



DOI:10.22144/ctu.jsi.2019.028

NGHIÊN CỨU NHÂN GIỐNG *in vitro* CÂY SÂM BỐ CHÍNH (*Hibiscus sagittifolius* KURZ) THÔNG QUА NUÔI CÂY TỪ HẠT VÀ ĐỐT THÂN

Trịnh Thị Hương^{1*}, Võ Phan Nhật Khang¹, Lê Trương Minh Châu¹, Vạn Minh Hiệu¹ và Trần Trọng Tuấn²

¹Khoa Công nghệ sinh học, Trường Đại học Công nghiệp Thực phẩm Thành phố Hồ Chí Minh

²Phòng Công nghệ tế bào thực vật, Viện Sinh học Nhiệt đới Thành phố Hồ Chí Minh

*Người chịu trách nhiệm về bài viết: Trịnh Thị Hương (email: trinhthihuongdhcntp@gmail.com)

Thông tin chung:

Ngày nhận bài: 13/11/2018

Ngày nhận bài sửa: 13/03/2019

Ngày duyệt đăng: 12/04/2019

Title:

In vitro propagation of *Hibiscus sagittifolius* Kurz via seed and node culture

Từ khóa:

Đốt thân, hạt, nhân giống *in vitro*, sâm bố chính

Keywords:

Hibiscus sagittifolius Kurz, *in vitro* propagation, node, seed

ABSTRACT

Hibiscus sagittifolius is not only a beautiful flower, but also species having high medicinal value. This study is aimed to complete the process of *in vitro* propagation of *H. sagittifolius* from seeds and nodes. The results show that the percentage of uninfected and survived samples was 71.99% when the seeds and nodes were sterilized with 15% NaClO solution for 15 min. The seed germination rate was improved when seed was pre-treated by immersion in 20 mg/L GA₃ for 120 min before being sterilized. The MS medium supplemented with 2.0 mg/L BA, 30.0 g/L sucrose, 100.0 mL/L coconut water, pH 5.8 was suitable for multiplication of *in vitro* shoots. After 45 days of culture, the number of shoots obtained was 6.6 shoots per sample and the shoots' average height was 3.28 cm. Afterwards, the *in vitro* shoots were inoculated on MS medium supplemented with 1 mg/L NAA for rooting. After 45 days of culture, the number of roots per shoot was 33.6 with an average length of 13 cm.

TÓM TẮT

Sâm bố chính không những là một loài hoa đẹp mà còn là một loài cây có giá trị dược liệu cao, được sử dụng nhiều trong đông y. Nghiên cứu này được thực hiện nhằm hoàn thiện quy trình vi nhân giống cây sâm bố chính từ hạt và đốt thân. Kết quả thu được cho thấy, mẫu hạt và đốt thân được khử trùng với dung dịch javel 15% trong 15 phút thu được tỷ lệ mẫu không nhiễm và sống sót đạt 71,99%. Tỷ lệ nảy mầm của hạt được nâng cao (82%) khi hạt được xử lý bằng cách ngâm trong dung dịch GA₃ 20 mg/L trong 120 phút trước khi tiến hành khử trùng. Môi trường thích hợp cho quá trình nhân nhanh chồi là môi trường MS (Murashige and Skoog, 1962) và chiều dài trung bình rễ đạt 13 cm sau 45 ngày nuôi cấy.

Trích dẫn: Trịnh Thị Hương, Võ Phan Nhật Khang, Lê Trương Minh Châu, Vạn Minh Hiệu và Trần Trọng Tuấn, 2019. Nghiên cứu nhân giống *in vitro* cây sâm bố chính (*Hibiscus sagittifolius* Kurz) thông qua nuôi cấy từ hạt và đốt thân. Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. 55(Số chuyên đề: Công nghệ Sinh học)(1): 216-221.

1 MỞ ĐẦU

Sâm bố chính (*Hibiscus sagittifolius* Kurz) là loài cây dược liệu quý có tác dụng chữa cơ thể suy

nhược, kém ăn, thiếu ngủ, đau lưng, đau mình, các chứng ho sốt nóng, trong người khô, táo bón, khát nước, gầy còm... (Đỗ Tất Lợi, 2004). Trong rễ sâm bố chính chứa phytosterol, coumarin, acid béo, acid

hữu cơ, đường khử và hợp chất uronic; hàm lượng lipid là 3,96%; hàm lượng protein toàn phần là 0,23%; hàm lượng protid là 1,26%; hàm lượng tinh bột 15,14% và chất nhầy là 18,92% (chất nhầy là D-glucose và L-rhamnose). Các acid amin gồm 11 chất, trong đó có histidin, arginin, threonin, alanin, prolin, tyrosin, valin, phenylalanin và leucin; ngoài ra, còn có 13 nguyên tố khoáng cần thiết cho cơ thể (Trần Công Luận và Bùi Trần Minh Phương, 2011). Một nghiên cứu khác về sâm bố chính cho thấy, trong rễ sâm bố chính còn chứa tinh bột và 30-40% chất nhầy (Đỗ Tất Lợi, 2004). Bên cạnh tác dụng dược liệu, sâm bố chính còn được người dân trồng làm cảnh với màu hoa khác nhau từ đỏ, hồng đến vàng. Với những công dụng và lợi ích trên mà sâm bố chính ngoài tự nhiên đang bị khai thác một cách quá mức làm cạn kiệt nguồn sâm trong tự nhiên. Do vậy, các nghiên cứu nhân giống, gây trồng loài cây này đang ngày càng được quan tâm. Trong đó, ứng dụng nuôi cấy mô tế bào thực vật trong công tác vi nhân giống có thể tạo ra các cây giống đồng nhất, có chất lượng tốt với số lượng lớn trong thời gian ngắn, là một giải pháp triển vọng trong quá trình phát triển loài dược liệu này, góp phần đảm bảo nguồn dược liệu cho sản xuất quy mô lớn cũng như bảo tồn loài sâm bố chính.

2 VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHÊN CỨU

2.1 Vật liệu

Vật liệu được sử dụng là các đoạn đốt thân sâm bố chính mang chồi ngủ có kích thước 2 cm và hạt cây sâm bố chính (*Hibiscus sagittifolius* Kurz) được thu nhận tại thành phố Cao Lãnh, tỉnh Đồng Tháp, Việt Nam.

2.2 Phương pháp nghiên cứu

2.2.1 Bố trí thí nghiệm

Khảo sát ảnh hưởng của thời gian khử trùng đoạn đốt thân và hạt sâm bố chính trong dung dịch HgCl₂, NaClO

Đoạn đốt thân và hạt sâm bố chính được rửa sạch với nước trong 10 phút, sau đó khử trùng bằng cồn 70% trong 1 phút. Tiếp theo mẫu được khử trùng với dung dịch HgCl₂ 0,1% và NaClO 15% ở các khoảng thời gian khác nhau: 5; 10; 15; 20 phút.

Sau khi khử trùng, tiến hành cấy 2 hạt/ống nghiệm (đối với mẫu hạt) và 1 mẫu/ống nghiệm (đối với mẫu đốt thân). Mỗi nghiệm thức thực hiện 10 ống nghiệm. Thí nghiệm được bố trí ngẫu nhiên với 3 lần lặp lại.

Ảnh hưởng của tiền xử lý GA₃ đến khả năng nảy mầm của hạt sâm bố chính

Hạt sâm bố chính được tiền xử lý bằng cách ngâm trong dung dịch GA₃ ở các nồng độ khác nhau (0; 10; 20; 30; 40 mg/L) trong 2 giờ trước khi tiến hành khử trùng. Thời gian và nồng độ chất khử trùng được chọn từ công thức tối ưu nhất ở thí nghiệm trên.

Ở hai thí nghiệm trên, môi trường nuôi cấy đốt thân là môi trường MS (Murashige and Skoog, 1962) có bổ sung 1,0 mg/L BA, 30 g/L sucrose, 8 g/L agar, pH 5,8. Môi trường nuôi cấy hạt là MS có bổ sung 10 mg/L GA₃, 30 g/L sucrose, 8 g/L agar, pH 5,8 (Phan Duy Hiệp và *ctv.*, 2014). Tiến hành theo dõi và thu nhận số liệu sau 20 ngày nuôi cấy.

Ảnh hưởng của BA đến khả năng nhân nhanh chồi sâm bố chính

Các chồi *in vitro* thu nhận ở thí nghiệm trên (bật chồi từ đốt thân và cây nảy mầm từ hạt) được cắt thành những đoạn thân có mang chồi bên với kích thước khoảng 1,5 cm. Sau đó, mẫu đốt thân được nuôi cấy ở môi trường MS có bổ sung 30 g/L sucrose, 100 mL/L nước dừa, 8 g/L agar, pH 5,8 (Phan Duy Hiệp và *ctv.*, 2014) đồng thời bổ sung BA với các nồng độ khác nhau: 0, 1, 2, 3, 4 mg/L. Số liệu được thu nhận sau 45 ngày nuôi cấy.

Ảnh hưởng của NAA đến khả năng ra rễ của cây sâm bố chính

Các chồi *in vitro* có kích thước khoảng 3 cm thu nhận từ môi trường tối ưu ở giai đoạn nhân nhanh được tách riêng lẻ và cấy vào môi trường MS có bổ sung 30 g/L sucrose, 8 g/L agar, pH 5,8 và bổ sung NAA với các nồng độ khác nhau: 0; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 mg/L. Số liệu được thu nhận sau 45 ngày nuôi cấy.

2.2.2 Điều kiện nuôi cấy

Thí nghiệm được thực hiện trong điều kiện nhiệt độ 25 ± 2°C, cường độ chiếu sáng 2.500 ± 200 lux, thời gian chiếu sáng 12 giờ/ngày, độ ẩm phòng nuôi cấy 50 - 60%.

2.2.3 Xử lý thống kê

Thí nghiệm được bố trí theo kiểu ngẫu nhiên hoàn toàn (CRD) với 3 lần lặp lại. Các số liệu được xử lý thống kê bằng phần mềm Microsoft Excel và Statgraphic Centurion XVI với độ tin cậy 95%.

3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

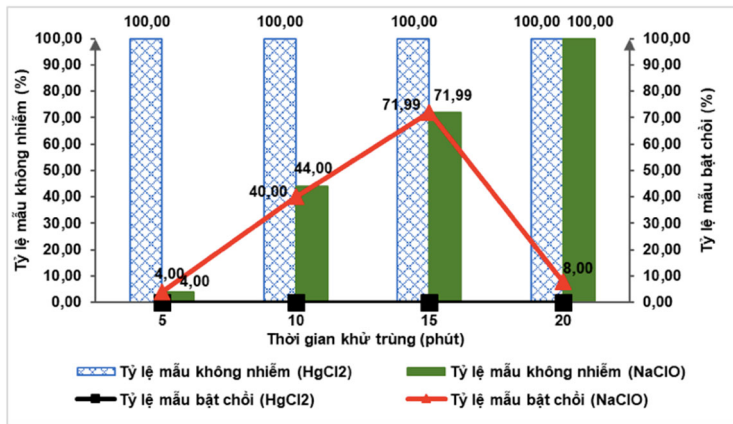
3.1 Ảnh hưởng của thời gian khử trùng đốt thân và hạt sâm bố chính trong dung dịch HgCl₂ và NaClO

Khi sử dụng dung dịch HgCl₂ 0,1%, tỷ lệ mẫu không nhiễm đều đạt 100% ở cả mẫu đốt thân và hạt, nhưng tất cả các mẫu nuôi cấy đều không bật chồi hoặc nảy mầm (Hình 1, 2). Nguyên nhân là do

HgCl₂ là một chất khử trùng mạnh, nên không chỉ gây chết đối với vi sinh vật mà còn gây chết đối với mẫu mô tế bào thực vật. Kết quả này cũng tương tự với quan sát của Wesely *et al.* (2012) khi khử trùng tạo mẫu sạch từ chồi non cây ngư tất (*Achyranthes bidentata*) sử dụng HgCl₂ 0,1% trong thời gian 5 phút cho tỷ lệ mẫu sạch đạt 100%, nhưng 95 – 100% mẫu bị chết.

Đối với nghiệm thức sử dụng NaClO 15%, kết quả khử trùng đoạn đốt thân cho thấy tỷ lệ mẫu không nhiễm đạt 71,99% và tất cả các mẫu đốt thân không nhiễm đều tạo chồi ở nghiệm thức 15 phút. Ở

nghiệm thức 20 phút, tỷ lệ mẫu đốt thân không nhiễm đạt cao nhất (100%), tuy nhiên tỷ lệ mẫu bật chồi chỉ đạt 8% (Hình 1). Ở hai nghiệm thức 5 và 10 phút, tỷ lệ mẫu không nhiễm thấp, chỉ đạt lần lượt là 4 và 44% và tỷ lệ mẫu bật chồi tương ứng của hai nghiệm thức là 4% và 40%. Do đó, thời gian khử trùng mẫu đốt thân trong dung dịch NaClO thích hợp là 15 phút. Nguyễn Văn Việt *et al.* (2016) khi nghiên cứu khử trùng mẫu đốt thân cây *Aerides odorata* Lour bằng NaClO cũng cho thấy, nếu khử trùng với NaClO thì thời gian khử trùng 17 phút thu được tỷ lệ mẫu sạch đạt 83,33% và tỷ lệ mẫu tái sinh là 60,67%.

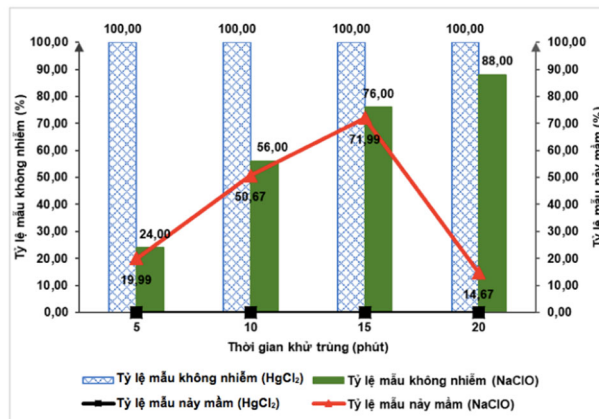


Hình 1: Ảnh hưởng của thời gian khử trùng đoạn đốt thân trong dung dịch HgCl₂0,1% và NaClO15

Mẫu hạt được khử trùng với dung dịch NaClO 15% cũng thu được kết quả tương tự với mẫu đốt thân. Ở các mức thời gian từ 5 đến 20 phút, tỷ lệ mẫu hạt không nhiễm gia tăng tỷ lệ thuận với thời gian khử trùng và đạt cao nhất (88%) ở nghiệm thức 20 phút; tuy nhiên, tỷ lệ hạt nảy mầm ở nghiệm thức này thấp (14,67%). Ở nghiệm thức 15 phút, tỷ lệ hạt không nhiễm là 76% và tỷ lệ mẫu sống sót đạt cao nhất (71,99%). Dựa trên kết quả nghiên cứu cho thấy, thời gian khử trùng có ảnh hưởng nhiều đến

hiệu quả khử trùng và khả năng sống sót của mẫu nuôi cấy. Vì vậy, thời gian khử trùng mẫu hạt thích hợp trong dung dịch NaClO 15% là 15 phút. Theo nghiên cứu của Yildiz and Er (2002), hạt của cây lanh (*Linum usitatissimum*) được khử trùng bằng NaClO kết hợp với nhiệt độ 10°C sẽ cho hiệu quả tối ưu nhất với tỷ lệ nảy mầm của hạt là 100%.

Như vậy, chất khử trùng thích hợp cho cả mẫu hạt và đốt thân là NaClO 15% với thời gian khử trùng 15 phút.



Hình 2: Ảnh hưởng của thời gian khử trùng hạt sâm bố chính trong dung dịch HgCl₂0,1% và NaClO15%

3.2 Ảnh hưởng của tiền xử lý GA₃ đến khả năng nảy mầm của hạt sâm bố chính

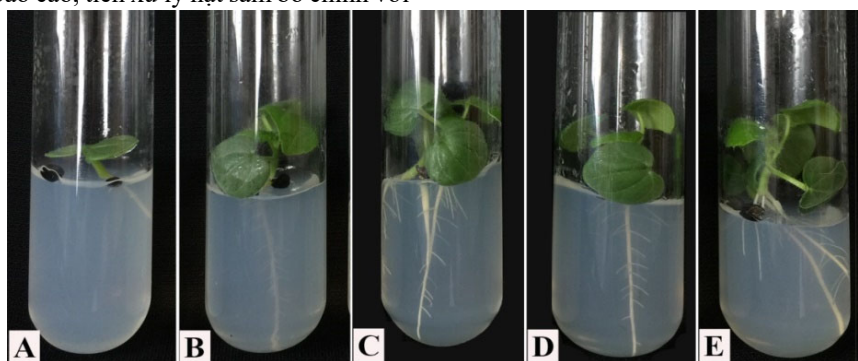
Trong nghiên cứu này, nhằm tăng khả năng nảy mầm nên các hạt sâm bố đều được xử lý bằng GA₃ trước khi nuôi cấy ở các nồng độ khác nhau. Sau 20 ngày nuôi cấy, các mẫu hạt được tiền xử lý bằng cách ngâm trong dung dịch GA₃ ở các nồng độ từ 10 – 30 mg/L đều thu được tỷ lệ hạt nảy mầm cao hơn so với mẫu không xử lý với GA₃ trước đó hoặc xử lý với GA₃ ở nồng độ cao (40 mg/L), và tỷ lệ hạt nảy mầm đạt cao nhất (82%) ở nồng độ 20 mg/L GA₃. Kết quả thu được cho thấy nồng độ GA₃ ảnh hưởng đến tỷ lệ nảy mầm của hạt. Phan Duy Hiệp và ctv. (2014) cũng báo cáo, tiền xử lý hạt sâm bố chính với

dung dịch GA₃ 30 mg/L trong thời gian 120 phút, đã giúp nâng cao tỷ lệ nảy mầm của hạt (55,60%).

Bảng 1: Ảnh hưởng của nồng độ GA₃ tiền xử lý đến khả năng nảy mầm của hạt sâm bố chính

Nồng độ GA ₃ (mg/L)	Tỷ lệ hạt nảy mầm (%)
0	6,00 ± 4,00 ^{d*}
10	40,00 ± 4,47 ^c
20	82,00 ± 2,00 ^a
30	56,00 ± 5,10 ^b
40	18,00 ± 4,89 ^d

*Các chữ cái a, b, c, d khác nhau trong cùng một cột chỉ sự khác biệt có ý nghĩa với độ tin cậy 95%



Hình 3: Ảnh hưởng của nồng độ GA₃ tiền xử lý đến khả năng nảy mầm của hạt sau 20 ngày nuôi cấy

A; B; C; D; E tương ứng với nồng độ GA₃: 0; 10; 20; 30; 40 mg/L

Ngoài ra, GA₃ cũng ảnh hưởng đến chiều cao của cây thu được. Ở nghiệm thức hạt không được tiền xử lý với GA₃, cây thu được có chiều cao thấp hơn hẳn so với các nghiệm thức có xử lý với GA₃ (Hình 3). Như vậy, tiền xử lý hạt với GA₃ (20 mg/L) giúp nâng cao tỷ lệ nảy mầm cũng như chiều cao của cây con.

3.3 Ảnh hưởng của BA đến khả năng nhân nhanh chồi sâm bố chính

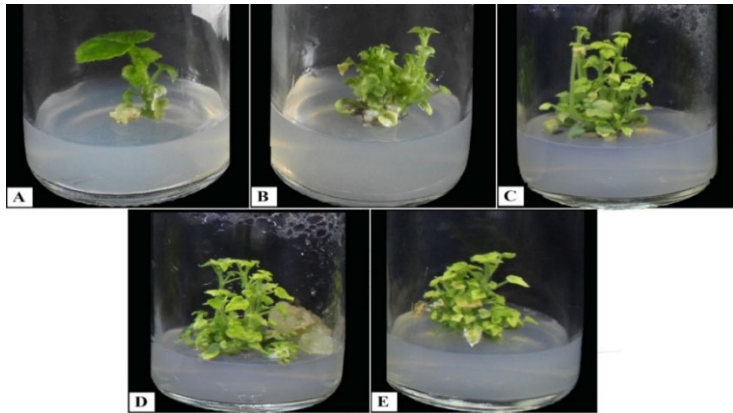
Nhân nhanh chồi là một giai đoạn quan trọng trong việc nhân giống tạo ra số lượng lớn cây *in vitro*. Các thể chồi sau khi hình thành có khả năng tiếp tục hình thành chồi với số lượng và chất lượng phụ thuộc rất nhiều vào môi trường nuôi cấy. Trong nghiên cứu này, khi bổ sung BA vào môi trường nuôi cấy từ 0 - 2 mg/L thì số lượng chồi/mẫu tăng từ 1,20 lên 6,60 chồi/mẫu và chiều cao chồi cũng tăng

từ 2,28 lên 3,28 cm. Tuy nhiên, nồng độ BA cao cũng gây ức chế sự phát triển của chồi, nên khi tăng nồng độ BA lên 3 - 4 mg/L thì số lượng chồi và chiều cao chồi giảm xuống (Bảng 2, Hình 4).

Bảng 2: Ảnh hưởng của BA lên khả năng nhân nhanh chồi sau 45 ngày nuôi cấy

Nồng độ BA (mg/L)	Số chồi/mẫu	Chiều cao chồi (cm)
0	1,20 ± 0,20 ^c	2,28 ± 0,10 ^{c*}
1	4,00 ± 0,32 ^c	2,52 ± 0,13 ^{bc}
2	6,60 ± 0,24 ^a	3,28 ± 0,12 ^a
3	5,00 ± 0,32 ^b	2,68 ± 0,04 ^b
4	2,40 ± 0,8 ^d	1,42 ± 0,07 ^d

*Các chữ cái a, b, c, d trong cùng một cột chỉ sự khác biệt có ý nghĩa với độ tin cậy 95%



Hình 4: Ảnh hưởng của BA đến khả năng nhân nhanh chồi của sâm bố chính sau 45 ngày nuôi cấy

A; B; C; D; E tương ứng với nồng độ BA: 0; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 mg/L

3.4 Ảnh hưởng của NAA đến khả năng ra rễ của cây sâm bố chính

Tạo rễ là bước cuối cùng trong quy trình tạo cây *in vitro* hoàn chỉnh. Có nhiều loại auxin được sử dụng trong giai đoạn tạo rễ, trong đó NAA là một loại auxin tổng hợp và có hoạt tính mạnh được ứng dụng nhiều trong nuôi cấy mô tế bào thực vật. Nhiều nghiên cứu cũng đã báo cáo, sử dụng NAA thích hợp cho giai đoạn ra rễ tạo cây con hoàn chỉnh, như nghiên cứu của Vũ Hoài Sâm và ctv. (2016) khi tiến hành nghiên cứu nhân giống *in vitro* cây bách hợp (*Lilium brownii* F.E. Brown) cũng đã chỉ ra rằng trong môi trường có bổ sung 1,0 mg/L NAA cho kết quả tạo rễ tối ưu nhất. Trên đối tượng cây hà thủ ô đỏ, Lin *et al.*, 2003 cũng nhận thấy nếu bổ sung NAA vào môi trường thì sau 45 ngày nuôi cấy tỷ lệ mẫu tạo rễ là tối ưu nhất 97%.

Trong nghiên cứu này, kết quả thu được cho thấy, số lượng rễ phụ thuộc vào nồng độ NAA bổ sung vào môi trường nuôi cấy. Ở nghiệm thức đối chứng, mẫu chồi vẫn tạo rễ, tuy nhiên số lượng rễ tạo ra thấp (6,6 rễ/mẫu), hình thái rễ mảnh với chiều dài trung bình là 13,6 cm, cây yếu và ít lá (Hình 5A). Khi tăng nồng độ NAA từ 0,5 đến 1,5 mg/L thì số

lượng rễ/mẫu cũng tăng dần lên và số lượng rễ đạt cao nhất ở nồng độ 1,5 mg/l với 34,8 rễ/mẫu; tuy nhiên, ở nồng độ NAA 1,5 mg/L rễ thu được ngắn hơn so với nồng độ 0,5 và 1,0 mg/L. Nếu tiếp tục tăng nồng độ NAA lên 2,0 mg/L thì số lượng rễ giảm (22,0 rễ/mẫu), đồng thời cây phát triển kém, thấp hơn so với các nghiệm thức khác. Ở nồng độ 1,0 mg/L NAA thu được 33,6 rễ/mẫu và chiều dài là 13,0 cm, rễ tạo ra dày, to, khỏe mạnh, đồng thời cây xanh, khỏe mạnh (Bảng 3, Hình 5). Do đó, nồng độ NAA 1,0 mg/L được chọn là phù hợp cho quá trình hình thành rễ tạo cây hoàn chỉnh ở cây sâm bố chính.

Bảng 3: Ảnh hưởng của NAA đến khả năng ra rễ của sâm bố chính

Nồng độ NAA (mg/L)	Số rễ/mẫu	Chiều dài rễ (cm)
0	6,60 ± 0,40 ^d	13,60 ± 0,51 ^{b*}
0,5	26,00 ± 0,55 ^b	16,20 ± 0,20 ^a
1,0	33,60 ± 0,75 ^a	13,00 ± 0,32 ^b
1,5	34,80 ± 0,86 ^a	7,80 ± 0,37 ^d
2,0	22,00 ± 0,71 ^c	10,60 ± 0,24 ^c

*Các chữ cái a, b, c, d trong cùng một cột chỉ sự khác biệt có ý nghĩa với độ tin cậy 95%



Hình 5: Ảnh hưởng của NAA đến khả năng tạo rễ của sâm bố chính

A; B; C; D; E tương ứng với nồng độ NAA: 0; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 mg/L

4 KẾT LUẬN

NaClO 15% thích hợp cho quá trình khử trùng hạt và đốt thân sâm bó chính để thu nhận nguồn mẫu *in vitro*, với thời gian khử trùng là 15 phút. Tiền xử lý hạt với dung dịch GA₃ ở nồng độ 20 mg/L trong 120 phút giúp nâng cao tỷ lệ nảy mầm và chiều cao của cây con. Môi trường thích hợp cho quá trình nhân nhanh chồi sâm bó chính là môi trường MS có bổ sung 2 mg/L BA, 30 g/L sucrose, 100 mL/L nước dừa, pH 5,8. Môi trường thích hợp cho quá trình phát sinh rễ tạo cây con hoàn chỉnh là MS có bổ sung 1 mg/L NAA, 30 g/L sucrose, 8 g/L agar, pH 5,8.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Đỗ Tất Lợi, 2004. Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam. NXB Y Học, 813 trang.

Lin, L.C., Satish, M.N., Vanisree, M., Yeh, M. and Sheng, H., 2003. Micropropagation of *Polygonum multiflorum* THUNB and quantitative analysis of the anthraquinones emodin and physcion formed in *in vitro* propagated shoots and plants. *Biol Pharm Bull.* 26(10): 1467-1471.

Murashige, T. and Skoog, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum.* 15: 473-497.

Nguyễn Văn Việt, Bùi Văn Thắng, Nguyễn Thị Hương và Nguyễn Thị Thu Hằng, 2016. Ứng

dụng kỹ thuật nuôi cấy *in vitro* trong nhân giống quế lan hương (*Aerides odorata* Lour.). *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Lâm nghiệp.* 6: 162-169.

Phan Duy Hiệp, Nguyễn Trí Minh, Phan Xuân Huyền, Cao Đình Hùng, Đinh Văn Khiêm và 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 sâm bó chính (*Hibiscus sagittifolius* Kurz) trong điều kiện *in vitro*. *Tạp chí Công Nghệ Sinh Học.* 36(1se): 266-271.

Trần Công Luận và Bùi Trần Minh Phương, 2011. Khảo sát thành phần hóa học của rễ cây sâm bó chính (*Hibiscussagittifolius* Kurz. Malvaceae) trồng ở Bạc Liêu. *Tạp chí Dược Liệu.* 5: 339-441.

Vũ Hoài Sâm, Bùi Đức Quỳnh, Nguyễn Thị Hương và Nguyễn Văn Khiêm, 2016. Nhân cứu nhân giống *in vitro* cây bách hợp (*Lilium brownii* F. E. Brown). *Tạp chí Công nghệ Sinh học.* 14(1): 121-129.

Wesely, E.G., Johnson, M.A., Mohanamathi, R.B. and Kavitha, M.S., 2012 *In vitro* clonal propagation of *Achyranthes aspera* L. and *Achyranthes bidentata* Blume using nodal explants. *Asian Pac J Trop Biomed.* 2(1): 1-5.

Yildiz, M. and Er, C., 2002. The effect of sodium hypochlorite solutions on *in vitro* seedling growth and shoot regeneration of Flax (*Linum usitatissimum*). *Naturwissenschaften.* 89: 259-261.