

APPLICATION OF IN VITRO CULTURE TECHNOLOGY IN THE CONSERVATION OF HIBISCUS SABDARIFFA LINN GENE RESOURCE

Bui Thi Ha*, Nguyen Thu Giang

TNU - University of Medicine and Pharmacy

ARTICLE INFO	ABSTRACT
Received: 10/12/2022	<i>Hibiscus sabdariffa</i> Linn is an extremely valuable medicinal plant. Hibiscus is known for its antibacterial, antifungal and antibacterial actions. Other effectiveness of Hibiscus includes enhancing the digestive, limiting the formation of stones in the urinary tract, supporting liver and bile function, reducing cholesterol and triglycerides in the blood, and limiting the formation of kidney stones, obesity due to the accumulation of fat in the blood, protect the vessel wall, antispasmodic, lower blood pressure. Flavonoid and Cyanidin in the calyx of Hibiscus can protect the walls of blood vessels and have antioxidant properties that help prevent cardiovascular disease and cancer. Currently, <i>Hibiscus sabdariffa</i> is rare in nature, therefore preservation and breeding of <i>Hibiscus</i> are necessary. In this paper, we use in vitro culture techniques to preserve the genetic resource of <i>Hibiscus sabdariffa</i> . The results showed that when using the basic MS environment combine with growth stimulants: BAP 1,5 mg/l, NAA 0,3 mg/l, IBA 1,5 mg/l and 2,4-D 2,5 mg/l, that creates the best growth of <i>Hibiscus sabdariffa</i> plants. Using the tissue culture technique, <i>Hibiscus</i> plant has been rapidly multiplied and successfully preserved.
Revised: 28/4/2023	
Published: 28/4/2023	
KEYWORDS	
Hibiscus sabdaiffa Linn	
Growth	
Tissue culture	
Conserve	
Environment	

ỨNG DỤNG KỸ THUẬT NUÔI CẤY *IN VITRO* TRONG VIỆC BẢO TỒN NGUỒN GEN CÂY BỤP GIẤM (*Hibiscus Sabdariffa* Linn)

Bùi Thị Hà*, Nguyễn Thu Giang

Trường Đại học Y Dược - ĐH Thái Nguyên

THÔNG TIN BÀI BÁO	TÓM TẮT
Ngày nhận bài: 10/12/2022	<i>Búp giấm</i> (<i>Hibiscus sabdariffa</i> Linn) là một loại cây dược liệu vô cùng quý giá. Búp giấm có tác dụng chống viêm nhiễm, kháng nấm, kháng khuẩn, tăng cường chức năng tiêu hoá, hạn chế sự tạo sỏi ở đường tiết niệu, nâng đỡ chức năng gan, mật, giảm cholesterol và triglyceril trong máu, hạn chế sự béo phì do tích mỡ trong máu, bảo vệ thành mạch, chống co thắt, hạ huyết áp. Chất flavonoid và cyanidin có trong đài quả Búp giấm không những bảo vệ thành mạch máu mà còn có tính chống sự oxy hoá của cơ thể, giúp ngăn ngừa bệnh tim mạch và ung thư. Hiện nay, cây Búp giấm trong tự nhiên ngày càng bị cạn kiệt, vì vậy việc bảo tồn và nhân giống là rất cấp bách. Trong bài báo này, chúng tôi sử dụng kỹ thuật nuôi cấy <i>in vitro</i> để bảo tồn nguồn gen cây Búp giấm. Kết quả cho thấy, khi sử dụng môi trường MS cơ bản kết hợp với các chất kích thích sinh trưởng: BAP nồng độ 1,5 mg/l, NAA nồng độ 0,3 mg/l, IBA 1,5 mg/l và 2,4D nồng độ 2,5 mg/l cho khả năng phát triển tốt nhất của cây Búp giấm. Bằng kỹ thuật nuôi cấy mô tế bào đã nhân nhanh và bảo tồn thành công giống cây Búp giấm.
Ngày hoàn thiện: 28/4/2023	
Ngày đăng: 28/4/2023	
TỪ KHÓA	
Búp giấm	
Sinh trưởng	
Nuôi cấy mô	
Bảo tồn	
Môi trường	

DOI: <https://doi.org/10.34238/tnu-jst.7081>

* Corresponding author. Email: Buihayk@gmail.com

1. Mở đầu

Ở Việt Nam, những năm gần đây, kỹ thuật nuôi cấy mô tế bào thực vật được nghiên cứu, phát triển mạnh mẽ. Nhân giống *in vitro* hay vi nhân giống là một trong các lĩnh vực chính của công nghệ tế bào thực vật. Phương pháp nhân giống *in vitro* đã khắc phục những hạn chế của phương pháp nhân giống thủ công như: giâm cành, giâm chồi, chiết, ghép... Chính vì vậy, phương pháp nhân giống *in vitro* được ứng dụng để duy trì và nhân nhanh các kiểu gen quý hiếm, các cá thể đầu dòng tốt [1], [2].

Ngày nay, xu hướng sử dụng cây thuốc chữa bệnh theo y học được người Việt Nam sử dụng rộng rãi, an toàn cho sức khỏe và cuộc sống của con người, thân thiện với môi trường. Từ nhiều năm nay, trong cơ chế thị trường, nhiều cây thuốc quý đã bị khai thác, buôn bán bất hợp lý mà không có biện pháp bảo vệ và nuôi trồng hợp lý làm ảnh hưởng nghiêm trọng đến những gen quý [3]. *Hibiscus sabdaiiffa* Linn thuộc họ Bông (Malvaceae). *Hibiscus sabdaiiffa* L. có tên tiếng Việt là cây Bụp giấm, cây Giấm, Đay Nhật, cây Me chua... Cây Bụp giấm có nguồn gốc từ Tây Phi, phân bố ở Đông Nam Á và Trung Mỹ [4]. Trên khắp thế giới, Bụp giấm được coi như một loại cây dược liệu vô cùng quý giá do có chứa nhiều hợp chất có khả năng chữa bệnh [5]. Trà hoa uống giúp tiêu hóa, chữa các bệnh gan, mật, cao huyết áp, thần kinh, chống oxy hóa [6]. Ngoài ra, cây Bụp giấm còn được dùng chung với một số cây khác để điều trị bệnh sốt rét [7], [8]. Tuy nhiên, Bụp giấm qua nhiều năm trồng ngoài tự nhiên sức sống giảm, sản lượng và năng suất thấp, đặc biệt là chất lượng hạt giống, biện pháp canh tác không hợp lý làm ảnh hưởng đến hệ gen quý của cây Bụp giấm. Vì vậy, việc bảo tồn nguồn gen cây Bụp giấm thông qua phương pháp nuôi cấy mô tế bào là cấp bách hiện nay.

2. Vật liệu và phương pháp

Vật liệu nghiên cứu: Hạt Bụp giấm được thu thập từ quả Bụp giấm tại xã Hiền Hào, huyện Cát Hải, tỉnh Hải Phòng. Dựa vào đặc điểm hình thái của hạt, chọn các hạt sạch, không bị mốc, nảy mầm tốt, được bảo quản tốt.

Phương pháp nghiên cứu

- Quy trình khử trùng hạt: Khử trùng hạt trong cồn 70% trong khoảng 30 giây. Rửa lại bằng nước cất 2-3 lần. Sau đó sử dụng thủy ngân clorua ($HgCl_2$) 0,1% khử trùng trong thời gian 10 phút.

- Nghiên cứu môi trường nuôi cấy: Để tìm ra môi trường nuôi cấy tối ưu cho nhân nhanh và tạo rễ cho cây Bụp giấm, chúng tôi đã bố trí thí nghiệm thăm dò các môi trường nuôi cấy. Thăm dò môi trường nhân chồi, môi trường tạo rễ, môi trường tạo mô sẹo đều dựa trên môi trường MS cơ bản.

(1) Môi trường nhân chồi: Thăm dò ảnh hưởng của nồng độ BAP và kinetin đến khả năng nhân chồi của các đoạn thân Bụp giấm thu được từ môi trường nuôi cấy. Các mẫu cây Bụp giấm được cắt thành khúc 1 cm mang mắt chồi bên, sau đó cấy lên môi trường MS cơ bản có bổ sung BAP nồng độ từ 1,0 - 3,0 mg/l. Theo dõi kết quả sau 7, 14 và 21 ngày nuôi cấy. Theo dõi tỷ lệ số lá/cây, số chồi/cây, chiều cao thân chính.

(2) Môi trường tạo rễ: Những chồi nhân có kích thước 1,0 – 1,5 cm được cấy chuyển sang môi trường tạo rễ, sử dụng nền môi trường MS cơ bản + 9,0g aga + 30g saccharose bổ sung α -NAA, nồng độ từ 0,1 mg/l; 0,3 mg/l; 0,5 mg/l.

(3) Môi trường tạo mô sẹo: Các lá Bụp giấm được cắt tạo vết thương qua các gân chính và đặt trên môi trường MS có bổ sung 2,4-D có nồng độ 0,5 mg/l; 1,0 mg/l; 1,5 mg/l; 2,0 mg/l; 2,5 mg/l. Các mẫu nuôi cấy được đặt trong tối ở điều kiện nhiệt độ $25^{\circ}C \pm 2^{\circ}C$.

- Phương pháp xử lý và tính toán số liệu: Các số liệu về tỷ lệ khử trùng hạt Bụp giấm, số chồi/cây, chiều cao thân chính, số rễ/cây, số lá/cây... được tính toán và xử lý trên phần mềm Excel.

3. Kết quả nghiên cứu

3.1. Nghiên cứu khử trùng hạt

Các nghiên cứu khử trùng hạt đưa từ môi trường vào ống nghiệm, với mục đích thu được vật liệu sạch phục vụ cho các giai đoạn nghiên cứu tiếp theo (hình 1). Người ta thường sử dụng hóa chất khử trùng là thủy ngân clorua (HgCl_2) 0,1%. Trong thí nghiệm này, chúng tôi sử dụng HgCl_2 0,1% với các thời gian khử trùng khác nhau. Đánh giá kết quả nghiên cứu khử trùng hạt sau 10 ngày nuôi cấy. Kết quả thu được ở bảng 1.

Bảng 1. Ảnh hưởng của thời gian khử trùng hạt Búp giấm bằng HgCl_2 0,1%

Lô TN	Số bình	Thời gian khử trùng (phút)	Tỷ lệ bình không nhiễm (%)	Tỷ lệ bình không nhiễm có hạt nảy mầm (%)
Lô 1	20	6	00,00	00,00
Lô 2	20	7	15,00	66,67
Lô 3	20	8	30,00	83,33
Lô 4	20	9	60,00	83,33
Lô 5	20	10	85,00	100,0
Lô 6	20	11	90,00	00,00

Số liệu tại Bảng 1 cho thấy, HgCl_2 nồng độ 0,1% có tác dụng khử trùng khá tốt đối với hạt cây Búp giấm, lượng mẫu sạch tỷ lệ thuận với thời gian khử trùng, thời gian càng dài tỷ lệ khử trùng thành công càng cao. Kết quả nghiên cứu cũng cho thấy, thời gian khử trùng 10 phút cho tỷ lệ mẫu sạch và nảy mầm cao nhất. Như vậy, khử trùng hạt Búp giấm phù hợp theo các bước: xử lý hạt bằng cồn 70° trong 30 giây, rồi rửa sạch bằng nước cất vô trùng 2 - 3 lần, sau đó khử trùng bằng thủy ngân clorua (HgCl_2) nồng độ 0,1% trong 10 phút và rửa sạch bằng nước cất vô trùng 7 - 8 lần trước khi cấy lên môi trường.



Hình 1. Hình ảnh hạt Búp giấm được khử trùng bằng HgCl_2 0,1

3.2. Ảnh hưởng của BAP tới sự sinh trưởng của cây Búp giấm

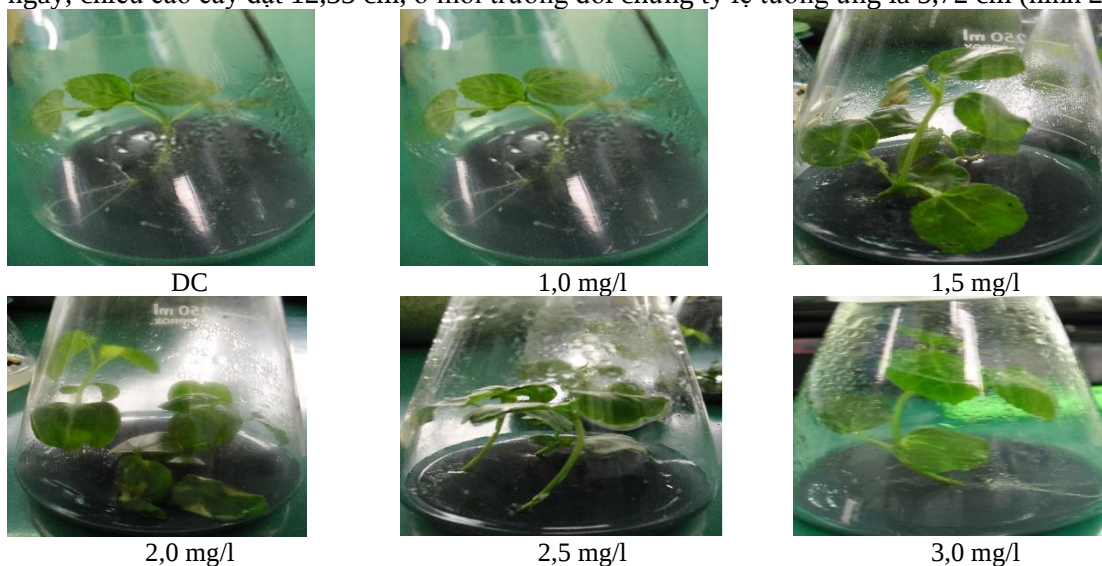
Dựa vào nghiên cứu của một số tác giả trên đối tượng tượng Phong lan, vi nhân giống Vani, Điều cao sản, cây Hà thủ ô, cây Dây chiêu, cây Nhàu..., chúng tôi đã tiến hành nghiên cứu thăm dò để tìm ra môi trường tối ưu cho sự phát sinh chồi của cây Búp giấm. Thí nghiệm sử dụng đoạn thân có kích thước khoảng 1 cm cấy trên môi trường MS cơ bản có bổ sung chất kích thích sinh trưởng BAP với nồng độ khác nhau (từ 1,0-3,0 mg/l). Theo dõi tỷ lệ số lá/cây, số chồi/cây, chiều cao thân chính. Kết quả thu được ở bảng 2.

Bảng 2. Ảnh hưởng của BAP tới khả năng sinh trưởng của cây Búp giấm

Các chỉ tiêu theo dõi	Nồng độ BAP (mg/l)					
	ĐC	1,0	1,5	2,0	2,5	3,0
Sau 7 ngày						
Số lá/cây	1,07 ± 0,31	1,30 ± 0,19	2,08 ± 0,22	1,36 ± 0,18	1,34 ± 0,17	1,27 ± 0,21
Số chồi/cây	1,12 ± 0,26	1,46 ± 0,29	1,59 ± 0,15	1,40 ± 0,14	1,42 ± 0,18	1,37 ± 0,22
Chiều cao thân chính (cm)	2,37 ± 0,19	2,91 ± 0,16	4,10 ± 0,11	2,74 ± 0,12	2,58 ± 0,16	2,79 ± 0,09
Sau 14 ngày						
Số lá/cây	1,16 ± 0,26	1,65 ± 0,24	2,51 ± 0,16	2,43 ± 0,18	2,41 ± 0,24	2,37 ± 0,24
Số chồi/cây	1,19 ± 0,29	1,54 ± 0,28	1,69 ± 0,06	1,54 ± 0,24	1,63 ± 0,38	1,45 ± 0,27
Chiều cao thân chính (cm)	3,27 ± 0,14	5,24 ± 0,22	7,15 ± 0,36	5,78 ± 0,23	5,22 ± 0,37	6,10 ± 0,48

Các chỉ tiêu theo dõi	Nồng độ BAP (mg/l)					
	ĐC	1,0	1,5	2,0	2,5	3,0
Sau 21 ngày						
Số lá/cây	2,45 ± 0,31	3,38 ± 0,18	4,13 ± 0,20	3,58 ± 0,28	3,17 ± 0,12	3,85 ± 0,08
Số chồi/cây	1,49 ± 0,25	1,91 ± 0,35	2,05 ± 0,14	1,74 ± 0,15	1,67 ± 0,22	1,52 ± 0,45
Chiều cao thân chính (cm)	5,72 ± 0,18	8,21 ± 0,19	12,33 ± 0,24	9,84 ± 0,13	8,42 ± 0,28	9,87 ± 0,12

Qua bảng 2 cho thấy, khi bổ sung BAP với nồng độ khác nhau vào môi trường nuôi cấy gây ảnh hưởng đến sự sinh trưởng cây là khác nhau. Ở nồng độ BAP 1,5 mg/l, cây phát triển tốt nhất. Sau 7 ngày đạt 2,08 lá/cây; 1,59 chồi/cây và chiều cao thân chính đạt 4,10 cm trong khi ở môi trường đối chứng các chỉ số tương ứng là 1,07 lá/cây; 1,24 chồi/cây và chiều cao thân là 2,37 cm, các môi trường có nồng độ BAP cao hơn hay thấp hơn mức 1,5 mg/l đều có các chỉ số thấp hơn. Sau 14 ngày, ở nồng độ BAP 1,5 mg/l, số lá trên mỗi cây đã tăng thêm 120%, số chồi tăng 107% và chiều cao tăng 174% so với thời điểm 7 ngày. Trong khi đó, ở môi trường đối chứng, mức tăng của các chỉ tiêu tương ứng là 108%; 106%; 138%. Sau 21 ngày, mức tăng của các chỉ tiêu ở môi trường có nồng độ BAP 1,5 mg/l vẫn ở mức cao nhất so với môi trường đối chứng và các môi trường có nồng độ cao hơn hay thấp hơn mức 1,5 mg/l. Ở nồng độ BAP 1,5 mg/l, sau 21 ngày, chiều cao cây đạt 12,33 cm, ở môi trường đối chứng tỷ lệ tương ứng là 5,72 cm (hình 2).



Hình 2. Hình ảnh cây Bup giấm sinh trưởng trên môi trường có nồng độ BAP khác nhau sau 21 ngày nuôi cấy

3.3. Ảnh hưởng của Kinetin đến sự sinh trưởng của cây Bup giấm

Kinetin là hoocmon sinh trưởng thuộc nhóm cytokinin được tổng hợp nhân tạo. Nó có vai trò tương tự như BAP. Kinetin là sản phẩm đầu tiên được phát hiện có cấu trúc phân tử là 6,2-furfuryl-aminopurin. Kinetin được phân lập từ chế phẩm DNA cũ hoặc axit nucleic mới sau khi hấp ở nhiệt độ cao hay đun sôi [9].

Trong nghiên cứu này, Kinetin được bổ sung vào môi trường nuôi cấy với các thang nồng độ khác nhau từ 1,0-3,0 mg/l và theo dõi sự phát triển của cây Bup giấm sau thời gian 7 ngày, 14 ngày và 21 ngày. Các chỉ tiêu theo dõi bao gồm: số lá/cây, số chồi/cây, chiều cao thân chính. Kết quả thu được ở bảng 3.

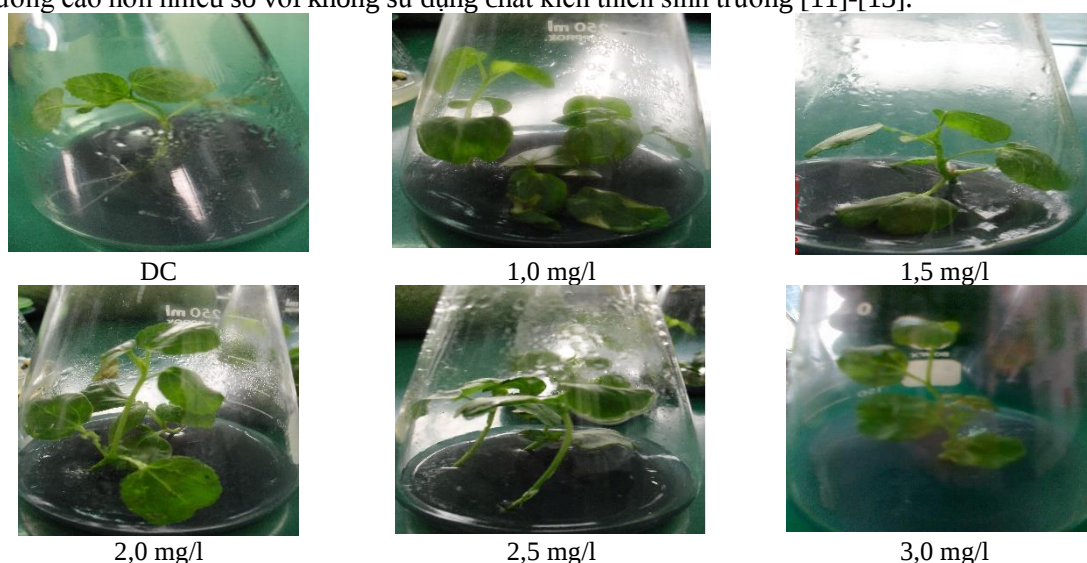
Bảng 3. Ảnh hưởng của Kinetin tới khả năng sinh trưởng của cây Bup giấm

Các chỉ tiêu theo dõi	Nồng độ Kinetin (mg/l)					
	ĐC	1,0	1,5	2,0	2,5	3,0
Sau 7 ngày						
Số lá/cây	1,07 ± 0,31	1,28 ± 0,16	1,87 ± 0,14	1,19 ± 0,17	1,25 ± 0,15	1,17 ± 0,13

Các chỉ tiêu theo dõi	Nồng độ Kinetin (mg/l)					
	ĐC	1,0	1,5	2,0	2,5	3,0
Số chồi/cây	1,12 ± 0,26	1,25 ± 0,10	1,41 ± 0,11	1,37 ± 0,26	1,32 ± 0,25	1,21 ± 0,20
Chiều cao thân chính (cm)	2,37 ± 0,19	4,04 ± 0,11	3,75 ± 0,08	3,61 ± 0,16	3,35 ± 0,15	3,33 ± 0,11
Sau 14 ngày						
Số lá/cây	1,16 ± 0,26	1,36 ± 0,23	1,75 ± 0,13	1,43 ± 0,18	1,34 ± 0,15	1,42 ± 0,09
Số chồi/cây	1,19 ± 0,29	1,29 ± 0,18	1,57 ± 0,11	1,41 ± 0,18	1,38 ± 0,38	1,35 ± 0,27
Chiều cao thân chính (cm)	3,27 ± 0,14	5,43 ± 0,20	5,91 ± 0,27	5,67 ± 0,17	5,57 ± 0,35	5,34 ± 0,33
Sau 21 ngày						
Số lá/cây	2,45 ± 0,31	3,32 ± 0,17	3,14 ± 0,05	3,47 ± 0,25	3,51 ± 0,23	2,58 ± 0,28
Số chồi/cây	1,49 ± 0,25	1,35 ± 0,15	1,63 ± 0,25	1,55 ± 0,44	1,49 ± 0,24	1,43 ± 0,31
Chiều cao thân chính (cm)	5,72 ± 0,18	8,54 ± 0,18	8,65 ± 0,26	8,13 ± 0,28	8,18 ± 0,18	8,21 ± 0,19

Kết quả tại bảng 3 cho thấy, Kinetin có ảnh hưởng khá rõ đến khả năng sinh trưởng của cây Búp giấm. Các mẫu thí nghiệm bổ sung Kinetin đều cho các chỉ tiêu về chiều cao thân chính, số lá/cây, số chồi/cây cao hơn so với đối chứng không bổ sung Kinetin.

So với một số cây thuốc khác đã được nghiên cứu như Thanh hao hoa vàng, khi môi trường được bổ sung riêng rẽ chất kích thích sinh trưởng kinetin hoặc BAP thì tốc độ sinh trưởng của cây giảm dần tỷ lệ thuận với nồng độ chất kích thích sinh trưởng. Khi sử dụng BAP thì tốc độ sinh trưởng của cây Thanh hao hoa vàng giảm nhiều hơn so với sử dụng kinetin, thấp nhất ở môi trường có nồng độ BAP 2,5 mg/l, tốc độ sinh trưởng giảm 43,89% so với đối chứng [10]. So với một số tác giả khác nghiên cứu trên cây dược liệu khi sử dụng chất kích thích sinh trưởng cho tốc độ sinh trưởng cao hơn nhiều so với không sử dụng chất kích thích sinh trưởng [11]-[13].



Hình 3. Hình ảnh cây Búp giấm sinh trưởng trên các môi trường có nồng độ kinetin khác nhau sau 21 ngày nuôi cấy

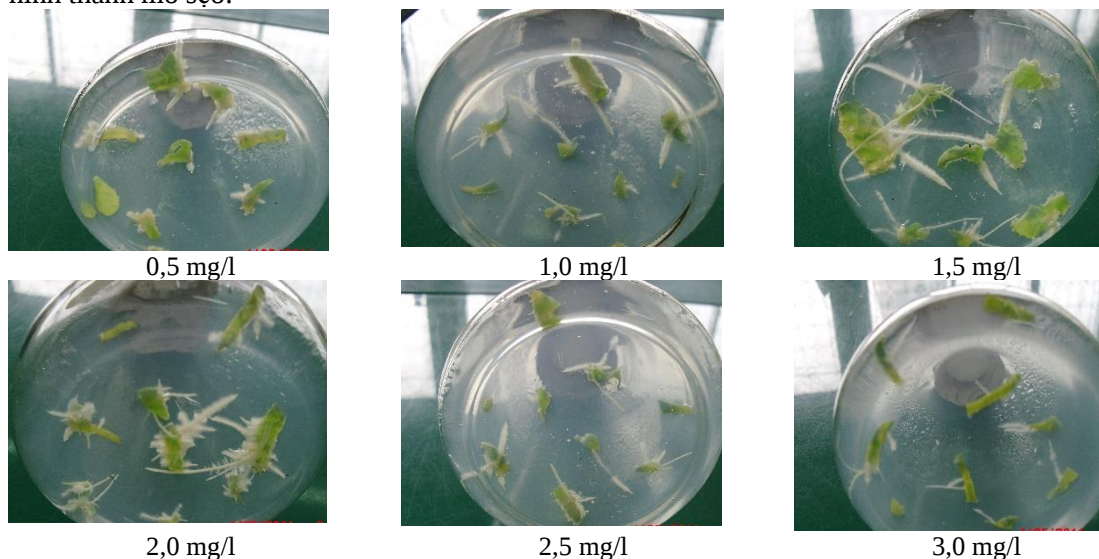
3.4. Ảnh hưởng của nồng độ IBA đến khả năng tạo rễ bất định, tạo mô sẹo từ lá cây Búp giấm

Qua nghiên cứu ảnh hưởng của BAP và kinetin đến sự sinh trưởng của cây cho thấy tỷ lệ nhân chồi thấp. Với mục đích tìm kiếm phương pháp tạo chồi cao hơn, chúng tôi tiến hành nghiên cứu tạo mô sẹo từ lá cây Búp giấm để tái sinh chồi. Thí nghiệm được tiến hành thông qua thăm dò ảnh hưởng của nồng độ IBA đến khả năng tạo mô sẹo và rễ bất định từ lá. IBA là hoocmon sinh trưởng thuộc nhóm auxin, đưa vào môi trường nuôi cấy nhằm thúc đẩy sự giãn nở của tế bào, tăng cường quá trình sinh tổng hợp và trao đổi chất, kích thích sự hình thành rễ và tham gia vào cảm ứng phát sinh chồi vô tính [14].

Bảng 4. Ảnh hưởng của IBA tới khả năng tạo rễ bất định từ lá cây Búp giấm sau 20 ngày nuôi cấy

Nồng độ IBA (mg/l)	Tỷ lệ mảnh cắt lá tạo rễ (%)	Số rễ/mảnh cắt lá	Chiều dài rễ (mm)	Đặc điểm rễ
0,5	40,28 ± 0,15	2,14 ± 0,15	10,15 ± 0,15	Rễ to, ít lông hút, không hình thành mô sẹo
1,0	42,26 ± 0,17	3,22 ± 0,17	14,25 ± 0,14	Rễ nhỏ, ít lông hút, không hình thành mô sẹo
1,5	60,31 ± 0,19	4,34 ± 0,15	30,00 ± 0,11	Rễ to, nhiều lông hút, hình thành mô sẹo
2,0	60,19 ± 0,21	5,09 ± 0,11	26,56 ± 0,25	Rễ to, nhiều lông hút, không hình thành mô sẹo
2,5	39,53 ± 0,14	2,24 ± 0,15	10,68 ± 0,11	Rễ nhỏ, ít lông hút, không hình thành mô sẹo
3,0	38,62 ± 0,18	2,17 ± 0,14	10,27 ± 0,12	Rễ nhỏ, ít lông hút, không hình thành mô sẹo

Sau 10 ngày trên môi trường MS cơ bản có bổ sung nồng độ IBA như trên, các mảnh cắt lá bắt đầu cong lên. Ở tất cả các mẫu cây đều có sự hình thành rễ. Tuy nhiên, sự hình thành rễ bất định từ lá không giống nhau. Cụ thể như sau: ở nồng độ IBA 1,5 mg/l cho rễ to, nhiều lông hút, hình thành mô sẹo.



Hình 4. Hình ảnh tạo rễ bất định từ lá cây Búp giấm khi ở nồng độ IBA khác nhau sau 20 ngày nuôi cấy

So sánh các mẫu cây về số lượng rễ, chiều dài rễ nhận thấy, môi trường thích hợp nhất cho sự tạo rễ bất định từ lá cây Búp giấm là 1,5 mg/l với tỷ lệ mẫu cây tạo rễ đạt 60,31%, số rễ trên mảnh cắt lá là 4,34, chiều dài rễ là 30,00 mm, rễ hình thành có nhiều lông hút, mẫu cây có sự tạo mô sẹo, trong khi ở môi trường đối chứng mẫu cây không có sự tạo rễ.

3.5. Ảnh hưởng của α -NAA tới sự tạo thành rễ của cây Búp giấm

α -NAA là hoocmon sinh trưởng thuộc nhóm auxin, được đưa vào môi trường nuôi cấy nhằm thúc đẩy sự giãn nở của tế bào, tăng cường quá trình sinh tổng hợp và trao đổi chất, kích thích sự hình thành rễ và tham gia vào cảm ứng phát sinh chồi vô tính. Auxin thường được sử dụng với nồng độ từ 0,1-2,5 mg/l. Chúng có hiệu quả sinh lý ở nồng độ thấp [10]. Để nghiên cứu ảnh hưởng của α -NAA đến sự sinh trưởng của cây, chúng tôi đã sử dụng các thang nồng độ từ 0,1-0,5 mg/l để xác định tỷ lệ cây ra rễ, số rễ/cây, chiều dài rễ. Kết quả trình bày ở bảng 5.

Bảng 5. Ảnh hưởng của α -NAA tới khả năng sinh trưởng của cây Búp giấm sau 30 ngày nuôi cấy

Nồng độ α -NAA (mg/l)	Tỷ lệ cây ra rễ (%)	Số rễ/cây	Chiều dài rễ (mm)
0,0	28,65 ± 0,14	2,32 ± 0,15	15,42 ± 0,33

0,1	64,37 ± 0,16	4,18 ± 0,12	26,52 ± 0,19
0,3	72,81 ± 0,10	7,12 ± 0,18	35,28 ± 0,22
0,5	58,26 ± 0,12	4,83 ± 0,11	29,22 ± 0,14

Kết quả tại bảng 5 cho thấy, môi trường thích hợp cho sự phát sinh rễ của cây là môi trường có bổ sung α -NAA 0,3 mg/l cho tỷ lệ cây ra rễ cao nhất đạt 72,81%, cao hơn 254,13% so với đối chứng; số rễ/cây là 4,18, cao hơn 306,89% so với đối chứng sau 30 ngày theo dõi; chiều dài rễ là 35,28 mm, cao hơn 228,79% so với đối chứng. Ở lô đối chứng, tỷ lệ này rất thấp (tỷ lệ mô tạo rễ là 28,65%, số rễ trên cây là 2,32, chiều dài rễ là 15,42 mm). Khi bổ sung α -NAA ở nồng độ 0,5 mg/l, tỷ lệ cây tạo rễ chỉ còn 58,26% và chỉ cao hơn 20,33% so với đối chứng.

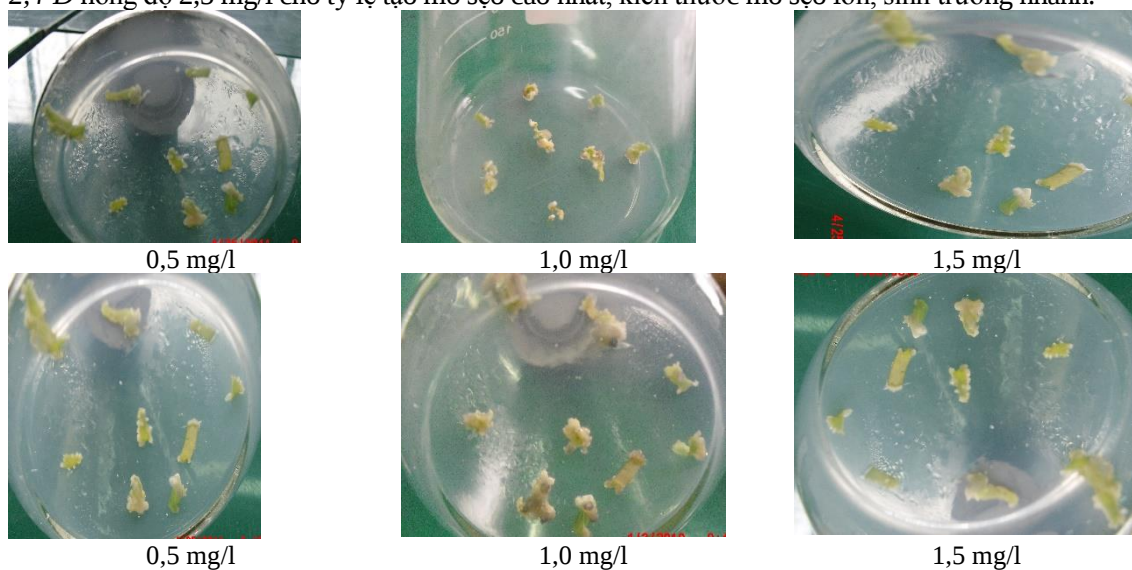
3.6. Ảnh hưởng của nồng độ 2,4-D đến khả năng tạo mô sẹo từ lá cây Búp giấm

Để nghiên cứu ảnh hưởng của 2,4-D đến sự tạo mô sẹo của lá cây Búp giấm, chúng tôi đã sử dụng các thang nồng độ từ 0,5- 3,0 mg/l. Kết quả nghiên cứu sau 3 tuần được trình bày ở bảng 6.

Bảng 6. Ảnh hưởng của nồng độ 2,4-D đến khả năng tạo mô sẹo từ lá cây Búp giấm

Nồng độ 2,4-D (mg/l)	Tỷ lệ mảnh cắt lá tạo mô sẹo (%)	Đặc điểm của mô sẹo
0,5	37,65 ± 0,17	Mô sẹo nhỏ, trắng, mềm, tăng sinh chậm
1,0	41,29 ± 0,21	Mô sẹo nhỏ, bờ, màu trắng vàng, tăng sinh chậm
1,5	38,94 ± 0,16	Mô sẹo nhỏ, bờ, màu trắng xanh, tăng sinh chậm
2,0	39,19 ± 0,18	Mô sẹo nhỏ, mềm, màu trắng vàng, tăng sinh chậm
2,5	61,11 ± 0,19	Mô sẹo lớn, chắc, màu trắng vàng, tăng sinh nhanh
3,0	38,55 ± 0,16	Mô sẹo nhỏ, mềm, màu trắng hơi vàng, tăng sinh chậm

Qua bảng 6 cho thấy, môi trường tối ưu cho sự tạo sẹo từ lá Búp giấm là môi trường có bổ sung 2,4-D 2,5 mg/l. Như vậy, môi trường thích hợp nhất cho sự tạo mô sẹo từ mảnh cắt lá Búp giấm là 2,4-D nồng độ 2,5 mg/l cho tỷ lệ tạo mô sẹo cao nhất, kích thước mô sẹo lớn, sinh trưởng nhanh.



Hình 5. Hình ảnh tạo mô sẹo từ lá cây Búp giấm khi sử dụng nồng độ 2,4-D khác nhau sau 3 tuần nuôi cấy

4. Kết luận

Trong nuôi cấy cây Búp giấm:

1. Khi khử trùng hạt Búp giấm sử dụng hóa chất khử trùng là thủy ngân clorua ($HgCl_2$) 0,1% trong thời gian 10 phút cho tỷ lệ này cao.

2. Môi trường thích hợp cho sự phát sinh chồi cây Búp giấm là môi trường MS cơ bản bổ sung BAP nồng độ 1,5 mg/l sau 21 ngày chiều cao cây đạt cao nhất là 12,33 cm.

3. Môi trường thích hợp cho sự tạo rễ và tạo mô sẹo từ lá cây Búp giấm là môi trường MS cơ bản bổ sung IBA 1,5 mg/l cho tỷ lệ rễ đạt cao nhất, rễ hình thành có nhiều lông hút, mẫu cây có sự tạo mô sẹo.

4. Môi trường thích hợp cho sự tạo rễ của cây Búp giấm là môi trường MS cơ bản bổ sung NAA 0,3 mg/l cho tỷ lệ cây ra rễ cao nhất đạt 72,81%.

5. Môi trường thích hợp cho sự tạo mô sẹo từ lá cây Búp giấm: MS cơ bản bổ sung 2,4-D nồng độ 2,5 mg/l.

TÀI LIỆU THAM KHẢO/ REFERENCES

- [1] T. B. Le, H. N. Ho, and T. M. Le, *Biotechnology in crop improvement*. Agricultural Publishing House, Ha Noi, 1997.
- [2] H. H. Pham, *Medicinal plants in Viet Nam*. Tre Publishing House, Ha Noi, 2006.
- [3] H. B. Do, Q. T. Dang, X. C. Bui, T. D. Nguyen, T. D. Do, V. H. Pham, N. L. Vu, D. M. Pham, K.M. Pham, T. N. Doan, T. Nguyen, and T. Tran, *Medicinal plants and medicinal animals in Viet Nam*. Science and technics Publishing House, Ha Noi, 2004.
- [4] Q. Fitrotunnisa, A. Arsianti, N. A. Tejaputri, and F. Qorina, "Antioxidative activity and phytochemistry profile of Hibiscus sabdariffa herb extracts," *International Journal of Applied Pharmaceutics*, vol. 11, Special Issue 6, pp. 29-32, 2019, doi: [10.22159/ijap.2019.v11s6.33532](https://doi.org/10.22159/ijap.2019.v11s6.33532).
- [5] S. M. Hoseini, S. H. Hoseinifar, and H. V. Doan, "Growth performance and hematological and antioxidant characteristics of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, fed diets supplemented with Roselle," *Hibiscus sabdariffa. Aquaculture*, vol. 530, pp. 735-827, 2021, doi: [10.1016/j.aquaculture.2020.735827](https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735827).
- [6] M. M. Cabrera, J. H. Morales, G. L. Rúelas, Y. S. Moreno, L. S. Rojas, and J. C. Rosas, "Influence of variety and extraction solvent on antibacterial activity of Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) calyces," *J Med Plants Res.*, vol. 7, pp. 2319-2322, 2013.
- [7] H. Khalid, W. E. Abdalla, H. Abdelgadir, T. Opatz, and T. Efferth, "Gems from traditional North-African medicine: Medicinal and aromatic plants from Sudan," *Nat Prod Bioprospect*, vol. 2, pp. 92-103, 2012.
- [8] H. H. El-Kamali and M. F. Mohammed, "Antibacterial activity of Hibiscus sabdariffa, Acacia seyal var. seyal and Sphaeranthus suaveolens var. suaveolens against upper respiratory tract pathogens," *Sudan J Med Sci.*, vol. 1, pp. 121-127, 2006.
- [9] N. V. Do, *Plants biotechnology*. Agricultural publishing House, Ha Noi, 2002.
- [10] P. L. Hoang, "Application in vitro techniques in propagation of Thanh Hao yellow flower (*Artemisia annua* L.)," Graduation thesis, Education University, Thai Nguyen University, 2007.
- [11] T. H. Bui, PhD thesis in Biology, Education University, Thai Nguyen University, 2018.
- [12] T. N. T. Vu, PhD thesis in Biology, Education University, Thai Nguyen University, 2019.
- [13] T. T. Nguyen and T. T. T. Vu, *Plant cell technology and its applications*. Thai Nguyen University Publishing House, 2016, pp. 51-62.
- [14] T. L. A. Nguyen and Q. T. Nguyen, *Research on creating virus -free plant by culturing meristem some sweet potato varieties grown in northern Viet Nam*, Science report, Scientific and technics Publishing House, Ha Noi, 2003.