

NGHIÊN CỨU HÌNH THÁI, GIẢI PHẪU VÀ PHƯƠNG PHÁP KHỬ TRÙNG TẠO MẪU SẠCH PHỤC VỤ NHÂN GIỐNG *IN VITRO* CÂY DƯƠNG ĐỒNG *Adinandra* sp.

Nguyễn Thị Thu Nga¹, Phan Thị Mai¹,

Đào Thị Thu Hà¹, Phạm Thị Hòa², Nguyễn Hữu Quân^{1*}

¹Trường Đại học Sư phạm – ĐH Thái Nguyên, ²Trường Cao đẳng Hải Dương

TÓM TẮT

Chi Dương đồng (*Adinandra*) là cây dược liệu quý chứa nhiều hợp chất có hoạt tính kháng viêm, chống oxy hóa, phòng và điều trị ung thư. Ở Việt Nam, cây Dương đồng *Adinandra* sp. phân bố hẹp ở một số tỉnh như Lào Cai, Vĩnh Phúc, Quảng Trị, Hà Giang, Lâm Đồng. Gần đây, chi Dương đồng đã được đưa vào danh sách là một trong những cây thuộc danh lục đỏ cây thuốc Việt Nam. Một trong những biện pháp nhân giống hiệu quả để bảo tồn và phát triển nguồn gen các cây thuốc quý đang bị đe dọa là phương pháp nuôi cấy *in vitro*. Trong nghiên cứu này, cây Dương đồng *Adinandra* sp. thu tại xã Liêm Phú, huyện Văn Bàn, tỉnh Lào Cai, Việt Nam được chúng tôi mô tả đặc điểm hình thái, tiến hành giải phẫu thân và lá để nhận diện loài. Hạt của cây Dương đồng *Adinandra* sp. được xác định là nguồn vật liệu ban đầu sử dụng trong nuôi cấy *in vitro*. Nghiên cứu tạo mẫu sạch cho thấy, mẫu hạt sau khi được khử trùng sơ bộ bằng ethanol 70° trong 1 phút, sau đó khử trùng bằng dung dịch HgCl₂ 0,1% trong 12 phút cho hiệu quả tạo mẫu sạch tốt nhất. Mẫu hạt sau khử trùng được nuôi cấy trên môi trường MS, tỉ lệ mẫu sạch đạt 91%, tỉ lệ mẫu phát sinh chồi đạt 87,33% sau 6 tuần nuôi cấy, chất lượng chồi tốt, chồi mập, màu xanh đậm.

Từ khóa: Cây Dương đồng *Adinandra* sp.; giải phẫu; hình thái; khử trùng; nhân nhanh *in vitro*.

Ngày nhận bài: 04/5/2020; Ngày hoàn thiện: 09/6/2020; Ngày đăng: 11/6/2020

STUDY ON MORPHOLOGY, ANATOMY AND DISINFECTION METHOD TO PREPARE CLEAN EXPLANTS FOR *IN VITRO* PROPAGATION OF *Adinandra* sp.

Nguyen Thi Thu Nga¹, Phan Thi Mai¹,

Dao Thi Thu Ha¹, Pham Thi Hoa², Nguyen Huu Quan^{1*}

¹TNU - University of Education, ²Hai Duong college

ABSTRACT

Genus *Adinandra* is a medicinal plant containing a wide range of pharmacologically active compounds that can be used in anti-inflammatory, antioxidant, prevention and treatment of cancer. This plant nowadays can be found distribution in some limited areas of provinces such as Lao Cai, Vinh Phuc, Quang Tri, Ha Giang, Lam Dong. Recently, *Adinandra* is listed in the Viet Nam's Red list of threatened species. The only effective way of artificial propagation to preserve and develop this genetic resource is the tissue culturing method. This study on the geographic distribution, morphological and anatomical conditions of the *Adinandra* sp. found in Liem Phu commune, Van Ban district, Lao Cai province, Vietnam. In this study, *Adinandra* is successfully propagated *in vitro* by using seeds as starting materials. These materials are sterilized using different chemical substances at different periods of time. After sterilizing materials in ethanol 70° for 1 minute then in HgCl₂ 0.1% solution for 12 minutes gives us the best performance of making clean samples. The disinfected samples then are cultivated in MS medium, clean samples proportion reaches its value 91%, the percentage of shoots generated 87.33% after 6 weeks of cultivating, the shoots are plump, deep green and have good quality.

Keywords: *Adinandra* sp.; anatomy; morphological; sterilization; *in vitro* propagation.

Received: 04/5/2020; Revised: 09/6/2020; Published: 11/6/2020

* Corresponding author. Email: quannh@tnue.edu.vn

1. Đặt vấn đề

Theo Phạm Hoàng Hộ (1999) trong “Cây cỏ Việt Nam” đã thống kê được 11 loài thực vật thuộc chi Dương đồng (Adinandra), họ Chè (Theaceae) được xác định là nguồn gen hiếm và phân bố ở một số tỉnh như Lào Cai, Vĩnh Phúc, Quảng Trị, Hà Giang, Lâm Đồng [1]. Các loài thuộc chi Dương đồng (Adinandra) chứa các hợp chất thứ cấp có hoạt tính kháng khuẩn, kháng viêm, chống oxy hóa, diệt các gốc tự do và chống ung thư [2]-[4]. Đặc biệt, flavonoid có trong lá của loài *Adinandra nitida* được chứng minh có hoạt tính chống oxy hóa, diệt trừ các gốc tự do, kháng viêm, chống trầm cảm, chống ung thư và tiêu diệt một số loài vi khuẩn gây bệnh [5]. Một số loài thuộc chi Dương đồng có chứa tinh dầu là chất có vai trò quan trọng trong lĩnh vực y học. Nhờ các hợp chất có trong cây mà ngành y học cổ truyền đã sử dụng các loài đó làm thuốc điều trị một số bệnh ung thư, đau dạ dày, rắn cắn [6].

Trước tình trạng người dân phá rừng tại các tỉnh miền núi Lào Cai, Hà Giang đã khiến cho nguồn gen cây Dương đồng đứng trước tình trạng khan hiếm, có nguy cơ cạn kiệt. Do đó, công tác bảo tồn và phát triển nguồn gen các loài cây này rất cần thiết. Các phương pháp nhân giống có thể thực hiện bằng nhiều biện pháp truyền thống như chiết cành, ghép cành và gieo hạt. Tuy nhiên, hiệu quả bảo tồn một số giống cây bằng phương pháp truyền thống chưa cao, do khó khăn trong chọn cành chiết - ghép, cũng như tỉ lệ hạt nảy mầm yếu. Để khắc phục hạn chế trên, kỹ thuật nuôi cấy mô tế bào thực vật đã được ứng dụng, chứng minh có hiệu quả trong công tác bảo tồn một số giống cây được liệt.

Kỹ thuật nuôi cấy mô tế bào thực vật đang được ứng dụng rộng rãi trong việc nhân giống nhằm bảo tồn và phát triển nhiều loại cây trồng bao gồm cả những cây dược liệu quý [7]. Một số loài cây quý hiếm có nguy cơ tuyệt chủng, có giá trị kinh tế cao như Ba kích

(*Morinda officinalis*), Đinh lăng (*Polyscias fruticosa*), Hà thủ ô đỏ (*Fallopia multiflora*), Đan sâm (*Salvia miltiorrhiza* Bunge), Bách hợp (*Ligusticum* F.E.Br ex Mieliez) [8], Ô đầu (*Aconitum carmichaelii*) [7] đã được nhân giống thành công bằng kỹ thuật nuôi cấy mô. Các nghiên cứu tập trung hoàn thiện quy trình bảo tồn *in vitro*, xác định môi trường nhân nhanh làm tiền đề cho các nghiên cứu chuyên sâu và sản xuất giống có năng suất chất lượng cao [8]. Tuy nhiên, cho đến nay nghiên cứu về nuôi cấy *in vitro* đối với các loài thuộc chi Dương đồng, họ Chè vẫn chưa được thực hiện ở Việt Nam và trên thế giới. Bài báo này công bố kết quả thu thập, nhận diện cây Dương đồng *Adinandra* sp. và bước đầu tìm kiếm công thức khử trùng, tạo mẫu sạch *in vitro* từ các nguồn nguyên liệu khác nhau.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu và môi trường nuôi cấy

Mẫu hạt và thân cây Dương Đồng *Adinandra* sp. thu thập tại xã Liêm Phú, huyện Văn Bàn, tỉnh Lào Cai, Việt Nam ở độ cao 1200-1800m làm vật liệu nuôi cấy ban đầu.

Hóa chất sử dụng trong thí nghiệm đều ở dạng tinh khiết, gồm: Ethanol, dung dịch Javen, HgCl₂ (Trung Quốc); Môi trường MS (Merck).

2.2. Phương pháp thu thập và nhận diện mẫu cây Dương đồng *Adinandra* sp.

Mẫu cây Dương đồng *Adinandra* sp. sử dụng trong nghiên cứu được thu tại xã Liêm Phú, huyện Văn Bàn, tỉnh Lào Cai, Việt Nam ở độ cao 1200-1800m, tọa độ 21°59'15"N; 104°19'28"E. Mẫu tiêu bản (cành mang lá và hoa) được thu thập, mang về phòng thí nghiệm để ép khô xác định tên khoa học. Tên khoa học của loài được xác định bằng phương pháp hình thái so sánh theo các tài liệu chuyên khảo: Cây cỏ Việt Nam của Phạm Hoàng Hộ (1999) và website <http://www.tropicos.org/> để tra cứu mẫu.

Nghiên cứu cấu tạo giải phẫu thân và lá của cây Dương đồng *Adinandra* sp. theo phương

pháp của Nguyễn Bá (2009) [9]. Mẫu thân và lá được cắt thành những lát mỏng, sau đó tiến hành nhuộm kép và quan sát, chụp ảnh mẫu vật trên kính hiển vi quang học kết nối với phần mềm Microscope Manager ở các độ phóng đại khác nhau.

2.3. Phương pháp khử trùng tạo mẫu sạch

Tạo mẫu sạch *in vitro* từ thân của cây Dương đồng

Đoạn thân được cắt bỏ lá, rửa sạch dưới vòi nước máy, sau đó rửa với nước xà phòng loãng trong thời gian từ 20-30 phút, tiếp tục rửa dưới vòi nước máy cho đến khi hết xà phòng. Mẫu thân được rửa lại bằng nước cất vô trùng 2 lần và khử trùng bằng cồn 70° trong 1 phút. Sau đó, mẫu được khử trùng bằng dung dịch Javen 60%; HgCl₂ 0,1% và H₂O₂ 15% trong các khoảng thời gian khác nhau là 10; 15; 20; 25 và 30 phút. Mẫu sau khi khử trùng được đưa vào nuôi trong môi trường MS bổ sung sucrose 3% và agar 0,9% [10].

Tạo mẫu sạch *in vitro* từ hạt của cây Dương đồng

Tách bỏ vỏ cứng, hạt bên trong quả được lấy đưa vào ống falcon thể tích 15 ml đã được khử trùng. Khử trùng hạt bằng cồn 70° lắc đều trong 1 phút, sau đó khử trùng hạt bằng dung dịch Javen 60%; HgCl₂ 0,1% ở các ngưỡng thời gian khác nhau. Mẫu hạt sau khử trùng được cấy vào môi trường MS có bổ sung sucrose 3% và agar 0,9% [11].

Khử trùng bằng khí Clo: Hạt được lấy ra khỏi quả đặt vào giấy thấm và đưa vào bình hút chân không. Lấy 25 ml dung dịch Javen vào cốc thủy tinh đặt trong bình hút chân không, đậy nắp bình. Bổ sung 5ml dung dịch HCl đặc vào cốc thủy tinh chứa dung dịch Javen đặt trong bình hút chân không, dán kín miệng bình bằng giấy paraffin. Sau các khoảng thời gian khử trùng (3 giờ; 4 giờ; 5 giờ và 6 giờ) lấy mẫu cho vào ống falcon đã được khử trùng, đậy nắp và đưa vào box cấy. Tiến hành

gieo hạt vào môi trường MS bổ sung sucrose 3% và agar 0,9% [11].

Quá trình khử trùng mẫu được tiến hành trong box cấy vô trùng, theo dõi các chỉ tiêu gồm: Tỷ lệ mẫu sạch (%), tỷ lệ mẫu bị nhiễm (%), tỷ lệ mẫu sạch nảy mầm (%); chất lượng chồi từ các mẫu nuôi cấy.

Tỷ lệ mẫu sạch (%) = (Số mẫu sạch/Tổng số mẫu thí nghiệm) x 100

Tỷ lệ mẫu bị nhiễm (%) = (Số mẫu bị nhiễm/Tổng số mẫu thí nghiệm) x 100

Tỷ lệ mẫu sạch nảy mầm (%) = (Số mẫu nảy mầm/Tổng số mẫu sạch) x 100

2.4. Phương pháp phân tích và xử lý số liệu

Các thí nghiệm được lặp lại 3 lần, số liệu nghiên cứu được xử lý thống kê bằng phần mềm Microsoft Excel với mức ý nghĩa $\alpha = 0,05$.

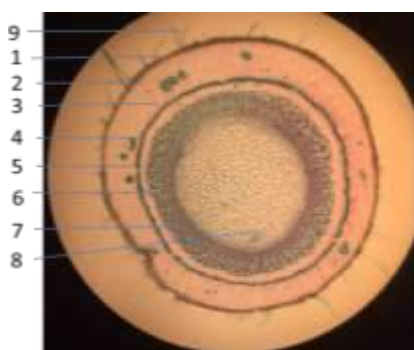
3. Kết quả và thảo luận

3.1. Thu thập và nhận diện mẫu cây Dương đồng *Adinandra sp.*

Mẫu cây Dương đồng *Adinandra sp.* thu tại xã Liêm Phú, huyện Văn Bàn, tỉnh Lào Cai được nhận diện bằng quan sát hình thái, giải phẫu thân và lá. Hình 1 cho thấy, Cây Dương đồng *Adinandra sp.* là cây thân gỗ, thường xanh, cao khoảng 8-10 m. Thân màu nâu, có lông bao phủ. Cuống lá dài khoảng 0,5-0,7 cm; thô ráp; lá đơn mọc cách. Phiến lá bản to, hình thuôn dài, dài khoảng 25-30 cm và rộng 8-12 cm. Lá có màu xanh lục khi tươi, màu nâu khi khô, mặt trên nhẵn, mặt dưới có lông bao phủ. Gốc lá tròn hoặc nhọn, chóp lá có mũi nhọn, dài khoảng 1,2-1,4 cm. Gân lá hình lông chim, gân bên rõ, có khoảng 20-25 cặp, gân giữa mặt trên có rãnh nông, mặt dưới hơi lồi. Hoa mọc ở nách lá, cuống hoa dài 1-2 cm. Nụ hoa hình cầu, đường kính khoảng 1,5 cm. Cây ra hoa vào mùa hè, thời gian từ tháng 5 đến tháng 8 hàng năm.



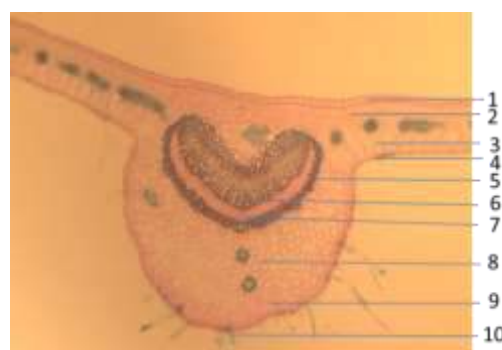
Hình 1. Hình thái của cây Dương đồng *Adinandra* sp.
A. Cây hoàn chỉnh, B. Đoạn cành, C. Lá, D. Nụ hoa



Hình 2. Giải phẫu cắt ngang thân cây Dương đồng *Adinandra* sp.

1. Lớp biểu bì, 2. Mô dày xốp, 3. Mô mềm vỏ, 4. Mô cứng, 5. Libe, 6. Tầng phát sinh, 7. Gỗ, 8. Mô mềm ruột, 9. Lông che chở

Lát cắt ngang của thân cây Dương đồng *Adinandra* sp. gồm: biểu bì (dày khoảng 10 μ m) gồm những tế bào hình trứng xếp sát nhau, hóa bản, bắt màu xanh nằm ngoài cùng; Mô dày xốp gồm 3-4 lớp tế bào hình tròn hoặc hình trứng xếp sát nhau, bắt màu hồng, có chức năng nâng đỡ; có màng sơ cấp dày, không hóa gỗ; Mô mềm vỏ gồm 6-8 lớp tế bào hình trứng, không có diệp lục, to hơn các tế bào mô dày, xếp thưa để lại nhiều khoảng gian bào; Lớp mô cứng (dày khoảng 22-50 μ m) gồm những tế bào thứ cấp có màng dày hóa gỗ tập trung thành một vòng, đảm nhiệm chức năng cơ học; Libe gồm những tế bào hình đa giác, xếp sát nhau, bắt màu hồng, có màng mỏng, phân hóa hướng tâm; Tầng phát sinh gồm các tế bào sống, hình chữ nhật phân chia theo hướng tiếp tuyến cho ra gỗ thứ cấp ở phía trong và libe thứ cấp ở phía ngoài; Gỗ gồm 5-6 lớp tế bào, bắt màu xanh, xếp thành vòng tròn liên tục. Hệ dẫn của thân điển hình của cây hai lá mầm gồm gỗ và libe phát triển



Hình 3. Giải phẫu cắt ngang phiến lá cây Dương đồng *Adinandra* sp.

1. Biểu bì trên; 2. Mô giậu; 3. Mô xốp; 4. Biểu bì dưới; 5. Vòng mô cứng; 6. Gỗ; 7. Libe; 8. Mô mềm; 9. Mô dày; 10. Lông che chở

thành vòng liên tục, phần gỗ phát triển với nhiều mạch gỗ và mô mềm gỗ, mạch có hình đa giác xen lẫn với các tế bào mô mềm gỗ bao quanh; Mô mềm ruột gồm các tế bào tròn cạnh, có kích thước khác nhau chiếm phần lớn diện tích; Lông che chở nằm phía ngoài lớp biểu bì có tác dụng ngăn cản sự thoát hơi nước, màu trắng sáng chống hạn bằng cách giữ ẩm ở các khoảng trống chân lông (Hình 2).

Lát cắt ngang của lá cây Dương đồng *Adinandra* sp. gồm: Biểu bì trên là những tế bào hình chữ nhật nằm ngang, vách thẳng, xếp sát nhau và không có lục lạp; Mô giậu gồm 2-3 lớp tế bào dài, xếp sát nhau, thẳng vuông góc với bề mặt cơ quan, ít có khoảng gian bào, nằm tiếp giáp ngay dưới biểu bì trên, chứa nhiều lục lạp, kích thước dày khoảng 11-15 μ m; Mô xốp có 4-6 lớp tế bào mô mềm gồm các tế bào hình bầu dục, to hơn các tế bào mô dày, xếp thưa hơn để lại nhiều khoảng gian bào, gồm các tế bào dày khoảng 10 μ m, có chức năng dự trữ dinh dưỡng; Biểu

bì dưới dày khoảng 8µm, gồm 2-3 lớp tế bào sống bắt màu đỏ đậm, có hình đa giác, vách dày, có nhiệm vụ bảo vệ các tế bào bên trong, có lông che chở; Vòng mô cứng gồm những tế bào có vách dày, xếp liền nhau tạo thành vòng hình cung, đảm nhiệm chức năng cơ học của lá; Gỗ sơ cấp gồm 8-9 lớp tế bào hình chữ V, bắt màu xanh, có kích thước khác nhau, nằm phía trong libe; Lớp libe sơ cấp gồm các tế bào sống bắt màu hồng, hình đa giác, nhỏ, xếp sát nhau; Lớp mô mềm gồm 10-11 lớp tế bào có kích thước không đồng đều chiếm phần lớn diện tích; Mô dày gồm 2-3 lớp tế bào sống bắt màu đỏ đậm, có hình đa giác, vách dày; Lông che chở là những tế bào mọc dài ra ngoài để tăng cường vai trò bảo vệ, hoặc để giảm bớt sự thoát hơi nước (Hình 3).

Như vậy, mẫu cây Dương đồng *Adinandra* sp. thu thập đã được nhận diện thông qua quan sát hình thái và giải phẫu. Hạt và đoạn thân mang chồi nách của loài này được chúng tôi sử dụng để khảo sát công thức khử trùng phục vụ cho quá trình tạo vật liệu khởi đầu trong nuôi cấy *in vitro* và làm cơ sở để tạo mẫu sạch phục vụ cho các nghiên cứu tiếp theo.

3.2. Kết quả khử trùng mẫu từ đoạn thân của cây Dương đồng

Kết quả xử lý đoạn thân mang chồi nách với cồn 70° và các dung dịch Javen 60%; HgCl₂ 0,1%; H₂O₂ 15% trong các khoảng thời gian

khử trùng là 10; 15; 20; 25; 30 phút sau 6 tuần nuôi cấy cho thấy tỉ lệ mẫu bị nhiễm nấm mốc khá cao (Bảng 1). Tất cả các mẫu cây từ đoạn thân sau khi được khử trùng bằng dung dịch Javen 60%; HgCl₂ 0,1% và H₂O₂ 15% ở các khoảng thời gian từ 10-30 phút đều chưa tái sinh tạo chồi. Tuy nhiên, mẫu cây sau khi khử trùng bằng dung dịch Javen 60% có biểu hiện khỏe mạnh, có sức sống hơn các chất khử trùng khác như H₂O₂ 15% và HgCl₂ 0,1%. Như vậy, trong nghiên cứu này, sử dụng Javen 60%; HgCl₂ 0,1% và H₂O₂ 15% khử trùng mẫu đoạn thân trong các khoảng thời gian khác nhau, đều chưa thu được kết quả khả quan, các mẫu sau khử trùng đều không tái sinh chồi sau 6 tuần nuôi cấy.

Năm 2008, Osono đã chỉ ra nguyên nhân nhiễm nấm mốc khi tiến hành nuôi cấy *in vitro* loài trà *Camellia japonica* là do trên thân có chứa nhiều lông tơ, có chứa nấm nội sinh và cộng sinh nên rất khó diệt bằng hóa chất khử trùng [12]. Danso và cộng sự (2011) cho rằng khi tăng thời gian khử trùng mẫu đã làm giảm tỉ lệ sống của mẫu [13]. Trong nghiên cứu của chúng tôi khi tăng thời gian xử lý mẫu bằng hóa chất khử trùng đã làm giảm tỉ lệ nhiễm nấm, tuy nhiên tỉ lệ nhiễm còn cao do nấm nội sinh và cộng sinh bên trong đoạn thân.

Bảng 1. Kết quả tạo nguồn vật liệu ban đầu từ đoạn thân mang chồi nách

Chất khử trùng	Thời gian khử trùng (phút)	Tỉ lệ mẫu chết (%)	Tỉ lệ mẫu sống (%)	Tỉ lệ mẫu sống bị nhiễm (%)	Tỉ lệ mẫu sạch tái sinh tạo chồi (%)	
Cồn 70° trong vòng 1 phút	Javen 60%	10	5,67±0,88	94,33±0,88	100	0
		15	14,67±0,88	85,33±0,88	100	0
		20	34,33±1,45	65,67±1,45	90,67±0,33	0
		25	65,33±0,88	34,67±0,88	79,67±0,67	0
		30	84,67±0,88	15,33±0,88	60,00±1,00	0
	HgCl ₂ 0,1%	10	9,67±1,45	90,33±1,45	100	0
		15	19,67±0,88	81,33±0,88	100	0
		20	45,33±1,45	54,67±1,45	80,67±0,67	0
		25	56,33±1,85	43,67±1,85	70,00±1,00	0
		30	81,33±1,45	19,67±1,45	64,33±0,67	0
	H ₂ O ₂ 15%	10	14,00±1,00	86,00±1,00	100	0
		15	25,00±1,00	75,00±1,00	100	0
		20	46,67±0,88	54,33±0,88	81,00±1,00	0
		25	64,33±1,20	35,67±1,20	74,67±0,33	0
		30	85,33±1,20	14,67±1,20	61,00±1,52	0

3.3. Kết quả khử trùng mẫu từ hạt của cây Dương đồng *Adinandra sp.*

3.3.1. Kết quả khử trùng hạt bằng $HgCl_2$ 0,1%

Hạt được khử trùng sơ bộ bằng cồn 70° trong thời gian 1 phút, sau đó khử trùng bằng $HgCl_2$ 0,1% trong các khoảng thời gian khác nhau. Mẫu sau khi khử trùng cấy vào môi trường MS có bổ sung sucrose 3% và agar 0,9%. Kết quả bảng 2 và hình 4 (C, D) cho thấy, thời gian khử trùng và các chỉ tiêu nghiên cứu có sự khác nhau rõ rệt. Tỷ lệ mẫu sạch dao động từ 20,67-95,00% và đạt tỷ lệ cao nhất ở thời gian khử trùng 16 phút. Tỷ lệ mẫu bị nhiễm giảm dần khi tăng thời gian khử trùng. Khử trùng hạt bằng $HgCl_2$ 0,1% trong thời gian 12 phút, tỷ lệ hạt sạch này mầm cao (đạt 87,33%), hạt không nảy mầm ít (chiếm 12,67%), chồi đạt chất lượng tốt nhất. Khi tăng thời gian khử trùng lên 16 phút thì hạt nảy mầm thấp hơn tỷ lệ đạt 62,67%, chất lượng chồi kém.

Trong nhân giống *in vitro* các loài thuộc họ Chè, nhiều nghiên cứu đã sử dụng hạt làm vật

liệu ban đầu để nuôi cấy. Nghiên cứu của Nguyễn Thị Hương và Nguyễn Văn Việt (2017) đã sử dụng hạt từ loài Trà hoa vàng để nhân nhanh *in vitro* và cho thấy, hạt Trà hoa vàng khử trùng bằng $HgCl_2$ 0,1% trong 13 phút cho kết quả này mầm tốt nhất [14]. Tuy nhiên, công bố này chưa đề cập đến tỷ lệ nhiễm của mẫu. So với nghiên cứu của chúng tôi cho thấy, khử trùng hạt bằng $HgCl_2$ 0,1% trong thời gian 12 phút là vừa đủ, giúp khả năng tiêu diệt mầm bệnh tốt, đồng thời tác động nhẹ đến thành tế bào nên cho tỷ lệ sống cao và kích thích mẫu tái sinh. Tỷ lệ này mầm của hạt Dương đồng giảm khi kéo dài thời gian ngâm với $HgCl_2$ 0,1% có thể do $HgCl_2$ là chất độc, nếu kéo dài thời gian khử trùng, $HgCl_2$ có thể xâm nhập vào phôi làm cho hạt bị độc nên không thể tái sinh được. Như vậy, thời gian và cách thức khử trùng có ảnh hưởng khá lớn tới tỷ lệ sống của hạt.

3.3.2. Kết quả khử trùng hạt bằng dung dịch Javen 60%

Bảng 2. Ảnh hưởng của thời gian khử trùng hạt bằng $HgCl_2$ 0,1% đến sự nảy mầm của hạt

Công thức	Thời gian khử trùng (phút)	Tỷ lệ mẫu sạch (%)	Tỷ lệ mẫu nhiễm (%)	Tỷ lệ hạt sạch nảy mầm (%)	Tỷ lệ hạt sạch không nảy mầm (%)	Chất lượng mầm
CT1 (ĐC)	0	20,67±1,45	79,33±1,45	0	100	(+)
CT2	10	85,67±1,76	14,33±1,76	74,33±0,88	25,67±0,88	(++)
CT3	12	91,00±1,52	9,00±1,52	87,33±0,88	12,67±0,88	(+++)
CT4	14	91,33±2,02	8,67±2,02	67,33±1,45	32,67±1,45	(++)
CT5	16	95,00±1,15	5,00±1,15	62,67±1,20	37,33±1,20	(+)

Ghi chú: (+) cây nhỏ, lá màu xanh nhạt; (++) cây nhỏ, lá màu xanh đậm; (+++) cây mập, lá to màu xanh đậm.

Bảng 3. Ảnh hưởng của thời gian khử trùng hạt bằng dung dịch Javen 60% đến sự nảy mầm của hạt

Công thức	Thời gian khử trùng (phút)	Tỷ lệ mẫu sạch (%)	Tỷ lệ mẫu nhiễm (%)	Tỷ lệ hạt sạch nảy mầm (%)	Tỷ lệ hạt sạch không nảy mầm (%)	Chất lượng chồi
CT1 (ĐC)	0	20,33±0,88	79,67±0,88	0	100	(+)
CT2	10	87,33±1,45	12,67±1,45	59,27±0,63	40,73±0,63	(+)
CT3	11	91,33±0,67	8,67±0,67	64,73±0,37	35,27±0,37	(++)
CT4	12	93,67±0,67	6,33±0,67	80,60±0,30	19,40±0,30	(+++)
CT5	13	96,67±0,33	3,33±0,33	64,27±0,37	35,73±0,37	(++)
CT6	14	88,67±0,67	11,33±0,67	58,33±0,88	41,67±0,88	(+)
CT7	15	86,67±0,88	13,33±0,88	57,17±0,73	42,83±0,73	(+)

Ghi chú: (+) cây nhỏ, lá màu xanh nhạt; (++) cây nhỏ, lá màu xanh đậm; (+++) cây mập, lá to màu xanh đậm.

Hạt được lãc trong cồn 70° với thời gian 1 phút sau đó khử trùng bằng dung dịch Javen 60% ở các khoảng thời gian khác nhau. Kết quả bảng 3 và hình 4 (E, F) cho thấy, tỷ lệ mẫu sạch dao động từ 20,33-96,67% và cao

nhất ở thời gian khử trùng 13 phút; tỷ lệ mẫu nhiễm dao động từ 3,33-79,67%. Trong đó, thời gian khử trùng 12 phút cho tỷ lệ hạt sạch nảy mầm cao nhất đạt 80,6%, hạt không nảy mầm ít (chiếm 19,4%) và chồi đạt chất lượng tốt

nhất. Khi tăng thời gian khử trùng lên 15 phút thì tỉ lệ hạt sạch nảy mầm chỉ còn 57,17%, tỉ lệ hạt không nảy mầm là 42,83% và chồi có chất lượng kém.

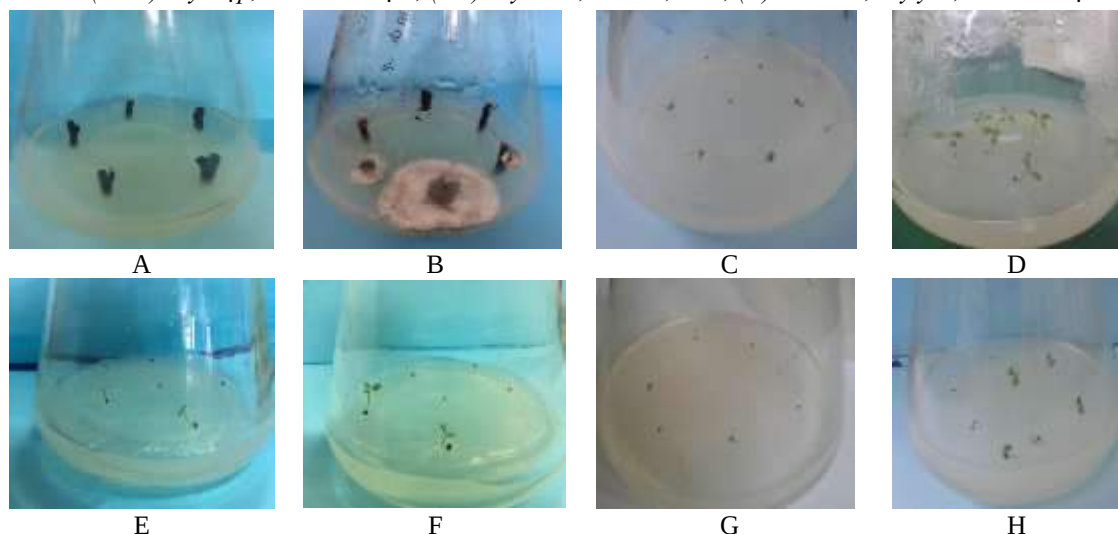
Trong nghiên cứu nhân nhanh *in vitro* loài *Camellia sinensis*, Mondal và cộng sự (1998) đã khử trùng hạt bằng NaClO 4% trong thời gian 20 phút cho kết quả nảy mầm cao nhất [15]. Trong khi, Nguyễn Văn Kết và cộng sự (2014) khi khảo sát khả năng nhân giống cây Trà my hoa đỏ (*Camellia piquetiana* (Pierre) Sealy) *in vitro* nhân thấy, kết quả khử trùng

hạt bằng $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ 7% trong 20 phút cho khả năng nảy mầm cao nhất [16]. Như vậy, thời gian khử trùng hạt ở hai công bố trên đều dài hơn so với nghiên cứu của chúng tôi. Tuy nhiên, các công bố trên lại không đề cập đến tỉ lệ nhiễm của mẫu. Nghiên cứu của chúng tôi cho thấy, khử trùng hạt trong dung dịch Javen 60% ở thời gian 12 phút là vừa đủ, vừa có khả năng tiêu diệt mầm bệnh, lại tác động nhẹ đến thành tế bào nên cho tỉ lệ hạt sống cao và kích thích mẫu tái sinh.

Bảng 4. Ảnh hưởng của thời gian khử trùng hạt bằng khí Clo đến sự nảy mầm của hạt

Công thức	Thời gian khử trùng (giờ)	Tỉ lệ mẫu sạch (%)	Tỉ lệ mẫu nhiễm (%)	Tỉ lệ hạt sạch nảy mầm (%)	Tỉ lệ hạt sạch không nảy mầm (%)	Chất lượng chồi
CT1 (ĐC)	0	19,67±1,20	81,33±1,20	0	100	(+)
CT2	3	71,67±0,88	29,33±0,88	45,57±0,29	54,43±0,29	(++)
CT3	4	71,67±0,67	29,33±0,67	58,97±0,59	41,03±0,59	(++)
CT4	5	80,33±0,88	19,67±0,88	64,93±0,64	35,07±0,64	(++)
CT5	6	85,67±0,67	14,33±0,67	80,17±0,44	19,83±0,44	(+++)

Ghi chú: (+++) cây mập, lá to xanh đậm; (++) cây xanh, lá khô, lá to; (+) chồi xấu, cây yếu, lá xanh nhạt.



Hình 4. Hình ảnh nghiên cứu điều kiện khử trùng tạo mẫu sạch cây Dương đồng *Adinandra* sp.

- A. Đoạn thân mang chồi nách khử trùng bằng Javen 60% sau 2 tuần
- B. Đoạn thân mang chồi nách khử trùng bằng Javen 60% sau 6 tuần
- C. Hạt cây Dương đồng khử trùng bằng HgCl_2 0,1% nảy mầm sau 4 tuần
- D. Hạt cây Dương đồng khử trùng bằng HgCl_2 0,1% nảy mầm sau 6 tuần
- E. Hạt cây Dương đồng khử trùng bằng Javen 60% nảy mầm sau 4 tuần
- F. Hạt cây Dương đồng khử trùng bằng Javen 60% nảy mầm sau 6 tuần
- G. Hạt Dương đồng khử trùng bằng khí Clo (Hạt nảy mầm khi được khử trùng trong 3 giờ)
- H. Hạt Dương đồng khử trùng bằng khí Clo (Hạt nảy mầm khi được khử trùng trong 6 giờ)

3.3.3. Kết quả khử trùng hạt bằng khí Clo

Hạt được đưa vào trong bình hút chân không để khử trùng, sau các thời gian 0 giờ; 3 giờ; 4 giờ; 5 giờ; 6 giờ lấy mẫu hạt đưa vào box cấy

và gieo vào môi trường MS có bổ sung đường sucrose 3% và thạch agar 0,9%. Sau 8 tuần theo dõi, kết quả thí nghiệm khử trùng tạo mẫu sạch thu được ở bảng 4 và hình 4 (G, H).

Kết quả cho thấy, sử dụng khí Clo khử trùng tạo mẫu sạch ở các khoảng thời gian 0; 3; 4; 5 và 6 giờ cho tỉ lệ hạt sạch dao động từ 19,67-85,67%, hạt sạch này mầm cao nhất ở thời gian khử trùng 6 giờ (tỉ lệ nảy mầm đạt 80,17%); trong khi ở thời gian khử trùng 3 giờ tỉ lệ hạt sạch nảy mầm thấp đạt 45,57%, tỉ lệ hạt sạch nảy mầm khi không khử trùng là 0%. Tỉ lệ hạt sạch không nảy mầm dao động từ 19,83-100%. Như vậy, thời gian khử trùng mẫu càng dài thì tỉ lệ hạt sạch không nảy mầm sẽ giảm và tỉ lệ hạt nhiễm cũng giảm. Ở thời gian khử trùng 6 giờ chồi mọc khỏe, mập; thời gian khử trùng 3 giờ chất lượng chồi kém hơn.

Trong nhân giống *in vitro* các loài thuộc họ Chè, nhiều nghiên cứu đã sử dụng hạt làm vật liệu ban đầu để nuôi cấy. Tuy nhiên, chưa có công bố nào nghiên cứu về việc sử dụng khí Clo để khử trùng tạo mẫu sạch.

4. Kết luận

Bằng quan sát hình thái đã nhận diện được mẫu cây Dương đồng *Adinandra* sp. thu tại xã Liêm Phú, huyện Văn Bàn, tỉnh Lào Cai. Bước đầu xác định được công thức khử trùng hạt của cây Dương đồng *Adinandra* sp. bằng $HgCl_2$ 0,1% cho kết quả tốt nhất với tỉ lệ hạt sạch nảy mầm cao đạt 87,33%; tỉ lệ hạt nhiễm thấp hơn đạt 9% và chất lượng chồi tạo thành tốt.

Lời cảm ơn

Nghiên cứu này được tài trợ bởi Bộ Giáo dục và Đào tạo, trong đề tài mã số B2019-TNA-08.

TÀI LIỆU THAM KHẢO/ REFERENCES

- [1]. H. H. Pham, *An Illustrate Flora of Vietnam*. Young Publishing, 1999, vol. 11.
- [2]. R. El-Haggar, and R. I. Al-Wabli, "Anti-Inflammatory screening and molecular modeling of some novel coumarin derivatives," *Molecules*, vol. 20, pp. 5374-5391, 2015.
- [3]. H. Gao, B. Liu, F. Liu, and Y. Chen, "Anti-Proliferative Effect of Camellianin A in *Adinandra nitida* Leaves and Its Apoptotic Induction in Human Hep G2 and MCF-7 Cells," *Molecules*, vol. 15, pp. 3878-3886, 2010.
- [4]. Y. Shi, and C. Zhou, "Synthesis and evaluation of a class of new coumarin triazole derivatives as potential antimicrobial agents," *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, vol. 21, pp. 956-960, 2011.
- [5]. B. Liu, Y. Ma, Y. Liu, Z. Yang, and L. Zhang, "Ultrasonic-Assisted Extraction and Antioxidant Activity of Flavonoids from *Adinandra nitida* leaves," *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, vol. 12, no. 6, pp. 1045-1051, 2013.
- [6]. V. C. Vo, *Vietnamese medicinal plant dictionary (new episode)*. Medical Publishing House, 2012.
- [7]. H. Q. Nguyen, T. T. H. Hoang, T. H. Tran, T. T. T. Vu, D. T. Sy, H. M. Chu, and T. N. L. Nguyen, "In vitro multiple shoot regeneration and hairy root induction of *Aconitum carmichaelii* Debex.-an important medicinal plant," *Sylwan*, vol. 164, no. 1, pp. 228-242, 2020.
- [8]. T. Nguyen, *Investigation of medicinal plants and conservation studies: Research medicine from herbs*. Science and Technology Publishing House, 2006.
- [9]. B. Nguyen, *Plant morphology (episode 1) and Plant morphology (episode 2)*. University and Secondary Publishing House, 1974-1975, 2009.
- [10]. Q. B. Dang, T. P. T. Nguyen, V. P. Nguyen, T. S. Dinh, T. T. Ninh, V. H. Nguyen, V. L. Tran, and T. T. L. Nguyen, "Establishment of In vitro Propagation Protocol for Golden *Camellia* (*Camellia* sp.)," *Vietnam J. Agri. Sci.*, vol. 15, no. 12, pp. 1664-1678, 2017.
- [11]. Q. Nguyen, and T. L. A. Nguyen, *Agricultural biotechnology*, Hanoi University of Education Publishing House, 2007.
- [12]. T. Osono, "Endophytic and epiphytic phyllosphere fungi of *Camellia japonica*: seasonal and leaf age - dependent variations," *Mycologia*, vol. 100, no. 3, pp. 387-391, 2008.
- [13]. K. Danso, E. Azu, W. Elegba, A. Asumeng, H. M. Amoatey, and G. Y. P. Klu, "Effective decontamination and subsequent plantlet regeneration of sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) in vitro," *International Journal of Integrative Biology*, vol. 11, no. 2, pp. 90-96, 2011.
- [14]. T. H. Nguyen, and V. V. Nguyen, "Micropropagation of *Camellia tampoensis* Ninh et Hakoda," *Journal of Forestry Science and Technology*, vol. 4, pp. 17-22, 2017.
- [15]. T. K. Mondal, A. Bhattacharya, A. Sood, and P. S. Ahuja, "Micropropagation of tea (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze) using thidiazuron," *Plant Growth Regulation*, vol. 26, no. 1, pp. 57-61, 1998.
- [16]. V. K. Nguyen, T. C. Nguyen, and T. T. Nguyen, "Propagation of *Camellia piquetiana* (Pierre) Sealy in vitro," *VNU Journal of Science*, vol. 30, no. 3, pp. 17-25, 2014.