

## ẢNH HƯỞNG CỦA NỒNG ĐỘ ĐƯỜNG, VITAMIN, CƯỜNG ĐỘ ÁNH SÁNG VÀ THÀNH PHẦN KHOÁNG LÊN SỰ TĂNG TRƯỞNG CỦA SÂM BỐ CHÍNH (*Hibiscus sagittifolius* Kurz) NUÔI CÂY *IN VITRO*

Nguyễn Lê Thụ Minh<sup>1</sup>, Nguyễn Thụy Phương Duyên<sup>1</sup>,  
Lê Thị Tuyết Anh<sup>2</sup>, Nguyễn Thị Quỳnh<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Viện Sinh học nhiệt đới, Viện Hàn Lâm KH & CN Việt Nam

<sup>2</sup>Trung tâm Nghiên cứu và Sản xuất Dược liệu miền Trung, Tuy Hòa, Phú Yên

**TÓM TẮT:** Sâm bố chính, *Hibiscus sagittifolius* Kurz, là loài dược liệu có phần rễ củ được sử dụng trong y học cổ truyền với các tác dụng như kích thích não bộ, tăng cường sinh lực, chống suy nhược thần kinh. Tỷ lệ nảy mầm từ hạt của cây sâm bố chính trong tự nhiên rất thấp, vì vậy, một số yếu tố ảnh hưởng lên quá trình vi nhân giống nhằm tạo ra một lượng lớn cây con chất lượng cao và đồng nhất đã được nghiên cứu. Những yếu tố ảnh hưởng gồm nồng độ đường, vitamin, cường độ ánh sáng, và thành phần khoáng của môi trường nuôi cấy. Sau 42 ngày nuôi cấy, các đốt thân sâm bố chính *in vitro* có mang lá được nuôi trong bao polypropylene trong điều kiện quang tự dưỡng dưới cường độ ánh sáng cao,  $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , thời gian chiếu sáng 12 giờ/ngày, nhiệt độ phòng nuôi cấy  $25^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ , ẩm độ tương đối (RH)  $55\% \pm 5\%$ , đã có sự tăng trưởng tốt hơn so với khi nuôi cấy trong điều kiện quang dị dưỡng hay trong điều kiện quang tự dưỡng dưới cường độ ánh sáng thấp,  $75 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Trên 6 loại môi trường khoáng khác nhau (MS, 1/2 MS, 1/2 NH<sub>4</sub>, SH, B5, EN), đốt thân sâm bố chính *in vitro* có mang lá được nuôi cấy quang tự dưỡng trên môi trường khoáng SH có sự gia tăng khối lượng tươi cao nhất (384,9 mg/cây) và có bộ thân lá và bộ rễ phát triển đồng bộ hơn so với các môi trường khoáng khác ở ngày nuôi cấy thứ 42. Kết quả của nghiên cứu này cho thấy, các cây sâm bố chính tăng trưởng tốt nhất khi được nuôi cấy *in vitro* trong bao polypropylene có gắn 2 màng trao đổi khí bằng giấy lọc, trên môi trường khoáng SH không đường và vitamin, dưới cường độ ánh sáng  $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , thời gian chiếu sáng 12 giờ/ngày, nhiệt độ phòng nuôi cấy  $25^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ , RH  $55\% \pm 5\%$ .

*Từ khóa:* *Hibiscus sagittifolius*, cường độ ánh sáng, quang dị dưỡng, quang tự dưỡng, thành phần khoáng.

### MỞ ĐẦU

Sâm bố chính, *Hibiscus sagittifolius* Kurz, còn được gọi là nhân sâm Phú Yên, thuộc họ Malvaceae, là một loài dược liệu có phần rễ củ được sử dụng trong y học cổ truyền với tác dụng kích thích não bộ, tăng cường sinh lực, chống suy nhược thần kinh, chóng mặt đau bụng (Đỗ Tất Lợi, 2004). Ngoài ra, sâm bố chính còn được khai thác như một loài cây cảnh do vẻ đẹp của hoa và hình dáng đặc biệt của rễ. Nhằm đáp ứng nhu cầu cây giống khỏe và đồng bộ về mặt di truyền với số lượng lớn, nhân giống vô tính bằng nuôi cấy mô thực vật, bao gồm vi nhân giống truyền thống và quang tự dưỡng, được xem là một phương pháp ưu việt so với nhân giống vô tính bằng phương pháp giâm cành, chiết cành, v.v. Trong phương pháp vi nhân giống truyền thống, còn gọi là vi nhân giống quang dị dưỡng, thực vật sử dụng nguồn carbon hữu cơ (đường,

vitamin, chất điều hòa sinh trưởng thực vật, v.v.) để gia tăng sinh khối. Trong phương pháp quang tự dưỡng, còn gọi là phương pháp vi nhân giống trên môi trường không có sự hiện diện của đường, vitamin và các chất điều hòa sinh trưởng thực vật, khả năng quang hợp của cây trong điều kiện nuôi cấy *in vitro* được xem là yếu tố quyết định cho sự tăng trưởng (Nguyen et al., 2016). Để cây đạt hiệu quả quang hợp tốt, bình nuôi cấy cần thoáng khí để cung cấp đủ lượng khí CO<sub>2</sub> cần thiết cho hoạt động quang hợp, đồng thời cường độ ánh sáng (photosynthetic photon flux, PPF) cũng phải được điều chỉnh ở mức tương ứng để cung cấp đủ lượng photon cho thực vật sử dụng trong hoạt động quang hợp. Ngoài ra, sự khác biệt về thành phần và hàm lượng các chất khoáng trong môi trường nuôi cấy cũng được chứng minh có vai trò quan trọng trong sự tăng trưởng của cây *in vitro* nuôi cấy quang tự dưỡng

(Lê Trọng Lưu và nnk., 2015; Ngô Thị Ngọc Hương và nnk., 2015). Phan Duy Hiệp và nnk. (2014) đã công bố nghiên cứu ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng thực vật lên sự tạo chồi và rễ bất định của cây sâm Phú Yên nuôi cấy *in vitro*. Số chồi bất định (4,5 chồi) cao nhất khi đốt thân cây sâm Phú Yên được nuôi cấy trên môi trường khoáng MS bổ sung 1 mg/l BA, 0,2 mg/l GA<sub>3</sub>, 10% nước dừa, trong khi số rễ bất định (6,6 rễ) cao nhất trên môi trường khoáng MS bổ sung 0,5 mg/l IBA, 0,5 mg/l NAA. Trong nghiên cứu này, ảnh hưởng của các điều kiện nuôi cấy *in vitro* (sự hiện diện của đường và vitamin, cường độ ánh sáng, thành phần khoáng của môi trường nuôi cấy) khác nhau đã được khảo sát, nhằm mục đích tìm được điều kiện thích hợp góp phần xây dựng quy trình vi nhân giống sâm bổ chính.

#### VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Mẫu nuôi cấy là các đốt thân thứ 2 và 3 (dài 1,0-1,5 cm) tính từ ngọn xuống mang 1 lá mở của cây *in vitro*. Cây sâm bổ chính trồng ngoài tự nhiên, do Trung tâm Nghiên cứu và Sản xuất dược liệu miền Trung, Tuy Hòa, Phú Yên cung cấp đã được khử trùng và nuôi cấy trước đó trên môi trường MS (Murashige & Skoog, 1962) có thành phần NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> giảm 1/2, vitamin Morel (Morel et al., 1951) đường (công ty Đường Biên Hòa, Đồng Nai) 15 g L<sup>-1</sup>, agar (Công ty Cổ phần Đồ hộp Hạ Long) 10 g L<sup>-1</sup>.

Nhằm mục đích tìm được điều kiện nuôi cấy thích hợp góp phần xây dựng quy trình vi nhân giống sâm bổ chính, nghiên cứu này được thực hiện với 2 thí nghiệm.

#### **Ảnh hưởng của cường độ ánh sáng và sự hiện diện của đường, vitamin trong môi trường nuôi cấy lên sự tăng trưởng của cây sâm bổ chính nuôi cấy *in vitro***

Đốt thân được nuôi cấy trong bao polypropylene (V = 800 ml) không gắn màng trao đổi khí khi được nuôi cấy trên môi trường có đường và vitamin, hoặc có gắn hai màng (φ = 1 cm) trao đổi khí bằng giấy lọc (cơ sở sản xuất Lê Mai Tâm, Đà Lạt) khi được nuôi cấy trên môi trường không có sự hiện diện của đường và vitamin. Số lần trao đổi khí (N) của bao không có hoặc có 2 màng trao đổi khí được đo lần lượt là 0,21 và 2,52 lần/giờ theo phương pháp của

Kozai et al. (1986). Mỗi bao chứa 120 ml môi trường khoáng MS với hàm lượng khoáng NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> giảm 1/2, giá thể sử dụng là agar 10 g L<sup>-1</sup>, pH của môi trường được điều chỉnh ở mức 6,0 trước khi khử trùng. Thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên với 1 yếu tố khác biệt về điều kiện nuôi cấy (bảng 1) gồm 3 công thức: (SL) môi trường có chứa đường 30 g L<sup>-1</sup>, vitamin Morel, kết hợp với PPF thấp, 75 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, (FL) môi trường không có sự hiện diện của đường và vitamin kết hợp với PPF thấp, 75 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, (FH) môi trường không có sự hiện diện của đường và vitamin kết hợp với PPF cao, 150 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>. Thí nghiệm được đặt trong phòng nuôi cấy có nhiệt độ không khí 25°C ± 2°C, độ ẩm tương đối (RH) 55% ± 5%, dưới đèn huỳnh quang (công ty Điện Quang, tp. Hồ Chí Minh) với thời gian chiếu sáng 12 giờ/ngày. Mỗi công thức gồm 6 bao polypropylene, mỗi bao chứa 6 đốt thân. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Thời gian thí nghiệm 42 ngày.

#### **Ảnh hưởng của thành phần khoáng lên sự tăng trưởng của cây sâm bổ chính**

Dựa trên kết quả của thí nghiệm 1, các đốt thân cây sâm bổ chính được nuôi cấy quang tự dưỡng (trên môi trường không có sự hiện diện của đường và vitamin) trong bao polypropylene (V = 800 ml) có 2 màng trao đổi khí, mỗi bao chứa 120 ml môi trường với giá thể agar 10 g L<sup>-1</sup> để khảo sát sự tăng trưởng do ảnh hưởng của các loại và thành phần khoáng khác nhau. pH của môi trường được điều chỉnh ở mức 6,0 trước khi khử trùng. Thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên với 1 yếu tố khác biệt là thành phần khoáng trong môi trường nuôi cấy. Thí nghiệm gồm 6 công thức: (MS) khoáng đa lượng và vi lượng MS, (1/2 MS) khoáng đa lượng MS giảm 1/2 kết hợp với khoáng vi lượng MS, (1/2 NH<sub>4</sub>) khoáng đa lượng MS có hàm lượng NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> giảm 1/2 kết hợp với khoáng vi lượng MS, (SH) khoáng đa lượng và vi lượng theo môi trường Schenk & Hildebrandt (Schenk et al., 1972), (B5) khoáng đa lượng và vi lượng theo môi trường Gamborg B5 (Gamborg et al., 1968) và (EN) khoáng đa lượng và vi lượng theo môi trường Enshi-Shoho (Hori, 1966). Mỗi công thức gồm 6 bao polypropylene, mỗi bao mang 6 đốt thân. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần và được đặt trong

phòng nuôi cây dưới cường độ ánh sáng  $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , thời gian chiếu sáng 12 giờ/ngày, nhiệt độ không khí  $25^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$  và RH  $55\% \pm 5\%$ .

Các chỉ tiêu tăng trưởng như số lá, diện tích lá, số rễ, chiều dài rễ, chiều cao cây, khối lượng tươi và khối lượng khô cây, được thu thập ở ngày thứ 42 của mỗi thí nghiệm. Diện tích lá được đo bằng máy LI-3100C (LI-COR<sup>®</sup> Biosciences, Inc., Hoa Kỳ). Cường độ ánh sáng được đo bằng máy đo cường độ ánh sáng LI-COR, model LI-250A (LI-COR<sup>®</sup> Biosciences, Inc., Hoa Kỳ). Hiệu suất quang hợp thuần được đo trong thời gian nuôi cây ở các ngày 21, 28, 35, 42 bằng máy sắc ký khí GC 2010 (Shimadzu Co., Nhật Bản) theo phương pháp của Fujiwara et al. (1987). Số liệu được thống kê và phân tích ANOVA một yếu tố và phân hạng theo LSD-test hay Duncan's Multiple Range Test (tùy theo số lượng công thức trong thí nghiệm) bằng phần mềm MSTATC phiên bản 2.10 của Đại học bang Michigan, Hoa Kỳ và vẽ đồ thị bằng phần mềm Excel 2010.

## KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### Ảnh hưởng của nồng độ đường, vitamin và cường độ ánh sáng lên sự tăng trưởng của cây sâm bố chính nuôi cấy *in vitro*

Ở ngày thứ 42, gia tăng khối lượng tươi (IFW) của sâm bố chính ở ba điều kiện nuôi cấy khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê (bảng 1). Cây sâm nuôi cấy trên môi trường không đường và vitamin dưới điều kiện cường độ ánh sáng cao (công thức FH) có IFW (297,7 mg/cây) lớn nhất so với cây ở hai công thức FL (268,5 mg/cây) và SL (242,5 mg/cây). Tuy nhiên, sự gia tăng tích lũy vật chất khô của cây không khác biệt về phương diện thống kê ở cả ba điều kiện nuôi cấy khác nhau (bảng 1). Như vậy, cây sâm bố chính nuôi cấy *in vitro* đã có thể tạo được một lượng sinh khối từ nguồn carbon vô cơ là  $\text{CO}_2$  của không khí thông qua hoạt động quang hợp, tương đương với lượng sinh khối mà cây đã tích lũy khi được nuôi cấy trong điều kiện có nguồn carbon hữu cơ là đường và vitamin.

Mặc dù số lá giữa các công thức không khác biệt về mặt thống kê, diện tích lá của cây sâm bố chính trên môi trường không đường và vitamin ở cả hai công thức, FL và FH, lớn hơn gấp hai lần so với khi được nuôi cấy trên môi trường có đường và vitamin (hình 1, bảng 2). Điều này cho thấy, hoạt động của bộ máy quang hợp của sâm bố chính dưới điều kiện nuôi cấy quang tự dưỡng đã được thúc đẩy mạnh, dẫn đến sự gia tăng kích thước của bộ lá trong điều kiện thí nghiệm.

Bảng 1. Gia tăng khối lượng tươi (IFW), gia tăng khối lượng khô (IDW) và phần trăm chất khô (% DM) của cây sâm bố chính ở ngày thứ 42

Tên công thức <sup>z</sup>	Điều kiện nuôi cấy				IFW (mg/cây)	IDW (mg/cây)	% DM
	Sucrose (mg L <sup>-1</sup> )	Vitamin Morel	Màng trao đổi khí	PPF ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )			
SL	30	Có	0	75	242,5 c <sup>x</sup>	24,3	10,15
FL	0	Không	2	75	268,5 b	24,6	9,40
FH	0	Không	2	150	297,7 a	26,1	9,03
ANOVA <sup>y</sup>					**	NS	NS
CV (%)					2,50	10,29	7,68

<sup>z</sup> S hay F bên trái tên công thức lần lượt tương trưng cho môi trường nuôi cấy có hay không có đường và vitamin; L hay H bên phải lần lượt tương trưng cho cường độ ánh sáng (PPF) ở mức thấp ( $75 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) hay cao ( $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ); <sup>y</sup> NS, \*\*: không khác biệt hay khác biệt có ý nghĩa ở mức  $p \leq 0,01$ ; <sup>x</sup> Các số có chữ cái giống nhau trên cùng một cột thì không có sự khác biệt theo trắc nghiệm phân hạng LSD-test.

Cây sâm bố chính ở công thức SL có số rễ (5,8 rễ/cây) và chiều dài rễ (56,8 mm) ở ngày thứ 42 lớn nhất so với các cây ở công thức FL (3,1 rễ/cây và 28,8 mm) hoặc FH (4,3 rễ/cây và 43,9 mm) (bảng 2). Điều này có thể do cây sâm bố chính nuôi cấy trên môi trường không có sự

hiện diện của đường và vitamin đã tập trung vào hoạt động quang hợp khiến bộ máy quang hợp, bộ lá, có tích lũy sinh khối lớn hơn bộ rễ. Cây được nuôi cấy trên môi trường có sự hiện diện của đường và vitamin đã tăng trưởng chiều cao tốt hơn, nhưng có thể đây là biểu hiện của cây nuôi trong điều kiện có cường độ ánh sáng thấp. Khi được nuôi cấy quang tự dưỡng (QTD), cây sâm bố chính đặt dưới PPF cao,  $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , có chiều cao cây tăng hơn 75% cùng với diện tích lá lớn hơn và số rễ nhiều hơn so với cây được đặt dưới cường độ ánh sáng thấp bằng 1/2 (bảng 2). Tuy nhiên, kết quả này không tương

đồng với kết quả nghiên cứu trên cây Neem (*Azadirachta indica* A. Juss.) nuôi cấy quang tự dưỡng dưới 3 mức cường độ ánh sáng 70, 150 hay  $230 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (Nguyen & Kozai, 2005). Chiều cao cây Neem thấp nhất nhưng gia tăng sinh khối lớn nhất, khi được nuôi cấy dưới cường độ ánh sáng cao nhất,  $230 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Oh et al. (2015) cũng đã chứng minh cây hoa anh thảo (*Cyclamen persicum*) có cuống lá dài hơn và hoạt tính gibberelin nội sinh cao hơn khi được nuôi cấy dưới cường độ ánh sáng  $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  so với cây nuôi dưới cường độ ánh sáng  $240 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

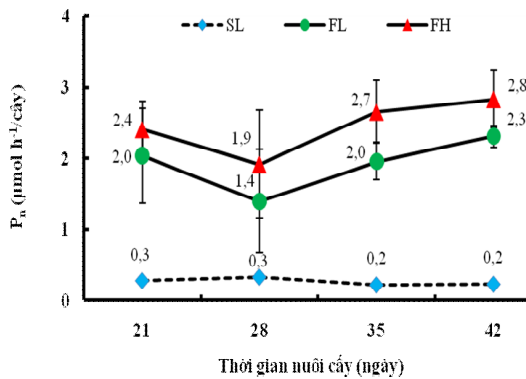


Hình 1. Sự tăng trưởng của cây sâm bố chính ở ngày thứ 42  
Ghi chú tên công thức như bảng 1.

Bảng 2. Ảnh hưởng của phương pháp nuôi cấy lên số lá (No.L), diện tích lá (LA), số rễ (No.R), chiều dài rễ (RL) và chiều cao cây (SL) của cây nhân sâm bố chính ở ngày nuôi cấy thứ 42

Tên công thức <sup>z</sup>	No.L (lá/cây)	LA ( $\text{cm}^2/\text{cây}$ )	No.R (rễ/cây)	RL (mm)	SL (mm)
SL	5,8	4,6 b <sup>x</sup>	5,8 a	56,8 a	41,3 a
FL	6,2	9,7 a	3,1 c	28,8 b	21,9 b
FH	6,4	10,3 a	4,3 b	43,9 ab	38,4 a
ANOVA <sup>y</sup>	NS	**	**	**	*
CV (%)	8,08	5,08	8,05	12,22	22,06

Ghi chú: như bảng 1.



Hình 2. Hiệu suất quang hợp thuần ( $P_n$ ) của cây sâm bô chính ở các công thức khác nhau theo thời gian nuôi cấy. Ghi chú tên công thức như bảng 1.

Hiệu suất quang hợp thuần ( $P_n$ ) của cây ở công thức SL thấp nhất, trong khi  $P_n$  của cây ở công thức FH cao nhất trong suốt thời gian nuôi cấy (hình 2). Việc giảm  $P_n$  từ ngày nuôi cấy thứ 21 đến ngày 28 ở cả hai công thức FH và FL có thể là do trạng thái sinh lý của cây vì không có sự rụng lá hay vàng lá trong thời gian này hay trước đó.

Hiệu quả của phương pháp nuôi cấy mô quang tự dưỡng đối với sự tăng trưởng của cây trong cả giai đoạn *in vitro* và *ex vitro* đã được chứng minh trong nhiều nghiên cứu. Nguyen & Kozai (2001) đã cho thấy, nhiều loài thực vật thân gỗ như măng cụt (*Garcinia mangostana*), cà phê (*Coffea arabusta*), hồng (*Paulownia fortunei*), keo (*Acacia mangium*) và Neem (*Azadirachta indica*) khi được nuôi cấy bằng phương pháp QTD đều tăng trưởng tương đương hoặc tốt hơn so với khi được nuôi cấy bằng phương pháp quang dị dưỡng (QDD). Trong điều kiện nuôi cấy QDD, cây tăng trưởng chậm do phụ thuộc phần lớn vào việc hấp thu carbohydrate từ đường và vitamin ở phần tiếp xúc với môi trường nuôi cấy, đồng thời trong bình nuôi cấy kín không có sự trao đổi khí với bên ngoài, khí ethylene do cây tạo ra không được phóng thích ra môi trường không khí mà được tích lũy dần trong bình nuôi cấy với nồng

độ ngày càng cao, dẫn đến việc hạn chế quá trình tăng trưởng của cây sâm bô chính. Theo Jackson et al. (1987), khi cây sung (*Ficus lyrata*) được nuôi cấy *in vitro* trong các bình kín, khí ethylene do cây tạo ra tích lũy trong các bình nuôi đã làm giảm diện tích lá của cây, gia tăng sự tạo mô sẹo và ảnh hưởng đến sự tạo chồi. Tương tự như cây sung, cây sâm bô chính nuôi cấy trong điều kiện QDD (trên môi trường có đường và vitamin, và trong bao polypropylene kín không có màng trao đổi khí) có diện tích lá chỉ bằng một nửa so với cây nuôi cấy trong điều kiện QTD. Tuy nhiên, Iarema et al. (2012) đã chứng minh cây sâm Brazil (*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen) có sự gia tăng khối lượng tươi cao hơn khi được nuôi cấy QDD. Điều này có thể do điều kiện nuôi cấy QTD (chủ yếu là nồng độ  $CO_2$  và cường độ ánh sáng) chưa phù hợp để cây sâm *Pfaffia* phát huy khả năng tự dưỡng trong điều kiện *in vitro*.

#### Ảnh hưởng của thành phần khoáng lên sự tăng trưởng của cây sâm bô chính

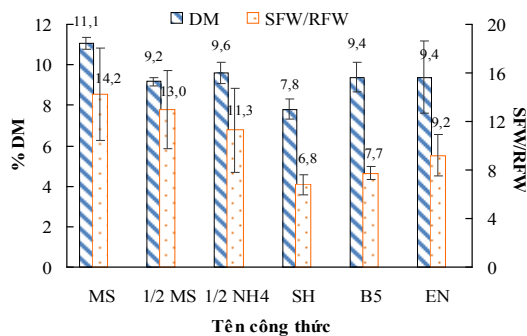
Thành phần khoáng là yếu tố hóa học quan trọng đối với sự tăng trưởng của cây trong điều kiện tự nhiên cũng như trong nuôi cấy mô tế bào thực vật. Ở ngày nuôi cấy thứ 42, gia tăng khối lượng tươi (IFW) của cây sâm bô chính cao nhất (384,9 mg/cây) khi được nuôi cấy trên môi trường khoáng Schenk & Hildebrandt (SH), và thấp nhất (229,5 mg/cây) khi được nuôi trên môi trường khoáng MS cơ bản (MS) (bảng 3). Gia tăng khối lượng khô (IDW) của các công thức sau 42 ngày nuôi cấy không có sự khác biệt về mặt thống kê (bảng 3), nhưng phần trăm chất khô (% DM) giữa các công thức lại có sự khác biệt có ý nghĩa ở mức  $p \leq 0,05$  (hình 3).

Trong thí nghiệm này, IFW và tỷ lệ khối lượng tươi thân lá/khối lượng tươi rễ (SFW/RFW) của các công thức có mối tương quan nghịch với nhau (bảng 3, hình 3). Tỷ lệ khối lượng tươi thân lá/rễ càng nhỏ thì sự phát triển giữa bộ phận thân lá và bộ phận rễ của cây càng đồng bộ. Cây sâm *in vitro* có tỷ lệ SFW/RFW nhỏ nhất (6,8) ở công thức SH và lớn nhất (14,2) ở công thức MS (hình 3).

Bảng 3. Gia tăng khối lượng tươi (IFW), gia tăng khối lượng khô (IDW) và diện tích lá (LA) của cây sâm bố chính dưới ảnh hưởng của loại và thành phần khoáng ở ngày thứ 42

Tên công thức <sup>z</sup>	IFW (mg/cây)	IDW (mg/cây)	LA (cm <sup>2</sup> )
MS	229,5 d <sup>x</sup>	25,3	7,8 b
1/2 MS	261,4 cd	23,2	9,5 ab
1/2 NH <sub>4</sub>	268,1 c	24,7	7,8 b
SH	384,9 a	29,2	12,4 a
B5	291,7 c	26,9	10,6 ab
EN	333,0 b	29,9	11,1 a
ANOVA <sup>y</sup>	**	NS	**
CV (%)	4,87	12,31	11,09

<sup>z</sup> MS, 1/2 MS, 1/2 NH<sub>4</sub>, SH, B5 và EN lần lượt tương trưng cho môi trường khoáng MS, khoáng đa lượng MS giảm 1/2, khoáng MS có thành phần NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> giảm 1/2, khoáng Schenk & Hildebrandt, khoáng Gamborg B5 và khoáng Enshi-Shoho; <sup>y</sup> NS, \*\*: không khác biệt hay khác biệt có ý nghĩa ở mức p ≤ 0,01; <sup>x</sup> Các số có chữ cái giống nhau trên cùng một cột thì không có sự khác biệt theo trắc nghiệm phân hạng Duncan's Multiple Range Test.



Hình 3. Phần trăm chất khô (% DM) và tỷ lệ khối lượng tươi thân+lá/rễ (SFW/RFW) của cây sâm bố chính ở ngày thứ 42

Ghi chú: Tên công thức xem bảng 3.

Cây sâm bố chính *in vitro* có nhiều lá nhất (6,4 lá/cây), thân cây cao nhất (49,6 mm/cây) ở công thức khoáng Enshi-Shoho (EN) (bảng 4). Các cây thuộc công thức SH không những có diện tích lá lớn nhất (12,4 cm<sup>2</sup>), còn có bộ rễ phát triển mạnh với số rễ nhiều nhất (8,2 rễ/cây) và chiều dài rễ dài nhất (58,1 mm/cây) (bảng 4). Cây sâm bố chính nuôi cấy quang tự dưỡng trên môi trường khoáng MS tăng trưởng chậm với số lượng lá mới (5,1 lá/cây) và rễ tạo thành (3,6 rễ/cây) đều ít hơn cây nuôi trên các môi trường khoáng còn lại (bảng 4). Ở ngày thứ 42, việc giảm 1/2 hàm lượng khoáng đa lượng của môi trường MS hay chỉ giảm 1/2 hàm lượng khoáng NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> đã đem lại các kết quả tương đương về

mật tăng trưởng của cây *in vitro* (bảng 3 & 4, hình 3).

Trong vi nhân giống thực vật, khoáng MS được sử dụng rất phổ biến và là môi trường nuôi cấy rất giàu nitơ ở cả hai dạng là nitrate và amonium (Villamor, 2010). Julkiflee et al. (2014) đã chứng minh môi trường khoáng MS cơ bản chưa phải là tối ưu cho sự tăng trưởng của cây *Dendrobium Sonia-28* nuôi cấy *in vitro*. George & Klerk (2008) cho rằng, phần lớn thực vật có thể hấp thu nitơ hiệu quả hơn và sinh trưởng tốt hơn nếu trong môi trường nuôi cấy có chứa cả hai loại ion NO<sub>3</sub><sup>-</sup> và NH<sub>4</sub><sup>+</sup>. Tuy nhiên, điều này liên quan mật thiết đến sự đồng hóa đạm của rễ. Giai đoạn đầu tiên của sự đồng hóa đạm là sự khử nitrate, thường xảy ra ở rễ, trong tối, tiếp theo là sự tổng hợp acid amin của tế bào rễ. Sự đồng hóa đạm ở rễ liên quan đến đặc điểm mô non phát triển cần NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, nhưng NH<sub>4</sub><sup>+</sup> thường đối kháng với K<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup> hay Mg<sup>2+</sup>. Do đó, nếu NH<sub>4</sub><sup>+</sup> được cung cấp cho tế bào rễ quá nhiều có thể gây thiếu hụt K<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup> hay Mg<sup>2+</sup> dẫn đến sự kìm hãm tăng trưởng của rễ. Sự kém phát triển của bộ rễ khi cây sâm bố chính được nuôi cấy trên môi trường MS so với các loại môi trường nuôi cấy khác có lẽ do việc dư thừa quá mức cần thiết các ion NH<sub>4</sub><sup>+</sup> vì lượng ion NH<sub>4</sub><sup>+</sup> hiện diện trong môi trường MS cao hơn 2-16 lần so với các môi trường đã sử dụng khác. Nói một cách khác, sự tăng trưởng chậm hơn của cây sâm bố chính *in vitro* nuôi trên môi trường MS so với các cây

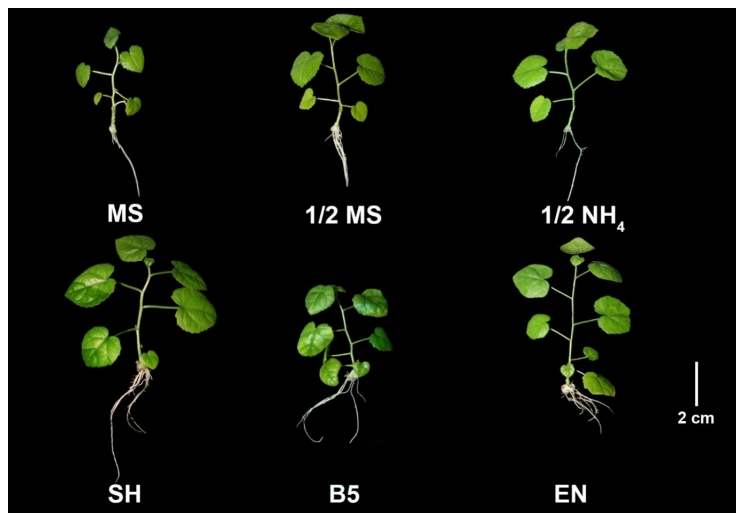
trên môi trường MS có toàn bộ khoáng đa lượng giảm 1/2 hay MS có  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  giảm 1/2 có thể do hàm lượng khoáng  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  cao hơn nhu cầu của cây sâm bố chính và dẫn đến sự kìm hãm tăng trưởng của cây (Britto et al., 2002). Đốt thân cây oải hương khi được nuôi cấy trên môi trường khoáng MS không bổ sung đường, vitamin và có thành phần khoáng  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  giảm 1/2 đã tăng trưởng tốt hơn so với khi được nuôi cấy trên môi

trường khoáng MS cơ bản (Lê Trọng Lưu và nnk., 2015). Tương tự, cây sâm Ngọc Linh nuôi cấy quang tự dưỡng trên môi trường khoáng MS có thành phần  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  và  $\text{KNO}_3$  giảm 1/2 đã có hoạt động quang hợp tốt hơn với diện tích lá tăng 30%, số lượng rễ tăng gấp 2 lần và khối lượng khô tăng 50% so với cây nuôi trên môi trường khoáng MS (Ngô Thị Ngọc Hương và nnk., 2015).

Bảng 4. Ảnh hưởng của thành phần khoáng lên số lá (NoL), số rễ (NoR), chiều dài rễ (RL) và chiều cao cây (SL) của cây sâm bố chính ở ngày thứ 42

Tên công thức <sup>z</sup>	NoL (lá/cây)	NoR (rễ/cây)	RL (mm)	SL (mm)
MS	5,1 c <sup>x</sup>	3,6 c	27,4 c	23,2 b
1/2 MS	6,0 ab	5,4 bc	32,5 bc	28,3 b
1/2 $\text{NH}_4$	5,5 bc	5,6 bc	30,1 bc	22,6 b
SH	6,0 ab	8,2 a	58,1 a	33,1 ab
B5	6,2 ab	7,0 ab	43,8 ab	30,1 b
EN	6,4 a	6,6 ab	30,1 bc	49,6 a
ANOVA <sup>y</sup>	*	**	**	**
CV (%)	6,88	13,89	15,93	21,87

<sup>z</sup> MS, 1/2 MS, 1/2  $\text{NH}_4$ , SH, B5 và EN lần lượt tương trưng cho môi trường khoáng MS, khoáng đa lượng MS giảm 1/2, khoáng MS có thành phần  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  giảm 1/2, khoáng Schenk & Hildebrandt, khoáng Gamborg B5 và khoáng Enshi-Shoho; <sup>y</sup> \*, \*\*: khác biệt có ý nghĩa ở mức  $p \leq 0,05$  hay  $p \leq 0,01$ ; <sup>x</sup> Các số có chữ cái giống nhau trên cùng một cột thì không có sự khác biệt theo trắc nghiệm phân hạng Duncan's Multiple Range Test.



Hình 4. Cây nhân sâm bố chính *in vitro* được nuôi trên các môi trường khoáng khác nhau ở ngày thứ 42  
Ghi chú tên công thức như bảng 3.

Theo Rothstein & Cregg (2005), tỷ lệ ion  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$  trong môi trường nuôi cấy *in vitro* cũng có ảnh hưởng rất lớn đến sự tăng trưởng của hầu hết các loại cây được nuôi cấy. Do đó, tỷ lệ ion  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$  trong môi trường cần được

điều chỉnh cho phù hợp với nhu cầu dinh dưỡng của từng loài thực vật. Tỷ lệ ion  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$  có trong các công thức SH, B5 và EN đều cao hơn (lần lượt là 9,5; 12,4 và 12,3) so với các công thức MS, 1/2 MS và 1/2  $\text{NH}_4$  (lần lượt là 1,9; 1

và 3,8). Cây sâm bố chính nuôi cấy *in vitro* khi được nuôi cấy trên môi trường khoáng có tỷ lệ  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$  cao như ở các công thức SH, B5 hay EN đều có bộ rễ và bộ lá tăng trưởng tốt hơn so với các công thức sử dụng môi trường khoáng cơ bản MS. Aliva (1998) cũng nhận được kết quả tương tự khi nuôi cấy cây khoai tây trên các loại môi trường khoáng khác nhau. Trong nghiên cứu này, hai công thức B5 và EN tuy có tỷ lệ  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$  cao nhưng có lẽ chưa phải là tối ưu so với nhu cầu của cây sâm bố chính, vì vậy, bộ lá và bộ rễ của cây đã phát triển không tương đồng.

#### KẾT LUẬN

Cây sâm bố chính *in vitro* đã tăng trưởng tốt nhất khi được nuôi cấy trong điều kiện quang tự dưỡng trên môi trường khoáng SH không bổ sung đường và vitamin dưới cường độ ánh sáng  $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Việc áp dụng nuôi cấy quang tự dưỡng trong vi nhân giống cây sâm bố chính cần được tiếp tục khảo sát với một số các yếu tố vật lý khác của môi trường nuôi cấy nhằm xây dựng quy trình nhân giống vô tính hoàn chỉnh phục vụ sản xuất loài cây này theo nhu cầu một số địa phương ở Việt Nam.

**Lời cảm ơn:** Đề tài được hỗ trợ kinh phí từ Sở Khoa học và Công nghệ tỉnh Phú Yên (2015-2017), cùng với sự hỗ trợ về trang thiết bị từ phòng Thí nghiệm Trọng điểm phía Nam về Công nghệ tế bào thực vật, Viện Sinh học nhiệt đới, Viện Hàn Lâm KH & CN Việt Nam.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Avilla A., Pereira M., Arguello A., 1998. Nitrogen concentration and proportion of  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  affect potato cultivar response in solid and liquid media. HortScience, 33(2): 336-338.
- Britto D. T., Kronzucker H. J., 2002.  $\text{NH}_4^+$  toxicity in higher plants: a critical review. J. Plant Physiol., 159(6): 567-584.
- Fujiwara K., Kozai T., Watanabe I., 1987. Measurements of carbon dioxide gas concentration in closed vessels containing tissue culture plantlets and estimates of net photosynthesis rates of the plantlets. J. Agri. Meteorol., 43(1): 21-30.
- Gamborg O. L., Miller R. A., Ojima K., 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. Exp. Cell Res., 50(1): 151-158.
- George E. F., de Klerk G. J., 2008. The components of plant tissue culture media I: macro- and micro-nutrients. In: George EF, Hall AM, de Klerk GJ (eds.) Plant Propagation by Tissue Culture, 3<sup>rd</sup> Edition, 1: 65-102. The Background, Springer, Dordrecht, The Netherlands.
- Phan Duy Hiệp, Nguyễn Trí Minh, Phan Xuân Huyền, Cao Đình Hùng, Đinh Văn Khiêm, Nguyễn Thị Thanh Hằng, 2014. Nghiên cứu ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng thực vật lên sự phát sinh hình thái của một số giống cây sâm Bố Chính (*Hibiscus sagittifolius* Kurz) trong điều kiện *in vitro*. Tạp chí Sinh học, 36(1se): 266-271. DOI: 10.15625/0866-7160/v36n1se.4406.
- Hori H., 1966. Gravel culture of vegetable and ornamental crops. Agric. Hort., pp. 210.
- Ngô Thị Ngọc Hương, Đinh Văn Khiêm, Nguyễn Thị Quỳnh, 2015. Ảnh hưởng của thành phần khoáng lên sự sinh trưởng của cây sâm Việt Nam (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.) nuôi cấy *in vitro* trong điều kiện quang tự dưỡng. Tạp chí Sinh học, 37(1): 96-102. DOI: 10.15625/0866-7160/v37n1.6202.
- Iarema L., Cláudia Ferreira da Cruz A., Saldanha C. W., Dias L. L., Vieira R. F., Oliveira E. J., Otoni W. C., 2012. Photoautotrophic propagation of Brazilian ginseng [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen], Plant Cell Tiss. Org. Cult., 110(2): 227-238.
- Jackson M. B., Abbott A. J., Belcher A. R., Hall K. C., 1987. Gas exchange in plant tissue cultures. In: Jackson M.B., Mantell S.H., Blake J. (eds) Advances in the Chemical Manipulation of Plant Tissue Cultures. Monograph 16, British Plant Growth Regulator Group, Bristol pp. 57-71.
- Julkiflee A. L., Uddain J., Subramaniam S., 2014. Efficient micropropagation of *Dendrobium* Sonia-28 for rapid PLBs



- proliferation. Emir. J. Food Agric., 26(6): 545-551.
- Kozai T., Fujiwara K., Watanabe I., 1986. Effects of stoppers and vessels on gas exchange rates between-inside and outside of vessels closed with stoppers. J. Agr. Meteorol., 42(2): 119-127.
- Đỗ Tất Lợi, 2004. Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam. Nxb. Y học, Hà Nội, trang 813-815.
- Lê Trọng Lư, Nguyễn Thụy Phương Duyên, Hoàng Ngọc Nhung, Phạm Minh Duy, Nguyễn Thị Quỳnh, 2015. Ảnh hưởng của hàm lượng  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  và  $\text{KNO}_3$  lên sự tăng trưởng của cây oải hương dưới điều kiện nuôi cấy quang tự dưỡng. Tạp chí Công nghệ Sinh học, 13(4A): 1313-1319.
- Morel G., Wetmore R., 1951. Tissue culture of monocotyledons. Am. J. Bot., 38(2): 138-140.
- Murashige T., Skoog E., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissues. Plant Physiol., 15(3): 473-497.
- Nguyen T. Q., Kozai T., 2001. Photoautotrophic micropropagation of tropical and subtropical woody plants, In: Morohoshi N., Komamine A. (eds.) Molecular Breeding of Woody Plants, Elsevier Science B.V., Amsterdam, The Netherlands pp. 335-334.
- Nguyen T. Q., Kozai T., 2005. Photoautotrophic micropropagation of woody species. In: Kozai T., Afreen F., Zobayed S.M.A. (eds.) Photoautotrophic (sugar-free medium) micropropagation as new micropropagation and transplant production system, Springer, Dordrecht, The Netherlands pp. 123-146.
- Nguyen T. Q., Xiao Y., Kozai T., 2016. Photoautotrophic micropropagation. In: Kozai T., Niu G., Takagaki M. (eds.) Plant Factory-An indoor vertical farming system for efficient quality food production. Academic Press, California, USA pp. 271-283.
- Oh W., Kim J., Kim Y.H., Lee I.J., Kim K.S., 2015. Shoot elongation and gibberellin contents in *Cyclamen persicum* are influenced by temperature and light intensity. Hortic. Environ. Biotechnol., 56(6): 762-768.
- Rothstein D. E., Cregg B. M., 2005. Effects of nitrogen form on nutrient uptake and physiology of Fraser fir (*Abies fraseri*). For. Ecol. Manag., 219(1): 69-80.
- Schenk R. V., Hildebrandt A. C., 1972. Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous plant cell cultures. Can. J. Bot., 50(1): 199-204.
- Villamor C. C., 2010. Influence of media strength and sources of nitrogen on micropropagation of ginger, *Zingiber officinale* Rosc. E-Int. Sci. Res. J., 2(2): 150-155.

**EFFECTS OF SUCROSE CONCENTRATION, VITAMINS,  
LIGHT INTENSITY AND MINERAL COMPONENTS ON GROWTH  
OF *Hibiscus sagittifolius* Kurz CULTURED *IN VITRO***

**Nguyen Le Thu Minh<sup>1</sup>, Nguyen Thuy Phuong Duyen<sup>1</sup>,  
Le Thi Tuyet Anh<sup>2</sup>, Nguyen Thi Quynh<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Institute of Tropical Biology, VAST

<sup>2</sup>Center for Research and Manufacturing of  
Pharmaceutical Material in Central Vietnam, Tuy Hoa, Phu Yen Province

**SUMMARY**

*Hibiscus sagittifolius* Kurz is one herb plant with tuber roots used in traditional medicine thanks to numerous pharmaceutical properties, such as brain stimulus, vitality strengthening, anti-neurasthenia, etc. Seed germination rate of *H. sagittifolius* is very low in nature; therefore, aiming to create the large number of uniform, high quality plants, factors affecting the propagation process including effects of sugar concentration, vitamins, light intensity and culture mineral components were investigated. After 42 days of culture, *in vitro* leafy nodal cuttings of *H. sagittifolius* cultured photoautotrophically in polypropylene bags under high light intensity,  $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , photoperiod of  $12 \text{ h d}^{-1}$ , room temperature at  $25^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$  and relative humidity (RH) of  $55\% \pm 5\%$ , showed a better growth than that cultured photomixotrophically or photoautotrophically under low light intensity,  $75 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . On 6 different culture media (MS, 1/2 MS, 1/2 NH<sub>4</sub>, SH, B5, EN), *in vitro* leafy nodal cuttings of *H. sagittifolius* cultured photoautotrophically on SH medium had the greatest increased fresh weight (384.9 mg/plant), and their root growth conformed to their shoot growth better than those in other treatments on day 42. This study proved that *H. sagittifolius* plants had the best growth when cultured *in vitro* in polypropylene bags having two paper membranes, on SH mineral medium without sucrose and vitamins, under light intensity of  $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , photoperiod of  $12 \text{ h d}^{-1}$ , room temperature at  $25^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$  and RH of  $55\% \pm 5\%$ .

*Keywords:* *Hibiscus sagittifolius*, light intensity, mineral components, photoautotrophic, photomixotrophic.

*Citation:* Nguyen Le Thu Minh, Nguyen Thuy Phuong Duyen, Le Thi Tuyet Anh, Nguyen Thi Quynh, 2017. Effects of sucrose concentration, vitamins, light intensity and mineral components on growth of *Hibiscus sagittifolius* Kurz cultured *in vitro*. Tap chi Sinh hoc, 39(1): 86-95. DOI: 10.15625/0866-7160/v39n1.8468.

\*Corresponding author: qtnnguyen\_vn@yahoo.com.

Received 6 July 2016, accepted 20 March 2017