

Ảnh hưởng của oligochitosan, oligoalginat và nuôi cấy vi thủy canh đến sự sinh trưởng *in vitro* và quá trình thích nghi khí hậu của sâm bố chính (*Hibiscus sagittifolius* Kurz)

Võ Thanh Phúc^{1,2,*}, Ngô An Mai Phương^{1,2}

¹Bộ môn Công nghệ Sinh học, Khoa Kỹ thuật Hóa học, Trường Đại học Bách Khoa Tp. Hồ Chí Minh, Việt Nam

²Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam

Liên hệ

Võ Thanh Phúc, Bộ môn Công nghệ Sinh học, Khoa Kỹ thuật Hóa học, Trường Đại học Bách Khoa Tp. Hồ Chí Minh, Việt Nam

Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam

Email: vothanhphuc@hcmut.edu.vn

Lịch sử

- Ngày nhận: 26-10-2023
- Ngày chấp nhận: 03-7-2024
- Ngày đăng: 30-9-2024

DOI:

<https://doi.org/10.32508/stdjet.v7i2.1296>



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.



TÓM TẮT

Sâm bố chính (*Hibiscus sagittifolius* Kurz) là loài cây dược liệu quý được sử dụng trong các bài thuốc đông y cổ truyền. Tuy nhiên, trong tự nhiên, cây bị khai thác nhiều, tỉ lệ nảy mầm của hạt khá thấp dẫn đến sự suy giảm đáng kể số lượng loài cây này. Vì vậy, việc nhân giống bảo tồn sâm bố chính là rất cần thiết. Nghiên cứu tiến hành khảo sát ảnh hưởng của một số yếu tố lên quá trình sinh trưởng của chồi sâm bố chính *in vitro* (oligochitosan, oligoalginat và tiền xử lý auxin khi nuôi cấy vi thủy canh). Kết quả nghiên cứu cho thấy môi trường nuôi cấy Murashige và Skoog bổ sung oligochitosan 10 mg/L là phù hợp với sự sinh trưởng của chồi sâm bố chính. Bên cạnh đó, trên các môi trường bổ sung oligoalginat, cây có bộ rễ khỏe và lá to hơn so với mẫu đối chứng. Trong điều kiện vi thủy canh, các chồi được nuôi cấy trong môi trường lỏng không bổ sung sucrose và vitamin. Tiền xử lý với IBA hoặc NAA ở nồng độ 10 mg/L khi nuôi cấy vi thủy canh đều giúp chồi ra rễ tốt, cây cao, lá to, rễ dài hơn so với các nghiệm thức còn lại. Bổ sung oligochitosan hay nuôi cấy vi thủy canh đều có tác dụng làm tăng sức sống của cây con khi được chuyển ra vườn ươm. Cây con từ hệ thống vi thủy canh (tiền xử lý với NAA 10 mg/L) có tỉ lệ sống cao (100%), số rễ là 23, chiều dài rễ 5,27 cm sau 3 tuần trồng ở vườn ươm.

Từ khoá: *Hibiscus sagittifolius* Kurz, oligoalginat, oligochitosan, thích nghi khí hậu, vi thủy canh

MỞ ĐẦU

Sâm bố chính còn gọi là sâm thổ hào, sâm báo, nhân sâm Phú Yên. Cây mọc tự nhiên và được tìm thấy nhiều nơi ở Việt Nam. Rễ cây là một vị thuốc quý được sử dụng trong y học cổ truyền. Sâm bố chính có tác dụng thông tiểu tiện, điều kinh, chữa sốt, bệnh phổi và bạch đới¹. Cây còn có tác dụng kích thích não bộ, tăng cường sinh lực, chống suy nhược thần kinh². Về mặt hoá học, rễ sâm có chứa saponin, triterpenoid, coumarin, chất nhầy, acid béo, polyphenol, protein, tinh bột và các nguyên tố khoáng thiết yếu Na, Ca, Mg, ...³. Hiện nay, cây đang được trồng thử nghiệm ở nhiều địa phương trong nước. Vì vậy, việc nghiên cứu hoàn thiện qui trình vi nhân giống loài cây này là cấp thiết, nhằm tạo ra cây giống có chất lượng tốt cung cấp cho thị trường. Các nghiên cứu vi nhân giống sâm bố chính chủ yếu tập trung khảo sát chế độ khử trùng mẫu, ảnh hưởng các chất điều hòa sinh trưởng thực vật ở giai đoạn nhân chồi và ra rễ của cây⁴⁻⁶. Chỉ có một số ít nghiên cứu đánh giá khả năng sống sót của cây con ngoài vườn ươm^{7,8}. Để nâng cao chất lượng cây con nuôi cấy mô, các nhà khoa học đã tiến hành thêm nhiều chất bổ sung vào môi trường nuôi cấy, đồng thời thử nghiệm các phương pháp nuôi cấy

mới.

Bổ sung chitosan và oligochitosan đã được nhận thấy có những tác động tích cực đến kết quả của kỹ thuật vi nhân giống. Chitosan thúc đẩy sự phát triển của cây bằng cách tác động đến các quá trình sinh lý như hấp thu chất dinh dưỡng, phân chia và kéo dài tế bào, tăng hoạt tính enzyme, tổng hợp protein, cuối cùng dẫn đến tăng năng suất⁹. Chitosan giúp tăng sinh PLBs, tái sinh chồi và tăng cường khả năng sống sót của cây lan *Dendrobium* ngoài vườn ươm¹⁰. Theo Acemi (2020), chitosan polymer và oligochitosan giúp kích thích sự hình thành protocorm, tăng chiều dài chồi, kích thích sự hình thành rễ bất định ở cây *Serapias vomeracea* (Burm.f.) Briq¹¹. Tương tự như chitosan, oligoalginat cũng có khả năng kích thích sự tăng trưởng ở thực vật bằng cách tăng cường quang hợp, tăng hàm lượng auxin và gibberellin, đồng hóa carbon và nitrogen¹². Khi vi nhân giống các cây hoa salem (*Limonium latifolium*), hoa cát tường (*Eustoma grandiflorum*) và cúc mâm xôi (*Chrysanthemum morifolium*), alginat đã làm tăng hệ số nhân chồi, chiều cao chồi, chiều dài rễ và khối lượng tươi, giúp cây tăng trưởng tốt hơn khi được chuyển ra trồng ngoài vườn ươm¹³. Số chồi, khối lượng tươi và khối lượng khô của cây *Pueraria tuberosa* cũng tăng lên

Trích dẫn bài báo này: Phúc V T, Phương N A M. Ảnh hưởng của oligochitosan, oligoalginat và nuôi cấy vi thủy canh đến sự sinh trưởng *in vitro* và quá trình thích nghi khí hậu của sâm bố chính (*Hibiscus sagittifolius* Kurz) . *Sci. Tech. Dev. J. - Eng. Tech.* 2024; 7(2):2220-2229.

đáng kể khi alginate được bổ sung vào môi trường nuôi cấy¹⁴.

Bên cạnh các hợp chất bổ sung vào môi trường nuôi cấy, các phương pháp nuôi cấy nhằm nâng cao khả năng thích nghi của cây con cũng được quan tâm nghiên cứu. Trong số đó, vi thủy canh (microponic) là một phương pháp khá hiệu quả vì kết hợp được các ưu điểm của vi nhân giống (micropropagation) và thủy canh (hydroponic). Do đó, phương pháp này có thể khắc phục nhiều nhược điểm của vi nhân giống truyền thống. Nuôi cấy vi thủy canh đã được áp dụng trong nhân giống các loại cây như cúc trắng¹⁵, cúc vàng¹⁶, chuối tiêu hồng¹⁷ và cho hiệu quả cao. Phương pháp được tiến hành ở giai đoạn ra rễ của cây, không bổ sung đường và agar, không hấp khử trùng môi trường, nuôi cấy trong điều kiện thoáng khí. Vì vậy, cây con tăng trưởng bình thường và thích nghi tốt khi được chuyển ra điều kiện vườn ươm¹⁸.

Nghiên cứu này được thực hiện nhằm khảo sát ảnh hưởng của oligochitosan, oligoalginate và điều kiện nuôi cấy vi thủy canh đến sự sinh trưởng của chồi sâm bố chính *in vitro* và quá trình thích nghi của cây con ngoài vườn ươm, nhằm góp phần nâng cao chất lượng cây con, hoàn thiện qui trình vi nhân giống.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu

Hạt giống sâm bố chính được cung cấp bởi Công ty Sâm bố chính Tiến Phát (Bù Đăng, Bình Phước). Hạt được khử trùng với Javel 15% (v/v) trong thời gian 15 phút và gieo trên môi trường Murashige Skoog, 1962 (MS)¹⁹ bổ sung sucrose 30 g/L, agar 7 g/L, pH 5.8 để tạo cây mầm *in vitro*. Các phân đoạn oligochitosan (độ deacetyl hoá 80%) và oligoalginate được cắt bởi bức xạ gamma, cung cấp bởi phòng thí nghiệm Công nghệ Sinh học Vật liệu và Nano (Trung tâm Công nghệ sinh học Thành phố Hồ Chí Minh). Các phân đoạn được sử dụng lần lượt là oligochitosan (I) (30143 Da), oligochitosan (II) (11126 Da), oligoalginate (I) (20471 Da), oligoalginate (II) (10913 Da).

Quá trình nuôi cấy được thực hiện ở nhiệt độ $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$, cường độ ánh sáng 2500 lux, sử dụng ánh sáng trắng từ đèn LED nuôi cấy mô của Công ty cổ phần bóng đèn phích nước Rạng Đông, thời gian chiếu sáng là 12 giờ/ngày.

Phương pháp

Khảo sát ảnh hưởng của oligochitosan và oligoalginate lên sự sinh trưởng của chồi ngủ sâm bố chính

Cây sâm bố chính *in vitro* được cắt thành các đoạn thân dài khoảng 2 cm có mang chồi bên. Mẫu được

cấy vào môi trường MS bổ sung sucrose 30 g/L, agar 7 g/L; oligochitosan (I) hoặc oligochitosan (II) 5, 10, 15 mg/L; oligoalginate (I) hoặc oligoalginate (II) 0,001; 0,01; 0,05 mg/L, pH 5.8. Các mẫu đối chứng được nuôi cấy trên môi trường MS. Chiều cao cây, số rễ, chiều dài rễ, khối lượng tươi, khối lượng khô được ghi nhận sau 3 tuần nuôi cấy.

Khảo sát ảnh hưởng của tiền xử lý auxin lên khả năng ra rễ của sâm bố chính trong điều kiện vi thủy canh

Mẫu cấy trong thí nghiệm này là các chồi có chiều cao 4 cm được cắt bỏ phần lá dưới gốc (còn 2 cặp lá). Môi trường nuôi cấy là môi trường MS lỏng không bổ sung vitamin, sucrose, agar, không hấp khử trùng, pH 5.8. Các mẫu chồi được ngâm với dung dịch naphthalene acetic acid (NAA) hoặc indole-3-butyric acid (IBA) ở các nồng độ 1; 5; 10; 50; 100 mg/L trong vòng 20 phút, sau đó rửa lại với nước cất trước khi cấy. Các mẫu đối chứng được ngâm với nước cất. Hệ thống vi thủy canh sử dụng các chai thủy tinh cấy mô có thể tích 380 mL, cao 10 cm, đường kính đáy 5,5 cm. Giá thể là các đoạn ống hút nhựa có đường kính 1 cm, dài 2 cm, xếp đầy phần đáy chai. Mẫu được cắm vào các ống hút nhựa này. Chai được đậy kín bằng các tấm nylon chịu nhiệt. Thể tích môi trường trong chai là 25 ml. Sau một tuần nuôi cấy, tiến hành đục 1 lỗ thoáng khí (0,5 cm) trên nắp nylon. Sau 2 tuần nuôi cấy, đục thêm 1 lỗ trên nắp nuôi cấy. Chiều cao cây, số rễ, chiều dài rễ, khối lượng tươi, khối lượng khô được ghi nhận sau 3 tuần nuôi cấy.

Khảo sát sự thích nghi của cây con ngoài vườn ươm

Các mẫu cấy từ các nghiệm thức có kết quả tốt của hai thí nghiệm trên (chiều cao trung bình 8,5 cm) được mang ra vườn ươm để trồng. Mẫu đối chứng là các cây được ra rễ trên môi trường MS bổ sung sucrose 30 g/L, agar 7 g/L, pH 5.8. Rễ cây con được rửa sạch agar, sau đó được ngâm trong dung dịch chế phẩm diệt nấm COC85 trong 5 phút, và rửa lại với nước sạch. Cây được trồng vào các ly nhựa có chứa giá thể mụn xơ dừa, đậy nắp ly kín trong 3 ngày. Sau đó, nắp được mở vào ban đêm và đậy lại vào ban ngày trong 4 ngày tiếp theo. Sau 7 ngày, nắp được mở ra và cây được tưới mỗi ngày 1 lần. Các cây được trồng trong điều kiện ánh sáng được che phủ 85%, nhiệt độ trung bình ban ngày là $32 \pm 2^{\circ}\text{C}$, nhiệt độ trung bình ban đêm là $26 \pm 2^{\circ}\text{C}$. Sau 3 tuần, tỉ lệ sống, chiều cao cây, số rễ, chiều dài rễ, khối lượng tươi, khối lượng khô của cây được ghi nhận.

Bố trí thí nghiệm và xử lý số liệu

Thí nghiệm được bố trí theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên, 10 mẫu/ thí nghiệm, lặp lại 3 lần. Kết quả được xử lý bằng phần mềm SPSS phiên bản 25. Sự sai khác giữa các giá trị trung bình được đánh giá bằng phương pháp phân tích phương sai một chiều (One way ANOVA) và phép thử Duncan với $\alpha = 0,05$.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Khảo sát ảnh hưởng của oligochitosan và oligoalginate lên sự sinh trưởng của chồi ngủ sẫm bố chính

Sau ba tuần nuôi cấy, sự sinh trưởng của chồi ngủ ở các thí nghiệm khác nhau có sự khác biệt (Bảng 1). Các chỉ tiêu thu được cao nhất ở thí nghiệm oligochitosan (I) 5 và 10 mg/L, oligochitosan (II) 15 mg/L. Khối lượng khô ở thí nghiệm bổ sung oligochitosan (I) 5 và 10 mg/L cao hơn và có sự khác biệt về mặt thống kê so với đối chứng. Bên cạnh đó, cây hình thành ở thí nghiệm bổ sung oligochitosan (I) 10 mg/L có thân dày, bộ rễ khỏe, lá to và nhiều (Hình 1). Oligochitosan được nhận thấy có thể kích thích tăng trưởng bằng cách kích hoạt các con đường truyền tín hiệu ở thực vật, tăng quang hợp, tăng hàm lượng các chất điều hòa sinh trưởng thực vật như auxin và gibberellin¹². Acemi (2019) nhận thấy cả oligochitosan và chitosan đều làm tăng hàm lượng diệp lục tố a, b và carotenoid, tăng hàm lượng protein và hàm lượng chất khô ở cây *Ipomoea purpurea* L. Roth²⁰. Bên cạnh đó, chitosan có thể thúc đẩy sự phân chia của các tế bào rễ bằng cách kích hoạt các hormone thực vật bao gồm auxin và cytokinin, từ đó giúp gia tăng lượng chất dinh dưỡng hấp thụ⁹. Chitosan được nhận thấy có tác dụng làm tăng số lượng rễ và kích thích sự hình thành rễ bất định ở cây *Ipomoea purpurea*²¹. Trong thí nghiệm này, oligochitosan cũng có tác dụng kích thích sự hình thành rễ ở chồi sẫm bố chính. Thí nghiệm bổ sung oligochitosan (I) 5 mg/L có số rễ thu được (10,33) cao hơn rõ rệt so với ở thí nghiệm đối chứng (6,00).

Tuy nhiên, khi nồng độ oligochitosan (I) tăng đến 15 mg/L, các chỉ tiêu theo dõi đều giảm xuống, thân cây mảnh hơn, lá nhỏ và ít hơn. Chitosan ở nồng độ cao đã được báo cáo là có thể tạo ra những ảnh hưởng bất lợi lên sự tăng trưởng của thực vật. Bổ sung chitosan nồng độ cao đã gây tác động xấu đến sự tăng trưởng của chồi cây *Thymus lotocephalus*, các chỉ tiêu tăng trưởng đều giảm mạnh so với đối chứng²².

Đối với các thí nghiệm bổ sung oligochitosan (II), các chỉ tiêu theo dõi có xu hướng tăng khi tăng nồng độ. Kết quả thu được cao nhất ở thí nghiệm bổ sung oligochitosan (II) 15 mg/L. Tuy nhiên, cây có thân

mảnh, lá nhỏ trên các môi trường có oligochitosan (II) (Hình 1). Khối lượng phân tử của chitosan là yếu tố quan trọng ảnh hưởng đến hoạt tính sinh học của hợp chất này. Chitosan trọng lượng phân tử cao giúp cây hoa freesia (*Freesia Eckl. ex Klatt*) tăng trưởng tốt hơn chitosan trọng lượng phân tử thấp²³.

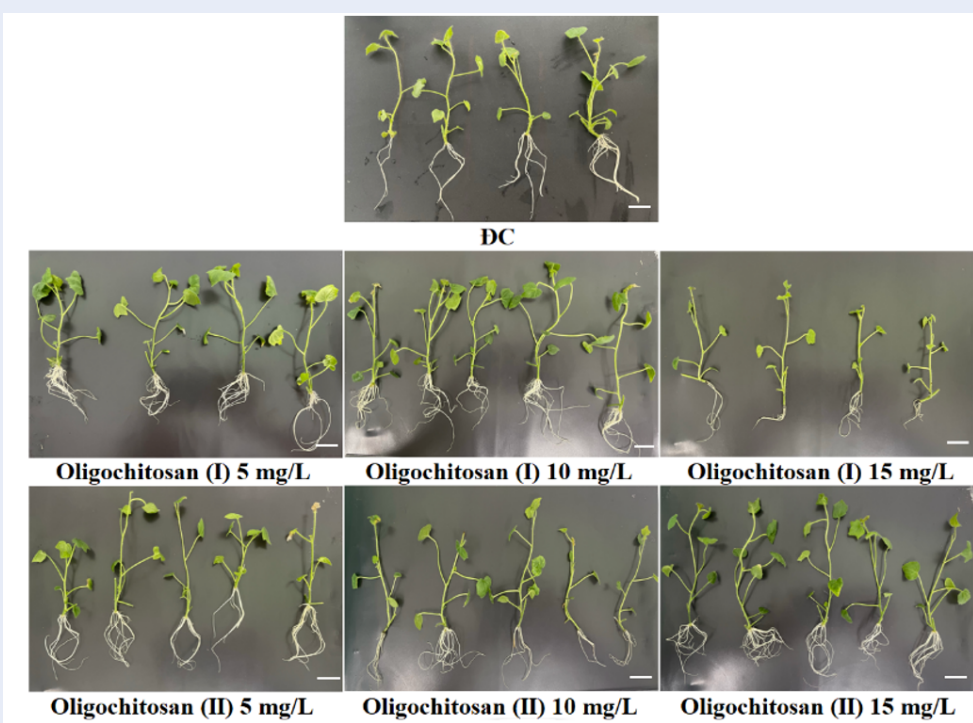
Trên các môi trường bổ sung oligoalginate, các chỉ tiêu thu được có xu hướng tăng dần khi tăng nồng độ từ 0,001 đến 0,05 mg/L, nhưng không tốt bằng kết quả thu được ở thí nghiệm đối chứng và các thí nghiệm bổ sung oligochitosan. Tuy nhiên, trên các môi trường bổ sung oligoalginate, cây có bộ rễ khỏe, thân dày và lá to hơn so với mẫu đối chứng (Hình 2). Oligoalginate được xem như là một chất kích kháng (elicitor), giúp thực vật tổng hợp auxin, phát triển rễ, kéo dài thân, tăng khả năng quang hợp cũng như tăng sự sinh tổng hợp một số hợp chất có hoạt tính sinh học²⁴. Oligoalginate có nồng độ từ 10 – 80 mg/L đã làm tăng biểu hiện của một số gene sinh tổng hợp auxin ở cây lúa (*Oryza sativa* L.) và giảm sự oxy hóa indole-3-acetic acid (IAA). Bổ sung oligoalginate ở nồng độ 20 mg/l cho kết quả tốt nhất (tăng 30% số rễ, trọng lượng tươi và thể tích rễ so với đối chứng)²⁵.

Như vậy, từ các số liệu và hình thái thu được, bổ sung oligochitosan (I) 10 mg/L là phù hợp với sự sinh trưởng chồi ngủ ở cây sẫm bố chính. Cây từ thí nghiệm này sẽ được sử dụng để khảo sát sự thích nghi ngoài vườn ươm.

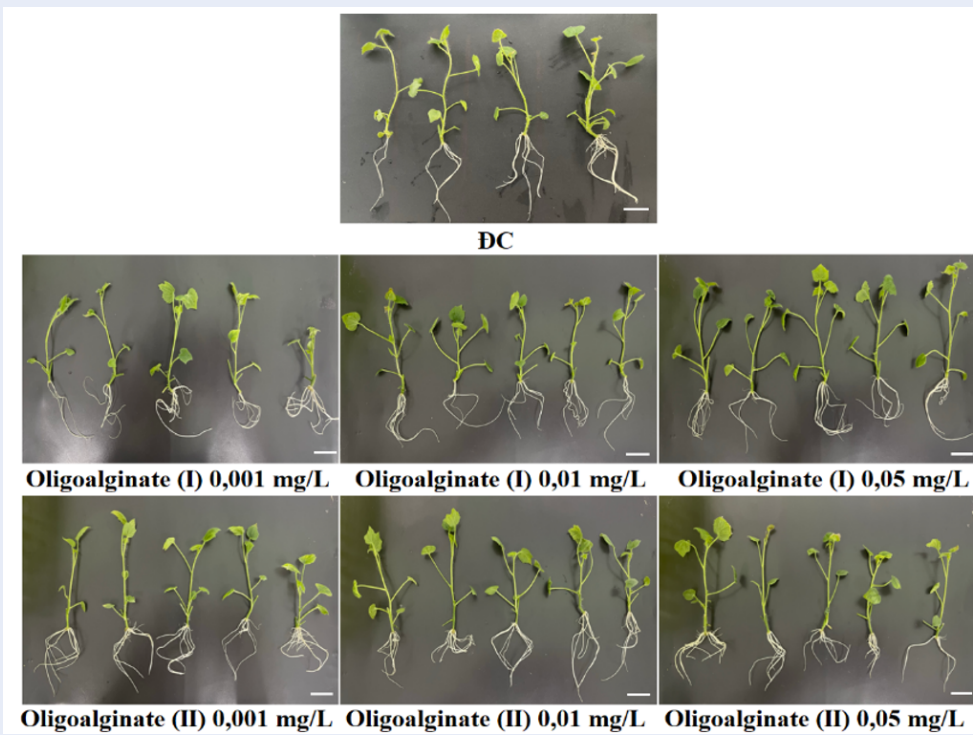
Khảo sát ảnh hưởng của tiền xử lý auxin lên khả năng ra rễ của sẫm bố chính trong điều kiện vi thủy canh

Sau 3 tuần nuôi cấy, ở các thí nghiệm được tiền xử lý auxin NAA hay IBA, các chỉ tiêu sinh trưởng có xu hướng tăng từ nồng độ 1 đến 10 mg/L và giảm dần đến nồng độ 100 mg/L, ngoại trừ chỉ tiêu số lượng rễ tăng từ nồng độ 1 đến 100 mg/L. Trong đó, thí nghiệm IBA 10 mg/L có các chỉ tiêu tăng trưởng tốt nhất so với các thí nghiệm còn lại. Ngoài ra, thí nghiệm tiền xử lý NAA 10 mg/L cũng cho kết quả khá tốt (Bảng 2). Về hình thái, ở các thí nghiệm được tiền xử lý bởi IBA 10 mg/L và NAA 10 mg/L, thân cây dày, cao, lá to, rễ dài hơn so với các thí nghiệm còn lại. Khi nồng độ auxin tăng từ 50 – 100 mg/L, thân cây có xu hướng thấp dần, mảnh hơn, lá nhỏ lại, rễ mọc nhiều hơn nhưng rễ rất nhỏ và ngắn (Hình 3 và 4). Điều này có thể do nồng độ auxin ngoại sinh quá cao đã ảnh hưởng tới sự tạo rễ. Auxin nồng độ cao kích thích sự tạo sơ khởi rễ nhưng để kéo dài phác thể rễ thì cần nồng độ auxin thấp²⁶.

Auxin là một hormone thực vật quan trọng liên quan đến sự điều hòa quá trình tăng trưởng và phát triển



Hình 1: Mẫu cây trên các môi trường có bổ sung oligochitosan (I) hoặc (II) ở các nồng độ khác nhau sau 3 tuần nuôi cấy (thanh kích thước 1 cm)



Hình 2: Mẫu cây trên các môi trường có bổ sung oligoalginat (I) hoặc (II) ở các nồng độ khác nhau sau 3 tuần nuôi cấy (thanh kích thước 1 cm)

Bảng 1: Ảnh hưởng của oligochitosan và oligoalginate đến khả năng tái sinh chồi cây sâm bố chính

Môi trường	Nồng độ (mg/L)	Chiều cao cây (cm)	Số lượng rễ	Chiều dài rễ (cm)	Khối lượng tươi (mg)	Khối lượng khô (mg)
Đối chứng	0	7,23± 0,41 ^{abcd}	6,00 ± 0,58 ^{bc}	8,20 ± 0,63 ^a	38,85 ± 3,58 ^{bc}	3,62 ± 0,43 ^{cd}
Oligochitosan (I)	5	7,63 ± 0,37 ^{abc}	10,33 ± 1,20 ^a	6,42 ± 0,42 ^{abc}	54,28 ± 4,95 ^a	5,38 ± 0,19 ^a
	10	8,18 ± 0,61 ^{ab}	8,67 ± 0,33 ^{ab}	7,60 ± 0,68 ^{ab}	44,18 ± 2,94 ^{ab}	4,77 ± 0,15 ^{ab}
	15	5,93 ± 0,54 ^{cdef}	5,00 ± 0,58 ^c	3,78 ± 0,66 ^d	16,40 ± 1,16 ^e	1,70 ± 0,10 ^f
Oligochitosan (II)	5	6,65 ± 1,38 ^{bcde}	7,00 ± 1,15 ^{bc}	5,63 ± 0,20 ^{bcd}	24,45 ± 1,33 ^{de}	2,95 ± 0,08 ^{de}
	10	7,08 ± 0,06 ^{bcd}	7,67 ± 1,76 ^{abc}	5,73 ± 0,81 ^{bcd}	22,73 ± 6,24 ^{de}	2,47 ± 0,66 ^{ef}
	15	9,22 ± 0,54 ^a	9,00 ± 0,58 ^{ab}	7,25 ± 0,36 ^{ab}	42,91 ± 4,89 ^b	4,32 ± 0,53 ^{bc}
Oligoalginate (I)	0,001	4,22 ± 0,66 ^f	6,00 ± 1,52 ^{bc}	6,87 ± 1,05 ^{abc}	20,67 ± 3,42 ^{de}	2,13 ± 0,22 ^{ef}
	0,01	4,92 ± 0,77 ^{ef}	5,33 ± 1,20 ^c	7,72 ± 0,94 ^{ab}	23,93 ± 1,35 ^{de}	2,33 ± 0,29 ^{ef}
	0,05	6,35±0,31 ^{bcdef}	6,00 ± 0,00 ^{bc}	7,47 ± 0,85 ^{ab}	31,68 ± 2,90 ^{cd}	2,88 ± 0,22 ^{de}
Oligoalginate (II)	0,001	4,63 ± 0,83 ^{ef}	6,67 ± 0,33 ^{bc}	6,28 ± 0,34 ^{abc}	27,07 ± 2,02 ^{de}	2,65 ± 0,38 ^{def}
	0,01	4,90 ± 0,63 ^{ef}	8,00 ± 0,58 ^{abc}	5,92 ± 0,31 ^{bc}	26,38 ± 2,83 ^{de}	2,65 ± 0,28 ^{def}
	0,05	5,28 ± 0,42 ^{def}	8,00 ± 0,58 ^{abc}	4,83 ± 0,57 ^{cd}	30,80 ± 3,50 ^{cd}	3,23 ± 0,28 ^{de}

Ghi chú: (*) Các chữ cái a, b, ... trong cùng 1 cột thể hiện thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa với $p < 0,05$ trong phép thử Duncan

của thực vật. Hiệu quả của từng loại auxin phụ thuộc vào loại cây trồng và nồng độ được sử dụng. IBA và NAA là hai loại auxin được sử dụng nhiều nhất trong việc kích thích sự hình thành rễ vì tính ổn định và hiệu quả. Theo Hoàng Thanh Tùng và cộng sự (2015), chồi cúc được tiến xử lý với IBA 500 ppm trong hệ thống vi thủy canh hộp nhựa tròn cho khả năng ra rễ tốt nhất¹⁵. Nồng độ auxin phù hợp để tiến xử lý ra rễ chồi cúc vàng trong hệ thống vi thủy canh cũng là IBA 500 ppm¹⁶. Trong khi đó, bổ sung trực tiếp NAA 1 ppm vào môi trường vi thủy canh cây chuối tiêu hồng giúp bộ rễ chuối phát triển tốt nhất¹⁷. Từ các kết quả trên, tiến xử lý với NAA 10 mg/L hoặc IBA 10 mg/L là phù hợp với việc ra rễ của cây sâm bố chính trong hệ thống vi thủy canh. Cây từ 2 nghiệm thức này sẽ được sử dụng để khảo sát sự thích nghi ngoài vườn ươm.

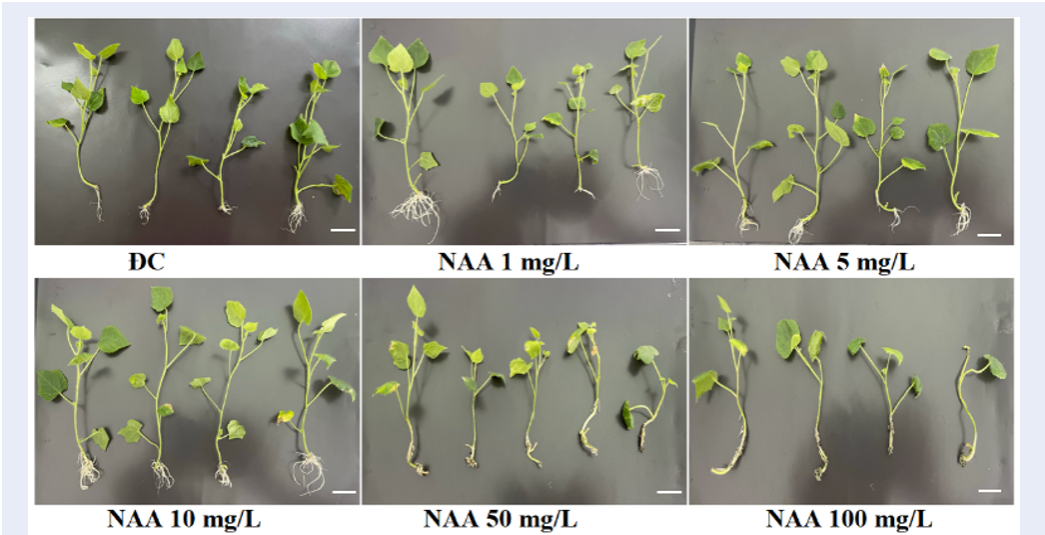
Khảo sát sự thích nghi của cây con ngoài vườn ươm

Sau 3 tuần trồng ở vườn ươm, cây con ở nghiệm thức vi nhân giống (đối chứng MS) có tỉ lệ sống thấp nhất (30%). Số lượng rễ (11,67) và khối lượng khô (5,45 mg) thu được thấp hơn các nghiệm thức còn lại. Trước khi được trồng ở vườn ươm, cây có thân mảnh, rễ ít và ngắn. Đây có thể là nguyên nhân làm cây khó thích nghi hơn, dẫn đến tỉ lệ sống ngoài tự nhiên thấp. Ngoài ra, độ ẩm trong điều kiện *in vitro* cao và ổn định hơn ở điều kiện ngoài vườn ươm. Do đó, cây cấy mô thường bị héo và chết khi chuyển từ điều kiện *in vitro* ra ngoài vườn ươm⁸. Kết quả ở Bảng 3 cho thấy, bổ sung oligochitosan hay nuôi cấy vi thủy canh đều giúp tăng tỉ lệ sống của cây ngoài vườn ươm. Nghiệm thức vi thủy canh - tiến xử lý NAA 10 mg/L có tỉ lệ sống cao nhất (100%), tiếp đến là nghiệm thức bổ sung oligochitosan (I) 10 mg/L (85,71%). Chiều dài rễ không có sự khác biệt

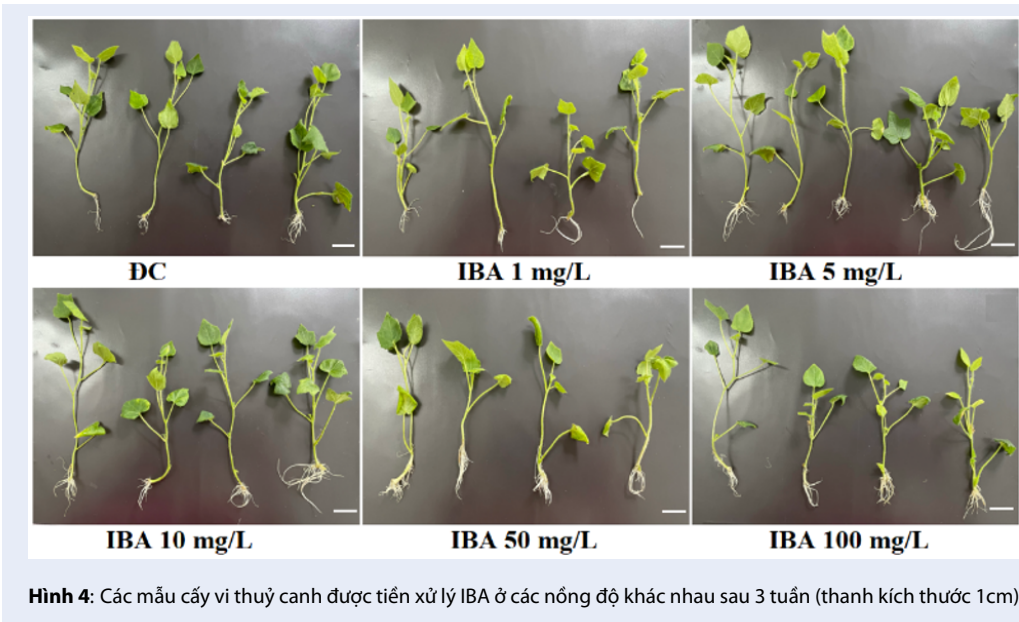
Bảng 2: Ảnh hưởng của xử lý tiền auxin lên khả năng ra rễ của sâm bố chính trong điều kiện vi thủy canh

Loại auxin	Nồng độ (mg/L)	Chiều cao cây (cm)	Số lượng rễ	Chiều dài rễ (cm)	Khối lượng tươi (mg)	Khối lượng khô (mg)
Đối chứng		8,23 ± 0,58 ^{abc}	8,67 ± 1,20 ^{cdef}	2,08 ± 0,49 ^{abc}	33,25 ± 4,90 ^{abc}	3,32 ± 0,42 ^{abcd}
NAA	1	7,01 ± 0,52 ^{abcd}	4,00 ± 0,00 ^f	2,85 ± 0,38 ^{ab}	30,22 ± 4,17 ^{bcd}	2,88 ± 0,48 ^{cde}
	5	9,83 ± 0,11 ^a	5,00 ± 0,58 ^{ef}	2,22 ± 0,27 ^{abc}	34,68 ± 1,36 ^{abc}	3,55 ± 0,23 ^{abcd}
	10	9,07 ± 0,77 ^{ab}	5,68 ± 0,33 ^{def}	2,19 ± 0,30 ^{abc}	42,22 ± 5,23 ^{ab}	4,13 ± 0,50 ^{ab}
	50	6,58 ± 0,89 ^{bcd}	10,00 ± 3,06 ^{cef}	0,23 ± 0,04 ^c	24,22 ± 1,21 ^{cd}	2,50 ± 0,18 ^{de}
	100	5,63 ± 1,15 ^{cd}	16,33 ± 0,88 ^{ab}	0,18 ± 0,06 ^c	26,42 ± 0,82 ^{cd}	2,30 ± 0,20 ^{de}
IBA	1	6,43 ± 1,10 ^{bcd}	6,00 ± 2,52 ^{def}	2,00 ± 0,71 ^{abc}	24,72 ± 2,80 ^{cd}	2,55 ± 0,29 ^{de}
	5	7,98 ± 1,35 ^{abc}	10,67 ± 1,76 ^{cd}	3,62 ± 1,67 ^a	36,45 ± 3,98 ^{abc}	4,00 ± 0,49 ^{abc}
	10	8,75 ± 0,86 ^{ab}	13,67 ± 1,20 ^{bc}	3,07 ± 0,98 ^{ab}	43,15 ± 5,79 ^a	4,28 ± 0,54 ^a
	50	6,58 ± 1,13 ^{bcd}	13,67 ± 1,86 ^{bc}	2,30 ± 0,21 ^{abc}	33,00 ± 4,45 ^{abc}	3,02 ± 0,40 ^{bcd}
	100	4,65 ± 0,13 ^d	18,67 ± 0,88 ^a	1,12 ± 0,28 ^{bc}	20,31 ± 1,75 ^d	0,97 ± 0,13 ^e

Ghi chú: (*) Các chữ cái a, b... trong cùng 1 cột thể hiện thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa với p < 0,05 trong phép thử Duncan.



Hình 3: Các mẫu cây vi thủy canh được tiến xử lý NAA ở các nồng độ khác nhau sau 3 tuần (thanh kích thước 1 cm)



Hình 4: Các mẫu cấy vi thủy canh được tiến xử lý IBA ở các nồng độ khác nhau sau 3 tuần (thanh kích thước 1cm)

về mặt thống kê giữa các nghiệm thức. Số lượng rễ ở các nghiệm thức vi thủy canh và bổ sung oligochitosan đều cao hơn so với đối chứng. Về mặt hình thái, các cây thu được từ hệ thống vi thủy canh có thân dày, nhiều lá, lá to, xuất hiện nhiều chồi mới, rễ dài và dày (Hình 5). Khi nuôi cấy vi thủy canh, môi trường không bổ sung vitamin, sucrose và điều kiện thoáng khí đã tạo bước đệm giúp cây thích nghi với môi trường tự nhiên. Vì vậy, khi được đưa ra ngoài vườn ươm, cây có tỉ lệ sống cao và phát triển tốt. Theo Hoàng Thanh Tùng (2015), cây cúc ra rễ trong hệ thống vi thủy canh có khả năng sinh trưởng tốt ở giai đoạn vườn ươm. Tỉ lệ sống, số rễ, chiều dài rễ, kích thước lá, khối lượng tươi, khối lượng khô của cây có nguồn gốc nuôi cấy vi thủy canh đều cao hơn so với cây vi nhân giống¹⁵. Ở nghiệm thức oligochitosan (I) 10 mg/L, thân cây và bộ rễ phát triển tốt hơn so với mẫu đối chứng. Ở giai đoạn *in vitro*, oligochitosan làm tăng những chỉ tiêu về sinh trưởng và sinh khối của mẫu cấy. Cây non có bộ rễ khỏe và thân dày hơn so với mẫu đối chứng. Nhờ vậy, cây thích nghi tốt hơn khi được chuyển ra trồng ngoài tự nhiên. Việc ngâm chitosan trước khi trồng và phun chitosan đã được báo cáo là làm tăng đáng kể khả năng tăng trưởng và thích nghi của cây con *Dendrobium* ngoài vườn ươm (tỉ lệ sống đạt 100%)¹⁰. Theo Veraplakorn (2021), bổ sung chitosan vào môi trường nuôi cấy *in vitro* kết hợp với phun chitosan qua lá và bón chitosan vào đất ở giai đoạn vườn ươm giúp tăng tỉ lệ sống và khả năng tăng trưởng của cây con *Lantana camara* L. Xử lý với chitosan làm tăng khả năng đóng khí khổng và hàm lượng acid abscisic trong

lá, dẫn đến làm giảm tốc độ thoát hơi nước, tăng tỷ lệ sống của cây con và tăng sinh khối²⁷. Ngoài ra, chitosan còn kích thích các cơ chế khác liên quan đến sự phát triển ở thực vật²⁴.

KẾT LUẬN

Việc bổ sung oligochitosan hay oligoalginate vào môi trường nuôi cấy *in vitro* là một hướng tiếp cận triển vọng trong việc thúc đẩy sự sinh trưởng của mẫu cấy *in vitro*. Oligochitosan với khối lượng phân tử và nồng độ phù hợp (oligochitosan 30143 Da 10 mg/L) giúp chồi ngủ sẫm bố sinh trưởng tốt, chồi cao, thân dày, lá to, rễ dài đồng thời tăng tích lũy sinh khối. Oligoalginate cũng mang lại hiệu quả cao, đặc biệt trong việc kích thích sự hình thành và tăng trưởng của rễ bất định.

Tiến xử lý auxin ở nồng độ phù hợp (NAA hoặc IBA 10 mg/L) và nuôi cấy trong hệ thống vi thủy canh giúp cải thiện hình thái của cây con sẫm bố chính, thân cây dày, cao, lá to, bộ rễ khỏe.

Việc nuôi cấy vi thủy canh hoặc bổ sung oligochitosan ở giai đoạn cuối quá trình vi nhân giống đã làm tăng khả năng thích nghi của cây ngoài vườn ươm.

LỜI CẢM ƠN

Chúng tôi xin cảm ơn Trường Đại học Bách Khoa, ĐHQG – HCM đã hỗ trợ cho nghiên cứu này.

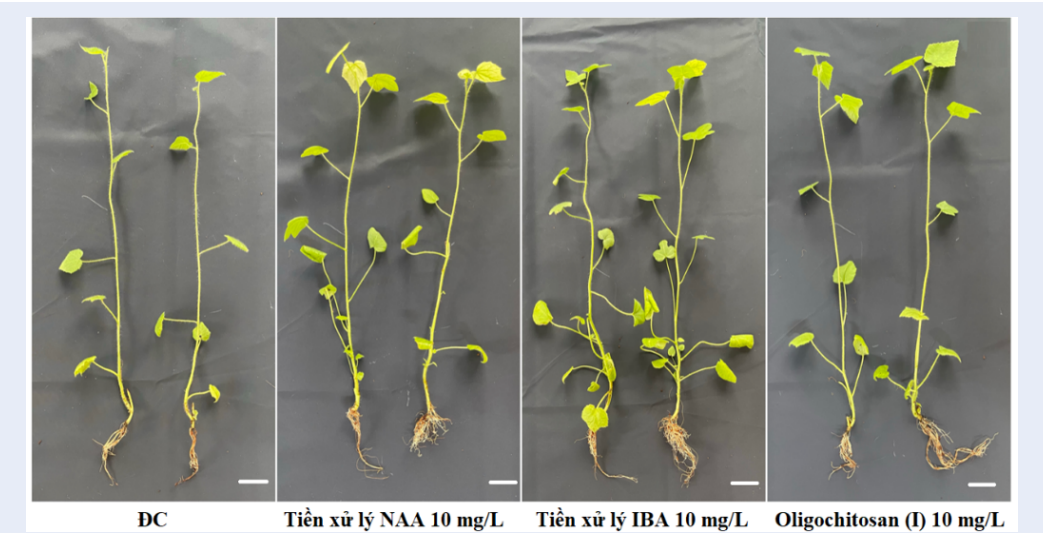
DANH MỤC CÁC TỪ VIẾT TẮT

ĐC: đối chứng
IAA: indole-3-acetic acid
IBA: indole-3-butyric acid

Bảng 3: Kết quả sau 3 tuần trồng cây ngoài vườn ươm

Môi trường in vitro	Tỉ lệ sống (%)	Chiều cao cây (cm)	Số lượng rễ	Chiều dài rễ (cm)	Khối lượng tươi (mg)	Khối lượng khô (mg)
MS (đối chứng - ĐC)	30,00	22,50± 1,62 ^b	11,67±2,02 ^b	4,50± 0,44 ^a	51,88 ± 7,04 ^b	5,45 ± 1,26 ^b
Oligochitosan (I) 10 mg/L	85,71	25,00±2,68 ^{ab}	17,67±1,76 ^a	4,77± 0,90 ^a	80,79 ± 21,83 ^b	8,93 ± 2,57 ^{ab}
Vi thủy canh (IBA 10 mg/L)	62,50	30,37 ± 1,12 ^a	22,67±1,45 ^a	5,30± 0,55 ^a	174,93 ± 31,31 ^a	16,50 ± 2,95 ^a
Vi thủy canh (NAA 10 mg/L)	100,00	29,03 ± 0,92 ^a	23,00±1,15 ^a	5,27± 0,38 ^a	101,63 ± 23,02 ^{ab}	10,48 ± 2,62 ^{ab}

Ghi chú: (*) Các chữ cái a, b trong cùng 1 cột thể hiện thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa với p < 0,05 trong phép thử Duncan.



Hình 5: Các mẫu cây sau 3 tuần trồng ở vườn ươm (thanh kích thước 1cm)

MS: Murashige and Skoog, 1962
 NAA: naphthalene acetic acid

XUNG ĐỘT LỢI ÍCH

Các tác giả tuyên bố không có xung đột lợi ích.

ĐÓNG GÓP CỦA CÁC TÁC GIẢ

Võ Thanh Phúc tiến hành thí nghiệm trồng cây ngoài vườn ươm, phân tích dữ liệu, viết và chỉnh sửa bản thảo. Ngô An Mai Phương tiến hành thí nghiệm sử dụng oligochitosan, oligoalginate và vi thủy canh, đóng góp giải thích dữ liệu và viết bản thảo.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Loi DT. Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam. Hồng Đức; 2013;.
- Minh NLT, Duyen NTP, Anh LTT, Quynh NT. Effects of sucrose concentration, vitamins, light intensity and mineral components on growth of Hibiscus sagittifolius Kurz cultured in vitro.

- Tạp chí Sinh học [Internet]. 2016 Aug 17;39(1):86-95;Available from: <https://vjs.ac.vn/index.php/vjbio/article/download/8468/381870/383360>.
- Van PTH, Anh NC, Nguyet NT. The effects of harvest time and preservation method to Abelmoschus Sagittifolius (Kurz) Merr.) quality. Ho Chi Minh City Univ Educ J Sci [Internet]. 2022 Sep 30;19(9):1508–1517;Available from: <https://journal.hcmue.edu.vn/index.php/hcmuejos/article/view/3434>.
- Chau MH, Nhung NT. Nhân chồi và tạo rễ in vitro cây sâm bố chính (Albemoschus sagittifolius (Kurz) Merr.). Tạp chí Công nghệ sinh học và Giống cây trồng [Internet]. 2022;3:3-11;Available from: <http://journal.vnuf.edu.vn/journal/3-2022/nhan-choi-va-cao-re-cay-sam-bo-chinh-albemoschus-sagittifolius-kurz-merr-in-vitro.html>.
- Huong TT, Khang VPN, Chau LTM, Hieu VM, Tuan TT. Nghiên cứu nhân giống in vitro cây sâm bố chính (Hibiscus sagittifolius) thông qua nuôi cấy từ hạt và đốt thân. Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ [Internet]. 2019;1:216-21;Available from: <https://doi.org/10.22144/ctu.jsi.2019.028>.
- Hiep PD, Minh NT, Huyen PX, Hung CD, Khiem DV, Hang NTT. Nghiên cứu ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng thực vật lên sự phát sinh hình thái của một số giống sâm bố chính (Hibiscus sagittifolius Kurz) trong điều kiện in vitro.

- Tạp chí sinh học [Internet]. 2014;36(1se):266-71;Available from: <https://stdjns.scienceandtechnology.com.vn/index.php/stdjns/article/view/710>.
7. Trang NTH, Huong VTT, Dung VN, Huyen TTT, Huong NQ. Nhân giống in vitro sâm bố chính. Tạp chí Khoa học Lạc Hồng [Internet]. 2015;4:42-26;Available from: https://tapchikhoahoc.lhu.edu.vn/Data/News/370/files/10_Huyen_Trang_Thu_Huong.pdf.
 8. Huyen PX, Ngoan HT, Hoang NTP. Nghiên cứu nhân giống in vitro cây sâm bố chính (Hibiscus sagittifolius Kurz) thông qua nuôi cấy đốt thân. Tạp chí khoa học Nông nghiệp Việt Nam [Internet]. 2017;15(5):664-72;Available from: <https://tapchi.vnua.edu.vn/wp-content/uploads/old/5-2017/13.pdf>.
 9. Chakraborty P, Hasanuzzaman M, Rahman M, Khan MA, Bhowmik P, Mahmud NU, Tanveer M, Islam T. Mechanism of plant growth promotion and disease suppression by chitosan biopolymer. Agric. 2020;10(12):1-30;Available from: <https://www.mdpi.com/2077-0472/10/12/624>.
 10. Pornpienpakdee P, Singhasurasak R, Chaiyasap P, Pichyangkura R, Bunjongrat R, Chadchawan S, Limpavanech P. Improving the micropropagation efficiency of hybrid Dendrobium orchids with chitosan. Sci Hortic (Amsterdam) [Internet]. 2010;124(4):490-9;Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2010.02.008>.
 11. Acemi A. Chitosan versus plant growth regulators: a comparative analysis of their effects on in vitro development of Serapias vomeracea (Burm.f.) Briq. Plant Cell, Tissue Organ Cult [Internet]. 2020 May 15;141(2):327-38;Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s11240-020-01789-3>.
 12. Moenne A, González A. Chitosan-, alginate- carrageenan-derived oligosaccharides stimulate defense against biotic and abiotic stresses, and growth in plants: A historical perspective. Carbohydr Res. 2021;503:1-7;Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0008621521000677>.
 13. Luan LQ, Hien NQ, Nagasawa N, Kume T, Yoshii F, Nakanishi TM. Biological effect of radiation-degraded alginate on flower plants in tissue culture. Biotechnol Appl Biochem [Internet]. 2003;38(3):283;Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12901723/>.
 14. Kanthaliya B, Joshi A, Arora J, Alqahtani MD, Abd Allah EF. Effect of Biotic Elicitors on the Growth, Antioxidant Activity and Metabolites Accumulation in In Vitro Propagated Shoots of Pueraria tuberosa. Plants [Internet]. 2023;12(6):1-16. Available from: <https://www.mdpi.com/2223-7747/12/6/1300#:~:text=The elicitors applied to shoot, activity compared to untreated control;PMID: 36986988>. Available from: <https://doi.org/10.3390/plants12061300>.
 15. Tung HT, Phuong TTB, Nhut DT. Hệ thống vi thủy canh trong nhân giống cây cúc trắng (Chrysanthemum morifolium). Tạp chí Công nghệ Sinh học [Internet]. 2015;13(4):1127-37;Available from: https://www.researchgate.net/profile/Tung-Hoang-5/publication/327515637_He_thong_thuy_canh_trong_nhan_giong_cay_cuc_trang_Chrysanthemum_morifolium/links/5b9f0a01299bf13e6037c633/He-thong-thuy-canh-trong-nhan-giong-cay-cuc-trang-Chrysanthemum-morifolium.pdf.
 16. Huong BTT, Huong HTT, Xuan DT, Luong NT, Gioi DH. Nghiên cứu ảnh hưởng một số yếu tố đến chồi Cúc vàng (Chrysanthemum indicum) trong hệ thống vi thủy canh. Công nghệ sinh học Giống cây trồng [Internet]. 2021;2:21-7;Available from: <http://vbdh2.vnuf.edu.vn/handle/123456789/16530>.
 17. Huong BTH, Gioi DH. Effects of some elements on the growth, and the development of Banana shoots (M. acuminata) in microponic system. Biotechnol Seed [Internet]. 2020;9:11-6;Available from: <http://vbdh2.vnuf.edu.vn/handle/123456789/13926>.
 18. Nhut DT, Tung HT, Yeung ECT. Plant Tissue Culture: New Techniques and Application in Horticultural Species of Tropical Region [Internet]. Nhut DT, Tung HT, YEUNG EC-T, editors. Singapore: Springer Singapore; 2022. 1-397 p;Available from: <https://link.springer.com/10.1007/978-981-16-6498-4https://doi.org/10.1007/978-981-16-6498-4>.
 19. Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiol Plant. 1962;15(3):473-97;Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>.
 20. Acemi RK, Acemi A. Polymerization degree-dependent changes in the effects of in vitro chitosan treatments on photosynthetic pigment, protein, and dry matter contents of Ipomoea purpurea. Eurobiotech J. 2019;3(4):197-202;Available from: <https://sciencedirect.com/article/10.2478/ebjt-2019-0024>.
 21. Acemi A, Bayrak B, Çakır M, Demiryürek E, Gün E, El Gueddari NE & Özen F. Comparative analysis of the effects of chitosan and common plant growth regulators on in vitro propagation of Ipomoea purpurea (L.) Roth from nodal explants, In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant, 2018, 54(5): 537 - 544;Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11627-018-9915-0>.
 22. Coelho N, Filipe A, Medronho B, Magalhães S, Vitorino C, Alves L, Gonçalves S, Romano A. Rheological and microstructural features of plant culture media doped with biopolymers: Influence on the growth and physiological responses of in vitro grown shoots of Thymus lotocephalus. Polysaccharides [Internet]. 2021;2(2):538-53;Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00344-012-9309-1>.
 23. Salachna P, Zawadzka A. Effect of chitosan on plant growth, flowering and corms yield of potted freesia. J Ecol Eng. 2014;15(3):97-102;Available from: <https://yadda.icm.edu.pl/baztech/element/bwmeta1.element/baztech-424b5475-43d5-47ed-9db0-b2847f671301>.
 24. González A, Castro J, Vera J, Moenne A. Seaweed oligosaccharides stimulate plant growth by enhancing carbon and nitrogen assimilation, basal metabolism, and cell division. J Plant Growth Regul [Internet]. 2013;32:443-8;Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00344-012-9309-1>.
 25. Zhang Y, Yin H, Zhao X, Wang W, Du Y, He A SK. The promoting effects of alginate oligosaccharides on root development in Oryza sativa L. mediated by auxin signaling. Carbohydr Polym [Internet]. 2014;113:446-54;Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0144861714006572>.
 26. Luong ND, Tien LTT. Công nghệ tế bào. Nhà xuất bản Đại học quốc gia Tp. Hồ Chí Minh; 2006. 1-376 p.
 27. Veraplakorn V, Kudan S. Chitosan elicitor stimulation of in vitro growth and ex vitro acclimatization of Lantana camara L. Agric Nat Resour [Internet]. 2021;55(3):431-9;Available from: <https://li01.tci-thaijo.org/index.php/anres/article/view/251799>.

Effects of oligochitosan, oligoalginate, and microponic culture on the *in vitro* growth and *ex vitro* acclimatization of *Hibiscus sagittifolius* Kurz

Vo Thanh Phuc^{1,2,*}, Ngo An Mai Phuong^{1,2}

ABSTRACT

Hibiscus sagittifolius Kurz is a valuable medicinal plant used in traditional oriental medicine. However, due to heavy exploitation and low seed germination rates in its natural habitat, the population of this tree species has significantly declined. Therefore, it is crucial to propagate *Hibiscus sagittifolius* Kurz. This study aimed to investigate the effects of various factors, such as oligochitosan, oligoalginate, and auxin pretreatment in microponic culture, on the growth process of propagating *Hibiscus sagittifolius* Kurz shoots. The results revealed that Murashige and Skoog's medium supplemented with 10 mg/L of oligochitosan promoted shoot growth. Additionally, on medium supplemented with oligoalginate, plants had well-developed roots and larger leaves compared to the control samples. In the microponic system, shoots were cultured in a liquid medium without sucrose and vitamin supplementation. Plants pretreated with 10 mg/L of IBA or NAA in microponic conditions resulted in successful root development. Both the addition of oligochitosan and microponic culture enhanced seedling vitality when transferred to the nursery. Notably, seedlings pretreated with 10 mg/L of NAA in microponic culture exhibited a 100% survival rate, with 23 roots and a root length of 5.27 cm after 3 weeks of planting.

Key words: *Hibiscus sagittifolius* Kurz, oligoalginate, oligochitosan, acclimatization, microponic

¹Department of Biotechnology, Faculty of Chemical Engineering, Ho Chi Minh University of Technology (HCMUT, Vietnam

²Vietnam National University Ho Chi Minh City, Vietnam

Correspondence

Vo Thanh Phuc, Department of Biotechnology, Faculty of Chemical Engineering, Ho Chi Minh University of Technology (HCMUT, Vietnam

Vietnam National University Ho Chi Minh City, Vietnam

Email: vothanhphuc@hcmut.edu.vn

History

- Received: 26-10-2023
- Accepted: 03-7-2024
- Published Online: 30-9-2024

DOI :

<https://doi.org/10.32508/stdjet.v7i2.1296>



Check for updates

Copyright

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



Cite this article : Phuc V T, Phuong N A M. **Effects of oligochitosan, oligoalginate, and microponic culture on the *in vitro* growth and *ex vitro* acclimatization of *Hibiscus sagittifolius* Kurz** . *Sci. Tech. Dev. J. – Engineering and Technology* 2024, 7(2):2220-2229.