

NGHIÊN CỨU QUÁ TRÌNH KHỬ MẪU VÀ HÌNH THÀNH MÔ SỢ
IN VITRO GIỐNG BONSAI LINH SAM SÔNG HÌNH 86
(*Desmodium unifoliatum* (Merr.) Steen.)

Nguyễn Thị Kim Triên^{1,*}, Nguyễn Khoa Lan², Văn Thị Phương Như¹,
Đào Lệ Tuyền¹, Nguyễn Khánh Hy¹

¹ Trường Đại học Phú Yên

² Trường Đại học Sư Phạm, Đại học Huế

*Email: nguyenthikimtrien@pyu.edu.vn

Ngày nhận bài: 19/08/2024; Ngày nhận đăng: 15/10/2024

Tóm tắt

Nghiên cứu này được thực hiện nhằm khảo sát ảnh hưởng của nồng độ Javel, thời gian khử trùng; môi trường dinh dưỡng và nồng độ α -NAA đến quá trình tạo mô sẹo giống Linh sam Sông Hình 86 (*Desmodium unifoliatum* (Merr.) Steen.). Kết quả nghiên cứu cho thấy mẫu Linh sam Sông Hình 86 được khử trùng ở nồng độ Javel 50% trong thời gian 8 phút sẽ cho tỷ lệ mẫu sạch cao nhất đạt 78,89%. Mô sẹo hình thành cao nhất (85,56% và 8,27 mm) trên môi trường $\frac{1}{2}$ MS bổ sung 30 g/L sucrose, 8 g/L agar và 0,7 mg/L α -NAA.

Từ khóa: *In vitro*, khử trùng, Linh sam Sông Hình 86, mô sẹo

Research on the sterilization and formation of *in vitro* callus of *desmodium unifoliatum* bonsai in Song Hình 86 (*Desmodium unifoliatum* (Merr.) Steen.)

Nguyen Thi Kim Trien^{1,*}, Nguyen Khoa Lan², Van Thi Phuong Nhu¹,
Dao Le Tuyen¹, Nguyen Khanh Hy¹

¹ Phu Yen University,

² University of Education, Hue University

Received: August 19, 2024; Accepted: October 15, 2024

Abstract

This study was conducted to investigate the effect of Javel concentration and sterilization time, nutrient medium, α -NAA concentration of callus formation process. Results showed that *Desmodium unifoliatum* (Merr.) Steen. sterilizing with Javel concentration 50% for 8 minutes was found to increase the survival rate of 78,89%. The best callus (85,56% and 8,27 mm) with $\frac{1}{2}$ MS medium added with 30g/L sucrose, 8,0 g/L agar and 0,7mg/L α -NAA.

Keywords: *In vitro*, sterilization, *Desmodium unifoliatum* (Merr.) Steen., callus

1. Đặt vấn đề

Linh sam là một trong những loại cây cảnh được đánh giá cao (Lê Văn Hoà, 2020), ưa chuộng nhất hiện nay và cũng không thể thiếu trong bộ sưu tập bonsai trong vườn kiếng của mọi người (Trần Bé Tâm, 2012). Linh sam (*Desmodium unifoliatum* (Merr.) Steen.) (Phạm Hoàng Hộ, 1999), ở vùng núi huyện Sông Hình, tỉnh Phú Yên là giống cây bản địa

được người dân chơi cây cảnh ghi nhận là bonsai có dáng đẹp, nhiều hoa và giá trị nhất trong các loại Linh sam.



Hình 1. Linh Sam Sông Hình 86 (*Desmodium unifoliatum* (Merr.) Steen.)

(Ảnh: Nguyễn Thị Kim Triển)

Hiện nay, Linh sam Sông Hình 86 được người dân tìm kiếm, khai thác về làm bonsai nên phân bố trong tự nhiên rất hiếm. Vì là cây thân gỗ, Linh sam sinh trưởng và phát triển khá chậm, chủ yếu được nhân giống bằng các phương pháp truyền thống như ghép cành, giâm hom, những phương pháp này có nguy cơ lây nhiễm bệnh đồng thời không đáp ứng đủ nhu cầu của thị trường do hạn chế về số lượng cây con tạo ra và độ đồng đều của tuổi cây.

Phương pháp nhân giống hữu tính bằng hạt tuy đơn giản nhưng quá trình thụ phấn tự nhiên không giữ được các đặc tính quý như mong muốn, không đồng nhất về mặt di truyền đồng thời rất khó thực hiện đối với giống Linh sam Sông Hình 86. Phương pháp vi nhân giống bằng nuôi cấy mô thực vật hiện nay đã rất phổ biến và mang lại nhiều lợi ích như nhân nhanh với số lượng lớn, đồng nhất và tạo cây con sạch bệnh, tạo cây giống chất lượng cao, tuy nhiên sử dụng phương pháp này đối với Linh Sam Sông Hình 86 còn rất hạn chế.

Vi nhân giống bao gồm nhiều giai đoạn: lựa chọn nguồn mẫu, thiết lập nguồn mẫu vô trùng, tạo mô sẹo, nhân nhanh chồi, tạo cây hoàn chỉnh và thuần hoá cây giống. Trong đó, khử trùng mẫu trong giai đoạn thiết lập nguồn mẫu vô trùng và tạo mô sẹo là bước vô trùng quan trọng và quyết định sự thành công của quá trình giống *in vitro* (Nguyễn Thị Kim Triển, 2018). Do đó, việc nghiên cứu nồng độ Javel, thời gian khử trùng hiệu quả nhất và các nghiên cứu hình thành mô sẹo *in vitro* trên Linh sam Sông Hình 86 là cần thiết.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu nghiên cứu

- Vật mẫu

Chồi Linh Sam Sông Hình 86 (*Desmodium unifoliatum* (Merr.) Steen.) được cung cấp và thu hái tại Hội Sinh vật cảnh Phú Yên.

- Môi trường nuôi cấy

Môi trường khoáng: ½WPM, WPM, ½MS, MS (Dương Công Kiên, 2003), mỗi môi trường có bổ sung 30 g/L sucrose, 8 g/L agar và chất kích thích sinh trưởng thực vật α -NAA (nồng độ tùy theo bố trí thí nghiệm). Môi trường được điều chỉnh pH là 5,8 trước khi

hấp khử trùng ở nhiệt độ 121°C, áp suất 1 atm trong thời gian 30 phút.

- Điều kiện nuôi cấy

Các thí nghiệm trong nghiên cứu này được thực hiện tại Phòng thí nghiệm Sinh học, Khoa Khoa học Tự nhiên, Trường Đại học Phú Yên.

Mẫu cây mô được nuôi cấy với thời gian chiếu sáng 16 giờ/ ngày, cường độ chiếu sáng 2000 lux, nhiệt độ $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$, độ ẩm trung bình khoảng 55-60%.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Khử trùng mẫu vật

Linh sam Sông Hinh 86 (*Desmodium unifoliatum* (Merr.) Steen.) sau khi thu hái được rửa sạch dưới vòi nước chảy, loại bỏ các phần bị hư hỏng, rửa sạch bằng xà phòng và nước cất vô trùng. Bên trong tủ cấy lần lượt thực hiện các bước: rửa nước cất khử trùng 3 lần, lắc mẫu cây với cồn 70° trong 30 giây, tiếp tục rửa bằng nước cất khử trùng 3 lần, ngâm Javel khử trùng (với nồng độ và thời gian tùy theo bố trí thí nghiệm). Thêm 2 giọt Tween 20 vào 100 ml dung dịch khử trùng để làm tăng độ tiếp xúc chất khử trùng vào mẫu Linh sam Sông Hinh 86. Cuối cùng, rửa lại 5 lần bằng nước cất vô trùng.

2.2.2. Cách đo kích thước mô sẹo

Trong tủ cấy vô trùng, mô sẹo lấy ra khỏi môi trường thí nghiệm và được đo bằng thước kẹp điện tử trên đĩa petri (đã khử trùng).

2.2.3. Bố trí thí nghiệm

- Khảo sát ảnh hưởng của nồng độ Javel và thời gian khử trùng đến hiệu quả khử trùng của mẫu Linh sam Sông Hinh 86.

Chúng tôi khảo sát hiệu quả khử trùng của Javel (NaOCl) với nồng độ lần lượt 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70% mỗi nồng độ Javel bố trí với 5 khoảng thời gian (2 phút, 4 phút, 6 phút, 8 phút và 10 phút).

Mẫu cây sau khi được khử trùng, cắt đoạn mẫu dài 2 cm chứa 2-3 chồi ngủ, cấy vào môi trường MS có bổ sung 30 g/L sucrose, 8 g/L agar.

- Khảo sát ảnh hưởng của môi trường dinh dưỡng khoáng đến khả năng hình thành mô sẹo của mẫu Linh sam Sông Hinh 86.

Chúng tôi khảo sát dấu hiệu hình thành mô sẹo trên 4 môi trường khoáng: $\frac{1}{2}$ WPM, WPM, $\frac{1}{2}$ MS, MS. Mẫu Linh sam Sông Hinh 86 *in vitro* có dấu hiệu xanh và không nhiễm vi sinh vật được cấy vào môi trường $\frac{1}{2}$ WPM, WPM; $\frac{1}{2}$ MS; MS. Trong mỗi môi trường khoáng có bổ sung 30 g/L sucrose, 8 g/L agar.

- Khảo sát ảnh hưởng của α -NAA lên sự hình thành mô sẹo từ mẫu Linh sam Sông Hinh 86.

Các mẫu Linh sam Sông Hinh 86 đã khử trùng được cấy vào môi trường khoáng tốt nhất ở thí nghiệm trên có bổ sung có bổ sung 30 g/L sucrose, 8 g/L agar và α -NAA với các nồng độ khác nhau (0,0; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6; 0,7; 0,8; 0,9 và 1,0 mg/L).

2.2.4. Xử lý số liệu

Số mẫu trong mỗi nghiệm thức là 30 mẫu, được thực hiện 3 lần lặp lại và kết quả báo cáo là giá trị trung bình.

Số liệu thí nghiệm được thu thập, tổng hợp, xử lý bằng phần mềm Microsoft Office Excel 2016 và phân tích thống kê bằng phần mềm Minitab.

3. Kết quả nghiên cứu và thảo luận

3.1. Ảnh hưởng của nồng độ Javel và thời gian khử trùng đến hiệu quả khử trùng của Linh sam Sông Hinh 86 (*Desmodium unifoliatum* (Merr.) Steen.)

Mẫu Linh sam Sông Hinh 86 sau khi thu hái được khử trùng Javel với nồng độ và thời gian khác nhau. Sau 2 tuần nuôi cấy, chúng tôi thu được kết quả được thể hiện ở Bảng 1.

Bảng 1. Kết quả tạo mẫu vô trùng của Linh Sam Sông Hinh 86 (*Desmodium unifoliatum* (Merr.) Steen.)

<i>unifoliatum</i> (Merr.) Steen.)	Thời gian khử trùng (phút)	Tỷ lệ sống (%)	Tình trạng mẫu cấy
Nồng độ Javel (%) 20	2	0,00 ^g	Nhiễm
	4	0,00 ^g	Nhiễm
	6	7,78 ^{fg}	Đa số mẫu nhiễm, mẫu xanh
	8	13,33 ^{efg}	Đa số mẫu nhiễm, mẫu xanh
	10	17,78 ^{ef}	Đa số mẫu nhiễm, mẫu xanh
30	2	0,00 ^g	Nhiễm
	4	0,00 ^g	Nhiễm
	6	12,22 ^{efg}	Đa số mẫu nhiễm, mẫu xanh
	8	14,44 ^{ef}	Đa số mẫu nhiễm, mẫu xanh
	10	21,11 ^{def}	Đa số mẫu chết, mẫu xanh
40	2	0,00 ^g	Nhiễm
	4	0,00 ^g	Nhiễm
	6	15,56 ^{ef}	Đa số mẫu nhiễm, mẫu xanh
	8	23,33 ^{cde}	Đa số mẫu nhiễm, mẫu xanh
	10	24,44 ^{cde}	Đa số mẫu chết
50	2	0,00 ^g	Nhiễm
	4	0,00 ^g	Nhiễm
	6	51,11 ^b	Đa số mẫu nhiễm, mẫu xanh
	8	78,89^a	Phần lớn mẫu xanh phát triển
	10	35,56 ^c	Đa số mẫu chết, mẫu xanh
60	2	0,00 ^g	Nhiễm
	4	22,22 ^{cde}	Đa số mẫu nhiễm, nâu đen, chết, mẫu xanh
	6	34,44 ^{cd}	Đa số mẫu nâu đen chết, mẫu xanh
	8	0,00 ^g	Chết
	10	0,00 ^g	Chết

Các trung bình có các ký tự theo sau khác nhau thì khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$)

Từ kết quả ở Bảng 1 cho thấy mẫu cấy Linh sam Sông Hinh 86 (*Desmodium unifoliatum* (Merr.) Steen.) được khử trùng bằng Javel ở các nồng độ và thời gian khác nhau sẽ cho kết quả khác nhau. Qua kết quả nghiên cứu chúng tôi kết luận, Linh sam Sông Hinh

86 (*Desmodium unifoliatum* (Merr.) Steen.) khử trùng hiệu quả nhất với Javel có nồng độ 50% trong thời gian 8 phút, tỷ lệ sống cao nhất 78,89%. Điều này có thể được giải thích như sau:

Ở nồng độ Javel 20%, 30%, 40% tỷ lệ khử trùng tương đối thấp vì ở nồng độ này Javel chưa tiêu diệt hết vi khuẩn và nấm bám trên mẫu cây Linh sam Sông Hinh 86. Ở nồng độ Javel 60% số lượng mẫu nâu đen, chết lại chiếm số lượng lớn, vì ở nồng độ này đã tiêu diệt phần lớn nấm và vi khuẩn bám trên mẫu cây, bên cạnh đó đã làm tổn thương mẫu cây gây chết mẫu cây. Vì vậy, nồng độ thích hợp khử trùng mẫu thân non Linh sam Sông Hinh là Javel 50% với thời gian 8 phút là hiệu quả khử trùng cao nhất.

3.2. Ảnh hưởng của môi trường khoáng lên sự hình thành mô sẹo từ mẫu Linh sam Sông Hinh 86 (*Desmodium unifoliatum* (Merr.) Steen.)

Sau 2 tuần nuôi cấy, kết quả tỷ lệ % mẫu Linh sam Sông Hinh 86 (*Desmodium unifoliatum* (Merr.) Steen.) cảm ứng mô sẹo được trình bày ở bảng 2.

Bảng 2. Ảnh hưởng môi trường khoáng đến mẫu cây Linh sam Sông Hinh 86 hình thành sẹo

Loại môi trường	Tỷ lệ mẫu không hình thành mô sẹo (%)	Tỷ lệ mẫu hình thành mô sẹo (%)
½ WPM	100,00 ^a ±0,00	0,00 ^b ±0,00
WPM	98,89 ^a ±1,92	1,11 ^b ±1,93
½ MS	84,44^b±1,92	15,56^a±1,93
MS	97,78 ^a ±3,18	2,22 ^b ±3,85

Các trung bình có các ký tự theo sau khác nhau thì khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$)

Qua kết quả Bảng 2, cho thấy mẫu Linh sam Sông Hinh 86 hầu như không có khả năng tạo sẹo trên môi trường khoáng nuôi cấy cây thân gỗ (1/2 WPM) và thấp nhất là môi trường WPM mẫu tạo sẹo chỉ có 1,11%; ngược lại môi trường giàu dinh dưỡng MS thì với nồng độ khoáng cao cũng không phù hợp với quá trình tạo sẹo của Linh sam Sông Hinh 86. Chúng tôi nhận thấy môi trường ½ MS có tỷ lệ mẫu tạo sẹo cao nhất 15,56%. Điều này được giải thích, Linh sam Sông Hinh 86 là cây thân gỗ nhưng để mô sẹo được hình thành thì môi trường nuôi cấy cây thân gỗ (½ WPM và WPM) lại không đáp ứng đủ lượng chất dinh dưỡng cần thiết để tạo sẹo. Ngược lại môi trường giàu chất dinh dưỡng khoáng MS lại giảm lượng hình thành mô sẹo vì lượng dinh dưỡng cao gây ức chế tạo sẹo đối với cây thân gỗ Linh sam Sông Hinh 86. Trong khi đó môi trường ½ MS lại cung cấp lượng dinh dưỡng phù hợp, cần thiết để mô sẹo được hình thành với tỷ lệ cao nhất. Vì vậy, chúng tôi sử dụng môi trường ½ MS cho các thí nghiệm tiếp theo.

3.3. Ảnh hưởng của α -NAA lên sự hình thành mô sẹo từ mẫu Linh sam Sông Hinh 86

Sau 2 tuần nuôi cấy, chúng tôi nhận thấy α -NAA sử dụng rất hiệu quả trong việc tạo mô sẹo ở Linh sam Sông Hinh 86, kết quả được thống kê ở Bảng 3.

Bảng 3. Ảnh hưởng của α -NAA lên khả năng tạo mô sẹo và hình thái mô sẹo Linh sam Sông Hinh 86

Nồng độ α -NAA (mg/l)	Tỷ lệ mẫu tạo sẹo (%)	Đặc điểm mô sẹo	Kích thước mô sẹo (mm)
0.0	15,56 ^f ±1,93	Mẫu cây có xuất hiện một ít mô sẹo,	1,13 ^g ±0,13

		kích thước rất nhỏ, dần hoá nâu và chết dần	
0.1	18,89 ^f ±1,93	Mẫu cây xuất hiện mô sẹo nhỏ, dần hoá nâu	1,63 ^g ±0,22
0.2	22,22 ^{ef} ±3,85	Mẫu cây tạo mô sẹo nhỏ, màu trắng vàng, chỉ phát triển trên bề mặt thạch	2,41 ^f ±0,29
0.3	24,44 ^{def} ±1,93	Mô sẹo màu vàng sẫm, kém phát triển	3,14 ^e ±0,34
0.4	34,44 ^{cd} ±5,09	Mô sẹo màu vàng hơi xanh, phát triển	3,49 ^{de} ±0,31
0.5	38,89 ^c ±5,09	Mô sẹo có màu trắng xanh, phát triển quanh thân, mô sẹo nhỏ	3,92 ^d ±0,27
0.6	43,33 ^{bc} ±3,33	Mô sẹo tạo thành khối, có màu xanh, phát triển dọc thân	4,75 ^c ±0,33
0.7	85,56^a±1,93	Mô sẹo phát triển thành khối to, bao quanh lấy đoạn thân non, có màu xanh, mô sẹo xốp và phát triển ngay cả dưới mặt thạch	8,27^a ± 0,21
0.8	51,11 ^b ±3,63	Mô sẹo có trắng xanh, phát triển thành cụm ở dọc thân	6,25 ^b ±0,38
0.9	38,89 ^c ±4,12	Mô sẹo có trắng đục, tạo thành khối, kém phát triển	5,73 ^b ±0,57
1.0	32,22 ^{cde} ±5,09	Mô sẹo trắng đục, nâu chết dần	5,04 ^c ±0,63

Các trung bình có các ký tự theo sau khác nhau thì khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$)

Sau 2 tuần cấy chuyền, các mẫu cây bắt đầu cảm ứng hình thành mô sẹo. Mỗi nồng độ của α -NAA khác nhau thì khả năng tạo mô sẹo cũng khác nhau. Các mẫu bắt đầu có sự phát triển mô sẹo với tỷ lệ tăng dần khi nồng độ α -NAA tăng từ 0,1- 0,6 mg/L với tỷ lệ 15,56% đến 43,33%, tỷ lệ mẫu tạo sẹo vượt trội là ở thí nghiệm với α -NAA 0,7 mg/l đạt 85,56%. Còn đối với công thức có nồng độ α -NAA từ 0,8 mg/L đến 1,0 mg/L thì tỷ lệ % mẫu tạo sẹo bắt đầu giảm từ 51,11% xuống 32,22%.



Hình 2. Mô sẹo và mô sẹo tạo chồi ở Linh Sam Sông Hinh 86 (*Desmodium unifoliatum* (Merr.) Steen.) (Ảnh: Nguyễn Thị Kim Triển)

Ngoài ra, hình thái của các tế bào mô sẹo được tạo thành ở các nồng độ α -NAA cũng có sự khác biệt rõ rệt. Mô sẹo hình thành ở nồng độ α -NAA 0,7 mg/L có đặc điểm vượt trội phát triển thành khối to với kích thước cao nhất 8,27 mm, bao quanh lấy mẫu cấy, có màu xanh, mô sẹo xốp thích hợp để làm nguyên liệu cho các thí nghiệm tạo chồi và tạo cây hoàn chỉnh.

4. Kết luận

Từ các kết quả thu được ở trên cho thấy, mẫu cấy Linh sam Sông Hình 86 (*Desmodium unifoliatum* (Merr.) Steen.) thu hái tại Hội Sinh vật cảnh Phú Yên khử trùng với nồng độ Javel 50% trong thời gian 8 phút sẽ cho tỷ lệ mẫu (sạch, có màu xanh) với tỷ lệ cao nhất 78,89%.

Mẫu cấy sạch có màu xanh được cấy chuyển trên môi trường $\frac{1}{2}$ MS bổ sung 30 g/L succrose, 8g/L agar và 0,7 mg/L α -NAA là thích hợp nhất cho sự hình thành mô sẹo Linh sam Sông Hình 86 (*Desmodium unifoliatum* (Merr.) Steen.) với tỷ lệ 85,56% với kích thước 8,27 mm.

Nghiên cứu này sẽ tạo nguồn nguyên liệu là mô sẹo để chúng tôi tiếp tục nghiên cứu quá trình tạo chồi và tạo cây hoàn chỉnh góp phần tạo giống cây *in vitro* Linh sam Sông Hình 86 (*Desmodium unifoliatum* (Merr.) Steen.) □

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Dương Công Kiên (2003). *Nuôi cấy mô thực vật (Tập II)*, Nxb Đại học Quốc gia, TP. Hồ Chí Minh, trang 12-16.
- Lê Văn Hoà, Mai Văn Trâm, Mai Vũ Duy và Diệp Thuý Hằng (2000). Ảnh hưởng của nồng độ NAA và loại cành giâm đến sự ra rễ cành giâm Linh sam (*Desmodium unifoliatum* (Merr.) Steen.). *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, 56(2B), 88-93.
- Phạm Hoàng Hộ (1999). *Cây cỏ Việt Nam* (Tập I). Nxb Trẻ, trang 915.
- Nguyễn Thị Kim Triền (2018). Nghiên cứu sự hình thành mô sẹo và tế bào đơn cây gỗ giáng hương quả to (*Pterocarpus macrocarpus* Kurz). *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Phú Yên*, 35-42.
- Trần Bé Tâm (2012). *Ảnh hưởng của HgCl₂ 1‰ và thời gian khử trùng đến tỷ lệ sống và tác động của BA, NAA lên sự tạo chồi và nhân chồi cây Linh Sam (Desmodium unifoliatum) in vi tro*. Đại học Cần Thơ. Luận văn tốt nghiệp đại học.