

ẢNH HƯỞNG CỦA LOẠI HÓA CHẤT, NỒNG ĐỘ HÓA CHẤT VÀ THỜI GIAN KHỬ TRÙNG ĐẾN KẾT QUẢ TẠO MẪU SẠCH SA MỘC DẦU (*Cunninghamia konishii* Hayata)

• Hồ Ngọc Sơn^(*), Nguyễn Thị Thoa^(*), Lê Văn Phúc^(*)

Tóm tắt

Sa mộc dầu (Cunninghamia konishii Hayata) là nguồn gen quý hiếm được xếp vào nhóm đang có nguy cơ bị tuyệt chủng. Sử dụng phương pháp nhân giống in vitro để bảo tồn và phát triển loài là cần thiết. Trong nghiên cứu này, đoạn thân non và đỉnh sinh trưởng cây Sa mộc dầu được nghiên cứu khử trùng để tạo vật liệu ban đầu cho nuôi cấy in vitro. Thí nghiệm được thực hiện với NaClO 20%; 30%; 40% trong thời gian 10-40 phút; H₂O₂ 10%, H₂O₂ 20% trong thời gian 10-40 phút; Ca(ClO)₂ 5%; 10%; 15% trong thời gian 10-20 phút, HgCl₂ 0,1%, 0,15%, 0,2% trong thời gian 5-15 phút. Kết quả cho thấy khử trùng với HgCl₂ 0,1% trong thời gian 10 phút cho hiệu quả vô trùng mẫu cao nhất, đạt 73,33%.

Từ khóa: Dung dịch; hóa chất; nồng độ; mẫu sạch; khử trùng.

1. Đặt vấn đề

Sa mộc dầu (*Cunninghamia konishii* Hayata) còn có tên khác là Ngọc am, Sa mộc quý phong, thuộc họ Hoàng đàn (Cupressaceae), bộ Thông (Coniferales) [2]. Sa mộc dầu không chỉ có ý nghĩa về mặt khoa học mà còn có giá trị kinh tế rất cao. Gỗ sa mộc dầu từ xưa rất được ưa chuộng, thường làm quan tài cho vua chúa do khả năng chôn dưới đất hàng trăm năm không bị mục nát, lại có tinh dầu giữ được mùi thơm. Gỗ sa mộc dầu có hoa vân, màu sắc đẹp nên cũng được sử dụng làm đồ mỹ nghệ, thủ công, vật dụng trong gia đình [4].

Tinh dầu sa mộc dầu có mùi thơm, được chiết xuất làm mỹ phẩm, dược phẩm. Sa mộc dầu là nguồn gen quý hiếm được xếp nhóm IIA: Thực vật rừng, động vật rừng hạn chế khai thác, sử dụng vì mục đích thương mại của Nghị định 32/2006/NĐ-CP. Loài Sa mộc dầu còn nằm trong Danh mục loài nguy cấp, quý hiếm được ưu tiên bảo vệ của Nghị định số 160/2013/NĐ-CP ngày 12 tháng 11 năm 2013 của Chính phủ. IUCN Redlist - 2017, Sa mộc dầu được xếp vào nhóm đang có nguy cơ bị tuyệt chủng: Endangered A2cd; B2ab.

Trên thế giới, Sa mộc dầu phân bố ở Đài Loan và Lào. Ở Việt Nam, chúng phân bố hẹp tại một số địa phương như: Hà Giang, Sơn La, Thanh Hóa và Nghệ An [3], [5]. Trong Sách đỏ Việt Nam (2007), chúng được xếp vào thứ hạng sắp bị tuyệt chủng: VU A1a,d,C1. Nhận thức được vấn đề bảo tồn và phát triển loài Sa mộc dầu, việc ứng dụng phương

pháp nuôi cấy mô tế bào trên đối tượng này là cần thiết. Nuôi cấy mô tế bào tạo ra những cây con sạch bệnh, chất lượng tốt, độ đồng đều cao, hệ số nhân lớn và giữ được đặc tính di truyền của cây mẹ [1]. Trong quá trình nuôi cấy mô tế bào thực vật, nguồn vật liệu khởi đầu và chế độ khử trùng tạo mẫu sạch bệnh là rất quan trọng.

2. Phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Cây Sa mộc dầu được thu thập từ tỉnh Hà Giang đưa về trồng tại Khu khảo nghiệm giống Trường Đại học Nông Lâm Thái Nguyên.

2.2. Hóa chất

Hóa chất khử trùng: NaClO, Oxy già (H₂O₂), thủy ngân chlorua (HgCl₂), Calcium hypochlorite (Ca(ClO)₂). Môi trường nuôi cấy: MS (Murashige & Skoog, 1962). Các hóa chất khác: Đường saccarose, Agar, NaOH, HCl.

2.3. Phương pháp nghiên cứu cụ thể

2.3.1. Phương pháp xử lý mẫu

Đỉnh sinh trưởng và thân non được đem rửa sạch bằng xà phòng. Rửa sạch bằng nước máy và tráng nước cất 3 lần. Sau đó khử trùng bằng hóa chất khử trùng. Kết thúc cắt phần chết ở các đầu tiếp xúc với chất khử trùng rồi cấy vào môi trường khởi đầu (1 mẫu/bình) để đánh giá hiệu quả khử trùng.

- **Hóa chất dùng để khử trùng:** NaClO, oxy già, thủy ngân chlorua, Calcium hypochlorite Ca(ClO)₂.

- **Môi trường nuôi cấy:** MS (Murashige and Skoog, 1962), bổ sung 30 gram saccarose/lít, 6 gram agar/lít, pH= 5,8.

^(*) Trường Đại học Nông lâm- Đại học Thái Nguyên.

- Các công thức thí nghiệm được bố trí theo kiểu ngẫu nhiên hoàn toàn với 3 lần lặp lại. Mỗi lần lặp lại 10 mẫu.

2.3.2. Nghiên cứu ảnh hưởng của một số chất khử trùng

a. Nghiên cứu ảnh hưởng của nồng độ và thời gian khử trùng bằng NaClO đến hiệu quả vô trùng vật liệu nuôi cấy

Thực hiện 3 thí nghiệm: Nghiên cứu ảnh hưởng của thời gian khử trùng bằng NaClO 20%; 30%; 40% đến hiệu quả vô trùng vật liệu nuôi cấy. Mỗi thí nghiệm được thực hiện với 05 công thức với các mức thời gian xử lý khác nhau từ 10 đến 40 phút. Tổng số mẫu là 30.

b. Nghiên cứu ảnh hưởng của hàm lượng, thời gian khử trùng bằng H_2O_2 đến hiệu quả vô trùng vật liệu nuôi cấy

Nghiên cứu ảnh hưởng của thời gian khử trùng bằng H_2O_2 10% và H_2O_2 20% đến hiệu quả vô trùng vật liệu nuôi cấy. Thí nghiệm được thực hiện với 05 công thức với các mức thời gian xử lý khác nhau từ 10 đến 40 phút. Tổng số mẫu là 30.

c. Nghiên cứu ảnh hưởng của hàm lượng, thời gian khử trùng bằng Calcium hypochlorite ($Ca(ClO)_2$) đến hiệu quả vô trùng vật liệu nuôi cấy

Nghiên cứu ảnh hưởng của thời gian khử trùng bằng $Ca(ClO)_2$ 5% và $Ca(ClO)_2$ 10% đến hiệu quả vô trùng vật liệu nuôi cấy. Thí nghiệm được thực hiện với 5 công thức với các mức thời gian xử lý khác nhau từ 10 đến 40 phút. Tổng số mẫu là 30. Đồng thời thí nghiệm nghiên cứu ảnh hưởng của thời gian khử trùng bằng $Ca(ClO)_2$ 15% đến hiệu quả vô trùng vật liệu nuôi cấy. Thí nghiệm được thực hiện với 04 công thức (01 công thức đối chứng) với các mức thời gian xử lý khác nhau từ 10 đến 20 phút. Tổng số mẫu là 30.

d. Nghiên cứu ảnh hưởng của hàm lượng, thời gian khử trùng bằng $HgCl_2$ đến hiệu quả vô trùng vật liệu nuôi cấy

Nghiên cứu ảnh hưởng của thời gian khử trùng bằng $HgCl_2$ 0,1%; $HgCl_2$ 0,15% và $HgCl_2$ 0,2% đến hiệu quả vô trùng vật liệu nuôi cấy. Thí nghiệm được thực hiện với 04 công thức với các mức thời gian xử lý khác nhau từ 5 đến 15 phút. Tổng số mẫu là 30.

2.3.3. Phương pháp xử lý số liệu

Sử dụng phương pháp thống kê toán học

trong lâm nghiệp để xử lý số liệu bằng chương trình SPSS 20.0 và phần mềm Excel 7.0. Phân tích phương sai một nhân tố và kiểm tra sai dị lớn nhất theo tiêu chuẩn Duncan bằng phần mềm SPSS 20.0 theo trình lệnh: Analyz/Compare Means/One-way Anova, theo tài liệu của Nguyễn Hải Tuất và cộng sự (2005) [6].

3. Kết quả nghiên cứu

3.1. Ảnh hưởng của nồng độ và thời gian khử trùng bằng NaClO đến hiệu quả vô trùng vật liệu nuôi cấy

3.1.1. Ảnh hưởng của thời gian khử trùng bằng NaClO 20% đến hiệu quả vô trùng vật liệu nuôi cấy

Kết quả ảnh hưởng của thời gian khử trùng bằng dung dịch NaClO 20% với các mức thời gian khác nhau đến hiệu quả khử trùng mẫu cây được trình bày trong Bảng 1:

Bảng 1. Kết quả khi khử trùng mẫu cây bằng NaClO 20%

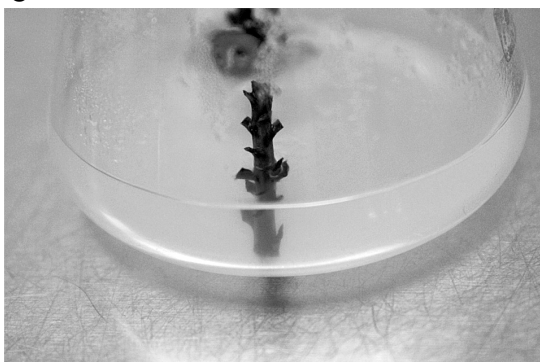
| CT | Thời gian (phút) | Tổng số mẫu | Tỷ lệ mẫu sống không nhiễm (%) | Tỷ lệ mẫu nhiễm (%) | Tỷ lệ mẫu chết (%) |
|----|------------------|-------------|--------------------------------|---------------------|--------------------|
| ĐC | Không xử lý | 30 | 0 | 100 | 0 |
| 1 | 10 | 30 | 26,67 | 70,0 | 3,33 |
| 2 | 20 | 30 | 33,33 | 56,67 | 10,0 |
| 3 | 30 | 30 | 43,33 | 43,33 | 13,33 |
| 4 | 40 | 30 | 46,67 | 36,67 | 16,67 |

Kết quả Bảng 1 cho thấy, khi sử dụng NaClO 20% với thời gian khử trùng khác nhau thì hiệu quả vô trùng mẫu cây là khác nhau. Khi tăng thời gian khử trùng từ 10 - 40 phút thì tỷ lệ mẫu nhiễm giảm từ 70,0% xuống 36,67%, tuy nhiên, tỷ lệ mẫu chết cũng tăng lên. Kết quả trên cho thấy, công thức 4 khi khử trùng NaClO 20% trong thời gian 40 phút đạt hiệu quả khử trùng mẫu cao nhất với 46,67%.

Vậy thời gian khử trùng bằng dung dịch NaClO 20% ảnh hưởng rõ rệt đến tỷ lệ mẫu sống không nhiễm bệnh. Để thể hiện rõ hơn ảnh hưởng của thời gian khử trùng đến tỷ lệ mẫu sống không nhiễm bệnh, tiến hành phân tích phương sai 1 nhân tố 3 lần lặp lại bằng phần mềm SPSS. Kết quả cho thấy xác suất về tỷ lệ mẫu sống không nhiễm bệnh ở các công thức thí nghiệm là $0,013 < 0,05$. Điều đó nói lên rằng tỷ lệ mẫu sống không nhiễm bệnh ở

các công thức thí nghiệm khác nhau là có sự khác nhau rõ rệt.

Sử dụng tiêu chuẩn Duncan để kiểm tra sai dị giữa các trung bình mẫu nhằm tìm ra công thức có tỷ lệ mẫu sống cao nhất. Kết quả cho thấy, công thức CT4 (thời gian khử trùng 40 phút) có trị số cao nhất là 15,56. Do đó, công thức CT4 là trội nhất. Chứng tỏ thời gian khử trùng mẫu cây bằng NaClO 20% trong thời gian 40 phút có ảnh hưởng đến tỷ lệ mẫu sống không nhiễm bệnh trội hơn các công thức khác.



Hình 1. Chồi Sa mộc dầu bị nhiễm nấm khi khử trùng bằng NaClO 20% trong 30 phút

3.1.2. Ảnh hưởng của thời gian khử trùng bằng NaClO 30% đến hiệu quả vô trùng vật liệu nuôi cấy

Kết quả nghiên cứu về ảnh hưởng của thời gian khử trùng bằng NaClO được thể hiện ở Bảng 2:

Bảng 2. Kết quả khi khử trùng mẫu cây bằng NaClO 30%

| CT | Thời gian (phút) | Tổng số mẫu | Tỷ lệ mẫu sống không nhiễm (%) | Tỷ lệ mẫu nhiễm (%) | Tỷ lệ mẫu chết (%) |
|----|------------------|-------------|--------------------------------|---------------------|--------------------|
| ĐC | Không xử lý | 30 | 0 | 100 | 0 |
| 1 | 10 | 30 | 43,33 | 46,67 | 10,00 |
| 2 | 20 | 30 | 53,33 | 33,33 | 13,33 |
| 3 | 30 | 30 | 73,33 | 10,00 | 16,67 |
| 4 | 40 | 30 | 56,67 | 20,00 | 23,33 |

Kết quả Bảng 2 cho thấy khi tăng thời gian khử trùng mẫu với NaClO 30% thì tỷ lệ mẫu sạch thu nhận được khá cao, từ 43,33% - 73,33%. Khi khử trùng mẫu Sa mộc dầu với NaClO 30% trong thời gian 30 phút thu được tỷ lệ mẫu sạch khá cao tới 73,33%, các mẫu phát triển tốt và có khả năng bật chồi.

Vậy thời gian khử trùng bằng dung dịch NaClO 30% ảnh hưởng rõ rệt đến tỷ lệ mẫu sống không nhiễm bệnh. Để thể hiện rõ hơn ảnh hưởng của thời gian khử trùng đến tỷ lệ mẫu sống không nhiễm bệnh, tiến hành phân tích phương sai 1 nhân tố 3 lần lặp bằng phần mềm SPSS, kết quả cho thấy: xác suất về tỷ lệ mẫu sống không nhiễm bệnh ở các công thức thí nghiệm là $0,00 < 0,05$, điều đó nói lên rằng tỷ lệ mẫu sống không nhiễm bệnh ở các công thức thí nghiệm khác nhau là có sự khác nhau rõ rệt.

Sử dụng tiêu chuẩn Duncan để kiểm tra sai dị giữa các trung bình mẫu nhằm tìm ra công thức có tỷ lệ mẫu sống cao nhất. Kết quả cho thấy, công thức CT3 (thời gian khử trùng 30 phút) là công thức trội nhất, có trị số cao nhất là 24,44. Do đó là công thức CT3 là trội nhất. Chứng tỏ thời gian khử trùng mẫu cây bằng NaClO 30% trong thời gian 30 phút có ảnh hưởng trội hơn các công thức khác đến tỷ lệ mẫu sống không nhiễm bệnh.

3.1.3. Ảnh hưởng của thời gian khử trùng bằng NaClO 40% đến hiệu quả vô trùng vật liệu nuôi cấy

Ảnh hưởng của thời gian khử trùng bằng NaClO được thể hiện ở Bảng 3:

Bảng 3. Kết quả khi khử trùng mẫu cây bằng NaClO 40%

| CT | Thời gian (phút) | Tổng số mẫu | Tỷ lệ mẫu sống không nhiễm (%) | Tỷ lệ mẫu nhiễm (%) | Tỷ lệ mẫu chết (%) |
|----|------------------|-------------|--------------------------------|---------------------|--------------------|
| ĐC | Không xử lý | 30 | 0 | 100 | 0 |
| 1 | 10 | 30 | 36,67 | 50,0 | 13,33 |
| 2 | 20 | 30 | 40,0 | 13,33 | 46,67 |
| 3 | 30 | 30 | 33,33 | 3,33 | 63,33 |
| 4 | 40 | 30 | 20,0 | 6,67 | 73,33 |

Kết quả Bảng 3 cho thấy khi khử trùng mẫu với NaClO 40% thì tỷ lệ mẫu bị chết rất cao từ 13,33 đến 73,33%. Tỷ lệ sống của mẫu cây sau khi khử trùng cao nhất đạt 40,0% khi khử trùng mẫu với NaClO 30% trong 20 phút. Tuy nhiên các chồi phát triển chậm.

So sánh giữa các thí nghiệm khi khử trùng bằng NaClO chúng tôi nhận thấy rằng khi tăng nồng độ chất khử trùng và thời gian khử trùng thì tỷ lệ mẫu sạch thu nhận được càng cao, tuy nhiên tỷ lệ mẫu chết cũng tăng lên. Đồng thời chất lượng

chôi cũng kém đi. Từ các công thức thí nghiệm trên, chúng tôi nhận thấy rằng khi khử trùng bằng NaClO 30% trong thời gian 30 phút cho hiệu quả vô trùng mẫu tốt nhất. Tỷ lệ mẫu sống không nhiễm đạt 70,04%.

3.2. Ảnh hưởng của hàm lượng, thời gian khử trùng bằng H₂O₂ đến hiệu quả vô trùng vật liệu nuôi cấy

3.2.1. Ảnh hưởng của thời gian khử trùng bằng H₂O₂ 10% đến hiệu quả vô trùng vật liệu nuôi cấy

Ảnh hưởng của thời gian khử trùng bằng H₂O₂ 10% được thể hiện ở Bảng 4:

Bảng 4. Kết quả khi khử trùng mẫu cấy bằng H₂O₂ 10%

| CT | Thời gian (phút) | Tổng số mẫu | Tỷ lệ mẫu sống không nhiễm (%) | Tỷ lệ mẫu nhiễm (%) | Tỷ lệ mẫu chết (%) |
|----|------------------|-------------|--------------------------------|---------------------|--------------------|
| ĐC | Không xử lý | 30 | 0 | 100 | 0 |
| 1 | 10 | 30 | 0 | 100 | 0 |
| 2 | 20 | 30 | 3,33 | 93,33 | 3,33 |
| 3 | 30 | 30 | 10,0 | 86,67 | 3,33 |
| 4 | 40 | 30 | 6,67 | 90,0 | 3,33 |

Kết quả Bảng 4 cho thấy, khi khử trùng mẫu với H₂O₂ 10% thì tỷ lệ thu được mẫu sạch rất thấp dao động từ 3,33% - 10,0%. Tỷ lệ thu nhận mẫu sống không nhiễm cao nhất khi khử trùng bằng H₂O₂ 10% trong thời gian 30 phút.

Vậy thời gian khử trùng bằng với H₂O₂ 10% ảnh hưởng rõ rệt đến tỷ lệ mẫu sống không nhiễm bệnh. Để thể hiện rõ hơn ảnh hưởng của thời gian khử trùng đến tỷ lệ mẫu sống không nhiễm bệnh, tiến hành phân tích phương sai 1 nhân tố 3 lần lặp lại bằng phần mềm SPSS. Kết quả cho thấy, xác suất về tỷ lệ mẫu sống không nhiễm bệnh ở các công thức thí nghiệm là 0,029 > 0,05. Điều đó nói lên rằng tỷ lệ mẫu sống không nhiễm bệnh ở các công thức thí nghiệm khác nhau là không có sự khác nhau rõ rệt.

Sử dụng tiêu chuẩn Duncan để kiểm tra sai dị giữa các trung bình mẫu nhằm tìm ra công thức có tỷ lệ mẫu sống cao nhất. Kết quả cho thấy, công thức CT3 (thời gian khử trùng 30 phút) là công thức trội nhất, có trị số cao nhất là 3,33. Do đó là công

thức CT3 là trội nhất. Chứng tỏ thời gian khử trùng mẫu bằng với H₂O₂ 10% trong thời gian 30 phút có ảnh hưởng trội hơn các công thức khác đến tỷ lệ mẫu sống không nhiễm bệnh.

3.2.2. Ảnh hưởng của thời gian khử trùng bằng H₂O₂ 20% đến hiệu quả vô trùng vật liệu nuôi cấy

Kết quả ảnh hưởng của thời gian khử trùng bằng dung dịch NaClO 20% với các mức thời gian khác nhau đến hiệu quả khử trùng mẫu cấy được trình bày trong Bảng 5:

Bảng 5. Kết quả khi khử trùng mẫu cấy bằng H₂O₂ 20%

| CT | Thời gian (phút) | Tổng số mẫu | Tỷ lệ mẫu sống không nhiễm (%) | Tỷ lệ mẫu nhiễm (%) | Tỷ lệ mẫu chết (%) |
|----|------------------|-------------|--------------------------------|---------------------|--------------------|
| ĐC | Không xử lý | 30 | 0 | 100 | 0 |
| 1 | 10 | 30 | 3,33 | 93,33 | 3,33 |
| 2 | 20 | 30 | 6,67 | 90,0 | 3,33 |
| 3 | 30 | 30 | 13,33 | 80,0 | 6,67 |
| 4 | 40 | 30 | 10,0 | 80,0 | 10,0 |

Kết quả Bảng 5 cho thấy, khi khử trùng bằng H₂O₂ 20% thu được tỷ lệ sống rất thấp, chỉ từ 3,33% - 13,33%. Đa phần ở các công thức, mẫu bị chết sau đó do bị nhiễm. Kết quả thí nghiệm cho thấy H₂O₂ 20% khử trùng mẫu Sa mộc dầu tốt nhất trong thời gian 30 phút, chiếm tỷ lệ 13,33%.

Vậy thời gian khử trùng bằng với H₂O₂ 20% ảnh hưởng rõ rệt đến tỷ lệ mẫu sống không nhiễm bệnh. Để thể hiện rõ hơn ảnh hưởng của thời gian khử trùng đến tỷ lệ mẫu sống không nhiễm bệnh, tiến hành phân tích phương sai 1 nhân tố 3 lần lặp lại bằng phần mềm SPSS. Kết quả cho thấy xác suất về tỷ lệ mẫu sống không nhiễm bệnh ở các công thức thí nghiệm là 0,031 > 0,05. Điều đó nói lên rằng tỷ lệ mẫu sống không nhiễm bệnh ở các công thức thí nghiệm khác nhau là không có sự khác nhau rõ rệt.

Sử dụng tiêu chuẩn Duncan để kiểm tra sai dị giữa các trung bình mẫu nhằm tìm ra công thức có tỷ lệ mẫu sống cao nhất. Kết quả cho thấy, công thức CT3 (thời gian khử trùng 30 phút) có trị số cao nhất là 4,44. Do đó, công thức CT3 là trội nhất. Chứng tỏ thời gian khử trùng mẫu bằng với H₂O₂

20% trong thời gian 30 phút có ảnh hưởng trội hơn các công thức khác đến tỷ lệ mẫu sống không nhiễm bệnh.

So sánh giữa các thí nghiệm khi khử trùng bằng H_2O_2 chúng tôi nhận thấy rằng khi tăng nồng độ khử trùng thì tỷ lệ mẫu sạch thu được càng cao, với công thức thí nghiệm khi khử trùng bằng H_2O_2 nồng độ thấp trong thời gian ngắn thì mẫu bị nhiễm gần như 100%. Công thức thí nghiệm tốt nhất khi khử trùng mẫu Sa mộc dầu bằng H_2O_2 là sử dụng H_2O_2 nồng độ 20% và trong thời gian 30 phút. Tuy nhiên mẫu phát triển kém, tỷ lệ bật chồi thấp.

3.3. Ảnh hưởng của hàm lượng, thời gian khử trùng bằng Calcium hypochlorite ($Ca(ClO)_2$) đến hiệu quả vô trùng vật liệu nuôi cấy

3.3.1. Ảnh hưởng của thời gian khử trùng bằng $Ca(ClO)_2$ 5% đến hiệu quả vô trùng vật liệu nuôi cấy

Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của thời gian khử trùng bằng dung dịch $Ca(ClO)_2$ 5% đến hiệu quả khử trùng mẫu cây được trình bày trong Bảng 6:

Bảng 6. Kết quả khử trùng mẫu bằng $Ca(ClO)_2$ 5%

| CT | Thời gian (phút) | Tổng số mẫu | Tỷ lệ mẫu sống không nhiễm (%) | Tỷ lệ mẫu nhiễm (%) | Tỷ lệ mẫu chết (%) |
|----|------------------|-------------|--------------------------------|---------------------|--------------------|
| ĐC | Không xử lý | 30 | 0 | 100 | 0 |
| 1 | 10 | 30 | 0 | 100 | 0 |
| 2 | 15 | 30 | 3,33 | 96,67 | 0 |
| 3 | 20 | 30 | 10,0 | 83,33 | 6,67 |

Kết quả Bảng 6 cho thấy khi khử trùng mẫu bằng $Ca(ClO)_2$ 5% cho tỷ lệ mẫu bị nhiễm khá cao, từ 83,33% - 100%. Tỷ lệ mẫu sống không nhiễm cao nhất là ở công thức thí nghiệm 3 khi khử trùng bằng $Ca(ClO)_2$ 5% trong thời gian 20 phút chỉ đạt 10,0%. Vậy khi khử trùng mẫu trong $Ca(ClO)_2$ 5% trong thí nghiệm này là không hiệu quả.

3.3.2. Ảnh hưởng của thời gian khử trùng bằng $Ca(ClO)_2$ 10% đến hiệu quả vô trùng vật liệu nuôi cấy

Ảnh hưởng của thời gian khử trùng bằng $Ca(ClO)_2$ 10% được thể hiện ở Bảng 7:

Bảng 7. Kết quả khử trùng mẫu bằng $Ca(ClO)_2$ 10%

| CT | Thời gian (phút) | Tổng số mẫu | Tỷ lệ mẫu sống không nhiễm (%) | Tỷ lệ mẫu nhiễm (%) | Tỷ lệ mẫu chết (%) |
|----|------------------|-------------|--------------------------------|---------------------|--------------------|
| ĐC | Không xử lý | 30 | 0 | 100 | 0 |
| 1 | 10 | 30 | 20,0 | 73,33 | 6,67 |
| 2 | 15 | 30 | 30,0 | 56,67 | 13,33 |
| 3 | 20 | 30 | 53,33 | 30,0 | 16,67 |

Kết quả Bảng 7 cho thấy, khi khử trùng bằng $Ca(ClO)_2$ 10% cho tỷ lệ mẫu sạch khá cao, công thức thí nghiệm 3 khi khử trùng bằng $Ca(ClO)_2$ 10% trong thời gian 20 phút cho hiệu quả vô trùng mẫu cao nhất, tỷ lệ mẫu sống không nhiễm đạt 53,33%.

Vậy thời gian khử trùng bằng với $Ca(ClO)_2$ 10% ảnh hưởng rõ rệt đến tỷ lệ mẫu sống không nhiễm bệnh. Để thể hiện rõ hơn ảnh hưởng của thời gian khử trùng đến tỷ lệ mẫu sống không nhiễm bệnh, tiến hành phân tích phương sai 1 nhân tố 3 lần lặp lại bằng phần mềm SPSS, kết quả cho thấy, xác suất về tỷ lệ mẫu sống không nhiễm bệnh ở các công thức thí nghiệm là $0,002 < 0,05$, điều đó nói lên rằng tỷ lệ mẫu sống không nhiễm bệnh ở các công thức thí nghiệm khác nhau là có sự khác nhau rõ rệt.

Sử dụng tiêu chuẩn Duncan để kiểm tra sai dị giữa các trung bình mẫu nhằm tìm ra công thức có tỷ lệ mẫu sống cao nhất. Kết quả cho thấy, công thức CT3 (thời gian khử trùng 20 phút) có trị số cao nhất là 17,78. Do đó, công thức CT3 là trội nhất. Chứng tỏ thời gian khử trùng mẫu bằng $Ca(ClO)_2$ 10% trong thời gian 20 phút có ảnh hưởng trội hơn các công thức khác đến tỷ lệ mẫu sống không nhiễm bệnh.

3.3.3. Ảnh hưởng của thời gian khử trùng bằng $Ca(ClO)_2$ 15% đến hiệu quả vô trùng vật liệu nuôi cấy

Ảnh hưởng của thời gian khử trùng bằng $Ca(ClO)_2$ 15% thể hiện ở Bảng 8:

Bảng 8. Kết quả khử trùng mẫu bằng Ca(ClO)₂ 15%

| CT | Thời gian (phút) | Tổng số mẫu | Tỷ lệ mẫu sống không nhiễm (%) | Tỷ lệ mẫu nhiễm (%) | Tỷ lệ mẫu chết (%) |
|----|------------------|-------------|--------------------------------|---------------------|--------------------|
| ĐC | Không xử lý | 30 | 0 | 100 | 0 |
| 1 | 10 | 30 | 30,0 | 13,33 | 56,67 |
| 2 | 15 | 30 | 23,33 | 6,67 | 70,0 |
| 3 | 20 | 30 | 13,33 | 10,0 | 76,67 |

Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của Ca(ClO)₂ 15% tới tỷ lệ sống của mẫu cây được thể hiện ở Bảng 8. Kết quả cho thấy khi tăng thời gian khử trùng mẫu bằng Ca(ClO)₂ 15% thì tỷ lệ mẫu sạch thu được lại giảm do mẫu bị chết. Tỷ lệ mẫu chết dao động từ 56,67% - 76,67%.

Để thể hiện rõ hơn ảnh hưởng của thời gian khử trùng đến tỷ lệ mẫu sống không nhiễm bệnh, tiến hành phân tích phương sai 1 nhân tố 3 lần lặp lại bằng phần mềm SPSS, kết quả cho thấy: xác suất về tỷ lệ mẫu sống không nhiễm bệnh ở các công thức thí nghiệm là $0,023 > 0,05$, điều đó nói lên rằng tỷ lệ mẫu sống không nhiễm bệnh ở các công thức thí nghiệm khác nhau là không có sự khác nhau rõ rệt.

Sử dụng tiêu chuẩn Duncan để kiểm tra sai dị giữa các trung bình mẫu nhằm tìm ra công thức có tỷ lệ mẫu sống cao nhất. Kết quả cho thấy, công thức CT1 (thời gian khử trùng 10 phút) là công thức trội nhất, có trị số cao nhất là 10,0. Do đó, công thức CT1 là trội nhất. Chứng tỏ thời gian khử trùng mẫu bằng Ca(ClO)₂ 15% trong thời gian 10 phút có ảnh hưởng trội hơn các công thức khác đến tỷ lệ mẫu sống không nhiễm bệnh.

Kết quả của các thí nghiệm trên cho thấy khi khử trùng mẫu bằng Ca(ClO)₂ thì sử dụng Ca(ClO)₂ 10% trong vòng 20 phút đạt hiệu quả khử trùng mẫu tốt nhất. Tỷ lệ mẫu vô trùng cao đạt 53,33%, tuy nhiên chồi gầy, vàng.

3.4. Ảnh hưởng của hàm lượng, thời gian khử trùng bằng HgCl₂ đến hiệu quả vô trùng vật liệu nuôi cấy

Thủy ngân là một loại hóa chất độc nên được dùng rất hạn chế và cẩn thận. Tuy nhiên, do việc

khử trùng mẫu Sa mọc đầu rất khó khăn, tỷ lệ mẫu sống thấp nên sử dụng HgCl₂ là cần thiết. Nồng độ HgCl₂ sử dụng trong thí nghiệm khử trùng mẫu Sa mọc đầu từ 0,1% - 0,2%.

3.4.1. Ảnh hưởng của thời gian khử trùng bằng HgCl₂ 0,1% đến hiệu quả vô trùng vật liệu nuôi cấy

Kết quả ảnh hưởng của thời gian khử trùng bằng dung dịch HgCl₂ 0,1% với các mức thời gian khác nhau đến hiệu quả khử trùng mẫu cây được trình bày trong Bảng 9:

Bảng 9. Kết quả khử trùng mẫu bằng HgCl₂ 0,1%

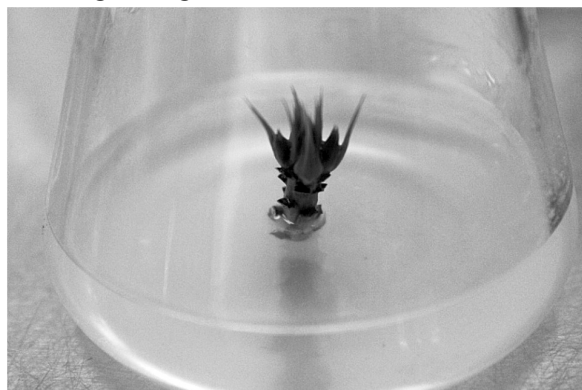
| CT | Thời gian (phút) | Tổng số mẫu | Tỷ lệ mẫu sống không nhiễm (%) | Tỷ lệ mẫu nhiễm (%) | Tỷ lệ mẫu chết (%) |
|----|------------------|-------------|--------------------------------|---------------------|--------------------|
| ĐC | Không xử lý | 30 | 0 | 100 | 0 |
| 1 | 5 | 30 | 46,67 | 43,33 | 10,0 |
| 2 | 10 | 30 | 73,33 | 13,33 | 13,33 |
| 3 | 15 | 30 | 60,0 | 10,0 | 30,0 |

Kết quả Bảng 9 cho thấy, thủy ngân có tác dụng diệt nấm, khuẩn khá tốt, tỷ lệ mẫu sạch cao biến động từ 46,67% - 73,33%. Khi mẫu Sa mọc đầu tiếp xúc với HgCl₂ 0,1% với thời gian thích hợp sẽ cho tỷ lệ mẫu sạch cao, thời gian tiếp xúc của mẫu với chất khử trùng càng lâu thì tỷ lệ mẫu chết càng cao. Công thức 2 khi khử trùng mẫu bằng HgCl₂ 0,1% trong thời gian 10 phút cho tỷ lệ mẫu sống không nhiễm cao nhất, đạt 73,33%, tỷ lệ mẫu chết không quá cao, chỉ 13,33%.

Để thể hiện rõ hơn ảnh hưởng của thời gian khử trùng đến tỷ lệ mẫu sống không nhiễm bệnh, tiến hành phân tích phương sai 1 nhân tố 3 lần lặp lại bằng phần mềm SPSS. Kết quả cho thấy, xác suất về tỷ lệ mẫu sống không nhiễm bệnh ở các công thức thí nghiệm là $0,003 < 0,05$. Điều đó nói lên rằng tỷ lệ mẫu sống không nhiễm bệnh ở các công thức thí nghiệm khác nhau là có sự khác nhau rõ rệt.

Sử dụng tiêu chuẩn Duncan để kiểm tra sai dị giữa các trung bình mẫu nhằm tìm ra công thức có tỷ lệ mẫu sống cao nhất. Kết quả cho thấy, công thức CT2 (thời gian khử trùng 10 phút) là công thức trội nhất, có trị số cao nhất là 24,44. Do đó công thức CT2 là trội nhất. Chứng tỏ thời gian khử trùng mẫu bằng HgCl₂ 0,1% trong thời gian 10 phút có

ảnh hưởng trội hơn các công thức khác đến tỷ lệ mẫu sống không nhiễm bệnh.



Hình 2. Chồi Sa mộc dầu không nhiễm sau khi khử trùng với $HgCl_2$ 0,1% trong 10 phút

3.4.2. Ảnh hưởng của thời gian khử trùng bằng $HgCl_2$ 0,15% đến hiệu quả vô trùng vật liệu nuôi cấy

Ảnh hưởng của thời gian khử trùng bằng $HgCl_2$ 0,15% được thể hiện ở Bảng 10:

Bảng 10. Kết quả khử trùng mẫu bằng $HgCl_2$ 0,15%

| CT | Thời gian (phút) | Tổng số mẫu | Tỷ lệ mẫu sống không nhiễm (%) | Tỷ lệ mẫu nhiễm (%) | Tỷ lệ mẫu chết (%) |
|----|------------------|-------------|--------------------------------|---------------------|--------------------|
| ĐC | Không xử lý | 30 | 0 | 100 | 0 |
| 1 | 5 | 30 | 46,67 | 36,67 | 16,67 |
| 2 | 10 | 30 | 30,0 | 16,67 | 53,33 |
| 3 | 15 | 30 | 20,0 | 10,0 | 70,0 |

Kết quả Bảng 10 cho thấy, khi khử trùng mẫu bằng $HgCl_2$ 0,15% thì thời gian khử trùng càng dài, tỷ lệ mẫu chết càng cao, công thức thí nghiệm 3 khi khử trùng mẫu với $HgCl_2$ 0,15% trong 15 phút thì tỷ lệ mẫu nhiễm thấp 10,0%, tuy nhiên tỷ lệ mẫu chết cao, lên đến 70,0%. Kết quả nghiên cứu cho thấy khi khử trùng mẫu bằng $HgCl_2$ 0,15% thì công thức số 1 khử trùng mẫu trong thời gian 5 phút là tốt nhất, với tỷ lệ mẫu sống không nhiễm bệnh đạt 46,67% và tỷ lệ mẫu chết là thấp nhất với 16,67%.

Để thể hiện rõ hơn ảnh hưởng của thời gian khử trùng đến tỷ lệ mẫu sống không nhiễm bệnh, tiến hành phân tích phương sai 1 nhân tố 3 lần lặp bằng phần mềm SPSS, kết quả cho thấy: xác suất về tỷ lệ mẫu sống không nhiễm bệnh ở các công

thức thí nghiệm là $0,000 < 0,05$, điều đó nói lên rằng tỷ lệ mẫu sống không nhiễm bệnh ở các công thức thí nghiệm khác nhau là có sự khác nhau rõ rệt.

Sử dụng tiêu chuẩn Duncan để kiểm tra sai dị giữa các trung bình mẫu nhằm tìm ra công thức có tỷ lệ mẫu sống cao nhất. Kết quả cho thấy, công thức CT1 (thời gian khử trùng 5 phút) là công thức trội nhất, có trị số cao nhất là 15,56. Do đó công thức CT1 là trội nhất. Chúng tỏ thời gian khử trùng mẫu bằng $HgCl_2$ 0,15% trong thời gian 5 phút có ảnh hưởng trội hơn các công thức khác đến tỷ lệ mẫu sống không nhiễm bệnh.

3.4.3. Ảnh hưởng của thời gian khử trùng bằng $HgCl_2$ 0,2% đến hiệu quả vô trùng vật liệu nuôi cấy

Ảnh hưởng của thời gian khử trùng bằng $HgCl_2$ 0,2% được thể hiện ở Bảng 11:

Bảng 11. Kết quả khử trùng mẫu bằng $HgCl_2$ 0,2%

| CT | Thời gian (phút) | Tổng số mẫu | Tỷ lệ mẫu sống không nhiễm (%) | Tỷ lệ mẫu nhiễm (%) | Tỷ lệ mẫu chết (%) |
|----|------------------|-------------|--------------------------------|---------------------|--------------------|
| ĐC | Không xử lý | 30 | 0 | 100 | 0 |
| 1 | 5 | 30 | 10,0 | 6,67 | 83,33 |
| 2 | 10 | 30 | 6,67 | 6,67 | 86,67 |
| 3 | 15 | 30 | 3,33 | 3,33 | 93,33 |

Kết quả thí nghiệm ở Bảng 11 cho thấy khi khử trùng bằng $HgCl_2$ 0,2% tỷ lệ mẫu sống không nhiễm thu được thấp, biến động từ 3,33% - 10,0%. Thời gian khử trùng càng cao thì tỷ lệ mẫu chết càng cao. Công thức thí nghiệm 3 khi khử trùng bằng $HgCl_2$ 0,2% trong 15 phút thì gần như mẫu chết 100%. Tỷ lệ mẫu sạch thu được thấp, công thức thí nghiệm 1 cho tỷ lệ mẫu sạch cao nhất trong thí nghiệm này nhưng chỉ đạt 10,0%.

Để thể hiện rõ hơn ảnh hưởng của thời gian khử trùng đến tỷ lệ mẫu sống không nhiễm bệnh, tiến hành phân tích phương sai 1 nhân tố 3 lần lặp bằng phần mềm SPSS, kết quả cho thấy: xác suất về tỷ lệ mẫu sống không nhiễm bệnh ở các công thức thí nghiệm là $0,077 > 0,05$, điều đó nói lên rằng tỷ lệ mẫu sống không nhiễm bệnh ở các công thức thí nghiệm khác nhau là không có sự khác nhau rõ rệt.

Sử dụng tiêu chuẩn Duncan để kiểm tra sai dị giữa các trung bình mẫu nhằm tìm ra công thức có tỷ lệ mẫu sống cao nhất. Kết quả cho thấy, công

thức CT1 (thời gian khử trùng 5 phút) là công thức trội nhất, có trị số cao nhất là 3,33. Do đó công thức CT1 là trội nhất. Chứng tỏ thời gian khử trùng mẫu bằng HgCl_2 0,2% trong thời gian 5 phút có ảnh hưởng trội hơn các công thức khác đến tỷ lệ mẫu sống không nhiễm bệnh.

So sánh giữa các thí nghiệm khi khử trùng bằng HgCl_2 chúng tôi nhận thấy rằng khi tăng nồng độ khử trùng thì tỷ lệ mẫu sạch thu được càng cao. Gốc Hg^{2+} có hoạt tính, tính khử trùng mạnh. Hg^{2+} gây thoái hóa tổ chức, tạo thành các hợp chất protein rất dễ tan làm tê liệt chức năng của các nhóm thiol (-SH), các hệ thống men cơ bản và oxi hóa khử của tế bào; Hg^{2+} có thể liên kết với các protein của máu và mô, làm tê liệt và phá hủy tế bào nấm, khuẩn nhanh chóng. Khi tăng thời gian khử trùng và nồng độ của HgCl_2 lên 15 phút tỷ lệ mẫu chết tăng (70,0%-93,33%) do mẫu ngâm trong dung dịch khử trùng kéo dài - hóa chất ngấm sâu vào bên trong mẫu gây độc mô nuôi cấy, làm mất khả năng tái sinh chồi.

Như vậy, công thức thí nghiệm tốt nhất khi khử trùng mẫu Sa mộc dầu bằng HgCl_2 là sử dụng ở nồng độ 0,1% và trong thời gian 10 phút, chồi mầm mập, màu xanh bình thường.

4. Kết luận

Khử trùng mẫu Sa mộc dầu bằng NaClO ở nồng độ 30% với thời gian 30 phút cho tỷ lệ mẫu sống không nhiễm cao nhất đạt 73,33%.

Khử trùng mẫu Sa mộc dầu bằng H_2O_2 ở nồng độ 20% với thời gian 30 phút cho tỷ lệ mẫu sống không nhiễm cao nhất đạt 13,33%.

Khử trùng mẫu Sa mộc dầu bằng $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ ở nồng độ 10% với thời gian 20 phút cho tỷ lệ mẫu sống không nhiễm cao nhất đạt 53,33%.

Khử trùng mẫu Sa mộc dầu bằng HgCl_2 ở nồng độ 0,1% với thời gian 10 phút cho tỷ lệ mẫu sống không nhiễm cao nhất đạt 73,33%.

Như vậy trong các hợp chất khử trùng đã nghiên cứu HgCl_2 0,1% trong 10 phút là thích hợp cho tạo vật liệu khởi đầu mẫu Sa mộc dầu./.

Tài liệu tham khảo

- [1]. Lê Trần Bình (1997), *Công nghệ sinh học thực vật trong cải tiến của cây trồng*, NXB Nông nghiệp, Hà Nội.
- [2]. Bộ Khoa học và Công nghệ, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam (2007), *Sách đỏ Việt Nam, Phần II -Thực vật*, NXB Khoa học tự nhiên và Công nghệ, Hà Nội.
- [3]. Nguyen Tien Hiep, Nguyen Duc To Luu, Philip Ian Thomas, Aljos Farjon, Leonid Averyanov and Jacinto Regalado Jr. (2004), Vietnam Conifers onservation status review, Fauna & Flora International, Vietnam Programme, 128p
- [4]. Nguyễn Công Hoan (2015), *Nghiên cứu đặc điểm sinh vật học và kỹ thuật gieo ươm Sa mộc dầu (Cunninghamia konishii Hayata) từ hạt tại Khu bảo tồn Tây Côn Lĩnh, tỉnh Hà Giang*, Luận văn Thạc sĩ Khoa học Lâm nghiệp, Trường Đại học Nông Lâm Thái Nguyên.
- [5]. Nguyễn Văn Sinh (2009), “Một số dẫn liệu về đặc điểm sinh thái, phân bố và bảo tồn loài Sa mộc dầu tại Vườn Quốc gia Pù Mát”, *Tuyển tập báo cáo Hội nghị sinh thái và Tài nguyên sinh vật lần thứ 3, 22/10/2009*, Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật, Hà Nội.
- [6]. Nguyễn Hải Tuất, Nguyễn Trọng Bình (2005), *Khai thác và sử dụng SPSS để xử lý số liệu nghiên cứu trong Lâm nghiệp*, NXB Nông nghiệp, Hà Nội.

EFFECTS OF CHEMICAL TYPES, CONCENTRATION AND STERILIZATION TIME ON CLEAN SAMPLES OF *Cunninghamia konishii* Hayata

Summary

Cunninghamia konishii Hayata is a valuable genetic source classified as endangered to be extinct. Thus, it is necessary to use in-vitro propagation for its conservation and development. In this study, its young stems and buds were sterilized as clean samples for in-vitro propagation. The experiments were done repeatedly with NaClO 20%, 30%, 40% for 10-40 minutes; with H_2O_2 10%, H_2O_2 20% for 10-40 minutes; with $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ 5%, 10%, 15% for 10-20 minutes; and with HgCl_2 0,1%, 0,15%, 0,2% for 5-15 minutes. The results show that sterilization with HgCl_2 0.1% for 10 minutes produced the cleanest samples of 73.33%.

Keywords: Solutions; chemicals; concentration; clean sample; sterilization.

Ngày nhận bài: 29/6/2018; Ngày nhận lại: 01/02/2019; Ngày duyệt đăng: 13/02/2019.