

**TRƯỜNG ĐẠI HỌC ĐÀ LẠT
KHOA SINH HỌC**



BÁO CÁO TỔNG KẾT

**ĐỀ TÀI KHOA HỌC SINH VIÊN CẤP TRƯỜNG
NĂM HỌC 2021-2022**

**BƯỚC ĐẦU NGHIÊN CỨU NHÂN GIỐNG *IN VITRO* CÂY CƠM CHÁY
(*SAMBUCUS JAVANICA* BLUME)**

Nhóm ngành khoa học: Tự nhiên

Người hướng dẫn: TS. Hoàng Thị Như Phương

ĐÀ LẠT, Tháng 5 năm 2022

**TRƯỜNG ĐẠI HỌC ĐÀ LẠT
KHOA SINH HỌC**



BÁO CÁO TỔNG KẾT

**ĐỀ TÀI KHOA HỌC SINH VIÊN CẤP TRƯỜNG
NĂM HỌC 2021-2022**

**BƯỚC ĐẦU NGHIÊN CỨU NHÂN GIỐNG *IN VITRO* CÂY CỜM CHÁY
(*SAMBUCUS JAVANICA* BLUME)**

Nhóm ngành khoa học: Tự nhiên

Sinh viên thực hiện: Võ Ngọc Thúy Vân

Nam, nữ: Nữ

Dân tộc: Kinh

Lớp, khoa: CSK43 – Khoa sinh học

Năm thứ: 3/Số năm đào tạo: 4

Ngành học: Công nghệ sinh học

Người hướng dẫn: TS. Hoàng Thị Như Phương

ĐÀ LẠT, Tháng 5 2022

LỜI CẢM ƠN

Trong suốt quá trình thực hiện đề tài, nhóm chúng tôi luôn nhận được sự quan tâm, hướng dẫn và giúp đỡ tận tình của các thầy, cô trong Khoa Sinh học cùng với sự giúp đỡ của anh chị, bạn bè trong phòng thí nghiệm Nuôi cấy mô thực vật và Tài nguyên thực vật.

Lời đầu tiên, chúng tôi xin cảm ơn Ban giám hiệu Trường Đại học Đà Lạt, Ban chủ nhiệm khoa Sinh học đã tận tình giúp đỡ, tạo điều kiện cho chúng tôi thực hiện đề tài này.

Đặc biệt, chúng tôi xin bày lòng biết ơn chân thành sâu sắc tới TS. Hoàng Thị Như Phương và Th.S Trần Thị Nhung đã trực tiếp giúp đỡ, hướng dẫn chúng tôi hoàn thành đề tài nghiên cứu.

Chúng tôi xin cảm ơn các anh, chị, các bạn thuộc phòng thí nghiệm Nuôi cấy mô thực vật đã trao đổi kinh nghiệm, chia sẻ những niềm vui nỗi buồn trong suốt thời gian làm việc tại phòng thí nghiệm và thực hiện nghiên cứu đề tài này.

Chúng tôi xin chân thành cảm ơn quý Thầy, Cô khoa Sinh học đã tận tình chỉ dạy và trang bị cho chúng tôi những kiến thức cần thiết trong suốt thời gian ngồi trên ghế giảng đường, làm nền tảng để có thể hoàn thành được bài đề tài nghiên cứu này.

Nhân dịp này, tôi xin cảm ơn gia đình đã tin tưởng và tạo điều kiện thuận lợi, luôn bên cạnh động viên tinh thần trong suốt thời gian học tập và hoàn thành đề tài này.

Một lần nữa, chúng tôi xin chân thành cảm ơn thầy/cô – người đã trực tiếp giúp đỡ, quan tâm, hướng dẫn chúng tôi hoàn thành tốt bài báo cáo này trong thời gian qua.

Xin chân thành cảm ơn!

Đà Lạt, 20 tháng 5 năm 2022

LỜI CAM ĐOAN

Chúng tôi xin cam đoan đây là đề tài nghiên cứu khoa học của chúng tôi được thực hiện tại Trường Đại học Đà Lạt, Khoa Sinh học, phòng nuôi cấy mô tế bào thực vật A19.5. Chúng tôi xin cam đoan các số liệu và kết quả trong đề tài hoàn toàn là trung thực. Chúng tôi xin chịu trách nhiệm về sự cam đoan này.

Đà Lạt, ngày 20 tháng 05 năm 2022

Chủ nhiệm đề tài

MỤC LỤC

LỜI CẢM ƠN	i
LỜI CAM ĐOAN	ii
DANH MỤC CHỮ VIẾT TẮT.....	iii
MỤC LỤC	iii
DANH MỤC BẢNG	vii
DANH MỤC HÌNH ẢNH	viii
LỜI MỞ ĐẦU	vii
PHẦN I - TỔNG QUAN TÀI LIỆU	4
1.1. Tổng quan về cây <i>Sambucus javanica</i> Blume	4
1.1.1. Nguồn gốc và phân bố.....	4
1.1.2. Đặc điểm sinh lý, sinh thái.....	4
1.1.3. Giá trị dược lý	5
1.1.4. Giá trị kinh tế	7
1.2. Tổng quan về nuôi cấy mô.....	8
1.2.1. Nuôi cấy mô tế bào thực vật (Lê, 2008).....	8
1.2.2. Phương pháp nuôi cấy mô và cơ quan tách rời (Chu, 1992).....	8
1.2.3. Phương pháp nuôi cấy mô sẹo	9
1.2.4. Các yếu tố ảnh hưởng đến nuôi cấy in vitro	10
1.2.4.1. Môi trường nuôi cấy	10
1.2.4.2. Mẫu nuôi cấy	12
1.3. Kỹ thuật vô trùng	12
1.3.1. Vô trùng dụng cụ và môi trường.....	12
1.3.1.1. Dụng cụ thủy tinh	12
1.3.1.2. Môi trường.....	13
1.3.2. Khử trùng mô thực vật	13
1.4. Tổng quan về tình hình vi nhân giống các loài thuộc chi <i>Sambucus</i>	13
PHẦN 2 - VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP.....	16
2.1. Địa điểm thời gian và mục đích thực hiện đề tài	16
2.2. Nội dung và phương pháp nghiên cứu	16
2.2.1. Nội dung.....	16
2.2.2. Phương pháp thu mẫu.....	17
2.2.3. Môi trường nuôi cấy.....	17
2.2.4. Điều kiện nuôi cấy	17
2.2.5. Bố trí thí nghiệm	17
2.2.6. Phương pháp xử lý số liệu.....	19
PHẦN 3 - KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN	20

3.1. Thí nghiệm 1: Khảo sát ảnh hưởng của chất khử trùng lên cây cơm cháy Com cháy.	20
3.1. Thí nghiệm 2: Khảo sát ảnh hưởng của 2,4D lên khả năng tạo mô sẹo của mẫu cây cơm cháy.....	21
3.2. Thí nghiệm 3: Khảo sát ảnh hưởng của BA lên khả năng bật chồi từ sẹo của cây cơm cháy.....	23
PHẦN 4: KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ.....	29
4.1. Kết luận.....	29
4.2. Kiến nghị.....	29
TÀI LIỆU THAM KHẢO.....	30
Tài liệu tham khảo trong nước.....	30
Tài liệu tham khảo nước ngoài.....	32

DANH MỤC BẢNG

Bảng 3. 1 Ảnh hưởng của chất khử trùng lên mẫu lá cây cơm cháy sau 1 tuần nuôi cấy trên môi trường MS	20
Bảng 3. 2 Tỷ lệ cảm ứng tạo sẹo của lá non sau 2 tuần nuôi cấy trên môi trường MS có bổ sung 2,4D	22
Bảng 3. 3 Ảnh hưởng của BA lên khả năng bật chồi từ mô sẹo có nguồn gốc từ môi trường bổ sung các nồng độ 2,4D khác nhau của cây cơm cháy sau 8 tuần nuôi cấy	26

DANH MỤC HÌNH ẢNH

Hình 1. 1 Cây com cháy	4
Hình 1. 2 Hoa cây com cháy	5
Hình 1. 3 Quả cây com cháy	5
Hình 2. 1 Mẫu lá com cháy	17
Hình 3. 1 Mẫu lá sau 1 tuần khử trùng trên môi trường MS không bổ sung chất điều hòa sinh trưởng	20
Hình 3. 2 Mẫu lá non cảm ứng tạo sẹo khi cấy trên môi trường MS có bổ sung 2,4D... ..	22
Hình 3. 3 Mức độ tăng sinh của mô sẹo khi chuyển từ môi trường 2,4D qua môi trường chứa BA	25
Hình 3. 4 Hình khối mô sẹo được chụp dưới kính hiển vi	24

DANH MỤC CHỮ VIẾT TẮT

BA	: 6-benzylaminopurine
IAA	: Indole-3-acetic acid
IBA	: Indole-3-butyric acid
TDZ	: Thidiazuron
GA3	: Gibberillic
KIN	: Kinetin (N6-furfuryladenine)
MS	: Murashie và Skoog (1962)
NAA	: α -Naphthalene acetic acid
2,4D	: 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid

**BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO
TRƯỜNG ĐẠI HỌC ĐÀ LẠT**

THÔNG TIN KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU CỦA ĐỀ TÀI

1. Thông tin chung:

- Tên đề tài: Bước đầu nghiên cứu nhân giống *in vitro* cây cơm cháy (*Sambucus javanica* Blume)
- Chuyên ngành: Công nghệ sinh học
- Sinh viên thực hiện: Võ Ngọc Thúy Vân
- Lớp: CSK 43 Khoa: Sinh học Năm thứ: 3 Số năm đào tạo: 4
- Người hướng dẫn: TS. Hoàng Thị Như Phương

2. Mục tiêu đề tài:

Tạo nguồn vật liệu *in vitro* thông qua nuôi cấy mô sẹo của cây *Sambucus javanica* Blume.

3. Tính mới và sáng tạo:

Hiện nay, ở Việt Nam chưa có nghiên cứu nào thực hiện nhân giống đối với loài *S. javanica*. Nghiên cứu này có thể góp phần khảo sát một số yếu tố lên khả năng nhân giống *in vitro* cây cơm cháy, từ đó làm nền tảng cho các nghiên cứu khác sâu hơn trong tương lai.

4. Kết quả nghiên cứu:

- Sử dụng NaClO 1% (20 phút) để khử trùng mẫu lá cây cơm cháy cho kết quả tốt nhất để tạo nguồn mẫu cây vô trùng cho các thí nghiệm tiếp theo.
- Môi trường MS có bổ sung 2,4D là phù hợp cho việc nuôi cấy tạo mô sẹo từ mẫu lá non cây cơm cháy.
- Dãy nồng độ BA sử dụng để khảo sát trong thí nghiệm trên chưa phù hợp cho cảm ứng bật chồi ở mẫu cơm cháy.

5. Đóng góp về mặt kinh tế - xã hội, giáo dục và đào tạo, an ninh, quốc phòng và khả năng áp dụng của đề tài:

Sambucus javanica Blume (cơm cháy) là một loài dược liệu dân tộc của Việt Nam và đã được thương mại hóa ở các nước Châu Âu và Bắc Mỹ. Hiện nay tại Việt Nam chưa được ứng dụng rộng rãi. Nghiên cứu này giúp góp phần đa dạng hóa nguồn tài nguyên dược liệu cho Việt Nam.

6. Công bố khoa học của sinh viên từ kết quả nghiên cứu của đề tài (*ghi rõ tên tạp chí nếu có*) hoặc nhận xét, đánh giá của cơ sở đã áp dụng các kết quả nghiên cứu (*nếu có*): chưa có công bố

Ngày tháng năm
Sinh viên chịu trách nhiệm chính
thực hiện đề tài
(ký, họ và tên)

Võ Ngọc Thúy Vân

Nhận xét của người hướng dẫn về những đóng góp khoa học của sinh viên thực hiện đề tài (phần này do người hướng dẫn ghi): Nhóm sinh viên đã thực hiện tốt các yêu cầu của thuyết minh đề tài đề ra.

Cơm cháy đã được nghiên cứu nhiều về hợp chất nhưng rất ít nghiên cứu về nhân giống. Nhóm bước đầu đã thực hiện tạo nguồn mẫu thông qua phương pháp nuôi cấy mô thông qua sẹo. Nhóm đã nuôi cấy thành công sọ khi nuôi mẫu lá trên môi trường MS có bổ sung 2,4-D. Tuy nhiên, do thời gian có hạn, các mẫu sẹo vẫn chưa tạo được chồi, nhưng cũng đưa ra một số kết luận có sự tương quan giữa nồng độ 2,4-D và BA ảnh hưởng đến sự tăng sinh của sẹo.

Trong quá trình thực hiện, nhóm sinh viên đã học được nhiều kiến thức và kỹ năng về phương pháp nghiên cứu nuôi cấy mô thông qua đọc tài liệu, thực nghiệm và viết báo cáo.

XÁC NHẬN CỦA TRƯỜNG ĐẠI HỌC
(tên và đóng dấu)

Ngày tháng 5 năm 2022
NGƯỜI HƯỚNG DẪN
(ký, họ và tên)



Hoàng Thị Như Phương

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO
TRƯỜNG ĐẠI HỌC ĐÀ LẠT

THÔNG TIN VỀ SINH VIÊN
CHỊU TRÁCH NHIỆM CHÍNH THỰC HIỆN ĐỀ TÀI

I. SƠ LƯỢC VỀ SINH VIÊN:

Họ và tên: Võ Ngọc Thúy Vân

Sinh ngày: 3 tháng 12 năm 2001

Nơi sinh: Thành phố Đà Lạt, Tỉnh Lâm Đồng

Lớp: CSK43

Khóa 43

Khoa: Sinh học

Địa chỉ liên hệ: Tổ 8, Kim Đồng, phường 6, Thành phố Đà Lạt, Tỉnh Lâm Đồng

Điện thoại: 0792341396

Email: 1911352@dlu.edu.vn

Ảnh 4x6

II. QUÁ TRÌNH HỌC TẬP (kê khai thành tích của sinh viên từ năm thứ 1 đến năm đang học):

* Năm thứ 1:

Ngành học: Công nghệ sinh học

Khoa: Sinh học

Kết quả xếp loại học tập: Khá

Sơ lược thành tích: 0

* Năm thứ 2:

Ngành học: Công nghệ sinh học

Khoa: Sinh học

Kết quả xếp loại học tập: Khá

Sơ lược thành tích: 0

XÁC NHẬN CỦA TRƯỜNG ĐẠI
HỌC

(ký tên và đóng dấu)

Ngày tháng năm
SINH VIÊN CHỊU TRÁCH NHIỆM
CHÍNH

(ký, họ và tên)

Võ Ngọc Thúy Vân

LỜI MỞ ĐẦU

Cây com cháy (*Sambucus javanica* Blume) là một loài dược liệu dân tộc của Việt Nam có nhiều tiềm năng trong việc cung cấp các hợp chất thứ cấp dùng trong lĩnh vực y học. Các bộ phận của cây được sử dụng làm thuốc giảm đau, lọc máu, kích thích ruột và bàng quang, hoặc thậm chí để làm chất độc. Nó cũng được cho là một chất hỗ trợ chống lại chứng tê, trị bệnh thấp khớp, co thắt, sung tấy và chấn thương (Acharya và cs., 2014). Chiết xuất từ cây com cháy có các hoạt động điều hòa miễn dịch để ngăn chặn tình trạng viêm và giảm tỷ lệ hoại tử (Putra và Rifa'I, 2019). Trong báo cáo gần đây nhất của Weng và cs. (2019) cho thấy các acid amin chiết xuất từ cây com cháy đã được báo cáo là có khả năng ức chế chủng virus *HCoV HCoV-NL63*.

Do đó, *Sambucus* là một chi các loại thảo mộc được biết đến rộng rãi với hiệu quả điều trị như một phương thuốc chống viêm, chống oxy hóa, trị tiểu đường và là tác nhân thúc đẩy tạo máu (Wira Eka Putra và cs., 2020). Chúng ta có thể kết luận rằng các loài thuộc chi *Sambucus* nói chung và *S. javanica* nói riêng, các chiết xuất và sản phẩm của nó có thể được coi là phụ gia dược liệu mạnh trong tương lai vì nhiều ứng dụng đã được chứng minh bằng các nghiên cứu lâm sàng, đặc biệt là khả năng tạo máu, kháng virus và điều hòa miễn dịch, chống viêm, kháng khuẩn. Cây com cháy thường được nhân giống bằng phương pháp gieo hạt và giâm cành.

Nuôi cấy mô là thuật ngữ dùng để chỉ quá trình nuôi cấy các bộ phận tách rời khác nhau của thực vật trong điều kiện vô trùng *in vitro*. Kỹ thuật nuôi cấy mô dùng cho các mục đích nhân giống và cải thiện di truyền, sản xuất sinh khối các sản phẩm hóa sinh, bệnh học thực vật, duy trì và bảo tồn các nguồn gen quý, v.v. (Lê, 2008).

Việc sử dụng phương pháp nuôi cấy mô giúp giải quyết các vấn đề mà khi nhân giống bằng các phương pháp truyền thống gặp phải như cung cấp số lượng cây con lớn trong thời gian ngắn với hệ số nhân cao, các cây con đồng nhất về mặt di truyền, tạo cây sạch bệnh, phục tráng giống cây trồng. Sự có mặt của các chất điều hòa sinh trưởng trong môi trường dinh dưỡng có tác động tích cực đến quá trình phát sinh hình thái và nâng cao hiệu quả của quá trình vi nhân giống.

Từ thực tiễn trên, chúng tôi tiến hành đề tài: **“Bước đầu nghiên cứu nhân giống *in vitro* cây *Sambucus javanica* Blume”** để khảo sát khả năng nhân nhanh của đối tượng

này trong điều kiện *in vitro* nhằm tạo ra nguồn cây con đáp ứng nhu cầu về giống của người tiêu dùng.

PHẦN I - TỔNG QUAN TÀI LIỆU

1.1. Tổng quan về cây *Sambucus javanica* Blume

1.1.1. Nguồn gốc và phân bố

Sambucus javanica Blume (cây com cháy) được tìm thấy lần đầu tiên vào năm 1826, thuộc chi *Sambucus*, họ Adoxaceae có nguồn gốc ở châu Á nhiệt đới và cận nhiệt đới, được tìm thấy ở Bhutan, Miến Điện, Campuchia, Trung Quốc (ngoại trừ miền bắc), Ấn Độ, Indonesia, Nhật Bản, Lào, Malaysia, Philippines, miền nam Thái Lan và Việt Nam (Acharya và cs., 2014). Ở Việt Nam cây mọc hoang ở miền núi, ven suối, bờ khe từ Lai Châu, Lào Cai, Cao Bằng, Lạng Sơn, Bắc Thái tới Lâm Đồng (Phạm Hoàng Hộ, 2000; Lương Y Hy, 2001; Nguyễn Thu Hằng, 2004; Đàm Đình Tiếp, 2020).

1.1.2. Đặc điểm sinh lý, sinh thái

Cây com cháy là một loại thảo mộc lâu năm và là cây bụi nhỏ mọc thành cụm, cao 1-2 m. Thân có rãnh hoặc nứt với vỏ màu be có thể bong ra, thân gỗ sần sùi (Marina Silalahi và cs., 2021).

Các lá có hình lông chim với mép lá hình răng cưa mọc đối xứng và có các lá chét từ 2–6 cặp. Kích thước của lá chét có chiều dài từ 9-10cm và chiều rộng từ 3-4cm. Mặt trên của lá có màu xanh lục nhạt với một gân giữa, trong khi mặt dưới có màu xám và thô trái ngược với mặt trên nhẵn hơn nhiều (Marina Silalahi và cs., 2021).



Hình 1. 1 Cây com cháy



Hoa nhỏ màu trắng mọc thành cụm, đài hoa và cánh hoa có đỉnh nhọn. Cụm hoa có các thể tuyến hình chén, màu vàng hoặc xanh. Hoa lưỡng tính, đều, đường kính 4–5 mm. Tràng hoa xoay tròn, có các thùy hình trứng, màu trắng hoặc màu kem, nhị xòe ra, bao phấn màu vàng, trắng hoặc kem (Marina Silalahi và cs., 2021).

Hình 1. 2 Hoa cây com cháy

Quả mọng hình cầu đường kính 3–4 mm, màu đen, tím đỏ hoặc hiếm khi đỏ tươi đến màu da cam, hình tròn, có mùi thơm nhẹ. Quả mọng có thể ép được và hạt có màu be hơi vàng được bao quanh bởi một chất tiết dính. Hạt hình trứng, thường dẹt ở bụng, có nhiều vân (Valkenburg 2003; Sujarwo và cs., 2020; Đàm Đình Tiếp, 2020).



Hình 1. 3 Quả cây com cháy

1.1.3. Giá trị dược lý

Cây com cháy được biết đến là loại cây có giá trị trong nông nghiệp, thực phẩm, và đặc biệt là trong y dược (Charlebois và cs., 2010). Các bộ phận của cây được sử dụng làm thuốc giảm đau, lọc máu, kích thích ruột và bàng quang. Nó cũng được cho là một chất hỗ trợ chống lại chứng tê, trị bệnh thấp khớp, co thắt, sung tấy và chấn thương, cũng như đối với sức khỏe hệ tuần hoàn và xương nói chung (Acharya và cs., 2014).

Phần lá của cây com cháy được dùng để chữa sung tấy, diệt côn trùng, trị tiêu chảy, làm mịn da, v.v. vì nó có chứa các hợp chất hóa học như flavonoid, glycosid, anthracon glycosid, saponin, steroid/triterpenoid và tanin. Chất chiết xuất từ lá của cây cho thấy hoạt tính chống lại vi khuẩn *Eschericia Coli* và *Salmonella Thypi* (Dasopang, 2017). Ngoài ra, lá của cây com cháy còn giúp điều trị rối loạn tiêu hoá, nhuận tràng; trong khi hoa và lá được sử dụng như một chất trị hôi miệng và lợi tiểu (Darwis, 2012).

Đồng thời lá, thân, hoa và bột lá còn được sử dụng để điều trị các bệnh khác nhau như sung tấy, bầm tím, gãy xương, bệnh thấp khớp, đau nhức, vàng da, beriberi, kiết lỵ

và viêm đường hô hấp (Aryanto, 2020; Rintani, 2020). Các acid amin từ chiết xuất của quả của cây cơm cháy (*Sambucus javanica subsp. Chinensis* (Lindl) Fukuoka) đã được báo cáo là có khả năng ức chế chủng virus *HCoV HCoV-NL63* (Weng và cs., 2019).

Chiết xuất từ cây cơm cháy hoạt động điều hòa miễn dịch để ngăn chặn tình trạng viêm và giảm tỷ lệ hoại tử (Putra và Rifa'I, 2019). Chiết xuất từ quả và lá của cây cơm cháy có hoạt tính tạo máu trong mô hình nghiên cứu chuột thiếu máu bất sản do *Cloramphenicol* (CMP) gây ra (Putra và Rifa'I, 2019). Ngoài ra, chiết xuất từ lá và quả của cây cơm cháy thực hiện các hoạt động điều hòa miễn dịch của chúng bằng cách tăng số lượng quần thể tế bào T điều hòa và tế bào T gây độc tế bào. Những kết quả này cho thấy cây cơm cháy có tác dụng điều trị đối với bệnh thiếu máu bất sản bằng cách thay đổi hệ thống miễn dịch như một tác nhân điều hòa miễn dịch (Putra và Rifa'I, 2020).

Ngoài *S. javanica* còn có các loài khác thuộc chi *Sambucus* có giá trị y học cao như: *Sambucus nigra*, *Sambucus canadensis*, *Sambucus chinensis*, v.v.

Chiết xuất của *S. nigra* còn được lựa chọn để đánh giá khả năng ức chế hoạt tính sinh học chống lại vùng liên kết thụ thể protein *SARS-CoV2 S1 (RBD)* gắn với thụ thể enzym chuyển đổi *Angiotensin 2 (ACE2)* tái tổ hợp ở người dựa trên xét nghiệm hấp thụ miễn dịch liên kết với enzym cạnh tranh (ELISA) (Anete Boroduskea, 2021).

Chiết xuất từ quả mọng của *S. nigra* và *S. canadensis* có tác dụng kháng virus, hoạt động chống oxy hóa cũng đã được chứng minh trong báo cáo của Youdim và cs. (2000). Sambucol®, một loại siro có chứa 38% chiết xuất tiêu chuẩn hóa từ quả cơm cháy, được phát triển và các nghiên cứu đã chỉ ra rằng nó có tác dụng vô hiệu hóa và giảm khả năng lây nhiễm của virus cúm A và B (ZakayRones và cs., 2004), các chủng HIV và phân lập lâm sàng (Sahpira -Nahor và cs., 1995), các chủng virus *Herpes simplex loại 1 (HSV-1)* và các phân lập lâm sàng.

Từ lâu, một số dân tộc đã sử dụng *Sambucus* như một nguồn thực phẩm và dược phẩm. *Sambucus* là một nhóm các loại thảo mộc được biết đến rộng rãi với hiệu quả điều trị như một phương thuốc chống viêm, chống oxy hóa, trị tiểu đường và là tác nhân thúc đẩy tạo máu (Wira Eka Putra và cs., 2020). *Sambucus* thường được nhân giống bằng hai phương pháp nhân giống truyền thống là gieo hạt và giâm cành. Tuy nhiên, để có thể nhân giống bằng phương pháp này, đòi hỏi phải có điều kiện ổn định về ánh sáng,

nhệt độ, pH và hàm lượng chất dinh dưỡng. Ngoài ra, chúng còn thường gặp các bệnh như: mặt nhện, rệp, sâu vẽ bùa, đốm lá và bệnh phấn trắng; từ đó làm giảm chất lượng sản phẩm của cây. Với những lợi ích về mặt y học và thực phẩm thì nhu cầu của con người ngày càng tăng dẫn đến việc các loài của chi *Sambucus* dần ít đi (Đàm Đình Tiếp, 2020; Acharya và cs., 2014).

1.1.4. Giá trị kinh tế

Các sản phẩm từ cây cơm cháy có thể tạo ra giá trị thương mại, đây là một loại cây trồng giúp thúc đẩy sự phát triển thương mại ở Florida. Cây cơm cháy có thể cung cấp nhiều sản phẩm cho thị trường như quả và hoa là hai sản phẩm chính được bán, ngoài ra lá, vỏ, rễ, gỗ và cành giâm từ cây cơm cháy Mỹ cũng được buôn bán trên thị trường (Charlebois và cs., 2010; Byers và cs., 2014).

Quả cơm cháy và hoa cơm cháy được bán chủ yếu để làm nguyên liệu cho sản xuất các sản phẩm thực phẩm và đồ uống. Các sản phẩm cuối cùng được làm từ quả cơm cháy và cây cơm cháy bao gồm đồ uống không cồn, chẳng hạn như trà, nước trái cây, siro và rượu bia không cồn, và một loạt các đồ uống có cồn bao gồm rượu vang, gin, bia, v.v. Ngoài ra còn có các sản phẩm khác như thạch, mứt, bánh nướng và các loại bánh ngọt khác. Là một chất bổ sung chế độ ăn uống hoặc thuốc chữa cảm lạnh và cúm, cơm cháy được bán dưới dạng nước ép, chiết xuất nguyên chất, hoặc như một thành phần trong viên nang, kẹo cao su hoặc viên ngậm. Cơm cháy cũng có thể được sử dụng như một chất tạo màu thực phẩm tự nhiên và làm thuốc nhuộm cho hàng dệt may.

Nghiên cứu cho biết quả cơm cháy được bán với giá 5 USD / pound cho nhà máy rượu, 11 USD / pound cho các nhà máy sản xuất thực phẩm chức năng (Cernusca và cs., 2011). Một nghiên cứu vào năm 2009 về các nhà sản xuất cơm cháy của Hoa Kỳ đã báo cáo quả cơm cháy tươi hoặc đông lạnh bán tại các chợ nông sản hoặc trực tuyến với giá từ 3 USD / pound đến 5 USD / pound (Cernusca và cs., 2011).

Một đánh giá hiện tại về giá trực tuyến cho thấy cơm cháy khô được bán với giá từ 20 đến 31 USD / pound và hoa cơm cháy khô được bán với giá từ 4,10 USD đến 4,40 USD / ounce. Nghiên cứu thị trường ước tính doanh số bán cơm cháy để sản xuất thực phẩm hoặc thực phẩm chức năng đạt tổng trị giá 113 triệu USD Mỹ vào năm 2019

(Grebow và Krawiec 2020).

Nghiên cứu thị trường ước tính doanh số bán cơm cháy để điều chế các loại thuốc về hô hấp và cảm cúm. Nhu cầu về quả cơm cháy đang tăng lên như một thành phần hỗ trợ chức năng miễn dịch trong đồ uống, bao gồm cả thị trường đồ uống có chứa trà và pre / probiotic (Grebow và Krawiec 2020).

1.2. Tổng quan về nuôi cấy mô

1.2.1. Nuôi cấy mô tế bào thực vật (Lê, 2008)

Công nghệ sinh học là ứng dụng tổng hợp của sinh hóa học, vi sinh học và các khoa học về công nghệ để đạt được sự ứng dụng công nghiệp các năng lực của vi sinh vật, các tế bào, các tổ chức nuôi cấy và các thành phần của chúng.

Nhờ ứng dụng các thành tựu của công nghệ sinh học như kỹ thuật nuôi cấy mô tế bào, kỹ thuật tái tổ hợp di truyền, v.v. Người ta có thể tạo ra những giống cây trồng với năng suất cao, chống chịu được với sâu bệnh, hạn hán và điều kiện nghèo phân bón.

Nuôi cấy mô là thuật ngữ dùng để chỉ quá trình nuôi cấy các bộ phận tách rời khác nhau của thực vật trong điều kiện vô trùng *in vitro*. Kỹ thuật nuôi cấy mô dùng cho cả hai mục đích nhân giống và cải thiện di truyền, sản xuất sinh khối các sản phẩm hóa sinh, bệnh học thực vật, duy trì và bảo tồn các nguồn gen quý, v.v.

Thuật ngữ nhân giống *in vitro* (*in vitro propagation*) hay còn gọi là vi nhân giống được sử dụng đặc biệt cho việc ứng dụng các kỹ thuật nuôi cấy mô để nhân giống thực vật, bắt đầu bằng nhiều bộ phận khác nhau của thực vật có kích thước nhỏ, sinh trưởng ở điều kiện vô trùng trong các ống nghiệm hoặc trong các loại bình nuôi cấy khác.

Trong thực tế, các nhà vi nhân giống dùng thuật ngữ nhân giống *in vitro* và nuôi cấy mô bắt đầu bằng các mảnh cắt nhỏ của thực vật, sạch vi sinh vật, được nuôi cấy vô trùng. Thuật ngữ đầu tiên dùng trong quá trình nhân giống là explant (mẫu vật) tương đương với các phương thức nhân giống khác là giâm cành, chiết cành, ghép cành hoặc gieo hạt.

1.2.2. Phương pháp nuôi cấy mô và cơ quan tách rời (Chu, 1992)

Năm 1946, Wetmore đã tiến hành nuôi cấy đỉnh chồi cây nho dại, cùng với một số tác giả khác, ông đã chứng minh các bộ phận của cây đều có thể nuôi cấy khi gặp điều kiện thuận lợi.

Nhu cầu dinh dưỡng khi nuôi cấy các bộ phận khác nhau của cây là khác nhau nhưng có thể thấy một số yêu cầu chung như nguồn carbon dưới dạng đường và các muối của các nguyên tố đa lượng (N, P, K, Ca) và vi lượng (Mg, Fe, Mn, Co, Zn, v.v.). Ngoài ra còn cần một số chất đặc biệt như vitamin (B1, B6, B3, v.v.) và các chất điều hoà sinh trưởng. Muốn duy trì sinh trưởng và phát triển của cơ quan nuôi cấy cần thường xuyên cấy chuyển qua môi trường mới.

Nuôi cấy đốt thân là một phương pháp phổ biến được sử dụng rộng rãi trong kỹ thuật nuôi cấy mô với tần số đột biến thấp, mẫu cấy thường được sử dụng là đoạn thân ngắn có chứa chồi ngọn hoặc chồi bên.

1.2.3. Phương pháp nuôi cấy mô sẹo

Mô sẹo là một khối tế bào phát triển vô tổ chức, hình thành do sự phân biệt hóa của các tế bào đã phân hóa. Mô sẹo có khả năng tái sinh thành cây hoàn chỉnh trong điều kiện môi trường có chất điều hòa sinh trưởng thích hợp (phát triển nhanh trên môi trường có sự hiện diện của auxin) (Yeoman và cs., 1973).

Nuôi cấy mô sẹo cho phép các khối tế bào không có hình dạng nhất định tăng lên từ sinh trưởng không phân hóa của mẫu vật trên môi trường dinh dưỡng rắn vô trùng. Mẫu vật thường là các cơ quan tử nhỏ hoặc các mẫu mô. Các khối tế bào này không tương ứng với mọi cấu trúc mô đặc trưng của cây hoàn chỉnh.

Thuật ngữ nuôi cấy mô sẹo được sử dụng do sự phân chia vô tổ chức của tế bào mà lúc đầu được nghĩ là nó cảm ứng với sự tổn thương thực thể của thực vật trong quá trình tách ra khỏi cây hoàn chỉnh. Tuy nhiên, sau đó người ta nhận thấy nó được cảm ứng bởi các chất điều hòa sinh trưởng thực vật trong môi trường dinh dưỡng rắn (Nguyễn, 2006).

Ngoài những phương pháp nuôi cấy trên thì còn có các phương pháp khác như: nuôi cấy phôi, nuôi cấy mô phân sinh, nuôi cấy bao phấn, nuôi cấy tế bào đơn, v.v. (Lê, 2008).

1.2.4. Các yếu tố ảnh hưởng đến nuôi cấy *in vitro*

1.2.4.1. Môi trường nuôi cấy

Một trong những yếu tố quan trọng nhất trong sự tăng trưởng, phát triển hình thái của mô và tế bào thực vật trong nuôi cấy mô là thành phần môi trường nuôi cấy. Thành phần môi trường nuôi cấy mô và tế bào thực vật thay đổi tùy theo loài và bộ phận nuôi cấy. Đối với cùng loại mẫu cấy nhưng tùy theo mục đích thí nghiệm mà thành phần môi trường sẽ thay đổi tùy theo giai đoạn phân hóa của mẫu cấy (Lê, 2008).

Môi trường nuôi cấy mô và tế bào thực vật tuy đa dạng nhưng đều có các thành phần cơ bản sau:

- Các muối khoáng đa lượng (nitrogen, potassium, calcium, phosphorus, magnesium và sulfur).
- Các muối khoáng vi lượng (sắt, kẽm, mangan, boron, copper, molybdenum và cobalt).
- Các vitamin (myo-inositol, thiamine (B1), nicotinic acid (PP), pyridoxine (B6), v.v.).
- Các amino acid.
- Nguồn carbon: một số các loại đường (glucose, fructose, saccarose, maltose, v.v.).
- Các chất điều hòa sinh trưởng (auxin, cytokinin, gibberellin, ethylene, acid abscisic).
- Các chất hữu cơ bổ sung: nước dừa, dịch chiết nấm men, dịch chiết khoai tây, bột chuối khô, v.v.
- Chất làm thay đổi trạng thái môi trường: agar, agarose, v.v.

Tất cả các hợp chất này đều tham gia vào một hoặc nhiều chức năng trong sự sinh trưởng, phân hóa của thực vật nuôi cấy *in vitro* (Lê, 2008; Nguyễn, 2008).

Việc lựa chọn môi trường nuôi cấy với thành phần hóa học đặc trưng phụ thuộc vào một số yếu tố:

- Đối tượng cây trồng hoặc mô nuôi cấy khác nhau có nhu cầu khác

nhau về thành phần môi trường.

- Mục đích nghiên cứu hoặc phương thức nuôi cấy khác nhau.
- Trạng thái môi trường khác nhau.

* Ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng thực vật

Chất điều hòa sinh trưởng là các chất hữu cơ có bản chất hóa học khác nhau, nhưng đều có tác dụng điều tiết quá trình sinh trưởng phát triển của cây. Các chất điều hòa sinh trưởng đóng vai trò quan trọng trong việc điều chỉnh sinh lý, quá trình sinh trưởng và phát triển của cây. Chúng có thể có nguồn gốc nội sinh do chính cơ thể thực vật tiết ra (phytohormone) hoặc được tổng hợp nhân tạo có cấu trúc tương tự với phytohormone. Các chất này được sử dụng với liều lượng rất nhỏ, nếu ở liều lượng cao có thể gây độc (một số loại được sử dụng làm thành phần chính của thuốc diệt cỏ) (Moore, 2012).

Dựa vào tác dụng sinh lý, các chất điều hòa sinh trưởng và phát triển thực vật được chia làm thành hai nhóm cơ bản: chất kích thích sinh trưởng và chất ức chế sinh trưởng (Hoàng và cs., 2006). Trong lĩnh vực nuôi cấy mô tế bào thực vật, chất điều hòa sinh trưởng thường được bổ sung trong môi trường nuôi cấy là các chất thuộc nhóm: auxin, cytokinin, gibberellin, acid abscisic và ethylene (Nguyễn, 2008).

* Auxin

Auxin được tạo ra từ vùng mô phân sinh ngọn của thực vật, sau đó được vận chuyển xuống các cơ quan phía dưới theo hướng gốc. Do vậy, càng xa đỉnh ngọn thì hàm lượng auxin càng giảm. Ngoài chồi ngọn, auxin còn được tổng hợp ở các cơ quan khác như lá non, quả non, v.v với một lượng rất nhỏ (Vũ, 2008).

Auxin can thiệp vào nhiều hiện tượng sinh lý và hoạt động tùy thuộc vào nồng độ hay sự kết hợp của chúng với các chất điều hòa sinh trưởng khác, ngoài ra còn tác dụng lên quá trình giãn của các tế bào gây nên sự tăng trưởng theo đường kính của cơ quan và toàn cây, kích thích sự phân chia tế bào tạo ra mô sẹo, hoạt hóa các vùng tế bào xuất hiện rễ để tạo mầm rễ bất định, ức chế sự phát triển của chồi nách và sự hình thành phôi soma trong môi trường nuôi cấy mô sẹo (Vũ, 2008; Davies, 2012; Moore, 2012).

Auxin là một chất có nhân indole, gồm hai loại là auxin tự nhiên và auxin nhân tạo. Các loại auxin thường được dùng là: IAA, IBA, NAA (Nguyễn, 2008).

* *Cytokinin*

Theo Davies (2012), cơ quan tổng hợp cytokinin là hệ thống rễ. Cytokinin được vận chuyển từ rễ lên các bộ phận trên mặt đất theo hướng ngược chiều với auxin. Ngoài ra, một lượng nhỏ cytokinin cũng được tổng hợp từ một số cơ quan non như lá non, quả non, v.v.

Cytokinin có vai trò quan trọng trong việc tạo cơ quan thực vật, chúng kích thích mạnh mẽ sự hình thành chồi non, duy trì sự sống của mô, kích thích sự phân chia tế bào và định hướng tế bào trong con đường phân hóa, tạo điều kiện thuận lợi cho nuôi cấy *in vitro* (Nguyễn, 2008). Do đó, cytokinin là một chất đối kháng với auxin và được sử dụng để kích thích sự hình thành chồi trong nuôi cấy mô, tăng hệ số nhân chồi.

- Nguồn carbon (thường sử dụng sucrose).
- Các tác nhân làm rắn (tạo gel) môi trường (thường sử dụng là agar) (Nguyễn, 2007).

Môi trường được Murashige và Skoog (MS) (phụ lục 1) nghiên cứu thành công vào năm 1962 (Murashige và cs., 1962). Hiện nay, môi trường MS là một trong những loại môi trường giàu dinh dưỡng, được sử dụng rộng rãi cho các loài thực vật vì nó chứa tất cả các chất dinh dưỡng cần thiết cho sự phát triển của cây trong ống nghiệm (Kumar và cs., 2011). Theo Phillips và cs., (2019), MS là môi trường thích hợp để tái sinh cây do hàm lượng nitơ tổng số cao (với tỷ lệ amoni cao hơn nitrate).

1.2.4.2. *Mẫu nuôi cấy*

Chọn lọc mẫu để đặt vào trong môi trường nuôi cấy là một bước vô cùng quan trọng, nó quyết định đến sự thành công của quá trình vi nhân giống. Một số yếu tố cần chú ý khi lựa chọn mẫu là: kiểu hình (màu sắc, hình dạng, v.v.), cơ quan lấy mẫu (lá, cuống lá, đọt thân, v.v.), độ tuổi sinh lý (các mẫu còn non như đỉnh sinh trưởng, chồi ngủ, v.v.) và độ khỏe của mẫu (mẫu được lấy từ cây mẹ khỏe, không bị bệnh, v.v.) (Murashige, 1974).

1.3. **Kỹ thuật vô trùng**

1.3.1. *Vô trùng dụng cụ và môi trường*

1.3.1.1. *Dụng cụ thủy tinh*

Thông thường các dụng cụ thủy tinh dùng trong các thí nghiệm thường được xử lý bằng dung dịch sulfocromate một lần đầu trước khi đưa vào sử dụng, về sau chỉ cần rửa sạch bằng xà phòng, tráng sạch bằng nước cất và để thật ráo trước khi sử dụng.

Trong trường hợp các dụng cụ thủy tinh dùng trong các thí nghiệm nuôi cấy mô và tế bào thực vật đòi hỏi vô trùng, có thể khử trùng trong tủ sấy ở nhiệt độ cao trong nhiều phút hoặc nhiều giờ. Các dụng cụ này luôn được gói trong giấy nhôm hoặc hộp kim loại để tránh bị nhiễm trở lại sau khi đã khử trùng.

1.3.1.2. *Môi trường*

Môi trường nuôi cấy thường được hấp khử trùng trong nồi hấp (autoclave), khử trùng bằng áp suất hơi nước bão hòa. Thời gian hấp từ 15-30 phút ở áp suất hơi nước bão hòa là 103,4 kPa (1atm) tương đương với nhiệt độ 121°C. Ở nhiệt độ 121°C, hầu hết các sinh vật có trong môi trường đều bị tiêu diệt, kể cả ở dạng bào tử. Sau khi vô trùng cần phải làm khô nắp ống nghiệm hoặc nút bông để tránh bị nhiễm trở lại.

1.3.2. *Khử trùng mô thực vật*

Nuôi cấy mô hầu hết các bộ phận khác nhau của thực vật giống như hạt giống, phôi, noãn, đế hoa, lá, đầu rễ, thân củ, v.v. Tùy theo sự tiếp xúc với môi trường bên ngoài, các bộ phận này chứa nhiều hay ít vi khuẩn và nấm ở ngoài bề mặt. Phương pháp vô trùng mô cây thông dụng nhất hiện nay là các chất hoá học có hoạt tính diệt nấm khuẩn. Hiệu lực diệt nấm khuẩn của các chất này phụ thuộc vào thời gian xử lý, nồng độ và khả năng xâm nhập của chúng vào các kẽ ngách lồi lõm trên bề mặt mô cây, khả năng đẩy hết các bọt khí bám trên bề mặt mô cây. Để tăng tính linh động và khả năng xâm nhập của chất diệt khuẩn, thông thường người ta xử lý mô cây trong vòng 30 giây trong rượu ethylic 70% sau đó mới xử lý dung dịch diệt khuẩn. Đồng thời, người ta thêm các chất giảm sức căng bề mặt như Tween 80, Fotoflo, Teepol vào dung dịch diệt nấm khuẩn.

1.4. **Tổng quan về tình hình vi nhân giống các loài thuộc chi *Sambucus***

Năm 2011, nhóm nghiên cứu của Song và cs., đã vi nhân giống *S. canadensis* L. cv. Aurea thành công thông qua chồi ngủ. Kết quả cho thấy môi trường tối ưu cho cảm ứng chồi là MS bổ sung 4,0 mg/l BA + 0,2 mg/l IAA + 0,2 mg/l GA₃ với tỷ lệ 94,17%; môi trường tăng sinh tối ưu là MS bổ sung 0,5 mg/l BA + 0,05 mg/l NAA với hệ số

nhân là 6,1 chồi/mẫu; môi trường tạo rễ tăng trưởng tốt nhất và tỷ lệ ra rễ là 97% là MS bổ sung 0,1mg/l NAA và 2 mg/l BA.

Năm 2012, nhóm nghiên cứu của Wang và cs., đã nuôi cấy mô cây *S. williamsii* Hance thông qua nuôi cấy chồi bên. Kết quả cho thấy môi trường tốt nhất để tăng sinh chồi là môi trường MS bổ sung 3 mg/l BA + 0,2 mg/l NAA + 0,03 mg/l TDZ + 2 mg/l GA₃; môi trường để tạo rễ tốt nhất là MS bổ sung 0,4 mg/l NAA + 0,2 mg/l IBA.

Năm 2013, nhóm nghiên cứu của Charlebois và Brassard, đã khảo sát tác dụng của chất khử trùng trong nuôi cấy mô *S. canadensis*. Kết quả khử trùng tốt nhất thu được là trong dung dịch natri hypoclorit 3% trong 20 phút sau đó ngâm trong dung dịch bạc nitrat 0,5% trong 20 phút, cuối cùng ngâm trong dung dịch acid xitric và acid ascorbic.

Năm 2013, nhóm nghiên cứu của Wu và cs., đã tối ưu hóa môi trường cho mô sẹo, cảm ứng nhiều chồi và nuôi cấy rễ cây con của *S. chinensis* với môi trường tối ưu cho cảm ứng mô sẹo của lá là môi trường MS bổ sung 1,5 mg/l 2, 4-D; môi trường tối ưu cho cuống lá là MS bổ sung 0,2 mg/l NAA + 1,0 mg/l Kinetin, MS bổ sung 0, 2 mg/l 2,4D + 1,0 mg/l Kinetin, MS bổ sung 0,2 mg/l NAA + 3,0 mg/l Kinetin + GA; môi trường tối ưu cho cảm ứng nhiều chồi là môi trường MS bổ sung 2 mg/l BA; môi trường tốt nhất để tạo rễ nuôi cấy mô là ½ MS bổ sung 0,3 mg/l NAA.

Năm 2020, nhóm nghiên cứu của Borodusske, nuôi cấy mô sẹo bằng chồi của *S. nigra* sử dụng chất khử trùng là bạc nitrat 1% trong 20 phút cho tỷ lệ nhiễm thấp nhất; môi trường cho tỷ lệ mô sẹo cao nhất là WPM bổ sung 0,2 mg/l 2,4D kết hợp với 1 mg/l Kinetin; và môi trường thích hợp cho nuôi cấy huyền phù tế bào là WPM bổ sung 2 mg/l TDZ và 2 mg/l NAA.

Năm 2020, nhóm nghiên cứu của Kopper và cs., đã vi nhân giống thành công *S. nigra* L. thông qua nuôi cấy chồi với chất khử trùng là natri hypoclorit nồng độ 2,8% trong 10 phút; môi trường thấy sự tăng sinh chồi tốt nhất là MS bổ sung 0,05 mg/l NAA và 2 mg/l BA; môi trường tạo ra nhiều chồi và rễ dài nhất là MS bổ sung 0,1 NAA mg/l và 0,5 mg/l mT.

Hiện nay, ở Việt Nam chưa có nghiên cứu nào thực hiện nhân giống đối với loài *S. javanica*. Nghiên cứu này có thể góp phần khảo sát một số yếu tố lên khả năng nhân giống *in vitro* cây com cháy, từ đó làm nền tảng cho các nghiên cứu khác sâu hơn trong

tương lai.

PHẦN 2 - VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Địa điểm thời gian và mục đích thực hiện đề tài

Thời gian thực hiện

Từ tháng 11 năm 2021 đến tháng 5 năm 2022.

Mục đích nghiên cứu

Tạo nguồn vật liệu *in vitro* thông qua nuôi cấy mô sẹo cây com cháy.

Đối tượng nghiên cứu

Mẫu cây com cháy (*Sambucus javanica* Blume) được thu tại huyện Lạc Dương tỉnh Lâm Đồng.

Dụng cụ trong nghiên cứu

Nồi hấp Autoclave (Tommy SS-325).

Tủ cấy vô trùng (ESCO).

Thiết bị hỗ trợ (cân phân tích, cân kỹ thuật, máy đo pH).

Bịch nilon (7x14 cm).

Dụng cụ thủy tinh (pipet, cốc đong, ống đong, đĩa thủy tinh).

Đèn cồn, dao mổ, pank, v.v.

Các dụng cụ khác.

2.2. Nội dung và phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Nội dung

Khảo sát ảnh hưởng của chất khử trùng lên cây com cháy .

Khảo sát ảnh hưởng của 2,4D lên khả năng tạo mô sẹo của mẫu cây com cháy.

Khảo sát ảnh hưởng của BA lên khả năng bật chồi từ mô sẹo của cây com cháy.

2.2.2. Phương pháp thu mẫu

Mẫu cây được thu từ những cây com cháy trưởng thành, khỏe mạnh, không nhiễm nấm bệnh.



Hình 2. 1 Mẫu lá com cháy

2.2.3. Môi trường nuôi cấy

Môi trường MS được sử dụng để nuôi cấy mẫu ở tất cả các thí nghiệm. Tùy theo mục đích của từng thí nghiệm mà sử dụng độc lập hay phối hợp với chất điều hòa sinh trưởng BA.

Chuẩn bị môi trường:

Môi trường MS được sử dụng độc lập hoặc phối hợp với 2,4D hoặc BA tùy mục đích của thí nghiệm. Tiến hành điều chỉnh pH của môi trường đã pha về 6,0 bằng các dung dịch NaOH 1N và HCl 1N sau đó phân phối vào các bình đựng môi trường (500 ml; 250 ml) và hấp khử trùng ở nhiệt độ 121°C với áp suất 1atm trong 20 phút. Sau khi hấp, đổ môi trường vào bịch nilon (đã được hấp vô trùng) có kích thước 7×14 cm, mọi thao tác đổ môi trường được thực hiện trong tủ cấy vô trùng.

2.2.4. Điều kiện nuôi cấy

Tất cả các giai đoạn sinh trưởng và phát triển của cây đều được chiếu sáng 16 giờ/ngày bằng đèn LED có cường độ $40 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ với nhiệt độ phòng là $25^\circ \text{C} \pm 2$.

2.2.5. Bố trí thí nghiệm

Thí nghiệm 1: Khảo sát ảnh hưởng của chất khử trùng lên cây com cháy.

Mục tiêu: Nghiên cứu chất khử trùng phù hợp cho việc vào mẫu cây com cháy.

Mẫu cây: Lá non.

Quy trình khử mẫu: Mẫu lá non được rửa với xà phòng trong 5 phút rồi rửa sạch với nước, rửa lại với nước hấp vô trùng hai lần, tiếp tục rửa với NaClO 1% (20 phút) hoặc Ca(ClO)₂ 7% (20 phút) có bổ sung Tween 80 (Wang và cs., 2012; Kopper và cs., 2020; Borodusske, 2020). Mẫu sau khi rửa trong chất khử trùng được tráng kỹ bằng nước hấp vô trùng 3 lần. Sau đó được cấy vào môi trường MS trong vòng 1 tuần theo dõi.

Chỉ tiêu theo dõi: Tỷ lệ mẫu nhiễm (%), Tỷ lệ mẫu chết/sống (%).

Thí nghiệm 2: Khảo sát ảnh hưởng của 2,4D lên khả năng tạo mô sẹo của mẫu cây com cháy.

Mục tiêu: Nghiên cứu nồng độ chất điều hòa sinh trưởng 2,4D, loại mẫu cây (lá non) cho hiệu quả tạo mô sẹo tốt nhất.

Mẫu cây: Mẫu còn sống ở thí nghiệm 1.

Môi trường thí nghiệm: Các mẫu lá còn sống ở thí nghiệm 1, cấy vào môi trường MS bổ sung 0; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 mg/l 2,4D và đặt trong môi trường không có ánh sáng (Wu và cs., 2013).

Chỉ tiêu theo dõi: Tỷ lệ mẫu tạo sẹo (%), đặc điểm sẹo. Số liệu được thu sau 14 ngày nuôi cấy.

Thí nghiệm 3: Khảo sát ảnh hưởng của BA lên khả năng bật chồi từ sẹo của cây com cháy.

Mục tiêu: Nghiên cứu nồng độ chất điều hòa sinh trưởng BA lên loại mẫu cây (lá non) cho hiệu quả bật chồi tốt nhất.

Mẫu cây: Các mẫu sẹo thu từ thí nghiệm 2.

Môi trường nuôi cấy: Các mẫu sẹo thu từ thí nghiệm 2 được cấy vào môi trường MS bổ sung 0; 0,5; 1; 1,5; 2; 2,5 mg/l BA.

Chỉ tiêu theo dõi: Số chồi trung bình/mẫu, số mẫu bật chồi, số liệu được thu sau 8 tuần nuôi cấy.

2.2.6. Phương pháp xử lý số liệu

Số liệu được xử lý bằng phần mềm Microsoft office excel 2019 và phần mềm IBM SPSS Statistics 20.

PHẦN 3 - KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

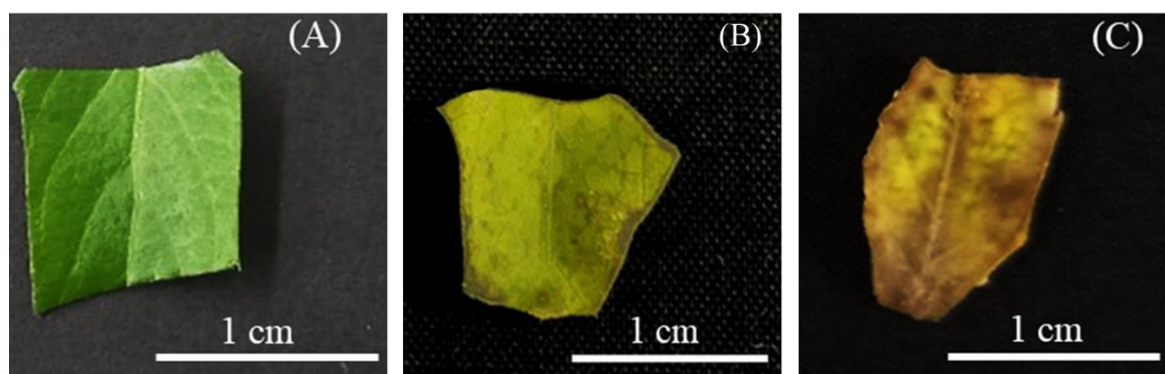
3.1. Thí nghiệm 1: Khảo sát ảnh hưởng của chất khử trùng lên cây cơm cháy.

Giai đoạn khử trùng mẫu cây là giai đoạn đầu tiên có vai trò quan trọng trong việc tạo ra nguồn mẫu nuôi cấy khởi động cho quy trình vi nhân giống. Mỗi loài cây đều có phản ứng khác nhau đối với từng loại chất khử trùng, nồng độ và thời gian xử lý khác nhau. Chính vì vậy, việc đánh giá ảnh hưởng của các loại chất khử trùng đến việc khử trùng mẫu cây lá non cây cơm cháy được tiến hành để tìm ra loại chất khử trùng phù hợp. Hiệu quả khử trùng của NaClO 1% hoặc Ca(ClO)₂ 7% trong 20 phút có bổ sung Tween 80 đối với mẫu lá non cây cơm cháy (Hình 3.1).

Sau một tuần nuôi cấy trên môi trường MS được thể hiện ở Bảng 1.

Bảng 3. 1 Ảnh hưởng của chất khử trùng lên mẫu lá non cây cơm cháy sau 1 tuần nuôi cấy trên môi trường MS

Chất khử trùng	Tỷ lệ nhiễm (%)	Tỷ lệ chết (%)	Tỷ lệ sống (%)
NaClO 1%	5,65	1,77	92,58
Ca(ClO) ₂ 7%	16,67	3,01	75,92



Hình 3. 1 Mẫu lá sau 1 tuần khử trùng trên môi trường MS không bổ sung chất điều hòa sinh trưởng

- (A) Mẫu lá ban đầu sau khi được xử lý chất khử trùng.
- (B) Mẫu lá còn sống sau 1 tuần nuôi cấy.
- (C) Mẫu lá bị chết sau 1 tuần nuôi cấy.

Việc khử trùng mẫu cấy phải đảm bảo loại bỏ được các vi sinh vật gây hại (giảm tỷ lệ nhiễm đến mức thấp nhất) nhưng vẫn giữ được sức sống của mẫu cấy (tỷ lệ sống phải đạt cao nhất) thì mới có ý nghĩa trong việc tạo nguồn mẫu nuôi cấy khởi động trong vi nhân giống. Kết quả thu được ở Bảng 3.1 cho thấy khử trùng mẫu lá non cây cơm cháy bằng NaClO 1% trong 20 phút là tốt hơn hẳn (với 92,58% mẫu sống và chỉ có 5,65% mẫu bị nhiễm) so với nghiệm thức còn lại. Kết quả thí nghiệm còn cho thấy xử lý mẫu bằng Ca(ClO)₂ 7% trong 20 phút là không phù hợp, chưa loại bỏ được vi sinh vật (tỷ lệ nhiễm là 16,67%) trong khi đó lại còn gây độc đến mẫu cấy (tỷ lệ chết là 3.01%) (Hình 3.1c).

Việc tạo mẫu vô trùng trong nuôi cấy mô phụ thuộc vào nhiều yếu tố khác nhau từ điều kiện sinh lý mẫu, loại chất khử trùng, nồng độ và thời gian khử trùng cũng cần được đánh giá phù hợp cho từng loại mẫu khác nhau. Các mẫu mỏng, nhỏ, dễ tổn thương nên được khử trùng với các loại hóa chất ít gây tổn thương mẫu, thời gian và nồng độ khử trùng thấp. Trong khi đó các mẫu cứng, dày có thể xem xét gia tăng nồng độ và thời gian khử trùng để tăng hiệu quả khử trùng cho mẫu cấy.

Mẫu lá còn sống, có cảm ứng với môi trường (Hình 3.1b) được tiếp tục làm nguồn mẫu để cấy vào môi trường thí nghiệm cảm ứng tạo sẹo.

Như vậy, kết quả từ thí nghiệm 1 cho thấy xử lý mẫu lá non cây cơm cháy bằng NaClO 1% trong 20 phút là tốt nhất để tạo nguồn mẫu cấy vô trùng cho các thí nghiệm tiếp theo.

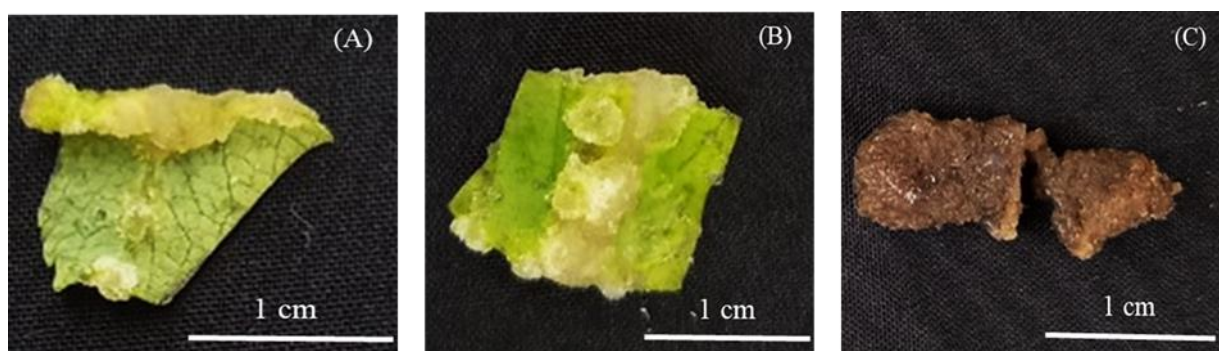
3.2. Thí nghiệm 2: Khảo sát ảnh hưởng của 2,4D lên khả năng tạo mô sẹo của mẫu cây cơm cháy.

Cảm ứng tạo mô sẹo là giai đoạn nhân nhanh nguồn mẫu vô trùng ban đầu, mô sẹo là khối tế bào chưa biệt hóa phát sinh một cách vô tổ chức, có thể cảm ứng phát sinh phôi vô tính hoặc chồi bất định. Để cảm ứng hình thành mô sẹo thì các chất điều hòa sinh trưởng thực vật là thành phần quan trọng của môi trường nuôi cấy. Trong số các auxin, 2,4D sử dụng rất có hiệu quả trong việc tạo mô sẹo ở nhiều loài thực vật. Theo Thomas và đồng tác giả (1996). chất điều hòa sinh trưởng 2,4D mặc dù có hoạt tính rất yếu trong kích thích tạo chồi và rễ bất định nhưng lại là auxin kích thích tạo mô sẹo và phôi rất hiệu quả. Vì vậy, thí nghiệm này được tiến hành nhằm khảo sát ảnh hưởng của

các nồng độ 2,4D khác nhau đến việc cảm ứng tạo mô sẹo từ mẫu cây lá non vô trùng cây com cháy.

Bảng 3. 2 Tỷ lệ cảm ứng tạo sẹo của lá non sau 2 tuần nuôi cấy trên môi trường MS có bổ sung 2,4D

Nồng độ 2,4D	Tỷ lệ mẫu cảm ứng (%)	Tỷ lệ mẫu không cảm ứng (%)	Tỷ lệ mẫu chết (%)
Đối chứng	0	0	100
0.5	94,06	0,91	5,02
1	91,72	0,00	8,28
1.5	96,07	0,00	3,93
2	95,90	0,00	4,10
2.5	95,27	0,00	4,73



Hình 3. 2 Mẫu lá non cảm ứng tạo sẹo khi cấy trên môi trường MS có bổ sung 1,5mg/l 2,4D

(A) Sau 1 tuần (B) Sau 2 tuần (C) Mẫu chết sau 2 tuần

Một tuần nuôi cấy trên môi trường MS, mẫu lá vẫn xanh, hơi cong chứng tỏ đã có phản ứng do trao đổi chất giữa mẫu cây và môi trường (Hình 3.1 b). Các mẫu này tiếp tục được cấy sang môi trường có bổ sung 2,4D. Sau 1 tuần, mẫu đã có phản ứng phát sinh sẹo ở quanh vết cắt và trên gân lá (Hình 3.2 a). Sau 2 tuần, cụm sẹo hình thành khá rõ và gia tăng kích thước, các tế bào sẹo khá đồng đều (Hình 3.2 b).

Qua bảng số liệu và hình ảnh cho thấy 2,4D là chất điều hòa sinh trưởng thích hợp cho quá trình cảm ứng hình thành mô sẹo ở mẫu lá non cây com cháy (tỷ lệ cảm

ứng ở tất cả các nghiệm thức đều trên 90%). Đối với nghiệm thức đối chứng không có chất điều hòa sinh trưởng, không ghi nhận được mẫu cảm ứng tạo sẹo, với 100% mẫu không cảm ứng và chết sau đó. Khi so sánh kết quả thu được giữa các nghiệm thức có bổ sung 2,4D thì thấy rằng tỷ lệ mẫu cảm ứng và mẫu chết có sự khác biệt không đáng kể giữa các nồng độ (1,5; 2,0 và 2,5 mg/l). Ở nồng độ thấp của 2,4D cho thấy có một số lượng nhỏ mẫu không cảm ứng (chỉ 0,91%), điều này cho thấy mẫu lá non cây com cháy nuôi cấy trên môi trường có bổ sung 2,4D sẽ cảm ứng hình thành mô sẹo tốt. Hình ảnh sẹo hình thành trong các môi trường không có sự khác biệt giữa các nghiệm thức.

Trong các nghiên cứu tạo mô sẹo thì lá được sử dụng như là một nguồn mẫu phổ biến do lá có thể tái sinh liên tục và đều đặn, việc thu mẫu lá không làm chết cây làm mẫu. Nhu mô thịt lá, phần chủ yếu của phiến có vách sơ cấp mỏng còn tiềm năng phân chia tế bào. Nhờ tiềm năng này, các tế bào nhu mô có vai trò hàn gắn vết thương và thường được dùng trong nuôi cấy tế bào *in vitro* (Vũ Thị Hiền, 2018).

Ngoài ra ánh sáng cũng là một yếu tố góp phần cho việc hình thành mô sẹo. Trong thí nghiệm này, chúng tôi đã để nguồn mẫu vào tối 2 tuần, sau đó đưa ra sáng. Tabaezadeh và Khosh-Khui (1981) trong nghiên cứu nuôi cấy bao phấn của *Rosa* đã báo cáo rằng sự hình thành mô sẹo tăng lên trong bóng tối, so với điều kiện ánh sáng, khi bao phấn của *R. darnascena* và *R. hybrida* được nuôi cấy trên môi trường tạo sẹo. Họ cũng chỉ ra rằng ánh sáng làm giảm số lượng bao phấn tạo ra mô sẹo trên các môi trường khác nhau. Kaoru Kawai và cs. (1993) đã nghiên cứu đề tài nuôi cấy mô cây Lô Hội (*Aloe arborescens* Miller var. natalensis Berger), kết quả cho thấy ở điều kiện tối tỷ lệ tạo mô sẹo cao hơn và thu được nhiều mô sẹo hơn là ở điều kiện ánh sáng. Năm 2018, nhóm nghiên cứu của Jarawan Summart đã thực hiện đề tài cảm ứng mô sẹo và ảnh hưởng của điều kiện môi trường nuôi cấy đến sự phát triển của gạo thơm Thái Lan. Kết quả đưa ra là khi nuôi cấy ở môi trường 2,4D và nuôi cấy ở nhiệt độ $25 \pm 2^\circ\text{C}$ trong điều kiện tối sẽ tạo ra mô sẹo chất lượng cao hơn.

Như vậy, mẫu lá non cây trên môi trường MS có 2,4D đều có thể tạo sẹo với tỷ lệ rất cao. Nồng độ 1,5 mg/l 2,4D cho tỷ lệ cảm ứng tạo sẹo cao nhất đối với mẫu lá non của cây com cháy.

3.3. Thí nghiệm 3: Khảo sát ảnh hưởng của BA lên khả năng bật chồi từ sẹo

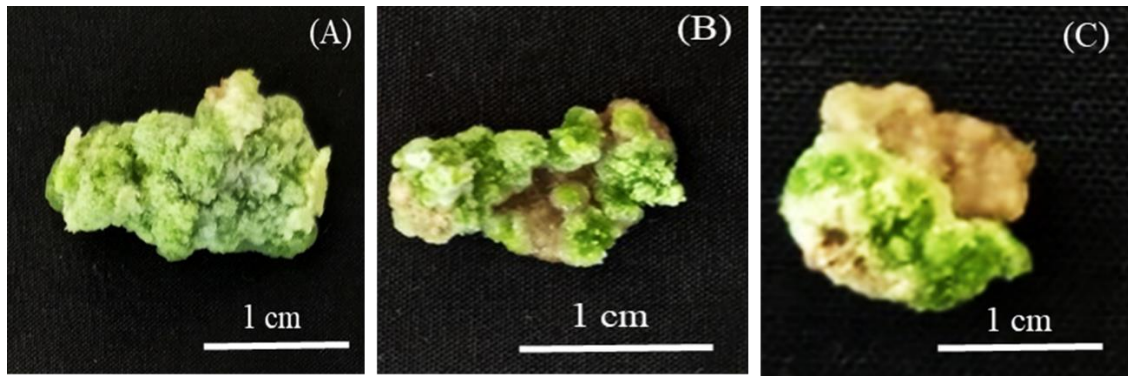
của cây cơm cháy.

Mô sẹo được xem như là giai đoạn trung gian của quá trình nhân nhanh mẫu cấy, chính vì vậy việc tìm ra môi trường thích hợp cho quá trình biệt hóa, phát sinh chồi hoặc phôi vô tính từ mô sẹo là bước tiếp theo trong nhân giống *in vitro*. Cytokinin là nhóm chất điều hòa sinh trưởng thường được sử dụng để cảm ứng bật chồi và nhân nhanh chồi, trong đó BA là chất được dùng rộng rãi nhất và có cảm ứng tốt trên nhiều đối tượng cây trồng khác nhau. Tuy nhiên, các chất thuộc nhóm auxin tích lũy trong khối mô sẹo (hàm lượng auxin nội sinh trong mô sẹo) có thể sẽ có ảnh hưởng nhất định đến hiệu quả bật chồi của các chất thuộc nhóm cytokinin trong giai đoạn nuôi cấy tiếp theo.

Mục đích của thí nghiệm này là đánh giá hiệu quả bật chồi của BA lên mô sẹo có nguồn gốc từ môi trường bổ sung các nồng độ 2,4D khác nhau. Các mẫu sẹo thu từ các nghiệm thức của thí nghiệm 2 được cấy đồng đều vào môi trường MS bổ sung 0; 0,5; 1; 1,5; 2; 2,5 mg/l BA.

Các chất điều hòa sinh trưởng thực vật đóng một vai trò quan trọng trong phản ứng tạo mô sẹo trong điều kiện *in vitro*. Nhiều nghiên cứu đã chứng minh tác dụng tích cực của 2,4D trong cảm ứng mô sẹo (Hesami và cs., 2018). Trong các nghiên cứu về cảm ứng phát sinh phôi vô tính ở nhiều loài thực vật thì auxin, đặc biệt là 2,4D thường được sử dụng nhiều nhất (Umehara và Kamada, 2005). Điều này được chứng minh bởi những thí nghiệm ở cà rốt (Borkird và cs., 1986), *F. sellowiana* (Cruz và cs., 1990), *Populus spp.* (Michler, 1995), ca cao (Canhoto và cs., 1999), *Paspalum scrobilatum* (Avcı và Can, 2006). Nồng độ auxin trong môi trường tạo phôi được sử dụng khác nhau và thay đổi tùy theo từng loài cũng như từng loại kiểu gen của thực vật.

Tuy nhiên, khi thực hiện cấy sẹo từ thí nghiệm 2 vào môi trường có bổ sung BA sau 8 tuần chỉ thấy số lượng và kích thước của các tế bào sẹo tăng lên chứ không xuất hiện chồi (Hình 3.3, Hình 3.4).

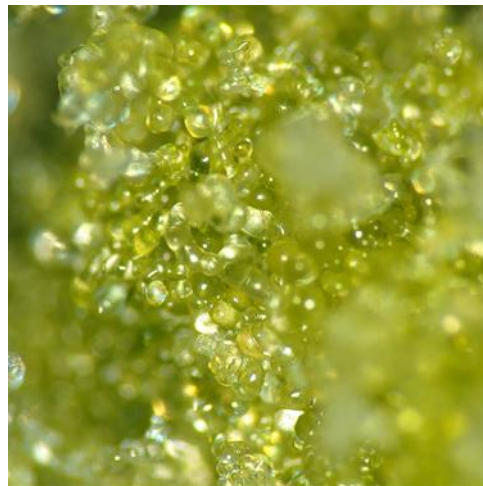


Hình 3. 3. Mức độ tăng sinh của mô sẹo khi chuyển từ môi trường 0.5 mg/l 2,4D qua môi trường bổ sung 0.5mg/l BA

(A) Mức độ tăng sinh mạnh.

(B) Mức độ tăng sinh bình thường.

(C) Mức độ tăng sinh yếu.



Hình 3. 4 Hình khối mô sẹo được chụp dưới kính hiển vi

Tỷ lệ sẹo cảm ứng và chất lượng sẹo được thu nhận sau 8 tuần và thống kê ở Bảng 3.3.

Bảng 3. 3 Ảnh hưởng của BA lên khả năng bật chồi từ mô sẹo có nguồn gốc từ môi trường bổ sung các nồng độ 2,4D khác nhau của cây com cháy sau 8 tuần nuôi cấy

Nồng độ 2,4D (mg/l) từ thí nghiệm 2	Nồng độ BA (mg/l)	Tỷ lệ mẫu sẹo sống (%)	Chất lượng sẹo (%)		
			Yếu	Bình thường	Mạnh
0,5	0,5	95	11	17	72
	1	100	27	33	40
	1,5	100	27	21	52
	2	100	46	14	40
	2,5	88	53	30	17
1	0,5	97	36	46	18
	1	98	12	49	39
	1,5	98	17	39	44
	2	92	26	39	35
	1,5	90	50	29	21
1,5	0,5	100	41	29	29
	1	100	40	43	17
	1,5	98	35	40	25
	2	100	38	58	4
	2,5	100	59	34	7
2	0,5	100	66	31	3
	1	100	66	25	9
	1,5	100	50	41	9
	2	100	58	32	10
	2,5	100	72	21	8
2,5	0,5	100	77	23	0
	1	97	67	33	0
	1,5	100	75	22	3
	2	98	77	21	2
	2,5	100	65	30	5

Kết quả thu được từ thí nghiệm trên cho thấy:

- Dãy nồng độ BA khảo sát trên chưa thích hợp cho việc bật chồi từ mô sẹo.
- Mô sẹo có nguồn gốc từ môi trường bổ sung 0,5 mg/l 2,4D được nuôi cấy trên môi trường chứa 0,5 mg/ml BA là cho kết quả cảm ứng tăng sinh mô sẹo tốt nhất với 72% mô sẹo cảm ứng mạnh và chỉ 11% mô sẹo yếu.

- Khi so sánh giữa các nghiệm thức cho thấy có sự tương quan giữa nồng độ của 2,4D trong giai đoạn tạo mô sẹo với nồng độ BA ở giai đoạn bật chồi. Ví dụ, mẫu tăng sinh tốt nhất trên môi trường bổ sung 1 mg/l BA là mô sẹo có nguồn gốc từ môi trường chứa 1 mg/l 2,4D (và kết quả tương tự cũng được ghi nhận ở các dải nồng độ khác).

- Các khối mô sẹo có nguồn gốc từ cùng một nồng độ 2,4D cho phản ứng tăng sinh mô sẹo giảm dần khi gia tăng nồng độ BA. Ví dụ mô sẹo có nguồn gốc từ môi trường chứa 0,5 mg/l 2,4D cho kết quả tăng sinh tốt nhất ở nồng độ 0,5 mg/l BA với tỷ lệ 72% và giảm dần và chỉ còn đạt 40% ở nồng độ 2,0 mg/l BA; 17% ở nồng độ 2,5 mg/l BA.

- Trong cùng một môi trường bổ sung nồng độ BA như nhau thì mô sẹo có nguồn gốc từ môi trường có chứa 2,4D với nồng độ càng cao thì sự phát triển của mô sẹo càng yếu. Như ở nồng độ 1,0 mg/l BA tỷ lệ mô sẹo tăng sinh mạnh giảm dần khi nồng độ 2,4D tăng lên, đạt tỷ lệ cao nhất là ở nồng độ 0,5 mg/l 2,4D là 40% và giảm dần còn 9% ở nồng độ 2,0 mg/l 2,4D và ở nồng độ 2,5 mg/l 2,4D thì không còn khả năng tăng sinh tốt nữa.

Như vậy, có sự tương tác rõ rệt giữa 2,4D trong giai đoạn cảm ứng tạo mô sẹo và BA trong giai đoạn bật chồi.

Khi bổ sung cytoinin ngoại sinh vào môi trường nuôi cấy sự thay đổi gradient nồng độ chất điều hòa sinh trưởng diễn ra đồng thời thiết lập một gradient nồng độ chất điều hòa sinh trưởng mới. Điều này giúp phá vỡ trạng thái ngủ và kích thích sự phát triển chồi (Ngô Thị Xuyên và cs., 2018). Như đã được chứng minh trước đó cytokinin có tác dụng kích thích sự hình thành phôi vô tính từ nuôi cấy mô sẹo không có khả năng phát sinh phôi được báo cáo trên các loài cây đậu như *Phaseolus* (Malik và Saxena, 1992), *Trifolium* (Maheshwaran và Williams, 1986), cây đậu phộng (Gill và Saxena, 1992). Tỷ lệ nồng độ giữa auxin và cytokinin đóng một vai trò quyết định trong việc điều chỉnh cảm ứng hình thành mô sẹo thực vật (Ikeuchi và cs., 2013). Khi tỷ lệ giữa hàm lượng auxin và cytokinin (nội sinh, ngoại sinh) cân bằng sẽ kích thích cảm ứng hình thành mô sẹo (Domagalska và cs., 2011). Việc sử dụng nguồn mẫu là lá non giúp cho quá trình biệt hóa trở nên thuận lợi hơn khi các tế bào còn non để xảy ra quá trình phân biệt hóa để tạo thành mô sẹo, đồng thời các mẫu lá có chứa gân lá là bộ phận giúp vận chuyển các chất dinh dưỡng cũng như các chất điều hòa sinh trưởng đến các cơ quan thông qua

hệ thống mạch dẫn; lá non còn là nơi có thể sản sinh và tổng hợp auxin giúp cho quá trình tạo mô sẹo thuận lợi hơn.

Bên cạnh việc đánh giá dựa trên hình thái bên ngoài và mức độ cảm ứng của mô sẹo, khối mô sẹo được giải phẫu và quan sát dưới kính hiển vi cho thấy mô sẹo gồm nhiều lớp tế bào hình cầu mỏng nước, xốp nhưng vẫn không có khả năng bật chồi (có thể là nồng độ BA bổ sung vào môi trường nuôi cấy chưa thích hợp). Lúc đầu khối mô sẹo là các tế bào có màu xanh nhưng khi không có khả năng bật chồi thì các tế bào đó chỉ tiếp tục nhân lên, tạo ra các tế bào chưa biệt hóa và chức năng của các tế bào bị giảm dần. Không còn sự xuất hiện của diệp lục, các tế bào dần chuyển sang màu trắng, qua một thời gian thì chuyển sang màu nâu, không còn khả năng phát triển, các tế bào chết dần và chết từ ngoài vào trong (càng ở ngoài thì màu càng đậm). Hiện tượng chết dần mẫn từ ngoài vào trong có thể là do khối mô sẹo càng lớn thì khả năng vận chuyển các chất dinh dưỡng từ môi trường đến các tế bào càng hạn chế do trong mô sẹo không có mạch dẫn. Vì vậy, khối tế bào bên ngoài sẽ thiếu chất dinh dưỡng và chết dần đi.

Từ kết quả mà chúng tôi thu được từ thí nghiệm trên, chúng tôi đưa ra được một vài kết luận của thí nghiệm này:

- Nồng độ BA khảo sát chưa thích hợp cho việc bật chồi từ mô sẹo.
- Nồng độ 0,5 mg/l 2,4D chuyển sang môi trường 0,5mg/l BA cho tỷ lệ mô sẹo tăng sinh mạnh cao nhất (72%).
- Nồng độ các chất điều hòa sinh trưởng cao làm giảm khả năng tăng sinh của mô sẹo.
- Tỷ lệ tăng sinh và còn sống sau 8 tuần của mô sẹo đạt trên 90% ở tất cả các nghiệm thức.

PHẦN 4: KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

4.1. Kết luận

Qua kết quả thu được từ các thí nghiệm trên chúng tôi đưa ra một số kết luận rằng:

- Sử dụng NaClO 1% (20 phút) để khử trùng mẫu lá cây com cháy cho kết quả tốt nhất để tạo nguồn mẫu cây vô trùng cho các thí nghiệm tiếp theo.
- Môi trường MS có bổ sung 2,4D là phù hợp cho việc nuôi cấy tạo mô sẹo từ mẫu lá non cây com cháy.
- Dãy nồng độ BA sử dụng để khảo sát trong thí nghiệm trên chưa phù hợp cho cảm ứng bật chồi ở mẫu com cháy.

4.2. Kiến nghị

Vì hạn chế về mặt thời gian, nên chúng tôi chưa thực hiện được quá trình nhân chồi từ mô sẹo của cây com cháy một cách hoàn chỉnh, vì vậy chúng tôi có một số kiến nghị sau:

- Khảo sát môi trường dinh dưỡng thích hợp lên khả năng bật chồi từ khối mô sẹo cây *S. javanica* Blume.
- Cấy chuyển mô sẹo có nguồn gốc từ môi trường bổ sung 2,4D sang môi trường MS để làm giảm nồng độ 2,4D trong khối mô sẹo trước khi cấy chuyển sang môi trường có BA để bật chồi.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Tài liệu tham khảo trong nước

1. Bùi, V. T. V., Vũ, T. T., Thái, T. H., Đỗ, K. T., & Dương, T. N. (2014). Nghiên cứu hình thái giải phẫu và cấu trúc phôi trong quá trình phát sinh phôi vô tính Sâm Ngọc
2. Hằng, N. T. (2004). “Nghiên cứu đặc điểm thực vật, thành phần hoá học và một số tác dụng sinh học của chi *Sambucus L.* ở Việt Nam”. Luận án tiến sĩ, Đại học Y Hà Nội.
3. Hằng, N. T., Kỳ, P. T. & Hiền, T. V. (1998). “Thăm dò tác dụng chống oxi hóa của flavonoid chiết từ cây tiếp cốt thảo (*Sambucus chinensis lindl*)”. Tạp chí dược liệu, 3(4), 118-120.
4. Hộ, P. H. (2000). Cây cỏ Việt Nam. Nxb Trẻ, tập 3, 223.
5. Hoàng, M. T., Nguyễn, Q. T., & Vũ, Q. S. (2006). Giáo trình sinh lý thực vật.
6. Lê Văn Hoàng (2008). Công nghệ nuôi cấy mô tế bào thực vật. Giáo trình.
7. Lương, Y. H., L, & H. V. V. (2001). Cây thuốc vị thuốc Đông y. Nxb Hà Nội.
8. Ngô, T. X., Nguyễn, T. D., Đặng, T. K. T., Nguyễn, T. H. T., Dương, Đ. H., Đỗ, Đ. G., & Trần, T. T. (2018). Xác định thành phần hóa học và hoạt tính sinh học trong mẫu lá xáo tam phân (*Paramignya trimera* (Oliv.) Guill) và nghiên cứu sự phát sinh hình thái từ các nguồn mẫu khác nhau. Tạp chí khoa học Đại học Văn Lang 9: 30-39
9. Nguyễn Thị Mỹ Duyên, Trương Phi Yên, Nguyễn Vũ Phong (2020). Bước đầu tạo phôi vô tính từ mô sẹo lá cây xáo tam phân (*Paramignya trimera* (Oliv.) Guillaum). Luận án Tiến sĩ, Hội nghị Công nghệ Sinh học Toàn quốc 2020, 879-884.
10. Nguyễn, Đ. L. (2008). Công nghệ tế bào. NXB Đại học quốc gia thành phố Hồ Chí Minh. Moore, T. C. (2012). Biochemistry and physiology of plant hormones. Springer Science & Business Media.

11. Nguyễn, Đ. L. (2008). Công nghệ tế bào. NXB Đại học quốc gia thành phố Hồ Chí Minh.
12. Nguyễn, H. L. (2007). Giáo trình công nghệ tế bào. Nhà xuất bản đại học Huế.
13. Nguyễn, T. M. D., Trương, P. Y., & Nguyễn, V. P. (2020). Bước đầu tạo phôi vô tính từ mô sẹo lá cây xáo tam phân (*Baramignya trimera* (oliv.) guillaum)
14. Tiếp, Đ. Đ. (2020). Xác định thành phần hóa học và đánh giá hoạt tính của một số hợp chất hóa học từ loài cơm cháy (*Sambucus javanica* Reinew). Luận văn thạc sĩ hóa học, Đại học Thái Nguyên.
15. Tùng, T. T. (2019). Nghiên cứu hiện trạng tài nguyên một vài cây thuốc được người dân sử dụng tại xã Mường Lựm – huyện Yên Châu – tỉnh Sơn La. Khóa luận tốt nghiệp, Đại học Lâm Nghiệp, Hà Nội.
16. Vũ Thị Hiền (2018). Nghiên cứu quá trình tái sinh và nhân giống in vitro cây sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis* Ha et grushv.) bằng kỹ thuật nuôi cấy lớp mỏng tế bào. Luận án Tiến sĩ Sinh học. Học viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam.
17. Vũ, V. V. (2008). Giáo trình sinh lý thực vật. NXB Giáo dục.

Tài liệu tham khảo nước ngoài

1. Acharya, J. and A. Mukherjee (2014). An account of Sambucus L. in the Himalayan regions of india. *Indian Journal of Life Sciences*, 4(1), 77-83.
2. Aryanto A. Tangkal Corona (2020). Eldeberry diyakini Tingkatkan Imunitas. Published on the Internet. <https://www.wartaekonomi.co.id/read296929/tangkal-corona-eldeberry-diyakinitingkatkan-imunitas>. Retrieved 7 August 2020. (In bahasa).
3. Avci, S., & Can, E. (2006). Efficient somatic embryogenesis from immature inflorescences of Dallisgrass (*Paspalum dilatatum* Poir). *Propag. Ornam. Plants*, 6: 134-139.
4. Bhaskaran S., & Smith R. H. (1990). Regeneration in cereal tissue cultures. *Crop Sci.*, 30: 1328-1337.
5. Borkird, C., Choi, J. H., & Sung, Z. R. (1986). Effect of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid on the expression of embryogenic program of carrot. *Plant Physiol.*, 81: 1143-1145
6. Boroduske, A. (2020). Callus culture of black elder (*Sambucus nigra*): initiation and basic chemical characterization. In of the 78th scientific conference of the universityof Latvia (p. 59).
7. Byers, P. L., Tomas, A. L., Gold, M. A., Cernusca, M. M., & Godsey. L. D. (2014). *Growing and Marketing Elderberries in Missouri*. Columbia, MO: University of Missouri.
8. Canhoto, J. M., Lopes, M. L. & Crus, G. S. (1999). Somatic embryogenesis and plant regeneration in myrtle (*Myrtaceae*). *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 57: 13-21
9. Cernusca, M., Gold, M., & Godsey. L. 2011. *Elderberry Market Research*. Columbia, MO: University of Missouri.
10. Charlebois, D., & Brassard, N. (2013, June). Micropropagation of American elderberry: disinfection of explants. In I International Symposium on Elderberry 1061 (pp. 165-173).
11. Charlebois, D., Byers, P. L., Finn, C. E., & Tomas. A. L. (2010). "Elderberry: Botany, Horticulture, Potential." *Horticultural Reviews* 37.

12. Cruz, G. S., Canhoto, J. M., & Abreu, M. A. (1990). Somatic embryogenesis and plant regeneration from zygotic embryos of *Feijoa sellowiana* Berg. *Plant Sci.*, 66: 263-270
13. Darwis, W. (2012). Tanaman obat yang terdapat di kota Bengkulu yang berpotensi sebagai obat penyakit dan gangguan pada sistem pencernaan manusia. *Konservasi Hayati*, 8(1), 1-15.
14. Dasopang, E. S. (2017). Skrining Fitokimia dan Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Sangitan (*Sambucus javanica* Reinw) Terhadap Pertumbuhan Bakteri *Escherichia coli* dan *Salmonella thypi*. *BIOLINK (Jurnal Biologi Lingkungan Industri Kesehatan)*, 4(1), 54-62.
15. Davies, P. J. (2012). *Plant hormones and their role in plant growth and development*. Springer Science & Business Media.
16. Davies, P. J. (2012). *Plant hormones and their role in plant growth and development*. Springer Science & Business Media.
17. Gill, R., & Saxena, P. K. (1992). Direct somatic embryogenesis and regeneration of plant from seedling explant of peanut (*Arachis Hypogae* L.). *Can. J. Bot.*, 70: 1186-1192
18. Grebow, J. & Krawiec, S. (2020). Ingredients to Watch: Te List. *Nutritional Outlook* 23:1.
19. Hesami, M., Daneshvar, M. H., & Yoosefzadeh-Najafabadi, M. (2018). Establishment of a protocol for in vitro seed germination and callus formation of *Ficus religiosa* L., an important medicinal plant. *Jundishapur J Nat Pharm Prod*, 13(4), e62682.
20. Kaoru, K., Hidehiko, B., Takaaki, K., Keisuke, F., & Tohru, M. (1993). Tissue culture of *Aloe arborescens* Miller var. *natalensis* Berger. doi:10.1002/ptr.2650070705
21. Kopper, E., Granilshchikova, M., Leichtfried, T., & Reizenzein, H. (2020). Micropropagation and pathogen elimination in elderberry (*Sambucus nigra* L.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 142(3), 647-652.
22. Kumar, N., & Reddy, M. P. (2011). In vitro plant propagation: a review. *Journal of forest and environmental science*, 27(2), 61-72.

23. Maheshwaran, G., & Williams, E. G. (1986). Somatic embryogenesis factors influencing coordinate behavior of cells as an embryogenic group. *Ann. Bot.*, 57: 442-462.
24. Malik, K. A., & Saxena, P. K. (1992). Regeneration in *Phaseolus vulgaris* L.: High frequency induction of direct shoot formation in intact seedlings by N6- benzylaminopurine and thidiazuron. *Planta*, 186: 384-389
25. Michler, C. H. (1995). Somatic embryogenesis in *Populus* spp. In: Somatic embryogenesis in Woody Plants, Jain S.M., Gupta P.K. and Newton R.J.
26. Moore, T. C. (2012). Biochemistry and physiology of plant hormones. Springer Science & Business Media.
27. Murashige, T. (1974). Plant propagation through tissue cultures. *Annual review of plant physiology*, 25(1), 135-166.
28. Murasnige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tohaoco tissue cultures. *Physiol. plant*, 15(3), 473-497.
29. Phillips, G. C., & Garda, M. (2019). Plant tissue culture media and practices: an overview. *In vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 55(3), 242-257.
30. Putra, W. E., & Rifa'i, M. (2020). Assessing the Immunomodulatory Activity of Ethanol Extract of *Sambucus javanica* Berries and Leaves in Chloramphenicol-Induced Aplastic Anemia Mouse Model. *Tropical Life Sciences Research*, 31(2), 175.
31. Putra, W. E., & Rifa'i, M. (2019). Hematopoiesis Activity of *Sambucus javanica* on chloramphenicol-induced aplastic anemia mouse model. *Natural Product Sciences*, 25(1), 59-63.
32. Putra, W. E., & Rifa'i, M. (2019). Immunomodulatory Activities of *Sambucus javanica* Extracts in DMBA-Exposed BALB/c Mouse. *Advanced pharmaceutical bulletin*, 9(4), 619.
33. Putra, W.E., et al. (2020). T cells regulation modulated by *Sambucus javanica* extracts in DMBA-exposed mice. *Journal of Herbmed Pharmacology*, 9(4), 408-411.
34. Rintani, D. M. (2020). Punya khasiat lebih dibanding jeruk, apa itu buah elderberry? Published on the Internet.

35. Silalahi, Marina and Wakhidah, Anisatu Z. (2021). *Sambucus javanica* Reinw. ex Blume Viburnaceae.
36. Song, X. L., Lin, Y., Zhao, H. X., Dong, R., & Gu, D. F. (2011). Tissue Culture Research of *Sambucus canadensis* L. cv. Aurea [J]. *Hubei Agricultural Sciences*, 2.
37. Summart, J., Panichajakul, S., Prathepha, P., & Thanonkeo, P. (2008). Callus induction and influence of culture condition and culture medium on growth of Thai Aromatic rice, Khao Dawk Mali 105, cell culture. *World Applied Sciences Journal*, 5(2), 246-251.
38. Tabaezadeh, Z., & Khosh-Khui, M. (1981). Anther culture of *Rosa*. *Scientia Horticulturae*, 15(1), 61-66.
39. Thomas KA, Martin KP, Chandel KPS (1996). In vitro multiplication of *Alpinla calcarata* Rose. *Phytomorphol* 46: 133 - 138.
40. Thomas, K. A., Martin, K. P., & Chandel, K. P. S. (1996). In vitro multiplication of *Alpinla calcarata* Rose. *Phytomorphol* 46: 133 – 138
41. Umehara, M., & Kamada, H. (2005). Development of the embryo proper and the suspensor during plant embryogenesis. *Plant Biotechnol.*, 22: 253-260.
42. Wang, G., Zhang, T., & Sun, H. (2012). Tissue culture and mass propagation of *Sambucus williamsii* Hance. *Journal of Shenyang Agricultural University*, 43(3), 284-288.
43. Weng J.-R., Lin C.-S., Lai H.-C., Lin Y.-P., Wang C.-Y., Tsai Y.-C., et al. (2019). Antiviral Activity of *Sambucus Formosana* Nakai Ethanol Extract and Related Phenolic Acid Constituents against Human Coronavirus NL63. *Virus Res.* 273, 197767 10.1016/j.virusres.2019.197767.
44. Wu, Q. G., Zou, L. J., & Luo, M. H. (2013). Callus induction and plant regeneration of *Sambucus chinensis*. *Zhong yao cai= Zhongyaocai= Journal of Chinese medicinal materials*, 36(12), 1899-1903.
45. Yeoman M. M, & Aitchison P.A. (1973). Plant tissue and cell culture. Ed. HE Street. 31-58.