

# Ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng thực vật đến sự tạo rễ trong nuôi cấy *in vitro* cây sâm bố chính (*Abelmoschus Sagittifolius* Kurz)

Dương Huỳnh Ngọc Trân\*, Lê Thị Diễm, Võ Thị Bạch Mai



Use your smartphone to scan this QR code and download this article

## TÓM TẮT

Sâm Bố Chính (*Abelmoschus sagittifolius* Kurz) được biết đến là loài cây dược liệu có tác dụng dược lý điển hình của cây họ Nhân sâm. Tuy nhiên, số lượng cây trong tự nhiên đang giảm nhanh do nhu cầu khai thác tăng cùng với sự thu hẹp vùng phân bố và tỷ lệ nảy mầm của hạt thấp, ảnh hưởng đến việc sử dụng để nghiên cứu và phát triển nguồn gene làm nguyên liệu sản xuất thuốc tại nhiều nơi. Trong các bộ phận của cây, rễ được cho là bộ phận quan trọng nhất, vì vậy việc nghiên cứu sự hình thành rễ *in vitro* vừa có ý nghĩa trong việc đánh giá tác động của chất điều hòa sinh trưởng thực vật trong sự cảm ứng rễ, vừa có ý nghĩa trong việc tạo nguồn nguyên liệu ban đầu cho các khảo sát về sự sinh tổng hợp các hợp chất thuộc nhóm saponin *in vitro* để thay thế cho việc trồng cây bên ngoài. Kết quả nghiên cứu cho thấy sau 2 tuần nuôi cấy, tỷ lệ hạt nảy mầm cao nhất (88%) khi hạt được khử trùng bằng dung dịch HgCl<sub>2</sub> 0,1%, 3 phút rồi ngâm trong dung dịch GA<sub>3</sub> 20,0 mg/L, 120 phút, cuối cùng nuôi cấy hạt trên môi trường MS + 20 g/L đường saccharose + GA<sub>3</sub> 5,0 mg/L + 7 g/L agar. Mô sẹo hình thành từ khúc cắt trụ hạ điệp nuôi cấy trên môi trường MS + 20 g/L đường saccharose + NAA 0,5 mg/L + BA 1,5 mg/L + 7 g/L agar cho tỷ lệ tạo mô sẹo tốt, phù hợp để sử dụng nuôi cấy cho mục đích tạo rễ *in vitro*. Và sự hình thành rễ tốt nhất trên môi trường MS + 20 g/L sucrose + IAA 0,3 mg/L + 7 g/L agar. Như vậy, phương pháp nuôi cấy mô phù hợp cho sự hình thành rễ bất định từ mô sẹo có nguồn gốc từ trụ hạ điệp cây sâm Bố Chính.

**Từ khoá:** *Abelmoschus sagittifolius* Kurz, *in vitro*, mô sẹo, rễ

## MỞ ĐẦU

Sâm Bố Chính, còn được gọi là sâm Thổ Hào, là một trong số các loài cây thuộc chi *Abelmoschus*, vừa được sử dụng làm dược liệu trong các bài thuốc y học cổ truyền, vừa được trồng làm cảnh nhờ vẻ đẹp của hoa và đã được đưa vào chương trình “Bảo tồn và sử dụng bền vững nguồn gene đến năm 2025, định hướng đến năm 2030”<sup>1</sup>. Sâm Bố Chính có tên khoa học *Abelmoschus sagittifolius* Kurz, thuộc chi Vòng vang, họ Bông (Malvaceae), phân bố chủ yếu ở vùng nhiệt đới hoặc cận nhiệt đới.

Về mặt hoá học, rễ sâm Bố Chính có chứa hợp chất phytosterol, coumarin, acid béo, acid hữu cơ và hợp chất uronic<sup>2</sup>. Ngoài ra, trong rễ sâm Bố Chính còn xác định có các chất như: ventricosin A, 4-eudesmen-11-ol, tagitinin A, β-sitosterol, β-sitosterol-3-O-glucopyranoside<sup>3</sup>. Về mặt y học, rễ cây được sử dụng làm thuốc bổ, thông tiểu, điều kinh, chữa sốt, bệnh viêm phổi và bạch đới<sup>4</sup>. Ngoài ra, cây còn được sử dụng điều trị loét dạ dày, an thần, giảm đau, tăng cường thể lực và không có biểu hiện độc tính cấp<sup>3</sup>.

Trong tự nhiên tỷ lệ nảy mầm của hạt sâm Bố Chính thấp, thời gian phát triển lâu, cây bị khai thác nhiều, thêm vào đó sự thu hẹp của rừng tự nhiên dẫn đến sự suy giảm đáng kể nguồn gene của cây này. Vì vậy, việc bảo tồn nguồn gene của các loại dược liệu quý nói chung và sâm Bố Chính nói riêng ở Việt Nam rất cần thiết.

Ở Việt Nam có một số công trình nghiên cứu về nuôi cấy *in vitro* cây sâm Bố Chính. Năm 2014, Phan Duy Hiệp và cộng sự<sup>5</sup> đã bước đầu tìm hiểu về ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng thực vật lên sự phát sinh hình thái của một số giống sâm Bố Chính trong điều kiện *in vitro*. Trong nghiên cứu này, tác giả đưa ra một số kết luận về điều kiện thích hợp nhất cho sự nảy mầm hạt sâm Bố Chính cũng như môi trường thích hợp để tăng sinh chồi và hình thành rễ từ chồi. Ngoài ra, gần đây, năm 2017, Phan Xuân Huyền và cộng sự<sup>6</sup> đã nghiên cứu nhân giống *in vitro* cây sâm Bố Chính thông qua nuôi cấy đốt thân.

Tuy nhiên hiện chưa có công bố nào về nghiên cứu tạo rễ bất định cây sâm Bố Chính. Trong khi đó, rễ được coi là bộ phận quan trọng nhất, vì vậy, chúng tôi thực hiện nghiên cứu này nhằm tạo bước đầu cho

Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG-HCM

### Liên hệ

Dương Huỳnh Ngọc Trân, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG-HCM  
Email: dhnt91@gmail.com

### Lịch sử

- Ngày nhận: 27-3-2019
- Ngày chấp nhận: 30-4-2019
- Ngày đăng: 25-6-2020

DOI: 10.32508/stdjns.v4i2.710



### Bản quyền

© ĐHQG Tp.HCM. Đây là bài báo công bố mở được phát hành theo các điều khoản của the Creative Commons Attribution 4.0 International license.



**Trích dẫn bài báo này:** Trân D H N, Diễm L T, Mai V T B. Ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng thực vật đến sự tạo rễ trong nuôi cấy *in vitro* cây sâm bố chính (*Abelmoschus Sagittifolius* Kurz). *Sci. Tech. Dev. J. - Nat. Sci.*;4(2):556-566.

nghiên cứu nuôi cấy nhân số lượng rễ *in vitro* để cung cấp nguồn nguyên liệu chủ động cho việc thu nhận các chất có hoạt tính sinh học quan trọng cho ngành dược.

## VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

### Vật liệu

Hạt giống cây sâm Bồ Chính (*Abelmoschus sagittifolius* Kurz) hoa màu đỏ, trồng tại thành phố Tây Ninh, được sử dụng làm vật liệu ban đầu.

Từ diệp, trụ hạ diệp cây sâm Bồ Chính *in vitro* 14 ngày tuổi gieo từ hạt được sử dụng làm nguồn mẫu cho các thí nghiệm tạo mô sẹo và rễ *in vitro*.

### Khử trùng hạt

Hạt được ngâm qua đêm, khử trùng lần lượt bằng xà phòng trong 2 phút, dung dịch Javel thương phẩm nồng độ 25%, 5 phút, dung dịch HgCl<sub>2</sub> nồng độ 0,1% hoặc 0,5%, thời gian 2, 3, 5 hoặc 7 phút, rửa lại bằng nước cất vô trùng 3 lần rồi lắc qua cón 70% trong 2 phút, ngâm trong dung dịch GA<sub>3</sub> 20,0 mg/L, 120 phút (Hình 1 A). Mẫu vật sau khi khử trùng được nuôi cấy cho sự nảy mầm (Hình 1 B, C). Một số bộ phận cây con *in vitro* được sử dụng làm nguồn vật liệu cho các thí nghiệm tiếp theo.

### Nuôi cấy *in vitro* hạt cây sâm Bồ Chính

Môi trường cho sự nảy mầm hạt cây sâm Bồ Chính là môi trường khoáng MS, vitamin Morel, đường saccharose 20 g/L, agar 7g/L bổ sung GA<sub>3</sub> 5,0 mg/L, điều kiện sáng với cường độ ánh sáng 2000 ± 200 lux, thời gian chiếu sáng 12 giờ/ngày, nhiệt độ 27 ± 2°C và độ ẩm 55 ± 5%.

### Ảnh hưởng auxin và cytokinin lên sự tạo mô sẹo

Vật liệu nuôi cấy: từ diệp được rạch 2 đường nhỏ 5 mm trên bề mặt để tạo vết thương và trụ hạ diệp cây sâm Bồ Chính *in vitro* 14 ngày tuổi thu từ thí nghiệm khử trùng hạt.

Thí nghiệm 1: Môi trường khoáng MS tương tự thí nghiệm khử trùng hạt bổ sung NAA 0,5 mg/L kết hợp BA 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0 mg/L.

Thí nghiệm 2: Môi trường khoáng MS tương tự thí nghiệm khử trùng hạt bổ sung BA nồng độ cho kết quả tốt nhất từ thí nghiệm 1 kết hợp NAA 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0 mg/L.

Các mô cấy được đặt trong tối ở phòng nuôi có nhiệt độ 27 ± 2°C, độ ẩm 55 ± 5%. Tỷ lệ mẫu cấy phát sinh mô sẹo và hình thái mô sẹo được ghi nhận sau 4 tuần nuôi cấy.

Thí nghiệm gồm 28 nghiệm thức, mỗi nghiệm thức lặp lại 3 lần, mỗi lần 9 bình, mỗi bình 2 mẫu cấy.

### Ảnh hưởng của auxin và cytokinin lên sự tạo rễ

Vật liệu nuôi cấy: từ diệp, trụ hạ diệp cây sâm Bồ Chính *in vitro* 14 ngày tuổi thu từ thí nghiệm khử trùng hạt và mô sẹo 4 tuần tuổi của nghiệm thức cho kết quả tốt nhất từ thí nghiệm tạo mô sẹo.

Thí nghiệm 1: Môi trường khoáng MS tương tự thí nghiệm khử trùng hạt bổ sung IAA 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 1,0 mg/L.

Thí nghiệm 2: Môi trường khoáng MS tương tự thí nghiệm khử trùng hạt bổ sung IAA nồng độ cho kết quả tốt nhất từ thí nghiệm trên kết hợp NAA 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5 mg/L hoặc BA 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5 mg/L. Các mô cấy được đặt trong tối ở phòng nuôi có nhiệt độ 27 ± 2°C, độ ẩm 55 ± 5%. Số lượng rễ (số rễ/mẫu cấy) và chiều dài rễ được ghi nhận sau 4 tuần nuôi cấy.

Thí nghiệm gồm 51 nghiệm thức, mỗi nghiệm thức lặp lại 3 lần, mỗi lần 9 bình, mỗi bình 1 mẫu cấy.

### Quan sát cấu trúc giải phẫu

Mô sẹo sau 5 và 10 ngày nuôi cấy được cắt ngang và rễ *in vitro* sau 7 và 10 ngày nuôi cấy trên môi trường MS bổ sung các chất điều hòa tăng trưởng được cắt dọc theo phương pháp cắt bằng tay, sau đó nhuộm theo phương pháp nhuộm hai màu đỏ carmin - xanh iod, quan sát dưới kính hiển vi và chụp ảnh.

### Xử lý số liệu

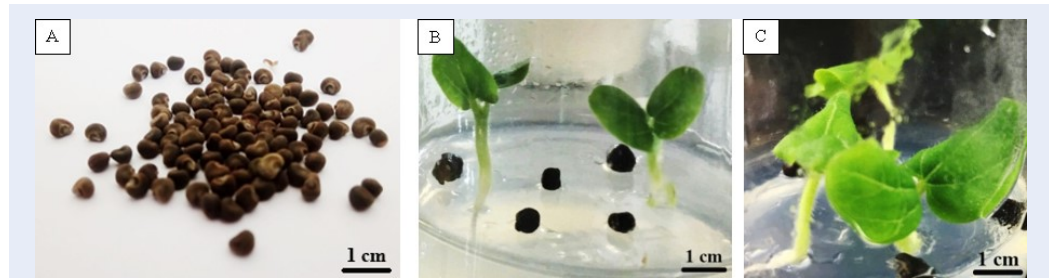
Các số liệu ghi nhận được xử lý thống kê bằng phần mềm StartGraphics Plus 3.0. Sự sai biệt có ý nghĩa ở mức p=0,05.

## KẾT QUẢ VÀ BIỆN LUẬN

### Khử trùng hạt tạo nguồn vật liệu ban đầu

Hạt dùng để nuôi cấy được khử trùng bằng dung dịch HgCl<sub>2</sub> 0,1% hoặc 0,5% ở các thời gian khác nhau. Kết quả sau 2 tuần nuôi cấy, đối với nồng độ 0,5%, thời gian 2 và 3 phút có xuất hiện hạt nảy mầm và không nhiễm, nhưng tỷ lệ không cao (Bảng 1). Khi tăng thời gian lên 5 và 7 phút ở cả hai nồng độ nhận thấy hoàn toàn không có sự nảy mầm (Bảng 1).

Khi nồng độ khử trùng là 0,1% và thời gian 2 phút, tỷ lệ hạt nảy mầm và không nhiễm thấp (Bảng 1). Nhưng cùng ở nồng độ này, khi tăng thời gian lên 3 phút cho tỷ lệ mẫu sống và không bị nhiễm cao nhất (88%) so với nồng độ và các thời gian còn lại (Bảng 1). Như vậy, HgCl<sub>2</sub> nồng độ 0,1% và thời gian 3 phút cho tỷ lệ nảy mầm cao nhất (88%).



**Hình 1:** Hạt và quá trình phát triển của cây sâm Bó Chính *in vitro*. A: hạt. B: sau 7 ngày nuôi cấy. C: sau 14 ngày nuôi cấy.

**Bảng 1:** Kết quả nảy mầm của hạt sau 2 tuần nuôi cấy

Thời gian (phút)	Tỷ lệ hạt nảy mầm và không nhiễm (%)	
	HgCl <sub>2</sub> 0,1%	HgCl <sub>2</sub> 0,5%
2	20,00b	6,67b
3	88,00c	13,33c
5	0,00a	0,00a
7	0,00a	0,00a
CV (%)	5,27	4,98

Trong cùng một cột, số có cùng mẫu tự thì không khác biệt nhau ở mức  $p \leq 0,05$  qua phép thử Duncan.

### Ảnh hưởng của chất điều hoà sinh trưởng thực vật lên sự tạo mô sẹo

#### Thí nghiệm 1: Sự nuôi cấy *in vitro* tử diệp và trụ hạ diệp trên môi trường MS bổ sung NAA kết hợp với BA các nồng độ khác nhau

Auxin là một hormone thực vật quan trọng liên quan đến sự điều hòa quá trình tăng trưởng và phát triển của thực vật. Ở mức tế bào, auxin kiểm soát sự phân chia, kéo dài và phân hóa tế bào. Các tế bào biểu bì và dưới biểu bì phản ứng mạnh nhất với auxin. Auxin kích thích mạnh sự phân chia của tế bào tượng tầng, do đó tác động trên sự tăng trưởng theo đường kính. Đồng thời auxin giúp sự phân hóa các mô dẫn và có khả năng cảm ứng trực tiếp sự phân hóa tế bào nhu mô thành các tổ chức mô dẫn<sup>7</sup>.

Cytokinin (CK) là một hormone thực vật có vai trò kích thích hoặc ức chế trong điều hòa nhiều khía cạnh của sự tăng trưởng và phát triển thực vật. CK hoạt động kết hợp với các hormone thực vật khác để điều hòa các đáp ứng khác nhau ở thực vật, trong đó có vai trò làm chậm sự lão suy<sup>7</sup>. Ngoài ra, CK có vai trò đặc biệt trong việc kích thích sinh tổng hợp protein và điều khiển chu trình tế bào. Vì vậy, người ta xem chúng như là các chất hoạt hóa sự phân chia tế bào, nguyên nhân là do CK hoạt hóa mạnh mẽ quá trình tổng hợp acid nucleic và protein dẫn đến kích thích sự phân chia tế bào<sup>8</sup>.

Trong nuôi cấy mô, CK cùng với auxin cần thiết cho sự phân chia tế bào<sup>9</sup>. Sự kết hợp giữa auxin và cytokinin trong môi trường nuôi cấy giúp kích thích sự tăng trưởng và phân chia tế bào để tạo mô sẹo<sup>10,11</sup>. Ngoài ra, yếu tố vết thương cũng cảm ứng hình thành và vận chuyển các hormone thực vật nội sinh, từ đó những chất này sẽ kích thích hình thành mô sẹo. Mặt khác sự tạo vết thương còn làm tăng sự hấp thu chất điều hoà sinh trưởng thực vật ngoại sinh. Điều này có thể thấy ở các tế bào sát vùng tạo vết thương đã hình thành các mạch khi tiếp xúc với NAA và BA<sup>12</sup>. Sau 5 và 10 ngày nuôi cấy, tử diệp và trụ hạ diệp *in vitro* đã có sự cảm ứng tạo mô sẹo trên một số môi trường (Hình 4 B,C), sau 4 tuần đã có sự hình thành và phát triển mô sẹo. Điều này có thể do BA giúp làm tăng hoạt động tổng hợp các protein liên quan tới sự phân chia tế bào đồng thời làm chậm sự thoái biến CK, qua đó làm chậm sự lão hoá<sup>13</sup>.

Trên môi trường MS bổ sung NAA 0,5 mg/L kết hợp với BA các nồng độ khác nhau, sự hình thành mô sẹo tốt nhất trên môi trường MS bổ sung NAA 0,5 mg/L kết hợp BA 1,5 mg/L hoặc 2,0 mg/L, mẫu cấy phát sinh mô sẹo 100% (Bảng 2), mô sẹo phát triển nhanh và nhiều (Hình 2). Mô sẹo trên môi trường MS bổ sung NAA 0,5 mg/L kết hợp BA 1,5 mg/L không bị hoá nâu sau 4 tuần nuôi cấy. Khi tăng hoặc giảm nồng độ BA tỷ lệ mô sẹo giảm dần hoặc không có sự xuất hiện mô

seọ. Điều này cho thấy sự tạo mô seọ phụ thuộc vào nồng độ cytokinin trong môi trường nuôi cấy.

Bên cạnh đó, sự tạo mô seọ còn phụ thuộc vào nguồn gốc của mẫu cấy, có lẽ sự hiện diện của các chất điều hoà sinh trưởng thực vật nội sinh trong các loại mẫu cấy khác nhau có đáp ứng khác nhau đối với sự hình thành mô seọ. Quan sát hiệu quả tạo mô seọ trên môi trường MS bổ sung NAA 0,5 mg/L kết hợp BA 1,5 mg/L ở hai vật liệu tử diệp và trụ hạ diệp, nhận thấy mô seọ phát sinh từ trụ hạ diệp phát triển nhanh, đều và nhiều hơn (Hình 2 C). Vì vậy, trụ hạ diệp trên môi trường MS bổ sung NAA 0,5 mg/L kết hợp BA 1,5 mg/L được sử dụng làm nguồn vật liệu cho thí nghiệm tạo rễ gián tiếp thông qua mô seọ. Kết quả này tương tự với nghiên cứu của Lê Hồng Giang (2010) khi khảo sát sự tạo mô seọ trên *Hydnophytum formicarum* Jack, khi nuôi cấy mô lá non trên môi trường MS bổ sung NAA 0,5 mg/L kết hợp BA 2,0 mg/L, tỷ lệ phát sinh mô seọ đạt 75%<sup>14</sup>.

#### **Thí nghiệm 2: Sự nuôi cấy in vitro tử diệp và trụ hạ diệp trên môi trường MS bổ sung BA kết hợp NAA các nồng độ khác nhau**

Tương tự thí nghiệm trên, quan sát hình thái mô seọ hình thành từ 2 nguồn vật liệu nêu trên sau 4 tuần nuôi cấy trên môi trường MS bổ sung BA 1,5 mg/L kết hợp NAA các nồng độ khác nhau, cho thấy ở môi trường có BA 1,5 mg/L kết hợp NAA 0,5 mg/L mô seọ phát triển tốt hơn các môi trường còn lại (Bảng 3, Hình 3). Điều này có thể do auxin có tác dụng làm ngừng chương trình sinh lý đang có sẵn trong mô thực vật đã phân hoá bằng cách gây methyl hoá DNA, làm tế bào đáp ứng với auxin gây phân phân hoá và bắt đầu phân chia<sup>12</sup>.

#### **Quan sát cấu trúc giải phẫu**

Cấu trúc giải phẫu trụ hạ diệp cho thấy ở ngày 0 nuôi cấy trên môi trường MS bổ sung NAA 0,5 mg/L kết hợp BA 1,5 mg/L, các tế bào chưa có sự phân chia (Hình 4 A). Theo dõi sau 5 và 10 ngày nuôi cấy có sự cảm ứng của các tế bào nhu mô trụ hạ diệp và phân chia không định hướng (Hình 4 B, C). Điều này dẫn đến sự hình thành mô seọ.

#### **Ảnh hưởng của chất điều hoà sinh trưởng thực vật lên sự tạo rễ**

##### **Thí nghiệm 1: Sự nuôi cấy in vitro tử diệp, trụ hạ diệp và mô seọ trên môi trường MS bổ sung IAA các nồng độ khác nhau**

Trong hầu hết các loài thực vật, sự hình thành rễ bất định đều được khởi phát bởi auxin. Auxin cần thiết cho sự phân chia và tăng trưởng của tế bào nên có vai trò quan trọng trong sự phát sinh hình thái thực vật.

Auxin kích thích sự tạo rễ và hoạt hoá cơ quan, có vai trò chủ yếu trong sự cảm ứng tạo rễ<sup>15</sup>. Việc sử dụng auxin cảm ứng tạo rễ được nghiên cứu và ứng dụng rất phổ biến trên nhiều đối tượng nghiên cứu. Tuy nhiên loại và nồng độ auxin còn tùy thuộc vào từng đối tượng mà sử dụng phù hợp. Trong thí nghiệm này, chúng tôi sử dụng IAA để cảm ứng ra rễ. Kết quả cho thấy khi tăng dần nồng độ IAA thì 100% mẫu cấy đều được cảm ứng tạo rễ. Số rễ cao nhất trên môi trường MS + IAA 0,3 mg/L là 4,2 rễ/mẫu cấy đối với tử diệp, 3,76 rễ/mẫu cấy đối với trụ hạ diệp và 5,83 rễ/mẫu cấy đối với mô seọ (Bảng 4). Tuy nhiên, mô seọ có sự hình thành rễ nhiều nhất, rễ dài nhất (Bảng 4, Hình 5), vì thế được sử dụng là nguồn vật liệu phù hợp cho sự tạo rễ cây sâm Bồ Chính. Kết quả này tương tự Phạm Minh Quang (2018) khi nghiên cứu về khả năng tạo rễ bất định trên *Dendrobium caesar* với môi trường KC bổ sung IAA 1,0 mg/L cho số lượng rễ đạt 15,186 rễ/mẫu cấy<sup>16</sup>.

##### **Thí nghiệm 2: Sự nuôi cấy in vitro tử diệp, trụ hạ diệp và mô seọ trên môi trường MS bổ sung IAA kết hợp NAA hoặc BA các nồng độ khác nhau**

Trên môi trường MS bổ sung IAA 0,3 mg/L kết hợp với NAA các nồng độ khác nhau nhận thấy số lượng rễ giảm so với môi trường MS chỉ bổ sung IAA 0,3 mg/L (Bảng 5). Điều này có lẽ do nồng độ cao của NAA có thể cản sự tích lũy cytokinin làm ngăn chặn sự phát sinh hình thái<sup>17</sup>. Đồng thời, khi bổ sung NAA các nồng độ kết hợp với IAA 0,3 mg/L cũng làm giảm chiều dài rễ (Bảng 5). Điều này có thể do nồng độ auxin ngoại sinh quá cao làm mất cân bằng hàm lượng hormone thực vật nội sinh, qua đó ảnh hưởng tới sự tạo rễ. Auxin nồng độ cao kích thích sự tạo sơ khởi rễ nhưng cản sự tăng trưởng của các sơ khởi này<sup>18</sup>. Còn khi quan sát môi trường MS bổ sung IAA 0,3 mg/L kết hợp với BA các nồng độ khác nhau không quan sát thấy sự xuất hiện rễ, chỉ có sự phát triển mô seọ, có lẽ vì auxin đang ở nồng độ phù hợp để tạo sơ khởi rễ, khi kết hợp với cytokinin thì sự tăng dần nồng độ dẫn đến sự mất dần cấu trúc sơ khởi rễ, dẫn đến sự hình thành mô seọ<sup>19</sup>.

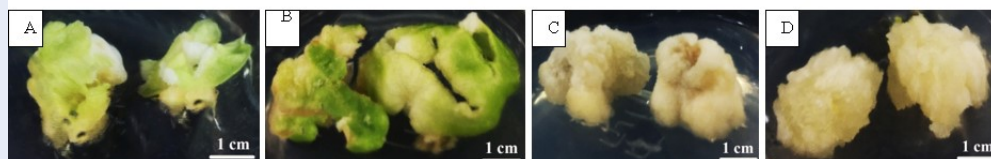
#### **Quan sát cấu trúc giải phẫu**

Cấu trúc giải phẫu trụ hạ diệp ở ngày đầu tiên nuôi cấy cho thấy xung quanh vùng trụ giữa và vùng nhu mô vỏ chưa có sự xuất hiện sơ khởi rễ (Hình 6 A). Sau 7 ngày nuôi cấy trên môi trường MS bổ sung IAA 0,3 mg/L có sự hình thành sơ khởi rễ từ nhóm tế bào có đặc tính phân chia mạnh của vùng tương tầng liber mội (Hình 6 B). Ở ngày 10, rễ hình thành và kéo dài ra vùng vỏ (Hình 6 C).

**Bảng 2:** Sự phát triển của mô sẹo sau 4 tuần nuôi cấy trên môi trường MS bổ sung NAA kết hợp BA các nồng độ khác nhau

Mẫu cấy	Nghiệm thức	Tỷ lệ phát sinh mô sẹo (%)	Ghi chú
Tử diệp	MS	0,00a	Mẫu cấy không đáp ứng với môi trường
	MS + NAA 0,5 mg/L + BA 0,5 mg/L	0,00a	Mẫu cấy có hiện tượng hoá vàng.
	MS + NAA 0,5 mg/L + BA 1,0 mg/L	45,45d	Mẫu cấy phát sinh mô sẹo chậm và không đều giữa các mẫu cấy.
	<b>MS + NAA 0,5 mg/L + BA 1,5 mg/L</b>	<b>100,00e</b>	Mô sẹo phát triển nhanh và đều ở tất cả các mẫu cấy.
	<b>MS + NAA 0,5 mg/L + BA 2,0 mg/L</b>	<b>100,00e</b>	Mô sẹo xuất hiện sớm nhưng sau một thời gian mô sẹo bắt đầu hoá nâu ở một số mẫu cấy.
	MS + NAA 0,5 mg/L + BA 2,5 mg/L	0,00a	Mẫu cấy hoá vàng sớm và nhiều mẫu cấy chết sớm.
	MS + NAA 0,5 mg/L + BA 3,0 mg/L	0,00a	Mẫu cấy hoá vàng sớm và nhiều mẫu cấy chết sớm.
Trụ hạ diệp	MS	0,00a	Mẫu cấy không đáp ứng với môi trường
	MS + NAA 0,5 mg/L + BA 0,5 mg/L	0,00a	Mẫu cấy có hiện tượng hoá vàng.
	MS + NAA 0,5 mg/L + BA 1,0 mg/L	45,45d	Mẫu cấy sinh mô sẹo chậm.
	<b>MS + NAA 0,5 mg/L + BA 1,5 mg/L</b>	<b>100,00e</b>	Mô sẹo phát triển nhanh và ổn định ở tất cả các mẫu cấy.
	<b>MS + NAA 0,5 mg/L + BA 2,0 mg/L</b>	<b>100,00e</b>	Mô sẹo xuất hiện sớm nhưng sau một thời gian mô sẹo bắt đầu hoá nâu ở một số mẫu cấy.
	MS + NAA 0,5 mg/L + BA 2,5 mg/L	33,33c	Mẫu cấy sinh mô sẹo yếu, hoá đen và một số chết sớm.
	MS + NAA 0,5 mg/L + BA 3,0 mg/L	6,66b	Mẫu cấy sinh mô sẹo yếu, hoá đen và một số chết sớm.
	CV (%)	12,74	

Trong cùng một cột, số có cùng mẫu tự thì không khác biệt nhau ở mức  $p \leq 0,05$  qua phép thử Duncan.



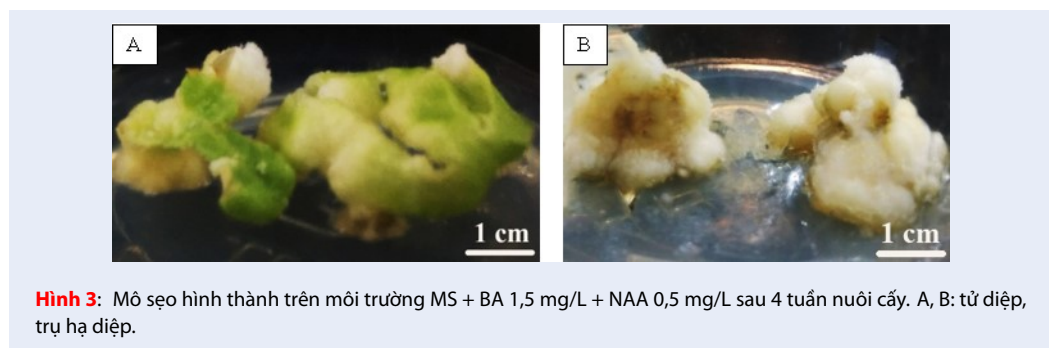
**Hình 2:** Mô sẹo hình thành trên môi trường MS + NAA 0,5 mg/L + BA 1,5 mg/L sau 4 tuần nuôi cấy. A, C: tử diệp, trụ hạ diệp. Hoặc môi trường MS + NAA 0,5 mg/L + BA 2,0 mg/L. B, D: tử diệp, trụ hạ diệp.



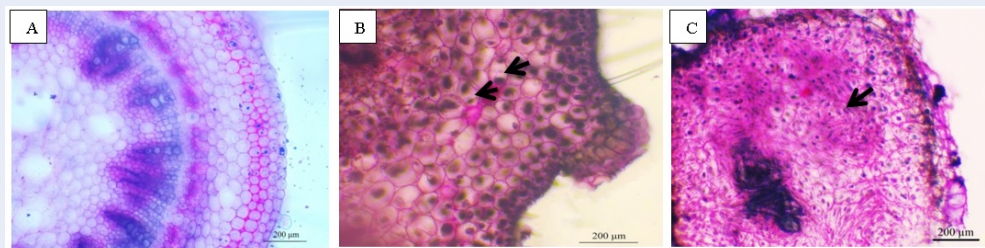
**Bảng 3:** Sự phát triển của mô sẹo sau 4 tuần nuôi cấy trên môi trường MS bổ sung BA kết hợp với NAA các nồng độ khác nhau

Mẫu cấy	Nhiệm thức	Tỷ lệ sinh mô sẹo (%)	Ghi chú
Tứ diệp	MS	0,00a	Mẫu cấy không đáp ứng với môi trường
	MS + BA 1,5 mg/L + NAA 0,5 mg/L	100,00e	Mô sẹo phát triển nhanh và đều.
	MS + BA 1,5 mg/L + NAA 1,0 mg/L	72,27d	Mô sẹo phát triển khá chậm và không đều giữa các mẫu cấy.
	MS + BA 1,5 mg/L + NAA 1,5 mg/L	20,00c	Mẫu cấy không sinh mô sẹo và mô sẹo có hiện tượng hoá nâu sớm.
	MS + BA 1,5 mg/L + NAA 2,0 mg/L	0,00a	Mẫu cấy có hiện tượng hoá nâu sớm.
	MS + BA 1,5 mg/L + NAA 2,5 mg/L	0,00a	Mẫu cấy có hiện tượng hoá vàng ở nhiều mẫu.
	MS + BA 1,5 mg/L + NAA 3,0 mg/L	0,00a	Mẫu cấy hoá vàng và có hiện tượng hoá đen ở nhiều vị trí.
Trụ hạ diệp	MS	0,00a	Mẫu cấy không đáp ứng với môi trường
	MS + BA 1,5 mg/L + NAA 0,5 mg/L	100,00e	Mô sẹo phát triển nhanh và đều.
	MS + BA 1,5 mg/L + NAA 1,0 mg/L	72,27d	Mô sẹo phát triển khá chậm.
	MS + BA 1,5 mg/L + NAA 1,5 mg/L	20,00c	Mô sẹo phát triển chậm và hoá vàng.
	MS + BA 1,5 mg/L + NAA 2,0 mg/L	5,55b	Mẫu cấy sinh mô sẹo yếu, có mẫu chết.
	MS + BA 1,5 mg/L + NAA 2,5 mg/L	0,00a	Mẫu cấy có hiện tượng hoá vàng.
	MS + BA 1,5 mg/L + NAA 3,0 mg/L	0,00a	Mẫu cấy có hiện tượng hoá đen.
	CV (%)	13,51	

Trong cùng một cột, số có cùng mẫu tự thì không khác biệt nhau ở mức  $p \leq 0,05$  qua phép thử Duncan.



**Hình 3:** Mô sẹo hình thành trên môi trường MS + BA 1,5 mg/L + NAA 0,5 mg/L sau 4 tuần nuôi cấy. A, B: tứ diệp, trụ hạ diệp.



**Hình 4:** Trụ hạ diệp nuôi cấy trên môi trường MS + NAA 0,5 mg/L + BA 1,5 mg/L. A, B, C: ngày 0, ngày 5, ngày 10. (mũi tên: tế bào đang phân chia)

**Bảng 4:** Sự phát triển của rễ *in vitro* sau 4 tuần nuôi cấy trên môi trường MS bổ sung IAA các nồng độ khác nhau

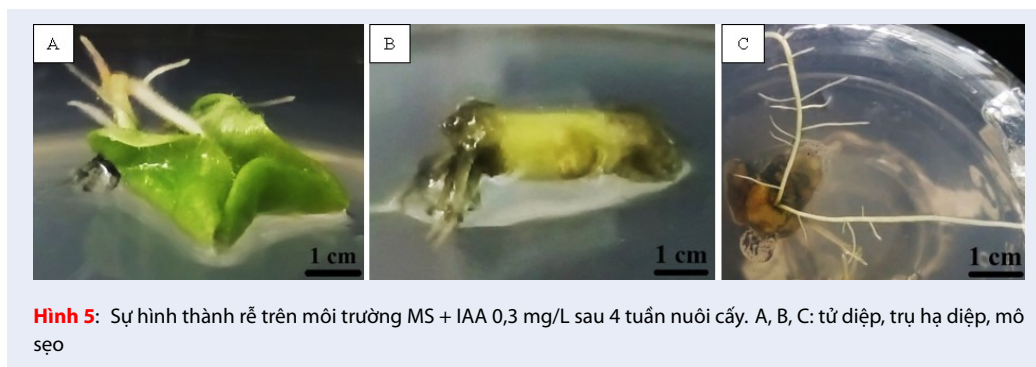
Mẫu cấy	Nghiệm thức	Số rễ/mẫu cấy	Chiều dài rễ (cm)
Tử diệp	MS	0,70b	0,50b
	MS + IAA 0,2 mg/L	2,48cd	0,50b
	<b>MS + IAA 0,3 mg/L</b>	<b>4,20i</b>	<b>1,05f</b>
	MS + IAA 0,4 mg/L	3,88h	0,83d
	MS + IAA 0,5 mg/L	2,56d	0,57bc
	MS + IAA 1,0 mg/L	3,50fg	1,20g
Trụ hạ diệp	MS	0,00a	0,00a
	MS + IAA 0,2 mg/L	2,22c	0,51
	<b>MS + IAA 0,3 mg/L</b>	<b>3,76gh</b>	<b>0,93de</b>
	MS + IAA 0,4 mg/L	3,50fg	0,67c
	MS + IAA 0,5 mg/L	3,33f	0,56bc
	MS + IAA 1,0 mg/L	3,01e	1,03ef
Mô sẹo	MS	0,00a	0,00a
	MS + IAA 0,2 mg/L	1,79c	2,55e
	<b>MS + IAA 0,3 mg/L</b>	<b>5,83fgh</b>	<b>5,10k</b>
	MS + IAA 0,4 mg/L	5,90gh	3,13h
	MS + IAA 0,5 mg/L	5,66f	2,95g
	MS + IAA 1,0 mg/L	6,00h	5,00j
	CV (%)	11,45	10,23

Trong cùng một cột, số có cùng mẫu tự thì không khác biệt nhau ở mức  $p \leq 0,05$  qua phép thử Duncan.

## KẾT LUẬN

Phương pháp thích hợp cho sự nảy mầm của hạt sâm Bồ Chính hoa màu đỏ là khử trùng hạt lần lượt bằng Javel thương phẩm 25%, 2 phút và dung dịch khử trùng  $HgCl_2$  0,1%, thời gian 3 phút, rồi lắc qua cồn 70%, 2 phút và ngâm hạt trong dung dịch  $GA_3$  20,0 mg/L, 120 phút, cuối cùng nuôi cấy trên môi trường MS bổ sung  $GA_3$  5,0 mg/L, điều kiện sáng. Môi trường thích hợp cho sự tạo mô sẹo là môi trường MS

bổ sung NAA 0,5 mg/L kết hợp BA 1,5 mg/L trong điều kiện tối với vật liệu nuôi cấy là trụ hạ diệp (100%). Sự hình thành rễ thích hợp trên môi trường MS bổ sung IAA 0,3 mg/L trong điều kiện tối, với số rễ là 4,2 rễ/mẫu cấy đối với tử diệp, 3,76 rễ/mẫu cấy đối với trụ hạ diệp và 5,83 rễ/mẫu cấy đối với mẫu cấy mô sẹo.

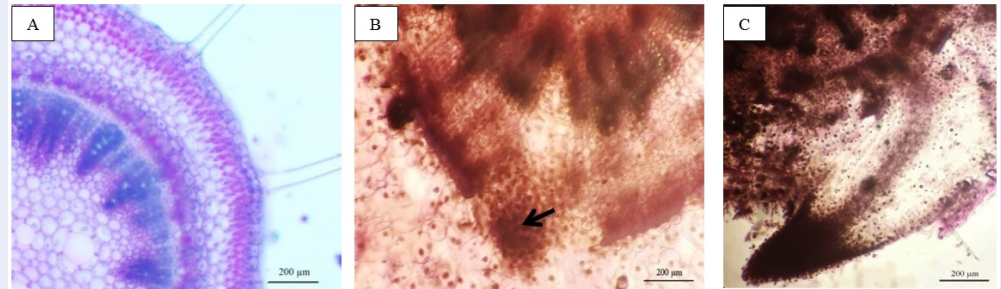


**Bảng 5:** Sự phát triển của rễ *in vitro* sau 4 tuần nuôi cấy trên môi trường MS bổ sung IAA kết hợp NAA các nồng độ khác nhau

Mẫu cấy	Nghiệm thức	Số rễ/mẫu cấy	Chiều dài rễ (cm)
Từ diệp	MS	0,70c	0,50d
	MS + IAA 0,3 mg/L + NAA 0,1 mg/L	1,00d	1,03h
	MS + IAA 0,3 mg/L + NAA 0,2 mg/L	1,41e	0,50d
	MS + IAA 0,3 mg/L + NAA 0,3 mg/L	1,77j	0,54e
	MS + IAA 0,3 mg/L + NAA 0,4 mg/L	1,82k	1,01g
	MS + IAA 0,3 mg/L + NAA 0,5 mg/L	1,67h	0,40c
Trụ hạ diệp	MS	0,00a	0,00a
	MS + IAA 0,3 mg/L + NAA 0,1 mg/L	0,72c	0,88f
	MS + IAA 0,3 mg/L + NAA 0,2 mg/L	1,51f	0,50d
	MS + IAA 0,3 mg/L + NAA 0,3 mg/L	1,64g	0,56e
	MS + IAA 0,3 mg/L + NAA 0,4 mg/L	1,70i	1,02gh
	MS + IAA 0,3 mg/L + NAA 0,5 mg/L	0,50b	0,30b
Mô sẹo	MS	0,00a	0,00a
	MS + IAA 0,3 mg/L + NAA 0,1 mg/L	3,57e	0,79c
	MS + IAA 0,3 mg/L + NAA 0,2 mg/L	6,00h	1,84d
	MS + IAA 0,3 mg/L + NAA 0,3 mg/L	5,73fg	3,21i
	MS + IAA 0,3 mg/L + NAA 0,4 mg/L	2,70d	2,76f
	MS + IAA 0,3 mg/L + NAA 0,5 mg/L	1,13b	0,72
	CV (%)	13,49	13,72

Trong cùng một cột, số có cùng mẫu tự thì không khác biệt nhau ở mức  $p \leq 0,05$  qua phép thử Duncan.





**Hình 6:** Trụ hạ diệp nuôi cấy trên môi trường MS + IAA 0,3 mg/L. A, B, C: ngày 0, ngày 5, ngày 10 (mũi tên: sơ khởi rễ).

### LỜI CẢM ƠN

Nhóm tác giả xin chân thành cảm ơn Bộ môn Sinh học Thực nghiệm – Hướng Sinh lý Thực vật, Trường ĐH Khoa học Tự nhiên – ĐHQG TP.HCM đã tạo điều kiện thuận lợi để tác giả hoàn thành bài báo này.

### DANH MỤC TỪ VIẾT TẮT

**BA:** Benzyl adenine

**CK:** Cytokinin

**GA:** Gibberellic acid

**IAA:** Indole acetic acid

**MS:** Murashige và Skoog, 1962

**NAA:** Naphthalene acetic acid

**DNA:** Deoxyribonucleic acid

### XUNG ĐỘT LỢI ÍCH

Các tác giả cam đoan không có xung đột lợi ích trong việc công bố bài báo này

### ĐÓNG GÓP CỦA TÁC GIẢ

Tác giả Dương Huỳnh Ngọc Trân: là tác giả chính tham gia thực hiện thí nghiệm, lấy kết quả nghiên cứu và viết bản thảo.

Tác giả Lê Thị Diễm: là tác giả tham gia viết bản thảo và biện luận các kết quả nghiên cứu.

Tác giả Võ Thị Bạch Mai: là tác giả tham gia hướng dẫn, chỉnh sửa bản thảo.

### TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Quyết định số 3765/QĐ-BKHCHN ngày 30 tháng 11 năm 2016 của Bộ trưởng Bộ Khoa học và Công nghệ.
- Luận TC, Phương BTM. Khảo sát thành phần hóa học của rễ cây sâm Bồ Chính (*Hibiscus sagittifolius* Kurz. Malvaceae) trồng ở Bạc Liêu. Công trình nghiên cứu khoa học, Viện Dược Liệu. 2001;

- Vui DT. Nghiên cứu thành phần hóa học và tác động dược lý theo hướng điều trị loét dạ dày của rễ củ cây sâm báo (*Abelmoschus sagittifolius* (Kurz) Merr). Viện Dược liệu. 2008;115.
- Hộ PH. Cây cỏ vị thuốc ở Việt Nam. NXB Trẻ. 2003;;105–115.
- Hiệp PD, Minh NT, Huyền PX, Hùng CD, Khiêm DV, Hằng NTT. Nghiên cứu ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng thực vật lên sự phát sinh hình thái của một số giống cây sâm Bồ Chính (*Hibiscus sagittifolius* Kurz) trong điều kiện in vitro. Tạp chí Sinh học. 2014;36(1se):266–271.
- Huyền PX, Ngoan HT, Hoàng NTP. Nghiên cứu nhân giống in vitro cây sâm Bồ Chính (*Hibiscus sagittifolius* Kurz) thông qua nuôi cấy đốt thân. Tạp chí Khoa học Nông nghiệp Việt Nam. 2017;15(5):664–672.
- Việt BT. Sinh lý thực vật đại cương. Phần II: Phát triển. NXB Đại Học Quốc Gia Thành Phố Hồ Chí Minh. 2000;.
- Vụ VV, Tâm VT, Tấn HM. Sinh lý học Thực vật. NXB Giáo Dục, Hà Nội. 2003;.
- Staden V, Zazimalova E, George EF. Plant growth regulators II: Cytokinins, their analogues and antagonist. Plant Propagation by Tissue Culture (3rd ed). Eds. George E. F., Hall M. A., Klerk G. J. Springer, Dordrecht, The Netherlands. 2008;p. 205–226.
- Litwack G. Vitamins and Hormones. Plant hormone Eds Litwack G. 2005;72:1–357.
- Machakova I, Zazimalova E, George EF. Plant Growth regulators: introduction; auxin, their analogues and inhibitors. Plant Propagation by Tissue Culture (3rd ed). Vol. 1: The Background. Eds. George E. F., Hall M. A., Klerk G. J. Springer, Dordrecht, The Netherlands. 2008;p. 175–205.
- Mai VTB. Sự phát triển chồi và rễ. NXB Đại học Quốc gia Tp Hồ Chí Minh. 2004;.
- Gahan P, George EF. Adventitious regeneration. Plant Propagation by Tissue Culture (3rd ed). Vol. 1: The Background. Eds. George E. F., Hall M. A., Klerk G. J. Springer, Dordrecht, The Netherlands. 2008;p. 355–401.
- Giang LH, Toàn NB. Tạo mô sẹo và tái sinh chồi từ mô lá non cây bí kì nam (*Hydnophytum formicarum* Jack.). Tạp chí Khoa học Đại học Cần Thơ. 2010;16a:216–222.
- Taiz L, Zeiger E. Plant Physiology (3rd ed). Sinauer Associates, USA. 2002;.
- Quang PM, Kiên DC, Phương QND, Minh HTT. Vi nhân giống và ra vườn ươm cây lan náng *Dendrobium* Caesar. Tạp chí Phát triển Khoa học và Công nghệ: chuyên san Khoa học Tự nhiên. 2018;2(3):14–22.
- Rahman ZA, Roowi S, Wan ZWS, Subramaniam S. Regeneration of Malaysian India rice (*Oryza sativa*) variety MR232 via optimized somatic embryogenesis system. Journal of Phytoology. 2010;2(3):30–38.
- Tiếng NTN, Lang NTN, Thanh DV, Sanh ND, Việt BT. Kích thích tổ mầm cành. Phần II: Cơ chế tạo rễ bất định. Thông báo Khoa học, Đại học Tổng hợp Tp Hồ Chí Minh. 1980;4:93–98.

19. Pernisová M, et al. Cytokinins modulate auxin-induced organogenesis in plants via regulation of auxin efflux. Proceedings of the National Academy of Science, USA. 2009;106:3609–3614. PMID: 19211794. Available from: <https://doi.org/10.1073/pnas.0811539106>.

# Effect of plant growth regulators on the root formation in *in vitro* culture of *Abelmoschus Sagittifolius* Kurz

Duong Huynh Ngoc Tran\*, Le Thi Diem, Vo Thi Bach Mai



Use your smartphone to scan this QR code and download this article

## ABSTRACT

*Abelmoschus sagittifolius* Kurz is a medicinal plant with typical pharmacological of ginseng. However, the number of trees in the nature wild is declining rapidly due to the increasing demand for logging along with the narrowing of the distribution area and the low incidence of seed germination, affecting the use for researching and developing gene sources for drug production in many areas. In this plant, root is the most important organ of the plant, so the study of root formation in *in vitro* has been of great significance in assessing the effect of plant growth regulators on induction roots, as well as creating a source of starting material for studies on the biosynthesis of saponin in *in vitro* compounds as an alternative to outside planting. The results showed that after 2 weeks of culture, the germination rate was highest (88%) when the seeds were disinfected with HgCl<sub>2</sub> 0.1%, 3 minutes and then soaked in GA<sub>3</sub> 20,0 mg/L, 120 minutes, finally seed culture on MS + 20 g/L saccharose + GA<sub>3</sub> 5.0 mg/L + 7 g/L agar. The callus formation from hypocotyl in the environment on MS medium + 20 g/L sucrose + NAA 0.5 mg/L + BA 1.5 mg/L + 7 g/L agar was appropriate for root reduction and the best root formation was applied in the medium of MS + 20 g/L sucrose + IAA 0.3 mg/L + 7 g/L agar. In conclusion, the method of tissue culture is suitable for the formation of adventitious roots from callus formation from hypocotyl of *Abelmoschus sagittifolius* Kurz.

**Key words:** *Abelmoschus sagittifolius* Kurz, callus, *in vitro*, root

University of Science, VNU-HCM

## Correspondence

Duong Huynh Ngoc Tran, University of Science, VNU-HCM

Email: dhnt91@gmail.com

## History

- Received: 27-3-2019
- Accepted: 30-4-2019
- Published: 25-6-2020

DOI : 10.32508/stdjns.v4i2.710



## Copyright

© VNU-HCM Press. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International license.



Cite this article : Tran D H N, Diem L T, Mai V T B. Effect of plant growth regulators on the root formation in *in vitro* culture of *Abelmoschus Sagittifolius* Kurz. *Sci. Tech. Dev. J. - Nat. Sci.*; 4(2):556-566.