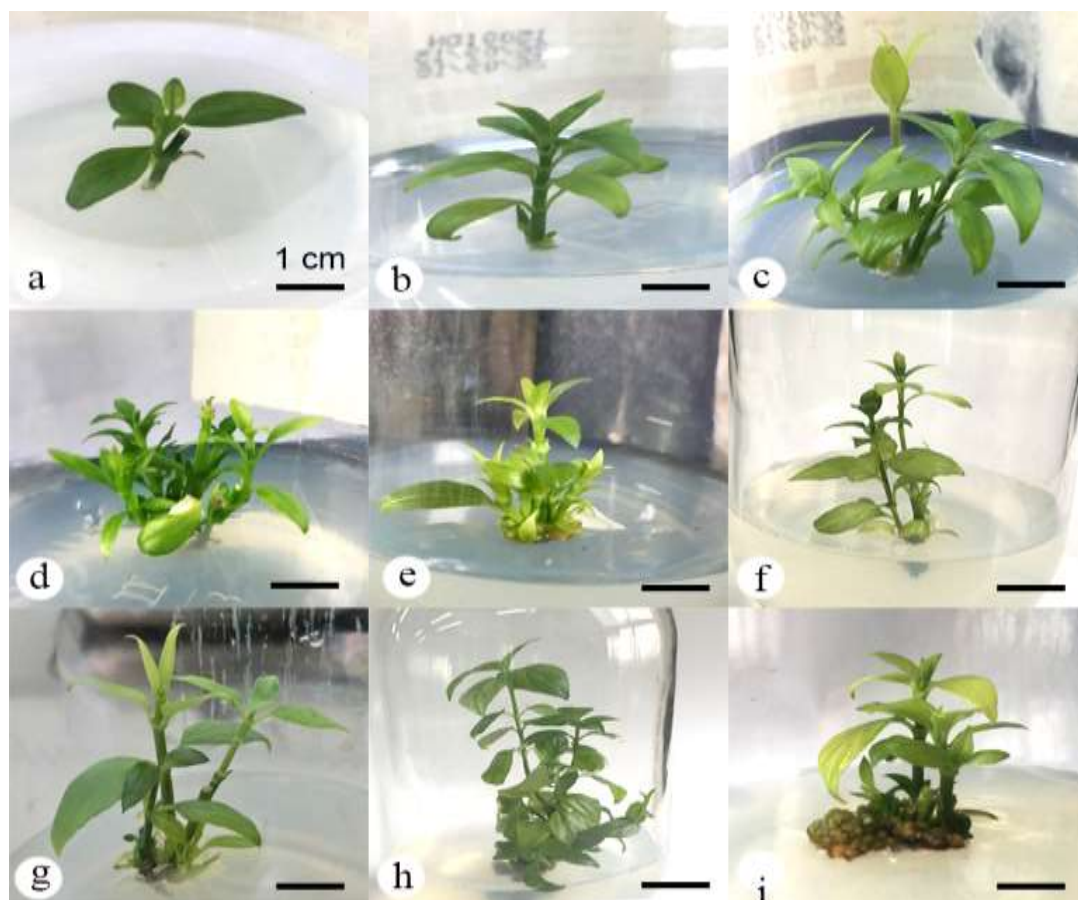
3.1. Tái sinh và nhân nhanh chồi *in vitro*

Bảng 1. Ảnh hưởng của BAP và BAP kết hợp NAA đến sự tạo chồi *in vitro* từ đốt thân cây Bìm bịp (sau 8 tuần nuôi cấy)

Công thức	Nồng độ (mg/l)		Số chồi/mẫu	Chiều cao chồi (cm)	Số lá/chồi	Chất lượng chồi tái sinh
	BAP	NAA				
CT 1	0,0	-	1,00 ^d	1,55 ^d	5,00 ^d	+++
CT 2	0,25	-	1,83 ^c	2,79 ^c	7,50 ^b	+++
CT 3	0,5	-	5,00^a	3,79^b	7,50^b	+++
CT 4	0,75	-	5,33 ^a	3,25 ^c	6,50 ^{bc}	++
CT 5	1,0	-	4,00 ^b	3,11 ^c	5,00 ^d	++
CT 6	0,25	0,05	3,33 ^b	3,70 ^b	11,16 ^a	+
CT 7	0,5	0,05	4,16 ^b	4,00 ^b	5,33 ^{cd}	+++
CT 8	0,75	0,05	5,17 ^a	4,91 ^a	11,83 ^a	+
CT 9	1,0	0,05	3,66 ^b	3,11 ^c	5,33 ^{cd}	++
	LSD _{0,05}		0,77	0,41	1,19	

Dấu (+) chồi xanh - gầy, (++) chồi xanh - mập - ngắn, (+++) chồi xanh - mập - dài

Theo Chen và cộng sự (2014), nồng độ BAP và NAA cần được điều chỉnh trong suốt quá trình nhân giống để tăng năng suất và chất lượng của chồi tái sinh [8]. Trong nghiên cứu này, việc bổ sung BAP riêng lẻ và BAP kết hợp với NAA (0,05 mg/l) có ảnh hưởng đến quá trình tái sinh và nhân nhanh chồi *in vitro* của cây Bìm bịp, số liệu được thể hiện ở Bảng 1, Hình 1. Kết quả phân tích cho thấy số chồi/mẫu thấp nhất ở CT đối chứng, (đạt 1,0), cao ở các CT3, CT4 và CT8, số chồi trên mẫu tương ứng là 5,00; 5,33 và 5,17 (Hình 1c, 1d, 1h). Kết quả này cao hơn so với công bố trước đây của Chen và cộng sự (2015), khi tiến hành nuôi đốt thân trên môi trường (MS) chứa BAP và NAA cho hệ số nhân là 3,9 [4]. Chất lượng chồi tái sinh tốt (xanh, mập) ở các CT bổ sung BAP thấp, cụ thể là CT2 và CT3 (Hình 1c, 1d), Tuy nhiên ở CT 8, chồi tái sinh gầy. Chỉ tiêu chiều cao chồi và số lá/chồi đạt cao nhất ở các CT kết hợp giữa BAP và NAA, cụ thể chiều cao chồi cao nhất ở CT8, đạt 4,91 (cm). Số lá/chồi cao nhất ở CT6, đạt 11,16 lá/chồi. Tuy nhiên ở cả 2 CT này, chất lượng chồi tái sinh không tốt (Hình 1f, 1h). Như vậy, xét chung cả ba chỉ tiêu thì môi trường bổ sung BAP 0,5 mg.L⁻¹ là phù hợp để tái sinh và nhân nhanh chồi *in vitro* từ đốt thân ở cây Bìm bịp, chỉ tiêu số chồi/mẫu, chiều cao chồi và số lá/chồi lần lượt là 5,00 (chồi/mẫu); 3,79 (cm) và 7,50 (lá/chồi).



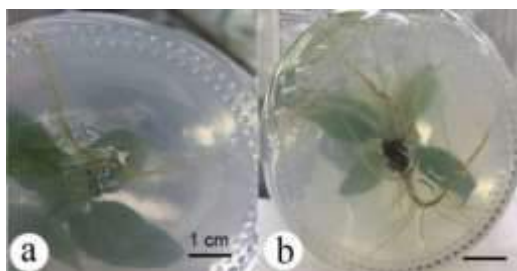
Hình 1. Hình ảnh chồi tái sinh trên môi trường MS chứa BAP, BAP kết hợp NAA (sau 8 tuần nuôi cấy)
a. Công thức đối chứng (MS cơ bản); b, c, d, e: Môi trường bổ sung BAP lần lượt: 0,25 mg.L⁻¹, 0,5 mg.L⁻¹, 0,75 mg.L⁻¹, 1,0 mg.L⁻¹; f, g, h, i: Môi trường bổ sung BAP (0,25 mg.L⁻¹, 0,5 mg.L⁻¹, 0,75 mg.L⁻¹, 1,0 mg.L⁻¹) kết hợp NAA 0,05 mg.L⁻¹

3.2. Tạo cây *in vitro* hoàn chỉnh

Trong nghiên cứu này, môi trường MS cơ bản và IAA được sử dụng để kích thích chồi Bim bip tạo rễ trong môi trường *in vitro*. Kết quả được thể hiện ở Bảng 2 và Hình 2. Sau 4 tuần nuôi cấy, 100% chồi cây Bim bip *in vitro* dễ dàng ra rễ ngay cả trong môi trường không có chất điều hòa sinh trưởng, tuy nhiên rễ nhỏ, mảnh (Hình 2a). Khi bổ sung IAA vào môi trường nuôi cấy, rễ tái sinh mập, khỏe, cụ thể ở CT 2, môi trường có bổ sung IAA 0,2 mg.L⁻¹ là thích hợp để ra rễ *in vitro*, thể hiện thông qua số rễ trung bình/chồi đạt 3,20 và chiều dài rễ trung bình là 5,05 cm (Bảng 2, Hình 2b). Kết quả này cho thấy với nồng độ chất điều hòa tương đối thấp (IAA 0,2 mg.L⁻¹) nhưng số rễ/chồi, chiều dài rễ đều cao hơn so với công bố trước đây khi sử dụng môi trường ½ MS bổ sung IBA 1,0 mg.L⁻¹ [4]. Sự khác biệt có thể do nguồn gốc của chất điều hòa.

Bảng 2. Ảnh hưởng của IAA đến quá trình ra rễ của chồi cây Bim bip sau 4 tuần nuôi cấy

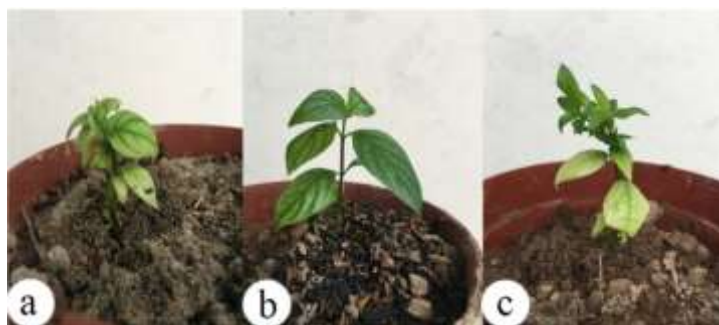
Công thức	Nồng độ IAA (mg/l)	Tỉ lệ ra rễ (%)	Số rễ/mẫu	Chiều dài rễ (cm)
CT 1	0	100	2,20 ^{bc}	3,10 ^c
CT 2	0,1	100	2,60 ^{ab}	3,65 ^c
CT 3	0,2	100	3,20^a	5,05^a
CT 4	0,3	100	2,80 ^{ab}	4,20 ^b
CT 5	0,4	100	1,80 ^c	3,15 ^c
CT 6	0,5	0	-	-
LSD _{0,05}			0,61	0,53



Hình 2. Hình ảnh tạo rễ in vitro của cây Bìm bịp in vitro trên môi trường MS sau 4 tuần nuôi cấy
a. Môi trường MS cơ bản; b. Môi trường MS bổ sung IAA 0,2 mg.L⁻¹

3.3. Rèn luyện cây in vitro thích nghi với điều kiện tự nhiên

Sự thành công của giai đoạn rèn luyện cây in vitro với điều kiện tự nhiên trong vườn ươm trước khi chuyển ra trồng ngoài đồng ruộng là một bước rất quan trọng, quyết định khả năng thương mại của công nghệ in vitro [9] [10]. Ở giai đoạn này, cây chưa phát triển hoàn thiện, dễ dàng bị mất nước do độ ẩm không khí thấp, dẫn đến tỉ lệ sống sót không cao. Để cải thiện tỉ lệ sống sót, cây in vitro thường trồng trên chậu chứa đất sạch hoặc hỗn hợp đất và cát, bao bọc bằng nilon, đặt dưới điều kiện che sáng, đảm bảo tưới đủ nước trong giai đoạn đầu [9]. Trong nghiên cứu này, cây Bìm bịp in vitro được trồng lên một số loại giá thể khác nhau, kết quả cho thấy tỉ lệ sống sót dao động từ 0-100%, cụ thể trên giá thể cát sạch, cát sạch + đất (1:1), trấu hun + đất (1:1) và đất, tỉ lệ sống sót lần lượt là 0,0; 33,0; 100,0 và 80,0 (%) sau 2 tuần thí nghiệm (Hình 3a, 3b, 3c). Như vậy, giá thể trấu hun + đất (tỉ lệ 1:1) là thích hợp để trồng cây giai đoạn rèn luyện.



Hình 3. Hình ảnh cây Bìm bịp in vitro trên giá thể sau 2 tuần thí nghiệm
a. Giá thể cát sạch + đất (1:1); b. Giá thể trấu hun + đất (1:1); c. Giá thể đất

4. Kết luận

Môi trường MS bổ sung BAP 0,5 mg.L⁻¹ là thích hợp để tái sinh và nhân nhanh cây Bìm bịp từ đốt thân. Sau 8 tuần nuôi cấy, số chồi trung bình/mẫu, chiều dài chồi trung bình, số lá trung bình/chồi lần lượt là 5,00 (chồi/mẫu); 3,79 (cm) và 7,50 (lá/chồi). Chồi tái sinh sinh trưởng tốt.

Môi trường MS bổ sung IAA 0,2 mg.L⁻¹ cho hiệu quả phát sinh rễ tốt nhất, số rễ trung bình/chồi là 3,20 và chiều dài rễ trung bình là 5,05 (cm) sau 4 tuần nuôi cấy.

Cây con được trồng trên giá thể trấu hun + đất (1:1) cho tỉ lệ sống sót cao nhất và đạt 100 % sau 2 tuần rèn luyện.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. A. Alam, Ferdosh S., Ghafoor K., Hakim A., Juraimi A. S., Khatib A., Sarker Z. I., "Clinacanthus nutans: A review of the medicinal uses, pharmacology and phytochemistry", *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, Vol. 9, No. 4, pp. 402-409, 2016.
- [2]. I. N. Zulkipli, Rajabalaya R., Idris A., Sulaiman N. A., David S. R., "Clinacanthus nutans: a review on ethnomedicinal uses, chemical constituents and pharmacological properties", *Pharm. Biol.*, Vol. 55, No. 1, pp. 1093-1113, 2017.
- [3]. Q. Yi Phua, Subramaniam S., Vuanghao L., Chew B. L., "The establishment of cell suspension culture of sabah snake grass (*Clinacanthus nutans* (Burm.F.) Lindau)", *In Vitro Cellular &*

Developmental Biology - Plant, Vol. 54, No. 4, pp. 413-422, 2018.

[4]. B. Chen, Zhang J., Zhang C., Xiao Y., "The rapid propagation technique of the medicinal plant *Clinacanthus nutans* by tissue culture", *New York Science Journal*, Vol. 8, No. 2, pp. 23-27, 2015.

[5]. T. Murashige, Skoog F., "A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures", *Physiologia Plantarum*, Vol. 15, No. 3, pp. 473-497, 1962.

[6]. Q.Y. Phua, Chin C. K., Asri Z. R. M., Lam D. Y. A., Subramaniam S., Chew B. L., "The callogenic effects of 2,4-Dichlorophenoxy acetic acid (2,4-d) on leaf explants of sabah snake grass (*Clinacanthus nutans*)", *Pakl J. Bot.*, Vol. 48, No. 2, pp. 561-566, 2016.

[7]. Nguyễn Văn Mã, La Việt Hồng, Ong Xuân Phong, *Phương pháp nghiên cứu sinh lý học thực vật*, Nxb Đại học quốc gia Hà Nội, 2013.

[8]. B. Chen, Trueman S., Li J., Li Q., Fan H., Zhang J., "Micropropagation of the endangered medicinal Orchid, *Dendrobium officinale*", *Life Science Journal*, Vol. 11, No. 9, pp. 526-530, 2014.

[9]. S. Chandra, Bandopadhyay R., Kumar V., Chandra R., "Acclimatization of tissue cultured plantlets: from laboratory to land", *Biotechnol Lett*, Vol. 32, No. 9, pp. 1199-1205, 2010.

[10]. P. K. Pati, Rath S. P., Sharma M., Sood A., Ahuja P. S., "In vitro propagation of rose - A review", *Biotechnology Advances*, Vol. 24, No. 1, pp. 94-114, 2006.