

NGHIÊN CỨU NHÂN GIỐNG *IN VITRO* CÂY SÂM THẬP TỬ (*Decaschistia* sp.)

Lê Thanh Hậu^{1,*}, Bùi Minh Trí¹, Trịnh Việt Nga²,

Đoàn Thị Hồng Điềm³, Phạm Minh Duy¹, Nguyễn Cao Kiệt¹

¹Trường Đại học Nông Lâm thành phố Hồ Chí Minh

²Viện Sinh học Nhiệt đới, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

³Trường Trung cấp Kinh tế - Kỹ thuật Tây Ninh

*Email: lthanhhau159@gmail.com

TÓM TẮT

Sâm thập tử (*Decaschistia* sp.) thuộc họ Malvaceae, là một loài dược liệu được người dân địa phương sử dụng làm thuốc do có hàm lượng dược liệu cao, khả năng bồi bổ sức khỏe, tăng cường sinh lực, chống suy nhược thần kinh. Nhằm xây dựng quy trình nhân giống *in vitro* cây sâm thập tử, nghiên cứu này đã tiến hành 3 thí nghiệm bao gồm: (1) Thí nghiệm ảnh hưởng của nồng độ BA và α NAA đến quá trình nhân nhanh chồi cây sâm thập tử *in vitro*; (2) Thí nghiệm ảnh hưởng của nồng độ α NAA và IBA đến quá trình ra rễ cây sâm thập tử *in vitro*; (3) Thí nghiệm ảnh hưởng của loại giá thể đến sự sinh trưởng của cây sâm thập tử giai đoạn vườn ươm. Kết quả nghiên cứu cho thấy, đốt thân cây sâm thập tử được cấy vào môi trường MS bổ sung 30 g/L sucrose, 2 mg/L BA và 0,5 mg/L α NAA cho số chồi cao nhất, đạt 6,7 chồi và số lá đạt 10,8 lá tại thời điểm 60 ngày sau cấy. Môi trường MS bổ sung 20 g/L sucrose, 0,5 mg/L IBA và 0,5 mg/L α NAA thích hợp nhất cho sự hình thành rễ cây sâm thập tử với số rễ đạt 6,1 rễ; chiều dài rễ đạt 5,4 cm và tỷ lệ ra rễ đạt 100% tại thời điểm 60 ngày sau cấy. Cây con sâm thập tử được trồng trên hỗn hợp giá thể 80% mụn dừa kết hợp 20% tro trấu giúp cây con sinh trưởng tốt với chiều cao cây đạt 12,1 cm; có 9,1 lá và tỷ lệ sống đạt 100% tại thời điểm 40 ngày sau trồng.

Từ khóa: Nuôi cấy mô, nhân giống, sâm thập tử, tạo chồi, tạo rễ, giá thể.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Vườn Quốc gia Lò Gò - Xa Mát, tỉnh Tây Ninh là khu vực có hệ sinh thái khá đặc biệt (đồi thấp, ngập nước theo mùa), tạo điều kiện cho sự phát triển của nhiều loài thực vật đặc hữu, quý hiếm, có nhiều đặc tính có giá trị. Kết quả điều tra tại khu vực Vườn Quốc gia Lò Gò - Xa Mát, một loài cây dược liệu với tên gọi sâm thập tử được phát hiện có giá trị dược liệu cao. Khảo sát sinh hóa ban đầu cho thấy, các mẫu cây sâm thập tử đã thu thập được đều chứa các hợp chất thuộc nhóm flavonoids, tanin, triterpenoids, polyuronic, proanthocyanidin, đặc biệt là hợp chất triterpenoid, saponin, coumarin, antraglycoside [1]. Tiến hành định danh sơ bộ bằng hình thái kết hợp xác định trình tự một số vùng ADN barcode, loài cây này được xác định thuộc chi *Decaschistia*, họ Malvaceae. Chi *Decaschistia* bao

gồm hơn 16 loài, được phân bố từ Ấn Độ qua Nam Á đến Úc [2]. Ở Việt Nam trước đây, chi *Decaschistia* đã ghi nhận sự hiện diện của 3 loài bao gồm: Thập tự harmand (*Decaschistia harmandii*), Thập tự (*Decaschistia parviflora*), Thập tự xiêm (*Decaschistia crotonifolia*) và các loài này thường được người dân sử dụng như một loại thuốc dân gian để điều trị bệnh [3, 4]. Mặc dù vậy, theo một số tài liệu phân loại thực vật, 3 loài trên có thể là cùng một loài [5, 6].

Trong tự nhiên, cây sâm thập tử chủ yếu nhân giống hữu tính bằng hạt, số lượng ít, cây không đồng đều. Việc nghiên cứu nhân giống vô tính cây sâm thập tử, hướng tới phát triển việc canh tác loài cây này là vấn đề cần đặt ra cho công tác bảo tồn cũng như đáp ứng nhu cầu dược liệu trong nước. Nghiên cứu này nhằm mục đích xây dựng một quy

trình nhân giống vô tính cho cây sâm thập tử từ đốt thân nhằm tạo ra các cây giống đồng nhất, số lượng lớn, có chất lượng tốt trong thời gian ngắn, đáp ứng vấn đề bảo tồn nguồn gen quý và sản xuất dược liệu tại Việt Nam.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

2.1.1. Đối tượng nghiên cứu

Cây sâm thập tử được thu tại Vườn Quốc gia Lò Gò - Xa Mát, sau đó được chăm sóc và cách ly trong nhà màng tại khu vực thực nghiệm, Bộ môn Sinh lý – Sinh hóa, Khoa Nông học, Trường Đại học Nông Lâm thành phố Hồ Chí Minh.

2.1.2. Khử trùng mẫu, chuẩn bị mẫu cấy

Mẫu chồi ngủ cây trồng ngoài vườn ươm được tia bằng vôi nước máy và lau bằng dung dịch xà phòng 1% trong 15 phút; sau đó nhúng vào cồn 70° trong 30 giây rồi tiếp tục nhúng trong dung dịch CuSO_4 1% trong 10 phút. Sau đó, mẫu được ngâm trong dung dịch nước javen thương mại 15% (có bổ sung 1 - 2 giọt Tween 80) trong 15 phút, rồi rửa lại 5 lần bằng nước cất vô trùng. Mô sau khi rửa được tiến hành cắt loại bỏ các phần bị tổn thương rồi cấy trên môi trường MS có bổ sung 7 g/L agar và 30 g/L đường sucrose.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Thí nghiệm 1

Xác định nồng độ BA kết hợp với αNAA phù hợp đến quá trình nhân nhanh chồi cây sâm thập tử trong điều kiện *in vitro*. Thí nghiệm này là loại thí nghiệm hai yếu tố với 16 nghiệm thức, bao gồm 4 mức nồng độ BA (0; 1; 2; 3 mg/L) kết hợp với 4 mức nồng độ αNAA (0; 0,25; 0,5; 0,75 mg/L), được bố trí theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên (CRD) với 3 lần lặp lại. Mẫu đốt thân thứ 2 – 3 tính từ ngọn mang một chồi ngủ kích thước 1 cm được cấy vào chai tam giác ($V = 250 \text{ mL}$) chứa 50 mL môi trường MS (pH = 5,8) có bổ sung 7 g/L agar, 30 g/L sucrose và BA kết hợp với αNAA theo nồng độ ở từng nghiệm thức. Việc theo dõi và xác định các chỉ tiêu số chồi (chồi/cụm), chiều cao cụm chồi (cm) và số lá (lá/cụm chồi) được tiến hành trong suốt 60 ngày nuôi cấy (NNC).

2.2.2. Thí nghiệm 2

Xác định nồng độ IBA kết hợp với αNAA phù hợp đến quá trình ra rễ cây sâm thập tử trong điều kiện *in vitro*. Đây là thí nghiệm hai yếu tố với 12 nghiệm thức, bao gồm 3 mức nồng độ IBA (0; 0,25; 0,5 mg/L) kết hợp với 4 mức nồng độ αNAA (0; 0,25; 0,5; 0,75 mg/L), được bố trí theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên (CRD) với 3 lần lặp lại. Mẫu chồi $2,5 \pm 0,5 \text{ cm}$ mang một lá mở được lấy từ cụm chồi đốt thân ở 60 NNC trên môi trường MS có bổ sung 30 g/L sucrose, không chứa chất điều hòa sinh trưởng. Mẫu được cấy vào bình tam giác ($V = 250 \text{ mL}$) chứa 50 mL môi trường MS có bổ sung 7 g/L agar, 20 g/L sucrose và IBA kết hợp với αNAA theo nồng độ ở từng nghiệm thức. Việc theo dõi và xác định các chỉ tiêu thời điểm hình thành rễ (được tính từ khi cấy đến khi có trên 50% số mẫu cấy ra rễ), số rễ trung bình (rễ/cây), chiều dài rễ trung bình (cm) được tiến hành trong suốt 60 NNC.

2.2.3. Thí nghiệm 3

Xác định loại giá thể cho tỷ lệ sống cao, phù hợp sự sinh trưởng của cây con sâm thập tử trong giai đoạn vườn ươm. Đây là thí nghiệm một yếu tố với 6 nghiệm thức bao gồm: 100% mụn dừa; 80% mụn dừa: 20% cát; 80% mụn dừa: 20% tro trấu; 60% mụn dừa: 20% cát: 20% tro trấu; 50% mụn dừa: 50% cát; 50% mụn dừa: 50% tro trấu, được bố trí theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên (CRD) với 3 lần lặp lại. Mẫu cây sâm thập tử đã được nuôi cấy trên môi trường MS bổ sung 0,5 mg/L αNAA kết hợp với 0,5 mg/L IBA sau 8 tuần tuổi, đạt chiều cao 4 - 5 cm, có 4 - 5 lá, 3 - 4 rễ. Cây giống cấy mô từ phòng thí nghiệm được mang đặt trên kệ vườn ươm trong một tuần nhằm thích nghi dần với điều kiện bên ngoài. Tiến hành trồng cây vào các hỗn hợp giá thể (đã được xử lý) theo tỷ lệ phối trộn tương ứng ở từng nghiệm thức. Việc theo dõi và xác định các chỉ tiêu chiều cao cây trung bình (cm), số lá (lá/cây), tỷ lệ cây sống (%) và tỷ lệ cây xuất vườn (%) được tiến hành trong vòng 40 ngày sau trồng.

2.2.4. Điều kiện nuôi cấy

Trong thí nghiệm 1 và 2, mẫu cấy được đặt dưới điều kiện thời gian chiếu sáng 10 giờ/ngày, cường độ chiếu sáng $2.500 \pm 500 \text{ lux}$, nhiệt độ và

âm độ của phòng nuôi cấy được duy trì lần lượt ở $25 \pm 2^\circ\text{C}$ và $55 \pm 5\%$. Ở thí nghiệm 3, cây được đặt dưới điều kiện cường độ chiếu sáng 3.755 ± 500 lux, nhiệt độ cao nhất là 35°C và thấp nhất là 24°C .

2.2.5. Phân tích thống kê

Dữ liệu thu thập được tổng hợp và xử lý bằng phần mềm Microsoft Excel 2010, sau đó phân tích phương sai (ANOVA) trên phần mềm R và trắc nghiệm phân hạng bằng Duncan's Multiple Range Test ở mức ý nghĩa $\alpha = 0,01$ hoặc $\alpha = 0,05$. Các số liệu tỷ lệ xuất vườn và tỷ lệ sống được chuyển đổi theo công thức $\sqrt{x}$.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

3.1. Khử trùng mẫu và chuẩn bị mẫu nuôi cấy

Để chuẩn bị vật liệu cho việc nhân chồi và tái sinh mẫu cây sâm thập tử, các mẫu từ cây mẹ đã được khử trùng như mô tả ở phần trên. Theo cách thức khử trùng mẫu này, tỷ lệ nhiễm của mẫu cấy sâm thập tử tương đối thấp (dưới 10%), đảm bảo tạo đủ vật liệu đáp ứng cho việc bố trí các thí nghiệm

tiếp theo. Các mẫu *in vitro* không nhiễm sau 30 ngày được tiếp tục cấy chuyển trên môi trường MS không bổ sung chất điều hòa sinh trưởng (Hình 1) để tạo nguồn vật liệu ban đầu.



Hình 1. Mẫu đốt thân cây sâm thập tử *in vitro* sau 30 NNC trên môi trường MS

3.2. Ảnh hưởng của nồng độ BA kết hợp với α NAA đến quá trình nhân nhanh chồi cây sâm thập tử *in vitro*

Bảng 1. Ảnh hưởng của nồng độ BA kết hợp với α NAA đến số chồi (chồi/cụm), chiều cao chồi (cm), số lá (lá/cụm chồi) cây sâm thập tử *in vitro* tại thời điểm 60 NNC

Chỉ tiêu theo dõi	Nồng độ BA (mg/L)	Nồng độ α NAA (mg/L)				Trung bình (B)
		0,00	0,25	0,5	0,75	
Số chồi (chồi/cụm)	0	1,0 ^g	1,0 ^g	1,0 ^g	1,0 ^g	1,0 ^D
	1	3,3 ^{ef}	3,2 ^{ef}	4,1 ^d	3,6 ^{de}	3,6 ^C
	2	3,8 ^d	5,8 ^b	6,7 ^a	4,9 ^c	5,3 ^A
	3	3,0 ^f	5,1 ^c	5,9 ^b	4,9 ^c	4,7 ^B
Trung bình (N)		2,8 ^C	3,8 ^B	4,4 ^A	3,6 ^B	
CV (%) = 6,41; F (B) = 799,77***; F (N) = 103,19***; F (B x N) = 24,86***						
Chiều cao chồi (cm)	0	3,8 ^b	4,8 ^a	4,2 ^b	4,8 ^a	4,4 ^A
	1	3,5 ^c	4,4 ^{ab}	3,6 ^c	4,4 ^{ab}	4,0 ^B
	2	3,4 ^c	4,3 ^b	3,5 ^c	4,3 ^{ab}	3,9 ^B
	3	3,5 ^c	3,6 ^c	3,5 ^c	3,4 ^c	3,5 ^C

Trung bình (N)		3,6 ^B	4,3 ^A	3,7 ^B	4,2 ^A	
CV (%) = 4,87; F (B) = 41,86***; F (N) = 41,74***; F (B x N) = 4,62***						
Số lá (lá/cụm chồi)	0	4,1 ⁱ	3,4 ⁱ	3,1 ⁱ	3,3 ⁱ	3,5 ^D
	1	6,8 ^{gh}	6,5 ^{gh}	8,2 ^{cde}	7,4 ^{efg}	7,2 ^C
	2	7,7 ^{ef}	8,8 ^{bcd}	10,8 ^a	9,5 ^b	9,2 ^A
	3	5,9 ^h	7,9 ^{de}	9,0 ^{bc}	9,6 ^b	8,1 ^B
Trung bình (N)		6,1 ^C	6,7 ^B	7,5 ^A	7,8 ^A	
CV (%) = 5,92; F (B) = 432,76***; F (N) = 39,55***; F (B x N) = 16,20***						

Ghi chú: Trong cùng một nhóm, các giá trị trung bình có cùng ký tự theo sau thể hiện sự khác biệt không có ý nghĩa trong thống kê; ***: Sự khác biệt có ý nghĩa ở mức $p \leq 0,001$.

Bảng 1 cho thấy, đối với chỉ tiêu số chồi và số lá, các mức BA khác nhau đã tác động có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa các nghiệm thức. Trong đó, bổ sung 2 mg/L BA cho số chồi cao nhất đạt 5,3 chồi, số lá đạt 9,2 lá, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê so với các mức BA còn lại. Ở các nghiệm thức không bổ sung chất điều hòa sinh trưởng BA, số lượng chồi xuất hiện bằng 1. Kết quả nghiên cứu này tương tự kết quả nghiên cứu của Irshad và cs (2018) đối với cây đậu bắp (*Abelmoschus esculentus* L.), cũng chỉ tạo được một chồi đơn từ mỗi mắt ngủ trên môi trường không chứa chất điều hòa sinh trưởng [7]. Tuy nhiên, khi bổ sung từ 1 - 2 mg/L BA vào môi trường nuôi cấy, số chồi trung bình phát sinh từ 3,6 - 5,3 chồi. Kết quả nghiên cứu này phù hợp với kết quả nghiên cứu của Trịnh Thị Hương và cs (2019) trên đối tượng sâm bố chính, khi bổ sung BA vào môi trường nuôi cấy từ 0 - 2 mg/L thì số lượng chồi tăng từ 1,2 chồi lên 6,6 chồi sau 45 NNC [8]. Xét theo yếu tố nồng độ α NAA, ở mức bổ sung 0,5 mg/L α NAA đạt số chồi cao nhất là 4,4 chồi, số lá đạt 7,5 lá và sự khác biệt có ý nghĩa thống kê so với các mức nồng độ α NAA còn lại. Xét sự tương tác giữa các nồng độ BA và α NAA, ở nghiệm thức bổ sung 2 mg/L BA và 0,5 mg/L α NAA cho số chồi đạt cao nhất là 6,7 chồi, số lá đạt 10,8 lá, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê so với các nghiệm thức còn lại. Tuy nhiên, hệ số nhân giống

đạt được trong thí nghiệm có thể thông qua quá trình tái sinh từ tế bào soma.

Đối với chỉ tiêu chiều cao chồi, xét theo yếu tố nồng độ BA, chiều cao chồi cao nhất đạt 4,4 cm khi không bổ sung BA, sự khác biệt rất có ý nghĩa thống kê so với các mức nồng độ BA còn lại. Điều này cho thấy, đã có sự tương quan nghịch giữa nồng độ BA và chiều cao chồi. Khi tăng nồng độ BA từ 0 - 3 mg/L thì chiều cao giảm tương ứng từ 4,4 cm xuống còn 3,5 cm. Điều này tương tự như kết quả nghiên cứu của Singh và cs (2020) thí nghiệm trên cây lê, khi sử dụng BA cũng cho thấy, có tác dụng giúp nhân nhanh số chồi nhưng lại giảm chiều cao chồi [9]. Nếu xét theo yếu tố nồng độ α NAA, ở mức bổ sung 0,25 mg/L α NAA, chiều cao chồi đạt được cao nhất, đạt 4,3 cm, sự khác biệt tuy không có ý nghĩa thống kê so với mức bổ sung 0,75 mg/L α NAA là 4,2 cm, nhưng sự khác biệt rất có ý nghĩa trong thống kê so với các mức nồng độ α NAA còn lại. Xét sự tương tác của các nồng độ BA kết hợp với α NAA, sự khác biệt giữa các nghiệm thức rất có ý nghĩa thống kê. Ở 2 nghiệm thức bổ sung 0,25 hoặc 0,75 mg/L α NAA và không có BA, chiều cao chồi đạt cao nhất là 4,8 cm.

Hiện nay, trên thế giới chưa có nghiên cứu về nhân giống *in vitro* chi *Decaschistia*, chỉ có một số nghiên cứu liên quan đến các loài thuộc chi *Hibicus*, *Gossypium*, *Abelmoschus*... cùng thuộc

họ Malvaceae. Kết quả của nghiên cứu này khá tương đồng với kết quả nghiên cứu của Kumar (2016) khi nghiên cứu về ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng thực vật lên sự phát sinh hình thái của loài *Hibiscus sabdariffa* L., với hệ số nhân chồi

là 7 - 8 chồi/mẫu trên môi trường MS bổ sung 2 mg/L BA và 0,5 mg/L auxin (IAA) sau 8 tuần nuôi cấy [10]. Điểm khác biệt trong nghiên cứu này là sử dụng BA kết hợp với α NAA.



Hình 2. Sự hình thành chồi mới từ mẫu cây cây sâm thập tử ở các nghiệm thức khác nhau tại thời điểm 60 NNC

Ghi chú: B1; B2; B3; B4 tương ứng với nồng độ BA: 0; 1; 2; 3 mg/L. N1; N2; N3; N4 tương ứng với nồng độ α NAA: 0; 0,25; 0,50; 0,75 mg/L.

3.3. Ảnh hưởng của nồng độ IBA kết hợp với α NAA đến quá trình ra rễ của cây sâm thập tử *in vitro*

Bảng 2 cho thấy, sau 15 ngày cây sâm thập tử ở tất cả các nghiệm thức đã hình thành rễ với tỷ lệ trên 50% số mẫu cấy, tỷ lệ ra rễ đạt 100% tại thời điểm 60 NNC. Kết quả nghiên cứu cũng cho thấy, cây sâm thập tử có thể ra rễ mà không cần bổ sung chất điều hòa sinh trưởng α NAA hoặc IBA (2,7 rễ

và chiều dài rễ đạt 1,6 cm). Hiện nay, cũng đã có nhiều nghiên cứu tạo rễ *in vitro* của một số giống cây trồng không cần sử dụng các chất điều hòa sinh trưởng thuộc nhóm auxin [11, 12]. Tuy nhiên, kết quả phân tích thống kê trong nghiên cứu này cho thấy, việc bổ sung α NAA và IBA giúp cải thiện số rễ xuất hiện và chiều dài rễ trên cây sâm thập tử.

Bảng 2. Ảnh hưởng của nồng độ IBA kết hợp với α NAA đến thời điểm hình thành rễ (ngày) và số rễ (rễ/cây), chiều dài rễ (cm) của cây sâm thập tử *in vitro* tại thời điểm 60 NNC

Chỉ tiêu theo dõi	Nồng độ IBA (mg/L)	Nồng độ α NAA (mg/L)				Trung bình (I)
		0,00	0,25	0,50	0,75	
Thời điểm hình thành rễ (ngày)	0,00	15,3	14,7	14,7	13,7	14,6 ^A
	0,25	14,7	14,3	13,3	12,7	13,8 ^B
	0,50	14,3	14,0	12,3	12,7	13,3 ^B
Trung bình (N)		14,8 ^A	14,3 ^A	13,4 ^B	13,0 ^B	
CV (%) = 4,5; F (N) = 15,2***; F (I) = 12,5***; F (N x I) = 1,2 ^{ns}						

KHOA HỌC CÔNG NGHỆ

Số rễ (rễ/cây)	0,00	2,7 ^e	2,9 ^{de}	3,3 ^{cd}	3,2 ^{cd}	3,0 ^C
	0,25	3,2 ^d	3,6 ^c	4,2 ^b	3,3 ^{cd}	3,6 ^B
	0,50	4,2 ^b	4,5 ^b	6,1 ^a	5,7 ^a	5,1 ^A
Trung bình (N)		3,3 ^D	3,7 ^C	4,5 ^A	4,1 ^B	
CV (%) = 4,69; F (N) = 70,07***; F (I) = 430,54***; F (N x I) = 16,25***						
Chiều dài rễ (cm)	0,00	1,6 ^h	2,4 ^g	3,3 ^e	2,8 ^f	2,5 ^C
	0,25	2,2 ^g	3,7 ^d	4,3 ^c	3,7 ^d	3,4 ^B
	0,50	2,9 ^{ef}	3,8 ^d	5,4 ^a	5,0 ^b	4,3 ^A
Trung bình (N)		2,2 ^D	3,1 ^C	4,3 ^A	3,8 ^B	
CV (%) = 4,87; F (N) = 266,05***; F (I) = 353,08***; F (N x I) = 6,99***						

*Ghi chú: Trong cùng một nhóm, các giá trị trung bình có cùng ký tự theo sau thể hiện sự khác biệt không có ý nghĩa trong thống kê; ns: Sự khác biệt không có ý nghĩa trong thống kê; ***: Sự khác biệt có ý nghĩa ở mức $p \leq 0,001$.*

Xét theo yếu tố nồng độ α NAA, khi tăng dần nồng độ α NAA từ 0 - 0,5 mg/L, số rễ xuất hiện tăng tương ứng từ 3,3 - 4,5 rễ, nhưng khi tăng nồng độ α NAA lên 0,75 mg/L, số rễ có xu hướng giảm còn 4,1 rễ. Điều này có thể là do nồng độ α NAA

cao đã ức chế sự sinh trưởng của mẫu cấy. Mức bổ sung 0,5 mg/L α NAA cho kết quả số rễ đạt nhiều nhất là 4,5 rễ, chiều dài rễ đạt 4,3 cm, sự khác biệt rất có ý nghĩa thống kê so với các mức nồng độ α NAA còn lại.



Hình 3. Sự hình thành rễ từ chồi cây sâm thập tử ở các nghiệm thức khác nhau tại thời điểm 60 NNC

Ghi chú: I1; I2; I3 tương ứng với nồng độ IBA: 0; 0,25; 0,50 mg/L. N1; N2; N3; N4 tương ứng với nồng độ α NAA 0; 0,25; 0,50; 0,75 mg/L.

Đối với IBA, khi tăng dần nồng độ từ 0 - 0,5 mg/L số rễ xuất hiện tăng tương ứng từ 3,0 - 5,1 rễ. Mức bổ sung 0,5 mg/L IBA đạt số rễ cao nhất là 5,1 rễ, chiều dài rễ đạt 4,3 cm, sự khác biệt rất có ý nghĩa thống kê so với các mức nồng độ IBA còn lại. Kết quả nghiên cứu này phù hợp với kết quả nghiên cứu của Phan Xuân Huyền và cs (2017), theo đó, trên cây sâm bố chính khi nồng độ IBA tăng từ 0 - 0,5 mg/L thì số rễ cũng tăng từ 3,0 - 6,5 rễ sau 30 NNC [13].

Kết quả nghiên cứu cho thấy, khi sử dụng đơn lẻ, IBA có hiệu quả hơn α NAA trong quá trình tạo rễ cây sâm thập tử. Cụ thể mức bổ sung 0,5 mg/L IBA cho 5,1 rễ và mức bổ sung 0,5 mg/L α NAA cho 4,5 rễ. Tuy nhiên, nếu xét sự tương tác giữa

hai yếu tố trên, thì nghiệm thức bổ sung 0,5 mg/L α NAA kết hợp với 0,5 mg/L IBA cho số rễ đạt cao nhất là 6,1 rễ, chiều dài rễ đạt 5,4 cm mặc dù sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê so với nghiệm thức bổ sung 0,75 mg/L α NAA kết hợp với 0,5 mg/L IBA (5,7 rễ), nhưng sự khác biệt rất có ý nghĩa thống kê so với các nghiệm thức còn lại. Kết quả nghiên cứu này phù hợp với kết quả nghiên cứu của Phan Duy Hiệp và cs (2014) trên đối tượng cây sâm bố chính, theo đó môi trường bổ sung 0,5 mg/L α NAA kết hợp với 0,5 mg/L IBA cho số rễ đạt cao nhất là 6,6 rễ sau 30 NNC [14].

3.4. Ảnh hưởng của loại giá thể lên sự sinh trưởng của cây sâm thập tử giai đoạn vườn ươm

Bảng 3. Ảnh hưởng của loại giá thể đến tỷ lệ sống (%), số lá (lá/cây) và chiều cao cây (cm) và tỷ lệ cây xuất vườn (%) của cây sâm thập tử giai đoạn vườn ươm tại thời điểm 40 ngày sau ươm

Loại giá thể (G)	Tỷ lệ sống (%)	Số lá (lá/cây)	Chiều cao cây (cm)	Tỷ lệ cây xuất vườn (%)
100% mụn dừa	100 ^a	8,3 ^a	10,0 ^b	85,3 ^a
80% mụn dừa: 20% cát	100 ^a	9,1 ^a	12,1 ^a	93,0 ^a
80% mụn dừa: 20% tro trấu	100 ^a	9,1 ^a	12,1 ^a	93,3 ^a
60% mụn dừa: 20% cát: 20% tro trấu	100 ^a	7,8 ^a	9,9 ^b	88,0 ^a
50% mụn dừa: 50% cát	86,3 ^b	6,6 ^b	6,7 ^c	72,7 ^b
50% mụn dừa: 50% tro trấu	83,3 ^b	6,2 ^b	7,4 ^c	74,7 ^b
CV (%)	0,5	6,2	4,6	1,9
F _G	221,9 ^{***}	19,05 ^{***}	78,25 ^{***}	24,04 ^{***}

*Ghi chú. Trong cùng một nhóm, các giá trị trung bình có cùng ký tự theo sau thể hiện sự khác biệt không có ý nghĩa trong thống kê; ***: Sự khác biệt có ý nghĩa ở mức $p \leq 0,001$.*

Bảng 3 cho thấy, loại giá thể ảnh hưởng lớn đến tỷ lệ sống của cây con trong giai đoạn vườn ươm. Cây sâm thập tử nuôi cấy mô trồng trên 4

loại giá thể gồm: 100% mụn dừa, 80% mụn dừa: 20% cát, 80% mụn dừa: 20% tro trấu, 60% mụn dừa: 20% cát: 20% tro trấu đạt tỷ lệ cây sống cao nhất là

100%, khác biệt rất có ý nghĩa thống kê so với nghiệm thức sử dụng giá thể 50% mụn dừa: 50% tro trấu (83,3%) và 50% mụn dừa: 50% cát (86,3%).

Việc sử dụng mụn dừa làm giá thể để chuyển cây cấy mô ra giai đoạn vườn ươm đã được Stefanello và cs (2009) [15] tiến hành trên cây *Miltonia flavesceus* Lindl. đã cho tỉ lệ sống đạt 100% sau 30 ngày chăm sóc; Nguyễn Hữu Tĩnh (2019) tiến hành trên cây nghệ vàng ươm trồng trên giá thể 100% mụn dừa cho tỉ lệ sống đạt 98,3% sau 21 ngày chăm sóc [16].

Kết quả nghiên cứu này tương tự kết quả nghiên cứu của Phan Xuân Huyền và cs (2017) khi đánh giá khả năng thích nghi và sinh trưởng của cây sâm bố chính ở giai đoạn vườn ươm sau 30 ngày chăm sóc đã đạt tỷ lệ sống trên giá thể xơ dừa đạt 95%, cao hơn so với giá thể 50% mụn xơ dừa kết hợp 50% cát (91,7%) [13]. Kết quả nghiên cứu này cũng cao hơn kết quả nghiên cứu của Nguyễn Thị Huyền Trang và cs (2015) khi đưa cây sâm bố chính *in vitro* ra vườn ươm trồng trên giá thể mụn xơ dừa với tỷ sống đạt 80% [17].



Hình 4. Ảnh hưởng của 6 công thức giá thể đến sự sinh trưởng của cây sâm thập tử ở 40 ngày sau ươm

Ghi chú: G1 là 100% mụn dừa; G2 là 80% mụn dừa: 20% cát; G3 là 80% mụn dừa: 20% tro trấu; G4 là 60% mụn dừa: 20% cát: 20% tro trấu; G5 là 50% mụn dừa: 50% cát; G6 là 50% mụn dừa: 50% tro trấu.

Tiêu chuẩn cây con sâm thập tử xuất vườn để xuất là cây có chiều cao trên 10 cm, có từ 7 - 8 lá thật, cây sinh trưởng tốt, khỏe mạnh, không bị sâu, bệnh. Bảng 3 cũng cho thấy, cây con sâm thập tử trồng trên giá thể 80% mụn dừa: 20% tro trấu cho tỷ lệ cây con xuất vườn cao nhất là 93,3%, sự khác biệt rất có ý nghĩa thống kê so với các nghiệm thức cây con sâm thập tử được trồng trên giá thể 50% mụn dừa: 50% cát (tỷ lệ xuất vườn chỉ đạt 72,8%) và giá thể 50% mụn dừa: 50% tro trấu (tỷ lệ xuất vườn chỉ đạt 74,7%).

4. KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

4.1. Kết luận

Sử dụng môi trường MS bổ sung 2 mg/L BA kết hợp với 0,5 mg/L α NAA trong giai đoạn nhân chồi từ đốt thân cây sâm thập tử sẽ cho số chồi trung bình

cao nhất là 6,7 chồi sau 60 NNC. Môi trường MS bổ sung 0,5 mg/L α NAA kết hợp với 0,5 mg/L IBA là thích hợp cho việc tạo cây hoàn chỉnh từ các chồi hình thành, với số rễ trung bình đạt 6,1 rễ và chiều dài rễ trung bình là 5,4 cm sau 60 NNC. Ở giai đoạn vườn ươm, cây sâm thập tử thích hợp trồng trên giá thể có tỷ lệ phối trộn là 80% mụn dừa: 20% tro trấu, cho cây có tỷ lệ sống cao đạt 100%, chiều cao cây đạt trung bình 12,1 cm, số lá trung bình đạt 9,1 lá/cây tại thời điểm 40 ngày sau ươm.

4.2. Kiến nghị

Khảo sát chế độ phân bón, lượng nước tưới, giá thể phù hợp cho cây giai đoạn từ nuôi cấy mô đến ra ngoài vườn ươm. Tiếp tục nghiên cứu một số nhóm chất điều hòa sinh trưởng (kinetin, 2,4-D, TDZ) và môi trường khác (1/2MS, WPM) để tối ưu thêm quá trình nhân chồi, tạo rễ cũng như

phát sinh cơ quan từ mô sẹo nhằm đưa ra giải pháp hữu hiệu nhất cho công tác bảo tồn và phát triển cây sâm thập tử tại Vườn Quốc gia Lò Gò - Xa Mát.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Lê Thanh Hậu (2024). Xác định trình tự mã vạch DNA và xây dựng quy trình nhân giống *in vitro* đối với cây sâm thập tử (*Decaschistia* sp.). Luận văn thạc sĩ ngành Khoa học cây trồng, Trường Đại học Nông Lâm thành phố Hồ Chí Minh.
2. Đỗ Thị Xuyên (2008). Nghiên cứu phân loại họ bông (Malvaceae Juss.) ở Việt Nam. Luận án Tiến sĩ Sinh học chuyên ngành Thực vật học. Viện Sinh thái và Tài nguyên Sinh vật.
3. Ban, N. T., Khoi, N. K. and Phuong, V. X. (2003). List of plant species in Vietnam. *Publisher of Agriculture*, Ha Noi, 2, 3.
4. Phạm Hoàng Hộ (1999). *Malvaceae - Họ Bông, Cây cỏ Việt Nam, tập 1*. Nxb Trẻ, 516 - 532.
5. Chayamarit, K. and Balslev, H. (2019). *Flora of Thailand*, Volume 14, Part 2. The Forest Herbarium, Royal Forest Department, 185 - 358.
6. POWO (2024). Plants of the World Online. Facilitated by the Royal Botanic Gardens, Kew. <https://powo.science.kew.org>, truy cập ngày 10/5/2024.
7. H. M., Irshad, Rizwan, M., He, B. Z., Liu, S., Debnath, B., Mitra, Qiu, d. l. (2018). Silver nitrate (AgNO_3) boosted high - frequency multiple shoot regeneration from cotyledonary node explants of Okra (*Abelmoschus esculentus* L.). *Applied Ecology & Environmental Research*, 16(3), 3421 - 3435.
8. Trịnh Thị Hương, Võ Phan Nhật Khang, Lê Trương Minh Châu, Vạn Minh Hiếu 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(1), 216 - 221.
9. Singh S., Gill P., Sangwan A., Singh N. P. and Kaur A. (2020). Induction of branching in nursery pear plants through benzyladenine and heading back. *Indian Journal of Horticulture*, 77(1), 192 - 195.
10. Kumar, S. S., Manoj, P., Giridhar, P. (2016). Micropropagation for mass multiplication and enriched production of ascorbic acid in tissue culture foliage of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.). *In vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 52, 427 - 436.
11. Chapla P. I., Besson J. C. F., Olivera L. K., Silva J. M. D., Rocha A. C. D. S. and Stefanello S. (2009). pH, activated charcoal and gelling agents of the culture medium on the *in vitro* growth of *Miltonia flavesceus* Lindl. *Plant Cell Cult. Micropropag*, 5(2), 87 - 93.
12. Besson J. C. F., Oliveira L. K. and Bonett L. P. (2010). Source and concentration of carbohydrates on shoot growth and rooting of *Miltonia flavesceus* Lindl. *R. Bra. Bioci*, 8(1), 9 - 13.
13. Phan Xuân Huyền, Huỳnh Thị Ngoan và Nguyễn Thị Phương Hoàng (2017). 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*, 15(5), 664 - 672.
14. Phan Duy Hiệp, Nguyễn Trí Minh, Phan Xuân Huyền, Cao Đình Hùng, Đinh Văn Khiêm, 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 bố chính (*Hibiscus sagittifolius* Kurz) trong điều kiện *in vitro*. *Tạp chí Sinh học*, 36(1), 266 - 271.
15. Stefanello, S., Karsten, J., Müller, T. S., Tomczak, A. P., Bonett, L. P. and Schuelter, A. R. (2009). *In vitro* conversion of *Miltonia flavesceus* Lindl. roots and leaf tip cells in protocorm like bodies and plant regeneration. *Ciência e Agrotecnologia*, 33, 53 - 59.

16. Nguyễn Hữu Tính (2019). *Ảnh hưởng của giá thể và liều lượng phân lân, đạm đến sinh trưởng cây nghệ vàng (Curcuma longa L.) sau nuôi cấy mô trong vườn ươm*. Luận văn thạc sĩ ngành Khoa học cây trồng, Trường Đại học Nông Lâm thành phố Hồ Chí Minh.

17. Nguyễn Thị Huyền Trang, Vũ Thị Thu Hương, Vũ Ngọc Dung, Trịnh Thị Thanh Huyền và Ngô Quang Hường (2015). Nhân giống *in vitro* cây sâm bố chính. *Tạp chí Khoa học Lạc Hồng*, 4(12), 42 - 46.

IN VITRO MICROPROPAGATION OF SAM THAP TU (*Decaschistia* sp.)

Le Thanh Hau¹, Bui Minh Tri¹, Trinh Viet Nga²,
Doan Thi Hong Diem³, Pham Minh Duy¹, Nguyen Cao Kiet¹

¹Nong Lam University, Ho Chi Minh city, Vietnam

²Institute of Tropical Biology, Vietnam Academy of Science and Technology

³Tay Ninh Technical and Economics Intermediate School, Vietnam

Summary

Sam thap tu (*Decaschistia* sp.), which belongs to the Malvaceae family, is an herbal plant used in traditional medicine due to its high contents of pharmaceutical compounds and abilities to improve health, increase vitality and prevent neurasthenia. To develop a protocol for *in vitro* propagation of *Decaschistia* sp., this study was conducted with three experiments: (1) Evaluating the effects of BA and α NAA concentrations on shoot multiplication; (2) Assessing the effects of α NAA and IBA concentrations on rooting; (3) Examining the effects of growth media on *Decaschistia* plantlet development. The results showed that in the shoot multiplication phase, the *in vitro* single nodal cuttings cultured on the MS medium supplemented with 2.0 mg/L BA and 0.5 mg/L α NAA produced the highest number of shoots, reaching 6.7 shoots and 10.8 leaves per explant after 60 days of culture. For rooting, the *in vitro* shoots cultured on the MS medium supplemented with 0.5 mg/L α NAA and 0.5 mg/L IBA got the highest root numbers (6.1 roots/plantlet), root length (5.4 cm) and a 100% rooting rate after 60 days of culture. Afterwards, *Decaschistia* plantlets grown in a growth medium composed of 80% coconut coir and 20% rice husk ash exhibited the best growth, achieving a height of 12.14 cm, 9.08 leaves per plantlet and a 100% survival rate 40 days after transplanting.

Keywords: *Decaschistia* sp., micropropagation, shoot generation, root generation, growth media.

Ngày nhận bài: 22/7/2024

Ngày chuyển phản biện: 12/8/2024

Ngày thông qua phản biện: 20/8/2024

Ngày duyệt đăng: 30/8/2024