

# ẢNH HƯỞNG CỦA MÔI TRƯỜNG NUÔI CÂY ĐẾN KHẢ NĂNG NHÂN GIỐNG *IN VITRO* CÂY THÔNG ĐẤT (*Huperzia squarrosa* (G. Forst.) Trev.)

Trần Thị Thu Hà<sup>1</sup>, Hoàng Ngọc Hà<sup>1</sup>, Nguyễn Thị Trang<sup>1</sup>,  
Lê Văn Phúc<sup>1</sup>, Ngô Thị Tinh<sup>2</sup>, Khuất Hữu Trung<sup>3</sup>

## TÓM TẮT

Bài báo trình bày kết quả nghiên cứu về ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy *in vitro* đối với loài Thông đất *Huperzia squarrosa* (G. Forst.) Trev tại Viện Nghiên cứu và Phát triển Lâm nghiệp. Kết quả nghiên cứu cho thấy, sát khuẩn bề mặt mẫu cây bằng cồn 70% trong 1 phút, khử trùng bằng dung dịch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 20% trong 15 phút, khử trùng bằng dung dịch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 15% trong 20 phút, khử trùng bằng dung dịch cefotaxim 100 mg/l trong 30 phút sau 04 tuần nuôi cấy trên môi trường nuôi cấy khởi động (MS + 30 g/l sucrose + 7 g/l aga) cho tỉ lệ mẫu sống không nhiễm đạt 68,76%. Nhân nhanh chồi Thông đất tốt nhất trên môi trường MS bổ sung 3 mg/l BA + 0,5 mg/l Kinetin + 0,2 mg/l NAA + 100ml/l N1 + 20g/l sucroza + 7 g/l aga cho tỉ lệ mẫu tái sinh tạo cụm 96,67%, hệ số nhân chồi 2,60 lần sau 08 tuần nuôi cấy. Môi trường ra rễ tốt nhất đối với chồi cây Thông đất là 1/2MS + 1 mg/l IBA + 20g/l sucrose + 7 g/l aga. Sau 8 tuần nuôi cấy cho kết quả hình thành 4,0 rễ/mẫu.

Từ khóa: Thông đất, môi trường nuôi cấy, *in vitro*, chất điều hòa sinh trưởng.

## 1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Thông đất (*Huperzia squarrosa* (Forst.) Trev.) thuộc chi *Huperzia* Bernh, họ Thông đất (Lycopodiaceae), lớp Lycopodiopsida. Loài này là cây thảo phụ sinh, thân mập, hình trụ, mọc đứng ở phần gốc, sau gặp thông xuống dài 30-70 cm. Lá hẹp, nhọn, xếp xoắn ốc hình dải ngọn giáo, tỏa rộng ra, không cuống, mép nguyên, lá ở đỉnh thì ngắn hơn lá ở gốc. Bộ phận sinh sản ở ngọn thân thành bông không phân nhánh, có túi bào tử hình thận, có 2 mảnh vỏ bằng nhau. Thông đất thường phân bố trong các rừng thưa, mọc trên các thân cây to, đá ẩm [10]. Ở Việt Nam cây thường phân bố ở Trung bộ và Bắc bộ [9].

Thông đất được xếp vào Sách đỏ thuộc loài có nguy cơ tuyệt chủng cần được bảo vệ, phát triển. Đặc biệt, đối với loài này trong thân cây có các chất alkaloid như Huperzine A (Hup A) có tác dụng ngăn chặn sự suy giảm trí nhớ hay teo não [2].

Để bảo tồn và phát triển loài thảo dược quý này Viện Nghiên cứu và Phát triển Lâm nghiệp tiến hành nghiên cứu về nhân giống *in vitro* để tạo cây con.

<sup>1</sup> Viện Nghiên cứu và Phát triển Lâm nghiệp, Trường Đại học Nông Lâm, Đại học Thái Nguyên

<sup>2</sup> Bệnh viện trung ương Thái Nguyên

<sup>3</sup> Viện Di truyền Nông nghiệp

Trong phạm vi bài báo này, trình bày kết quả nghiên cứu lựa chọn môi trường nuôi cấy để đánh giá ảnh hưởng của môi trường nhằm xác định môi trường phù hợp nhất đảm bảo cho hệ số nhân cao, chất lượng chồi tốt và tỷ lệ cây giống sống cao.

## 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Vật liệu nghiên cứu

Vật liệu vào mẫu được lấy các đoạn thân chồi bánh tẻ từ cây đấng Thông đất tại Viện Nghiên cứu và Phát triển Lâm nghiệp có xuất xứ từ Na Hang - Tuyên Quang được lựa chọn có hàm lượng huperzin A cao (27,92 µg/g). Các chồi được lấy từ cây khỏe, không sâu bệnh, đang trong thời kỳ phát triển để tạo mẫu sạch *in vitro*.

### 2.2. Phương pháp nghiên cứu

#### 2.2.1. Phương pháp bố trí thí nghiệm và thu thập số liệu

Các thí nghiệm được bố trí trong phòng thí nghiệm với các điều kiện ánh sáng, nhiệt độ và độ ẩm như sau:

- Ánh sáng: Mẫu được nuôi cấy dưới ánh đèn neon với cường độ ánh sáng từ 2000 – 2500 lux, thời gian chiếu sáng 8 – 10 giờ/ngày.

- Nhiệt độ: Nhiệt độ trong phòng duy trì 25 ± 2°C

- Độ ẩm: Thường xuyên duy trì 60 – 70%

- Khử trùng môi trường nuôi cấy: Tất cả các môi trường nuôi cấy được chuẩn độ đến pH = 5,7; khử trùng ở 121°C trong 20 phút.

- Các thí nghiệm được bố trí trong các bình tam giác thủy tinh (1 mẫu/bình 100ml). Mỗi công thức nhắc lại 3 lần.

**\* Khử trùng và tái sinh chồi:**

Lấy chồi bánh tẻ rửa sạch, rồi ngâm trong nước xà phòng loãng 5 phút, xử lý bằng cồn 70% trong 1 phút + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nồng độ 20% trong thời gian 15 phút + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nồng độ 15% trong thời gian 20 phút + dung dịch cefotaxim 100 mg/l trong 30 phút và được rửa lại nhiều lần bằng nước cất vô trùng. Chồi sau khi khử trùng được cắt thành các đoạn ngắn (2-3 cm) chứa dinh sinh trưởng cấy lên môi trường khoảng MS bổ sung 30 g/l sucrose và 7 g/l aga và nuôi dưới ánh sáng đèn. Sau 04 tuần nuôi cấy, các chồi tái sinh được sử dụng làm vật liệu cho giai đoạn nhân nhanh chồi.

Chỉ tiêu theo dõi sau 04 tuần nuôi cấy: Tỷ lệ mẫu chết, tỷ lệ mẫu nhiễm, tỷ lệ mẫu sống không nhiễm.

**\* Nhân nhanh chồi in vitro cây Thông đất:**

**Thí nghiệm 1:** Nghiên cứu ảnh hưởng của môi trường dinh dưỡng cơ bản đến nhân nhanh chồi

Sử dụng chồi cây Thông đất tái sinh *in vitro* làm vật liệu nghiên cứu nhân nhanh chồi. Chồi được nuôi cấy trên các loại môi trường khác nhau, gồm: MS [5], Knops [6], B5 [3] và N6 [1], các loại môi trường này đều được bổ sung thêm 30g/l sucrose + 7 g/l aga.

Thí nghiệm được bố trí theo kiểu khối ngẫu nhiên hoàn chỉnh với 04 công thức, mỗi công thức 3 lần nhắc lại, mỗi lần nhắc lại 10 mẫu.

Chỉ tiêu theo dõi sau 4 tuần nuôi cấy: Tỷ lệ mẫu tạo cụm chồi, hệ số nhân chồi.

**Thí nghiệm 2:** Nghiên cứu ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng đến khả năng nhân nhanh chồi

Chồi được nuôi cấy trên môi trường khoảng MS bổ sung tổ hợp chất kích thích sinh trưởng (0-4 mg/l) BA + (0-1 mg/l) kinetin + (0-0,4 mg/l) NAA + 30g/l sucrose + 7 g/l aga.

Thí nghiệm được bố trí theo kiểu khối ngẫu nhiên hoàn chỉnh với 5 công thức, mỗi công thức 3 lần nhắc lại, mỗi lần nhắc lại 10 mẫu.

Chỉ tiêu theo dõi sau 08 tuần nuôi cấy: Tỷ lệ mẫu tái sinh, hệ số nhân chồi, hình thái chồi.

**Thí nghiệm 3:** Nghiên cứu ảnh hưởng của nước dừa đến nhân nhanh chồi

Chồi được nuôi cấy trên môi trường khoảng MS bổ sung 3 mg/l BA + 0,5 mg/l kinetin + 0,2 mg/l NAA + 30g/l sucrose + 7 g/l aga và bổ sung nước dừa (ND) với thể tích (30-150 ml ND/l môi trường).

Thí nghiệm được bố trí theo kiểu khối ngẫu nhiên hoàn chỉnh với 05 công thức, mỗi công thức 3 lần nhắc lại, mỗi lần nhắc lại 10 mẫu.

Chỉ tiêu theo dõi sau 08 tuần nuôi cấy: Tỷ lệ mẫu tạo cụm chồi, hệ số nhân chồi, chất lượng chồi.

**Thí nghiệm 4:** Nghiên cứu ảnh hưởng của hàm lượng đường đến nhân nhanh chồi.

- Chồi được nuôi cấy trên môi trường khoảng MS bổ sung 3 mg/l BA + 0,5 mg/l kinetin + 0,2 mg/l NAA + 100 ml/l ND + 7 g/l aga và bổ sung đường sucrose (10-40 g/l môi trường).

- Thí nghiệm được bố trí theo kiểu khối ngẫu nhiên hoàn chỉnh với 04 công thức, mỗi công thức 3 lần nhắc lại, mỗi lần nhắc lại 10 mẫu.

- Chỉ tiêu theo dõi sau 08 tuần nuôi cấy: Tỷ lệ mẫu tạo cụm chồi, hệ số nhân chồi, chất lượng chồi.

**Tạo cây Thông đất in vitro hoàn chỉnh**

**Thí nghiệm 5** Nghiên cứu ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng đến tạo cây hoàn chỉnh

- Chọn cụm chồi phát triển đồng đều, dùng dao cấy tách các chồi hữu hiệu có kích thước > 2,5 cm và cấy lên môi trường kích thích chồi ra rễ tạo cây hoàn chỉnh: 1/2MS có bổ sung (0-1,5 mg/l) IBA + 20g/l sucroza + 7 g/l aga.

- Thí nghiệm được bố trí theo kiểu khối ngẫu nhiên hoàn chỉnh với 05 công thức, mỗi công thức 3 lần nhắc lại, mỗi lần nhắc lại 10 mẫu.

- Chỉ tiêu theo dõi sau 08 tuần nuôi cấy: Tổng số rễ, số rễ trên cây, chất lượng rễ

**2.2.2. Phương pháp xử lý số liệu**

- Chỉ tiêu thu thập: Hệ số nhân chồi (lần) = Tổng số chồi mới tạo thành/ Tổng số chồi ban đầu; số rễ trung bình = Tổng số rễ của các chồi/ Tổng số chồi cấy ban đầu

- Xử lý số liệu bằng Microsoft Excel 2010 và phần mềm IRRISTAT 5.0.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Ảnh hưởng của chất khử trùng ở giai đoạn nuôi cấy khởi động

Đoạn chồi cây Thông đất chứa dinh sinh trưởng sau khi khử trùng cây trên môi trường nuôi cấy khởi động (MS + 30 g/l sucroza + 7 g/l aga), nuôi cấy dưới ánh sáng gián đoạn. Sau 4 tuần nuôi cấy, mẫu được khử trùng kép cho tỉ lệ mẫu sống không nhiễm

cao hơn mẫu chỉ được khử trùng đơn bằng cồn 70% và H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 20%. Trong khử trùng kép, công thức 3 cho tỉ lệ mẫu sống không nhiễm vượt trội đạt 68,76% khi bổ sung thêm cefotaxim 100 mg/l trong thời gian 30 phút. Với giá trị LSD<sub>05</sub> đạt 9,55 các công thức thí nghiệm có sự sai khác nhau có ý nghĩa ở mức độ tin cậy 95% (bảng 1).

Bảng 1. Ảnh hưởng của khử trùng kép bằng H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> đến hiệu quả vô trùng vật liệu nuôi cấy chồi Thông đất (sau 4 tuần nuôi cấy)

Hóa chất	Công thức	Thời gian (phút)	Số mẫu đưa vào	Tỷ lệ mẫu chết (%)	Tỷ lệ mẫu nhiễm (%)	Tỷ lệ mẫu sống không nhiễm (%)
Cồn 70% + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (20%)	1 (ĐC)	15	30	9,12	35,73	55,15
Khử trùng kép cồn 70% + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (15%) + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (20%)	2	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (20%) 15 phút + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (15%) 20 phút	30	14,21	23,64	62,15
	3	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (20%) 15 phút + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (15%) 20 phút + cefotaxim 100 mg/l 30 phút	30	14,25	16,99	68,76
CV (%)						3,66
LSD (5%)						9,55

Kết quả đạt được có thể lý giải bởi kháng sinh dùng trong nuôi cấy mô thực vật là nhằm ngăn chặn sự phát triển hay tiêu diệt sự phát triển của khuẩn, nấm mốc. Bên cạnh đó, Cefotaxim là kháng sinh thuộc nhóm ức chế tổng hợp màng tế bào của vi khuẩn. Do vậy, công thức thích hợp nhất cho khử

trùng mẫu Thông đất là khử trùng kép bằng cồn 70% + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (20%) 15 phút + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (15%) 20 phút + cefotaxim 100 mg/l 30 phút. Chồi Thông đất tái sinh được sử dụng làm vật liệu cho giai đoạn nhân nhanh chồi.



Chọn vật liệu mẫu



Cho mẫu trong bình cấy vô trùng



Thông đất sau khi khử trùng được cấy vào bình



Thông đất được khử trùng kép cấy vào bình nuôi cấy (CT3)

Hình 1. Hình ảnh vào mẫu Thông đất

### 3.2. Ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy ở giai đoạn nhân nhanh chồi

#### 3.2.1. Ảnh hưởng của môi trường dinh dưỡng cơ bản đến nhân nhanh chồi

Trong nhân giống *in vitro*, môi trường dinh dưỡng khoáng được xem là nhân tố quan trọng có ảnh hưởng rất lớn đến hiệu quả nhân giống thông qua việc cung cấp các chất dinh dưỡng cần thiết cho sự tăng trưởng, phát triển và phân hóa các mô trong suốt quá trình nuôi cấy. Vì vậy, việc nghiên cứu để xác định được môi trường khoáng phù hợp với từng đối tượng cây trồng ở từng giai đoạn cụ thể trong quy trình nuôi cấy là rất cần thiết, để đạt được hiệu quả nuôi cấy cao nhất. Thí nghiệm đã sử dụng môi trường khoáng MS, Knops, B5 và N6 cho giai đoạn nhân nhanh chồi. Kết quả thu được cho thấy môi trường dinh dưỡng khoáng khác nhau cho tỉ lệ mẫu tái sinh cụm chồi và hệ số nhân chồi cây Thông đất khác nhau rõ rệt (bảng 2). Môi trường N6 và B5 cho tỉ lệ số mẫu tạo cụm chồi thấp nhất (44,33% và 53,33%), số chồi trung bình chỉ đạt tương ứng là 1,27 và 1,0 chồi sau 04 tuần nuôi cấy, chồi có chất lượng trung bình (chồi mảnh, lá nhạt, mỏng). Môi trường Knops cho tỉ lệ mẫu tạo cụm chồi đạt 71,17%, số chồi trung bình là 1,57 lần. Trên môi trường MS mẫu cây có khả năng tái sinh tốt nhất với tỉ lệ mẫu tạo cụm chồi đạt 78,29%, số chồi trung bình đạt 2,64 chồi/mẫu và chất lượng chồi tốt (chồi mập, khỏe mạnh, lá xanh đậm, chồi phát triển nhanh).

**Bảng 2. Ảnh hưởng của môi trường dinh dưỡng khoáng đến nhân nhanh chồi**

Môi trường	Tỷ lệ mẫu tạo cụm chồi (%)	Số chồi trung bình (chồi)	Chất lượng chồi
MS	78,29	2,64	Tốt
Knops	71,17	1,57	Tốt
B5	53,33	1,00	Trung bình
N6	43,33	1,27	Trung bình
CV(%)	3,28	2,5	
LSD <sub>0,05</sub>	5,55	0,16	

Như vậy môi trường dinh dưỡng cơ bản MS rất thích hợp cho nuôi cấy cây Thông đất *in vitro* giai đoạn nhân nhanh chồi. Tương tự, các nghiên cứu nhân giống bằng nuôi cấy mô *Huperzia serrata* tác

giả Liang H [4] cũng cho thấy môi trường nuôi cấy *Huperzia serrata in vitro* thích hợp là môi trường nền MS.

Theo Rothstein & Cregg (2005)[7], tỷ lệ ion  $\text{NO}_3^-/\text{N}_4^+$  trong môi trường nuôi cấy *in vitro* cũng có ảnh hưởng rất lớn đến sự tăng trưởng của hầu hết các loại cây được nuôi cấy. Do đó, tỷ lệ ion  $\text{NO}_3^-/\text{N}_4^+$  trong môi trường cần được điều chỉnh cho phù hợp với nhu cầu dinh dưỡng của từng loài thực vật. Kết quả thí nghiệm với tỷ lệ ion  $\text{NO}_3^-/\text{N}_4^+$  có trong các công thức môi trường MS, Knops, B5, N6 đã cho kết quả tương tự với những nhận định chung của các nghiên cứu trước đây đối với các loài thực vật khác nói chung.

#### 3.2.2. Ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng đến nhân nhanh chồi

Kết quả nghiên cứu cho thấy các công thức có bổ sung thêm NAA cho hệ số nhân chồi cao hơn công thức đối chứng chỉ bổ sung BA và kinetin (bảng 3). Sau 08 tuần nuôi cấy các công thức thí nghiệm cho hệ số nhân chồi lần 3 tăng dần từ 2,24 lần đến 2,60 lần ở công thức 1 đến công thức 3. Từ công thức 4 hệ số nhân chồi có xu hướng giảm dần. Từ kết quả nghiên cứu trên đã xác định được nồng độ NAA tốt nhất để phối hợp với tổ hợp BA và kinetin cho nhân nhanh *in vitro* chồi Thông đất là 0,2 mg/l. Công thức môi trường MS bổ sung 3 mg/l BA + 0,5 mg/l Kinetin + 0,2 mg/l NAA cho tỷ lệ mẫu tái sinh tạo cụm chồi đạt 96,67%, hệ số nhân chồi (2,60 lần) cao nhất trong các công thức thí nghiệm; chồi có chất lượng tốt nhất (Chồi xanh nhạt, có nhiều chồi hữu hiệu).

Như vậy, BA, kinetin là một trong các cytokinin có vai trò trong việc hoạt hóa quá trình phân bào, nhờ đó có tác dụng tái sinh và phân hóa chồi cho cây. NAA là một auxin gây ra hiện tượng ưu thế ngọn cho cây. Do vậy, khi kết hợp NAA cùng với BA và kinetin sẽ kích thích sự hình thành chồi bên. Khi tăng dần nồng độ BA, kinetin, NAA trong môi trường nuôi cấy thì tỷ lệ tái sinh chồi tăng và hệ số nhân chồi tăng. Nhưng khi tiếp tục tăng nồng độ BA, kinetin, NAA lên cao hơn kết quả thu được có xu hướng giảm do hàm lượng BA, kinetin cao có thể gây độc cho mẫu, từ đó gây ức chế khả năng tạo chồi cho mẫu. NAA tăng cao làm mất cân bằng giữa auxin và cytokinin sẽ dẫn tới tình trạng chồi bên không phát triển, chất lượng chồi giảm.

Bảng 3. Ảnh hưởng của tổ hợp BA và Kinetin với NAA đến khả năng nhân nhanh chồi Thông đất (sau 8 tuần nuôi cấy)

Công thức (CT)	Nồng độ BA + Kinetin (mg/l)	Nồng độ NAA (mg/l)	Tỷ lệ mẫu tái sinh (%)	Hệ số nhân chồi lần 1 (lần)	Hệ số nhân chồi lần 2 (lần)	Hệ số nhân chồi lần 3 (lần)	Hình thái chồi
CT 1	BA 3mg/l + Kinetin 0,5 mg/l	0	96,67	1,14	1,93	2,24	Chồi xanh, ít chồi hữu hiệu
CT 2	BA 3mg/l + Kinetin 0,5 mg/l	0,1	93,33	1,18	2,06	2,27	Chồi xanh, ít chồi hữu hiệu
CT 3	BA 3mg/l + Kinetin 0,5 mg/l	0,2	96,67	1,41	2,12	2,60	Chồi xanh nhạt, có nhiều chồi hữu hiệu
CT 4	BA 3mg/l + Kinetin 0,5 mg/l	0,3	93,33	1,32	2,14	2,39	Chồi xanh nhạt, ít chồi hữu hiệu
CT 5	BA 3mg/l + Kinetin 0,5 mg/l	0,4	93,33	1,21	1,83	2,17	Chồi xanh nhạt, ít chồi hữu hiệu
	LSD <sub>0,05</sub>			3,2	4,9	1,4	
	CV%			0,81	0,20	0,68	

Kết quả nghiên cứu này phù hợp với nghiên cứu của Szyplala et al (2013) trong đó tác giả chỉ ra rằng môi trường MS cơ sở bổ sung BA và Kinetin có ảnh

hưởng đến sự nhân chồi của *Huperzia selago* và cho tỷ lệ chồi xanh, hữu hiệu cao [8].



Hình 2. Chồi Thông đất trên môi trường bổ sung 3mg/l BA + 0,5 mg/l kinetin + 0,2 mg/l NAA

### 3.2.3. Ảnh hưởng của nước dừa đến nhân nhanh chồi

Trong nuôi cấy mô thực vật ngoài việc nghiên cứu xác định môi trường dinh dưỡng, chất điều hòa sinh trưởng phù hợp ảnh hưởng mạnh đến khả năng tái sinh của chồi, nhiều nghiên cứu cũng cho thấy các chất phụ gia hữu cơ ảnh hưởng rõ rệt đến tỷ lệ mẫu tái sinh chồi và đặc biệt là chồi hữu hiệu. Kết quả thí nghiệm với hàm lượng nước dừa (ND) bổ

sung vào môi trường thay đổi từ 30 ml/l đến 150ml/l cho tỷ lệ mẫu tái sinh tạo cụm chồi thay đổi từ 77,5% đến 92,7%, hệ số nhân chồi thấp nhất 1,67 lần và cao nhất 3,02 lần (bảng 4). Với giá trị LSD<sub>0,05</sub> đạt 0,88 các công thức thí nghiệm có sự sai khác nhau có ý nghĩa ở mức độ tin cậy 95% có thể kết luận rằng công thức môi trường bổ sung 100ml/l ND cho tỷ lệ mẫu tái sinh tạo cụm chồi và hệ số nhân chồi tốt nhất trong các công thức thí nghiệm. Mọi điều cũng được nhận thấy là khi môi trường nuôi cấy Thông đất bổ sung

thêm nước dừa thì cụm chồi tái sinh có chất lượng tốt (chồi phát triển mập, lá xanh đậm).

**Bảng 4. Ảnh hưởng của nước dừa (ND) đến khả năng tái sinh chồi**

ND (ml/l)	Tỷ lệ mẫu tạo cụm chồi (%)	Hệ số nhân chồi (lần)	Chất lượng chồi
30	82,5	2,12	Tốt
50	86,7	2,67	Tốt
100	92,7	3,02	Tốt
120	83,3	2,64	Tốt
150	77,5	1,67	Tốt
CV(%)		5,2	
LSD <sub>0,05</sub>		0,88	

**3.2.4. Ảnh hưởng của hàm lượng đường đến nhân nhanh chồi**

Mô và tế bào thực vật sống chủ yếu theo phương thức dị dưỡng nên việc đưa đường vào môi trường nuôi cấy làm nguồn chất hữu cơ là điều bắt buộc. Đường không chỉ điều hòa áp suất thẩm thấu của môi trường mà còn là nguồn cacbohydrat tốt nhất cung cấp cho mô và tế bào.

Kết quả thu được ở bảng 5 với giá trị LSD<sub>0,05</sub> đạt 4,4 các công thức thí nghiệm có sự sai khác nhau có ý nghĩa ở mức độ tin cậy 95% cho thấy đường có ảnh hưởng đến khả năng nhân nhanh của chồi, tỷ lệ mẫu tạo cụm chồi thay đổi từ 65,7 đến 94,7%. Môi trường bổ sung đường 20 - 30 g/l cho tỷ lệ mẫu tái sinh chồi đạt cao (>90%) và hệ số nhân chồi cũng đạt cao (2,64 - 3,02 lần); cao nhất là công thức môi trường bổ sung 20 g/l đường sucroza. Khi tăng hàm lượng đường lên

40 g/l thì tỷ lệ mẫu tạo cụm chồi và hệ số nhân chồi giảm đi rõ rệt còn 58,67% và 1,02 lần. Từ kết quả nghiên cứu trên đã xác định được nồng độ đường sucroza tốt nhất để nhân nhanh *in vitro* chồi Thông đất là 20 g/l (Hình 2).

**Bảng 5. Ảnh hưởng của hàm lượng đường đến nhân chồi**

Sucroza (g/l)	Tỷ lệ mẫu tạo cụm chồi (%)	Hệ số nhân chồi (lần)	Chất lượng chồi
10	65,7	1,06	Khá
20	94,7	3,02	Tốt
30	92,5	2,64	Tốt
40	58,67	1,02	Trung bình
CV(%)		4,4	
LSD <sub>0,05</sub>		0,66	

**3.3. Ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng đến tác dụng cây hoàn chỉnh**

Khi các chồi mang lá đạt tiêu chuẩn kích thước (3-5 cm) được tách khỏi cụm chồi và cấy chuyển sang môi trường cảm ứng tạo rễ (MS bổ sung IBA với các nồng độ khác nhau). Nhiều nghiên cứu cho thấy, sử dụng IBA trong môi trường ra rễ đạt kết quả tốt hơn NAA. Vì vậy, đã tiến hành nghiên cứu ảnh hưởng của IBA đến khả năng tạo rễ chồi Thông đất *in vitro*.

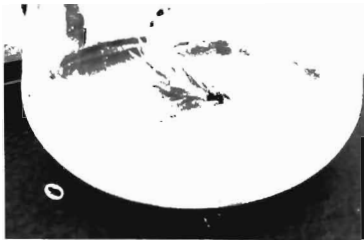
IBA được đưa vào môi trường với nồng độ 0 - 2,0 mg/l. Kết quả thí nghiệm sau 8 tuần nuôi cấy được trình bày trong bảng 6.

**Bảng 6. Kết quả ảnh hưởng của hàm lượng IBA đến khả năng ra rễ của mẫu nuôi cấy (sau 8 tuần nuôi cấy)**

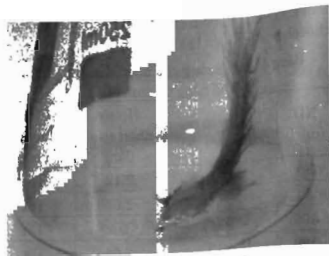
Công thức (CT)	Nồng độ IBA (mg/l)	Tổng số mẫu (mẫu)	Tổng số rễ (rễ)	Số rễ trên cây (rễ)	Chất lượng rễ
CT 1	0,0	30	54	1,80	Ngắn, nhỏ
CT 2	0,5	30	64	2,13	Mập, dài
CT 3	1,0	30	119	4,0	Mập, dài
CT 4	1,5	30	82	2,73	Mập, dài
CT 5	2	30	100	3,33	Nhỏ, dài
LSD <sub>0,05</sub>				0,13	
CV%				2,40	

Môi trường không bổ sung chất điều hòa sinh trưởng chồi không ra rễ. Khi bổ sung nồng độ 1,0 mg/l IBA kết quả cho tổng số rễ là 119 rễ tương đương 4,0 rễ/cây là công thức có số rễ trên cây lớn nhất. Đồng thời, khi tăng nồng độ IBA từ 0-1 mg/l

cho số rễ trên cây tăng từ 1,8 rễ/cây lên đến 4,0 rễ trên cây. Nhưng khi tăng nồng độ IBA lên đến 1,5 - 2 mg/l thì số rễ trên cây lại giảm xuống còn 2,73 và 3,33 rễ/cây. Điều này chứng tỏ nồng độ IBA quá cao sẽ ức chế khả năng ra rễ của cây.



a. Rễ xuất hiện sau 2 tuần nuôi cấy



b. Rễ sau 8 tuần nuôi cấy

### Hình 3. Chồi Thông đất ra rễ trên môi trường bổ sung IBA 0,5 mg/l

Như vậy 1mg/l IBA là thích hợp cho ra rễ tao cây Thông đất hoàn chỉnh *in vitro*, số rễ đạt được tương ứng 4,0 rễ.

#### 4. KẾT LUẬN

- Công thức khử trùng chồi cây Thông đất tốt nhất là xử lý bằng cồn 70% trong 1 phút + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nồng độ 20% trong thời gian 15 phút + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nồng độ 15% trong thời gian 20 phút + dung dịch cefotaxim 100 mg/l trong 30 phút và được rửa lại nhiều lần bằng nước cất vô trùng sau 04 tuần nuôi cấy trên môi trường nuôi cấy khởi động (MS + 30 g/l sucroza + 7 g/l aga), nuôi cấy dưới ánh sáng gián đoạn, cho tỉ lệ mẫu sống không nhiễm đạt 68,76%.

- Nhân nhanh chồi Thông đất tốt nhất trên môi trường MS bổ sung 3 mg/l BA + 0,5 mg/l Kinetin + 0,2 mg/l NAA + 100ml/IND+ 20g/l sucroza + 7 g/l aga cho tỉ lệ mẫu tái sinh tạo cụm chồi 94,7%, hệ số nhân chồi 2,60 lần sau 08 tuần nuôi cấy.

- Môi trường ra rễ tốt nhất đối với chồi cây Thông đất là 1/2MS + 1 mg/l IBA + 20g/l sucroza + 7 g/l aga. Sau 8 tuần nuôi cấy nuôi cấy cho kết quả hình thành 4,0 rễ/mẫu.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Chu CC, Wang CC, Sun CS, Hsu C, Yin kwang C, Chu CY, Bi feng Y (1975). Establishment of an efficient medium for anther culture of rice, through comparative experiment on the nitrogen sources. *Sci. Sin* 18: 659-668.
- Nguyễn Ngọc Chương, Trần Mạnh Hùng, Trần Thị Kim Dung, Trần Công Luận (2016). Thiết lập chất chuẩn và định lượng Huperzin A trong một số loài họ Thạch tùng ở Việt Nam. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ* 54 (2C): 417-424.

- Gamborg O. L, Miller R. A, Ojima K (1968). Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp. Cell Res* 50: 151-158.

- Liang H (2010). Establishment of the tissue culture system of *Huperzia Serrata* and effects of phytohormones on multiple shoot growth and Huperzine A accumulation. *Hefei Univ. Tech., Hefei*.

- Murashige T. and Skoog F.(1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissues cultures. *Physiol Plant* 15: 473- 497.

- Reski R, Abel W. O (1985). Induction of budding on chloronemata and caulonemata of the moss *Physcomitrella patens* using isopentenyladenine. *Planta* 165: 354-358.

- Rothstein, Cregg (2005). Effects of nitrogen form on nutrient uptake and physiology of Fraser fir (*Abies fraseri*). *Forest Ecology and Management* 219: 69-80.

- Wojciech J Szypula, Paulina Mistrzak, Olga Olszowska (2013). A new and fast method to obtain *in vitro* cultures of *Huperzia selago* (Huperziaceae) sporophytes a club moss which is a source of huperzine A, Department of Biology and Pharmaceutical Botany, The Medical University of Warsaw, *Banacha* 1: 092-097.

- Đỗ Thị Xuyên (2013). Hiện trạng các loài khuyết thực vật tại Vườn Quốc gia Kon Ka Kinh, tỉnh Gia Lai. Hội nghị Khoa học toàn quốc về sinh thái và tài nguyên sinh vật lần thứ 5.

- Yumkham S.D, Singh P.K (2011). *Huperzia squarrosa* (G. Forst.) Trev.(Lycopodiaceae) in Manipur. *Taxonomy and Biological Aspects*. *Talwania* 56(2): 157-164.

INFLUENCE OF CULTURE MEDIUM ON THE *IN VITRO* BREEDING ABILITY  
OF *Huperzia squarrosa* (G. Forst) Trev.

Tran Thi Thu Ha<sup>1\*</sup>, Hoang Ngoc Ha<sup>1</sup>, Nguyen Thi Trang<sup>1</sup>,

Le Van Phuc<sup>1</sup>, Ngo Thi Tinh<sup>2</sup>, Khuat Huu Trung<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Institute of Forestry Research and Development,

Thai Nguyen University of Agriculture and Forestry

<sup>2</sup>Thai Nguyen National Hospital

<sup>3</sup>Agricultural Genetics Institute

\*Corresponding author: e-mail: tranthithuhaptn@tuaf.edu.vn

Summary

The objective of this study was to examine the effect of *in vitro* culture medium on the species of *Huperzia squarrosa* (G. Forst) Trev. at Institute of Forestry Research and Development, Thai Nguyen University of Agriculture and Forestry. The results of this study showed that the surface antiseptic inoculated with alcohol 70% for 1 minute, sterilized with solution H<sub>2</sub>O 20% for 15 minutes, sterilized with solution H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 15% for 20 minutes, sterilized with solution cefotaxim 100 mg/l for 30 minutes and after 4 weeks of *in vitro* culture medium (MS + 30 g/l sucrose + 7 g/l aga) resulted rate of non-infectious samples of 68.76%. The best result of multi-shoot was on MS medium supplemented with 3 mg/l BA + 0.5 mg/l Kinetin + 0.2 mg/l NAA + 100 ml/l ND + 20 g/l sucrose + 7 g/l aga for rate of regenerated clusters of 96.67%, multiplication coefficient of 2.60 times after 08 weeks of culture. The best rooting environment for shoots was 1/2MS + 1 mg/l IBA + 20g/l sucrose + 7 g/l aga. After 8 weeks in this environment resulted 4.0 roots/sample

**Keywords:** *Huperzia squarrosa* (G. Forst) Trev, culture medium, *in vitro*, growth stimulant.

Người phản biện: PGS.TS. Hà Văn Huân

Ngày nhận bài: 29/7/2019

Ngày thông qua phản biện: 29/8/2019

Ngày duyệt đăng: 5/9/2019